论著

文章编号:1000-5404(2005)05-0402-04

PD-L1蛋白的表达、纯化与鉴定

毛丽伟,倪 兵,姜 曼,黎万玲,肖 宇,吴玉章 (第三军医大学基础医学部全军免疫学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 克隆人PD-L1的基因,纯化Flp-In CHO系统表达PD-L1蛋白。**方法** 用RT-PCR方法制备PD-L1基因,以哺乳细胞高效表达质粒载体pSec/WG为载体构建重组PD-L1/pSec/WG质粒,重组体用载体上的通用引物为测序引物,鉴定克隆的正确性。再将鉴定过的重组质粒用脂质体法转化转染Flp-In CHO细胞收集上清,G蛋白亲和层析法纯化蛋白。用免疫印迹法鉴定转化细胞所分泌上清的PD-L1基因的表达。**结果** 正确构建了PD-L1/pSec/WG重组质粒,并且在转化细胞所分泌的上清中检测出了PD-L1基因的表达。亲和层析法成功纯化出PD-L1蛋白,分子量为40×10^3。**结论** 成功地构建了PD-L1/pSec/WG重组质粒,纯化出PD-L1蛋白,可进行下一步mAb制备,进一步研究其功能。

关键词:PD-L1;RT-PCR;克隆

中图法分类号:Q503;Q513.2 **文献标识码**:A

Expression, purification and identification of PD-L1 protein

MAO Li-wei, NI Bing, JIANG Man, LI Wan-ling, XIAO Yu, WU Yu-zhang (Institute of Immunology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To clone human programmed death-1 (PD-L1) gene to purify PD-L1 protein which is expressed stably in Flp-inCHO cell lines. **Methods** Recombinant PD-L1/pSec/WG plasmid was constructed by ligating PD-L1 gene, which was prepared by RT-PCR and the vector pSec/WG that can express in mammals with high efficiency. The recombinant was sequenced on an automatic sequencer with T7 promoter and T3 promoter sequence as the sequencing primers that locate upstream and downstream of the multiple cloning site (MCS) respectively, and the correctness of the recombinant was determined. The identified recombinant plasmids were then transformed into Flp-In CHO cell lines with Lipofectamine 2000 and the culture medium was collected for purification with protein G-Sepharose 4B column. The expression of PD-L1 was detected by Western blotting. **Results** The recombinant PD-L1/pSec/WG plasmid was constructed correctly and the expression of PD-L1 gene in the transformed Flp-inCHO cell lines was determined. The protein PD-L1 was purified successfully by protein G-Sepharose 4B column. **Conclusion** We have constructed successfully the recombinant PD-L1/pSec/WG plasmid and purified the protein PD-L1, based on which we can prepare mAb that aims directly at the protein PD-L1.

Key words: programmed death-1; RT-PCR; clone

PD-1(programed death-1),CD28家族新成员,与CD28,ICOS,和CTLA-4类似,为免疫球蛋白Ⅰ型跨膜糖蛋白,胞内含有ITIM(免疫受体酪氨酸抑制基序),与CTLA-4有23%同源性[1,2]。PD-L1(programed death-1 ligand)/B7-H1与PD-L2(programed death-2 ligand)/B7-DC为PD-1的两个配体,其全长cDNA通过同源性筛选从胎盘的cDNA文库中获得。定位于染色体9p24.2,起始于同一方向,间隔42×10^3,同属B7家族,具有此家族其他成员的共同特征,即:包含有IgV样结构域,IgC样区,跨膜区及一个短的胞浆区尾部。PD-1与PD-L1相互作用可抑制T细胞的增殖,同时抑制其产生IL-2,INF-γ和IL-10。近来研究表明在体内使用Anti-PD-L1mAb能够调节自身免疫性疾病[3,4]。PD-L1$^{-/-}$小鼠在感染腺病毒后,其肝脏的效应T细胞明显增殖,病毒清除率增高[5],并且增强宿主对肿瘤逃逸的监控[6]。基于此,阻断PD-1与PD-L1之间的交互作用可能为将来的治疗性调控抗病毒免疫、抗肿瘤反应和自动免疫性疾病提供可行的策略。因此,本研究拟以哺乳细胞高效表达质粒载体pSec/WG为载体,用RT-PCR方法从胎盘组织中制备PD-L1基因,构建重组PD-L1/pSec/WG质粒,将鉴定过的重组质粒用脂质体法转化转染Flp-In CHO细胞,G蛋白亲和层析法纯化

