

## بررسی خصوصیات ژنوتیپی آنزیم هیستامیناز گیاه خلر (*Lathyrus sativus*) در راستای اهداف درمانی و تشخیصی

- وحیده تقدسی: بخش پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران
- حسن شریفی یزدی\*: بخش علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران
- حمیدرضا کر بلائی حیدری: بخش زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

تاریخ دریافت: آبان ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: بهمن ۱۳۹۷

### چکیده

هیستامین یک آمین زیستی است که در بیماری‌های مختلف مانند رینیت آلرژیک، التهاب ملتحمه، کهیر و درماتیت آتوپیک و همچنین در ایجاد بیماری‌های آنافیلاکسی قلبی و آسم‌های آلرژیک نقش دارد. گیاهان دارویی از دیر باز در درمان بیماری‌های مختلف استفاده شده‌اند. به دلیل کاربردهای وسیع آنزیم هیستامیناز در درمان بیماری‌های با منشا هیستامین در انسان و دام، در این مطالعه شناسایی و هم‌سان‌سازی ژن آنزیم هیستامیناز (DAO) از گیاه خلر (*Lathyrus sativus*) بومی صورت گرفت. به این منظور استخراج mRNA از جوانه خلر بومی استان فارس و به دنبال آن سنتز cDNA به منظور تکثیر ژن هیستامیناز با پرایمرهای طراحی شده انجام شد، سپس هم‌سان‌سازی ژن پس از برش آنزیمی در ژن و وکتور pQE-80L انجام گردید، در نهایت انتقال وکتور نو ترکیب به باکتری *Escherichia coli* سویه XL1-Blue صورت گرفت. صحت کلونینگ نیز با هضم آنزیمی و توالی‌یابی تایید شد. پس از توالی‌یابی نوکلئوتیدی، ترادف mRNA ژن مربوط به طول ۱۹۹۵ جفت باز در بانک ژن امریکا به شماره دسترسی KR063661 ثبت گردید، توالی پروتئینی آن نیز در بانک ژن به شماره ALE71304 ثبت شد. ارزیابی ساختار سه بعدی آنزیم هیستامیناز بومی و مطالعه فیلوژنتیک آن نیز براساس ترادف‌های شناخته شده در این مطالعه انجام گرفت که نشان‌دهنده بیش‌ترین شباهت ژنتیکی (۹۴٪) و پروتئینی (۹۶٪) به گونه نخود (*Pisium sativum*) است. پلاسمید نو ترکیب تولید شده در آینده می‌تواند در سیستم‌های بیانی استفاده شود و منجر به تولید انبوه آنزیم برای استفاده از خصوصیات درمانی این آنزیم منحصربه‌فرد گردد.

**کلمات کلیدی:** آنزیم هیستامیناز، رینیت، دی آمین اکسیداز، کلونینگ، pQE-80L



## مقدمه

نتیجه حضور مقادیر بالایی از آمین‌های بیوژنیک خاص در مواد غذایی به‌عنوان نتیجه استفاده از مواد خام با کیفیت پایین، آلودگی میکروبی، شرایط نامناسب تهیه و تولید غذا و یا شرایط نامناسب نگهداری شناخته می‌شود (Kung و همکاران، ۲۰۱۲). در حال حاضر چندین نوع زیست‌حسگر بر پایه آنزیم دی‌آمین‌اکسیداز برای تشخیص میزان آمین‌های بیوژنیک در مواد غذایی ساخته شده است (Rosini و همکاران، ۲۰۱۴؛ Wimmerova و Macholan، ۱۹۹۹). از آن‌جاکه اطلاعات ژنوتیپی و فنوتیپی کافی در مورد آنزیم هیستامیناز گیاه خلر در دسترس نیست در این مطالعه به بررسی خصوصیات این آنزیم در این گونه گیاهی پرداخته شد. به‌دلیل کاربردهای وسیع این آنزیم در درمان بیماری‌های با منشأ هیستامین در انسان و دام در این مطالعه شناسایی و هم‌سان‌سازی ژن آنزیم هیستامیناز گیاه خلر در وکتور pQE-80L انجام شد تا با در دسترس بودن این سازه ژنی بیان و تولید انبوه این آنزیم در آینده تسهیل گردد.

## مواد و روش‌ها

### استخراج mRNA از جوانه خلر و تکثیر ژن هیستامیناز:

در ابتدا تعداد مناسبی از دانه‌های گیاه خلر (*Lathyrus sativus*) تهیه شده از دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز در خاک ورمیکولیت در عمق ۲ سانتی‌متری خاک در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی قرار داده شد. بعد از ۵ تا ۷ روز جوانه‌ها رشد کردند، جوانه‌ها چیده شد و سپس به‌کمک ازت مایع در یک هاون چینی استریل، به‌صورت کاملاً یکنواخت پودر گردید و سپس ۷۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم از آن به یک میکروتیوب استریل منتقل شد. در مرحله بعد استخراج RNA (کیفیت شرکت دنایست آسیا) مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده صورت گرفت. تولید cDNA نیز با میکروتیوب‌های Cycle script (شرکت بیونیر، کره جنوبی) مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. PCR با حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر انجام شد. طراحی پرایمرها براساس توالی آنزیم هیستامیناز موجود در بانک ژن صورت گرفت (AJ786401). PCR با مواد (شرکت سینازن) جداگانه PCR buffer (۱۰X) به‌میزان ۵ میکرولیتر، آغازگر رفت DAO-F (۱۰ پیکومول/میکرولیتر) به‌میزان ۱ میکرولیتر و آغازگر برگشت DAO-R (۱ میکرولیتر) به‌میزان ۱ پیکومول/میکرولیتر،  $MgCl_2$  (۵۰ میلی‌مول) به‌میزان ۱/۵ میکرولیتر (غلظت نهایی ۱/۵ میلی‌مول)، dNTP به‌میزان ۱ میکرولیتر (غلظت نهایی ۲۰۰ میکرومول) و Taq DNA polymerase به‌میزان ۰/۵ میکرولیتر (معادل ۲/۵ واحد آنزیم)، cDNA به‌میزان ۵ میکرولیتر (معادل ۵۰ نانو گرم) و آب مقطر به‌میزان ۳۵ میکرولیتر انجام شد. آغازگر رفت با توالی 5'ATG CGA GCT CGT TAC ACCATTGCATGTTCAAC 3'

