

# 不同地理种群鳄蜥 *tlr4* 基因遗传多样性 及 SNPs 分布特点分析

莫大颖<sup>①②③</sup> 江海英<sup>③</sup> 黄铭威<sup>③</sup> 武正军<sup>①②\*</sup> 陈金平<sup>③</sup>

<sup>①</sup> 珍稀濒危动植物生态与环境保护教育部重点实验室 桂林 541004;

<sup>②</sup> 广西濒危动物生态学重点实验室 桂林 541004; <sup>③</sup> 广东省生物资源应用研究所 广州 510260

**摘要:** Toll 样受体 (TLRs) 是一类识别病原体中高度保守的病原相关分子模式 (PAMPs) 的蛋白家族, 在启动先天性免疫中具有重要作用。人类 toll 样受体 4 基因 (*toll4*) 的点突变与许多疾病有关, 如呼吸道合胞病毒感染、动脉粥样硬化、疟疾等, 并且这种点突变往往具有种族分布特异性。鳄蜥 (*Shinisaurus crocodilurus*) 是一种古老的爬行动物, 属于国家 I 级保护野生动物, 由于其遭受非法捕杀、栖息地破坏等人为干扰, 目前数量极其稀少。近年来, 鳄蜥因疾病造成大量的死亡, 且这种疾病的分布具有种群差异性, 不同种群往往疾病症状也不同, 可能是因不同的病原体感染引起的。我们设想 *toll4* 基因的点突变在鳄蜥种群之间可能具有分布的差异性, 以适应不同的当地病原体。因此, 本文利用 PCR 产物直接测序和生物信息学分析法初步探索鳄蜥 *toll4* 基因的遗传多样性以及单核苷酸多态性 (SNPs) 的分布特点, 验证该基因的点突变是否具有种群特异性分布特点, 以及预测其氨基酸替换是否对蛋白质结构和功能产生影响。结果获得的扩增片段长为 1 694 bp, 在 5 个种群 52 条序列中 (登录号 MN380726 ~ MN380777), 共发现 27 个点突变位点, 导致 9 个氨基酸替换, 其中 3 个氨基酸替换被预测为影响蛋白质的结构和功能。27 个点突变中有 12 个只分布在单个种群, 4 个分布无种群特异性, 即每个种群中均有野生型和突变型, 其余 11 个点突变的突变型分布在 2 或 3 个种群不等。研究表明, 鳄蜥 *toll4* 基因遗传多态性在各种种群间不一致, 且点突变具有种群特异性分布特征, 反映不同地理种群遭受不同的病原压力。

**关键词:** Toll 样受体 4; 遗传多样性; 点突变; 鳄蜥

**中图分类号:** Q953 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2019) 06-845-15

## Genetic Diversity and SNPs Distribution Characteristics of *tlr4* Gene in Different Geographic Populations of the Chinese Crocodile Lizard

MO Da-Ying<sup>①②③</sup> JIANG Hai-Ying<sup>③</sup> HUANG Ming-Wei<sup>③</sup>  
WU Zheng-Jun<sup>①②\*</sup> CHEN Jin-Ping<sup>③</sup>

**基金项目** 广州市科技计划项目重点项目专题 (No. 201804020080), 国家自然科学基金项目 (No. 31760623);

\* 通讯作者, E-mail: wu\_zhengjun@aliyun.com;

**第一作者介绍** 莫大颖, 男, 硕士研究生; 研究方向, 动物生态学; E-mail: 573741049@qq.com。

收稿日期: 2019-07-05, 修回日期: 2019-10-11 DOI: 10.13859/j.cjz.201906011

- ① *Key Laboratory of Ecology and Environmental Protection of Rare and Endangered Animals and Plants, Ministry of Education, Guilin 541004*; ② *Guangxi Key Laboratory of Endangered Animal Ecology, Guilin 541004*;  
③ *Guangdong Institute of Applied Biological Resources, Guangzhou 510260, China*

**Abstract:** Toll-like receptors (TLRs) are a family of proteins that recognize highly conserved pathogen-related molecular patterns (PAMPs) in pathogens, and play an important role in initiating innate immunity. Point mutations in the human *tlr4* gene have been shown to be associated with many diseases, such as respiratory syncytial virus infection, atherosclerosis, malaria, etc., and these mutations are often racially specific. The Chinese Crocodile Lizard (*Shinisaurus crocodilurus*) is an ancient reptile which belongs to the national first-class protection animal. Due to anthropogenic disturbance, such as illegal hunting and habitat destruction, the number of the Chinese Crocodile Lizard is extremely rare. In recent years, a large number of death of the Chinese Crocodile Lizard has been caused due to various diseases, and the diseases are different among different populations, often with different disease symptoms, which are possibly caused by different pathogens. We predict that point mutations in the *tlr4* gene might be distributed differently among the Chinese Crocodile Lizard populations to accommodate different local pathogens. Therefore, the aim of this study is to preliminarily explore the genetic diversity of *tlr4* gene and the distribution characteristics of SNPs in the Chinese Crocodile Lizard by using PCR product direct sequencing and bioinformatics analysis, and to verify whether the point mutation on the gene has the population-specific distribution, and to test whether its non-synonymous substitution has an impact on the structure and function of protein. The amplified fragment length was 1 694 bp (Fig. 1), and the genetic diversity of each population was different, with Linzhouding population the highest and Dayaoshan population the lowest, which corresponds to the largest population of Linzhouding and the smallest population of Dayaoshan (Table 1). A total of 27 point mutations were found in 52 individuals (GenBank accession: MN380726 - MN380777) from five populations, leading to nine non-synonymous substitutions (Table 2), three of which were predicted to affect the function and structure of proteins (Table 4). Twelve of the 27 point mutations were distributed in only one population, while four point mutations were not specific to any population, with wild-types and mutant types in each population, and the other eleven point mutations were distributed in two to three populations (Table 3). Only three of the 31 haplotypes were shared among populations, while the rest were distributed in a single population (Fig. 2). The results have shown that the genetic polymorphism of *tlr4* gene is not consistent among different populations, and point mutations have population-specific distribution characteristics, reflecting the fact that different geographical populations are affected by different pathogenic pressures. It is suggested that attention should be paid to the maintenance of genetic diversity in future conservation of this species.

