

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2011.00163

猪 *TLR4* 基因外显子 1 新等位基因的分离及遗传变异分析

潘章源¹, 叶兰¹, 朱璟¹, 杜子栋², 黄小国^{3,4}, 朱国强^{2,3,4}, 包文斌^{1,3,4}, 吴圣龙^{1,3,4}

1. 扬州大学动物科学与技术学院, 江苏省动物遗传繁育与分子设计重点实验室, 扬州 225009;
2. 扬州大学兽医学院, 扬州 225009;
3. 江苏省现代种猪分子选育工程技术研究中心, 常州 213149;
4. 江苏(扬州)规模猪场高效健康养殖公共技术服务中心, 扬州 225009

摘要: 文章采用 PCR-SSCP 方法对亚洲野猪、3 个引进的商业化品种和 10 个中国地方猪品种共 893 个个体 *TLR4* 基因外显子 1 的遗传变异进行了检测, 旨在系统分析国内外猪种 *TLR4* 基因的多态性, 为探讨该基因在免疫和防御系统中发挥的作用提供依据。结果, 在猪 *TLR4* 基因外显子 1 中分离到新的等位基因, 共检测到 3 个等位基因, 6 种基因型。其中杜洛克检测到 *AA*、*BB*、*CC*、*AB*、*AC*、*BC* 基因型, 有杜洛克血统的苏太猪中检测到 *BB*、*CC*、*BC* 基因型, 长白猪、约克夏中检测到 *CC*、*BC* 基因型, 野猪及所有 10 个中国地方猪品种 *TLR4* 基因外显子 1 高度保守, 只检测到 *CC* 基因型, 中国地方猪品种和引进品种 *TLR4* 基因外显子 1 多态性存在极显著的差异。3 种基因型中 *CC* 型与 GenBank 中的序列一致, *BB* 和 *AA* 基因型分别存在 G93C 同义突变位点和 G194A 无义突变位点, 这 2 个变异位点与抗逆性和一般抗病力的关系值得进一步深入研究。

关键词: *TLR4* 基因; 多态性; 野猪; 地方猪种; 引进猪种

Isolation of new alleles of the swine *TLR4* gene and analysis of its genetic variation

PAN Zhang-Yuan¹, YE Lan¹, ZHU Jing¹, DU Zi-Dong², HUANG Xiao-Guo^{3,4},
ZHU Guo-Qian^{2,3,4}, BAO Wen-Bin^{1,3,4}, WU Sheng-Long^{1,3,4}

1. Animal Science and Technology College, Yangzhou University, Key Laboratory for Animal Genetics, Breeding, Reproduction and Molecular Design of Jiangsu Province, Yangzhou 225009, China;
2. College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China;
3. Jiangsu Engineering Research Centre for Molecular Breeding of Breeder Pig, Changzhou 213149, China;
4. Jiangsu (Yangzhou) Public Technical Service Centre for Efficient and Healthy Culture Technology in Large-scale Swine Farms, Yangzhou 225009, China

Abstract: Using the PCR-SSCP method, the genetic variation in exon 1 of the *TLR4* gene was detected among 893 animals, including Asian wild boars, 3 imported commercial and 10 Chinese indigenous swine breeds. This was conducted to analyze the polymorphisms of exon 1 of *TLR4* gene in native and foreign pig breeds and aimed at providing a theoretical

收稿日期: 2010-07-15; 修回日期: 2010-09-14

基金项目: 转基因生物新品种培育科技重大专项(编号: 2009ZX08006-004B), 江苏省科技支撑计划(农业)(编号: BE2008364, BE2009330-2, BE2010371, BE2010450)和江苏省高校自然科学基金基础研究项目(编号: 08KJB230004)资助

作者简介: 潘章源, 硕士生, 专业方向: 猪抗病育种。E-mail: pzq170450077@163.com

通讯作者: 吴圣龙, 博士, 研究员, 研究方向: 猪遗传育种。E-mail: slwu@yzu.edu.cn;

