

研究用試薬

YK081 Mouse/Rat PYY EIA

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	10
VIII. 文献	11

YK081 Mouse/Rat PYY EIA キット

I. はじめに

本EIA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Mouse/Rat PYY EIAキットでは合成mouse/rat PYY (3-36)を標準品、ビオチン化mouse/rat PYY (3-36)を標識抗原、およびmouse/rat PYY を特異的に認識するポリクローナル抗体を使用し、マウス、ラット血清または血漿PYY(1-36) および PYY(3-36)濃度の測定が可能です。

Mouse/rat PYY 配列：

Y-P-A-K-P-E-A-P-G-E-D-A-S-P-E-E-L-S-R-Y-Y-A-S-L-R-H-Y-L-N-L-V-T-R-
Q-R-Y-amide

YK081 Mouse/Rat PYY EIA キット	内容
▼ 0.15~12.5 ng/mL の範囲で測定できます。	1) 測定プレート
▼ 42 検体を duplicate でアッセイできます。	2) 標準品
▼ 血清、血漿 (検体量 25 μ L) サンプルの直接測定ができます。	3) 標識抗原
▼ 測定は 18.5 時間と 1.5 時間で終了します。	4) 特異抗体溶液
▼ プレートは 1 列 (8 ウェル) ずつ取り外しができますので、キットの分割使用が可能です。	5) SA-HRP 溶液
▼ 同時再現性 CV (%) 3.1~9.8	6) 酵素基質液
▼ 日差再現性 CV (%) 4.2~14.2	7) 酵素反応停止液
	8) 緩衝液
	9) 濃縮洗浄液
	10) プレート密閉用シール

保存と安定性
2~8°Cで保存してください。製造日より
18 ヶ月は安定です。

II. 特徴

本キットはマウス、ラット血清および血漿中に含まれる PYY および PYY (3-36)を直接且つ特異的に定量するためのキットです。操作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多くの利点があります。なお、添付の mouse/rat PYY (3-36) 標準品は高純度合成品（純度 98%以上）であり、表示の重量は絶対量を示しております。

<特異性>

本キットは mouse/rat PYY (3-36)とは 100%、mouse/rat PYY(1-36)とは 115%の交差反応性が認められます。mouse/rat NPY、rat GLP-2、GLP-1 および GLP-1 (7-36)-NH₂ との交差性は認められません。

<測定原理>

本アッセイ系は特異性の高いウサギ抗 mouse/rat PYY 抗体を用いた競合法に、ビオチンとストレプトアビジンの非常に高い親和性を利用した測定法です。

測定プレート (96 ウェル) の各ウェルには、ヤギ抗ウサギ IgG 抗体が固定されています。この各ウェルにビオチン化標識抗原、標準品または検体およびウサギ抗 mouse/rat PYY 特異抗体を順次加えて競合反応させます。これに HRP (horse radish peroxidase) 結合 SA (streptavidin) を加え、ウェル上に HRP 結合 SA-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 HRP 活性を測定することにより、検体中の mouse/rat PYY および PYY (3-36)濃度を求めることができます。本キットの測定濃度範囲は 0.15~12.5 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	1 枚	固定化ヤギ抗ウサギ IgG 抗体
2. Standard (標準品)	凍結乾燥品	12.5 ng	1 本	合成 mouse/rat PYY (3-36)
3. Labeled antigen (標識抗原)	凍結乾燥品		1 本	ビオチン化 mouse/rat PYY (3-36)
4. Specific antibody (特異抗体溶液)	液状	8.5 mL	1 本	ウサギ抗 mouse/rat PYY 抗体
5. SA-HRP solution (SA-HRP 溶液)	液状	12 mL	1 本	HRP 結合したストレプトアビジン
6. Enzyme substrate solution (TMB) (酵素基質液)	液状	12 mL	1 本	3, 3' 5, 5'-テトラメチルベンジジン (TMB)
7. Stopping solution (酵素反応停止液)	液状	12 mL	1 本	1 M 硫酸溶液
8. Buffer solution (緩衝液)	液状	25 mL	1 本	非特異的の反応除去剤を含む緩衝液
9. Washing solution (concentrated) (濃縮洗浄液)	液状	50 mL	1 本	1% Tween20 を含む濃縮生理食塩液
10. 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 450 nm 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ポリプロピレン製試験管またはガラス製試験管。
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、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、内容物を充分溶解させ、12.5 ng/mL の標準液を作製します。この標準液 0.1 mL を取り、これを緩衝液 0.2 mL で希釈し 4.17 ng/mL の標準液を調製します。以下同様の希釈操作を繰り返し、さらに 1.39、0.46、0.15 ng/mL の各標準液を調製する。0 ng/mL (Bo)の標準液は緩衝液をそのまま使用します。
2. 標識抗原溶液の調製法：標識抗原の容器に緩衝液 7 mL を加え、内容物を溶解させてから使用します。
3. 洗浄液の調製法:50 mL (全量)を蒸留水または脱イオン水 950 mL で希釈し使用します。
4. その他の試薬はそのまま<測定操作>に従って使用します。

