

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования
«СЕВАСТОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт радиоэлектроники и информационной безопасности

МОЛЕКУЛЯРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ

Учебно-методическое пособие
по выполнению курсовой работы по дисциплине
для студентов очной формы обучения
направления 03.03.02 «Физика»

Севастополь
СевГУ
2019

УДК 577.113

Р е ц е н з е н т:

В.В. Костюков - доктор физ.-мат. наук, профессор

Ответственный за выпуск:

О.С. Завьялова - заведующий кафедрой «Физика», канд. физ.-мат. наук, доцент

Составитель: Ю.В. Мухина

М75 Молекулярное моделирование: учеб.-метод. пособие по выполнению курсовой работы по дисциплине для студентов очной формы обучения направления 03.03.02 «Физика» / Сост. Ю.В. Мухина. – Севастополь: СевГУ, 2019. – 12 с.

Цель учебно-методического пособия – оказание помощи студентам в выполнении курсовой работы по дисциплине «Молекулярное моделирование», а также в получении ими теоретических знаний и практических навыков самостоятельной работы с программами молекулярного моделирования.

УДК 577.113

Учебно-методическое пособие утверждено на заседании кафедры «Физики» «30» августа 2018 года, протокол № 1.

Учебно-методическое пособие рассмотрено и рекомендовано к изданию на заседании методической комиссии Института радиоэлектроники и информационной безопасности «13» сентября 2018 года, протокол № 1.

Изд. № 157/18. Объем 0,75 п.л.

РИИЦМ ФГАОУ ВО "Севастопольский государственный университет"

СОДЕРЖАНИЕ

1. Цель курсовой работы	4
2. Оформление курсовой работы	4
3. Методические указания по выполнению основной части работы	5
3.1. Получение структурных файлов молекул	5
3.2. Оптимизация структур молекул, задание водного бокса, сравнение пространственных конформаций	5
3.3. Расчет физических свойств молекул	7
3.4. Построение комплексов молекул	8
3.5. Расчет энергии гидрофобных взаимодействий при димеризации биомолекул	8
4. Литература	9
Приложение А - Образец оформления титульного листа	10
Приложение Б - Таблица вариантов	11

1. Цель курсовой работы

Курсовая работа выполняется при изучении дисциплины «Молекулярное моделирование» и имеет своей целью:

- обобщение и систематизация полученных в ходе обучения теоретических и практических знаний по специальности;
- приобретение навыков самостоятельной работы с программами моделирования;
- приобретение навыков работы с базами данных белковых структур;
- научить самостоятельно анализировать полученные результаты.

2. Оформление курсовой работы

Курсовая работа является самостоятельной учебно-исследовательской работой студента, выполняемой по индивидуальному заданию, вариант которого выбирается из таблиц по указанию преподавателя.

Курсовая работа оформляется в виде пояснительной записки – отчета на листах стандартного формата А4 (210 x 297мм). В тексте записки необходимо делать ссылки на использованные литературные источники, нумеруя их по порядку расположения в тексте. Все страницы курсовой работы, включая иллюстрации, нумеруются по порядку, начиная с титульного листа. Примерный объем пояснительной записки – 20 листов. Терминология и определения должны быть едиными и соответствовать установленным стандартам.

Структура пояснительной записки включает:

- титульный лист;
- содержание;
- введение;
- основная часть;
- выводы;
- список использованных источников.

Образец титульного листа курсовой работы приведен в приложении А.

Во введении сообщаются сведения о биологической значимости исследуемых веществ, в соответствии с вариантом, их применения на практике и литературный обзор по теме исследования. Формулируются цели работы, обосновывается выбор программных методов расчета. Введение должно быть кратким (1-2 стр.) и давать ясное представление о том, **зачем** проводилась эта работа.

