

王会敏,罗 成,齐江蛟,等. 中国美利奴羊 *TLR4* 基因多态性的 PCR-SSCP 鉴定[J]. 江苏农业科学,2017,45(21):27-31.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.21.007

中国美利奴羊 *TLR4* 基因多态性的 PCR-SSCP 鉴定

王会敏,罗 成,齐江蛟,王元元,李村院,高剑峰

(石河子大学生命科学学院,新疆石河子 832003)

摘要:为了研究中国美利奴羊 TOLL 样受体(*TLR4*)基因第 3 外显子上的单核苷酸多态性(SNPS)和单氨基酸多态性(SAPS)。利用生物信息学方法对 NCBI 上公布的有关绵羊的 *TLR4* 序列进行下载并用 SeqMan 对下载的绵羊 *TLR4* 基因外显子进行多态性比对分析,然后采用 PCR-SSCP 并结合测序的方法对 119 只中国美利奴羊 *TLR4* 基因的外显子 3 的扩增片段进行分析。通过分析发现,在中国美利奴羊第 3 外显子 1 180 bp 处有 1 个突变位点,由 G 突变成 T,氨基酸由天冬氨酸(D)变成酪氨酸(Y),即该位点为有义突变。在 1 537 bp 处也有 1 个突变位点,即由 G 突变成了 A,氨基酸由丙氨酸(A)变成苏氨酸(T),在 *TLR4* 第 3 外显子的其他位点并没有 SNPS 位点,说明中国美利奴羊 *TLR4* 基因上的第 3 外显子区域有 2 个多态位点。

关键词:中国美利奴羊;*TLR4* 基因;多态性;生物信息学方法;PCR-SSCP;外显子;突变位点

中图分类号:S826.8⁺62 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2017)21-0027-05

Toll 样受体(toll-like receptor, TLR)最早是从果蝇体内分离得到的,它对果蝇腹背侧体轴的发展方向和特异性免疫反应起重要的作用^[1]。Medzhitov 等首次人体分离出果蝇 TLR 的同系物,从而发现人类及哺乳动物存在一个 TLR 家族,它是一种重要的模式识别受体,能识别微生物的多种成分

如 DNA、RNA、脂多糖、脂蛋白等,从而激活非特异性和特异性免疫反应,抵抗细菌、病毒的侵入^[2]。TLR 家族至少有 10 个 TLR 成员,它们分别在不同的免疫应答机制中扮演各自的重要角色。*TLR* 基因的多态性可以使机体对疾病的遗传具有易感性和抗性,基因 *TLR* 位点多态性与炎症应答损伤和感染性疾病的遗传易感性相关^[3-5]。TOLL 样受体 4 是一种 I 型跨膜蛋白,包括富含半胱氨酸的胞内区、富含亮氨酸的胞外区和跨膜区^[6]。*TLR4* 广泛表达于哺乳动物细胞表面,在抗感染免疫中发挥重要作用。目前,关于 *TLR4* 的多态主要集中在人和小鼠的研究上。例如,刘继峰等对 *TLR2*、*TLR4* 基因多态性与尖锐湿疣患者易感性及复发性的相关性进行研究^[7]。

收稿日期:2016-06-30

基金项目:国家“973”计划(编号:2010CB530200)。

作者简介:王会敏(1990—),女,硕士研究生,研究方向为动物基因工程。

通信作者:高剑峰,博士,教授,研究方向为动物功能基因组学与分子免疫学。E-mail: jianfengg@shuzu.edu.cn。

[6] Nover L, Bharti K, Döring P, et al. *Arabidopsis* and the heat stress transcription factor world: how many heat stress transcription factors do we need? [J]. Cell Stress Chaperones, 2001, 6(3): 177-189.

[7] Döring P, Treuter E, Kistner C, et al. The role of AHA motifs in the activator function of tomato heat stress transcription factors HsfA1 and HsfA2 [J]. Plant Cell, 2000, 12(2): 265-278.

[8] Pennell R I, Lamb C. Programmed cell death in plants [J]. Plant Cell, 1997, 9(7): 1157-1168.

[9] Lin J, Wang Y, Wang G. Salt stress-induced programmed cell death in tobacco protoplasts is mediated by reactive oxygen species and mitochondrial permeability transition pore status [J]. J Plant Physiol, 2006, 163(7): 731-739.

