

麦洼牦牛 *TLR1~10* 基因克隆及分子生物学特征分析

林宝山, 兰道亮*, 陈亚冰, 黄 偲, 符 梅, 李 解, 李 键*

(西南民族大学 生命科学与技术学院/西南民族大学 青藏高原研究院, 成都 610041)

摘要: 本研究克隆了麦洼牦牛天然免疫受体 1~10 基因的编码区, 利用生物信息学工具分析基因特点, 荧光定量 PCR 测定 *TLR*s 基因在不同组织中的表达量。序列比较分析结果表明, 麦洼牦牛 *TLR* 基因与其他物种在核苷酸水平及氨基酸水平上均表现出很高的保守性。遗传进化方面, 麦洼牦牛 *TLR*s 与牛和绵羊 *TLR*s 遗传进化距离最近, 并与人、马、鼠 *TLR*s 等形成哺乳动物的一个分支, 与鸡则形成遗传距离较远的一个分支。同时我们在进行系统发育分析时发现, *TLR1*、*TLR6* 先聚为一小支, 再与 *TLR10* 又聚为更紧密的一支, 然后 *TLR1*、2、6、10 和 *TLR7*、8、9 分别聚集在两个单个的分支上, *TLR* 其他成员各自成为一支。荧光定量结果表明, *TLR*s 在麦洼牦牛各组织均有表达, 但不同成员在不同组织的表达存在较大的差异。其中 *TLR2*、*TLR4* 和 *TLR6* 在脾表达量最高, 在卵巢、小肠、肾、肝中有高表达, *TLR1*、*TLR5*、*TLR7*、*TLR8*、*TLR9* 和 *TLR10* 在肾表达量最高, 在肝、肾、脾等组织中高表达。综上所述, 本研究的开展能为以后揭示 *TLR*s 在牦牛等高原模式动物分子免疫机制以及牦牛抗病育种奠定基础。

关键词: 麦洼牦牛; *TLR1-10*; 克隆; 荧光定量 PCR; 组织表达分布

中图分类号: S823.8⁺5; S813.3

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2015)05-0728-10

Molecular Cloning and Biological Characterization Analysis of Toll-like Receptors 1-10 in Maiwa Yak

LIN Bao-shan, LAN Dao-liang*, CHEN Ya-bing, HUANG Cai, FU Mei, LI Jie, LI Jian*

(College of Life Science and Technology, Southwest University for Nationalities / College of Tibetan Plateau Research, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China)

Abstract: In this study, the coding region of Maiwa yak toll-like receptors 1-10 genes were cloned, and then the bioinformatics tool was used to analyze the characteristics of *TLR*s sequences, and real-time PCR was used to detect the expression pattern of *TLR*s. The results showed that Maiwa yak *TLR* genes exhibited high homologies at the nucleotide and the amino acid levels with other species. Phylogenetic relationships showed that Maiwa yak had a nearest relationship with cattle and sheep, Maiwa yak was clustered into a branch with human, horse and mouse. It was noteworthy that *TLR1*, *TLR6* first clustered into a small branch, then gathered with *TLR10* for a closer one, then *TLR1*, 2, 6, 10 and *TLR7*, 8, 9 were gathered in the 2 individual branches, respectively. The other members of *TLR*s became respective one. Real-time PCR results showed that *TLR*s were expressed in all tissues of yak, but different members had different expression patterns. *TLR2*, *TLR4* and *TLR6* had the highest expression in the spleen, followed with ovary, small intestine, kidney, liver. *TLR1*, *TLR5*, *TLR7*, *TLR8*, *TLR9* and *TLR10* had the highest expression in kidney, higher expression in liver, kidney, spleen. The study provide useful information for further study in immune molecular mechanisms and disease resistance breeding of yaks.

收稿日期: 2014-08-01

基金项目: 西南民族大学中央高校青年教师基金项目(2014NZYQN37); 西南民族大学研究生学位点建设项目(2014XWD-S0906)

作者简介: 林宝山(1987-), 男, 藏族, 甘肃天祝藏族自治县人, 硕士生, 主要从事高原动物分子免疫机制方面的研究, E-mail: 172407151@qq.com

* 通信作者: 兰道亮, 副教授, 博士, 主要从事高原动物分子免疫机制方面的研究, E-mail: landaoliang@163.com; 李 键, 教授, 博士, 主要从事动物生殖调控研究, E-mail: lijian@swun.cn

Key words: Maiwa yak; *TLR1-10*; cloning; real-time PCR; expression and distribution in tissues

TLR 如同天然免疫的眼睛,监视与识别各种不同疾病的相关分子模式“PAMP”,引发一系列信号转导,进而导致炎性介质的释放,并最终激活获得性免疫系统,是机体抵抗感染性疾病的第一道屏障^[1]。近期研究发现,TLRs 参与并调控获得性免疫应答^[2]。迄今,TLR 家族在哺乳动物中至少有 13 个成员,其中,人类 *TLR1~10*,小鼠 *TLR1~9*、*11~13*,牛和羊 *TLR1~10*,猪 *TLR1~10* 等。TLRs 成员各自能够特异性地识别不同的 PAMPs/DAMPs (病原体相关分子模式/损伤关联分子模式),并调节先天性与获得性免疫以限制病原微生物的入侵,同时清除宿主产生的机体残留物质。例如 *TLR2* 与 *TLR1* 或 *TLR6* 协同识别革兰阳性菌的肽聚糖、磷壁酸、脂蛋白等;*TLR3* 识别病毒的双链 RNA(dsRNA);*TLR4* 识别革兰阴性菌的脂多糖、类脂 A、热休克蛋白 60/70 等;*TLR5* 识别细菌的鞭毛蛋白;*TLR7* 和 *TLR8* 识别病毒单链 RNA(ssRNA);*TLR9* 识别细菌、病毒、真菌及一些原生动物的非甲基化的 CpG DNA 等^[1-3]。

