

DOI:10.13350/j.cjpb.220108

• 论著 •

# 乙肝病毒核心蛋白序列特征的生物信息学分析<sup>\*</sup>

郝锐<sup>1</sup>, 刘仟仟<sup>1</sup>, 王璐<sup>1</sup>, 陆合<sup>1</sup>, 胡源<sup>2</sup>, 胡接力<sup>2</sup>, 黄爱龙<sup>2</sup>, 涂增<sup>1,2,\*</sup>

(1. 重庆医科大学基础医学院病原生物学教研室, 重庆 400016; 2. 重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室)

**【摘要】** 目的 乙型肝炎病毒 C 基因编码的核心(HBc)蛋白抗原性强,也与持续性病毒感染有关。采用生物信息学方法分析 HBc 蛋白的结构和序列特征,有助于 HBc 蛋白的优化表达和纯化,并为乙肝患者的治疗以及疫苗的研制提供参考。方法 乙肝病毒 HBc 序列的获取来源于 NCBI 网站 GenBank 数据库。运用 Prot-Param 和 ProtScale 工具在线预测乙肝病毒 HBc 的理化性质及其亲疏水性;通过在线软件 SignalP 4.0 Server 和 TMHMM 分别分析该序列的信号肽特征,跨膜区域及磷酸化位点;利用 SOPMA 和 SWISS-MODEL 全自动在线软件预测其二级结构和三级结构模型;利用 IEDB Analysis Resource, ABCpred 和 SYFPEITHI HLA-A \* 02:01 预测该蛋白抗原表位,利用 Venny2.1.0 工具筛选该蛋白最佳表位形成位置等。结果 HBc 蛋白由 212 个氨基酸组成,分子式为 C<sub>1086</sub> H<sub>1710</sub> N<sub>314</sub> O<sub>300</sub> S<sub>12</sub>, 分子质量单位为 24.35017 ku, 理论等电点为 9.49。为不稳定亲水性蛋白质。该蛋白质具有信号肽,没有跨膜区域,具有 40 个潜在的磷酸化位点。预测其主要二级结构为 α 螺旋和无规卷曲,含量分别 36.32% 和 41.04%。结合 HBc 蛋白序列的 T、B 细胞表面抗原、表面可及性、β 转角、线性表位的预测结果,发现 HBc 蛋白具有 T、B 细胞抗原表位,并且存在 4 个潜在的优势抗原决定簇区域,分别为 37-38、110、158-164、180-208 位氨基酸。结论 生物信息学方法预测 HBc 蛋白存在潜在的抗原表位区域,具有多个磷酸化位点。这有利于疫苗的研发与制备。

**【关键词】** 生物信息学;乙肝病毒核心蛋白;序列分析

**【中图分类号】** R373.21

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1673-5234(2022)01-0031-06

[Journal of Pathogen Biology. 2022 Jan;17(1):31-36, 42.]

## Sequence characterization of core protein in hepatitis B virus

HAO Rui<sup>1</sup>, LIU Qian-qian<sup>1</sup>, WANG Lu<sup>1</sup>, LU He<sup>1</sup>, HU Yuan<sup>2</sup>, HU Jie-li<sup>2</sup>, HUANG Ai-long<sup>2</sup>, TU Zeng<sup>1,2</sup> (1. Department of Pathogenic Biology, Basic Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 2. Key Laboratory of Chongqing Medical University Infectious Disease Molecular Biology) <sup>\*\*\*</sup>

**【Abstract】** **Objective** The core (HBc) protein encoded by the hepatitis B virus C gene has strong antigenicity and is also related to persistent viral infection. Bioinformatics methods were used to analyze the structure and sequence characteristics of HBc protein. It is helpful for the optimal expression and purification of HBc protein, provides reference for the treatment of hepatitis B patients, and the development of vaccines. **Methods** Get the sequence of hepatitis B virus HBc from the Genbank database in the NCBI website. We have predicted the physicochemical properties and hydrophobicity of hepatitis B virus HBc using the online tools Prot-Param and ProtScale, and analyzed the signal peptide properties, transmembrane region, and phosphorylation sites of the sequence using the online software SignalP 4.0 Server and TMHMM, respectively. To predict the secondary structure and the three-level structure model, SOPMA and Swiss-Model fully automatic online software were used. IEDB Analysis Resource, ABCpred, and SYFPEITHI HLA-A \* 02:01 were used to predict the epitope, and the Venny 2.1.0 tool was used to screen the best epitope formation position of the protein. **Results**

HBc protein is composed of 212 amino acids, its molecular formula is C<sub>1086</sub> H<sub>1710</sub> N<sub>314</sub> O<sub>300</sub> S<sub>12</sub>, its molecular mass unit is 24.35017 ku, and its theoretical isoelectric point is 9.49. It is an instabile hydrophilic protein. This protein has a signal peptide, no transmembrane region, and 40 phosphorylation sites. It is predicted that its main secondary structure is an alpha-helix and random coil, the contents of which are 36.32% and 41.04%, respectively. According to the predictions of T and B cell surface antigens, surface accessibility, the β-turn, and linear epitope combined with the HBc protein sequence, it is found that HBc has T and B cell epitopes, and there are 4 potential epitope regions, respectively, 37-38, 110, 158-164, 180-208 amino acids. **Conclusion** HBc has multiple phosphorylation sites in the epitope region, which makes it a good candidate for vaccine development and preparation. Bioinformatics methods confirm this finding.

