

糜蛋白酶提高膜蛋白质谱分析序列覆盖率的胶内消化方法

刘红丽¹, 沈滢¹, 高稳稳¹, 于海川², 席守民¹, 沈国民¹

1 河南科技大学 医学院, 河南 洛阳 471023

2 新乡医学院 医学检验学院, 河南 新乡 453003

刘红丽, 沈滢, 高稳稳, 等. 糜蛋白酶提高膜蛋白质谱分析序列覆盖率的胶内消化方法. 生物工程学报, 2020, 36(11): 2435-2442.

Liu HL, Shen Y, Gao WW, et al. An in-gel digestion method of chymotrypsin to improve sequence coverage of membrane protein by mass spectrometry. Chin J Biotech, 2020, 36(11): 2435-2442.

摘要:近年来, 质谱技术在膜蛋白结构与功能研究中被广泛应用。由于膜蛋白的跨膜结构域含有大量疏水性氨基酸, 常常导致液质串联质谱检测的序列覆盖率较低, 从而限制了质谱技术在膜蛋白结构与功能研究中的应用。文中利用人的整合膜蛋白维生素 K 环氧化物还原酶为模型, 优化胶内消化条件, 建立了一种稳定提高膜蛋白质谱序列覆盖率的糜蛋白酶胶内消化方法。通过探索钙离子浓度、pH 值和缓冲体系对序列覆盖率、检测特异肽段的总数和类型以及特异肽段大小的影响, 发现在 5–10 mmol/L 钙离子浓度、pH 8.0–8.5 的 Tris-HCl 缓冲液中, 可以兼顾序列覆盖率和肽段的多样性。该方法可以使膜蛋白的质谱覆盖率达到 80% 以上, 将在膜蛋白结构与功能、膜蛋白相互作用位点的鉴定以及膜蛋白与小分子药物结合位点的鉴定等研究中具有广泛的应用价值。

关键词:膜蛋白, 胶内消化, 序列覆盖率, 糜蛋白酶, 液质串联质谱, 维生素 K 环氧化物还原酶, 膜蛋白结构

An in-gel digestion method of chymotrypsin to improve sequence coverage of membrane protein by mass spectrometry

Hongli Liu¹, Yan Shen¹, Wenwen Gao¹, Haichuan Yu², Shoumin Xi¹, and Guomin Shen¹

1 College of Medicine, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023, Henan, China

2 School of Medical Laboratory, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan, China

Abstract: In recent years, mass spectrometry has been widely used to study membrane protein structure and function. However, the application of mass spectrometry to study integral membrane protein is limited because there are many

Received: March 18, 2020; **Accepted:** May 19, 2020

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 81770140), Natural Science Foundation of Henan Province, China (No. 162300410226), Scientific and Technological Projects in Henan Province, China (No. 182102410079).

Corresponding authors: Shoumin Xi. Tel: +86-379-64252715; E-mail: xishoumin1968@163.com

Guomin Shen. Tel: +86-379-64830345; E-mail: shenba433@163.com

国家自然科学基金 (No. 81770140), 河南省自然科学基金 (No. 162300410226), 河南省科技攻关项目 (No. 182102410079) 资助。

hydrophobic amino acids in the trans-membrane domain of integral membrane protein to cause low sequence coverage detected by LC-MS/MS. Therefore, we used vitamin K epoxide reductase (VKORC1), a human integral membrane protein, as a model to optimize the digestion conditions of chymotrypsin, and developed an in-gel digestion method of chymotrypsin to improve sequence coverage of membrane protein by mass spectrometry. By exploring the effects of calcium concentration, pH value and buffer system on the percentage of sequence coverage, number of total detected and types of unique peptide, and the size of unique peptide, sequence coverage and peptide diversity could be considered under condition of Tris-HCl buffer with 5–10 mmol/L calcium ion concentration and pH value 8.0–8.5. This method could make the sequence coverage of membrane protein to reach more than 80%. It could be widely used in the study of membrane protein structure and function, identification of interaction site between membrane proteins, and identification of binding site between membrane protein and small molecular drug.

