

研究用試薬

YK080 Human PYY ELA

New type

取扱説明書

FOR RESEARCH LABORATORY USE ONLY

株式会社 矢内原研究所

〒418-0011 静岡県富士宮市栗倉 2480-1

FAX: 0544-22-2770 TEL: 0544-22-2771

Website: www.yanaihara.co.jp E-mail: ask@yanaihara.co.jp

目 次

I.	はじめに	2
II.	特 徴	3
III.	キットの構成	4
IV.	操作法	5～6
V.	操作上の注意	7
VI.	基本性能	8～10
VII.	貯蔵法および有効期間	11
VIII.	文献	11～12

YK080 Human PYY EIA キット / New type

I. はじめに

本キットは下部消化管に特異的に存在する消化管ホルモン、Peptide YY (PYY)の簡易で安定な測定系であり、下部消化管の機能検査に有用な測定系として使用できます。

PYYは1980年、tatemotoらにより、ブタ十二指腸抽出物から初めて単離された36アミノ酸残基のポリペプチドであり、膵ポリペプチドやニューロペプチドY (NPY) と高い相同性があるアミノ酸配列を有しています。回腸、結腸、直腸の内分泌細胞に特に分布し、胃腸の運動抑制、膵外内分泌抑制、胃酸分泌抑制などの作用が知られています。食餌（特に脂肪）により分泌が亢進し、未熟児や新生児において血中PYY値は成人の正常値の2倍から数倍に達しています。腸切除後には有意に低値を示すことが知られており、腸切除により下部消化管のPYY細胞数が減少することで、血中濃度が低下することが示唆されています。

本キットでは合成ヒトPYY(3-36)を標準品、ビオチン化ヒトPYY(3-36)を標識抗原、およびヒトPYY を特異的に認識するポリクローナル抗体を使用し、ヒト血清、血漿のPYY 濃度 [PYY(3-36)およびPYY(1-36)]の測定が可能です。

ヒト P Y Y : Y-P-I-K-P-E-A-P-G-E-D-A-S-P-E-E-L-N-

R-Y-Y-A-S-L-R-H-Y-L-N-L-V-T-R-Q-R-Y-amide

YK080 Human PYY EIA キット / New type

	内容
▼ ヒト PYY 測定用です。	1) 測定プレート
▼ 0.082~20 ng/mL の範囲で測定できます。	2) 標準品
▼ 測定は 16~18 時間と 3 時間で終了します。	3) 標識抗原
▼ 41 検体を duplicate で測定できます。	4) SA-HRP 溶液
▼ 血清、血漿サンプルの測定ができます。	5) 酵素基質液
▼ 検体量は 50 μ L です。	6) 酵素反応停止液
▼ プレートは 1 列 (8 ウェル) 毎に取り外し できますのでキットの分割使用が可能です。	7) 緩衝液
	8) 濃縮洗浄液
	9) プレート密閉用シール
▼ 同時再現性 ヒト血清 CV(%) 3.67~5.13 ヒト血漿 CV(%) 6.08~8.52	
▼ 日差再現性 ヒト血清 CV(%) 2.33~6.55 ヒト血漿 CV(%) 5.45~10.26	
保存と安定性 2~8°Cで保存してください。 製造日より 24 ヶ月間は安定です。	

II. 特 徴

本キットはヒト血清、血漿中に含まれるヒト PYY 濃度[PYY(3-36)および PYY(1-36)]を定量的に測定するためのキットです。本キットによるヒト PYY の測定は簡便でしかも特異性、定量性に優れ、共存する他の生理活性物質や体液成分の影響を受けにくいなどの多くの利点を備えています。なお、添付のヒト PYY(3-36)標準品は高純度の合成品であり、表示の重量は絶対量を示しています。

<特異性>

本キットはヒト PYY(3-36) およびヒト PYY(1-36) と 100%の交差反応性が認められます。ヒト PYY とアミノ酸構造が類似しているヒトおよびラット NPY とは、0.003%以下の交差反応を示すにすぎません。

