



استفاده از فناوری رزونانس پلاسمون سطحی برای ارزیابی اولیه فعالیت آنتی-توکسین آگزوپلی ساکارید

دکستران علیه انتروتوکسین حساس به حرارت اشرشیا کلی

مجتبی آذری آنبار^۱، فریده طباطبایی یزدی^۲، پاسکال دقعاو^۳، نادیا اولال^۴، کامبیز جهان‌بین^۵

۱- دانشجوی دکتری زیست فناوری مواد غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۲- دانشجوی دکتری زیست فناوری مواد غذایی، واحد تحقیقاتی ISARA .BioDyMIA، دانشگاه کلود برنارد لیون ۱، لیون، فرانسه

۳- استاد گروه علوم و صنایع غذایی، زیست فناوری مواد غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۴- استاد گروه علوم و صنایع غذایی، تکنولوژی مواد غذایی، واحد تحقیقاتی ISARA .BioDyMIA، دانشگاه کلود برنارد لیون ۱، لیون، فرانسه

۵- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، زیست فناوری مواد غذایی، واحد تحقیقاتی ISARA .BioDyMIA، دانشگاه کلود برنارد لیون ۱، لیون، فرانسه

۶- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، تکنولوژی مواد غذایی، دانشکده مهندسی کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود، شاهرود، ایران

اطلاعات مقاله	چکیده
تاریخ های مقاله :	
تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۵/۱۸	
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۶/۲۱	
کلمات کلیدی:	
دکستران، توکسین حساس به حرارت، رزونانس پلاسمون سطحی، آگزوپلی ساکارید، برهمکنش.	<p>باکتری اشرشیا کلی انتروتوکسیژنیک با اتصال به مخاط روده و تولید انتروتوکسین‌های حساس به حرارت، متداول‌ترین عامل بیماری باکتریایی ایجاد کننده اسهال است. مطالعه حاضر با هدف روشن کردن برهمکنش دو نوع آگزوپلی ساکارید دکستران با وزن‌های مولکولی مختلف ((۹-۱۱ kDa) و ((۶۰-۷۶ kDa)) تولید شده از باکتری پروبیوتیک <i>Leuconostocmesenteroides</i> با توکسین حساس به حرارت (زیر واحد B-پنتامر) (LTB) با استفاده از رزونانس پلاسمون سطحی انجام شد. بر اساس نتایج به دست آمده از سینتیک برهمکنش حاصله در دمای ۲۹۸K، هر دو نوع دکستران با وزن مولکولی پایین و بالا، به ترتیب دارای میل ترکیبی بالایی (M-1) (۱/۰۷×۱۰۶KA و ۱/۹۵×۱۰۶M-1) نسبت به توکسین LTB در شرایط برون تنی داشتند. از نقطه نظر ترمودینامیکی مقادیر به دست آمده از معادله وانت هوف، انرژی آزاد گیبس منفی (<math>\Delta G^{\circ}</math>)، آنتالپی و آنتروپی نیز هر دو مثبت (<math>\Delta H^{\circ}</math> و <math>\Delta S^{\circ}</math>) ارزیابی شدند که به ترتیب نشان دهنده‌ی فرآیند اتصال از نوع خود به خودی، گرماگیر و مبتنی بر بی‌نظمی بود. با توجه به این یافته‌ها، فعل و انفعالات آگزوپلی ساکارید به همراه پیوندهای هیدروژنی به نظر می‌رسد که نقش مهمی در برهمکنش هر دو نوع دکستران با توکسین LTB می‌توانند ایفا کنند. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که آگزوپلی ساکارید دکستران می‌تواند با توکسین LTB تعامل داشته و تا حدودی خاصیت ضد توکسینی از خود نشان بدهند. به طور کلی، این نتایج می‌تواند بینش بیشتری برای شروع تحقیقات گسترده روی آگزوپلی ساکاریدهای با منشأ باکتری‌های اسید لاکتیک در برهمکنش با توکسین‌های باکتری‌های پاتوژن مواد غذایی ارائه دهد.</p>
DOI: 10.22034/FSCT.20.136.1 DOR:20.1001.1.20088787.1402.20.136.1.9	
* مسئول مکاتبات: tabatabai@um.ac.ir	

۱- مقدمه

متشکل از یک زیر واحد A و ۵ زیر واحد B (LTB) هستند [۱].

امروزه همراه با پیشرفت علم بیوتکنولوژی در زمینه‌های مختلف توجه به استفاده از میکروارگانیسم‌هایی که به طور طبیعی قادر به فعالیت و تولید متابولیت‌های مفید هستند، در صنعت غذا و داروسازی بیشتر متمرکز گردیده است. از این رو توجه دانشمندان به تولید و شناسایی متابولیت‌های جدید میکروارگانیسم‌ها به عنوان ترکیبات دارویی فعال و درک سازوکار عمل آن‌ها معطوف شده است [۲].

باکتری‌های اسید لاکتیک مانند بسیاری از باکتری‌های دیگر قادر به تولید چندین نوع پلی‌ساکارید خارج سلولی یا گلیکان‌هایی تحت عنوان بیوپلی‌مرهای کربوهیدراتی با تنوع ساختاری بسیار متنوع هستند. در این خصوص یکی از مهمترین متابولیت‌های تولید شده توسط باکتری‌های اسید لاکتیک پروبیوتیک، آگزوپلی‌ساکاریدها می‌باشد که دارای کاربردهای بالقوه‌ی فراوانی در مکمل‌های غذایی و داروسازی هستند [۳، ۴]. آگزوپلی‌ساکاریدها پس از تولید توسط باکتری‌های اسید لاکتیک، قابلیت اتصال به سطح سلول خود را دارند و یا اینکه می‌توانند به محیط اطراف خود رها شده و با عوامل دیگری وارد واکنش شوند [۲].

