

## 微过氧化物酶水溶液的 ABEEM/MM 动力学模拟

崔宝秋<sup>1,2</sup> 宫利东<sup>1,\*</sup> 赵东霞<sup>1</sup><sup>1</sup> 辽宁师范大学化学化工学院, 辽宁 大连 116029; <sup>2</sup> 锦州师范高等专科学校化学系, 辽宁 锦州 121000

**摘要:** 应用原子-键电负性均衡浮动电荷分子力场(ABEEM/MM), 对微过氧化物酶水溶液进行了分子动力学模拟. 研究了水溶液对微过氧化物酶的结构, 血红素的皱裂构象以及轴配体咪唑基的取向的影响. 结果表明, 在水溶液中微过氧化物酶的骨架氨基酸是稳定的, 而血红素的皱裂构象在水分子的作用下趋于平面. 与血红素轴配体咪唑基键连的组氨酸决定着咪唑基的空间取向, 而咪唑基与血红素侧链的丙酸基的静电作用对其取向仅起次要作用.

**关键词:** ABEEM/MM 浮动电荷分子力场; 微过氧化物酶; 血红素; 构象; 分子动力学模拟

**中图分类号:** O642; O643

## Molecular Dynamics Simulation of Microperoxidase in Aqueous Solution in Terms of the ABEEM/MM Method

CUI Bao-Qiu<sup>1,2</sup> GONG Li-Dong<sup>1,\*</sup> ZHAO Dong-Xia<sup>1</sup><sup>1</sup>College of Chemistry and Chemical Engineering, Liaoning Normal University, Dalian 116029, Liaoning Province, P. R. China;<sup>2</sup>Department of Chemistry, Jinzhou Teacher College, Jinzhou 121000, Liaoning Province, P. R. China)

**Abstract:** In terms of the atom-bond electronegativity equilization fluctuating charge molecular mechanics(ABEEM/MM), molecular dynamics simulation on aqueous microperoxidases (MP) was performed. The impact of water molecules on the structure of MP, the ruffling conformation of the heme, and the orientation of the axially ligated imidazole were investigated. Results show that, in the aqueous solution, the backbone amino acids of the MP are stable, while the ruffling conformation of heme turns to be planar, which comes from the interaction between water and MP. The orientation of the axially coordinated imidazole is mainly determined by the histidine bonded with the imidazole, while the electrostatic force between the imidazole and the side-chained propionic acid group of the heme is only a subsidiary factor.

**Key Words:** ABEEM/MM fluctuating charge molecular force field; Microperoxidase; Heme; Conformation; Molecular dynamics simulation

含有血红素辅基的微过氧化物酶(microperoxidase, MP)因其结构简单, 常被选作血红素蛋白的活性中心模型来研究<sup>[1,2]</sup>. 但限于微过氧化物酶中氨基酸的流动性等因素, 目前还很难得到微过氧化物酶的晶体结构. 分子动力学模拟方法能够给出分子在原子水平上的运动细节, 为了解微过氧化物酶的构象变化, 结构与功能的关系提供了参考依据.

Melchionna 等<sup>[3,4]</sup>曾应用 GROMOS 力场模拟研究了细胞色素 c 中血红素-11 肽单体水溶液, 并预测了微过氧化物酶的结构. 此外, 能否正确描述体系的静电极化势能, 也是动力学模拟生物分子水溶液体系成败的关键因素之一. 例如, 在血红素蛋白中, 有些血红素的侧链丙酸基暴露在水溶液中, 水分子和它的静电极化作用有时会非常重要; 如 Zarić 等<sup>[5]</sup>的研究

Received: December 4, 2007; Revised: March 14, 2008; Published on Web: April 9, 2008.

\*Corresponding author. Email: gongjw@lnnu.edu.cn; Tel: +86411-82159607; Fax: +86411-82158977.

