第三章 采购需求

**第4包 载脂蛋白检测**

**一、采购内容：**

**内容：载脂蛋白检测**

**数量：1200例**

**二、具体要求：**

1. 人血浆样本蛋白质DIA相对定量检测：采用最新一代高通量质谱Orbitrap Astral仪器。

1.1 检测通量：1200例

1.2 配备Asymmetric Track Lossless非对称轨道无损质量分析器，能够以高灵敏度和高达200HZ的扫描速度采集高动态范围HRAM谱图。

1.3样品采用Vanquish Neo UHPLC纳升液相系统进行分离。

1.4 单个样本8min检测时长，能够实现血液蛋白质组超深度鉴定。

1.5 每个样本做去除高丰度蛋白处理，处理方法采用top14方法去除高丰度蛋白，再对血浆里中低丰度蛋白检测。

1.6质谱实验分析流程能够包括蛋白质提取、肽段酶解、色谱分级、液相色谱-串联质谱（LC-MS/MS）DIA数据采集、数据库检索等步骤。

1.7 正式实验阶段分析内容包括定性定量结果蛋白质功能注释、定性结果质量评估、定量结果质量评估蛋白质差异表达分析、生物信息学分析、项目质控分析。

1.8 使用搜库软件为DIA-NN(v1.8.1；搜库软件应为最新版本；或利用Spectronaut搜库软件)，利用DIA数据产生一个谱图库，并利用该谱图库对DIA数据进行重分析以获取蛋白质定性定量结果，提供蛋白定性定量列表，肽段定性定量列表。

1.9 提供差异表达蛋白质GO功能注释及富集分析、差异表达蛋白质KEGG功能注释及富集分析、差异表达蛋白质结构域功能注释及富集分析、差异表达蛋白质亚细胞定位、差异表达蛋白质互作网络、WGCNA分析等生物信息学分析结果。提供蛋白质组组学风险模型回归（如cox回归、lasso回归、xgBOOTS等风险模型评估）

1.10提供与其他组学的联合分析，例如蛋白组与临床脂蛋白亚组分参数（甲方检测的临床指标，由甲方提供）、代谢组联合分析；蛋白组与转录组联合分析。

1. 11蛋白总检出数量不低于3000，所检出的蛋白应包含载脂蛋白，包括APOA,APOB，APOC,APOD,APOE,APOF,APOH,APOM相关各亚型，原则上载脂蛋白检测数量不低于15种。

1.13 所有的送检样本，应固定1台Orbitrap Astral上机检测，1台预备，且采集过程连续，采集过程中不可插入其他类型或其他甲方的样本。

**2. 平台要求**

**2.1 DIA组学相对定量检测：**

2）DIA样本检测：分别掺入适量iRT标准肽段，每个样品进行1次DIA质谱测试。每个样本时长8min，用最新质谱仪器Astral。

**2.2 具备DIA-NN(v1.8.1或以上)搜库软件或Spectronaut搜库软件：**过滤标准为： peptide FDR <0.01, protein FDR <0.01

**2.3 DIA蛋白组检测方法成熟，工作团队发表或协助甲方发表蛋白论文数量大于20篇，供应商近三年蛋白和代谢均发表过正刊（CNS）的文章至少5篇，至少一篇是署名，蛋白代谢服务供应商应具备基于自身质谱平台检测数据的客户文章10篇以上(影响因子在20分以上)**

