



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



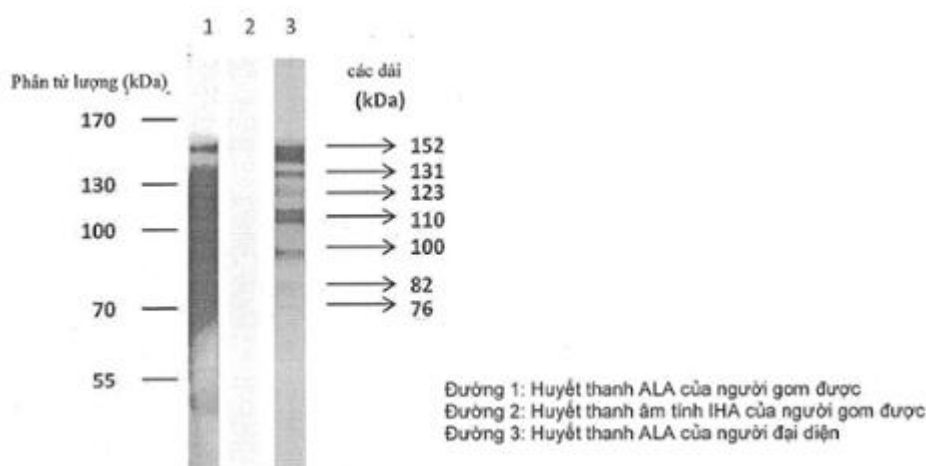
1-0033872

(51)⁷ G01N 33/569; A61P 33/02; G01N 33/53; (13) B
A61K 39/00; C12Q 1/04

- (21) 1-2014-00331 (22) 20/07/2011
(86) PCT/MY2011/000172 20/07/2011 (87) WO2013/006024 10/01/2013
(30) PI 2011003202 07/07/2011 MY
(45) 25/11/2022 416 (43) 25/04/2014 313A
(73) UNIVERSITI SAINS MALAYSIA (MY)
11800, USM, Pulau Pinang, Malaysia
(72) Rahmah Binti NOORDIN (MY); Boon Huat LIM (MY); Zeehaida MOHAMED
(MY); Nurulhasanah OTHMAN (MY); Weng Kin WONG (MY); Zi Ning TAN
(MY).
(74) Công ty cổ phần tư vấn Trung Thực (TRUNG THUC.,JSC)

(54) PHƯƠNG PHÁP *IN VITRO* PHÁT HIỆN PROTEIN CỦA ENTAMOEBA
HISTOLYTICA, CHẤT CHỈ ĐIỂM SINH HỌC Ở HUYẾT THANH, KIT VÀ TÁC
NHÂN LIÊN KẾT ĐẶC HIỆU VỚI PROTEIN CỦA ENTAMOEBA
HISTOLYTICA

(57) Sáng chế đề xuất phương pháp *in vitro* để phát hiện sự có mặt của ít nhất là một protein của *E. histolytica*, đoạn, biến thể hoặc thể đột biến của nó trong mẫu huyết thanh lấy từ đối tượng. Ngoài ra, sáng chế còn đề xuất chất chỉ điểm sinh học ở huyết thanh, kit và tác nhân liên kết đặc hiệu với ít nhất là một protein của *E. histolytica*.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp phát hiện protein của *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*) trên mẫu xét nghiệm.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Entamoeba histolytica (*E. histolytica*) là vật ký sinh đơn bào, mà là nguyên nhân của bệnh do amip gây ra ngoài đường ruột, mà biểu hiện như bệnh áp xe gan do amip (amoebic liver abscess - ALA). *E. histolytica* gây ra tỷ lệ bệnh tật và tử vong cao ở người, đặc biệt ở các nước đang phát triển. Ví dụ, *E. histolytica* ảnh hưởng đến khoảng 480 triệu người mỗi năm; khoảng 10 phần trăm số người này phát triển bệnh viêm ruột kết, ALA, hoặc các triệu chứng bệnh lý khác. Tổ chức Y tế Thế giới (World Health Organization - WHO) đã thông báo rằng trong năm 1997, bệnh do amip gây ra đứng thứ hai trong số các nguyên nhân gây tử vong trên toàn thế giới so với các bệnh ký sinh khác.

Vào năm 2005, một nghiên cứu đã được thực hiện ở Malayxia cho thấy rằng khoảng 72,4% trong số 58 ca áp xe gan nhập viện Hospital Universiti Sains Malaysia (HUSM) trong vòng ba năm được chẩn đoán bệnh ALA nhờ áp dụng thử nghiệm phát hiện kháng thể (Zeehaida và các đồng tác giả, 2008). Trong năm 2009, bằng cách sử dụng kỹ thuật trên cơ sở ADN, 76,7% trong số 30 ca áp xe gan ở HUSM được thấy là dương tính với ADN của *E. histolytica* trong mẫu lấy từ các mẫu hút ra từ gan (Othman và các đồng tác giả, 2010). Để phòng ngừa các biến chứng do ALA gây ra, việc chẩn đoán sớm và chính xác về ALA là quan trọng.

Việc chẩn đoán nhiễm *E. histolytica* thường là khó. Bệnh lý do amip gây ra bởi *E. histolytica* dễ bị nhầm lẫn với sự thực bào hồng cầu đơn nhân to và sự thực bào hồng cầu gây ra bởi *Entamoeba coli*. Các thử nghiệm chẩn đoán sớm bao gồm việc soi kính hiển vi và nuôi cấy.

Phát hiện kháng thể là phương pháp khác mà có thể được áp dụng để phát hiện các kháng thể của *E. histolytica* trong các mẫu huyết thanh. Tuy nhiên, phương pháp này chỉ có thể là hữu dụng ở các vùng không mang tính địa phương vì các thử nghiệm hiện có sử dụng phức hỗn hợp gồm các protein của *E. histolytica* tự nhiên và thường không thể phân biệt sự nhiễm hiện tại và sự nhiễm trước đó nếu được dùng ở các vùng mang tính địa phương (Zengzhu và các đồng tác giả, 1999). Ở Kelantan, khi mức độ địa phương chưa rõ, thì việc dịch kết quả của các thử nghiệm hiện có thường khó khăn do mức độ huyết thanh dương tính nền cao đặc biệt nếu chuẩn độ kháng thể là thấp (Zeehaida và các đồng tác giả, 2008). Tính huyết thanh dương tính có thể còn dai dẳng nhiều năm, vì vậy tạo ra nền cao do đối tượng khỏe mạnh cho kết quả dương tính. Vì vậy, không thể thu được các kết quả mang tính quyết định đối với các vùng mang tính địa phương bằng cách áp dụng các thử nghiệm hiện có này.

Mặc dù các kỹ thuật trên cơ sở ADN như PCR thời gian thực đã được áp dụng để phát hiện ADN của *E. histolytica* trong mủ hút ra với độ nhạy và mức đặc hiệu cao, chi phí để thực hiện kỹ thuật này là khá cao và chỉ có thể được thực hiện trong các phòng thí nghiệm chuẩn nơi sẵn có thiết bị chuyên dụng và nhân lực đã được đào tạo. Ngoài ra, việc hút mủ là quy trình mang tính xâm lấn, và không thích hợp để được thực hiện đối với tất cả các bệnh nhân bị nghi mắc bệnh.

Phương pháp chẩn đoán khác bao gồm việc phát hiện lectin tìm thấy trên bề mặt của *E. histolytica* và *E. dispar trophozoites*. Việc làm nhiễm tế bào bằng *Entamoeba* bao gồm việc liên kết lectin này với các gốc Gal/GalNAc trên bề mặt của tế bào đích. Lectin, có phân tử lượng 260kDa, bao gồm hai cấu trúc siêu phân tử 170kDa và 35kDa. Đã thấy rằng các thử nghiệm chẩn đoán mà sử dụng các kháng thể đơn dòng xuất hiện đối với kháng nguyên 170kDa tự nhiên đã được làm sạch có vấn đề với các kết quả dương tính nhầm. Các kháng thể đơn dòng đối với dạng cấu trúc siêu phân tử 170kDa đã được tạo ra theo phương pháp tái tổ hợp và việc sử dụng các kháng thể để phát hiện kháng nguyên 170kDa thu được trong quá trình thực hiện thử nghiệm miễn dịch hiện có, kit TechLab *Entamoeba histolytica* II, để phát hiện *E. histolytica*. Thử nghiệm miễn dịch thứ hai hiện có, Alexon "ProSpecT *Entamoeba histolytica* Microplate Assay", còn phát hiện cả các chủng *Entamoeba* gây bệnh và các chủng *Entamoeba* không gây bệnh, thông qua việc sử dụng kháng huyết thanh đa dòng của thỏ. Việc so sánh hai thử

thử nghiệm này với phương pháp PCR và/hoặc phương pháp nuôi cấy cho thấy rằng thử nghiệm Alexon chỉ có độ nhạy 55% và mức tương quan 66%, trong khi thử nghiệm TechLab có độ nhạy 100% và mức tương quan 84%. Tuy nhiên, cả hai thử nghiệm này đều không thể phân biệt giữa các chủng gây bệnh và các chủng không gây bệnh.

Ngoài ra, việc phát hiện bệnh do amip gây ra ở ruột từ các mẫu phân bằng cách sử dụng thử nghiệm hiện có để chẩn đoán ALA, cho thấy rằng độ nhạy thay đổi nằm trong khoảng từ <40% đến 100%, tùy theo việc điều trị đã được bắt đầu hay chưa (Fotedar và các đồng tác giả, 2007). Một nghiên cứu gần đây cho thấy rằng kit TechLab Entamoeba histolytica II, là ví dụ về thử nghiệm phát hiện kháng nguyên, là không nhạy để phát hiện các kháng nguyên *E. histolytica* trong các mẫu huyết thanh của các bệnh nhân mắc bệnh ALA tại Hospital Universiti Sains Malaysia (Zeehaida và các đồng tác giả, 2008).

Do đó, cần có các thử nghiệm nhạy và đáng tin cậy để phát hiện nhiễm *E. histolytica* trong mẫu lâm sàng.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Phạm vi của sáng chế được xác định trong các điểm yêu cầu bảo hộ độc lập kèm theo. Một số dấu hiệu tùy ý của sáng chế được xác định trong các điểm yêu cầu bảo hộ phụ thuộc đi kèm.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất phương pháp phát hiện ít nhất là một protein của *E. histolytica*, đoạn, biến thể hoặc thể đột biến của nó và/hoặc kháng thể mà liên kết đặc hiệu với protein của *E. histolytica*, đoạn, biến thể hoặc thể đột biến của nó trong mẫu huyết thanh của đối tượng. Sự có mặt của protein này, đoạn, biến thể hoặc thể đột biến của nó và/hoặc kháng thể mà liên kết đặc hiệu với protein này, đoạn, biến thể hoặc thể đột biến của nó trong mẫu huyết thanh có thể là dấu hiệu chỉ báo về việc đối tượng bị nhiễm hoặc có nguy cơ bị nhiễm *E. histolytica*.

Cụ thể, sáng chế đề xuất phương pháp chẩn đoán ít nhất là một đối tượng bị nhiễm hoặc có nguy cơ bị nhiễm *E. histolytica*, phương pháp này bao gồm việc phát hiện sự có mặt của ít nhất là một protein của *E. histolytica*, đoạn, biến thể hoặc thể đột biến của nó trong mẫu huyết thanh của đối tượng, trong đó sự có mặt của protein này,

đoạn, biến thể hoặc thể đột biến của nó là dấu hiệu chỉ báo về việc đối tượng bị nhiễm hoặc có nguy cơ bị nhiễm *E. histolytica*. Cụ thể, phương pháp có thể là *in vitro* hoặc *in vivo*.

Protein có thể được chọn từ nhóm bao gồm pyruvat phosphat đikinaza, phosphoglucomutaza, pyruvat:ferredoxin oxidoreductaza, protein họ phosphoglucomutaza/ phosphomanomutaza, protein lặp lại giàu leuxin thuộc họ BspA, và protein thuộc họ Cullin.

Protein có thể có phân tử lượng 42kDa, 70kDa, 79kDa, hoặc 110kDa.

Theo các khía cạnh khác, sáng chế đề xuất các chất chỉ điểm ở huyết thanh, kit, vắc xin, tác nhân, sử dụng và/hoặc các phương pháp điều trị bệnh nhiễm *E. histolytica* chứa các protein của *E. histolytica* và/hoặc các kháng thể của nó.

Như sẽ được thấy rõ từ phần mô tả dưới đây, các phương án được ưu tiên theo sáng chế cho phép sử dụng tối ưu các protein của *E. histolytica* trong phương pháp chẩn đoán bệnh nhiễm *E. histolytica* và/hoặc các bệnh có liên quan từ huyết thanh của đối tượng để khai thác ưu điểm của tính đặc hiệu, tính nhạy, và tính đơn giản của phương pháp này. Các ưu điểm này và các ưu điểm có liên quan khác là rõ ràng đối với chuyên gia từ phần mô tả chi tiết dưới đây.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Phương pháp phát hiện các protein của *E. histolytica* trong huyết thanh của đối tượng theo các phương án được ưu tiên sẽ được mô tả để làm ví dụ có đưa vào các hình vẽ kèm theo, trong đó:

Hình 1 là ảnh chụp gel của thẩm tách Western đã được thực hiện để thể hiện biên dạng đại diện cho chế phẩm của kháng nguyên tiết-kích thích tiết (excretory-secretory antigen - ESA) thu được từ dịch nuôi cấy *E. histolytica* phát hiện được bằng các mẫu huyết thanh lấy từ các bệnh nhân mắc bệnh ALA và huyết thanh đối chứng.

Hình 2 là ảnh chụp gel của thẩm tách Western được thực hiện để thể hiện biên dạng đại diện cho chế phẩm kháng nguyên hòa tan thô (crude soluble antigen - CSA)

thu được từ dịch nuôi cấy *E.histolytica* phát hiện được bằng các mẫu huyết thanh lấy từ các bệnh nhân mắc bệnh ALA và huyết thanh đối chứng.

Hình 3 là kết quả MS/MS đối với protein ESA 110kDa. Hình 3A là kết quả tra cứu Mascot từ công cụ tra cứu cơ sở dữ liệu Matrix Science (Matrix Science database - MSDB); Hình 3B là các báo cáo tóm tắt về peptit từ công cụ tra cứu MSDB; và Hình 3C là các quan sát về protein từ công cụ tra cứu MSDB.

Hình 4 là việc xác định CSA 70kDa theo MS-MS. Hình 4A sơ đồ xác định CSA 70kDa lần đầu tiên có thể theo MS-MS; Hình 4B là sơ đồ xác định CSA 70kDa lần thứ hai có thể theo MS-MS; Hình 4C là sơ đồ xác định CSA 70kDa lần thứ ba có thể theo MS-MS.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các tài liệu tham khảo dưới dạng thư mục nêu trong bản mô tả sáng chế được liệt kê ở dạng danh mục gồm các tài liệu được trích dẫn và được bổ sung vào cuối phần Ví dụ thực hiện sáng chế. Toàn bộ nội dung của các tài liệu được trích dẫn dưới dạng thư mục này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Định nghĩa

Để thuận tiện, các thuật ngữ nhất định được dùng trong bản mô tả này, các ví dụ và các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo được tập trung ở đây.

Thuật ngữ "tác nhân" được dùng trong bản mô tả này để chỉ chất mà làm giảm hoặc loại bỏ sự biểu hiện của protein bất kỳ trong số các protein của *E. histolytica*. Ví dụ, tác nhân theo khía cạnh bất kỳ của sáng chế có thể có khả năng làm giảm mức độ biểu hiện của ít nhất pyruvat phosphat đikinaza, phosphoglucomutaza, pyruvat:ferredoxin oxidoreductaza, protein họ phosphoglucomutaza/phosphomanomutaza, protein lặp lại giàu leuxin thuộc họ BspA, và/hoặc protein thuộc họ Cullin trong tế bào. Các ví dụ về tác nhân bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các phân tử đối nghĩa, các kháng thể hoặc các đoạn kháng thể, các protein hoặc các polypeptit cũng như các phân tử nhỏ và các tác nhân tương tự.

