



(12)

## BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2009 01039**

(22) Data de depozit: **11.12.2009**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30.08.2012** BOPI nr. **8/2012**

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

(73) Titular:  
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE  
DEZVOLTARE PENTRU FIZICĂ ȘI  
INGINERIE NUCLEARĂ  
"HORIA HULUBEI", STR.ATOMIȘTILOR  
NR.407, 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:  
**I. DOROBANȚU, L. HARANGUȘ, M. RADU,  
"SYNTHESIS OF ENZYMATIC MARKER  
3,6-DICHLORO-2- METHOXY-  
BENZOIC-ALKALINE PHOSPHATASE AND  
EVALUATION OF THE AFFINITY AGAINST  
HOMOLOGUE ANTIPESTICIDE  
ANTIBODY", ROMANIAN J. BIOPHYS.,  
VOL. 19, NR. 1, PP. 63-71, BUCUREȘTI,  
2009; B. STEPHEN CLEGG, G.R.  
STEPHENSON, J. CHRISTOPHER HALL,  
"DEVELOPMENT OF AN ENZYME-LINKED  
IMMUNOSORBENT ASSAY FOR THE  
DETECTION OF DICAMBA", J. AGRIC.  
FOOD CHEM., 49, PP. 2168-2174, 2001**

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



# RO 126442 B1

1 Inventția se referă la un procedeu de obținere a markerului enzimatic dicamba-glicil-  
fosfatază alcalină, utilizat în tehnica ELISA (engleză: Enzyme Linked Immunosorbent Assay)  
3 de dozare a pesticidului acid 3,6-dicloro-2-metoxi benzoic (dicamba) din probe de mediu.

În prezent, sunt cunoscuți, pe plan mondial, markeri enzimatici, pe bază de: anticorpi  
5 antidicamba, legați direct covalent la enzima peroxidază [J. W. Roy, J. C. Hall, G. W. Parkin,  
C. Wagner-Riddle, B. S. Clegg, *Seasonal Leaching and Biodegradation of Dicamba in  
7 Turfgrass, J. Environ. Qual.*, vol. 30, pp. 1360-1370, 2001]; anticorp anticorp dicamba,  
legat indirect cu enzima peroxidază [B. Stephen Clegg, Gerald R. Stephenson, J.  
9 Christopher Hall, *Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection  
of Dicamba, J. Agric. Food Chem.*, vol. 49, (5), pp. 2168-2174, 2001] și dicamba legat direct  
11 covalent cu enzima fosfatază alcalină [I. Dorobanțu, Livia Harangus, M. Radu, *Synthesis of  
enzymatic marker 3,6-dichloro-2-methoxy-benzoic-alkaline phosphatase and evaluation of  
13 the affinity against homologue antipesticide antibody, Rom. J. Biophys.*, vol. 19, No. 1, pp.  
63-71, 2009].

15 Procedeu conform invenției constă în aceea că circa 20 mg acid 3,6-dicloro-2-metoxi  
benzoic, 10 mg de N-hidroxisuccinimidă și 50 mg 1 etil-3-(3-dimetil aminopropil)-carbodiimidă  
17 sunt dizolvate în 1 ml dimetil formamidă (DMF), se agită 4 h la temperatura camerei, în  
vederea activării grupării carboxil a pesticidului (acid 3,6-dicloro-2-metoxi benzoic).  
19 Amestecul activat de pesticid se introduce sub agitare la 10 mg de glicină în 2 ml de tampon  
carbonat de sodiu 50 mM, pH 9,6. Reacția de cuplare a pesticidului de glicină se efectuează  
21 sub agitare magnetică, continuă, 24 h, la temperatura camerei. Precipitatul format este  
separat prin centrifugare la 3000 x g, timp de 10 min, apoi spălat de 3 ori cu apă la tempe-  
23 ratura de 5...10°C, urmată de centrifugare și îndepărtarea supernatantului. Produsul purificat  
(dicamba-glicina) cristalizat a fost uscat la 60°C și depozitat în vederea cuplării la enzimă  
25 (fosfatază alcalină). Procedeu de cuplare a derivatului dicamba-glicină de enzimă (fosfatază  
alcalină) constă în etapele E1 și E2.