В основной части приводится описание выполненной работы с приведением таблиц результатов и изображения молекулярных комплексов, и анализ полученных результатов. Работа включает в себя следующие обязательные части:

- 1) получение структурных файлов молекул. Расчет энергии и оптимизация структур молекул;
- 2) изучение свойств молекул;
- 3) построение комплексов само- и гетероассоциата молекул;
- 4) расчет энергии гидрофобных взаимодействий и изучение динамического поведения комплекса молекул.

Заключение должно кратко отразить все этапы решения поставленной задачи. В нем приводится анализ результатов построения комплексов, полученных значений энергий и формулируются основные выводы по силам, стабилизирующих комплексы.

Список используемой литературы (монографии, учебники, учебные пособия, статьи, в том числе на иностранном языке, Интернет-источники). В тексте записки в квадратных скобках [] должны быть сделаны ссылки на литературные источники. Пример оформления ссылок:

Книги:

1. В.И.Минкин, Б.Я.Симкин, Р.М.Миняев. Теория строения молекул. Ростов на Дону: Изд-во Феникс, 1997.
2. Н.Ф.Степанов. Квантовая механика и квантовая химия. М.: Мир, 2001.

3. Методические указания по выполнению основной части работы

3.1. Получение структурных файлов двух молекул из банка данных и при помощи программы HyperChem (HCh)

1. В соответствии с вариантом сохранить структурные файлы 2х молекул из PDB банка данных. Поиск в интернет браузере:

<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/cgi-bin/pdbsum/GetPage.pl?pdbcode=n/a&template=ligletters.html&s=1>

В окне *Search ligand data* - ввести полное название лиганда (лат.), открыть одну из предложенных ссылок, сравнив химическую формулу молекулы сохранить координатный файл (значок ). Сохраненные файлы двух молекул, скопировать в рабочую папку заменив при этом расширение с *.pl на *.ent (или *.hin), указав в названии (*_bank).

2. Общий алгоритм построения молекулы в HCh:

- создание двумерной модели молекулы;
- нахождение ее трехмерной структуры со стандартным набором параметров;
- введение и задание всех данных, если таковые известны: заряд, тип атомов, ограничения по структуре;
- установление метода расчета (эмпирический, полуэмпирический) и соответствующего для исследуемой системы поля;
- проведение оптимизации структуры молекулы (минимизация ее полной энергии) в соответствии с заданным методом расчета.

Постройте двумерный эскиз своей молекулы, нанесите необходимое количество связей. Построение трехмерной структуры:

а) конвертирование двухмерного наброска молекулы в трехмерную модель возможно двумя способами:

- в меню выбираем *Build/Add H & Model Build* - программа автоматически строит модель и добавляет водороды, при этом структура не соответствует своему равновесному состоянию, она лишь имеет стандартный набор параметров для длин и углов связей;
- или Д-нажатием на инструменте выбора.

Если H не появились, проверьте, выделена ли опция *Show Hydrogens* в меню *Display*.

б) Сохраните результат в рабочую папку, указав название молекулы, и в скобках отметьте (*_nonoptim), тип файла указать **hin**. При сохранении в диалоговом окне установите галочки в *PDB Options: Hydrogens, Connectivity*.

В результате получилась не оптимизированная структура, имеющая стандартный набор параметров – длины связей, валентные и торсионные углы.

Подготовьте структуру второй молекулы из варианта.

3.2. Оптимизация структур молекул, задание водного бокса, сравнение пространственных конформаций

1. Откройте сохраненную ранее молекулу своего варианта (*_nonoptim). **Убедитесь, по количеству атомов водорода, о корректном задании двойных/полуторсионных связей!** Если водороды не видны, выделите в меню *Display/Show Hydrogens*.

Рассчитайте вначале энергию молекулы при помощи *Compute/Single Point*, данная команда позволяет рассчитать полную энергию молекулы и среднеквадратический градиент (RMS - root mean square deviation) текущей конфигурации атомов. Следует учесть, что при локальном минимуме энергии RMS стремится к нулю и полученная при этом молекула находится в равновесном состоянии. Обратите внимание на RMS и энергию вашей структуры в строке состояния.

