

# 鸭 *TLR4* 基因可变剪接体的克隆、鉴定及组织表达分析

黄正洋<sup>1</sup>, 陈阳<sup>1</sup>, 李欣钰<sup>2</sup>, 甄霆<sup>1</sup>, 张扬<sup>1</sup>, 徐琪<sup>1</sup>, 段修军<sup>3</sup>, 赵文明<sup>1\*</sup>, 陈国宏<sup>1\*</sup>

(1. 江苏省动物遗传繁育与分子设计重点实验室, 扬州 225009; 2. 江西农业大学动物科学技术学院, 南昌 330045; 3. 国家水禽种质资源基因库, 泰州 225300)

**摘要:** 本研究旨在克隆、鉴定鸭 *TLR4* 基因的可变剪接体, 并对 *TLR4* 基因的可变剪接体表达规律进行分析。根据 GenBank 中鸭 *TLR4* 基因的 mRNA 序列(登录号: JN048668)设计引物, 利用 RT-PCR 扩增鸭 CDS 区, 以获取 *TLR4* 可变剪接体; 并通过构建雏鸭 PolyI:C 感染模型, 利用 qRT-PCR 检测 *TLR4* 可变剪接体的时空表达变化。结果, 获得一种鸭 *TLR4* 基因新的可变剪接体(*TLR4-b*), 并鉴定其剪接形式为跨内含子剪接。组织表达分析表明, *TLR4* 基因的表达主要以野生型(*TLR4-a*)为主, 且在 PolyI:C 等抗原刺激后, 肺、脾脏等组织中 *TLR4-a* mRNA 表达量总体表现为先上升, 后下降, 而 *TLR4-b* 表达变化不大。本研究成功克隆并鉴定了鸭 *TLR4* 基因新的可变剪接体, 在正常情况下 *TLR4-a* 表达量显著高于 *TLR4-b*, 在 PolyI:C 感染下, *TLR4-a* 表现为先上升, 后下降。研究结果初步揭示了鸭 *TLR4* 基因可变剪接体的结构, 且其功能主要取决于 *TLR4-a*。

**关键词:** 鸭; *TLR4*; 可变剪接体; 表达分析

中图分类号: S813.3

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2013)05-0697-06

## Identification and Expression Analysis of Alternative Splicing of *TLR4* in Duck

HUANG Zheng-yang<sup>1</sup>, CHEN Yang<sup>1</sup>, LI Xin-yu<sup>2</sup>, ZHEN Ting<sup>1</sup>, ZHANG Yang<sup>1</sup>, XU Qi<sup>1</sup>, DUAN Xiu-jun<sup>3</sup>, ZHAO Wen-ming<sup>1\*</sup>, CHEN Guo-hong<sup>1\*</sup>

(1. Jiangsu Key Laboratory of Animal Genetics, Breeding and Molecular Design, Yangzhou 225009, China; 2. College of Animal Science and Technology, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China; 3. National Waterfowl Germplasm Resourse Gene Pool, Taizhou 225300, China)

**Abstract:** This experiment was conducted to clone and identify the spliced variants of the *TLR4* gene, and analyze the regulation of their gene expression in duck. Based on the sequence of *TLR4* gene in GenBank(accession number: JN048668), the primers were designed, and the *TLR4* gene was obtained by the RT-PCR. The temporal and spatial expression pattern was detected by qRT-PCR to analysis the levels of transcript variants in different tissues by constructing the polyI:C infection duck model. One new transcript variants(*TLR4-b*) of duck *TLR4* gene was found, and sequences analysis showed that it was an alternative exon between the first and the second exon. The tissue expression analysis showed that the expression of *TLR4* was mainly wild type(*TLR4-a*). And the expression of *TLR4-a* mRNA always increased firstly, then decreased in lung and spleen after the stimulation of polyI:C, but the expression of *TLR4-b* had little change. The new

收稿日期: 2012-09-17

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-43-3); 江苏高校优势学科建设工程资助项目(苏政办发【2011】137号)

