

李强子, 朱国强, 刘吴鑫, 等. 荷斯坦牛 *TLR6* 基因 CDS 区的生物信息学分析[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(3): 608-614.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2016.03.019

荷斯坦牛 *TLR6* 基因 CDS 区的生物信息学分析

李强子, 朱国强, 刘吴鑫, 刘丽霞, 张 丽

(西北民族大学生命科学与工程学院, 甘肃 兰州 730030)

摘要: 采用生物信息学方法分析和预测了荷斯坦牛 *TLR6* 基因编码蛋白质的理化特性、结构功能及其同源进化关系。结果表明, 荷斯坦牛 *TLR6* 基因编码 793 个氨基酸, 组成蛋白为不稳定的水溶性蛋白, 二级结构为混合型, 三级结构由 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角和无规则卷曲组成。蛋白质功能显示信号转导、胁迫应答、免疫应答和生长因子的几率相对较高。荷斯坦牛 *TLR6* 基因氨基酸序列与牦牛的同源性较高。说明 *TLR6* 基因能在荷斯坦牛免疫应答和生长调节过程中发挥重要作用, 可能对牛的抗病力和生产性能起作用。

关键词: 荷斯坦牛; *TLR6* 基因; 生物信息学

中图分类号: S823.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2016)03-0608-07

Bioinformatics analysis of CDS of *TLR6* gene in Holstein cattle

LI Qiang-zi, ZHU Guo-qiang, LIU Wu-xin, LIU Li-xia, ZHANG Li

(College of Life Science and Engineering, Northwest University for Nationalities, Lanzhou 730030, China)

Abstract: In order to provide a theoretical basis for disease resistance molecular breeding and genetic screening of economic traits of cattle, the physical and chemical properties, the structure and function of the encoded product and homologous evolutionary relationships of *TLR6* gene in Holstein cattle were analyzed and predicted by means of bioinformatics. *TLR6* gene encodes 793 amino acids. The *TLR6* gene-encoded protein is a kind of instable and soluble protein, with mixed-type secondary structure and tertiary structure consisting of alpha helix, extended strand, beta turn and random coil. The *TLR6* protein was predicted to play a major role in signal transduction, stress response, immune response and growth factor. The amino acid sequence of Holstein cattle *TLR6* shared high homology with that of yaks. Due to its role in the immune response and growth adjustment process, *TLR6* gene may be responsible for disease resistance and production performance of Holstein cattle.

Key words: Holstein cattle; *TLR6* gene; bioinformatics

Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLRs) 是一类模式识别受体 (Pattern recognition receptors,

PRRs), 能在抗原入侵机体早期激活免疫细胞, 并使其识别病原相关分子模式 (Pathogen-associated molecular patterns, PAMPs), 进而启动免疫应答, 抵御病原体。TLRs 作为一种 PRRs, 不仅在天然免疫中起重要作用, 同时也被视为天然免疫与获得性免疫的“桥梁”。至今在动物中已发现 15 种 TLRs, 其中人类体内发现 11 个, 即 TLR1~TLR10 和 TLR14。小鼠不表达 TLR10, 但体内含有 TLR11~TLR13。而在鸡中发现了 TLR15^[1-4]。TLR6 作为 Toll 样受体家族一员, 主要通过激活抗原递呈细胞来对抗原做出

收稿日期: 2015-12-21

基金项目: 西北民族大学引进人才科研项目 (xbmuyjrc201316); 西北民族大学国家级大学生创新创业训练计划项目 (201510742084)

作者简介: 李强子 (1993-), 男, 河北赵县人, 本科, 主要从事分子生物学研究。 (Tel) 15751949497; (E-mail) lqz2015@sina.cn