作者简介:毛丽伟(1977-),女,河北省石家庄市人,硕士,医师,主要从事分子免疫学方面的研究。电话:(023)68752234-617

通讯作者:倪 兵,E-mail: nibing@vip.163.com

收稿日期:2004-09-01;修回日期:2005-01-18

蛋白。Western-blot 鉴定 CHO 细胞稳定表达 PD-L1 蛋白，继而制备其 mAb，为进一步研究其功能奠定基础。

1　材料与方法

1.1　主要材料和试剂

健康人胎盘组织来自本校西南医院妇产科。Flp-In CHO 细胞系来自 ATCC(CCL-61)，为 CHO-K1 特性。小鼠抗人 PD-L1 单克隆抗体由美国 NIH 陈列平教授赠送，效价 1∶5 000。Trizol、high pure plasmid isolation kit 等均购于 Roche 公司；Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司。AMV、核酸内切酶、Taq 酶、连接酶、RNA 抑制剂及 Oligo(dT)15 购于 Pomega 公司；dNTP 和各种引物购于上海申友生物技术有限公司，重组质粒测序也由其完成；ECL-Western-blot 试剂盒均购于 Roche 公司。表达载体 pSec/WG 由美国哈佛医学院 Gao 博士提供，该载体克隆位点上游有分泌信号肽，下游含人 IgG4 Fc 基因片段。重组后，分泌到培养上清中的融合表达的 PD-L1 蛋白可通过 Protein G 偶联柱纯化。Protein G-Sepharose 4B Fast Flow 购自 Amersham Biosciences 公司。Zeocin 和潮霉素购自德国 Calbiochem 公司。UltraCHO 无血清培养基购自 Cambrex 公司(美国)。

1.2　PD-L1 基因克隆、鉴定

1.2.1　RT-PCR 扩增 PD-L1 基因　　按照购置 Roche 的 Trizol 试剂说明书提取健康人胎盘组织总 RNA。RT-PCR 按试剂盒说明书进行。为了扩增 PD-L1 基因胞外区片段，利用 DNAstar 软件设计出 PCR 引物：上游引物为 5′-cg**acatgt**GCTAGCATG CTGCTCCTGC-3′，下游引物为 5′-cc**ctcgag**GCGGCCGC CTAGATCCTCTTTC-3′。上述黑体带下划线部分序列分别为 *Pci* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ的酶切位点。此两位点与表达载体 pSec/WG 上的相应多克隆位点吻合。PCR 条件：95 ℃变性 5 min；(94 ℃，1 min；50 ℃，2 min；72 ℃，1 min)×35 循环；72 ℃，10 min。产物于 1.0% 琼脂糖凝胶上电泳鉴定纯度和分子量的大小。

1.2.2　PD-L1 基因的连接、转化及筛选　　酚/氯仿抽提 PCR 产物，乙醇沉淀，TE 溶解备用。提取质粒载体，然后用 *Psi* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ对质粒 pSec/WG 和纯化后的 PCR 产物分别进行双酶切。载体酶切后，凝胶电泳法回收。再次分别纯化 PCR 酶切产物和载体的胶回收产物，TE 溶解备用。紫外分光光度计上定量载体和 PCR 两种双酶切产物量。然后按 1∶1(PD-L1∶pSec/WG)的摩尔比混合，并于 16 ℃反应 12 h，置 70 ℃，10 min 以终止反应。将连接产物转化感受态 DH-5α，氨苄平板筛选。取阳性单克隆进行扩增，抽提重组 PD-L1/pSec/WG 质粒备用。

1.2.3　重组 PD-L1/pSec/WG 质粒的鉴定　　重组质粒经过 *Pci* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ双酶切后，在 1% 琼脂糖凝胶上电泳鉴定目的片段是否插入。重组质粒送上海申友生物技术公司进行双向步移法测序鉴定其正确性。测序引物根据已知序列由上海申友生物技术公司自行设计。

