

면역측정법을 이용한 식물 호르몬의 분석

I. 옥신(IAA)에 대한 단클론 항체 생산

黃台益 · 林賢玉 · 李載雍*

Analysis of Plant Hormones by Immunoassay

I. Production of Monoclonal Antibodies to Indole-3-acetic acid

Tay Eak Whang, Hyun Ock Lim and Jee Wa Lee*

ABSTRACT : Monoclonal antibodies (mAb) to indole-3-acetic acid(IAA) were produced and characterized. Spleen cells from mouse immunized with IAA coupled to bovine serum albumin were fused with SP2/0-Ag14 myeloma cells. Three clones secreted specific antibodies to IAA were established to hybridoma cell lines and designated WLI-G1, WLI-G3 and WLI-E11. The antibodies produced were classified into IgG₁ types and revealed the high degree of specificity by cross-reaction in the IAA derivatives and its analogues. In the IAA-ELISA with mAb, the measuring range of the assay was 1-500 p mol, and K_a and binding capacity calculated from Scatchard plot were 6.7×10^{-10} L/M and 6×10^{-10} L/M respectively. The ELISA with mAb can be used to quantitate IAA directly in crude plant extract. The results showed that the immunoassay was easy and sensitive method to perform and applicate for quantitative analysis of IAA in plant.

Indole-3-acetic acid (IAA)는 옥신류중에서 가장 중요한 생장촉진 물질로서 식물의 발아에서 결실까지 모든 성장 단계에서 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 특히 옥신은 세포의 신장³⁾에 관여하며 세포의 분화와 조직의 분열¹⁸⁾ 기능을 수행하는 주요 식물호르몬으로 알려지고 있다. 옥신은 기능이 다양함에도 불구하고 생체중의 함량은 ng/g이하의 극미량으로 존재하고 있다.^{8,21)} 따라서 생체조직에서 생합성되는 IAA의 정량분석은 대단히 복잡하며 어렵게 인식되고 있다. 지금까지 가장 정밀한 분석방법으로는 GC-MS¹⁾, GC-SICM^{2,17)}에 의해서 분석하든지 또는 IAA의 형광특성을 이용하여 indole-pyrone으로 변화시켜 10pg까지 검출하였다.¹⁹⁾

또한 생물검정에 의해서 1 pg까지 정량분석 한 보고¹²⁾가 있으나 비특이적이고 정확성이 비교적 낮았다고 한다. 이와같이 기기분석이나 생물검정

방법은 분석전 복잡한 정제과정이 필요하고 고도의 숙련된 기술이 요한다는 것은 주지의 사실이다.

옥신을 신속 간편하게 그리고 기기분석 정도로 정확하게 분석할 수 있는 방법으로 옥신에 대한 면역측정법을 생각할 수 있다.^{4,5,22)} IAA의 면역측정법은 Fuchs등⁷⁾에 의해서 가능성이 시사된 이후에 IAA의 방사면역측정법(radioimmunoassay, RIA)이 개발 보고되었으며,^{15,16,23)} 효소면역측정법(enzyme immunoassay EIA)도 보고되어 있다.^{24,25)} 이상의 연구자들이 IAA 면역측정법에 사용한 항체는 가토를 이용한 다세포군항체(polyclonal antibody, pAb)로서 이 항체는 다양한 항원결정기에 대해서 인식되기 때문에 역가와 특이성이 비교적 낮다는 특성을 가지고 있다.¹⁰⁾ 옥신과 같은 hapten을 정밀하게 연구하기 위해서는 특이성과 역가가 높은 항체가 필요하

* 전남대학교 농과대학 (College of Agriculture, Chonnam Univ)
본 연구는 과학재단 연구비 지원에 의해서 수행되었음

다. 이러한 필요성을 충족시키기 위해서는 pAb 보다는 특이성과 역가가 월등하게 높은 단클론항체(monoclonal antibody, mAb)가 필요하다. 그러나 식물홀몬에 대한 단클론항체 생산과 이용은 국내외적으로 초보적인 단계로서 편리성이 인정되고 있는 시점에서 이에 대한 연구는 필요하다고 생각된다. 다만 IAA에 대한 mAb는 Mertens¹¹⁾과 Pence¹⁷⁾ 등에 의해서 보고된 바 있을 정도이다.