**Key words:** Toll-like receptor 4; Genetic diversity; Point mutations; *Shinisaurus crocodilurus*

Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLRs) 是由 Toll 样多基因家族编码的一类具有免疫功能的模式识别受体 (pattern recognition receptors, PRRs), 主要表达在防御细胞上, 如树突状细胞、巨噬细胞、中性粒细胞等, 对

脊椎动物识别病原体具有重要作用。Toll 样受体识别病原体中高度保守的病原相关分子模式 (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs), 如外源微生物的细胞壁、病毒的核酸等, 从而启动先天性免疫进程 (Medzhitov

2001)。Toll 样受体的基础结构包括细胞外的亮氨酸重复富集区域 (leucine-rich repeats, LRRs)、跨膜区域、细胞内高度保守的 toll 白介素-L 受体 (toll/IL-1 receptor domain, TIR) 区域。亮氨酸重复富集区域 (LRRs) 具有对细菌、真菌、病毒、原生生物的保守分子元件进行识别的肽识别位点 (Mikami et al. 2012)。迄今为止, 在脊椎动物中共发现 28 种 toll 样受体类型, 不同物种之间 toll 样受体的数量和种类具有差异性, 如鸟类和人类都具有 10 种 toll 样受体, 但类型却不完全相同, 两栖类具有 20 种, 硬骨鱼中有 21 种 (Akira 2001, Ishii et al. 2007, Rebl et al. 2010, Knafler et al. 2015, Wang et al. 2015, 2016)。不同 toll 样受体类型识别不同的病原体类型, 按配体分类, 可以分为识别病毒的 toll 样受体 (TLR3、7、8、9) 和识别非病毒的 toll 样受体 (TLR1、2、4、5、6、10) (Wlasiuk et al. 2010)。

Toll 样受体 4 功能多样化, 主要识别革兰阴性菌中的内毒素脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) (Barton et al. 2003), 还可识别类脂 A、热休克蛋白 60 (heat shock protein 60, HSP60) 等 (赵保胜等 2007), 可能对爬行动物的免疫系统具有极其重要作用 (Aderem et al. 2000, Zimmerman et al. 2010)。对脊椎动物 toll 样受体 4 的研究发现, 其多态性与多种疾病相关。如人类 toll 样受体 4 中两个氨基酸突变, 蛋白质 299 位上天冬氨酸突变为甘氨酸, 蛋白质 399 位上苏氨酸突变为异亮氨酸, 已被证实涉及连锁不平衡及与 toll 样受体 4 对脂多糖 (LPS) 的反应下降有关 (Noreen et al. 2012)。这两个突变位于亮氨酸重复富集区域 (LRRs), 降低受体对病原体的识别能力, 减弱细胞因子响应应答能力, 进而导致致病性病原的感染。据报导, 人类 toll 样受体 4 第 399 位上苏氨酸突变为异亮氨酸会导致呼吸道合胞病毒感染性提高 (Awomoyi et al. 2007), 提高对动脉粥样硬化的易感性 (Noreen et al. 2012); 第 299 位上天冬氨酸突变为甘氨酸对嗜肺军团菌 (一种鞭毛

细菌) 感染具有抗性 (Hawn et al. 2005), 但该突变也会提高儿童脑膜炎球菌侵袭性死亡的风险 (Faber et al. 2009), 也有研究表明, 该位点的多态性对恶性疟疾没有显著影响 (Kar et al. 2015)。此外, 299 位上天冬氨酸突变为甘氨酸还和类风湿性关节炎、炎症肠道疾病、慢性牙周炎 (Kiechl et al. 2002, Török et al. 2004, Berdeli et al. 2007) 等疾病有关。基于人类不同种群的研究表明, 上述两种突变具有独特的地理分布特点 (Hise et al. 2007)。这可能是不同病原体对 toll 样受体基因施加不同选择压力的结果 (Ferwerda et al. 2007)。

鳄蜥 (*Shinisaurus crocodilurus*) 是我国 I 级保护野生动物, 为单科单属单种, 在脊椎动物中占据重要地位 (莫运明等 2000)。由于其栖息地遭受严重破坏, 生境面积不断减小, 截止 2005 年全国鳄蜥数量已不足 1 000 只, 现主要分布在广西大瑶山、大桂山自然保护区以及广东林洲顶、罗坑自然保护区, 国外仅分布于越南广宁省安图自然保护区 (武正军等 2007)。近年鳄蜥频繁爆发疾病, 但感染的病原种类仍未解决。Jiang 等 (2019) 从广东省罗坑自然保护区的 1 只鳄蜥病灶中分离出龟嗜皮菌 (*Austwickia chelonae*), 并确定其为病灶中的主要菌群及致死病原, 结果暗示细菌感染极有可能是鳄蜥产生疾病的主要原因。Toll 样受体 4 对鳄蜥抵抗细菌感染具有重要作用, 了解鳄蜥的 toll 样受体 4 基因 (*toll4*) 对鳄蜥疾病治疗和生存保护具有深远意义。因此, 我们对中国 4 个及越南 1 个鳄蜥种群的 *toll4* 基因外显子 3 片段进行多态性研究。本实验首次对鳄蜥的免疫基因 *toll4* 多态性进行探索, 目的是初步了解鳄蜥 *toll4* 基因遗传多样性和单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNPs) 的分布特点, 并对核苷酸突变导致的氨基酸替换对蛋白质结构和功能影响进行预测。对鳄蜥免疫基因的遗传学背景进行初步了解, 为今后鳄蜥和其他爬行动物疾病的研究提供分子理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 样本采样

本实验的国内鳄蜥唾液样品采集于 2018 年 8 月至 11 月之间。采样数量为, 广西金秀自治县大瑶山自然保护区 10 只, 广西贺州市大桂山自然保护区鳄蜥救护站 10 只, 广东省罗坑自然保护区鳄蜥救护站 15 只, 广东省林洲顶自然保护区鳄蜥救护站 11 只。越南鳄蜥唾液样品于 2017 年采集于越南广宁省安图自然保护区, DNA 提取后保存于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  备用, 本实验所用的越南鳄蜥 DNA 来自该批样品, 共 10 只。鳄蜥个体采用随机取样方法进行选取, 每个种群都囊括不同的年龄阶段、性别、饲养池(生长环境)的个体, 以确保样品具有一定的代表性。唾液采集方法采用口腔拭子法(罗丹等 2013), 口腔唾液拭子用 2 ml 的无水乙醇保存在无菌采样管中并用干冰带回实验室,  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冷冻直至 DNA 提取。

### 1.2 DNA 提取和 PCR 扩增及测序

DNA 采用 QIAGEN (天根生化科技有限公司, 广州) 小量 DNA 提取试剂盒并根据产品说明书进行操作提取, 提取的 DNA 保存于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  备用。PCR 引物设计方法为, 从鳄蜥基因组中下载预测为 toll 样受体的核苷酸序列与对应的氨基酸序列(Gao et al. 2017), 在 NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 上对核苷酸序列和氨基酸序列进行同源性 BLAST (Altschul 1990), 根据同源性结果鉴定是否属于 *toll4* 基因。确定为该基因后, 根据基因结构注释文件, 对基因的外显子进行区分。结果显示, 鳄蜥的 *toll4* 基因全长 8 038 bp, 共 3 个外显子, 长度分别为 108 bp (外显子 1)、167 bp (外显子 2) 和 2 263 bp (外显子 3)。利用外显 3 序列在 Oligo7 (Rychlik 2007) 软件上进行 PCR 引物设计, 最终确定最优引物为 ShcrTLR4F 5'-GAT CCT GAC TGC CAA TCC TC-3' (正向引物) 和 ShcrTLR4R 5'-ACT CCC GCT TCT AGT GTC T-3' (反向引物), PCR 扩增产物长度为 1 803 bp。引物由生工生物工