青藏高原是中国最大、世界海拔最高的高原,平均海拔 4 000~5 000 m,有“世界屋脊”和“第三极”之称。牦牛是生长在这里的一种特有古老物种,是世居青藏高原藏族人重要的生活和生产资源,也是当地畜牧经济发展的重要支柱。与平原动物相比,牦牛作为高原模式动物能够在青藏高原极度高寒、低氧等恶劣气候环境下生存,其抗病及免疫分子机制可能存在特殊性。同时近年来,牦牛疾病尤其是传染性疾病如犏牛腹泻病、乳房炎、寄生虫性疾病等疾病严重威胁着牦牛群体的健康,影响了牦牛产业的发展。因此研究牦牛分子免疫机制具有重要意义。

目前,小鼠和人类的 Toll 样受体已经研究的比较深入了,关于家畜 Toll 样受体的鉴定和研究在最近几年也取得了较大的进展。K. McGurie 等将牛 Toll 样受体 1~10 完成了鉴定并绘制了物理图谱,发现其 95% 的核苷酸序列和人是一致的^[4];M. Menzies 等对羊 *TLR1~10* 基因进行了克隆与测序^[5];A. Raja 等对山羊 *TLR1~10* 基因进行了测序和分析^[6];在猪和马上也都做了相关的研究^[7-8],但是 TLRs 在牦牛上的研究基本空白。鉴于此,本研究克隆了麦洼牦牛 *TLR1~10* 基因并进行了相关的预测和分析研究,这为今后进一步揭示牦牛等高原模式动物免疫分子机

制和高原动物重大疫病的防控提供依据,同时也为牦牛抗病育种提供重要的基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验所有牦牛组织采自高原屠宰场(中国四川红原县,北纬 31°51′~33°19′,东经 101°51′~103°23′,平均海拔 3 600 m),属于麦洼牦牛品种。分别采集雌性麦洼牦牛 7 头(年龄 3~5 岁,体重 300~400 kg)11 种组织样本(心、肝、脾、肺、肾、大肠、小肠、肌肉、胃、卵巢、乳腺),均放入液氮速冻,送回实验室 -80 °C 保存。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取和 cDNA 合成 称取约 1 g 组织样本至液氮中研磨后,按照 RNAprep pure 动物总 RNA 提取试剂盒(天根生化科技(北京)有限公司)提取总 RNA。按照的 RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 反转录试剂盒(Fermentas 公司)进行反转录反应,采用 20 μL 体系:Oligo dT₁₈ 1 μL,5× Reaction Buffer 4 μL, Ribolock™ Rnase Inhibitor (20 U·μL⁻¹) 1 μL, 10 mmol·L⁻¹ dNTP Mix 2 μL, RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase (200 U·μL⁻¹) 1 μL,模板 1 μL,最后用 RNase Free dH₂O 补足 20 μL。反应条件:42 °C 60 min;70 °C 5 min。cDNA 于 -20 °C 保存备用。

1.2.2 引物的设计与合成 麦洼牦牛 *TLR1~10* 克隆及荧光定量引物根据 GenBank 中登陆的牛 *TLR1~10* 基因序列,用 Premier 5.0 软件分别设计,内参引物根据牛 *βactin* 序列设计。引物详细信息见表 1、表 2。以上所有引物由 Invitrogen(上海)公司合成。

1.2.3 目的基因的克隆 每个 *TLR* 基因均以麦洼牦牛脾组织 cDNA 为模版,进行普通 PCR 扩增,扩增体系为 50 μL。所有 PCR 产物经 10 g·L⁻¹ 琼脂糖凝胶电泳观察扩增结果,用 Axygen 的凝胶回收试剂盒回收纯化 PCR 产物,取适量已纯化 PCR 产物与克隆载体 pMD19-T 进行连接,转化 DH5α 感受态细胞并在 Amp⁺ 琼脂平板上涂菌。挑取单个菌落接种于含 Amp⁺ 的 LB 液体培养基中。经 PCR 鉴定后,将阳性重组质粒送往 Invitrogen(上海)公司测序。

表 1 基因 *TLR1*~*10* 的克隆引物序列Table 1 Primer sequences of *TLR1*-*10* genes

基因	引物名称	引物序列(5'-3')	产物长度/bp
Gene	Name of primers	Sequence of primers	Length of fragment
<i>TLR1</i>	F	TTTAATTGACAGGTCAAAAAGAGG	2 287
	R	TTAATGTATTTCTGCTGCTTTTCC	
<i>TLR2</i>	F	ATGCCACGTGCTTTGTGG	2 620
	R	GAGTCAGTGATGCCATCCAACC	
<i>TLR3</i>	F	GAAAACGAACTGGATTTGGACTAA	2 942
	R	GGGAGACGTATTTCCATAGAAGAGA	
<i>TLR4</i>	F	AGGATGATGGCGCGTG	2 807
	R	CTCTAATTCAGTTTGATGGGGTAAG	
<i>TLR5</i>	F	GGATCATGGGAGACTGCCTT	2 582
	R	AGGAGATGGTGGTTACATTTTGC	
<i>TLR6</i>	F	AGAAGCTGTCATTTTGTTTACAT	2 364
	R	AACCTTTCACATCATCATTTTC	
<i>TLR7</i>	F	AGGTGTTTCCAATGTGGACAT	3 142
	R	TCTTTGAACACCTGACTGTAGGT	
<i>TLR8</i>	F	CCCTTTTCCTGCTCATCTCTGA	3 033
	R	CGTGAATCGTTGGCTGTTAGGAC	
<i>TLR9</i>	F	AGCTCAGACAGAAGACGATCAA	3 303
	R	CGGCAGAAGTTCCGGTTATAG	
<i>TLR10</i>	F	ATTGTTACGTCTGTGCATAGTGG	2 367
	R	AACCTCCAAACCCTTCATTTCAG	

