

# 程序性细胞死亡配体 1 胞外区原核重组表达、纯化及其多克隆抗体制备

薛德明<sup>1,2</sup>, 梁永波<sup>2</sup>, 常秋霜<sup>2</sup>, 翟晋豫<sup>2</sup>, 张东辉<sup>2</sup>, 柴素真<sup>2</sup>, 齐华<sup>2</sup>

(1.河南师范大学 生命科学学院,河南 新乡 453007;2.河南赛诺特生物技术有限公司  
河南省肿瘤病理诊断试剂工程技术研究中心,郑州 450008)

**摘要:**为制备程序性细胞死亡配体 1 胞外区多肽及其鼠源性多克隆抗体,根据 UniProtKB 数据库中公布的其胞外区基因序列(标识符:Q9NZQ7-1)和原核表达载体 pET-28a(+)*Nde* I 上游和 *Xho* I 位点下游的序列,设计合成带有同源臂的特异性引物.以合成的 PD-L1 胞外区基因为模板,PCR 扩增程序性细胞死亡配体 1 胞外区基因并将其克隆至 pET-28a(+),构建重组质粒 pET-28a(+)-PD-L1-E,转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$  中,扩增并提取其质粒,然后将质粒转化至大肠杆菌 BL21(DE3)中进行诱导表达.亲和层析镍柱纯化重组蛋白后,经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳和基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱鉴定,确认表达蛋白正确.浓缩换液后用重组蛋白免疫 Balb/c 品系小鼠制备多克隆抗体,经 ELISA 检测,成功获得抗程序性细胞死亡配体 1 胞外区血清.该研究对于研发某些肿瘤伴随诊断检测试剂有重要意义.

**关键词:**程序性细胞死亡配体 1 胞外区;原核表达;多克隆抗体

**中图分类号:**Q812

**文献标志码:**A

程序性细胞死亡配体 1(Programmed cell death 1 ligand 1,PD-L1,又称 B7-H1),由华人科学家陈列平教授在 1999 年首次发现<sup>[1-2]</sup>.PD-L1 是一种跨膜蛋白,分子量为 40 kD,由 CD274 基因编码,在心脏、骨骼肌、肺和胎盘中高表达,在胸腺、脾脏、肾脏和肝脏中弱表达,诱导表达于活化 T 细胞、B 细胞、树突细胞、角蛋白形成细胞和单核细胞中.PD-L1 与 PD-1 胞外区结构域结合,起到免疫检查点的作用,在肿瘤、器官移植、妊娠及自身免疫疾病中发挥抑制免疫系统的作用<sup>[3]</sup>.

通常情况下,为了防止 T 细胞攻击正常组织细胞,免疫系统通过“双信号”系统和免疫检查点调控 T 细胞活化、增殖和细胞毒作用的阈值来维持免疫耐受.就人体而言,这是一种正常程序,然而有很多肿瘤细胞在长期的进化和自然选择过程中,也获得了这种程序,通过过表达 PD-L1 等配体分子激活免疫检查点来抑制 T 细胞活性,从而达到免疫逃逸的目的<sup>[4]</sup>.

免疫治疗是近年来恶性肿瘤治疗的热点之一,针对免疫检查点 PD-L1/PD-1,国外知名医药公司开发了 5 种单抗,获得美国 FDA 批准上市用于一些恶性肿瘤治疗,其中美国默沙东公司和百时美施贵宝公司研制的 K 药(Pembrolizumab/Keytruda)和 O 药(Nivolumab/Opdivo)属于 PD-1 单抗;瑞士罗氏公司研制的 T 药(Atezolizumab/Tecentriq),英国和瑞典阿斯利康公司研制的 I 药(Durvalumab/Imfinzi),德国默克公司与美国辉瑞公司合作开发的 B 药(Avelumab/Bavencio),属于 PD-L1 单抗<sup>[5-6]</sup>.

