

梁田,杨霞,张勋,等. 绵羊 Toll 样受体 7 基因多态性分析[J]. 江苏农业科学,2017,45(8):26-29.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.08.007

绵羊 Toll 样受体 7 基因多态性分析

梁田,杨霞,张勋,肖媛媛,陈新凯,宋佳玮,盛金良
(石河子大学动物科技学院,石河子 832000)

摘要:对新疆萨福克羊 Toll 样受体 7 基因单核苷酸进行多态性分析,探索绵羊 *TLR7* 基因多态性与抗病力的关系,为家畜抗病育种提供候选分子标记。采集新疆地区种羊场萨福克羊血液 600 份,提取 DNA,设计扩增引物进行聚合酶链式反应-单链构象多态性(PCR-SSCP)检测,对突变位点进行测序分析。结果表明,12 对扩增引物中,第 2、5、6、7 对引物扩增产物具有多态性。其中第 2 对和第 7 对引物扩增产物存在错义突变,第 5 对和第 6 对引物扩增产物存在同义突变。经 SSCP 分析,第 2 对引物扩增产物表现为 3 种带型,第 7 对引物有 2 种带型。经序列比对分析存在 A343G、A350G、A1244G 的错义突变,氨基酸改变分别是 Lys 突变为 Gln, Asp 突变为 Ser, Glu 突变为 Arg,且突变都发生在胞外区亮氨酸重复区内。其中第 2 对引物的带型 AB 是位点 A343G 和 A350G 同时发生突变。位点 A343G 的突变频率最高为 45.0%, A350G 突变频率 12.0%, 而 A1244G 突变频率为 5.8%。检测的突变可能改变 *TLR7* 基因的功能,进而影响其对病原的免疫应答。为进一步的疾病相关的研究奠定基础,以调查这些研究结果在家畜育种方面的用处。

关键词:Toll 样受体 7; 多态性; 萨福克羊; 基因型

中图分类号:S826.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2017)08-0026-04

先天性免疫系统是生物进化过程中 1 种比较古老而保守的防御体系,是抵御病原微生物感染和有害物质侵害的第一道防线,而广泛模式识别受体(pattern recognition receptors, PRR)^[1]是先天性免疫系统执行识别潜在的病原微生物和非

致病性共生菌群,并清除病原微生物的重要受体。PRR 包括 NK 细胞活化受体、清道夫受体、甘露糖受体和 Toll 样受体(Toll like receptors, TLRs)。这些受体中,TLRs 是最为重要的受体,能够识别不同病原微生物所携带的特异性结构成分,即病原相关分子模式(patho-gen-associated molecular patterns, PAMPs)。在家畜中,已经检测到 10 种功能性 TLR 基因^[2]。TLR3、TLR7、TLR8、TLR9 能够识别细胞内的病原体表达的配体。其中 TLR7 属于 I 型跨膜蛋白受体,具有与其他 TLR 家族成员共同的结构特征,其分子结构由胞外区、跨膜区和胞内区组成。其存在于多种细胞中,包括浆细胞样树突状细胞(pDC)、巨噬细胞、T 细胞、B 细胞等免疫细胞,嗜酸性粒细胞、中性粒细胞和内皮细胞中也有一定水平的表达^[3-5]。另外,在扁桃体、脾、胎盘、骨髓、肺和淋巴结等组织中也有表达^[6]。

收稿日期:2016-02-23

基金项目:兵团博士基金(编号:2014BB016);国家自然科学基金(编号:30960276、31360589);留学人员科技活动项目(编号:RSLX201304)。

共同第一作者简介:梁田(1991—),女,黑龙江鹤岗人,硕士,主要从事动物疾病病理研究, E-mail: 549939333@qq.com; 杨霞(1977—),女,四川绵阳人,硕士,讲师,主要从事免疫遗传与抗病育种研究, E-mail: 546808238@qq.com。

通信作者:盛金良,副教授, E-mail: sjlshz@126.com。

对浓度和数量要求不严。另外,有学者指出,任何形式的 DNA 和 RNA 都能够满足作为底物的要求,在大多数的 PCR 过程中,对 DNA 模板浓度要求很宽泛,在某适宜浓度范围内即可,本研究结果与其基本吻合。

参考文献:

- [1] 王兰芬,武晶,景蕊莲,等. 绿豆种质资源芽期抗旱性鉴定[J]. 植物遗传资源学报,2014,15(3):498-503.
- [2] 刘慧. 我国绿豆生产现状和发展前景[J]. 农业展望,2012,8(6):36-39.
- [3] Reddy R N, Madhusudhana R, Mohan S M, et al. Characterization, development and mapping of unigene-derived microsatellite markers in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] [J]. Molecular Breeding, 2012, 29(3):543-564.
- [4] 柏锡,梁爽,邢雪莹. 干旱、高温胁迫下大豆 SSR 标记与产量性状关联分析[J]. 东北农业大学学报, 2015, 46(10):15-22.

