

生物正交反应法制备含有赖氨酸翻译后修饰类似物的蛋白质

王志鹏^{1,2,*}, 程农壹⁴, 李曼^{1,3}, 王田⁵

¹ Department of Chemistry, Texas A&M University, College Station, Texas 77840, USA

² 清华大学化学系, 北京 100084

³ Department of Plant Pathology and Microbiology, Texas A&M University, College Station, Texas 77840, USA

⁴ Department of Chemistry, University of Wisconsin-Madison, Madison, Wisconsin 53706, USA

⁵ Division of Biological Science, University of California, San Diego, La Jolla 92093, USA

摘要: 翻译后修饰一直是表观遗传学的重要研究内容, 尤其是近年来多种新型天然蛋白质中翻译后修饰被发现广泛存在于蛋白质组中。细胞生物学证明这些翻译后修饰对染色体结构和基因转录功能有关, 但是其中具体的分子生物学机制还处于未知状态。为了后续的进一步研究, 人们需要发展制备方法以求获取足量具有特定翻译后修饰的蛋白质。本文将讨论利用生物正交反应的手段制备含有这些新型赖氨酸翻译后修饰的蛋白的探索, 期对教学与科研有助。

关键词: 翻译后修饰; 生物正交反应; 蛋白质组

中图分类号: G64; O6; Q501

Applying Bioorthogonal Reactions to the Synthesis of Proteins Containing Lysine Post-Translational Modification Mimics

WANG Zhipeng A.^{1,2,*}, CHENG Nongyi⁴, LI Man^{1,3}, WANG Tian⁵

¹ Department of Chemistry, Texas A&M University, College Station, Texas 77840, USA.

² Department of Chemistry, Tsinghua University, Beijing 100084, P. R. China.

³ Department of Plant Pathology and Microbiology, Texas A&M University, College Station, Texas 77840, USA.

⁴ Department of Chemistry, University of Wisconsin-Madison, Madison, Wisconsin, USA 53706.

⁵ Division of Biological Science, University of California, San Diego, La Jolla 92093, USA.

Abstract: As an important topic in epigenetic research, post-translational modifications (PTMs) have been drawing more and more attention recently. With the increasing number of novel PTMs discovered, they have been found widely existing in human proteome. Although cell biology research showed their significant roles in the regulation of chromatin structure and gene transcription functions, the more detailed functions are remaining unclear. For further biology research, chemical biologists need to develop synthetic strategies for the proteins with specific PTMs at desired sites. This manuscript will introduce the application of bioorthogonal reactions to protein chemistry for the incorporation of lysine PTMs. We hope it can contribute to the research and education ongoing.

Key Words: Post-translational modification; Bioorthogonal reaction; Proteome

1 引言

天然蛋白质的翻译后修饰在“后基因组”时代被逐渐发现。这些翻译后修饰模式广泛存在于细

胞核蛋白质、胞质蛋白质及胞膜蛋白质上，它们可以参与一系列重要的生物化学过程，调控基因的转录与表达，并最终实现对细胞的结构与状态的调控。近年来，新型蛋白质翻译后修饰被逐步发现，以赖氨酸为例，除了已知经典的乙酰化与甲基化等广泛存在的修饰模式外^[1]，人们还发现了很多新型的酰基化修饰(图 1)。虽然这些翻译后修饰所具有的重要调控作用人们已经从细胞生物学的尺度上进行了研究，但目前很多具体的作用机制与调控过程等问题尚不清楚^[2]。