作者简介: 黄正洋(1987-), 男, 河南信阳人, 硕士生, 主要从事动物遗传育种研究, E-mail: beansgreen@outlook.com

\* 通信作者: 陈国宏, 教授, 博士生导师, 主要从事动物遗传资源评价、保护与利用研究, E-mail: ghchen@yzu.edu.cn; 赵文明, 博士, 副教授, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究, E-mail: wmzhao@yzu.edu.cn

splicing isoforms (*TLR4*-b) of *TLR4* gene was cloned and identified successfully in duck. The expression of *TLR4*-a was higher than that of *TLR4*-b under normal conditions, but the expression level of *TLR4*-a gene firstly increased, then decreased after polyI:C stimulation. The results preliminary reveal the structure of *TLR4* gene transcript variant in duck, and its function mainly depends on *TLR4*-a gene.

**Key words:** duck; *TLR4*; alternative splicing; expression analysis

Toll 样受体 (Toll like receptor, TLRs) 是 1997 年发现的介导天然免疫和获得性免疫的病原模式识别受体 (Pattern recognition receptors, PRPs)<sup>[1-3]</sup>。能识别表达在病原微生物上的高度保守的病原相关分子模式 (Pathogen associated molecular patterns, PAMPs), 并可向下游传递, 启动和调节机体的免疫反应。TLR4 是目前 TLRs 家族之中研究最热门的成员之一<sup>[4-6]</sup>。在病原体入侵的早期即可通过其介导的细胞内信号转导通路启动核内相关基因的表达, 合成 IFN、IL 和 TNF $\alpha$  等细胞因子并释放到细胞外, 激发天然免疫反应以杀伤和清除病原体, 并最终激活获得性免疫反应。

RNA 的可变剪接 (Alternative splicing, AS) 是指从一个 mRNA 前体中通过不同的剪接方式 (选择不同的剪接位点组合) 产生不同的 mRNA 剪接异构体的过程, 是调节基因表达和产生蛋白质组多样性的重要机制。已有研究表明, 可变剪接在产生受体多样性、控制调节生长发育等方面起决定性作用, 尤其表现在神经系统和免疫系统, 这与该类系统的功能多样性和反应敏感性是密切相关的<sup>[7-9]</sup>。许多遗传疾病都与剪接异常紧密相关, 据估计, 导致疾病的变异中约 15% 会影响 pre-mRNA 的剪接<sup>[9-12]</sup>。TLR4 是与动物疾病抗性/易感性相关的候选基因, 已经广泛被认可<sup>[13-15]</sup>。迄今为止, 已先后在猪、绵羊、小鼠等生物上发现 *TLR4* 基因的可变剪接体<sup>[16]</sup>, 而至今在鸭上的尚未见相关报道。

本研究通过 RT-PCR 技术克隆、鉴定鸭 *TLR4* 基因的可变剪接体, 并通过构建 PolyI:C 感染模型, 利用 qRT-PCR 检测各可变剪接体感染后基因表达变化, 旨在揭示鸭 *TLR4* 基因可变剪接体结构、表达特征及功能, 为今后研究禽类先天性免疫提供基础数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验试剂

Trizol Reagent、反转录试剂盒、SYBR Premix Ex

Taq (Perfect Real Time)、dNTP、Taq DNA 聚合酶、DNA Marker DL2000、DNA Marker DL5000、PCR 切胶回收试剂盒、pMD19-T 载体均购自大连宝生物 TaKaRa 公司; PolyI:C 购自 Sigma 公司; *E. coli* DH5 $\alpha$  菌株由本实验室保存。

### 1.2 试验设计

同批出雏的金定鸭 (无母源抗体), 由国家级水禽种质资源基因库 (泰州) 提供, 3 日龄时选取体重相当, 精神状态较好的 80 只雏鸭, 即试验组 (40 只) 和对照组 (40 只)。试验组注射 0.4 mL (0.5 mg  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>) PolyI:C, 对照组注射 0.4 mL 生理盐水, 隔离饲养, 分别于 0、4、8、12、24、36、48、72、96 h 不同时间点采集胸腺、肝脏、脾脏、肺、肾脏等组织样 (其中对照组脾脏取 2 份样品, 1 份用于基因克隆, 另 1 份用于基因表达) 和血样, 样品于液氮中速冻, -70  $^{\circ}$ C 冻存。

