

白皮书

采用Olink检测蛋白生物标志物 ——技术比较和正交验证

引言

Olink panel采用了专有的邻位延伸分析（PEA）技术，这是一种独特的方法，每个生物标志物采用一对匹配的抗体定位，抗体上偶联了独特的、部分互补的寡核苷酸链，可通过实时定量PCR进行检测。该技术可以实现超多重检测，同时保持优异的数据质量。

截止目前，Olink panel已经分析了超过110万份样本，并发表了展示Olink数据的1000多篇文章，这说明了PEA技术产生的高质量数据为蛋白质生物标志物研究领域带来了重要影响。

在本文中，我们想要提出的是：“Olink的研究数据与其他技术的数据相比是怎样的？”我们展示了从单重ELISA到多重检测的比较案例，并提供了比较Olink数据与其它技术的数据时的一些要点。

基于抗体的单重检测

ELISA

Siegbahn等人的一项研究表明，Olink的多重检测与临床实验室用于常规分析的单重全自动ELISA检测之间具有良好的相关性^[1]。该研究对共计10,000例样本的三个大队列（ARISTOTLE, PLATO 和STABILITY）进行了用于体外诊断的单重检测。该检测采用电化学发光（ECL）读取方式，在cobas分析仪运行了Elecsys分析（罗氏诊断），检测结果与Olink多重检测对应结果（采用Olink CVD III panel检测的生长分化因子15（GDF-15））的相关性如图1所示。值得注意的是，Olink panel只需要1 μl 血浆即可同时检测92种蛋白，而Elecsys检测GDF-15则需要35 μl 血浆。这也是PEA技术一个重要的特点，因为临床样本量通常非常有限。

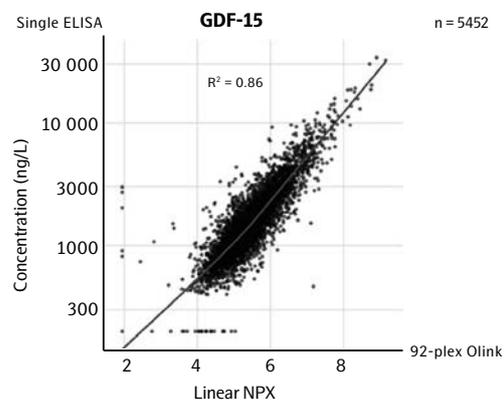


图1. GDF-15. Elecsys检测与Olink CVD III panel多重检测对应结果间的相关性。

下面（图2）的例子则采用相同的抗体对Olink多个panel的PEA检测和市售ELISA之间进行了直接比较。在本例中，对白介素6（IL-6）的检测显示了Olink 92-plex PEA 分析和R&D Systems™ 单重 ELISA 分析间的强相关性。ELISA需要100 μl 样本，而Olink只需要1 μl 样本。

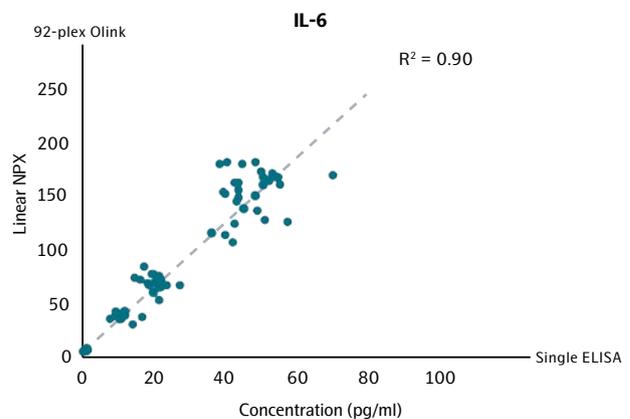


图2. IL-6. 单重 ELISA 检测（R&D系统）与 Olink assay 多重检测对应结果间的相关性。

CMIA

Arrigo等人进行了一项研究，采用PEA技术和FDA批准的化学发光微粒子免疫分析法（CMIA, Architect i2000 平台，雅培诊断公司）对脑尿钠肽（BNP）定量的准确性进行了研究与对比^[2]。该研究对30例稳定慢性血液透析患者的共120份血浆样本进行了比较。

