

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学号: 21620071152016

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

甜菊苷单克隆抗体的制备及 ELISA 检测方法的建立

Preparation of Monoclonal Antibody against Stevioside
And Development of ELISA Method for Stevioside

易红飞

指导教师姓名: 徐金森 副 教 授

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2010 年 6 月

论文答辩日期: 2010 年 7 月

学位授予日期: 2010 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2010 年 7 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名): 易红飞

2010年7月20日



厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

() 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 2012年 3 月 1 日解密，解密后适用上述授权。

() 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）： 易红飞

2010年 7月20日

目录

摘要.....	1
Abstract.....	2
第一章 前言.....	4
1 甜菊苷的研究概况.....	4
1.1 甜叶菊的起源及其生长特性.....	4
1.2 甜叶菊甜味成分的种类和结构.....	5
1.3 甜菊苷的性质和特点.....	6
1.4 甜菊苷的应用和安全性研究进展.....	7
1.5 甜菊苷的定量分析方法.....	8
2 单克隆抗体技术.....	11
2.1 单克隆抗体技术的基本原理.....	11
2.2 单克隆抗体技术的优点.....	11
3. ELISA 技术.....	11
3.1 ELISA 的实验原理和类型.....	12
3.2 ELISA 的主要试剂和材料.....	13
3.3 ELISA 常见问题及其解决策略.....	13
4. 研究的意义及内容.....	14
第二章 材料与amp;方法.....	17
1 材料.....	17
1.1 主要仪器.....	17
1.2 主要试剂与材料.....	18
1.3 常用溶液和培养基的配制.....	20
2 实验方法.....	22
2.1 人工抗原的合成与鉴定.....	22
2.2 人工抗原ST-HSA的动物免疫.....	23

2.3 抗 ST 单克隆抗体生产流程.....	26
2.4 抗 ST 单克隆抗体的特性鉴定.....	31
2.5 ELISA/HPLC 法测定甜菊叶中 ST 含量.....	35
第三章 结果与分析.....	37
1 ST-载体蛋白偶联效果鉴定.....	37
1.1 MALDI-TOF MS 测定 ST-HSA 和 ST-BSA 半抗原数.....	37
1.2 ST-HSA 和 ST-BSA 人工合成产率.....	40
2 Bal b/C 小鼠免疫效果.....	40
2.1 免疫过程中小鼠血清效价检测.....	41
2.2 融合前小鼠血清效价.....	41
2.3 小鼠血清特异性分析.....	41
3 杂交瘤细胞株的建立.....	42
3.1 Sp2/0 骨髓瘤细胞的准备.....	42
3.2 细胞融合的结果.....	43
3.3 阳性杂交瘤细胞的筛选、克隆化及建株.....	43
3.4 抗 ST 单克隆抗体的大量生产与鉴定.....	44
4 抗 ST 单克隆抗体的性质鉴定.....	46
4.1 抗 ST MA b 效价检测.....	46
4.2 抗 ST MA b 的灵敏度和亲和常数测定.....	46
4.3 抗 ST MA b 的特异性分析.....	47
5 竞争 ELISA 和 HPLC 测定 ST 含量结果.....	49
5.1 甜菊叶的含水量测定结果.....	49

5.2 ELISA 测定甜菊叶提取液中 ST 含量.....	49
5.3 HPLC 测定甜菊叶提取液中 ST 含量.....	49
5.4 各甜菊叶提取液 HPLC 和 ELISA 测定结果比较.....	51
总结.....	55
参考文献.....	56

