

Development of a colloidal gold immunochromatographic test strip for detection of lymphocystis disease virus in fish
魚類におけるリンパシスチス病ウイルス検出のためのコロイド金イムノクロマト試験片の開発

M1 陳孟珂

Abstract

Aims:

To develop a gold immunochromatographic test strip for on-site rapid detection of lymphocystis disease virus (LCDV).

Methods and Results:

Monodispersional colloidal gold and gold-labelled anti-LCDV monoclonal antibody (McAb) 2D11 were prepared and characterized by UV-visible spectroscopy and transmission electron microscopy.

Gold-labelled probe was used as the detection antibody, and goat anti-mouse IgG at the control line and anti-LCDV McAb 1A8 at the test line of the test strip served as the capture antibody.

The positive results could be easily judged by the presence of a red test line with naked eye within 10min.

The test strip, in good agreement with enzyme-linked immunosorbent assay and dot-blotting in sensitivity and LCDV detection, gave a detection limit of 1 lg ml⁻¹ of LCDV and was stable for 6 months at room temperature and 12 months at 4°C.

Conclusions:

The test strip was specific, simple and convenient for rapid detection of LCDV

概要

目的:

リンパシスチス病ウイルス(LCDV)をオンサイトで迅速検出するための金イムノクロマト検査ストリップを開発する。

方法と結果

単分散コロイド金と金標識抗 LCDV モノクローナル抗体(McAb)2D11を調製し、紫外可視分光法と透過型電子顕微鏡で特性評価を行った。

検出抗体には金標識プローブを用い、コントロールラインにはヤギ抗マウス IgG を、テストストリップのテストラインには抗 LCDV McAb 1A8 を捕捉抗体として用いた。

陽性結果は、10 分以内に肉眼で赤いテストラインが存在することで容易に判定できた。このテストストリップは、感度および LCDV 検出において酵素結合免疫吸着法およびドットブロット法とよく一致し、LCDV の検出限界は 1μg ml⁻¹ で、室温で 6 ヶ月間、4°C で 12 ヶ月間安定であった。

結論

このテストストリップは、LCDV の迅速な検出に特異的で簡便であり、安定性と再現

presenting good stability and reproducibility.

性が良好であった。

Significance and Impact of the Study:

研究の意義と影響

This ready-to-use test strip allows on-site rapid detection of LCDV in fish without the requirement of specialized equipments and professional personnel, which could augment the practical application for diagnosis of LCDV even in disadvantage areas.

このテストストリップは、特殊な装置や専門的な人材を必要とせず、魚の LCDV を現場で迅速に検出することができる。

Introduction

はじめに

Lymphocystis disease, caused by lymphocystis disease virus (LCDV), is a chronic viral disease characterized by the appearance of pearl-like nodules consisting of hypertrophied dermal cells in fish skin, gills, fins and even the internal organs (Sheng et al. 2007;Cano et al. 2009).

リンパシスチス病ウイルス(LCDV)によって引き起こされるリンパシスチス病は、魚類の皮膚、エラ、ヒレ、さらには内臓にまで、肥大化した真皮細胞からなる真珠様結節の出現を特徴とする慢性ウイルス性疾患である。(Sheng et al. 2007;Cano et al. 2009).

It has a worldwide geographical distribution and has been detected in more than 140 species of freshwater,estuarine and marine fishes (Wolf 1988).

世界中に分布し、140 種以上の淡水魚、河口魚、海産魚から検出されている(Wolf 1988)。

Lymphocystis disease is rarely fatal;however,the diseased fish exhibiting deformation cannot be commercialized and are more susceptible to secondary infection by other micro-organisms resulting in a great economic loss in aquaculture (Iwamoto et al.2002;Kvitt et al.2008).

リンパシスチス病が致死的となることは稀であるが、奇形を示す発病魚は商品化できず、他の微生物による二次感染を受けやすく、養殖業において大きな経済的損失をもたらす(Iwamoto et al.2002; Kvitt et al.2008)。

In addition, water contamination,oxygen depletion and nutrition deficiency in fish culture may activate virus latent in asymptomatic carriers and lead to a

さらに、養殖における水質汚染、酸素欠乏、栄養不足は、無症候性キャリアに潜伏するウイルスを活性化させ、疾病の発生につながる可能性がある(Cano et al.2006)。

disease occurrence (Cano et al.2006).

In this case,it is imperative for LCDV surveillance in aquaculture systems to control viral dissemination.

Various laboratory methods are available for the diagnosis of LCDV,such as indirect immunofluorescence assay,indirect dot-blot immunoenzymatic assay,flow cytometry based on cell culture inoculation,immunoblot,PCR,multiplex PCR and in situ hybridization techniques(García-Rosado et al.2002;Cano et al.2006,2007,2009;Kitamura et al.2006).

Generally,these diagnostic approaches have respective merits in terms of accuracy,sensitivity,safety and cost.However,their performances are restricted to laboratory mainly because of the requirement of highly trained personnel and specialized equipments.

Gold immunochromatographic assay (GICA),a technique based on the specific antigen-antibody immunoreactions,is a highly useful tool in diagnostics,as the assay results are directly visible to the naked eye without the requirement of specialized equipments and complicated handling procedures,providing convenience for rapid testing.These characteristics enable it feasible and accessible for on-site detection of antigens (Wang and Zhan2006).

This study demonstrated the development of a GICA-based test strip as a supplementary technique for rapid detection of LCDV in fish.

