

# 人源 PD-1 蛋白多克隆抗体的筛选与功能验证

巢志英 吕唯 罗岭 李萍 李坤 杨娟娟\*

福州大学, 福建省海洋酶工程重点实验室, 中国·福建 福州 350108

**摘要:** 论文建立了人源程序性死亡受体 1 (hPD-1) 的主要抗原表位区 (hPD-142-168) 的原核表达体系; 制备高纯度, 构象均一、稳定的 hPD-142-168。利用该蛋白免疫 Balb/c 雌性小鼠, 采用 ELISA 法检测鼠抗人血清的滴度, 效价达到  $1:10^6$ , Western-Blot 验证制备的多抗血清特异性识别 hPD-1 的效果。最后, 利用免疫组化 (IHC) 评估与鉴定制备的多抗血清的多克隆抗体, 实验结果表明: 以 hPD-142-168 为免疫原制备的多克隆抗体具有很强的膜定位且背景清晰。

**关键词:** hPD-1 蛋白; 原核表达; 多克隆抗体; 免疫组化

## Screening and Functional Validation of Human PD-1 Protein Polyclonal Antibodies

Zhiying Chao Wei Lv Ling Luo Ping Li Kun Li Juanjuan Yang\*

Fuzhou University, Fujian Key Laboratory of Marine Enzyme Engineering, Fuzhou, Fujian, 350108, China

**Abstract:** This study established a prokaryotic expression system for the major antigenic epitope region of human programmed death receptor 1 (hPD-1) (hPD-142-168) and produced a high-purity, conformationally homogeneous, and stable hPD-142-168 protein. Female Balb/c mice were immunized with the protein, and the titer of mouse anti-human serum was detected by ELISA, achieving a titer of  $1:10^6$ . The specificity of the polyclonal antiserum in recognizing hPD-1 was verified via Western blot. Finally, the membrane localization and specificity of the polyclonal antibodies were evaluated and validated by immunohistochemistry (IHC). Results demonstrated that the antiserum prepared using hPD-142-168 as an immunogen exhibited strong membrane localization and a clear background in tissue detection.

**Keywords:** human PD-1 protein; prokaryotic expression; polyclonal antibodies; immunohistochemistry

## 0 前言

Human PD-1 (hPD-1) 是 CD28/CTLA-4 家族的重要免疫抑制分子, 通过调节 T 细胞活性维持免疫稳态<sup>[1-2]</sup>。hPD-1 蛋白包含胞外 IgV 和 IgC 结构域。作为免疫检查点核心成员, hPD-1 在活化的 T/B 细胞、树突状细胞等广泛表达。其负向调控机制在肿瘤免疫逃逸中起关键作用——肿瘤细胞高表达 PD-L1, 通过 hPD-1 通路抑制抗肿瘤免疫应答<sup>[3-4]</sup>。目前, PD-1/PD-L1 抑制剂 (如纳武单抗、阿特珠单抗等) 已成为多种癌症的治疗突破, 通过阻断该通路恢复 T 细胞活性<sup>[5]</sup>。2015 年, 中国将 PD-1/PD-L1 通路列为抗癌药物研发重点。近期研究通过克隆 hPD-1 的 IgV 抗原表位区 (42-168 为氨基酸残基), 成功制备高特异性鼠抗人多抗血清, 为开发快速肿瘤诊断技术提供基础, 进而推动 PD-1 靶向治疗的精准化与临床转化。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

蛋白表达载体 pET-22b, 宿主菌 DH-5 $\alpha$  和 BL21 (DE3) 感受态细胞均由本实验室保存。hPD-1 的基因由南京金斯瑞公司合成。分子克隆所使用的上下游引物由生工生物工程 (上海) 有限公司合成。

### 1.2 试剂与仪器

实验用鼠购自吴式动物公司。分子克隆实验中, TapDNA 聚合酶、 $2\times$  dNTP、 $10\times$  PCR buffer、限制性内切酶 (Nde I/Xho I)、T4 DNA 连接酶及蛋白 Marker 均购自 Takara 公司; 质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒、卡那霉素、IPTG 等化学试剂由生工生物工程 (上海) 有限公司提供。LB 培养基的胰蛋白胨和酵母提取物购自 Oxoid, 弗式佐剂 (完全/不完全) 购自 Sigma, 免疫组化及 ELISA 试剂由福州迈新生物提供。实验仪器包括: 高速冷冻离心机 (Eppendorf)、pH 计 (Thermo Fisher)、超净工作台 (苏州净化)、超声破碎仪 (宁波新芝)、紫外分光光度计 (上海第三分析仪器)、生物安全柜 (上海力康)、倒置显微镜 (莱卡)、PCR 仪 (Eppendorf) 及超低温冰箱 (Thermo Fisher)。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 引物的设计和合成

