کلونینگ ژن کدکننده‌ی آنزیم هیستامیناز نخود

هادی کریم‌بیگی[۱]، فرهاد نظریان فیروزآبادی[۲] ،احمد اسماعیلی[۳]، مسعود علیرضایی[۴]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی،گروه زراعت واصلاح نباتات،دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان،خرم‌آباد،ایران
۲. دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران
۳. دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران
۴. دانشیار بیوشیمی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

افلاک/سال نهم/ شماره ۳۲و۳۳/پاییز و زمستان ۱۳۹۵

چکیده

مقدمه: هیستامینازها (دی‌آمین اکسیداز) در پستانداران از جمله انسان، پوترسین، کادوارین، آگماتین و هیستامین را اکسید می‌کنند. هیستامیناز با منشاء گیاهی مخصوصاً خانواده‌ی لگومینوز نسبت به هیستامیناز جانوران عمل کاتالیزوری بهتر و سریعتری دارد. اخیرا هیستامیناز با منشاء گیاهی در ساخت دارو برای درمان بیماری‌هایی مختلفی نظیر شوک آنافیلاکسی قلبی، افت فشار خون، سردردهای عروقی، نقص در عملکرد روده، سرطان و غیره مورد استفاده قرار می‌گیرند. هدف از انجام این مطالعه جداسازی و همسانه‌سازی ژن کد کننده آنزیم هیستامیناز نخود به منظور بیان در گیاه و تولید پروتئین نوترکیب هیستامیناز گیاهی به مقدار فراوان می‌باشد.

مواد و روش‌ها: دراین مطالعه تجربی، از تعداد ۵ جوانه سفید رنگ هفت‌روزه نخود توده‌ی محلی گریت، RNA ی کل استخراج و سپس با استفاده از آنزیم نسخه‌برداری معکوس، cDNA تک رشته‌ای سنتز شد. در مرحله‌ی بعد، ژن هیستامیناز توسط آغازگرهای اختصاصی تکثیر و محصول PCR از ژل خالص‌سازی شد. در نهایت همسانه‌سازی در ناقل pTZ57RT با استفاده از روش‌های مولکولی مرسوم مورد تائید قرار گرفت.

یافته‌ها: در این تحقیق، cDNAی کدکننده‌ی آمینواکسیداز حاوی مس از نخود به کمک روش‌های مولکولی جداسازی و همسانه‌سازی گردید. نتایج توالی یابی مشخص نمود که این cDNA دارای یک چهارچوب قرائت باز (ORF) به طول ۲۰۱۳ نوکلئوتیدی بود و پروتئینی با ۶۷۰ اسیدآمینه با وزن مولکولی۷۵/۷ کیلو دالتون را کد می‌کند . این توالی ۹۹ درصد با نخود زراعی و ۸۵ درصد با نخودفرنگی مشابه بود.

نتیجه‌گیری: از ژن کدکننده‌ی آنزیم هیستامیناز با منشاء گیاهی برای تولید داروهای جدید استفاده می‌شود و با بیان آن در سیستم‌های گیاهی می‌توان مواد غذایی حاوی هیستامیناز تولید کرد و آنزیم بیان شده را در گیاه خالص‌سازی نمود.

واژه‌های کلیدی: هیستامیناز، سنتزcDNA، همسانه‌سازی مولکولی، نخود توده گریت

آدرس مکاتبه: خرم آباد، دانشگاه لرستان ،دانشکده کشاورزی ،گروه زراعت و اصلاح نباتات
پست الکترونیک: Nazarian.f@lu.ac.ir

مقدمه

آمین‌های بیوژنیک، از بنیادی‌ترین ترکیباتی هستند که توسط طیف وسیعی از موجودات زنده، حیوانات، گیاهان، باکتری‌ها و ویروس‌ها تولید می‌شوند (۱). این ترکیبات در طیف وسیعی از انواع فرآیندهای مهم بیولوژیکی از قبیل مونو، دی و پلی‌آمین، هیستامین، آگماتین و کاتکول آمین وجود دارند و اکسیداسیون آمین‌های بیوژنیک توسط دو گروه اصلی از آنزیم‌ها یعنی، آمینواکسیدازهای حاوی مس و آمینواکسیدازهای حاوی فلاوین کاتالیز می‌شوند که بر اساس طبیعت شیمیایی کوفاکتورشان گروه‌بندی می‌شوند (۲). به آمین اکسیداز مس‌دار (E.C. 1.4.3.6; Cu-AOs)، دی‌آمین اکسیداز[1] (DAOs) یا به عبارتی هیستامیناز نیز گفته می‌شود (۳). آمین اکسیداز مس دار یک پروتئین همودایمر است و در هریک از زیرواحدهایش یک یون مس و در بیشتر موارد، ۵،۴،۲ تری هیدروکسی فنیل آلانین کوئینون[2] وجود دارد و در هر دو مورد، اکسیژن مولکولی پذیرنده الکترون و پراکسید هیدروژن (H_2O_2) محصول واکنش می‌باشد. به طورکلی، آمین اکسیدازهای مس‌دار واکنش بیوشیمیایی[3] زیر را کاتالیز می‌کنند (۴).

