

白皮书

# PEA 超多重免疫分析技术 可基于qPCR 或NGS 读取



扫码观看PEA视频

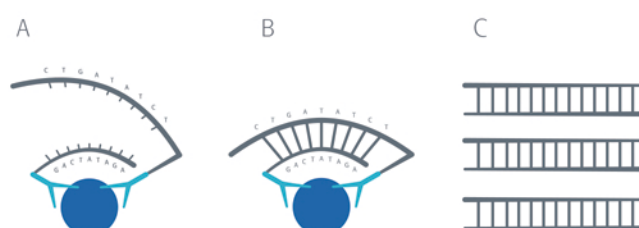
## 介绍

随着基因组学的兴起，蛋白质研究正成为了解实时人体生物学的新前沿。蛋白质标志物的发现可实现具有病理生理学重要意义的特征鉴定，在基因组和表型之间建立桥梁。此类数据可能会对改善未来的医疗条件产生深远影响，特别是在精准医疗方面。但由于缺乏能够提供可靠特异性，高通量，良好准确性和高灵敏度的技术，该项发展一度备受阻碍。

## PEA 技术 - 将基于亲和力的蛋白质测量提升到全新水平

邻位延伸分析（PEA）技术<sup>[1]</sup>将基于抗体和DNA的最佳方法结合起来，可提供蛋白标志物发现与开发的独特技术。该项技术已经被 Olink Proteomics AB 公司商业化，用来开发一系列 Olink 生物标志物 panel。PEA 技术成功地融合了基于抗体的免疫分析方法与聚合酶链式反应（PCR）的强大特性，并可用实时荧光定量PCR（qPCR）或二代测序（NGS）读取。这将产生一种可扩展，超多重检测，高特异性的方法，可以同时定量数千种蛋白质生物标志物的浓度。PEA 技术的基础（图1）是双重识别免疫分析，带有独特DNA寡核苷酸标签的一对抗体同时与溶液中的目标蛋白结合。这使得这对抗体在位置上邻近，并使它们所带的DNA寡核苷酸标签杂交，成为依赖DNA聚合酶的延伸步骤的模版。这产生了特异性抗原所独有的双链DNA的“条形码”，并与目标蛋白的初始浓度成定量正比。在杂交和延伸后立即进行PCR扩增。

如后文所述，产生的DNA扩增子，最后可通过微流控qPCR Olink Signature Q100平台或NGS Illumina NovaSeq平台读取量化，具体取决于所使用Olink Panel的产品类型。



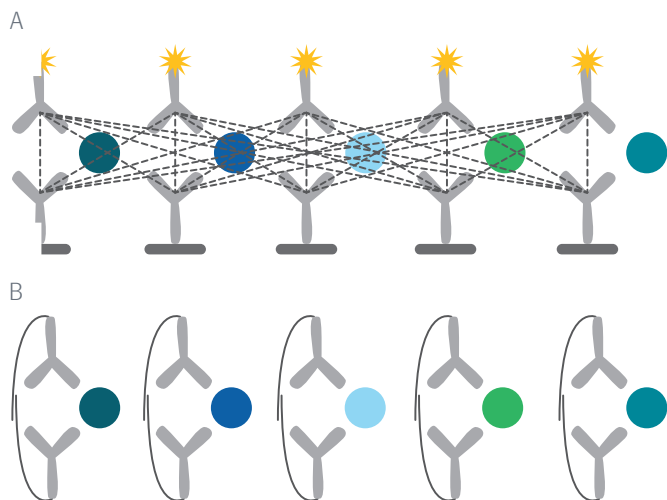
**图1.** PEA技术读取前的主要步骤。(A) 用DNA寡核苷酸标记的一对抗体在溶液中与目标抗原结合。(B) 处于邻位的两条寡核苷酸链杂交并经DNA聚合酶延伸。(C) 新创建的DNA条码通过PCR扩增，以备NGS或qPCR读取。

## PEA的技术优势

传统的免疫分析无法很好的实现多重检测，因为抗体的交叉反应性结合将带来信号的读取。这个问题将随着多重检测的程度呈指数级增长。相反，PEA技术基于DNA的数据读取则规避了这个问题。其需要准确匹配的PEA探针（DNA-标记抗体）的双重识别，同时需要DNA序列-特异性蛋白到DNA的转换来产生信号。这提供了一个高度可扩展的方法，且具有优越的特异性（图2）。

PEA技术利用PCR的指数扩增特性获取较强的读取信号，提供了与传统酶联免疫吸附试验（ELISAs）同等或更高的检测灵敏度。重要的是，这也意味着只需要极小的样本量即可同时检测大量的蛋白，这在珍贵样本供应有限的情况下非常有益，例如使用临床队列中的人体样本或生物样本库中的材料进行研究。对于Olink qPCR 读取的产品，每96个蛋白的panel仅需1  $\mu$ L

