Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 21:58 +0330 on Friday November 24th 2017

پژوهش درپزشکی (مجله پژوهشی دانشکده پزشکی)
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
دوره ۳۴، شماره ۲، تابستان ۱۳۸۹، صفحات ۱۲۳ تا ۱۲۷

مقاله اصلی
(Original Article)

بیــان پروتئین نوترکیب غنی از ســرین انتــامبا هیستولیتیکا

شهرام نکوئیان[۱]، دکتر علی حقیقی*[۱]، دکتر بهرام کاظمی[۲]، دکتر سیدجواد سید طبایی[۱]، نیلوفر تقی پور[۱]، دکتر سیما راستی[۳]

[۱] گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
[۲] گروه بیوتکنولوژی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و ملکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
[۳] گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان

چکیده

سابقه و هدف: *استفاده از شاخص‌های آنتی‌ژنیک انتامباهیستولیتیکا مانند آنتی‌ژن پروتئین غنی از سرین انتامباهیستولیتیکا (SREHP) جهت تهیه واکسن، بررسی تنوع ژنتیکی و تشخیص قطعی و افتراق آن از انتامبا دیسپار کاربرد بیشتری پیدا کرده است. این مطالعه با هدف بیان پروتئین نوترکیب غنی از سرین انتامبا هیستولیتیکا به منظور استفاده در کیت تشخیصی الایزا انجام شد.*

روش بررسی: *در این تحقیق که یک روش توصیفی از نوع اکتشافی است، ابتدا ژن SREHP ایزوله ایرانی که قبلاً در پلاسمید بلواسکریپت (pBSc) کلون شده بود، با استفاده از آنزیم BamHI جدا گردید و پس از تخلیص از ژل در پلاسمید بیانی pET32a کلون شد. از روش‌های غربالگری شامل روش سریع (Quick check) با استفاده از محلول Rosconis، PCR با پرایمرهای اختصاصی SREHP و pET و برش آنزیمی با آنزیم‌های BamHI و HindIII جهت تایید کلونینگ استفاده شد. ترادف نوکلئوتیدهای ژن با روش سکوئنسینگ تعیین گشت و پلاسمید نوترکیب حاوی ژن SREHP جهت تکثیر به سلول پذیرای BL21(DE3) انتقال یافت. در نهایت ازکلنی حاوی پلاسمید نوترکیب کشت انبوه تهیه شد و پروموتور ژن با IPTG القا و وجود پروتئین نوترکیب برروی ژل SDS-PAGE بررسی گردید.*

یافته‌ها: *ژن SREHP در پلاسمید بیانی pET32a ساب کلون گردید و صحت کلونینگ با روش‌های غربالگری سریع (Quick check)، PCR با پرایمر های اختصاصی SREHP و pET T7 promoter و برش آنزیمی با آنزیم های BamHI و HindIII تایید شد. ترادف نوکلئوتیدهای ژن با اندازه ۶۶۶ نوکلئوتید تعیین گشت و ژن کلون شده در پلاسمید بیانی در حضور IPTG در مدت زمان ۵ ساعت در محیط کشت ابراز شد. وجود پروتئین نوترکیب غنی از سرین انتامبا هیستولیتیکا به انضمام تیوردوکسین (Trx-Tag) موجود در pET32a با وزن ملکولی ۴۴ کیلودالتونی در کنار مارکر برروی ژل SDS-PAGE مشاهده و مورد تایید قرار گرفت.*

نتیجه‌گیری: *با توجه به کاربرد زیاد پروتئین نوترکیب غنی از سرین انتامباهیستولیتیکا در تهیه کیت‌های تشخیصی و تهیه واکسن از آن علیه تک یاخته انتامباهیستولیتیکا، در این مطالعه پروتئین سرین ریچ (SREHP) با موفقیت بیان شد.*

