

白皮书

炎症蛋白的多重分析：多平台比较研究

引言

当今世上许多最畅销的药物无法对全部患者有效，主要原因是我们对疾病的生物学和其在个体之间的差异仍缺乏了解。蛋白质直接控制和调节身体的大部分生物学功能，对健康、疾病和药物疗效都至关重要。因此，将医疗保健服务从目前的“一刀切”方法转换为更精准和明智的解决方案是必不可少的。为了助力此类转换，我们需要准确且精密的蛋白组学平台。为了能在生物样本中同时检测多种蛋白，目前已经有几种基于抗体检测的平台被开发。比较这些平台的相关性或质量参数并不简单。不同测量者对测量的定义也可能略有不同，比如对检测限的定义。多重检测往往会伴随着交叉反应结合或信号读出干扰的影响，将导致特异性差。上述问题还会随着检测的多重性增加而升级。Olink专有的邻位延伸技术（PEA）通过带有互补DNA寡核苷酸链标记的一对抗体，采用双重识别方法避免了这些问题（参见图 1）。

白皮书内容

- 三种多重检测蛋白组学平台的比较研究
- Olink Target 48 细胞因子与Olink Explore 1536的相关性比较（与麻省总医院合作）

研究目的

该研究的目的是将 [Olink® Target 48 细胞因子](#) panel 与两种常用的多重检测蛋白组学商业化平台进行直接比较（Mesoscale Discovery (MSD) 和BioRad/Luminex）。通过这项比较研究，我们旨在验证Olink技术相对于在蛋白标志物研究中广泛应用的同类产品的质量。本项研究的目的并非调查或者解释不同平台之间的潜在差异，也没有暗示或有意评判其它涉及到的技术。在随后的研究中，我们还验证了Olink Target 48 细胞因子和Olink Explore 1536的相关性。

方法

这是一项针对三个基于抗体的平台（其具有最大的蛋白靶点重叠）和Olink Target 48 细胞因子的比较。三个技术平台分别为：Olink、MSD和Luminex。我们使用了三个相同的样品板，在每个平台上运行，并采用20种检测到的重叠蛋白做直接比较。每个平台在瑞典斯德哥尔摩-乌普萨拉的不同实验室运行。

表1. 平台、样品和分析实验室信息。

Olink技术采用1 µL/panel，BioRad/Luminex通常使用12.5 µL/panel，MSD则需要20-40 µL/panel。MSD的每个panel只可以最多检测10个蛋白，这是样本消耗量增加的原因。

	Olink	MSD	Luminex
	Olink R&D Uppsala	SciLife Lab Uppsala	SciLife Lab Stockholm
每板运行样品量	80	80	80
每板检测蛋白数	45	10	27
总蛋白检测数	45	43	27
样本消耗量	20 µL	150 µL	50 µL

采用线性、稀释级数、检测限，检测范围和精确度对交叉检测的结果进行评价和比较。三种panel有20个重叠蛋白，Olink和MSD还额外有13个重叠蛋白。由于生成的大量的数据在白皮书中无法全部呈现，我们将完整数据放在了附录（[white paper data appendix](#)）中。

技术平台

Olink

得益于PEA技术，Olink的panel能够在实现高水平多重检测的同时仍保持数据的质量。每个蛋白均通过一对匹配的抗体识别，抗体上偶联了独特的、部分互补的寡核苷酸链，并根据Olink特定的读取平台采用实时定量PCR（qPCR）或新一代测序（NGS）进行测量。成对抗体的识别和DNA-偶联提供了卓越的特异性^[1]。

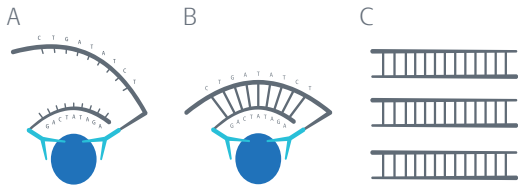


图1. PEA技术读取前步骤。(A) 用DNA寡核苷酸链标记的一对抗体在溶液中与目标蛋白结合。(B) 寡核苷酸链被带入到邻近位置，杂交并通过DNA聚合酶延伸。(C) 新创建出的DNA条码片段通过PCR扩增，并准备用NGS或qPCR读取。

MSD (MesoScale Discovery)