Spearman等级检验表示，CMIA与PEA技术所得到的BNP值具有较高的整体相关性（ $\rho=0.865$, $P<0.0001$ ），详见图3。

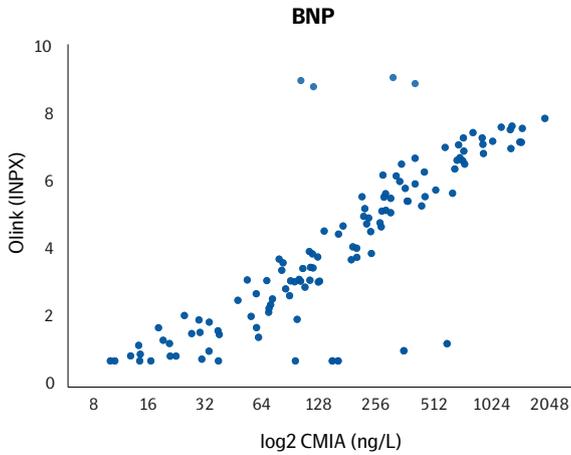


图3. BNP。Olink与CMIA分析BNP的相关性。

密切的相关性受到了两例离群样本的影响，可能反映了分析前样本的变异对两种测定方法造成了不同影响。当这两个样本被剔除时，Bland-Altman图显示了两种技术在整个测试浓度范围内具有非常高的相关性（ $\rho=0.966$, $P<0.0001$ ）。

作者总结道：“这项初步研究表明了基于PEA技术的多重分析可以在宽浓度范围内对血浆中BNP进行线性和精确定量，仅需要一微升血浆。”他们还建议用更大规模的研究来证实BNP的结果。

单重分析的高灵敏度

神经丝轻链蛋白（NFL）是一种高特异性的生物标志物，可用于监测中枢神经系统（CNS）的活动性损伤，包括多发性硬化症（MS）、肌萎缩侧索硬化症（ALS），和痴呆等神经退行性疾病，以及创伤性脑损伤^[3]。脑脊液和血浆中的NFL水平被用于监测中枢神经系统的损伤，而创伤性更低血浆样本则更适合监测疾病进展。血浆中NFL的浓度水平比脑脊液中低50倍，因此目前的ELISA方法并不建议用于血浆NFL检测。Quanterix的高灵敏Simoa技术对NFL的单重检测进行了完全优化，可覆盖两种基质的浓度范围。

Olink也开发了一种NFL的检测方法（用于其神经探索panel），与Simoa技术采用了相同的抗体

（NF-light™，来UmanDiagnostics, Umeå, Sweden）。Olink的NFL分析覆盖了脑脊液和血浆中NFL的全部范围，并在多发性硬化症患者和对照组的血浆样本中展现了与Simoa NFL分析高度的相关性（图4）。

这表明了PEA技术可以在92重格式下进行高灵敏度的检测，与高灵敏单重“金标准”检测方法的性能相匹配，并且仅使1μl血浆或脑脊液就能够提供额外91个蛋白的数据。

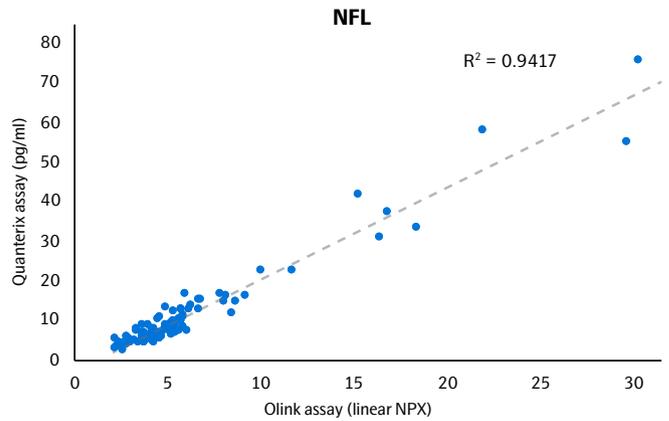


图4. NFL。Olink与Simoa分析NFL的相关性。样品由Tomas Olsson教授友情提供（Karolinska Institute, Stockholm）。

