

ФИЗИОЛОГИЯ

УДК 577.175.1

НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ В ИЗУЧЕНИИ ДИНАМИКИ АБСИЗОВОЙ КИСЛОТЫ

А.Н. Блинцов, М.А. Гусаковская, Т.А. Власова,
О.Г. Полесская, Е.И. Каширина, Н.Д. Алексина

(кафедра физиологии растений)

Гормональная система является одной из главных систем, обеспечивающих целостность растительного организма в течение всей его жизни как в периоды регулярных фаз (рост, репродукция), так и в периоды нерегулярных фаз (температурный, водный, солевой, транспирационный, фотопериодический и другие стрессы (Кулаева, 1973; Дерфлинг, 1985). В настоящее время наиболее перспективным методом изучения динамики фитогормонов является иммуноферментный анализ (ИФА), позволяющий количественно и с высокой чувствительностью определять содержание исследуемых гормонов в любых тканях и органах растения в процессе их роста и развития (Weiler, 1984; Катаева и др., 1990; Кудоярова и др., 1990). Среди известных в настоящее время фитогормонов особое место занимает абсцизовая кислота (АБК) — единственный гормон, способный выступать антагонистом по отношению ко всем другим гормонам. Отсюда — особая роль АБК, ее присутствие во всех тканях и органах во все периоды жизни растения, ее сложный характер взаимодействия с другими гормонами и широкий спектр морфофизиологической экспрессии (Кефели и др., 1989).

Современные иммунохимические методы анализа АБК являются мощным инструментом исследования, однако не позволяют непосредственно определять различные эндогенные формы (свободную — активную и связанную — запасную, неактивную) этого гормона. Дифференциальное определение свободной АБК возможно только при фракционирования образца (Milborrow, 1968; Weiler, 1982), что может приводить к существенному искажению результатов анализа и требует накопления значительного количества исследуемого биоматериала.

В связи с этим актуальной задачей является изучение иммунохимических закономерностей различных иммуноферментных систем для определения АБК с целью достижения максимально полной и достоверной информации о динамике различных природных форм гормона в ходе онто-

генеза. Представляет особый интерес создание систем прямого мониторинга, прежде всего свободной формы АБК, которой принадлежит ведущая роль в механизме гормональной регуляции разнообразных биохимических и физиологических процессов, имеющих место в ходе онтогенеза.

Материал и методы

В работе использованы следующие природные и синтетические изомеры 5-(1-гидрокси-2,6,6-триметил-4-оксоциклогексен-2-ил-1)-3 метилпентадиен-2,4-ой кислоты (АБК): (+) — 2-цис, 4-транс-АБК — эндогенная свободная форма АБК (Aldrich Chemical Company, США); (±) — 2-цис, 4-транс-АБК — синтетическая форма гормона (Aldrich Chemical Company, США); метиловый эфир (±) — 2-цис, 4-транс-АБК (Sigma, США) — синтетический аналог запасной формы гормона; а также синтезировали 4'-р-аминобензоилгидразон (±) — 2-цис, 4-транс-АБК — (АБГ-АБК) — химическое производное синтетической формы гормона.

АБГ-АБК получали по следующему методу (Quarrie, Galfre, 1985). р-Аминобензоилгидразин (Aldrich Chemical Company, США) перекристаллизовывали в кипящем этаноле, затем сушили в вакууме при комнатной температуре. 30 мг р-аминобензоилгидразина растворяли в 6 мл метанола, содержащего 1 М уксусной кислоты. Полученный раствор добавляли к 30 мг (±) — 2-цис, 4-транс-АБК в 4 мл того же раствора. Смесь инкубировали при комнатной температуре в темноте в течение 3 суток в атмосфере азота, периодически перемешивая, после чего растворитель удаляли в вакууме при комнатной температуре. Сухой остаток растворяли в 10 мл 0,1 М Na-богротного буфера pH 9,0, добавляли равный объем этилацетата. Экстракцию АБГ-АБК равным объемом этилацетата проводили дважды. Объединенные фракции органического экстракта концентрировали и очищали на силикогеле тонкослойной хроматографией в системе толуол-этилацетат-метанол (2,5 : 7,5 : 1,5). Зону адсорбции с $R_f = 0,40$ (контроль УФ-лампа) собирали, после чего

АБГ-АБК элюировали смесью метанол-этилацетат (4 : 6). Растворитель удаляли вакуум-сушкой при комнатной температуре. Выход АБГ-АБК составил 78%.

(\pm) — 2-цис,4-транс-АБК и АБГ-АБК использовали для получения иммуногенов и конъюгатов с различными белковыми носителями (бычий сывороточный альбумин (БСА) и яичный альбумин (ОВ)).

