

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

2025/05/15 雑誌会

M1 陳 孟珂

論文の選定

- 研究テーマ
- 金コロイド親和性タンパク質による低分子抗体の集積化と高感度イムノクロマトグラフィ法の開発
- 本論文
- 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
- 金コロイドのイムノクロマト法実際の応用

Introduction

- 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。
- 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。
- 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。

Materials and methods

- 陰性対照サンプルと陽性対照サンプル、および異なる場所からテストするサンプルを選択する。
- 抗LCDV McAbの産生と精製
- 金コロイドの合成と同定
- コロイド金と結合したMcAbの最適濃度
- コロイド状金-McAbプローブの調製
- 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。

Materials and methods

- コロイド状金溶液とコロイド状金-McAb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。
- イムノクロマトテストストリップの調製

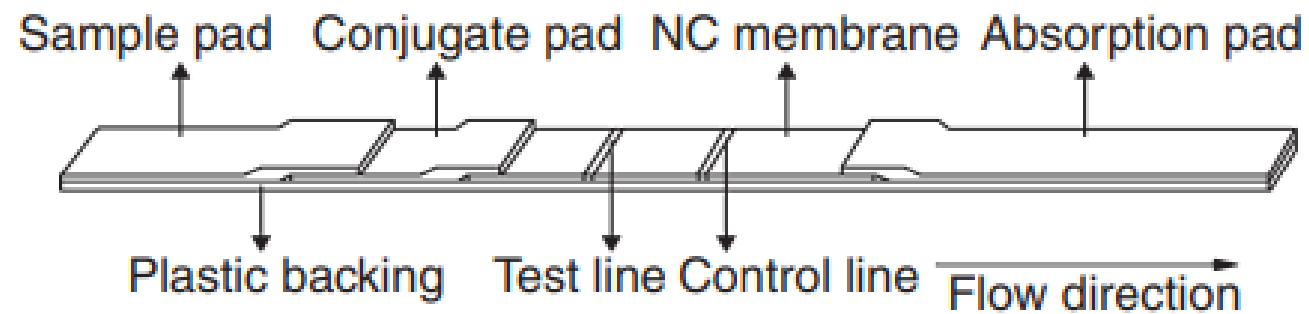


Figure 1 Schematic diagram of a test strip (cross section) showing several components.

図1 テストストリップの模式図(断面図)いくつかのコンポーネントを示す。

Materials and methods

- 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。
- 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)およびドットブロット法も実施した。
- イムノクロマトストリップの感度と特異性
- イムノクロマトストリップの再現性と安定性

