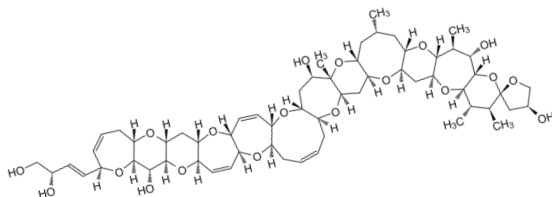


# Ciguatoxin1B ELISA Kit



## “CTX-ELISA™1B” Operation Manual

(Ver.2)

CSI, Code No. 8100

Wako, Code No. 382-14341

This kit contains sufficient reagents for 2 x 96 determinations.

Code	Components	Quantity
8111	Plate Wash Buffer x20 conc, <b>W-1</b>	1 x 50 mL
8112	STD/Sample Diluent, <b>D-1</b>	1 x 50 mL
8113	Anti-CTX1B-ALP Diluent, <b>D-2</b>	1 x 50 mL
8114	ALP Substrate Solution (pNPP), <b>R-1</b>	1 x 50 mL
8115	ELISA Assay Plate CTX1B	2 x 96 well
8116	Anti-CTX1B-ALP	1 x 250 µL
8117	CTX-1B STD 5 ng/mL <sup>*1</sup>	1 x 100 µL
--	Adhesive plastic sheet	6 sheet
--	Operation manual	1

Storage: Keep in the refrigerator (2~8°C) promptly upon receipt, or quickly freeze at below -30°C if dose not use immediately.

<sup>\*1</sup>The standard solution of Ciguatoxin1B “**CTX1B STD 5 ng/ml**” was prepared using synthetic CTX1B chemically synthesized by M. Hirama et al. The concentration of CTX1B in the standard was calibrated using a standard curve based on ELISA measurements of natural CTX1B that was quantified by T. Kato and T. Yasumoto. Standard curves of natural and synthetic CTX1B are provided at the end of this manual.

\* Please read this operation manual thoroughly and check the attached reagents match the above accessory list before use.

**RESEARCH USE ONLY, NOT FOR FOOD INSPECTION AND CLINICAL DIAGNOSTIC USE.**

**Manufacture:** Cell Science Inc. (CSI); 82-16 Imozawa-Gongenmoriyama, Aoba-ku, sendai, 989-3212, JAPAN

**Supplier:** FUJIFILM Wako Pure Chemical Co.; 1-2 Doshomachi 3-Chome, Chuo-ku, Osaka 540-6605, JAPAN



[www.cellscience.co.jp](http://www.cellscience.co.jp)

## Table of Contents

1. INTRODUCTION .....	3
2. PRINCIPLE OF THE ASSAY .....	3
3. PRECAUTIONS .....	4
4. STORAGE CONDITIONS .....	4
5. OTHER SUPPLIES REQUIRED .....	4
6. REAGENTS PREPARATION .....	5
7. PREPARATION OF TEST SAMPLE .....	6
7-1. Fish flesh extracts	
7-2. Blood preparation	
8. ASSAY PROCEDURE .....	7
8-1. Colorimetric assay	
8-2. Highly sensitive fluorometric assay	
9. CALCURATION OF RESULTS .....	8
10. TECHNICAL HINTS .....	9
11. REFERENCE .....	9
12. COMPARISION BETWEEN THE CALIBRATION CURVES OF NATURAL AND SYNTHETIC CTX1B .....	11
13. TYPICAL STANDARD CURVES FOR COLORIMETRIC AND FLUOROMETRIC ASSAY .....	11
14. PERFORMANCE CHARACTERISTICS .....	11

Abbreviations used in this manual.

Alkaline phosphatase: ALP, Ciguatoxin: CTX, Enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA

**RESEARCH USE ONLY, NOT FOR FOOD INSPECTION AND CLINICAL DIAGNOSTIC USE.**

**Manufacture:** Cell Science Inc. (CSI); 82-16 Imozawa-Gongenmoriyama, Aoba-ku, sendai, 989-3212, JAPAN

**Supplier:** FUJIFILM Wako Pure Chemical Co.; 1-2 Doshomachi 3-Chome, Chuo-ku, Osaka 540-6605, JAPAN



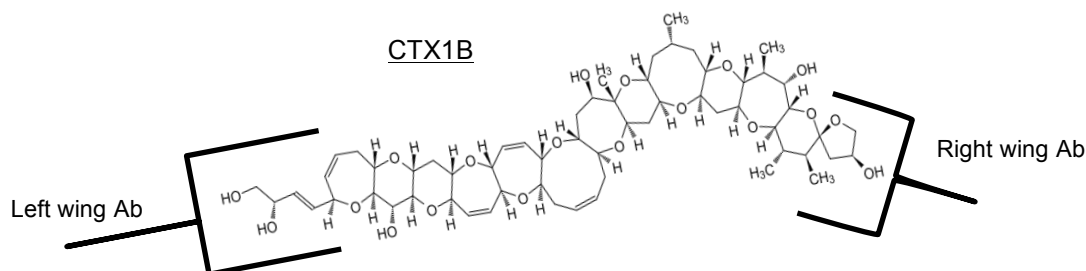
[www.cellscience.co.jp](http://www.cellscience.co.jp)

## 1. INTRODUCTION

In areas surrounded by subtropical and tropical coral reefs, more than 50,000 people in a year suffer from Ciguatera food poisoning (CFP). This CFP had been reported from Great Navigation Age of the 16th from the 17th century, but the cause of it was unknown until late years. But the causative organism, a species of "Dinoflagellate Gambierdiscus Toxicus", was elucidated by Dr. Yasumoto at 1977 year. Afterwards, various studies of the ciguatera seafood poisoning, so called Ciguatoxins (CTXs), were performed by many researchers, and the result more than 20 congeners toxins were discovered all over the world.

Recently, Dr. Hirama and coworkers of Tohoku University in Japan chemically synthesized four congeners of CTX (CTX3C, CTX1B, 51-hydroxy-CTX3C, and 54-deoxy-CTX1B), which are mainly present in the Pacific Ocean. Subsequently, using synthetic hapten-KLH conjugates as antigens, Dr. Tsumuraya produced several kinds of monoclonal antibodies (mAb) that strongly bind to the right side and the left side of CTX molecules, and they successfully developed a highly sensitive immunochemical detection method (SANDWICH ELISA).

Based on these researches, a new ELISA kit "CTX-ELISA™1B" that detectable CTX1B and 54-deoxyCTX1B at the quantitative range from 0.2 to 0.0003 ppb was developed, and commercialized as a first product in the world. Since the detection sensitivity is much superior to the FDA guidance level of 0.01 ppb, these kits will be useful not only for prevention of CFP but also for the epidemiological and physiological studies.



## 2. PRINCIPLE OF THE ASSAY

The "CTX-ELISA™1B" kit (Code number: 8100) is an *in vitro* enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative measurement of ciguatoxin1B (CTX1B) and 54-deoxyCTX1B in fish flesh, serum, plasma, etc. This kit contains sufficient reagents for 2 x 96 determinations.

### Operation flow

1. Prepare **washing buffer**, **test sample** and **CTX1B standard solution** as directed.
- ↓
2. Add 100  $\mu$ L of **test sample**, **CTX1B standard solution**, and **D-1** to each well.  
Incubate for 30 min at 37°C.
- ↓
3. Aspirate and wash 3 times with 200  $\mu$ L/well of washing buffer.
- ↓

**RESEARCH USE ONLY, NOT FOR FOOD INSPECTION AND CLINICAL DIAGNOSTIC USE.**

**Manufacture:** Cell Science Inc. (CSI); 82-16 Imozawa-Gongenmoriyama, Aoba-ku, sendai, 989-3212, JAPAN  
**Supplier:** FUJIFILM Wako Pure Chemical Co.; 1-2 Doshomachi 3-Chome, Chuo-ku, Osaka 540-6605, JAPAN



[www.cellscience.co.jp](http://www.cellscience.co.jp)

4. Make **anti-CTX1B-ALP solution** as directed.
- ↓
5. Add 100  $\mu$ L of **anti-CTX1B-ALP solution** to each well and Incubate for 30 min at 37°C.
- ↓
6. Aspirate and wash 3 times with 200  $\mu$ L/well of washing buffer.
- ↓
7. Add 100~200  $\mu$ L of **R-1** or a commercially available ALP fluorescent substrate solution to each well and incubate for 30 to 45 min at 37°C.
- ↓
8. Measure  $A_{405}$  and  $A_{490}$  (or FI using a fluorescence micro-plate reader).

### 3. PRECAUTIONS

- **RESEARCH USE ONLY, NOT FOR FOOD INSPECTION AND CLINICAL DIAGNOSTIC USE.**
- Expiration date stored in the refrigerator (4-8°C) is shown side on the box. If dose not use immediately, quickly freeze at below -30°C promptly upon receipt, and should be used within 6 months. After thawing the Kit, keep it in refrigerator and use within 4 months. Avoid repeated freezing and thawing.
- Detection kit is restricted only to the investigation of CTX1B and 54-deoxy CTX1B and can't detect CTX3C congeners.
- Do not expose reagents to excessive heat or light during storage and incubation.
- The reagents **W-1**, **D-1** and **D-2** contain surfactant, therefore strong stirring will generate persistent foam which is interfere with measurement, please stir slowly and gently.
- Reagents may contain antibiotics and antiseptics. Wear gloves while running the assay to avoid contact with sample and reagents. Please follow the appropriate disposal procedure established in each country or region.

