

## 四溴联苯醚(BDE47)与溶菌酶的相互作用研究

杨露露, 杨 雾, 易忠胜\*, 赵 赛, 段家喜

广西高校食品安全与检测重点实验室, 岩溶地区水污染控制与用水安全保障协同创新中心,  
桂林理工大学化学与生物工程学院, 广西 桂林 541004

**摘 要** 在模拟人体生理条件下, 采用分子模拟结合三维荧光、圆二色谱、荧光光谱、时间分辨荧光等光谱方法, 研究了四溴联苯醚(BDE47)与溶菌酶的相互作用机制。结果表明: BDE47 能有效地猝灭溶菌酶的内源性荧光, 猝灭机制为静态猝灭。分子对接显示, BDE47 与溶菌酶分子中的 TRP62, TRP63, ARG61, ASN59, ALA107 和 ILE98 等氨基酸残基具有相互作用, 且 BDE47 分子中的醚键 O 原子与 TRP63 形成了氢键, 氢键距离为 2.2 Å。三维荧光的实验结果表明, BDE47 的加入导致了溶菌酶的荧光强度降低, 峰位置发生略微红移, BDE47 与溶菌酶之间的结合作用改变了溶菌酶的微环境。圆二色谱分析则进一步证明, BDE47 的存在引起了溶菌酶的构象发生改变, 导致  $\alpha$ -螺旋结构的含量减少。根据 Förster 非辐射能量转移理论计算得出, 供体(溶菌酶)与受体(BDE47)的结合距离  $r$  为 3.31 nm, 满足非辐射能量的条件。分析四个温度下的热力学参数发现, BDE47 与溶菌酶之间的结合是一个自发放热的过程, 主要驱动力为氢键和范德华力, 与分子对接、结合自由能分析结论一致。

**关键词** 四溴联苯醚; 溶菌酶; 分子模拟; 光谱; 结合自由能

**中图分类号:** O657.3 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2019)11-3614-05

### 引 言

多溴联苯醚(polybrominated diphenyl ethers, PBDEs)是一系列含溴原子的芳香族化合物, 其同系物共有 209 种。PBDEs 在高温下分解产生还原性很强的溴原子, 它可以捕获燃烧过程中产生的  $\cdot\text{OH}$  自由基和  $\cdot\text{O}\cdot$  自由基, 生成水和活性较低的溴原子, 从而达到阻燃灭火的目的, 且 PBDEs 价格便宜, 因而被广泛应用于生产生活中<sup>[1]</sup>。研究表明, PBDEs 可随着食物链富集在生物体内, 对人体具有内分泌干扰毒性<sup>[2]</sup>、发育神经毒性<sup>[3]</sup>和免疫毒性等<sup>[4]</sup>作用。2,2',4,4'-四溴联苯醚(tetra-brominated diphenyl ethers, BDE47)是环境样品及生物组织中含量最高的 PBDEs 同系物之一, 主要蓄积于人体脂肪、肝脏等组织中, 具有较强的生物毒性<sup>[5]</sup>。

溶菌酶是一种低分子量的球形蛋白质, 因其具有溶解细菌细胞壁的作用, 故命名为溶菌酶。溶菌酶作为一种存在于人体正常体液及组织中的非特异性免疫因子, 能够与很多外源性、内源性物质结合, 从而具有多种生理、药理作用, 如抗菌、抗病毒、抗肿瘤等<sup>[6]</sup>。长期以来, 溶菌酶一直被作为

一种模型蛋白, 用于研究蛋白质的空间构象、酶动力学以及分子进化与分子免疫间的关系<sup>[7]</sup>。目前, 已有部分研究者在进行溶菌酶与药物<sup>[8-9]</sup>、染料<sup>[10-11]</sup>、纳米粒子<sup>[12-13]</sup>等的相互作用研究, 但关于溶菌酶与污染物(如 PBDEs)的相互作用研究甚少。研究四溴联苯醚与溶菌酶的结合作用, 从而更好的了解污染物对生物体的毒理学效应, 这对于阐明多溴联苯醚的毒理作用机制具有重要的指导意义。

