



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2021 00122

(22) Data de depozit: 19/03/2021

(41) Data publicării cererii:  
30/09/2022 BOPI nr. 9/2022

(71) Solicitant:  
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE  
- DEZVOLTARE PENTRU FIZICĂ ȘI  
INGINERIE NUCLEARĂ "HORIA HULUBEI"  
(IFIN-HH), 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, ET.2, AP.10,  
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;  
• STOICA RALUCA- DIANA,  
STR.EUCALIPTULUI NR.14B1, SECTOR 6,  
BUCUREȘTI, B, RO

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A NANOIMUNOSORBENTULUI  
TIP ANTICORP ANTIDICAMBA DE ÎNALTĂ AFINITATE PE  
BAZĂ DE NANOPARTICULE DE AUR UTILIZAT ÎN TEHNICA  
NANOELISA PENTRU DETECȚIA PESTICIDULUI DICAMBA  
DIN PROBE ALIMENTARE ȘI DE MEDIU**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui imunosorbent de tip anticorp anti acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic (anti-dicamba) de înaltă afinitate pe bază de nanoparticule de aur utilizat în tehnica nanoELISA pentru detecția pesticidului dicamba din probe alimentare și de mediu. Procedeu, conform invenției, constă în reacțiile: 1-sinteza nanoparticulelor de aur, 2-obținerea anticorpilor anti-di-camba, 3-separarea  $\gamma$ -globulinelor specifice și nespecifice prezente în antiserul anti-dicamba, 4-obținerea nanoimunosorbentului de tip antigen pe bază de dioxid de siliciu, 5-reacția

acestui cu IgG specifică, 6-separarea anticorpilor specifici anti-dicamba labili la pH 1,7-separarea anticorpilor specifici anti-dicamba labili la pH 0,5 și 8-obținerea nanoimunosorbentului de tip anticorp anti-dicamba pe bază de particule de aur, care este suspendat în tampon fosfat și depozitat la 4°C, în vederea utilizării în metoda de detecție a pesticidului dicamba din probe alimentare și de mediu.

Revendicări: 1



**Procedeu de obtinere a nanoimunisorbentului tip anticorp anticamba de inalta afinitate pe baza de nanoparticule de aur utilizat in tehnica nanoELISA pentru detectia pesticidului dicamba din probe alimentare si de mediu**

Inventia se refera la o metoda de obtinere a nanoimunisorbentului tip anticorp pe baza de nanoparticule de aur la suprafata carora sunt cuplate molecule de anticorp anticamba de inalta afinitate folosit ca reactiv de baza in tehnica ELISA (engleza: Enzyme Linked Immunosorbent Assay) neconventionala de dozare a pesticidului acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic (dicamba) din probe alimentare si de mediu. Tehnica imunochimica ELISA este o tehnica de dozare in faza omogena bazata pe imunisorbenti- componente imune antigen sau anticorp cuplate covalent la suprafata fazei solide si markeri enzimatici tip antigen sau anticorp-enzima utilizand recunoasterea specifica antigen-anticorp si proprietatile biocatalitice ale enzimelor [1] si se aplica in diagnosticul clinic, in controlul calitatii alimentelor si in monitorizarea mediului. In tehnica ELISA clasica se foloseste ca faza solida de legare a complexului imun suprafata interioara a tuburilor de analiza sau a godeurilor placilor de tip ELISA, legarea componentelor imune, antigenul sau anticorpul, la suprafata realizandu-se prin adsorbția fizica. Dezavantajul fiind suprafata limitata a fazei solide accesibila, posibilitatea desorbției componentelor imune si viteza redusa de atingere a echilibrului chimic dintre antigenul dicamba si anticorpul anticamba. In vederea creșterii sensibilitatii metodei au fost sintetizate nanomateriale noi cu proprietati optice, electrice, magnetice si catalitice unice pe baza de nanoparticule de aur, nanoparticule de siliciu, nanoparticule de fier, nanoparticule de platina etc. De suprafata acestor nanoparticule se pot cupla diferite macromolecule biologice: anticorpi, enzime, acizi nucleici etc. De exemplu, in vederea determinarii concentratiei Pb (II) din apa prin metoda ELISA s-au utilizat nanoparticule de aur pe a caror suprafata specifica mare s-au cuplat anticorpul si enzima obtinandu-se amplificarea semnalului substratului oxidat catalitic si imbunatatirea sensibilitatii (limita de detectie: 9 pg/ml) [2] sau in cazul detectiei prin tehnica ELISA a gliadinei, componenta a glutenului din grau, pe suprafata nanoparticulelor de aur s-au cuplat anticorpii si enzima ceea ce a dus la cresterea sensibilitatii metodei ELISA si la scaderea timpului de analiza [3]. Cuplarea covalenta sau necovalenta a anticorpilor de nanoparticulele de aur se efectueaza prin mai multe metode in functie de scopul utilizarii acestora [4].