Thuật ngữ "bệnh do amip gây ra" được dùng trong bản mô tả này để chỉ bệnh do *E. histolytica* gây ra. Thuật ngữ "bệnh do amip gây ra" được dùng thay thế nhau với

thuật ngữ "bệnh ly amip". Các triệu chứng thường là vừa phải và có thể bao gồm phân lỏng, đau dạ dày, và chứng co cứng cơ dạ dày. Bệnh ly amip là thể nặng của bệnh do amip kèm theo bệnh đau dạ dày, phân có máu, và sốt. Đôi khi, *E. histolytica* xâm nhập vào gan và gây áp xe. Hiếm hơn, nó lan tràn đến phần khác của cơ thể, như phổi hoặc não.

Thuật ngữ "kháng thể" được dùng trong bản mô tả này để chỉ globulin miễn dịch bất kỳ hoặc phân tử nguyên vẹn cũng như các đoạn của chúng, mà liên kết với biểu vi đặc hiệu. Các kháng thể này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, kháng thể đa dòng, kháng thể đơn dòng, kháng thể thể khảm, kháng thể được làm giống như của người, mạch đơn, Fab, Fab', các đoạn F(ab)' và/hoặc phần F(v) của toàn bộ kháng thể. Ví dụ, trong phương pháp chẩn đoán theo khía cạnh bất kỳ của sáng chế, kháng thể mà có thể có khả năng liên kết đặc hiệu với ít nhất là một protein của *E. histolytica* mà có thể được tìm thấy ở huyết thanh của đối tượng có thể được phát hiện để chẩn đoán bệnh nhiễm *E. histolytica* và/hoặc các bệnh có liên quan.

Thuật ngữ "đoạn kháng thể" được dùng trong bản mô tả này để chỉ phần trình tự không đầy đủ hoặc phân phân lập được của trình tự đầy đủ của kháng thể mà giữ được chức năng liên kết kháng nguyên của kháng thể gốc. Các ví dụ về các đoạn kháng thể bao gồm đoạn Fab, đoạn Fab', đoạn F(ab')₂, và đoạn Fv; các nhị thể; các kháng thể mạch thẳng; các phân tử kháng thể chuỗi đơn; và các kháng thể đa đặc hiệu được tạo ra từ các đoạn kháng thể. Các đoạn chứa các kháng thể theo khía cạnh bất kỳ của sáng chế được bao hàm trong sáng chế chừng nào chúng duy trì được ái lực mong muốn của kháng thể có chiều dài đầy đủ. Cụ thể, nó có thể ngắn hơn ít nhất là một axit amin.

Các thuật ngữ "chất chỉ điểm sinh học" hoặc "chất chỉ điểm" được dùng trong bản mô tả này để chỉ chất chỉ điểm bất kỳ dùng để chẩn đoán như chất chỉ điểm sinh hóa, chất chỉ điểm huyết học, chất chỉ điểm di truyền, hoặc tính chất lâm sàng hoặc siêu âm khác mà có thể được dùng để phân loại mẫu lấy từ cá thể là mẫu của đối tượng nhiễm *E. histolytica*. Cụ thể, chất chỉ điểm sinh học có thể là chất chỉ điểm sinh học ở huyết thanh, nếu chất chỉ điểm có thể được tìm thấy ở huyết thanh, huyết tương hoặc máu của cá thể. Các ví dụ không giới hạn phạm vi của sáng chế về các chất chỉ điểm dùng để chẩn đoán thích hợp để sử dụng theo sáng chế là pyruvat phosphat đikinaza, phosphoglucomutaza, pyruvat:ferredoxin oxidoreductaza, protein họ

phosphoglucomutaza/phosphomanomutaza, protein lắp lại giàu leuxin thuộc họ BspA, protein thuộc họ Cullin và kể cả các ARN thông tin hoặc ADN của các protein này.

Thuật ngữ "chứa" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là khi các cấu tử, các thành phần, hoặc các bước, có thể cùng được dùng để thực hiện sáng chế. Do đó, thuật ngữ "chứa" bao hàm các thuật ngữ mang tính hạn chế hơn như "chủ yếu bao gồm" và "bao gồm". Với thuật ngữ "chủ yếu bao gồm", cần phải hiểu rằng phương pháp theo khía cạnh bất kỳ của sáng chế "hầu như" chứa bước phát hiện đã được chỉ rõ và/hoặc bước sử dụng protein của *E.histolytica* làm yếu tố "chủ yếu". Các bước bổ sung có thể nằm trong phạm vi của sáng chế. Do đó, phương pháp "chủ yếu bao gồm" bước phát hiện tất cả các protein của *E.histolytica* đã được bộc lộ trong mẫu huyết thanh, sẽ là mới vì phương pháp này chỉ sử dụng một trong số các protein của *E.histolytica* đã được bộc lộ.

Thuật ngữ "đoạn" được dùng trong bản mô tả này để chỉ phần không đầy đủ hoặc phần phân lập được của trình tự đầy đủ của protein của *E.histolytica*. Ví dụ, một đoạn của pyruvat phosphat đikinaza có thể không bao gồm trình tự đầy đủ nhưng chứa (các) vị trí hoạt tính khiến cho trình tự này có đặc tính và chức năng của peptit. Cụ thể, nó có thể ngắn hơn ít nhất là một nucleotit hoặc axit amin và có thể là đoạn sinh miễn dịch. Đoạn này còn có thể là một đoạn của kháng thể theo khía cạnh bất kỳ của sáng chế, trong đó kháng thể chứa vị trí hoạt tính mà nhận diện kháng nguyên tương ứng. Đoạn này có thể dài ít nhất 10 axit amin.

Các thuật ngữ "cá thể", "đối tượng", hoặc "bệnh nhân" thường được dùng để chỉ người, nhưng cũng có thể chỉ các động vật khác bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các động vật linh trưởng khác, các động vật gặm nhấm, chó, mèo, ngựa, cừu, lợn và các động vật tương tự.

Chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết rõ các phương pháp phân tích và/hoặc phát hiện, và cụ thể là các kỹ thuật để phát hiện một cách định lượng hoặc bán định lượng ARN thông tin của protein của *E.histolytica*. Thuật ngữ "phương pháp phân tích và/hoặc phát hiện" được dùng trong bản mô tả này để chỉ phương pháp bất kỳ để có thể đo mức độ biểu hiện gen. Các phương pháp này thường là đã biết đối với

chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này và có thể được chọn theo tốc độ phiên mã hoặc tốc độ dịch mã.

Thuật ngữ "thể đột biến" của protein của *E.histolytica* được dùng trong bản mô tả này, để chỉ một protein mà có ít nhất là một trình tự axit amin thay đổi so với ít nhất là một trình tự protein chuẩn bằng cách thay thế, xóa bỏ hoặc bổ sung ít nhất là một axit amin, nhưng vẫn giữ được chức năng của protein đó.

Các thuật ngữ "liên kết đặc hiệu" hoặc "liên kết một cách đặc hiệu" được dùng trong bản mô tả này để chỉ tương tác giữa protein hoặc peptit và chất chủ vận, kháng thể, hoặc chất đối kháng. Cụ thể, liên kết là giữa kháng nguyên và kháng thể. Tương tác phụ thuộc vào sự có mặt của cấu trúc cụ thể của protein nhận ra được bởi phân tử liên kết (tức là kháng nguyên hoặc biểu vị). Ví dụ, nếu kháng thể là đặc hiệu với biểu vị "A", thì sự có mặt của polypeptit chứa biểu vị A, hoặc sự có mặt của biểu vị A tự do không gắn nhãn, trong hỗn hợp phản ứng chứa biểu vị A tự do không gắn nhãn và kháng thể sẽ làm giảm lượng biểu vị A đã được gắn nhãn liên kết với kháng thể. Ví dụ, kháng thể từ huyết thanh của cá thể mà liên kết đặc hiệu với protein của *E.histolytica* thuộc thuật ngữ này.

Thuật ngữ "biến thể" của ít nhất là một protein của *E.histolytica* được dùng trong bản mô tả này để chỉ trình tự axit amin mà đã bị thay đổi bởi một hoặc nhiều axit amin. Biến thể có thể chứa các thay đổi "bảo toàn", trong đó axit amin được thế có các đặc điểm cấu trúc hoặc tính chất hóa học tương tự (ví dụ, thay thế leuxin bằng isoleuxin). Hiếm hơn, biến thể này có thể chứa các thay đổi "không bảo toàn" (ví dụ, thay thế glyxin bằng tryptophan). Các biến đổi tương tự không đáng kể có thể còn bao gồm việc xóa bỏ axit amin hoặc việc cài xen axit amin, hoặc cả hai. Hướng dẫn trong việc xác định gốc axit amin nào có thể được thế, cài xen, hoặc xóa bỏ mà không làm mất hoạt tính sinh học hoặc hoạt tính miễn dịch học có thể được tìm thấy bằng cách áp dụng các chương trình máy tính đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, chương trình DNASTAR.

Chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này cần phải hiểu rằng sáng chế có thể được thực hiện mà không cần thử nghiệm quá mức theo phương pháp được bộc lộ trong bản mô tả này. Các phương pháp, các kỹ thuật và các hóa chất như được bộc lộ trong các

tài liệu đã được trích dẫn hoặc theo quy trình nêu trong các sách giáo khoa về công nghệ sinh học và sinh học phân tử thông thường.

Các protein của *E. histolytica*, đoạn, biến thể hoặc thể đột biến của chúng có thể được dùng để phát hiện ALA và các dạng khác của bệnh do amip gây ra ngoài ruột bằng cách phát hiện sự có mặt của ít nhất là một protein của *E. histolytica*, đoạn, biến thể hoặc thể đột biến của nó trong mẫu này. Mẫu có thể là huyết thanh, huyết tương hoặc máu của đối tượng. Các protein này của *E. histolytica* còn có thể được dùng trong thử nghiệm phát hiện kháng nguyên đối với bệnh do amip gây ra trong ruột và/hoặc vaccin phòng bệnh ly amip.

Protein của *E. histolytica* có thể được chọn từ nhóm bao gồm pyruvat phosphat đikinaza, phosphoglucomutaza, pyruvat:ferredoxin oxidoreductaza, protein họ phosphoglucomutaza/phosphomanomutaza, protein lặp lại giàu leuxin thuộc họ BspA, và protein thuộc họ Cullin.

Protein lặp lại giàu leuxin thuộc họ BspA là protein họ bề mặt đã được mã hóa bởi 116 gen kiểu Bsp-A trong hệ gen này, và 41 gen trong số này kết hợp với thành phần có thể hoán vị được. Nó đóng vai trò trong việc gắn và thâm vào các tế bào chủ và đã được thấy là có liên quan đến tương tác protein-protein. Nó liên kết với thành phần nền ngoại bào, fibronectin và fibrinogen. Protein thuộc họ Cullin là một trong số khung protein của enzym E3, đa cấu trúc siêu phân tử ubiquitin-ligaza, mà tham gia vào việc tạo điều kiện thuận lợi cho ubiquitin từ ubiquitin-enzym tiếp hợp (E2), đến gốc Lys trong phân tử nền, và chủ yếu xảy ra trong các tế bào nhân chuẩn. Thể tương đồng với protein Cullin CDC53 đã được tìm thấy ở từng vật ký sinh apicomplexa (PF08-0094 ở *Plasmodium falcifarum* và 80.m02207 ở *Toxoplasma gondii*). Vì thấy rằng cả hai protein này của *E. histolytica*, tức là họ Bsp-A (protein lặp lại giàu leuxin) và protein thuộc họ Cullin tuần hoàn trong các mẫu huyết thanh của các bệnh nhân mắc bệnh ALA mà các mẫu mủ chứa ADN ly amip, nên chúng có thể là hữu dụng trong việc chẩn đoán ALA.

Protein của *E. histolytica* có thể có phân tử lượng 42kDa, 70kDa, 79kDa, hoặc 110kDa.

Các chất chỉ điểm sinh học protein có thể được phát hiện theo nhiều cách. Phương pháp này có thể là phương pháp *in vitro*. Vì là phương pháp nhanh, không xâm lấn và tương đối tiết kiệm chi phí để phát hiện sự có mặt, hoặc sự không có mặt, của ít nhất là một protein của *E. histolytica*, nên phương pháp này đặc biệt có lợi. Phương pháp này có thể bao gồm việc phát hiện ít nhất là một protein của *E. histolytica* trong mẫu của cá thể. Cụ thể, mẫu này có thể là máu, huyết tương hoặc huyết thanh. Dữ liệu định lượng liên quan đến các chất chỉ điểm protein của *E. histolytica* có thể là dữ liệu bất kỳ mà cho phép thu được kết quả hữu dụng để chẩn đoán *E. histolytica* và bệnh có liên quan, bao gồm số đo về nồng độ ADN hoặc ARN liên quan đến các chất chỉ điểm mà thường là kiểu biểu hiện protein. Lượng protein có thể được đo theo phương pháp bất kỳ mà chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết mà tạo ra số đo định lượng riêng rẽ hoặc thông qua các phương pháp hiệu suất cao là một phần của biên dạng biểu hiện. Ví dụ, mẫu huyết thanh có thể được dùng cho tác nhân liên kết đặc hiệu hoặc nhóm tác nhân liên kết đặc hiệu để xác định sự có mặt và lượng của chất chỉ điểm protein của *E. histolytica*.

Ví dụ, mẫu biểu hiện ADN và ARN (ARN thông tin, ARN nhỏ đầu tiên, tiền ARN micro, ARN nhỏ, tiền ARN hình cặp tóc, ribo-nucleo-protein nhỏ, và các dạng tương tự) có thể được đánh giá theo phân tích Northern, PCR, RT-PCR, phân tích Taq Man, phát hiện FRET, theo dõi một hoặc nhiều mục tiêu phân tử, lai với mảng oligonucleotit, lai với mảng ADN bổ trợ, lai với mảng polynucleotit, lai với vi mảng lỏng, lai với mảng vi điện, xác định trình tự ADN bổ trợ, lai dòng, lấy dấu đoạn ADN bổ trợ, phân tích hàng loạt sự biểu hiện gen (SAGE), lai trừ, thể hiện sự biệt hóa và/hoặc sàng lọc biệt hóa. Các kỹ thuật này và các kỹ thuật khác là đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Phương pháp này có thể là phương pháp *in vivo*. Ví dụ, phương pháp hiện hình *in vivo* có thể được áp dụng để phát hiện sự có mặt của các protein của *E. histolytica* trong máu. Các phương pháp này có thể sử dụng, ví dụ, các kháng thể đã được đánh dấu hoặc các phối tử đặc hiệu với các protein này. Theo các phương án này, gốc đã được đánh dấu theo cách có thể phát hiện được, ví dụ, kháng thể, phối tử, v.v., mà là đặc hiệu với polypeptit dùng cho cá thể (ví dụ, bằng cách tiêm), và các tế bào đã được đánh dấu được định vị bằng cách áp dụng các kỹ thuật hiện hình chuẩn bao gồm,

nhưng không chỉ giới hạn ở, kỹ thuật hiện hình cộng hưởng từ tính, kỹ thuật quét chụp X quang theo tính toán, và các kỹ thuật tương tự. Việc phát hiện có thể sử dụng một, hoặc hỗn hợp gồm các, chất phản ứng hiện hình.

Phương pháp theo khía cạnh bất kỳ của sáng chế có thể bao gồm việc phát hiện ít nhất 2 hoặc 6 protein trong số các protein của *E. histolytica* nêu trên. Cụ thể, phương pháp có thể bao gồm việc phát hiện ít nhất 3, 4 hoặc 5 protein trong số các protein của *E. histolytica* nêu trên.

