



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 355 265**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/72 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05745128 .8**

96 Fecha de presentación : **30.04.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1879029**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.01.2008**

54 Título: **Un kit para detección inmunológica de neuroglobulina ligada a enzima y uso del mismo.**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.03.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.03.2011

73 Titular/es: **Institute of Radiation Medicine
Academy of Military Medical Sciences
People's Liberation Army
27 Taiping Road
Haidan District Beijing 100850, CN
Beijing Threeman Medicine Science and
Technology Limited Company**

72 Inventor/es: **Wang, Lihong;
Chen, Tingfang;
Shang, Aijia;
Gao, Yan y
Zhang, Chennang**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un kit de inmunoensayo, en especial a un **kit de ensayo de inmunoabsorción de neuroglobina ligado a enzima** (kit NGB-ELISA) para detectar la neuroglobina y a un uso del mismo.

Antecedentes de la invención

La neuroglobina (NGB) es el tercer tipo de proteína transportadora de oxígeno aparte de la hemoglobina y la mioglobina. La proteína NGB se expresa especialmente en el sistema nervioso y se distribuye extensamente en el cerebro. Al igual que la mioglobina, la proteína NGB puede fijar el oxígeno de manera reversible con una afinidad de fijación muy alta. Es bien sabido que la concentración de mioglobina en el suero es muy baja para su detección en el individuo normal, por lo que cuando se producen heridas en los músculos cardíacos y en los músculos esqueléticos, la mioglobina se liberará a la sangre desde las células lesionadas, dando como resultado un aumento significativo de la proteína mioglobina en el suero. Por consiguiente, se ha considerado a la concentración de mioglobina en el suero (mioglobina sérica) un marcador biológico específico y sensible para algunas enfermedades importantes tales como el infarto de miocardio y la insuficiencia renal, etc. Es interesante destacar que las características de la NGB y la MGB son muy similares entre sí. Por ejemplo, hay 151 aminoácidos (aa) en la proteína NGB, y 154 aa en la proteína MGB. El peso molecular tanto para la MGB como para la NGB es de 17 kD. Puesto que las funciones de la NGB y la MGB son tan similares (es decir, la MGB es responsable del suministro de oxígeno del músculo cardíaco y del músculo esquelético, mientras que la NGB es responsable del suministro de oxígeno del cerebro), y ambas pueden ser liberadas en el suero desde las células lesionadas, es razonable deducir que la concentración de la proteína NGB en el suero tiene valor potencial para el diagnóstico clínico de las enfermedades del sistema nervioso tales como la enfermedad de Alzheimer, el ictus y otros daños cerebrales. De manera análoga, la detección de la proteína NGB en la sangre tiene también un valor significativo para revelar el estadio de la enfermedad cuando nos referimos a las anteriores enfermedades del sistema nervioso.

Actualmente, el principal procedimiento para detectar la proteína NGB es el análisis de inmunotransferencia. En detalle, los usuarios deben someter la muestra de prueba en primer lugar a SDS-PAGE y a continuación deben detectar la proteína NGB con un anticuerpo anti-NGB, seguido por la reacción usando un segundo anticuerpo específico marcado con enzimas para posteriormente exponer la señal de la banda en la película de rayos X. Finalmente, los usuarios deben realizar la exploración de la película en un ordenador para realizar otro análisis de imágenes para estimar aproximadamente el nivel de la proteína NGB en la muestra de prueba. La mayor desventaja de este procedimiento es que no puede obtenerse la concentración exacta de la proteína NGB.

Resumen de la invención

El objeto de la presente invención es proporcionar un kit NGB-ELISA para medir la concentración de la proteína NGB en diversas muestras.

El kit NGB-ELISA de la presente invención comprende un anticuerpo monoclonal anti-NGB, un anticuerpo policlonal anti-NGB, un anticuerpo marcado con enzimas y un patrón de NGB, en el que el anticuerpo monoclonal anti-NGB se obtiene inmunizando ratones con el antígeno de NGB seguido por la fusión celular para producir una célula de hibridoma y posteriormente cultivando la célula de hibridoma; en el que el anticuerpo policlonal anti-NGB se obtiene inmunizando un animal con el antígeno de NGB y recogiendo a continuación el suero del animal, y en el que la proteína NGB patrón es el antígeno de NGB obtenido por medio de las siguientes etapas:

(1) construir un vector de expresión procariota que contenga una secuencia de ADNc de NGB de longitud integral de origen humano;

(2) transformar el vector de expresión procariota construido en la cepa HB101 de *E. coli*, y a continuación seleccionar los clones positivos;

(3) inducir la expresión de NGB por estimulación térmica para obtener un producto de expresión; y

(4) purificar el producto de expresión en primer lugar por filtración en gel y a continuación por cromatografía de intercambio aniónico para obtener el antígeno de NGB.

Más específicamente, el vector de expresión procariota es pBV220-rhNGB.

Las condiciones para cultivar los clones positivos son: inocular la cepa de *E. coli* en medio de cultivo LB que contiene ampicilina 80-120 µg/ml y cultivar durante 2-3 horas a 28-32 °C, seguido por el cultivo con agitación a 40-44 °C para inducir la expresión de rhNGB.

- 5 En el kit según la invención, el anticuerpo marcado con enzimas es típicamente inmunoglobulina de cabra anti-conejo marcada con HRP.

Por lo general, el kit NGB-ELISA comprende además la placa de marcado con enzimas, la proteína NGB patrón y reactivo para el desarrollar color. En la presente invención, el reactivo para desarrollar el color es TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina).

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un uso del kit NGB-ELISA.

- 10 El kit de la presente invención tiene especificidad alta y sensibilidad alta. Por consiguiente, el kit puede utilizarse para ayudar en el diagnóstico clínico de la demencia senil, el infarto cerebral o la lesión traumática del cerebro.

Breve descripción de los dibujos

- 15 La Figura 1 es un diagrama que muestra el dibujo de la electroforesis del producto amplificado de rhNGB obtenido por la técnica de PCR;

La Figura 2 son diagramas que muestran el mapa de restricción de los clones positivos para rhNGB después de identificar por medio de PCR y el procedimiento de enzimas de restricción, respectivamente;

La Figura 3 es un diagrama que muestra el análisis de inmunotransferencia del anticuerpo monoclonal obtenido;

- 20 La Figura 4 son diagramas que muestran la identificación de la subclase de los anticuerpos monoclonales obtenidos;

La Figura 5 son diagramas que muestran el análisis de inmunotransferencia del anticuerpo policlonal obtenido;

- 25 La Figura 6 es un diagrama que muestra la distribución de las proteínas NGB en el cerebro de un jerbo adulto detectadas por medio del anticuerpo policlonal obtenido;

La Figura 7 es un diagrama que muestra la curva patrón para la proteína NGB detectada por el kit de la presente invención;

La Figura 8 son diagramas que muestran la distribución de las neuronas positivas para NGB en el hipocampo del jerbo;

- 30 La Figura 9 son diagramas que muestran la distribución de las neuronas positivas para NGB en el cerebro 72 horas después de la lesión por reperusión tras la isquemia;

La Figura 10 es un diagrama que muestra el cambio serológico de la NGB en el cerebro del jerbo de 2 a 72 horas después de la lesión por reperusión tras la isquemia.

Descripción detallada de la invención

- 35 Ejemplo 1. La preparación del kit NGB-ELISA

I. Preparación del antígeno de NGB

1. Construcción de la cepa de *E. coli* de pBV220-rhNGB/HB101 1

- 40 1) Síntesis de los cebadores: los cebadores específicos de NGB pU y pD se diseñaron y sintetizaron según la secuencia conocida de un gen humano de NGB (hNGB), en el que se incorpora al extremo 5' del cebador "pU" un sitio de restricción de EcoRI y un codón de inicio ATG, y se incorpora al extremo 5' del cebador "pD" un sitio de restricción de BamHI. Los cebadores fueron sintetizados por Shanghai Boya Biotechnology Inc. Las secuencias de los cebadores son:

pU: 5'-CCggAATTCATggAgCgCCCggAg-3'

pD: 5'-ggTggATCCTTACTCgCCATCCCgCCTCg-3'.

