

Molecular dynamics simulation and calculation of binding free energy of a HBc-VLP

Yanyan MA^{1,2}, Zhengjun LI³, Songping ZHANG³, Wei CHEN^{1,4*}, Ying REN^{1,5*}

1. State Key Laboratory of Multiphase Complex Systems, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China

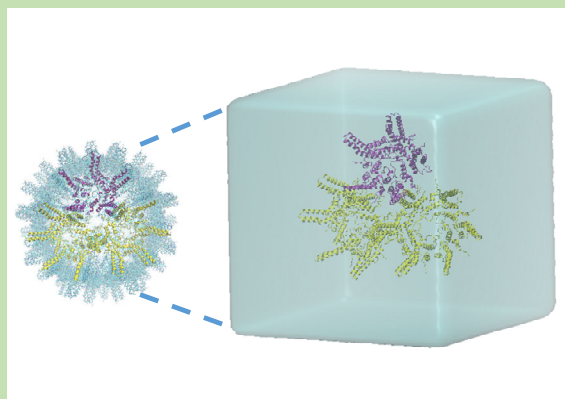
2. School of Chemical Engineering, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

3. State Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China

4. Dalian National Laboratory for Clean Energy, Chinese Academy of Sciences, Dalian, Liaoning 116023, China

5. Innovation Academy of Green Manufacture, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China

Abstract: Hepatitis B core antigen virus-like particles (HBc-VLPs) are widely used as vaccine vectors due to their good stability and easy modification, and the investigations of VLPs is one of the hot spots in the field of bio-pharmaceutical engineering. However, VLPs may disassemble or aggregate due to their sensitivity to temperature, pH and other factors, which becomes the bottleneck hindering the widely application, and the underlying mechanisms which governs the structure and thus stability of VLPs is still ambiguous. In this work, molecular dynamics simulation was utilized to investigate the stability of the dimer, pentamer and hexamer formed by protein subunits in HBc-



VLP. Instead of using empirical values in previous studies, the parameters of protein dielectric constant in aqueous solution were obtained by molecular dynamics simulations, and the results suggested that both the aqueous solvent and the arrangement of protein subunits in the complex could significantly change the dielectric constant, which further affected the binding free energy. Furthermore, with the dielectric constant of protein subunits, the binding free energy between protein subunits were calculated by the molecular mechanics-Poisson Boltzmann solvent accessible surface area (MM-PBSA) method. Finally, according to the calculation results, it was speculated that the stability of the hexamer was better than the pentamer, and the dimers formed between two adjacent hexamers or between a pentamer and a hexamer can further lead to a more stable structure. These understandings could provide theoretical guidance for the modification of candidate vaccine with HBc-VLPs as the carrier.

Key words: HBc-VLPs; molecular dynamics simulation; dielectric constant; MM-PBSA; binding free energy; stability

收稿: 2020-03-14, 修回: 2020-04-24, 网络发表: 2020-05-14, Received: 2020-03-14, Revised: 2020-04-24, Published online: 2020-05-14

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 21973097; 91834303; 21821005); 中国科学院绿色制造创新研究院自署布置课题(编号: IAGM-2019-A13)

作者简介: 马艳艳(1993-), 女, 河南省商丘市人, 硕士研究生, 化学工程专业, E-mail: yyma@ipe.ac.cn; 通讯联系人, 陈卫, E-mail: chenwei@ipe.ac.cn; 任瑛, E-mail: yren@ipe.ac.cn.

引用格式: 马艳艳, 李正军, 张松平, 等. HBc-VLP 的分子动力学模拟和结合自由能计算. 过程工程学报, 2021, 21(2): 219-229.

Ma Y Y, Li Z J, Zhang S P, et al. Molecular dynamics simulation and calculation of binding free energy of a HBc-VLP (in Chinese).

Chin. J. Process Eng., 2021, 21(2): 219-229, DOI: 10.12034/j.issn.1009-606X.220085.

HBc-VLP 的分子动力学模拟和结合自由能计算

马艳艳^{1,2}, 李正军³, 张松平³, 陈卫^{1,4*}, 任琰^{1,5*}

1. 中国科学院过程工程研究所多相复杂系统国家重点实验室, 北京 100190

2. 中国科学院大学化学工程学院, 北京 100049

3. 中国科学院过程工程研究所生化工程国家重点实验室, 北京 100190

4. 中国科学院洁净能源创新研究院, 辽宁 大连 116023

5. 中国科学院绿色过程制造创新研究院, 北京 100190

摘要: 乙型肝炎核心病毒样颗粒 HBc-VLPs (Hepatitis B Core Antigen Virus-like Particles) 因稳定性好且易于改造, 被作为疫苗载体广泛使用, 但影响 VLPs 稳定性的控制机制尚不清楚。采用分子动力学模拟研究了 HBc-VLP 中蛋白亚基二聚体、五聚体及六聚体复合物的稳定性, 计算了体系中蛋白亚基的介电常数, 避免了以往研究中直接使用经验参数的做法; 通过分子力学-泊松玻尔兹曼溶剂可及表面积(MM-PBSA)方法计算亚基分子间的结合自由能, 表明范德华作用能和非极性溶剂化作用能有利于促进相邻蛋白亚基间的亲和作用; 根据计算结果可推测 HBc-VLPs 中六聚体比五聚体的稳定性更强, 而两个六聚体之间或五聚体同六聚体之间形成的二聚体有助于进一步形成结构更加稳定的 HBc-VLPs。该结论有助于生物工程中对 HBc-VLPs 的蛋白质改造, 从而提高 HBc-VLPs 为载体的候选疫苗的稳定性。

关键词: 乙型肝炎核心病毒样颗粒; 分子动力学模拟; 介电常数; 分子力学-泊松玻尔兹曼溶剂可及表面积; 结合自由能; 稳定性

中图分类号: TQ460.1

文献标识码: A

文章编号: 1009-606X(2021)02-0219-11

1 前言

病毒样颗粒 VLPs (Virus-like Particles)是由多个蛋白质亚基组装而成、具有与天然病毒颗粒相似结构的柔性生物纳米颗粒, 不含病毒核酸, 不具有感染性^[1]。VLPs 具有形态均一、生物相容性好、易功能化等突出优点, 且能够激发机体的免疫系统产生有效的细胞和体液免疫应答, 其作为候选疫苗具有广阔的应用前景, 成为近年来生物制药工程领域的研究热点之一^[2]。VLPs 在结构上具有易改造性和可修饰性, 允许外源基因插入, 将抗原肽融合在颗粒内部或表面而不影响颗粒的正确组装, 还可以化学偶联的方式对外源抗原肽进行展示, 是理想的疫苗载体^[3]。但 VLPs 的稳定性往往较弱, 在生产及储运过程中易受温度、pH 值等因素的影响而发生裂解、聚集或沉淀^[4,5]。裂解后的 VLPs 生物活性大幅降低, 聚集沉淀的 VLPs 成为新的杂质, 甚至会产生严重毒副作用^[6]。因此, 提高 VLPs 的稳定性, 对 VLPs 疫苗的工业转化和普遍应用具有极为重要的战略意义。

实验研究中, 通常通过调节 VLPs 组装、应用和存储过程中的 pH、离子强度和浓度、添加剂等因素提高 VLPs 的组装效率或稳定性。Kissmann 等^[7]在对诺瓦克

病毒 VLPs 的稳定性研究中, 经过筛选, 发现壳聚糖、谷氨酸盐、蔗糖、海藻糖等添加剂对 VLPs 的稳定性有促进作用。Li 等^[3]研究了乙肝病毒核心抗原病毒样颗粒 HBc-VLPs (Hepatitis B Core Antigen Virus-like Particles) 的稳定性, 发现通过基因工程手段插入外源的抗原表位后, 尽管不影响 VLPs 的组装, 但其热稳定性却显著降低。上述研究表明, VLPs 的稳定性的影响机制复杂, 目前通过“trial-and-error”的传统实验模式优化 VLPs 的稳定条件仍存在很大的局限性和不确定性。