国家自然科学基金(20633050 和 20703022)和高等学校博士学科点专项科研基金(20040165001)资助项目

认为, 血红素的侧链丙酸基氧原子与轴配体咪唑基氮上氢原子的静电相互作用, 影响着血红素轴配体咪唑基的构象, 进而对血红素蛋白的反应活性有重要影响. 在原子-键电负性均衡方法 (ABEEM)<sup>[6-9]</sup>基础上, 新近发展的原子-键电负性均衡浮动电荷分子力场 (ABEEM/MM)<sup>[9-18]</sup>, 可较好地描述原子间的静电极化作用. 目前该分子力场已成功应用到纯水体系<sup>[9-11]</sup>、离子体系<sup>[12,13]</sup>、多肽以及小蛋白体系<sup>[14-18]</sup>的研究中. 为进一步认识水溶液对血红素蛋白活性中心结构与功能的影响, 本文采用 ABEEM/MM 浮动电荷分子力场对水溶液中的 MP 进行了分子动力学模拟, 研究水溶液对其结构、活性中心血红素以及轴配体咪唑基构象的影响.

## 1 模拟方法

### 1.1 模拟体系和分子力场模型

微过氧化物酶的模型分子结构取自蛋白质晶体结构数据库中的细胞色素 (PDB code 1HRC<sup>[19]</sup>), 保留其中第 11-21 位的氨基酸残基及活性中心血红素辅基, 其中半胱氨酸 Cys14 和 Cys17 通过硫醚键与血红素辅基相连, 组氨酸 His18 的咪唑基 (5th-Im) 作为血红素中心 Fe(III) 的轴向第五配体与血红素相连. 为探讨轴配体咪唑基的构象, 采用 4-甲基咪唑 (6th-Im) 作为 Fe(III) 的轴向第六配体, 具体结构如图 1 所示. 对于模拟研究的 MP 水溶液, 水分子由 Tinker 3.9 程序包产生, 立方盒子的边长为 2.5662 nm. 在模拟体系中含有 411 个水分子和位于盒子中央的溶质 MP 分子, 其中 MP 分子的整体电荷为 -1.

MP 水溶液的 ABEEM/MM 浮动电荷力场势能由 MP、水分子体系、MP 与水分子的非键相互作用等三个部分组成, 其中 MP 的势能函数 ( $E_{MP}$ ) 主要由以下五个部分组成: 键伸缩能 ( $E_{bonds}$ )、键角弯曲能

( $E_{angles}$ )、二面角扭转势能 ( $E_{torsion}$ )、静电库仑势能 ( $E_{elec}$ ) 和范德华势能 ( $E_{vdw}$ ) 组成:

$$E_{MP} = \sum_{bonds} k_b (r - r_{eq})^2 + \sum_{angles} k_\theta (\theta - \theta_{eq})^2 + \sum_{torsion} \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\varphi - \gamma)] + \sum_{elec} [k_{ij} \frac{q_i q_j}{r_{ij}}] + \sum_{vdw} \{4f_{ij} \epsilon_{ij} [(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}})^{12} - (\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}})^6]\} \quad (1)$$

方程(1)中  $k_b$  和  $k_\theta$ 、 $r$  和  $\theta$ 、 $r_{eq}$  和  $\theta_{eq}$  分别表示键伸缩和键角弯曲势能的力常数、实际的键长和键角值、平衡键长和平衡键角值;  $V_n/2$  表示二面角扭转势能项的展开力常数,  $\varphi$ 、 $n$ 、 $\gamma$  分别为实际二面角值、周期值和相角. 库仑静电势能项中的  $q_i$  和  $q_j$  是指各个原子、化学键以及孤对电子等位点上所带的电荷, 由原子-键电负性均衡方法 (ABEEM)<sup>[6-9]</sup> 计算得到, 范德华势能项 ( $E_{vdw}$ ) 采用 Lennard-Jones 形式, 其中势能参数  $\sigma$  指碰撞直径,  $\epsilon$  指势阱深度, 原子对  $i$  和  $j$  的势能参数等于两个原子势能参数的几何平均.

溶液中水分子的势能函数采用 ABEEM-TIP7P 水模型<sup>[9-11]</sup>, MP 与水分子的非键相互作用如方程(2)所示:

$$E_{MPH_2O} = \sum_{i \in MP} \sum_{j \in H_2O} \left\{ k_{ij} \frac{q_i q_j}{r_{ij}} + 4f_{ij} \epsilon_{ij} \left[ \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \right\} \quad (2)$$

其中的 ABEEM/MM 浮动电荷力场势能参数和非键相互作用系数 ( $k_{ij}$  和  $f_{ij}$ ) 可参见文献[14,15], 血红素的 ABEEM/MM 参数参见文献[20-22].