很多研究表明,患者癌组织样本 PD-L1 表达水平越高,意味着使用 PD-1/PD-L1 单抗抑制剂治疗效果可能越好.从目前临床实践来看,PD-L1 表达水平是临床研究、验证、认可度最高的 PD-L1/PD-1 单抗抑制剂疗效标志物.免疫组织化学是临床评估癌组织 PD-L1 表达水平最具可行性的方法<sup>[7]</sup>.本研究通过原核重组表达 PD-L1 胞外区多肽、纯化及其多克隆抗体制备,以期制备免疫组化检测 PD-L1 用单抗奠定一些基础.

**收稿日期:**2019-11-20;**修回日期:**2020-06-01.

**基金项目:**河南省国际科技合作计划项目(152102410038);河南省重大科技专项(191110311200);郑州市重大科技创新专项项目(188PCXZX789).

**作者简介(通信作者):**薛德明(1964—),男,河南新乡人,河南师范大学副教授,博士,研究方向为动物分子和细胞,E-mail:xuedeming2003@163.com;梁永波(1978—),男,河南郑州人,河南赛诺特生物技术有限公司工程师,研究方向为肿瘤抗体病理学检测,E-mail:yongbo\_liang@163.com.

# 1 材料和方法

## 1.1 材料

PD-L1 胞外区基因序列(标识符:Q9NZQ7-1)来自于 UniProtKB 数据库.大肠杆菌 DH5 $\alpha$  菌株感受态细胞(上海近岸蛋白科技有限公司),大肠杆菌 BL21(DE3)菌株感受态细胞(北京索莱宝科技有限公司),质粒 pET-28a(+ )由本实验室保存,小鼠 Balb/c 品系(郑州大学实验动物中心).

## 1.2 主要试剂

2 $\times$  Taq Master Mix(上海近岸蛋白科技有限公司),KOD-Plus(日本 ToYoBo 公司),AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒和质粒 DNA 小量提取试剂盒(苏州康宁生命科学有限公司),限制性内切酶 *Nde* I 和 *Xho* I(美国 New England BioLabs Inc.),NovoRec Plus PCR 一步定向克隆试剂盒(上海近岸蛋白科技有限公司),His 标签纯化树脂 Ni-NTA 琼脂糖凝胶(北京索莱宝科技有限公司),ImmunFast<sup>TM</sup> Adjuvant 佐剂(台湾 Visual Protein),辣根过氧化物酶标记的兔抗小鼠 IgG 二抗(北京博奥森生物技术有限公司),双组分 TMB 显色液(北京索莱宝科技有限公司).

## 1.3 方法

### 1.3.1 PD-L1 胞外区(PD-L1-E)基因合成、引物设计与合成

依据 UniProtKB 数据库中 PD-L1 基因序列(标识符:Q9NZQ7-1)截取胞外区(不含信号肽)基因片段序列(663 bp,其中 3'端含有跨膜区 3 个碱基 ACT),由南京金斯瑞生物科技合成并连接在 pUC57(2 710 bp)质粒中.

根据 NovoRec Plus PCR 一步定向克隆试剂盒引物设计原则,在上下游引物 5'端引入同源重组序列,同源重组序列中包含 *Nde* I 和 *Xho* I 限制性内切酶位点.引物由南京金斯瑞生物科技合成,引物序列见表 1.

表 1 PD-L1 胞外区基因扩增引物及鉴定引物

Tab.1 Amplification and identification primers on PD-L1-E gene

引物名称	引物序列(5'-3')
PL-28 F	CGCGCGGCAGCCATATGTTTACTGTACGGTCCCAAGGA
PL-28 R	GGTGGTGGTGTCTCGAGAGTCCTTTCATTTGGAGGATGTGC
T7 P	TAATACGACTCACTATAGGG

### 1.3.2 PD-L1-E 扩增、检测及胶回收

PCR 扩增反应体系:10 X Buffer for kod-plus 5  $\mu$ L, dd H<sub>2</sub>O 33  $\mu$ L, dNTPs 5  $\mu$ L, MgSO<sub>4</sub> 2  $\mu$ L, PL-28 F 1.5  $\mu$ L, PL-28 R 1.5  $\mu$ L, pUC57(2 710 bp)1  $\mu$ L, kod-plus 1  $\mu$ L. PCR 反应条件:预变性 94  $^{\circ}$ C 2 min;变性 94  $^{\circ}$ C 15 s,退火 70  $^{\circ}$ C 30 s,延伸 68  $^{\circ}$ C 45 s,共 35 个循环;延伸 68  $^{\circ}$ C 5 min.扩增产物用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳进行检测,检测后用 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒回收.

