

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2012.01050

猪 Toll 样受体 4 基因 SNPs 功能分析

杨秀芹¹, 陈月婵¹, 汪亮², 李海涛¹, 刘娣², 关庆芝¹, 付博²

1. 东北农业大学动物科技学院, 哈尔滨 150030;
2. 黑龙江省农业科学院, 哈尔滨 150086

摘要: Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4, TLR4)在机体的免疫反应中发挥重要作用, 该基因突变会影响受体的信号转导能力和机体的疾病抗性/易感性。文章在前期工作的基础上, 进一步分析 c.611 T>A (p.Leu204His)、c.1027 C>A (p.Gln343Lys) 和 c.1605 G>T (p.Leu535Phe) 3 个错义突变对猪 *TLR4* 功能的影响。利用 RT-PCR 方法克隆猪 *TLR4* 基因全长编码区并引入定点突变; 利用真核表达、双荧光素酶报告系统和 Western blotting 方法在瞬时转染的 PK-15 细胞内研究 3 个单核苷酸多态(Single nucleotide polymorphisms, SNPs)对猪 TLR4 配体识别和信号转导能力的影响; 同时, 利用创造酶切位点 PCR-RFLP 方法分析对 TLR4 活性有显著影响的点突变在民猪、大白、长白和中国东北野猪 4 个群体中的分布。结果, 成功获得了民猪 *TLR4* 基因的全长编码区和 3 个单碱基变异体, 构建了不同等位基因的真核表达载体, 在 PK-15 细胞内确定了 c.1605 G>T 变异导致 TLR4 向下游传递信号的能力显著降低($P<0.01$), 该 SNP 只存在于民猪和野猪中且频率较高。猪 *TLR4* 基因 c.1605 G>T 变异影响 Toll 样受体的信号传递, 可能和机体的疾病抗性/易感性有关。

关键词: 猪; TLR4; SNP; 功能分析

Functional analysis of SNPs in porcine *TLR4* gene

YANG Xiu-Qin¹, CHEN Yue-Chan¹, WANG Liang², LI Hai-Tao¹, LIU Di², GUAN Qing-Zhi¹, FU Bo²

1. College of Animal Science & Technology, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China;
2. Heilongjiang Academy of Agricultural Science, Harbin 150086, China

Abstract: Toll-like receptor 4 (TLR4) plays an important role in immune response and the polymorphism in it might affect protein signaling and host resistance/susceptibility to disease. This study was designed to characterize the functional relevance of 3 nonsynonymous single nucleotide polymorphisms (SNPs), c.611 T>A (p.Leu204His), c.1027 C>A (p.Gln343Lys), and c.1605 G>T (p.Leu535Phe), which were selected based on our previous studies. RT-PCR method was used to clone the complete coding sequence of porcine *TLR4* gene and the PCR-based method was used to introduce the point mutation. The effects of 3 SNPs on the ligand recognition and signaling of porcine TLR4 were investigated in transiently transfected PK-15 cells using dual-luciferase reporter system and Western blotting method. At the same time, the

收稿日期: 2012-01-03; 修回日期: 2012-03-15

基金项目: 黑龙江省教育厅科学技术研究项目(编号: 11551033)资助

作者简介: 杨秀芹, 博士, 教授, 研究方向: 动物遗传育种。E-mail: xiuqin163@163.com

网络出版时间: 2012-6-15 9:34:37

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20120615.0934.009.html>

distribution of c.1605 G>T among pig populations composed of Min pig, Yorkshire, Landrace, and Wild boar from north-eastern China was studied by created restriction site PCR-RFLP method. The complete coding sequence of *TLR4* gene in Min pig and 3 variants with single point mutations were obtained. Eukaryotic expression vectors containing different alleles of porcine *TLR4* were constructed. SNP c.1605 G>T significantly decreased the TLR4 signaling ($P<0.01$) and the polymorphism only existed in Min pig and Wild boar from northeastern China with high frequencies. SNP c.1605 G>T in porcine TLR4 might affect the receptor function and host resistance/susceptibility to diseases.