利用计算模拟研究了 BDE47 与溶菌酶的结合模式, 获得两者结合作用力的类型、相互作用的氨基酸残基、结合自由能等信息。并结合荧光光谱、荧光寿命和圆二色谱法对两者的作用机制及其溶菌酶的构象变化进行探究。

### 1 实验部分

#### 1.1 仪器与试剂

RF-5301PC 型荧光光度计, Hitachi F-4600 荧光光谱仪; JASCO-810 圆二色谱仪, FL3-P-TCSPC 时间分辨荧光仪。

BDE47 和鸡蛋清溶菌酶(分别购于美国 AccuStandard、Sigma 公司), pH 7.40 的 Tris-HCl 缓冲溶液(含 0.15 mol·

收稿日期: 2016-11-11, 修订日期: 2018-02-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(21267008)和广西高等学校高水平创新团队及卓越学者计划项目(桂教人[2014]49号)资助

作者简介: 杨露露, 女, 1991年生, 桂林理工大学化学与生物工程学院硕士研究生 e-mail: LLYang822@163.com

\* 通讯联系人 e-mail: yzs@glut.edu.cn

$L^{-1}$  NaCl), 其他试剂为分析纯, 实验用水为二次蒸馏水。

用 pH 7.40 的 Tris-HCl 缓冲液配制浓度为  $5.0 \times 10^{-4}$  mol  $\cdot$  L $^{-1}$  的溶菌酶贮备液和  $1.0 \times 10^{-6}$  mol  $\cdot$  L $^{-1}$  的 BDE47 贮备液, 并置于 4  $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

## 1.2 方法

### 1.2.1 计算模拟

溶菌酶的晶体结构(1aki.pdb, 1.5  $\text{\AA}$ )从 Brookhaven 蛋白质数据库 (<http://www.rcsb.org/pdb>) 获得。首先, 对溶菌酶进行除水、加氢、加电荷等前处理, 利用 AutoDock 4.2 将 BDE47 对接进入溶菌酶分子的活性口袋中。

将对接后的蛋白和小分子导入 GROMACS 4.6.5 程序中, 采用正则系统(NVT)和等温等压系统(NPT)平衡体系, 并进行 50 ns 的分子动力学模拟。然后, 用分子力学泊松玻尔兹曼表面积(MM-PBSA)方法计算分析溶菌酶与 BDE47 之间的结合自由能<sup>[14-15]</sup>。

### 1.2.2 光谱法

荧光光谱: 在 291, 298, 306 和 310 K 4 个温度下, 以 280 nm 为激发波长, 激发和发射狭缝宽度均为 5.0 nm, 测定溶菌酶-BDE47 体系在 290~450 nm 范围内的荧光光谱。

三维荧光: 激发波长和发射波长均设为 200~500 nm, 步长和狭缝分别为 5 和 2.5 nm, 测定溶菌酶与溶菌酶-BDE47 体系的三维荧光光谱。

时间分辨荧光: 激发和发射波长分别为 280 和 346 nm, 激发和发射狭缝均为 6 nm, 计数峰值 counts 为 4 000, 记录溶菌酶荧光寿命的变化。

圆二色谱: 用 Tris-HCl 缓冲液做基线校正, 扫描速度为 200 nm  $\cdot$  min $^{-1}$ , 响应时间为 2 s, 在波长为 190~260 nm 范围内扫描样品液的圆二色谱。