随着理论研究的不断深入及计算机模拟技术的快速发展, 结合自由能的模拟计算为 VLPs 的稳定性研究奠定了基础。结合自由能指蛋白质分子与配体(小分子、蛋白质、多肽分子等)之间的相互作用能, 可用于评估自组装体的稳定性强弱。结合自由能的计算方法主要包括以下两类: (1) 经典自由能计算方法, 如自由能扰动和热力学积分方法, 其理论基础十分严格, 几乎适用于任何体系, 但因需对体系进行长时间的数据采集, 计算量巨大, 所以只能应用于简单体系^[8,9]; (2) 经验性自由能计算方法, 将结合自由能分解为几个能量分项, 通过统计计算和经验公式得到最终结果, 这类方法采样时间短、计算量相对较小, 应用较广泛。经验性自由能计算

方法主要包括线性相互作用能 (Linear Interaction Energies, LIE) 和分子力学-泊松玻尔兹曼溶剂可及表面积 (Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area, MM-PBSA) 方法。LIE 方法便于计算蛋白质-配体间的极性作用能, 但难以处理非极性相互作用和疏水效应对自由能的影响^[10]; MM-PBSA 方法通过比较同一分子两种不同的溶剂化构象的自由能, 或计算两个溶剂化分子的结合态和未结合态两种状态之间的自由能差, 得到体系的自由能变化^[11-13], 因而常见于蛋白质-配体结合能的计算中。MM-PBSA 算法中, 体系的自由能变化由真空中的分子力学势能、熵对自由能的贡献和溶剂化作用能组成^[14]。溶剂化作用能通过求解线性化的泊松-玻尔兹曼方程获得静电相互作用对溶剂化自由能的贡献, 并添加表示疏水贡献的经验项进行计算, 而蛋白质分子的相对介电常数(简称介电常数)会显著影响计算结果。Wang 等^[15]研究了 HIV 二聚体在溶剂介电常数为 80(293 K 下的水溶剂), 蛋白质介电常数设为 1.0 时, 溶剂化能的数值为 1941.5 kJ/mol; 蛋白质介电常数设为 2.0 时, 溶剂化能的数值仅为 921.3 kJ/mol, 相差一倍。因此, 蛋白质介电常数的数值对结合自由能的精确计算极为重要。Simonson 等^[16]对肌红蛋白等四种蛋白质的水溶液体系分别开展分子动力学(Molecular Dynamics, MD)模拟, 并采用 Fröhlich-Kirkwood 模型假设蛋白分子为球形, 计算得到的蛋白分子介电常数为 11~21。Pitera 等^[17]通过 MD 模拟计算的鸡蛋清溶菌酶在水溶液中的介电常数为 25.7, 在有机溶剂 CHCl₃ 中的介电常数为 15.4。Ahmed 等^[18]针对大豆蛋白水溶液的实验工作和 Pitera 等^[17]的 MD 模拟计算也表明蛋白浓度、温度和 pH 值均显著影响蛋白质的介电常数。蛋白质的介电常数的经验值广泛用于 MM-PBSA 法计算结合能的工作中, 常用值为 1~8^[19-22]。考虑到不同种类的蛋白质分子结构不同, 所处的溶剂环境也有差异, 采用上述经验参数计算所得结合自由能的准确性值得怀疑。如能针对特定的蛋白质体系准确计算蛋白质分子在此环境中的介电常数, 再由此计算体系的自由能变化, 即可得到更准确的蛋白质-配体结合自由能, 为体系稳定性研究及进一步开展的蛋白质分子结构设计工作提供可靠的理论指导。

本研究以乙肝病毒核心抗原 HbcAg (Hepatitis B Virus Core Antigen) 组成的乙肝核心抗原病毒样颗粒 HBc-VLPs 为研究对象。HBc-VLPs 具有结构稳定、免疫原性强、易于改造的优点, 是疫苗工程领域的研究热点之一。蛋白亚基是形成聚合体的基本单元, 按照聚合体所含亚基的不同数量分为二聚体、五聚体和六聚体等^[23]。本工作通过分子动力学模拟研究 HBc-VLPs 中二聚体、

五聚体和六聚体的稳定性, 先计算亚基复合物中蛋白亚基的介电常数, 再采用 MM-PBSA 方法计算不同数量的亚基单体自组装为不同复合物过程的结合自由能, 最后对 HBc-VLPs 自组装和稳定性的规律进行理论分析, 以指导 VLPs 体系的稳定性调控。

2 模型与方法

2.1 模拟体系

HBc-VLPs 是由 180 或 240 个 HBcAg 蛋白亚基自组装形成的正二十面体颗粒, 粒径约 27 nm^[24]。每个亚基由 183~185 个氨基酸组成, 每个亚基的 α 螺旋长链形成二聚体的界面, 相邻两个亚基的二聚体界面相互作用, 即四个 α 螺旋在 HBc-VLPs 表面形成刺突结构^[24]。其中, 由 39 个氨基酸所构成的富含精氨酸的 C-末端延伸段, 可以被去除而不会影响 HBc-VLPs 衣壳的自组装^[25]。本研究中 HBc-VLP 的三维结构从蛋白质数据库获得(PDB ID:3J2V)^[26], 共 240 个蛋白亚基, 每个亚基的 C-末端延伸段已被去除。如图 1(a)所示, 此 HBc-VLP 由 12 个五聚体和 30 个六聚体组成, 相邻的五聚体同六聚体间形成 60 个二聚体, 相邻的两个六聚体间形成 60 个二聚体。如图 1(b)所示, 二聚体由相邻两个蛋白亚基的 α 螺旋结构相互作用而成, 并进一步形成 HBc-VLP 外表面的刺突结构; 五聚体和六聚体分别由相邻的五个或六个

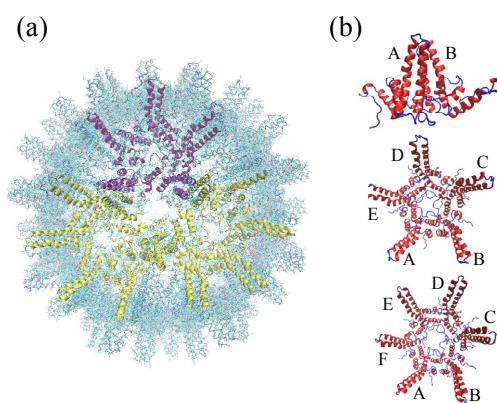


图1 图(a)为 HBc-VLP 的结构, 其中一个五聚体(紫色)和两个六聚体(黄色)间形成复合物; 图(b)从上到下依次为二聚体、五聚体和六聚体, 二级结构的着色方式为红色(α 螺旋), 蓝色(loop 环), 复合物中的不同亚基分子用英文字母区分 (本图采用 VMD 软件绘制^[27])

Fig.1 (a) Structure of a HBc-VLP, where a large complex is formed with one pentamer (purple) and two hexamers (yellow); (b) Structure of the dimer (top), pentamer (middle) and hexamer (bottom), with the helices colored in red and loops in blue. The protein subunits in the complex are distinguished by English letters as marked in the figure (The picture is drawn with VMD^[27])

蛋白亚基两两之间通过底端的 α 螺旋和 coil 结构相互作用形成环状复合物, 并进一步形成 HBc-VLP 的球面结构。本工作以 HBc-VLP 中一个五聚体同周围两个六聚体形成的复合物为模拟对象, 该 HBc-VLP 及复合物中二聚体、五聚体、六聚体的结构如图 1 所示。