表 2 基因 *TLR1*~*10* 和 β -*actin* 的荧光定量引物序列Table 2 Real-time PCR primer sequences of *TLR1*-*10* and β -*actin* genes

基因	引物名称	引物序列(5'-3')	退火温度/°C	产物长度/bp
Gene	Name of primers	Sequence of primers	T _m	Length of fragment
<i>TLR1</i>	F	ATTTCTTGCCACCCTACTCTGA	58	241
	R	TAAGGTCTTGAAGGCTCTCGG		
<i>TLR2</i>	F	AGGAAGGCTCCCCGCAGG	60	225
	R	GTTCTCCGAAAGCACAAAGATGGT		
<i>TLR3</i>	F	TTGGGCAAGAACTCACAGGC	60	188
	R	AAGAGGGCGAAAAGGCGA		
<i>TLR4</i>	F	GAAGACGACACATTTTCAGGGC	57	256
	R	GCTCCAGATTGGGCAGGTTAG		
<i>TLR5</i>	F	CAGGACAGTCACAACCGCATC	60	229
	R	AGCATCGGAGAGACCACAGGA		
<i>TLR6</i>	F	TGTTTTCAGATGTTTACCTCCTCG	60	387
	R	GGGGTTCCCTTGTAGCGTTC		
<i>TLR7</i>	F	TCCCCACTGTTTTGCCAT	58	255
	R	GCTGTAGAGAGTTACTGTGTAGACG		
<i>TLR8</i>	F	TGAAGCCAGTTATCCCCGAA	60	273
	R	GCCCCGTCTGTAATAGTCATAGC		
<i>TLR9</i>	F	TCCTGGTTCGGTTCCTTAGC	60	254
	R	GCCACCATTAGCAGCGAGAG		
<i>TLR10</i>	F	TATCCCCCAGGAGAGCGTC	60	392
	R	TTCCAGGCAAGCACCCAA		
β - <i>actin</i>	F	AGGTGACAGCAGTCGGTTGGA	59	170
	R	CCTTAGAGAGAAGCGGGGTGG		

1.2.4 实时荧光定量 PCR 实时荧光定量 PCR 参照 β -actin 对 *TLR* 基因组织表达进行定量检测。实时荧光定量采用 20 μ L 反应体系:SYBR Premix Ex Taq™ II (TaKaRa 公司) 10 μ L, 上、下游引物各 0.8 μ L, cDNA 2 μ L, dH₂O 6.4 μ L。使用 Bio-Rad 公司荧光定量 PCR 仪进行荧光定量分析。优化处理后每个基因的最佳反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s, X $^{\circ}$ C (表 2) 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 20 s, 39 个循环; 添加一个熔解曲线, 设置以 dH₂O 为模板的阴性对照, 每个组织进行 3 次重复。

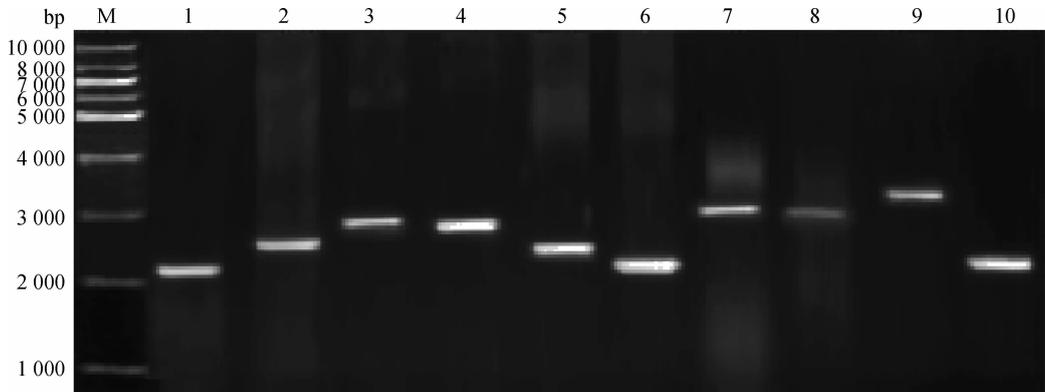
1.2.5 分析与处理 *TLR* 克隆序列应用 Laser-gene 软件包进行分析; 蛋白质结构域由 SMART 在线软件预测分析 (<http://smart.embl-heidelberg>,

de/); *TLRs* 同其他物种的多序列同源性比对利用在线软件 ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>); 遗传进化关系树的建立应用 Clustalx、MEGA5.1 软件。荧光定量结果采用相对定量的 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行数据分析并用 SpassV19.0 软件进行数据处理, 最后使用 Excel 制图功能绘制出麦洼牦牛 *TLRs* 各基因的组织相对表达柱状图。

2 结果

2.1 目的基因的扩增

麦洼牦牛 *TLR1~10* 基因的克隆扩增结果如图 1。由图可知, 扩增片段大小与预期扩增片段大小基本相符。



M. DNA 相对分子质量标准; 1~10. 基因 *TLR1~10* 扩增的片段
M. DNA marker 1kb; 1-10. PCR products of *TLR1-10* genes

图 1 基因 *TLR1~10* 的 PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR products of *TLR1-10* genes