### 1.2 动力学模拟

分子动力学模拟利用我们修改后的 Tinker 3.9 程序包进行, 在 298.15 K 的正则系综 (NVT) 条件下进行. 采用 Berendsen 热浴控制分子的温度, Verlet 跳蛙法积分运动方程. 同时采用周期性边界条件和最近镜像, 截断半径选为 1.200 nm, 并利用开关函数调节非化学键的连接相互作用. 选取的积分步长为 1 fs, 且每隔 100 fs 保存一次坐标用于计算. 在分子动力学模拟中, 化学键和孤对电子的电荷重新回归到相应的原子上. 模拟前首先对初始结构采用共轭梯度法进行能量最小化, 共轭梯度小于  $0.418 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{nm}^{-1}$ . 能量优化后的结构到达平衡态的预平衡时间约为 50 ps, 随后 450 ps 的轨迹用来统计相关性. 考虑到计算时间的消耗问题, 确定以 1.0 ps 间隔来计算各部分的电荷. 模拟计算在 SGI Altix 3700 服务器上进行, 数据处理与分析采用 Tinker 3.9 以及我们自编的程序.

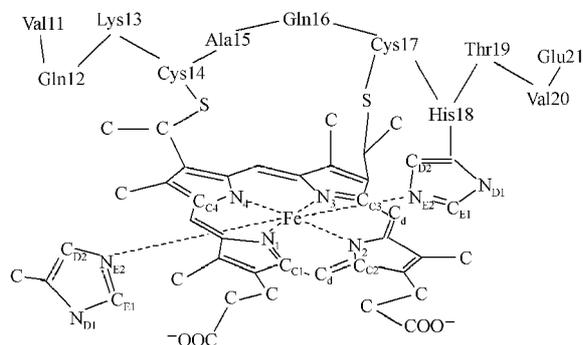


图 1 MP-11 骨架结构

Fig.1 Frame structure of MP-11

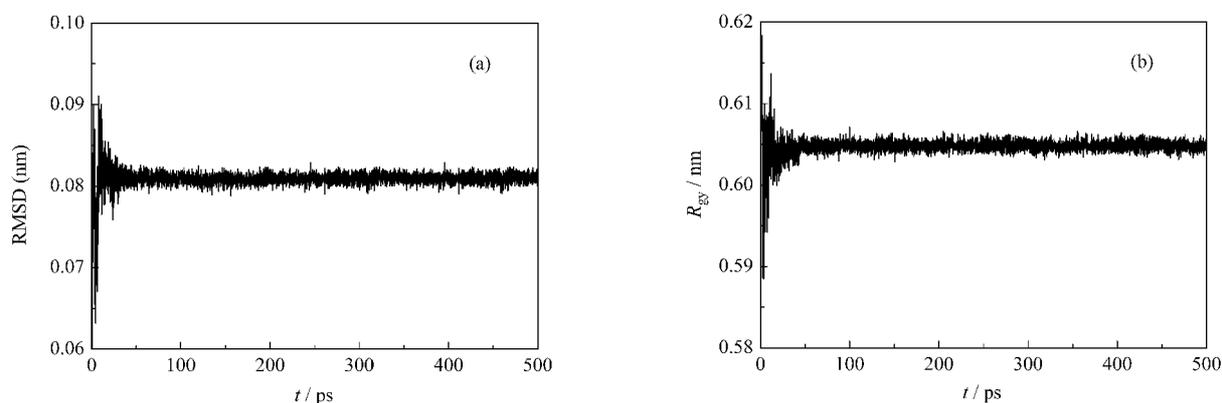


图2 动力学模拟中骨架原子的位移均方根偏差(a)和回旋半径(b)随时间的变化

Fig.2 Root mean square deviation (RMSD) of displacements (a) and gyration radius ( $R_{gy}$ ) for backbone atoms (b) in molecular dynamics simulations as a function of time

## 2 结果与讨论

### 2.1 氨基酸结构

原子位移均方根偏差(RMSD)和回旋半径(gyration radius, 简写为 $R_{gy}$ )是衡量模拟体系稳定程度的重要依据. 图2为模拟获得的MP模型分子中氨基酸骨架原子的位移RMSD和 $R_{gy}$ 的时间变化图. 可以看出, 经过50 ps后, 骨架原子的位移RMSD和 $R_{gy}$ 都逐渐趋于稳定, 表明体系处于平衡状态.