2.2 分子动力学模拟

本工作通过 GROMACS-5.0.7 软件包^[28], 采用 Gromos 96 43A1 力场^[29]进行分子动力学模拟计算。模拟体系的构建如下: 将蛋白质复合物放置在正方体盒子中心, 在蛋白质最外侧周围添加最小厚度为 1.5 nm 的水分子层; 添加反离子(Na^+)使体系达到电中性; 模拟盒子的边长为 23.1 nm, 共包含 1225927 个原子。模拟体系的初始设置如表 1 所示。盒子的三个维度均采用周期性边界条件, 静电力采用 Particle-Mesh-Ewald 算法^[30], 蛋白质分子的共价键约束采用 LINCS 算法^[31], 水分子采用 SPC/E^[32]模型并通过 SETTLE 算法^[33]约束其空间结构。采用时间常数为 0.1 ps 的 V-rescale 温度耦合算法^[34]保持体系温度为 330 K; 采用时间常数为 2.0 ps 的 Parrinello-Rahman 压力耦合算法^[35]调控体系压强为 1.0 大气压。模拟过程包括能量最小化、弛豫计算和动力学模拟三个步骤: 采用最陡下降法将体系能量降低至 1000 kJ/mol 以下; 进行 0.5 ns 的弛豫计算, 优化溶剂中小分子位置; 对体系进行 50 ns 的 NPT 系综模拟, 积分时间步长为 2 fs, 每 40 ps 保存一次坐标文件用于后续分析。本工作在 CPU/GPU 耦合异构的超级计算机群 Mole-8.5^[36,37]上进行模拟, 采用一个节点(Intel Xeon E5 2680 CPU, 搭载 12 块 Tesla K80 GPU)可达到 3.74 ns/天的计算速度。

表 1 模拟体系中不同物质的分子数设置

Table 1 Number of molecules in the simulation system

Protein subunits	Water molecules	Na^+	Total atoms	Box length/nm
17	400299	110	1225927	23.1

2.3 分析方法

2.3.1 蛋白亚基介电常数的计算方法

蛋白质溶液作为蛋白质亚基复合物和溶剂分子的混合物, 其中蛋白亚基的电极化强度受到周围溶剂所形成的电介质的影响, 因此, 蛋白亚基的介电常数应表达为溶剂的介电常数的函数。通过线性响应理论^[38]可知, 蛋白亚基分子的介电常数^[17,39]为

$$\epsilon = \frac{1 + \frac{\langle M^2 \rangle - \langle M \rangle^2}{3\epsilon_0 V k_B T} \frac{2\epsilon_{\text{RF}}}{(2\epsilon_{\text{RF}} + 1)}}{1 - \frac{\langle M^2 \rangle - \langle M \rangle^2}{3\epsilon_0 V k_B T} \frac{1}{(2\epsilon_{\text{RF}} + 1)}} \quad (1)$$

式中, ϵ_0 为真空的介电常数, V 为蛋白质分子体积(m^3), k_B 为玻尔兹曼常数(J/K), T 为热力学温度(K), ϵ_{RF} 为蛋白质周围的电介质(即溶剂)的介电常数。蛋白质分子的偶极矩涨落 $\langle M^2 \rangle - \langle M \rangle^2$ ($\text{C}^2 \cdot \text{m}^2$)可由式(2)计算:

$$\begin{aligned} \langle M^2 \rangle - \langle M \rangle^2 &= \langle M_x^2 \rangle - \langle M_x \rangle^2 + \\ &\langle M_y^2 \rangle - \langle M_y \rangle^2 + \langle M_z^2 \rangle - \langle M_z \rangle^2 \end{aligned} \quad (2)$$

本研究中的溶剂为水, 仅添加极少量离子平衡体系电荷, Zasetsky 等^[40]和 Raabe 等^[41]的研究表明, 含有电解质的水溶液的介电常数主要受温度影响, 低浓度离子产生的电偶极矩影响可忽略不计。可根据式(3)确定水溶剂的介电常数^[42], 其中 t 为摄氏温度:

$$\epsilon_{\text{RF}} = 88.083 - 0.4041t + 9.2 \times 10^{-4}t^2 \quad (3)$$

将水的介电常数代入式(1), 可获得体系中蛋白质分子的介电常数。

针对 HBc-VLPs 中五聚体-六聚体界面形成的二聚体、六聚体-六聚体界面形成的二聚体、五聚体、六聚体这四种复合物采用上述方法分别计算各体系中蛋白亚基的介电常数。为减小统计偏差, 模拟达到平衡后, 每隔 2 ns 统计本段模拟轨迹的介电常数, 同时每隔 0.4 ns 更新到下一段模拟轨迹, 将所得结果的平均值视为本体系中蛋白亚基的介电常数。为描述方便, 将上述四种复合物分别简称为 Dimer(P-H), Dimer(H-H), Pentamer 和 Hexamer。

2.3.2 蛋白亚基间结合自由能的计算方法

采用 MM-PBSA 方法计算 HBc-VLPs 的不同蛋白亚基复合物结构中相邻两个蛋白亚基间的结合自由能 ΔG_{bind} 。如式(4)所示, ΔG_{bind} 含三个能量项贡献: 真空中的平均分子力学势能 ΔG_{gas} 、溶剂化作用能 ΔG_{sol} 和真空中熵对自由能的贡献 $-T\Delta S$ ^[14]。

$$\Delta G_{\text{bind}} = \langle \Delta G_{\text{gas}} \rangle + \langle \Delta G_{\text{sol}} \rangle - \langle T\Delta S \rangle \quad (4)$$

式中, 分子力学势能 ΔG_{gas} 基于分子力学力场参数计算, 包括键合作用 ΔG_{bonded} 和非键合相互作用 $\Delta G_{\text{nonbonded}}$ 的能量。 ΔG_{bonded} 包括键长、键角、二面角等相互作用, $\Delta G_{\text{nonbonded}}$ 由静电能 ΔG_{elec} 和范德华能 ΔG_{vdw} 组成^[43-45], 如式(5)所示。蛋白亚基自组装为复合物的过程中, 一般蛋白亚基分子内部结构变化不大, 则 ΔG_{bonded} 对结合自由能的贡献可近似为零^[11]。

$$\Delta G_{\text{gas}} = \Delta G_{\text{bonded}} + \Delta G_{\text{nonbonded}} = \Delta G_{\text{bonded}} + (\Delta G_{\text{elec}} + \Delta G_{\text{vdw}}) \quad (5)$$

ΔG_{sol} 为将溶质从真空中转移到溶剂中所需要的能量, 可以通过密度泛函方法^[46]和积分方程理论^[47]采用统计力学的理论计算。因本工作通过分子动力学模拟进行

理论研究, 故采用隐式溶剂模型计算该部分的能量。 ΔG_{sol} 包括静电溶剂化能 ΔG_{PB} 和非极性溶剂化能 ΔG_{np} , 计算如式(6)^[48]所示:

$$\Delta G_{\text{sol}} = \Delta G_{\text{PB}} + \Delta G_{\text{np}} \quad (6)$$