## 2 结果与讨论

### 2.1 分子对接分析

利用分子对接软件 AutoDock 4.2 将小分子 BDE47 对接进入溶菌酶的活性口袋, 得到 10 种构象。10 种构象的对接结果均表明, 溶菌酶与 BDE47 结合的主要作用力为范德华力和氢键, 而静电作用能非常小, 可忽略不计。选取结合自由能较低的一种构象进行分析, 如图 1。溶菌酶中与 BDE47 发生相互作用的氨基酸残基有: TRP62, TRP63, ARG61, ASN59, ALA107, ILE98 和 ILE58 等, 其中, TRP62 和 TRP63 距离 BDE47 非常近, 相互作用较强。另外, 可以观察到 BDE47 与色氨酸(TRP62)的苯环、吡啶环部分基本平行, 存在着错位面对面堆积作用(即 F 型堆积作用); BDE47 分子中的醚键 O 原子与 TRP63 形成氢键, 氢键距离为 2.2  $\text{\AA}$ 。氢键的形成和 F 型堆积作用在一定程度上对 BDE47 与溶菌酶结合起到了稳定的作用, 结合位点更靠近 TRP62 和 TRP63。

### 2.2 计算模拟中的结合自由能分析

50 ns 的动力学模拟结束后, 选取平衡后 30~50 ns 的模拟轨迹对溶菌酶与 BDE47 之间的结合自由能进行分析, 结果如图 2。用 MM-PBSA 方法计算得到的结合自由能为  $-27.10$  kJ  $\cdot$  mol $^{-1}$ 。体系的范德华相互作用能  $\Delta G_{vdw}$  为负( $-$

$36.81$  kJ  $\cdot$  mol $^{-1}$ ), 且绝对值比其他能量项大很多, 表明  $\Delta G_{vdw}$  有利于溶菌酶与 BDE47 的结合作用, 范德华作用为主要驱动力。体系的静电相互作用能  $\Delta G_{elect}$  虽然也利于两者的结合, 但非常弱, 极性的静电溶剂化能很大程度上抵消了这种趋势(体系的极性能高达  $15.22$  kJ  $\cdot$  mol $^{-1}$ ), 这表明极性溶剂化自由能对结合是极为不利的<sup>[16]</sup>。

