

HUMAN PYY (TOTAL) RIA
125 TUBES (Cat. N° PYYT-66HK)

I. UTILISATION

Le peptide YY (PYY), une hormone de 36 acides aminés, est un neuropeptide libéré dans la circulation sanguine par les cellules endocrines de type L de l'iléon distal et du colon. L'injection de la forme active de cette hormone (3-36) réduit la prise alimentaire chez les individus sains comme chez les obèses. La perfusion intraveineuse de PYY entraîne également une baisse du taux plasmatique de la ghréline, l'hormone responsable de la sensation de faim. Les taux circulants de PYY sont abaissés avant la prise alimentaire et augmentent dans la phase postprandiale. Dans le sang, le PYY est présent sous au moins 2 formes moléculaires (1-36) et (3-36).

La trousse RIA PYY Total de Millipore est destinée au dosage du PYY dans le sérum, le plasma et les milieux de culture. Elle utilise un anticorps qui reconnaît les deux formes du PYY humains, (1-36) et (3-36). Lorsque le volume de sérum ou de plasma est de 100 µl, on peut aisément mesurer des concentrations de l'ordre de 10 pg/ml.

Cette trousse est uniquement destinée à la recherche.

II. PRINCIPE DU DOSAGE

Dans un dosage radioimmunologique, une quantité fixe d'antigène marqué est incubée avec une dilution constante de l'antisérum calculée de telle sorte que le nombre de sites de liaison de l'antigène est limité, par exemple, seuls 40 à 50% de traceur seront liés à l'anticorps. Si de l'antigène non marqué est ajouté dans le milieu, il y a compétition entre le traceur marqué et l'antigène non marqué pour un nombre limité et constant de sites de liaison sur l'anticorps. De plus, la quantité de traceur lié à l'anticorps diminue quand la concentration de l'antigène non marqué augmente. On peut effectuer la mesure après avoir effectué la séparation de l'anticorps lié du traceur libre et après avoir compté la fraction libre, la fraction liée ou les deux.

On prépare une courbe standard à l'aide de quantités croissantes d'antigène non marqué et on calcule à partir de cette courbe la concentration des échantillons inconnus. On a ainsi les quatre conditions de base d'un dosage radioimmunologique : un antisérum spécifique de l'antigène à doser, l'antigène marqué par une substance radioactive, une méthode de séparation de l'antigène sous forme liée à l'antisérum, de l'antigène sous forme libre, et finalement l'instrument qui permet de compter la radioactivité.

Le dosage du PYY Total de Millipore utilise du PYY marqué à l'iode 125 et un antisérum de cochon d'Inde anti-PYY, afin de mesurer le taux du PYY dans le sérum, le plasma et les milieux de culture au moyen d'une technique de dosage par double anticorps/PEG.

III. RÉACTIFS FOURNIS

Chaque trousse contient le matériel suffisant pour effectuer 125 dosages :

1. Réactif A – Tampon de dosage PYY Total

2 flacons de 25 ml contenant de la BSA et de l'azoture de sodium à 0,08%. Prêts à l'emploi.

2. Réactif B - Solution d'antisérum

1 flacon contenant 13 ml d'antisérum de cochon d'Inde anti-PYY dans le tampon de dosage. Prêt à l'emploi.

3. Réactif C - ¹²⁵I PYY

1 flacon contenant 13,5 ml après reconstitution d'une solution de PYY marquée à l'iode 125 et

purifiée par HPLC (activité spécifique 302 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$). Sous forme lyophilisée. Chaque flacon a une activité < 56 kBq (1,5 μCi).

Préparation : reconstituer en ajoutant 13,5 ml de tampon de dosage. Laisser reposer à température ambiante pendant 30 minutes en agitant doucement le flacon à intervalles réguliers.

4. Réactif D - Standard

1 flacon contenant 2 ml après reconstitution d'une solution de PYY dans le tampon de dosage.

Préparation : reconstituer avec 2 ml d'eau distillée ou désionisée.

La concentration du standard varie de lot en lot. Consulter la feuille d'analyse incluse dans la trousse pour obtenir la concentration exacte en PYY.

5. Réactifs E - Contrôles 1 et 2

2 flacons contenant chacun après reconstitution 1 ml du PYY synthétique. Sous forme lyophilisée.

