

四核铁配合物 $[\text{Fe}_4(\text{NTB})_4(\mu_2\text{-O})_2(\mu_4\text{-Suc})](\text{ClO}_4)_6$ 促进 DNA 水解

汪 明² 潘群慧¹ 沈 涛¹ 廖展如² 刘长林^{*,1}

(¹ 华中科技大学化学系, 武汉 430074)

(² 华中师范大学化学系, 武汉 430079)

摘要: 四核铁配合物 $[\text{Fe}_4(\text{NTB})_4(\mu_2\text{-O})_2(\mu_4\text{-Suc})](\text{ClO}_4)_6$ 与 DNA 具有较强的结合作用, 结合常数 K_b 达 $(5.9 \pm 0.4) \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。该多核铁配合物由水解途径促进 DNA 断裂, 在酸性及低离子浓度条件下的促进作用较为显著。动力学分析表明 DNA 水解没有明显的序列选择性, 质粒 DNA 从超螺旋转变为切口形式符合饱和酶动力学规律, 饱和速率常数 $k_{\text{sat}} = 0.014 \text{ min}^{-1}$ 。

关键词: 四核铁配合物; DNA; 水解断裂

中图分类号: O614.81¹

文献标识码: A

文章编号: 1001-4861(2005)09-1296-05

DNA Hydrolysis Mediated by the Tetranuclear Iron(III) Complex $[\text{Fe}_4(\text{NTB})_4(\mu_2\text{-O})_2(\mu_4\text{-Suc})](\text{ClO}_4)_6$

WANG Ming² PAN Qun-Hui¹ SHEN Tao¹ LIAO Zhan-Ru² LIU Chang-Lin^{*,1}

(¹ Department of Chemistry, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074)

(² Department of Chemistry, Huazhong Normal University, Wuhan 430079)

Abstract: The interactions between the tetranuclear iron(III) complex $[\text{Fe}_4(\text{NTB})_4(\mu_2\text{-O})_2(\mu_4\text{-Suc})](\text{ClO}_4)_6(\text{Fe}_4)$ and DNA were studied by absorption titration and biochemical methods. This tetranuclear iron complex binds to DNA with an apparent binding constant $K_b = (5.9 \pm 0.4) \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, and mediates DNA cleavage via a hydrolytic pathway. The acidic media are in favor of the Fe_4 -mediated DNA hydrolysis. The kinetic assays show that the conversion of plasmid DNA from the supercoiled to nicked forms promoted by Fe_4 is in good agreement with the saturation kinetics of enzyme reactions with a saturation rate constant $k_{\text{sat}} = 0.014 \text{ min}^{-1}$. In addition, the DNA sequence specificity in the DNA hydrolysis was not observed.

Key words: tetranuclear iron complex; DNA; hydrolytic cleavage

金属配合物促进 DNA 水解在生物无机化学中一直是广受关注的研究领域之一, 其可能应用包括作为核酸结构探针、阐明天然核酸酶中金属结合部位的结构和功能, 以及作为特效化学药物的先导化合物^[1,2]。许多核酸酶, 如 II 型限制性内切酶和磷酸酯酶, 含有两个甚至多个金属结合部位^[3,4], 金属结合部位之间存在的协同性使 DNA 磷酸二酯键水解的速度达每秒 10 个数量级以上, 因此, 设计能加快 DNA

水解的多核金属配合物在核酸化学和药物设计中具有重要意义^[1,2,5-12]。本文首先用紫外-可见吸收光谱滴定法探讨了四核铁配合物 $\text{Fe}_4([\text{Fe}_4(\text{NTB})_4(\mu_2\text{-O})_2(\mu_4\text{-Suc})](\text{ClO}_4)_6$, NTB=三(2-苯并咪唑基甲基)胺, Suc=丁二酸, 该配合物的晶体结构和 NTB 的结构如图 1 所示^[13]与 DNA 的相互作用, 其次用凝胶电泳分析了该配合物促进 DNA 水解的影响因素及反应动力学。