この場合、養殖システムにおけるLCDVサーベイランスは、ウイルスの拡散を抑制するために不可欠である。

LCDV の診断には、間接免疫蛍光法、間接ドットブロット法、免疫酵素法、細胞培養 PCR 法、in situ ハイブリダイゼーション法 接種に基づくフローサイトメリー、イムノブロット法、PCR 法、マルチプレックスなど、さまざまな検査法が利用できる。(García-Rosado et al.2002;Cano et al.2006,2007,2009;Kitamura et al.2006)

一般的に、これらの診断アプローチは、精度、感度、安全性、コストの面でそれぞれの利点がある。しかし、これらの性能は、主に高度な訓練を受けた人員と特殊な機器を必要とするため、実験室に限定されている。

金イムノクロマト法(GICA)は、特異的な抗原抗体免疫反応に基づく技術であり、専門的な装置や複雑な操作手順を必要とせず、測定結果が肉眼で直接確認できるため、迅速な検査に便利であり、診断に非常に有用なツールである。

このような特性により、現場での抗原検出が可能であり、利用しやすい(Wang and Zhan2006)。

本研究は、魚類中の LCDV を迅速に検出するための補助技術として、GICA を用いたテストストリップの開発を実証した。

The test strip utilized two monoclonal antibodies (McAbs) of distinct specificity, one LCDV-specific McAb 1A8 immobilized on nitrocellulose (NC) membrane as the capture antibody and another LCDV-specific McAb 2D11 labelled with colloid gold particles as the detection antibody.

The performance of assay was very simple and the test could be completed within 10 min.

Materials and methods

Samples

Flounders (*Paralichthys olivaceus*) were collected from a farm located in Qingdao, Shandong province of China, and subjected to PCR to ensure LCDV free as described previously (Zhan et al. 2010).

LCDV-infected flounders were from another farm in Shandong province, and flounders suspected of LCDV infection were from Hebei province of China.

Pearl-like nodules on the body surface of LCDV-infected flounder were isolated, and LCDV purification was carried out following the methods described by Cheng et al. (2006).

Skin and fins from flounder suspected of LCDV infection were sampled and vigorously homogenized in PBS at a ratio of 10% (w/v) on ice, and the supernatant fluids were collected as test solution and used for LCDV detection.

このテストストリップは、捕捉抗体としてニトロセルロース (NC) 膜に固定化した LCDV 特異的 McAb 1A8、検出抗体としてコロイド金粒子で標識した LCDV 特異的 McAb 2D11 という、異なる特異性を持つ 2 つのモノクローナル抗体 (McAb) を用いた。

測定は非常に簡単で、10 分以内に終了した。

材料と方法

サンプル

ヒラメ (*Paralichthys olivaceus*) は、中国山東省青島の養殖場から採集し、前述 ((Zhan et al. 2010).

LCDV に感染したヒラメは山東省の別の養殖場から、LCDV 感染が疑われるヒラメは中国河北省から採取した。

LCDV 感染ヒラメの体表に認められた真珠様結節を分離し、Cheng et al. (2006) の方法に従って LCDV の精製を行った。

LCDV 感染が疑われるヒラメの皮と鰭を採取し、氷上で 10% (w/v) の PBS で激しくホモジナイズし、上清液を試験溶液として採取し、LCDV 検出に使用した。

Production and purification of anti-LCDV McAbs

Hybridomas secreting anti-LCDV McAb 1A8 and 2D11 (Cheng et al. 2006), stored in liquid nitrogen, were revived by quickly warming in a water bath at 37°C.

Each 8-week-old BALB/c female mouse was injected with 0.5 ml of liquid paraffin intraperitoneally and induced for 7 days, and then 1×10^6 of McAb 1A8 and 2D11 hybridoma clones were injected into the peritoneal cavity of BALB/c mouse, respectively.

Ten days later, the mice ascites were harvested and centrifuged at 800g for 15 min, and anti-LCDV McAbs 1A8 and 2D11 were separated from the ascitic fluids by the method of salting out with caprylic acid-ammonium sulfate as described by Ogden and Leung (1988) and stored at 80°C until use.

Synthesis and identification of colloidal gold

Colloidal gold was produced through controlled reduction of chloroauric acid following the procedures described by Frens (1973) with slight modifications.

Briefly, 100 ml of 0.01% (m v^{-1}) chloroauric acid (HAuCl_4) (China) was heated to boiling for 2 min in microwave oven (Galanz Group, Guangdong, China; 700 W), and 2.0 ml of 1% (m v^{-1}) sodium citrate solution was then added rapidly to the boiling chloroauric acid solution and reduced the heat to medium-low (280 W) for another 3 min.

抗 LCDV McAb の産生と精製

液体窒素中に保存されていた抗 LCDV モノクローナル抗体 1A8 および 2D11 を分泌するハイブリドーマ細胞(Cheng et al. 2006) は、37°Cの水浴で急速に解凍して復活させた。

各 8 週齢の BALB/c 雌マウスに 0.5ml の液体パラフィンを腹腔内に注射し、7 日間誘導した後、McAb 1A8 および 2D11 ハイブリドーマクローンをそれぞれ 1×10^6 個、BALB/c マウスの腹腔内に注射した。

10 日後、マウスの腹水を採取し、800g で 15 分間遠心分離し、Ogden and Leung (1988)に記載されているように、カプリル酸-硫酸アンモニウムで塩析する方法により、抗 LCDV McAbs 1A8 および 2D11 を腹水から分離し、使用するまで 80°Cで保存した。

金コロイドの合成と同定

金コロイドは、Frens (1973) の手順に若干の改変を加えて、塩化金酸を制御還元することにより製造した。

概略としては、0.01% (m v^{-1}) 塩化金酸 (HAuCl_4) (中国製) 100 ml を電子レンジ (Galanz Group、中国広東省、700 W) で 2 分間加熱沸騰させた、次に、1% (m v^{-1}) クエン酸ナトリウム溶液 2.0 ml を沸騰塩化金酸溶液に素早く加え、中弱火 (280 W) でさらに 3 分間加熱加熱した。得られた金コロイド懸濁液を室温まで冷却し、4°Cで保存した。

The colloidal gold suspension was allowed to cool down to room temperature and stored at 4°C.

