

白皮书

蛋白质生物标志物研究的分析前影响因素

引言

蛋白质作为至关重要的一类生物分子，直接控制和调节人体的大部分生理功能。它们对于健康和疾病十分关键，目前我们可以获取的药物，在很大程度上是通过与蛋白质的相互作用发挥其作用。与基因组不同，蛋白质组是非常动态的，并且响应生物信号、环境条件和其他外部刺激而发生显著变化。鉴于这种枢纽作用，蛋白质可以作为重要的生物标志物，以更好地了解生物学机制，并监测任何给定疾病的健康状况，治疗效果或实时状态。

与被广泛用作生物标志物的基因相比，蛋白质的稳定性不如DNA，因此在存储和处理时需要更加小心。举一个极端的例子，恐龙的DNA可以提供数百万年样品的序列数据，而无法对此样品进行可靠的蛋白质分析（图1）。



图1. DNA与蛋白质。您可以在哪怕过期后很长时间内对食物中的DNA进行测序（但将其保存在适当的温度下对后者有帮助）

Olink蛋白质组学开发了用于蛋白生物标志物研究的高质量免疫测定法，可以同时测量许多不同的蛋白质。但是，为了确保获得最佳的数据，此检测性能需要与高质量、正确处理的样品相匹配。蛋白质可能会受到

与收集和存储有关的多种因素的影响，在测量生物样品中的蛋白质并解释结果时，都需要考虑所有这些因素。尽可能多地记录有关样本及其收集方式的信息是非常重要的。采用这种方法，即使未对样品进行最佳处理，也完全有可能获得有意义的结果。样本处理相关文档也可以在解释数据时提供有价值的信息。

本白皮书将帮助您在进行研究时考虑样品收集和处理方面的问题提供一些指导。这些建议通常适用于使用任何基于免疫测定方法的蛋白质研究，而不仅仅只是Olink的技术。

血清和血浆

Olink panels可用于多种样品基质（详见www.olink.com/sample-types 获取更多信息），但本文档将重点介绍血液样品。血浆和血清都来自全血，但是许多蛋白的测量水平可能会存在差异。

血清

血清是血液在室温下30-60分钟完全凝结后的液体部分。血清不含凝结蛋白，但含有凝结过程产生的凝块代谢产物。凝块通过离心去除。有两种常见的血清收集管类型，带（黄色盖）和不带（红色盖）凝胶分离器。带有凝胶分离器的管称为血清分离器管（SST）。凝胶在凝块和血凝块之间形成物理屏障，其中包含的颗粒会导致血液迅速凝结。

血浆

血浆是经过抗凝剂处理的血液的液体部分，通过离心去除血细胞。由于血浆已被阻止凝结，因此它能反映血液在体内循环的状态。血浆收集管中含有不同的抗凝剂，例如EDTA，肝素或柠檬酸钠，并且这些添加剂中的任何一种都可以用于Olink的分析中，但为保持一致性，研究中的所有样品应以相同的方式处理。

影响蛋白质生物标志物研究的分析前因素

采样程序的标准化很重要。任何分析的关键在于，从研究设计、样品收集到数据分析的整个分析过程中，都要对病例和对照样品进行一致的处理。但是，这并不总是可能的。当涉及多个实验室或使用历史不确定的生物库样品时，有几个因素会影响质量。

来自血液成分的干扰

在大多数情况下，溶血是不可避免的分析前影响因素。它可能是血液样本采集过程中采集步骤导致，也可能是由于运输条件和样本制备所致。溶血可导致临床化学中许多常见测定错误，主要是由于渗漏细胞内容物导致。然而，溶血的影响取决于所测蛋白质。除此之外，胆红素和脂质是可能干扰免疫测定的其他血液成分。

然而，在Olink分析中，这些成分的干扰通常只在8或10倍于正常值的极端水平上观察到，因此不太可能是显著的因素。溶血产物的潜在影响是使用EDTA血浆和血清中的系列稀释液进行评估（图2）。为了提供有关潜在干扰问题的指导，对每种生物标志物测定性能没有影响的最高溶血度，均记录在我们的panel信息中。该信息可以在每个panel的验证数据文档中找到。

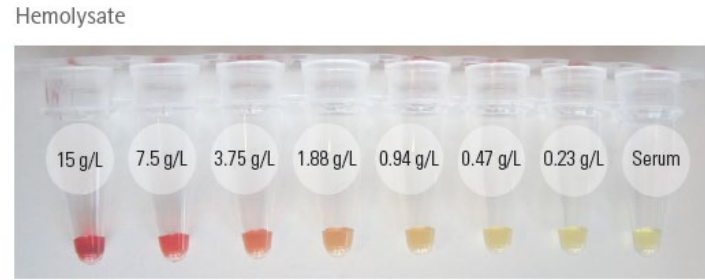


图 2. 内源性干扰。测试的血红蛋白水平为 0.23-15 g / L。最高浓度对应于大约 10% 的溶血。

温度

温度是蛋白质处理中的主要变量。一切从处理过程和运输过程中的温度到长期储存温度均会影响样品的质量。蛋白质稳定性和酶活性与温度有关。通过处理和运输过程中将样品保持低温，可以减少蛋白质降解。