2. Оптимизация:

Перед проведением расчетов необходимо вначале задать силовое поле параметров, используя которое программа будет проводить оптимизацию молекулы: *Setup/MM (MM+, AMBER, OPLS)*.

- в меню *Compute/Geometry Optimization* выберете алгоритм минимизации: *Steepest descent* - метод применяется когда молекула далека от равновесного состояния, *conjugate gradient* метод – лучше использовать когда минимум близко;

- в окне *Options* можно выбрать условия остановки процесса минимизации - значение RMS=0.1 или максимальное количество циклов минимизации.

Нажмите Ok, при этом начнется процесс по минимизации полной энергии молекулы, в строке состояния будут отображаться значения энергии и градиента, при достижении условий минимизация будет завершена.

3. Сохранить полученную структуру молекулы под новым именем, при этом в названии в скобках указать поле (пр.: CFF_MM) и алгоритм минимизации (пр.: CFF_MM_PR). **Проверить правильность структуры молекулы (плоскостность ароматических колец и т.п.)!**

4. Прodelать минимизацию (см. пункты 1-4) с неоптимизированной структурой (*_попoptim) с другими полями (кроме BIO+) и алгоритмами минимизации, сохраняя результаты под новыми именами с указанием поля и алгоритма. Все расчеты занести в отчет, оформив их в табличном виде, с указанием поля и алгоритма минимизации, пр. для кофеина:

Название файла (код_примечание)	E	RMS
CFF_MM,PR		
CFF_AMBER,PR		
...		
CFF_wat		
CFF_bank		

5. Сравнить энергии и градиенты RMS всех полученных структур (значение энергии для молекулы можно посмотреть в меню *Compute/Properties* только после *Single Point Calculation*). Выбрать и сохранить структуру с минимальной полной энергией и градиентом, оставшиеся файлы молекул (не с минимальной энергией) можно удалить.

6. Произвести расчет энергии без оптимизации структуры для той же молекулы из банка данных при помощи *Compute/Single Point*, значение занести в отчет.

7. Выбранным полем и алгоритмом минимизации произвести оптимизацию структуры второй молекулы из варианта. Сохранить структуру и значение энергии.

Отобразить в отчете изображения оптимизированных молекул и таблицы с результатами.

8. Добавление водного окружения:

а) Загрузить в чистую рабочую область молекулу, выбранную в пункте 5 предыдущего задания. Измерить ее наибольшие размеры. Для этого, выделяя крайние атомы молекулы, в строке состояния узнать ее «габариты».

б) Вычислить минимально необходимые размеры водного бокса. Считается, что при молекулярно-механических расчетах минимальная приемлемая толщина водной оболочки соответствует двойному слою молекул воды и составляет 4...5 Å. Прибавить к соответствующим размерам молекулы по 10 Å (два слоя с противоположных сторон по 5 Å).

в) Задать водный бокс в меню *Setup/Periodic Box*, в диалоговом окне указать размеры бокса и минимальное расстояние между атомами молекулы и воды (как правило 2.7Å), при этом центры масс молекулы и бокса воды совмещаются и молекула оказывается в центре бокса. Расстояние между молекулами воды соответствует ее плотности 1000кг/м³.

г) Убрать любое выделение в рабочей области П-нажатием в пустом месте области.

д) Задать силовое поле MM+, выбрать *Compute/Geometry Optimization*, условия остановки процесса минимизации - значение RMS=0.1 или максимальное количество циклов минимизации - 200 циклов, расчеты займут некоторое время.

Поскольку в расчетах участвует молекула, оптимизированная ранее, то изменение ее пространственной структуры будет отражать различие между изолированной и растворенной формой молекулы.

е) После окончания минимизации сохраните полученный результат, в названии отразить наличие водного окружения (*_wat).

