



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2009 01039

(22) Data de depozit: 11.12.2009

(41) Data publicării cererii:
30.06.2011 BOPI nr. 6/2011

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE
DEZVOLTARE PENTRU FIZICĂ ȘI
INGINERIE NUCLEARĂ-HORIA HULUBEI,
STR. ATOMIȘTILOR NR.407, CP-MG-06,
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

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A MARKERULUI ENZIMATIC
ACID 3, 6-DICLORO-2-METOXI-BENZOIL-
GLICIL-FOSFATAZA ALCALINĂ (DICAMBA-GLICIL-
FOSFATAZA ALCALINĂ)**

(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la un procedeu de obținere a markerului enzimatic acid 3,6-dicloro-2-metoxi-benzoil-glicil fosfatază alcalină, utilizat în tehnica ELISA de analiză a pesticidului, prin dizolvarea a 20 mg acid 3,6-dicloro-2-metoxi-benzoic, 10 mg N-hidroxisuccinimidă și 50 mg 1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil)-carbodiimidă în 1 ml de dimetilformamidă la temperatura camerei, și agitarea amestecului timp de 4 h, urmată de adăugarea la 10 mg glicină în 2 ml tampon carbonat de sodiu 50 mM, pH 9,6, și agitarea amestecului 24 h la 5...10°C, apoi centrifugarea la 3000 xg, pentru separarea dicamba-glicinei precipitate, care se spală cu apă rece și se usucă, după care 5 mg din derivatul

dicamba-glicină, 10 mg de N-hidroxisuccinimidă și 40 mg de 1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil)-carbodiimidă în 1 ml de dimetilformamidă se agită timp de 4 h, în vederea activării grupării carboxil a derivatului, la 1 ml de soluție (5 mg/ml) de fosfatază alcalină în tampon carbonat 50 mM, pH 9,6, se adaugă 100 μl de pesticid activ, cu agitare continuă timp de 24 h la 4°C, produsul dicamba-glicil-fosfatază alcalină fiind purificat prin cromatografie pe coloană Sephadex G25, eluată cu tampon fosfat 10 mM, pH 7,5, markerul purificat rezultat fiind depozitat la -25°C.

Revendicări: 1



7

OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
Cerere de brevet de invenție
Nr. <u>a 2009 01039</u>
Data depozit <u>11-12-2009</u>

DESCRIERE

PROCEDEU DE OBTINERE A MARKERULUI ENZIMATIC ACID 3,6-DICLORO-2-METOXI-BENZOIL-GLICIL-FOSFATAZA ALCALINA (Dicamba-glicil-fosfataza alcalina)

Inventia se refera la procedeul de obtinere a markerului enzimatic Dicamba-glicil-fosfataza alcalina utilizat in tehnica ELISA (engl.: Enzyme Linked Immunosorbent Assay) de dozare a pesticidului acid 3,6-dicloro-2-metoxi benzoic (dicamba) din probe de mediu. In prezent sunt cunoscuti pe plan mondial markeri enzimatici pe baza de dicamba legata direct covalent la enzime ca fosfataza alcalina si peroxidaza. Datorita masei moleculare mici si a structurii sale (dicamba) markerul enzimatic rezultat are o afinitate scazuta fata de anticorpul omolog (anticorp antidicamba) si distanta mica dintre cele doua proteine anticorpul (epitop) si suprafata enzimei la care este legat este redusa datorita impiedicarii sterice dintre cele doua proteine anticorpul respectiv enzima din structura markerului enzimatic. In vederea imbunatatirii caracteristicilor imunologice (afinitatea si aviditatea) fata de anticorp este necesara crearea unei puncti de legatura intre dicamba si enzima care sa favorizeze cresterea distantei dintre epitop (dicamba) si enzima la care este legat.