Keywords: membrane protein, in-gel digestion, sequence coverage, chymotrypsin, LC-MS/MS, vitamin K epoxide reductase, membrane protein structure

质谱技术是研究蛋白质的常用技术,在蛋白质鉴定、蛋白质定量、蛋白质组学、蛋白质翻译后修饰、蛋白与蛋白相互作用等方面有广泛的应用^[1-5]。近年来,质谱技术与其他方法结合广泛应用于探测蛋白质三维结构的研究。通过化学交联,将蛋白质中空间相近但序列相距较远的部分连接起来,就可以推断出蛋白结构的信息^[6]。激光诱导共价标记技术被用于研究蛋白质的折叠^[7]。氨基酸残基的化学标记技术用于研究蛋白质构象变化以及小分子化合物结合位点的鉴定^[8-9]。氢-氘交换质谱用于研究蛋白质结构已有 20 多年,利用氢-氘交换的速率和程度推测蛋白质高级结构及非共价结合物的作用位点,该方法还适用于研究蛋白质结构的动力学性质^[10]。整合膜蛋白在调节细胞与细胞外环境之间的通讯方面起着关键的调节作用,现在临床用药有 50% 以上作用靶点是膜蛋白^[9]。据估计,人类基因组中编码膜蛋白的基因占 20%–30%^[11]。因此,质谱技术在膜蛋白结构的研究中具有广泛的应用价值。

在对膜蛋白结构与功能、膜蛋白相互作用位点的鉴定以及膜蛋白与小分子药物结合位点的研究中^[7-9],需要达到较高的蛋白序列覆盖率,但目前存在一定的技术瓶颈。由于膜蛋白酶切消化困难、疏水肽段从跨膜结构域中的回收和分离困难等,这严重影响了质谱技术在膜蛋白结构与功能等研究中的应用^[12]。在一些研究中,通过结合多

种方法,可以对一些膜蛋白达到较高的序列覆盖率,但这些方法步骤繁琐、耗时、耗力^[13-15]。本研究以人维生素 K 环氧化物还原酶 (VKORC1) 蛋白为研究模型,摸索出一个糜蛋白酶的胶内消化方法,该方法结合串联质谱技术可以显著提高整合膜蛋白的序列覆盖率,将有助于提高质谱技术在膜蛋白结构与功能研究中的应用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 膜蛋白

人 VKORC1 蛋白和人维生素 K 环氧化物还原酶 1 的同源蛋白 (VKORC1L1) 按文献方法^[8,16]从稳定表达细胞系中纯化。重组表达的人葡萄糖转运体 4 (rGLUT4) 蛋白和重组表达的细菌 4-羟基苯甲酸八异戊烯基转移酶 (rUBIA) 蛋白由圣路易斯华盛顿大学 Li Weikai 实验室馈赠。

1.1.2 试剂与耗材

三乙基碳酸氢铵 (TEAB) 缓冲液、氯化钙、NEM、Tris-base、三 (2-羧乙基) 膦 (TECP) 和色谱级乙腈、甲醇、甲酸购自 Sigma 公司;表面活性剂 RapiGest SF 购自 Waters 公司;测序级糜蛋白酶购自 Promega 公司;0.5 mL 的蛋白质低亲和力离心管购自 Eppendorf 公司。

1.1.3 仪器

液质串联质谱 (LC-MS/MS) 的配置:

Eksigent 2D nano LC Eksigent (二维纳升液相色谱仪) 分离酶解的肽段, Thermo LTQ Orbitrap XL 质谱检测仪 (或更好的质谱仪) 检测多肽段。低温离心机, 37 °C 恒温水浴锅。