دی آمین اکسیدازها در پستانداران از جمله انسان، پوترسین، کاداوارین، آگماتین و هیستامین را اکسید می‌کنند (۳). در بدن انسان، دی آمین‌اکسیدازها در لایه موکوسی روده، مانع تجمع هیستامین تولیدی در بدن و هیستامین آزادشده از مواد غذایی می‌شوند (۵). چون تجمع هیستامین باعث بروز برخی از مشکلات در معده، روده، پوست، خون و اعصاب می‌شود، بنابراین دی‌آمین اکسیداز برای بدن یک آنزیم ضروری است. تحقیقات نشان می‌دهد که دی‌آمین اکسیداز در پاسخ به شوک آنافیلاکسی در خوکچه‌هندی (۶) و علیه آسیب‌های ناشی از ایسکمی در قلب موش صحرایی مؤثر است اثر حفاظتی خود را اعمال می‌کند (۷). دی‌آمین‌اکسیدازهای گیاهی در مقایسه با دی‌آمین‌اکسیدازهای جانوری دارای مزایایی چون ۱- عمل کاتالیزوری بیشتر و اکسیداسیون کمتر مجدد آنزیم‌ها ۲- میل ترکیبی بیشتر با هیستامین و ۳- پایداری بالاتری هستند (۸). با مطالعاتی در این زمینه می‌توان توالی‌های ژن‌کدکننده‌ی آنزیم هیستامیناز در موجودات مختلف را شناسایی کرد که بتوان از آنها برای تولید داروهای نوترکیب استفاده کرد. همچنین دستکاری جایگاه‌های فعال آنزیم می‌تواند باعث افزایش تولید بیشتر پروتئین از ژن کدکننده‌ی هیستامیناز شود.

تحقیقات[1] نشان می‌دهد که کمبود هیستامیناز باعث حاملگی‌های پرخطر می‌شود و غلظت هیستامین بالا در دوران بارداری به دلیل تزریق هیستامین یا مهار DAO با آمینوگوانیدین منجر به اثرات مرگبار در مدل‌های مختلف حیوانات و سقط جنین شده است (۹). در مطالعه‌ای تزریق هیستامین به گربه منجر به انقباض رحم و سقط در گربه می‌شود. همچنین محققان دیگر نشان دادند که مهار DAO در بدن موش که در ریه و کبد موش به فراوانی وجود دارد، باعث سقط جنین در موش‌های باردار می شود (۱۰). هیستامین

1. Diamine oxidase (DAOs)
2. 2,4,5-trihydroxyphenulalanine quinone (TPQ)
3. $H2NH2 + O2 + H2O \rightarrow RCHO + NH3 + HO2$

نقش‌های مختلف در فرآیندهای آلرژیک والتهابی و اقدامات عصبی غدد درون ریز، درسیستم عصبی مرکزی دارد. علاوه بر این، هیستامیناز در تعادل چرخه قاعدگی و بارداری نقش دارد که به احتمال زیاد بر اساس فعل و انفعالات بین هیستامین و هورمون استروئید، رشد سلول و تمایز آن می‌باشد (۱۱). بالاترین بیان DAO در کلیه، روده، و جفت جنین مشاهده شده است و تحقیقات نشان داده است که تعادل بین هیستامین و آنزیم DAO برای یک دوره بدون عارضه بارداری بسیار مهم است (۹). مشاهدات نشان داده است که سطح فعالیت DAO پلاسمای مادر در ۲۰ هفته‌ی اول بارداری افزایش پیدا می‌کند که حدود ۱۰۰۰ برابر بیشتر از قبل از بارداری است (۱۲). همچنین کمبود هیستامیناز باعث پارگی زودرس پرده می‌شود و فعالیت‌های پایین DAO بیماری‌های تروفوبلاستیک بارداری می‌شود (۱۳). در حال حاضر، از دی آمین اکسیدازها جهت درمان ایسکمی میوکارد استفاده می‌شود. اخیراً یک شرکت دارویی آمریکایی (n.PCT/EP01/13770) از هیستامیناز با منشاء گیاهی برای درمان شوک آنافیلاکسی در قلب، درمان آسم، شوک آلرژیک، عفونی و به طور کلی همه‌ی بیماری‌های مرتبط با هیستامین از قبیل ورم آلرژیکی و التهابات ملتحمه و التهابات پوستی استفاده می‌کند (۸).