<測定原理>

本キットによるヒト PYY の測定は競合法に基づいて行います。

測定プレート(96 ウェル)の各ウェルにはウサギ抗ヒト PYY 抗体が固定化されており、この各ウェルに標準液または検体、ビオチン化ヒト PYY(3-36)を順次加えて競合反応させます。これに HRP(horse-radish peroxidase)結合ストレプトアビジンを加え、ウェル上に HRP 結合ストレプトアビジン-ビオチン化抗原-抗体複合体を形成させます。最後にこの複合体中の酵素(HRP)活性を測定することにより、検体中のヒト PYY 濃度を求めることができます。測定範囲は、0.082 ~ 20 ng/mL です。

Ⅲ. キットの構成

試薬・器具	形状	規格	内容物
1. Antibody coated plate (測定プレート)	96 ウエルプレート	1 枚	ウサギ抗ヒト PYY 特異抗体 固定化プレート
2. Standard (標準品)	凍結乾燥品	1 本(20 ng)	合成ヒト PYY(3-36)
3. Labeled antigen (標識抗原)	凍結乾燥品	1 本	ビオチン化ヒト PYY(3-36)
4. SA-HRP solution (SA-HRP 溶液)	液状	1 本 (12mL)	安定剤を含むトリス塩酸緩衝液に溶解 した HRP 結合ストレプトアビジン
5. Enzyme substrate solution (酵素基質液)	液状	1 本 (12mL)	3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(TMB)
6. Stopping solution (酵素反応停止液)	液状	1 本 (12mL)	1M 硫酸溶液
7. Buffer solution (緩衝液)	液状	1 本 (25mL)	非特異的の反応除去剤を含む トリス塩酸緩衝液
8. Washing solution (concentrated) (濃縮洗浄液)	液状	1 本 (50mL)	1% Tween 20 を含む濃縮生理食塩液
9. Adhesive foil (プレート密閉用シール)		3 枚	

IV. 操作法

測定を始める前に必ずお読みください。

(注意：キットに含まれるすべての試薬は室温に戻してから測定を始め
てください。)

<使用器具および装置>

1. マイクロピペットおよびチップ (25 μ L ~ 1 mL) ; 8 連または 12 連のマルチチャンネルピペットの使用を薦めます
2. マイクロプレート用吸光度計(測定波長 450nm で吸光度 2.5 まで測定できる装置)
3. マイクロプレート用振とう機またはシェーカー
4. 標準液の調製に使用するガラス製の試験管
5. マイクロプレート洗浄装置、用手法の場合は連続分注器、ニードルディスプレイスパー、アスピレーターまたは真空ポンプの使用を薦めます
6. メスシリンダー(1000 mL)
7. 蒸留水または脱イオン水

<試薬の調製>

1. 標準液の調製法：標準品の容器に緩衝液 1 mL を加え内容物を溶解させ、20 ng/mL の標準液を作製する。この標準液 0.1 mL をとり、これを緩衝液 0.2 mL で希釈し 6.667 ng/mL の標準液を調製する。以下同様の希釈操作を繰り返し、2.222、0.741、0.247、0.082 ng/mL の各標準液を調製する。0 ng/mL の標準液は緩衝液をそのまま使用する。
2. 標識抗原溶液の調製法：標識抗原の容器に緩衝液 6 mL を加え内容物を溶解させ使用する。
3. 洗浄液の調製法：50 mL (全量)を蒸留水 950 mL にて希釈し使用する。
4. その他の試薬はそのまま<測定操作>に従って使用する。