Results

透過型電子顕微鏡イメージング

図2 透過電子顕微鏡で観察した
コロイド金粒子の顕微鏡写真

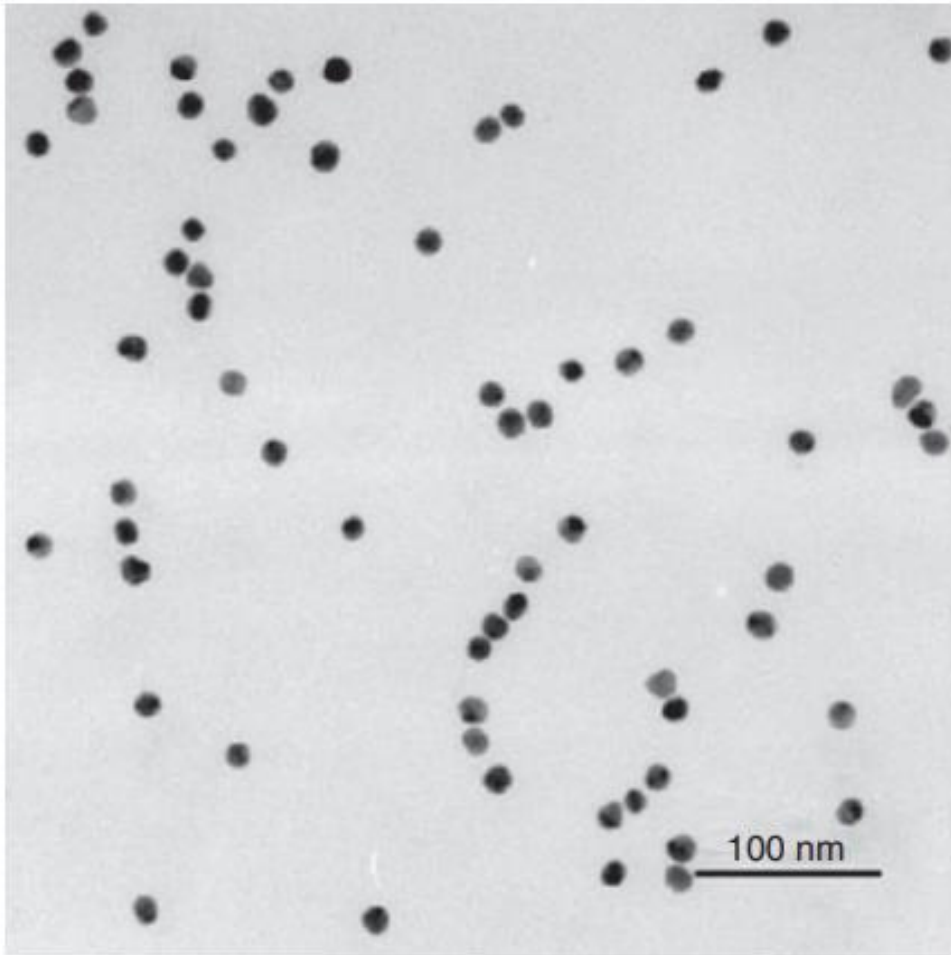


Figure 2 The colloidal gold particles micrograph observed by transmission electron microscopy.

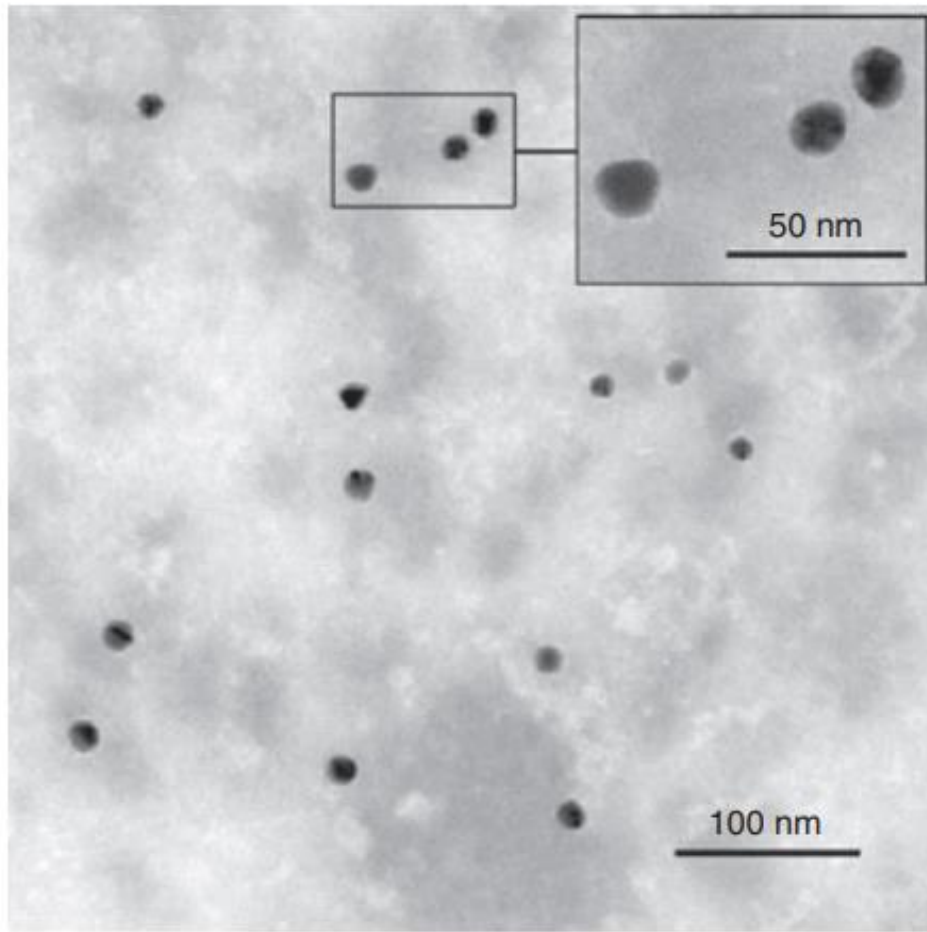


Figure 3 The colloidal gold-monoclonal antibody (McAb) probe micrograph observed by transmission electron microscopy after negative staining with uranyl acetate, a thin white 'halo' layer surrounding the surface of the nanoparticles indicating coating with the anti-lymphocystis disease virus McAb (insert area at higher magnification)

