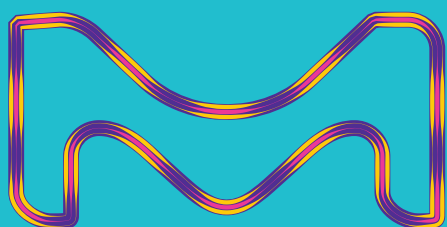


MERCK

SMC™ Erenna®

单分子免疫检测平台

—— 见“微”知著，单分子技术创领生物标志物新发现



蛋白生物标志物研究现状

蛋白

，作为机体最重要的组成成分，诠释着生命个体每一点的生长，发育和变化。从上世纪40年代开始，随着免疫组化等经典蛋白检测技术的发展，蛋白作为生物标志物的价值逐渐被人们所重视。尽管免疫组化，ELISA，Luminex等蛋白检测技术已经实现了数以千计的蛋白生物标志物检测，但蛋白生物标志物的开发速度仍显缓慢：年均仅有1-2个新的生物标志物进入实际的临床应用。据统计，在40,000多种已知的人类蛋白中，约有30,000种因为表达丰度过低而无法实现传统方法的检测。在现有技术可以检测的约10,000种蛋白中，大多数又无法在健康个体的样本中检测到，而仅仅出现在特定的疾病时期。大量蛋白生物标志物的重要功能，如同海平面下的冰山，无法被现有技术准确界定。不论临床还是基础研究，蛋白生物标志物的应用都拥有可观的发展前景，但现有技术的瓶颈极大限制了蛋白生物标志物的发展。



见“微”知著 突破极限

Erenna®灵感源自深海

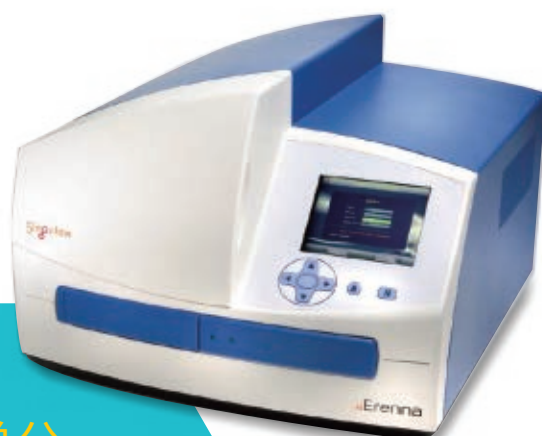
Erenna®是海洋深处一群神秘的生物，通过自身红色荧光吸引猎物靠近，设法将其捕获，微弱的荧光成为这个弱势群体独特的生存之道……

自然界的检测“高手”

- ④ 一公里以外顺风飘来的气味，狗凭借近两亿两千万个嗅觉细胞轻松辨识。
- ④ 老鹰可以发现10公里处猎物的活动，依赖的是鹰眼中密集分布感的光细胞视网膜黄斑。
- ④ 抹香鲸能够潜到深海3000公尺的深处，头部的鲸蜡器官作为一个超级导体，有极其灵敏的探测系统即“声纳”。

科技领域，突破极限

- ④ 锶晶格原子钟，世界上最精确的时钟，该钟摆和非常稳定，能和发出激光的光波在一起合作，形成了世界上最精确的钟——“光晶格钟”，其误差为百万分之一秒，能够保证在50亿年之内不会走快一秒或者走慢一秒。
- ④ 位于贵州的500米口径球面射电望远镜，接受面积等同30个标准足球场大，突破望远镜的百米工程极限，触摸上百亿光年以外的微弱无线电信号。

