خالص سازی و بررسی خواص سینتیکی آنزیم هیستامیناز از گونه خلر (*Lathyrus sativus*) با استفاده از کروماتوگرافی تعویض آنیون

مسعود علیرضایی[۲،۱]، آزاده خونساری[۲] ، شیما نعمتی[۲]، نجمه خلیقیان[۳] ،کتایون جاوید نیا[۳]

۱-بخش بیوشیمی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران

۲-مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران

۳-مرکزتحقیقات شیمی و فراورده های دارویی دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

یافته / دوره چهاردهم / شماره ۲ / بهار ۹۱ / ویژه نامه گیاهان دارویی

چکیده

دریافت مقاله: ۹۰/۱۱/۲۳ ، پذیرش مقاله: ۹۱/۱/۲۲

✱ **مقدمه:** مسمومیت با هیستامین به طور مستقیم در ارتباط با نگهداری نامناسب غذاها می‌باشد. دی آمین اکسیداز، دآمیناسیون اکسیداتیو هیستامین و آمین‌های بیوژنیک دیگر مانند کاداورین و پوترسین را کاتالیز می‌کند. دی‌آمین اکسیدازهای گیاهی پراکندگی زیادی در خانواده لگومینه مانند نخود، خلر و ماش دارند. به این دلیل، این مطالعه انجام گرفت تا خالص‌سازی و خواص کینتیکی آنزیم هیستامیناز از جوانه‌های خلر آزمایش گردد.

✱ **مواد و روش‌ها:** خالص‌سازی آنزیم بوسیله روش انجام شده فدریکو و همکاران با یکسری تغییرات بود. به طور کوتاه، با استفاده از رسوب دادن بوسیله سولفات آمونیوم، دیالیز علیه بافر پتاسیم ۵۰ میلی مولار pH=۷ به مدت ۱۸ ساعت، تغلیظ بوسیله کیسه‌های دیالیز بر روی پلی اتیلن گلیکول، گذاشتن روی ستون DEAE-52 سفادکس که قبلاً با بافر فسفات پتاسیم ۱۵ میلی مولار و pH=۵/۵ به تعادل رسیده بود حاوی یک میکرومول $CuCl_2$ و در نهایت آنزیم با افزایش شیب نمک در ۰/۲ M خارج گردید. هموژنوسیته آنزیم بوسیله تکنیک SDS-PAGE در هر مرحله تائید شد و فعالیت دی‌آمین اکسیداز بوسیله اسپکتروفتومتر مشخص گردید.

✱ **یافته‌ها:** فعالیت ویژه آنزیم نهایی خالص شده برای سوبسترای هیستامین ۵۰ واحد در میلی‌گرم پروتئین یادداشت شد و خواص کینتیکی آنزیم (V_{max} =۳/۰۵، K_m=۲/۵) و هموژنوسیتی آنزیم خالص شده بوسیله SDS-PAGE در ناحیه ۷۲ کیلو دالتون نشان داده شد.

✱ **بحث و نتیجه‌گیری:** در مجموع آنزیم هیستامیناز گیاهی به عنوان یک آنزیم جدید در پیشگیری از مسمومیت با هیستامین امیدوار کننده است.

✱ **واژه‌های کلیدی:** هیستامیناز، کینتیک آنزیمی، ***Lathyrus sativus***

آدرس مکاتبه: خرم آباد، دانشگاه لرستان، دانشکده دامپزشکی، بخش بیوشیمی

پست الکترونیک: alirezaei_m54@yahoo.com

مقدمه

آمین‌های بیوژنیک بازهای آلی هستند که پراکندگی وسیعی در ارگانیسم های زنده، حیوانات، گیاهان، باکتری ها و ویروس ها دارند (۱). این ترکیبات شامل گروهی از آمین ها هستند که در بسیاری از پروسه های بیولوژیک درگیر بوده و از این ترکیبات دی و پلی آمین، هیستامین، آگماتین و کاتکول آمین ها را می توان نام برد. اکسیداسیون آمین های بیوژنیک به آمین های مربوطه بوسیله دو کلاس اصلی از آنزیم ها کاتالیز می گردد که براساس طبیعت شیمیایی کوفاکتورشان گروه بندی می‌شوند. ۱-آمین اکسیدازهای حاوی مس که ویژگی بالایی برای آمین های اولیه دارند ۲- آمین اکسیدازهای حاوی فلاوین که آمین های اولیه، ثانویه و حتی آمین های نوع سوم را هم کاتالیز می کنند. در هر دو مورد مولکول اکسیژن گیرنده الکترون است در حالیکه پراکسید هیدروژن به عنوان محصول واکنش می باشد (۲،۳).

دی آمین اکسیداز[1] که همان هیستامیناز است یک آمین اکسیداز همودیمر است (Cu-AOs, E.C. 1.4.3.6) که هرکدام از زیرواحدهای آن ۹۰-۷۰ کیلودالتون وزن دارند (۴). این آنزیم حاوی یک یون مس است و در بعضی موارد واجد ۵،۴،۲-تری هیدروکسی فنیل آلانین کوئینون می باشد (۵). دی آمین اکسیدازها آنزیم هایی هستند که پراکندگی وسیعی در پستانداران دارند و پوترسین، کاداورین، اگماتین و هیستامین را اکسید می کنند. دی آمین اکسیدازها، دآمیناسیون اکسیداتیو بسیاری از آمین های بیوژنیک اولیه را کاتالیز می کنند (۶). سطح بالایی از دی آمین اکسیداز در لایه موکوسی روده دیده شده است که گفته می شود به عنوان حفاظت علیه هیستامین تولیدی ناشی از مسمومیت غذایی و همچنین هیستامین تولیدی در بدن عمل می کند (۹-۷).