آمین‌اکسیدازها دسته وسیعی از آنزیم‌های دارای Cu یا FAD هستند. این آنزیم‌ها در میان تمام موجودات زنده گسترش دارند و قادر به اکسید کردن آمین‌های بیوژنیک ( $H_2NH_2$ ) در حضور اکسیژن و آب به پراکسید هیدروژن ( $H_2O_2$ ) و آلدئیدها هستند. گسترش وسیع آن‌ها بی‌شک به‌دلیل عملکرد مهم آن‌ها در متابولیسم آمین‌های بیوژنیک است. آنزیم‌های آمین‌اکسیداز در ساختار، مکانیسم کاتالیتیکی و روش اکسیداسیون سوپرسترا با هم متفاوت هستند (Bachrach، ۲۰۱۸؛ Biji و همکاران، ۲۰۱۶):  $H_2NH_2 + O_2 + H_2O \rightarrow RCHO + NH_3 + H_2O_2$ . هم‌چنین دی‌آمین‌اکسیدازهای (DAO) گیاهی (Cu-AO; histaminase; EC 1.4.3.6) به‌طور فیزیولوژیکی در دی‌آمیناسیون اکسیداتیو آمین‌های بیوژنیک مختلف مانند: پوترسین، کاداورین، آگماتین و هیستامین به آلدئیدهای وابسته نقش دارد (Brazeau و همکاران، ۲۰۰۴). DAOهای گیاهی از آنزیم‌های هم‌سان خود در پستانداران و پروکاریوت‌ها در چندین ویژگی خاص برتری دارند که شامل: ۱- سرعت (Rate) و اصطلاحاً عدد برگشتگی (Turnover) کاتالیزوری این آنزیم‌ها بسیار بیش‌تر است و فعالیت بیش‌تری دارند ۲- تمایل بیش‌تری برای متصل شدن به هیستامین دارند ۳- بسیار پایدارترند (Federico و همکاران، ۲۰۰۶). آنزیم‌های DAO کاربردهای وسیعی در زمینه صنعت دارویی و غذایی دارند. دیده شده است که این آنزیم‌ها تأثیر خوبی در کاهش پاسخ‌های آنافیلاکسی در خوکچه‌هندی داشته است (Masini و همکاران، ۲۰۰۲) و به همین دلیل گفته می‌شود که این آنزیم‌ها در تهیه داروهای مربوط به درمان ایسکمی قلبی چشم‌انداز خوبی دارند (Federico و همکاران، ۲۰۰۶). به تازگی یک ثبت اختراع بین‌المللی (N.PCT/EP01/13770) عنوان کرده است که داروهایی که حاوی هیستامیناز با منشأ گیاهی هستند می‌تواند برای درمان تمام بیماری‌های با منشأ هیستامین مانند رینیت آلرژیک، التهاب ملتحمه، کهیر و درماتیت آتوپیک و هم‌چنین در درمان آنافیلاکسی قلبی، آسم‌های آلرژیک، شوک‌های سپتیک و آلرژیک موثر واقع گردد (Çakmaz و همکاران، ۲۰۱۳). در صنعت مواد غذایی از این آنزیم‌ها در تشخیص آمین‌های بیوژنیک به‌عنوان شاخصی از کیفیت مواد غذایی در طی فراوری یا نگهداری از مواد غذایی می‌توان استفاده کرد. آمین‌های بیوژنیک ترکیبات حاوی نیتروژن هستند که در طی تخمیر ناشی از دکربوسیلیه شدن اسیدهای آمینه توسط مخمر و باکتری تولید می‌شوند. به‌عنوان مثال: لیزین تولید کاداورین، هیستیدین تولید هیستامین و اسیدهای آمینه گلوتامین، آگماتین و آرژنین تولید پوترسین می‌کنند (Alonso-Lomillo و همکاران، ۲۰۱۰؛ Koyanagi و همکاران، ۲۰۰۰). تولید آمین‌های بیوژنیک می‌تواند ناشی از فعالیت باکتریایی در زمان تولید یا نگهداری از مواد غذایی باشد، در

۳۷ درجه سانتی‌گراد تیمار گردیدند، در نهایت مخلوط واکنش را بر روی پلیت‌های حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین (۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) پخش کرده و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. **تعیین توالی و ثبت ژن هیستامیناز کلون شده در بانک جهانی ژن امریکا:** از تک کلونی‌های به‌دست آمده کشت مجدد و استخراج پلاسمید انجام شد. برای تایید صحت کلونینگ، پلاسمید استخراج شده تعیین توالی گردید و هضم آنزیمی پلاسمید نیز با آنزیم‌های *Sac I* و *Hind III* انجام شد. در پایان کلونی‌های تایید شده کشت داده و با محیط کشت تجاری LB حاوی ۰.۵٪ گلیسرول در ۸۰- درجه نگه‌داری گردید.

**طراحی ساختار سه بعدی و تعیین جایگاه فعال آنزیم هیستامیناز خلر:** برای رسم ساختار سه بعدی آنزیم هیستامیناز گیاه خلر از روش Homology modelling استفاده شد. این روش به یک مولکول الگو مناسب نیاز دارد. پروتئین مورد نظر براساس آن مدل سازی گردید. بر همین اساس برای یافتن یک الگوی مناسب ابتدا یک جستجوی BLASTp انجام گرفت که در آن توالی پروتئین (ALE71304) به‌عنوان توالی مورد نظر وارد شد و جستجو به ساختارهای پایگاه‌های PDB محدود گردید. نتیجه این جستجو چندین الگوی محتمل را معرفی می‌کند که ساختار تحت شماره‌شناسایی ۱w۲z A دارای بهترین امتیاز (۹۶٪ مشابهت) بود. ساختارهایی که بیش از ۳۰٪ شباهت به مولکول مورد نظر داشته باشند می‌توانند برای Homology modelling استفاده شوند. به‌همین دلیل از این ساختار به‌عنوان الگو برای پیش‌بینی ساختار پروتئین مورد نظر استفاده شد. برای این که بتوان از این مولکول برای پیش‌بینی ساختار پروتئین مورد نظر استفاده کرد با نرم‌افزار Context (version 1.7) یکی از زیرواحدهای موجود در مولکول ۱w۲z A از آن جدا شد. برای انجام پیش‌بینی از نرم افزارهای Homology modelling استفاده گردید که به‌ترتیب شامل Galaxyweb و Structuropedia بودند. پس از انجام پیش‌بینی‌ها، ساختارهای پیش‌بینی شده برای بررسی میزان کیفیت ساختارهای به دست آمده از نرم‌افزار QMEAN استفاده گردید. براساس نتایج بررسی کیفیت ساختار پیش‌بینی شده با Galaxyweb کیفیت بالاتری داشت (جدول ۱).

**جدول ۱: ارزیابی کیفیت ساختارهای پیش‌بینی شده آنزیم**

هیستامیناز گیاه خلر با دو نرم‌افزار Galaxyweb و structuropedia.

Zscore پایین‌تر نشان‌دهنده کیفیت بالاتر مدل‌سازی است.

