



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111116748 B

(45) 授权公告日 2022. 10. 25

(21) 申请号 202010156943.9

(22) 申请日 2020.03.09

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111116748 A

(43) 申请公布日 2020.05.08

(66) 本国优先权数据
201910604225.0 2019.07.05 CN

(73) 专利权人 石河子大学
地址 832003 新疆维吾尔自治区石河子市
北四路221号

(72) 发明人 陈创夫 吴鹏

(74) 专利代理机构 北京金智普华知识产权代理
有限公司 11401
专利代理师 杨采良

(51) Int.Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

A61K 47/68 (2017.01)

审查员 程呈

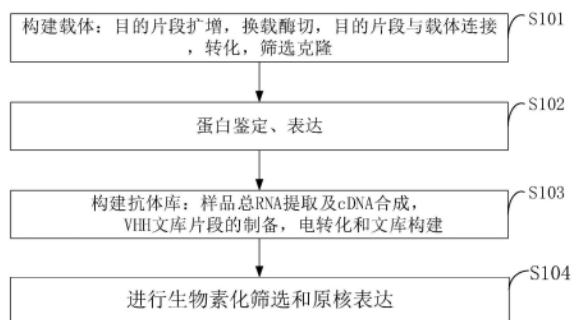
权利要求书1页 说明书25页
序列表2页 附图10页

(54) 发明名称

PD-L1纳米抗体、制备方法及其应用

(57) 摘要

本发明属于抗体技术领域,公开了一种PD-L1纳米抗体、制备方法及其应用,设计合成引物2条,通过PCR的方法扩增出足够量的目的产物换载酶切,目的片段与载体连接,转化,筛选克隆;蛋白鉴定表达;构建抗体库;选用M13噬菌体展示系统展示VHH抗体文库,该系统由pMECS噬菌粒载体、E.coli TG1和M13K07辅助噬菌体组成。本发明在噬菌粒载体pMECS中,Pst I酶切位点之前的序列为pe1B分泌信号肽和抗体第一个框架区部分氨基酸的编码序列,pe1B信号肽能够将后续多肽引导分泌至周质腔;Not I酶切位点之后是HA和6×His标签的编码序列,可用于融合蛋白的纯化或检测。



1. 一种纳米抗体,其特征在于,所述纳米抗体为PD-L1纳米抗体,其序列为SEQ ID NO: 1, DNA序列为:cggggcgggaacatttccaagcttaaggagacagtacatatgaaatacctattgcctacggcagccgctggattgttattactcgcggcccagccggccatggcccaggtgcagctgcaggagtctgggggaggcttggtgcaggctgggggctctctgagactctcctgtgcagcctctggacgcaccttcagaaacgatgtcatggcctggttccgccagattccaggaaggagcgtgagtttgttgcggtgattgcctacgatgcggctgacacagactacgcagactccgtgaaggccgattcatcatctccagagacaacgcccaagaacacgatataattgcaaatgaacaccctgaaaccctgaggacacggccgtttattactgtgcagccgacaaggacagaatgtacggtagtaggactggccggaatatgagtatgactactggggccaggggaccaggtcaccgtctcctcagcggccgcatacccgtacgacgttccggactacggttcccaccaccatcaccatcactagactgttgaaagttgtttagcaaaacctcatacagaaaattcatttactaacgtctggaaagacgacaaaaactttagatcgttacgctaactatgagggctgtctgtggaatgtacaggcgttgctgtttgtactggtgacgaaactcagtgttacggtacatgggttccctattgggcttgcctatccctgaaaatgaggggtgtggctctgaggggtggcggttctgaggggtggcggtactaaacctcctgagtacgggtgatacctattccgggctatacttataatcaacctctcgcagcacttatccgcctggactggagcaaaaccccgctaatcctaaatccttctcttggaggagtctcagcctcttaatactttcatgtttcagaataataggtccgaataaggcagggtgcataagctgtttatacgggactgttactcaaggcactgacccgattaaagttagtaacagtacactcccgtgaatcatacgaagcatggtaggacgcttaactgggacaggaaaagtc。

PD-L1纳米抗体、制备方法及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于抗体技术领域,尤其涉及一种PD-L1纳米抗体、制备方法及其应用。

背景技术

[0002] 目前,已有一些抗PD-L1的单克隆抗体获批用于癌症的治疗。例如PD-L1抑制剂Tecentriq (Atezolizumab或称MDL3280a),批准适应症为膀胱癌(尿路上皮癌)。PD-L1在绝大多数肿瘤组织中表达增高,例如乳腺癌、非小细胞肺癌和黑色素瘤等,PD-L1在肿瘤细胞中的表达也被认为是许多类型的恶性肿瘤的预后因素。为了阻断PD-L1与受体PD1结合,抑制肿瘤发展,免疫治疗抗体药物的研发也非常迅速,opdivo、keytruda、Atezolizumab等知名药物也有着显著效果。因此,在使用这些药物前,进行PD-L1基因解码基因检测是非常有必要的。同济大学医学院肿瘤研究所所长,上海市肺科医院周彩存教授指出,当前的临床试验证据显示,PD-1免疫检查点抑制剂如帕博利珠单抗,在作为单药一线,或联合标准化疗治疗无EGFR/ALK基因突变的非小细胞肺癌时,都显示了比单纯的标准化疗更好的疗效,为病人带来了更显著的生存获益。但是,在判断是单药治疗还是联合化疗治疗时,我们需要根据肿瘤生物标志物PD-L1的表达情况来决定,以取得更精准的效果。目前国外临床研究免疫药物治疗对应的有四种PD-L1检测试剂盒,分别是:罗氏的SP142(用于罗氏的Atezolizumab单抗的PD-L1检测)、罗氏的SP263(用于阿斯利康Durvalumab单抗的PD-L1检测)、Dako的28-8(用于施贵宝的纳武利尤单抗的PD-L1检测)、Dako的22C3(用于默沙东的帕博利珠单抗的PD-L1检测)。

[0003] 生物免疫治疗相对传统化疗或靶向治疗,有一个本质逻辑区别:“免疫治疗”针对的是免疫细胞(或者说是免疫系统),而不是癌症细胞。在癌症免疫治疗中,抑制免疫检查点通路被认为是最有前景的治疗方式之一,其机制是通过抑制通路中相关靶点解除T细胞活性受抑状态,活化后的T细胞能够进攻和消灭肿瘤细胞。抗体并不直接作用于肿瘤细胞,而是通过作用于T细胞类间接杀伤肿瘤细胞;另外,它们并不是针对肿瘤表面的某种特定物质,而是系统性地增强了全身的抗肿瘤免疫反应。

[0004] 纳米抗体是由比利时科学家于1993年在自然杂志中首次报道,在羊驼外周血液中存在一种天然缺失轻链的抗体,该抗体只包含一个重链可变区(VHH)和两个常规的CH2与CH3区,但却不像人工改造的单链抗体片段(scFv)那样容易相互沾粘,甚至聚集成块。更重要的是单独克隆并表达出来的VHH结构具有与原重链抗体相当的结构稳定性以及与抗原的结合活性,是目前已知的可结合目标抗原的最小单位。VHH晶体为2.5nm,长4nm,分子量只有15KD,因此也被称作纳米抗体(Nanobody, Nb)。

[0005] 综上所述,现有技术存在的问题是:

[0006] (1) 单克隆抗体存在异源性。如果用于小鼠单克隆抗体的单克隆抗体,对人体的应用会产生抗鼠单克隆抗体,它不可重复应用,影响其疗效。

[0007] (2) 单克隆抗体体积相对较大,不能较好的进入肿瘤组织。

[0008] (3) 单克隆抗体开发周期长,生产成本高,产量低。

- [0009] (4) 单克隆抗体类药物价格昂贵,研发复杂,人源化复杂,成功率有限。
- [0010] (5) 难以大规模生产,单克隆抗体药物在建厂和生产过程中消耗的资金非常巨大
- [0011] (6) 不稳定,容易降解,保存成本高;容易污染,维护成本高昂。在高温和强酸强碱的条件下会分解,须在低温下保存,否则就会在数周内完全失去活性。抗体能被消化系统很快降解,从而阻止了其进入大脑或其他有效作用部位。
- [0012] 解决上述技术问题的意义:
- [0013] 纳米抗体包含3个高变区与4个骨架区,高变区均在同一侧。与人类抗体的VH有着同样的结构,测序显示与VH3同源性极高,但是纳米抗体的CDR1 (Complementarity-determining region-1) 与CDR3 (Complementarity-determining region-3) 相对较长。纳米抗体的CDR3具有突出,可以增加与抗原结合的亲和力。纳米抗体具有稳定的结构,保证了结合的稳定性。噬菌体展示技术是应用普遍的一种生产纳米抗体的途径,将纳米抗体的序列导入到噬菌体序列中,目的蛋白将表达在噬菌体的外壳上,噬菌体文库构建是免疫驼科动物,取动物白细胞,将RNA进行反转录,构建对抗原有针对性地文库。
- [0014] 纳米抗体可以在严苛的环境中保持构象不变。纳米抗体抗热特别好,可以在室温下存放一周以上。而超强的耐酸碱性可以使纳米抗体更好的抵抗不同的环境,也可以增加纳米抗体的作用范围。单域重链抗体微小的体积也使它获得了较低的免疫原性。使动物长期注射蛋白成为可能。纳米抗体与抗原的结合位点也与单克隆抗体不同,纳米抗体可以更紧密的结合到抗原上,并且可以结合到传统抗原结合不到的地方。中国医学科学院研制成一种具有定向性、选择性杀伤肿瘤细胞的“单抗-药物”联结物,即以单克隆抗体为“载体”,携带药物精确地和肿瘤细胞结合,能在原位杀死癌细胞,而对其他正常细胞无损伤。这种综合性药物好比是专攻癌症的“生物导弹”,人们把这种治疗方法形象地比喻为导弹疗法。

发明内容

- [0015] 针对现有技术存在的问题,本发明提供了一种PD-L1抗原免疫羊驼制备PD-L1纳米抗体的方法。
- [0016] 本发明是这样实现的,一种纳米抗体,所述纳米抗体为PD-L1纳米抗体,其序列为SEQ ID NO:1。
- [0017] 一种通过哺乳动物细胞表达PD-L1抗原免疫羊驼制备PD-L1纳米抗体的方法,所述的通过哺乳动物细胞表达PD-L1抗原免疫羊驼制备PD-L1纳米抗体的方法包括:
- [0018] 通过PD-L1抗原为哺乳动物细胞瞬时转染表达,使用生物素化方法筛选得到纳米抗体片段SEQ ID NO:1。进一步,通过哺乳动物细胞表达PD-L1抗原免疫羊驼制备PD-L1纳米抗体的方法进一步包括:
- [0019] 步骤一:构建载体:目的片段扩增,换载酶切,目的片段与载体连接,转化,筛选克隆。
- [0020] 步骤二:蛋白鉴定、表达。
- [0021] 步骤三:构建抗体库:进行样品总RNA提取及cDNA合成,VHH文库片段的制备,电转化和文库构建。
- [0022] 步骤四:进行生物素化筛选和原核表达。
- [0023] 进一步,所述步骤一中,目的片段扩增中包括:

- [0024] (1) 设计合成引物:
- [0025] PD-L1上游引物5'-GACACGAATTCGCCACC-3' SEQ ID NO:2。
- [0026] PD-L1下游引物5'-GTGTCAAGCTTTCACCTATCATCA-3' SEQ ID NO:3。
- [0027] 通过PCR的方法扩增出足够量的目的产物(PD-L1 Uniprot:Q9NZQ7)。
- [0028] (2) PCR反应采用的是pfu高温聚合酶。
- [0029] 进一步,步骤一中,PCR各个成分的用量:
- [0030] 引物浓度为10D溶于400ul ddH₂O。
- | | | |
|--------|--------------------|----------------------------|
| | 反应体系 | 50ul。 |
| | 引物 mix | (1/34) 0.4ul x 13.6 共 8ul。 |
| [0031] | 10X pfu Buffer | 5ul。 |
| | 每段上下游引物 | 各 2ul。 |
| | Pfu | 0.4ul(5u/ul)。 |
| | ddH ₂ O | 分别补水至 50ul。 |
- [0032] 进一步,步骤一中,目的片段PCR的方法扩增具体步骤为:
- [0033] (1) 第一轮PCR程序:
- | | | | |
|--------|------|-------|----------|
| | 95°C | 3min | } 18cyc。 |
| | 95°C | 22sec | |
| [0034] | 50°C | 20sec | |
| | 72°C | 40sec | |
| | 72°C | 5min | |
- [0035] 以上为第一轮PCR反应体系,以第一轮} PCR产物为模板做第二轮PCR。
- [0036] (2) 第二轮PCR反应体系:
- [0037] PCR各个成分的用量:引物浓度为10D溶于400ul ddH₂O。
- | | | |
|--------|--------------------|-----------------|
| | 上游引物-1 | 2 ul。 |
| | 下游引物-34 | 2 ul。 |
| | 第一轮 pcr 产物 | 1ul。 |
| [0038] | dNTP | 1ul(25mM each)。 |
| | 10X pfu Buffer | 5ul。 |
| | Pfu | 0.4ul(5u/ul)。 |
| | ddH ₂ O | 补齐至 50 ul。 |
- [0039] (3) 第二轮PCR程序:
- | | | | |
|--------|------|-------|----------|
| | 95°C | 3min | } 22cyc。 |
| | 95°C | 22sec | |
| [0040] | 55°C | 20sec | |
| | 72°C | 45sec | |
| | 72°C | 5min | |
- [0041] 以第二轮PCR琼脂糖凝胶电泳,回收纯化好的片段备用酶切。
- [0042] 进一步,步骤一中,换载酶切,将上述PCR产物进行酶切。
- | | | |
|--------|--------------------|--------------|
| | PCR 产物片段酶切体系 | 50ul。 |
| | 纯化回收好的片段 | 1ug(20ul)。 |
| [0043] | 10X FD Buffer | 5ul。 |
| | EcoRI | 1ul(10u/ul)。 |
| | HindIII | 1ul(10u/ul)。 |
| | ddH ₂ O | 23ul。 |
- [0044] 以上体系放入37°C恒温水浴锅中反应2h。
- [0045] 载体的酶切体系:

	PCDNA3.1+	1ug。
	10X FD Buffer	5ul。
[0046]	EcoRI	1ul(10u/ul)。
	HindIII	1ul(10u/ul)。
	ddH ₂ O	42ul。

[0047] 以上体系放入37℃恒温水浴锅中反应2h。

[0048] 回收酶切的载体和片段。

[0049] 进一步,步骤一中,将回收纯化好的目的DNA片段和载体,进行连接。

[0050] 连接体系:20ul。

[0051] 酶切目的片段:8ul。

[0052] 酶切载体PCDNA3.1+4ul。

[0053] 10X T4 DNAligase Buffer 2ul。

[0054] T4 DNAligase 1ul (5u/ul)。

[0055] ddH₂O补充至20ul。

[0056] 上述连接混合液放在22℃PCR仪1h即可。

[0057] 进一步,步骤一中,转化,筛选克隆:

[0058] 将上述连接液转入oneshort感受态中,检测筛选出阳性克隆进行测序。

[0059] 进一步,PD-L1纳米抗体DNA序列为:

[0060] CGGGGCGGGAACATTTCCAAGCTTAAGGAGACAGTACATATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCT
GGATTGTTATTACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCCCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGGC
TGGGGGCTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGACGCACCTTCAGAAACGATGTCATGGCCTGGTTCCGCCAGA
TTCCAGGGAAGGAGCGTGAGTTTGTGCGGTGATTGCCTACGATGCGGCTGACACAGACTACGCAGACTCCGTGAAG
GGCCGATTCATCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGATATATTTGCAAATGAACACCCTGAAACCTGAGGACAC
GGCCGTTTATTACTGTGCAGCCG

[0061] ACAAGGACAGAATGTACGGTAGTAGGCACTGGCCGGAATATGAGTATGACTACTGGGGCCAGGGGACC
CAGGTCACCGTCTCCTCAGCGGCCGCATACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTCCCACCACCATCACCATCACT
AGACTGTTGAAAGTTGTTTAGCAAAACCTCATAACAGAAAATTCATTTACTAACGTCTGAAAGACGACAAAACCTT
AGATCGTTACGCTAACTATGAGGGCTGTCTGTGGAATGCTACAGGCGTTGTCGTTTGTACTGGTGACGAACTCAG
TGTTACGGTACATGGGTTCCCTATTGGGCTTGCTATCCCTGAAAATGAGGGTGGTGGCTCTGAGGGTGGCGGTTCTG
AGGGTGGCGGTTCTGAGGGTGGCGTACTAAACCTCCTGAGTACGGTGATACACCTATCCGGGCTATACTTATAT
CAACCCTCTCGACAGCACTTATCCGCCTGGTACTGGAGCAAAACCCCGCTAATCCTAAATCCTTCTCTTGGAGGAG
TCTCAGCCTCTTAATACTTTCATGTTTCAGAATAATAGGTCCGAATAAGGCAGGGTGCATAAGCTGTTTATACGGG
ACTGTTACTCAAGGCACTGACCCGATTAAGTTAGTAACAGTACACTCCCGTGAATCATAACGAAGCATGGTAGGAC
GCTTAACCTGGGACAGGAAAAGTC SEQ ID NO:1。

[0062] 进一步,步骤三包括:

[0063] 利用骆驼抗体引物对,分别扩增出四个VHH文库片段。将四种VHH文库片段分别插入pMECS噬菌粒载体,并转化到大肠杆菌TG1,构建噬菌体展示抗体免疫文库,库容>10⁹。从文库中随机挑取20个克隆,进行序列测定和分析,使文库中大于99%的克隆包含目的插入序列。

[0064] 进一步,VHH文库片段的制备包括:分别以cDNA为模板,使用引物CAL-leader和CAL-CH2扩增骆驼抗体片段,取适量PCR产物进行1%琼脂糖凝胶电泳检测。

[0065] 连接和转化预实验:

[0066] 在正式建库前,通过连接和转化预实验,对噬菌粒载体质量、载体和VHH文库片段的连接效率进行测试和评估。使用T4 DNA ligase将经Pst I/Not I酶切后的VHH片段和同样经Pst I/Not I酶切后的噬菌粒载体pMECS以不同的比例进行连接反应,然后转化E.coli TG1化学感受态细胞,涂布氨苄抗性平板进行菌落计数。

[0067] 电转化和文库构建:

[0068] 按照连接和转化预实验得出的最佳比例,将载体与四种VHH片段进行连接反应。纯化后的连接产物经电转化到大肠杆菌TG1,得到15ml转化产物。取10 μ l进行10倍梯度稀释,并取10⁻⁴、10⁻⁵和10⁻⁶共三个梯度进行涂氨苄抗性平板计数,以评估文库库容,库容=克隆数 \times 稀释倍数 \times 转化产物总体积。将剩下的转化产物全部涂布到15块直径为15cm的Amp抗性平板培养过夜,次日分别刮下来混匀后,加入20%终浓度的甘油,分装并冻存于-80 $^{\circ}$ C。

[0069] 免疫文库质量分析:

[0070] 从每种文库的梯度稀释平皿上随机挑取20个单克隆,使用引物MP57和PMCF进行菌落PCR。使用引物MP57对这些克隆进行测序。

[0071] 进一步,步骤四包括:

[0072] 1) PD-L1血清效价检测:

[0073] 用梯度稀释ELISA方法检测PD-L1免疫前后血清效价,包被PD-L1,加入梯度稀释抗血清,二抗为抗羊驼-HRP 1:15000稀释使用,最后用TMB底物显色。

[0074] 2) PD-L1蛋白样品SDS-PAGE、Western-blot和生物素标记:

[0075] SDS-PAGE检测PD-L1蛋白上样量为2 μ g,Western-blot检测,抗血清1:20000稀释,抗羊驼-HRP二抗工作浓度为1:2000,用化学发光法显色。

[0076] 3) 靶点PD-L1的生物素标记及效率检测:

[0077] 对PD-L1进行生物素标记,条件为0.25mg/ml,pH 7.4,蛋白与生物素比例为1:15,室温标记1h。标记好的蛋白,采用PD-Midi脱盐柱去除游离生物素,置换buffer为PBS 5%甘油pH7.4,最后各分装后保存于-70 $^{\circ}$ C。

[0078] 检测PD-L1的生物素标记效率:取两份1.5 μ g标记后的b-PD-L1蛋白,然后分别加入5 μ g链霉亲和素和5 μ l PBS。另外同样取5 μ g SA,加入5 μ l PBS作为SA样品对照。室温反应1h后,各加入5 μ l的非还原loading buffer,不加热变性,直接进行SDS-PAGE。

[0079] 4) 体外定向筛选:

[0080] 用构建好的免疫文库,对PD-L1进行3轮筛选。

[0081] 5) 鉴定:

[0082] 将第二、三轮洗脱的富集产物中挑322个克隆进行Monoclonal phage ELISA验证,分别包被PD-L1和BSA对照200ng/well。

[0083] 将16个PD-L1序列独特克隆在30 $^{\circ}$ C进行IPTG诱导表达,离心后收集菌体,进行周质腔抽提。将周质腔抽提样品用0.5 \times blocker稀释10倍加入包被并封闭好的PD-L1和BSA中,同时设置TG1周质腔抽提物作为阴性对照。使用mouse anti-HA tag 1:5000稀释的单克隆抗体作二抗,1:5000稀释的羊抗鼠-HRP作为三抗,检测可溶性表达纳米抗体的活性。

[0084] 本发明的另一目的在于提供一种结合所述方法中制备的PD-L1纳米抗体构建的纳米抗体-药物联结物。

[0085] 本发明的另一目的在于提供一种如权利要求1所述纳米抗体在制备肿瘤检测或治疗的试剂中的应用。

[0086] 本发明的另一目的在于提供如权利要求1所述纳米抗体在制备用于提高动物免疫水平的免疫佐剂或者有病毒和/或细菌传播时的免疫促进剂中的应用。

[0087] 综上所述,本发明的优点及积极效果为:

[0088] 本发明通过PD-L1抗原为哺乳动物细胞瞬时转染表达,免疫动物使用羊驼,筛选使用生物素化方法,筛选得到的纳米抗体片段为自己独特的基因序列。本抗体可以用于结合人的靶点阻断信号通路的结合,可以用于作为肿瘤治疗,肿瘤检测等。

[0089] 纳米抗体与抗原的结合位点与单克隆抗体不同,使用纳米抗体替代单克隆抗体可以提高或者协同增强与抗原的结合能力。纳米抗体并不具备完整的抗体结构,缺少Fc端以及Y型结构,致使纳米抗体不容易被识别,可以轻易逃避免疫系统的捕捉。

[0090] 本发明使用人HEK293细胞株对抗原进行表达,使用哺乳动物表达系统表达人的蛋白可以最大化的保证蛋白的原始结构,保证了蛋白拥有翻译后修饰以及糖基化等真核蛋白特有的修饰,可以使获取的蛋白具有较高活性。该方法最大地的保证了蛋白的原始结构与活性。

[0091] 本发明方法使用羊驼作为免疫动物可以更好的保定以及节约抗原的用量。本方法筛选得到的纳米抗体可以高效、特异性的结合到靶点上。

附图说明

[0092] 图1是本发明实施例提供的通过哺乳动物细胞表达PD-L1抗原免疫羊驼制备PD-L1纳米抗体的方法流程图。

[0093] 图2是本发明实施例提供的PCR琼脂糖凝胶电泳原图。

[0094] 图3是本发明实施例提供的载体PCDNA3.1+切过后琼脂糖凝胶电泳图。

[0095] 图4是本发明实施例提供的序列编码噬菌体P111衣壳蛋白示意图。

[0096] 图5是本发明实施例提供的噬菌粒pMECS质粒图谱。

[0097] 图6是本发明实施例提供的PD-L1 PCR扩增图。

[0098] 图7是本发明实施例提供的酶切鉴定结果图一。

[0099] 图8是本发明实施例提供的PD-L1酶切鉴定图二。

[0100] 图9是本发明实施例提供的PD-L1 SDS-PAGE检测结果图。

[0101] 图10是本发明实施例提供的特异性Western-blot检测图。

[0102] 图11是本发明实施例提供的总RNA样品凝胶电泳图。

[0103] 图12是本发明实施例提供的骆驼抗体片段PCR扩增产物电泳分析图。

[0104] 图中,M为Marker,1为阳性对照,2为PD-L1。

[0105] 其中,图12-A为四种样品均有两条带,主带分子量大小约为600bp,另外在900bp处有一条非目标条带(此条带应为传统抗体的扩增片段)。将足量的PCR产物进行电泳,切胶回收600bp的主条带,作为后续PCR的模板,使用VHH-back和PMCF引物扩增VHH。

[0106] 图12-B为PCR扩增得到了分子量大小与预期一致(约为400bp)的目的条带。

[0107] 图13是本发明实施例提供的载体自连检测图。

[0108] 图14是本发明实施例提供的连接小试抗性平板菌落计数图。

- [0109] 图15是本发明实施例提供的VHH文库的库容测定图。
- [0110] 图16是本发明实施例提供的菌落PCR产物琼脂糖凝胶电泳分析图。
- [0111] 图17是本发明实施例提供的靶点蛋白PD-L1经SDS-PAGE检测结果图。
- [0112] 图18是本发明实施例提供的生物素标记效率检测结果图。
- [0113] 图19是本发明实施例提供的PD-L1纳米抗体BHK-21细胞、绵羊肾细胞、MDBK细胞的细胞毒性示意图。图中,横坐标为PD-L1的不同浓度处理($\mu\text{g}/\text{ml}$),纵坐标为测定492nm处的OD值。BHK-21为BHK-21细胞实验组。Kidney为绵羊肾细胞实验组,MDBK为MDBK细胞实验组,数据表示为平均值 \pm SD。
- [0114] 图20是本发明实施例提供的PD-L1对小鼠骨髓干细胞诱导后的原代细胞的NO增强作用示意图,图中,negative为试剂盒阴性对照;PBS为添加PBS的阴性对照,PD-L1为添加PD-L1纳米抗体的实验组。
- [0115] 图21是本发明实施例提供的使用MC-38细胞表达PD-L1受体,PD-L1表达情况示意图。
- [0116] 图22是本发明实施例提供的纳米抗体与MC-38细胞流式检测结果示意图。