程(上海)股份有限公司合成。PCR 反应体系为 50  $\mu\text{l}$ , 包括 25  $\mu\text{l}$  的  $2\times$  EasyTaq Super Mix 预混合酶(北京全式金生物技术有限公司), 2  $\mu\text{l}$  DNA 模板(浓度大约  $5\sim 10\text{ mg/L}$ ), 10  $\mu\text{mol/L}$  的正、反向引物各 1  $\mu\text{l}$ , 加入双蒸水补足 50  $\mu\text{l}$ 。反应程序为  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min;  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,  $62\text{ }^{\circ}\text{C}$  退火 45 s,  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸 2 min 10 s, 共 35 个循环; 最后终延伸 10 min,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存。PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳并在紫外光下观察条带, 条带清晰、分辨率高的产物送至天一辉远(广州)生物公司进行纯化回收并直接测序。测序方式为测通, 除了正向和反向测序, 额外设计一条中间引物 5'-TAA AGG AAC TAA GGG TGC-3' 对扩增产物中间片段进行测序, 以保证序列的准确性。

### 1.3 数据分析

采用 DNASTar7.0 (Burland 2000) 中的 SeqMan 软件对结果序列进行拼接, 并对突变位点的峰图进行校对, 把预测错误的碱基或错误插入、缺失的碱基进行修正或删除。为确保突变位点的可靠性, 只有该位点的突变型存在于两个或以上的个体中才将视为有效突变。若突变只存在于单个个体中且峰图正确, 将其再进行一次扩增及测序, 验证该突变是否正确。在 MEGA7 (Kumar et al. 2016) 软件上用 Clustal W 程序进行多序列比对, 截去两端杂锋的序列, 使序列两端对齐。在 DnaSp5.0 (Librado et al. 2009) 上分析序列的多态性位点以及多态性信息, 各遗传指标数据均来源于该软件。Tajima's *D* 中性检验值在 DnaSp5.0 (Librado et al. 2009) 软件上分析计算, 单倍型网络图在软件 NETWORK5.0 上构建 (Bandelt 1999)。核苷酸序列用 MEGA7 (Kumar et al. 2016) 软件翻译成氨基酸序列, 以确认氨基酸的同义替换和非同义替换。利用 PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) 和 SIFT (<https://sift.bii.a-star.edu.sg/>) 两种在线软件预测氨基酸替换对蛋白质结构和功能的影响。使用 LRRfinder (<http://www.lrrfinder.com/>) 和 SMART (

smart.embl-heidelberg.de/) 对鳄鱼 toll 样受体 4 完整氨基酸序列进行蛋白质结构域的区分, SignalP 3.0 (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-3.0/) 预测信号肽区域, TMHMM2.0 (http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/) 预测蛋白质的跨膜区域。用 Swiss-Model 在线软件 (https://www.swissmodel.expasy.org/interactive) 对鳄鱼 toll 样受体 4 的氨基酸序列进行蛋白质三维同源建模, 并用 Pymol2.3 (Krauss et al. 2014) 软件对蛋白质三维模型进行编辑。

## 2 结果

### 2.1 遗传多样性分析

共获得 52 条 *toll4* 基因序列 (表 1) (登录号 MN380726 ~ MN380777), 截除测序结果前后端不可信部分后的序列长度为 1 694 bp, 该序列用于后续的分析与展示, 序列编码 564 个氨基酸 (图 1)。变异位点数最多的是广东林洲顶种群, 最低为广西大瑶山种群。单倍型数量, 最高的是广东林洲顶种群, 其次为广西大瑶山种群。核苷酸多样性最高的种群为广

东林洲顶种群, 最低的为广西大瑶山种群 (表 1)。在 5 个鳄鱼种群中, 广东林洲顶种群测序的个体数 (11 只) 并不是最多, 但其变异位点数最多, 且其单倍型、单倍型多样性和核苷酸多样性也是 5 个种群中最高的, 由此说明林洲顶种群比其他 4 个种群具有较高的遗传变异程度 (表 1)。广西大瑶山种群的遗传多样性较低可能是由于广西大瑶山种群现存的鳄鱼数量太少, 导致遗传多样性大幅度丧失。在种群之间共享的单倍型较少, 仅有 3 个单倍型在部分种群间共享, 其余的 28 个单倍型均为种群特有 (图 2)。

### 2.2 SNPs 位点分析

27 个单核苷酸多态性 (SNPs) 位点导致 9 个氨基酸非同义替换, 其中 6 个氨基酸突变位点位于亮氨酸重复富集区域 (LRRs), 2 个位于亮氨酸重复富集区域 C 端 (LRRCT), 1 个位于预测的跨膜区域 (表 2)。结果表明, 鳄鱼的单核苷酸多态性分布具有种群分布特异性 (表 3)。越南 VN-23 个体具有 3 个特有的点突变, 即表 3 中编号为 1、6 和 19 的突变点,

表 1 鳄鱼种群的遗传多样性参数

Table 1 Genetic diversity indices of the populations of the Chinese Crocodile Lizard

	总数 Total	广西大桂山 Daguishan, Guangxi	广西大瑶山 Dayaoshan, Guangxi	广东罗坑 Luokeng, Guangdong	广东林洲顶 Linzhouing, Guangdong	越南 Vietnam
样本数量 Number of samples	52	7	10	14	11	10
序列长度 Sequence length (bp)	1 694	1 694	1 694	1 694	1 694	1 694
变异位点数 Numbers of variations	27	10	9	12	16	15
单倍型数量 Number of haplotypes	31	6	7	6	10	6
单倍型多样性 Haplotype diversity, $H_d$	0.962	0.952	0.911	0.813	0.982	0.844
单倍型多样性变异 Variance of haplotype diversity	0.000 18	0.009 12	0.005 98	0.005 44	0.002 15	0.010 60
$H_d$ 的标准偏差 Standard deviation of haplotype diversity	0.014	0.096	0.077	0.074	0.046	0.103
核苷酸多样性 Nucleotide diversity	0.003 94	0.003 04	0.002 47	0.003 36	0.003 54	0.003 41
简约信息位点 Parsimony informative sites	24	10	8	12	14	12
单变量位点 Singleton variable sites	3	0	1	0	2	3
Tajima's $D$	0.382 95 ( $P > 0.10$ )	1.395 11 ( $P > 0.10$ )	1.371 43 ( $P > 0.10$ )	2.025 20 ( $P < 0.05$ )	0.4384 30 ( $P > 0.10$ )	0.413 05 ( $P > 0.10$ )
统计值显著性 Statistical significance	不显著 Not significant	不显著 Not significant	不显著 Not significant	显著 Significant	不显著 Not significant	不显著 Not significant