由模拟计算可知, MP水溶液中11个氨基酸内重原子的 $R_{gy}$ 为0.6047 nm, 大于晶体结构中的 $R_{gy}$ (0.5942 nm), 而后者又大于在真空中优化获得结构的 $R_{gy}$ (0.5940 nm). 这说明, 暴露在水溶液中的氨基酸残基与水分子发生相互作用, 使得极性氨基酸伸展到水溶液中, 因而 $R_{gy}$ 增大; 而在真空中, 由于MP模型分子中氨基酸既没有与晶体结构中周围氨基酸的相互作用, 也不存在与水的相互作用, 从而此时的 $R_{gy}$ 最小, 这与Melchionna等<sup>[3]</sup>的研究结论是一致的.

表1列出了水溶液中MP模型分子中11个氨基酸的重原子相对于晶体结构的位移RMSD. 可以看出, 这11个氨基酸在水溶液中的位移波动是不同的. 其中Cys14、Cys17和His18等残基位于MP模型分子的中部, 而且还与血红素辅基直接相连, 起到稳定骨架的作用. 此外, 亲水性残基如Gln16、Thr19、Lys13和Glu21等显示出很强的浮动性, 与晶体结构偏离较大. 实际上, Gln16、Thr19、Lys13和Glu21等极性残基都与水分子形成了比较强的氢键.

图3为平衡态Glu21中羧基氧原子与水中氢原子间的径向分布函数, 图中径向分布函数第一峰的位置在0.205 nm左右, 表明羧基氧原子与水的氢原子形成了很强的氢键. 这也验证了亲水性氨基酸偏离晶体结构的原因, 同时也说明了极化的水分子对于MP中氨基酸的结构稳定性影响很大. 从相关原子的电荷分布上也可以看出原子发生了极化. 例如, 残基Glu21中的羧基氧原子比真空中的相应原子电荷平均大0.04e左右; 而血红素辅基中的羧基氧原子的电荷要比真空中的电荷平均大0.10e左右. 这充分说明MP在水溶液作用下发生了极化作用. 这在传统的固定点电荷力场模型中是体现不出来的.

### 2.2 血红素构象

#### 2.2.1 血红素扭曲角

常用扭曲角来表征血红素的皱裂构象<sup>[23]</sup>. 本文将图1中由 $C_{C1}-N_1-N_3-C_{C3}$ 构成的扭曲角标记为 $\tau_{AC}$ , 由 $C_{C2}-N_2-N_4-C_{C4}$ 构成的扭曲角标记为 $\tau_{BD}$ . 图4为模拟过程中血红素扭曲角的变化情况, 由图可知,  $\tau_{AC}$ 和 $\tau_{BD}$ 在模拟预平衡时间(50 ps)内变化比较明显, 此后逐渐趋于稳定, 平衡状态扭曲角的平均值分别为 $\tau_{AC}=2.49^\circ$ 和 $\tau_{BD}=2.27^\circ$ . 表明在水溶液的作用下, 血红素由晶体中的皱裂构象( $\tau_{AC}=11.48^\circ$ 和 $\tau_{BD}=-25.04^\circ$ )逐渐趋于平面, 这与Anderson等<sup>[24]</sup>研究的结论是一致的. 这说明在动力学模拟过程中, 水溶液中血红素平面上下的水分子与血红素的相互作用比较均衡<sup>[3]</sup>; 而在细胞色素c晶体中, 扭曲角要大得多,

表1 水溶液中微过氧化物酶模型分子中11个氨基酸的重原子相对于晶体结构的位移的均方根偏差

Table 1 RMSD for the heavy atoms of 11 amino acids of model MP in aqueous solution

