

## Проведение простого анализа с использованием реактива SLP-HS

### Цель

Проведение простого анализа с использованием реактива SLP-HS, который не требует специального оборудования и программного обеспечения.

\*Данный документ представляет собой дополнительное объяснение того, как использовать реактив без прибора Toxinometer®.

### Информация о продукте

Каталожный номер No.296-81001 SLP-HS Набор реактивов на одно определение II

- Условия хранения 2~10 °C
- Срок годности указан на этикетке коробки
- Упаковка 20 тестов

<<Только для использования в научных целях. Не для использования в диагностике>>

### Особенности

1. Высокочувствительное определение пептидогликана (PG) и β-глюканов.
2. Точное и чувствительное количественное определение PG и β-глюканов с помощью ридера Toxinometer®



### Содержание набора

1. Реактив SLP-HS II (Лиофилизированный реактив, содержащий плазму личинок шелкопряда и DOPA) 20 флаконов по 0.1 мл

\*Как указание, диапазон количественного определения составляет от 10 пкг/мл до 10 нг/мл для PG и от 1 пкг/мл до 1 нг/мл для β-глюканов при измерении в течение 120 минут.

2. SLP-растворитель 2 флакона по 5 мл
3. Стандарт (фрагментированный пептидогликан, полученный из Staphylococcus aureus) 1 флакон 0,5 мл.



**Введение**

Гемолимфа шелкопряда *Bombyx mori* содержит механизм самозащиты, называемый «профенолоксидазо-(proPO) активированная система» или «proPO каскад». При попадании в гемолимфу микроорганизмов, таких как бактерии или грибы, система участвует в образовании меланина, что наблюдается в жидкости тела насекомых для защиты их от проникновения чужеродных частиц. Система запускается пептидогликаном (PG) бактерий и (1→3)-β-D-глюканом (β-глюканом) грибов и дрожжей с последующей активацией ProPO каскада (1,2). Считается, что система представляет собой каскадную реакцию, в которую вовлечена активация многочисленных зимогенов протеиназ. SLP-реактив (Silkworm Larvae Plasma) представляет собой лиофилизированный продукт, содержащий факторы ProPO каскада, который получают из жидкости тела личинок шелкопряда и не содержит меланина. SLP-реактив активируется PG и/или β-глюканом, затем L-3,4-дигидроксифенилаланин (DOPA) окисляется и в конечном итоге образуется меланин. Так как PG обнаруживается в клеточной стенке большинства бактерий, а β-глюкан - это компонент, найденный в клеточной стенке многих грибов, возможно определять различные микроорганизмы, используя образование пигмента меланина в SLP-реактиве, как показано на рисунке 3.

**Принцип анализа**

Предположительный механизм активации SLP-реактива показан на рисунке 1. Как PG, так и β-глюкан связываются с соответствующими рецепторными белками, называемыми PGRP или β GRP. Эта реакция активирует ProPO-каскадную систему, в результате которой ProPO превращается в фенолоксидазу (PO) (4). PO катализирует окисление DOPA, в следствие чего в реакционной смеси образуется меланин.

