

УДК 543.645:57.083.3

РАЗРАБОТКА ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА ЧЕЛОВЕКА

© 2013 г. Н. А. Бызова*, Л. Н. Лухверчик**, А. В. Жердев*, Н. В. Пивень**,
А. И. Бураковский**, Б. Б. Дзантиев*

*Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва, 119071, e-mail: nbyzova@inbi.ras.ru

**Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, 220141, Беларусь, e-mail: piven@iboch.bas-net.by

Поступила в редакцию 15.04.2013 г.

Разработан метод экспрессной детекции эпидермального фактора роста человека, представляющий собой иммунохроматографический анализ в “сэндвич”-формате. Контакт пробы и тест-полоски с нанесенными иммунореагентами инициирует движение жидкости по мембранным компонентам тест-полоски, иммунохимические взаимодействия и формирование окрашенных зон. В ходе разработки определены требования к комплектации тест-системы, обеспечивающие минимальный предел обнаружения. Показано, что данный метод позволяет за 5 мин детектировать эпидермальный фактор роста человека в концентрациях до 10 пг/мл в водных растворах, моче, сыворотке и плазме крови. Разработанная тест-система может быть использована для внелабораторной диагностики.

DOI: 10.7868/S0555109913060032

Эпидермальный фактор роста (ЭФР) – одноцепочечный глобулярный белок с м.м. 6,4 кДа, состоящий из 53 аминокислотных остатков [1]. ЭФР синтезируется преимущественно в слюнных железах [2] и присутствует во всех основных биологических жидкостях организма – в моче (в которой был описан как урогастрон), крови, cerebrospinalной жидкости, молоке, слюне, желудочном и панкреатическом соках [3]. ЭФР стимулирует пролиферацию различных эпидермальных и эпителиальных клеток (включая фибробласты, почечный эпителий, глиальные клетки, клетки гранулы яичников и тиреоидные клетки) [4], а также эмбриональных клеток, способствуя высвобождению кальция из костной ткани и резорбции костей. Действие ЭФР вносит существенный вклад в процессы заживления ран и ангиогенеза. ЭФР играет важную роль в канцерогенезе, индуцируя, в частности, протоонкогены *c-fos* и *c-myc* [5]. Повышенный уровень ЭФР в крови и моче характерен для ряда онкологических заболеваний [6, 7].

Показано, что блокирование ЭФР антителами, препятствуя связыванию ЭФР со специфическим рецептором, тормозит развитие опухолей. Этот эффект используется в ряде разработок противоопухолевых вакцин [8–11]. Так, показана эффективность вакцины *SimaVax-EGF* для лечения немелкоклеточного рака легкого. При этом установлено, что ее терапевтический эффект зависит от уровня ЭФР в крови пациента [11].

На сегодняшний день в медицинской практике для определения концентрации ЭФР используются иммунохимические методы [12]. Коммерчески доступны иммуноферментные микропланшет-

ные наборы фирм “RnD Systems”, “eBioscience”, “RayBio”, “Invitrogen”, “Thermo Scientific”, “Abnova”, позволяющие определять природный и рекомбинантный ЭФР в среде для культивирования клеток, моче, сыворотке и плазме крови в концентрациях от 1 до 1000 пг/мл.

Однако иммуноферментный анализ (ИФА) в силу диффузионных ограничений требует довольно продолжительных инкубаций реагентов [13], вследствие чего продолжительность ИФА составляет от 2 до 4 ч. В последние годы в иммунохимическом анализе интенсивно идет замена традиционных форматов, таких как ИФА, на экспрессные тесты – иммуносенсорные, иммунохроматографические и др., позволяющие существенно (до 5–15 мин) сократить продолжительность определения и снизить его трудоемкость. Особый интерес в ряду этих методов представляет иммунохроматографический анализ (ИХА), в котором достигнуто максимальное методическое упрощение. Все необходимые для анализа реагенты предварительно наносятся на тест-полоску (мультимембранный композит). После ее контакта с тестируемой жидкой пробой одновременно с движением по тест-полоске впитавшейся жидкости осуществляются иммунохимические взаимодействия и формирование на определенных участках тест-полоски окрашенных зон, свидетельствующих о присутствии (а в ряде случаев – и о содержании) в пробе контролируемого соединения [13]. Таким образом, ИХА не предполагает использования устройств и реагентов, дополняющих тест-полоску, а также каких-либо действий оператора в ходе анализа. Это позволяет проводить тестирование вне специали-

зированных лабораторий и регистрировать его результат либо визуально, либо с помощью портативных детектирующих устройств – от видеокамеры мобильного телефона или офисного сканера [14] до серийно производимых видеоцифровых детекторов [15].