### 1.3.3 重组质粒 pET-28a(+)-PD-L1-E 构建

用 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切载体 pET-28a(+),然后根据 NovoRec Plus PCR 一步定向克隆试剂盒说明书与 PD-L1-E 片段进行体外同源重组.重组产物经热激法转化至感受态大肠杆菌 DH5 $\alpha$  细胞中,加入 500  $\mu$ L LB 培养基 37  $^{\circ}$ C 培养 1 h,然后 5 000 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup> 离心 3 min,弃去部分培养液,留 100  $\mu$ L 菌液均匀涂布于含卡那霉素的 LB 平板上,37  $^{\circ}$ C 倒置过夜培养.挑取单个菌落扩大培养,然后进行 PCR 扩增,琼脂糖凝胶电泳鉴定.鉴定后阳性菌液经进一步扩大培养,提取质粒,送交北京擎科生物技术有限公司测序验证.测序正确的重组质粒命名为 pET-28a(+)-PD-L1-E.

### 1.3.4 pET-28a(+)-PD-L1-E 重组质粒转化、His-PD-L1-E 重组蛋白预表达及鉴定

将构建的 pET-28a(+)-PD-L1-E 重组质粒经热激法转化至大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞中,加入 500  $\mu$ L LB 培养基 37  $^{\circ}$ C 培养 1 h,然后 5 000 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup> 离心 3 min,弃去部分培养液,留 100  $\mu$ L 菌液均匀涂布于含卡那霉素的 LB 平板上,37  $^{\circ}$ C 倒置过夜培养.挑取单个菌落在 3 mL 含卡那霉素的 LB 培养基中 200 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup> 培养 5 h,取 1 mL 菌液做诱导前对照,剩余菌液加 2  $\mu$ L 1 mol/L IPTG,200 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup> 摇 2 h,取 1 mL 诱导表达后菌液用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳进行预表达鉴定.

### 1.3.5 His-PD-L1-E 重组蛋白大量表达、纯化及鉴定

预表达验证成功的克隆,进行扩大培养后低温诱导过夜表达,收集大量诱导表达后菌体,用 10 mmol/L PBS(含 20 mmol/L 咪唑)缓冲液重悬,冰浴超声破碎,4  $^{\circ}$ C 离心收集沉淀包涵体,包涵体经 10 mmol/L PBS(含 20 mmol/L 咪唑和 6 mol/L 尿素)溶解后,12 000 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup>、4  $^{\circ}$ C 离心 30 min,收集上清以备纯化.

使用 AKTA EXPLORER 蛋白纯化系统和镍柱纯化重组蛋白.平衡液和样品缓冲液为 10 mmol/L PBS(含 20 mmol/L 咪唑和 6 mol/L 尿素,pH=7.6),洗涤液为 10 mmol/L PBS(含 50 mmol/L 咪唑和 6 mol/L 尿素),洗脱液为 10 mmol/L PBS(含 200 mmol/L 咪唑和 6 mol/L 尿素).平衡流速为 5 mL/min,上样流速、洗涤流速和洗脱流速均为 2 mL/min.洗脱后蛋白经过

超滤换液保存在 10 mmol/L PBS 缓冲液中,取样用 BD-500 超微量分光光度计测其浓度和 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳进行进一步鉴定,然后  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存备用。

