

人DPP4/CD26双抗夹心ELISA检测试剂盒

请在实验前仔细阅读本说明书

产品货号: KE00292

规格: 96T

灵敏度: 0.03 ng/mL

检测范围: 0.313-20 ng/mL

用途: 此试剂盒用于定量检测血清、血浆、细胞上清、尿液以及唾液中的人DPP4/CD26浓度

本产品仅用于科学研究，不适用于临床诊断

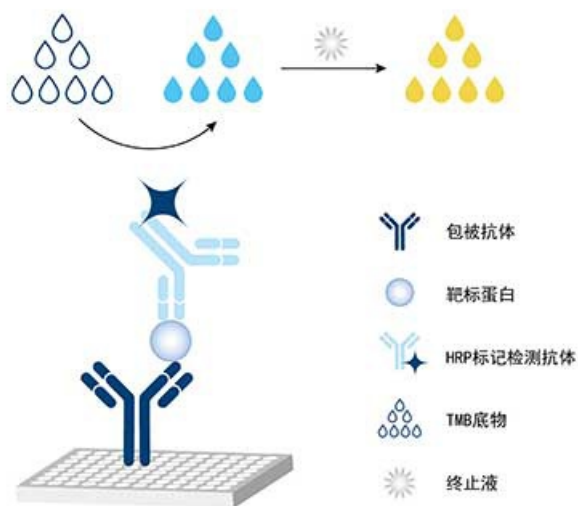
目录

一：背景信息	3
二：检测原理	3
三：需自备的实验器材	3
四：试剂盒组分及储存	4
五：实验注意事项	4
六：样本准备	4
七：试剂准备	5
八：实验步骤	6
九：实验参数	7
9.1 参考标曲图	7
9.2 精密度	7
9.3 加标回收率	7
9.4 样本值	8
9.5 灵敏度	8
9.6 线性	8
9.7 特异性	9
十：参考文献	9

一：背景信息

二肽基肽酶4 (DPP4, 也被称为CD26) 是一种丝氨酸外肽酶, 可从多肽的N端裂解X-脯氨酸二肽。它是一种II型膜蛋白, 由一个短的胞质尾区、一个跨膜结构域和一个大的细胞外结构域组成, 胞外结构域包括一个灵活的柄、富含糖基化的区域、富含半胱氨酸的区域和催化区。DPP4广泛表达于T细胞、活化的B细胞、活化的NK细胞和髓系细胞, 以及各种组织的上皮细胞、内皮细胞。体液中存在缺乏胞内部分和跨膜区的DPP4的可溶性形式。血清可溶性DPP4水平改变的报道于多种疾病包, 括炎症和传染病以及肿瘤。

二：检测原理



◀双抗夹心模式图 (检测抗体直标HRP)

按操作顺序形成抗体夹心结构后, 加入TMB底物, 板孔液体由无色变成蓝色, 再加入终止液液体变为黄色后进行吸光度值测定。

三：需自备的实验器材

- 3.1 酶标仪 (可读取450 nm和630 nm双波长);
- 3.2 高精度移液器及一次性移液器枪头;
- 3.3 洗板机 (亦可手动洗板);
- 3.4 EP管 (用于稀释标准品及样本);
- 3.5 吸水毛巾或滤纸 (用于拍干);
- 3.6 烧杯和量筒;
- 3.7 用于ELISA实验的数据分析的统计拟合软件 (推荐四参数拟合方法), 如: Origin, ELISA Calc等。

四：试剂盒组分及储存

英文名称	中文名称	规格	数量
Microplate	预包被酶标板 - 96孔板	8孔 × 12条	1 块
Protein standard	标准品 - 冻干粉状 *	40 ng/瓶	2 瓶
Detection antibody, HRP-conjugated (100×)	HRP标记检测抗体浓缩液 (100×) **	120 μL/支	1 支
Sample Diluent PT 4B1	样本稀释液 PT 4B1	30 mL/瓶	2 瓶
Detection Diluent	抗体稀释液	30 mL/瓶	1 瓶
Wash Buffer Concentrate (20×)	浓缩洗涤液 (20×)	30 mL/瓶	1 瓶
Tetramethylbenzidine Substrate (TMB)	显色底物 TMB	12 mL/瓶	1 瓶
Stop Solution	终止液	12 mL/瓶	1 瓶
Plate Cover Seals	封板膜		4 张