Иммунохроматографические тест-системы для определения ЭФР на сегодняшний день не описаны в научной литературе и не представлены на рынке как коммерчески доступные изделия. Учитывая практическую значимость контроля содержания ЭФР для онкодиагностики и терапии, целью проведенного исследования была разработка иммунохроматографической тест-системы для определения ЭФР в водных растворах, моче, сыворотке и плазме крови. Достижение этой цели предполагало решение ряда методических задач, связанных с характеристикой взаимодействия иммунореагентов в проточной мембранной системе и оптимизации условий проведения иммунохроматографии. В настоящей статье представлены результаты, полученные при решении этих задач и характеристике разработанной тест-системы.

МЕТОДИКА

Реактивы. В работе использовали рекомбинантный человеческий эпидермальный фактор роста, мышинные моноклональные (МАт), клон 10827, и поликлональные (ПАт), АВ-236-NA, козы антигена против ЭФР (все – “RnD Systems”, США), антигена козы (GAMIss), кролика (RAMIss) и овцы (SAMIss) против иммуноглобулинов (Ig) мыши и антигена кролика (RAGIss) против Ig козы (“Имтек”, Россия), антигена козы (GAMI) против Ig мыши и антигена осла (DAGI) против Ig козы (“Arista Biologicals”, США), трис, Тритон X-100, цитрат натрия, азид натрия, золотохлористоводородную кислоту (“Sigma”, США), Твин-20, бычий сывороточный альбумин (БСА) (“MP Bio-medicals”, Великобритания). Все вспомогательные реагенты (соли, кислоты, щелочи, органические растворители) были аналитической или химической чистоты.

Растворы для получения коллоидного золота (КЗ) и его конъюгатов готовили на деионизированной воде (удельное сопротивление при 25°C не менее 18.2 МОм · см, система Simplicity, “Millipore”, США).

Для изготовления иммунохроматографических тест-полосок использовали наборы mdi Easyrack (“Advanced Microdevices”, Индия), включающие закрепленную на твердой основе рабочую мембрану CNPF-SN12 с размером пор 10 мкм, стекловолоконную мембрану для коллоидного конъюгата PT-R7, мембрану для нанесения пробы FR-1 и конечную адсорбирующую мембрану AP045.

Получение КЗ цитратным методом [16]. К 97.5 мл деионизированной воды добавляли 1.0 мл 1%-ного раствора золотохлористоводородной кислоты, доводили до кипения и при перемешивании добавляли 1.5 мл 1%-ного раствора цитрата натрия. Смесь кипятили 25 мин, затем охлаждали и хранили при 4–6°C.

Просвечивающая электронная микроскопия. Препараты КЗ наносили на сеточки (300 меш., “Pelco International”, США), покрытые пленкой-подложкой из поливинилформала, растворенного в хлороформе. Снимки получали на электронном микроскопе CX-100 (“Jeol”, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ и увеличении 330000. Фотографии в цифровой форме анализировали в программе Image Tool.

Получение конъюгатов КЗ с антителами. Предварительную характеристику связывания антител с КЗ проводили согласно [17]. С этой целью к 0.1 мл раствора антител в воде (МАт либо ПАт; концентрацию варьировали от 5 до 250 мкг/мл) добавляли по 1.0 мл раствора КЗ ($D_{520} = 1.0$), перемешивали и инкубировали 10 мин при комнатной температуре. Затем добавляли 0.1 мл 10%-ного хлорида натрия, перемешивали и через 10 мин измеряли D_{580} . Зависимость D_{580} от концентрации антител (флокуляционная кривая) отражала агрегацию получаемого конъюгата при высокой ионной силе раствора. Выбор соотношений антитела : КЗ проводили на основании полученных концентрационных зависимостей, используя антитела в количестве, на 10–15% превосходящем точку выхода D_{580} на плато, как рекомендовано в [17].

Перед конъюгацией с КЗ антигена диализовали против 1 000-кратного объема 10 mM трис-НСl буфера, pH 9.0, в течение 2 ч при 4°C. К раствору КЗ ($D_{520} = 1.0$) добавляли 0.1 M карбонат калия до достижения pH 9.0 и вносили КЗ в раствор антител выбранной концентрации. Смесь инкубировали 30 мин при комнатной температуре и перемешивали, после чего вносили водный раствор БСА до конечной концентрации 0.25%. Частицы КЗ с иммобилизованными на них антителами отделяли от непрореагировавших антител центрифугированием при 8000 g в течение 30 мин. После удаления супернатанта осадок ресуспендировали в 10 mM трис-НСl буфере, pH 9.0, содержащем 0.25% БСА, 0.05% Твина 20 и 0.05% азид натрия (Трис-БТА). Препараты конъюгатов хранили при 4–6°C.