2) Amplificación por PCR: se utilizó el fragmento de ADNc del gen humano de la neuroglobina (a saber, Neurosurvivin (NSV)), que fue obtenido en nuestro laboratorio previamente de la biblioteca de ADNc de cerebro fetal humano por la técnica de PCR) como molde para realizar la amplificación por PCR con los cebadores sintetizados en la etapa 1) (Referencia: Burmester T, Weich B, Reinhardt S, Hankeln T. A vertebrate globin expressed in the brain. *Nature*. 2000; 407 (6803): 520-523). Las condiciones para la reacción de PCR fueron: desnaturalización durante 5 minutos a 95 °C, seguida por 30 ciclos de 45 segundos a 94 °C, 45 segundos a 60 °C y 45 segundos a 72 °C, y a continuación la elongación durante 5 minutos a 72 °C. Después de la reacción, se detectaron 5 µl del producto de amplificación por electroforesis en gel de agarosa al 1,0% (peso/volumen) para comprobar si la región codificadora del gen de NGB se había amplificado con éxito. El resultado se muestra en la Figura 1, en la que el carril A muestra el marcador de ADN DL2000, el carril B muestra el fragmento de la secuencia de ADNc de NGB (aproximadamente 470 pares de bases) amplificado con éxito.

3) Construcción del plásmido de expresión: tanto el vector de expresión altamente eficiente pBV220 (disponible del instituto de virología de la Academy of Chinese Prevent Medical Science) como los productos amplificados por PCR purificados se sometieron a digestión por las enzimas de restricción EcoRI y BamHI simultáneamente y se recuperaron por medio de electroforesis. Posteriormente los fragmentos se unieron por medio de la DNA ligasa T₄ para obtener el plásmido de expresión pBV220-rhNGB.

4) Construcción de las bacterias producidas por ingeniería genética: se transformó el plásmido pBV220-rhNGB en las células de *E. coli* HB101 competentes (disponibles de Beijing Baiweisheng Inc.) tratadas con CaCl₂. Se seleccionaron los transformantes, se inocularon en 3 ml de medio de cultivo LB y se cultivaron durante la noche a 30 °C. El ADN del plásmido se extrajo nuevamente del clon positivo identificado por PCR y a continuación se identificó por medio de otro análisis de restricción para confirmar la construcción. Los resultados se muestran en la Figura 2. En la Figura 2A, el carril A representa el marcador de ADN DL-2000, B-G indica la identificación de los productos reconocidos por PCR. En la Figura 2B, el carril A representa un marcador de ADN DL-2000, el carril B representa un control del vector sin pBV220, y C-F indica la identificación de los productos reconocidos por análisis doble de enzimas restricción con EcoRI y BamHI.

Los resultados sugieren que hay un fragmento de ADN de aproximadamente 470 pares de bases en todos los plásmidos recombinantes después de la identificación por PCR así como del análisis de restricción doble con EcoRI y de BamHI, que coincide con el fragmento del gen de NGB esperado (Neurosurvivin). El clon positivo se denominó pBV220-rhNGB/HB101 y se utilizó como cepa de ingeniería genética para expresar la proteína rhNGB.

2. Activación de las bacterias genéticamente modificadas producidas por ingeniería genética

Se usaron 5 µl de la cepa estable de las bacterias almacenadas a 4 °C y se inocularon en 5 ml del medio de cultivo LB que contenía ampicilina 100 µg/ml, posteriormente se cultivó con agitación a 200 rpm durante 8 horas a 30 °C. A continuación se inoculó el 1% (v/v) de los cultivos en el matraz de cultivo (el medio de cultivo era el mismo de antes). La cepa cultivada se mantuvo para cultivar con agitación a 200 rpm a 30 °C durante 16 horas para obtener un cultivo de siembra.

3. Inducción de la expresión de rhNGB

El cultivo de siembra se inoculó al 3% (v/v) en 150 ml de un medio de cultivo LB que contenía ampicilina 100 µg/ml y se cultivó con agitación a 200 rpm durante 2-3 horas a 30 °C. Una vez alcanzada la DO₆₀₀ de 0,3-0,4, los cultivos se transfirieron inmediatamente a un baño de agua de 42 °C y se mantuvieron en cultivo con agitación durante 5 horas para inducir la expresión de rhNGB.

4. Recogida de las bacterias, lavado y congelación/descongelación

Se recogieron las bacterias después de la inducción por centrifugación a 6000 rpm a 4 °C durante 15 minutos. Una pequeña cantidad de las bacterias se utilizó para detectar la expresión de la proteína rhNGB por análisis SDS-PAGE. Las bacterias se lavaron tres veces con tampón TE (Tris-HCl 25 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM). Después de entonces, las bacterias se colocaron en nitrógeno líquido durante 5 minutos y a continuación se descongelaron en un baño de hielo. El procedimiento de congelación/descongelación se repitió tres veces. A continuación se añadió diez veces el volumen de tampón TE (Tris-HCl 25 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM) para suspender las bacterias.

5. Lisis de las bacterias

Las bacterias suspendidas con el tampón TE (Tris-HCl 25 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM) se sometieron a ultrasonido (400 W) en un baño de hielo durante 30 segundos en un intervalo de 20 segundos. El tratamiento por ultrasonido se repitió 15 veces. A continuación, se centrifugaron las muestras a 12000 rpm durante 20 minutos a 4 °C. Se desechó el sobrenadante y se recogió la inclusión cuidadosamente.

5 6. Lavado de la inclusión

La inclusión se lavó con tampón Tris (Tris-HCl 25 mM, pH 8,0, NaCl 1 M), se centrifugó a 12000 rpm durante 20 minutos a 4 °C. Se desechó el sobrenadante. El precipitado se lavó dos veces con tampón TE (Tris-HCl 25 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM) seguido por otra centrifugación a 12000 rpm durante 20 minutos a 4 °C. Se desechó el sobrenadante y se recogió la inclusión.

10 7. Lisis de la inclusión

La inclusión se resuspendió nuevamente en el tampón TE que contenía carbamida 8 mol/l y mercaptoetanol al 1% (v/v) y se sometió a ultrasonido (400 W) durante 30 segundos en un intervalo de 20 segundos. El tratamiento de ultrasonido se repitió 6 veces. El producto resultante se hirvió a 100 °C durante 5 minutos y a continuación se centrifugó nuevamente a 12000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se recogió el sobrenadante y se desechó el precipitado.

15

8. Filtración en gel

Se usó una columna cromatográfica Sephacryls-200 para otro análisis, que en primer lugar se equilibró con el tampón TE que contenía carbamida 2 mol/l y mercaptoetanol al 0,1% (v/v). La muestra preparada en la etapa 7 se cargó en la columna cromatográfica, posteriormente se eluyó por medio del tampón TE que contenía carbamida 2 mol/l y mercaptoetanol al 0,1% (v/v) y a continuación se recogieron las fracciones eluidas. Tras este procedimiento, los eluyentes de cada tubo se transfirieron para realizar el análisis de SDS-PAGE para detectar las muestras con mayor cantidad de proteínas diana.