따라서 본 연구에서는 IAA에 대한 mAb를 생산하고 면역측정법을 개발하였고 항체의 특성을 구명하는 결과를 얻었던 바 이를 보고하는 바이다.

材料 및 方法

1. 材料

IAA 등 옥신류와 bovine serum albumin (BSA), 그리고 anti mouse IgG는 Sigma사 제품을 사용하였으며 세포배양용 배지 RPMI 1640, fetal calf serum(FCS), hypoxanthine (H), aminopterin(A), thymidine(T)은 Gibco사에서 도입 사용하였으며 96 well plate 등 plastic제품은 Nunclon사 제품을 그리고 면역글로블린의 정제는 Pierce사의 immunopure 시스템, ¹⁴C-IAA는 Amersham에서 구입하였고 면역세포획득을 위한 생쥐는 Balb/c, myeloma cell line은 SP2/0-Ag14를 사용하였다.

2. 方法

1) 항원조제

IAA는 hapten이기 때문에 거대 분자화가 필요하다. IAA는 Weiler의 방법²³⁾을 약간 변경하여 다음과 같이 BSA에 결합시켰다. 52mg IAA를 dimethyl formamide(DMF) 2ml에 녹여 75 μ l tri-n-butylamine를 가하여 -15 $^{\circ}$ C까지 냉각시킨 뒤 40 μ l iso-butylchlorocarbonate를 가한 뒤 8분 동안 더 방치하였다. 이 용액을 BSA(421mg/1:1, DMF:H₂O)에 교반하면서 서서히 가하고 나서 1M NaOH 0.2ml를 가하고 다시 5시간 반응시켰다. IAA-BSA conjugate는 Sephadex G-25 column chromatography하여 유리 IAA를 제거하였고 IAA-BSA 결합물은 결합전에 가한 ¹⁴C-IAA에 의해서 계산하였다.

2) 면역

IAA-BSA conjugate 200 μ g/100 μ l(0.9% saline + Freund's complete adjuvant, FCA)를 8주된 Balb/c 10마리에 접종하고 2-3주 간격으로 3개월간 50 μ g씩 추가 접종하였다. 접종 8주부터 RIA에 의해서 항체 역가검사를 실시하였다.

세포융합

단클론 항체생산을 위한 세포융합은 Koehler & Milsten⁹⁾의 방법을 기본적으로 적용하였다. 잘 면역된 Balb/c로 부터 비장세포(1.5 \times 10⁸)와 myeloma 세포(1.5 \times 10⁷)를 50% polyethylene glycol(Gibco, MW 4000, 37 $^{\circ}$ C) 1ml로 융합시켰다. 융합후 hybridoma는 10% FCS-RPMI 1640으로 2회 원심세척하여 PEG를 완전히 제거하였다.

3) 세포배양

상기와 같이 융합된 hybridoma cell은 20% FCS-RPMI 1640-HAT 배지를 가하여 적당한 밀도로 조정하여 96 well plate에 1 \times 10⁵/well/myeloma로 가하였다. 2주정도는 HAT 첨가배지로 그리고 그 이후는 HT 10% FCS RPMI 1640으로 바꾸어주고 정기적으로 배지를 갈아주었다. 2주 후부터는 hybridoma를 관찰하여 well plate바닥을 1/3이상 덮게 자라면 24well plate로 증식시키고 2회의 제한희석법에 의해서 역가높은 세포주를 선발한 뒤에 6 well 또는 25cm² flask에 옮겨 배양 하였다. 배지에는 세포배양을 양호하게 하기 위해서 MEM-비필수 아미노산과 Na-피브린산을 그리고 세균 오염 방지를 위해서 gentamycin, penicillin, streptomycin을 사용하였다.

