

兔抗猪 PD-L1 多克隆抗体的制备及初步应用

全钺涵, 李 宁, 罗弼豪, 郭抗抗*

(西北农林科技大学动物医学院, 陕西杨陵 712100)

摘 要:细胞程序性死亡配体 1(PD-L1)通过调控 T 细胞功能参与免疫应答。由于猪 PD-L1 与人、鼠存在结构差异,且缺乏特异性抗体,本研究通过从 PK-15 细胞中克隆到猪 PD-L1 基因片段并进行序列分析,发现其与 NCBI 数据库中猪 PD-L1 基因序列完全相同,其二级结构主要为 β 折叠以及无规则卷曲。构建 pET-28a 重组载体表达其蛋白。纯化后的蛋白免疫新西兰兔,成功制备了可特异性用于 Western blot 的多克隆抗体。利用该抗体,研究发现 PD-L1 在猪 PK-15 细胞中过表达可促进猪瘟病毒(CSFV)复制,而干扰 PD-L1 则抑制病毒复制,表明 PD-L1 在 CSFV 感染中发挥重要作用。为后续研究 PD-L1 在病毒感染中的作用积累数据资料。

关键词:猪;细胞程序性死亡配体 1;新西兰兔;多克隆抗体;猪瘟病毒

DOI:10.16437/j.cnki.1007-5038.2026.05.007

中图分类号:S852.4;S858.28;S858.291

文献标识码:A 文章编号:1007-5038(2026)05-0017-07

细胞程序性死亡配体 1(Programmed cell death 1 ligand 1, PD-L1)是一种属于免疫球蛋白超家族的 I 型跨膜糖蛋白^[1],其配体为程序性死亡因子 1(Programmed death-1, PD-1),在哺乳动物心脏、胎盘、肺脏和骨骼肌等的组织细胞中均可表达。PD-L1 通过与 PD-1 结合抑制 T 细胞功能,从而调节机体免疫功能^[2]。在癌症研究领域发现,PD-L1 是一种在癌细胞表面高度表达的免疫检查点蛋白,肿瘤可以通过过表达 PD-L1 抑制 T 细胞活性,逃避免疫系统的监视^[3]。近年来,PD-L1 及配体 PD-1 在肿瘤学性疾病或病毒性疾病中作为免疫检查点分子被广泛研究^[4-5]。探究 PD-L1/PD-1 通路在相关免疫抑制性疾病中的致病机制,对于免疫相关疾病的防控及治疗意义重大。

猪的免疫抑制性疾病种类繁多,会影响宿主的免疫功能并继发感染其他疾病,制约着养猪业的健康发展。如猪圆环病毒 2 型(Porcine circovirus type 2, PCV2)感染会引发多种高致死性疾病,诱导猪的免疫抑制导致其他感染源的易感性增强^[6];猪繁殖与呼吸综合征病毒(Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)感染会导致繁殖障碍、呼吸系统疾病、免疫抑制及继发感染^[7]。研究发现,在一些猪的免疫抑制性病原如 PRRSV、PCV2 及猪瘟病毒(Classical swine fever virus, CSFV)感染过程中,PD-1 及 PD-L1 基因表达出现

上调,抑制了宿主细胞的抗病毒作用,是导致宿主免疫抑制的重要机制之一^[5,8]。但在深入研究中缺少抗猪 PD-L1 抗体。本研究通过原核表达及纯化获得了猪 PD-L1 重组蛋白,制备了 PD-L1 的兔源多克隆抗体,用于鉴定猪细胞内 PD-L1 蛋白,从而为 PD-L1 在免疫抑制性疾病中的机制探究提供材料支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞和质粒 猪肾细胞(PK-15)、pcDNA3.1⁺-PD-L1 质粒及 PET-28a 载体均由西北农林科技大学动物医学院兽医公共卫生与畜禽产品安全实验室保存提供;大肠埃希氏菌 DH5 α 及 BL21 感受态细胞,购自擎科生物有限公司。

1.1.2 实验动物 4—8 月龄的新西兰兔,购自西北农林科技大学实验动物中心。

1.1.3 主要试剂 TsingZol 总 RNA 提取试剂、SynScript[®] III RT SuperMix、DL 2 000 DNA Marker、DL 5 000 DNA Marker、Prime STAR[®] Max DNA Polymerase 和 Ex Taq 酶购自擎科生物有限公司;pMDTM 19-T, TAKARA 公司产品;Xho I、EcoR I 和 T4 DNA 连接酶,自擎科生物有限公司产品;蛋白浓度测定试剂盒,ZHHC 公司产品;鼠抗 His 单克隆抗体,ABWAYS 公司产品;HRP-山

收稿日期:2025-04-12

基金项目:国家自然科学基金项目(32272997)

作者简介:全钺涵(1999—),女,陕西榆林人,硕士研究生,主要从事猪 PD-L1 多克隆抗体研究。* 通讯作者

羊抗鼠 IgG(H+L)和 HRP-山羊抗兔 IgG(H+L), IMMUNOWAY 公司产品;鼠抗 CSFV E2 单克隆抗体,西北农林科技大学动物医学院兽医公共卫生与畜禽产品安全实验室自制。

