

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号：E-BC-F053

产品规格：96T(40 samples)

检测仪器：荧光酶标仪(激发波长 360 nm，发射波长 460 nm)

Elabscience®二肽基肽酶（DPP4）荧光法测试盒

Dipeptidyl Peptidase IV (DPP4) Activity

Fluorometric Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话：400-999-2100

邮箱：biochemical@elabscience.cn

网址：www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测血清、血浆、动物组织和细胞样本中的二肽基肽酶(DPP4)的酶活力。

检测原理

二肽基肽酶(Dipeptidyl peptidase 4)，又称为 CD26，是一种丝氨酸蛋白酶，能够分解肽链 N 端的第二位的脯氨酸或者丙氨酸残基的肽键。在生物体内二肽基肽酶能够快速分解肠促胰岛素，肠促胰岛素能够稳定胰岛素水平，促进生物体血糖水平降低。本试剂盒的检测原理为二肽基肽酶能够分解底物释放荧光物质 AMC，同时加入二肽基肽酶抑制剂可抑制该酶活。通过抑制前后荧光值大小差异能够计算出该酶的酶活大小。

本试剂盒检测组织或细胞样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 E-BC-K318-M)进行测定。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 (Size)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	缓冲液 (Buffer Solution)	60 mL×1 瓶	-20℃ 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	阳性对照 (Postive Control)	粉剂×1 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	底物 (Substrate)	1.2 mL×2 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	抑制剂 (Inhibitor)	0.3 mL×2 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	1 mmol/L 标准品 (1 mmol/L Standard)	1 mL×1 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
	96 孔黑色酶标板	96 孔 × 1 块	无要求
	96 孔覆膜	2 张	
	样本位置标记表	1 张	

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。
对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：荧光酶标仪(激发波长为 360 nm，发射波长为 460 nm)，37℃ 恒温箱

试剂准备

- ① 检测前，试剂二置于冰盒待用，其余试剂平衡至室温。
- ② 阳性工作液(DPP4)的配制：
取一支试剂二用0.2 mL双蒸水溶解，2-8℃避光可保存1天。（阳性对照与阳性测定可选做，用于判断试剂性能是否正常。）
- ③ 反应工作液的配制：
按试剂三：试剂一体积比=1：9混匀，按需配制，反应工作液2-8℃避光可保存1天，未使用完的试剂三可分装至-20℃保存，避免反复冻融。
- ④ 抑制工作液的配制：
按试剂四：试剂一体积比=1：39混匀，按需配制，抑制工作液2-8℃避光可保存1天，未使用完的试剂四可分装至-20℃保存，避免反复冻融。
- ⑤ 100 μmol/L标准品溶液的配制：
按试剂五：试剂一体积比=1：9混匀，按需配制，2-8℃避光可保存3天。
未使用完的试剂五可分装至-20℃保存，避免反复冻融。
- ⑥ 不同浓度标准品的稀释：

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度(μmol/L)	0	20	40	50	60	70	80	100
100 μmol/L 标准品(μL)	0	40	80	100	120	140	160	200
试剂一(μL)	200	160	120	100	80	60	40	0

样本准备

① 样本处理

组织样本：按组织样本质量(g)：试剂一体积(mL) = 1: 19的比例进行匀浆，4℃，10000 × g离心10 min取上清待测，留取部分上清进行蛋白浓度测定。

细胞样本：按1×10⁶个细胞加0.2 mL试剂一进行匀浆，4℃，10000 × g离心10 min取上清待测，留取部分上清进行蛋白浓度测定。

血清血浆样本：直接测定。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：0.92-3.77 U/L，请参考下表稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
5%小鼠肾组织	4-5	猪血清	4-5
5%小鼠肺组织	4-5	马血清	4-5
5%小鼠脑组织	4-5	狗血清	4-5
5%小鼠心组织	4-5	雌鸡血清	4-5
5%小鼠肝组织	4-5	食蟹猴血清	6-10
5%大鼠肝组织	4-5	5.0×10 ⁶ HL-60 cell	不稀释
5%大鼠脑组织	4-5	4.1×10 ⁶ 293T cell	不稀释

注：稀释液为试剂一。

实验关键点

由于样本与抑制剂的加入量较小，当这 2 个组分加入到酶标板孔中后要充分振板，使板孔壁上粘到的液滴掉到孔底，减少实验误差。同时振板也能让这 2 个组分充分混匀，让样本与抑制剂充分接触。