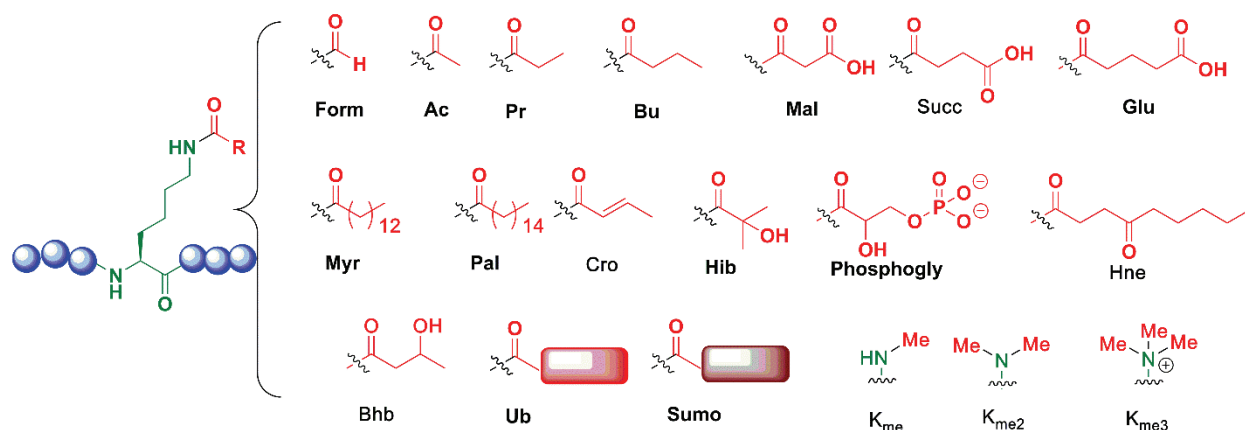


图 1 赖氨酸各类翻译后修饰的结构

为了对这些翻译后修饰模式进行深入研究，我们需要获得足量的具有特定翻译后修饰蛋白质。但由于这些含有翻译后修饰的蛋白质在细胞中分布极为分散，而总体含量又较低，我们很难直接从细胞中进行提取分离。不仅如此，同一个蛋白质上可能存在若干种不同的翻译后修饰模式，且这些翻译后修饰通常处于高度动态变化中。故而，我们几乎无法直接获得^[3]。而传统的基因工程手段又难以从 DNA 层面直接控制所表达的蛋白质翻译后修饰模式。因此，通过引入化学生物学与合成生物学以发展可行、有效且便于操作的制备方法，对于后续表观遗传学研究极为重要。为了解决这一难题，近期生物学家与化学生物学家发展出多种技术。本文将讨论其中一种利用生物正交反应制备赖氨酸翻译后修饰天然结构及其类似物的方法。我们首先简要介绍生物正交反应的原理，进而讨论这些反应在制备含有赖氨酸翻译后修饰的蛋白质中的应用实例。

生物正交反应是化学生物学的一个经典研究领域。其种类繁多，功能丰富，可以用于生物大分子的交联、标记、定位等，在蛋白质的化学生物学中有重要的作用。其在对于含有特定位点非天然结构的蛋白质的制备也有广泛的实用性。但是本部分内容在国内高校本科的化学系或生物系专业教育中几乎没有涉及，期望本文对相关专业的科研与教学能够有所帮助。

2 生物正交反应

本部分主要介绍生物正交反应的原理与基本特征，并以一些典型实例分析利用生物正交反应对天然蛋白质的修饰、交联与功能化。

2.1 技术简介

生物正交反应指一类生物大分子与功能小分子或生物大分子之间的化学反应，这些反应具备高选择性、反应条件温和、反应效率高等特点^[4]。与普通的有机反应需要高温或有机溶剂的条件不同，生物正交反应可以发生在常温常压的近中性水溶液中^[5]。正因如此，生物正交反应可以发生在具备天然结构与功能的生物大分子上，如蛋白质、核酸等。

发现与发展新型的生物正交反应是本领域一个重要的研究方向。尤其是最近，人们进一步改进了一系列传统的有机化学反应，使得一些以前并不属于生物正交反应的反应也得以在生命体系中使