通讯作者: 张 丽, (Tel) 13919959122; (E-mail) shiningstar2013@sina.cn

免疫应答^[5]。Vikki 等^[6]研究发现, *TLR6* 无法直接识别抗原, 需和 *TLR2* 聚合形成异嗜二聚体结构而增强 *TLR2* 对某些抗原 PAMPs 的识别。牛的 *TLR6* 基因位于第 6 号染色体上^[7]。Axford 等发现鼠的 *TLR6* 基因主要表达在脾等胸腺免疫器官中^[8]。林宝山等^[9]研究结果表明牦牛 *TLR6* 基因在所有组织均有表达, 但在脾脏中表达量最高。而奶牛 *TLR6* 基因的多态性也与乳腺炎抗性显著相关^[10-11]。

为深入探讨荷斯坦牛 *TLR6* 基因的性质和功能, 避免人工选育对该基因演化造成的差异, 本研究利用生物信息学方法从分子水平对荷斯坦牛 *TLR6* 基因序列结构及相关生物信息学特征进行预测和分析, 同时构建系统发育进化树, 为揭示该基因理化性

质、功能信息、遗传特性、相关生理机制以及荷斯坦牛的抗病育种提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 荷斯坦牛 *TLR6* 基因序列来源

从 GenBank 中查找获得牛 *TLR6* 基因的全长编码区序列 (Coding sequences, CDS) (GenBank no. NM_001001159)。

1.2 方法

对荷斯坦牛 *TLR6* 基因 CDS 编码产物的氨基酸序列、其蛋白质特性及功能结构域进行分析与预测所用各种工具软件与网址见表 1。

表 1 荷斯坦牛 *TLR6* 基因生物信息学主要分析软件
Table 1 The main softwares for the bioinformatics analysis of *TLR6* gene in Holstein cattle

名称	软件及网址
开放阅读框分析	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html
编码蛋白质理化性质分析	http://web.expasy.org/protparam/
编码蛋白质疏水性/亲水性分析	http://web.expasy.org/protscale/
编码蛋白质的 N-糖基化位点分析	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/
编码蛋白质二级结构预测	http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html
编码蛋白质三级结构	http://swissmodel.expasy.org/ 和 PyMOL 软件
编码蛋白质的信号肽跨膜区预测	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/
编码蛋白质的功能预测	http://www.cbs.dtu.dk/services/ProtFun/
同源系统发育进化树分析	DNAStar 软件中的 Meg Align 程序

2 结果与分析

2.1 荷斯坦牛 *TLR6* 基因的开放阅读框 (ORF)

阅读框是基因的编码区, 包含从起始密码子到翻

译终止密码子之间的 cDNA 序列, 而 ORF 的识别则是证明一个新的 DNA 序列为特定蛋白质编码基因的部分或全部的先决条件。荷斯坦牛 *TLR6* 基因 ORF 分析结果如图 1 所示, 基因编码区全长为 2 382 bp。

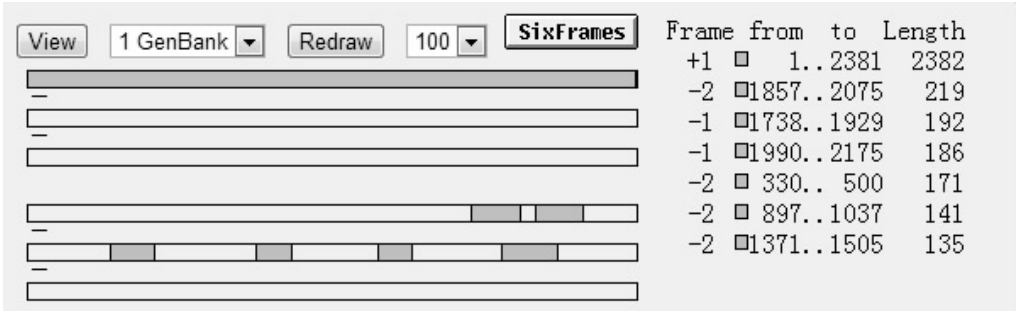


图 1 荷斯坦牛 *TLR6* 基因开放阅读框分析
Fig.1 The open reading frame of *TLR6* gene in Holstein cattle