具体实施方式

[0117] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白,以下结合实施例,对本发明进行进一步详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。

[0118] 下面结合附图对本发明的应用原理作详细描述。

[0119] 如图1所示,本发明实施例提供的通过哺乳动物细胞表达PD-L1抗原免疫羊驼制备PD-L1纳米抗体的方法通过PD-L1抗原为哺乳动物细胞瞬时转染表达,免疫动物使用羊驼,筛选使用生物素化方法,筛选得到的纳米抗体片段为自己独特的基因序列。

[0120] 具体包括以下步骤:

[0121] S101:构建载体:目的片段扩增,换载酶切,目的片段与载体连接,转化,筛选克隆。

[0122] S102:蛋白鉴定、表达。

[0123] S103:构建抗体库:样品总RNA提取及cDNA合成,VHH文库片段的制备,电转化和文库构建。

[0124] S104:进行生物素化筛选和原核表达。

[0125] 本发明的另一目的在于提供一种利用所述PD-L1纳米抗体的筛选和鉴定方法筛选的PD-L1纳米抗体,所述PD-L1纳米抗体DNA序列为:

[0126] CGGGCGGGAACATTTCCAAGCTTAAGGAGACAGTACATATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGATTGTTATTACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCCCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGGAGGCTTGTTGCAGGCTGGGGCTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGACGCACCTCAGAAACGATGTCATGGCCTGGTTCCGCCAGATTCCAGGGAAGGAGCGTGAGTTTGTGCGGTGATTGCCTACGATGCGGCTGACACAGACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCATCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGATATATTTGCAAATGAACACCCTGAAACCTGAGGACACGGCCGTTTATTACTGTGCAGCCG

[0127] ACAAGGACAGAATGTACGGTAGTAGGCACTGGCCGGAATATGAGTATGACTACTGGGGCCAGGGGACCAGGTCACCGTCTCCTCAGCGGCCGATACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTCCCACCACCATCACCATCACT

AGACTGTTGAAAGTTGTTTAGCAAACCTCATACAGAAAATTCATTTACTAACGTCTGGAAAGACGACAAAACCTTT
 AGATCGTTACGCTAACTATGAGGGCTGTCTGTGGAATGCTACAGGCGTTGTCGTTTGTACTGGTGACGAAACTCAG
 TGTTACGGTACATGGGTTCCCTATTGGGCTTGCTATCCCTGAAAATGAGGGTGGTGGCTCTGAGGGTGGCGGTTCTG
 AGGGTGGCGGTTCTGAGGGTGGCGGTAATAACCTCCTGAGTACGGTGATACACCTATCCGGGCTATACTTATAT
 CAACCCTCTCGACAGCACTTATCCGCCTGGTACTGGAGCAAAACCCGCTAATCCTAAATCCTTCTTGGAGGAG
 TCTCAGCCTCTTAATACTTTCATGTTTCAGAATAATAGGTCCGAATAAGGCAGGGTGCATAAGCTGTTTATACGGG
 ACTGTTACTCAAGGCACTGACCCGATTAAGTTAGTAACAGTACACTCCCGTGAATCATACGAAGCATGGTAGGAC
 GCTTAACTGGGACAGGAAAAGTC SEQ ID NO:1。

[0128] 步骤S101中,本发明实施例提供的目的片段扩增具体为:

[0129] (1) 设计合成引物:

[0130] PD-L1上游引物5'-GACACGAATTCGCCACC-3' SEQ ID NO:2。

[0131] PD-L1下游引物5'-GTGTCAAGCTTTCACCTATCATCA-3' SEQ ID NO:3。

[0132] 通过PCR的方法扩增出足够量的目的产物(PD-L1 Uniprot:Q9NZQ7)。

[0133] (2) PCR反应采用的是pfu高温聚合酶。

[0134] 步骤S101中,本发明实施例提供的PCR各个成分的用量:

[0135] 引物浓度为10D溶于400ul ddH₂O。

反应体系	50ul。
引物 mix	(1/34) 0.4ul x 13.6 共 8ul。
10X pfu Buffer	5ul。
每段上下游引物	各 2ul。
Pfu	0.4ul(5u/ul)。
ddH ₂ O	分别补水至 50ul。

[0136]

[0137] 步骤S101中,本发明实施例提供的目的片段PCR的方法扩增具体步骤为:

[0138] (1) 第一轮PCR程序:

95°C 3min	} 18cyc
95°C 22sec	
50°C 20sec	
72°C 40sec	
72°C 5min	

[0140] 以上为第一轮PCR反应体系,以第一轮} PCR产物为模板做第二轮PCR。

[0141] (2) 第二轮PCR反应体系:

[0142] PCR各个成分的用量:引物浓度为10D溶于400ul ddH₂O。

上游引物-1	2 ul
下游引物-34	2 ul
第一轮 pcr 产物	1ul
dNTP	1ul(25mM each)
10X pfu Buffer	5ul
Pfu	0.4ul(5u/ul)
ddH ₂ O	补齐至 50 ul。

[0143]

[0144] (3) 第二轮PCR程序:

95°C 3min	} 22cyc
95°C 22sec	
55°C 20sec	
72°C 45sec	
72°C 5min	

[0146] 以第二轮PCR琼脂糖凝胶电泳,回收纯化好的片段备用酶切。

- [0147] 步骤S101中,本发明实施例提供的换载酶切,将上述PCR产物进行酶切。
- | | | |
|--------|--------------------|-------------|
| | PCR 产物片段酶切体系 | 50ul |
| | 纯化回收好的片段 | 1ug(20ul) |
| [0148] | 10X FD Buffer | 5ul |
| | EcoRI | 1ul(10u/ul) |
| | HindIII | 1ul(10u/ul) |
| | ddH ₂ O | 23ul |
- [0149] 以上体系放入37℃恒温水浴锅中反应2h。
- [0150] 载体的酶切体系:
- | | | |
|--------|--------------------|-------------|
| [0151] | PCDNA3.1+ | 1ug |
| | 10X FD Buffer | 5ul |
| [0152] | EcoRI | 1ul(10u/ul) |
| | HindIII | 1ul(10u/ul) |
| | ddH ₂ O | 42ul |
- [0153] 以上体系放入37℃恒温水浴锅中反应2h。
- [0154] 回收酶切的载体和片段。
- [0155] 步骤S101中,本发明实施例提供的将回收纯化好的目的DNA片段和载体,进行连接。
- [0156] 连接体系:20ul。
- [0157] 酶切目的片段:8ul。
- [0158] 酶切载体PCDNA3.1+4ul。
- [0159] 10X T4 DNAligase Buffer 2ul。
- [0160] T4 DNAligase 1ul (5u/ul)。
- [0161] ddH₂O补充至20ul。
- [0162] 上述连接混合液放在22℃PCR仪1h即可。
- [0163] 步骤S101中,本发明实施例提供的转化,筛选克隆:
- [0164] 将上述连接液转入oneshort感受态中,检测筛选出阳性克隆进行测序。
- [0165] 下面结合具体实施例对本发明的应用原理进行进一步说明。
- [0166] 实施例1.本发明实施例提供的载体构建,具体为:
- [0167] 1、目的片段扩增具体为:
- [0168] (1) 设计合成引物34条,通过PCR的方法扩增出足够量的目的产物。
- [0169] (2) PCR反应采用的是pfu高温聚合酶。
- [0170] PCR各个成分的用量:(引物浓度为10D溶于400ul ddH₂O)。
- [0171] 反应体系:50ul。引物mix, (1/34) 0.4ul x 13.6共8ul。10X pfu Buffer, 5ul。每段上下游引物,各2ul。Pfu, 0.4ul (5u/ul) 。ddH₂O, 分别补水至50ul。
- [0172] 目的片段PCR的方法扩增具体步骤为:
- [0173] (1) 第一轮PCR程序:
- | | | | |
|--------|-----|-------|----------|
| | 95℃ | 3min。 | |
| | 95℃ | 22sec | } 18cyc。 |
| [0174] | 50℃ | 20sec | |
| | 72℃ | 40sec | |
| | 72℃ | 5min | |
- [0175] 以上为第一轮PCR反应体系,以第一轮} PCR产物为模板做第二轮PCR。
- [0176] (2) 第二轮PCR反应体系:

[0177] PCR各个成分的用量:(引物浓度为10D溶于400ul ddH₂O)。

上游引物-1 2 ul。
下游引物-34 2 ul。
第一轮 pcr 产物 1 ul。

[0178] dNTP 1ul(25mM each)。
10X pfu Buffer 5ul。
Pfu 0.4ul(5u/ul)。
ddH₂O 补齐至 50 ul。

[0179] (3) 第二轮PCR程序:

95°C 3min
95°C 22sec
55°C 20sec } 22cyc。
72°C 45sec
72°C 5min

[0181] 如图2所示,本发明实施例提供的PCR琼脂糖凝胶电泳原图。回收纯化好的片段备用酶切。

[0182] 2、换载酶切,将上述PCR产物进行酶切。

PCR 产物片段酶切体系 50ul。
纯化回收好的片段 1ug(20ul)。
10X FD Buffer 5ul。
EcoRI 1ul(10u/ul)。
HindIII 1ul(10u/ul)。
ddH₂O 23ul。

[0183] EcoRI 1ul(10u/ul)。
HindIII 1ul(10u/ul)。
ddH₂O 23ul。

[0184] 以上体系放入37°C恒温水浴锅中反应2h。

[0185] 载体的酶切体系:

PCDNA3.1+ 1ug。
10X FD Buffer 5ul。
EcoRI 1ul(10u/ul)。
HindIII 1ul(10u/ul)。

[0187] ddH₂O 42ul。

[0188] 如图3所示,本发明实施例提供的载体PCDNA3.1+切过后琼脂糖凝胶电泳图。

[0189] 以上体系放入37°C恒温水浴锅中反应2h。

[0190] 回收酶切的载体和片段。

[0191] 3、目的片段与载体连接,将回收纯化好的目的DNA片段和载体,进行连接。

连接体系: 20ul。
酶切目的片段: 8ul。
酶切载体 PCDNA3.1+ 4ul。
10X T4 DNAligase Buffer 2ul。
T4 DNAligase 1ul (5u/ul)。
ddH₂O 补充至 20ul。

[0192] 10X T4 DNAligase Buffer 2ul。
T4 DNAligase 1ul (5u/ul)。
ddH₂O 补充至 20ul。

[0193] 4、转化,筛选克隆:

[0194] 上述连接混合液放在22°C PCR仪1h即可。

[0195] 实施例2。

[0196] 本发明实施例提供的纳米抗体库构建具体为:

[0197] 1、实验设计

[0198] 选用M13噬菌体展示系统展示VHH抗体文库,该系统由pMECS噬菌粒载体、E.coli TG1和M13K07辅助噬菌体组成。在噬菌粒载体pMECS中,Pst I酶切位点之前的序列为pe1B分

泌信号肽和抗体第一个框架区部分氨基酸的编码序列,pe1B信号肽能够将后续多肽引导分泌至周质腔。Not I酶切位点之后是HA和6×His标签的编码序列,可用于融合蛋白的纯化或检测。紧随其后的序列编码噬菌体P111衣壳蛋白(图4所示)。6×His标签和gene III序列之间有一个琥珀终止密码子,在琥珀终止密码子抑制型菌株(例如E.coli TG1)中有10%~20%的琥珀终止密码子能够翻译为谷氨酸(Glu,或E),VHH与gene III蛋白融合表达,当利用辅助噬菌体M13K07拯救后,VHH抗体展示在噬菌体尾部P111蛋白的N末端。

[0199] 如图4所示,本发明实施例提供的序列编码噬菌体P111衣壳蛋白示意图。

[0200] 因此,首先抽提样品的总RNA,并反转录为cDNA,然后利用CAL-leader和CAL-CH2引物对,扩增骆驼抗体片段。切胶回收上述PCR的~600bp的条带,作为后续PCR的模板,使用VHH-back和PMCF引物扩增VHH基因片段。在VHH基因片段的3'端引入Not I酶切位点(VHH片段的5'端带有Pst I酶切位点),并利用酶切和连接反应,将该片段插入pMECS噬菌粒载体,然后转化到大肠杆菌TG1,构建M13单链丝状噬菌体展示骆驼纳米抗体免疫文库。

[0201] 2、实验材料

[0202] (1) 骆驼外周血淋巴细胞样品采集自骆驼外周血。

[0203] (2) cDNA合成、PCR扩增、限制性内切酶、T4 DNA连接酶等试剂盒和工具酶主要购自Thermo Scientific和New England Biolabs等公司。

[0204] (3) pMECS、E.coli TG1、Helper phage M13K07等实验材料由人畜共患病实验室保存。

[0205] 如图5所示,本发明实施例提供的噬菌粒pMECS质粒图谱。

[0206] 2、实验结果

[0207] (1) 样品总RNA提取及cDNA合成。

[0208] 使用Trizol试剂分别抽提骆驼外周血淋巴细胞样品总RNA,通过琼脂糖凝胶电泳检测总RNA的质量。

[0209] 如图11所示,本发明实施例提供的总RNA样品凝胶电泳图。

[0210] 图中,M为DL2000 DNA marker。

[0211] 总RNA样品存在非常轻微的降解现象,38S、18S及5S rRNA条带均清晰可见,且28S条带亮度大于18S,表明RNA的完整性较好。Nanodrop测定RNA样品的浓度,结果表明RNA样品浓度及纯度符合要求(表1)。以10μg总RNA为模板,反转录合成cDNA。