储存条件：
1：未开启试剂盒可在2-8°C条件下存放6个月或者在-20°C条件下存放1年
2：已开启试剂盒可在2-8°C存放7天
3：每次实验均使用新的标准品,使用后丢弃

* 使用对应的样本稀释液对标准品进行复溶，复溶过程避免产生气泡

** 开盖前请离心

五：实验注意事项

- 5.1 避免皮肤接触终止液以及TMB 显色液；
- 5.2 在实验过程中，注意穿戴个人防护装备，如实验服，手套，口罩和护目镜；
- 5.3 请勿将不同批次的试剂进行混用，过期产品请勿使用；
- 5.4 在使用自动洗板机时，板孔加入洗涤液之后，设置30秒的浸泡程序，以提高分析的精确度。

六：样本准备

- 6.1 血清：全血标本室温凝固 30 min后1000×g 离心15 min，取上清立即使用或分装后-20°C存放，避免反复冻融。
- 6.2 血浆：可用EDTA、肝素或柠檬酸盐作为抗凝剂，标本采集后1000×g 离心15 min，立即使用或分装后-20°C存放，避免反复冻融（注意：标本溶血会影响检测结果，因此溶血标本不宜进行检测）。
- 6.3 细胞上清：收集细胞培养液，500×g 离心5 min取上清，立即使用或分装后-20°C存放，避免反复冻融。
- 6.4 尿液：收集尿液后，1000×g离心20 min，取上清，立即使用或分装后-20°C存放，避免反复冻融。
- 6.5 唾液：收集唾液后10000×g 离心5 min，取上清立即使用或分装后-20°C存放，避免反复冻融。

七：试剂准备

7.1 洗涤液 (1×)：

如果洗涤液 (20×) 有晶体析出, 37°C加热至晶体全部溶解。按1:20稀释倍数进行稀释: 如取30 mL 浓缩洗涤液 (20×), 加入570 mL 超纯水或去离子水, 得到洗涤液 (1×)。

7.2 HRP标记检测抗体 (1×)：

开盖前瞬时离心, 按1:100比例进行稀释, 稀释前根据预先计算实验所需的总量配制 (100 μL/孔), 实际配制时应多配制0.1-0.2 mL。如10 μL HRP标记检测抗体浓缩液 (100×) 加 990μL 抗体稀释液进行配制, 轻轻混匀。

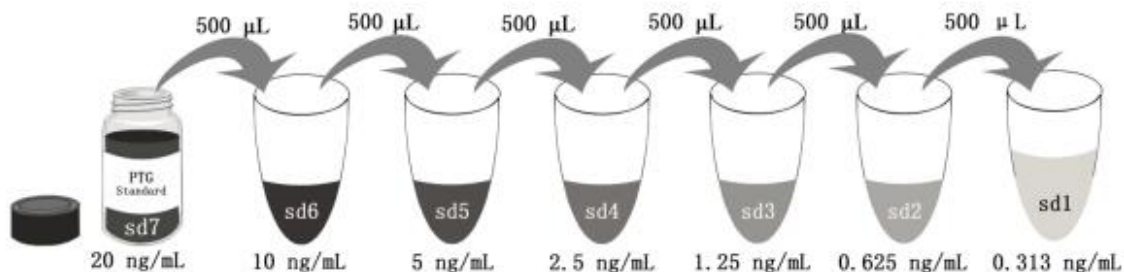
7.3 待检测样本：

不同的样本使用相应的样本稀释液进行稀释, 如果样本检测值超过标曲最高范围, 可将样本进行一定的稀释后再进行实验, 使样本的检测值处于标曲范围内, 不同样本的稀释倍数需自行优化。

稀释比推荐如下: 人血清和血浆样本1:160或1:320稀释; 细胞上清样本1:2稀释; 尿液样本1:8或1:16稀释; 唾液样本1:8或1:16稀释; 样品采集、处理和储存的差异可能导致测值的改变。

