

流感疫苗中神经氨酸酶的温度稳定性分析

曹海丹, 邱璐, 赵丽佳, 徐文, 王敏, 李汶倩, 李帅
长春生物制品研究所有限责任公司, 吉林 长春 130012

摘要: 目的 分析流感疫苗中神经氨酸酶(neuraminidase, NA)在不同温度下的稳定性,为更全面地了解疫苗综合活性货架期提供参考。方法 将 H1N1、H3N2 和 B 型单价流感疫苗原液分别在 4(低温)、25(室温)、37(变温) °C 放置 0.5、2、7、24、48 h,同时以极端温度(100 °C)处理 1 h 作为对照。采用酶连凝集素法测定 NA 活性。结果 H1N1 型疫苗在 25 和 37 °C 放置,NA 活性均随时间延长而显著下降;H3N2 和 B 型疫苗在两个非储藏温度下放置 48 h 内活性均无明显下降。3 种疫苗在 100 °C 高温下活性均下降。结论 H3N2 和 B 型流感疫苗在不超过 37 °C 的异常储藏温度下有较高的稳定性,H1N1 型流感疫苗相比 H3N2 和 B 型,对储藏温度较为敏感。

关键词: 流感疫苗;神经氨酸酶;温度稳定性

中图分类号: R392-33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-5503(2023)01-0016-05

Thermal stability of neuraminidase in influenza vaccine

CAO Hai-dan, QIU Lu, ZHAO Li-jia, XU Wen, WANG Min, LI Wen-qian, LI Shuai

Changchun Institute of Biological Products Co., Ltd.,

Changchun 130012, Jilin Province, China

Corresponding author: LI Shuai, E-mail: lsandzlj@163.com

Abstract: Objective To analyze the stabilities of neuraminidase (NA) in influenza vaccine at different temperatures and provide a reference for further complete understanding of overall shelf life of vaccines. **Methods** Monovalent bulks of influenza H1N1, H3N2 and B vaccines were stored at 4 (low temperature), 25 (room temperature) and 37 °C (changed temperature) for 0.5, 2, 7, 24 and 48 h separately, using that at 100 °C (extreme temperature) for 1 h as control, and determined for NA activity by enzyme-linked lectin method. **Results** The NA activities of influenza H1N1 vaccines stored at 25 and 37 °C decreased significantly with the increasing of time. No significant decreases were observed in H3N2 and B vaccines even after storage at two non-storage temperatures for 48 h. However, all the NA activities of three vaccines decreased at 100 °C. **Conclusion** Both H3N2 and B vaccines showed high stability at abnormal storage temperatures not more than 37 °C, while H1N1 vaccine was relatively sensitive to the temperature for storage.

Keywords: Influenza vaccine; Neuraminidase (NA); Temperature stability

神经氨酸酶(neuraminidase, NA)和血凝素(hemagglutinin, HA)均为流感病毒表面的关键抗原,其中,HA 是目前流感疫苗开发所用的主要抗原。但在流感研究领域,早有学者呼吁以 NA 为流感疫苗抗原进行针对性开发^[1-5]。2018 年,CHEN 等^[6]研究发现,针对 NA 产生的体液免疫应答,相比针对 HA 产生的免疫应答,能更有效地保护人体不受流感侵害^[7-8]。但

现有流感疫苗接种人体后诱发 NA 的免疫应答(即抗体数量)效率远低于自然感染人群,因此,研究者呼吁针对 NA 优化抗原表位,设计开发 NA 免疫应答效率更高的流感疫苗^[2,9-10]。

针对 NA 的流感应对策略在我国同样适用。根据中国国家流感中心发布的 2020 年第 29 周第 605 期中国流感监测周报,自 2019 年 10 月以来,耐药性监测显示,所有甲型 H1N1 和 A(H3N2)亚型流感毒株均对烷胺类药物耐药;所有 A(H3N2)和 B 型流感毒株均对 NA 抑制剂敏感^[11]。除 1 株甲型 H1N1 毒株