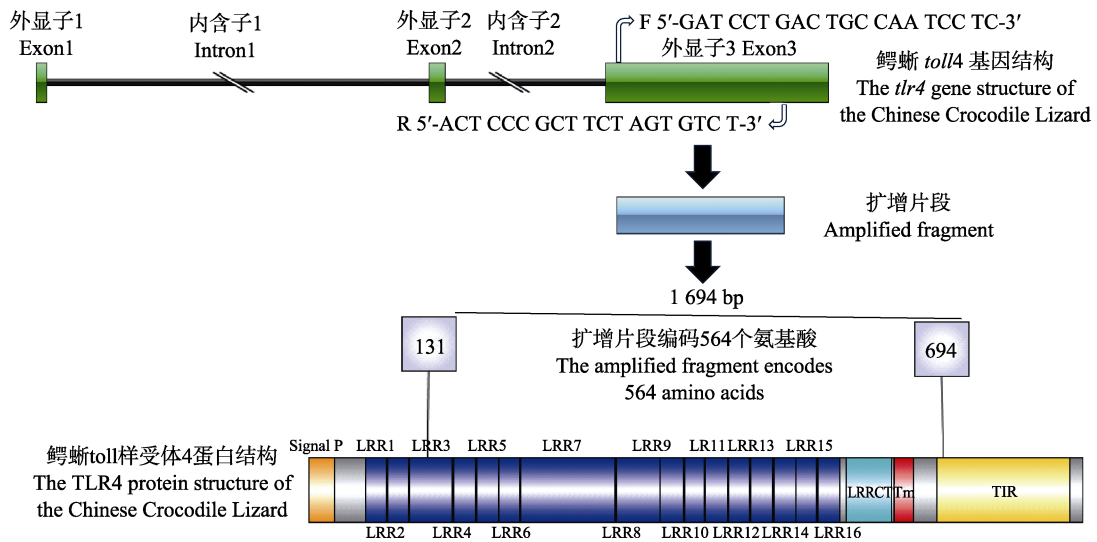


图 1 扩增片段示意图

Fig. 1 A schematic diagram of the amplified fragment

结构域由 LRRfinder 和 SMART 预测, 由于两个软件都无法预测出 LRRNT, 因此在蛋白质结构中没有体现出 LRRNT。图中扩增片段 1 694 bp 为截除测序结果前后端杂峰序列后用于分析的序列长度。蛋白结构部分中标注的“131”与“694”代表分析序列编码的第一个氨基酸与最后一个氨基酸在完整蛋白质上的位置。蛋白质结构中 LRR1 ~ LRR16 代表亮氨酸重复富集区域 1 ~ 16。作图方法参照 Liu 等 (2015)。The structural domain was predicted by LRRfinder and SMART. Since neither software could predict LRRNT, LRRNT was not reflected in the protein structure. In the figure, the amplified fragment 1 694 bp is the sequence length used for analysis after the truncation of the front and rear clutter sequences of sequencing results. The labels "131" and "694" in the protein structure section represent the position of the first and last amino acids encoded by the analysis sequence on the complete protein. LRR1 to LRR16 in protein structure represents leucine-repeat enrichment region 1 - 16. The drawing method was referred to Liu et al. (2015).

是一只拥有稀有等位基因的个体。广东林洲顶种群和越南种群分别具有 4 个种群特异性单核苷酸多态性 SNPs, 但越南种群的 4 个特有 SNPs 中 3 个来自同一只个体 VN-23。29 个变异位点中仅有 4 个变异位点无种群分布特异性, 剩余的点突变分布在 2 或 3 个种群中不等 (表 3)。突变位点中存在连续的两个碱基变异的位点, 如编码 DNA (cDNA) 第 791、792 位上的两个变异位点位于同一个密码子第二位和第三位, 共形成 4 种密码子 (ACA、ACG、AAA、AAG), cDNA 第 871、872 位变异位点分别位于密码子第一位和第二位, 形成两种密码子 (GCA、ACA)。在 9 个非同义替换的氨基酸中 (表 2), 有 6 个只存在于单个种群中, 其余 3 个分布在 2 或 3 个种群不等。

### 2.3 预测氨基酸替换对蛋白质结构和功能的影响

6 个氨基酸替换在两种软件中的预测结果是“可耐受的”和“良性”突变, 暗示这 6 个氨基酸替换可能不会影响 toll 样受体的正常结构和功能。两个氨基酸替换在 SIFT 软件中预测为“影响蛋白功能”, 但在 PolyPhen-2 预测结果中显示“良性”, 这种结果并不矛盾, 因为不同的算法可能会产生不一致的结果。一个氨基酸替换在两个软件中的预测结果都显示对蛋白质功能和结构有影响, 因此这极有可能是一个有害的氨基酸突变位点 (表 4)。缬氨酸 (Val) 突变成蛋氨酸 (Met) 仅在广东罗坑种群中出现, 该位点位于预测的跨膜结构域中,

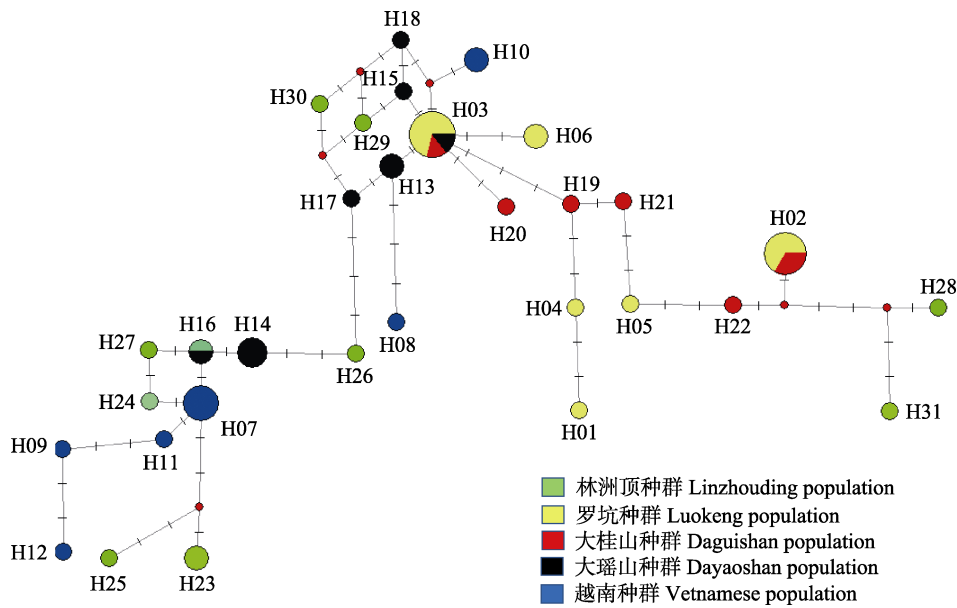


图 2 Toll 样受体 4 基因单倍型网络图

Fig. 2 Haplotype network diagram of *tlr4* gene

每个圆圈表示一种单倍型, 圆圈的大小代表该单倍型的个体数量, 连接单倍型的突变步骤由单倍型之间的小黑线表示, 没有标注的小红点表示中间向量。H01 ~ H31 分别表示 31 个单倍型。

Each haplotype is shown as a circle, the size of which indicates the number of individuals with that haplotype. Mutational steps connecting haplotypes are represented by a small black line between haplotypes. Little red dots that are not labeled represent median vector. H01 - H31 represent 31 haplotypes respectively.