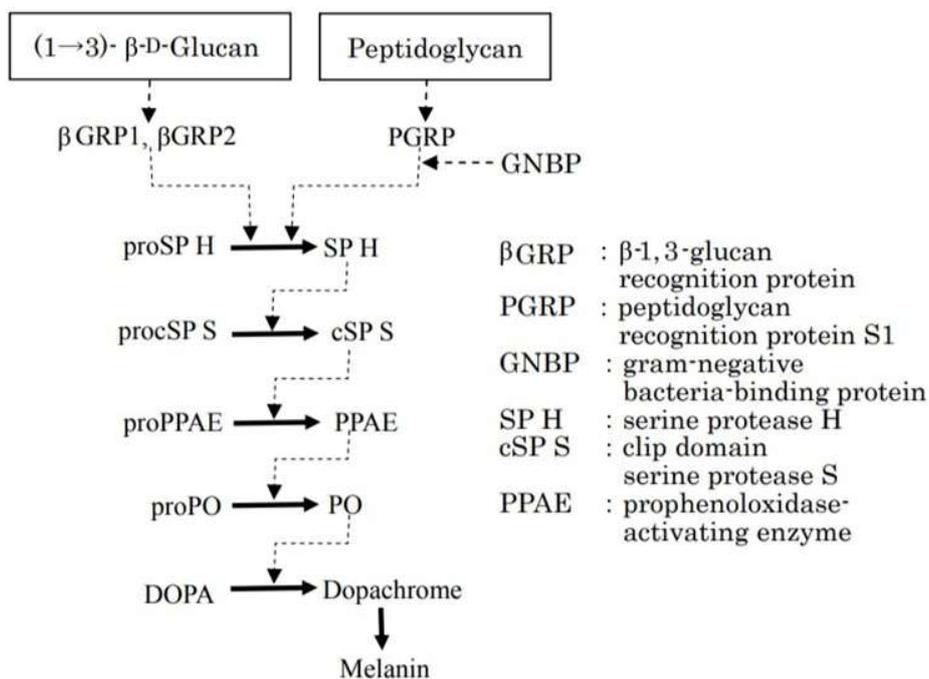


Fig 1. Механизм активации SLP системы  
(4) (измененный от ссылки 4)

Процедура анализа

[1] *Визуальный анализ - Качественный метод*

В данном анализе PG и/или β-гликаны определяются визуально.

Что потребуется

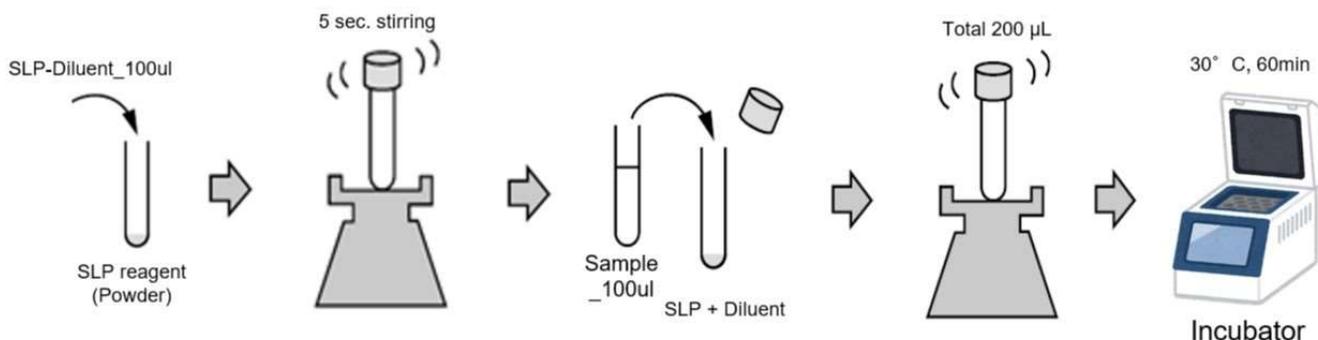
- SLP-HS Набор реактивов на одно определение II
- Апиrogenная вода
- Инкубатор (30°C)
- Апиrogenные пипетки/наконечники
- Планшет для анализа (при использовании микропланшетного метода)
- Апиrogenные резервуары для реактивов (при использовании микропланшетного метода)

Процедура анализа

1. Добавьте 100 мкл SLP-растворителя к SLP-реактиву и растворите. Перемешайте около 5 секунд.
2. Перемешайте образец в течение нескольких секунд.
3. Добавьте 100 мкл образца к SLP-реактиву, разведенному с помощью растворителя. Перемешайте около 5 секунд.
4. Инкубируйте смесь при 30°C в течение 60 минут.
5. Визуально оцените результаты.

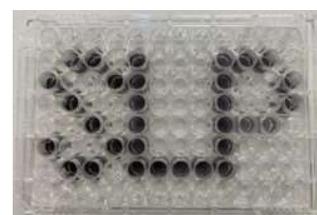
\*Одновременно рекомендуется проверять отрицательный контроль (апиrogenную воду), так как по требованиям анализа отрицательные результаты не дают окрашивания.