واژگان کلیدی: *انتامبا هیستولیتیکا، پروتئین نوترکیب غنی از سرین، SREHP.*

مقدمه

در بیشتر موارد تشخیص آمیبیازیس با مشاهده مستقیم انگل و یا لام رنگ‌آمیزی شده نمونه مدفوع توسط میکروسکوپ نوری تائید می‌شود. اما این روش دارای محدودیت‌هایی از جمله عدم افتراق کیست و تروفوزئیت سویه بیماریزای انتامبا هیستولیتیکا از سویه غیربیماریزای انتامبا دیسپار است. تکرار آزمایش مدفوع و وجود کیست‌های گونه‌های متفاوت انتامبا، آندولیماکس و یدآمبا از مشکلات دیگر استفاده از این روش است (۱). روش‌های کشت آمیب نیز اگرچه دارای حساسیت بالایی نسبت به روش های میکروسکوپی هستند اما زمان‌بر

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دکتر علی حقیقی (**e-mail:** ahaghighi@sbmu.ac.ir)
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۸/۱۱/۲۵
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۹/۵/۱۹

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 21:58 +0330 on Friday November 24th 2017

جدول ۱- پرایمرها و برنامه های PCR این مطالعه

Primer name	Primer sequence 5'to 3'	PCR program
SREHP (F)	GAGGATCCATGTTCGCATTTTTATTGT	۵ دقیقه ۹۵°c برای یک سیکل، ۱ دقیقه در ۹۵°c، ۳۰ ثانیه در ۶۰°c، ۳۰ ثانیه در ۷۲°c برای ۳۰ سیکل و ۳ دقیقه در ۷۲°c
SREHP (R)	GAGGATCCTTAGAAGATGATAGCTAT	
pET T7 promoter (F)	TAATACGACTCACTATAGGG	۵ دقیقه ۹۵°c برای یک سیکل، ۱ دقیقه در ۹۵°c، ۶۰ ثانیه در ۵۰°c، ۶۰ ثانیه در ۷۲°c برای ۳۰ سیکل و ۵ دقیقه در ۷۲°c
SREHP (R)	GAGGATCCTTAGAAGATGATAGCTAT	

بوده و مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها می‌تواند باعث ایجاد جواب‌های منفی کاذب در نتایج آن گردد. وقت‌گیر و پرهزینه بودن و پاسخ‌های منفی و مثبت کاذب نیز از محدودیت‌های روش‌های مولکولی هستند (۳،۲). راه کار جدید استفاده از منوکلونال آنتی‌بادی تهیه شده بر علیه شاخص‌های آنتی‌ژنیک انتامبا هیستولیتیکا در کیت‌های الایزا است. این کیت‌ها قادر هستند با کمک پروتئین‌های نوترکیب گالاگتوز/ گالاگتوز N استیل لکتین (GAL/GALNAC) و غنی از سرین انتامبا هیستولیتیکا (SREHP)، انگل را در مدفوع و مایعات بدن شناسایی کرده و آمیبیازیس روده‌ای و کبدی را با حساسیت و اختصاصیت بالا تشخیص دهند و از گونه مشابه ولی غیربیماریزای انتامبادیسپار افتراق دهند (۵،۴).

لذا با توجه به کاربرد پروتئین نوترکیب SREHP در تهیه واکسن، تعیین تنوع ژنتیکی ایزوله‌های مختلف انتامبا هیستولیتیکا و همین طور تهیه کیت تشخیصی به منظور تشخیص قطعی و افتراق انتامباهیستولیتیکا از انتامبا دیسپار، در این مطالعه ژن SREHP ایزوله ایرانی SHR 10 IR که قبلاً در گروه انگل شناسی و قارچ شناسی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی در پلاسمید بلواسکریپت (pBSc) کلون و پلاسمید نوترکیب (pBSc-C4) نام‌گذاری شده بود (۶)، با هدف بیان پروتئین نوترکیب به منظور استفاده در کیت تشخیصی الایزا در پلاسمید بیانی pET32a ساب‌کلون گردید و پروتئین نوترکیب آن در باکتری BL21(DE3) بیان شد.