基于抗体的多重检测

在Mahboob等人的一项研究中，Olink Oncology I panel 被用来分析结肠直肠癌（CRC）杜克分期患者的血浆样本，以识别早期CRC检测的生物标志物^[4]。为了将Olink的结果与FDA批准的检测技术进行验证，研究采用基于Luminex™技术建立的BioPlex Pro™ 人细胞因子27-plex panel对相同的样本集进行了分析（请注意，具体的Luminex™ 细胞因子检测并没有经过FDA批准）。

对两个平台间13种常见癌蛋白表达谱进行比较，9个蛋白在平台之间表现出了合理的相关性，且PDGF亚基B的Spearman相关性尤其强（ $\rho=0.87$, p and q values = 0）。有趣的是，Olink检测到的CEA、IL-8和催乳素水平在CRC的不同分期之间均存在显著相关性。

研究作者认为，Olink-鉴定的蛋白是CRC疾病发展潜在的全新标志物，在临床肿瘤学中具有应用潜力^[4]。

Olink, MSD和Myriad RBM平台的评估与对比

一个客户对Olink、MSD和Myriad RBM三种平台进行了头对头对比评估，以确定哪种蛋白质生物标志物技术最适合在他们的临床试验中使用。

阶段1: 精密度

第一阶段对分析方法的性能进行了评估。来自于10名健康个体和10名慢性淋巴细胞白血病患者血浆样本被用于Olink肿瘤免疫panel的三次重复分析。得出的板内-CV值为4%；板间-CV值为6%，检出率为87%。

阶段2 线性度

在第二阶段，八个高蛋白水平样本在四种稀释倍数下被重复分析。所选的目标分析物为：趋化因子CCL2、CCL3、CCL4；干扰素 γ (IFN-gamma)；白介素IL-10、IL-18、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8和肿瘤坏死因子 α (TNF-alpha)。并生成了以上分析物的标准曲线。

结果总结

在采用三种技术检测13种目标蛋白并进行比较时，某些单独的蛋白在一个平台上比另一个平台更容易被检测到，这是可预期的（图8）。

在全部八个样本中均检测到的蛋白数目为：MSD 9个，Olink 7个，RBM 2个。在所有样本中均未检测到的蛋白数目为：RBM 6个，Olink 2个，MSD 3个（包括未使用MSD检测的IL-18）。由上可得，RBM Myriad在本次比较中的检出率较差，这可能与它们的检测要求1:5稀释有关，而Olink和MSD可以分析未稀释样本。Olink和MSD则具有相似的检出率。对于TNF- α 和IFN- γ ，MSD比Olink具有更好的检测能力，在所有样本中都检测到了这些蛋白。

客户还发现来自Olink分析的数据精度和线性都非常优秀，尽管对TNF- α 和IFN- γ 的检出率较低，客户在检测技术中依然选择了Olink，并声明如下：“从我们的立场来看，使用Olink进行大规模的生物标志物发现工作非常有意义。”

目前TNF- α 和IFN- γ 的Olink检测已得到了改进，检出率已得到显著提高（参见第四页驱动检测技术改进信息栏）。我们重新分析了在前述的比较研究中所使用的样本（未稀释），采用改进的检测方法，在所有样本中均检测到了目标蛋白（图5和6）。