式中, ΔG_{PB} 是溶剂环境中的极性能, 通过求解线性化的泊松-玻尔兹曼方程确定^[49-51]。泊松-玻尔兹曼方程是二阶非线性椭圆偏微分方程, 当溶液中出现一定浓度高价离子导致离子间相互作用和关联增强时, 需要考虑离子间的关联才能得到合理解释^[52]。但当离子溶液的电势能绝对值较小时, 可以把该方程中的指数项展开到一阶, 得到线性的德拜-休克尔(Debye-Huckel)方程^[53], 在稀溶液中, 德拜-休克尔方程对于泊松-玻尔兹曼方程是很好地近似。本研究将采用蛋白质分子的介电常数计算值求解 ΔG_{PB} 。 ΔG_{np} 是溶剂环境中的非极性能, 即疏水贡献。 ΔG_{np} 可使用多种模型进行计算, 本研究采用应用最为广泛的溶剂可及表面积(SASA)模型, 该模型是定标粒子理论衍生的近似方程, 1965 年 Lebowitz 等^[54]首先提出了定标粒子理论方法, 基本思想是在硬球液体里加入一个直径可变的定标粒子。这相当于在液体内部构成一个空腔, 液体粒子的球心不能进入该空腔, 通过计算空腔的表面自由能和排开周围液体所做的功, 可以得到硬球液体的自由能。Dong 等^[55]经过十数年的努力, 将定标粒子理论方法发展到受限多孔材料内的硬球液体。溶剂可及表面积(SASA)模型对应着定标粒子理论中表面自由能项, 见式(7)^[56-58]。

$$\Delta G_{\text{np}} = \gamma \times \text{SASA} + b \quad (7)$$

式中, 常数 $\gamma = 2.27 \text{ kJ}/(\text{mol} \cdot \text{nm}^2)$, 常数 $b = 3.85 \text{ kJ}/\text{mol}$, SASA 为使用半径为 0.14 nm 的探针计算得到的蛋白质分子的溶剂可及表面积。

$-T\Delta S$ 为真空中熵对体系自由能的贡献, 主要考虑蛋白质发生平移、转动等构象改变引起的能量变化。本研究关注多个蛋白亚基分子自组装为亚基复合物的过程中体系自由能的变化, 即结合自由能, 鉴于亚基分子构象变化不大, 因此不再考虑熵变的贡献^[59,60]。

3 结果与讨论

3.1 蛋白亚基复合物的结构稳定性

通过下述两个物理量随时间的演化判断蛋白亚基复合物的结构稳定性: 根据蛋白亚基复合物体系主链结构同初态结构的均方偏差(RMSD)研究模拟对象的三级结构动态变化(图 2); 根据蛋白亚基复合物的氢键数量(各蛋白亚基分子内的氢键数量及不同亚基分子间的

氢键数量之和)研究亚基分子的二级结构及亚基分子间相对构型的结构演化(图 3)。

如图 2 所示, 蛋白亚基复合物体系主链结构同初态结构的 RMSD 在模拟的前 20 ns 内迅速上升至 1.06 nm , 在随后的 20 ns 内缓慢上涨至 1.30 nm , 并在最后 10 ns 内保持稳定。

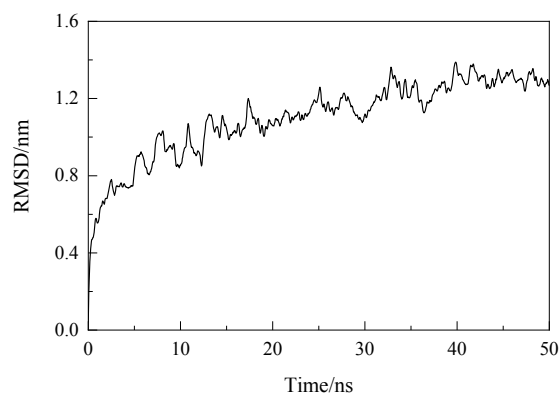


图2 蛋白复合物的主链结构与其初始结构的均方偏差随模拟时间的变化

Fig.2 Root-mean-square-deviation of the backbone structure of the simulated protein complex compared with its initial structure as a function of simulation time

蛋白亚基复合物内部的氢键数量随模拟时间的变化如图 3 所示, 前 10 ns 内氢键数量从 1701 逐渐上升至 1846, 在随后的 40 ns 内稳定在约 1834, 表明各蛋白亚基的二级结构及不同亚基间的相对构型已经稳定。因此, 本工作以 40~50 ns 的模拟轨迹进行后续统计计算。

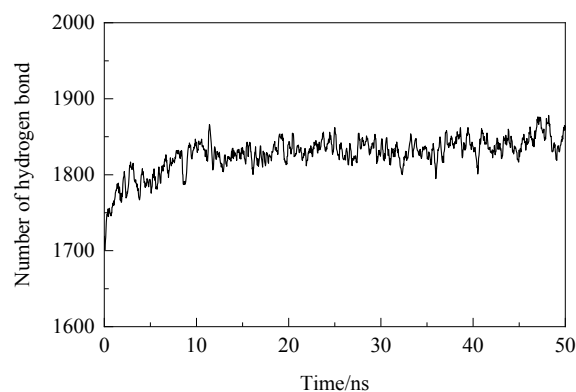


图3 蛋白复合物中的氢键数量随模拟时间的变化

Fig.3 Number of hydrogen bond of the simulated protein complex as a function of simulation time

综上, 该体系在 50 ns 内基本达到平衡, 更长时间的 MD 模拟有助于体系达到更精准的热力学平衡态。考虑到计算量, 针对 40~50 ns 的模拟轨迹开展统计计算。

3.2 介电常数

以 40~50 ns 的模拟轨迹为研究对象, 计算得到的四种复合物体系中蛋白亚基分子在单位体积的偶极矩差值的涨落值如图 4 所示, 四种复合物单位体积内的偶极矩差值的涨落较小, 表明偶极子的振荡幅度较小, 蛋白亚基分子表面极性残基的位置基本稳定, 可由此计算蛋白亚基的介电常数。

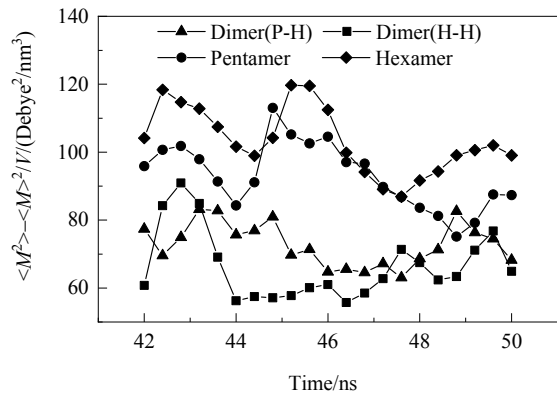


图 4 四种复合物体系中蛋白亚基分子在单位体积的偶极矩差值的涨落值

Fig.4 Total dipole moment fluctuation per unit volume as a function of time for protein subunit in four protein complexes

由式(3)可知, 在体系温度 $T=330\text{ K}(57^{\circ}\text{C})$ 下, 水的介电常数为 68.0, 由式(1)可以获得四种复合物的介电常数, 结果见表 2。Hexamer 的介电常数为 11.4, 稍高于 Pentamer 的 10.2, 且两个体系的标准差也大致相同。对二聚体而言, Dimer(P-H)的介电常数为 8.1, 稍高于

Dimer(H-H)的 7.4, 且这两个体系的标准差也基本相同。这些数值表明, 虽然蛋白亚基和溶剂均保持不变, 但亚基间聚集形式会影响蛋白分子中带电基团的动态结构, 进而影响介电常数。此外, 为深入考察蛋白质分子的介电常数对复合物结合自由能的影响, 选取 6.0 为其介电常数的经验值, 即 Dimer(P-H), Dimer(H-H), Pentamer, Hexamer 的介电常数计算值分别为此经验值的 1.4, 1.2, 1.7, 1.9 倍。MM-PBSA 法中 ΔG_{sol} 的计算将分别采用复合物体系中蛋白亚基介电常数的经验值(6.0)与表 2 中所列的计算值, 以便比较两种方法所得结合自由能的差别。

表 2 不同复合物中蛋白亚基分子的介电常数及标准差

Table 2 Dielectric constant for protein subunit in different complexes with standard deviation shown in the brackets

Protein complex	Dimer(P-H)	Dimer(H-H)	Pentamer	Hexamer
Dielectric constant	8.1(1.4)	7.4(1.3)	10.2(2.5)	11.4(2.4)

