

Aerolysin 纳米孔道探究硫酸乙酰肝素与金属离子的单分子相互作用

张鹏玲^{1#}, 高凡^{2#}, 陈嘉乐⁶, 邹爱华¹, 汤娟³, 马慧⁴, 蒋翠玲⁵,
万永菁⁵, 夏冰清⁶, 李铁海⁶, 高召兵⁶, 应佚伦², 龙亿涛²

(1. 上海师范大学化学与材料科学学院, 上海 200234;

2. 南京大学化学学院, 分子传感与成像中心, 南京 210023;

3. 江西师范大学化学与材料学院, 南昌 330022; 4. 浙江理工大学化学与化工学院, 杭州 310018;

5. 华东理工大学信息科学与工程学院, 上海 200237; 6. 中国科学院上海药物研究所, 上海 201203)

关键词 气单胞菌溶素; 单分子分析; 纳米孔道; 硫酸乙酰肝素; 金属离子

中图分类号 O657

文献标志码 A

doi: 10.7503/cjcu20250405

肝素(HP)和硫酸乙酰肝素(HS)是一种高度柔性的直链多糖^[1], 其基本结构单元由交替重复的二糖组成, 通常包含一种己糖胺(如 *N*-乙酰-*D*-葡萄糖胺, GlcNAc)和一种糖醛酸(如 *D*-葡萄糖醛酸, GlcA)^[2]. 值得注意的是, HP/HS 中普遍存在多样的磺酸化修饰, 包括 GlcNAc 的 *N*-磺酸化、GlcA 的 2-*O*-磺酸化以及 GlcNAc 的 6-*O*-磺酸化^[3]. 这些修饰赋予了 HP/HS 高度负电性, 因而在与金属离子结合时, 不同链段负电荷的空间排列可导致多种局部构象, 甚至同一金属离子也可能结合于不同位点, 使其能够与多种蛋白质发生特异性相互作用, 从而在细胞生长^[4]、炎症反应^[5]和肿瘤抑制^[6]等过程中发挥关键作用. 因此, 揭示 HP/HS 与不同金属离子的相互作用机制, 对于深入理解其生物学功能具有重要意义^[7-9].

目前, 核磁共振波谱^[10]、圆二色光谱^[11]以及离子迁移质谱^[12]等传统光谱和质谱技术已被用于 HP/HS 与金属离子结合行为的研究. 质谱方法虽然能够提供 HP/HS 结合金属离子的信息, 但其离子化过程可能导致磺酸根的部分丢失, 且气相结合状态难以完全反映溶液中的真实相互作用^[13]; 圆二色光谱法通常依赖体相分子发生较明显的整体结构变化^[14], 较难在单分子水平表征 HP/HS 与金属离子的相互作用. 因此, HP/HS 虽仅由两种重复二糖构成, 但由于长度与磺酸化修饰的高度异质性及构象柔性, 其序列解析、结构表征及相互作用的精细测量至今仍具有较大挑战性.

纳米孔道电化学作为一种无标记、高通量的单分子分析方法, 具有亚毫秒级时间分辨率和皮安级

收稿日期: 2025-12-29. 网络首发日期: 2026-01-09.

联系人简介: 邹爱华, 女, 博士, 教授, 主要从事纳米药物方面的研究. E-mail: aihuazou@shnu.edu.cn

汤娟, 女, 博士, 教授, 主要从事功能材料性能分析及应用方面的研究. E-mail: juantang@jxnu.edu.cn

马慧, 女, 博士, 特聘教授, 主要从事单体碰撞电化学、纳米孔道单分子分析方面的研究. E-mail: huima@zstu.edu.cn

蒋翠玲, 女, 博士, 副教授, 主要从事智能信息处理方面的研究. E-mail: cuilingjiang@ecust.edu.cn

万永菁, 女, 博士, 教授, 主要从事智能信息处理、模式识别与机器学习方面的研究. E-mail: wanyongjing@ecust.edu.cn

李铁海, 男, 博士, 研究员, 主要从事糖化学和糖药理学方面的研究. E-mail: tiehaili@simm.ac.cn

应佚伦, 女, 博士, 教授, 主要从事单分子电化学测量方面的研究. E-mail: yilunying@nju.edu.cn

基金项目: 上海市市级科技重大专项项目、国家自然科学基金(批准号: 32250019, 22474055)和中央高校基本科研业务费专项资金(批准号: 020514380356)资助.