因此极有可能影响细胞的信号传递。在 LRRfinder 预测的糖基化位点和磷酸化位点中, 蛋白质第 421 位苏氨酸 (Thr) 和第 630 位丝氨酸 (Ser) 被预测为 O-糖基化位点和磷酸化位点。根据 SWISS-MODEL 建立的蛋白质三维模型, 将 8 个突变氨基酸位点匹配到蛋白质三维结构中, 由于缺少其他 toll 样受体 4 氨基酸的同源序列, 导致无法模拟鳄蜥完整的 toll 样受体 4 蛋白三维结构, 因此蛋白质模型没有包括第 643 位突变位点, 模拟的三维蛋白质结构长度为 611 个氨基酸(第 28 到第 638 位氨基酸), 该片段与模板 toll 样受体 4 的同源性为 43.67% (图 3)。

### 3 讨论

本研究分析的 *toll4* 基因片段平均每 63 bp

一个单核苷酸多态性 (SNP) 位点, 显示出较高的突变频率。各个种群的单核苷酸多态性 (SNP) 分布频率在 1/106 (即平均每 106 bp 一个单核苷酸多态性位点) (林洲顶种群) 到 1/188 (瑶山种群) 之间。鉴于扩增片段位于 *toll4* 基因外显子 3 上, 编码大部分的亮氨酸重复富集区域 (LRRs), 因此较高突变频率是可以理解的。亮氨酸重复富集区域 (LRRs) 是和病原体相互作用的区域, 具有很高的突变率和多态性 (Vaure et al. 2014), 是一种免疫基因和病原体进行军备竞赛、协同进化的结果。广西大瑶山种群核苷酸多样性最低, 可能因为其是一个极小的种群, 仅有 20 只个体左右, 且野外个体近年来近乎灭绝。这种低多态性可能是由于小种群经历遗传漂变事件和严重的近亲繁殖压力引起的。免疫基因遗传多样性的匮乏是导致

表 2 SNPs 的位置及突变类型信息

Table 2 Information of SNPs location and mutational type

编号 Number	在扩增产片段的位 Position in amplicon	在 cDNA 的位 Position in cDNA	核苷酸变异类型 Nucleotide variational type	比率 (野生型 /突变型) Ratio (Wild/Mutant)	在密码子中的位 Position in codon	同义/非同义替换 Synonymous/ Nonsynonymous	氨基酸替换类型 Amino acid substitutional type	点突变所在区域 在蛋白序列的位置 Domain of variation Position in protein
1	49	439	G>A	51/1	1	非同义 Non-Syn	天冬氨酸 > 天冬酰胺 Asp > Asn	LRR3 147
2	78	468	T>G	41/11	3	同义 Synonymous		
3	132	522	A>G	48/4	3	同义 Synonymous		
4	445	835	T>C	50/2	1	同义 Synonymous		
5	465	855	G>A	48/4	3	同义 Synonymous		
6	467	857	A>G	51/1	2	非同义 Non-Syn	组氨酸 > 精氨酸 His > Arg	LRR7 286
7	644	1034	A>G	47/5	2	非同义 Non-Syn	赖氨酸 > 精氨酸 Lys > Arg	LRR8 345
8	654	1044	G>A	50/2	3	同义 Synonymous		
9	663	1053	C>T	28/24	3	同义 Synonymous		
10	737	1127	C>T	40/12	2	非同义 Non-Syn	丙氨酸 > 缬氨酸 Ala > Val	LRR8 376
11	791	1187	C>A	43/9	2	非同义 Non-Syn	苏氨酸 > 赖氨酸 Thr > Lys	LRR9 394
12	792	1182	G>A	39/13	3	非同义 Non-Syn		
13	822	1212	C>T	32/20	3	同义 Synonymous		
14	871	1261	G>A	38/14	1	非同义 Non-Syn		
15	872	1262	A>C	38/14	2	非同义 Non-Syn	谷氨酸 > 苏氨酸 Glu > Thr	LRR10 421
16	894	1284	C>A	26/26	3	同义 Synonymous		
17	957	1347	C>T	28/24	3	同义 Synonymous		
18	1215	1605	C>A	50/2	3	同义 Synonymous		
19	1281	1671	G>A	50/1	3	同义 Synonymous		
20	1296	1686	T>C	27/25	3	同义 Synonymous		
21	1320	1710	C>T	48/4	3	同义 Synonymous		
22	1323	1713	C>T	27/25	3	同义 Synonymous		
23	1345	1735	C>T	50/2	1	同义 Synonymous		
24	1389	1779	C>T	48/4	3	同义 Synonymous		
25	1424	1814	A>T	50/2	2	非同义 Non-Syn	组氨酸 > 亮氨酸 His > Leu	LRR-C 端 LRRCT 605
26	1498	1888	A>G	49/3	1	非同义 Non-Syn	丝氨酸 > 甘氨酸 Ser > Gly	LRR-C 端 LRRCT 630
27	1537	1927	G>A	49/3	1	非同义 Non-Syn	缬氨酸 > 蛋氨酸 Val > Met	跨膜区域 Tm domain 643

核苷酸变异类型和氨基酸替换类型中大于号 (>) 前的碱基或氨基酸表示野生型, 大于号后的碱基或氨基酸表示突变型。

In the column of "Nucleotide variational type" and "Amino acid substitution type", the base or amino acid before ">" indicates wild type, and the base or amino acid after ">" indicates mutant type.



表 3 点突变在各种群中的分布信息  
 Table 3 Information on the distribution of point mutations in various populations

种群 Population	个体 Individual	点突变 Point mutation																											
		1*	2	3*	4*	5	6*	7*	8*	9#	10	11	12	13	14	15	16#	17	18*	19*	20#	21	22#	23*	24	25*	26*	27*	
	野生型 Wild type	G	T	A	T	G	A	A	G	C	C	C	G	C	G	A	C	C	C	C	G	T	C	C	C	C	A	A	G
大瑶山 Dayaoshan	DYS-1	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	
	DYS-2	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	C	-	-	-	-	-	
	DYS-3	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	T	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	
	DYS-4	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	A	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	DYS-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	C	-	-	-	-	-	
	DYS-6	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	T	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	
	DYS-7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	C	-	-	-	-	-	
	DYS-8	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	T	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	
	DYS-9	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	T	-	-	-	A	T	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	
	DYS-10	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	T	-	-	-	A	T	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	
大桂山 Daguishan	DGS-1	-	-	-	-	-	-	-	-	T	A	A	-	-	A	C	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	
	DGS-2	-	-	-	-	-	-	T	-	-	A	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	
	DGS-3	-	-	-	-	-	-	T	T	-	-	T	A	C	A	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	
	DGS-4	-	-	-	-	-	-	T	T	-	A	T	A	C	A	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	
	DGS-5	-	-	-	-	-	-	-	T	-	A	A	-	A	C	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	
	DGS-6	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	T	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	
	DGS-7	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	A	-	A	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
林洲顶 Linzhouding	LZD-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	
	LZD-2	-	G	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	C	-	-	-	-	G	-	
	LZD-3	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	T	-	-	-	-	C	T	-	-	-	-	-	
	LZD-4	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	A	-	A	C	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	G	-	
	LZD-5	-	G	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	A	T	-	-	-	C	-	T	-	-	-	-	
	LZD-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	C	-	-	-	-	-	
	LZD-7	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	C	-	-	-	-	-	
	LZD-8	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	
	LZD-9	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	T	-	-	-	T	-	-	-	-	
	LZD-10	-	-	G	-	-	-	G	-	-	-	-	A	-	A	C	A	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	LZD-11	-	G	G	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	C	-	-	-	-	G	-