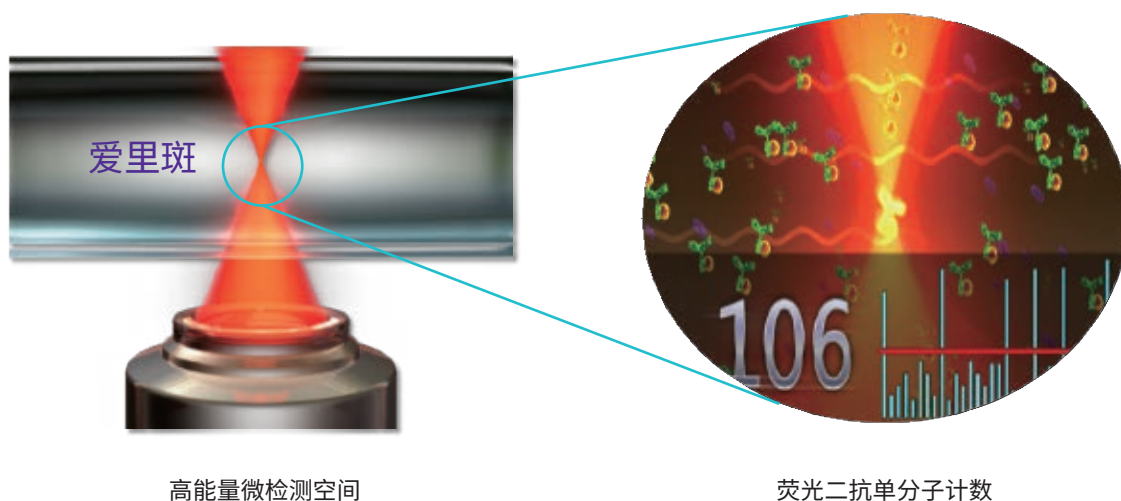


现在，默克独创Erenna®单分子免疫检测平台，采用专利单分子检测技术，突破蛋白检测极限，创领生物标志新发现，助力疾病研究再创新。

单分子检测技术驱动的 Erenna[®]免疫检测平台

单分子检测技术(Single Molecule Counting, SMC[™]) 能降低背景，并提高检测信号

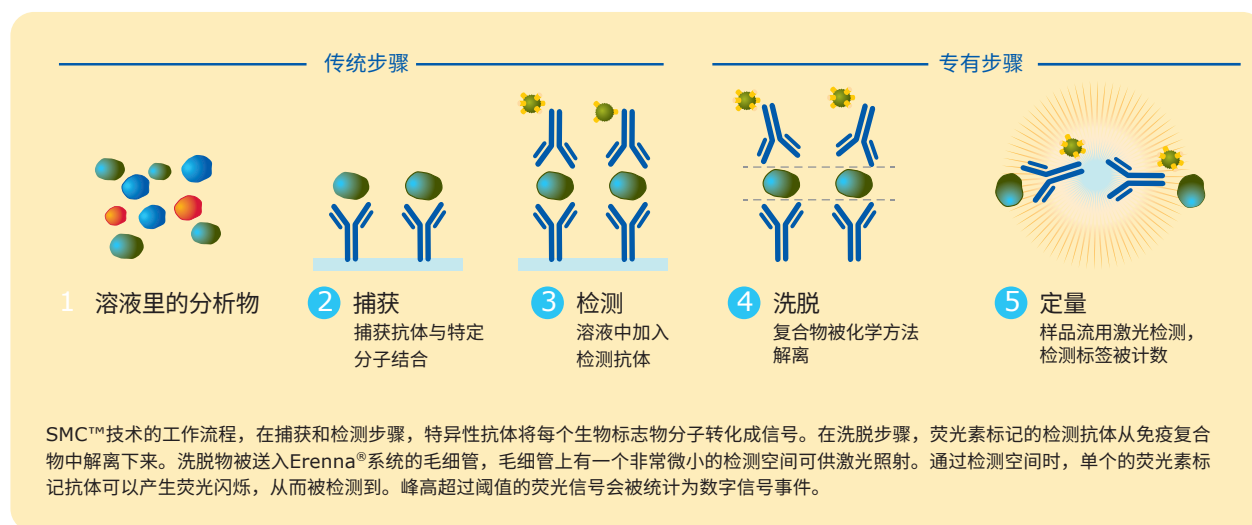
SMC[™]技术相较于传统免疫检测技术，信噪比有了很显著的改善，使得在一个系统里可以同时检测低表达和高表达的蛋白靶标，揭示疾病相关生物标志物的微小变化。



高能量微检测空间

荧光二抗单分子计数

由于激光的聚焦效应，会形成一个非常狭小的检测空间“爱里斑”，这个空间集中了多达84%的激光能量，能够最有效地照射和激发单个荧光分子。SMC[™]单分子检测技术会依次检测通过“爱里斑”区域的单个荧光信号，峰高超过阈值的荧光信号会被统计为数字信号，并将检测到的数字信号进行汇总，显著地提高了检测灵敏度。



体液样本蕴含着最为直接和丰富的生物标志物信息，但相对于人工样本而言，也是检测起来最为困难的样本。体液样本有着非常复杂的特性，不同个体的同一标志物表达水平呈现巨大的差异。即使是同一种生物标志物，也在不同的时间能出现几十倍乃至几百倍的表达量变化。例如正常个体和发生细胞因子风暴个体的IFN- γ 标志物含量可产生2000-3000倍的差异。再加上样本所处的液体背景，使得实际的检测异常复杂。

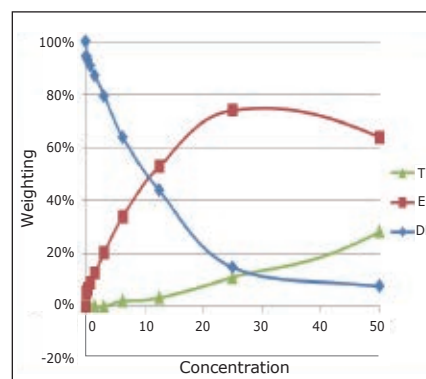
开创性的科学工作需要新的检测技术能够适用于不同浓度条件的样本，也就是要求具备大的动态检测范围，这一点已经成为生物标志物检测技术的重要要求。Erenna®平台采用专有的算法，实现了高灵敏度，大动态范围的检测。

Erenna® 平台 实现大动态检测范围 三条标曲的巧妙配合

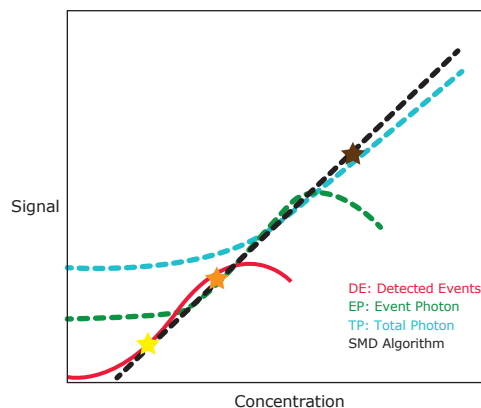
Erenna®平台在检测每一个样品时，都会获得三套数据：检测事件（Detected Events, DE），事件光子含量（Event Photons, EP），以及总光子含量（Total Photons, TP）。

- 🔍 检测事件指的是在一定检测时间段之内得到的所有高于阈值的信号的数目，这些信号可以是单个分子在爱里斑中产生的，也有可能是几个分子同时进入爱里斑时形成的。
- 🔍 事件光子含量指的是在所有的检测事件中，检测器测到的总光子含量。
- 🔍 总光子含量为在整个检测过程里面，检测器所收集到的所有光子的含量，高于阈值和低于阈值的信号都会被统计。

根据标准品浓度，我们可以使用上述三套检测数据得到三条标曲。其中检测事件标曲在低浓度条件下能很好地反映样品的浓度变化，因为这时一般是单个分子进入爱里斑，检测事件的数据与样品浓度有非常好的一致性。但随着样品浓度的提升，此时越来越多的情况下有几个分子同时进入爱里斑，检测事件就不能准确反映浓度变化了，而此时事件光子含量标曲能接过“接力棒”，测定样品的浓度并在溶液的浓度特别高时。