Z score	Model
۰/۳۲	Galaxyweb
۰/۶۷	Structuropedia

دارای جایگاه برش برای آنزیم محدودکننده *SacI* و آغازگر برگشت با توالی ۵' ATG CAA GCT TAT TGG AGC AAC CTGGCCATG C3' دارای جایگاه برش برای آنزیم *Hind III* طراحی شد. سپس سیکل حرارتی به‌صورت دمای دناتور اولیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد (۵ دقیقه)، دمای دناتور سیکل ۹۴ درجه سانتی‌گراد (۴۵ ثانیه)، دمای اتصال پرایمر ۵۶ درجه سانتی‌گراد (۱ دقیقه)، دمای تکثیر ۷۲ درجه سانتی‌گراد (۲ دقیقه) طی ۳۵ سیکل و دمای تکثیر نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد (۷ دقیقه) برای واکنش PCR بهینه گردید. در پایان کار محصولات PCR در ژل آگاروز ۱٪ الکتروفورز شد.

**هم‌سان سازی در پلاسمید بیانی pQE-80L و انتقال به**

**باکتری *E. coli* XL1-Blue.** دو انتهای محصول PCR و وکتور بیانی pQE-80L در میکروتیوب‌های جداگانه آنزیم‌های محدودکننده *SacI* و *Hind III* برش داده شد. هر کدام از آنزیم‌های محدودکننده به‌میزان ۵ واحد، بافر تانگو (۱۰X) به‌میزان ۲ میکرولیتر، محصول PCR و وکتور هر کدام به‌میزان ۴۰۰ نانوگرم و آب مقطر به‌میزان ۴ میکرولیتر در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر استفاده شد، سپس نمونه‌ها در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک شب نگه‌داری شدند. نمونه‌ها بر روی ژل آگاروز الکتروفورز شد و قطعات مورد نظر از ژل تخلیص شد و سپس فرآیند الحاق به‌میزان ۲۵۰ نانوگرم از وکتور به‌همراه ۴۰۰ نانوگرم از محصول PCR، ۲ میکرولیتر از بافر آنزیم T4 ligase (۱۰X)، ۰/۵ واحد از آنزیم T4 ligase و مابقی آب مقطر تا حجم ۲۰ میکرولیتر انجام گردید. مخلوط واکنش در دمای ۱۶ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک شب نگه‌داری شد. از محیط کشت (Luria Bertani) برای رشد سویه‌های باکتری *E. coli* استفاده شد. به‌منظور تهیه سلول‌های مستعد، ابتدا سویه *E. coli* XL1-Blue در محیط کشت LB به‌مدت ۱۶ ساعت کشت داده شد، سپس به‌صورت ۱ درصد در محیط کشت LB جدید تلقیح گشت. بعد از ۱/۵ الی ۲ ساعت، جمعیت سلولی با اندازه‌گیری کدورت در طول موج ماکزیمم ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و زمانی که جذب نوری به ۰/۳ تا ۰/۳۵ رسید، سلول‌ها رسوب داده شدند. در مرحله بعد، ۰/۱ حجم اولیه کشت، محیط کشت TSB سرد اضافه و سلول‌ها مجدد معلق شدند. سلول‌ها به‌مدت نیم‌ساعت در کنار یخ مجاور شدند، سپس محلول واکنش برای عمل انتقال (حاوی ۲۵ میکرولیتر سلول باکتری، ۵ میکرولیتر محلول KCM (5X)، و محصول الحاق به‌میزان ۱۰ میکرولیتر و مابقی آب مقطر به‌میزان ۱۸ میکرولیتر) اضافه گردید. در کنار این موارد دو مخلوط واکنش نیز برای کنترل مثبت و منفی تهیه گردید. محلول‌های واکنش به‌مدت ۳۰ دقیقه در مجاور یخ قرار گرفتند و سپس میکروتیوب‌ها به بن‌ماری با دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۵ ثانیه منتقل شدند و در ادامه بلافاصله به آن محیط LB سرد افزوده شدند. در مرحله بعد میکروتیوب‌ها به‌مدت ۱ ساعت در دمای



با توجه به این که مولکول حاصل از مدل سازی فاقد لیگاند ها و مولکول های یونی مربوط به ساختار DAO است. لازم است برای به دست آوردن ساختاری که حالت طبیعی دارد، این مولکول ها به مدل اضافه گردند. برای انجام این کار ابتدا با نرم افزار Context کتوردیناسیون مربوط به این مولکول ها از ساختار مولکول 1w2z A به دست آمد، سپس این داده ها به ساختار مدل شده اضافه شد. برای اصلاح موقعیت این مولکول ها نسبت به ساختار مدل شده ساختار سه بعدی مربوط به 1w2z A و ساختار مدل شده با نرم افزار Chimera 1.11 روی هم انطباق داده شدند. پس از این انطباق جایگاه مولکول های اضافه شده بر پایه ساختار 1w2z A و با ابزارهای موجود در نرم افزار Chimera 1.11 اصلاح گردید. با انجام این مرحله ساختار پیش بینی شده نهایی به دست آمد که شباهت بسیار بالایی به ساختار 1w2z A دارد.

#### آنالیز فیلوژنتیکی و هم‌ردیفی پروتئینی توالی هیستامیناز:

در پایان نتایج نهایی و استخراج شده حاصل از سکانس (تعیین ترادف) با برنامه BLAST p بررسی و با دیگر موارد مشابه موجود در بانک ژن آمریکا (NCBI) مقایسه گردید تا هرگونه قرابت و اختلاف بین آنزیم هیستامیناز گونه خلر بومی ایران با سایر موارد مشابه در بانک ژنی مشخص گردد. در ضمن نمودار فیلوژنی سکانس های مرتبط با گونه های مختلف به کمک نرم افزار MEGA6 با روش Maximum Likelihood رسم گردید و علاوه بر آن اختلاف ژنتیکی بین توالی ها با نرم افزار CLC محاسبه گردید. برای مقایسه اختلاف در اسید آمینه های موجود در توالی پروتئینی آنزیم هیستامیناز گونه خلر بومی ایران و جمهوری چک (AJ786401) هم‌ردیفی با نرم افزار CLC بین توالی دو جدایه صورت گرفت.