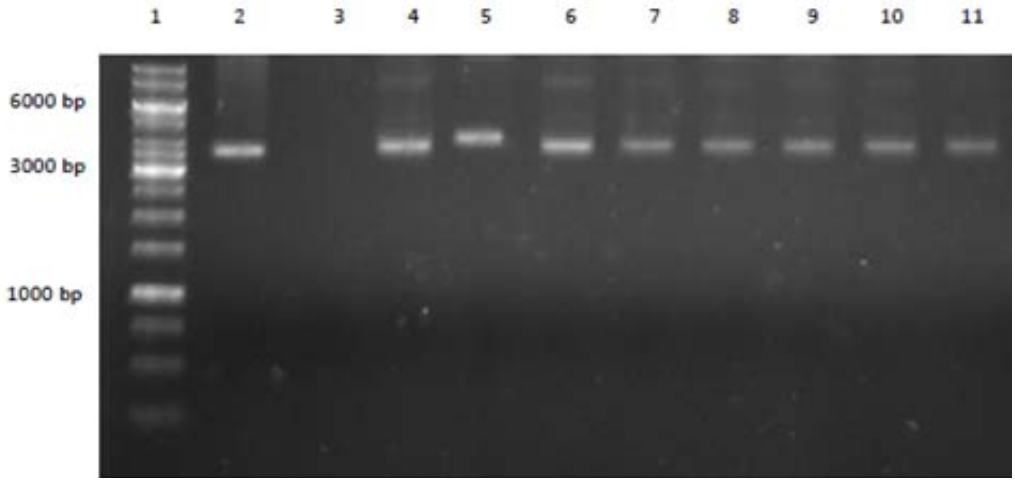
مواد و روشها

به منظور انتقال ژن غنی از سرین انتامباهیستولیتیکا در پلاسمید بیانی pET32a، در این مطالعه که یک روش توصیفی از نوع اکتشافی است، ابتدا پلاسمید نوترکیب pBSc-C4 و پلاسمید بیانی pET32a، به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تحت تاثیر آنزیم *BamH*I قرار داده شدند. دو انتهای پلاسمید pET32a خطی شده با استفاده از ۱ میکرولیتر آنزیم CIAP به مدت ۳۰ دقیقه دفسفریله شد (۷). قطعات SREHP و پلاسمید خطی شده پس از الکتروفورز در ژل ۱ درصد، با استفاده از کیت استخراج DNA شرکت فرمنتاز، استخراج و تخلیص شد. سپس ژن غنی از سرین و پلاسمید خطی در حضور آنزیم T4 DNA ligase به یکدیگر متصل شدند. مخلوط واکنش در باکتری BL21(DE3) منتقل و بر روی پلیت LB آگار حاوی ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر آمپی‌سیلین پخش شد (۸).

در غربالگری پلاسمید نوترکیب pET32a، جهت کنترل انتقال ژن به پلاسمید به روش سریع (Quick check)، کلنی بدست آمده به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۲ میکرولیتر محلول Rusconis حاوی لیزوزیم، EDTA، Tris-Cl و RNase A قرار داده شد. پس از کشت در پلیت LB آگار حاوی آمپی‌سیلین، ۲ میکرولیتر از مخلوط مساوی فنل- کلروفرم به میکروتیوپ اضافه و به مدت دو دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰دور در دقیقه سانتریفوژ و مایع رویی بروی ژل ۰/۸ درصد لود گردید (۹). پلاسمید نوترکیب با واکنش PCR به کمک پرایمرهای (F, R) SREHP و پرایمرهای (F) T7 Promoter و (R) SREHP (جدول ۱) و همین طور روش هضم آنزیمی با آنزیم‌های *BamH*I و *Hind*III تأیید شد و در نهایت صحت ژن نوترکیب با روش سکوئنسینگ تایید شد.