20

9. Cromatografía de intercambio aniónico

La columna de cromatografía de intercambio de aniones fuertes (Q Sepharose FF de Amersham) se equilibró en primer lugar con el tampón TE que contenía carbamida 2 mol/l y mercaptoetanol al 0,1% (v/v). Las muestras que contenían más proteínas diana se combinaron y se cargaron en la columna y a continuación se eluyeron gradualmente con el tampón de equilibrado (tampón TE que contenía carbamida 2 mol/l y mercaptoetanol al 0,1% (v/v)) que contenía NaCl de diferentes concentraciones tales como 0,05 M, 0,1 M, 0,15 M, 0,2 M, 0,5 M y 0,7 M, respectivamente. Se recogieron todos los picos de elución. Posteriormente, se regeneró la columna con el tampón de equilibrado que contenía NaCl 1 M. Al mismo tiempo, las muestras de los eluyentes que contenían diferentes concentraciones de NaCl se identificaron por medio del análisis de SDS-PAGE. Como resultado, se encontró que las muestras eluidas por el tampón de equilibrado que contenía NaCl 0,7 M contenían las proteínas diana.

25

30

10. Renaturalización y desalinización de la proteína diana rhNGB

Se equilibró una columna Sephadex G-50 resistente al disolvente en primer lugar con el tampón TE que contenía SDS al 0,1% (v/v). A continuación se cargaron las muestras que contenían las proteínas diana en la columna, y posteriormente se lavó la columna por medio del tampón TE que contenía SDS al 0,1% (v/v). Se recogieron todos los eluyentes.

35

Después del análisis, la concentración de rhNGB en el medio de cultivo era de 1,2 g/l. A continuación se identificó la proteína rhNGB recogida y se sometió al análisis de inmunotransferencia.

40

II. Identificación de NGB humana de longitud integral recombinante (rhNGB)

Se sabe que hay 456 pares de bases en la región codificadora del gen de la neuroglobina humana Neurosurvivin (NSV), que pueden codificar 151 aminoácidos (Referencia: Burmester T, Weich B, Reinhardt S, Hankeln T. A vertebrate globin expressed in the brain. Nature. 2000; 407 (6803): 520-523)). Las secuencias de los ácidos nucleicos y de los aminoácidos se mostraron en ID SEC. Nº 1 y en ID SEC. Nº 2, respectivamente.

45

Después de analizar las muestras de la proteína rhNGB por medio del espectrómetro de masas, se obtuvo la secuencia de aminoácidos según se muestra en ID SEC. Nº 3, en la que los aminoácidos que coincidían con

el fragmento de NSV eran 66 aminoácidos, que es aproximadamente el 43,7% de la proteína neuroglobina humana de longitud integral (151 aminoácidos). Por consiguiente, puede verse que las muestras obtenidas por el procedimiento de la presente invención son correctas.

Además, la secuencia de aminoácidos de la proteína rhNGB se secuenció por medio de secuenciación directa usando el analizador secuencias proteicas 491 (ABI Company, EEUU, la temperatura del entorno era de 20 °C, la humedad relativa era del 28%). El extremo N terminal de la secuencia es M-E-R-P-E-P-E-L-I-R-Q-S-W-R-A-V, que coincide totalmente con el extremo N terminal de la proteína NGB humana. Por consiguiente, puede verse que las muestras obtenidas por el procedimiento de la presente invención son totalmente correctas.

III. Preparación de los anticuerpos anti-NGB

1. Preparación del anticuerpo monoclonal

1) Animal experimental: ratones BALB/c hembra, de 8-12 semanas de edad, 18-20 g de peso (adquiridos del Centro animal de la Academia de ciencias médicas militares del Ejército Popular de Liberación de China). Las células SP2/0 obtenidas de mieloma de ratón se adquirieron del banco de células de la Academia China de Ciencias, Shanghai.

2) Inmunización: se utilizaron 100 µg, 125 µg y 150 µg de rhNGB purificada como antígenos y se separaron en tres grupos. En cada grupo, se mezcló la rhNGB respectivamente con volúmenes iguales de adyuvante completo de Freund y se emulsionó totalmente. A continuación se inyectaron las mezclas a tres ratones por medio de inyección intraperitoneal e inyección subcutánea en múltiples sitios. Tres semanas más tarde, se mezclaron los mismos volúmenes de antígenos con cantidades iguales de adyuvante incompleto de Freund y se inyectaron en los ratones por inyección intraperitoneal e inyección subcutánea en múltiples sitios. La inmunización se repitió dos veces en un intervalo de cuatro semanas. La potencia se midió el día 15 después de cada inmunización recogiendo el suero. Los ratones con una potencia más alta recibieron inyección intraperitoneal con 100 µg de antígeno para reforzar la inmunización tres días antes de la fusión celular.

3) Preparación de la célula alimentadora: un día antes de la fusión celular, se sacrificó un ratón Kunming normal por medio de luxación de vértebras cervicales y se sumergió en etanol al 70% durante 5 minutos. A continuación, se retiró la piel del abdomen en un banco limpio y se expuso el peritoneo. Se inyectaron 5 ml de disolución de GKN (constituida por PBS suplementado con d-glucosa 11 mM, KCl 5,5 mM, NaCl 137 mM, Na₂HPO₄ 25 mM y NaH₂PO₄ 5,5 mM) en la cavidad abdominal por medio de una jeringa. A continuación se recogió la ascitis presionando el abdomen de manera reiterada y posteriormente se transfirió a un tubo de centrifugación y se centrifugó a 1000 rpm durante 5 min. Tras desechar el sobrenadante, se añadió medio de cultivo HAT para suspender las células. Las células alimentadoras se transfirieron a continuación a una placa de 96 pocillos y se cultivaron en una incubadora con CO₂ al 5% a 37 °C durante la noche.

4) Fusión celular: se utilizaron ratones con inmunización de refuerzo para preparar el suero. En detalle, se retiraron los ojos de los ratones para recoger la sangre y para preparar el suero, que se almacenó a baja temperatura. A continuación, se sacrificaron los ratones por luxación de las vértebras cervicales y se sumergieron en etanol al 70% durante 5 min. A continuación de esto, se extrajeron los bazo de los ratones en un banco limpio y a continuación se trituraron para preparar la suspensión de células. Posteriormente se centrifugó el resultante a 1000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. Tras desechar el sobrenadante, las células se lavaron dos veces con disolución de GKN y se resuspendieron en disolución de GKN. Se tomaron 0,2 ml de disolución para el recuento de células bajo el microscopio.

Se mezclaron las células del bazo con las células SP2/0 en una relación de 10:1 en un tubo de centrifuga cónico de 50 ml, y se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 minutos a 37 °C. Se desechó totalmente el sobrenadante y el precipitado celular se liberó sacudiendo rápidamente el fondo del tubo. El tubo de centrifuga se colocó en un baño de agua a 37 °C y se añadió gota a gota 1 ml de una disolución de polietilenglicol (PEG) al 50% con agitación durante 1 min. Se añadieron 10 ml de disolución GKN (1 minuto para los primeros 2 ml, 2-3 minutos para los últimos 8 ml) tras reposar durante 1 minuto para interrumpir la fusión celular. Tras reposar durante otro 1 minuto, se centrifugó el resultante a 1000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se desechó y se añadió el medio de cultivo de hipoxantina, aminopterina y timidina (HAT). A continuación se agitó con una pipeta de manera cuidadosa para preparar una suspensión homogénea. Las células se inocularon en una placa de 96 pocillos cubierta previamente con células de alimentación y se cultivaron en una incubadora con CO₂ al 5% a 37 °C. El medio de cultivo se cambió cada tres días y posteriormente se cambió a un medio de cultivo de

hipoxantina-timidina (HT) 6 días más tarde.