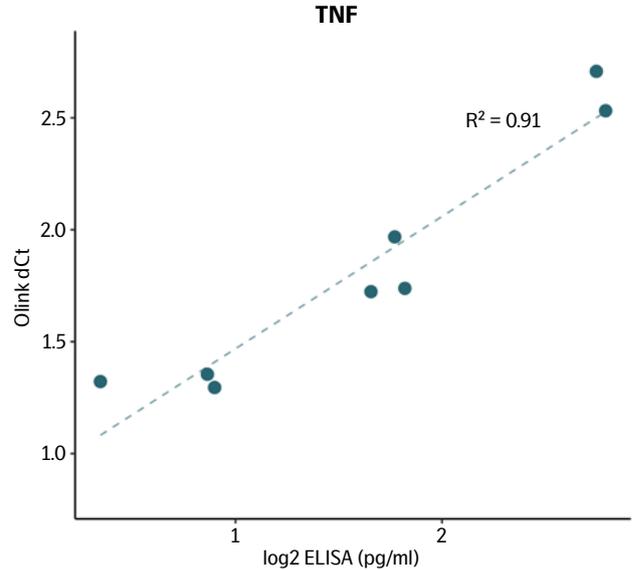


图5. TNF。高灵敏度ELISA (R&D System) 与改进后的单重Olink TNF- α 检测的相关性。

对于TNF- α 的检测，我们将PEA数据与R&D System的高灵敏度ELISA（金标准）数据做了对比，这些数据均显示出了非常高的相关性（ $R^2=0.91$ ）。

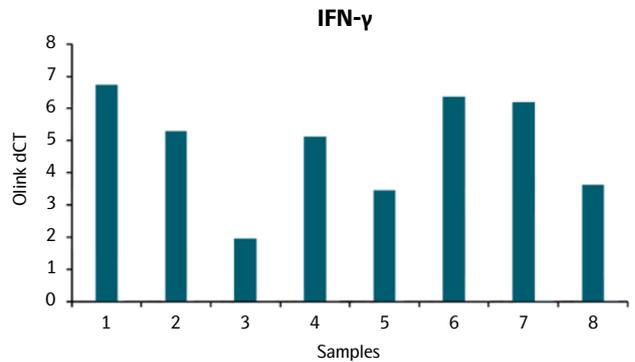


图6 . IFN- γ 。改进后的单重Olink检测对IFN- γ 的灵敏度更高。

随着对两种蛋白检测方法的改进，Olink与MSD在所选的13个目标蛋白中均可以在全部样本中检测到9个蛋白。综上所述，Olink的表现优于RBM Myriad，在所有对比中与MSD的表现等同。

驱动检测技术改进

在某些情况下，Qink会参考其它技术设定基准来进一步改进现有检测技术。一个例子是Qink在炎症或肿瘤免疫panel中对TNF- α 和IFN- γ 的测定。

背景

之前的Qink TNF- α 检测专门针对生物活性的天然三聚体 TNF- α 。在许多样品中，三聚体的检出率都相对较低。由于我们的客户表达出想要检测血清和血浆中可溶性TNF- α 单体和二聚体的强烈愿望，Qink决定开发新的检测方法以实现这一点。客户也要求提高 IFN- γ 的灵敏度，鉴于该标志物的检出率相对较低，Qink也优化并改进了检测方法。

检测技术改进

为了开发新的检测方法，我们在75个TNF- α 的抗体组合中筛选出23个抗体；在73个IFN- γ 的抗体组合中筛选出16个抗体，使用来自于健康受试者和/或不同疾病患者的样本，样本中的TNF- α 或IFN- γ 可能会升高。该项丰富工作的结果是每个检测确定了最佳抗体组合。改进后的两种方法在健康对照组和一系列不同疾病类型的血浆样本中均展现了更高的（图7），并在验证实验中在所有血浆样本中100%检测到了高于LOD/LLOQ的信号。

新的TNF检测技术与R&D System™的ELISA检测金标准相比，具有非常好的相关性（ $R^2=0.92$ ）。新检测方法的校准曲线和验证数据均可以在Olink网站上找到。