用。例如传统的 Staudinger 反应,原本是一类古老的有机化学反应,近年来得到了重要的拓展。例如多类无痕 Staudinger 反应的发展,并被广泛地应用于生命科学领域^[6]。而近期新发现的亚铜离子催化的叠氮-炔基环合成反应(CuAAC)及其相关反应已被广泛应用于蛋白质的功能化^[7]。这些反应都可以被应用于含有翻译后修饰蛋白质的制备中。

2.2 技术特点

考虑到蛋白质中天然氨基酸侧链结构多样性的限制,这些反应大多都只能在半胱氨酸的巯基上。半胱氨酸的巯基相比于赖氨酸的侧链氨基或者多肽的 N 末端氨基具有较强的亲核性,故而可以与各种亲电试剂反应进而形成赖氨酸翻译后修饰的类似物^[8]。

除了利用天然蛋白质上自然存在的氨基酸侧链进行反应外,人们还可以利用其他手段在蛋白质上引入特定的官能团^[9]。例如非天然氨基酸引入手段可以在蛋白质特定位点上植入一个非天然的反应基团^[10]。利用蛋白质标签的方法人们也可进一步用酶促反应对目标蛋白质进行功能化^[11]。

2.3 赖氨酸翻译后修饰

随着新型生物正交反应逐渐应用于蛋白质化学生物学的各个领域,人们同时也发展出越来越多的新的化学方法^[12]。利用这些新的方法学,一大批赖氨酸类似物被制备出来,其结构与天然结构的类似性也越来越高。

赖氨酸是二十种天然蛋白质中唯一一个侧链带有 ϵ -氨基官能团的氨基酸。作为碱性氨基酸的代表,赖氨酸在生理条件下携带正电荷,并可与其他带有负电荷的分子相互作用,例如 DNA。故而,组蛋白上带有大量的赖氨酸以结合 DNA 共同形成核小体。近年来,人们发现赖氨酸上存在一系列的翻译后修饰,这些翻译后修饰可以通过改变靶蛋白质的赖氨酸电荷情况进而调控其与其他生物大分子的相互作用,并最终影响基因的转录。这些翻译后修饰分布广泛,结构多样,含量却很低。故而,引入包括生物正交反应在内的化学生物学方法是研究蛋白质翻译后修饰的主要途径。

3 应用实例

前文中我们简要介绍了生物正交反应技术应用于赖氨酸翻译后修饰及其类似物合成研究的必要性和可行性。本部分将分三类系统地讨论本领域的研究进展。

3.1 半胱氨酸烷基化修饰法

作为自然界中唯一一种含有巯基的天然氨基酸,半胱氨酸与多种小分子都有反应性。这是由于巯基本身作为强亲核性的“软碱”可以发生一系列的反应,如亲电取代反应、巯基-烯反应、二硫键的形成反应等。另一个重要因素是半胱氨酸在自然界中天然蛋白质上的含量极低。这虽然对依靠半胱氨酸进行链接的蛋白质的全合成很不利^[13],但却间接保证了生物正交反应的位置特异性。一方面,由于天然的半胱氨酸含量很低,除了我们感兴趣的位点外一般不会有其他半胱氨酸的干扰。另一方面,这些半胱氨酸一般处于非活性位点,人们常常将其他半胱氨酸突变后仅留下一个感兴趣的位点,将其由天然的赖氨酸突变为半胱氨酸用于标记^[14]。

2007 年 Shokat 课题组^[15]首次报道了其系统性地研究基于半胱氨酸的甲基化赖氨酸类似物的研究进展。他们设计了多种甲基化赖氨酸类似物(MLAs),而这些甲基化赖氨酸类似物可以由半胱氨酸烷基化高效便捷地制备,且对于单甲基化、双甲基化和三甲基化赖氨酸都可以适用。由于 *S*-(2-氨基乙基)-L-半胱氨酸是赖氨酸良好的类似物,*N*-(单,双或三)甲基氨基乙基氯被用于半胱氨酸的烷基化(图 2)。该反应在碱性条件下发生,可以在蛋白质的半胱氨酸处得到位置特异性的甲基化赖氨酸类似物。这些类似物可以进一步被用于研究不同甲基化对染色体结构与功能的调控作用。