5) Selección de los clones positivos: se utilizó la técnica de dot-ELISA modificada para seleccionar las células de hibridoma positivas que pueden secretar el anticuerpo anti-rhNGB. En detalle, se sumergió una membrana de nitrocelulosa (filtro NC) en PBS 0,01 mol/l (pH 7,4) durante 15-30 minutos y a continuación se secó mediante papel de filtro. La proteína rhNGB se diluyó con PBS 0,01 mol/l (pH 7,4) hasta 50 µg/ml y a continuación se añadió gota a gota sobre el papel de filtro NC a razón de 1 µl por punto y se dejó secar a temperatura ambiente. A continuación se colocó la membrana en un tampón de bloqueo durante 30 minutos manteniendo la agitación. La membrana se lavó con tampón de lavado 3 veces durante 3 minutos. Tras secar mediante papel de filtro, se colocó la membrana en el sobrenadante de las células de hibridoma cultivadas (el sobrenadante de las células SP2/0 se utilizó como control) durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación se lavó la membrana con tampón de lavado 3 veces durante 3 minutos y se sumergió en la disolución de trabajo del segundo anticuerpo marcado con HRP manteniendo la agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente. La membrana se lavó con tampón de lavado 4 veces durante 3 minutos. A continuación, se colocó la membrana de nitrocelulosa en disolución de 3,3-diaminobencidina (DAB) y se agitó durante 15 minutos. El resultante se lavó con agua durante varios minutos y a continuación se colocó en agua destilada para detener la reacción. Posteriormente se dejó secar la membrana a temperatura ambiente.

6) Subclonación de las células de hibridoma: la subclonación se llevó a cabo con el procedimiento de dilución limitada. Tras realizar el recuento de las células obtenidas en la placa con señales positivas, se suspendió nuevamente el resultante con una concentración de 230 células cada 4,6 ml en una placa de 96 pocillos que contenía 2-5 x 10⁴ células de alimentación por pocillo en medio de cultivo HT. Por consiguiente había 36 pocillos que contenían 0,1 ml en cada pocillo. Se añadió el restante 1,0 ml en 4 ml de medio de cultivo HT y a continuación se añadió a otros 36 pocillos a razón de 0,1 ml por pocillo. Se añadió el restante 1,4 ml en 1,4 ml de medio de cultivo HT y se inoculó en los restantes 24 pocillos a razón de 0,1 ml por pocillo. Por consiguiente, debería haber tres grupos con la relación de recuento de células de 5:1:0,5. Tras cultivar en incubadora de CO₂ durante cuatro días, se añadieron 100 µl de medio de cultivo HT en cada pocillo. Se añadió medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) el día 9 y a continuación se detectó la proliferación de las células y se determinó la potencia de los anticuerpos. Se usó (usaron) 1-2 pocillos con la potencia de anticuerpos más alta para la subclonación hasta alcanzar la relación positiva del 100%. Todos los demás clones se recogieron y se almacenaron en nitrógeno líquido.

7) Cepa monoclonal: después de seleccionar y subclonar, se obtuvieron cuatro cepas de células de hibridoma que podían secretar de manera estable anti-NGB. Se denominaron 4G7, 4H1, 3E6 y 2E11, respectivamente.

8) Preparación de la ascitis: la suspensión de las células de hibridoma monoclonal obtenidas mediante subclonación se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 min. Se deseó el sobrenadante y se lavaron las células con medio de cultivo sin suero una vez. Se añadió el medio de cultivo sin suero nuevamente y a continuación se recogió el sobrenadante para usarlo 3 días más tarde. Los ratones recibieron inyecciones intraperitoneales de 0,5 ml de parafina líquida/ratón. Siete días más tarde, los ratones recibieron inyecciones intraperitoneales con suspensión de 5 x 10⁶ células de hibridoma /ratón. 7-10 días más tarde, se observó que la hinchazón abdominal de los ratones. Se recogió la ascitis y se almacenó a -20 °C.

2. Preparación del anticuerpo policlonal

Se usaron dos conejos hembra jóvenes y sanos para preparar los anticuerpos policlonales anti-NGB. En primer lugar se inyectó el conejo con 400 µg de proteína rhNGB purificada (mezclada previamente con el mismo volumen de adyuvante completo de Freund) mediante inyecciones intramusculares y de manera subcutánea en el parte dorsal con múltiples sitios. Cuatro semanas más tarde, se inyectó la misma dosificación (mezclada previamente con el mismo volumen de adyuvante incompleto de Freund) para potenciar la inmunización. Dos semanas más tarde, se recogió el suero del conejo obteniendo la sangre de la carótida del conejo. El procedimiento detallado se describe en 'Zhu Zhiping, Chen Xueqing. Common Experimental Methods in Immunology. Beijing: People's Surgeon Publishing House, 2000'.

3. Purificación de los anticuerpos

La ascitis obtenida de los ratones (anticuerpo monoclonal) y el suero del conejo (anticuerpo policlonal) se centrifugaron, se precipitaron y se sometieron a desalinización para obtener los anticuerpos sin purificar. A continuación, se purificaron los anticuerpos por medio de una columna de Proteína G para obtener el anticuerpo monoclonal y el anticuerpo policlonal purificados. Los procedimientos detallados se describen en

'Zhu Zhiping, Chen Xueqing. Common Experimental Methods in Immunology. Beijing: People's Surgeon Publishing House, 2000'.

4. Control de calidad de los anticuerpos

1) Identificación del anticuerpo monoclonal

5 A. Identificación de la especificidad: se usó el análisis de inmunotransferencia para probar la especificidad del anticuerpo monoclonal. Los resultados para la identificación del anticuerpo 2E11 se mostraron en la Figura 3, en la que el carril 1 representa el sobrenadante de la lisis de la de *E. coli* pBV220-rhNGB/HB101 que expresa la proteína rhNGB; el carril 2 representa la mioglobina como control negativo; el carril 3 representa la inclusión de la cepa de *E. coli* pBV220-rhNGB/HB101; el carril 4 representa la hemoglobina como control negativo; el carril M representa el marcador de proteína de bajo peso molecular. Sugiere que el anticuerpo monoclonal tiene especificidad alta y reconoce la proteína rhNGB sin reacción cruzada con las otras globinas tales como la mioglobina y la hemoglobina.

15 B. Identificación de la subclase de los anticuerpos: se usó el kit de identificación de la subclase de anticuerpos (Roche, Alemania) para detectar la subclase del anticuerpo monoclonal. Específicamente, se añadieron 150 µl de medio de cultivo sin suero diluido con PBS 0,01 mol/l (pH 7,4) gota a gota en un tubo de reacción y se incubó durante 30 segundos a temperatura ambiente. Se sacudió el tubo de manera transitoria para resuspender totalmente el gel en el fondo. Se colocó el papel de la prueba de identificación de la subclase en el tubo de reacción durante 10 minutos y se leyó la banda para determinar la subclase del anticuerpo monoclonal. Los resultados se mostraron en la Figura 4, que indica que la cadena pesada del anticuerpo monoclonal anti-NGB es IgG₁ (Figura 4A), mientras que la cadena ligera es cadena κ (Figura 4B).

2) Identificación del anticuerpo policlonal

El análisis de inmunotransferencia se utilizó para la identificación del anticuerpo policlonal. Se probó la capacidad del anticuerpo para reconocer la proteína rhNGB expresada por células procariotas o por células eucariotas.

25 Específicamente, tras la identificación de la capacidad del anticuerpo policlonal para reconocer la proteína rhNGB expresada por células procariotas, usamos el vector obtenido por ingeniería genética pBV220-rhNGB/HB101 mencionado anteriormente y el cepas HB101 de *E. coli* que contenían el vector sin pBV220 en la inducción térmica. Después de la electroforesis de los productos de expresión, se probaron por medio del análisis de inmunotransferencia. Los resultados se mostraron en la Figura 5A, en la que el carril 1 sugiere que el anticuerpo policlonal de conejo anti-rhNGB reconoce la proteína rhNGB (de aproximadamente 17 kDa) contenida en el producto de expresión del vector obtenido por ingeniería genética pBV220-rhNGB/HB101; el carril 2 representa el control negativo que sugiere que el anticuerpo policlonal de conejo anti-rhNGB no puede reconocer ninguna banda en el producto de expresión de las cepas HB101 de *E. coli* que contienen el vector sin pBV220.

