

非人类灵长类动物血浆与 Olink PEA技术的相容性

背景

动物模型在医学研究中发挥着关键作用，特别是大型动物，如狗、猪和非人类灵长类动物（NHPs）^[1,2]。由于与人类有密切的系统发育关系^[3]，当使用啮齿类动物等其它动物模型的治疗方法已经失败时，NHPs 通常被建议用作临床前设置和转化前研究中的动物模型^[1]，例如肺结核^[4]或改进像HIV等疫苗和疗法的研究中^[5,6]。NHPs 的应用进一步弥补了小动物模型和人类之间的转化研究差距，NHPs的大尺寸也使样本收集、运行诊断检测和成像都更加容易^[7]。

概念验证

不同NHPs物种的基因组^[8,9]和外显子组^[10,11]与人类的相似性在93%-98.8%之间，这种相似性会在蛋白水平上被翻译。因此人类蛋白的靶向抗体也可能识别NHPs来源的蛋白。本白皮书的目的是考察Olink™ Explore 平台上NHPs血浆中蛋白的可检测性，并评估该平台的技术性能（质量指标）与其在NHPs研究中的潜在用途。

Olink的 PEA 技术

Olink™ Explore 3072和 Olink™ Target 96 与 48的开发为蛋白生物标志物的研究提供了有价值的工具，提高了蛋白组覆盖度，并能够用极小样本量（1-6μl）识别近3000个生物标志物。我们的蛋白组学平台采用邻位延伸分析（PEA）技术（图1），将双重抗体的识别能力与基于DNA

的技术（如二代测序NGS和qPCR）相结合，从而实现高灵敏度、高特异性，可扩展水平的高通量蛋白组学分析。更多关于 PEA技术的信息，请阅读 [白皮书](#) ^[12]。

研究设计

这项与炎症相关的研究包括四个食蟹猴实验组，每组4只动物。组1作为对照组，组2-4则包含递增剂量的化合物处理过的动物。在治疗前和治疗后的6个时间点共收集了88份EDTA血浆样本。

为了捕捉最佳动态范围，样本被直接运行（即未稀释）和在不同稀释度下运行（1:10-1:10,000），操作方式类似于人类血浆样本。得到的结果与先前进行的一项人血浆项目（598例样本，其中299例来自于健康受试者）进行了对比。

结果

质量控制（QC）

Olink的质量控制系统包括了内部对照和外部对照（图2）^[13]。内部对照被加入到每个样本中，用来检测Olink操作流程中的三个主要步骤：免疫反应、延伸和扩增/检测。外部对照用于监测技术差异（样品对照）、检测限LOD（阴性对照），并对每个检测进行归一化来补偿运行间和板间的潜在差异（板间对照）（图2）。

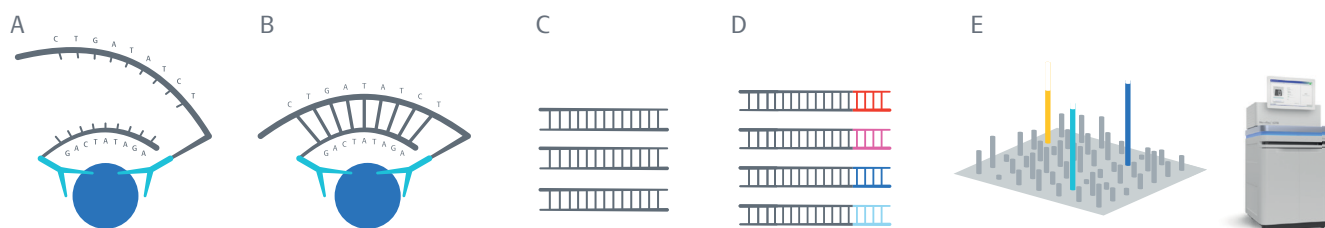


图1. NGS读取的 Olink PEA技术主要步骤。(A) 一对带有DNA寡核苷酸链的抗体在溶液中结合目标抗原（免疫反应）。(B) 处于邻位的寡核苷酸杂交并被DNA聚合酶扩增。(C) 每个蛋白生成包含唯一条码的DNA模版（延伸）。(D) DNA条码模版通过PCR扩增，每个样本可通过独特的检索序列鉴定（扩增）。(E, 检测) 用二代测序（NGS）对扩增子进行测序（读取）。