\*Отрицательные результаты видны как прозрачные, а положительные как темно-фиолетовые.



При использовании микропланшета

1. Добавьте 100 мкл SLP-растворителя к SLP-реактиву и растворите. Перемешайте около 5 секунд.
2. Соберите требуемый для измерения объем SLP-реактива, разведенного растворителем, в апиrogenном контейнере. Желательно держать контейнер на льду.
3. Перенесите 50 мкл SLP-реактива, разведенного растворителем, в планшет.
4. Перемешайте образец в течение нескольких секунд.
5. Внесите 50 мкл образца в лунки планшета, содержащие реактив.
6. Инкубируйте при 30°C в течение 60 минут.



7. Оцените результаты визуально.

\* Отрицательные результаты видны как прозрачные, а положительные как темно-фиолетовые.

Определение концентрации конечной точки чувствительности SLP-реактива к PG

Процедура анализа

Шаг 1: Подготовка стандартов

1. Перед тем, как открыть стандарт (жидкость), перемешайте его в течение 120 секунд.
2. Разведите стандарт с помощью апиrogenной воды таким образом, чтобы концентрация пептидогликана в растворе составляла 1 мкг/мл (1000 нг/мл). (Например, если указана концентрация стандарта 7,1 мкг/мл, смешайте 100 мкл раствора стандарта и 610 мкл воды)  
1 мкг / мл ( $7.1 * 100/710$ )
3. Подготовьте серию разведений стандарта (как в таблице ниже).

№.	Раствор стандарта пептидогликана (мл)	Вода (мл)	Концентрация пептидогликана
1	0.1 (1000 нг /мл)	0.9	100 нг /мл
2	0.1 (100 нг /мл)	0.9	10 нг /мл
3	0.1 (10 нг /мл)	0.9	* 1 нг /мл
4	0.1 (1 нг /мл)	0.9	* 0.1 нг /мл
5	0.1 (0.1 нг /мл)	0.9	* 0.01 нг /мл

\*Концентрации, используемые в анализе

Шаг 2: Внесение на планшет

1. Добавьте 100 мкл SLP-растворителя к SLP-реактиву и растворите. Перемешайте около 5 секунд.
2. Соберите требуемый для измерения объем SLP-реактива, разведенного растворителем, в апиrogenном контейнере. Желательно держать контейнер на льду.  
\*Требуется 50 мкл SLP-реактива, разведенного растворителем, на один образец.
3. Перенесите 50 мкл SLP-реактива, разведенного растворителем, в планшет.
4. Перемешайте образец в течение нескольких секунд.
5. Внесите по 50 мкл каждого стандарта для анализа (начинайте со стандарта с концентрацией 1 нг/мл) в каждую лунку планшета.
6. Инкубируйте при температуре 30°C в течение 60 минут.
7. Оцените результаты визуально. Конечной точкой реакции является наименьшая концентрация стандарта, которая дает темно-фиолетовое окрашивание.

Шаг 3 (Если необходимо): Определение конечной точки реакции в двукратных разведениях.

1. Конечная точка реакции может быть далее определена путем повторения теста в трех последовательных двукратных разведениях концентрации конечной точки. Например, если конечная точка равна концентрации стандарта 0.1 нг/мл, то могут быть проверены три следующих разведения.

№.	Раствор стандарта пептидогликана (мл)	Вода (мл)	Концентрация пептидогликана
1	0.5 (0.1 нг /мл)	0.5	0.05 нг /мл
2	0.5 (0.05 нг/мл)	0.5	0.025 нг/мл
3	0.5 (0.025 нг/мл)	0.5	0.0125 нг/мл

2. Оцените результаты визуально. Конечной точкой реакции является наименьшая концентрация стандарта, которая дает темно-фиолетовое окрашивание.

## Интерпретация

На основании значения конечной точки можно охарактеризовать образцы на содержание PG. Например, если концентрация конечной точки составила 0.025 нг/мл, то образец, который дал положительный результат, будет содержать  $\geq 0.025$  нг/мл PG. Если образец дал отрицательный результат, то содержание PG в нем составит  $< 0.025$  нг/мл PG. Рекомендуется повторять данный тест каждый раз при использовании новой серии реактивов или при любых изменениях условий протекания реакции.