- [5] 王贺,姜敏,刘欣芳,等. 玉米抗大斑病 *Ht* 基因有效 SSR 标记的筛选[J]. 玉米科学,2011,19(1):48-51,55.
- [6] Singh S, Gautam R K, Singh R K, et al. Diversity analysis of *Sesbania acculeata* by using transferable rice SSR markers[J]. Crop Research, 2010, 39(1/2/3):127-131.
- [7] 贺石林. 中医科研设计与统计方法[M]. 长沙:湖南科学技术出版社,1989.
- [8] 王伟,肖松,吴洪娥,等. 月季 ISSR-PCR 体系的建立[J]. 种子,2015,34(7):33-36.
- [9] 程江,郑常祥. 水稻 SSR-PCR 的反应体系优化及 RIL 亲本间多态性引物筛选[J]. 贵州农业科学,2013(4):10-13.
- [10] 糜亚男,张水寒,蔡媛,等. 杜仲 SSR-PCR 反应体系的优化[J]. 中国实验方剂学杂志,2015(2):1-6.
- [11] 梁玉琴,李芳东,傅建敏,等. 正交设计优化柿属植物 SSR-PCR 反应体系[J]. 经济林研究,2011,29(4):17-22.
- [12] 徐璋,张合平. 南方红豆杉 SSR-PCR 扩增体系的建立[J]. 广西林业科学,2015,44(1):54-58.

1996 年, Hofmann 等证实克隆果蝇 Toll 样受体能识别并抑制真菌繁殖^[7]。随后, 人们发现 Toll 样受体在天然免疫系统和获得性免疫中起着重要的作用。TLRs 信号转导途径主要包括依赖 MyD88 的信号通路和非依赖 MyD88 的信号通路。TLR7 能够通过依赖 MyD88 的信号通路激活免疫细胞, 并诱导免疫细胞表达高水平的干扰素、肿瘤坏死因子- α 、IL-12 等细胞因子, 介导抗病毒免疫。TLR7 胞外区负责识别和接受相应信号, 随后 TIR 位点招募富含 Toll/白介素 1 受体接头蛋白分子, 启动下游信号分子, 最终杀伤感染的病原体^[8-9]。通过 TLR7 的作用, 机体能激发天然免疫与获得性免疫, 有效地防御来自外部环境的病原体感染, 维持机体内环境的稳定。

基因多态性与机体对疾病的遗传易感性相关。Toll 样受体在识别病原微生物启动免疫应答中起重要作用。越来越多数据表明, TLRs 单核苷酸多态性与炎症应答损伤及感染性疾病的遗传易感性相关, 如 TLR4 基因 *Asp299Gly* 和 *Thr399Ile* SNPs 与多种感染性疾病正相关, 在动脉粥样硬化及其相关疾病中则起保护作用^[10]。研究表明, 当动物面对体外环境(空气灰尘较多)和体内环境(细菌入侵)的变化, 会作出适应性反应, 由于 TLR 配体可能会受到 Toll 样受体基因单核苷酸多态性的影响, 导致对细菌感染或炎症性疾病易感性的改变^[11]。目前, 绵羊 TLRs 的多态性研究较少, 其与疾病关系还不十分清楚。本研究通过 PCR-SSCP 分析及其基因突变频率分析, 研究绵羊 Toll 样受体 7 胞外区基因的多态性, 为今后绵羊育种的标记辅助选择提供确切的遗传学证据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

丙烯酰胺、双丙烯酰胺、TEMED、2 × *Taq* PCR MasterMix, 均购自上海生工生物工程有限公司; DNA 提取试剂盒购自北京天根生物工程有限公司; DNA 凝胶回收试剂盒购自上海捷