دی آمین اکسیدازها همچنین در پاسخ به شوک آنافیلاکسی در خوکچه هندی هم استفاده شده اند (۱۰) و برعلیه آسیب ناشی از ایسکمی در قلب موش صحرایی نیز نقش حفاظتی داشته اند (۱۱). به همین دلیل دی آمین اکسیدازها جهت درمان ایسکمی میوکارد در حال حاضر استفاده می گردند (۱۲). اخیرا یک پتنت دارویی (N.PCT/EP01/13770) در امریکا پیشنهاد کرده که داروهایی که حاوی هیستامیناز بوده و منشا گیاهی دارند در درمان شوک آنافیلاکسی در قلب، آسم آلرژیک، شوک آلرژیک و عفونی و به طور کلی در تمام عفونت ها بواسطه هیستامین مانند رنیت آلرژیک و التهاب ملتحمه و درماتیت می توانند استفاده گردند (۱۲).

در مقایسه با پستانداران مشخص شده است که دی آمین اکسیداز گیاهان شرایط بهتری دارند از جمله این که ۱- میزان و اصطلاحاً فرکانس[2] کاتالیزوری این آنزیم بسیار بیشتر است و فعالیت بیشتری دارد. ۲- تمایل بیشتری برای باند شدن به هیستامین دارد. ۳- بسیار پایدار است. همچنین مشخص شده است که دی آمین اکسیدازهای گیاهی در جوانه های درحال رشد خلر با غلظت هایی حدود ۴٪ از کل محتوی پروتئینی آن وجود دارند و می توان توسط روش های کروماتوگرافیک آن را خالص کرد (۱۲). بنابراین هدف از انجام این مطالعه خالص سازی و بررسی برخی خواص کینتیکی آنزیم هیستامیناز خالص شده از گونه خلر با استفاده از تکنیک های کروماتوگرافی تعویض یون[3] و سدیم دودسیل سولفات–پلی اکریل آمید ژل الکتروفورز[4] می باشد.

1. Diamine oxidase (DAOs)
2. Turnover
3. Ion-exchange chromatography
4. Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel Electerophoresis (SDS-PAGE)

مواد و روش ها

آکریل آمید، N،N–متیل بیس آکریل آمید تریس[1]، اسید کلریدریک، سدیم دودسیل سولفات[2]، آمونیوم پرسولفات، N،N-تترامتیلن اتیلن دی آمین[3]، منوسدیم فسفات، گلیسرول، ۲- مرکاپتوتانل، کوماسی بریلیانت بلو[4]، اسیداستیک گلاسیال، متانول، آگار ۱٪، مارکر، رزین دی اتیل آمینواتیل سفادکس[5]، هیستامین، آمینوآنتی پیرین، ۵،۳ دی کلرو ۲-هیدروکسی بنزن سولفونیک اسید و آنزیم پراکسیداز از شرکت سیگما (امریکا) تهیه گردید. سولفات آمونیوم، کلرور مس خشک و پتاسیم دی هیدروژن فسفات از شرکت مرک (آلمان) تهیه گردیدند. بذر اصلاح شده خلر و ورمیکولایت از جهاد کشاورزی لرستان تهیه گردیدند و بقیه مواد از نوع خالص تهیه شدند. همچنین ۲ عدد ستون شیشه ای به ابعاد (۳۰×۵ cm) از شرکت های داخلی (پویش طب- ایران) فراهم گردیدند.

پس از خیساندن دانه های خلر بمدت ۱۸ ساعت، در ظروف مخصوص کشت (شانه نشاء) بوسیله ورمیکولایت کشت داده شده و به مدت ۷ روز در دمای ۲۳ درجه سانتیگراد در داخل دستگاه ژرمیناتور (Lab Tech, Korea) قرار داده شدند. خالص سازی آنزیم بر اساس روش قبلی (۱۲) با یک سری تغییرات صورت پذیرفت. به طور خلاصه، پس از برداشت ۴۰۰ گرم جوانه با محلول بافر فسفات ۵۰ میلی مولار pH=۷ با استفاده از ازت مایع بصورت دستی هموژنیزه شدند. محلول بافر حاوی ۱ میکرومول $CuCl_2$ جهت تامین cu^{2+} برای کمک به عمل کاتالیزوری آنزیم بود. یک حجم از جوانه با ۴ حجم از بافر فوق کاملاً هموژنیزه شده و از پارچه عبور داده شده سپس برای از بین بردن ناخالصی ها در ۵۰۰۰RPM به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ گردید (Rotofix Centrifuge 5415 R; 32A, Germany) و محلول رویی برداشته شد. با استفاده از فرمول زیر محلول سولفات آمونیوم ۷۰٪ اشباع در دمای صفر درجه سانتیگراد تهیه گردید (۱۳).

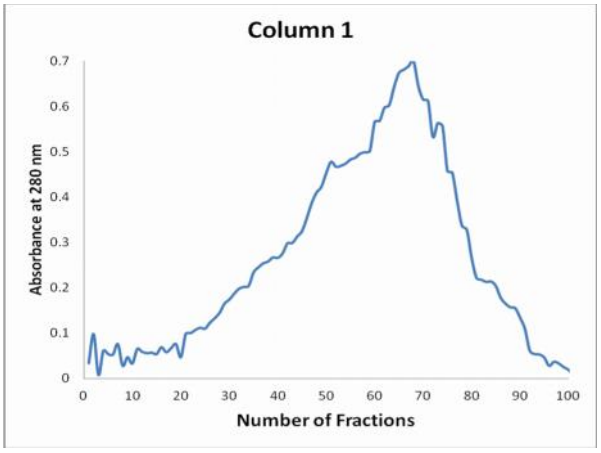
(سولفات آمونیوم) گرم /۱۰۰ ml = ۵/۵ (x-x_0) /(۱۰۰-۰/۲۷x)

که x درصد اشباع مورد نظر و x_0 درصد اشباع اولیه است و مطابق این فرمول ۴۴/۴۵ گرم از سولفات آمونیوم به محلول رویی از مرحله سانتریفوژ اضافه و به مدت نیم ساعت به کمک استریر در کنار یخ کاملاً مخلوط گردید و آن گاه در RPM ۱۰،۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید و رسوب آن با بافر حل گردید و پس از حل شدن به مدت ۱۸ ساعت بر علیه بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مولار و با استفاده از کیسه دیالیز cut off ۱۰ دیالیز صورت پذیرفت و آن گاه جهت تغلیظ کردن آنزیم، آب گیری با استفاده از پلی اتیلن گلیکول صورت گرفت (بمدت نیم ساعت) و محلول حاوی آنزیم تغلیظ گردید.