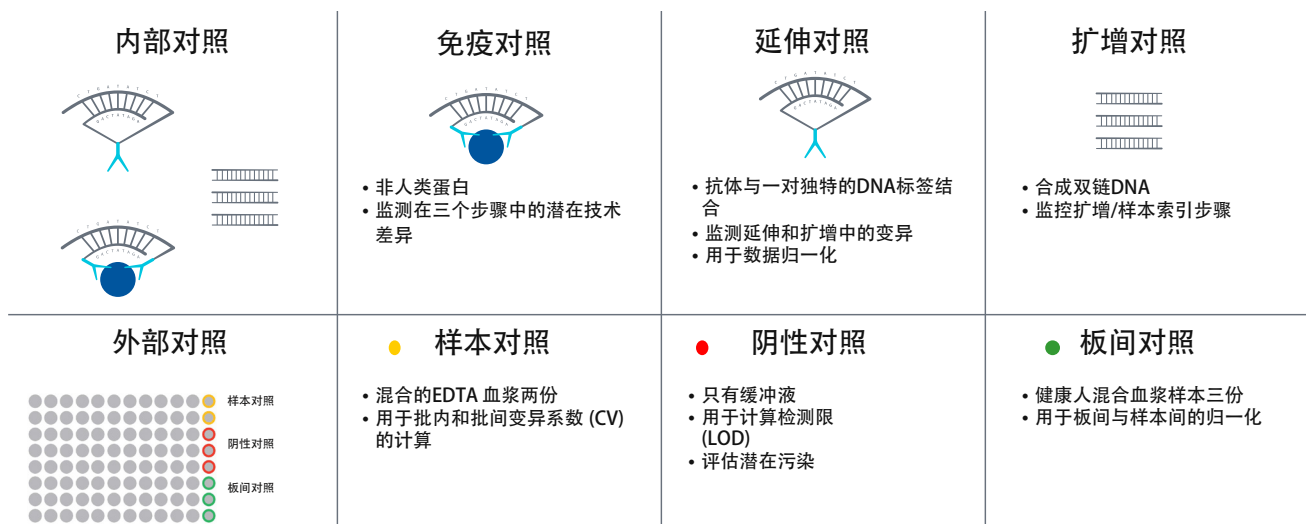


图2. Olink™ Explore平台工作流程中的内部和外部对照。

内部对照

NGS读取的计数以相对定量单位——归一化蛋白表达

(NPX) 表示。由于内部对照 (图2) 以相同的浓度添加到每个样本中，它们在整个板上的信号理应相等。如果孵育对照或扩增对照的信号与所有样本的中位数信号值相差 ± 0.3 NPX，则该样本未通过QC。此类偏差可能是由移液误差或样本分析前变化等因素造成的，从而影响了分析性能 (如基质效应)。

定义

NPX是蛋白归一化表达展现的任意值，以Log2格式表示。

Olink用NPX来直观反应样本中的蛋白质丰度。NPX的使用可以使用户识别每个个体蛋白的变化，并在项目中比较不同样本间的蛋白变化，从而能够建立或识别特定研究、疾病或治疗的蛋白质信号。

图3展示了NHP样本中孵育对照和扩增对照对应中位数的NPX偏差。虚线表示了 ± 0.3 NPX的阈值，内部对照如超过阈值，在对应的panel上则不能通过QC。88个NHP血浆样本共产生了约256K的NPX数据点，其中6,801 (2.6%) 未通过QC。相比之下，在598个人血浆样本中产生了1.72M个数据点，其中约43K (2.4%) 未通过QC。这些结果表明，在两个队列中，来自内部对照的质量指标是相似的，与样本来源无关。这也说明了样本分析工作流程的技术一致性，而且NHP血浆样本中没有干扰。

