

SNAP-tag 蛋白标签技术与荧光分析法在 蛋白原位分析中的联合应用

乔庆龙, 周 伟, 陈 婕, 刘文娟, 苗 露, 尹文婷, 徐兆超*

(中国科学院大连化学物理研究所, 辽宁 大连 116023)

摘要: 为将生物体内微观的蛋白行为可视化并以宏观信号呈现出来对蛋白进行实时、动态分析, 借助 SNAP-tag 蛋白标签技术与有机小分子荧光染料, 构建了一系列用于活细胞内实时监测目标蛋白的免洗荧光探针。标签蛋白 SNAP-tag 能够特异性识别探针中的苄基鸟嘌呤, 从而使目标蛋白共价连接上荧光团(萘酰亚胺), 携带上荧光信息。此外, 由于萘酰亚胺从水环境中被牵引至 SNAP-tag 蛋白的疏水空腔, 其荧光信号呈现出 2~13 倍的增强。通过 SNAP-tag 标签蛋白与目标蛋白的融合, 该荧光探针实现了对活细胞内线粒体蛋白 CoX8A 及核内蛋白 H2B 特异性识别, 在免洗条件下完成了对目标蛋白的实时追踪及原位分析。

关键词: SNAP-tag; 原位; 有机小分子荧光染料; 免洗荧光探针

中图分类号: O658

文献标识码: A

文章编号: 1000-8713(2019)08-0872-06

Combined application of SNAP-tag and fluorescence technique in in-situ protein analysis

QIAO Qinglong, ZHOU Wei, CHEN Jie, LIU Wenjuan, MIAO Lu,

YIN Wenting, XU Zhaochao*

(Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China)

Abstract: The visualization of the microcosmic behavior of proteins in vivo is the key to real-time monitoring of proteins. A series of wash-free SNAP-tag probes were designed and synthesized based on the combination of SNAP-tag and small organic molecule fluorescent dyes. SNAP-tag, which specifically recognized O6-benzylguanine, could be labeled with a fluorophore (e. g., 1,8-naphthalimide) through the formation of covalent bonds. Furthermore, the change from a hydrophilic environment to the hydrophobic cavum of SNAP-tag realized a 2–13-fold enhancement in fluorescence. Through the fusion of SNAP-tag and the target protein, the probes could recognize the mitochondrial proteins (e. g., cytochrome oxidase, Cox8A) and nuclear proteins (e. g., H2B) in living cells. Besides, the fluorescent probes allowed the in-situ real-time monitoring of proteins without washing.

Key words: SNAP-tag; in-situ; organic small molecule fluorescent dyes; wash-free fluorescent probes

蛋白是生命科学领域最重要的研究对象, 参与多种生命过程中所必需的信号转导, 其功能通过与小分子、DNA、其他蛋白底物之间相互作用实现^[1,2]。因此, 对蛋白的原位分析, 包括蛋白识别、

蛋白分布及实时动态追踪等, 能够更真实地揭示蛋白在生理过程中发挥的作用。然而, 紫外吸收法、圆二色光谱法、电化学法、红外光谱法、核磁共振法等均很难实现活细胞及活体内蛋白的原位分析^[3]。

收稿日期: 2019-03-19

* 通讯联系人. Tel: (0411) 84379648, E-mail: zcxu@dicp.ac.cn.

基金项目: 国家自然科学基金(21878286)。

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 21878286)。

基于有机小分子的荧光分析法能够在不破坏原生环境下对蛋白进行监测。相比于传统基于荧光蛋白的分析法^[4-6],有机小分子具有分子结构简单、颜色可选择多、易改造等优点,因此其在蛋白识别、标记领域逐渐成为荧光蛋白的替代者^[7-10]。然而,有机小分子染料通常源于人工合成,无法像荧光蛋白一样由细胞内源产生。这就为小分子应用于蛋白原位分析中带来了诸多问题:如有机小分子荧光染料在细胞中分布不均匀,易产生非特异性标记,细胞毒性大等。其中,有机小分子的非特异性标记问题尤为突出,科研工作者无法像荧光蛋白分析法一样控制目标蛋白上连接有机小分子的数量及位置。因此,这引发化学家去开发新的生物正交方法,并基于生物正交的方式将小分子染料定点、共价连接到目标蛋白上,进一步通过荧光信息跟踪、研究目标蛋白的位置和功能。目前应用最广泛的生物正交方式是基于酶促反应的蛋白标签技术,如 SNAP-tag、Halo-tag、PYP (Photoactive yellow protein)-tag 等。SNAP-tag 标签蛋白是人源 DNA 修复蛋白的 O⁶-烷基鸟嘌呤-DNA-烷基转移酶 (hAGT) 的突变体^[11,12],能够快速、特异性地与苄基鸟嘌呤 (BG) 或苄基氯嘧啶 (CP) 的衍生物反应,进而使 SNAP-tag 蛋白与有机小分子之间形成稳定的硫醚键,融合有 SNAP-tag 的目标蛋白能够特异性地连接一个探针分子。