瑞生物工程有限公司。其他常规试剂来自于石河子大学动物科技学院病理实验室。

DYC 系列电泳仪、水平电泳槽、垂直电泳槽, 均购自北京市六一仪器厂; 脱色摇床, 购自江苏省会坛市医疗仪器厂; PCR 仪、凝胶成像系统为美国生产。

1.2 试验动物与样品采集

分别在新疆维吾尔自治区昌吉市和玛纳斯县某种羊场分别随机采集 200、400 份萨福克羊血液样本, 用颈静脉采血法, 每只羊采 5 mL 血液, 用肝素钠采血管带回实验室, 4 ℃ 保存备用。

1.3 DNA 的提取

采血管中的羊血用试剂盒进行 DNA 提取, -20℃ 保存备用。

1.4 引物的设计与合成

采用文献报道的 12 对引物^[12], 送上海生工生物工程有限公司合成, 扩增片段 200 ~ 400 bp。

1.5 PCR 扩增

PCR 扩增体系 25 μ L: 上游引物和下游引物各 1 μ L, 模板 DNA 2 μ L, 1 × LightScannerMaster 12 μ L, 超纯水 9 μ L。PCR 反应条件: 95 ℃ 预变性 5 min; 95 ℃ 变性 35 s, 退火 30 s (退火温度见表 1), 72 ℃ 延伸 30 s, 33 个循环; 72 ℃ 延伸 10 min; 4 ℃ 保存。PCR 产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.6 PCR-SSCP 分析

1.6.1 制备 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶 首先将玻璃板洗净、擦干, 玻璃板的两边放上塑料胶条, 用夹子固定在架子上, 1.5% 琼脂糖封底, 防止漏胶。配置 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶: 加入丙烯酰胺和甲叉双丙烯酰胺体积比为 29 : 1 的 30% 丙烯酰胺贮备液 16 mL, 5 × TBE 12 mL, ddH₂O 32 mL, 10% 过硫酸铵 500 μ L, *N,N'*-二甲基乙二胺 (TEMED) 30 μ L, 混合后将配好的 8% 凝胶液缓慢倒入两玻璃板之间, 插上梳子, 室内聚合 2 h 后, 拔掉梳子, 用针管冲洗点样孔, 向电泳槽中加入 1 × TBE 电泳缓冲液。

表 1 引物扩增 TLR7 胞外区序列

引物	引物序列 (5'→3')	长度 (bp)	退火温度 (℃)
ECD-1	F: AAATTCTGGATCTTGGTGATTTT; R: TGCACACGTTGCTTTTGG	386	58.5
ECD-2	F: AATGCCACCAACCTTACCC; R: GCCAGTTCTGTTAGATTCTCCTTC	320	58.5
ECD-3	F: GGATCTTCCTCCAGCTTACA; R: GGC AAAACAGTGGGGACA	240	64.0
ECD-4	F: TTAAAATTGCTCTCCCTAAAAGATAA; R: GGTGTGCAAGGAAATGGAA	200	55.0
ECD-5	F: AGTTCCTGATCTGAGTGGAAATTG; R: GTTGACAAGGTTATGAAGAAGATG	277	50.7
ECD-6	F: GCCAAAGAAATTGGGGATG; R: TCATGTTAGAGCAGAAACCACCT	367	60.0
ECD-7	F: TGAAGTCTTGATCTTGGCACTA; R: TGAGGAAAGAAAGATGCTGGA	365	66.0
ECD-8	F: CCGGTCCAAGAGCAAAGAGC; R: CAAGCCGATTGTTAGAGAAGTCCA	242	57.0
ECD-9	F: GAATTTACGCTTTAGTGGAGTTG; R: GCTGCTGGAGGTAGCAATGT	231	60.0
ECD-10	F: GGTTCCTGAGGAAACTGATGATG; R: GAGTCTTTAGATTGGAGGCATACT	251	60.0
ECD-11	F: CTCTGAGTTTCTTACCTTTGGGAGT; R: ACTGGAAGCACCTTGGAGAA	264	59.5
ECD-12	F: CGCAGCCTCAAGAAACTCATAC; R: CCACCAGACAAACCACACAG	225	62.0

