

雏鸡不同组织 *TLR1*、*TLR2*、*TLR4*、*TLR5* 和 *TLR15* mRNA 转录水平相对定量研究

周作勇^{1,3}, 聂奎^{2*}, 宋振辉¹, 胡世君¹, 周荣琼¹, 郭智莉², 刘丽琼², 秦波²

(1. 西南大学荣昌校区动物医学系, 重庆 402460; 2. 西南大学动物科技学院, 重庆 400715;

3. 西南大学蚕学与系统生物研究所, 重庆 400715)

摘要: 参考 GenBank 登录的 *ChTLRs* 基因序列设计实时定量 PCR 特异性引物, 建立检测鸡 Toll 样受体 (*ChTLR*) mRNA 相对转录水平的实时定量 PCR 方法, 分析 *ChTLR1*、*ChTLR2*、*ChTLR4*、*ChTLR5* 和 *ChTLR15* 在雏鸡不同器官组织中的转录水平。结果显示 5 种 *ChTLRs* 在脾脏、法氏囊、胸腺和各段肠道组织中均有转录。其中, *ChTLR1* mRNA 在法氏囊、肾脏和盲肠组织中转录水平较高; *ChTLR2* mRNA 在脾脏、法氏囊和肝脏等组织中转录水平较高, 在肾脏、肺脏和皮肤未检测到转录; *ChTLR4* mRNA 在所检测组织中转录水平差异较小, 在脾脏、十二指肠和胸腺转录水平较高; *ChTLR5* mRNA 在肾脏、脾脏和空肠中的转录水平较高; *ChTLR15* mRNA 在法氏囊中转录水平最高, 其次为脾脏和盲肠。本研究建立了检测 *ChTLRs* mRNA 在不同器官组织中表达水平的实时定量 PCR 方法, *ChTLRs* mRNA 在雏鸡各器官组织中转录水平差异较大, 可能与雏鸡各器官组织对病原的识别和抵抗能力有关。

关键词: Toll 样受体; mRNA 转录水平; 罗曼鸡; 荧光定量 PCR

中图分类号: S852.42

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2010)11-1453-07

Relative Quantification of mRNA Transcription of Toll-like Receptors in Different Tissues of Chicken by Real-time Quantitative PCR

ZHOU Zuo-yong^{1,3}, NIE Kui^{2*}, SONG Zhen-hui¹, HU Shi-jun¹, ZHOU Rong-qiong¹, GUO Zhi-li², LIU Li-qiong², QIN Bo²

(1. Department of Veterinary Medicine, Rongchang Campus, Southwest University, Chongqing 402460, China;

2. College of Animal Science and Technology, Southwest University, Chongqing 400715, China;

3. Institute of Sericulture and Systems Biology, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: According to the sequences of chicken Toll-like receptors (*ChTLR*), the real-time PCR primers were designed and synthesized to establish a method for the detection of mRNA transcription of *ChTLRs* by real-time quantitative PCR. And the transcriptions of *ChTLRs* in different tissues of Luo-man chicken were analyzed. The result showed that the *ChTLRs* mRNA were transcribed in spleen, bursa, thymus and intestinal tract. The *ChTLR1* is transcribed at high level in bursa, kidney and cecum, in contrast, *ChTLR2* mRNA is restricted in the partial tissues, and at high level in spleen, bursa and liver, and not detected in kidney, lung and skin. *ChTLR4* is transcribed at approximately the same level in all tissues tested. The *ChTLR5* is transcribed at high level in kidney, spleen and cecum, and *ChTLR15* is transcribed at high level in bursa, spleen and cecum. These results indicated that the real-time quantitative PCR was established successfully for the detection of *ChTLRs* mRNA transcription, and there were comparatively

收稿日期: 2010-06-07

基金项目: 西南大学青年基金资助项目(QNRC200804)

作者简介: 周作勇(1979-), 男, 四川冕宁人, 讲师, 博士, 主要从事动物传染病与寄生虫病防治研究, E-mail: zzyxny@163.com

* 通讯作者: 聂奎, E-mail: niekui@126.com

large differences on the transcription level of *ChTLRs* mRNA in different tissues, which may be associated with the ability of chicken to recognize pathogens.