آماده کردن ستون کروماتوگرافی (ستون یک)

ستون شماره یک از رزین دی اتیل آمینواتیل سفادکس با استفاده از بافر فسفات ۱۵ mM و pH=۷ حاوی یک میکرومول $CuCl_2$ به تعادل رسید و به مدت یک شبانه روز کاملاً با بافر فوق شستشو داده شده و آنگاه نمونه تغلیظ شده بر روی ستون کروماتوگرافی ریخته شده و به صورت دستی هر بخش حاوی ۳cc از ستون کروماتوگرافی با سرعت ۱ ml/min خارج شدند و جذب لوله ها بلافاصله در طول موج ۲۸۰ نانومتر بوسیله یکدستگاه اسپکتروفتو متر (S2000 UV model; WPA, Cambridge, UK) خوانده شد. جذب های بیشتر از ۰/۱ جمع آوری شده و همه جذب های بیشتر از ۰/۱ با هم مخلوط گردید. حجم بدست آمده ۱۵۰cc بود که pH آن به ۵/۵ رسانده شد و برای ستون دوم آماده گردید (شکل ۱).

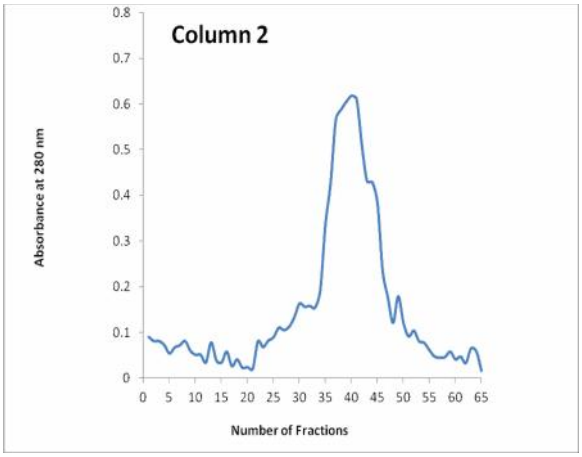
1. Tris base
2. Sodium dodecyl sulfate (SDS)
3. Tetra methyl ethylene diamine (TEMED)
4. Coomassie brilliant blue
5. DEAE-sephadex A-52



شکل شماره ۱- تغییرات جذب در طول موج ۲۸۰ نانومتر مربوط به فراکسیونهای بدست آمده از ستون ۱.

آماده کردن ستون کروماتوگرافی (ستون دو)

ستون دوم از رزین دی اتیل آمینواتیل سفادکس که قبلاً با بافر فسفات ۵۰ mM و pH=۵/۵ تهیه شده بود فراهم گردید و به مدت یک شبانه روز به کمک بافر فوق شستشو داده شد. آنگاه از فراکسیون های بدست آمده از ستون یک که pH آنها به ۵/۵ رسانده شده بود بر روی ستون کروماتوگرافی دوم ریخته شده و با سرعت ۱ml/min بخش ها به کمک لوله های آزمایش در حجم های ۳cc جمع آوری گردیدند و همزمان جذب هر فراکسیون خوانده شد و تا زمان به صفر نزدیک شدن جذب ها ادامه داشت. سپس از شیب نمک ۰/۲—۰ مولار استفاده گردید و در غلظت بالای نمک آنزیم از ستون خارج گردید (شکل ۲). پس از بررسی فعالیت آنزیم در فراکسیون های نزدیک به هم، خالص ترین بخش ها در حضور مارکر و با استفاده از تکنیک سدیم دو دسیل سولفات-پلی اکریل آمید ژل الکتروفورز مشخص گردید.



شکل شماره ۲- تغییرات جذب در طول موج ۲۸۰ نانومتر مربوط به فراکسیونهای بدست آمده از ستون ۲.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم هیستامیناز با استفاده از سوبسترای هیستامین

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم با استفاده از روش قبلی با یک سری تغییرات صورت پذیرفت و به جای پوترسین از هیستامین به عنوان سوبسترا استفاده گردید(۱۲). به طور خلاصه اندازه‌گیری فعالیت آنزیم با استفاده از ضریب خاموشی مولی $۲/۶\times۱۰^{۴}$/M.cm و در طول موج ۵۱۵nm صورت پذیرفت و مطابق با واکنش زیر ارزیابی گردید.

$$R\text{-}CH_2\text{-}NH_2 + O_2 + H_2O \longrightarrow RCHO + NH_3 + H_2O_2$$

در این روش محصول واکنش (آب اکسیژنه) با آنتی پیرین و ۵،۳-دی کلرو هیدروکسی بنزن سولفونیک اسید و به کمک آنزیم پراکسیداز ایجاد کمپلکس صورتی رنگ می‌کند که در طول موج ۵۱۵nm بیشترین جذب را دارد.

محلول های مورد نیاز جهت فعالیت آنزیم

۱-محلول A : بافر فسفات ۰/۱ مولار pH=۷ تهیه شد.

