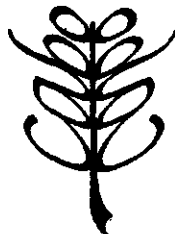


# **Monoklonale antilichamen voor de bepaling van abscissinezuur**

E. Davelaar, C.R. Vonk, P.M. Boonekamp <sup>\*1)</sup> en H. Pomp\*

**CABO-verslag nr. 104**

**Januari 1989**



**Centrum voor Agrobiologisch Onderzoek**

Postbus 14, 6700 AA Wageningen

**\*Laboratorium voor Monoklonale Antistoffen, Wageningen**

**<sup>1)</sup>huidig adres:**

**Laboratorium voor Bloembollenonderzoek,**

**Lisse**

*275980*

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

## INHOUDSOPGAVE

	Pagina
Samenvatting	1
1. Inleiding	3
2. Lijst van gebruikte afkortingen	4
3. Materiaal en Methoden	5
3.1 Antigeen en immunisatie	5
3.2 Produktie monoklonale antilichamen (McAb)	5
3.3 Produktie polyklonale antilichamen (PcAb)	6
3.4 Plantemateriaal	6
3.5 Extractiemethode	6
3.6 Zuivering extracten	7
3.7 Glucosidase-behandeling	7
3.8 Methylering	7
3.9 Enzym-immunologische toets (ELISA)	8
3.10 Radio-immunologische toets (RIA)	8
4. Resultaten en Discussie	9
4.1 Produktie van hybridoma's	9
4.2 Kruisreactiviteit	12
4.3 Gehalte- en opbrengstbepaling van (+)-cis-ABA, na zuivering van irisknopmateriaal	13
4.4 ABA-glucose-ester (ABAGE)	15
4.5 Vergelijking met Phytodetek McAb	16
5. Conclusies	19
6. Referenties	21

## 1. Inleiding

Planteregulatoren, zoals abscissinezuur (ABA), komen in zeer kleine hoeveelheden in de plant voor. Daarom moeten methoden voor de kwantitatieve bepaling van ABA zeer gevoelig en specifiek zijn.

Immunologische toetsen, waarbij gebruik wordt gemaakt van antilichamen tegen de verbinding die moet worden bepaald, voldoen aan deze eisen.

Enzym-immunologische toetsen werden ontwikkeld voor verschillende planteregulatoren, na productie van polyklonale antilichamen (in samenwerking met het Laboratorium voor Bloembollenonderzoek te Lisse).

Polyklonale antilichamen (PcAb) tegen ABA reageren in het algemeen gevoeliger wanneer het ABA (dus in het monster) wordt gemethyleerd. Het methylerings-percentages is echter monster-afhankelijk en dus variabel.

Bij de productie van monoklonale antilichamen (McAb) is het mogelijk te selecteren op de meest geschikte celkloon. In dit geval is getracht een celkloon te isoleren die antilichamen levert, die gevoelig reageren met het vrije (+)-cis-ABA. Bij gebruik van dergelijke antilichamen zal methylering van de monsters niet meer nodig zijn. McAb hebben daarnaast ook nog andere voordelen, die bijdragen aan standaardisering van het toetssysteem, zoals:

1. een monoklonale cellijn kan ongelimiteerd en op ieder moment verder gekweekt worden;
2. een monoklonale cellijn produceert altijd identieke antilichamen.

Van de verkregen antilichamen tegen ABA werd de specificiteit vastgesteld. Voor irisknop- en tulpespruitmateriaal werd de mate van monster-zuivering bepaald die noodzakelijk is voor het verkrijgen van betrouwbare resultaten. Tevens werden de door ons ontwikkelde McAb vergeleken met McAb tegen ABA, die sinds 1987 commercieel verkrijgbaar zijn. Op deze wijze kon een zekere kwaliteitswaarde aan de door ons verkregen McAb worden toegekend.

Het methyleringspercentage werd bepaald via TLC. Een deel van een monster, waaraan  $^{14}\text{C}$ -ABA werd toegevoegd, werd aangebracht op een Silicagel TLC-plaatje. Na chromatograferen met loopmiddel toluen:ethylacetaat:azijnzuur = 80:20:4 werd de radioactiviteit gemeten van de plaatsen met Rf-waarden voor respectievelijk ABA en  $\text{CH}_3$ -ABA.