7.4 梯度稀释的标准品：

使用2 mL PT 4B1 样本稀释液复溶标准品, 具体操作如下:



Add # μL of Standard diluted in the previous step	—	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL
# μL of Sample Diluent PT 4B1	2000 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL
	"sd7"	"sd6"	"sd5"	"sd4"	"sd3"	"sd2"	"sd1"

八：实验步骤

实验前,需要将所需试剂在室温平衡20-30 min (HRP标记检测抗体浓缩液不需要平衡室温,即用即取);在进行标准品、样本以及不同试剂加样时,更换枪头,避免接触微孔板的内表面,不同的试剂,使用不同的加样槽;

8.1 根据实验用量,取出需要用到的酶标板条,剩余板条加入干燥剂放入铝箔袋密封后存放于4°C,并于一周之内用完;

8.2 加样,分别设零孔、标准孔、待测样本孔。零孔加样本稀释液100 μL,余孔分别加梯度稀释的标准品或待测样本100 μL/孔,注意不要产生气泡(建议标准品和样本都做复孔,尽量避免实验误差,确保上样不间断,5-10 min完成加样);

8.3 酶标板盖上覆膜,37°C孵育2 h;

8.4 洗涤

1) 揭开封板膜(动作轻柔,避免动作过大导致液体溢出串孔),弃液体,拍干;

2) 洗涤液(1×)洗涤板条,每孔350-400 μL,洗涤后,甩掉液体拍干板条,重复此步骤4次,避免异物进入板孔以及板条干燥;

8.5 每孔加100 μL HRP标记检测抗体(1×)(参照试剂准备部分7.2),盖上封板膜,37°C孵育40 min;

8.6 重复步骤8.4;

8.7 显色:每孔加TMB显色液100 μL,37°C避光显色 15-20 min(如果颜色偏浅,可适当延长显色时间,不超过30 min;保持显色底物始终处于避光状态,显色底物在加样前应是无色透明,如有变色,请勿使用);

8.8 终止:每孔加终止液100 μL,蓝色变黄色。终止液与TMB显色液的加样顺序一致;(注意:眼睛和皮肤避免接触终止液)

8.9 读数:以630 nm为校正波长,用酶标仪在450 nm波长测量各孔的光密度(OD值)。加入终止液后5 min内进行读数,若无630 nm波长,也可直接使用450 nm 波长读数;

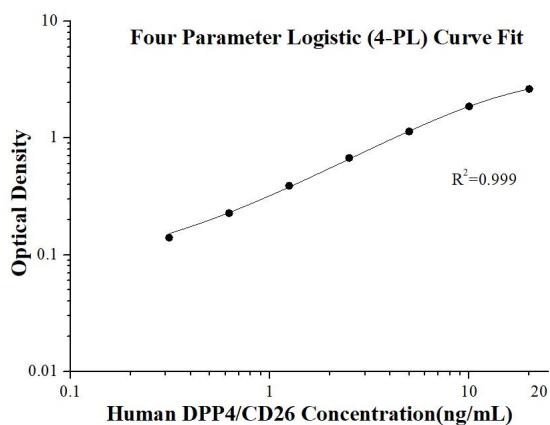
8.10 数据分析:每个标准品和样本的OD值需减去零孔的OD值,设置复孔,取其平均值。以标准品的浓度为横坐标,OD 值为纵坐标,使用专业软件(如Origin、ELISACalc等)进行四参数拟合(4-PL),根据样本的OD值由标准曲线推算出拟合浓度,乘以稀释倍数得到样本的实测浓度。

操作流程如下:

步骤	试剂	体积	孵育时间	洗涤次数	孵育温度
1	标准品或样本	100 μL	120 分钟	4 次	覆膜后37°C孵育
2	HRP标记检测抗体(1×)	100 μL	40 分钟	4 次	覆膜后37°C孵育
3	显色 TMB	100 μL	15-20 分钟	不需要洗涤	覆膜后37°C孵育,避光
4	终止液	100 μL	0 分钟	不需要洗涤	-
5	加入终止液后以630 nm为校正波长,在450 nm处测量OD值,此过程建议不超过5分钟				

