



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2015 00885

(22) Data de depozit: 25/11/2015

(41) Data publicării cererii:
30/06/2017 BOPI nr. 6/2017

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE
ȘI DEZVOLTARE PENTRU FIZICĂ ȘI
INGINERIE NUCLEARĂ "HORIA
HULUBEI", STR.REACTORULUI NR.30,
MĂGURELE, IF, RO

(72) Inventatori:
• DOROBANȚU IOAN,
ALEEA CÂMPUL CU FLORI NR.1, BL.OD 2,
SC.C, AP.110, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,
RO;
• NEAGU LIVIA, ALEEA POIANA VADULUII
NR.1, BL.OD8, SC.1, AP.10, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A MARKERULUI
ACID 2,4-DICLOROFENOXI-ALBUMINĂ SERICĂ
DE CAPRINĂ-BIOTINĂ, UTILIZAT ÎN TEHNICA
IMUNOCHIMICĂ ÎN FAZĂ OMOGENĂ PENTRU DOZAREA
ACIDULUI 2,4-DICLOROFENOXIACETIC (2,4-D)
ÎN PROBE BIOLOGICE ȘI DE MEDIU**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a markerului acid 2,4-diclorofenoxi-albumină serică de caprină-biotină utilizat în faza omogenă pentru dozarea acidului 2,4-diclorofenoxiacetic (2,4-D) în probe biologice și de mediu. Procedeu conform invenției constă în activarea biotinei cu N-hidroxisuccinimidă și 1-etil-3-(3-dimetilaminopropilcarbodiimida) (CDI), cuplarea biotinei activate la albumina serică de caprină, purificarea

conjugatului albumină serică de caprină-biotină, activarea pesticidului 2,4-D cu N-hidroxisuccinimidă și CDI, cuplarea pesticidului activat la conjugatul albumină serică de caprină-biotină și purificarea produsului acid 2,4-diclorofenoxi-albumină serică de caprină-biotină.

Revendicări: 1



OFICIUL-DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
Cerere de brevet de invenție
Nr. *a 2015 0885*
Data depozit *25-11-2015*

~~NESECRET~~

SECRET DE SERVICIU

DESCRIERE

8/92 - 24.11.2015. 24
8/33/25.11.2015

Procedeu de obtinere a markerului acid 2,4-diclorofenoxi-albumina serica de caprina-biotina utilizat in tehnica imunochimica in faza omogena pentru dozarea acidului 2,4-diclorofenoxiacetic (2,4-D) in probe biologice si de mediu

Inventia se refera la procedeul de obtinere a markerului utilizat in tehnica imunochimica in faza omogena pentru dozarea acidului 2,4-diclorofenoxiacetic (2,4-D) in probe biologice si de mediu. In prezent sunt cunoscuti marker enzimatici realizati prin cuplarea pesticidului activat cu carbodiimida cu enzima fosfataza alcalina sau peroxidaza. Acesti markeri pot fi utilizati in tehnica ELISA (tehnica imunochimica de dozare in faza omogena bazata pe imunosorbenti-componente imune antigen sau anticorp cuplate covalent la suprafata fazei solide si markeri enzimatici tip antigen sau anticorp-enzima) clasica de dozare pesticidica, dar care prezinta dezavantaje privind legarea nespecifica a acestuia la suprafata fazei solide utilizate in tehnica in raport cu legarea specifica la anticorpul cuplat la suprafata. Avantajul produsului acid 2,4-diclorofenoxi-albumina serica de caprina-biotina este scaderea nespecificitatii sistemului de analiza, amplificarea semnalului enzimatic specific datorat multiplelor grupari de biotina cuplate la albumina in reactia biotinei cu streptavidin-peroxidaza, marker enzimatic utilizat in tehnica imunochimica de dozare si in consecinta cresterea sensibilitatii sistemului de analiza.