### 3.9 Enzym-immunologische toets (ELISA)

Het ABA-gehalte werd bepaald volgens de ELISA procedure zoals beschreven voor cytokininen (Vonk et al., 1986). De microtiterplaten werden hiertoe gecoat met (+/-)-cis-ABA/KHLH-conjugaat (10  $\mu\text{g/ml}$  coating-buffer). [(+/-)-cis-ABA werd aan KHLH gekoppeld met de gemengde-anhydridemethode. De uitgangshoeveelheid was 2,5  $\mu\text{mol}$  (+/-)-cis-ABA per 100 mg KHLH].

Voor de bepaling van  $\text{CH}_3$ -ABA werd gebruikt:

PcAb code 24-1-84: 0,1  $\mu\text{g/ml}$

Goat anti rabbit IgG + alk.phosphatase: 4000x verdund.

Voor de bepaling van ABA werd gebruikt:

McAb code  $3\text{G}_4$ : 1500x verdund.

Goat anti mouse IgG + alk.phosphatase: 2000x verdund.

### 3.10 Radio-immunologische toets (RIA)

De activiteit van antilichamen werd met een RIA bepaald overeenkomstig de procedure beschreven door Weiler (1979). In het kort, per scintillatieflesje: 0,5 ml buffer (0,01 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ /0,15 M NaCl pH 7,4)

0,1 ml verdund runderserum

0,1 ml  $^3\text{H}$ -ABA of  $^3\text{H}$ - $\text{CH}_3$ -ABA-oplossing (10 000 dpm, specifieke activiteit 33,2 Ci/mmol)

0,1 ml verdund antiserum

Na mengen en 1 uur incuberen bij kamertemperatuur werd 1,25 ml 90 % verzadigde  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  oplossing toegevoegd. Na 30 minuten staan bij kamertemperatuur werden de flesjes gecentrifugeerd. De pellet werd hierna gewassen met 1 ml 50 % verzadigde  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  oplossing, opnieuw gecentrifugeerd en opgenomen in 0,2 ml water. Na toevoeging van 2,5 ml scintillatievloeistof (Rialuma) werd de radio-activiteit (dpm) in de flesjes gemeten.