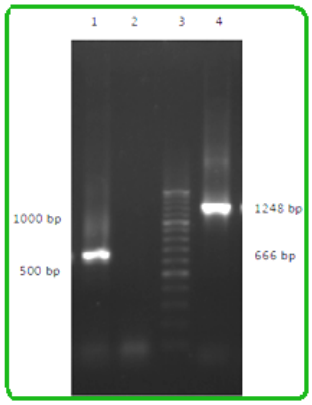
برای بیان پروتئین نوترکیب SREHP، پلاسمید نوترکیب pET32a به سلول BL21(DE3) منتقل گردید. از کلنی کشت شبانه تهیه و در ۳۷ درجه انکوبه شد و روز بعد در ۱۰ برابر محیط کشت LB آمپی سیلین دار کشت دو ساعته داده شد. در فاز لگاریتمی با $OD_{600} = 0.6$ ، مقدار 1mM IPTG به محیط کشت اضافه و مجدد در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. ۳، ۵ و ۸ ساعت پس از القاء از محیط کشت نمونه برداری انجام گرفت. برای آماده سازی نمونه جهت SDS-PAGE یک میلی‌لیتر از نمونه کشت داده شده به مدت ۲ دقیقه با سرعت g ۵۰۰۰ در دمای اطاق سانتریفوژ شد. مایع رویی حذف و به رسوب آن ۲۰۰ میکرولیتر بافر PBS اضافه شد (۹). سوسپانسیون فوق ۵ بار در ۸۰- درجه سانتی‌گراد و ۳۷ درجه سانتی‌گراد فریز و ذوب شد و پس از سونیکاسیون، به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۵۰۰۰g سانتریفوژ گشت. محلول رویی و رسوب جدا شده با

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 21:58 +0330 on Friday November 24th 2017



شکل ۱- الکتروفورز محصول کنترل سریع با محلول Rusconis کلنی های مشکوک pET32a روی ژل آگارز ۰/۸ درصد.
ستون ۱: 1kb DNA Ladder marker؛ ستون ۲: کلنی های حاوی پلاسمید pET32a؛ ستون۵: کلنی های حاوی پلاسمید نوترکیب؛ ستون ۴ و۱۱- ۶ : کلنی های حاوی پلاسمید pET32a و فاقد ژن

بافر 4X SDS مخلوط و روی ژل پلی اکریل آمید ۱۲ درصد الکتروفورز گردید (۹).

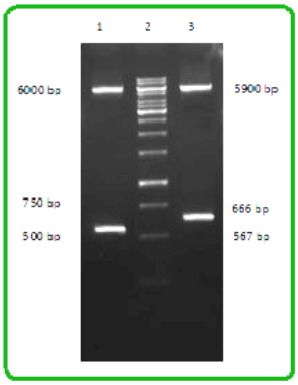


شکل ۲- الکتروفورز محصول PCR پلاسمید های نوترکیب pET32a + SREHP-C4 برروی ژل آگارز ۱ درصد.
ستون ۱: محصول PCR پلاسمیدهای نوترکیب با پرایمر SREHP (F+R) با اندازه bp ۶۶۶؛ ستون ۲: کنترل منفی ستون؛ ستون ۳: 100bp DNA Ladder؛ ستون ۴: محصول PCR کلنی پلاسمیدهای نوترکیب pET32a + SREHP-C4 با پرایمر SREHP (R) و T7 Promoter (F) با اندازه bp ۱۲۴۸

یافته‌ها

در مورد انتقال ژن SREHP در پلاسمید pET32a، ژن سرین ریچ با اندازه ۶۶۶ نوکلئوتید از پلاسمید کلون شماره ۴ با نام pBSc-C4 که قبلاً در گروه انگل شناسی و قارچ شناسی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهیه شده بود (۶)، جدا و به کمک آنزیم T4 DNA ligase درون پلاسمید pET32a که با آنزیم *BamHI* هضم شده بود، منتقل و pET32a + SREHP-C4 نامیده شد. محصول واکنش درون باکتری BL21(DE3) انتقال یافت و جهت تکثیر روی پلیت LB آگار حاوی آمپی‌سیلین پخش شد.

شکل ۱ تایید اولیه انتقال ژن سرین ریچ به پلاسمید را با روش سریع با استفاده از محلول Rusconis در کلون ستون شماره ۵ نشان می‌دهد.