[10] Xu C J, Chen K S, Ferguson I B. Programmed cell death features in apple suspension cells under low oxygen culture [J]. Bioscience & Biotechnology, 2004, 5(2): 137-143

[11] Gechev T S, Van Breusegem G F, Stone J M, et al. Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death [J]. BioEssays, 2006, 28(11): 1091-1101.

[12] Gechev T S, Hille J. Hydrogen peroxide as a signal controlling plant programmed cell death [J]. J Cell Biol, 2005, 168(1): 17-20.

[13] Thonel A D, Mezger V, Garrido C. Implication of heat shock factors

in tumorigenesis: therapeutical potential [J]. Cancers, 2011, 3: 1158-1181.

[14] Jacobs A T, Marnett L J. HSF1-mediated BAG3 expression attenuates apoptosis in 4-hydroxynonenal-treated colon cancer cells via stabilization of anti-apoptotic Bcl-2 proteins [J]. J Biol Chem, 2009, 284(14): 9176-9183.

[15] Beere H M. ‘The stress of dying’: the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis [J]. J Cell Sci, 2004, 117: 2641-2651.

[16] Ahn S G, Thiele D J. Redox regulation of mammalian heat shock factor 1 is essential for *Hsp* gene activation and protection from stress [J]. Genes and Development, 2003, 17(4): 516-528.

[17] Guo L H, Cai J, Yu Z X, et al. Influence of High Temperature on the Expression of *Arabidopsis* Heat Shock Transcription Factor *AtHsfA1a* [J]. Agricultural Biotechnology, 2013, 2(1/2): 13-15

[18] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding [J]. Analyt Biochem, 1976, 44: 276-287.

[19] Zhang L, Jiang H, Gao X, et al. Heat shock transcription factor 1 inhibits H₂O₂-induced apoptosis via down-regulation of reactive oxygen species in cardiac myocytes [J]. Mol Cell Biochem, 2011, 347(1/2): 21-28.

韩璐等 *TLR4* 基因的多态性与胃癌的关系^[8]。赵刚等利用 PCR-SSCP 方法研究牛血液组胺浓度、*TLR4* 基因多态性与抗蛱能力的关系发现,B 等位基因可作为婆罗门杂交牛抗蛱选育的分子标记^[9]。吕伟丽等用 PCR-SSCP 方法检测这 4 种绵羊第 3 外显子的多态性发现,白萨福克羊、小尾寒羊和特克塞尔羊处于高度多态,而永昌羊处于中度多态^[10]。鲜有关于绵羊 *TLR4* 基因的多态性与疾病关联的报道。中国美利奴绵羊是新疆绵羊毛肉兼用细毛羊品种的一种,具有优良的遗传稳定性,包括军垦型、科尔沁型、吉林型 3 种类型^[11]。本试验以中国美利奴羊为材料,利用生物信息学方法对 NCBI 上公布的有关绵羊的 *TLR4* 序列进行下载并用 SeqMan 对下载的绵羊 *TLR4* 基因外显子进行多态性比对分析,然后采用 PCR-SSCP 技术并结合克隆测序的方法来检测中国美利奴羊 *TLR4* 基因的多态位点,从而为进一步研究标记辅助育种、培育中国美利奴绵羊抗性新品系奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物 试验中的 119 只中国美利奴羊来自新疆建设兵团农九师第 170 团,取每只试验羊的颈静脉血于 5 mL 肝素钠抗凝管中,放入车载冰箱里带回实验室,然后放入 -40 ℃ 保存备用。

1.1.2 主要试剂 血液基因组试剂盒、EB(核酸染料)、2 ×

Taq PCR MasterMix、DL 2000 DNA Marker 等,均购自生工生物工程(上海)股份有限公司;过硫酸铵和去离子甲酰胺,均购自北京索莱宝科技有限公司;丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺和 TEMED,均购自美国 Am-resco 公司;亲和硅烷、剥离硅烷,均购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司。其他试剂均由实验室配制。

1.2 方法

1.2.1 生物信息学分析 从 NCBI 上通过绵羊基因 mRNA 序列(登录号:XM_012111214)下载绵羊的编码区,并利用 NCBI 上的 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=CAQ37825.1&report=gene_table 将 *TLR4* 基因的编码区进行外显子的划分。

1.2.2 利用生物信息学方法 对 NCBI 上公布的有关绵羊 *TLR4* 所有的 mRNA 序列进行下载并用 SeqMan 软件对下载的绵羊 *TLR4* 基因外显子的序列进行多态性比对分析找出位于其品种羊的多态位点并分析。