1.1.4 主要仪器 低温高速离心机(Centrifuge 5417R), Eppendorf 公司产品;PCR 仪(Simpli-Amp™), Thermo 公司产品;超声波细胞粉碎仪(SCIENTZ-IIID), 宁波新芝生物科技股份有限公司产品;凝胶成像系统(GelDoc Go)、蛋白质电泳仪(Mini-PROTEAN® Tetra)和转膜仪(Mini Trans-Blot™), BIO-RAD 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 猪 PK-15 细胞总 RNA 的提取与反转录 收取 PK-15 细胞,用 TsingZol 总 RNA 提取试剂按说明书提取细胞总 RNA。对 RNA 样品进行反转录,首先去除 RNA 样品中的 DNA,反应体系:5×gDNA Eraser Buffer(2 μL)、gDNA Eraser(1 μL)、总 RNA(1 μg)和 ddH₂O(补足至 10 μL)。反应条件为:42℃ 反应 2 min。cDNA 合成反应体系为 20 μL,包括:10 μL RNA 样品、1 μL Prime Script RT Enzyme Mix I、1 μL RT Primer Mix、4 μL 5×Prime Script Buffer 2 和 4 μL ddH₂O。反应条件为:37℃ 反应 15 min,85℃ 反应 5 s。反应产物用于 PCR 扩增。

1.2.2 猪 PD-L1 基因片段克隆 根据 NCBI 上的猪 PD-L1 基因序列(序列号:XM-005660125.3),设计扩增猪 PD-L1 基因片段的特异性引物,引物由西安擎科生物有限公司进行合成。使用 cDNA 为模板,以特异性引物扩增猪 PD-L1 基因的 CDS 片段。PCR 反应体系为 30 μL,包括:PrimeSTAR® Max DNA Polymerase(15 μL)、上下游引物各 1 μL、cDNA(1 μL)及 ddH₂O(12 μL)。PCR 反应程序为:98℃ 预变性 5 min;98℃ 变性 10 s,56℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 90 s,共进行 36 个循环;72℃ 末延伸 10 min。扩增产物通过 1% 琼脂糖凝胶电泳分析,并按 TIANGEN 胶回收试剂盒操作说明回收 PCR 产物。将回收的 PCR 产物与 pMD™-19T 载体连接。反应结束后,取 3 μL 反应产物转入 30 μL 大肠埃希氏菌 DH5α 感受态细胞,冰上静置 30 min,42℃ 热激 90 s,快速冰浴 2 min,加入 700 μL 无抗 LB 培养基,37℃、220 r/min 振荡培养 60 min。将 100 μL 培养液涂布于含 Amp 的 LB 平板,37℃ 培养 8~12 h。挑取单个菌落接种于 1 mL LB/Amp 培养基,37℃、220 r/min 振荡培养 6~8 h,送至西安擎科生物有限公司进行测序。

1.2.3 猪 PD-L1 基因的核苷酸分析 将获取的猪 PD-L1 基因进行核苷酸序列分析。利用 DNAMAN 分析其蛋白电荷、二级结构、亲水性、疏水性等。

1.2.4 猪 PD-L1 基因的信号肽分析 利用 SignalP-6.0 在线服务器(<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-6.0/>)对猪 PD-L1 基因编码的蛋白质序列进行信号肽预测。根据预测结果,设计去除信号肽编码序列的猪 PD-L1 基因片段引物,用于后续 pET-28a 载体构建。设计的引物序列如下:

F: CGGAATTCATGTTTACTATCACAGT-TCCC

R: CCGCTCGAGCGTCTCCTCAAATTGTG-TATC

1.2.5 重组猪 PD-L1 原核表达载体的构建 以 1.2.1 获得的 cDNA 为模板,通过上述引物进行 PCR 扩增。将回收后的 PCR 产物与 pET-28a 载体进行双酶切。酶切反应体系为 30 μL,包括:10×Cut Smart Buffer(3 μL)、EcoR I(1.5 μL)、Xho I(1.5 μL)和回收产物(24 μL)。37℃ 反应 2.5 h。酶切产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析,并按 TIANGEN 胶回收试剂盒操作说明回收双酶切产物。

将回收的基因片段与载体 pET-28a 连接。反应体系为 10 μL,包括:T4 DNA 连接酶(0.3 μL)、10×T4 DNA Ligase Buffer(1 μL)、目的基因(6.6 μL)和载体(2.2 μL)。反应在 22℃ 下过夜进行。然后将连接好的质粒转入 DH5α 感受态细胞中进行扩增和鉴定。

