

学校编码: 10384

分类号 \_\_\_\_\_ 密级 \_\_\_\_\_

学号: 21620071151954

UDC \_\_\_\_\_

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

莱包迪苷 A 的单克隆抗体制备及免疫法测定

Preparation of Monoclonal Antibody against Rebaudioside A and Its  
Immunoassay Application

潘金铃

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 9 月

答辩委员会主席: 陈清西 教授

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2010 年 7 月

## 厦门大学学位论文原创性声明

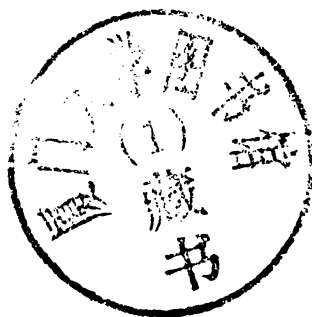
本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为(植物细胞)课题(组)的研究成果,获得(该)课题(组)经费或实验室的资助,在(徐金森副教授)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。)

潘金铃

声明人(签名): 潘金铃

2010年 6月 21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2017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）：潘金铃

2010年 6 月 2日

## 目录

摘要.....	1
Abstract .....	2
<b>第一章 前言</b>	
<b>1 甜菊的介绍和研究现状.....</b>	<b>4</b>
1.1 甜菊和甜菊叶的形态特征.....	4
1.2 甜菊的化学成分.....	5
1.3 甜菊和甜菊糖苷的应用.....	8
<b>2 单克隆抗体技术及 ELISA 技术概述.....</b>	<b>11</b>
2.1 单克隆抗体技术的原理.....	11
2.2 ELISA 技术的原理.....	11
<b>3 研究目的和内容.....</b>	<b>13</b>
3.1 研究的目的意义.....	13
3.2 研究的具体内容.....	14
<b>第二章 材料与amp;方法</b>	
<b>1 材料.....</b>	<b>15</b>
1.1 主要仪器.....	15
1.2 细胞株与实验动物.....	16
1.3 实验药品与试剂.....	16
1.4 其他耗材.....	17
1.5 常用溶液和培养基的配置.....	17
<b>2 实验方法.....</b>	<b>19</b>
2.1 高碘酸钠法合成 RA-OVA 和 RA-HSA.....	19
2.2 人工抗原的 MALDI-TOF MS 测定.....	19
2.3 动物免疫.....	20
2.4 单克隆抗体的制备.....	21
2.5 单抗的 SDS-PAGE 鉴定.....	26

2.6 单抗的 MALDI-TOF-MS 鉴定.....	26
2.7 单抗的性质鉴定.....	26
2.8 ELISA/HPLC 法测定甜菊叶中 RA 的含量.....	27

### 第三章 结果与分析

1 人工抗原合成的效果与分析 (MALDI-TOF MS) .....	29
2 免疫小鼠抗血清的效价检测.....	32
3 单抗杂交瘤细胞株的建立.....	33
3.1 细胞融合效果的观察 .....	33
3.2 杂交瘤细胞单克隆的挑选.....	34
4 腹水制备及抗体纯化的结果.....	35
4.1 腹水抗体纯化的结果.....	35
4.2 抗体的 MALDI-TOF-MS 鉴定.....	36
4.3 腹水和抗体的 SDS-PAGE 鉴定.....	36
5 抗体的性质鉴定 .....	37
5.1 抗体的敏感度与亲和常数测定.....	37
5.2 抗体的特异性测定.....	39
6 甜菊叶中 RA 含量测定 (ELISA 法和 HPLC 法) .....	40
6.1 甜菊叶样品的含水量测定 .....	40
6.2 HPLC 法测定甜菊叶样品中 RA 含量 .....	41
6.3 间接竞争 ELISA 法测定甜菊叶样品中 RA 的含量.....	43

