

Denumire proiect: Cercetari privind dezvoltarea de tehnica ELISA pentru detectia contaminantului pesticidic 3,6 dicloro-2-metoxibenzoic din probele alimentare si de mediu

Etapa I: Obtinerea conjugatului 3,6 dicloro-2-metoxibenzoic-proteina si caracterizarea fizico-chimica a acestuia

Data predarii: 10.12.2007

1. S-a obtinut prin sinteza chimica conjugatul imunogen acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic-albumina serica de bovina (dicamba-ASB) in mediu alcalin la pH 9,6.
2. S-a obtinut prin sinteza chimica conjugatul acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic-ovalbumina, reactiile si etapele fiind conform cu cele descrise la sinteza conjugatului cu albumina serica de bovina.
3. A fost sintetizat conjugatul imunogen acid 2,4 diclorofenoxiacetic-albumina serica de bovina.
4. Cele trei conjugate sintetizate au fost purificate prin cromatografie pe coloana de Sephadex G25.
5. Cele trei conjugate imunogene au fost supuse analizei spectrale in vederea determinarii numarului de reziduuri pesticidice cuplate la o molecula de proteina.
6. Numarul de reziduuri pesticidice cuplate pe molecula de proteina calculat pentru cele trei conjugate au fost 25,4 in cazul conjugatului dicamba-ASB, 17,7 in cazul dicamba-OVA si 33,1 in cazul 2,4D-ASB.
7. Conjugatul 2,4D-ASB a fost sintetizat in vederea validarii metodelor de obtinere si control a conjugatelor dicamba-proteina ce constituie obiectivele acestei etape.

Etapa a II-a: Obtinerea anticorpilor anti 3,6 dicloro-2-metoxibenzoic. Imunizarea, obtinerea antiserurilor, separare, caracterizare imunologica si imunochimica, titru, afinitate fata de antigen

Data predarii: 15.06.2008

1. S-au obtinut anticorpi anti 3,6 dicloro-2-metoxibenzoic prin imunizarea iepurilor din rasa Chinchila cu imunogenul compus din antigen acid 3,6 dicloro-2-metoxibenzoic-hemocianina si adjuvant Freund complet sau incomplet.
2. Antiserurile specifice obtinute au fost prelucrate in vederea separarii γ globulinelor totale; imunoglobulinele specifice au fost analizate din punct de vedere al caracteristicilor imunologice si imunochimice.
3. S-a obtinut imunosorbentul dicamba-albumina serica de bovina-carboximetilceluloza-celuloza si analizat din punct de vedere al legarii antigenului (dicamba-ASB), concentratia de antigen cuplata la CM-celuloza in conditiile experimentale date a fost de circa 57 mg/g de celuloza.
4. Antiserurile obtinute (anticorpul antidicamba) au fost caracterizate imunologic din punct de vedere al afinitatii fata de antigenul omolog (dicamba)- tehnica ELISA utilizata a folosit ca prima etapa reactia dintre antigenul (dicamba-ASB) expus pe suprafata fazei solide si o solutie de anticorp antidicamba purificat si diferite concentratii cunoscute antigen (dicamba). Complexul imun de pe suprafata a fost pus in reactie cu markerul enzimatic anticorp antiIgG de iepure marcat cu fosfataza alcalina. In final activitatea enzimatica a imunosorbentului a fost realizata prin reactia cu substratul enzimatic p-nitrofenilfosfatul, iar masuratorile colorimetrice au fost facute dupa un timp dat la cititorul de placi ELISA. Din absorbantele optice corelate cu concentratia antigenului liber din amestecul de reactie au fost calculate constantele de afinitate ale antiserurilor.

Etapa a III-a: Obținerea markerilor enzimatici acid 3,6 dicloro-2-metoxibenzoic-fosfataza alcalina și acid 3,6 dicloro-2-metoxibenzoic-peroxidaza respectiv anticorp anti 3,6 dicloro-2-metoxibenzoic-fosfataza alcalina și anti 3,6 dicloro-2-metoxibenzoic-peroxidaza. Caracteristici structurale și enzimatică ale markerilor obținuți, stabilitate, activitate enzimatică specifică, caracteristici ale reacției marker enzimatic-anticorp anti 3,6 dicloro-2-metoxibenzoic.

Termen de predare: 01.01.2009

1. S-au sintetizat markerii enzimatici pesticid-enzima: acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic-peroxidaza (80 U/mg) și acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic-fosfataza alcalina (560 U/mg).

2. S-au sintetizat markerii enzimatici anticorp antipesticid-enzima: anticorp anti acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic-peroxidaza (60 U/mg) și anticorp anti acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic-fosfataza alcalina (230 U/mg).

3. Markerul selectat dicamba-fosfataza alcalina a fost caracterizat structural și enzimatic, s-a determinat constanta Michaelis în reacție cu p-nitrofenilfosfatul a cărei valoare este $K_m=9,51$ mM, s-a determinat influența vitezei de reacție în funcție de concentrația substratului și stabilitatea enzimatică a markerului.