Nhiều phương pháp thu dữ liệu biểu hiện là đã biết, và một hoặc nhiều kỹ thuật bất kỳ trong số các kỹ thuật này, đơn lẻ hoặc kết hợp, là thích hợp để xác định mẫu và biên dạng biểu hiện trong phạm vi bản mô tả này.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp *in vitro* chẩn đoán ít nhất là một đối tượng bị nhiễm hoặc có nguy cơ bị nhiễm *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*), phương pháp này bao gồm việc phát hiện sự có mặt của ít nhất là một protein của *E. histolytica*, đoạn, biến thể hoặc thể đột biến của nó được chọn từ nhóm bao gồm pyruvat phosphat đikinaza, phosphoglucomutaza, pyruvat:ferredoxin oxidoreductaza, protein họ phosphoglucomutaza/phosphomanomutaza, protein lặp lại giàu leuxin thuộc họ BspA, và protein thuộc họ Cullin, trong mẫu lấy từ đối tượng, trong đó sự có mặt của protein này, đoạn, biến thể hoặc thể đột biến của nó là dấu hiệu chỉ báo về việc đối tượng bị nhiễm hoặc có nguy cơ bị nhiễm *E. histolytica*.

Mẫu có thể ít nhất là một là dịch sinh học bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, dịch cổ tử cung-âm đạo (cervical-vaginal fluid - CVF), máu lấy từ tủy, huyết thanh mới sinh, dịch não tủy (cerebrospinal fluid - CSF), dịch ối, huyết thanh, huyết tương, nước tiểu, dịch não tủy, sữa, dịch nhầy, nước bọt, mồ hôi và các loại dịch tương tự. Cụ thể, mẫu có thể là máu, huyết tương hoặc huyết thanh.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp chẩn đoán ít nhất là một đối tượng bị nhiễm hoặc có nguy cơ bị nhiễm *E. histolytica*, phương pháp này bao gồm việc phát hiện sự có mặt của ít nhất là một kháng thể hoặc đoạn của nó, mà liên kết đặc hiệu với protein của *E. histolytica*, đoạn, biến thể hoặc thể đột biến của nó trong mẫu huyết thanh lấy từ đối tượng, trong đó sự có mặt của kháng thể hoặc đoạn của nó là dấu hiệu chỉ báo về việc đối tượng bị nhiễm hoặc có nguy cơ bị nhiễm *E. histolytica*.

Việc phát hiện kháng thể có thể bao gồm phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ về các phương pháp này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, ELISA, thẩm tách điểm, thẩm tách Western, thử nghiệm nhanh dòng chảy qua, thử nghiệm nhanh dòng bên, cảm biến sinh học và các phương pháp tương tự.

Các protein của *E. histolytica* có thể được dùng riêng rẽ hoặc kết hợp để phát hiện các kháng thể đặc hiệu (ví dụ, IgG, IgA) trong các ca nhiễm *E. histolytica* ngoài ruột. Các protein này có thể ở dạng tự nhiên hoặc dạng tái tổ hợp. Các peptit mà chứa các biểu vị kháng nguyên của chúng thu được từ các protein này cũng có thể được dùng.

Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất ít nhất là một chất chỉ điểm sinh học ở huyết thanh/máu hoặc huyết tương để chẩn đoán nhiễm *E. histolytica* ở đối tượng. Chất chỉ điểm sinh học có thể là ít nhất là một protein phân lập được chọn từ nhóm bao gồm pyruvat phosphat đikinaza, phosphoglucomutaza, pyruvat:ferredoxin oxidoreductaza, protein họ phosphoglucomutaza/phosphomanomutaza, protein lặp lại giàu leuxin thuộc họ BspA, protein thuộc họ Cullin, đoạn, biến thể và thể đột biến của chúng. Chất chỉ điểm sinh học có thể bao gồm protein, polynucleotit, alen, hoặc bản sao của chất chỉ điểm bất kỳ trong số các chất chỉ điểm sinh học ở huyết thanh nêu trên. Chất chỉ điểm sinh học có thể được phát hiện trong mẫu huyết thanh, mẫu huyết tương hoặc mẫu máu. Sự có mặt của chất chỉ điểm sinh học bất kỳ trong số chất chỉ điểm sinh học có thể biểu thị sự có mặt của *E. histolytica* và lượng chất chỉ điểm sinh học bất kỳ trong số các chất chỉ điểm sinh học có thể chỉ báo về mức độ nhiễm *E. histolytica*.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kit chứa:

a) chất phản ứng có khả năng phát hiện protein của *E. histolytica*, đoạn, biến thể hoặc thể đột biến của nó trong mẫu huyết thanh; và

b) bảng hướng dẫn có khả năng chẩn đoán nhiễm *E. histolytica* dựa trên sự có mặt của protein phát hiện được.

Kit có thể là hữu dụng để thực hiện phương pháp xác định việc đối tượng có bị nhiễm hay không bị nhiễm *E. histolytica* hoặc đối tượng đó có dễ bị nhiễm *E. histolytica* hay không. Protein của *E. histolytica* cần được phát hiện có thể được chọn

từ nhóm bao gồm pyruvat phosphat đikinaza, phosphoglucomutaza, pyruvat:ferredoxin oxidoreductaza, protein họ phosphoglucomutaza/phosphomanomutaza, protein lặp lại giàu leuxin thuộc họ BspA, và protein thuộc họ Cullin.

Kit có thể là tập hợp gồm các nguyên liệu hoặc các thành phần, bao gồm ít nhất là một chất phản ứng có khả năng phát hiện protein của *E. histolytica* trong mẫu huyết thanh, huyết tương và/hoặc máu. Do đó, theo một số phương án, kit này có thể chứa chế phẩm chứa các tác nhân theo khía cạnh bất kỳ của sáng chế.

Bản chất chính xác của các thành phần cấu thành trong kit phụ thuộc vào mục đích dự định của nó. Ví dụ, theo một số phương án kit có thành phần nhằm mục đích điều trị bệnh nhiễm *E. histolytica*. Theo một phương án, kit có thành phần đặc biệt nhằm mục đích điều trị bệnh ở các đối tượng là động vật có vú. Theo phương án khác, kit có thành phần đặc biệt nhằm mục đích điều trị bệnh ở đối tượng là người. Theo phương án khác nữa, kit có thành phần cho các ứng dụng trong thú y, điều trị bệnh ở đối tượng như, nhưng không chỉ giới hạn ở, động vật ở trang trại, động vật nuôi, và động vật dùng cho phòng thí nghiệm.

Hướng dẫn sử dụng có thể được đưa vào trong kit. "Hướng dẫn sử dụng" thường bao gồm cách thể hiện hữu hình mô tả kỹ thuật cần được áp dụng khi sử dụng các thành phần của kit để đạt được hiệu quả mong muốn, như để chẩn đoán bệnh nhiễm *E. histolytica* và/hoặc để điều trị tình trạng nhiễm *E. histolytica*. Tùy ý, kit còn có thể có các thành phần hữu dụng khác, như các chất pha loãng, các dung dịch đệm, các chất mang dược dụng, bơm tiêm, các ống thông, các dụng cụ bôi, dụng cụ hút hoặc dụng cụ đo, chất liệu để băng bó hoặc đồ dùng cá nhân hữu dụng khác mà chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này dễ dàng nhận ra được.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tác nhân mà liên kết đặc hiệu với ít nhất là một protein của *E. histolytica* trong huyết thanh của ít nhất là một đối tượng để điều trị bệnh nhiễm *E. histolytica*. Protein của *E. histolytica* có thể được chọn từ nhóm bao gồm pyruvat phosphat đikinaza, phosphoglucomutaza, pyruvat:ferredoxin oxidoreductaza, protein họ phosphoglucomutaza/phosphomanomutaza, protein lặp lại giàu leuxin thuộc họ BspA, và protein thuộc họ Cullin.

Các tác nhân điều biến sự biểu hiện của protein bất kỳ trong số các protein của *E. histolytica* nêu trên có thể được dùng trong các ứng dụng *in vivo*, *ex vivo*, và *in vitro*, trong đó có thể là có lợi nếu làm giảm hoặc loại bỏ sự biểu hiện hoặc hoạt tính của protein bất kỳ trong số các protein của *E. histolytica* hoặc phân tử tạo chức năng tiếp theo. Các tác nhân này có thể được dùng làm thuốc để điều trị bệnh nhiễm *E. histolytica*. Các tác nhân này có thể được dùng ngoài đường tiêu hóa, qua đường khu trú, qua đường miệng, hoặc tại chỗ để điều trị bệnh. Cụ thể, các dược phẩm này có thể được dùng qua đường miệng hoặc ngoài đường tiêu hóa, tức là qua đường tĩnh mạch, trong khoang màng bụng, trong da, hoặc tiêm bắp.

Tác nhân này có thể ở dạng chế phẩm mà có thể còn chứa chất mang hoặc tá dược được dùng. Nhiều loại chất mang trong nước có thể được dùng. Ví dụ, nó bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, nước, nước được đệm, nước muối 0,4%, glyxin 0,3%, và các loại tương tự có thể được dùng làm các chất mang trong nước.

Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất việc sử dụng tác nhân theo khía cạnh bất kỳ của sáng chế mà liên kết đặc hiệu với ít nhất là một protein của *E. histolytica* trong huyết thanh của đối tượng để bào chế thuốc để điều trị bệnh nhiễm *E. histolytica*.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh nhiễm *E. histolytica* ở đối tượng, phương pháp này bao gồm việc dùng tác nhân mà liên kết đặc hiệu với ít nhất là một protein của *E. histolytica* trong huyết thanh của đối tượng.

Protein của *E. histolytica* có thể được chọn từ nhóm bao gồm pyruvat phosphat đikinaza, phosphoglucomutaza, pyruvat:ferredoxin oxidoreductaza, protein họ phosphoglucomutaza/phosphomanomutaza, protein lặp lại giàu leuxin thuộc họ BspA, và protein thuộc họ Cullin.

Sau khi nói chung đã được mô tả, sáng chế sẽ trở nên dễ hiểu có dựa vào các ví dụ được đưa ra nhằm mục đích minh họa dưới đây mà không nhằm giới hạn phạm vi của sáng chế.

Chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này cần phải hiểu rằng sáng chế có thể được thực hiện mà không cần thử nghiệm quá mức theo phương pháp nêu trong bản mô tả này. Các phương pháp, các kỹ thuật và các hóa chất là như đã được bộc lộ trong các tài

liệu trích dẫn hoặc theo các quy trình nêu trong các sách giáo khoa chuẩn về công nghệ sinh học và sinh học phân tử.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các kỹ thuật sinh học phân tử chuẩn đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và chưa được mô tả một cách cụ thể được thực hiện như đã được bộc lộ trong ấn phẩm: Sambrook and Russel, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Springs Harbor Laboratory, New York (2001).

Ví dụ 1. Phát hiện protein đặc hiệu của E. histolytica liên kết với các kháng thể đặc hiệu trong huyết thanh của bệnh nhân

Đã phát hiện ra rằng hai protein kháng nguyên của *E. histolytica* liên kết với các kháng thể đặc hiệu trong huyết thanh của bệnh nhân. Hai loại chế phẩm kháng nguyên được nghiên cứu để xác định hai protein này. Hai chế phẩm này là: (1) kháng nguyên tiết-kích thích tiết (ESA) và (2) kháng nguyên hòa tan thô (CSA). Các kết quả này cho thấy rằng protein có phân tử lượng ~110kDa của ESA, xác định được theo phân tích MS-MS là pyruvat phosphat đikinaza của *E. histolytica* có độ nhạy 82%, đặc hiệu 100% đối với việc phát hiện bệnh nhân mắc bệnh ALA và độ nhạy chung >90% đối với việc phát hiện bệnh nhân mà các mẫu áp xe gan là dương tính với ADN của *E. histolytica*.

Từ phân tích CSA, thấy rằng protein có phân tử lượng 70kDa có độ nhạy 75% và độ đặc hiệu 100% để phát hiện bệnh nhân ALA. Phân tích MS-MS cho thấy ba định danh có khả năng đối với protein này của *E. histolytica* là protein họ phosphoglucomutaza/phosphomanomutaza, phosphoglucomutaza hoặc pyruvat:ferredoxin oxidoreductaza.

Cả hai protein nêu trên của *E. histolytica* thể hiện độ đặc hiệu 100% khi được thử nghiệm với huyết thanh từ các cá thể nhiễm khuẩn và cá thể khỏe mạnh khác.

Các mẫu huyết thanh

Các mẫu huyết thanh được thu gom từ Hospital Universiti Sains Malaysia trong khoảng thời gian từ 2008 đến 2010. Các mẫu này được chia thành bốn nhóm. (a) Các

mẫu huyết thanh ALA của người (n=24) đã được xác nhận thông qua biểu hiện lâm sàng (tức là sốt, đau ngực gan bụng/phải, chứng gan to, và vàng da): kỹ thuật hình ảnh X quang và là dương tính đối với kháng thể theo thử nghiệm về bệnh do amip gây ra IHA; (b) các mẫu huyết thanh ALA của người (n=14) từ các bệnh nhân có mẫu áp xe gan là dương tính đối với ADN của *E. histolytica* theo thử nghiệm PCR thời gian thực và âm tính khi được nuôi cấy với vi khuẩn (c) các mẫu huyết thanh lấy từ cá thể cho máu khỏe mạnh (n=30) mà là âm tính với kháng thể theo thử nghiệm về bệnh do amip gây ra IHA; và (d) các mẫu huyết thanh lấy từ các ca nhiễm khác mà là âm tính với IHA (n=33) [bệnh nhiễm vi khuẩn *Salmonella* (n=5), bệnh shigella (n=1), bệnh nhiễm trùng máu *Escherichia coli* (n=2), bệnh nhiễm trùng máu *Staphylococcus* spp. (n=2), *H. pylori* (n=6), áp xe gan sinh mủ (n=4), bệnh nhiễm trùng máu *Stenotrophomonas maltophilia* (n=1), *Escherichia coli* gây bệnh ở ruột (n=1), *Ascaris lumbricoides* (n=1), *Klebsiella pneumoniae* (n=1) và bệnh do toxoplasma (n=9)].

Nuôi cấy và duy trì *E. histolytica*

E. histolytica HM-1:IMSS được duy trì trong môi trường TYI-S-33 và được chuyển sang con chuột đồng Syrian Golden hai tuần một lần để duy trì hiệu lực gây độc của nó.

Chuẩn bị kháng nguyên hòa tan thô (CSA)

10×10^6 tế bào *E. histolytica* đã được thu gom, 400µl dung dịch đệm phân giải và 20µl dung dịch iodoacetamid 0,5M được trộn. Dịch phân giải tế bào được xử lý bằng siêu âm ở 10% biên độ trong 3 chu kỳ 1 phút trên nước đá nghiền. Sau đó, dịch phân giải tế bào được ly tâm với vận tốc $10.000 \times g$ ($100.000m/s^2$) trong thời gian 10 phút ở 4°C. Dịch nổi tức là kháng nguyên hòa tan thô được thu gom và sau đó nồng độ protein được xác định (Das và các đồng tác giả, 1993).