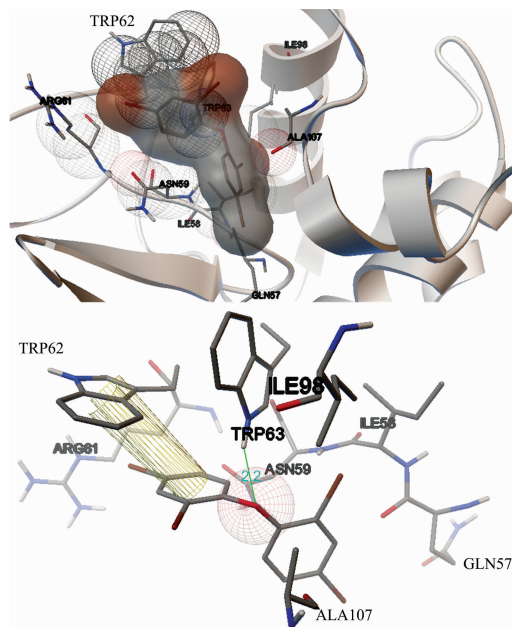


图 1 溶菌酶与 BDE47 的分子对接

Fig. 1 Molecular docking between lysozyme and BDE47

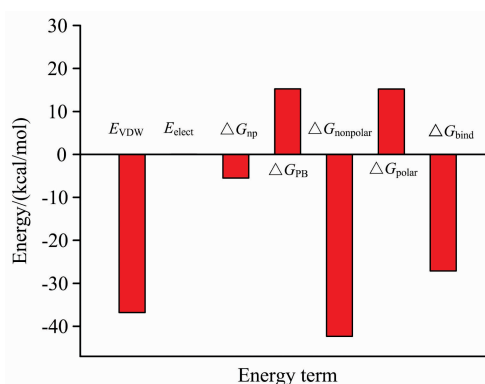


图 2 BDE47 与溶菌酶之间的结合自由能

Fig. 2 Binding free energies of BDE47-lysozyme complex

### 2.3 溶菌酶的构象分析

#### 2.3.1 三维荧光

蛋白质一般含有色氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸这三种芳香氨基酸, 因此能发射荧光。常用三维荧光来分析药物小分子对溶菌酶的构象和微环境的影响。图 3 中, 加入 BDE47 后, 体系的瑞利散射峰( $\lambda_{ex} = \lambda_{em}$ )增强, 这可能是由于溶菌酶与 BDE47 生成复合物, 导致溶液中溶质粒径增大, 散射效应增强<sup>[17]</sup>。峰 1 是色氨酸、酪氨酸等残基的特征峰, BDE47 的加入使溶菌酶的荧光强度降低, 色氨酸的微环境发生改变。峰 2 是溶菌酶多肽骨架的特征峰, 加入 BDE47 后, 峰 2 的强度

降低, 并且其发射波长发生略微红移(5 nm), 这表明 BDE47 的存在导致了溶菌酶的构象发生改变<sup>[18]</sup>。

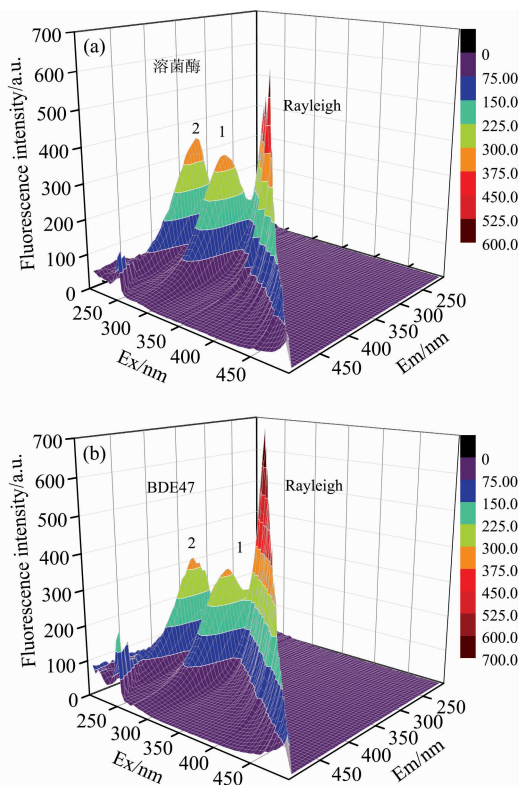


图 3 溶菌酶(a)与溶菌酶-BDE47(b)体系的三维荧光光谱  
Fig. 3 Three-dimensional fluorescence spectra of lysozyme (a) and lysozyme-BDE47 (b) systems

$$c_{\text{lysozyme}} = 2.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}, c_{\text{BDE47}} = 5.0 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

### 2.3.2 圆二色谱

为了进一步验证溶菌酶的构象发生变化, 采用圆二色谱对溶菌酶的二级结构含量进行定量分析。溶菌酶的圆二色谱在 208 和 222 nm 附近有两个负峰, 这是  $\alpha$ -螺旋的光谱特征<sup>[9]</sup>。如图 4, 加入 BDE47 后, 谱图中负峰的强度减弱。根据式(1)和式(2)<sup>[19]</sup>计算溶菌酶中  $\alpha$ -螺旋的含量, 结果显示, 蛋白的  $\alpha$ -螺旋含量从 35.8% 减少到 33.1% 和 31.6%, 这表明 BDE47 与溶菌酶的相互作用改变了溶菌酶的二级结构, 导致其  $\alpha$ -螺旋含量减少。

$$\text{MRE} = \frac{\text{CD}(m \text{ deg})}{c_p n l \times 10} \quad (1)$$

$$\alpha \text{ helix}(\%) = \frac{-\text{MRE}_{208} - 4 \ 000}{33 \ 000 - 4 \ 000} \times 100\% \quad (2)$$

