

بیان پروتئین نوترکیب غنی از سرین انتامبا 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 پلاسמיד بلواسکریپت (pBSc) کلون شده بود، با استفاده از آنزیم BamHI جدا گردید و پس از تخلیص از ژل در پلاسמיד 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 سکونسینگ تعیین گشت و پلاسמיד نوترکیب حاوی ژن SREHP جهت تکثیر به سلول پذیرای BL21(DE3) انتقال یافت. در نهایت از کلنی حاوی پلاسמיד نوترکیب کشت انبوه تهیه شد و پروموتور ژن با IPTG/لقا و وجود پروتئین نوترکیب بر روی ژل SDS-PAGE بررسی گردید.

یافته‌ها: ژن SREHP در پلاسמיד بیانی pET32a ساب کلون گردید و صحت کلونینگ با روش‌های غربالگری سریع (Quick check)، PCR با پرایمرهای اختصاصی SREHP و pET T7 promoter و برش آنزیمی با آنزیم‌های BamHI و HindIII تایید شد. ترادف نوکلئوتیدهای ژن با اندازه ۶۶۶ نوکلئوتید تعیین گشت و ژن کلون شده در پلاسמיד 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 بر روی 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 تأیید می‌شود. اما این روش دارای محدودیت‌هایی از جمله عدم افتراق کیست و تروفوزیست سویه بیمار برای انتامبا هیستولیتیکا از سویه غیربیماری انتامبا دیسپار است. تکرار آزمایش مدفوع و وجود کیست‌های گونه‌های متفاوت انتامبا، آندولیماکس و یدامبا از مشکلات دیگر استفاده از این روش است (۱). روش‌های کشت آمیب نیز اگرچه دارای حساسیت بالایی نسبت به روش‌های 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

جدول ۱- پرایمرها و برنامه های PCR این مطالعه

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

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 میلی گرم در میلی لیتر آمپی سیلین پخش شد (۸).

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

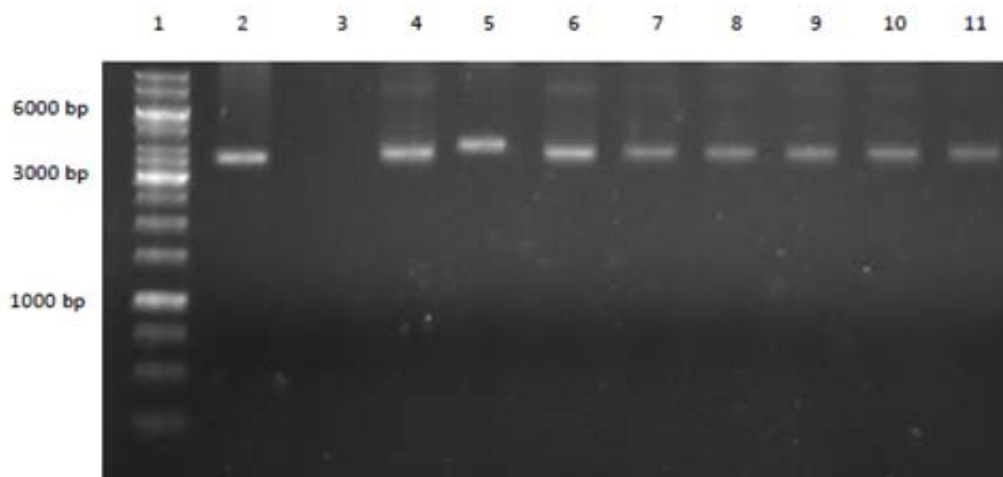
برای بیان پروتئین نو ترکیب SREHP، پلاسمید نو ترکیب pET32a به سلول BL21(DE3) منتقل گردید. از کلنی کشت شنبه تهیه و در ۳۷ درجه انکوبه شد و روز بعد در ۱۰ برابر محیط کشت LB آمپی سیلین دار کشت دو ساعته داده شد. در فاز لگاریتمی با $OD_{600} = 0.6$ ، مقدار IPTG 1mM به محیط کشت اضافه و مجدد در ۳۷ درجه سانتی گراد 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 میلی لیتر از نمونه کشت داده شده به مدت ۲ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ g در دمای اطلاق سانتریفوژ شد. مایع رویی حذف و به رسوب آن ۲۰۰ میکرو لیتر بافر PBS اضافه شد (۹). سوسپانسیون فوق ۵ بار در ۸۰- درجه سانتی گراد و ۳۷ درجه سانتی گراد فریز و ذوب شد و پس از سونیکاسیون، به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد با سرعت ۵۰۰۰ g سانتریفوژ گشت. محلول رویی و رسوب جدا شده با