包文斌, 博士, 副教授, 研究方向: 猪抗病育种。E-mail: wbbao@yzu.edu.cn

foundation for further research on the role that *TLR4* gene played in immune and defense system. New alleles were isolated for exon 1 of the swine *TLR4* gene for the first time, There were 6 genotypes and 3 alleles, in which the Duroc appeared *AA*, *BB*, *CC*, *AB*, *AC* and *BC* genotypes; Sutan pig, which has Duroc pig origin, were detected to be *BB*, *CC*, and *BC* genotypes; Yorkshire and Landrace were detected to be *CC* and *BC* genotypes. Wild boar and all 10 Chinese native pig breeds appeared highly conserved in exon 1 of *TLR4* gene, with only *CC* genotype. Among the 3 homozygous genotypes, the *CC* genotype matches the sequence in GenBank, while a G93C synonymous mutation and a G194A nonsense mutation were found in the *BB* and *AA* genotypes, respectively. The correlation between these two mutation points of *TLR4* gene with resistance to stress and disease is worthy of further study.

Keywords: *TLR4* gene; polymorphism; wild boar; native pig breed; exotic pig breed

Toll-like 受体(Toll-like receptors, TLRs)存在于机体淋巴组织和非淋巴组织细胞,不同类型的TLRs在相应的组织和细胞上表达量不一,其种和个体遗传多态性,广泛影响着对多种病原感染的应答^[1]。至今,TLRs家族中有13个成员在哺乳动物上已被鉴定,组成了一个庞大的I型跨膜受体蛋白家族^[2],研究表明,TLRs在机体激活固有免疫和诱导适应性免疫的防御机制,特别是在先天性固有免疫中起着重要作用,与人类和多种动物病原菌的PAMP(病原相关分子模式)识别中起着关键作用^[3,4]。在TLRs庞大家族中,人们尤为感兴趣的是在*TLR4*研究上,它是细菌脂多糖LPS识别的主要受体,并识别许多革兰氏阴性病原菌、衣原体、螺旋体和病毒等病原微生物,其受体基因的遗传差异可造成机体对多种病原体抵抗力不一^[5,6]。

人类和小鼠*TLR4*位点上的遗传变异在一定程度上改变了对疾病的易感性和防御性,这一问题已引起关注^[5,7,8]。*TLR4* SNPs也广泛分布在其它动物如鸡、猪、奶牛等群体,*TLR4*往往与动物对疾病的抗性/易感性相关,如Leveque等^[9]认为鸡*TLR4*的多态与沙门氏菌的易感性相关;Goldammer等^[10]报道奶牛乳腺中*TLR4*拷贝数在乳腺炎作用下增加;王兴平等^[11]对*TLR4*基因的遗传多态性及其与乳房炎的关联进行了分析;猪*TLR4*基因编码区由3个外显子组成,Shinkai等^[12]和周波等^[13]曾对猪*TLR4*基因编码区的多态性进行过分析,仅在外显子3发现SNPs,没有发现外显子1的变异位点。Palermo等^[14]对欧洲猪种以及梅山猪*TLR4*基因包含编码区在内的4305bp序列进行了多态性分析,检测到34个SNPs,也大部分集中于外显子3区域。鉴于*TLR4*作为连接天然免疫与特异性免疫的关键环节发挥着极为重要的作用,本研究通过PCR-SSCP方法,以

研究的相对较少的外显子1区域为对象,对亚洲野猪和国内外14个家猪品种*TLR4*基因外显子1部分序列多态性进行比较分析,进而对不同带型的DNA片段进行测序分析,筛查*TLR4*基因的SNPs,为进一步研究*TLR4*基因的功能提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

杜洛克、约克夏和长白猪来自兴泰(扬州)农牧科技发展有限公司种猪场(所有种猪均引自台湾王将种猪场),淮猪采自安徽省农科院种猪场,梅山猪、二花脸、枫泾猪和苏太猪采自江苏省苏州市苏太猪育种中心,五指山猪采自海南省农科院五指山猪育种中心,荣昌猪采自重庆市畜牧科学研究所荣昌猪试验场,修水杭猪采自江西省修水县畜牧良种场,万安花猪采自江西省万安县畜牧良种场,乐平花猪采自江西省乐平市畜牧良种场,藏猪采自西藏自治区林芝地区,野猪采自安徽省金寨县。每个个体采耳组织块约1.0g,放入1.5mL的Eppendoff管内于冰盒中取回实验室备用。

