



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2016 00906

(22) Data de depozit: 25/11/2016

(41) Data publicării cererii:
30/05/2018 BOPI nr. 5/2018

(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 VADULUI
NR.1, BL.OD8, SC.1, AP.10, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO

(54) TEHNICA ELISA ÎN FAZĂ OMOGENĂ PE BAZĂ
DE NANOIMUNOSORBENȚI DE SiO₂
PENTRU DETECȚIA DE PESTICIDE
ORGANOCOLORATE DIN PRODUSE
ALIMENTARE ȘI DE MEDIU

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă pentru detecția de pesticide organoclorurate din produse alimentare și de mediu. Metoda conform invenției constă în trei etape, și anume: sinteza nanoimunisorbentului format din nanoparticule de SiO₂, la suprafața cărora se cuplează anticorpii antiacid 2,4-diclorfenoxiacetic și proteina nespecifică imunologic-albumină serică de capră, în raport 1:10, sinteza markerului enzimatic pesticid-

enzimă acid 2,4-diclorfenoxiacetic-fosfatază alcalină, și aplicarea tehnicii ELISA în faza omogenă, pe bază de 1...2 μg nanoimunisorbenți, în care reacția de culoare dezvoltată este măsurată spectrofotometric la lungimea de undă de 405 nm.

Revendicări: 1



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
Cerere de brevet de invenție
Nr. a 2016 ee 906
Data depozit ... 25.-11.-2016

NESECRET

SECRET DE SERVICIU

DESCRIERE

Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
Informații Clasificate
INTRARE
Nr. ST 39 din 25.11.2016

Tehnica ELISA in faza omogena pe baza de nanoimunisorbenti de SiO₂ pentru detectia de pesticide organoclorurate din produse alimentare si de mediu

Inventia se refera la tehnica ELISA in faza omogena pe baza de nanoimunisorbenti de SiO₂ pentru detectia de pesticide organoclorurate din produse alimentare si de mediu. In prezent sunt cunoscute tehnici ELISA (engleza: Enzyme Linked Immunosorbent Assay) de dozare pesticidica care folosesc ca imunisorbent suprafete de polistiren (placi ELISA) acoperite cu antigen (pesticid) sau anticorpi (anticorpi antipesticid) componente cuplate la suprafata fazei solide prin adsorbție fizica sau utilizarea de microparticule magnetice de Fe₂O₃ [1,2] si pe baza de SiO₂ [3, 5, 6, 7] sau nanoimunisorbenti pe baza de SiO₂ utilizati in cromatografia de afinitate [4]. Tehnica conform inventiei utilizeaza ca nanoimunisorbent nanoparticule de SiO₂ functionalizate cu anticorpi antipesticid cuplat covalent la suprafata nanoparticulei de SiO₂ si proteina nespecifica imunologic cuplata la aceeasi suprafata in raport molar cunoscut si ales conform cu criteriile optime de sensibilitate si specificitate cerute de tehnica. Avantajele tehnicii ELISA in faza omogena pe baza de nanoimunisorbenti constau in:

- suprafata externa functionala a nanoimunisorbentului de (100-200) m²/g echivalent (10⁶-2*10⁶) suprafata de 1 cm²/proba in tehnica ELISA clasica (1 cm²/proba suprafata godeu) avantaj care duce la scaderea pretului de cost per analiza;
- folosirea nanoparticulelor de SiO₂ functionalizate cu anticorpi prezinta avantajul suprafetei specifice mari 200 m²/g ceea ce permite efectuarea unui numar mare de analize si anume 2*10⁶ analize/gram de nanoimunisorbent comparativ cu tehnica descrisa in [3];
- rapiditatea tehnicii: reactia antigen-anticorp in faza omogena se realizeaza prin aceea ca cele doua componente antigenul (pesticidul) si antigenul marcat enzimatic sunt in contact direct cu anticorpii omologi (anticorpi antipesticid) cuplati covalent la suprafata nanoimunisorbentului existent in suspensie in sistemul de reactie in comparatie cu reactia lenta prin difuzie cu anticorpii existenti la suprafata fazei solide (godeu) din tehnica ELISA clasica (difuzia pesticidului si a pesticidului marcat enzimatic la suprafata godeului la care este cuplat anticorpii antipesticid prin adsorbție fizica);
- stabilitatea nanoimunisorbentului: cuplajul covalent al anticorpului la suprafata nanoparticulei este stabil in comparatie cu fenomenul de instabilitate legat de desorbția anticorpului de pe suprafata godeului fapt ce poate afecta analiza;
- nanoimunisorbentul astfel realizat cuprinde doua specii moleculare cuplate covalent la suprafata nanoparticulelor: anticorpii antipesticidici si proteina nespecifica imunologic in raport molar prestabilit care in reactie cu markerul enzimatic 2,4-D-fosfataza alcalina si cu 2,4-D permite obtinerea unei sensibilitati crescute in comparatie cu [3] prin scaderea efectului nespecificitatii la suprafata nanoparticulelor ceea ce duce la imbunatatirea sensibilitatii si a acuratetii sistemului de analiza;
- datorita suprafetei specifice mari cantitatea de nanoimunisorbent utilizata la o analiza este foarte mica, de ordinul (1-2) μg fapt care necesita folosirea ca antrenor a (1-2) mg nanoimunisorbent nanoparticule de SiO₂ functionalizate cu proteina nespecifica de separare prin centrifugare, precipitatul format din nanoparticule de antrenor care include nanoimunisorbentul marcat enzimatic, supernatantul este inlaturat iar activitatea enzimatica a nanoimunisorbentului din precipitat este masurata prin folosirea substratului enzimatic p-nitrofenilfosfat.