Optimal amount of McAb conjugated by colloidal gold

The purified McAb 2D11 was dialysed against distilled water overnight at 4°C and subsequently centrifuged at 15000g for 30 min to get a clear supernatant for conjugation.

The pH of colloidal gold was adjusted to 8.2 with 0.01 mol l⁻¹ K₂CO₃ solution according to the pre-experiment.

Various amounts of McAb 2D11 (0, 5, 10, 15, 20, 25 and 30 µg) were added to 1ml of colloidal gold at room temperature, respectively, and incubated for 10 min with shaking, followed by addition of 100 µl of 10% NaCl solution and shaking for 10 min.

Two hours later, the absorbance of each solution was measured spectrophotometrically at 520 nm, and the amount of protein showing maximum absorbance was confirmed as the minimum amount of McAb needed to prevent the colloidal gold from aggregating.

The optimal amount of McAb used for conjugation was 20% excess of the minimum amount of McAb.

Preparation of colloidal gold-McAb probe

The purified McAb 2D11 (180 µg) was added to 10 ml of dispersed colloidal gold solution and agitated for 30 min.

コロイド金と結合した McAb の最適量

精製した McAb 2D11 を蒸留水に対して 4°C で一晩透析し、その後 15000g で 30 分間遠心分離し、コンジュゲーション用の透明な上清を得た。

コロイド状金の pH は、事前の実験に従い、0.01 mol l⁻¹ K₂CO₃ 溶液で 8.2 に調整した。

様々な量の McAb 2D11 (0、5、10、15、20、25、30µg) をそれぞれ 1ml のコロイド状金に室温で添加し、振盪しながら 10 分間インキュベートした後、100µl の 10%NaCl 溶液を添加し、10 分間振盪した。

2 時間後、各溶液の吸光度を 520nm で分光光度計で測定し、最大吸光度を示すタンパク質の量を、コロイド状金の凝集を防ぐのに必要な McAb の最小量として確認した。

コンジュゲーションに使用した McAb の最適量は、McAb の最小量の 20%過剰量であった。

コロイド状金-McAb プローブの調製

精製 McAb 2D11 (180µg) を 10ml の分散コロイド金溶液に加え、30 分間攪拌した。

After coating, the reaction mixture was further stabilized by adding 2.5 ml of 10% bovine serum albumin (BSA) (Sigma-Aldrich Co. LLC, USA) with moderate stirring for 20 min and then stored overnight at 4°C.

Following the colloidal gold-McAb probe centrifuged at 30000g for 30 min at 4°C, the supernatant was removed and the resulting precipitate was resuspended in 0.01 mol l⁻¹ PBS containing 1% BSA and then centrifuged again to remove free unconjugated antibody.

The pellet was resuspended in 1 ml storage buffer (0.01 mol l⁻¹ PBS containing 1% BSA, 5% sucrose, 0.5% Tween-20 and 0.02% NaN₃) and stored at 4°C prior to use.

Transmission electron microscopy

The average diameter and dispersion of colloidal gold particles and colloidal gold-McAb probe were estimated by transmission electron microscopy (TEM).

A drop of colloidal gold solution or colloidal gold-McAb conjugates was dropped on a carbon-coated TEM copper grid and allowed to air dry for 15 min, and then colloidal gold particles were observed by TEM, while colloidal gold-McAb conjugates were measured after negative staining with uranyl acetate.

UV-visible spectroscopy

The colloidal gold solution and

コーティング後、反応混合物をさらに 10% ウシ血清アルブミン (BSA) (Sigma-Aldrich Co. LLC, USA) 2.5ml を 20 分間適度に攪拌しながら加えて安定化させ、4°C で一晩保存した。

コロイド状金-McAb プローブを 30000g、4°C で 30 分間遠心した後、上清を除去し、得られた沈殿を 1% BSA を含む 0.01 mol l⁻¹ PBS に再懸濁し、再度遠心して遊離の非結合抗体を除去した。

ペレットを 1ml の保存用緩衝液 (1% BSA、5% スクロース、0.5% Tween-20、0.02% NaN₃ を含む 0.01 mol l⁻¹ PBS) に懸濁し、使用前に 4°C で保存した。

透過型電子顕微鏡 (TEM)

金コロイド粒子および金コロイド-McAb プローブの平均粒径と分散度を透過型電子顕微鏡 (TEM) で評価した。

金コロイド溶液または金コロイド-McAb 複合体をカーボンコーティングした TEM 銅グリッドに滴下し、15 分間風乾させた後、金コロイド粒子を TEM で観察し、金コロイド-McAb 複合体は酢酸ウラニルでネガティブ染色した後、測定した。

紫外可視分光法

コロイド状金溶液とコロイド状金

-McAb formation of colloidal gold-McAb probe were scanned by UV-visible (UV-vis) spectroscopy (200–700 nm) using a double-beam spectrophotometer.

