

(90 × 210mm Size)

FUJIFILM

Wako

Code No. 291-73501

For research use only

Mouse/Rat PYY ELISA Kit *Wako*

< Competition assay >

Package Size : 96 tests

[Introduction]

PYY is a gastrointestinal peptide hormone consisting of 36 amino acid residues. It is mainly released from endocrine cells localizing in the intestinal tract after food ingestion, and inhibits appetite through the vagus nerve and blood. The ELISA kit is used for the quantitative determination of mouse/rat PYY in plasma and serum samples.

[Kit Contents]

1. Antibody Coated Plate	1 plate
2. Mouse/Rat PYY Standard	12.5 ng
3. Biotinylated Mouse/Rat PYY	1 vial
4. Anti Mouse/Rat PYY, Rabbit	8.5 mL
5. HRP Labeled Streptavidin Solution	12 mL
6. Enzyme Substrate Solution	12 mL
7. Stopping Solution	12 mL
8. Buffer Solution	25 mL
9. Washing Solution (concentrated)	50 mL
10. Adhesive Foil	3 sheets

[Principle of the assay]

This ELISA kit for determination of PYY in mouse/rat plasma or serum samples is based on a competitive enzyme immunoassay using the combination of an antibody to mouse/rat PYY and a biotin-streptavidin affinity system. The 96 wells plate is coated with goat anti rabbit IgG, to which biotin labeled antigen, standard antigen or samples and rabbit anti mouse/rat PYY antibody are added for the competitive immunoreaction. After incubation and plate washing, horse radish peroxidase (HRP) labeled streptavidin (SA) is added to form a HRP labeled SA-biotinylated antigen-antibody complex on the surface of the wells. Finally, HRP enzyme activity is determined by 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) and the concentration of mouse/rat PYY is calculated.

[Procedures]

(1) Preparations

1. Preparation of the standards :
Reconstitute the Mouse/Rat PYY Standard (lyophilized 12.5 ng/vial) with 1 mL of Buffer Solution, which affords a 12.5 ng/mL standard solution. The reconstituted standard solution (0.1 mL) is diluted with 0.2 mL of Buffer Solution which yields a 4.17 ng/mL standard solution. Continue the dilution procedure to prepare a series of one each of 1.39, 0.46, and 0.15 ng/mL standard solutions. The Buffer Solution itself is used as 0 ng/mL.
2. Preparation of the labeled antigen solution :
Reconstitute the Biotinylated Mouse/Rat PYY with 7 mL of Buffer solution.

- 1/8 -

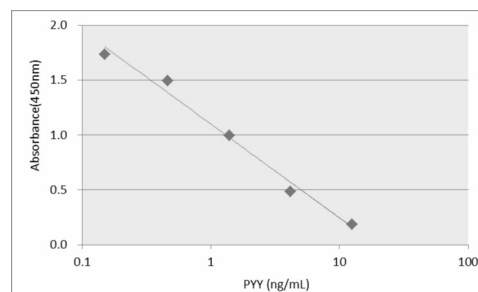
3. Preparation of the washing solution :
Dilute 50 mL of the Washing Solution (concentrated) to 950 mL with distilled or deionized water.
4. The other reagents are ready-to-use.

(2) Assay Procedure

1. Bring all the reagents to room temperature (20-30 °C) before starting assay.
2. Add 350 μ L of washing solution to each well and aspirate the washing solution in the wells. Repeat this washing procedure two more times (total 3 times). Finally, invert the plate and firmly tap it onto an absorbent surface, such as paper toweling, to ensure blotting free most of the residual washing solution.
3. Pipette 50 μ L of the labeled antigen solution into each well first, then introduce 25 μ L of each of standard solution (0, 0.15, 0.46, 1.39, 4.17, 12.5 ng/mL) or samples and finally add 75 μ L of Anti Mouse/Rat PYY, Rabbit into the wells.
4. Cover the plate with adhesive foil and incubate it at 4 °C for 18 hours (\pm 1 hour) without shaking and then 30 minutes more at room temperature with shaking (100-150 rpm).
5. After incubation, take off the adhesive foil, aspirate and wash the wells 5 times with 350 μ L of washing solution. Finally, invert the plate and firmly tap it onto an absorbent surface, such as paper toweling, to ensure blotting free most of the residual washing solution.
6. Add 100 μ L of HRP Labeled Streptavidin Solution into each well.
7. Cover the plate with adhesive foil and incubate it at room temperature for 1 hour with shaking (100-150 rpm).
8. Take off the adhesive foil, aspirate and wash the wells 5 times with 350 μ L of washing solution. Finally, invert the plate and firmly tap it onto an absorbent surface, such as paper toweling, to ensure blotting free most of the residual washing solution.
9. Add 100 μ L of Enzyme Substrate Solution into each well ; cover the plate with adhesive foil and keep it for 30 minutes at room temperature in a dark place without shaking for the color reaction.
10. Add 100 μ L of Stopping Solution into each well to stop the color reaction.
11. Shake the plate 5-10 seconds to mix the contents and immediately read the optical absorbance of the wells at 450 nm.