1.2.6 重组质粒的诱导表达及纯化 将鉴定正确的重组质粒转化入大肠埃希氏菌 BL21 细胞,培养至 OD_{600nm} 为 0.6~0.8 h,加入 IPTG 进行蛋白诱导表达。培养 6 h 后,重悬细胞于 PBS 中,使用超声波破碎法对细胞进行裂解,裂解完成通过 SDS-PAGE 和 Western blot 对目的蛋白的表达进行验证,一抗为鼠抗 His 单克隆抗体(1:5 000),二抗为 HRP-山羊抗鼠 IgG(H+L)(1:10 000)。进行离心和透析去除溶解液中的杂质。纯化蛋白使用 Ni-TED Beads 6FF 柱进行亲和层析。对纯化的蛋白进行 SDS-PAGE 和 Western blot 分析,确认蛋白的表达和纯度。通过 BCA 法测定蛋白浓度。

1.2.7 动物免疫与多克隆抗体制备 将 50 μg 纯化的 PD-L1 蛋白与等体积的弗氏完全佐剂或弗氏不完全佐剂混匀乳化,经皮下注射免疫新西兰兔,免疫间隔时间为 14 d,共免疫 4 次。首次免疫使用弗氏完全佐剂,后续免疫使用弗氏不完全佐剂。将 4 兔后 14 d 的兔心脏采血,分离血清保存,此血清即为

抗猪 PD-L1 多克隆抗体血清,通过 Western blot 对抗体特异性进行验证。

1.2.8 过表达及干扰 PD-L1 表达对 CSFV 复制影响的检测 实验室前期制备了 PD-L1 真核表达载体 pcDNA3.1+-PD-L1 及 PD-L1 干扰质粒 si-PD-L1。将 PK-15 细胞铺于 6 孔板培养至细胞密度约 60% 时,按照 Lipo8000 说明书分别配制 pcDNA 3.1+、pcDNA3.1+-PD-L1 和 siNC、si-PD-L1 质粒的转染体系,转染后 24 h 按 1 MOI 分别给转染的细胞接种 CSFV,继续培养 24 h 后收取蛋白样,通过 Western blot 检测 PD-L1 及 CSFV E2 蛋白的表达,一抗为鼠抗 CSFV E2 抗体(1:1 000)及制备的兔抗 PD-L1 多克隆抗体(1:1 000),二抗为 HRP-山羊抗鼠 IgG(H+L)和 HRP-山羊抗兔 IgG(H+L)(1:10 000)。

2 结果

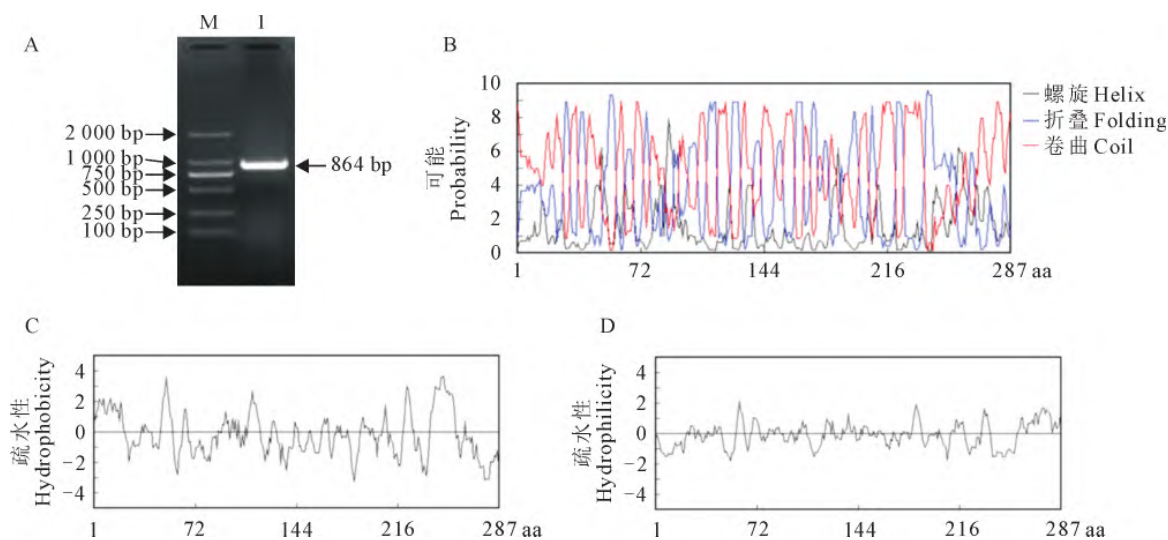
2.1 猪 PD-L1 基因片段的扩增

通过 RT-PCR 方法从 PK-15 细胞中克隆获得

目的基因片段,经 1% 琼脂糖凝胶电泳显示目的条带大小约为 900 bp,与预期片段大小(864 bp)相符(图 1A)。

2.2 猪 PD-L1 基因片段序列分析

将扩增基因片段的测序结果与 NCBI 中猪 PD-L1 基因序列对比,结果显示其与猪 PD-L1 的 CDS 区核苷酸序列相似性为 100%,说明该基因片段为猪 PD-L1 基因 CDS 片段。然后对目的基因的编码蛋白及结构进行了预测,利用软件 DNAMAN 分析了猪 PD-L1 基因的蛋白二级结构(图 1B);疏水性(图 1C);亲水性(图 1D)。结果显示其二级结构主要以 β 折叠和无规则卷曲为主,含有少量 α 螺旋;该基因编码蛋白疏水性最大值为 3.684,最小值为 -3.579;亲水性最大值为 2.215,最小值为 -1.903。该蛋白是一种兼具亲水和疏水区域的两亲性蛋白,其尾部呈弱亲水性。