Procedeele conform inventiei consta in trei **etape principale: E1, E2 si E3** si sunt redate schematic

Inventatori: Dorobanțu Ioan, Neagu Livia

SECRET DE SERVICIU

dupa descrierea acestora.

E1) Sinteza nanoimunosorbentului format din nanoparticule de SiO₂ la suprafata carora se cupleaza anticorpii antipesticid (anticorpii anti acid 2,4-diclorofenoxiacetic) si proteina nespecifica imunologic (albumina serica de capra) in raport molar dat, anticorpii antipesticid: proteina specifica 1:10.

E2) Sinteza markerului enzimatic pesticid-enzima acid 2,4-diclorofenoxiacetic-fosfataza alcalina

E3) Tehnica ELISA in faza omogena, procedura de lucru

Descrierea etapelor tehnicii:

E1) Sinteza nanoimunosorbentului format din nanoparticule de SiO₂ la suprafata carora se cupleaza anticorpii antipesticid (anticorpii anti acid 2,4-diclorofenoxiacetic) si proteina nespecifica imunologic (albumina serica de capra) in raport molar dat de criteriul de sensibilitate optimal al tehnicii cuprinde patru reactii, R1, R2, R3 si R4, unde reactiile R1 si R2 sunt conforme cu descrierea din [4]:

R1) Reactia de cuplare a α -aminopropiltriethoxisilan la nanoparticulele de SiO₂

R2) Reactia de activare cu glutaraldehida

R3) Reactia de cuplare a anticorpului antipesticid la componentul rezultat in reactia R2

R4) Reactia de cuplare a proteinei nespecifice imunologic (albumina serica de capra)

R1) Reactia de cuplare a α -aminopropiltriethoxisilan la nanoparticulele de SiO₂

100 mg nanoparticule de SiO₂ ($\varnothing=14$ nm si arie specifica 200 m²/g) si 10 ml HNO₃ sunt agitate la temperatura de 80°C timp de 30 minute. Dupa indepartarea solutiei acide prin centrifugare la 1500 x g timp de 5 minute a suspensiei apoi nanoparticulele sunt spalate cu apa deionizata. Nanoparticulele sunt colectate si tratate cu 5 ml solutie 10 % de α -aminopropiltriethoxisilan in apa deionizata sub continua agitare la temperatura de 80°C timp de 3 ore. Suspensia este centrifugata la 1500 x g timp de 5 minute, supernatantul este indepartat iar nanoparticulele grefate de SiO₂-(C₂H₅O)₂-Si-C₃H₆-NH₂ sunt colectate si spalate de 3 ori cu apa deionizata, urmata de spalare cu 10 ml alcool etilic si resuspendate in 10 ml apa deionizata.

R2) Reactia de activare cu glutaraldehida

2 ml nanoparticule grefate cu α -aminopropiltriethoxisilan rezultate in reactia R1) (10 mg/ml) in apa deionizata sunt tratate cu 200 μ l solutie de glutaraldehida 50 % sub continua agitare timp de o ora urmat de centrifugare la 1500 x g timp de 5 minute. Supernatantul este indepartat iar nanoparticulele activate cu glutaraldehida sunt spalate cu apa deionizata si suspendate in solutie de NaCl 9 ‰ in vederea cuplarii cu anticorpii anti 2,4-D.

R3) Reactia de cuplare a anticorpului antipesticid la componentul rezultat in reactia R2

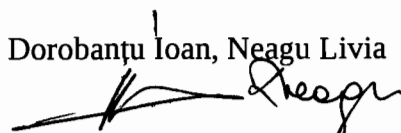
200 μ l solutie de anticorpii anti 2,4-D (2 mg/ml) au fost introdusi peste suspensia de nanoparticule (5 mg/ml) activate cu glutaraldehida in reactia R2) sub continua agitare timp de 4 ore pentru legarea covalenta a anticorpilor la suprafata nanoparticulei la temperatura camerei.