<測定操作>

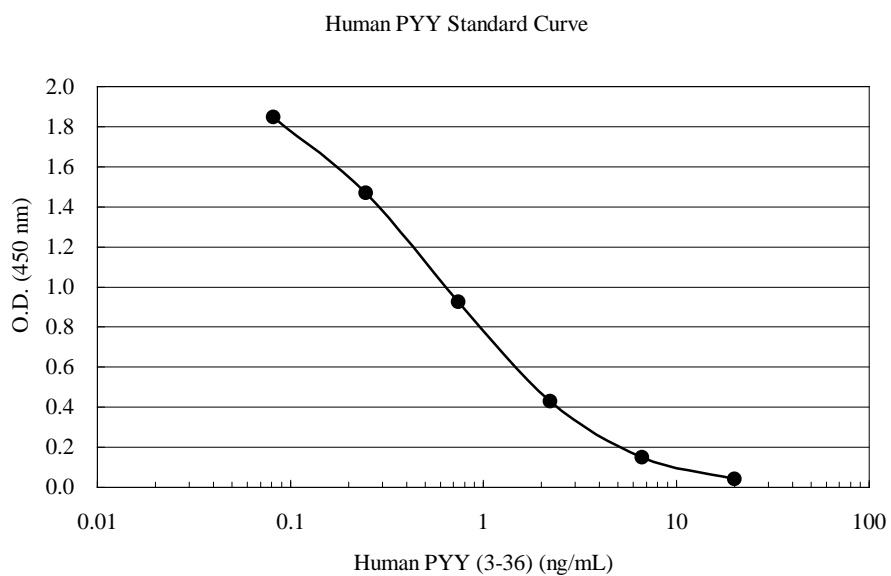
1. キット内容を室温(20~30°C)に戻す。
標準液、標識抗原溶液および洗浄液を上記の試薬調製法に従って調製する。
2. 測定プレートの各ウェルに洗浄液 300 μL を満たした後、アスピレーターにより吸引するか、あるいはプレートを反転し液を捨てたあと、紙タオルなどに軽くたたきつけるようにして液を除く。この操作をさらに2回繰り返し、合計3回の洗浄操作を行う。
3. 各ウェルに緩衝液 25 μL を入れ、ついで標準液または検体 50 μL を加える。
さらに標識抗原溶液 25 μL を加える。
※標準液の分注を始めてから検体の分注を終えるまでの操作はできるだけすみやかに行ってください(30分以内)。
4. 測定プレートをプレート密閉用シールでシールし、4°Cで一晩(16~18時間)静置する。
5. 測定プレートを室温に戻した後(約40分静置)、各ウェル中の液を除き、2と同様の洗浄操作を合計4回行う。
6. 各ウェルにSA-HRP溶液 100 μL を加える。
7. 測定プレートをシールし、室温で2時間振とうする(約100 rpm)。
8. 各ウェルの液を除き2と同様の洗浄操作を4回行う。
9. 各ウェルに酵素基質液 100 μL を加えプレートをシールで密閉し、遮光の状態にて室温で静置し30分間反応させる。
10. 各ウェルに酵素反応停止液 100 μL を加える。
11. マイクロプレート用吸光度計にて 450 nm の吸光度を測定する。
12. 市販のソフトウェアを用いて、4 (or 5) -Parameter、もしくはLog-Logitの回帰式を使用し、ヒトPYY(3-36)標準液の各濃度(6ポイント)の測定値から標準曲線を作成し、検体のヒトPYY濃度を求める。片対数方眼紙を用いる場合は、横軸(Log側)に標準液の濃度を、縦軸(linear側)に標準液各濃度の吸光度をプロットし、標準曲線を作成し、検体の吸光度を標準曲線に当てはめ、ヒトPYYの濃度を読み取る。

V. 操作上の注意

1. 血液検体は採取後、血清または血漿を分離し、直ちに測定してください。直ちに測定できない場合は血清または血漿を適宜小分けして、 -30°C 以下で凍結保存してください。検体の凍結融解を繰り返さないようにしてください。血漿はEDTAを入れた採血管で採血してください。なお、同じ血液検体を用いて他のキットを用いて同時に PYY (3-36)のみを測定される場合は(本キットでは PYY (1-36)と PYY (3-36)の両方を測定)、DPP IV インヒビターを血液検体へ添加してください (最終濃度 $100\ \mu\text{M}$)。DPP IV インヒビター、アプロチニンの本測定系への影響はございません。
2. 試薬は用時調製を原則としてください。特に、標準品および標識抗原は調製後、直ちに使用してください。なお、キットを分割使用する場合、調製後の標準品および標識抗原は適宜小分けして、 -30°C 以下で凍結保存してください (約1ヶ月は安定です)。
3. 標準液の分注を始めてから検体の分注を終わるまでの操作はできるだけすみやかに行ってください (30分以内)。
4. 濃縮洗浄液は保存中に沈殿を生じることがありますが、この沈殿は希釈調製時に溶解します。
5. 各ウェルへの分注操作は測定精度に影響を与えますので正確に行ってください。また検体をウェルに注入する場合は、検体ごとに新しいチップを用い、検体相互間の汚染がないように注意してください。標準液を希釈するときは、希釈段階ごとに必ず新しいチップを使ってください。
6. $20\ \text{ng/mL}$ を超える高値検体の場合は、検体を本キット添付の緩衝液にて希釈して測定してください。
7. 室温で反応中は必ずマイクロプレート用振とう器を用い振とうしてください (呈色反応は除く)。なお振とうはプレート密閉用シールに反応液がはねないようにゆっくりと行ってください。(約100rpm)
8. 測定はすべて2重測定で行ってください。
9. 酵素-基質反応停止後は、すみやかに吸光度の測定を行ってください。
10. 酵素基質の発色レベルは反応温度、時間、測定プレートの振とうの程度などでわずかですが影響を受けることがありますので、標準曲線は必ず測定ごとに作成してください。
11. 各試薬の保存もしくは使用中には、これらに強い光が当たらないように注意してください。
12. 本法による測定には、異なるロットのキットを組み合わせ使用しないでください。