Изготовление иммунохроматографических тест-систем. Нанесение реагентов на мембраны, входящие в состав тест-системы, проводили с использованием автоматического диспенсера IsoFlow (“Image Technology”, США). Конъюгаты КЗ с МАт (МАт–КЗ) и ПАт (ПАт–КЗ) наносили на стекловолоконную мембрану в разведении, соответствующем $D_{520} = 6.0$ (16 мкл на 1 см ширины

стекловолоконной мембраны). Для формирования аналитической зоны использовали МАт или ПАт (0.5 мг/мл в 50 мМ К-фосфатном буфере, pH 7.4, содержащем 0.1 М хлорида натрия, 0.05% БСА и 0.1% азида натрия, **ФБС-БА**), контрольной зоны – антигена ГАМ1, ГАМ1ss, РАМ1ss, САМ1ss (0.5 мг/мл в **ФБС-БА**) для конъюгата МАт–КЗ либо антигена РАГ1ss и DAG1 (0.3 мг/мл в **ФБС-БА**) для конъюгата ПАт–КЗ. На 1 см ширины рабочей мембраны нанесли по 2.0 мкл растворов. Полученные стекловолоконные и рабочие мембраны сушили на воздухе при 20–22°C не менее 20 ч. Из этих двух мембран, мембраны для нанесения пробы и конечной адсорбирующей мембраны собирали мультимембранный композит и получали из него тест-полоски шириной 3.5 мм, используя автоматический гильотинный нарезчик Index Cutter-1 (“A-Point Technologies”, США). Эти тест-полоски герметично упаковывали с силикагелем в качестве осушителя в пакеты из ламинированной алюминиевой фольги с помощью запаивателя с миниконвейером FR-900 (“Wenzhou dingli packing machinery”, Китай). Нарезку и упаковку проводили при 20–22°C в специальном помещении с относительной влажностью воздуха не более 30%. Упакованные тест-полоски хранили при комнатной температуре.

Иммунохроматографический анализ и регистрация результатов. Анализ проводили при комнатной температуре. Вскрывали пакет, извлекали тест-полоску и в вертикальном положении погружали ее нижний конец на 1 мин в аликвоту пробы (50 мкл), после чего помещали тест-полоску на горизонтальную поверхность. Через 5 мин после начала анализа контролировали результат, получая цифровое изображение тест-полоски на сканере CanoScan LiDE 90 (“Canon”) и рассчитывая интенсивность окрашивания зон на мембране с помощью программы TotalLab, как описано в работе [18], или с помощью видеоцифрового детектора Рефлеком фирмы “Окта-Медика”, Россия [15].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Получение и характеристика реагентов для иммунохроматографии. Размеры молекулы ЭФР позволяют ожидать наличие у нее нескольких непрерывающихся антиген-связывающих сайтов. Благодаря этому становится возможным реализовать для детектирования ЭФР двухсайтный “сэндвич”-формат иммунохроматографического анализа, основанный на формировании в ходе анализа комплекса (иммобилизованные в аналитической зоне антигена против ЭФР) : (ЭФР в тестируемой пробе) : (антигена против ЭФР, конъюгированные с КЗ). Для проведения данного анализа были получены препарат КЗ и его конъюгаты со специфическими антигенами.

Размеры и однородность частиц КЗ, синтезированных цитратным методом, определяли с по-

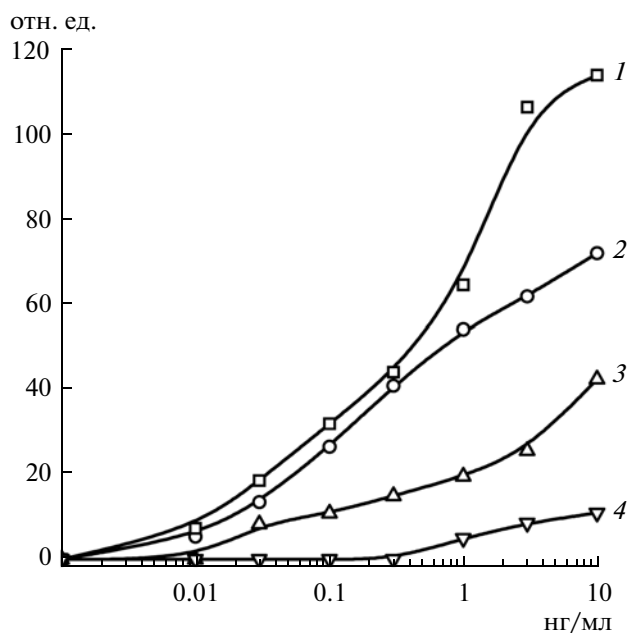


Рис. 1. Зависимость интенсивности окрашивания аналитической зоны (отн. ед.) от концентрации ЭФР (нг/мл) для четырех вариантов иммунохроматографических тест-систем: в аналитической зоне сорбированы ПАт (кривые 1, 3) либо МАт (кривые 2, 4); с коллоидным золотом конъюгированы МАт (кривые 1, 4) либо ПАт (кривые 2, 3).