总结 .....	45
----------	----

参考文献 .....	46
------------	----

致谢 .....	50
----------	----

## Contents

<b>Abstract( in Chinese)</b> .....	<b>1</b>
<b>Abstract(in English)</b> .....	<b>2</b>
<b>Chapter 1. Preface</b>	
<b>1 Introduction and actuality of stevia study</b> .....	<b>4</b>
1.1 Characteristics of <i>Stevia Rebaudiana</i> and its leaf .....	4
1.2 Chemical compositions of <i>Stevia Rebaudiana</i> .....	5
1.3 Applications of stevia and its sweeteners .....	8
<b>2 Introduction of MAb and ELISA techniques</b> .....	<b>11</b>
2.1 The principle of preparation of MAb technique.....	11
2.2 The principle of ELISA technique .....	11
<b>3 The aim and content of this work</b> .....	<b>13</b>
3.1 The aim and potentiality of this work .....	13
3.2 The content of this work.....	14
<b>Chapter 2. Materials and Methods</b>	
<b>1 Materials</b> .....	<b>15</b>
1.1 Apparatus.....	15
1.2 Cells and animals.....	16
1.3 Reagents and other chemicals .....	16
1.4 Other materials.....	17
1.3 The preparation of solutions .....	17
<b>2 Methods</b> .....	<b>19</b>
2.1 The synthesis of RA-OVA and RA-HSA.....	19
2.2 The MALDI-TOF-MS determination of antigens.....	19
2.3 Immunization.....	20
2.4 The preparation of anti-RAMAb.....	21
2.5 SDS-PAGE determination of the anti-RA MAb.....	26
2.6 MALDI-TOF-MS determination of the anti-RA MAb.....	26

2.7 Characteristics of the anti-RA MAb.....	26
2.8 Quantification of RA by ELISA and HPLC.....	27
<b>Chapter 3. Results and Analysis</b>	
<b>1 Determination of RA-carrier conjugates (MALDI-TOF MS) .....</b>	<b>29</b>
<b>2 Immune effects of the Balb/c mice.....</b>	<b>32</b>
<b>3 Establishment of hybridomas producing anti-RA MAb.....</b>	<b>33</b>
3.1 Picture of the fusion cell.....	33
3.2 Selection of the hybridomas.....	34
<b>4 Large-scale produce and determination of the MAb.....</b>	<b>35</b>
4.1 Results of the purified antibody.....	35
4.2 Determination of the antibody by MALDI-TOF-MS.....	36
4.3 Determination of the antibody by SDS-PAGE.....	36
<b>5 Characteristics of the anti-RA MAb.....</b>	<b>37</b>
5.1 Assay sensitivity and affinity of the MAb.....	37
5.2 Assay specificity of the MAb.....	39
<b>6 Assay the RA content in the stevia leaf (ELISA and HPLC) .....</b>	<b>40</b>
6.1 Quantification of water in the stevia.....	40
6.2 Quantification of RA by HPLC.....	41
6.3 Quantification of RA by competitive ELISA.....	43
<b>Conclusions .....</b>	<b>45</b>
<b>References .....</b>	<b>46</b>
<b>Acknowledgement.....</b>	<b>50</b>

## 摘要

甜菊 (*Stevia rebaudiana* (Bertoni) Hemsl.) 是一种具有商业前景的甜味剂。甜菊苷 (Stevioside, ST) 和莱包迪苷 A (Rebaudioside A, RA) 是甜菊提取物中最主要的两种物质, 其中 RA 具有许多的优点, 譬如口感好, 甜度高, 稳定性强, 无毒副作用等。因此 RA 更加适合用于食品饮料药物中。

本研究的目的是通过制备莱包迪苷 A 的单克隆抗体, 从而尝试建立以此为基础的酶联免疫测定 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 方法, 对甜菊叶中的 RA 进行定量分析。

首先采用高碘酸钠法合成人工抗原 RA-HSA、RA-OVA。通过 MAIDI-TOF MS 对偶联物进行鉴定, 其半抗原数分别为 19 和 11。再用聚乙二醇法 (PEG 1450) 将 RA-HSA 免疫的 Balb/c 小鼠脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞系 SP2/0 融合形成杂交瘤细胞。通过 HAT 培养基筛选和有限稀释克隆化及 ELISA 检测, 最终获得能稳定分泌抗 RA 单克隆抗体的杂交瘤细胞。

其次, 利用小鼠腹腔注射以诱导生产含有大量目的单抗的腹水, 所得含单抗腹水经蛋白质 G 亲和柱纯化, SDS-PAGE 和 MALDI-TOF MS 检测, MAb 纯度很高。通过 ELISA 法对抗体的特性进行测定, 腹水抗体效价可达 1: 256000; MAb 的敏感度为 0.069  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 亲和常数  $K=4.81\times 10^{-8}$  mol/L; 所得 MAb 具有高度特异性, 和其他几种结构类似物几乎不发生交叉反应 (ST 除外, 由于 ST 特殊的结构, 其交叉反应率达到 33%)。

