

< For Research Use Only, Not for USE in Diagnostic Procedure >

Code No. 297-51501

< For Microorganism Detection >

SLP Reagent Set

INTENDED USE

Wako SLP Reagent Set is intended for detection of peptidoglycan and (1→3)- β -D-glucan.

SUMMARY AND GENERAL INFORMATION

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 fluids 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, reconstituted with a solution containing L-3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) as a phenoloxidase substrate, is triggered by PG and/or β -glucan. DOPA is oxidized by phenoloxidase, forming melanin pigment in the reaction mixture. PG is a component of most bacterial cell walls and 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. Sensitive quantitation and detection of PG and β -glucan.
2. Sensitive and accurate quantitation of PG and β -glucan by use of a microplate reader or Toxinometer.
3. Visual detection of bacterial and fungal contamination without any special apparatus.
4. SLP in a lyophilized form is stable at 2~10°C for at least 18 months.

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 reaction by the change in color of the reaction mixture after a certain period of time due to the development of a black color.

When using a microplate reader or Toxinometer, one can quantitate either PG or β -glucan by measuring the onset 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.

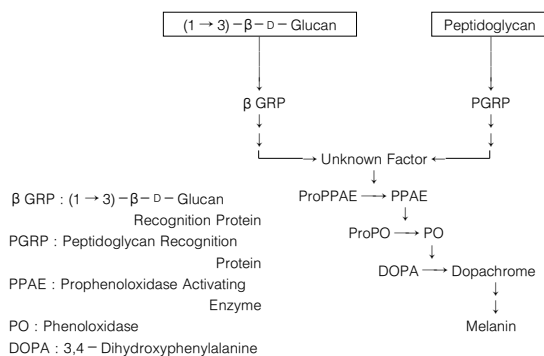


Fig 1 (Activation mechanism of SLP system)

REAGENTS

All the reagents should be stored at 2~10°C.

1. SLP lyophilized 1 vial for 3 mL

For use with a microplate reader or for visual tests, approximately 50 assays can be made. For use with a Toxinometer, approximately 30 assays can be performed.

Sensitivity ; Endpoints determined by the visual test described below after 1 hour incubation at 30°C with PG and β -glucan are indicated in each lot.

2. Substrate, lyophilized 1 vial for 3 mL

Contains DOPA as a phenoloxidase substrate.

3. Diluent 1 vial 4 mL

Contains a "good's" buffer.

Preparation of reagents

- (A) Add 3 mL of Diluent to substrate. Gently stir the mixture to dissolve the substrate completely. Avoid getting the rubber cap wet.
- (B) Add the entire reconstituted substrate solution to the vial of lyophilized SLP. Gently stir to completely dissolve the lyophilized product. Again, avoid wetting the rubber cap. The resultant solution is termed the "SLP test solution".

PROCEDURE

1. Visual test using microplate

- (A) Make a 2-fold dilution series with the reference material of either PG or β -glucan and add 0.05 mL of each dilution and sample to the wells of the microplate.
- (B) Dispense 0.05 mL of SLP test solution to each well.
- (C) After gentle stirring, incubate the plate at 30°C for one hour.
- (D) Visually judge the formation of melanin in the reaction mixture : sample where melanin formation is observed are positive and others are negative.
- (E) The minimum concentration of the reference material at which melanin is formed is defined as the endpoint of the SLP test solution.
- (F) The determination of whether the sample is negative or positive depends on whether or not the sample contains SLP reactive materials at a concentration greater than that of the endpoint.

2. Procedure using microplate reader

- (A) 0.05 mL of samples and the dilution series of a reference material of either PG or β -glucan are dispensed into each well of the microplate.
- (B) Add 0.05 mL of SLP test solution to each well quickly. The use of a sterilized successive dispenser is recommended.
- (C) Read the absorbance of the microplate reader under the following conditions :

Assay absorbance :	650 nm
Assay mode :	Kinetic
Reaction time :	90 minutes
Assay temperature :	30°C
Auto mix :	Once
- (D) The standard curve is plotted with a regression of Log-Log : horizontal axis-concentration of SLP activation material ; vertical axis-onset time.
- (E) Using the standard curve, calculate the concentration of SLP reactive material from the measured onset time.

3. Procedure using Toxinometer

When using the Toxinometer for the SLP test assay, the procedure can be performed in the same manner as the endotoxin assay described in the operator's manual. The Toxinometer may exhibit a signal indicating "lack of transmittance light" in the activated sample reaction mixture. Ignore this alarm. The results are not affected by the alarm.

Notes in using SLP

1. Apparatuses should be sterilized by dry-heating at 250 °C for at least 2 hours and should be free of contamination by SLP reactive material.
2. After reconstitution, store SLP test solutions at 0~4 °C and use them as soon as possible.
3. Pay careful attention to avoid contamination of the apparatuses by SLP activation material during storage.
4. The sensitivity of the SLP test solution is largely influenced by the ionic strength.
5. 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.