VI. 基本性能

<標準曲線の一例>



<添加回収試験>

ヒト血清 A

Human PYY added(ng/mL)	Observed (ng/mL)	Expected (ng/mL)	Recovery (%)
0	0.376		
0.2	0.579	0.576	100.52
1.0	1.357	1.376	98.62
5.0	4.712	5.376	87.65

ヒト血清 B

Human PYY added(ng/mL)	Observed (ng/mL)	Expected (ng/mL)	Recovery (%)
0	0.337		
0.2	0.516	0.537	96.09
1.0	1.296	1.337	96.93
5.0	4.897	5.337	91.76

ヒト血清 C

Human PYY added(ng/mL)	Observed (ng/mL)	Expected (ng/mL)	Recovery (%)
0	0.677		
0.2	0.913	0.877	104.10
1.0	1.821	1.677	108.59
5.0	6.257	5.677	110.22

ヒト血清 D

Human PYY added(ng/mL)	Observed (ng/mL)	Expected (ng/mL)	Recovery (%)
0	0.336		
0.2	0.536	0.536	100
1.0	1.307	1.336	97.83
5.0	4.251	5.336	79.67

ヒト血漿 A

Human PYY added(ng/mL)	Observed (ng/mL)	Expected (ng/mL)	Recovery (%)
0	0.341		
0.2	0.546	0.541	100.92
1.0	1.318	1.341	98.28
5.0	4.447	5.341	83.26

ヒト血漿 B

Human PYY added(ng/mL)	Observed (ng/mL)	Expected (ng/mL)	Recovery (%)
0	0.336		
0.2	0.548	0.536	102.24
1.0	1.304	1.336	97.60
5.0	4.212	5.336	78.94

