

دراسة تأثير مورث (TLR4(T4CRB1) في بعض المؤشرات الإنتاجية والمناعية عند أبقار الهولشتين-فريزيان

طالبة الدكتوراه: صباح الحاج نعيان كلية الزراعة - جامعة البعث

اشراف الدكتور: علي ديب + د. عامر الدباغ

الملخص

أجريت الدراسة على 20 رأساً من أبقار الهولشتين-فريزيان في منشأة أبقار حمص، وتم أخذ عينات دم من الأبقار خلال فترة التجربة ولمرة واحدة، وكذلك جمع الحليب من الحلبتين الصباحية والمسائية من الكنترولات الشهرية بالمحطة، إذ نفذ العمل المخبري على عينات الدم في مخابر كلية الطب البيطري في حماة، وحللت عينات الحليب في مركز البحوث العلمية الزراعية بحماة باستخدام جهاز لآكتوسكان، لهدف تحديد الأنماط الوراثية للموقع الوراثي (TLR4(T4CRB1)، ودراسة ارتباطه وعلاقته مع إنتاج الحليب ومكوناته، بالإضافة لتأثيره في عدد الخلايا الجسمية ودرجة الإصابة بالتهاب الضرع، ونتج عن استخدام تقنية polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)، وتقنية تسلسل DNA لـ TLR4(T4CRB1) نتجت الأنماط الوراثية الثلاثة AA,AB,BB. ساد القرين B على القرين A في المورث (TLR4(T4CRB1)، وكانت درجة التعددية الشكلية معتدلة، وأظهرت النتائج عدم ارتباط الأنماط الوراثية للموقع الوراثي (TLR4(T4CRB1) مع المؤشرات الإنتاجية (النسبة المئوية للدسم والمواد الصلبة اللادهنية واللاكتوز والبروتين بالإضافة للكثافة وكميات الحليب الصباحية والمسائية والموسمية)، والمناعية (عدد الخلايا الجسمية ودرجة الإصابة بالتهاب الضرع).

الكلمات المفتاحية: هولشتين-فريزيان، PCR-RFLP، تسلسل DNA،
TLR4(T4CRB1).

A study of effect TLR4(T4CRB1) gene on some productive and immunological indicator in Holstein-Friesian cattle

Summary

The study was conducted on **20** Holstein-Friesian cows in the facility of Homs cows, blood and milk samples were collected, and laboratory work was carried out on blood samples in the laboratories of the College of Veterinary Medicine in Hama, and milk samples were analyzed at the Agricultural Scientific Research Center in Hama. The genotypes of the TLR4(T4CRB1) gene, and the study of their association with milk production and its components, in addition to their effect on the number of somatic cells and the degree of mastitis, polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) and DNA sequencing, was used to determine the AA,AB,BB genotypes. The results showed that the three genotypes of the TLR4(T4CRB1) gene were not associated with milk production and its components, and all the genotypes were not significantly associated with the number of somatic cells and the degree of infection.

Key words: TLR4(T4CRB1) gene, PCR-RFLP - mastitis - milk.

أولاً: المقدمة:

يؤثر العامل الوراثي على سمة إنتاج الحليب وحدوث التهاب الضرع، وتتحكم بهاتين السمتين المعقدتين العديد من المورثات في عدة مواقع وراثية، من هذه المورثات مورث toll like receptor TLR4، الذي يعد أول مستقبل تم تحديده من عائلة مستقبلات التول TLRs عند الثدييات [1]، التي تنتمي إلى عائلة مستقبلات التعرف النمطية عبر الغشاء البروتينية pattern recognition receptor PRR [2]، وكل مستقبل يتعرف على مجموعة خاصة من الأنماط الجزيئية المرتبطة بالعوامل الممرضة pathogen associated molecular patterns PAMP مما يؤدي إلى استجابات مناعية [3]، وتم الإبلاغ عن عشرة أفراد من مستقبلات التول TLR1-10 عند الأبقار لكل منها موقعه الكروموسومي الخاص وطول وتسلسل مميز من الأحماض الأمينية [4]. يتعرف TLR4 ويرتبط في غدة الضرع مع عديد السكاريد الشحمي lipopolysaccharides LPS وهو أحد مكونات الجدار الخلوي للبكتريا سالبة الغرام التي تعد من أهم مسببات التهاب الضرع مما يؤدي لإحداث استجابة مناعية التهابية [5], [6].