اعتقاد محققین در سال‌های اخیر بر این است که آگزوپلی‌ساکاریدهای تولید شده توسط باکتری‌های اسید لاکتیک می‌توانند منجر به کاهش اثرات سیتوتوکسیکی^۷ فلزات سنگینو حتی توکسین‌های باکتری‌های پاتوژن در بیماری‌های گاستروآنتریت^۹ شوند. به عبارت دیگر آگزوپلی‌ساکاریدهای تولید شده توسط پروبیوتیک‌ها شاید به عنوان یک مانع فیزیکی عمل کرده که بتواند هم از طریق مسدود کردن گیرنده‌های توکسین موجود در سطح سلول‌های آنروسیت^{۱۰} روده‌ای میزبان شده و یا هم به عنوان یک جاذب زیستی، توکسین‌های باکتری را احاطه کرده که نهایتاً مانع از اتصال

توکسین‌های باکتریایی، اولین فاکتورهای ویروانس^۱ باکتری‌ها هستند که تا به امروز شناخته شده‌اند. توکسین‌های باکتریایی را به طور کلی می‌توان به دو گروه اندوتوکسین‌ها و آگزوتوکسین‌ها تقسیم نمود. یکی از شناخته شده‌ترین باکتری‌های تولید کننده آگزوتوکسین، گروه‌های پاتوژنیک /شرشیا کلی تحت عنوان شرشیا ای انتروتوکسیژنیک^۲ (ETEC) مطرح می‌باشد. اخیراً توجه به نقش /شرشیا کلی به عنوان عامل بیماری اسهال به واسطه ظهور سویه 0157:H7 و سویه‌های انتروهموراژیک^۳، به علت شدت بیماری مربوطه، افزایش یافته است. دو ویژگی ویروانس مشخص /شرشیا کلی انتروتوکسیژنیک ETEC شامل کلونیزاسیون در سطح روده و همچنین تولید انتروتوکسین می‌باشد. انتروتوکسین‌های تولید شده به وسیله‌ی این باکتری‌ها شامل دو گروه توکسین‌های حساس به حرارت^۴ (LT) مشابه کلرا توکسین^۵ (CT) و توکسین‌های مقاوم به حرارت^۶ (ST) می‌باشد که در ساختار، آنتی ژنیسیته و مکانیسم عمل تفاوت دارند [۱].

توکسین حساس به حرارت LT جزء آگزوتوکسین‌های پروتئینی محسوب می‌شود. این پروتئین به صورت متصل به لیپوپلی‌ساکاریدهای سطحی /شرشیا کلی باقی می‌ماند و قابلیت اتصال به قندهای گروه خونی A، مولکول TLR و پذیرنده‌های گانگلیوزیدی سطح انتروسیت‌ها را دارد. مکانیسم عمل آن مشابه کلرا توکسین بوده و چرخه‌ی آدنیلات سیکلاز را فعال کرده غلظت cAMP را در سلول افزایش می‌دهد و موجب ترشح مقادیر زیادی آب و یون‌ها از جمله کلر به روده شده و نهایتاً منجر به اسهال می‌شود. LT ساختمانی با فرمول A-B₅ دارد که

1. Virulence
2. Enterotoxigenic *Escherichia coli*
3. Enterohemorrhagic
4. Heat-labile enterotoxin
5. Cholera toxin
6. Heat-stable enterotoxin

7. heat-labile enterotoxin B-pentamer
8. cytotoxic
9. Gastroenteritis
10. Enterocytes

توکسین به سطح سلول‌های یوکاریوتی می‌شود [۲، ۵، ۶، ۷، ۸، ۹].

از آنجائیکه هیچ گونه تحقیقاتی مبنی بر برهمکنش بین آگزوپلی ساکارید باکتری‌های اسید لاکتیک و توکسین LT تا به حال صورت نپذیرفته است و صرفاً فرضیاتی در این خصوص پیشنهاد شده است. لذا بررسی‌های دقیق روی برهمکنش آگزوپلی ساکاریدهای دکستران با توکسین مورد بحث در شرایط *in vitro* می‌تواند بیش دقتی از درک فعل و انفعالات این زیست مولکول‌ها فراهم سازد. از این رو مطالعات برون تنی (*in vitro*) امکان بررسی‌های اختصاصی برهمکنش بین مولکولی را به آسانی فراهم می‌سازد و اطلاعات ارزشمندی از جزئیات پیوند آنها در اختیار محققین قرار می‌دهد. همچنین، اگرچه گزارشات حاکی از آن است که پارامترهای محلول مانند pH عوامل مهمی برای کنترل حالت‌های مختلف برهمکنش بین پروتئین و پلی ساکارید هستند، اما نوع پروتئین‌ها/پلی ساکاریدها، وزن مولکولی، چگالی بار و آب‌گریزی پلیمرهای زیستی نیز نقش مهمی در میزان کمپلکس شدن بین دو پلیمر در شرایط ثابت دارند [۱۰]. در نتیجه هدف اصلی این پژوهش بررسی اثر دکستران‌های با وزن مولکولی مختلف بر روی برهم‌کنش مولکولی توکسین حساس به حرارت زیر واحد **B** (پنتامر) (LTB) به عنوان بخش مهم در اتصال به سلول‌های اپیتلیال‌روده با استفاده از مطالعات کنتیکتی و ترمودینامیکی و به روش رزونانس پلاسمون سطحی می‌باشد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

مواد شیمیایی مورد استفاده در این مطالعه شامل: توکسین LTB (سیگما-آمریکا)، دکستران با وزن مولکولی پایین (۹-۱۱ kDa) (سیگما، کانادا) و وزن مولکولی بالا (۶۰-۷۶ kDa) (سیگما، آمریکا)، محلول آمونیاک ۲۵ درصد (سیگما-آلمان)، اسید

مرکاپتوتاندکانوئیک-۱۱ (سیگما، هند)، N-اتیل-N-(۳-دی اتیل آمینوپروپیل) کربودییمید^۲ (EDC) (سیگما، مجارستان)، N هیدروکسی سوکسینیمید^۳ (NHS) (سیگما، کانادا) بودند.

۲-۲- روش‌ها

۲-۲-۱- رزونانس پلاسمون سطحی^۴

آزمون اتصال دو بیومولکول با استفاده از دستگاه رزونانس پلاسمون سطحی دو کاناله (MP-SPR Navi 210A, Tampere-region.BioNavis Ltd، فنلاند) بر اساس مطالعات قبلی فتیحی و همکاران (۲۰۱۹) انجام گرفت. آزمون مورد نظر در حالت زاویه ثابت و با استفاده از یک لیزر ۶۷۰ nm برای تحریک پلاسمون سطحی انجام گرفت. استخراج و تحلیل داده های مربوط به محاسبات میلتریکی و ثابت جنبشیه ترتیب توسط نرم‌افزارهای SPR NaviTM Data viewer و TraceTM DrawerTM برای SPR NaviTM انجام گرفت [۱۱].