## نتیجه

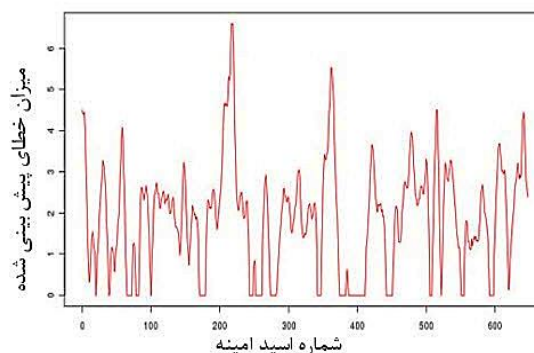
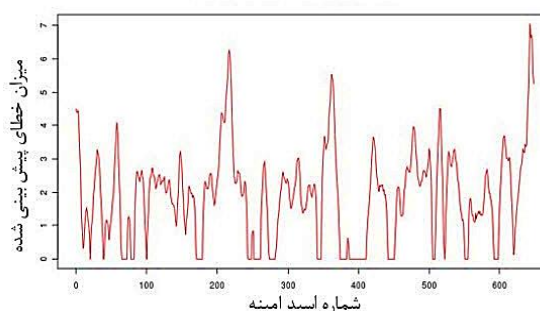
#### تعیین توالی و هم‌سان سازی ژن آنزیم هیستامیناز: برای

تایید هم‌سان سازی ژن هیستامیناز، وکتور حاوی سازه ژنی نو ترکیب به نام PQE-80L-DAO استخراج گردیده و با آنزیم های *Sac I* و *Hind III* برش صورت گرفت و در ژل آگارز یک درصد دو باند مجزا مربوط به پلاسمید (4751 جفت باز) و قطعه ژنی هیستامیناز (1995 جفت باز) صحت ساختاری سازه تایید گردید. برای خطی کردن پلاسمید یک بار هم با آنزیم *Hind III* وکتور حاوی ژن هیستامیناز برش داده شد (شکل 2)، هم چنین کلونی های حاوی سازه ژنی مجدداً در محیط حاوی آنتی بیوتیک رشد داده شد و ارزیابی با PCR نیز صورت گرفت. در نهایت استخراج پلاسمید از کلونی های تایید شده انجام گرفت و در نهایت توالی یابی بر روی آن ها انجام شد. توالی حاصل از ژن هیستامیناز خلر ایرانی در بانک ژن آمریکا ثبت گردید. طرح شماتیک از وکتور حاوی ژن هیستامیناز در شکل 2 مشاهده می گردد.

باتوجه به کیفیت بالاتر مدل به دست آمده از نرم افزار Galaxyweb این مدل برای بهبود ساختار بررسی شد. برای بهبود کیفیت ساختار، بررسی روی کیفیت انجام شد که نشان می داد ناحیه های 640-649 و 213-222 پایین ترین کیفیت را دارد. به همین دلیل این دو ناحیه برای بهبود ساختار به نرم افزار Modloop داده شد تا مجدد مدل سازی شوند و منجر به بهبود ساختار شوند. شکل مربوط به کیفیت ساختار در ادامه آورده شده است (شکل 1) که هرچه این مقادیر بالاتر باشد میزان کیفیت پایین تر خواهد بود. تاثیر عمل کرد نرم افزار Modloop روی ساختار پیش بینی شده با نرم افزار QMEAN مجدداً بررسی شد. این بررسی ها نشان داد که ساختار به دست آمده کیفیت بهتری دارد (جدول 2).

جدول 2: ارزیابی کیفیت ساختار پیش بینی شده آنزیم هیستامیناز گیاه خلر با نرم افزار قبل (نرم افزار Galaxyweb) و بعد (نرم افزار QMEAN) از بهبود ساختار Z score پایین تر نشان دهنده کیفیت بالاتر مدل سازی است.

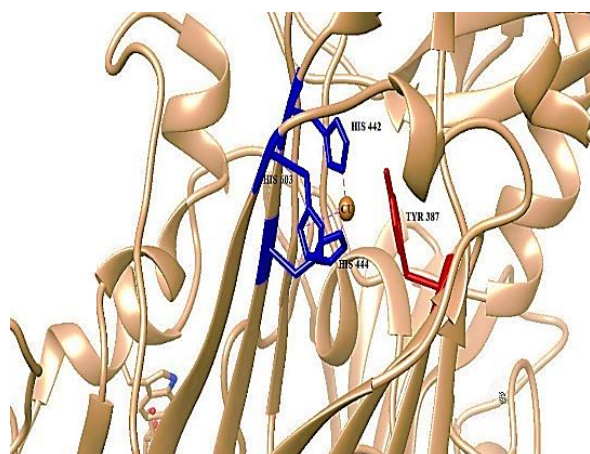
Z score	Model
0.32	Galaxyweb
0.27	After refinement



شکل 1: بالا، کیفیت نواحی مختلف توالی پروتئین (نرم افزار Galaxyweb). ناحیه های 640-649 و 213-222 پایین ترین کیفیت را دارد. پایین، نمودار کیفیت ساختار بعد از بهبود ساختارهای کیفیت پایین دارد. میزان خطای پیش بینی شده بر حسب انگستروم است.



است اما آنزیم فعال هر دو یون مس و TPQ را دارد. حدس زده می‌شود که تغییرات ساختاری مربوط به تشکیل TPQ فقط در داخل ناحیه جایگاه فعال و به خصوص در ارتباط با یون مس متصل شده، اتفاق می‌افتد (Tanizawa و همکاران، ۲۰۰۰). برای درک بهتر، جایگاه فعال آنزیم هیستامیناز خلر به همراه اسید آمینه‌های درگیر در ایجاد جایگاه فعال، در شکل ۴ نشان داده شده است.



#### بررسی ساختار سه بعدی آنزیم هیستامیناز: ساختار سه

بعدی نهایی آنزیم هیستامیناز گیاه خلر همراه با ساختار ناحیه فعال آنزیم در شکل ۴ مشاهده می‌گردد. در تمام آنزیم‌های Cu-AO، ناحیه جایگاه فعال شامل یک اتم  $Cu^{2+}$  و یک کوفاکتور آلی Topaquionone (TPQ) است. TPQ به‌طور خودبه‌خودی به‌وسیله اکسیداسیون یک اسید آمینه تیروزین (Tyr 387) حفاظت شده در حضور مولکول اکسیژن و کوفاکتور مس تولید می‌شود. آنزیم پیش‌ساز، فاقد یون مس و TPQ