۲-محلول B (سوبسترا) : پوترسین یا هیستامین با غلظت ۴mM با استفاده از محلول A آماده گردید.

۳-محلول C : آنتی پیرین با غلظت ۰/۲ mM در محلول A تهیه گردید.

۴-محلول D (۵،۳ دی کلرو هیدروکسی بنزن سولفونیک اسید) با غلظت ۰/۲ mM در محلول C تهیه گردید.

۵-محلول E : آنزیم خالص شده یا آنزیم خالص تجاری از کلیه خوک (۰/۱۸ U/mg protein) با رقت ۰/۱۸ واحد در ۱۰۰ میکرو لیتر۰تهیه شدند.

۶-محلول F (آنزیم HRP) با غلظت ۸۰mg/ml در محلول A (بافر فسفات) ساخته شد.

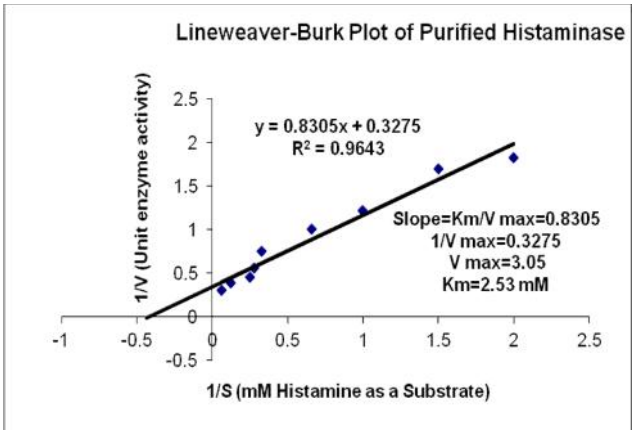
ابتدا با استفاده از آنزیم خالص تجاری واکنش آنزیمی تنظیم شده سپس بر اساس ضریب خاموشی مولی فعالیت آنزیم خالص شده در هر مرحله بدست آمد و اندازه گیری فعالیت آنزیم بر اساس فرمول روبرو صورت پذیرفت.

۲ml B + ۲ ml D + ۵۰ µl E + ۱۰۰ µl F

محلول E، آنزیم خالص هیستامیناز (تجاری) و یا آنزیم خالص شده در این مطالعه است و در نمونه بلانک بجای محلول E ، ۵۰ میکرولیتر آب مقطر استفاده گردید. پس از اضافه کردن محلول ها در لوله شیشه ای به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد در شیکر قرار گرفتند و سپس دستگاه در طول موج ۵۱۵nm با محلول بلانک صفر گردید. آن گاه جذب نمونه ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شدند و با استفاده از ضریب خاموشی ($۲/۶\times۱۰^{۴}$/M.cm) میزان فعالیت آنزیم بر اساس میلی لیتر و سپس فعالیت ویژه بر اساس U/mg protein بدست آمد. طبق این روش یک واحد آنزیم میزانی از آنزیم است که در شرایط آزمایش، ۰/۱ واحد افزایش جذب در طول موج ۵۱۵ نانومتر ایجاد کند. اندازه گیری میزان پروتئین در هر مرحله با استفاده از روش لوری صورت گرفت و از سوبسترای آلبومین به عنوان استاندارد استفاده گردید (۱۴). فعالیت ویژه آنزیم در مرحله قبل از ستون کروماتوگرافی (محلول دیالیز شده) E، آنزیم خارج شده از ستون۱ (فراکسیون های با جذب بیشتر از ۰/۱ در ۲۸۰ نانومتر) E1 و آنزیم خارج شده از ستون ۲ بعد از شیب نمک تحت عنوان E2 با استفاده از روش فوق اندازه گیری شد.

اثر غلظت سوبسترا بر فعالیت آنزیم و تعیین V_{max} و K_m

برای بررسی غلظت سوبسترا بر فعالیت آنزیم خالص شده با توجه به اینکه غلظت سوبسترا در اندازه گیری فعالیت آنزیم ۲mM توصیه شده است (۱۲)، بنابراین از غلظت۰/۵ mM، mM ۰/۶۶، ۱ mM، ۱/۵ mM، ۲mM، ۲/۵ mM، ۳ mM، ۳/۵ mM، ۴ mM استفاده گردید و محلول ها T1 تا T9 از هیستامین ساخته شدند و مطابق با هر کدام بلانک آنها ساخته شد (بلانک حاوی سوبسترا و بافر و آب مقطر بدون حضور آنزیم) و تغییرات جذب با استفاده از روش فوق در طول موج ۵۱۵ nm بدست آمد. برای هر غلظت از سوبسترا، ۳ تکرار پیاپی صورت گرفت و میانگین تغییرات جذب در نظر گرفته شد (شکل ۵).



شکل شماره ۵- منحنی لینیور-برک مربوط به فعالیت آنزیم هیستامیناز خالص شده از جوانه های خلر (*Lathyrus sativus*) در مقابل غلظت های مختلف از هیستامین به عنوان سوبسترا.

تکنیک SDS–PAGE

پروتئین ها در حضور سدیم دودسیل سولفات دناتوره می شوند و ثابت شده است که درجنت یونی سدیم دودسیل سولفات جهت الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید مناسب است. این ماده دارای بار منفی است و پروتئین ها در حضور این ماده

دناتوره شده و در حضور ماده ۲-مرکاپتواتانول باند دی سولفیدیشان احیا می شود و به صورت زیر واحد ها و پلی پپتید هایی با ساختمان اولیه در می آیند. در روش SDS–PAGE پروتئین ها همه از نظر بار مثبت خنثی شده و تفکیک پروتئین ها در میدان الکتریکی فقط تحت تاثیر جرم مولکولی قرار می گیرد (۱۵).