(3) Standard Curve

The standard curve of PYY is obtained by measurement of the series dilution of the standard PYY solution with the kit, as is shown in the figure.



- 2/8 -

[Capability]

- (1) Dynamic range
0.15 ~ 12.5 ng/mL
- (2) Reproducibility
Intra-assay CV (%) 3.1 ~ 9.8
Inter-assay CV (%) 4.2 ~ 14.2
- (3) Cross-reactivity
Specific to Mouse, Rat
No cross reactivity to Human PYY

[Notes on use]

- 1) EDTA-2Na additive blood collection tube is recommended for the plasma collection. It is recommended that serum or plasma samples should be tested as soon as possible after separation. If the sample is tested later, they should be aliquoted and frozen below -30 °C (for long term storage, it is recommended that the sample should be stored in a -70 °C deep freezer). Avoid repeated freezing and thawing of samples. Samples should be kept in an ice bath after thawing before the assay and used within 60 minutes.
- 2) Standard and labeled antigen solutions should be prepared immediately before use. The plate can be used for twice if separated. In that case, the reconstituted reagents (standard and labeled antigen solution) should be stored at or below -30 °C.
- 3) During storage of washing solution (concentrated) at 2-8 °C, precipitates may be observed occasionally, however they will be dissolved when diluted.
- 4) As pipetting operations may affect accuracy and precision of the assay, pipette solutions especially for standard solutions or samples precisely into each well of the plate. In addition, use clean test tubes or vessels in assay and use a new tip for each sample or standard solution and for each step of preparation of the standard diluting solution to avoid cross contamination.
- 5) Perform all the determinations in duplicate.
- 6) If a high range sample (over than 12.5 ng/mL) will be tested or predicted, dilute this sample with assay buffer, before starting the assay procedure.
- 7) To quantitate accurately, always run a standard curve when measuring samples.
- 8) The color reaction should be carried out under light proof conditions.
- 9) Read optical absorbance of the reaction solution in wells as soon as possible after stopping the color reaction.
- 10) Protect reagents from strong light (e.g. direct sunlight) during storage and assay.

[Storage condition]

Keep at 2~10 °C

[Shelf life]

18 months after production

[Package size]

96 tests

FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation

1-2, Doshomachi 3-Chome, Chuo-Ku, Osaka 540-8605, Japan
Telephone : + 81-6-6203-3741
Facsimile : + 81-6-6201-5964
<http://www.wako-chem.co.jp>

FUJIFILM Wako Chemicals U.S.A. Corporation

1600 Bellwood Road
Richmond, VA 23237
U.S.A.
Telephone : + 1-804-271-7677
Facsimile : + 1-804-271-7791
<http://www.wakousa.com>

FUJIFILM Wako Chemicals Europe GmbH

Fuggerstrasse 12
D-41468 Neuss
Germany
Telephone : + 49-2131-3111-0
Facsimile : + 49-2131-311100
<http://www.wako-chemicals.de>

コード No. 291-73501

マウス/ラット PYY ELISA キットワコー

〔はじめに〕

PYYは36アミノ酸からなる消化管ペプチドホルモンです。主に腸管に分布しているL型細胞から食後に分泌され、血液や迷走神経を介して摂食抑制作用を示します。本キットはマウス、ラットの血清および血漿中のPYY濃度を定量的に測定可能なELISAキットです。

〔キット内容〕

1) Antibody Coated Plate/抗体固相化プレート (固定化ヤギ抗ウサギIgG抗体)	1プレート
2) Mouse/Rat PYY Standard/マウス/ラットPYY標準品	12.5 ng
3) Biotinylated Mouse/Rat PYY/ ビオチン標識マウス/ラットPYY	1本
4) Anti Mouse/Rat PYY, Rabbit/ 抗マウス/ラットPYY, ウサギ	8.5 mL
5) HRP Labeled Streptavidin Solution/HRP標識ストレプト アビジン溶液	12 mL
6) Enzyme Substrate Solution/酵素基質液	12 mL
7) Stopping Solution/反応停止液	12 mL
8) Buffer Solution/緩衝液	25 mL
9) Washing Solution (concentrated)/濃縮洗浄液	50 mL
10) Adhesive Foil/プレート密閉用シール	3枚