4) Hybridoma의 항체생산 조사

세포배양중 항체 생산여부는 두가지로 검사하였다. 먼저 가토의 IgG(anti mouse IgG antibody)를 생산하여 이를 capture antibody(cAp)로 하고 anti mouse IgG-alkaline phosphatase를 이용하여 면역 글로블린 생산여부를 검사하였다. 이때 양성반응으로 나타난 세포주는 다시 ¹⁴C-IAA를 이용한 RIA¹⁰⁾로 탐색하여 IAA에 대한 항체생산 고역가 세포주를 선발하였다.

5) 腹水(Ascitic fluid) 생산

다량의 항체를 얻기위해서 고역가의 항체를 생산하는 hybridoma를 다량 증식시켜 0.5ml pristane이 1주일전 접종된 Balb/c mouse의 복

강에 1×10^7 정도씩 주사하였다. 대개 주사 1주일 전후하여 복수를 채취하고 고역가 특히 항체를 protein A-Sepharose 4B column chromatography하여 분리하였다.⁶⁾ 이 항체는 적정농도로 회석하거나 -70°C 에 동결 건조 저장하였다.

6) Double immunodiffusion

가토 또는 면양의 anti mouse IgG, IgA, IgM 그리고 IgG₁, IgG₂, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃를 이용하여 Ouchterlony의 방법¹³⁾에 따라서 class와 subclass를 검사하였다.

7) IAA-alkaline phosphatase(AP) 결합

IAA의 COOH기에 효소의 아미노산기를 carbodiimide방법에 의해서 결합시켰다.²⁴⁾ IAA(10 μmol)를 0.2ml(1:1, DMF:H₂O)에 녹여 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide. HCl(EDC, 15 μmol)을 가하고 pH 6.4로 조정하여 1시간동안 25°C 에서 반응시켰다. 0.1ml alkaline phosphatase(1mg protein)에 상기용액을 가하여 90분 교반하고 1°C 에서 15시간 방치하였다. 반응후 외액(TBS; 50mM Tris, 1 mM MgCl₂, 0.01M NaCl, pH7.5)에 대해서 3일간 투석후 glycerol을 30%로 가하여 -20°C 에 저장하였다.

8) IgG의 coating

단크론 항체는 polystyrene의 표면에 coating이 잘 되지 않는다. 따라서 가토의 IgG를 생산하여 cAp로 이용하였다. cAp는 먼저 BSA로 면역된 Balb/c로 부터 항혈청을 분리하고 protein A-Sepharose 4B를 이용하여 IgG를 분리하였다.⁶⁾ 이 IgG를 가토에 200 μg /FCA씩 접종한 후 3회 추가접종하여 cAb를 생산하였다. 상기 항체를 1 μg /well(100 μl /50mM NaHCO₃, pH9.6)을 96well plate에 가하여 4°C 에 16시간 방치하여 coating하였다. coating후 1% BSA/100 μl TBS를 가하여 2시간 방치했다가 이를 제거하고 직접사용하거나 4°C 에 보관하였다.

9) ELISA

상기 준비된 plate에 IAA-mAb 1 μg /100 μl TBS를 가하여 2시간 동안 cAb와 결합반응시켰다. 200 μl 증류수(4°C)로 1회세척후 시료 50 μl 와 IAA-AP 50 μl 를 가하여 2시간 반응시킨 후 이를 모두 흡인 제거하고 4°C 증류수로 4-5회 세척하였다. 완전히 세척된 well에 기질 p-nitrophenyl phosphate(0.1ml/1mg/ml/50mM NaHCO₃, pH9.

6)를 첨가하여 37°C 에서 30분간 효소반응을 시키고 50 μl 5M KOH로 반응을 종결시켜 흡광도(A₄₀₅)를 측정하였다. 이때의 시료는 모두 diazomethane을 처리하여 메틸화 시켰다.

10) IAA 추출

담배(품종; 버어리 21) 종자 1g을 25°C 포화 petri-dish에서 48시간 발아시켜 액체질소를 처리하여 균질화시킨다음 10ml MeOH(10mg 1-butylhydroxytoluene)로 24시간 4°C 에 간헐적으로 흔들어주면서 추출하였다. 표준 IAA는 ¹⁴C-IAA(1×10^6 cpm) 첨가하여 동정하였으며 시료는 thin layer chromatography(TLC, Merk, F254, silica)를 이용하여 정제 추적하였다.