1.2 方法

1.2.1 糜蛋白酶胶内消化方法

(1) 切胶: SDS-PAGE 胶用考马斯亮蓝染色, 切目的蛋白条带, 把凝胶切成约 0.5 mm³ 的小块, 转移胶块到 0.5 mL 的蛋白质低亲和力的收集管中, 加入 300 μL 的去离子水; (2) 吸取去离子水, 加入 350 μL 质谱级的乙腈, 在室温孵育 10 min, 待凝胶收缩成小块, 12 000×g 离心 1 min 后去除液体; 重复该步骤 1 次; 之后静置 10–20 min 使其干燥; (3) 加入 100 μL TECP 溶液 (5 mmol/L TECP, 50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5), 12 000×g 离心 1 min, 56 °C 孵育 30 min; 室温冷却, 吸去 TECP 溶液, 重复步骤 (2); (4) 加入 150 μL NEM 溶液 (10 mmol/L NEM, 50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5), 封闭自由的半胱氨酸, 12 000×g 离心 1 min, 室温孵育 60 min; 吸去 NEM 溶液, 重复步骤 (2); (5) 加入 350 μL 胶块脱色液 (等体积 100 mmol/L pH 8.5 的 TEAB 缓冲液和乙腈), 4 °C 在混合仪上混合 30 min, 12 000×g 离心 1 min, 吸去液体; 重复该步骤 3–5 次; 最后 1 次, 4 °C 在混合仪上混合过夜脱色; 第二天, 12 000×g 离心 1 min, 吸去液体, 重复步骤 (2); (6) 加入适量体积 (70–150 μL) 的糜蛋白酶消化液 (50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 0.02 μg/μL 糜蛋白酶, 10 mmol/L 氯化钙, 0.1% RapiGest) 覆盖胶块, 12 000×g 离心 1 min, 在冰上放置 30 min; 后再加入 30 μL 糜蛋白酶消化缓冲液 (0.1% RapiGest, 10 mmol/L 氯化钙, 50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0) 覆盖胶块, 再在冰上放置 30 min (注: 在本步骤进行优化条件, 比如改变 Tris-HCl 缓冲液的 pH 值, 改变钙离子浓度, 改变缓冲液为 TEAB 缓冲体系); (7) 用研磨杵在离心管中碾碎胶块, 12 000×g 离心 1 min 后, 在 37 °C 水浴中

过夜消化; (8) 加质谱级的甲酸终止消化, 终浓度为 1% (V/V), 充分涡旋, 12 000×g 离心 1 min, 37 °C 水浴中孵育 30 min; (9) 20 000×g 离心 15 min, 吸取 10 μL 转移到蛋白质低亲和力的收集管中, 之后加 1 μL 质谱级的甲酸, 混匀, 用于 LC-MS/MS 分析 (注: 如样品不能立即分析, 可放置于 -80 °C 保存)。

1.2.2 LC-MS/MS 参数设定

Eksigent 2D nano-LC Eksigent 系统和 Thermo LTQ Orbitrap XL 质谱检测仪用于对糜蛋白酶水解的肽段进行 LC-MS/MS 分析。质谱分析参数按文献方法[1]进行。首先, 消化的样品先上样至 C18 的 Trap 柱上 (Acclaim PepMap100, 100 μm×2 cm, 5 μm, 100 Å) 进行脱盐处理, 流速为 4.5 μL/min, 时间为 10 min, 流动相为 0.1% 的甲酸水溶液; 然后串联至 C18 的反相色谱柱 (0.007 5 mm×180 mm, 5 μm, 200 Å) 进行肽段的分离, 其中流动相 A 相为 0.1% 甲酸水溶液, B 相为含 0.1% 甲酸的乙腈溶液, 流速为 260 nL/min, 0–5 min 设定梯度为 0–10% B 相的梯度分离液, 5–100 min 设定梯度为 10%–40% B 相的梯度分离液。在高质量分辨率 (50 000) 下获得洗脱肽段的质谱图 (*m/z* 范围 350–2 000), 选取 7 个丰度最强的肽段离子进行串联质谱分析 (MS/MS), 不限制检测肽段离子的带电荷数。

1.2.3 对质谱数据进行肽段搜索

质谱数据用 Matrix Science 公司的 Mascot 数据库进行蛋白鉴定和肽段搜索。搜索条件: 无酶解特异性, 可变蛋白修饰包括蛋氨酸氧化, 半胱氨酸 NEM 修饰, 半胱氨酸 NEM 修饰+水。

2 结果与分析

2.1 人 VKORC1 蛋白的纯化

人 VKORC1 蛋白是含有 163 个氨基酸残基, 4 个跨膜结构域, 分子量约 20 kDa 的整合膜蛋白 (图 1A), 其跨膜结构域占总序列的 52%。在稳定

细胞系 293TRex-VKORC1 细胞中表达 VKORC1 蛋白, 用 Anti-Flag 亲和柱纯化蛋白, 之后进行还原的 SDS-PAGE, 考马斯亮蓝染色, 切取目的条带 (图 1B), 用于糜蛋白酶胶内消化。