Key words: Toll-like receptors; mRNA transcription; Luo-man chicken; real-time quantitative PCR

Toll 样受体 (toll-like receptors, TLR) 是一类胚系编码的模式识别受体 (pattern recognition receptors, PRR), 通过识别病原微生物保守的分子相关模式 (pathogen-associated molecular patterns, PAMP), 实现对外来病原体的早期识别, 启动机体的天然免疫和引起获得性免疫反应^[1]。在目前已经鉴定的 10 种鸡 Toll 样受体 (Chicken TLRs, *ChTLR*) 中^[2-3], *ChTLR1*、*ChTLR2*、*ChTLR4*、*ChTLR5* 和 *ChTLR15* 主要参与细菌识别, 其中 *ChTLR1* 主要与其他的 *ChTLRs* 协同作用、影响其特异性识别相关配体的能力^[4], *ChTLR2* 和 *ChTLR4* 主要识别细菌的脂蛋白和脂多糖^[5], *ChTLR5* 可特异性识别细菌的鞭毛蛋白^[6], *ChTLR15* 的配体尚不清楚, 可能与识别沙门氏菌某些病原成分有关^[7-9]。近年来, 已有多篇关于 *ChTLRs* 对沙门氏菌和弯曲杆菌等细菌感染应答的研究^[8-11], 然而这些研究所检测的组织局限于脾脏和盲肠等个别组织器官。虽然 Iqbal 等检测了部分 *ChTLRs* 在脾脏等组织中的表达^[12], 但是他们采用的是半定量 RT-PCR 方法来检测, 且所研究对象为 8 周龄白来航鸡, 雏鸡各组织中 *ChTLRs* 转录水平如何尚不清楚。此外, *ChTLR15* 为鸡所特有的受体^[8-9], 在多个组织中的表达情况如何无相关报道。目前, 反转录实时定量 PCR 方法与其他方法相比, 具有更高的准确性和敏感性, 成为研究基因表达的金标准^[13], 利用该方法检测基因转录水平已见于多篇文献报道^[9, 14-17]。尚未见有利用荧光定量 PCR 方法研究雏鸡 *ChTLRs* mRNA 组织转录水平的研究。*TLRs* mRNA 在不同组织中的转录表达水平直接影响其对入侵该组织病原的识别作用^[17], 本试验建立了检测 *ChTLR1*、*ChTLR2*、*ChTLR4*、*ChTLR5* 和 *ChTLR15* mRNA 转录水平的实时定量 RT-PCR 方法, 分析 *ChTLRs* 在不同组织器官中的相对转录水平, 为理解和研究鸡细菌性传染病发生过程中宿主与病原相互间的关系以及免疫诱导产生的过程奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

DEPC, RNAiso™ Plus, cDNA 反转录试剂盒、

DNase I、*Taq* DNA 聚合酶、dNTPs、20 bp DNA Ladder Marker, pMD19-T 载体、小量质粒抽提试剂盒、感受态细胞 DH5 α 、SYBR® Prime Script RT-PCT Kit 均购自 TaKaRa 公司。胶回收试剂盒购于 Promega 公司。Mini Opticon Real Time PCR 仪为美国 Bio-Rad 公司产品, Biometra 梯度 PCR 仪为德国产品。

1.2 试验动物

1 日龄罗曼雏鸡 10 只, 购自内江市种鸡场, 饲喂于经严格消毒的鸡笼中, 饮水经煮沸消毒, 饲喂雏鸡全价饲料。

1.3 引物设计

参考 GenBank 收录的 *ChTLRs* mRNA 基因序列, 进行在线引物设计 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>), 同时结合 Primer 5.0 和 Oligo 软件进行分析设计特异性引物, 其中 *ChTLR4* 为跨内含子 (Exon junction 272/273) 引物 (表 1), 引物由英潍捷基 (上海) 贸易有限公司合成。

1.4 RNA 的提取

10 日龄时, 随机选择 5 只罗曼雏鸡, 无菌采集心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、胸腺、法氏囊、十二指肠、空肠、盲肠、肌肉和皮肤共 12 种组织, 编号并迅速置于液氮冻存。参考 Nishimura 等的报道^[18], 分别按组织类别混合, 按照 RNAiso™ Plus 提取试剂盒说明书进行总 RNA 提取, DNase I 消化, 去除可能存在的基因组 DNA, 总 RNA 置于 -70 °C 保存备用。

1.5 反转录

在 200 μ L PCR 反应管中加入如下试剂进行反转录: 5 \times PrimeScript® Buffer 2 μ L, PrimeScript® RT Enzyme Mix I 0.5 μ L, Oligo dT Primer (50 μ mol \cdot L⁻¹) 0.5 μ L, Random 6 mers (100 μ mol \cdot L⁻¹) 0.5 μ L, Total RNA 2 μ L, RNase Free dH₂O 4.5 μ L, 37 °C 15 min, 85 °C 5 s。反转录产物置于 -20 °C 保存备用。