結果 및 考察

1. Hybridoma 작성

5개 96 well plate를 이용하여 hybridoma를 배양하였던 바 거의 모든 well에서 colony 형성이 관찰되었다. 이 가운데서 50% 정도에서 면역글로블린의 분비를 관찰하였고 총 13개 colony가 IAA 특히 항체를 생산하였다. 그러나 10개의 colony가 역가가 낮거나 나중에, 항체생산이 중단되었다. 이 나머지 3가지 세포주는 역가와 특이성이 높아서 WLI-G1, WLI-G3, WLI-E11이라고 명명하고 이로부터 복수를 생산하였다. 이 복수로부터 protein A-Sepharose 4B를 이용하여 IgG를 정제하였던 바 복수 1ml에 15-18mg protein/immunoglobuline이었다.

2. IAA-mAb 특성

mAb는 그림 1과 같이 하나의 피크로부터 획득하였으며 RIA에 의해서 1:30000-1:325000 배 희석에서 30%결합(¹⁴C-IAA; 10000 cpm)반응을 보였으며 이 항체는 표 1에 표시한 바와 같이 항원으로 사용한 IAA에 대하여 높은 특이성이 있음을 여러가지 비슷한 구조를 가진 대사 화합물 또는 유사물질과 교차반응을 통하여 확인할 수가 있었으며 나머지 유사물질 등에는 극히 미미한 반응을 나타냈을 뿐이다.

3. 면역침강반응

전술한 3가지 세포주로부터 생산된 mAb에 대하여 이중항체를 이용하여 면역 침강반응을 수행하였던 바 그 결과는 세가지 모두 IgG₁ 타입으로 나타났다(그림 2).

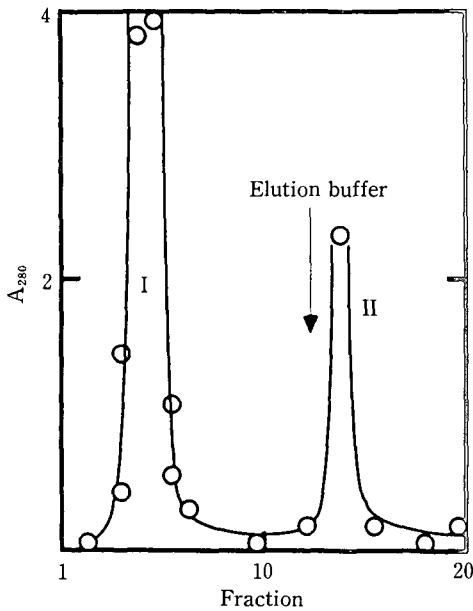


Fig. 1. Protein A-Sepharose chromatographic pattern for IAA-IgG purified from ascitic fluid (peak II). The peak fraction was pooled and lyophilized. 1 g of protein A-Sepharose 4B swelled was packed in 10ml syringe and applied sample with immunopure buffer system.

4. ELISA의 표준곡선

IAA를 정량분석하기 위해서 표준곡선을 작성

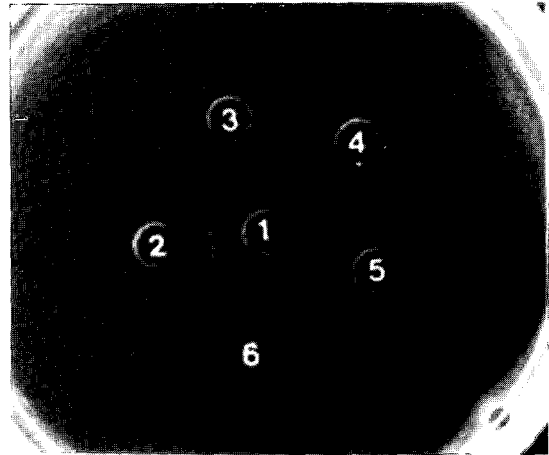


Fig. 2. Double immunodiffusion assay of WLI-G1.

