



(12) **CERERE DE BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. cerere: **a 2019 00883**

(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.DONATH NR.65-103, 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;**
• **STOICA RALUCA- DIANA,
STR.EUCALIPTULUI NR.14B1, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **CRĂCIUNESCU IZABELL,
STR. BUCUREȘTI NR.57-63, BL.A, SC.2,
AP.20, CLUJ- NAPOCA, CJ, RO;**
• **TURCU RODICA PAULA,
STR. TITU MAIORESCU, NR.7, AP.4,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO**

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A NANOIMUNOSORBENTULUI
SUPERPARAMAGNETIC TIP ANTICORP PE BAZĂ DE Fe_xO_y
UTILIZAT ÎN TEHNICA NANOELISA PENTRU DETECȚIA
PESTICIDULUI DICAMBA (ACID 3,
6-DICLORO-2-METOXIBENZOIC) DIN PROBE ALIMENTARE
ȘI DE MEDIU**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a imunosorbentului superparamagnetic tip anticorp pe bază de Fe_xO_y utilizat în tehnica ELISA pentru detecția pesticidului acid 3, 6-dicloro-2- metoxibenzoic (**DICAMBA**) din probe alimentare și de mediu. Procedeu, conform invenției, constă în etapele de: E1-obținerea nanoparticulelor superparamagnetice de Fe_xO_y cu diametru de 10 nm, E2-activarea acestora cu 3-aminopropil trietoxisilan (**APTES**), E3-activarea complexului nanoparticule Fe_xO_y -**APTES** cu glutaraldehidă, E4-activarea nanoparticulelor de SiO_2 cu **APTES** și glutaraldehidă,

E5-activarea pesticidului **DICAMBA**, E6-obținerea conjugatului imunogen ovalbumină-**DICAMBA**, E7-purificarea conjugatului proteină-pesticid, E8-obținerea nanoimunosorbentului tip antigen, E9-caracterizarea tehnică și funcțională a coloanei, E10-obținerea anticorpilor antipesticid purificați pe coloana de afinitate și E11-cuplarea anticorpilor din E10 cu nanoparticule din E3 din care rezultă nanoimunosorbentul tip anticorp.

Revendicări: 1

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



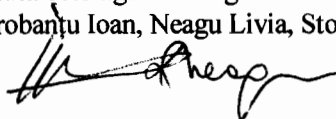
Procedeu de obtinere a nanoimunisorbentului superparamagnetic tip anticorp pe baza de Fe_xO_y utilizat in tehnica nanoELISA pentru detectia pesticidului DICAMBA (acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic) din probe alimentare si de mediu

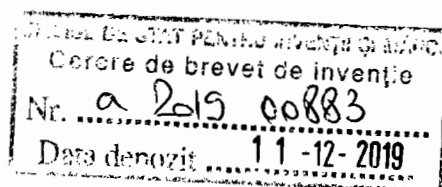
In prezent, detectia si analiza pesticidului DICAMBA (acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic) se efectueaza in principal prin metode cromatografice cum ar fi: cromatografia de lichide de inalta performanta cuplata cu spectrometria de masa si cromatografia in gaz cuplata cu spectrometria de masa si prin electroforeza capilara cuplata cu spectroscopie UV sau spectrometrie de masa, aceste metode necesitand o prelucrare laborioasa a probelor si echipamente costisitoare. O alta tehnica de analiza cantitativa a pesticidelor este tehnica imunochimica cu enzima legata de immunosorbent (faza solida), ELISA (engleza: Enzyme Linked Immunosorbent Assay) care se bazeaza pe capacitatea de recunoastere specifica a structurii moleculare a unui antigen (epitop) (pesticide) de catre un anticorp (anticorp antipesticid). In aceasta tehnica se folosesc ca imunosorbenti suprafete de polistiren (placi ELISA) acoperite cu antigen sau anticorpi componente cuplate la suprafata fazei solide prin adsorbție fizica. Dezavantajele acestei tehnici sunt date de desorbția speciilor deoarece nu sunt legate covalent, reproductibilitatea si neuniformitatea rezultatelor obtinute. NanoELISA este tehnica ELISA bazata pe nanoparticule astfel performantele tehnicii ELISA clasice fiind imbunatatite obtinand o metoda extrem de sensibila. Nanomaterialele sunt folosite ca una sau mai multe componente ale tehnicii si imbunatatesc limita de detectie, sensibilitatea metodei si reducerea timpului de analiza. Au fost acoperite cu anticorp: nanoparticule de fier pentru detectia micotoxinei zearalenonei din cereale si produse alimentare [1]; nanoparticule de aur pentru detectia gliadinei din gluten [2] sau a proteinei p53 [3]; nanoparticule de SiO_2 pentru detectia markerului tumoral antigen carbohidrat 19-9 (CA19-9) [4]; nanoparticule de siliciu acoperite cu aur (en. Nanoshells) pentru cresterea sensibilitatii metodei ELISA in cazul detectiei receptorului factorului de crestere al epidermei (EGFR) [5]. Nanoimunosorbentii pe baza de SiO_2 pot fi utilizati si in cromatografia de afinitate de purificare a anticorpilor anti acid 2,4-diclorofenoxiacetic (2,4D) din amestecuri complexe de proteine [6]. In cazul nanoparticulelor de aur cuplate cu anticorp [1] sensibilitatea metodei a crescut de cel puțin cinci ori, limita de detectie mai mica fata de tehnica ELISA clasica de cel puțin trei ori si timpul de analiza a scazut.

Inventia prezinta procedeul de obtinere a nanoimunisorbentului superparamagnetic tip anticorp utilizat in tehnica nanoELISA in faza omogena pe baza de nanoimunosorbenti acestia avand urmatoarele avantaje: zona specifica a nanoimunisorbentului este de (100-200) m^2/g : 1 mg de nanoimunisorbent este echivalent cu suprafata de lucru a zece placi ELISA, moleculele de anticorp sunt legate covalent pe suprafata nanoparticulelor in comparatie cu tehnica ELISA clasica in care anticorpii sunt cuplati prin adsorbție pe suprafata godeurilor placii ELISA; legarea covalenta chimica elimina desorbția anticorpului de la suprafata din cazul tehnicii ELISA clasice ceea ce confera stabilitate nanoimunosorbentilor. Nanoimunosorbentii nonmagnetici pot fi separati prin centrifugare, iar nanoimunosorbentii superparamagnetici sunt separati folosind un separator de camp magnetic. Timpul de incubare necesar pentru a atinge echilibrul chimic intre anticorp si antigen (analit) este scurt (1-10 min fata de 1-2 ore in tehnica ELISA clasica), deoarece nanoparticulele sunt in suspensie (faza omogena) comparativ cu tehnica ELISA clasica unde reactia dintre anticorp si antigen este limitata prin difuzarea componentelor din solutie la suprafata godeurilor sau a tuburilor.