2.2 蛋白质结构分析

采用 SMART 在线软件分析 *TLR1~10* 分子的结构特征 (图 2), 结果显示, *TLR1~10* 分子结构包含 N 末端信号肽结构、胞外区的 LRRs 结构域、跨膜区以及保内去 TIR 结构域, 是典型的 *TLRs* 结构特征。但是 *TLR* 家族成员所含 LRR 及 TIR 结构域数量有很大的差异, 其中, *TLR3*、*TLR7*、*TLR8*、*TLR9* 含有数量较多的 LRR 区域, *TLR1* 包含的 LRR 区域为最少。通过与牛、羊、人、鸡等不同物种 *TLRs* 蛋白功能结构与排布方式比较, 发现麦洼牦牛 *TLR* 蛋白结构域与牛、羊数量与分布位置较为一致, 与其他物种间 *TLRs* 蛋白大小相近, 但蛋白功能结构域排布方式存在细微差别。

2.3 同源性分析

TLRs 同其他物种的多序列同源性比对利用在线软件 ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/>

msa/clustalw2/)(表 3) 实施。结果显示, 麦洼牦牛 *TLR* 基因与其他物种均表现出很高的保守性。在核苷酸水平上, 麦洼牦牛与牛和绵羊的同源性均大于 96%, 与人和鼠的同源性在 75%~87%。在氨基酸水平上, 麦洼牦牛与牛及绵羊的同源性为 90%~99%, 与人和鼠的同源性为 64%~86%。在所有 *TLR* 家族成员中 *TLR7* 基因最为保守 (氨基酸同源性达到 80%~99.71%); 而 *TLR2*、*TLR4* 相对较低, 分别为 66.58%~94.11%、64.07%~92.17%。

2.4 遗传进化树

麦洼牦牛 *TLR* 基因遗传进化树的建立利用了 MEGA 5.0 软件的 Neighbor-Joining 法, 重复 1 000 次, 将克隆所得麦洼牦牛 *TLR1~10* 分别与 GenBank 中登录的牛、羊、人、鼠、马、原鸡 *TLR1~10* 序列比对构建 Bootstrap 验证的系统发育树 (图 3)。结果显示, 麦洼牦牛与牛和绵羊遗传进化距离最近,

并与人、马、鼠等形成哺乳动物的一个分支。原鸡则形成与麦洼牦牛遗传距离较远的一个分支。值得一提的是,TLR1、TLR6 先聚为一小支,再与 TLR10

又聚为更紧密的一支,然后 TLR1、2、6、10 和 TLR7、8、9 分别聚集在两个单个的分支上,TLR 其他成员各自成为一支。

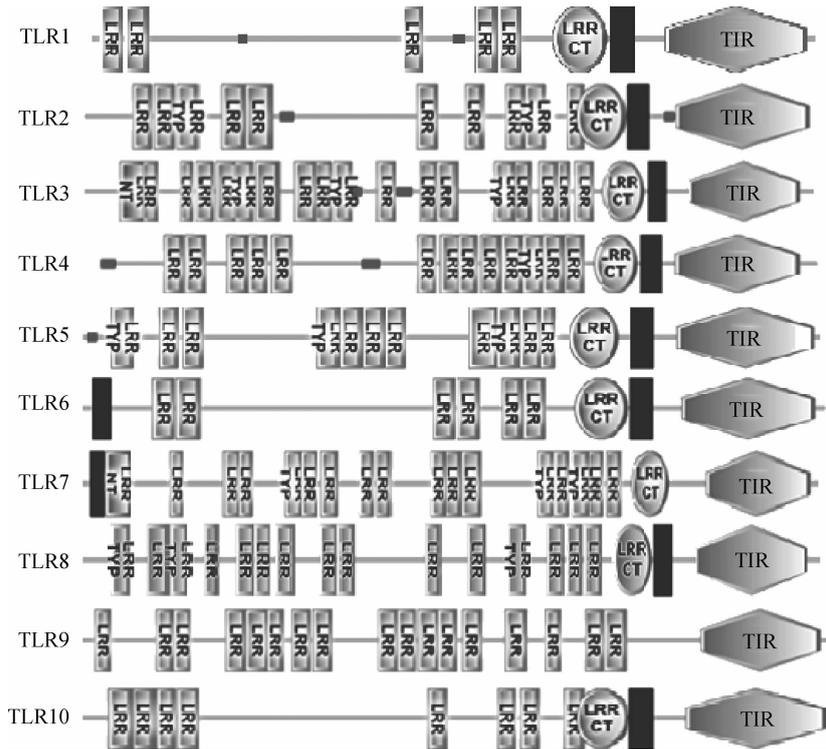


图 2 *TLR1~10* 基因蛋白结构域分析结果
Fig. 2 Protein domains prediction of *TLR1-10* genes

2.5 标准曲线的建立

标准曲线以连续 10 倍倍比稀释 ($1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^8 \text{ copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 的阳性质粒为模板,经定量 PCR 扩增后,计算 Ct 值得出最佳检测区域,并制作各基因的标准曲线。图 4 可见,*TLR1~10* 和 βactin 基因的相关系数 (R^2) 大于 0.990,说明 Ct 值与 cDNA 浓度间具有良好的线性关系;*TLR1~10* 基因和 βactin 基因扩增效率 (E) 在 1.0 左右,说明扩增效率基本相同,以上分析说明建立的荧光定量检测方法快速、敏感性高、特异性强等,可用于 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 相对定量的 PCR 分析。