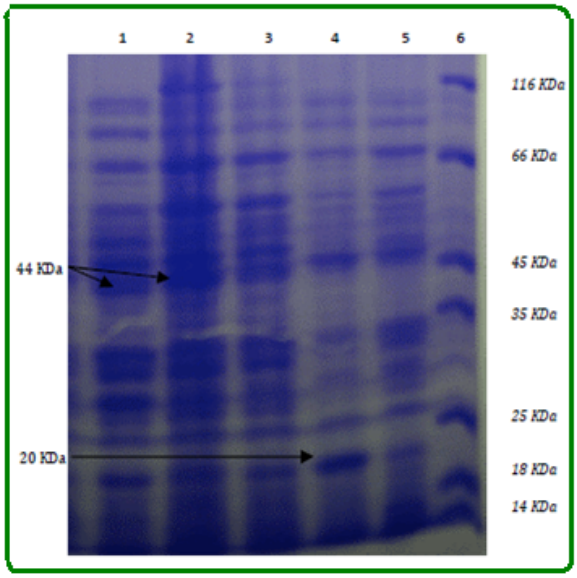


شکل ۳- الکتروفورز پلاسمیدهای نوترکیبpET32a + SREHP-C4 بعد از هضم آنزیم *BamHI* و *Hind*III بر روی ژل آگارز ۱درصد.
ستون ۱: قطعه bp ۵۶۷ جدا شده از پلاسمید نوترکیب pET32a + SREHP-C4 پس از عمل هضم آنزیمي با آنزیم *Hind*III؛ ستون ۲: DNA Ladder-marker 1kb؛ ستون ۳ : قطعه bp ۶۶۶ جدا شده از پلاسمید pET32a + SREHP-C4 پس از عمل هضم آنزیمی با آنزیم *BamHI*

برای تعیین قطعی صحت ژن کلون‌شده از روش‌های PCR و هضم آنزیمی پلاسمید با آنزیم‌های *HindIII* و *BamHI* استفاده شد. شکل ۲ الگوی الکتروفورزی محصول PCR کلون مثبت با پرایمرهای اختصاصی ژن غنی از سرین و همینطور پرایمر T7 Promoter را نشان می‌دهد. قطعات با اندازه bp ۶۶۶ و ۱۲۴۸bp به خوبی با پرایمرهای اختصاصی سرین ریچ

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 21:58 +0330 on Friday November 24th 2017

و پرایمر اختصاصی پلاسمید pET تکثیر یافت. شکل ۳ الگـوی الکتروفورزی هضـم آنزیمـی پلاسـمید pET32a حـاوی ژن را نشان مـی‌دهـد. قطعـات ۵۶۷ bp، ۶۶۶ bp و ۱۲۴۸ bp در دو روش PCR و هضم آنزیمـی، تاییـد قطعـی بـر انتقـال ژن بـه پلاسمید بیانی و جهت صحیح قرارگیری آن نسبت بـه جهـت نسخه‌برداری پروموتور است. لذا بیان صحیح پـروتئین غنـی از سرین انتامبا هیسـتولیتیکا (SREHP) در پلاسـمید نوترکیـب pET32a در کلون به دست آمده امکـان‌پـذیر اسـت و تـرادف نوکلئوتیدهای پروتئین نوترکیـب SREHP-C4 بـا انـدازه ۶۶۶ باز و وزن ملکولی حدود ۲۴ کیلو دالتون در بانک اطلاعات ژن (GenBank) با شماره AB253474 قابل دستیابی است.



شکل ۴- نتایج بیان ژن SREHP در پلاسمید نوترکیب PET32a به روش SDS-PAGE.

ستون ۱، ۲ و ۳: محلول رویی Lysate باکتری حاوی pET32a + SREHP-C4جمع آوری شده ۳، ۵ و ۸ ساعت پس از القاء و واجد پروتئین نوترکیب ۴۴ کیلودالتونی؛ ستون ۴ : Lysate باکتری های حاوی پلاسمید pET32a سالم جمع آوری شده ۵ ساعت پس از القاء با باند Trx و وزن ۲۰ کیلودالتون؛ ستون ۵ : Lysate سلول های سالم فاقد پلاسمید جمع آوری شده ۵ ساعت پس از القاء؛ ستون ۶ : مارکر وزنی پروتئینی

در مورد بیان ژن در پلاسمید نوترکیـب pET32a، نمونـه‌هـای لیزات سلول بدون پلاسمید، سلول حاوی پلاسمید فاقـد ژن و سلول حاوی پلاسمید نوترکیب (pET32a + SREHP-C4) ۳، ۵ و ۸ ساعت پس از القـاء بـا IPTG بـر روی ژل پلـی اکریـل آمید الکتروفورز شـدند (شـکل ۴). بیشـترین مقـدار بیـان در محلول رویی و در ساعت پنجم پس از القاء به دست آمـد. وزن مولکولی پروتئین SREHP همراه فیوژن پروتئین تیوردوکسین (Trx-Tag) که در پلاسمید pET32a تعبیه شـده اسـت، روی ژل پلی‌آکریل‌آمید ۱۲ درصد در حدود ۴۴ KDa می‌باشد.