Procedeul conforma inventiei consta in aceea ca circa 20 mg acid 3,6-dicloro-2-metoxi benzoic, 10 mg de N-hidroxisuccinimida si 50 mg 1 etil-3-(3'-dimetil aminopropil)-carbodiimida sunt dizolvate in 1 ml dimetil formamida (DMF) se agita 4 ore la temperatura camerei in vederea activarii gruparii carboxil a pesticidului (acid 3,6-dicloro-2-metoxi benzoic). Amestecul activat de pesticid se introduce sub agitare la 10 mg de glicina in 2 ml de tampon carbonat de sodiu 50 mM pH 9,6. Reactia de cuplare a pesticidului de glicina se efectueaza sub agitare magnetica continua 24 ore la temperatura camerei. Precipitatul format este separat prin centrifugare la 3000Xg timp de 10 minute, apoi spalat de 3 ori cu apa la temperatura de 5-10°C, urmat de centrifugare si indepartarea supernatantului. Produsul purificat (dicamba-glicina) cristalizat a fost uscat la 60 °C si depozitat in vederea cuplarii la enzima (fosfataza alcalina). Procedeul de cuplare a derivatului dicamba-glicina de enzima (fosfataza alcalina) consta in etapele E1 si E2.

1



Director General IFIN-HH,
Dr. Nicolae Victor Zamfir

E1) Activarea derivatului Dicamba-glicina: O solutie de 15 mg Dicamba-glicina, 10 mg N-hidroxisuccinimida si 40 mg 1 etil-3-(3'-dimetil aminopropil)-carbodiimida in 1 ml dimetil formamida sunt agitate 4 ore in vederea activarii gruparii carboxi a derivatului pesticidic.

E2) Cuplarea derivatului Dicamba-glicina la fosfataza alcalina: 100 µl amestec activ rezultat la etapa E1 se adauga la 1 ml solutie de fosfataza alcalina (5mg/ml) in tampon carbonat de sodiu 50 mM pH 9,6 sub continua agitare. Reactia de cuplare a derivatului pesticidic la enzima se desfasoara timp de 24 ore la temperatura de 4 °C. Produsul dicamba-glicil-fosfataza alcalina se purifica prin cromatografie pe coloana pe Sephadex G25, avand ca eluent tampon fosfat 10 mM pH 7,5 si depozitat la -25 °C in vederea utilizarii in tehnica ELISA.

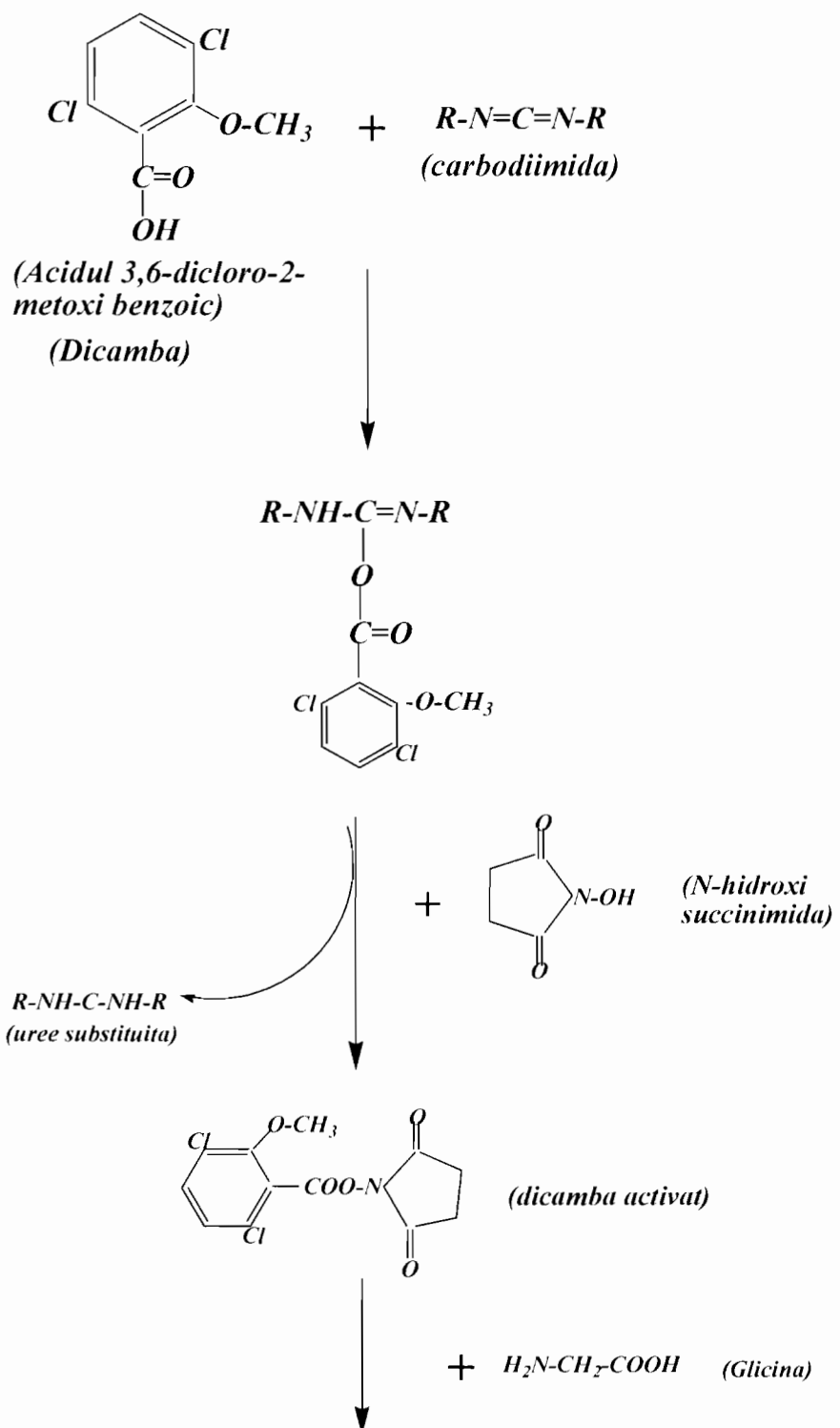
Procedeul conform inventiei prezinta avantajul ca prin utilizarea glicinei ca punte de legatura intre pesticidul dicamba si fosfataza alcalina, afinitatea dintre markerul pesticidic si anticorpul antipesticid omolog este mai mare datorita prevenirii impiedicarii sterice dintre epitop (antigenul dicamba) si situsul de legatura a anticorpului.