最后, 将抗 RA 的 MAb 应用于 ELISA 分析, 建立了直接定量测定甜菊叶样品 RA 含量的免疫测定方法。结果显示样品的竞争性 ELISA 检测结果与 HPLC 的检测结果基本一致, 且竞争 ELISA 比 HPLC 法的灵敏度高很多。

关键词: 甜菊; 莱包迪苷 A; 单克隆抗体; ELISA



## Abstract

*Stevia* (*Stevia rebaudiana* (Bertoni) Hemsl.) is a commercially promising high-quality sweetener. Stevioside (ST) and Rebaudioside A (RA) are the two main compounds from the stevia. Between them, RA has a lot of advantages, such as good taste, high sweet potential, high steadily, no side-effect, ect. All those characteristics make RA a better sweetener suitable for food industry comparing with others.

This work aimed at the preparation of the anti-RA MAb and the establishment of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to determine the concentration of RA, which is a major bioactive constituent in *Stevia*. This immunochemical approach can be used to determine the RA in samples.

RA-carrier protein conjugates (RA-HSAS&RA-OVA) were artificially synthesized by the method using  $\text{NaIO}_4$ , and the hapten number of the conjugates was determined to be 19 and 11 by MALDI-TOF MS. Splenocytes yielded from RA-HSA-immunized Balb/c mice were fused with hypoxanthine–aminopterin–thymidine (HAT)-sensitive mouse myeloma cell SP2/0 by PEG 1450. Following fusion, the cells were selected by HAT medium. Then hybridomas were cloned by the limiting dilution method and screened by indirect ELSA. One hybridomas producing MAb reactive to RA was obtained.

Large-scale antibody production was performed by the generation of ascites in mice. Each MAb was purified using a Protein G column. The purity of the obtained MAb was estimated by the SDS-PAGE and the MALDI-TOF MS to be high enough for the ELISA test. The characteristics of the MAb were also tested by ELISA. The titre of ascites containing MAb was 1:256000. The sensitivity was  $0.069\mu\text{g/mL}$ . The affinity constant was  $4.81 \times 10^{-8}$  mol/L. It has very high reactivity with RA. The other structural analogs nearly did not cross-react (except ST, whose cross ratio was 33%, due to its special structure).

Finally, a series of stevia samples have been determined by the competitive ELISA using anti-RA MAb, and the results showed agreement with that determined by traditional high-performance liquid chromatography (HPLC), whereas the

established competitive ELISA was much sensitive than the HPLC.

**Key Words: Stevia; Rebaudioside A; Monoclonal Antibody; Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)**

厦门大学博硕士学位论文摘要库

## 第一章 前言

### 1. 甜菊的介绍和研究现状

#### 1.1 甜菊和甜菊叶的形态特征

甜菊为菊科植物 (*Stevia rebaudiana* (Bertoni) Hemsl.)，又名甜叶菊，甜草，蜜菊或甜茶。甜菊原产南美洲亚热带地区，巴拉圭和巴西交接的阿曼拜山脉。目前我国于山东、安徽、河北、陕西、江苏、福建、湖南、云南等 27 个省区均有引种。

甜菊 (图 1-1 a) 为多年生宿根草本植物，株高 90—150 厘米，根稍肥大。茎直立，基部木质化，上部柔嫩，密生白色短绒毛。叶对生或茎上部互生，叶形长椭圆形或倒卵形，叶片中部以上有浅锯齿，一般为 7~9 对，两面被短绒毛，具 3 主脉，中脉明显。头状花序排成伞房状，全部为管状花，每一个头状花序一般生有 5 朵管状花，总苞片 5 枚，萼片变为冠毛，花冠白色 5 齿裂。聚药雄蕊 5 枚，花丝分离着生于花冠管上，花药合生成管状，包在花柱的外面，雌蕊由 2 心皮合生，1 室，子房下位，具 1 倒生胚珠。柱头 2 叉。花粉粒单粒，表面有棘突。瘦果，线形，稍扁平，褐色，具冠毛。种子 1 粒。<sup>[1]</sup>

