

一切都是相对的

生物标志物发现使用相对定量Olink™ NPX 值的四个原因

摘要

蛋白质组学中采用绝对定量和相对定量的方法来鉴定和验证用于临床应用的蛋白质生物标志物。本白皮书提供了为何相对定量仍是发现生物标志物常用方法的四个原因。此外，还介绍了 Olink 提供绝对和相对定量选择的多重蛋白质组学平台。

引言

蛋白质组学的一个主要目标是为临床应用(如诊断、治疗和监测病人)鉴定和验证蛋白质生物标志物。采用绝对或相对定量法测量蛋白质水平，并在不同的患者组间进行比较。这些患者分组通常基于健康状况(如患病和健康)或治疗类型(如治疗和未治疗)。

绝对定量根据信号读数推断蛋白质的浓度(例如pg/μL)(图1)，通常是利用已知蛋白质浓度的样本(即参考标准)生成的标准曲线来实现的。绝对定量在许多临床应用中都有使用，因为它便于直接比较来自不同实验室、不同个体和不同研究之间的数据^[1]。

另一方面，相对定量不以标准单位(如pg/μL)计算蛋白质浓度。相反，样本间蛋白质水平的相对差异利用信号读数的相对差异来确定。相对定量也称为"差异"定量，可在有或没有参比样本的情况下进行^[1,2]。