35 Al identificar la capacidad del anticuerpo policlonal anti-NGB en el reconocimiento de las proteínas NGB expresadas en células eucariotas, utilizamos el vector de expresión eucariota de NGB, pcDNA3.1/V5/6XHis/NGB (que se construye insertando la secuencia del gen de NGB entre los sitios de restricción, BamHI y XhoI, del vector pcDNA3.1/V5/6XHis (Invitrogen Inc.) usando un cebador directo 5'-ggATCCgCATggAgCgCCCggAg-3' y un cebador inverso 5'-CTCgAgCTCgC CATCCCAgCCTCg-3', y la proteína NGB expresada de modo eucariota puede obtenerse después de transformar el vector recombinante resultante en las células) y el vector sin pcDNA3.1N5/6XHis para transfectar las células COS-7, respectivamente. 48 horas más tarde, se recogieron las células y se extrajeron todas las proteínas de las células para el análisis de inmunotransferencia. Los resultados se mostraron en la Figura 5B, en la que el carril 3 sugiere que el anticuerpo policlonal de conejo anti-NGB puede reconocer las proteínas NGB; el carril 4 representa el control positivo que indica que la proteína LacZ-6XHis (la proteína LacZ-6XHis se obtuvo transfectando los vectores disponibles en el comercio pcDNA3.1/VS-His/lacZ (Invitrogen, EEUU)) puede ser detectada por el anticuerpo monoclonal anti-6XHis. Sugiere que el anticuerpo policlonal de conejo anti-NGB puede reconocer la proteína NGB expresada en las células eucariotas.

50 El anticuerpo policlonal de conejo anti-NGB se usó además para detectar la distribución de la proteína NGB en el cerebro del jerbo. Según se muestra en la Figura 6, puede verse que las células positivas para la inmunorreacción de NGB estaban extensamente distribuidas en la corteza cerebral (Figura 6A) y en las células piramidales y las neuritas del hipocampo (Figura 6B).

Los resultados indican que el anticuerpo policlonal anti-NGB preparado por medio de la presente invención puede reconocer específicamente la proteína NGB.

IV. Kit NGB-ELISA

1. Los siguientes reactivos se utilizaron en el kit NGB-ELISA

- 1) Tampón de dilución de recubrimiento (tampón carbonato 0,85 M, pH 9,5): Na_2CO_3 , g 1,59; NaHCO_3 , 2,93 g. Añadir agua bidestilada hasta 1000 ml.
- 5 2) Tampón de lavado (PBS, pH 7,4): KH_2PO_4 , 0,2 g; KCl, 0,2 g; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 2,9 g; NaCl, 8,0 g; Tween-20, 0,5 ml. Añadir agua bidestilada hasta 1000 ml.
- 3) Tampón de dilución de la muestra: BSA 0,1 g, añadir el tampón de lavado hasta 100 ml.
- 4) Tampón de bloqueo (caseína al 1,5%, concentración de trabajo: 0,05%): caseína: 36 g; NaOH, 2,4 g; disuelto en 600 ml de agua. Añadir aproximadamente 1800 de PBS hasta completar un volumen de 2400 ml.
- 10 5) Tampón del sustrato (tampón de fosfato ácido-cítrico, pH 5,0): Na_2HPO_4 0,2 M (28,4 g/l) 25,7 ml; ácido cítrico 0,1 M (19,2 g/l) 24,3 ml; añadir 50 ml de agua bidestilada.
- 6) Tampón de dilución del sustrato TMB: 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) (1 mg/ml) 1,0 ml; tampón de dilución del sustrato 10 ml; H_2O_2 al 30% 7 μl .
- 15 7) Tampón de parada (H_2SO_4 2 M): añadir 21,7 ml de ácido sulfúrico concentrado en 178,3 ml de agua gota a gota.

El kit NGB-ELISA de la presente invención se preparó a partir del anticuerpo monoclonal y el anticuerpo policlonal anti-NGB preparados anteriormente, junto con la proteína NGB patrón y los reactivos anteriores.

2. Protocolos para usar el kit NGB-ELISA

- 20 a) Recubrimiento: se diluyó el anticuerpo monoclonal anti-NGB con el tampón de recubrimiento (tampón carbonato 0,85 M, pH 9,6) en una relación 1:1000. Se recubrió una placa de marcado enzimático de 96 pocillos con 100 μl por pocillo a 4 °C durante la noche.
- b) Lavado: se lavó con el tampón de lavado PBST (tampón fosfato 0,01 M (pH 7,4) que contenía Tween-20 al 0,05%) tres veces.
- 25 c) Bloqueo: se usó el tampón de bloqueo (caseína al 0,05%) para bloquear el pocillo a temperatura ambiente durante 4 horas o durante la noche a 4 °C, 125 μl por pocillo.
- d) Carga de las muestras: se establecieron los pocillos para el blanco y el control negativo (pocillos dobles para cada grupo). Se añadieron diferentes concentraciones del patrón rhNGB en los pocillos (pocillos dobles para cada concentración) para obtener la curva patrón. Se añadieron las muestras a determinar. Para todos los pocillos, el volumen de las muestras fue de 100 μl por pocillo. Se incubó en baño de agua a 37 °C durante 1 hora.
- 30 e) Lavado: se lavó con el tampón de lavado PBST (tampón fosfato 0,01 M (pH 7,4) que contenía Tween-20 al 0,05%) tres veces.
- f) Adición del anticuerpo policlonal: se diluyó el anticuerpo policlonal a 1:1500 con PBS (tampón fosfato 0,01 M, pH 7,4), 100 μl por pocillo. Se incubó durante 1 hora en baño de agua a 37 °C.
- 35 g) Lavado: se lavó con el tampón de lavado PBST (tampón fosfato 0,01 M (pH 7,4) que contenía Tween-20 al 0,05%) tres veces.
- h) Adición del segundo anticuerpo: se diluyó la IgG de cabra anti-conejo marcada con HRP a 1:5000 con el tampón de bloqueo (caseína al 1%), 100 μl por pocillo. Se incubó durante 30 minutos en baño de agua a 37 °C.
- 40 i) Lavado: se lavó con el tampón de lavado PBST (tampón fosfato 0,01 M (pH 7,4) que contenía al Tween-20 0,05%) tres veces.
- j) Desarrollo del color: se desarrolló con 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB), 100 μl por pocillo. Se incubó durante 10-20 minutos en baño de agua a 37 °C.
- 45 k) Parada: se detuvo la reacción con el tampón de parada (H_2SO_4 2 M), 100 μl por pocillo.

l) Detección: se detectó la absorción a una DO_{450} por medio del instrumento del inmunoensayo enzimático.

m) Obtención de la curva patrón: se dibujó la curva patrón, donde la concentración de la proteína patrón se aplicó como eje X, la DO_{450nm} se aplicó como eje Y. El resultado se muestra en la Figura 7. Puede verse que la región detectable de la concentración de la proteína NGB es de 150 ng/ml a 18 µg/ml.

n) Cálculo: el usuario puede obtener la concentración de NGB en las muestras basándose en la curva patrón. Después de la multiplicación por las veces de la dilución, puede obtenerse la concentración exacta de NGB en las muestras.

Ejemplo 2. La aplicación del kit NGB-ELISA

Los cambios dinámicos de la proteína NGB en el suero tras la isquemia cerebral pueden revelarse detectando la concentración de la proteína NGB en el suero del modelo animal. Se utilizó el modelo de isquemia-reperfusión del cerebro del jerbo y se recogió el suero a las 2 horas, 8 horas, 16 horas, 24 horas, 48 horas y 72 horas tras la perfusión realizada después de 20 minutos de producida la isquemia. En primer lugar, se detectó el cambio de los tejidos en el modelo de isquemia-reperfusión usando el anticuerpo policlonal anti-NGB de la presente invención mediante el procedimiento inmunohistoquímico, y los resultados se muestran en la Figura 8 y Figura. 9. En las que, las Figuras 8A y 8B representan las distribuciones normales de las neuronas positivas para la inmunorreacción de NGB en las regiones CA_1 y CA_3 del hipocampo del jerbo normal, las Figuras 9A y 9B representan las distribuciones de las neuronas positivas para la inmunorreacción de NGB en las regiones CA_1 y CA_3 del hipocampo del jerbo tras 72 horas de perfusión. Después de realizar la comparación, puede verse que las células neuronales con lesión por isquemia-reperfusión están rotas y una gran cantidad de las mismas están muertas.