2.6 荧光定量 PCR 检测麦洼牦牛 *TLR1~10* 基因在各组织的表达分布

采用 βactin 为参照基因,SYBR Green I 为荧光染料,通过荧光定量 PCR 方法检测 *TLR1~10* 基因在麦洼牦牛各组织的表达分布。数据经分析处理后,绘制的麦洼牦牛 *TLR1~10* 基因在各组织相对表达柱状图(图 5)。结果显示,麦洼牦牛 *TLRs* 在各主要器官组织均有表达,但不同成员在不同组织

的表达存在较大的差异。其中 *TLR1*、*TLR2*、*TLR4* 和 *TLR6* 在脾表达量最高在卵巢、小肠、肾、肝中有较高表达,*TLR5*、*TLR7*、*TLR8*、*TLR9* 和 *TLR10* 在肾表达量最高,在肝、脾、肺等组织中高表达。与其他组织相比较麦洼牦牛 *TLR1~10* 基因除 *TLR10* 外,其他成员均在心组织相对表达量最低。同时,通过比较发现麦洼牦牛 *TLR1*、*TLR6* 基因在各组织的表达比较相似,*TLR2* 与 *TLR4*、*TLR7* 与 *TLR8*、*TLR9* 表达比较相似。

3 讨论

Toll 样受体作为连接动物机体天然免疫和获得性免疫的桥梁,通过识别病原体组织和细胞特异性表达模式进而使机体对各种致病挑战作出反应,抵御疾病。牦牛作为藏族人重要的生产生活资源,也是当地的畜牧经济发展不可或缺的重要畜种。其作为高原模式动物对青藏高原恶劣极端气候有较强的适应能力,然而近年来牦牛重大疫病的发生和不断加强的趋势所带来的影响和损失让人担忧。因

表 3 *TLR1~10* 基因的核苷酸序列同源性比较Table 3 Alignment of *TLR1-10* gene sequences

名称 Name	物种 Species	长度/bp Length	核苷酸相似性/% Nucleotide similarity to Maiwa yak	氨基酸相似性/% Amino similarity to Maiwa yak	GenBank 登录号 GenBank accession No.
<i>TLR1</i>	Yak	2 183			KJ101605.1
	Bovine	2 184	99.13	98.21	NM_001046504.1
	Ovine	2 196	96.63	94.55	NM_001135060.2
	Human	2 361	84.43	82.11	NM_003263.3
	Mouse	2 388	78.49	77.87	NM_001172120.2
<i>TLR2</i>	Yak	2 355			KF977429.1
	Bovine	2 355	99.02	94.11	NM_174197.2
	Ovine	2 355	95.71	90.01	DQ890157.1
	Human	2 355	83.82	76.53	NM_003264.3
	Mouse	2 355	76.18	66.58	NM_198769.2
<i>TLR3</i>	Yak	2 714			KF990165.1
	Bovine	2 715	99.26	98.78	NM_001008664.1
	Ovine	2 715	96.8	95.91	NM_001135928.1
	Human	2 715	84.42	82.52	NM_003265.2
	Mouse	2 718	79.95	78.34	NM_198791.1
<i>TLR4</i>	Yak	2 526			KF977430.1
	Bovine	2 523	99.25	92.17	NM_174198.6
	Ovine	2 523	96.23	89.76	NM_001135930.1
	Human	2 520	82.14	75.8	AB445638.1
	Mouse	2 508	75.16	64.07	NM_019178.1
<i>TLR5</i>	Yak	2 576			KJ101606.1
	Bovine	2 577	97.36	95.66	NM_001040501.1
	Ovine	2 577	96.47	93.35	NM_001135926.1
	Human	2 577	83.24	78.41	NM_003268.5
	Mouse	2 616	75.87	70.52	NM_001145828.1
<i>TLR6</i>	Yak	2 397			KM359137
	Bovine	2 382	97.57	96.34	NM_001001159.1
	Ovine	2 394	96.91	94.98	NM_001135927.1
	Human	2 391	86.49	80.65	AB020807.1
	Mouse	2 421	77.64	71.55	NM_207604.1
<i>TLR7</i>	Yak	3 153			KM359138
	Bovine	3 153	99.81	99.71	NM_001033761.1
	Ovine	3 141	98.28	98.09	NM_001135059.1
	Human	3 150	87.43	86.27	NM_016562.3
	Mouse	3 153	82.37	80.76	NM_001097582.1
<i>TLR8</i>	Yak	3 102			KM359140
	Bovine	3 075	97.43	96.15	NM_001033937.1
	Ovine	3 102	97.56	95.34	NM_001135929.1
	Human	3 180	81.02	76.04	AF246971.1
	Mouse	3 090	76.01	70.23	NM_001101009.1
<i>TLR9</i>	Yak	3 090			KM359141
	Bovine	3 090	99.14	99.03	NM_183081.1
	Ovine	3 090	95.86	95.03	NM_001011555.1
	Human	3 099	84.23	79.24	NM_017442.3
	Mouse	3 099	77.83	70.81	NM_198131.1
<i>TLR10</i>	Yak	2 296			KM359139
	Bovine	2 439	99.37	98.99	NM_001076918.2
	Ovine	2 331	95.07	94.2	NM_001135925.1
	Human	2 436	86.19	80.23	AB445680.1
	Mouse	2 436	77.45	68.57	NM_001146035.1