续表 3

		点突变 Point mutation																										
种群 Population	个体 Individual	1*	2	3*	4*	5	6*	7*	8*	9#	10	11	12	13	14	15	16#	17	18*	19*	20#	21	22#	23*	24	25*	26*	27*
	野生型 Wild type	G	T	A	T	G	A	A	G	C	C	C	G	C	G	A	C	C	C	C	G	T	C	C	C	A	A	G
罗坑 Luokeng	LK-1	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	A	-	A	C	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A
	LK-2	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	T	-	-	A	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-
	LK-3	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	T	-	-	A	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-
	LK-4	-	-	-	-	-	-	-	-	T	T	-	-	-	A	C	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	LK-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	A	A	-	A	C	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-
	LK-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	A	A	-	A	C	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-
	LK-7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	A	A	-	A	C	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-
	LK-8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	A	A	-	A	C	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-
	LK-9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	T	-	-	A	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-
	LK-10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	T	-	-	A	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-
	LK-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	A	T	A	C	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-
	LK-12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	T	-	-	A	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	A
	LK-13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	T	-	-	A	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	A
	LK-14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	T	-	-	A	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-
越南 Vietnamese	VN-2	-	G	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	C	-	-	T	-	-	
	VN-3	-	-	-	-	-	-	-	A	T	-	-	T	-	-	-	A	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	
	VN-4	-	G	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	A	T	-	-	-	-	-	T	-	-	-	
	VN-7	-	-	-	-	-	-	-	A	T	-	-	T	-	-	-	A	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	
	VN-14	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	C	-	-	-	-	-	
	VN-16	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	C	-	-	-	-	-	
	VN-21	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	T	-	-	C	-	-	-	-	-	
	VN-22	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	C	-	-	-	-	-	
	VN-23	A	-	-	-	-	-	G	-	-	T	-	-	T	-	-	A	T	-	-	A	-	-	T	-	-	-	
	VN-24	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	C	-	-	-	-	-	

标注\*列代表种群特异性突变碱基, 标注#的列代表突变碱基存在于每一个种群中。- 表示与第一行的野生型核苷酸相同。当一个碱基在该位点占据绝大部分时, 将其划分为野生型碱基。有些个体因 DNA 提取失败, 无法继续下游分析, 表中各种群的序列数与采样数量并不完全一致。

The columns labeled \* represent the species-specific mutant bases, and the columns labeled # represent the presence of mutant bases in each population. - means the same nucleotide as the wild type in the first line. When a base occupies the majority of the site, it is classified as a wild-type base. Due to the failure of DNA extraction of some individuals, the downstream analysis could not be continued, and the sequence number of various populations in the table was not completely consistent with the number of samples.

表 4 非同义替换对蛋白质结构和功能影响的预测结果

Table 4 Prediction of the effects of nonsynonymous substitution on protein structure and function

替换类型 Substitution type	SIFT 预测结果 SIFT predicted results	PolyPhen-2 预测结果 PolyPhen-2 predicted results
天冬氨酸 > 天冬酰胺 Asp > Asn	耐受 Tolerated (0.24)	良性 Benign (0.000)
组氨酸 > 精氨酸 His > Arg	耐受 Tolerated (0.05)	良性 Benign (0.000)
赖氨酸 > 精氨酸 Lys > Arg	耐受 Tolerated (0.16)	良性 Benign (0.015)
丙氨酸 > 缬氨酸 Ala > Val	耐受 Tolerated (0.24)	良性 Benign (0.015)
苏氨酸 > 赖氨酸 Thr > Lys	影响蛋白质功能 Affect protein function (0.03)	良性 Benign (0.166)
谷氨酸 > 苏氨酸 Glu > Thr	耐受 Tolerated (1.00)	良性 Benign (0.000)
组氨酸 > 亮氨酸 His > Leu	影响蛋白质功能 Affect protein function (0.02)	良性 Benign (0.075)
丝氨酸 > 甘氨酸 Ser > Gly	耐受 Tolerated (0.42)	良性 Benign (0.201)
缬氨酸 > 蛋氨酸 Val > Met	影响蛋白质功能 Affect protein function (0.00)	很可能有害 Probably damage (0.998)

括号中给出的是软件的预测数值；大于号前的氨基酸表示野生型，大于号后的氨基酸表示突变型。

What is given in brackets is the predicted value of the software; The amino acid before “>” indicates wild type and the amino acid after “>” indicates mutant type.

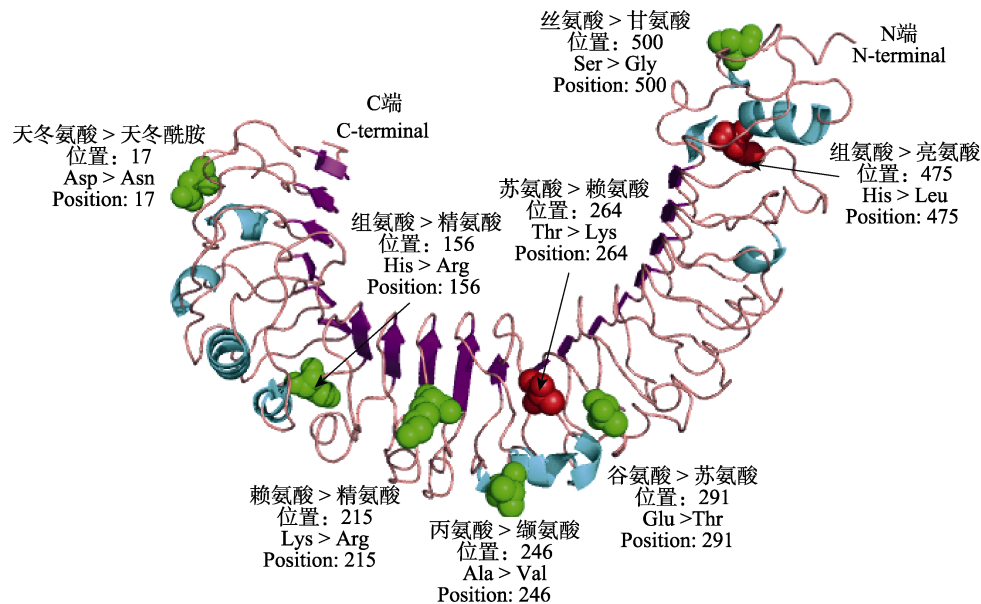


图 3 氨基酸替换在 toll 样受体 4 蛋白质三维结构中的位置

Fig. 3 Position of amino acid substitutions in tertiary structure of TLR4 protein

绿色的位置表示对结构和功能没有影响的氨基酸突变位点；红色表示预测可能影响结构和功能的氨基酸突变位点；大于号前的氨基酸表示野生型，大于号后的氨基酸表示突变型。

The green sites represent amino acid mutations that have no effect on structure or function, and the red sites predict amino acid mutations that may affect structure or function; The amino acid before “>” indicates wild type and the amino acid after “>” indicates mutant type.