El cambio serológico dinámico de NGB se detectó usando el kit de la presente invención, y se comparó con las secciones del cerebro. El cambio de NGB en el suero se muestra en la Tabla 1 y en la Figura 10. Puede verse que tras de 8 horas de lesión por isquemia-reperfusión del cerebro del jerbo, la concentración de NGB en el suero aumentó significativamente ($P < 0,05$) y de manera gradual, alcanzando un máximo a las 48 horas. El nivel serológico de NGB se relaciona positivamente con el nivel de lesión cerebral en el modelo de isquemia-reperfusión. Por consiguiente, puede concluirse que la detección del nivel serológico y el cambio dinámico de NGB pueden revelar el nivel del daño cerebral. Este resultado indica claramente que el kit NGB-ELISA de la presente invención puede ser utilizado en el estudio del patrón de cambios de la proteína NGB en el suero tras el infarto cerebral. Al mismo tiempo, el resultado puede utilizarse además para evaluar la aparición y el desarrollo del infarto cerebral.

Tabla 1. El cambio de la proteína NGB en el suero en diversos momentos después de la isquemia-reperfusión en el cerebro del jerbo (µg/ml)

Grupo	Cantidad de pruebas	Promedio	DE	EE	valor P
Control	10	4,61	2,53	0,80	
2 h	6	5,81	3,50	1,41	0,436
8 h	6	7,69	2,19	0,89	0,027*
16 h	6	8,59	2,70	1,21	0,011*
24 h	6	10,97	3,27	1,33	0,001*
48 h	6	14,02	3,38	1,38	0,000*
72 h	5	11,94	2,47	1,10	0,000*

*: en comparación con el grupo de control, $P < 0,05$

Ejemplo 3. Detección de la concentración de proteína NGB en las muestras de suero de pacientes que padecían enfermedad vascular relacionada con isquemia y en el modelo de lesión de isquemia-reperfusión en ratas.

Se utilizó el kit NGB-ELISA para detectar la concentración de proteína NGB en las muestras de suero de pacientes que padecían enfermedad vascular relacionada con isquemia y en el modelo de lesión de isquemia-reperfusión en ratas. Los protocolos detallados fueron los siguientes:

- 5 a) Recubrimiento: se diluyó el anticuerpo monoclonal anti-NGB con el tampón de recubrimiento (tampón carbonato 0,85 M, pH 9,6) en una relación 1:1000. Se recubrió una placa de marcado enzimático de 96 pocillos con 100 µl por pocillo a 4 °C durante la noche.
- b) Lavado: se lavó con el tampón de lavado PBST (tampón fosfato 0,01 M (pH 7,4) que contenía Tween-20 al 0,05%) tres veces.
- 10 c) Bloqueo: se usó el tampón de bloqueo (caseína al 0,05%) para tratar el pocillo a temperatura ambiente durante 4 horas o durante la noche a 4 °C, 125 µl por pocillo.
- d) Carga de las muestras: se establecieron los pocillos para el blanco y el control negativo (pocillos dobles para cada grupo).
 - (i) Se añadieron diferentes concentraciones del patrón rhNGB en los pocillos (pocillos dobles para cada concentración) para obtener la curva patrón;
 - 15 (ii) se añadió el suero del modelo de isquemia en rata (isquemia durante 20 minutos seguida por perfusión durante 48 horas);
 - (iii) se añadió el suero de paciente que padecía enfermedad vascular relacionada con isquemia (adquirido del hospital N° 307, recogido antes de la cirugía, y el paciente no recibió ningún tratamiento con medicamentos especiales. El análisis de sangre de rutina era normal);
 - 20 (iv) para todos los pocillos, el volumen de las muestras fue de 100 µl por pocillo. Se incubó en baño de agua a 37 °C durante 1 hora.
- e) Lavado: se lavó con el tampón de lavado PBST (tampón fosfato 0,01 M (pH 7,4) que contenía Tween-20 al 0,05%) tres veces.
- 25 f) Adición del anticuerpo policlonal: se diluyó el anticuerpo policlonal a 1:1500 con PBS (tampón fosfato 0,01 M, pH 7,4), 100 µl por pocillo. Se incubó durante 1 hora en baño de agua a 37 °C.
- g) Lavado: se lavó con el tampón de lavado PBST (tampón fosfato 0,01 M (pH 7,4) que contenía Tween-20 al 0,05%) tres veces.
- h) Adición del segundo anticuerpo: se diluyó la IgG de cabra anti-conejo marcada con HRP a 1:5000 con el tampón de bloqueo (caseína al 1%), 100 µl por pocillo. Se incubó durante 30 minutos en baño de agua a 37 °C.
- 30 i) Lavado: se lavó con el tampón de lavado PBST (tampón fosfato 0,01 M (pH 7,4) que contenía al Tween-20 0,05%) tres veces.
- j) Desarrollo del color: se desarrolló con 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB), 100 µl por pocillo. Se incubó durante 10-20 minutos en baño de agua a 37 °C.
- 35 k) Parada: se detuvo la reacción con el tampón de parada (H₂SO₄ 2 M), 100 µl por pocillo.
- l) Detección: se detectó la absorción a una DO₄₅₀ por medio del instrumento del inmunoensayo enzimático.
- m) Obtención de la curva patrón.
- 40 n) Basándose en la curva patrón, la concentración de NGB en las muestras de suero fue de 13 µg/ml en el paciente, 11 µg/ml en el modelo de perfusión en rata durante 48 horas después de producida la isquemia durante 20 minutos.

El resultado sugiere que el kit NGB-ELISA de la presente invención puede utilizarse para detectar la

concentración exacta de NGB en el suero del paciente o de la rata.

Aplicabilidad industrial

- 5 El kit NGB-ELISA de la presente patente es suficientemente sensible para detectar la concentración de proteína NGB en diversas muestras y puede utilizarse como línea de guía potencial para el diagnóstico clínico de muchas de las enfermedades relacionadas con lesiones neuronales y enfermedades degenerativas tales como la demencia senil, el infarto cerebral o la lesión traumática del cerebro, y es útil para el seguimiento del desarrollo de las enfermedades.

Listado de secuencias

- <160> 3
- 10 <210> 1
- <211> 456
- <212> ADN
- <213> Neuroglobina humana
- <400> 1
- 15
- | | |
|---|-----|
| atggagcgcc cggagcccg gctgatccgg cagagctggc gggcagtgag ccgcagcccg | 60 |
| ctggagcagc gcaccgtcct gtttgccagg ctgttgccc tggagcctga cctgctgccc | 120 |
| ctcttcagc acaactgccg ccagttctcc agcccagagg actgtctctc ctcgcctgag | 180 |
| ttcctggacc acatcaggaa ggtgatgctc gtgattgatg ctgcagtgac caatgtggaa | 240 |
| gacctgtcct cactggagga gtacctgcc agcctgggca ggaagcaccg ggcagtgggt | 300 |
| 20 gtgaagctca gtccttctc gacagtgggt gactctctgc tctacatgct ggagaagtgt | 360 |
| ctgggccctg ccttcacacc agccacacgg gctgcctgga gccaaactta cggggccgta | 420 |
| gtgcaggcca tgagtcgagg ctgggatggc gagtaa | 456 |
- <212> PRT
- <213> Neuroglobina humana
- 25