2.2 荷斯坦牛 *TLR6* 基因编码蛋白质理化特性预测与分析

蛋白质的基本性质包括相对分子质量、氨基酸组成和等电点等,利用 Bioedit 及 Lasergene7.1 软件预测荷斯坦牛 *TLR6* 基因编码蛋白质理化特性(表 2)。荷斯坦牛 *TLR6* 基因编码 793 个氨基酸,20 种氨基酸所占比例见图 2,亮氨酸(Leu)最多,占整个氨基酸组成的 14.5%,甲硫氨酸(Met)和色氨酸(Trp)最少,分别占 1.4%。基因编码产物不稳定指数大于 40,表明该基因编码产物不稳定^[12]。

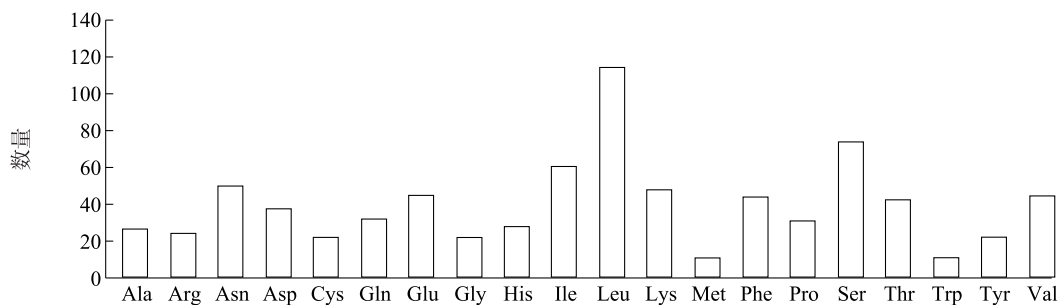


图 2 荷斯坦牛 *TLR6* 基因编码蛋白质氨基酸组成

Fig.2 The amino acids of the protein encoded by *TLR6* gene in Holstein cattle

2.3 荷斯坦牛 *TLR6* 基因编码蛋白质疏水性/亲水性预测和分析

运用 ExPASy 服务器上的 ProtScale 程序预测荷斯坦牛 *TLR6* 基因编码蛋白质的疏水性,结果(图 3)显示该蛋白质第 589 位异亮氨酸(Ile)疏水性最强(+3.400),第 766 位的谷氨酸(Glu)亲水性最强(-2.800)。整个编码产物中,亲水氨基酸占 59.02%,疏水氨基酸占 40.98%,平均分值为 -0.300,表现为亲水性,由此可推断荷斯坦牛 *TLR6* 基因编码的蛋白质是一种可溶性蛋白质。

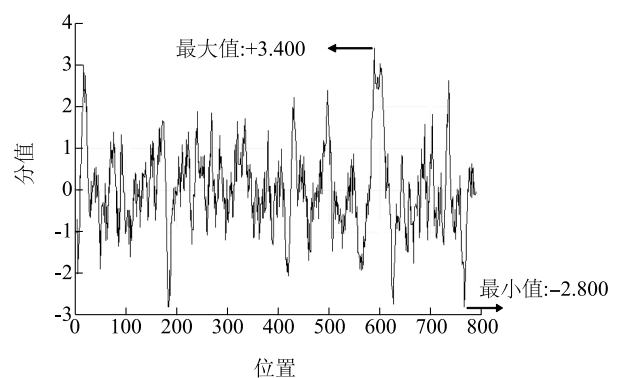
2.4 荷斯坦牛 *TLR6* 基因编码蛋白质 N-糖基化位点的预测和分析

蛋白质糖基化是指在蛋白质合成的同时或合成后,在酶的催化下寡糖链被连接在特定的糖基化位点,形成糖蛋白。蛋白质糖基化是真核生物蛋白质翻译后加工的重要修饰之一,蛋白质糖基化修饰对蛋白质折叠、分选及其定位有重要影响,糖链结构不同还将影响蛋白质的半衰期和降解。利用 CBS 在