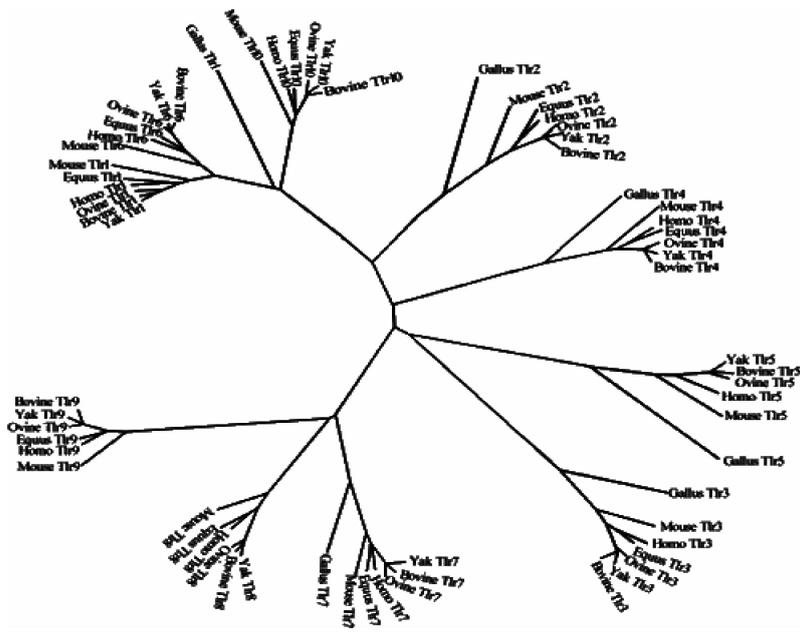


图 3 *TLR1*~*10* 基因的核苷酸序列系统进化树
 Fig. 3 Phylogenetic tree of *TLR1*-*10* gene sequences

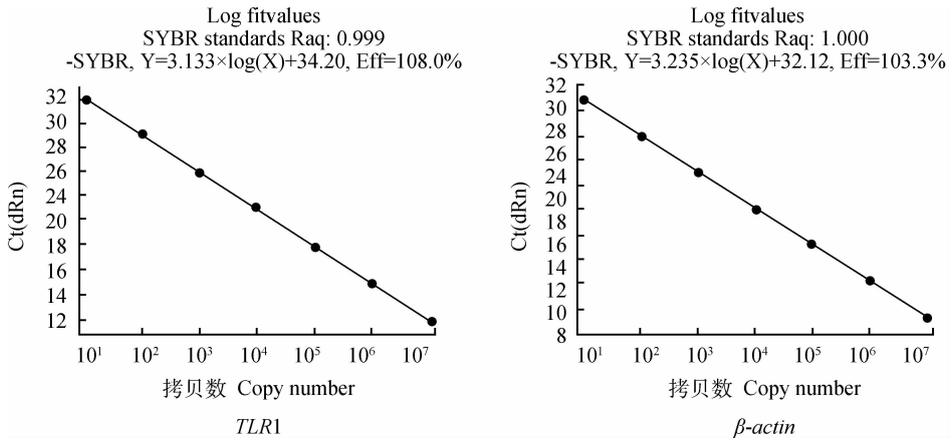


图 4 Real-time PCR 的标准曲线
 Fig. 4 The standard curves of the real-time PCR

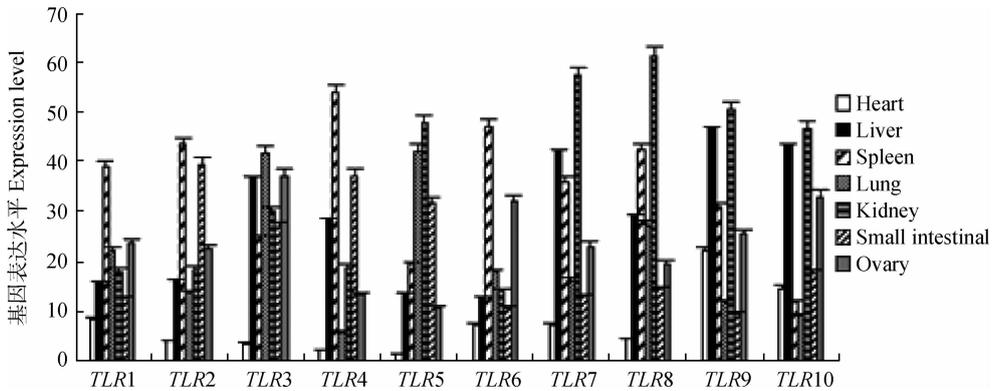


图 5 *TLR1*~*10* 基因组织表达分布
 Fig. 5 Tissues expression and distribution of *TLR1*-*10* genes

此,研究牦牛分子免疫机制具有重要理论及实践意义。

3.1 克隆及序列分析

本研究克隆了麦洼牦牛天然免疫受体 *TLR1~10* 家族基因,利用生物信息学相关软件对所得序列进行分析和预测。众所周知,*TLRs* 分子中胞外区 *LRRs* 结构域的数量及排布是 *TLRs* 识别不同类别 *PAMPs* 配体的结构基础,*TIR* 结构域是免疫信号向胞内传导,激活天然免疫的结构基础。麦洼牦牛 *TLR* 蛋白结构分析预测显示,*TLR* 家族成员间结构及排布相似但各成员所含 *LRR* 及 *TIR* 结构域数量有较大的差异,提示,牦牛 *TLR* 不同成员可能有相似的 *PAMPs* 识别配体,但其信号传导通路可能不尽相同;与牛、羊、人、鸡等不同物种 *TLRs* 蛋白功能结构与排布方式比较,发现麦洼牦牛 *TLR* 蛋白结构域与牛、羊数量与分布位置较为一致,与其他物种间 *TLRs* 蛋白大小相近,但蛋白功能结构域排布方式存在差别。认为麦洼牦牛 *TLR1~10* 基因尽管与其他物种 *TLRs* 结构域存在细微差别,但由此可以推断不同物种间 *TLRs* 蛋白应该识别相类似的配体,发挥相同的功能。