R4) Reactia de cuplare a proteinei nespecifice imunologic, albumina serica de capra, in raport masic 10:1 fata de anticorpii anti 2,4-D

Reactia de cuplare a proteinei se desfasoara 24 ore la temperatura de 4°C urmata de centrifugare la 1500 x g timp de 15 minute, supernatantul este indepartat iar nanoimunosorbentul format este suspendat in tampon fosfat de sodiu 10 mM pH 7,2 si depozitat la 4°C in vederea utilizarii in tehnica ELISA.

E2) Sinteza markerului enzimatic pesticid-enzima acid 2,4-diclorofenoxiacetic-fosfataza alcalina consta in cinci etape: e1, e2, e3, e4 si e5.

Inventatori: Dorobanțu Ioan, Neagu Livia



e1) Reactia de activare a pesticidului acid 2,4-diclorofenoxiacetic (2,4-D) cu 1-etil-3(3'-diaminopropil)-carbodiimida (CDI) si N-hidroxisuccinimida (NHS): 10 mg 2,4-D, 20 mg CDI si 10 mg NHS in 1,0 ml dimetilformamida (DMF) au fost agitate timp de 30 minute in vederea activarii gruparii carboxi a pesticidului 2,4-D;

e2) Cuplarea pesticidului 2,4-D activat cu 1,8 diaminoctan: 0,5 ml amestec activ rezultat in e1) se introduce peste 1 ml solutie de 1,8 diaminoctan 50 mg/ml in tampon carbonat de sodiu 50 mM pH 9,6 si lasat sa reactioneze timp de 4 ore in vederea cuplarii;

e3) Purificarea compusului 2,4-D-amido-octil-amina: Purificarea compusului este efectuata prin cromatografie in strat subtire pe Silicagel G avand ca eluent amestecul alcool etilic:apa in proportii 60:40 (V/V);

e4) Cuplarea derivatului pesticidic la fosfataza alcalina: derivatul pesticidic purificat in etapa e3) (4 mg) in 1 ml tampon fosfat 10 mM pH 8,2 si 500 µl solutie de fosfataza alcalina (1 mg/ml) sunt amestecate si apoi sub continua agitare se adauga 100 µl solutie de glutaraldehida 1 % picatura cu picatura si lasate sa reactioneze timp de 4 ore pentru cuplare;

e5) Purificare compusului 2,4-D-amido-octil-glutaraldehyd-fosfataza alcalina: purificarea markerului enzimatic pesticid-enzima 2,4-D-amido-octil-glutaraldehyd-fosfataza alcalina se efectueaza prin cromatografie pe coloana de Sephadex G25 (30*1) cm avand ca eluent tamponul fosfat de sodiu 5 mM pH 7,2, produsul purificat este depozitat la -10°C in vederea utilizarii in tehnica ELISA in faza omogena de dozare pesticidica din probe alimentare si de mediu.

E3) Tehnica ELISA in faza omogena, procedura de lucru

In tuburi din polistiren tip Ellerman (volum 3 ml) se introduc in ordine urmatoarele componente:

-1 ml tampon fosfat de sodiu 10 mM pH 7,2;

-100 µl suspensie de nanoimunisorbent rezultat in E1 (20 µg);

-100 µl suspensie de nanoparticule de SiO₂ functionalizate numai cu proteina nespecifica (1mg) utilizate ca antrenor (procedura de obtinere a antrenorului este identica cu R4) de la obtinerea nanoimunisorbentului);

-100 µl solutie standard de pesticid 2,4-D in concentratiile de 0, 1, 2, 5, 10, 20, 50 si 100 ng/ml sau proba de analizat (extract lichid);

-100 µl solutie de albumina serica de capra (1 mg/ml);

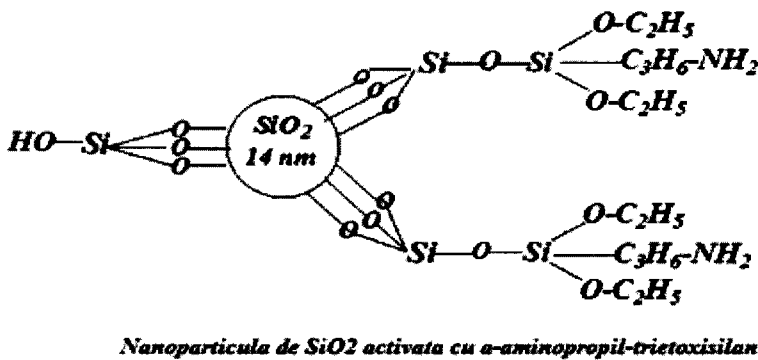
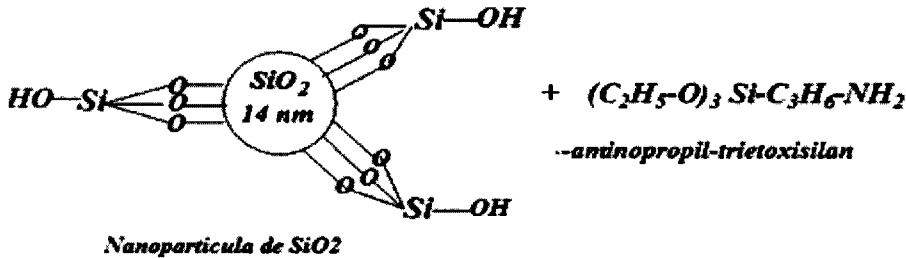
-100 µl solutie de marker enzimatic 2,4-D-fosfataza alcalina (10 ng/ml).