1.2.3 基因组 DNA 的提取 采用血液基因组 DNA 提取试剂盒说明书操作提取 DNA,用紫外分光光度计估计浓度并用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测提取的 DNA 浓度,于 -80℃ 保存备用。

1.2.4 PCR 扩增反应 根据 NCBI 上公布的绵羊 *TLR4* 基因的序列(登录号:XM_012111214)利用 Primer Premier 5.0 设计扩增 *TLR4* 第 3 外显子的特异性引物,引物信息见表 1。引物均由北京六合华大基因科技股份有限公司合成。

表 1 绵羊 *TLR4* 基因第 3 外显子的引物序列

基因	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')	退火温度(℃)
<i>TLR4</i> (316~532)	CTTGATACTGACGGGAAAC	TCCAGGTTGGGAAGCT	54.0
<i>TLR4</i> (530~753)	AGCACTTGGATCTTTCTAACA	ACCAGCCAGACCTTGAATAC	54.5
<i>TLR4</i> (821~106)	TCTTGCCTGGAGGGACTG	AACTTTTGTAGAGAACGGAGC	56.0
<i>TLR4</i> (1 093~1 370)	GCACTTTTACTAAGACTGAGC	GTGTAAGAGATGTCAAGGTAG	54.0
<i>TLR4</i> (1 382~1 634)	GTCTTCCACGGCATCTTTACT	CGACTGGAGTGTTTCATAAAG	56.0
<i>TLR4</i> (1 867~2 098)	TCAGGAATGCCACTTGTCAGA	CCTCCTCCAAGTCTTTACCA	57.0

TLR4 基因的第 3 外显子(即表 1 中)的所有片段的反应总体系都为 20 μL:ddH₂O 8 μL, *Taq* PCR MasterMix 8 μL, DNA 模板 2.0 μL,上、下引物(10 μmol/L)各 1.0 μL。PCR 扩增程序:95 ℃ 预变性 5min;95 ℃ 变性 1 min,72 ℃ 延伸 40 s,35 个循环;72 ℃ 总延伸 10 s;4 ℃ 保存。PCR 扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶中电泳,凝胶系统照相检测扩增结果。

1.2.5 PCR-SSCP 检测和测序分析 分别取 4.5 μL 的 PCR 扩增产物与 9.0 μL 的变性上样缓冲液(0.25% 二甲苯菁、0.05% 溴酚蓝、95% 去离子甲酰胺、pH 值为 8.0 的 EDTA)离心混匀,于 PCR 仪上 98 ℃ 变性 10 min,然后取出立即冰浴 5 min。快速在预先制备好的 10% 非变性聚丙烯酰胺凝胶(9.0 mL 10 × TTE,22.5 mL 40% 丙烯酰胺,58.0 mL ddH₂O,最后同时加入 450.0、70.0 μL TEMED)上点样并连接至冷凝循环系统,9 ℃、300 V 预电泳 15 min,45 mA 电泳 5 h,结束后采用银染色法显色并在 X 光上分析带型且拍照保存。

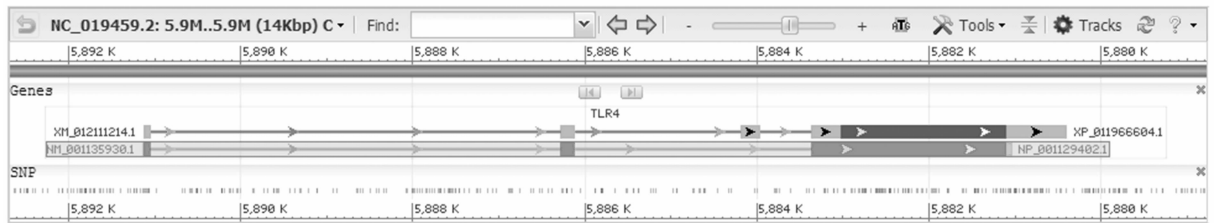
选择有不同带型样品的 PCR 产物经电泳检测符合测序要求后,送北京六合华大基因科技有限公司进行双向测序,然后用 SeqMan 和 GenDoc 等软件对测序序列进行比对分析。

2 结果与分析

2.1 用生物信息学对绵羊 *TLR4* 基因编码区外显子的划分 *TLR4* 基因的编码区分为 3 个外显子:外显子 1 是从 *TLR4* 编码区序列的 1~90 长 93 bp、外显子 2 是从 *TLR4* 编码区序列的 91~257 长 167 bp、外显子 3 为 *TLR4* 编码区序列的 258~2 523 长 2 266 bp(图 1)。