به‌طور کلی هیستامین اضافی به دو روش در بدن انسان متابولیزه می‌شود؛(۱) از طریق آمین‌زدایی اکسیداتیو توسط آنزیم دی‌آمین‌اکسیداز (DAO) و (۲) متیلاسیون توسط آنزیم هیستامین- ان-متیل ترانسفراز (HNMT)،[1] هر دو آنزیم DAO و HNMT در لایه مخاطی روده حضور دارند. با این حال، DAO مانع اصلی جذب هیستامین در جریان خون است ولی HNMT نقش کمی در این فرایندها دارد. تحت شرایط عادی این مانع آنزیمی به اندازه کافی از جذب هیستامین در جریان خون جلوگیری می‌کند. بنابراین در یک فرد سالم مواد غذایی غنی از هیستامین تا حدودی در روده از بین می‌رود. حتی DAO هیستامیناز تولیدی توسط باکتری‌ها روده را تجزیه می‌کند (۵). تعدادی از واکنش‌های شیمیایی و فیزیکی مسئول آزاد شدن هیستامین در بدن هستند. برای مثال، دمای زیاد، آسیب‌دیدگی، مصرف الکل و گونه‌های مختلفی از غذاها و داروها باعث آزادسازی هیستامین می‌شوند که در نتیجه باعث بیماریهایی مانند حساسیت، خودایمنی، رماتیسم و التهاب و غیره می‌شود (۱).

هدف از این مطالعه پژوهشی جداسازی و همسانه‌سازی این ژن از گیاهان بخصوص لگوم‌ها است که هیستامیناز آنها به مراتب دارای فعالیت و پایداری بیشتری است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی مراحل انجام تحقیق به شرح بود. بذر نخود توده محلی گریت از مرکز تحقیقات کشاورزی استان لرستان تهیه شد؛ بذرها به مدت ۱ دقیقه در الکل ۷۰ درصد و ۱۰ دقیقه در هیپوکلرایت سدیم ۵ درصد ضدعفونی شدند. سپس بذرها سه بار با آب استریل شستشو داده شدند و پس از خشک شدن در شرایط کاملاً استریل کشت شدند. بذرها در

1. Histamine –N - methyltransferase

یک محیط تاریک در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد تا ظهور جوانه سفید رنگ قرار گرفتند.

جهت استخراج RNA از جوانه‌های سفید رنگ هفت‌روزه، RNAی کل بر اساس روش دستی با کلراید لیتیم (LiCl) استخراج شد. مقدار ۱تا ۳ گرم از جوانه‌های نخود در هاون چینی توسط نیتروژن مایع پودر شدند. مواد پودر شده به یک فالکون ۱۵ میلی لیتری منتقل شد و سپس مقدار ۳ml بافر استخراج(۵۰mMTris،۱۰EDTAmM،٪۲ SDS) و ۳ml فنل اضافه شد و لوله‌ها ورتکس شدند تا یک مخلوط یکنواخت حاصل شود. لوله حاوی پودر جوانه به مدت ۱۵ دقیقه با ۳۰۰۰rpm در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. فاز بالایی شفاف به یک فالکون جدید محتوی ۳ml phenol/CHCL3/IAA(۲۵:۲۴:۱) منتقل شد. پس از چندین فرآیند ورتکس کردن و سانتریفیوژ کردن، رسوب حاصل دو بار با اتانول ۷۰ درصد شستشو و خشک گردید. در مرحله‌ی بعد، رسوب در ۱۰۰ µL -۲۰ آب مقطر استریل حل شد. از این RNAی استخراج شده برای واکنش نسخه‌برداری معکوس و تولید cDNA تک‌رشته‌ای استفاده شد.

سنتز cDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA شرکت فرمنتاز و با استفاده از آنزیم نسخه‌برداری معکوس توسط واکنش RT-PCR صورت گرفت.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز: به منظور تکثیر ژن یک جفت آغازگر اختصاصی بر اساس توالی ژن هیستامیناز نخود (به شماره‌ی دسترس AJ009825) با استفاده از نرم‌افزار Vector NTI، به گونه‌ای طراحی شدند تا ناحیه کدکننده‌ی ژن هیستامیناز به طول کامل ۲۰۱۳bp تکثیر شود (جدول ۱).

