

# 柑橘 PGIP 的 B 细胞抗原表位分析和原核表达

陈波, 罗庆华, 谭雅芹, 闫慧清

(贵州师范大学生命科学学院, 贵州贵阳 550001)

**摘要:** 柑橘是重要的经济园艺植物, 但是部分人群在食用柑橘后会造成过敏现象, 其中多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白 (PGIP) 是柑橘中重要的过敏原。本文利用 Jameson-Wolf 法、Kyte-Doolittle 法、Emini 法和 Karplus-Schulz 法对柑橘过敏原蛋白 PGIP 的抗原指数、亲水性、蛋白表面可及性及柔韧性进行分析, 通过构建 PET-28 a-PGIP 载体转移到大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中进行原核表达。结果表明: 当 PGIP 二级结构是  $\beta$ -转角和无规则卷曲, 同时氨基酸序列的抗原指数  $>0$ 、柔韧性  $>0$ 、亲水性  $>0$  和蛋白表面可及性  $>1$  时的氨基酸时, 过敏原蛋白 PGIP 的 B 细胞表位结合氨基酸的序列区域是在 19~22、37~41、49~52、68~69、117~120、163~164、173~177、221~226、236~240。通过分析氨基酸的区域及原核表达, 为寻找柑橘过敏原蛋白 PGIP 的 B 细胞抗原表位的最佳优势区域提供支持, 同时也为消除柑橘过敏原蛋白 PGIP 对人体的影响的进一步研究提供理论基础。

**关键词:** 柑橘; 多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白; B 细胞表位

文章编号: 1673-9078(2018)04-18-22

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.04.004

## B Cell Epitopes Analysis and Prokaryotic Expression of PGIP in Citrus

CHEN Bo, LUO Qing-hua, TAN Ya-qin, YAN Hui-qing

(College of Life Science, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China)

**Abstract:** Citrus is an important horticulture. However consumption of citrus fruits could cause allergen for some people. With the method of Jameson-Wolf, Kyte-Doolittle, Emini and Karplus-Schulz, the antigenicity, hydrophilicity, protein surface accessibility and flexibility of citrus allergen protein PGIP (polygalacturonase inhibitor protein) were predicted. Meanwhile PET-28 a-PGIP vector was constructed, and then transfer to *Escherichia coli*. The target gene was induced and expressed. The results showed: When the secondary structure of amino acid was  $\beta$ -angle and irregular curl, the antigen index  $>0$ , the flexibility  $>0$ , the hydrophilicity  $>0$ , the protein surface accessibility  $>1$  amino acid region, the sequences of the B cell epitope binding amino acid were 19~22, 37~41, 49~52, 68~69, 117~120, 163~164, 173~177, 221~226, 236~240. By estimating the amino acid region, it provides support for finding the best possible region of the B cell epitope of citrus allergen protein PGIP, and also provides a theoretical basis for the further study of citrus allergen protein PGIP.

**Key words:** citrus; polygalacturonase inhibitory protein; cell epitope

柑橘 (*Citrus reticulata* Blanco) 的栽培面积和果实产量均居各类水果首位。柑橘果实中富含维生素 C、类胡萝卜素、类黄酮、橙皮柑和膳食纤维等多种次生代谢产物, 具有抗氧化活性、抗癌、预防心脑血管疾病以及抗菌作用等<sup>[1,2]</sup>。但在生活中仍有部分人群食用后会有发痒、肿胀、哮喘及过敏性休克等过敏反应<sup>[3]</sup>。柑橘过敏反应主要是由 IgE 介导的 I 型变态反应, 其反应包括呼吸系统、中枢神经系统和皮肤等不同形式的临床症状<sup>[4]</sup>。过敏原分布在少数限定功能蛋白家族中<sup>[5]</sup>, 包括有运输蛋白、病程相关蛋白、结构蛋白、