表 2 荷斯坦牛 *TLR6* 基因编码蛋白质理化特性

Table 2 The physico-chemical properties of the protein encoded by *TLR6* gene in Holstein cattle

蛋白质基本性质	预测结果
负电荷残基总数(Asp + Glu)	83
正电荷残基总数(Arg + Lys)	72
分子式	C ₄₁₂₈ H ₆₄₆₆ N ₁₀₆₂ O ₁₁₈₁ S ₃₃
分子质量	1.287×10 ⁴
编码产物不稳定指数	40.96
理论等电点	6.22
半衰期(h)	30

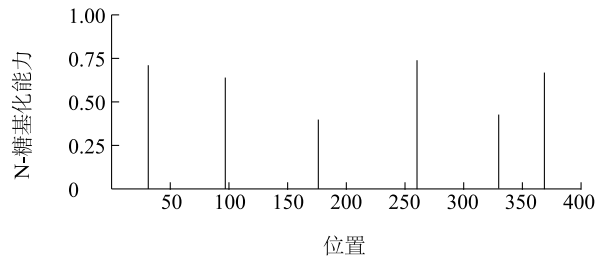
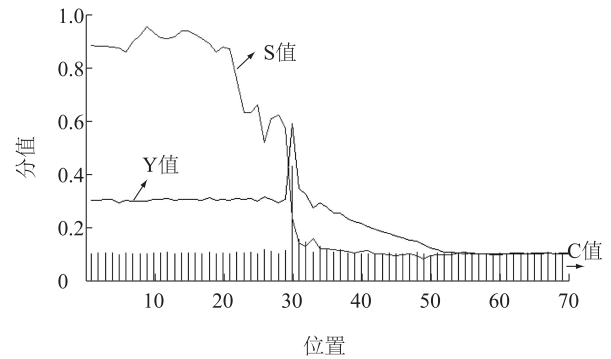


纵坐标正值表示疏水,负值表示亲水。

图 3 荷斯坦牛 *TLR6* 基因编码蛋白质的疏水性预测

Fig.3 Hydrophobic prediction of the *TLR6*-encoded protein in Holstein cattle

线分析软件 NetNGlyc 1.0 对 *TLR6* 的 N-糖基化位点进行预测(图 4)。荷斯坦牛 *TLR6* 基因编码蛋白质具有 6 个潜在的 N-糖基化位点,分别为 Asn31、Asn96、Asn176、Asn260、Asn330、Asn369。

图4 荷斯坦牛 *TLR6* 基因编码蛋白质 N-糖基化位点预测Fig.4 N-glycosylation site prediction of *TLR6*-encoded protein in Holstein cattle图5 荷斯坦牛 *TLR6* 基因编码蛋白质信号肽分析Fig.5 The signal peptide prediction of *TLR6*-encoded protein in Holstein cattle

2.5 荷斯坦牛 *TLR6* 基因编码蛋白质信号肽分析

信号肽位于蛋白质 N 端,一般由 16~26 个氨基酸残基组成^[13]。信号肽可引导蛋白质肽链穿过内质网进入腔内,对蛋白质进行定位。根据运输方向不同可将信号序列分为核信号、引导肽和信号肽,而信号肽引导内膜系统的蛋白质运输,并在蛋白质翻译完成后被切下。荷斯坦牛 *TLR6* 基因编码蛋白质信号肽分析结果(图 5)显示,*TLR6* 基因编码蛋白质的分值曲线较为典型,其中 C 值和 Y 值趋向于+1, S 值在剪切位点之前较高而在剪切位点之后变低。其切割点位于 29~30 位的氨基酸之间,可以判定荷斯坦牛 *TLR6* 基因编码蛋白质存在信号肽。