**【Key words】** bioinformatics; hepatitis B virus core protein; sequence analysis

\* **【基金项目】** 重庆市科技局自然科学基金面上项目 (No. cstc2021jcyj-msxmX0158); 国家自然科学基金青年科学基金项目 (No. 81501751); 重庆市博士后科学基金项目 (No. Xm2014006)。

\*\* **【通讯作者】** 涂增, E-mail: tuz1980@126.com; tuzeng@cqmu.edu.cn

**【作者简介】** 郝锐 (1996-), 女, 湖南常德人, 在读研究生, 主要从事肝炎病毒和细菌的相关研究。E-mail: 1031689600@qq.com

乙型肝炎病毒(Hepatitis B virus, HBV)是一个仅有3.2kb长的双链DNA病毒。HBV感染会引起乙型肝炎,并逐渐引起肝硬化,严重时甚至发展成肝癌<sup>[1-2]</sup>。目前,干扰素<sup>[3]</sup>和核苷类似物<sup>[4-5]</sup>等HBV治疗药物只能发挥抗病毒作用,并不能彻底清除HBV,而且大多患者经过长期治疗后会产生耐药性<sup>[6-7]</sup>。因此,新的治疗方法的研究和探索尤为重要。

HBV核衣壳由前C/C(preC/C)基因编码的衣壳蛋白和松弛环状DNA(relaxed circular DNA, rcDNA)及逆转录酶等组成。HBV的病毒复制过程有从RNA转变成DNA的逆转录阶段,因其逆转录酶缺乏校正功能,病毒常会HBV各个基因上发生变异<sup>[8]</sup>。前C/C(preC/C)基因变异是常见变异之一,且与病毒持续性感染和临床病程相关<sup>[9]</sup>。PreC/C基因具有重叠的开放阅读框(ORF),起始密码子不同,分别编码HBV的衣壳蛋白HBeAg<sup>[10]</sup>和HBcAg<sup>[11]</sup>。HBeAg可诱导免疫耐受从而促进病毒的持久性,血清中HBeAg阳性常常与病人体内病毒活跃复制和高感染性密切相关<sup>[12-13]</sup>。HBcAg是核衣壳的主要组成成分<sup>[11]</sup>,在病毒颗粒的组装、成熟、诱导细胞免疫反应,以及肝炎甚或肝癌的发生发展都有重要作用。另外,HBcAg容易发生变异,这些变异多发生在T或B淋巴细胞抗原识别位点,也会影响核心颗粒组装和病毒粒子成熟。同时,HBcAg可高效包装,也能提高抗原表位的免疫原性<sup>[14-15]</sup>,因此可以作为载体承载其他抗原做疫苗。

鉴于HBc如此多的功能,了解HBc蛋白的结构以及预测其抗原表位有效区域至关重要。本研究应用生物信息学方法预测分析HBc蛋白的结构组成和抗原表位,为乙肝的治疗和疫苗研制提供参考。

## 材料及方法

### 1 材料

乙肝病毒C基因编码蛋白的氨基酸序列从NCBI网站中的GenBank数据库中获取(检索号:BAC57444.1)。

### 2 方法

**2.1 蛋白质的理化性质分析** 利用蛋白质分析工具ExPasy中的Prot-param(<https://web.expasy.org/protparam/>)和ProtScale(<https://web.expasy.org/protscale/>),输入HBc蛋白序列,计算序列的基本理化性质,包括氨基酸组成,理论等电点,稳定性,半衰期及亲疏水性等。

**2.2 蛋白质的信号肽特征,跨膜区及磷酸化位点的预测与分析** 利用SignalP 4.0 Server工具(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)在线分析HBc

蛋白的信号肽特征;利用TMHMM Server v. 2.0分析网站(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)和NetPhos 3.1 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)在线工具分别对HBc的跨膜区及磷酸化位点进行预测。

**2.3 蛋白质二级结构及三级结构预测及建模** 在SOPMA工具([https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa\\_sopma.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html))上输入HBc序列,分析和预测其二级结构;利用SWISS-MODEL(<https://swissmodel.expasy.org/>)在线工具预测HBc蛋白的三级结构模型。