Keywords: porcine; TLR4; SNP; functional analysis

模式识别受体 (Pattern recognition receptors, PRRs) 在宿主的免疫防御反应中发挥重要作用。当外源微生物入侵后, PRRs 能够通过识别、结合微生物特有的病原相关分子模式 (Pathogen associated molecular patterns, PAMPs), 将信号向下游传递, 启动核内相关基因的表达, 合成白介素 (Interleukin, IL)、肿瘤坏死因子 α (Tumor necrosis factor- α , TNF- α)、干扰素 (Interferon, IFN) 等细胞因子, 激发机体的天然免疫反应, 进而诱发获得性免疫的产生^[1,2]。

Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLRs) 是一类重要的模式识别受体, 哺乳动物中至少存在着 13 种 TLRs, 其中 10 种 (TLR 1-10) 已经在猪上得到了克隆测序^[3]。TLR4 识别革兰氏阴性菌的脂多糖及具有保守类脂 A 结构的衍生物, 是重要的抗病候选基因^[4-6]。越来越多的研究表明, *TLR4* 基因突变能改变蛋白的信号转导能力, 影响机体的疾病抗性/易感性。人 *TLR4* 基因突变导致宿主对 LPS 的应答能力降低^[7], 与子宫内膜异位症^[8]、系统性红斑狼疮^[9]、型糖尿病^[10]等疾病的发生存在着相关; 在家畜中, *TLR4* 基因突变与狗炎症性肠病^[11]、牛传染性角结膜炎^[12]、兔消化障碍等疾病的发生相关^[13]; 鸡 *TLR4* 基因突变与沙门氏菌的易感性相关^[14,15]。在 PubMed 数据库中 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>), 尚未发现有关猪 *TLR4* 基因突变与疾病抗性/易感性相关的研究报告。

猪 *TLR4* 基因编码区由 3 个外显子组成, 全长 2 526 bp, 编码 841 个氨基酸残基的多肽。猪 *TLR4* 基因高度保守, 其编码区的变异位点数显著低于细胞膜上的其他 TLRs ($P<0.01$)^[16]。Shinkai 等^[16] 和 Palermo 等^[17] 分别对猪 *TLR4* 基因的完整编码区进行了多态性分析, 共寻找到 9 个错义突变, 其中 6 个发生的频

率极低或只在单个个体 (品种) 中检测到。潘章源^[18] 等分析了 10 个中国地方猪种 *TLR4* 基因外显子 1 的遗传变异, 未发现多态。所有这些均表明猪 *TLR4* 基因在进化过程中承受着较大的选择压力, 突变会对其功能产生重要影响。本实验室分析了 c.611 T>A (p.Leu204His)、c.962 G>A (p.Arg321His)、c.1027 C>A (p.Gln343Lys) 3 个发生频率较高的点突变在中外猪群体中的分布, 发现在 c.611 T>A 和 c.1027 C>A 两个多态位点, 等位基因在民猪和引进的大白、长白猪中的分布存在着明显的差异 ($P<0.01$)^[19]。另外, 在对民猪 *TLR4* 基因进行克隆、测序时, 发现 c.1605 G>T (p.Leu535Phe) 点突变发生的频率较高^[20]。为了揭示 c.611 T>A、c.1027 C>A、c.1605 G>T 3 个错义突变对 TLR4 功能的影响, 本研究利用定点突变、真核表达、双荧光素酶报告系统和 Western blotting 方法研究其对 TLR4 信号传递和翻译表达的影响, 并利用创造酶切位点 PCR-RFLP 方法分析对 TLR4 信号传递有显著影响的点突变在民猪、大白、长白和中国东北野猪共 4 个群体中的分布。

1 材料和方法

1.1 实验动物

民猪 (1 头) 用于克隆 *TLR4* 基因全长编码区并引入定点突变、构建野生型和突变型 *TLR4* 基因的真核表达载体; 猪屠宰后立即取脾脏组织, 液氮中速冻后, -80°C 长期保存。民猪 (40 头)、大白 (40 头)、长白 (40 头)、野猪 (6 头) 用于分析对信号传递有显著影响的 SNP 位点在群体中的分布情况; 取耳组织样, 置于 70% 乙醇中, 常温带回实验室。民猪样采自黑龙江省兰西县民猪保种场, 大白、长白猪样采自黑龙江省农业科学院畜牧中心猪场, 野猪来自黑龙江