### 1.3.6 His-PD-L1-E 重组蛋白质谱鉴定

将纯化后经 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后的目的条带溶解在 Trypsin 溶液中进行酶解,然后经脱色、脱盐后点于样品靶上,经 CHCA 基质溶液处理后,用串联飞行时间质谱仪(5800 MALDI-TOF/TOF, AB SCIEX)进行测试分析,激光源为 349 nm 波长 Nd,加速电压为 2 kV,采用正离子模式和自动获取数据模式采集数据,一级质谱(MS)扫描范围为 800~4 000 Da,选择信噪比大于 50 母离子进行二级质谱(MS/MS)分析,每个样品点上选择 10 个母离子,二级质谱累计叠加 2 500 次,碰撞能量 2 kV,CID 关闭。

质谱测试原始文件用 Mascot2.2 软件检索 Uniprot 数据库,最后获得鉴定蛋白结果。

### 1.3.7 小鼠多克隆抗体制备及检测

将纯化的 His-PD-L1-E 重组蛋白质量浓度调整为  $2\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,加入等体积的 ImmunFast™ Adjuvant 佐剂乳化,然后对小鼠(Balb/c 品系)大腿部位肌肉注射 100  $\mu\text{L}$  乳化液,3 周后用同样方法再注射 100  $\mu\text{L}$  乳化液进行加强免疫,10 d 后采取尾血,3 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 10 min 分离血清,置  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存备用。

用间接酶联免疫吸附测定(Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay, ELISA)方法检测 His-PD-L1-E 蛋白小鼠多克隆抗体制备效果:以纯化后的 PD-L1-E 重组蛋白包被酶标板,50 ng/孔,4  $^{\circ}\text{C}$  包被过夜,一抗为不同稀释倍数的 PD-L1-E 抗血清,未免疫小鼠血清作为对照;二抗为 1:2 000 稀释的辣根过氧化物酶标记的免抗鼠 IgG, TMB 底物显色,用酶标仪检测 450 nm 波长 OD 值,以未免疫血清作为对照,高于未免疫血清 OD 值 3 倍的最高免疫血清稀释度作为抗体效价。

## 2 结 果

### 2.1 PD-L1-E 基因的扩增、重组表达载体的构建及鉴定

以合成 PD-L1-E 基因为模板,以同源重组用 PL-28F 和 PL-28R 为引物,通过 PCR 获得 PD-L1-E 基因扩增产物,扩增产物应为 696 bp,经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,四条带都处在 500~750 bp 之间(图 1),符合设计要求,对凝胶中目的条带 PD-L1-E 基因扩增产物进行割胶回收,测其质量浓度为  $46.27\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ,  $A_{260/280}=1.84$ 。

双酶切质粒 pET-28a(+)与目的片段 PD-L1-E 基因同源重组连接后转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,经含卡那霉素 LB 平板筛选后所获得的转化子单菌落克隆(图 2)。随机选取 20 个单克隆菌落扩大培养,然后对其是否含有目的片段 PD-L1-E 基因进行菌液 PCR 扩增,最后通过琼脂糖凝胶电泳鉴定,在 750~1 000 bp 间有 7 个泳道出现扩增条带(图 3),分别为泳道 3、5、7、11、16、19 和 20,与理论值 829 bp 相符,说明有 7 个菌液中含有 pET-28a(+)-PD-L1-E 重组质粒。

为了进一步验证目的 DNA 片段是否符合最初设计,提取了 11、16 和 20 号菌液质粒,送交北京擎科生物技术有限公司用 5'测序引物 T7 promoter primer # 69348-3 进行测序,通过 NCBI Blastn 比对,结果完全一致。

### 2.2 pET-28a(+)-PD-L1-E 重组质粒转化、表达、纯化及鉴定

将经过鉴定的 pET-28a(+)-PD-L1-E 重组质粒经热激法转化至大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞中,经含卡那霉素 LB 平板筛选后所获得的重组子单菌落见图 4。