Problema pe care e rezolva inventia consta in obtinerea nanoimunisorbentului de tip anticorp anticamba de inalta afinitate pe baza de nanoparticule de aur utilizat in tehnica nanoELISA pentru detectia pesticidului dicamba din probe alimentare si de mediu astfel: prin utilizarea nanoimunisorbentului de tip antigen dioxid de siliciu-albumina serica de capra-dicamba in cromatografia de afinitate se caracterizarea antiserurile policlonale anticamba repartizand astfel anticorpii separati pe clase de afinitate: anticorpi cu constanta de afinitate mica obtinuti in cazul utilizarii eluentului glicina-acid clorhidric 10 mM pH 1 si anticorpi cu constanta de afinitate mare obtinuti in cazul utilizarii eluentului glicina-acid clorhidric 10 mM pH 0,5. Anticorpii cu afinitate crescuta se utilizeaza la obtinerea nanoimunisorbentului de tip anticorp anticamba de inalta afinitate pe baza de nanoparticule de aur utilizat in tehnica nanoELISA.

Avantajele inventiei sunt: i) separarea anticorpilor anticamba in doua clase de afinitate: anticorpi de afinitate scazuta si anticorpi de afinitate ridicata care vor fi utilizati in tehnica nanoELISA; ii) utilizarea nanoparticulelor de aur in tehnica nanoELISA cuplate cu anticorpi anticamba de afinitate inalta va conduce la cresterea sensibilitatii de analiza a metodei.

Sinteza nanoimunisorbentului tip anticorp anticamba de inalta afinitate pe baza de nanoparticule de aur conform inventiei cuprinde opt reactii, reactia 1, reactia 2, reactia 3, reactia 4, reactia 5, reactia 6, reactia 7 si reactia 8 si sunt descrise in cele ce urmeaza:

**Reactia 1: Sinteza nanoparticulelor de aur**

50 mg acid tetracloroauric (III) se dizolva in 120 ml apa bidistilata, se adauga la solutia data 110 mg citrat de sodiu. Amestecul format este agitat si adus la temperatura de 60-70 °C pana la formarea unei solutii de culoare rosie de nanoparticule de aur. Nanoparticulele de aur sunt separate prin centrifugare

Inventatori: Dorobanțu Ioan, Neagu Livia, Stoica Raluca-Diana

1 IMR Rucaru SR

~~SECRET DE SERVICIU~~

la 1500 x g timp de 15 min, supernatantul este indepartat iar nanoparticulele de aur sunt resuspendate in 10 ml apa bidistilata, din nou centrifugate si spalate si suspendate in final in 5 ml apa bidistilata. Randamentul de recuperare al procedurii este de 57-60 % iar diametrul mediu al nanoparticulelor obtinute este de 20 nm, aria tuturor nanoparticulelor de aur obtinute fiind de 0,202 m<sup>2</sup>.

**Reactia 2: Obtinerea anticorpilor anti acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic (anti-dicamba)**

Antiserul antidicamba a fost obtinut prin imunizarea animalelor de experienta, iepuri rasa Noua Zeelanda, efectuandu-se opt imunizari succesive la interval de o luna, utilizandu-se in acest scop conjugatul imunogen albumina serica de bovina (ASB)-dicamba (15 rezidii pesticidice cuplate la o molecula de albumina serica de bovina) in prezenta adjuvantului Freund complet/incomplet.

