فهرست

پیشگفتار ۷

فصل ۱: راه‌کارها، میانکنش‌ها و چالش‌های پیش روی پپتید-نانوذره..... ۹

فصل ۲: اصول روابط پپتید-مواد ۲۷

فصل ۳: تعیین خصوصیات برهمکنش پپتید-سطح در آزمایشگاه ۴۷

فصل ۴: شناسایی ساختار سطحی مشترک..... ۱۰۹

فصل ۵: شناخت رشد مواد معدنی زیستی و اجتماع آنها جهت مهندسی مواد نانویی سبز ۱۴۳

فصل ۶: تئوری و شبیه‌سازی کامپیوتری در راستای درک جذب سطحی مولکول‌ها بر روی نانوساختارهای فلزی و اکسیدی.... ۱۵۹

فصل ۷: نانوکاتالیست‌های زیست‌الهام ۱۹۱

فصل ۸: عملگرا کردن بیولوژیکی هدفمند مواد غیرآلی: الحاق پروتئین‌های انتخاب‌گر مواد در بیونانوتکنولوژی..... ۲۴۳

فصل ۹: برهمکنش‌های محیطی ماکرومولکول‌های زمین و زیستی با نانومواد ۲۸۱

فصل ۱۰: سیستم‌های تقلیدی مواد زیستی: چه چیزی بدست آورده‌ایم و به کجا می‌رویم؟ ۳۱۷

واژه‌نامه..... ۳۴۱

فهرستی منتخب از منابع ۳۴۹

واژه‌یاب..... ۳۵۵

پیشگفتار

منابع علمی نشـــان می‌دهد بســـیاری از نوآوری‌های علمی در کشـــورهای پیشرفته مبتنی بر الهام‌گیری از حیات و ترجمه اصول طراحی خلقت به فناوری بوده اســـت. محصولات زیست الهامی در آمریکا در فاصله ســـال‌های ۲۰۰۸-۲۰۰۵ بالغ بر ۱/۵ میلیارد دلار فروش داشـــته اســـت و فروش ســـالیانه این محصولات در ســـال‌های آینده با رشد قویا فزآینده ادامه خواهد یافت. نانوزیست الهام (نانوبیومیمیتیک) به عنوان یک علم میان‌رشته‌ای حوزه نوینی از علم است که دارای پتانسیل‌های مهمی در نوآوری می‌باشـــد که در آن‌ها عناصر، مدل‌ها، سیســـتم‌ها و فرآیندهای طبیعی مطالعه می‌شـــود و از آن‌ها برای حل مشکلات انســـانی به طور خلاقانه الگوبرداری می‌گردد. در حال حاضر بزرگترین دانشـــگاه‌های جهان در آمریکای شـــمالی و اروپا اقدام به ارائـــه دوره‌های بیومیمتیک با سرفصل‌های متمرکز بر بیومیمتیک مولکولی و نانوبیومیمتیک و گسترش زمینه‌های پژوهشی متنوع در این حوزه نموده‌اند. این شـــاخه از علم با توجه به رویکرد الهام گرفتن از طبیعت در بنیادی‌ترین سطح که در مقیاس نانو است، می‌تواند محققین را هدایت و کمک کند تا نسبت به توسعه مفاهیم جدید مبتنی بر فرآیندهای آفرینش و از مسیر دانش فنی و مهندسی مورد نظر به نوآوری و فناوری و محصولات جدید در عرصه فناوری نانو دست پیدا کنند. علی رغم اینکه الهام و الگوگیری از خلقت در مقیاس‌های مختلف امکان‌پذیر است در بیشتر موارد بیومیمتیک در سطح میکروسکوپی و مقیاس مولکولی و نانو دنبال می‌شود. علت عمده این گرایش این است که بسیاری از ویژگی‌های برتر طراحی در خلقت در مقیاس نانو یافت می‌شود. DNA و ماشین‌های مولکولی بیولوژیکی همواره به عنوان منبعی الهام برای توسعه ماشین‌های نانو-مقیاس خود سرهم شونده مورد توجه بوده است. از اواسط دهه نود پدیده اثر (گیاه) سدر برای نانوفرآوری سطوح با قابلیت‌های ابر-آبگریزی، خودتمیزشوندگی و چسبندگی و اصطکاک کم به کار گرفته شد. بازتولید ویژگی‌های نانوساختاری پای مارمولک منتهی به طراحی دستکش‌هائی شده که توسط آن انسان می‌تواند از دیوار راست بالا رود.