A.猪 PD-L1 基因 CDS 片段扩增产物电泳图;M,DL 2 000 DNA Marker;1,PD-L1 基因 CDS 区片段;B.猪 PD-L1 蛋白二级结构;C.猪 PD-L1 蛋白疏水性分析;D.猪 PD-L1 蛋白亲水性分析

A.Electrophoresis of amplified porcine PD-L1 gene CDS fragment;M,DL 2 000 DNA Marker;1,PD-L1 gene CDS region fragment;B.Secondary structure of porcine PD-L1 protein;C.Hydrophobicity analysis of porcine PD-L1 protein;D.Hydrophilicity analysis of porcine PD-L1 protein

图 1 猪 PD-L1 基因片段扩增及蛋白特性分析

Fig.1 Amplification of porcine PD-L1 gene fragment and protein characterization analysis

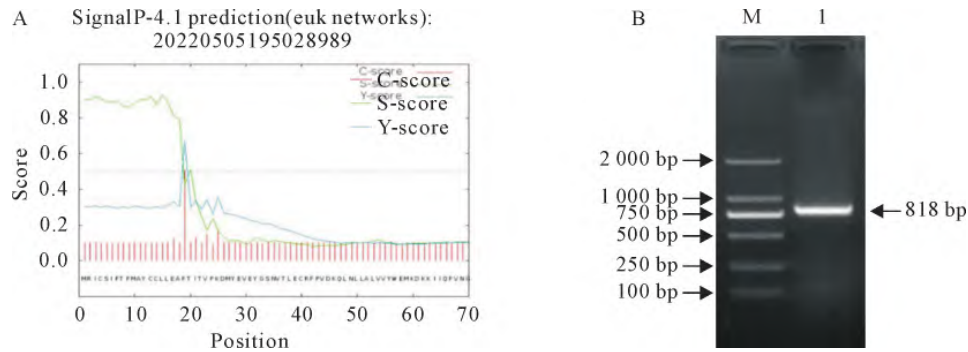
2.2.1 去除信号肽编码序列的猪 PD-L1 目的基因的扩增 通过生物信息学分析,预测猪 PD-L1 蛋白的信号肽序列位于其 N 端,由前 18 个氨基酸组成(图 2A),其核苷酸序列为 ATG AGG ATA TGT AGT ATC TTT ACA TTC ATG GCT TAC TGT TGT TTG CTG GAA GCA。设计扩增去除信号肽编码序列的引物,以 cDNA 作为模板进行 PCR 扩

增,将扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,结果显示目的条带大小约为 800 bp 左右,与预期片段大小(818 bp)相符(图 2B)。

2.2.2 重组表达质粒的酶切及测序鉴定 使用 *EcoR* I 和 *Xho* I 对 pET-28a 载体和目的基因进行双酶切,将双酶切后的载体和目的基因用 T4 连接酶连接,构建原核表达质粒 pET-28a-PD-L1。对

重组质粒进行双酶切鉴定(图 3),在 818 bp 处出现酶切后的目的基因条带,说明重组 pET-28a-PD-L1

质粒构建成功。进行测序鉴定,插入序列与 NCBI 预测的猪 PD-L1 基因序列一致。

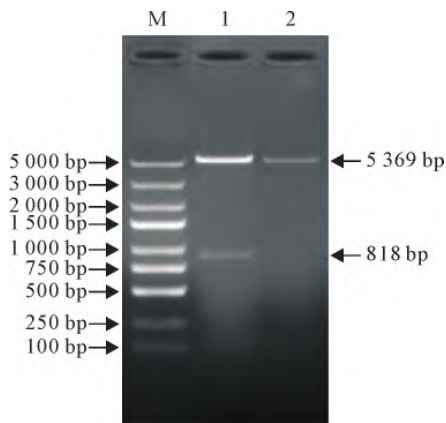


A.猪 PD-L1 蛋白信号肽分析;B.去除信号肽编码序列的猪 PD-L1 基因 CDS 片段扩增产物电泳图;M,DL 2 000 DNA Marker;1.去除信号肽编码序列的 PD-L1 基因 CDS 区片段

A.Analysis of signal peptide in porcine PD-L1 protein;B.Electrophoresis of amplified porcine PD-L1 gene CDS fragment with signal peptide coding sequence removed;M,DL 2 000 DNA Marker;1.The CDS region fragment of the PD-L1 gene with the signal peptide removed

图 2 猪 PD-L1 的信号肽特征分析及去除信号肽编码序列克隆

Fig.2 Analysis of signal peptide characteristics of porcine PD-L1 and cloning of the sequence without signal peptide coding