2.2 不同品种绵羊 *TLR4* 基因外显子 3 的生物信息学分析 用 SeqMan 软件对从 NCBI 上下载的所有有关绵羊 *TLR4* 的 mRNA 序列进行多态性比对分析发现,其多态位点主要集中在位于 *TLR4* 基因第 3 外显子的 316~532、530~753、821~1 066、1 093~1 370、1 382~1 634、1 867~2 098 bp 之间。其中,316~532 bp 之间共有 9 个 SNP 位点,含有 A→C、T→C 的突变各 2 个,A→G 突变 4 个,G→C 突变 1 个;530~753 bp 之间共有 8 个 SNP 位点,含有 C→T、A→G、A→C 的突变各 2 个,G→C、T→C 的突变各 1 个;821~1 066 bp 之间共有 23 个 SNP 位点,含有 A→G 突变 6 个,G→A 突变 4 个、G→T 突变 3 个,T→C、C→T 突变各 2 个,C→A、G→C、T→A、C→G、A→T、T→C/G 各 1 个;1 093~1 370 bp 之间共有 20 个 SNP 位点,

Reference Oar_v4.0 Primary Assembly NC_019459.2 (minus strand) from: 5891142 to: 5880391

Go to nucleotide: [Graphics](#) [FASTA](#) [GenBank](#)

Exon table for RefSeq mRNA XM_012111214.1 and protein XP_011966604.1 Interval (exons 5' to 3')

Exon table for RefSeq mRNA NM_001135930.1 and protein NP_001129402.1 Interval (exons 5' to 3')

[Top of page](#) [Gene Table help](#)

mRNA NM_001135930.1, 3 exons, total annotated spliced exon length: 2598

protein precursor NP_001129402.1, 3 coding exons, annotated AA length: 840

Interval (exons 5' to 3')		Length (bp)		
Exon	Coding	Exon	Coding	Intron
5891142-5891050	5891139-5891050	93	90	4768
5886281-5886115	5886281-5886115	167	167	2744
5883370-5881033	5883370-5881105	2338	2266	

图1 *TLR4* 基因的编码区外显子划分

含有 C→T 突变 6 个、G→A 突变 5 个、A→G 突变 5 个、G→C、G→T、A→T、C→G 的突变各 1 个；1 382 ~ 1 634 bp 之间共有 11 个 SNP 位点，含有 T→C 突变 2 个、G→A 突变 5 个、A→C 突变 1 个、C→T 突变 2 个、A→G 突变 1 个；1 867 ~ 2 098 bp 之间共有 9 个 SNP 位点，其中 C→A 突变 1 个、C→T 突变 2 个、G→A 突变 3 个、A→G 突变 3 个。G→C、G→T 各占所有突变位点的 5%、A→T、C→G、C→A 各占所有突变位点的 2.50%、T→A、T→C/G 各占所有突变位点的 1.25%、T→C 占所有突变位点的 8.75%、C→T 占所有突变位点的 17.50%、A→G 占所有突变位点的 26.25%、A→C 占所有突变点的 6.25%、G→A 占所有突变位点的 21.25%。从上述统计结果来看，G 与 A（即为转换位点）之间的突变在绵羊的 *TLR4* 的第 3 外显子中比较常见，C→T 突变次之，且有 1 个 T→C/G 即简约信息位点。绵羊 *TLR4* 基因第 3 外显子的所有突变位点中既有转换位点又有颠换位点，且转换位点多于颠换位点。可能是由于 DNA 双螺旋结构的差异，越是结构相似的碱基越易相互替换。

2.3 基因组 DNA 电泳图检测结果

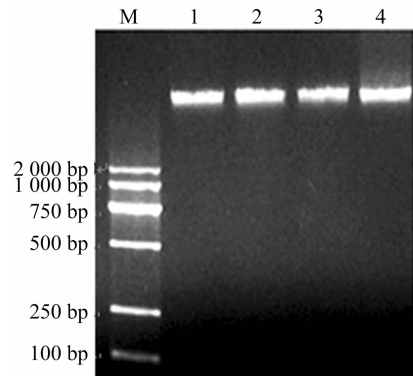
提取的 DNA 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测，由图 2 可见，电泳条带清晰单一，可以进行下步试验。