Конъюгат БСА-АБК был получен по следующей методике. 100 мг (\pm) — 2-цис,4-транс-АБК растворяли в 2 мл свежеперегнанного абсолютного диметилформамида. Добавляли 2 мл смеси, содержащей 100 мг N, N'-циклогексилкарбодиимида и 50 мг N-гидроксисукциниимида в диметилформамиде. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 90 мин. Выпавший осадок отделяли центрифугированием 10 мин при 8000 об/мин. К супернатанту (АБК с активированной карбоксильной (С1) группой) добавляли 100 мг БСА в 10 мл 0,2 М К-фосфатного буфера. Смесь инкубировали при перемешивании 1 ч при 20° и ночь при 4°. Осадок отделяли центрифугированием 10 мин при 8000 об/мин. Супернатант диализовали против дистиллированной воды в течение 3 суток при 4°. Концентрацию белка в синтезированном иммуногене определяли по методу Лоури. Степень модификации аминогрупп белка определяли титрованием тринитробензольсульфокислотой (Полевая и др., 1978).

Конъюгат БСА-АБГ-АБК получали следующим методом (Quarrelle, Galfre, 1985). 20 мг АБГ-АБК суспензировали в 0,5 мл метанола, добавляли 1,0 мл раствора 0,1 М HCl и медленно при перемешивании добавляли 150 мкл водного раствора нитрита натрия (25 мг/мл). Диазотирование АБГ-АБК проводили в течение 20 мин, после чего ярко-желтый раствор по каплям добавляли к охлажденному раствору БСА (60 мг) в 3 мл раствора 0,25 М Na-боратного буфера pH 9,2. Смесь инкубировали в течение 16 ч при 4°. Полученный оранжевый раствор конъюгата диализовали против 0,25 М Na-боратного буфера pH 9,2 в течение суток и еще двое суток против воды. Концентрацию белка в конъюгате определяли по методу Лоури. Соотношение белок : гормон в синтезированном конъюгате определяли спектрофотометрически при 275 нм.

Иммунизацию кроликов проводили в течение 2—3 месяцев введением 1 мг конъюгата БСА-АБК или БСА-АБГ-АБК с интервалом в 2 недели. Первую иммунизацию проводили введением конъюгатов в смеси с полным адьювантом Фрейнда 1 : 1 подкожно в холку. Вторую с неполным адьювантом Фрейнда 1 : 1 подкожно в несколько точек живота. Последующие иммунизации проводили чистым конъюгатом в мышцу бедра. Забор крови осу-

ществляли из ушной вены через 8—10 дней после седьмой иммунизации (Блинцов и др., 2000).

Для характеристики полученных антисывороток использовали конъюгаты ОВ с (\pm) — 2-цис, 4-транс-АБК и АБГ-АБК. Синтез конъюгатов антигенов с ОВ проводили по методикам, аналогичным для получения иммуногенов, при этом варьировали мольное соотношение ОВ/АБК в реакционной смеси с целью получения конъюгатов различного состава.

Разведение антигена проводили в 0,1 мл ТФБ pH 7,4 (0,01 М К-фосфатным буфером pH 7,4, содержащим 0,1 М NaCl и 0,1%-й тритон X-100) на полистироловых планшетах с высокой сорбционной емкостью (Nunk Maxi Sorb, Дания) с предварительно адсорбированным антигеном ОВ-АБК или ОВ-АБГ-АБК (0,2 мл, 0,5 мкг/мл в 0,02 М Na-карбонатном буфере pH 9,5 12 ч при 4°), после чего добавляли 0,1 мл раствора антисыворотки в разведении 1 : 500 000 и инкубировали при 37° 90 мин. Планшет промывали 4 раза по 0,2 мл ТФБ pH 7,4 и добавляли по 0,2 мл раствора меченых пероксидазой хрена антивидовых антител (Sigma, США) в ТФБ pH 7,4 (1 нМ по ферменту-маркеру). После инкубации (37°, 60 мин) отмывали несвязавшиеся реагенты 4 раза по 0,2 мл ТФБ pH 7,4 и добавляли по 0,15 мл свежеприготовленного субстратного раствора (4 мг о-фенилендиамина и 4 мкл 30%-й перекиси водорода на 10 мл 0,1 М Na-цитратного буфера pH 5,0). Через 60 мин реакцию останавливали добавлением в лунки планшета по 50 мкл раствора 4 М серной кислоты и измеряли оптическую плотность при 490 нм на вертикальном спектрофотометре для 96-луночных планшетов (Униплан АИФР-01, РФ) (Егоров и др., 1991).