此外,类似地 Davis 课题组报道了另外一些半胱氨酸修饰法以制备赖氨酸翻译后修饰类似物的研究工作^[16]。同样在 2007 年 Davis 课题组^[17]报道了基于半胱氨酸二硫键的糖基化类似物的制备方法。他们将两种正交的反应基团引入目标蛋白质中并进而分别用于标记。其中,一个位点用单点突变的策略引入半胱氨酸;而另一个位点用氨基酸替代的方法引入叠氮高丙氨酸(Aha)。接下来他们用

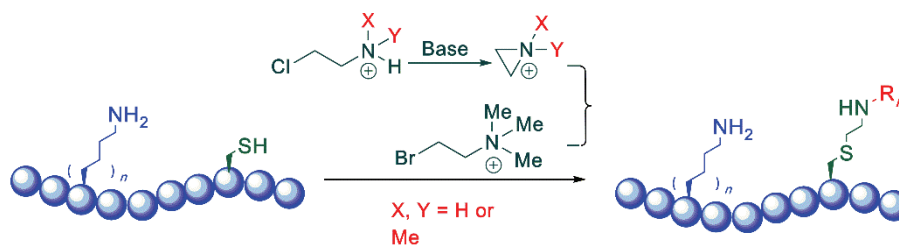


图2 半胱氨酸的烷基化修饰策略及制备甲基化赖氨酸类似物示意图

带有寡糖基团的二硫键形成试剂与双突变的蛋白质进行作用来形成半胱氨酸链接的 S-S 糖基化修饰, 并进一步利用铜催化的“点击反应”形成第二个寡糖修饰。这两步反应都具备高的转化率。Liu 课题组^[18]报道了一种新的由半胱氨酸烷基化的方法制备乙酰化赖氨酸类似物的途径。在该研究中, *N*-乙烯基乙酰胺(*N*-vinylacetamide)被用于与组蛋白 H3 或 H4 中特定位点的半胱氨酸在紫外光的照射下发生反应最终得到赖氨酸的类似物。所得的组蛋白产物在组蛋白 H3 的第 27 位与 H4 的 16 位带有赖氨酸的类似物, 并被进一步用于体外核小体折叠继而进行乙酰化功能实验。

综上所述, 半胱氨酸的直接烷基化修饰的方法是一个便捷而可靠的制备翻译后修饰赖氨酸类似物的手段。尽管所得产物与天然的翻译后修饰有所不同, 但半胱氨酸保留了本身 α -碳原子得到手性, 所得的产物也是对映异构体纯的。此外, 为了保证本方法的位置选择性, 蛋白质中只能有一个半胱氨酸侧链。

3.2 脱氢丙氨酸修饰法

第二类主要的生物正交反应发生在脱氢丙氨酸(Dha)上, 包括脱氢丙氨酸的形成与后续的原位(*in situ*)亲核进攻反应。脱氢丙氨酸作为一种 α,β -不饱和的氨基酸是良好的 Michael 加成受体分子, 可以被各类亲核试剂进攻以形成赖氨酸类似物。人们已经发展了很多在蛋白质中产生脱氢丙氨酸的策略。最为直接的方式是半胱氨酸的氧化消除反应(图 3a), 此过程天然存在于含有羊毛硫氨酸的天然活性环肽(Lantibiotics)的生物合成中^[19]。而脱氢丙氨酸的形成也同样发生在人体中^[20]。除了半胱氨酸, 硒代半胱氨酸及其衍生物也可以被转化为脱氢丙氨酸^[21]。例如, 人们可以利用非天然氨基酸引入的手段将含硒的前体分子如硒代赖氨酸(K_{Se})引入目标蛋白质中。一旦实现了硒代赖氨酸的引入, 其亦可进行氧化消除反应以生成脱氢丙氨酸^[22]。另外, β -苯基硒代半胱氨酸也可作为脱氢丙氨酸的前体分子直接通过多肽化学合成引入目标蛋白质中^[23]。