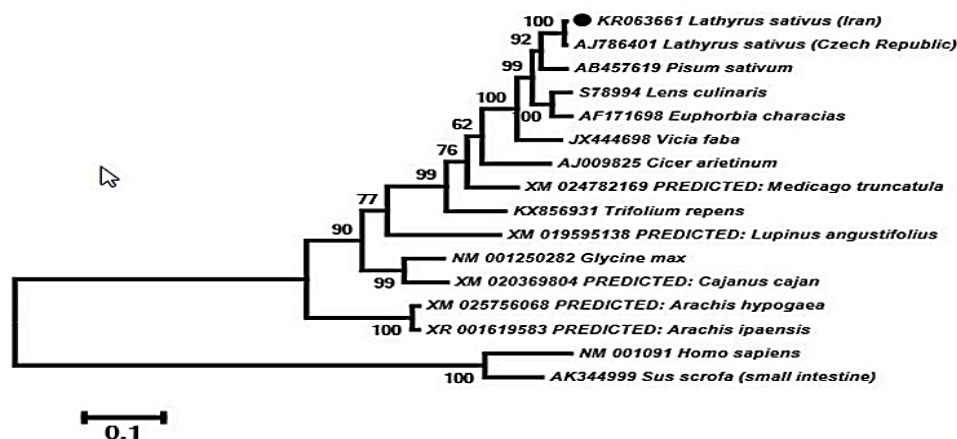


شکل ۴: سمت راست، ساختار سه بعدی آنزیم هیستامیناز گیاه خلر ترسیم شده به کمک نرم‌افزار Chimera 1.11. سمت چپ، شماتیک ناحیه فعال آنزیم هیستامیناز گیاه خلر. اتم مس به سه هیستامین حفاظت شده متصل است (His 442, His 444, His 03)

نخود (*Cicer arietinum*) ۸۵٪ و شبدر (*Trifolium repens*) ۸۴٪ را دارد. اما تفاوت این آنزیم با آنزیم هیستامیناز گونه انسان و خوک بسیار زیاد بود که باعث جدا شدن آن در شاخه مجزا شده است (شکل ۵ و ۶). آنالیز حاصل از درخت فیلوژنی نیز نشان داد که آنزیم هیستامیناز گونه بومی ایران و آنزیم هیستامیناز گونه خلر جمهوری چک در یک گروه فرعی واحدی قرار گرفته که این گروه فرعی رابطه نزدیکی با آنزیم هیستامیناز گونه‌های نخود فرنگی دارند (شکل ۵).

#### هم‌ردیف‌سازی چندگانه و روابط فیلوژنتیکی: آنالیزهای

ملکولی در این مطالعه نشان داد که توالی نوکلئوتیدی آنزیم هیستامیناز گونه بومی ایران، بیش‌ترین شباهت را با آنزیم هیستامیناز گونه خلر جمهوری چک (۹۹٪) داراست. بعد از آن بیش‌ترین شباهت را با آنزیم هیستامیناز گونه‌های نخود فرنگی (*Pisium sativum*) ۹۴٪، عدس (*Lens culinaris*) ۹۲٪، فریون (*Euphorbia characias*) ۹۰٪، باقله (*Vicia faba*) ۹۰٪، یونجه سربریده (*Medicago truncatula*) ۸۶٪



شکل ۵: درخت فیلوژنی رسم شده با نرم‌افزار MEGA 5، مدل Neighbor joining (Bootstrap 1000 replication)



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
KR063661 Lathyrus sativus (Iran)-2	1		7	114	153	202	193	284	333	299	450	467	459	567	575	1337	1349
AJ786401 Lathyrus sativus (Czech Republic)-2	2	99.64		112	154	203	191	283	331	297	446	465	456	567	575	1337	1348
AB457619 Pisum sativum-2	3	94.15	94.26		153	202	185	277	317	286	439	440	456	556	564	1344	1367
S78994 Lens culinaris	4	92.16	92.11	92.16		135	213	283	340	289	443	472	477	579	580	1349	1362
AF171698 Euphorbia characias	5	89.80	89.75	89.80	93.18		258	328	380	347	496	518	526	617	623	1368	1380
JX444656 Vicia faba	6	90.12	90.23	90.53	89.10	86.97		275	344	301	440	454	473	566	569	1355	1377
XM_024782169 PREDICTED: Medicago truncatula	7	85.47	85.52	85.82	85.52	83.46	85.96		284	278	410	428	449	534	536	1356	1360
KX856931 Trifolium repens	8	82.96	83.06	83.78	82.61	80.84	82.43	85.46		332	422	449	461	565	563	1367	1381
AJ009825 Cicer arietinum	9	84.68	84.78	85.35	85.20	82.47	84.61	85.79	83.03		411	435	455	551	550	1352	1379
NM_001250282 Glycine max	10	76.97	77.18	77.53	77.34	74.99	77.53	79.01	78.39	78.99		196	412	479	478	1314	1332
XM_020369804 PREDICTED: Cajanus cajan	11	76.10	76.20	77.48	75.86	73.88	76.81	78.19	77.01	77.76	89.96		421	489	490	1297	1316
XM_019595138 PREDICTED: Lupinus angustifolius	12	76.55	76.70	76.70	75.64	73.51	75.88	77.04	76.43	76.77	78.94	78.48		524	513	1344	1359
XM_025759068 PREDICTED: Arachis hypogaea	13	71.13	71.13	71.69	70.53	68.98	71.17	72.87	71.29	71.95	75.66	75.15	73.37		33	1330	1343
XR_001619583 PREDICTED: Arachis ipaensis	14	70.68	70.68	71.24	70.44	68.63	70.97	72.72	71.35	71.95	75.67	75.06	73.89	98.32		1319	1335
AK344999 Sus scrofa (Small intestine)	15	36.70	36.70	36.36	36.10	35.62	35.90	35.80	35.15	35.98	37.78	38.59	36.36	37.15	37.64		337
NM_001091 Homo sapiens	16	36.31	36.36	35.48	35.66	35.24	35.05	35.79	34.67	34.89	37.11	37.87	35.84	36.71	37.06	83.42	

شکل ۶: ارزیابی میزان تفاوت نوکلئوتیدی (مثلث بالا سمت راست) و درصد شباهت (مثلث پایین سمت چپ) جهت مقایسه توالی‌های نوکلئوتیدی آنزیم هیستامیناز در گونه‌های مرتبط (نرم افزار CLC main workbench 5)