Préparation : reconstituer avec 1 ml d'eau distillée ou désionisée.

6. Réactif F - Réactif précipitant

1 flacon contenant 130 ml d'anticorps de chèvre anti-cochon d'Inde en solution dans du tampon phosphate 0,05M, qui contient du PEG à 3%, du Triton X-100 à 0,05%, de l'EDTA à 0,025 M et de l'azoture de sodium à 0,08%. Prêt à l'emploi, réfrigérer à 4 °C avant utilisation.

7. Réactif G - Réactif co-précipitant

1 flacon de 2 ml contenant du sérum normal de cochon d'Inde. Prêt à l'emploi.

IV. CONSERVATION ET STABILITE DES REACTIFS

Conserver tous les réactifs à 2-8 °C pour une conservation à court terme. Pour une conservation prolongée (> à 2 semaines), conserver à -20 °C. **Après reconstitution, la portion de standard le plus concentré qui n'a pas été utilisé doit être stocké à -20 °C. Il en va de même pour le traceur et les contrôles après reconstitution.** Eviter les congélations/décongélations répétées (>5 fois). Se référer à la date d'expiration figurant sur l'étiquette pour connaître la date d'expiration pour une conservation à -20 °C. Ne pas mélanger les réactifs qui proviennent de différentes trusses, sauf s'ils proviennent du même lot.

V. PRECAUTIONS D'UTILISATION

A. Règles de base de radioprotection

1. Le matériel radioactif de cette trousse doit être manipulé en respectant les règles de sécurité concernant l'emploi des radionucléides en source non scellées.

2. Toute manipulation de substances radioactives doit s'effectuer dans une zone contrôlée, conformément à la réglementation en vigueur.

3. Ne pas pipeter les solutions radioactives à la bouche.

4. Ne pas manger, boire ou fumer en zone contrôlée.

5. Eviter tout contact direct avec les produits radioactif. Utiliser des blouses et des gants de protection.

6. Tout déchet radioactif solide ou liquide sera éliminé selon la réglementation en vigueur.

7. Dans le cas de contamination ou de perte de substance radioactive, observer les procédures établies.

B. Autres précautions

1. Les réactifs de cette trousse sont destinés exclusivement à l'analyse in vitro et ne doivent en aucun cas être administrés à l'homme ou à l'animal.
2. ATTENTION : Tous les réactifs de cette trousse contiennent de l'azoture de sodium en tant qu'agent conservateur à une concentration de 0,08%. Bien qu'il s'agisse d'une concentration très faible, il faut noter que l'azoture de sodium peut réagir avec le plomb et le cuivre des tuyauteries pour former des composés explosifs. Lors de l'élimination des réactifs dans l'évier, faire couler un grand volume d'eau pour éviter la formation d'azotures métalliques. Eviter toute contamination de la peau et des muqueuses.

VI. MATERIEL NECESSAIRE MAIS NON FOURNI

1. Tubes en verre borosilicaté, à usage unique, 12 x 75 mm (il est possible d'utiliser des tubes de polypropylène ou de polystyrène si l'utilisateur estime que le précipité est suffisamment stable)
2. Pipettes de précision et pointes de 100 µl
3. Distributeur automatique : 10 µl, 100 µl et 1,0 ml
4. Papier absorbant
5. Vortex
6. Réfrigérateur
7. Centrifugeuse réfrigérée capable de développer 2000 à 3000 xg
8. Compteur à scintillations gamma
9. Aprotinine : son usage est **hautement recommandée** (voir section VII)

VII. PRELEVEMENT ET CONSERVATION DES ECHANTILLONS

Note : les échantillons doivent être traités aussi vite que possible et conservés dans un bain de glace pour retarder la dégradation du PYY. Nous recommandons de traiter le sang en ajoutant de l'aprotinine à une concentration finale de 500 kUI/ml de sang. Pour doser le PYY total avec cette trousse, il n'est pas indispensable d'ajouter un inhibiteur de DPP4. Toutefois, s'il est envisagé de mesurer le PYY total et le PYY (3-36) dans les mêmes échantillons, il est recommandé d'ajouter 10 µl d'inhibiteur de DPP4 par ml de sang en plus de l'aprotinine.