Conjugatul imunogen albumina serica de bovina-dicamba a fost realizat prin cuplarea a 100 mg albumina serica de bovina cu 34 mg dicamba activat in prealabil cu 20 mg N-hidroxisuccinimida si 200 mg 3-amino(3'aminopropil)carbodiimida in 2 ml dimetilformamida pentru 3 h sub continua agitare, pus in reactie cu 6 ml tampon carbonat 10 mM, pH 9,6 timp de 24 h si apoi purificat pe coloana cromatografica de Sephadex G25 avand ca tampon de elutie tampon fosfat 5 mM pH 7,2.

**Reactia 3: Reactia de separare a gama-globulinelor specifice si nespecifice prezente in antiserul anti-dicamba**

Dupa cea de-a opta imunizare, 1 ml antiser antidicamba recoltat (brut) a fost separat prin utilizarea a 1 ml sulfat de amoniu ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 50 %, centrifugat la 1500 x g, timp de 15 minute, in supernatant fiind prezente proteinele plasmatiche cu M<sub>w</sub><150000 Da (ex. Albumine etc) iar in precipitat gama-globulinele totale, specifice si nespecifice.

**Reactia 4: Reactia de obtinere a nanoimunisorbentului de tip antigen pe baza de SiO<sub>2</sub>**

Pentru functionalizarea nanoparticulelor de dioxid de siliciu, SiO<sub>2</sub> s-au spalat 200 mg SiO<sub>2</sub> avand diametrul de 14 nm si suprafata de cca 200 m<sup>2</sup>/g cu acid azotic 10 % la temperatura de 70 °C, timp de 2 h, apoi au fost puse in reactie cu 10 ml alfa-aminopropiltriethoxisilan (APTS) 10 % si incalzit timp de 2 h la 60-70 °C urmat de spalare cu apa bidistilata in final supuse reactiei cu 2 ml glutaraldehida 25 %, timp de 6 h pana la obtinerea unei culori rosiiatice. Capacitatea de cuplaj a nanoparticulelor de SiO<sub>2</sub> functionalizate este urmatoarea: 1 mg de proteina se cupleaza la 3 mg de nanoparticule de SiO<sub>2</sub>. 100 mg nanoparticule de SiO<sub>2</sub> functionalizate se pun in reactie cu 50 mg albumina-serica de capra-dicamba, in apa distilata, timp de 24 h, cu agitare continua pana la cuplarea covalenta a albuminei serice de capra-dicamba cu nanoparticulele de SiO<sub>2</sub> prin intermediul glutaraldehidei ce reactioneaza cu gruparile amino libere ale lizinei din structura albuminei serice de capra obtinandu-se nanoimunisorbentul tip antigen dioxid de siliciu-albumina serica de capra-dicamba. Procedura de obtinere a conjugatului albumina serica de capra-dicamba este identica cu cea a conjugatului imunogen albumina serica de bovina-dicamba. Nanoimunisorbentul tip antigen dioxid de siliciu-albumina serica de capra-dicamba va fi utilizat la determinarea cantitatii de gama-globulina specifica (prin metoda spectrofotometrica UV-Vis sau prin metoda Bradford) cat si la purificarea anticorpilor antidicamba cu constanta de afinitate mare. S-a utilizat la obtinerea nanoimunisorbentului de tip antigen albumina serica de capra pentru a preintampina cuplarea anticorpilor anti-ASB existenti in gama globulinele specifice formate din anticorpi antidicamba si anticorpi anti-ASB) de suprafata nanoimunisorbentului.

**Reactia 5: Reactia dintre nanoimunisorbentul tip antigen pe baza de SiO<sub>2</sub> si IgG specifica**

Se pune in reactie 1 ml gama-globulina specifica antidicamba cu 20 mg nanoimunisorbent tip antigen, la temperatura camerei, sub continua agitare, timp de 24 h, urmat de centrifugare la 1500 x g, timp de 15 minute, urmat de determinarea concentratiei totale de gama-globuline nespecifice antidicamba existente in supernatant si a concentratiei gama-globulinei specifice totale, si anume cantitatea de anticorpi policlonali cuplati pe nanoimunisorbent. In urma acestei reactii se obtine complexul imun antigen-anticorp specific existent la suprafata nanoparticulei de SiO<sub>2</sub>.