Supported by the Shanghai Municipal Science and Technology Major Project, China, the National Natural Science Foundation of China (Nos.32250019, 22474055) and the Special Fund for the Basic Scientific Research of Central Universities, China(No.020514380356).

共同第一作者.

电流灵敏度^[15], 近年来已在核酸^[16-20]、蛋白质^[21-24]、多肽^[25-27]及寡糖^[28-33]等单分子测量中展现出优异的单分子识别能力. 由于该技术通常在温和的中性水溶液条件下进行, 可保持HP/HS的天然结构, 且对磺酸化修饰影响较小^[34], 因此在HP/HS分析中独具优势. 本文选用对负电性分子具有高灵敏响应的T232K/K238Q Aerolysin(气单胞菌溶素)突变型纳米孔道, 通过调节缓冲液中的阳离子种类, 改变HS与孔道在不同金属离子结合状态下的弱相互作用, 实现了对硫酸乙酰肝素五糖(HS-5)及其与不同金属离子结合状态的灵敏检测. 在此基础上, 进一步探究了Na⁺, K⁺和Ca²⁺离子对HS-5与纳米孔道相互作用的影响机制, 为限域环境下HP/HS与不同金属离子的相互作用解析提供了新工具.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

Proaerolysin(气单胞菌溶素原)在大肠杆菌体系中表达并通过AKTA蛋白纯化系统纯化; 1,2-二植烷酰基磷脂(纯度≥99%), 美国Avanti Polar Lipids公司; 胰蛋白酶-EDTA、氯化钾(KCl, 纯度≥99%)和正癸烷(纯度≥99.8%), 美国Sigma-Aldrich公司; 氯化钠(NaCl)(纯度≥99%)、氯化钙(CaCl₂, 纯度≥99%)、三羟甲基氨基甲烷(Tris, 纯度≥99%)和盐酸(纯度≥99.9%), 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 超纯水(18.2 MΩ·cm, 25 °C)由德国Sartorius公司的Arium Pro系统制备; HS-5由中国科学院上海药物研究所李铁海课题组合成纯化.

BSA124S-CW型分析天平, 德国Sartorius公司; PB-10型pH计, 德国Sartorius公司; Cube 3.0型单通道超微电流检测仪, 实验室自主研发^[35-37].

1.2 实验过程

1.2.1 纳米孔道电化学实验 将Proaerolysin与胰蛋白酶-EDTA按50:3的体积比混合, 在室温下孵育4 h进行活化. 实验中使用的聚四氟乙烯检测池分为*cis*和*trans*两个部分, 分别含有1.0 mol/L KCl/NaCl/CaCl₂和10.0 mmol/L Tris缓冲溶液(pH=8.0), 通过提拉法在检测池中间50 μm的微孔上形成磷脂双分子层后, 在*cis*检测池中加入活化的T232K/K238Q Aerolysin蛋白溶液. 当T232K/K238Q Aerolysin蛋白在磷脂双分子层自组装形成七聚体孔道后, 离子电流发生阶跃, 记录电流-电压(*I-V*)曲线和基线电流. 将待测物HS-5溶液加入*cis*检测池中, 终浓度为50 μmol/L. 在采样频率为100 kHz, 滤波频率为5 kHz, 温度为(24±2) °C条件下采集电流信号. 通过SmartNano软件实时记录并监测纳米孔道单分子实验数据(<https://zenodo.org/records/11609574>).

1.2.2 单分子信号数据处理 对采集得到的单分子电流信号通过实验室自主研发的Pynanolab软件^[38]进行数据处理. 在软件中设定开孔电流、阻断电流阈值等参数, 提取得到每个信号的阻断电流量度(*I/I*₀)、阻断时间(τ_{off})等特征参数. 通过Origin pro 2021软件进行数据统计分析, 对阻断电流量度直方图进行高斯拟合, 阻断时间直方图和相邻信号之间的间隔时间(τ_{on})直方图进行指数拟合, 即可获得待测物在孔道内的平均阻断电流量度、阻断时间以及捕获率(*f*)信息.

