



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2019 00882

(22) Data de depozit: 11/12/2019

(41) Data publicării cererii:
30/06/2021 BOPI nr. 6/2021

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE
- DEZVOLTARE PENTRU FIZICĂ ȘI
INGINERIE NUCLEARĂ "HORIA
HULUBEI", STR.REACTORULUI, NR.30,
MĂGURELE, IF, RO;
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
TEHNOLOGII IZOTOPICE ȘI
MOLECULARE, STR.DONAT NR.67-103,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(72) Inventatori:
• DOROBANȚU IOAN, ALEEA CÂMPUL CU
FLORI NR.1, BL.OD 2, SC.C, ET.5, AP.110,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• NEAGU LIVIA, ALEEA POIANA VADULUI
NR.1, BL.OD8, SC.1, ET.2, AP.10,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• PORAV ALIN SEBASTIAN,
STR.BARAGANULUI NR.10, AP.2,
TÂRGU-MUREȘ, MS, RO;
• FALAMAȘ ALEXANDRA, STR.BÂRSEI
NR.10/20, SIBIU, SB, RO;
• BOCĂNEALĂ MARICEL,
STR.MIHAI VITEAZU NR.96, SAT LIEȘTI,
COMUNA LIEȘTI, GL, RO

(54) **PROCEDEU DE SEPARARE A ANTICORPILOR
SPECIFICI DIN ANTISERURI POLICLONALE
ANTIFICOCIANINĂ PE COLOANĂ DE AFINITATE
UTILIZÂND NANOIMUNOSORBENTUL
SiO₂-OVALBUMINA-FICOCIANINA**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de separare a anticorpilor specifici din antiseruri policlonale antifococianină pe coloana de afinitate utilizând nanoimunosorbentul SiO₂-ovalbumină-ficocianină. Procedeu, conform invenției constă în etapele: I-sinteza nanoimunosorbentului tip antigen format din nanoparticule de SiO₂ funcționalizate covalent cu ovalbumină și ficocianină, II-separarea gamma-globulinei din antiseruri policlonale care conțin anticorpi specifici și antifococianina, III-reacția imună

dintre antiserul antifococianină și nanoimunosorbentul tip antigen cu formare de complex imun cuplat la suprafața imunosorbentului, IV-centrifugarea suspensiei de nanoimunosorbent, V- cromatografierea pe coloană de afinitate a imunoglobulinelor specifice anticorpilor antifococianina și VI-dozaarea cantității de anticorp antifococianina.

Revendicări: 1



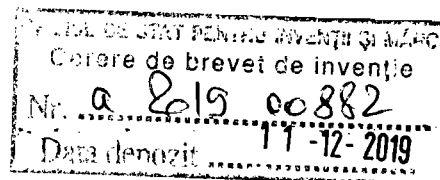
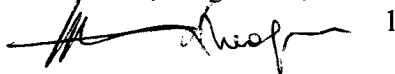
Procedeu de separare a anticorpilor specifici din antiseruri policlonale antifococianina pe coloana de afinitate utilizand nanoimunosorbentul SiO₂-ovalbumina-ficocianina

Anticorpii policlonali sunt un amestec de anticorpi pentru un antigen dat produs de celulele B. Fiecare din acesti anticorpi avand diferite afinitati si specificitati pentru diferiti epitopi ai antigenului. Anticorpii se utilizeaza in diferite domenii stiintifice fapt care necesita prepararea unor anticorpi omogeni de puritate inalta. Anticorpii policlonali pot fi purificati prin electroforeza in gel SDS-poliacrilamida [1] sau prin cromatografia de afinitate, aceasta tehnica fiind cea mai eficienta si utilizata datorita specificitatii, randamentului si usurintei de utilizare a acesteia [2]. Cromatografia de imunoafinitate este procesul in care ca baza de separare se foloseste afinitatea de legare a unui antigen de anticorp fiind una din cele mai selective, rapide si versatile metode pentru purificarea anticorpilor [3]. Imunosorbentul este antigenul cuplat covalent pe o faza solida (matrice) insolubila naturala: agaroză (denumire comercială Sepharose), dextransi (denumire comercială Sephadex) sau celuloză, sintetica: acrilamida, polistiren, polimetacrilat sau anorganica: siliciu poros, fibra de sticla sau TiO₂. Amestecul complex de proteine care contine anticorpul de interes este aplicat intr-o faza mobile care are compozitia si pH-ul adecvat pentru legarea proteinei de antigen (ligand de afinitate) in timp ce restul componentelor din amestec sunt eluate. Anticorpul retinut este apoi eluat din coloana cu o solutie de tampon de un anumit pH si colectat cu ajutorul unui colector de fractiuni. Dupa eluare coloana este lasata sa se regenereze inainte de aplicarea urmatorului esantion de purificat. Dezavantajele acestei tehnici sunt reprezentate de aparatura complexa necesara de-a lungul desfasurarii procedurii de purificare: pompe peristaltice pentru solventul de elutie al coloanei, colector de fractiuni cromatografice, coloane de afinitate, faze multiple de spalare a coloanei in vederea regenerarii acesteia fiind astfel o tehnica consumatoare de timp.