### 4. STORAGE CONDITIONS

\* Storage conditions for each part after opening are as follows, please observe this condition

Parts	Store condition
ELISA Assay Plate CTX-1B	Cool (2~8°C)
Anti-CTX1B-ALP, 250 $\mu$ l/vial	Cool (2~8°C)
*1 CTX1B STD 5ng/mL, 100 $\mu$ l/vial	Cool (2~8°C)
Plate Wash Buffer x20 Conc. <b>W-1</b>	Cool or Room temp.
STD/Sample diluent, <b>D-1</b>	Cool or Room temp.
Anti-CTX1B-ALP diluent, <b>D-2</b>	Cool or Room temp.
ALP Substrate Solution, <b>R-1</b> (pNPP)	Cool (2~8°C)
Adhesive plastic sheet	Room temp.

### 5. OTHER SUPPLIES REQUIRED

- Micro-plate reader capable of measuring absorbance (A) at 405 nm and 490 nm. If a 490nm filter is not available, measurement at only  $A_{405}$  may be useful.

**RESEARCH USE ONLY, NOT FOR FOOD INSPECTION AND CLINICAL DIAGNOSTIC USE.**

**Manufacture:** Cell Science Inc. (CSI); 82-16 Imozawa-Gongenmoriyama, Aoba-ku, sendai, 989-3212, JAPAN

**Supplier:** FUJIFILM Wako Pure Chemical Co.; 1-2 Doshomachi 3-Chome, Chuo-ku, Osaka 540-6605, JAPAN



[www.cellscience.co.jp](http://www.cellscience.co.jp)

- Multichannel 6 or 12 channel dispenser with disposable plastic tips to deliver 100-200  $\mu\text{L}$ .
- Single channel precision pipettes with disposable tip to dispense 10-1,000  $\mu\text{L}$ .
- Glass test tubes or vials for preparing CTX1B standard solutions and test sample solutions.
- Glass or plastic 1 liter bottle for preparing washing buffer.
- Disposable reagent reservoir tray to dispense washing buffer, Anti-CTX1B-ALP solution, and **R-1** with Multichannel Dispenser
- Ultrapure water.
- Acetone, Chemical grade, for extract CTX1B from fish flesh.
- Dimethyl sulfoxide (DMSO), chemical grade, for preparing the sample solution.
- Automated microplate washer, if available.
- Linear or logarithmic graph paper, or a computer with statistical analysis software for ELISA data.
- The following additional reagents and equipment are required for more sensitive assays.  
“AttoPhos<sup>®</sup>AP Fluorescence Substrate System; Cat. #S1000, Promega, Fitchburg, WI, USA”  
or “QuantiFluo<sup>™</sup> Alkaline Phosphatase Assay Kit; Cat. #QFAP-100, Bioassay Systems, Hayward, CA, USA” as fluorescent substrate, and Fluorescent Micro-plate Reader.

## 6. REAGENTS PREPARATION

\*Bring all reagents to room temperature before use.

### ① Washing buffer

Transfer the entire contents of **W-1** (50 mL) to the 1 L bottle. Dilute **W-1** to a final volume of 1 L with ultrapure water and mix thoroughly.

\*The diluted washing buffer solution must be kept at room temperature before use.

### ② Anti-CTX1B-ALP solution

\*Do not prepare more diluted “anti-CTX1B-ALP” solution than necessary.

\*Use 15 mL plastic test tube to prepare the solution.

- Dilute “**anti-CTX1B-ALP**” with **D-2** as indicated below just before use and use the solution as quickly as possible. The remaining “**anti-CTX1B-ALP**” should be stored in a refrigerator.
- **Colorimetric assay.** Dilute 100 fold
- **Fluorometric assay.** Dilute 200~400 fold

### ③ CTX1B standard solution

Pipette 960  $\mu\text{L}$  of **D-1** into one glass test tube or vial and 500  $\mu\text{L}$  of **D-1** into 7 glass test tubes or glass vials. Remove 40  $\mu\text{L}$  of “**CTX1B STD 5 ng/ml**” and add to the first tube containing 960  $\mu\text{L}$  of **D-1** to

**RESEARCH USE ONLY, NOT FOR FOOD INSPECTION AND CLINICAL DIAGNOSTIC USE.**

**Manufacture:** Cell Science Inc. (CSI); 82-16 Imozawa-Gongenmoriyama, Aoba-ku, sendai, 989-3212, JAPAN

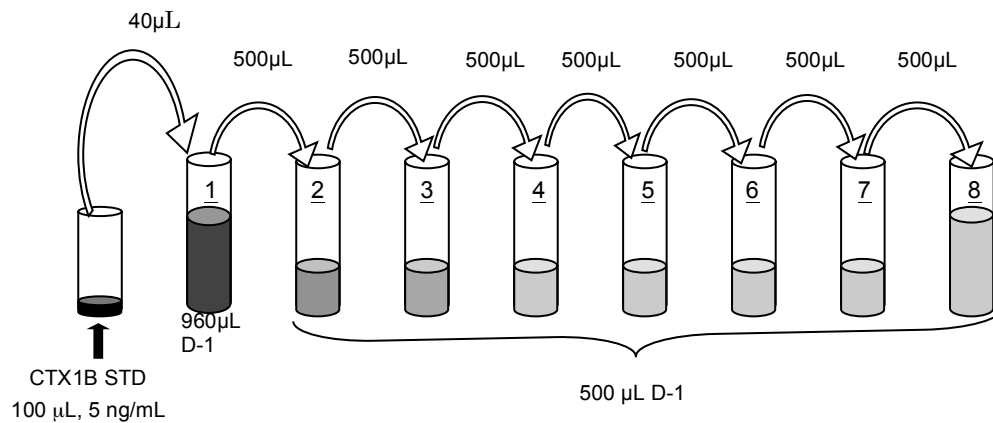
**Supplier:** FUJIFILM Wako Pure Chemical Co.; 1-2 Doshomachi 3-Chome, Chuo-ku, Osaka 540-6605, JAPAN



[www.cellscience.co.jp](http://www.cellscience.co.jp)

make a 200 pg/mL solution of CTX1B STD. Transfer half (500  $\mu$ L) of this solution into the second tube and mix well before the next transfer. Next, 200~1.5 pg/mL standard solutions are prepared by serial 2-fold dilutions. These diluted solutions should be used within 30 minutes of preparation. The remaining **D-1** can be used as the zero standard (0 pg/mL).

The rest of “**CTX1B STD 5 ng/ml**” should be kept in refrigerator.



Vial No.	1	2	3	4	5	6	7	8
Conc. pg/mL	200	100	50	25	12.5	6.25	3.12	1.56

## 7. PREPARATION OF TEST SAMPLE

### 7-1. Fish flesh extracts

\*This is a proposed method and users may develop a better extraction procedure.

- ① Transfer 1 g of fish flesh into a glass test tube, add 5 mL of acetone, then mince finely using an ultra-sonic vibrator, glass homogenizer, etc.
- ② Centrifuge at 20,000xg for 10 min at 4°C, collect the supernatant using a pipette, transfer to an evaporation glass tube, then remove the acetone and water by evaporation in a vacuum or by air-blow drying.
- ③ Add 1 mL of DMSO to the residue and dissolve by stirring.
- ④ Centrifuge and collect the supernatant into a glass test tube or vial and store in a refrigerator as a test sample until use.
- ⑤ This DMSO extract should be diluted more than 20-fold with **D-1** just before the assay.

### 7-2. Blood preparation

\* Wear protective gloves, mask and eyeglasses when handling human blood.

- ① Collect 2 to 5 mL of blood without anti-coagulant from a patient or a fish, place in a glass centrifuge tube, and let it stand overnight in a refrigerator.
- ② Centrifuge at 1,500xg for 10 minutes at room temperature, transfer the whole supernatant (serum

**RESEARCH USE ONLY, NOT FOR FOOD INSPECTION AND CLINICAL DIAGNOSTIC USE.**

**Manufacture:** Cell Science Inc. (CSI); 82-16 Imozawa-Gongenmoriyama, Aoba-ku, sendai, 989-3212, JAPAN

**Supplier:** FUJIFILM Wako Pure Chemical Co.; 1-2 Doshomachi 3-Chome, Chuo-ku, Osaka 540-6605, JAPAN

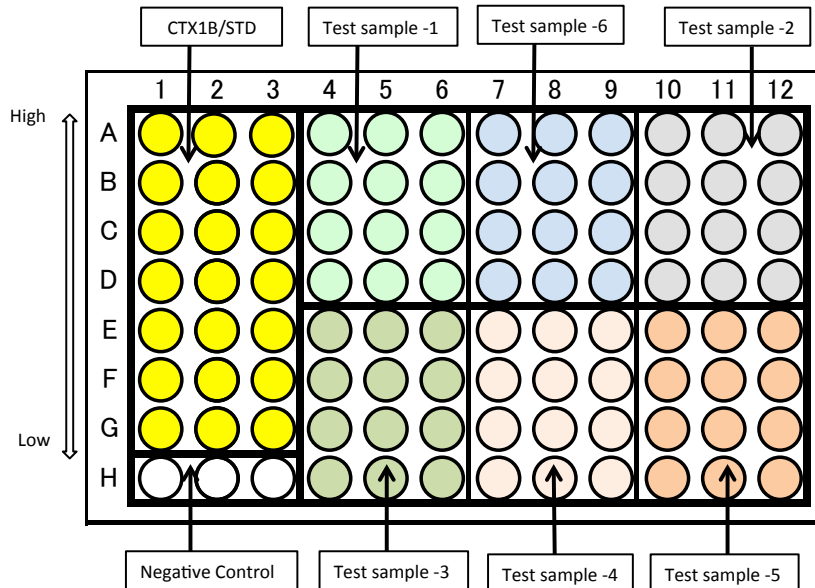


[www.cellscience.co.jp](http://www.cellscience.co.jp)

fraction) into a new glass tube, and use it as a test sample.