جدول ۱: توالی آغازگرهای رفت و برگشت به ترتیب دارای جایگاه آنزیم-های برشی برای تکثیر ژن هیستامیناز از نخود تودی گریت

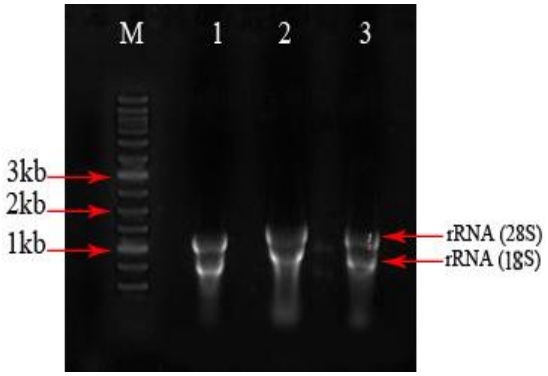
شماره	نام	توالی پرایمر	
۱	Forward	TTAGAGCTCATGGCTTCC ACCACCACCAT	*Sac*I=GA GCTC
۲	Reverse	TACCCCGGGTTAATTGG AGCAACCAGGC	*Sma*I=CC CGGG

برای سهولت همسانه‌سازی محصول PCR، جایگاه برشی آنزیم *Sac*I و کدون شروع در توالی آغازگر رفت و جایگاه آنزیم *Sma*I در توالی آغازگر برگشت به همراه کدون پایان طراحی گردید. واکنش PCR با استفاده از ۵ میکرولیتر cDNA،۱ میکرولیترdNTP و ۱ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای رفت و برگشت و ۱ میکرولیتر از آنزیم پلیمرازی *Pfu* (۲.۵u/µl) در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر، انجام شد. برنامه PCR برای تکثیر cDNA ژن هیستامیناز، شامل یک مرحله دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل دناتوراسیون در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال آغازگر دردمای ۶۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، بسط طول زنجیره DNA در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲/۳۰ دقیقه انجام شد. همچنین یک مرحله بسط نهاییDNA در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. محصول PCR روی ژل آگارز ۰/۸ درصد و به مدت ۹۰ دقیقه الکتروفورز انجام شد.

همسانه‌سازی محصول PCR: محصول PCR ژن هیستامیناز با استفاده از کیت (High pure purfication kit Roche) از ژل خالص‌سازی شد و در ناقلpTZ57RT همسانه‌سازی گردید تا پلاسمید pTZ57/RT histaminase حاصل شود.

یافته‌ها

در شکل زیر RNA استخراج شده با استفاده از ۵ میکرولیتر از محصول بر روی ژل آگارز ۱ درصد معلوم گردید. همان طور که مشاهده می‌شود کیفیت RNAی استخراج‌شده برای سنتز رشته اول cDNA مطلوب بود (شکل۱).



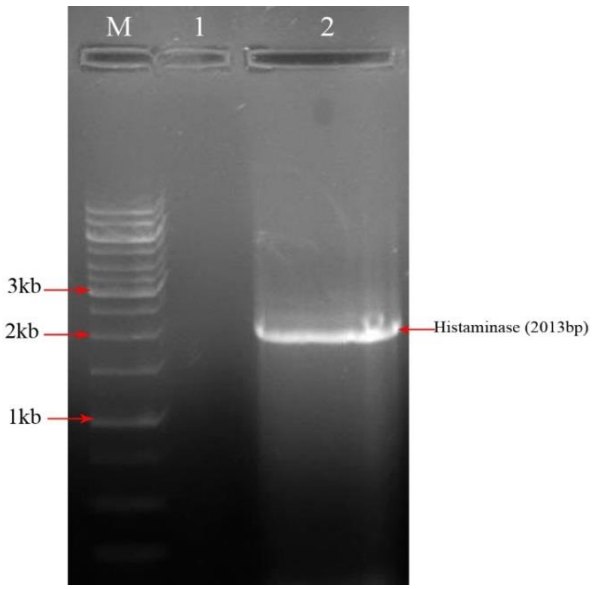
شکل۱: الکتروفورز RNAی کل استخراج شده از جوانه‌های هفت روزه بذر نخود
چاهک M نشانگر اندازه1kb ،چاهک‌های ۱،۲و ۳ RNA استخراج شده از بذر نخود توده‌ی بومی گریت