## بحث

در این مطالعه برای اولین بار توالی نوکلئوتیدی آنزیم هیستامیناز گیاه بومی خلر (*L. sativus*) شناسایی شد و اطلاعات ژنتیکی مرتبط با آن در بانک اطلاعات داده‌های ژنتیکی (NCBI) ثبت گردید. آنالیز ملکولی حاصل از این مطالعه نشان داد که آنزیم هیستامیناز گونه بومی ایران و آنزیم هیستامیناز گونه خلر جمهوری چک در یک گروه فیلوژنتیک واحدی قرار گرفته و تشابه زیادی با آنزیم هیستامیناز گونه‌های نخود فرنگی دارند. درحالی‌که میزان شباهت توالی آن با دیگر توالی‌های آنزیم انسانی و خوکی بسیار پایین (به ترتیب ۳۶/۳۱، ۳۶/۷ درصد) بود. آنزیم DAO یک دایمر است که هر یک از زیر واحدهای آن از ۳ دومن تشکیل شده است که آن‌ها را با D3، D2 و D4 نشان می‌دهند. این آنزیم را می‌توان به یک قارچ بدون پایه تشبیه کرد. بزرگ‌ترین دومن هر زیر واحد (D4، توالی ۶۴۷-۲۲۷) یک ساندویچ بتا است که از دو صفحه بتا پیچ خورده و ناهم‌سو با ۸ تا ۱۰ شاخه تشکیل شده است. دو دومن کوچک‌تر زیرواحدها، D2 (توالی ۶ تا ۹۶) و D3 (توالی ۱۰۷ تا ۲۰۴) در سطح ساندویچ بتا قرار گرفتند و تشکیل یکی از زوایای کلاهدک قارچ را می‌دهند. برای فعالیت این آنزیم یون مس ضروری است که در جایگاه فعال آنزیم قرار می‌گیرد و به همین دلیل در زمان بیان این آنزیم باید  $\text{CuSO}_4$  در محیط کشت اضافه گردد (Kumar و همکاران، ۱۹۹۶). با انجام کلونینگ ژن هیستامیناز در وکتور PQE-80L امکان تکثیر ژن و برش آنزیمی با کارایی بالا برای انجام مراحل بعدی امکان‌پذیر می‌شود، هم‌چنین وکتور PQE-80L چندین سایت برشی برای آنزیم‌های اندونوکلازای دارد و این استراتژی کلونینگ ژن مورد نظر را در حامل‌های بیانی متعدد امکان‌پذیر می‌سازد.

هیستامین یک ترکیب نیتروژن دار آلی است که به‌عنوان یک انتقال‌دهنده عصبی برای سیستم بدن انسان و بسیاری از گونه‌های دیگر موجودات زنده ضروری است. علاوه بر آن نقش دیگر هیستامین در زمان ایجاد آسیب بافتی است که باعث پرخون شدن رگ‌ها در نزدیکی بافت آسیب دیده و افزایش نفوذپذیری آن شده و با افزایش جریان خون سبب حرکت سلول‌های سفید خون به جایگاه آسیب دیده و در نتیجه موجب قرمزی و تورم می‌شود. در علم پزشکی برای کنترل اثرات مضر هیستامین، آنتی‌هیستامین تجویز می‌شود که به گیرنده‌های H1 هیستامین متصل می‌شوند. در بدن مازاد هیستامین با دو آنزیم هیستامیناز (دی‌آمین‌اکسیداز) و هیستامین‌ان‌متیل‌ترانسفراز (HNMT) متابولیزه می‌شود (Petersen, ۲۰۰۲).

افزایش هیستامین در بدن عوارض مختلفی را به همراه دارد که موجب ایجاد حالتی در بدن به نام Histamine intolerance می‌شود که به دلیل کاهش آنزیم هیستامیناز یا آنزیم هیستامین‌ان‌متیل‌ترانسفراز است که علائمی مانند حالت تهوع، استفراغ، التهاب مخاط بینی را شامل می‌شود (Manzotti و همکاران، ۲۰۱۶).

گیاهان دارویی از دیر باز در درمان بیماری‌های مختلف استفاده شده‌اند. هیستامینازهای گیاهی دارای عملکرد بهتری نسبت به جانوری هستند از جمله دارای عمل کاتالیزوری بیشتر، اکسیداسیون مجدد آنزیمی کم‌تر، میل ترکیبی بیشتر با سوبسترای خود (هیستامین) و پایداری بالاتری هستند. از این‌رو هیستامینازهای گیاهی مورد توجه بیش‌تری برای تولید انبوه قرار گرفته‌اند (Federico و همکاران، ۲۰۰۶).



محافظت می‌کنند (Wolvekamp, ۱۹۹۴). علاوه بر آن، این آنزیم نقش‌های دیگری در بدن دارد که میزان فعالیت سرمی این آنزیم می‌تواند نشانگر بیماری‌های مختلفی باشد و از آن برای غربالگری بیماری‌های مختلف می‌توان استفاده کرد که در جدول ۳ به برخی از آن‌ها اشاره شده است. براین اساس کیت تشخیصی این آنزیم، تولید شده و در آزمایشگاه‌ها و مراکز درمانی استفاده می‌شود.

آنزیم هیستامیناز تقریباً در بیش تر اندام‌های موجودات زنده تولید می‌شود (Masini و همکاران، ۲۰۰۷). این آنزیم در بدن پستانداران پوترسین، کاداوارین، آگماتین و هیستامین را اکسید می‌کند. پژوهش‌ها نشان می‌دهد که سطح بالای این آنزیم در لایه موکوسی روده دیده می‌شود که در برابر هیستامین تولید شده در بدن و هیستامین آزاد شده در مواد غذایی به‌صورت اختصاصی از بدن

جدول ۳: نقش آنزیم هیستامیناز (DAO) در بیماری‌های مختلف به همراه تغییرات سطح سرمی آن در این بیماری‌ها

بیماری یا اختلال	تغییرات سطح سرمی	دلیل	منابع
Pregnancy Toxemia, Abortion	کاهش فعالیت سرمی DAO	به‌عنوان یک سد در جفت عمل می‌کند و مانع از عبور هیستامین/ پلی‌آمین‌ها از طریق جفت می‌شود.	(Maintz و همکاران، ۲۰۰۸)
Neoplasia	افزایش فعالیت DAO در داخل کارسینوما که به دنبال آن افزایش فعالیت آنزیم در جریان خون رخ می‌دهد	نقش آن مشخص نشده	(Petersen و همکاران، ۲۰۰۲)
Allergic response	مهار فعالیت DAO	شکستن هیستامین آزاد شده	(Manzotti و همکاران، ۲۰۱۶)
Infertility	افزایش شدید فعالیت DAO در Semen	نامشخص	(Schwelberger و همکاران، ۲۰۱۳)
Uremia	کاهش بسیار زیاد DAO در کلیه و ادرار و افزایش آن در پلاسما	محافظت در مقابل Nephrotoxicity	(Pini و همکاران، ۲۰۱۷؛ Singh و Chand، ۲۰۱۶)
Bowel ischemia	افزایش فعالیت سرمی DAO به دنبال کاهش فعالیت بافتی آن	محافظت از روده در مقابل اثرات سمی Ischemia	(Çakmaz و همکاران، ۲۰۱۳)

حفاظتی دارند (Masini و همکاران، ۲۰۰۴؛ Masini و همکاران، ۲۰۰۳). در مطالعه Alirezaei و همکاران (۲۰۱۴) مشخص شد که آنزیم هیستامیناز گیاهی خالص شده از جوانه‌های خلر (*Lathyrus sativum*) می‌تواند یک آنزیم مناسب با ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی در مقابل آزاد شدن هیستامین و استرس اکسیداتیو در انفارکتوس میوکارد القاشده به‌وسیله ایزوپرنالین عمل کند. اخیراً از آمین اکسیداز مس‌دار برای درمان ایسکمی میوکارد استفاده شده است. یک شرکت دارویی در آمریکا داروهایی حاوی هیستامیناز گیاهی را به بازار عرضه کرده است که در درمان شوک آنافیلاکسی در قلب، درمان آسم و شوک آلرژیک و التهابات ملتحمه و التهابات پوستی کارایی بالایی دارد (Federico و همکاران، ۲۰۰۶).