ويتم تنشيط هذه الخلايا عن طريق التعرف على LPS، ويؤدي الارتباط بين المستقبل والمسبب PRR-PAMP إلى نسخ وإفراز السيتوكينات والكيموكينات cytokines and chemokines التي تؤدي إلى تضاعف أعداد العدلات [7]، وإرسال إشارات لتوجيه خلايا البالعات الوحيدات monocytes إلى مكان الإصابة التي تعد الخلايا الفعالة في الجهاز المناعي الطبيعي.

اكتشف مورث TLR4 البقري في عام 2003، وهو يقع على الكروموسوم 8 (BTA8) [4]، ويتكون من ثلاثة إكسونات وإنترونين [8]، ويشفر مورث TLR4 841 من الأحماض أمينية مقسمة إلى ثمانية مناطق، وتعد منطقة ربط المستقبل المشتركة المفترضة co receptor-binding region منطقة التعرف على العوامل الممرضة ومنها تم اختيار الموقع الوراثي TLR4(T4CRB1) [9].

يعتبر مورث TLR4 مورث مرشح بقوة في الدراسات الوظيفية لتعزيز مقاومة التهاب الضرع في ماشية الحليب [10]، وارتبط اختلاف تسلسل النوكلووتيدات في مناطق الترميز

لمورث TLR4 مع درجة الخلايا الجسمية SCS وثبات إنتاج الحليب، وأن الأبقار ذات القرين A كانت درجة الخلايا الجسمية SCS لديها أقل من الأبقار ذات القرين B [9]. وقد أشارت العديد من الدراسات إلى وجود علاقة بين تعدد أشكال TLR4 ومؤشرات إنتاج الحليب، وارتبط TLR4 في الأبقار الإيرلندية مع كل من نسبة البروتين والدهن في الحليب في أواخر موسم الحلابة بفروق معنوية $P < 0.05$ [11]، وارتبط القرين B في أبقار الهولشتاين الإيرانية بزيادة إنتاج الحليب بالموسم المعدل وبالقيمة التربوية لإنتاج الحليب، وانخفاض كل من النسبة المئوية للدهن وSCS بالمقارنة مع القرين A [12]، ولم تكن هناك علاقة معنوية بين مورث TLR4 وعدد الخلايا الجسمية SCC في أبقار الهولشتاين الصينية، ولكن كانت العلاقة معنوية مع محتوى الحليب من الدهن والمواد الصلبة الكلية [13]، ولوحظ عدم وجود ارتباط بين SNP لـ TLR4 و SCC مع وجود تأثير معنوي لـ TLR4 على كل من كمية الحليب ومحتواه من الدهن والبروتين والمواد الصلبة الكلية [14].

ولهذا يهدف البحث إلى التوصيف الجزيئي لمورث (TLR4(T4CRB1) من خلال تحديد أنماطه الوراثية و قرائنه في الأبقار المدروسة، بالإضافة لتقدير إنتاج الحليب والنسبة المئوية للدهن والبروتين والمواد الصلبة اللادهنية واللاكتوز وكذلك الكثافة، وإلى تحديد الحالة الصحية لضرع الأبقار المدروسة من خلال إصابتها أو عدم إصابتها بمرض التهاب الضرع السريري، بالإضافة لدراسة العلاقة بين القرائن والأنماط الوراثية الناتجة (TLR4(T4CRB1) مع المؤشرات الإنتاجية والمناعية المدروسة.