1.6 鸡 TLRs 及 β -actin PCR 扩增

PCR 反应体系总体积为 25 μ L, 其中 10 \times PCR Buffer (Mg²⁺ Free) 2.5 μ L, dNTP Mixture (2.5 mmol \cdot L⁻¹) 0.5 μ L, MgCl₂ (25 mmol \cdot L⁻¹) 1 μ L, 上游引物 SF (20 μ mol \cdot L⁻¹) 0.5 μ L, 下游引物 SR (20 μ mol \cdot L⁻¹) 0.5 μ L, *Taq* DNA 聚合酶 (5 U \cdot μ L⁻¹) 0.25 μ L, ddH₂O 18.75 μ L, cDNA 1 μ L。

表 1 用于分析 *ChTLRs* 基因组织表达图谱的实时定量 PCR 引物

Table 1 Primers used for transcription analysis of chicken toll-like receptor mRNAs by real-time quantitative PCR

Toll 受体	参考序列	引物(上游引物 SF, 下游引物 SR)	产物长度/bp
Toll-like receptor	Accession number	Primers(Special forward primer, SF; Special reverse primer, SR)	Length of product
<i>ChTLR1</i>	AB109401	SF: ACCCGTTCAAGTGTTCTCGTG SR: TTCCGCTCAAGTCTTCTGG	120
<i>ChTLR2</i>	NM_204278	SF: GGTGTTCTGTTTCATCCTCATC SR: GTTGGAGTCGTTCTCACTGTAGG	169
<i>ChTLR4</i>	NM_001030693	SF: ATCTTTCAAGGTGCCACATC SR: GGATATGCTTGTTTCCACCA	167
<i>ChTLR5</i>	AJ626848	SF: ACTCCCTTCTTCCCACATCT SR: GTTTGCGAGCCAGTTTCTCTCT	118
<i>ChTLR15</i>	NM_001037835	SF: GGCTGTGGTATGTGAGAATG SR: ATCGTGCTCGCTGTATGA	113
<i>βactin</i>	L08165	SF: GCCAACAGAGAGAAGATGACAC SR: GTAACACCATCACCAGAGTCCA	140

PCR 程序如下: 首先 94 °C 变性 5 min; 接着以下程序循环 30 次: 94 °C 变性 30 s, 60 °C 复性 30 s, 72 °C 延伸 50 s; 最后 72 °C 延伸 5 min。4% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

1.7 *ChTLRs* 和 *β actin* 基因的克隆及序列测定

PCR 扩增产物经 4% 琼脂糖凝胶电泳, 回收目的 DNA 片段, 具体操作按胶回收试剂盒说明书进行。将目的片段 DNA 与 pMD19-T 载体连接, 转化 DH5 α 感受态细胞, 涂布于含 Amp、X-gal 和 IPTG 的 LB 琼脂平板中, 37 °C 培养 14~16 h。挑选白色菌落, 进行培养, 经抽提质粒和 PCR 鉴定为阳性克隆, 送英潍捷基(上海)贸易有限公司测序, 测序结果用在线 BLASTn 软件进行同源性搜索。

1.8 *ChTLRs* 与 *β actin* 扩增效率的比较

分别以 *ChTLR1*、*ChTLR2*、*ChTLR4*、*ChTLR5*、*ChTLR15* 和 *β actin* 基因 PCR 产物为模板进行 10 倍梯度稀释, 以扩增对应 *ChTLRs* 和 *β actin* 基因的引物进行实时荧光定量 PCR 分析。反应体系: SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (2 \times) 10 μ L, 上游引物 SF (20 μ mol \cdot L⁻¹) 0.4 μ L, 下游引物 SR (20 μ mol \cdot L⁻¹) 0.4 μ L, ddH₂O 7.2 μ L, DNA 模板 2 μ L。实时荧光定量 PCR 反应程序: 首先 95 °C 预变性 30 s; 然后 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 读板收集荧光, 40 个循环; 最后从 65 °C 至 95 °C, 按 0.5 °C 增值进行溶解曲线分析。

1.9 实时定量 PCR 反应

按照 1.5 方法对各组织总 RNA 进行反转录合成

cDNA, 将 cDNA 进行 2 倍稀释作为检测模板, 按照 1.8 的反应体系和反应程序, 每个样品设 3 个重复孔, 检测各组织中 *ChTLR1*、*ChTLR2*、*ChTLR4*、*ChTLR5* 和 *ChTLR15* mRNA 的转录水平。