図3 酢酸ウラニルによるネガティブ染色後、透過型電子顕微鏡で観察したコロイド状金-モノクローナル抗体(McAb)プローブ顕微鏡写真。ナノ粒子表面を取り囲む薄い白い「ハロー」層は、抗リンフォシスチス病ウイルスMcAbによるコーティングを示している(高倍率の挿入部)。

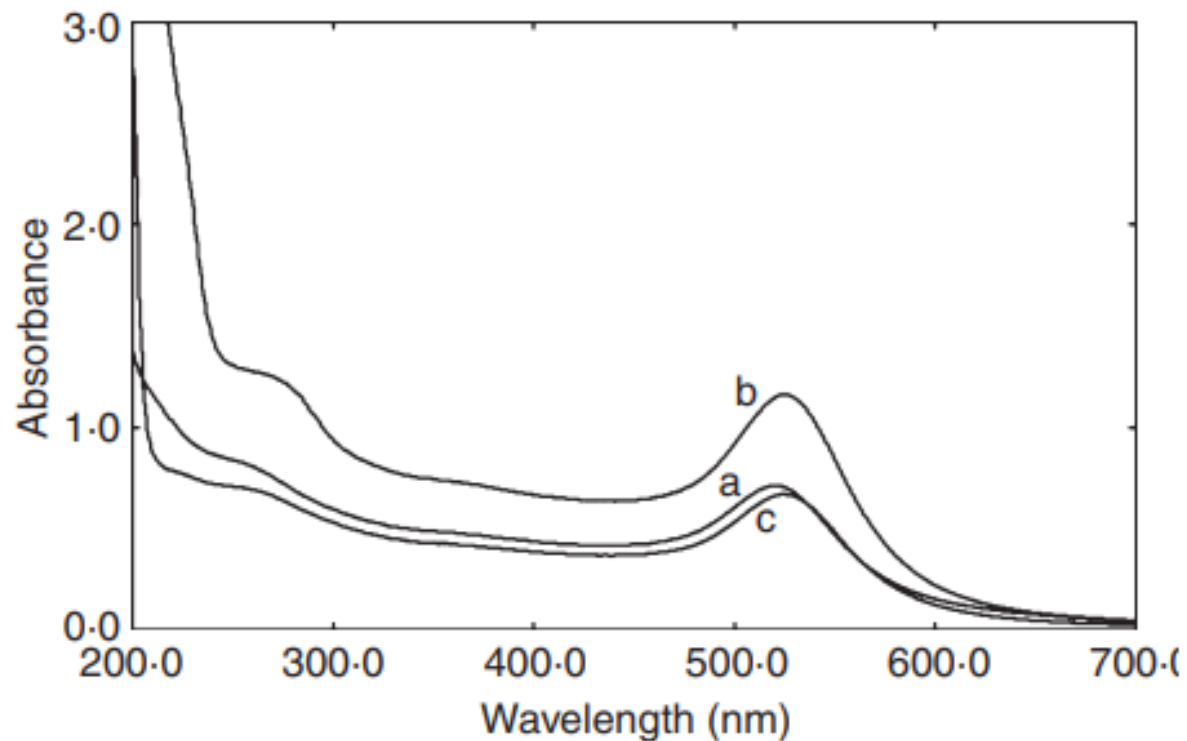


Figure 4 UV-visible spectra of colloidal gold and colloidal gold-monoclonal antibody (McAb) probe. Curve a, colloidal gold solution; curve b, the colloidal gold-McAb probe immediately after addition of anti-lymphocystis disease virus McAb 2D11 to colloidal gold solution; Curve c, the colloidal gold-McAb probe after centrifugation and resuspension.

紫外可視スペクトル

図4 コロイド金とコロイド金-モノクローナル抗体 (McAb) プローブの紫外可視スペクトル。曲線aはコロイド状金溶液、曲線bはコロイド状金溶液に抗リンポシスチス病ウイルスMcAb 2D11を添加した直後のコロイド状金-McAbプローブ、曲線cは遠心分離および再懸濁後のコロイド状金-McAbプローブ。