Tuburile sunt inchise cu dopuri de plastic si agitate in pozitie orizontala la agitatorul electric timp de o ora, apoi sunt centrifugate la 1500 x g, timp de 15 minute, supernatantul este indepartat si se introduce in tuburi 1 ml solutie de substrat enzimatic p-nitrofenilfosfat (1 mg/ml), din nou agitate timp de 10 minute urmata de stoparea reactiei enzimatice prin adaos de 100 µl solutie de NaOH 0,1 M, reactia de culoare dezvoltata si masurata la lungimea de unda de 405 nm.

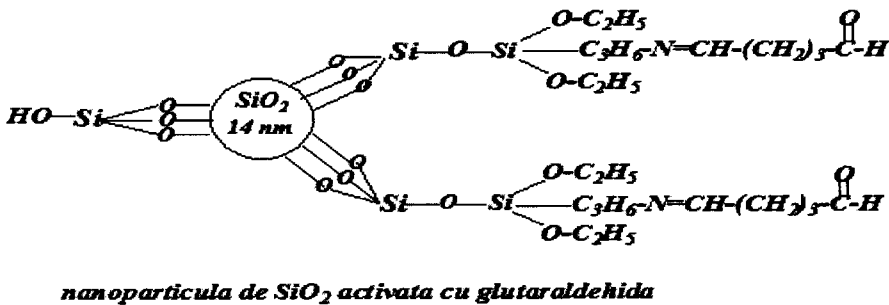
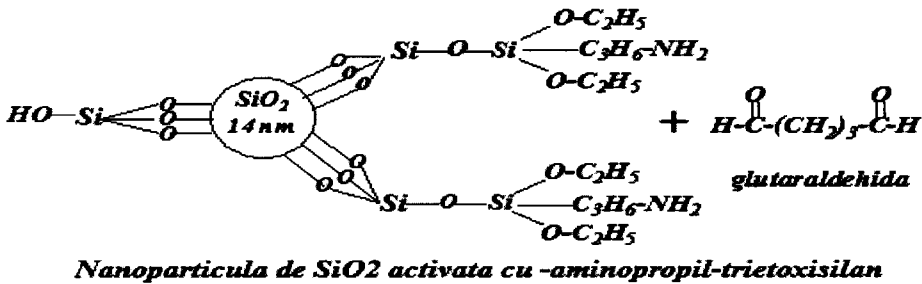
Inventatori: Dorobanţu Ioan, Neagu Livia