1.10 数据分析

试验结果采用相对比较 Ct 法 ($Q_r = 2^{-\Delta\Delta C_t}$) 分析^[19], 首先计算出每只雏鸡各组织样品中目的基因与内参基因的 Ct 差值 ($\Delta C_t = \Delta C_{t_{\text{目的基因}}} - \Delta C_{t_{\text{内参基因}}}$), 然后计算每种组织样品 ΔC_t 平均值, 选取肌肉样品为对照, 以其他组织 Ct 差值减去肌肉组织对照 Ct 差值, 即为比较的 Ct ($\Delta\Delta C_t$), 即 $\Delta\Delta C_t = (\Delta C_{t_{\text{目的基因}}} - \Delta C_{t_{\text{内参基因}}})_{\text{试验组}} - (\Delta C_{t_{\text{目的基因}}} - \Delta C_{t_{\text{内参基因}}})_{\text{对照组}}$ 。

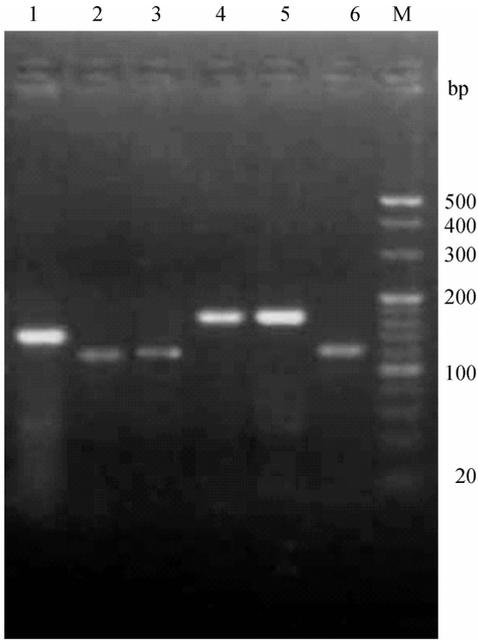
2 结果

2.1 *ChTLRs* 基因片段的 PCR 扩增

对所提取的组织总 RNA 进行反转录和 PCR 扩增, 分别得到与预期大小相符的单一扩增条带(图 1)。同时, 直接使用所提取的总 RNA 为模板, 进行实时荧光定量 PCR 反应, 未检测到扩增产物。将所扩增的 *ChTLRs* 基因片段进行克隆测序, BLAST 检索, 发现均为鸡对应的 Toll 样受体。

2.2 实时荧光定量 PCR 产物特异性

经溶解曲线分析, *ChTLR1*、*ChTLR2*、*ChTLR4*、*ChTLR5*、*ChTLR15* 和内参基因 *β actin* 的溶解温度分别为 87.0、86.0、81.5、80.5、82.5 和 83.5 °C, 6 个基因片段的溶解曲线均呈单峰, 无引物二聚体或其他杂峰(图 2)。

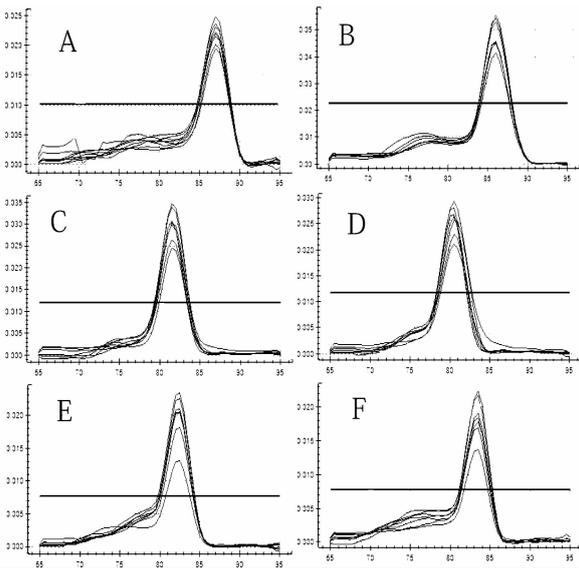


M. 20 bp 梯度 Marker; 1. *βactin*; 2. *TLR15*; 3. *TLR5*; 4. *TLR4*; 5. *TLR2*; 6. *TLR1*

M. 20 bp DNA ladder Marker; 1. *βactin*; 2. *TLR15*; 3. *TLR5*; 4. *TLR4*; 5. *TLR2*; 6. *TLR1*

图 1 鸡 Toll 样受体基因 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification of chicken Toll like receptors