### 1.3 引物设计与合成

根据 GenBank 数据库中鸭 *TLR4* (登录号: JN048668) 和 *GAPDH* (登录号: AY436595) mRNA 序列, 利用 Primer 5.0 和 Oligo 6.0 设计 *TLR4* 基因 RT-PCR 引物、基因扩增引物和 qRT-PCR 引物。引物由生工生物工程 (上海) 有限公司和大连宝生物有限公司合成, 相关引物信息见表 1。

### 1.4 基因组 DNA 抽提和总 RNA 抽提与 cDNA 的合成

采用禽血基因组 DNA 抽提试剂盒提取基因组 DNA, 采用 Trizol Reagent 提取鸭胸腺、肝脏、脾脏、肺、肾脏等组织总 RNA, 加入 DNase I 去除可能存在的基因组 DNA, 将提取的 RNA 用 NanoDrop 浓度仪测定其浓度, 并用琼脂糖凝胶电泳检测其完整性, 待分析表明总 RNA 完整且纯度符合要求后, 方可进行下一步试验。取 2  $\mu$ g 总 RNA, 根据采用 Fermentas 反转录试剂盒说明以 Oligo dT 为引物合成 cDNA 第一链。

### 1.5 鸭 *TLR4* 基因 CDS 区及基因序列的克隆与测序

以反转录合成的 cDNA 为模板进行 PCR 反

应,RT-PCR 扩增鸭 *TLR4* CDS 区,反应总体系为 20  $\mu\text{L}$ :cDNA 模板 1  $\mu\text{L}$ , $10\times$ PCR Buffer( $\text{Mg}^{2+}$ ) 2  $\mu\text{L}$ ,dNTP( $2.5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )2  $\mu\text{L}$ ,上下游引物各 1  $\mu\text{L}$  ( $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ),*Taq* DNA 聚合酶( $5\text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ) 0.5  $\mu\text{L}$ ,补 ddH<sub>2</sub>O 到 20  $\mu\text{L}$ 。扩增程序:95  $^{\circ}\text{C}$  5 min;94  $^{\circ}\text{C}$  45 s,58  $^{\circ}\text{C}$  50 s,72  $^{\circ}\text{C}$  3 min,35 个循环;72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min;4  $^{\circ}\text{C}$  保存;1%琼脂糖凝胶电泳检

测 PCR 产物。经琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒纯化后,连接到 pMD19-T 载体,转化大肠杆菌 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态,蓝白斑筛选挑取阳性克隆,菌落 PCR 鉴定为阳性克隆送生工生物工程(上海)有限公司测序。*TLR4* 基因序列以鸭 DNA 为模板,扩增其基因序列,克隆步骤同上。

表 1 *TLR4* 基因组 DNA 和 cDNA 扩增及 RT-PCR 引物

Table 1 Primers used for RT-PCR and qRT-PCR in this study

引物名称 Name	引物序列(5'→3') The sequences of primer	退火温度/ $^{\circ}\text{C}$ Annealing temperature	备注 Note
P1F	CACTTCCCCTTGTTCTCTGC	65	CDS 区扩增
P1R	AGAGGCAGACAAATGGATGG		
P2F	CACTTCCCCTTGTTCTCTGC	65	基因组 DNA 扩增
P2R	AGAGGCAGACAAATGGATGG		
P3F	CCATGGTGCTTTCTCCTGTGT	60	组织表达
P3R	CTGGGTGGTGTGTTGGGACTT		
P4F	CCCTCTGCTTGGGAGATTTG	60	组织表达
P4R	GCTTGTTCTGTTTCTCAGGTGTTTT		
GAPDH-F	TGCTAAGCGTGTTCATCATCT	60	组织表达
GAPDH-R	AGTGGTCATAAGACCCTCCA		