Результаты и обсуждение

В настоящей работе проведено иммунохимическое исследование двух твердофазных систем ИФА конкурентного анализа, характеризующихся различной специфичностью относительно свободной и связанной форм АБК. В первой аналитической системе в качестве иммобилизованного антигена использовался конъюгат ОВ-АБК с мольным соотношением ОВ/АБК, равным 1 : 4 и антисыворотка к БСА-АБК. Другая аналитическая система ИФА основана на использовании БСА-АБГ-АБК-специфичной антисыворотки и иммобилизованного антигена ОВ-АБГ-АБК с мольным соотношением ОВ/АБК, равным 1 : 3. Первая иммунохимическая система основана на иммунореагентах, полученных ковалентной иммобилизацией (\pm) — 2-цис, 4-транс-АБК за счет карбоксильной группы (С1) молекулы гормона. Во втором случае использовались карбонильные (С4') производные АБК. При этом значительно менялось пространственное рас-

положение функциональных групп АБК, экстраполированных полярно относительно белковой глобулы носителя и доступных для взаимодействия с активным центром антител. Таким образом, менялась как химическая природа подложки (т.е. пространственная ориентация функциональных групп молекулы АБК по отношению к белку), так и специфичность используемой антисыворотки, при этом практически не изменялось мольное соотношение белок : гормон в конъюгатах-подложках. Выбранные нами аналитические иммунохимические системы включали только гомологичные пары конъюгат-антисыворотка, что определялось значительно большей специфичностью иммунохимического взаимодействия в гомологичных системах ИФА в отличие от альтернативных гетерологичных систем — антисыворотка к БСА-АБК/подложка ОВ-АБГ-АБК и антисыворотка к БСА-АБГ-АБК/подложка ОВ-АБК.

Моделирование и изучение указанных гетерологичных аналитических систем ИФА в данной работе не проводилось из-за низкого титра используемых антител на гетерологичных подложках. Аналитическая система ИФА на основе ОВ-АБК и антисыворотки к БСА-АБК хорошо изучена и описана в литературе (Weiler, 1984; Кефели и др., 1989; Катаева и др., 1990). Принцип метода конкурентного твердофазного ИФА заключается в конкуренции определяемого и иммобилизованного антигенов за центры связывания антител. После установления равновесия в системе и разделения компонентов иммунохимической реакции, образовавшийся комплекс антиген-антитело на полистироловой поверхности выявляется с помощью ативидовых антител, меченных молекулой фермента. Использование специфичной субстратной системы позволяет определять концентрацию ферментативного маркера (Егоров и др., 1991). Измеряемая величина ферментативной активности на поверхности полистиролового носителя пропорциональна концентрации комплекса (иммобилизованный антиген-антитело-ативидовые антитела-фермент), и, следовательно, служит характеристикой содержания АБК в исследуемом растворе.

Первая аналитическая система ИФА характеризовалась высокой специфичностью как к исходной (\pm) — 2-цис,4-транс-АБК, так и к ее метилированной форме (метиловый эфир (\pm) — 2-цис,4-транс-АБК), причем поведение обеих форм АБК в данной аналитической системе было идентичным в области изученных концентраций гормона до 1×10^{-8} М (рис. 1, кривые 1, 2), что связано с близостью химической структуры антигенов и иммуногена. Полученные нами данные хорошо согласуются с литературными (Weiler, 1982). В данном случае этерификация карбоксильной группы (С1) молекулы АБК не выявлялась при использо-

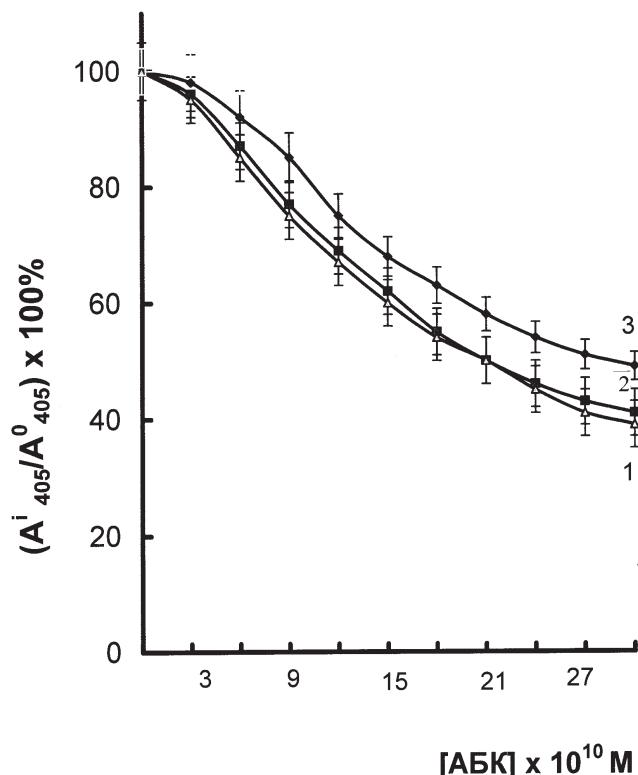


Рис. 1. Зависимость оптической плотности продукта ферментативной реакции окисления *o*-фенилендиамина перекисью водорода от концентрации антигена в растворе конкурентной твердофазной системы ИФА: (\pm) — 2-цис,4-транс-АБК (1); метиловый эфир (\pm) — 2-цис,4-транс-АБК (2); (+) — 2-цис,4-транс-АБК (3)