通过脱氢丙氨酸的引入, 人们进而利用不同亲核试剂的 Michael 加成反应实现了一系列翻译后修饰及其类似物的制备。Davis 课题组^[24]于 2008 年首先报道了一种非氧化性的脱氢丙氨酸引入手段。同样是利用蛋白质中的半胱氨酸侧链, 他们将其与 *O*-均三甲苯磺酰羟胺酯(MSH)相互作用, 半胱氨酸进而发生 β -消除反应生成脱氢丙氨酸(图 3b)。该过程可以实现完全转化, 且对蛋白质中所含的甲硫氨酸具有耐受性而不会产生副反应。通过利用此方法, 该课题组将脱氢丙氨酸引入一个仅含有单一半胱氨酸的丝氨酸蛋白酶上, 进而通过巯基-烯反应将其转化为不同的翻译后修饰如磷酸化、甲基化和糖基化等(图 3d)。2011 年 Davis 课题组^[25]又报道了另外一种便捷的脱氢丙氨酸合成方法。在该方法中, 半胱氨酸通过双烷基化-消除机理可以直接转化为脱氢丙氨酸。他们以含有单一半胱氨酸位点的蛋白 Np276 为模型蛋白, 通过与新型试剂 α,α' -二溴代-丁二酰胺的作用下生成脱氢丙氨酸并进一步用于蛋白质标记(图 3c)。相比于该条件下使用 MSH 仅仅得到非特异性的氨基化产物。

综上所述, 尽管利用脱氢丙氨酸修饰的策略人们可以高效而便捷地制备理想的翻译后修饰类似物, 但这些产物中大多不可避免地含有硫原子。这个硫原子来自 Michael 加成反应中所使用的含硫亲核试剂。这也使得本方法与前文提到的半胱氨酸烷基化修饰的方法得到同样的产物。同时, 半胱氨酸的烷基化修饰保留了半胱氨酸 α -碳原子的手性, 而脱氢丙氨酸的形成就意味着手性的消失进而