## 27 E1) Activarea derivatului dicamba-glicină

O soluție de 15 mg dicamba-glicină, 10 mg N-hidroxisuccinimidă și 40 mg 1 etil-3-(3'-  
29 dimetil aminopropil)-carbodiimidă în 1 ml dimetil formamidă este agitată 4 h, în vederea  
activării grupării carboxi a derivatului pesticidic.

## 31 E2) Cuplarea derivatului dicamba-glicină la fosfataza alcalină

100 μl amestec activ, rezultat la etapa E1, se adaugă la 1 ml soluție de fosfatază  
33 alcalină (5 mg/ml) în tampon carbonat de sodiu 50 mM, pH 9,6, sub continuă agitare. Reacția  
de cuplare a derivatului pesticidic la enzimă se desfășoară timp de 24 h, la temperatura de  
35 4°C. Produsul dicamba-glicil-fosfatază alcalină se purifică prin cromatografie pe coloana pe  
Sephadex G25, având, ca eluent, tampon fosfat 10 mM, pH 7,5 și depozitat la -25°C, în  
37 vederea utilizării în tehnica ELISA.

Procedeu conform invenției prezintă avantajul că, prin utilizarea glicinei ca punte de  
39 legătură între pesticidul dicamba și fosfataza alcalină, afinitatea dintre markerul pesticidic și  
anticorpus anticrop omolog este mai mare, datorită prevenirii împiedicării sterice dintre  
41 epitop (antigenul dicamba) și situsul de legătură a anticorpului.

Se prezintă, mai jos, un exemplu de aplicare a procedeuului conform invenției, pentru  
43 obținerea markerului enzimatic dicamba-glicil-fosfatază alcalină, ce constituie obiectul  
acestei cereri de brevet de invenție.

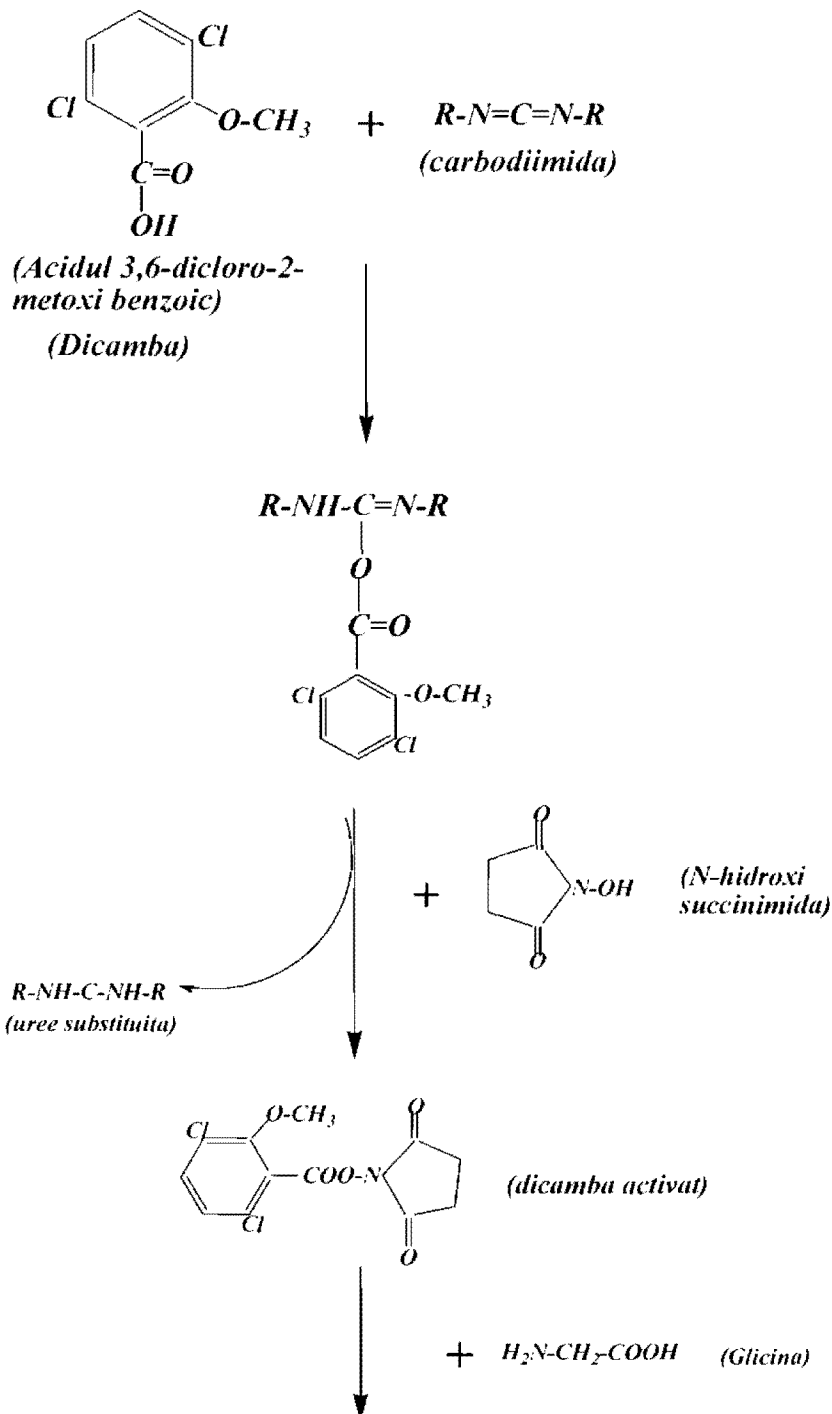
45 Potrivit invenției, 20 mg acid 3,6-dicloro-2-metoxi benzoic, 10 mg de N-hidroxi-  
succinimidă și 50 mg 1 etil-3-(3'-dimetil aminopropil)-carbodiimidă sunt dizolvate în 1 ml  
47 dimetilformamidă (DMF). Amestecul se agită 4 h, la temperatura camerei, în vederea activării  
grupării carboxi a pesticidului. Amestecul de pesticid activat se introduce la 2 ml soluție de  
49 glicină (10 mg), sub continuă agitare, timp de 24 h. Precipitatul format este separat prin  
centrifugare la 3000 x g, timp de 10 min, apoi spălat de 3 ori cu apă distilată la 5...10°C,  
51 urmată de centrifugare și îndepărtarea supernatantului. Derivatul obținut, dicamba-glicină,