牦牛与牛和绵羊等内地平原物种相比生活生长环境恶劣,同等条件下对某些传染性疾病的抵抗能力相对较强,本研究推测,麦洼牦牛免疫分子机制与其他物种相比可能存在特殊性,但同源性分析结果显示,麦洼牦牛 *TLR* 家族基因与其他物种表现出高同源性,其中同源性最高的是牛和绵羊,与人、马和鼠的同源性也相对较高。这一结果与 K. McGuire 等在牛、羊及山羊上的研究结果基本一致^[4-8]。推测,麦洼牦牛 *TLR* 家族基因可能在最初遗传进化时与其他物种的 *TLR* 一样起源于同一祖先,这也提示我们 *TLR* 基因在不同物种间依然保持有高度的同源性和保守型可能是因为在机体天然免疫和获得性免疫过程中担任着非常重要的作用,其所识别的病原微生物结构模式要求其必须高度保守^[9-11]。尽管 *TLRs* 基因有很高的保守性,然而在麦洼牦牛所有 *TLR* 家族成员中 *TLR2* 和 *TLR4* 却表现出相对较低的同源性,这说明在不断的遗传进化中部分 *TLRs* 成员会因为动物机体所处环境及所识别病原微生物的不同而发生特异性的改变^[12-13]。虽然与其他物种 *TLR* 相比麦洼牦牛 *TLR* 家族基因编码区亦高度保守,但推测由于高原恶劣环境影响的差异性和麦洼牦牛物种本身的特殊性,麦洼牦

牛 *TLR* 基因可能还是与其他物种相比存在差异,这种差异有可能存在于编码区之外的区域,如启动子区域或是由于甲基化等表观遗传学方面的差异造成^[14-16]。

麦洼牦牛与其他物种的 *TLRs* 的遗传进化关系表明,麦洼牦牛进化距离最近的是牛和绵羊。在进行系统发育分析时发现,*TLR1*、*2*、*6*、*10* 和 *TLR7*、*8*、*9* 分别聚集在两个单个的分支上,其中 *TLR1*、*TLR6*、*TLR10* 又聚为更紧密的一支,*TLR* 其他成员各自成为一支。推测这种分组可能是基于配体结合特性,*TLR7*、*8*、*9* 是作为内体与其配体结合,*TLR1*、*6*、*10* 则作为异源二聚体与 *TLR* 的配体结合,进而传递细胞信号引起相关免疫反应。这也提示人们,保守的 *TIR* 在结合配体过程中通过相似的模式组合配体,进而在细胞信号传递中发挥重要的作用^[17-19]。

3.2 荧光定量方法的建立及组织表达分布研究

本试验采用 SYBR Green I 荧光染料嵌合法检测麦洼牦牛天然免疫受体 *TLRs* 家族基因的荧光定量 PCR 方法。通过标准曲线分析,*TLR1~10* 和 β -*actin* 基因的相关系数 (R^2) 大于 0.990,说明 Ct 值与 cDNA 浓度间具有良好的线性关系;*TLR1~10* 和 β -*actin* 基因扩增效率 (E) 在 1.0 左右,说明扩增效率基本相同,以上分析说明建立的荧光定量检测方法快速、敏感性高、特异性强等,可用于 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 相对定量的 PCR 分析。数据分析上,本试验选择了相对定量法,利用内参基因 β -*actin* 消除 mRNA 的提取效率和反转录效率间的差异,对麦洼牦牛 *TLR1~10* 基因 mRNA 表达水平的检测结果进行校正,保证了研究结果的可靠性。试验证明了该方法具备很好的稳定性,是可行的。

组织表达结果显示,麦洼牦牛 *TLRs* 在各主要器官组织均有表达,但不同成员在不同组织的表达存在较大的差异。总体来看,麦洼牦牛 *TLR* 家族成员在免疫及与免疫相关的组织和器官例如脾、肝、肾、肺均有相对较高的表达量,这说明 *TLR* 作为天然免疫识别受体其与麦洼牦牛免疫相关的组织器官之间保持者相当紧密的联系,在机体面临病原入侵时参与其中并发挥重要作用。麦洼牦牛腹泻性疾病及麦洼牦牛生殖性疾病在饲养过程中特别常见,本研究中,麦洼牦牛 *TLR1*、*TLR2*、*TLR4* 及 *TLR6* 等成员在麦洼牦牛小肠和生殖相关的卵巢组织中高表达,提示我们 *TLRs* 很可能参与牦牛相关的黏膜免

疫系统,在牦牛常见的肠道疾病以及生殖系统疾病的发生发展过程中扮演重要角色,这为人们进一步解决牦牛腹泻和生殖疾病导致的繁殖能力低下等难题提供新的思路。同时,通过比较发现,麦洼牦牛 *TLR1*、*TLR6* 基因在各组织的表达比较相似,*TLR2* 与 *TLR4*、*TLR7* 与 *TLR8*、*TLR9* 表达比较相似。这与 J. S. Chang 等、K. A. Zarembler 等和 A. O. Monica 等的研究结果基本一致^[20-22]。*TLR2* 和 *TLR4* 除了能够各自识别革兰阳性菌的脂蛋白和脂多糖之外,*TLR2*、*TLR4* 能够共同识别外分泌蛋白 MD-2 进而引起细胞反应,此外 *TLR2*、*TLR4* 在炎症反应中同时受一些炎症因子的调控^[23]。*TLR7*、*TLR8* 和 *TLR9* 在识别配体以及相关信号传递过程中也均有很多相似和内在的联系,这提示人们麦洼牦牛这些基因之间表达相似可能是与其在识别病原微生物并参与动物机体抗病免疫过程中相互协调调控共同发挥作用有关。

