

黄丽丽,张艳,刘海隆,等.海南五指山猪 *TLR4* 基因克隆及生物信息学分析[J].江苏农业科学,2019,47(8):41-45.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.08.009

海南五指山猪 *TLR4* 基因克隆及生物信息学分析

黄丽丽^{1,2},张艳^{1,2},刘海隆¹,林哲敏^{1,2},谭树义^{1,2}

(1. 海南省农业科学院畜牧兽医研究所,海南海口 571100; 2. 海南省热带动物繁育与疫病研究重点实验室,海南海口 571100)

摘要:为获得海南五指山猪 *TLR4* 基因序列并分析其分子结构特征,以 GenBank 中猪的 *TLR4* 基因序列为参考序列,采用 PCR 技术对该基因组序列进行克隆、测序及相关生物信息学分析。结果显示,获得的五指山猪 *TLR4* 基因 DNA 序列长 10 435 bp,其中编码区全长 2 526 bp,共编码 841 个氨基酸;与 GenBank 中发布的普通猪的 *TLR4* 基因序列相比,存在 38 处突变(其中有 2 处突变位于编码区);与普通猪、牛、绵羊、犬、马、猕猴、人、黑猩猩、小鼠和鸡的同源性分别为 99.9%、80.7%、79.9%、74.8%、74.7%、73.1%、73%、72.7%、62.5%、43.4%;五指山猪 *TLR4* 编码的蛋白属于分泌性蛋白和跨膜蛋白,具有亲水性,有 8 个糖基化修饰位点、17 个丝氨酸(ser)、7 个苏氨酸(Thr)及 8 个酪氨酸(Tyr)磷酸化位点;氨基酸系统进化树分析表明,不同物种 *TLR4* 基因在进化过程中具有较高的保守性。该结果为进一步深入研究 *TLR4* 基因的功能奠定基础。

关键词:五指山猪;*TLR4* 基因;克隆;生物信息学分析

中图分类号:S828.1;Q785 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2019)08-0041-05

Toll 样受体 4(toll-like receptor 4, TLR4)是一种模式识别受体,其可特异性地识别革兰氏阴性菌表达的脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)或脂质 A(LPS 的活性成分),快速启动免疫反应,诱导各种炎性介质释放,激活相关免疫细胞来抵抗微生物的入侵,在动物机体的免疫反应和炎症等方面起重要作用^[1]。目前,*TLR4* 基因在免疫和感染领域研究较热。大量研究表明,*TLR4* 基因的缺失或突变可能会诱发细胞对 LPS 的反应性减弱或丧失,导致机体对疾病易感性增加。如 *TLR4* 基因缺失会加重慢性阻塞性肺炎患者的肺损伤^[2];近端肿瘤和转移性疾病的发生与 *TLR4* 基因的突变相关^[3]; *TLR4* 基因突变会增加儿童患慢性肾盂肾炎的风险^[4]。

海南五指山猪是重要的试验动物资源之一,也是国家试验用小型猪种质资源中心的首选猪种,社会、经济价值颇高。目前,尚未见到关于海南五指山猪 *TLR4* 基因克隆和相关功能结构预测的研究报道。因此,本研究于 2016 年 6 月以五指山猪为研究对象,利用克隆测序方法寻找五指山猪 *TLR4* 基因中的突变位点,并利用生物信息学软件对其序列进行分析和功能预测,为进一步研究五指山猪 *TLR4* 的功能及其基因遗传变异与免疫疾病的关系提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物与样本采集

收稿日期:2017-11-21

基金项目:国家自然科学基金(编号:31560696);海南省农业科学院农业科技创新专项(编号:CXXZ201504);海南省自然科学基金(编号:20153080)。

作者简介:黄丽丽(1971—),女,海南陵水人,畜牧师,研究方向为抗病育种。E-mail:17732440@qq.com。

通信作者:张艳,博士,副研究员,研究方向为动物疫病防治研究。E-mail:zy79818_0@163.com。

畜牧兽医所永发猪场的五指山猪作为研究对象,采集血液样品后,于 -20℃ 保存于海南省农业科学院畜牧兽医所实验室备用。

1.1.2 主要试剂 血液基因组 DNA 提取试剂盒、PCR 产物纯化回收试剂盒、重组质粒抽提试剂盒,均购自天根生化科技(北京)有限公司;Ex Taq DNA 聚合酶、T₄ DNA 连接酶、EcoR I、Hind III、pMD18-T 载体试剂盒,均购自宝生物工程(大连)有限公司;克隆宿主菌 JM109,由海南省农业科学院畜牧兽医所实验室提供。