ثانياً: مواد وطرائق البحث

1. مواد البحث:

جمعت عينات الدم لمرة واحدة من 20 رأساً من إناث أبقار الهولشتين-فريزيان (من الموسم الثاني و الثالث) من منشأة أبقار حمص (محطة المختارية)، من الوريد الوداجي بأنابيب مانعة لتخثر الدم EDTA، وخزنت بالثلاجة لحين الاستخلاص، وجمعت عينات الحليب من 20 رأساً من أبقار الهولشتين - فريزيان من الكنترول الشهري طول موسم الحلابة من الحلابتين الصباحية والمسائية، وتم تسجيل كمية الحليب الصباحية والمسائية،

وحساب الإنتاج الكلي الموسمي من الحليب، وشخصت الإصابة بالتهاب الضرع باختبار كاليفورنيا.

2. طرائق البحث:

a. تحليل عينات الحليب: حلت عينات الحليب في مركز البحوث الزراعية في حماة باستخدام جهاز لكتوسكان Lactoscan لتحديد النسبة المئوية للدهن والبروتين والمواد الصلبة اللاذهنية واللاكتوز والكثافة.

b. استخلاص DNA: تم استخلاص DNA من عينات الدم الكامل باستخدام كيت خاص DUAL Genomic DNA Isolation Kit (Cat no.NA015-0100) ووفقاً لتعليمات الشركة المصنعة في مخبر كلية الطب البيطري بجامعة حماة. وحددت الأنماط الوراثية للمورث (T4CRBR1) TLR4 باستخدام تقنية polymerase chain reaction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)، وتقنية التسلسل.

c. شروط PCR:

صممت المرئسات primers المطلوبة للمورث (T4CRBR1) TLR4 مطابقة لمرئسات الباحث wang (2007)، ونفذ تفاعل الـ PCR بحجم 50 µl وفقاً لبرنامج الـ PCR المذكور في الجدول (1).

وتم الكشف عن طول القطعة الهدف بترحيل ناتج تفاعل الـ PCR بالرحلان الكهربائي بهلام الآغاروز 1.5% المصبوغ بالإثديوم برومايد ethidium bromide، وتعرض الهلامة للأشعة فوق البنفسجية .

الجدول(1): برنامج ونتائج تفاعل الـ PCR

الطول bp	الموقع	الاستطالة لجميع الدورات	عدد الدورات	الاستطالة للدورة الأولى	الاتحام	مرحلة التمسح	المرحلة التمهيدية	القطعة الهدف
316	إكسون 2 وجزء من الإنترون 1 و 2	10 / م° 72 د	35	72 م° / 40 ثا	62 م° / 30 ثا	95 م° / 30 ثا	95 م° / 5 د	TLR4 (T4CRBR1)
forward: 5' AGGTTGACTGGTCTCTTTG 3' reverse: 5' ACAGTGGTAGAACTCATGC 3								المرئسات

d. تحديد الأنماط الوراثية للمورث (TLR4 (T4CRBR1) :

حددت الأنماط الوراثية باستخدام تقنية PCR-RFLP وفقاً للبرنامج المذكور في الجدول رقم (1)، ورحل ناتج التقطيع بالرحلان الكهربائي بهلام الآغاروز 1.5% المصبوغ بالإثديوم برومايد، لمشاهدة وقياس الحزمة الناتجة بوحدة الأشعة فوق البنفسجية [9]. ثم سلسل ناتج الـ PCR (القطعة الهدف 316 bp) بتقنية تسلسل الحمض النووي.

e. تحليل البيانات:

حللت البيانات إحصائياً باستخدام برنامج التحليل الإحصائي (SPSS ver.15) وتمت المقارنة بين المتوسطات باستخدام اختبار أقل مدى معنوي (اختبار Duncan)، وبإجراء تحليل التباين ANOVA، واختبار t لعينتين مستقلتين.

تم حساب تكرار الأنماط الوراثية والأليلات، وتغاير الزيغوت (H, Ho, He) heterozygosity، وتحديد توازن هاردي-واينبرغ للطفرة باختبار مربع كاي باستخدام برنامج (POPGENE software ver. 1.31).