Residue	Val11	Gln12	Lys13	Cys14	Ala15	Gln16	Cys17	His18	Thr19	Val20	Glu21
RMSD(nm)	0.0564	0.0401	0.0513	0.0365	0.0118	0.0802	0.0540	0.0277	0.0860	0.0176	0.0669

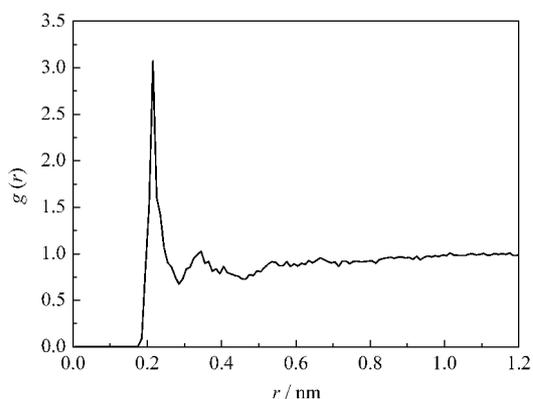


图3 Glu21 中羧基氧原子与水中氢原子的径向分布函数  
Fig.3 Radial distribution of O atom of carboxyl in Glu21 and H atom in H<sub>2</sub>O

表明晶体中扭曲的皱裂构象源于血红素与周围氨基酸的相互作用。

### 2.2.2 轴配体咪唑基的取向

血红素的轴配体咪唑基构象与血红素蛋白的反应活性有重要联系. 通常采用倾斜角(tilting angle)、方位二面角(azimuthal torsion angle)<sup>[24,25]</sup>和赝二面角(pseudo torsion angle)<sup>[5]</sup>等来描述血红素轴配体咪唑基的构象. 在图 1 中, 由 Fe-N<sub>E2</sub>-C<sub>D2</sub> 构成的角为倾斜

角, 由 N<sub>3</sub>-Fe-N<sub>E2</sub>-C<sub>E1</sub> 构成的角为方位二面角, 而由 C<sub>d</sub>-Fe-N<sub>E2</sub>-C<sub>E1</sub> 构成的角为赝二面角. 倾斜角用来量度咪唑基(N<sub>D1</sub>)上氢原子与邻近原子形成氢键或静电作用的强弱, 该角越大, 表明氮上氢原子与邻近原子的相互作用越强; 方位二面角则表示咪唑基与血红素平面成交错的还是重叠的构象; 赝二面角表示 N<sub>D1</sub> 上氢原子是否指向血红素侧链的丙酸基氧原子.

图 5(a, b, c) 分别为模拟血红素两个轴配体咪唑基(5th-Im 和 6th-Im)的倾斜角、方位二面角和赝二面角的变化. 由图可知, 动力学模拟的血红素轴配体在 50 ps 预平衡后较稳定. 其中 5th-Im 与晶体结构相比较变化不大, 而 6th-Im 的方位二面角和赝二面角与初始结构明显不同. 在初始结构中, 两个咪唑基中 N<sub>D1</sub> 原子均指向血红素中 N<sub>1</sub> 和 N<sub>2</sub> 间的 C<sub>d</sub> 原子(参见图 1), 并与血红素平面成交错构象. 但在模拟过程中, 6th-Im 发生旋转, 与血红素平面形成另一个交错构象, 即 6th-Im 中的 N<sub>D1</sub> 原子指向 N<sub>2</sub> 和 N<sub>3</sub> 间的 C<sub>d</sub> 原子, 相应的方位二面角由初始结构的 -129.54° 变为 -31.62° (平均值); 其赝二面角为 98.60° (平均值); 而 5th-Im 变化不大, 其方位二面角的平均值为 145.00° (晶体结构实验值 136.32°<sup>[19]</sup>), 赝