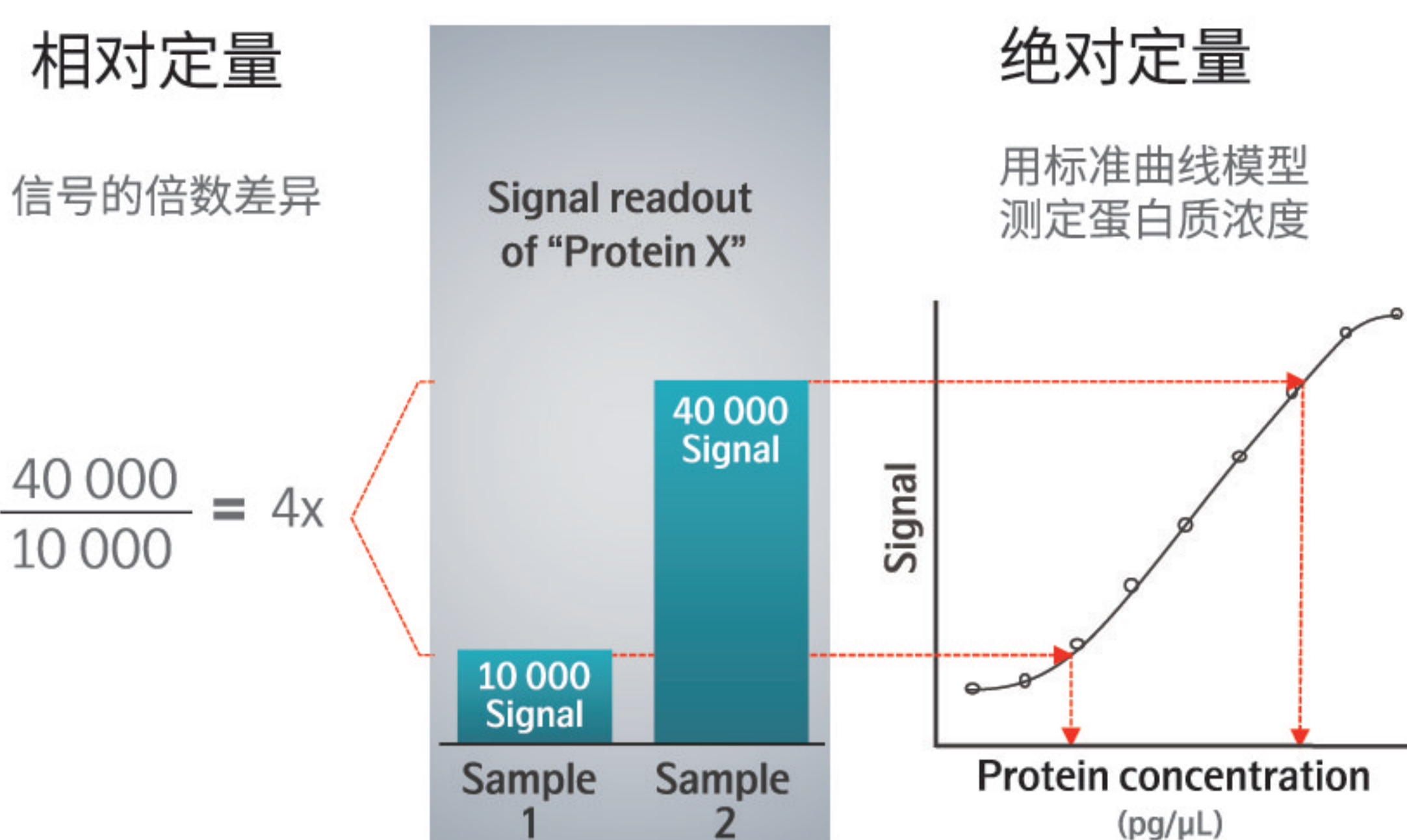


图1.两个样本中对同一感兴趣的蛋白质(蛋白质 "X") 的相对定量和绝对定量的比较示例。采用相对定量，样本 2 中"蛋白质X"的丰度是样本 1 的 4 倍。采用绝对定量，样本 1 和 2 中的蛋白质浓度则是通过标准曲线模型估算出来的。

虽然较不常用，但在跨研究之间样本比较和数据整合时，使用桥接样本和经过严格验证的方法，进行相对定量分析是可行的。绝对定量和相对定量可应用于蛋白质生物标志物从发现到临床应用的整个流程中。这里探讨了相对定量仍然是生物标志物发现过程中主要定量方法的四个原因。此外，还将讨论采用绝对定量和相对定量来测量蛋白质的Olink蛋白质组学技术。

定量很少是绝对的

生物标志物发现例行使用同时检测中等数量("中等多重检测")或大量("高度多重检测")蛋白质指标的蛋白检测方法。由于以下原因，大多数此类多重检测都是相对定量，而不是绝对定量。

1.明确定义的参考标准蛋白质数量有限

大多数情况下，标准曲线是采用在非原生、外源系统中表达的纯化蛋白质"标准"来绘制的。然而，并非所有蛋白质都能在体外表达或有效纯化，从而限制了可量化的蛋白质数量^[3,4]。

蛋白质折叠、翻译后修饰(PTM)和纯度在批次间的差异也导致明确定义的参考标准蛋白质数量有限。此外，在蛋白质组学领域，很少有绝对定量的参考标准蛋白质是根据世界卫生组织(WHO)等机构制定的严格指南生成的^[1,2]。这意味着，不同方法测得的同一种蛋白质的浓度可能会有所不同。

为了阐明已知的"绝对"定量分析测试的可变性^[5]，对使用不同供应商标准曲线的两种商用夹心酶联免疫吸附测定法(ELISA)进行了比较。两者均使用同一组血浆样本(n=18)测量马IGF-1蛋白^[6]。然而，对于相同的样本两种试剂盒测量的浓度相差约100倍。

2.样本基质会影响标准曲线的准确性

用于生成标准曲线的蛋白质应显示出与检测样本相同的剂量-反应特征^[7]。虽然基于生物的标准基质可以解决基质效应问题，但它们可能含有内源性靶蛋白，从而影响准确定量^[3]。替代选择包括成本高昂的对照"替代"基质或需要长时间开发的分析物。无论如何，标准曲线的剂量-反应特性必须在开发过程中进行彻底测试，以确保线性度。

3.绝对定量通常会增加实验偏差的风险

与相对定量相比，绝对定量的蛋白质组工作流程通常需要更多步骤，如移液、细胞培养和标记。然而，随着样本处理步骤的增加，影响定量准确性的实验偏差的风险也会随之增加^[1]。

4.多重蛋白质检测很难做到绝对定量

包括使用Olink蛋白组学技术的研究在内的越来越多的生物标志物研究表明多蛋白特征比单蛋白具有更高的鉴别力^[8]。这些研究凸显了生物标志物发现过程中多重蛋白质检测的重要性。然而，随着多重化程度的提高，绝对定量变得更加困难，因为必须为每种感兴趣的蛋白质制定标准参考或曲线。