## [2] Анализ с использованием микропланшетного ридера - количественный метод

В данном анализе концентрация в образце рассчитывается на основании значения поглощения, полученного на микропланшетном ридере.

\*В качестве примера используется ридер ELx808IU (Agilent) и программное обеспечение Gen5.

## Что необходимо

- SLP-HS Набор реактивов на одно определение II
- Апиrogenная вода
- Микропланшетный ридер и программное обеспечение
- Планшет
- Апиrogenный контейнер
- Апиrogenные пипетки / наконечники

## Описание анализа

Шаг 1. Установка микропланшетного ридера и программного обеспечения.

Шаг 2. Подготовка образца и внесение его на планшет.

Шаг 3. Подготовка и внесение SPL-реактива.

Шаг 4. Получение значений поглощения.

Шаг 5. Построение стандартной кривой и задание шаблона для расчета.

Шаг 6. Расчет концентрации в образце по шаблону.

## Процедура

Шаг 1. Установка микропланшетного ридера и программного обеспечения.

1. Включите ридер (ELx808IU) и запустите программное обеспечение (Gen5).
2. Установите следующие параметры измерения:

Temperature: 30°C

Plate In

Shake: Medium for 0:00:10

Start Kinetic [Run 1:30:00, Interval 0:00:40]

Read: (A) 430 nm

End Kinetic

Plate Out

\* Длина волны может быть установлена от 400 до 700 нм.

Шаг 2. Подготовка стандартной кривой и внесение ее на планшет.

1. Подготовьте раствор стандарта для построения стандартной кривой. Перед тем как открыть стандарт (жидкость), перемешайте его в течение 120 секунд.
2. С помощью апиrogenной воды разведите стандарт до концентрации пептидогликана 1 мкг/мл (1000 нг/мл).

Например, если указана концентрация стандарта 7,1 мкг/мл, смешайте 100 мкл раствора стандарта и 610 мкл воды

$1 \text{ мкг / мл } (7.1 * 100/710)$ .

3. Подготовьте серию разведений стандарта для стандартной кривой (как в таблице ниже)

№.	Раствор стандарта пептидогликана (мл)	Вода (мл)	Концентрация пептидогликана
1	0.1 (1000 нг /мл)	0.9	100 нг /мл
2	0.1 (100 нг /мл)	0.9	* 10 нг /мл
3	0.1 (10 нг /мл)	0.9	* 1 нг /мл
4	0.1 (1 нг /мл)	0.9	* 0.1 нг /мл
5	0.1 (0.1нг /мл)	0.9	* 0.01 нг /мл
6	0	0.9	Отрицательный контроль (NC)

\*Как пример, можно использовать 4 концентрации для построения стандартной кривой (10, 1, 0.1, 0.01 нг/мл).

4. Внесите по 50 мкл каждой концентрации стандарта в лунки планшета.

Шаг 3. Подготовка и внесение на планшет SLP-реактива и образца

1. Добавьте 100 мкл SLP-растворителя к SLP-реактиву и растворите. Перемешайте около 5 секунд.
2. Соберите требуемый для измерения объем SLP-реактива, разведенного растворителем, в апиrogenном контейнере. Желательно держать контейнер на льду.

\*Требуется 50 мкл SLP-реактива, разведенного растворителем, на один образец.

3. Перенесите в планшет 50 мкл SLP-реактива, разведенного растворителем.
4. Перемешайте образец в течение нескольких секунд.
5. Внесите по 50 мкл образца в лунки планшета.

Шаг 4. Сбор данных по поглощению.

1. Сразу после добавления SLP-реактива поместите планшет в микропланшетный ридер и начните измерение.
2. После измерения перенесите значения поглощения в Excel.

Шаг 5. Построение калибровочной кривой и шаблона для расчетов.

1. Вычтите нулевое значение ряда для каждого наблюдения.

Это можно сделать в программе Excel, перенеся значения ячеек изначальной таблицы в область рядом, вычитая значения первой строки столбца.