9. Сравнение пространственных форм молекулы в вакууме, в растворе, в комплексе:

а) Выделите молекулу из водного окружения для проведения дальнейшего сравнения:

- для этого выберете в меню *Select/Molecule*, при помощи инструмента выделение полностью выделить молекулу Л-нажатием на любой ее связи;

- выбрать *Select/Complement selection* – будут выделены только молекулы воды;

- выбрать *Edit/Clear* – вода будет удалена;

- сохраните молекулу без водного окружения, указав в названии (*_solv);

- измените цвет молекулы!

б) Соединяем две молекулы, в растворенной и газовой фазе, в рабочей области: при помощи *File/Merge* выберете молекулу из списка, которая использовалась в предыдущем задании в пункте 1, две молекулы будут представлены для дальнейшей работы.

в) Совмещаем молекулы: для этого необходимо выделить по три одинаковых атома (в одинаковом порядке!) в каждой молекуле, эти атомы будут в дальнейшем совмещаться вместе. Выбрать атомы, принадлежащие кольцу. После выделения нажать *Display/Overlay*. Рассмотреть отличия в полученных структурах.

г) Сохраните для отчета результаты сравнительного анализа (копировать изображение - F9). Прodelать сравнение структур, полученных с помощью программы HyperChym в вакууме и в растворе, со структурой в комплексе (из банка данных). Сохранить результаты, в названии указав сравниваемые фазы и обозначить молекулы.

3.3. Расчет физических свойств молекул

1. Рассчитать заряды на атомах молекул:

Первый способ (для расчета заряда на 1ой молекуле):

- открыть оптимизированную молекулу в газовой фазе;

- в меню *Setup* выбрать полуэмпирический метод расчета (*Semi-empirical*), в диалоговом окне метода выбрать набор параметров *AM1* (см. таблицы, сверить наличие атомов в своей молекуле и атомы доступные в соответствующих методах расчета);

- зайти в *Options*, установить предел сходимости 0.0001, который означает, что расчеты закончатся при условии, когда разница между энергиями двух последующих циклов будет менее установленного значения. Предел итераций (повторений) = максимальному числу этих циклов;

- в том случае если известен заряд молекулы, необходимо значение указать в поле *Total Charge*;

- задав исходные параметры, просчитайте заряд при помощи функции *Single Point*, для просмотра заряда, установите соответствующую индикацию для атомов;

- сохраните результат, назвав файл (*_charge), скопируйте изображение молекулы с зарядами на атомах в отчет;

- не закрывая полученную структуру, перейти к заданию №2.

Второй способ (для расчета заряда на 2ой молекуле):

- в меню *Setup* выбрать метод расчета *Ab Initio*, в диалоговом окне которого установить набор параметров *Large*;

- в меню *Compute/QSAR Properties* выбрать *Partial Charges*;

- произвести расчет заряда, сохранить файл с новым названием (*_charge). В отчете указать рассчитанные заряды для двух молекул своего варианта, в рабочую папку сохранить два новых файла молекул с зарядами.

2. Построение графиков различных свойств молекулы:

- в меню *Compute/Plot Molecular Graphs* ознакомьтесь с графиками таких свойств молекулы как электростатический потенциал, зарядовая плотность, а также с различными видами представления этих графиков;

- отобразите дипольный момент молекулы (*Display*). Сохраните рисунок в отчет с направлением и величиной дипольного момента для двух молекул;

- просмотреть *Compute/QSAR* свойства молекулы и представить таблицей результаты в отчете: объем, площадь поверхности, энергия гидратации, поляризуемость, масса.

3. Анализ вибрации молекулы, колебательный спектр:

- открыть оптимизированную ранее молекулу, произвести расчет *Single point* подходящим полуэмпирическим методом (см. таблицы);
- в меню *Compute* выбрать *Vibrations*, после окончания расчетов просмотреть результаты – *Vibrational Spectrum* – частоты вибрации и колебательный спектр молекулы, просмотреть анимацию вибрации для соответствующих частот в спектре (*Apply*);

3.4. Построение комплексов молекул

1. Открыть в программе HyperChem координатный файл (.ent или .hin) с молекулой БАС, измерить энергию внутримолекулярных взаимодействий в каждой отдельной молекуле G_1 и G_2 .