۲-۲-۲- آماده سازی نمونه‌ها

۰/۲۵ mg.mL⁻¹ توکسین LTB با حل کردن در سدیم فسفات بافر (۵/۵ = ۰/۰۱ M.pH) تهیه شد و با استفاده از همزن چرخان آزمایشگاهی به مدت یک شب تا حل شدن کامل آن در یخچال با دمای ۵°C قرار گرفت. همچنین برای تهیه محلول مادر آگزوپلی ساکاریدهای دکستران (۲mg.mL⁻¹)، در همان بافر ولی با pH = ۷ (۰/۰۱M) حل شد و سپس سانتریفوژ شد و به منظور حذف هر گونه ترکیبات غیر قابل حل، از فیلتر سرنگی ۰/۴۵ μm استفاده شد. از سدیم فسفات بافر (۷ = ۰/۰۱ M.pH) نیز برای رقت‌سازی نمونه‌های دکستران (۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۲ mg.mL⁻¹) استفاده گردید. در نهایت محلول نمونه‌ی توکسین LTB (به عنوان گیرنده) تثبیت روی تراشه‌های طلا و همچنین

1.11-mercaptoundecanoic acid
2.N-ethyl- N-(3-diethylaminopropyl) carbodiimide
3.N- hydroxysuccinimide
4.Surface plasmon resonance

سدیم فسفات بافر (۵/۵ M, pH = ۰/۰۱) به مدت ۸min با سرعت جریان $30 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ مکان‌های اتصال غیراختصاصی روی سطح تراشه توسط اتانول آمین (۱M) به مدت ۵min مسدود شدند [۱۱].

۲-۲-۴- تجزیه و تحلیل جنبشی برهم‌کنش توکسین LTB تثبیت‌شده با دکستران

غلظت‌های مختلف دکستران‌های با وزن مولکولی پایین (۹-۱۱ kDa) و بالا (۶۰-۷۶ kDa) در سدیم فسفات بافر با سرعت جریان $30 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ به مدت ۳min تزریق شد. از آنجایی که توکسین LTB در دو سلول جریان‌ثبیت شده بود، یکی از آن‌ها (کانال ۱) برای تزریق نمونه و دیگری (کانال ۲) به عنوان مرجع استفاده شد. تمام مراحل ذکر شده در بالا، در بافر یکسان و با pH=۷ انجام شد. با این حال، مدل دو مولکولی برای تخمین ثابت‌های سرعت اتصال (k_d) و تفکیک (k_d) استفاده شد. سپس مقادیر ثابت اتصال تعادل (K_A) با تقسیم k_d بر k_a محاسبه شد [۱۲].

۲-۲-۵- تجزیه و تحلیل ترمودینامیکی برهم‌کنش توکسین

LTB تثبیت‌شده با دکستران

اثر دما بر اتصال دکستران‌ها به LTB برای به دست آوردن پارامترهای ترمودینامیکی تشکیل کمپلکس دکستران-LTB مورد بررسی قرار گرفت. اندازه‌گیری SPR در سه دمای مختلف (۲۹۸، ۳۰۳ و ۳۱۰ K) انجام شد. بدین منظور، پارامترهای ترمودینامیکی برهم‌کنش با اندازه‌گیری K_A در دماهای مختلف تعیین شد. در نهایت، تغییرات در آنتالپی استاندارد (ΔH)، آنتروپی (ΔS)، و انرژی آزاد گیبس (ΔG) از تجزیه و تحلیل معادله وانت هوف^۴ داده‌ها با جایگزینی K_A در $1/K_D$ در معادله وانت هوف تخمین زده شد (معادله (۱)).

$$\ln K_A = -(\Delta H/R) \times (1/T) + \frac{\Delta S}{R}$$

4. van't Hoff

غلظت‌های مختلف دکستران با وزن مولکولی مختلف (۹ - ۱۱ و ۶۰ - ۷۶ kDa) به عنوان لیگاند آماده تزریق شدند.

۲-۲-۳- آماده‌سازی تراشه‌ی طلا برای تثبیت توکسین LTB

۲-۲-۳-۱- تشکیل تک‌لایه‌های خودآرایی (SAM) اسید مرکاپوتاندکانوئیک-۱۱

به منظور تشکیل SAM اسید مرکاپوتاندکانوئیک-۱۱، ابتدا تراشه‌های SPR با روکش طلا (Bionavis، فنلاند) در محلول داغ ۳۰٪ آمونیاک، ۳۰٪ پراکسید هیدروژن و آب مقطر دوبار تقطیر (۵:۱:۱ v/v/v) در دمای ۹۰ °C به مدت ۲۰min غوطه‌ور شدند. بدین منظور عمل شستشو چندین بار با آب دو بار تقطیر و اتانول خالص انجام شدند تا عاری از هرگونه مواد ناخالصی روی تراشه باشند. سپس تراشه مورد نظر تحت جریان گاز نیتروژن خشک گردید. اسید مرکاپوتاندکانوئیک-۱۱ (۵ mM) در محلول اتانول و آب مقطر دوبار تقطیر با نسبت حجمی ۳:۷ (v/v) به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ °C تیمار شدند. نهایتاً، تراشه تیمار شده سه بار با آب و سه بار با سدیم فسفات بافر شسته شد و دوباره تحت جریان گاز نیتروژن خشک شد [۱۱].