вании антител, специфичных к функциональным группам АБК, расположенным полярно относительно карбоксильной (С1) группы молекулы гормона. Степень перекрестного реагирования для метилового эфира (\pm) — 2-цис,4-транс-АБК, рассчитанная в данном случае по (\pm) — 2-цис,4-транс-АБК, равнялась 100%. Таким образом, важной особенностью первой аналитической системы является наблюдаемая идентичность поведения свободной и связанной форм АБК при ингибировании комплексообразования антител с иммобилизованным антигеном. Следовательно, определяемая с помощью первой тест-системы эффективная концентрация АБК отражает практически в равной мере содержание как свободной, так и запасной форм АБК, т.е. реально является суммарной концентрацией фитогормона. Однако данная аналитическая система не позволяет дифференцированно выявить свободную и связанную формы АБК без предварительного фракционирования исследуемого образца, поскольку используемые антитела взаимодействуют как с той, так и с другой формой гормона практически в равной мере. Дифференциальное определение различных форм АБК и прежде всего свободной формы гормона возможно только за счет фракционирования исследуемого образца.

даемого образца, что может приводить к искажению результатов анализа из-за низкого содержания гормона в растительных тканях. В настоящее время данный подход, несмотря на его сложность, используется в исследовательской практике (Milborrow, 1968; Weiler, 1982) из-за отсутствия альтернативных методов исследования.

Образование комплекса ОВ-АБГ-АБК с антителами к БСА-АБГ-АБК во второй аналитической системе ингибируется свободной и запасной формами АБК в разной степени (рис. 2, кривые 1, 2). Максимальная ингибирующая способность связывания антител с иммобилизованным антигеном наблюдалась для свободной формы (\pm) — 2-цис, 4-транс-АБК (рис. 2, кривая 3), т.е. для антигена, наиболее близкого по химическому строению к используемому в данной системе иммуногену БСА-АБГ-АБК (т.е., когда не затронута модификация карбоксильной (C1) группы гормона). Степень перекрестного реагирования для этифицированной формы АБК (метиловый эфир (\pm) — 2-цис, 4-транс-АБК), рассчитанная по контрольному антигену (\pm) — 2-цис, 4-транс-АБК, составила всего 9%. Крайне важно, что вторая аналитическая система характеризуется значительным различием

по своей специфичности по отношению к свободной и этифицированной формам АБК. В данном случае антитела специфичны к поверхности антигена, экстраполированной полярно от белкового носителя, включая и карбоксильную (C1) группу молекулы АБК. Естественно, что химическая модификация карбоксильной (C1) группы молекулы АБК должна заметно сказываться на взаимодействии гормона с такими антителами, поскольку возможно как стерическое несоответствие антигенного эпитопа с активным центром антител, так и влияние погашения заряда карбоксильной (C1) группы при ее этификации на структуру резонансной электронной плотности в молекуле АБК. Вторая тест-система, характеризующаяся значительно большей специфичностью по отношению к свободной АБК по сравнению с ее этифицированной формой, позволяет определять эффективную суммарную концентрацию эндогенной АБК, отражающую, главным образом, содержание свободной формы гормона с немодифицированной карбоксильной группой (табл. 1).

Таблица 1

Влияние соотношения различных форм АБК в стандарте: (\pm) — 2-цис, 4-транс-АБК и метилового эфира (\pm) — 2-цис, 4-транс-АБК на результаты определения концентрации гормона с использованием различных систем ИФА абсциссовой кислоты (N = 10)