三套数据不同的权重由软件自动计算

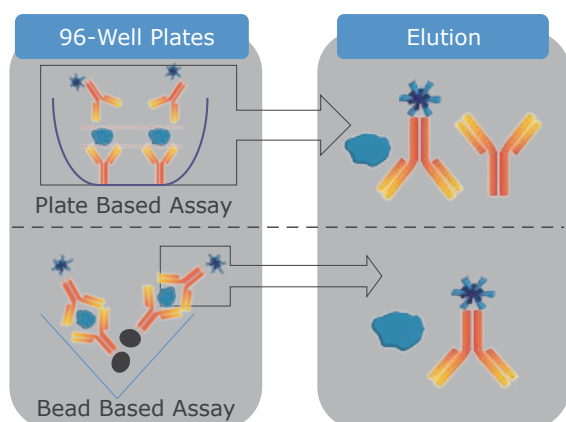


Sgxlinc软件应用SMDCurveFit算法自动计算样本浓度

Erenna®平台 是具备高度灵活性的开放平台

Erenna®单分子免疫检测平台在孵育时可以采用2种方式。第一种将一抗包被在磁珠上，在磁珠的表面形成双抗免疫夹心法。第二种将一抗包被在96孔板的板底，在板底形成免疫双抗夹心。由于Erenna®平台卓越的单分子检测能力以及磁珠的低背景，基于磁珠的孵育形式比使用同样抗体的ELISA灵敏度能提高大约1000倍。基于96孔板板底的孵育形式大约比同等抗体条件的ELISA灵敏度也能提高约50-100倍，同时试剂成本低于ELISA。

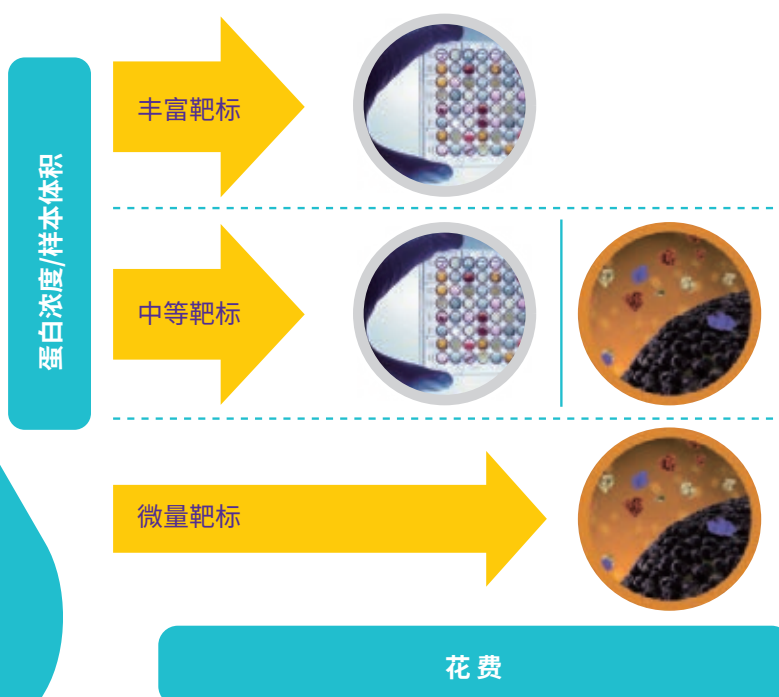
Erenna®单分子免疫检测平台可以根据不同实验条件灵活选择孵育形式



第一种将一抗包被在96孔板的板底，在板底形成免疫双抗夹心；基于96孔板的孵育形式大约比同等抗体条件的ELISA灵敏度能提高约50-100倍。

第二种将一抗包被在磁珠上，在磁珠的表面形成免疫双抗夹心；基于磁珠的孵育形式比使用同样抗体的ELISA灵敏度能提高大约1000倍。

在实际的科研工作中，研究者可根据所检测蛋白的浓度/样本体积以及实验预算来灵活选择孵育形式。如果检测的是丰度较高的靶标，或是具备较为充足的样本体积，可以选用96孔板的孵育条件，这样不仅灵敏度可满足需求，而且实验的花费也会很低。而针对特别微量蛋白靶标或者样本，灵敏度是最重要的考虑因素，研究者可选择基于磁珠的孵育条件。根据不同实验条件灵活选择孵育形式，能够在满足灵敏度需求的情况下获得更好的性价比。



可方便地自行开发检测试剂盒

在日常的研究过程中，研究者们经常会需要检测一些新的生物标志物。这些生物标志物非常新颖，以至于没有商品化的产品能满足检测需求，或是现有ELISA等方案的灵敏度很难达到检测要求。Erenna®平台的试剂盒开发方案对于开发新的生物标志物极为重要。我们提供的工具主要针对三个步骤，包括抗体标记，筛选抗体应用条件以及优化溶液。利用这些工具研究者能非常方便地开发出新的生物标志物的检测方法，而这些新的检测项目不论是对于基础研究还是转化医学研究都极具价值。



建立和优化您自己的免疫检测试剂盒

Development Kit	Catalog No.
Erenna® Detection Antibody Labeling Kit (for Plate and Bead Based Assay Development)	03-0076
Erenna® Capture Antibody Labeling Kit (for Bead Based Assay Development)	03-0077
Erenna® Bead Based Immunoassay Development Kit	03-0078
Erenna® Plate Based Immunoassay Development Kit	03-00128
Erenna® Assay Buffer Optimization Kit (for Plate and Bead Based Assay Optimization)	03-0122