小兴安岭地区。

1.2 方法

1.2.1 引物设计与合成

所有引物根据本实验室克隆的民猪 *TLR4* 序列 (GenBank 登录号: GU723684), 利用 primer premier 5.0 软件自行设计(表 1)。C1F/R 引物用于克隆猪 *TLR4* 基因全长编码区, 在 5' 末端分别引入了 *Hind* 和 *Xho* 识别位点。M611F/R、M1027F/R、M1605F/R 是各位点的定点突变引物, 通过引物的错配在扩增产物中引入突变碱基。

1.2.2 猪 *TLR4* 基因克隆

利用 Trizol(Invitrogen 公司)从民猪脾脏组织中提取总 RNA。以 Oligo(dT)为引物, 利用 SuperScript (Invitrogen 公司)逆转录酶合成 cDNA。RNA 提取和 cDNA 合成严格按照说明书进行。PCR 反应利用 *ExTaq*(宝生物工程(大连)有限公司)进行催化, 总体系为 50 μ L, 含有 2 μ L cDNA, 其他成分按照说明书要求添加。反应条件为 94 30 s, 58 30 s, 72 2 min, 30 个循环。PCR 产物回收、纯化后, 克隆入 pMD18-T 载体, 转化大肠杆菌 JM109, 挑选阳性质粒, 送北京华大基因科技股份有限公司测序, 内部测序引物为 S1F/R(表 1)。含有正确插入片段的重组质粒命名为 TLR4-WT-pMD18-T。

1.2.3 定点突变

利用 PCR 方法通过引物错配引入定点突变。引

物的配对使用方案见表 2。A、B 反应以 TLR4-WT-pMD18-T 质粒为模板, 利用高保真的 *pfu* DNA 聚合酶催化(北京全氏金生物技术有限公司)。A、B 反应扩增产物经胶回收、纯化后, 适当稀释, 作为 C 反应的模板。C 反应利用 *ExTaq* 催化, 以使扩增产物的 3' 末端引入突出的腺苷酸 A, 为后续克隆入 pMD18-T 载体提供方便。A、B 反应通过引物的错配在扩增产物的末端引入突变, C 反应通过对 A、B 反应扩增产物的拼接, 将突变引入片段的内部。C 反应的扩增产物经胶回收、纯化后, 克隆、测序验证。

1.2.4 表达载体构建

1.2.4.1 野生型表达载体构建 TLR4-WT-pMD18-T 和真核表达载体 pcDNA3.1+分别用 *Hind* 和 *Xho* 双酶切后, 回收目的片段。由于 TLR4-WT-pMD18-T 酶切后的两个片段(pMD18-T 和 *TLR4*)长度相近, 无法通过琼脂糖凝胶电泳将其分开, 又利用 *Pvu* 内切酶将 pMD18-T 切断。酶切后的 *TLR4* 和 pcDNA3.1+用 T4 DNA 连接酶于 16 过夜连接。连接产物转化大肠杆菌 JM109, 提取阳性质粒测序、验证。阳性重组质粒命名为 TLR4-WT-pcDNA3.1+。

1.2.4.2 突变型表达载体构建 c.1027 C>A 和 c.1605 G>T 两个定点突变表达载体的构建方法同野生型表达载体构建。对于 c.611 T>A 定点突变表达载体的构建, 由于在 *TLR4* 基因内部有一个 *EcoR* 酶切位点可以利用, TLR4-WT-pcDNA3.1+和相应的 pMD18-T 重组质粒分别用 *Hind* 和 *EcoR* 双酶切后, 回收目的片段, 连接、转化、测序验证。

表 1 引物信息

名称	序列 (5' 3')	位置
C1F	acttaagcttatgattcctcgcac	1~15
C1R	cgcctcgaagtttaaggaaggctgtgtatc	2506-2526
M-EcoRI-R	actgggaattcaccaaagtgtg	878-899
S1F	ttctgccacagatacca	1931-1948
S1R	accaggtgcctttaacaa	657-674
M611R	gagattgtaggggcacttgat	596-618
M611F	tgccctacacaatctctcttt	602-623
M1027R	caggaaattgttaagttacagttaaccac	1009-1039
M1027F	taactgtaaaccttaacaatttctgcattg	1014-1044
M1605R	ggaagtgtatcaagaacaagagtctgttg	1587-1616
M1605F	gactcttgtcttgatacacttctataaac	1592-1624
P1605F	tgaaaatggctgccaattc	1427-1445
P1605R	ggagtggtataaagggaagtgcgatc	1606-1630