мощью просвечивающей электронной микроскопии. Было показано, что полученный препарат КЗ не содержит агрегатов и характеризуется средним диаметром частиц 34 нм (по данным 90 измерений). Среднее значение максимальной оси изображений частиц составляло 37 ± 8 нм, минимальной оси – 30 ± 5 нм.

На основании флоккуляционных кривых для получения конъюгатов МАт–КЗ и ПАт–КЗ были выбраны концентрации антител, равные 12 (МАт) и 9 (ПАт) мкг/мл. Для этих условий синтеза конъюгатов мольное соотношение антигена : КЗ в реакционной смеси составляло 380 : 1 для МАт и 290 : 1 для ПАт, являясь, таким образом, избыточным по сравнению с пропорцией, достигаемой при монослойной иммобилизации [19]. Избыток непрореагировавших антител удаляли с супернатантом при осаждении конъюгатов центрифугированием.

Выбор комплектации иммунохроматографической тест-системы. С использованием двух препаратов антител, специфичных к ЭФР, были изготовлены иммунохроматографические тест-системы четырех видов (рис. 1). В первом и третьем вариантах тест-систем в аналитической зоне сорбировали ПАт, во втором и четвертом – МАт. В первом и четвертом вариантах с КЗ конъюгированы МАт, во втором и третьем – ПАт. Для каждой комплектации были получены зависимости интенсивности окрашивания аналитической зоны от

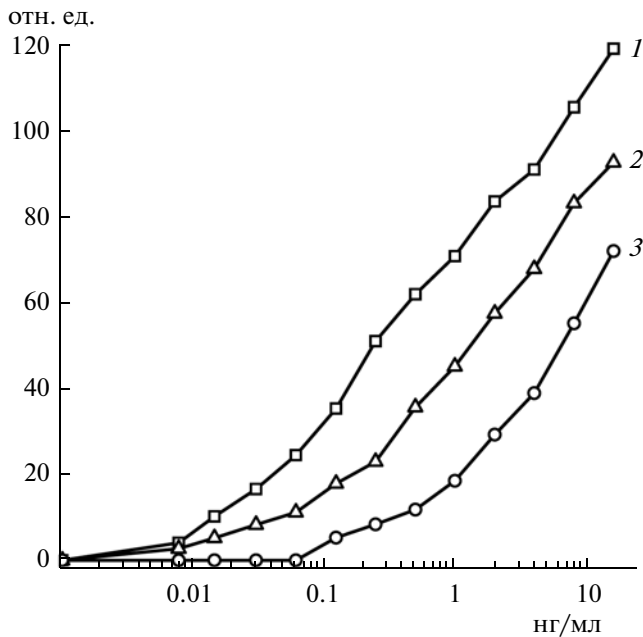


Рис. 2. Зависимости интенсивности окрашивания аналитической зоны иммунохроматографической тест-системы (отн. ед.) от концентрации ЭФР (нГ/мл), полученные при сорбции ПАТ из концентраций 0.5, 0.25 и 0.125 мг/мл для кривых 1–3 соответственно.

концентрации ЭФР в пробе. Как следует из представленных на рис. 1 результатов, первый и второй варианты тест-систем позволяют детектировать ЭФР в концентрациях до 10 пг/мл, третий – до 30 пг/мл, а четвертый – до 1 нг/мл. Максимальная интенсивность окрашивания аналитической зоны для первого варианта тест-системы в 1.7, 4 и 12 раз больше, чем для второго, третьего и четвертого вариантов тест-систем соответственно. Таким образом, предпочтительным является первый вариант тест-системы: в аналитической зоне сорбированы ПАТ, а с КЗ конъюгированы МАТ.

Оптимизация выбранного варианта тест-системы. Для обеспечения максимальной достоверности результатов тестирования и выявления ЭФР в минимальных концентрациях была проведена оптимизация тест-системы, включавшая выбор типа и концентрации реагентов в контрольной, аналитической и стартовой зонах тест-полоски.

Исходя из данных наших предшествующих работ [18, 19], реагенты в контрольную и аналитическую зоны наносили из объема 2.0 мкл на 1 см ширины рабочей мембраны, что обеспечивает равномерность иммобилизации и, соответственно, минимальный разброс между изготовленными в одной серии тест-полосками по степени связывания окрашенного маркера при проведении анализа.

Конъюгат МАТ–КЗ наносили из раствора с $D_{520} = 6.0$ при скорости 16.0 мкл на 1 см ширины стекловолоконной мембраны. Это обеспечивало формирование интенсивно окрашенных зон в ходе анализа в сочетании с полнотой вымывания реагента из стартовой зоны и отсутствием неспецифического окрашивания рабочей мембраны.