بحث

آنتی‌ژن‌های سطحی تروفوزوئیت انتامبا هیسـتولیتیکا هماننـد گـالاگتوز/ گـالاگتوز N اسـتیل لکتـین (Gal/GalNAC) و پـروتئین غنـی از سـرین از عوامـل اصـلی در بـروز بیمـاری آمیبیازیس و ایجاد واکنش‌هـای سـرولوژی در انسـان هسـتند (۱۰) و در کیت‌های تشخیصی الایزا از پروتئین نوترکیب آنهـا جهـت تشـخیص آمیبیـازیس و تشـخیص افتراقـی انتامبـا هیستولیتیکا از دیگر گونه‌ها استفاده می‌گردد.

پروتئین غنی از سـرین انتامبـا هیسـتولیتیکا (SREHP) یـک پـروتئین غشـائی ایمونـوژن در سـطح تروفوزوئیـت انتامبـا هیستولیتکا است که در اتصال انگل به سلول پستانداران نقش دارد و علت نام‌گذاری آن وجود ۵۲ اسید آمینه سـرین از ۲۳۳ اسـیدآمینه آن در سـویه HM1:IMSS مـی‌باشـد (۱۱). ایـن پـروتئین دارای اپـی‌تـوپ‌هـایی اسـت کـه میـزان بـالایی از واکنش‌های مثبت سرولوژی را در بیماران مبتلا به آمیبیازیس تهاجمی ایجاد می‌کند (۱۲). تحقیقات قبلـی نشـان داده کـه حساسیت پروتئین‌های نوترکیب SREHP در تست الایزا جهت شناسـایی آمیبیـازیس حـاد مهـاجم و تشـخیص سـرولوژی آمیبیازیس در مناطق آندمیک ۹۲ درصد می‌باشد (۱۴،۱۳).

در سـال ۱۹۹۵، Stanley و همکـاران پـروتئین نوترکیـب SREHP را بدون نیاز به شـریک اتصـال (Fusion partner) در باکتوویروس در حضور 0.9 mM IPTG بیان کردند و بیشترین بیان پروتئین را در مـایع رویـی کشـت ۱۰ سـاعته بـه دسـت آوردند (۱۱).

دراین مطالعه به منظور بیـان پـروتئین نوترکیـب SREHP در بـاکتری اشرشـیاکلی از پلاسـمید بیـانی pET32a اسـتفاده گردید. وجـود تـوالی تیوردوکسـین (Trx -Tag) در Multiple Site Cloning (MSC) وکتور pET32a (۷) باعث اضافه شـدن پروتئینی در حدود ۲۰KDa بـه پـروتئین نوترکیـب SREHP مـی‌شـود. تیوردوکسـین میـزان بیـان را افـزایش و تشـخیص پروتئین نوترکیب را بر روی ژل الکتروفـورز تسـهیل مـی‌کنـد. بنابراین پس از بیان ژن، از پروتئین نوترکیب SREHP بـا وزن حـدود ۲۴ کیلودالتـون بـه انضـمام فیـوژن پـروتئین، در کـل پروتئینی با وزن مولکولی حدود ۴۴ KDa بدست آمد. هماننـد مطالعه Stanley و همکـاران (۱۵) بیشـترین میـزان پـروتئین بیان شده در مایع رویی بدست آمد. با توجه به ضرورت افتراق دو تک‌یاخته انتامباهیستولیتیکا و انتامبادیسپار و عـدم امکـان افتراق میکروسکوپی این دو گونه که یکـی بیمـاری‌زا و دومـی شایع ولی غیـر بیمـاری‌زا اسـت، همـین طوراحتمـال خطـای