1.6.2 SSCP 电泳 取 3 μ L PCR 产物, 8 μ L 变性剂 (98% 甲酰胺, 10 mmol/L EDTA, 0.025% 溴酚蓝和 0.025% 二甲苯青), 经 98 ℃ 变性 10 min, 然后置于冰上 10 min, 每孔加样 10 μ L, 在 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 12 ~ 16 h, 银染显带, 并拍照分析。

1.7 PCR 产物测序

SSCP 分析后, 选取不同基因型个体, 将其进行 PCR 扩增胶回收, 将纯化回收的目的片段吸取 5 μ L 于小 EP 管中, 分别加入 0.5 μ L 的 T₄ DNA Ligase、0.5 μ L 的 PGEM-T Easy、4 μ L 的 Buffer, 吹打混匀, 室温放置 1 h, 之后 4 ℃ 孵育过夜。

将连接产物转化到感受态细胞中,筛选阳性克隆后送上海生物工程技术有限公司测序。

1.8 数据统计分析

用 DNAMAN (V 5.2.10) 将测得的序列与 GenBank 已登录的绵羊的 *TLR7* 基因序列分别进行比对。使用卡方分析 SPSS 13.0 软件进行差异显著性检验,对群体多态性分布及基因频率进行统计分析。

2 结果与分析

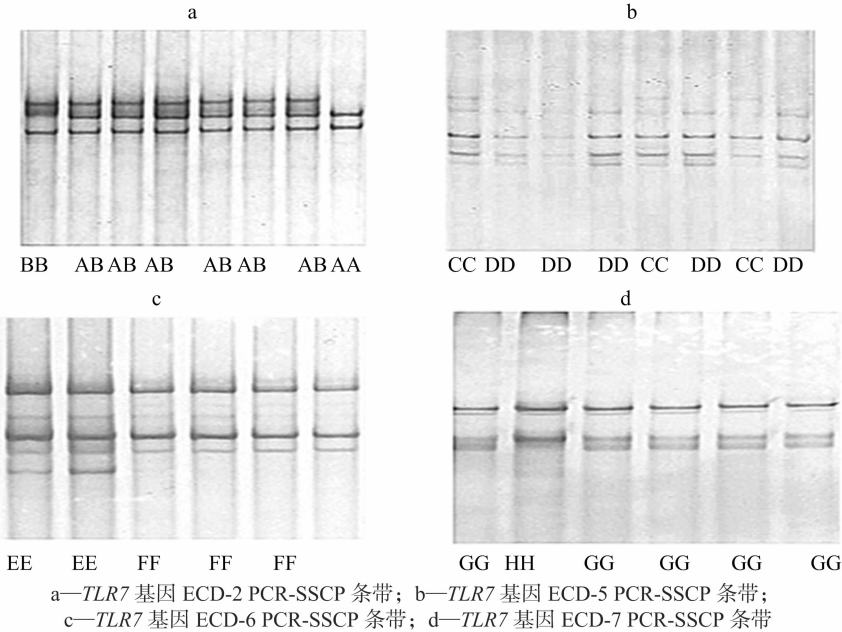


图1 绵羊 *TLR7* 基因胞外区 SSCP 分析结果

表 2 单链构象多态性分析带型的频率

基因型	基因型频率	个体数 (<i>n</i> = 600)	基因频率	χ^2
AA	0.55	330	A 0.815	93.963 **
AB	0.33	196	B 0.285	
BB	0.12	74		
CC	0.13	78	C 0.13	—
DD	0.87	522	D 0.87	—
EE	0.068	41	E 0.068	—
FF	0.932	559	F 0.932	—
GG	0.942	565	G 0.942	—
HH	0.058	35	H 0.058	—

注: $\chi^2_{0.05}(2) = 5.991$, $\chi^2_{0.01}(2) = 9.219$; “**”表示差异极显著。

2.2 *TLR7* 基因胞外区的点突变

经测序发现,绵羊 *TLR7* 胞外区共有 5 个点突变,包括 3 个错义突变和 2 个同义突变。在 343 位核苷酸的改变导致了 Lys115Glu,350 位核苷酸的改变导致了 Asn117Ser,1244 位核苷酸的改变导致了 Gln415Arg。115 位氨基酸的改变使电荷由正变负(表 3),415 位氨基酸的改变使其带上正电荷,这 3 个突变都发生在胞外区的亮氨酸重复区外的区域。