厦门大学博硕士论文摘要库

Contents

Abstract (in Chinese)	1
Abstract (in English)	2
Chapter 1. Preface	4
1 Actuality of Stevioside study	4
1.1 The origin and growth characteristics of <i>Stievia rebaudiana</i>	4
1.2 The varieties and structure of sweet compositions in <i>Stievia rebaudiana</i>	5
1.3 The properties and characteristics of Stevioside.....	6
1.4 The application and research progress in safety of Stevioside.....	7
1.5 The quantitative analysis method of Stevioside.....	8
2 Monoclonal antibody technique	11
2.1 The basic principle of monoclonal antibody technique.....	11
2.2 The advantages of monoclonal antibodies technique	11
3 ELISA technique	11
3.1 The principle and varieties of ELISA experiment.....	12
3.2 The main reagents and materials of ELISA.....	13
3.3 The common problems and the solutions of ELISA.....	13
Chapter 2. Materials and methods	17
1 Materials	17
1.1 Main apparatus.....	17
1.2 Main reagents and materials.....	18
1.3 The preparation of solutions and culture mediums.....	20
2 Methods	22
2.1 The synthesis and determination of the artificial antigens.....	22
2.2 Immunization with ST-HSA.....	23
2.3 The preparation of anti-ST MAb.....	26
2.4 Characteristics determination of the anti-ST MAb.....	31
2.5 Quantification of ST by ELISA and HPLC.....	35

Chapter 3. Results and analysis.....	37
1 Determination of ST-carrier conjugates.....	37
1.1 Determination of hapten number of ST-HSA by MALDI-TOF MS.....	37
1.2 The synthesis rate of ST-HSA.....	40
2 Immune effects of the Bal b/C mice.....	40
2.1 Antibody titres in mouse after immunization.....	41
2.2 The detection of titres of antiserum before fusion of cells.....	41
2.3 Specificity of the antiserum.....	41
3 Establishment of hydromas producing anti-ST MAb.....	42
3.1 Preparation of Sp2/0.....	42
3.2 The result of cells fusion.....	43
3.3 Selection and ELISA screening of hybridomas.....	43
3.4 Large-scale produce and determination of MAb.....	44
4 Characteristics of anti-ST MAb.....	46
4.1 Titres determination of the anti-ST MAb.....	46
4.2 Assay sensitivity and affinity of the anti-ST MAb.....	46
4.3 Assay specificity of the anti-ST MAb.....	47
5 The results of quantifying ST by competitive ELISA and HPLC.....	49
5.1 The results of testing water content of Stevia rebaudiana.....	49
5.2 Quantification of ST by competitive ELISA.....	49
5.3 Quantification of ST by HPLC.....	49
5.4 Comparison between competitive ELISA and HPLC.....	51
Conclusions.....	55
References.....	56

摘 要

甜菊苷(stevioside, ST)为甜叶菊中所含的主要甜味成分, 是理想的高甜度、低热量, 对糖尿病和高血糖脂有很好疗效的一种新型高安全性甜味剂, 也可作为一些药品的品位改良剂和矫味剂, 从而广泛应用于食品和药物。目前, 甜菊叶中甜菊苷的提取工艺已经日趋成熟, 然而甜菊苷的准确含量的检测方法主要是使用HPLC, 还存在不足之处, 因此, 建立简单, 快速, 准确的甜菊苷定量方法对于甜菊苷的生产和应用都具有极其重要的意义。

本研究利用高碘酸钠法将甜菊苷(ST)分别与人血清白蛋白(HSA)和牛血清白蛋白(BSA)进行偶联, 成功制备了免疫抗原和包被抗原, 经MALDI-TOF MS 鉴定得 HSA, BSA 上分别挂 13, 8 个 ST。采用常规免疫和加强免疫相结合的方法, 免疫 Bal b/C 小鼠。将免疫后的血清效价达到 1: 16000 以上的 Bal b/C 小鼠取脾细胞与 Sp2/0 细胞融合、筛选和克隆化, 获得一株能稳定分泌抗 ST 的单克隆抗体杂交瘤细胞。将杂交瘤细胞注入小鼠腹腔诱生腹水, 以 Protein G 亲和层析柱分离纯化单克隆抗体。所制备的单克隆抗体的性质测定结果显示: ST 标准品对所制备的抗体的半数抑制率(IC₅₀)为 3.77 ng/mL; 单抗与 Rebaudioside A 的交叉反应率为 7.30%, 与其它结构类似物不存在交叉反应; 亲和常数为 6.86×10^{-12} mol/L, 属于高亲和力抗体。将单抗应用于建立 ST 的间接竞争 ELISA 检测方法, 检测条件优化后, 获得了以 ST 浓度梯度和各自的反应 OD 值拟合出的标准曲线, 其回归方程为 $y=0.80354367-0.21894619\ln x$, 相关系数 r 为 0.992。对 24 个甜菊叶提取液样品中 ST 含量进行检测, 检测结果与 HPLC 法检测结果基本一致。本研究表明所制备的 ST 单克隆抗体应用到 ST 定量检测中具有切实可行性, 可为建立分析快速的 ST 检测方法提供参考。