目前,基于 SNAP-tag 技术与小分子荧光染料已开发出多种商业的 SNAP-tag 荧光探针,该类荧光探针通常由环境不敏感的荧光团 (如:罗丹明、花菁染料、荧光素等) 与苄基鸟嘌呤两部分构成。虽然,这类探针与 SNAP-tag 标签蛋白能够达到很高的反应速率,但是反应前后荧光信号变化通常较小 (增强 1~2 倍)。因此,这类探针在对细胞着色后存在较高的荧光背景,需要多次洗涤以除去未反应或非特异性标记的分子,才能达到高的信噪比。细胞的洗涤往往会造成时间分辨率的降低,对于蛋白动力学分析带来不利。因此,开发增强型的 SNAP-tag 荧光探针 (即与 SNAP-tag 标签蛋白结合后荧光信号明显增强) 显得尤为迫切。环境敏感型染料能够通过荧光信号的变化对分子周围环境微小改变进行快速、灵敏的响应 (通常水中荧光量子产率很低),因此这类染料逐渐被应用于 SNAP-tag 探针的设计中。通常这类探针由水环境中到 SNAP-tag 较为疏水的蛋白表面或空腔后,荧光信号会明显增强,从而

达到免洗的效果^[13-15]。Tan 课题组^[16-18]以环境敏感型染料 (4-磺酰胺基-7-氨基苯并恶二唑, SBD) 为发光基团,设计合成了用于活细胞内免洗荧光成像的 SNAP-tag 探针 BGSBD。与 SNAP-tag 结合后其荧光增强约 280 倍,实现了活细胞内原位蛋白的荧光成像,但是该探针的绝对亮度较低,不能满足超分辨荧光成像需求。针对以上问题,本研究基于传统的环境敏感型荧光染料萘酰亚胺,结合 SNAP-tag 蛋白标记技术设计合成免洗的用于蛋白原位分析的荧光探针^[19-21];同时,通过苄基鸟嘌呤的位置选择提高探针信噪比、选择性及反应速率,以满足不同实验方案及领域对识别与标记效果的要求。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与材料

核磁共振氢谱 (¹H NMR) 在 Bruker (AVANCE III 400/101MHz) 波谱仪上测试得到,其中以 0.03% (v/v) 的四甲基硅烷作为基准物质。紫外/可见吸收光谱与荧光发射光谱分别在 Agilent Cary 60 UV-Vis 分光光度计及 Agilent CARY Eclipse 荧光光谱仪上测得。溶剂 pH 在 Sartorius PB-10 的 pH 计上测得。生物细胞成像则在 Olympus FV1000 激光共聚焦显微镜上测得,其中镜头选取 100 倍油镜 (NA = 1.40)。

分子合成所使用试剂为国产 (伊诺凯公司和百灵威公司) 或进口 (Sigma-Aldrich 公司) 试剂,未经特殊说明外,均为分析纯,直接使用。商业化染料细胞核染料 Hoechst 33342 与线粒体商业染料 Mito-Tracker Red 均购自凯基生物公司。柱色谱分离纯化用硅胶粉型号为 200~300 目 (伊诺凯公司)。生物测试用商业化亚细胞器标记染料 (美国 Life Technologies 公司)。生物细胞培养所需的 DMEM 及 1640 培养基、青链霉素 (美国 Hyclone 公司); 优质胎牛血清 (以色列 Biological Industries)。