2.3 *TLR7* 基因多态性频率分析

根据 PCR-SSCP 的结果,600 只萨福克羊的 *TLR7* 存在多态性,其分布情况见表 2。其中 343 位核苷酸突变频率最

2.1 *TLR7* 基因胞外区多态性

本研究对 *TLR7* 基因胞外区扩增产物进行 SSCP 分析,结果发现,第 2 对引物扩增的胞外区产物有 3 种带型(图 1-a),第 5、6、7 对分别具有 2 种不同带型(图 1-b、图 1-c、图 1-d)。从表 2 中可以看出,AA、AB、BB、CC、DD、EE、FF、GG、HH 基因型频率分别是 0.55、0.33、0.12、0.13、0.87、0.068、0.932、0.942、0.058。对第 2 对引物带型进行 χ^2 适合性检验,发现 χ^2 值差异极显著,该基因位点在绵羊群体中哈迪-温伯格平衡处于非平衡状态(表 2)。

高,达 45%;其次 350 位核苷酸突变频率是 12%,864 位核苷酸突变频率是 13%,突变频率最少的是 1244 位核苷酸突变,突变频率是 5.8%(表 3)。

表 3 绵羊 *TLR7* 基因多态位点

胞外区	多态位点	氨基酸	极性和电荷	多态性频率 (%)
ECD-2	A343G	Lys115Glu	+ polar → - polar	45
	A350G	Asn117Ser	polar	12
ECD-5	G864A	Leu288	Non - polar	13
ECD-6	T1185C	Leu 395	Non - polar	6.8
ECD-7	A1244G	Gln415Arg	polar→+ polar	5.8

注:氨基酸位点是基于 GenBank 序列,SNP 是根据 SSCP 和 DNAMAN 分析得出。

3 讨论

本研究发现 *TLR7* 基因胞外区有 5 个点突变,包括 3 个错义突变和 2 个同义突变,证明了 *TLR7* 基因高度保守。其中突变带型 AB 的频率是 33%,是突变带型中频率最高的,然后是突变带型 CC(13%)、BB(12%),其他的突变带型频率都小于 10%。在 AB 和 BB 条带中都存在 343 位核苷酸的突变,突变频率为 45%,经检测分析该基因位点不处于 Hardy-Wernberg 平衡状态,可能由于人工饲养,受育种选择的影响。

绵羊的 *TLR7* 由 1046 个氨基酸残基组成,*TLR7* 的胞外

区由 LRR 区和 LRR 区外的基序组成, LRR 区在胞外区的内部, 而 LRR 区外的基序形成胞外区凸表面^[13]。这种凸表面可能影响病原相关分子模式(PAMP)与 TLR 的结合^[14]。本研究发现的 115 和 415 位的氨基酸突变都是在绵羊 TLR7 的 LRR 区外的基序上, 也导致了氨基酸极性和带电荷量的改变, 这种替换极可能会影响 TLR7 的结构或功能, 从而改变对疾病的易感性。由于同义突变可能通过影响 mRNA 稳定、翻译和蛋白质的折叠^[15-16]影响 TLR7 的功能, 本研究也分析了同义突变, 有研究表明 TLR7 能够识别单链 RNA 病毒, 包括水泡口腔咽喉病毒和流感病毒^[17]。TLR7 单核苷酸多态性与丙型肝炎病毒感染引起的炎症反应密切相关。研究显示, TLR7 的遗传变异影响丙型肝炎病毒感染后的免疫反应^[18]。同样的, 羊的梅迪维斯纳病毒易感性差异可能与 TLR7 多态性有关。TLR7 也能被自身的 RNA 活化, 引起自身免疫性疾病^[19]。在狼疮小鼠模型中 Toll 样受体 7 与此病的风险性直接相关^[20-21]。研究表明, TLR7 的激动剂能增强 T 细胞免疫和固有免疫, 诱导 TLR7 表达肿瘤凋亡来抗肿瘤^[22]。大量研究表明肿瘤细胞表面表达多种 Toll 样受体与肿瘤细胞的生长转移有关。在这一领域未来的研究需要检测 *TLR7* 基因多态性与绵羊群病毒感染易感性的关系。