[0212] 表1:总RNA样品浓度及纯度

样品名称	浓度 (ng/μL)	OD ₂₆₀ /OD ₃₄₀
PD-L1	740.9	2.04

[0214] (2) VHH文库片段的制备

[0215] 分别以上述的cDNA为模板,使用引物CAL-leader和CAL-CH2扩增骆驼抗体片段,取适量PCR产物进行1%琼脂糖凝胶电泳检测,结果如图12-A所示:样品均有两条带,主带分子量大小约为600bp,另外在900bp处有一条非目标条带(此条带应为传统抗体的扩增片段)。将足量的PCR产物进行电泳,切胶回收600bp的主条带,作为后续PCR的模板,使用VHH-back和PMCF引物扩增VHH。结果如图12-B所示:PCR扩增得到了分子量大小与预期一致(约为400bp)的目的条带。

[0216] 如图12所示,本发明实施例提供的骆驼抗体片段PCR扩增产物电泳分析示意图。

- [0217] A, 骆驼抗体片段1st PCR扩增。B, 骆驼纳米抗体VHH片段2nd PCR扩增。
- [0218] (3) 电转化和文库构建
- [0219] 实施例3。
- [0220] 本发明实施例提供的蛋白鉴定、表达, 具体为:
- [0221] (一) 构建哺乳动物细胞表达载体
- [0222] 1、扩增并抽提含有目的基因的载体质粒。
- [0223] 2、亚克隆到真核表达载体pcDNA3.1中。
- [0224] 3、测序验证构建质粒的准确性。
- [0225] 4、通过中抽获得重组质粒pcDNA3.1。
- [0226] (二) 哺乳动物细胞培养, 蛋白表达和纯化小试
- [0227] 1、细胞株及材料
- [0228] 细胞株: HEK293细胞。
- [0229] 培养基: DMEM (10% 血清), DMEM (无血清)。
- [0230] 培养器皿: 10cm dish or 15cm dish
- [0231] 2、HEK293细胞转染 (10cm dish)
- [0232] (1) 转染前24h以4-5X10⁶/10cm培养皿的细胞总量铺板, 当细胞生长状态良好且贴壁细胞密度达到50-80%时即可进行转染。
- [0233] (2) 在1.5ml离心管中加入待转质粒DNA 5ug, 混匀。
- [0234] (3) 将10ul脂质体加入500ul DMEM培养液中, 加入上述DNA, 轻轻混匀, RT温育30min。
- [0235] (4) 将含有DNA和脂质体的液体小心加入到培养皿中, 分散均匀, 置于37℃5%CO₂的培养箱中培养72h。
- [0236] 3、观察并收集细胞
- [0237] (1) 转染72h后, 小心吸干细胞培养液, 用预冷的PBS润洗贴壁细胞1次。
- [0238] (2) 离心收集细胞沉淀。
- [0239] 4、裂解细胞
- [0240] (1) 加细胞裂解液Lysis Buffer: 50mM Tris (pH8.0), 300mM NaCl, 1% Triton X-100, 1mM DTT, 5% 甘油。
- [0241] (2) 200W冰浴超声10min。
- [0242] (3) 16000rpmX20min, 4℃, 收集裂解上清液。
- [0243] 5、Flag标签纯化
- [0244] (1) 使用Flag填料, 1ml柱子用于纯化。
- [0245] (2) 柱子事先用Binding Buffer: (50mM Tris (pH 8.0), 300mM NaCl, 0.1% Triton X-100, 1mM DTT, 5% 甘油) 平衡10CV。
- [0246] (3) 裂解后的细胞上清液加入到平衡好的柱子上。
- [0247] (4) 样品上完, 用Binding Buffer清洗柱子。
- [0248] (5) 用Wash Buffer: (50mM Tris (pH8.0), 500mM NaCl, 1mM DTT, 5% 甘油) 清洗柱子5-10CV, 洗去若结合的非特异吸附的杂质。
- [0249] (6) 用Elution Buffer: (50mM Tris (pH8.0), 150mM NaCl, 150μg/μl Flag

peptide, 1mM DTT, 10% 甘油) 洗脱目标蛋白, 收集目标蛋白。

[0250] 6、Western-blot检测

[0251] (1) 溶液准备:

[0252] 转印缓冲液: 0.025M Tris base, 0.192M 甘氨酸, 30% 甲醇

[0253] 10×TBST: 250mM Tris-HCl (pH 8.0), 1.25M NaCl, 0.5% Tween20

[0254] 封闭液: 1×TBST, 3% 脱脂奶粉

[0255] 洗涤液: 1×TBST

[0256] (2) 实验程序:

[0257] A. 膜准备: 将PVDF膜切成条浸在甲醇中, 室温条件下在摇床上摇1min, 去除甲醇后加入1×TBST。

[0258] B. 膜转印:

[0259] i. SDS-PAGE电泳。

[0260] ii. 用夹心法电转至PVDF膜。

[0261] iii. 海绵和滤纸浸泡在转印缓冲液预湿润。

[0262] iv. 300mA转印80min, 封闭液室温封闭1h或者4℃过夜。

[0263] C. 抗体检测:

[0264] i. 将一抗anti-Flag tag按说明书稀释, 4℃孵育过夜。

[0265] ii. 用洗涤液洗涤3次, 每次5min。

[0266] iii. 用封闭液来稀释二抗, 室温下培育1h。

[0267] iv. 用洗涤液洗涤3次, 每次5min。

[0268] v. TMB显色检测。

[0269] (三) 蛋白鉴定结果:

[0270] 关于蛋白电泳分子量和电泳条带的说明:

[0271] (1) 由于每个蛋白具体的氨基酸组成和排列不相同, 即使是分子量很接近的蛋白, SDS-PAGE胶上的表现也会有所不同。蛋白分子量marker是一个分子量的参考, 在SDS-PAGE电泳上, 目的蛋白有可能和在理论分子量完全吻合, 也有可能高出或者低些。

[0272] (2) 分泌蛋白样品, 有糖基化修饰, 分子量常规会高于理论分子量。另外, 蛋白的糖基化修饰过程不是完全均一的, 经常会看见目的蛋白出现蛋白条带弥散, 出现相互靠近的多条条带, 这些是分泌蛋白的典型电泳表现。

[0273] 下面结合实验一对本发明作进一步描述。

[0274] 实验方法:

[0275] 蛋白表达与羊驼免疫: 试验采用PCR方法扩增PD-L1胞外区序列, 构建重组pcDNA3.1质粒, 将质粒转染至HEK293细胞株中表达目的蛋白, 并对目的蛋白进行SDS-PAGE及Western-blot检测, 通过ProtParam软件分析蛋白性质, 通过SWISS-MODEL软件预测蛋白结构。结果表明: PCR法成功扩增出目的条带, 1% 琼脂糖凝胶电泳显示酶切成功。10% SDS-PAGE检测显示目的蛋白成功表达。Western-blot检测证明蛋白具有特异性。成功构建了纳米抗体文库。成功筛选了高特异的纳米抗体。

[0276] 1材料与方法

[0277] 1.1材料

[0278] 1.1.1质粒与菌株

[0279] pcDNA3.1质粒、HEK293细胞和HEK293感受态细胞,均由新疆民族与地方高发病省部共建实验室保存。

[0280] 1.1.2主要生化试剂

[0281] 胎牛血清、DMEM培养基,购自Gibco公司。EcoRI内切酶、HindIII内切酶、鼠抗His单克隆IgG抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记的兔抗鼠IgG,均购自生工生物工程(上海)股份有限公司。镍柱,购自GE公司。TMB显色液,购自北京中杉金桥生物技术有限公司。SM331 GeneRuler DNA Ladder Mix(Thermo Scientific公司)。(其余试剂均为sangan公司生产)。所用的酶为Thermo Scientific公司生产的NdeI,XhoI酶及对应的FDBuffer。电泳仪为北京六一仪器厂的DYY85型。PCR产物纯化使用生工产的PCR纯化试剂盒。10X T4 DNAligase Buffer所用的连接酶为Thermo Thermo Scientific公司生产。

[0282] 1.2方法:

[0283] 1.2.1PD-L1免疫原的制备:

[0284] 通过Uniprot数据库获取目的序列,使应用Primer Premier 5.0软件设计引物,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,以合成片段为PCR模板。

	引物名称	引物序列
[0285]	PD-L1 上游引物	5'-GACACGAATTCGCCACC-3'
	PD-L1 下游引物	5'-GTGTCAAGCTTCACTTATCATCA-3'

[0286] PCR各个成分的用量:(引物浓度为10D溶于400ul ddH₂O)

PCR 体系	
成分	体积
上游引物	2 ul
下游引物	2 ul
[0287] 目的基因	3 ul
dNTP	1ul(25mM each)
10X pfu Buffer	5ul
Pfu	0.4ul(5u/ul)
ddH ₂ O	补齐至 50 ul

[0288] PD-L1目的片段、TIM-3目的片段、CTLA-4目的片段PCR程序:

PCR 程序		
温度	时间	
95°C	3 min	
[0289] 95°C	22 sec	
55°C	20 sec	22cyc
72°C	45 sec	
72°C	5min	

[0290] PCR完成后进行1%琼脂糖凝胶电泳,回收纯化好的片段酶切备用。

[0291] 1.2.2酶切与鉴定

[0292] 将上述PCR产物进行酶切,PCR产物片段酶切体系50ul。

PCR 产物片段酶切体系 50ul

组份	体积
纯化回收好的片段	1ug(20ul)
[0293] 10X FD Buffer	5ul
EcoRI	1ul(10u/ul)
HindIII	1ul(10u/ul)
ddH ₂ O	23ul

[0294] 以上体系放入37℃恒温水浴锅中反应2h。

[0295] 1.2.3载体的酶切体系：

载体的酶切体系

组份	体积
PCDNA3.1+	1ug
[0296] 10X FD Buffer	5ul
EcoRI	1ul(10u/ul)
HindIII	1ul(10u/ul)
ddH ₂ O	42ul

[0297] 以上体系放入37℃恒温水浴锅中反应2h,回收酶切的载体和片段。

[0298] 目的片段与载体连接

[0299] 将回收纯化好的目的DNA片段和载体,进行连接。

连接体系: 20ul

酶切目的片段	8ul
[0300] 酶切载体 PCDNA3.1+	4ul
10X T4 DNAligase Buffer	2ul
T4 DNAligase	1ul (5u/ul)
ddH ₂ O	补充至 20ul

[0301] 将连接混合液置22℃PCR仪中作用1h。将上述连接液采用42℃热激法转入HEK293感受态细胞中,检测筛选出的阳性克隆,提取重组质粒。

[0302] 1.3SDS-PAGE检测

[0303] 转染HEK293细胞前24h铺板,当细胞生长状态良好且贴壁细胞密度达到50%~80%时进行转染。将10μL脂质体加到500μL DMEM培养基中,加入重组质粒5μg,轻轻混匀,常温温育30min。将含DNA和脂质体的液体小心加到培养皿中,分散均匀,置37℃、5%CO₂培养箱中培养72h。吸干细胞培养液,离心收集细胞,加入细胞裂解液,200W冰浴超声10min。16000r/min离心20min。收集裂解上清液进行10%SDS-PAGE电泳,确定蛋白表达之后使用镍柱纯化蛋白。

[0304] 1.4特异性Western-blot检测

[0305] 将PVDF膜切成条浸在甲醇中,室温条件下在摇床中培养1min。去除甲醇后加入1×TBST进行SDS-PAGE电泳,用夹心法将蛋白电转移至PVDF膜。将滤纸浸泡在转印缓冲液预湿润后,300mA转印80min。于室温条件下用封闭液封闭1h。将一抗进行3000倍稀释,4℃孵育过夜。用PBST洗涤3次,每次5min。然后用封闭液5000倍稀释二抗,室温条件下温育1h。用PBST洗涤3次,每次5min,使用TMB显色液显色。PD-L1一抗为Anti-PD-L1 (ABM4E54) (小鼠单克隆抗体 (ABM4E54) to PD-L1, Anti-PD-L1 antibody (ABM4E54) ab210931), 二抗为山羊多

克隆抗体二抗to小鼠IgG-H&L (HRP) 抗体 (abcam公司ab6789)。

[0306] 1.5免疫羊驼

[0307] 初次免疫,使用弗氏完全佐剂0.5ml+蛋白0.5ml乳化,进行皮下与皮内注射免疫。弗氏不完全佐剂0.25ml+蛋白0.25ml乳化均匀,分别在28天(二免)、49天(三免)、70天(四免)皮下免疫羊驼。弗氏不完全佐剂0.125ml+蛋白0.125ml乳化均匀,分别在91天(五免)、112天(六免)、133天(七免)免疫羊驼。在第144天,分离淋巴细胞。

		免疫方案							
项目	首免	二免	三免	四免	五免	六免	七免	分离淋巴细胞	
免疫时间	0天	28天	49天	70天	91天	112天	133天	144天	
[0308]							3天	PD-L1	
免疫剂量	1 mL	0.5 mL		0.25 mL					
佐剂	弗氏完全佐剂	弗氏不完全佐剂							
免疫方式	皮下、皮内	皮下							