Procedeul conform inventiei consta in aceea ca 5 mg de biotina, 5 mg N-hidroxisuccinimida (NHS) si 20 mg 1-etil-3-(3-dimetilaminopropilcarbodiimida) (CDI) sunt dizolvate in 1 ml dimetilsulfoxid si lasate sa reactioneze timp de 1 ora la temperatura camerei in vederea activarii gruparii carboxi a biotinei. Amestecul activat se adauga picatura cu picatura la 3 ml solutie albumina serica de caprina (10 mg/ml) in tampon carbonat de sodiu 50 mM pH 9,6 si lasat sa reactioneze 3 ore la temperatura camerei si timp de 24 ore la 4°C. Produsul rezultat conjugat albumina serica de caprina-biotina (ASC-biotina) se purifica pe coloana de Sephadex G25 avand ca eluent tamponul carbonat de sodiu 50 mM pH 9,6. Pentru activarea pesticidului se dizolva 10 mg acid 2,4-diclorofenoxiacetic, 10 mg N-hidroxisuccinimida si 30 mg 1-etil-3-(3-dimetilaminopropilcarbodiimida) (CDI) in 1 ml dimetilformamida (DMF). Amestecul se agita timp de 2 ore pentru activarea gruparii carboxi a pesticidului. In final 0,5 ml solutie de pesticid activat se adauga picatura cu picatura la 2 ml solutie de conjugat albumina-serica de caprina-biotina in tampon carbonat de sodiu 10 mM pH 9,6 rezultat in etapa precedenta si lasat sa reactioneze timp de 3 ore la temperatura camerei si 24 ore la 4°C iar produsul obtinut acid 2,4-diclorofenoxi-albumina serica de caprina-biotina se purifica pe coloana de Sephadex G25 avand ca eluent tamponul fosfat 10 mM pH 7,4. Produsul acid 2,4-diclorofenoxi-albumina serica de caprina-biotina se depoziteaza la -20°C in vederea utilizarii in tehnica imunochimica de dozare a pesticidului 2,4-D din probe alimentare si de mediu. Procedeul de obtinere a markerului acid 2,4-diclorofenoxi-albumina serica de caprina-biotina consta in 6 etape, E1÷E6.

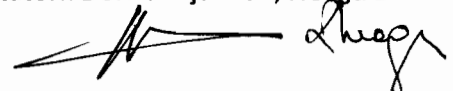
E1) Activarea biotinei cu N-hidroxisuccinimida si 1-etil-3-(3-dimetilaminopropilcarbodiimida) (CDI)

5 mg de biotina, 5 mg N-hidroxisuccinimida (NHS) si 20 mg 1-etil-3-(3-dimetilaminopropilcarbodiimida) (CDI) au fost dizolvate in 1 ml dimetilsulfoxid si lasate sa reactioneze timp de 1 ora la temperatura camerei in vederea activarii gruparii carboxi a biotinei.

E2) Cuplarea biotinei activate la albumina serica de caprina

Amestecul activat in etapa E1 se adauga picatura cu picatura la 3 ml solutie albumina serica de caprina (10 mg/ml) in tampon carbonat de sodiu 50 mM pH 9,6 si lasat sa reactioneze 3 ore la temperatura camerei si timp de 24 ore la 4 °C.

Inventatori: **Dorobanțu Ioan, Neagu Livia**



E3) Purificarea conjugatului albumina serica de caprina-biotina

Produsul rezultat in etapa E2 conjugat albumina serica de caprina-biotina (ASC-biotina) se purifica pe coloana de Sephadex G25 (H=30 cm si $\Phi=1$ cm) avand ca eluent tamponul carbonat de sodiu 50 mM pH 9,6.

E4) Activarea pesticidului acid 2,4-diclorofenoxiacetic cu N-hidroxisuccinimida si 1-etil-3-(3-dimetilaminopropilcarbodiimida) (CDI)

Se dizolva 10 mg acid 2,4-diclorofenoxiacetic, 10 mg N-hidroxisuccinimida si 30 mg 1-etil-3-(3-dimetilaminopropilcarbodiimida) (CDI) in 1 ml dimetilformamida (DMF). Amestecul se agita timp de 2 ore pentru activarea gruparii carboxi a pesticidului.