در کشور با توجه به زیرســـاخت‌های قوی علمی-آموزشی-پژوهشی به ویژه در حوزه نانوتکنولوژی، این رشته چندسالی است که در مراکز آموزشی راه اندازی شده است. با توجه به اینکه منابع موجود در این زمینه بسیار محدود می‌باشند و غالبا محدود به رشته های نانوتکنولوژی هستند ضرورت ترجمه

کتاب‌های تخصصی در زمینه نانوبیومیمیتیک احساس می‌گردد. کتاب فوق با این هدف مورد ترجمه قرار گرفت. امید است که این کتاب مورد قبول دانش پژوهان قرار گیرد و ما را بر خطاهای آن آگاهی دهند.

دکتر جواد ملکوتی‌خواه
پاییز ۱۴۰۰

فصل ۱

راه‌کارها، میانکنش‌ها و چالش‌های پیش روی پپتید-نانوذره

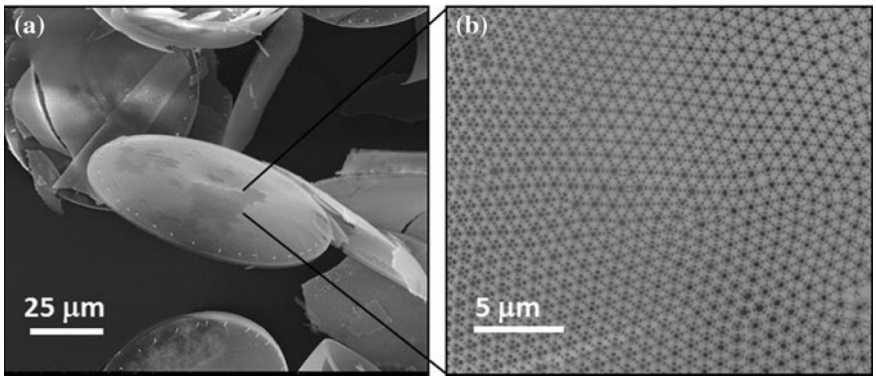
چکیده

توانایی کنترل و دست‌ورزی واکنش‌های پپتید–نانوذره، هدف مهمی در راستای دستیابی به مواد دارای عملکرد زیستی با خصوصیات ارتقا یافته و نانوساختارهای دقیق جهت کاربردهای تشخیصی، کاتالیزوری و بیوپزشکی است. با این حال، در حال حاضر، چالش‌های فراوانی جهت دستیابی به طراحی بهتر و ساخت نانومواد عملکردی برپایه‌ی پپتید وجود دارد. چالش‌هایی همچون نیاز به درک بهتر ما از مکانیسم‌ها و یا نیروهایی که مسبب میانکش بین پپتید–نانوذره می‌شوند، بهبود تکنیک‌های تشخیصی به منظور ردیابی میانکنش‌های پپتید-نانوذره، طراحی و شناسایی پپتیدهای متصل شونده به نانوذرات با میل ترکیبی بالا با تلفیق تکنیک‌های ترکیبی پیشرفته و تعیین توالی متعارف و استفاده‌ی موثر از مدلسازی کامپیوتری برای پیش بینی و یا بررسی پیوند بین پپتید–نانوذره. در این فصل، چالش‌های تکنیکی، نمونه‌هایی از میانکنش پپتید–نانوذره و ویژگی‌های منتج از آنها را مطرح خواهیم کرد و خواهیم دید چگونه برخی از این چالش‌ها برطرف خواهند شد.

۱-۱ مقدمه

طبیعت مولکول‌هایی را تکامل بخشیده است که در فرم‌های خودتجمعی، پیام‌رسانی، تشخیص، کاتالیز، حرکت و ذخیره خصوصیات عملکردی داشته باشند. به علاوه طبیعت مواد مختلفی (آلی و غیرآلی) را به منظور ایجاد ساختارها و مواد پیچیده‌تر در کنار هم قرار می‌دهد. دیاتوم‌های دریایی که اسکلت خارجی سیلیسی را در مقیاس‌های مختلف تولید می‌کنند (شکل ۱.۱) و یا مواد تشکیل‌شده‌ی آلی-غیرآلی مرواریدی که توسط نرم‌تنان ساخته می‌شود (Skowronski و همکاران 2007؛ Dickerson و همکاران 2008) بهترین مثال‌ها برای شرح این پدیده‌اند.