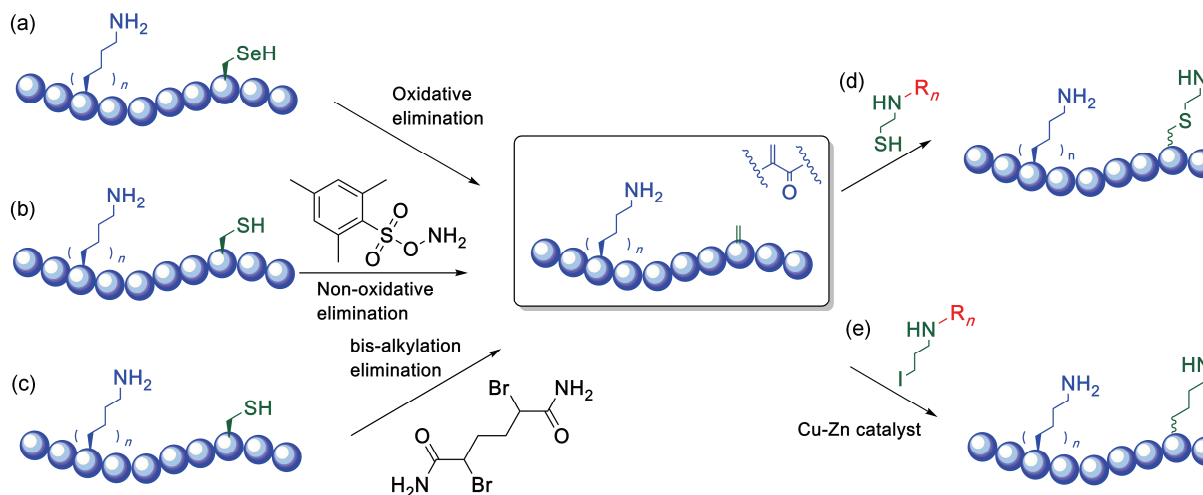


图3 利用脱氢丙氨酸修饰的策略引入含有天然或非天然翻译后修饰赖氨酸结构示意图

(a) 半胱氨酸的氧化消除反应生成脱氢丙氨酸；(b) 半胱氨酸的 β -消除反应生成脱氢丙氨酸；(c) 半胱氨酸在 α,α' -二溴代-丁二酰胺的作用下生成脱氢丙氨酸；(d) 脱氢丙氨酸在巯基-烯反应下生成翻译后修饰赖氨酸类似物；(e) 脱氢丙氨酸在硫金属催化偶联反应下生成翻译后修饰赖氨酸类似物

得到蛋白质非对映异构体的混合物。虽然有以上两点不足，但本方法与半胱氨酸烷基化修饰相比还有位置特异性这一优势。正是由于脱氢丙氨酸可以通过非天然氨基酸引入的策略引入到蛋白质的特定位点，而后续反应也就是位置特异性的^[26]。

3.3 金属催化碳碳键形成反应法

前文所提到的两种方法都不可避免地具有一个问题，即产物中含有非天然的硫原子。虽然硫原子在化学生物学中常常作为亚甲基的替代物，但其在键长与键角上都和亚甲基有显著区别。故而如何解决这一问题成为本领域的一个重大调整。

最近，传统的脱氢丙氨酸制备翻译后修饰的策略又得到了新的发展。随着过渡金属催化碳-碳缩合反应的发展，一系列新的有机化学反应被引入到蛋白质的生物正交反应中来，并可替代了已有的巯基-烯反应以形成翻译后修饰的类似物。与前文提到的 Michael 加成类反应不同的是，利用金属锌-铜(Zn-Cu)复合金属催化剂催化的交叉偶联反应可以在脱氢丙氨酸上形成碳-碳键联。值得注意的是，虽然本方法属于基于脱氢丙氨酸修饰，但是利用的反应与 3.2 节中的经典反应完全不同，故而单独分类。2016 年，Park 课题组^[27]报道了双金属催化的碘代烷对脱氢丙氨酸的自由基加成反应，该反应可以形成与天然结构更加相似的碳-碳键连产物以避免引入硫原子(图 3e)。利用此方法，他们合成了带有在赖氨酸 79 位甲基化的组蛋白，并且研究了甲基化与乙酰化之间的相互调控作用(cross-talk)与对基因转录的作用。Davis 课题组^[28]也于同年报道了一个相似的工作，他们将这个策略称作翻译后修饰突变法(posttranslational mutagenesis)，同样也是利用卤代烃与脱氢丙氨酸之间的自由基机理碳-碳偶联反应以制备各类翻译后修饰结构。由于卤代烃可选用的种类多样，理论上说本方法可以适用于各种翻译后修饰。总体说来，本方法与传统方法相比避免了在侧链上引入杂原子，因而更加接近于天然结构。不过本方法并没有解决脱氢丙氨酸带来的 α -碳原子消旋化问题，而且所得到的蛋白质产物也是含有一个 D/L 手性碳的非对映异构体。

3.4 本方法的局限性

如前文所述，通过生物正交反应法我们可以制备含有各类赖氨酸翻译后修饰结构与其类似物的纯品蛋白质。该策略设计的方法多种多样，简便易行，具有广泛的适用性。然而，本方法的一个缺