## 4. Resultaten en Discussie

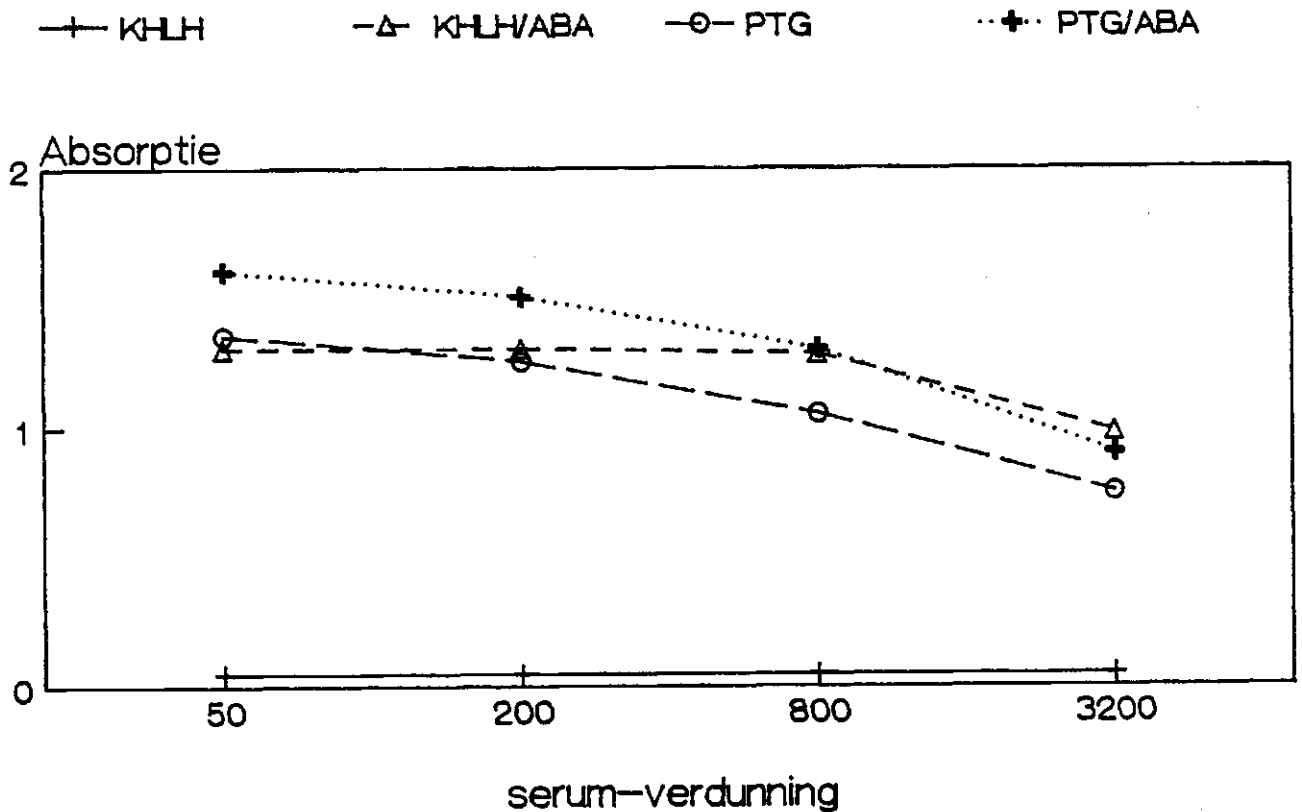
### 4.1 Produktie van hybridoma's

ABA werd gekoppeld aan een eiwit omdat met een klein molecuul, een zogenaamd haptene, in het algemeen geen immunogene reactie wordt verkregen. In de eerste experimenten werd (+/-)-*cis*-ABA/BSA-conjugaat gebruikt voor de immunisatie van muizen. Wanneer hierbij aluin werd gebruikt als adjuvant werd er met behulp van ELISA geen antiserumtiter aangetoond en werden er na fusie geen opgroeiende hybridoma's verkregen. Geen verbetering van de titer en de fusie-frequentie werd waargenomen wanneer het (+/-)-*cis*-ABA/BSA-conjugaat voor de immunisatie werd gecomplexed met glutaaraldehyde. Enige immunogene reactie werd verkregen wanneer het (+/-)-*cis*-ABA/BSA-conjugaat werd opgenomen in "Freund's adjuvant". De titer was echter laag en er was voornamelijk affiniteit voor het dragereiwit BSA.

Het kleine aantal positieve hybridoma's (alleen van de IgM klasse), dat tegen ABA geselecteerd kon worden, geeft aan dat het (+/-)-*cis*-ABA/BSA-conjugaat waarschijnlijk te weinig immunogeen is. Omdat BSA geen geschikte drager bleek te zijn noch voor de ELISA, noch voor de immunisatie, werden er andere dragereiwitten toegepast.

Omdat gebleken is dat voor een ELISA (Vonk et al., 1986) KHLH een goed dragereiwit voor haptene is, werd er voor dit ELISA-systeem gekozen. Daarnaast werd thyroglobuline (PTG) gebruikt als dragereiwit voor de immunisatie. Zoals blijkt uit figuur 1 is (+/-)-*cis*-ABA/PTG zeer immunogeen. Een goede titer werd verkregen tegen het haptene ABA en tegen het dragereiwit PTG. Echter, in het KHLH/ELISA-systeem werden alleen maar antilichamen tegen ABA aangetoond en geen kruisreactie met KHLH. Hieruit blijkt dat bij gebruik van het KHLH/ELISA-systeem PTG zeer geschikt is als dragereiwit voor immunisatie. Daarom werd voor de selectie van hybridoma's voor deze combinatie gekozen. In de eerste experimenten (tabel 1, experiment A) werden hybridoma's geselecteerd met ELISA waarbij de putjes van een microtiterplaat gecoat werden met KHLH alleen of KHLH/ABA. Er werden afhankelijk van het fusie-experiment, celklonen verkregen die sterk positief reageerden met het KHLH/ABA en weinig positief met KHLH alleen. Echter, bij toetsing met de RIA-methode reageerde geen van de positieve klonen van experiment A (tabel 1) met het vrije *cis*-ABA. Dit resultaat geeft aan dat voor de selectie van antilichamen tegen het (+)-*cis*-ABA een ELISA-systeem, waarbij binding aan het ABA-eiwit-conjugaat gemeten wordt, niet de meest geschikte methode is. Daarom werd bij de volgende