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>

研究用試薬

Code No. 297-51501 (3 mL 用)

微生物検出用

SLP Reagent Set

SLP 試薬セット

使用説明書

【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) 及び (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 (PO) が活性化されます^{1,2)}。POの活性化の機構は、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おりますが、まだ十分には解明されておられません。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しております。

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、ProPOカスケードの因子をすべて含んだ凍結乾燥品です。本試薬は、PG及び β -グルカンによって活性化され、基質剤に含まれるDOPA (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】

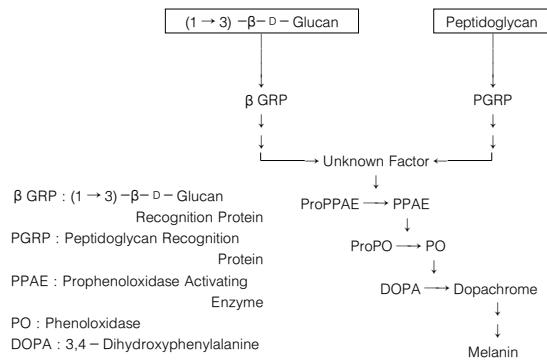
1. 高感度でPG及び β -グルカンを測定できます。
2. 特別な測定装置を必要としない目視判定法による測定が可能です。
3. マイクロプレートリーダーや並列型比濁時間分析装置トキシノメーターを用いることにより、精度よく、高感度にPG及び β -グルカンの定量が可能です。
4. 本品は、冷蔵 (2~10℃) で18カ月間安定です。

【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蛋白 (PGRP及び 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POが活性化されます。活性化したPOによって基質剤に含まれる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。

マイクロプレートリーダー及びトキシノメーターでは、活性化にもなって生じる色素量を吸光度変化としてとらえ、吸光度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、または onset time）とし、Ta を指標に SLP 活性化物質（PG 及び β -グルカン）を定量します。



(S L P のカスケード機構)

〔内 容〕

1. SLP 1バイアル 3 mL 用

マイクロプレート法で約50回、トキシノメーター法で約30回測定できます。

感度：箱ラベルに表示。〔目視判定法（30℃、1時間反応）によるエンドポイント（PG 及び β -グルカン）〕

2～10℃ 保存

2. 基質剤 1バイアル 3 mL 用

DOPAを含有

2～10℃ 保存

3. 基質溶解液 1バイアル 4 mL

グッド緩衝液を含有

2～10℃ 保存

〔使用方法〕

1. 試薬の調製

- (1) 基質溶解液 3 mL を基質剤に加え、ゴム栓を濡らさないようにゆっくりと攪拌し、完全に溶解して下さい。
- (2) 溶解した基質剤全量を SLP に加え、ゴム栓を濡らさないようにゆっくりと攪拌し、完全に溶解して下さい。これを SLP 試液として使用して下さい。

2. 測定操作

2-1 目視判定法（マイクロプレートを使用する場合）

- (1) 標準品（PG または β -グルカン）の 2 倍希釈系列及び試料それぞれ 0.05 mL をマイクロプレートの各ウェルに入れます。
- (2) SLP 試液 0.05 mL を試料に添加します。
- (3) 軽く攪拌した後、30℃ で 1 時間インキュベートします。
- (4) 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、認められないものを陰性とします。
- (5) 色素生成の認められた最少標準濃度をエンドポイントとします。
- (6) 各試料の判定結果より、試料中の SLP 活性化物質濃度がエンドポイントより多いか少ないかを判定して下さい。

2-2 マイクロプレートリーダー法サンライズサーモ

- (1) 標準品（PG または β -グルカン）の 2 倍希釈系列及び試料それぞれ 0.05 mL をマイクロプレートの各ウェルに入れます。
- (2) SLP 試液 0.05 mL をすばやく試料に添加します。（汚染のないことを確認した連続分注器が推奨されます。）
- (3) マイクロプレートリーダーサンライズサーモを用いて、以下の条件で測定します。

測定波長：650 nm

測定 mode：Kinetic

Onset OD：0.01

測定時間：90分

測定温度：30℃

Auto mix：Once

- (4) 標準品濃度を横軸に、Onset time を縦軸に対数プロットし、検量線を作製します。
- (5) 作製した検量線を用いて、試料の Onset time より SLP 活性化物質濃度を算出します。

2-3 トキシノメーター法

トキシノメーターを用いたリムルス試験と同様に操作を行って下さい。詳しくは、「トキシノメーターの標準操作法」を参照下さい。なお、活性化が起こった場合、測定中に「透過光量過小」のエラーがでる場合がありますが、測定結果には影響がありません。

〔ご使用上の注意〕

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下さい。
2. SLP は、溶解後、低温（0～4℃）に保ち、できるだけその日のうちに使用して下さい。
3. 使用試薬及び用具が SLP 活性化物質によって汚染しないよう、十分注意して下さい。
4. SLP 試液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、体外診断用医薬品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），学会出版センター，p. 111（1992）.
- 2) Ashida, M. : *In Molting and Metamorphosis* ed. by Onishi, E. and Ishizaki, H., Japan Sci. Soc. Press, Tokyo/Springer-Verlag, Berlin p.239 (1990).
- 3) 土谷正和、朝日信雄、山片ゆかり、津田脩臣、松浦脩治：日本薬学会第109年会講演要旨集V、114（1989）.
- 4) 朝日信雄、小林譜紀子、土谷正和、松浦脩治：日本防菌防黴学会第21年次大会要旨集、44（1994）.
- 5) 日本国特許特開昭63 - 141598
- 6) 日本国特許特開昭63 - 141599

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

1808KA1