Серия препаратов антител против Ig мыши, нанесенных в контрольную зону, была сопоставлена по связыванию конъюгата МАТ–КЗ в ходе иммунохроматографии. При насыщающих концентрациях реагентов (см. раздел “Методика”) интенсивность окрашивания контрольной зоны составляла: для козьих антител 80 отн. ед. (GAMIss) и 87 отн. ед. (GAMI), для кроличьих антител (RAMIss) – 51 отн. ед. и для овечьих антител (SAMIss) – 73 отн. ед. Для дальнейшего использования в анализе были выбраны козы антитела GAMI фирмы “Arista Biologicals”, обеспечивающие максимальное связывание окрашенного маркера.

При формировании аналитической зоны варьировали количество сорбируемых ПАТ. На рис. 2 представлены градуировочные кривые ИХА ЭФР, полученные при иммобилизации в аналитической зоне ПАТ из растворов с концентрациями 0.5, 0.25 и 0.125 мг/мл. Установлено, что при концентрациях сорбируемых ПАТ 0.5 и 0.25 мг/мл предел обнаружения ЭФР составляет 10 пг/мл, а при концентрации ПАТ 0.125 мг/мл – 100 пг/мл. Интенсивность окрашивания аналитической зоны при концентрации ЭФР в пробе 16 нг/мл составляла 120, 93 и 72 отн. ед. для концентраций ПАТ, равных 0.5, 0.25 и 0.125 мг/мл соответственно. Исходя из этих данных и необходимости максимальной достоверности диагностики, был выбран вариант изготовления тест-систем, предусматривающих иммобилизацию ПАТ в аналитической зоне из раствора с концентрацией 0.5 мг/мл.

Характеристика разработанной иммунохроматографической тест-системы. На основании результатов оптимизации были изготовлены тест-полоски и охарактеризовано определение с их использованием ЭФР в стандартных растворах, моче, сыворотке и плазме крови.

На рис. 3 представлены результаты тестирования проб с разной концентрацией ЭФР в буфере (50 мМ К-фосфатный буфер, рН 7.4, с 0.1 М NaCl; ФБС). Предел обнаружения ЭФР составляет 10 пг/мл, точность определения (среднеквадратичное отклонение регистрируемой интенсивности окрашивания) – 5–7%.

Далее нами была проведена характеристика определения ЭФР в сыворотке и плазме крови. Как следует из представленных на рис. 4, 5 результатов тестирования и полученных концентрационных зависимостей, предел обнаружения ЭФР в этих видах проб также равняется 10 пг/мл. Отсутствие негативного влияния матрикса на результаты тести-

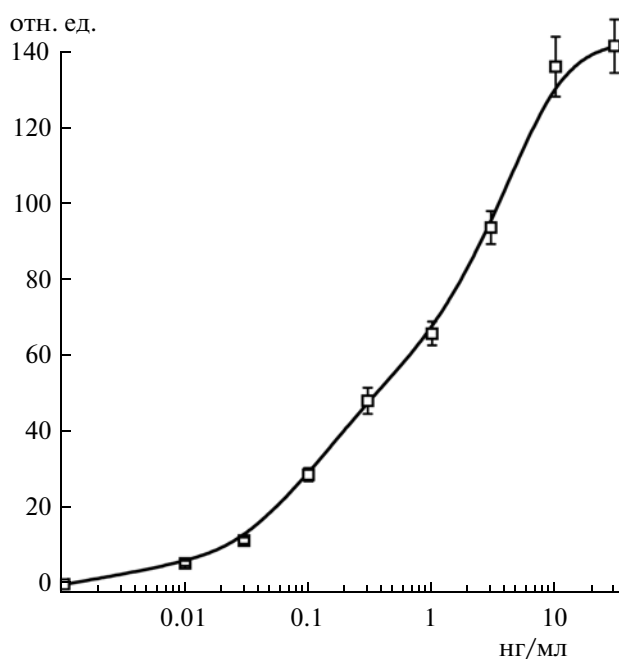


Рис. 3. Зависимость интенсивности окрашивания аналитической зоны (отн. ед.) от концентрации ЭФР (нг/мл) при определении ЭФР в ФБС с использованием иммунохроматографической тест-системы, изготовленной в соответствии с оптимизированной методикой.

рования исключает необходимость дополнительного разведения проб и упрощает процедуру проведения анализа. Точность определения при тестировании проб плазмы составляет 3–7%, а в сыворотке достигает 10%. Отметим монотонную зависимость интенсивности окрашивания от кон-

центрации ЭФР во всем диагностически значимом диапазоне концентраций — до 10 нг/мл (некоторый спад наблюдается лишь при детектировании ЭФР в концентрациях, больших 10 нг/мл, в пробах сыворотки). Таким образом, выбранные концентрации иммунореагентов исключают так называемый “хук”-эффект — снижение сигнала при высоких концентрациях антигена [20] — и позволяют проводить достоверное количественное определение ЭФР. Связывание конъюгата в аналитической зоне не препятствует контролю качества тест-системы по взаимодействию непрореагировавшего конъюгата с антивидовыми антителами в контрольной зоне. И в случае сыворотки, и в случае плазмы крови окрашивание контрольной зоны достоверно регистрируется во всем диапазоне концентраций ЭФР.