冷藏可以防止细胞蛋白质的泄漏。Olink 要求客户在干冰上运送样品，以最大程度地减少蛋白质降解。样品的长期储存温度应在-80°C 或更低。

血浆样品制备

血浆通过离心从血液分离制备。Shen et al.进行的一项研究表明，延迟预离心对血浆蛋白图谱有显著影响（1）。

她们揭示了一个总体趋势，即全血离心前的延迟时间越长，某些血浆蛋白水平越高(图 3)。这被解释为这些蛋白从溶解的血细胞中泄漏。血液离心并在8小时内分离血浆（样品在 4° C 下处理），这种影响非常小，但如果在室温（22° C）下处理，仅1小时后便观察到某些蛋白水平升高。这一观察表明，在温度变化的背景下，蛋白质降解并不是唯一需要考虑的因素。除了以上所述的时间线之外，对测定的蛋白质水平也观察到越来越显著的影响。因此，预离心的延迟时间要短，样品间的延迟时间要一致，以免影响所获得的数据。

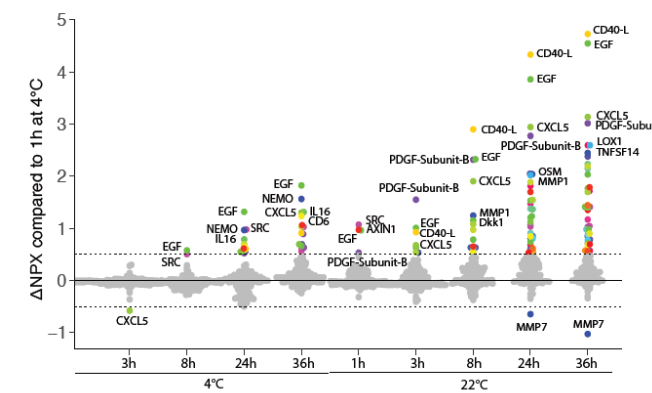


图 3. 蛋白质水平的改变。4° C 和 22° C 各延迟时间点的蛋白水平变化。10 种水平变化最大的蛋白质被标注出来。

长期储存和反复冻融

生物库样品的质量对于蛋白生物标志物研究非常重要。生物库应努力保持样本收集时的成分，但可以长期保存也是要考虑的分析前因素。在Enroth S. et al.的研究中，在研究蛋白质水平如何随个体年龄变化时，将样本储存时间作为一个自变量进行检验。分析的样本来自50岁的个体，这些样本在-80° C保存了30年。108个被研究的蛋白质中的18种收到贮藏时间的影响，在这18种蛋白质中，仅贮藏时间就可以解释单个蛋白质5-35%的变异。

了解不同组分在反复冻融循环过程中的行为也很重要，这样才能最大限度地利用生物样本库中有限的材料。冻融循环的影响已经由几个研究小组进行了研究(如Lee et al. (3))，数据显示，一些蛋白的表达水平可能受到影响，而另一些蛋白则没有受到影响。然而，研究(如Shen et al.)也表明，在冻融循环次数相同的情况下，组间的相对差异是相同的。Shen et al. (1)和Olink in house研究(图4)调查了经过多次冻融循环的同一样品的蛋白质水平的相关性。这些研究的Pearson 相关系数

