

利用Illumina Protein Prep 解决方案实现准确可靠的蛋白质检测



使用DRAGEN™蛋白质定量二级分析流程的QC和数据归一化步骤指南

可重现的结果

可在不同样本和板之间实现一致的蛋白质检测

自动启动分析

利用DRAGEN二次分析生成高质量输出结果

综合见解

使用Illumina Connected Multiomics轻松分析归一化的蛋白质计数文件

简介

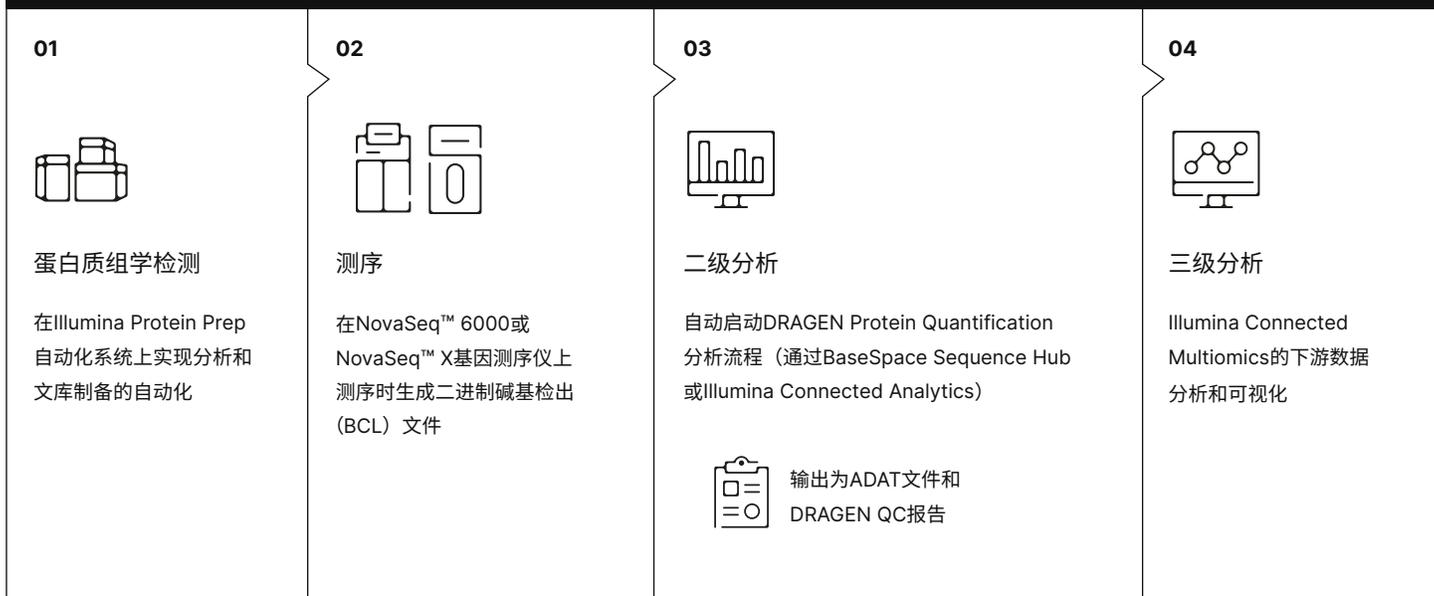
蛋白质在人类生物学中发挥着关键作用，实时反映健康和疾病状态。准确、可重现的蛋白质定量对于获得有意义的生物学见解至关重要。Illumina Protein Prep是一种创新的蛋白质组学检测方法，它使用SOMAmer®（缓释修饰适配体）试剂捕获蛋白质，实现了高灵敏度的蛋白质检测。将该检测方法与新一代测序（NGS）读取功能和DRAGEN二级分析的生物信息学功能相结合，可得到简化、高通量的从样本到结果的蛋白质组学解决方案。

Illumina Protein Prep可在单个样本中同时检测数千种蛋白质，为生物标志物的发现提供了一个强大的平台。然而，高通量蛋白质组学平台的板间偏差和技术差异会掩盖差异表

达，尤其是对于效应量较小的生物标志物。DRAGEN Protein Quantification分析流程可在二级分析中通过稳健的归一化方法解决上述挑战，提供高质量、可比较的实验数据。在云端，该流程将在NovaSeq™ 6000或NovaSeq™ X基因测序仪完成测序后自动启动，生成DRAGEN QC报告和ADAT文件（包含归一化蛋白计数数据），支持通过Illumina Connected Multiomics进行下游三级分析（图1），以深入了解蛋白质组的生物学特性。DRAGEN Protein Quantification分析流程可安装在DRAGEN本地服务器上，供需要本地分析选项的用户使用。