多重蛋白质检测的"金标准"方法是自下而上的质谱(MS)，其中相对定量仍是最常用的定量方法。这是因为绝对定量的成本较高，标准曲线的优化需要大量时间，而且有些标准品很难获得^[3]。不完全的和可变的酶解也阻碍了基于MS方法的精确定量^[9]。最后，使用"无标记"质谱方法进行精确、稳健的绝对定量仍然是一项挑战，尤其是对于多重蛋白质检测而言，因为肽洗脱峰的色谱图需要对齐，必须在复杂样本和不同进样中确定合适的肽进行定量，而且仍然没有理想的归一化方法来消除系统性偏差^[10]。

利用Olink技术进行蛋白质定量

Olink™ 邻位延伸分析 (PEA) 可实现在多个多重检测层级上的蛋白质检测，为生物标志物的发现提供端到端的解决方案，同时只需使用极少的样本量(表1，图2)。该解决方案可以以试剂盒或付费服务的形式提供，所有 **Olink** 平台都经过严格的验证过程，以确保高特异性、高灵敏度和高精确度。相关验证报告可在 **Olink** 网站上免费获取。

Olink™ Explore 3072 是生物标志物发现和探索性研究的理想解决方案，可测量跨越**10**个数量级的近3000种蛋白质，而每个样本仅需 **6 μL**。**Olink™ Explore 3072** 具有二代测序(NGS)读数和半自动化工作流程，是一个相对定量平台，其蛋白质检测库涵盖了所有主要生物通路。

Olink™ Target 96 是使用定量 PCR (qPCR) 的相对定量蛋白质

多重检测平台。Olink™ Target 96 提供15 种不同的模块化panel，针对特定疾病领域或关键生物过程的蛋白质，为生物标志物的发现和验证提供了有针对性的分析。每个96重检测的panel 只需1μL样本。

Olink™ Target 48 细胞因子可使用定量 PCR(qPCR) 和 1μL样本进行绝对或相对定量，靶向检测45种参与多种疾病的炎症过程的蛋白质。

Olink™ Flex 和 Olink™ Focus 是根据研究需求的定制产品，一次最多可同时检测21种感兴趣的蛋白质，且只需消耗 1μL 样本。

Olink™ Flex 可在同一 panel 中同时进行绝对和相对定量。Olink™ Focus 则允许研究人员选择定量方法和验证水平。Olink™ Flex 或 Olink™ Focus 检测的目标蛋白质可分别从200多种与炎症相关的人类蛋白质列表或整个Olink蛋白库约3000种蛋白质中选择。

为确保在生物基质中使用Olink™ Target 48细胞因子、Olink™ Flex 和Olink™ Focus 时绝对定量准确，我们使用血浆进行了一系列线性实验。此外，血浆中的参考标准有助于板间归一化。更为重要的是，PEA技术的绝对定量和相对定量工作流程完全相同，因此无需担心其他蛋白质组学方法在进行绝对定量时通常需要的额外处理步骤带来的实验偏差。

对用Olink™ Target 48细胞因子和Olink™ Explore分别得到的绝对定量和相对定量结果进行比较后发现，38种可检出蛋白质的斯皮尔曼相关系数(rs)中位数为0.95^[11]。在本研究中，绝对定量以 pg/μL 为单位，而相对定量则使用 Log2 转化的任意单位(比如Olink™ NPX, Normalized Protein eXpression, 均一化蛋白表达)这些数据展示这两种产品产生的数据高度相关。这些数据直接表明，这两种产品得出的数据高度相关，并不受最终读出方法(NGS或qPCR)、蛋白多重水平和定量方法的影响。数据还表明，在没有标准曲线的情况下，使用Olink技术进行相对定量，可以准确计算出差异蛋白表达。事实上，许多研究都已经证明，使用Olink平台获得的相对浓度与使用其他免疫测定方法获得的绝对浓度之间具有很高的相关性。例如，最近的一项比较研究表明，用Olink™ Target 96和传统的单重免疫测定法分别测得的特定分析物的相对浓度和绝对浓度的具有很好的相关性(r=0.89-0.93)^[12]。

表1. Olink 生物标志物检测产品的主要参数对比

Olink 平台产品	读取仪器	定量方法	#	#每个panel的	蛋白质检测的应用场景 †	
			panel数量	目标蛋白数量	探索 / 发现	靶向检测 / 验证
Explore 3072	NGS	相对定量	8	372	+++	+
Target 96	qPCR	相对定量	15	92	++	++
Target 48	qPCR	绝对&相对定量	1	45	+	++
Flex	qPCR	绝对&相对定量	定制	21		+++
Focus	qPCR	绝对&相对定量	定制	21		+++