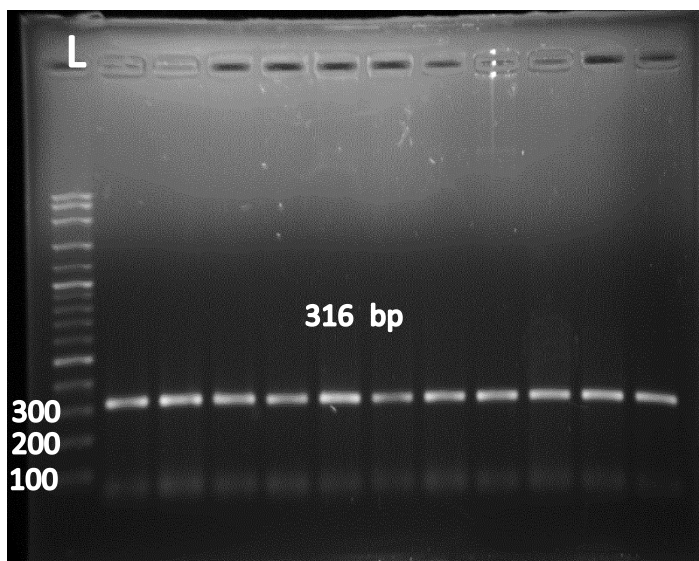
قدر متوسط عدد الخلايا الجسمية (SCC) somatic cell count، ودرجة الإصابة عن طريق اختبار الحساسية لالتهاب الضرع (اختبار كاليفورنيا)، كما يبين الجدول رقم (2).

الجدول(2): تقدير درجة الإصابة بالتهاب الضرع

درجة الإصابة	غير مصابة	مشتبه الإصابة	إصابة متوسطة	إصابة شديدة
عدد الخلايا الجسمية	100000- 220000	220000- 400000	400000- 1200000	أكبر من 1200000

ثالثاً: النتائج والمناقشة:

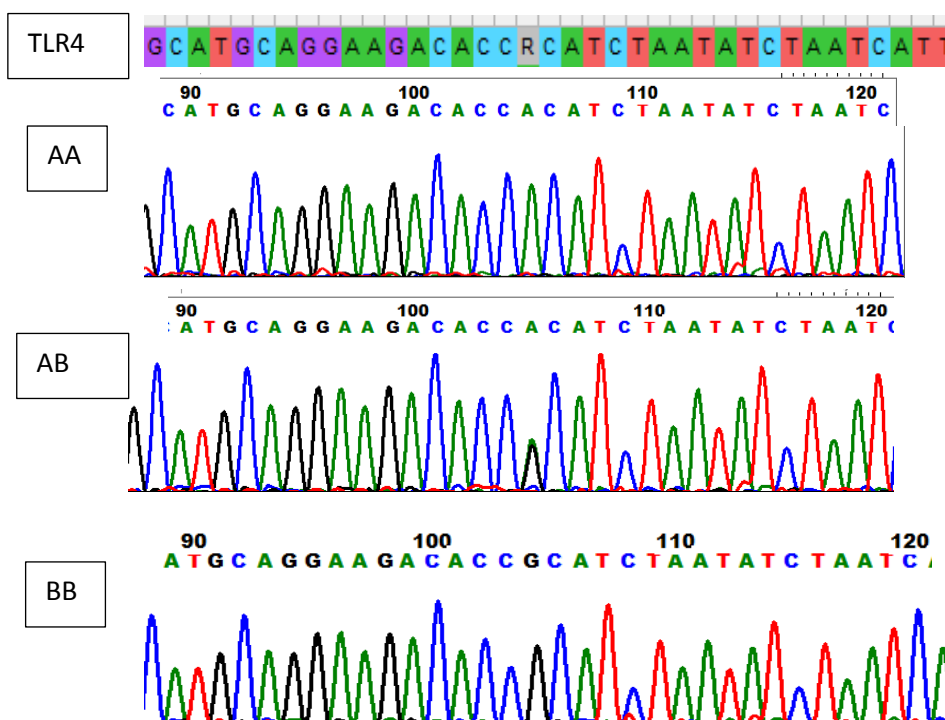
A. نتائج تقنية PCR-RFLP: بعد ترحيل ناتج تفاعل الـ PCR لـ 20 عينة تم على هلام الأغاروز 1.5% ظهرت حزمة القطعة الهدف (316bp) كما يظهر في الشكل رقم (1).