1.2 方法

1.2.1 PCR-SSCP 分析

根据GenBank上公布的猪*TLR4-1*基因序列(GenBank登录号:AB232527)设计引物,P1:5'-TTC TCACTTCCTCTTACC-3';P2:5'-AGACTCCTACCA CATAACC-3',预期扩增片段为277bp,引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。*Taq* DNA polymerase、dNTP购自宝生物工程(大连)有限公司。PCR反应体系为:基因组DNA(100 ng/ μ L)1.0 μ L, 10 \times Buffer(Mg²⁺)2.0 μ L, dNTP混合物1.5 μ L,引物(10 pmol/L)各1.0 μ L, *Taq* 酶(5 U/ μ L)0.2 μ L,加灭菌

蒸馏水补足至 20 μ L。PCR 扩增条件为: 95 预变性 10 min, 95 变性 30 s, 58 复性 30 s, 72 延伸 30 s, 共进行 30 个循环, 然后 72 后延伸 8 min, 4 保存备用。PCR 扩增产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测。取 7 μ L 上样缓冲液与 15 μ L PCR 产物混和, 98 变性 15 min, 冰浴 10 min。然后将冰浴的变性混合样全部上到 12% 非变性聚丙烯酰胺凝胶(Acr:Bis=29:1)中电泳。130 V 电泳过夜, 银染显色。

1.2.2 序列测定

根据 PCR-SSCP 分析结果, 选取不同基因型的纯合子进行序列测定。PCR 产物经电泳鉴定后, 用胶回收试剂盒(BBI, Canada) 回收目标片段、纯化后, 交由上海生工生物工程技术服务有限公司 ABI PRISM 377 DNA 自动测序仪完成序列测定。

1.2.3 统计分析

基因及基因型频率根据 Hardy-Weinberg 平衡定律进行计算, $p = P + H/2$, $q = Q + H/2$, $\chi^2 = \sum d^2/e$, 其中 $d = e - o$ 是期望值与观测值之差, p 、 q 表示给定位点上的等位基因的频率。

2 结果与分析

2.1 PCR-SSCP 分析结果

用设计的引物进行 PCR 扩增, 1% 琼脂糖凝胶电泳, 扩增片段长度与预期片段大小一致, 且没有非特异的条带, 可以进行 SSCP 分析。结果发现, 在 *TLR4* 基因外显子 1 检测到 6 种基因型, 分别定义为 *AA*、*BB*、*CC*、*AB*、*AC*、*BC*, 3 个等位基因 *A*、*B* 和 *C*(图 1)。

2.2 序列分析结果

取 *AA*、*BB* 和 *CC* 3 种纯合子的 PCR 产物片段

进行测序。结果表明 *CC* 型与 GenBank (AB232527) 中的序列一致, 定义为野生型。*BB* 型与 *CC* 型相比在 93 bp 处发生碱基 *G/C* 的突变, *AA* 型与 *CC* 型相比在 194 bp 处发生碱基 *G/A* 的突变。(图 2、3), 两个变异位点均位于第 1 外显子, 将核苷酸序列演绎成氨基酸序列后, 发现 G93C 为同义突变, G194A 为无义突变即终止突变, 突变的结果导致 Try 变成终止密码子。

2.3 不同猪种 *TLR4* 基因外显子 1 的基因型及其等位基因频率分析

利用 PCR-SSCP 方法对不同品种个体进行检测, 分型后计算出各品种的基因型和等位基因频率。由表 1 可以看出, 共检测到 3 种等位基因, 6 种基因型, 其中杜洛克检测到 *AA*、*BB*、*CC*、*AB*、*AC*、*BC* 基因型, 有杜洛克血统的苏太猪中检测到 *BB*、*CC*、*BC* 基因型, 长白猪、约克夏中检测到 *CC*、*BC* 基因型, 野猪及所有 10 个中国地方猪品种 *TLR4* 基因外显子 1 高度保守, 只检测到 *CC* 基因型。

3 讨论

研究表明, 免疫分子 Toll 样受体家族(Toll-like receptor, TLRs)的多态性或差异与动物对病原的抵抗力和易感性有着显著的相关^[15]。*TLR4* 是 TLRs 中的一员, 是天然免疫识别微生物机制中对革兰氏阴性菌表达的内毒素-脂多糖应答的主要受体^[16]。分析美国国家生物技术信息中心(NCBI)的 GenBank 数据库中已登录猪 *TLR4* 基因的 cDNA 序列后, 发现猪 *TLR4* 基因仅在外显子 3 存在单核苷酸多态性(Single nucleotide polymorphism, SNP), Shinkai 等^[12]研究也表明, 猪 *TLR4* 基因的 SNP 明显少于其他 TLRs, 11 个猪种 *TLR4* 基因中的 7 个氨基酸的替换全部位于外

