

SLP-HS Single Reagent Set II

《Research Use only, Not for use in diagnostic procedures》

Preface

The hemolymph of the silkworm *Bombyx mori* contains a self-defense mechanism termed the “prophenoloxidase (proPO) activating system” or “proPO cascade”. Upon invasion of microbe such as bacteria and fungi, the system participates in melanin formation observed in the body fluid of insects to protect them from the invader’s attack. The system is triggered by peptidoglycan (PG) from bacteria and (1→3)- β -D-glucan (β -glucan) from fungi and yeast, and consequently, proPO in the system is activated¹⁾²⁾. The system is thought to be a cascade reaction involving activation of multiple zymogens of proteinases.

The SLP (Silkworm Larvae Plasma) reagent is a lyophilized product containing factors of the proPO cascade, it is prepared from silkworm larvae body fluid and processed without melanin formation. The SLP reagent is activated by PG and/or β -glucan, then L-3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) is oxidized and melanin is formed. Since PG is found on the cell wall of most bacteria and β -glucan is a component found in cell walls of many fungi, it is possible to detect various microorganisms by using melanin pigment formation of SLP reagent as an index³⁾.

Features

1. High sensitive detection of PG and β -glucan
2. Accurate and sensitive quantification of PG and β -glucan with Toxinometer

Assay Principle

The activation mechanism of SLP is considered as shown in Figure 1. Either PG or β -glucan binds to the respective recognition proteins termed PGRP or β GRP. The proPO cascade system is initiated by these reactions, and consequently, proPO is converted to phenoloxidase (PO)⁴⁾. The PO catalyzes oxidation of DOPA and is followed by the formation of melanin in the mixture.

In the kinetic colorimetric assay with the Toxinometer, the amount of melanin pigment by SLP reaction is monitored as a change in the light transmission rate, and the reaction time until the light transmission rate reaches a preset threshold value is defined as activation time (Ta). SLP activating substances (PG and β -glucan) are quantified with Ta as an index.

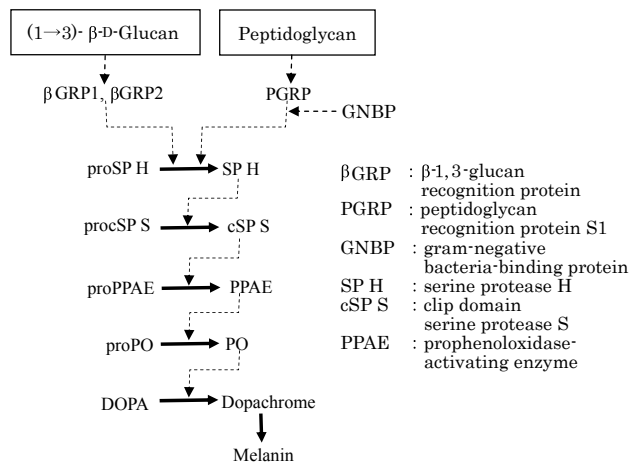


Fig 1. Activation mechanism of SLP system⁴⁾
(modified from Ref.4)

Kit Contents

1. SLP-HS Reagent II (Lyophilized reagent containing Silkworm Larvae Plasma and DOPA) for 0.1 mL × 20 vials
Sensitivity : 10 pg/mL for PG, 1 pg/mL for β-glucan in 120 minutes.
2. SLP-Diluent 5 mL × 2 vials
3. Standard (Digested Peptidoglycan from *Staphylococcus aureus*) 0.5 mL × 1 vial

Assay Procedures

1. Materials required but not supplied

- (1) Pipettes
- (2) Test tubes with aluminum caps for dilution of standard or sample
- (3) Vortex mixer
- (4) Toxinometer
- (5) Test water for dilution of standard or sample

NOTE : A test tube and the pipette should be dry heat sterilized by 250 °C and more than two hours. Test water should be confirmed that they are no contamination and no interference for the measurement. The plastic products such as tips for micropipettes should be confirmed that they are no contamination and no interference for the measurement, or products shown in “Related Products” should be used.