## 8. ASSAY PROCEDURE

- \* Warm all reagents at room temperature just before use.
- \* It is recommended that 3 wells be used to measure each test sample, standard solution and zero standard.
- \* Be careful not to disconnect the strip-wells from the microplate frame when removing the adhesive sheet and discard the liquid in the well.



### 8-1. Colorimetric assay

- ① Prepare **Washing Buffer**, **CTX1B standard solution** and **Test samples** as described section 6 and 7.
- ② Take out the ELISA Assay Plate from the aluminum pouch, and remove excess strip-wells from the micro-plate frame, then return them into the aluminum pouch and reseal it, and store in the refrigerator.
- ③ Add 100  $\mu$ L of **CTX1B standard solution**, test sample and **D-1** as zero standard, in each defined well. It is recommended to use 3 wells for each concentration of standard solution and test sample. See the figure below.
- ④ Cover with the adhesive plastic sheet provided, and incubate for 30 minutes at room temperature or in 37°C incubator.
- ⑤ Remove the adhesive plastic sheet carefully, and discard the buffer in all wells by aspirating or decanting.

**RESEARCH USE ONLY, NOT FOR FOOD INSPECTION AND CLINICAL DIAGNOSTIC USE.**

**Manufacture:** Cell Science Inc. (CSI); 82-16 Imozawa-Gongenmoriyama, Aoba-ku, sendai, 989-3212, JAPAN

**Supplier:** FUJIFILM Wako Pure Chemical Co.; 1-2 Doshomachi 3-Chome, Chuo-ku, Osaka 540-6605, JAPAN



[www.cellscience.co.jp](http://www.cellscience.co.jp)

- ⑥ Plate washing:
  - a. Add 200  $\mu\text{L}$  of washing buffer in each well using multichannel dispenser.
  - b. Wash all wells by shaking with plate mixer.
  - c. Discard the buffer in all wells by aspirating or decanting.
  - d. Turn over the plate on a clean paper towel and tap the plate to blot the remaining buffer.
  - e. Repeat the above procedures three times.
- ⑦ Add 100  $\mu\text{L}$  of diluted **Anti-CTX1B-ALP** solution into each well using multichannel dispenser, cover with adhesive plastic sheet, and incubate for 30 minutes at room temperature or 37°C.
- ⑧ Repeat the above washing procedure ⑥
- ⑨ Add 100-200  $\mu\text{L}$  of **R-1** in each well using multichannel dispenser, and incubate for 30 to 45 minutes at 37°C. \* If air bubbles remain in the wells, erase the bubbles by air blowing or by plate centrifuge, before measurement.
- ⑩ Measure the absorbance (A) of each well at  $\lambda$  405 nm and 490 nm using a micro-plate reader. Subtract  $A_{490}$  from  $A_{405}$  to correct for optical imperfections in the micro-plate. Only  $A_{405}$  is also useful, if  $A_{490}$  is not available.

## 8-2. Highly sensitive fluorometric assay

- ① Follow the above procedures ①~⑧.
- ② Then, add 100  $\mu\text{L}$  of ALP substrate solution written below, and measure the fluorescence intensity (FI).
  - \* Usable fluorescent reagents:
    - “AttoPhos<sup>®</sup> AP Fluorescence Substrate System” Cat. #S1000, Promega;
    - “QuantiFluo<sup>™</sup> Alkaline Phosphatase Assay Kit” Cat. #QFAP-100, Bioassay Systems.
- ③ All assay procedure should be performs according to technical bulletin of each substrate Kit.

## 9. CALCULATION OF RESULTS

Average the absorbance (A) (or the fluorescence intensities (FI)) of the standard solutions, from which subtract the averaged A (or FI) of the zero standard. Plot the corrected A (or FI) on the Y-axis against the concentration (pg/mL) of CTX1B on the X-axis of the graph paper, and draw the best-fit straight line as the standard curve. The concentration of the sample (CTX1B) can be determined from the X-axis by interpolation of A (or FI) on the Y-axis. If the sample was diluted, multiply the obtained interpolated value by the dilution factor to calculate amount of CTX1B in the sample.

If the A (or FI) values of a sample are higher than the highest value of the standard, try again after appropriately diluted with **D-1**.

**RESEARCH USE ONLY, NOT FOR FOOD INSPECTION AND CLINICAL DIAGNOSTIC USE.**

**Manufacture:** Cell Science Inc. (CSI); 82-16 Imozawa-Gongenmoriyama, Aoba-ku, sendai, 989-3212, JAPAN

**Supplier:** FUJIFILM Wako Pure Chemical Co.; 1-2 Doshomachi 3-Chome, Chuo-ku, Osaka 540-6605, JAPAN





The optimal standard curve can be obtained by statistical analysis using computer and the software for ELISA to give the concentration of the sample automatically.

## 10. TECHNICAL HINTS

- Glass vessels should be used in all processes. Do not use plastic test tubes or vials to prepare and to store the CTX1B Standard solution and the test sample. Disposable plastic tip is usable only for short time.
- For dilution of **Anti-CTX1B-ALP**, please use plastic test tube.
- When take out **R-1** solution from the bottle, pour directly into test tube or measuring cylinder without using pipette. It can not be used when the color of the solution shows a strong yellow.
- When adding standard solutions or test samples to the ELISA assay plate, please add in order from the lower concentration to the higher concentration.
- To avoid cross-contamination, pipettes and dispensing pipette tips should be carefully replaced. Separate reservoirs be used for each reagent.
- **CTX1B Standard solution** and **test samples** must be transferred to the plate well within 30 minutes after preparation.
- Use a new adhesive plate cover for every incubation step.
- If the test sample solution contains organic solvents more than 10%, the antigen-antibody reaction is suppressed. Therefore, their concentration should be reduced below 5% by dilution with **D-1**.
- If the test sample solution becomes turbid possibly due to contamination of lipid when diluted with **D-1**, the lipid should be removed by high-speed centrifugation since it might disturb the antigen-antibody reaction.

## 11. REFERENCE

Ciguatera and its off-shoots-Chance encounters en route to a molecular structure. Scheuer, P. J. *Tetrahedron*, **50**, 3 (1994).

Structures and configurations of ciguatoxin from moray eel *Gymnothorax javanicus* and its likely precursor from the dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*. Murata, M., Legrand, A. M., Ishibashi, Y., Fukui, M., Yasumoto, T. *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 4380 (1990).

Marine toxins. Yasumoto, T., Murata, M. *Chem. Rev.* **93**, 1897 (1993).

Structural elucidation of ciguatoxin congeners by fast-atom bombardment tandem mass spectroscopy. Yasumoto, T., Igarashi, T., Legrand, A.-M., Cruchet, P., Chinain, M., Fujita, T., Naoki, H. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 4988 (2000).

The chemistry and biological function of natural marine toxins. Yasumoto, T. *Chem. Rec.* **1**, 228 (2001).

**RESEARCH USE ONLY, NOT FOR FOOD INSPECTION AND CLINICAL DIAGNOSTIC USE.**

**Manufacture:** Cell Science Inc. (CSI); 82-16 Imozawa-Gongenmoriyama, Aoba-ku, sendai, 989-3212, JAPAN

**Supplier:** FUJIFILM Wako Pure Chemical Co.; 1-2 Doshomachi 3-Chome, Chuo-ku, Osaka 540-6605, JAPAN



[www.cellscience.co.jp](http://www.cellscience.co.jp)

Total synthesis of ciguatoxin CTX3C. Hirama, M., Oishi, T., Uehara, H., Inoue, M., Maruyama, M., Oguri, H., Satake, M.  
*Science*, **294**, 1904 (2001).

Synthesis-based approach toward direct sandwich immunoassay for ciguatoxin CTX3C. Oguri, H., Hirama, M., Tsumuraya, T., Fujii, I., Maruyama, M., Uehara, H., Nagumo, Y.  
*J. Am. Chem. Soc.* **125**, 7608 (2003).

Total synthesis of ciguatoxin and 51-hydroxyCTX3C. Inoue, M., Miyazaki, K., Ishihara, Y., Tatami, A., Ohnuma, Y., Kawada, Y., Komano, K., Yamashita, S., Lee, N., Hirama, M.  
*J. Am. Chem. Soc.* **128**, 9352 (2006).

Production of monoclonal antibodies for sandwich immunoassay detection of Pacific ciguatoxins. Tsumuraya, T., Fujii, I., Hirama, M.  
*Toxicon*, **56**, 797 (2010).

Ciguatera incidence and fish toxicity in Okinawa, Japan. Oshiro, N., Yogi, K., Asato, S., Sasaki, T., Tamanaha, K., Hirama, M., Yasumoto, T., Inafuku, Y.  
*Toxicon*, **56**, 656 (2010).

First toxin profile of ciguateric fish in Madeira Arquipelago (Europe). Otero, P., Perez, S., Alfonso, A., Vale, C., Rodriguez, P., Gouveia, N. N., Gouveia, N., Delgado, J., Vale, P., Hirama, M., Ishihara, Y., Molgo, J., Botana, L. M.  
*Anal. Chem.* **82**, 6032 (2010).

Detailed LC-MS/MS analysis of ciguatoxins revealing distinct regional and species characteristics in fish and causative alga from the Pacific. Yogi, K., Oshiro, N., Inafuku, Y., Hirama, M., Yasumoto, T.  
*Anal. Chem.* **83**, 8886 (2011).

Development of a monoclonal antibody against the left wing of ciguatoxin CTX1B: Thiol strategy and detection using a sandwich ELISA. Tsumuraya, T., Takeuchi, K., Yamashita, S., Fujii, I., Hirama, M.  
*Toxicon*, **60**, 348 (2012).