1.1.3 引物设计与合成 根据 GenBank 中 *TLR4* 基因序列(登录号为 AY753179.1)设计合成 11 对引物(表 1),由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取 按照血液基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取基因组 DNA,取部分 DNA 样品稀释至 100 ng/μL, -20℃ 保存备用。

1.2.2 PCR 扩增 PCR 扩增体系为:DNA 模板 2.0 μL,10×PCR Buffer(不含 Mg²⁺)2.5 μL,dNTP Mixture(2.5 mmol/L)2.0 μL,MgCl₂(25 mmol/L)2.0 μL,Ex Taq 聚合酶(5 U/μL)0.5 μL,P₁(10 pmol/L)0.5 μL,P₂(10 pmol/L)0.5 μL,无菌去离子 H₂O 15 μL。PCR 反应程序为:95℃ 预变性 4 min;94℃ 变性 50 s,退火 50 s(退火温度见表 1),72℃ 延伸 2 min,30 个循环;最后 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.3 基因克隆及序列测定 利用胶回收试剂盒回收纯化 PCR 产物,将其连接到 pMD18-T easy 载体,再转化至 JM109 感受态细胞后,涂布含有 IPTG、X-gal 和氨苄青霉素的平板,37℃ 培养,挑取白斑接种于 LB 培养基中增菌培养后,经菌液 PCR 和酶切鉴定正确的送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.2.4 生物信息学分析 利用 DNAMAN 软件对 DNA 序列进行比对拼接;应用 NCBI 的 ORF Finder 程序寻找序列的开

表 1 *TLR4* 引物信息

引物名称	引物序列 (5'→3')	退火温度 (℃)	目的片段大小 (bp)
P1	GAAAGCCACCGTCCCA;CCCGGAGAAAGCATGACC	61	370
P2	AAGTCCAGAATGCGAAGG;AGGATCTGCCCCAGAGTG	61	1 406
P3	GGCAGGGTCAGAAACTC;GGAAGAGGGCACAGCAA	60	1 477
P4	GCCTCTAGTTTCCTATGC;GCACCCTAACAGACTTCC	59	1 960
P5	ACCAAGGCAGCATCAA;CTGTCCTCTACCTCACTTT	61	1 428
P6	GACAACATCCCCACATCAGT;CAGAATCTCCTCTGGCTAA	60	1 661
P7	AGTGTGCTTCAACTCCC;GACGCTAGGTTTGTCTCAA	60	1 618
P8	AACTCCAGTCCACCCA;GAACCAGCCAGACCTTG	59	1 284
P9	CTGGTTGCCGTTGAGAC;GAGGAGTGGAGTGGTTTA	59	1 248
P10	CATGGGCTTAGAGCAACTA;TGATCTCGGGCATCACTG	59	1 396
P11	GGTGTCCCAGCACTTCATA;ACCTGACCCACAGTAACCC	61	1 433

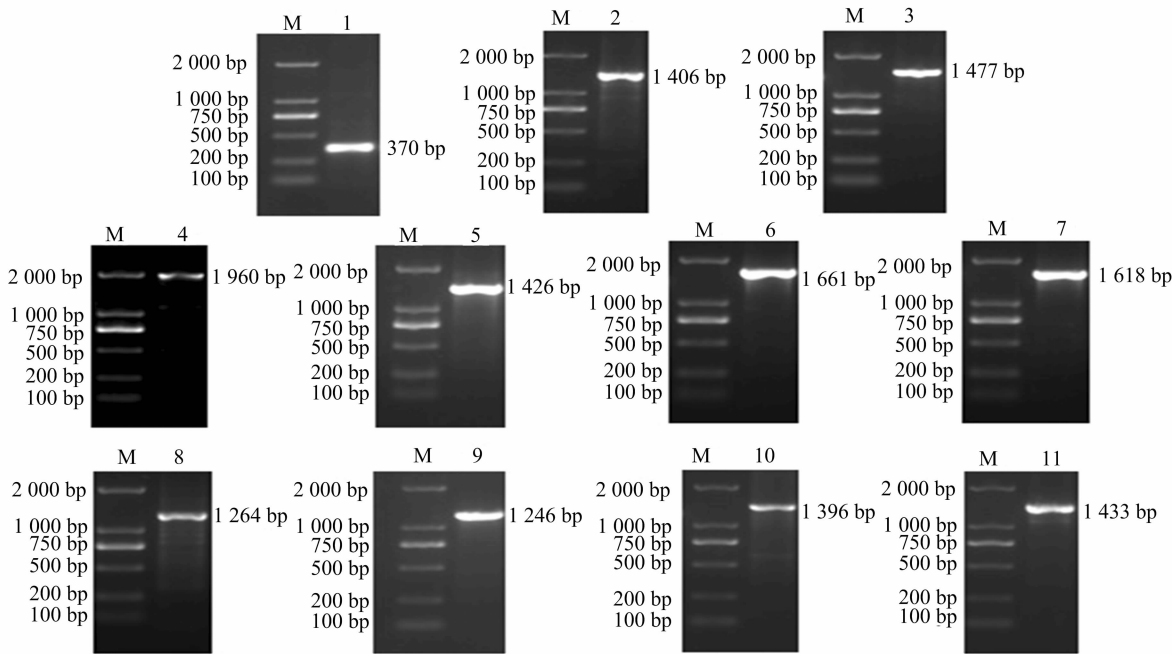
放阅读框;利用 MEGA(6.0) 软件构建系统发育进化树;利用 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 程序、Protscale 软件、NetPhos 2.0 TMHMM 程序、NetNGlyc (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) 程序分析蛋白的特性,利用 Signal P 4.1 Server 程序预测信号肽;利用 TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 软件预测跨膜结构域;利用 SOPMA 程序 (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)、SWISS-

MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) 分析蛋白的结构;通过 PSORT II 程序进行亚细胞定位。

2 结果与分析

2.1 五指山猪 *TLR4* 基因的克隆

使用 11 对引物扩增五指山猪 *TLR4* 基因,分别获得长度为 370、1 406、1 477、1 960、1 428、1 661、1 618、1 284、1 248、1 396、1 433 bp 的 DNA 序列(图 1)。



M—DNA 标准 DL 2 000; 1~11—五指山猪 P₁~P₁₁ 引物的扩增片段

图 1 *TLR4* 基因 PCR 扩增片段电泳检测结果

2.2 五指山猪 *TLR4* 基因组序列分析

测序拼接后获得全长为 10 435 bp 的五指山猪 *TLR4* 基因 DNA 序列,其中 CDS 长 2 526 bp,编码 841 个氨基酸(图 2)。与 GenBank 发布的普通猪 *TLR4* 基因序列相比,存在 38 处突变(表 2);其中在 CDS 区序列存在 2 处突变,1 处为无义突变,在 7 779 位点由 G 突变为 A,不引起氨基酸变化;另 1 处为有义突变,7 781 位点由 G 突变为 A,氨基酸由精氨酸变为组氨酸。

2.3 五指山猪 *TLR4* 氨基酸序列的同源性比对及系统进化

树构建

由图 3 可知,五指山猪 *TLR4* 基因氨基酸序列同 GenBank 中已发布的普通猪(登录号 AAW82895.1)、牛(登录号 NP_776623.5)、绵羊(登录号 NP_001129402.1)的氨基酸序列的同源性较高,分别为 99.9%、80.7%、79.9%;与犬(登录号 NP_001002950.2)、马(登录号 NP_001093239.2)、猕猴(登录号 NP_001032169.1)、人(登录号 NP_003257.1)、黑猩猩(登录号 BAG55036.1)、小鼠(登录号 NP_067272.1)的同源性稍低,分别为 74.8%、74.7%、73.1%、73%、72.7%、

```

1  ATGATTCTCGCATCCGCTGGCTGTGGCCACGATCCCAGCCATGGCCTTTCTCTCTGCCTGAGATCTGAGAGCTGGGACCCT
M I P R I R L A V A T I P A M A F L S C L R S E S W D P
85  TCGGTGACAGGTGGTTCTAACATTAGTTACCAATGCATGGAGCTGAATTTCTACAAAATCCCTGACAACATCCCCACATCAGTC
C V Q V V P N I S Y Q C M E L N F Y K I P D N I P T S V
169  AAGATACTGGACCTGAGCTTTAACTACCTGAGTCATTTAGACAGCAATAGCTTCTCCAGCTTTCAGAACTGCAGGTGCTGGAT
K I L D L S F N Y L S H L D S N S F S S F P E L Q V L D
253  TTATCCAGATGAAATTCAGCAATTGACGATGCATATCAGGGCCTAAATTACCTTCCACCTTGATACTGACGGGAAAT
L S R C E I Q T I D D A Y Q G L N Y L S T L I L T G N
337  CCTATCCAGAGTTTAGCCCTGGGAGCCTTTTCTGGACTACCAAGTTACAGAAAGCTGGTGGCCCTTGAGACAAACCTAGCGTCT
P I Q S L A L Q A F S G L P S L V Q K L V A V E T N L A S
421  CTAGAGGACTTCCCCATTGGACATCTTAAACCTTGAAGGAGCTTAATGTGGCTCACAATCATATCCATTCTTTCAAGTTACCT
L E D F P I G H L K T L K E L N V A H N H I H S F K L P
505  GAATATTTTCTAACCTGCCAACCTGGAGCATTGGATCTTTCTAAGAACAAAATCGAAAATATTTATCATGAACACTTGCAG
E Y F S N L P N L E H L D L S K N K I E N I Y H E H L Q
589  GTTCTACATCAAGTGCCCTACTCAATCTCTCTTAGACTGTGCCTGAACCTTTAACTTTTATGAACAGGCTGCCCTTTAAC
V L H Q V P L N L N L S L D L S L N P L N P I E P G A F N
673  AAAATTAGGCTCAATGGATTGACTTTTGGAGAATTTTAAATAGTTTCGGATGTAATGAAACTTGATTCAAGGTCTGGCTGGT
K I R L N G L T L R S N F N S S D V M K T C I Q G L A G
757  TCAAAAATCAATCAGTTGGTTTGGGAGAATTTAAAAATGAAAGAACTTGGAAAAGTTTGACAAATCTGCTCTGGAGGAAGT
S K I N Q L V L G E F K N E R N L E S F D K S V L E E L
841  TGCAATTTGACCTTGAACAGTTCGGATAGCACACTTGGTGTAATCCAGATGATGTTTCTGACTTATTTAATGTGTGGCA
C N L T L E Q F R I A H F G E F P D D V S D L F N C L A
925  AATGCCTCTGTGATTTCTGTGTGAGTCTGAATTTACATGGTCTAGAAGCCCTTCTAATGATTTACAGGTGGCAACACTTAGAA
N A S V I S L L S L N L H G L E A L P N D F R W Q H L E
