



(12)

## BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2008 00943**

(22) Data de depozit: **27.11.2008**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30.06.2011** BOPI nr. **6/2011**

(41) Data publicării cererii:  
**28.05.2010** BOPI nr. **5/2010**

(73) Titular:  
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE  
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU  
FIZICĂ ȘI INGINERIE NUCLEARĂ "HORIA  
HULUBEI", STR. ATOMIȘTILOR NR. 407,  
PO BOX MG-6, MĂGURELE, IF, RO**

(72) Inventatori:  
• **DOROBANȚU IOAN,  
ALEEA CÂMPUL CU FLORI NR. 1, BL. OD2,  
SC. C, AP.110, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,  
RO;**  
• **HARANGUS LIVIA,  
STR. ALEXANDRU LĂPUȘNEANU NR.81,  
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:

**B.S.CLEGG, G.R.STEPHENSON,  
J.C.HALL, "DEVELOPMENT OF AN  
ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT  
ASSAY FOR THE DETECTION OF  
DICAMBA", J.AGRIC.FOOD CHEM.,  
VOL.49, NO.5, PP. 2168-2174, 2001;  
JIAN-YING HU, TAKAKO AIZAWA ȘI  
YASUMOTO MAGARA, "ANALYSIS OF  
PESTICIDES IN WATER WITH LIQUID  
CHROMATOGRAPHY/ATMOSPHERIC  
PRESSURE CHEMICAL IONIZATION MASS  
SPECTROMETRY", WAT.RES., VOL.33,  
NO.2, PP. 417-425, ELSEVIER SCIENCE  
LTD., 1999.**

(54) **METODĂ DE DOZARE A PESTICIDULUI ACID  
3,6-DICLORO-2-METOXI BENZOIC DIN PROBE DE MEDIU**



# RO 125452 B1

1 Invenția se referă la o metodă imunochimică de dozare a pesticidului acid 3,6-dicloro-  
2-metoxi benzoic din probe de mediu.

3 Clegg B.S., G.R. Stephenson, J.C. Hall, "Development of an Enzyme-Linked  
4 Immunosorbent Assay for the Detection of Dicamba", *J. Agric. Food Chem.*, 2001 May, 49(5),  
5 pp. 2168-2174, se referă la markeri enzimatici pentru detectarea cantitativă a erbicidelor  
6 dicamba (acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic) în probele de apă. Antiserul policlonal dicamba  
7 nu reacționează încrucișat cu un număr de alte erbicide testate, dar reacționează direct cu  
8 metabolitul dicamba, 5-hidroxidicamba, și asociate structural cu acizii clorobenzoici. Testul  
9 este utilizat pentru a estima concentrațiile cantitative de dicamba în probele de apă.

10 Jian-Ying Hu, Takako Aizawa și Yasumoto Magara, "Analysis of pesticides in water  
11 with liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry",  
12 *Wat. Res.*, Vol. 33, nr. 2, pp. 417-425, 1999, Elsevier Science Ltd., se referă la LC/APCI/MS  
13 pentru determinarea multireziduurilor pesticide termolabile și/sau polare în apă, care nu pot  
14 fi supuse la o procedură de rutină GC/MS. În acest studiu au fost utilizate 31 de pesticide  
15 termolabile, care includ 14 pesticide neutre sau bazice și 17 acide.

16 În prezent, tehnicile ELISA utilizate pe plan mondial folosesc ca fază solidă de legare  
17 suprafața interioară a tuburilor de analiză sau a godeurilor plăcilor tip ELISA, legarea  
18 componentelor imune la suprafața acestor faze solide este realizată prin adsorbția fizică a  
19 antigenului sau anticorpului la suprafață. Dezavantajul acestor tehnici este suprafața limitată  
20 a fazei solide accesibilă, cât și posibilitatea desorbției componentului imun și viteza redusă  
21 de atingere a echilibrului chimic între antigen și anticorp.