外部对照

板间对照由健康人的EDTA 血浆混合样本组成，每块板上运行三份，并用于每次Olink检测中NPX值的归一化。样本板上所有其它样本的NPX值都是相对于板间对照而定义的，NPX负值表示蛋白水平低于板间对照；正值则表示蛋白水平高于板间对照。

因此对于健康人血浆样本，任何蛋白的 averages NPX值应接近于0。

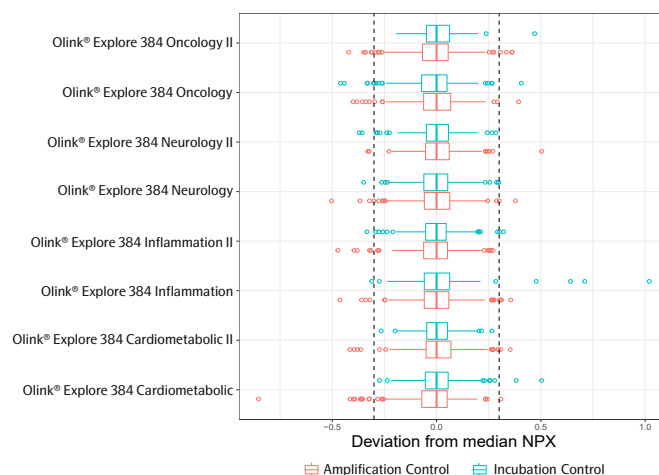


图3. Olink Explore平台的8个panel中目标生物标志物的分布。箱线图显示了在每个Olink Explore panel中内部对照 (扩增对照-红色和孵育对照-蓝色) 的NPX值与所有NHP血浆样本中的NPX值中位数的偏差。

图4显示了88个NHP样本和299个健康人样本中NPX中位数的叠加。在两个群体中，大多数蛋白质的NPX中位值接近于零，表明它们在NHP血浆中的平均水平类似于在健康人类血浆中观察到的水平。在NHP样本中，很大一部分蛋白的NPX值为负值，这表明和人类相比，某些蛋白在NHPs中的表达水平较低。在NHP血浆中也包含对照样本和给药样本，与健康人血浆样本相比也可能会有蛋白水平潜在中位表达的影响。

EDTA 血浆样本也在每块板间运行两份 (即样品对照) 以监测每个蛋白质信号的技术差异。如果板内中位数的变异系数 (CV) 小于15%，则认为该检测成功。本研究中和NHP样本的运行板内CV均小于15%，表明了该技术的高精密度 (表1)。

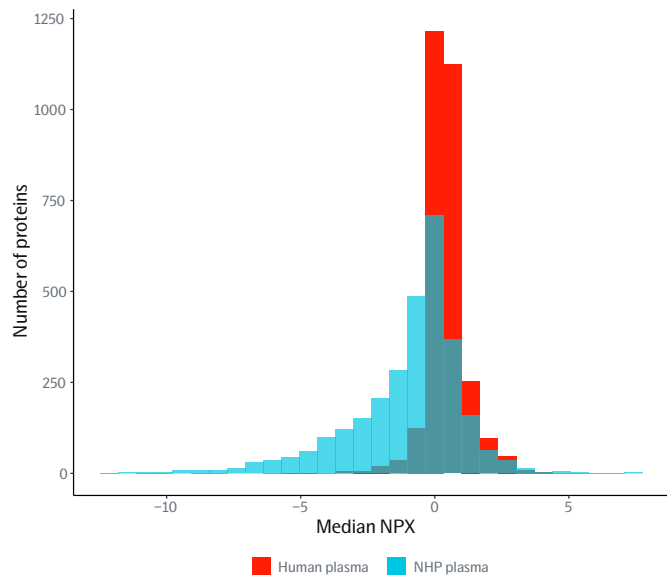


图4. 直方图展示了在 Olink Explore 平台上每个蛋白NPX值的中位数分布。中位数对应着88个NHP样本（蓝色）或299个健康人样本（红色）。

表1. 人血浆和NHP血浆样本检测的板内中位数CV值对比。

Panel	Median CV	
	Human Plasma	NHP Plasma
Olink® Explore 384 Oncology II	8.3 %	8.0 %
Olink® Explore 384 Oncology	6.7 %	6.5 %
Olink® Explore 384 Neurology II	8.7 %	8.7 %
Olink® Explore 384 Neurology	5.9 %	7.5 %
Olink® Explore 384 Inflammation II	5.3 %	4.8 %
Olink® Explore 384 Inflammation	5.4 %	5.4 %
Olink® Explore 384 Cardiometabolic II	6.7 %	7.8 %
Olink® Explore 384 Cardiometabolic	4.8 %	3.4 %