**2.4 蛋白质的T与B抗原表位预测分析** 运用ABCpred(<https://webs.iitd.edu.in/raghava/abcpred/>)和SYFPEITHI HLA-A \* 02:01(<http://www.syfpeithi.de/>)软件分别预测HBc的T与B抗原表位,利用IEDB Analysis Resource软件(<http://tools.immuneepitope.org/bcell/>)预测HBc的B抗原表位表面可及性、 $\beta$ 转角及线性表位,并将上述各预测的数值进行可视化分析。利用Venny2.1.2.0软件综合分析最佳抗原表位形成位置。

## 结果

### 1 HBc的理化性质及其亲疏水性

HBc蛋白由212个氨基酸组成,分子质量单位为24.35017 ku,原子总数为3422,分子式为 $C_{1086}H_{1710}N_{314}O_{300}S_{12}$ ,理论等电点9.49。HBc蛋白的亮氨酸(Leu)、精氨酸(Arg)、丝氨酸(Ser)、脯氨酸(Pro)占氨基酸总数的含量占比较高(图1)。HBc蛋白带负电荷天冬氨酸+谷氨酸(Asp+Glu)的残基总数为18,带正电荷精氨酸+赖氨酸(Arg+Lys)的残基总数为27。当所有半胱氨酸(Cys)残基对形成胱氨酸时,HBc的消光系数为40950。HBc蛋白的脂肪系数是85.52,不稳定系数是88.70,为不稳定蛋白。HBc序列的N端为M(Met),预测HBc蛋白的半衰期发现其在体外的哺乳动物网状细胞内是30 h。HBc的亲水性总平均值(GRAVY)为-0.210,可能为亲水蛋白质(图2)。

### 2 HBc的信号肽、跨膜区及磷酸化位点

蛋白质信号肽是一段出现在多肽链N端氨基酸序列,对于蛋白质跨膜转运起着关键作用<sup>[16]</sup>。通过SignalP 4.0 Server预测HBc的S分值最大为0.838,而信号肽的阈值仅为0.488,超过阈值0.35。另外,S分值与阈值线的交点处蛋白的剪切部位在19-20氨基酸位点处(图3),提示HBc存在信号肽,可能为分泌性蛋白。预测HBc蛋白的跨膜区,结果如图4。图中的蓝色,紫色,红色线条分别代表在细胞膜内,细胞膜

外和跨膜区。预测图结果表明 HBc 蛋白序列无跨膜区结构。

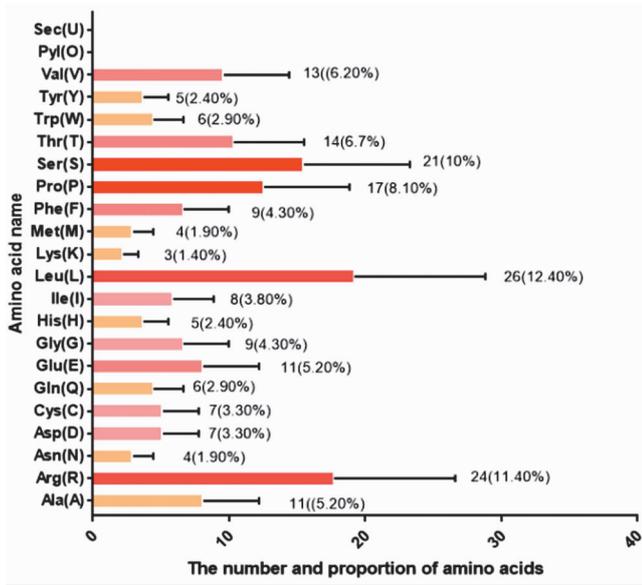


图 1 HBc 中的氨基酸含量  
Fig. 1 Content of each amino acid in HBc  
ProtScale output for user\_sequence

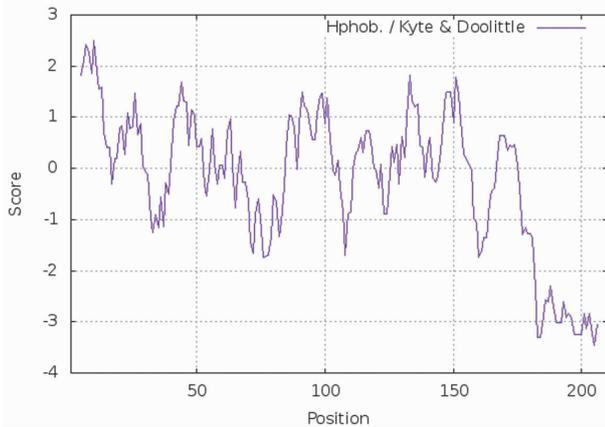


图 2 HBc 疏水性预测结果  
Fig. 2 Hydrophobicity prediction results for HBc  
SignalP-4.0 prediction (euk networks): BAC57444.1