2. Открыть в рабочей области 2 одинаковых молекулы с рассчитанным зарядом (*_charge), для одной из них меняем цвет изображения. Полностью выделяем одну молекулу и П-переносом перемещаем выделенную молекулу, помещая ее над другой на некотором расстоянии, при этом плоскости их должны быть параллельны. **Убедиться в наличии всех кратных связей в молекулах и снять все выделения.** Сохранить стартовый комплекс для последующих вычислений.

3. Выбираем в меню *Setup* метод молекулярной механики (ММ+). Провести оптимизацию комплекса ($N=300$, $RMS=0,1$). Значение энергии и градиента можно просмотреть в диалоговом окне *Compute/Molecule Properties*. Сохранить структуру комплекса и значение энергии.

4. Вновь открыть стартовый комплекс (см.п.2), развернуть его т.о., чтобы плоскости хромофоров лежали в плоскости экрана, а 2 молекулы находились одна над другой. Выделить одну молекулу и, не изменяя расстояния между молекулами, повернуть ее П-переносом на некоторый угол. Провести оптимизацию. Так проделать не менее 10-15 раз, поворачивая по кругу вторую молекулу и запоминая расположение молекул. Для молекул, которые не являются плоско-симметричными (есть боковые цепи выходящие из плоскости расположения колец) поменять их местами и проделать п.3,4 еще раз.

5. Выбрать ассоциат молекул соответствующий минимальной энергии и восстановить (снова проведя оптимизацию) данный комплекс. Если в строке состояния *Converged=NO*, увеличить в диалоговом окне *Geometry Optimization* количество циклов или уменьшить *RMS*.

6. Сохранить структуру самоассоциата (*_self). Занести значения энергии и градиента в отчет, представить в двух проекциях вид полученного самоассоциата.

7. Аналогичным образом построить гетерокомплекс (*_heter) (см.п. 1-6).

8. Проанализировать полученные комплексы с минимальной энергией, сделать выводы о видах взаимодействия молекул в комплексе (по расположению дипольных моментов, эл.стат.потенциалу, в-д-в отталкиванию боковых цепей, дисперсионном взаимодействии ароматических хромофоров).

9. Поместить димер в водный бокс необходимых размеров (см.п.3.2/8); выполнить минимизацию потенциальной энергии системы «комплекс-растворитель», сохранить файл;

10. Удалить водное окружение (выделить комплекс, затем нажать *Select→Complement Selection*); сохранить файл. Измерить энергию взаимодействий в комплексе G_3 .

3.5. Расчет энергии гидрофобных взаимодействий при димеризации биомолекул

1. Расчет энергий внутримолекулярных взаимодействий в гетероассоциате:

1.1. Вычислить энергию межмолекулярных взаимодействий в комплексе $\Delta G_{\text{мм}} = G_3 - (G_1 + G_2)$, где G_1 и G_2 - энергии внутримолекулярных взаимодействий в каждой отдельной молекуле в гетероассоциате (см.п.3.4/1);

1.2. Сделать вывод о том, стабилизируют или дестабилизируют димерный комплекс межмолекулярные ван-дер-ваальсовы и электростатические взаимодействия.

2. Измерить площадь молекулярной поверхности, доступной для растворителя (*Solvent-Accessible Surface Area, SASA*) для комплекса димера с удаленным водным окружением (*Compute→QSAR Properties→Surface Area (Grid)*), записать значение A_{AB} . Удалить одну из молекул комплекса, для оставшейся измерить и записать значение A_{A} , открыть исходный

файл комплекса, удалить вторую молекулу, измерить и записать величину A_B первой молекулы. Сохранить данные в отчет.