Пример нужной формулы: “=B3-B\$3”

M3    :    ✕ ✕ ✕    fx    =B3-B\$3

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T
1																				
2	time	A	A	A	B	B	B	C	C	C		time	A	A	B	B	B	C	C	C
3		0,039	0,039	0,039	0,039	0,039	0,038	0,038	0,039	0,038	0,039		0							
4		0,039	0,039	0,039	0,039	0,039	0,039	0,039	0,039	0,038	0,04									
5		0,039	0,039	0,039	0,039	0,04	0,039	0,04	0,039	0,04	0,039	0,04								
6		0,039	0,039	0,039	0,041	0,041	0,041	0,04	0,04	0,04	0,04									
7		0,039	0,039	0,039	0,041	0,041	0,041	0,041	0,041	0,041	0,041									
8		0,039	0,039	0,039	0,041	0,041	0,041	0,041	0,041	0,041	0,041									
9		0,039	0,039	0,039	0,041	0,041	0,041	0,041	0,041	0,041	0,041									
10		0,039	0,039	0,039	0,041	0,041	0,041	0,041	0,041	0,041	0,041									
11		0,039	0,039	0,039	0,42	0,041	0,42	0,42	0,42	0,041	0,041									
12		0,039	0,039	0,039	0,42	0,041	0,42	0,42	0,42	0,041	0,041									
13		0,039	0,039	0,039	0,42	0,041	0,42	0,42	0,42	0,041	0,041									
14		0,039	0,039	0,039	0,42	0,041	0,42	0,42	0,42	0,041	0,041									
15		0,039	0,039	0,039	0,43	0,041	0,42	0,43	0,43	0,041	0,041									
16		0,039	0,039	0,039	0,43	0,041	0,42	0,43	0,43	0,041	0,041									
17		0,039	0,039	0,039	0,43	0,041	0,42	0,43	0,43	0,041	0,041									
18		0,039	0,039	0,039	0,43	0,041	0,42	0,43	0,43	0,041	0,041									
19		0,039	0,039	0,039	0,43	0,041	0,42	0,43	0,43	0,041	0,041									

Далее формула протягивается вправо на все ячейки строки.

M3    :    ✕ ✕ ✕    fx    =B3-B\$3

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T
1																				
2	time	A	A	A	B	B	B	C	C	C		time	A	A	B	B	B	C	C	C
3		0,039	0,039	0,039	0,039	0,039	0,038	0,038	0,039	0,038	0,039		0	0	0	0	0	0	0	0
4		0,039	0,039	0,039	0,039	0,039	0,039	0,039	0,039	0,038	0,04									
5		0,039	0,039	0,039	0,039	0,04	0,039	0,04	0,039	0,04	0,039	0,04								
6		0,039	0,039	0,039	0,041	0,041	0,041	0,04	0,04	0,04	0,04									
7		0,039	0,039	0,039	0,041	0,041	0,041	0,041	0,041	0,041	0,041									
8		0,039	0,039	0,039	0,041	0,041	0,041	0,041	0,041	0,041	0,041									
9		0,039	0,039	0,039	0,041	0,041	0,041	0,041	0,041	0,041	0,041									
10		0,039	0,039	0,039	0,041	0,041	0,041	0,041	0,041	0,041	0,041									
11		0,039	0,039	0,039	0,42	0,041	0,42	0,42	0,42	0,041	0,041									
12		0,039	0,039	0,039	0,42	0,041	0,42	0,42	0,42	0,041	0,041									
13		0,039	0,039	0,039	0,42	0,041	0,42	0,42	0,42	0,041	0,041									
14		0,039	0,039	0,039	0,42	0,041	0,42	0,42	0,42	0,041	0,041									
15		0,039	0,039	0,039	0,43	0,041	0,42	0,43	0,43	0,041	0,041									
16		0,039	0,039	0,039	0,43	0,041	0,42	0,43	0,43	0,041	0,041									
17		0,039	0,039	0,039	0,43	0,041	0,42	0,43	0,43	0,041	0,041									
18		0,039	0,039	0,039	0,43	0,041	0,42	0,43	0,43	0,041	0,041									
19		0,039	0,039	0,039	0,43	0,041	0,42	0,43	0,43	0,041	0,041									
20																				

Далее формулы протягиваются на все строки.