در این مطالعه تکنیک SDS–PAGE بر اساس روش قبلی (۱۶) انجام گرفت و به طور خلاصه برای تهیه ژل پائینی از محلول ۵ درصد پلی اکریل امید استفاده گردید و محلول های لازم (A، B، C، D، E وF) استفاده شدند.

محلول A (محلول بافر نمونه): شامل ۳ میلی‌لیتر گلیسرول، ۰/۲ میلی لیتر بتامرکاپتواتانول و ۱۰ میلی گرم رنگ برموفنل در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر. محلول B (محلول ژل پائینی): شامل ۱۸/۱۶۵ گرم بافر تریس، ۰/۴ گرم سدیم دودسیل سولفات و ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر می‌باشد و pH بوسیله اسید کلریدریک روی ۸/۸ تنظیم گردید. محلول C: شامل ۱۰۰ میلی گرم آمونیوم پرسولفات در یک سی سی آب مقطر. محلول D (محلول ژل بالایی): شامل ۶۰/۰۵ گرم بافر تریس و ۰/۴ گرم سدیم دودسیل سولفات در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر می باشد و pH آن روی ۶/۸ تنظیم گردید. محلول E (محلول ۳۰٪ اکریل آمید): این محلول شامل ۳۰ گرم اکریل آمید و ۰/۸ گرم بیس اکریل آمید در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر بود. محلول F (محلول بافر تانک): شامل ۱۵/۱۴ گرم بافر تریس، ۷۲/۰۵ گرم گلیسین و ۵ گرم سدیم دودسیل سولفات در ۵۰۰ میلی لیتر آب مقطر و pH روی ۸/۳ تنظیم گردید.

تهیه ژل پائینی

جهت ساخت محلول ۵ درصد: ۰/۵ میلی لیتر از محلول B، ۲/۸ میلی لیتر از محلول E، ۲/۹ میلی لیتر آب مقطر و ۰/۵۵ میلی لیتر گلیسرول ۶۰٪ را با هم مخلوط و درون بشر ریخته شد و سپس ۴۰ میکرولیتر از آمونیوم پرسولفات داخل بشر ریخته و بلافاصله ۱۰ میکرولیتر TEMED به آن اضافه و سپس درون قالب شیشه ای ریخته شد و بخاطر صاف شدن سطح ژل، ml ۲ الکل ایزو پروپانول روی سطح ژل ریخته شد. پس از یک ساعت، پلیمراسیون اکریل آمید در دمای آزمایشگاه به انجام رسید و ژل پائینی تهیه گردید. آن گاه محلول ایزوپروپانول از سطح ژل خالی گردید.

تهیه ژل بالایی

برای تهیه ژل بالایی ۱/۸ میلی لیتر از محلول D، ۱/۰۵ میلی لیتر از محلول E، ۴/۵ میلی لیتر آب مقطر، ۱/۳ میکرولیتر آمونیوم پرسولفات و بلافاصله ۱۰ میکرولیتر TEMED اضافه و در قالب شیشه ای بر روی ژل پایینی ریخته و بلافاصله شانه مخصوص در محلول ژل بالایی فرو برده شد. بطوری که فاصله ته چاهک تا ژل پائینی یک سانتیمتر باقیمانده و بعد از یک ساعت ژل بالایی نیز آماده شد، ژل بدست آمده جهت الکتروفورز در روز بعد مورد استفاده گردید.

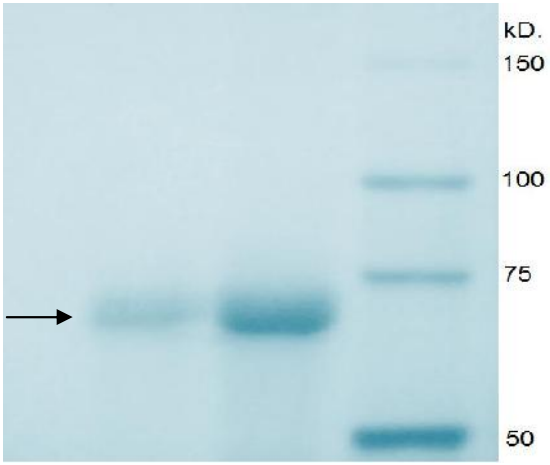
نمونه گذاری و الکتروفورز

نمونه های لازم در مراحل مختلف خالص سازی که در یخچال نگهداری شده بود از نظر پروتئین به اندازه ای رقیق شدند که هر کدام ۱mg/ml پروتئین داشته باشند و از هر نمونه به نسبت مساوی در بافر نمونه (محلول A) حل شده و جهت غیر طبیعی شدن پروتئین ها به مدت یک دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد قرار گرفته و به کمک سدیم دودسیل سولفات و بتامرکاپتو اتانول که در بافر نمونه است پروتئین ها غیر طبیعی شده و به ساختار اولیه بازگشتند. سپس محفظه تانک از بافر الکترود (محلول F) پر شد و با سرنگ همیلتون در هر چاهک ۴۰ میکرولیتر از نمونه های

مراحل مختلف خالص سازی قرار داده شد و در یک چاهک از مارکر ۱۰ میکرولیتر به عنوان راهنما گذاشته شد. دستگاه با شدت جریان ثابت ۲۵ میلی آمپر و ولتاژ متغییر به مدت ۲ ساعت به جریان برق متصل گردید. پس از آزاد سازی ژل از دستگاه از محلول (حاوی ۰/۱ گرم کوماسی بلو، ۰/۱ گرم استات مس، ۲۵ میلی لیتر ایزوپروپانول، ۱۰ میلی لیتر اسید استیک و به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد) به مدت یک ساعت برای رنگ آمیزی استفاده گردید و ژل درون محلول قرار گرفت و سپس مرحله رنگبری با استفاده از محلول رنگبر (حاوی ۶۰۰ میلی لیتر متانول خالص، ۱۴۰ میلی لیتر اسید استیک خالص به حجم ۲ لیتر رسانده شد) به مدت ۴۸ ساعت صورت گرفت. ژل بدست آمده چندین بار با محلول رنگبر شستشو داده شد و تصاویر اسکن بدست آمده در شکل ۳ و ۴ نشان داده شده است.