式中,  $c_p$  为蛋白质的摩尔浓度,  $n$  为氨基酸残基数(溶菌酶为 129),  $l$  为样品池的厚度(0.1 cm);  $\text{MRE}_{208}$  是蛋白质在 208 nm 处的平均残基椭圆率( $\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$ ), 4 000 是螺旋和无规则卷曲在 208 nm 处的平均残基椭圆率, 33 000 是纯螺旋结构在 208 nm 处的平均残基椭圆率。

## 2.4 溶菌酶与 BDE47 的相互作用机制

### 2.4.1 溶菌酶的荧光猝灭机制

溶菌酶分子中含有 6 个色氨酸残基, 其中 TRP62 和

TRP108 是溶菌酶主要的荧光基团之一, 最大荧光发射波长分别为 352 和 342 nm。如图 5, 随着 BDE47 的加入, 溶菌酶的荧光强度逐渐降低, 但峰型基本保持不变, 表明 BDE47 与溶菌酶发生了相互作用, 改变了 TRP62 附近的微环境, 导致荧光猝灭。

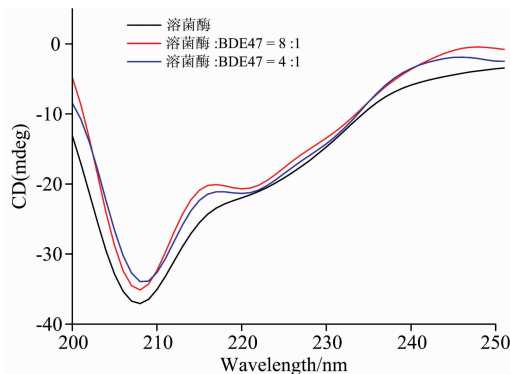


图 4 溶菌酶与溶菌酶-BDE47 体系的圆二色谱  
Fig. 4 Circular dichroism spectra of lysozyme in the absence and presence of BDE47

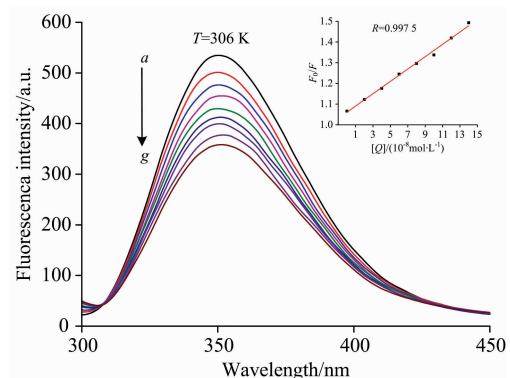


图 5 306 K 时 BDE47 对溶菌酶的荧光猝灭光谱图  
Fig. 5 Fluorescence quenching spectra of lysozyme in presence of BDE47 at 306 K

$$c_{\text{lysozyme}} = 4.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}; c_{\text{BDE-47}}(a-g): 0, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 (\times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}), \text{ respectively}$$

蛋白质的荧光猝灭通常有动态猝灭、静态猝灭及非辐射能量转移三种。而时间分辨荧光是区分动态猝灭和静态猝灭最准确的方法。静态猝灭过程中, 猝灭剂的加入, 荧光分子激发态等寿命并不会改变; 而在动态猝灭中, 猝灭剂的存在可引起溶菌酶荧光寿命的缩短<sup>[20]</sup>。图 6 为加入 BDE47 前后溶菌酶的荧光寿命衰减曲线, 双指数拟合结果列于表 1。加入 BDE47 后, 溶菌酶的平均寿命由 1.72 s 变到 1.77 和 1.78 s, 荧光寿命有微小的增加, 表明溶菌酶与 BDE47 发生相互作用, 改变了溶菌酶 TRP 的微环境。但变化不大, 由此可认为 BDE47 对溶菌酶的荧光猝灭是一个静态猝灭过程。