On utilisera un maximum de 100 µl de sérum ou de plasma par dosage. **Toutefois il est de loin préférable d'utiliser du plasma plutôt que du sérum.** Dans la plupart des cas, un volume de 50 µl par tube est suffisant. Pour les milieux de culture, on utilisera des volumes de 50 à 100 µl.

On conservera les échantillons à 4 °C, si on doit les doser dans les 24 heures. Pour un stockage prolongé, il est préférable de les stocker à -20 °C. **Eviter les congélations/décongélations répétées qui entraîneront une baisse des résultats à chaque cycle.** Eviter d'utiliser des échantillons hémolysés ou lipidiques.

Il est préférable de prendre des précautions si on utilise l'héparine comme anticoagulant, car sa présence en excès provoque une augmentation des taux². Il est préférable de *ne pas* utiliser plus de 10 UI d'héparine par ml de sang prélevé.

VIII. DOSAGE

A- Préparation des standards de PYY Total

1- Ouvrir avec précaution le flacon de standard lyophilisé. A l'aide d'une pipette Eppendorf, reconstituer le standard de PYY Total avec 2 ml d'eau distillée ou désionisée pour obtenir la concentration indiquée sur la fiche d'analyse. Bien mélanger par inversion, laisser reposer 5 minutes ou jusqu'à dissolution complète, puis mélanger à nouveau.

2- Numéroter 7 tubes 1, 2, 3, 4, 5, 6 et 7. Ajouter 0,5 ml de tampon de dosage à chacun des 7 tubes. Préparer des dilutions en série de la façon suivante :

- ajouter 0,5 ml du standard reconstitué au tube 1. Mélanger soigneusement et transférer 0,5 ml du tube 1 au tube 2.
- mélanger soigneusement et transférer 0,5 ml du tube 2 au tube 3.
- mélanger soigneusement et transférer 0,5 ml du tube 3 au tube 4.
- mélanger soigneusement et transférer 0,5 ml du tube 4 au tube 5.
- mélanger soigneusement et transférer 0,5 ml du tube 5 au tube 6.
- mélanger soigneusement et transférer 0,5 ml du tube 6 au tube 7.
- mélanger soigneusement

Remarque : ne pas utiliser un distributeur. Changer de pointe pour chaque dilution. Mouiller la pointe avec le standard avant de pipeter. **La solution de standard reconstitué non utilisée doit être stockée à -20 °C. Eviter les congélations / décongélations répétées.**

	Volume d'eau désionisée à ajouter 2 ml	Volume de standard à ajouter 0	Concentration du standard (pg/ml) X (voir feuille d'analyse pour la concentration exacte)
Tube	Volume de tampon de dosage à ajouter 0,5 ml	Volume de standard à ajouter 0,5 ml de standard reconstitué	Concentration du standard (pg/ml) X/2
1			
2	0,5 ml	0,5 ml du tube 1	X/4
3	0,5 ml	0,5 ml du tube 2	X/8
4	0,5 ml	0,5 ml du tube 3	X/16
5	0,5 ml	0,5 ml du tube 4	X/32
6	0,5 ml	0,5 ml du tube 5	X/64
7	0,5 ml	0,5 ml du tube 6	X/128

B- Préparation des contrôles 1 et 2

Ouvrir avec précaution les flacons de contrôle. A l'aide d'une pipette Eppendorf, reconstituer les contrôles 1 et 2 avec 1 ml d'eau distillée ou désionisée. Bien mélanger par inversion, laisser reposer 5 minutes ou jusqu'à dissolution complète, puis mélanger à nouveau.

Remarque : la concentration exacte en PYY des contrôles 1 et 2 figure sur la feuille d'analyse incluse dans la trousse. **Après reconstitution, les portions de contrôles non utilisées doivent être congelées à -20 °C. Eviter les congélations / décongélations répétées.**

C- Mise en place du dosage – Jour 1:

Il est important de suivre ce protocole et d'être précis dans les étapes de pipetage.

1. Pipeter 300 µl de tampon de dosage dans les tubes 3 et 4 correspondant à la liaison non spécifique (LNS) et 200 µl dans les tubes 5 et 6 correspondant au B₀ et 100 µl dans tous les autres tubes.