M,DL 5 000 DNA Marker;1.重组子 pET-28a-PD-L1 双酶切;2.重组子 pET-28a-PD-L1

M,DL 5 000 DNA Marker; 1. Double digestion of recombinant pET-28a-PD-L1;2.Recombinant pET-28a-PD-L1

图 3 重组载体 pET-28a-PD-L1 的双酶切鉴定

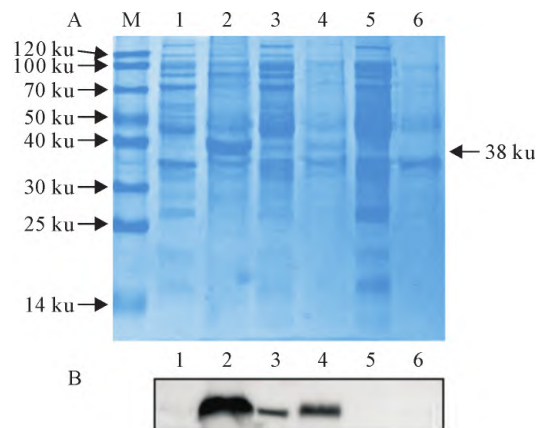
Fig.3 Recombinant pET-28a-PD-L1 and double digestion products

2.3 重组蛋白的表达与纯化

2.3.1 重组蛋白的分析 将构建成功的重组 pET-28a-PD-L1 质粒转入 BL21 感受态细胞,将含有 pET-28a-PD-L1 重组质粒的大肠埃希氏菌在 37℃ 和 22℃ 条件下经 IPTG 诱导表达,同时设置未诱导对照组。菌体经裂解后,分离上清(可溶性组分)与沉淀(包涵体组分)。SDS-PAGE 和 Western blot 分析结果显示:37℃ 诱导的菌体沉淀中目的蛋白表达量最高;22℃ 菌液上清和沉淀均表达;未诱导对照组无目的蛋白表达(图 4)。表明目的蛋白主要在 37℃ 条件下以包涵体形式表达。

2.3.2 目的蛋白纯化 经过 SDS-PAGE 和

Western blot 鉴定确定目的蛋白成功表达,由于 22℃ 诱导条件可实现可溶性表达,因此按照 22℃ 诱导表达的条件进行大量的诱导表达,菌体裂解后,分离上清并用 Ni-TED Beads 6FF 重力柱进行纯化然后用超滤管进行浓缩。SDS-PAGE 分析结果表明目的蛋白成功洗脱(图 5)。



A.重组蛋白 SDS-PAGE 分析;B.重组蛋白 Western blot 分析;M.蛋白分子量标准;1.37℃ 上清;2.37℃ 沉淀;3.22℃ 上清;4.22℃ 沉淀;5.未诱导上清;6.未诱导沉淀

A.Western blot analysis of recombinant protein B.Analysis of recombinant protein SDS-PAGE; M.Protein molecular weight standard; 1.37℃ supernatant;2.37℃ precipitation;3.22℃ supernatant;4.22℃ precipitation;5.Uninduced supernatant;6.Uninduced pellet

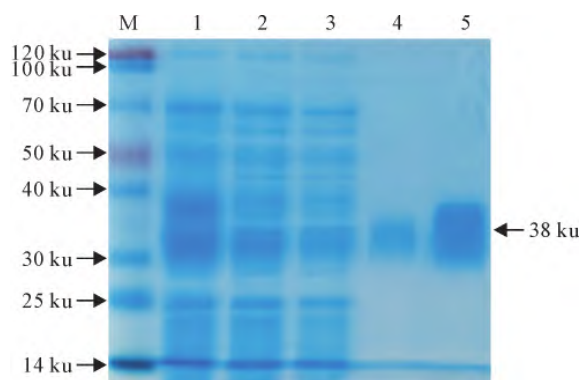
图 4 重组猪 PD-L1 蛋白分析

Fig.4 Analysis of recombinant porcine PD-L1 protein

2.4 多克隆抗体 Western blot 验证

第 4 次免疫后 14 d,采集新西兰兔全血,分离血清为兔抗猪 PD-L1 多克隆抗体。收取 PK-15 细胞

蛋白样,进行 Western blot 检测,以 Flag 单克隆抗体(1:5 000)和本实验所得兔抗猪 PD-L1 多克隆抗体(1:1 000)以及阴性血清(1:1 000)作为一抗,以 HRP-山羊抗兔 IgG(H+L)(1:10 000)为二抗,Western blot 结果显示本试验制备的猪源 PD-L1 多克隆抗体条带单一,并且过表达 PD-L1 质粒转染后检测到条带增强,满足后期实验需求(图 6)。



A.重组蛋白 SDS-PAGE 分析;B.重组蛋白 Western blot 分析;M.蛋白分子量标准;1.上样液;2.流出液;3.洗杂液;4.洗脱液;5.浓缩液
M. Protein molecular weight standard; 1. Sample loading solution; 2. Sample effluent; 3. Washing liquid; 4. Elution; 5. Concentrate