1.2 探针合成

1.2.1 探针 BGAN-Amino 的合成

依次称取 4-氨基-N-(4-(O-2-氨基嘌呤) 基甲基) 苄基-1,8-萘酰亚胺 (AN-Amino) (30 mg, 0.09 mmol)、2-氨基-6-(N-甲基) 四氢吡咯氨基嘌呤氯盐 (BG⁺) (81 mg, 0.27 mmol) 和叔丁醇钾 (70 mg, 0.54 mmol) 溶于 5 mL N,N-二甲基甲酰胺 (DMF) 中,在氮气氛围保护下室温搅拌 10 h 后停止反应 (见图 1)。减压除去 DMF,粗产物经硅胶柱分离纯

化(洗脱剂为二氯甲烷-甲醇,15:1, v/v),通过薄层色谱板监测产物流出,所得产物减压除去溶剂得黄色粉末 26 mg,产率 62%。

1.2.2 探针 mBGAN-2C 的合成

依次称取 4-乙氨基-*N*-(3-(*O*-2-氨基嘌呤)基甲基)苄基-1,8-萘酰亚胺(mAN-2C)(50 mg, 0.14 mmol)、BG⁺(105 mg, 0.41 mmol)和叔丁醇钾(90 mg, 0.80 mmol)溶于 5 mL 干燥的 DMF 中,在氮气氛围保护下室温搅拌 3 h 后停止反应(见图 2)。减压除去 DMF,粗产物经硅胶柱(200~300 目)分离纯化(洗脱剂为二氯甲烷-甲醇,20:1, v/v),通过薄层色谱板监测产物流出,所得产物减压除去溶剂得黄色粉末 33 mg,产率 48%。

1.2.3 探针 4BGAN-Bu 的合成

依次称取 4-(4-(*O*-2-氨基嘌呤)基甲基)苄基-*N*-丁基-1,8-萘酰亚胺(4AN-Bu)(100 mg, 0.26 mmol)、BG⁺(197 mg, 0.77 mmol)和叔丁醇钾

(175 mg, 1.56 mmol)溶于 5 mL 干燥的 DMF 中,在氮气氛围保护下室温搅拌 10 h 后停止反应(见图 3)。减压除去 DMF,粗产物经硅胶柱分离纯化(洗脱剂为二氯甲烷-甲醇,15:1, v/v),通过薄层色谱板监测产物流出,所得产物减压除去溶剂得到黄色粉末 26 mg,产率 19%。

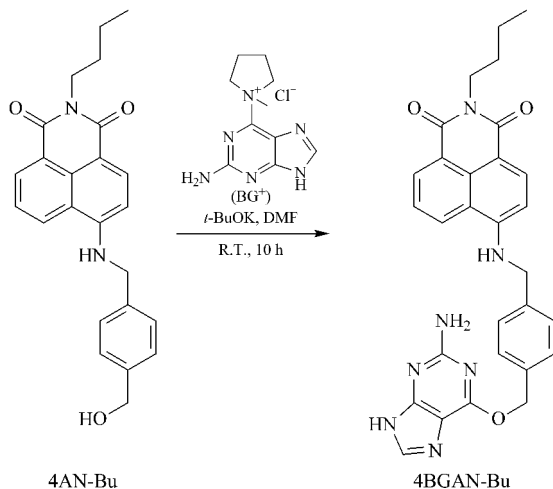


图 3 探针 4BGAN-Bu 的合成

Fig. 3 Synthesis of 4BGAN-Bu

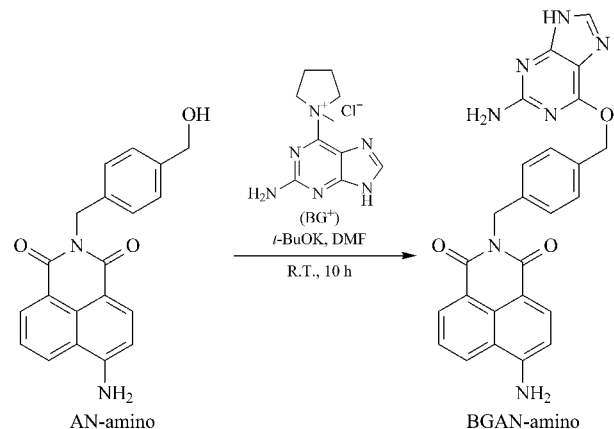


图 1 探针 BGAN-Amino 的合成

Fig. 1 Synthesis of BGAN-Amino

t-BuOK; potassium *tert*-butoxide; DMF; *N*, *N*-dimethyl-formamide.