MSD采用了一种电化学发光检测技术。该技术可提供最多10个检测点的分析，板上每孔每点。在特有的孔板底部绑定了碳电极，可以很容易地吸附生物试剂。每个点的夹心免疫吸附由一个针对目标分析物的捕获抗体、目标分析物和一个具有目标分析物特异性的检测抗体（上面偶联了一个被称为sulfo-tag的电化学发光标签）所组成。为了后续的检测，加入缓冲液为电化学发光创造化学环境。该仪器向孔板加压，电压使被捕获的发光标签发光，并由读板仪器检测^[2]。

Biorad/Luminex

Luminex的技术是基于彩色编码的磁珠。每个磁珠在多重分析中都有不同的红色或绿色信号比例。这些磁珠被偶联到与样本一起孵育的捕获抗体上，另有二次检测抗体与目标分析物结合。Luminex使用了一种扩增方法，其中抗体的检测是生物素化的，最终的检测步骤是加入发出荧光信号的链霉亲和素。在与不同磁珠和不同的捕获抗体共同孵育后，这些磁珠将根据它们的光谱位置被分类。然后仪器和软件会用每个特定标记磁珠的光谱位置推断出相关的荧光信号^[3]。

检测的重叠蛋白

当选择所对比的平台时，我们的目标是有尽可能多的重叠蛋白。

对于MSD，我们尽可能优先采用V-plex检测，共检测了23个生物标志物。另外的10个生物标志物则采用U-plex检测。使用的MSD panel有：V-PLEX 趋化因子Panel 1（人）、V-PLEX促炎Panel 1（人）、V-PLEX 细胞因子Panel 1（人）、V-PLEX细胞因子Panel 2（人），和10-plex的人U-PLEX（G-CSF/CSF3、IL-17F、IL-33、FLT3L、TRAIL/TNFSF10、SDF-1α/CXCL12、MIP-3β、MCP-2/CCL8、MCP-3/CCL7、I-TAC）。

Luminex检测采用了BioRad公司的Bio-Plex Pro人细胞因子27-plex panel。

Olink与MSD的总重叠蛋白为33个；Olink与Luminex的总重叠蛋白为20个。三种panel的重叠蛋白为20，这些蛋白在表2中列出。

表2. Olink，MSD和Luminex检测的重叠蛋白。

UniProt ID	Protein	UniProt ID	Protein
P51671	Eotaxin	P22301	IL-10
P09919	G-CSF	P35225	IL-13
P04141	GM-CSF	P40933	IL-15
P01579	IFN-γ	Q16552	IL-17A
P01584	IL-1β	P02778	IP-10
P60568	IL-2	P13500	MCP-1
P05112	IL-4	P10147	MIP-1α
P05231	IL-6	P13236	MIP-1β
P13232	IL-7	P01375	TNF-α
P10145	IL-8	P15692	VEGF-A

Olink vs MSD

所有三种检测平台均有20个重叠蛋白。然而MSD和Olink的panel还有额外13个重叠蛋白。这13个蛋白在下表中列出，检测结果也可以在附录（[white paper data appendix](#)）中查看。

表3. Olink与MSD额外的13个重叠蛋白。

UniProt ID	Protein
P49771	FL3LG
Q9P0M4	IL-17C
Q96PD4	IL-17F
Q95760	IL-33
Q14625	I-TAC
P80075	MCP-2
P80098	MCP-3
Q99616	MCP-4
Q99731	MIP-3β
P48061	SDF-1α
P01374	TNF-β
P50591	TRAIL
Q969D9	TSLP

样本

去除了识别信息的分析样本购买自一家生物样品库。我们在每个检测平台制备并运行了各三个样品板，并评估了线性、稀释级数、检测限、检测范围、精确度，相关性和干扰。该研究包括了来自健康成年捐献者的8个样本和来自炎症相关疾病确诊患者的24个样本。详见表4。