بوده و مصرف آنتی بیوتیک ها می تواند باعث ایجاد جواب های منفی کاذب در نتایج آن گردد. وقت گیر و پرهزینه بودن و پاسخ های منفی و مثبت کاذب نیز از محدودیت های روش های مولکولی هستند (۳، ۲). راه کار جدید استفاده از منوکلونال آنتی بادی تهیه شده بر علیه شاخص های آنتی ژنیک انتامبا هیستولیتیکا در کیت های الیزا است. این کیت ها قادر هستند با کمک پروتئین های نو ترکیب گالاکتوز/ گالاکتوز N استیل لکتین (GAL/GALNAC) و غنی از سرین انتامبا هیستولیتیکا (SREHP)، انگل را در مدفوع و مایعات بدن شناسایی کرده و آمیبیازیس روده ای و کبدی را با حساسیت و اختصاصیت بالا تشخیص دهند و از گونه مشابه ولی غیر بیماریزای انتامبا دیسپار افتراق دهند (۵، ۴).

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

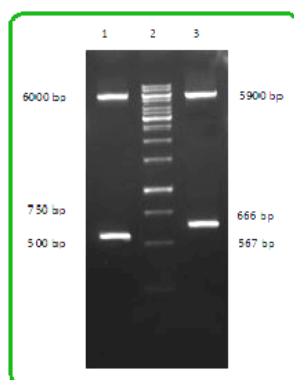
مواد و روشها

به منظور انتقال ژن غنی از سرین انتامبا هیستولیتیکا به پلاسمید بیانی pET32a در این مطالعه که یک روش توصیفی از نوع اکتشافی است، ابتدا پلاسمید نو ترکیب pBSc-C4 و پلاسمید بیانی pET32a، به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد تحت تاثیر آنزیم *Bam*HI قرار داده شدند. دو انتهای پلاسمید pET32a خطی شده با استفاده از ۱ میکرو لیتر آنزیم CIAP به مدت ۳۰ دقیقه دفسفریله شد (۷). قطعات SREHP و پلاسمید خطی شده پس از الکتروفرورز در



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؛ ستون ۵: کلنی های حاوی پلاسمید نوترکیب؛ ستون ۴ و ۱۱-۶: کلنی های حاوی پلاسمید pET32a و فاقد ژن

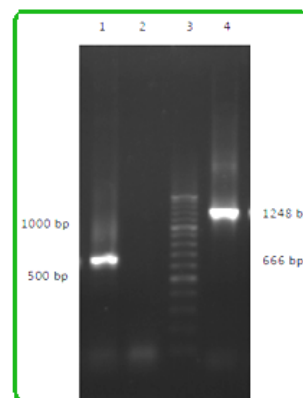
با فر 4X SDS مخلوط و روی ژل پلی اکریل آمید ۱۲ درصد الکتروفورز گردید (۹).
BL21(DE3) انتقال یافت و جهت تکثیر روی پلیت LB آگار حاوی آمپی سیلین پخش شد.
شکل ۱ تایید اولیه انتقال ژن سرین ریج به پلاسمید را با روش سریع با استفاده از محلول Rusconis در کلون ستون شماره ۵ نشان می دهد.