Chuẩn bị kháng nguyên gây tiết-kích thích tiết (ESA)

Sinh khối cá thể dinh dưỡng *E. histolytica* được thu gom trong pha logarit và được tập hợp vào một ống nghiệm. Huyền phù cá thể dinh dưỡng được ly tâm, dịch nổi được gạn đi và cá thể dinh dưỡng đã được kết viên được rửa ba lần (bằng cách ly tâm) với RPMI có bổ sung 0,1% cysteine và 0,02% axit ascorbic (RPMI-C&A). Sau đó,

các cá thể dinh dưỡng đã kết viên được tạo huyền phù lại với RPMI-C&A và được đếm bằng cách áp dụng phương pháp loại trừ dùng xanh Trypan. Tiếp theo, các tế bào này được cấy vào các ống nghiệm nuôi cấy ở mật độ tế bào $0,5 \times 10^6$ tế bào trong mỗi ml RPMI-C&A với môi trường nạp đến 80%. Sau đó, các ống nghiệm được ủ ở 36°C trong 6 giờ. Tiếp theo, các ống nghiệm nuôi cấy này được ướp lạnh trên nước đá và được ly tâm với tốc độ $20.000 \times g$ (200.000m/s^2) trong thời gian 2 phút ở 25°C . Dịch nổi được thu gom và được ly tâm với tốc độ $5.000 \times g$ (50.000m/s^2) trong thời gian 10 phút ở 4°C . Sau đó, dịch nổi được lọc bằng bơm tiêm qua màng có cỡ lỗ $0,22\mu\text{m}$, và $0,5\text{M}$ iodoacetamid được bổ sung vào đến nồng độ cuối cùng 1mM . Dịch nổi chứa ESA được cô 1000 lần bằng cách sử dụng thiết bị cô chữ U với ngưỡng phân tử lượng 10kDa , và được ly tâm với tốc độ $8000 \times g$ (80.000m/s^2), 16°C . Nồng độ protein được xác định bởi chất phản ứng thử nghiệm protein Bradford. Dung dịch đệm phân giải M đầy đủ chứa 10 lần chất ức chế proteaza (do Roche, USA cung cấp) được bổ sung vào cho đến khi đạt được nồng độ cuối cùng của chất ức chế proteaza 1 lần. Dịch nổi lại được ly tâm với vận tốc $10000 \times g$ (100.000m/s^2) trong thời gian 5 phút ở 4°C để kết viên chất kết tủa. Nồng độ protein của dịch nổi được xác định lại, sau đó được bảo quản ở -80°C .

Phân tích SDS-PAGE và phân tích thẩm tách Western

ESA được tách theo phương pháp SDS-PAGE bằng cách sử dụng hệ protein Bio-Rad, tức là Mini Protean III Electrophoresis Cell và Protean® II xi Cell theo quy trình của Laemmli (1976) có cải biến. Trước khi thực hiện SDS-PAGE, từng mẫu ESA và CSA thô được trộn với dung dịch đệm mẫu Laemmli 2 lần và đun sôi trong thời gian 5 phút. Sau đó, các mẫu protein được tách theo cách điện di qua gel SDS-PAGE 6% với cường độ dòng ổn định 25mA mỗi gel trong khoảng thời gian 1 giờ.

Sau khi hoàn thành SDS-PAGE, các protein tách được được chuyển sang màng nitrocellulose có cỡ lỗ $0,45\mu\text{m}$ (NCP) bằng cách áp dụng kỹ thuật chuyển vết bán khô (do Bio Rad, USA cung cấp) ở điện áp không đổi 15V trong thời gian 30 phút. NCP bị phong bế trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ phòng với 5% sữa gầy được chuẩn bị trong nước muối đệm dung dịch Tris 10mM , độ $\text{pH}=7,2$ (TBS). Tiếp đó, NCP được rửa ba lần bằng 0,1% Tween-20 trong TBS (TBS-T) trong thời gian 10 phút. Sau đó, NCP được cắt thành nhiều dải và ủ với các loại huyết thanh khác nhau của người theo

tỷ lệ pha loãng 1:200 chuẩn bị được trong TBS-T trong thời gian 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau bước rửa, các dải NCP được ủ với IgG đơn dòng của chuột kháng người đã được tiếp hợp với peroxit của cây củ cải cay (horseradish peroxide - HRP) theo tỷ lệ pha loãng 1:6000 trong thời gian 1 giờ nữa. Sau bước rửa nữa, các cơ chất thẩm tách Western tức là chất phản ứng thẩm tách có mức phát quang hóa học cao (ECL) (do Roche diagnostics, Germany cung cấp), và/hoặc cơ chất Tetramethylbenzidin (TMB) đối với màng (Sigma, USA) được dùng để phát triển tín hiệu và bày bằng cách sử dụng thiết bị phân tích phim hoặc hình ảnh. Các dải kháng nguyên mà thể hiện độ nhạy và độ đặc hiệu tốt được xác định.

Phân tích điện di hai chiều (2-DE) và phân tích thẩm tách Western

Để đảm bảo tách thích hợp dải kháng nguyên đã được nhận biết, 2-DE được thực hiện. Đối với kích thước đầu tiên, thiết bị OFF-GEL (do Agilent Technologies cung cấp) và dải gel IPG loại có 12 giếng có độ pH nằm trong khoảng từ 3 đến 10 được dùng theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Dải gel IPG này được hydrat hóa lại trong dụng cụ đã được lắp ráp với 40 μ l dung dịch đệm hydrat hóa lại mỗi giếng trong thời gian 15 phút trước khi nạp mẫu. Lượng 1,5mg CSA và 2mg ESA được trộn với dung dịch đệm mẫu OFFGEL lần lượt đến thể tích cuối cùng là 2ml. Sau đó, mẫu được nạp vào từng giếng thể tích 150 μ l. Mẫu này được tập trung tại một điểm với cường độ tối đa 50mA, với lực tối đa 200mW và điện áp nằm trong khoảng từ 400V đến 4000V cho đến khi đạt được 50kV giờ trong thời gian khoảng 15 giờ đối với CSA và trong thời gian khoảng 26 giờ đối với ESA. Đối với kích thước thứ hai, các mẫu từ các phân đoạn OFFGEL được trộn với mẫu dung dịch đệm (theo tỷ lệ 4:1) chứa 28,6% SDS và 4,76% 2-mercaptoethanol, sau đó được tách bằng cách sử dụng dung dịch chứa 12% natri dodecyl sulphat-polyacrylamit Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) trong dung dịch đệm đang chạy (25mM Tris bazơ, 192mM Glyxin, 0,1% SDS, có độ pH 8,3). Thể tích mẫu 23 μ l mỗi giếng được nạp đều, và việc điện di được thực hiện ở nhiệt độ trong phòng với dòng điện không đổi 100 V trong thời gian 100 phút. Sau đó, phân tích thẩm tách Western điển hình được thực hiện như nêu trên để xác nhận vị trí của dải đã được nhận biết.

Phân tích phổ khối và xác định protein

Các protein kháng nguyên theo quy trình 2-DE nêu trên được cắt và gửi đến Proteomic Laboratory Service Center, Australia để phân tích phổ khối (MALDI-TOF-TOF), và sử dụng cơ sở dữ liệu Amoeba DB. Định danh của từng protein được xác định, và sau đó các trình tự nucleotit tương ứng được suy ra.

Kết quả

Độ nhạy và mức độ đặc hiệu của dải kháng nguyên được tính như sau:

Độ nhạy: số huyết thanh của bệnh nhân ALA phản ứng với dải

Tổng số huyết thanh của bệnh nhân ALA được thử nghiệm (n=38)

Mức độ đặc hiệu: số huyết thanh đối chứng không phản ứng với dải

Tổng số huyết thanh đối chứng được thử nghiệm (n=64)

Từ phân tích thẩm tách Western đối với ESA khi được phát hiện bằng mẫu huyết thanh ALA của người), có bảy dải kháng nguyên luôn thể hiện hoạt tính kháng nguyên, tức là ở phân tử lượng gần đúng (MW) 152kDa, 131kDa, 123kDa, 110kDa, 100kDa, 82kDa và 76kDa (Hình 1). Khi ESA được phân tích với huyết thanh đối chứng, không có dải nào trong số các dải kháng nguyên này thể hiện hoạt tính chéo. Độ nhạy và mức độ đặc hiệu của các protein này được tổng kết trong Bảng 1.

Bảng 1: Độ nhạy và mức độ đặc hiệu của dải kháng nguyên của ESA

Phân tử lượng của dải đích (kDa)	Độ nhạy, % [n = 38]	Mức độ đặc hiệu, % [n = 63]
152	84	100
131	45	100
123	16	100
110	82	100
100	18	100
82	39	100
76	39	100

Trong số các protein kháng nguyên, chỉ có protein có phân tử lượng 152kDa và protein có phân tử lượng 110kDa thể hiện độ nhạy cao, lần lượt là 84% và 82%. Do đó, chỉ hai kháng nguyên này là đích để xác định trình tự theo phân tích đo phổ khối MS/MS. Các dải protein này được cắt từ các phân đoạn được chọn và được xác định trình tự. Theo kết quả xác định trình tự, protein có phân tử lượng 152kDa được xác

định là cấu trúc siêu phân tử nặng Gal/GalNAc của lectin của *E. histolytica*. Protein này được loại ra khỏi đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế này vì nó đã được thông báo có giá trị chẩn đoán từ trước. Protein có phân tử lượng 110kDa được xác định là pyruvat phosphat đikinaza của *E. histolytica* và chưa từng liên quan đến việc chẩn đoán bệnh do amip gây ra (Hình 2).

Phân tích thẩm tách Western đối với CSA khi được phát hiện bằng các mẫu huyết thanh ALA của người thể hiện ba dải kháng nguyên có phân tử lượng 170kDa, 110kDa và 70kDa (Hình 3). Khi CSA được phân tích với huyết thanh trong số các huyết thanh đối chứng, các kháng nguyên này còn thể hiện tính đặc hiệu cao. Độ nhạy và mức độ đặc hiệu của các kháng nguyên này được tổng kết trong Bảng 2. Các protein có phân tử lượng 170kDa và 70kDa thể hiện độ nhạy bằng nhau là 75%. Theo nghiên cứu trước đây, protein có phân tử lượng 170kDa được thông báo là một phần của protein lectin hiện được dùng, do đó chỉ protein có phân tử lượng 70kDa được phân tích theo phương pháp đo phổ khối MS/MS. Phân tích MS-MS thể hiện ba định danh có thể cho protein có phân tử lượng 70kDa này của *E. histolytica*, cụ thể là (Hình 4a-c):

1. tr|C4M3Z6|protein họ Phosphoglucomutaza/phosphomanomutaza
2. sp|O15820|Phosphoglucomutaza
3. tr|C4LTX6|Pyruvat:ferredoxin oxidoreductaza

Bảng 2. Độ nhạy và mức độ đặc hiệu của các dải kháng nguyên đích của CSA

Phân tử lượng của dải đích (kDa)	Độ nhạy, % (n = 24)	Mức độ đặc hiệu, % (n = 63)
170	75	100
110	62,5	100
70	75	96,92

Ví dụ 2. Phát hiện protein của *E. histolytica* tuần hoàn trong huyết thanh của bệnh nhân

Hai protein của *E. histolytica* được tìm thấy trong huyết thanh của bệnh nhân và được xác định theo phân tích MS-MS là protein lặp lại giàu leuxin thuộc họ BspA và protein thuộc họ Cullin. Hướng phân tích protein trong huyết thanh bằng cách sử dụng các mẫu huyết thanh lấy từ người và chuột đồng đã bị nhiễm bệnh cho thấy dai protein có phân tử lượng ~42kDa là có tính kháng nguyên và đặc hiệu, và protein này được

xác định là thuộc họ Bsp-A, protein lặp lại giàu leuxin (LRR) của *E. histolytica*. Tương tự, bằng cách sử dụng các mẫu huyết thanh cá thể lấy từ người đã bị nhiễm bệnh, xác định được protein thuộc họ Cullin từ dải kháng nguyên có phân tử lượng ~79kDa.

Mẫu

Huyết thanh của bệnh nhân ALA và mẫu tương ứng từ dịch hút từ gan được thu gom từ Hospital Universiti Sains Malaysia (HUSM), Kubang Kerian, Kelantan, Malaysia. Ridascreen, ELISA (Rbiopharm, Germany) được thực hiện để xác nhận sự có mặt của các kháng thể kháng *E. histolytica* trong huyết thanh và phản ứng chuỗi polymeraza thời gian thực được thực hiện để phát hiện ADN của *E. histolytica* trong dịch hút mủ. Mười lăm mẫu huyết thanh được thử nghiệm dương tính đối với cả hai thử nghiệm và được sử dụng trong thử nghiệm này. Chín mẫu huyết thanh bình thường được thử nghiệm âm tính đối với các kháng thể kháng *E. histolytica* theo ELISA cũng được thu gom và sử dụng làm các đối chứng âm tính. Ngoài mẫu huyết thanh thu gom được từ 30 con chuột đồng đã được gây nhiễm bệnh thử nghiệm với ALA còn được dùng làm kháng thể sơ cấp trong một số phân tích thâm tách Western.

Làm tiêu huyết thanh

Việc làm tiêu huyết thanh được thực hiện đối với các huyết thanh thu gom được từ 15 bệnh nhân ALA, ba mẫu huyết thanh riêng rẽ lấy từ bệnh nhân ALA, và huyết thanh bình thường thu gom được từ 9 cá thể. Hai loại huyết thanh có hàm lượng protein cao được loại bỏ (albumin và IgG) bằng cách sử dụng ProteoSeek Albumin trên cơ sở kháng thể và kit loại bỏ IgG (do Thermo Scientific, USA cung cấp) theo quy trình của nhà sản xuất. Quy trình tiếp theo được thực hiện bằng cách sử dụng 2ml Viva spin, MWCO 3000 (Sortorius, USA) và được ly tâm trong thời gian 60 phút, $3.000 \times g$ ($30.000m/s^2$) ở $4^\circ C$ cho đến khi tổng thể tích là ~400 μ l. Sau đó, việc trao đổi dung dịch đệm được thực hiện bằng cách sử dụng dung dịch chứa 10mM Tris-HCl, độ pH=7,6 bằng cách ly tâm trong thời gian 120 phút, $3.000 \times g$ ($30.000m/s^2$) ở $4^\circ C$. Protein cô đặc được thu gom vào các ống nghiệm mới và phương pháp BioRad, RCDC, được áp dụng để xác định nồng độ của nó. Cuối cùng, hỗn hợp gồm các chất ức chế proteaza (do Roche cung cấp) được bổ sung vào theo hướng dẫn của nhà sản xuất để tránh quá trình thoái biến protein.

Tách protein trên cơ sở điện di hai chiều

Đối với kích thước đầu tiên của điện di gel 2D, thiết bị OFF-GEL (do Agilent Technologies cung cấp) và dải gel IPG loại 12 giếng có độ pH nằm trong khoảng từ 4 đến 7 được dùng theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Dải gel IPG này được hydrat hóa lại trong thiết bị đã được lắp ráp chứa 40 μ l dung dịch đệm hydrat hóa lại mỗi giếng trong thời gian 15 phút trước khi nạp mẫu.

Lượng 1mg huyết thanh đã được làm kiệt dịch và cô được trộn với dung dịch đệm mẫu OFF-GEL đến thể tích cuối cùng 2ml, và mẫu với thể tích 150 μ l được nạp vào từng giếng. Mẫu này được tập trung với cường độ tối đa 50 μ A, với công suất tối đa 200mW và điện áp điện hình nằm trong khoảng từ 400V đến 4000V cho đến khi đạt được 64kVgiờ trong khoảng thời gian 17 giờ. (Baik và các đồng tác giả, 2004; Ge và các đồng tác giả, 2007). Đối với kích thước thứ hai, các mẫu từ các phân đoạn OFFGEL được trộn với dung dịch đệm mẫu (theo tỷ lệ 4:1) chứa 28,6% SDS và 4,76% 2-mercaptoetanol, sau đó được điện di bằng cách sử dụng điện di gel natri dodecyl sulphat-polyacrylamit 10% (SDS-PAGE) trong dung dịch đệm đang chảy chứa 0,3% tris, 1,44% glyxin và 0,1% SDS với độ pH = 8,3. Thể tích mẫu 20 μ l mỗi giếng được nạp đều, và việc điện di được thực hiện ở nhiệt độ trong phòng với dòng điện không đổi 100V trong thời gian 120 phút.