†实用性：高 (+++), 中 (++)，低 (+)

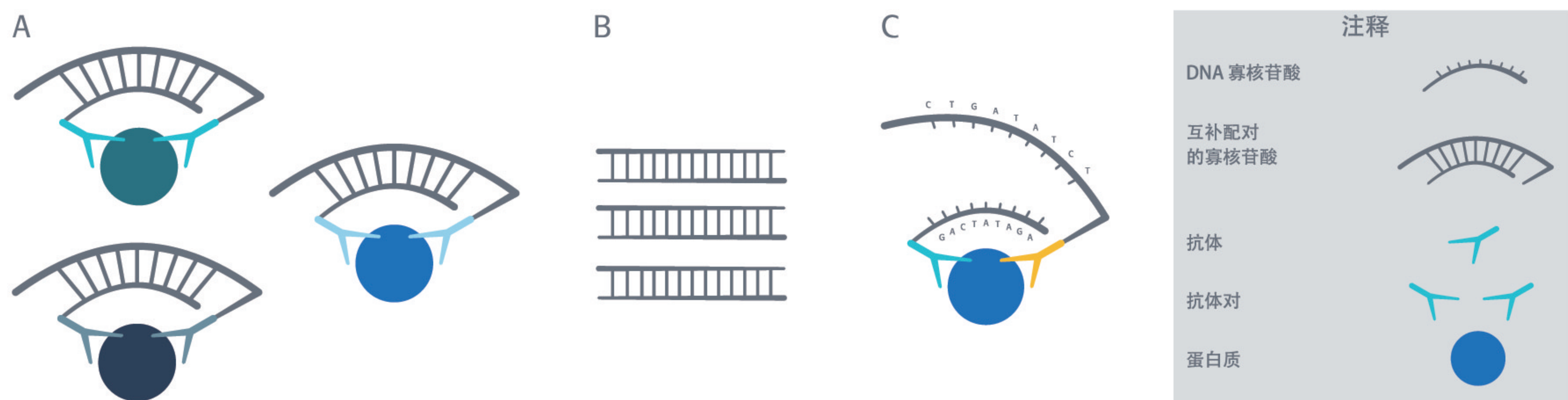


图2. Olink PEA技术使用标记有DNA寡核苷酸的抗体来检测蛋白质。(A)当抗体对在溶液中与目标蛋白结合时，它们互补的寡核苷酸相互杂交。双链寡核苷酸充当条形码，用于识别样本和蛋白质，因为每个样本-蛋白质组合都具有唯一的寡核苷酸序列。(B)然后通过PCR扩增寡核苷酸，用qPCR或下一代测序分析所得到的DNA扩增子。(C)如果发生非特异性结合，由于寡核苷酸不会杂交，因此不会产生信号。

结论

相对定量仍然是发现蛋白质组学中高通量、多重检测所采用的主要方法，主要有两个原因。首先，绝对定量需要耗费大量时间开发检测方法，而且每种感兴趣的蛋白质都可能需要昂贵的试剂。因此，时间和成本与被测蛋白质的数量成正比。其次，在病例对照研究中，如果研究设计合理、样本充足，差异表达蛋白质的统计显著性是可以由绝对和相对定量来确定的。一旦确定了候选生物标志物的子集，开发一种更小、更有针对性的检测方法并以标准单位(如 pg/ μ L)报告蛋白质浓度，就变得更加容易实现，研发成本也会大大降低。因此，在生物标志物验证和临床应用中通常就会选择绝对定量。在生物标志物发现到临床应用的过程中，从相对到绝对的定量工作流程也有例外。有些体外诊断检测是定性的(如家庭妊娠测试)或使用任意临界值的参考标准。其他体外诊断检测则是利用参考标准建立临床临界值，提供相对定量^[2,7]。例如，世界卫生组织的乙型肝炎表面抗原生物参考标准有一个指定的任意值，并被欧盟委员会的医疗器械部门用于诊断乙型肝炎^[7]。有几种基于蛋白质的疗法是以任意单位(即国际单位，IU)进行管理，每种新的参考标准均一化为之前的参考标准^[2]。这些疗法包括 α -2b干扰素(IFN α -2b)、贝伐珠单抗、曲妥珠单抗和人绒毛膜促性腺激素(hCG)。准确测量蛋白质对生物标志物的开发至关重要。利用可靠的蛋白质组技术确定的候选生物标志物更有可能通过验证并批准用于临床，从而提高耗时且昂贵的生物标志物验证的效益成本。这些都是生物标志物研究和临床开发重要的考虑因素，因为每年都有数以千计的潜在生物标志物被学术界发表，而美国食品药品监督管理局(FDA)平均每年只批准大约1.5种新的蛋白质生物标志物^[13]。Olink平台可在跨层级的多重水平和定量方法中提供准确、可重复的数据。