九：实验参数

9.1 参考标曲图



(ng/mL)	O.D	Average	Corrected
0	0.049 0.050	0.049	-
0.313	0.140 0.141	0.140	0.091
0.625	0.229 0.226	0.227	0.178
1.25	0.398 0.382	0.390	0.340
2.5	0.695 0.655	0.675	0.626
5	1.152 1.122	1.137	1.088
10	1.860 1.868	1.864	1.815
20	2.647 2.607	2.627	2.578

9.2 精密度

板内精密度：3个不同浓度的样本在板内重复测定 20次；

板间精密度：3个不同浓度的样本在板间重复测定 24次。

板内精密度 (CV内)				
样本	数量	平均值 (ng/mL)	标准差	变异系数CV%
1	20	9.78	0.23	2.39
2	20	2.43	0.03	1.32
3	20	0.62	0.02	2.53

板间精密度 (CV间)				
样本	数量	平均值 (ng/mL)	标准差	变异系数CV%
1	24	9.70	0.23	2.41
2	24	2.42	0.07	2.78
3	24	0.59	0.02	2.99

9.3 加标回收率

样本稀释后，在标曲范围内选择高、中、低3个浓度，进行人DPP4/CD26的加标回收率实验，结果如下：

样本类型	稀释倍数	平均值 (%)	范围 (%)
人血清	1:200	86	71-102
	1:400	88	74-102
细胞上清	1:2	87	82-94
	1:4	86	81-89
尿液	1:20	88	78-94
	1:40	89	82-94
唾液	1:20	89	81-94
	1:40	93	88-103

9.4 样本值

应用本试剂盒，检测来自人的血清、尿液及唾液样本中人DPP4/CD26的浓度：

样本类型	均值 (ng/mL)	范围 (ng/mL)
人血清 (n=16)	475.10	189.59-990.11
尿液 (n=8)	33.23	9.07-105.84
唾液 (n=8)	33.57	21.27-77.69

细胞上清 - 在含有5%胎牛血清、50 μM β -巯基乙醇、2 mM L-谷氨酰胺、100 U/mL青霉素和100 $\mu\text{g/mL}$ 硫酸链霉素的DMEM中培养人外周血单个核细胞(1×10^6 cells/mL)，细胞未经刺激或在10 $\mu\text{g/mL}$ 植物血凝素PHA 刺激下培养5天。收集细胞上清，并检测人DPP4/CD26浓度。

刺激条件	(ng/mL)
未刺激	0.18
刺激5天	1.48

9.5 灵敏度

用20个重复的零孔平均OD值加上两倍标准差得到的OD值带入标准曲线拟合出对应的浓度值，此试剂盒中人DPP4/CD26的灵敏度为0.03 ng/mL。

9.6 线性

用对应样本稀释液稀释样品检测样本线性，稀释后检测值应处于标曲范围内，线性如下：

(人血清样本预先稀释40倍，尿液和唾液样本预先稀释4倍)

稀释倍数		人血清	细胞上清	尿液	唾液
1:2	均值 (%)	100	100	100	100
	范围 (%)	-	-	-	-
1:4	均值 (%)	104	102	101	103
	范围 (%)	97-107	100-105	99-103	101-104
1:8	均值 (%)	105	87	105	107
	范围 (%)	94-111	79-102	100-108	102-110
1:16	均值 (%)	106		106	109
	范围 (%)	90-120		106-107	98-117

9.7 特异性

本试剂盒特异性识别天然和重组人DPP4/CD26，加入50 ng/mL以下细胞因子，无明显交叉反应

Human:

Neprilysin/CD10

ECE-1

Cathepsin A

ECE-2

ACE-2

FAP

ACE

十：参考文献

1. Anne-Marie Lambeir, et al. (2003) Crit Rev Clin Lab Sci. 40(3):209-94.
2. Oscar J Cordero, et al. (2009) Cancer Immunol Immunother. 58(11):1723-47.
3. C Klemann, et al. (2016) Clin Exp Immunol. 185(1):1-21.