Энергетические вклады обоих факторов: ван-дер-ваальсового и гидрофобного, в суммарную энергию Гиббса реакции в водном растворе пропорциональны изменению ΔA площади молекулярной поверхности, доступной для растворителя. В случае бимолекулярной реакции

$$\begin{aligned} A+B &\rightarrow AB, \\ \Delta A &= A_{AB} - A_A - A_B, \end{aligned} \quad (1)$$

где A_{AB} и A_A , A_B – площади поверхностей комплекса и исходных веществ, соответственно.

Таким образом, энергии ван-дер-ваальсовых взаимодействий с водой $\Delta G_{ВДВ}$ и гидрофобных взаимодействий $\Delta G_{ГФ}$ могут быть вычислены как

$$\begin{aligned} \Delta G_{ВДВ} &= \gamma_{ВДВ} \Delta A, \\ \Delta G_{ГФ} &= \gamma_{ГФ} \Delta A, \end{aligned} \quad (2)$$

где $\gamma_{ВДВ} = -38.8$ кал/(моль·Å²), $\gamma_{ГФ} = 46$ кал/(моль·Å²) – соответствующие микроскопические коэффициенты поверхностного натяжения. В итоге полная неэлектростатическая энергия сольватации $\Delta G_{сольв}$ вычисляется как

$$\Delta G_{сольв} = \Delta G_{ВДВ} + \Delta G_{ГФ} = (\gamma_{ВДВ} + \gamma_{ГФ}) \Delta A = \gamma \Delta A,$$

где $\gamma = 7.2$ кал/(моль·Å²).

Как видно, гидрофобный вклад преобладает над ван-дер-ваальсовым. При уменьшении площади молекулярной поверхности ($\Delta A < 0$) в реакции в водном растворе гидрофобный вклад энергетически выгоден ($\gamma_{ГФ} > 0$, $\Delta G_{ГФ} < 0$). По мнению многих авторов, именно гидрофобные взаимодействия являются наиболее значимыми при реакциях с участием биомолекул в водном растворе, поскольку дают наибольший энергетический вклад в полную энергию Гиббса реакции комплексообразования.

Вычислить значение ΔA по формуле (1), вычислить энергию гидрофобных взаимодействий $\Delta G_{ГФ}$ по формуле (2).

Сделать выводы по расчетным данным, а также общий вывод по работе. В выводах указать возможные причины стабилизации/дестабилизации комплекса, основываясь на анализе результатов расчета.

4. Литература

1. Минкин В.И., Симкин Б.Я., Миняев Р.М. Теория строения молекул. - Ростов н/Д: Изд-во Феникс, 1997.
2. Степанов Н.Ф. Квантовая механика и квантовая химия. - М.: Мир, 2001.
3. Симкин Б.Я., Клецкий М.Е., Глуховцев М.Н. Задачи по теории строения молекул. - Ростов н/Д: Изд-во Феникс, 1997.
4. Блюменфельд Л.А., Кукушкин А.К. Курс квантовой химии и строения молекул. - М.: Изд-во МГУ, 1980.
5. Бете Г. Квантовая механика. - М.: Мир, 1965.
6. Новосадов Б.К. Методы решения уравнений квантовой химии. Основы теории молекулярных орбиталей. - М.: Наука, 1988.

Приложение А
Образец оформления титульного листа

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
СЕВАСТОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Кафедра физики

Курсовая работа по дисциплине:
«Молекулярное моделирование»

МОДЕЛИРОВАНИЕ МОЛЕКУЛ АДЕНИНА И ДАУНОРУБИЦИНА
И ИХ КОМПЛЕКСОВ В ПРОГРАММЕ HYPERCHEM

Выполнил(а): студент группы Ф-41
_____ (ФИО)