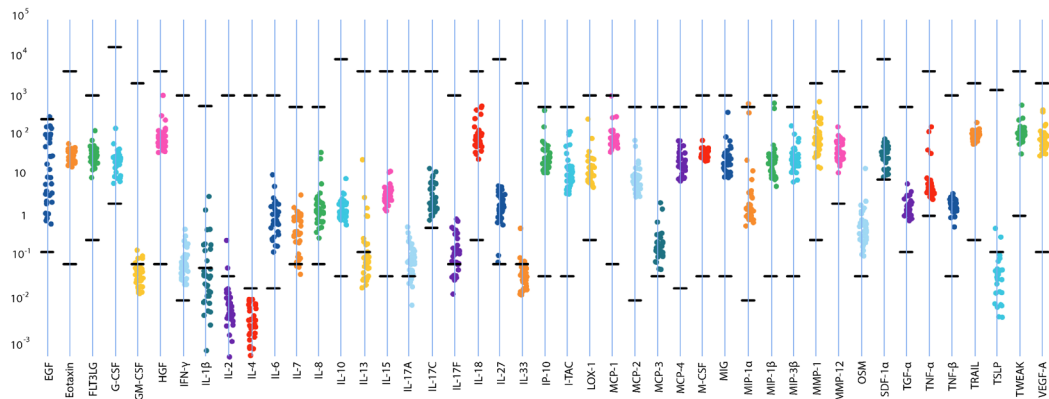
表4. 样本信息。

样本数	样本信息
3	阿尔兹海默症
2	特应性皮炎
3	冠状动脉疾病
3	克罗恩病
1	肝病
2	多发性硬化症 (MS)
2	银屑病
4	风湿性关节炎 (RA)
3	系统性红斑狼疮 (SLE)
1	溃疡性结肠炎 (UC)

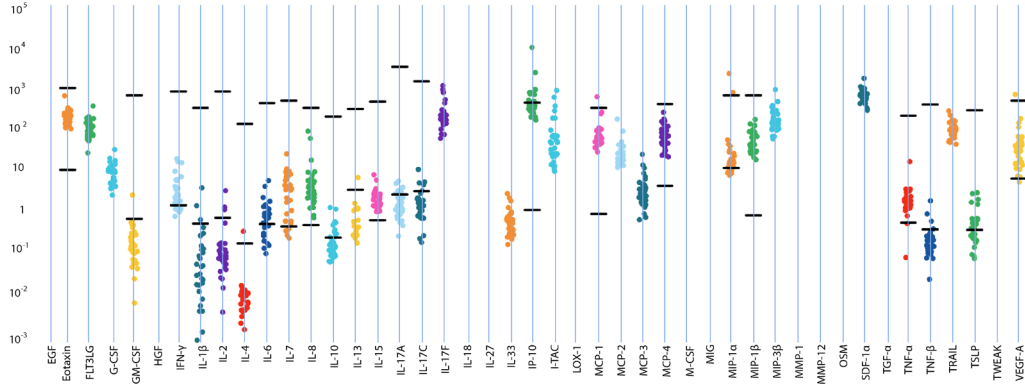
动态范围和样本分布

32个未稀释样本（8个健康样本和24个病理样本）检测的动态范围见图2。每个平台的检测限（LOD）和定量上下限LLOQ和ULOQ）被用来估计在定量限（LOQ）内可量化样本的百分比。MSD和Luminex的LOD与LOQ在SciLife Lab的报告中提供；Olink的LOD和LOQ则从Olink官网的验证数据中获取。数据的完整表格可以在Olink官网本白皮书的附录中查找。