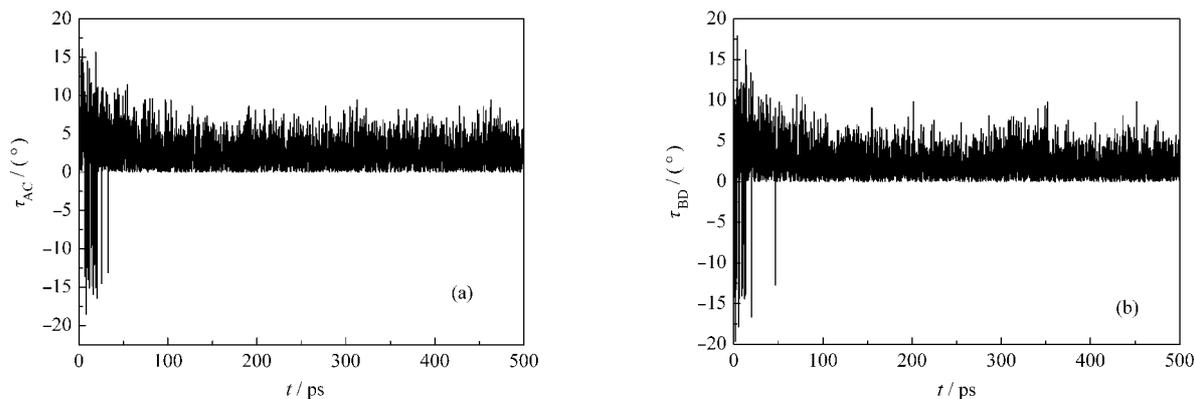


图 4 动力学模拟 MP 水溶液中血红素的扭曲角  $\tau_{AC}$  (a) 和  $\tau_{BD}$  (b) 随时间的变化情况

Fig.4 Twist angles  $\tau_{AC}$  (a) and  $\tau_{BD}$  (b) of heme in molecular dynamics simulations as a function of time

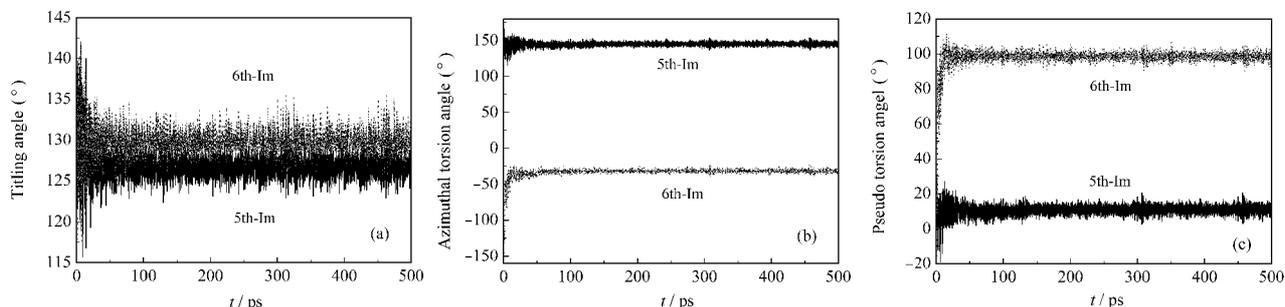


图 5 轴配体咪唑基的倾斜角(a)、方位二面角(b)和赝二面角(c)随时间变化

Fig.5 Titling (a), azimuthal torsion (b), and pseudo torsion (c) angles of the axially ligated imidazole as a function of time

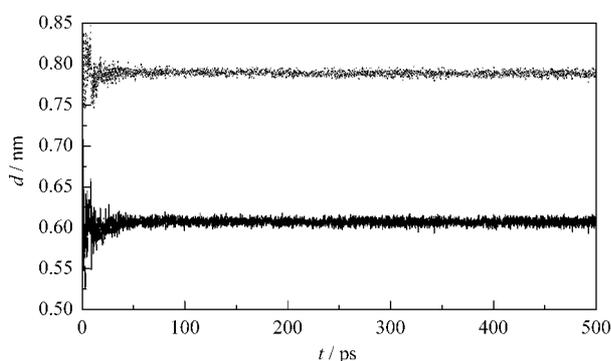


图6 第六轴配体咪唑基上  $N_{D1}$  与丙酸基上两个氧原子的距离( $d$ )随时间的变化

Fig.6 Distances ( $d$ ) between  $N_{D1}$  in 6th-Im and O atoms in propionic acid group as a of function of time