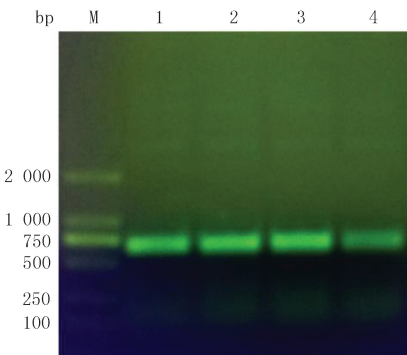


图 1 PD-L1-E 基因 PCR 产物电泳鉴定

Fig. 1 PCR products of PD-L1-E gene

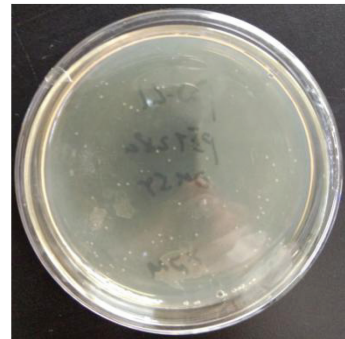


图 2 转化子克隆

Fig. 2 Transformant clones

随机挑取图 5 平皿中单克隆进行扩大培养,经 IPTG 诱导后,聚丙烯酰胺凝胶电泳检测在 25~34 kDa 之间,位于第 2、4 泳道有高表达蛋白条带出现,第 1、3 泳道为未加 IPTG 作为对照(图 5),与设计相符。

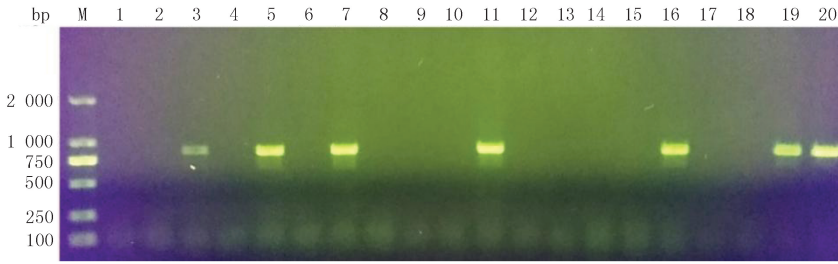


图3 含有pET-28a(+)-PD-L1-E重组质粒菌液PCR产物电泳鉴定

Fig. 3 Identification of positive bacterial liquid including pET-28a(+)-PD-L1-E

经过上述预表达实验验证后,进行大量低温诱导表达,重组蛋白 His-PD-L1-E 以包涵体形式存在,提取、纯化、换液超滤后经 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳进一步验证其分子量和纯度,分子量和纯度符合设计要求(图 6)。经紫外光谱吸收法检测其质量浓度为  $9.32 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $A_{260}/A_{280} = 0.5$ 。



图4 重组子克隆

Fig. 4 Recombinant clone

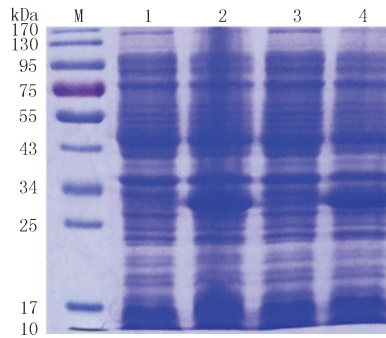


图5 His-PD-L1-E预表达验证

Fig. 5 Verification of His-PD-L1-E expression

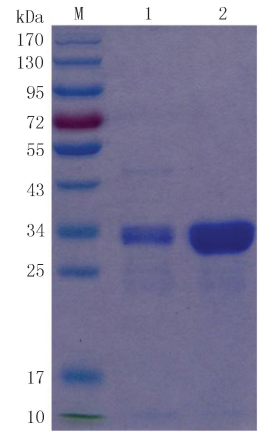


图6 纯化后His-PD-L1-E不同浓度样品

Fig. 6 Purified His-PD-L1-E

### 2.3 His-PD-L1-E 重组蛋白质谱鉴定

使用 MALDI-TOF/TOF 对目的蛋白酶解产物进行 MS1 和 MS2 质谱分析,采集多肽分子及其碎片分子,获得部分肽段氨基酸残基排列顺序(表 2),然后通过数据库软件匹配,并结合上述鉴定结果,最后确定表达产物为 His-PD-L1-E 重组蛋白,各项参数符合设计要求。