همان طور که ملاحظه می‌شود، دو باند مربوط به RNAی ریبوزومی ۲۸S و ۱۸S به خوبی از هم تفکیک شده‌اند و هیچ گونه شکستگی در RNA کل استخراج شده ملاحظه نمی‌شود با استفاده از این RNA، cDNA سنتز شده بر روی اسپکتروفتومتری cDNA نشان داد که کیفیت و غلظت آن برای ادامه‌ی روش‌های مولکولی مناسب است

تکثیر هیستامیناز

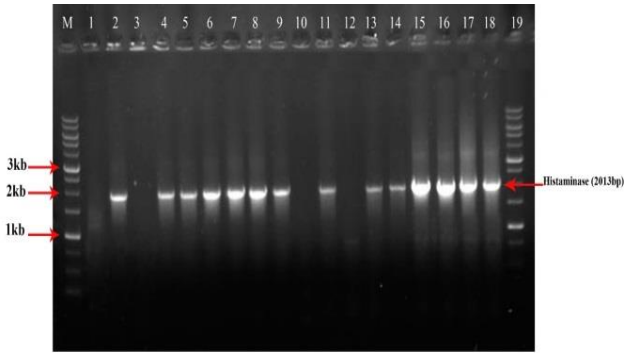
واکنش PCR به کمک آغازگرهای اختصاصی (جدول۱) و با استفاده از cDNA جوانه‌های هفت‌روزه نخود رقم گریت، محصولی به طول حدوداً ۲kb تکثیر نمود که با اندازه‌ی مورد انتظار ژن هیستامیناز درگیاه نخود مطابقت داشت. توالی ژن هیستامیناز نخود گریت به طول ۲۰۱۳ bp و تعداد۶۷۰ اسیدآمینه به شماره دسترسی KU058599 در پایگاه داده‌ی NCBI ثبت گردید. مقایسه این توالی با توالی پروتئین‌های این خانواده با استفاده از نرم افزار Vector NTI10 نشان داد که این توالی با توالی ژن هیستامیناز نخود AJ009825 ۹۹٪ مشابهت داشت. نتایج همردیفی این توالی با استفاده از نرم افزار آنلاین BLAST از پایگاه داده‌های زیستی NCBI (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) نشان داد که این پروتئین با پروتئین‌های عدس (۸۵٪)، خلر (۸۵٪)، باقلا (۸۵٪)، یونجه (۸۶٪)، نخودفرنگی (۸۵٪)، شیر سگ (۸۳٪)، سویا (۷۹٪) و ذرت (۸۶٪) همولوگ است. هم‌ردیفی جفتی توالی نوکلئوتیدی نخود گریت این مطالعه KU058599 با توالی همین ژن در نخود AJ009825 در تعدادی از نوکلئوتیدها متفاوت بودند. تفاوت در تعدادی ازنوکلئوتیدها منجر به تغییر تعدادی از اسیدآمینه در توالی پروتئین نخود گریت نسبت به توالی پروتئین نخود پایگاه NCBI گردید. برای مثال، اسیدآمینه‌ی شماره‌ی ۲۵۷ در توالی نخود پایگاه تیروزین اما در توالی پروتئین نخود گریت هیستیدین بود. همچنین اسیدآمینه‌ی موقعیت ۲۹۱ در نخود پایگاه سرین و در نخود گریت پرولین و اسید آمینه‌ی موقعیت ۳۴۶ در توالی نخود پایگاه گلوتامین می‌باشد اما در توالی پروتئین نخود

گریت لوسین و اسیدآمینه‌ی موقعیت ۳۶۲ لوسین نخود پایگاه با اسیدآمینه‌ی سرین جایگزین شده بود. با توجه به مقایسه‌ی ساختار سه‌بعدی و کریستالوگرافی، هیچ‌کدام از این تغییرات در جایگاه فعال آنزیم قرار نگرفته‌اند که یا باعث افزایش فعالیت آنزیم یا باعث کاهش آن شود و این تغییرات ظاهراً از فعالیت آنزیم بی‌تأثیر می‌باشد، چون هیچ‌یک از این اسیدآمینه‌ها در جایگاه فعال آنزیم وجود نداشتند.