二面角由晶体结构中的  $3.02^\circ$ 变为  $10.75^\circ$ . 对比两个轴配体在模拟过程中的取向变化, 不难发现, 组氨酸 His18 决定着轴配体咪唑的取向. 因为 6th-Im 是相对独立的, 它没有与其它氨基酸直接键连在一起, 只受到环境水分子的作用. 同时 5th-Im 的倾斜角由晶体中的  $131.64^\circ$ 减小为  $126.70^\circ$ (平均值), 而 6th-Im 的倾斜角由初始结构的  $125.59^\circ$ 增大为  $129.80^\circ$ (平均值), 这也表明与 5th-Im 键连的组氨酸 His18 对其倾斜取向具有固定作用.

通过对两个咪唑基方位二面角的平均值进行分析, 可知两个轴配体均与血红素平面成稳定的交错构象. 但是孤立的 6th-Im 从原来的交错构象旋转到另一个交错构象, 中间必然要经过一个能量较高的重叠构象. 这说明, 咪唑基上  $N_{E2}$  与血红素活性中心 Fe 的转动势垒不是很大, 比如 Autenrieth 等<sup>[26]</sup>就曾计算出该二面角势垒值为  $3.1 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ . 此外, 轴配体的取向变化还与咪唑基上  $N_{D1}$  的氢原子与血红素侧链上丙酸基的氧原子间的静电相互作用有关. Galstyan 等<sup>[27]</sup>在没有考虑周围氨基酸残基的影响作用下, 采用密度泛函方法计算得出如下结论: 影响咪唑基取向的首要原因, 是  $N_{D1}$  上带正电的氢原子与血红素侧链带有负电的丙酸基氧原子的静电相互作用. 为进一步确定决定轴配体取向的主要因素, 我们分析了 6th-Im 中  $N_{D1}$  原子与丙酸基氧原子的电荷以及二者间的距离变化. 在平衡态过程中,  $N_{D1}$  上氢原子的电荷在  $0.56e$  左右浮动, 而丙酸基中氧原子的电荷在  $-0.67e$  左右浮动, 可见二者之间的静电作用不可忽略, 这可解释 6th-Im 旋转后  $N_{D1}$  上氢原子指向丙酸基氧原子, 而不是背离丙酸基氧原子. 此外, 二者间的距离变化如图 6 所示,  $N_{D1}$  原子与丙酸

基两个氧原子间距离的平均值: 一个约为  $0.61 \text{ nm}$ , 另一个约为  $0.78 \text{ nm}$ . 由于  $N_{D1}$  距丙酸基氧原子较远, 它们的相互作用强度还无法同轴配体咪唑基和 His18 的键连作用相比. 因此可以认为, 决定轴配体咪唑基取向的首要因素是与其键连的氨基酸, 而不是咪唑基  $N_{D1}$  原子与丙酸基氧原子间的静电作用, 后者对咪唑基的取向只起次要作用.

### 3 结论

利用 ABEEM/MM 浮动电荷分子力场, 对细胞色素中的微过氧化物酶模型分子水溶液进行了分子动力学模拟. 结果表明, 微过氧化物酶模型分子中的骨架氨基酸在水溶液中较稳定, 而亲水性残基在水中浮动较大, 这主要是由于它们与水分子形成了氢键. 在水溶液中, 血红素的构象并不像晶体结构中扭曲得那么强烈, 而是趋向平面, 表明晶体结构中扭曲的皱裂构象与其周围氨基酸的相互作用有关. 研究还发现, 咪唑基与血红素形成了稳定的交错构象, 与血红素轴配体咪唑基键连的组氨酸决定着咪唑基的取向; 同时, 咪唑基氮上的氢原子与血红素侧链的丙酸基氧原子的静电相互作用对咪唑基的取向仅起次要作用.