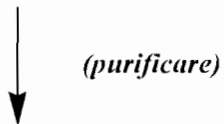
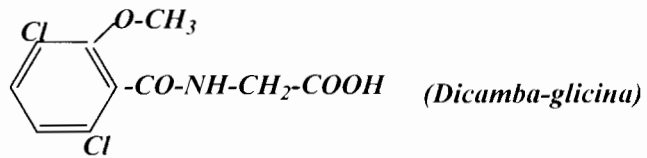
Se prezinta mai jos un exemplu de aplicare a procedului conform inventiei pentru obtinerea markerului enzimatic dicamba-glicil-fosfataza alcalina ce constituie obiectul acestei cereri de brevet de inventie. Potrivit inventiei 20 mg acid 3,6-dicloro-2-metoxi benzoic, 10 mg de N-hidroxisuccinimida si 50 mg 1 etil-3-(3'-dimetil aminopropil)-carbodiimida sunt dizolvate in 1 ml dimetilformamida (DMF). Amestecul se agita 4 ore la temperatura camerei in vederea activarii gruparii carboxi a pesticidului. Amestecul de pesticid activat se introduce la 2 ml solutie de glicina (10 mg) sub continua agitare timp de 24 ore. Precipitatul format este separat prin centrifugare la 3000Xg timp de 10 minute apoi spalata de 3 ori cu apa distilata la 5-10 °C urmat de centrifugare si indepartarea supernatantului. Derivatul obtinut dicamba-glicina se foloseste la obtinerea markerului enzimatic. In acest scop o solutie de 15 mg Dicamba-glicina, 10 N-hidroxisuccinimida si 40 mg 1 etil-3-(3'-dimetil aminopropil)-carbodiimida in 1 ml dimetil formamida sunt agitate 4 ore la temperatura camerei in vederea activarii gruparii carboxi a derivatului pesticidic. Pentru cuplarea derivatului activ la enzima 100 µl amestec activ rezultat se adauga la 1ml solutie de fosfataza alcalina (5 mg/ml) in tampon carbonat de sodiu 50 mM pH 9,6 sub continua agitare. Reactia de cuplare a derivatului pesticidic la enzima se desfasoara timp de 24 ore la temperatura de 4 °C. Markerul enzimatic dicamba-glicil-fosfataza alcalina se purifica pe cromatografie pe coloana de Sephadex G25 avand ca eluent solutie de tampon fosfat 10 mM pH 7,6 urmat de depozitare la -25 °C in vederea utilizarii in tehnica ELISA de dozare pesticida.