در مطالعه Rosini و همکاران (۲۰۱۲)، آنزیم DAO موشی به‌طور موفق در سلول‌های اشریشیاکلی بیان و خالص‌سازی شد ولی متأسفانه، این DAO نوترکیب به‌طور ضعیفی فعال بوده (فعالیت اختصاصی آن تقریباً ۱mU/mg پروتئین بر روی هیستامین می‌باشد) و دلیل آن این بود که به‌میزان زیادی به فرم نابالغ کوئینون (*immature quinone form*) تولید شده بود.

در مطالعه Sun و همکاران (۲۰۱۲)، یک *Copper amine oxidase* جدید از گیاه *Huperzia serrata* مورد کلونینگ قرار گرفت.

هم‌چنین میزان فعالیت پلاسمایی آنزیم DAO ارتباط مستقیمی با بلوغ (Maturity) و سالم بودن (Integrity) موکوس روده دارد. برای مثال، سگ‌های مبتلا به انسداد شریان مزانتریک (Superior mesenteric artery occlusion) که با داروی Aminoguanidine (مهارکننده قوی آنزیم DAO) پیش‌درمان شده بودند کاهش معنی‌داری در سطح سرمی فعالیت آنزیم DAO و افزایش معنی‌دار هیستامین در سرم را داشتند (Wolvekamp, ۱۹۹۴؛ Kusche و همکاران، ۱۹۷۷). بنابراین آنزیم DAO یک نقش ارزشمند به‌عنوان نشانگر بیماری روده دارد. بنابراین بررسی DAO به‌عنوان یک ابزار تشخیصی در ارزیابی بالینی برخی از بیماری‌ها می‌تواند استفاده شود (Wolvekamp, ۱۹۹۴).

علاوه بر نقش تشخیصی، به نقش درمانی این آنزیم در موارد زیر اشاره شده است، پژوهش‌ها نشان داده است هیستامیناز به شوک آنافیلاکسی در خوکچه‌های هندی پاسخ می‌دهد و نقش دفاعی دارد (Masini و همکاران، ۲۰۰۲)، هم‌چنین دریافت هیستامیناز آزاد حاصل از گیاه نخود به‌طور آتروسول توسط خوکچه‌های هندی که با تنفس آنتی‌ژن دچار واکنش‌های شبه آسم شدند، می‌تواند به‌میزان زیادی از علائم حساسیت را کاهش دهد و به‌عنوان یک راه درمانی برای آسم‌های آلرژیک در انسان پیشنهاد شده است. از طرف دیگر این آنزیم در مقابل آسیب‌های ناشی از ایسکمی در قلب موش صحرایی هم نقش





- potential marker for acute mesenteric ischemia. *Libyan Journal of Medicine*. Vol. 8, No. 1, pp: 20596.
۷. **Chand, G. and Singh, P., 2016.** Possible retrieval of organochlorine induced renal toxicity in fish by aqueous root extract of withania somnifera. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. Vol. 7, pp: 6.
  ۸. **Federico, R.; Cona, A.; Caliceti, P. and Veronese, F.M., 2006.** Histaminase PEGylation: preparation and characterization of a new bioconjugate for therapeutic application. *Journal of controlled release*. Vol. 115, No. 2, pp: 168-174.
  ۹. **Koyanagi, T.; Matsumura, K.; Kurda, S.i. and Tanizawa, K., 2000.** Molecular cloning and heterologous expression of pea seedling copper amine oxidase. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. Vol. 64, No. 4, pp: 717-722.
  ۱۰. **Kumar, V.; Dooley, D.M.; Freeman, H.C.; Guss, J.M.; Harvey, I.; McGuirl, M.A.; Wilce, M.C. and Zubak, V.M., 1996.** Crystal structure of a eukaryotic (pea seedling) copper-containing amine oxidase at 2.2 Å resolution. *Structure*. Vol. 4, No. 8, pp: 943-55.
  ۱۱. **Kung, H.F.; Tsai, Y.H.; Chang, S.C. and Hong, T.Y., 2012.** Biogenic amine content, histamine-forming bacteria, and adulteration of pork in tuna sausage products. *Journal of food protection*. Vol. 75, No. 10, pp: 1814-1822.
  ۱۲. **Kusche, J.; Stahlknecht, C.-D.; Lorenz, W.; Reichert, G. and Richter, H., 1977.** Diamine oxidase activity and histamine release in dogs following acute mesenteric artery occlusion. *Agents and actions*. Vol. 7, No. 1, pp: 81-84.
  ۱۳. **Maintz, L.; Schwarzer, V.; Bieber, T.; van der Ven, K. and Novak, N., 2008.** Effects of histamine and diamine oxidase activities on pregnancy: a critical review. *Human reproduction update*. Vol. 14, No. 5, pp: 485-495.
  ۱۴. **Manzotti, G.; Breda, D.; Di Gioacchino, M. and Burastero, S., 2016.** Serum diamine oxidase activity in patients with histamine intolerance. *International journal of immunopathology and pharmacology*. Vol. 29, No. 1, pp: 105-111.
  ۱۵. **Masini, E.; Vannacci, A.; Marzocca, C.; Mannaioni, P.F.; Befani, O.; Federico, R.; Toma, A. and Mondovì, B., 2002.** A plant histaminase modulates cardiac anaphylactic response in guinea pig. *Biochemical and biophysical research communications*. Vol. 296, No. 4, pp: 840-846.
  ۱۶. **Masini, E.; Pierpaoli, S.; Marzocca, C.; Mannaioni, P.F.; Pietrangeli, P.; Mateescu, M.A.; Zelli, M.; Federico, R. and Mondovì, B., 2003.** Protective effects of a plant histaminase in myocardial ischaemia and reperfusion injury in vivo. *Biochemical and biophysical research communications*. Vol. 309, No. 2, pp: 432-439.
  ۱۷. **Masini, E.; Vannacci, A.; Giannini, L.; Befani, O.; Nistri, S.; Mateescu, M.A.; Mannaioni, P.F.; Mondovì, B. and Federico, R., 2004.** Effect of a plant histaminase on asthmalike reaction induced by inhaled antigen in sensitized guinea pig. *European journal of pharmacology*. Vol. 502, No. 3, pp: 253-264.
  ۱۸. **Masini, E.; Bani, D.; Marzocca, C.; Mateescu, M.A.; Mannaioni, P.F.; Federico, R. and Mondovì, B., 2007.** Pea seedling histaminase as a novel therapeutic approach to anaphylactic and inflammatory disorders. *The Scientific World Journal*. Vol. 7, pp: 888-902.
  ۱۹. **Petersen, J.; Raithe, M. and Schwelberger, H., 2002.** Histamine N-methyltransferase and diamine oxidase gene polymorphisms in patients with inflammatory and neoplastic intestinal diseases. *Inflammation Research*. Vol. 51, pp: S91-S92.
- وزن مولکولی این آنزیم ۷۶/۸ و دارای ۶۸۱ اسیدآمین است. گفته می‌شود این آنزیم با آمین اکسیدازهای شناخته شده گیاهی توالی اسیدآمین‌های آن ۴۴ تا ۵۶٪ شباهت دارد (با آنزیم *L. sativus* ۴۵/۴٪). توالی ناحیه active site این آنزیم Asn-Tyr-Asp/Glu که تیروزین این ناحیه تبدیل به TPQ می‌شود. تمام طول cDNA این آنزیم در وکتور pET22b(+) کلون شده و پروتئین نوترکیب همراه با یک hexahistidine tag در انتهای C-terminal خود، در باکتری *E. coli* BLR, BL21 (DE3) pLysS بیان شد و سپس پروتئین با ستون‌های کروماتوگرافی نیکل خالص‌سازی شد. بهترین سوبسترا برای این آنزیم tyramine است البته سوبسترهای دیگری را هم غیر از tyramine می‌تواند پذیرا باشد این درحالی است که در *L. sativum* و *L. sativus* سوبسترای مطلوب پوترسین است و tyramine را هم می‌تواند قبول کنند.
- در این مطالعه با روش‌های مهندسی ژنتیک سازه ژنی یک آنزیم مفید و پرکاربرد در صنعت دارو که در درمان بیماری‌های مختلف (مانند رینیت‌های آلرژیک، التهاب ملتحمه، آسم‌های آلرژیک، کهیر و درماتیت) نقش دارد و هم‌چنین می‌تواند در صنعت مواد غذایی در تولید زیست‌حسگر در تشخیص فساد مواد غذایی استفاده شود، با موفقیت طراحی و ساخته شد. در مطالعات آینده می‌توان این سازه ژنی را در سویه بیانی باکتری *E. coli* (مثل BL21) انتقال داده و یا آن را به سایر وکتورهای بیانی یوکاریوتی برای بیان و تولید انبوه آنزیم نیز ارزیابی کرد.