2.6 荷斯坦牛 *TLR6* 基因编码蛋白质二级结构和三级结构预测与分析

蛋白质的二级结构是指多肽链主链折叠产生的

由主链内和主链间周期性氢键维系的有规则构象,这些构象借助各种次级键共同构成其三级结构。蛋白质的结构决定其功能,而对蛋白质高级结构的预测和分析对了解蛋白结构与功能之间的相关性有着极其重要的意义。荷斯坦牛 *TLR6* 基因编码蛋白质二级结构预测结果(图 6)显示,二级结构组分中 α -螺旋(Hh)占 42.50%, β -折叠(Ee)占 21.94%, β -转角(Tt)占 7.06%,无规则卷曲(Cc)占 28.50%。其中 Hh<45%,Ee>20%,因此判断荷斯坦牛 *TLR6* 基因编码蛋白质二级结构为混合型^[14]。其三级结构见图 7。

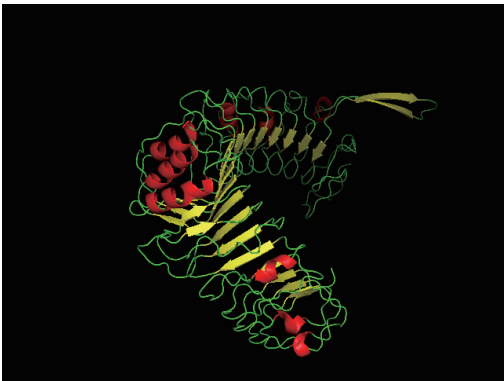
2.7 荷斯坦牛 *TLR6* 基因编码蛋白质的功能预测

荷斯坦牛 *TLR6* 基因编码蛋白质的功能预测见

```
MIKDKESPIRSCHFVYIYVALVFGTIIQFSDSESEFVVDMSKTSLIHVPKDLPPKTKVLDLSQNNISELHLS
eettcccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccc
DISFLSGLRVLRLSHNRIQGLDISIFKFNHDLLEYLDLSHNQLQKISCHPITTTLKHLDLSFNDFDALPIC
hhhhhtthcccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccc
KEFGNLQTLNFGLSATKLQQLDLLPIAHLHLSCILLDLEDYMKENKESLQILNTKKLHLVFHPNSFFS
hhhtcccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccc
VQVDISGNSLACLQLTNIKLNDYNCQVLLKFLSGLTGGPTLLNFTLNHVEITWVCLVKVFQFLWPKPIEY
eetttcccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccc
LNIYNLTIVESIDEVFTYYKTTLKALKIEHITNKVFIQSQTALYTVFSEMMILMLTISDTRFIHMLCPQ
hcccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccc
EPSTFKFLNFTQNSFTDSVFQNCDTLARLETILQKNELKDLFKTSLMTKDMLSLETLDVSWNSLEYDRS
cccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccc
NGMCSWVGSIIVLNLSSNALTDVFRCLPPRIKVLDLHNNRIRSIKPDVTGLETLQELMLASNSLAHLPG
ttcccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccc
CGIFSSLSILIEHNSISNPSADFFQSCQKIRSLKAGNPFQCSCELRDFIQSVGQVSSDVVEGWPESEYK
cccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccc
CDYPESYKGTPLKDFQVSELSNTALLIITIVVPLVLAVAVTVLCIYLDLPWYLRMVCQWTQTRRRARN
ttcccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccc
VPLEELQRTLQFHAFISYSEHDSAWVKNELIPNLEKEDIRICLHERNFVAGKSIVENIINCIEKSYKSIF
cccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccc
VLSNPFVQSEWCHYELYFAHNLPHFEGSDNLILILLDIPQYSIPSSYHKLALMAQRTYLEWPKEKSKH
ecccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccc
GLFWANLRASINTIKLMEKAAEIH
cccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccc
```

H: α -螺旋;e: β -折叠;t: β -转角;c:无规则卷曲。

图6 荷斯坦牛 *TLR6* 基因编码蛋白质二级结构预测Fig.6 The prediction of secondary structure of *TLR6*-encoded protein in Holstein cattle



红色代表 α -螺旋;绿色代表无规则卷曲;黄色代表 β -折叠。

图 7 荷斯坦牛 *TLR6* 基因编码蛋白质三级结构预测

Fig.7 The prediction of the tertiary structure of *TLR6*-encoded protein in Holstein cattle