2.2 钙离子对糜蛋白酶消化 VKORC1 的影响

为了探索钙离子浓度对糜蛋白酶消化膜蛋白的影响, 本实验只改变 1.2.1 胶内消化步骤 (6) 中的钙离子浓度。在不同钙离子浓度下, 糜蛋白酶对 VKORC1 序列的覆盖范围有一定的影响 (图 2A), 但对其序列覆盖率基本没有影响, 都可以达到 80% 以上 (图 2B)。该结果提示, 在不同钙离子浓度下, 糜蛋白酶对蛋白的酶切位点可能有一定的影响。进而我们分析了不同钙离子浓度对检测到特异肽段的总次数、类型和长度的影响, 发现在 5 mmol/L 钙离子浓度下, 检测到特异肽段的总次数最高, 大约是不加钙离子条件下的 3 倍 (图 3A); 在 10 mmol/L 钙离子浓度下, 检测到肽段类型最多, 大约是不加钙离子条件下的 2 倍 (图 3A); 在 2.5–20.0 mmol/L 钙离子浓度范围内, 可以获得较短的特异肽段, 但无钙离子的条件下检测到肽段的长度明显更长些 (图 3B)。这些结果提示一定浓度的钙离子可能增加糜蛋白酶的非特异酶切活性, 进而增加了对蛋白的酶切位点。综上所述, 5–10 mmol/L 的钙离子浓度范围是糜蛋白酶消化膜蛋白获得较多特异肽段的总次数和肽段类型的最适条件。

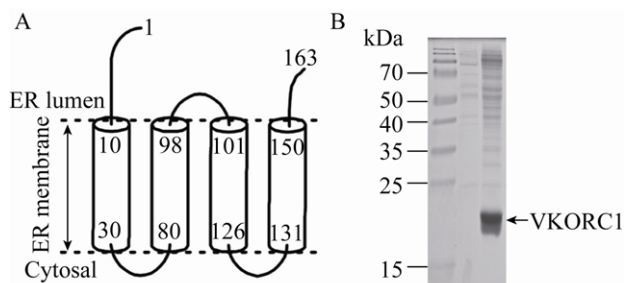


图 1 人 VKORC1 蛋白

Fig. 1 Human VKORC1 protein. (A) Topology model of human VKORC1. (B) Reduced SDS-PAGE of affinity purified human VKORC1.

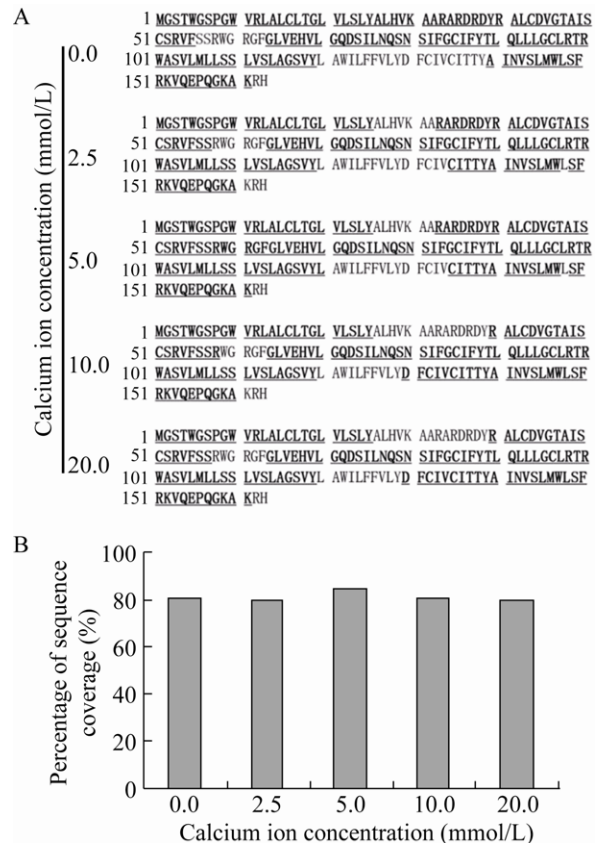


图 2 钙离子对糜蛋白酶消化 VKORC1 的序列覆盖的影响

Fig. 2 Effect of calcium ion on sequence coverage of VKORC1 digested by chymotrypsin. (A) Sequence coverage of VKORC1 at different calcium ion concentrations. (B) Percentage of sequence coverage VKORC1 at different calcium ion concentrations.