Preparation of anti-ciguatoxin monoclonal antibodies using synthetic haptens: Sandwich ELISA detection of ciguatoxins. Tsumuraya, T., Fujii, I., Hirama, M.  
*J. ACAC.* **97**, 373 (2014).

Practical route to the left wing of CTX1B and total syntheses of CTX1B and 54-deoxyCTX1B. Yamashita, S., Takeuchi, K., Koyama, T., Inoue, M., Hayashi, Y., Hirama, M.  
*Chem. Eur. J.* **21**, 2621 (2015).

Highly Sensitive and Practical Fluorescent Sandwich ELISA for Ciguatoxins. Tsumuraya, T., Sato, T., Hirama, M., Fujii, I.,  
*Anal. Chem.* **90**, 7318 (2018).

**RESEARCH USE ONLY, NOT FOR FOOD INSPECTION AND CLINICAL DIAGNOSTIC USE.**

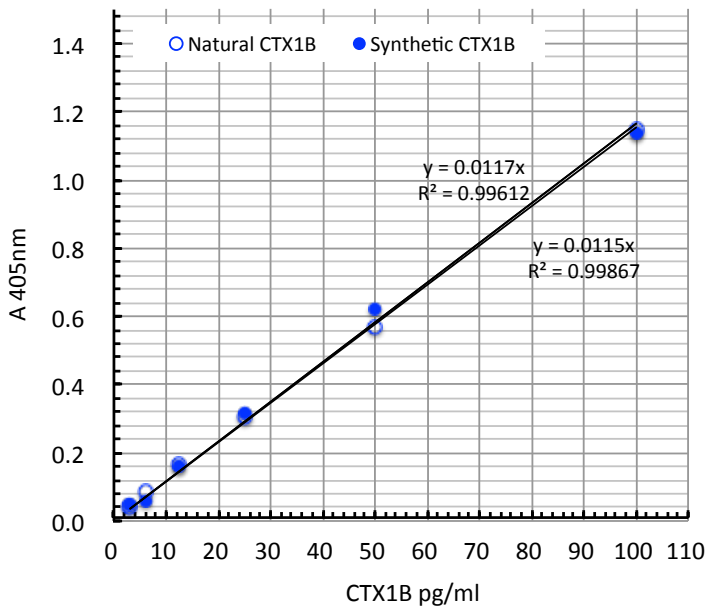
**Manufacture:** Cell Science Inc. (CSI); 82-16 Imozawa-Gongenmoriyama, Aoba-ku, sendai, 989-3212, JAPAN

**Supplier:** FUJIFILM Wako Pure Chemical Co.; 1-2 Doshomachi 3-Chome, Chuo-ku, Osaka 540-6605, JAPAN



[www.cellscience.co.jp](http://www.cellscience.co.jp)

## 12. COMPARISON BETWEEN THE CALIBRATION CURVES OF NATURAL AND SYNTHETIC CTX1B

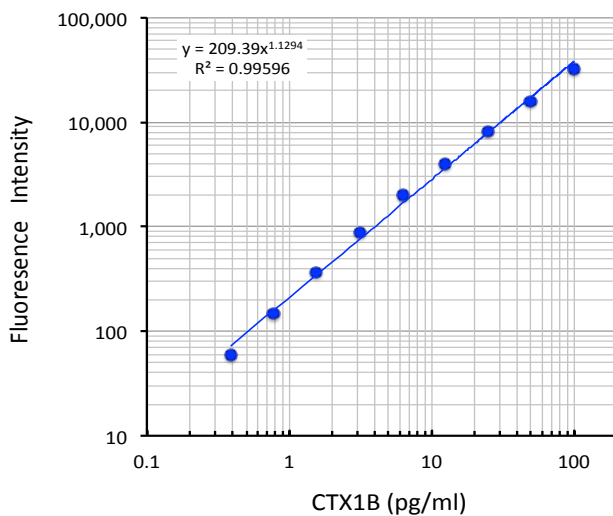


There are no difference in reactivity between the natural and the synthetic CTX1B.

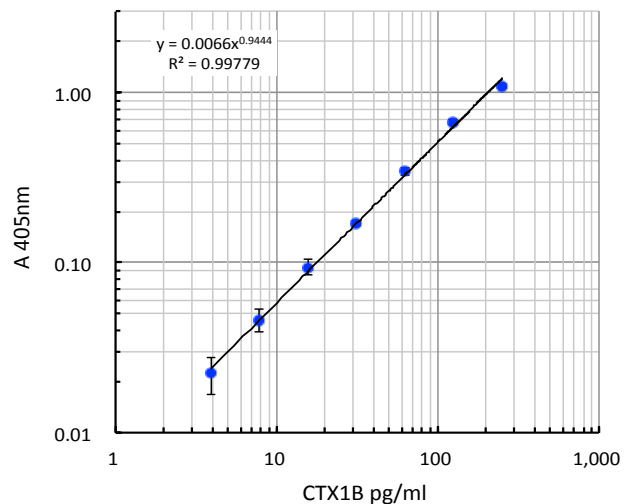
Caution: These data are provided for demonstration only. A standard curve should be generated for each assay.

## 13. TYPICAL STANDARD CURVES FOR COLORIMETRIC AND FLUOROMETRIC ASSAY

Fluorometric assay by "AttoPhos® AP Fluorescence Substrate System"



Colorimetric assay by R-1 (pNPP)



1. Quantitative limit of Colorimetric assay and Fluorometric procedures are about 3 pg/ml (0.003 ppb) and 0.3 pg/ml (0.0003 ppb), respectively.
2. The Fluorometric assay was 10 times higher than the Colorimetric method, and its performance greatly exceeded the FDA guidance of 0.01ppb.

## 14. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

**Detection limit:** <1 pg/ml by colorimetric assay.

Detection limits were determined by repeated measurements of negative control (0 pg) and standards.

**RESEARCH USE ONLY, NOT FOR FOOD INSPECTION AND CLINICAL DIAGNOSTIC USE.**

**Manufacture:** Cell Science Inc. (CSI); 82-16 Imozawa-Gongenmoriyama, Aoba-ku, sendai, 989-3212, JAPAN

**Supplier:** FUJIFILM Wako Pure Chemical Co.; 1-2 Doshomachi 3-Chome, Chuo-ku, Osaka 540-6605, JAPAN



[www.cellscience.co.jp](http://www.cellscience.co.jp)

**Assay Range:** 3 to 100 pg /mL by Colorimetric assay, 0.3 to 200 pg/mL by Fluorometric assay.

**Specificity:** This ELISA kit can detect ciguatoxin1B and 54-deoxyCTX1B, but not cross-react with other ciguatoxins.

**Reproducibility:** CV value <15%

The coefficient of variation (CV%) of the measured value when repeatedly measuring standard antigens of three concentrations.

**Calibration of "CTX1B STD 5 ng/ml":** Concentration of CTX1B in "CTX1B STD 5 ng/ml" preparation was calibrated using natural CTX1B whose concentration was determined by T. Kato and T. Yasumoto et al. as a standard.

\* "CTEX-ELISA™" is a trademark of Cell Science Inc., JAPAN. "AttoPhos® AP" is a registered trademark of Promega, USA. "QuantiFluo™" is a trademark of Bioassay Systems, USA.

**RESEARCH USE ONLY, NOT FOR FOOD INSPECTION AND CLINICAL DIAGNOSTIC USE.**

**Manufacture:** Cell Science Inc. (CSI); 82-16 Imozawa-Gongenmoriyama, Aoba-ku, sendai, 989-3212, JAPAN

**Supplier:** FUJIFILM Wako Pure Chemical Co.; 1-2 Doshomachi 3-Chome, Chuo-ku, Osaka 540-6605, JAPAN



[www.cellscience.co.jp](http://www.cellscience.co.jp)

---

**RESEARCH USE ONLY, NOT FOR FOOD INSPECTION AND CLINICAL DIAGNOSTIC USE.**

**Manufacture:** Cell Science Inc. (CSI); 82-16 Imozawa-Gongenmoriyama, Aoba-ku, sendai, 989-3212, JAPAN

**Supplier:** FUJIFILM Wako Pure Chemical Co.; 1-2 Doshomachi 3-Chome, Chuo-ku, Osaka 540-6605, JAPAN



[www.cellscience.co.jp](http://www.cellscience.co.jp)

# 日本語マニュアル

## 「CTX-ELISA™1B」操作説明書

(Ver. 2)

CSI 品番 : 8100

Wako 品番 : 382-14341

本キットには 2 × 96 検体の検査に十分な以下の試薬類が含まれます。

品番	試薬/材料 (表記名称)	数量
8111	× 20 プレート洗浄液, W-1 (Plate Wash Buffer x20 Conc., W-1)	1 × 50 mL
8112	試料希釈液, D-1 (STD/Sample Diluent, D-1)	1 × 50 mL
8113	標識抗体希釈液, D-2 (Anti-CTX1B-ALP Diluent, D-2)	1 × 50 mL
8114	比色測定用 ALP 基質溶液, R-1 (ALP Substrate Solution, R-1 (pNPP))	1 × 50 mL
8115	抗体固相化マイクロプレート (ELISA Assay Plate, CTX1B)	2 枚
8116	アルカリフォスファターゼ標識抗体 (Anti-CTX1B-ALP)	1 × 250 μL
8117	CTX1B 標準抗原 <sup>注1</sup> 5 ng/mL (CTX-1B STD 5 ng/mL, 100 μL)	1 × 100 μL
--	粘着マイクロプレートシール	6 枚
--	簡易説明書 (英文)	1 冊