操作步骤

- ① 标准孔：向相应孔中加入 20 μL 不同浓度标准品；
测定孔：向相应孔中加入 20 μL 待测样本；
对照孔：向相应孔中加入 20 μL 待测样本；
阳性对照孔：向相应孔中加入 20 μL 阳性工作液；
阳性测定孔：向相应孔中加入 20 μL 阳性工作液。
- ② 向步骤①中对标准孔中加入 200 μL 试剂一；
对照孔、阳性对照孔中加入 30 μL 试剂一；
测定孔、阳性测定孔中加入 30 μL 抑制工作液。
- ③ 振板 3 s，37°C 孵育 10 min。
- ④ 向步骤③中对照孔、测定孔、阳性对照孔，阳性测定孔中加入 170 μL 反应工作液。
- ⑤ 荧光酶标仪于激发波长 360 nm，发射波长 460 nm 处检测各对照孔荧光值 $F_{1\text{对}}$ ，各测定孔荧光值 $F_{1\text{测}}$ ，37°C 下孵育 30 min，相同条件下，检测各对照孔荧光值 $F_{2\text{对}}$ ，各测定孔荧光值 $F_{2\text{测}}$ ，标准孔荧光值 F_2 ，标准曲线根据标准孔 F_2 值进行拟合。 $\Delta F_{\text{测}} = F_{2\text{测}} - F_{1\text{测}}$ ， $\Delta F_{\text{对}} = F_{2\text{对}} - F_{1\text{对}}$ 。

操作表

	标准孔	对照孔	测定孔	阳性对照孔	阳性测定孔
不同浓度的标准品溶液(μL)	20	--			
待测样本(μL)	--	20	20		
阳性工作液(μL)				20	20
试剂一(μL)	200	30		30	
抑制工作液(μL)			30		30
振板 3 s, 37°C 孵育 10 min					
反应工作液(μL)		170	170	170	170
荧光酶标仪于激发波长 360 nm, 发射波长 460 nm 处检测各对照孔荧光值 $F_{1对}$, 各测定孔荧光值 $F_{1测}$, 37°C 下孵育 30 min, 相同条件下, 检测各对照孔荧光值 $F_{2对}$, 各测定孔荧光值 $F_{2测}$, 标准孔荧光值 F_2 , 标准曲线根据标准孔 F_2 值进行拟合。 $\Delta F_{测} = F_{2测} - F_{1测}$, $\Delta F_{对} = F_{2对} - F_{1对}$ 。					

本试剂盒检测组织或细胞样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 E-BC-K318-M)进行测定。

结果计算

标准品拟合曲线： $y = ax + b$

组织与细胞样本中二肽基肽酶(DPP4)活力计算公式：

定义：37°C 条件下，每克样本蛋白每分钟催化底物生成 1 μmol 的 AMC 所需要的酶量为一个酶活单位。

$$\text{DPP4 活力} = (\Delta F_{\text{对}} - \Delta F_{\text{测}}) \div a \div t \div C_{\text{Pr}} \times f \\ (\text{U/gprot})$$

血清血浆样本中二肽基肽酶(DPP4)活力计算公式：

定义：37°C 条件下，每升血清血浆每分钟催化底物生成 1 μmol 的 AMC 所需要的酶量为一个酶活单位。

$$\text{DPP4 活力} = (\Delta F_{\text{对}} - \Delta F_{\text{测}}) \div a \div t \times f \\ (\text{U/L})$$

注解：

y: 标准品荧光值-空白荧光值(标准品浓度为 0 时的荧光值，标准曲线以标准孔 F_2 值进行拟合)