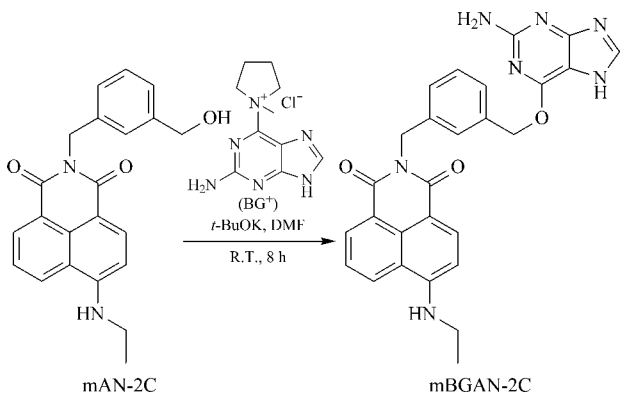


图 2 探针 mBGAN-2C 的合成

Fig. 2 Synthesis of mBGAN-2C

1.3 探针的紫外吸收与荧光发射光谱测试

准确称取待测探针化合物溶于色谱纯二甲基亚砜(DMSO)溶液中配制成 2 mmol/L 测试母液。准确量取一定体积的母液加入到测试体系中以配制成所需测试浓度(1~10 μ mol/L)(其中 DMSO 所占体积分数小于 0.5%)进行吸收与荧光发射光谱的测定。

分别取 2.5 μ L 探针母液加入 1 mL 磷酸缓冲液(PBS, 20 mmol/L, pH 7.4)配制为 5 μ mol/L 的测试液进行吸收及荧光发射光谱测试,DMSO 含量为 0.25% (v/v);而后向上述测试液中分别加入 20 μ L SNAP-tag 蛋白溶液(250 μ mol/L 的 PBS 溶液,20 mmol/L, pH 7.4)并反应 30 min 后进行吸收及荧光发射光谱测试。以上荧光光谱采集均选用 440 nm 激发,狭缝为 5-5;控制测试温度为 37 $^{\circ}$ C。

1.4 细胞培养及其荧光成像

细胞选用 DMEM 培养基(其中加入青霉素或者链霉素和 10% 胎牛血清(FBS))进行培育。对对数期 HeLa 细胞进行消化处理后接种于共聚焦专用皿(MatTek,半径 20 mm)中,于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 下孵育 24~48 h。而后将所需质粒与 Lip3000 分别加入无血清培养基中,混合 5~10 min 后加入细胞培

养皿,继续孵育 24~48 h 后,取适量待测化合物母液加入培养基中(根据需求选择合适终浓度)置于共聚焦荧光显微镜下观察(镜头选用 100 倍油镜)。激光为 405 nm,荧光采集为 420~470 nm;激光为 488 nm,荧光采集为 500~550 nm;激光为 561 nm,荧光采集为 580~653 nm。

2 结果与讨论

2.1 探针的核磁共振表征

探针 BGAN-Amino 核磁氢谱数据为: ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12.41 (s, 1H), 8.64 (d, $J=8.3$ Hz, 1H), 8.45 (d, $J=6.8$ Hz, de 1H), 8.22 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.70~7.61 (m, 1H), 7.51 (s, 2H), 7.43 (d, $J=8.1$ Hz, 2H), 7.34 (d, $J=8.1$ Hz, 2H), 6.86 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 6.27 (s, 2H), 5.43 (s, 2H), 5.23 (s, 2H)。

探针 mBGAN-2C 核磁氢谱数据为: ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12.42 (s, 1H), 8.69 (t, $J=15.8$ Hz, 1H), 8.44 (d, $J=7.2$ Hz, 1H), 8.25 (dd, $J=28.3, 8.6$ Hz, 1H), 7.78 (t, $J=16.4$ Hz, 2H), 7.66 (dd, $J=17.9, 9.8$ Hz, 1H), 7.45 (d, $J=27.3$ Hz, 1H), 7.32 (dt, $J=16.0, 7.8$ Hz, 2H), 6.77 (d, $J=8.7$ Hz, 1H), 6.28 (s, 2H), 5.44 (s, 2H), 5.24 (s, 2H), 3.43 (dd, $J=11.6, 5.9$ Hz, 2H), 1.39~1.21 (m, 3H)。