Problema pe care o rezolva inventia consta in prezentarea unui procedeu de obtinere a anticorpilor antifococianina din antiseruri policlonale antifococianina pe baza de nanoimunosorbent SiO₂-ovalbumina-ficocianina acesta avand avantajul unei suprafete specifice mari (>200 m²/g) obtinandu-se o cantitate mare de anticorp specific (utilizand 1 g de nanoimunosorbent se obtine (100-200) mg anticorp pur) astfel intr-o perioada mai scurta de timp decat in cromatografia de afinitate clasica se separa o cantitate mai mare de anticorpi specifici. Datorita suprafetei specifice mari de cuplaj a proteinei de faza solida coloanele de afinitate sunt dimensional reduce fata de coloanele clasice, timpul de elutie este mic in comparatie cu cromatografia de afinitate pe coloane clasice eliminand posibilitatea denaturarii anticorpilor in faza de elutie ceea ce conduce la pretul scazut al operatiei de separare. Materialele folosite in realizarea de nanoimunosorbenti sunt mai ieftine fata de cele utilizate in tehnica clasica.

Procedeu conform inventiei inlatura dezavantajele de mai sus prin aceea ca se iau 3 ml tetraetil ortosilan se introduce intr-un balon de sticla si se amesteca cu 100 ml alcool etilic de concentratie 95 % apoi se aduc la temperatura de 65 °C si se trateaza cu 8 ml de hidroxid de amoniu (NH₄OH) 25 %, picatura cu picatura sub continua agitare pana la formarea unei suspensii opalescente de nanoparticule, apoi se continua agitarea timp de 2 h dupa care suspensia se aduce la temperatura camerei, se centrifugheaza la 1500 x g timp de 15 min iar precipitatul format se spala cu apa deionizata, se centrifugheaza din nou la 1500 x g timp de 15 min iar nanoparticulele de SiO₂ precipitate sunt tratate cu 25 ml solutie de HNO₃ 10 % la temperatura de 80 °C timp de 30 min apoi solutia acida este indepartata prin centrifugare la 1500 x g timp de 15 min iar nanoparticulele sunt din nou spalate cu apa deionizata, urmat de centrifugare la 1500 x g timp de 15 min, apoi precipitatul de nanoparticule este tratat cu 10 ml solutie de 3-aminopropil trietoxisilan la temperatura de 50 °C timp de 2 h apoi sunt centrifugate la 1500 x g timp de 15 min, spalate cu apa deionizata, centrifugate iar precipitatul este tratat cu 10 ml glutaraldehida 10 % la temperatura de 70 °C timp de 1 h apoi nanoparticulele activate sunt centrifugate la 1500 x g timp de 15 min, spalate cu apa deionizata sip use in reactie cu 20 ml solutie de ovalbumina 5 mg/ml timp de 24 h sub agitare la temperatura camerei

Inventatori: Dorobantu Ioan, Neagu Livia, Porav Alin Sebastian, Falamaş Alexandra, Bocăneală Maricel



dupa care complexul format dintre nanoparticule de SiO₂-ovalbumina este centrifugat si spalat cu apa deionizata pentru indepartarea proteinei nereactionate, centrifugat la 1500 x g si tratat cu 5 ml glutaraldehida 10 % la temperatura de 30 °C pentru activarea gruparilor aminice ale lizinei, componenta a ovalbuminei, timp de 6 ore, urmat de centrifugare iar complexul nanoparticula de SiO₂-ovalbumina-glutaraldehida active este centrifugat la 1500 x g timp de 15 min spalat cu tampon fosfat 10 mM pH 7,2 si pus in reactie cu o solutie de 10 ml ficocianina 2,4 mg/ml timp de 24 ore la temperatura camerei sub continua agitare iar produsul final nanoimunosorbent tip antigen SiO₂-ovalbumina-ficocianina este centrifugat si spalat cu tampon fosfat 10mM pH 7,2 si utilizat in cromatografia de afinitate pentru separarea anticorpilor antificocianina din seruri antificocianina, prin folosirea unei coloane de sticla de dimensiuni L=10 cm si Φ=1 cm, coloana avand la partea inferioara un strat de Sephadex G25 de inaltime 1 cm ce constituie un suport pentru nanoimunosorbentul tip antigen, nanoparticula SiO₂-ovalbumina-ficocianina cuplat cu anticorpul antificocianina din antiserul antificocianina, 1 ml antiser ce este tratat initial cu 1 ml solutie de (NH₄)₂SO₄ (sulfat de amoniu) 50 % pentru precipitarea γ-globulinelor serice ce contin anticorpul antificocianina urmat de centrifugare la 1500 x g timp de 10 min iar supernatantul ce contine albuminele serice este indepartat, precipitatul de γ-globuline este redizolvat in 10 ml tampon fosfat 10 mM pH 7,2 iar 1 ml de γ-globuline de concentratie proteica 10 mg/ml este pus in amestec cu 1 ml suspensie de nanoimunosorbent tip antigen, SiO₂-ovalbumina-ficocianina 50 mg/ml si lasat sa reactioneze 6 h la temperatura camerei pentru formarea complexului imun dintre ficocianina legata covalent in nanoimunosorbent si anticorpul antificocianina existent in γ-globulinele din antiser apoi se centrifugheaza si se spala cu tampon fosfat 5 mM pH 7,2 iar nanoparticulele sunt resuspendate in tampon fosfat 5 mM pH 7,2 si introdus pe coloana cromatografica peste stratul de Sephadex G25, urmat de elutie cu tampon glicina-HCl 10 mM initial pH 5,0 apoi cu pH 4,0, urmat de pH 3,0 si pH 2,3 in faza finala, solutiile de anticorpi antificocianina colectate la diferite pH-uri sunt aduse la pH 7,2 cu tampon fosfat 1 M pH 7,2 si depozitate la -20 °C in vederea utilizarii in tehnicile imunochimice.

Procedeul conform inventiei consta in cinci etape: Etapa I, Etapa a II-a, Etapa a III-a, Etapa a IV-a, Etapa a V-a si Etapa a VI-a.