### 2.4 小鼠多克隆抗体制备效果鉴定

用纯化后的重组 His-PD-L1-E 多肽免疫血清和未免疫血清进行倍比稀释,ELISA 检测,根据免疫血清与未免疫血清 OD 值比值大于 3 的判定标准,His-PD-L1-E 抗血清效价为  $1/32\ 000$ (图 7),说明重组 His-PD-L1-E 多肽具有良好的免疫原性,表明此时免疫小鼠脾脏细胞可以和骨髓瘤细胞融合,为下一步筛选单克隆抗体细胞株奠定了良好基础。

## 3 讨论

随着人们对于肿瘤抗原、免疫应答及免疫逃逸机制研究的深入,免疫疗法已广泛应用于肿瘤治疗。肿瘤免疫治疗是通过人为激发和增强机体的免疫功能,以达到控制和杀伤肿瘤细胞的目的。根据免疫效应机制,肿瘤免疫治疗分为主动和被动治疗两大类。目前,解除肿瘤患者免疫抑制状态以达到治疗目的的理论和应用均有重大进展,表现最突出的是免疫检查点抑制剂疗法。免疫检查点是指免疫系统中存在一些抑制性信号通路,如 CTLA-4 和 PD-L1/PD-1 信号通路。正常生理状态下,CD8<sup>+</sup> T 细胞可以识别体内变异细胞,发挥细胞毒作用,清除变异细胞。CD8<sup>+</sup> T 细胞在活化之后,诱导表达膜蛋白 PD-1。很多正常组织细胞表达膜蛋白 PD-L1,PD-L1 是 PD-1 的配体,当 PD-L1 和 PD-1 特异结合时,CD8<sup>+</sup> T 细胞无法发挥细胞毒作用,对正常组织细胞起到免疫保护作用。然而有些肿瘤细胞在长期进化过程中,逐渐形成过度表达 PD-L1 的机制,从而抑制 CD8<sup>+</sup> T 细胞活化、增殖和分化,导致 CD8<sup>+</sup> T 细胞无法发挥细胞毒作用,从而达到免疫逃逸的目的<sup>[8-9]</sup>。

近年来,世界知名医药公司默沙东、百时美施贵宝等已针对 PD-L1/PD-1 靶点研发了人源化 PD-L1/PD-1 单抗药物,已应



用于非小细胞肺癌、恶性黑色素瘤、霍奇金淋巴瘤、膀胱癌等癌种的治疗<sup>[10]</sup>。由于癌细胞的异质性,上述单抗价格昂贵,如何评估哪些癌症患者使用 PD-L1/PD-1 单抗药物会从中获益,成为当务之急。很多研究表明,肿瘤组织样本中 PD-L1 表达水平越高,意味着患者可能从 PD-L1/PD-1 单抗药物治疗中获益。肿瘤组织 PD-L1 表达水平评估是目前临床研究、验证和认可度最高的 PD-L1/PD-1 单抗药物治疗效标志物。从目前来看,临床伴随诊断级别评估 PD-L1 表达高低的唯一方法是免疫组化。