Olink



MSD



Luminex

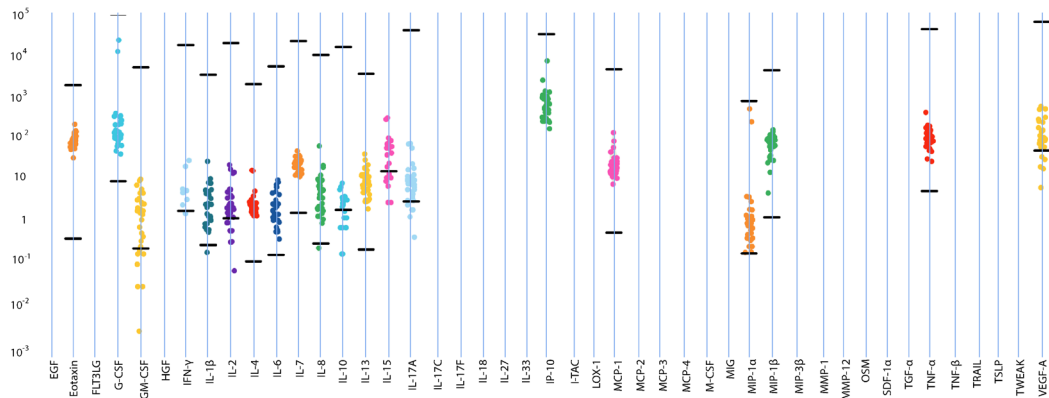


图2. Olink, MSD和Luminex的动态范围和样本分布。水平条带代表了每种检测的定量下限（LLOQ）和定量上限（ULOQ）。MSD的部分检测是在U-plex平台上运行的，因此缺少LOQ的信息，其它的检测是在V-plex平台上运行的。

精密度CV (%)