## منابع

۱. **Alirezaei, M.; Delfan, B.; Dezfoulian, O.; Kheradmand, A.; Divekan, H.; Rashidipour, M. and Khonsari, A., 2014.** The plant histaminase: a promising enzyme with antioxidant properties versus histamine release in isoprenaline-induced myocardial infarction in rats. *Journal of physiology and biochemistry*. Vol. 70, No. 3, pp: 837-847.
۲. **Alonso-Lomillo, M.A.; Domínguez-Renedo, O.; Matos, P. and Arcos-Martínez, M.J., 2010.** Disposable biosensors for determination of biogenic amines. *Analytica chimica acta*. Vol. 665, No. 1, pp: 26-31.
۳. **Bachrach, U., 2018.** Copper amine oxidases and amines as regulators of cellular processes. in *Structure and Functions of Amine Oxidases*; CRC Press. pp: 19-34.
۴. **Biji, K.; Ravishankar, C.; Venkateswarlu, R.; Mohan, C. and Gopal, T.S., 2016.** Biogenic amines in seafood: a review. *Journal of food science and technology*. Vol. 53, No. 5, pp: 2210-2218.
۵. **Brazeau, B.J.; Johnson, B.J. and Wilmot, C.M., 2004.** Copper-containing amine oxidases. *Biogenesis and catalysis; a structural perspective*. *Archives of biochemistry and biophysics*. Vol. 428, No. 1, pp: 22-31.
۶. **Çakmaz, R.; Büyükaşık, O.; Kahramansoy, N.; Erkol, H.; Çöl, C.; Boran, Ç. and Buğdaycı, G., 2013.** A combination of plasma DAO and citrulline levels as a



۲۰. **Pini, A.; Veglia, E. and Rosa, A.C., 2017.** Histamine and the Kidney: In Vivo Animal Models; in Histamine Receptors as Drug Targets. Springer. pp: 309-352.
۲۱. **Rosini, E.; Nossa, S.; Valentino, M.; D'Arrigo, P.; Marinesco, S. and Pollegioni, L., 2012.** Expression of rat diamine oxidase in escherichia coli. Journal of Molecular Catalysis. Vol. 82, pp: 115-120.
۲۲. **Rosini, E.; Tonin, F.; Vasylieva, N.; Marinesco, S. and Pollegioni, L., 2014.** Evolution of histamine oxidase activity for biotechnological applications. Applied microbiology and biotechnology. Vol. 98, No. 2, pp: 739-748.
۲۳. **Schwelberger, H.G.; Feurle, J. and Ahrens, F., 2013.** Characterization of diamine oxidase from human seminal plasma. Journal of Neural Transmission. Vol. 120, No. 6, pp: 983-986.
۲۴. **Sun, J.; Morita, H.; Chen, G.; Noguchi, H. and Abe, I., 2012.** Molecular cloning and characterization of copper amine oxidase from *Hyperzia serrata*. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters. Vol. 22, pp: 5784-5790.
۲۵. **Tanizawa, K.; Matsunami, H. and Yamaguchi, H., 2000.** Mechanism of Topa Quinone Biogenesis in Copper Amine Oxidase Studied by Site-Directed Mutagenesis and X-Ray Crystallography. in Biochemistry and Molecular Biology of Vitamin B6 and PQQ-dependent Proteins. Springer. pp: 67-70.
۲۶. **Wimmerova, M. and Macholan, L., 1999.** Sensitive amperometric biosensor for the determination of biogenic and synthetic amines using pea seedlings amine oxidase: a novel approach for enzyme immobilisation. Biosensors and Bioelectronics. Vol. 14, pp: 695-702.
۲۷. **Wolvekamp, M.C. and de Bruin, R.W., 1994.** Diamine oxidase: an overview of historical, biochemical and functional aspects. Digestive Disease Journal. Vol. 12, No. 1, pp: 2-14.