2.4 绵羊 *TLR4* 基因第 3 外显子片段的 PCR 扩增

由图 3 可知，绵羊 *TLR4* 基因第 3 外显子 *TLR4* (316 ~ 532)、*TLR4* (530 ~ 753)、*TLR4* (821 ~ 1 066)、*TLR4* (1 093 ~ 1 370)、*TLR4* (1 382 ~ 1 634)、*TLR4* (1 867 ~ 2 098) 的 PCR 扩增，上述序列的扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测与目的片段大小一致且带型清晰、无杂带符合 SSCP 试验要求。

2.5 PCR-SSCP 检测

对绵羊 *TLR4* 基因第 3 外显子的 *TLR4* (316 ~ 532)、*TLR4* (530 ~ 753)、*TLR4* (821 ~ 1 066)、*TLR4* (1 093 ~ 1 370)、*TLR4* (1 382 ~ 1 634)、*TLR4* (1 867 ~ 2 098) 扩增得到的 PCR 产物进行 SSCP 试验检测，在扩增片段中都没有发现多态性都为 AA 基因型（图 4-A 至图 4-D）；*TLR4* (1 093 ~ 1 370) 与



M—DL2000；1~4—基因组 DNA

图2 绵羊全血基因组 DNA 电泳图

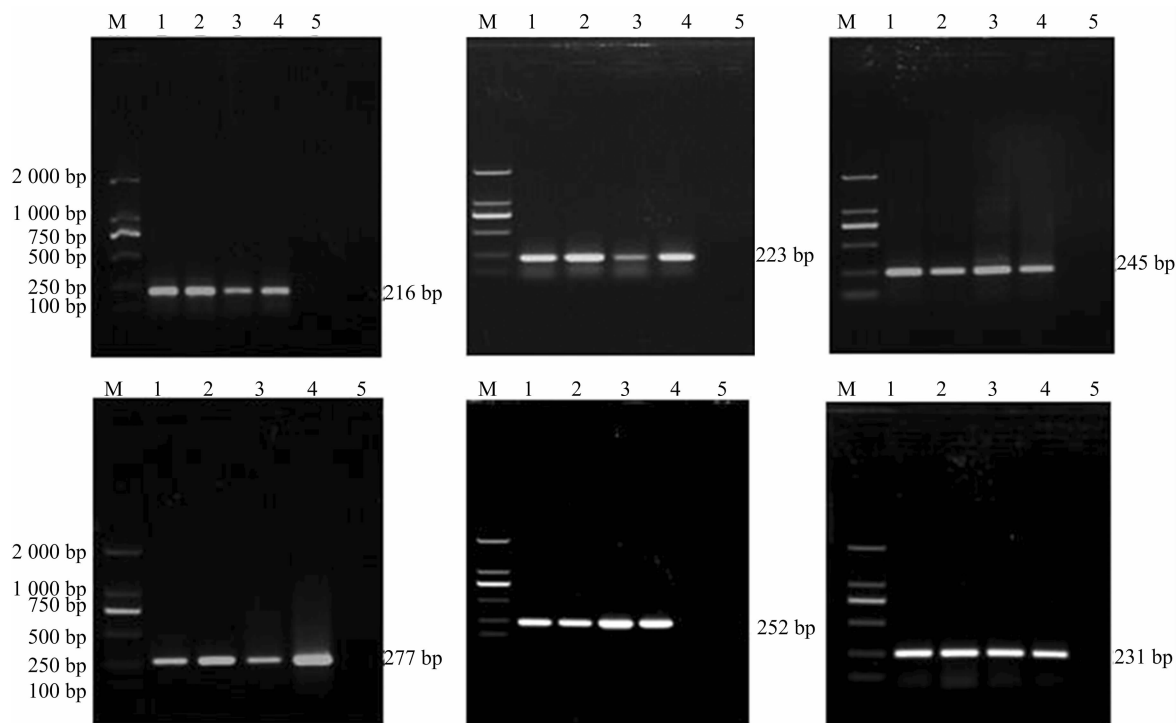
TLR4 (1 382 ~ 1 634) PCR 扩增得到的产物进行 SSCP 试验，在扩增产物片段中发现不同的带型，即 *TLR4* (1 093 ~ 1 370) 有 AA、AB、BB 等 3 种基因型 *TLR4* (1 382 ~ 1 634) 有 2 种基因型 AA、AB（图 4-E 至图 4-F）。