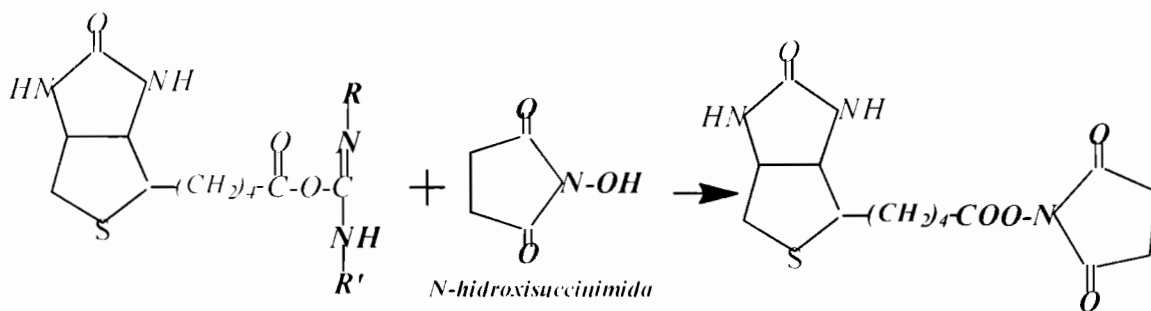
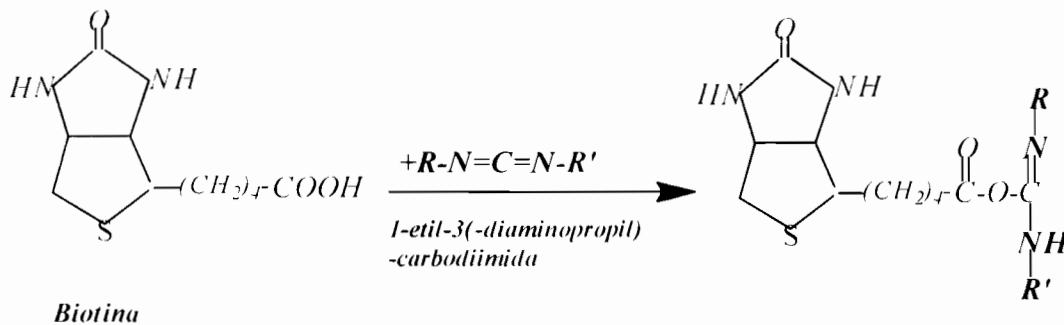
E5) Cuplarea pesticidului activat la conjugatul albumina serica de caprina-biotina

0,5 ml solutie de pesticid activat in etapa E4 se adauga picatura cu picatura la 2 ml solutie de conjugat albumina serica de caprina-biotina in tampon carbonat de sodiu 10 mM pH 9,6 rezultat in etapa E3 si lasat sa reactioneze timp de 3 ore la temperatura camerei si 24 ore la 4°C.

E6) Purificarea produsului acid 2,4-diclorofenoxi-albumina serica de caprina-biotina

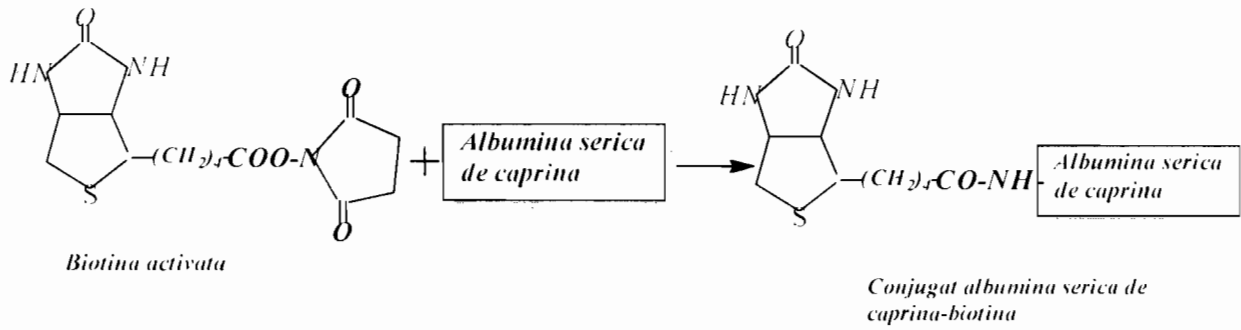
Produsul obtinut in etapa E5 acid 2,4-diclorofenoxi-albumina serica de caprina-biotina se purifica pe coloana de Sephadex G25 (H=30 cm si $\Phi=1$ cm) avand ca eluent tamponul fosfat 10 mM pH 7,4.