		采血时间	
[0309]	0天	7天	
	28天	35天	
	49天	56天	
	70天	77天	
[0310]	91天	98天	
	112天	119天	
	133天	140天	

[0311] 1.5.1ELISA检测实验步骤

[0312] 抗原分别200ng/well,4度包被过夜。PBST (0.1%)洗板1次,1×bloker 300μl/well,37度封闭2h。PBST (0.1%)洗板1次,0.5×blocker梯度稀释抗血清,100μl/wel加入板中,37度1h。PBST (0.1%)洗板3次,抗羊驼二抗用0.5×blocker稀释1:15000,100μl/孔加入板中37度1h。PBST (0.1%)洗板3次,PBS洗板3次,100μl/孔TMB显色约20min,50μl/孔2M H₂SO₄终止。酶标仪OD450-OD630nm读数。

[0313] 1.5.2淋巴细胞分离:

[0314] 将淋巴细胞分离液预热至22℃。使用肝素钠抗凝管每只羊驼采集外周血200mL。使用等体积的组织稀释液稀释全血。在离心管中加入等体积的分离液。室温,水平转子1000g,离心30min。吸取白膜层,加入10mL PBS洗涤液洗涤白膜层细胞。250g,离心10min。弃上清,5mL的PBS重悬细胞,250g,离心10min。弃上清,5mL的PBS重悬细胞,250g,离心10min。弃上清,细胞使用Trizol重悬。

[0315] 下面结合实验一中骆驼纳米抗体免疫库的构建对本发明作进一步描述。

[0316] 抽提骆驼外周血淋巴细胞总RNA,并反转为cDNA。利用骆驼抗体引物对,分别扩增出四个项目的VHH文库片段。将四种VHH文库片段分别插入pMECS噬菌粒载体,并转化到大肠杆菌TG1,构建噬菌体展示抗体免疫文库,库容>10⁹。从文库中随机挑取20个克隆,进行序列测定和分析,确保文库中99%以上的克隆包含了目的插入序列。0

[0317] 1. 实验材料

[0318] cDNA合成、PCR扩增、限制性内切酶、T4 DNA连接酶等试剂盒和工具酶主要购自Thermo Scientific和New England Biolabs等公司。pMECS、E.coli TG1、Helper phage M13K07等实验材料由实验室保存。

[0319] 2. 实验方法包括：

[0320] 样品总RNA提取及cDNA合成：

[0321] 使用Trizol抽提骆驼外周血淋巴细胞样品的总RNA，通过琼脂糖凝胶电泳检测总RNA的质量。

[0322] VHH文库片段的制备：

[0323] 分别以cDNA为模板，使用引物CAL-leader和CAL-CH2扩增骆驼抗体片段，取适量PCR产物进行1%琼脂糖凝胶电泳检测。

[0324] 引物CAL-leader序列：GTCCTGGCTGCTCTTCTACAAGG。

[0325] 引物CA-CH2序列：GGTACGTGCTGTTGAACTGTTCC。

[0326] PCR体系：

[0327] 使用pfu高保真DNA聚合酶(TransStart FastPfu DNA Polymerase, AP221-01)。

	Component	Volume	Final Concentration
	5× <i>pfu</i> Buffer	10 μL	1×
	dNTPs (2.5 mM each)	4 μL	0.2 mM
[0328]	CAL-leader(10 μM)	1 μL	0.2 μM
	CAL-CH2(10 μM)	1 μL	0.2 μM
	cDNA	2 μL	
	<i>pfu</i> DNA polymerase	1 μL	2.5 units
	DdH ₂ O	31 μL	

[0329] PCR程序：

	Number of cycles	Temperature	Time
	1 cycle	95°C	2 min
[0330]	30 cycles	95°C	30 s
		56°C	30 s
		72°C	1 min
	1 cycle	72°C	5 min
	1 cycle	4°C	∞

[0331] 连接和转化预实验：

[0332] 在正式建库之前，通过连接和转化预实验，对噬菌粒载体质量、载体和VHH文库片段的连接效率进行测试和评估。使用T4 DNA ligase将经Pst I/Not I酶切后的VHH片段和同样经Pst I/Not I酶切后的噬菌粒载体pMECS以不同的比例进行连接反应(每组的载体用量相同)，然后转化E.coli TG1化学感受态细胞，涂布样品有两条带，主带分子量大小约为600bp，另外在900bp处有一条非目标条带，此条带应为传统抗体的扩增片段。将足量的PCR产物进行电泳，切胶回收600bp的主条带，作为后续PCR的模板，使用VHH-back和PMCF引物扩增VHH，PCR扩增得到了分子量大小与预期一致，约为400bp的目的条带。

[0333] 引物VHH-back序列：GATGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGRGGAGG

[0334] 引物PMCF序列:CTAGTGC GCCGCTGAGGAGACGGTGACCTGGGT。

[0335] PCR体系:

Component	Volume	Final Concentration
5×pfu Buffer	10 μL	1×
dNTPs (2.5 mM each)	4 μL	0.2 mM
PMCF (10 μM)	1 μL	0.2 μM
VHH-back (10 μM)	1 μL	0.2 μM
Template	X μL	50 ng/50 μL 体系
pfu DNA polymerase	1 μL	2.5 units
DdH ₂ O	Add to 50 μL	

[0337] PCR程序:

Number of cycles	Temperature	Time
1 cycle	95°C	2 min
25 cycles	95°C	30 s
	58°C	30 s
	72°C	1 min
1 cycle	72°C	5 min
1 cycle	4°C	∞

[0339] 氨苄抗性平板进行菌落计数。

[0340] 电转化和文库构建:

[0341] 在正式建库的连接实验中,按照连接和转化预实验得出的最佳比例,将载体与四种VHH片段进行连接反应。纯化后的连接产物经电转化到大肠杆菌TG1,得到了15ml转化产物。取10μl(即为 10^{-2} ml)进行一系列10倍梯度稀释,并取 10^{-4} 、 10^{-5} 和 10^{-6} 共三个梯度进行涂氨苄抗性平板计数,以评估文库库容,库容=克隆数×稀释倍数×转化产物总体积(ml)。将剩下的转化产物全部涂布到15块直径为15cm的Amp抗性平板培养过夜,次日分别刮下来混匀后,加入20%终浓度的甘油,分装并冻存于-80°C。

[0342] 电转化实验方案:

[0343] 1) 制备E.coli TG1电转化感受态细胞。

[0344] 2) 将纯化后的连接产物加入适量TG1感受态细胞,混合均匀后,分装至0.2cm电转化杯。

[0345] 3) 利用电转化仪进行电转化,BIORAD推荐转化条件:2.5kV,25μF,200Ω。

[0346] 4) 加入2YT培养基至电转化杯中,重悬感受态细胞,37°C,150rpm复苏30min。

[0347] 免疫文库质量分析:

[0348] 从每种文库的梯度稀释平皿上随机挑取20个单克隆,使用引物MP57和PMCF进行菌落PCR。使用引物MP57(-TTATGCTTCCGCTCGTATG-)对这些克隆进行测序。

[0349] PCR体系:

[0350] 使用Taq DNA聚合酶(2×Taq Plus MasterMix,CW2849M)。

Component	Volume	Final Concentration
2×Taq Plus MasterMix	25 μL	1×
MP57 (10 μM)	2 μL	0.4 μM
PMCF (10 μM)	2 μL	0.4 μM
Template	1 μL	
DdH ₂ O	20 μL	

[0351]

[0352] PCR程序:

	Number of cycles	Temperature	Time
	1 cycle	94°C	2 min
[0353]	27 cycles	94°C	30 s
		57°C	30 s
		72°C	1 min
	1 cycle	72°C	2 min
	1 cycle	4°C	∞

[0354] 下面结合实验一中实验结果对本发明作进一步描述。

[0355] 2结果

[0356] 2.1PCR扩增:

[0357] 经PCR扩增得到大小相符的目的条带,用1%琼脂糖凝胶电泳检测目的条带清晰,与预期大小相符,说明成功扩增出目的条带。

[0358] PD-L1 PCR扩增图6所示。图中,M表示DL-10 000Marker。1表示目的条带。泳道为扩增的PCR目的片段全长783bp。

[0359] 2.2酶切鉴定

[0360] pcDNA3.1质粒酶切后用1%琼脂糖凝胶电泳检测,得到大小为为5 300bp的条带(见图7酶切鉴定结果图一)与预期大小相符,说明回收片段酶切成功。图中,1,2表示pcDNA3.1酶切条带。M表示DL-10 000Marker。

[0361] 回收酶切的载体和片段进行凝胶电泳验证。使用质粒小提试剂盒提取目的片段。

[0362] PD-L1酶切鉴定图二,如图8所示。

[0363] 2.3SDS-PAGE检测

[0364] PD-L1 SDS-PAGE检测结果,如图9所示。

[0365] 细胞培养液经10%SDS-PAGE凝胶电泳分析显示与预期大小相符,证明蛋白成功表达,同时证明该蛋白以可溶性形式表达。

[0366] 2.4Western-blot检测

[0367] 特异性Western-blot检测,如图10所示。

[0368] 羊驼免疫实验结果

	12800 倍	25600 倍	51200 倍	102400 倍	204800 倍	409600 倍	PBS
[0369] PD-L1 免疫前	0.072	0.054	0.046	0.042	/	/	0.041
PD-L1 七免	OUT	OUT	2.242	1.491	0.784	0.395	0.043

[0370] 下面结合实验一中噬菌体文库的构建对本发明作进一步描述。

[0371] 样品总RNA提取及cDNA合成:

[0372] 结果如图11总RNA样品凝胶电泳图所示,图中,M为DL2000 DNA marker。四种总RNA样品存在非常轻微的降解现象,28S、18S及5S rRNA条带均清晰可见,且28S条带亮度大于18S,表明RNA的完整性较好。Nanodrop测定RNA样品的浓度,结果表明RNA样品浓度及纯度符合要求(表1)。以10μg总RNA为模板,反转录合成cDNA。

[0373] 表1总RNA样品浓度及纯度

	样品名称	浓度 (ng/μL)	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀
[0374]	PD-L1	740.9	2.04

[0375] VHH文库片段的制备:

[0376] 如图12骆驼抗体片段PCR扩增产物电泳分析图。图中,M为Marker,1为阳性对照,2为PD-L1。结果如图12-A所示:四种样品均有两条带,主带分子量大小约为600bp,另外在900bp处有一条非目标条带(此条带应为传统抗体的扩增片段)。将足量的PCR产物进行电泳,切胶回收600bp的主条带,作为后续PCR的模板,使用VHH-back和PMCF引物扩增VHH。结果如图12-B所示:PCR扩增得到了分子量大小与预期一致(约为400bp)的目的条带。

[0377] 图12-A中A表示骆驼抗体片段1st PCR扩增。图12-B中B表示骆驼纳米抗体VHH片段2nd PCR扩增。

[0378] 下面结合实验一中连接和转化预实验对本发明作进一步描述。

[0379] 1) 结果如图13和图14所示:Pretest 1无插入片段,即载体自连,有9个菌落。在第一个连接比例的实验组(Pretest 2)中,PD-L1的克隆数目分别约为1100个。在第二个实验组(Pretest 3)中,四个项目的克隆数目分别约为1600个。在第三个实验组(Pretest 4)中,四个项目的克隆数目分别约为1600个。通过比较载体自连和最佳实验组中的克隆数目,可以计算载体的自连比例约为: $9 \div 2000 \times 100\% = 0.45\%$ 。第三个连接比例的实验组中,四种样品的克隆数目满足建库要求,且文库片段用量较少。因此,正式建库时均采用第三个实验组的连接比例进行连接反应。

[0380] 其中,图13中,转化后加入培养基至1ml进行复苏,取100 μ L涂布氨苄抗性平板。

[0381] 载体与VHH基因片段以不同的比例连接和转化到E.coli TG1,在氨苄抗性平板上的菌落生长情况。转化后加入培养基至1ml进行复苏,取100 μ L涂布到平皿上,进行培养和计数,故平板上的克隆数目为实际的十分之一。

[0382] 2) 电转化和文库构建:

[0383] 如图15所示,PD-L1文库-5和-6梯度的克隆数量分别为~1800和205个,故库容为: $[205 \times 15 \times 10^6 + (1800 + 205) \times 15 \times 10^5] \div 2 = 3.0 \times 10^9$ 。

[0384] 3) 免疫文库质量分析:

[0385] 结果如图16所示,所有的克隆都有分子量大小约为500bp的特异性条带,表明这些克隆均为阳性。使用引物MP57(TTATGCTTCCGGCTCGTATG)对这些克隆进行测序。

[0386] 下面结合实验中材料及方法对本发明作进一步描述。

[0387] 1) NeutrAvidin预包被的板子、Dynabeads和试剂主要购自Thermo Scientific和国药等公司。

[0388] 2) Helper phage、E.coli TG1等实验材料由本公司保存。

[0389] 3) 实验方法

[0390] PD-L1血清效价检测:

[0391] 用梯度稀释ELISA方法检测PD-L1免疫前后血清效价,包被PD-L1(200ng/well),加入梯度稀释抗血清,二抗为抗羊驼-HRP 1:15000稀释使用,最后用TMB底物显色。