2.3 不同 pH 值对糜蛋白酶消化 VKORC1 的影响

为了探索 pH 值对糜蛋白酶消化膜蛋白的影响, 本实验只改变 1.2.1 胶内消化步骤 (6) 糜蛋白酶消化液中 Tris-HCl 缓冲液的 pH 值。我们发现不同 pH 值对糜蛋白酶消化 VKORC1 的覆盖范围 (图 4A) 和序列覆盖率 (图 4B) 基本没有影响, 提示在不同 pH 值条件下糜蛋白酶对蛋白消化的模式变化不大。通过分析不同 pH 值条件对检测到特异肽段的总次数、类型和长度的影响, 我们发现在 pH 8.0–9.0 的范围内, 随着 pH 值增加, 检测到特异肽段的总次数和类型都逐渐减少 (图 5A), 但对特异

肽段的长度无明显变化 (图 5B)。这些结果提示在 pH 8.0–9.0 的范围内, pH 值可能主要影响糜蛋白酶对蛋白的消化效率, 但对酶切模式影响不大, 因而 pH 8.0–8.5 的范围是较适宜的糜蛋白酶消化条件。

2.4 TEAB 缓冲液对糜蛋白酶消化 VKORC1 的影响

为了探索 TEAB 缓冲液对糜蛋白酶消化膜蛋白的影响, 本实验把 1.2.1 胶内消化步骤 (6) 中糜

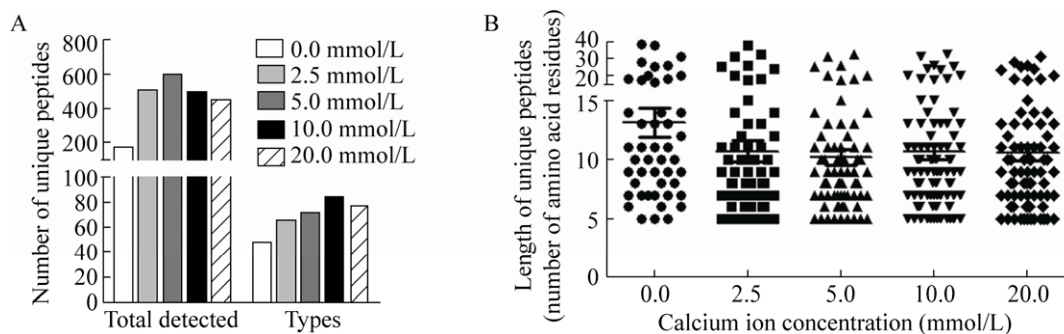


图 3 不同钙离子浓度下糜蛋白酶消化 VKORC1 的肽段特征

Fig. 3 Peptides feature of VKORC1 digested by chymotrypsin under different calcium concentrations. (A) Total detected number and types of unique peptides. (B) Size distribution of unique peptides.

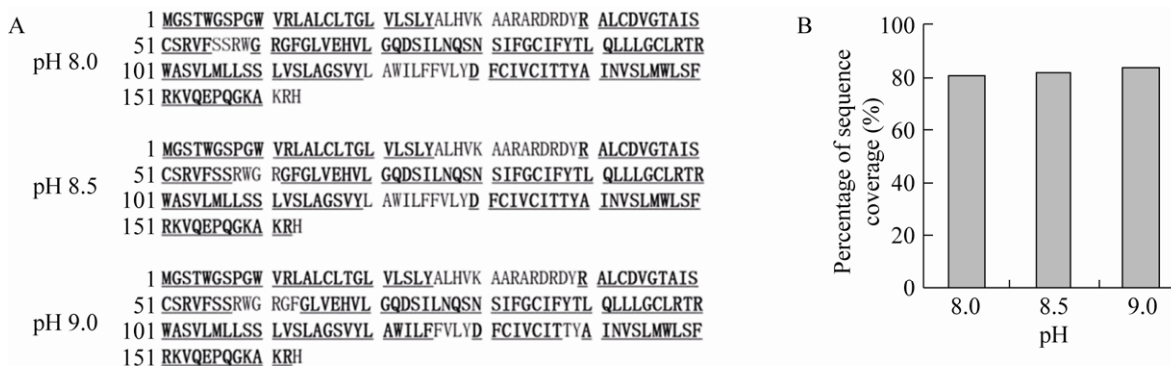


图 4 pH 值对糜蛋白酶消化 VKORC1 的序列覆盖的影响

Fig. 4 Effect of pH values on sequence coverage of VKORC1 digested by chymotrypsin. (A) Sequence coverage of VKORC1 at different pH values. (B) Percentage of sequence coverage VKORC1 at different pH values.