1.3　重组质粒转染 Flp-In CHO 细胞

本实验采用脂质体试剂 Lipofectamine 2000 转染重组质粒到真核表达细胞系 Flp-In CHO 中，具体方法参见相关试剂说明书。转染后，即将细胞置于含潮霉素的培养基中培养和筛选。

1.4　转染和未转染的 Flp-In CHO 细胞培养

未转染的 Flp-In CHO 细胞系在 Hams F12 完全培养基中培养(含 10% FBS、2 mmol/L L-谷氨酰胺)，其中添加 1% 青/链霉素和 100 μg/ml Zeocin 转染了重组质粒 PD-L1/pSec/WG 的 Flp-In CHO 细胞，因为 PD-L1 基因插入使宿主细胞基因组中的 Zeocin 抗性基因失活，但同时带入了潮霉素抗性基因(Hyg+)，因此，转染了重组质粒的宿主细胞可以在含潮霉素的培养基中培养，而未转染的宿主细胞在此条件下不能存活。在含 400、600、800 μg/ml 和 1 000 μg/ml 的潮霉素的完全 Hams F12 培养基中培养，最后确定 800 μg/ml 为最佳筛选用抗生素浓度。在此浓度下培养，6～7 d 可以筛选出相应的重组基因表达克隆。

1.5　培养细胞上清的收集、PD-L1 蛋白的亲和纯化、鉴定

1.5.1　PD-L1 的纯化　　将转染了重组质粒的 Flp-In CHO 细胞在 UltraCHO 无血清培养基中培养，每隔 3～4 d 收集细胞培养上清 1 次。收集的培养上清，10 000 r/min 离心 5 min，弃沉淀；上清中加入 0.02% NaN_3，并通过 0.22 μm 滤膜过滤除去所有可能的细胞碎片；在柱子中填装 1 ml 树脂，并用大约 10 体积的 PBS(pH 7.2)平衡；将含目的蛋白的上清过 Protein G-Sepharose 4B Fast Flow 柱 1～2 次；20～30 体积的 PBS(pH 7.2)洗柱；预先在每支收集小管中加入 28 μl 的 1.25 mol/L Tris-HCl(pH 8.0)。再用 100 mmol/L Glycine-HCl(pH 3.0)洗脱液洗脱，按每管 1.0 ml 收集于收集小管中，使洗脱液能在收集小管中立即被中和。通常，蛋白在第 3～10 管被洗脱下来，峰值大约在 3、4、5 管。收集所有 $A_{280}>0.01$ 的洗脱液，再用 UltraFree 15(MWCO 10 000，Millipore)的离心过滤柱浓缩。蛋白定量后，最后通过 0.22 μm 滤膜过滤除菌，贮存于 -20 ℃备用。

1.5.2　纯化的 PD-L1 蛋白的鉴定　　取纯化出的 PD-L1 蛋白溶液 10 μl，加入等体积 2×SDS-PAGE 上样缓冲液，置沸水浴中加热 10 min。样本在 10% SDS-PAGE 凝胶中电泳，电压 100 V。电泳完后，凝胶或者用于考马斯亮蓝染色，照相保存；或用于电转印到硝纤膜上，再将此膜于 4 ℃封闭过夜。次日按 ECL-Western-blot 试剂盒说明书，利用抗人 PD-L1 单抗进行抗原抗体结合反应和发光实验，最后于暗盒中对 X 线片曝光 10 s，并进行后续处理。

2　结果

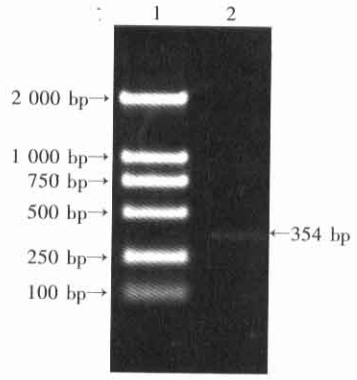
2.1　RT-PCR 扩增 PD-L1 基因

用 Trizol 试剂抽提健康人胎盘组织总 RNA 并反转录后，再以此 cDNA 为模板，用设计的 PCR 引物进行扩增。PCR 的扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶电泳后，溴化乙锭染色显示出单一条带，且分子量与理论值一致，即 354 bp(图 1)。