۲-۲-۳-۲- تثبیت توکسین LTB با استفاده از آمین‌های کوپلینگ^۳

در این بخش ابتدا تراشه‌ی تیمار شده با MUA درون دستگاه SPR قرار گرفت و سپس سدیم فسفات بافر (pH = ۷) درون دستگاه تزریق شد تا بتواند خط پایه ثابتی را در سنسوگرام ایجاد کند. به طور خلاصه، به منظور فعال کردن آن، سطح تراشه‌ی طلای تیمار شده با MUA همراه با انتهای کربوکسیل در معرض مخلوطی از $N\text{-}0/2$ اتیل-N-(۳-دی اتیل آمینوپروپیل) کربومید (EDC) و $N\text{-}0/5$ هیدروکسی سوکسینیمید (NHS) (۱:۱ v/v) به مدت ۵ min قرار گرفت. در نهایت، پس از قرار گرفتن در معرض محلول توکسین LTB در

1.Ligand
2.Self-assembled monolayer
3.Amine coupling

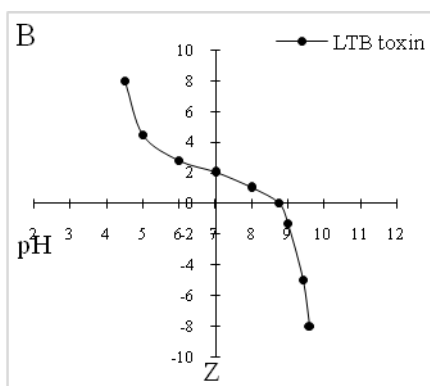
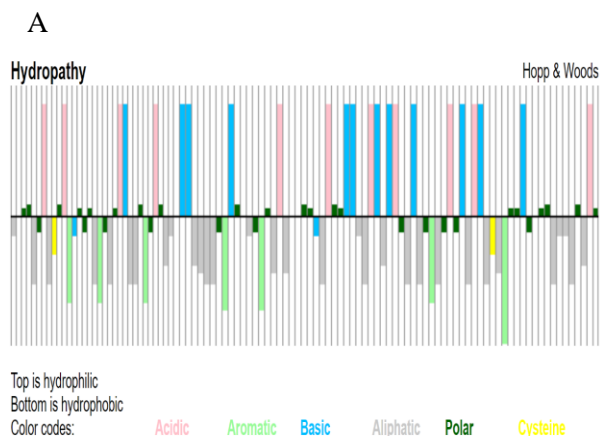
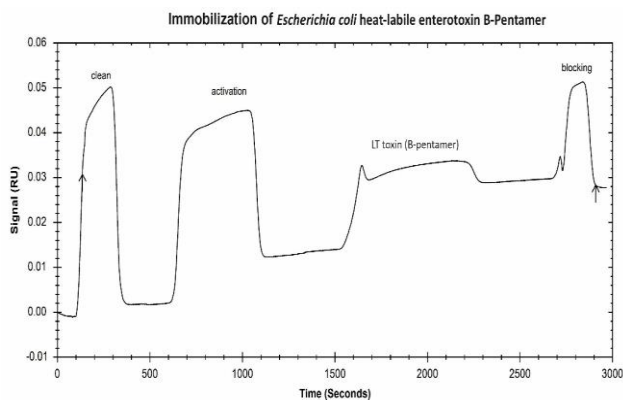


Fig 1: Estimations of LTB toxin physicochemical properties (A) hydropathy (B) net charge vs pH.



که R نشان دهنده ثابت جهانی گاز است، T دمای مطلق و ΔH و ΔS به ترتیب تغییرات در آنتالپی و آنتروپی استاندارد را نشان می‌دهند. ΔG با استفاده از معادله انرژی آزاد گیبس پس از به دست آوردن مقادیر ΔH و ΔS محاسبه شد (معادله (۲)) [۱۲].

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

۳- نتایج و بحث

۳-۱- تجزیه و تحلیل SPR

در آزمایش SPR، در حالیکه لیگاند مورد نظر در فاز جریان در حال حرکت است، پروتئین به سطح تراشه‌ای با سطحی از جنس طلا متصل شده است. به دنبال آن اتصال و یا تفکیک پروتئین-لیگاند منجر به تغییر در ضریب شکست در لایه سطحی و تغییر در زاویه SPR می‌شود. جابجایی‌ها نظارت می‌شوند و به واحدهای رزونانس دلخواه (RU) تبدیل می‌شوند و به صورت سنسورگرام نشان داده می‌شوند. به طور کلی SPR را می‌توان به عنوان ابزار خودکار مفیدی برای تعیین کمیت برهمکنش دکستران و توکسین LTB در این تحقیق در نظر گرفت که می‌تواند داده‌های سینتیکی و ترمودینامیکی را در زمان واقعی ارائه دهد [۱۱و۱۲].

۳-۲- تثبیت توکسین LTB

برای اطمینان از برهمکنش بالای الکترواستاتیکی بین پروتئین با بار مثبت و MUA با گروه کربوکسیلا بار منفی، pH محلول بافر مورد استفاده برای تثبیت LTB، کمتر از pI پروتئین در نظر گرفته شود (pH = ۵/۵).

1. Arbitrary resonance units

Fig 2 LTB toxin immobilization processes by an SPR sensorgram on a CMD chip

آز و سرعت جریان بالا ($10 \mu\text{L}/\text{min}$) برای جلوگیری از اثر انتقال جرم و محدود کردن مقدار LTB مورد استفاده در مراحل تثبیت، انجام شد. روش مبتنی بر SPR، که در آن توکسین LTB بر روی یک تراشه حسگر MUA تثبیت شد، برای تعیین k_a و k_d برای اتصال دکستران‌ها به توکسین LTB استفاده گردید. شکل ۳ سنسورگرام‌های SPR با توکسین LTB تثبیت شده روی تراشه تیمار شده با MUA در حضور غلظت‌های مختلف دکستران‌های با وزن مولکولی پایین و بالا ($2 - 25 \text{ mg/mL}$) را در سه دمای مختلف (۲۹۸، ۳۰۳ و ۳۱۰ K) نشان می‌دهد. مقادیر RU مربوطه با افزایش غلظت هر دو دکستران افزایش یافت، که نشان دهنده اتصال دکستران به توکسین LTB تثبیت شده می‌باشد. k_a ، AB تشکیل شده در هر ثانیه را نشان می‌دهد، در حالی که k_d کسری از کمپلکس‌های جدا شده در ثانیه است (معادله (۳)).