收稿日期: 2005-01-04。收修改稿日期: 2005-05-09。

国家自然科学基金资助项目(No.29871011)。

*通讯联系人。E-mail: liuchl@hust.edu.cn

第一作者: 汪 明, 男, 26 岁, 北京化学研究所博士研究生; 研究方向: 多核金属配合物加速 DNA 水解。

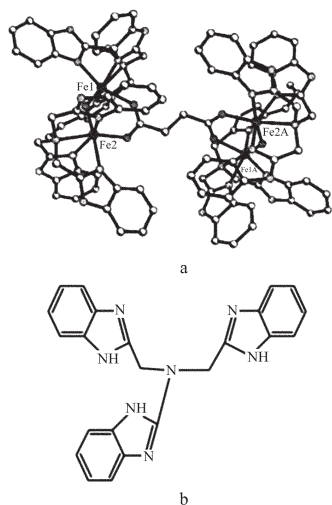


图1 $[\text{Fe}_4(\text{NTB})_4(\mu_2\text{-O})_2(\mu_4\text{-Suc})](\text{ClO}_4)_6$ 的晶体结构(a)和配体 NTB 的结构(b)

Fig.1 Crystallographic structure of $[\text{Fe}_4(\text{NTB})_4(\mu_2\text{-O})_2(\mu_4\text{-Suc})](\text{ClO}_4)_6$ (a) and the structure of ligand NTB (b)

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

小牛胸腺 DNA(ctDNA)、溴乙锭及质粒 pBR322 DNA 分别来自于 Sigma 和 TaKaRa 公司, DNA 按标准方法纯化并由其在 260 nm 处的紫外吸收确定浓度(用碱基对表示)^[14]。四核铁配合物 Fe_4 按文献^[13]提供的方法合成, 所有其他试剂均为分析纯或优级纯试剂, 所有溶液均用三次去离子水配制。紫外-可见吸收光谱使用 PE 公司 Lamda Bio 4.0 分光光度计测定, 凝胶中 DNA 的定量分析使用 Bio-Rad 凝胶成像系统及 Quantity One1-0 数据分析软件进行。

1.2 Fe_4 的紫外-可见吸收光谱滴定

在 $\text{pH}=5.6$, $40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ HAc-NaAc 缓冲溶液中, 由浓度不断增大的 ctDNA 溶液($0 \sim 6.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)滴定 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Fe_4 溶液, 在 37°C 反应 5 min 后分别测定吸收光谱。利用 Scatchard 方程^[15], 根据 274 nm 的吸收值, 经线性拟合产生 Fe_4 与 ctDNA 的结合常数 K_b 。

$$\frac{C_{\text{DNA}}}{\varepsilon_A - \varepsilon_F} = \frac{C_{\text{DNA}}}{\varepsilon_B - \varepsilon_F} + \frac{1}{K_b(\varepsilon_B - \varepsilon_F)} \quad (1)$$

这里 C_{DNA} 为用碱基对表示的 DNA 浓度, ε_F 是游离配合物在指定波长的摩尔消光系数, ε_B 为配合物与 DNA 结合后在该波长的摩尔消光系数, ε_A 为反应体系在该波长的表观吸光度与配合物浓度之比。

1.3 Fe_4 促进 pBR322 DNA 断裂

每次平行的实验在 pH 值不同的缓冲溶液中 (pH 值在 3.6~9.0 之间变化, 离子强度在 C_{Na^+} 为 $46 \sim 116 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间变化, 磷酸盐浓度为 $1 \sim 50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 37°C 下进行, 反应物总体积为 $10 \mu\text{L}$, 含有 $15.4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pBR322 DNA, $0.6 \sim 40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Fe_4 。为了消除溶解在溶液中的氧导致的氧化性物种对 DNA 断裂的影响, 反应前所有样品溶液均用氮气和氩气除氧, 并在隔绝空气或惰性气体保护的无氧条件下进行 DNA 水解反应。DNA 水解反应进行一定的时间后, 加入 $4 \mu\text{L}$ $5 \times \text{TBE}$ 加样缓冲液 ($89 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris, $89 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硼酸, $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA) 终止, 反应产物在 1% 琼脂糖凝胶上进行电泳分离, 在 $\text{pH}=7.0$, $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的磷酸缓冲液中以 75 V 的电压电泳 45 min。DNA 电泳条带用溴乙锭染色可可视化, 用 Bio-Rad 凝胶成像系统进行分析定量。