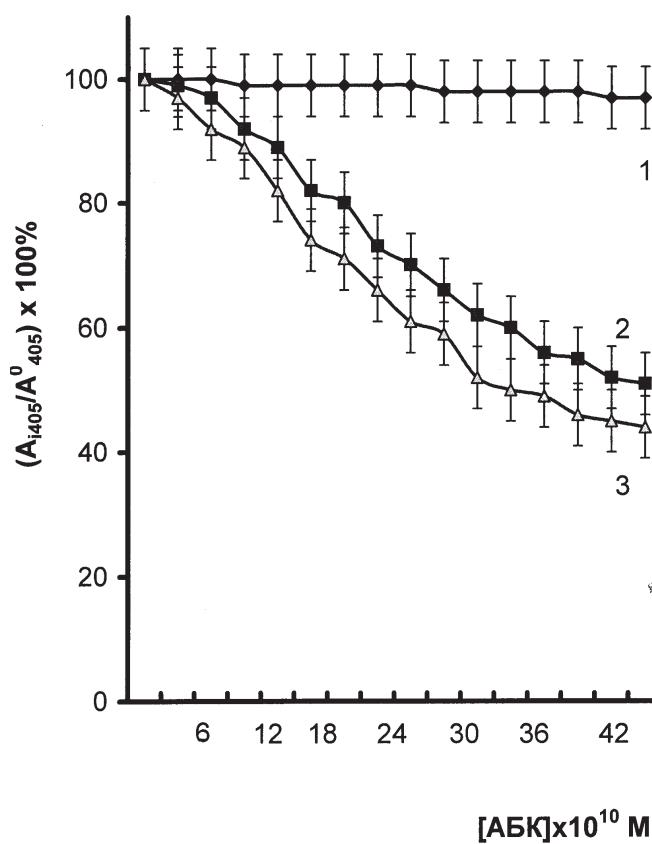


Рис. 2. Зависимость оптической плотности продукта ферментативной реакции окисления *o*-фенилендиамина перекисью водорода от концентрации антигена в растворе конкурентной твердофазной системы ИФА: метиловый эфир (\pm) — 2-цис, 4-транс-АБК (1); (+) — 2-цис, 4-транс-АБК (2); (\pm) — 2-цис, 4-транс-АБК (3)

Исходная концентрация (\pm) — 2-цис, 4-транс-АБК, М	Исходная концентрация метилового эфира (\pm) — 2-цис, 4-транс-АБК, М	Определяемая суммарная концентрация АБК, М 1-я система ИФА	Определяемая эффективная концентрация АБК, М 2-я система ИФА
1,0 × 10 ⁻⁹	0	0,9 × 10 ⁻⁹	0,9 × 10 ⁻⁹
2,0 × 10 ⁻⁹	0	1,9 × 10 ⁻⁹	2,0 × 10 ⁻⁹
3,0 × 10 ⁻⁹	0	3,1 × 10 ⁻⁹	3,0 × 10 ⁻⁹
1,0 × 10 ⁻⁹	1,0 × 10 ⁻⁹	2,1 × 10 ⁻⁹	1,1 × 10 ⁻⁹
2,0 × 10 ⁻⁹	1,0 × 10 ⁻⁹	3,2 × 10 ⁻⁹	2,2 × 10 ⁻⁹
3,0 × 10 ⁻⁹	1,0 × 10 ⁻⁹	4,2 × 10 ⁻⁹	3,2 × 10 ⁻⁹
1,0 × 10 ⁻⁹	2,0 × 10 ⁻⁹	3,1 × 10 ⁻⁹	1,3 × 10 ⁻⁹
2,0 × 10 ⁻⁹	2,0 × 10 ⁻⁹	4,2 × 10 ⁻⁹	2,2 × 10 ⁻⁹
3,0 × 10 ⁻⁹	2,0 × 10 ⁻⁹	5,3 × 10 ⁻⁹	3,3 × 10 ⁻⁹
1,0 × 10 ⁻⁹	3,0 × 10 ⁻⁹	4,2 × 10 ⁻⁹	1,4 × 10 ⁻⁹
2,0 × 10 ⁻⁹	3,0 × 10 ⁻⁹	5,2 × 10 ⁻⁹	2,4 × 10 ⁻⁹
3,0 × 10 ⁻⁹	3,0 × 10 ⁻⁹	6,4 × 10 ⁻⁹	3,4 × 10 ⁻⁹
0	1,0 × 10 ⁻⁹	1,0 × 10 ⁻⁹	0,1 × 10 ⁻⁹
0	2,0 × 10 ⁻⁹	2,1 × 10 ⁻⁹	0,2 × 10 ⁻⁹
0	3,0 × 10 ⁻⁹	2,9 × 10 ⁻⁹	0,3 × 10 ⁻⁹

Указанные свойства второй аналитической системы являются крайне важными, поскольку позволяют непосредственно осуществлять мониторинг свободной формы АБК в тестируемых образцах, т.е. дают наиболее ценную информацию о динами-

ке активной формы гормона. Определяемый данным методом параметр концентрации АБК не является истинным (так как включает в себя также некоторое количество запасной формы АБК), однако может быть использован для выявления изменений в динамике свободной формы АБК, когда невозможно проведение пробоподготовки и накопления значительного количества тестируемого материала. Чувствительность определения (\pm) — 2-цис,4-транс-АБК в буферном растворе составила $1,0 \times 10^{-9}$ М, относительная ошибка не превышала 13% на всем изученном диапазоне концентраций (\pm) — 2-цис,4-транс-АБК калибровочной кривой. В отдельном эксперименте на примере пшеницы и одуванчика показано отсутствие существенного влияния компонентов растительного экстракта завязей и семяпочек на определение АБК (в данном случае использовались отдиализованные растительные соки, не содержащие гормон) вплоть до разведения 1 : 10 растительного сока в аналитической системе.