### 2.4.2 溶菌酶与 BDE47 的结合距离

小分子与溶菌酶相互作用的结合距离可根据 Förster 偶极-偶极非辐射能量转移理论计算<sup>[10]</sup>。图 7 为溶菌酶的荧光光谱与 BDE47 的紫外吸收光谱的重叠图谱。

$$J = \left( \sum F(\lambda) \epsilon(\lambda) \lambda^4 \Delta\lambda \right) / \left( \sum F(\lambda) \Delta\lambda \right) \quad (3)$$

$$E = 1 - F/F_0 = R_0^6 / (R_0^6 + r^6) \quad (4)$$

$$R_0^6 = 8.79 \times 10^{-25} K^2 N^{-4} \Phi J \quad (5)$$

式(3)—式(5)中  $K^2 = 2/3$ ;  $N = 1.36$  为介质折射指数;  $\Phi = 0.15$  为给体的荧光量子产率;  $J$  为给体的荧光发射光谱与受体的吸收光谱间的重叠积分,  $R_0$  是转移效率为 50% 时的临界距离;  $r$  为给体与受体的结合距离。

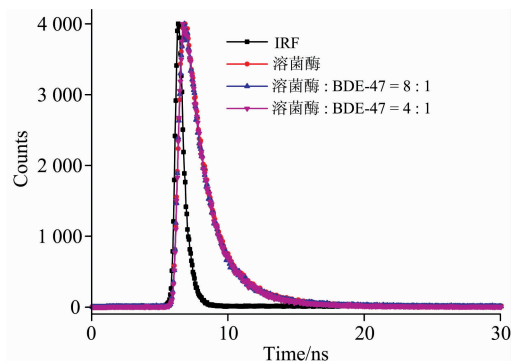


图 6 溶菌酶的荧光寿命衰减曲线

Fig. 6 The time-resolved fluorescence decay of lysozyme in the absence and presence of BDE47

$c_{\text{lysozyme}} = 2.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $c_{\text{BDE47}} = 0$  (Red),  $0.25 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  (Blue),  $0.5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  (Magenta). The sharp pattern on the left (Black) is the lamp profile

表 1 加入 BDE47 后溶菌酶的荧光寿命变化

Table 1 Fluorescence lifetime of lysozyme as a function of concentration of BDE47

Samples	$\tau_1$ /ns	$\tau_2$ /ns	$A_1$	$A_2$	$\tau$ /ns	$\chi^2$
溶菌酶	0.88	3.53	68.28	31.72	1.72	1.29
溶菌酶+BDE47 (8:1)	1.55	3.80	89.89	10.11	1.77	1.38
溶菌酶+BDE47 (4:1)	1.56	3.84	90.38	9.62	1.78	1.19

表 2 不同温度下 BDE47 与溶菌酶相互作用的热力学常数

Table 2 The thermodynamic parameters of BDE47-lysozyme interaction at different temperatures

compound	$T/\text{K}$	$\Delta H/(\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	$\Delta G/(\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	$\Delta S/(\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1})$
BDE47	291		-33.19	
	298		-31.49	
	306	-103.90	-29.54	-242.99
	310		-28.57	

### 3 结论

利用分子模拟、结合自由能分析以及光谱法研究了溶菌酶与 BDE47 的作用机制。由荧光光谱和时间分辨荧光可知,

界距离;  $r$  为给体与受体的结合距离。

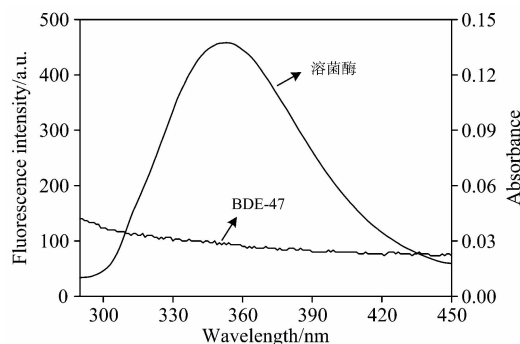


图 7 溶菌酶荧光光谱和 BDE47 吸收光谱的重叠图

Fig. 7 The overlap of lysozyme fluorescence and BDE47 absorbance spectra

$$c_{\text{lysozyme}} = c_{\text{BDE47}} = 5.0 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