利用 primer 5.0 设计引物对 hPD-1 蛋白的胞外免疫球蛋白样 IgV 结构域 (hPD-1<sup>42-168</sup>) 进行扩增, 引物由上海生工合成。

#### 1.3.2 重组质粒的构建和鉴定

以人工合成的 hPD-1 基因为模板, 利用上述的引物, 进行聚合酶链式反应 (PCR) 大量扩增 hPD-1<sup>42-168</sup> 的基因片段,

扩增体系为 50 $\mu$ L, PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C -5min, 94 $^{\circ}$ C -30s, 55 $^{\circ}$ C -30s, 72 $^{\circ}$ C -45s, 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C -5min。同时, 利用 Nde I 和 Xho I 双酶切上述扩增的 hPD-1<sup>42-168</sup> 基因片段和 pET-22b 载体, 并将二者进行连接, 转化至 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 挑选单菌落进行 PCR 鉴定, 将阳性菌落送至测序公司测序, 将测序正确的重组质粒命名为 pET-22b- hPD-1<sup>42-168</sup>。提取测序正确的单菌落重组质粒, 转化至 BL21 (DE3) 感受态细胞进行蛋白的表达与纯化。

### 1.3.3 目的基因的诱导表达及纯化

挑取含 pET-22b-hPD-142-168 的 BL21 (DE3) 单克隆菌落, 接种至含 50 $\mu$ g/mL 氨苄的 LB 培养基 (10mL), 37 $^{\circ}$ C、220rpm 过夜培养后, 按 1 : 100 接种至 1L 相同培养基中, 37 $^{\circ}$ C、220rpm 培养至 OD<sub>600nm</sub>=0.6, 加入 0.5mM IPTG 诱导 6h。4 $^{\circ}$ C、4000rpm 离心 30min, PBS 洗涤 3 次后重悬菌体, 超声破碎后收集上清。8M 尿素 PBS 溶解沉淀, Ni<sup>2+</sup>-NTA 柱纯化。纯化蛋白透析复性 (100mM Tris-HCl pH 8.5, 200mM NaCl, 0.2mM GSH, 0.2mM GSSG, 0.099mM NDSB, 5% glycerol) 12h, 4 $^{\circ}$ C、11000rpm 离心 30min 后浓缩至 5mg/mL。

### 1.3.4 western-blot 法鉴定 hPD-1 蛋白

将纯化后的 hPD-1<sup>42-168</sup> 重组蛋白经聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 转移至 PVDF 膜, 加入 5% (质量分数) BSA-TBST 于 37 $^{\circ}$ C 封闭 1h, 洗膜 3 次, 每次 3min, 加入从 CST 购买的兔抗人 PD-1 单抗作为一抗于 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h, 洗膜后加入 HRP 标记的羊抗鼠二抗于 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h, 洗膜, 利用 ECL 法检测实验结果。

### 1.3.5 多抗血清制备及滴度测定

分别将纯化后的 hPD-1<sup>42-168</sup> 重组蛋白利用生理盐水稀释至浓度为 1mg/mL, 然后与等体积的弗氏完全佐剂混合, 利用乳化器将混合物乳化均匀。对 Balb/c 雌性小鼠进行免疫, 首次免疫剂量为 100 $\mu$ g/ 只, 加强免疫两次 (时间间隔为 14d, 两个重组蛋白浓度为 1mg/mL 样品与弗氏不完全佐剂混匀), 免疫剂量为 50 $\mu$ g/ 只。免疫前三天的血清作为空白对照; 第三次免疫 10 天后断尾取血清利用间接 ELISA 法测定多抗的滴度。

### 1.3.6 多抗血清的特异性测定

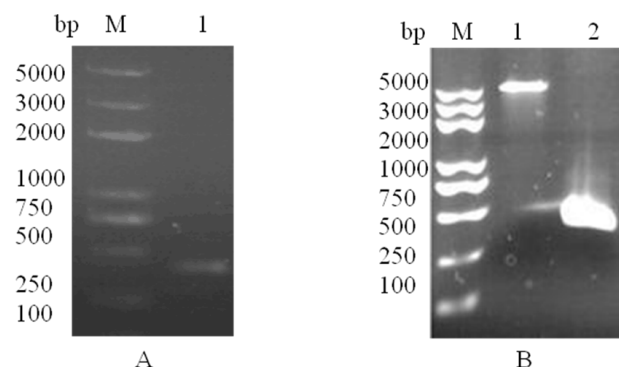
采用常规 Western-blot 法检测制备的 hPD-1<sup>42-168</sup> 重组蛋白的多抗血清的效果, 具体步骤按 1.3.4 进行, 其中一抗为制备的 hPD-1<sup>42-168</sup> 重组蛋白的多抗血清 (1 : 1000), 二抗为 HRP 标记的羊抗鼠抗体。