22 Problema pe care o rezolvă invenția constă în dozarea pesticidului acid 3,6-dicloro-2-  
23 metoxi benzoic din probe de mediu.

24 Metoda de dozare a pesticidului acid 3,6-dicloro-2-metoxi benzoic din probe de  
25 mediu, conform invenției, înlătură dezavantajele de mai sus, prin aceea că aceasta constă  
26 în:

27 a) obținerea suspensiei de microsferă de oxid de siliciu, în care o parte, în greutate,  
28 de microsferă de oxid de siliciu cu diametrul de 1...2  $\mu\text{m}$  se tratează cu 5 părți, în volum,  
29 soluție de acid azotic 10%, la temperatura de 60°C, timp de o oră, se centrifughează la  
30 2000 x g, timp de 20 min, pentru îndepărtarea soluției acide, apoi se tratează cu o soluție de  
31  $\alpha$ -aminopropiltriethoxisilan 10%, la pH 3,2, timp de 3 h, la 60°C, se spală cu apă distilată, se  
32 centrifughează la 2000 x g și se resuspendă în 5 părți, în volum, soluție de glutaraldehidă  
33 3%, în tampon fosfat 50 mM, cu pH 7,4 și se lasă 8 h la temperatura camerei, în vederea  
34 activării, se spală cu apă distilată și se resuspendă în tampon fosfat 10 mM, apoi se tratează  
35 cu o soluție de anticorp anti acid 3,6-dicloro-2-metoxi benzoic, se lasă să reacționeze timp  
36 de 4 h, la temperatura camerei, apoi se spală cu tampon fosfat și se resuspendă în tampon  
37 fosfat 10 mM, cu pH 7,2, cu adaos de albumină serică de bovină 1%;

38 b)  $2 \times 10^{-4}$  părți, în volum, suspensie de microsferă obținută în etapa a) se tratează  
39 cu  $2 \times 10^{-4}$  părți, în volum, soluție standard de acid 3,6-dicloro-2-metoxi benzoic și  $1 \times 10^{-4}$   
40 părți, în volum, marker enzimatic acid 3,6-dicloro-2-metoxi benzoic-fosfat alcalină,  
41 amestecul se lasă 2 h, la temperatura camerei, în vederea stabilirii echilibrului chimic dintre  
42 antigen și anticorp, apoi se centrifughează la 2000 x g, se spală cu tampon fosfat și se  
43 măsoară activitatea enzimatică a complexului imun cuplat la suprafață, prin adăugarea în  
44 tuburile de reacție a o parte, în volum, soluție de p-nitrofenilfosfat de sodiu în carbonat de  
45 sodiu 50 mM, cu pH 9,6, iar reacția enzimatică este oprită după o oră, prin adăugarea în  
46 tuburile de reacție a  $1 \times 10^{-4}$  părți, în volum, NaOH 1M, și se măsoară absorbanta optică la  
47 lungimea de undă de 400 nm.