Thẩm tách Western

Các dải protein trên SDS-PAGE được chuyển theo cách điện chuyển lên màng nitroxenluloza (NCP), có cỡ lỗ 0,45 μ m bằng cách áp dụng thẩm tách chuyển bán khô (do Bio Rad –USA cung cấp) ở dòng điện không đổi 12A trong thời gian 30 phút. Các màng này bị phong bế trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng bằng 5% sữa gầy, và sau đó được rửa ba lần bằng 0,05% Tween 20 trong TBS trong thời gian 30 phút. Tiếp theo, các màng này được ủ với hai loại huyết thanh ALA; từ chuột đồng và từ người.

Đối với nhóm I của thử nghiệm này, màng đã được phong bế được ủ với huyết thanh của chuột đồng ALA theo tỷ lệ pha loãng 1:50 qua đêm, 4°C. Để làm đối chứng, các phân đoạn OFFGEL huyết thanh thường đã được thẩm tách được ủ với huyết thanh của chuột đồng ALA với cùng tỷ lệ pha loãng. Đối với nhóm II của thử nghiệm

này, màng được ủ với 0,25µg/ml IgG đã được làm sạch từ huyết thanh của bệnh nhân ALA, qua đêm, 4°C. Hai loại huyết thanh đối chứng với tỷ lệ pha loãng 1:100 được áp dụng làm các kháng thể chính, tức là các huyết thanh thu gom được từ huyết thanh của các bệnh nhân có áp xe gan sinh mủ (PLA) và huyết thanh thường. Bước phát hiện miễn dịch được thực hiện với IgG đơn dòng của chuột kháng chuột đồng và IgG của chuột kháng người đã được tiếp hợp với peroxit của cây củ cải cay (HRP) lần lượt đối với các thử nghiệm nhóm I và thử nghiệm nhóm II, mỗi dịch pha loãng theo tỷ lệ 1:2000 trong thời gian 1 giờ. Quá trình phát triển cơ chất được thực hiện bằng cách sử dụng chất phản ứng thẩm tách có mức độ phát quang hóa học cao (do Roche diagnostics, Germany cung cấp).

Phân tích phổ khối và xác định protein

Các dải protein chọn lọc được cắt một cách thủ công từ gel thể keo đã được nhuộm xanh, chuyển vào ống nghiệm ly tâm dùng trong phòng thí nghiệm, và khử màu bằng dung dịch đậm khử màu chứa 20% metanol và 5% axit axetic trong thời gian 15 phút. Sau khi loại bỏ dung dịch đậm, các dải gel được gửi đến Academia Sinica, Đài Loan để chuẩn bị phân giải trong gel và phân tích đo phổ khối (MS-MS) bằng cách sử dụng cơ sở dữ liệu AmoebaDB và cơ sở dữ liệu của người. Phân tích sinh tin được dùng để làm sáng tỏ các trình tự axit amin của các protein. Sau đó, các trình tự nucleotit tương ứng được suy ra.

Kết quả

Dải protein kháng nguyên tiềm năng với phân tử lượng gần đúng 42kDa từ phân đoạn OFFGEL số 4 được phát hiện theo thử nghiệm thẩm tách Western bằng cách sử dụng hai loại huyết thanh ALA, cụ thể là huyết thanh của chuột đồng bị nhiễm bệnh đã thu gom được và huyết thanh của người. Họ BspA, protein lặp lại giàu leuxin được xác định từ dải này theo phân tích MS-MS. Trong khi đó, từ dải kháng nguyên có phân tử lượng ~79kD đã phát hiện được bằng từng mẫu huyết thanh bị nhiễm bệnh của người, protein thuộc họ Cullin được xác định ở hai trong ba mẫu (Bảng 3 và Bảng 4).

Ngưỡng điểm ion 25

Ngưỡng điểm protein 25

Các điểm ion > 34 biểu thị độ đồng nhất hoặc mức tương đồng cao ($p < 0,05$).

Bảng 3. Xác định họ BspA, protein lặp lại giàu leuxin theo phân tích MS-MS

	Mô tả protein	Điểm của protein	Phân tử lượng	Số nghiệm protein	Điểm ion	Trình tự peptit
jCVI EHI_013940	Protein lặp lại giàu leuxin, họ BspA	48	70473	2	45,10 47,87	GCRSIELIDTK (SEQ ID NO:1) GCRSIELIDTK (SEQ ID NO:1)

Bảng 4. Xác định protein thuộc họ Cullin theo phân tích MS-MS

Số truy cập	Mô tả protein	Điểm của protein	Phân tử lượng	Số nghiệm protein	Điểm ion	Trình tự peptit
jCVI:EHI_167280	Protein họ cullin	41	78963	2	41,27 40,9	KMEKICK (SEQ ID NO:2) KMEKICK (SEQ ID NO:2)

Phần trên đây mô tả các phương án được ưu tiên, mà như chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này cần phải hiểu rằng có thể thay đổi hoặc được cải biến về thiết kế, cấu trúc hoặc thực hiện mà không vượt quá phạm vi của các điểm yêu cầu bảo hộ. Các thay đổi này, ví dụ, được dự tính nằm trong phạm vi của các điểm yêu cầu bảo hộ.

Các tài liệu trích dẫn

1. Baik, S. C., Kim, K. M., Song, S. M., Kim, D. S., Jun, J. S., Lee, S. G., Song, J. Y., Park, J. U., Kang, H. L., Lee, W. K., Cho, M. J., Youn, H. S., Ko, G. H. & Rhee, K. H. (2004). Proteomic analysis the sarcosine-insoluble outer membrane fraction of *Helicobacter pylori* strain 26695. *J Bacteriol*, 186 (4), 949-55.
2. Das, P., Sengupta, K., Pal, S., Das, D. & Pal, S. C. (1993). Biochemical and immunological studies on soluble antigens of *Entamoeba histolytica*. *Parasitol Res*, 79 (5), 365-71.

3. Ge, R., Sun, X., Gu, Q., Watt, R. M., Tanner, J. A., Wong, B. C., Xia, H. H., Huang, J. D., He, Q. Y. & Sun, H. (2007). A proteomic approach for the identification bismuth-binding proteins in *Helicobacter pylori*. *J Biol Inorg Chem*, 12 (6), 831-42.
4. Fotedar, R., Stark, D., Beebe, N., Marriott, D., Ellis, J. & Harkness, J. (2007). Laboratory diagnostic techniques for *Entamoeba* species. *Clin Microbiol Rev*, 20 (3), 511-32, Bảng danh mục.
5. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 (5259), 680-5
6. Othman, N., Mohamed, Z., Verweij, J. J., Huat, L. B., Olivos-Garcia, A., Yeng, C. & Noordin, R. (2010). Application of real-time polymerase chain reaction in detection of *Entamoeba histolytica* pus aspirates of liver abscess patients. *Foodborne Pathog Dis*, 7 (6), 637-41.
7. Sambrook and Russel, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Springs Harbor Laboratory, New York (2001).
8. Zeehaida, M., Wan Nor Amilah, W. A., Amry, A. R., Hassan, S., Sarimah, A. & Rahmah, N. (2008). A study on the usefulness of Techlab *Entamoeba histolytica* II antigen detection ELISA in the diagnosis of amoebic liver abscess (ALA) at Hospital Universiti Sains Malaysia (HUSM), Kelantan, Malaysia. *Trop Biomed*, 25 (3), 209-16.
9. Zengzhu, G., Bracha, R., Nuchamowitz, Y., Cheng, I. W. & Mirelman, D. (1999). Analysis by enzyme-linked immunosorbent assay and PCR of human liver abscess aspirates from patients in China for *Entamoeba histolytica*. *J Clin Microbiol*, 37 (9), 3034-6.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp *in vitro* phát hiện sự có mặt của ít nhất là một protein của *E. histolytica*, trong mẫu huyết thanh, mẫu huyết tương hoặc mẫu máu của đối tượng, trong đó protein được chọn từ nhóm bao gồm phosphoglucomutaza có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 5, protein họ phosphoglucomutaza/phosphomanomutaza có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 4, protein lặp lại giàu leuxin thuộc họ BspA có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1, và protein thuộc họ Cullin có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2.
2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó protein có phân tử lượng 42kDa, 70kDa hoặc 79kDa.
3. Phương pháp theo điểm 2, trong đó protein có phân tử lượng 42kDa hoặc 79kDa.
4. Phương pháp *in vitro* theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1 đến 3, trong đó phương pháp này bao gồm việc phát hiện sự có mặt của ít nhất là hai protein của *E. histolytica*, và sự có mặt của hai protein.
5. Phương pháp *in vitro* phát hiện sự có mặt của các protein của *E. histolytica* pyruvat phosphat đikinaza có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 3, phosphoglucomutaza có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 5, pyruvat:feredoxin oxidoreductaza có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 6, protein họ phosphoglucomutaza/phosphomanomutaza có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 4, protein lặp lại giàu leuxin thuộc họ BspA có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1, và protein thuộc họ Cullin có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2, ở mẫu huyết thanh, mẫu huyết tương hoặc mẫu máu từ đối tượng.
6. Phương pháp *in vitro* phát hiện sự có mặt của ít nhất là một kháng thể hoặc đoạn của nó mà nó liên kết một cách đặc hiệu với protein của *E. histolytica* ở mẫu huyết thanh, mẫu huyết tương hoặc mẫu máu của đối tượng, trong đó protein được chọn từ nhóm bao gồm pyruvat phosphat đikinaza có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 3, phosphoglucomutaza có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 5, pyruvat:feredoxin oxidoreductaza có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 6, protein họ phosphoglucomutaza/phosphomanomutaza có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 4, protein lặp lại giàu leuxin thuộc họ BspA có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1, và protein thuộc họ Cullin có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2.

7. Phương pháp theo điểm 6, trong đó ít nhất là một kháng thể hoặc đoạn của nó liên kết một cách đặc hiệu với protein pyruvat phosphat đikinaza có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 3.

8. Phương pháp *in vitro* theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1 đến 7, trong đó đối tượng là người.

9. Phương pháp *in vitro* theo điểm 6 hoặc điểm 8, trong đó phương pháp này bao gồm việc phát hiện sự có mặt của ít nhất là hai kháng thể hoặc các đoạn của chúng mà chúng liên kết một cách đặc hiệu với các protein của *E. histolytica*.

10. Chất chỉ điểm sinh học ở huyết thanh, trong đó chất chỉ điểm sinh học ở huyết thanh chứa ít nhất là một protein phân lập được chọn từ nhóm bao gồm phosphoglucomutaza có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 5, protein thuộc họ phosphoglucomutaza/phosphomanomutaza có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 4, protein lặp lại giàu leuxin thuộc họ BspA có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1, protein thuộc họ Cullin có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2.

11. Kit chứa:

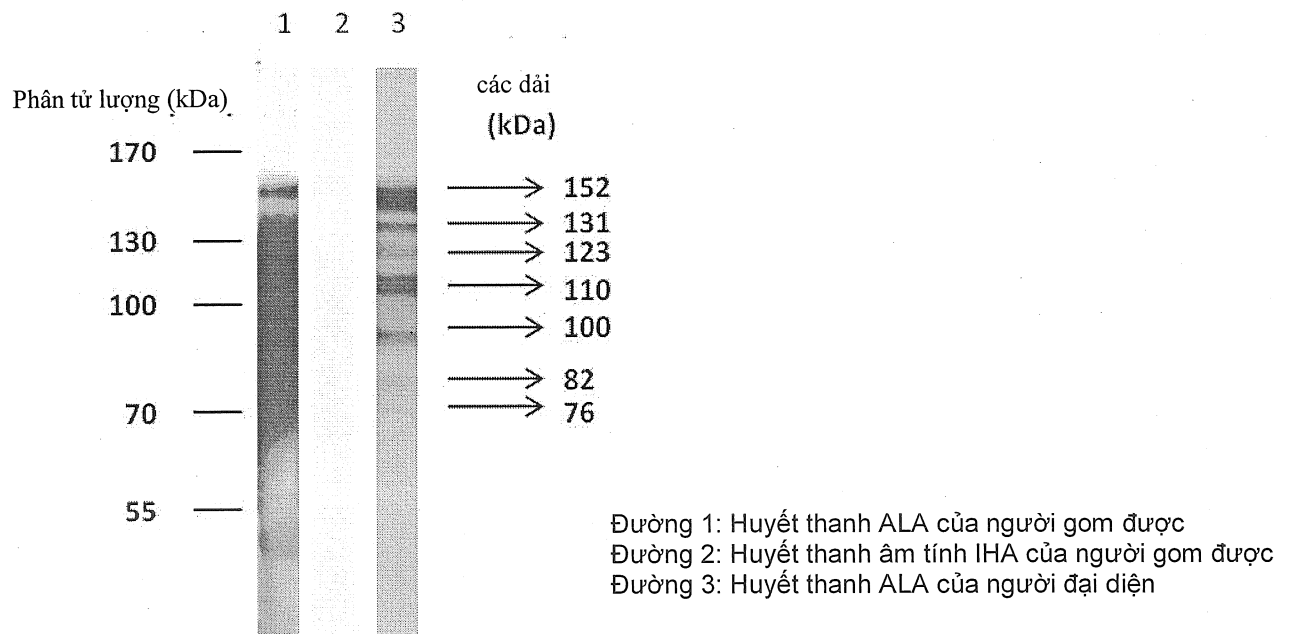
a) chất phản ứng để phát hiện protein của *E. histolytica* ở mẫu huyết thanh, mẫu huyết tương hoặc mẫu máu; trong đó protein được chọn từ nhóm bao gồm phosphoglucomutaza có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 5, pyruvat:ferredoxin oxidoreductaza, protein thuộc họ phosphoglucomutaza/phosphomanomutaza có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 4, protein lặp lại giàu leuxin thuộc họ BspA có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1, và protein thuộc họ Cullin có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2 và

b) bản hướng dẫn về việc chẩn đoán bệnh nhiễm *E. histolytica* dựa trên sự có mặt của protein phát hiện được.

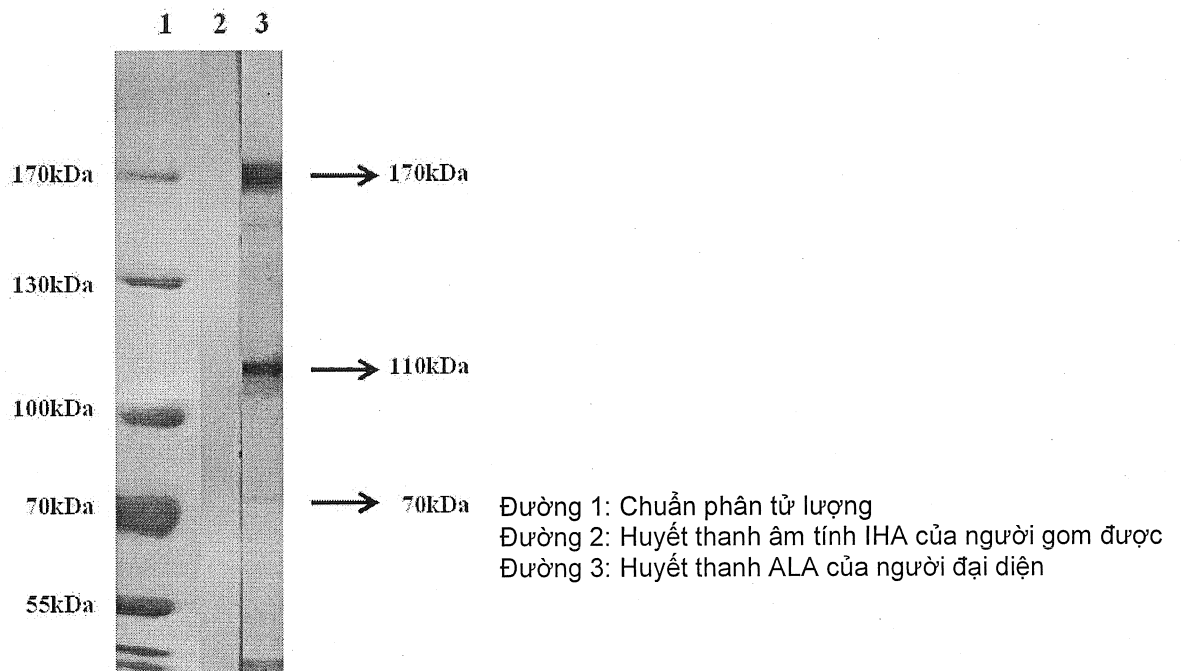
12. Kit xét nghiệm dòng ngang để dùng trong phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm 6 đến 9, trong đó kit xét nghiệm chứa protein của *E. histolytica* được chọn từ nhóm bao gồm pyruvat phosphat đikinaza có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 3 và pyruvat:ferredoxin oxidoreductaza có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 6.