## 2 结果

### 2.1 重组表达质粒的鉴定

以合成的 hPD-1 基因为模板, 利用 PCR 方法成功扩增 hPD-1<sup>42-168</sup> 相应的基因片段, 其大小为 378bp, 同预期一致, 然后使用常规的酶切酶联方法, 将目的基因插入 pET-22b 载

体中获得重组质粒, 最后将经 PCR 验证和基因测序表明正确的重组质粒 pET-22b-hPD-1<sup>42-168</sup> 转化至 BL21 (DE3) 感受态细胞进行蛋白的表达与纯化 (见图 1)。

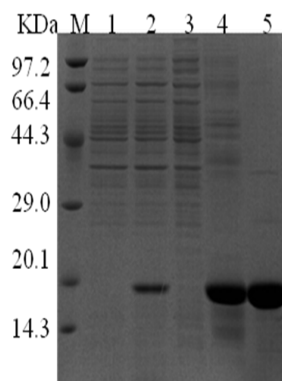


(A) hPD-1<sup>42-168</sup> 的 PCR 扩增产物电泳图 M—Marker DL 2000; 1—目标产物; (B) 质粒和目的基因双酶切电泳图 M—Marker DL 2000; 1—质粒双酶切结果; 2—目的基因双酶切结果。

图 1 hPD-1<sup>42-168</sup> 的 PCR 扩增产物电泳和质粒、目的基因双酶切结果图

### 2.2 hPD-1<sup>42-168</sup> 重组蛋白的表达、纯化与鉴定

按照方法 1.2.3 对重组蛋白进行诱导表达, pET-22b 载体可以使重组蛋白的 N 端携带 His 标签, 得到的融合蛋白相对分子质量大约为 17kDa 左右, 与理论相对分子质量相符。将上述重组蛋白的菌体进行超声破碎, 分别取上清与沉淀进行 SDS-PAGE 鉴定, 发现在菌体裂解液上清中未检测到融合蛋白表达 (泳道 3), 而只在重组菌体的沉淀中检测到重组蛋白表达 (泳道 4), 说明 hPD-1<sup>42-168</sup> 重组蛋白是以包涵体的形式表达的。将 hPD-1<sup>42-168</sup> 重组蛋白的包涵体经 8M 脲溶解变性, 0.45 $\mu$ m 的滤膜过滤, 利用 Ni<sup>2+</sup>-NTA 柱亲和层析法纯化, 经复性液复性可获得纯度达到 95% 左右的融合蛋白 (泳道 5), 见图 2。



hPD-1<sup>42-168</sup> 蛋白表达与纯化的 SDS-PAGE 分析 M—Protein Ruler II; 1—诱导前全菌; 2—诱导后全菌; 3—破碎后上清; 4—破碎后沉淀; 5—纯化后的 hPD-1<sup>42-168</sup> 蛋白。

图 2 hPD-1<sup>42-168</sup> 蛋白表达与纯化的 SDS-PAGE 结果图

### 2.3 hPD-1<sup>42-168</sup> 重组蛋白的多抗血清的制备、滴度测定与效价测定

按照方法 1.2.5 制备鼠抗人的 hPD-1<sup>42-168</sup> 重组蛋白的多抗血清, 采用断尾取血的方式对三次免疫后的 Balb/c 雌性小鼠进行取血, 将取得的血于室温静置 30~60min, 8000g, 4℃ 离心 10min, 移取上清即为免疫后的血清。将第一次免疫前

三天取的小鼠血清作为阴性对照, PBS 作为空白对照。包被 5μg/mL 的重组 hPD-1<sup>42-168</sup> 蛋白, 利用间接 ELISA 法测定抗体滴度与效价。如表 1 所示: 制备的鼠抗人的 hPD-1<sup>42-168</sup> 重组蛋白的多抗血清中抗体效价高于 10<sup>4</sup>, 表明制备的多抗均获得足够的抗体滴度和亲和力。