Etapa I: Sinteza nanoimunosorbentului tip antigen format din nanoparticule de SiO₂ functionalizate covalent cu ovalbumina si ficocianina.

Etapa a II-a: Separarea γ-globulinei din antiseruri policlonale ce contin anticorpi specifici antificocianina

Etapa a III-a: Reactia imuna dintre antiserul antificocianina si nanoimunosorbentul tip antigen cu formare de complex imun cuplat la suprafata nanoimunosorbentului

Etapa a IV-a: Centrifugarea suspensiei de nanoimunosorbent

Etapa a V-a: Cromatografierea pe coloana de afinitate a imunoglobulinelor specific anticorpilor antificocianina

Etapa a VI-a: Dozarea cantitatii de anticorp antificocianina

Descrierea etapelor procedeului:

Etapa I: Sinteza nanoimunosorbentului tip antigen format din nanoparticule de SiO₂ functionalizate covalent cu ovalbumina si ficocianina se desfasoara pe parcursul a sapte reactii: Reactia 1 (R1), Reactia 2 (R2), Reactia 3 (R3), Reactia 4 (R4), Reactia 5 (R5), Reactia 6 (R6) si Reactia 7 (R7).

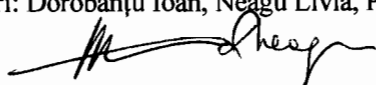
Reactia 1 (R1): Obtinerea nanoparticulelor de SiO₂

3 ml tetraetil ortosilan (TEOS) se introduc intr-un balon de sticla si se amesteca cu 100 ml alcool etilic de concentratie 95 % apoi se aduc la temperatura de 65 °C si se trateaza cu 8 ml de hidroxid de amoniu (NH₄OH) 25 %, picatura cu picatura sub continua agitare pana la formarea unei suspensii opalescente de nanoparticule, apoi se continua agitarea timp de 2 h dupa care suspensia se aduce la temperatura camerei si se centrifugheaza la 1500 x g timp de 15 min iar precipitatul format se spala cu apa deionizata, se centrifugheaza din nou la 1500 x g timp de 15 min.

Reactia 2 (R2): Tratatul termic al nanoparticulelor de SiO₂ cu HNO₃

Nanoparticulele de SiO₂ rezultate in cadrul Reactiei 1 sunt tratate cu 25 ml solutie de HNO₃ 10 % la

Inventatori: Dorobanțu Ioan, Neagu Livia, Porav Alin Sebastian, Falamaș Alexandra, Bocăneală Maricel

 2

temperatura de 80 °C timp de 30 min apoi solutia acida este indepartata prin centrifugare la 1500 x g timp de 15 min, iar precipitatul de nanoparticule este spalat cu apa deionizata si din nou centrifugat la 1500 x g timp de 15 min.

Reactia 3 (R3): Activarea nanoparticulelor de SiO₂ cu 3-aminopropil trietoxisilan

Nanoparticule de SiO₂ rezultate in cadrul Reactiei 2 sunt tratate cu 10 ml solutie de 3-aminopropil trietoxisilan (APTES) la temperatura de 50 °C timp de 2 h apoi sunt centrifugate la 1500 x g timp de 15 min, spalate cu apa deionizata si centrifugate din nou la 1500 x g timp de 15 min.

Reactia 4 (R4): Activarea complexului nanoparticule de SiO₂-APTES cu glutaraldehida

Complexul nanoparticule de SiO₂-APTES obtinut in cadrul Reactiei 3 este tratat cu 10 ml glutaraldehida 10 % la temperatura de 70 °C timp de 1 h sub continua agitare, apoi nanoparticulele activate sunt centrifugate la 1500 x g timp de 15 min, spalate cu apa deionizata si centrifugate din nou la 1500 x g timp de 15 min.

Reactia 5 (R5): Cuplarea ovalbuminei de nanoparticulele de SiO₂ activate cu glutaraldehida

500 mg nanoparticule de SiO₂ activate cu glutaraldehida obtinute in cadrul Reactiei 4 sunt puse in reactie cu 20 ml solutie de ovalbumina 5 mg/ml timp de 24 h sub agitare continua la temperatura camerei, dupa care complexul format dintre nanoparticulele de SiO₂ si ovalbumina este centrifugat si spalat cu apa deionizata pentru indepartarea proteinei nereactionate.

Reactia 6 (R6): Activarea gruparilor amino ale ovalbuminei din complexul nanoparticule de SiO₂-APTES-GA-OVA cu glutaraldehida

Complexul nanoparticule de SiO₂-APTES-GA-OVA rezultat in cadrul Reactiei 5 este tratat cu 5 ml solutie glutaraldehida 10 % la temperatura de 30 °C sub agitare continua pentru activarea gruparilor aminice libere ale lizinei, componenta a ovalbuminei, timp de 6 ore, urmat de centrifugare la 1500 x g timp de 15 min si spalare cu tampon fosfat 10 mM pH 7,2.

Reactia 7 (R7): Obtinerea nanoimunosorbentului de tip antigen

Complexul nanoparticule de SiO₂-APTES-GA-OVA activ rezultat in cadrul Reactiei 6 este pus in reactie cu o solutie de 10 ml ficocianina 2,4 mg/ml timp de 24 ore la temperatura camerei sub continua agitare, iar produsul final nanoimunosorbent tip antigen SiO₂-ovalbumina-ficocianina este centrifugat si spalat cu tampon fosfat 10mM pH 7,2 si utilizat in cromatografia de afinitate pentru separarea anticorpilor antificocianina din seruri antificocianina.