E1): Sinteza nanoimunosorbentului

R1): Reactia de cuplare a α -aminopropil-trietoxisilan la nanoparticula de SiO₂

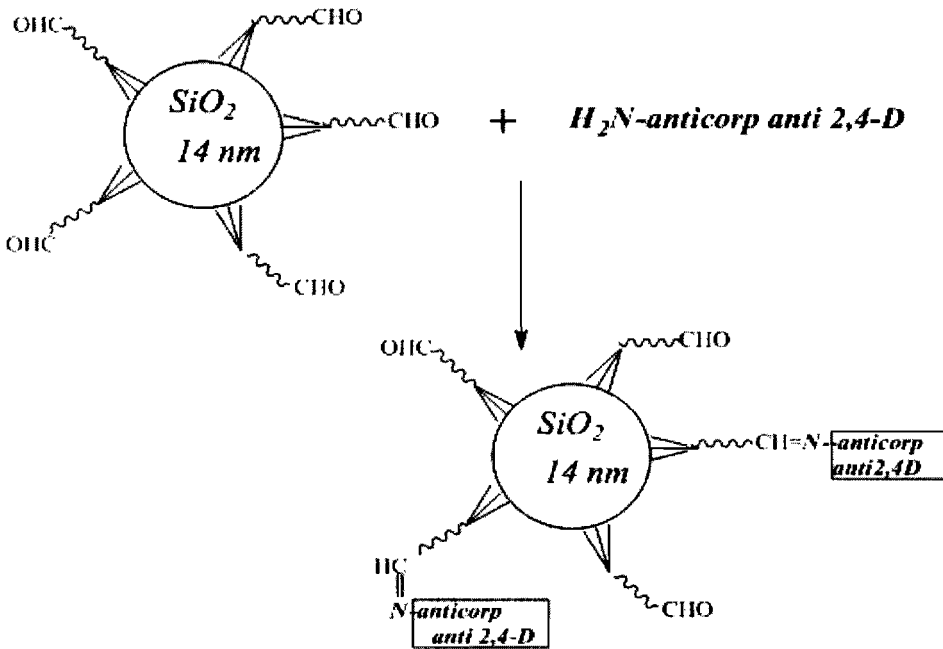


R2): Reactia de activare cu glutaraldehida

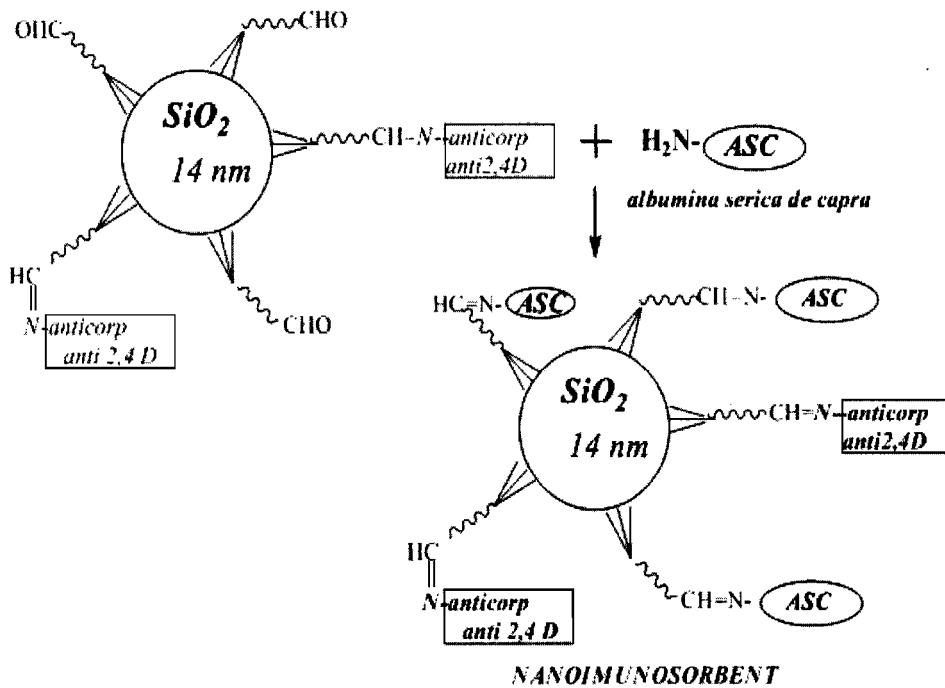


Inventatori: Dorobanțu Ioan, Neagu Livia

R3): Reactia de cuplare a anticorpului antipesticid la nanoimunosorbentul activat



R4): Reactia de cuplare a proteinei nespecifice imunologic (albumina serica de capra)