# RO 125452 B1

Prin aplicarea invenției, se obțin următoarele avantaje:	1
- prin utilizarea microimunosorbentilor se realizează o cuplare covalentă a anticorpului antiacid 3,6-dicloro-2-metoxi benzoic la suprafața microsferelor de SiO <sub>2</sub> comparativ cu adsorbția fizică în tehnica ELISA clasică;	3
- realizarea unei suprafețe mari de 10...100 cm <sup>2</sup> a fazei solide dată de microimunosorbent comparativ cu suprafața limitată de circa 1 cm <sup>2</sup> în cazul godeurilor plăcilor ELISA, fapt ce îmbunătățește performanțele acestei tehnici;	5
- reacția imună dintre componente se realizează în volumul soluției comparativ cu reacția lentă la suprafața internă a tubului sau godeurilor, care se realizează în tehnica ELISA clasică.	7
Procedeele conform invenției constă în aceea că: 1 g de microsferă de oxid de siliciu cu diametrul de 1...2 μm se suspendă într-o soluție 5 ml de acid azotic 10%, la temperatura de 60°C, timp de o oră. După centrifugare la 2000 x g, timp de 20 min, la 18°C și îndepărtarea soluției acide, microsferele au fost resuspendate într-o soluție de 10% α-aminopropiltriethoxisilan, la pH 3,2 pentru 3 h, la 60°C. După centrifugare și îndepărtarea supernatantului, microsferele au fost spălate cu apă distilată, centrifugate iar supernatantul îndepărtat. Microsferele au fost apoi resuspendate în 5 ml soluție de glutaraldehidă 3% în tampon fosfat 50 mM, pH 7,4 și lăsate 8 h la temperatura camerei. Îndepărtarea soluției de glutaraldehidă se realizează prin centrifugare urmată de spălare cu apă distilată, apoi microsferele se suspendă în 10 ml soluție de tampon fosfat 10 mM, cu pH 8. 2 ml suspensie de microsferă activate se adaugă la 1 ml soluție de anticorp anti 3,6 dicloro-2-metoxibenzoic 10 mg/ml, suspensia se agită și se lasă să reacționeze timp de 4 h, la temperatura camerei, în vederea cuplării covalente a anticorpului antipesticid la suprafața microsferelor, anticorpul nereacționat a fost îndepărtat prin centrifugare, iar microimunosorbentul realizat este resuspendat în 10 ml soluție albumină serică de bovină 1%, în tampon fosfat 10 mM, pH 7,2 și depozitat la 4°C, în vederea utilizării în tehnica ELISA de dozare a pesticidului acid 3,6 dicloro-2-metoxi benzoic. Tehnica ELISA constă în reacția antigen anticorp realizată între anticorpul antipesticid cuplat covalent la suprafața microsferelor, antigenul acid 3,6 dicloro-2-metoxi benzoic din proba necunoscută sau soluția standard sau markerul enzimatic acid 3,6 dicloro-2-metoxi benzoic-fosfataza alcalină. Astfel în tuburi de plastic în volum de 2...3 ml se introduc 200 μl suspensie de microimunosorbent diluată 1/10 (v/v) cu tampon fosfat, 200 μl de standard de acid 3,6 dicloro-2-metoxi benzoic de concentrație cunoscută (0-100 ng/ml) sau proba necunoscută în tampon fosfat și 100 μl soluție de marker enzimatic acid 3,6 dicloro-2-metoxi benzoic-fosfatază alcalină de concentrație 10 μg/ml. Reacția imună dintre antigenul din soluție și anticorpul de la suprafața microsferelor este realizată timp de 2 h, la temperatura camerei. După centrifugarea la 2000 x g, supernatantul se îndepărtează, iar microsferele sunt spălate de 3 ori cu tampon fosfat, centrifugate, urmate de aruncarea supernatantului. În final, activitatea enzimatică a complexului imun realizat la suprafața microsferelor este măsurată la spectrofotometru prin reacția cu substratul enzimatic, introducerea în tuburi a 1 ml soluție de p-nitrofenilfosfat de sodiu în carbonat de sodiu 50 mM, cu pH 9,6. Reacția cu substratul enzimatic este stopată după o oră cu ajutorul a 100 μl NaOH 1 M introdus în tubul de reacție. Absorbanta optică este măsurată la spectrofotometru la lungimea de undă de 400 nm.	11
	13
	15
	17
	19
	21
	23
	25
	27
	29
	31
	33
	35
	37
	39
	41
	43
Tehnica ELISA ce utilizează microimunosorbentul constă în două etape E1 și E2.	
<b>E1: Obținerea microimunosorbentului anticorp antiacid 3,6-dicloro-2-metoxi benzoic cuplat covalent la microsferă de SiO<sub>2</sub></b>	45
1 g de microsferă de SiO <sub>2</sub> este suspendat în 5 ml soluție de HNO <sub>3</sub> 10%, la temperatura de 60°C, timp de o oră. Excesul de acid este îndepărtat prin centrifugare la 2000 x g, timp de 20 min, la 18°C. Microsferele sunt apoi resuspendate într-o soluție de α-	47
	49