Etapa a II-a: Separarea γ -globulinei din antiseruri policlonale ce contin anticorpi specifici antificocianina

1 ml antiser policlonal care contine anticorpi specifici antificocianina este tratat cu 1 ml solutie de (NH₄)₂SO₄ (sulfat de amoniu) 50 % pentru precipitarea γ -globulinelor serice ce contin anticorpii antificocianina urmat de centrifugare la 1500 x g timp de 10 min iar supernatantul ce contine albuminele serice din antiser este indepartat, precipitatul de γ -globuline este redizolvat in 10 ml tampon fosfat 10 mM pH 7,2.

Etapa a III-a: Reactia imuna dintre antiserul antificocianina si nanoimunosorbentul tip antigen cu formare de complex imun cuplat la suprafata nanoimunosorbentului

1 ml de γ -globuline obtinute in cadrul Etapei a II-a de concentratie proteica 10 mg/ml este pus in amestec cu 1 ml suspensie de nanoimunosorbent tip antigen, SiO₂-ovalbumina-ficocianina 50 mg/ml obtinut in cadrul Etapei I, Reactia 7 si lasat sa reactioneze 6 h sub continua agitare la temperatura camerei pentru formarea complexului imun dintre ficocianina legata covalent in nanoimunosorbent si anticorpii antificocianina existent in γ -globulinele din antiser

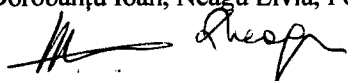
Etapa a IV-a: Centrifugarea suspensiei de nanoimunosorbent

Suspensia de complex imun dintre ficocianina legata covalent in nanoimunosorbent si anticorpii antificocianina existent in γ -globulinele din antiser se centrifugheaza la 1500 x g timp de 15 min si se indeparteaza supernatantul de γ -globuline nespecifice urmata de spalarea nanoparticulelor cu tampon fosfat 5 mM pH 7,2 si resuspendare in tampon fosfat 5 mM pH 7,2.

Etapa a V-a: Cromatografierea pe coloana de afinitate a imunoglobulinelor specific anticorpilor antificocianina

In operatia de cromatografie pe coloana de afinitate se foloseste o coloana de sticla de dimensiuni:

Inventatori: Dorobanțu Ioan, Neagu Livia, Porav Alin Sebastian, Falamaș Alexandra, Bocăneală Maricel

 3

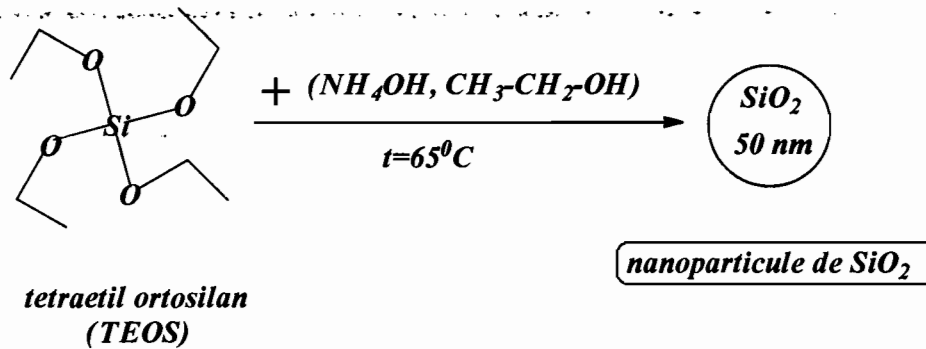
L=10 cm și $\Phi=1$ cm având ca bază un strat de Sephadex G25 de înălțime, $h=1$ cm ca suport pentru nanoimunisorbentul tip antigen, nanoparticula SiO_2 -ovalbumina-ficocianina cuplat cu anticorpul antificocianina din antiserul antificocianina obținut în cadrul etapei a IV-a. Disocierea complexului imun existent la suprafața nanoimunisorbentului se efectuează prin eluție succesivă cu tampon glicina-HCl 10 mM de diferite pH-uri (inițial 5,0; 4,0; 3,0 și final 2,3) urmată de neutralizarea anticorpilor antificocianina din eluțiile efectuate la diferite pH-uri cu tampon fosfat 1 M pH 7,2.

Etapa a VI-a: Dozarea cantității de anticorp antificocianina

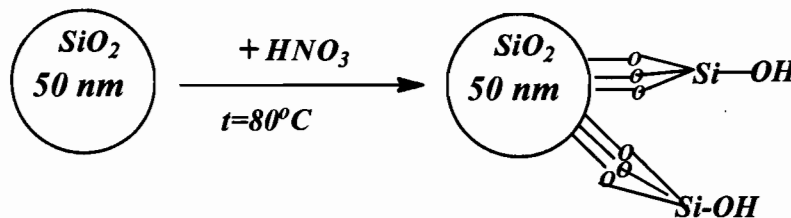
Dozarea cantității de anticorp antificocianina din fiecare eluat se efectuează prin spectrofotometrie UV-VIS la lungimea de undă, $\lambda=279$ nm sau prin metoda Bradford la lungimea de undă, $\lambda=595$ nm și depozitarea acestora la temperatura de -20°C în vederea utilizării în tehnicile imunochimice.