- 1 ; WLI-G1 mAb
- 2 ; anti mouse IgG1 antibody
- 3 ; anti mouse IgG1₂ antibody
- 4 ; anti mouse IgG1_{2b} antibody
- 5 ; anti mouse IgG1₃ antibody
- 6 ; anti mouse IgM antibody

하였다. 여러농도의 IAA 존재하에 IAA-AP를 이용하여 ELISA를 수행하여 표준곡선을 작도하였다. 그 결과 IAA의 검출한계는 1pmol이었고 측정범위는 500 pmol까지로서 정밀분석이 가능하였다. 이 표준곡선으로 부터 작성한 Scatchard plot에 의한 친화상수는 6.7×10^{-10} L/M이었고

Table 1. Cross reactivity of monoclonal antibodies against indole-3-acetic acid and its analogues.

Compound	Cross reactivity (%)		
	WLI-G1	WLI-G3	WLI-E11
Indole-3-acetic acid	100	100	100
Indole-3-acetaldehyde	0.1	0.12	0.1
Indole-3-acetamide	0.0	0.0	0.0
Indole-3-acetic acid ethyl ester	1.8	1.9	2.0
indoleacetone	0.0	0.0	0.0
Indole-3-aldehyde	0.0	0.0	0.0
Indole-3-butyric acid	0.23	0.18	0.25
Indole-3-carbinol	0.0	0.0	0.0
Indole-3-carboxylic acid	0.0	0.0	0.0
dl-indole-3-lactic acid	0.0	0.0	0.0
indole-3-propionic acid	0.0	0.0	0.0
indole-3-pyruvic acid	0.0	0.11	0.18
alfa-naphthaleneacetic acid	0.1	0.23	0.16
beta-naphthaleneacetic acid	0.2	0.0	0.0
2,4-dichlorophenoxyacetic acid	0.0	0.0	0.0
tryptamine	0.0	0.0	0.0
l-tryptophan	0.0	0.0	0.0
d-tryptophan	0.0	0.0	0.0
tryptophol	0.0	0.0	0.0

결합용량은 6×10^{-10} L/M이었다(그림 3).

5. 담배종자 발아중 IAA의 동정

발아중인 담배종자로 부터 IAA를 추출하여 상기 개발된 IAA에 대한 ELISA를 이용하여 정량 분석하였던바 그 결과는 그림 4에 표시한바와 같다. 즉 담배종자로 부터 면역 측정을 위해서는 일반적으로 기기분석에서와 같은 고도의 정제가 필요하지 않고 TLC 정도의 간단한 분리에 의해서 극미량으로 존재하는 생체중의 IAA를 분리

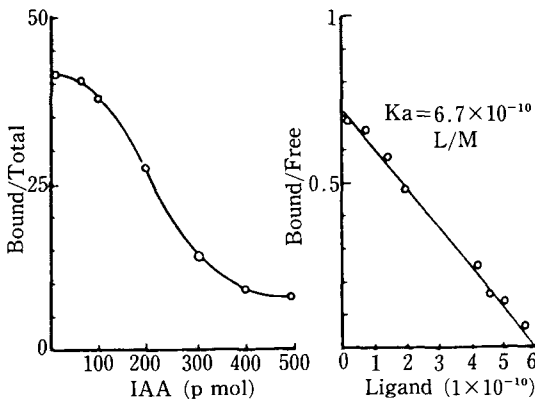


Fig. 3. Standard curve and corresponding Scatchard plot for IAA-ELISA.

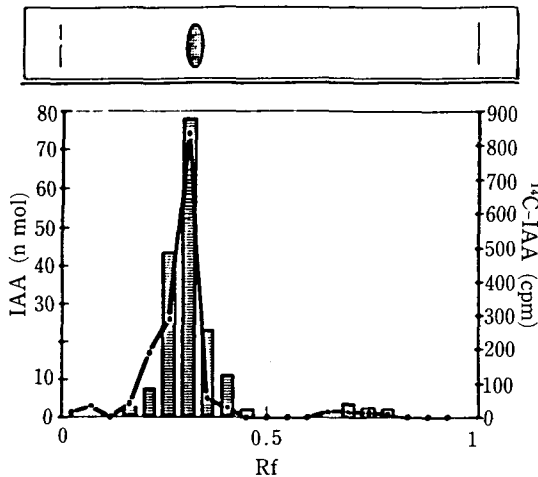


Fig. 4. Distribution of IAA like substances reacted to IAA-mAb on a thin-layer chromatographic plate of a crude methanolic extract from germinating tobacco seedling. Solvent system for TLC was $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 9:1(\text{v/v})$. ■: Immunoreactivity -•-: Internal standard recovered

