Special Research Project Title	Limitations of NGAL lateral flow immunoassay using carbon label
Special Research Project Credits	6
Candidate	Miss Saranthida Wongvanichchot
Special Research Project Advisor	Asst. Prof. Dr. Kwanchanok Pasuwat
Program	Master of Engineering
Field of Study	Chemical Engineering
Department	Chemical Engineering
Faculty	Engineering
Academic Year	2013

Abstract

Nowadays, acute kidney injury (AKI) becomes one of the public health problems in Thailand. AKI is a type of kidney failure that affects kidneys' functions, e.g., the removal of waste products from blood and the balance of electrolyte and body's fluid. Current diagnosis of AKI relies on the measurement of biomarkers. One of the best AKI biomarkers is Neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) because of its sensitivity and specificity. NGAL is easily detected in the blood and urine soon after the kidney injury. Moreover, NGAL concentration has been shown to increase within 2 hours after renal injury. An alternative method to measure NGAL is immunoassay. Immunoassay can be performed on several platforms such as enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), ARCHITECT (Abbott Diagnostic), Triage (Alere's device) and lateral flow chromatographic immunoassay (LFIA). Previously, colloidal gold was used as a label to detect NGAL. Unfortunately, the color intensity of the gold label was too pale, making the result interpretation by naked eye impossible. Then, carbon nanoparticles were used as labels in LFIA for the diagnosis of AKI. Unfortunately, the color intensity of the carbon label was too pale, making the result interpretation by naked eye impossible as well. In this study, the cause of low intensity test line was investigated by checking the label performance and antibody activity. The performance of the carbon nanoparticles, as labels, was assessed using a dot blot assay. There were two types of NGAL antibodies used in this study. The first antibody was the monoclonal anti-NGAL antibody at its optimal concentration of 350 μg/ml. The second which had higher activity and was used in the previous study was human lipocalin2 NGAL biotinylated antibody at the recommended concentration of 1 μg/ml. To test this platform, the concentrations of NGAL protein in phosphate buffer saline (PBS) were varied between 50 – 1000 ng/ml and spotted onto a nitrocellulose membrane. The remaining non-specific sites on the membrane were blocked by immersing the membrane into 5% (w/v) BSA solution. After that, the PBS solution containing antibody specific to NGAL was allowed to flow through the nitrocellulose membrane in which NGAL proteins were previously spotted. No spot was visible on the membrane, indicating that the flow through method was not successful. An alternative was to add the antibody-carbon conjugate solution directly to the protein spots, This method gave much clearer results. However, the intensities of the NGAL-antibody spots were not

sufficiently high to indicate the binding of the antibody-protein. In the same way, the results of human lipocalin2 NGAL biotinylated antibody testing cannot indicate the presence of different concentrations of NGAL protein either which was shown in terms of the color intensity of each spot. Increasing the concentration of the carbon conjugate and the antibody did not show the detection of NGAL protein either. Thus, the dot blot format and the carbon nanopaticles are not suitable for the detection of NGAL protein in a nitrocellulose membrane platform.

Keywords: Acute kidney injury/ Lateral flow immunoassay (LFIA)/ Dot blot/

Neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL)/ Carbon nanoparticle

หัวข้อโครงการศึกษาวิจัย	ข้อจำกัดในการใช้คาร์บอนเลเบลด้วยวิธีอิมมูโนแอสเสย์แบบการไหลเลเทอรอล
หน่วยกิต	6
ผู้เขียน	นางสาวศรัณย์ธิดา วงศ์วณิชย์โชติ
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ. ดร.ขวัญชนก พสุวัต
หลักสูตร	วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	วิศวกรรมเคมี
ภาควิชา	วิศวกรรมเคมี
คณะ	วิศวกรรมศาสตร์
ปีการศึกษา	2556