本技术说明介绍了DRAGEN Protein Quantification分析流程中包含的质量控制（QC）和归一化步骤，旨在消除样本和技术差异，确保获得高质量蛋白质组数据。

图1: Illumina Protein Prep工作流程概述。



该高通量蛋白质组学解决方案采用基于SOMAmer试剂的蛋白质组学检测方法，对血清或血浆样本中的蛋白质进行灵敏检测，然后在NovaSeq™ 6000或NovaSeq™ X基因测序仪上进行因美纳文库制备和测序。蛋白质组学检测和文库制备工作流程由Illumina Protein Prep自动化系统（定制的Tecan Fluent 780）自动完成，以获得一致且可重现的结果。DRAGEN Protein Quantification分析流程可在测序后在BaseSpace Sequence Hub或Illumina Connected Analytics中自动启动，将因美纳基因测序仪生成的BCL文件中的蛋白质组学数据转换为ADAT文件中的标准化蛋白质组学计数，并附有DRAGEN QC报告。ADAT文件可直接集成到三级分析程序中，包括Illumina Connected Multiomics，用于进一步的数据解析。

数据归一化的必要性

技术差异是任何高通量蛋白质组学检测的固有特性，可能来源于样本制备、样本固有异质性、杂交效率、PCR效率和测序过程等多个来源。除了样本内部的技术差异外，同一板上所有样本可能受操作者、仪器或环境因素影响，产生批次效应。如果没有有效的归一化或批次校正，这些系统误差可能掩盖真实的生物学差异，从而导致不准确的结论。

数据归一化对于校正这种差异、标准化数据以及实现样本、板甚至不同分析运行之间的有意义比较至关重要。利用DRAGEN Protein Quantification分析流程实施全面的归一化策略，能够提供可靠、可重现的蛋白质定量数据。

Illumina Protein Prep对照

Illumina Protein Prep检测包括板对照和每个样本中的SOMAmer试剂对照，以减少检测差异。这两种对照均用于通过DRAGEN Protein Quantification分析流程生成归一化蛋白质表达计数。

板对照

每个96孔板包含85个样本和11个板对照（图2），包括空白对照、校准对照和QC样本。这些对照与Illumina Protein Prep检测一起提供，在每个检测板中与血浆或血清样本一起运行，用于归一化和QC。它们作为基准，用于检测和校正技术偏差，并为不同板上运行的样本比对提供基础。

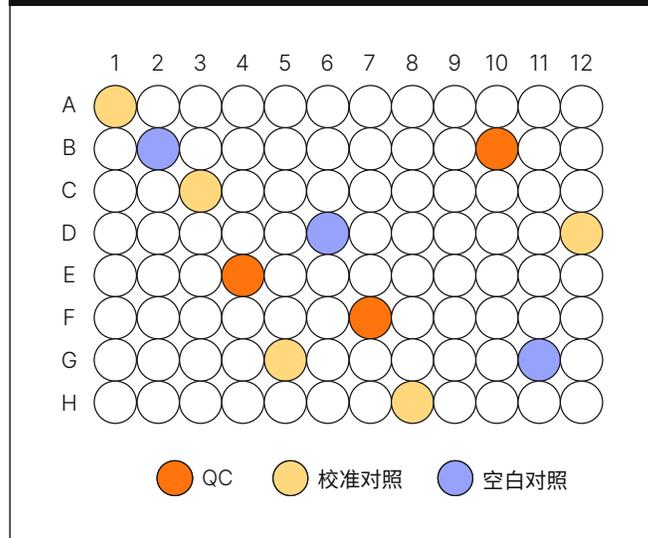
空白对照

空白对照样本由纯缓冲液组成，可估算Illumina Protein Prep检测中的非特异性背景。这些对照的计数应显著低于血浆或血清样本。空白孔中计数升高可能表明运行中存在高背景或样本污染。

校准对照

校准对照用于校正板间差异。这些对照为混合人血浆或血清，具体取决于运行的样本类型。将每个SOMAmer试剂的校准对照中位数与相应的校准参考进行比较，由此进行板校准归一化。

图2: 带对照的板布局示例。



QC样本

QC样本用于质量控制检查，以确定板是否按预期运行。这些对照样本为混合人血浆或血清，具体取决于运行的样本类型。将每个SOMAmer试剂的对照样本中位数与相应的QC参考进行比较，由此评估板的质量。

SOMAmer试剂对照

SOMAmer试剂对照以已知浓度加入每个样本中，在杂交前用于计算样本特异性比例因子，以归一化样本并评估质量。

数据归一化步骤

原始蛋白质组计数的归一化涉及多个步骤，用以消除Illumina Protein Prep工作流程中可能产生的样本和板间系统偏差。这些调整采用四个非连续步骤完成：杂交归一化、外部参考中位数归一化、校准和板缩放（图3）。