注: 酶切位点用下划线标出, 错配碱基用边框标出。

表 2 引物配对方案

位点	A 反应	B 反应	C 反应
T611A	C1F	M611F	C1F
	M611R	M-EcoRI-R	M-EcoRI-R
C1027A	C1F	M1027F	C1F
	M1027R	C1R	C1R
G1605T	C1F	M1605F	C1F
	M1605R	C1R	C1R

1.2.5 荧光素酶活性分析

PK-15 细胞用含有 10%胎牛血清和 1%双抗(青霉素、链霉素)的完全培养基进行培养, 在 5%CO₂培养箱、37 生长至 80~90%融合。利用Invitrogen公司的脂质体 2000 将 *TLR4* 基因真核表达载体(野生型或一种突变型)、含有 NF- κ B 结合位点的萤火虫荧光素酶报告基因质粒(pNF- κ B-Luc)和内参海肾荧光素酶报告基因质粒(pRL-TK)共转染 PK-15 细胞。转染 24 h 后, 加入 100 ng/mL LPS 诱导 12 h, 收获细胞。每组转染 3 次, 每次 3 个重复。利用双荧光素酶检测试剂盒(Promega 公司)测量萤火虫和海肾荧光素酶活性, 目的基因诱导产生荧光信号的能力用海肾荧光素酶活性进行校正, 克服转染效率不同带来的误差。野生型和突变型活化转录因子 NF- κ B 的差异用诱导对未诱导的倍数来表示, 利用 SAS 软件进行统计分析。

1.2.6 Western blotting 分析

野生型和突变型表达载体分别瞬时转染 PK-15 细胞, 48 h 后收集细胞。用细胞裂解液分离上清, BCA 法进行蛋白定量。将分离的上清与等体积的 2 \times SDS 电泳缓冲液混合, 煮沸 5 min, 每孔加样 20 μ L, 经 5%积层胶后进行 10%分离胶 SDS-PAGE 电泳。常规方法将蛋白印迹转移至硝酸纤维素膜上。将膜在含 5%脱脂乳的 PBST 中室温封闭 1 h, 洗膜后分别在一抗 TLR4 和 GAPDH 抗体中 4 封闭过夜, PBST 洗膜 3 次, 每次 5 min; 在羊抗兔 IgG 的二抗溶液中孵育 1 h, PBST 洗膜, 常规 ECL 显色。

荧光素酶活性和 Western blotting 分析的技术路线见图 1。

1.2.7 序列分析

由于 c.1605 G > T 没有引起酶切位点的增减, 故利用创造酶切位点 PCR(CSC-PCR)方法^[21], 通过引物 3'末端的错配使其与 1605 位点的 G 碱基形成了

*Bam*H 识别位点, 采用 PCR-RFLP 方法分析 c.1605 G > T 点突变在民猪、大白、长白和野猪 4 个群体中的分布。利用常规的酚-氯仿法从耳组织中提取基因组 DNA。PCR 反应体系为 20 μ L, 含有 50 ng 基因组 DNA, 0.2 μ mol/L 上、下游引物(P1605F/R, 表 1), 1 \times PCR 缓冲液, 200 μ mol/L dNTPs 和 1 U *rTaq* DNA 聚合酶。PCR 反应条件为 94 3 min; 94 30 s, 58 30 s, 72 30 s, 35 个循环; 72 7 min。酶切反应按说明书要求进行, 酶切产物在 4%的琼脂糖凝胶电泳上分型。