Problema pe care o rezolva inventia consta in prezentarea unui procedeu de obtinere a nanoimunisorbentului superparamagnetic tip anticorp pe baza de Fe_xO_y utilizat in tehnica nanoELISA pentru detectia pesticidului DICAMBA (acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic) din probe alimentare si de mediu. Procedeul conform inventiei inlatura dezavantajele de mai sus prin aceea ca se iau: intr-un balon cu fund rotund se disperseaza 6,5 mmoli (2,284 g) de acetyl acetat de fier in 40 ml solvent dibenzileter si se adauga 0,4 M (5 ml) de acid oleic si 0,4 M (5,2 ml) oleilamina iar solutia astfel obtinuta este agitata magnetic 30 minute pana la dizolvarea complete a reactantilor, apoi

Inventatori: Dorobanțu Ioan, Neagu Livia, Stoica Raluca-Diana, Crăciunescu Izabell, Turcu Rodica Paula

 1



este incalzita si mentinuta la temperatura dupa cum urmeaza: 30 min la 150 °C sub flux de argon, o ora la 250 °C, apoi o ora la reflux, 295 °C apoi la terminarea timpului de reactie proba este spalata de trei ori cu cate 50 ml amestec de metanol-etanol si redispersata la concentratie cunoscuta in toluen, apoi se introduce un volum de 200 ml de hexan acidifiat cu 0,04 ml de acid acetic in care se dizolva 2 ml de 3-aminopropiltriethoxisilan si se redisperseaza echivalentul volumic a 1 g de proba de nanoparticule magnetice hidrofobe apoi proba este mentinuta timp de 72 h sub agitare magnetica puternica la temperatura camerei si dupa terminarea timpului de reactie proba este separate magnetic din mediul de reactie, spalata de 3 ori cu apa distilata si redispersata la concentratie cunoscuta in mediu apos iar 1 g de nanoparticule de Fe_xO_y de diametrul 10 nm este tratat cu 20 ml solutie de α -aminopropiltriethoxisilan (APTES) 10 % in amestec hexan: acid acetic timp de 5 ore, apoi centrifugate la 1500xg, spalate cu apa deionizata, din nou centrifugate la 1500x g si tratate apoi cu 10 ml solutie de glutaraldehida 10% timp de 3 ore sub continua agitare apoi spalate de excesul de glutaraldehida si depozitate la 4 °C in vederea cuplarii cu anticorpii antiDICAMBA separate din antiseruri policlonale antipesticid prin utilizarea nanoimunosorbentului de tip antigen obtinut prin tratamentul a 100 mg de nanoparticule de SiO_2 de diametru de 15 nm cu o solutie de HNO_3 10 % timp de 1 h la temperatura de 80 °C iar solutia acida este indepartata si nanoparticulele de SiO_2 sunt centrifugate la 1500 x g timp de 15 min apoi spalate cu 20 ml apa deionizata apoi tratate cu 10 ml solutie de APTES 10 % in apa deionizata sub continua agitare timp de 3 ore apoi nanoparticulele obtinute prin centrifugare la 1500 x G timp de 15 min sunt tratate cu 5 ml solutie de glutaraldehida 10 % timp de 2 ore la temperatura camerei apoi centrifugate la 1500 x g timp de 15 min si apoi puse in reactie cu 20 mg conjugat 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic-ovalbumina, conjugat realizat din reactia dintre 10 mg acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic, 10 mg N-hidroxisuccinimida (NHS) si 30 mg 1-etil-3-(3'-dimetilaminopropilcarbodiimida) (CDI) in 1 ml dimetilformamida (DMF) pentru 30 minute in vederea activarii pesticidului acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic care este pus in reactie cu 4 ml solutie de ovalbumina de concentratie 3 mg/ml in tampon carbonat 50 mM pH 9,6 timp de 24 h la temperatura de 4°C, apoi este purificat pe coloana de Sephadex G25 avand ca tampon de elutie tampon fosfat 5 Mm iar conjugatul 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic-ovalbumina este pus sa reactioneze cu 100 mg de nanoparticule de SiO_2 activate cu glutaraldehida 2 h in vederea obtinerii de nanoimunosorbent tip antigen nanoimunosorbent SiO_2 -ovalbumina-acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic care este folosit in obtinerea anticorpilor specifici anti 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic rezultati din tratarea a 100 μ l antiser antipesticid brut cu $(NH_4)_2SO_4$ 50 % (v/v) in vederea precipitarii γ -globulinelor ce sunt separate prin centrifugare la 1500 x g timp de 10 min, supernatantul este indepartat iar precipitatul dizolvat in tampon fosfat 10 mM pH 7,2 1 ml apoi este pus in amestec cu 20 mg suspensie de nanoimunosorbent tip antigen timp de 3 h in vederea reactiei imune dintre anticorpii antipesticid si conjugatul pesticidic cuplat la suprafata nanoparticulelor de SiO_2 urmata de centrifugare la 1500 x g timp de 15 min, spalarea nanoimunosorbentului cu solutie de NaCl 9 % iar apoi introduce pe coloana de sticla diametrul 1 cm, L=10 cm pentre un strat de Sephadex G25 de inaltime 1 cm iar anticorpii specifici anti acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic sunt disociati prin elutie cu solutie de glicina-HCl 10 mM pH 2,3 aduse la pH 7,0 cu tampon fosfat 1 mM pH 7 si cuplati la 100 mg nanoparticule superparamagnetice de Fe_xO_y , activate cu glutaraldehida cu formare de nanoimunosorbent tip anticorp Fe_xO_y -anticorp anti acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic care este depozitat la temperatura de -18°C in vederea utilizarii in tehnica nanoELISA pe baza de nanoimunosorbent tip anticorp pentru detectia pesticidului acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic din probe alimentare si de mediu.