点是所得的结构要么是天然结构的类似物, 要么是消旋化混合物。这也在一定程度上影响了产物蛋白的生物学应用。

具体说来, 半胱氨酸烷基化策略的前提条件是该天然蛋白质有且仅有一个天然的半胱氨酸, 否则将对原有序列进行突变。例如, 如果含有多于一个半胱氨酸侧链, 人们需要保留关键位点并将其其他半胱氨酸突变成其他氨基酸; 如果序列中并没有天然的半胱氨酸, 人们则需要在关键位点引入一个半胱氨酸。而对于脱氢丙氨酸修饰法, 首先需要通过基于半胱氨酸转化法形成脱氢丙氨酸, 并进而进行修饰。人们也可以利用非天然氨基酸引入法引入其他前体氨基酸并转化为脱氢丙氨酸。

此外, 利用生物正交反应的方法大多仅仅用于赖氨酸翻译后修饰蛋白质的合成, 这是因为无论使用半胱氨酸修饰法或者脱氢丙氨酸修饰法所得的链长度恰好与赖氨酸相近而长于其他天然氨基酸侧链。

值得一提的是, 除了以上提到的基于天然氨基酸侧链的生物正交反应修饰法外, 人们还发展了结合非天然氨基酸引入法与生物正交反应修饰法的策略^[29]以引入一些具有复杂结构的翻译后修饰^[30], 并将其广泛应用于生命科学研究中^[31]。

4 结论与展望

蛋白质赖氨酸翻译后修饰的制备是一个亟待合成化学家与化学生物学家解决的问题^[32]。通过发展生物正交反应以修饰表达蛋白质的技术, 人们可以有效地在目标蛋白质中引入这些翻译后修饰及其类似物。然而, 国内在化学生物学相关专业的本科教学中对本领域几乎无涉及。这对于培养化学生物学等跨学科研究人才是极为不利的。

本文通过介绍近期利用生物正交反应向目标蛋白质中引入新型赖氨酸翻译后修饰及其类似物的研究进展, 探索尝试将前沿的生命科学问题引入本科生的基础教育中^[33]。这种尝试可以有效地增加学生的探索兴趣, 拓宽学生的知识面, 并巩固学生的基础知识^[34]。期望本文对相关专业的基础教学与科研有所帮助。

致谢: 感谢 University of Chicago 博士研究生邱天对本文构思提供的灵感。感谢 Texas A&M University 博士研究生 Erol Can Vatansever 对本文讨论部分提出的意见与建议。

参 考 文 献

- [1] Li, Y.; Barlose, C.; Jørgensen, J.; Carlsen, B. D.; Jørgensen, K. A. *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 1.
- [2] 刘金凤, 王京兰, 钱小红, 蔡耘. 中国生物化学与分子生物学报, **2007**, *23*, 93.
- [3] Chen, B.; Zang, W.; Wang, J.; Huang, Y.; He, Y.; Yan, L.; Liu, J.; Zheng, W. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 5246.
- [4] Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 13.
- [5] Foley, T. L.; Burkart, M. D. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, *11*, 12.
- [6] Wang, Z. A.; Tian, C. L.; Zheng, J. S. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 107192.
- [7] Lang, K.; Chin, J. W. *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 16.
- [8] Baslé, E.; Joubert, N.; Pucheault, M. *Chem. Biol.* **2010**, *17*, 213.
- [9] 王志鹏, 李娟, 李宜明. 有机化学, **2013**, *33*, 1874.
- [10] Wang, Z. A.; Kurra, Y.; Wang, X.; Zeng, Y.; Lee, Y. J.; Sharma, V.; Lin, H.; Dai, S. Y.; Liu, W. R. *Angew. Chem. Int. Edit.* **2017**, *56*, 1643.
- [11] Wang, Z.; Ding, X.; Li, S.; Shi, J.; Li, Y. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 7235.
- [12] Davis, B. G. *Science* **2004**, *303*, 480.
- [13] Dawson, P. E.; Kent, S. B. H. *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 923.
- [14] Li, Y.; Yang, M.; Huang, Y.; Song, X.; Liu, L.; Chen, P. R. *Chem. Sci.* **2012**, *3*, 2766.