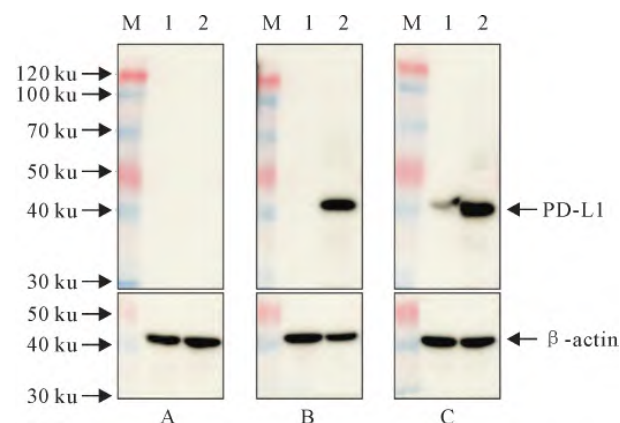
图 5 猪 PD-L1 重组蛋白的纯化

Fig.5 Purification of recombinant porcine PD-L1

2.5 调控 PD-L1 表达影响 PK-15 细胞中 CSFV 的复制

PK-15 细胞转染 pcDNA3.1+-PD-L1 质粒过表达 PD-L1 或 si-PD-L1 干扰 PD-L1 24 h 后,CSFV

感染 24 h,然后通过 Western blot 及 TCID₅₀ 检测 CSFV 的表达水平。结果显示,与对照组相比,PD-L1 过表达后,PK-15 细胞中 CSFV E2 蛋白的表达水平显著升高,PK-15 细胞上清中 CSFV 病毒滴度水平显著上升(图 7)。干扰 PD-L1 表达后,CSFV E2 蛋白的表达水平显著降低,上清中 CSFV 病毒滴度水平显著下降(图 8)。

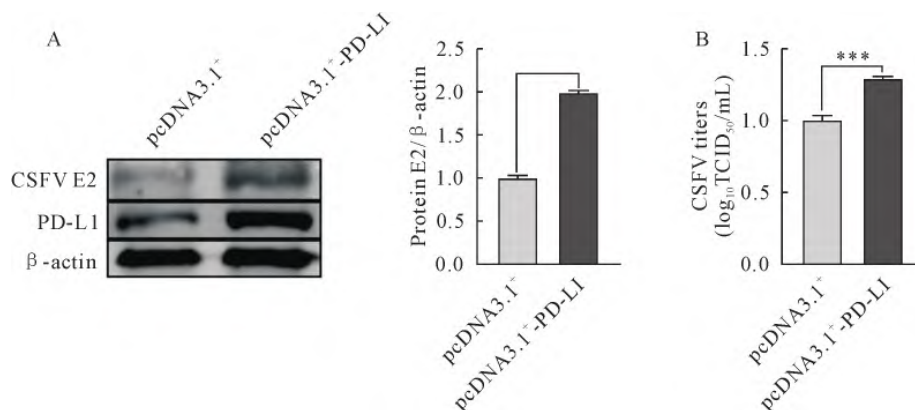


A.阴性血清;B.Flag 单克隆抗体;C.兔抗猪 PD-L1 多克隆抗体;M.蛋白分子量标准;1.空质粒转染 PK-15 细胞;2.过表达 PD-L1 质粒转染 PK-15 细胞

A. Negative serum; B. Flag monoclonal antibody; C. Rabbit anti porcine PD-L1 polyclonal antibody; M. Protein molecular weight standard; 1. PK-15 cells transfected with empty vector plasmid; 2. PK-15 cells transfected with PD-L1 overexpression plasmid

图 6 重组猪 PD-L1 抗体 Western blot 验证

Fig.6 Western blot validation of recombinant porcine PD-L1 antibody



A. Western blot 检测过表达 PD-L1 对于 CSFV 增殖的影响;B.过表达 Rab27a 后细胞上清中 CSFV 病毒滴度的检测

A. Western blot was used to detect the effect of overexpression of PD-L1 on the proliferation of CSFV; B. Detection of CSFV virus titer in the cell supernatant after overexpression of Rab27a

图 7 过表达 PD-L1 对于 CSFV 增殖的影响

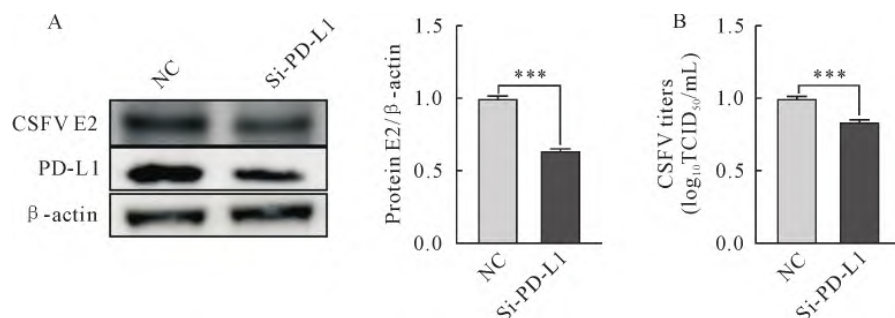
Fig.7 The effect of PD-L1 overexpression on the proliferation of CSFV