2. Pipeter 100 µl de standards et de contrôles en double (Voir le schéma du dosage).

3. Pipeter 100 µl d'échantillon dilué en double.

Remarque : des volumes d'échantillons moindres peuvent être utilisés lorsque les concentrations

de PYY sont supposées très élevées ou lorsque le volume d'échantillon disponible est réduit. On ajoutera la quantité de tampon de dosage nécessaire pour compenser la différence de volume (par exemple si on utilise 50 µl d'échantillon, on ajoutera 50 µl de tampon de dosage). Se reporter à la section calcul des résultats pour modifier celui-ci.

4. Ajouter 100 µl d'anticorps anti-PYY dans tous les tubes à l'exception des tubes correspondant à l'activité totale (1 et 2) et à la LNS (3 et 4).

5. Mélanger au vortex, couvrir et laisser incuber pendant 20 à 24 heures à 4 °C.

Jour 2 :

6. Reconstituer le traceur avec 13,5 ml de Diluant pour traceur. Mélanger et pipeter 100 µl de PYY marqué à l'iode 125 dans tous les tubes.

Remarque : reconstituer le traceur juste avant de le pipeter et congeler immédiatement les portions inutilisées.

7. Mélanger au vortex, couvrir et laisser incuber pendant 22 à 24 heures à 4 °C.

Jour 3 :

8. Ajouter 10 µl de réactif co-précipitant à tous les tubes sauf ceux qui correspondent à l'activité totale.

9. Ajouter 1,0 ml de réactif précipitant froid (4 °C) à tous les tubes à l'exception de ceux qui correspondent à l'activité totale.

10. Mélanger au vortex et laisser incuber 20 minutes à 4 °C.

11. Centrifuger à 4 °C tous les tubes, à l'exception de ceux qui correspondent à l'activité totale pendant 20 minutes à 2000 - 3000 x g. Remarque : Si on utilise une vitesse inférieure à 2000 x g, ou si on a observé des précipités de mauvaise qualité au cours des dosages précédents, on augmentera le temps de centrifugation afin d'obtenir des précipités de bonne qualité (par exemple 40 minutes).

Conversion des tr/min. en xg

$$xg = (1,12 \times 10^{-5}) (r) (\text{tr/min.})^2$$

r = distance radiale en cm (depuis l'axe de rotation jusqu'au fond des tubes)

tr/min. = vitesse du rotor

12. Décanter immédiatement le surnageant de tous les tubes à l'exception des tubes correspondant à l'activité totale (tubes 1 et 2), laisser égoutter pendant au moins 15 à 60 secondes, et retirer l'excès de liquide au bord des tubes. Remarque : Ne retourner les tubes qu'une seule fois. Les culots sont fragiles et pourraient glisser.

13. Compter tous les tubes dans un compteur à scintillations gamma pendant 1 minute. Calculer la concentration en PYY humain des échantillons en utilisant une procédure de calcul automatique.

Schéma de dosage du PYY

Préparation	Jour 1				Jour 2		Jour 3		
	Étape 1	Étapes 2 et 3	Étape 4	Étape 5	Étape 6	Étape 7	Étape 8	Étape 9	Étapes 10-13
Numéroter les tubes	Ajouter Tampon de dosage	Ajouter Standard/ Contrôle/ Echantillon	Ajouter anticorps		Ajouter traceur		Ajouter réactif co-précipitant	Ajouter réactif précipitant	
1,2	-	-	-	Vortexer, couvrir, et incuber 20-24 heures à 4°C	100 µl	Vortexer, couvrir, et incuber 22-24 heures à 4°C	-	-	Centrifuger 20 min. à 4°C, décanter et compter
3,4	300 µl	-	-		100 µl		10 µl	1,0 ml	
5,6	200 µl	-	100 µl		100 µl		10 µl	1,0 ml	
7,8	100 µl	100 µl du tube 7	100 µl		100 µl		10 µl	1,0 ml	
9,10	100 µl	100 µl du tube 6	100 µl		100 µl		10 µl	1,0 ml	
11,12	100 µl	100 µl du tube 5	100 µl		100 µl		10 µl	1,0 ml	
13,14	100 µl	100 µl du tube 4	100 µl		100 µl		10 µl	1,0 ml	
15,16	100 µl	100 µl du tube 3	100 µl		100 µl		10 µl	1,0 ml	
17,18	100 µl	100 µl du tube 2	100 µl		100 µl		10 µl	1,0 ml	
19,20	100 µl	100 µl du tube 1	100 µl		100 µl		10 µl	1,0 ml	
21,22	100 µl	100 µl de standard reconstitué	100 µl		100 µl		10 µl	1,0 ml	
23,24	100 µl	100 µl de contrôle 1	100 µl		100 µl		10 µl	1,0 ml	
25,26	100 µl	100 µl de contrôle 2	100 µl		100 µl		10 µl	1,0 ml	
27,n	100 µl	100 µl d'échantillon	100 µl	100 µl	10 µl	1,0 ml			