Для предварительной характеристики возможностей определения ЭФР в моче был охарактеризован ряд разведений биопробы (столбцы 2–8 на рис. 6), а также результаты добавления стандартного ЭФР в неразбавленную пробу мочи (столбцы 9, 10). Полученная корреляция интенсивности окрашивания с содержанием ЭФР (эндогенного или добавленного при проведении эксперимента) подтверждает возможность детектирования ЭФР в данном матриксе.

Поскольку матрикс проб потенциально может влиять на скорость движения фронта жидкости и иммунореагентов вдоль тест-полоски, была экспериментально исследована динамика окрашивания аналитической и контрольной зон при тестировании проб сыворотки. Как следует из представленных на рис. 7 данных, через 3 мин после начала движения фронта жидкости интенсивность окрашивания контрольной зоны составля-

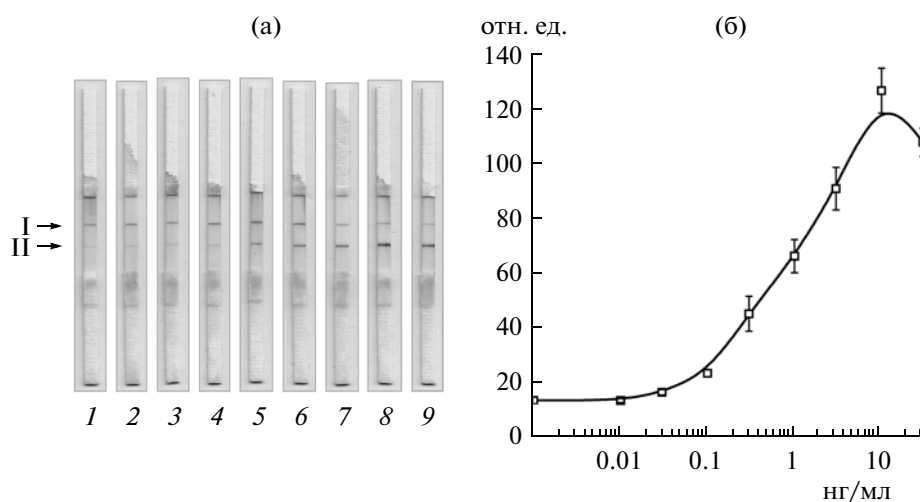


Рис. 4. Иммунохроматографическое определение ЭФР в сыворотке крови: а — внешний вид тест-полосок после проведения анализа (I — контрольная зона, II — аналитическая зона); 1–9 — концентрации ЭФР 0, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10 и 30 нг/мл; б — зависимость интенсивности окрашивания аналитической зоны (отн. ед.) от концентрации ЭФР (нг/мл).

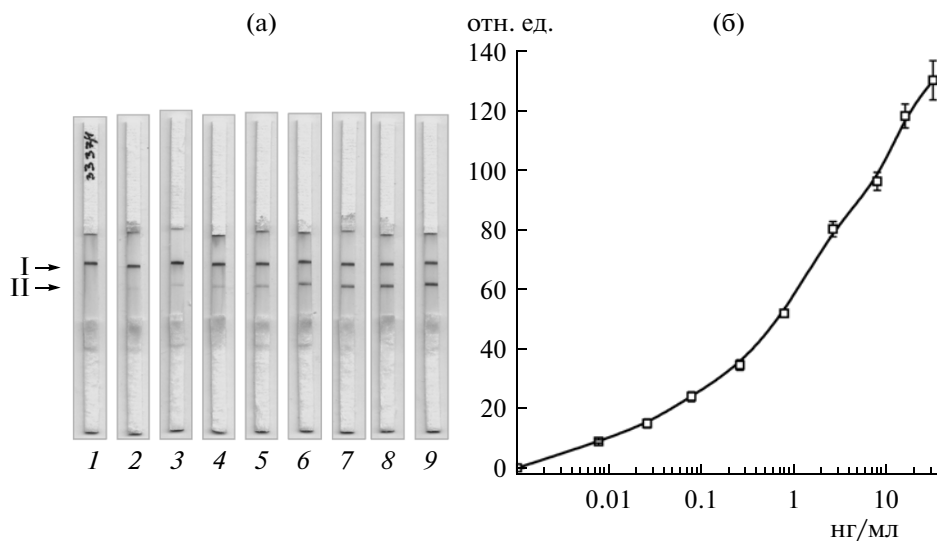


Рис. 5. Иммунохроматографическое определение ЭФР в плазме крови: а – внешний вид тест-полосок после проведения анализа (I – контрольная зона, II – аналитическая зона); 1–9 – концентрации ЭФР 0, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10 и 30 нг/мл; б – зависимость интенсивности окрашивания аналитической зоны (отн. ед.) от концентрации ЭФР (нг/мл).