همچنین سنتز و گردهمایی بسیار منظم زنجیره‌های نانوذرات مغناطیسی (Bazylinski) (NP) و همکاران 2007)، شکل‌گیری قفس‌های خودتجمعی پروتئینی برای ذخیره‌ی مواد غیرآلی (Flenniken و همکاران 2008) از دیگر مثال‌ها هستند. در همه‌ی این نمونه‌ها، طبیعت بیومولکول‌های منحصربه‌فردی را با عملکردهای خاص به وجود آورده است که بهترین حالت ممکن از کنترل، اختصاصیت شیمیایی، تکمیل هندسی و تجمع نانوساختارها می‌باشند. توانایی



شکل ۱-۱ موجوداتی که از طبیعت الهام گرفته‌اند مثل دیاتوم‌ها، مواد معدنی با ترکیب شناخته‌شده و ساختاری تحت شرایط سلولی و کنترل ژنتیکی می‌سازند (aوb). نمونه‌ای از معدنی شدن در طبیعت در تصویر SEM از دیواره‌ی سلولی (تمیز شده) سیلیکا (مثل صدف آهکی دوکپه‌ای) که توسط دیاتوم Coscinodiscus granii رشد داده شده است، ترسیم شده است (تصویر از M. B. Dickerson و کشت دیاتوم توسط Y. Fang فراهم شده است).

تکثیر ساختارها و عملکردهای بیومولکول‌ها با توجه به این اصل که چگونه تجمع می‌یابند و چگونه با مواد غیرآلی برهمکنش دارند، برای زمینه‌هایی همچون پزشکی، تشخیص و کاتالیز بسیار کار آمد خواهد بود. با پیشرفت‌های اخیر در زمینه‌ی نانوتکنولوژی، دستاوردهای بسیاری در زمینه‌ی استفاده از بیومولکول‌ها برای ساخت و یا کارآمدکردن نانوذرات غیرآلی به دست آمده است که عملکرد جدیدی از ماده را هنگام ترکیب با خصوصیات الکترونیکی، نوری و مغناطیسی نانو ذرات نشان می‌دهد (Pelaz و همکاران 2012). تا به امروز، این دستاوردها شامل استفاده از بیومولکول‌ها (مثل پپتیدها یا DNA) برای ساخت مواد مختلف (غیرآلی و یا برپایه‌ی کربن) به منظور تغییر خواص و ساختار نانوذرات و مهمتر از آن بهره‌مند شدن از فعالیت بیولوژیکی و عملکرد تشخیصی مولکولی به نانومواد می‌باشد.

پپتیدها و پروتئین‌ها یکی از ابزارهای ساخت تجمع و اصلاح سطح مواد می‌باشند که به دلیل تنوع غنی شیمیایی‌شان (زیرواحدهای آبدوست/آبگریز، آروماتیک، اسیدی و بازی) و وجود قسمت‌های کوتاهی از عناصر ساختاری دوم (مارپیچی، صفحات β، پیچ‌ها) کاربرد گسترده دارند. و امکان سنتز آنها با مراجعه به کتابخانه‌های غنی ژنی فراهم می‌باشد. (Knecht، 2012 و Briggs). این خواص نشان می‌دهد که آن‌ها در مقایسه با پروتئین‌های بزرگ آسان‌تر کنترل و دست‌ورزی می‌شوند، اما برخلاف یک تک‌آمینو اسید یا بازهای DNA، تنوع ساختاری و شیمیایی بسیار بیشتری دارند. همچنین، ویژگی مشترک اکثر آن‌هایی (اگر نگوییم همه‌ی آن‌ها) که دارای فعالیت معدنی‌شدن هستند، وجود دومین‌های تکراری پپتیدی متعدد است (Dickerson و همکاران، 2008). این خصوصیت کمک می‌کند تا فعالیت این دومین‌ها را در یک تکرار پپتیدی جدا کنیم و مورد مطالعه قرار دهیم بدون اینکه با پیچیدگی یک پروتئین کامل سروکار داشته باشیم. این آزمایش برای اولین