综上所述,本研究成功克隆了麦洼牦牛 *TLR1*~*10* 基因,并利用相关生物学软件对其生物学特点进行分析,同时建立了检测麦洼牦牛 *TLR1*~*10* 基因的荧光定量 PCR 方法,并对天然免疫受体基因 *TLR* 在麦洼牦牛各组织中的表达进行了研究。这为进一步理解和研究天然免疫受体 *TLRs* 在牦牛等高原动物的免疫分子机制以及抗病育种提供理论基础。

参考文献(References):

- [1] 于莉莉,韩代书. Toll 样受体(TLR)介导的天然免疫间的相互调节[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2013,22(1):79-84.
YU L L, HAN D S. Toll-like receptor(TLR) mediated between the natural immune adjustment[J]. *Chinese Journal of Histochemistry Cytochemistry*, 2013, 22(1):79-84. (in Chinese)
- [2] SANG Y, YANG J, ROSS C R, et al. Molecular identification and functional expression of porcine Toll-like receptor *TLR3* and *TLR7*[J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2008,125:162-167.
- [3] SHI Z A, KIYOSHI T, TSUNEYASU K. Toll-like receptors:critical proteins linking innate and acquired immunity[J]. *Nat Publish Group*, 2001,2(8):675-680.
- [4] MeGURIE K, JONES M, WERLING D, et al. Radiation hybrid mapping of all 10 characterized bovine Toll-like receptor[J]. *Anim Genet*, 2006,37:47-50.
- [5] MENZIES M, INGHAM A. Identification and expression of Toll-like receptors 1-10 in selected bovine and ovine tissues[J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2006, 109:23-30.
- [6] RAJA A, VIGNESH A R, MARY B A, et al. Sequence analysis of Toll-like receptor genes 1-10 of goat(*Capra hircus*) [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2011,140(3-4):252-258.
- [7] MOROZUMI T, UENISHI H. Polymorphism distribution and structural conservation in RNA-sensing Toll-like receptors 3,7 and 8 in pigs[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009,1790:267-274.
- [8] 赵一萍,白东义,李蓓,等. 马 Toll 样受体表达水平 SYBR Green I 荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立 [J]. 畜牧兽医学报,2013,44(2):220-227.
ZHAO Y P, BAI D Y, LI P, et al. Establishment of a real-time RT-PCR assay based on SYBR Green I for detection of the expression of horse toll-like receptor genes[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2013,44(2):220-227. (in Chinese)
- [9] 李根亮,穆淑梅,李彦芹,等. TLR—天然免疫中的特异性受体[J]. 生命的化学,2006,26(6):495-497.
LI G L, MU S M, LI Y Q, et al. TLR specificity of innate immune receptors[J]. *Chemistry of Life*, 2006, 26(6):495-497. (in Chinese)
- [10] WERLING D, PIERCY J, COFFEY T J. Expression of Toll-like receptors(TLR) by bovine antigen-presenting cells-potential and ovine tissues[J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2006,112:2-11.
- [11] CAROLYN S J, NATHALIE A, JOSHUA M, et al. TLR signaling tailors innate immune responses in human microglia and astrocytes[J]. *J Immunol*, 2005, 175(7):4320-4330.
- [12] OSAMU T, KATSUAKI H, TARO K, et al. Differential roles of *TLR2* and *TLR4* in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components[J]. *Immunity*, 1999,10(11):443-451
- [13] MOIRA M, AARON I. Identification and expression of Toll-like receptors 1-10 in selected bovine and ovine tissues[J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2006, 109(2):23-30.
- [14] MARION J, FLORIAN H, JORG V, et al. Human *TLR7* or *TLR8* independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848[J]. *Nat Immunol*, 2002,3(499):602-606.
- [15] JUNG S C, GEORGE C R, OLIVER J, et al. Molecular cloning and characterization of Toll-like receptors

- 1-10 in sheep[J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2009, 127(333):94-105.
- [16] STANIS LM, WIERZBICKI P M. Decreased Toll-like receptor-5 (TLR-5) expression in the mucosa of ulcerative colitis patients[J]. *J Physiol Pharmacol*, 2009, 60(4):71-75.
- [17] SANDRA S D, TSUNEYASU K, HIROAKI H, et al. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA[J]. *Science*, 2004, 303(5663):1529-1531.
- [18] 韩猛立, 黄新, 何延华, 等. 牛 Toll 样受体实时荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. *农业生物技术学报*, 2011, 19(3):521-529.
- HAN M L, HUANG X, HE Y H, et al. Establishment of a real-time fluorescent quantitative PCR assay for detection of bovine toll-like receptors genes[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2011, 19(3):521-529. (in Chinese)
- [19] VAHANAN M B, RAJ G D, PAWAR R M C, et al. Expression profile of toll like receptors in a range of water buffalo tissues (*Bubalus bubalis*) [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2008, 116:149-155.
- [20] CHANG J S, RUSSELL G C, JANN O, et al. Molecular cloning and characterization of Toll-like receptors 1-10 in sheep [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2009, 127:94-105.
- [21] ZAREMBER K A, GODOWSKI P J. Tissue expression of human toll-like receptors and differential regulation of toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines [J]. *J Immunol*, 2002, 168:554-561.
- [22] MONICA A O, DAG I V, BEN H, et al. Genomic organization and transcript profiling of the bovine toll-like receptor gene cluster TLR6-TLR1-TLR10 [J]. *Gene*, 2006, 384:45-50.
- [23] GOLDAMMER T. Mastitis increases mammary mRNA abundance of beta-defensin 5, toll-like-receptor 2 (TLR2), and TLR4 but not TLR9 in cattle [J]. *Immunol*, 2004, 11:174-185.

(编辑 郭云雁)