Erenna®平台提供 严格质控的已验证试剂盒

通过严格的试剂盒开发标准，我们已经开发了大量已验证的免疫检测试剂盒，能满足苛刻的研究需求。这些严格控制的标准包括：

检测下限

标准曲线上同时满足两个条件的最低点：
(1)CV<20%和(2)检测浓度与理论浓度偏差小于20%

稀释线性

检测能达到3-4个log的定量检测范围

批内和批间精度

在不同实验板和不同实验日期的样本。加标和不加标样本检测值差别均小于20%

内源本底表达范围

至少10个来源于不同个体的样本，均能够检测其本底的生物标志物水平

加标回收实验

至少10个加标样品,回收率在80%-120%的可接受范围

Analyte	Part No.	Assay Format	LLOQ (pg/mL)	Median Endogenous (pg/mL)	Species *	Sample Type †
KIM-1	03-0118	PBA	3.91	P: 65; S: 75; U: 147	H	P, S, U
AKT1 – pSer473	03-0100	BBA	0.98	NA	H, M, R	L
AKT1 – total	03-0099	BBA	7.8	NA	H, M, R	L
cTnI	03-0092	BBA	0.4	1.75	H, Cy, R, C, GP	P, S
G-CSF	03-0047	BBA	0.08	17	H	P
GM-CSF	03-0067	BBA	0.02	0.2	H	P
GLP-1 – active	03-0024	BBA	0.4	3.46	H, M, R, C	P
GLP-1 – total	03-0025	BBA	0.2	17.8	H, M, R, C	P
IFN-γ	03-0049	BBA	0.2	0.79	H	P
IL-1α	03-0072	BBA	0.39	1.06	H	P
IL-1β	03-0028	BBA	0.2	0.08	H	P
IL-2	03-0051	BBA	0.05	0.21	H	P, S
IL-4	03-0052	BBA	0.04	0.02	H	P
IL-5	03-0053	BBA	3.91	4.52	H	P
IL-6	03-0089	BBA	0.08	1.3	H	P
IL-7	03-0094	BBA	0.39	4.91	H	P, S
IL-8	03-0055	BBA	0.24	3.6	H	P, S
IL-10	03-0056	BBA	0.39	1.01	H	P
IL-12	03-0057	BBA	0.05	0.13	H	P, S
IL-13 (V2)	03-0109	BBA	0.04	0.21	H	P, S
IL-15	03-0058	BBA	0.1	3.38	H	P, S
IL-17A (V2)	03-0103	BBA	0.03	0.12	H	P, S
IL-17F (V2)	03-0102	BBA	0.2	0.86	H	P, S
IL-17A/F Heterodimer (V2)	03-0119	BBA	1.2	2.75	H	P, S
IL-21	03-0014	BBA	0.2	0.53	H	S
IL-22	03-0059	BBA	0.2	3.3	H	P
IL-23	03-0112	BBA	0.1	0.18	H	P, S
TNF-α (Human)	03-0088	BBA	0.1	2.3	H	P
TNF-α (Mouse)	03-0108	BBA	0.4	38.6	M	S
VEGF (Human)	03-0068	BBA	0.2	66.5	H	P

* 针对所列出的第一个检测物种做了优化,其他所列出的物种做过验证,但并非针对其专门优化。

缩写: H = human; M = mouse; R = rat; GP = guinea pig; Cy = cynomolgus monkey; C = canine

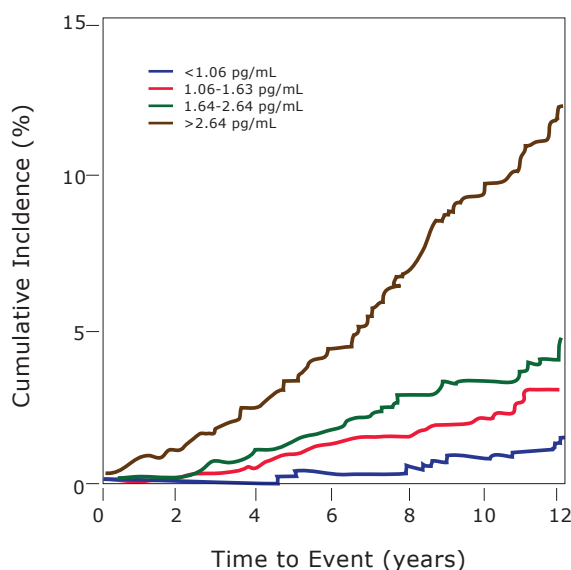
† 针对所列出的样本做了优化。缩写: P = EDTA plasma; S = serum; L = lysate; U = urine

Erenna®

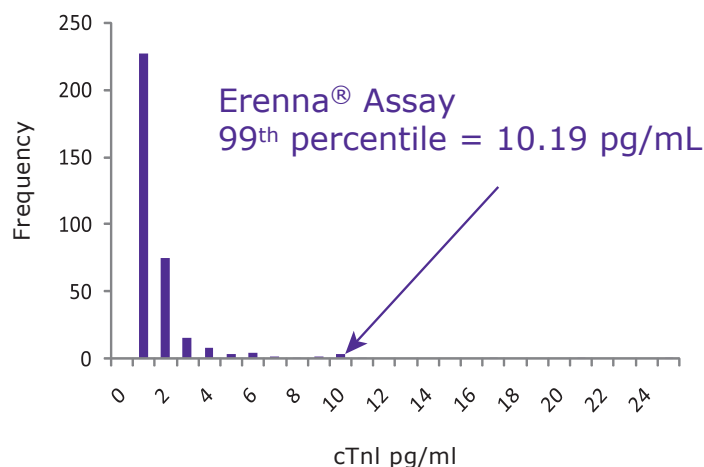
改变了生物标志物的传统认识

1. 经典生物标志物的全新意义

肌钙蛋白cTnI是心脏病领域经典的生物标志物，也是常见的体检项目。cTnI的检测被用来判断冠心病、心衰等心脏疾病的发生，同时也帮助医生进行预后评估。正常人血液无法通过ELISA有效测得cTnI指标，因此一般认为这种因子在正常人中并不存在。而Erenna®平台通过基于磁珠孵育条件的单分子检测，能够实现低至0.4pg/mL的检测灵敏度。研究发现，在350例健康的男性和女性个体中，几乎所有个体血液中的cTnI都可被精确检测，并且99%个体的表达水平都在10.19pg/mL以下，而市售其他所有检测试剂盒都无法达到10pg/mL以下的检测能力。大多数个体的实测值在1-2pg/mL之间，远远超出了传统方法的检测范围。



Wang T, et al. Circulation. 2012.