2 结果与讨论

2.1 Fe_4 与 DNA 的结合

用紫外-可见光谱吸收滴定法对 Fe_4 与 DNA 间的结合作用进行了表征。 Fe_4 在 250 nm, 280 nm 和 330~390 nm 处的吸收分别为羧基 $\rightarrow \text{Fe}^{3+}$, 苯并咪唑中 $\pi \rightarrow \pi$ 及 $\mu\text{-O}^{2-} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$ 跃迁所产生^[14]。在 pH 值为 3.6~10 的范围内, Fe_4 的吸收依赖于溶液的 pH 值, 随着 pH 值减小, 在 330~390 nm 和 280 nm 处分别呈现明显的增色效应和减色效应, 并伴随有 2 nm 的轻微红移, 在 285 nm 处出现明显的等吸收点。这些结果表明在酸性介质中 Fe_4 中桥连 2 个 Fe^{3+} 的氧原子发生了质子化作用, 即发生了 $\text{Fe}_2(\mu\text{-O}^{2-}) \rightarrow \text{Fe}_2(\text{OH}^-)$ 的转换^[1,6], 由此产生的与 Fe^{3+} 配位的 OH^- 作为亲核试剂, 可进攻 DNA 骨架; 配位不饱和的 Fe^{3+} 可与 DNA 的磷氧原子结合。

用不同浓度的 ctDNA 滴定 Fe_4 溶液, 结果显示随着 ctDNA 浓度的增大, Fe_4 在 250~280 nm 和 330~390 nm 处的吸收分别呈增色和减色效应, 红移 2 nm, 等吸收点出现在 343 nm 处。当 $C_{\text{Fe}_4}/C_{\text{ctDNA}}$ 之比达 5 时, Fe_4 的吸收达到饱和 (图 2)。这些结果表明 Fe_4 能与 DNA 结合, 根据 Scatchard 方程(1), 用 Fe_4 在 274 nm 吸收值的变化拟合得二者的结合常数 $K_b = (5.9 \pm 0.4) \times 10^5 (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})^{-1}$, 说明在 Fe_4 和 DNA 之间有较强的结合作用。这种强结合作用可能是通过 Fe_4 与 DNA 间静电吸引和氢键, 以及 Fe^{3+} 与 DNA 的磷酸基配位而发生^[16], 其中静电吸引可能有较大的贡

献,因为 Fe_4 带有 6 个正电荷。按照 $\Delta G_b = -RT \ln K_b$ 计算,二者由静电吸引而产生的结合能为 $-32.8 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。

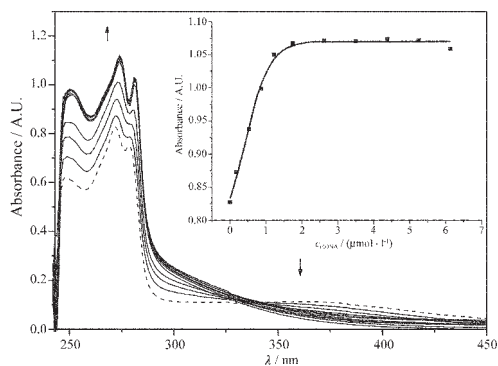


图 2 ctDNA 浓度不断增大对四核铁配合物 Fe_4 紫外-可见吸收光谱的影响

Fig.2 UV-Visible absorption spectra of $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Fe}_4$ in the absence (···) and in the presence (—) of increased concentration of ctDNA ($0 \sim 6.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) in $\text{pH}=5.6$, $40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{HAc-NaAc}$ buffer at room temperature
Arrows show the absorbance changes upon increasing ctDNA concentration.