$$A+B + AB$$

مقادیر k_a و k_d برای واکنش تشکیل کمپلکس توکسین LTB با هر دو نوع دکستران در سه دمای مختلف به دست آمد (جدول ۱). k_a در دمای بالاتر افزایش یافت در حالی که k_d تقریباً بدون تغییر باقی ماند. مقدار K_A در دمای ۲۹۸ K برای هر دو نوع دکستران با وزن مولکولی پایین و بالا به ترتیب $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ و $1/30 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ محاسبه شد که نشان دهنده تمایل هر دو دکستران به توکسین LTB است. این نتایج نشان داد که تشکیل کمپلکس این دو مولکول زیست‌دارای فرآیندی تقریباً اتصال سریعی نرخ تفکیک کم است. بر اساس تجزیه و تحلیل‌سیستیکی سنسورگرام‌ها، افزایش‌نسبی در K_A هنگام افزایش دما را نیز می‌توان به بهبود ثابت نرخ اتصال نسبت داد. به نظر می‌رسد که افزایش اتصال هر دو دکستران به توکسین LTB در دماهای بالاتر به بهبود برخورد مولکول‌ها و دکستران به مولکول‌ها منتهی شده است. توکسین LTB روی سطح تراشه و انتشار بهتر مولکول‌های دکستران مربوط می‌شود. از طرف دیگر مطابق با نتایج بدست آمده، وزن مولکولی دکستران‌ها تأثیری در ثابت اتصال تعادل نداشت و یا به عبارت دیگر وزن مولکولی تأثیر قابل توجهی در برهمکنش‌های آن‌ها با توکسین LTB نداشت.

در این خصوص، توسط ماشین حساب پپتیدی Innovagen (<https://pepcalc.com>) [۱۳]، محاسبات و تخمین‌هایی را در مورد خواص فیزیکی‌شیمیایی، بار خالص و pI توکسین LTB انجام گرفت (شکل ۱، A و B). طبق نتایج بدست آمده از مدل مورد نظر، توکسین LTB حلالیت خوبی نسبت به آب داشته و در $pH=7$ دارای بار خالص برابر ۱/۱ می‌باشد. همچنین نقطه ایزوالکتریک آن برابر با $pH=8/08$ تخمین زده شد. با این تفاسیر pH مطلوب بافر مورد نظر برای تقویت تثبیت توکسین LTB روی سطح حسگر طلا، ۵/۵ در نظر گرفته شد [۱۴]. شکل ۲ شماتیک تثبیت کردن توکسین LTB را روی سطح حسگر طلایی نشان می‌دهد. پس از تمیز کردن سطح تراشه طلا، سطح SAM با انتهای کربوکسیلیک مولکول‌های MUA روی تراشه تشکیل شد. MUA به عنوان یکی از آلکانتیولات‌های جایگزین ω^2 در نظر گرفته می‌شود که از زنجیره‌های هیدروکربنی آبگریز و گروه‌های سر آبدوست تشکیل شده است. سپس، گروه‌های کربوکسیلیک مولکول‌های MUA توسط EDC/NHS به منظور جفت شدن گروه‌های آمینو توکسین LTB فعال شدند. در نهایت، اتانول آمین برای مسدود کردن مکان‌های واکنش نداده سطح تراشه اعمال شد. مراحل ثبت شده سنسورگرام SPR (شکل ۲) و همچنین تغییر در رزونانس زاویه‌ای پس از فرآیند تثبیت، تثبیت موفقیت آمیز توکسین LTB را در سطح تراشه‌ی طلا تیمار شده با MUA همراه با انتهای کربوکسی تایید کرد. منحنی اولیه فرآیند فوق‌الذکر افزایش زاویه SPR را حدود $0/32$ درجه را نشان داد. ($69/26$ قبل از تثبیت) - ($69/58$ بعد از تثبیت)). در واقع تثبیت توکسین LTB، به افزایش ضخامت لایه جذب شده ناشی از تشکیل لایه جدید روی سطح تراشه طلا نسبت داده می‌شود.