شکل ۲- الکتروفورز محصول PCR پلاسمید های نوترکیب pET32a + SREHP-C4 بر روی ژل آگارز ۱ درصد. ستون ۱: قطعه ۵۶۷ bp جدا شده از پلاسمید نوترکیب pET32a + SREHP-C4 پس از عمل هضم آنزیمی با آنزیم HindIII؛ ستون ۲: DNA Ladder-marker؛ ستون ۳: قطعه ۶۶۶ bp جدا شده از پلاسمید pET32a + SREHP-C4 پس از عمل هضم آنزیمی با آنزیم BamHI

برای تعیین قطعی صحت ژن کلون شده از روش های PCR و هضم آنزیمی پلاسمید با آنزیم های 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 می دهد. قطعات با اندازه ۶۶۶ و ۱۲۴۸ bp به خوبی با پرایمرهای اختصاصی سرین ریج

شکل ۲- الکتروفورز محصول PCR پلاسمید های نوترکیب pET32a + SREHP-C4 بر روی ژل آگارز ۱ درصد.



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

یافته ها

در مورد انتقال ژن SREHP در پلاسمید pET32a، ژن سرین ریج 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

بحث

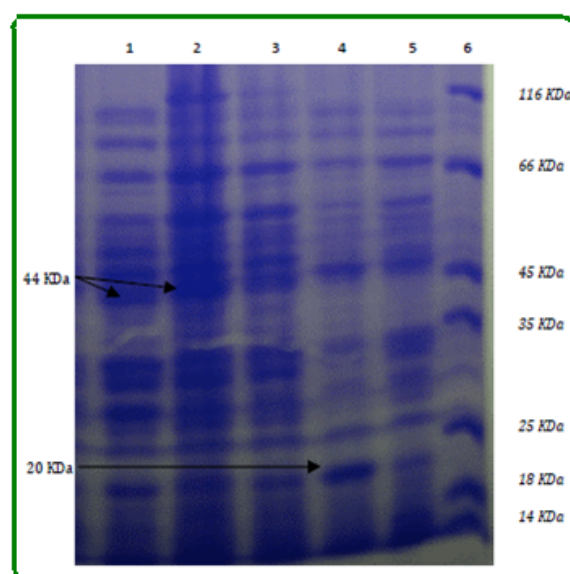
آنتی‌ژن‌های سطحی تروفوزوئیت انتامبا هیستولیتیکا همانند گالاکتوز/ گالاکتوز N استیل لکتین (Gal/GalNAC) و پروتئین غنی از سرین از عوامل اصلی در بروز بیماری آمیبیازیس و ایجاد واکنش‌های سرولوژی در انسان هستند (۱۰) و در کیت‌های تشخیصی الایزا از پروتئین نوترکیب آنها جهت تشخیص آمیبیازیس و تشخیص افتراقی انتامبا هیستولیتیکا از دیگر گونه‌ها استفاده می‌گردد.

پروتئین غنی از سرین انتامبا هیستولیتیکا (SREHP) یک پروتئین غشائی ایمونوژن در سطح تروفوزوئیت انتامبا هیستولیتیکا است که در اتصال انگل به سلول پستانداران نقش دارد و علت نام‌گذاری آن وجود ۵۲ اسید آمینه سرین از ۲۳۳ اسید آمینه آن در سویه HM1:IMSS می‌باشد (۱۱). این پروتئین دارای اپی‌توپ‌هایی است که میزان بالایی از واکنش‌های مثبت سرولوژی را در بیماران مبتلا به آمیبیازیس تهاجمی ایجاد می‌کند (۱۲). تحقیقات قبلی نشان داده که حساسیت پروتئین‌های نوترکیب SREHP در تست الایزا جهت شناسایی آمیبیازیس حاد مهاجم و تشخیص سرولوژی آمیبیازیس در مناطق آندمیک ۹۲ درصد می‌باشد (۱۳، ۱۴).

در سال ۱۹۹۵، Stanley و همکاران پروتئین نوترکیب SREHP را بدون نیاز به شریک اتصال (Fusion partner) در باکتروپروس در حضور ۰.۹ mM IPTG بیان کردند و بیشترین بیان پروتئین را در مایع رویی کشت ۱۰ ساعته به دست آوردند (۱۱).