**Reactia 6: Separarea anticorpilor specifice antidicamba labili la pH 1**

Nanoimunisorbentul de tip antigen pe baza de SiO<sub>2</sub> a fost obtinut in vederea utilizarii in cromatografia de afinitate pentru purificarea anticorpilor policlonali antidicamba avand ca eluent tamponul glicina-acid clorhidric la diferite pH-uri si in final, solutiile fiind tamponate la pH neutru cu o solutie de Tris-baza (2-amino-2(hidroximetil)-1,3-propandiol)) 2 M pH 10,88, obtinandu-se in

Inventatori: Dorobanțu Ioan, Neagu Livia, Stoica Raluca-Diana

final anticorpi anticamba pe diferite clase de afinitate.

Pe coloana cromatografica de Sephadex G25 de inaltime 3 cm s-a introdus 5 mg nanoimunisorbent de tip antigen pe baza de  $\text{SiO}_2$  care contine 1 mg de anticorp anticamba specifici urmat de trecerea pe coloana a 2 ml eluent glicina -acid clorhidric 10 mM pH 1 si se indeparteaza anticorpii anticamba cu constanta de afinitate mica (labili), ramanand pe coloana nanoimunisorbentul de tip antigen  $\text{SiO}_2$ -albumina serica de capra-dicamba-anticorpi anticamba stabili la pH 1.

**Reactia 7: Separarea anticorpilor specifici anticamba labili la pH 0,5**

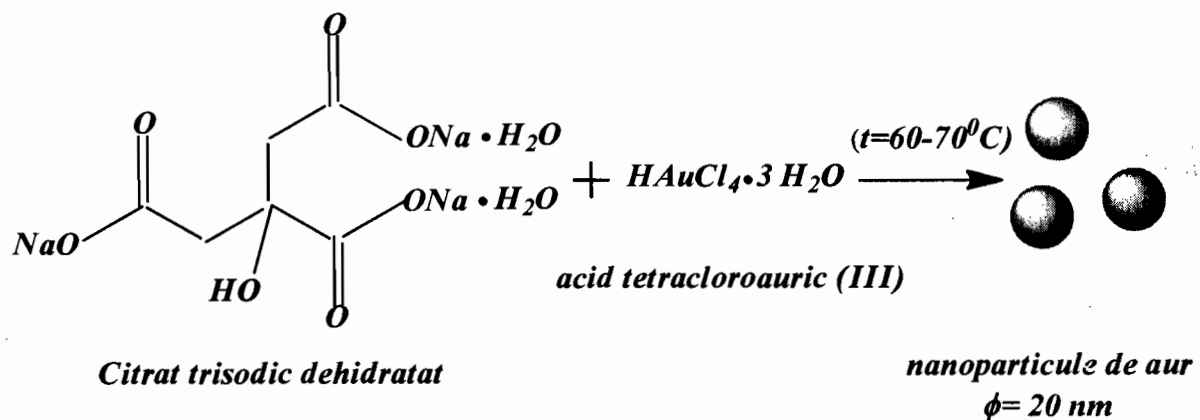
Peste nanoimunisorbentul de tip antigen  $\text{SiO}_2$ -albumina serica de capra-dicamba-anticorpi anticamba stabili la pH 1 ramas pe coloana se trece un volum de 2 ml eluent glicina -acid clorhidric 10 mM pH 0,5 obtinandu-se anticorpii anticamba cu constanta de afinitate mare care se colecteaza si solutia se aduce la pH 7 cu ajutorul tamponului Tris baza 2 M pH 10,88.