表 3。该蛋白质信号转导、胁迫应答、免疫应答和生长因子的几率相对较高,分别为 1.271、2.534、1.447 和 2.857,这表明 *TLR6* 基因在荷斯坦牛免疫应答和生长调节过程中发挥重要作用,能对牛的抗病力和生产性能起作用。

表 3 荷斯坦牛 *TLR6* 基因编码蛋白质的功能预测

Table 3 Function prediction of the protein encoded by *TLR6* gene in Holstein cattle

功能	几率
信号转导	1.271
受体	0.047
荷尔蒙	17.538
结构蛋白	0.107
运载体	0.394
离子通道	1.386
电压门控离子通道	0.136
阳离子通道	0.217
转录	0.242
转录调控	0.248
胁迫应答	2.534
免疫应答	1.447
生长因子	2.857
金属离子转移	0.056

2.8 荷斯坦牛 *TLR6* 基因编码产物及系统发育分析
利用 MegAlign4.0 软件对荷斯坦牛、绵羊、牦牛、

野猪及水牛 *TLR6* 基因编码的氨基酸序列进行同源性比较(表 4)并构建系统发育树(图 8)。*TLR6* 基因几乎在所有的哺乳动物中都有表达,且荷斯坦牛与牦牛的同源性(92.0%)最高;系统发育树中同属偶蹄目的荷斯坦牛、水牛、牦牛、绵羊和野猪聚为一类,啮齿目中鼠类聚为一类,灵长目的人和猩猩聚为一类。

表 4 荷斯坦牛与 4 个物种 *TLR6* 蛋白质氨基酸序列同源性比较

Table 4 Homologies of amino acid sequences of *TLR6* protein between Holstein cattle and other 4 species

动物	相似度(%)				
	水牛	荷斯坦牛	绵羊	牦牛	野猪
水牛		83.7	94.9	82.9	53.3
荷斯坦牛			83.2	92.0	59.4
绵羊				86.3	54.4
牦牛					58.5
野猪					

3 讨论

基因决定生物的性状,但最终是由蛋白质来体现的。研究发现,*TLR6* 基因作为致病性分子受体和内生相关分子在先天性免疫系统占据重要的地位^[15]。因此对 *TLR6* 基因的深入研究能对荷斯坦牛的抗病育种提供重要理论基础。目前国内外对于人、鼠、猪、马、牛和牦牛等动物 *TLR6* 基因的研究已有报道^[16-22],但对 *TLR6* 基因编码蛋白质的生物信息学研究仅限于牦牛^[11]。本研究通过蛋白质的理化性质、疏水性/亲水性、糖基化位点、信号肽、二级结构、三级结构、功能以及同源关系分析 *TLR6* 基因编码蛋白质的功能。从预测结果看,*TLR6* 基因编码产物是由 793 个氨基酸折叠而成的不稳定亲水蛋白质。*TLR6* 基因编码蛋白质二级结构主要以 α -螺旋为主,信号肽的剪切位点位于 29~30 位氨基酸之间。已知信号肽位于分泌蛋白的 N 端,它对于外分泌蛋白的分泌起主导作用^[23-24]。而牦牛 *TLR6* 基因编码 798 个氨基酸,比荷斯坦牛多 5 个,蛋白质二级结构表现为疏水,信号肽处于第 26 个氨基酸处,与荷斯坦牛有一定的差别,这可能是物种差别和生活环境不同造成的^[11]。蛋白质半衰期越长则蛋白质稳定性越高,荷斯坦牛 *TLR6* 基因编码蛋白质半衰