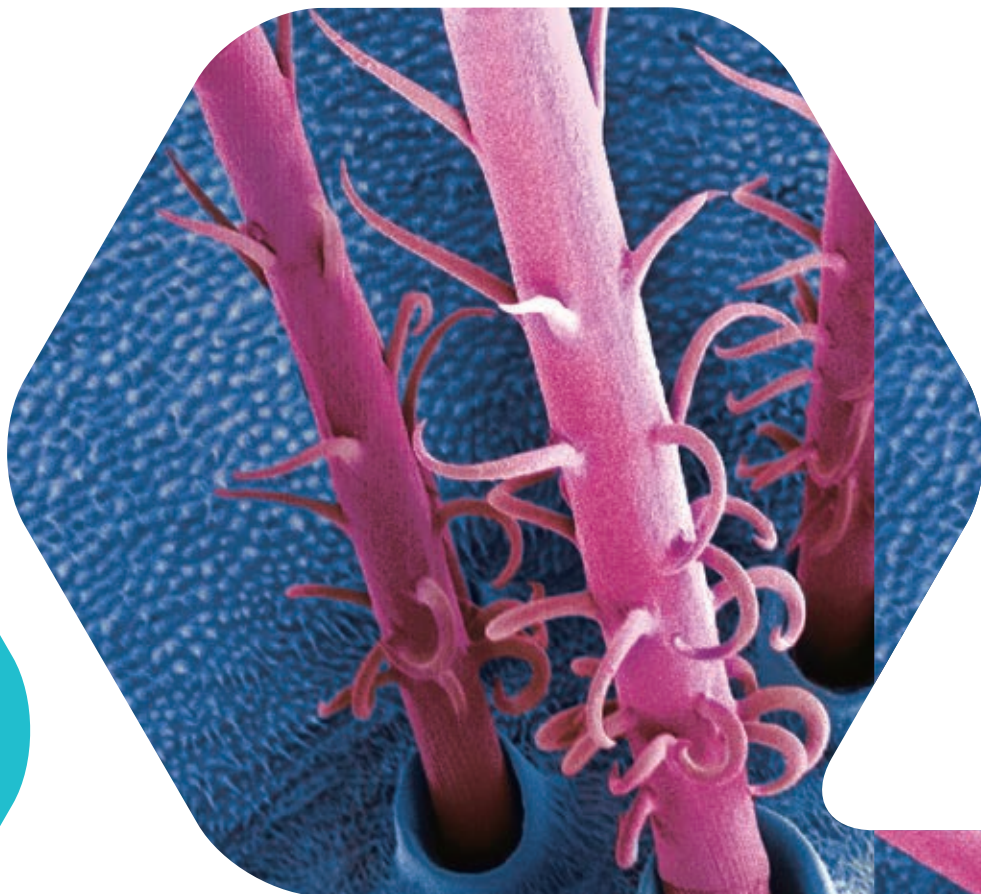
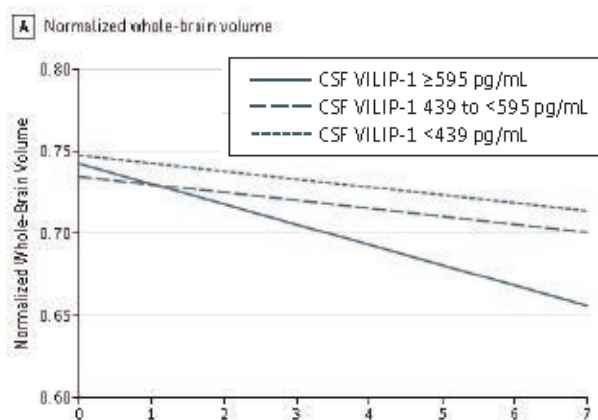
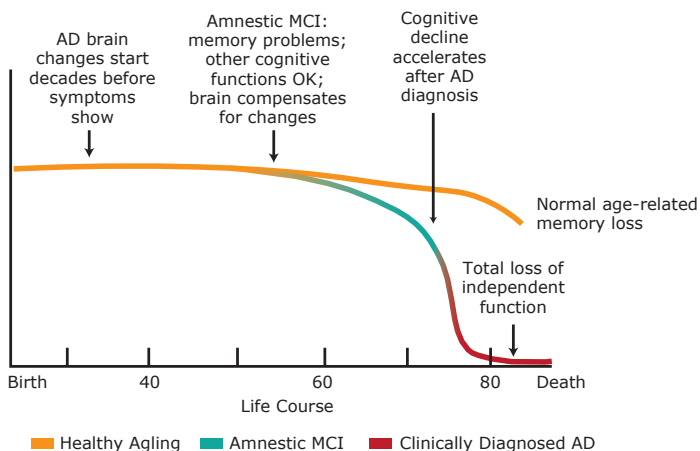
A. Wu, A. Jaffe. Am Heart J. 2008
J. Todd, et al. Clin Chem. 2007
F. Apple, et al. Clin Biochem. 2010

在一项长达12年的连续研究中，cTnI的价值被彻底地重新定义。研究者在12年前检测了正常个体的cTnI，并且根据本底表达水平的差异将被测者分为4组。在随后12年的临床追踪中，发现本底表达cTnI较高的个体倾向于较高的累积心脏病发病率，而本底表达丰度低于1.06pg/mL的个体12年后心脏病的累积发病率极低。研究揭示cTnI本底表达水平可影响多年后心脏病事件发病率。

2. 全新生物标志物的发现

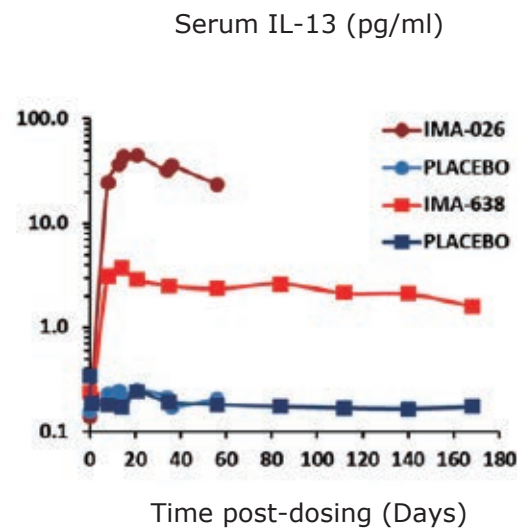
阿尔茨海默症是严重的神经疾病，全球有多达3650万阿尔茨海默症患者。人类已经发现一些重要的蛋白可能会参与到这种疾病，并且可以作为判断疾病的重要标志物。