The colloidal gold solution was monitored for both conjugation and aggregation by measuring gold solution with: no antibody, immediately after addition of anti-LCDV McAb 2D11, and after centrifugation and resuspension of the colloidal gold-McAb conjugates in storage buffer.

Preparation of immunochromatographic test strip

The test strip consisted of four components assembled together on a plastic backing: the colloidal gold-McAb conjugate pad, NC membranes, sample pad and absorption pad.

Colloidal gold-McAb conjugate pad was prepared by spraying colloidal gold-labelled McAb 2D11 on a glass fibre and dried at room temperature.

Purified McAb 1A8 at 1 mg ml⁻¹ and goat anti-mouse IgG (Sigma) at 0.5 mg ml⁻¹ in 0.01 mol l⁻¹ PBS were dispensed on NC membrane (Whatman Inc., Clifton, USA) with 5-8-μm pore size to form test line and control line, respectively. The distance between the two lines was about 5 mm.

The membrane was then air dried, blocked with 25% BSA in 0.01 mol l⁻¹ PBS at 37°C for 1 h and washed three times with PBST (0.01 mol l⁻¹ PBS containing 0.05% Tween-20) and dried again at 37°C for 1 h.

プローブの形成は、ダブルビーム分光光度計を用いた紫外可視 (UV-vis) 分光法 (200-700 nm) でスキャンした。

コロイド金溶液は、抗体なし、抗 LCDV McAb 2D11 添加直後、およびコロイド金-McAb コンジュゲートを遠心分離して保存用緩衝液に再懸濁した後の金溶液を測定することにより、コンジュゲーションと凝集の両方をモニターした。

イムノクロマトテストストリップの調製

テストストリップは、プラスチック製の台紙に組み合わされた 4 つのコンポーネントから構成されている: コロイド状金-McAb コンジュゲートパッド、NC 膜、サンプルパッド、吸収パッド。

コロイド状金-McAb コンジュゲートパッドは、コロイド状金標識 McAb 2D11 をガラス繊維にスプレーして調製し、室温で乾燥させた。

精製 McAb 1A8 を 1 mg ml⁻¹、ヤギ抗マウス IgG (Sigma) を 0.01 mol l⁻¹ PBS 中 0.5 mg ml⁻¹ で、孔径 5-8 μm の NC 膜 (Whatman Inc, Clifton, USA) 上に分注し、それぞれテストラインとコントロールラインを形成した。2 つのライン間の距離は約 5 mm でした。

その後、メンブレンを風乾し、0.01 mol l⁻¹ PBS 中の 25% BSA で 37°C、1 時間ブロッキングし、PBST (0.05% Tween-20 を含む 0.01 mol l⁻¹ PBS) で 3 回洗浄し、再び 37°C、1 時間乾燥させた。

For test strip assembly, the NC membrane was pasted onto the centre of the plastic plate and covered with the colloidal gold–McAb conjugate pad and the absorption pad on each side.

The sample pad receiving liquid sample to be analysed was attached to the other side of colloidal gold–McAb conjugate pad (Fig. 1). Then, they were cut into 3-mm-wide pieces and stored desiccated at 4°C.

Lymphocystis disease virus detection by immunochromatographic strip test

Flounder suspected of LCDV infection were detected by the developed immunochromatographic strip.

About 100 µl of gill or fin supernatant fluids was pipetted onto the sample pad, or the sample pad of test strip was immersed into the test solution of which the surface must be lower than the conjugate pad, allowing the test solution to flow by chromatography through the NC membrane to the other end.

The result was observed by naked eye within 10 min, and the presence of two red lines in control line and test line region indicated a positive reaction denoting the sample containing LCDV, while the presence of one red line in control line region suggested the absence of LCDV in the sample or below the limit of detection for the strip. If the red control line did not appear, the test was invalid.

The indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and

テストストリップの組み立てでは、NC 膜をプラスチックプレートの中央に貼り付け、コロイド金-McAb コンジュゲートパッドと吸収パッドで両側を覆った。

液体試料を受け取るサンプルパッドは、コロイド金-モノクローナル抗体結合体パッドの反対側に接着された(図 1)。その後、これらは幅 3mm に切り分けられ、乾燥状態で 4°C に保存された。

イムノクロマトストリップ試験によるリンパシスティス病ウイルスの検出

LCDV 感染が疑われるヒラメを、開発したイムノクロマトストリップを用いて検出した。

鰓または鰭の上清液約 100 µl をサンプルパッドにピペッティングするか、またはコンジュゲートパッドより表面が低い検液にテストストリップのサンプルパッドを浸し、検液を NC 膜を通して反対側にクロマトグラフィーで流す。

結果は 10 分以内に肉眼で観察され、コントロールラインとテストラインの領域に 2 本の赤線がある場合は LCDV を含むサンプルを示す陽性反応を示し、コントロールラインの領域に 1 本の赤線がある場合はサンプル中に LCDV が存在しないか、ストリップの検出限界以下であることを示唆した。赤色のコントロールラインが表示されない場合、検査は無効であった。

また、これらの上清液に対して、対照法として間接酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)

dot-blotting as control methods were also performed on these supernatant fluids.

LCDV-infected flounder and LCDV-free flounder were used as positive and negative controls, respectively.

For ELISA, the 96-well EIA plates (Costar, Corning, NY, USA) were coated overnight at 4°C with serial dilutions of purified LCDV (100µl per well) and blocked with 3% BSA at 37°C for 1h.

After washing the wells three times with PBST, the anti-LCDV McAb was added to the ELISA plates and held at 37°C for 1h and then washed three times with PBST.