2.2 Fe_4 促进 DNA 断裂

在 $\text{pH}=5.0$ 的醋酸缓冲溶液中(37°C),我们观测了 Fe_4 促进 DNA 由超螺旋 pBR322 DNA(form I)转变成切口(form II)和线性(form III)DNA 的行为。图 3 显示了在 Fe_4 及单独的 Fe^{3+} 或配体 NTB 存在下,质粒 DNA 断裂的凝胶电泳分离结果。显然,与对照实

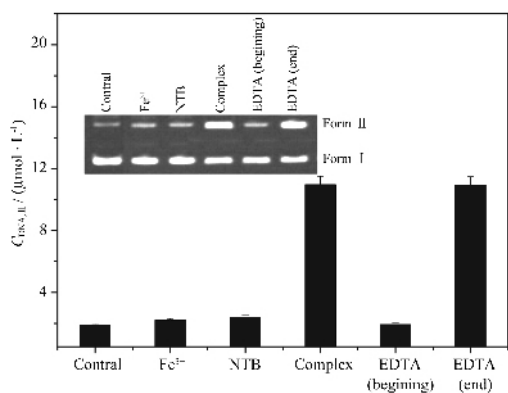


图 3 四核铁配合物 Fe_4 促使 pBR322 DNA 由超螺旋向切口形式转变

Fig.3 Agarose gel electrophoresis of $15.4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pBR322 DNA after 90 min incubation with different species in $\text{pH} 5.6$, $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{HAc-NaAc}$ buffer at 37°C
Here, Fe^{3+} , $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; NTB, $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; Fe_4 , $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; EDTA, $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. $C_{\text{DNA,II}}$ represents the concentration of form II DNA.

验相比,只有 Fe_4 能有效的促进 DNA 断裂,单独的 Fe^{3+} 和配体 NTB 均不具有这种活性。另一方面,我们在反应前和反应终止后分别加入 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 EDTA,发现反应前加入 EDTA 后,DNA 结构保持完整不受影响;而在反应终止后加入 EDTA,则 DNA 的断裂反应不受影响。这进一步表明 Fe_4 确实能促进 DNA 断裂。

DNA 断裂的途径有两种:活性氧物种导致的氧化和亲核试剂(水或羟基离子)引发的水解反应。我们分别在脱氧、引入惰性气体和加入自由基猝灭剂的条件下进行了平行实验。结果显示无论是无氧的反应条件,还是加入自由基猝灭剂二甲亚砜(DMSO)、甘露醇(mannitol)或聚乙二醇(PEG),均未能观测到 DNA 断裂反应被显著抑制(图 4)。然而,不同的自由基猝灭剂对反应有一定的影响,推测这种影响是由猝灭剂的物理性质(如粘度、极性)引起的。这表明 Fe_4 促进 DNA 断裂的反应不是由于反应物溶液中存在的氧经氧化还原产生活性氧物种(如羟自由基等)而导致的。

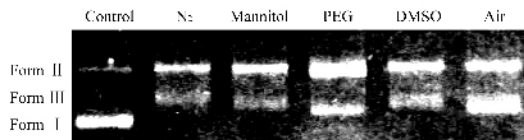


图 4 惰性气氛及自由基猝灭剂对 Fe_4 促进 DNA 断裂的影响

Fig.4 $15.4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pBR322 DNA cleavage by $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Fe}_4$ in the presence of free radical scavenger or under inert atmosphere
Reaction time was 90 min.
Here, mannitol, $40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; PEG(polyethylene glycol), $0.8\% (m/V)$; DMSO, $2\% (V/V)$.