**2.4 提供自主算法的机器学习筛选标志物，以及成熟的分子分型研究全套标准分析流程。具备自主基于蛋白多组学的的分子分型的生信平台，并基于此生信分析发表过IF10 或以上的生信署名的文章成果至少一篇，并提供作者署名的文章证明。**

**2.5 具备云平台交付数据的能力，并可进行交互分析。**

**2.6 服务供应商应具备蛋白组学仪器平台：**服务供应商应具备蛋白组学仪器平台：质谱仪和超高压液相色谱仪，质谱仪的数量不少于25台（设备需提供采购合同，若通过代理商采购，需提供制造厂商给代理商的授权）**。**

**2.7 具备Vanquish Neo UHPLC纳升液相系统，具备高通量样本检测能力，并提供资料。**

**2.8 拥有蛋白质组学自动化前处理设备（需提供采购合同）**

**2.9 有单细胞蛋白技术平台和空间蛋白技术平台，并提供产品发布相关资料。**

2.10 拥有thermo top14去高丰度试剂盒，对血液样本进行高丰度蛋白去除，对去除高丰度之后的样本进行蛋白质组学检测。

2.11 具备利用thermo top14去高丰度试剂盒检测能力，需提供蛋白组学检测的两篇血液蛋白相关文章发表，其中一篇要有这类方法应用。

**2.12 服务供应商应具备单个项目为1000例以上蛋白组经验。并提供合同（如合同首页，即合同关键页，即合同数量页及双方签字盖章页）。**

**2.13 实验室仪器均符合 ISO9001 质量体系的认证;具备专业的实验室流程化体系。**

**2.14 有**蛋白色谱柱产品和商业化酶解试剂盒，**并提供产品发布相关资料。**

**3. 资质要求**

3.1 实验室仪器均符合 IS9001 质量体系的认证

3.2 具备专业的实验室流程化体系，具备实验室生物安全 2 级（BSL-2）资质备案

3.3 实验室通过CNAS认证

**4. 检测要求**

**4.2血浆去高丰度**

利用thermo top14去高丰度试剂盒，进行高丰度去除，对去除高丰度之后的样本进行蛋白质组学检测。功能性生物磁珠特异性吸附血液中低丰度蛋白，形成包裹纳米颗粒的蛋白冠，然后对富集的蛋白进行检测。

**4.2纳升液相色谱仪检测**

样品采用Vanquish Neo UHPLC纳升液相系统进行分离，进样模式为捕获-分析双柱法。

**4.3 Orbitrap Astral质谱仪检测**

检测模式：正离子，母离子扫描范围为 380-980m/z，一级质谱分辨率为 240000 at 200 m/z，Normalized AGC Target 为 500% Maximum IT 为 5ms。MS2 采用 DIA 数据采集模式，设置 299 个扫描窗口， Isolation Window 为 2 Th，HCD Collision Energy 为 25% ，Normalized AGC Target 为 500%，Maximum IT 为 3ms。

**4.4质谱数据解析**

需要采用专业的质谱数据分析软件DIA-NN(v1.8.1)进行数据解析。

**4.6 数据质控：**

**4.6.1样本制备质控**

质控策略

1.酶解质控：所有样本经 LC-MS/MS 检测下机并搜库后，评估每个样本的酶解效率。

2.混样策略：样本数大于 192 时，使用混样策略。取项目的 10-20%个样品的蛋白液混合，制备成若干份等量混样（QC），后续实验中每批次插入 2 个QC，上机时依次先后上机。质控样本制备过程的稳定性；

3. 分别掺入适量iRT标准肽段，每个样品进行1次DIA质谱测试,查库后通过iRT内标肽的检出以及保留时间的稳定性来评估上机稳定性；

**4.6.2 LC-MS/MS 过程质控**

质控策略

1.添加内标肽段（iRT 肽段）：在每个实测样本中添加iRT内标标准肽段，其保留时间可分布在整个洗脱梯度过程，因此可以监控跑样过程 LC-MS/MS 的稳定性。

2.混样策略：取 2-10 个 QC 样本的肽段液做成混样(QC)。每 10-20 个样本跑一个 sQC。

质控指标

1.所有QC CV 值小于20%；

2.所有 QC 样本中共有蛋白定量值的皮尔森相关系数不低于 0.85；

3.QC 样本的 PCA 分布集中

4. QC样本间的相关性达到0.9以上;iRT肽出峰时间波动小于3%。

5. 如果数据不符合质控指标要求，应该免费重测。

**5. 项目周期**

质检合格后，检测周期35自然日，分析周期5自然日；

**6. 售后服务**

6.1 数据验收合格后，至少提供 2 年内的售后服务，原始数据保存2年；

6.2 提供技术培训及咨询服务，专业大项目服务团队服务。

6.3 按甲方所撰写文章拟投杂志的要求提供分辨率和大小合格的图表；

6.4 免费进行一次组学分析培训；

6.5 组建1对1的专属售后团队，直到项目结束（文章发表、结题）：能免费 7\*24 小时处理甲方问题，全国范围内有相应的销售与技术，免费进行疑难问题解答，对数据分析结果进行指导，并通过上门、往来信函、电话、传真、电子邮件，解答用户在使用中碰到的各种技术问题。

6.6 检测数据未经授权不允许透露或分享给第三方。