13. Kit xét nghiệm theo điểm 12, trong đó protein của *E. histolytica* là pyruvat phosphat đikinaza có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 3.

14. Tác nhân liên kết đặc hiệu với ít nhất là một protein của *Entamoeba histolytica* trong huyết thanh, huyết tương hoặc máu của ít nhất là một đối tượng để bào chế thuốc điều trị bệnh nhiễm *E. histolytica*, trong đó protein được chọn từ nhóm bao gồm phosphoglucomutaza có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 5, protein thuộc họ phosphoglucomutaza/phosphomanomutaza có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 4, protein lặp lại giàu leuxin thuộc họ BspA có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1, và protein thuộc họ Cullin có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2.



HÌNH 1



HÌNH 2

(A)

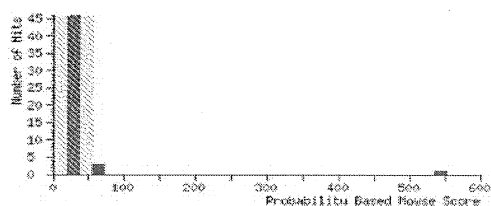
J.MATRIX
SCIENCE

Các kết quả nghiên cứu của Mascot

User :
 Email :
 Search title : Project: Proteomics, Spot Set: Proteomics\110117, Label: F2, Spot Id: 37936, Peak List Id: 9159
 MS data file : C:\Proteomics Files\Proteomics\110117\ppv_F2_129549409603.txt
 Database : LudwigNR Q111_generic_forward (14359729 sequences; 4875314780 residues)
 Timestamp : 29 Jan 2011 at 03:45:13 GMT
 Protein hits : EHI_009530 jCVI[EHI_009530]pyruvate phosphate dikinase | location=DS571184:42067-44724(+) | len

Probability Based Mowse Score

Ions score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.
 Individual ions scores > 56 indicate identity or extensive homology ($p < 0.05$).
 Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



(B)

1. EHI_009530 Mass: 97836 Score: 544 Queries matched: 11
 jCVI[EHI_009530]pyruvate phosphate dikinase | location=DS571184:42067-44724(+) | length=885 Tax_Id=294381
☐ Check to include this hit in error tolerant search or archive report

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
1	882.3855	881.3782	881.4494	-0.0712	1	25	63	1	K.KTEETPK.Q (SEQ ID NO:3)
2	911.4656	910.4583	910.4985	-0.0402	0	80	0.00018	1	K.TSHAAVVAR.G (SEQ ID NO:4)
7	921.3679	920.3606	920.4028	-0.0422	0	30	28	1	R.FAYDSYR.R (SEQ ID NO:5)
10	941.5051	940.4978	940.5454	-0.0476	0	31	18	2	R.IAAQAQIR.H (SEQ ID NO:6)
18	1103.5370	1102.5297	1102.5805	-0.0508	0	20	2.2e+002	1	K.TMIGLEVTVR.L + Oxidation (M) (SEQ ID NO:7)
22	1228.5717	1227.5644	1227.6208	-0.0563	0	80	0.00022	1	K.NAQGEDVVAGIR.T (SEQ ID NO:8)
25	1264.5988	1263.5915	1263.6533	-0.0618	0	19	2.4e+002	4	K.YLNELMPLQK.Q + Oxidation (M) (SEQ ID NO:9)
27	1348.6987	1347.6914	1347.7510	-0.0596	0	69	0.0024	1	R.IAPQSDVQLLH.K (SEQ ID NO:10)
30	1443.6094	1442.6021	1442.6678	-0.0656	1	76	0.00053	1	R.VYAFEDGGSTNKK.L (SEQ ID NO:11)
34	1515.7487	1514.7414	1514.8093	-0.0679	0	78	0.00029	1	K.VEGGEENPLVSVR.S (SEQ ID NO:12)
37	1549.7440	1548.7367	1548.8147	-0.0780	1	41	1.5	1	K.NVLEPVHEEVEKK.Y (SEQ ID NO:13)

(C)

Protein View

Match to: EHI_009530 Score: 544
 jCVI[EHI_009530]pyruvate phosphate dikinase | location=DS571184:42067-44724(+) | length=885 Tax_Id=294381 [Entamoeba histolytica]
 Found in search of C:\Proteomics Files\Proteomics\110117\ppv_F2_129549409603.txt

Nominal mass (M_r): 97836; Calculated pI value: 5.89
 NCBI BLAST search of EHI_009530 against nr
 Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: Unknown species

Variable modifications: Oxidation (M)

Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P

Sequence Coverage: 13%

Các peptit khớp được gạch chân

```

1  MQRVYAFEDG DGTNKKLLGG KGAGLCITMK IGLPVPQGFV ITTEMCKQFI
51  ANGNKIMPEGL MEEVKKNMQL VEKKSQKVEG GREENELLVSV RSGAAMSMPG
101 MMDTIENLGL NDKTVVALAK LTNNERFAYD SYRFEVSLFG KIALNVDDVEV
151 YDKTLENKKV ERGVKLDTEL DANDMKELAQ VFIKKTEETP KQFFPVDPPYA
201 QLEFAICAVF RSWMGKRAVD YRREFKITPE QADGTAVSVV SMVYGNMGND
251 SATGVCFTRD PGTGSENMFFG EYLKNAQGED VVAGIRTPQI ISKMAEDADL
301 PGCEYQLLDI RKKLEGYFHE VQDFEFTIER KKLYMLQTRN GKMNATATVR
351 TGVDMVEEGL ITKEQAIMRI APQSDVQLLH KNMPANYAEA PLVKGLPASP
401 GAATGAVVFD ADDAVEQAKG KKVLLIREET KPEDIHGFFV AEGILTCRGG
451 KTSAAVVAR GMGKPCVSGA EGIKVDVAKK IAKIGSLEVH EGDILTIDGS
501 TGCVYKGEVP LEEPQVGGSGY FGITLKWANE IKKIGVFANA DLP SARKKAL
551 EFGAEGIGLC RTERMFNAVE RLPIVVKMIL SNTLEERKKY LNELMPLQKQ
601 DFIGLLKTMN GLPVTYRLLD PELHEFLPTL EELNREIFFE KLSGKTEGLA
651 EKEVVLKVKV ELMENVPMIG HRGIRLGTIN PELVEMQIRA FLEATAEVIK
701 EGKITHAEIM IPNVIEVNEL INLRKNVLEP VHEEVEKKYK IKVPFMYGIM
751 VECVRAALTA DKIAERASFF SFGTNDLTQG TFSYSREDSE NKFIPIKVEL
801 KILPANFEI LDRPGVGEVM RIATVTKGRQT RPELLVIGIG ERSGEPSSIE
851 WCHMIGLNYV SCSSYRIPVA RIAAAQAQIR HPREN

```

(SEQ ID NO:14)

HÌNH 3

(A)

(MATRIX)
(SCIENCE)

Các kết quả theo Nghiên cứu Mascot

Xem xét Protein

Khớp với: C4M3Z6 Ghi: 778

tr|C4M3Z6|Protein họ phosphoglucomutaza/phosphomannomutza

Tax_Id=5759 [Entamoeba histolytica]

Thấy khi tìm kiếm trong D:\Analyst Data\Projects\Proteomics\Proteomics
Files\Data\2011\110408\110408 2416B.wiffKhối lượng thường (M_r): 66607; Trị số pI theo tính toán: 6,05

Tìm kiếm C4M3Z6 theo phương pháp NCBI BLAST theo nr

Chùm trình tự không định dạng để dán vào các đơn khác

Phân loại: Loài chưa biết

Các cải biến khả biến: Oxy hóa (M)

Phân cắt bởi Trypsin: cắt bên đầu tận cùng C của KR trừ khi gốc tiếp
theo là P

Mức độ phủ trình tự: 27%

Các peptit khớp không được gạch chân

1 MALNNYIKKT EMDYLYEQAA LWLKW~~DKTPE~~ TRKEIEDLVA SKNEEELKKR
51 FCK~~RIEFGTA~~ GLRGKMCAGF NCMNNLIVQQ ASQGLALAVE ELVQNAHEKG
101 VVIGYDGRYH SKEFAAITAK VFISKGFKTY LFSTLCPTPW TAFVAVGYLKT
151 ACGVMVTASH NPKADNGYKV YWENGQIIE PIDANIASKI HSNLEPWDLS
201 NVDISKVIDP LADVSAEYYK QMMLTIPHFE CPEQPKVKYV YTAMHGVGSK
251 YVQDAFKTAK LPQPILVPLQ NEPDPEFPTV PFPNPEEGKG ALKCSIEVAE
301 ANGATVIIAN DPDADRLSVA VKSGNGWRQF TGNEMANLIA DWTYNKYIVS
351 GDKTPAFMVR STVSSSFISK MGEVEGFDY ETLTGFKWIG NKAKEIVDTQ
401 HKLLMAYEE AIGFVIGNMS YDKDGVRAAV CFAAMALEYA EQGFNLEDRL
451 NMLYEKGYF ASNKNYYFCY DPKLMEKIFN KMRNNGQYYW KFGKYAVKSI
501 RDLTVGIDTA QPDKKPLLPV SASTQMITYT FENGCKATLR GSGTEPKLKY
551 YIELPGKKGV KAEDVIAELM DLSHELLQAS LEPEKNGLIP PKAE

(SEQ ID NO:15)

(B)

(MATRIX)
(SCIENCE)

Các kết quả theo Nghiên cứu Mascot

Xem xét protein

Khớp với: O15820 Ghi: 746

sp|O15820|Phosphoglucomutaza Tax_Id=5759 [Entamoeba histolytica]

Thấy khi tìm kiếm trong D:\Analyst Data\Projects\Proteomics\Proteomics
Files\Data\2011\110408\110408 2416B.wiffKhối lượng thường (M_r): 60750; Trị số pI theo tính toán: 5,91

Tìm kiếm O15820 theo phương pháp NCBI BLAST theo nr

Chùm trình tự không định dạng để dán vào các đơn khác

Phân loại: Loài chưa biết

Các cải biến khả biến: Oxy hóa (M)

Phân cắt bởi Trypsin: cắt bên đầu tận cùng C của KR trừ khi gốc tiếp theo là P

Mức độ phủ trình tự: 30%

Các peptit khớp không được gạch chân

```

1 MQATIKKRYPT SPISGQTLGT SGLRKRASEV ENTPNYLENF VNAMEFNAASN
51 LQKPGKIIIG GDGRYLNKKA LDIIIRVALS RGFTDIVVGK SGFMSTPAES
101 ATIIRRKAEA GFIMTASHNP AGKEEHGDFGL KLNMSNGGPA PIEVTSKIEE
151 SARNIKEIVI AELNKPLNID SVGDIEIECE GKKAVVHVID PLEDYIAYLH
201 ECFDFENLKQ FVSKYHLKVQ VDGFNAVTGI YNKKVFCELL GLPESSLKNA
251 IPMPDFGGKH PDPNLTYAAE LVHAVIPEDS PYDIGFAFDG DGDRNLIVGR
301 GAFVSPSDSL AILSTKYNDI PFFVKNGFKG VARSMPTSAA VDHVTSITET
351 PTGWKFFGNL MDSGKISLCG EESFGTGCCG IREKDWIWA LCWVSILAAE
401 SERAQRLVGV KEILESHWAK YGRNYYQRYD FDEVDKKAAE DMMQMMRDNA
451 KTVKCDLNGV PLKFCDDFEY HDSVDGSVTS KQGIRFVFED GSRIIFRLSG
501 TGSVGATIRV YFDKYSKDYK ADQTKVLADM VTVAYAVSQI TKFTGREKPS
551 VVT

```

(SEQ ID NO:16)

(C)

(MATRIX)
(SCIENCE)

Các kết quả theo Nghiên cứu Mascot

Xem xét protein

Khớp với: C4LTX6 Ghi: 700

tr|C4LTX6|Pyruvat:ferredoxin oxidoreductaza Tax_Id=5759 [Entamoeba histolytica]

Thấy khi tìm kiếm trong D:\Analyst Data\Projects\Proteomics\Proteomics Files\Data\2011\110408\110408 2416A.wiff

Khối lượng thường (M_r): 127554; Trị số pI theo tính toán: 6,35

Tìm kiếm C4LTX6 theo phương pháp NCBI BLAST theo nr

Chùm trình tự không định dạng để dán vào các đơn khác

Phân loại: Loài chưa biết

Các cải biến khả biến: Oxy hóa (M)

Phân cắt bởi Trypsin: cắt bên đầu tận cùng C của KR trừ khi gốc tiếp theo là P

Mức độ phủ trình tự: 15%

Các peptit khớp không được gạch chân

```

1 MQSVDGNQAA AYVSIALSDV SFIFPITPSS PMAENADVWS SQGRKNVFGQ
51 VVDVYEMESE AGASGAVHGG CAAGSLVSTY TCSQGLMLMI PNMIKIAGEH
101 LPCVFHVHTAR ALAGQALSIF GDHSDVMACR STGFCLLSSH NVQQCHDLAI
151 VAHLATLEAS LPFMHFFDGF RTSHEIQKIH QLTYDQIKSL VDMKYVDRAH
201 KRGLNPIHPS QRGTSQGPDV FFQAVEKSNA DYLVKVEIVQ KYMDKVGELT
251 GRHYKIFEYY GAADAERVVV VMGAAPVLE ECVDYLMKSG EKVGVLSVHL

```

5/5

301 YRPWSAKHFL EQLPKTVTKI SVLDRTKEAG SFGEPLYLDV ATTLLDAGKH
 351 IKCVGGRYGL GSKEFTPAMA KAVFDNLKNE EPKNHFTVGI EDDVTHMSLP
 401 IGENFNPIPE GTTQCMFWGL GSDGTVGANH DAIRIIGQNT DMYVQGYFSY
 451 DAHKS GGVTV SHLRFGQKPI KSQYLIQNAD YTACHFPNYV KKYKLLDAAK
 501 PNSVFVLNCP WTGAELEAQL PGSLKRVIAE KQIKFYTIDA IKIGQEVKLG
 551 RRINMIMQTV FFKLANVIPF EKAIVLLKEA VQKTYGAKGP AIVKMNHDAI
 601 DKALDGLVEV KVPAEWANAP LETVTKIEAP EFVTDVLMPO LAMKGNELPV
 651 SKFAADGFMP MGTTKYEKRG IATKIPTWEA SKCVQCNMCS LYCPHAAIRC
 701 FYLTPEESAK APAEFVQIDG KAQQAGYKFR IQVSAMDCTG CEVCTTACPV
 751 KCLSMTPFEQ VSEVESKNWE FAMTLSPKNS LSDRSNIKTT MIHQPYLEFS
 801 GACEGCNETA LVKLITQLYG ERTIIANATG CSSIWGATWG TNPYTVDGEG
 851 RGPWAGNSLF EDNAEYGFGM FKANEQRRLY LEQICKEAIA EGKLSNELKT
 901 LLEEWIAKKE DANESEKIYA AVKPLLAEEK DKSEVLGLIE QNSDMFVKIS
 951 HWIVGGDGWA YDIGYNGVDH VLASGHNVNI LVLDTEMYSN TGGQKSKATN
 1001 LGAVVKFASS GCKRPKKDLG AIAMAYGDVY VASIALGANP AQAFKAFKEA
 1051 ESYNGVSLII AYCPCKEQGV PLQKSIEEAK MAVNSGYWSL YRYDPRLVEQ
 1101 GKPGQLDCS EVKGDLEAFL ARENRFALLG RKDKETADKL HAQLKANIDK
 1151 KLAHLKVVSQ QA