2.6 绵羊 *TLR4* 第 3 外显子的 *TLR4* (1 093 ~ 1 370) 与 *TLR4* (1 382 ~ 1 634) 序列的测序结果

通过测序和 SeqMan 软件的比对分析（图 5 至图 6）可知，在 *TLR4* 基因第 3 外显子的 1 180 bp 处有 1 个突变位点，由 G 突变成 T，氨基酸由天冬氨酸（D）变成酪氨酸（Y），即该位点为有义突变。在 *TLR4* 基因第 3 外显子的 1 537 bp 处也有 1 个突变位点，即由 G 突变成了 A，氨基酸由丙氨酸（A）变成苏氨酸（T）该位点为有义突变。

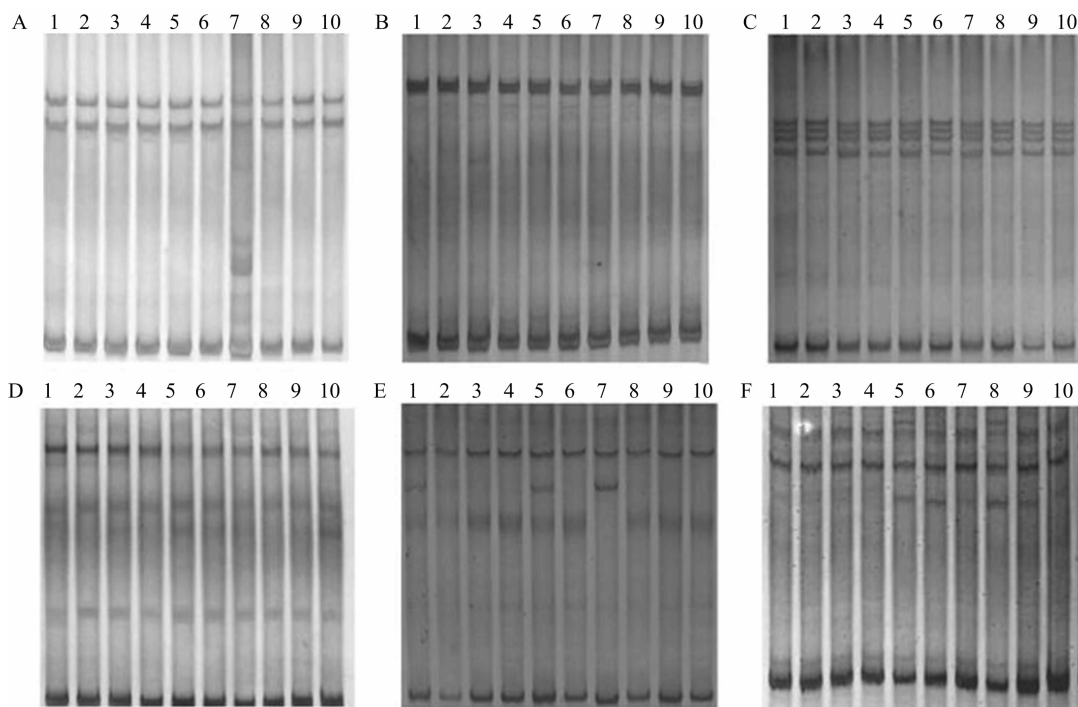
3 讨论与结论

目前，国内外学者在人 TOLL 样受体的多态性方面研究得比较广泛。Mu 等发现，人的 TLR9 - 1486T/C 和 2848G/A 的基因型能增加患宫颈癌的风险^[12]。吴春香等采用 PCR-FLRP 技术对 110 例 AAV 患者及 101 例健康的成人进行研究，发现 TLR4 - 1837A/G 基因型影响 AAV 患者的血红蛋白、



从左上依次为绵羊 *TLR4* 基因第 3 外显子 *TLR4* (316~532)、*TLR4* (530~753)、*TLR4*(821~1 066)、*TLR4*(1 093~1 370)、*TLR4*(1 382~1 634)、*TLR4*(1 867~2 098)的 PCR 扩增
1~4—不同羊样品目的片段的 PCR 扩增产物, 5—阴性对照, M—DL2000 DNA marker