## 1.6 鸭 *TLR4* 基因时空表达分析

分别对 *TLR4* 和 *GAPDH* 进行 qRT-PCR,引物见表 1。qRT-PCR 扩增体系:10 $\times$ PCR 缓冲液 2  $\mu\text{L}$ ,25 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{Mg}^{2+}$  2.0  $\mu\text{L}$ ,10 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$  dNTPs 0.4  $\mu\text{L}$ ,10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  上下游引物各 1  $\mu\text{L}$ ,*rTaq* 酶 2.0 U,100 ng $\cdot\mu\text{L}^{-1}$  cDNA 模板 1  $\mu\text{L}$ ,ddH<sub>2</sub>O 12.2  $\mu\text{L}$ 。PCR 扩增采用两步法,反应程序:95  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s;95  $^{\circ}\text{C}$  5 s,60  $^{\circ}\text{C}$  34 s,40 个循环;用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。同时进行实时荧光定量 PCR 检测,反应体系总体积为 20  $\mu\text{L}$ :SYBR Premix Ex *Taq*TM II( $2\times$ )10  $\mu\text{L}$ ,PCR Forward Primer( $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )0.8  $\mu\text{L}$ ,PCR Reverse Primer( $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )0.8  $\mu\text{L}$ ,ROX Reference Dye II( $50\times$ )0.4  $\mu\text{L}$ ,cDNA 2  $\mu\text{L}$ ,RNase-free dH<sub>2</sub>O 6  $\mu\text{L}$ 。相对表达量采用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法<sup>[17]</sup>,基因相对表达差异量用 SPSS16.0 软件进行统计分析。

## 2 结果

### 2.1 鸭 *TLR4* 基因 CDS 的克隆及可变剪接体的发现

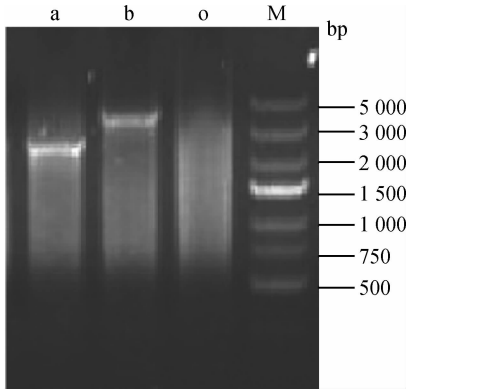
以鸭脾脏组织 cDNA 为模板,将 RT-PCR 产物

纯化后,转化克隆,随机挑取单个菌落进行菌液 PCR,1.0%琼脂糖凝胶电泳,扩增得到了大小不等片段(图 1),经测序,1 条为 2 532 bp,与 GenBank 提交序列一致,定义为野生型(*TLR4*-a),另 1 条为 3 367 bp,经比对,与鸭 *TLR4* 基因 CDS 相比,除包含相同的序列之外,还多出 835 bp 的碱基序列,定义为突变型(*TLR4*-b),经多次测序确定为鸭 *TLR4* 基因的一种新的剪接体,并提交至 GenBank。经分析,*TLR4*-a 编码 843 个氨基酸残基的多肽链,而新的可变剪接形式 *TLR4*-b,经预测,导致序列的读码框发生变化,编码不同于 *TLR4*-a 的多肽链。利用在线分析工具 SignalIP 进行信号肽预测,发现在 1~33 残基处存在信号肽序列。

### 2.2 *TLR4* 基因可变剪接体的鉴别及剪接方式确定

以鸭基因组 DNA 为模板,扩增鸭 *TLR4* 基因(图 2),经克隆测序,去除冗余序列,获得全长 4 697 bp 的序列,并提交至 GenBank(登录号:JQ839148)。经过与鸭 *TLR4* 基因的 CDS 区比对,分析发现该基因包含 3 个外显子和 2 个内含子。对 *TLR4*-a CDS 序列、*TLR4*-b CDS 序列和 *TLR4* 基因进行比对,结果

见图 3。从图 3 可以看出 *TLR4*-b 多余的序列为第一内含子,且为第一内含子全部序列,即 *TLR4*-b 为内含子完全保留类型的可变剪接。



a. *TLR4*-a; b. *TLR4*-b; o. 阴性对照; M. DNA 相对分子质量标准  
a. *TLR4*-a; b. *TLR4*-b; o. Negative control; M. DL5000 marker