蛋白酶及蛋白酶抑制剂, 如多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白 PGIP (Polygalacturonase inhibiting protein, PGIP)<sup>[6]</sup>。由于这些过敏原蛋白在不同物种之间的序列具有保守性, 因此三维空间结构很相似, 易具有相似的抗原表位, 因而易引起不同物种间的交叉过敏反应<sup>[7]</sup>, 它包括同一科 (属) 水果和不同科 (属) 内的水果<sup>[8]</sup>, 水果过敏原是导致水果过敏复杂性的关键物质基础之一, 而不同植物过敏原分子结构上共同的表位是免疫交叉反应的基础。

本文利用 BLAST 将柑橘中 PGIP 蛋白序列同其他物种进行同源性对比, 根据相似程度, 利用其它植物在过敏原蛋白方面的研究与成果将有助于研究柑橘的过敏原蛋白, 而这些过敏原表位往往位于细胞表面易于检测与鉴定, 所以本文对柑橘的柑橘多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白 (PGIP) 的 B 细胞抗原表位结构域进行分析, 为寻找柑橘多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白 (PGIP)

收稿日期: 2017-12-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31660554); 博士科研启动项目 (11904-0514156、11904-0514157); “通识教育基础课程-营养与健康”课程团队项目和品牌团队 (KT2016015B)

作者简介: 陈波 (1990-), 男, 硕士在读, 主要从事园艺植物功能成分

通讯作者: 闫慧清 (1987-), 女, 副教授, 从事食品营养与健康

B 细胞抗原表位的最佳优势提供支持。同时本文构建 PET-28a-PGIP 载体, 对目的基因诱导进行原核表达, 为纯化后进行免疫学的深入研究提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 柑橘中 PGIP 氨基酸序列及同源比对

通过 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中检索到 PGIP 的蛋白序列及其登录号, 得到 PGIP 多肽链中氨基酸的排列顺序为一级结构, 并利用生物软件 BioEdit 对不同中间的一级结构进行同源比对。

### 1.2 PGIP 的二级结构及蛋白特性分析

将在 NCBI 上检索到的氨基酸序列, 利用 DNASTar 生物软件中的 Gamier-Robson 方法对蛋白质  $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠、 $\beta$ -转角和无规则卷曲的氨基酸区域进行分析。再利用 DNASTar 生物分析软件中的 protean 程序, 采用 Jameson-Wolf 法<sup>[9]</sup>、Kyte-Doolittle 法<sup>[10]</sup>、Emini 法<sup>[11]</sup>和 Karplus-Schulz 法<sup>[12]</sup>对柑橘过敏原蛋白 PGIP 的抗原指数、亲水性、蛋白表面可及性及柔韧性进行分析。将柑橘过敏原蛋白 PGIP 的二级结构分析结果与抗原指数、亲水性、蛋白表面可及性及柔韧性分析结果相结合, 进行综合分析得出 B 细胞抗原表位。

### 1.3 原核表达载体 PET-28a-PGIP 的构建

利用 Trizol 试剂盒 (Invitrogen, 货号: 15596026) 提取成熟温州蜜柑的果实总 RNA, 经 cDNA 反转录试剂盒 (Thermo, K1622) 后生成 cDNA, 并设计用于扩增 PGIP 基因的特异引物 F1: GGAATTCCATATGATGAGCAACACGTCCTACTG; R1: CCCCCCGCTCGAGTCACTTGCAGCTTTTCGA GGGGCGC。

PCR 产物电泳检测回收, 连接入 PMD18-T 载体转化测序。准备经测序可用的菌斑质粒和 pET28a(+) 载体质粒, 用 BamHI 和 HindIII 分别酶切、回收后进行过夜连接, 获得重组质粒 pET-28a-PGIP, 经 PCR 验证、酶切验证和测序证明后将重组质粒转移到大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中, 对目的基因诱导进行原核表达。

### 1.4 PET-28a-PGIP 表达产物 SDS-PAGE 检测

挑取阳性克隆, 接种于 LB 液体培养基 (含 Km=100  $\mu$ g/mL) 振荡培养过夜, 振荡培养至 OD<sub>600</sub> 约为 0.6~1.0 时, 加 IPTG 至 1.0 mM 诱导 0、1、2、5 和 7 h, 收集菌液 12000 r/min 离心 1 min, 沉淀用 SDS