基金项目: 国家科技重大专项(2018ZX09737008-003)。

通信作者: 李帅, E-mail: lsandzlj@163.com

对 NA 抑制剂的敏感性高度降低,其余甲型 H1N1 毒株均对 NA 抑制剂敏感。而且,相比 HA 的高度变异特性,NA 的变异程度要明显降低^[12-13]。据此推测,NA 所引起的特异性免疫应答,很可能帮助人体抵御绝大多数流感病毒毒株的侵害,从而起到广谱抗流感作用。因此,流感疫苗中 NA 的有效抗原含量(活性)对疫苗抗流感效果有较大影响^[14]。

近年来,我国流感疫苗生产工艺和质量均有大幅优化,疫苗保质期也长达 18 个月。但在基层卫生工作实践中,遇各种自然或人为突发情况,疫苗保存条件可能无法保证,因此,疫苗的温度稳定性是关键指标。已有研究者检测了疫苗中 HA 抗原在不同温度条件下的稳定性^[15-17],但我国学者对国产疫苗 NA 的温度稳定性研究较少。

本研究结合卫生实践中可能遇到的温度变化条件,开展了 3 种型别流感疫苗 NA 含量的温度稳定性测试,监测了疫苗单价原液样品在常规冷藏条件,室温(25 °C)、变温(37 °C)等条件下保存不同时间后的残余 NA 含量,以期为系统了解流感疫苗中 NA 的稳定性提供参考。

1 材料与方法

1.1 疫苗原液 H1N1、H3N2 和 B 型流感疫苗单价原液为长春生物制品研究有限责任公司疫苗六室制备。

1.2 主要试剂及仪器 胎球蛋白和 HRP-PNA 购自美国 Sigma 公司;TMB 液购自北京索莱宝科技有限公司;酶标板购自美国 Thermo Fisher 公司;酶标仪购自瑞士 TECAN 公司。

1.3 样本处理 将 H1N1、H3N2 和 B 型流感疫苗单价原液分别置 4、25(室温)、37(变温) °C 放置 0.5、2、7、24、48 h,以 4 °C 储存单价原液为对照,100 °C 放置 1 h 作为 NA 失活的阳性对照。处理后的样品放回 4 °C,所有样品统一检测。

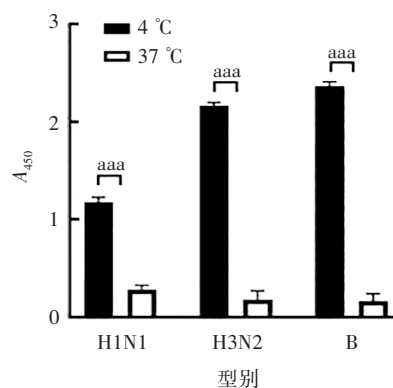
1.4 NA 活性测定 采用酶连凝集素法,参考本单位先前方法,略有改动^[18]。将胎球蛋白用 0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液(pH 9.6)稀释至 25 μg/mL,加入酶标板中,100 μL/孔,用密封膜包裹,4 °C 过夜;次日弃上清,用洗液(100 mL 0.15 mol/L pH 7.2 的磷酸盐缓冲液加入 50 μL 吐温 20)洗涤 3 次,加入倍比稀释的疫苗单价原液样品,100 μL/孔,每个样品设双孔,最后一排前两孔加入 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.2)100 μL 作为阴性对照,37 °C 孵育 16~18 h;用洗液洗涤 3 次,加入 HRP-PNA(用酶稀释液稀释至

1:500),100 μL/孔,37 °C 孵育 2 h;用洗液洗涤 5 次,加入 TMB 底物液 100 μL,室温作用 15 min;加入终止液 1 mol/L 盐酸溶液 100 μL,10 min 内于酶标仪波长 450 nm 处测定吸光度值(A)。以待测样品 A_{450} 值 ≥ 阴性对照 A_{450} 值的 2.1 倍作为 Cutoff 值,确定单价原液的酶活性。阴性对照 A_{450} 值 ≤ 0.1,样品 A_{450} 均值 × 90% ≤ A_{450} 值 ≤ A_{450} 均值 × 110% 判为试验结果有效。

1.5 统计学分析 应用统计学软件 Graphpad Prism v 8.0 对 3 种疫苗在不同温度下储存的 NA 活性数据进行统计分析,组间比较使用双尾 *t*-test 检验,以变化倍数超过 1.2 或小于 0.8 为有差异,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NA 热变性的系统验证 经 100 °C 极端高温处理疫苗原液后,H1N1、H3N2、B 型流感疫苗中 NA 活性均明显降低,且差异均有统计学意义(*t* 分别为 23.482、35.750 和 43.299, P 分别为 1.95 E-05、3.65 E-06 和 1.70 E-06),见图 1。表明本研究所用检测系统可检测到温度导致的 NA 活性变化。