1.2.3 聚类算法分析 由于散点图中存在少量离散分布的背景事件, 因此引入层次密度聚类算法(HDBSCAN), 以滤除低密度无法成簇分布的事件, 同时保持主分布特征不变. 在该聚类算法中, 最小簇包含样本数(Min cluster size)设置范围在10~20, 核心点邻域最小样本数(Min samples)设置范围在5~10. 每次聚类分析均统一使用3500个单分子事件, 聚类后从中提取2000个单分子事件用于绘制散点图. 所有聚类分析过程均在Python 3.10.9环境下进行.

2 结果与讨论

2.1 T232K/K238Q Aerolysin 检测 HS-5

鉴于纳米孔道与待测物分子之间的非共价相互作用会显著影响分子的过孔行为及电流阻断特征^[39,40], 首先通过定点突变增强Aerolysin纳米孔道对负电性寡糖的检测灵敏度[图1(A)和(B)]. 基于前期对Aerolysin传感机制的理解, 选用T232K/K238Q Aerolysin突变型纳米孔道, 该孔道结合了T232K

位点增强的静电相互作用和K238Q位点的高排斥势垒,在孔道限域空间中形成独特的静电势阱,可以显著延长负电性多肽在该孔道中的停留时间^[41].如图1(C)和(D)所示,HS-5[序列结构为GlcA(β 1,4)-GlcNHSO₃H(α 1,4)-GlcA(β 1,4)-GlcNHSO₃H(α 1,4)-GlcA-pnp]能够被T232K/K238Q Aerolysin孔道高效捕获,并产生特征电流阻断,表明T232K/K238Q Aerolysin孔道同样具有增强的负电性寡糖识别的能力.