甜菊主要以叶入药，(图 1-1 b) 也可连枝带叶入药。其叶片多卷曲，皱缩不平，外表暗绿色至棕绿色。完整的叶片呈长椭圆形或倒卵形，长 3.5~6.5cm，宽 2.0~3.0cm，叶片较薄，中部以上的叶缘有浅锯齿，一般为 7~9 对，先端纯圆，基部渐狭下延至叶柄成翼状；三出羽状叶脉，侧脉一般 3~4 对，约成 200~30° 角离开中脉向上弯曲，主脉明显，且在下表皮明显突起。叶质柔软，不易碎。气清香，味甘甜。<sup>[2]</sup>



a. 甜菊

b. 甜菊干燥叶

图 1-1 甜菊和甜菊干燥叶

Fig.1-1 Stevia and its dried leaves

## 1.2 甜菊的化学成分

到目前为止, 可以从甜菊的提取物中分离出十多种成分, 其名称、分子式、分子量及其甜度见表 1-1。

甜菊糖中的甜味成分均属苷类。苷(Glycoside 或 Heteroside)亦称苷或配糖体杂糖体, 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。现已确定的甜菊甜味成分有 10 多种: 即甜菊苷(Stevioside); 莱包迪苷(Rebaudioside) A、B、C、D、E、F; 杜尔可苷 A (Dulcoside A); 甜菊双苷(Steviolbioside)和甜茶苷 A(Rubusodide A)等。它们均属苷类化合物, 具有相同苷元——甜菊醇(Steviol)。它们之间的区别在于苷键上结合糖的种类数量和构成型式不同。其中甜菊苷, 莱包迪苷 A, 莱包迪苷 B, 莱包迪苷 C, 杜尔可苷 A, 甜茶苷和甜菊双苷这六种物质至少占甜菊叶提取物干重的 95%。[3-9]

表 1-1 十种甜菊糖苷的比较

Tab.1-1 Comparison of ten kinds of stevia sweeteners

甜菊苷种类名称	分子式	分子量 (g/mol)	甜度 (蔗糖相比倍数)
甜菊苷 (Stevioside)	$C_{38}H_{60}O_{18}$	804.88	210
莱包迪苷 A (Rebaudioside A)	$C_{44}H_{70}O_{23}$	967.01	200-300
莱包迪苷 B (Rebaudioside B)	$C_{38}H_{60}O_{18}$	804.88	150
莱包迪苷 C (Rebaudioside C)	$C_{44}H_{70}O_{22}$	951.01	30
莱包迪苷 D (Rebaudioside D)	$C_{50}H_{80}O_{28}$	1129.15	221
莱包迪苷 E (Rebaudioside E)	$C_{44}H_{70}O_{23}$	967.01	174
莱包迪苷 F (Rebaudioside F)	$C_{43}H_{68}O_{22}$	936.99	200
杜尔可苷 A (Dulcoside A)	$C_{38}H_{60}O_{17}$	788.87	30
甜菊双苷 (Steviolbioside)	$C_{32}H_{50}O_{13}$	642.73	90
甜茶苷 A (Rubusodide A)	$C_{32}H_{50}O_{13}$	642.73	114