1009  GTGGTTAACTGAACTTAAACAATTTCTGCAATGAAGTCAACTCTCTCAAAAAGTTTGTGTTTCAAGACAATAAACATATG
V V N C K L K Q F P A L K F N S L K K F V F K D N K H M
1093  CACACTTTTACTGAAATTAACCTGCCAAACCTTCAGTTTCTAGATCTCAGTGGAAATCACTTGAGCTTTAAAGGTTGCTGTCT
H T F T E I N L P N L Q F F L D L S G N H L S F G K C C S
1177  CACAATGAATTTGGGACAACCAACTGAAGCATTAGATCTGAGCTTCAATGAAATCATACCATTGAAGTCAAACTTCATGGGC
H N E F G T T K L K H L D L S F N E I I T M K S N F M G
1261  TTAGAGCAACTAGATATCCAGTATTCAGCATTCCAGTTTGAACAGGCTAATGACTTTTCCATATCTATCATCAGAAAC
L E Q L E Y L D F Q H S S L K Q A N D F S I F L S L R N
1345  CTCCATTACCTGATATTTCTTATACTAATCCAGTTGTCTTCGTTGGCATTGTTGCTGGCTTGGTCAGCCTCCAAACCTTG
L H Y L D I S Y T N I H V V F R G I F A G L V S L Q T L
1429  AAAATGGCTGCAATTTTTCAGAACCACTTGCTTCTGATGCTTTCACAGATCTGACTAACTTAATCCTCTGGACCTCTCT
K M A G N S F Q N N L L P D V F T D L T N L I L L D L S
1513  AAGTGTCAACTGGAACAGGTATCCAGAGGGCATTTCATTCCTCCCTAGGCTTCAGGTGCTAAATATGAGTCACAACAGACTC
K C Q L E Q V S Q R A F H S L P R L Q N M S H N R L
1597  TTGTCTTGGATCACTTCTTATAAACCACTCCACTCCCTCAGGATTCTGGATTGAGTTACAATCTTATCGTGGCCTCCAAG
L F L D T L P Y K P L H S L R I L D C S Y N L I V A S K
1681  GAACAAGAATACAGATCTGCCAAGGAGCCTAGCTTTTAAATCTCACTAAGAATGACTTTTCTTGCGGTGGAACACAG
E Q E L Q H L P R S L A F L N L T K N D F S C A C E H Q
1765  ACTTTCTTGCAGTGGGTCAAGGACCAGAAGCAGCTCTTGTGGGAGCTGAGCAATGGTGTGTACACAACCTTTAGAAATGCG
T F L Q V V K D Q K Q L L V G A E Q M V C Q P L E F M Q
1849  GACCTGCTGTGCTGAGTTTCAGGAACGCCACCTGTCAGATAAGCGAGGCCGTCATTAGTCGTCAGTTCTCACCTTCTCTCTG
D L P V L S F R N A T C Q I S E A V I S A S V L T F L L
1933  GTATCTGTGGCAGGAATCTGGTCTATAAGTTCTATTTCACCTTGTGCTTTTGTGGGCTGCAAAAAATATGGCAGAGGTGAA
V S V A G I L V Y K F Y F H L L L F V G C K K Y G R G E
2017  AGCACCTATGACGCCTTTGTTATCTACTCCAGCCAGGACGAAGACTGGGTGAGGAATGAAGTAAAGAAGCTTGGAGAGGGG
S T Y D A G I Y S S Q D E D W V R N E L V K N L E E G
2101  GTGCCCCCTTTTCTCTGCTTCACTACAGAGACTTCATTCCCGTGTGGCCATCGCTGCTAACATCATCCAGGAAGGTTTC
V P P F H L C L H Y R D F I P G V A I A A N I I Q E G F
2185  CACAAAAGTCGGAAGGTTATTGCTGTGGTGTCCAGCACTTCATACAGAGCCGATGGTGATCTTTGAGTATGAGATTGCCCCG
H K S R K V I V V V S Q H F I Q S R W C I F E Y E I A Q
2269  ACCTGGCAGTTTCTGAGGAGTCATGCCGGCATCATCTTCATCGTCTGCGAGAAGTTGGAGAAGTCCCTGCTGCGGCAGCAGGTG
T W Q F L R S H A G I F I V L Q K L E K S L L R Q Q V
2353  GAGCTGTATCGCCTTCTCAGCAGGAATACCTACCTGGAGTGGGAGGACAGCGTCTGGGGCGGCACATCTTCTGGAGACGACTCAAG
E L Y R L L S R N T Y L E W E D S V L G R H I F W R R L K
2440  AAAGCCTTGTGGAATGTAACCATGGAGTCCAGAAAGCAAGAGGATTGAGAAAGCAACCCAGATGATACCAACAGCAGCTTCACTTAA
K A L L D G K P W S P E G T E D S E S N Q H D T T A F T *