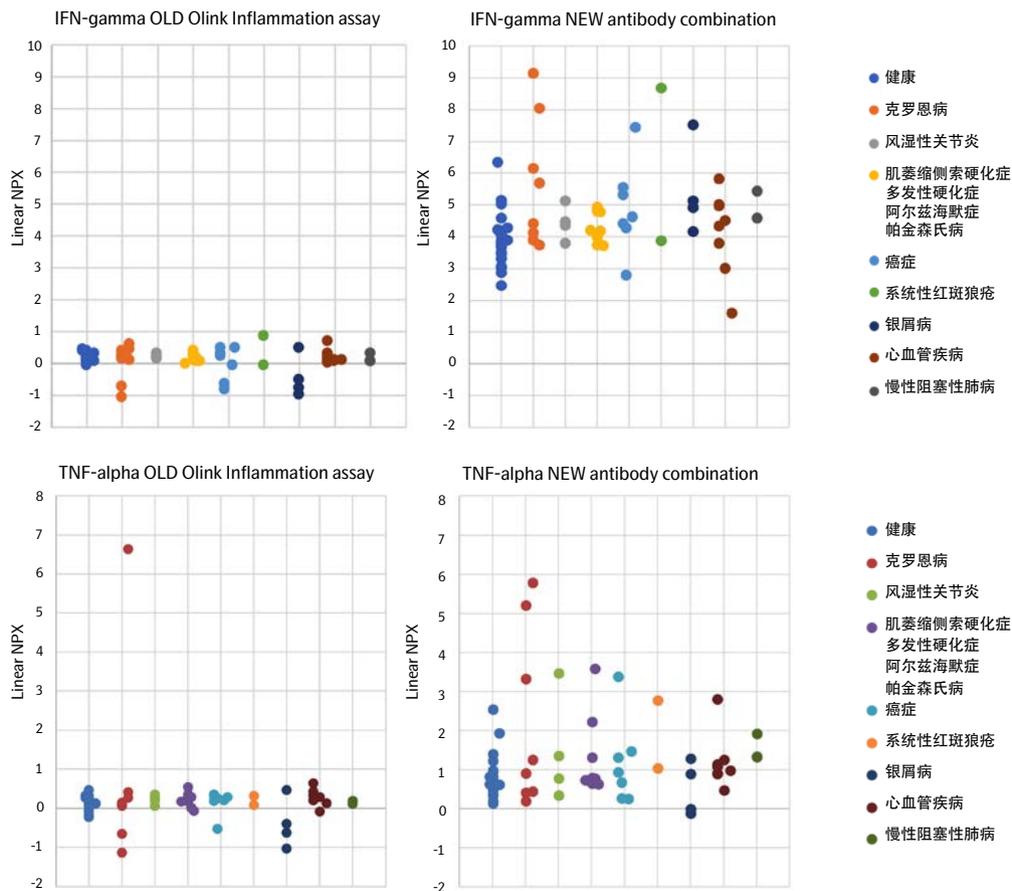
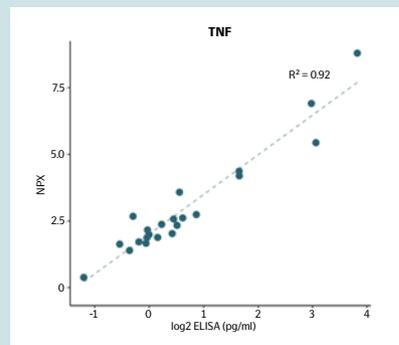


图7. 检测技术改进图示。右侧的图中显示了最终优化的炎症panel对不同疾病中IFN- γ 和TNF- α 的检测能力；左侧的图中则显示了之前的panel相应的检测能力。