experimenten de RIA-methode, waarbij binding aan het vrije *cis*-ABA gemeten wordt, gebruikt als eerste screening van de hybridoma's tegen het (+)-*cis*-ABA. Na fusie-experiment B (tabel 1) konden met de RIA-procedure 95 hybridoma's worden geselecteerd tegen het *cis*-ABA. Deze 95 hybridoma's werden vervolgens met behulp van ELISA gescreend op hun gevoeligheid ten opzichte van (+)-*cis*-ABA en CH<sub>3</sub>-ABA. PcAb tegen *cis*-ABA en andere kleine haptenen reageren in het algemeen gevoeliger wanneer het hapteen wordt gemethyleerd. Het bleek dat sommige McAb dezelfde eigenschap vertonen, namelijk een grotere gevoeligheid voor CH<sub>3</sub>-ABA. Andere McAb reageerden minstens even gevoelig met het ongemethyleerde (+)-*cis*-ABA, de natuurlijk voorkomende vorm van ABA. Van de 95 met de RIA-methode geselecteerde hybridoma's werden na de ELISA-screening 6 klonen geselecteerd op basis van verschil in reacties met CH<sub>3</sub>-ABA en (+)-*cis*-ABA (tabel 2). Na subklonering werd vastgesteld of van deze klonen monoklonale cellijnen werden verkregen.



Figuur 1 Titers van muizenserum na immunisatie met (+/-)-*cis*-ABA/PTG. De titers zijn bepaald met behulp van ELISA. Voor de coating zijn verschillende dragereiwitten met en zonder ABA gebruikt, zoals aangegeven.

Tabel 1

Het aantal hybridoma's verkregen na immunisatie met (+/-)-*cis*-ABA/PTG. De eerste screening werd uitgevoerd met de ELISA- en de RIA-methode.

# Experiment	aantal klonen	aantal positieve klonen in	
		ELISA	RIA
A	400	21	0
B	700	690	95

Tabel 2

Gevoeligheid in ELISA voor gemethyleerd en niet-gemethyleerd ABA van enkele bij experiment B geselecteerde hybridoma's. Het percentage van de Bo waarde werd bepaald na toevoeging van 100 pmol gemethyleerd of 100 pmol niet-gemethyleerd ABA.

Kloon	% Bo (ELISA)		
	(+/-)-CH <sub>3</sub> -ABA	(+/-)- <i>cis</i> -ABA	(+)- <i>cis</i> -ABA
9 <sup>G</sup> 12	20	15	12
3 <sup>G</sup> 4	8	8	5
9 <sup>E</sup> 7	10	7	4
5 <sup>D</sup> 12	12	10	7
3 <sup>B</sup> 11	20	17	14
10 <sup>A</sup> 7	1	90	100



#### 4.2 Kruisreactiviteit

Eerst nadat (+)-*cis*-ABA en (+/-)-ABAGE in 1987 commercieel verkrijgbaar waren, kon van de PcAb en McAb de activiteit tegen deze stoffen worden bepaald. Hierbij bleek (tabel 3) dat de PcAb weinig actief zijn tegen het (+)-*cis*-ABA maar vooral activiteit vertonen tegen het (-)-*cis*-ABA. Het natuurlijk voorkomende (+)-*cis*-ABA kan dus (ook na methyleren) niet of zeer ongevoelig worden bepaald door middel van een ELISA, wanneer gebruik wordt gemaakt van deze PcAb.

Van de McAb konden klonen worden geselecteerd, die alleen de (+)-vorm van *cis*-ABA herkennen. Deze klonen zijn niet gevoeliger voor het (+)-CH<sub>3</sub>-ABA. Bij gebruik van McAb van een dergelijke kloon (code 3G<sub>4</sub>) wordt in een ELISA 50 % van de Bo waarde bereikt met 2,5 pmol (+)-*cis*-ABA. Dus bij gebruik van McAb-3G<sub>4</sub> kunnen lage (+)-*cis*-ABA-concentraties worden bepaald zonder dat de monsters eerst gemethyleerd moeten worden.