综上所述, TLR7 识别病毒单链 RNA 介导抗病毒免疫应答, 在自身免疫性疾病和一些肿瘤的发生中也有一定的作用, 这些均提示 TLR7 在治疗病毒感染性疾病、自身免疫性疾病和肿瘤疾病的重要作用。本研究探讨绵羊 TLR7 胞外结构域的区域遗传变异, 这些研究结果可以用来进一步探索遗传易感性羊感染疾病与 *TLR7* 基因变异的关系。通过基因图谱分析估计疾病的危险因素, 也可用于育种计划中增加羊群的自然抵抗力。

参考文献:

- [1] Janeway Jr C A, Medzhitov R. Innate immune recognition [J]. Annual review of immunology, 2002, 20(1): 197-216.
- [2] Chang J, Russell G, Jann O, et al. Molecular cloning and characterization of Toll-like receptors 1-10 in sheep [J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2009, 127(1/2): 94-105.
- [3] Chuang T, Ulevitch R. Cloning and characterization of a sub-family of human toll-like receptors; hTLR7, hTLR8 and hTLR9 [J]. European Cytokine Network, 2000, 11(3): 372-378.
- [4] Martin M, Wesche H. Summary and comparison of the signaling mechanisms of the Toll/interleukin-1 receptor family [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2002, 1592(3): 265-280.
- [5] 何小兵, 房永祥, 贾怀杰, 等. Toll 样受体 7 介导的抗病毒天然免疫反应研究进展[J]. 中国兽医科学, 2010, 40(6): 645-649.
- [6] Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors [J]. Annual Review of Immunology, 2003, 21(1): 335-376.
- [7] Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, et al. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults [J]. Cell, 1996, 86(6): 973-983.
- [8] 曾爽, 何小兵; 陈国华. Toll 样受体介导的信号转导通路及其调控分子的研究进展[J]. 中国兽医科学, 2011, 41(4): 433-440.
- [9] 马思慧, 杨欢, 吴天成, 等. Toll 样受体信号传导通路的研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2014, 41(8): 160-164.
- [10] Kolek M, Carlquist J, Muhlestein J, et al. Toll-like receptor 4 gene Asp299Gly polymorphism is associated with reductions in vascular inflammation, angiographic coronary artery disease, and clinical diabetes [J]. American Heart Journal, 2004, 148(6): 1034-1040.
- [11] Schröder N, Schumann R. Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility to infectious disease [J]. The Lancet Infectious Diseases, 2005, 5(3): 156-164.
- [12] Mikula I, Bhide M, Pastorekova S, et al. Characterization of ovine TLR7 and TLR8 protein coding regions, detection of mutations and Maedi Visna virus infection [J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2010, 138(1/2): 51-59.
- [13] Bell J K, Mullen G E, Leifer C A, et al. Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors [J]. Trends in Immunology, 2003, 24(10): 528-533.
- [14] Möller-Larsen S, Nyegaard M, Haagerup A, et al. Association analysis identifies TLR7 and TLR8 as novel risk genes in asthma and related disorders [J]. Thorax, 2008, 63(12): 1064-1069.
- [15] Duan J, Wainwright M S, Comeran J M, et al. Synonymous mutations in the human dopamine receptor D2 (DRD2) affect mRNA stability and synthesis of the receptor [J]. Human Molecular Genetics, 2003, 12(3): 205-216.
- [16] Kimchi-Sarfaty C, Oh J M, Kim I W, et al. A "silent" polymorphism in the *MDR1* gene changes substrate specificity [J]. Science, 2007, 315(5811): 525-528.
- [17] Lund J, Alexopoulou L, Sato A, et al. Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7 [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(15): 5598-5603.
- [18] Yue M, Gao C, Wang J, et al. Toll-like receptor 7 variations are associated with the susceptibility to HCV infection among Chinese females [J]. Infection, Genetics and Evolution, 2014, 27: 264-270.
- [19] Krieg A. The toll of too much TLR7 [J]. Immunity, 2007, 27(5): 695-697.
- [20] Berland R, Fernandez L, Kari E, et al. Toll-like receptor 7-dependent loss of B cell tolerance in pathogenic autoantibody knockin mice [J]. Immunity, 2006, 25(3): 429-440.
- [21] Deng Y, Shen N. Effects of Toll-like receptor 7 in anti-infection and autoimmune disease [J]. Journal of Medical Molecular Biology, 2008.
- [22] Kanzler H, Barrat F, Hessel E, et al. Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists [J]. Nature Medicine, 2007, 13(5): 552-559.