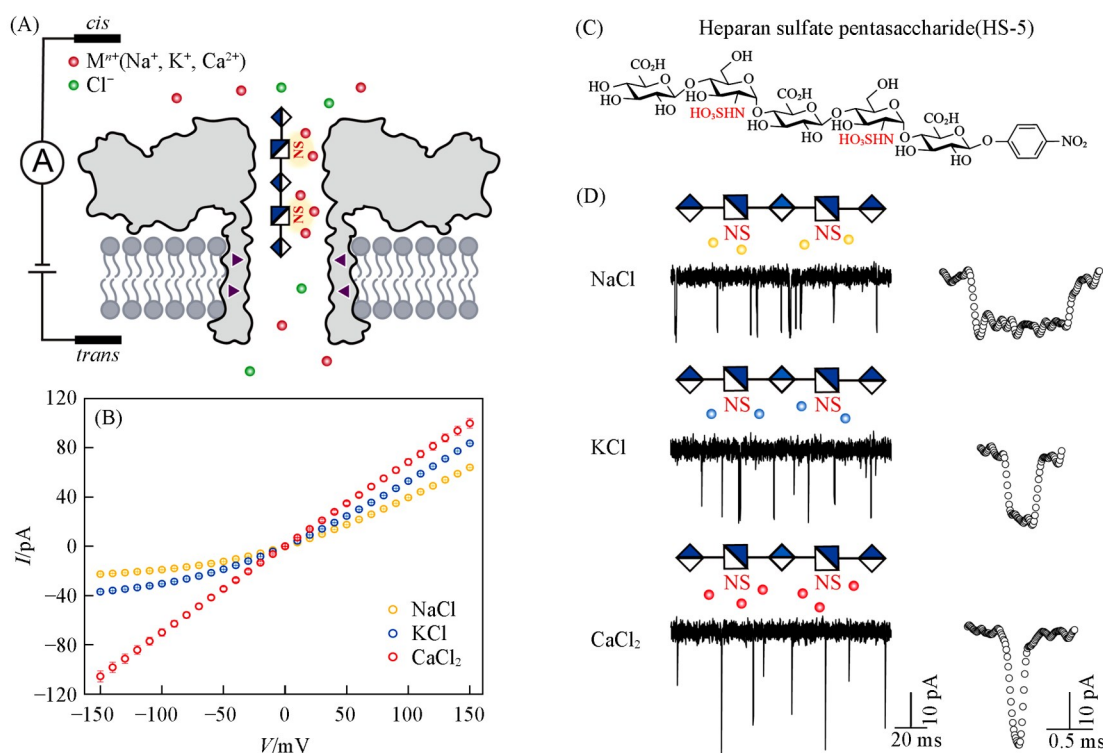


Fig. 1 High-sensitivity sensing of HS-5 using the T232K/K238Q Aerolysin nanopore

(A) Schematic illustration of HS sensing by T232K/K238Q Aerolysin; (B) *I-V* curves of T232K/K238Q Aerolysin recorded in different electrolyte buffers; (C) molecular structure of the heparan sulfate pentasaccharide (HS-5); (D) illustrations of HS-ion binding, typical current traces, and enlarged events for T232K/K238Q Aerolysin sensing HS-5 in different electrolyte buffers at an applied voltage of 70 mV.

(A) Metal ions are shown in red, chloride ions in green, and the mutation sites (T232K and K238Q) in purple; (B) the sulfate groups highlighted in red.

2.2 不同金属离子与HS结合能力研究

不同金属离子与HP/HS的结合能力和结合位点均存在显著差异,其中二价金属离子通常比一价金属离子更易与硫酸乙酰肝素发生结合,如HP对Ca²⁺表现出明显的选择性^[42,43].基于这一特性,选取纳米孔道实验中常用的KCl和NaCl,以及与HP/HS具有较强结合能力的CaCl₂作为电解质体系,考察了不同金属离子与HS之间的结合作用,及其对T232K/K238Q Aerolysin孔道相互作用行为的影响.如图1(B)所示,在上述3种缓冲体系中,T232K/K238Q Aerolysin孔道均表现出稳定的开孔电流,表明不同金属离子的引入未影响孔道本身的稳定性.

在3种缓冲溶液条件下,HS-5的阻断时间均随外加电压的升高而逐渐缩短,表明在不同金属离子存在下,HS-5均能通过孔道(图2).值得注意的是,在CaCl₂缓冲溶液中,HS-5所产生的信号变化最为显著,其阻断电程度大幅降低[图2(C₁)~(C₃)],仅为NaCl和KCl条件下的约71%[图2(A₁)~(A₃)和(B₁)~(B₃)];同时,其阻断时间比NaCl缩短了约84%[图3(A)和(B)].该结果与Ca²⁺在3种金属离子中对HP/HS具有最强结合能力的特性高度一致.从作用机制上看,HS与Ca²⁺的结合可能引发最显著的构象变化,使糖链的有效体积和刚性增加^[12],从而在通过孔道时产生更强的电流阻断效应;同时,Ca²⁺对HS-5上负电荷的屏蔽作用削弱了其Aerolysin孔道内静电势垒之间的相互作用,使HS-5能够更快地