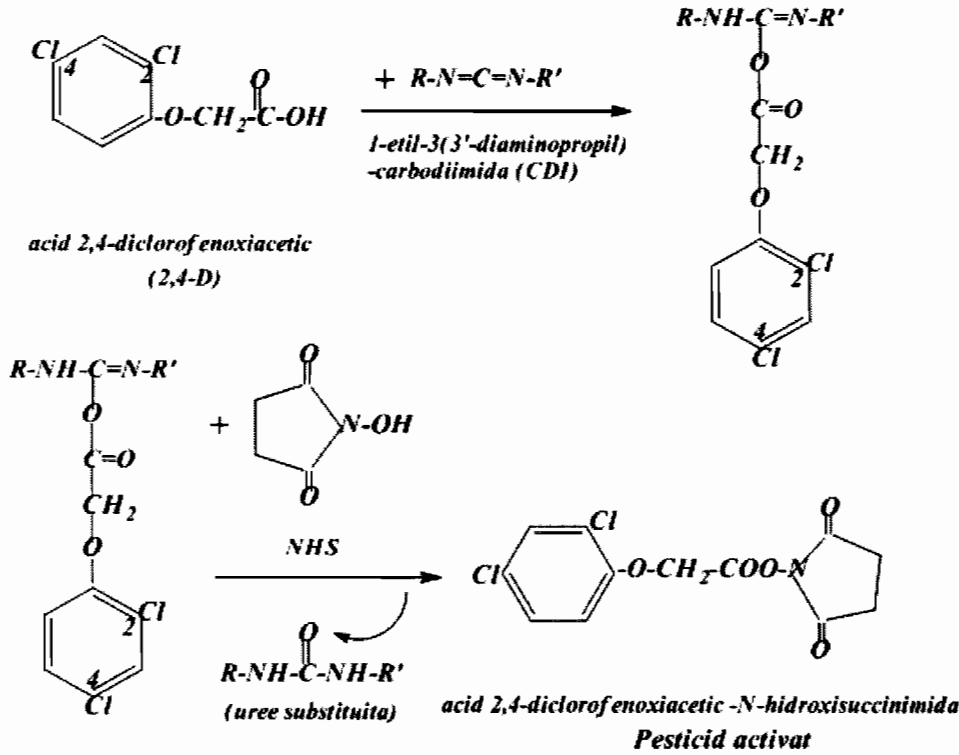


Inventatori: Dorobanța Ioan, Neagu Livia

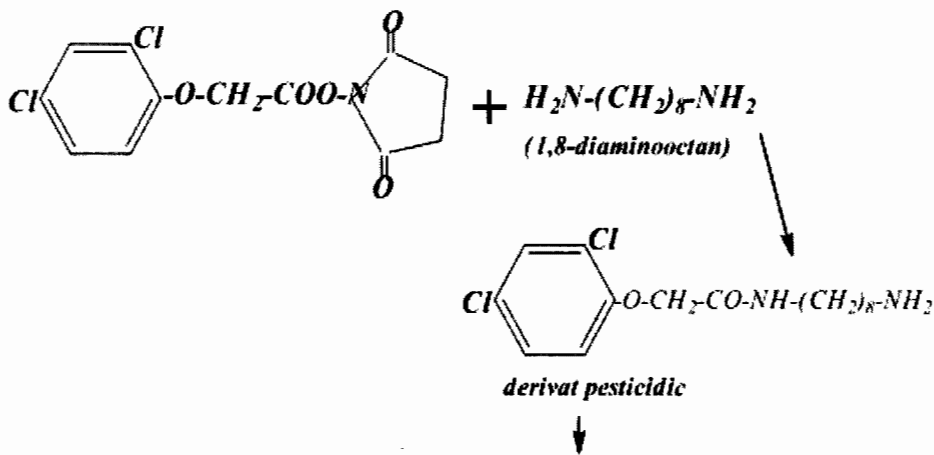
[Handwritten signatures]

E2): Sinteza markerului enzimatic pesticid-enzima, acid 2,4-diclorofenoxiacetic acid-fosfataza alcalina

e1): Reactia de activare a pesticidului acid 2,4-diclorofenoxiacetic cu CDI si NHS



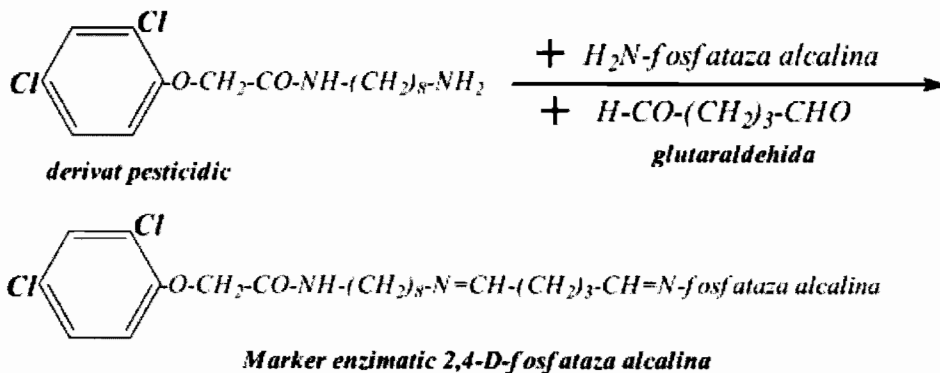
e2): Cuplarea pesticidului 2,4-D activat cu 1,8 diaminoctan



e3): Purificarea derivatului pesticidic prin cromatografie in strat subtire pe Silicagel G