Procedeeul conform inventiei consta in 11 etape: E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, E9, E10 si E11.

E1: Obtinerea de nanoparticule superparamagnetice de Fe_xO_y cu diametrul de 10 nm

E2: Activarea nanoparticulelor de Fe_xO_y cu APTES

E3: Activarea complexului nanoparticule Fe_xO_y -APTES cu glutaraldehida cu formare de nanoparticule de Fe_xO_y activate.

E4: Activarea nanoparticulelor de SiO_2 cu 3-aminopropil triethoxisilan (APTES) si glutaraldehida, activare realizata in trei reactii: Reactia 1 - tratamentul termic al nanoparticulelor cu HNO_3 , Reactia

Inventatori: Dorobanțu Ioan, Neagu Livia, Stoica Raluca-Diana, Crăciunescu Izabell, Turcu Rodica Paula



2 - reactia nanoparticulelor de SiO₂ cu APTES cu formare de complex nanoparticule de SiO₂-APTES si Reactia 3-activarea complexului nanoparticule de SiO₂-APTES cu glutaraldehida si formare de nanoparticule de SiO₂ activate.

E5: Activarea pesticidului acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic (dicamba) realizata prin doua reactii: Reactia 1 - activarea pesticidului acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic cu 1-etil-3(3'-diaminopropil)carbodiimide (CDI) reactie desfasurata in dimetilformamida si reactia 2- activarea complexului pesticid-CDI cu N-hidroxisuccinimida (NHS) cu formare de pesticid activat.

E6: Obtinerea conjugatului imunogen ovalbumina-dicamba prin reactia dintre ovalbumina si pesticidul activ.

E7: Purificarea conjugatului proteina-pesticid pe coloana de Sephadex G25.

E8: Obtinerea nanoimunisorbentului tip antigen, reactie dintre nanoparticule de SiO₂ activate cu glutaraldehida si conjugatul imunogen purificat in etapa E7.

E9: Obtinerea coloanei de afinitate utilizand nanoimunisorbent de tip antigen (caracteristici tehnice si functionale ale coloanei).

E10: Obtinerea anticorpilor antipesticid purificati pe coloana de afinitate

E11: Obtinerea nanoimunisorbentului tip anticorp prin reactia nanoparticulelor superparamagnetice Fe_xO_y activate in etapa 3 cu anticorpii anti 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic purificati in etapa E10.

Descrierea etapelor procedurii de obtinere:

E1: Obtinerea de nanoparticule superparamagnetice de Fe_xO_y cu diametrul de 10 nm

Intr-un balon cu fund rotund se disperseaza 6,5 mmoli (2,284 g) de acil acetat de fier in 40 ml solvent dibenzileter si se adauga 0,4 M (5 ml) de acid oleic si 0,4 M (5,2 ml) oleilamina. Solutia astfel obtinuta este agitata magnetic 30 minute pana la dizolvarea completa a reactantilor, apoi este incalzita si mentinuta la temperatura dupa cum urmeaza: 30 min la 150 °C sub flux de argon, o ora la 250 °C, apoi o ora la reflux, 295 °C. La terminarea timpului de reactie proba este spalata de trei ori cu cate 50 ml amestec de metanol-etanol si redispersata la concentratie cunoscuta in toluene. Se introduce un volum de 200 ml de hexan acidifiat cu 0,04 ml de acid acetic in care se dizolva 2 ml de 3-aminopropiltriethoxisilan si se redisperseaza echivalentul volumic a 1 g de proba de nanoparticule magnetice hidrofobe apoi proba este mentinuta timp de 72 h sub agitatie magnetica puternica la temperatura camerei si dupa terminarea timpului de reactie proba este separate magnetic din mediul de reactie, spalata de 3 ori cu apa distilata si redispersata la concentratie cunoscuta in mediu apos.

E2: Activarea nanoparticulelor de Fe_xO_y cu APTES

1 g de nanoparticule de Fe_xO_y de diametrul 10 nm este tratat cu 20 ml solutie de α-aminopropiltriethoxisilan (APTES) 10 % in amestec hexan:acid acetic (10:0,1) timp de 5 ore, separare prin centrifugate la 1500 x g, spalate cu apa deionizata, din nou centrifugate la 1500x g.

E3: Activarea complexului nanoparticule Fe_xO_y-APTES cu glutaraldehida cu formare de nanoparticule activate de Fe_xO_y.

Complexului nanoparticule Fe_xO_y-APTES este tratat cu 10 ml solutie de glutaraldehida 10% timp de 3 ore sub continua agitatie apoi spalate pentru indepartarea excesului de glutaraldehida si depozitate la 4 °C in vederea cuplarii cu pesticidul acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic.

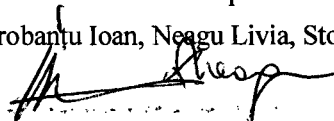
E4: Activarea nanoparticulelor de SiO₂ cu 3-aminopropil triethoxisilan (APTES) si glutaraldehida, activare realizata in trei reactii: Reactia 1 - tratamentul termic al nanoparticulelor cu HNO₃, Reactia 2 - reactia de activare a nanoparticulelor de SiO₂ cu APTES cu formare de complex nanoparticule de SiO₂-APTES si Reactia 3-activarea complexului nanoparticule de SiO₂-APTES cu glutaraldehida.

Reactia 1: 100 mg de nanoparticule de SiO₂ cu diametrul Φ=15 nm se trateaza cu o solutie de HNO₃ 10 % timp de 1 h la temperatura de 80 °C. nanoparticulele sunt separate prin centrifugarea la 1500 x g timp de 15 min apoi spalate cu 20 ml apa deionizata.

Reactia 2: Nanoparticulele rezultate in reactia 1 sunt tratate cu 10 ml solutie de APTES 10 % in apa deionizata timp de 3 ore sub continua agitatie apoi sunt centrifugate la 1500 x g, timp de 15 min si spalate cu apa deionizata (30 ml).