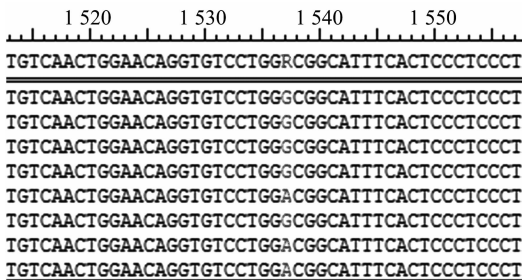
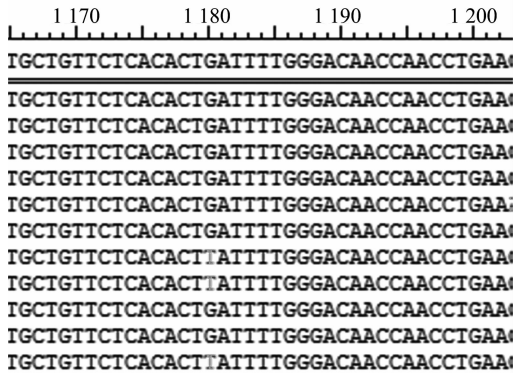
图3 绵羊 *TLR4* 基因第 3 外显子片段的 PCR 产物的电泳图



A—绵羊 *TLR4* 基因第 3 外显子(316~532)PCR-SSCP电泳图; B—绵羊 *TLR4* 基因第 3 外显子(530~753)PCR-SSCP电泳图; C—绵羊 *TLR4* 基因第 3 外显子(821~1 066)PCR-SSCP电泳图; D—绵羊 *TLR4* 基因第 3 外显子(1 093~1 370)PCR-SSCP电泳图; E—绵羊 *TLR4* 基因第 3 外显子(1 382~1 634)PCR-SSCP电泳图; F—绵羊 *TLR4* 基因第 3 外显子(1 867~2 098)PCR-SSCP电泳图

1~10为不同羊样品的 PCR-SSCP 带型, 图 A、B、C、D 中的 1~10 都为 AA 基因型; 图 E 中的 1、5 为 AB 基因型, 7 为 BB 基因型, 其余的均为 AA 基因型; 图 F 中的 5、6、8、9 为 AB 基因型, 其余的为 AA 基因型

图4 绵羊 *TLR4* 基因第 3 外显子 PCR-SSCP



血尿发生率、血沉水平、C 反应蛋白^[13]。林茂虎等用 iMLDR 技术对 423 例鲍曼不动杆菌感染病人和 385 例非感染病人的血标本进行 *TLR4* 基因的多态性检测,证明位于启动子区域的 *TLR4* 单倍型 GCG 与鲍曼不动杆菌感染的相关性^[14]。王永堂等用 PCR-RFLP 技术对正常汉族人群样本 *TLR4* 启动子区 -2 242、-1 892 和 -1 837 这 3 个多态位点进行基因分型,证明中国汉族人群中位于 *TLR4* 基因启动子区的 -2 242 位点可能是脓毒症关联分析重要的遗传标记^[15]。从以上可知,*TLR4* 基因的多态性在人方面研究得比较成熟,但其在家畜方面研究得比较少,有待进一步研究,*TLR4* 基因具有 SNPs 的免疫基因,而基因多态性能够与生产性能上的一些经济性状联系起来,为动物遗传育种提供一定的依据。同时,*TLR* 基因多态性与动物的免疫力及疾病的易感性和抗病性也有很大关联性。绵羊是这个星球上最有经济价值的家养动物之一,在工农业生产中占据着重要的地位。羊肉蛋白质含量高、胆固醇含量低、营养丰富,是社会上很多人喜爱的食物^[16],2012 年中国的出口羊肉产量为 4.01 万 t,占世界的 32%。优质羊毛是毛纺工业的重要原材料,此外绵羊也是重要的科学研究模式动物。因此,对于选育具有优良品种和抗性新品系的绵羊尤为重要,必须从多个方面考虑、创新、发现新的有关提高绵羊经济价值领域。在本试验中,将中国美利奴羊的 *TLR4* 编码基因的第 3 外显子分成 7 个在 300 bp 以下的片段,分别为 *TLR4* (316 ~ 532)、*TLR4* (530 ~ 753)、*TLR4* (821 ~ 1 066)、*TLR4* (1 093 ~ 1 370)、*TLR4* (1 382 ~ 1 634)、*TLR4* (1 867 ~ 2 098) 来检测 *TLR4* 编码基因第 3 外显子在中国美利奴羊上的多态性,因为 *TLR4* 编码基因的第 3 外显子总长为 2 266 bp,而做 SSCP 试验 DND 片段总长最好在 300 bp 以下,这样检测到目的 DNA 片段多态性的灵敏度才高^[17]。对以上 *TLR4* 编码基因的 7 个片段进行多态检测,除