探针 4BGAN-Bu 核磁氢谱数据为: ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12.42 (s, 1H), 8.78 (d, $J=8.3$ Hz, 1H), 8.52~8.46 (m, 1H), 8.46 (d, $J=7.2$ Hz, 1H), 8.18 (d, $J=8.5$ Hz, 1H), 7.83 (s, 1H), 7.76~7.67 (m, 1H), 7.49 (d, $J=8.2$ Hz, 2H), 7.43 (d, $J=8.1$ Hz, 2H), 6.67 (d, $J=8.6$ Hz, 1H), 6.27 (s, 2H), 5.45 (s, 2H), 4.68 (d, $J=5.8$ Hz, 2H), 4.05~3.96 (m, 2H), 1.57 (dt, $J=14.8, 7.5$ Hz, 2H), 1.35~1.27 (m, 2H), 0.91 (t, $J=7.3$ Hz, 3H)。

经检测,以上核磁数据与各探针结构相符,探针结构正确。

2.2 探针对 SNAP-tag 标签蛋白的荧光响应

基于环境敏感的萘酰亚胺荧光团,在萘酰亚胺母体不同位置引入苄基鸟嘌呤基团,有望得到与 SNAP-tag 结合效果不同的荧光探针。通过萘酰亚胺内酰胺引入苄基鸟嘌呤基团,并调节嘌呤在苯环

的取代位置得到 BGAN-Amino 与 mBGAN-2C;在萘酰亚胺 4-位引入苄基鸟嘌呤基团得到探针 4BGAN-Bu。终浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$ 的 BGAN-Amino、mBGAN-2C、4BGAN-Bu 分别与 5 $\mu\text{mol/L}$ SNAP-tag 蛋白结合后荧光信号均得到了增强,但增强倍数不一(见图 4)。BGAN-Amino 与 SNAP-tag 结合后荧光强度增强约 9 倍,而 mBGAN-2C、4BGAN-Bu 分别只有 2 倍与 3 倍。探针荧光强度的增加主要来源于 SNAP-tag 标签蛋白表面的疏水作用与荧光淬灭基团鸟嘌呤的离去;荧光波长的变化源于探针由水环境(20 mmol/L PBS, pH 7.4)到 SNAP-tag 标签蛋白疏水空腔的变化。相比于 BGAN-Amino, mBGAN-2C 与 4BGAN-Bu 荧光增强倍数少的原因因为二者在 PBS(磷酸缓冲液,20 mmol/L, pH 7.4)中荧光强度高,即荧光背景强。以上数据说明本论