Reactia 3: Activarea complexului nanoparticule de SiO₂-APTES cu glutaraldehida:

Inventatori: Dorobanțu Ioan, Neagu Livia, Stoica Raluca-Diana, Crăciunescu Izabell, Turcu Rodica Paula

 3

nanoparticulele rezultate in reactia R2 sunt tratate cu 5 ml de solutie de glutaraldehida 10 % timp de 2 h la temperatura camerei sub continua agitare, apoi centrifugate la 1500 x g timp de 15 min pentru indepartarea glutaraldehidei in exces si depozitate la 4 °C in vederea cuplarii cu conjugatul acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic-ovalbumina.

E5: Activarea pesticidului acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic realizata prin doua reactii: Reactia 1 – activarea pesticidului acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic cu 1-etil-3(3'-diaminopropil)carbodiimida (CDI) reactie desfasurata in dimetilformamida si reactia 2- activarea complexului pesticid-CDI cu N-hidroxisuccinimida (NHS) cu formare de pesticid activ.

Reactia 1: 10 mg de acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic si 30 mg 1-etil-3(3'-diaminopropil)carbodiimida (CDI) in 1 ml dimetilformamida (DMF) pentru realizarea complexului pesticid-CDI.

Reactia 2: Reactia dintre complexul pesticide-CDI cu 10 mg N-hidroxisuccinimida in 1 ml DMF cu formarea complexului active acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic-N-hidroxisuccinimida (pesticidul activat).

E6: Obținerea conjugatului imunogen ovalbumina-dicamba

Pesticidul activat realizat in etapa E5, reactia 2 este tratat cu 4 ml solutie de ovalbumina de concentratie 3 mg/ml in tampon carbonat 50 mM pH 9,6 timp de 24 h la temperatura de 4 °C cu formare de conjugat 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic-ovalbumina.

E7: Purificarea conjugatului proteina-pesticid pe coloana de Sephadex G25

Conjugatul 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic-ovalbumina este purificat pe coloana de Sephadex G25 avand ca tampon de elutie tamponul fosfat 5 mM pH 7,2.

E8: Obținerea nanoimunisorbentului tip antigen

100 mg nanoparticule de SiO₂ activate cu glutaraldehida realizate in etapa E3 au fost tratate cu 20 mg conjugat proteina-pesticid purificat in etapa E7 timp de 2 h pentru formarea de nanoimunisorbent tip antigen.

E9: Obținerea coloanei de afinitate utilizand nanoimunisorbent de tip antigen (caracteristici tehnice si functionale ale coloanei).

Coloana de afinitate are diametrul de 1 cm, lungimea de 10 cm, grosimea stratului de Sephadex G25= 1cm si eluent glicina-HCl 10 mM, pH 2,3.

E10: Obținerea anticorpilor antipesticid purificati pe coloana de afinitate

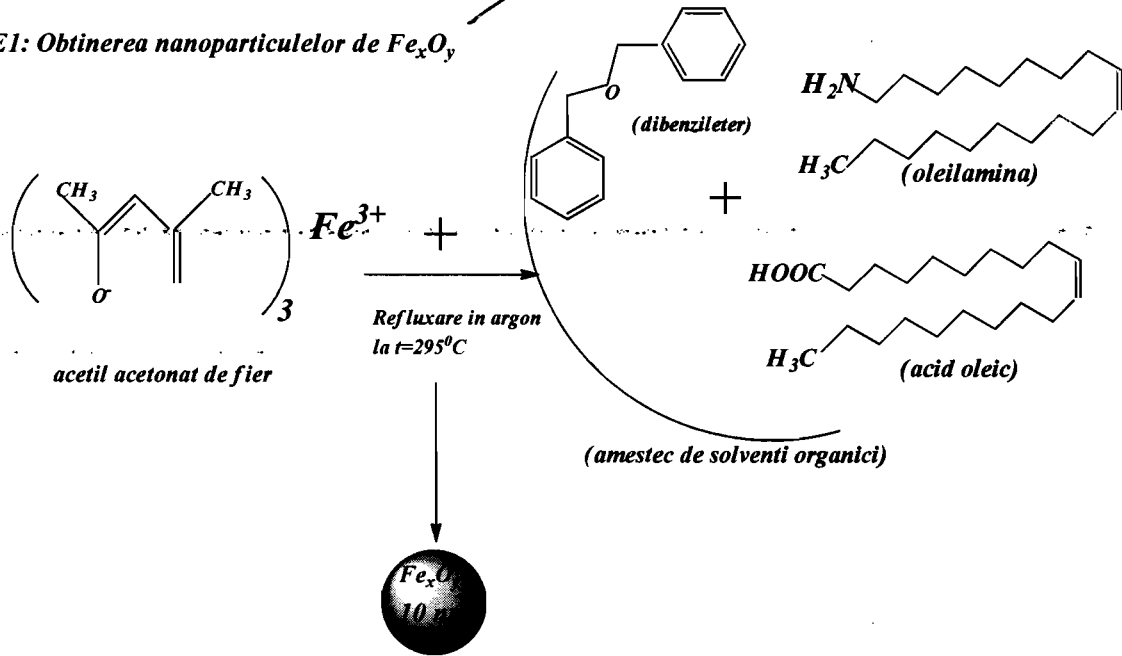
100 μl antiser anti 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic brut in 1 ml apa deionizata este tratat cu 1 ml solutie de (NH₄)₂SO₄ (sulfat de amoniu) 50 %. Precipitatul continand γ-globulinele sunt separate prin centrifugare la 1500 x g, supernatantul indepartat iar γ-globulinele precipitate sunt dizolvate in tampon fosfat 10 mM pH 7,2 apoi sunt puse in contact cu 20 mg nanoimunisorbent tip antigen obtinut in etapa E8 timp de 3 ore sub continua agitare in vederea reactiei immune dintre antigenul acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic cuplat la suprafata nanoparticulelor si γ-globulina specifica (anticorpul anti 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic). Suspensia de nanoparticule avand complexul imun cuplat la suprafata este introdusa in coloana peste un strat de Sephadex G25 de 1 cm iar anticorpii anti 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic sunt dissociati de pe nanoimunisorbent prin elutie cu solutie de tampon glicina-HCl 10 mM pH 2,3 si adusi la pH 7,2 cu tampon fosfat 1 M pH 7,2.