〔測定原理〕

本キットは特異性の高いウサギ抗マウス/ラット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親和性を利用した測定法です。測定プレートにはヤギ抗ウサギIgG抗体が固定されており、ビオチン化標識抗原、標準品または検体およびウサギ抗マウス/ラット PYY抗体を順次加えて競合反応させます。これにHRP結合ストレプトアビジンを加えて複合体を形成させます。最後に、この複合体中のHRPと基質を反応させることにより、検体中のマウス/ラットPYY濃度を測定します。

〔操作法〕

(1) 試薬の調製

① 標準液

マウス/ラットPYY標準品のバイアル瓶に緩衝液1 mLを正確に加えて溶解させます。これを標準原液(12.5 ng/mL)とします。この標準原液0.1 mLを緩衝液0.2 mLで希釈して、4.17 ng/mLの標準液を作製します。さらに同様の操作を繰り返して1.39、0.46、0.15 ng/mLの標準液を作製します。ブランク(0 ng/mL)には緩衝液をそのまま用いてください。

② 標識抗原溶液

ビオチン標識マウス/ラットPYYの容器に緩衝液7 mLを加え内容物を溶解させます。

③ 洗浄液

濃縮洗浄液50 mLを精製水950 mLで希釈します。

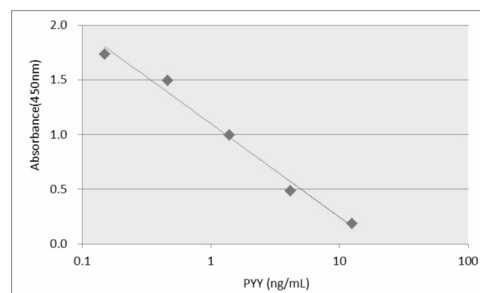
④ その他の試薬は、そのまま使用します。

(2) 測定操作法

- すべての試薬を室温(20~30℃)に戻します。
- 各ウェルに洗浄液350 μ Lを加えた後、液を取り除き紙タオルなどに叩きつけて完全に液を除きます。この操作を3回行います。
- 各ウェルに標識抗原溶液を50 μ L加えた後に、標準液(0、0.15、0.46、1.39、4.17、12.5 ng/mL)または検体を25 μ L加えます。さらに抗マウス/ラットPYY、ウサギを75 μ L加えます。
- 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(±1時間)静置します。その後、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)。
- 各ウェルの液を取り除き、洗浄液350 μ Lを満たした後、2.と同じ洗浄操作を5回行います。
- 各ウェルにHRP標識ストレプトアビジン溶液を100 μ L加えます。
- プレートをシールし、室温で1時間振とうしながら反応させます(100~150 rpm)。
- 各ウェルの液を取り除き、2.と同じ洗浄操作を5回行います。
- 各ウェルに酵素基質液を100 μ L加え、遮光して室温で静置し30分間反応させます。
- 各ウェルに反応停止液を100 μ L加えます。
- プレートを5~10秒ほど振とうして、450 nmの吸光度を測定します。

(3) 検量線

上述のプロトコルに従って得られたPYYの標準的な検量線



〔性能〕

- (1) 検量線範囲 : 0.15～12.5 ng/mL
(2) 再現性
同時再現性 CV(%) 3.1 ～ 9.8
日差再現性 CV(%) 4.2 ～ 14.2
(3) 種交差性
マウス、ラット
※ヒトのPYYとは反応致しません。

〔使用上の注意〕

- ① 血液はEDTA-2Na添加採血管で採取してください。血清または血漿検体は分離直後の測定を推奨します。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。ただし凍結融解の繰り返しは避けてください。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、保存時間は60分間を超えないようにしてください。
- ② 試薬は用時調製を原則としてください。キットを分割使用する場合、調製後の標準品と標識抗原溶液は適宜小分けし、 -30°C 以下で凍結保存してください。
- ③ 濃縮洗浄液は沈殿を生じることがあります。沈殿は希釈時に溶解させてください。
- ④ 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。
- ⑤ 測定はすべて2重測定 ($n=2$) で行ってください。
- ⑥ 検体のPYY濃度が12.5 ng/mL以上の場合は、キット添付の緩衝液で希釈してください。
- ⑦ 検量線は必ず測定ごとに作成してください。
- ⑧ 発色反応は必ずプレートを遮光して行ってください。
- ⑨ 反応停止液添加後、プレートを5～10秒振とうしてすみやかに吸光度測定を行ってください。
- ⑩ 各試薬の保存中もしくは使用中には、強い光が当たらないようにしてください。

〔貯 法〕 2～10℃保存

〔使用期限〕 製造日より18ヶ月

〔包 装〕 96回用

製造発売元

富士フイルム 和光純薬株式会社

大阪府中央区道修町三丁目1番2号

Tel : 06-6203-3741

1801KA1