杂交归一化

这一步骤可校正杂交和文库制备阶段检测中可能出现的样本间差异。通过比较每个样本中杂交归一化对照的计数与板中所有样本的中位数，计算出样本特定的比例因子。

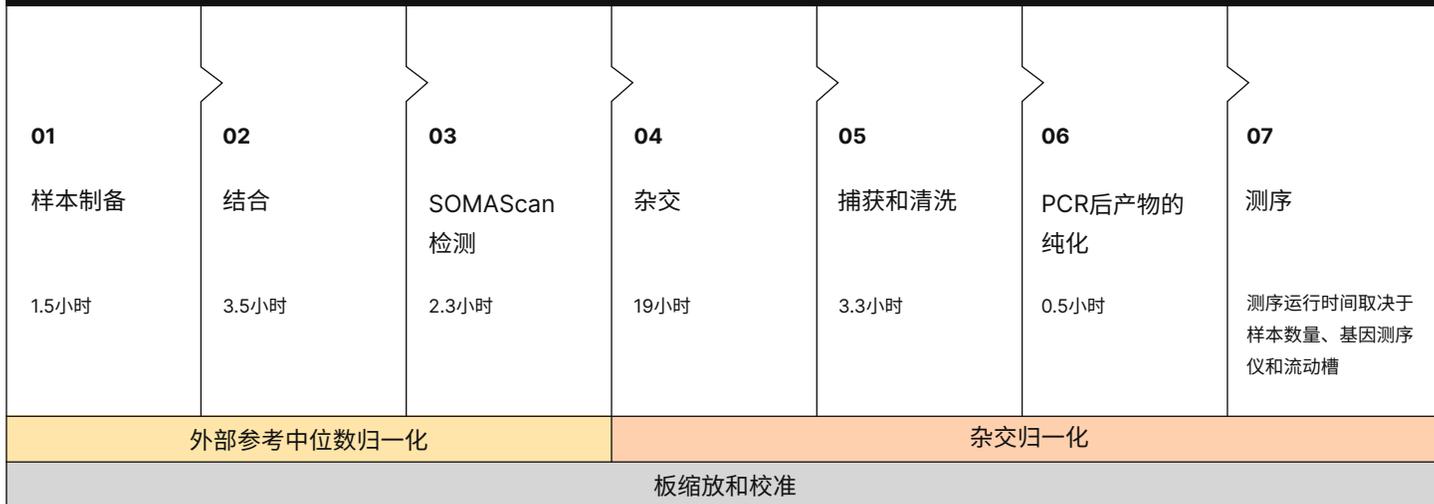
外部参考中位数归一化

这一步骤可校正非对照样本总蛋白质丰度测量值的差异。通过将观察到的蛋白质测量值与每种蛋白质的预期参考值进行比较，计算出比例因子。

校准

使用板对照部分中概述的五种校准样本进行校准，并校正影响单个SOMAmer试剂的批次效应。通过这一步骤可以准确比较不同板和运行生成的数据。对于每种SOMAmer试剂，校准可纠正校准品与校准品对照的预期参考值之间的差异。

图3: DRAGEN Protein Quantification分析流程执行的归一化步骤概览。



校准分两步进行：

- 步骤1：将校准品的中位数与来自基因测序仪的参考值进行比较，并相应地调整各SOMAmer试剂。
- 步骤2：将更新后的校准品中位数与来自基因测序仪的参考值进行比较，从而比较不同基因测序仪上生成的数据。用于将校准品中位数与参考值比对的比例因子适用于板上的所有样本。

板缩放

板缩放通过使用校准品中每个SOMAmer Reagent测量值的中位数，并将其与外部校准参考比对，可解决板间总蛋白测量值的差异问题。

缩放过程分两步进行：

1. 步骤1：根据基因测序仪（即NovaSeq™ 6000或NovaSeq™ X基因测序仪）提供的参考值调整测量值。
2. 步骤2：使用跨基因测序仪的参考值进一步优化调整，从而比较不同基因测序仪上生成的数据。DRAGEN Protein Quantification报告中仅显示第一个缩放步骤的QC指标。

尾部QC检查百分比

在归一化结束时，使用每个板上的QC对照品执行QC步骤。此步骤通过将三个重复的QC样本中每个SOMAmer试剂测量的中位数与外部QC参考进行比较，分配SOMAmer试剂特异性比例因子和QC指标（QCCheckTailPercent）。

DRAGEN Protein Quantification分析流程中实施的各种归一化步骤能够尽可能减少源自Illumina Protein Prep工作流程不同阶段的无关差异（图4）。