保存条件: 製品受け取り後できるだけ速やかに 2~8°C に保存、直ちに使用しない場合はマイナス 30°C 以下で凍結保存してください。詳しくはセクション 3. 使用上の注意をご覧ください。

<sup>注1</sup> CTX1B 標準抗原には東北大学名誉教授 平間正博博士から提供された合成シガトキシン 1B を使用しています。この標準抗原の濃度は、東北大学名誉教授 安元健博士より提供された天然型シガテラ毒 CTX1B をスタンダードとして、本 ELISA キットで測定した標準曲線を用いて検定しております。

合成及び天然型 CTX1B の検量線の比較試験は本マニュアルの最後に記載しました。

\* ご使用前にこの操作マニュアルを良く読み、付属の試薬類が上記付属品リストと一致していることをご確認ください。

**RESEARCH USE ONLY, NOT FOR FOOD INSPECTION AND CLINICAL DIAGNOSTIC USE.**

Manufacture: Cell Science Inc. (CSI); 82-16 Imozawa-Gongenmoriyama, Aoba-ku, sendai, 989-3212, JAPAN

Supplier: FUJIFILM Wako Pure Chemical Co.; 1-2 Doshomachi 3-Chome, Chuo-ku, Osaka 540-6605, JAPAN



[www.cellscience.co.jp](http://www.cellscience.co.jp)

## 目 次

1. はじめに	16
2. 測定方法の概要	16
3. 使用上の注意	17
4. キット付属品と保存条件	17
5. その他必要な試薬・機材	18
6. 試薬類の調製方法	18
7. 検査試料の調製	19
8. 測定手順	20
9. 測定結果から含有量の算出	21
10. 技術的ヒント	22
11. 参考文献	23
12. 合成及び天然型 CTX1B の検量線比較	24
13. 比色法と蛍光測定法の代表的な検量線	24
14. 品質規格	25

\* 本説明書で使用する省略語

アルカリフォスファターゼ：ALP、シガテラ毒：CTX、酵素結合免疫測定法 (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)：ELISA

**RESEARCH USE ONLY, NOT FOR FOOD INSPECTION AND CLINICAL DIAGNOSTIC USE.**

**Manufacture:** Cell Science Inc. (CSI); 82-16 Imozawa-Gongenmoriyama, Aoba-ku, sendai, 989-3212, JAPAN

**Supplier:** FUJIFILM Wako Pure Chemical Co.; 1-2 Doshomachi 3-Chome, Chuo-ku, Osaka 540-6605, JAPAN



[www.cellscience.co.jp](http://www.cellscience.co.jp)

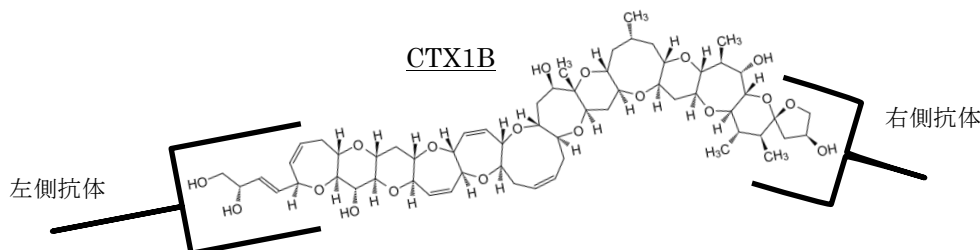
## 1. はじめに

亜熱帯や熱帯の珊瑚礁に囲まれた地域では、一年間に5万人以上の人々が「シガテラ」と呼ばれる、毒化した魚介類による食中毒に苦しんでいます。この中毒は16~17世紀の大航海時代から報告されていましたが、その原因物質は最近まで特定されていませんでした。

しかし、1976年にその原因となる毒素を生産するのは、渦鞭毛藻(Dinoflagellate) *Gambierdiscus toxicus*であり、食物連鎖により藻食魚から肉食魚へと蓄積されることが東北大学の安元健博士により明らかにされました。更に、1989年に安元健博士らは、4トンの毒ウツボから0.35 mgのシガトキシン (CTX1B) を単離し、化学構造を決定しました。その後、安元博士やLewis博士ら多くの研究者によって、20種以上のシガトキシン同族体 (CTXs) の構造が決定されています。

近年、東北大学の平間正博博士のグループが、主に太平洋に分布する4種類のCTX類 (CTX3C, CTX1B, 51-hydroxyCTX3C, 54-deoxyCTX1B) の化学合成に挑戦し、その人工合成に成功しました。そして彼の共同研究者である大阪府立大学教授 円谷健博士は合成したCTX類の部分構造を抗原として数種類の単クローン抗体 (mAb) の製造に成功しました。

これらの研究に基づいて、0.2~0.0003ppbの広い濃度範囲でCTX1Bと54-deoxyCTX1Bを検出できる新しいELISAキット「CTX-ELISA™1B」を開発し、世界で初めて製品化致しました。本キットの検出感度はFDAが定めた管理基準である“0.01ppb”よりはるかに優れているため、シガテラ食中毒の予防だけでなく、疫学および生理学的研究にも有用です。



## 2. 測定方法の概要

この検査キットはCTX1Bの左側と右側に結合するモノクローナル抗体2種類を用いた定量的酵素結合免疫測定法 (ELISA) を利用しています。測定操作概要は以下のとおりです。

- ① マイクロプレート表面に結合させた左側の抗体で目的の抗原を捕獲します。
- ② 捕獲した抗原にALPを標識した右側抗体を結合させます。
- ③ ALPの発色基質または蛍光基質を加え、抗原の量に比例して結合したALP標識右側抗体で基質を発色物質または蛍光物質に変換します。
- ④ 発色または蛍光の強度をマイクロプレートリーダーで計測し、数値化します。
- ⑤ 標準抗原で検量線を作成し、測定試料の吸光度または蛍光強度値を元に試料中のCTX1Bの含有量を計算します。

**RESEARCH USE ONLY, NOT FOR FOOD INSPECTION AND CLINICAL DIAGNOSTIC USE.**

**Manufacture:** Cell Science Inc. (CSI); 82-16 Imozawa-Gongenmoriyama, Aoba-ku, sendai, 989-3212, JAPAN

**Supplier:** FUJIFILM Wako Pure Chemical Co.; 1-2 Doshomachi 3-Chome, Chuo-ku, Osaka 540-6605, JAPAN



[www.cellscience.co.jp](http://www.cellscience.co.jp)



### 操作手順

1. 洗浄液、検査試料を指示通りに準備する
- ↓
2. CTX1B 標準液、検査試料、ブランク用の D-1 を抗体固相化マイクロプレートに 100  $\mu$ L ずつ分注
- ↓
- 37 $^{\circ}$ C または室温で 30 分インキュベート
- ↓
3. プレートの液を捨て、各ウエルを 200  $\mu$ L のプレート洗浄液で 3 回洗浄
- ↓
4. ALP 標識抗体溶液を指示通りに希釈し、各ウエルに 100  $\mu$ L ずつ加える
- ↓
- 37 $^{\circ}$ C または室温で 30 分インキュベート
- ↓
5. プレートの液を捨て、各ウエルを 200  $\mu$ L のプレート洗浄液で 3 回洗浄
- ↓
6. R-1 を各ウエルに 200  $\mu$ L ずつ加える  
(高感度蛍光検出の場合は各基質キットの説明書に従って下さい)
- ↓
- 37 $^{\circ}$ C で 30~45 分インキュベート
- ↓
7. 測定波長 405nm、対照波長 490nm にセットしマイクロプレートリーダーで吸光度を測定  
(蛍光測定法の場合は使用する基質に合わせて蛍光波長と励起波長をセットして下さい)

### 3. 使用上の注意

- \* 本品は研究用試薬です、食品の検査及び臨床検査には使用できません。
- \* 本キットを受け取り後はできるだけ速やかに冷蔵庫に入れ、検査キットの箱側面に表示した使用期限までにご使用下さい。直ちにご使用にならない場合は、-30 $^{\circ}$ C 以下で冷凍保存し、6 ヶ月以内にご使用ください。なお解凍した後は冷蔵保存して 4 ヶ月以内にご使用ください。凍結融解の繰り返しは行わないでください。
- \* このキットは CTX1B 及びその同族体の検査専用であり、その他の CTX 類は検出できません。
- \* 本キットに含まれる試薬類を保存する時は強い光を避けて保存条件をお守り下さい。
- \* 本キットの試薬 W-1, D-1, D-2 には界面活性剤が含まれています。強く攪拌すると持続性の泡が発生し測定誤差が大きくなる原因になります、攪拌は緩やかに行って下さい。
- \* それぞれの試薬類には抗菌剤や殺菌剤が含まれています、使用する場合は手袋、マスク、保護衣などを着用して試験試料や試薬類に直接触れない様に注意して下さい。
- \* 試薬類の廃棄は各国や地域、自治体で定められた方法に従って下さい。

### 4. キット付属品の保存条件

- \* 使用前のキットは箱に入れたまま 2 ~ 8  $^{\circ}$ C で冷蔵または -30 $^{\circ}$ C 以下で凍結保管して下さい、開封後は下表の保存条件に従って下さい。

**RESEARCH USE ONLY, NOT FOR FOOD INSPECTION AND CLINICAL DIAGNOSTIC USE.**

**Manufacture:** Cell Science Inc. (CSI); 82-16 Imozawa-Gongenmoriyama, Aoba-ku, sendai, 989-3212, JAPAN

**Supplier:** FUJIFILM Wako Pure Chemical Co.; 1-2 Doshomachi 3-Chome, Chuo-ku, Osaka 540-6605, JAPAN



[www.cellscience.co.jp](http://www.cellscience.co.jp)