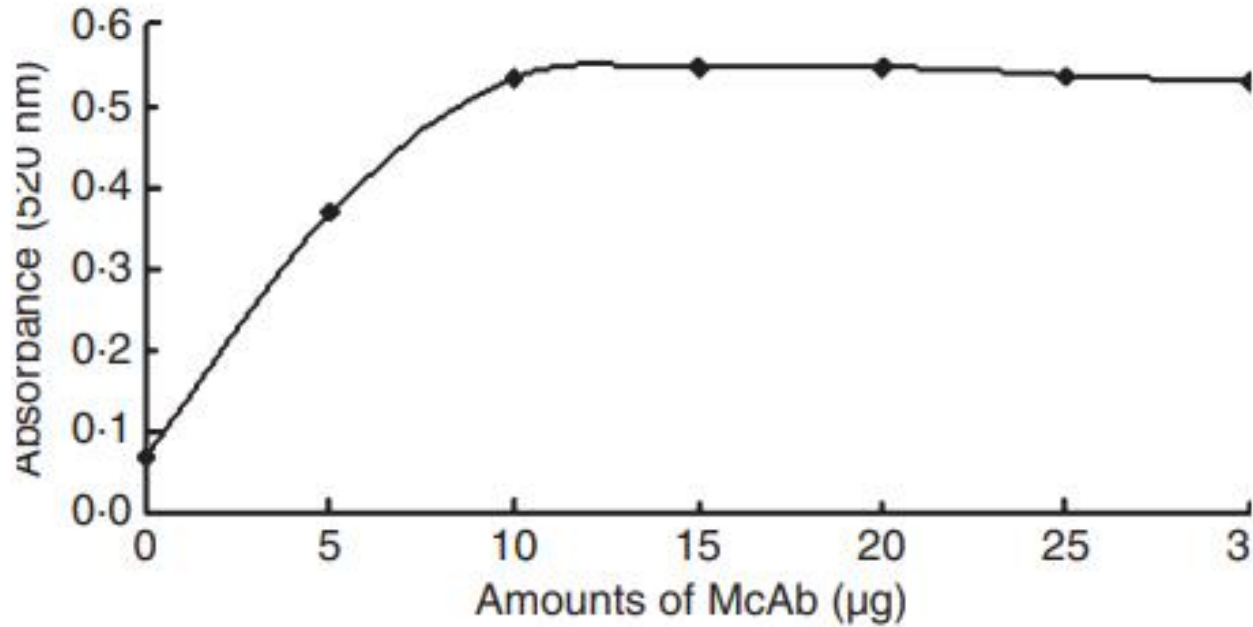


Figure 5 Absorbance of colloidal gold conjugates measured at 520 nm with various amounts of anti-lymphocystis disease virus monoclonal antibody (0–30 µg).

コロイド状金結合体に対するMcAbの最適量

図5
様々な量の抗リンポシスチス病ウイルスモノクローナル抗体(0～30µg)を用いて520 nmで測定したコロイド状金コンジュゲートの吸光度。

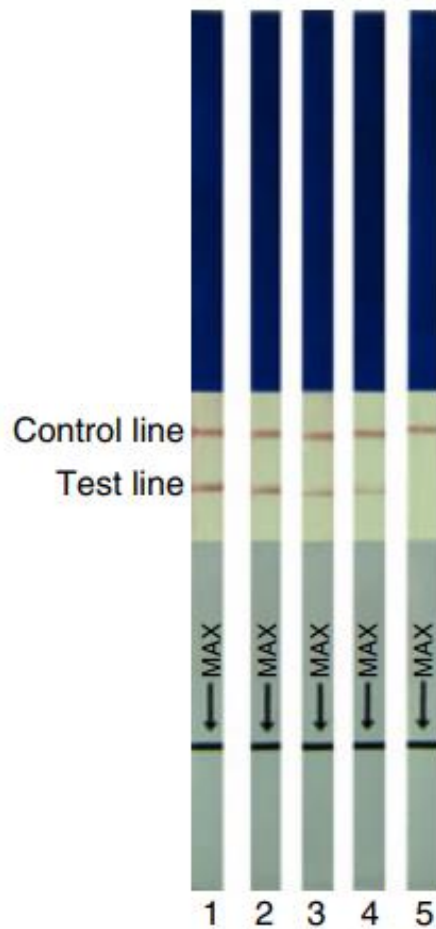


Figure 6 Immunochromatographic strip test results of purified lymphocystis disease virus (LCDV) showed positive at protein concentrations of 50, 10, 5 and 1 $\mu\text{g/ml}$ (1–4), using the tissue homogenate supernatant of LCDV-free founder as negative control (5).