할 수 있음을 확인할 수 있었다. 특히 추출전 첨가한 ^{14}C -IAA의 면역반응에 의한 추적에서 100% 회복을 나타내서 면역 측정에 의한 내생 옥신의 정량의 정확성을 확인할 수가 있었다.

전술한 바와 같이 IAA는 hapten이기 때문에 거대 분자화가 필요하다. IAA를 거대 분자화 시키기 위한 단백질의 결합부위는 COOH기와 indole ring의 NH기가 있다. 이러한 다른 항원 결정기(epitope)에 따라서 생산된 항체의 항원반응성은 달라진다고 알려져 있다. 즉 NH에 BSA를 결합을 시켜서 항원으로 사용하면 분석전 메틸화의 필요성은 없으나 생성된 항체의 특이성이 낮게 나타나서 문제로 지적이 되고 있다. 따라서 일반적으로 COOH기를 이용하여 항원을 조제하고 있다.^{14,15,20,25)}

또한 본 연구자들이 보고한바 있는 pAb²⁵의 면역측정에 사용한 항체와 그 특이성과 정밀도를 비교해 보면 본 연구에서 생산한 mAb가 훨씬 특이성이 높고 역가가 높아서 향후 IAA의 연구를 위한 새로운 연구 방법임을 확인할 수가 있었다.

摘 要

IAA에 대한 단클론 항체를 생산하고 이를 이용하여 생체중의 내생 IAA를 정량분석하기 위해 ELISA를 개발하고 본법을 사용하여 담배 종자 발아중 내생 IAA함량을 정량분석하였다. 그 결과는

1. IAA에 대한 단클론 항체 생산 세포주 3가지를 선발 작성하였으며 이 세포주로 부터 생산되는 항체는 모두 IgG₁ 타입의 면역 글로블린이었다.
2. 상기 항체를 사용하여 ELISA를 수행하여 표준곡선을 작성하였던 바 검출 한계는 1 pmol이었으며 검출 범위는 500pmol이었다.
3. 표준곡선으로부터 작성한 Scatchard plot에 의한 친화 상수와 결합상수는 6.7×10^{-10} L/M과 6×10^{-10} L/M이었다.
4. 여러가지 IAA유사물질과 교차반응에 의해서 본 mAb는 특이성이 매우 높고 RIA에 의해서 고역가임을 확인하였다.
5. 발아중인 담배종자로 부터 면역측정에 의해서 내생 IAA를 정량분석하였다.

6. 상기의 결과에 따라서 본 mAb를 이용하여 생체중의 내생 IAA를 간편하게 정밀 분석할 수 있음을 확인하였다.