凝胶加样缓冲液 (Tris-HCl 50 mmol/L, pH 6.8; SDS 2%; 二硫苏糖醇 100 mmol/L; 溴酚蓝 0.1%; 甘油 10%) 100  $\mu$ L 重悬。按比例配置 5% 浓缩胶溶液和 10% 分离胶溶液。在两玻璃板的间隙中灌注分离胶, 留出浓缩胶所需体积, 用少量水封盖。待分离胶聚合后 (30 min), 倾出水; 在已聚合的分离胶上直接灌注浓缩胶, 并插入干净的梳子。浓缩胶聚合完全后 (30 min), 小心移出梳子, 每个样品 20  $\mu$ L, 接上电源。所选用的蛋白 Marker 是 140-15 ku (NexusView™ 20 ku Dual Color, Bionexus, USA)。电泳完成后经考马斯亮蓝 R250 染色后, 更换脱色液四、五次。脱色后可将凝胶浸于水中以便观察。

## 2 结果与分析

### 2.1 PGIP 蛋白质序列的同源比对

通过 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中检索柑橘中 PGIP 的蛋白质序列, 其登陆号为 BAA31841.1。PGIP 一共编码 327 个氨基酸, 所对应序列为:

```
MSNTSLLSLFFFLCLCISPSLSDL CNPNDDKKVL
LKFKKSLNPNPYVLASWNPKTDCCDWYCVTCDLT
TNRINSLTIFAGDLPGQIPPEVGDLPYLETLMFHKL
PSLTGPIQPAIAKLNKTLRISWTNISGVPDFISQL
TNLTFLLELSFNLSGTIPGSLSKLQKLGALHLDRN
KLTGSIPESFGTFTGSIPDLYLSHNQLSGKIPASLGS
MDFNTIDLSRNKLEGDASFLFGLNKTQTRIDVSRN
LLEFNLSKVEFPQSLTNLDLNHNKIFGSIPAQITSLE
NLGFLNVSYNRLCGPIPVGGKLGQSFQYTEYFHNR
CLCGAPLER.
```

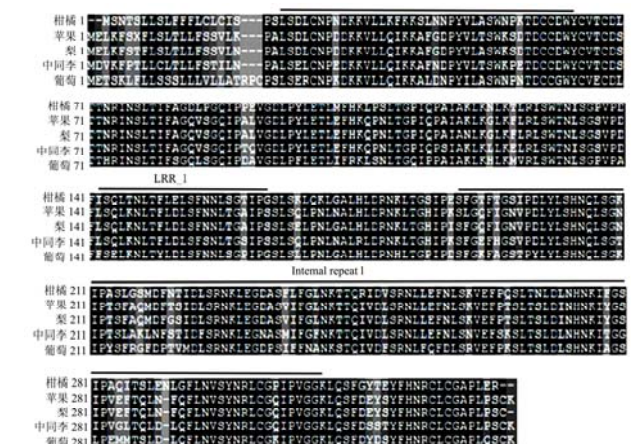


图 1 柑橘中 PGIP 与其他物种的同源比较  
Fig.1 Amino acid sequence alignments of PGIP in citrus with other plants

注: 黑色和灰色分别表示序列的相同和相似性, 相对保守区域 LRRNT\_2、LRR\_1 和 Internal repeat 1 显示在序列上方。

PGIP 的结构域包含有 LRR\_2、LRR\_1 和 Internal repeat 1, 分别位于柑橘氨基酸序列的 26-64、142-164 和 189-310。利用 BLAST 对柑橘中 PGIP 蛋白的蛋白质序列与其他物种, 如苹果(*Malus pumila*)、梨(*Pyrus*)、中国李(*Prunus salicina*)和葡萄(*Vitis vinifera*)进行同源性比对搜索后的结果如下图 1, 且氨基酸序列的相似度分别为 74%、75%、73%和 73%, 表明其在氨基酸序列上有较高的相似性, 说明这些物种之间可能存在着交叉过敏的现象。