物种灭绝的潜在因素 (Sullivan et al. 2017)，因此广西大瑶山鳄蜥种群的生存问题令人担忧。广西大瑶山种群免疫基因 *toll4* 遗传多样性

极低、种群数量极少，因此，该小种群将面临严峻的生存挑战，应引进其他种群中免疫基因多样性较高的新个体进行交配，增加种群免疫

基因的遗传变异程度，同时在管理中应该注重对家系进行明确区分，避免近亲繁殖导致遗传多样性进一步丧失。但广西大瑶山种群具有较多数量的单倍型以及较高的单倍型多样性，可能短时期内弥补了核苷酸多样性较低的缺点，但一旦拥有唯一点突变的个体死亡，该突变又没有得到遗传，则单倍型数量也会急剧下降。广东林洲顶种群遗传多样性最高，这可能是其种群数量较多的缘故，近年来林洲顶已经成为国内鳄蜥分布最多的地方，随机交配可以有效地保持其种群的遗传变异。广东罗坑种群测序个体最多，但各个遗传多样性参数均较低，这种结果可能是由于近亲繁殖压力引起的，近亲繁殖导致的遗传变异丧失不利于该种群的长期生存。因此，今后在鳄蜥的人工救治繁育中应给予一定的人工干预，如对其家系进行区分及交配期将亲缘关系较远的个体放在一起进行交配，可以一定程度上保持基因遗传变异。

Tajima's  $D$  值在总体和各种群中均为正值，当 Tajima's  $D > 0$  时，代表群体中高等/中等频率的等位基因较多，由平衡选择和瓶颈效应引起 (Agnieszka et al. 2018)。Toll 样受体基因的平衡选择在田鼠 (*Myodes glareolus*) 中已有报导，田鼠的 toll 样受体 1 基因 (*toll1*)、toll 样受体 5 基因 (*toll5*) 中均发现平衡选择的证据，但并未在 toll 样受体 4 基因 (*toll4*) 中发现任何选择压力的证据 (Agnieszka et al. 2018)。许多研究表明，寄生虫驱动的平衡选择作用在适应性免疫基因主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex, MHC) 基因上，如病原介导的平衡选择是长期维持川金丝猴 (*Rhinopithecus roxellana*) MHC 基因变异的原因，从而维持其种群水平上的高遗传多样性水平 (Zhang et al. 2018)。一篇对爬行动物 (包含鳄蜥) *toll2* 和 *toll4* 基因复制和适应性进化的研究报导中，在 *toll2* 和 *toll4* 基因中分别发现 30 个、13 个正向选择的密码子，得出 *toll2* 基因处在不同的进化压力下，然而 *toll4* 基因没有显著选择压力的结论 (Shang et al.

2017)。因此，Tajima's  $D$  值的结果可能暗示鳄蜥经历了瓶颈效应导致了遗传多样性降低。

鳄蜥 *toll4* 基因的点突变在种群水平上具有特异性分布特征，可能是由于当地环境中的病原微生物对 *toll4* 基因施加持续的选择压力以及宿主和微生物之间的相互作用引起，促使 *toll4* 基因的分布具有地理差异性 (Ferwerda et al. 2007)。并且，这种点突变的种群特异性分布极有可能与不同种群的疾病产生有联系，因为只有受到不同的病原体压力才会导致不同的突变，不同的病原体感染所引起的疾病也不一致。位于跨膜结构域中氨基酸替换 (缬氨酸突变为蛋氨酸) 极有可能对蛋白质的结构和功能有害，可能会阻碍信号由细胞外传入细胞内，导致无法启动下游免疫反应。该替换仅分布在广东罗坑种群，该种群鳄蜥感染的皮肤疾病 (Jiang et al. 2019) 是否与该替换有关还需要进一步的实验证明。2 个氨基酸替换位于亮氨酸重复富集区域 (LRRs)，该区域是识别病原体的关键位置，因此可能影响 toll 样受体 4 对病原体组件的识别从而损害鳄蜥的免疫能力。突变位点种群分布差异可能暗示若出现有害突变，则会影响到其中个别种群，不会出现大范围的影响，这也揭示鳄蜥疾病经常发生在单个种群、且不同种群疾病症状不同的可能原因；若突变是稀有的良性突变，则会使其某些种群受益，增强该种群对地方病原微生物的抵抗能力。保护管理中可以初步观察具有这些变异型氨基酸的鳄蜥个体是否患有疾病，以及今后应该进一步探索疾病与这些氨基酸变异型是否有联系。位于 O-糖基化位点和磷酸化位点的突变极有可能影响蛋白质的结构和功能，因为 O-糖链能够维持其连接的蛋白质的空间构象，从而避免该蛋白受到蛋白酶水解以及掩盖了蛋白质中的一些抗原决定簇，此外还影响多种细胞生化过程 (刘可人等 2006)，磷酸化则是最重要的蛋白质翻译后的修饰之一，对细胞功能的调节意义重大 (陈铭 2011)。

在对中华鳖 (*Pelodiscus sinensis*) toll 样受

体 4 的研究发现, 中华鳖的 toll 样受体 4 能够识别脂多糖 (LPS) 并启动 NF- $\kappa$ B 信号通路, 与哺乳动物相似, 但该反应的灵敏度较低 (Zhou et al. 2016)。Toll 样受体 4 基因 (*toll4*) 在鱼类和两栖动物中缺失或者无功能, 但乌龟 (*Chincmys reevesii*) 在进化过程中, 将 *toll4* 纳入免疫系统中并成为其一部分, 以便更好地应对恶劣的水生环境 (Zhou et al. 2016)。目前鳄蜥 toll 样受体 4 的功能和表达水平仍未见报导, 鉴于爬行类动物 *toll4* 基因的研究严重匮乏, 在缺乏其近缘种参考的情况下, 本实验假设鳄蜥的 toll 样受体 4 具有功能并且在防御细胞中表达, 进而探索其多态性。

Toll 样受体家族在先天性免疫系统对病原微生物启动第一轮抵抗反应以及诱导适应性免疫反应具有重要意义 (O'Neill et al. 2013)。爬行动物免疫系统研究的缺乏 (Zimmerman et al. 2010) 不利于其保护。病原体通过不断进化以逃避宿主的免疫机制, 探索免疫基因的变异对了解鳄蜥遭受疾病的压力据有重要参考意义。尽管本研究的鳄蜥个体数量并不是很多, 但鉴于其种群数量极少, 本研究为随机采样, 因此研究结果对鳄蜥的遗传变异程度具有代表性。总体来说, 本研究的结果为鳄蜥的疾病研究、保护管理、野外放归等提供分子遗传背景的理论支撑, 为鳄蜥的保护工作提供重要资料, 同时也为其他爬行类动物特别是蜥蜴目的 toll 样受体 4 研究提供了参考。