ла 81%, а аналитической зоны 48% от максимума, через 5 мин – 93 и 78%, через 7 мин – 97 и 88%, соответственно. Процесс формирования детектируемых комплексов не замедляется под действием матрикса проб и идет с такой же скоростью, как для стандартных растворов ЭФР, что позволяет осуществлять быстрое тестирование. Исходя из

полученных результатов, рекомендуемая продолжительность определения ЭФР с использованием разработанной тест-системы составляет 5 мин.

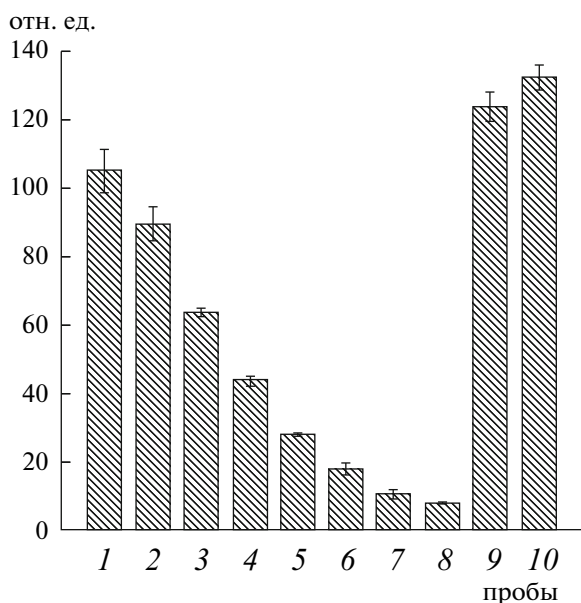


Рис. 6. Иммунохроматографическое определение ЭФР в моче. Проба 1 соответствует неразбавленной моче; пробы 2–8 – разбавлениям мочи ФБС в 2, 4, 8, 16, 32, 64 и 128 раз, соответственно; пробы 9 и 10 – неразбавленной моче с добавленным ЭФР в концентрациях 10 (9) и 20 (10) нг/мл.

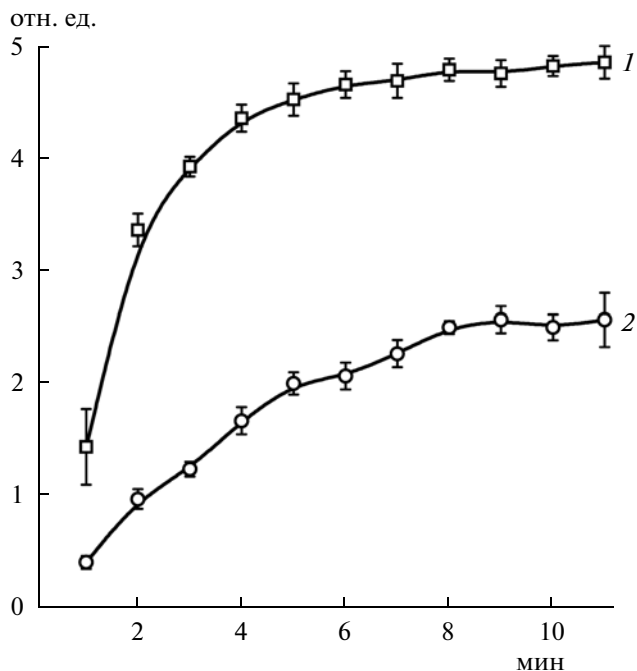


Рис. 7. Динамика окрашивания контрольной (1) и аналитической (2) зон в иммунохроматографической тест-системе определения ЭФР при тестировании сыворотки крови с концентрацией ЭФР 1 нг/мл. 1 отн. ед. интенсивности окрашивания, полученная с помощью Рефлекса, соответствует 35 отн. ед., полученным с помощью сканера.

Полученные результаты свидетельствуют о возможности применения разработанной системы для детектирования ЭФР во всем физиологическом диапазоне концентраций — вплоть до 10 пг/мл. Регистрация интенсивности окрашивания аналитической зоны позволяет проводить количественное определение содержания ЭФР. Продолжительность анализа составляет всего 5 мин, причем тестирование биопроб (плазма, сыворотка, моча) не требует какой бы то ни было их предварительной подготовки. Нетривиальным результатом является универсальность тест-системы — пригодность одной и той же ее комплектации для характеристики и мочи, и препаратов крови. Впервые разработанная иммунохроматографическая система представляется перспективным аналитическим средством при диагностике онкологических заболеваний, планировании и контроле терапевтических мероприятий.

Исследования проведены при поддержке Федеральной целевой программы “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” на 2009–2013 гг. (государственный контракт № 14.740.11.1065 от 24 мая 2011 г.).