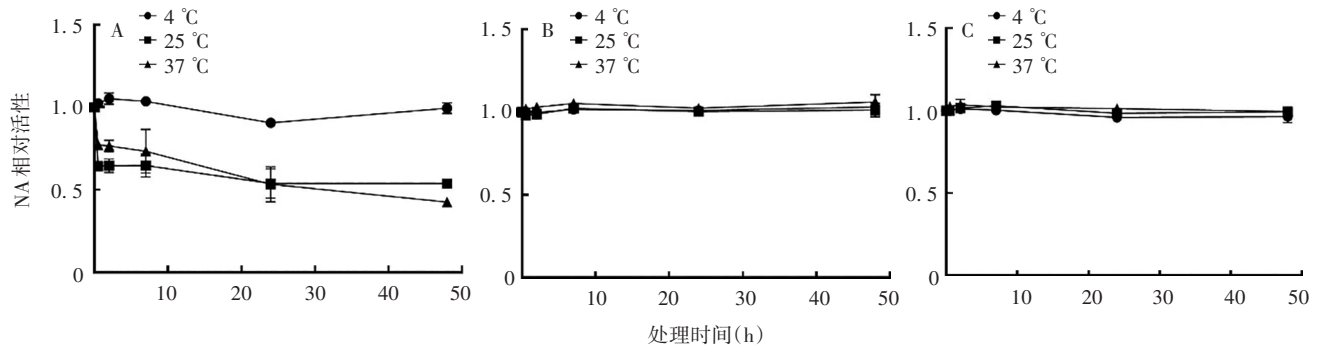


注:aaa 表示 $P < 0.001$ 。

图 1 3 种型别流感疫苗单价原液经 100 °C 处理后的 NA 活性

Fig. 1 NA activities of monovalent bulks of three types of influenza vaccines after storage at 100 °C

2.2 3 种疫苗在常见升温条件下的 NA 活性变化 H1N1 型疫苗中的 NA 活性在 4 °C 条件下无显著变化,而在 25 和 37 °C 下,NA 活性均随处理时间的延长而显著下降;相比之下,在 48 h 处理范围内,H3N2 和 B 型疫苗中的 NA 活性均无明显下降。见图 2、表 1~表 3。表明在本研究条件下,H3N2 和 B 型疫苗中的 NA 比 H1N1 型疫苗更为稳定。



A: H1N1 型; B: H3N2 型; C: B 型。

注: 每种疫苗的结果均以 4 °C, 0 h 样品 A₄₅₀ 值为参考值校正。

图 2 3 种疫苗中 NA 活性在不同温度下随处理时间的变化

Fig. 2 Changes of NA activities of three influenza vaccines at different temperatures with time for storage

表 1 H1N1 型疫苗不同处理条件下的 NA 活性变化

Tab. 1 Change of NA activity of H1N1 vaccine at different temperatures for various hours

处理时间(h)	4 °C			25 °C			37 °C		
	变化倍数	t	P	变化倍数	t	P	变化倍数	t	P
0.5	1.023	-2.485	0.068	0.644	29.022	8.4 E-06	0.772	17.752	5.9 E-05
2	1.052	-2.427	0.072	0.645	13.748	1.6 E-04	0.766	11.038	3.8 E-04
7	1.036	-2.860	0.046	0.647	8.631	9.9 E-04	0.734	3.458	2.6 E-02
24	0.905	5.724	0.005	0.539	8.814	9.1 E-04	0.533	7.530	1.7 E-03
48	0.995	0.247	0.817	0.538	33.877	4.5 E-06	0.425	59.288	4.8 E-07

表 2 H3N2 型疫苗不同处理条件下的 NA 活性变化

Tab. 2 Change of NA activity of H3N2 vaccine at different temperatures for various hours