بار با استفاده از پپتید R۵ رسوب دهنده‌ی سیلیکای جداشده از دیاتوم‌هایی که در شرایط آزمایشگاهی تکثیر یافتند و واکنش تولید زیستی سیلیکا در آن‌ها اتفاق افتاداست؛ نشان داده شد (Kroger و همکاران 1999). علاوه بر توالی‌های پپتیدی زیستی برای ساخت و تجمع مواد، پپتیدهایی با توالی‌های اختصاصی متصل شونده به مواد، از طریق روش‌های پایشی ترکیبی[1] جداسازی شده‌اند و به عنوان الگوهایی برای سنتز، عامل‌دار کردن و تجمع انواع مختلفی از نانوذرات مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Song و همکاران 2013؛ Nam و همکاران 2008؛ Coppage و همکاران 2011). برای مثال، پپتیدهای متصل‌شونده به پلاتینیوم و سیلیکا که از کتابخانه‌ی پپتیدهای نمایش فاژی[2] جداسازی شده‌اند، گزارش داده شده‌است که مورفولوژی و شکل ذرات پلاتینیوم (Huang 2010 و Li) و سیلیکا (Patwardhan و همکاران 2012) را کنترل می‌کنند.

از میانکنش‌های پپتید-نانوذره برای سنتز و تجمع ساختارهای غیرآلی با پیچیدگی بیشتر که از داربست[3]های پروتئینی یا مولکول‌های شبه لیپیدی استفاده می‌کنند، بهره‌برداری شده است. در مورد استفاده از داربست‌های پروتیینی، پپتیدها به شکل موضعی و یا فضایی در یک فرم سه بعدی اطراف پروتیین پیچیده شده‌اند تا ساختاری متشکل از چندین توالی تکراری را به نمایش بگذارند که قابلیت فعالیت الگو قرارگرفتن نانوذره را دارد. برای مثال، پروتئین‌هایی مثل β-silk (ساختار β در پروتئین ابریشم)، پروتئین‌های لایه‌ی S در باکتری‌ها، پروتئین‌های چاپرون، کپسیدهای ویروسی و محفظه‌های پروتئینی فریتین، همگی برای ساخت مواد و تجمع اشکال خاصی از نانوساختارها با پپتیدهای خاصی تغییر یافته‌اند.(Coordination Chemistry 2013).

فریتین(پروتئین ذخیره‌کننده‌ی آهن) مثالی از یک داربست پروتئینی مهم زیستی است که همه‌ی این ویژگی‌ها را به خوبی نشان می‌دهد. شایان ذکر است که فریتین یک نانوساختار به فرم محفظه تشکیل می‌دهد که به ترتیب دارای قطر خارجی و داخلی ۱۲nm و ۸nm است و شامل چندین زیرواحد تکراری در جایگاه‌های تقارن پنج‌وجهی یا شش وجهی در در محل افزوده شدن پپتیدها (اتصال بصورت فیزیکی با شیمیایی) است. (Coordination Chemistry 2013). به عنوان یک نتیجه، علاقه‌ی زیادی به پروتئین فریتین، نه تنها به عنوان یک دارو بلکه به عنوان یک داربست برای استفاده در زمینه‌ی مواد زیستی معطوف است. قبلا نشان دادیم که محفظه‌های خودتجمع‌یافته‌ی فریتین، می‌توانند از طریق مهندسی نوترکیب زنجیره‌ی سبک فریتین انسانی با یک پپتید متصل شونده به نقره تولید شوند (Kramer و همکاران 2004). در نتیجه پپتید فریتین تغییر داده شده، این اجازه را به نانوذرات نقره می‌دهد تا در حفره‌ی داخلی پروتئین و به خصوص در محل پپتید مورد نظر رشد کنند. به‌طور قابل توجه، سلول‌های باکتریایی که محفظه‌ی پروتئینی را با پپتید متصل شونده به نقره بیان کردند، در مقابل غلظت‌های افزایش‌یافته‌ی یون Ag^{+} مقاوم بودند. فریتین اصلاح شده همچنین می‌تواند بر روی سطح نانوذرات آلومینیوم تجمع یابد که در این صورت مواد ترمیتی (موادی که حرارت بالا تولید می‌کنند و در جوشکاری استفاده می‌شوند) حاصل خواهند شد که