Zowel de muizen als de konijnen werden geïmmuniseerd met (+/-)-*cis*-ABA, dat op dezelfde wijze aan een dragereiwit werd gekoppeld. Het is daarom merkwaardig dat de PcAb verkregen uit konijneserum, in tegenstelling tot de McAb (muizen), weinig actief zijn tegen het (+)-*cis*-ABA. Aangezien veel geselecteerde McAb een goede reactie met (+)-*cis*-ABA vertoonden, mag ook verwacht worden dat muize-PcAb hiermee goed zullen reageren. Het lijkt er dus op dat konijn en muis verschillend op de immunisatie met (+/-)-*cis*-ABA reageren. Het mechanisme hierachter kan vooralsnog niet verklaard worden. Waarschijnlijk doordat ABA via de carboxylgroep aan het dragereiwit werd gekoppeld vertonen de McAb kruis-reactiviteit met (+)-ABAGE variërend van 50-400 % ten opzichte van (+)-*cis*-ABA.

Tabel 3

Specificiteit van polyklonale en monoklonale antilichamen weergegeven als percentage kruisreactiviteit in ELISA.

Het percentage kruisreactiviteit wordt berekend als  $100x/y$ , waarbij  $x$  = de hoeveelheid pmol, benodigd voor 50 % van de  $B_0$  waarde en  $y$  = de hoeveelheid pmol van de kruisreactieve verbinding, benodigd voor 50 % van de  $B_0$  waarde ( $x$  tussen haakjes weergegeven).

Verbinding	PcAb	McAb	McAb	McAb
	24-1-84	$3G_4$	$3A_8$	$10A_7$
	(%)	(%)	(%)	(%)
(+)- <i>cis</i> -ABA	0,02	100 (2,5)	100 (20)	0
(+/-)- <i>cis</i> -ABA	5,0	50	50	n.b.*
(+)-CH <sub>3</sub> -ABA	2,5	n.b.	70	2,4
(+/-)-CH <sub>3</sub> -ABA	100 (1)	55	35	100 (0,6)
(+/-)- <i>trans</i> -ABA	n.b.	0,9	n.b.	n.b.
(+/-)-ABAGE	n.b.	130	25	0,6

\* n.b.- niet bepaald

#### 4.3 Gehalte- en opbrengst-bepaling van (+)-*cis*-ABA, na zuivering van irisknopmateriaal

Het (+)-*cis*-ABA-gehalte van irisknoppen werd op twee manieren bepaald. Na geringe zuivering van het extract (alleen via Seppak C18) en na volledige zuivering. Met behulp van dit irisknopmateriaal werd ook, door toevoeging van  $^{14}C$ -(+/-)-*cis*-ABA, het ABA verlies bepaald na zuivering van een monster. Tevens werd het (+)-*cis*-ABA-gehalte bepaald van een monster waaraan een bekende hoeveelheid (+)-*cis*-ABA was toegevoegd.

Uit tabel 4 blijkt dat de hoeveelheid kruisreactieve verbindingen in irisknopmateriaal gering is. Het (+)-*cis*-ABA-gehalte na volledige zuivering komt overeen met het gehalte dat werd gevonden nadat alleen via Seppak-C18 werd gezuiverd. Wanneer het ABA-gehalte werd berekend met (+/-)-*cis*-ABA en (+)-*cis*-ABA als standaard, dan werd met (+/-)-*cis*-ABA een 2x grotere waarde gevonden. Ook hieruit blijkt dat McAb- $3G_4$  alleen het natuurlijk voorkomende (+)-*cis*-ABA herkent.

Het (+)-*cis*-ABA-gehalte komt overeen met de waarden die werden gevonden via gaschromatografie (Vonk & Ribôt, 1982). Na correctie voor het verlies tijdens de zuivering werd het aan een monster toegevoegde (+)-*cis*-ABA volledig teruggevonden.

Tabel 4

Bepaling van het ABA-gehalte van irisknoppen, na geringe en volledige zuivering, met behulp van ELISA (McAb- $_3G_4$ ).