在不同的条件下,我们进一步观测了 Fe_4 由水解途径促进 DNA 断裂的效果。增大 Fe_4 的浓度或升高温度均明显更有效的促进 DNA 水解。当该铁配合物的浓度与 DNA 碱基对浓度之比达 1.2 时,质粒 DNA 的超螺旋成分完全消失。另一方面,我们发现 Fe_4 促进 DNA 水解依赖于反应介质的类型及其 pH 值,如图 5 所示。在 pH 值为 $3.6 \sim 5.6$ 的醋酸缓冲溶液中,DNA 被显著水解;而在 pH 值为 $6.0 \sim 8.0$ 的磷酸和 pH 值为 $7.4 \sim 9.0$ 的 Tris-HCl 缓冲溶液中,该 DNA 的水解反应几乎完全被抑制,尤其是磷酸缓冲溶液中。导致这些差异的原因可能包括:(1) 在高 pH 值条件下,产生亲核试剂 OH^- 的转化反应 $\text{Fe}_2(\mu_2\text{-O}^{2-}) \rightarrow \text{Fe}_2(\text{OH})$ 被抑制;(2) 低 pH 值有利于咪唑基氮原

子的质子化($-\text{NH}_2=\text{p}K_a=5.5^{[17]}$),导致与 Fe^{3+} 配位的咪唑基解离,由此产生的配位不饱和和 Fe^{3+} 可与DNA的磷酸基结合,使与DNA结合的水解促进剂的量增大;(3)缓冲溶液中的大量磷酸根离子能和DNA竞争结合四核铁配合物 Fe_4 ,使二者的加合物 DNA-Fe_4 发生解离,从而导致DNA水解几乎完全终止。为了证实磷酸根的抑制作用,我们由改变醋酸盐缓冲溶液(pH值为3.6~5.6)中磷酸盐的浓度($1\sim 50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)观测了DNA的水解效果。结果显示随着磷酸盐的浓度增大,切口DNA的浓度逐渐减小(图6),表明磷酸盐对 Fe_4 促进DNA水解确实有抑制作用。

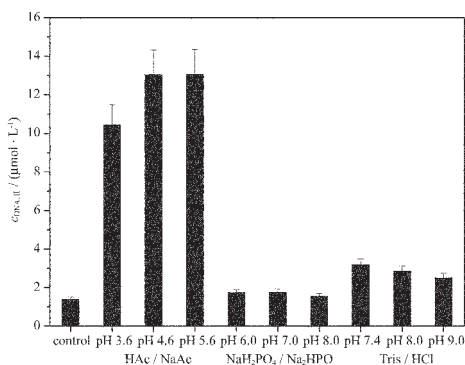


图5 反应介质及其pH值对 Fe_4 促进DNA水解的影响

Fig.5 pH-dependence of $15.4\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pBR322 DNA cleavage mediated by $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Fe_4 at $37\text{ }^\circ\text{C}$. Reaction time was 90 min. Here, the buffer systems are pH 3.6, 4.6, 5.6, $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ HAc-NaAc, pH 6.0, 7.0, 8.0, $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$, and pH 7.4, 8.0, 9.0, $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl, respectively.

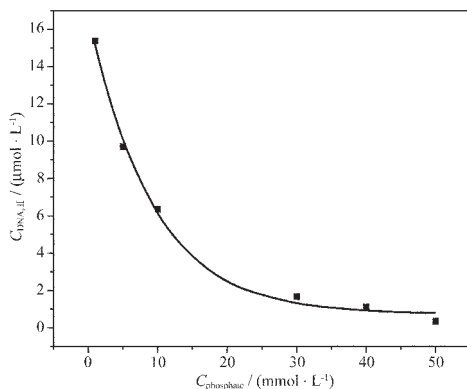


图6 磷酸盐对 Fe_4 促进DNA水解的抑制作用

Fig.6 Inhibition of DNA hydrolysis by added phosphate

探讨离子强度对DNA水解的影响有可能获得有关DNA与 Fe_4 相互作用的信息。当反应体系中 Na^+ 浓度从 $46\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 增大到 $116\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,

DNA的断裂反应被逐渐抑制,说明DNA与 Fe_4 之间的静电相互作用是导致二者有效结合的重要原因之一。

2.3 Fe_4 促进DNA水解的动力学研究

超螺旋DNA在水解试剂作用下,可由如图7所示的两种途径转变为线性DNA^[18]。图8显示了 Fe_4 促进DNA水解时断裂产物随着反应时间延长的变化趋势,表明超螺旋DNA首先被随机的转变为切口形式,再被转变成线性DNA。由超螺旋直接转变成线性DNA不是主要的反应途径。这个结果说明 Fe_4 以非特异方式促进DNA水解。