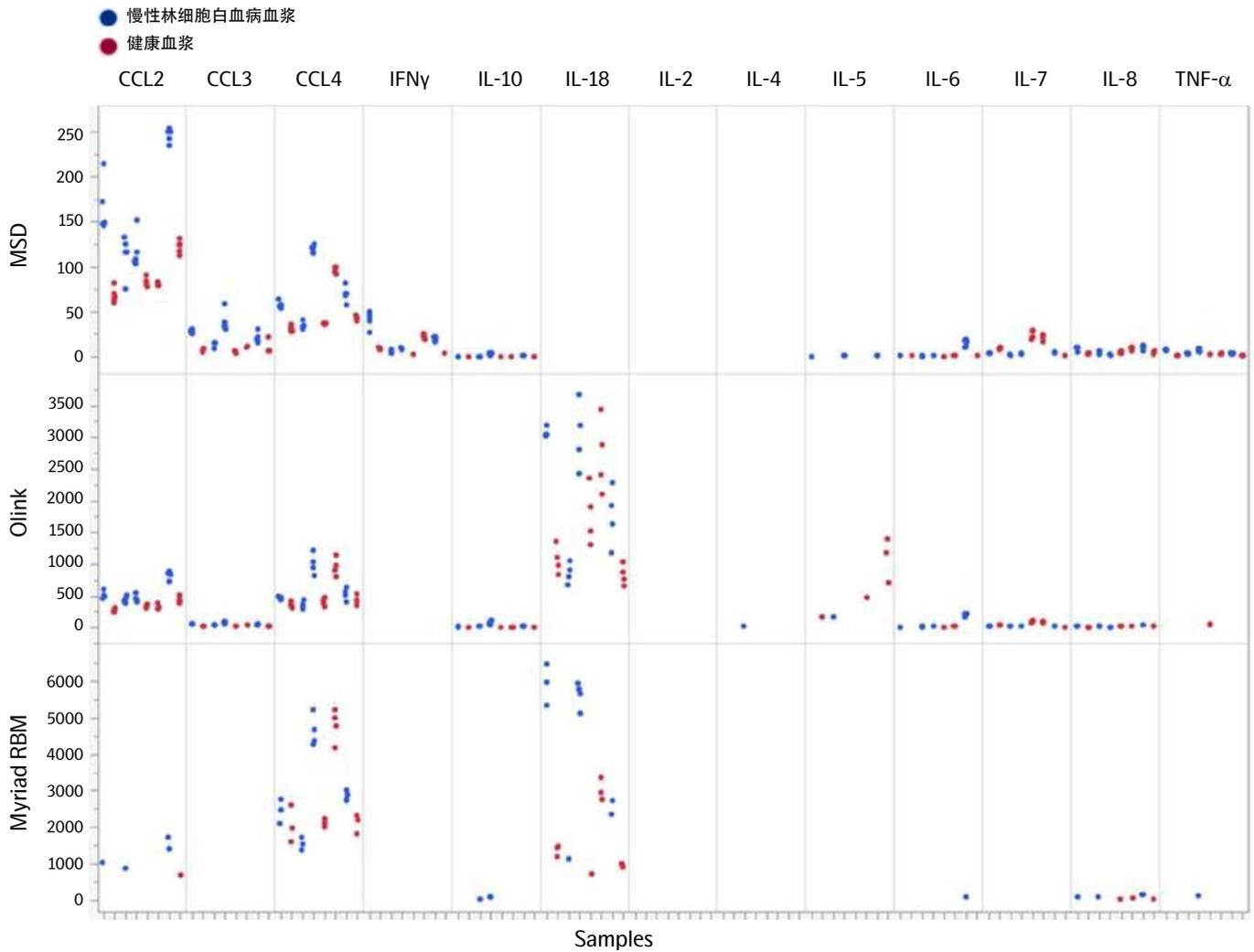


图8. MSD, Olink和Myriad RBM在临床试验中的应用。在MSD和Olink平台上, 样本以未稀释和1:2, 1:4以及1:8的稀释方式运行, 而Myriad RBM采用了4种稀释: 1:5, 1:10, 1:20和1:40。IL-18没有在MSD平台上检测。y轴表示各个平台的稀释校正浓度; x轴表示每次测定所检测的8个样本。

基于非抗体的超多重检测

在Sun等人的一项研究中, 来自Somalogic™ 的蛋白数据需要通过另一种方法来验证。样本的一个子集通过Olink 炎症, 心血管II 和 心血管 III panel进行了分析^[5], Olink和Somalogic 两个平台对选定子集中蛋白定量性状位点 (pQTLs) 的估算效应值有很强的相关性 ($r=0.83$)。

由于该相关性的研究是单向的 (Somalogic 到 Olink), 因此还没有证据表明采用Olink的单独蛋白数据可以得到额外的 pQTLs。这一点可能很重要, 因为Somalogic在其所覆盖的大量蛋白质中识别出顺式-QTLs的频率明显低于使用Olink panel进行蛋白检测所报道的频率^[6]。

基因组学

SCALLOP (www.olink.com/scallop) 是一个采用Olink panel进行蛋白质分析来发现蛋白定量性状位点 (pQTLs) 和全新生物标志物的合作框架。在一项具有里程碑意义的发表^[6]中报道了顺式-pQTLs的高检测频率 (在83个蛋白中检测到了41个)。这通过基因组学提供了非常强的特异性的正交验证, 因为所识别出的多态性与目标蛋白的基因编码位置一致。