۳-۳- تجزیه و تحلیل‌سیستیکی بر هم‌کنش

1. Net charge
2. ω -substituted alkanethiolates

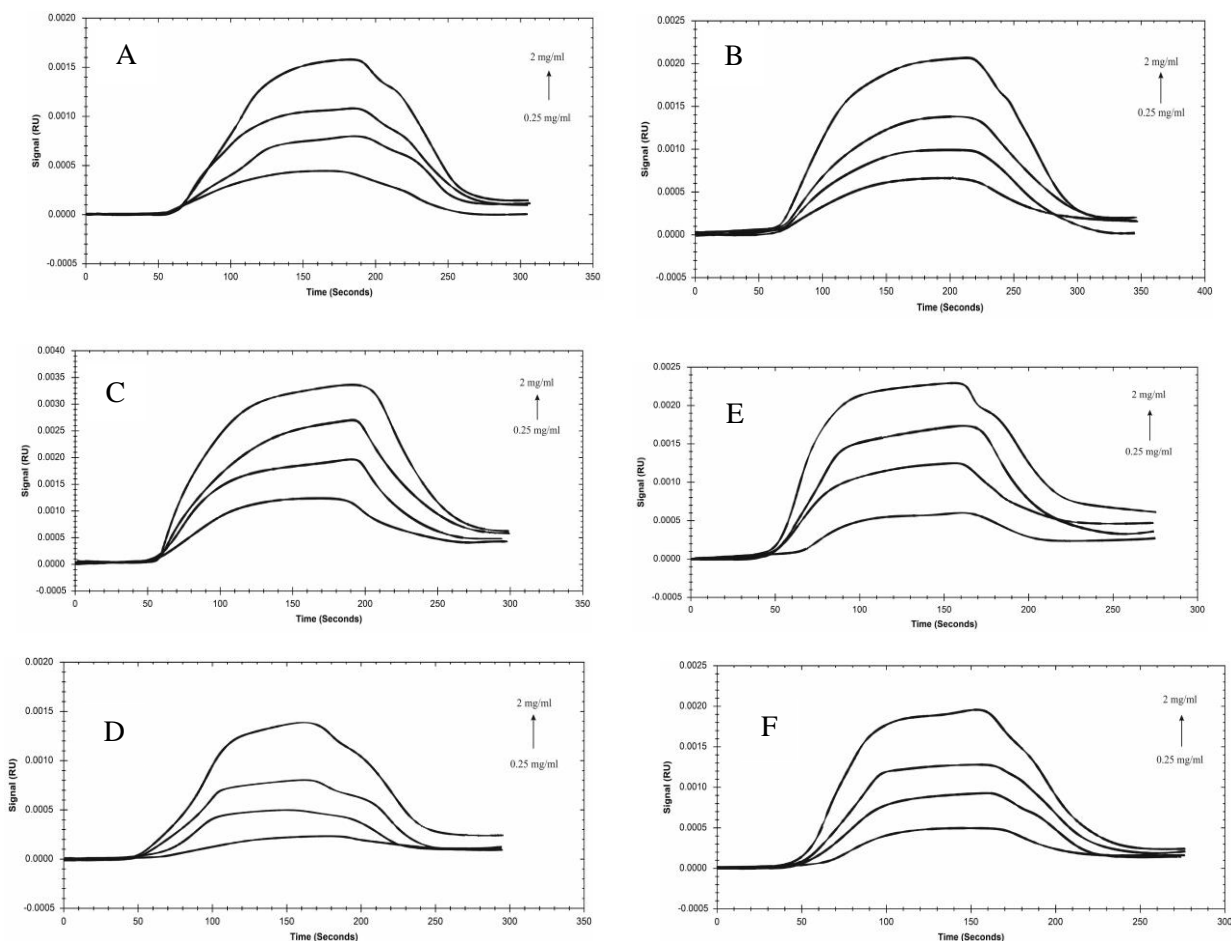


Fig 3. SPR sensorgrams of the interaction of LTB toxin with different concentrations of low MW dextran (top) and high MW dextran (bottom) (0.25–2 mg/ml in sodium phosphate buffer; 10 mM; pH 7) in the presence of various temperatures 298 K (A, D), 303 K (B, E), and 310 K (C, F).

Table 1 The kinetic parameters (association rate constant (k_a), dissociation rate constant (k_d), and equilibrium constants (K_A)) of LTB toxin binding with dextrans (low MW dextran and high MW dextran) at three different temperatures (298, 303, 310 K).

K_A (M^{-1})	K_d (s^{-1})	K_a ($M^{-1} \times s^{-1}$)	Temperature (K)	
$(1.07 \pm 0.02) \times 10^6$	$(1.25 \pm 0.25) \times 10^{-3}$	$(1.28 \pm 0.02) \times 10^3$	298	Low MW dextran
$(1.75 \pm 0.04) \times 10^6$	$(1.16 \pm 0.04) \times 10^{-3}$	$(2.02 \pm 0.4) \times 10^3$	303	
$(3.86 \pm 0.81) \times 10^6$	$(1.6 \pm 0.40) \times 10^{-3}$	$(5.45 \pm 1.4) \times 10^3$	310	
$(0.95 \pm 0.01) \times 10^6$	$(1.50 \pm 0.3) \times 10^{-3}$	$(1.40 \pm 0.15) \times 10^3$	298	High MW dextran
$(1.15 \pm 0.01) \times 10^6$	$(1.70 \pm 0.3) \times 10^{-3}$	$(1.90 \pm 0.12) \times 10^3$	303	
$(1.89 \pm 0.02) \times 10^6$	$(2.90 \pm 0.07) \times 10^{-3}$	$(5.35 \pm 0.75) \times 10^3$	310	

۳-۴- تجزیه و تحلیل ترمودینامیکی برهم کنش

پارامترهای ترمودینامیکی مانند تغییرات آنتالپی و آنتروپی می توانند اطلاعات مفیدی در مورد تغییرات انرژی مرتبط با فرآیند جذب و همچنین نقش عوامل مختلف دخیل در تشکیل کمپلکس این دو مولکول زیستی مولکول زیستی ارائه دهند. جدول ۲ نتایج مربوط به پارامترهای ترمودینامیکی برهمکنش بیندکستران هاو توکسین LTB را نیز خلاصه می کند. همانطور که در شکل ۴ نشان داده شد، نمودار وانت هوف برای هر دو نوع دکسترانیک خط مستقیم با شیب منفی است (به ترتیب 0.9735 و 0.998 $R^2 =$ ، که نشان می دهد که تغییر آنتالپی برای تشکیل کمپلکس دکستران ها و توکسین LTB در محدوده دما ثابت می ماند. علاوه بر این، شیب منفی نشان می دهد که اتصال بیندکستران و توکسین LTB گرماگیر ($\Delta H < 0$) و از نظر تغییرات آنتالپیشاهد تاثیر قابل توجهی در برهمکنش بین آنها مشاهده نشد. مقادیر مثبت ΔH (0.08 و 0.44 kJ mol^{-1}) و ΔS ($392/42$ و $263/93$ $\text{Jmol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$) از نمودار وانت هوف فرآیند جذب مبتنی بر آنتروپی را نشان می دهد.

با این تفاسیر و مطابق با خصوصیات ساختاری پیش گویی شده از توکسین LTB در بخش ۳-۲ (شکل ۱، A) که بخش اعظم ساختار آنرا اسیدهای آمینه ی آبگریز تشکیل می دهند، برهم کنش بین آن و دکستران ها بیشتر از طریق فعل و انفعالات آبگریز منتسب به کم آبیبخش آبگریز پروتئین می تواند انجام شد ($\Delta H < 0$ و $\Delta S > 0$). با این تفاسیر آنتروپی اتصال تخمین زده شده ($T\Delta S$)، یک سهم آنتروپیک مطلوب ($T\Delta S$ مثبت)، و همچنین افزایش تمایل اتصال توکسین LTB با هر دو نوع دکستران در دمای بالا را نشان داد (جدول ۲). مقدار ΔG در دمای 298 K برای هر دو دکستران با وزن مولکولی پایین و بالا به ترتیب با $-34/39$ و $-34/11$ kJ mol^{-1} محاسبه شد که علامت منفی آن به خوداندگیختگی و مطلوبیت اتصال دکستران ها به توکسین LTB اشاره دارد. به طور کلی، اگرچه جاذبه الکترواستاتیکی نیروی محرکه اصلی برای کمپلکس شدن بین

پروتئین و پلی ساکارید در نظر گرفته می شود، اما گزارش شده است که پیوند هیدروژنی و برهمکنش آبگریز نقش ثانویه ای برای پایداری تجمع^۱ پروتئین/پلی ساکارید ایفا می کند. با این تفاسیر میزان پیوند هیدروژنی و برهمکنش آبگریز به دما بستگی دارد. پیشنهاد می شود اعمال حرارت ملایم و در نتیجه باز شدگی در ساختار پروتئین ها منجر می شود که مکان های واکنش پذیر (اسیدهای آمینه) بیشتری در معرض فاز حلال قرار گیرند و در نتیجه شانس بیشتری برای برهمکنش (یا اتصال) با پلی ساکاریدها داشته باشند [۱۰]. به عنوان یک نتیجه کلی و مطابق با نتایج حاصل از این کار انتظار می رود که برهمکنش های ایجاد شده از نوع آبگریز و هیدروژنی بین آگروپلی ساکاریدهای دکستران با توکسین LTB می توانند نقطه شروع اتصالات قوی تر بوده و از طریق محصور کردن و به دنبال آن محدودیت توکسین LTB، به عنوان یک سد فیزیکی در اتصال به سلول های اپیتلیال روده عمل کنند.