一个健康样本和三个病理样本共计四个样本各重复运行三次来评估精密度。板内精密度的%CV由每个样本的标准偏差除以统一样本的平均值计算而来（见图3和表5）。

定义
样品的变异系数（CV）指观测值的标准偏差除以平均值。

表5. 每个技术的板内精密密度%CV。

	Olink	MSD	Luminex
板内分析%CV（均值）	10 %	5 %	13 %

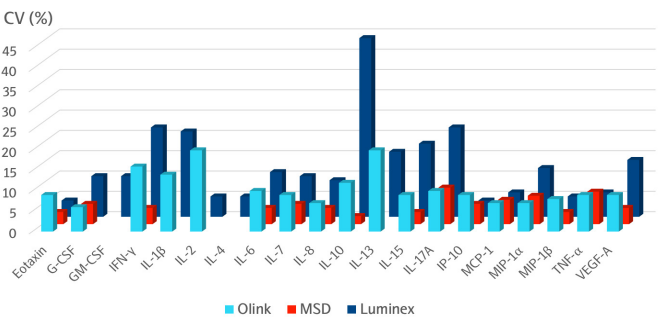


表3. 3个蛋白组学平台的板内分析% CV。低于LLOQ的检测结果显示为空白。

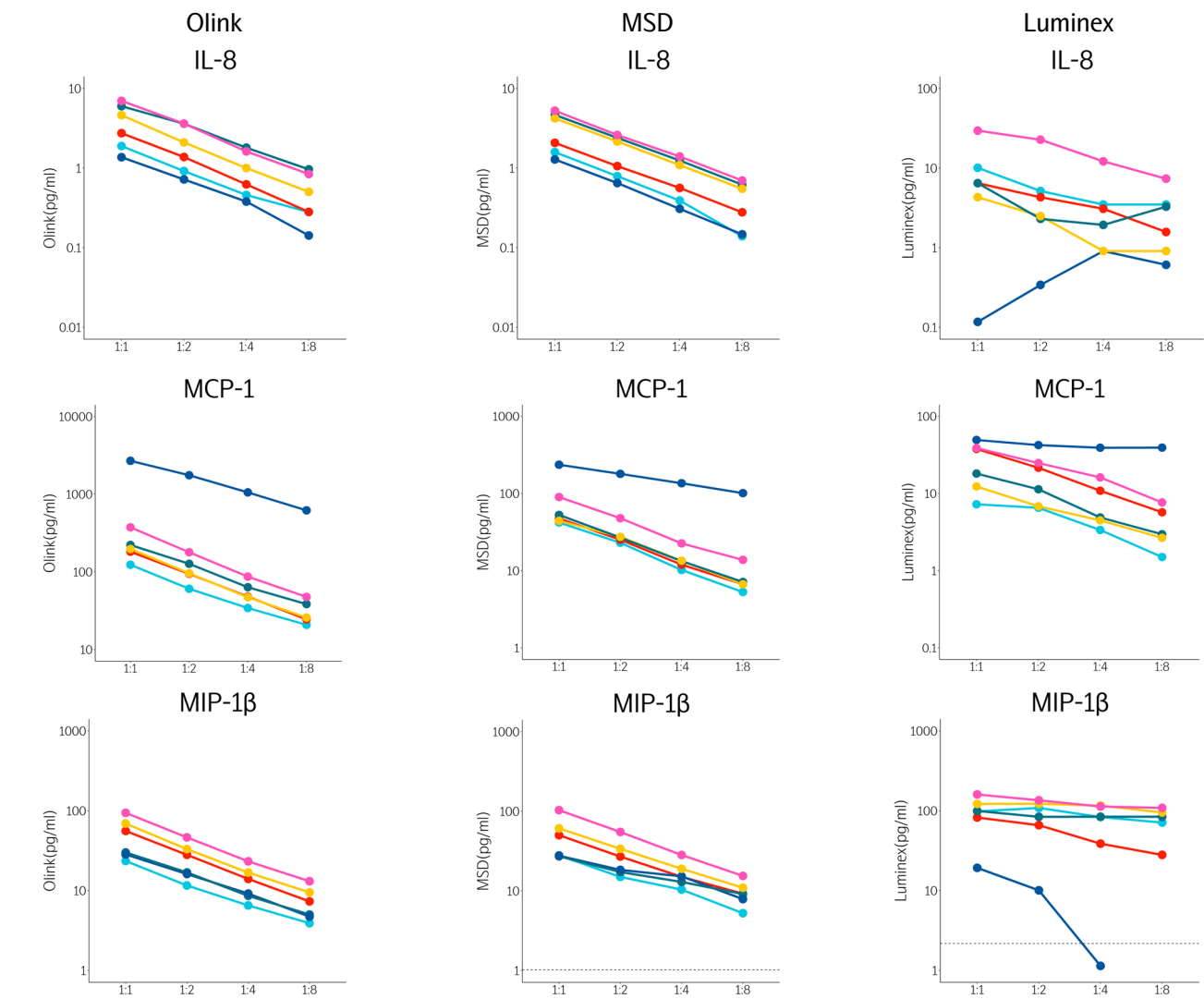


图4. Olink, MSD和Luminex的平行度（采用稀释级数计算）。Olink的结果在左侧展示；MSD的结果在中间展示；Luminex的结果在右侧展示。在所有图表中的每个样本都以相同的颜色展示。稀释级数看起来应该是线性的。值得注意的是，与Olink和MSD相比，Luminex的部分分析显示了更高的浓度并改变了样本顺序。虚线下的浓度低于LLOQ。