Работа защищена с оценкой _____
канд. физ.-мат. наук, доцент

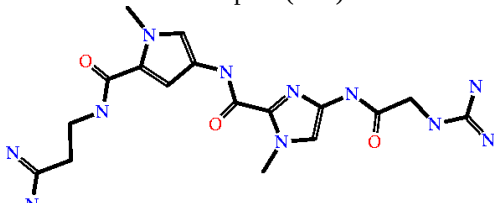
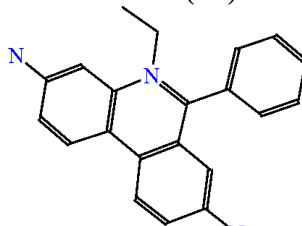
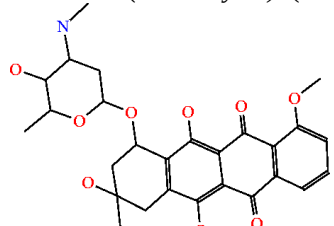
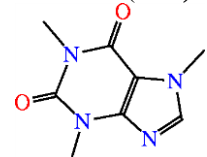
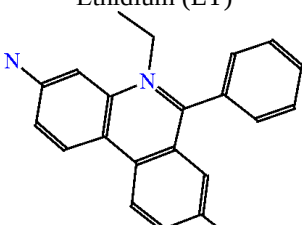
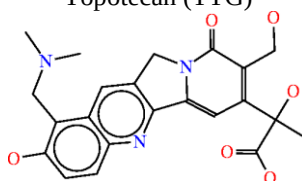
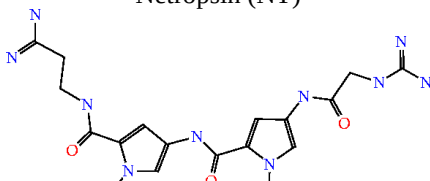
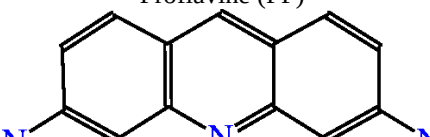
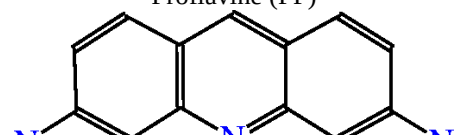
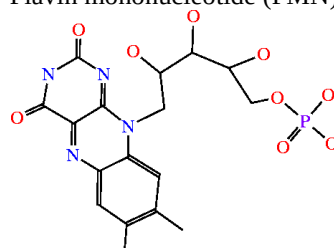
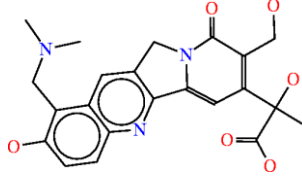
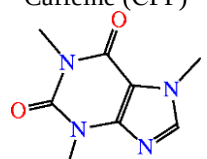
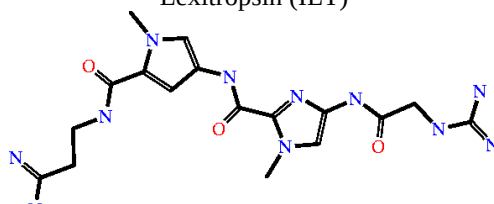
Мухина Ю.В.