Behandeling	(+)- <i>cis</i> -ABA (ng/knop)	(+/-)- <i>cis</i> -ABA (ng/knop)
extract alleen via Seppak-C18 gezuiverd	67	114
extract volledig gezuiverd*	48	92
extract volledig gezuiverd, gehalte gecorrigeerd voor de hoeveelheid (+)- <i>cis</i> -ABA die werd toegevoegd.	49	

\*Door meting van toegevoegd  $^{14}C$ -(+/-)-*cis*-ABA bleek dat na volledige zuivering 26 % verlies optrad.

De ABA-gehalten zijn voor dit verlies gecorrigeerd.

#### 4.4 ABA-glucose-ester (ABAGE)

Vanwege de kruisreactiviteit (tabel 3) van McAb- $_3G_4$  met (+)-ABAGE werd nagegaan of door middel van zuivering (+)-*cis*-ABA van (+)-ABAGE kon worden gescheiden. Hiertoe werd aan extracten van tulpespruiten (1,5 g) een bekende hoeveelheid (+)-*cis*-ABA of een bekende hoeveelheid (+/-)-ABAGE toegevoegd.

Uit tabel 5 blijkt dat met de beschreven zuiveringsmethode inderdaad ABAGE volledig van (+)-*cis*-ABA kan worden gescheiden. Het (+)-*cis*-ABA-gehalte van het monster waaraan ABAGE werd toegevoegd is gelijk aan het (+)-*cis*-ABA-gehalte van het monster zonder toevoeging. Er vindt dus ook geen afbraak van het ABAGE plaats tijdens de zuiveringsprocedure. Ook werd nagegaan of, na het uitschudden van (+)-*cis*-ABA, in de resterende buffer (na indampen tot  $CH_2Cl_2$ -vrij) het ABAGE direct kan worden bepaald. De gevonden waarden werden vergeleken met een indirecte bepaling van ABAGE. Voor de indirecte bepaling werd de bufferfractie (met (+)-ABAGE) eerst behandeld met glucosidase, waarna het (+)-*cis*-ABA uitgeschud werd en bepaald.

Met de directe bepaling werd gevonden: 250 pmol (+)-ABAGE per gram en met de indirecte bepaling: 100 pmol (+)-ABAGE per gram (als (+)-*cis*-ABA bepaald). Hieruit bleek dat naast de ABAGE-activiteit er ook nog enige andere kruisreactieve of storende activiteit in de buffer-fractie aanwezig was (ca. 150 pmol/g als (+)-ABAGE berekend).

ABAGE kan dus niet rechtstreeks in de bufferfractie worden bepaald. Voor de bepaling van het ABAGE-gehalte moet de bufferfractie eerst met glucosidase behandeld worden, waarna het door deze behandeling ontsane vrije (+)-*cis*-ABA als maat voor het aanwezige (+)-ABAGE gebruikt kan worden.

Tabel 5

Bepaling van het (+)-*cis*-ABA-gehalte van tulpespruiten, met ELISA (McAb-<sub>3</sub>G<sub>4</sub>). De tulpespruitextracten werden gezuiverd met en zonder toevoeging van (+)-*cis*-ABA of (+/-)-ABAGE.

Behandeling	(+)- <i>cis</i> -ABA		hoeveelheid
	<u>in het monster</u>		toevoeging
	totaal	g droog	teruggevonden
	(pmol)	(pmol)	(%)
<hr/>			
monster			
zonder toevoeging	292	255	
monster + 1030 pmol			
(+)- <i>cis</i> -ABA toegevoegd	1070		76
monster + 1040 pmol			
(+/-)-ABAGE toegevoegd	290	253	0

#### 4.5 Vergelijking met Phytodetek McAb

McAb tegen (+)-*cis*-ABA zijn sinds 1987 commercieel verkrijgbaar. Door Ross et al. (1987) werd een ELISA-toets voor (+)-*cis*-ABA beschreven waarbij gebruik wordt gemaakt van Phytodetek McAb.

Deze Phytodetek McAb, die volgens opgave van de leverancier Novo Food Diagnostics niet kruisreactief zijn met (+)-ABAGE, werden gekocht om hiermee de door ons verkregen McAb-<sub>3</sub>G<sub>4</sub> te kunnen vergelijken.