表 1 PD-1 二次加强免疫血清滴度

Coating Ag		PD-1 二次加强免疫血清滴度检测							
稀释度	编号	NC:1	PC:1	NC:2	PC:2	NC:3	PC:3	NC:4	PC:4
1000		0.0504	0.0567	0.0578	0.0631	0.0589	0.0755	0.0617	0.0728
5000		0.0601	OVER	0.0698	OVER	0.0674	OVER	0.0730	OVER
25000		0.0655	OVER	0.0656	OVER	0.0653	OVER	0.0644	OVER
125000		0.0662	1.3754	0.0715	1.6939	0.0681	1.9925	0.0813	1.9372
625000		0.0768	0.5348	0.0813	0.0847	0.0790	0.7578	0.0829	0.9275
3125000		0.0753	0.2014	0.0599	0.1993	0.0785	0.3268	0.0728	0.2518
15625000		0.0683	0.0914	0.0682	0.1413	0.0707	0.8914	0.0724	0.1109
NONE		0.0691	0.0629	0.0659	0.0632	0.0599	0.0619	0.0626	0.0669

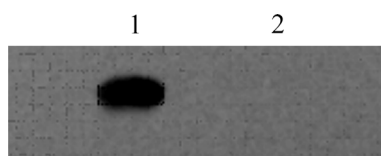
### 2.4 hPD-1<sup>32-160</sup> 重组蛋白的多抗血清的特异性检测

利用从 Sino Biological 公司购买的 hPD-1 蛋白为检测抗原, 以未免疫的 Balb/c 雌性小鼠血清作为阴性对照 (见图 3, 泳道 2), 采用 Western-Blot 方法对制备的 hPD-1<sup>42-168</sup> 重组蛋白的多抗血清的特异性进行检测。Western-Blot 结果显示: 所制备的多抗血清在 hPD-1 蛋白相应的位置出现了特异性反应条带 (见图 3, 泳道 1), 而阴性对照则在 hPD-1 蛋白相应位置无特异性反应条带。该实验结果表明: hPD-1<sup>42-168</sup> 重组蛋白作为免疫原所制备的多抗血清能够特异性的识别 hPD-1 蛋白。

清均具有良好的滴度。Western-blot 实验结果表明本论文以 hPD-1<sup>42-168</sup> 重组蛋白作为免疫原所制备的多克隆抗体能够特异性的识别 hPD-1 蛋白。论文的研究结果不仅为 hPD-1 蛋白的功能研究提供有用的抗体试剂, 也为建立快速、高效的肿瘤诊断方法奠定一定的基础。

#### 参考文献:

- [1] Bray F, Laversanne M, Weiderpass E, et al. The ever-increasing importance of cancer as a leading cause of premature death worldwide[J]. *Cancer-Am Cancer Soc*,2025,127(16):3029-3030.
- [2] 杨浩,饶莉.程序性细胞死亡因子1信号通路研究进展[J].*西部医学*,2013,25(9):1422-1425.
- [3] 王宝英,宋爱华,李涛,等.PD-1/PD-L1通路在免疫调节作用中的研究进展[J].*现代检验医学杂志*,2014,29(3):124-126.
- [4] Sharpe A H, Wherry E J, Ahmed R, et al. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection[J]. *Nature Immunology*,2007,8(3):239.
- [5] Sung H, Ferlay J, Siegel R L, et al. Global cancer statistics 2024: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *Ca-Cancer J Clin*,2025,71(3): 209-249.



1—实验组; 2—阴性对照。

图 3 Western-blot 法鉴定多抗血清

### 3 讨论

hPD-1 在多种恶性肿瘤, 如宫颈癌、卵巢癌、乳腺癌、肺癌、肝癌、食管癌和胰腺癌细胞中呈异常表达<sup>[3-4]</sup>。因此, 可采用 IHC 的方法对组织或细胞中的 PD-1 蛋白进行定量检测和精确定位, 以此指导肿瘤的诊断、治疗以及准确评价肿瘤预后疗效。本研究利用原核表达系统大量制备了 hPD-1<sup>42-168</sup> 重组蛋白, 经 Ni<sup>2+</sup>-NTA 柱纯化与复性。重组蛋白 hPD-1<sup>42-168</sup> 作为免疫原免疫 Balb/c 雌性小鼠制备鼠抗人的多抗血清, 经间接 ELISA 法检测其效价均达到 1 : 10<sup>6</sup>, 表明多抗血

清均具有良好的滴度。Western-blot 实验结果表明本论文以 hPD-1<sup>42-168</sup> 重组蛋白作为免疫原所制备的多克隆抗体能够特异性的识别 hPD-1 蛋白。论文的研究结果不仅为 hPD-1 蛋白的功能研究提供有用的抗体试剂, 也为建立快速、高效的肿瘤诊断方法奠定一定的基础。

通讯作者: 杨娟娟 (1986-), 博士, 副教授, 从事分子生物学与结构生物学研究。  
基金项目: 福建省自然科学基金资助项目 (项目名称: 靶向 PD-L1 用于肿瘤免疫治疗的新颖活性小分子化合物的发现; 项目编号: 2022J01560)。