Reacțiile chimice:

Reacția 1 (R1): Obținerea nanoparticulelor de SiO_2

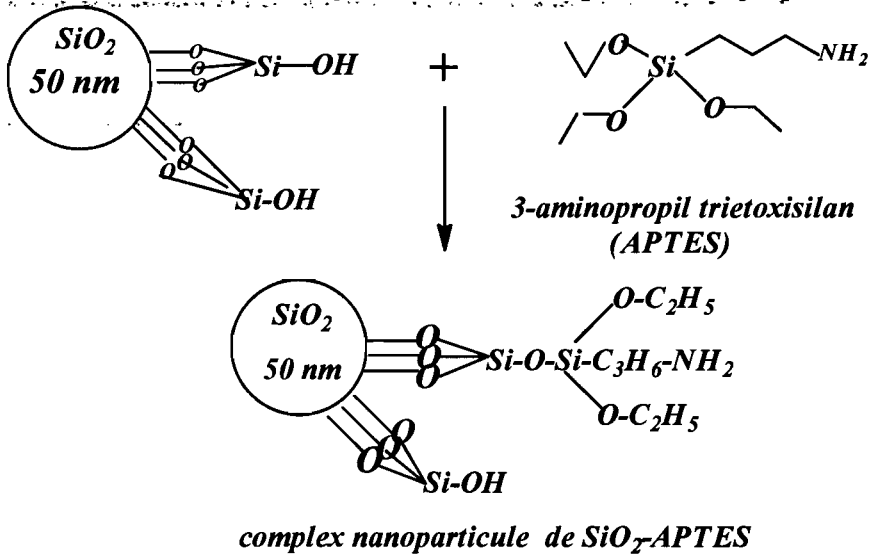


Reacția 2 (R2): Tratamentul termic al nanoparticulelor de SiO_2 cu HNO_3

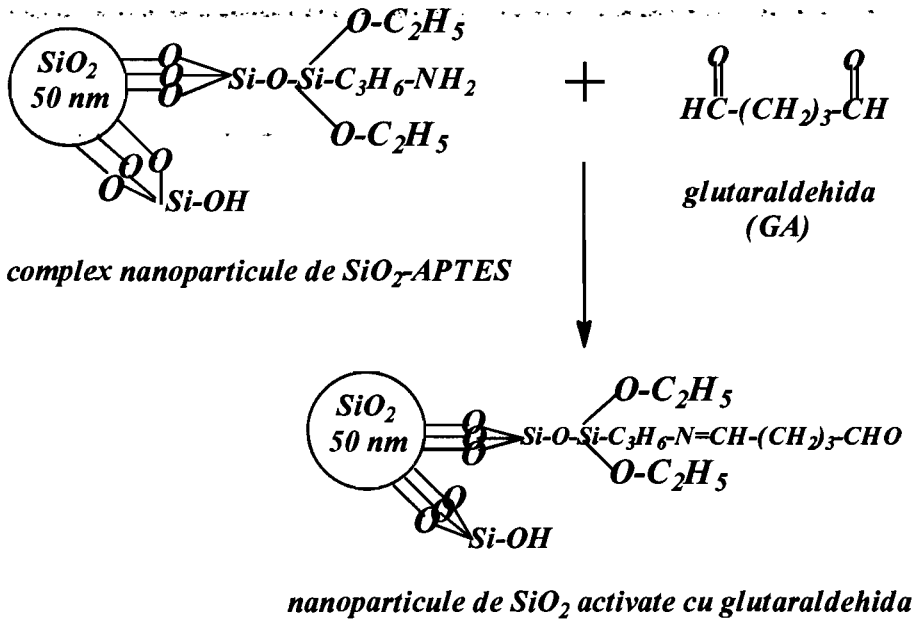


Inventatori: Dorobanțu Ioan, Neagu Livia, Porav Alin Sebastian, Falamaș Alexandra, Bocăneală Maricel

Reactia 3 (R3): Activarea nanoparticulelor de SiO₂ cu 3-aminopropil trietoxisilan



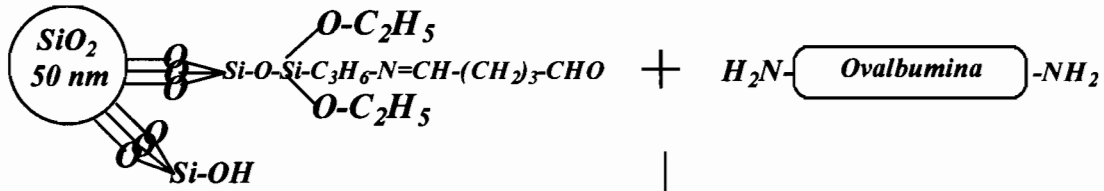
Reactia 4 (R4): Activarea complexului nanoparticule de SiO₂-APTES cu glutaraldehida



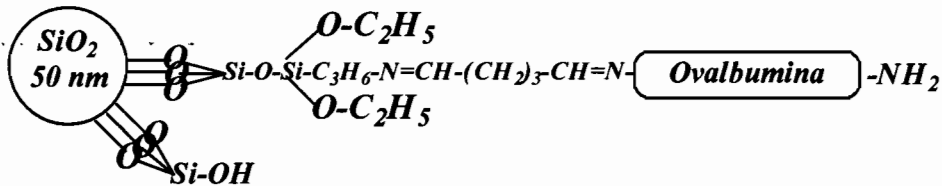


28

Reactia 5 (R5): Cuplarea ovalbuminei de nanoparticule de SiO₂ activate cu glutaraldehida