在Målarstig等人一项未发表的研究中, 采用Olink检测了血液中大量与心血管相关的蛋白质, 并采用经典流行病学和相关研究评估了顺式-pQTLs。如果患病风险较高的个体某种蛋白质水平较高, 这种蛋白就可能与疾病相关。然而这并不意味着该蛋白会导致疾病的发生, 它也可以只是疾病过程的一个结果。

为了确定一种蛋白是否会导致疾病发生，可以使用对反向因果关系不敏感的遗传学方法。在分析中，采用调节蛋白质水平的基因变异和孟德尔随机化结合，而不是仅仅关联蛋白质自身水平。这种方法需要事先了解哪些遗传变异与单个蛋白质有关联。

“我们使用Olink PEA 技术的心血管 I panel 测量血浆中蛋白水平并进行了基因组相关性研究，研究结合了来自于13个队列研究的数据，共包含约22,000名受试者。共有90个蛋白通过了我们的质量控制，其中80个蛋白的顺式-pQTL超出了基因组显著水平 ($p < 5 \times 10^{-8}$)。这意味着对于90%的被测蛋白，都有正交证据表明该分析检测到了预期的蛋白。” (Anders Mälarstig, 辉瑞和卡罗林斯卡学院，个人对话)。

Mahdessian等人在一项多组学研究中发现了特定蛋白质的Olink检测水平和GWAS数据间的类似关联^[7]。该研究强烈表明了MMP-12与大动脉粥样硬化中风相关，血浆中的MMP-12水平与基因SNP和临床表型均相关，如突发心脑血管事件和颈动脉内膜-中层膜厚度的发展。此外，MMP-12在动脉粥样硬化斑块中增强弹性蛋白降解和巨噬细胞侵袭的功能得到了转录组学、蛋白质组学和免疫组化的支持。

缺乏相关性——谁对谁错

偶尔也会出现Olink的数据与标准ELISA结果不相关的情况——所以在这种情况下，是否有可能找出哪种试验是正确的？

背景

一项研究出现了类似的问题，该研究使用Olink炎症panel通过Olink分析服务检测了细胞裂解液和细胞上清液，并在不同细胞组别间发现白血病抑制因子 (LIF) 和白血病抑制因子受体 (LIF-R) 有显著差异。但当客户采用ELISA对相同细胞裂解物和上清液中的LIF和LIF-R进行检测时，ELISA无法重现Olink所获得的显著性结果。

实验和结果

为了进一步研究这个问题，Olink进行了一系列实验。实验中采用的重组LIF和LIF-R蛋白来自于四个不同的供应商。Olink对LIF-R的检测并没有识别出客户在ELISA实验中同一个供应商ELISA试剂盒中的LIF-R抗原 (图9)。