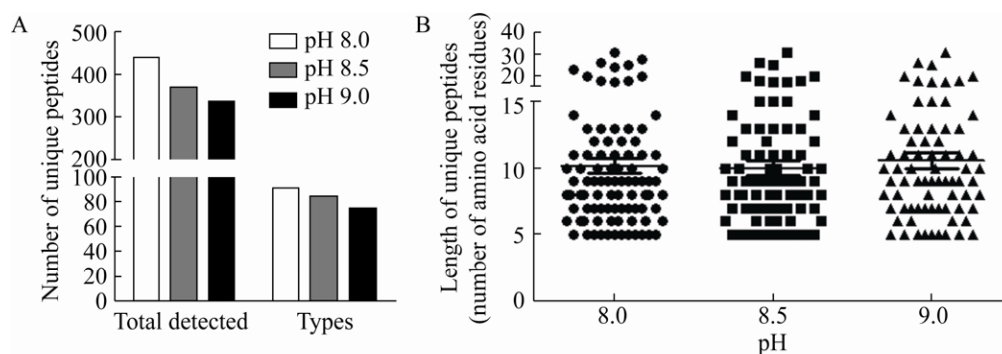


图 5 不同 pH 值中糜蛋白酶消化 VKORC1 的肽段特征

Fig. 5 Peptides feature of VKORC1 digested by chymotrypsin under different pH values. (A) Total detected number and types of unique peptides. (B) Size distribution of unique peptides.

蛋白酶消化液和缓冲液中的 Tris-HCl 缓冲液改为 100 mmol/L、pH 8.5 的 TEAB 缓冲液。我们把 TEAB 缓冲液的消化结果与 2.2 中 10 mmol/L 钙离子的消化结果进行比较,发现两种条件下的序列覆盖范围 (图 6A) 基本没有影响,但在 TEAB 缓冲液条件下检测到特异肽段的总次数和类型均较少 (图 6B); 此外,发现在 TEAB 缓冲液中检测到特异肽段的长度要长一些 (图 6C)。该结果提示 TEAB 缓冲液和 Tris-HCl 缓冲液对糜蛋白酶消化 VKORC1 的模式可能不同。由于 TEAB 可以和钙离子反应生成碳酸钙沉淀,从而降低了该缓冲液中的钙离子浓度,这可能是 TEAB 缓冲液影响糜

蛋白酶消化的主要原因。

2.5 糜蛋白酶胶内消化方法在其他整合膜蛋白中的应用

为了检验该酶切方法的适用性,我们选择了 3 个整合膜蛋白 VKORC1L1、rUBIA 和 rGLUT4 进行胶内消化和分析。在 Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0) 和 10 mmol/L 氯化钙的条件下进行消化。VKORC1L1、rUBIA 和 rGLUT4 的序列覆盖率为 80%、89% 和 94%,均在 80% 以上 (图 7A)。分析 3 种蛋白检测到特异肽段的总次数, VKORC1L1、rUBIA 和 rGLUT4 的结果分别为 465、1 035 和 1 980; 分析 3 种蛋白检测到特异肽