样本；而对于基于NGS的Olink Explore产品，只需要6  $\mu$ L 分析3072个蛋白。低样本量的另一个好处是可以将潜在的干扰物质的浓度降至最低，与PEA流程中定制的封闭试剂一起，样品的基质干扰将被降至最低水平。



**图2.**克服多重免疫检测的局限性。(A) 当采用传统的免疫分析法进行多重检测时的交叉反应。(B) 采用PEA 技术不会检测到交叉反应。

## 可选两种读取方案的独特而稳健的技术平台

对蛋白质标志物的分析需求在不同的应用领域中具有相当大的差异，从假设驱动的，强针对性的研究，到同时对大量样本中的多种不同蛋白进行筛选的广泛研究。近几年，Olink开发出了qPCR读取的一系列96重生物标志物 panel，每个panel 聚焦特定的疾病领域或生物过程，这为蛋白质组学提供了一种独特且灵活的解决方案，根据选择的panel不同，可以对数十种至上千种蛋白进行研究。然而，在大型研究中有一个清晰且不断增长的需求——开发低丰度血浆蛋白质组中蕴藏的巨大知识潜力。而这类研究需要在大量样本中进行尽可能多的蛋白质的稳健的检测。为了满足这些需求，Olink 进一步开发了PEA技术，



**图3.**通过 NGS 读取每个蛋白和样品的条码。

使其通过NGS进行读取，为显著扩展的蛋白质库实现了通量的大幅增加，并提供了更加经济的解决方案。

因此，Olink目前的产品组合包含了采用两种主要仪器平台之一的各种产品。用户需要通过选择读取方式选择对应的产品，这将在下文中详细描述。

## 将NGS读取的PEA技术用于大规模蛋白质标志物的发现

384重的格式的读取可以通过Olink PEA技术和 NGS Illumina NovaSeq仪器实现。Olink Explore 1536是该平台上第一款针对大规模血浆或血清样品研究的产品（现已扩展为3072）。一般情况下，一组运行可以测定88个客户样品和8个对照样品中的3072个蛋白。3072个蛋白的分析被分配到8个384重 panel中并行运行，并在36小时内生成超过 260,000 个数据点。

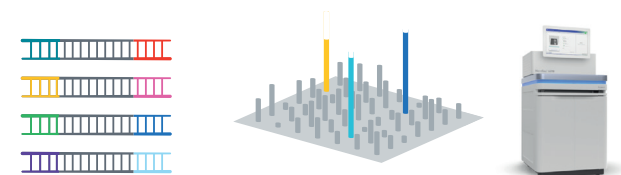
### Olink背景下的NGS

传统的NGS 通过与参照基因组匹配识别未知的DNA 序列，应用于快速全基因组测序或突变筛选等。Olink技术中的NGS数据则具有不同用途，在该技术中已知的DNA 序列被用做 PEA 扩增子来计数；对应的NGS计数将代表样本中的原始蛋白浓度。

扩增子的分子设计包含了带有 assay ID信息的一段正链和一段反链的DNA条码。第三段DNA条码则保存了样本的 ID 信息（图 3）。这使96个样本中384种蛋白的同时检测只需要使用0.8  $\mu$ L的血浆或血清。

分析中的原始数据是已知序列的计数匹配，其中正链和反链的条码通过给定的索引进行匹配。只有具有精确序列匹配的计数能通过并用于进一步分析。不同的条码序列间差异很大，因此带有错误碱基序列计数的风险可以忽略不计。半自动化的工作流程和移液工作站最大程度减少了手工移液操作，为PEA技术贡献了卓越的可重复性和重现性。

额外的精确度则通过在每个样品中加入标准化的专门设计的内部对照来实现，以减少检测内的变异（图4）。其包含有一个孵育对照，一个延伸对照和一个扩增步骤对照。



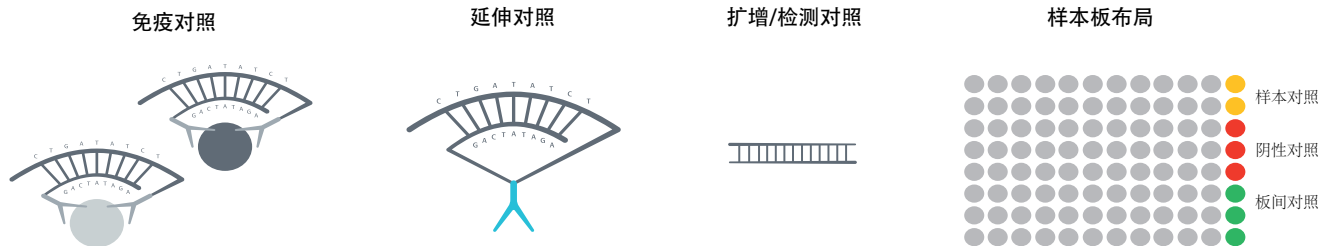


图4. PEA的内部对照。

这些内部质控共同监控PEA流程中的每个步骤。在每个样本板中包括外部阴性对照样本和板间对照样本各三份，用于提高分析间的精度，并允许对多次运行得到的数据进行最佳比较。