1. A 为 *ChTLR1*, B 为 *ChTLR2*, C 为 *ChTLR4*, D 为 *ChTLR5*, E 为 *ChTLR15*, F 为 *βactin*; 2. 横坐标为摄氏温度(°C), 纵坐标为溶解峰, 即 *ChTLRs* 基因每个温度下的相对荧光单位数据的负导数(-dRFU/dT)

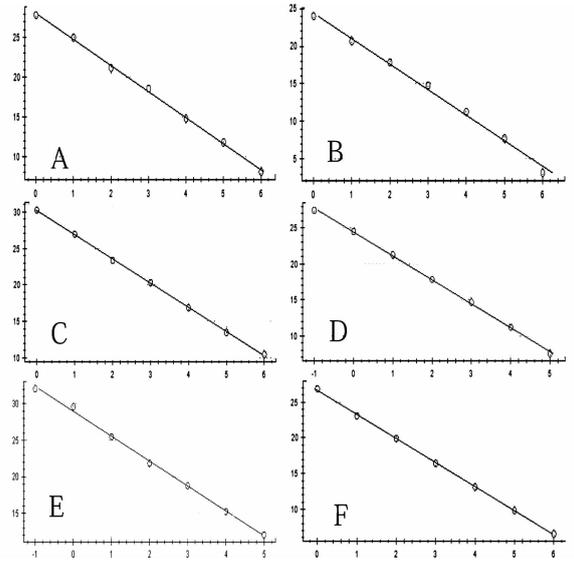
1. A: *ChTLR1*; B: *ChTLR2*; C: *ChTLR4*; D: *ChTLR5*; E: *ChTLR15*; F: *βactin*; 2. Abscissa represent Celsius temperature, ordinates represent melt peak, which was the negative derivate of fluorescence versus the temperature (-dRFU/dT) of *ChTLRs*

图 2 *ChTLRs* 基因熔解曲线

Fig. 2 Dissociation curve of *ChTLRs*

2.3 *ChTLRs* 与 *βactin* 基因的扩增效率

ChTLRs 与 *βactin* 基因的扩增效率(Amplification efficiency, E values)和相关系数(Correlation coefficients, R^2 values)分别如下: *ChTLR1* ($E = 101.5\%$, $R^2 = 0.999$), *ChTLR2* ($E = 97.5\%$, $R^2 = 0.995$), *ChTLR4* ($E = 100.2\%$, $R^2 = 1.000$), *ChTLR5* ($E = 99.9\%$, $R^2 = 0.999$), *ChTLR15* ($E = 96.5\%$, $R^2 = 0.998$), *βactin* ($E = 98.0\%$, $R^2 = 1.000$)(图 3)。



1. A 为 *ChTLR1*, B 为 *ChTLR2*, C 为 *ChTLR4*, D 为 *ChTLR5*, E 为 *ChTLR15*, F 为 *βactin*; 2. 横坐标为 *ChTLRs* 基因起始模板量的对数值, 纵坐标为阈值循环数

1. A: *ChTLR1*; B: *ChTLR2*; C: *ChTLR4*; D: *ChTLR5*; E: *ChTLR15*; F: *βactin*; 2. Abscissa represent Log starting quantity of *chTLRs*, ordinates represent threshold cycle

图 3 *ChTLRs* 基因扩增标准曲线

Fig. 3 Standard curve of *ChTLRs* amplification

2.4 雏鸡不同组织 *ChTLRs* mRNA 的转录水平

整体上, *ChTLRs* 在免疫器官和各段肠道组织中的转录水平较高, 而在其他组织中转录较低, 甚至不转录, 如 *ChTLR2* mRNA 在肾脏、肺脏和皮肤组织中未检测到转录, 而部分受体在非免疫器官中转录水平却非常高, 如 *ChTLR1* 和 *ChTLR5* mRNA 在肾脏中的转录。其中, *ChTLR1* mRNA 在法氏囊、肾脏、盲肠和脾脏组织中转录水平较高, 分别为肌肉组织中的 22.13、21.30、11.95、11.69 倍。 *ChTLR2* mRNA 在脾脏、法氏囊、肝脏和盲肠等组织中均检测到转录水平较高, 其中脾脏转录水平最高, 为肌肉组织的 18.66 倍。 *ChTLR4* mRNA 在脾脏、十二指肠、胸腺和空肠中的转录水平较高, 相对其