2.2　PD-L1 基因克隆及鉴定

PCR 产物经过 *Pci* Ⅰ/*Xho* Ⅰ双酶切后与同样双酶切的线性空载体 pSec/WG 进行连接，连接产物铺氨苄平板进行筛选。挑取氨苄抗性单克隆菌落，扩增后用 High Pure 质粒提取试剂盒提取质粒，用 *Pci* Ⅰ/*Xho* Ⅰ双酶切后在 1% 琼脂糖凝胶电泳，结果显示重组质粒酶切产物呈现出两条带。且载体部分的条带位

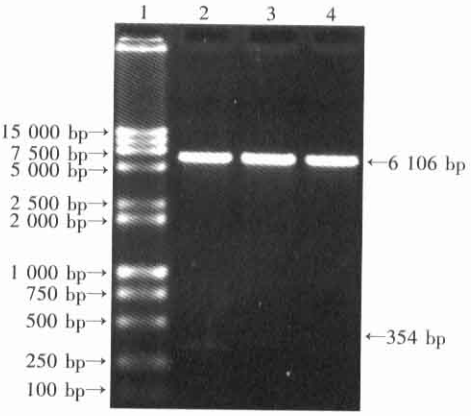
置与 pSec/WG 的 *Xho* Ⅰ酶切产物位置一致(6 106 bp);而插入片段条带为 350 bp 左右,与理论值基本一致。从结果可以看出,克隆已基本成功(图 2)。取阳性克隆的重组质粒送上海博亚生物技术有限公司进行测序,测序结果证实克隆的 PD-L1 基因片段序列完全正确。



1: DNA marker (DL2000); 2: Extracellular region of PD-L1 gene

图 1 PD-L1 基因胞外区 PCR 产物在 1%琼脂糖凝胶中的电泳结果

Fig 1 Electrophoretic result of PCR product of extracellular region of PD-L1 gene on 1% agarose gel



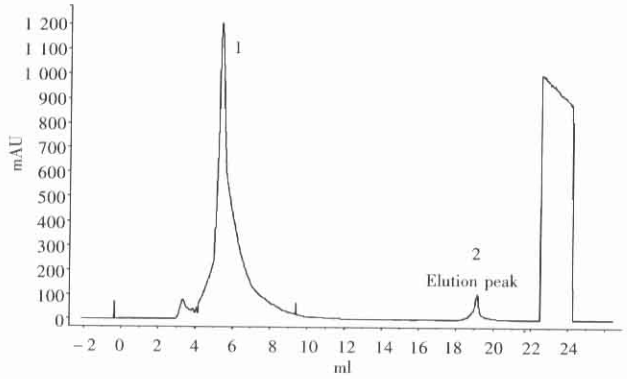
1: DNA ladder (DL2000 + 15000); 2 and 4: *Pci* Ⅰ/*Xho* Ⅰ double-digested product of recombinant plasmid from ampicillin resistant clones; 3: *Xho* Ⅰ digested vector pSec/WG

图 2 重组质粒 *Pci* Ⅰ/*Xho* Ⅰ双酶切产物在 1%琼脂糖凝胶上的电泳结果

Fig 2 Electrophoretic result of the *Pci* Ⅰ/*Xho* Ⅰ double-digested product of recombinant plasmids on 1% agarose

2.3 PD-L1 蛋白纯化及鉴定

2.3.1 Protein G-Sepharose 4B Fast Flow 柱亲和纯化 PD-L1 蛋白 转染了重组质粒 PD-L1/pSec/WG 的 Flp-In CHO 细胞在含 800 μg/ml 潮霉素的完全 Hams F12 培养基中培养筛选,7 d 后获得了潮霉素抗性多克隆细胞。将转染了重组质粒的 Flp-In CHO 细胞在 Ultra CHO 无血清培养基中培养,按时收集细胞培养上清。按照材料与方法中的步骤,用 Protein G-Sepharose 4B Fast Flow 亲和层析柱对重组融合蛋白进行了纯化,得到相应的亲和洗脱峰(图 3 第 2 峰)。