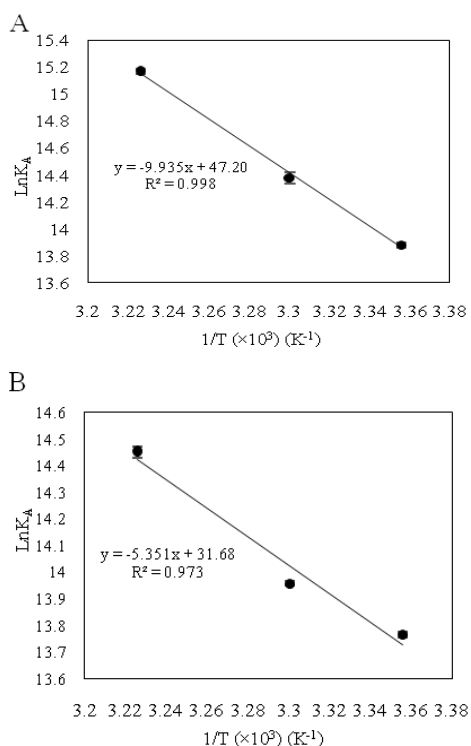


Fig 4 Van't Hoff plot for the interaction of LTB toxin and low MW dextran (A) and high MW dextran (B).

Table 2 The thermodynamic parameters of LTB toxin binding with dextran (low MW dextran and high MW dextran) at three different temperatures (298, 303, 310 K)

ΔG (kJ mol ⁻¹)	ΔS (J mol ⁻¹ .K ⁻¹)	ΔH (kJ mol ⁻¹)	K_A (M ⁻¹)	Temperature (K)	
-34.39 ± 0.55			$(1.07 \pm 0.02) \times 10^6$	298	Low MW dextran
-36.22 ± 0.57	392.42 ± 6.53	0.08 ± 0.02	$(1.75 \pm 0.04) \times 10^6$	303	
-39.09 ± 1.3			$(3.86 \pm 0.81) \times 10^6$	310	
-34.11 ± 0.24			$(0.95 \pm 0.01) \times 10^6$	298	High MW dextran
-35.16 ± 0.29	263.39 ± 2.12	0.044 ± 0.01	$(1.15 \pm 0.01) \times 10^6$	303	
-37.25 ± 0.26			$(1.89 \pm 0.02) \times 10^6$	310	

۴- نتیجه گیری

اگزوپلی ساکاریدها در حضور توکسین LTB، مطالعات تکمیلی و بیشتری بر روی مدل‌های *in-vivo* و *in-vitro* مورد انتظار است.

مطالعه حاضر، گزارشی در مورد پارامترهای جنبشی و ترمودینامیکی برهمکنش وزن‌های مولکولی دکستران‌ها به توکسین LTB است. از نقطه نظر سینتیکیو ترمودینامیکی در شرایط دمایی مختلف نتایج نشان داد که هر دو اگزوپلی ساکارید دکستران (با وزن مولکولی بالا و پایین) می‌توانند به توکسین LTB با میل ترکیب نسبتاً بالا (K_A) از طریق تعامل گرماگیر و آنتروپی محور متصل شود ($\Delta H < 0$ و $\Delta S > 0$) که مطابق با مقادیر منفی انرژی آزاد گیبس فرآیند اتصال آن از نوع خودبخودی ارزیابی شد ($\Delta G > 0$). در نتیجه فعل و انفعالات آگزیزه نظر می‌رسد که نقش مهمی در برهمکنش هر دو نوع دکستران با توکسین LTB می‌تواند داشته باشند. علاوه بر پیوند آگزیزه که در ناحیه آگزیز میانی می‌تواند نقش ایفا کند، پیوندهای هیدروژنی با سطوح آبدوستینز انتظار می‌رود که می‌توانند نقطه شروعی برای ایجاد پیوندهای قوی‌تر داشته باشند و به دنبال آن منجر به کاهش اثرات سیتوتوکسیکی توکسین LTB شوند. از طرف دیگر وزن مولکولی دکستران‌ها تأثیری روی نتایج برهمکنش این دو مولکول زیستی نداشتند. یافته‌های حاصل از مطالعه کنونی، تامل محققین را می‌تواند در خصوص برهمکنش بین دکستران با توکسین LTB را عمیق‌تر سازد. لذا به منظور درک بهتر فعالیت ضد سیتوتوکسیکی

۵- تشکر و قدردانی

نویسندگان از حمایت مالی دانشگاه کلود برنارد لیون ۱ - واحد تحقیقاتی BioDyMIA (Bioingénierie et Dynamique Microbienne aux Interfaces Alimentaires) در فرانسه و همچنین دانشگاه فردوسی مشهد به شماره طرح ۳/۵۰۶۸۱ در ایران سپاسگزار هستند.

۶- منابع

- [1] Hosseini, F and Akbari, I. (2017). Microbial toxins. University Jihad Publications, pp:116-123, [in Persian].
- [2] Saadat, Y.R., Khosroushahi, A.Y. and Gargari, B.P., 2019. A comprehensive review of anticancer, immunomodulatory and health beneficial effects of the lactic acid bacteria exopolysaccharides. *Carbohydrate polymers*, 217, pp.79-89.