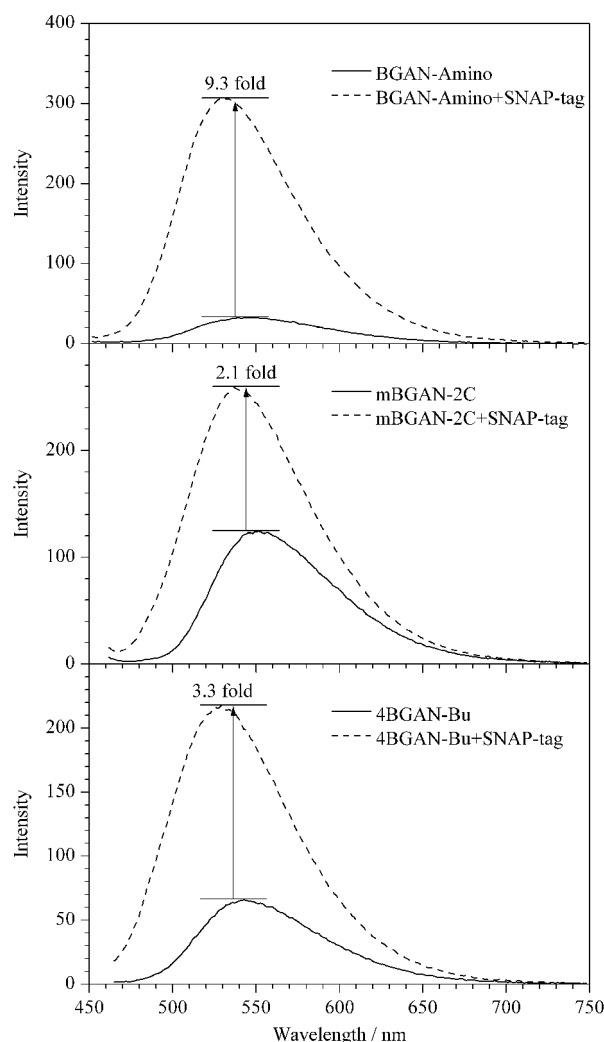


图 4 不同 SNAP-tag 探针与蛋白结合前后的荧光谱图
Fig. 4 Fluorescence spectra of different probes in the absence and presence of SNAP-tag

文中的探针与 SNAP-tag 标签蛋白结合后,蛋白空腔或表面的疏水作用给苯酰亚胺母体带来了较好的荧光增强效果,其能够作为免洗的 SNAP-tag 探针用于生物原位成像及蛋白的原位分析中。4BGAN-Bu 探针具有较好的细胞相容性及染色速度,因此该探针被进一步用于活细胞内蛋白的原位分析及荧光成像。

2.3 探针 4BGAN-Bu 在活细胞内对细胞核内 H2B 蛋白的原位监测

在体外 4BGAN-Bu 能够对 SNAP-rag 蛋白进行特异性识别,且荧光得到明显增强,但其能否应对复杂生物环境中特异标记目标蛋白仍需进一步考究。首先,对 HeLa 细胞进行瞬时转染以表达融合有 SNAP-tag 的核内蛋白 H2B。终浓度 1 μmol/L 的 4BGAN-Bu 细胞培养液在 37 ℃ 孵育 HeLa 细胞 30 min 后通过共聚焦荧光显微镜对目标蛋白进行荧光分析。图 5a 表明 4BGAN-Bu 能对细胞核内融合有 SNAP-tag 的 H2B 蛋白进行染色,细胞核轮廓清晰,无需洗涤细胞。4BGAN-Bu 标记的 H2B 蛋白与商品化 Hoechst 33342 标记的 DNA 结构能够很好重

合(见图 5b、5c),这间接证明了 H2B 蛋白存在染色体内并与 DNA 双链有较强结合。此外,图 5d 中对细胞内荧光强度分析表明,4BGAN-Bu 对 H2B 染色的信噪比较高,具有很好的免洗荧光成像效果。

2.4 探针 4BGAN-Bu 在活细胞内对线粒体中 Cox8A(细胞色素 C 氧化酶)的原位监测

细胞色素 C 氧化酶是线粒体内电子传递链中的末端酶,其动态分布、功能的行使与细胞的代谢密切相关。然而,由于时间分辨与空间分辨率的限制,质谱、圆二色光谱等分析手段在原位监测细胞色素 C 氧化酶的动态行为上存在较大困难。而通过转染融合有 SNAP-tag 蛋白的 Cox8A,可以借助探针 4BGAN-Bu 达到对 Cox8A 的实时跟踪。图 6a 中标记有 4BGAN-Bu 的 Cox8A 在线粒体中分布均匀,线粒体清晰可见且呈线条型(见图 6b)。图 6c-e 表明,4BGAN-Bu 与商业线粒体染料能够实现共定位,且 SNAP-tag 结合后有较高信噪比。4BGAN-Bu 能够在染色后直接用于对 Cox8A 的原位监测,避免反复洗涤细胞过程中对细胞的细微损伤。