M3    :    ✕ ✕ ✕    fx    =B3-B\$3

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T
1																				
2	time	A	A	A	B	B	B	C	C	C		time	A	A	B	B	B	C	C	C
3		0,039	0,039	0,039	0,039	0,039	0,038	0,038	0,039	0,038	0,039		0	0	0	0	0	0	0	0
4		0,039	0,039	0,039	0,039	0,039	0,039	0,039	0,039	0,038	0,04		0	0	0	0	0,001	0,001	0	0
5		0,039	0,039	0,039	0,039	0,04	0,039	0,04	0,039	0,04	0,04		0	0	0	0	0,002	0,001	0,001	0,001
6		0,039	0,039	0,039	0,041	0,041	0,041	0,04	0,04	0,04	0,04		0	0	0	0,002	0,003	0,003	0,001	0,002
7		0,039	0,039	0,039	0,041	0,041	0,041	0,041	0,041	0,041	0,041		0	0	0	0,002	0,003	0,003	0,002	0,003
8		0,039	0,039	0,039	0,041	0,041	0,041	0,041	0,041	0,041	0,041		0	0	0	0,002	0,003	0,003	0,002	0,003
9		0,039	0,039	0,039	0,041	0,041	0,041	0,041	0,041	0,041	0,041		0	0	0	0,002	0,003	0,003	0,002	0,003
10		0,039	0,039	0,039	0,041	0,041	0,041	0,041	0,041	0,041	0,041		0	0	0	0,002	0,003	0,003	0,002	0,003
11		0,039	0,039	0,039	0,42	0,041	0,42	0,42	0,42	0,041	0,041		0	0	0	0,381	0,003	0,382	0,381	0,003
12		0,039	0,039	0,039	0,42	0,041	0,42	0,42	0,42	0,041	0,041		0	0	0	0,381	0,003	0,382	0,381	0,003
13		0,039	0,039	0,039	0,42	0,041	0,42	0,42	0,42	0,041	0,041		0	0	0	0,381	0,003	0,382	0,381	0,003
14		0,039	0,039	0,039	0,42	0,041	0,42	0,42	0,42	0,041	0,041		0	0	0	0,381	0,003	0,382	0,381	0,003
15		0,039	0,039	0,039	0,43	0,041	0,42	0,43	0,43	0,041	0,041		0	0	0	0,391	0,003	0,382	0,391	0,003
16		0,039	0,039	0,039	0,43	0,041	0,42	0,43	0,43	0,041	0,041		0	0	0	0,391	0,003	0,382	0,391	0,003
17		0,039	0,039	0,039	0,43	0,041	0,42	0,43	0,43	0,041	0,041		0	0	0	0,391	0,003	0,382	0,391	0,003
18		0,039	0,039	0,039	0,43	0,041	0,42	0,43	0,43	0,041	0,041		0	0	0	0,391	0,003	0,382	0,391	0,003
19		0,039	0,039	0,039	0,43	0,041	0,42	0,43	0,43	0,041	0,041		0	0	0	0,391	0,003	0,382	0,391	0,003

2. Систематизируйте данные в файле Excel. Рекомендуется указывать название образца и соответствующей лунки.