試薬/材料（表記名称）	保存条件
x 20 プレート洗浄液, W-1 (Plate Wash Buffer x20 conc. W-1) *	冷蔵/凍結/室温 希釈後は室温保存
試料希釈液, D-1 (STD/Sample Diluent, D-1)	冷蔵/凍結/室温
標識抗体希釈液, D-2 (Anti-CTX1B-ALP Diluent, D-2)	冷蔵/凍結/室温
比色測定用 ALP 基質溶液, R-1 (ALP Substrate Solution, R-1 (pNPP))	冷蔵/凍結
抗体固相化マイクロプレート (ELISA Assay Plate, CTX1B)	冷蔵/再凍結厳禁
アルカリフォスファターゼ標識抗体, (Anti-CTX1B-ALP)	冷蔵/再凍結厳禁
CTX1B 標準抗原 5 ng/mL, (CTX-1B STD 5 ng/mL, 100 µL)	冷蔵/凍結
粘着マイクロプレートシール	室温
簡易説明書（英文）	

\* 「Plate Wash Buffer x20 conc. W-1」は冷蔵または凍結によって濁りを生じますが性能には影響ありません、ご使用前に室温～35℃に加熱してください。

## 5. その他必要な試薬・機材

1. マイクロプレートリーダー：波長 405nm 及び 490nm の 2 波長が設定できる機種、波長 490nm が設定できない場合は 405nm だけで吸光度を測ります。
2. 100～200 µL を分注できる使い捨てチップを使用する 6 または 12 チャンネルのマルチチャンネル分注器、及び 10～1,000 µL を分注する使い捨てチップを使用するマイクロピペット
3. CTX1B 標準液の作成及び検査試料調製用のガラス製試験管またはバイアル
4. 洗浄液作成用のガラス製またはプラスチック製の 1 L 瓶
5. 洗浄液、ALP 標識抗体溶液、R-1 を分注するための使い捨てリザーバー
6. 超純水・精製水
7. 化学グレードのアセトン及びジメチルスルフォキシド (DMSO)
8. 超音波破碎機、ホモジェナイザー等の魚肉粉碎用機材
9. 高速遠心分離機
10. 自動マイクロプレート洗浄装置（無くても良い）
11. マイクロプレートミキサー
12. 対数または標準グラフ用紙または ELISA 用ソフトウェアの付いたコンピューター
13. 高感度蛍光測定の場合、以下の ALP 蛍光基質キット及び蛍光マイクロプレートリーダーが必要です。
  - ① AttoPhos<sup>®</sup> AP Fluorescence Substrate System; Cat. #S1000, Promega, WI USA
  - ② QuantiFluo<sup>™</sup> Alkaline Phosphatase Assay Kit; Cat. #QFAP-100, Bioassay Systems, CA USA

## 6. 試薬類の調製方法

\* 全ての試薬類は使用前に室温に戻して下さい。

\* 標準抗原の作成や検査試料の希釈系列を作成する場合、ガラス製の試験管またはバイアルの使用を

**RESEARCH USE ONLY, NOT FOR FOOD INSPECTION AND CLINICAL DIAGNOSTIC USE.**

Manufacture: Cell Science Inc. (CSI); 82-16 Imozawa-Gongenmoriyama, Aoba-ku, sendai, 989-3212, JAPAN

Supplier: FUJIFILM Wako Pure Chemical Co.; 1-2 Doshomachi 3-Chome, Chuo-ku, Osaka 540-6605, JAPAN



[www.cellscience.co.jp](http://www.cellscience.co.jp)

推奨します。プラスチック容器はCTXの濃度を低下させる可能性があります。希釈した試料や標準抗原をマイクロプレートに注入するための使い捨てプラスチックチップは、短時間に限り使用出来ます。

- ① プレート洗浄液： W-1 全量（50 mL）を 1 L の蓋付き容器に入れ、精製水 950 mL に加えて全量 1 L として静かに混合し、容器の蓋をして室温保存して下さい。

\* 保存中に目視できる濁りが発生した場合は使用しないで下さい。

- ② ALP 標識抗体溶液：

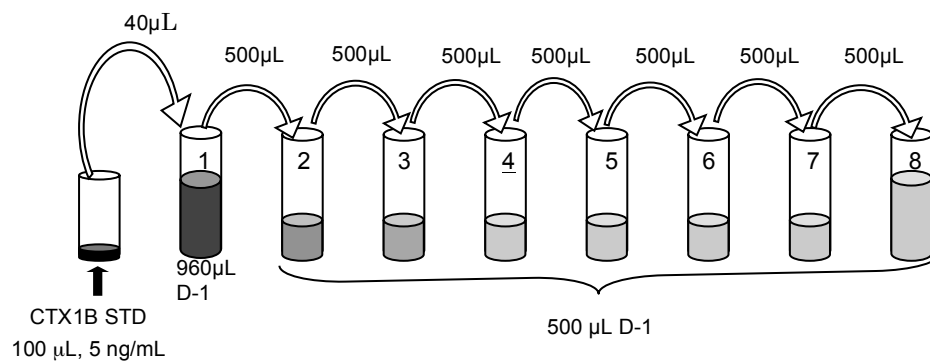
\* 15 mL のプラスチック試験管を使い、抗体固相化マイクロプレート 1 枚当たり 11 mL を目安として、必要とする最小量を製造して下さい。過剰に作製しないこと。

使用直前に、ALP 標識抗体を D-2 で下記の濃度に希釈して下さい。なお希釈した標識抗体は保存できません、速やかにご使用下さい。残った ALP 標識抗体は冷蔵庫に保存して下さい。

比色法の場合 1/100, 蛍光測定法の場合 1/200~400

- ③ CTX1B 標準液の調製： 使用直前に行うこと。

洗浄したガラス製試験管またはガラスバイアル瓶を 8 本準備します。D-1 を分注して、960  $\mu$ L を 1 本、500  $\mu$ L を 7 本作成します（図参照）。CTX1B 標準抗原 5 ng/mL をロングタイプのピペットチップを付けたマイクロピペットで正確に 40  $\mu$ L をはかり取り、960  $\mu$ L の D-1 と混合して 200 pg/mL の CTX1B 標準液を作成します。500  $\mu$ L の D-1 を分注したガラス試験管またはバイアル瓶で 1/2 段階希釈を行い、200~1.56 pg/mL の検量線用 CTX1B 標準溶液を作成します。未使用の CTX1B 標準抗原（CTX1B STD 5 ng/mL）は蓋をして冷蔵保管して下さい。



Vial No.	1	2	3	4	5	6	7	8
Conc. pg/mL	200	100	50	25	12.5	6.25	3.12	1.56

## 7. 検査試料の調製

### 7-1. 魚肉抽出液の作成

\* 記載した方法は暫定的な方法です、最適な抽出方法をご検討下さい

- ① 検査する魚肉を切り取り、1 g を秤量して超音波破碎機やホモジェナイザーなどの破碎機で使用する

**RESEARCH USE ONLY, NOT FOR FOOD INSPECTION AND CLINICAL DIAGNOSTIC USE.**

Manufacture: Cell Science Inc. (CSI); 82-16 Imozawa-Gongenmoriyama, Aoba-ku, sendai, 989-3212, JAPAN

Supplier: FUJIFILM Wako Pure Chemical Co.; 1-2 Doshomachi 3-Chome, Chuo-ku, Osaka 540-6605, JAPAN



[www.cellscience.co.jp](http://www.cellscience.co.jp)

るガラス製容器に入れ、5 mL のアセトンを加え良く挽き潰します。

- ② 全量を遠心分離用チューブに入れ 4°C、20,000 x g、10 分間遠心分離して上清液全量を新しいガラス容器に移します。最上部に多量の油成分が有る場合は油成分を避けて下の溶液部分を回収します。
- ③ 減圧濃縮装置または空気吹き込みによってアセトンを除き乾燥します。
- ④ 容器内に残った残渣に 1 mL の DMSO を加え、強く攪拌して残渣を溶解します。
- ⑤ DMSO 溶液をガラス製遠心管に移し 4°C で 20,000 x g、10 分間遠心分離し、上清液を新しいガラス容器に移し検査試料とします。検査試料は測定するまで冷凍保存して下さい。

## 7-2. 血液試料の作成

- \* 保護手袋、マスク、保護眼鏡等を使用し血液に直接触れない様に注意して下さい。
- \* 多量の脂質成分の混入は検査を妨害します。出来るだけ除去して下さい。

- ① 抗凝固剤を使わず血液を 2~5 mL 採取、ガラス製の遠心管に入れ、冷蔵庫に一夜静置します。
- ② 4°C、1,500 x g、10 分間遠心分離して上清液を新しいガラス容器に移し、検査試料とします。

## 8. 測定手順

- \* 全ての試薬材料は使用前に室温に戻して下さい。
- \* 検体、標準液、ネガティブコントロールは各濃度 3 ウェルで試験することを推奨します。
- \* 粘着シールをはがすときやウェル内の液を棄てる時、マイクロプレートの固定枠からストリップウェルが外れないように注意して下さい。

### 8-1. 比色法による測定手順

- ① 洗浄液、CTX1B 標準液、検査試料を作成します。
- ② 抗体固相化マイクロプレートをアルミ袋から取り出し、使用しないストリップウェルをプレート枠から外しアルミ袋に入れて冷蔵保管します。
- ③ 事前に作成した CTX1B 標準液、検査試料、ネガティブコントロール用の D-1 をマイクロプレートの各ウェルに 100  $\mu$ L ずつ分注します。標準液、検査試料は各濃度に 3 ウェルを推奨します、下図参考。
- ④ プレートを攪拌機で攪拌後、付属の粘着シールで蓋をして 37°C または室温で 30 分インキュベートします。
- ⑤ ストリップウェルが枠から外れないように注意して粘着シールを剥がし、全てのウェルから吸引または直接廃棄して除きます。
- ⑥ プレートウェルの洗浄操作
  - a. マルチチャンネル分注器を使い、全てのウェルに 200  $\mu$ L のプレート洗浄液を注入する。
  - b. マイクロプレート攪拌機で攪拌する。
  - c. 洗浄液を吸引除去または直接廃棄する。