[0392] PD-L1蛋白样品SDS-PAGE、Western-blot和生物素标记:

[0393] SDS-PAGE检测PD-L1蛋白上样量为2 μ g,Western-blot检测,抗血清1:20000稀释,抗羊驼-HRP二抗工作浓度为1:2000,用化学发光法显色。方法同上。

[0394] 靶点PD-L1的生物素标记及效率检测:

[0395] 对PD-L1进行生物素标记,条件为0.25mg/ml,pH 7.4,蛋白与生物素比例为1:15,

室温标记1h。标记好的蛋白,采用PD-Midi脱盐柱去除游离生物素,置换buffer为PBS 5%甘油pH7.4,最后各分装后保存于-70℃。为了检测PD-L1的生物素标记效率,取两份1.5μg标记后的b-PD-L1蛋白,然后分别加入5μg链霉亲和素(SA)和5μl PBS。另外同样取5μg SA,加入5μl PBS作为SA样品对照。室温反应1h后,各加入5μl的非还原loading buffer,不加热变性,直接进行SDS-PAGE。

[0396] 体外定向筛选:

[0397] 用构建好的免疫文库,针对PD-L1进行3轮筛选。

[0398] 鉴定:

[0399] Monoclonal phage ELISA analysis。

[0400] 将第二、三轮洗脱的富集产物中挑322个克隆进行Monoclonal phage ELISA验证,分别包被PD-L1和BSA对照200ng/well。

[0401] Soluble ELISA analysis。

[0402] 将16个PD-L1序列独特克隆(in E.coli TG1)在30℃进行IPTG诱导表达,离心后收集菌体,进行周质腔抽提。将周质腔抽提样品用0.5×blocker稀释10倍加入包被并封闭好的PD-L1和BSA中,同时设置TG1(不含phagemid)周质腔抽提物作为阴性对照。使用mouse anti-HA tag单克隆抗体(ProteinTech,1:5000稀释)作二抗,羊抗鼠-HRP(1:5000稀释)作为三抗,检测可溶性表达纳米抗体的活性。

[0403] 4) 构建pET28a-SUMO载体表达和纯化:

[0404] 为提高纳米抗体的表达量和活性,将10个有活的纳米抗体PD-L1克隆构建到pET28a-SUMO载体中,进行胞内表达,超声破菌后用Ni柱纯化。

[0405] 将纯化的纳米抗体用0.5×blocker梯度稀释加入包被并封闭好的PD-L1和BSA(200ng/well)、中,同时设置PBS作为阴性对照。使用mouse anti-HA tag单克隆抗体(ProteinTech,1:5000稀释)作为二抗,羊抗鼠-HRP(1:5000稀释)作为三抗,检测可溶性纯化纳米抗体的活性。

[0406] 5) 纳米抗体筛选:

[0407] 靶点蛋白PD-L1的抗血清效价测定、SDS-PAGE、Western-blot、生物素标记及效率测试。针对PD-L1筛选相应的免疫文库,采用NeutrAvidin预包被的ELISA板(NA-strip)和Invitrogen Dynabeads固定生物素化的靶点PD-L1(简称“b-PD-L1”),实施筛选。进行3轮筛选,挑选单克隆进行monoclonal phage ELISA实验,鉴定出阳性克隆,测序。对阳性克隆进行可溶性表达、纯化和活性分析。

[0408] 对PD-L1项目用梯度稀释ELISA进行抗血清效价检测,结果效价高,达到1:102400。western-blot结果表明抗血清能特异识别抗原蛋白。蛋白SDS-PAGE检测,结果蛋白条纯度高,无降解。对PD-L1进行生物素标记,标记效率>80%。

[0409] 针对PD-L1进行三轮筛选,在第二轮和第三轮筛选后出现明显富集。采用monoclonal phage ELISA检测R3筛选后的随机克隆,阳性率约40%,将60个强阳性克隆测序,结果共得到16个独特序列克隆。可溶性表达活性分析发现有10个克隆有较好活性。将克隆构建到pET28a-SUMO载体后,5个克隆的蛋白有良好表达,纯化的纳米抗体对PD-L1有很好的结合活性。

[0410] 下面结合实验一中实验结果表对本发明作进一步描述。

[0411] PD-L1抗血清效价检测:

[0412] 结果抗血清效价高,达到1:102400。

[0413] 表1.羊驼免疫前后血清效价检测

抗血清稀释倍数	免疫后血清	免疫前血清
200	/	0.631
400	OUT	0.557
800	OUT	0.396
1600	OUT	0.292
3200	OUT	0.183
6400	OUT	0.118
12800	OUT	0.072
25600	OUT	0.054
51200	2.242	0.046
102400	1.491	0.042
204800	0.784	/
409600	0.395	/
PBS	0.043	0.041

[0415] OUT代表OD450nm下的ELISA值大于3。

[0416] PD-L1蛋白样品SDS-PAGE、Western-blot和生物素标记:

[0417] 1) 筛选抗原SDS-PAGE和Western-blot检测:

[0418] 靶点蛋白PD-L1经SDS-PAGE检测,结果如图17显示,蛋白纯度高,无降解,分子量约35kDa,满足后续标记和筛选要求。Western-blot检测结果显示抗血清特异识别PD-L1。

[0419] 2) 生物素标记效率检测结果如图18显示,SA+b-PD-L1泳道比SA+PBS有明显条带迁移,同时在35kDa附近的b-PD-L1条带较等量的b-PD-L1+PBS组有明显减少,因此估计标记效率为>80%。

[0420] 3) 体外定向筛选

[0421] 用构建好的免疫文库,针对b-PD-L1进行3轮筛选,结果如下表:

Round	Conditions	Input	Output	Enriching factor
1 st -P	Target protein: b-PD-L1 (10μg) Blocking: 2% Milk-PBS Washing: 0.1% Tween20-PBS, 10 times Elution: 0.2M Glycine-HCl, pH2.2 Pre-counter select: None	1.0×10 ¹³	1.1×10 ⁸	9.1×10 ⁴
2 nd -P	Target protein: b-PD-L1 (5μg) Blocking: 2% Milk-PBS Washing: 0.2% Tween20-PBS, 15 times Elution: 0.2M Glycine-HCl, pH2.2 Pre-counter select: None	5.6×10 ¹¹	6.0×10 ⁶	9.3×10 ⁴
3 rd -P	Target protein: b-PD-L1 (1μg) Blocking: 2% Milk-PBS Washing: 0.2% Tween20-PBS, 20 times Elution: 0.2M Glycine-HCl, pH2.2 Pre-counter select: None	1.4×10 ¹²	2.0×10 ⁸	7.0×10 ³

[0423] 筛选结果显示,在第二轮和第三轮筛选时(R2和R3)出现明显富集(第一轮的

output高是NA strip的非特异吸附导致)。

[0424] 4) 鉴定

[0425] 噬菌体ELISA检测。

编 号	PD-L1 (200ng/well)	BSA (200ng/well)
[0426] PD-L1-7	0.635	0.054
<i>E. coli</i> TG1	0.046	0.049

[0427] 下面结合具体检测试验对筛选的纳米抗体进行检测:

[0428] 1方法

[0429] 1.1纳米抗体细胞毒性实验

[0430] 37℃温水复苏BHK-21细胞、MDBK细胞、羊的肾细胞,加入细胞培养液(90%DMEM+10%FBS),传代到96孔板,6×10³个细胞每孔。等待细胞贴壁,并孵育3小时。加入PD-L1纳米抗体,终浓度梯度设置为:5μg/ml,10μg/ml,20μg/ml,40μg/ml。共4个梯度。将20μl/孔MTS试剂加入每个孔中37℃温育3小时。振荡后在492nm测量吸光度。

[0431] 1.2纳米抗体与噬菌体的NO检测实验

[0432] 将小鼠免疫细胞加入96孔板3h后加入终浓度为1μg/mL的T7噬菌体,然后孵育24h。将PD-L1纳米抗体使用培养液(90%DMEM+10%FBS)稀释加入孔中,终浓度调整为10μg/mL,20μg/mL,40μg/mL,80μg/mL,每个样品三个复孔。细胞培养箱中培养细胞38h。对照组加入提取液100μL,试剂一50μL,试剂二50μL(均为购自北京索莱宝生物技术有限公司NO水平检测试剂盒中的试剂)。测定实验组加入样品100μL,试剂一50μL,试剂二50μL。混匀然后室温静置15min,测定550nm处吸光值。

[0433] 1.3数据分析

[0434] 结果表示为平均值±标准偏差(SD)。使用GraphPad Prism 8软件进行统计学分析通过Mann-Whitney U检验进行差异显著分析(*=P<0.05,**=P<0.01)。

[0435] 1.4纳米抗体注射小鼠后,小鼠体内IL-4、IFN-γ细胞因子以及NO分泌变化水平

[0436] 注射抗体BalB/C小鼠,每只0.1mg。每只注射0.2ml,浓度为0.5mg/ml。分组如下:(例如PBS对照组有两组,并非重复与错误,后续会用金黄色葡萄球菌与无乳链球菌分别攻毒,故每个抗体注射分了两组)。

分组注射抗体	
[0437] PBS 对照	8 只小鼠
PD-L1	8 只小鼠
PBS 对照	8 只小鼠
PD-L1	8 只小鼠

[0438] 免疫三天后,采血并分离血清,检测细胞因子IL-4、IFN-γ与NO水平(IL-4检测试剂盒、IFN-γ检测试剂盒与NO水平检测试剂盒均购自北京索莱宝生物技术有限公司)。

[0439] 1.5金黄色葡萄球菌和无乳链球菌攻毒保护实验

[0440] 然后分别注射金黄色葡萄球菌与无乳链球菌,其中金黄色葡萄球菌注射150μl/1.9×10⁹cfu(多次研究判定的小鼠最低致死剂量)。无乳链球菌注射无乳200μl/5.1×10¹⁰cfu(多次研究判定的小鼠最低致死剂量)。24小时后观察小鼠状态并记录。

[0441] 2结果

[0442] 2.1纳米抗体的细胞毒性测定

[0443] 如图19PD-L1纳米抗体BHK-21细胞、绵羊肾细胞、MDBK细胞的细胞毒性所示。图中，横坐标为PD-L1的不同浓度处理 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)，纵坐标为测定492nm处的OD值。BHK-21为BHK-21细胞实验组。Kidney为绵羊肾细胞实验组，MDBK为MDBK细胞实验组，数据表示为平均值 \pm SD。

[0444] 不同浓度的纳米抗体对小鼠 (BHK-21细胞)、绵羊 (绵羊肾细胞) 以及牛的细胞 (MDBK细胞) 均没有细胞毒性。证明PD-L1纳米抗体对动物细胞没有细胞毒性。

[0445] MTT商品名称噻唑蓝通过特定波长的分光光度测定，可对细胞存活及生长情况进行定量测定和分析。BioVision的MTS细胞增殖分析试剂盒是一种比色法，是MTT的升级版，用于在增殖和细胞毒性分析中灵敏定量活细胞，可以用于判断试剂对细胞有无毒性。通过验证纳米抗体对哺乳动物细胞BHK-21，MDBK或绵羊肾细胞没有毒性，可以安全的用于动物。

[0446] 2.2NO激活实验测定

[0447] 如图20PD-L1对小鼠骨髓干细胞诱导后的原代细胞的NO增强作用所示，图中，negative为试剂盒阴性对照；PBS为添加PBS的阴性对照，PD-L1为添加PD-L1纳米抗体的实验组。

[0448] 在小鼠骨髓干细胞诱导后的原代细胞添加T7噬菌体后，添加不同浓度的PD-L1纳米抗体共同孵育24h后，显示PD-L1纳米抗体对于NO浓度的增强与浓度呈正相关，PD-L1纳米抗体浓度越高，NO检测值越大。在第80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时达到最大值。

[0449] 一氧化氮 (Nitric Oxide, NO) 作为细胞间及细胞内的信息传递物质，发挥了信号传递的作用，是一种新型的生物信使分子。中国农业科学院兰州兽医研究所农业部兽医病原生物学国家重点实验室和动物病毒学重点实验室研究表明T7噬菌体颗粒很容易由免疫细胞吞噬并促进免疫细胞的成熟和NO等细胞因子分泌，可以作为细胞模型验证FMDV与免疫细胞的相互作用关系与作用强度。使用试剂盒检测培养液中的NO含量，可以反映出免疫细胞与抗原相互作用的强度。

[0450] PD-L1纳米抗体在高浓度时，对免疫细胞分泌NO的水平促进能力更好，解除了T细胞等免疫细胞受到的其他免疫细胞的抑制 (通过PD-L1受体与配体的结合)。对免疫细胞的促进能力，表明了PD-L1纳米抗体有可以用于促进动物细胞免疫水平的提高，可以作为一种潜在的免疫佐剂或者有病毒传播时的免疫促进剂。PD-L1免疫抑制性受体也存在于其他免疫相关细胞中，阻断免疫检查点可以增强免疫相关细胞的活性已经验证清楚。