在Olink™ Explore 3072上检测NHP血浆中的蛋白

表2展示了与人血浆相比，NHP血浆在每个panel上的检出率（NPX值高于LOD的样本超过50%）。两项研究的检出率相似，但人类样本的检出率略高。这表明与人类血浆的预期检出率相比，NHP血浆在Olink Explore平台上实现了良好的可检测性。结果也显示了心血管代谢、神经科学、肿瘤学和炎症panel比对应的扩展panel（心血管代谢II、神经科学II、肿瘤学II和炎症II）具有更高的检出率。这也在意料之中，因为扩展panel瞄准了更多胞内来源的蛋白。NHP和人血浆之间微小的检出率差异可能是由于两个样本类型或物种之间蛋白表达的差异、实验设置，或某些NHP蛋白缺乏抗体的亲和力。

表2. NHP血浆与人血浆在Olink Explore 3072上检测能力的比较。*基于未发表的Olink数据。

Panel	Detectability		
	Human Plasma	NHP Plasma	Expected Range (Human)*
Olink® Explore 384 Oncology II	49%	38%	45 – 55%
Olink® Explore 384 Oncology	90%	80%	80 – 90%
Olink® Explore 384 Neurology II	51%	44%	45 – 55%
Olink® Explore 384 Neurology	85%	81%	80 – 90%
Olink® Explore 384 Inflammation II	78%	53%	70 – 80%
Olink® Explore 384 Inflammation	88%	77%	80 – 90%
Olink® Explore 384 Cardiometabolic II	66%	56%	60 – 70%
Olink® Explore 384 Cardiometabolic	93%	85%	85 – 95%

给药对NHP血浆中蛋白水平的影响

为了评估在给药后NHP血浆蛋白组是否有显著的变化，每个蛋白都用线性混合模型进行了分析，包括时间点、给药组，以及两组之间相互作用的固定效应。每只动物的随机效应也被包含在其中，以解释每只动物NPX基线的潜在差异。在不同时间点或给药组中总共有998个蛋白存在显著差异（多重检验校正的P值<0.05）。

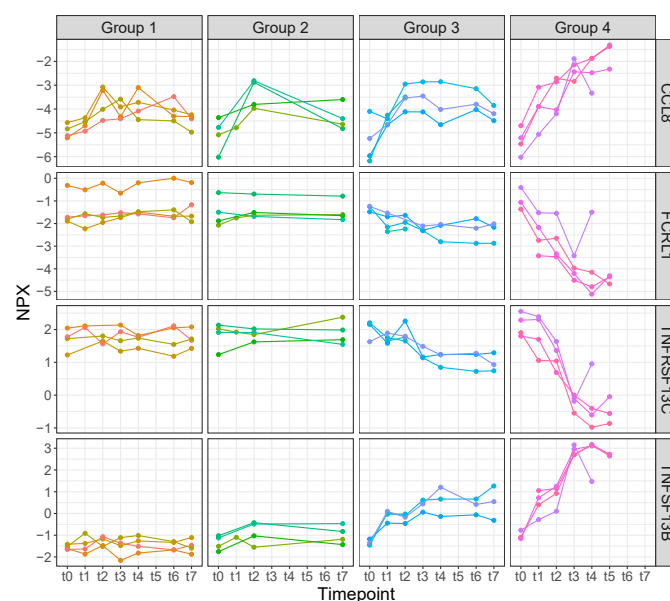


图5. 线性混合模型分析中前四种最显著的蛋白每时间点（x-轴）NPX水平（y-轴）。每行对应一个蛋白，每列对应一个给药组。每个点代表了一个NPX观测值，并用线连接了属于每只动物的观测值。时间点标注为T0-T7。