关键词: 甜菊苷; 单克隆抗体; 间接竞争酶联免疫吸附分析

Abstract

Stevioside, as the major sweet ingredient of *Stevia rebaudiana*, is a new kind of natural high sweetness, low-calorie and high safety sweetener, which has physiological functions including anti-hyperglycemia and anti-diabetes. It's also can be used as improving the tastes of medicine. Its stable chemical and physical properties and non-fermentability lead to long shelf life and widely using in food and medicine. Currently, the extractive technique of stevioside is increasingly perfect, but the techniques used to quantify the content of stevioside have not been developed well, and we mainly use HPLC, which has its own defect. So it's significant to develop a simple, rapid and accurate determination method applied in production and application of stevioside.

This work mainly includes: ST was conjugated to HSA and BSA by the sodium periodates oxidation method respectively, so that immune antigen and coating antigen were successively obtained; The hapten number of each was determined to be thirteen and eight, respectively, by MALDI-TOF MS; The Bal b/C mice were immunized with artificial ST-HSA; Spleen cells from the immunized mouse were fused with cells Sp2/0 by routine method; The positive cell lines that secrete anti-ST MAb were selected by ELISA; After three times cloning, one hybridoma cell line was obtained; The obtained hybridoma cells were injected into mice's abdominal cavity to induce the production of anti-ST MAb, which was then purified by protein G; Through testing, we have known the characteristics of the anti-ST MAb as follows: The IC₅₀ (the half inhibition rate) for anti-ST MAb was 3.77 ng/mL; The cross-reactivity ratio of anti-ST MAb against rebaudioside A is 7.30%, and there were no cross reactions between the anti-ST MAb and other several selected ST chemical analogs; The affinity constant of anti-ST MAb was 6.86×10^{-12} mol/L, showing its high affinity. Finally, indirect competitive ELISA method was established to quantify ST from 24 samples of extracting solution from *Stevia rebaudiana*. After optimizing the testing conditions, we established the standard curve between concentration gradients of ST and their OD, and the linear equation was $y=0.80354367-0.21894619\ln x$, the

correlation coefficient was 0.992. The results of the ELISA and HPLC detection were in high agreement. This indicated that the anti-ST MAb could be used in the testing of concentration of ST effectively by indirect competitive ELISA, and provided the reference of establishing a rapid method to quantify ST.

Key Words:

Stevioside; Monoclonal Antibody; Indirect Competitive ELISA

厦门大学博硕士学位论文摘要库

第一章 前言

1 甜菊苷的研究概况

甜叶菊 (*Stevia rebaudiana* (Bertoni) Hemsl.), 又名“甜菊”、“甜草”, 原产南美, 属菊属菊科多年生草本植物 (见图 1-1), 含 154 种以上, 但具有甜味的仅甜叶菊一种^[1]。四百年前, 南美居民将就将甜菊提取物用作甜味剂和传统药物^[2]。甜菊苷 (stevioside, 简称 ST) 是甜叶菊的主要甜味成份, 具有高甜度、低热量、无毒、无副作用等特点, 同时具有一定的药理作用, 对高血压、糖尿病、肥胖症、冠心病、小儿龋齿等病症有很好疗效^[3]。甜菊苷是一种安全的食品甜味剂, 已经被 FDA 批准使用, 国内外大量毒理学实验结果表明, 甜菊苷摄入人体后原形经粪便和尿液排出, 无致畸形、致突变、致癌性, 且不被细菌代谢, 是目前国内外公认的可替代蔗糖的理想的健康新糖源, 现已广泛应用于保健、低热值食品和医药工业中^[4]。