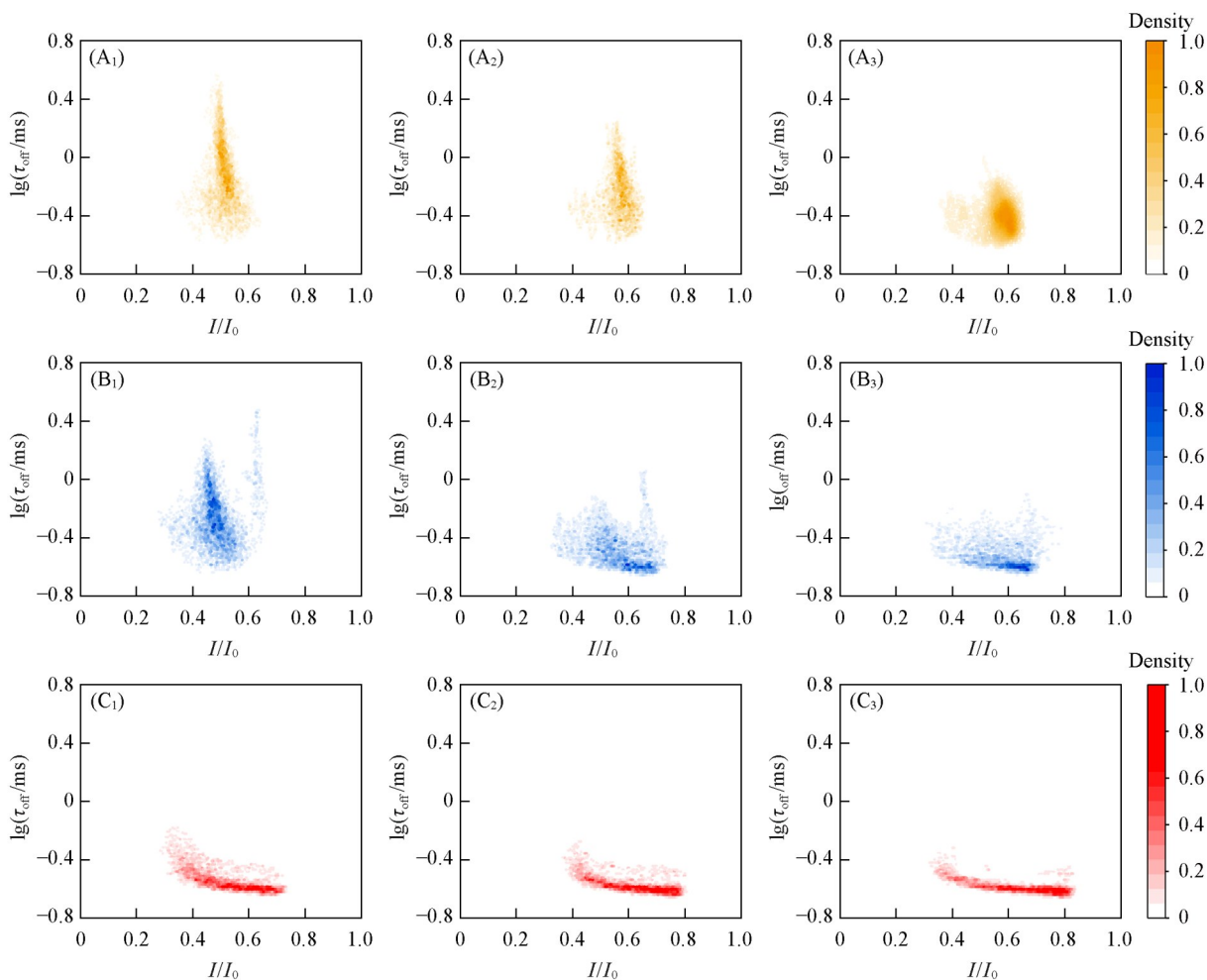


Fig. 2 Single-molecule events of HS-5 in different metal ion buffers

Density plots of a single HS-5 translocating through T232K/K238Q Aerolysin at applied voltages of 60 (A₁, B₁, C₁), 80 (A₂, B₂, C₂), and 100 mV (A₃, B₃, C₃) in buffers containing NaCl (A₁–A₃), KCl (B₁–B₃), and CaCl₂ (C₁–C₃), respectively. The concentrations of all three electrolytes were fixed at 1.0 mol/L.

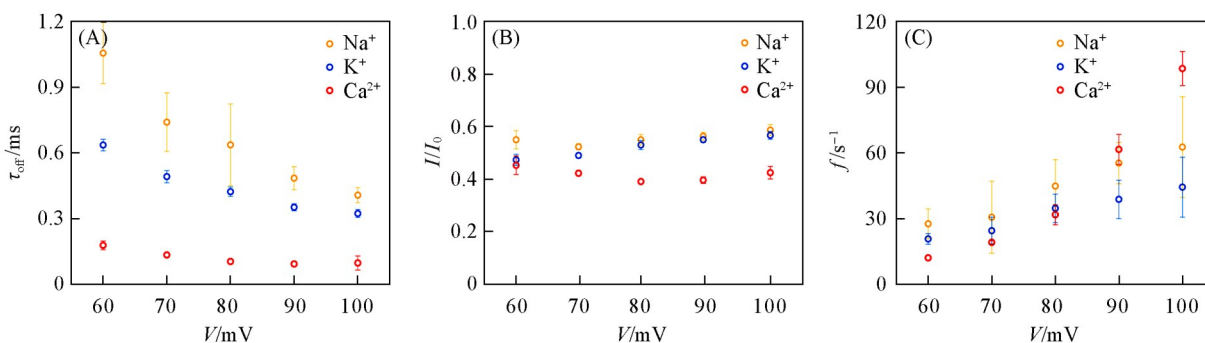


Fig. 3 Influence of different metal ions on the translocation behavior of HS-5

(A) Statistical analysis of duration time (τ_{off}); (B) current blockage (I/I_0); (C) frequency (f) of HS-5 in different metal ion buffers at applied voltages ranging from 60 to 100 mV.