处理时间(h)	4 °C			25 °C			37 °C		
	变化倍数	t	P	变化倍数	t	P	变化倍数	t	P
0.5	1.004	-0.201	0.850	0.982	2.135	0.100	1.021	-2.409	0.074
2	0.998	0.196	0.854	0.988	0.745	0.497	1.030	-3.046	0.038
7	1.017	-1.525	0.202	1.023	-2.607	0.060	1.053	-4.074	0.015
24	1.010	-0.772	0.483	1.003	-0.193	0.857	1.025	-2.130	0.100
48	1.030	-2.681	0.055	1.014	-0.535	0.621	1.062	-2.318	0.081

表 3 B 型疫苗不同处理条件下的 NA 活性变化

Tab. 3 Change of NA activity of B vaccine at different temperatures for various hours

处理时间(h)	4 °C			25 °C			37 °C		
	变化倍数	t	P	变化倍数	t	P	变化倍数	t	P
0.5	1.002	-0.171	0.873	1.001	-0.068	0.949	1.024	-1.853	0.137
2	1.010	-0.608	0.576	1.014	-1.180	0.303	1.036	-1.634	0.178
7	1.002	-0.197	0.854	1.029	-1.833	0.141	1.021	-1.358	0.246
24	0.958	2.719	0.053	0.983	0.837	0.450	1.012	-0.949	0.396
48	0.964	1.525	0.202	0.993	0.389	0.717	0.994	0.336	0.753

3 讨论

流感病毒 A 和 B 型是引发季节性流感的主要病

毒亚型,其中以甲 1 型(H1N1)、甲 3 型(H3N2)和 B 型为主。流感疫苗注射入人体内,引发免疫系统针对 HA 或 NA 抗原产生免疫反应,产生中和型抗体^[19-21]。

因此,疫苗中的 HA、NA 含量或活性对疫苗的免疫效果有直接影响。

目前我国流感疫苗出厂检测质检过程中,主要针对 HA 含量和稳定性进行检测,而对 NA 含量及稳定性尚未形成行业标准^[22];生产疫苗过程中,也少有机构或企业针对 NA 进行特异性设计^[23-24]。对于流感疫苗中 NA 在不同温度下的稳定性研究,经文献检索仅发现 1 篇^[25];而针对国产疫苗,尚无类似的系统研究。因此,本研究对流感疫苗单价原液中 NA 活性的温度稳定性进行了初步的系统探索,结果显示,甲 3(A, H3N2)和乙型(B)流感疫苗中的 NA 抗原含量具有很好的温度稳定性,37 °C 热处理 48 h 后仍无明显降低;相比之下,甲 1 型(A, H1N1)流感疫苗中的 NA 含量在 25 和 37 °C 处理条件下均表现出随温度下降的趋势。本研究为系统了解流感疫苗中 NA 的稳定性提供了参考,有助于日后开发和制定相关工艺标准,亦可帮助基层卫生人员合理评估疫苗保质期,节约卫生成本。基于已有结果,在流感高发季节组合配比多价疫苗时,可尝试根据当季流行毒株型别,适当调整对应单价疫苗病毒的比例,从而保证即便遇到异常储存情况也能保证足够的活性免疫原含量。后续将利用小鼠等动物模型,研究不同货架保存期或不同温度处理条件下疫苗所诱导的流感病毒 NA 抗体滴度,以进一步升级改善流感疫苗功效。