شکل شماره ۳- فراکسیونهای خارج شده (Lane 1, 2, 3) از ستون یک با جذب بیشتر از ۰/۱حاوی آنزیم هیستامیناز با باند مشخص در ناحیه تقریباً ۷۲ کیلودالتون در حضور مارکر هستند. به باند مشخص شده در محدوده ۷۲ کیلو دالتون که مربوط به حضور زیر واحد های آنزیم هیستامیناز خالص شده از جوانه خلر در Lane 1, 2, 3 است، دقت شود.



شکل۴- آنزیم هیستامیناز خالص شده از ستون دو بعد از شیب نمک در غلظتهای متفاوت در حضور ماکر. به باند مشخص شده در محدوده تقریباً۷۲ کیلو دالتون که مربوط به حضور زیرواحدهای آنزیم هیستامیناز خالص شده است، دقت شود.

یافته ها

شکل ۱و۲- بیانگر تغییرات جذب فراکسیون ها در طول موج ۲۸۰ نانومتر است. فراکسیون های با جذب بیشتر از ۰/۱ در شکل ۱ مشخص شده اند و افزایش چشمگیر جذب در فراکسیون های ۴۵-۳۵ ستون ۲ بیانگر خروج آنزیم پس از شیب نمک می باشد. شکل ۳- بیانگر خروج آنزیم هیستامیناز و آنزیم های دیگر از ستون ۱ است که باند مشخص شده در ناحیه پائین تر از ۷۵ کیلو دالتون (تقریباً ۷۲ کیلو دالتون) بیانگر زیرواحدهای باز شده آنزیم در اثر استفاده از مرکاپتو اتانول است در حالیکه باندهای بالاتر از منطقه ۷۵ کیلو دالتون مربوط به حضور آنزیم های دیگر است. شکل۴-بیانگر خروج آنزیم بصورت خالص در فراکسیون های پس از شیب نمک با غلظت های متفاوت است و وجود زیرواحدهای باز شده آن در منطقه تقریباً ۷۲ کیلو دالتون نشان دهنده خلوص آنزیم می باشد.

شکل ۵- بیانگر غلظت سوبسترا، K_m ، V_{max} و شیب خط است و میزان K_m ، V_{max} در مقایسه با آنزیم تجاری مشخص

شده است در این منحنی مشاهده می شود که میزان K_m آنـزیم خالص شده کمتر از نوع تجاری بوده و نشان می دهد که آنـز یـم گیـاهی تمایـل بیـشتری بـرای سوبـسترا دارد. در معادلـه ($Y=ax+b$) شیب خـط برابـر اسـت بـا ۸۳/۰۵ (K_m/V_{max}) و بنابراین K_m مساوی است با ۲/۵۳ میلی مولار که در این غلظـت از سوبسترا سرعت برابر با نصف سرعت مـاکزیموم (واحـد ۳/۰۵) است. مقایسه خواص کینتیکی ایـن آنـزیم بـا خـواص کینتیکـی آنزیم خالص تجاری از کلیه خوک : K_m=۳ میلی مولار و سرعت ماکزیمم (V_{max}=۸/۳۵) واحد بیانگر میـل ترکیبـی بیـشتر ولـی حداکثر سرعت کمتر آنزیم گیاهی است اما به علت میل ترکیبـی بیشتر، آنـزیم گیـاهی فرکـانس بیـشتری دارد و در واحـد زمـان هیستامین بیشتری را تجزیه می کند. میزان فعالیت ویژه آنزیم ۷ واحد در میلی گرم پروتئین برای E بدست آمد، اما میزان فعالیت ویژه آنزیم ۱۰/۵ واحد در میلـی گـرم پـروتئین در محلـول هـای خارج شده از ستون ۱ بدست آمد (E1) و در نهایت افزایش بیش از چهار و نیم برابری در فعالیت آنزیم خـارج شـده بعـد از شـیب نمک بدست آمد و میزان فعالیـت آنـزیم (E2) بـه ۵۰ واحـد در میلی گرم پروتئین رسید.

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که با توجـه بـه ایـن که میزان ۴٪ از کل محتوی پروتئین هـای جوانـه خلـر، آنـزیم هیستامیناز است و با استفاده از روش های کروماتوگرافی تبادل یونی به آسانی مـی تـوان آنـزیم خـالص بدسـت آورد، بنـابراین جوانه خلر منبع مناسبی جهـت تـامین آنـزیم هیـستامیناز بـه حساب می آید ضمن اینکه آنزیم خالص شده دارای K_m پـائین تری نسبت به آنزیم تجاری (تهیه شده از کلیـه خـوک بـوده) و بنابراین دارای تمایل بیشتری برای سوبستراهای خود از جملـه هیستامین، پوترسین، کاداورین و آگمانتین اسـت و قـادر اسـت فساد مواد غذایی را پیشگیری کنـد یـا بـه حـد بـسیار پـائینی کاهش دهد. علاوه بر این یکی از مزایای این روش خالص سازی آنزیم نسبت به روش قبلی (۱۲) این است که در ایـن مطالـه از ستون های HiTrap شرکت آمرشام استفاده نـشد و بـه جـای آن از یک ستون کروماتوگرافی دیگر استفاده شد و تنهـا باعـث کـاهش ۵ درصـدی در فعالیـت آنـزیم نـسبت بـه روش قبلـی (۱۲)گردید.