**RESEARCH USE ONLY, NOT FOR FOOD INSPECTION AND CLINICAL DIAGNOSTIC USE.**

**Manufacture:** Cell Science Inc. (CSI); 82-16 Imozawa-Gongenmoriyama, Aoba-ku, sendai, 989-3212, JAPAN

**Supplier:** FUJIFILM Wako Pure Chemical Co.; 1-2 Doshomachi 3-Chome, Chuo-ku, Osaka 540-6605, JAPAN

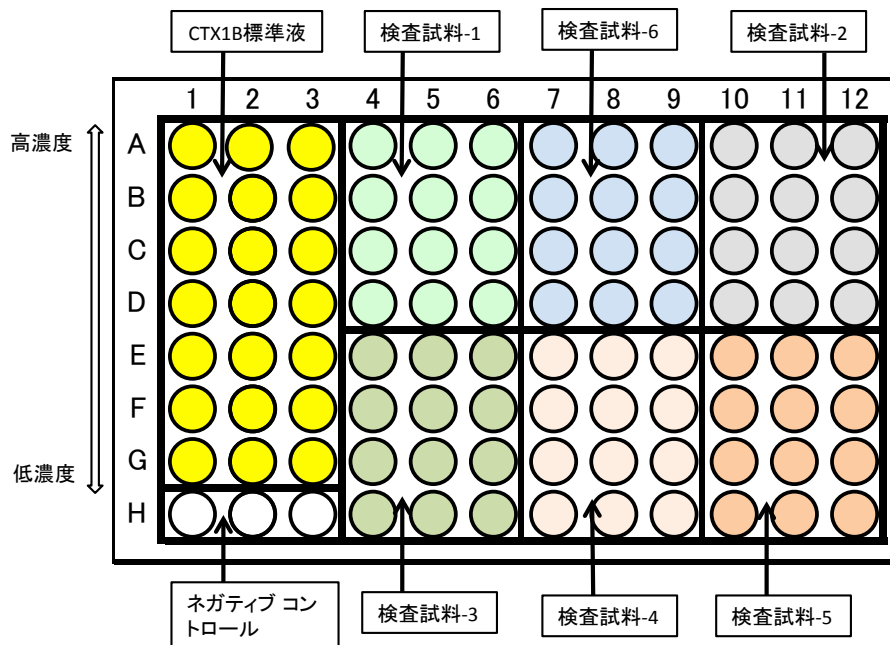


[www.cellscience.co.jp](http://www.cellscience.co.jp)

d. プレートを吸水紙の上に逆に乗せ手のひらに軽く叩き付け、余分な洗浄液を除きます、この際マイクロプレートのストリップウエルが枠から外れないように注意して下さい。

このステップを3回繰り返します。

- ⑦ ALP 標識抗体を D-2 で 1/100 濃度に希釈し、各ウエルに 100  $\mu$ L ずつ加え、攪拌して粘着シールで蓋をして、37°C または室温で 30 分インキュベートします。
- ⑧ ⑥ プレートウエルの洗浄操作を行う。
- ⑨ マルチチャンネル分注器を用いて R-1 を各ウエルに 200  $\mu$ L ずつ加え攪拌し、37°C で 30~45 分インキュベートします。この際、ウエル内に泡が残っている場合はドライヤーで風を吹き付ける、またはプレート遠心分離機で遠心して泡を消して下さい。
- ⑩ マイクロプレートリーダーの測定波長を 405nm、対照波長を 490nm 以上に設定して、30 分または 45 分後に吸光度を測定します。



## 8-2. 蛍光測定法による高感度分析

- ① 比色法による測定手順に従い⑥まで実行します。
- ② ALP 標識抗体を D-2 で 1/200~400 濃度に希釈し、各ウエルに 100  $\mu$ L ずつ加え、攪拌して粘着シートを付け、37°C または室温で 30 分インキュベートします。
- ③ 比色法による測定手順⑥「プレートウエルの洗浄操作」を実施しプレートを洗浄します。
- ④ 市販の ALP 蛍光基質キットを準備し、その使用説明書に従って操作して下さい。

## 9. 測定結果から含有量の算出

各濃度の CTX1B 標準液と希釈した検査試料を測定して得られた 3 ウエルの吸光度（蛍光強度）の平均

**RESEARCH USE ONLY, NOT FOR FOOD INSPECTION AND CLINICAL DIAGNOSTIC USE.**

Manufacture: Cell Science Inc. (CSI); 82-16 Imozawa-Gongenmoriyama, Aoba-ku, sendai, 989-3212, JAPAN

Supplier: FUJIFILM Wako Pure Chemical Co.; 1-2 Doshomachi 3-Chome, Chuo-ku, Osaka 540-6605, JAPAN



[www.cellscience.co.jp](http://www.cellscience.co.jp)

値を計算し、その計算値からネガティブコントロールの平均吸光度（蛍光強度）を差し引き、正味の吸光度（蛍光強度）を算出します。

吸光度（蛍光強度）を Y 軸に、CTX1B 濃度を X 軸として、CTX1B 標準液の濃度別吸光度（蛍光強度）をグラフ用紙上にプロットして各ポイントに最適な標準曲線を作成します。検査試料中の含有量は、検査試料の吸光度（蛍光強度）から標準曲線を使用して CTX1B 濃度（X 軸）に補間して決定します。

最適な標準曲線は、コンピューターと ELISA 用ソフトウェアを使用して統計分析によって決定することが可能です。また、検査試料中の濃度を自動的に計算することも可能になります。

希釈した検査試料を測定した場合、得られた値を希釈律で補正して検査試料中に含有される CTX1B の含有量を計算します。

検査試料の吸光度値（蛍光強度）が CTX1B 標準液の最大測定値を上回った場合は、検査試料を D-1 でさらに希釈して再度測定する必要があります。

## 10. 技術的ヒント

- ・ CTX1B 標準液及び検査試料の作成にはプラスチック製試験管やバイアルは使用せず、ガラス製の容器を使って下さい。使い捨てピペットチップは短時間に限り使用可能です。
- ・ ALP 標識抗体の希釈はプラスチック試験管を使って下さい。
- ・ R-1 の取り出しにはピペットを使用せず、目盛り付き試験管または計量容器に直接注いで下さい。取り出した溶液が濃い黄色を呈した場合は使用できません。
- ・ CTX1B 標準液や検査試料をマイクロプレートに添加する際、濃度の低い試料から順番に添加してください。
- ・ マイクロプレート内での交差汚染を防ぐために CTX1B 標準液の添加、検査試料の添加、各試薬の添加に使うピペットチップや試薬を入れるリザーバー容器は注意深く交換してください。
- ・ 希釈した CTX1B 標準液、検査試料、希釈した ALP 標識抗体溶液は調製後 30 分以内に使用して下さい。
- ・ 各ウェル内の測定液の蒸発ロス防止のためにインキュベート中は粘着シール等で蓋をしてください。
- ・ 5%以上のメタノールやエタノール、アセトン、DMSO などの水溶性有機溶剤は抗原抗体反応を妨害します。検査試料に含まれる有機溶剤の濃度が 5%未満になる様に溶剤を除去するか D-1 で希釈して下さい。
- ・ 魚肉や血清試料中に含まれる脂質は反応を妨害する可能性があります。検査試料が濁っている場合は混入する脂質を高速遠心分離機で除去して下さい。
- ・ R-1 を分注後プレートウェルの中に泡がある場合、空気の吹き付けまたは遠心分離機を使用して泡を消して下さい。
- ・ 付属の R-1 の代わりに市販の ALP 蛍光検出試薬を用いるとさらに高感度の検出が可能になります。蛍光検出試薬の使用方法は各メーカーのマニュアルに従って下さい。

**RESEARCH USE ONLY, NOT FOR FOOD INSPECTION AND CLINICAL DIAGNOSTIC USE.**

**Manufacture:** Cell Science Inc. (CSI); 82-16 Imozawa-Gongenmoriyama, Aoba-ku, sendai, 989-3212, JAPAN

**Supplier:** FUJIFILM Wako Pure Chemical Co.; 1-2 Doshomachi 3-Chome, Chuo-ku, Osaka 540-6605, JAPAN



[www.cellscience.co.jp](http://www.cellscience.co.jp)