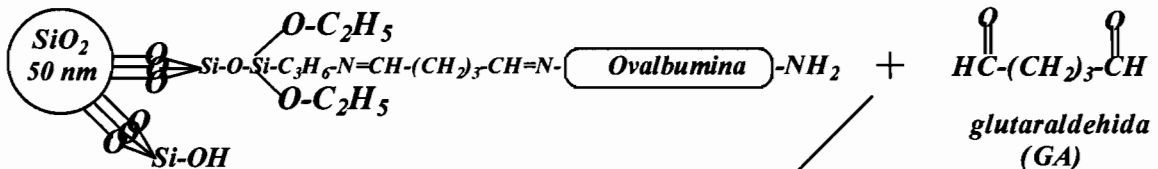


nanoparticule de SiO₂ activate cu glutaraldehida

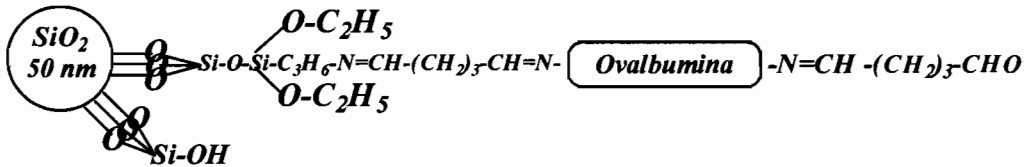


complex nanoparticule de SiO₂-APTES-GA-OVA

Reactia 6 (R6): Activarea gruparilor amino ale ovalbuminei din complexul nanoparticule de SiO₂-APTES-GA-OVA cu glutaraldehida