Важным вопросом при определении концентрации гормона с использованием различных иммуноферментных систем является корректный выбор калибровочного стандарта. В случае определения АБК решение этого вопроса имеет особое значение, что обусловлено многообразием возможных пространственных изомеров абсцизовой кислоты и особой биологической активностью исключительно (+) — 2-цис,4-транс-АБК.

В настоящей работе для получения иммuno-реагента использовался только синтетический рацемат (\pm) — 2-цис,4-транс-АБК. В этом случае при иммунизации животных иммunoгенами БСА — (\pm) — 2-цис,4-транс-АБК и БСА-АБГ (\pm) — 2-цис,4-транс-АБК образуются антитела как к (+) — 2-цис,4-транс-АБК, так и к (−) — 2-цис,4-транс-АБК формам гормона. В работе показано, что обе аналитические системы, полученные за счет использования реагентов на основе рацемата АБК, имели меньшую специфичность к оптически активной природной форме (+) — 2-цис,4-транс-АБК, первая система — 60%, вторая — 68% (рис. 1, кривая 3; рис. 2, кривая 3). Таким образом, с использованием в качестве калибровочного стандарта (\pm) — 2-цис,4-транс-АБК невозможно определить истинное содержание природной (+) — 2-цис,4-транс-АБК в исследуемых образцах, что продемонстрировано данными табл. 2 и 3. В этом случае рассчитанные значения концентрации гормона по калибровочной зависимости с использованием (\pm) — 2-цис,4-транс-АБК будут заниженными. Как видно из данных табл. 2 и 3, в связи с этим для определения природной формы гормона необходимо при проведении измерений использовать природный изомер (+) — 2-цис,4-транс-АБК, который будет взаимодействовать как со специфичными антителами с равно-

Таблица 2

Тест на открытие различных стандартов АБК с использованием калибровочных зависимостей, построенных с различными формами гормона для системы БСА-АБК/ОВ-АБК (1-я аналитическая система), N = 25

Гормон, используемый для построения калибровочной зависимости	Состав исследуемого стандарта фитогормона, М	Измеренная концентрация гормона, М	Открытие АБК, %
(+ — 2-цис, 4-транс-АБК	$1,0 \cdot 10^{-9}$ (+) — 2-цис,4-транс-АБК	$1,1 \cdot 10^{-9}$	110
	$1,5 \cdot 10^{-9}$ (+) — 2-цис,4-транс-АБК	$1,5 \cdot 10^{-9}$	100
	$2,0 \cdot 10^{-9}$ (+) — 2-цис,4-транс-АБК	$1,9 \cdot 10^{-9}$	95
	$2,5 \cdot 10^{-9}$ (+) — 2-цис,4-транс-АБК	$2,3 \cdot 10^{-9}$	92
(+ — 2-цис, 4-транс-АБК	$1,0 \cdot 10^{-9}$ (±) — 2-цис,4-транс-АБК	$1,7 \cdot 10^{-9}$	170
	$1,5 \cdot 10^{-9}$ (±) — 2-цис,4-транс-АБК	$2,5 \cdot 10^{-9}$	166
	$2,0 \cdot 10^{-9}$ (±) — 2-цис,4-транс-АБК	$3,2 \cdot 10^{-9}$	160
(\pm) — 2-цис, 4-транс-АБК	$1,0 \cdot 10^{-9}$ (±) — 2-цис,4-транс-АБК	$1,0 \cdot 10^{-9}$	100
	$1,5 \cdot 10^{-9}$ (±) — 2-цис,4-транс-АБК	$1,4 \cdot 10^{-9}$	93
	$2,0 \cdot 10^{-9}$ (±) — 2-цис,4-транс-АБК	$2,1 \cdot 10^{-9}$	105
	$2,5 \cdot 10^{-9}$ (±) — 2-цис,4-транс-АБК	$2,6 \cdot 10^{-9}$	104
(\pm) — 2-цис, 4-транс-АБК	$1,0 \cdot 10^{-9}$ (+) — 2-цис,4-транс-АБК	$0,6 \cdot 10^{-9}$	60
	$1,5 \cdot 10^{-9}$ (+) — 2-цис,4-транс-АБК	$0,9 \cdot 10^{-9}$	60
	$2,0 \cdot 10^{-9}$ (+) — 2-цис,4-транс-АБК	$1,1 \cdot 10^{-9}$	55
	$2,5 \cdot 10^{-9}$ (+) — 2-цис,4-транс-АБК	$1,4 \cdot 10^{-9}$	56

Примечание. Открытие антигена (%) равно отношению найденной концентрации АБК к истинной концентрации АБК, выраженному в %.