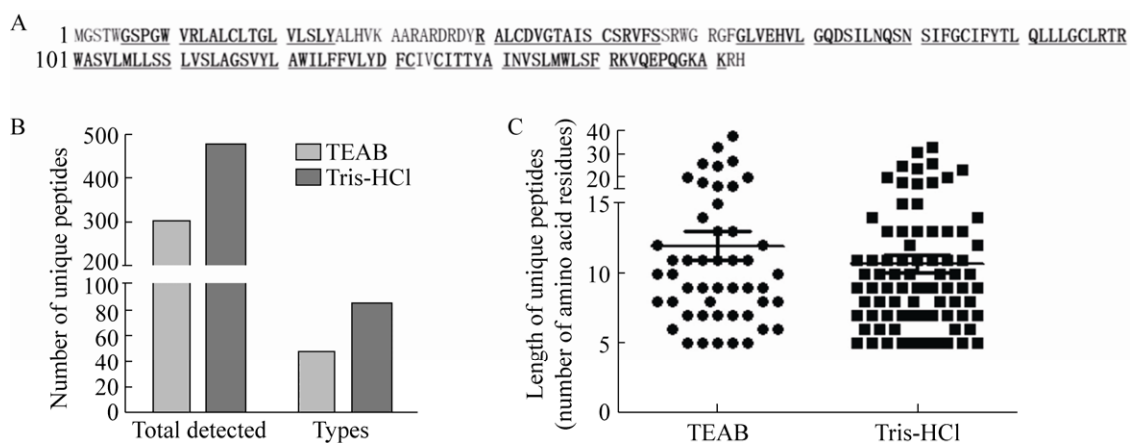


图 6 TEAB 缓冲液对糜蛋白酶消化 VKORC1 的影响

Fig. 6 Effect of TEAB buffer on VKORC1 digested by chymotrypsin. (A) Sequence coverage of VKORC1 digested by chymotrypsin in TEAB buffer. (B) Total number and types of unique peptides. (C) Size distribution of unique peptides.

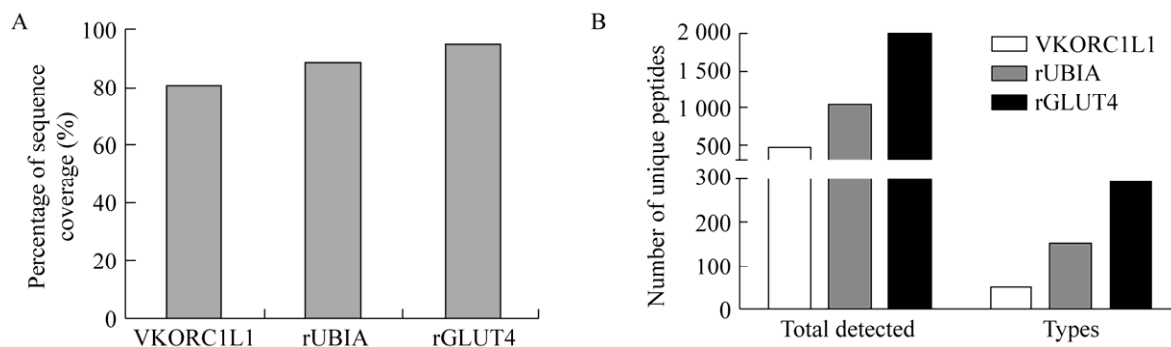


图 7 糜蛋白酶消化 VKORC1L1、rUBIA 和 rGLUT4 的结果

Fig. 7 Results of VKORC1L1, rUBIA and rGLUT4 digested by chymotrypsin. (A) Sequence coverage of VKORC1L1, rUBIA and rGLUT4 digested by chymotrypsin. (B) Total detected number and types of unique peptides.

段的类型(图7B),VKORC1L1、rUBIA和rGLUT4的结果分别为51、152和289(图7B)。结果表明检测到的特异肽段的总数和类型呈正相关。VKORC1L1、rUBIA和rGLUT4氨基酸残基数分别为176、303和552,结果表明检测到的特异肽段的总数和类型与氨基酸残基数呈正相关,这也说明该方法中糜蛋白酶对膜蛋白具有稳定的消化效果。

3 结论

膜蛋白在多种生命活动中发挥重要作用,是药物研发的重要靶点。近年来,质谱技术在研究膜蛋白结构与功能方面具有广泛的应用。由于膜蛋白的跨膜结构域含有大量疏水性氨基酸,常常导致质谱检测的序列覆盖率较低,从而限制了质谱技术在膜蛋白结构与功能研究中的应用。本研究以糜蛋白酶对膜蛋白VKORC1进行胶内消化为模型,探索在不同钙离子浓度、pH值和缓冲体系的条件下,对样品质谱分析数据的序列覆盖范围、序列覆盖率、检测到特异肽段的总数、类型以及大小的影响,进而建立了一种稳定提高膜蛋白质谱序列覆盖率的胶内消化方法。该方法选择Tris-HCl缓冲液,最适pH值在8.0至8.5的范围,最适钙离子浓度为5–10 mmol/L。该方法不仅可以获得较高的序列覆盖率,还可以获得较多的肽段类型,为膜蛋白结构和功能的研究提供更多的分析选择。该方法将在膜蛋白结构与功能、膜蛋白相互作用以及膜蛋白与小分子药物相互作用等研究方面具有广泛的应用价值。