穿过孔道, 进而表现出显著缩短的阻断时间. 相比之下, 尽管 Na^+ 和 K^+ 均为一价金属离子且理化性质相近, HS-5 在 NaCl 条件下的阻断时间仍比 KCl 延长了约 34%, 并伴随着更高的捕获率和更大的阻断电流程度 [图 3 (B) 和 (C)]. 该差异可能源于 Na^+ 与 K^+ 引起 HS 不同的结合构象^[11]. 这一结果表明, T232K/K238Q Aerolysin 孔道能够在单分子水平上灵敏分辨 Na^+ 和 K^+ 与仅含 2 个磷酸根的 HS-5 之间细微的结合作用差异, 凸显了该方法在解析 HS-金属离子相互作用方面的高分辨优势.

3 结 论

通过构建 T232K/K238Q Aerolysin 突变型纳米孔道, 发展了一种用于在溶液环境下直接解析 HP/HS 类负电性寡糖与金属离子相互作用的高灵敏单分子传感平台. 利用增强的静电限域环境, 该突变孔道不仅实现了对 HS 的高效捕获, 还能够在单分子水平上识别不同金属离子(如 Na^+ , K^+ , Ca^{2+})诱导的 HS 构象变化及与孔道相互作用行为的差异. 本研究结果表明, 纳米孔道单分子分析技术具有解析 HP/HS 精细结构信息的潜力, 可进一步用于表征其硫酸化位点分布、重复单元长度及相关序列特征, 为复杂糖链的高分辨分析提供新的技术路径.

Single-molecule Investigation of Heparan Sulfate-metal Ion Interactions Using Aerolysin Nanopore

ZHANG Pengling^{1#}, GAO Fan^{2#}, CHEN Jiale⁶, ZOU Aihua^{1*}, TANG Juan^{3*}, MA Hui^{4*},
JIANG Cuiling^{5*}, WAN Yongjing^{5*}, XIA Bingqing⁶, LI Tiehai^{6*}, GAO Zhaobing⁶,
YING Yilun^{2*}, LONG Yitao²

(1. College of Chemistry and Materials Science, Shanghai Normal University, Shanghai 200234;

2. Molecular Sensing and Imaging Center, School of Chemistry, Nanjing University, Nanjing 210023;

3. College of Chemistry and Materials, Jiangxi Normal University, Nanchang 330022;

4. School of Chemistry and Chemical Engineering; Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018;

5. School of Information Science and Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237;

6. Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203)

Abstract Heparin (HP) and heparan sulfate (HS) are highly anionic glycosaminoglycans that play essential roles in diverse biological processes through the metal ion-mediated interactions with proteins. However, direct characterization of HS-metal ion interactions at the single-molecule level in solution remains challenging. Nanopore electrochemistry is a label-free and single-molecule technique that enables direct analysis of individual molecular interactions. In this study, a T232K/K238Q Aerolysin nanopore featuring an enhanced electrostatic repelling barrier was utilized to probe the interactions between HS and different metal ions. By systematically varying the electrolyte cations (Na^+ , K^+ , and Ca^{2+}), we have found that the metal ions significantly regulate HS translocation behavior by modulating its conformation, charge screening, and HS-nanopore interactions. Notably, in addition to Ca^{2+} , which exhibits strong binding affinity to HS, the monovalent cations Na^+ and K^+ with similar physicochemical properties and weaker binding also induce distinct single-molecule signal signatures. Our results demonstrate that the nanopore-based single-molecule analysis holds strong potential to resolve the fine structural features of HS, enabling the characterization of sulfation site distributions, repeat-unit lengths, and related sequence features, and thereby providing a new avenue for high-resolution analysis of complex glycans.