<測定操作>

1. キット内容を室温 (20~30℃) 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します。
2. 測定プレートの各ウェルに洗浄液 350 μ L を満たした後、アスピレーターによって吸引するか、あるいはプレートを反転して液を除きます。反転したプレートを紙タオルなどに適切な力でたたきつけるようにして残液を除きます。この操作をさらに 2 回繰り返し、合計 3 回の洗浄操作を行います。
3. 各ウェルに標識抗原溶液 50 μ L を加え、ついで標準液または検体 25 μ L を入れ、さらに特異抗体溶液 75 μ L を加えます。
4. 測定プレートをプレート密閉用シールで密閉し、4℃で 18 時間 (\pm 1 時間) 静置します。
5. 4℃から室温へ移して、30 分間マイクロプレート用シェーカーにて振とうします (100~150 rpm)。
6. 各ウェル中の液を除き、洗浄液 350 μ L を満たした後、2. と同様の洗浄操作を合計 5 回行います。
7. 各ウェルに SA-HRP 溶液 100 μ L を加えます。
8. 測定プレートをプレート密閉用シールで密閉し、室温で 1 時間振とうします (100~150 rpm)。
9. 各ウェル中の液を除き、2. と同様の洗浄操作を 5 回行います。
10. 各ウェルに酵素基質液 100 μ L を加え、プレートをプレート密閉用シールで密閉し、遮光の状態で室温 30 分間静置します。
11. 各ウェルに酵素反応停止液 100 μ L を加えます。
12. プレートを速やかにマイクロプレート用吸光度計で 450 nm 波長での吸光度を測定します。
13. 標準液の各濃度 (5 ポイント) の測定値から標準曲線を作成し、検体の測定値を標準曲線に当てはめ、検体の濃度を算出します。ソフトをご利用の場合、4-parameter Logistic curve で標準曲線を作成し、検体値を計算してください。