با توجه به شکل ۵ مشخص می شـود کـه آنـزیم خـالص شده فرکانس بیشتری نسبت بـه نـوع تجـاری (آنـزیم خـوکی) داشته و واکنش تجزیه هیستامین و به طور کلی دی آمین ها را با سرعت بیشتری انجـام مـی دهـد ضـمن اینکـه فراوانـی و در دسترس بودن جوانه خلـر (کـه بـه راحتـی در ژرمینـاتور قابـل کشت می باشد) نسبت به تهیـه کلیـه خـوک و یـا روش هـای نوترکیب که نیاز به هزینه بالاتری دارد، باعث می شود که تهیه آنزیم خالص از جوانه جوانه نخـود[1] ، مـاش[2] ، خلـر[3] و گیاهـان لگومینه زمینه مناسب برای تولید تجاری ایـن آنـزیم محـسوب شوند (۱۷).

در حال حاضر دی آمین اکسیداز تجاری مورد اسـتفاده از کلیه خوک گرفته می شود که ایـن آنـزیم فعالیـت ویـژه کمـی داشته (۰/۱۸. واحد در میلی گرم پروتئین) و حتی هنگامی کـه خالص شده است در مقایسه با آنزیم هموژنوس گیاهان فعالیـت ویژه کمتری نشان داده است (۱۲) و در این مطالعه نـسبت بـه آنزیم خالص شده (۵۰ واحد در میلی‌گرم پروتئین) از جوانه‌های خلر، فعالیت آنزیم خوکی بـسیار پـائین نـشان داده شـد. گفتـه می‌شود آنزیم خالص شده از خلر آنزیمی هموژنوس اسـت (۱۸) و مشخص گردیده که این آنزیم یک همـودیمر از زیرواحـدهای ۹۰-۷۰ کیلودالتون بوده که هر کدام حاوی یک یون مس بـوده و به طور کووالانسی به یک کوفاکتور که ناشی از تغییرات پـس

[1] *Cicer arietinum*
[2] *Vigna radiate*
[3] *Lathyrus sativus*

از ترجمه است متصل می گردند (تغیر در ریشه تیروزیل منجر به تولید ۵،۴،۲-تری هیدروکسی فنیل آلانین کوئینون به عنوان کوفاکتور می گردد).

وزن مولکولی این آنزیم ۱۵۰ کیلو دالتون است که بوسیله کروماتوگرافی مشخص شده و زیرواحدهای ۷۲ کیلو دالتون آن توسط تکنیک SDS-PAGE تشخیص داده شده است و بیانگر دایمر بودن آنزیم می باشد (۱۲، ۱۹). در مطالعه حاضر نیز تکنیک SDS-PAGE و وجود باند در ناحیه تقریباً ۷۲ کیلو دالتونی وجود دایمرهای آنزیم را که توسط بتامرکاپتو اتانول از هم باز شده اند در حضور مارکر تائید می کند ضمن اینکه غلظت های مختلف آنزیم بر روی میزان ضخامت باند در این ناحیه تاثیر گذاشته اند (شکل ۴).

آمین های بیوژنیک مولکول های آلی با وزن مولکولی کم هستند و در بسیاری از منابع غذایی از جمله ماهی و فراورده های ماهی، گوشت و غذاهای تخمیری وجود دارند، اگر این غذاها در طی ذخیره و پروسه شدن در شرایط نامناسب نگهداری شوند از دکربوکسیله شدن اسیدهای آمینه، آمین های بیوژنیک مربوطه بدست می آیند. به عنوان مثال: لیزین تولید کاداورین، هیستیدین تولید هیستامین و اسیدهای آمینه گلوتامین، آگماتین و آرژنین تولید پوترسین می کنند. آمین های بیوژنیک در ارتباط با مسمومیت های غذایی مطرح هستند و در زمان پروسه شدن غذا، رسیدن (مانند پنیر)، ذخیره شدن و تخمیر غذا بوجود می آیند و از این جهت آمین های بیوژنیک می توانند به عنوان یک شاخص از کیفیت غذاها در زمان پروسه شدن در نظر گرفته شوند (۲۰).

هیستامین نقش مهمی در متابولیسم بدن مانند آزاد شدن اسید معده دارد و در مقادیر کم اثرات فیزیولوژیک مناسبی داشته اما در دوزهای بالاتر سمی است (۱۲). دستگاه گوارش انسان حاوی آنزیم دی آمین اکسیداز و آنزیم هیستامین N-متیل ترانسفراز است که در تبدیل هیستامین به محصولات کم خطرتر نقش دارد. پوترسین و کاداورین می توانند باعث مهار این واکنش ها گردند و بنابراین سمیت هیستامین را تقویت می‌کنند.

به‌طور کلی هیستامین در اثر پختن، انجماد، دود دادن، بسته بندی و کنسرو کردن از بین نمی رود و اگر میزان آن از ۲۰۰ mg/kg غذا (۲۰۰ PPM) افزایش یافت، باعث مسمومیت می گردد (۲۱). این مسمومیت بیشتر در غذاهایی مثل تن ماهی از خانواده اسکومبرئیده است که این سمیت مربوط به وجود باکتری هایی مانند گونه های E. coli ، Proteus، Klebsiella می باشد که باعث دکربوکسیله شدن هیستیدین و تولید هیستامین با مقادیر بالا در ماهی تن می گردند. علاوه بر این منابع غذایی دیگر از جمله پنیر سوئیسی هم به عنوان منبع مسمومیت با هیستامین مطرح می شود (۲۲).

به طور کلی با توجه به اینکه از سال ۱۹۹۹ استفاده از سنسورهای بیولوژیک و روشهای آمپرومتریک برای تشخیص آمین های بیوژنیک، مواد افزودنی و داروها جهت کنترل کیفی و بهداشت مواد غذایی در کشورهای اروپایی بکار برده می شود (۲۳). بنابراین در این خصوص لزوم استفاده از فعالیت آمین اکسیدازهای گیاهی در ساخت سنسورهای بیولوژیک و استفاده از آنزیم هیستامینازهای گیاهی و تشخیص میزان هیستامین و میزان آلودگی و مهمتر از آن پیشگیری از تولید هیستامین در بهداشت و سلامت جامعه در کشورمان می تواند مفید باشد.