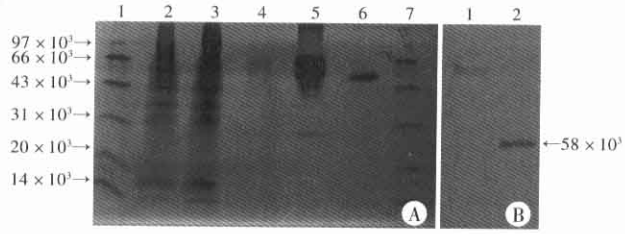


Culture supernatant of PD-L1/pSec/WG transformed Flp-In CHO cells was sampled on protein G-Sepharose 4B Fast Flow column; 1: Flow-through fraction; 2: Target fusion protein PD-L1-Ig Fc fraction

图 3 重组蛋白 PD-L1-Ig Fc 亲和层析纯化结果

Fig 3 Affinity chromatography of recombinant PD-L1-Ig Fc protein

2.3.2 纯化的人 PD-L1-Ig Fc 融合蛋白的鉴定 将 Protein G-Sepharose 4B Fast Flow 亲和层析柱纯化的 PD-L1-Ig Fc 蛋白用 12% Tris-Gly PAGE 系统(参见《精编分子生物学指南》)进行分析。图 4A 显示,纯化后的 PD-L1-Ig Fc 蛋白在考马斯亮蓝染色 PAGE 胶上为一条带,条带分子量在 58×10^3 左右(位于第 6 泳道),同理论值一致。Western-blot 结果显示(图 4B),纯化后的 PD-L1-Ig Fc 蛋白在分子量在 58×10^3 左右的位置出现单一特异性条带(第 2 泳道),而对照组在此位置未见任何条带,提示纯化的蛋白的确可以结合 PD-L1 单抗,即纯化的 PD-L1 蛋白的特异性。



A: SDS-PAGE analysis of recombinant PD-L1 protein in Flp-In CHO cells. 1 and 7: Protein ladder, the MW for each band was indicated; 2: Lysate of Flp-In CHO cells; 3: Lysate of Flp-In CHO cells transformed with PD-L1/pSec/WG; 4: Culture supernatant of Flp-In CHO cells; 5: Culture supernatant of Flp-In PD-L1 CHO cells; 6: purified protein PD-L1 by Protein G-Sepharose 4B column

B: Western-blot analysis of the expressed PD-L1 in the culture Supernatant. 1: Culture supernatant of Flp-In CHO cells. 2: Culture supernatant of Flp-In PD-L1 CHO cells

图 4 PD-L1 蛋白表达及纯化的 SDS-PAGE 及 Western-blot 分析结果

Fig 4 Analyses of the expressed and purified PD-L1 protein by SDS-PAGE and Western-blot

3 讨论

机体的免疫系统既能产生有效的免疫应答,清除入侵的病原微生物及突变的细胞,同时又能适时的终

止这一过程，防止对自身组织的过度损伤及引发自身免疫性疾病。B7 家族受体和配体阐明了 T 细胞及其靶细胞间的共刺激和抑制性途径[7]。PD-L1/B7-H1 和 PD-L2/B7-DC 参与着机体负调控免疫应答。PD-L1 表达于静止或活化的 B，T，DC 细胞，非造血系统细胞（如：微血管内皮细胞），非淋巴器官（如心脏和胎盘），以及肿瘤细胞[8~11]。近几年研究表明，PD-L1 能够调控外周组织的 T、B 淋巴细胞的自身反应性免疫应答以及靶器官的炎性反应。Anti-PD-L1 mAbs 在体内能够调节 T 细胞介导的慢性炎症性皮肤粘膜自身免疫性疾病[12]、增强宿主对肿瘤逃逸的监控[6]及抗病毒性疾病[5]。另外，一些研究还表明 PD-L1 和其它受体结合发挥了共刺激作用[8,11,13]，故近年对其功能的研究日益受到重视。由于 PD-L1/PD-1 广泛表达于 T、B、巨噬细胞，使两者之间经常发生潜在的双向交互作用。然而，这些研究都不能区别不同来源的 PD-L1 功能的重要性。基于这些有争议的研究结果，本实验拟制备其单克隆抗体。制备单克隆抗体所使用的抗原多种多样，包括原核表达、酵母表达和哺乳动物细胞表达或初步纯化的蛋白等，但是来自于哺乳动物细胞的保持天然活性结构的高纯度的蛋白质抗原无疑是最佳选择，其优势不仅体现在动物免疫应答方面（如，不受其它杂蛋白的影响，最后得到的主要是针对 PD-L1 的克隆；由于免疫的蛋白有天然构象，最终可以得到尽可能全面的单克隆），还体现在克隆化筛选过程中，使筛选过程更为直接、方便，从而减少不必要的时间浪费。因此，拟在 Flp-inCHO 系统表达 PD-L1，通过其单抗阻滞 PD-1 与 PD-L1 之间的相互作用，从而剖析 PD-L1 在机体内外的功能。