شکل (۲) الکتروفورز محصول PCR ژن هیستامیناز پس از تکثیر توسط *pfu* چاهک (M) نشانگر اندازه ۱Kb، چاهک (۱) کنترل منفی و چاهک (۲) محصول PCR

قطعه تکثیر شده مربوط به ORF کامل ژن هیستامیناز، در ناقل pTZ57R/T همسانه‌سازی شد. پلاسمید حاوی ژن هیستامیناز (pTZ57R/T-Hista) به ای‌کولای با تراریزش منتقل شد. با بررسی پرگنه‌های رشد کرده روی محیط انتخابی(حاوی آمپی‌سیلین) در مرحله اول توسط انجام کلنی PCR از پرگنه‌ها، وجود این ژن در ۱۲ کلنی از ۱۶ کلنی تایید شد (شکل ۳)



شکل ۳: نتیجه الکتروفورز محصول PCR از کلونی‌های نوترکیب به‌منظور تشخیص پرگنه‌های دارای ژن هیستامیناز

چاهک(M) نشانگر اندازه kb ۱، چاهک ۱ کنترل منفی، چاهک۲، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸، ۹، ۱۱، ۱۳، ۱۴، ۱۵، ۱۶ قطعه ۲۰۱۳bp مربوط به ژن هیستامیناز، چاهک ۱۷،۱۸ – کنترل مثبت (محصول PCR).

بحث

ژن کدکننده‌ی هیستامیناز در گیاهان زیادی شناسایی و از آنها جداسازی شده است. به عنوان مثال، این ژن از گیاه *Huperzia serrate* جداسازی و همسانه‌سازی گردید. توالی کامل cDNA این ژن یک ORF به طول۲۰۴۳ bp و پروتئین با وزن مولکولی ۷۶/۸۵ KDa و ۶۸۱ اسید آمینه را کد نمود (۴). همچنین پادیگلیا و همکاران این ژن را به طول ۲۰۶۸bp و با ۶۵۳ اسید آمینه و با وزن مولکولی ۷۴ KDa از گیاه شیرسگ جداسازی کردند (۱۴). توالی کامل cDNA ژن هیستامیناز نخود رقم گریت به طول۲۰۱۳ bp، ۶۷۰ اسید آمینه و وزن مولکولی آن ۷۵/۷ KDa بود که نسبت به همین ژن در گیاه *Huperzia serrate* ۱۱ اسید آمینه کمتر بود (۴). محققان متعددی ژن‌های کد کننده ی هیستامینازها را در باکتری‌ها و مخمر بیان و پروتئن بیان شده را از نظر کنتیکی بررسی کردند. نتایج این مطالعات نشان داد که در همه‌ی

هیستامینازهای گیاهی مخصوصا در خانواده لگومینوز مقدار Km پاینتری نسبت به پروتئین‌های خوک و حیوانات داشتند و مقدار در میلی گرم آنها هم نسبت به پروتئین خوک بیشتر بود به گونه‌ای که در بافت‌های تازه یا جوانه‌های هفت روزه لگوم‌ها مقدار ۴ درصد از کل پروتئین را تشکیل می‌دهد. همچنین نتایج نشان داد که عمل کاتالیزوری این آنزیم نسبت به پروتئن هیستامیناز تجاری‌سازی شده خوک که برای مصارف دارویی انسان استفاده می‌شود، بیشتر و هزینه‌ی تولید آن کمتر است (۴). مسینی و همکاران (۲۰۰۷) در یک مطالعه هیستامیناز خالص‌سازی شده از دانه‌های نخود را برای درمان آنافیلاکتیک و اختلالات التهابی معرفی کردند (۳). در طول دهه گذشته، افزایش سطح هیستامین خون در بیمارانی که از ایسکمی قلبی رنج می‌برند در مطالعات مختلف گزارش شده است(۳، ۷، ۱۵، ۱۶). علیرضایی و همکاران (۲۰۱۴) در مطالعات خود اثر هیستامیناز با منشاء گیاهی را در یک مدل حیوانی انفارکتوس قلبی بخوبی مورد بررسی قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که این آنزیم خصوصیات امیدبخشی با ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی در مقابل آزاد شدن هیستامین و استرس اکسیداتیو در انفارکتوس میوکارد القاء شده به وسیله ایزوپرنالین دارد. بنابراین مطالعات مختلف نقش درمانی آنزیم هیستامیناز با منشاء گیاهی در انفارکتوس میوکارد برای مطالعات کلینیکی آینده در انسان‌ها را برجسته و پررنگتر می‌کند (۱۷). در پژوهش حاضر با ادامه پروژه و انتقال ژن به گیاهان مختلف هم می‌توان گیاه تراریخت حاوی هیستامیناز بالا تولید کرد. در مرحله بعد با خالص‌سازی آنزیم هیستامیناز با منشاء گیاهی از گیاهان تراریخت می‌توان با افزودن این آنزیم از فساد مواد غذایی با هیستامین و آمین‌های بیوژنیک دیگر جلوگیری کرد. به طور کلی محققان امروزه این آنزیم را بیشتر از گیاهان خالص‌سازی می‌کنند و به منظور افزایش قابلیت دارویی این آنزیم به‌ویژه برای کاهش ناخالصی‌های ناشی از منبع، پروتئین را با پلی‌اتیلن‌گلیکول کانژوگه می‌کنند (۳). مطالعات متعدد نشان می‌دهد که پروتئین کانژوگه خواص آنزیمی و مولکولی مشابه با آنزیم بومی و تغییر نیافته دارد. با دست‌کاری آنزیم و مهندسی آن، ماندگاری دارویی این آنزیم افزایش‌یافته و با تزریق به بدن موجودات، اثر ایمنی آن مشاهده شد. تولید بسیار آسان هیستامیناز و نیز خواص بهبودیافته‌ی آن پس از کانژوگه‌سازی، گیاهان تراریخت حاوی ژن کدکننده‌ی این آنزیم را به یک جایگزین دارویی مناسب برای درمان بیماری‌های ناشی از هیستامین تبدیل می‌کند (۸). درنتیجه، نتایج حاصل از مطالعات به‌صورت خلاصه نشان‌دهنده پتانسیل درمانی هیستامیناز گیاهی در درمان بیماری‌های آلرژیک و آنافیلاکسی و همچنین توانایی آن در مهار آسیب‌های التهابی و زخم‌های بافتی ناشی از ROS به دلیل ایسکمی مجدد می‌باشد (۳).