Keywords Aerolysin; Single-molecule sensing; Nanopore; Heparan sulfate; Metal ion

参 考 文 献

- [1] Rabenstein D. L., *Nat. Prod. Rep.*, **2002**, 19(3), 312—331
- [2] Capila I., Linhardt R. J., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, 41(3), 390—412
- [3] Zong C., Venot A., Li X., Lu W., Xiao W., Wilkes J. S. L., Salanga C. L., Handel T. M., Wang L., Wolfert M. A., Boons G. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **2017**, 139(28), 9534—9543
- [4] Nguyen T. H., Kim S. H., Decker C. G., Wong D. Y., Loo J. A., Maynard H. D., *Nat. Chem.*, **2013**, 5(3), 221—227
- [5] Parish C. R., *Nat. Rev. Immunol.*, **2006**, 6(9), 633—643
- [6] Khorana A. A., Mackman N., Falanga A., Pabinger I., Noble S., Ageno W., Moik F., Lee A. Y., *Nat. Rev. Dis. Primers*, **2022**, 8, 11

- [7] Xu D., Esko J. D., *Annu. Rev. Biochem.*, **2014**, *83*(1), 129—157
- [8] Sheng J., Ollrichs N. K., Geerts W. J., Kaloyanova D. V., Helms J. B., *Sci. Rep.*, **2019**, *9*(1), 15048
- [9] Zhang F., Liang X., Beaudet J. M., Lee Y., Linhardt R. J., *J. Biomed. Tech. Res.*, **2014**, *1*(1), 6000101
- [10] Sieme D., Griesinger C., Rezaei-Ghaleh N., *Int. J. Mol. Sci.*, **2022**, *23*(21), 13185
- [11] Rudd T. R., Guimond S. E., Skidmore M. A., Duchesne L., Guerrini M., Torri G., Cosentino C., Brown A., Clarke D. T., Turnbull J. E., Fernig D. G., Yates E. A., *Glycobiology*, **2007**, *17*(9), 983—993
- [12] Seo Y., Schenauer M. R., Leary J. A., *Int. J. Mass Spectrom.*, **2011**, *303*(2/3), 191—198
- [13] Guo P., Min K., Luo W., Huang S., Yang Z., Ma M., Liu S., Fang Z., Chen B., Zuilhof H., *Talanta*, **2021**, *234*, 122674
- [14] Katner S. J., Johnson W. E., Peterson E. J., Page P., Farrell N. P., *Inorg. Chem.*, **2018**, *57*(6), 3116—3125
- [15] Ying Y. L., Hu Z. L., Zhang S., Qing Y., Fragasso A., Maglia G., Meller A., Bayley H., Dekker C., Long Y. T., *Nat. Nanotechnol.*, **2022**, *17*(11), 1136—1146
- [16] Deamer D., Akeson M., Branton D., *Nat. Biotechnol.*, **2016**, *34*(5), 518—524
- [17] Cao C., Ying Y. L., Hu Z. L., Liao D. F., Tian H., Long Y. T., *Nat. Nanotechnol.*, **2016**, *11*(8), 713—718
- [18] Cao C., Liao D. F., Ying Y. L., Long Y. T., *Acta Chim. Sinica*, **2016**, *74*(9), 734—737(曹婵, 廖冬芳, 应佚伦, 龙亿涛. 化学学报, **2016**, *74*(9), 734—737)
- [19] Hu Z. L., Du J. H., Ying Y. L., Peng Y. Y., Cao C., Long Y. T., *Acta Chim. Sinica*, **2017**, *75*(11), 1087—1090(胡正利, 杜冀晖, 应佚伦, 彭岳一, 曹婵, 龙亿涛. 化学学报, **2017**, *75*(11), 1087—1090)
- [20] Wu X. Y., Ying Y. L., Long Y. T., *Chem. J. Chinese Universities*, **2019**, *40*(9), 1825—1831(武雪原, 应佚伦, 龙亿涛. 高等学校化学学报, **2019**, *40*(9), 1825—1831)
- [21] Galenkamp N. S., Biesemans A., Maglia G., *Nat. Chem.*, **2020**, *12*(5), 481—488
- [22] Jiang J., Li M. Y., Wu X. Y., Ying Y. L., Han H. X., Long Y. T., *Nat. Chem.*, **2023**, *15*(4), 578—586