E1) Activarea biotinei cu N-hidroxisuccinimida si 1-etil-3-(3-dimetilaminopropilcarbodiimida)

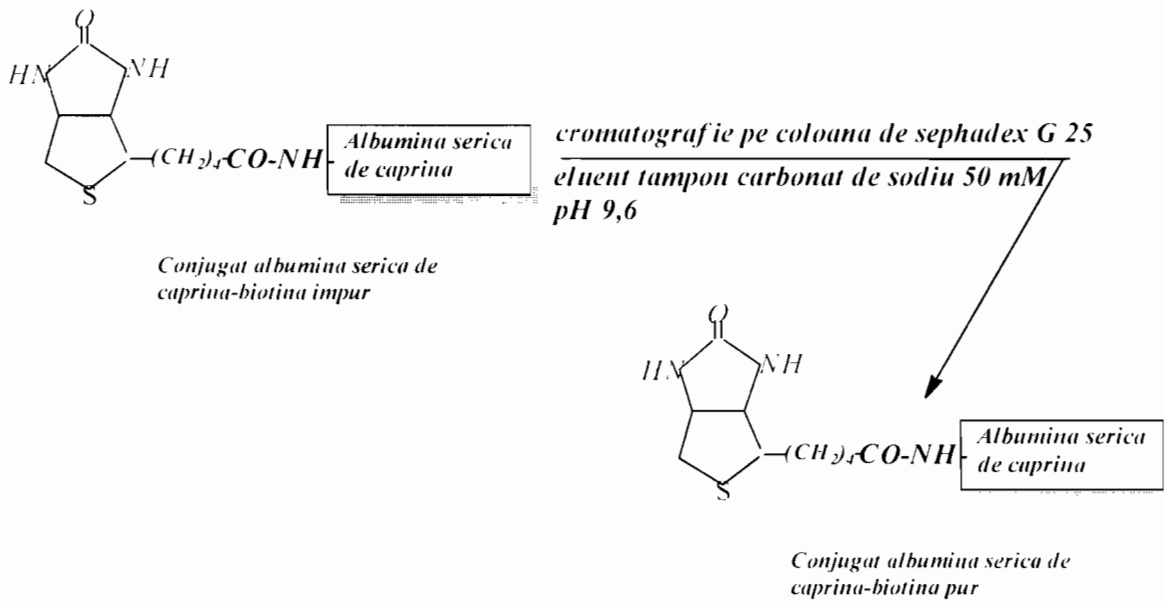


Inventatori: Dorobanțu Ioan, Neagu Livia

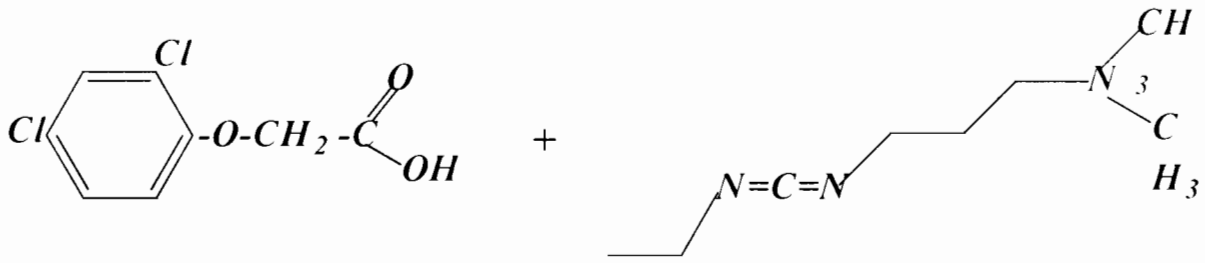
E2) Cuplarea biotinei activate la albumina serica de caprina