```

图2 五指山猪 *TLR4* 基因 CDS 区核苷酸与编码氨基酸序列

62.5%；与鸡（登录号 ACR26315.1）的同源性最低，为 43.4%。采用 MEGA 6.0 软件的 NJ 法系统构建进化树，结果（图 3）显示，五指山猪 *TLR4* 基因与普通猪的亲缘关系最近，随后依次是绵羊、牛、犬、马、猕猴、人、黑猩猩、小鼠和鸡。

2.4 五指山猪 TLR4 蛋白理化特性分析

经 ProtParam 软件在线预测显示，五指山猪 TLR4 蛋白分子量为 96 312.93 u，等电点为 6.12，分子式为 $C_{4378}H_{6808}N_{1146}O_{1241}S_{30}$ 。其氨基酸组成及比例分别为：丙氨酸（Ala, 4.4%）、精氨酸（Arg, 3.4%）、天冬酰胺（Asn, 6.7%）、天冬氨酸（Asp, 4.6%）、半胱氨酸（Cys, 2.3%）、谷氨酰胺（Gln, 5.2%）、谷氨酸（Glu, 5.7%）、甘氨酸（Gly, 3.7%）、组氨酸（His, 3.9%）、异亮氨酸（Ile, 5.6%）、亮氨酸（Leu, 16.1%）、赖氨酸（Lys, 5.1%）、甲硫氨酸（Met, 1.3%）、苯丙

氨酸（Phe, 6.7%）、脯氨酸（Pro, 3.7%）、丝氨酸（Ser, 8.6%）、苏氨酸（Thr, 3.8%）、色氨酸（Trp, 1.1%）、酪氨酸（Tyr, 2.5%）、缬氨酸（Val, 5.7%）、吡咯赖氨酸（Pyl, 0.0）、硒半胱氨酸（Sec, 0.0）。SignalP-4.1 软件预测发现，五指山猪 TLR4 蛋白有信号肽序列，说明其为分泌性蛋白（图 5-A）。经 Prot Scale 软件分析发现，五指山猪 TLR4 蛋白 841 个氨基酸当中疏水性氨基酸最大值为 2.811，亲水性氨基酸最小值为 -2.867，大多数氨基酸为亲水性，属于亲水性蛋白（图 5-B）。利用 Tmhmm 软件分析发现，五指山猪 TLR4 有 1 个跨膜区，属于跨膜蛋白（图 5-C）。

