（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素，肠促胰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	-20ºC 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	1 板	
	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1×10^6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 ℃ 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 $F_{1对}$，各测定孔荧光值 $F_{1测}$，37 ℃ 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。$\triangle F_{测} = F_{2测} - F_{1测}$，$\triangle F_{对} = F_{2对} - F_{1对}$。

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 ℃ 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 ℃ 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。$\triangle F_{测} = F_{2测} - F_{1测}$，$\triangle F_{对} = F_{2对} - F_{1对}$。					

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℃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。

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

血清血浆样本中二肽基肽酶(DPP4)活力计算公式：

定义：37℃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。

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

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

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

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

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

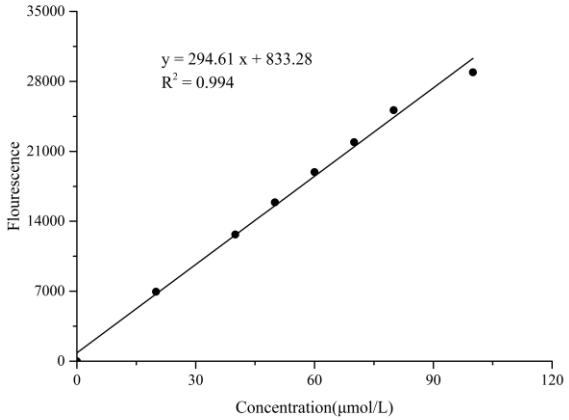
检测范围	0.92-3.77 U/L	**平均批间差**	5.7 %
灵敏度	0.92 U/L	**平均批内差**	0.6 %
平均回收率	100 %		

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 (μmol/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)：



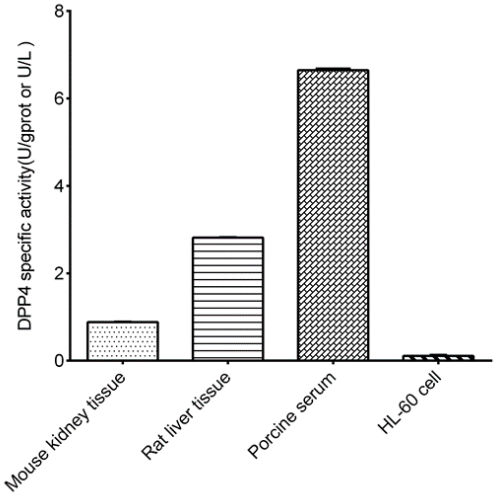
附录2 实例分析

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 = 294.61 x + 833.29，0 min测得对照孔荧光值$F_{1对}$为7917，测定孔荧光值$F_{1测}$为7498.5，30 min测得对照孔荧光值$F_{2对}$为15582.5，测定孔荧光值$F_{2测}$为10508.5，$\triangle F_{测} = F_{2测} - F_{1测}$=10508.5 - 7498.5 = 3010，$\triangle F_{对} = F_{2对} - F_{1对}$=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：

DPP4活力(U/gprot) = (7665.5 - 3010) ÷294.61 ÷30 ÷3.97 ×4= 0.53 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同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。