**致谢** 黄锦龙老师、何明先同学、程瑞同学协助采样, 在此表达衷心的感谢!

## 参 考 文 献

- Altschul S F. 1990. Basic local alignment search tool (BLAST). *Journal of Molecular Biology*, 215(3): 403–410.
- Aderem A, Ulevitch R J. 2000. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*, 406(6797): 782–787.
- Akira S. 2001. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature Immunology*, 2(8): 675–680.
- Awomoyi A, Rallabhandi P, Pollin T I, et al. 2007. Association of TLR4 polymorphisms with symptomatic respiratory syncytial virus infection in high-risk infants and young children. *Immunology*, 179(5): 3171–3177.
- Agnieszka K, Wenzel M A, Laetsch D R, et al. 2018. Signatures of balancing selection in toll-like receptor (TLRs) genes—novel insights from a free-living rodent. *Scientific Reports*, 8(1): 8361.
- Bandelt H J, Forster P, Röhl A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16(1): 37–48.
- Burland T G. 2000. DNASTAR's lasergene sequence analysis software. *Methods in Molecular Biology*, 132: 71–91.
- Barton G M, Medzhitov R. 2003. Toll-Like Receptor Signaling Pathways. *Science*, 300(5625): 1524–1525.
- Berdeli A, Emingil G, Saygan B H, et al. 2007. TLR2 Arg753Gly, TLR4 Asp299Gly and Thr399Ile gene polymorphisms are not associated with chronic periodontitis in a Turkish population. *Journal of Clinical Periodontology*, 34(7): 551–557.
- Ferwerda B, McCall M B, Alonso S, et al. 2007. TLR4 polymorphisms, infectious diseases, and evolutionary pressure during migration of modern humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(42): 16645–16650.
- Faber J, Henninger N, Finn A, et al. 2009. A toll-like receptor 4 variant is associated with fatal outcome in children with invasive meningococcal disease. *Acta Paediatrica Japonica*, 98(3): 548–552.
- Gao J, Li Q, Wang Z, et al. 2017. Sequencing, de novo assembling and annotating the genome of the endangered Chinese crocodile lizard *Shinisaurus Crocodilurus*. *Gigascience*, 6(7):1–6.
- Hawn T R, Verbon A, Janer M, et al. 2005. Toll-like receptor 4 polymorphisms are associated with resistance to Legionnaires' disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(7): 2487–2489.
- Hise A G, Dachel K, Gillette-Ferguson I, et al. 2007. Innate immune responses to endosymbiotic *Wolbachia* bacteria in *Brugia malayi* and *Onchocerca volvulus* are dependent on TLR2, TLR6, MyD88, and Mal, but not TLR4, TRIF, or TRAM. *The Journal of Immunology*, 178(2): 1068–1076.
- Ishii A, Kawasaki M, Matsumoto M, et al. 2007. Phylogenetic and expression analysis of amphibian *Xenopus* toll-like receptors. *Immunogenetics*, 59(4): 281–293.
- Jiang H, Zhang X, Li L, et al. 2019. Identification of *Austwickia*

- chelonae* as cause of cutaneous granuloma in endangered crocodile lizards using metataxonomics. *Peer J*, 7: e6574.
- Kar A, Panigrahi S, Tripathy S, et al. 2015. Influence of common variants of TLR4 and TLR9 on clinical outcomes of *Plasmodium falciparum* malaria in Odisha, India. *Infection, Genetics and Evolution*, 36: 356–362.
- Kiechl S, Lorenz E, Reindl M, et al. 2002. Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis. *The New England Journal of Medicine*, 347(3): 185–192.
- Krauss I R, Parkinson G N, Merlino A, et al. 2014. A regular thymine tetrad and a peculiar supramolecular assembly in the first crystal structure of an all-LNA G-quadruplex. *Acta Crystallographica Section D, Biological Crystallography*, 70(2): 362–370.
- Knafler G J, King T M, Senior A M, et al. 2015. Toll-like receptor diversity in 10 threatened bird species: relationship with microsatellite heterozygosity. *Conservation Genetics*, 16(3): 595–611.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7): 1870–1874.
- Librado P, Rozas J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(11): 1451–1452.
- Liu W, Xie Y, Ma J, et al. 2015. IBS: an illustrator for the presentation and visualization of biological sequences. *Bioinformatics*, 31(20): 3359–3361.
- Medzhitov R. 2001. Toll-like receptors and innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 1(2): 135–145.
- Mikami T, Miyashita H, Takatsuka S, et al. 2012. Molecular evolution of vertebrate Toll-like receptors: evolutionary rate difference between their leucine-rich repeats and their TIR domains. *Gene*, 503(2): 235–243.
- Noreen M, Shah M A, Mall S M, et al. 2012. TLR4 polymorphisms and disease susceptibility. *Inflammation Research*, 61(3): 177–188.
- O'Neill L A, Golenbock D, Bowie A G. 2013. The history of Toll-like receptors—redefining innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 13(6): 453–460.
- Rychlik W. 2007. OLIGO 7 primer analysis software. *Methods in Molecular Biology*, 402: 35–59.
- Rebl A, Goldammer T, Seyfert H M. 2010. Toll-like receptor signaling in bony fish. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 134(3–4): 139–150.
- Shang S, Zhong H, Wu X, et al. 2017. Genomic evidence of gene duplication and adaptive evolution of Toll like receptors (TLR2 and TLR4) in reptiles. *International Journal of Biological Macromolecules*, 109: 698–703.
- Sullivan A P, De Manuel M, Marques-Bonet T, et al. 2017. An evolutionary medicine perspective on Neandertal extinction. *Journal of Human Evolution*, 108: 62–71.
- Török H P, Glas J, Tonenchi L, et al. 2004. Polymorphisms of the lipopolysaccharide-signaling complex in inflammatory bowel disease: association of a mutation in the Toll-like receptor 4 gene with ulcerative colitis. *Clinical Immunology*, 112(1): 85–91.
- Vaure C, Liu Y. 2014. A comparative review of toll-like receptor 4 expression and functionality in different animal species. *Frontiers in Immunology*, 5: 316.
- Wlasiuk G, Nachman M W. 2010. Adaptation and constraint at Toll-like receptors in primates. *Molecular Biology and Evolution*, 27(9): 2172–2186.
- Wang J, Zhang Z, Liu J, et al. 2015. Structural characterization and evolutionary analysis of fish-specific TLR27. *Fish and Shellfish Immunology*, 45(2): 940–945.
- Wang J, Zhang Z, Liu J, et al. 2016. Ectodomain architecture affects sequence and functional evolution of vertebrate toll-like receptors. *Scientific Reports*, 6(1): 26705.
- Zimmerman L M, Vogel L A, Bowden R M. 2010. Understanding the vertebrate immune system: insights from the reptilian perspective. *Journal of Experimental Biology*, 213(5): 661–671.
- Zhou Y, Liang Q, Li W, et al. 2016. Characterization and functional analysis of toll-like receptor 4 in Chinese soft-shelled turtle *Pelodiscus sinensis*. *Developmental and Comparative Immunology*, 63: 128–135.
- Zhang P, Huang K, Zhang B, et al. 2018. High polymorphism in MHC-DRB genes in golden snub-nosed monkeys reveals balancing selection in small, isolated populations. *BMC Evolutionary Biology*, 18(1): 29.
- 陈铭. 2011. 水稻蛋白质磷酸化位点预测工具 Meta-Server 的构建. 福州: 福建农林大学硕士学位论文.
- 刘可人, 金美芳, 吴士良. 2006. O-糖基化位点预测及糖基化酶催化特点. *生命的化学*, 26(1): 25–27.
- 罗丹, 贝荣丙, 陈金平, 等. 2013. 应用口腔拭子法采集鳄鱼 DNA 的效果评价 // 中国动物学会兽类学分会. 第九届全国野生动物生态与资源保护学术研讨会论文集. 武汉. 127.

莫运明, 邹异. 2000. 鳄蜥的现状与保护. 东北林业大学学报, 28(6): 121-122.

武正军, 戴冬亮, 黄乘明, 等. 2007. 广东省罗坑自然保护区鳄蜥

对溪沟林型的选择. 生态学杂志, 26(11): 1777-1781.

赵保胜, 霍海如, 姜廷良. 2007. Toll 样受体 4 的研究及现状. 中国临床药理学与治疗学, 12(1): 19-22.