在控制条中也包括两个外部样本对照，用来估计精密度（CV）。最后，六个生物标志物蛋白（IL-6, IL-8 和 TNF- $\alpha$ ）以及（IDO1, LMOD1 和 SCRIB）在对应的八个 384 重 panel 中分别测量，作为额外的质量控制。

## qPCR 读取的 PEA 技术用于靶向蛋白生物标志物的发现

基于 qPCR 读取的 PEA 技术可通过 Olink Signature Q100 系统实现，通常采用 96 重检测。该技术已形成完善的平台，拥有一系列 Olink Target 96 panel，每个 panel 可定量 92 个聚焦于某疾病领域或生物过程的生物标志物。使用微流控 qPCR 对 PEA 流程中得到的 92 个独特的 DNA 条码进行最终检测，从而实现高通量。在通常情况下，每次运行可以对 88 个客户样本和 8 个对照样本中的 92 个不同的蛋白和 4 个内部对照进行检测，在 24 小时内产生超过 8000 个数据点。自动化微流控技术的使用也减少了手动移液操作的步骤，为 PEA 技术贡献了卓越的可重复性和重现性（图 5）。

与 NGS 读取的 PEA 技术一致，在每个样本中加入专门设计的内部对照来规范数据（图 4）。归一化步骤有助于减少内部分析的变异性。qPCR 方法中的对照包括两个孵育对照，一个延伸对照和一个检测对照。这些内部对照一起监控 PEA 流程中的每一步。每个样本板上包含三份阴性对照和三份板间对照（IPC），用以提高多次运行之间的精密度。

尽管 96 重 panel 中的分析方法已经在血浆和血清样本中得到了最有力的验证，许多方法在其它一系列样本类型中也得到了很好的效果，包括 脑脊液<sup>[2]</sup>，干血斑<sup>[3]</sup>，组织裂解物，如动脉粥样硬化斑块<sup>[4]</sup>，和肿瘤活检<sup>[5]</sup>。

## 总结

PEA 技术是一种非常适合中等-至大规模蛋白标志物研究的方法，该技术可以提供良好的灵敏度、快速且高通量分析和多重检测水平上的卓越特异性。从强针对性研究，假设驱动研究到大型筛选项目，该技术可以为广泛的应用提供一系列解决方案：

Olink Explore 3072（NGS 读取）是希望使用大量人类血清或血浆样本对完整的蛋白质库进行高通量研究的科学家们理想的解决方案。

Olink Target 96 的一系列 panel（qPCR 读取）为更多采用一个或多个与学科主题最相关的 panel 进行针对性的研究，或当样本基质是血清和血浆以外的研究提供高质量和高灵活度的服务。

无论您使用哪种平台，Olink 的技术都可以使科学家们在低丰度的血浆蛋白质组中找到全新的，可操作的蛋白质生物标志物，并可应用于液体活检试验以改善疾病诊断，这将更有助于个性化医疗，并让我们更好地了解实时人体生物学。

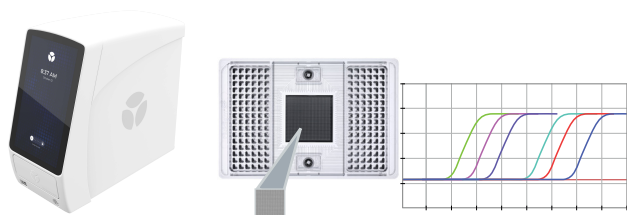


图5. 使用微流控 qPCR 读取延伸/扩增产物。

## 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. E. Bäckryd, L. Tanum, A. L. Lind, A. Larsson, T. Gordh, Evidence of both systemic inflammation and neuroinflammation in fibromyalgia patients, as assessed by a multiplex protein panel applied to the cerebrospinal fluid and to plasma. *J. Pain Res.* 10, 515–525 (2017).
3. J. Björkstén *et al.*, Stability of proteins in dried blood spot biobanks. *Mol. Cell Proteomics* doi:10.1074/mcp. RA117.000015. [Epub ahead of print] (2017).
4. M. Wigren *et al.*, Decreased levels of stem cell factor in subjects with incident coronary events. *J. Intern. Med.* 279, 180–191 (2016).
5. A. Loskog *et al.*, Immunostimulatory AdCD40L gene therapy combined with low-dose cyclophosphamide in metastatic melanoma patients. *Br. J. Cancer* 114, 872–880 (2016).

## 上海鲸舟基因科技有限公司（中科普瑞科研服务子公司）

### Olink认证技术服务商

地址：上海市浦东新区康新公路3399弄21号楼

电话：021-58086128

邮箱：market@sinomics.com

网址：www.olink-service.com

## 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：1129,CN1.1,2022-11-02



关注官方微信公众号  
可获取更多详细信息