**Reactia 8: Obtinerea nanoimunisorbentului de tip anticorp anticamba pe baza de nanoparticule de Au**

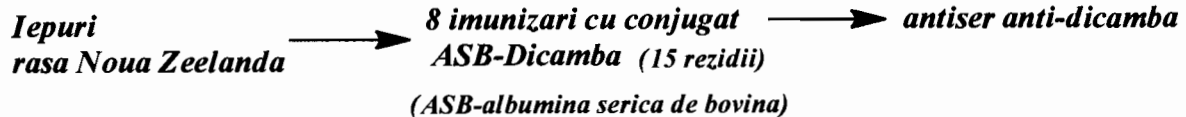
1 mg anticorpi anticamba cu constanta de afinitate mare, obtinuti in reactia 7, vor reactiona in solutie apoasa cu 10 mg nanoparticule de aur ( $\Phi=20$  nm), la temperatura camerei, cu agitare continua timp de 30 minute obtinandu-se nanoimunisorbentul de tip anticorp anticamba pe baza de nanoparticule de aur care este suspendat in 10 ml tampon fosfat 10 mM pH 7,2 si depozitat la temperatura de 4 °C in vederea utilizarii in tehnica nanoELISA pentru detectia pesticidului dicamba din probe alimentare si de mediu.

Reactiile chimice de obtinere a nanoimunisorbentului tip anticorp sunt urmatoarele:

**Reactia 1: Sinteza nanoparticulelor de aur**



**Reactia 2: Obtinerea anticorpilor anti acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic (anti-dicamba)**

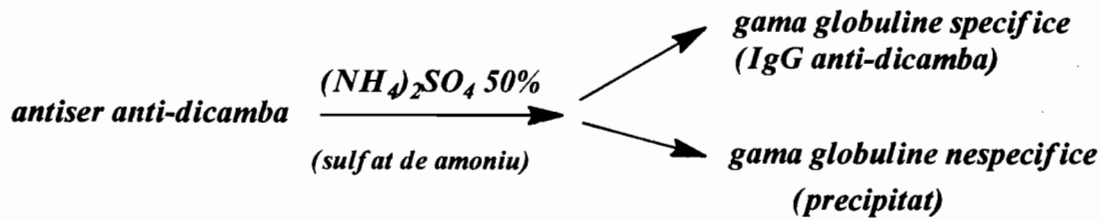
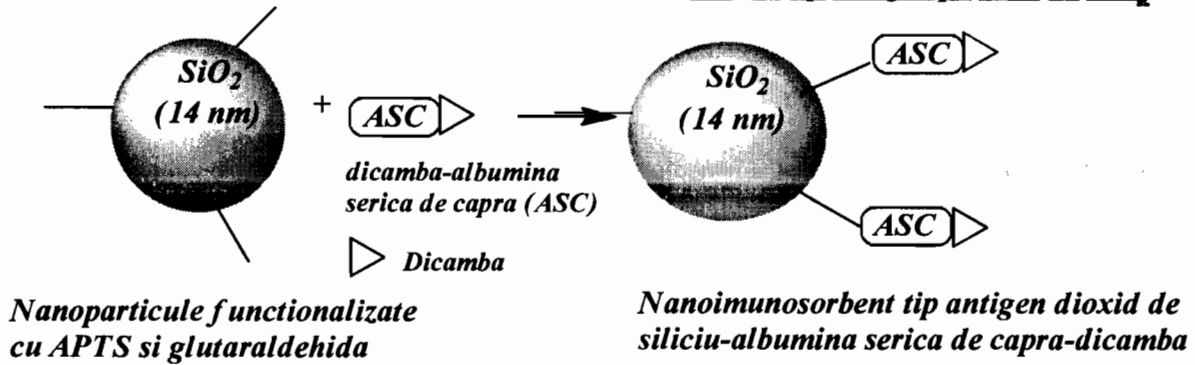
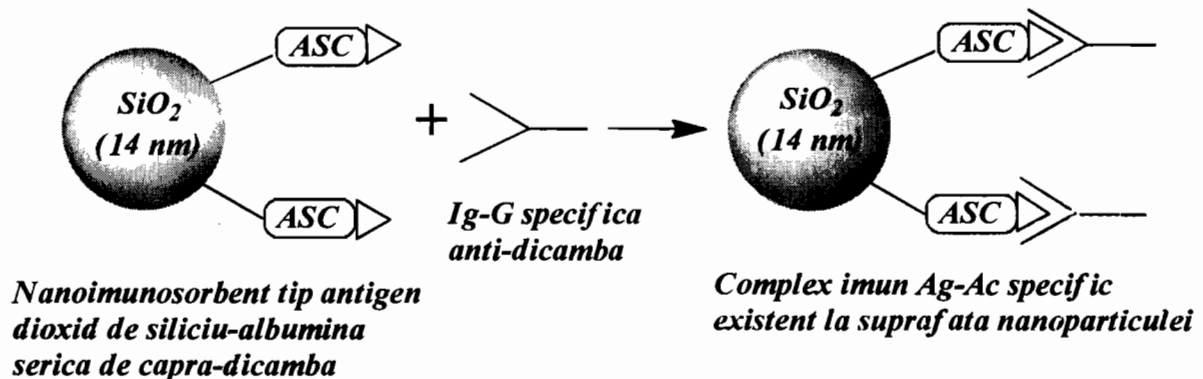