## 2.2 柑橘 PGIP 的 B 细胞抗原表位分析

### 2.2.1 柑橘中 PGIP 蛋白二级结构分析结果

利用 DNASTar 生物软件中 Gamier-Robson 方法对

表 1 分析柑橘多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白的二级结构氨基酸序列

Table 1 Prediction secondary amino acid sequences of citrus PGIP

相关参数	分析区域 (AA)
$\alpha$ -螺旋	29、94
$\beta$ -折叠	1~15、20~22、24~25、30~38、42~46、59~63、64~67、69~77、84~89、91~93 95~100、108~127、134~140、143~148、155~158、160~174、180~186、193、194~201、205~211、213~220、227~233、239~252、255~260、262~267、269~285、287~292、297~312、323~327
$\beta$ -转角	15~16、18~19、23、26~28、37、40、47~49、51~58、64、68、78、82、102~104 128~129、149~152、154~155、159、175~176、187、189~190、193、202~204、226、293~296、313~321
无规则卷曲	17、39、41、50、79~81、83、90~91、101~102、105~107、130~133、141~142、153、177~179、188、191~192、212、221~225、234~238、253~255、261、268、286、322

### 2.2.2 Profilin 蛋白与 PGIP 蛋白抗原指数、柔韧性、亲水性及蛋白表面可及性分析

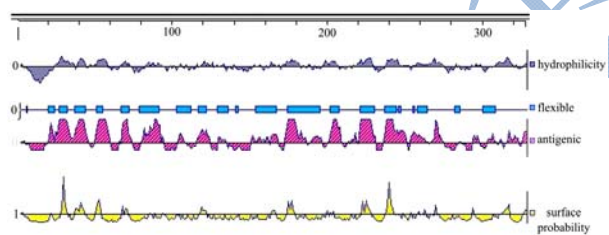


图 3 柑橘中 PGIP 蛋白的抗原指数、柔韧性、亲水性及蛋白表面可及性分析

Fig.3 The hydrophilicity, flexible regions, antigenic index and surface probability amino acid sequences of citrus PGIP

表 2 柑橘中 PGIP 蛋白抗原指数、柔韧性、亲水性及蛋白表面可及性的氨基酸序列

Table 2 Prediction of citrus PGIP antigenic index, flexible Regions, hydrophilicity and surface Probability

相关参数	分析区域 (AA)
亲水性>0	1~2、22~35、37~42、45~46、48~56、65~71、81~83、85~87、89~91、97、99、103~104、107、114、117~124、127、130~131、138、151、155、159、162~164、167、169~180、182~183、186~187、190、196~205、213、215、218~227、236~245、247~251、253~254、256~273、283、291、294~297、307~318、320、325~327

柑橘中 PGIP 蛋白的  $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠、 $\beta$ -转角和无规则卷曲的氨基酸区域进行分析, 得到的结果如图 2 所示。

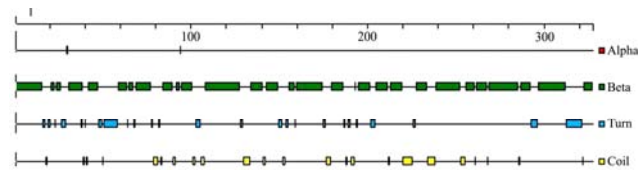


图 2 柑橘多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白的  $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠、 $\beta$ -转角和无规则卷曲相对应的氨基酸序列

Fig.2 The corresponding  $\alpha$ -helix,  $\beta$ -helix,  $\beta$ -turn and coil amino acid sequences of citrus PGIP