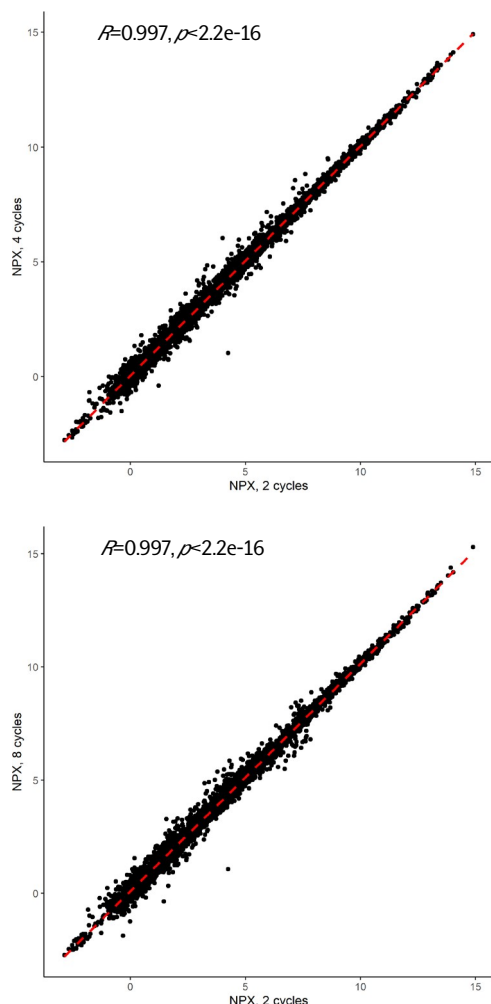


图4. 反复冻融循环对血浆蛋白谱的影响。与4个(顶部图)或8个(底部图)周期进行比较,并在5个Olink面板(Olink内部数据)上分析了16个个体样本中蛋白质水平的相关性。两种情况下的皮尔逊相关系数(R)均为0.997。等式($y = x$)用虚线表示。每个相关panel包括16个人的数据x 460蛋白质= 7360个数据点。

分别为 0.998 和 0.997。说明有多次冻融循环历史的样品仍然可以得到高质量的处理。

鉴于在特定研究中数据收集和样本存储的挑战,生物库几乎没有标准化。生物样本库应提供每个样本的完整数据使样本能够与其他类似样本更广泛合作。

运输

样品在设备内和设备之间的运输过程中会出现潜在的温度问题。必须注意确保血清和血浆样本在运输过程中有足够的干冰。

未来的发展

液体样本仍然是生物标志物研究中最常见的类型,但是滤纸样本,例如干血斑点、血浆、泪液或阴道分泌

液具有吸引力,因为易于收集和储存且成本低。

Berglund M.等人进行的一项研究证明了从滤纸上干燥的阴道液和血浆中测量蛋白质的可行性(4)。

Björkstén et al. 进行的另一项研究调查了在-24°C保存的干血斑用于蛋白质测量的适用性。后者主要发现是,即使在储存了30年之后,干燥的行为对血液蛋白的检测也只有轻微的影响(5)。通过加强血液生物标志物的发现和常规分析,干血斑生物库可以证明其巨大的医学价值。

Olink如何提供帮助

即使有最好的意图和准备,偏离也可能在分析前发生,导致个别异常值或整体偏移。Olink的技术支持可以在这些问题上指导您,我们的数据科学团队可以帮助您进行数据分析。您提供的关于样品收集、制备和存储的信息越多,我们的数据科学家就越有可能识别出潜在的问题,从而能够将具有不同分析前历史的样品之间的数据标准化。

最佳实践

- 新采集的血浆样品:应尽快离心,室温下至少1小时内,4°C下至少8小时内。
 - 新收集的的血清样本:让血清在室温下完全凝血30-60分钟,然后离心。
 - 随机抽样,并始终分析与病例和对照相同的样本类型。
 - 使用干冰运输。
 - 按照全球生物库组织ISBER(6)的建议,将样品储存在-80°C的冰箱中。
 - 记录如何收集和处理样品。
 - 保证一项研究所有样品的处理方法尽可能一致。
- 例如:

- 所有血浆标本的温度和离心条件保持一致。
- 采集血清时,保持凝血时间和条件一致。
- 使用相同类型的收集管(对血清和血浆样本都很重要)。
- 如果可能,尽量使所有样品冻融循环次数保持在相同的范围内

参考文献

1. [Shen et al., Strong impact on plasma protein profiles by precentrifugation delay but not by repeated freeze-thaw cycles, as analyzed using multiplex proximity extension assays. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine \(2017\).](#)
2. [Enroth S., et al., Effects of Long-Term Storage Time and Original Sampling Month on Biobank Plasma Protein Concentrations, EBioMedicine \(2016\).](#)

3. [Lee JE. et al., Effect of Repeated Freezing and Thawing on Biomarker Stability in Plasma and Serum Samples. Osong Public Health and Research Perspectives \(2015\).](#)
4. [Berglund M. et al., Protein Detection Using the Multiplexed Proximity Extension Assay \(PEA\) from Plasma and Vaginal Fluid Applied to the Indicating FTA Elute Micro Card™. Journal of Circulation Biomarkers \(2016\).](#)
5. [Björkesten et al., Stability of Proteins in Dried Blood Spot Biobanks. Molecular & Cellular Proteomics 16.7 \(2017\).](#)
6. [International Society for Biological and Environmental Repositories, ISBER Best Practices: Recommendations for Repositories Fourth Edition \(2018\)](#)



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



关注我们微信公众号
可获取更多详细信息

版本号：1095,CN1.1, 2022-11-01