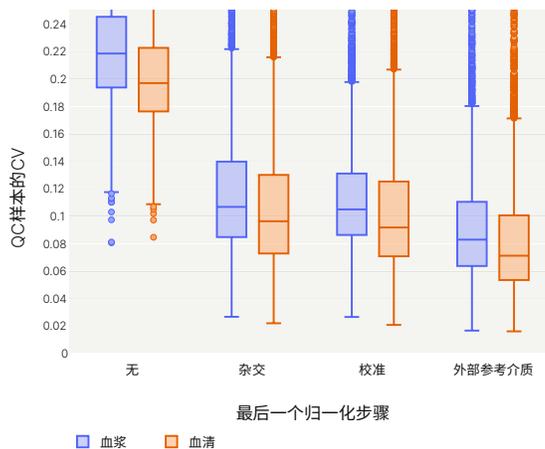
DRAGEN Protein Quantification输出

DRAGEN Protein Quantification分析流程可输出两种对分析Illumina Protein Prep数据至关重要的文件。第一种是来自每个归一化步骤的一系列ADAT文件，第二种是总结运行QC的DRAGEN QC报告。

ADAT文件

DRAGEN Protein Quantification分析流程可处理原始计数，并为每个归一化步骤生成以ADAT扩展名结尾的制表符分隔ASCII文本文件。ADAT文件包含一系列样本（行）中一系列分析物（列）的测量结果，并包括分析物描述和样本描述信息。

图4：归一化对数据差异的影响。



对原始检测数据进行归一化处理可降低板内变异系数（CV）。图中数据采用Illumina Protein Prep 6K检测分析血浆和血清QC样本获得。中位CV约为5.5%^a的Illumina Protein Prep 9.5K检测法现已上市。

^a使用健康供体样本。

图5: ADAT文件结构。



ADAT文件是制表符分隔文件，结构如下（图5）：

- 运行元数据包含与整个运行或单个板相关的指标（如，RunID和与尾部QC检查百分比相关的指标）
- SOMAmer元数据包含与每个SOMAmer试剂或蛋白质靶标相关的指标（如SOMAmer ID、特定基因和靶标ID）
- 样本元数据包含与每个样本相关的指标（如样本ID、板ID和QC指标）
- SOMAmer计数反映每个样本中每个SOMAmer相对丰度的NGS计数矩阵

该格式设计可灵活处理样本数量以及分析物和样本描述符的数量和类型，并可用于下游三级分析，以获得生物学特性信息。

DRAGEN QC报告

DRAGEN Protein Quantification QC报告随ADAT文件一起提供，汇总了每个样本和整个板的QC。单个样本的QC来自杂交归一化和外部参考中位数归一化步骤。板QC来自校准归一化和QC步骤。

使用ADAT文件进行三级分析

归一化后的ADAT文件可通过Illumina Connected Analytics立即用于Illumina Connected Multiomics的进一步数据分析。Illumina Connected Multiomics配备了用于数据管理和选择的图形用户界面，可用于高级数据解析，包括差异蛋白质表达、通路分析和基因集富集分析。ADAT文件的内容还可以使用R（SomadataIO）和Python（Canopy）提供的开源包进行分析。

总结

原始蛋白质组数据的归一化对于尽可能减少Illumina Protein Prep工作流程中可能产生的检测和样本偏差至关重要。DRAGEN Protein Quantification分析流程使用多个归一化和校准步骤来减少系统偏差，同时尽可能降低掩盖真实生物学偏差的风险，提供更准确的结果。此工作流可在云端或本地服务器上使用。在云端，DRAGEN Protein Quantification分析流程将在NovaSeq™ 6000或NovaSeq™ X基因测序仪完成测序后自动启动，生成DRAGEN QC报告和包含归一化蛋白质计数的ADAT文件。ADAT文件输出可立即用于通过Illumina Connected Multiomics进行下游三级分析，深入了解蛋白质组生物学信息。

了解更多 →

[Illumina Protein Prep](#)

[DRAGEN二级分析](#)

[Illumina Connected Analytics](#)

Illumina中国

上海办公室 • 电话 (021) 6032-1066 • 传真 (021) 6090-6279
北京办公室 • 电话 (010) 8441-6900 • 传真 (010) 8455-4855
技术支持热线 400-066-5835 • chinasupport@illumina.com
市场销售热线 400-066-5875 • china_info@illumina.com • www.illumina.com.cn

© 2025 Illumina, Inc. 保留所有权利。所有商标均为因美纳公司或其各自所有者的财产。
关于具体的商标信息，请访问 www.illumina.com.cn/company/legal.html。
M-GL-03205 v1.0



illumina[®]