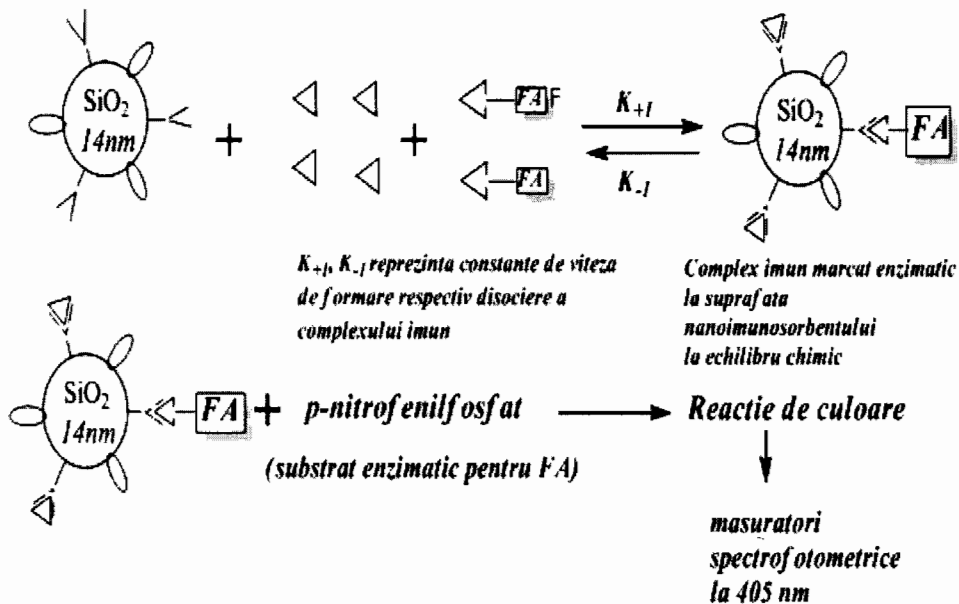
24

e4): Cuplarea derivatului pesticidic la fosfataza alcalina



e5): Purificarea markerului enzimatic prin cromatografie pe coloana de Sephadex G25

E3): Tehnica ELISA in faza omogena




Inventatori: Dorobanțu Ioan, Neagu Livia

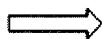
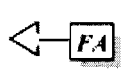
SECRET DE SERVICIU


 albumina serica de capra

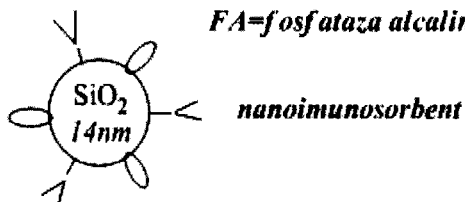

 anticorp antipesticid


 pesticid

Componentele sistemului
de analiza tip ELISA in
faza omogena



 pesticid - enzima
(marker enzimatic)

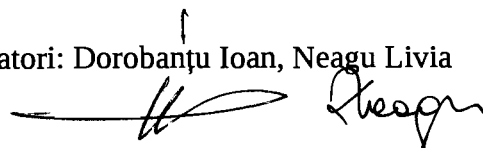
FA=fosfataza alcalina



Bibliografie

- [1] N.T.K. Thanh, L.A.W. Green, Functionalisation of nanoparticles for biomedical applications, Nano Today, vol. 5, pp. 213-230, 2010.;
- [2] C. Xu, S. Sun, Nanodisperse magnetic nanoparticles for biomedical applications, Polymer International, vol. 56, pp. 821-826, 2007;
- [3] Dorobantu Ioan, Harangus Livia, Tehnica imunochimica de dozare a pesticidului acid 3,6-dicloro-2-metoxi-benzoic din probe de mediu, brevet OSIM nr. 125452/30.06.2011;
- [4] Dorobantu Ioan, Neagu Livia, procedeu de obtinere a anticorpilor anti acid 2,4-diclorofenoxiacetic (2,4D) din amestecuri complexe de proteine pe baza de nanoimunosorbenti, Cerere brevet de inventie nr. OSIM A00911/26.11.2014;
- [5] B.A. Kairdolf, M. C. Mancini, A.M. Smith, S. Nie, Minimizing nonspecific cellular binding of quantum dots with hydroxyl-derivatized surface coatings, Analytical Chemistry, vol. 80, issue 8, pp. 3029-3034, 2008;
- [6] A.M. Smith, S. Nie, Minimizing the hydrodynamic size of quantum dots with multifunctional multidentate polymer ligands, Journal of the American Chemical Society, vol. 130, issue 34, pp. 11278-11279, 2008;
- [7] C. Graf, S. Dembski, A. Hofmann, E. Ruhl, A general method for the controlled embedding of nanoparticles in silica colloids, Langmuir, vol. 22, issue 13, pp. 5604-5610, 2006.