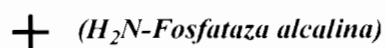
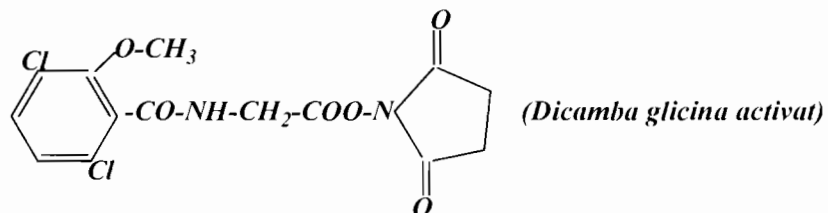
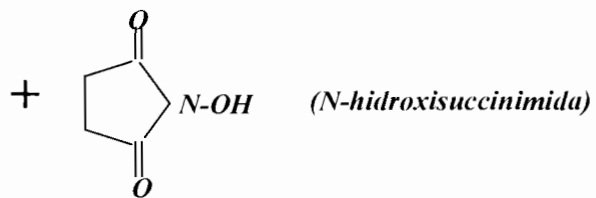
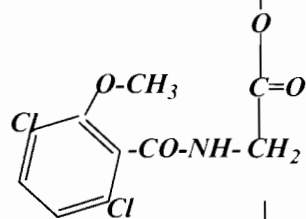
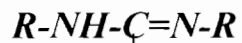
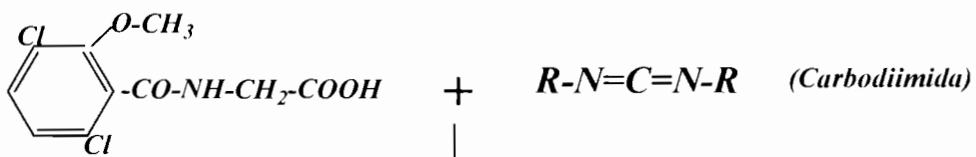
Reactiile de obtinere a markerului enzimatic sunt urmatoarele:

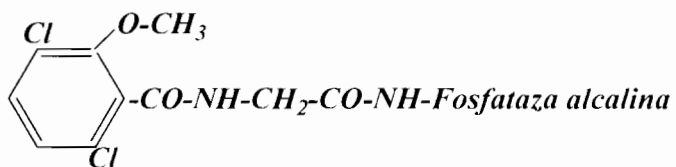
REACTII CHIMICE





Dicamba-glicina purificat





(Dicamba -glicin-fosfataza alcalina)

(Marker enzimatic)

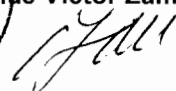


Purificare pe Sephadex G25

Marker enzimatic purificat



Director General IFIN-HH,
Dr. Nicolae Victor Zamfir



REVENDICARI

Procedeul de obtinere a markerului enzimatic acid 3,6-dicloro-2-metoxi benzoil-glicil-fosfataza alcalina caracterizat prin dizolvarea a 20 mg acid 3,6-dicloro-2-metoxi benzoic, 10 mg N-hidroxisuccinimida si 50 mg 1 etil-3-(3'-dimetil aminopropil)-carbodiimida in 1 ml dimetilformamida (DMF) la temperatura camerei si agitarea amestecului timp de 4 ore urmata de adaugarea la 10 mg glicina in 2 ml tampon carbonat de sodiu 50 mM pH 9,6 si agitarea amestecului 24 ore la temperatura de 5-10 °C apoi centrifugare la 3000Xg cu separarea precipitatului dicamba-glicina urmat de spalare cu apa rece, uscat si 5 mg derivat dicamba-glicina, 10 mg N-hidroxisuccinimida si 40 mg 1 etil-3-(3'-dimetil aminopropil)-carbodiimida dizolvate in 1 ml dimetilformamida sunt agitate 4 ore in vederea activarii gruparii carboxi ale derivatului si 100 µl de amestec de pesticid activ este adaugat la 1 ml solutie de fosfataza alcalina (5mg/ml) in tampon carbonat 50 mM pH 9,6 sub continua agitare timp de 24 ore la temperatura de 4 °C si purificarea produsului dicamba-glicil-fosfataza alcalina pe coloana de Sephadex G 25 eluate cu tampon fosfat 10 mM pH 7,5 si depozitarea markerului purificat la -25 °C in vederea utilizarii in tehnica ELISA de analiza a pesticidului.



Nicolae Victor Zamfir