3.3 不同复合物结构中蛋白亚基间的结合自由能

为考察统计时间间隔的选取对计算结构的影响, 以五聚体内相邻的蛋白亚基 Chain A 和 Chain B 为例, 分别选定每 0.04, 0.2, 0.4 ns 计算一次结合自由能, 并将所得结合自由能各分量的平均值及标准差列于表 3。采用三种不同采样间隔计算得到的结合能及其各分量的数值基本一致, 表明该体系已达平衡态, 统计窗口的时间间隔对计算结果影响不大。为提高运算速度, 每 0.4 ns 统计一次结合自由能, 并取其平均值作为最终结果。

表 3 五聚体中 Chain A 和 Chain B 在不同采样时间间隔下所得结合自由能的均值及标准差

Table 3 Binding energy of Chain A and Chain B in pentamer using different sampling intervals with standard deviation shown inside the brackets

Times/ns	$\Delta G_{\text{vdw}}/(\text{kJ/mol})$	$\Delta G_{\text{elec}}/(\text{kJ/mol})$	$\Delta G_{\text{PB}}/(\text{kJ/mol})$	$\Delta G_{\text{np}}/(\text{kJ/mol})$	$\Delta G_{\text{bind}}/(\text{kJ/mol})$
0.04	-458.2(2.2)	80.2(0.7)	249.6(4.0)	-43.2(0.3)	-171.8(4.1)
0.2	-456.4(6.1)	80.8(2.2)	250.9(13.0)	-42.5(1.0)	-167.3(13.3)
0.4	-456.5(6.2)	80.7(2.3)	250.3(13.3)	-42.5(1.1)	-168.0(13.3)

表 4 蛋白的介电常数取经验值 6.0 时复合物内相邻亚基间的平均结合能

Table 4 Average binding energy between adjacent subunits in the complex when the protein dielectric constant is empirical 6.0

HBc-VLP	$\Delta G_{\text{vdw}}/(\text{kJ/mol})$	$\Delta G_{\text{elec}}/(\text{kJ/mol})$	$\Delta G_{\text{PB}}/(\text{kJ/mol})$	$\Delta G_{\text{np}}/(\text{kJ/mol})$	$\Delta G_{\text{bind}}/(\text{kJ/mol})$
Dimer(P-H)	-1146.0	185.4	794.4	-104.3	-270.5
Dimer(H-H)	-1097.8	160.6	767.5	-103.9	-273.6
Pentamer	-511.5	126.6	353.9	-48.8	-79.8
Hexamer	-577.3	196.4	384.0	-54.2	-51.1

蛋白亚基的介电常数取为经验值 6.0, 得到四种复合物的结合自由能见表 4。Dimer(P-H), Dimer(H-H), Pentamer, Hexamer 中相邻蛋白亚基间平均结合能依次为 -270.5, -273.6, -79.8, -51.1 kJ/mol, 即四种复合物中

蛋白亚基间的亲和性依次降低。从结合自由能的各分量对复合物稳定性的贡献来看, 四种复合物的 ΔG_{vdw} 和 ΔG_{np} 均为负值, 有利于蛋白亚基间的亲和作用, 从而维持复合物结构的稳定性, 而 ΔG_{elec} 和 ΔG_{PB} 则对该过程不

利。

将表 2 中蛋白亚基在四种复合物结构中的介电常数分别用 MM-PBSA 方法计算四种复合物内相邻蛋白亚基间的结合自由能。二聚体内相邻蛋白亚基间的结合自由能见表 5。Dimer(P-H)和 Dimer(H-H)的结合能分别为-418.9 和-302.6 kJ/mol, 表明两种形式的二聚体均比较稳定, 且前者比后者的稳定性更强。结合能分量 ΔG_{vdw} 和 ΔG_{np} 均为负值, 有利于亚基间的亲和作用, 其中 ΔG_{vdw} 分别为-1146.0 和-1097.8 kJ/mol, 表明 ΔG_{vdw} 对于维持二聚体的稳定性起主导作用。 ΔG_{elec} 分别为 137.5 和 130.5 kJ/mol, 表明真空下蛋白亚基分子间存在少许静电作用, 不利于亚基间的亲和作用; ΔG_{PB} 分别为 693.9 和 768.6 kJ/mol, 表明溶剂环境强化了静电斥力作用; Dimer(P-H)和 Dimer(H-H)的 ΔG_{elec} 和 ΔG_{PB} 之和分别占 ΔG_{vdw} 和 ΔG_{np} 之和的 66.5%和 74.8%, 对二聚体的稳定性起较大阻碍作用。当蛋白介电常数取经验值 6.0(表 4)时, Dimer(P-H)和 Dimer(H-H)的结合能分别为-270.5 和 -273.6 KJ/mol, 相差较小, 且两者的结合能分别占其相应计算值(表 5 中-418.9 和-302.6 KJ/mol)的 64.6%和 90.4%, 即采用此经验值会显著低估这两种二聚体结构的热力学稳定性且误判两种二聚体结构中亚基间的亲

和作用力强弱。与采用表 2 计算所得的介电常数相比, 表 4 中 Dimer(P-H)和 Dimer(H-H)的 ΔG_{elec} 分别增大了 47.9 和 30.1 kJ/mol, ΔG_{PB} 分别改变了 100.5 和-1.1 KJ/mol, 表明介电常数会显著改变真空环境中的极性能量项 ΔG_{elec} , 溶剂环境中的贡献项 ΔG_{PB} 也稍有影响, 其他项因不涉及电荷作用故不受影响。

五聚体内相邻蛋白亚基间的结合自由能数值列于表 6。五聚体内相邻亚基间的平均结合自由能为-188.6 kJ/mol, 结合能分量 $\Delta G_{\text{vdw}}=-511.5$ KJ/mol, 表明 ΔG_{vdw} 是维持五聚体稳定的主要因素。 $\Delta G_{\text{elec}}=74.5$ kJ/mol, 不利于亚基间的亲和作用, 而 $\Delta G_{\text{PB}}=297.2$ kJ/mol, 表明溶液环境进一步增强了蛋白亚基间的静电作用, 且从绝对值看, 二者之和占 ΔG_{vdw} 和 ΔG_{np} 之和的 66.3%, 不利于五聚体的稳定。如蛋白介电常数取经验值 6.0(表 4), ΔG_{elec} 和 ΔG_{PB} 比表 6 中相应结果分别提高了 52.1 和 56.7 kJ/mol, 会显著低估蛋白亚基间的平均结合自由能, 所得结果仅占计算值的 42.3%。目前尚无 HBc-VLPs 结合自由能的实验或计算的报道, Zhang 等^[61]使用 MM-PBSA 法计算得到 0.2 mol/L NaCl 的水溶液中的鼠多瘤病毒衣壳粒中的五聚体总结合能为-1113.5 kJ/mol, 与本工作中五聚体的总结合能-942.9 kJ/mol 接近。

表 5 二聚体内相邻蛋白亚基的结合能
Table 5 Binding energy of adjacent protein subunits in the dimer

Dimer	$\Delta G_{\text{vdw}}/(\text{kJ/mol})$	$\Delta G_{\text{elec}}/(\text{kJ/mol})$	$\Delta G_{\text{PB}}/(\text{kJ/mol})$	$\Delta G_{\text{np}}/(\text{kJ/mol})$	$\Delta G_{\text{bind}}/(\text{kJ/mol})$
Chain A-Chain B (P-H)	-1146.0(8.6)	137.5(4.5)	693.9(22.0)	-104.3(1.0)	-418.9(24.0)
Chain A-Chain B (H-H)	-1097.8(11.0)	130.5(4.4)	768.6(12.0)	-103.9(1.2)	-302.6(14.4)

表 6 五聚体内相邻蛋白亚基的结合能
Table 6 Binding energy of adjacent protein subunits in the pentamer