将 PGIP 的二级结构和其所对应的氨基酸序列分别列出, 得到柑橘中过敏原 PGIP 蛋白的序列如表 1 所示。

利用 DNASTar 生物软件中 Jameson-Wolf 方法分析得到柑橘过敏原蛋白 PGIP 的抗原指数、

Karplus-Schulz 得到柔韧性, Kyte-Doolittle 法和 Emini 法分别获得亲水性和表面可及性的氨基酸序列, 其具体的序列分布如图 3 所示。

当蛋白质的亲水性>0、柔韧性>0 蛋白表面可及性>1 和抗原指数>0 时, 形成与抗原结合表位的可能性增大, 因此根据上图 3 中显示的区域结合 Profilin 在亲水性>0、柔韧性>0 蛋白表面可及性>1 和抗原指数>0 时所对应的氨基酸序列进行列表, 结果如表 2 所示。

转下页

接上页

柔性性>0	5、19~22、26~30、36~42、50~53、66~70、78~90、102~110、116~120、128~134、139~131、153~165、173~194、200~206、220~229、235~243、244~245、254、257~263、281~284、299~306
抗原指数>0	1~3、18~44、48~58、64、66~72、79~92、102~105、114~122、128~133、149~155、157、159~160、162~166、171~184、188~194、199~207、212、214~217、219~229、235~249、252~263、265~273、283~284、292~296、302~307、310、315~321、324~327
蛋白表面可及性>1	1~20、27~30、35~41、49~52、66、68~69、83~84、87、92、116~120、160、163~165、172~177、198、200、202、221~226、236~240、243、247、252、254、256~257、259、261、268、292、309~315、325~327

### 2.2.3 PGIP 的 B 细胞抗原表位分析

蛋白质的表面可及性、亲水性和柔韧性等在抗原的形成方面发挥着重要作用,当亲水性>0、柔韧性>0、抗原指数>0、表面可及性>1 时,形成抗原表位的可能性大<sup>[9]</sup>,PGIP 二级结构中的  $\alpha$ -螺旋和  $\beta$ -折叠因氢键存在使得结构较稳定,因此不易与 B 细胞等其他物质发生作用,而 PGIP 的  $\beta$ -转角和无规则卷曲的氨基酸区域多位于蛋白质表面,较易与抗体结合,形成 B 细胞抗原表位的可能性也越大。因此综合以上所有参数,将满足要求的氨基酸序列进行综合,得到柑橘中 PGIP 的抗原结合区氨基酸的序列分别为 19~22、37~41、49~52、68~69、117~120、163~164、173~177、221~226、236~240。

### 2.3 柑橘 PET-28a-PGIP 的载体构建及表达产物检测

物检测

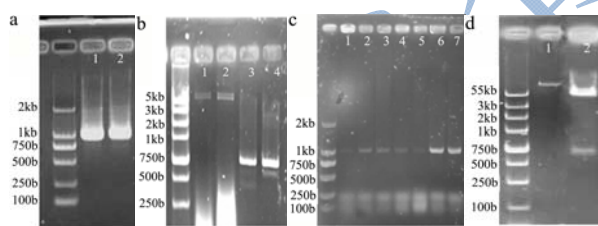


图 4 PET-28a-PGIP 载体构建图

Fig.4 The construction of PET-28a-PGIP

注: a.1 和 2 是扩增得到温州蜜柑中 PGIP 的片 cDNA 片段; b.双酶切 PET-28a 载体的电泳图, 1 和 2 为大片段, 3 和 4 为小片段; c.菌液 PCR 的阳性检测, 1-7 均为阳性克隆; d.双酶切验证, 1 为构建的重组载体, 2 酶切后的两个片段, 分别为载体和目的基因 PGIP。

从温州蜜柑的果实中扩增得到 PGIP 的 cDNA 片段大约在 1 kb(图 4a)。用 BamH I 和 Hind III 分别酶切 PGIP 和 PET-28a(图 4b)后,并连接转化到大肠杆菌中,得到的阳性克隆经菌液 PCR(图 4c)和酶切验证后(图 4d)表示载体构建 PET-28a-PGIP 成功。将重组质粒转移到大肠杆菌(*Escherichia coli*)进行增值。经 IPTG