(SEQ ID NO:17)

HÌNH 4

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Universiti Sains Malaysia
 <120> Phương pháp in vitro phát hiện protein của *Entamoeba histolytica*,
 chất chỉ điểm sinh học huyết thanh, kit và tác nhân liên kết đặc
 hiệu với protein của *Entamoeba histolytica*
 <130> FP5513
 <160> 17
 <170> PatentIn phiên bản 3.5
 <210> 1
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Entamoeba histolytica*

 <220>
 <221> dấu hiệu_hỗn hợp
 <223> Họ BspA protein lặp lại giàu Leucin
 <400> 1
 Gly Cys Arg Ser Ile Glu Leu Ile Asp Thr Lys
 1 5 10

 <210> 2
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Entamoeba histolytica*

 <220>
 <221> dấu hiệu_hỗn hợp
 <223> protein họ cullin
 <400> 2
 Lys Met Glu Lys Ile Cys Lys
 1 5

 <210> 3
 <211> 885
 <212> PRT
 <213> *Entamoeba histolytica*

 <220>
 <221> dấu hiệu_hỗn hợp
 <223> pyruvat phosphat đikinaza
 <400> 3
 Met Gln Arg Val Tyr Ala Phe Glu Asp Gly Asp Gly Thr Asn Lys Lys
 1 5 10 15

 Leu Leu Gly Gly Lys Gly Ala Gly Leu Cys Thr Met Thr Lys Ile Gly

20	25	30
Leu Pro Val Pro Gln Gly Phe Val Ile Thr Thr Glu Met Cys Lys Gln 35 40 45		
Phe Ile Ala Asn Gly Asn Lys Met Pro Glu Gly Leu Met Glu Glu Val 50 55 60		
Lys Lys Asn Met Gln Leu Val Glu Lys Lys Ser Gly Lys Val Phe Gly 65 70 75 80		
Gly Glu Glu Asn Pro Leu Leu Val Ser Val Arg Ser Gly Ala Ala Met 85 90 95		
Ser Met Pro Gly Met Met Asp Thr Ile Leu Asn Leu Gly Leu Asn Asp 100 105 110		
Lys Thr Val Val Ala Leu Ala Lys Leu Thr Asn Asn Glu Arg Phe Ala 115 120 125		
Tyr Asp Ser Tyr Arg Arg Phe Val Ser Leu Phe Gly Lys Ile Ala Leu 130 135 140		
Asn Val Asp Asp Glu Val Tyr Asp Lys Thr Leu Glu Asn Lys Lys Val 145 150 155 160		
Glu Lys Gly Val Lys Leu Asp Thr Glu Leu Asp Ala Asn Asp Met Lys 165 170 175		
Glu Leu Ala Gln Val Phe Ile Lys Lys Thr Glu Glu Phe Thr Lys Gln 180 185 190		
Pro Phe Pro Val Asp Pro Tyr Ala Gln Leu Glu Phe Ala Ile Cys Ala 195 200 205		
Val Phe Arg Ser Trp Met Gly Lys Arg Ala Val Asp Tyr Arg Arg Glu 210 215 220		
Phe Lys Ile Thr Pro Glu Gln Ala Asp Gly Thr Ala Val Ser Val Val 225 230 235 240		
Ser Met Val Tyr Gly Asn Met Gly Asn Asp Ser Ala Thr Gly Val Cys 245 250 255		
Phe Thr Arg Asp Pro Gly Thr Gly Glu Asn Met Phe Phe Gly Glu Tyr 260 265 270		

Leu Lys Asn Ala Gln Gly Glu Asp Val Val Ala Gly Ile Arg Thr Pro
 275 280 285

Gln Ile Ile Ser Lys Met Ala Glu Asp Ala Asp Leu Pro Gly Cys Tyr
 290 295 300

Glu Gln Leu Leu Asp Ile Arg Lys Lys Leu Glu Gly Tyr Phe His Glu
 305 310 315 320

Val Gln Asp Phe Glu Phe Thr Ile Glu Arg Lys Lys Leu Tyr Met Leu
 325 330 335

Gln Thr Arg Asn Gly Lys Met Asn Ala Thr Ala Thr Val Arg Thr Gly
 340 345 350

Val Asp Met Val Glu Glu Gly Leu Ile Thr Lys Glu Gln Ala Ile Met
 355 360 365

Arg Ile Ala Pro Gln Ser Val Asp Gln Leu Leu His Lys Asn Met Pro
 370 375 380

Ala Asn Tyr Ala Glu Ala Pro Leu Val Lys Gly Leu Pro Ala Ser Pro
 385 390 395 400

Gly Ala Ala Thr Gly Ala Val Val Phe Asp Ala Asp Asp Ala Val Glu
 405 410 415

Gln Ala Lys Gly Lys Lys Val Leu Leu Leu Arg Glu Glu Thr Lys Pro
 420 425 430

Glu Asp Ile His Gly Phe Phe Val Ala Glu Gly Ile Leu Thr Cys Arg
 435 440 445

Gly Gly Lys Thr Ser His Ala Ala Val Val Ala Arg Gly Met Gly Lys
 450 455 460

Pro Cys Val Ser Gly Ala Glu Gly Ile Lys Val Asp Val Ala Lys Lys
 465 470 475 480

Ile Ala Lys Ile Gly Ser Leu Glu Val His Glu Gly Asp Ile Leu Thr
 485 490 495

Ile Asp Gly Ser Thr Gly Cys Val Tyr Lys Gly Glu Val Pro Leu Glu
 500 505 510

Glu Pro Gln Val Gly Ser Gly Tyr Phe Gly Thr Ile Leu Lys Trp Ala
 515 520 525

Asn Glu Ile Lys Lys Ile Gly Val Phe Ala Asn Ala Asp Leu Pro Ser
 530 535 540

Ala Ala Lys Lys Ala Leu Glu Phe Gly Ala Glu Gly Ile Gly Leu Cys
 545 550 555 560

Arg Thr Glu Arg Met Phe Asn Ala Val Glu Arg Leu Pro Ile Val Val
 565 570 575

Lys Met Ile Leu Ser Asn Thr Leu Glu Glu Arg Lys Lys Tyr Leu Asn
 580 585 590

Glu Leu Met Pro Leu Gln Lys Gln Asp Phe Ile Gly Leu Leu Lys Thr
 595 600 605

Met Asn Gly Leu Pro Val Thr Val Arg Leu Leu Asp Pro Pro Leu His
 610 615 620

Glu Phe Leu Pro Thr Leu Glu Glu Leu Met Arg Glu Ile Phe Glu Met
 625 630 635 640

Lys Leu Ser Gly Lys Thr Glu Gly Leu Ala Glu Lys Glu Val Val Leu
 645 650 655

Lys Lys Val Lys Glu Leu Met Glu Val Asn Pro Met Ile Gly His Arg
 660 665 670

Gly Ile Arg Leu Gly Thr Thr Asn Pro Glu Ile Tyr Glu Met Gln Ile
 675 680 685

Arg Ala Phe Leu Glu Ala Thr Ala Glu Val Ile Lys Glu Gly Ile Lys
 690 695 700

Thr His Ala Glu Ile Met Ile Pro Asn Val Thr Glu Val Asn Glu Leu
 705 710 715 720

Ile Asn Leu Arg Lys Asn Val Leu Glu Pro Val His Glu Glu Val Glu
 725 730 735

Lys Lys Tyr Gly Ile Lys Val Pro Phe Met Tyr Gly Thr Met Val Glu
 740 745 750

Cys Val Arg Ala Ala Leu Thr Ala Asp Lys Ile Ala Thr Glu Ala Ser
 755 760 765

Phe Phe Ser Phe Gly Thr Asn Asp Leu Thr Gln Gly Thr Phe Ser Tyr
 770 775 780

Ser Arg Glu Asp Ser Glu Asn Lys Phe Ile Pro Lys Tyr Val Glu Leu
785 790 795 800

Lys Ile Leu Pro Ala Asn Pro Phe Glu Ile Leu Asp Arg Pro Gly Val
805 810 815

Gly Glu Val Met Arg Ile Ala Val Thr Lys Gly Arg Gln Thr Arg Pro
820 825 830

Glu Leu Leu Val Gly Ile Cys Gly Glu His Gly Gly Glu Pro Ser Ser
835 840 845

Ile Glu Trp Cys His Met Ile Gly Leu Asn Tyr Val Ser Cys Ser Ser
850 855 860

Tyr Arg Ile Pro Val Ala Arg Ile Ala Ala Ala Gln Ala Gln Ile Arg
865 870 875 880

His Pro Arg Glu Asn
885

<210> 4
<211> 594
<212> PRT
<213> Entamoeba histolytica

<220>
<221> dấu hiệu hỗn hợp
<223> Protein họ phosphoglucomutaza/phosphomannomutaza

<400> 4

Met Ala Leu Asn Asn Tyr Ile Lys Lys Thr Glu Met Asp Tyr Leu Tyr
1 5 10 15

Glu Gln Ala Ala Leu Trp Leu Lys Trp Asp Lys Thr Pro Glu Thr Arg
20 25 30

Lys Glu Ile Glu Asp Leu Val Ala Ser Lys Asn Glu Glu Glu Leu Lys
35 40 45

Lys Arg Phe Cys Lys Arg Ile Glu Phe Gly Thr Ala Gly Leu Arg Gly
50 55 60

Lys Met Cys Ala Gly Phe Asn Cys Met Asn Asn Leu Ile Val Gln Gln
65 70 75 80

Ala Ser Gln Gly Leu Ala Leu Ala Val Glu Glu Leu Val Gln Asn Ala

				85				90				95				
His	Glu	Lys	Gly	Val	Val	Ile	Gly	Tyr	Asp	Gly	Arg	Tyr	His	Ser	Lys	
			100				105						110			
Glu	Phe	Ala	Ala	Ile	Thr	Ala	Lys	Val	Phe	Ile	Ser	Lys	Gly	Phe	Lys	
			115				120						125			
Thr	Tyr	Leu	Phe	Ser	Thr	Leu	Cys	Pro	Thr	Pro	Trp	Thr	Ala	Phe	Ala	
			130				135						140			
Val	Gly	Tyr	Leu	Lys	Thr	Ala	Cys	Gly	Val	Met	Val	Thr	Ala	Ser	His	
			145				150						155			
Asn	Pro	Lys	Ala	Asp	Asn	Gly	Tyr	Lys	Val	Tyr	Trp	Glu	Asn	Gly	Cys	
			165						170						175	
Gln	Ile	Ile	Glu	Pro	Ile	Asp	Ala	Asn	Ile	Ala	Ser	Lys	Ile	His	Ser	
			180						185						190	
Asn	Leu	Glu	Pro	Trp	Asp	Leu	Ser	Asn	Val	Asp	Ile	Ser	Lys	Val	Ile	
			195						200						205	
Asp	Pro	Leu	Ala	Asp	Val	Ser	Ala	Glu	Tyr	Tyr	Lys	Gln	Met	Met	Leu	
			210			215						220				
Thr	Ile	Pro	His	Phe	Glu	Cys	Pro	Glu	Gln	Pro	Lys	Val	Lys	Tyr	Val	
			225			230						235			240	
Tyr	Thr	Ala	Met	His	Gly	Val	Gly	Ser	Lys	Tyr	Val	Gln	Asp	Ala	Phe	
			245						250						255	
Lys	Thr	Ala	Lys	Leu	Pro	Gln	Pro	Ile	Leu	Val	Pro	Leu	Gln	Asn	Glu	
			260						265						270	
Pro	Asp	Pro	Glu	Phe	Pro	Thr	Val	Pro	Phe	Pro	Asn	Pro	Glu	Glu	Gly	
			275						280						285	
Lys	Gly	Ala	Leu	Lys	Cys	Ser	Ile	Glu	Val	Ala	Glu	Ala	Asn	Gly	Ala	
			290			295						300				
Thr	Val	Ile	Ile	Ala	Asn	Asp	Pro	Asp	Ala	Asp	Arg	Leu	Ser	Val	Ala	
			305			310						315			320	
Val	Lys	Ser	Gly	Asn	Gly	Trp	Arg	Gln	Phe	Thr	Gly	Asn	Glu	Met	Ala	
			325						330						335	