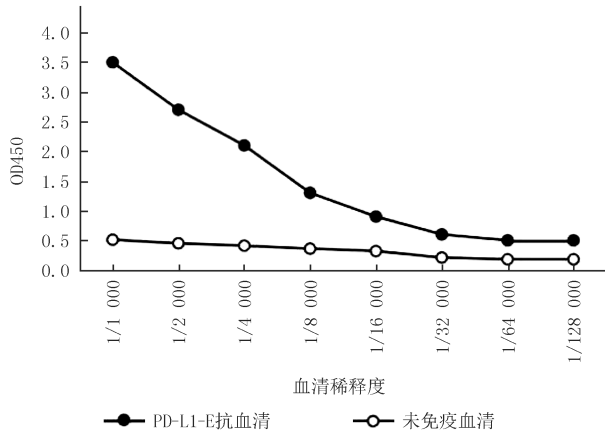


图7 PD-L1-E多克隆抗体效果评价

Fig.7 Determination of PD-L1-E polyclonal antibody titer

表 2 串联质谱测定肽段序列

Tab.2 Sequence determination by MALDI-TOF/TOF mass spectrometry

Calc.Mass	Obsrv.Mass	± da	± ppm	Sequence	Modification
876.432 2	876.421 4	-0.010 8	-12	VQHSSYR	
921.478 8	921.457 2	-0.021 6	-23	LQDAGVYR	
1 050.594 2	1 050.588	-0.006 2	-6	LFNVTSTLR	
1 316.707	1 316.725	0.018	14	VNAPYNKINQR	
1 420.634 8	1 420.559 6	-0.075 2	-53	CMISYGGADYKR	Carbamidomethyl(C)[1]
1 436.774 4	1 436.782 1	0.007 7	5	EEKLFNVTSTLR	
1 541.795 9	1 541.772 7	-0.023 2	-15	NIIQFVHGEECLK	
1 685.906 9	1 685.872 4	-0.034 5	-20	DQLSLGNAALQITDVK	
1 779.837 2	1 779.816 3	-0.020 9	-12	INTTTNEIFYCTFR	Carbamidomethyl(C)[11]
2 399.210 2	2 399.174 8	-0.035 4	-15	NIIQFVHGEECLKVQHSSYR	
2 485.228	2 485.168 7	-0.059 3	-24	ILVVDPTSEHELTCQAEGYPK	Carbamidomethyl(C)[15]
2 811.413 6	2 811.405 3	-0.008 3	-3	LFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFR	Carbamidomethyl(C)[20]
2 830.437	2 830.394 5	-0.042 5	-15	LDPEENHTAELVIPELPLAHPNER	
2 986.538 1	2 986.504 2	-0.033 9	-11	RLDPEENHTAELVIPELPLAHPNER	

最近几年美国食品药品监督管理局陆续批准了 4 个 PD-L1 伴随诊断抗体,克隆号分别是英国 Abcam 公司的 28-8、SP142,瑞士 Roche 公司旗下 Ventana 公司的 SP263,美国 Agilent 公司旗下 Dako 公司的 22C3,其中 28-8 免疫原为重组蛋白 Phe19-Thr239,SP142 为 Cys250 至 C 末端合成肽,准确序列具有专利保护,SP263 未公布其免疫原,22C3 为 Phe19-Thr239 与人类 IgG1 片段融合蛋白<sup>[7,11-12]</sup>。2019 年 8 月 30 日,Dako 公司的 PD-L1 免疫组化检测试剂盒获得我国国家药品监督管理局批准,在国内正式上市。为了推进 PD-L1 单抗检测试剂的国产化进程,我们课题组构建了 PD-L1 胞外区与组氨酸标签重组蛋白原核表达质粒,转染大肠杆菌 BL21(DE3),获得了足量的免疫原,注射小鼠后,经检测获得了多克隆抗体。该研究为进一步研发 PD-L1 伴随诊断单抗奠定了良好的基础。

作者贡献声明:薛德明与梁永波为本文共同第 1 作者。

### 参 考 文 献

[1] DONG H,ZHU G,TAMADA K,et al.B7-H1,a third member of the B7 family,co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion[J].Nature Medicine,1999,5(12):1365-1369.  
 [2] FREEMAN G J,LONG A J,IWAI Y,et al.Engagement of the Pd-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to