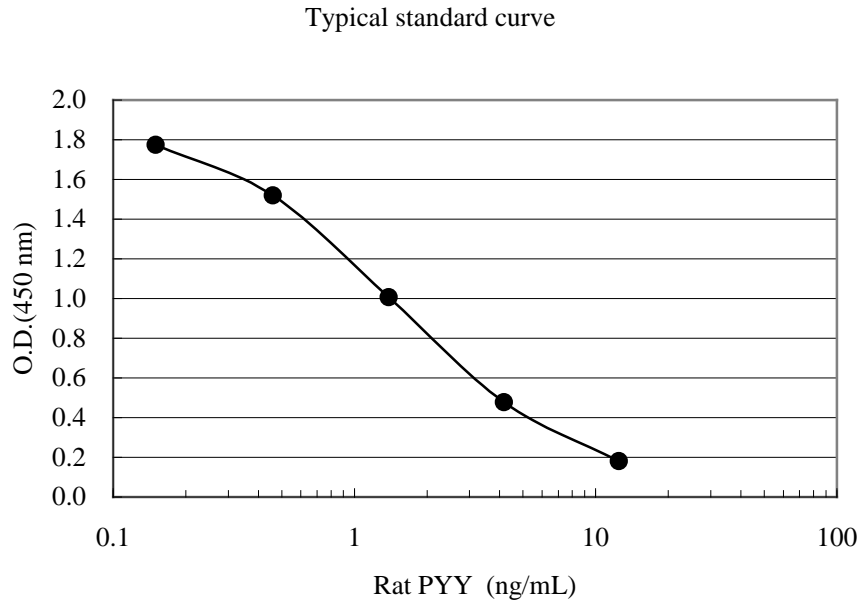
V. 操作上の注意

1. 血清または血漿検体は分離後直ちに測定してください。直ちに測定出来ない場合は検体を適宜小分けし、 -30°C 以下で凍結保存してください。血液検体は分離後または凍結から融解後プレートに添加するまでは氷冷保存してください。また氷冷下での保存時間は60分間を超えないようにしてください。なお、同じ血液検体につ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 $100\ \mu\text{M}$)。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下さい。
2. 試薬は、用時調製・希釈を原則としてください。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下さい。
3. 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。
4. 洗浄中ウエルに残液が残らないよう反転したプレートを適切な力で充分叩いて除去してください。
5. 検体をウエルに注入する場合は、検体ごとにかかわらず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、希釈段階ごとにかかわらず新しいチップを使ってください。なお、ピペットのウエルへの分注操作は測定精度に影響を与えますので丁寧かつ正確に行なってください。
6. 標準液、検体ともに測定はすべて二重測定で行なってください。
7. $12.5\ \text{ng/mL}$ を超える高値検体の場合は、検体をキット添付の緩衝液で希釈し測定して下さい。
8. 酵素基質の発色レベルは、反応温度、時間などでわずかながら影響を受けることがありますので、標準曲線は必ず測定毎に作成してください。
9. 発色反応はかならずプレートを遮光して行なってください。
10. 酵素-基質反応停止後、すみやかに吸光度の測定を行なってください。
11. 試薬の保存中もしくは使用中は、強い光が当たらないように注意して下さい。
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

<測定範囲> 測定濃度範囲 0.15~12.5 ng/mL

<標準曲線の一例>



<再現性試験> 同時再現性 (CV) 3.1% ~ 9.8% 日差再現性 (CV) 4.2% ~14.2%

<添加回収試験>

ラット血清1

Added PYY ng/mL	Observed ng/mL	Expected ng/mL	Recovery (%)
0.0	0.965		
0.5	1.447	1.465	98.7
2.0	2.748	2.965	92.7
5.0	5.077	5.965	85.1

ラット血清2

Added PYY ng/mL	Observed ng/mL	Expected ng/mL	Recovery (%)
0.0	1.107		
0.5	1.510	1.607	94.0
2.0	3.274	3.107	105.4
5.0	5.395	6.107	88.3

ラット血漿 1

Added PYY ng/mL	Observed ng/mL	Expected ng/mL	Recovery (%)
0.0	0.718		
0.5	1.111	1.218	91.2
2.0	2.407	2.718	85.9
5.0	5.059	5.718	81.8

ラット血漿 2

Added PYY ng/mL	Observed ng/mL	Expected ng/mL	Recovery (%)
0.0	0.595		
0.5	0.898	1.095	82.0
2.0	2.543	2.595	98.0
5.0	4.605	5.595	82.3

マウス血清 1

Added PYY ng/mL	Observed ng/mL	Expected ng/mL	Recovery (%)
0.0	1.987		
0.5	2.633	2.487	105.9
2.0	5.052	3.987	126.7
5.0	9.009	6.987	128.9

マウス血清 2

Added PYY ng/mL	Observed ng/mL	Expected ng/mL	Recovery (%)
0.0	1.867		
0.5	2.562	2.367	108.2
2.0	5.029	3.867	130.1
5.0	9.547	6.867	139.0