الشكل (1): ناتج تفاعل PCR لـ TLR4(T4CRBR1)، وظهور القطعة الهدف

L: سلم أطوال DNA، 316 bp

B. نتائج تسلسل DNA: بعد التأكد من ظهور القطعة الهدف 316 bp أرسلت العينات للسلسلة في شركة Macrogen، نجح التسلسل في 19 عينة وفشلت عينة واحدة، بعد السلسلة تم تحديد تعدد أشكال النوكليوتيدات الأحادية (SNP) single nucleotide polymorphism A-G عند النيوكليوتيد 4,525 في الإنترون الأول من المورث TLR4، وبسبب هذا الاختلاف ظهرت الأنماط الثلاثة AA,AB,BB، كما يظهر بالشكل رقم(2)، وهذه النتيجة تتفق مع نتيجة الباحثين [9].



الشكل (2): تسلسل وأنماط المورث (TLR4(T4CRB1) ، R: مكان الاختلاف

النيكلوتيدي الذي نتج عنه الأنماط AA, AB, BB.

C. تكرارات الأنماط الوراثية والقرائن: يظهر الجدول رقم (3) أن القرين B بتكرار 0.5263 هو السائد على القرين A، والنمط الوراثي AB بتكرار 0.5263 هو النمط الأكثر تكراراً، وأن النمط الوراثي AA هو الأقل تكراراً، وهذه النتيجة لاتتفق مع الأبحاث الأخرى التي ساد فيها القرين A على القرين B، ولكن تتفق معها بأن النمط الوراثي AB الأكثر تكراراً [15], [9] ، ويعزى سبب التناقض إلى صغر حجم العينة المدروسة من الأبقار.

الجدول (3): تكرار الأنماط الوراثية والقرائن للموقع (TLR4(T4CRB1).

تكرار القرين		تكرار النمط الوراثي			النمط الوراثي العدد
B	A	BB 5	AB 10	AA 4	
0.5263	0.4737	0.2631	0.5263	0.2105	

D. السمات والخصائص الوراثية: يبين الجدول رقم (4) السمات الوراثية لـ TLR4(T4CRBR1)، في هذه الدراسة كانت قيمة كل من $H=0.49861$ و $PIC=0.3743$ أقل من 0.50 مما يشير إلى أن درجة التعددية الشكلية والاختلاف الوراثي معتدلة [16]، وقيمة مربع كاي كانت غير معنوية ($P > 0.05$) أي أنه ضمن توازن هاردي-واينبرغ، وأن التكرارات الوراثية والقرائنية سوف تبقى ثابتة في الأجيال التالية، وهذه النتيجة تتفق مع نتيجة الباحثين [9]، [15].

الجدول (4): السمات والخصائص الوراثية للمورث TLR4(T4CRBR1)

عدد القرائن	تأثير عدد القرائن	تغاير الزايجوت المشاهد	تغاير الزايجوت المتوقع	التغاير	درجة التعددية الشكلية	مربع كاي
N_a	N_e	H_o	H_e	H	PIC	χ^2
2	1.9945	0.5263	0.5121	0.49861	0.3743	n.s.0.9009

N_a , number of alleles; N_e , effective number of alleles; H_o , observed heterozygosity; H_e , expected heterozygosity; PIC , polymorphism information contents; n.s., non-significant

E. العلاقة بين الأنماط الوراثية للمورث TLR4(T4CRBR1) وسمة إنتاج الحليب: لم تؤثر الأنماط الوراثية الثلاثة للمورث TLR4(T4CRBR1) معنوياً على النسبة المئوية للدهن وللمواد الصلبة اللادھنية وللبروتين وللاكتوز والكثافة في الحلابتين الصباحية والمساءية، وكذلك لم ترتبط الأنماط معنوياً بكميات الحليب (الصباحية والمساءية والموسمية)، كما هو موضح بالجدولين رقم (5 و6)، وهناك تفسيران لهذه النتيجة، إما بسبب قلة عدد الأبقار الداخلة في الدراسة (19 بقرة)، أو لأن المورث TLR4 من مورثات التي لها دور مناعي وليس إنتاجي، وتساهم بشكل مباشر في الاستجابة الالتهابية [17].