E11: Obținerea nanoimunisorbentului tip anticorp

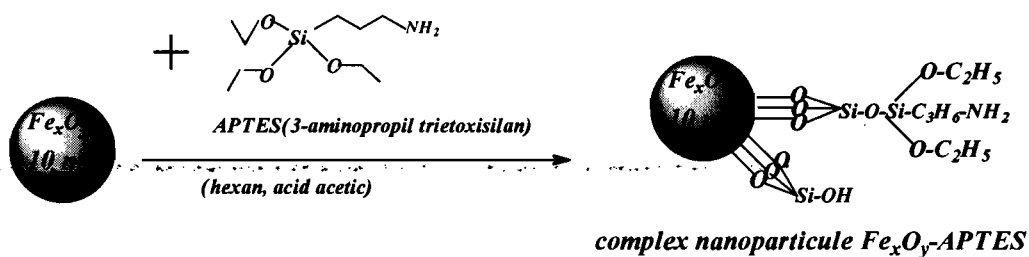
Anticorpii anti 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic purificati in etapa E10 sunt cuplati la 100 mg nanoparticule superparamagnetice Fe_xO_y activate cu glutaraldehida in etapa 3 obtinandu-se nanoimunisorbentul tip anticorp.

Reactii chimice de obținere a nanoimunisorbentului tip anticorp

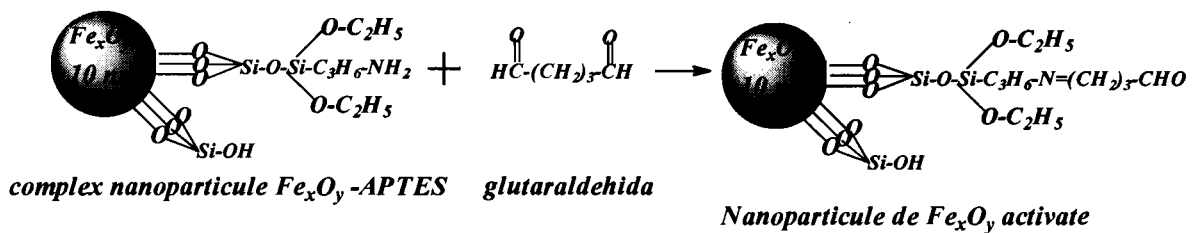
E1: Obținerea nanoparticulelor de Fe_xO_y



E2: Activarea nanoparticulelor de Fe_xO_y cu APTES

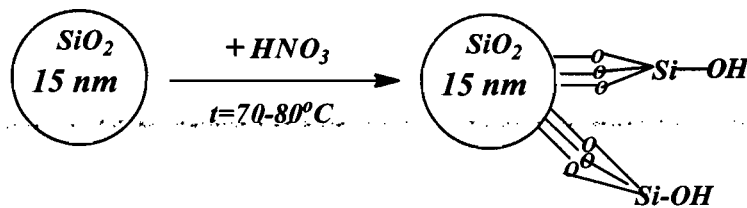


E3: Activarea complexului nanoparticule Fe_xO_y -APTES cu glutaraldehida



E4: Activarea nanoparticulelor de SiO_2 cu 3-aminopropil trietoxisilan (APTES) și glutaraldehida

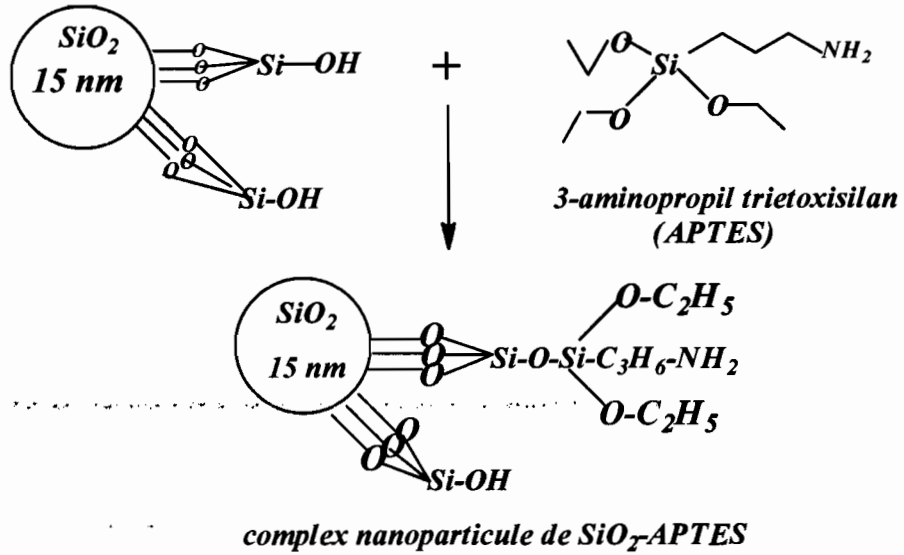
Reactia 1: Tratamentul nanoparticulelor de SiO_2 cu HNO_3



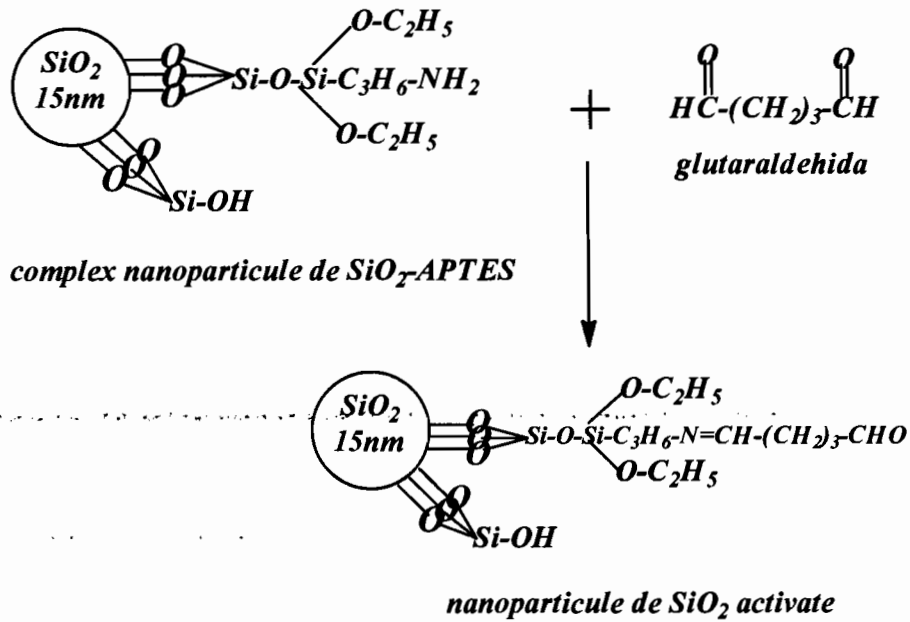
Inventatori: Dorobanțu Ioan, Neagu Livia, Stoica Raluca-Diana, Crăciunescu Izabell, Turcu Rodica Paula