2. Preparation of reagents

(1) Dilution of peptidoglycan standard and sample

Vortex vigorously for approximately 120 seconds before opening the standard. Vigorously vortex each dilution step for about 20 seconds before preparing the next dilution.

Table 1 Example of preparing dilution series of standard
(When the labeled concentration is 7.2 $\mu\text{g/mL}$)

Standard solution (μL)	Test water (μL)	Prepared standard concentration (ng/mL)
100 (7.2 $\mu\text{g/mL}$)	620	1,000
100 (1,000 ng/mL)	900	100
100 (100 ng/mL)	900	10
100 (10 ng/mL)	900	1
100 (1 ng/mL)	900	0.1
100 (0.1 ng/mL)	900	0.01

(2) Preparation of SLP-HS Reagent II solution

Take SLP-HS Reagent II vials out of the package and put the vials in a rack. When powder of SLP-HS Reagent II is attached to the rubber stopper, knock on several times of the bottom of the vial. A little reagent attached to a rubber stopper does not influence the result of the measurement. Each rubber stopper is loosened by releasing the vacuum and slowly pulling up the rubber stopper slightly.

Dispense 0.1 mL of the SLP-Diluent into SLP-HS Reagent II vial and put the rubber stopper on the vial. Mix gently to dissolve the reagent without making bubbles. Please proceed to the step of “3. Measurement procedure” promptly after dissolving.

3. Measurement procedure

(1) Add 0.1 mL of dilution series of Standard, test water, or samples to SLP-HS Reagent II solution.

(2) Mix immediately so as not to make bubbles, and start to measure with the following conditions using Toxinometer at 30 $^{\circ}\text{C}$.

< Recommended measurement conditions for Toxinometer >

Threshold	90.0%
Count	3
Wait time	5 minutes
Measurement Time	120 minutes

(3) Calculate the concentration of SLP reactive substance in the sample from the activation time (T_a) of the standard and T_a of the sample as the concentration equivalent to peptidoglycan standard. A good fitting can be obtained from the logarithm (Log) of the peptidoglycan standard concentration on the x-axis and the double log (LogLog) of T_a on the y-axis with the quadratic regression of x as a calibration curve.

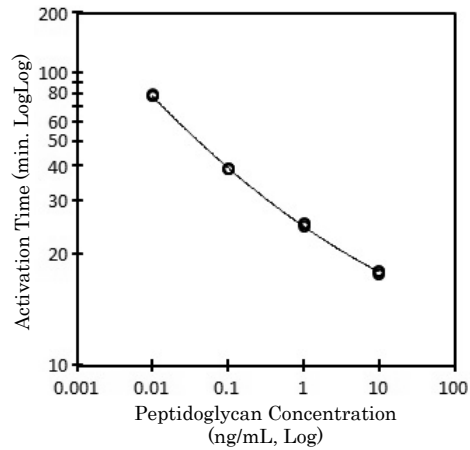


Fig.2 Example of standard curve graph

Usage notes

1. Since this product reacts very sensitively to peptidoglycan and β -glucan, please pay attention to contamination from pipette, other instruments, test water etc. Please use equipment to be sterilized by dry heat at 250 °C for 2 hours or more, or as described in “Related Products”.
2. Do not use the reagent if it is discolored or insoluble materials are observed when dissolving.
3. Since the toxicity of this product is not confirmed well, please pay attention to handling so as not to inhale it.
4. The sensitivity of SLP reagent is suppressed by samples with a high ionic strength.
5. This kit is for research use only and not for use in diagnostic procedures.
6. Carefully open the vial so as not to get injured by the aluminium cap.