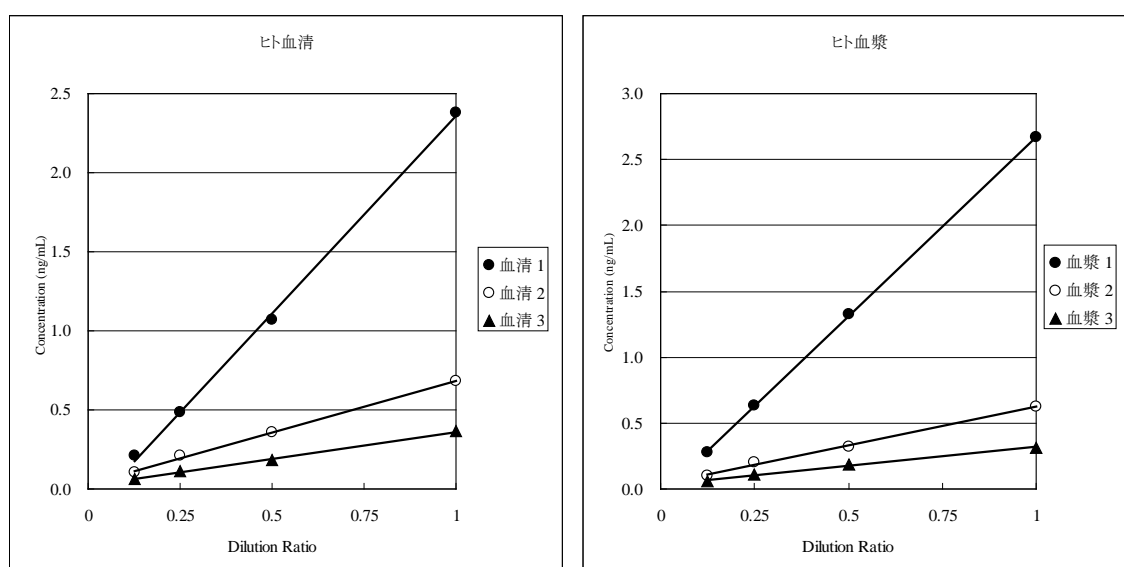
ヒト血漿 C

Human PYY added(ng/mL)	Observed (ng/mL)	Expected (ng/mL)	Recovery (%)
0	0.605		
0.2	0.847	0.805	105.22
1.0	1.728	1.605	107.66
5.0	5.669	5.605	101.14

ヒト血漿 D

Human PYY added(ng/mL)	Observed (ng/mL)	Expected (ng/mL)	Recovery (%)
0	0.331		
0.2	0.538	0.531	101.32
1.0	1.395	1.331	104.81
5.0	4.631	5.331	86.87

<希釈試験>



<交差反応性>

関連ペプチド	交差反応性 (%)
Human PYY(3-36)	100
Human PYY(1-36)	100
Rat/human NPY	<0.003

<再現性試験>

同時再現性: ヒト血清 CV (%) 3.67~5.13 ヒト血漿 CV (%) 6.08~8.52
 日差再現性: ヒト血清 CV (%) 2.33~6.55 ヒト血漿 CV (%) 5.45~10.26

VII. 貯蔵法および有効期間

<貯法>

遮光し、2～8℃にて保存してください。

<有効期間>

製造日より 24 ヶ月間（使用期限は外箱に表示）

<包装>

1 キット 96 テスト分（標準曲線作成用を含む）

VIII. 文 献

1. Adrian, T.E., Smith, H.A., Calvert, S.A., Aynsley-Green, A. and Bloom, S.R. (1986): Elevated plasma peptide YY in human neonates and infants. *Pediatr Res.*, **20**:1225-1227.
2. Adrian T.E., Ferri, G.L., Bacarese-Hamilton, A.J., Fuessl, H.S., Polak, J.M. and Bloom, S.R.(1995): Human distribution and release of a putative new gut hormone, peptide YY. *Gastroenterology*, **89**: 1070-1077.
3. El-Salhy, M., Grimelius, L., Wilander, E., Ryberg B., Terenius, L., Lundburg, J.M. and Tatemoto, K.(1983): Immunocytochemical identification of polypeptide YY(PYY) cells in the human gastrointestinal tract. *Histochemistry*, **77**:15-23.
4. Greeley, G.H.Jr., Hashimoto, T., Izukura, M., Gomez, G., Jeng, J., Hill, F.L., Lhuis, F., and Thompson, J.C.(1989): A comparison of intraduodenally and intracolonicly administered nutrients on the release of peptide YY in the dog. *Endocrinology*, **125**:1761-1765.
5. Greeley, G.H.Jr., Hill, F. L., Spannagel, A. and Thompson, J.C.(1987): Distribution of peptide YY in gastrointestinal tract of the rat, dog, and monkey. *Regul.Pept.*, **19**, 365-372.
6. Gomez, G., Zhang, T., Rajaraman, S., Thakore, K.N., Yanaihara, N., Townsend C.M.Jr., Thompson, J.C. and Greeley, G.H.Jr.(1995): Intestinal peptide YY : ontogeny of gene expression in rat bowel and trophic actions on rat and mouse bowel. *Am J.Physiol.* **268**, G71-G81.

7. Larhammar, D.(1996): Evolution of neuropeptide Y, peptide YY and pancreatic polypeptide:
Regul.Pept., **62**, 1-11.

<お問合せ先>

株式会社 矢内原研究所

〒418-0011 静岡県富士宮市栗倉 2480-1

FAX:0544-22-2770 TEL:0544-22-2771

www.yanaihara.co.jp ask@yanaihara.co.jp

2020年2月14日改訂