весным значением константы связывания K_1 (M^{-1}), так и с присутствующими антителами к альтернативной оптической форме (−) — 2-цис,4-транс-АБК с равновесной константой связывания K_2 (M^{-1}). При этом очевидно, что K_2 не превышает K_1 , т.е. можно в этом случае популяцию антител к (−) — 2-цис,4-транс-АБК рассматривать как низкоаффинную фракцию антител к природной форме (+) — 2-цис,4-транс-АБК. В этом случае калибровочная зависимость, полученная с ис-

пользованием в качестве стандарта (+) — 2-цис, 4-транс-АБК, более растянута по диапазону концентрации калибровочного стандарта по сравнению с аналогичной зависимостью, построенной для рацемата (\pm) — 2-цис,4-транс-АБК, что может быть устранено при использовании (+) — 2-цис,4-транс-АБК при получении иммунореагентов. Полученные в настоящее время иммунореагенты на основе антисыворотки (\pm) — 2-цис, 4-транс-АБК могут быть эффективно использованы во многих биохимических исследованиях в связи с высоким содержанием (+) — 2-цис,4-транс-АБК (10^{-6} — 10^{-8}) М в различных растительных органах и тканях. В нашем случае чувствительность калибровочных зависимостей для (+) — 2-цис, 4-транс-АБК не превышала 1 нМ, что полностью включало физиологически активный диапазон концентраций этого гормона. Экстраполируя полученные в работе результаты для этилового эфира рацемата (\pm) — 2-цис,4-транс-АБК на природную запасную форму (+) — 2-цис,4-транс-АБК, следует предполагать для нее аналогичную картину поведения как и в случае со свободной формой природного изомера (+) — 2-цис,4-транс-АБК, т.е. специфичность изученных систем должна пропорционально уменьшиться для природной связанный формы (+) — 2-цис,4-транс-АБК по сравнению с этерифицированным рацематом (\pm) — 2-цис,4-транс-АБК. Данные предположения являются наиболее вероятными, пока экспериментально не проверены. В настоящее время проведены тесты на открытие только для образцов, содержащих исключительно свободную форму (+) — 2-цис, 4-транс-АБК (табл. 2 и 3). Полученные данные подтверждают высокий процент открытия 92—117% природной формы (+) — 2-цис,4-транс-АБК в образцах при различной концентрации фитогормона в растворе.

Показана возможность изучения динамики свободной формы эндогенной АБК в растительных тканях, подвергнутых минимальной обработке, без очистки гормонов и химической модификации. На базе результатов, полученных в данной работе, проведено сравнительное изучение динамики свободной формы АБК. Возможность практического применения изученных систем ИФА АБК была продемонстрирована на примере *Triticum aestivum* L. и *Taraxacum officinale* Web., где впервые проведено исследование динамики различных форм эндогенной АБК в ходе раннего эмбриогенеза *in vivo* с целью установления корреляции между активностью гормональной системы и основными событиями этого этапа репродукции, а также с целью определения возможной гормональной индукции этих событий.

Таблица 3

Тест на открытие различных стандартов АБК с использованием калибровочных зависимостей, построенных с различными формами гормона для системы БСА-АБГ-АБК/ОВ-АБГ-АБК (2-я аналитическая система), N = 25

Гормон, используемый для построения калибровочной зависимости	Состав исследуемого стандарта фитогормона, М	Измененная концентрация гормона, М	Открытие АБК, %
(+)-2-цис, 4-транс-АБК	0,6 · 10 ⁻⁹ (+)-2-цис,4-транс-АБК	0,7 · 10 ⁻⁹	117
	1,2 · 10 ⁻⁹ (+)-2-цис,4-транс-АБК	1,1 · 10 ⁻⁹	92
	1,8 · 10 ⁻⁹ (+)-2-цис,4-транс-АБК	1,7 · 10 ⁻⁹	94
	2,4 · 10 ⁻⁹ (+)-2-цис,4-транс-АБК	2,5 · 10 ⁻⁹	104
(+)-2-цис, 4-транс-АБК	0,6 · 10 ⁻⁹ (\pm)-2-цис,4-транс-АБК	0,9 · 10 ⁻⁹	150
	1,2 · 10 ⁻⁹ (\pm)-2-цис,4-транс-АБК	1,7 · 10 ⁻⁹	142
	1,8 · 10 ⁻⁹ (\pm)-2-цис,4-транс-АБК	2,6 · 10 ⁻⁹	144
	2,4 · 10 ⁻⁹ (\pm)-2-цис,4-транс-АБК	3,4 · 10 ⁻⁹	142
(\pm)-2-цис, 4-транс-АБК	0,6 · 10 ⁻⁹ (\pm)-2-цис,4-транс-АБК	0,7 · 10 ⁻⁹	117
	1,2 · 10 ⁻⁹ (\pm)-2-цис,4-транс-АБК	1,3 · 10 ⁻⁹	108
	1,8 · 10 ⁻⁹ (\pm)-2-цис,4-транс-АБК	1,8 · 10 ⁻⁹	100
	2,4 · 10 ⁻⁹ (\pm)-2-цис,4-транс-АБК	2,3 · 10 ⁻⁹	96
(\pm)-2-цис, 4-транс-АБК	0,6 · 10 ⁻⁹ (+)-2-цис,4-транс-АБК	0,4 · 10 ⁻⁹	67
	1,2 · 10 ⁻⁹ (+)-2-цис,4-транс-АБК	0,8 · 10 ⁻⁹	67
	1,8 · 10 ⁻⁹ (+)-2-цис,4-транс-АБК	1,3 · 10 ⁻⁹	72
	2,4 · 10 ⁻⁹ (+)-2-цис,4-транс-АБК	1,7 · 10 ⁻⁹	71