<400> 2

Met Glu Arg Pro Glu Pro Glu Leu Ile Arg Gln Ser Trp Arg Ala Val
 1 5 10 15
 5 Ser Arg Ser Pro Leu Glu His Gly Thr Val Leu Phe Ala Arg Leu Phe
 20 25 30
 Ala Leu Glu Pro Asp Leu Leu Pro Leu Phe Gln Tyr Asn Cys Arg Gln
 35 40 45
 Phe Ser Ser Pro Glu Asp Cys Leu Ser Ser Pro Glu Phe Leu Asp His
 50 55 60
 10 Ile Arg Lys Val Met Leu Val Ile Asp Ala Ala Val Thr Asn Val Glu
 65 70 75 80
 Asp Leu Ser Ser Leu Glu Glu Tyr Leu Ala Ser Leu Gly Arg Lys His
 85 90 95
 15 Arg Ala Val Gly Val Lys Leu Ser Ser Phe Ser Thr Val Gly Glu Ser

 100 105 110
 <210> Leu Leu Tyr Met Leu Glu Lys Cys Leu Gly Pro Ala Phe Thr Pro Ala
 <211> 115 120 125
 20 <212> Thr Arg Ala Ala Trp Ser Gln Leu Tyr Gly Ala Val Val Gln Ala Met
 <213> 130 135 140
 Ser Arg Gly Trp Asp Gly Glu
 145 150

<220>

<223>

<400> 3

5 Met Glu Arg Pro Glu Pro Glu Leu Ile Arg Gln Ser Trp Arg Ala Val
 1 5 10 15
 Ser Arg Ser Pro Leu Glu His Gly Thr Val Leu Phe Ala Arg Leu Phe
 20 25 30
 Ala Leu Glu Pro Asp Leu Leu Pro Leu Phe Gln Tyr Asn Cys Arg Gln
 35 40 45
 10 Phe Ser Ser Pro Glu Asp Cys Leu Ser Ser Pro Glu Phe Leu Asp His
 50 55 60
 Ile Arg Lys Val Met Leu Val Ile Asp Ala Ala Val Thr Asn Val Glu
 65 70 75 80
 Asp Leu Ser Ser Leu Glu Glu Tyr Leu Ala Ser Leu Gly Arg Lys His
 85 90 95
 15 Arg Ala Val Gly Val Lys Leu Ser Ser Phe Ser Thr Val Gly Glu Ser
 100 105 110
 Leu Leu Tyr Met Leu Glu Lys Cys Leu Gly Pro Ala Phe Thr Pro Ala
 115 120 125
 Thr Arg Ala Ala Trp Ser Gln Leu Tyr Gly Ala Val Val Gln Ala Met
 130 135 140
 Ser Arg Gly Trp Asp Gly Glu
 145 150

REIVINDICACIONES

1. Un kit NGB-ELISA que comprende un anticuerpo monoclonal anti-NGB, un anticuerpo policlonal anti-NGB, un anticuerpo marcado con enzimas y un patrón de proteína NGB, en el que el anticuerpo monoclonal anti-NGB se obtiene inmunizando ratones con el antígeno de NGB seguido por la fusión celular para producir una
5 célula de hibridoma y posteriormente cultivando la célula de hibridoma, en el que el anticuerpo policlonal anti-NGB se obtiene inmunizando un animal con el antígeno de NGB y recogiendo a continuación del suero del animal, y en el que la proteína NGB patrón es el antígeno de NGB obtenido por medio de las siguientes etapas:
 - (1) construir un vector de expresión procariota que contenga una secuencia de ADNc de NGB de longitud
10 integral de origen humano;
 - (2) transformar el vector de expresión procariota construido en la cepa HB101 de *E. coli*, y a continuación seleccionar los clones positivos;
 - (3) inducir la expresión de NGB por estimulación térmica para obtener un producto de expresión; y
 - (4) purificar el producto de expresión en primer lugar por filtración en gel y a continuación por
15 cromatografía de intercambio aniónico para obtener el antígeno de NGB.
2. El kit NGB-ELISA según la reivindicación 1, en el que el vector de expresión procariota es pBV220-rhNGB.
3. El kit NGB-ELISA según la reivindicación 1, en el que las condiciones para el cultivo de los clones positivos son: inocular la cepa de *E. coli* en medio de cultivo LB que contiene 80-120 µg/ml de ampicilina y cultivar
20 durante 2-3 horas a 28-32 °C, seguido por el cultivo con agitación a 40-44 °C para inducir la expresión de rhNGB.
4. El kit NGB-ELISA según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el anticuerpo marcado con enzimas es inmunoglobulina de cabra anti-conejo marcada con HRP.
5. El kit NGB-ELISA según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el kit NGB-ELISA comprende además una placa de marcación enzimática y un reactivo de desarrollo de color.
- 25 6. El kit NGB-ELISA según la reivindicación 5, en el que el reactivo de desarrollo de color es 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB).
7. Un uso del kit NGB-ELISA según la reivindicación 1 para ayudar en el diagnóstico clínico de la demencia senil, el infarto cerebral o la lesión traumática del cerebro.