参 考 文 献

1. Bridges, I.G., J.R. Hillman and M.B. Willkins. 1973. Identification and localization of auxin in primary root of *zea mays* by mass-spectrometry. *Planta* 115 : 189-192.
2. Caruso, J.I., R.G. Smith, I.M. Smith, T.Y. Cheng and G.D. Daves. 1978. Determination of indole-3-acetic acid in douglas fir using a deuterated analog and selected ion current monitoring comparion of microquantities in seedling and adult tree. *Plant Physiol.* 62 : 841-845.
3. Cleland, R.E. 1987. Auxin and cell elongation. in *Plant hormones and their role in plant growth and developement*, pp. 132-148. Martinus Nijhoff publ. (Dordrecht/Boston/Lankaster).
4. Daie, J. and R.E. Wyse. 1982. Immunoassay -an alternative for the detection and quantification of small molecules in plants. *Hort. Sci.* 17 : 307-310.
5. Daie, J. and R.E. Wyse. 1982. A adaptation of the enzyme-liked immunosorbent assay (ELISA) to the quantitative analysis of abscisic acid. *Anal. Biochem.* 119 : 365-371.
6. Ey, P.L., S.J. Prowse and C.R. Jenkin. 1978. Isolation of pure IgG₁, IgG₂ and IgG_{2a} immunoglobuline from mouse using protein A-Sepharose. *Immunochem.* 15 : 429-436.
7. Fuchs, S. and Y. Fuchs. 1969. *Immunological assay for plant hormones using specific antibodies to indole acetic acid and gibberellic acid.* *Biochim. Biophys. Acta.* 192 : 528-530.
8. Hamilton, R.H., R.S. Bandurski and B.H. Grigsby. 1961. Isolation of indole-3-acetic acid from corn kernels & etiolated seedlings. *Plant Physiol.* 36 : 354-359.
9. Köhler, G. and Milstein. 1975. Continuous of fused cell ssecreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256 : 495-497.
10. Maej, A. and P. Haggblom. 1985. Radioimmunoassay for determination of indole-3-acetic acid in fungi and plants. *Physiol. Plant.* 64 : 389-392.
11. Mertens, R.R., J. Eberle, A. Arnscheidt, A. A. Ledebur and E.W. Weiler. 1985. Monoclonal antibodies to plant regulators. II. Indole-3-acetic acid. *Planta* 166 : 389-392.
12. Nitsch, J.P. and C. Nitsch. 1956. Studies on the growth of coleoptile and first internode sections. A new, sensitive, straight growth test for auxin. *Plant Physiol.* 31 : 94-111.
13. Ouchterlony, O. 1958. in *Progress in allergy*. Kallos, P. ed.. Vol.5, pp. 1-78. Karger/Brasel.
14. Pence, V.C. and J.L. Caruso. 1987. Immunoassay methods of plant hormone analysis. in *Plant hormones and their role in plant growth and development*. pp 240-256. Martinus Nijhoff publ. Dordrecht/Boston/Lancaster.
15. Pengelly, W.L., R.S. Bandurski and A. Schulze. 1981. Validation of radioimmunoassay for indole-3-acetic acid using gas-chromatography-selected ion monitoring-mass spectrometry. *Plant Physiol.* 68 : 96-98.
16. Pengelly, W.L. and F.J. Meins. 1977. A specific radioimmunoassay for nanogram quantities of the auxin, indole-3-acetic acid. *Planta* 136 : 173-180.
17. Rivier, L. and P.E. Pilet. 1974. Indole-3-acetic acid in cap and apex of maize roots ; Identification and quantification by mass spectrometry. *Planta* 120 : 107-112.
18. Skoong, F. and C.O. Miller. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 11 : 118-131.
19. Stoessl, A. and M.A. Veis, . 1970. Determination of submicrogram levels of indole-3-acetic acid ; a new highly specific method. *Anal. Biochem.* 34 : 334-351.
20. Sundberg, B., G. Sundberg and A. Crozier. 1986. Purification of indole-3-acetic acid in plant extracts by immunoaffinity chromatography. *Phytochem.* 25 : 295-298.
21. Suzuki, T., K. Kondo, and T. Fuji. 1979. Distribution of growth regulators in relation to the light-induced geotropic responsiveness in

- zea roots. *Planta* 145 : 323-329.
22. Weiler, E.W. 1981. Plant hormones immunoassay. *Physiol. Plant.* 54 : 230-234.
23. Weiler, E.W. 1981. Radioimmunoassay for pmol quantities of indole-3-acetic acid for use with high stable (^{125}I) and (^3H) IAA derivatives as radiotracers. *Planta* 153 : 319-325.
24. Weiler, E.W., P.S. Jourdan, and W. Canrad. 1981. Levels of indole-3-acetic acid in intact and decapitated coleoptiles as determined by a specific and highly sensitive solid-phase enzyme immunoassay. *Planta* 153 : 561-571.
25. 黃台益 · 林賢玉 · 金容在. 1985. 옥신 (IAA) 의 효소면역측정법. 전남대학교 논문집 제 30 집 농수산편 : 11-17.