- [23] Chen T. Z., Hu F. Z., Lin X. B., Ying Y. L., Zou A. H., *Chem. J. Chinese Universities*, **2024**, *45*(11), 212—220(陈天泽, 胡方舟, 林绪波, 应佚伦, 邹爱华. 高等学校化学学报, **2024**, *45*(11), 212—220)
- [24] Chen D., Zheng F., Qin G., Zou L., Ma C., Liu W., Wang H., Sha J., *Analyst*, **2026**, doi: 10.1039/D5AN01140J
- [25] Sutherland T. C., Long Y. T., Stefureac R. I., Bediako-Amoa I., Kraatz H. B., Lee J. S., *Nano Lett.*, **2004**, *4*(7), 1273—1277
- [26] Wang J., Prajapati J. D., Gao F., Ying Y. L., Kleinekathöfer U., Winterhalter M., Long Y. T., *J. Am. Chem. Soc.*, **2022**, *144*(33), 15072—15078
- [27] Liu W., Zhu Q., Yang C. N., Fu Y. H., Zhang J. C., Li M. Y., Yang Z. L., Xin K. L., Ma J., Winterhalter M., Ying Y. L., Long Y. T., *Nat. Nanotechnol.*, **2024**, *19*(11), 1693—1701
- [28] Li M., Xiong Y., Cao Y., Zhang C., Li Y., Ning H., Liu F., Zhou H., Li X., Ye X., *Nat. Commun.*, **2023**, *14*(1), 1737
- [29] Yao G., Tian Y., Ke W., Fang J., Ma S., Li T., Cheng X., Xia B., Wen L., Gao Z., *J. Am. Chem. Soc.*, **2024**, *146*(19), 13356—13366
- [30] Zhang S., Cao Z., Fan P., Sun W., Xiao Y., Zhang P., Wang Y., Huang S., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2024**, *63*(8), e202316766
- [31] Gao F., Wang J. H., Ma H., Xia B., Wen L., Long Y. T., Ying Y. L., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2025**, *64*(9), e202422118
- [32] Wang J. H., Ma W., Hu Z. L., Gao Z., Long Y. T., Li T., Ying Y. L., *Research*, **2025**, *8*, 0850
- [33] Wang Y., Ma H., Long Y. T., Ying Y. L., *Chem. Res. Chinese Universities*, **2024**, *40*(2), 272—278
- [34] Niu H., Li M. Y., Gao Y., Li J. G., Jiang J., Ying Y. L., Long Y. T., *Nat. Chem. Biol.*, **2025**, *21*(5), 716—726
- [35] Gu Z., Wang H., Ying Y. L., Long Y. T., *Sci. Bull.*, **2017**, *62*(18), 1245—1250(顾震, 王慧锋, 应佚伦, 龙亿涛. 科学通报, **2017**, *62*(18), 1245—1250)
- [36] Gu Z., Ying Y. L., Long Y. T., *Sci. China Chem.*, **2018**, *61*(12), 1483—1485(顾震, 应佚伦, 龙亿涛. 中国科学: 化学, **2018**, *61*(12), 1483—1485)
- [37] Yang C. Y., Gu Z., Hu Z. L., Ying Y. L., Long Y. T., *J. Electrochem.*, **2019**, *25*(3), 312—318(杨铖宇, 顾震, 胡正利, 应佚伦, 龙亿涛. 电化学, **2019**, *25*(3), 312—318)
- [38] Liu S. C., Xie B. K., Zhong C. B., Wang J., Ying Y. L., Long Y. T., *Rev. Sci. Instrum.*, **2021**, *92*(12), 121301
- [39] Li M. Y., Ying Y. L., Yu J., Liu S. C., Wang Y. Q., Li S., Long Y. T., *JACS Au*, **2021**, *1*(7), 967—976
- [40] Li M. Y., Ying Y. L., Long Y. T., *Acta Chim. Sinica*, **2019**, *77*(10), 984—988(李孟寅, 应佚伦, 龙亿涛. 化学学报, **2019**, *77*(10), 984—988)
- [41] Li S., Wu X. Y., Li M. Y., Liu S. C., Ying Y. L., Long Y. T., *Small Methods*, **2020**, *4*(11), 2000014
- [42] Stevic I., Parmar N., Paredes N., Berry L. R., Chan A. K., *Cell Biochem. Biophys.*, **2011**, *59*(3), 171—178
- [43] Remko M., Van Duijnen P. T., Broer R., *RSC Advances*, **2013**, *3*(25), 9843—9853

(Ed.: F, K)