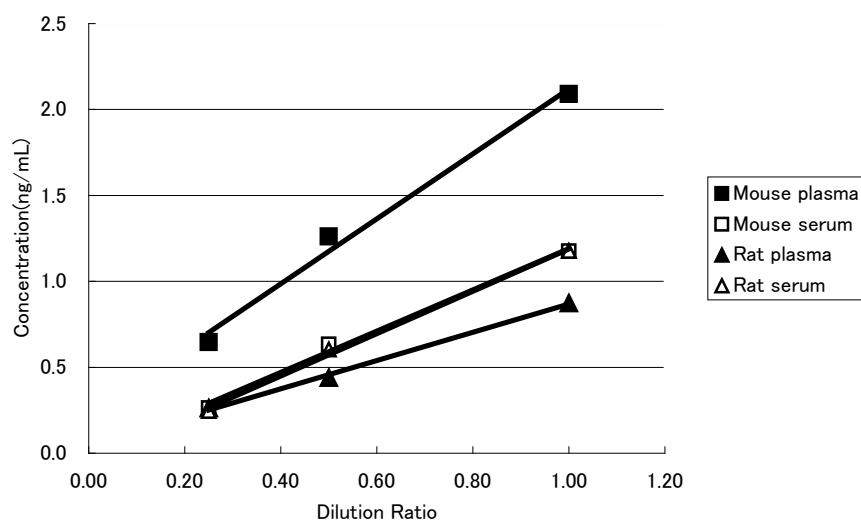
マウス血漿 1

Added PYY ng/mL	Observed ng/mL	Expected ng/mL	Recovery (%)
0.0	0.766		
0.5	1.153	1.266	91.1
2.0	2.645	2.766	95.6
5.0	5.647	5.766	97.9

マウス血漿 2

Added PYY ng/mL	Observed ng/mL	Expected ng/mL	Recovery (%)
0.0	1.466		
0.5	1.926	1.966	97.9
2.0	4.050	3.466	116.8
5.0	7.721	6.466	119.4

<希釈試験>



抗原未添加のラットおよびマウスの個体別の血清、血漿を用いて 4 倍まで希釈し、それぞれ良好な希釈性を示しました。

VII. 貯蔵法および有効期間

<貯蔵>

遮光し、2~8°Cで保存してください。

<有効期間>

製造日より 18 ヶ月（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.: Elevated plasma peptide YY in human neonates and infants. *Pediatric Research*, 20:1225 -1227. 1986
2. Adrian T.E., Ferri, G.L., Bacarese-Hamilton, A.J., Fuessl, H.S., Polak, J.M. and Bloom, S.R.: Human distribution and release of a putative new gut hormone, peptide YY. *Gastroenterology*, 89:1070-1077. 1995
3. El-Salhy, M., Grimelius, L., Wilander, E., Ryberg B., Terenius, L., Lundburg, J.M. and Tatemoto, K.: Immunocytochemical identification of polypeptide YY (PYY) cells in the human gastrointestinal tract. *Histochemistry*, 77:15-23. 1983
4. Greeley, G.H. Jr., Hashimoto, T., Izukura, M., Gomez, G., Jeng, J. Hill, F.L.C., Liuis, F., and Thompson, J.C.: A comparison of intraduodenally and intracolonicly administered nutrients on the release of peptide YY in the dog. *Endocrinology*, 125:1761 -1765. 1989
5. Greeley, G.H. Jr., Hill, F. L. C., Spannagel, A. and Thompson, J.C.: Distribution of peptide YY in gastrointestinal tract of the rat dog, and monkey. *Regulated Peptides*, 19, 365-372. 1987
6. Gomez, G., Zhang, T., Rajaraman, S., Thakore, K.N., Yanaihara, N., Townsend C.M. Jr., Thompson, J.C. and Greeley, G.H. Jr.: Intestinal peptide YY : ontogeny of gene expression in rat bowel and trophic action on rat and mouse bowel. *American Journal Physiology*. 268, G71-G81. 1995
7. Larhammar, D.: Evolution of neuropeptide Y, peptide YY and pancreatic polypeptide: *Regulated Peptides*, 62, 1-11. 1996
8. National Committee for Clinical Laboratory Standards Evaluation Protocols, SC1, (1989), Vallanova, PA: NCCLS

<お問い合わせ先>

株式会社 矢内原研究所

〒418-0011 静岡県富士宮市粟倉 2480-1

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

<http://www.yanaihara.co.jp> ask@yanaihara.co.jp

2019年9月26日改訂