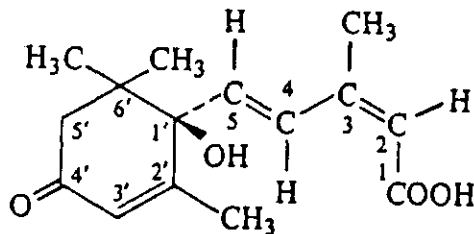
Phytodetek McAb werden geproduceerd na immunisatie met een (+/-)-*cis*-ABA-conjugaat, verkregen door het (+/-)-*cis*-ABA via de C<sub>4</sub>'-plaats (figuur 2) te koppelen aan het dragereiwit.

Bij gebruik van Phytodetek McAb moeten daarom ook de microtiterplaten worden gecoat met een (+/-)-*cis*-ABA-C<sub>4</sub>'-conjugaat. Overeenkomstig de door Ross et al. (1987) beschreven methode werd (+/-)-*cis*-ABA na vorming van een oxim-derivaat gekoppeld aan thyroglobuline en werd als coatingbuffer 6 M guanidine-HCl gebruikt. Tevens werd (+/-)-*cis*-ABA na vorming van een oxim-derivaat gekoppeld aan KHLH en werd als coatingbuffer 0,05 M

carbonaatbuffer gebruikt (zie 3.9).

De microtiterplaten gecoat met thyroglobuline/ABA-oxim-conjugaat werden vergeleken met microtiterplaten gecoat met KHLH/ABA-oxim-conjugaat. Hierbij bleek dat alleen na coating met thyroglobuline/ABA-oxim derivaat, toediening van lage (+)-*cis*-ABA concentraties resulteerde in een niet te verklaren verhoging van de Bo-waarde.

Daarom werd bij gebruik van de Phytodetek McAb het (+)-*cis*-ABA-gehalte bepaald met behulp van microtiterplaten gecoat met KHLH/ABA-oxim-conjugaat.



Figuur 2 Structuurformule van (+)-*cis*-ABA

Nadat werd vastgesteld dat de Phytodetek McAb inderdaad niet kruisreactief zijn met ABAGE werd, met behulp van ELISA, het (+)-*cis*-ABA-gehalte van tulpespruiten bepaald met deze Phytodetek McAb en tevens opnieuw met de door ons verkregen McAb-<sub>3G<sub>4</sub></sub>. Dezelfde monsters werden gebruikt als beschreven bij 4.4 (tabel 5).

Uit tabel 6 blijkt dat met beide McAb, na volledige zuivering, een gelijk (+)-*cis*-ABA-gehalte werd gevonden.

Na gedeeltelijke zuivering (Seppak C18 en PVP) werd bij gebruik van McAb-<sub>3G<sub>4</sub></sub> een te hoog gehalte gevonden, vanwege kruisreactiviteit met ABAGE en een nog onbekende component.

Bij gebruik van Phytodetek McAb liep, na gedeeltelijke zuivering, de verdunningslijn van het monster niet parallel met de (+)-*cis*-ABA-ijklijn. Dit wijst op storende bestanddelen in het gedeeltelijk gezuiverde extract. Hoewel Phytodetek McAb niet reactief zijn met ABAGE moet tulpespruit-

materiaal blijkbaar toch volledig gezuiverd worden om een betrouwbare bepaling van (+)-*cis*-ABA mogelijk te maken.

Tabel 6

Bepaling van het (+)-*cis*-ABA-gehalte van tulpespruiten, met behulp van ELISA met McAb-<sub>3G<sub>4</sub></sub> en met Phytodetek McAb.

Behandeling	McAb- <sub>3G<sub>4</sub></sub> (+)- <i>cis</i> -ABA (pmol/g)	Phytodetek McAb (+)- <i>cis</i> -ABA (pmol/g)
Seppak-C18 + PVP	448	n.t.b.*
volledige zuivering	278	267