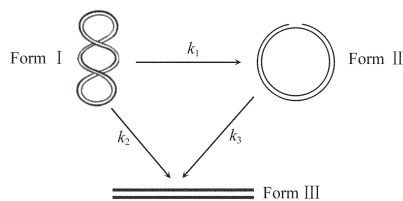


图7 在水解试剂作用下超螺旋DNA转变为线性DNA的两种途径

Fig.7 Proposed models for the conversion of plasmid DNA from the supercoiled to linear forms

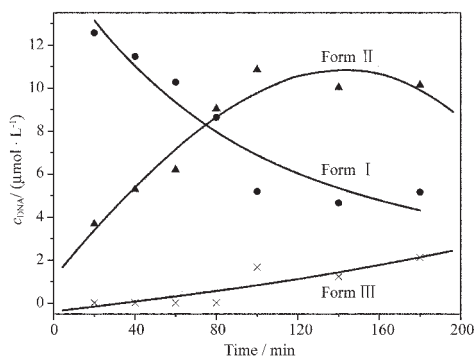


图8 Fe_4 促进DNA水解的产物随着反应时间延长的变化

Fig.8 Time dependence of $15.4\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pBR322 DNA cleavage by $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Fe_4 in pH 5.6, $40\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ HAc-NaAc buffer at $37\text{ }^\circ\text{C}$

为了理解 Fe_4 促进DNA水解的动力学规律,我们对DNA由超螺旋向切口形式转变的反应数据进行了拟合处理。假定这种转变符合准一级反应动力学规律,当 Fe_4 的浓度为 $2.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时可拟合得表观一级速率常数 $k_{\text{obs}}=0.0031\text{ min}^{-1}$ 。改变 Fe_4 的浓度,可拟合相应的 k_{obs} 。将该表观一级速率常数对四核铁配合物的浓度作图(图9)。结果表明pBR322 DNA从I型转变为II型的表观一级速率常数对 Fe_4 浓度的依赖性符合酶的饱和动力学规律。将这些数据按方程(2)^[19]进行拟合可获得促进剂 Fe_4 浓度达到

饱和时, DNA 水解的饱和速率常数 $k_{\text{sat}}=0.014 \text{ min}^{-1}$; 以及这种“酶促反应”的米氏常数 $K_{\text{M}}=7.4 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

$$k_{\text{obs}} = \frac{k_{\text{sat}} C_{\text{Fe}_4}}{K_{\text{M}} + C_{\text{Fe}_4}} \quad (2)$$

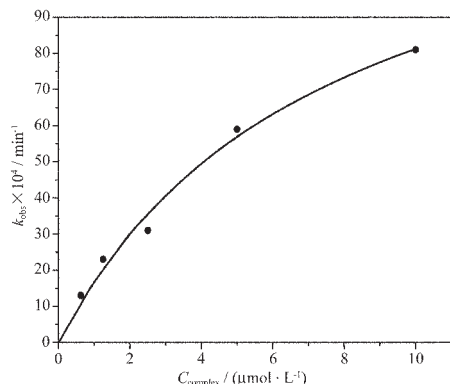


图 9 pBR322 DNA 从超螺旋形式转变为切口形式的速率常数随 Fe_4 浓度的变化趋势

Fig.9 Fe_4 concentration dependence for the conversion of pBR322 DNA from the supercoiled to nicked forms

相对于双链 DNA 自发水解的速率常数 $k=1 \times 10^{-11} \text{ s}^{-1}$ 而言^[3], Fe_4 能加速 DNA 水解达 2.4×10^7 倍。在酶促反应动力学可用 $1/K_{\text{M}}$ 来衡量酶与底物的结合能力, 经计算 K_{b} 为约 $1.4 \times 10^5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 这与由吸收光谱法测定的结果 ($K_{\text{b}}=5.9 \times 10^5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 处于同一数量级, 二者相符比较好。