[0451] 2.3纳米抗体注射小鼠后，小鼠体内IL-4、IFN- γ 细胞因子以及NO分泌变化水平

[0452] 使用索莱宝IL-4细胞因子检测试剂盒检测小鼠血清中IL-4细胞因子水平，索莱宝IFN- γ 细胞因子检测试剂盒检测小鼠血清中IFN- γ 细胞因子水平，索莱宝NO检测试剂盒检测小鼠血清中NO水平，结果见下表。(每组检测8只，每个数据代表了1只小鼠检测的OD450值。)

	IL-4		IFN- γ		NO	
	PBS	PD-L1	PBS	PD-L1	PBS	PD-L1
[0453]	0.093	0.119	0.071	0.063	0.066	0.072
	0.088	0.128	0.069	0.062	0.075	0.074
	0.08	0.122	0.076	0.062	0.072	0.066
	0.096	0.099	0.091	0.069	0.08	0.076
	0.093	0.083	0.077	0.057	0.073	0.061
	0.105	0.078	0.083	0.064	0.077	0.064
	0.087	0.094	0.088	0.068	0.073	0.063
	0.124	0.099	0.12	0.065	0.082	0.066

[0454] 2.4金黄色葡萄球菌和无乳链球菌攻毒保护实验

[0455] 每组8只小鼠,攻毒24小时后小鼠状态,见下表。

	小鼠/每组 8 只	其中状态良 好/只数	其中状态不佳/ 只数	其中死亡/只数
[0456]	金黄色葡萄球菌攻毒	PBS	1	7
		PD-L1	5	3
	无乳链球菌攻毒	PBS	1	7
		PD-L1	2	6

[0457] 对小鼠免疫水平的促进能力,揭示了PD-L1纳米抗体可以用于促进动物细胞免疫水平的提高,可以作为一种潜在的免疫佐剂或者有病毒/细菌传播时的免疫促进剂,用于动物的保护。PD-L1免疫抑制性受体也存在于其他免疫相关细胞中,虽然有很多机制没有研究清楚,但是阻断免疫检查点可以增强免疫相关细胞的活性已经验证清楚。本研究所制备的PD-L1纳米抗体可以用于保护动物在接受金黄色葡萄球菌和无乳链球菌侵害时,增强了小鼠存活的数量。

[0458] 2.5PD-L1纳米抗体的流式细胞检测方法与结果:

[0459] 使用MC-38细胞表达PD-L1受体,PD-L1表达情况,见图21。

[0460] 流式检测步骤为通用步骤。PD-L1纳米抗体与MC-38细胞流式检测结果,见图22。

[0461] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 石河子大学
- [0003] <120> PD-L1纳米抗体、制备方法及其应用
- [0004] <150> 2019106042250
- [0005] <151> 2019-07-05
- [0006] <160> 3
- [0007] <170> SIPOSequenceListing 1.0
- [0008] <210> 1
- [0009] <211> 1099
- [0010] <212> DNA
- [0011] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0012] <400> 1
- [0013] cggggcggga acatttccaa gcttaaggag acagtacata tgaataacct attgcctacg 60
- [0014] gcagccgctg gattgttatt actcgcggcc cagccggcca tggcccaggt gcagctgcag 120
- [0015] gactctgggg gaggttggg gcaggctggg ggctctctga gactctctctg tgcagcctct 180
- [0016] ggacgcacct tcagaaacga tgtcatggcc tggttccgcc agattccagg gaaggagcgt 240
- [0017] gagtttgttg cggtgattgc ctacgatgcg gctgacacag actacgcaga ctccgtgaag 300
- [0018] ggccgattca tcattctccag agacaacgcc aagaacacga tatatttgca aatgaacacc 360
- [0019] ctgaaacctg aggacacggc cgtttattac tgtgcagccg acaaggacag aatgtacggt 420
- [0020] agtaggcaact ggccggaata tgagtatgac tactggggcc aggggaccca ggtcaccgtc 480
- [0021] tctcagcgg ccgcataccc gtacgacgtt ccggaactac gttcccacca ccatcaccat 540
- [0022] cactagactg ttgaaagttg tttagcaaaa cctcatacag aaaattcatt tactaacgtc 600
- [0023] tgaaaagacg acaaaacttt agatcggtac gctaactatg agggctgtct gtggaatgct 660
- [0024] acaggcgttg tcgtttgtac tggtgacgaa actcagtgtt acggtacatg ggttcctatt 720
- [0025] gggcttgcta tcctgaaaa tgagggtggg ggctctgagg gtggcggttc tgagggtggc 780
- [0026] ggttctgagg gtggcggtac taaacctcct gactacggtg atacacctat tccgggctat 840
- [0027] acttatatca accctctcga cagcacttat ccgcctggta ctggagcaaa accccgctaa 900
- [0028] tcctaaatcc ttctcttggg ggagtctcag cctcttaata ctttcatggt tcagaataat 960
- [0029] aggtccgaat aaggcagggt gcataagctg tttatacggg actgttactc aaggcactga 1020
- [0030] cccgattaaa gttagtaaca gtacactccc gtgaatcata cgaagcatgg taggacgctt 1080
- [0031] aactgggaca ggaaaagtc 1099
- [0032] <210> 2
- [0033] <211> 17
- [0034] <212> DNA
- [0035] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0036] <400> 2
- [0037] gacacgaatt cgccacc 17
- [0038] <210> 3
- [0039] <211> 24
- [0040] <212> DNA
- [0041] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0042] <400> 3

[0043] gtgtcaagct ttcacttate atca 24

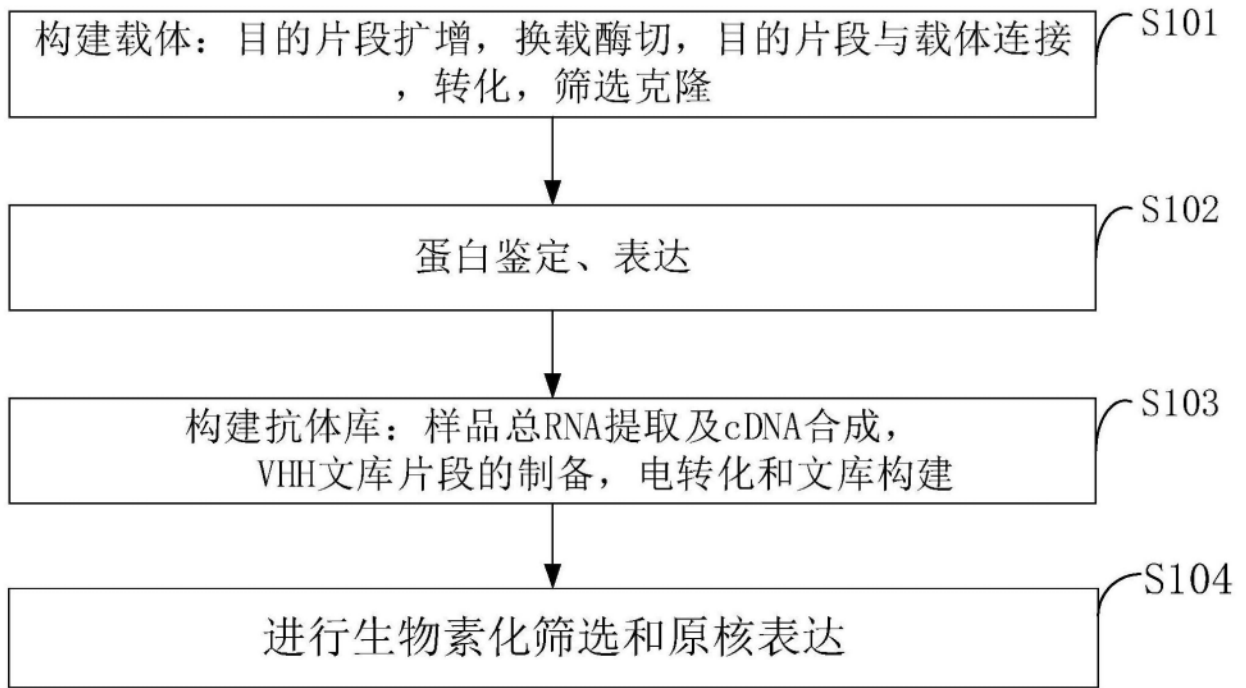


图1

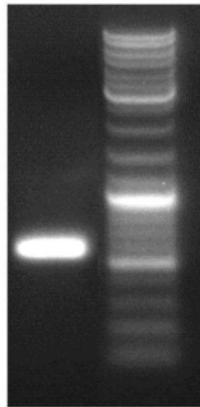


图2

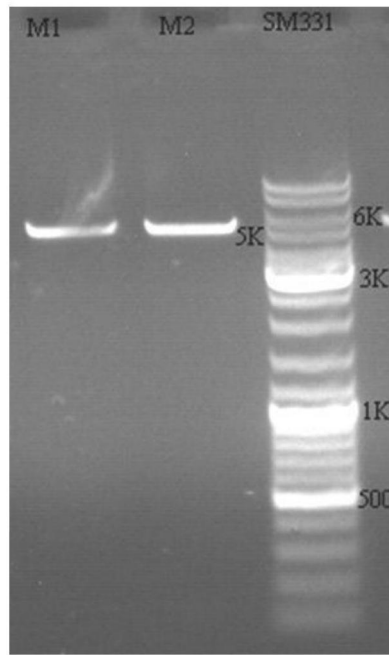


图3

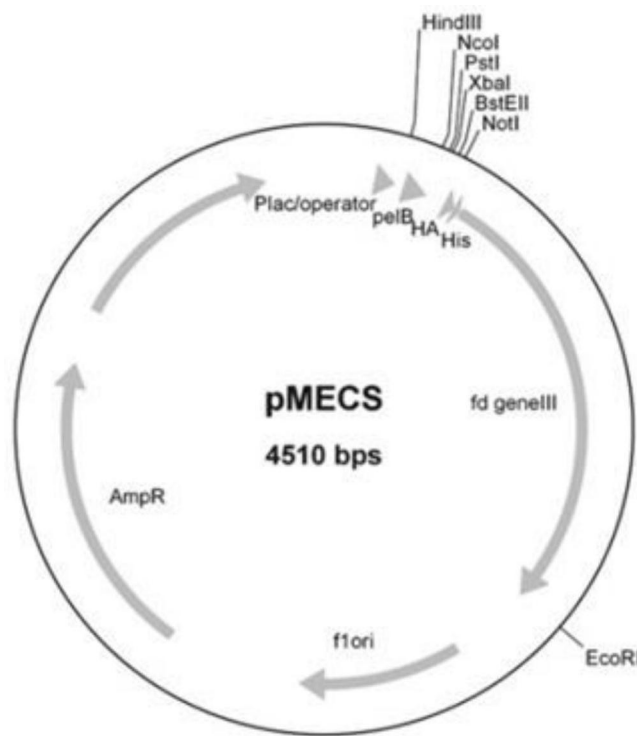


图4

```
HindIII                                     NcoI
aagcttaaggagacagtacat atgaaatacctattg // ccggccatggcc
<<.....pelB.. // .....>>
m k y l l // p a m a

PstI      XbaI      Eco91I      NotI
cagggtgcagctgcaggagtctagaggggacccagggtcaccgtctcctcagcggccgca
<<.....VHH.....-----.....VHH.....>>
q v q l q      g t q v t v s s a a a

taccgtagcagcgttccggactacggttcc caccaccatcaccatcac tag act..
>>.....HA-tag.....>> <<....His-tag...>> Gene3
y p y d v p d y g s h h h h h h X t
```