### References

- 1 Meunier, B. *Chem. Rev.*, **1992**, *92*: 1411
- 2 Adams, P. A.; Byfield, M. P.; Milton, R. C. D.; Pratt, J. M. *J. Inorg. Biochem.*, **1988**, *34*: 167
- 3 Melchionna, S.; Barteri, M.; Ciccotti, G. *J. Comput. Aided Mater. Des.*, **1995**, *2*: 9
- 4 Melchionna, S.; Barteri, M.; Ciccotti, G. *J. Phys. Chem.*, **1996**, *100*: 19241
- 5 Zarić, S. D.; Popović, D. M.; Knapp, E. W. *Biochemistry*, **2001**, *40*: 7914
- 6 Yang, Z. Z.; Wang, C. S. *J. Phys. Chem. A*, **1997**, *101*: 6315
- 7 Wang, C. S.; Yang, Z. Z. *J. Chem. Phys.*, **1999**, *110*: 6189
- 8 Cong, Y.; Yang Z. Z. *Chem. Phys. Lett.*, **2000**, *316*: 324
- 9 Yang, Z. Z.; Ye, Y. J.; Tang, A. Q. *Quantum chemistry of macromolecular systems*. 2nd ed. Changchun: Jilin University Press, 2005: 124–156, 215–294 [杨忠志, 叶元杰, 唐敬庆. 大分子体系的量子化学. 第二版. 长春: 吉林大学出版社, 2005: 124–156, 215–294]
- 10 Yang, Z. Z.; Wu, Y.; Zhao, D. X. *J. Chem. Phys.*, **2004**, *120*: 2541
- 11 Wu, Y.; Yang, Z. Z. *J. Phys. Chem. A*, **2004**, *108*: 7563
- 12 Li, X.; Yang, Z. Z. *J. Chem. Phys.*, **2005**, *122*: 084514
- 13 Yang, Z. Z.; Li, X. *J. Chem. Phys.*, **2005**, *123*: 094507
- 14 Zhang, Q.; Yang, Z. Z. *Chem. Phys. Lett.*, **2005**, *403*: 242
- 15 Yang, Z. Z.; Zhang, Q. *J. Comput. Chem.*, **2006**, *27*: 1

- 16 Yang, Z. Z.; Qian, P. *J. Chem. Phys.*, **2006**, **125**: 064311
- 17 Zhang, Q.; Yang, Z. Z. *Chem. J. Chin. Univ.*, **2005**, **26**: 2345  
[张 强, 杨忠志. 高等学校化学学报, **2005**, **26**: 2345]
- 18 Zhang, Q.; Yang, Z. Z. *Acta Phys. -Chim. Sin.*, **2006**, **22**: 1243  
[张 强, 杨忠志. 物理化学学报, **2006**, **22**: 1243]
- 19 Bushnell, G. W.; Louie, G. V.; Brayer, G. D. *J. Mol. Biol.*, **1990**, **214**: 585
- 20 Yang, Z. Z.; Cui, B. Q. *Acta Phys. -Chim. Sin.*, **2007**, **23**: 1332  
[杨忠志, 崔宝秋. 物理化学学报, **2007**, **23**: 1332]
- 21 Yang, Z. Z.; Cui, B. Q. *J. Chem. Theory Comput.*, **2007**, **3**: 1561
- 22 Cui, B. Q.; Guan, Q. M.; Gong, L. D.; Zhao, D. X.; Yang, Z. Z. *Chem. J. Chin. Univ.*, **2008**, **29**: 585 [崔宝秋, 管清梅, 宫利东, 赵东霞, 杨忠志. 高等学校化学学报, **2008**, **29**: 585]
- 23 Munro, O. Q.; Bradley, J. C.; Hancock, R. D.; Marques, H. M.; Marsicano, F.; Wade, P. W. *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, **114**: 7218
- 24 Anderson, K. K.; Hobbs, J. D.; Luo, L.; Kimber, D.; Quirke, G.; Shelnutt, J. A. *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, **115**: 12346
- 25 Nowak, W. *Comput. Chem.*, **1998**, **22**: 49
- 26 Autenrieth, F.; Tajkhorshid, E.; Baudry, J.; Luthey-Schulten, Z. *J. Comput. Chem.*, **2004**, **25**: 1613
- 27 Galstyan, A. S.; Zarić, S. D.; Knapp, E. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2005**, **10**: 343