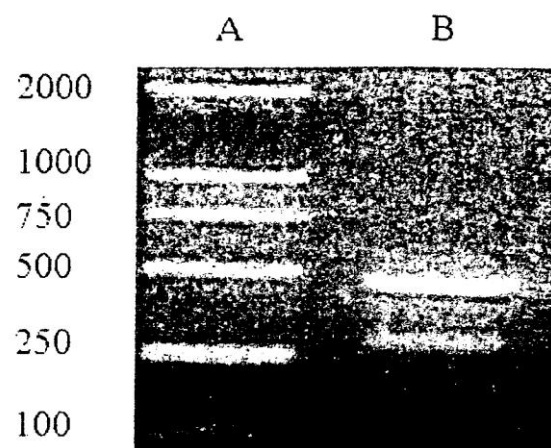


Fig. 1

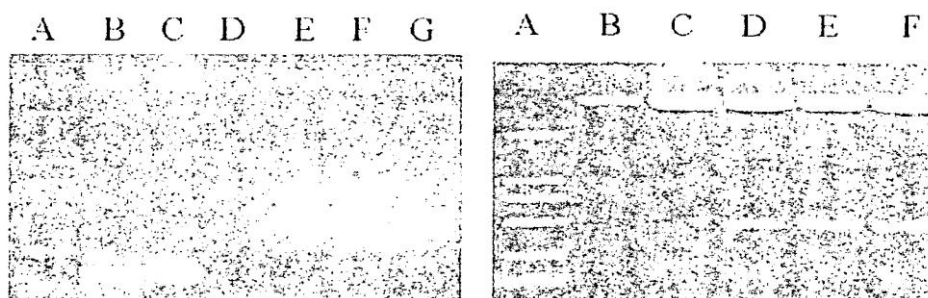


Fig. 2A

Fig. 2B

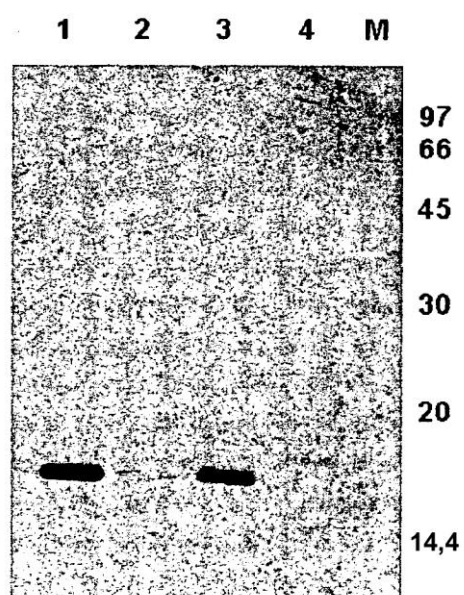


Fig. 3

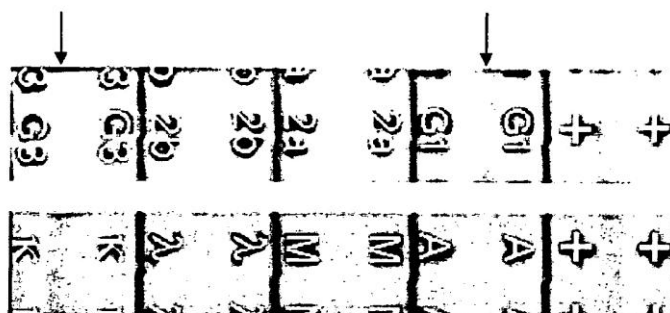


Fig. 4A

Fig. 4B

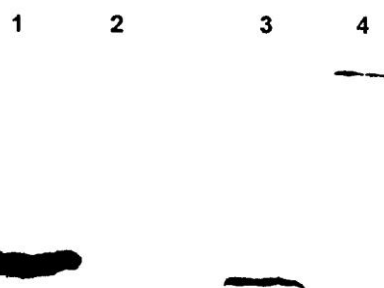


Fig. 5A

Fig. 5B

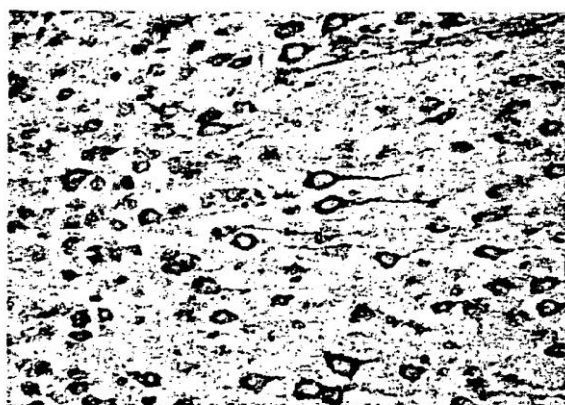


Fig. 6A

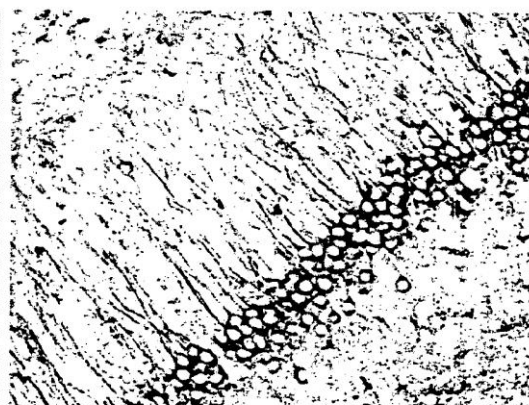


Fig. 6B

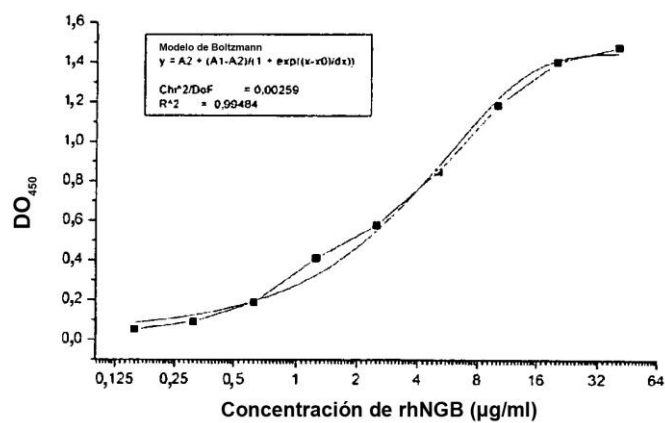


Fig. 7

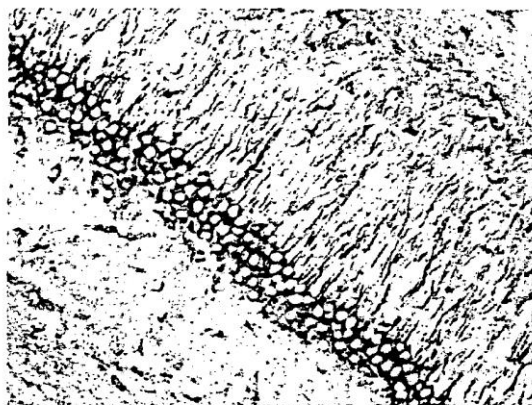


Fig. 8A



Fig. 8B

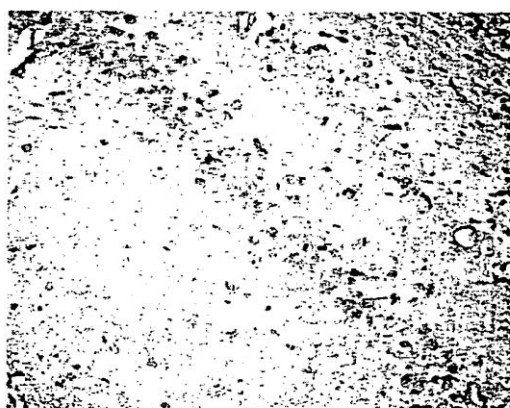


Fig. 9A

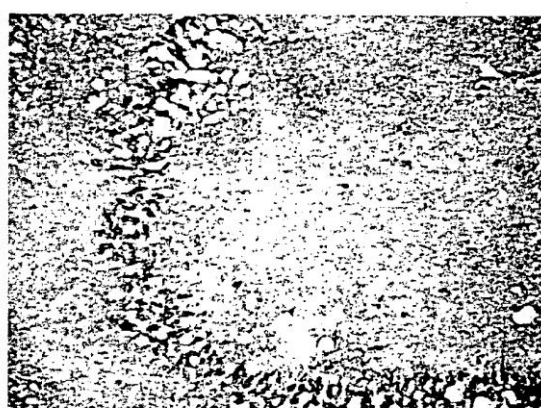


Fig. 9B

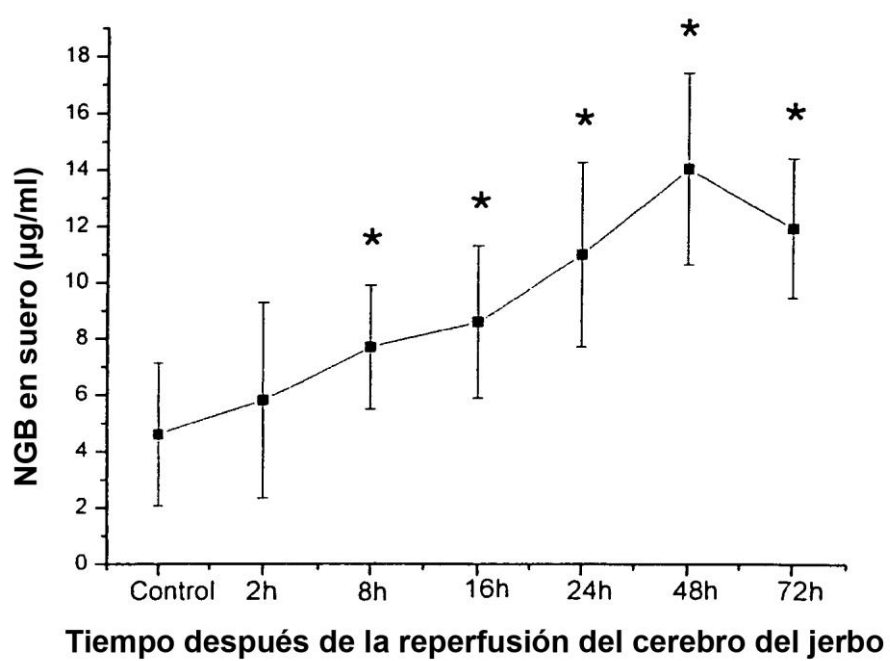


Fig. 10