E3) Purificarea conjugatului albumina serica de caprina-biotina

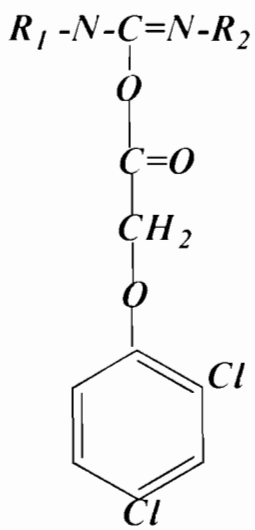


E4) Activarea pesticidului acid 2,4-diclorofenoxiacetic cu N-hidroxisuccinimida si 1-etil-3-(3-dimetilaminopropilcarbodiimida) (CDI)

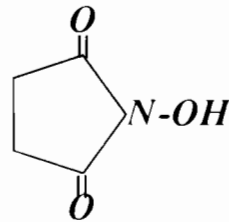


acid 2,4 diclorofenoxiacetic
(2,4D)

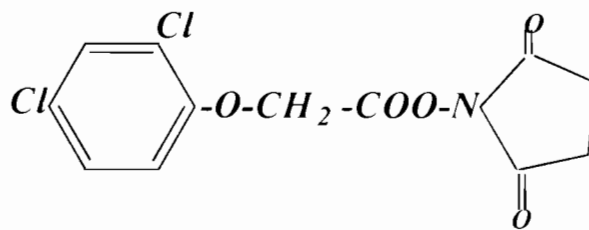
1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-
-carbodiimida



+



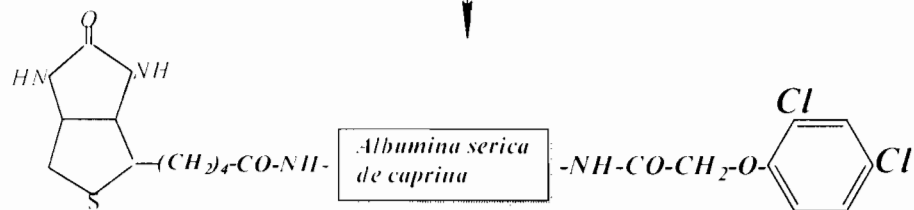
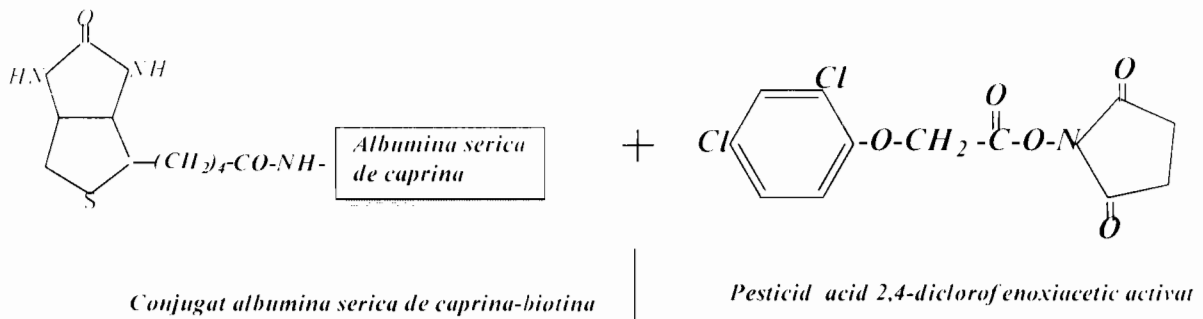
N-hidroxisuccinimida
(NHS)