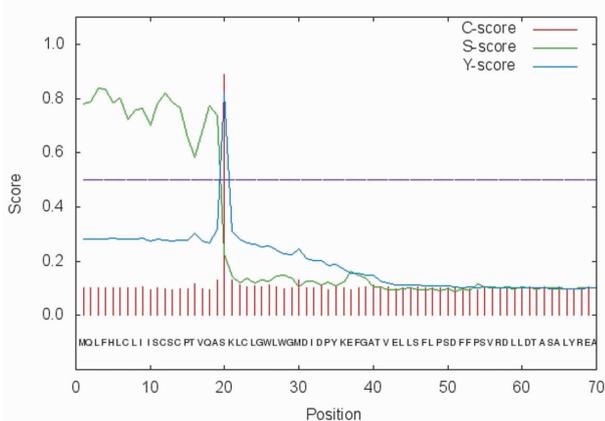


图 3 HBc 信号肽预测结果  
Fig. 3 Signal peptide prediction results for HBc

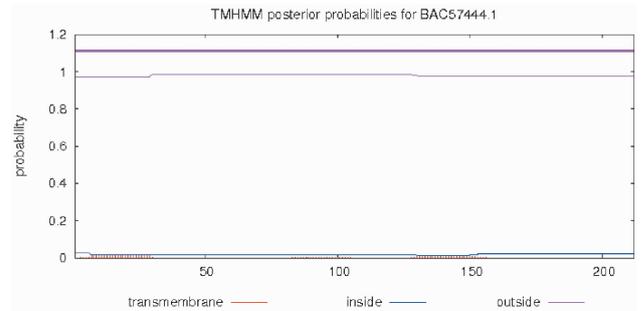


图 4 HBc 跨膜区预测结果  
Fig. 4 Transmembrane region prediction results of HBc

磷酸化修饰是蛋白质常见的翻译后修饰之一,参与许多生物过程的发生发展,其失调与各种疾病相关<sup>[17-18]</sup>。引用 NetPhos 3.1 Server 工具预测 HBc 蛋白存在 40 个潜在的磷酸化位点,分别为 14 个苏氨酸磷酸化位点,21 个丝氨酸磷酸化位点,5 个酪氨酸磷酸化位点(图 5)。

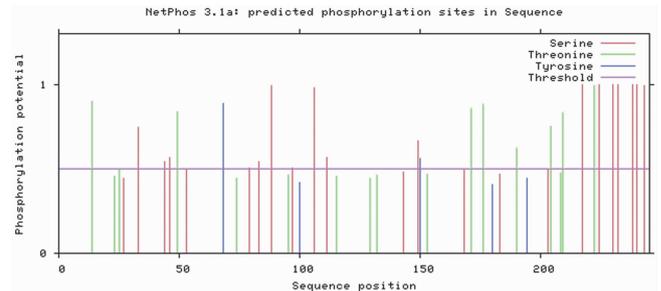


图 5 HBc 的磷酸化位点预测结果  
Fig. 5 Phosphorylation site prediction results of HBc

### 3 HBc 的二级结构预测与三级结构同源性建模分析

蛋白质二级结构对生物学功能的影响较大,与抗原表位分布密切相关<sup>[19]</sup>。HBc 的二级结构预测见图 6 和图 7,预测 HBc 有 77 处  $\alpha$  螺旋,约占 36.32%;38 处  $\beta$  折叠,约占 17.92%;10 处  $\beta$  转角,约占 4.72%;87 处无规则卷曲,约占 41.04%。图 7 中的蓝色,红色,绿色,紫色分别代表  $\alpha$  螺旋, $\beta$  折叠, $\beta$  转角和无规则卷曲。利用软件 SWISS-MODEL 对 HBc 进行三级结构预测建模,结果如图 8,为 HBc 的最优建模,其评价指标 QMQE(全球模型质量评估)和 QMEAN 得分分别为 0.51 和 0.77,该模型质量良好。

### 4 HBc 最佳抗原表位位置的预测

利用 ABCpred 在线软件预测 HBc 蛋白的 B 细胞抗原表位,结果如表 1。该蛋白存在 24 个 B 细胞抗原表位(临界阈值标准为 0.5);通过 SYFPEITHI 在线软件预测时得到 10 个 HLA-A \* 02:01 限制性 CD8<sup>+</sup> 细胞毒性 T 淋巴细胞表位(阈值为 20)(图 2)。