根据式(3)—式(5)计算得出, 两光谱重叠区的重叠积分  $J = 5.12 \times 10^{-14} \text{ cm}^3 \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$ , 能量转移效率  $E = 0.13$ ,  $R_0$  和  $r$  分别为 3.31 和 4.55 nm。BDE47 与溶菌酶的结合距离  $r$  小于 7 nm, 且满足  $0.5R_0 < r < 1.5R_0$ , 符合非辐射能量转移的条件, 表明非辐射能量转移是导致溶菌酶荧光猝灭的另一个原因。此外, MD 的计算结果显示, BDE47 与 TRP62 之间的距离为 2.03 nm, 小于 7 nm, 与能量转移结论一致。

#### 2.4.3 溶菌酶与 BDE47 结合的作用力类型

小分子-受体相互作用力的类型包括范德华力、疏水作用力、静电引力和氢键等。根据 Ross 和 Subramanian 理论<sup>[21]</sup>, 由热力学参数可判断其结合作用力类型。由实验计算得出的自由能值与上述计算模拟获得的结合自由能 ( $-27.10 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) 吻合良好。由表 2 可知, 291~310 K 时, 该体系中  $\Delta G < 0$ ,  $\Delta H < 0$ ,  $\Delta S < 0$ , 说明 BDE47 与溶菌酶之间的结合是一个自发放热的过程, 二者结合的作用力类型为氢键和范德华力<sup>[9]</sup>。这与分子对接、结合自由能分析的结论一致, 表明了计算模拟的准确性。

BDE47 使溶菌酶的荧光发生猝灭, 猝灭机制为静态猝灭, 且伴随着非辐射能量转移。三维荧光光谱表明, BDE47 能与溶菌酶生成复合物, 导致溶菌酶的微环境及构象发生改变, 这与圆二色谱分析一致。根据热力学参数分析, 溶菌酶与 BDE47 结合的主要作用力为范德华力与氢键。

### References

[1] LIU Han-xia, ZHANG Qing-hua, JIANG Gui-bin(刘汉霞, 张庆华, 江桂斌). Progress in Chemistry(化学进展), 2005, 17(3): 554.