Pentamer	$\Delta G_{\text{vdw}}/(\text{kJ/mol})$	$\Delta G_{\text{elec}}/(\text{kJ/mol})$	$\Delta G_{\text{PB}}/(\text{kJ/mol})$	$\Delta G_{\text{np}}/(\text{kJ/mol})$	$\Delta G_{\text{bind}}/(\text{kJ/mol})$
Chain A-Chain B	-456.5(6.2)	80.7(2.3)	250.3(13.3)	-42.5(1.1)	-168.0(13.3)
Chain B-Chain C	-496.9(5.3)	88.2(3.4)	310.2(17.8)	-47.5(0.8)	-146.0(14.7)
Chain C-Chain D	-619.2(6.2)	69.5(1.9)	245.4(9.8)	-54.9(1.0)	-359.2(13.3)
Chain D-Chain E	-441.5(7.0)	61.5(2.2)	355.3(13.1)	-46.9(0.7)	-71.6(13.4)
Chain E-Chain A	-543.4(5.4)	72.4(2.4)	324.9(13.2)	-52.0(1.0)	-198.1(14.7)
Average	-511.5	74.5	297.2	-48.8	-188.6
Total	-2557.5	372.3	1486.1	-243.8	-942.9

六聚体内相邻蛋白亚基间的结合自由能见表 7。六聚体内相邻亚基间的平均结合自由能为-221.2 kJ/mol, 比五聚体更稳定。结合能分量 $\Delta G_{\text{vdw}}=-577.3$ kJ/mol, 表明 ΔG_{vdw} 是维持六聚体稳定的关键因素, ΔG_{elec} 和 ΔG_{PB} 分别为 103.4 和 306.8 kJ/mol, 且从绝对值看, 二者之和占 ΔG_{vdw} 和 ΔG_{np} 之和的 65.0%, 对亚基间的亲和作用不利。为验证复合物中形态一致的两个六聚体的自由能是否一致, 计算了复合物中的另外一个六聚体结构, 其亚基

间的平均结合自由能为-213.6 kJ/mol, 六聚体总结合自由能为-1281.8 kJ/mol, 两个六聚体间的总自由能差异仅为 3.4%。该数据表明, HBc-VLPs 中处于不同位置处的五聚体或六聚体, 其结合自由能基本相同。当蛋白介电常数取经验值 6.0(表 4), 则 ΔG_{elec} 和 ΔG_{PB} 分别提高了 93.0 和 77.2 kJ/mol, 蛋白亚基间的平均结合自由能仅占表 7 中计算结果的 23.1%, 该结果比 HBc-VLP 中的二聚体和五聚体相应差异更显著。由此可知, 忽略不同亚基复

合物中蛋白分子所处的局部环境,即忽略蛋白分子上静电分布及其动态结构对介电常数的影响,采用经验介电常数计算亚基间的结合能不准确。

表 7 六聚体内相邻蛋白亚基的结合能
Table 7 Binding energy of adjacent protein subunits in the hexamer

Hexamer	$\Delta G_{\text{vdw}}/(\text{kJ/mol})$	$\Delta G_{\text{elec}}/(\text{kJ/mol})$	$\Delta G_{\text{PB}}/(\text{kJ/mol})$	$\Delta G_{\text{np}}/(\text{kJ/mol})$	$\Delta G_{\text{bind}}/(\text{kJ/mol})$
Chain A–Chain B	−620.2(7.8)	84.8(2.6)	364.9(20.0)	−58.6(1.1)	−229.1(20.4)
Chain B–Chain C	−608.0(4.9)	94.7(1.5)	277.4(10.1)	−56.6(0.7)	−292.5(11.7)
Chain C–Chain D	−535.7(7.2)	154.9(2.3)	205.2(11.5)	−49.1(0.9)	−224.7(10.4)
Chain D–Chain E	−547.2(7.2)	67.0(2.5)	375.8(15.9)	−55.6(0.9)	−160.0(16.7)
Chain E–Chain F	−621.0(9.7)	84.8(2.7)	288.9(14.9)	−55.8(0.6)	−303.1(15.7)
Chain F–Chain A	−531.4(11.0)	134.0(2.2)	328.8(18.3)	−49.4(1.5)	−118.0(16.9)
Average	−577.3	103.4	306.8	−54.2	−221.2
Total	−3463.5	620.2	1841.0	−325.1	−1327.4

复合物中相邻蛋白亚基间的亲和作用最弱的为 Pentamer, 而 Hexamer, Dimer(H-H), Dimer(P-H)三种复合物亚基间的平均结合能分别为 Pentamer 亚基间平均结合能的 1.2, 1.6, 2.2 倍, 同时各个复合物 ΔG_{vdw} 的强弱依次对应于各个复合物中亚基亲和性的强弱, 表明 ΔG_{vdw} 对于维持复合物的稳定性起主导作用。四种复合物中亚基间结合能的分量 ΔG_{elec} (74.5, 103.4, 130.5, 137.5 kJ/mol)均为正值且数值较小, 表明真空环境下蛋白亚基分子间存在少许静电作用, 会减弱相邻蛋白亚基间的亲和作用, 但对整体稳定性的影响较小。Pentamer 和 Hexamer 中 ΔG_{PB} 分别为 297.2 和 306.8 kJ/mol, 而 Dimer(P-H)和 Dimer(H-H)中 ΔG_{PB} 分别达到了 693.9 和 768.6 kJ/mol, 表明溶剂环境强化了亚基上带电原子的极性作用, 从而对多聚体自组装产生阻碍。相对于五聚体和六聚体, 二聚体复合物中的蛋白亚基有更多带电原子暴露于最外层, 因此 ΔG_{PB} 数值更大。溶剂化能中的疏水作用贡献 ΔG_{np} 与真空中的分子势力贡献 ΔG_{vdw} 呈现相同的规律, 即 Dimer(P-H)和 Dimer(H-H)体系中的 ΔG_{vdw} 数值(−104.3 和 −103.9 kJ/mol)相近, Pentamer 和 Hexamer 的 ΔG_{vdw} 数值(−48.8 和 −54.2 kJ/mol)相近, 且前者约为后者的两倍。

图 5 为 Dimer(P-H), Dimer(H-H), Pentamer 和 Hexamer 四个复合物体系中, 不同蛋白亚基分子间的结合自由能总和及其四个能量分项的贡献。Pentamer 和 Hexamer 中, 所有蛋白亚基分子间的结合自由能总和分别为−942.9 和−1327.4 kJ/mol, 表明六聚体比五聚体更能显著降低体系自由能; Dimer(P-H)和 Dimer(H-H)的 ΔG_{bind} 表明, 相邻的一个五聚体和一个六聚体通过各自贡献一个亚基形成二聚体的形式自组装为更大的复合物, 或邻近的两个六聚体形成类似结构的复合物, 二者虽然均可显著降低体系自由能, 但前者形成的二聚体结合能比后者低 116.3 kJ/mol, 即前者结构更稳定。从结合

自由能的四个分量上看, ΔG_{vdw} 和 ΔG_{np} 均为负值, 即范德华作用和非极性溶剂作用是导致复合物结构稳定的主要因素, 且前者贡献尤其显著; ΔG_{elec} 和 ΔG_{PB} 均为正值, 即荷电原子间及其同溶剂间的作用会导致体系失稳, 且 ΔG_{PB} 贡献较大。总体上, 二聚体、五聚体和六聚体蛋白亚基间非极性作用依次增强的同时, 总结合能依次增强, 表明蛋白亚基的疏水性作用对维持蛋白亚基的稳定性有明显的积极作用。因此, 对 HBc-VLPs 的刺突结构实施外接抗原等免疫改造时, 应尽量保持此片段的疏水性, 且需考虑外接抗原片段自身所带电荷对 ΔG_{PB} 的影响, 以减小其对 VLPs 稳定性的影响^[3]。