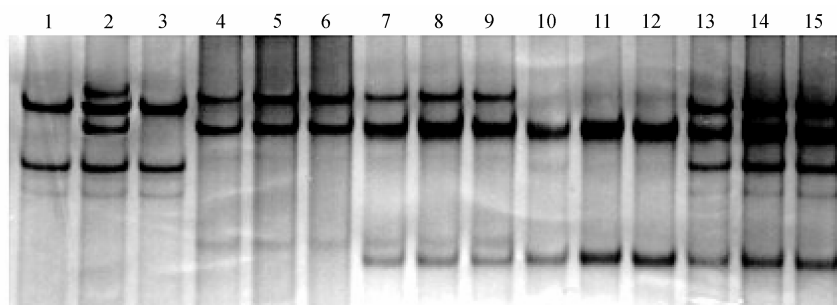


图 1 PCR 扩增产物的 SSCP 分析

1,3 为 *BB* 型; 2 为 *AB* 型; 4~6 为 *AA* 型; 7~9 为 *AC* 型; 10~12 为 *CC* 型; 13~15 为 *BC* 型。

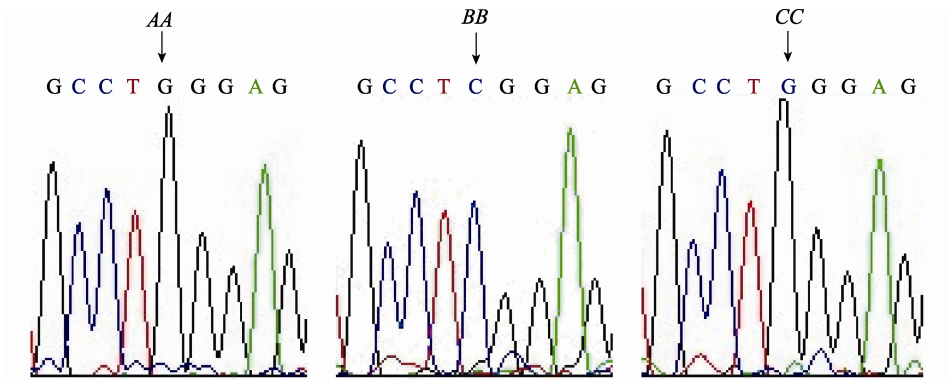


图 2 AA、BB 和 CC 基因型 93 处突变的测序峰图

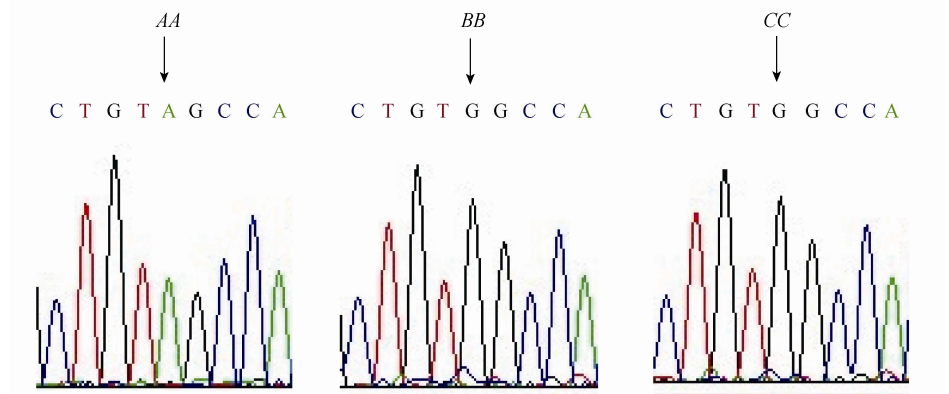


图 3 AA、BB 和 CC 基因型 194 处突变的测序峰图

表1 不同猪种TLR4基因外显子1基因型频率及等位基因频率

群体	样本量	基因型频率						基因频率		
		AA	BB	CC	AB	BC	AC	A	B	C
杜洛克	77	0.039(3)	0.039 (3)	0.455 (35)	0.519(40)	0.247(19)	0.169(13)	0.149	0.188	0.662
约克夏	68	0.000(0)	0.000 (0)	0.075(51)	0.000(0)	0.025(17)	0.000(0)	0.000	0.125	0.875
长白猪	95	0.000(0)	0.000(0)	0.968(92)	0.000(0)	0.032(3)	0.000(0)	0.000	0.016	0.984
苏太猪	219	0.000(0)	0.018(4)	0.927(203)	0.000(0)	0.055(12)	0.000(0)	0.000	0.046	0.954
梅山猪	43	0.000(0)	0.000(0)	1.000(43)	0.000(0)	0.000(0)	0.000(0)	0.000	0.000	1.000
二花脸	46	0.000(0)	0.000(0)	1.000(46)	0.000(0)	0.000(0)	0.000(0)	0.000	0.000	1.000
枫泾猪	38	0.000(0)	0.000(0)	1.000(38)	0.000(0)	0.000(0)	0.000(0)	0.000	0.000	1.000
淮猪	39	0.000(0)	0.000(0)	1.000 (39)	0.000(0)	0.000(0)	0.000(0)	0.000	0.000	1.000
荣昌猪	48	0.000(0)	0.000(0)	1.000(48)	0.000(0)	0.000(0)	0.000(0)	0.000	0.000	1.000
万安花猪	31	0.000(0)	0.000(0)	1.000 (31)	0.000(0)	0.000(0)	0.000(0)	0.000	0.000	1.000
修水杭猪	34	0.000(0)	0.000(0)	1.000(34)	0.000(0)	0.000(0)	0.000(0)	0.000	0.000	1.000