诱导原核细胞表达和 SDS-PAGE 电泳后,得到的结果如图 5 所示,可以发现在 36 ku 和 50 ku 之间有大量的蛋白质被诱导产生,而 PGIP 蛋白的大小 36.69 ku,说明将重组载体转入到大肠杆菌中得到大量的 PGIP 蛋白。

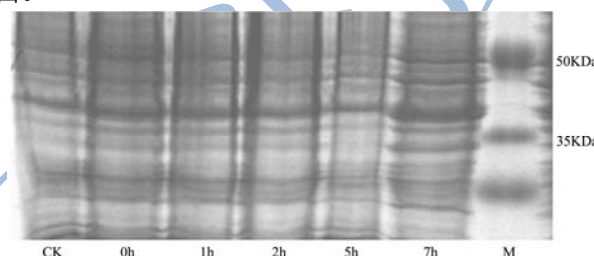


图 5 不同时间诱导下 PGIP 的 SDS-PAGE 电泳检测图(CK 为空载, M 为 marker)

Fig.5 The SDS-PAGE detection of PGIP expressed at different time (CK was used as control, M is abbreviation of marker)

### 3 讨论

抗原表位是抗原分子中能激发 B 细胞产生抗体并与抗体分子结合的一段序列,是抗原分子启动机体免疫反应最基本的结构单位<sup>[13]</sup>。引发柑橘过敏反应的免疫学物质基础就是过敏原 PGIP 的结构表位<sup>[14,15]</sup>。对柑橘过敏原 PGIP 进行 B 细胞表位的分析,可为开展低过敏性或无过敏性的柑橘制品加工以及过敏原的检测等研究工作提供理论和技术依据。

PGIP 的结构域包括 LRRNT\_2 (富含亮氨酸重复 N 端结构域)和 LRR\_1 (富亮氨酸重复)。多序列比对表明,PGIP 与其他物种的 PGIP 蛋白在氨基酸序列上有较高的相似性,都参与至于的抗病免疫系统。丰富的亮氨酸重复结构域是参与形成蛋白质与蛋白质相互作用<sup>[16]</sup>。

富含亮氨酸的结构域较小,是经典的免疫球蛋白域的特征。LRR 是丰富重复的亮氨酸在其他植物生长发育和抗病反应等方面发挥着重要作用<sup>[17]</sup>,同时也会影响植物病原体和综合防御反应的感染<sup>[18]</sup>。很多数据表明动物组织和植物之间在非自我识别系统和抗菌防御之间有着惊人的相似之处<sup>[19]</sup>。

## 4 结论

通过对 PGIP 的 B 细胞抗原表位的分析, 可利用该片段进行基因功能改造, 为后续研究培育低过敏的柑橘品种提供了一定的理论依据。本文中对于抗原性的分析均为二级结构, 对一些表位特别是通过三维结构表现其抗原性的构象依赖型抗原表位具有一定的局限性, 研究结果可以作为确定柑橘 PGIP 蛋白潜在表位的参考。实验通过构建 PET-28a-PGIP 原核表达得到大量诱导产生的 PGIP 蛋白, 可以将诱导产生的蛋白质与病原菌进行免疫杂交反应和蛋白质结构鉴定, 进一步验证其生物学功能。

