

(109 × 209mm Size)

FUJIFILM

Wako

Code No. 293-58301

SLP-HS Single Reagent Set

《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 cascade system”. Upon invasion of foreign material such as bacteria and fungi, the cascade 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, prophenoloxidase in the system is activated. It is also postulated that serial serine proteases are involved in the cascade system, but little has been elucidated on this point.

SLP (Silkworm Larvae Plasma) is prepared sterile and contains all of the factors participating in the activation of the cascade system. The system, containing L-3, 4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) as a phenoloxidase substrate, is triggered by PG and/or β -glucan is widely distributed in the cell wall of a variety of fungi. Therefore, SLP enables one to quantify and/or detect contamination by bacterial and fungal material by measuring the development of melanin formation in the assay.

Features

1. High sensitive detection of bacteria and fungi by measuring PG and β -glucan
2. Accurate and sensitive quantification of PG and β -glucan by use of Toxinometer (Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan)
3. Visual estimation of PG and β -glucan by color development without any special apparatus
4. This product is stable at 2-10°C for at least 24 months.

Assay Principle

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

One can visually judge a reaction by the change in color or the reaction mixture after a certain period of time due to the development of a block color.

When using Toxinometer, one can quantitate either PG or β -glucan by measuring the Activating time (T_a) of the reaction and the absorbance change caused by the color change from the start of the reaction to a predetermined level.

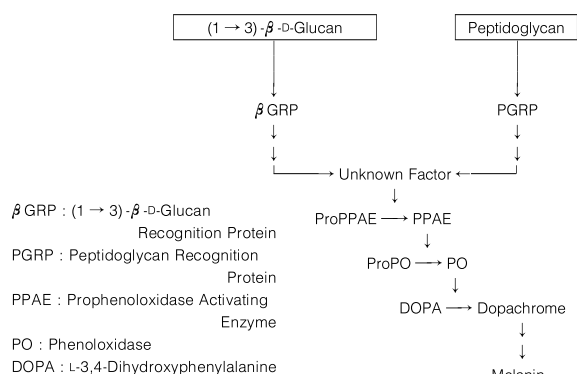


Fig 1. Activation mechanism of SLP system

Kit contents

1. SLP-HS(Silkworm Larvae Plasma High Sensitive)
for 0.2 mL \times 20 vials
Sensitivity : Either 10 pg/mL of PG or 1 pg/mL of β -glucan can be detected with Toxinometer at 30°C in 120 minutes.
2. SLP-Diluent 1.0 mL \times 20 vials
3. Standard (Digested Peptidoglycan from *S. aureus*)
0.5 mL \times 1 vial

Assay Procedures

<Procedure 1>

- 1) Dispense 0.1 mL of SLP-Diluent provided into the vial of SLP-HS, and then gently stir it to dissolve the SLP material completely to reconstitute the SLP reagent.

- 2) Add 0.1 mL of either dilution series of Standard provided or samples to the SLP reagent.
- 3) Mix the solutions by gently stirring the vial, set the vial to Toxinometer at 30 °C, and measure it.

〈**Procedure 2**〉

- 1) Add either the dilution series of Standard or samples to SLP-diluent vial to become the more than 2 volumes of dilution for added solution.
- 2) Remove 0.2 mL of diluted sample with SLP-Diluent to transfer it to a SLP-HS vial.
- 3) Dissolved SLP-HS completely with gently stirring the vial, set the vial to Toxinometer and measure it as described above.

※See the details in “Instruction of Toxinometer”.

※Visual estimation : Concentration of SLP activation material in the samples can be determined based on the endpoint and the dye development of the serial dilution solutions with the standard material.

Usage notes

1. All the vessels and apparatuses to be used should be free of SLP activating substance such as PG and β -glucan. Dry-heating at 250 °C for 2 hours is recommended.
2. The sensitive of SLP reagent is suppressed by samples with a high ionic strength.
3. This kit is for research use only and not for use in diagnostic procedures. For in vitro use only. Not for internal use in humans or animals.