IX. CALCUL DES RÉSULTATS

A. Explication

Les calculs des taux de PYY total peuvent être faits automatiquement par la plupart des compteurs gamma qui possèdent des capacités de traitement des données ou par un traitement indépendant des données par un logiciel disponible dans le commerce². Choisir un système à 4 paramètres ou un log/logit pour le traitement mathématique des données (**Remarque** : S'assurer que la LNS est bien soustraite de la moyenne des cpm obtenus pour chaque duplicata à l'exception de l'activité total, avant de finaliser les calculs).

B. Calcul manuel

1. Calculer la moyenne des coups par minute (CPM) obtenus pour les tubes correspondant à l'AT (tubes 1 et 2), à la LNS (tubes 3 et 4), Maximum de liaison (tubes 5 et 6), standards, contrôles et échantillons de malade.
2. Soustraire la moyenne des coups correspondant aux tubes LNS de la moyenne des coups obtenus pour les autres tubes, (à l'exception de AT), pour obtenir la moyenne des coups corrigée.
3. Calculer le pourcentage maximum de liaison en divisant les CPM corrigés correspondant au standard zéro (B_0) par les CPM moyens correspondant à l'activité total (AT). Ce pourcentage devrait être compris entre 35 et 50%.
4. Calculer le pourcentage de liaison ($B/B_0 \times 100$) correspondant à chaque standard et à chaque échantillon, en divisant la moyenne des coups corrigés de chacun des standards et de chacun des échantillons par la moyenne corrigée des coups correspondant au maximum de liaison (standard zéro).
5. Tracer la courbe standard en reportant le pourcentage de B/B_0 correspondant à chaque standard en ordonnée, et le logarithme de la concentration de chacun des standards en abscisse

(l'utilisation d'un papier log-log permet d'obtenir une courbe presque droite).

6. Construire la courbe standard en joignant les points obtenus.

7. Calculer la concentration en pg/ml de PYY humain des échantillons inconnus et des contrôles par interpolation avec la courbe standard.

8. Lorsque l'on dose des milieux de culture le taux de PYY dans le milieu de culture pur doit être soustrait de la concentration obtenue pour chaque échantillon afin d'obtenir le taux réel en PYY.

9. Une correction mathématique sera faite pour tenir compte du facteur de dilution dans le cas d'échantillons de sérum ou de plasma.

X. INTERPRÉTATION – CRITÈRES D'ACCEPTATION

1. Il faudra éliminer le dosage si l'un des 2 contrôles est en dehors des 2 déviations standards.

2. Si les CV observés entre les duplicates d'un même échantillon sont supérieurs à 10%, il faudra redoser l'échantillon.

XI. CARACTÉRISTIQUES DU DOSAGE

A. Sensibilité

La plus petite quantité de PYY total qui puisse être détectée dans ce dosage est égale à 10 pg/ml quand on utilise un prélèvement de 100 µl.

B. Caractéristiques de la courbe standard

Les paramètres suivants sont indiqués sous forme de moyenne \pm 1 écart type.

$$ED_{80} = 36 \pm 5 \text{ pg/ml}$$

$$ED_{50} = 103 \pm 12 \text{ pg/ml}$$

$$ED_{20} = 300 \pm 38 \text{ pg/ml}$$

C. Spécificité

La spécificité permet de connaître la capacité du test à mesurer l'analyte de façon sélective en présence d'autres composants présents dans la matrice de l'échantillon.