- [15] Simon, M. D.; Chu, F.; Racki, L. R.; Cecile, C.; Burlingame, A. L.; Panning, B.; Narlikar, G. J.; Shokat, K. M. *Cell* **2007**, *128*, 1003.
- [16] Chalker, J. M.; Bernardes, G. J. L.; Davis, B. G. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 730.
- [17] van Kasteren, S. I.; Kramer, H. B.; Jensen, H. H.; Campbell, S. J.; Kirkpatrick, J.; Oldham, N. J.; Anthony, D. C.; Davis, B. G. *Nature* **2007**, *446*, 1105.
- [18] Li, F.; Allahverdi, A.; Yang, R.; Lua, G. B. J.; Zhang, X.; Cao, Y.; Korolev, N.; Nordenskiöld, L.; Liu, C. F. *Angew. Chem. Int. Edit.* **2011**, *50*, 9611.
- [19] Willey, J. M.; van der Donk, W. A. *Annu. Rev. Microbiol.* **2007**, *61*, 477.
- [20] Bar-Or, R.; Rael, L. T.; Bar-Or, D. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2008**, *22*, 711.
- [21] Hashimoto, K.; Sakai, M.; Okuno, T.; Shirahama, H. *Chem. Commun.* **1996**, 1849.
- [22] Seebeck, F. P.; Szostak, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 7150.
- [23] Okeley, N. M.; Zhu, Y. T.; van der Donk, W. A. *Abstr. Pap. Am. Chem. Soc.* **2001**, *221*, U150.
- [24] Bernardes, G. J.; Chalker, J. M.; Errey, J. C.; Davis, B. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5052.
- [25] Chalker, J. M.; Gunnoo, S. B.; Boutureira, O.; Gerstberger, S. C.; Fernández-González, M.; Bernardes, G. J.; Griffin, L.; Hailu, H.; Schofield, C. J.; Davis, B. G. *Chem. Sci.* **2011**, *2*, 1666.
- [26] Wang, Z. U.; Wang, Y. S.; Pai, P. J.; Russell, W. K.; Russell, D. H.; Liu, W. R. *Biochemistry* **2012**, *51*, 5232.
- [27] Yang, A.; Ha, S.; Ahn, J.; Kim, R.; Kim, S.; Lee, Y.; Kim, J.; Söll, D.; Lee, H. Y.; Park, H. S. *Science* **2016**, *354*, 623.
- [28] Wright, T. H.; Bower, B. J.; Chalker, J. M.; Bernardes, G. J.; Wiewiora, R.; Ng, W. L.; Raj, R.; Faulkner, S.; Vallée, M. R. J.; Phnumartwath, A. *Science* **2016**, *354*, 1465.
- [29] Wang, Z. A.; Kurra, Y.; Wang, X.; Zeng, Y.; Lee, Y. J.; Sharma, V.; Lin, H.; Dai, S. Y.; Liu, W. R. *Angew. Chem. Int. Edit.* **2017**, *56*, 1643.
- [30] Wang, Z. A.; Zeng, Y.; Kurra, Y.; Wang, X.; Tharp, J. M.; Vatansever, E. C.; Hsu, W. W.; Dai, S.; Fang, X.; Liu, W. R. *Angew. Chem. Int. Edit.* **2017**, *56*, 212.
- [31] Xie, X.; Li, X. M.; Qin, F.; Lin, J.; Zhang, G.; Zhao, J.; Bao, X.; Zhu, R.; Song, H.; Li, X. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 6522.
- [32] 王志鹏, 邓耿. 化学教育, **2017**, *38*, 72.
- [33] 王志鹏, 冯天师, 崔丽嘉, 石玉洁, 沙耀武. 中国科学(生命科学), **2013**, *43*, 778.
- [34] 王志鹏. 大学化学, **2017**, *32*, 86.