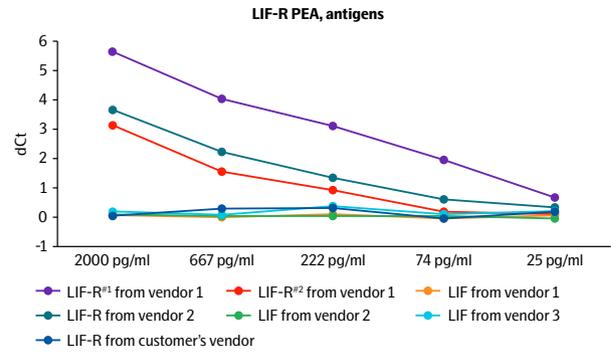


图9. LIF-R的PEA分析。Olink的LIF-R分析未检测到客户供货商的LIF-R抗原。

然而Olink的LIF检测却检测到了客户使用供货商的LIF-R抗原 (图10)。

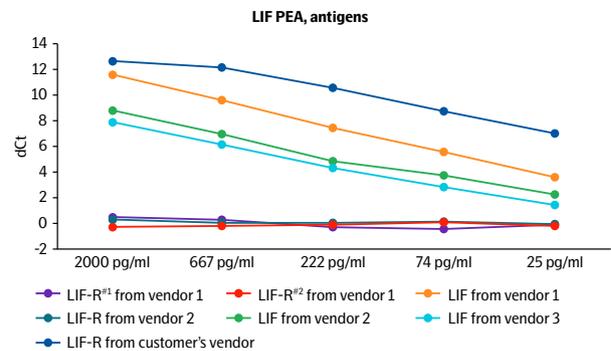


图10. LIF的PEA分析。Olink的LIF分析检测到了客户供货商的LIF-R抗原。

来自于客户使用供货商的ELISA试剂盒只对来自其它供货商中一家的LIF抗原有着显著的反应，而对测试中使用的其它供货商的LIF或LIF-R均没有反应。

结论

Olink的调查结果表明，客户使用的LIF-R ELISA试剂盒其实测量了一个类似LIF-R的蛋白序列，而Olink炎症panel检测到的LIF-R是正确的。更多信息可联系 support@olink.com 获取。

不同技术对比——需考虑的要点

有一些原因可以解释为什么数据可能不相关。在对Olink的数据与其它技术的数据进行比较之前，我们总结了一些要点：

- 确保相关性研究有足够的 datapoints，并且 datapoints 之间的检测范围足够显示相关性，而不仅仅是方法的技术可变性。
- 为了验证不同方法测量的是哪种确切的蛋白，可以在样品中加入目标抗原。
- 当对两种不同方法的结果（如Olink和ELISA）直接进行关联时，要确保使用了相同的样本，并做了正确的注释。最好是从完全相同的小瓶中提取样品，并在同一时间点进行分析。
- NPX，蛋白的归一化表达，是Olink以Log2格式表示的任意单位。当NPX数据要与另一种方法的数据相关和/或绘图时，请记住需要对NPX数据(2^{NPX})进行线性化，或对从被测试的其他技术中获得的线性数据进行log2转换。也可以用Bland-Altman法作为相关性图的替代。
- 当通过分析另一个队列来验证结果时，如果两个队列使用相同的样本基质，并用类似的方式处理样本，结果将会是最准确的。
 - 需要注意的是，不能将肝素钠血浆和EDTA血浆视为同一种样本基质，因为这两种抗凝剂会对凝血级联的不同步骤产生影响，导致样本类型有不同的组成。
- 如果你没有发现任何明显的相关性：
 - 调查一下这些方法是否测量了蛋白质的同一部分，由于裂解等原因，蛋白质的不同结构域可能以不同的浓度存在。
 - 检查方法间是否有相似的检测范围，以及结果是否在范围之间。
 - Bland-Altman图可以告诉您在某些特定的测量范围是否存在问题，如浓度较低的一端。

总结

比较来自于不同技术的数据是验证结果的好方法，本文表明Olink的数据可以使用文中介绍的所有的其它技术进行验证。正如前面章节所述，在执行不同技术间的比较时，需要考虑许多要点。为了协助我们的客户分析Olink数据，我们有一个专门的数据科学团队，提供收费的统计学服务，也包括与其它技术的数据对比的相关服务。

参考文献

1. Siegbahn A. *et al.*, A comparison of the proximity extension assay with established immunoassays, in *Advancing precision medicine: Current and future proteogenomic strategies for biomarker discovery and development*, p. 22-25. Science/AAAS (2017).
2. Arrigo M. *et al.*, High accuracy of proximity extension assay technology for the quantification of plasma brain natriuretic peptide. *J Clin Lab Anal* (2018)
3. Zetterberg H., Neurofilament Light: A Dynamic Cross-Disease Fluid Biomarker for Neurodegeneration. *Neuron* (2016)
4. Mahboob S. *et al.*, A novel multiplexed immunoassay identifies CEA, IL-8 and prolactin as prospective markers for Dukes' stages A-D colorectal cancers. *Clin Proteomics* (2015)
5. Sun B. *et al.*, Genomic atlas of the human plasma proteome. *Nature* (2018)
6. Folkersen L. *et al.*, Mapping of 79 loci for 83 plasma protein biomarkers in cardiovascular disease. *PLOS Genetics* (2017)
7. Mahdessian H. *et al.*, Integrative Studies Implicate Matrix Metalloproteinase 12 as a Culprit Gene for Large-Artery Atherosclerotic Stroke. *J Intern Med* (2017)

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：1118,CN1.1, 2022-11-09



关注官方微信公众
号可获取更多详细信
息