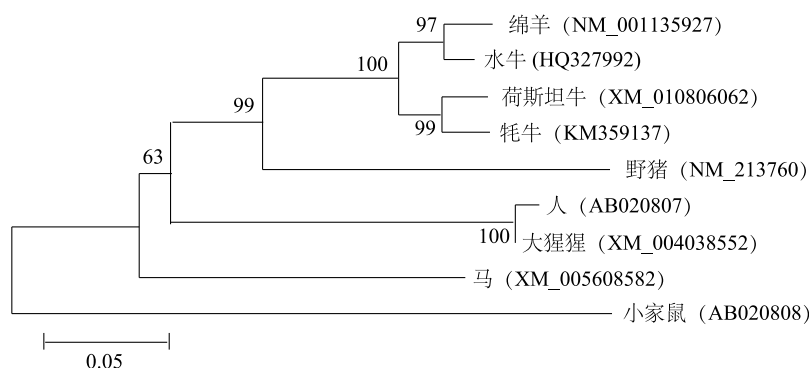


图8 荷斯坦牛 *TLR6* 基因编码蛋白质的氨基酸系统进化树

Fig.8 Phylogenetic tree of Holstein cattle and other species based on amino acid sequences of protein encoded by *TLR6* gene

期为30 h,但其却是不稳定蛋白质,可能是由于不同基因发挥不同生理功能而出现的相悖结果。蛋白质糖基化修饰对蛋白质折叠、分选及其定位有重要影响,糖链结构不同还将影响蛋白质的半衰期和降解。而糖基化位点发生变化可能与疾病的发生有关^[25]。荷斯坦牛 *TLR6* 基因潜在的糖基化位点有可能与其乳房炎的发生密切相关。荷斯坦牛 *TLR6* 基因编码蛋白质的信号转导、胁迫应答、免疫应答和生长因子的几率相对较高,尤其是胁迫应答,说明该基因可能会增强荷斯坦牛抗乳房炎的能力^[26]。从氨基酸序列比对结果和系统发育树可以看出,荷斯坦牛 *TLR6* 基因氨基酸序列与牦牛的同源性最高,其次为水牛。从系统发育树可以看出,各物种的分化与同源性分析结果一致,荷斯坦牛先与牦牛聚在一起,再与水牛和绵羊聚在一起,符合物种遗传距离远近的现实情况。

本研究系统地对荷斯坦牛 *TLR6* 基因编码蛋白质的理化性质和结构功能进行了预测,在此基础上我们将进一步对 *TLR6* 基因的表达差异进行探究,以期能更好地为荷斯坦牛的抗病育种供理论基础。

参考文献:

- [1] TAKEDA K, KAISHO T, AKIRA S. Toll-like receptors[J]. *Annu Rev Immunol*, 2003, 21: 335-376.
- [2] 吴双,朱善元,王永娟,等. 鸡 Toll 样受体 2 的克隆表达及多克隆抗体的制备[J]. *江苏农业学报*, 2014, 30(3): 586-589.
- [3] HIGGS R, CORMICAN P, CAHALANE S, et al. Induction of a novel chicken Toll-like receptor following salmonella enterica serovar typh in urium infection[J]. *Infect Immun*, 2006, 74(3): 1692-1698.