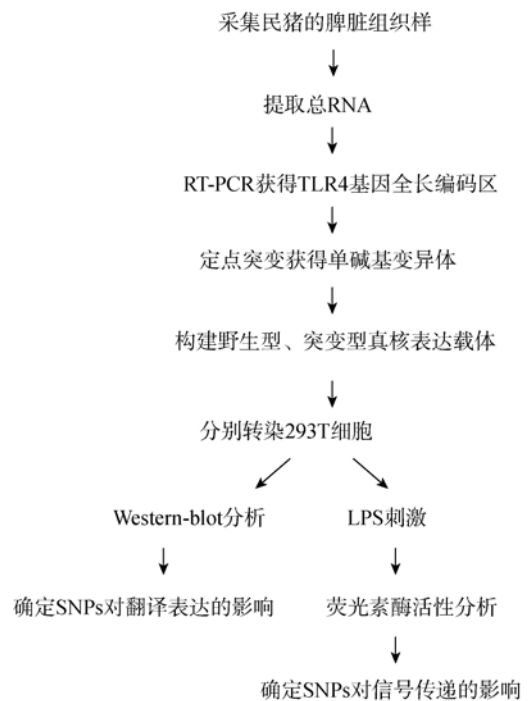


图 1 荧光素酶活性和 Western blotting 分析技术路线

2 结果与分析

2.1 猪 *TLR4* 基因克隆

利用 RT-PCR 方法成功克隆了民猪 *TLR4* 基因序列, 以此作为野生型等位基因, 进行表达载体构建和定点突变。克隆的 *TLR4* 在编码区 611、1027 和 1605 碱基处的核苷酸分别为 T、C 和 G, 多肽链 204、343 和 535 位置处的氨基酸分别为 Leu、Gln 和 Leu。与西方商品猪种 *TLR4* 基因(GenBank 登录号: AJ628065)相比, 克隆的民猪序列还存在着 4 个特有的错义突变, 分别是 c.323 C>T(p.Thr108Leu)、c.584

C>T(p.Ser195Leu)、c.1340 A>G(p.Lys447Arg)和 c.1798 T>C(p.Phe600Leu)。

2.2 荧光素酶活性分析

c.611 T>A、c.1027 C>A 和 c.1605 G>T 均是错义突变, 分别引起了多肽链 Leu204His、Gln343Lys 和 Leu535Phe 氨基酸的变化。双荧光素酶活性分析表明, c.1605 G>T 导致 TLR4 诱导产生荧光素酶活性的能力显著降低($P<0.01$), c.611 T>A 和 c.1027 C>A 对 TLR4 的信号传导能力无影响($P>0.05$)。突变型相对于野生型的荧光素酶活性变化见图 2。

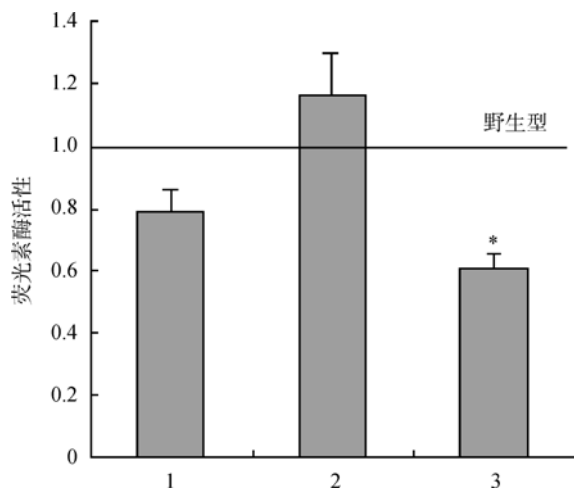


图 2 突变型相对于野生型的荧光素酶变化
1 c.611 T>A 变异体; 2 c.1027 C>A 变异体; 3 c.1605 G>T 变异体。*表示与野生型相比差异显著($P<0.01$)。

2.3 Western blotting 分析

Western blotting 分析表明, 3 个变异体都能在蛋白水平上表达; 与野生型相比, 表达量无明显差异(图 3)。

2.4 序列分析

利用建立的创造酶切位点 PCR-RFLP 方法, 成

功地对 c.1605 G > T 点突变进行了基因分型(图 4)。共分析了 40 头民猪、40 头长白、40 头大白和 6 头来自黑龙江小兴安岭的野猪的遗传多态性, 结果发现该点突变只存在于民猪和野猪中, 引进的大白和长白猪在该位点不存在着多态。各等位基因在猪种中的分布见表 3。 χ^2 独立性检验表明, 该位点等位基因在中外猪种中的分布存在着极显著的差异($P<0.01$)。