他 *ChTLRs*, *ChTLR4* mRNA 在所检测组织中差异较低。*ChTLR5* mRNA 在肾脏、脾脏和空肠中的转录水平较高, 分别是肌肉组织的 29.72、14.21 和 12.17

倍。*ChTLR15* mRNA 在法氏囊中转录水平最高, 为肌肉组织的 20.74 倍, 其次为脾脏和盲肠(表 2)。

表 2 雏鸡不同组织中 *ChTLRs* mRNA 表达水平的相对定量

Table 2 Fold difference of *ChTLRs* mRNA transcription in chicken tissues

组织 Tissue	Toll 受体 mRNA 表达相对差异 Fold difference $2^{-\Delta\Delta Ct}$				
	<i>TLR1</i>	<i>TLR2</i>	<i>TLR4</i>	<i>TLR5</i>	<i>TLR15</i>
肌肉 Muscle	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
胸腺 Thymus	6.81	1.53	1.98	1.66	7.43
脾脏 Spleen	11.69	18.66	2.29	14.21	18.15
法氏囊 Bursa	22.13	8.12	0.95	6.59	20.74
肝脏 Liver	2.18	5.11	0.60	2.99	1.25
肾脏 Kidney	21.30	-	0.25	29.72	0.03
肺脏 Lung	2.39	-	0.27	4.15	0.07
心脏 Heart	1.13	0.37	0.31	0.07	0.48
皮肤 Skin	0.22	-	0.21	0.71	0.67
十二指肠 Duodenum	9.25	2.36	2.32	1.80	2.35
空肠 Jejunum	2.95	1.80	1.94	12.17	4.29
盲肠 Cecum	11.95	2.74	0.87	3.31	11.3

3 讨论

目前, 用于实时荧光定量 PCR 检测染料常见的有 Taqman 荧光探针和 SYBR Green I 荧光嵌合染料 2 种, 其中 SYBR Green I 荧光嵌合法因避免了设计、标记荧光探针和价格昂贵等问题, 被许多研究者采用。由于 SYBR Green I 可与任何一种双链 DNA 结合发出荧光, 其特异性完全由扩增引物决定^[20]。本试验中, PCR 扩增产物在 4% 琼脂糖电泳结果显示, 5 种 *ChTLRs* 和 $\beta actin$ 均只扩增出相应大小的单一扩增条带, 溶解曲线分析发现扩增产物呈特异性较好的单峰, 无其他杂峰, 测序结果证实为相应的 *ChTLRs*, 表明引物特异性好。荧光定量的方法有相对定量和绝对定量 2 种^[19], 本试验选择了相对定量法, 利用内参基因 $\beta actin$ 消除 mRNA 的提取效率和反转录效率间的差异, 使结果更为准确可靠, 但是此法需要内参基因与目的基因具有相同或近似的扩增效率^[19]。本试验中 $\beta actin$ 与 *ChTLRs* 基因荧光定量 PCR 扩增相关系数均在 0.99 以上, 表明 Ct 值与 cDNA 浓度间的线性关系好^[21]。*ChTLRs* 和 $\beta actin$ 基因具有相似的扩增效率, 均在 1.0 左右, 表明所建立的实时荧光定量 PCR 扩增质量好^[22]。以上分析表明, 作者所建立的用于 *ChTLRs* 基因表达检测的荧光定量 PCR 反应

可行。运用实时荧光定量 PCR 研究目标基因 mRNA 转录水平时, 需要确保所提取的总 RNA 无基因组 DNA 污染^[13]。通过使用 DNase 消化去除可能存在的基因组 DNA, 然后以制备的总 RNA 作为模板进行实时荧光定量 PCR 反应, 检测是否有扩增产物, 或者是跨内含子设计引物, 检测扩增片段大小, 这 2 种方法可以检测所提取的总 RNA 是否有基因组 DNA 污染^[13]。本研究中, 仅 *ChTLR4* 具有 3 个外显子^[3], 所以作者设计了跨内含子引物, 同时作者对所提取的总 RNA 进行 DNase 处理, 并以荧光定量 PCR 反应检测无基因组 DNA 的污染, 保证了试验结果的可靠性。