TLR4(1 093 ~ 1 370) 与 *TLR4*(1 382 ~ 1 634) 片段中各有 1 个有义突变外,其他片段都没有多态,这种现象可能是因为中国美利奴羊 *TLR4* 基因在所检测的区域是比较保守的,由此也可得出中国美利奴羊具有多态位点的改变。有关更多的突变基因可能位于中国美利奴羊 *TLR4* 基因的其他外显子或启动子区、调控区域,还有可能是检测样本量和羊所选地区偏少导致的。因此,须要扩大样本的数量和对多个地区的中国美利奴羊进行进一步的研究。

参考文献:

- [1] Hashimoto C, Hudson K L, Anderson K V. The toll gene of drosophila, required for dorsal - ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein[J]. Cell, 1988, 52(2): 269 - 279.
- [2] 韩 凝, 张 彩, 罗南萍. *TLR4* 研究进展与肾脏疾病[J]. 放射免疫学杂志, 2009, 22(2): 133 - 135.
- [3] Kiechl S, Lorenz E, Reindl M, et al. Toll - like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis [J]. New England Journal of Medicine, 2002, 347(3): 185 - 192.
- [4] Szomolanyi - Tsuda E, Liang X, Welsh R M, et al. Role for *TLR2* in NK cell - mediated control of murine cytomegalovirus *in vivo* [J]. Journal of Virology, 2006, 80(9): 4286 - 4291.
- [5] 张 欣, 张小丽, 马小军, 等. 甘肃高山细毛羊 *TLR2* 基因遗传多态性及其与乳房炎相关性[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(6): 1357 - 1361.
- [6] 李 静, 姜相君. Toll 样受体及其基因多态性与胃黏膜疾病相关性的研究进展[J]. 胃肠病学, 2015(7): 431 - 434.
- [7] 刘继峰, 瞿 镔, 王向东, 等. *TLR2*、*4* 基因多态性与尖锐湿疣患者易感性及复发的相关性研究[J]. 中华男科学杂志, 2015, 21(8): 708 - 712.
- [8] 韩 璐, 赵真真, 王笑峰, 等. *TLR3* 和 *TLR4* 基因多态性与 EBV 相关胃癌易感性的关系[J]. 肿瘤防治研究, 2015, 42(1): 14 - 18.
- [9] 赵 刚, 余 梅, 崔群维, 等. 牛血液组胺浓度、*TLR4* 基因多态性与抗蜱能力的关联分析[J]. 中国奶牛, 2015(6): 1 - 5.
- [10] 吕伟丽, 马小军, 张小丽, 等. 绵羊 *TLR4* 基因的遗传多态性分析[J]. 江苏农业学报, 2014, 30(4): 790 - 795.
- [11] 刘守仁, 邵长发, 张凤林, 等. 中国美利奴羊(新疆军垦型)多胎品系的选育研究[J]. 畜牧与兽医, 1995(6): 246 - 248.
- [12] Mu X Y, Zhao J, Yuan X, et al. Gene polymorphisms of Toll - Like receptor 9 - 1486T/C and 2848G/A in cervical Cancer risk[J]. International Journal of Gynecological Cancer, 2015, 25(7): 1173 - 1178.
- [13] 吴春香, 薛 超, 廖蕴华, 等. *TLR4* 基因 1837A/G 多态性与广西汉族人群原发性中性粒细胞胞浆抗体相关性小血管炎的相关性[J]. 广东医学, 2015(4): 528 - 531.
- [14] 林茂虎, 朱晓应, 苗 芮, 等. *TLR - 2* 和 *TLR - 4* 受体单核苷酸多态性与鲍曼不动杆菌感染的相关性[J]. 解放军医学院学报, 2015(8): 829 - 831.
- [15] 王永堂, 蒋建新, 段朝霞, 等. *TLR4* 基因启动子区多态性及其对蛋白表达的影响[J]. 现代生物医学进展, 2009, 9(7): 1209 - 1212.
- [16] Gao J, Liu K, Liu H, et al. A complete DNA sequence map of the ovine major histocompatibility complex[J]. BMC Genomics, 2010, 11(11): 466.
- [17] 李玉梅, 姚纪元, 吴 静, 等. PCR - SSCP 技术的研究及应用进展[J]. 生物技术通报, 2007(6): 71 - 74.