## 参考文献

- [1] Kundusen S, Saha P, Bhattacharya S, et al. Evaluation of in vitro antioxidant activity of *Citrus Limetta* and *Citrus Maxima* on reactive oxygen and nitrogen species [J]. Pharma Cologyonline, 2010, 3(24-5): 850-857
- [2] Georgina E O, Kingsley O, Esosa U S, et al. Comparative evaluation of antioxidant effects of watermelon and orange, and their effects on some serum lipid profile of Wister albino rats [J]. International Journal of Nutrition & Metabolism, 2011, 8: 97-102
- [3] Bourrier C T. Allergy to citrus juice [J]. Clinical and Translational Allergy, 2013, 3(S3): 1-1
- [4] 杨朝崑. 桃过敏原表达鉴定和免疫分析[D]. 杭州: 浙江大学, 2013  
YANG Chao-wei. Expression and immunological characterization of peach allergens [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2013
- [5] 徐国强, 倪海东, 杨明, 等. 食物过敏原蛋白家族分类及其结构特点[J]. 检验检疫学刊, 2012, 22(5): 66-70  
XU Guo-qiang, NI Hai-dong, YANG Ming, et al. The classification and structural characteristics of food allergen protein families [J]. Journal of Inspection and Quarantine, 2012, 22(5): 66-70
- [6] Wang X H. Molecular cloning and functional analysis of polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) gene from mulberry (*Roxb.*) [J]. Acta Agronomica Sinica, 2015, 41(9): 1361
- [7] Antunez C, Blanca-Lopez N, Torres M J, et al. Immediate allergic reactions to cephalosporins: evaluation of cross-reactivity with a panel of penicillins and cephalosporins [J]. J Allergy Clin Immunol, 2006, 117(2): 404-410
- [8] Romano A, Mayorga C, Torres M J, et al. Immediate allergic reactions to cephalosporins: cross-reactivity and selective responses [J]. Journal of Allergy & Clinical Immunology, 2000, 106(6): 1177-83
- [9] Jameson B A, Wolf H. The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants [J]. Computer Applications in the Biosciences Cabios, 1988, 4(1): 181-186
- [10] Karplus P A, Schulz G E. Prediction of chain flexibility in proteins [J]. Naturwissenschaften, 1985, 72(4): 212-213
- [11] Kyte J, Doolittle R F. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein [J]. Journal of Molecular Biology, 1982, 157(1): 105-132
- [12] Emmil E A, Hughes J V, Perlow D S, et al. Induction of hepatitis a virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide [J]. Journal of Virology, 1985, 55(3): 836-839
- [13] 沈海旺, 陈亨莉, 曹敏杰, 等. 甲壳类动物 4 种过敏原的序列分析、抗原表位预测及三维结构建模[J]. 免疫学杂志, 2012, 7: 613-619  
SHEN Hai-wang, CHEN Heng-li, CAO Min-jie, et al. Sequence analysis, antigen epitopes prediction, and three dimensional structure modeling of four allergens in crustaceans [J]. Immunological Journal, 2012, 7: 613-619
- [14] Brandström J, Lilja G, Nilsson C, et al. IgE to novel citrus seed allergens among cashew-allergic children [J]. Pediatric Allergy & Immunology Official Publication of the European Society of Pediatric Allergy & Immunology, 2016, 27(5): 550-553
- [15] Claudianos C, Campbell H D. The novel flightless-I gene brings together two gene families, actin-binding proteins related to gelsolin and leucine-rich-repeat proteins involved in Ras signal transduction [J]. Molecular Biology & Evolution, 1995, 12(3): 405-414
- [16] Zhang J, Wang X, Zhang Y, et al. Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains protein 1 and fascin actin-bundling protein 1 expression in nonsmall cell lung cancer [J]. Journal of Cancer Research & Therapeutics, 2016, 12 (Supplement): C248-C251
- [17] Freiberg A, Machner M P, Pfeil W, et al. Folding and stability of the leucine-rich repeat domain of internalin B from *Listeria monocytogenes* [J]. Journal of Molecular Biology, 2004, 337(2): 453-461
- [18] Schubert W D, Gobel G, Diepholz M, et al. Internalins from the human pathogen *Listeria monocytogenes* combine three distinct folds into a contiguous internalin domain [J]. J Mol. Biol., 2001, 312: 783-794

[19] Wang C, Cai Y, Gu Z, et al. Clinical profiles of Parkinson's disease associated with common leucine-rich repeat kinase 2 and glucocerebrosidase genetic variants in Chinese individuals [J]. Neurobiol Aging, 2014, 35(3): 725 e721-726