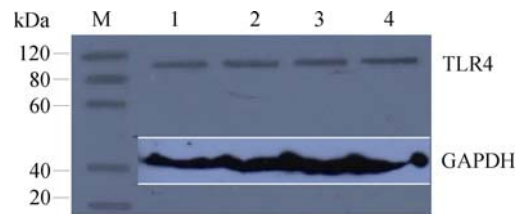


图 3 Western blotting 结果

M: Marker; 1: 野生型; 2: c.611 T>A 变异体; 3: c.1027 C>A 变异体; 4: c.1605 G>T 变异体。

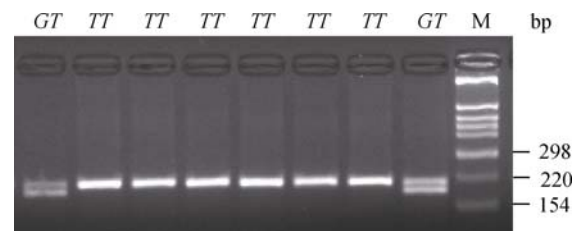


图 4 PCR-RFLP 检测结果

3 讨论

TLR4 是最早发现的 Toll 样受体^[22], 自 1997 年在果蝇中被发现以来, 人们对其识别微生物和 LPS 的分子机制进行了广泛研究。一系列实验证明了革兰氏阴性菌的 LPS 是 TLR4 的配体^[4-6], 当病原菌入侵机体后, LPS 被辅助分子(脂多糖结合蛋白和 CD-14)运送到 TLR4 形成的复合体上^[23], TLR4 通过跨膜结构将信号转导入细胞内, 引起一系列级联信号反应, 导致核转录因子 NF- κ B 从抑制物中释放出

表 3 等位基因在猪种中的分布

群体	个体数	基因型频率			基因频率		PIC
		GG	GT	TT	G	T	
民猪	40	0	11	29	13.75	86.25	0.209
野猪	6	0	2	4	16.7	83.3	0.251
大白	40	0	0	40	0	100	0
长白	40	0	0	40	0	100	0

来、入核,启动 IL-1、IL-6、IL-8 和 TNF- α 等促炎细胞因子的表达。NF- κ B 位于 TLR4 下游信号通路的枢纽位置,其活化水平直接反映着 TLR4 的配体识别和信号传导能力。因此,本研究通过启动子上含有 NF- κ B 结合位点的荧光素酶报告基因,分析 TLR4 变异体诱导活化 NF- κ B 的能力,确定突变对 TLR4 功能的影响。

本研究共分析了 3 个 SNPs 对 TLR4 信号传导的影响,发现 c.611 T>A 和 c.1027 C>A 突变不影响 TLR4 诱导活化 NF- κ B ($P>0.05$), c.1605 G>T 导致 TLR4 活化 NF- κ B 的能力显著下降 ($P<0.01$) (图 2)。Western blotting 分析发现,这些 SNPs 对 TLR4 蛋白水平的表达没有影响 (图 3),表明 c.1605 G>T 对 LPS 的低反应不是蛋白合成不足造成的。翻译后的糖基化修饰会影响蛋白的泳动速度^[24],本研究结果也说明 c.1605 G>T 对 TLR4 的修饰无影响。c.1605 G>T 变异体的信号传导能力下降,可能与其细胞定位或配体结合能力有关。

TLRs 均是 型跨膜蛋白,胞外区负责识别、结合微生物的 PAMPs,由于长期和微生物共进化的结果,保守性较低,目前发现的猪 TLR4 错义突变都位于该区域^[16,17]。晶体结构分析表明,TLR4 的氨基末端 41~288 位氨基酸负责与 MD-2 相互作用,通过氢键形成二聚体^[25],LPS 被位于多肽链 264~463 位置处的 7 个氨基酸锚定^[26]。41~288 和 264~463 两个区域在 TLR4 形成异源二聚体和结合 LPS 中发挥着重要作用,该区域内氨基酸在进化过程中会承受着较大的选择压力,对蛋白功能有重要影响的突变会受到自然选择的作用而淘汰。c.611 T>A 和 c.1027 C>A 位于这两个功能区内并且以较高的频率普遍存在于所检测的猪种中^[16,17,19],暗示着这两个突变不会影响 TLR4 的信号传递,我们的荧光素酶活性分析结果印证了这一点。此外,这 3 个 SNPs 在群体中的发生频率^[16,17,19]及其对 TLR4 功能的影响也符合分子进化的中性学说原理:遗传漂变导致了中性突变在群体中广泛存在,而对基因功能有显著影响的突变将从群体中消失^[27]。