Практическое применение изученных систем ИФА было продемонстрировано также на примере исследования патогенеза болезней сельскохозяйственных растений, вызванных фитопатогенными грибами *Botrytis cinerea*. Выявленная динамика АБК в плодах клубники в ходе поражения грибом, вызывающим серую гниль, свидетельствовала об изменении гормонального статуса растения в ходе инфекции.

Эффективность определения концентрации АБК было продемонстрировано также при определении

содержания АБК в донорном листе пшеницы, выращенной на средах с наличием источников азота (NO^- , NH_4^+) и без них. Выявленные изменения в содержании свободной формы АБК подтвердили адаптивную роль этого гормона в зависимости от условий азотного питания. Максимальная концентрация АБК наблюдалась у голодающих по азоту

растений, а минимальная — в листе растений, получавших нитрат.

* * *

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 03—04—48045).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Блинцов А.Н., Гусаковская М.А., Ермаков И.П. 2000. Об изменении гормонального статуса завязи *Taraxacum officinale* Web. на начальных этапах раннего эмбриогенеза // Биохимия. **65**. Вып. 2. 231—237.
- Дерфлинг К. 1985. Гормоны растений. Системный подход. М.
- Егоров А.М., Осипов А.П., Дзантиев Б.Б., Гаврилова Е.М. 1991. Теория и практика иммуноферментного анализа. М.
- Катаева Н.В., Александрова И.Г., Карягина Т.Б., Машкова А.Х. 1990. Возможности метода иммуноферментного анализа для определения фитогормонов в культивируемых *in vitro* побегах // Физиол. раст. **37**. Вып. 4. 813—621.
- Кефели В.И., Ко Э.М., Власов П.В., Кислин Е.Н. 1989. Природный ингибитор роста — абсцизовая кислота М. 186 с.
- Кудоярова Г.Р., Веселов С.Ю., Каравайко Н.Н., Гюли-заде В.З., Чeredova Е.И., Мустафина А.Р., Мошков И.Е., Кулакова О.Н. 1990. Иммуноферментная тест-система для определения цитокининов // Физиол. раст. **37**. № 1. 193—199.
- Кулакова О.Н. 1973. Цитокинины. Их структура и функции. М.
- Методические рекомендации по определению фитогормонов. 1988. Киев. 169 с.
- Полевая О.Ю., Залинова И.В., Данилова Н.П., Дуранова Л.И., Ковалев И.Б. 1978. Синтез и иммунотропная активность конъюгата холестерина с белком // Хим.-фарм. журн. **12**. № 6. 35—41.
- Dörfling K. 1982. Hormonsystem der Pflanzen. Stuttgart: Georg Thieme. (Translated under the title Hormony rastenii sistemnyi podkhod. M., 1985).
- Milborrow B. V. 1968. Identification and measurement of (+) — abscisic acid in plants // Biochemistry and physiology of plant growth substances / Eds. F. Wightman, H. Setterfield. Ottawa. P. 1531—1545.
- Quarrie S.A., Galfré G. 1985. Use of different hapten-protein conjugates immobilized on nitrocellulose to screen monoclonal antibodies to abscisic acid // An. biochem. **151**. 389—397.
- Weiler E.W. 1982. Immunoassay of plant growth regulators // Ann. Rev. Plant. Physiol. **35**. 85—91.
- Weiler E.W. 1984. An enzym-immunoassay of (+) — abscisic acid // Physiol. plant. **54**. 510—518.

Поступила в редакцию
01.03.04

NEW POSSIBILITY FOR THE DYNAMIC RESEARCH OF ABScisic Acid

*A.N. Blintsov, M.A. Gussakovskaya, T.A. Vlasova,
O.G. Polesskaya, E.I. Kashirina, N.D. Alechina*

Immunochemical investigation of two ELISA systems was carried out. Theese system had different specificity to free and bound ABA. New immunochemical system for monitoring free ABA was suggested. Practical possibility of theese ELISA-systems was demonstrated for the investigation of free and bound ABA dynamic in different plant tissues and organs of *Triticum aestivum* L. and *Taraxacum officinale* Web.