参考文献

- [1] WOHLBOLD T J, KRAMMER F. In the shadow of hemagglutinin: a growing interest in influenza viral neuraminidase and its role as a vaccine antigen [J]. *Viruses*, 2014, 6 (6): 2465-2494.
- [2] DENG T, ZHOU J H, MA N. Evaluation of immune protection of H5N1 influenza virus neuraminidase in mouse model [J]. *Chin J Biologicals*, 2022, 35 (5): 513-517. (in Chinese)
邓涛, 周建花, 马宁. H5N1 型流感病毒神经氨酸酶在小鼠模型中的免疫保护性评价 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2022, 35 (5): 513-517.
- [3] DENG T, ZANG J Y, YANG X M. Progress in research on influenza virus neuraminidase and its vaccine [J]. *Chin J Biologicals*, 2021, 34 (6): 751-755. (in Chinese)
邓涛, 张家友, 杨晓明. 流感病毒神经氨酸酶及其疫苗的研究进展 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2021, 34 (6): 751-755.
- [4] MONTO A S, PETRIE J G, CROSS R T, *et al.* Antibody to influenza virus neuraminidase: an independent correlate of protection [J]. *J Infect Dis*, 2015, 212 (8): 1191.
- [5] EICHELBERGER M, WAN H Q. Influenza neuraminidase as a vaccine antigen [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2015, 386: 275-299.
- [6] CHEN Y Q, WOHLBOLD T J, ZHENG N Y, *et al.* Influenza infection in humans induces broadly cross-reactive and protective neuraminidase-reactive antibodies [J]. *Cell*, 2018, 173 (2): 417-429.
- [7] SYLTE M J, SUAREZ D L. Influenza neuraminidase as a vaccine antigen [J]. *Vaccin Pandemic Influenza*, 2009, 333: 227-241.
- [8] MEMOLI M J, SHAW P A, HAN A, *et al.* Evaluation of anti-hemagglutinin and antineuraminidase antibodies as correlates of protection in an influenza A / H1N1 virus healthy human challenge model [J]. *MBio*, 2016, 7: e00417-e516. DOI: 10.1128 / mBio.00417-16.
- [9] WOHLBOLD T J, PODOLSKY K A, CHROMIKOVA V, *et al.* Broadly protective murine monoclonal antibodies against influenza B virus target highly conserved neuraminidase epitopes [J]. *Nat Microbiol*, 2017, 2 (10): 1415-1424.
- [10] CREYTENS S, PASCHA M N, BALLEGEER M, *et al.* Influenza neuraminidase characteristics and potential as a vaccine target [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 786617.
- [11] 中国国家流感中心. 中国流感流行情况概要(截至 2020 年 7 月 19 日)[EB/OL]. (2020-07-25) [2020-07-27]. http://www.chinaivdc.cn/cnic/zyzx/lgz/b/202007/t20200725_217939.htm.
- [12] ZHAO X D, HAN F, WANG Y. Construction of recombinant adenovirus expressing influenza virus neuraminidase gene [J]. *Chin J Viral Dis*, 2003, 18 (3): 213-216. (in Chinese)
赵小东, 韩峰, 王艳, 等. 表达流感病毒神经氨酸酶基因的重组腺病毒的构建 [J]. *中国病毒学*, 2003, 18 (3): 213-216.
- [13] PRACHANRONARONG K L, CANALE A S, LIU P, *et al.* Mutations in influenza A virus neuraminidase and hemagglutinin confer resistance against a broadly neutralizing hemagglutinin stem antibody [J]. *J Virol*, 2019, 93 (2): e01639-18. DOI: 10.1128 / JVI.01639-18.
- [14] KRAMMER F, FOUCHIER R A M, EICHEOLBERGER M C, *et al.* How can neuraminidase-based immunity contribute to better influenza virus vaccines [J]. *Am Soc Microbiol*, 2018, 9: 1-12.
- [15] MESEDA C A, ATUKORALE V, SOTO J, *et al.* Immunogenicity and protection against influenza H7N3 in mice by modified vaccinia virus ankara vectors expressing influenza virus hemagglutinin or neuraminidase [J]. *Sci Rep*, 2018, 8 (1): 5364.
- [16] PARKER L, RITTER L, WEN W, *et al.* Haemagglutinin stability was not the primary cause of the reduced effectiveness of live attenuated influenza vaccine against A / H1N1pdm09 viruses in the 2013-2014 and 2015-2016 seasons [J]. *Vaccine*, 2019, 37 (32): 4543-4550.
- [17] KLEIN E Y, BLUMENKRANTZ D, SEROHIJOS A, *et al.* Stabi-