图 1-1 甜叶菊和干燥的甜菊叶

Fig.1-1 *Stevia rebaudiana* Bertoni and its dry leaves

1.1 甜叶菊的起源及其生长特性

甜叶菊原产于巴拉圭的 Amambay 及 Mbarcayu 山脉, 土壤条件是古代水成岩及火成岩的风化土壤^[5]。呈现出明显的局部特异性土壤分布, 多含沙壤土和腐质土, 肥力较差。气候条件因地势及地形的原因, 降雨量较多, 温差较大, 且有霜降现象, 可认为近似温带气候, 整个生长温度都在 20℃ 以上。甜叶菊具有喜

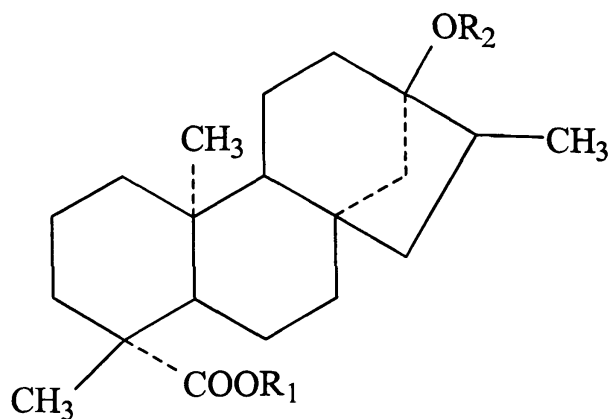
温性，种子萌发的最适温度为 20-25℃，营养生长期温度也要求 22℃ 以上，开花的最适温度为 18-22℃。甜叶菊属感光性强的短日照植物，临界夜长大于 12h。长日照反应期分别在现蕾前 13-14d 和开花前 26-30d，此阶段为花芽形成诱导期。此时期需具备少于 12h 的短日照才能正常开花，所以短日照是甜叶菊由营养生长转到生殖生长的关键^[6]。

甜叶菊作为糖料植物，早在第二次世界大战时就曾引起国际重视。1955 年，人们进行了人工苗圃栽培试验，1964 年巴拉圭开始甜叶菊的大田移植驯化并取得了很大成功。1970 年日本从巴西引进甜叶菊，开始驯化、栽培、制苷，同时进行毒理、食品检测等试验，并首先开发利用甜叶菊产品 - 甜菊苷。不久，甜菊苷的栽培成功地推广到亚洲的其他一些国家，包括中国、马来西亚、韩国、中国台湾和泰国，在美国、加拿大和欧洲也引种成功^[7]。

1.2 甜叶菊甜味成分的种类和结构

人们已经从甜叶菊叶片中分离得到至少 8 种糖苷，它们的含量往往因种植环境及其基因型而异^[8]。含量高、且有经济价值的糖甙体有 ST、Rebaudioside A (简称 RA)、Rebaudioside C、Rebaudioside D 四种^[9]。甜叶菊糖苷在植物中叶片中约 10%，其中甜菊苷占有所有糖苷的 60%-70%，其甜度为 10%蔗糖的 300 倍；其次是莱包迪苷 A，占有所有糖苷的 15%-20%，甜度为 10%蔗糖的 450 倍，且甜味最接近蔗糖，其他组分含量都较少^[10]。