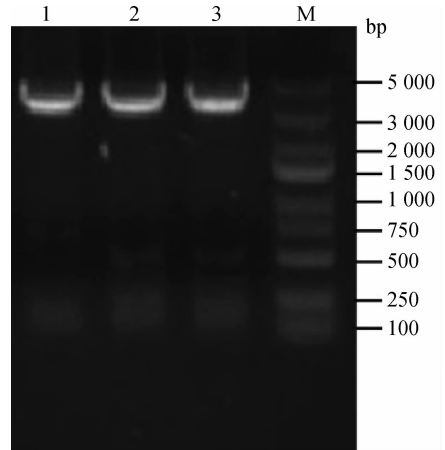
图 1 鸭 *TLR4* 基因菌液 PCR 结果

Fig. 1 The results of *TLR4* gene identification by bacteria PCR

### 2.3 鸭 *TLR4* 基因在组织时空表达检测

采用 qRT-PCR 法分别检测正常情况下鸭

*TLR4* 基因在各组织的表达情况,鸭 *TLR4* 基因的扩增效率为 97%, *GAPDH* 基因的扩增效率为 103%,均在 95%~115%之间, Ct 值可不作矫正,直接采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算 *TLR4* 各剪接体组织表达情况,结果见图 4。



1,2,3 分别是 PCR 产物; M. DNA 相对分子质量标准 DL5000

1, 2, 3. DNA PCR products; M. DL5000 marker

图 2 鸭 *TLR4* 基因 DNA 电泳图

Fig. 2 PCR amplification of DNA of duck *TLR4*

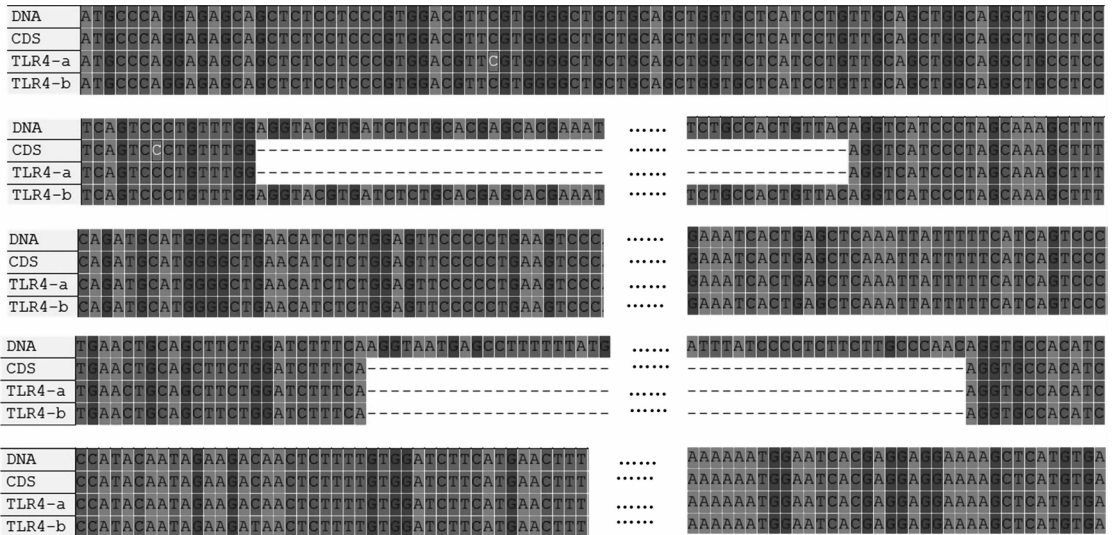
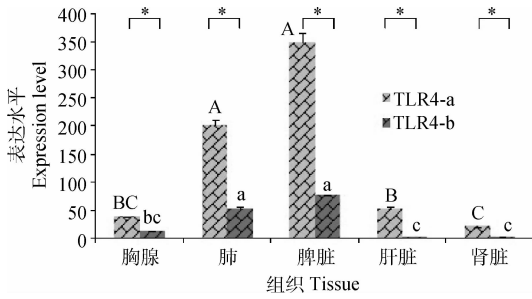