PYY (1-36) humain	100%
PYY (3-36) humain	100%
[Pro34] PYY	100%
[Leu31,Pro34] PYY	100%
PYY (1-36) de Rat/Porcine	<0,1%
PYY (3-36) de Rat/Porcine	<0,1%
HPPP	<0,1%
NPY	<0,1%
Ghréline humaine	*
Leptine humaine	*
Insuline humaine	*
Glucagon	*
GLP-1 (7-36)	*

* Indétectable

D. Précision

Variation Inter et Intra - essai :

Echantillon	Moyenne (pg/ml)	Répétabilité %	Reproductibilité %
1	82,7	9,4	8,5
2	111,1	2,9	7,1
3	542,6	3,6	5,5

3 plasmas humains contenant des concentrations variables en PYY ont été utilisés pour cette étude. Le % de répétabilité a été calculé à partir de la moyenne de 8 réplicats lors d'un seul dosage. Le % de reproductibilité a été calculé à partir de la moyenne de 16 résultats obtenus dans 8 dosages.

E. Test de surcharge

Echantillon	PYY humain ajouté (pg/ml)	Récupération %
1	40	111
2	320	96
3	1280	83

On a ajouté à 3 échantillons de plasma humain des quantités variables du PYY. Chaque échantillon a été dosé en double dans 1 seul dosage.

F. Test de parallélisme

Effet de la dilution du plasma

Echantillon	Volume d'échantillon	Concentration observée (pg/ml)	Concentration attendue (pg/ml)	Pourcentage de concentration attendue (%)
1	100 µl	161	161	100
	75 µl	162		101
	50 µl	170		105
	25 µl	180		112
2	100 µl	156	156	100
	75 µl	167		107
	50 µl	169		108
	25 µl	179		115
3	100 µl	199	199	100
	75 µl	220		111
	50 µl	217		109
	25 µl	246		124
4	100 µl	124	124	100
	75 µl	125		101
	50 µl	133		107
	25 µl	155		125

Des aliquots de plasma humain contenant des concentrations en PYY différentes ont été analysés dans des volumes indiqués ci-dessus. Les facteurs de dilution 1 – 1,33 – 2 et 4, représentant respectivement les volumes 100, 75, 50 et 25 µl ont été utilisés dans le calcul des concentrations observées.

XIII. CONTROLE DE QUALITE

Les bonnes pratiques de laboratoire recommandent que des contrôles soient inclus dans chaque série de dosages afin d'en vérifier les performances. Deux sérums de contrôles sont inclus dans la trousse dans ce but. Il est nécessaire de doser ces contrôles ainsi que d'autres propres au laboratoire de façon régulière, afin d'établir des valeurs moyennes et des fourchettes de valeurs acceptables. Les valeurs attendues pour les contrôles de la trousse figurent sur une carte incluse dans chaque coffret. La reproductibilité des paramètres de la courbe standard et des valeurs des contrôles doit se situer dans un intervalle de valeurs défini par le laboratoire.

1. Quand les 2 contrôles sont dans la fourchette des ± 2 DS : Dosage OK
2. L'un des contrôles est en dehors de la fourchette :
Vérifier les points suivants :
 - a) Erreur de calcul.
 - b) Duplicates des standards et des contrôles
 - c) Vérification des solutions de réactifs
 - d) Vérification du compteur gamma

XIV. BIBLIOGRAPHIE

1. Morgan, C.R. and Lazarow, A. Immunoassay of Insulin: Two antibody system. Plasma insulin levels in normal, subdiabetic, and diabetic rats. *Diabetes* 12:115-126, 1963.
2. Thorell J.I. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 31:187, 1973.
3. Feldman H. and Rodbard D. « Mathematical Theory of Radioimmunoassay », in W.D. Odell and Doughaday, W.H. (Ed), *Principles of Competitive Protein-Binding Assays*. Philadelphia : J.B : Leppincott Company ; pp 158-203, 1971.
4. Westgard, J.O., et al. A multi-rule Shewart chart for quality control in clinical chemistry. *Clin. Chem.* 27 :493-501, 1981.

Fabriqué par :
Millipore
6 Research Park Drive
St Charles, Missouri
63304 USA

Distribué en France par :
Labodia France
266 avenue Daumesnil
75012 Paris