Goat antimouse immunoglobulin conjugated with AP (1: 20000) (Sigma) was applied and incubated at 37°C for 1h and washed three times with PBST.

Finally, the wells were incubated with freshly prepared pNPP (p-Nitrophenyl phosphate) substrate solution for 15 min, and the absorbance of the reaction product was measured at 405 nm with a Versa Max automated microplate reader.

For dot-blotting, serial dilutions of purified LCDV were made (4µl) and the resultant LCDV was spotted onto NC membrane and air dried.

The NC membrane was blocked with 10% BSA at 37°C for 1 h and washed three times with PBST.

およびドットブロット法も実施した。

LCDV 感染ヒラメと LCDV 非感染ヒラメが、それぞれ陽性対照および陰性対照として使用された。

ELISA の実施では、96 ウェルの EIA プレート (Costar, Corning, NY, USA) は、精製された LCDV を段階希釈して各ウェルに 100µL ずつ添加し、4°C で一晩コーティングした。その後、37°C で 1 時間、3% BSA でブロッキングを行った。

ウェルを PBST で 3 回洗浄した後、抗 LCDV モノクローナル抗体 (McAb) を加え、37°C で 1 時間反応させ、再び PBST で 3 回洗浄した。

アルカリホスファターゼ (AP) 標識ヤギ抗マウス免疫グロブリン (1:20000) (Sigma) を適用し、37°C で 1 時間インキュベートし、PBST で 3 回洗浄した。

最後に、ウェルを新しく調製した pNPP (p-ニトロフェニルリン酸) 基質溶液とともに 15 分間インキュベートし、反応産物の吸光度を Versa Max 自動マイクロプレートリーダーを用いて 405nm で測定した。

ドットブロット法の実施では、精製された LCDV を段階希釈し (4µL)、その LCDV 溶液をニトロセルロース (NC) 膜にスポットし、自然乾燥させた。

NC 膜は 10% BSA で 37°C、1 時間ブロッキングを行い、その後 PBST で 3 回洗浄した。

Next, the anti-LCDV McAb was added and held at 37°C for 1h and then washed three times with PBST, followed by addition of goat antimouse immunoglobulin conjugated with AP (1 : 20000) and incubation at 37°C for 1h.

After three washes with PBST, the colour reaction was developed with NBT-BCIP (nitro-blue tetrazonium chloride—5-bromo-4-chloro-3'-indolyl phosphate p-toluidine salt) substrate solution for 15min in the dark as described by Zhan et al.(2004).

Sensitivity and specificity of immunochromatographic strip

Purified LCDV was diluted with PBS to protein concentrations of 50, 10, 5, 1 and 0.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ and used as test solution for the sensitivity, and the last dilution that yielded an observable positive result was regarded as the detection limit of immunochromatographic test strip.

The diluted test solution was also used for ELISA and dot-blotting simultaneously as described above, and the tissue homogenate supernatant of LCDV-free founder served as negative controls.

To determine specificity of the test strip for LCDV detection, gill homogenates of LCDV-infected *P. olivaceus*, infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV)-infected *P. olivaceus* and turbot reddish body iridovirus (TRBIV)-infected *Scophthalmus maximus* (Qingdao, China) were detected using the strip. Purified LCDV served as positive controls.

次に、抗 LCDV モノクローナル抗体 (McAb) を添加し、37°C で 1 時間反応させた後、PBST で 3 回洗浄した。続いて、アルカリホスファターゼ (AP) と結合したヤギ抗マウス免疫グロブリン (1:20000) を加えて 37°C で 1 時間インキュベートした。

PBST で 3 回洗浄した後、NBT-BCIP (ニトロブルーテトラゾリウムクロリド-5-ブロモ-4-クロロ-3'-インドリルリン酸-p-トルイジン塩) 基質溶液を加え、暗所で 15 分間発色させた (Zhan et al.(2004))。

イムノクロマトストリップの感度と特異性

精製 LCDV を PBS で 50、10、5、1 および 0.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ のタンパク質濃度に希釈し、感度を測定する試験液として使用し、観察可能な陽性結果が得られた最後の希釈液をイムノクロマト試験片の検出限界とした。

希釈した試験液は、上記のように ELISA とドットブロット法にも同時に使用し、LCDV を含まない創始者の組織ホモジネート上清を陰性対照とした。

LCDV 検出のためのテストストリップの特異性を決定するために、LCDV に感染したヒラメ、感染性造血壊死ウイルス (IHNV) に感染したヒラメ、およびターボット赤色体イリドウイルス (TRBIV) に感染したイシビルアメ (中国、青島) の鰓ホモジネートをストリップを使用して検出した。精製 LCDV が陽性対照となった。

Reproducibility and stability of immunochromatographic strip

Positive and negative samples of LCDV were tested three times to determine the reproducibility of test strips.

The same batch or three different batches of test strips were applied. For stability, test strips were stored at room temperature and 4°C for up to 12 months and tested by positive and negative samples at 30-day intervals.

Results

Characterization of colloidal gold particles and colloidal gold-McAb probe.

Transmission electron microscopy imaging.

After gold nanoparticle formation, the colloidal gold solution had a ruby-red colour.

Under TEM, the colloidal gold particles were well dispersed and uniform in size and shape with an average diameter of approximately 20 nm (Fig. 2).

There was no obvious difference in the size distribution of colloidal gold before and after conjugation.

Upon conjugation, TEM image showed a thin white layer, called 'halo' effect, surrounding the surface of the nanoparticles indicating coating of the gold with McAb 2D11 (Fig. 3), which was not present prior to treatment.