Storage Keep at 2~10 °C

Expiration Indicate on the label (outer box)

Package 20 tests

References

- 1) Ashida, M. *Invertebrate Biological Defense* ed. by Natori, S. *et al.* Society Publishing Center, 111-126 (1992)
- 2) Ashida, M. and Yamazaki, H. I. *Molting and Metamorphosis* ed. by Ohnishi, E. and Ishizaki, H., Japan Sci. Soc. Press, Tokyo/Springer-Verlag, Berlin, 239-265 (1990)
- 3) Tsuchiya, M., Asahi, N., *et al.* *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **15**, 129-134 (1996)
- 4) Ochiai, M. *SANSHI-KONCHU BIOTEC* **84** (3), 195-204 (2015)

Related Products

293-26551	Limulus Test Tube-S (12 × 75mm, Endotoxin Free)	10 vials × 10
293-28251	Aluminium Cap-S (14.7 × 18 mm, Endotoxin Free)	10 pieces × 10
298-35031	Bio Clean Tip Wako [®] 1000 II	100 tips
291-35021	Bio Clean Tip Wako [®] 200 II	100 tips
294-35011	Bio Clean Tip Wako [®] Extend S II	100 tips

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 : + 49-2131-3111100
<http://www.wako-chemicals.de>

微生物検出用

SLP-HS Single Reagent Set II**SLP-HS シングル試薬セット II**

〔はじめに〕

カイコ (*Bombyx mori*) の体液中にはフェノール酸化酵素前駆体 (proPO) カスケードと呼ばれる生体防御機構が存在し、ペプチドグリカン (PG) および (1→3)- β -D-グルカン (β -グルカン) によって反応が開始され、最終的にフェノール酸化酵素前駆体 (proPO) がフェノールオキシダーゼ (PO) に変換されます¹⁾²⁾。proPO の活性化機構は、複数のセリンプロテアーゼの活性化を含むカスケード機構であると考えられています。このカスケード機構は、異物侵入の際に昆虫体内で認められるメラニン形成に重要な役割を果たしています。

SLP 試薬はカイコ幼虫の体液をメラニン形成させることなく採取・調製した、proPO カスケードの因子を含んだ凍結乾燥品です。本試薬は PG および β -グルカンによって活性化され、試薬に含まれる DOPA 基質 (L-3, 4-dihydroxyphenylalanine) を酸化し、メラニン色素を生成します。PG はほとんどの細菌の細胞壁に、 β -グルカンも多くの真菌の細胞壁に認められる成分であることから、生成したメラニン色素を指標として、各種微生物の検出が可能です³⁾。

〔特 長〕

1. 高感度に PG および β -グルカンの検出が可能です。
2. トキシノメーターにより PG および β -グルカンを正確かつ高感度に定量することが可能です。

〔原 理〕

SLP の活性化機構は次の図のように考えられております。すなわち PG または β -グルカンがそれぞれの認識タンパク (PGRP または β GRP) と結合することにより、proPO カスケードの反応が開始され、最終的に proPO が PO に変換されます⁴⁾。活性化した PO によって試薬に含まれる DOPA が酸化され、結果として黒色のメラニン色素が生じます。

トキシノメーターを用いた比色時間分析法では、活性化に伴って生じる色素量を透過光量比の変化として測定し、透過光量比があらかじめ設定したしきい値に達するまでの反応時間を活性化時間 (Ta) として、Ta を指標に SLP 活性化物質 (PG および β -グルカン) を定量します。

2. 試薬、試料の調製

(1) ペプチドグリカン標準品および試料の希釈

Standardを開栓する前に約120秒間ボルテックスミキサーで激しく攪拌します。各希釈溶液は次の希釈操作を行う前に約20秒間ボルテックスミキサーで激しく攪拌します。

表 1 Standardの希釈系列作成例（表示濃度が7.2 µg/mLの場合）

Standard溶液(µL)	試験用水(µL)	終濃度 (ng/mL)
100 (7.2 µg/mL)	620	1,000
100 (1,000 ng/mL)	900	100
100 (100 ng/mL)	900	10
100 (10 ng/mL)	900	1
100 (1 ng/mL)	900	0.1
100 (0.1 ng/mL)	900	0.01

(2) SLP-HS Reagent II 溶液の調製

必要な本数のSLP-HS Reagent IIをラックに並べます。もし凍結乾燥試薬の粉末がゴム栓に付着している場合は、台上でバイアルの底を数回軽く叩きゴム栓に付着している粉末をバイアルの底に落とします。少量の試薬がゴム栓に付着している程度では試験の結果に影響はありません。試薬が飛び散らないように、ゴム栓をゆっくりと開けて中の真空を少しずつ開放してください。