Procedure Details																						
Plate Type	96 WELL PLATE																					
Set Temperature	Setpoint 30°C																					
	Primed before moving to next step																					
Plate In	Medium: 0.10 (MM SS)																					
Shake	Routine: 1:30.00 (MM SS), Interval: 0:00.40, 136 Reads																					
Start Kinetic	Absorbance Endpoint																					
Read	Full Plate																					
	Wavelength: 450																					
	Read Speed: Normal																					
Time	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	NC				10		10		1		1		1	
Time(min)	B2	B3	B4	C2	C3	C4	D2	D3	D4													
0.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
0.67	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.001	0.001	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
1.33	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.003	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
2.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.004	0.004	0.004	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
2.67	0.000	0.000	0.000	0.000	0.006	0.006	0.007	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
3.33	0.000	0.000	0.000	0.000	0.009	0.009	0.009	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
4.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.013	0.011	0.012	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
4.67	0.000	0.000	0.000	0.000	0.016	0.014	0.016	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
5.33	0.000	0.000	0.000	0.000	0.021	0.018	0.020	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
6.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.026	0.022	0.024	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
6.67	0.000	0.000	0.000	0.000	0.031	0.026	0.029	0.001	0.001	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
7.33	0.000	0.000	0.000	0.000	0.037	0.031	0.035	0.001	0.002	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
8.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.044	0.037	0.041	0.002	0.002	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
8.67	0.000	0.000	0.000	0.000	0.051	0.042	0.048	0.002	0.003	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
9.33	0.000	0.000	0.000	0.000	0.059	0.049	0.055	0.004	0.004	0.004	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
10.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.067	0.055	0.063	0.005	0.006	0.005	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
10.67	0.000	0.000	0.000	0.000	0.076	0.063	0.071	0.007	0.008	0.007	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
11.33	0.000	0.000	0.000	0.000	0.085	0.070	0.079	0.009	0.010	0.008	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
12.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.095	0.078	0.088	0.012	0.013	0.011	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
12.67	0.000	0.000	0.000	0.000	0.105	0.087	0.098	0.015	0.016	0.013	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
13.33	0.000	0.000	0.000	0.000	0.115	0.096	0.107	0.019	0.020	0.016	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	

- Установите пороговое значение (Onset OD), указывающее, что образец прореагировал. Обычно оно равно 0.10.
- Запишите для каждого образца время в минутах (Ta), за которое было превышено значение Onset OD.

Например:

Onset OD: 0.1						
Time(min)	C2	C3	C4			
0.00	0.000	0.000	0.000			
0.67	0.001	0.001	0.001			
1.33	0.002	0.003	0.002			
2.00	0.004	0.004	0.004			
2.67	0.006	0.006	0.007			
3.33	0.009	0.009	0.009			
4.00	0.013	0.011	0.012			
4.67	0.016	0.014	0.016			
5.33	0.021	0.018	0.020			
6.00	0.026	0.022	0.024			
6.67	0.031	0.026	0.029			
7.33	0.037	0.031	0.035			
8.00	0.044	0.037	0.041			
8.67	0.051	0.042	0.048			
9.33	0.059	0.049	0.055			
10.00	0.067	0.055	0.063			
10.67	0.076	0.063	0.071			
11.33	0.085	0.070	0.079			
12.00	0.095	0.078	0.088			
12.67	0.105	0.087	0.098			
13.33	0.115	0.096	0.107			
14.00	0.125	0.105	0.117			
14.67	0.134	0.114	0.127			
15.33	0.144	0.123	0.137			

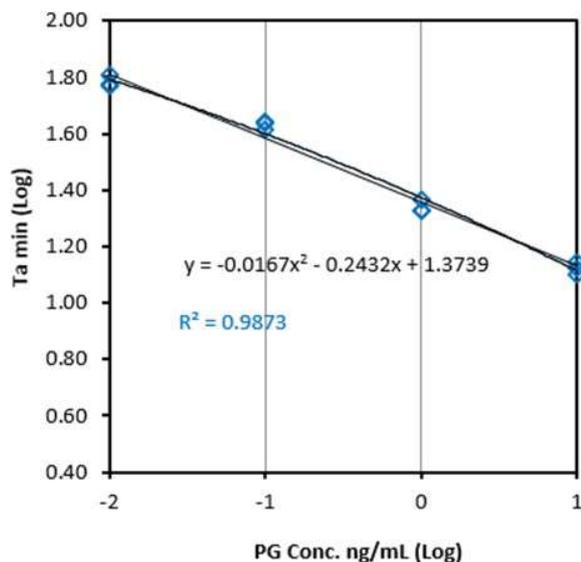
  

ng/mL	Ta(min)
NC	>90.00
NC	>90.00
NC	>90.00
10	12.67
10	13.33
10	14.00
1	21.33
1	21.33
1	23.33
0.1	44.00
0.1	41.33
0.1	43.33
0.01	64.00
0.01	58.67
0.01	59.33
Sample1	56.00
Sample1	56.67
Sample1	52.67