x: 标准品的浓度

a: 标曲的斜率

b: 标曲的截距

$\Delta F_{\text{测}}$: 样本测定孔变化荧光值: $F_{2\text{测}} - F_{1\text{测}}$

$\Delta F_{\text{对}}$: 样本对照孔变化荧光值: $F_{2\text{对}} - F_{1\text{对}}$

t: 反应时间, 30 min

f: 样本加入检测体系前的稀释倍数

C_{pr} : 待测样本的蛋白浓度, gprot/L

附录1 关键数据

1. 技术参数

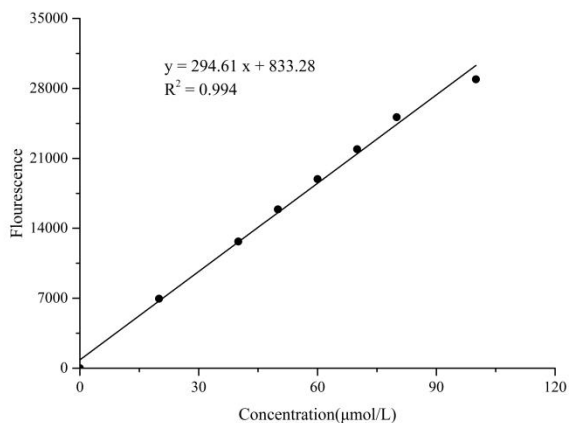
检测范围	0.92-3.77 U/L	平均批间差	5.7 %
灵敏度	0.92 U/L	平均批内差	0.6 %
平均回收率	100 %		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

①不同浓度标准品加样量20 μL ，按照操作步骤进行实验，荧光值如下表所示：

标准品浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	0	20	40	50	60	70	80	100
荧光值	16	6862	12505	15781	18403	21563	24781	28544
	20	7082	12876	16059	19481	22312	25503	29309
平均荧光值	18	6972	12691	15920	18942	21938	25142	28927
绝对荧光值	0	6954	12673	15902	18924	21920	25124	28909

②绘制标曲(如下图)：



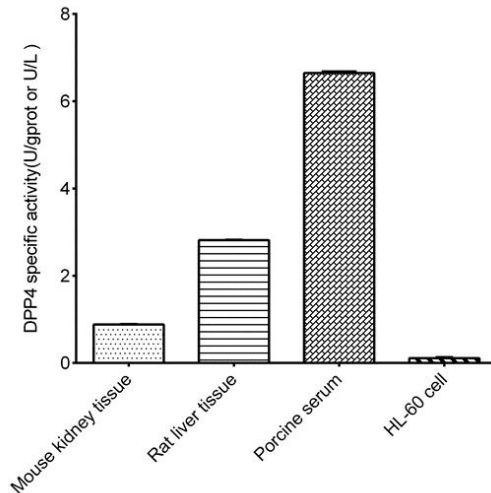
附录2 实例分析

例如检测5%小鼠肾组织(数据仅供参考):

制备的5%小鼠肾组织上清液用试剂一稀释4倍, 取稀释后的样本20 μL , 按操作表操作, 结果如下: 标准曲线: $y = 294.61x + 833.29$, 0 min测得对照孔荧光值 $F_{1\text{对}}$ 为7917, 测定孔荧光值 $F_{1\text{测}}$ 为7498.5, 30 min测得对照孔荧光值 $F_{2\text{对}}$ 为15582.5, 测定孔荧光值 $F_{2\text{测}}$ 为10508.5, $\Delta F_{\text{测}} = F_{2\text{测}} - F_{1\text{测}} = 10508.5 - 7498.5 = 3010$, $\Delta F_{\text{对}} = F_{2\text{对}} - F_{1\text{对}} = 15582.5 - 7917 = 7665.5$, 5%小鼠肾组织匀浆蛋白浓度为3.97 gprot/L计算结果为:

$$\text{DPP4活力(U/gprot)} = (7665.5 - 3010) \div 294.61 \div 30 \div 3.97 \times 4 = 0.53 \text{ U/gprot}$$

按说明书操作, 测定小鼠肾组织(5%组织匀浆蛋白浓度3.97 gprot/L, 稀释4倍, 加样量20 μL)、大鼠肝组织(5%组织匀浆蛋白浓度4.72 gprot/L, 稀释4倍, 加样量20 μL)、猪血清(稀释4倍, 加样量20 μL)、HL-60细胞(5.0×10^6 个细胞匀浆蛋白浓度0.68 gprot/L, 加样量为20 μL)中的DPP4活力(如下图):



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
样本测不出值	样本稀释倍数太大	选择合适稀释倍数, 重新检测
样本测不出值 复孔差异大	样本保存时间过长或者保存不当	取新鲜样本, 重新检测
	未严格按照说明书操作	严格按照说明书操作

声明

1. 试剂盒仅供研究使用, 如将其用于临床诊断或任何其他用途, 我公司将不对因此产生的问题负责, 亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器, 严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低, 请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中, 建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责, 不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责, 使用前请充分考虑样本可能的使用量, 预留充足的样本。