Авторы благодарят С.М. Придворову (Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва) за проведение электронно-микроскопических измерений препарата коллоидного золота.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Boonstra J., Rijken P.J., Humbel B., Cremers F., Verkleij A.J., van Bergen en Henegouwen P.M.P.* // *Cell Biol. Intern.* 1995. V. 19. № 5. P. 413–430.
2. *Gresik E.W.* // *Microsc. Res. Tech.* 1994. V. 27. № 1. P. 1–24.
3. *Jorgensen P.E.* // *Danish Med. Bull.* 1997. V. 44. № 2. P. 111–124.
4. *Duffy M.J., O'Donovan N., Crown J.* // *Cancer Treatment Rev.* 2011. V. 37. № 2. P. 151–159.
5. *Aaronson S.A.* // *Science.* 1991. V. 254. № 5035. P. 1146–1153.
6. *Шаназаров Н.А., Сабиров А.Х., Сироткина С.М.* // *Росс. биотерапевт. журн.* 2009. Т. 8. № 4. С. 85–90.
7. *Унгер К., Муш А., Залуцкий И.В., Петрович С.В., Жаврид Э.А.* // *Онкологич. журн.* 2009. Т. 3. № 1. С. 51–64.
8. *Cheng J.Y., Kananathan R.* // *Human Vaccines Immunotherapeutics.* 2012. V. 8. № 12. P. 1799–1801.
9. *Gonzalez M., Gisela M., Santos E.S., Racz L.E.* // *Expert Rev. Anticancer Ther.* 2012. V. 12. № 4. P. 439–445.
10. *Neninger E., Verdecia B.G., Crombet T., Viada C., Pereda S., Leonard I., Mazonza Z., Fleites G., Gonzalez M., Wilkinson B., Gonzalez G., Lage A.* // *J. Immunother.* 2009. V. 32. № 1. P. 92–99.
11. *Garcia B., Neninger E., de la Torre A., Leonard I., Martinez R., Viada C., Gonzalez G., Mazonza Z., Lage A., Crombet T.* // *Clin. Cancer Res.* 2008. V. 14. № 3. P. 840–846.
12. *Sizemore N., Dudeck R.C., Barksdale C.M., Nordblom G.D., Mueller W.T., McConnell P., Wright D.S., Guglietta A., Kuo B.S.* // *Pharm. Res.* 1996. V. 13. № 7. P. 1088–1094.
13. *Дзантиев Б.Б., Жердев А.В.* // *Биохимические методы анализа* / Ред. Б.Б. Дзантиев. М.: Наука, 2010. С. 303–332.
14. *Breslauer D.N., Maamari R.N., Switz N.A., Lam W.A., Fletcher D.A.* // *PLoS ONE.* 2009. V. 4. № 7. P. e6320.
15. *Старовойтова Т.А., Зайко В.В., Стериополо Н.А., Мартынкина Л.П., Кутвицкий В.А., Туголуков А.Е., Волощук С.Г., Тогузов Р.Т., Венгеров Ю.Ю.* // *Биомед. журн. Medline.ru.* 2010. Т. 11. С. 44–62.
16. *Frens G.* // *Nat. Phys. Sci.* 1973. V. 241. № 105. P. 20–22.
17. *Hermanson G.T.* *Bioconjugate Techniques.* Amsterdam: Acad. Press, Elsevier, 2008. 900 p.
18. *Byzova N.A., Zvereva E.A., Zherdev A.V., Eremin S.A., Dzantiev B.B.* // *Talanta.* 2010. V. 81. № 3. P. 843–848.
19. *Бызова Н.А., Зверева Е.А., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б.* // *Прикл. биохим. микробиол.* 2011. Т. 47. № 6. С. 685–693.
20. *Schweers B.A., Old J., Boonlayangoor P.W., Reich K.A.* // *Forensic Sci. Intern.: Genetics.* 2008. V. 2. № 3. P. 243–247.

Development of an Immunochromatographic Test System for the Detection of Human Epidermal Growth Factor

N. A. Byzova^a, L. N. Lukhverchik^b, A. V. Zherdev^a, N. V. Piven^b, A. I. Burakovskii^b, and B. B. Dzantiev^a

^a A. N. Bach Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Leninsky prospect 33, Moscow, 119071 Russia

^b Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus, Kuprevich str. 5/2, Minsk, 220141 Belarus

e-mails: nbyzova@inbi.ras.ru; piven@iboch.bas-net.by

Received April 15, 2013

Abstract—A method was developed for the rapid detection of human epidermal growth factor based on a sandwich-format immunochromatographic assay. The contact between the sample and the test strip with immobilized immunoreagents initiates the fluid flow movement across the membrane components of the test strip, immunochemical reactions, and the formation of colored lines. Requirements on the configuration of the test system in order to achieve the lowest limit of detection were defined in the course of the development of the assay. It was shown that this method enables the detection of human epidermal growth factor within 5 min at concentrations as low as 10 pg/mL in aqueous solutions, urine, and the blood serum and plasma. The developed test system can be used for point-of-care diagnostics.