5. Логарифмируйте значения концентраций стандарта для серии разведений и значения "Ta".

ng/mL	Ta(min)	ng/mL	Log(pg/mL)	Ta(min)	Log(Ta)
NC	>90.00	NC	-	>90.00	-
NC	>90.00	NC	-	>90.00	-
NC	>90.00	NC	-	>90.00	-
10	12.67	10	1	12.67	1.10
10	13.33	10	1	13.33	1.12
10	14.00	10	1	14.00	1.15
1	21.33	1	0	21.33	1.33
1	21.33	1	0	21.33	1.33
1	23.33	1	0	23.33	1.37
0.1	44.00	0.1	-1	44.00	1.64
0.1	41.33	0.1	-1	41.33	1.62
0.1	43.33	0.1	-1	43.33	1.64
0.01	64.00	0.01	-2	64.00	1.81
0.01	58.67	0.01	-2	58.67	1.77
0.01	59.33	0.01	-2	59.33	1.77

6. Постройте точечную диаграмму (график зависимости) со значениями логарифмов концентрации по горизонтальной оси и  $T_a$  по вертикальной оси. Затем добавьте полиномиальную линию тренда степени 2.



Шаг 6. Рассчитайте концентрацию образца по формуле:

1. Организуйте информацию, необходимую для расчета. Применение полученной формулы к " $y = ax^2 + bx + c$ " дает следующее.

a: -0.0167  
b: -0.2432  
c: 1.3739

2. Рассчитайте значение X (концентрация) по значениям Y.

Когда  $T_a$  для образца 1 = 56.0 min,  $y = \text{Log}(T_a) = \text{Log}(56.0) = 1.6096$

$$y = ax^2 + bx + c$$

$$ax^2 + bx + (c - y) = 0$$

$$x = \frac{-b - \sqrt{b^2 - 4a(c - y)}}{2a}$$

**В Excel:**  $=(-b - \text{SQRT}((b^2 - 4a(c - y))))/2a$

$$= -1.7482$$

$$x = \text{Log "PG (образец) конц."}$$

$$\text{PG конц.} = 10^x$$

$$= 10^{-1.7482}$$

$$= \underline{0.018 \text{ ng/mL}}$$

#### Полезные заметки

1. Так как данный продукт очень чувствителен к пептидогликану и  $\beta$ -глюканам, пожалуйста, будьте осторожны, чтобы избежать контаминации от дозаторов, другого оборудования, воды и т.д. Используйте оборудование и материалы, обработанные сухожаром при 250 °C в течение двух часов или более.

2. Не используйте реактив, если он изменил цвет или если при его растворении наблюдаются нерастворенные частицы.
3. Так как токсичность данного продукта не изучена должным образом, пожалуйста, при работе с реактивом избегайте его вдыхания.
4. Чувствительность реактива подавляется образцами с высокой ионной силой.
5. Данный набор предназначен только для научно-исследовательских целей и не предназначен для использования в диагностике.
6. Открывайте пробирку аккуратно, чтобы не пораниться алюминиевым колпачком.

### Ссылки

- 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)

### Контактная информация

FUJIFILM Wako Chemicals U.S.A Corp. ([www.wakopyrostar.com](http://www.wakopyrostar.com))

1600 Bellwood Road North Chesterfield, VA 23237

Toll Free: 800-992-9256

Tel: 804-714-1919/ 804-672-4655

Fax: 804-271-7791

Email: [wkuspyrostarinfo@fujifilm.com](mailto:wkuspyrostarinfo@fujifilm.com)

296-81001 SLP-HS Single Reagent Set II

<https://www.wakopyrostar.com/brands/wako/product/slp-hs-single-reagent-set/>



030-09903 Curdlan ( $\beta$ -1,3 glucan)

<https://labchem-wako.fujifilm.com/us/product/detail/W01W0103-0990.html>