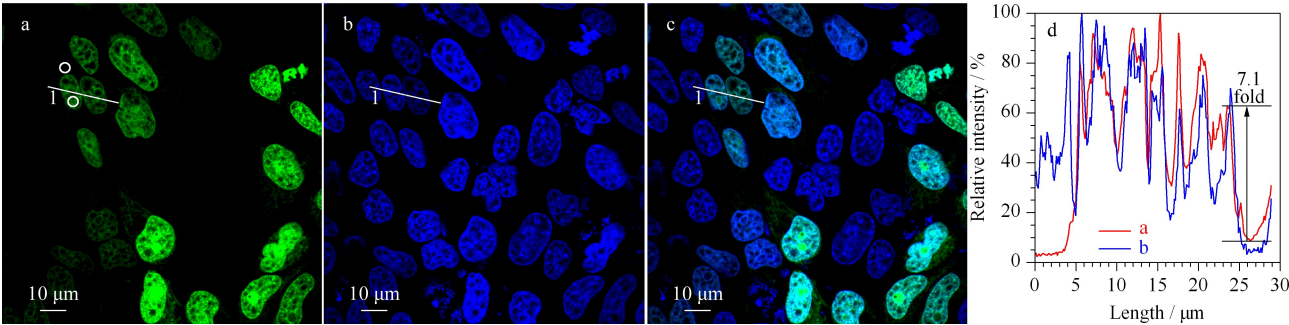


图 5 HeLa 细胞的共聚焦成像图
Fig. 5 Confocal images of HeLa cells

a. Live cell imaging of unwashed HeLa cells labeled with 4BGAN-Bu; b. Live cell imaging of unwashed HeLa cells labeled with commercial dye Hoechst 33342; c. Live cell imaging of unwashed HeLa cells labeled with 4BGAN-Bu and Hoechst 33342; d. Intensity profile of regions of interest (ROI) across HeLa cells.

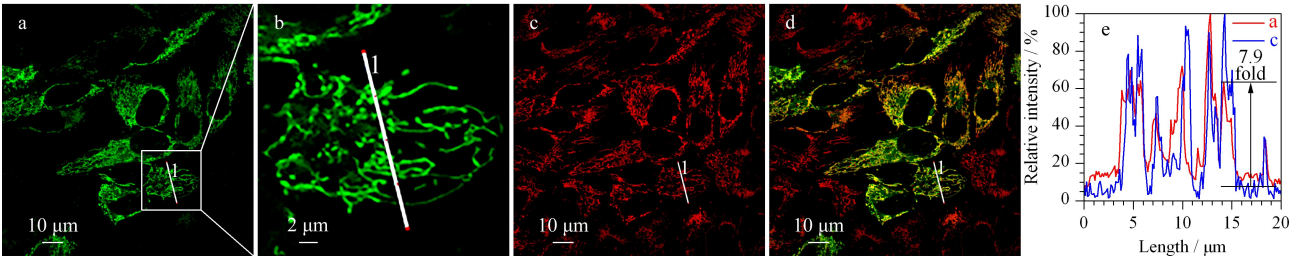


图 6 HeLa 细胞的共聚焦成像图
Fig. 6 Confocal images of HeLa cells

a, b. live cell imaging of unwashed HeLa cells labeled with 4BGAN-Bu; c. live cell imaging of unwashed HeLa cells labeled with commercial dye MitoTracker Red; d. live cell imaging of unwashed HeLa cells labeled with 4BGAN-Bu and MitoTracker Red; e. intensity profile of regions of interest (ROI) across HeLa cells.

2.5 线粒体损伤过程中探针 4BGAN-Bu 对 Cox8A(细胞色素 C 氧化酶)的原位监测

借助探针 4BGAN-Bu 的免洗及高特异性,进一步考察了线粒体受到损伤后线粒体形态变化及 Cox8A 分布变化(见图 7a)。高强度激光照射后,

线粒体逐渐由线型(见图 6b)变为棒状或圆形(见图 7b),而 Cox8A 仍然精准定位线粒体内。实验表明,借助有机小分子探针 4BGAN-Bu 与 SNAP-tag 融合蛋白可以实现对活细胞内不同状态下的细胞色素 C 氧化酶 Cox8A 的实时监测。