至今的研究表明，甜菊中的甜味物质均属甙类。甙 (glycoside) 又成苷或配糖体、杂糖体、是糖或糖的衍生物与另一非糖化合物，通过糖的端基碳原子连接缩合而成的化合物。甙水解后生成糖和非糖两部分，其非糖部分成为甙元或配基、配糖基 (aglycone)，为四环二萜类物。甜菊糖苷核心结构通式为 (C₅H₈)，即贝壳杉烯 (ent-aurene)，在 C-19 和 C-13 位上分别连接不同数量的葡萄糖基以及鼠李糖基而形成不同甜度和甜味的甜菊糖苷^[11] (图 1-2)。。



名称 compound name	R1	R2
1 甜菊醇 Steviol	H	H
2 甜菊单苷 Steviolmonoside	H	β -Glc
3 甜茶苷 A Rubucoside A	β -Glc	β -Glc
4 甜菊双苷 Steviobioside	H	β -Glc- β -Glc (2-1)
5 甜菊苷 Stevioside	β -Glc	β -Glc- β -Glc (2-1)
6 莱包迪苷 A(rebaudioside A)	β -Glc	β -Glc (β -Glc (3-1)) - β -Glc (2-1)
7 莱包迪苷 B(rebaudioside B)	H	β -Glc (β -Glc (3-1)) - β -Glc (2-1)
8 莱包迪苷 C(rebaudioside C)	β -Glc	β -Glc (β -Glc (3-1)) - α -Glc (2-1)
9 莱包迪苷 D(rebaudioside D)	β -Glc- β -Glc (2-1)	β -Glc (β -Glc (3-1)) - β -Glc (2-1)
10 莱包迪苷 E(rebaudioside E)	β -Glc- β -Glc (2-1)	β -Glc- β -Glc (2-1)
11 莱包迪苷 F(rebaudioside F)	β -Glc	β -Glc (β -Glc (3-1)) - β -Glc (2-1)
12 杜尔可苷 A(Dulcoside A)	β -Glc	β -Glc- β -Glc (2-1)

图 1-2 甜菊醇和甜菊糖苷化学结构

Fig.1-2 Chemical structure of steviol and steviol glycosides

1.3 甜菊苷的性质和特点^[12]

1931 年法国化学家 Bridel 和 Lavielle 第一次从甜叶菊中提取结晶的纯甜味物质，其分子式为 $C_{38}H_{60}O_{18}$ ，分子量为 804.9，结构为图 1-2 所示。甜菊苷常态下为白色或微黄色松散粉末或结晶，常温下稳定，热量仅为蔗糖的三分之一。

1.3.1 甜度与风味性质

甜菊苷甜度约为 10%蔗糖的 300 倍，味感与蔗糖相似，甜味纯正，无异味，

单残味存留的时间比蔗糖长，同其它甜味剂一样，甜菊苷随着浓度的增大，其甜度有所下降，且微带苦味，甜菊苷在冷饮中比同浓度的甜菊苷在热饮料中的甜度高。甜菊苷与蔗糖异构化糖浆混合使用时，可以充分发挥糖的甜味；有机酸（如苹果酸、酒石酸、谷氨酸、甘氨酸）及其盐混合使用可改善甜味质量，在食盐存在下，甜菊苷的甜度倍数有所提高。

1.3.2 耐热性

甜菊苷有较好的耐热性，在 95℃ 以下加热 2 小时甜味不变；在 pH 值为 2.5-3.5 之间，甜菊苷浓度为 0.05% 时，80°-100℃ 加热 1 小时，甜菊苷残存率为 90% 左右；在 pH 值为 3.0-4.0 之间，其浓度为 0.013% 时，室温保存六个月，其残存率为 90% 左右，在玻璃容器中的 0.1% 甜菊苷溶液，经日光暴晒七个月，残存率在 90% 以上。

甜菊苷还有较好的耐盐性，无褐变性，不被微生物同化和发酵的特点。

1.3.3 溶解性

甜菊苷可溶于水和乙醇等，不溶于苯、醚等有机溶剂。其精制程度越高，在水中溶解速度越慢。室温时在水中溶解度为 0.12% 左右。市售品由于掺杂了其它的糖、糖醇和其它甜味剂，其溶解度有很大差异，且易吸潮。