บทคัดย่อ

ปัจจุบันนี้ โรคไตวายเฉียบพลันเป็นหนึ่งในปัญหาสุขภาพที่คนไทยต้องเผชิญ โรคไตวายเฉียบพลันเป็นภาวะที่ไตเกิดความเสียหาย ซึ่งส่งผลกระทบการทำงานของไต เช่น การจัดการของเสียออกจากเลือด และการควบคุมสมดุลของอิเล็กโทรไลต์ และของเหลวในร่างกาย การวินิจฉัยโรคไตวายเฉียบพลันในปัจจุบันนี้ใช้วิธีการตรวจวัดตัวบ่งชี้ชีวภาพ หนึ่งในตัวบ่งชี้ชีภาพที่ดีที่สุดในการวินิจฉัยโรคไตวายเฉียบพลัน คือNeutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) เพราะ ความไวและความจำเพาะของมัน NGAL สามารถตรวจพบได้ง่ายในเลือด และปัสสาวะอย่างรวดเร็วหลังการเกิดไตวายเฉียบพลัน ยิ่งไปกว่านั้นความเข้มข้นของ NGAL จะปรากฏได้ภายใน 2 ชั่วโมงหลังจากที่ไตล้มเหลว ทางเลือกสำหรับการตรวจวัด NGAL โดยทั่วไป คือ Immunoassay ซึ่ง Immunoassay สามารถดำเนินการได้หลายวิธี ได้แก่ Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), ARCHITECT (Abbott Diagnostic), Triage (Alere's device) และ Lateral flow chromatographic immunoassay (LFIA) ก่อนหน้านี้ Colloidal gold ได้ถูกนำมาใช้เป็นตรวจจับใน NGAL แต่อย่างไรก็ตามความเข้มสีของ Gold label มีค่าต่ำมาก ทำให้ไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ต่อจากนั้นได้มีการนำ Carbon nanoparticles มาใช้เป็นตัวตรวจจับแทน แต่อย่างไรก็ตามความเข้มสีของ Carbon label ยังคงมีค่าต่ำอยู่ ทำให้ไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าได้ ในการศึกษาครั้งนี้ ได้ทำการหาสาเหตุของปัญหาของสีที่จางบนเส้นทดสอบซึ่งได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพของตัวตรวจจับ และความสามารถของแอนติบอดี้ ประสิทธิภาพของ Carbon nanoparticles ซึ่งถูกใช้เป็นตัวตรวจจับใน LFIA ถูกทดสอบด้วยวิธี Dot blot ในการศึกษานี้มีการใช้แอนติบอดี้สองตัว ตัวแรก คือ Monoclonal anti-NGAL antibody ซึ่งมีความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ 350 μg/ml ตัวที่สอง คือ Human lipocalin2 NGAL biotinylated antibody ซึ่งแอนติบอดี้ตัวนี้มีความสามารถในการทำปฏิกิริยามากกว่า และถูกใช้ในการศึกษาก่อนหน้านี้ โดยมี

ความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ 1 μg/ml การทดสอบนี้ เริ่มต้นจากการเตรียมความเข้มข้นของ NGAL ใน Phosphate buffer saline (PBS) ที่ความเข้มข้นระหว่าง 50-1000 ng/ml และหยดลงบนเมมเบรน พื้นที่บนเมมเบรนที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยาจะถูกขัดขวางการทำปฏิกิริยาโดยการแช่ในสารละลาย BSA หลังจากนั้น สารละลาย PBS ที่มีแอนติบอดี้ที่ทำปฏิกิริยากับ NGAL จะถูกไหลผ่านไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนตรงจุดที่เคยหยด NGAL ไว้ก่อนหน้านี้ การที่มองไม่เห็นจุดใดๆบนไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนนั่นหมายความว่า วิธีนี้ไม่ประสบความสำเร็จ อีกทางเลือกหนึ่ง คือ การหยดสารละลาย Antibody-carbon conjugate บนเมมเบรนโดยตรงบนจุด NGAL วิธีนี้ให้ผลที่ชัดเจนกว่าวิธีแรก แต่อย่างไรก็ตาม ความเข้มสีของจุด NGAL-antibody spots ไม่สูงมากพอที่จะระบุการมีอยู่ของ Antibody-protein ได้ ในทางเดียวเดียวกัน ผลของการทดสอบ Human lipocalin2 NGAL biotinylated antibody ก็ไม่สามารถแสดงความแตกต่างของความเข้มข้นของโปรตีน NGAL ได้ การเปลี่ยนความเข้มข้นของคาร์บอนคอนจูเกตและการเปลี่ยนแอนติบอดี้ ไม่สามารถตรวจสอบโปรตีน NGAL ได้ ดังนั้นวิธี Dot blot และ Carbon nannoparticles นี้ ไม่เหมาะสำหรับการใช้ตรวจสอบโปรตีน NGAL

คำสำคัญ : โรคไตวายเฉียบพลัน/ Lateral flow immunoassay (LFIA)/ Dot blot/

Neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL)/ Carbon nanoparticle