- [ 2 ] Hu X N, Zhang J Q, Jiang Y S, et al. *Toxicol. Vitro.*, 2014, 28(8): 1377.
- [ 3 ] Meironyté G D, Bergman Å, Norén K. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 2001, 40(4): 564.
- [ 4 ] WAN Bin, GUO Liang-hong(万斌, 郭良宏). *Environmental Chemistry(环境化学)*, 2011, 30(1): 143.
- [ 5 ] Sara J L, Barbara P M, James R O, et al. *Chem. Res. Toxicol.*, 2009, 22: 1802.
- [ 6 ] Wu D, Yan J, Tang P X, et al. *Food Chem.*, 2015, 188: 370.
- [ 7 ] Jeffrey S N, John J R, Bruce S Z. *Cancer Res.*, 1981, 4: 1642.
- [ 8 ] Roy A S, Ghosh P. J. *Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, 2016, 84: 21.
- [ 9 ] Wang Q, Ma X L, He J W, et al. *Spectrochim. Acta Pt. A-Molec. Biomolec. Spectr.*, 2016, 153: 612.
- [10] Paramaguru G, Kathiravan A, Selvaraj S, et al. *J. Hazard. Mater.*, 2010, 175: 985.
- [11] Peng W, Ding F, Peng Y K, et al. *J. Agric. Food Chem.*, 2013, 61(50): 12415.
- [12] Chakraborti S, Chatterjee T, Joshi P, et al. *Langmuir*, 2010, 26(5): 3506.
- [13] Revathi R, Rameshkumar A, Sivasudha T. *Spectrochim. Acta Pt. A-Molec. Biomolec. Spectr.*, 2016, 152: 192.
- [14] HU Guo-dong, ZHANG Shao-long, ZHANG Qing-gang(扈国栋, 张少龙, 张庆刚). *Acta Chim. Sinica(化学学报)*, 2009, 67(9): 1019.
- [15] Zhang L, Sun Y. *Langmuir*, 2014, 30(16): 4725.
- [16] HU Jian-ping, SUN Ting-guang, CHEN Wei-zu, et al(胡建平, 孙庭广, 陈慰祖, 等). *Acta Chim. Sinica(化学学报)*, 2006, 64(20): 2079.
- [17] Yue Y, Liu J, Yao M, et al. *Spectrochim. Acta Pt. A-Molec. Biomolec. Spectr.*, 2012, 96: 316.
- [18] GUO Qing-lian, PAN Ling-li, YANG Li-yun, et al(郭清莲, 潘凌立, 杨立云, 等). *Acta Phys.-Chim. Sin.(物理化学学报)*, 2016, 32(1): 274.
- [19] Greenfield N, Fasman G D. *Biochemistry*, 1969, 8(10): 4108.
- [20] Ma F, Huang H Y, Zhou L, et al. *Spectrochim. Acta Pt. A-Molec. Biomolec. Spectr.*, 2012, 97: 1159.
- [21] Ross P D, Subramanian S. *Biochemistry*, 1981, 20: 3096.

## Study on the Interaction of Tetra-Brominated Diphenyl Ethers (BDE47) with Lysozyme

YANG Lu-lu, YANG Wu, YI Zhong-sheng\*, ZHAO Sai, DUAN Jia-xi

Guangxi Colleges and Universities Key Laboratory of Food Safety and Detection, Collaborative Innovation Center for Water Pollution Control and Water Safety in Karst Area, College of Chemistry and Bioengineering, Guilin University of Technology, Guilin 541004, China

**Abstract** The binding of BDE47 to lysozyme was investigated by molecular modeling combined with three-dimensional (3D) fluorescence, circular dichroism (CD) techniques, fluorescence spectroscopy, and time-resolved fluorescence decay under simulative physiological conditions. The results indicated that the quenching reaction of BDE47 to lysozyme was observed, and the quenching mechanism was suggested as static quenching. Molecular docking showed that the amino acid residues, TRP62, TRP63, ARG61, ASN59, ALA107, ILE98 in lysozyme have interactions with BDE47. The hydrogen bonds were formed between the O atom of BDE47 and TRP62 with the distances of 2.2 Å. The 3D fluorescence experiments showed that the fluorescence intensity of lysozyme gradually decreased in the presence of BDE47 and a red shifted was observed, suggesting that the microenvironment around the TRP-residues of lysozyme has changed during the binding process. Furthermore, CD spectra implied that the interaction of BDE47 with lysozyme induced conformational change of lysozyme, and the content of  $\alpha$ -helix structures in lysozyme decreased. The binding distance  $r$  between the donor (lysozyme) and acceptor (BDE47) calculated using Förster's nonradiative energy transfer theory was 3.31 nm, indicating a high probability of energy transfer from lysozyme to BDE47. The thermodynamic parameters at different temperatures indicated that the hydrogen bonds and van der Waals forces played a predominant role in the spontaneous binding process. The results were consistent with the molecular docking and binding free energy analysis.

**Keywords** Tetra-brominated diphenyl ethers; Lysozyme; Molecular modeling; Spectroscopy; Binding free energy

\* Corresponding author

(Received Nov. 11, 2016; accepted Feb. 9, 2018)