参考文献：

[1] Shinohara T, Taniwaki M, Ishida Y, *et al*. Structure and chromosomal localization of the human PD-1 gene (PDCD1)[J]. Genomics, 1994, 23(3): 704 - 706.

[2] Finger L R, Pu J, Wasserman R, *et al*. The human PD-1 gene: complete cDNA, genomic organization, and developmentally regulated expression in B cell progenitors [J]. Gene, 1997, 197(1-2): 177 - 187.

[3] Ansari M J, Salama A D, Chitnis T, *et al*. The programmed death-1 (PD-1) pathway regulates autoimmune diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice[J]. J Exp Med, 2003, 198(1): 63 - 69.

[4] Salama A D, Chitnis T, Imitola J, *et al*. Critical role of the programmed death-1 (PD-1) pathway in regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. J Exp Med, 2003, 198(1): 71 - 78.

[5] Iwai Y, Terawaki S, Ikegawa M, *et al*. PD-1 inhibits antiviral immunity at the effector phase in the liver[J]. J Exp Med, 2003, 198(1): 39 - 50.

[6] Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, *et al*. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(19): 12293 - 12297.

[7] Carreno B M, Collins M. The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses [J]. Annu Rev Immunol, 2002, 20(1): 29 - 53.

[8] 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]. Nat Med, 1999, 5(12): 1365 - 1369.

[9] Brown J A, Dorfman D M, Ma F, *et al*. Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production [J]. J Immunol, 2003, 170(3): 1257 - 1266.

[10] Eppihimer M J, Gunn J, Freeman G J, *et al*. Expression and regulation of the PD-L1 immunoinhibitory molecule on microvascular endothelial cells [J]. Microcirculation, 2002, 9(2): 133 - 145.

[11] Latchman Y, Wood C R, Chernova T, *et al*. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation[J]. Nat Immunol, 2001, 2(3): 261 - 268.

[12] Youngnak-Piboonratanakit P, Tsushima F, Ohtsuki N, *et al*. The expression of B7-H1 on keratinocytes in chronic inflammatory mucocutaneous disease and its regulatory role [J]. Immunol Lett, 2004, 94(3): 215 - 222.

[13] 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]. J Exp Med, 2002, 192(7): 1027 - 1034.

（编辑　王　红）

关于数字的用法

在各种出版物上数字的用法总的原则是：凡是可以使用阿拉伯数字，而且又很普遍的地方均应使用阿拉伯数字，以下两种情况必须使用阿拉伯数字：

1　公历世纪、年代、年、月、日和时刻　　例如：公元前5世纪，20世纪90年代，1995年6月8日14时30分

表示年份要写全称，1995年不能写成95年或'95年；1953－1958年不能写成1953－58年。年月日可以写成1995-06-08　时刻用":"分隔的形式　如：13时45分8秒可以写成13:45:08

2　计数和计量（整数、小数、分数、百分数、均数）包括字数、编号　　4位和4位以上的数字采用三位分节法，采用"千分撇"，节与节之间留半个阿拉伯数字的空隙（如2 431改为2 431）　年份、部分代号、仪器型号等非计量数字不用分节，也不加千分撇　凡数"0"多、5位以上的数字，可以用"万""亿"表示，但千用以上，百、千、百万、十亿等汉字表示，例如3 579 000可写成357.9万但千万写成3百57万千或357万9千。

本刊编辑部