寻找合适的生物标志物用于早期诊断对于防治阿尔茨海默症十分关键。 $A\beta$ 蛋白造成的淀粉样蛋白沉淀和tau蛋白造成神经纤维缠结，会在最早出现认知损失症状的10-15年前开始，这段时间也被称为阿尔茨海默症潜伏期（preclinical Alzheimer Disease）。如果能在这个时期尽早确认疾病的存在，将为医学干预和治疗争取非常宝贵的治疗期。因此，要求有更好的生物标志物能够在早期进行诊断。通过Erenna®单分子免疫检测平台，研究者自主开发出了VILIP（Visinin-like protein 1）的超高灵敏度检测技术，并且证实VILIP在阿尔茨海默症造成的神经细胞损失方面是非常有效的生物标志物。



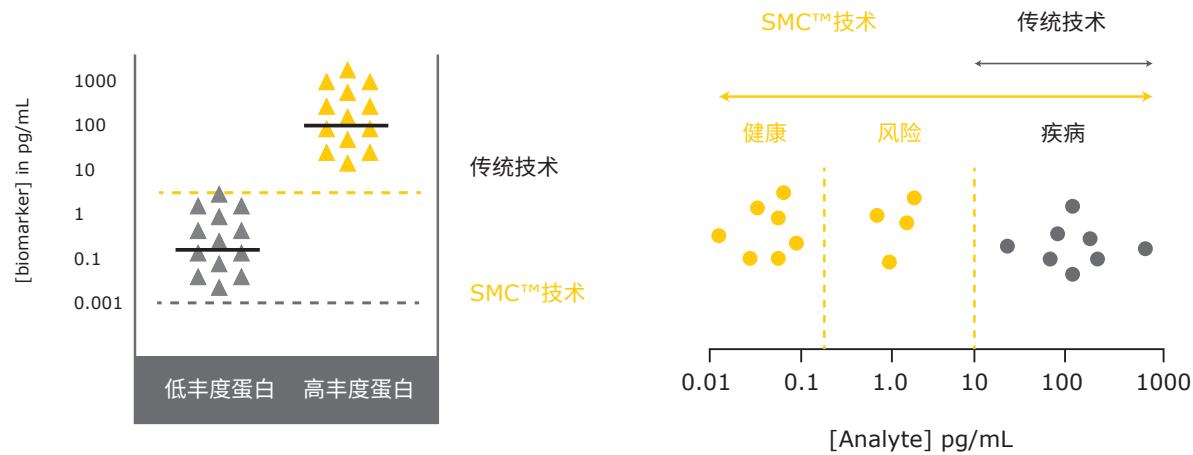
3. Erenna®助力全新单抗药物开发

IL-13是重要的细胞炎症因子，与IL-13信号通路相关研究发现青壮年的哮喘很多是由于IL-13信号通路所造成，因而IL-13被认为是一种很重要的成年哮喘诱发因素。Pfizer辉瑞制药公司为解决这种问题，计划开发IL-13单克隆抗体药物阻断IL-13同其受体的结合。在药物研发过程中两个候选药物，即IMA638和IMA026获得了比较好的疗效，但临床实验急需方法测量血液中的IL-13进行药物代谢动力学和药物效应动力学的检测。这些关键数据对于药物通过临床实验，进入FDA审批阶段起着至关重要的作用。而当时普通的ELISA受制于较低的灵敏度，无法检测到IL-13的本底表达水平。Erenna®单分子免疫检测平台具备数倍乃至上百倍于高质量ELISA检测试剂盒的灵敏度，磁珠孵育系统达到了0.07pg/mL的超高检测灵敏度，实现了所有个体本底表达水平的检测，从而得到了血液中IL-13在治疗条件下的完整变化数据，提供了关键的临床证据。



检测方法	供应商	检测下限 (pg/mL)	灵敏度差别 (倍数)	可检测样本 (n=182)
Original IL-13 ELISA	R&D Systems	9.8	–	0%
Erenna® Plate Based Assay	Merck	1.2	8×	<1%
Erenna® Bead Based assay	Merck	0.07	140×	99%

4. Erenna®高灵敏度检测突破传统技术局限，区分健康，风险与疾病个体



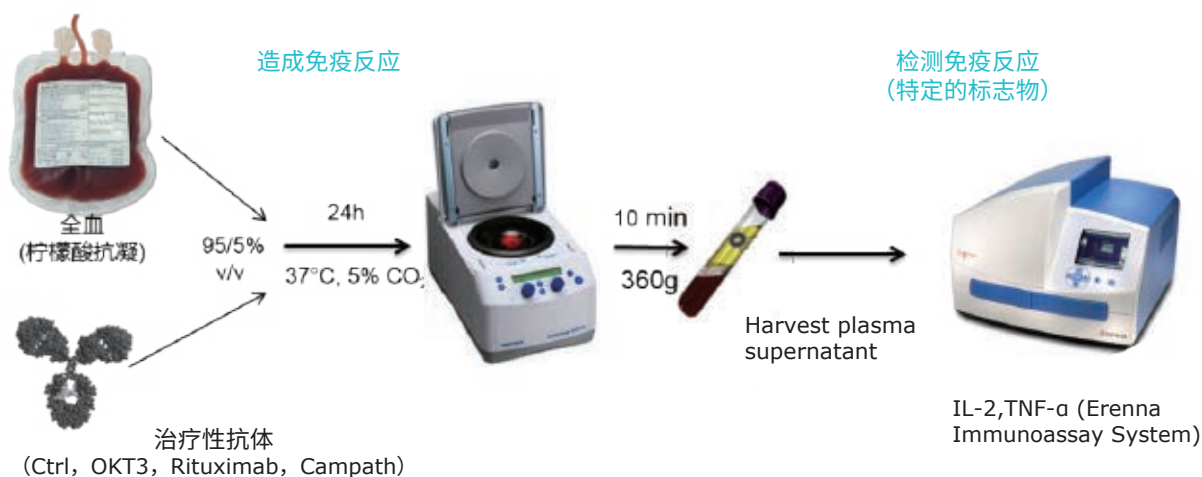
5. 新蛋白药物/治疗方法的免疫原性检测

随着生物技术的发展，重组蛋白药物或者单抗类药物，以及CAR-T等新型治疗方法越来越受到关注，但这些治疗过程会在体内产生新的免疫原，有可能导致大量细胞因子的释放，引起血管透性变化，病人出现高烧等一系列严重的反应，甚至休克死亡。在这些创新的疗法中，免疫原性检测被作为药物安全评价的最主要指标。