3 讨论

PD-L1 是免疫系统中的重要分子^[9],属于 CD28 家族,通常在活化的 T 细胞、B 淋巴细胞、巨

噬细胞、树突状细胞(DC)和一些上皮细胞中表达^[10]。PD-1 通过其配体 PD-L1 的相互作用,对抗原特异性 T 细胞及 B 细胞的功能起到抑制作用^[11]。

随着研究的深入,PD-L1 在免疫逃逸和病毒感染中的作用也备受关注^[12]。



A. Western blot 检测干扰 PD-L1 对于 CSFV 增殖的影响; B. 干扰 Rab27a 后细胞上清中 CSFV 病毒滴度的检测

A. Western blot was used to detect the effect of interfering with PD-L1 on the proliferation of CSFV; B. Detection of CSFV virus titer in the cell supernatant after interfering with Rab27a

图 8 干扰 PD-L1 表达对于 CSFV 增殖的影响

Fig.8 The effect of interfering with PD-L1 on the proliferation of CSFV

不同物种中 PD-L1 的基本功能相似,但基因和蛋白质差异导致其免疫反应有所不同。在应用人和鼠源 PD-L1 抗体检测猪源 PD-L1 时特异性较差,提示人源及鼠源 PD-L1 与猪源 PD-L1 有较大差异。所以本研究构建了重组表达载体 pET-28a-PD-L1 并进行了猪 PD-L1 蛋白的表达和纯化,通过 SDS-PAGE 和 Western blot 验证了其表达,然后将猪 PD-L1 蛋白免疫新西兰兔后得到可以用于 Western blot 的抗猪 PD-L1 多克隆抗体。这些抗体有助于了解猪 PD-L1 在猪免疫反应中的作用,可以更深入地研究猪的免疫逃逸机制、病毒感染和肿瘤免疫逃逸等生物学过程,对于猪免疫学和病毒学研究具有重要意义。

PD-L1 是免疫抑制分子之一,通过与 PD-1 受体结合来抑制 T 细胞的活化和增殖,以此来调节免疫应答反应。PD-L1 在肿瘤免疫逃逸、慢性病毒感染和自身免疫疾病等免疫异常状态中扮演重要角色^[13-14]。近年来,将免疫检查点应用到免疫治疗中使得 PD-L1 成为癌症免疫治疗的潜在靶点,许多以 PD-L1 为基础的免疫治疗方法已经获得临床应用^[15]。虽然 PD-L1 在哺乳动物免疫反应中的免疫作用已被广泛研究,但其对病毒感染的免疫反应目前尚未充分报道。本研究结果显示,猪 PD-L1 的过表达促进了 CSFV 的增殖,而抑制 PD-L1 表达则显著抑制了病毒的复制,表明猪 PD-L1 很可能在 CSFV 传播中发挥一定的作用,并为继续了解 PD-L1 在病毒感染中的作用提供了可靠的实验依据。

在猪免疫系统中,PD-L1 不仅参与 T 细胞的抑制调节,还可能在病毒免疫逃逸过程中发挥关键作用。PCV2 体外感染外周血单核细胞后随着病毒载量的升高,PD-1 及 PD-L1 的转录水平均显著上

升^[8],PCV2 感染可激活 PD-1/PD-L1 通路活化,降低细胞免疫功能^[16]。PRRSV 感染后可引起 PD-1 及其配体 PD-L1 的表达上调,对免疫功能起到负调控的作用^[17]。在病毒感染中病毒可以通过调节 PD-L1 表达来抑制宿主的免疫反应为病毒增殖提供有利环境。在本研究中,猪 PD-L1 的过表达增强了 CSFV 的复制,说明 PD-L1 可能通过抑制免疫反应帮助病毒逃逸宿主的免疫监视,为研究 PD-L1 在病毒免疫逃逸中的作用提供一个新的见解并为研究病毒感染免疫机制奠定了基础。

PD-L1 在猪免疫反应中有重要的作用,尤其在防止病毒感染方面的免疫作用。此研究通过制备针对猪 PD-L1 的特异性抗体,为深入研究猪 PD-L1 在机体免疫调节中的作用提供了基础实验材料。

参考文献:

- [1] YING H,ZHANG X,DUAN Y,et al.Non-cytomembrane PD-L1: An atypical target for cancer[J]. Pharmacol Res, 2021, 170:105741.
- [2] ZHOU Y J,LI G,WANG J,et al.PD-L1: expression regulation[J]. Blood Sci, 2023, 5(2): 77-91.
- [3] ZHU Q,WANG H,CHAI S,et al.O-GlcNAcylation promotes tumor immune evasion by inhibiting PD-L1 lysosomal degradation[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2023, 120(13): e2216796120.
- [4] 宣函沁,曹 磊,詹升华.靶向 PD-1/PD-L1 免疫治疗疗效评估的生物标志物研究进展[J]. 华夏医学, 2025, 1-9.
- [5] 岳 锋,周娟娟,章金刚,等.PD-1/PD-Ls 通路的特性及在动物疾病中的研究进展[J]. 中国兽医学报, 2020, 40(6): 1241-7 + 52.
- [6] GUO J,HOU L,ZHOU J,et al.Porcine circovirus type 2 vaccines: Commercial application and research advances[J]. Viruses, 2022, 14(9): 2005.
- [7] CAI H,ZHANG H,CHENG H,et al.Progress in PRRSV infection and adaptive immune response mechanisms[J]. Viruses, 2023, 15(7): 1442.

- [8] 朱艳平,何 勇,刘 佳,等.猪圆环病毒 2 型对外周血单核细胞中 PD-1、PD-L1 和 IL-21 转录水平的影响[J].动物医学进展,2021,42(8):14-20.
- [9] ISHIDA Y, AGATA Y, SHIBAHARA K, et al. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death[J]. Embo J, 1992, 11 (11):3887-3895.
- [10] 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]. Nat Immunol, 2007, 8 (3): 239-245.
- [11] QIN G, WANG X, YE S, et al. NPM1 upregulates the transcription of PD-L1 and suppresses T cell activity in triple-negative breast cancer[J]. Nat Commun, 2020, 11(1):1669.
- [12] LEUZZI G, VASCIABEO A, TAGLIALATELA A, et al. SMARCA1 is a dual regulator of innate immune signaling and PD-L1 expression that promotes tumor immune evasion [J]. Cell, 2024, 187(4):861-81.e32.
- [13] GOU Q, DONG C, XU H, et al. PD-L1 degradation pathway and immunotherapy for cancer[J]. Cell Death Dis, 2020, 11 (11):955.
- [14] LEE D, CHO M, KIM E, et al. PD-L1: From cancer immunotherapy to therapeutic implications in multiple disorders[J]. Mol Ther, 2024, 32(12):4235-4255.
- [15] LIN X, KANG K, CHEN P, et al. Regulatory mechanisms of PD-1/PD-L1 in cancers[J]. Mol Cancer, 2024, 23(1):108.
- [16] 岳 锋. CSFV 和 PCV2 感染后免疫抑制性受体转录水平研究及阻断猪 PD-1/PD-L1 通路多肽基序鉴定[D]. 四川雅安: 四川农业大学, 2015.
- [17] 彭金美. 猪程序性死亡因子 1 的克隆鉴定以及猪繁殖与呼吸综合征病毒感染对 PD-1/PD-L 通路的影响[D]. 黑龙江哈尔滨: 东北农业大学, 2010.

Preparation and Preliminary Application of Porcine PD-L1 Polyclonal Antibody

QUAN Yue-han, LI Ning, LUO Bi-hao, GUO Kang-kang

(College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Programmed cell death ligand-1 (PD-L1) modulates immune responses by regulating T cell functions. Due to structural divergence among porcine, human, and murine PD-L1, and the lack of specific antibodies, this study cloned the porcine PD-L1 gene fragment from PK-15 cells. Sequence analysis revealed it was identical to the porcine PD-L1 gene sequence in the NCBI database. Its secondary structure was primarily composed of beta-sheets and random coils. We constructed a pET-28a recombinant vector to express the protein. New Zealand white rabbits were immunized with the purified protein, successfully generating polyclonal antibodies that specifically detect porcine PD-L1 in Western blot assays. Utilizing this antibody, the study demonstrated that overexpression of PD-L1 in porcine PK-15 cells facilitates the replication of classical swine fever virus (CSFV), whereas knockdown of PD-L1 inhibits viral replication. This indicates that PD-L1 plays a significant role in CSFV infection. These findings provide foundational data for subsequent research into the function of PD-L1 during viral infections.

Key words: Pig; PD-L1; Rabbit; Polyclonal antibody; CSFV

欢迎订阅 2026 年《动物医学进展》(月刊)

《动物医学进展》为中文核心期刊、中国科技核心期刊、中国农林核心期刊、中国畜牧兽医优秀科技期刊,原名为《国外兽医学—畜禽疾病》,1980 年创刊,由教育部主管、西北农林科技大学主办,为动物医学类学术性刊物,国内外公开发行,面向全国组稿。本刊已被多家数据库和文摘期刊收录,多次获省、学会优秀期刊奖。

《动物医学进展》为月刊, A4 开本, 144 页, 每期订价 15.00 元, 年价 180.00 元。全国各地邮局均可订阅, 邮发代号 52—60。欢迎订阅!

地 址: 陕西杨陵西北农林科技大学动物医学院

邮 编: 712100

电 话(传真): 029-87092574

E-mail: dyjzyilan@263.net

http://dyjz.cbpt.cnki.net/portal

dyjz_sendmail@163.com