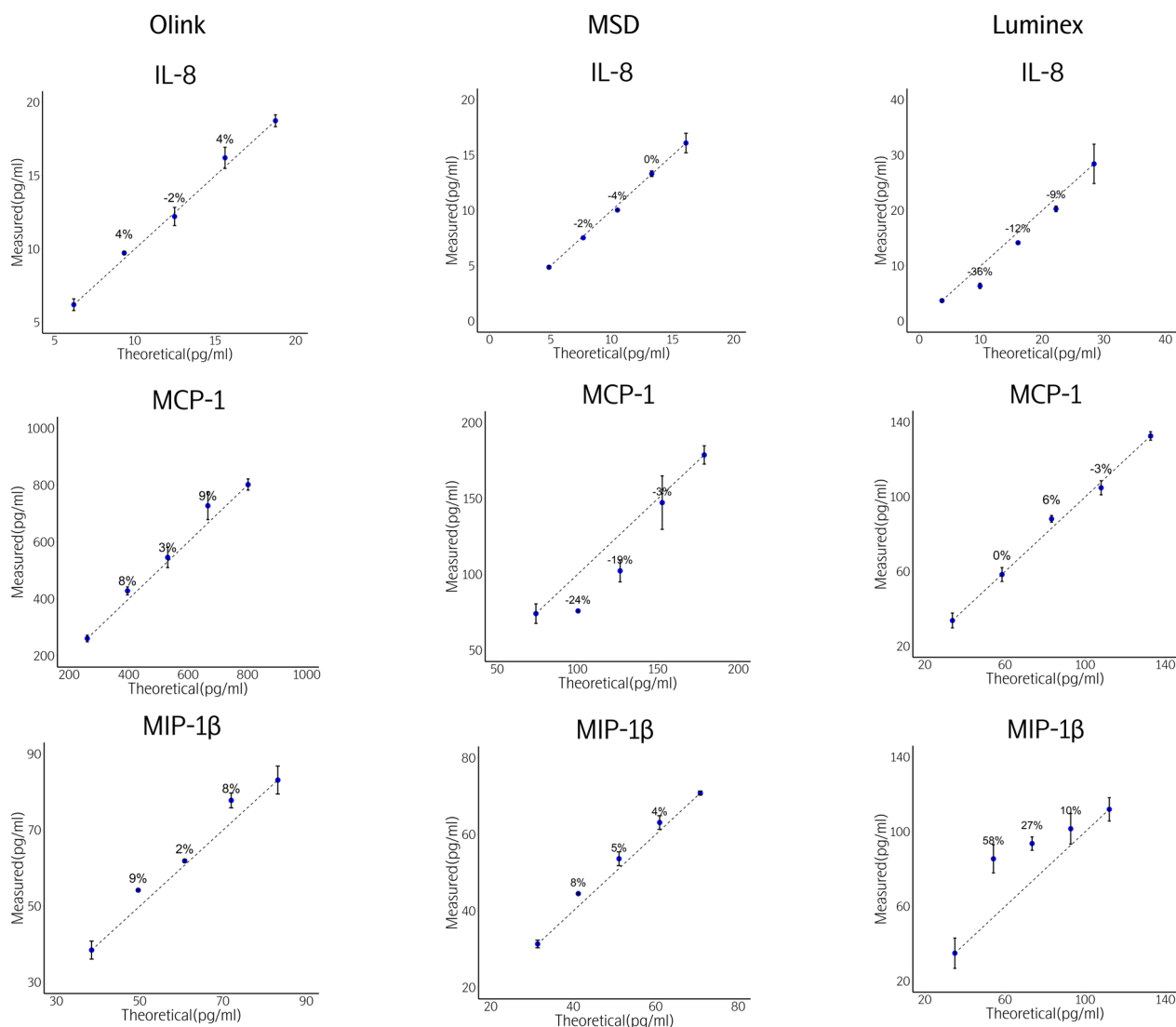


图5. 3例分析的平台线性：IL-8、MCP-1、MIP-1β。图表显示了测量浓度和理论浓度。柱形表示标准偏差，百分比表示每个点的准确性。

缓冲液的稀释系数（平行度）

健康样本和病理样本各三，共计六个样本被以1:2的倍数分别各稀释四次。Olink Target 48的样品稀释剂被用作所有三个平台样本的稀释。样本信息如表6所示。从图4所展示的数据中我们可以看出，Olink展现了出色的平行度。

表6. 稀释系数中使用的样本信息。

样本数	样本信息
1	过敏性皮炎
1	克罗恩病
1	系统性红斑狼疮，肺栓塞
3	健康成年捐献者

线性

我们选择了两个样本，下文分别称为 HIGH和LOW，两个样本分别展现了尽可能多的高浓度蛋白和低浓度蛋白。

线性的评估通过对高样本和低样本按照预先确定的不同比例混合稀释。

HIGH样本被诊断为糖尿病性肾病、2型糖尿病、哮喘、高血压、冠状动脉疾病、多发性硬化症，牛皮癣和慢性阻塞性肺病。LOW样本来自于健康捐献者。

表7. 用于线性比较的样本信息。

样本量	样本信息
100%	100% HIGH sample
75%	75% HIGH+ 25% LOW
50%	50% HIGH + 50% LOW
25%	25% HIGH + 75% LOW
0%	100% LOW sample

理论值和实际检测值的差异在图5的图表中以百分比展示，其中的柱形表示标准偏差。

五个低检测度的蛋白（GM-CSF, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-13）由于所有平台的检测结果均低于LLOQ而被排除在外。