イムノクロマトストリップと LCDV検出の検出限界

図6:

精製されたリンホシスチス病ウイルス(LCDV)に対するイムノクロマトグラフィーストリップ検査では、タンパク質濃度が50、10、5、および1 $\mu\text{g/ml}$ の場合(1–4)に陽性反応を示した。LCDV非感染のヒラメ組織ホモジネート上清を陰性対照として使用した(5)。

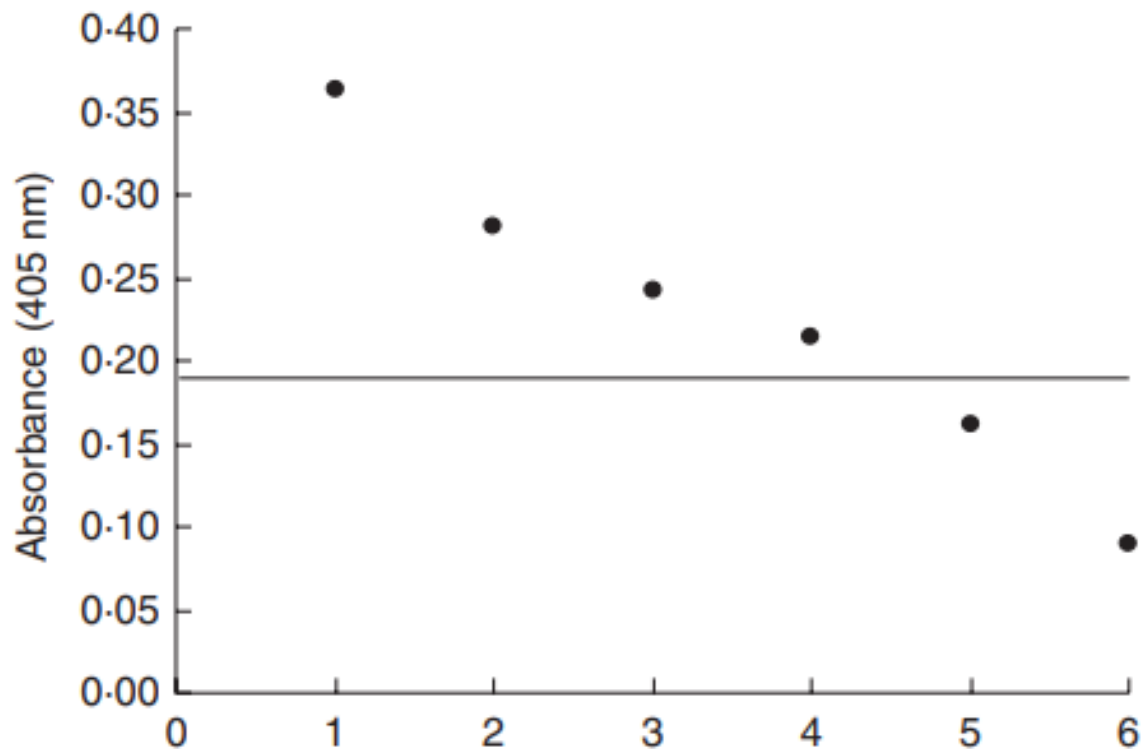


Figure 7 Result of enzyme-linked immunosorbent assay for lymphocystis disease virus (LCDV) detection. Purified LCDV at protein concentrations of 50, 10, 5, 1 and 0.5 $\mu\text{g/ml}$ (1–5) were tested. Absorbance values twice higher than the background level reactivity on negative samples (6) were considered to be positive. The dashed line (– –) indicated the visual detection limit.

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 $1\mu\text{g ml}^{-1}$ であった。

図7 リンパシスチス病ウイルス(LCDV)検出のための酵素結合免疫吸着アッセイの結果。タンパク質濃度50、10、5、1および $0.5\mu\text{g/ml}$ (1-5)の精製LCDVを検査した。陰性サンプル(6)のバックグラウンドレベルの反応性より2倍高い吸光度値を陽性とみなした。破線(– –)は視覚的検出限界を示した。



Figure 8 Result of dot-blotting for lymphocystis disease virus (LCDV) detection. Purified LCDV at the protein concentrations of 50, 10, 5, 1 $\mu\text{g/ml}$ gave positive results (1–4), showing a detection limit of 1 $\mu\text{g/ml}$ (4). Tissue homogenate supernatant of LCDV-free founder was used as negative control (5).

- 図8:
- リンホシスチス病ウイルス（LCDV）検出のためのドットブロット法の結果。タンパク質濃度が50、10、5、1 $\mu\text{g/ml}$ の精製LCDV（1～4）は陽性反応を示し、検出限界は1 $\mu\text{g/ml}$ （4）であることが示された。LCDV非感染ヒラメの組織ホモジネート上清が陰性対照として使用された（5）。