关于人和小鼠 Toll 样受体的研究报道较多, 表明这些受体在减少和清除细菌性病原感染中发挥着十分关键的作用^[23], 而在鸡 Toll 样受体方面的研究资料较少。作者首次利用实时荧光定量 PCR 方法对 10 日龄罗曼雏鸡部分器官及组织进行 *ChTLRs* mRNA 转录水平的研究。结果发现, 5 种 *ChTLRs* 在胸腺、脾脏、法氏囊及各段肠道组织中均有转录。Mackinnon 等报道在 2 日龄雏鸡的各肠段组织中, 均能检测到 *ChTLRs* mRNA 的转录^[9]。作者的研究结果也证实在肠道组织中 *ChTLRs* mRNA 不同程度的转录, 其中, *ChTLR1* 和 *ChTLR15* mRNA 在盲肠组织转录水平最高, *ChTLR5* mRNA

在空肠组织中的转录水平最高, *TLR2* 和 *TLR4* 的转录水平差异不明显。本研究发现 *ChTLR1* mRNA 在法氏囊、肾脏、盲肠和脾脏组织中转录表达水平较高, 在肺脏组织中相对较低, Iqbal 等研究结果也证实了 8 周龄白来航鸡 *ChTLR1* mRNA 在脾脏、法氏囊和盲肠等组织中转录水平较高, 同时他们的结果还显示该受体在肺脏组织中为高通量的转录, 而在肾脏组织中转录水平低^[12], 这与作者的结果差异较大。据 Higgs 等报道, 5 周龄雏鸡 *TLR2* 和 *TLR4* 在脾脏、肝脏、法氏囊和盲肠等组织的转录情况相似, 而且发现这些受体在骨髓和法氏囊组织中的转录水平最高, 而在脾脏、肝脏、小肠和盲肠组织中的转录水平相对较低^[7]。Iqbal 等报道 *TLR2* mRNA 在白来航鸡的脾脏和法氏囊中转录水平很高^[12]。而 Yilmaz 等研究发现 *TLR2* 在白来航产蛋鸡的肝脏、小肠和脾脏组织中转录水平较高^[4]。作者发现 *ChTLR2* mRNA 在脾脏组织中转录水平最高, 其次才为法氏囊组织, 与 Iqbal 等^[12]报道一致, 与 Higgs 等^[7]和 Yilmaz 等^[4]报道有一定差异, 这种差异是否由鸡品种和年龄不同有待进一步研究。Leveque 等报道 *TLR4* 在白来航鸡具有很广的组织转录表达谱, 且在胸腺、肾脏、肠道、肌肉和脾脏中的转录水平一致^[5], 本试验发现 *ChTLR4* 在所检测的 12 个组织中均有转录, 与其他 *TLRs* 相比, *ChTLR4* 在各组织中的转录水平差异较小, 与 Leveque 等的检测结果基本一致。而与 Higgs 等报道 *ChTLR4* 主要在骨髓中表达, 而在脾脏、肝脏、小肠、法氏囊和盲肠等组织中转录水平低或者不转录有较大差异^[7]。作者发现 *ChTLR5* mRNA 在肾脏组织中转录水平最高, 其次为脾脏和空肠, 在肺脏组织中也有一定量的转录, 和 Leveque 等^[5]的报道结果基本一致。*TLR15* 为鸡所特有的受体, 其配体还不清楚, 研究表明受到沙门氏菌感染后, 盲肠 *TLR15* mRNA 比未感染鸡显著上升。暗示 *TLR15* 可以识别沙门氏菌, 其配体可能为沙门氏菌属细菌的某些成分^[8-9]。本试验发现 *ChTLR15* mRNA 在法氏囊中表达最高, 与 Higgs 等报道一致^[7], 为肌肉组织的 20.74 倍, 其次为脾脏和盲肠。综上分析, 作者认为不同品种和不同日龄的鸡 *ChTLRs* mRNA 组织转录水平不完全一致, 这可能与其对病原的识别和抵抗能力有关。当然, 仅仅检测 *TLRs* mRNA 转录水平不能完全代表 Toll 样受体蛋白的表达水平^[17], 在雏鸡各组织中 *TLRs* mRNA 的差异性转录是否

会造成相应组织中 Toll 样受体蛋白表达水平的变化, 从而影响其配体结合能力以及下游信号传导和细胞因子的释放, 有待进一步研究。

参考文献:

- [1] MANICASSAMY S, PULENDRAN B. Modulation of adaptive immunity with Toll-like receptors[J]. *Semin Immunol*, 2009, 21(4): 185-193.
- [2] LEULIER F, LEMAITRE B. Toll-like receptors-taking an evolutionary approach [J]. *Nat Rev Genet*, 2008, 9(3): 165-178.
- [3] TEMPERLEY N D, BERLIN S, PATON I R, et al. Evolution of the chicken Toll-like receptor gene family: a story of gene gain and gene loss[J]. *BMC Genomics*, 2008, 9: 62.
- [4] YILMAZ A, SHEN S, ADELSON D L, et al. Identification and sequence analysis of chicken Toll-like receptors[J]. *Immunogenetics*, 2005, 56(10): 743-753.
- [5] LEVEQUE G, FORGETTA V, MORROLL S, et al. Allelic variation in *TLR4* is linked to susceptibility to *Salmonella enterica* serovar typhimurium infection in chickens[J]. *Infect Immun*, 2003, 71(3): 1116-1124.
- [6] KEESTRA A M, DE ZOETE M R, VAN AUBEL R A, et al. Functional characterization of chicken *TLR5* reveals species-specific recognition of flagellin[J]. *Mol Immunol*, 2008, 45(5): 1298-1307.
- [7] HIGGS R, CORMICAN P, CAHALANE S, et al. Induction of a novel chicken Toll-like receptor following *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection [J]. *Infect Immun*, 2006, 74(3): 1692-1698.
- [8] NERREN J R, HE H, GENOVESE K, et al. Expression of the avian-specific toll-like receptor 15 in chicken heterophils is mediated by Gram-negative and Gram-positive bacteria, but not *TLR* agonists[J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2010, 136(1-2): 151-156.
- [9] MACKINNON K M, HE H, NERREN J R, et al. Expression profile of toll-like receptors within the gastrointestinal tract of 2-day-old *Salmonella enteritidis*-infected broiler chickens[J]. *Vet Microbiol*, 2009, 137(3-4): 313-319.
- [10] SHAUGHNESSY R G, MEADE K G, CAHALANE S, et al. Innate immune gene expression differentiates the early avian intestinal response between *Salmonella* and *Campylobacter*[J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2009, 132(2-4): 191-198.
- [11] ABASHT B, KAISER M G, VANDER POEL J, et al. Genetic lines differ in Toll-like receptor gene expres-

- sion in spleens of chicks inoculated with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis [J]. *Poult Sci*, 2009, 88(4):744-749.
- [12] IQBAL M, PHILBIN V J, SMITH A L. Expression patterns of chicken Toll-like receptor mRNA in tissues, immune cell subsets and cell lines [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2005, 104(1-2):117-127.
- [13] DERVEAUX S, VANDESOMPELE J, HELLEMANS J. How to do successful gene expression analysis using real-time PCR [J]. *Methods*, 2010, 50(4):227-230.
- [14] MEADE K G, HIGGS R, LLOYD A T, et al. Differential antimicrobial peptide gene expression patterns during early chicken embryological development [J]. *Dev Comp Immunol*, 2009, 33(4):516-524.
- [15] 明晓波, 尹鑫, 张颖, 等. 氨肽酶 N mRNA 在雏鸡不同组织中的表达情况 [J]. *中国兽医科学*, 2009, 39(12):1089-1093.
- [16] 独军政, 常惠芸, 薛霜, 等. 1-2 月龄荷斯坦奶牛不同组织中 FMDV 受体亚基 α_v 、 β_3 、 β_6 mRNA 转录水平的相对定量研究 [J]. *中国农业科学*, 2010, 43(3):605-611.
- [17] TIRUMURGAAN K G, DHANASEKARAN S, RAJ G D, et al. Differential expression of toll-like receptor mRNA in selected tissues of goat (*Capra hircus*) [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2010, 133(2-4):296-301.
- [18] NISHIMURA M, NAITO S. Tissue-specific mRNA expression profiles of human toll-like receptors and related genes [J]. *Biol Pharm Bull*, 2005, 28(5):886-892.
- [19] KENNETH J L, THOMAS D S. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25(4):402-408.
- [20] WONG M L, MEDRANO J F. Real-time PCR for mRNA quantitation [J]. *Biotechniques*, 2005, 39(1):75-85.
- [21] PFAFFL M W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR [J]. *Nucleic Acid Res*, 2001, 29(9):2002-2007.
- [22] STHALBERG A, AMAN P, RIDELL B, et al. Quantitative real-time PCR method for detection of B-lymphocyte monoclonality by comparison of κ and λ immunoglobulin light chain expression [J]. *Clin Chem*, 2003, 49(1):51-59.
- [23] ALBIGER B, DHALBERG S, HENRIQUES-NORMARK B, et al. Role of the innate immune system in host defence against bacterial infections; focus on the toll-like receptors [J]. *J Intern Med*, 2007, 261(6):511-528.

(编辑 白永平)