イムノクロマトストリップの再現性と安定性

テストストリップの再現性を調べるため、LCDV の陽性および陰性サンプルを 3 回試験した。

テストストリップは同じバッチまたは 3 つの異なるバッチを適用した。

温および 4°C で最長 12 ヶ月間保存し、30 日間隔で陽性および陰性検体で検査した。

研究成果

コロイド金粒子およびコロイド金-McAb プローブの特性評価

透過型電子顕微鏡イメージング

金ナノ粒子形成後のコロイド金溶液はルビー色をしていた。

TEM で観察すると、コロイド状金粒子はよく分散しており、大きさも形も均一で、平均直径は約 20 nm であった(図 2)。

コンジュゲーション前後でコロイド状金のサイズ分布に明らかな違いは見られなかった。

コンジュゲーション後、TEM 像ではナノ粒子表面を取り囲む「ハロー」効果と呼ばれる薄い白い層が観察され、処理前には存在しなかった McAb 2D11 による金のコーティングが確認された(図 3)。

UV-visible spectra

Spectra of the colloidal gold solution without antibody, immediately after the addition of antibody and after centrifugation and resuspension of the colloidal gold-McAb conjugate, were recorded (Fig.4).

An absorbance peak at 520 nm in curve a, with a high symmetry and narrow width, was observed owing to surface plasmon resonance of colloidal gold particles, indicating that the prepared colloidal gold was monodisperse and had narrow size distribution.

Upon addition of antibody (curve b), the surface resonance band shifted a little into the red direction as a result of colloidal gold-McAb interaction and a peak at approximately 280 nm in the conjugation system arose.

After centrifugation and resuspension of colloidal gold-McAb probe, two absorption bands was observed at 524 and 280 nm as shown in curve c, suggesting that the antibody was present on the gold surface.

The intensity of the surface resonance band and protein absorbance band at 280 nm decreased because of the reduction of colloidal gold concentration and removal of the unconjugated McAb molecules in solution.

Optimal amount of McAb for colloidal gold conjugate

Various amounts of anti-LCDV McAb 2D11 were added to colloidal gold solution.

紫外可視スペクトル

抗体無添加のコロイド状金溶液、抗体添加直後、およびコロイド状金-McAb 結合体の遠心分離・再懸濁後のスペクトルを記録した (Fig.4)。

曲線 a では、520nm に高い対称性と狭い幅を持つ吸光度ピークが観察され、これはコロイド状金粒子の表面プラズモン共鳴によるもので、調製されたコロイド状金が単分散で狭い粒度分布を持っていることを示している。

抗体を添加すると(曲線 b)、コロイド状金-McAb 相互作用の結果、表面共鳴バンドは赤色方向に少しシフトし、コンジュゲーション系の約 280 nm にピークが生じた。

コロイド状金-McAb プローブを遠心分離して再懸濁すると、曲線 c に示すように 524nm と 280nm に 2 つの吸収バンドが観測され、抗体が金表面に存在していることが示唆された。

表面共鳴バンドと 280nm のタンパク質吸光度バンドの強度が減少したのは、コロイド状金濃度が低下し、溶液中の非共役 McAb 分子が除去されたためである。

コロイド状金結合体に対する McAb の最適量

様々な量の抗 LCDV McAb 2D11 をコロイド状金溶液に添加した。

The minimum amount of McAb required for conjugation with colloidal gold particles was determined based on the measured absorbance at 520 nm, showing a maximum absorbance at approximately 15µg of McAb (Fig. 5).

To ensure complete reaction with colloidal gold particles, the optimal amount of McAb 2D11 was chosen to be 120% of the minimum amount of McAb.

Detection limit of immunochromatographic strip and LCDV detection

In test solution containing LCDV, the virus would bind to colloidal gold-conjugated McAb 2D11, and the resulting complex would be captured by the McAb 1A8 at the test line to give a red band.

The unbound McAb conjugated with colloidal gold moved across the test line to be captured by the goat anti-mouse IgG and form a red band at the control line.

Immunochromatographic strip test (ICT) showed that the serial dilutions of purified LCDV at protein concentrations of 1, 5, 10 and 50 µg ml⁻¹ yielded positive results, so the detection limit of test strip was 1 µg ml⁻¹ (Fig. 6).

The same serial virus dilutions were examined by ELISA and dot-blotting simultaneously, and the sensitivity of ELISA (Fig. 7) and dot-blotting (Fig. 8) was found to be 1 µg ml⁻¹.

コロイド状金粒子との結合に必要な McAb の最小量は、測定された 520nm の吸光度に基づいて決定され、約 15µg の McAb で最大吸光度を示した(図 5)。

コロイド状金粒子との完全な反応を確実にするために、McAb 2D11 の最適量は McAb の最小量の 120%に選ばれた。

イムノクロマトストリップと LCDV 検出の検出限界

LCDV を含む検査液中で、ウイルスはコロイド状金に結合した McAb 2D11 に結合し、生じた複合体は検査ラインで McAb 1A8 に捕捉され、赤いバンドを示す。

コロイド状金と結合した未結合の McAb はテストラインを横切って移動し、ヤギ抗マウス IgG に捕捉され、コントロールラインで赤いバンドを形成する。

イムノクロマトストリップテスト (ICT) では、精製 LCDV をタンパク質濃度 1、5、10、50µg ml⁻¹ で連続希釈すると陽性となり、テストストリップの検出限界は 1µg ml⁻¹ であった(図 6)。

同じ連続ウイルス希釈液を ELISA とドットブロット法で同時に調べたところ、ELISA (図 7) とドットブロット法 (図 8) の感度は 1µg ml⁻¹ であった。

Samples from flounder *P. olivaceus* suspected of LCDV infection were tested positive by ICT, which were in agreement with the detection results of ELISA and dot-blotting (data not shown).