الجدول (5): علاقة الأنماط الوراثية للمورث TLR4(T4CRBR1) مع متوسطات

مكونات الحليب ± الانحراف المعياري في الحلابة الصباحية والمسائية.

البروتين (%) n.s.	اللاكتوز (%) n.s.	المواد الصلبة اللادهنية (%) n.s.	الكثافة كغ/م ³ n.s.	الدهن % n.s.	موعد الحلابة	النمط الوراثي عدد الأبقار
0.0585±3.0675	0.0387±4.5150	0.2581±8.4275	0.759±28.922	0.4626±3.6350	صباحا	AA
0.0714±3.1025	0.0408±4.5500	0.2476±8.4675	0.917±29.055	0.4420±3.7950	مساء	4
0.1032±3.1240	0.1200±4.6020	0.2073±8.4940	0.824±28.528	0.4813±3.6110	صباحا	AB
0.1005±3.1620	0.1186±4.6530	0.2289±8.5600	0.832±28.446	0.4950±3.7610	مساء	10
0.1915±3.1260	0.0918±4.5840	0.1516±8.3820	0.476±28.224	0.2628±3.9280	صباحا	BB
0.1800±3.1800	0.0844±4.6240	0.1361±8.4480	0.471±28.260	0.2765±4.0660	مساء	5

n.s.: غير معنوي

الجدول (6): علاقة الأنماط الوراثية للمورث TLR4(T4CRBR1) مع متوسطات

كميات الحليب ± الانحراف المعياري في الحلابة الصباحية و المسائية.

الانتاج الموسمي كغ اليومي/ n.s.	الانتاج الموسمي كغ n.s.	الحليب اليومي كغ n.s.	الحليب الكلي في الحلابة كغ n.s.	موعد الحلابة	النمط الوراثي عدد الأبقار
7.518±21.430	2475±6380	3.798±11.690	1260.4±3476.5	صباحا	AA
		3.724±9.745	1215.7±2903.5	مساء	4
5.513±25.920	1659±7863	2.874±13.946	862.9±4229.8	صباحا	AB
		2.640±11.978	797.7±3633.1	مساء	10
4.867±23.720	1382±7061	2.571±12.834	714.7±3819.2	صباحا	BB
		2.315±10.888	671.1±3242.0	مساء	5

n.s.: غير معنوي

F. العلاقة بين درجة الإصابة بالتهاب الضرع ومكونات الحليب وكميته والنمط الوراثي

وعدد الخلايا الجسمية:

ويظهر الجدول رقم (7) وجود فروق غير معنوية بين الأنماط الوراثية للمورث TLR4(T4CRBR1) ودرجة الإصابة بالتهاب الضرع، وذلك بسبب صغر حجم العينة المدروسة بالمقارنة مع الأبحاث الأخرى، ولقد ارتبطت درجة الإصابة وعدد الخلايا الجسمية بفروق معنوية وبالعلاقة طردية، كما يظهر في الجدول رقم (7)، وهذه نتيجة طبيعية لأن عدد الخلايا الجسمية يعكس درجة الإصابة بالتهاب الضرع [18].

الجدول (7): العلاقة بين درجة الإصابة بالتهاب الضرع وTLR4(T4CRBR1) وعدد الخلايا الجسمية، (مربع كاي، الانحراف المعياري \pm المتوسط).

عدد الخلايا الجسمية $\times 1000$	مورث TLR4(T4CRBR1)	درجة الإصابة
200.00 \pm 0.000 ^c **	Chi-square $\chi^2=4.402$ P= 0.8292 n.s.	غير مصابة
460.00 \pm 0.000 ^{b,c} **		مشتببه الإصابة
638.33 \pm 192.110 ^b **		إصابة متوسطة
2900.00 \pm 1055.525 ^a **		إصابة شديدة

a,b: تشير الأحرف إلى الاختلافات بين بعضها البعض، **: المعنوية أقل من 0.01، *المعنوية أقل من 0.05، n.s.: غير معنوي.