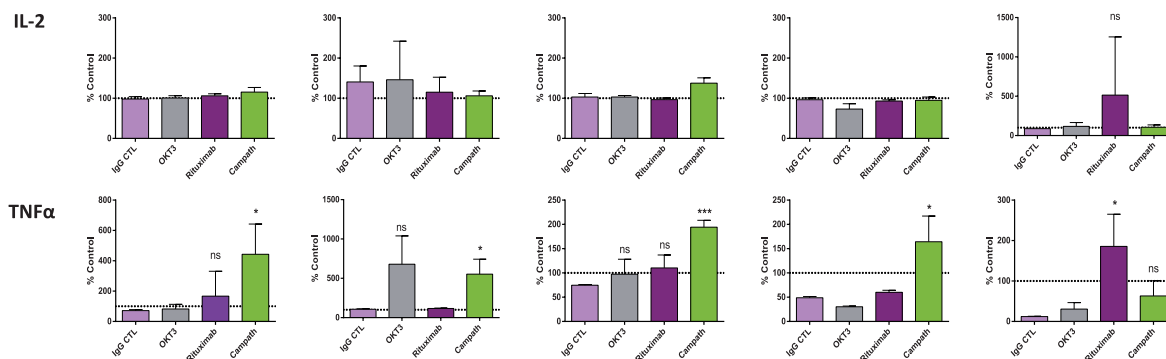
免疫原性指的是抗原激发免疫反应的能力，也指抗原刺激机体后，机体免疫系统能形成抗体或致敏T淋巴细胞的特异性免疫反应的能力。免疫原性很多情况下是对机体有利的，例如疫苗产生的免疫反应。但是，在生物治疗过程中，对治疗性抗原（重组蛋白，单抗）的免疫反应是非常不利的，会产生细胞因子释放综合症cytokine release syndrome (CRS)，促炎症因子在治疗中被免疫细胞释放(例如TNF- α , IL-6, IL-8, IFN- γ , 等等)，或者是抗药性抗体产生 anti-drug-antibodies (ADAs)，削弱治疗效果，对治疗产生反作用。

细胞因子释放检测

细胞因子释放检测一般采用全血测试方法，即将治疗性抗体与抗凝全血孵育，并在血浆中检测特定细胞因子的产生。

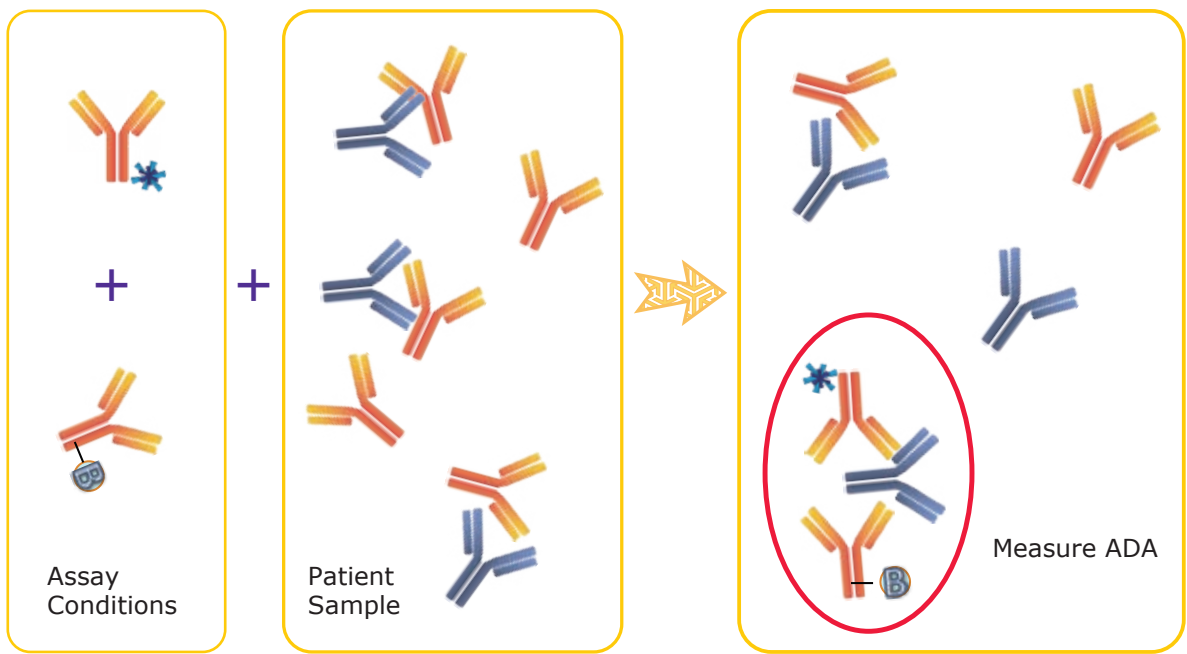


Erenna®其检测灵敏度可达到TNF- α :0.1 pg/mL，IL-2:0.2 pg/mL，本底细胞因子水平: 100% 可被检测，提高了数据质量，并且可通过本底水平对样品进行分级。而其大动态检测范围能力可满足在CRS中炎症反应细胞因子剧烈变化，同时高通量的实验形式可检测大量实验样本，减小个体差异对结果的影响。