در این مطالعه به منظور بیان پروتئین نوترکیب SREHP در باکتری اشرشیاکلی از پلاسمید بیانی pET32a استفاده گردید. وجود توالی تیوردوکسین (Trx-Tag) در Multiple Site Cloning (MSC) وکتور pET32a باعث اضافه شدن پروتئینی در حدود ۲۰ KDa به پروتئین نوترکیب SREHP می‌شود. تیوردوکسین میزان بیان را افزایش و تشخیص پروتئین نوترکیب را بر روی ژل الکتروفورز تسهیل می‌کند. بنابراین پس از بیان ژن، از پروتئین نوترکیب SREHP با وزن حدود ۲۴ کیلوالتون به انضمام فیوژن پروتئین، در کل پروتئینی با وزن مولکولی حدود ۴۴ KDa بدست آمد. همانند مطالعه Stanley و همکاران (۱۵) بیشترین میزان پروتئین بیان شده در مایع رویی بدست آمد. با توجه به ضرورت افتراق دو تک‌یاخته انتامبا هیستولیتیکا و انتامبا دیسپار و عدم امکان افتراق میکروسکوپی این دو گونه که یکی بیماری‌زا و دومی شایع ولی غیر بیماری‌زا است، همین طور احتمال خطای

و پرایمر اختصاصی پلاسمید pET تکثیر یافت. شکل ۳ الگوی الکتروفورزی هضم آنزیمی پلاسمید pET32a حاوی ژن را نشان می‌دهد. قطعات ۵۶۷ bp و ۶۶۶ bp و ۱۲۴۸ bp در دو روش PCR و هضم آنزیمی، تایید قطعی بر انتقال ژن به پلاسمید بیانی و جهت صحیح قرارگیری آن نسبت به جهت نسخه‌برداری پروموتور است. لذا بیان صحیح پروتئین غنی از سرین انتامبا هیستولیتیکا (SREHP) در پلاسمید نوترکیب pET32a در کلون به دست آمده امکان‌پذیر است و مترادف نوکلئوتیدهای پروتئین نوترکیب SREHP-C4 با اندازه ۶۶۶ باز و وزن مولکولی 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-C4 جمع‌آوری شده ۳، ۵ و ۸ ساعت پس از القاء و واجد پروتئین نوترکیب ۴۴ کیلوالتونی؛ ستون ۴: Lysate باکتری‌های حاوی پلاسمید pET32a سالم جمع‌آوری شده ۵ ساعت پس از القاء با باند Trx و وزن ۲۰ کیلوالتون؛ ستون ۵: Lysate سلول‌های سالم فاقد پلاسمید جمع‌آوری شده ۵ ساعت پس از القاء؛ ستون ۶: مارکر وزنی پروتئینی

در مورد بیان ژن در پلاسمید نوترکیب pET32a، نمونه‌های لیزات سلول بدون پلاسمید، سلول حاوی پلاسمید فاقد ژن و سلول حاوی پلاسمید نوترکیب (pET32a + SREHP-C4) ۳، ۵ و ۸ ساعت پس از القاء با IPTG بر روی ژل پلی‌اکریل آمید الکتروفورز شدند (شکل ۴). بیشترین مقدار بیان در محلول رویی و در ساعت پنجم پس از القاء به دست آمد. وزن مولکولی پروتئین SREHP همراه فیوژن پروتئین تیوردوکسین (Trx-Tag) که در پلاسمید pET32a تعبیه شده است، روی ژل پلی‌اکریل‌آمید ۱۲ درصد در حدود ۴۴ KDa می‌باشد.

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 مولکولی با شماره ۱۱۴۳ است که در گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام گرفت.

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 مولکولی و سرولوژی ارزیابی شود.

REFERENCES

1. Zuhlainan H, Songsak P, Mathirut M, Saovane 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 zymodemes of *Entamoeba histolytica* [Dissertation]. Tehran: Tehran University of Medical Sciences; 2005.
10. Gilchrist CA. Virulence 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.