表 1 HBc 的 B 细胞抗原表位预测  
Table 1 B cell epitope prediction of HBc

等级 Rank	序列 Sequence	开始的氨基酸位置 Start position	得分 Score
1	GVWIRTPPAYRPPNAP	181-196	0.96
2	STLPETTIVRRRGRSP	199-214	0.92
3	SALYREALESPHCSP	93-108	0.9
3	GWLWGMIDIDPYKEFGA	54-69	0.9
3	LCLIISCSCPTVQASK	35-50	0.9
4	REANDEANTIGENHEP	4-19	0.88
4	HCSPHHTALRQAILCW	105-120	0.88
5	PPAYRPPNAPILSTLP	187-202	0.87
6	SPRRRTSPRRRRSQS	213-228	0.84
6	TALRQAILCWGELMTL	111-126	0.84
7	RRRSQSPRRRRSQSRE	223-238	0.83
8	TVIEYLVSFVWIRTP	172-187	0.82
9	GVNLEDPASRDVVSYS	131-146	0.78
10	ISVIRSMQLFHLCLII	24-39	0.77
10	TVVRRRGRSPRRRTPS	205-220	0.77
11	YVNTNMGLKFRQLLWF	146-161	0.76
12	LPSDFFPSVRDLDDTA	77-92	0.74
12	WFHISCLTFGRETIVIE	160-175	0.74
13	ELMTLATWVGVNLEDP	122-137	0.73
14	EPATITISVIRSMQLF	18-33	0.7
14	ANTIGENHEPATITIS	10-25	0.7
15	PNAPILSTLPETTIVR	193-208	0.64
16	GLKFRQLLWFHISCLT	152-167	0.59
17	IDPYKEFGATVELLSF	61-76	0.52

表 2 HBc 的 T 细胞抗原表位预测  
Table 2 T cell epitope prediction of HBc

等级 Rank	序列 Sequence	开始的氨基酸位置 Start position	得分 Score
1	LLWFHISCL	129	26
2	IISCSCPTV	9	23
2	ATVELLSFL	40	23
2	DLLDTASAL	58	23
2	YLVSFVWVI	147	23
3	CLTFGRETIV	136	22
3	STLPETTIVV	170	22
4	QLFHLCLII	2	21
4	LCWGELMTL	89	21
5	KEFGATVEL	36	20

对 HBc 进行表面可及性,β 转角及线性表位的预测。表面可及性的大小与氨基酸残基的分布有关,且与抗体的结合难易程度成正比。β 转角也是预测 B 细胞表面抗原的重要参数之一,该结构多出现在蛋白质抗原表面,为凸出结构,较为松散,与结构规则的 α 螺旋和 β 折叠相比,更易结合抗体。此外,预测到好的线性表位氨基酸位点更利于抗体的制备。通过 IEDB Analysis Resource 软件预测到得分较高的 HBc 抗原中氨基酸残基可被溶剂分子接触的区域有 4 个,分别为 37-38、110-112、158-164、180-208 位氨基酸(图 9)。β 转角预测得分在阈值线以上区域分别为 10-19、29-39、49-59、74-81、105-110、115-124、156-169、180-210(图 10)。预测线性表位氨基酸位点,10-19、29-39、49-59、