Specificity of immunochromatographic strip

Cross-reactivity studies using gill homogenates of LCDV-infected *P. olivaceus*, IHNV-infected *P. olivaceus* and TRBIV-infected *S. maximus* showed that positive signals were observed in the positive control and LCDV-infected *P. olivaceus*, but not in IHNV, TRBIV samples.

Reproducibility and stability of immunochromatographic strip

Lymphocystis disease virus viral suspensions and the LCDV-free flounder samples tested three times with the same batch of immunochromatographic test strips showed the same positive or negative results, respectively.

Similar results were obtained for the three different batches of test strips. The test strips were stable for at least 6 months at room temperature and 12 months at 4°C without changes in sensitivity (data not shown).

Discussion

Gold immunochromatographic assay is a technology combining immunology with chromatography which has been developed for several years and applied increasingly in immunoanalysis diagnosis (Sithigorngul et al. 2007; Cui

LCDV 感染が疑われたヒラメの検体は ICT で陽性となり、ELISA およびドットブロット法の検出結果と一致した(データは示さず)。

イムノクロマトストリップの特異性

LCDV 感染ヒラメ、IHNV 感染ヒラメおよび TRBIV 感染イシビルアヒの鰓ホモジネートを用いた交差反応性試験では、陽性コントロールおよび LCDV 感染ヒラメで陽性シグナルが観察されたが、IHNV、TRBIV サンプルでは観察されなかった。

イムノクロマトストリップの再現性と安定性

リンパシステイス病ウイルスのウイルス懸濁液と LCDV を含まないカレイのサンプルを、同じバッチのイムノクロマト検査用試験紙で 3 回検査したところ、それぞれ同じ陽性または陰性の結果が得られた。

3 つの異なるバッチのテストストリップでも同様の結果が得られた。テストストリップは、少なくとも室温で 6 ヶ月間、4°C で 12 ヶ月間、感度の変化なく安定であった(データは示さず)。

考察

金イムノクロマト法は、免疫学とクロマトグラフィーを組み合わせた技術であり、数年前から開発され、免疫分析診断への応用が進んでいる (Sithigorngul et al.2007; Cui et al.2008; Zhao et al.2010)。

et al. 2008; Zhao et al. 2010).

The quality of colloidal gold particles plays a key role in the development of a GICA-based one step lateral-flow strip for antigen analysis.

Appropriate size and uniformity of the colloidal gold particles can result in good performance and yield more tests per litre (Carney et al. 2006).

The size and hence the property of the gold nanoparticles can be controlled through the use of different reducing agents and the speed of reduction (Frens 1973; Morrow et al. 2009).

In this study, colloidal gold in ruby-red colour was synthesized with the reduction of chloroauric acid by sodium citrate at pH 8.2.

As shown in TEM images, the gold nanoparticles were well dispersed and uniform in size with diameter of approximately 20 nm, revealing they were of good quality and aggregate free.

Additionally, the stability of gold–McAb conjugates is important for desirable biological reactivity and optimal performance of test strip (Thobhani et al. 2010).

Our research showed that the developed step strip was stable for 6 months at room temperature and 12 months at 4°C without changes in sensitivity for LCDV detection, suggesting that the synthesized colloidal gold–McAb conjugates were stable which ensured the quality, stability and reproducibility of batches of test strip.

コロイド状金粒子の品質は、抗原分析用の GICA ベースのワンステップラテラルフローストリップの開発において重要な役割を果たす。

コロイド状金粒子の適切なサイズと均一性は、良好な性能をもたらし、1 リットル当たりにより多くのテストをもたらすことができる。
(Carney et al. 2006)

金ナノ粒子のサイズと性質は、還元剤の種類と還元速度によって制御できる (Frens 1973; Morrow et al. 2009)、

本研究では、pH8.2 のクエン酸ナトリウムによるクロロ尿酸の還元により、ルビー赤色のコロイド状金を合成した。

TEM 画像に示されるように、金ナノ粒子はよく分散し、直径が約 20 nm と均一であったことから、良質で凝集物がないことが明らかになった。

さらに、金-McAb 結合体の安定性は、望ましい生物学的反応性とテストストリップの最適な性能にとって重要である (Thobhani et al. 2010).

本研究では、開発したステップ型ストリップが、室温で 6 か月間、4°C で 12 か月間にわたって LCDV の検出感度に変化がなく安定していることが示された。このことは、合成されたコロイド金–モノクローナル抗体 (McAb) 複合体が安定であり、試験ストリップの品質、安定性、およびロット間の再現性を保証することを示唆している。

UV-visible spectroscopy is a powerful characterization tool, which can be used to monitor the conjugation of nanoparticles and indicate adsorption of proteins onto gold with a change in absorbance peak for the nanoparticles, and the intensity and position of spectrum peak of colloidal gold solution are related to the dispersity of nanoparticles (Thobhani et al. 2010).

In the colloidal gold solution without antibody, an absorbance peak at 520 nm with high symmetry and narrow width was observed, showing that gold particles were monodisperse and had similar size, which was consistent with the results of TEM.

Upon addition of antibody, the surface resonance band shifted a little suggesting the McAb conjugation, and a peak at approximately 280 nm arose for the absorbance from the tyrosine and tryptophan residues in the protein of McAb (Gole et al. 2002).