Storage Keep at 2~10 °C

Expiration Indicate on the label (outer box)

Package 20 Tests

References

- 1) Ashida, M. and Yamazaki, H. I. : “Molting and Metamorphosis” ed. by Ohnishi, E. and Ishizaki, H., Japan Sci. Soc. Press, Tokyo/Springer-Verlag, Berlin, p.239 (1990)
- 2) Tsuchiya, M., Asahi, N., *et al.* : Detection of peptidoglycan and β -glucan with silkworm larvae plasma test. FEMS Immunol. Med. Microbiol., **15**, 129-134 (1996)

Related product

297-51501	SLP Reagent Set	for 3 mL
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

SLP-HS シングル試薬セット

〔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 (Pro-PO) 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 (Pro-PO) がフェノールオキシダーゼ (PO) に変換されます¹⁾²⁾。Pro-PO 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推測されていますが、まだ十分には解明されていません。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 試薬はカイコの体液をメラニン形成させることなく無菌的に採取・調製した、Pro-PO 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。

〔特 長〕

1. 高感度に PG および β -グルカンの検出・定量ができます。
2. 特別な測定装置を必要としない目視判定法による測定が可能です。
3. 冷蔵 (2~10℃) で24ヶ月安定です。

〔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、Pro-PO カスケードの反応が開始され、最終的に Pro-PO が PO に変換されます。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。

目視判定法では、一定時間反応させた後、反応液の色調の変化を観察することにより判定を行います。

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。

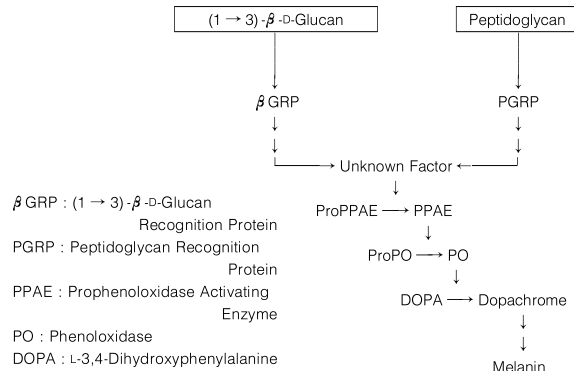


図. SLP のカスケード機構

〔内 容〕

1. SLP-HS (Silkworm Larvae Plasma High Sensitive) 0.2 mL 用 \times 20 バイアル
 感 度 : 10 pg/mL (PG)
 1 pg/mL (β -グルカン)
 (トキシノメーター (30℃), 120分測定)
2. SLP-Diluent 1.0 mL \times 20 バイアル
3. Standard (Digested Peptidoglycan from *S. aureus*) 0.5 mL \times 1 バイアル

〔使用方法〕

〈測定方法 1〉

- 1) SLP-HS の入ったバイアル瓶に SLP 溶解液 0.1 mL を加え、ゆっくりと攪拌し、完全に溶解します (SLP 試薬).
- 2) 標準液の希釈系列あるいは試料を 0.1 mL ずつ SLP 試薬に加えます.
- 3) 攪拌した後、トキシノメーター (30℃) を用いて測定します*。

〈測定方法 2〉

- 1) 標準液の希釈系列あるいは試料を SLP 溶解液に加え、試料が 2 倍以上希釈されるようにします.
- 2) 1) の試料希釈液を直接 SLP-HS に 0.2 mL 加え、溶解します.

3) 攪拌した後、トキシノメーター (30℃) を用いて測定します*。

※ 詳しくは「トキシノメーターにおける標準操作法」をご請求下さい。

※ 目視判定法では、一定時間後に目視によりメラニン色素の生成の有無を判定し、色素生成の認められたものを陽性とします。

〔使用上の注意〕

1. 使用する用具は、250℃で2時間以上乾熱滅菌したものか、SLP 活性化物質による汚染のないものを使用してください。
2. 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ください。
3. 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。

〔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，p.111，（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, p.239 (1990)
- 3) Tsuchiya, M., Asahi, N., *et al.* : Detection of peptidoglycan and β -glucan with silkworm larvae plasma test. FEMS Immunol. Med. Microbiol., **15**, 129-134 (1996)
- 4) 日本国特許特開昭 63-141598
- 5) 日本国特許特開昭 63-141599

〔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〕

297-51501	SLP試薬セット	3 mL 用
293-26551	リムルステストチューブ S (12 × 75 mm, エンドトキシンフリー)	10 本入 × 10
293-28251	アルミキャップ S (14.7 × 18 mm, エンドトキシンフリー)	10 個 × 10
298-35031	ハイオクリンチップ ワコー® 1000 II	100 本入
291-35021	ハイオクリンチップ ワコー® 200 II	100 本入
294-35011	ハイオクリンチップ ワコー® エクステンド S II	100 本入

製造発売元

富士フイルム 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

1802KA1