74-81、105-110、115-124、156-169、180-210 这 8 个区域得分较高(图 11)。

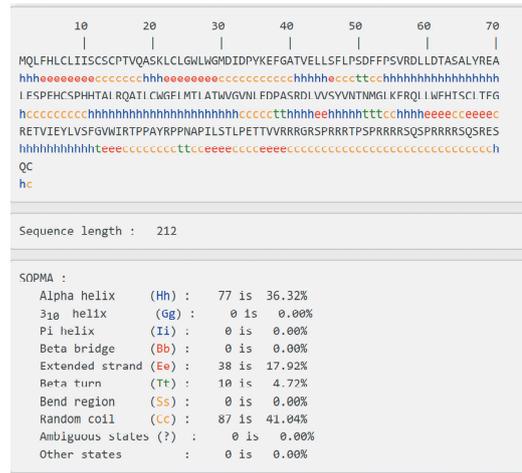


图 6 HBc 的二级结构预测  
Fig. 6 Secondary structure prediction of HBc

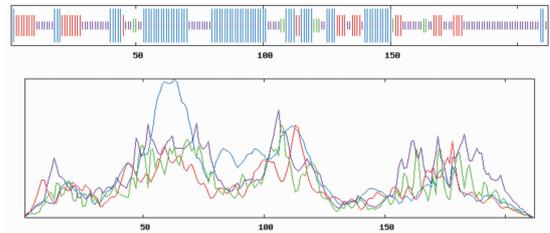


图 7 HBc 二级结构可视化  
Fig. 7 Visualization of HBc secondary structure

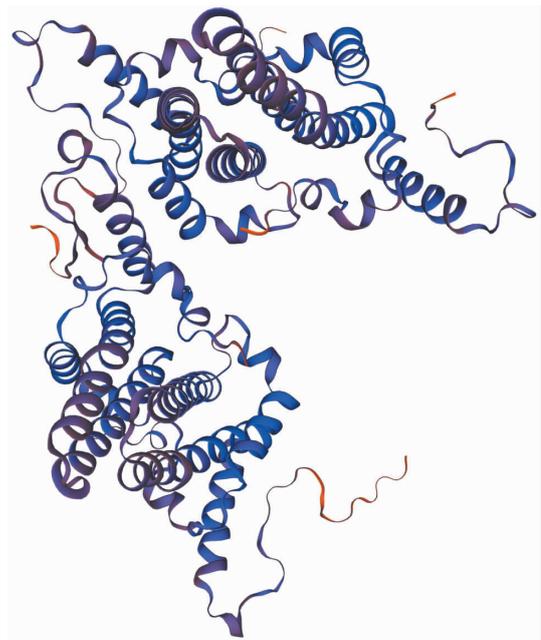


图 8 HBc 的三级结构同源性建模预测  
Fig. 8 Modeling prediction of HBc tertiary structure homology

综合分析 HBc 抗原表位,表面可及性,β 转角及线性表位的预测结果,提示 HBc 存在多个 T 或 B 抗

原表位。此外,将不同预测中得分高的区域的氨基酸位点进行交集筛选得到 39 个交集序列,最终得到了 4 个优势的 B 细胞抗原表位区域,分别为 37-38、110、158-164、180-208 位氨基酸(表 3,图 12)。

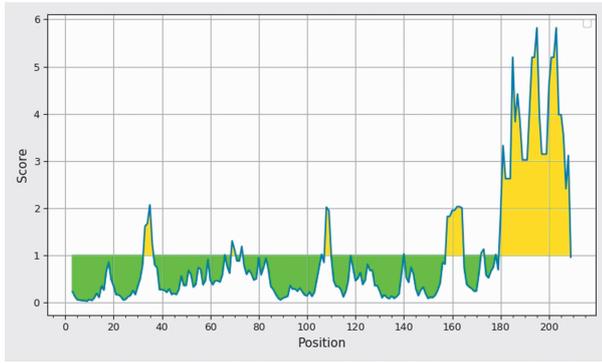


图 9 HBc 可及性的预测结果  
Fig. 9 Accessibility prediction results for HBc

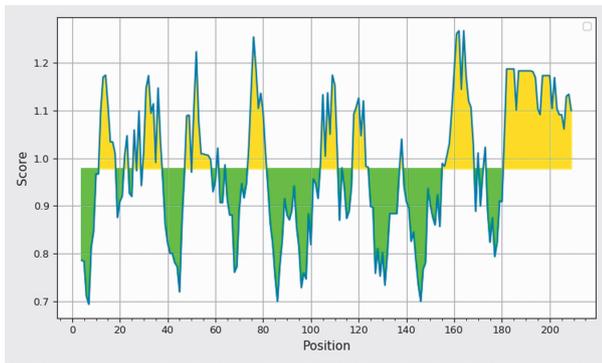


图 10 HBc $\beta$  转角的预测结果  
Fig. 10  $\beta$  angle prediction results for HBc

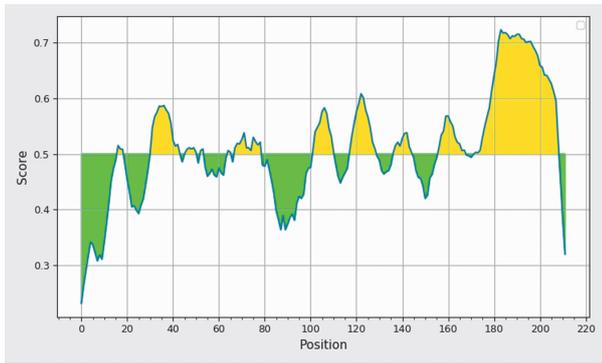


图 11 HBc 线性表位的预测结果  
Fig. 11 Linear epitope prediction results for HBc

表 3 交集区域氨基酸位置  
Table 3 Amino acid position of intersection

交集区域氨基酸位置 Amino acid position of intersection	序列 Sequence
37-38	LI
110	H
158-164	LLWFHIS
180-208	FGVWIRTPPAYRPPNAPILSTLPETTVVR