complex nanoparticule de SiO₂-APTES-GA-OVA

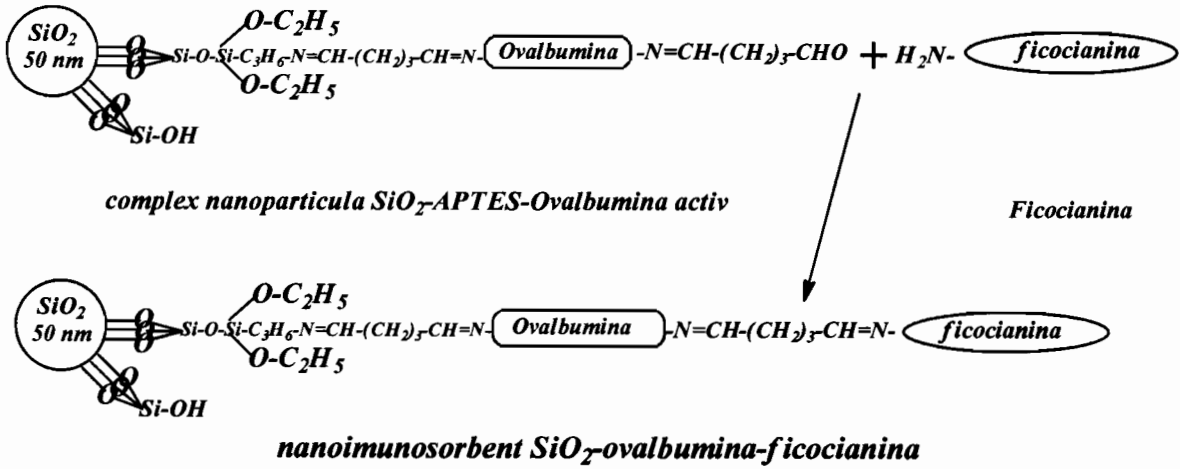


complex nanoparticule de SiO₂-APTES-OVA activ

24



Reactia 7 (R7): Obținerea nanoimunisorbentului de tip antigen

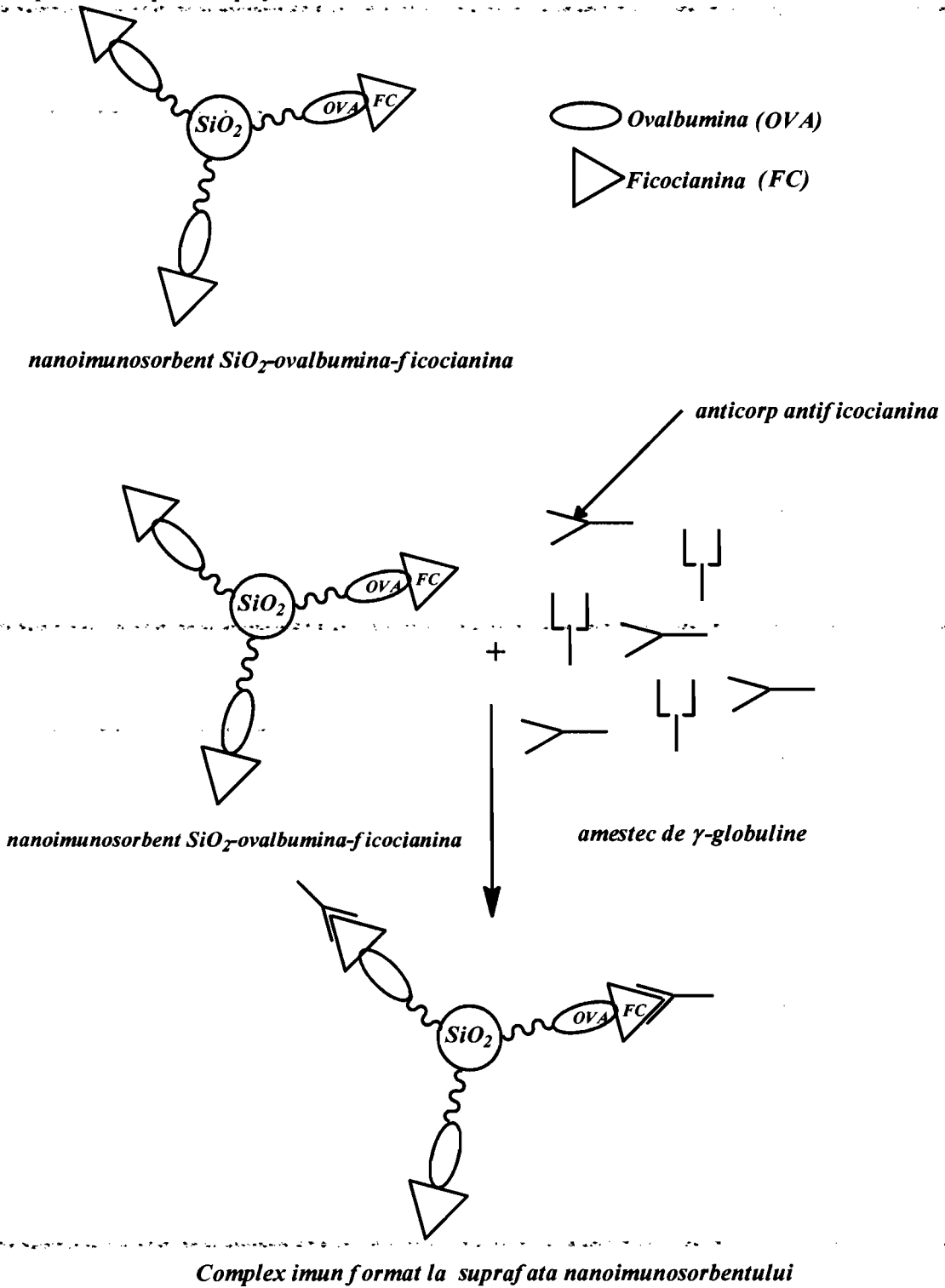


Inventatori: Dorobanțu Ioan, Neagu Livia, Porav Alin Sebastian, Falamaș Alexandra, Bocăneală Maricel

Neagu 7

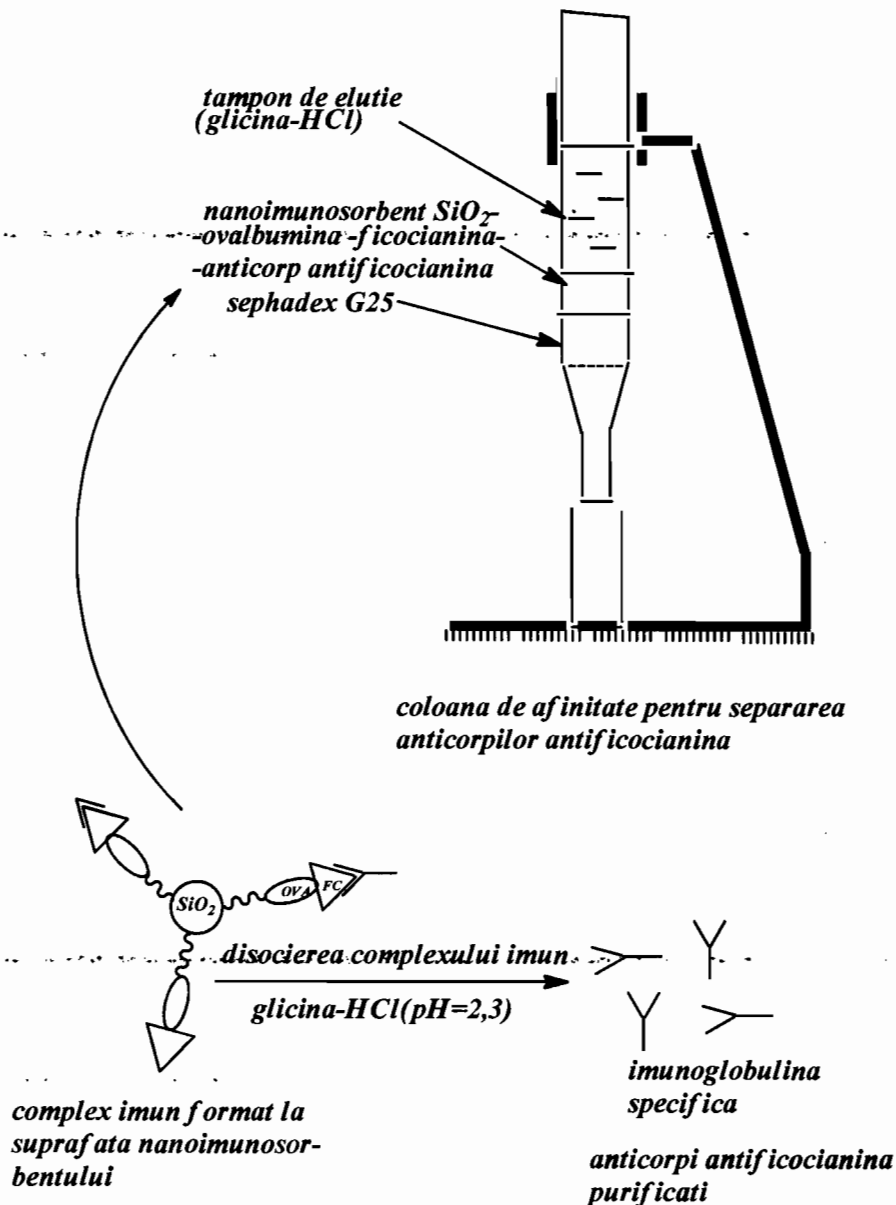
Ue

Etapa a III-a: Reactia imuna dintre antiserul antificocianina si nanoimunosorbentul tip antigen cu formare de complex imun cuplat la suprafata nanoimunosorbentului



Inventatori: Dorobanțu Ioan, Neagu Livia, Porav Alin Sebastian, Falamaș Alexandra, Bocăneală Maricel

Etapa a V-a: Cromatografierea pe coloana de afinitate a imunoglobulinelor specifice anticorpilor antificocianina



Bibliografie

- [1] P.J. Madara, L.R. Banghart, L.J.W. Jack, L.M. Neira, I.H. Mather, Affinity purification of pyclonal antibodies from antigen immobilized in situ in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels, *Analytical Biochemistry*, vol. 187, pp. 246-250, 1990;
- [2] S. Arora, V. Saxena, B.V. Ayyar, Affinity chromatography: A versatile technique for antibody purification, *Methods*, vol. 116, pp. 84-94, 2017;
- [3] S. Sheng, F. Kong, Separation of antigens and antibodies by immunoaffinity chromatography, *Pharmaceutical Biology*, vol. 50, issue 8, pp. 1038-1044, 2012.