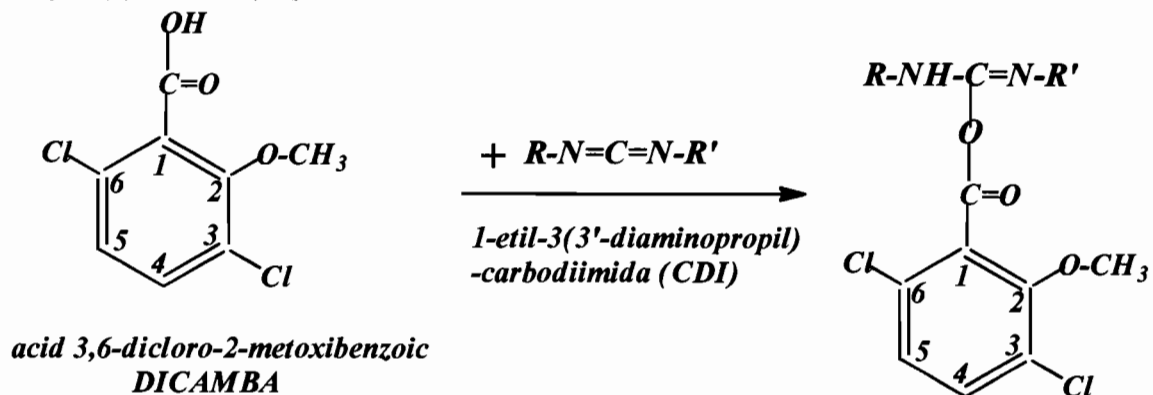
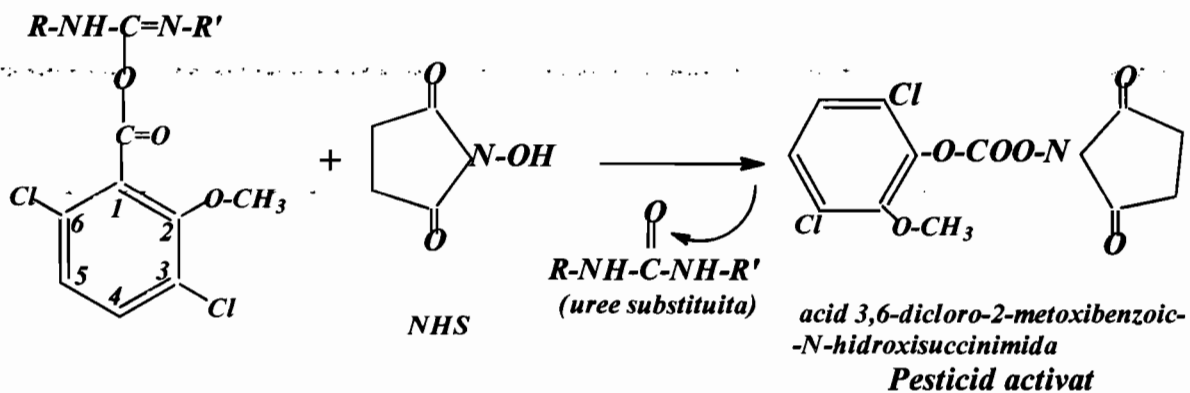
[Handwritten signature] 5

Reactia 2: Activarea nanoparticulelor de SiO₂ cu 3-aminopropil trietoxisilan



Reactia 3: Activarea complexului nanoparticule de SiO₂-APTES cu glutaraldehida



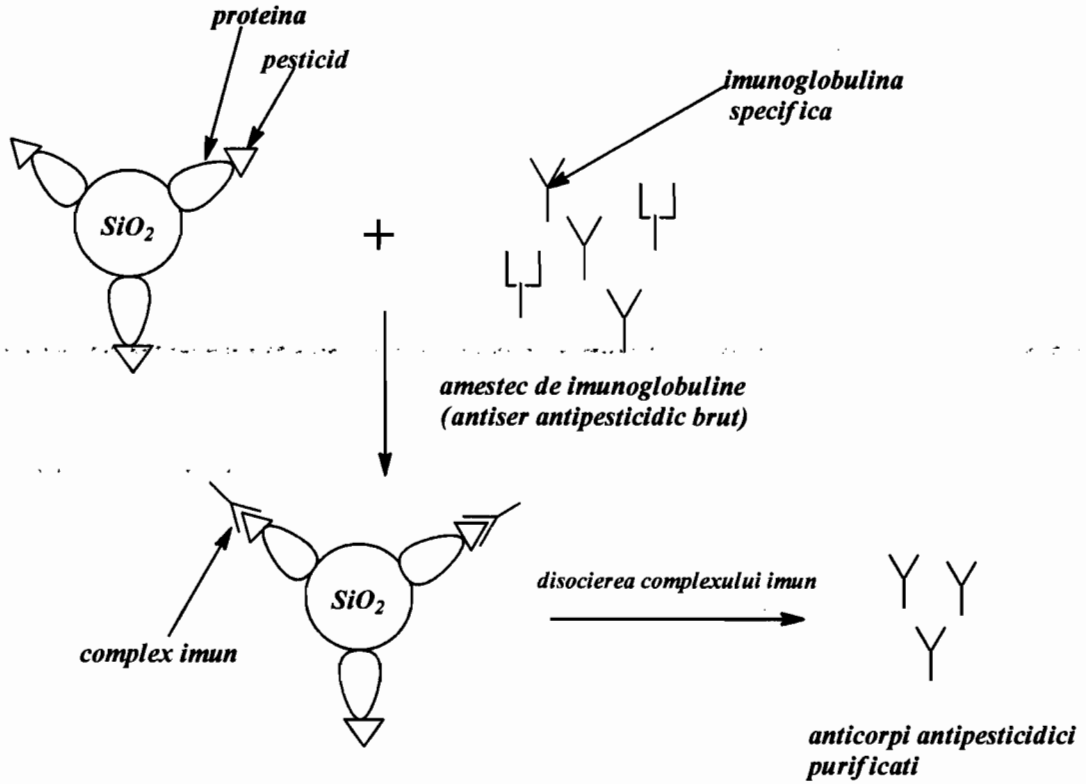
E5: Activarea pesticidului acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic (dicamba)**Reactia 1: Activarea pesticidului cu 1-etil-3(3'-diaminopropil)-carbodiimida (CDI)****Reactia 2: Activarea complexului pesticid-CDI cu N-hidroxisuccinimida (NHS)**