- [9] Hidalgo-Cantabrana, C., López, P., Gueimonde, M., Clara, G., Suárez, A., Margolles, A. and Ruas-Madiedo, P., 2012. Immune modulation capability of exopolysaccharides synthesised by lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 4(4), pp.227-237.
- [10] Ghosh, A.K. and Bandyopadhyay, P., 2012. Polysaccharide-protein interactions and their relevance in food colloids. *The complex world of polysaccharides*, 14, pp.395-406.
- [11] Fathi, F., Sharifi, M., Jafari, A., Kakavandi, N., Kashanian, S., Dolatabadi, J.E.N. and Rashidi, M.R., 2019. Kinetic and thermodynamic insights into interaction of albumin with piperacillin: Spectroscopic and molecular modeling approaches. *Journal of Molecular Liquids*, 296, p.111770.
- [12] Dehghani, M., Jalal, R. and Rashidi, M.R., 2021. Kinetic and thermodynamic insights into the interaction of A β 1–42 with astaxanthin and aggregation behavior of A β 1–42: Surface plasmon resonance, microscopic, and molecular docking studies. *Biophysical Chemistry*, 275, p.106612.
- [13] Jiménez-Vargas, J.M., Ramírez-Carreto, S., Corzo, G., Possani, L.D., Becerril, B. and Ortiz, E., 2021. Structural and functional characterization of NDBP-4 family antimicrobial peptides from the scorpion *Mesomexovis variegatus*. *Peptides*, 141, p.170553.
- [14] Heggelund, J.E., Heim, J.B., Bajc, G., Hodnik, V., Anderluh, G. and Kregel, U., 2019. Specificity of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin investigated by single-site mutagenesis and crystallography. *International journal of molecular sciences*, 20(3), p.703.
- [3] Zajšek, K., Goršek, A. and Kolar, M., 2013. Cultivating conditions effects on kefir production by the mixed culture of lactic acid bacteria imbedded within kefir grains. *Food chemistry*, 139(1-4), pp.970-977.
- [4] Jeong, D., Kim, D.H., Kang, I.B., Kim, H., Song, K.Y., Kim, H.S. and Seo, K.H., 2017. Characterization and antibacterial activity of a novel exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* DN1 isolated from kefir. *Food Control*, 78, pp.436-442.
- [5] Ruas-Madiedo, P., 2014. Biosynthesis and bioactivity of exopolysaccharides produced by probiotic bacteria. *Food Oligosaccharides*, pp.118-133.
- [6] Ruas-Madiedo, P., Medrano, M., Salazar, N., De Los Reyes-Gavilán, C.G., Pérez, P.F. and Abraham, A.G., 2010. Exopolysaccharides produced by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains abrogate in vitro the cytotoxic effect of bacterial toxins on eukaryotic cells. *Journal of applied microbiology*, 109(6), pp.2079-2086.
- [7] Kim, J.U., Kim, Y., Han, K.S., Oh, S., Whang, K.Y., Kim, J.N. and Kim, S.H., 2006. Function of cell-bound and released exopolysaccharides produced by *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595. *Journal of microbiology and biotechnology*, 16(6), pp.939-945.
- [8] Hidalgo-Cantabrana, C., Sánchez, B., Milani, C., Ventura, M., Margolles, A. and Ruas-Madiedo, P., 2014. Genomic overview and biological functions of exopolysaccharide biosynthesis in *Bifidobacterium* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(1), pp.9-18.



Using surface plasmon resonance technology for initial evaluation of the antitoxin activity of dextran exopolysaccharide against *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin

Mojtaba Azari-Anpar^{1,2}, Farideh Tabatabaei Yazdi^{3*}, Pascal Degraeve⁴, Nadia Oulahal⁵, KambizJahanbin⁶

¹Ph.D. Student of Food Biotechnology, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad-91775-1163, Iran

²Ph.D. Student of Food Biotechnology, BioDyMIA Research Unit, ISARA Lyon, Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, 155 ru8 Henri de Boissieu, F-01000, Bourg enBresse, France

³ Professor in Food Biotechnology, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad –91775-1163, Iran

⁴ Professor in Food Science and Technology, BioDyMIA Research Unit, ISARA Lyon, Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, 155 ru8 Henri de Boissieu, F-01000, Bourg enBresse, France

⁵ Associate Professor in Food Biotechnology, BioDyMIA Research Unit, ISARA Lyon, Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, 155 ru8 Henri de Boissieu, F-01000, Bourg enBresse, France

⁶ Associate Professor in Food Science and Technology, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agricultural Engineering, Shahrood University of Technology, P.O. Box 361999-5161, Shahrood, Iran

ABSTRACT

Enterotoxigenic *Escherichia coli* is the most common bacterial agent causing diarrhea by binding to the intestinal mucosa and producing heat-labile enterotoxins. The aim of this study was to elucidate the interaction of two forms of dextran exopolysaccharides (molecular weights of (11-9 kDa) and (76-60 kDa)) produced by the probiotic bacterium *Leuconostocmesenteroides* with the heat-labile enterotoxin((B-pentamer) (LTB)) by using surface plasmon resonance (SPR). According to the results of interaction kinetics at 298 K, both low and high molecular weight dextran types exhibited high affinity (KA) (1.07×10^6 M⁻¹ and 0.95×10^6 M⁻¹, respectively) for LTB toxin in vitro. From a thermodynamic point of view, the values calculated of the Gibbs energy were negative ($\Delta G < 0$), and also enthalpy and entropy achieved both positive values ($\Delta H > 0$ and $\Delta S > 0$) via the van't Hof equation, indicating that the interaction was spontaneous, endothermic, and disordered, respectively. With these findings, hydrophobic interactions appear to be important in the interaction between dextran and LTB toxins with hydrogenic bindings. Therefore, dextran molecules are capable of binding to LTB toxin and relatively displaying antitoxin effects. To sum up, these results could provide further insights for initiating extensive research with other lactic acid-derived exopolysaccharides in bacterial interactions and also with foodborne pathogen toxins.

ARTICLE INFO

Article History:

Received 2022/8/9

Accepted 2022/9/12

Keywords:

Dextran,

Heat-Labile Enterotoxin,

Surface Plasmon Resonance,

Exopolysaccharide,

Interaction

DOI: 10.22034/FSCT.20.136.1

DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.136.1.9

*Corresponding Author E-Mail:
tabatabai@um.ac.ir