乐平花猪	35	0.000(0)	0.000(0)	1.000(35)	0.000(0)	0.000(0)	0.000(0)	0.000	0.000	1.000
五指山猪	44	0.000(0)	0.000(0)	1.000(44)	0.000(0)	0.000(0)	0.000(0)	0.000	0.000	1.000
藏猪	43	0.000(0)	0.000(0)	1.000(43)	0.000(0)	0.000(0)	0.000(0)	0.000	0.000	1.000
野猪	33	0.000(0)	0.000(0)	1.000(33)	0.000(0)	0.000(0)	0.000(0)	0.000	0.000	1.000

显子 3 中, 周波等^[13]对利用 PCR-SSCP 并结合 PCR 产物双向测序的方法, 对梅山猪、新淮猪、大白猪、长白猪和杜洛克猪共 203 个样本 *TLR4* 基因外显子 3 部分片段的单核苷酸多态性进行了研究, 结果检测到了 5 个 SNPs。Palermo 等^[14]在欧洲猪种 *TLR4* 基因检

测到 34 个 SNPs, 也集中于外显子 3 区域。在本研究中, 3 个引进的商业化品种(杜洛克、约克夏、长白猪)以及具有 50%杜洛克血统的苏太猪中首次发现 *TLR4* 基因外显子 1 存在 SNPs, 杜洛克猪的多态性最为丰富, 共检测到 3 种等位基因, 6 种基因型, 其中杜洛克检测

到 *AA*、*BB*、*CC*、*AB*、*AC*、*BC* 基因型, 有杜洛克血统的苏太猪中检测到 *BB*、*CC*、*BC* 基因型, 长白猪、约克夏中检测到 *CC*、*BC* 基因型, 这是以前报道从未出现的; 本实验所采的杜洛克、约克夏、长白猪均引自中国台湾, 可见台系商业化品种与欧美引进的商业化品种 *TLR4* 基因外显子 1 多态性也存在明显差异。而 10 个中国地方猪品种 *TLR4* 基因外显子 1 高度保守, 均为 *CC* 基因型; 中国地方猪品种和引进品种 *TLR4* 基因外显子 1 的多态性存在极显著的差异。Palermo 等^[14]对欧洲猪种以及梅山猪 *TLR4* 基因的单倍型分析认为, *TLR4* 基因的多态性与猪种的起源以及人口迁移等因素有关, 本实验中亚洲野猪的 *TLR4* 基因外显子 1 也高度保守, 有理由相信中国地方猪种 *TLR4* 基因外显子 1 与外来猪种遗传背景的差异可能与不同的起源有关。在养猪生产实践中, 中国地方猪品种生长性能普遍不如引进品种优越, 但是表现出很强的抗逆性和一般抗病力, 这种普遍现象一方面进一步证实中国地方猪品种对各种疾病一般抵抗力的遗传基础上与外来猪种确实存在差异, 另一方面, 这种差异是否与 *TLR4* 基因外显子 1 多态性的显著差异有关, 值得深入探讨分析。