Inventatori: Dorobanțu Ioan, Neagu Livia, Stoica Raluca-Diana, Crăciunescu Izabell, Turcu Rodica Paula

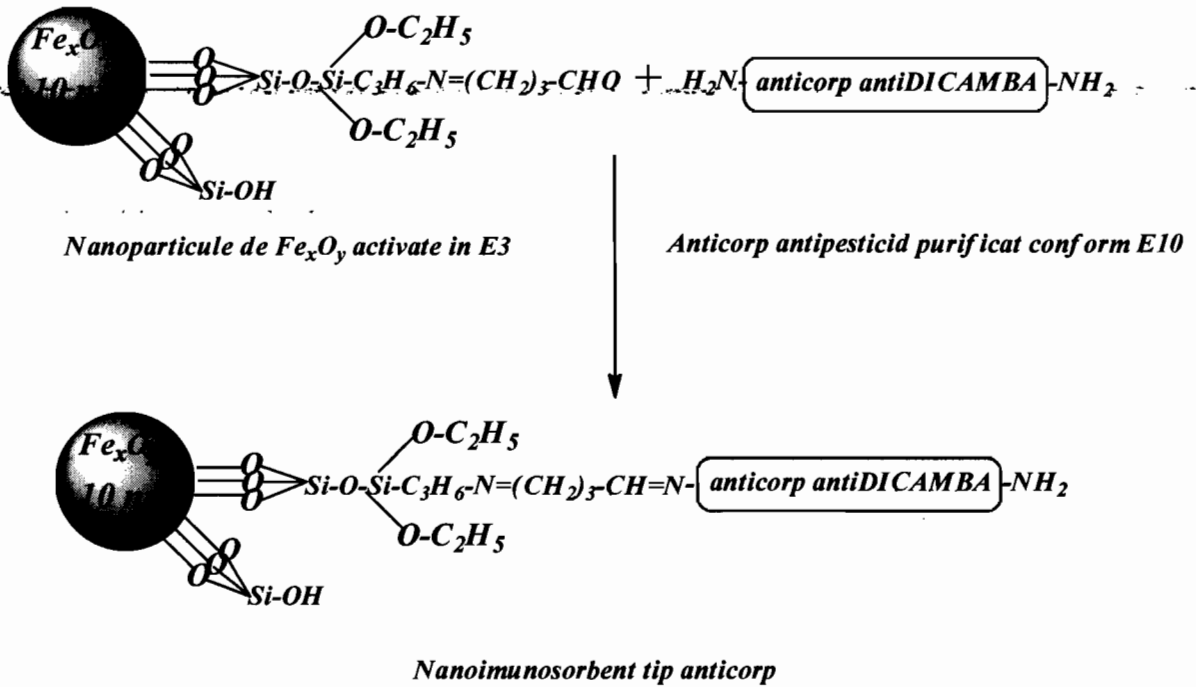
[Signature] 7

E9: Obținerea coloanei de afinitate utilizând nanoimunisorbentul de tip antigen (caracteristici)

E10: Obținerea anticorpilor antipesticid purificați pe coloana de afinitate



E11: Obținerea nanoimunisorbentului tip anticorp



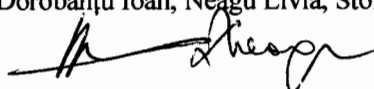
Inventatori: Dorobanțu Ioan, Neagu Livia, Stoica Raluca-Diana, Crăciunescu Izabell, Turcu Rodica Paula

[Handwritten signature]

Bibliografie:

- [1] X. Zhang, X. Wang, M. Sun, X. Zhang, H. Song, Y. Yan, J. Sun, X. Li, W. Fang, A magnetic nanoparticle based enzyme-linked immunosorbent assay for sensitive quantification of zearalenone in cereal and feed samples, *Toxins*, vol. 7, pp. 4216-4231, 2015;
- [2] P. Ciauriz, F. Fernandez, E. Tellechea, J.F. Moran, A.C. Asensio, Comparison of four functionalization methods of gold nanoparticles for enhancing the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), *Beilstein Journal of Nanotechnology*, vol. 8, pp. 244-253, 2017;
- [3] C.-P. Jia, X.-Q. Zhong, B. Hua, M.-Y. Liu, F.-X. Jing, X.-H. Lou, S.-H. Yao, J.-Q. Xiang, Q.-H. Jin, J.-L. Zhao, Nano-ELISA for highly sensitive protein detection, *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 24, pp. 2836-2841, 2009;
- [4] Y. Zhuo, R. Yuan, Y.-Q. Chai, C.-L. Hong, Functionalized SiO₂ labeled CA19-9 antibodies: A new strategy for signal amplification of antigen-antibody sensing processes, *The Analyst*, vol. 135, issue 8, art. No. 2036, 2010;
- [5] M.M. Billingsley, R.S. Riley, E.S. Day, Antibody-nanoparticle conjugates to enhance the sensitivity of ELISA-based detection methods, *Plos One*, vol. 12, issue 5, article no. e0177592, 2017.
- [6] Dorobanțu Ioan, Neagu Livia, Procedeu de obtinere a anticorpilor anti acid 2,4-diclorofenoxiacetic (2,4D) din amestecuri complexe de proteine pe baza de nanoimunosorbenti, Brevet de inventie nr. OSIM 131121/30.09.2019.