TLR4 被细菌 LPS 激活后,能通过复杂的级联信号反应,引起炎症介质基因的表达,合成和释放相应的炎症介质,启动针对病原微生物的天然和获得性免疫反应,清除病原体,维护机体健康。但是,

如果这些炎症介质基因过度表达,将会对宿主产生危害。本研究利用创造酶切位点 PCR-RFLP 方法,分析了对 TLR4 信号传导有显著影响的 SNP c.1605 G>T 在民猪、野猪、大白、长白 4 个群体中的分布,结果发现该 SNP 只存在于民猪和野猪中,且频率较高 (表 3)。民猪是我国的地方猪种,生长于我国北方高寒地区,以抗病性、抗逆性强著称;野猪生长于自然环境中,在长期的进化过程中,获得了抵御疾病的天然能力。c.1605 G>T 引起的 TLR4 信号转导能力改变,是否和野猪、民猪的抗病力有关,值得我们进一步研究。

参考文献 (References):

- [1] Chang ZL. Important aspects of Toll-like receptors, ligands and their signaling pathways. *Inflamm Res*, 2010, 59(10): 791–808. DOI
- [2] Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, 2010, 140(6): 805–820. DOI
- [3] Uenishi H, Shinkai H. Porcine Toll-like receptors: The front line of pathogen monitoring and possible implications for disease resistance. *Dev Comp Immunol*, 2009, 33(3): 353–361. DOI
- [4] Chow JC, Young DW, Golenbock DT, Christ WJ, Gusovsky F. Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J Biol Chem*, 1999, 274(16): 10689–10692. DOI
- [5] Lien E, Means TK, Heine H, Yoshimura A, Kusumoto S, Fukase K, Fenton MJ, Oikawa M, Qureshi N, Monks B, Finberg RW, Ingalls RR, Golenbock DT. Toll-like receptor 4 imparts ligand-specific recognition of bacterial lipopolysaccharide. *J Clin Invest*, 2000, 105(4): 497–504. DOI
- [6] Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity*, 1999, 11(4): 443–451. DOI
- [7] Rallabhandi P, Bell J, Boukhalova MS, Medvedev A, Lorenz E, Arditi M, Hemming VG, Blanco JC, Segal DM, Vogel SN. Analysis of TLR4 variants: new insights into TLR4/MD-2/CD14 stoichiometry, structure, and signaling. *J Immunol*, 2006, 177(1): 322–332. DOI
- [8] Latha M, Vaidya S, Movva S, Chava S, Govindan S, Govatati S, Banoori M, Hasan Q, Kodati VL. Molecular pathogenesis of endometriosis; *Toll-like receptor-4* A896G