许多证据显示 *TLR4* 在 LPS 跨膜信号转导中起主导作用, *TLR4* 基因的某个保守碱基的突变会导致宿主对革兰氏阴性菌的反应能力严重丧失。因此, 猪 *TLR4* 基因多态性研究可能为猪革兰氏阴性菌的抗病机制提供遗传学依据。本研究所检测到猪 *TLR4* 基因外显子 1 新的变异位点中 T93G 为一个同义突变, 而 T194G 为一个无义突变, 其氨基酸 Try 变成终止密码子, 即在翻译过程中, 翻译到这里时就终止了, 从而可能引起蛋白质结构的改变, 进一步可能引起功能的改变。此突变是否对肺部炎症疾病的抗性/易感性有影响, 是否能作为一个抗病性状的标记, 还有待于进一步研究分析。

参考文献(References):

- [1] Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol*, 2001, 1(2): 135–145.
- [2] Beutler B. The Toll-like receptors: analysis by forward genetic methods. *Immunogenetics*, 2005, 57(6): 385–392.
- [3] Hirschfeld M, Ma Y, Weis JH, Vogel SN, Weis JJ. Cutting edge: repurification of lipopolysaccharide eliminates signaling through both human and marine Toll-like receptor 2. *J Immunol*, 2000, 165(2): 618–622.
- [4] Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB, Schroeder L, Aderem A. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between Toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(25): 13766–13771.
- [5] Werling D, Jungi TW. Toll-like receptors linking innate and adaptive immune response. *Vet Immunol Immunopathol*, 2003, 91(1): 1–12.
- [6] Machida K, Cheng KT, Sung VM, Levine AM, Fong S, Lai MM. Hepatitis C virus induces toll-like receptor 4 expression, leading to enhanced production of beta interferon and interleukin-6. *J Virol*, 2006, 80(2): 866–874.
- [7] Poltorak A, Ricciardi-Castagnoli P, Citterio S, Beutler B. Physical contact between lipopolysaccharide and Toll-receptor 4 revealed by genetic complementation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(5): 2163–2167.
- [8] 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.
- [9] Leveque G, Forgetta V, Morroll S, Smith AL, Bumstead N, Barrow P, Loredi-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.
- [10] Goldammer T, Zerbe H, Molenaar A, Schuberth HJ, Brunner RM, Kata SR, Seyfert HM. Mastitis increases mammary mRNA abundance of beta-defensin 5, toll like-receptor 2(TLR2) and TLR4 but not TLR9 in cattle. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2004, 11(1): 174–185.
- [11] 王兴平, 许尚忠, 马腾壑, 高雪, 任红艳, 陈金宝. 牛 *TLR4* 基因的遗传多态性与乳房炎的关联分析. 畜牧兽医学报, 2007, 38(2): 120–124.
- [12] 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.
- [13] 周波, 刘传武, 虞德兵, 黄瑞华, 刘红林, 王林云. 用 PCR-SSCP 方法检测猪 Toll 样受体 4 (*TLR4*) 基因外显子 3 的 SNP. 畜牧与兽医, 2008, 40(6): 26–30.
- [14] Palermo S, Capra E, Torremorell M, Dolzan M, Davoli R, Haley CS, Giuffrè E. Toll-like receptor 4 genetic diversity among pig populations. *Anim Genet*, 2009, 40(3): 289–299.
- [15] Trinchieri G, Sher A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defense. *Nat Rev Immunol*, 2007, 7(3): 179–190.
- [16] Lazarus R, Vercelli D, Palmer LJ, Klimecki WJ, Silverman EK, Richter B, Riva A, Ramoni M, Martinez FD, Weiss ST, Kwiatkowski DJ. Single nucleotide polymorphisms in innate immunity genes: abundant variation and potential role in complex human disease. *Immunol Rev*, 2002, 190(1): 9–25.