Asn Leu Ile Ala Asp Trp Thr Tyr Asn Lys Tyr Ile Val Ser Gly Asp
 340 345 350

Lys Thr Pro Ala Phe Met Val Arg Ser Thr Val Ser Ser Ser Phe Ile
 355 360 365

Ser Lys Met Gly Glu Val Glu Gly Phe Asp Thr Tyr Glu Thr Leu Thr
 370 375 380

Gly Phe Lys Trp Ile Gly Asn Lys Ala Lys Glu Ile Val Asp Thr Gln
 385 390 395 400

His Lys Lys Leu Leu Met Ala Tyr Glu Glu Ala Ile Gly Phe Val Ile
 405 410 415

Gly Asn Met Ser Tyr Asp Lys Asp Gly Val Arg Ala Ala Val Cys Phe
 420 425 430

Ala Ala Met Ala Leu Glu Tyr Ala Glu Gln Gly Phe Asn Leu Glu Asp
 435 440 445

Arg Leu Asn Met Leu Tyr Glu Lys Tyr Gly Tyr Phe Ala Ser Asn Asn
 450 455 460

Lys Tyr Tyr Phe Cys Tyr Asp Pro Lys Leu Met Glu Lys Ile Phe Asn
 465 470 475 480

Lys Met Arg Asn Asn Gly Gln Tyr Tyr Trp Lys Phe Gly Lys Tyr Ala
 485 490 495

Val Lys Ser Ile Arg Asp Leu Thr Val Gly Ile Asp Thr Ala Gln Pro
 500 505 510

Asp Lys Lys Pro Leu Leu Pro Val Ser Ala Ser Thr Gln Met Ile Thr
 515 520 525

Tyr Thr Phe Glu Asn Gly Cys Lys Ala Thr Leu Arg Gly Ser Gly Thr
 530 535 540

Glu Pro Lys Leu Lys Tyr Tyr Ile Glu Leu Pro Gly Lys Lys Gly Val
 545 550 555 560

Lys Ala Glu Asp Val Ile Ala Glu Leu Met Asp Leu Ser His Glu Leu
 565 570 575

Leu Gln Ala Ser Leu Glu Pro Glu Lys Asn Gly Leu Ile Pro Pro Lys
 580 585 590

Ala Glu

<210> 5
 <211> 553
 <212> PRT
 <213> Entamoeba histolytica

<220>
 <221> dấu hiệu hỗn hợp
 <223> Phosphoglucomutaza

<400> 5

Met Gln Ala Thr Ile Lys Arg Tyr Pro Thr Ser Pro Ile Ser Gly Gln
 1 5 10 15

Thr Leu Gly Thr Ser Gly Leu Arg Lys Arg Ala Ser Glu Val Glu Asn
 20 25 30

Thr Pro Asn Tyr Leu Glu Asn Phe Val Asn Ala Met Phe Asn Ala Ala
 35 40 45

Ser Asn Leu Gln Lys Pro Gly Lys Ile Ile Ile Gly Gly Asp Gly Arg
 50 55 60

Tyr Leu Asn Leu Lys Ala Leu Asp Ile Ile Ile Arg Val Ala Leu Ser
 65 70 75 80

Arg Gly Phe Thr Asp Ile Val Val Gly Lys Ser Gly Phe Met Ser Thr
 85 90 95

Pro Ala Glu Ser Ala Thr Ile Ile Arg Arg Lys Ala Glu Ala Gly Phe
 100 105 110

Ile Met Thr Ala Ser His Asn Pro Ala Gly Lys Glu His Gly Asp Phe
 115 120 125

Gly Leu Lys Leu Asn Met Ser Asn Gly Gly Pro Ala Pro Ile Glu Val
 130 135 140

Thr Ser Lys Ile Glu Glu Ser Ala Arg Asn Ile Lys Glu Ile Val Ile
 145 150 155 160

Ala Glu Leu Asn Lys Pro Leu Asn Ile Asp Ser Val Gly Asp Ile Glu
 165 170 175

Ile Glu Cys Glu Gly Lys Lys Ala Val Val His Val Ile Asp Pro Leu
 180 185 190

Glu Asp Tyr Ile Ala Tyr Leu His Glu Cys Phe Asp Phe Glu Asn Leu
195 200 205

Lys Gln Phe Val Ser Lys Tyr His Leu Lys Val Gln Val Asp Gly Phe
210 215 220

Asn Ala Val Thr Gly Ile Tyr Asn Lys Lys Val Phe Cys Glu Leu Leu
225 230 235 240

Gly Leu Pro Glu Ser Ser Leu Lys Asn Ala Ile Pro Met Pro Asp Phe
245 250 255

Gly Gly Lys His Pro Asp Pro Asn Leu Thr Tyr Ala Ala Glu Leu Val
260 265 270

His Ala Val Ile Pro Glu Asp Ser Pro Tyr Asp Ile Gly Phe Ala Phe
275 280 285

Asp Gly Asp Gly Asp Arg Asn Leu Ile Val Gly Arg Gly Ala Phe Val
290 295 300

Ser Pro Ser Asp Ser Leu Ala Ile Leu Ser Thr Lys Tyr Asn Asp Ile
305 310 315 320

Pro Phe Phe Val Lys Asn Gly Phe Lys Gly Val Ala Arg Ser Met Pro
325 330 335

Thr Ser Ala Ala Val Asp His Val Thr Ser Ile Thr Glu Thr Pro Thr
340 345 350

Gly Trp Lys Phe Phe Gly Asn Leu Met Asp Ser Gly Lys Ile Ser Leu
355 360 365

Cys Gly Glu Glu Ser Phe Gly Thr Gly Cys Cys Gly Ile Arg Glu Lys
370 375 380

Asp Gly Ile Trp Ala Ala Leu Cys Trp Val Ser Ile Leu Ala Ala Glu
385 390 395 400

Ser Glu Arg Ala Gln Arg Leu Val Gly Val Lys Glu Ile Leu Glu Ser
405 410 415

His Trp Ala Lys Tyr Gly Arg Asn Tyr Tyr Gln Arg Tyr Asp Phe Asp
420 425 430

Glu Val Asp Lys Lys Ala Ala Glu Asp Met Met Gln Met Met Arg Asp

435

440

445

Asn Ala Lys Thr Val Lys Cys Asp Leu Asn Gly Val Pro Leu Lys Phe
 450 455 460

Cys Asp Asp Phe Glu Tyr His Asp Ser Val Asp Gly Ser Val Thr Ser
 465 470 475 480

Lys Gln Gly Ile Arg Phe Val Phe Glu Asp Gly Ser Arg Ile Ile Phe
 485 490 495

Arg Leu Ser Gly Thr Gly Ser Val Gly Ala Thr Ile Arg Val Tyr Phe
 500 505 510

Asp Lys Tyr Ser Lys Asp Tyr Lys Ala Asp Gln Thr Lys Val Leu Ala
 515 520 525

Asp Met Val Thr Val Ala Tyr Ala Val Ser Gln Ile Thr Lys Phe Thr
 530 535 540

Gly Arg Glu Lys Pro Ser Val Val Thr
 545 550

<210> 6
 <211> 1162
 <212> PRT
 <213> Entamoeba histolytica

<220>
 <221> dấu hiệu hỗn hợp
 <223> Pyruvat:ferredoxin oxidoreductaza

<400> 6

Met Gln Ser Val Asp Gly Asn Gln Ala Ala Tyr Val Ser Tyr Ala
 1 5 10 15

Leu Ser Asp Val Ser Phe Ile Phe Pro Ile Thr Pro Ser Ser Pro Met
 20 25 30

Ala Glu Asn Ala Asp Val Trp Ser Ser Gln Gly Arg Lys Asn Val Phe
 35 40 45

Gly Gln Val Val Asp Val Tyr Glu Met Glu Ser Glu Ala Gly Ala Ser
 50 55 60

Gly Ala Val His Gly Gly Cys Ala Ala Gly Ser Leu Val Ser Thr Tyr
 65 70 75 80

Thr Cys Ser Gln Gly Leu Met Leu Met Ile Pro Asn Met Ile Lys Ile
 85 90 95

Ala Gly Glu His Leu Pro Cys Val Phe His Val Thr Ala Arg Ala Leu
 100 105 110

Ala Gly Gln Ala Leu Ser Ile Phe Gly Asp His Ser Asp Val Met Ala
 115 120 125

Cys Arg Ser Thr Gly Phe Cys Leu Leu Ser Ser His Asn Val Gln Gln
 130 135 140

Cys His Asp Leu Ala Ile Val Ala His Leu Ala Thr Leu Glu Ala Ser
 145 150 155 160

Leu Pro Phe Met His Phe Phe Asp Gly Phe Arg Thr Ser His Glu Ile
 165 170 175

Gln Lys Ile His Gln Leu Thr Tyr Asp Gln Ile Lys Ser Leu Val Asp
 180 185 190

Met Lys Tyr Val Asp Arg Ala His Lys Arg Gly Leu Asn Pro Ile His
 195 200 205

Pro Ser Gln Arg Gly Thr Ser Gln Gly Pro Asp Val Phe Phe Gln Ala
 210 215 220

Val Glu Lys Ser Asn Ala Asp Tyr Leu Lys Val Pro Glu Ile Val Gln
 225 230 235 240

Lys Tyr Met Asp Lys Val Gly Glu Leu Thr Gly Arg His Tyr Lys Ile
 245 250 255

Phe Glu Tyr Tyr Gly Ala Ala Asp Ala Glu Arg Val Val Val Val Met
 260 265 270

Gly Ala Ala Val Pro Val Leu Glu Glu Cys Val Asp Tyr Leu Met Lys
 275 280 285

Ser Gly Glu Lys Val Gly Val Leu Ser Val His Leu Tyr Arg Pro Trp
 290 295 300

Ser Ala Lys His Phe Leu Glu Gln Leu Pro Lys Thr Val Thr Lys Ile
 305 310 315 320

Ser Val Leu Asp Arg Thr Lys Glu Ala Gly Ser Phe Gly Glu Pro Leu
 325 330 335

Tyr Leu Asp Val Ala Thr Thr Leu Leu Asp Ala Gly Lys His Ile Lys
 340 345 350

Cys Val Gly Gly Arg Tyr Gly Leu Gly Ser Lys Glu Phe Thr Pro Ala
 355 360 365

Met Ala Lys Ala Val Phe Asp Asn Leu Lys Asn Glu Glu Pro Lys Asn
 370 375 380

His Phe Thr Val Gly Ile Glu Asp Asp Val Thr His Met Ser Leu Pro
 385 390 395 400

Ile Gly Glu Asn Phe Asn Pro Ile Pro Glu Gly Thr Thr Gln Cys Met
 405 410 415

Phe Trp Gly Leu Gly Ser Asp Gly Thr Val Gly Ala Asn His Asp Ala
 420 425 430

Ile Arg Ile Ile Gly Gln Asn Thr Asp Met Tyr Val Gln Gly Tyr Phe
 435 440 445

Ser Tyr Asp Ala His Lys Ser Gly Gly Val Thr Val Ser His Leu Arg
 450 455 460

Phe Gly Gln Lys Pro Ile Lys Ser Gln Tyr Leu Ile Gln Asn Ala Asp
 465 470 475 480

Tyr Thr Ala Cys His Phe Pro Asn Tyr Val Lys Lys Tyr Lys Leu Leu
 485 490 495

Asp Ala Ala Lys Pro Asn Ser Val Phe Val Leu Asn Cys Pro Trp Thr
 500 505 510

Gly Ala Glu Leu Glu Ala Gln Leu Pro Gly Ser Leu Lys Arg Val Ile
 515 520 525

Ala Glu Lys Gln Ile Lys Phe Tyr Thr Ile Asp Ala Ile Lys Ile Gly
 530 535 540

Gln Glu Val Lys Leu Gly Arg Arg Ile Asn Met Ile Met Gln Thr Val
 545 550 555 560

Phe Phe Lys Leu Ala Asn Val Ile Pro Phe Glu Lys Ala Ile Val Leu
 565 570 575

Leu Lys Glu Ala Val Gln Lys Thr Tyr Gly Ala Lys Gly Pro Ala Ile
 580 585 590

Val Lys Met Asn His Asp Ala Ile Asp Lys Ala Leu Asp Gly Leu Val
595 600 605

Glu Val Lys Val Pro Ala Glu Trp Ala Asn Ala Pro Leu Glu Thr Val
610 615 620

Thr Lys Ile Glu Ala Pro Glu Phe Val Thr Asp Val Leu Met Pro Gln
625 630 635 640

Leu Ala Met Lys Gly Asn Glu Leu Pro Val Ser Lys Phe Ala Ala Asp
645 650 655

Gly Phe Met Pro Met Gly Thr Thr Lys Tyr Glu Lys Arg Gly Ile Ala
660 665 670

Thr Lys Ile Pro Thr Trp Glu Ala Ser Lys Cys Val Gln Cys Asn Met
675 680 685

Cys Ser Leu Tyr Cys Pro His Ala Ala Ile Arg Cys Phe Tyr Leu Thr
690 695 700

Pro Glu Glu Ser Ala Lys Ala Pro Ala Glu Phe Val Gln Ile Asp Gly
705 710 715 720

Lys Ala Gln Gln Ala Gly Tyr Lys Phe Arg Ile Gln Val Ser Ala Met
725 730 735

Asp Cys Thr Gly Cys Glu Val Cys Thr Thr Ala Cys Pro Val Lys Cys
740 745 750

Leu Ser Met Thr Pro Phe Glu Gln Val Ser Glu Val Glu Ser Lys Asn
755 760 765

Trp Glu Phe Ala Met Thr Leu Ser Pro Lys Asn Ser Leu Ser Asp Arg
770 775 780

Ser Asn Ile Lys Thr Thr Met Ile His Gln Pro Tyr Leu Glu Phe Ser
785 790 795 800

Gly Ala Cys Glu Gly Cys Asn Glu Thr Ala Leu Val Lys Leu Ile Thr
805 810 815

Gln Leu Tyr Gly Glu Arg Thr Ile Ile Ala Asn Ala Thr Gly Cys Ser
820 825 830

Ser Ile Trp Gly Ala Thr Trp Gly Thr Asn Pro Tyr Thr Val Asp Gly

835	840	845
Glu Gly Arg Gly Pro Ala Trp Gly Asn Ser Leu Phe Glu Asp Asn Ala		
850	855	860
Glu Tyr Gly Phe Gly Met Phe Lys Ala Asn Glu Gln Arg Arg Leu Tyr		
865	870	875
		880
Leu Glu Gln Ile Cys Lys Glu Ala Ile Ala Glu Gly Lys Leu Ser Asn		
	885	890
		895
Glu Leu Lys Thr Leu Leu Glu Glu Trp Ile Ala Lys Lys Glu Asp Ala		
	900	905
		910
Asn Glu Ser Glu Lys Ile Tyr Ala Ala Val Lys Pro Leu Leu Ala Ala		
	915	920
		925
Glu Lys Asp Lys Ser Glu Val Leu Gly Leu Ile Glu Gln Asn Ser Asp		
930	935	940
Met Phe Val Lys Ile Ser His Trp Ile Val Gly Gly Asp Gly Trp Ala		
945	950	955
		960
Tyr Asp Ile Gly Tyr Asn Gly Val Asp His Val Leu Ala Ser Gly His		
	965	970
		975
Asn Val Asn Ile Leu Val Leu Asp Thr Glu Met Tyr Ser Asn Thr Gly		
	980	985
		990
Gly Gln Lys Ser Lys Ala Thr Asn Leu Gly Ala Val Val Lys Phe Ala		
995	1000	1005
Ser Ser Gly Cys Lys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Gly Ala Ile Ala		
1010	1015	1020
Met Ala Tyr Gly Asp Val Tyr Val Ala Ser Ile Ala Leu Gly Ala		
1025	1030	1035
Asn Pro Ala Gln Ala Phe Lys Ala Phe Lys Glu Ala Glu Ser Tyr		
1040	1045	1050
Asn Gly Val Ser Leu Ile Ile Ala Tyr Cys Pro Cys Lys Glu Gln		
1055	1060	1065
Gly Val Pro Leu Gln Lys Ser Ile Glu Glu Ala Lys Met Ala Val		
1070	1075	1080

Asn Ser Gly Tyr Trp Ser Leu Tyr Arg Tyr Asp Pro Arg Leu Val
 1085 1090 1095

Glu Gln Gly Lys Pro Gly Leu Gln Leu Asp Cys Ser Glu Val Lys
 1100 1105 1110

Gly Asp Leu Glu Ala Phe Leu Ala Arg Glu Asn Arg Phe Ala Leu
 1115 1120 1125

Leu Gly Arg Lys Asp Lys Glu Thr Ala Asp Lys Leu His Ala Gln
 1130 1135 1140

Leu Lys Ala Asn Ile Asp Lys Lys Leu Ala His Leu Lys Val Val
 1145 1150 1155

Ser Lys Gln Ala
 1160

<210> 7
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Entamoeba histolytica

<400> 7

Lys Lys Thr Glu Glu Phe Thr Lys Gln
 1 5

<210> 8
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Entamoeba histolytica

<400> 8

Lys Thr Ser His Ala Val Val Ala Arg Gly
 1 5 10

<210> 9
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Entamoeba histolytica

<400> 9

Arg Phe Ala Tyr Asp Ser Tyr Arg Arg
 1 5

<210> 10
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Entamoeba histolytica

<400> 10

Arg Ile Ala Ala Ala Gln Ala Gln Ile Arg His
1 5 10

<210> 11
<211> 12
<212> PRT
<213> Entamoeba histolytica

<400> 11

Lys Thr Met Asn Gly Leu Pro Val Thr Val Arg Leu
1 5 10

<210> 12
<211> 13
<212> PRT
<213> Entamoeba histolytica

<400> 12

Lys Asn Ala Gln Gly Glu Asp Val Val Ala Gly Ile Arg
1 5 10

<210> 13
<211> 12
<212> PRT
<213> Entamoeba histolytica

<400> 13

Lys Tyr Leu Asn Glu Leu Met Pro Leu Gln Lys Gln
1 5 10

<210> 14
<211> 14
<212> PRT
<213> Entamoeba histolytica

<400> 14

Arg Ile Ala Pro Gln Ser Val Asp Gln Leu Leu His Lys Asn
1 5 10

<210> 15
<211> 15
<212> PRT
<213> Entamoeba histolytica

<400> 15

Arg Val Tyr Ala Phe Glu Asp Gly Asp Gly Thr Asn Lys Lys Leu
1 5 10 15

<210> 16
<211> 16
<212> PRT

<213> Entamoeba histolytica

<400> 16

Lys	Val	Phe	Gly	Gly	Glu	Glu	Asn	Pro	Leu	Leu	Val	Ser	Val	Arg	Ser
1				5					10					15	

<210> 17

<211> 15

<212> PRT

<213> Entamoeba histolytica

<400> 17

Lys	Asn	Val	Leu	Glu	Pro	Val	His	Glu	Glu	Val	Glu	Lys	Lys	Tyr
1				5					10					15