علاوه بر این به علت نقش هیستامین تولیدی در پیچیدگی های ناشی از ایسکمی قلب و نقش موثر هیستامین در پدیده آریتمی قلبی و همچنین شوک آنافیلاکسی(۱۲) در این رابطه، نویسندگان از آنزیم خالص شده گیاهی جهت بررسی اثر حفاظتی آن بر روی قلب در مطالعات آینده استفاده خواهند کرد. بنابراین آنزیم خالص شده در این مطالعه پس از کانژوگه شدن با پلی اتیلن گلیکول جهت مطالعات کاربردی در

آینده استفاده دارویی خواهد داشت و نویسندگان ادامه کار در این راستا را برای خود محفوظ نگه می‌دارند.

تشکر و قدردانی

منابع مالی این مطالعه به طور مشترک از معاونت تحقیقات و فناوری و مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی وابسته به دانشگاه علوم پزشکی لرستان (۷۰٪) و مرکز شیمی و فراورده های دارویی دانشگاه علوم پزشکی شیراز (۳۰٪) تامین شده است. نویسندگان بر خود لازم می دانند از جناب آقای دکتر ناصر اکبری (استادیار گروه زراعت دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان) به جهت راهنمائیهای مفیدشان تشکر و قدردانی نمایند و نیز از زحمات سرکار خانم سمیرا چاش به خاطر همکاری در مراحل اولیه طرح تقدیر و تشکر می گردد.

References

1. Mondovì B. Structure and Function of Amine Oxidases, CRC Press, Boca Raton, FL, 1985.
2. Hartmann C, McIntire W.S. Amine-oxidizing quinoproteins, Method Enzymol. 1997;280: 98–150.
3. Massey V. The chemical and biological versatility of riboflavin, Biochem Soc. Trans. 2000; 28 :283–296.
4. Kusche J, Lorenz W. Diamine oxidase, in: H.Y. Bergmeyer (Ed.), Method Enzymatic Anal, vol. 3, Academic Press, New York, 1983, pp. 237–250.
5. Klinman J.P, Mu D, Quino enzymes in biology, Ann. Rev. Biochem. 1994; 63 :299–344.
6. Sessa A, Perin A. Diamine oxidase in relation to diamine and polyamine metabolism, Agents Actions. 1994; 43 : 69–77.
7. Beaven M.A. Factors regulating availability of histamine at tissue receptors, in: C.N. Ganellin, M.E. Parson (Eds.), Pharmacology of histamine receptors Wright, Bristol, UK, 1982, pp. 101-105.
8. Rangachari P.K, Prior T, Bell R.A, Huynh T. Histamine potentiation by hydroxylamines: structure activity relations; inhibition of diamine oxidase, Am. J. Physiol. 1992; 263 : G632–G641.
9. Taylor S.L. Histamine food poisoning: toxicology and clinical aspects, CRC Crit. Rev. Toxicol. 1986;17 : 91–128.
10. Masini E, Vannacci A, Marzocca C, Mannaioni P.F, Befani O, Federico R, Toma A, Mondovì B. A plant histaminase modulates cardiac anaphylactic response in guinea pig, Biochem. Biophys. Res. Commun. 2002; 296: 840–846.
11. Masini E, Pirpaoli S, Marzocca C, Mannaioni P.F, Pietrangeli P, Mateescu M.A, Zelli M, Federico R, Mondovì B. Protective effects of a plant histaminase in myocardial ischaemia and reperfusion injury in vivo, Biochem. Biophys. Res. Commun. 2003;309 : 432–439.
12. Federico R, Cona A, Caliceti P, Veronese F. M. Histaminase PEGylation: Preparation and characterization of a new bioconjugate for therapeutic application, J Control Relase. 2006; 115 : 168–174.
13. Bollag D. M. Protein Method. 2nd Edition. United States of America: John Wiley & Sons Inc. 1996
14. Lowry OH; Rosebrough, NJ; Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 1951;.193: 265-275.
15. Alirezaei M, Aminlari M, Gheisari HR, Tavana M. Actinidin: A Promising Milk Coagulating Enzyme. Eur J Food Res Rev. 2011;.2: 43-51.
16. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970; 227:680-685.
17. Choudhary A, Singh I, Sigh R. P. A thermostable Diamine Oxidase from Vigna radiata Seedlings. Phytochemistry. 1999;.52: 1-5.
18. Leuschner R.G, Heidel M, Hammes W. P. Int J Food Microbiol. 1998;. 39:1-9.

19. Lange J, Wittmann C. Enzyme Sensor Array for the Determination of Biogenic Amines in Food Samples. Anal Bioanal Chem. 2001; 34: 4524-4530.
20. Hughes J. M, Potter M. E. Scombroid-fish Poisoning: From Pathogenesis to Prevention. 1991; 324: 766-8.
21. Suresh M. R, Ramakrishna S, Adiga P. R. Diamine Oxidase of Lathyrus sativus Seddlings. Phytochemistry. 1976;15: 483-485.
22. Padiglia A, Cogoni A, Floris G. Characterization of Amine Oxidases from Pisum, Lens, Lathyrus and Cicer. Phytochemistry. 1991;.30: 3895-3897.
23. Wimmerova M, Macholan L. Sensitive Amperometric Biosensor for the Determination of Biogenic and Synthetic Amines Using Pea Seedlings Amine Oxidase: A Novel Approach for Enzyme Immobilization. Biosens Bioelectron. 1999; 14: 695-702.