- (D299G) polymorphism: a novel explanation. *Genet Test Mol Biomarkers*, 2011, 15(3): 181–184. [DOI](#)
- [9] Verma A, Prasad KN, Gupta RK, Singh AK, Nyati KK, Rizwan A, Pandey CM, Paliwal VK. *Toll-like receptor 4* polymorphism and its association with symptomatic neurocysticercosis. *J Infect Dis*, 2010, 202(8): 1219–1225. [DOI](#)
- [10] Buraczynska M, Baranowicz-Gaszczyk I, Tarach J, Ksiazek A. *Toll-like receptor 4* gene polymorphism and early onset of diabetic retinopathy in patients with type 2 diabetes. *Hum Immunol*, 2009, 70(2): 121–124. [DOI](#)
- [11] Kathrani A, House A, Catchpole B, Murphy A, German A, Werling D, Allenspach K. Polymorphisms in the *TLR4* and *TLR5* gene are significantly associated with inflammatory bowel disease in German shepherd dogs. *PLoS One*, 2010, 5(12): e15740. [DOI](#)
- [12] Kataria RS, Tait RG Jr, Kumar D, Ortega MA, Rodriguez J, Reecy JM. Association of *toll-like receptor four* single nucleotide polymorphisms with incidence of infectious bovine keratoconjunctivitis (IBK) in cattle. *Immunogenetics*, 2011, 63(2): 115–119. [DOI](#)
- [13] Zhang GW, Wang HZ, Chen SY, Li ZC, Zhang WX, Lai SJ. A reduced incidence of digestive disorders in rabbits is associated with allelic diversity at the *TLR4* locus. *Vet Immunol Immunopathol*, 2011, 144(3–4): 482–486. [DOI](#)
- [14] Leveque G, Forgetta V, Morroll S, Smith AL, Bumstead N, Barrow P, Loredano-Osti JC, Morgan K, Malo D. Allelic variation in *TLR4* is linked to susceptibility to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in chickens. *Infect Immun*, 2003, 71(3): 1116–1124. [DOI](#)
- [15] Ye X, Avendano S, Dekkers JC, Lamont SJ. Association of twelve immune-related genes with performance of three broiler lines in two different hygiene environments. *Poult Sci*, 2006, 85(9): 1555–1569. [DOI](#)
- [16] Shinkai H, Tanaka M, Morozumi T, Eguchi-Ogawa T, Okumura N, Muneta Y, Awata T, Uenishi H. Biased distribution of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in porcine *Toll-like receptor 1 (TLR1)*, *TLR2*, *TLR4*, *TLR5*, and *TLR6* genes. *Immunogenetics*, 2006, 58(4): 324–330. [DOI](#)
- [17] Palermo S, Capra E, Torremorell M, Dolzan M, Davoli R, Haley CS, Giuffra E. *Toll-like receptor 4* genetic diversity among pig populations. *Anim Genet*, 2009, 40(3): 289–299. [DOI](#)
- [18] 潘章源, 叶兰, 朱璟, 杜子栋, 黄小国, 朱国强, 包文斌, 吴圣龙. 猪 *TLR4* 基因外显子 1 新等位基因的分离及遗传变异分析. *遗传*, 2011, 33(2): 163–167. [DOI](#)
- [19] 翟春媛, 李海涛, 杨秀芹, 李金玲, 刘娣. 猪 *TLR4* 基因的变异位点分析. *中国畜牧杂志*, 2011, 47(3): 18–21. [DOI](#)
- [20] 杨秀芹, 翟春媛, 李海涛, 刘娣. 猪 *TLR4* 基因可变剪接体的鉴定. *畜牧兽医学报*, 2011, 42(8): 1051–1056. [DOI](#)
- [21] 赵春江, 李宁, 邓学梅. 应用创造酶切位点法检测单碱基突变. *遗传*, 2003, 25(3): 327–329. [DOI](#)
- [22] Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, 1997, 388(6640): 394–397. [DOI](#)
- [23] Miyake K. Roles for accessory molecules in microbial recognition by Toll-like receptors. *J Endotoxin Res*, 2006, 12(4): 195–204. [DOI](#)
- [24] Sun J, Duffy KE, Ranjith-Kumar CT, Xiong J, Lamb RJ, Santos J, Masarapu H, Cunningham M, Holzenburg A, Sarisky RT, Mbow ML, Kao C. Structural and functional analyses of the human Toll-like receptor 3. Role of glycosylation. *J Biol Chem*, 2006, 281(16): 11144–11151. [DOI](#)
- [25] Kim HM, Park BS, Kim JI, Kim SE, Lee J, Oh SC, Enkhbayar P, Matsushima N, Lee H, Yoo OJ, Lee JO. Crystal structure of the *TLR4*-MD-2 complex with bound endotoxin antagonist Eritoran. *Cell*, 2007, 130(5): 906–917. [DOI](#)
- [26] Park BS, Song DH, Kim HM, Choi BS, Lee H, Lee JO. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the *TLR4*-MD-2 complex. *Nature*, 2009, 458(7242): 1191–1195. [DOI](#)
- [27] Kimura M. The neutral theory of molecular evolution and the world view of the neutralists. *Genome*, 1989, 31(1): 24–31. [DOI](#)