G. تأثير الأنماط الوراثية للمورثين الكابا كازنين وTLR4 في عدد الخلايا الجسمية يوضح الجدول رقم (8) نتائج تحليل التباين أحادي الاتجاه، ومنه نستنتج أنه لا توجد فروق ذات دلالة إحصائية بين الأنماط الوراثية للمورث (TLR4(T4CRBR1) وعدد الخلايا الجسمية، هذه النتيجة لا تتفق مع نتيجة الباحثين [9] ونظراً للارتباط الوراثي العالي بين التهاب الضرع وعدد الخلايا الجسمية [19]، فإن هذه النتيجة تفسر كما فسرت علاقة الأنماط الوراثية للموقع الوراثي بدرجة الإصابة.

الجدول (8): تأثير الأنماط الوراثية للمورث (TLR4(T4CRB1) في عدد

الخلايا الجسمية

المورث	الأنماط الوراثية	عدد الخلايا الجسمية $1000 \times$ المتوسط \pm الانحراف المعياري	قيمة عامل فيشر F قيمة الاحتمالية P	الدالة الإحصائية
TLR4(T4CRB1)	AA AB BB	1005 \pm 879 1030 \pm 922 1196 \pm 2051	F= 0.03 P= 0.967	غير معنوي

خامساً: الاستنتاجات والتوصيات

• الاستنتاجات

1. نتج عن استخدام تقنية PCP-RFLP وبسلسلة القطعة الهدف للموقع الوراثي TLR4(T4CRB1) الأنماط الوراثية الثلاثة AA,AB,BB.
2. ساد القرين B على القرين A في كل من TLR4(T4CRB1)، وكانت درجة التعددية الشكلية معتدلة في الموقع الوراثي.
3. لم ترتبط الأنماط الوراثية للموقع الوراثي TLR4(T4CRB1) بفروق معنوية مع المؤشرات الإنتاجية (النسبة المئوية للدم والمواد الصلبة اللادهنية واللاكتوز والبروتين بالإضافة للكثافة وكميات الحليب الصباحية والمسائية والموسمية)، والمناعية (عدد الخلايا الجسمية ودرجة الإصابة بالتهاب الضرع).

• التوصيات

ينصح بإجراء مزيداً من الأبحاث مع أعداد كبيرة من الحيوانات ومن سلالات مختلفة للتحقق من النتائج.

سادساً: المراجع:

- [1] K. Takeda and S. Akira, "Toll-like receptors in innate immunity," *Int. Immunol.*, vol. 17, no. 1, pp. 1–14, 2005, doi: 10.1093/intimm/dxh186.
- [2] N. J. Gay and M. Gangloff, "Structure and function of toll receptors and their ligands," *Annual Review of Biochemistry*, vol. 76. pp. 141–145, 2007. doi: 10.1146/annurev.biochem.76.060305.151318.
- [3] M. Muzio *et al.*, "Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells," *J. Immunol.*, vol. 164, no. 11, pp. 5998–6004, 2000.
- [4] K. McGuire, M. Jones, D. Werling, J. L. Williams, E. J. Glass, and O. Jann, "Radiation hybrid mapping of all 10 characterized bovine Toll-like receptors," *Anim. Genet.*, vol. 37, no. 1, pp. 47–50, Feb. 2006, doi: 10.1111/j.1365-2052.2005.01364.x.
- [5] D. D. Bannerman, M. J. Paape, W. R. Hare, and J. S. Eun, "Increased levels of LPS-binding protein in bovine blood and milk following bacterial lipopolysaccharide challenge," *J. Dairy Sci.*, vol. 86, no. 10, pp. 3128–3137, 2003, doi: 10.3168/jds.S0022-0302(03)73914-9.
- [6] D. D. Bannerman, "Pathogen-dependent induction of cytokines and other soluble inflammatory mediators during intramammary infection of dairy cows.," *Journal of animal science*, vol. 87, no. 13 Suppl. pp. 10–25, 2009. doi: 10.2527/jas.2008-1187.
- [7] A. W. Hill, "Factors influencing the outcome of Escherichia coli mastitis in the dairy cow," *Res. Vet. Sci.*, vol. 31, no. 1, pp. 107–112, 1981, doi: 10.1016/s0034-5288(18)32532-3.
- [8] S. N. White, K. H. Taylor, C. A. Abbey, C. A. Gill, and J. E. Womack, "Haplotype variation in bovine Toll-like receptor 4 and computational prediction of a positively selected ligand-binding domain," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 100, no. 18, pp. 10364–10369, 2003, doi: 10.1073/pnas.1333957100.