图 3 鸭 *TLR4* 基因 DNA 与 CDS 及 2 种剪接形式的比对结果

Fig. 3 Alignment of the DNA, CDS and the transcript variants of duck *TLR4* gene

由图 4 可以看出,在正常情况下,在各个组织中 *TLR4*-a 的表达量都显著大于 *TLR4*-b 的表达量 ( $P < 0.05$ ),即野生型 (*TLR4*-a) 大于新的剪接形式的转录本的表达量。其中, *TLR4*-a 在脾脏和肺中表达量最高; *TLR4*-b 在各组织表达量均较低,肝脏和肾脏中表现尤为明显。同时采用 PolyI:C 进行诱导,利

用 qT-PCR 对感染后鸭的脾脏和肺组织 *TLR4* 各剪接体进行了动态检测,结果见图 5。由图 5 可以看出,经 PolyI:C 诱导后,在大多时间点 *TLR4*-a 表达量均高于 *TLR4*-b, *TLR4*-a 在脾脏和肺组织总体表现为先上升,后下降,而 *TLR4*-b mRNA 在这 2 个组织中总体表现出 *TLR4*-b 随着刺激时间延长表达量升高。



\*. 表示差异显著 ( $P < 0.05$ ); \*\*. 表示差异极显著 ( $P < 0.01$ ). 同系列含有相同字母表示差异不显著 ( $P > 0.05$ ), 含有相邻字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ ), 含有相隔字母表示差异极显著 ( $P < 0.01$ ), 下同

\*. Indicate significant difference ( $P < 0.05$ ); \*\*. Indicate extremely significant difference ( $P < 0.01$ ). The difference between the same letters is not significant ( $P > 0.05$ ); Different adjacent capital letters ( $P < 0.05$ ) and interphase capital letter ( $P < 0.01$ ) in one same series showed the significant difference. The same as below

图 4 *TLR4* 基因的 2 种可变剪接体在各组织的表达情况

Fig. 4 The transcript variants of duck *TLR4* gene expression in duck tissue

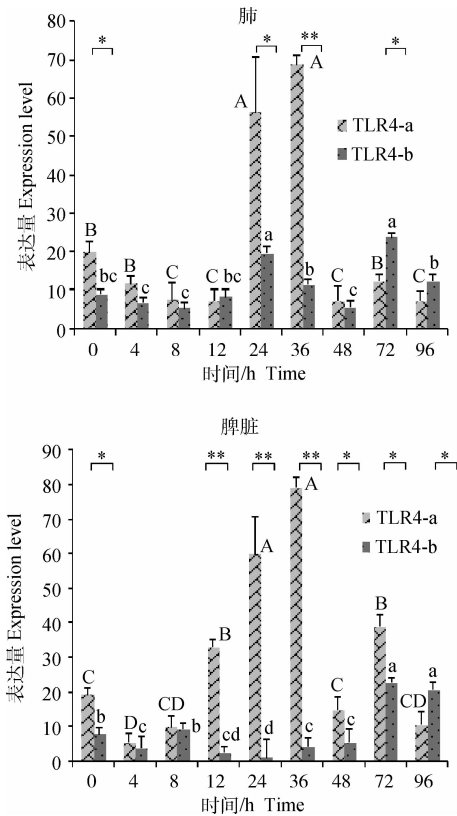


图 5 PolyI:C 感染过程中 *TLR4* 基因各种剪接体表达变化

Fig. 5 The transcript variants of duck *TLR4* gene expression in lung and spleen during PolyI:C stimulated