# RO 125452 B1

1 aminopropiltriethoxisilan 10%, cu pH 3,2, pentru 3 h, la 60°C. După centrifugare la 2000 x g,  
2 microsferile sunt spălate cu apă distilată și apoi sunt resuspendate în 5 ml soluție de  
3 glutaraldehidă 3%, în tampon fosfat 50 mM, cu pH 7,4 și lăsate 8 h la temperatura camerei,  
4 în vederea activării. Microsferile sunt spălate cu apă distilată și suspendate în 10 ml tampon  
5 fosfat, 10 mM, pH 8. 2 ml suspensie de microsferi activate se adaugă la 1 ml soluție de  
6 anticorp antiacid 3,6-dicloro-2-metoxi benzoic 10 mg/ml. Suspensia se agită și lăsată să  
7 reacționeze timp de 4 h, la temperatura camerei, în vederea cuplării covalente a anticorpului  
8 antipesticid la suprafața microsferelor. Suspensia se centrifughează la 2000 x g, timp de  
9 20 min, iar supernatantul conținând anticorpul nereacționat se îndepărtează imunosorbentul  
10 format, se suspendă în 10 ml soluție de albumină serică de bovină 1% și este depozitat la  
11 4°C, în vederea utilizării în tehnica ELISA.

## **E2: Tehnica ELISA de dozare a acidului 3,6-dicloro-2-metoxi benzoic**

12 Reactivii componenți ai tehnicii ELISA cu utilizare de microimunosorbenți sunt  
13 următorii: suspensie de microsferi acoperite cu anticorp antiacid 3,6-dicloro-2-metoxi  
14 benzoic în diluție 1/10, în tampon fosfat, soluții standard de pesticid acid 3,6-dicloro-2-metoxi  
15 benzoic de concentrație cunoscută (0-100 ng/ml) sau proba necunoscută, în tampon fosfat  
16 cu pH 7,2, soluție de marker enzimatic acid 3,6-dicloro-2-metoxi benzoic-fosfatază alcalină  
17 de concentrație 10 μg/ml. Astfel, în tuburi de plastic de volum 2...3 ml se introduc 200 μl  
18 suspensie de microimunosorbent, 200 μl antigen standard (acid 3,6-dicloro-2-metoxi  
19 benzoic) sau 200 μl din proba necunoscută ce conține pesticidul de analizat și 100 μl marker  
20 enzimatic. Reacția imună dintre antigenul marcat sau nemarcat din soluție și anticorpul  
21 cuplat covalent la faza solidă este realizată timp de 2 h la temperatura camerei. După  
22 centrifugare la 2000 x g și îndepărtarea supernatantului, microsferile sunt spălate de 3 ori  
23 cu tampon fosfat, centrifugate, iar supernatantul înlăturat. În final, activitatea enzimatică a  
24 complexului imun anticorp-antigen realizat la suprafața microsferelor este măsurată la  
25 spectrofotometru prin reacție cu substratul enzimatic, introducerea în tuburi a 1 ml soluție de  
26 p-nitrofenilfosfat în carbonat de sodiu 50 mM, cu pH 9,6. Reacția cu substratul enzimatic este  
27 stopată după o oră, cu ajutorul a 100 μl NaOH 1 M introdus în tubul de reacție. Absorbanta  
28 optică este măsurată la spectrofotometru la lungimea de undă de 400 nm.

În continuare, se prezintă un exemplu de aplicare a procedurii în legătură cu figura.