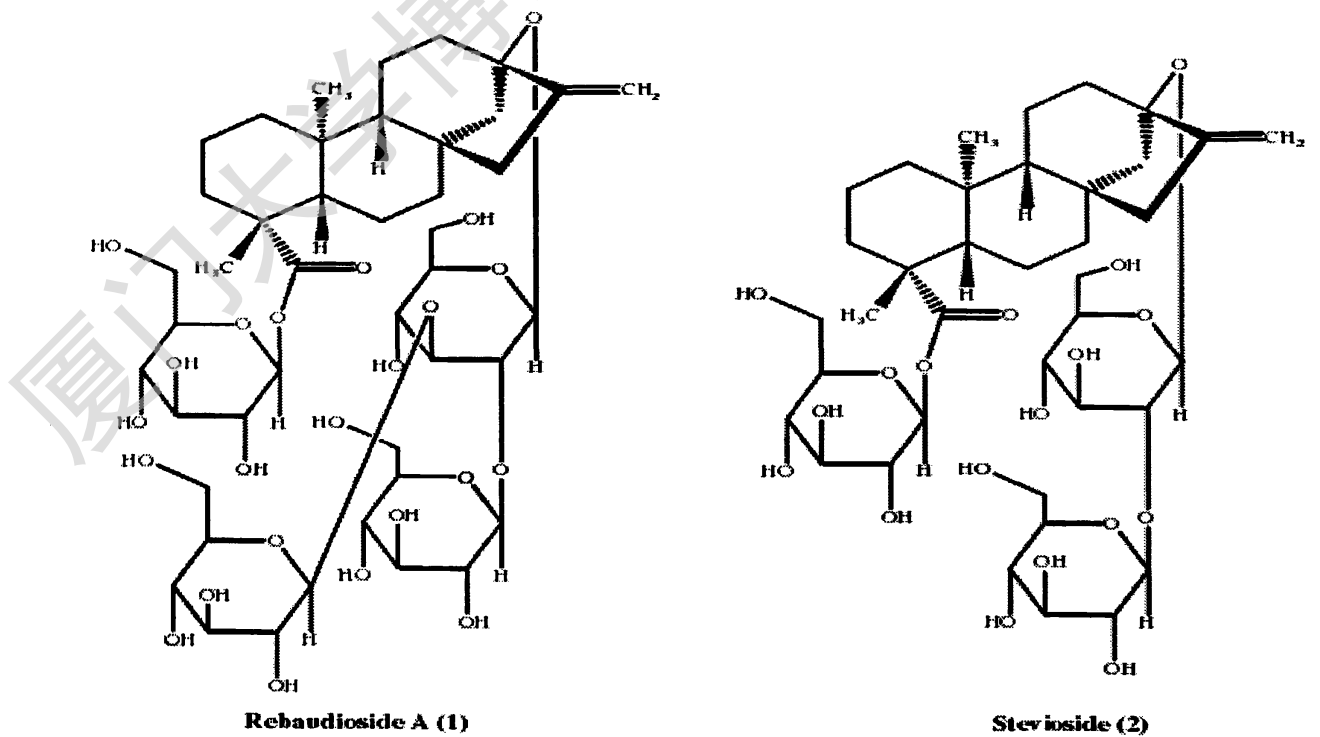


图 1-2 RA (Rebaudioside A) 和 ST (Stevioside) 的结构式

Fig.1-2 Structures of RA and ST

甜菊提取物中的主要成分是甜菊苷 (Stevioside, ST) 和莱包迪苷 A (Rebaudioside A, RA)。(图 1-2) 其中 ST 是主要成分, 占 60%-70%, 甜度为蔗糖的 210 倍, 其次是 RA, 占 15%-20%, 甜度为蔗糖的 200-300 倍, 且甜味最接近蔗糖。甜菊糖苷主要有 3 种基本形式, (1) 淡棕色提取物, 为 50% 纯品; (2) 微黄色, 为 80%-90% 等高纯品; (3) 白色粉末状, 为 90% 以上精品。

RA 极易溶于水 (>20 g/100 g, 25°C, 5 min), 但是不易溶于乙二醇等物质。RA 跟蔗糖、果糖、葡萄糖、麦芽糖等混合使用时, 不仅甜菊糖味更纯正, 且甜度可得到相乘效果。该糖稳定性特别好, 当它作为干粉物质存储时, 在常温常压和一定的湿度条件下可至少保存 2 年。而 RA 溶液在 pH4-8 之间时相对较稳定, 同时可知当 pH 低于 2 时, RA 将会非常不稳定。温度的升高也会影响到 RA 溶液的稳定性。<sup>[10]</sup>即使这样, RA 仍能在稳定性上比阿斯巴甜 (Aspartame) 和纽甜 (Neotame) 强, 特别是在酸性, 碱性和高温的条件下。在一般饮料食品加工的 pH 范围内, 进行加热处理仍然很稳定。甜菊糖在含有蔗糖的有机酸溶液中存放半年变化不大; 在酸碱类介质中不分解可防止发酵, 变色和沉淀等; 并可降低粘稠度, 抑制细菌生长和延长产品保质期。

RA 的甜度是蔗糖的 200 到 300 倍。和 ST 等其他甜味剂相比, RA 的口感特别的好, 无苦味, 因此是食品添加剂最好选择。<sup>[11-12]</sup>和蔗糖相比, RA 是零卡路里的, 在人体内几乎不会被吸收, 而是直接被排除体外, 因此可以说是非常安全和优质的甜味剂。<sup>[13]</sup>蔗糖是以果糖和葡萄糖为主要成分的双糖, 既是营养源又是热能供应者。甜菊糖是烯帖类配糖体, 具有高甜度低热值。甜菊糖用于饮料、食品, 人长期食用不易发胖, 特别适于肥胖症、糖尿病、高血压、小儿龋齿等病症患者食用, 安全性高。国内外药理实验证明, 甜菊糖为非致

癌性食品，无毒、无副作用。经急性、亚急性以及慢畜性试验，均未发现什么问题。原产地居民食用数百年，至今未发现任何毒害。物理化学性稳定，无发酵性，因此比蔗糖制品可延长保质期。甜菊糖甜度高，且持续时间长，无褐变，极利保持饮料、食品的本色。