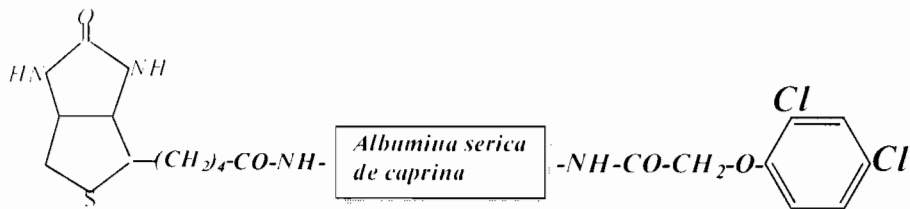
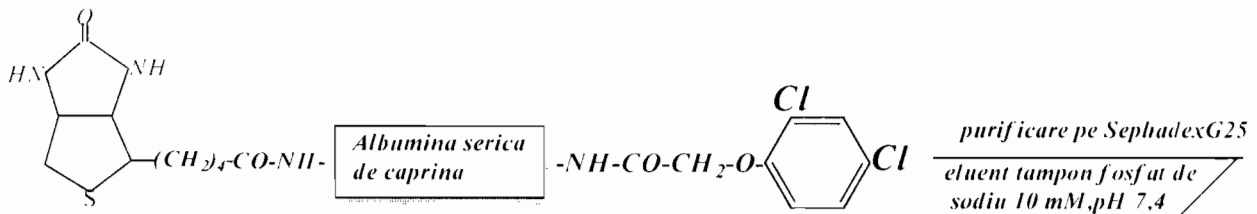
Pesticid acid 2,4-diclorofenoxiacetic activat

Inventatori: Dorobanțu Ioan, Neagu Livia

E5) Cuplarea pesticidului activat la conjugatul albumina serica de caprina-biotina



E6) Purificarea produsului acid 2,4-diclorofenoxi-albumina serica de caprina-biotina



a 2015 00885
25/11/2015

~~NESECRET~~

~~SECRET DE SERVICIU~~

~~REVENDICARI~~

~~S/32 - 24.11.2015~~
S/33 / 25.11.2015 16

Procedeul de obtinere al markerului 2,4-diclorofenoxi-albumina serica de caprina-biotina caracterizat prin dizolvarea a 5 mg biotina, 5 mg N-hidroxisuccinimida si 20 mg 1-etil-3-(3-dimetilaminopropilcarbodiimida) in 1 ml dimetil sulfoxid si lasat sa reactioneze timp de o ora iar amestecul rezultat se adauga la 3 ml solutie de albumina serica de caprina (10 mg/ml) sub continua agitare in tampon carbonat de sodiu 50 mM pH 9,6 si lasat sa reactioneze timp de 3 ore la temperatura camerei si 24 ore la 4°C, iar compusul rezultat albumina serica de caprina-biotina se purifica pe coloana de sephadex G25, avand ca eluent carbonatul de sodiu 50 mM pH 9,6 si care apoi a fost pus sa reactioneze cu amestecul activ de 10 mg acid 2,4-diclorofenoxiacetic, 10 mg N-hidroxisuccinimida si 30 mg 1etil-3-(3-dimetilaminopropilcarbodiimida) in 1 ml dimetilformamida (DMF) timp de 2 ore si in final reactia de cuplare a pesticidului activat la conjugatul albumina serica de caprina-biotina se desfasoara timp de 3 ore la temperatura camerei si 24 ore la 4°C, iar produsul acid 2,4-diclorofenoxi-albumina serica de caprina-biotina se purifica pe coloana de Sephadex G25 avand ca eluent tamponul fosfat 10 mM pH 7.4 si se depoziteaza la -10°C in vederea utilizarii in tehnica imunochimica de dozare in faza omogena a pesticidului acid 2,4-diclorofenoxiacetic din probe alimentatare si de mediu.

Inventatori: Dorobanțu Ioan, Neagu Livia