Inventatori: Dorobanțu Ioan, Neagu Livia, Stoica Raluca-Diana, Crăciunescu Izabell, Turcu Rodica Paula



Procedeeul de obtinere a nanoimunisorbentului superparamagnetic tip anticorp pe baza de Fe_xO_y utilizat in tehnica nanoELISA pentru detectia pesticidului DICAMBA (acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic) din probe alimentare si de mediu conform inventiei este caracterizat prin aceea ca se iau intr-un balon cu fund rotund se disperseaza 6,5 mmoli (2,284 G) de acetil acetona de fier in 40 ml solvent dibenzilic si se adauga 0,4 M (5 ml) de acid oleic si 0,4 M (5,2 ml) oleilamina iar solutia astfel obtinuta este agitata magnetic 30 minute pana la dizolvarea complete a reactantilor, apoi este incalzita si mentinuta la temperatura dupa cum urmeaza: 30 min la 150 °C sub flux de argon, o ora la 250 °C, apoi o ora la reflux, 295 °C apoi la terminarea timpului de reactie proba este spalata de trei ori cu cate 50 ml amestec de metanol-etanol si redispersata la concentratie cunoscuta in toluen, apoi se introduce un volum de 200 ml de hexan acidificat cu 0,04 ml de acid acetic in care se dizolva 2 ml de 3-aminopropiltriethoxisilan si se redisperseaza echivalentul volumic a 1 g de proba de nanoparticule magnetice hidrofobe apoi proba este mentinuta timp de 72 h sub agitare magnetica puternica la temperatura camerei si dupa terminarea timpului de reactie proba este separata magnetic din mediul de reactie, spalata de 3 ori cu apa distilata si redispersata la concentratie cunoscuta in mediu apos iar 1 g de nanoparticule de Fe_xO_y de diametru 10 nm este tratat cu 20 ml solutie de α -aminopropiltriethoxisilan (APTES) 10 % in amestec hexan: acid acetic timp de 5 ore, apoi centrifugate la 1500xg, spalate cu apa deionizata, din nou centrifugate la 1500x g si tratate apoi cu 10 ml solutie de glutaraldehida 10% timp de 3 ore sub continua agitare apoi spalate de excesul de glutaraldehida si depozitate la 4 °C in vederea cuplarii cu anticorpii antiDICAMBA separate din antiseruri policlonale antipesticid prin utilizarea nanoimunisorbentului de tip antigen obtinut prin tratamentul a 100 mg de nanoparticule de SiO_2 de diametru de 15 nm cu o solutie de HNO_3 10 % timp de 1 h la temperatura de 80 °C iar solutia acida este indepartata si nanoparticulele de SiO_2 sunt centrifugate la 1500 x g timp de 15 min apoi spalate cu 20 ml apa deionizata apoi tratate cu 10 ml solutie de APTES 10 % in apa deionizata sub continua agitare timp de 3 ore apoi nanoparticulele obtinute prin centrifugare la 1500 x G timp de 15 min sunt tratate cu 5 ml solutie de glutaraldehida 10 % timp de 2 ore la temperatura camerei apoi centrifugate la 1500 x g timp de 15 min si apoi puse in reactie cu 20 mg conjugat 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic-ovalbumina, conjugat realizat din reactia dintre 10 mg acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic, 10 mg N-hidroxisuccinimida (NHS) si 30 mg 1-etil-3-(3'-dimetilaminopropilcarbodiimida) (CDI) in 1 ml dimetilformamida (DMF) pentru 30 minute in vederea activarii pesticidului acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic care este pus in reactie cu 4 ml solutie de ovalbumina de concentratie 3 mg/ml in tampon carbonat 50 mM pH 9,6 timp de 24 h la temperatura de 4°C, apoi este purificat pe coloana de Sephadex G25 avand ca tampon de elutie tampon fosfat 5 mM iar conjugatul 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic-ovalbumina este pus sa reactioneze cu 100 mg de nanoparticule de SiO_2 activate cu glutaraldehida 2 h in vederea obtinerii de nanoimunisorbent tip antigen nanoimunisorbent SiO_2 -ovalbumina-acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic care este folosit in obtinerea anticorpilor specifici anti 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic rezultati din tratarea a 100 μ l antiser antipesticid brut cu $(NH_4)_2SO_4$ 50 % (v/v) in vederea precipitarii γ -globulinelor ce sunt separate prin centrifugare la 1500 x g timp de 10 min, supernatantul este indepartat iar precipitatul dizolvat in tampon fosfat 10 mM pH 7,2 1 ml apoi este pus in amestec cu 20 mg suspensie de nanoimunisorbent tip antigen timp de 3 h in vederea reactiei imune dintre anticorpii antipesticid si conjugatul pesticidic cuplat la suprafata nanoparticulelor de SiO_2 urmata de centrifugare la 1500 x g timp de 15 min, spalarea nanoimunisorbentului cu solutie de NaCl 9 ‰ iar apoi introduce pe coloana de sticla diametru 1 cm, L=10 cm pentru un strat de Sephadex G25 de inaltime 1 cm iar anticorpii specifici anti acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic sunt disociati prin elutie cu solutie de glicina-HCl 10 mM pH 2,3 aduse la pH 7,0 cu tampon fosfat 1 mM pH 7 si cuplati la 100 mg nanoparticule superparamagnetice de Fe_xO_y , activate cu glutaraldehida cu formare de nanoimunisorbent tip anticorp Fe_xO_y -anticorp anti acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic care este depozitat la temperatura de -18°C in vederea utilizarii in tehnica nanoELISA pe baza de nanoimunisorbent tip anticorp pentru detectia pesticidului acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic din probe alimentare si de mediu.

Inventatori: Dorobantu Ioan, Neagu Livia, Stoica Raluca-Diana, Crăciunescu Izabell, Turcu Rodica Paula