31 **Exemplu.** 1 g de microsferi de SiO<sub>2</sub> este suspendat în 5 ml soluție de HNO<sub>3</sub> 10% la  
32 temperatura de 60°C, timp de o oră. Excesul de acid este îndepărtat prin centrifugare la  
33 2000 x g, timp de 20 min, la 18°C. Microsferile sunt apoi resuspendate într-o soluție de α-  
34 aminopropiltriethoxisilan 10%, cu pH 3,2, pentru 3 h, la 60°C. După centrifugare la 2000 x g,  
35 microsferile sunt spălate cu apă distilată și apoi sunt resuspendate în 5 ml soluție de  
36 glutaraldehidă 3%, în tampon fosfat 50 mM, cu pH 7,4 și lăsate 8 h la temperatura camerei,  
37 în vederea activării. Microsferile sunt spălate cu apă distilată și suspendate în 10 ml tampon  
38 fosfat 10 mM, pH 8. 2 ml suspensie de microsferi activate se adaugă la 1 ml soluție de  
39 anticorp antiacid 3,6-dicloro-2-metoxi benzoic 10 mg/ml. Suspensia se agită și este lăsată  
40 să reacționeze timp de 4 h, la temperatura camerei, în vederea cuplării covalente a  
41 anticorpului antipesticid la suprafața microsferelor. Suspensia se centrifughează la 2000 x g,  
42 timp de 20 min, iar supernatantul conținând anticorpul nereacționat se îndepărtează,  
43 imunosorbentul format se suspendă în 10 ml soluție de albumină serică de bovină 1% și este  
44 depozitat la 4°C, în vederea utilizării în tehnica ELISA.

45 Reactivii componenți ai tehnicii ELISA cu utilizare de microimunosorbenți sunt  
46 următorii: suspensie de microsferi acoperite cu anticorp antiacid 3,6-dicloro-2-metoxi  
47 benzoic în diluție 1/10 în tampon fosfat, soluții standard de pesticid acid 3,6-dicloro-2-metoxi  
benzoic de concentrație cunoscută (0...100 ng/ml) sau proba necunoscută în tampon fosfat,

## RO 125452 B1

cu pH 7,2, soluție de marker enzimatic acid 3,6-dicloro-2-metoxi benzoic-fosfatază alcalină de concentrație 10 µg/ml. Astfel, în tuburi de plastic de volum 2...3 ml se introduc 200 µl suspensie de microimunosorbent, 200 µl antigen standard (acid 3,6-dicloro-2-metoxi benzoic) sau 200 µl probă necunoscută ce conține pesticidul de analizat și 100 µl marker enzimatic. Reacția imună dintre antigenul marcat sau nemarcat din soluție și anticorpul cuplat covalent la faza solidă este realizată timp de 2 h la temperatura camerei. După centrifugare la 2000 x g și îndepărtarea supernatantului, microsferile sunt spălate de 3 ori cu tampon fosfat, centrifugate, iar supernatantul înlăturat. În final, activitatea enzimatică a complexului imun anticorp-antigen realizat la suprafața microsferelor este măsurată la spectrofotometru prin reacție cu substratul enzimatic, introducerea în tuburi a 1 ml soluție de p-nitrofenilfosfat în carbonat de sodiu 50 mM, cu pH 9,6. Reacția cu substratul enzimatic este oprită după o oră, cu ajutorul a 100 µl NaOH 1 M introdus în tubul de reacție. Absorbanta optică este măsurată la spectrofotometru la lungimea de undă de 400 nm.	1 3 5 7 9 11 13
Reacțiile chimice de obținere a microimunosorbentului anticorp antiacid 3,6-dicloro-2-metoxi benzoic-microsfere de SiO <sub>2</sub> sunt prezentate în figurile atașate.	15

# RO 125452 B1

1

## Revendicare

3

Metodă de dozare a pesticidului acid 3,6-dicloro-2-metoxi benzoic din probe de mediu, **caracterizată prin aceea că** aceasta constă în:

5

a) obținerea suspensiei de microsferă de oxid de siliciu, în care o parte, în greutate, de microsferă de oxid de siliciu cu diametrul de 1...2  $\mu\text{m}$  se tratează cu 5 părți, în volum, soluție de acid azotic 10%, la temperatura de 60°C, timp de 1 h, se centrifughează la 2000 x g, timp de 20 min, pentru îndepărtarea soluției acide, apoi se tratează cu o soluție de  $\alpha$ -aminopropiltriethoxisilan 10%, la pH 3,2, timp de 3 h, la 60°C, se spală cu apă distilată, se centrifughează la 2000 x g și se resuspendă în 5 părți, în volum, soluție de glutaraldehidă 3%, în tampon fosfat 50 mM, cu pH 7,4 și se lasă 8 h la temperatura camerei în vederea activării, se spală cu apă distilată și se resuspendă în tampon fosfat 10 mM, apoi se tratează cu o soluție de anticorp antiacid 3,6-dicloro-2-metoxi benzoic, se lasă să reacționeze timp de 4 h, la temperatura camerei, apoi se spală cu tampon fosfat și se resuspendă în tampon fosfat 10 mM, cu pH 7,2 cu adaos de albumină serică de bovină 1%;

15

17

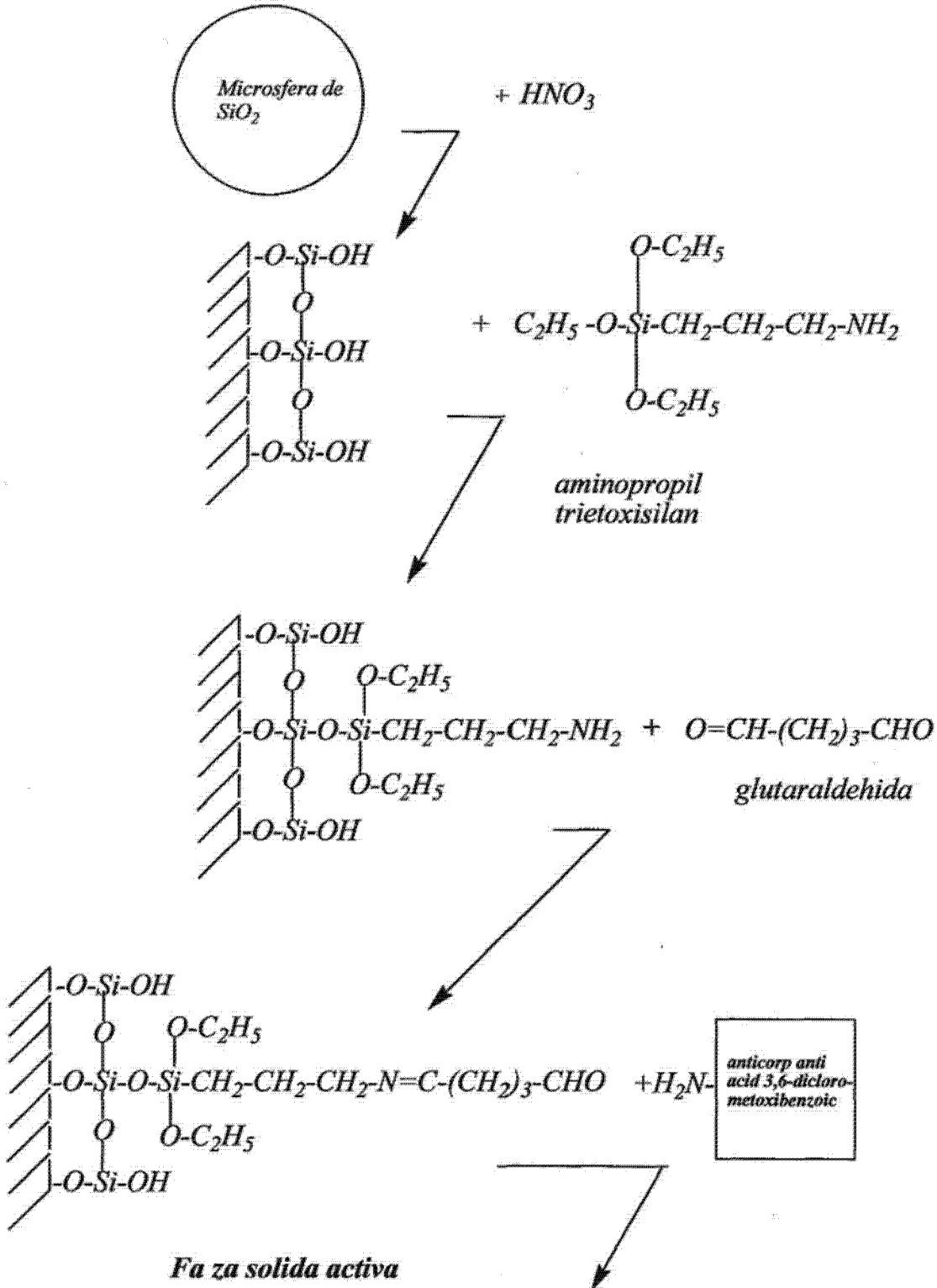
19

21

23

25

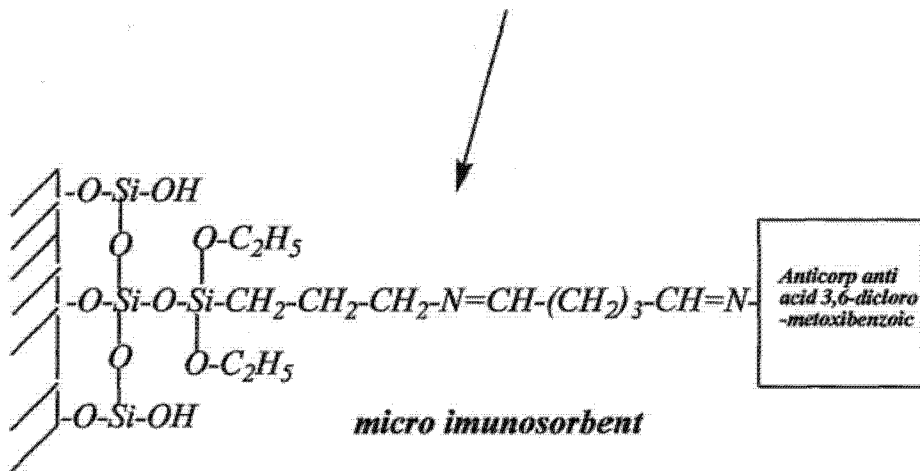