### 1.3 甜菊和甜菊糖苷的应用

甜菊作为一种新型甜味剂，可以广泛应用于各类食品、饮料、医药、日化工业。可以说凡是用糖产品几乎都可以用甜菊糖替代部分蔗糖或全部替代糖精等化学合成甜味剂。实验证明，甜菊糖无毒副作用，无致癌作用，无残留，安全可靠，经常使用可预防高血压、心脏病、龋齿等病症，特别适用于糖尿病患者、苯丙酮尿患者以及肥胖人群的保健。<sup>[14]</sup>

#### 1.3.1 甜菊糖苷在药物制剂方面的应用

有学者提出，在未来不久或许可以将甜菊糖替代蔗糖做中药制剂。目前市场上，含糖的主要剂型有冲剂、糖浆剂和口服液等，其中主要以蔗糖为主，在这里蔗糖一般都是作用矫味剂，但是人们却忽略了蔗糖的药效，蔗糖摄入过多会导致许多疾病，譬如糖尿病患者就不适宜服用含有蔗糖的药物。所以我们应该努力开发出一种无糖的药剂供人们选择。甜菊糖苷在人体中不参与生理、生化反应作用，还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，不仅可以供一般病人服用，而且患有糖尿病、肾盂肾炎、高血压并以及肥胖的人也能服用。在液体制剂中，它的用料一般为 0.6%-0.8%，其价格为同甜度蔗糖的三分之一，因此应当大力提倡使用甜菊糖替代蔗糖作为含糖药剂的矫味剂。<sup>[15]</sup>卫生部于 1992 年批准甜菊糖可以在医药上应用。现已开发出许多产品，如桔味 Vc、消渴润喉片、小儿复方新诺明、止咳糖浆、葡萄糖酸锌口服液等。

### 1.3.2 甜菊糖苷在治疗糖尿病和降血压方面的作用

据报道,<sup>[16]</sup>用降糖康(杭白菊、甜菊苷)治疗96例2型糖尿病,发现可明显降低患者空腹血糖、餐后血糖及血甘油三酯,且糖耐量在各时间段均显著下降。有学者<sup>[17]</sup>采用动静脉插管术研究甜菊苷静脉注射对清醒及麻醉自发性高血压大鼠和麻醉犬的降血压作用特点,结果发现,甜菊糖苷可计量依赖性的降低清醒自发性高血压大鼠的收缩压和舒张压。甜菊糖苷对犬降压作用的效价较自发性高血压大鼠高,提示其可能对大动物的降压作用较小动物强。而且甜菊糖苷对麻醉自发性高血压大鼠的降压作用较清醒自发性高血压大鼠强,提示其可能有一定的放射性兴奋交感神经的作用。

### 1.3.3 甜菊叶以及甜菊糖苷在食品中的应用

根据甜菊及甜菊糖的特性,现在已经开发出数以千计的产品,归纳如下:(1)茶。用甜菊叶直接制茶或与其它原料茶配合制成的茶,对糖尿病患者降血糖,对健胃促进消化,醒酒和消除疲劳,对肥胖病、高血压及龋齿等病患者均有防治作用。目前,国内市场上的降糖茶如(康宁茶),宁红减肥茶,乌龙戏珠枣茶,红花茶等,均含有甜菊成分,有的已销往国外市场。(2)饮料。汽水、桔子汁、健力宝、娃哈哈以及各种果汁、冰淇淋等。(3)点心。甜菊益康乐、甜菊月饼、饼干等,成为营养、保健,以及儿童、老年人特殊需要的食品。(4)罐头。水果罐头如糖水杨梅、桔子、山楂、龙眼等;水产品以及肉类罐头等如含有甜菊糖既起到调味功能亦发挥防腐延长保质期作用。(5)腌制品类。用甜菊腌制如萝卜等酱菜以及榨菜,保鲜期长,清腌味美,不腐烂。(6)水产品。加入甜菊糖可防止水产品蛋白质腐败变质,在改善水产品风味的同时还降低成本。如各种鱼罐头、海带等。(7)蜜饯、果脯及果糕。如话梅果脯应用甜菊糖后,不仅甜而且爽口好吃。(8)酒类。用甜菊糖交入如刺梨、沙棘、葡萄等果酒以



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](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士学位论文摘要库