UV-vis provided physical confirmation that the anti-LCDV McAb had bound to the nanoparticles with well dispersity and size uniformity.

Many serological methods have been developed for rapid and sensitive detection and diagnosis of fish viruses according to immunological principles, such as ELISA, dot-blotting, immunofluorescence assay test (IFAT) and immunohistochemistry (Olesen et al. 1993; Lorenzo et al. 1996; Falk et al. 1998; Shieh and Chi 2005; Fenner et al. 2006), and McAbs against unique antigens or epitopes of antigens have

紫外可視分光法は強力な特性評価ツールであり、ナノ粒子のコンジュゲーションをモニターしたり、ナノ粒子の吸光度ピークの変化で金へのタンパク質の吸着を示したりするのに用いることができ、コロイド金溶液のスペクトルピークの強度と位置はナノ粒子の分散性に関連している。(Thobhani et al. 2010)

抗体無添加のコロイド金溶液では、520 nm に高い対称性と狭い幅を持つ吸光度ピークが観察され、金粒子が単分散で同程度の大きさであることを示し、これは TEM の結果と一致した。

抗体を添加すると、表面共鳴バンドは McAb との結合を示唆するように少しシフトし、約 280nm に McAb のタンパク質中のチロシン残基とトリプトファン残基からの吸光度のピークが生じた(Gole et al. 2002)。

UV-vis により、抗 LCDV McAb がナノ粒子によく分散し均一に結合していることが物理的に確認された。

ELISA、ドットプロット法、免疫蛍光抗体法 (IFAT)、免疫組織化学染色法など、免疫学的原理に基づいた迅速かつ高感度な魚類ウイルスの検出および診断のための多くの血清学的手法が開発されている(Olesen et al. 1993; Lorenzo et al. 1996; Falk et al. 1998; Shieh and Chi 2005; Fenner et al. 2006)。また、特異的な抗原や抗原エпитープに対するモノクローナル抗体 (McAb) も広く利用されている ((Zhou et al. 2006; Reschova et al. 2007; Chen et al. 2008)。

been widely used (Zhou et al. 2006; Reschova et al. 2007; Chen et al. 2008).

As a highly effective and economical immunological tool, McAbs assure a reliable source of antibodies and often achieve greater specificity and sensitivity than polyclonal antibodies (Shi et al. 2003; Dixon and Longshaw 2005; Reschova et al. 2007).

To avoid the possible cross-reactivity and low affinity of polyclonal antibodies, two clones of McAbs that recognized different surface epitopes of LCDV (Cheng et al. 2006) were chosen to develop the colloidal gold immunochromatographic test strip for LCDV detection of fish.

The test strip gave a detection limit of $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ of LCDV and was in good accordance with ELISA and dotblotting in sensitivity and in LCDV detection. Moreover, ICT had several advantageous features such as simplicity, immediate result and the fact that it could be performed anywhere at any time without prior preparation of equipment.

Therefore, the rapid ICT could augment the practical application for diagnosis of LCDV even in disadvantage areas and laboratories with limited technical expertise.

The affected fish with lymphocystis disease show typical pearl-like nodules on the skin and fins, and fibroblasts are proved to be the main target cells for LCDV replication (Cano et al. 2009).

高効率かつ経済的な免疫学的ツールとして、モノクローナル抗体 (McAb) は信頼性の高い抗体供給源となり、しばしばポリクローナル抗体よりも高い特異性および感度を実現する。(Shi et al. 2003; Dixon and Longshaw 2005; Reschova et al. 2007)

ポリクローナル抗体による交差反応や親和性の低さを回避するために、LCDV の異なる表面エピトープを認識する 2 種類のモノクローナル抗体クローン (Cheng et al. 2006) が選択され、魚類における LCDV 検出のためのコロイド金イムノクロマトグラフィー (ICT) ストリップの開発に用いられた。

このテストストリップは、 $1 \mu\text{g/ml}$ の LCDV に対する検出限界を示し、感度および LCDV 検出において ELISA やドットブロット法と良好な一致を示した。さらに、ICT は、簡便性、即時結果が得られること、そして特別な装置準備なしにいつでもどこでも実施できるという複数の利点を有していた。

したがって、この迅速な ICT は、技術的専門性が限られる地域や施設においても、LCDV の診断に実用的な応用を拡大する可能性がある。

に真珠様の典型的な結節を示し、線維芽細胞が LCDV の主要な複製標的細胞であることが確認されている (Cano et al. 2009)。

Thus, fish skin and fins were homogenized and used as test samples of suspected fish.

Considering sensitivity of immunological methods is confined by viral extraction, suspected positive samples tested with the test strip may show negative results.

It is necessary that the tiny infection samples should be further confirmed by cell culture, histological or molecular tests.

Nevertheless, the strip test is still recommended for screening of subclinical infection or greater intensity infection of LCDV to differentiate from other pathogen infections.

リンホシスチス病に罹患した魚は、皮膚や鰭そのため、疑わしい魚の検査試料として皮膚および鰭をホモジナイズして使用した。

免疫学的手法の感度はウイルス抽出の効率に左右されるため、テストストリップで検査した疑陽性試料が陰性を示す場合もある。

したがって、微細な感染の可能性がある試料については、細胞培養、組織学的検査、または分子生物学的検査による追加の確認が必要である。

それでもなお、このストリップテストは、LCDVによる無症候性感染や高強度感染のスクリーニングにおいて、他の病原体感染との鑑別を目的として推奨される。