SLP-HS Reagent IIにSLP-Diluent 0.1 mLを加え、泡立てないようにゆっくりと攪拌し、完全に溶解します。溶解したら速やかに「3. 測定手順」に進んでください。

3. 測定手順

(1) Standardの希釈系列、水、あるいは試料を0.1 mLずつSLP-HS Reagent II溶液に加えます。

(2) 泡立たないように直ちに攪拌し、30℃に設定したトキシノメーターを用いて以下の条件で測定します。

<トキシノメーターの推奨測定条件>

しきい値 90.0%

カウント 3

ウェイトタイム 5分

測定時間 120分

(3) Standardの各希釈系列の活性化時間 (Ta) と試料のTaから試料中のSLP反応性物質濃度をペプチドグリカン標準品換算濃度として算出します。検量線はx軸にペプチドグリカン濃度の対数 (Log) を、y軸にTaの二回対数 (LogLog) をとり、xの二次式で回帰したものをを用いると、良好なフィッティングが得られます。

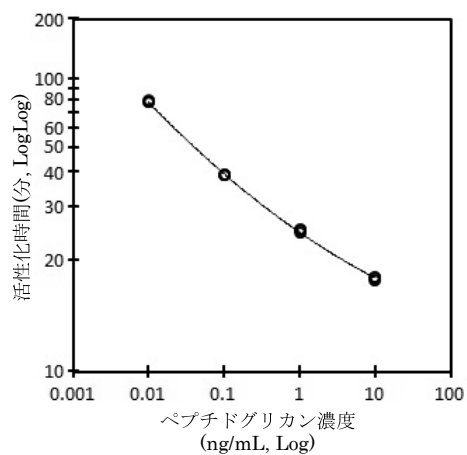


図 2. 検量線グラフの例

〔使用上の注意〕

1. 本品はペプチドグリカン、 β -グルカンに対して極めて鋭敏に反応しますので、ピペット、その他の器具および希釈用水などによる汚染には十分注意して下さい。使用する用具は、250℃で2時間以上乾熱滅菌したものか、〔関連商品〕に記載のものを使用して下さい。
2. 変色したり溶解した時に多量の不溶物が生じたりしたものは変質しておりますので使用しないで下さい。
3. 本品の毒性については確認されておりませんので、吸い込んだりしないよう取扱いには十分注意して下さい。
4. SLP試薬の感度はイオン強度の影響を受けますのでご注意下さい。
5. 本セットは体外診断用ではありませんので、診断用には使用できません。
6. バイアル瓶の開栓は、アルミキャップ部分で怪我をしないよう慎重に行ってください。

〔参考文献〕

- 1) 芦田正明：「無脊椎動物の生体防御」名取俊二ら編，111-126，(学会出版センター株) (1992)
- 2) Ashida, M. and Yamazaki, H. I. *Molting and Metamorphosis* ed. by Ohnishi, E. and Ishizaki, H., Japan Sci. Soc. Press, Tokyo/Springer-Verlag, Berlin, 239-265 (1990)
- 3) Tsuchiya, M., Asahi, N., et al. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **15**, 129-134 (1996)
- 4) 落合正則：「カイコの微生物感染によるメラニン形成と異物認識」蚕糸・昆虫バイオテック **84** (3), 195-204 (2015)

〔貯 法〕 2～10℃保存

〔使用期限〕 外箱ラベルに表示

〔包 装〕 20回用

〔関連商品〕

293-26551	リムルステストチューブ S (12 × 75 mm, エンドトキシソフリー)	10 本入 × 10
293-28251	アルミキャップ S (14.7 × 18 mm, エンドトキシソフリー)	10 個 × 10
298-35031	バイオクリソチップ ワコー® 1000 II	100 本入
291-35021	バイオクリソチップ ワコー® 200 II	100 本入
294-35011	バイオクリソチップ ワコー® エクステンソ S II	100 本入

製造発売元

富士フィルム 和光純薬株式会社

大阪市中央区道修町三丁目1番2号

Tel : 06-6203-3741

1812KA1