Inventatori: Dorobanțu Ioan, Neagu Livia



NESECRET
SECRET DE SERVICIU
REVENDICARE

2016 00906

25/11/2016

Oficiul de Stat pentru Invenții și Invenții
Informații Clasificate
INTRADE
Nr. 5/39 din 25.11.2016

S/108 24.11.2016

W

Tehnica ELISA in faza omogena pe baza de nanoimunosorbenti de SiO₂ pentru detectia pesticidelor organoclorurate din produse alimentare si de mediu caracterizat prin aceea ca aceasta consta in obtinerea nanoimunosorbentului pe baza de SiO₂ in care 100 mg de nanoparticule Ø=14 nm se trateaza cu HNO₃ la temperatura de 80°C timp de 30 minute urmata de centrifugare la 1500 x g, nanoparticulele spalate cu apa deionizata apoi tratate cu 5 ml solutie 10 % de α-aminopropiltriethoxisilan timp de 3 ore la temperatura de 80°C centrifugate la 1500 x g apoi spalate cu apa deionizata si in final cu alcool etilic, urmat de resuspendare in 2 ml apa deionizata si puse in reactie cu 200 µl solutie de glutaraldehida 50 % timp de o ora apoi separate prin centrifugare la 1500 x g timp de 5 minute si suspendate in solutie de NaCl 9 ‰ timp de 5 minute si 1 ml de nanoparticule activate cu glutaraldehida (5 mg/ml) este pusa in reactie cu 200 µl solutie de anticorp anti 2,4-D (2 mg/ml) sub continua agitare timp de 4 ore pentru cuplarea covalenta a anticorpului la suprafata nanoparticulei urmata de reactia de cuplare cu albumina serica de capra, in raport masic fata de anticorp anti 2,4-D de 10:1 (m_{ASC}/m_{AC}) reactie desfasurata timp de 24 ore la temperatura de 4°C, urmata de centrifugare la 1500 x g iar nanoimunosorbentul precipitat este suspendat in solutie de tampon fosfat de sodiu 10 mM pH 7,2 si utilizat in tehnica ELISA asociat cu markerul enzimatic pesticid 2,4-D-fosfataza alcalina obtinut prin reactia de activare a 10 mg 2,4-D cu 20 mg CDI si 10 mg NHS in 1,0 ml dimetilformamida timp de 30 minute urmata de cuplarea pesticidului 2,4-D activat cu 1 ml solutie de 50 mg 1,8 diaminoctan in tampon carbonat de sodiu 50 mM pH 9,6, lasat sa reactioneze timp de 4 ore iar derivatul pesticidic 2,4-D-amido-octil-amina este purificat prin cromatografie in strat subtire pe Silicagel G avand ca eluent amestecul alcool etilic:apa in proportii 60:40 (V/V) si 4 mg de derivat pesticidic in 1 ml tampon fosfat de sodiu 10 mM pH 8,2 si 500 µl solutie de fosfataza alcalina (1 mg/ml) sunt amestecate si apoi sub continua agitare sunt tratate cu 100 µl solutie de glutaraldehida 1 % timp de 4 ore in vederea cuplarii derivatului pesticidic la enzima urmat de purificarea pe coloana de Sephadex G25 avand ca eluent tampon fosfat de sodiu 5 mM pH 7,2 iar markerul enzimatic, 2,4D-fosfataza alcalina impreuna cu nanoimunosorbentul realizat si solutiile standard de pesticid de diferite concentratii sunt utilizate in tehnica ELISA pe baza de nanoimunosorbent ce constituie obiectul prezentei cereri de brevet si care consta in punerea in competitie a pesticidului respectiv a pesticidului marcat enzimatic cu anticorpul antipesticid existent pe suprafata nanoimunosorbentului, tehnica constand in introducerea in tuburi tip Ellerman in urmatoarea ordine a 1 ml tampon fosfat de sodiu 10 mM pH 7,2, 100 µl suspensie de nanoimunosorbent rezultat in E1 (20 µg), 100 µl suspensie de nanoparticule de SiO₂ functionalizate numai cu proteina nespecifica (1mg) utilizate ca antrenor, 100 µl solutie standard de pesticid 2,4-D in concentratiile de 0, 1, 2, 5, 10, 20, 50 si 100 ng/ml sau proba de analizat (extract lichid), 100 µl solutie de albumina serica de capra (1 mg/ml) si 100 µl solutie de marker enzimatic 2,4-d-fosfataza alcalina (10 ng/ml). Tuburile sunt inchise cu dopuri de plastic si agitate in pozitie orizontala la agitatorul electric timp de o ora in vederea atingerii echilibrului chimic al reactiei componentelor anticorp antipesticid si antigenul pesticid si pesticidul marcat enzimatic, tuburile sunt centrifugate timp de 15 minute, supernatantul este indepartat, in tuburi se introduce apoi 1 ml solutie de p-nitrofenilfosfat (1 mg/ml) substrat enzimatic pentru fosfataza alcalina din complexul imun format pe suprafata nanoimunosorbentului din precipitat, tuburile sunt agitate timp de 10 minute, iar reactia enzimatica este stopata cu 100 µl solutie de NaOH 0,1 M iar reactia de culoare dezvoltata este masurata spectrofotometric la lungimea de unda de 405 nm.

Inventatori: Dorobanţu Ioan, Neagu Livia