图5

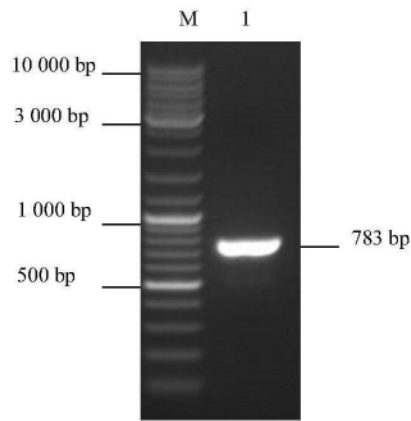


图6

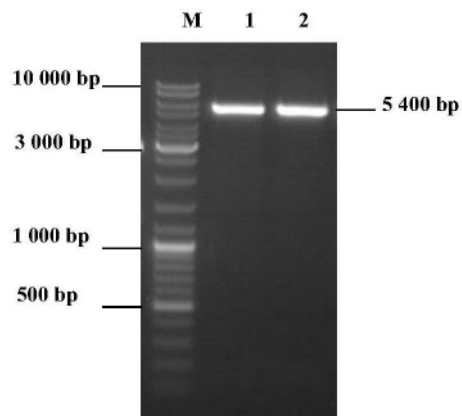


图7

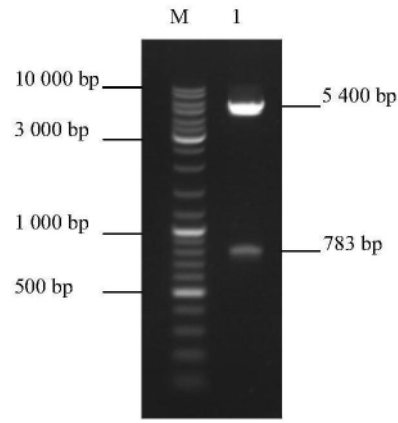


图8

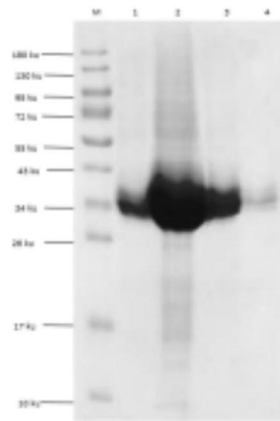


图9

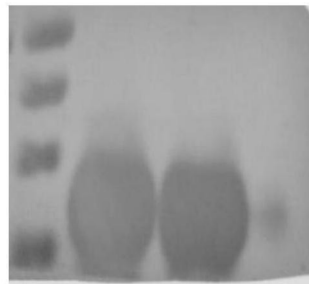


图10

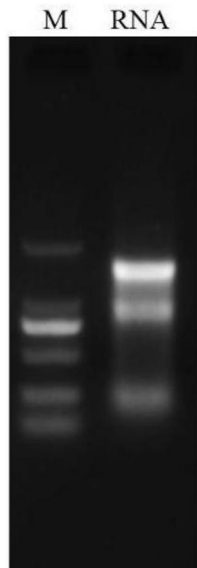
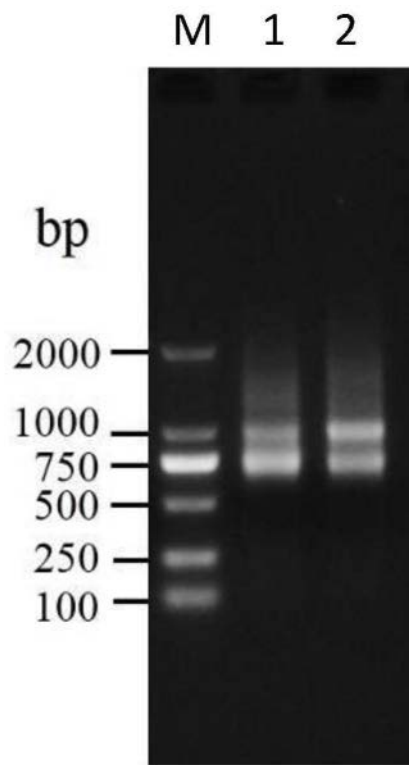
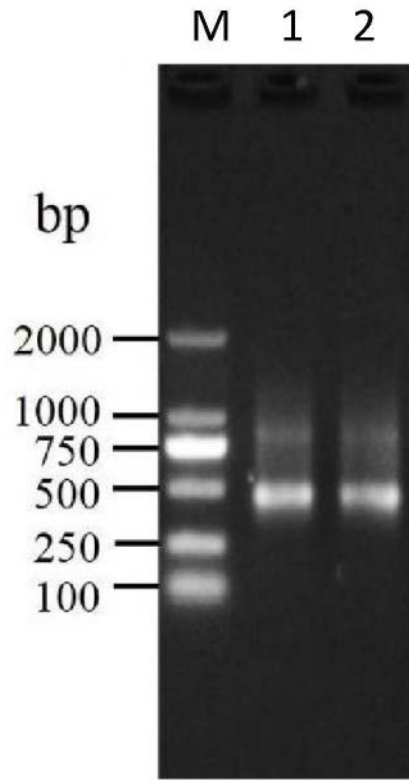


图11



A



B

图12

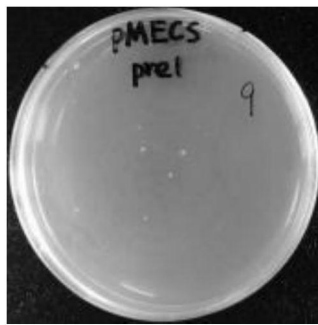


图13

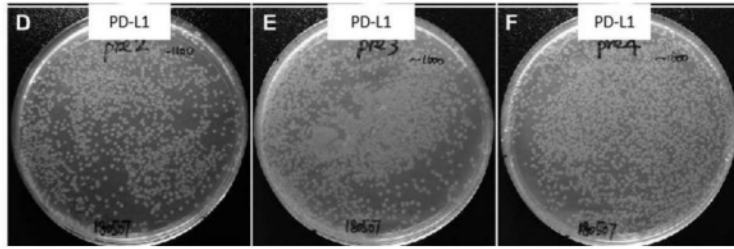


图14

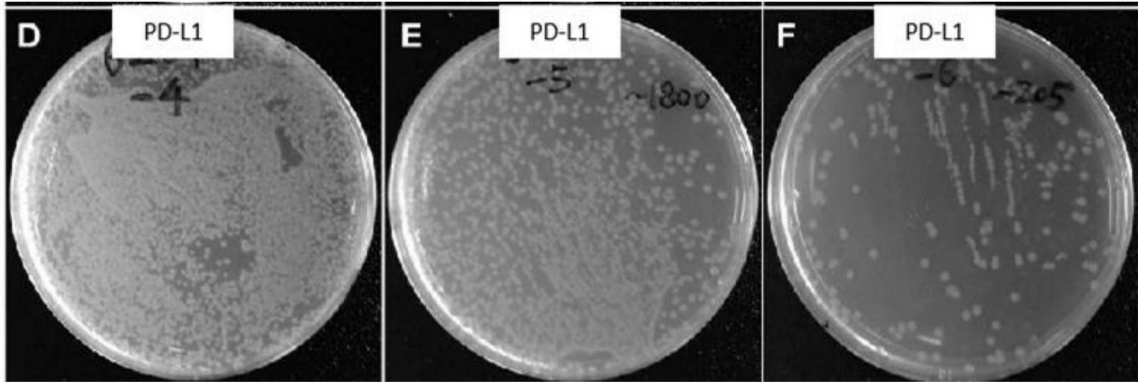


图15

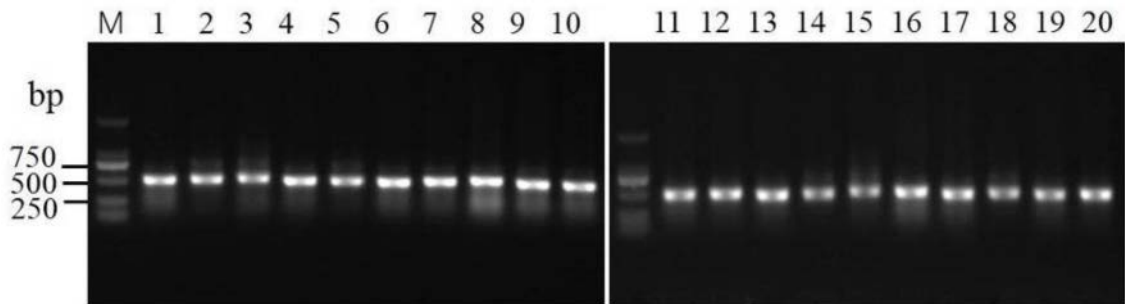


图16

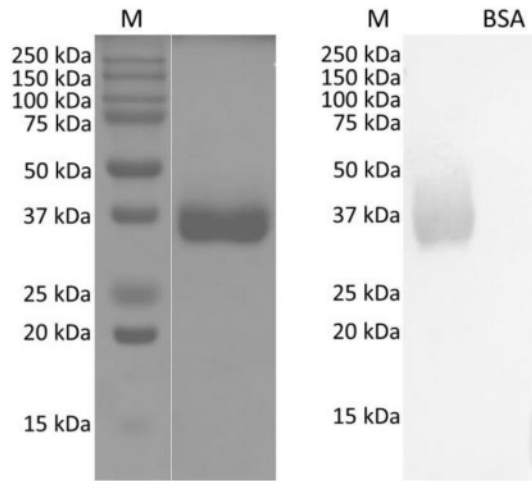


图17

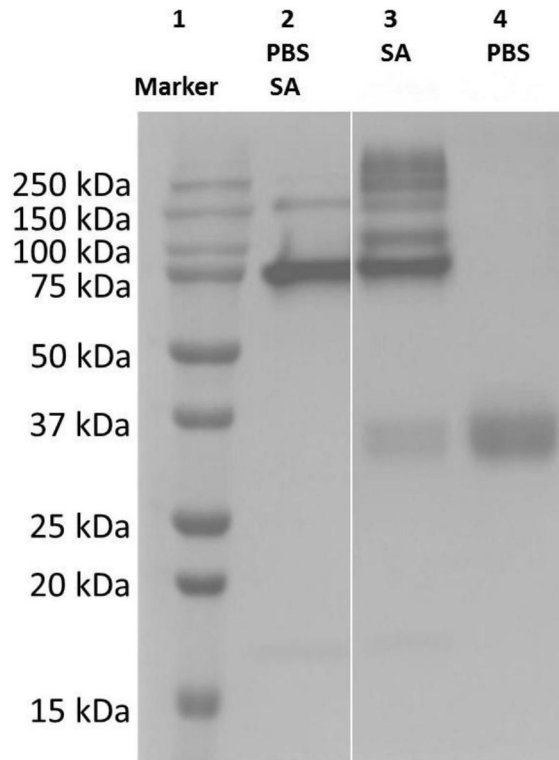


图18

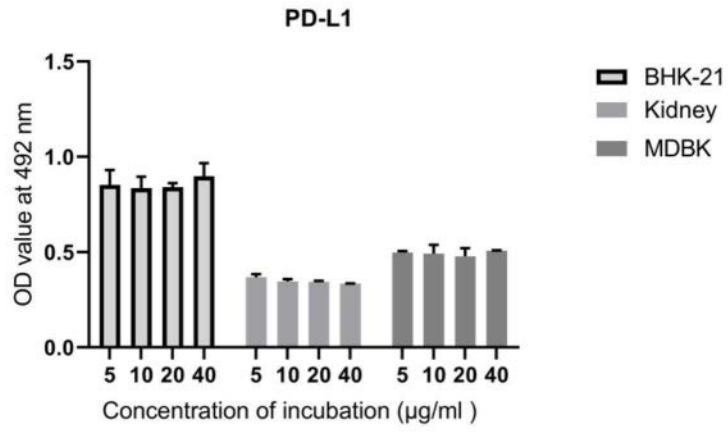


图19

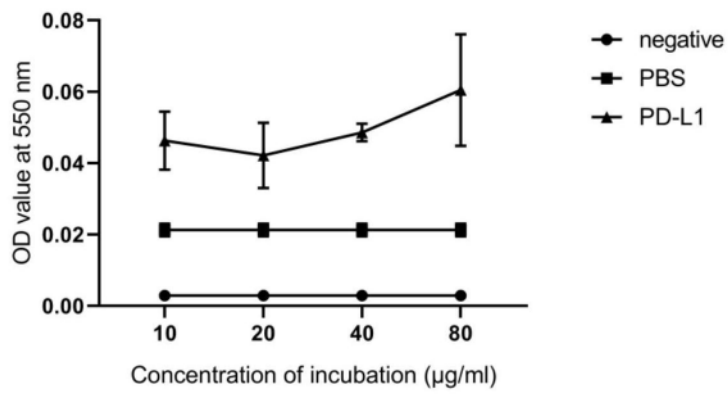


图20

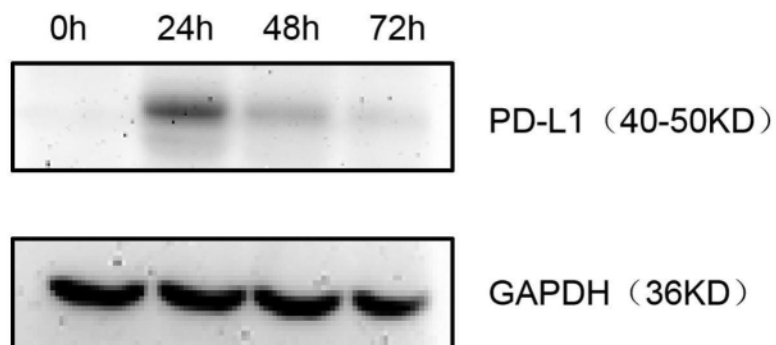


图21

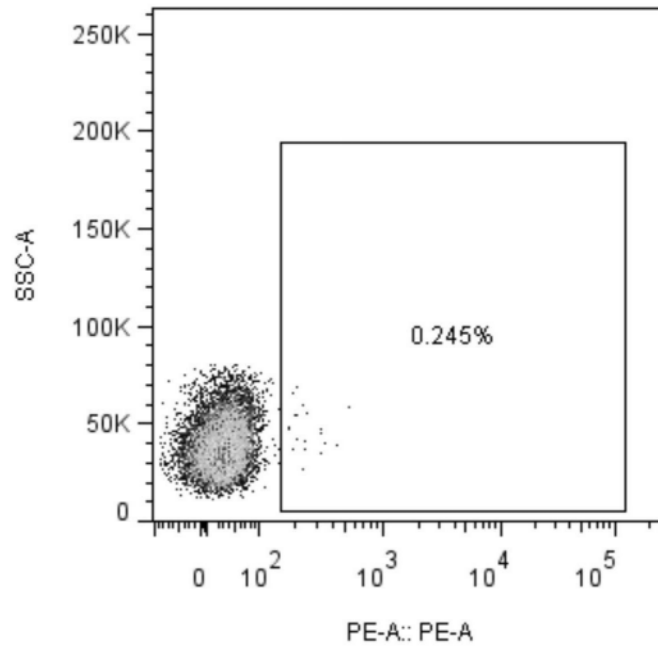


图22