Comunicare științifică:

Studii de cinetică a sistemului anticorp antigen pentru sistemul binar anticorp antidicamba-dicamba, Livia Harangus, Ioan Dorobantu, *Ziua IFIN-HH'08, Sesiunea de comunicări a tinerilor cercetători din IFIN-HH*, Magurele-București, 18 decembrie 2008

S-au depus două **cereri de brevet de invenție naționale:**

1. „Procedeu de obținere a markerului enzimatic acid 3,6-dicloro-2-metoxi benzoil-CO-NH-(CH₂)₆-N=CH-(CH₂)₃-CH=N-fosfataza alcalina”, Dorobantu Ioan, Harangus Livia, nr. OSIM A/00942 / 27.11.2008.

2. „Tehnică imunochimică de dozare a pesticidului acid 3,6-dicloro-2-metoxi benzoic din probe de mediu”, Dorobantu Ioan, Harangus Livia, nr. OSIM A/00943 / 27.11.2008.

Etapa a IV-a: Studii de cinetică a sistemului anticorp antigen pentru sistemul binar anticorp antipesticid-pesticid

Termen de predare: 15.12.2009

Rezultate intermediare:

1. S-a efectuat studiul de cinetică pentru sistemul binar anticorp antidicamba-dicamba în prezența markerului enzimatic, determinarea constantei de echilibru a sistemului studiat și a constantelor de viteză de reacție (asociere, disociere);

2. S-a obținut produsul marker enzimatic acid 3,6-dicloro-2-metoxi-benzoil-glicil-fosfataza alcalina (Dicamba-glicil-fosfataza alcalina).

S-a publicat **articolul:**

Synthesis of enzymatic marker 3,6-dicholoro-2-methoxy-benzoic-alkaline phosphatase and evaluation of the affinity against homologue antipesticide antibody, I. Dorobanțu, Livia Harangus, M. Radu, *Romanian Journal of Biophysics*, vol. 19, no. 1, p. 63–71, Bucharest, 2009

S-a depus **cererea de brevet național:**

Procedeu de obținere a markerului enzimatic acid 3,6-dicloro-2-metoxi-benzoil-glicil-fosfataza alcalina (Dicamba-glicil-fosfataza alcalina), nr. OSIM A01039/11.12.2009, autori: Dorobantu Ioan, Harangus Livia.

Etapa a V-a: Obținerea imunosorbentilor faza solida-antigen faza solida anticorp: faza solida-anticorp anti 3,6 dicloro-2-metoxibenzoic, faza solida-acid 3,6 dicloro-2-metoxibenzoic. Caracterizare imunosorbent, densitate proteica de suprafata, stabilitate, reactia imunosorbentului cu antigenul sau anticorpul omolog. Studii de cinetica chimica a sistemului imunosorbent-antigen (anticorp cuplat la faza solida) sau imunosorbent-anticorp (antigen cuplat la faza solida).

Termen de predare: 10.12.2010

Rezultate obtinute:

S-au obtinut imunosorbentul tip faza solida-anticorp nanoimunosorbent bioxid de siliciu-aminopropiltriethoxisilan-glutaraldehyd anticorp anti acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic utilizat în tehnica ELISA de dozare a pesticidului acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic si imunosorbentul faza solida-antigen nanoimunosorbent bioxid de siliciu-aminopropiltriethoxisilan-glutaraldehyd-albumina serica de bovina- acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic utilizat în tehnica ELISA de dozare a pesticidului acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic.

Imunosorbentii obtinuti s-au caracterizat fizico-chimic din punct de vedere al densitatii de suprafata a anticorpului respectiv a antigenului si s-au obtinut urmatoarele valori: $\rho = 3,16 \cdot 10^{11}$ molecule/cm² pentru anticorpul cuplat la faza solida si pentru antigen acid 3,6diclor-2-metoxi benzoic-albumina serica de bovina $\rho = 3,5 \cdot 10^{11}$ molecule/cm².

S-au efectuat studii de cinetica a sistemului binar faza solida anticorp anti 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic (imunosorbent)-acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic in prezenta markerului enzimatic obtinandu-se valoarea medie a constantei de echilibru $\bar{K} = (5,1 \pm 1,42) \cdot 10^6$ l/mol si a sistemului faza solida antigen (imunosorbent)-anticorp anti 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic in prezenta markerului enzimatic obtinandu-se valoarea constantei de echilibru (afinitate), $K = (1,9 \cdot 10^5 \pm 0,42)$ l/mol.

S-au depus cererile de brevet national:

1. „Procedeu de obținere a nanoimunosorbentului bioxid de siliciu-aminopropiltriethoxisilan-glutaraldehyd anticorp anti acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic utilizat în tehnica ELISA de dozare a pesticidului acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic”, autori: Dorobantu Ioan, Neagu Livia, Cerere brevet de inventie nr. OSIM A/00975/14.10.2010;
2. „Procedeu de obținere a nanoimunosorbentului bioxid de siliciu-aminopropiltriethoxisilan-glutaraldehyd-albumina serica de bovina-acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic utilizat în tehnica ELISA de dozare a pesticidului acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic”, autori: Dorobantu Ioan, Neagu Livia, Cerere brevet de inventie nr. OSIM A / 01271 / 02.12.2010.

Scopul proiectului a fost obținerea setului de reactivi ELISA necesari in analiza imunochimica a pesticidului acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic (dicamba) si caracterizarea acestora cu utilizare in monitorizarea contaminarii chimice a produselor alimentare avand ca scop final imbunatatirea calitatii hranei si a factorilor de mediu (apa, sol, plante) si prevenirea utilizarii unor produse contaminate.