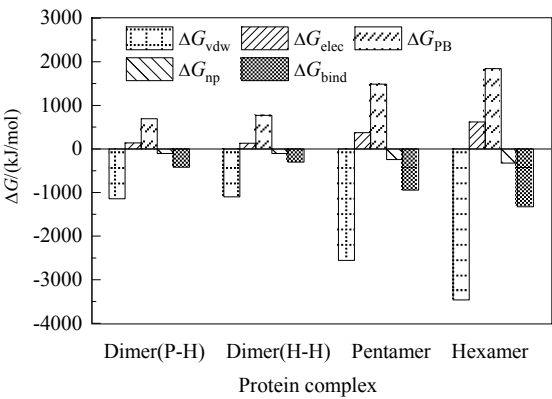


图 5 四种复合物的结合自由能及能量分量
Fig.5 Binding free energies and the respective components for the four protein complexes

根据上述数据及分析可推断多个蛋白亚基分子自组装为 HBc-VLPs 的自组装步骤: 多个亚基分子间相互作用, 极易在空间中形成多个六聚体或五聚体; 相邻两个多聚体在布朗运动驱动下相互靠近时, 两个六聚体之间或五聚体同六聚体之间通过每个多聚体贡献一个蛋白亚基的形式迅速形成二聚体, 从而将两个多聚体形成一个更大的复合物, 以此方式进一步建立热力学更稳定

的结构;该笼状结构不断拓展,逐步形成极为稳定的正二十面体的HBc-VLPs结构。

4 结 论

通过分子动力学模拟,采用MM-PBSA方法,计算了HBc-VLP中二聚体、五聚体和六聚体中相邻蛋白亚基的结合自由能,以此判断结构稳定性,得到如下结论:

(1) 针对蛋白质的介电常数,摒弃以往研究中直接使用经验参数的做法,综合考虑了溶剂及蛋白亚基聚集状态的影响,分别计算两个六聚体之间或五聚体同六聚体之间形成的二聚体、五聚体、六聚体四种复合物中蛋白亚基的介电常数,分别为7.4, 8.1, 10.2, 11.4,用于MM-PBSA方法中计算结合自由能。采用介电常数经验值6.0计算的四种复合物中蛋白亚基的结合自由能分别为本工作的90.4%, 64.6%, 42.3%, 23.1%。采用介电常数经验值获得的亚基间结合自由能因没有考虑蛋白分子在局部环境中呈现的电荷分布及静电作用,结果准确性不高。

(2) 根据不同复合物中相邻蛋白亚基间的结合自由能,HBc-VLPs中五聚体的稳定性最弱,六聚体、两个六聚体之间或五聚体与六聚体之间形成的二聚体亚基间的结合自由能分别为五聚体亚基间结合自由能的1.2, 1.6, 2.2倍。相邻两个多聚体之间形成的二聚体亚基间的亲和力明显强于多聚体内部亚基间的亲和力,这有助于蛋白亚基在自组装过程中以多聚体为组成单元,进一步形成结构更加稳定的HBc-VLPs的球面结构。

(3) 结合自由能的能量分解表明,蛋白亚基分子内的范德华作用能和非极性溶剂化能为负值,有利于促进相邻蛋白亚基间的亲和作用进而维持复合物的稳定,且范德华能对体系稳定性占据主导作用;而蛋白亚基分子内的静电作用和极性溶剂化作用为正值,会减弱蛋白亚基间的亲和作用;且从绝对值看,模拟的HBc-VLP中的四种不同复合物结构,后者之和占前者之和的65.0%~74.8%。

(4) 对HBc-VLPs实施蛋白质改造时,应将改造位点聚焦在二聚体的复合物结构,主要考察蛋白亚基所含原子之间的范德华相互作用和其在溶剂中呈现的疏水性作用,以此评估HBc-VLPs为载体的候选疫苗的稳定性。

参考文献

[1] Stehle T, Yan Y W, Benjamin T L, et al. Structure of murine polyomavirus complexed with an oligosaccharide receptor fragment [J]. *Nature*, 1994, 369(6476): 160–163.
[2] Frey S, Castro A, Arsiwala A, et al. Bionanotechnology for vaccine

design [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2018, 52: 80–88.
[3] Li Z J, Wei J X, Yang Y L, et al. Strong hydrophobicity enables efficient purification of HBc-VLPs displaying various antigen epitopes through hydrophobic interaction chromatography [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2018, 140: 157–167.
[4] Chen Y, Zhang Y, Quan C, et al. Aggregation and antigenicity of virus like particle in salt solution—a case study with hepatitis B surface antigen [J]. *Vaccine*, 2015, 33(35): 4300–4306.
[5] Brown F, Cartwright B. Dissociation of foot-and-mouth disease virus into its nucleic acid and protein components [J]. *Nature*, 1961, 192(4808): 1163–1164.
[6] Ge J P, Zhao J W, Zhang L Y, et al. Construction and analysis of high-ethanol-producing fusants with co-fermentation ability through protoplast fusion and double labeling technology [J]. *Plos One*, 2014, 9(9): e108311.
[7] Kissmann J, Ausar S F, Foubert T R, et al. Physical stabilization of norwalk virus-like particles [J]. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2010, 97(10): 4208–4218.
[8] Meirovitch H. Recent developments in methodologies for calculating the entropy and free energy of biological systems by computer simulation [J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2007, 17(2): 181–186.
[9] Kollman P. Free energy calculations: applications to chemical and biochemical phenomena [J]. *Chemical Reviews*, 1993, 93(7): 2395–2417.
[10] Wang W, Wang J, Kollman P A. What determines the van der Waals coefficient β in the LIE method to estimate binding free energies from MD simulations? [J]. *Proteins Structure Function and Bioinformatics*, 1999, 34(3): 395–402.
[11] Homeyer N, Gohlke H. Free energy calculations by the molecular mechanics Poisson-Boltzmann surface area method [J]. *Molecular Informatics*, 2012, 31(2): 114–122.
[12] Hou T J, Wang J M, Li Y Y, et al. Assessing the performance of the molecular mechanics/Poisson Boltzmann surface area and molecular mechanics/generalized Born surface area methods. II. the accuracy of ranking poses generated from docking [J]. *Journal of Computational Chemistry*, 2011, 32(5): 866–877.
[13] Xu L, Sun H Y, Li Y Y, et al. Assessing the performance of MM/PBSA and MM/GBSA methods. 3. the impact of force fields and ligand charge models [J]. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2013, 117(28): 8408–8421.
[14] Kumari R, Kumar R, Lynn A. g_mmpbsa—a GROMACS tool for high-throughput MM-PBSA calculations [J]. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2014, 54(7): 1951–1962.
[15] Wang W, Kollman P A. Free energy calculations on dimer stability of the HIV protease using molecular dynamics and a continuum solvent model [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2000, 303(4): 567–582.
[16] Simonson T, Brooks C L. Charge screening and the dielectric constant of proteins: insights from molecular dynamics [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1996, 118(35): 8452–8458.
[17] Pitera J W, Faltus M, Gunsteren W F V. Dielectric properties of proteins from simulation: the effects of solvent, ligands, pH, and temperature [J]. *Biophysical Journal*, 2001, 80(6): 2546–2555.
[18] Ahmed J, Ramaswamy H S, Raghavan G S V, et al. Dielectric properties of soybean protein isolate dispersions as a function of concentration, temperature and pH [J]. *Lwt-Food Science and*