### 3 讨论

选择性剪接在机体内普遍存在, 并且大多数选择性剪接都涉及到蛋白质功能的改变, 如改变了蛋白质的氨基端或羧基端, 或者增删了某个功能区域等<sup>[18]</sup>。本研究获得了鸭 *TLR4* 基因的新可变剪接体——*TLR4-b*。目前已经发现的选择性剪接形式主要有 5 种基本形式: 内含子保留; 可变的 5' 端; 可变的 3' 端; 外显子盒; 互斥外显子<sup>[19-20]</sup>。本研究中的 *TLR4-b* mRNA 的产生就属于内含子保留。经过对 *TLR4-b* 序列结构进行研究发现, 由于其保留了第一内含子 (835 bp), 因此 *TLR4-b* 在翻译过程中可能存在 2 种情况, 其一, 在 291 bp 处提前终止 (PTC, Premature termination codons), 仅编码 76 个氨基酸残基; 其二, 发生整码突变 (RFS, Reading frame shift), 从 967 bp 开始翻译, 造成 1~77 位的氨基酸缺失, 导致细胞膜上蛋白质多肽链第一个跨膜区片段缺失, 究竟属于哪种情况还需通过蛋白功能和免疫原性试验进一步证实。已有研究报道, 在人 *TLR4* 中检测到了 4 种可变剪接体<sup>[21]</sup>; 在小鼠中检测到了 2 种可变剪接体<sup>[21]</sup>; 在羊检测到了 3 种可变剪接体<sup>[22]</sup>; 在猪检测到了 3 种可变剪接体<sup>[16]</sup>。而对于鸭上是否还存在其他可变剪接形式也需试验进一步验证, 但是可以肯定的是 *TLR4* 基因复杂可变剪接形式, 必然对 *TLR4* 基因功能产生很大的影响。

本研究通过 qRT-PCR, 发现不同组织间 *TLR4* 基因的表达差异较大, 且主要以野生型 (*TLR4-a*) 为主。杨秀芹等通过 RT-PCR 检测了猪 *TLR4* 基因可变剪接体组织表达, 也同样发现了猪 *TLR4* 也是以野生型为主, 其他 2 种剪接形式表达量均较低。研究还发现, 通过 PolyI:C 等抗原刺激后, 肺、脾脏等组织中 *TLR4-a* mRNA 表达量总体表现为先上升, 后下降。B. L. Zhang 等通过用 LPS 刺激过表达 *TLR4* 基因的成纤维细胞后发现: IL-6、IL-8 表达量升高, TNF- $\alpha$  的表达具有时效关系<sup>[22]</sup>。小鼠中检测到了 2 种可变剪接体并且其在巨噬细胞内的表达都能被 IFN 和 LPS 诱导<sup>[21]</sup>。由此可见, 鸭 *TLR4* 基因其功能主要取决于 *TLR4-a*。同时笔者也注意到, *TLR4-b* 随着 Poly I:C 刺激时间延长表达量升高, 这种变化提示了鸭 *TLR4* 该剪接体在免疫应答方面亦有一定的功能。TLR4 作为促进细胞因子合成和释放的重要因子, 并能引发炎症反应。体内的某些免疫细胞膜表面的 TLR4 蛋白感受到

病原体的刺激后,经由胞内信号传导,将信号传递到细胞核,启动核内相关基因,转导出相应的 mRNA,从而合成 IL-1、IL-6、IL-8、IL-12、TNF- $\alpha$  及 IFN- $\gamma$  等多种细胞因子并释放到胞外,引起粒细胞、巨噬细胞等免疫细胞趋化聚集,使得毛细血管通透性增高,淋巴细胞浸润等炎症反应,发挥早期免疫应答的效应。至于本试验所获得的可变剪接产物具体的生物学功能,现已着手进行研究。另外,TLR4 基因不同选择性剪接产物的丰度是如何调控的以及它们具体的生理学作用是什么尚需进一步的验证。

## 4 结 论

**4.1** 本研究扩增获得了鸭 TLR4 基因的一种新的可变剪接形式,且发现该可变剪接体属于第一内含子全保留类型。

**4.2** 在正常情况下主要以 TLR4-a 为主,其表达量高于 TLR4-b,在 PolyI: C 感染下,TLR4-a 和 TLR4-b 的表达均表现为先上升,后下降。

## 参考文献:

[1] CHAPES S K, MOSIER D A, WRIGHT A D, et al. MHCII, Tlr4 and Nramp1 genes control host pulmonary resistance against the opportunistic bacterium *Pasteurella pneumotropica*[J]. *J Leukoc Biol*, 2001, 69(3): 381-386.

[2] DU X, POLTORAK A, SILVA M, et al. Analysis of Tlr4-mediated LPS signal transduction in macrophages by mutational modification of the receptor[J]. *Blood Cells Mol Dis*, 1999, 25(5-6): 328-338.