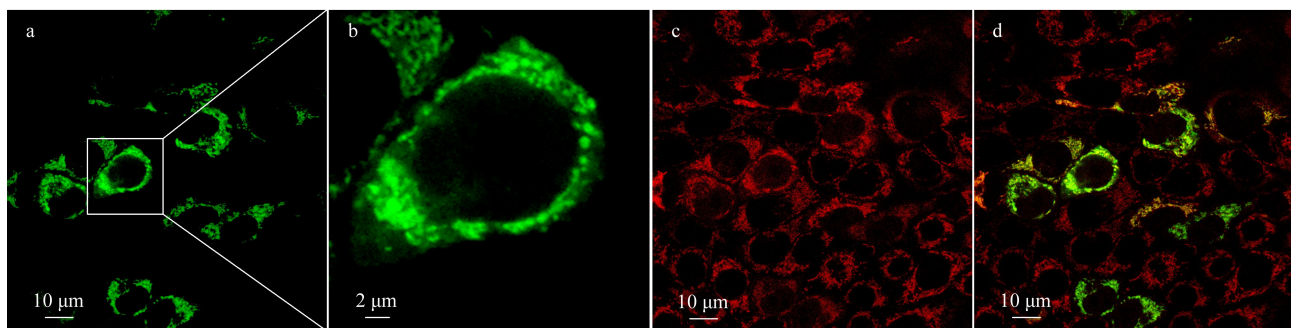


图 7 损伤的 HeLa 细胞的共聚焦成像图

Fig. 7 Confocal images of injured HeLa cells

a, b. live cell imaging of unwashed HeLa cells labeled with 4BGAN-Bu; c. live cell imaging of unwashed HeLa cells labeled with commercial dye MitoTracker Red; d. live cell imaging of unwashed HeLa cells labeled with 4BGAN-Bu and MitoTracker Red.

3 结论

本研究通过对苄基鸟嘌呤基团连接位置的改造设计了一系列基于萘酰亚胺的 SNAP-tag 探针,达到了对 SNAP-tag 不同的识别效果。该系列探针对融合有 SNAP-tag 的目标蛋白进行了特异性识别,其中 BGAN-Amino 与 SNAP-tag 结合后荧光增强了 9 倍,4BGAN-Bu 具有较高反应速率。此外,此系列 SNAP-tag 探针能够针对目标蛋白实现活细胞内的免洗荧光成像,对原位分析目标蛋白的动态变化及功能的行使具有重要意义。

参考文献:

- [1] Naik P N, Chimatadar S A, Nandibewoor S T. *Biopharm Drug Dispos*, 2010, 31: 120
- [2] Kubota R, Hamachi I. *Chem Soc Rev*, 2015, 44: 4454
- [3] Brown M P, Royer C. *Curr Opin Biotech*, 1997, 8: 45
- [4] Newman R H, Fosbrink M D, Zhang J. *Chem Rev*, 2011, 111: 3614
- [5] Cranfill P J, Selll B R, Baird M A, et al. *Nat Methods*, 2016, 13: 557
- [6] Xu Z Q, Huang X T, Han X, et al. *Chem*, 2018, 7: 1609
- [7] Owens E A, Henary M, Fakhri G E, et al. *Acc Chem Res*, 2016, 49: 1731

- [8] Tsukiji S, Miyagawa M, Takaoka Y, et al. *Nat Chem Biol*, 2009, 5: 341
- [9] Han X, Liu Y H, Liu G T, et al. *Chem Asian J*, 2019, 14: 890
- [10] Chen W J, Pan Y L, Chen J H, et al. *Chinese Chem Lett*, 2018, 29: 1429
- [11] Peter J B, Ivan R C, Michael H S, et al. *Biophys J*, 2014, 107: 803
- [12] Hoehnel S, Lutolf M P. *Bioconjugate Chem*, 2015, 26: 1678
- [13] Wang C, Song X B, Chen L C, et al. *Biosens Bioelectron*, 2017, 89: 757
- [14] Song X B, Bian H, Wang C, et al. *Org Biomol Chem*, 2017, 15: 8091
- [15] Wang C, Song X B, Xiao Y. *ChemBioChem* 2017, 18: 1762
- [16] Liu T K, Hsieh P Y, Zhuang Y D, et al. *ACS Chem Biol*, 2014, 9: 2359
- [17] Hou T C, Wu Y Y, Chiang P Y, et al. *Chem Sci*, 2015, 6: 4643
- [18] Yu W T, Wu T W, Huang C L, et al. *Chem Sci*, 2016, 7: 301
- [19] Leng S, Qiao Q Q, Miao L, et al. *Chem Commun*, 2017, 53: 6448
- [20] Leng S, Qiao Q Q, Gao Y, et al. *Chinese Chem Lett*, 2017, 28: 1911
- [21] Qiao Q Q, Liu W J, Chen J, et al. *Dyes and Pigments*, 2017, 147: 327