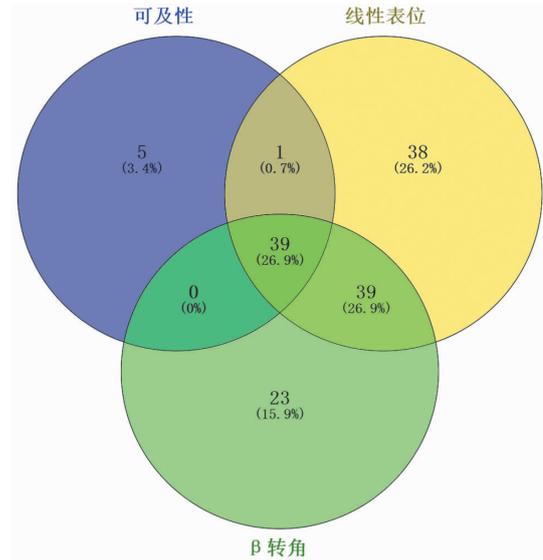


图 12 HBc 可及性、 $\beta$  转角及线性表位预测结果交集的韦恩图  
Fig. 12 Venn diagram of the intersection of HBc accessibility,  $\beta$  turn and linear epitope prediction results

## 讨论

乙型肝炎是一种全球性疾病,危害极大,大多数乙型肝炎病毒携带者有着发展为肝硬化甚至肝癌的高风险,每年约 70 万人失去生命<sup>[20]</sup>。治疗乙肝病毒的难点在于因其极强的潜伏性和复制能力导致现今临床药物中不能做到彻底根除。

随着生物信息学技术和领域的广泛应用与不断发展,利用生物信息相关技术分析蛋白结构和特征更加的直观和全面,这也为各类蛋白的鉴定、表达、纯化,以及疫苗研制奠定了基础。为了提高预测蛋白结构特征的准确性,本研究利用生物信息学工具预测分析了 HBc 的二级和三级结构、亲疏水性、信号肽、跨膜区域、磷酸化位点。结果表明 HBc 是不稳定蛋白,并很难与水分子形成氢键属于亲水蛋白质。无规则卷曲的含量在蛋白质二级结构中占 41.04%,蛋白的亲水部位和无规则卷曲均位于蛋白质表面,有利于抗体嵌合,显示出很大的抗原潜力<sup>[21]</sup>。HBc 蛋白存在信号肽剪切位点,属于分泌蛋白。既往研究报道利用信号肽来引导不同外源蛋白在不同表达系统的分泌表达<sup>[22-23]</sup>,随着对重组蛋白的需求的日益增加,信号肽的研究价值和作用愈加重要。利用 NetPhos 3.1 Server 工具预测 HBc 存在 40 个潜在的磷酸化位点。HBc 磷酸化在 HBV 感染过程中扮演重要角色,还能调节逆转录、pgRNA 包裹、DNA 合成、亚细胞定位和病毒颗粒分泌<sup>[24-27]</sup>。

预测有效的抗原表位对于表位疫苗研制至关重要。目前,获得批准和使用许可的预防性 HBV 疫苗主要是针对乙肝病毒表面抗原(HBsAg)设计的<sup>[28-29]</sup>,疫苗接种后能有效诱导产生保护性抗体<sup>[30-32]</sup>,并已经

阻止了世界范围内数百万人的感染<sup>[33]</sup>,但是不能根除病毒达到完全治愈的目的。早在20世纪90年代HBc蛋白就被发现其结构可组装成病毒样颗粒(virus-like particles, VLPs)<sup>[34]</sup>。HBcAg作为常见载体之一可以帮助多种病原体组装成表位抗原,也能提高抗原表位的免疫原性<sup>[35-36]</sup>。Robbert等<sup>[37]</sup>报道了一种新型治疗性HBV候选疫苗,使用黄热病疫苗为载体表达HBc在体内实验中能诱导一系列高水平免疫应答反应。Obeng-Adjei等<sup>[38]</sup>开发了针对HBV共有核心和表面抗原基因型A和C的高度优化的合成DNA质粒,发现此质粒能驱动强大的细胞介导免疫,并产生强大的细胞毒性和抗体反应。HBc特有的分子结构和理化特征在疫苗研究中显示了其潜在的优势和潜力。本研究利用生物信息学工具ABCpred, SYFPEITHI和IEDB Analysis Resource对应的3种预测方法共同进行HBc抗原表位的预测,对不同方法得到的结果进行比较,并利用Venny2.1.0软件找到交集区域作为最佳抗原表位位置。综合HBc的序列可及性、 $\beta$ 转角、线性表位的预测结果得到4个优势的B细胞抗原表位区域,分别为37-38、110、158-164、180-208位氨基酸。以上结果可为乙肝疫苗的研制提供参考依据。