抗药性抗体（ADA）检测

Bridging Assay With Free Drug Present



KEY

 Fluorescently Tagged Drug

 Biotinylated Drug

 [Free] Drug—Present in treated individuals

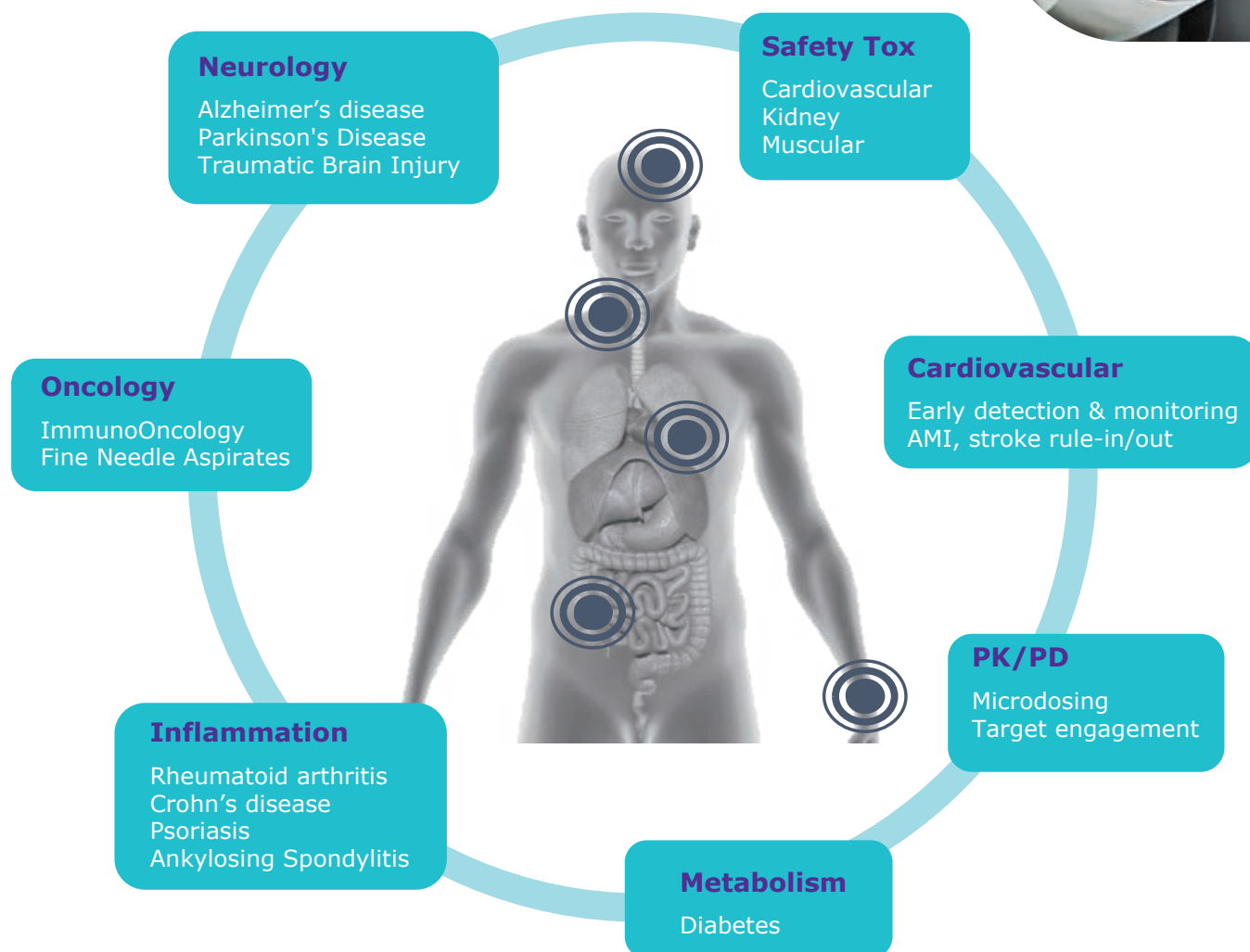
 Anti drug antibody (ADA)—Present in treated individuals



Erenna®

生物标志物研究进展

Erenna®在肿瘤，药物安全评价，神经科学，心血管疾病，代谢病，炎症反应，药效动力学和药代动力学等多个研究领域已经获得了大量成功的数据，并发表了一系列重要的文献。Erenna®平台的卓越检测灵敏度，高度的灵活性，宽广的动态范围，以及高通量的检测能力都将助力您的创新研究。



Erenna®

单分子免疫检测平台

仪器参数

参数指标	特征参数
激发激光	635nm, 25 mw固态激光器
检测器	单光子检测模块, 最大检测效率在650nm
检测速度	3000万光子/秒
检测下限	1fM
动态检测范围	>4log
检测精度	<7%CV
斜率	>20DE/fM*
背景	<100DE
检测下限	<1 fM*
上样液流速度	40ul/min
信号处理模式	4或5参数标曲拟合

*在如下校准条件测得: 0-300 fM的 150 kD 荧光素标记抗体

†DE 通过30fM 校准试剂测得, n=20



网络/电脑硬件要求

- Microsoft Windows® 7 操作系统
- 动态IP地址和FTP服务器
- Sgx link操作和分析软件 (已包括)

仪器尺寸和重量

- H: 400 mm (15.75 in)
- W: 540 mm (21.25 in)
- D: 575.6 mm (22.7 in)
- W: 31.3 kg (69 lbs)

读板系统

- 384孔板

检测形式

- 基于多孔板板底的检测
- 基于微球的检测

电源要求

- 美国: 115 VAC, 50-60 Hz (工作电压范围 90-125 V)
- 国际: 230 VAC, 50-60 Hz (工作电压范围 180-250 V)

Amnis® 量化成像分析流式细胞仪



SMC™ Erenna®
单分子免疫检测平台



Guava® easyCyte系列
微毛细管细胞分析平台



Muse™ 智能触控细胞分析仪



上海
上海市浦东新区张江高科
晨晖路88号二号楼2楼
电话: (021)20338288
传真: (021)50803042
邮编: 201203

北京
北京市朝阳区曙光西里甲5号
凤凰置地广场A座写字楼18层
电话: (010)59898600
传真: (010)57623560
邮编: 100035

广州
广州市黄埔大道西638号
富力科讯大厦803A室
电话: (020) 37883048
传真: (020) 37883072
邮编: 510627

成都
成都市锦江区东大街芷泉街
东方广场C座11楼7号
电话: (028)85288550
传真: (028)85288553
邮编: 610061

本资料中所有内容（包括但不限于产品图片、公司logo等）为德国默克集团所有，未经允许，任何人或实体不得擅自使用或转载。
更多详情，敬请登陆：www.merckmillipore.com 技术服务电话：400 889 1988 中国技术服务中心：asiatechserv@merckgroup.com