2.5 五指山猪 TLR4 蛋白结构预测

应用 SOPMA 程序预测五指山猪 TLR4 蛋白的二级结构发现，五指山猪 TLR4 蛋白主要由 α -螺旋（47.44%）、延伸

表 2 猪 TLR4 基因中的突变位点

序号	突变类型	突变位置 (bp)	五指山猪	普通猪
1	A/G 突变	359	G	A
2	A/C 突变	910	A	C
3	A/C 突变	951	A	C
4	C/T 突变	959	T	C
5	A/G 突变	960	G	A
6	C/T 突变	986	T	C
7	A/G 突变	1 012	A	G
8	A/G 突变	1 014	A	G
9	增加 G	1 017	G	
10	A/G 突变	1 031	G	A
11	C/T 突变	1 460	T	C
12	C/T 突变	1 662	C	T
13	A/G 突变	1 820	G	A
14	A/G 突变	1 991	A	G
15	A/G 突变	2 054	G	A
16	A/G 突变	2 059	G	A
17	A/G 突变	2 082	A	G
18	A/T 突变	2 119	T	A
19	G/T 突变	2 125	T	G
20	G/T 突变	2 194	G	T
21	A/G 突变	2 222	A	G
22	G/T 突变	2 256	T	G
23	A/G 突变	2 494	G	A
24	C/T 突变	2 568	C	T
25	A/T 突变	2 608	T	A
26	C/T 突变	2 630	T	C
27	A/T 突变	2 643	A	T
28	A/T 突变	2 673	A	T
29	A/G 突变	2 682	A	G
30	C/T 突变	4 554	T	C
31	C/T 突变	4 762	C	T
32	A/G 突变	5 091	G	A
33	A/G 突变	7 779	A	G
34	A/G 突变	7 781	A	G
35	A/G 突变	9 848	A	G
36	G 缺失	10 359	—	G
37	T 缺失	10 421	—	T
38	A 缺失	10 422	—	A

链(17.36%)、β-转角(8.44%)和无规则卷曲(26.75%)组成(图6)。利用 SWISS-MODEL 在线软件对五指山猪 TLR4 蛋白的三级结构预测后发现,TLR4 蛋白主要由 α-螺旋和无

规则卷曲组成(图7),与二级结构预测结果相符。

2.6 五指山猪 TLR4 蛋白亚细胞定位、磷酸化和糖基化位点预测及功能预测分析

定位分析发现,五指山猪 TLR4 蛋白在内质网、线粒体、膜泡分泌系统、细胞质、细胞外基质、质膜中均有分布,其比例分别为 33.30%、22.20%、11.10%、11.10%、11.10%和 11.11%,其中在内质网中分布最多。磷酸化分析显示,五指山猪 TLR4 蛋白存在 17 个丝氨酸(ser)、7 个苏氨酸(Thr)和 8 个酪氨酸(TYR)磷酸化位点。糖基化位点分析表明,五指山猪 TLR4 蛋白存在 8 个糖基化修饰位点,分别位于氨基酸序列的第 35、第 205、第 238、第 282、第 309、第 526、第 575 和第 625 位。

3 讨论与结论

TLR4 在天然免疫系统调节、炎症和组织损伤修复中发挥关键作用,不仅可以识别细菌脂多糖,还可被损伤诱发的内源性介质激活^[5]。虽然大量研究都选择 *TLR4* 基因作为抗病的候选基因进行研究,但 *TLR4* 基因的变异与疾病的确切关系还不清楚。

本研究采用 PCR 法克隆了五指山猪的 *TLR4* 基因,序列分析结果显示,五指山猪 *TLR4* 基因 DNA 序列长 10 435 bp,其中 CDS 长为 2 526 bp,共编码 841 个氨基酸。与 GenBank 发布的普通猪 *TLR4* 基因序列相比,存在 38 处突变;其中在 CDS 区序列存在 2 处突变(1 处为无义突变,另 1 处为有义突变,氨基酸由精氨酸变为组氨酸),说明五指山猪与普通猪 *TLR4* 基因的生物學功能可能存在一些差异。同源性分析结果显示,五指山猪 *TLR4* 基因氨基酸序列同普通猪、牛、绵羊、犬、马、猕猴、人、黑猩猩、小鼠和鸡的同源性分别为 99.9%、80.7%、79.9%、74.8%、74.7%、73.1%、73.0%、72.7%、62.5%、43.4%,说明 *TLR4* 基因在不同物种间相对保守,但仍存在着一定的种属特异性。