\* n.t.b.- niet te berekenen

## 5. Conclusies

- Bij de immunisatie van muizen wordt met een ABA/PTG-conjugaat een veel betere immunogene reactie verkregen dan met een ABA/BSA-conjugaat.
- De eerste screening van de hybridoma's kan het beste worden uitgevoerd met een RIA-methode.
- Na een immunisatie met ABA/PTG moet de screening van hybridoma's met behulp van een KHLH/ELISA-systeem worden uitgevoerd. Er worden dan geen hybridoma's geselecteerd die reageren met het dragereiwit, dat werd gebruikt voor de immunisatie.
- Er werden McAb verkregen, die gevoelig reageren met het natuurlijk voorkomende (+)-cis-ABA. Bij gebruik van deze antilichamen is methylering van de monsters niet meer nodig.
- De verkregen PcAb zijn weinig actief tegen het (+)-cis-ABA, maar vertonen vooral activiteit tegen het (-)-cis-ABA en enige activiteit tegen het (+)-CH<sub>3</sub>-ABA. Het natuurlijk voorkomende (+)-cis-ABA kan dus met behulp van deze PcAb niet worden bepaald.
- Waarschijnlijk doordat ABA via de carboxylgroep aan het dragereiwit werd gekoppeld (voor de immunisatie) vertonen de door ons verkregen McAb kruisreactiviteit met (+)-ABAGE.
- Met de beschreven zuiveringsmethode is (+)-ABAGE volledig van (+)-cis-ABA te scheiden. Na de volledige zuivering wordt ongeveer 75 % van het (+)-cis-ABA teruggevonden.
- Voor de bepaling van het (+)-cis-ABA-gehalte van tulpespruitmateriaal moet zowel bij gebruik van McAb-<sub>3</sub>G<sub>4</sub> als bij gebruik van Phytodetek McAb de beschreven zuiveringsmethode volledig worden uitgevoerd.
- Na de volledige zuiveringsprocedure werd met de door ons verkregen McAb-<sub>3</sub>G<sub>4</sub> en met de gekochte Phytodetek McAb een gelijk (+)-cis-ABA-gehalte gevonden in tulpespruitmateriaal.



- Carboxylderivaten van ABA worden niet door het Phytodetek McAb herkend (voor de immunisatie werd ABA via de C<sub>4</sub>'-plaats gekoppeld aan het dragereiwit) en het mag verwacht worden dat eventuele C<sub>4</sub>'-derivaten van ABA niet herkend worden door ons McAb-<sub>3</sub>G<sub>4</sub> (voor de immunisatie werd ABA via de carboxylgroep gekoppeld aan het dragereiwit). Wanneer van plantaardig materiaal nog niet eerder met McAb-<sub>3</sub>G<sub>4</sub> het (+)-cis-ABA-gehalte werd bepaald, verdient het aanbeveling met hetzelfde materiaal ook met Phytodetek McAb een (+)-cis-ABA-bepaling uit te voeren. Wanneer de waarden van beide bepalingen overeenstemmen dan kan het McAb-<sub>3</sub>G<sub>4</sub> gebruikt worden voor een zeer betrouwbare bepaling van (+)-cis-ABA.

## 6. Referenties

- De Ley, L., S. Poppema & T.H. The, 1983. Cryopreservation of newly formed hybridomas. *Journal of Immunological Methods* 62, 73-78.
- Foung, S.K.H., D.T. Sasaki, F.C. Grumet & E.G. Engleman, 1982. Production of functional human T-T hybridomas in selection medium lacking aminopterin and thymidine. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 79, 7484-7488.
- Goding, J.W., 1983. *Monoclonal antibodies; principles and practice*. Academic Press NY & London, pp.45-85.
- Hurn, B.A.L. & S.M. Chantler, 1980. Production of reagent antibodies. In: *Methods in Enzymology* 70, 104-142.
- Ross, G.S., P.A. Elder, J.A. McWha, D. Pearce & R.P. Pharis, 1987. The development of an indirect enzyme linked immunoassay for abscisic acid. *Plant Physiology* 85, 46-50.
- Vonk, C.R. & S.A. Ribôt, 1982. Assimilate distribution and the role of abscisic acid and zeatin in relation to flower bud blasting, induced by lack of light, in *Iris cv Ideal*. *Plant Growth Regulation* 1, 93-105.
- Vonk, C.R., E. Davelaar & S.A. Ribôt, 1986. The role of cytokinins in relation to flower-bud blasting in *Iris cv. Ideal*: Cytokinin determination by an improved enzyme-linked immunosorbent assay. *Plant Growth Regulation* 4, 65-74.
- Weiler, E.W., 1979. Radioimmunoassay for the determination of free and conjugated abscisic acid. *Planta* 144, 255-263.
- Weiler, E.W., 1982. An enzyme-immunoassay for cis-(+)-abscisic acid. *Physiologia Plantarum* 54, 510-514.