- [9] X. Wang, S. Xu, X. Gao, H. Ren, and J. Chen, "Genetic Polymorphism of TLR4 Gene and Correlation with Mastitis in Cattle," *J. Genet. Genomics*, vol. 34, no. 5, pp. 406–412, 2007, doi: 10.1016/S1673-8527(07)60044-7.
- [10] J. Ogorevc, T. Kunej, A. Razpet, and P. Dovc, "Database of cattle candidate genes and genetic markers for milk production and mastitis," *Anim. Genet.*, vol. 40, no. 6, pp. 832–851, 2009, doi: 10.1111/j.1365-2052.2009.01921.x.
- [11] C. Beecher *et al.*, "Polymorphisms in bovine immune genes and their associations with somatic cell count and milk production in dairy cattle," *BMC Genet.*, vol. 11, no. 1, p. 99, 2010, doi: 10.1186/1471-2156-11-99.
- [12] R. Noori, A. H. Mahdavi, M. A. Edriss, H. R. Rahmani, M. Talebi, and M. Soltani-Ghombavani, "Association of polymorphism in Exon 3 of toll-like receptor 4 gene with somatic cell score and milk production traits in Holstein dairy cows of Iran," *South African J. Anim. Sci.*, vol. 43, no. 4, pp. 493–498, 2013, doi: 10.4314/sajas.v43i4.6.
- [13] X. Zhu, M. Wang, S. Xing, Z. Yang, and Y. Mao, "The polymorphisms of Toll-like receptor 4 gene influences milk production traits in Chinese Holstein cows," *J. Anim. Sci.*, vol. 94, no. suppl_5, pp. 167–168, 2016, doi: 10.2527/jam2016-0348.
- [14] M. Wang *et al.*, "Toll-like receptor 4 gene polymorphisms influence milk production traits in Chinese Holstein cows," *J. Dairy Res.*, vol. 85, no. 4, pp. 407–411, 2018, doi: 10.1017/S0022029918000535.
- [15] P. H. Gupta, N. A. Patel, D. N. Rank, and C. G. Joshi, "Genetic polymorphism of toll-like receptors 4 gene by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphisms, polymerase chain reaction-single-strand conformational polymorphism to correlate with mastitic cows," *Vet. World*, vol. 8, no. 5, pp. 615–620, 2015, doi: 10.14202/vetworld.2015.615-620.
- [16] D. Botstein, R. L. White, M. Skolnick, and R. W. Davis, "Botstein," *Am J Hum Gen*, vol. 32, pp. 314–331, 1980.

- [17] O. C. Jann *et al.*, “Comparative genomics of Toll-like receptor signalling in five species,” *BMC Genomics*, vol. 10, pp. 1–15, 2009, doi: 10.1186/1471-2164-10-216.
- [18] H. W. Barkema, J. D. Van Der Ploeg, Y. H. Schukken, T. J. G. M. Lam, G. Benedictus, and A. Brand, “Management style and its association with bulk milk somatic cell count and incidence rate of clinical mastitis,” *J. Dairy Sci.*, vol. 82, no. 8, pp. 1655–1663, 1999, doi: 10.3168/jds.S0022-0302(99)75394-4.
- [19] B. Heringstad, D. Gianola, Y. M. Chang, J. Ødegård, and G. Klemetsdal, “Genetic associations between clinical mastitis and somatic cell score in early first-lactation cows,” *J. Dairy Sci.*, vol. 89, no. 6, pp. 2236–2244, 2006, doi: 10.3168/jds.S0022-0302(06)72295-0.