Inventatori: Dorobanțu Ioan, Neagu Livia, Stoica Raluca-Diana

*My Neagu SR*

SECRET DE SERVICIU

21

**Reactia 3: Reactia de separare a gama-globulinelor specifice si nespecifice prezente in antiserul anti-dicamba****Reactia 4: Reactia de obtinere a nanoimunisorbentului de tip antigen pe baza de SiO<sub>2</sub>****Reactia 5: Reactia dintre nanoimunisorbentul tip antigen pe baza de SiO<sub>2</sub> si IgG specifica**

Metoda Bradford este folosita pentru dozarea IgG specific legat din IgG total

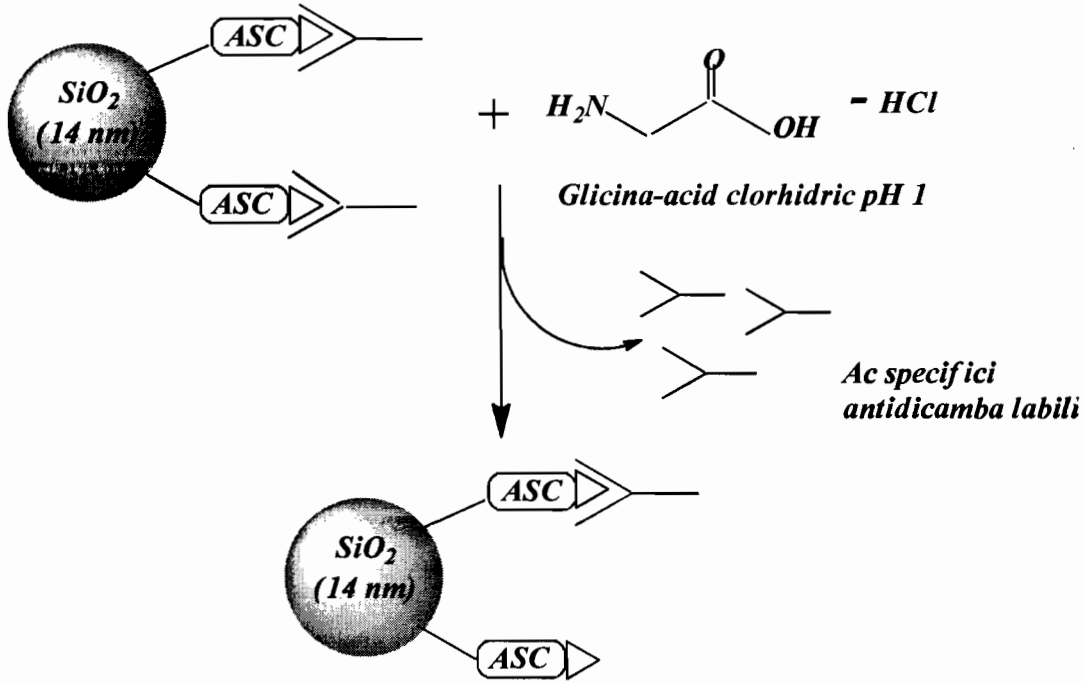
$$c_{\text{specific}} = c_{\text{total}} - c_{\text{nespecific}} \text{ unde}$$

$c_{\text{total}}$  -concentratia IgG totale inainte de adaugarea nanoimunisorbentului

$c_{\text{nespecific}}$  -concentratia totala IgG nespecifice antidicamba existente in supernatant rezultat in urma separarii prin centrifugare