Inventatori: Dorobanțu Ioan, Neagu Livia, Porav Alin Sebastian, Falamaș Alexandra, Bocăneală Maricel

8/109
06.12.2019

NR. 0871 - 8/17 / 11.12.2019

Procedeeul conform invenției este caracterizat prin aceea că se iau 3 ml tetraetil ortosilan se introduc într-un balon de sticlă și se amestecă cu 100 ml alcool etilic de concentrație 95 % apoi se aduce la temperatura de 65 °C și se tratează cu 8 ml de hidroxid de amoniu (NH₄OH) 25 %, picătura cu picătura sub continuă agitare până la formarea unei suspensii opalescente de nanoparticule, apoi se continuă agitarea timp de 2 h după care suspensia se aduce la temperatura camerei, se centrifughează la 1500 x g timp de 15 min iar precipitatul format se spală cu apă deionizată, se centrifughează din nou la 1500 x g timp de 15 min iar nanoparticulele de SiO₂ precipitate sunt tratate cu 25 ml soluție de HNO₃ 10 % la temperatura de 80 °C timp de 30 min apoi soluția acidă este îndepărtată prin centrifugare la 1500 x g timp de 15 min iar nanoparticulele sunt din nou spălate cu apă deionizată, urmat de centrifugare la 1500 x g timp de 15 min, apoi precipitatul de nanoparticule este tratat cu 10 ml soluție de 3-aminopropil trietoxisilan la temperatura de 50 °C timp de 2 h apoi sunt centrifugate la 1500 x g timp de 15 min, spălate cu apă deionizată, centrifugate iar precipitatul este tratat cu 10 ml glutaraldehidă 10 % la temperatura de 70 °C timp de 1 h apoi nanoparticulele activate sunt centrifugate la 1500 x g timp de 15 min, spălate cu apă deionizată și puse în reacție cu 20 ml soluție de ovalbumină 5 mg/ml timp de 24 h sub agitare la temperatura camerei după care complexul format dintre nanoparticule de SiO₂-ovalbumină este centrifugat și spălat cu apă deionizată pentru îndepărtarea proteinei nereacționate, centrifugat la 1500 x g și tratat cu 5 ml glutaraldehidă 10 % la temperatura de 30 °C pentru activarea grupărilor aminice ale lizinei, componenta a ovalbuminei, timp de 6 ore, urmat de centrifugare iar complexul nanoparticula de SiO₂-ovalbumină-glutaraldehidă activă este centrifugat la 1500 x g timp de 15 min spălat cu tampon fosfat 10 mM pH 7,2 și pus în reacție cu o soluție de 10 ml ficocianină 2,4 mg/ml timp de 24 ore la temperatura camerei sub continuă agitare iar produsul final nanoimunisorbent tip antigen SiO₂-ovalbumină-ficocianină este centrifugat și spălat cu tampon fosfat 10 mM pH 7,2 și utilizat în cromatografia de afinitate pentru separarea anticorpilor antificocianină din seruri antificocianină, prin folosirea unei coloane de sticlă de dimensiuni L=10 cm și Φ=1 cm, coloana având la partea inferioară un strat de Sephadex G25 de înălțime 1 cm ce constituie un suport pentru nanoimunisorbentul tip antigen, nanoparticula SiO₂-ovalbumină-ficocianină cuplat cu anticorpul antificocianină din antiserul antificocianină, 1 ml antiser ce este tratat inițial cu 1 ml soluție de (NH₄)₂SO₄ (sulfat de amoniu) 50 % pentru precipitarea γ-globulinelor serice ce conțin anticorpul antificocianină urmat de centrifugare la 1500 x g timp de 10 min iar supernatantul ce conține albuminele serice este îndepărtat, precipitatul de γ-globuline este redizolvat în 10 ml tampon fosfat 10 mM pH 7,2 iar 1 ml de γ-globuline de concentrație proteică 10 mg/ml este pus în amestec cu 1 ml suspensie de nanoimunisorbent tip antigen, SiO₂-ovalbumină-ficocianină 50 mg/ml și lăsat să reacționeze 6 h la temperatura camerei pentru formarea complexului imun dintre ficocianină legată covalent în nanoimunisorbent și anticorpul antificocianină existent în γ-globulinele din antiser apoi se centrifughează și se spală cu tampon fosfat 5 mM pH 7,2 iar nanoparticulele sunt resuspendate în tampon fosfat 5 mM pH 7,2 și introdus pe coloana cromatografică peste stratul de Sephadex G25, urmat de eluție cu tampon glicină-HCl 10 mM inițial pH 5,0 apoi cu pH 4,0, urmat de pH 3,0 și pH 2,3 în fază finală, soluțiile de anticorpi antificocianină colectate la diferite pH-uri sunt aduse la pH 7,2 cu tampon fosfat 1 M pH 7,2 și depozitate la -20 °C în vederea utilizării în tehnicile imunochimice.

Inventatori: Dorobanțu Ioan, Neagu Livia, Porav Alin Sebastian, Falamaș Alexandra, Bocăneală Maricel