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که ژن هیستامیناز گیاهی از منبع نخود ضمن شباهت ۹۹ درصدی با همین ژن در گیاه نخود پایگاه NCBI در تعدادی از اسیدهای آمینه متفاوت است. با توجه به مقایسه‌ی ساختار سه‌بعدی این آنزیم

با روش‌های بیوانفورماتیکی مشخص شد که هیچ‌کدام از این تغییرات در جایگاه فعال آنزیم رخ نداده بودند. بنابراین احتمالاً تاثیری در فعالیت آنزیم نخواهند داشت. انتظار می‌رود تا به طریقه‌ی مهندسی ژنتیک و همسانه‌سازی آن در یک ناقل گیاهی بتوان آن را در یک گیاه زراعی بیان کرد و با خالص سازی پروتئین، آن را برای ساخت داروهای نوترکیب در درمان بسیاری از بیماری‌های نقص در هیستامیناز استفاده کرد.

تقدیر و تشکر

این تحقیق به کمک حمایت پژوهشی دانشگاه لرستان صورت گرفته است. از سرکار خانم مهندس زیبا نظری برای مساعدت در انجام این پژوهش تشکر می‌شود

References

1. Agostinelli E, Vianello F, Magliulo G, Thomas T, Thomas T. Nanoparticle strategies for cancer therapeutics: Nucleic acids, polyamines, bovine serum amine oxidase and iron oxide nanoparticles (Review). Int J Oncol. 2015; 46(1):5-16.
2. Rea G, Metoui O, Infantino A, Federico R, Angelini R. Copper amine oxidase expression in defense responses to wounding and Ascochyta rabiei invasion. Plant Physiology. 2002; 128(3):865-75.
3. Masini E, Bani D, Marzocca C, Mateescu MA, Mannaioni PF, Federico R, et al. Pea seedling histaminase as a novel therapeutic approach to anaphylactic and inflammatory disorders. The Scientific World Journal. 2007; 7:888-902.
4. Sun J, Morita H, Chen G, Noguchi H, Abe I. Molecular cloning and characterization of copper amine oxidase fromHuperzia serrata. Bioorganic & medicinal chemistry letters. 2012; 22(18):5784-90.
5. Maintz L, Novak N. Histamine and histamine intolerance. The American journal of clinical nutrition. 2007; 85(5):1185-96.
6. Masini E, Vannacci A, Marzocca C, Mannaioni PF, Befani O, Federico R, et al. A plant histaminase modulates cardiac anaphylactic response in guinea pig. Biochemical and biophysical research communications. 2002; 296(4):840-6.
7. Masini E, Pierpaoli S, Marzocca C, Mannaioni PF, Pietrangeli P, Mateescu MA, et al. Protective effects of a plant histaminase in myocardial ischemia and reperfusion injury in vivo. Biochemical and biophysical research communications. 2003; 309(2):432-9.
8. Federico R, Cona A, Caliceti P, Veronese FM. Histaminase PEGylation: preparation and characterization of a new bioconjugate for therapeutic application. Journal of controlled release. 2006;115(2):168-74.
9. Brew O, Sullivan M. The links between maternal histamine levels and complications of human pregnancy. Journal of reproductive immunology. 2006; 72(1):94-107.
10. Dey S, Lim H, Das SK, Reese J, Paria B, Daikoku T, et al. Molecular cues to implantation. Endocrine reviews. 2004; 25(3):341-73.
11. Pap E. Connection between histamine and the sexual steroids. Histamine:

Biology andMedical Aspects Budapest, Basel: SpringMed Publishing, Karger AG. 2004:317-28.

12. Maintz L, Schwarzer V, Bieber T, van der Ven K, Novak N. Effects of histamine and diamine oxidase activities on pregnancy: a critical review. Human reproduction update. 2008; 14(5):485-95.
13. Szewczyk G, Pyzlak M, Smiertka W, Klimkiewicz J, Szukiewicz D. Does histamine influence differentiation of trophoblast in preeclampsia? Inflammation Research. 2008; 57:71-2.
14. Padiglia A, Medda R, Scanu T, Longu S, Rossi A, Floris G. Structure and nucleotide sequence of Euphorbia characias copper/TPQ-containing amine oxidase gene. Journal of protein chemistry. 2002; 21(7):435-41.
15. Francis GS, Tang WW. Histamine, mast cells, and heart failure: is there a connection? Journal of the American College of Cardiology. 2006; 48(7):13856.
16. Zdravkovic V, Pantovic S, Rosic G, Tomic-Lucic A, Zdravkovic N, Colic M, et al. Histamine blood concentration in ischemic heart disease patients. BioMed Research International. 2011;2011.
17. Alirezaei M, Delfan B, Dezfoulian O, Kheradmand A, Divekan H, Rashidipour M, et al. The plant histaminase: a promising enzyme with antioxidant properties versus histamine release in isoprenaline-induced myocardial infarction in rats. Journal of physiology and biochemistry. 2014; 70(3):837-47. [In Persian].

Isolation and Cloning of the Histaminase Encoding Gene from Chickpea

Karimbeigi H[1], Nazarian Firouzabadi F[2], Ismaili A[3], Alirezaei M[4]

1. Graduate student, Agronomy and Plant Breeding Department, Faculty of agriculture, LorestanUniversity, Khorramabad, Iran
2. Associate Professor, Agronomy and Plant Breeding Department, Faculty of agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran
3. Division of Biochemistry, School of Veterinary Medicine, Lorestan University, Khorramabad,, Iran
4. Associate Professor of Biochemistry, Faculty of Veterinary Medicine, Lorestan University , ,Khorramabad. Iran

Abstract

Background and Objective: Histaminase (diamine oxidase) in mammals, including human, oxidize putrescine, cadaverine, agmatine and histamine. Plant histaminases, especially from Fabaceae family have a better and faster catalytic activity than animal counterparts. Recently, plant histaminases are being used as medicine to treat diseases such as hypotension, vascular headaches, impaired bowel function, respiratory symptoms, allergic infectious swelling, cancer treatment and anaphylactic cardiac shock. The aim of this study was to isolate and clone a chickpea histaminase gene to be expressed in plants, producing the recombinant protein.

Materials and Methods: The RNA of 5 seven-day old etiolated chickpea (*Cicer arietinum* L var grit) seeds was extracted. A cDNA encoding a histaminase gene was synthesized, using reverse transcriptase enzyme. Next, histaminase gene was amplified by PCR, using specific primers. Finally cDNA was cloned in the pTZ57RT cloning vector and bioinformatics analysis was performed.

Results: In this study, the encoding amine oxidase copper-containing cDNA from the pea was isolated and cloned, using molecular techniques. Results of this study showed that the full length of the cDNA was 2013 bp. The histaminases open reading frame (ORF) encoded a protein of 670 amino acids with a molecular mass of 75.7 KDa. Chickpea histaminase protein sequence shared 99% and 85% similarity to *Cicer arietinum* (CAAO), and *Pisumsativum* (PSAO), respectively.

Conclusion: In general, chickpea histaminases can be introduced to plants to produce new drugs. Plant recombinant expression may hold great promise to increase the yield as well as quality of plant made histaminase.

Keywords: Histaminase, Molecular Cloning, *Cicer arietinum*, cDNA Synthesis