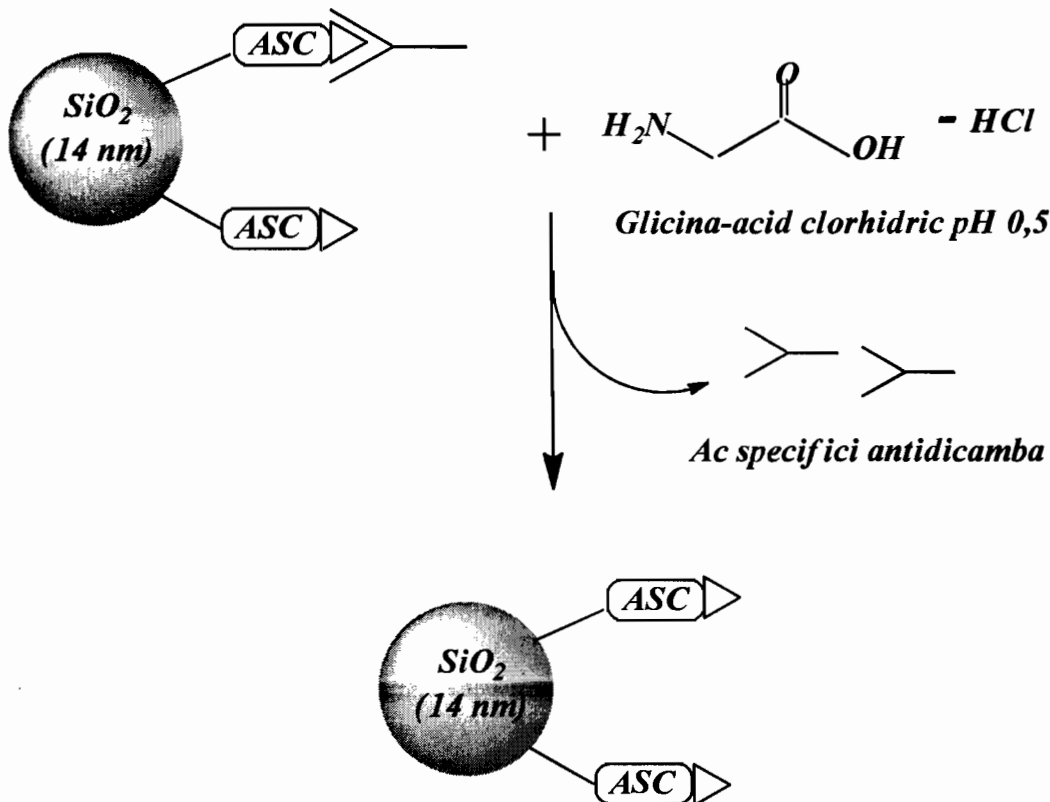
Inventatori: Dorobanțu Ioan, Neagu Livia, Stoica Raluca-Diana

**Reactia 6: Separarea anticorpilor specifici anticamba labili la pH 1**



**Nanoimunosorbent de tip Ag SiO<sub>2</sub>-ASC-dicamba-anticorpi anticamba stabili la pH 1**

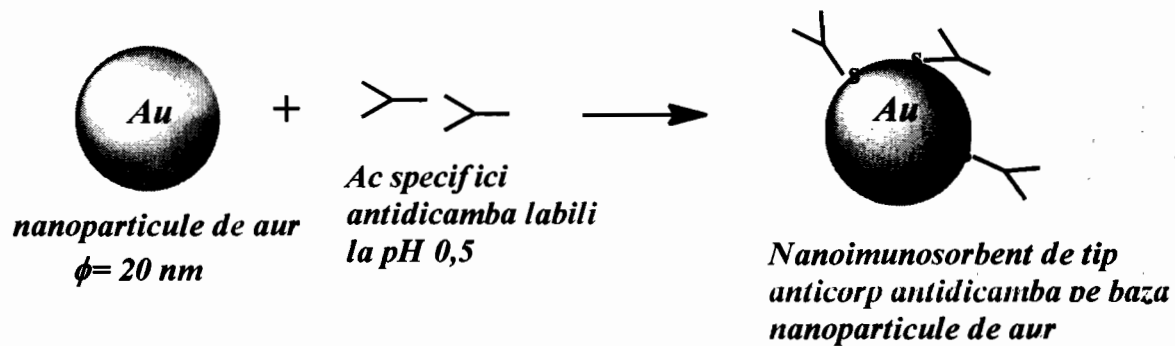
**Reactia 7: Separarea anticorpilor specifici anticamba labili la pH 0,5**