- negative regulation of lymphocyte activation[J].*Journal of Experimental Medicine*,2000,192(7):1027-1034.
- [3] BOUSSIOTIS V A.Molecular and biochemical aspects of the PD-1 checkpoint pathway[J].*The New England Journal of Medicine*,2016,375(18):1767-1778.
- [4] NURIEVA R,WANG J,SAHOO A.T-cell tolerance in cancer[J].*Immunotherapy*,2013,5(5):513-531.
- [5] VARRICCHI G,MARONE G,MERCURIO V,et al.Immune checkpoint inhibitors and cardiac toxicity:an emerging Issue[J].*Current Medicinal Chemistry*,2018,25(11):1327-1399.
- [6] NISHIJIMA T F,SHACHAR S S,NYROP K A,et al.Safety and tolerability of PD-1/PD-L1 inhibitors compared with chemotherapy in patients with advanced cancer:a meta-analysis[J].*The Oncologist*,2017,22(4):470-479.
- [7] KINTSLER S,CASSATARO M A,DROSCHE M,et al.Expression of programmed death ligand(PD-L1)in different tumors.Comparison of several current available antibody clones and antibody profiling[J].*Annals of Diagnostic Pathology*,2019,41:24-37.
- [8] ALSAAB HO,SAU S,ALZHRANI R,et al.PD-1 and PD-L1 checkpoint signaling inhibition for cancer immunotherapy:mechanism,combinations,and clinical outcome[J].*Frontiers in Pharmacology*,2017,8:561.
- [9] TENG M W,NGIOW S F,RIBAS A,et al.Classifying cancers based on T-cell infiltration and PD-L1[J].*Cancer Research*,2015,75(11):2139-2145.
- [10] DE S L A,BATTIN C,JUTZ S,et al.Therapeutic PD-L1 antibodies are more effective than PD-1 antibodies in blocking PD-1/PD-L1 signaling[J].*Scientific Reports*,2019,9(1):11472.
- [11] PHILLIPS T,SIMMONS P,INZUNZA H D,et al.Development of an automated PD-L1 immunohistochemistry(IHC) assay for non-small cell lung cancer[J].*Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*,2015,23(8):541-549.
- [12] ROACH C,ZHANG N,CORIGLAIANO E,et al.Development of a companion diagnostic PD-L1 immunohistochemistry assay for Pembrolizumab therapy in non-small-cell lung cancer[J].*Applied immunohistochemistry & Molecular Morphology*,2016,24(6):392-397.

## Prokaryotic recombinant expression, purification and polyclonal antibody preparation of extracellular domain of programmed cell death 1 ligand 1

Xue Deming<sup>1,2</sup>, Liang Yongbo<sup>2</sup>, Chang Qiushuang<sup>2</sup>, Zhai Jinyu<sup>2</sup>, Zhang Donghui<sup>2</sup>, Chai Suzhen<sup>2</sup>, Qi Hua<sup>2</sup>

(1.College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China; 2.Research Center of Engineering Technology on Diagnostic Reagent of Tumor Pathology of Henan Province, Henan Celnovte Biotechnology Co., Ltd., Zhengzhou 450008, China)

**Abstract:** In order to prepare the polypeptides of extracellular domain of programmed cell death 1 ligand 1(PD-L1) and its mouse-derived polyclonal antibody, we designed and synthesized the specific primers with homologous arms according to the gene sequence of its extracellular domain published in UniProtKB(identifier: Q9NZQ7-1) and the *Nde* I upstream and *Xho* I downstream sequences of the prokaryotic expressive vector pET-28a(+). The artificially synthesized gene encoding the extracellular domain of PD-L1 as a template was amplified by PCR. The amplified gene was cloned into the vector pET-28a(+) to construct the recombinant plasmid pET-28a(+)-PD-L1-E. The constructed plasmid was transformed into *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , amplified and extracted. Then the extracted plasmid was transformed into *E.coli* BL21(DE3) to induce expression. The recombinant protein was purified by Ni-affinity chromatography, and then identified by SDS-PAGE and MALDI-TOF-MS/MS. After ultrafiltration concentration and buffer exchange, the recombinant protein was used to immunize Balb/c mice to prepare the polyclonal antibody against PD-L1. The antisera was successfully obtained by ELISA determination. The research has great significance for development of tumor companion diagnostic reagent.

**Keywords:** extracellular domain of programmed cell death 1 ligand 1; prokaryotic expression; polyclonal antibody

[责任编辑 王凤产 杨浦]