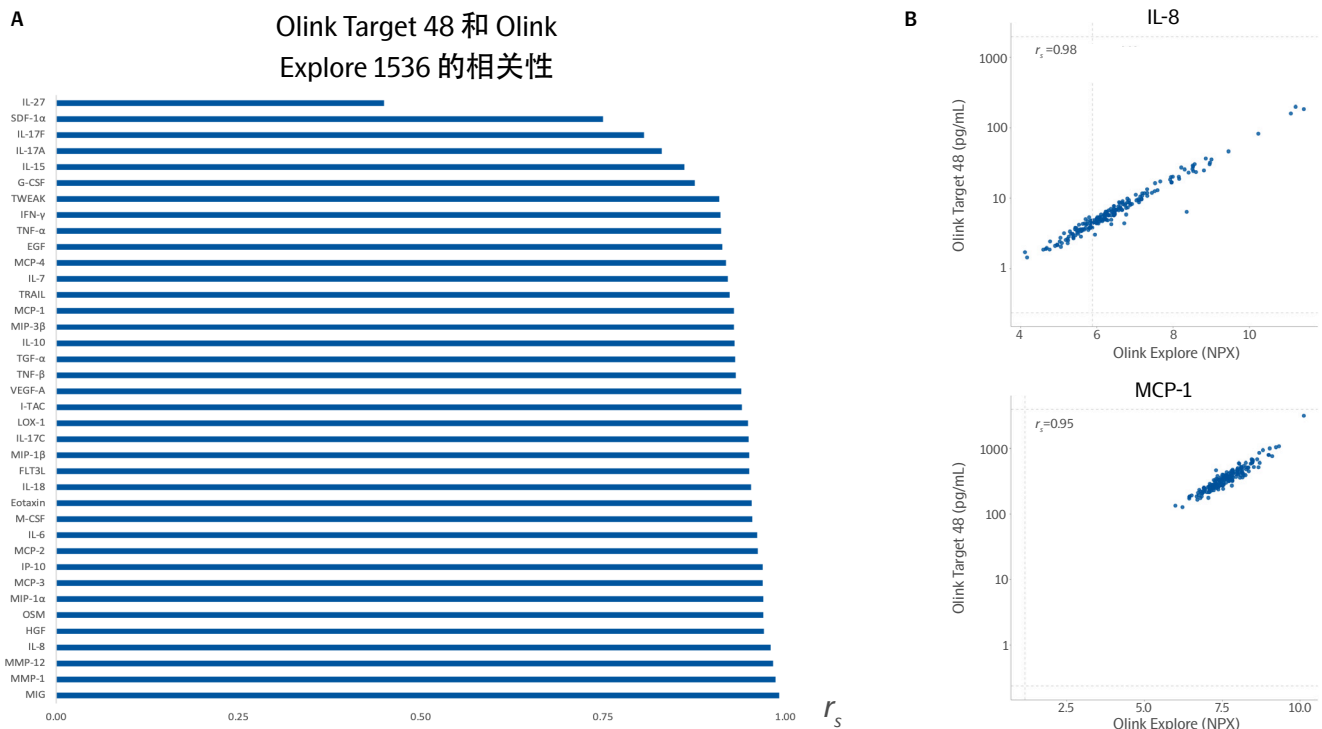


图6. Olink Target 48和Olink Explore 1536的相关性结果。A) x轴表示斯皮尔曼相关系数(r_s)。B) 图中展示了Olink Target 48 细胞因子和 Olink Explore 1536 中 IL-8 和 MCP-1的相关性。

在全部三个平台中均检测到了高于ULOQ的IL-6和IL-7浓度。IL-6和IL-7可以观察到高剂量过饱和效应。可以在 [white paper data appendix](#)中查看这些蛋白的图。

从图5的图片中可以看出，Olink展现出了良好的线性。

后续研究：Olink panel的对比

在后续的研究中，我们考察了Olink Target 48细胞因子和 Olink Explore 1536的相关性。Target 48 和 Explore 1536在45个蛋白的检测中有44个重叠。

与MGH合作的相关性研究

免疫检查点阻断（ICB）改变了转移性黑色素瘤和其它癌症的治疗方式。

定义

免疫检查点阻断采用免疫检查点抑制剂阻断检查点蛋白和其互作蛋白的结合。这阻止了“关闭”信号的发送，使T细胞能够杀死癌细胞。

然而，ICB治疗的响应结果很不一致，大部分患者的预后差。采用无创标志物预测ICB的疗效仍然是新兴研究领域。

在与MGH癌症中心的合作中，我们使用Olink Explore 1536对200例转移性黑色素瘤患者的基线水平、ICB治疗6周和ICB治疗6个月的血浆中约1500 种蛋白进行了全面的蛋白质组学筛选。

该研究证明了循环蛋白生物标志物在ICB治疗应答预测方面的潜力。具体来看，采用Explore 1536 测量到几种细胞因子的NPX水平在黑色素瘤患者治疗期间以及ICB应答者和非应答者之间具有显著的差异表达。