图5展示了在检测中四个最显著蛋白的轨迹。对于这些蛋白，对照组（组1）和低剂量组（组2）中的水平基本保持稳定，然而在高剂量给药动物（组3和组4）中，有高度显著的给药响应。组4中的响应尤其明显，一些蛋白给药后的平均变化为~4个NPX单位，对应了~2⁴（即16-倍）蛋白浓度的增加。这说明了PEA技术可以用来检测NHP血浆样本经处理后的蛋白质组结果，证明了它在NHP研究中的可用性。

总结

在本文的研究中，我们采用Olink Explore平台分析了NHP血浆样本，以评估NHP血浆样本与Olink™ PEA技术的兼容性。我们考察了多种质量指标，并将检测结果与前期的人血浆研究结果进行了对比。结果显示NHP血浆与人血浆的质量指标相似，没有确定的干扰效应。对于Olink Explore 3072中的大多数panel，我们观察到的检测能力与在人类队列中检测到的范围相似。在NHP血浆蛋白质组中，约1000个蛋白观察到了强烈的给药后影响，这意味着Olink Explore平台能够准确测量给药对NHPs中蛋白质水平的影响。总的来说，结果表明NHP血浆与Olink Explore 3072兼容，并可能与Olink™ Target panel兼容（数据未展示，可联系contact.support@olink.com获取更多信息），并能在NHPs研究中产生可靠的结果。

参考文献

1. J. D. Harding, Nonhuman Primates and Translational Research: Progress, Opportunities, and Challenges. *ILAR J.* 58, 141-150 (2017).
2. K. Strange, Drug Discovery in Fish, Flies, and Worms. *ILAR J.* 57,133-143 (2016).
3. H. Friedman *et al.*, The Critical Role of Nonhuman Primates in Medical Research. *Pathog Immun.* 2, 352-365 (2017).
4. T. W. Foreman, S. Mehra, A. A. Lackner, D. Kaushal, Translational Research in the Nonhuman Primate Model of Tuberculosis. *ILAR J.* 8, 151-159 (2017).
5. K. K. A. Van Rompay, Tackling HIV and AIDS: Contributions by non-human primate Models. *Lab Anim (NY).* 46, 259–265 (2017).
6. R. Veazey and A. Lackner, NMP models for understanding the pathogenesis of HIV infection and AIDS. *ILAR J.* 58, 160-171 (2017).
7. P. J. Havel, P. Kievit, A. G. Comuzzie, A. A. Bremer, Use and Importance of Nonhuman Primates in Metabolic Disease Research: Current State of the Field. *ILAR J.* 58, 251-268 (2017).
8. R. A. Gibbs *et al.*, Evolutionary and biomedical insights from the rhesus macaque genome. *Science.* 316, 222–234 (2007).
9. H. Watanabe, M. Hattori, A. Fujiyama, T. Sakaki, Construction and analysis of a human-chimpanzee comparative clone map. *Tanpakushitsu Kakusan Koso Protein Nucleic Acid Enzym.* 47, 808–813 (2002).
10. J. Chan, et al., Efficiency of whole-exome sequencing in old world and new world primates using human capture reagents. *J Med Primatol.* 50,176-181 (2021).
11. Z. Su *et al.*, Species specific exome probes reveal new insights in positively selected genes in nonhuman primates. *Sci Rep* 6, 33876 (2016).
12. <https://www.olink.com/application/pea/>
13. L. Wik *et al.*, Proximity Extension Assay in Combination with Next-Generation Sequencing for High-throughput Proteome-wide Analysis. *Mol Cell Proteomics.* 20, 100168 (2021).

欧邻科生物科技（上海）有限公司

中国技术中心

地址：上海市浦东新区沪南路2157弄2号1011室
电话：021-50778771
邮箱：china@olink.com
网址：www.olink.com

版本号：1256, CN1.1, 2022-11-10



关注官方微信公众号
可获取更多详细信息