b)  $2 \times 10^{-4}$  părți, în volum, suspensie de microsferă obținută în etapa a) se tratează cu  $2 \times 10^{-4}$  părți, în volum, soluție standard de acid 3,6-dicloro-2-metoxi benzoic și  $1 \times 10^{-4}$  părți, în volum, marker enzimatic acid 3,6-dicloro-2-metoxi benzoic-fosfatază alcalină, amestecul se lasă 2 h, la temperatura camerei, în vederea stabilirii echilibrului chimic dintre antigen și anticorp, apoi se centrifughează la 2000 x g, se spală cu tampon fosfat și se măsoară activitatea enzimatică a complexului imun cuplat la suprafață, prin adăugarea în tuburile de reacție a o parte, în volum, soluție de p-nitrofenilfosfat de sodiu în carbonat de sodiu 50 mM, cu pH 9,6, iar reacția enzimatică este oprită după 1 h, prin adăugarea în tuburile de reacție a  $1 \times 10^{-4}$  părți, în volum, NaOH 1 M, apoi se centrifughează la 2000 x g și se măsoară absorbanta optică a supernatantului rezultat la lungimea de undă de 400 nm.



(51) Int.Cl.

C12Q 1/00<sup>(2006.01)</sup>,

G01N 33/552<sup>(2006.01)</sup>



**Tehnica ELISA**

**Reactia de competitie  
antigen marcat si nemarcat cu anticorpul**