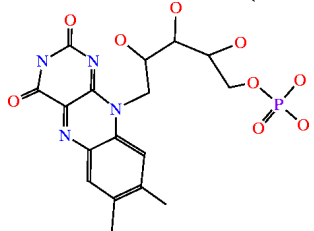
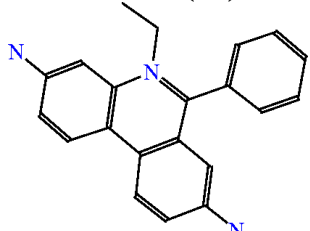
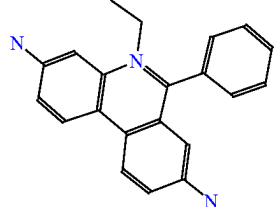
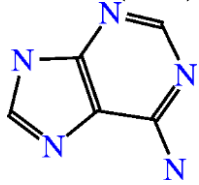
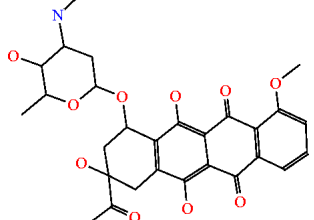
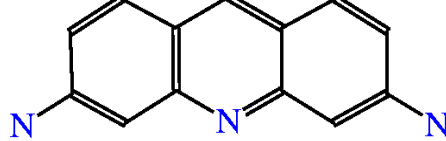
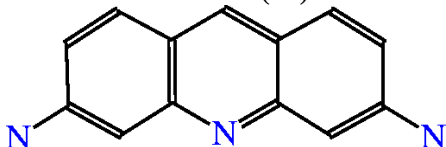
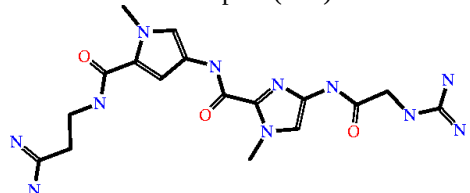
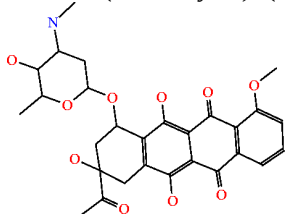
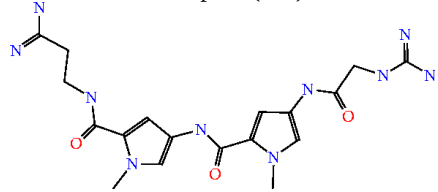
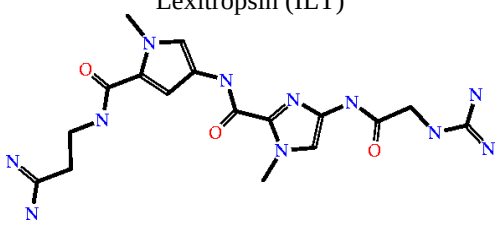
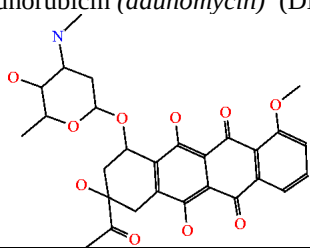
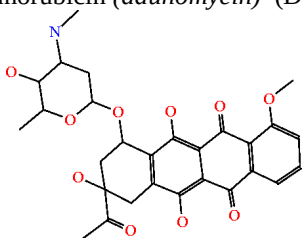
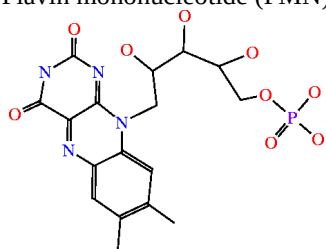
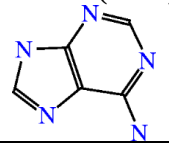
Севастополь

20__

Приложение Б

Таблица с вариантами заданий

№	1я молекула	2я молекула
1	Lexitropsin (ILT) 	Ethidium (ET) 
2	Daunorubicin (<i>daunomycin</i>) (DM1) 	Caffeine (CFF) 
3	Ethidium (ET) 	Topotecan (TTG) 
4	Netropsin (NT) 	Proflavine (PF) 
5	Proflavine (PF) 	Flavin mononucleotide (FMN) 
6	Adenine (ADE) 	Topotecan (TTG) 
7	Caffeine (CFF) 	Lexitropsin (ILT) 

8	Flavin mononucleotide (FMN) 	Ethidium (ET) 
9	Ethidium (ET) 	Adenine (ADE) 
10	Daunorubicin (<i>daunomycin</i>) (DM1) 	Proflavine (PF) 
11	Proflavine (PF) 	Lexitropsin (ILT) 
12	Daunorubicin (<i>daunomycin</i>) (DM1) 	Netropsin (NT) 
13	Lexitropsin (ILT) 	Daunorubicin (<i>daunomycin</i>) (DM1) 
14	Daunorubicin (<i>daunomycin</i>) (DM1) 	Flavin mononucleotide (FMN) 
15	Adenine (ADE) 	Proflavine (PF) 