- lity of the influenza virus hemagglutinin protein correlates with evolutionary dynamics [J]. *mSphere*, 2018, 3 (1): e00554-17. DOI: 10.1128 / mSphereDirect.00554-17.
- [18] CAO H D, LIU X G, WANG P. Development of enzyme-linked lectin assay for activity and subtyping of influenza virus neuraminidase [J]. *Chin J Biologicals*, 2021, 34 (5): 585-589. (in Chinese)
曹海丹, 刘旭光, 王平. 流感病毒神经氨酸酶活性及型别鉴定酶联凝集素法的建立 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2021, 34 (5): 585-589.
- [19] SAUTTO G A, KIRCHENBAUM G A, ROSS T M. Towards a universal influenza vaccine: different approaches for one goal [J]. *Virology*, 2018, 15 (1): 17.
- [20] ZHOU F, HANSEN L, PEDERSON G, *et al.* Matrix M adjuvanted H5N1 vaccine elicits broadly neutralizing antibodies and neuraminidase inhibiting antibodies in humans that correlate with in vivo protection [J]. *Front Immunol*, 2021, 12 (11): 747774.
- [21] WONG S S, WEBBY R J. Traditional and new influenza vaccines [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2013, 26 (3): 476-492.
- [22] CHEN J R, LIU Y M, TSENG Y C, *et al.* Better influenza vaccines: an industry perspective [J]. *J Biomed Sci*, 2020, 27: 33.
- [23] EICHELBERGER M C, MONTO A S. Neuraminidase, the forgotten surface antigen, emerges as an influenza vaccine target for broadened protection [J]. *J Infect Dis*, 2019, 219 (Suppl_1): S75-S80.
- [24] JOB E R, YSENBAERT T, SMET A, *et al.* Broadened immunity against influenza by vaccination with computationally designed influenza virus N1 neuraminidase constructs [J]. *NPJ Vaccin*, 2018, 3: 55.
- [25] SULTANA I, YANG K, GETIE-KEBTIE M, *et al.* Stability of neuraminidase in inactivated influenza vaccines [J]. *Vaccine*, 2014, 32 (19): 2225-2230.

收稿日期: 2022-03-22 编辑: 何巍

(上接第 15 页)

- [12] LI T, HUA C, YUE W, *et al.* Discrepant antitumor efficacies of three CpG oligodeoxynucleotide classes in monotherapy and co-therapy with PD-1 blockade [J]. *Pharmacol Res*, 2020, 161: 105293.
- [13] LIANG H, XIAO X, ZHANG X, *et al.* Self-assembled nanovehicle-mediated co-encapsulation of inactivated EV71 virus and CpG oligonucleotides elicits potent anti-EV71 humoral and cellular immune protective responses [J]. *Biochem Biophysical Res Commun*, 2019, 511 (2): 253-259.
- [14] ZHAO J Q, NOOR K S, DONG X X, *et al.* Anti-tumor immunologic modulation and efficacy of na-no-complex adjuvant [J]. *Lett Biotechnol*, 2020, 31 (2): 129-134. (in Chinese)
赵佳琦, Noor Khattak Sameena, 董晓筱, 等. 纳米复合佐剂的抗肿瘤免疫调控作用及效果研究 [J]. *生物技术通讯*, 2020, 31 (2): 129-134.
- [15] HU Z K, DENG X W, ZHAO J Q, *et al.* Study of immune killing effect induced by HPV16 E786-93 nano-vaccine [J]. *Lett Biotechnol*, 2020, 31 (2): 135-141. (in Chinese)
胡张可, 邓雄威, 赵佳琦, 等. HPV16 E786-93 纳米颗粒疫苗的免疫杀伤效果研究 [J]. *生物技术通讯*, 2020, 31 (2): 135-141.
- [16] UMAR A. Cancer immunoprevention: a new approach to intercept cancer early [J]. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2014, 7 (11): 1067-1071.
- [17] VOLLMER J, KRIEG A M. Immunotherapeutic applications of CpG oligodeoxynucleotide TLR9 agonists [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009, 61 (3): 195-204.
- [18] SAUTER M M, GAUGER J J, BRANDT C R. Oligonucleotides designed to inhibit TLR9 block Herpes simplex virus type 1 infection at multiple steps [J]. *Antiviral Res*, 2014, 109: 83-96.
- [19] BENENCIA F, SPRAGUE L, MCGINTY J, *et al.* Dendritic cells the tumor microenvironment and the challenges for an effective antitumor vaccination [J]. *J Biomed Biotechnol*, 2012, 2012: 425476. DOI: 10.1155 / 2012 / 425476.
- [20] KUAI R, OCHYL L J, BAHJAT K S, *et al.* Designer vaccine nanodiscs for personalized cancer immunotherapy [J]. *Nat Materials*, 2017, 16 (4): 489-496.
- [21] LI T, WU J, ZHU S, *et al.* A novel C type CpG oligodeoxynucleotide exhibits immunostimulatory activity in vitro and enhances antitumor effect in vivo [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 8.

收稿日期: 2022-03-03 编辑: 李靓