REFERENCES

- [1] Sun K, Yang F, Kong YJ, et al. Collagen quantitation by detection of marker peptides with HPLC-MS. *Chin J Biotech*, 2015, 31(11): 1660–1668 (in Chinese).
孙坤, 杨帆, 孔英俊, 等. 基于生物质谱的胶原蛋白定量检测方法. *生物工程学报*, 2015, 31(11): 1660–1668.
- [2] Wilhelm M, Schlegl J, Hahne H, et al. Mass-spectrometry-based draft of the human proteome. *Nature*, 2014, 509(7502): 582–587.
- [3] Yang H, Li YC, Zhao MZ, et al. Precision *de novo* peptide sequencing using mirror proteases of Ac-lysarginase and trypsin for large-scale proteomics. *Mol Cell Proteomics*, 2019, 18(4): 773–785.
- [4] Zhang JL, Peng XH, Wang FQ, et al. Development of LysargiNase, a mirror trypsin and its application in proteomics. *Chin J Biotech*, 2019, 35(5): 741–748 (in Chinese).
张俊令, 彭雪辉, 王富强, 等. 胰蛋白酶镜像酶LysargiNase的开发及其在蛋白质组学研究中的应用. *生物工程学报*, 2019, 35(5): 741–748.
- [5] Zhang P, Shao XF, Wang ZS, et al. Identification of mouse organ endogenous peptides by high throughput mass spectrometry. *Chin J Biotech*, 2019, 35(4): 697–706 (in Chinese).
张佩, 邵先锋, 王振山, 等. 高通量质谱法用于小鼠器官内源性肽的鉴定. *生物工程学报*, 2019, 35(4): 697–706.
- [6] Weisz DA, Liu HJ, Zhang H, et al. Mass spectrometry-based cross-linking study shows that the Psb28 protein binds to cytochrome b_{559} in Photosystem II. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(9): 2224–2229.
- [7] Cheng M, Zhang BJ, Cui WD, et al. Laser-initiated radical trifluoromethylation of peptides and proteins: application to mass-spectrometry-based protein footprinting. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2017, 56(45): 14007–14010.
- [8] Shen GM, Cui WD, Zhang H, et al. Warfarin traps human vitamin K epoxide reductase in an intermediate state during electron transfer. *Nat Struct Mol Biol*, 2017, 24(1): 69–76.
- [9] Shen GM, Li S, Cui WD, et al. Membrane protein structure in live cells: methodology for studying drug interaction by mass spectrometry-based

- footprinting. *Biochemistry*, 2018, 57(3): 286–294.
- [10] Illes-Toth E, Rempel DL, Gross ML. Pulsed hydrogen-deuterium exchange illuminates the aggregation kinetics of α -synuclein, the causative agent for Parkinson's disease. *ACS Chem Neurosci*, 2018, 9(6): 1469–1476.
- [11] Almén MS, Nordström KJV, Fredriksson R, et al. Mapping the human membrane proteome: a majority of the human membrane proteins can be classified according to function and evolutionary origin. *BMC Biol*, 2009, 7: 50.
- [12] Speers AE, Wu CC. Proteomics of integral membrane proteins-theory and application. *Chem Rev*, 2007, 107(8): 3687–3714.
- [13] Chen ZW, Fuchs K, Sieghart W, et al. Deep amino acid sequencing of native brain GABA_A receptors using high-resolution mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*, 2012, 11(1): M111.011445.
- [14] Kang SU, Lubec G. Complete sequencing of GABA_A receptor subunit β 3 by a rapid technique following in-gel digestion of the protein. *Electrophoresis*, 2009, 30(12): 2159–2167.
- [15] Ryan CM, Souda P, Bassilian S, et al. Post-translational modifications of integral membrane proteins resolved by top-down Fourier transform mass spectrometry with collisionally activated dissociation. *Mol Cell Proteomics*, 2010, 9(5): 791–803.
- [16] Shen GM, Li S, Cui WD, et al. Stabilization of warfarin-binding pocket of VKORC1 and VKORL1 by a peripheral region determines their different sensitivity to warfarin inhibition. *J Thromb Haemost*, 2018, 16(6): 1164–1175.

(本文责编 郝丽芳)