了解更多Olink技术的相关信息

PEA 技术: olink.com/content/uploads/2021/09/olink-white-paper-pea-a-high-multiplex-immunoassay-technology-with-qpcr-or-ngs-readout-v1.0.pdf

Olink Explore 3072: olink.com/products-services/explore/

Olink Target 96: olink.com/products-services/target/#relative

Olink Target 48 Cytokine: olink.com/products-services/target/48-cytokine-panel/

Olink Flex: olink.com/products-services/flex/

Olink Focus: olink.com/products-services/custom-panels/

Olink NPX: olink.com/faq/what-is-npx/

定制型生物标志物panel的开发与验证: olink.com/content/uploads/2021/09/olink-development-and-validation-of-customized-pea-biomarker-panels-1083-v2.0.pdf

Olink Explore 和 Target panel的完整验证数据: olink.com/resources-support/document-download-center/

联系我们

如需详细了解关于 Olink 蛋白质组学技术与平台的信息，欢迎邮件联系：info@olink.com。获取认证服务商的列表与信息：olink.com/products-services/sample-analysis-service/external-service-providers/。

参考文献

1. Calderón-Celis F, et al. Standardization approaches in absolute quantitative proteomics with mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev.* 2018 Nov;37(6):715-737.
2. WHO Expert Committee on Biological Standardization: report of the seventy-second and seventy-third meetings. Geneva: World Health Organization; 2021 (WHO Technical Report Series, No. 1030).
3. Neubert H, et al. Protein Biomarker Quantification by Immunoaffinity Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry: Current State and Future Vision. *Clin Chem.* 2020 Feb 1;66(2):282-301.
4. Palomares LA, Estrada-Mondaca S, Ramírez OT. Production of recombinant proteins: challenges and solutions. *Methods Mol Biol.* 2004;267:15-52.
5. Bratcher PE, Gaggar A. Factors influencing the measurement of plasma/serum surfactant protein D levels by ELISA. *PLoS One.* 2014 Nov 3;9(11):e111466.
6. Baskerville CL, et al. Comparison and validation of ELISA assays for plasma insulin-like growth factor-1 in the horse. *Open Vet J.* 2017;7(1):75-80.
7. WHO Expert Committee on Biological Standardization. Forty-third report. Geneva, World Health Organization, 2006 Annex 2 (WHO Technical Report Series, No. 932).
8. Enroth S, et al. High throughput proteomics identifies a high-accuracy 11 plasma protein biomarker signature for ovarian cancer. *Commun Biol.* 2019 Jun 20;2:221.
9. Brownridge P, Beynon RJ. The importance of the digest: proteolysis and absolute quantification in proteomics. *Methods.* 2011 Aug;54(4):351-60.
10. Lai X, Wang L, Witzmann FA. Issues and applications in label-free quantitative mass spectrometry. *Int J Proteomics.* 2013;2013:756039.
11. Olink®. Multiplex analysis of inflammatory proteins: A comparative study across multiple platforms. White paper. 2021 Sept.
12. Skau E, Wagner P, Leppert J. et al. Are the results from a multiplex proteomic assay and a conventional immunoassay for NT-proBNP and GDF-15 comparable?. *Clin Proteom.* 2023; 20, 5.
13. Zhao Y, Brasier AR. Qualification and Verification of Protein Biomarker Candidates. *Adv Exp Med Biol.* 2016;919:493-514.

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：1317,CN1.1, 2024-1-05



关注官方微信公众
号可获取更多详细信
息