## 11. 参考文献

- Ciguatera and its off-shoots—Chance encounters en route to a molecular structure. Scheuer, P. J. *Tetrahedron*, **50**, 3 (1994).
- Structures and configurations of ciguatoxin from moray eel *Gymnothorax javanicus* and its likely precursor from the dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*. Murata, M., Legrand, A. M., Ishibashi, Y., Fukui, M., Yasumoto, T. *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 4380 (1990).
- Marine toxins. Yasumoto, T., Murata, M. *Chem. Rev.* **93**, 1897 (1993).
- Structural elucidation of ciguatoxin congeners by fast-atom bombardment tandem mass spectroscopy. Yasumoto, T., Igarashi, T., Legrand, A.-M., Cruchet, P., Chinain, M., Fujita, T., Naoki, H. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 4988 (2000).
- The chemistry and biological function of natural marine toxins. Yasumoto, T. *Chem. Rec.* **1**, 228 (2001).
- Total synthesis of ciguatoxin CTX3C. Hirama, M., Oishi, T., Uehara, H., Inoue, M., Maruyama, M., Oguri, H., Satake, M. *Science*, **294**, 1904 (2001).
- Synthesis-based approach toward direct sandwich immunoassay for ciguatoxin CTX3C. Oguri, H., Hirama, M., Tsumuraya, T., Fujii, I., Maruyama, M., Uehara, H., Nagumo, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 7608 (2003).
- Total synthesis of ciguatoxin and 51-hydroxyCTX3C. Inoue, M., Miyazaki, K., Ishihara, Y., Tatami, A., Ohnuma, Y., Kawada, Y., Komano, K., Yamashita, S., Lee, N., Hirama, M. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 9352 (2006).
- Production of monoclonal antibodies for sandwich immunoassay detection of Pacific ciguatoxins. Tsumuraya, T., Fujii, I., Hirama, M. *Toxicon*, **56**, 797 (2010).
- Ciguatera incidence and fish toxicity in Okinawa, Japan. Oshiro, N., Yogi, K., Asato, S., Sasaki, T., Tamanaha, K., Hirama, M., Yasumoto, T., Inafuku, Y. *Toxicon*, **56**, 656 (2010).
- First toxin profile of ciguateric fish in Madeira Arquipelago (Europe). Otero, P., Perez, S., Alfonso, A., Vale, C., Rodriguez, P., Gouveia, N. N., Gouveia, N., Delgado, J., Vale, P., Hirama, M., Ishihara, Y., Molgo, J., Botana, L. M. *Anal. Chem.* **82**, 6032 (2010).
- Detailed LC-MS/MS analysis of ciguatoxins revealing distinct regional and species characteristics in fish and causative alga from the Pacific. Yogi, K., Oshiro, N., Inafuku, Y., Hirama, M., Yasumoto, T. *Anal. Chem.* **83**, 8886 (2011).
- Development of a monoclonal antibody against the left wing of ciguatoxin CTX1B: Thiol strategy and detection using a sandwich ELISA. Tsumuraya, T., Takeuchi, K., Yamashita, S., Fujii, I., Hirama, M. *Toxicon*, **60**, 348 (2012).

**RESEARCH USE ONLY, NOT FOR FOOD INSPECTION AND CLINICAL DIAGNOSTIC USE.**

**Manufacture:** Cell Science Inc. (CSI); 82-16 Imozawa-Gongenmoriyama, Aoba-ku, sendai, 989-3212, JAPAN

**Supplier:** FUJIFILM Wako Pure Chemical Co.; 1-2 Doshomachi 3-Chome, Chuo-ku, Osaka 540-6605, JAPAN



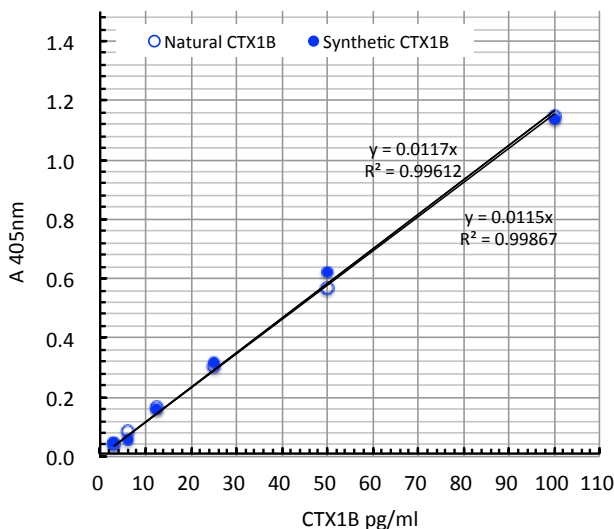
[www.cellscience.co.jp](http://www.cellscience.co.jp)

Preparation of anti-ciguatoxin monoclonal antibodies using synthetic haptens: Sandwich ELISA detection of ciguatoxins. Tsumuraya, T., Fujii, I., Hirama, M. *J. ACAC.* **97**, 373 (2014).

Practical route to the left wing of CTX1B and total syntheses of CTX1B and 54-deoxyCTX1B. Yamashita, S., Takeuchi, K., Koyama, T., Inoue, M., Hayashi, Y., Hirama, M. *Chem. Eur. J.* **21**, 2621 (2015).

Highly Sensitive and Practical Fluorescent Sandwich ELISA for Ciguatoxins. Tsumuraya, T., Sato, T., Hirama, M., Fujii, I., *Anal. Chem.* **90**, 7318 (2018).

## 12. 合成及び天然型 CTX1B の検量線比較

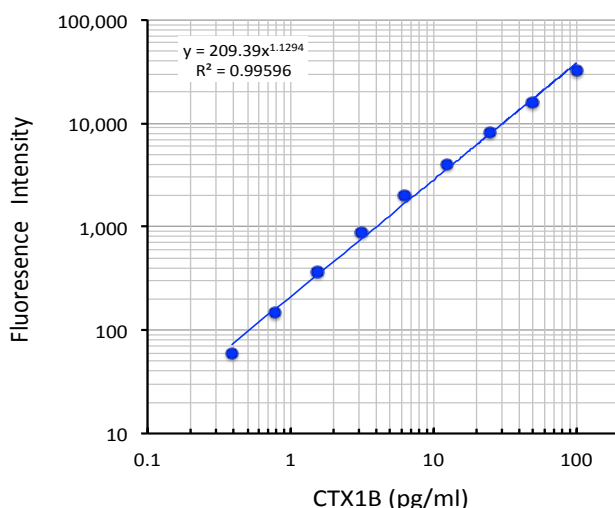


結果： 100~0.3 pg/mL の濃度の合成及び天然 CTX1B を CTX-ELISA 1B キットで測定し、検量線を作成しました。この 2 種類の CTX1B の ELISA キットでの反応性に差は見られなかった。

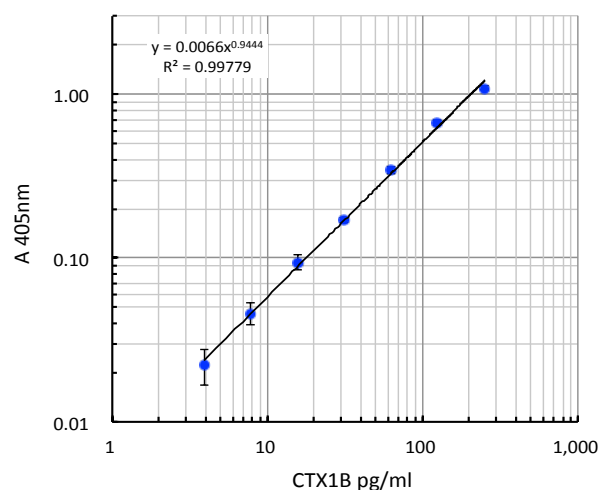
注意：このデータは検量線としては使用できません。検量線は試験ごとに作成して下さい。

## 13. 比色法と蛍光測定法の代表的な検量線

AttoPhos<sup>®</sup>AP 蛍光基質による蛍光測定法



ALP 基質溶液 R-1 (pNPP) を用いた比色法



定量限界濃度は比色法が約 3 pg/mL、蛍光測定法が約 0.3 pg/mL で、蛍光測定法は比色法の 10 倍の検出感度であった。この結果は FDA の定めるシガテラ毒の管理基準値 “0.01 ppb” を十分に上回りました。

**RESEARCH USE ONLY, NOT FOR FOOD INSPECTION AND CLINICAL DIAGNOSTIC USE.**

**Manufacture:** Cell Science Inc. (CSI); 82-16 Imozawa-Gongenmoriyama, Aoba-ku, sendai, 989-3212, JAPAN

**Supplier:** FUJIFILM Wako Pure Chemical Co.; 1-2 Doshomachi 3-Chome, Chuo-ku, Osaka 540-6605, JAPAN



[www.cellscience.co.jp](http://www.cellscience.co.jp)



#### 14. 品質規格

- 1, 検出限界値： 比色法で<1 pg/ml  
検出限界値はネガティブコントロール（0 pg）及び標準液の反復測定によって決定されました。
- 2, 定量範囲： 比色法 3~100 pg/mL、 蛍光測定法 0.3~200 pg/mL
- 3, 特異性： この ELISA キットはシガトキシン 1B とその類似毒素を検出できます、他のシガトキシン類とは反応しません。
- 4, 再現性： 社内規格 CV 値<15%  
3 種類の濃度の標準抗原を繰り返し測定したときの測定値の変動係数（CV%）
- 5, CTX1B 標準抗原の濃度検定： 本キットに添付した CTX1B 標準抗原の濃度は、東北大学名誉教授/日本食品分析センター学術顧問 安元健 博士から提供された定量済み天然型シガテラ毒 CTX1B 標品を比較対照品として本 ELISA キットで決定しました。

“AttoPhos<sup>®</sup>AP” は米国プロメガ社の登録商標です。

“QuantiFluo<sup>™</sup>” は米国バイオアッセイシステム社の商標です。

“CTX-ELISA<sup>™</sup>” は日本国株式会社セルサイエンスの登録商標です、無許可での使用を禁止します。

**RESEARCH USE ONLY, NOT FOR FOOD INSPECTION AND CLINICAL DIAGNOSTIC USE.**

**Manufacture:** Cell Science Inc. (CSI); 82-16 Imozawa-Gongenmoriyama, Aoba-ku, sendai, 989-3212, JAPAN

**Supplier:** FUJIFILM Wako Pure Chemical Co.; 1-2 Doshomachi 3-Chome, Chuo-ku, Osaka 540-6605, JAPAN



[www.cellscience.co.jp](http://www.cellscience.co.jp)