1.3.4 抑菌性

甜菊苷不被微生物同化和发酵，使其具有抗菌作用，这使其正广泛地应用于医药工业。这一性质可延长甜菊苷制品的保质期。

1.4 甜菊苷的应用和安全性研究进展

由于甜菊苷较好的风味性质及高甜度、高稳定性，高安全性，决定其广泛的应用于诸多领域。但由于有些国家和地区禁售含甜菊糖苷的食品，其安全性问题引起了国家相关部门和消费者的广泛关注。

1.4.1 甜菊苷应用于食品工业^[13]

在食品工业中，甜菊苷广泛应用于饮料中，如汽水、酒、果酒等，其味感较好，可改善砂糖、果糖、山梨糖等甜味，由于其热能仅为蔗糖的 1/3，属低热能型甜味剂，可将其用于糖尿病人和肥胖人群的健康型饮料中；面包，糕点，油炸食品等也使用甜菊苷；香肠，火腿等肉制品也可用甜菊苷作为甜味剂；甜菊苷还能用来腌制果蔬，使其不发生收缩，能较好地保持果蔬的原状。

1.4.2 甜菊苷应用于医药工业^[10]

在医药工业上,它可作为矫口剂应用于糖浆剂、散剂,片剂等制作上。甜菊苷在人体内不参与生理、生化反应作用,还具有某种程度的抑制细菌和防腐的作用,安全性好。用其生产的制剂,不仅可供一般病人服用,而且患有糖尿病、肾盂肾虚、高血压病以及肥胖的人也能服用。如果在罗布麻中加入甜菊苷,对高血压病人的降压作用更为显著。甜菊苷还可以降低成本。在体液制剂中,它的用量一般为 0.6%-0.8%,其价格为同甜度蔗糖的 1/3 左右,所以应当大力提倡在非用糖尿病而又使用蔗糖的制剂中使用甜菊苷,来替代所使用的蔗糖^[14]。甜菊苷还可作为新陈代谢促进剂,减肥剂,强壮剂及治疗胃酸过多症。有文献报道^[10],甜菊苷还用于抗高血压、抗炎症、抗癌变和抗腹泻的治疗。

1.4.3 甜菊苷应用于其它领域

由于甜菊苷不被微生物利用,故可用于保健品,如作为防龋齿型甜味剂添加到泡泡糖中。甜菊苷也可应用于口腔护理中,生产工艺简单,在水中的溶解性能好,通过高速搅拌,能保证甜味剂均匀分散在整个牙膏和漱口水体系中。甜菊苷以其性质稳定,不易霉变且利于抑制细菌生长,在牙膏和漱口水产品中与其它组分均获得了良好的配伍性,能保证口腔护理品在贮存期内保持良好的稳定性。甜菊苷以其清新甜醇的口感,掩盖牙膏和漱口水组分中其它成份的不良味道,赋予料体优良甜醇的口感,使香气更清新^[15]。

1.4.4 甜菊苷的安全性研究

在甜菊苷代谢方面的研究显示,甜菊苷在上消化道不被吸收,而在消化道下段被盲肠内微生物分解成甜菊醇,并被完全吸收,后由胆汁排泄,存在肝肠循环,最终绝大部分由尿液排泄^[16]。

大量的动物实验未发现甜菊糖苷的急性、短期及遗传毒性,无致癌、促癌作用,对生长繁殖、胎鼠发育亦无明显影响,而且在南美、日本等地有长期的食用传统,是一种较为安全的天然甜味剂^[17]。甜菊苷的安全性已得到国际 FAO 和 WHO 等组织的认可^[3],我国卫生部自 1985 年和 1990 年分别批准甜叶菊糖苷为不限量使用的天然甜味剂和医药用甜味剂辅料^[18]。

1.5 甜菊苷的定量分析方法

1.5.1 重量法

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士学位论文摘要库