[3] FRANTZ S, KOBZIK L, KIM Y D, et al. Toll4 (TLR4) expression in cardiac myocytes in normal and failing myocardium[J]. *J Clin Invest*, 1999, 104(3): 271-280.

[4] 于 鑫,王月秋,李明恒,等. Toll 样受体 2 和 4 在脂多糖诱导人牙周膜成纤维细胞表达细胞核因子- $\kappa$ B 受体活化因子配基中的作用[J]. *华西口腔医学杂志*, 2012, 30(3): 325-328.

[5] 周作勇,聂 奎,宋振辉,等. 雏鸡不同组织 TLR1、TLR2、TLR4、TLR5 和 TLR15mRNA 转录水平相对定量研究[J]. *畜牧兽医学报*, 2011, 41(11): 1453-1459.

[6] 荆 科,孙 梅. TLR2 和 TLR4mRNA 表达与 LPS 诱导肠组织损伤的关系[J]. *世界华人消化杂志*, 2010, 18(21): 2197-2202.

[7] 李稚锋,王正志,张成岗. 真核基因可变剪接研究现状与展望[J]. *生物信息学*, 2004, 2(5): 35-38.

[8] ZHU Q, ZOU L, JAGAVELU K, et al. Intestinal decontamination inhibits TLR4 dependent fibronectin-mediated cross-talk between stellate cells and endothelial cells in liver fibrosis in mice[J]. *J Hepatol*, 2012, 56(4): 893-899.

[9] 盛金良,陈创夫,杨 霞,等. 绵羊 Toll 样受体家族在肺泡巨噬细胞的分布及脂多糖(LPS)刺激对 TLR2、TLR4 表达的影响[J]. *华北农学报*, 2010, 25(1): 30-35.

[10] 李 鹏,夏平安,宋咏梅,等. 鸡 TLR4 基因表达水平与沙门氏菌感染关系的研究[J]. *中国畜牧兽医*, 2009, 36(5): 72-74.

[11] 韩 凝,张 彩,罗南萍. TLR4 研究进展与肾脏疾病文献综述[J]. *放射免疫学杂志*, 2009, 22(2): 133-135.

[12] 邱莫寒,俞 宁. RNA 的可变剪接[J]. *畜牧与饲料科学*, 2010, 31(5): 13-14.

[13] ZHANG K, ZHOU B, WANG Y, et al. Lack of association between TLR4 Asp299Gly polymorphism and atherosclerosis: evidence from meta-analysis[J]. *Throm Res*, 2012, 130(4): e203-e208.

[14] POLTORAK A, HE X, SMIRNOVA I, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene[J]. *Science*, 1998, 282(5396): 2085-2088.

[15] 贾红敏,卢立志,石放雄,等. 动物 TLR4 基因多态性及其抗病相关性研究进展 [J]. *生命科学*, 2010, 22(6): 546-550.

[16] 杨秀芹,翟春媛,李海涛,等. 猪 TLR4 基因可变剪切体的鉴定[J]. *畜牧兽医学报*, 2011, 42(8): 1051-1056.

[17] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  method [J]. *Methods*, 2001, 25:402-408.

[18] 章国卫,宋怀东,陈 竺. mRNA 选择性剪接的分子机制[J]. *遗传学报*, 2004, 31(1):102-107.

[19] 林鲁萍,马 飞,王义权. 基因选择性剪接的生物信息学研究概况[J]. *遗传*, 2006, 27(6): 1001-1006.

[20] 王科俊,吕俊杰,冯伟兴,等. 可变剪接与疾病的生物信息学研究概况[J]. *生命科学研究*, 2011, 15(1): 86-94.

[21] WELLS C A, CHALK A M, FORREST A, et al. Alternate transcription of the Toll-like receptor signaling cascade[J]. *Genome Biol*, 2006, 7:R10

[22] ZHANG B L, DU J L, HAN H B, et al. Two novel splice variants of the ovis aries Toll-like receptor 4 [J]. *Asian J Anim Vet Adv*, 2011, 6(2): 155-165.