#### 【参考文献】

- [1] Lavanchy D. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures [J]. *J Viral Hepat*, 2004, 11(2): 97-107.
- [2] Seto WK, Lo YR, Pawlotsky JM, et al. Chronic hepatitis B virus infection [J]. *Lancet*, 2018, 392(10161): 2313-2324.
- [3] Kim V, Abreu RM, Nakagawa DM, et al. Pegylated interferon alfa for chronic hepatitis B: systematic review and meta-analysis [J]. *J Viral Hepat*, 2016, 23(3): 154-169.
- [4] Marcellin P, Heathcote EJ, Buti M, et al. Tenofovir disoproxil fumarate versus adefovir dipivoxil for chronic hepatitis B [J]. *N Engl J Med*. 2008 Dec 4; 359(23): 2442-2455.
- [5] Berg T, Zoulim F, Moeller B, et al. Long-term efficacy and safety of emtricitabine plus tenofovir DF vs. tenofovir DF monotherapy in adefovir-experienced chronic hepatitis B patients [J]. *J Hepatol*, 2014, 60(4): 715-722.
- [6] Kwon SY, Park YK, Ahn SH, et al. Identification and characterization of clevudine-resistant mutants of hepatitis B virus isolated from chronic hepatitis B patients [J]. *J Virol*, 2010, 84(9): 4494-4503.
- [7] Ghany M, Liang TJ. Drug targets and molecular mechanisms of drug resistance in chronic hepatitis B [J]. *Gastroenterology*, 2007, 132(4): 1574-1585.
- [8] Choi YM, Lee SY, Kim BJ. Naturally occurring hepatitis B virus reverse transcriptase mutations related to potential antiviral drug resistance and liver disease progression [J]. *World J Gastroenterol*, 2018, 24(16): 1708-1724.
- [9] Kim H, Lee SA, Do SY, et al. Precore/core region mutations of hepatitis B virus related to clinical severity [J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(17): 4287-4296.
- [10] Kimura T, Ohno N, Terada N, et al. Hepatitis B virus DNA-negative Dane particles lack core protein but contain a 22-kDa pre-core protein without C-terminal arginine-rich domain [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(23): 21713-21719.
- [11] Pumpens P, Grens E. Artificial genes for chimeric virus-like particles [M]. Boca Raton: ResGate, 2002: 249-327.
- [12] Kramvis A, Kostaki EG, Hatzakis A, et al. Immunomodulatory function of HBcAg related to short-sighted evolution, transmissibility, and clinical manifestation of hepatitis B virus [J]. *Front Microbiol*, 2018(9): 2521.
- [13] Chen HS, Kew MC, Hornbuckle WE, et al. The precore gene of the woodchuck hepatitis virus genome is not essential for viral replication in the natural host [J]. *J Virol*, 1992, 66(9): 5682-5684.
- [14] Roldo A, Mellado MC, Castilho LR, et al. Virus-like particles in vaccine development [J]. *Expert Rev Vaccines*, 2010, 9(10): 1149-1176.
- [15] Clarke BE, Newton SE, Carroll AR, et al. Improved immunogenicity of a peptide epitope after fusion to hepatitis B core protein [J]. *Nature*, 1987, 330(6146): 381-384.
- [16] Almagro Armenteros JJ, Tsirigos KD, Sønderby CK, et al. SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks [J]. *Nat Biotechnol*, 2019, 37(4): 420-423.
- [17] Ikeda F, Dikic I. Atypical ubiquitin chains: new molecular signals. 'Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects' review series [J]. *EMBO Rep*, 2008, 9(6): 536-542.
- [18] Fujishima Y, Nishiumi S, Masuda A, et al. Autophagy in the intestinal epithelium reduces endotoxin-induced inflammatory responses by inhibiting NF- $\kappa$ B activation [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2011, 506(2): 223-235.
- [19] Pellequer JL, Westhof E, Van Regenmortel MH. Correlation between the location of antigenic sites and the prediction of turns in proteins [J]. *Immunol Lett*, 1993, 36(1): 83-99.
- [20] FitzSimons D, Hendrickx G, Vorsters A, et al. Hepatitis B vaccination: a completed schedule enough to control HBV lifelong? Milan, Italy, 17-18 November 2011 [J]. *Vaccine*, 2013, 31(4): 584-590.
- [21] 来鲁华, 骆兆文. 基于蛋白质结构知识的合理药物分子设计 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 1993, 20(3): 176-181.
- [22] Low KO, Muhammad Mahadi N, Md Illias R. Optimisation of signal peptide for recombinant protein secretion in bacterial hosts [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(9): 3811-3826.
- [23] Mergulho FJ, Summers DK, Monteiro GA. Recombinant protein secretion in *Escherichia coli* [J]. *Biotechnol Adv*, 2005, 23(3): 177-202.
- [24] Basagoudanavar SH, Perlman DH, Hu J. Regulation of hepadnavirus reverse transcription by dynamic nucleocapsid phosphorylation [J]. *J Virol*, 2007, 81(4): 1641-1649.
- [25] Gazina EV, Fielding JE, Lin B, et al. Core protein phosphorylation modulates pregenomic RNA encapsidation to different extents in human and duck hepatitis B viruses [J]. *J Virol*, 2000, 74(10): 4721-4728.