- Technology, 2008, 41(1): 71–81.
- [19] Massova I, Kollman P A. Computational alanine scanning to probe protein–protein interactions: a novel approach to evaluate binding free energies [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1999, 121(36): 8133–8143.
- [20] Zhang L, Tang R H, Bai S, et al. Molecular energetics in the capsomere of virus-like particle revealed by molecular dynamics simulations [J]. *Journal of Physical Chemistry B*, 2013, 117(18): 5411–5421.
- [21] Archontis G, Simonson T. Proton binding to proteins: a free-energy component analysis using a dielectric continuum model [J]. *Biophysical Journal*, 2005, 88(6): 3888–3904.
- [22] Genheden S, Ryde U. The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities [J]. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 2015, 10(5): 449–461.
- [23] Branden C, Tooze J. *Introduction to protein structure* [M]. New York: Garland Publishing, 1991: 302.
- [24] Schödel F, Peterson D, Hughes J, et al. Hybrid hepatitis B virus core antigen as a vaccine carrier moiety: I. presentation of foreign epitopes [J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1996, 44(1/2/3): 91–96.
- [25] Takamura S, Niikura M, Li T C, et al. DNA vaccine-encapsulated virus-like particles derived from an orally transmissible virus stimulate mucosal and systemic immune responses by oral administration [J]. *Gene Therapy*, 2004, 11(7): 628–635.
- [26] Yu X K, Jin L, Jih J, et al. 3.5 Å cryoEM structure of hepatitis B virus core assembled from full-length core protein [J]. *Plos One*, 2013, 8(9): e69729.
- [27] Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD: visual molecular dynamics [J]. *Journal of Molecular Graphics*, 1996, 14(1): 33–38.
- [28] Van Der Spoel D, Lindahl E, Hess B, et al. GROMACS: fast, flexible, and free [J]. *Journal of Computational Chemistry*, 2005, 26(16): 1701–1718.
- [29] Billeter S, Eising A A, Hünenberger P, et al. *Biomolecular simulation: the GROMOS96 manual and user guide* [M]. Zurich: Vdf Hochschulverlag AG, 1996: 1042.
- [30] Darden T, York D, Pedersen L. Particle mesh ewald: an $Mog(N)$ method for Ewald sums in large systems [J]. *The Journal of Chemical Physics*, 1993, 98(12): 10089–10092.
- [31] Hess B, Bekker H, Berendsen H J C, et al. LINCS: a linear constraint solver for molecular simulations [J]. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 1997, 18(12): 1463–1472.
- [32] Berendsen H, Grigera J, Straatsma T. The missing term in effective pair potentials [J]. *Journal of Physical Chemistry*, 1987, 91(24): 6269–6271.
- [33] Miyamoto S, Kollman P A. Settle: an analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithm for rigid water models [J]. *Journal of Computational Chemistry*, 1992, 13(8): 952–962.
- [34] Bussi G, Donadio D, Parrinello M. Canonical sampling through velocity rescaling [J]. *The Journal of Chemical Physics*, 2007, 126(1): 014101.
- [35] Okumura H, Itoh S G, Okamoto Y. Explicit symplectic integrators of molecular dynamics algorithms for rigid–body molecules in the canonical, isobaric-isothermal, and related ensembles [J]. *The Journal of Chemical Physics*, 2007, 126(8): 084103.
- [36] Xu J, Wang X W, He X F, et al. Application of the Mole-8.5 supercomputer: probing the whole influenza virion at the atomic level [J]. *Chinese Science Bulletin*, 2011, 56(20): 2114–2118.
- [37] Xiong Q G, Li B, Zhou G F, et al. Large-scale DNS of gas–solid flows on Mole-8.5 [J]. *Chemical Engineering Science*, 2012, 71(71): 422–430.
- [38] Neumann M. Dipole moment fluctuation formulas in computer simulations of polar systems [J]. *Molecular Physics*, 1983, 50(4): 841–858.
- [39] Heinz T N, Gunsteren W F V, Hünenberger P H. Comparison of four methods to compute the dielectric permittivity of liquids from molecular dynamics simulations [J]. *The Journal of Chemical Physics*, 2001, 115(3): 1125–1136.
- [40] Zasetsky A Y, Svishchev I M. Dielectric response of concentrated NaCl aqueous solutions: molecular dynamics simulations [J]. *The Journal of Chemical Physics*, 2001, 115(3): 1448.
- [41] Raabe G, Sadus R J. Molecular dynamics simulation of the dielectric constant of water: the effect of bond flexibility [J]. *The Journal of Chemical Physics*, 2011, 134(23): 234501.
- [42] Rusche E W, Good W B. Search for discontinuities in the temperature dependence of the dielectric constant of pure water from -5° to $+25^{\circ}\text{C}$ [J]. *The Journal of Chemical Physics*, 1966, 45(12): 4667–4669.
- [43] Hornak V, Abel R, Okur A, et al. Comparison of multiple Amber force fields and development of improved protein backbone parameters [J]. *Proteins Structure Function and Bioinformatics*, 2006, 65(3): 712–725.
- [44] Lindorff-Larsen K, Piana S, Palmo K, et al. Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field [J]. *Proteins-structure Function and Bioinformatics*, 2010, 78(8): 1950–1958.
- [45] Wang J M, Wolf R M, Caldwell J W, et al. Development and testing of a general amber force field [J]. *Journal of Computational Chemistry*, 2004, 25(9): 1157–1174.
- [46] Zhao S L, Liu Y, Chen X Q, et al. Unified framework of multiscale density functional theories and its recent applications [J]. *Advances in Chemical Engineering*, 2015, (47): 1–83.
- [47] Yoshida N, Phongphanphane S, Hirata F. Selective ion binding by protein probed with the statistical mechanical integral equation theory [J]. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2007, 111(17): 4588–4595.
- [48] Gallant R A, Ames L. *Exploring chemistry* [M]. London: Doubleday, 1958: 142.
- [49] Baker N A, Sept D, Joseph S, et al. Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001, 98(18): 10037–10041.
- [50] Srinivasan J, Cheatham T E, Cieplak P, et al. Continuum solvent studies of the stability of DNA, RNA, and phosphoramidate–DNA helices [J]. 1998, 120(37): 9401–9409.
- [51] Honig B, Nicholls A. Classical electrostatics in biology and chemistry [J]. *Science*, 1995, 268(5214): 1144–1149.
- [52] Vlasy V. Ionic effects beyond Poisson-Boltzmann theory [J]. *Annual Review of Physical Chemistry*, 1999, 50(1): 145–165.
- [53] Hückel E. *Zur theorie der elektrolyte* [M]. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 1924: 76.
- [54] Lebowitz J L, Helfand E, Praestgaard E. Scaled particle theory of fluid mixtures [J]. *The Journal of Chemical Physics*, 1965, 43(3): 774–779.
- [55] Dong W, Chen W, Zhao S L, et al. Scaled particle theory for

- multicomponent hard sphere fluids confined in random porous media [J]. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2016, 120: 5491–5504.
- [56] Gohlke H, Kiel C, Case D A. Insights into protein–protein binding by binding free energy calculation and free energy decomposition for the Ras–Raf and Ras–RalGDS complexes [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2003, 330(4): 891–913.
- [57] Still W C, Tempczyk A, Hawley R C, et al. Semianalytical treatment of solvation for molecular mechanics and dynamics [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1990, 112(16): 6127–6129.
- [58] Sitkoff D, Sharp K A, Honig B. Accurate calculation of hydration free energies using macroscopic solvent models [J]. *Journal of Physical Chemistry B*, 1994, 98(7): 1978–1988.
- [59] Pronk S, Páll S, Schulz R, et al. GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit [J]. *Bioinformatics*, 2013, 29(7): 845–854.
- [60] Phillips J C, Braun R, Wang W, et al. Scalable molecular dynamics with NAMD [J]. *Journal of Computational Chemistry*, 2005, 26(16): 1781–1802.
- [61] Zhang L, Tang R H, Bai S, et al. Energetic changes caused by antigenic module insertion in a virus-like particle revealed by experiment and molecular dynamics simulations [J]. *Plos One*, 2014, 9(9): e107313.