蛋白质的功能与其空间结构有密切关系^[6]。研究分析发现,五指山猪 TLR4 蛋白主要由 α-螺旋和无规则卷曲组成。其中 α-螺旋是蛋白质中常见的、含量也最丰富的二级结构原件,而无规则卷曲通常会构建成特性功能部位或是酶活性部位^[7]。五指山猪 TLR4 蛋白有信号肽序列,说明其为分泌性蛋白;有 1 个跨膜区,说明其为跨膜蛋白,可能参与信号传导;蛋白中有许多亲水性氨基酸,因而该蛋白也具有亲水性。

磷酸化和糖基化是生物体蛋白质翻译后常见的修饰方式,广泛参与调节许多生命活动^[8-9],如干扰机体对抗原的应

同源性(%)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		
1	—	99.9	72.7	79.9	62.5	73.1	73.0	43.4	74.7	74.8	80.7	1	五指山猪
2	0.1	—	72.7	79.9	62.5	73.1	73.0	43.4	74.7	74.8	80.7	2	普通猪
3	33.4	33.4	—	74.4	65.6	94.1	99.6	43.7	76.5	73.2	75.7	3	黑猩猩
4	23.3	23.3	31.3	—	63.4	74.3	74.7	43.6	77.3	76.7	95.1	4	绵羊
5	49.2	49.2	42.9	47.2	—	66.5	65.8	42.2	65.5	63.1	64.3	5	小鼠
6	32.7	32.7	6.2	30.6	41.4	—	92.6	43.8	76.8	73.2	75.2	6	猕猴
7	33.0	33.0	0.4	30.7	42.6	6.1	—	44.9	76.3	72.7	76.0	7	人
8	93.9	93.9	91.2	92.6	97.6	92.9	87.6	—	44.1	44.5	43.9	8	鸡
9	30.1	30.1	26.8	26.5	44.1	26.8	27.0	90.4	—	78.9	77.5	9	马
10	30.3	30.3	32.3	27.5	47.7	32.4	32.2	90.5	24.4	—	76.8	10	犬
11	22.2	22.2	29.2	4.9	45.7	29.5	28.7	91.9	25.8	27.4	—	11	牛
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		

图3 不同物种 TLR4 氨基酸序列同源性比对结果

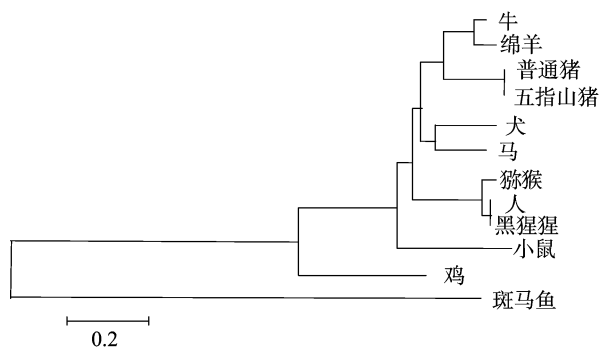


图4 TLR4 蛋白的进化树分析 (NJ法)