# RO 126442 B1

se folosește la obținerea markerului enzimatic. În acest scop, o soluție de 15 mg dicamba-  
glicină, 10 mg N-hidroxisuccinimidă și 40 mg 1 etil-3-(3'-dimetil aminopropil)-carbodiimidă în  
1 ml dimetil formamidă este agitată 4 h, la temperatura camerei, în vederea activării grupării  
carboxi a derivatului pesticidic. Pentru cuplarea derivatului activ la enzimă, 100 μl amestec  
activ rezultat se adaugă la 1 ml soluție de fosfatază alcalină (5 mg/ml) în tampon carbonat  
de sodiu 50 mM, pH 9,6, sub continuă agitare. Reacția de cuplare a derivatului pesticidic la  
enzimă se desfășoară timp de 24 h, la temperatura de 4°C. Markerul enzimatic, dicamba-  
glicil-fosfatază alcalină, se purifică prin cromatografie pe coloana de Sephadex G25, având  
ca eluent o soluție de tampon fosfat 10 mM, pH 7,6 urmată de depozitare la -25°C, în  
vederea utilizării în tehnica ELISA de dozare pesticidică.

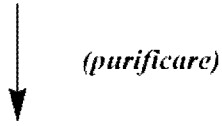
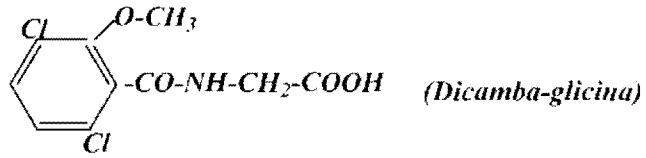
Reacțiile de obținere a markerului enzimatic sunt următoarele:

## REACTII CHIMICE

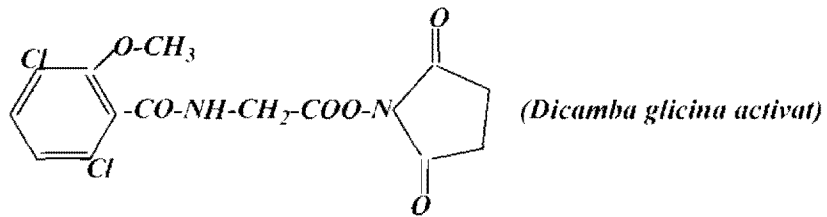
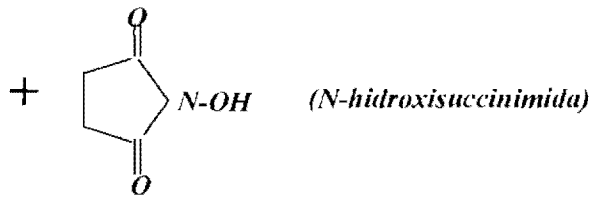
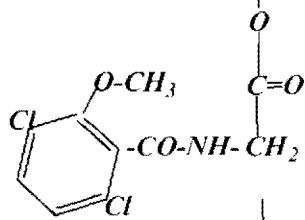
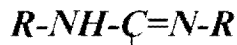
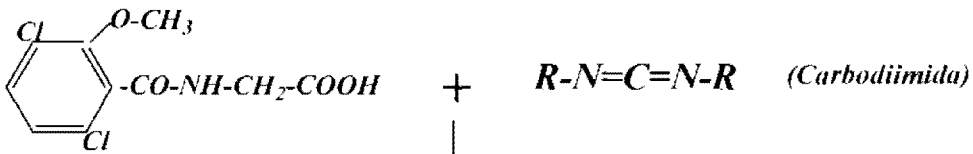


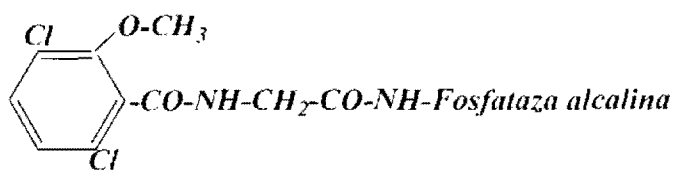
# RO 126442 B1

1  
3  
5  
7  
9  
11  
13  
15  
17  
19  
21  
23  
25  
27  
29  
31  
33  
35  
37  
39  
41



Dicamba-glicina purificat





1

3

5

7

*(Dicamba -glicin-foşfataza alcalina)*

9

*(Marker enzimatic)*

11



*Purificare pe Sephadex G25*

13

15

*Marker enzimatic purificat*

# RO 126442 B1

1

## Revendicare

3

Procedeu de obținere a markerului enzimatic acid 3,6-dicloro-2-metoxi-benzoil-glicil-fosfatază alcalină, care cuprinde dizolvarea a 20 mg acid 3,6-dicloro-2-metoxi-benzoic, 10 mg N-hidroxisuccinimidă și 50 mg 1-etil-3-(3'-dimetil-aminopropil)-carbodiimidă în 1 ml dimetilformamidă, la temperatura camerei, și agitarea amestecului rezultat, timp de 4 h, urmată de adăugarea acestui amestec la 10 mg glicină în 2 ml tampon carbonat de sodiu 50 mM, pH 9,6, și de agitarea amestecului rezultat, timp de 24 h, la temperatura de 5...10°C, iar apoi de centrifugare la 3000 x g, cu separarea precipitatului derivat de dicamba-glicină, urmată de spălare cu apă rece și uscare, iar apoi, de agitarea a 5 mg derivat de dicamba-glicină, 10 mg de N-hidroxisuccinimidă și 40 mg 1-etil-3-(3'-dimetil-aminopropil)-carbodiimidă, dizolvate în 1 ml dimetilformamidă, în vederea activării grupării carboxi a derivatului și de adăugarea de 100 μl din amestecul pesticid, activ, rezultat, la 1 ml de soluție 5 mg/ml fosfatază alcalină în tampon carbonat 50 mM, pH 9,6, sub continuă agitare, timp de 24 h, la temperatura de 4°C și, în final, de purificarea produsului dicamba-glicil-fosfatază alcalină pe coloană de Sephadex G25, eluată cu tampon fosfat 10 mM, pH 7,5, și de depozitarea markerului purificat la -25°C.

5

7

9

11

13

15

17



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM  
Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci  
sub comanda nr. 439/2012