与结构相似的双核铁配合物 $\text{Fe}_2[(\text{Fe}_2(\text{DTPB})(\mu_2\text{-O})(\mu_2\text{-Ac})\text{Cl})^{2+}]$ 相比^[1,6], Fe_4 促进 DNA 水解的速度要低一个数量级, 但二者的结合常数相近。然而这里应指出, Fe_4 和该双核铁配合物促进 DNA 水解的条件及配合物/DNA 浓度比不一样。晶体结构^[13]显示, Fe_4 的双核铁配位单元正好与 Fe_2 的结构相似, 但配合物中金属部位的成倍增加并不能提高促进 DNA 水解的速率, 说明二者结构间的微小差异可能起着重要作用。另一方面, Fe_2 中存在一个动力学易变的 Cl^- 配体, 而在 Fe_4 中则不存在这样的配体; 而且 Fe_4 中两个双核铁单元作为促进 DNA 水解的中心, 可能并没有起到应有的协同作用。因此, 在 Fe_4 中引入动力学易变的配体和增长两个双核铁单元之间连接链, 并使其具有足够的柔性, 有可能大大提高 Fe_4 促进 DNA 水解的速度。

3 结 论

四核铁配合物 Fe_4 在酸性条件下, 由 $\text{Fe}_2(\mu_2\text{-O}^{2-})$

→ $\text{Fe}_2(\text{OH}^-)$ 产生的亲核试剂 OH^- , 进攻磷酸二酯骨架使 DNA 水解, 高 pH 值的磷酸盐等反应介质及高离子强度对 Fe_4 促进的 DNA 水解反应有抑制作用。 Fe_4 促进的质粒 DNA 从超螺旋转变为切口形式符合酶的饱和和动力学规律, 对 DNA 序列没有明显的选择性。

参考文献:

- [1] Liu C, Wang M, Zang T, Sun H. *Coord. Chem. Rev.*, **2004**, **248**:147~168
- [2] LIU Chang-Lin(刘长林), YU Si-Wang(余四旺), XU Hui-Bi(徐辉碧), et al. *Wuji Huaxue Xuebao(Chinese J. Inorg. Chem.)*, **2000**, **16**(3):374~384
- [3] Cowan J A. *Chem. Rev.*, **1998**, **98**:1067~1088
- [4] Pingoud A, Jeltsch A. *Nucleic Acids Res.*, **2001**, **29**:3705~3727
- [5] Williams N H, Takasaki B, Wall M, et al. *Acc. Chem. Res.*, **1999**, **32**:485~493
- [6] Liu C, Yu S, Li D, et al. *Inorg. Chem.*, **2002**, **41**:913~922
- [7] YU Si-Wang(余四旺), LIU Chang-Lin(刘长林), LI Dong-Feng(李东风), et al. *Wuji Huaxue Xuebao(Chinese J. Inorg. Chem.)*, **2002**, **18**(11):1112~1118
- [8] Korupolu S R, Mangayarkarasi N, Zacharias P S, et al. *Inorg. Chem.*, **2002**, **41**:4099~4101
- [9] De Iuliis G N, Lawrance G A, Fieuw-Makaroff S. *Inorg. Chem. Commun.*, **2000**, **3**:307~309
- [10] Franklin S. J. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2001**, **5**:201~208
- [11] Cowan J A. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2001**, **5**:634~642
- [12] Yang P, Rui R, Mao L. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2004**, **9**:495~506
- [13] Li D, Liao Z, Wei Y, et al. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **2003**:2164~2169
- [14] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd. Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, **1989**. Chapter 5.
- [15] Wolfe A, Shimer G H, Meehan J T. *Biochemistry*, **1987**, **26**:6392~6396
- [16] Black C B, Cowan J A. *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, **116**:1174~1178
- [17] Mani F. *Coord. Chem. Rev.*, **1992**, **120**:325~359
- [18] Boscaglia E, Gatos M, Lucatello L, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, **126**:4543~4549
- [19] Hettich R, Schneider H J. *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, **119**:5638~5647