- [4] 梁利国,陈凯,谢骏. Toll 样受体及其对水生动物疾病调控作用的研究进展[J]. *江苏农业科学*, 2015, 43(5): 12-15.
- [5] CAROLYN S J, NATHALIE A, JOSHUA M, et al. *TLR* signaling tailors innate immune responses in human microglia and astrocytes[J]. *The Journal of Immunology*, 2005, 175(7): 4320-4330.
- [6] VIKKI M A, PAULOMI B A, SHAUN P M, et al. *TLR6* Modulates first trimester trophoblast responses to peptidoglycan[J]. *The Journal of Immunology*, 2008, 180(6): 6035-6043.
- [7] MRODE R A, SWANSON G J T. Genetic and statistical properties of somatic cell count and its suitability as an indirect means of reducing the incidence of mastitis in dairy cattle[J]. *Animal Breeding Abstracts*, 1996, 64(11): 847-857.
- [8] AXFORD R F E, BISHOP S C, NICHOLAS F W, et al. Breeding for disease resistance in farm animals [M]. 2nd Edition. Wallingford: CABI Publishers, 2000: 243-252.
- [9] 林宝山,兰道亮,黄偲,等. 牦牛 *TLR6* 基因的克隆、序列分析及其表达分布研究[J]. *东北农业大学学报*, 2014, 45(7): 91-97.
- [10] SHINKAL H, MUNETA Y, SUZUKI K, et al. Porcine Toll-like receptor 1, 6, and 10 genes: complete sequencing of genomic region and expression analysis[J]. *Molecular Immunology*, 2006, 43(9): 1474-1480.
- [11] OPSAL M A, VAGE D I, HAYES B, et al. Genomic organization and transcript profiling of the bovine Toll-like receptor gene cluster *TLR6-TLR1-TLR10*[J]. *Gene*, 2006, 384: 45-50.
- [12] GURUPRASAD K, REDDY B V, PANDIT M W. Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence[J]. *Protein Engineering*, 1990, 4(2): 155-161.
- [13] NAKAI K, HORTON P. PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization[J]. *Trends Biochem Sci*, 1999, 24: 34-36.
- [14] ROST B, SANDER C. Combining evolutionary information and neural networks to predict protein secondary structure [J].

- Proteins, 1994, 19(1): 55-72.
- [15] PICCININI A M, MIDWOOD K S. DAM Pening inflammation by modulating *TLR* signaling [J]. *Mediators Inflamm*, 2010, 2010(7): 1-21.
- [16] TANTISIRA K, KLIMECKI W T, LAZARUS R, et al. Toll-like receptor 6 gene (*TLR6*): Single-nucleotide polymorphism frequencies and preliminary association with the diagnosis of asthma [J]. *Genes and Immunity*, 2004, 5(456): 343-346.
- [17] 魏麟, 陈斌, 黎晓英, 等. 猪 *TLR6* 基因 Msp I 多态性与生长性状相关性研究 [J]. *中国农学通报*, 2011, 27(11): 5-9.
- [18] ISAMU S, HIROYUKI Y, CHUANYOU L, et al. Mycobacterial infection in *TLR2* and *TLR6* knockout mice [J]. *Microbiol Immunol*, 2003, 47(5): 327-336.
- [19] 赵令斋, 陈伟烈, 胡凤玉, 等. HIV/AIDS 患者外周血白细胞 *TLR-1*、*-2*、*-4* 和 *-6* 表达的初步研究 [J]. *中国病毒病杂志*, 2011, 1(5): 354-357.
- [20] 韩猛立, 黄新, 何延华, 等. 牛 Toll 样受体荧光定量 PCR 检测方法的建立 [J]. *农业生物技术学报*, 2011, 19(3): 521-529.
- [21] 赵一萍, 白东义, 李蓓, 等. 马 Toll 样受体表达水平 SYBR Green I 荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立 [J]. *畜牧兽医学报*, 2013, 44(2): 220-227.
- [22] JUNG S C, GEORGE C R, OLIVER J, et al. Molecular cloning and characterization of Toll-like receptors 1-10 in sheep [J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2009, 127(333): 94-105.
- [23] IZARD J W, DOUGHTY M B, KENDALL D A. Physical and conformational properties of synthetic idealized signal sequences parallel their biological function [J]. *Biochemistry*, 1995, 23(12): 9904-9906.
- [24] 杨运桂, 徐京宁, 胡泰山. 信号肽疏水性的提高促进青霉素 G 酰化酶分泌 [J]. *生物化学与生物物理学报*, 2000, 32(2): 163-168.
- [25] LITYNSKA A, PRZYBYUULO M, POCHEC E, et al. Comparison of the lectin-binding pattern in different human melanoma cell lines [J]. *Melanoma Research*, 2001, 11(3): 205-212.
- [26] 徐飞, 成述儒, 罗玉柱. 绵羊 *DRBI* 基因生物信息学分析 [J]. *生物技术通报*, 2011(1): 113-118.

(责任编辑: 张震林)