结果

为了确定几个关键生物标志物的最佳阈值，我们采用Olink Target 48 细胞因子panel 对相同黑色素瘤队列的子集进行了分析，蛋白浓度以pg/mL展示。为了进行相关性分析，我们在位于波士顿的Olink 分析服务部门采用Olink Target 48细胞因子对前期用Olink Explore 1536 分析过的来自于84例接受ICB治疗的黑色素瘤患者的200份样本进行了再分析。

总体看来，数据证实了在Explore 1536（NPX水平）平台和Target 48（pg/mL）平台上测量的生物标志物具有很强的相关性，请见图6。

在45个检测蛋白中，有6个蛋白在不多于5个样本中的检测结果高于LLOQ，被排除在进一步分析之外。另有6个蛋白的检测结果低于LOQ：IL-33、IL-4、IL-13、IL-2、TSLP和IL-1β。

余下38个检测蛋白的斯皮尔曼相关系数 (r_s) 的中位数范围在0.50-0.99（中位数为0.95）。33个检测蛋白的 r_s 大于0.9。

定义

斯皮尔曼相关系数 r_s ，测量两组等级变量之间关联的强度和方向。 r_s 越接近1，等级之间的关联性越强。

在黑色素瘤患者ICB治疗过程中，以及对ICB治疗有效和无效患者之间，以下生物标志物有显著的表达差异：

IL-6、IL-8、IL-10、MIG (CXCL9)，IP-10 (CXCL10) 和I-TAC (CXCL11)。

表8展示了Target 48 和 Explore 1536识别出的具有显著性的相同的生物标志物，以及这些生物标志物在两个平台间的相关性。

表8. 具有特殊意义的细胞因子的相关性。

细胞因子	斯皮尔曼系数 (r_s)
IL-6	0.96
IL-8	0.98
IL-10	0.93
MIG	0.99
IP-10	0.97
I-TAC	0.94

两种Olink平台上数据的相关性支持了这些关键细胞因子与ICB治疗应答的可靠联系。总体而言，对于44个蛋白的检测，高检测量的Explore 1536探索平台得到的NPX水平与48-plex平台得到的pg/mL浓度水平高度相关，证明了两种方法的可扩展性和重现性。

在黑色素瘤患者接受ICB治疗期间，鉴定出的细胞因子的NPX差异显著变化，并与以pg/mL计算的定量数据倍数的变化一致，进一步验证了以上发现。

结论

MSD 和 Luminex 一直以来被很多人认为是基于抗体的多重蛋白质组学研究的首选技术。这反映了两种技术在市场上有相对较长和成功的历史。科学的车轮一直向前，而新技术的发展将可能为研究人员提供新的解决方案，更好地满足研发需求。

Olink是一项快速发展的技术，具有无与伦比的特异性和可扩展性。在本篇白皮书中，我们的实验结果表明Olink在稀释序列中展现了优异的平行型和良好的线性。Olink的结果与MSD的结果具有更高一致性，这比MSD与其它方法或Olink与Luminex的一致性更高。因此我们可以看出，Olink的数据与成熟的低-或中等-plex的方法基本一致，并用其在多重检测分析中无与伦比的特异性和独特的低样本消耗提供了更广泛的、可扩展的解决方案。

后续的研究则表明不同的Olink panel上的蛋白标志物高度相关，与读取方法（qPCR或NGS），分析多重度或蛋白浓度单位（pg/mL或NPX）均无关。

Olink Explore 1536和Olink Target 48的数据展现了优异的相关性和可比性结果。这表明采用不同的读取技术（NGS或qPCR）并不会影响最终结果。

Olink可以提供多种解决方案，从小型定制化panel（www.olink.com/custom）到高通量的Olink Explore平台。Explore平台可以采用6 μ L的样本实现3000多个蛋白质的检测，并采用NGS读取（www.olinkexplore.com）。

参考文献

1. E. Assarsson *et al.*, Homogenous 96-plex PEA immunoassay exhibiting high sensitivity, specificity, and excellent scalability. *PLoS ONE* 9, e95192 (2014).
2. https://www.mesoscale.com/en/technical_resources/our_technology/
3. <https://www.bio-rad.com/en-se/applications-technologies/multiplex-detection-analytes-using-bio-plex-system> and <https://www.bio-rad.com/en-se/applications-technologies/multiplex-immunoassays>

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：1146,CN1.1, 2022-11-04



关注官方微信公众号
可获取更多详细信息