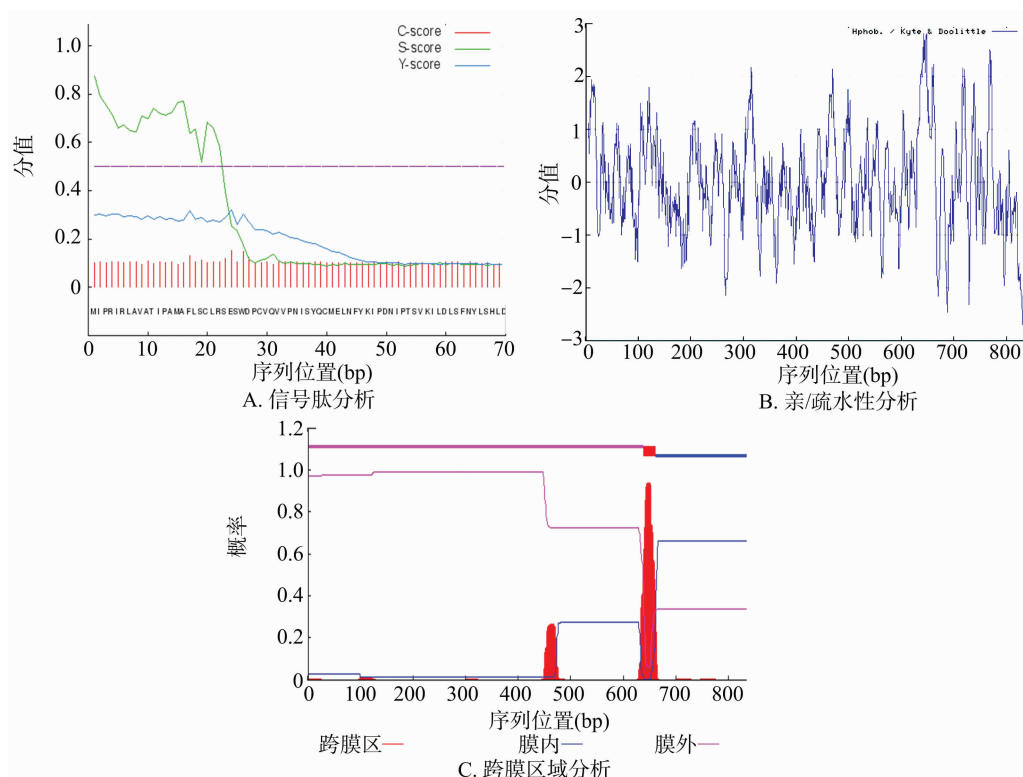


图5 五指山猪 TLR4 蛋白的信号肽、亲/疏水性和跨膜区域分析

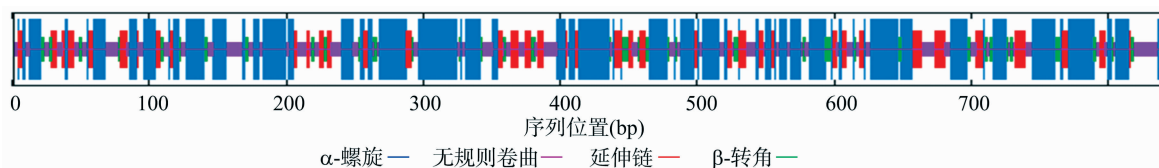


图6 五指山猪 TLR4 蛋白二级结构分析

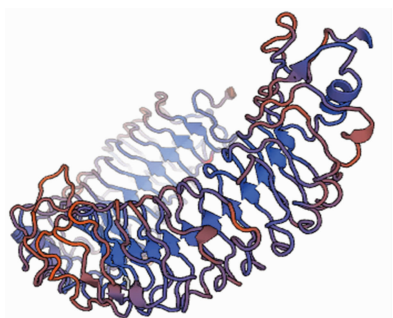


图7 五指山猪 TLR4 蛋白三级结构分析

答反应,影响病毒的体外增殖^[10]。对五指山猪 TLR4 蛋白进行磷酸化和糖基化位点分析后发现,五指山猪 TLR4 蛋白存在 17 个丝氨酸、7 个苏氨酸和 8 个酪氨酸磷酸化位点,有 8 个糖基化修饰位点,但这些磷酸化和糖基化修饰位点对该基因的作用内容还须进一步深入研究。

参考文献:

- [1] Zhou Y, Li Y B, Zhou B, et al. Inflammation and apoptosis: dual mediator role for toll - like receptor 4 in the development of necrotizing enterocolitis [J]. Inflammatory Bowel Diseases, 2017, 23 (1): 44 - 56.

- [2] Knobloch J, Chikosi S J, Yanik S, et al. A systemic defect in Toll - like receptor 4 signaling increases lipopolysaccharide - induced suppression of IL - 2 - dependent T - cell proliferation in COPD [J]. American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology, 2016, 310 (1): L24 - L39.
- [3] Elliott D R, Pernier J, Li X A, et al. Impact of mutations in Toll - like receptor pathway genes on esophageal carcinogenesis [J]. PLoS Genetics, 2017, 13 (5): e1006808.
- [4] Harshman V P, Kryuchko T O, Kolenko I O, et al. Role of genetic mutations in development of immunological and clinical disorders in children with chronic pyelonephritis [J]. Wiadomosci Lekarskie, 2017, 70 (1): 47 - 51.