روش‌های میکروسکوپی در تشخیص آمیب‌های دستگاه گوارش، مشکلات استفاده از روش‌های مولکولی نظیر گران بودن روش PCR، عدم وجود امکانات در آزمایشگاه‌های بالینی و پاسخ‌های منفی و مثبت کاذب روش‌های مولکولی (۳-۱)، تولید کیت‌های تشخیصی با استفاده از آنتی‌ژن‌های نوترکیب و منوکلونال آنتی‌بادی و کاربرد آن‌ها در روش‌های سرولوژی نظیر الایزا توصیه می‌شود (۴، ۵). بنابراین با بیان پروتئین نوترکیب SREHP در این تحقیق شرایط برای تکثیر و تولید انبوه پروتئین غنی از سرین انتامباهیستولیتیکا در آزمایشگاه و استفاده از آن در تست تشخیصی الایزا محقق شده است. با این وجود باید کارایی پروتئین تهیه شده پس از مقایسه با دیگر روش‌های ملکولی و سرولوژی ارزیابی شود.

قدردانی و تشکر

نویسندگان این مقاله از همکاری خانم‌ها دکتر فریده شهبازی، دکتر مژگان بنده‌پور، ناهید حسین‌زاده و کلیه همکاران گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی و مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی تشکر و قدردانی می‌نمایند. این مقاله برگرفته از پایان‌نامه دانشجویی مقطع کارشناسی ارشد انگل‌شناسی و طرح تحقیقاتی مصوب مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و ملکولی با شماره ۱۱۴۳ است که در گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام گرفت.

REFERENCES

1. Zulhainan H, Songsak P, Mathirut M, Saovanee L. Differential Detection of *Entamoeba histolytica, Entamoeba dispar,* and *Entamoeba moshkovskii* by a Single Round PCR Assay. J Clin Microbiol 2006; 44: 3196-200.
2. Nuran D, Gonul A, Mehmet S, Cahit B, Arzu K Detection of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in Stool Specimens by Using Enzyme-linked Immunosorbent Assay. Mem Inst Oswaldo Cruz 2004; 99: 769-72.
3. Haque R, Ali IKM, Akther S, Petri WA. Comparison of PCR, isoenzyme analysis and antigen detection for diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. J Clin Microbiol 1998; 36: 449-52.
4. Clark CG. Methods for investigation of diversity in *Entamoeba histolytica*. Arch Med Res 2006; 37: 258-61.
5. Haque R, Mollah NU, Ali IK, Pteri WA. Diagnosis of amebic liver abscess: an intestinal infection with the Tech Lab *Entamoeba histolytica* II antigen detection and antibody test. J Clin Microbiol 2000; 38: 3235-39.
6. Rasti S, Haghighi A, Kazemi B, Rezaian M. Cloning and characterization of Serine-rich *Entamoeba histolytica* protein gene from an Iranian E. histolytica isolate. Pakistan J of Biol Sci 2006; 9: 654-58.
7. Novagen Co. PET system manual handbook. 10th Edition. Darmstadt, Germany: Novagen Co.; 2001. p.37-49.
8. Sambrook J, Fritsch F, Maniatis T, Editors. Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd edition. New York: Cold Spring Harbor laboratory Press; 2001.
9. Razmjou E. Characterization of glucosephosphate isomerase gene from different zymodems of *Entamoeba histolytica* [Dissertation]. Tehran: Tehran University of Medical Sciences; 2005.
10. Gilchrist CA. Virulance factor of *Entamoeba histolytica*. Curr Opin Microbiol 1999; 2: 433-37.
11. Stanley SL, Tian K, Koester JP, Li E. The serine rich *Entamoeba histolytica* protein is a phosphorylated membrane protein containing O-linked terminal N-acetylglucosamine residues. J Bio Chemistry 1995; 270: 4121-26.
12. Li E, Kunz- Jenkins C, Stanley SL. Isolation and characterization of genomic encoding a serine rich *Entamoeba histolytica* protein. Mol Bioch Parasitol 1992; 50: 355-58.
13. Stanley SL, Jackson TF. Serodiagnosis of invasive amebiasis using a recombinant *Entamoeba histolytica* protein. JAMA 1991; 266: 1984-86.
14. Myung K, Burch D, Jackson F, Stanley SL. Serodiagnosis of invasive amebiasis using recombinant *Entamoeba histolytica* antigen-based ELISA. Arch Med Res 1992; 23: 258-85.

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 21:58 +0330 on Friday November 24th 2017