Inventatori: Dorobanțu Ioan, Neagu Livia, Stoica Raluca-Diana

*My Neagu SD*

**Reactia 8: Obținerea nanoimunisorbentului de tip anticorp antidicamba pe baza de nanoparticule de Au**



**Bibliografie**

1. Q. Zhao, D. Lu, G. Zhang, D. Zhang, X. Shi, Recent improvements in enzyme-linked immunosorbent assays based on nanomaterials, *Talanta*, vol. 223, article ID 121722, 2021;
2. Y. Zhou, X.-L. Tian, Y.-S. Li, F.-G. Pan, Y.-Y. Zhang, J.-H. Zhang, L. Yang, X.-R. Wang, H.-L. Ren, S.-Y. Lu, Z.-H. Li, Q.-J. Chen, Z.-S. Liu, J.-Q. Liu, An enhanced ELISA based on modified colloidal gold nanoparticles for the detection of Pb (II), *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 26, pp. 3700-3704, 2011;
3. P. Ciaurriz, 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;
4. M.H. Jazayeri, H. Amani, A. A. Pourfatollah, H. Pazoki-Toroudi, B. Sedighimoghaddam, Various methods of gold nanoparticles (GNPs) conjugation to antibodies, *Sensing and Bio-Sensing Research*, vol. 9, pp. 17-22, 2016.

Inventatori: Dorobanțu Ioan, Neagu Livia, Stoica Raluca-Diana

6

*IM* *Neagu* *SR*

~~SECRET DE SERVICIU~~

REVENDICARE

NR. asist: 8/2/19.03.2021<sup>18</sup>

Procedeul de obtinere a nanoimunisorbentului tip anticorp anticamba de inalta afinitate pe baza de nanoparticule de aur utilizat in tehnica nanoELISA pentru detectia pesticidului acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic (dicamba) din probe alimentare si de mediu este caracterizat prin aceea ca 50 mg acid tetracloroauric se dizolva in 120 ml apa bidistilata la care se adauga o cantitate de 110 mg citrat de sodiu iar amestecul de reactie rezultat este adus la temperatura de 60-70 °C sub continua agitare pana la formarea unei solutii de culoare rosie de nanoparticule de aur ce sunt separate prin centrifugare la 1500 x g timp de 15 min apoi spalate cu 10 ml apa bidistilata si suspendate in final in 5 ml apa bidistilata iar 10 mg nanoparticule de aur se adauga la 1 mg anticorpi anticamba cu constanta de afinitate mare in solutie apoasa pH 7 obtinuti prin separare pe coloana de afinitate cu Sephadex G25 cu inaltimea de 3 cm utilizand nanoimunisorbentul de tip antigen SiO<sub>2</sub>-albumina serica de capra-dicamba-anticorpi anticamba stabili la pH 1 avand ca eluent un volum glicina-acid clorhidric 10 mM pH 0,5 ulterior 5 mg nanoimunisorbentul de tip antigen care contine 1 mg de anticorp anticamba specifici eluat pe coloana de Sephadex G25, inaltime 3 cm cu 2 ml glicina -acid clorhidric 10 mM pH 1, 20 mg nanoimunisorbent tip antigen pe baza de SiO<sub>2</sub> reactioneaza cu 1 ml gama-globulina specifica la temperatura camerei, timp de 24 h apoi centrifugat la 1500 x g timp de 15 minute, rezultand ca faza intermediara calculul cantitatii anticorpilor specifici anticamba prin metoda spectrofotometrica sau metoda Bradford, nanoimunisorbentului tip anticorp anticamba de inalta afinitate pe baza de nanoparticule de aur obtinut este suspendat in 10 ml tampon fosfat 10 mM pH 7,2 si depozitat la temperatura de 4 °C in vederea utilizarii in tehnica nanoELISA pentru detectia pesticidului dicamba din probe alimentare si de mediu.

Inventatori: Dorobanțu Ioan, Neagu Livia, Stoica Raluca-Diana

7