1. Combinatorial screening approaches
2. Phage displayed peptide libraries
3. Scaffold

خواص کینتیکی و انرژی‌زایی بهتری خواهند داشت (Slocik و همکاران 2013). همچنین، پپتیدها با مولکول‌های دوگانه به شـــکل زنجیره‌های کوتاه کربنی (C_{12})، جهت خودتجمعی نانوساختارهای جدیدی از پپتید-طلا، کانژوگه شـــده‌اند. در مطالعات اخیر توســـط Rosi و همکاران، داربست‌های برپایه‌ی پپتید متصل‌شونده به طلا، توسط اصول طراحی منطقی جهت آماده سازی مواد پلاسمونیک پیچیده با خواص نوری مناســـب ساخته شـــدند (Chen و همکاران 2008). استفاده از پپتیدهایی که برای دســـت‌ورزی محتوای مارپیچی داربست مجاز هســـتند، برای بالا بردن خواص نوری مورد نیاز می‌باشـــند. متناوبا Mirkin و دیگران از هیبریدشدن DNA برای کنترل جایگیری نانوذرات در ساختارهای سه بعدی دلخواه استفاده کردند (Macfarlane و همکاران ۲۰۱۱).

به خاطر اثر بیومولکول‌ها و به‌ویژه پپتیدها در خصوصیات مواد، مطالعات بسیاری برای پیگیری میانکنش‌های پپتیدها با نانو مواد در جهت درک مفاهیم اساســـی که اتصال و ســـاختار را در چنین رابطه‌ی پویایی تحت کنترل دارد، انجام گرفته است. این دیدگاه می‌تواند منجر به طراحی بهتر پپتیدها با تمایل اتصالی متفاوت و اختصاص دادن عملکرد ویژه به پپتید و نانوذره، با هدف ساخت بیوسنسور، بهبود فرایند کاتالیز و یا استفاده در زمینه‌ی بیوپزشکی مثل آزادسازی هدفمند دارو و عکس برداری در محیط زنده شود (Slocik 2010 و Nail). برای بیوسنسورها، به‌عنوان مثال، کسب درک جزئی از اثرات میانکنش‌های اتصالی/ ساختاری بین عنصر تشخیص‌دهنده‌ی پپتید، نانوماده و ماده‌ی شیمیایی یا مولکول زیستی هدف ضروری است. هر میانکنش برای بهبود پاسخ سنسور، افزایش حساسیت و اختصاصیت به مولکول هدف و رســـیدن به کمترین محدودیت تشخیص ضروری است. متناوبا، این مسئله حتی برای میانکنش با لیگاندهای غیربیولوژیکی (پلیمرها، لیگاندهای آلی)، آنالوگ‌های ساده‌ی پپتیدی مثل پپتوئید[1] و پپتید نوکلئیک‌اسیدها[2] (PNA) نیز درست خواهد بود. با این حال، چالش‌های فراوانی در مسیر درک و بهره‌برداری از میانکش‌های پپتید-نانوذره پیش روی ما وجود دارد.

۲-۱ چالش‌های بزرگ در بیونانوتکنولوژی

اتصـــال بیومولکول‌ها با نانومواد منجر به بروز اثرات هم‌افزایی می‌شـــود که توانایی مولکول‌های زیستی را در کنترل، شکل، دست‌کاری و بهبود خواص فیزیکی و شیمیایی نانوذره ترکیب می‌کند. در نتیجه، همانگونه که تاکنون گفته شـــد و در ادامه‌ی فصل ذکر خواهد شـــد، این مشـــارکت از نظر تکنولوژیکی برای بهبود مواد پیشـــرفته‌ی چندعملکردی مهـــم خواهد بود. نانومواد‌ها از وجود بیومولکول‌ها بهره می‌برند و ترکیب نانومواد با بیومولکول‌ها به ســـمت خاصی رهنمون می‌شود که مورد پذیرش علوم مواد، جوامع پزشکی و مهندسی است. (شکل۱.۲). با این حال هنوز چالش‌های تامل برانگیـــزی وجود دارند که تا به امروز به‌طورکامـــل درک نکرده‌ایم. به عنوان مثال چه چیزی میانکنش‌های زیستی-غیرزیســـتی را باعث می‌شود و یا موثرترین عوامل زیستی (DNA، پپتیدها، پروتئین‌ها) که محکم‌ترین میانکنش‌ها را ایجاد می‌کنند، کدام هستند.

1. Peptoid
2. Peptid Nucleic Acids

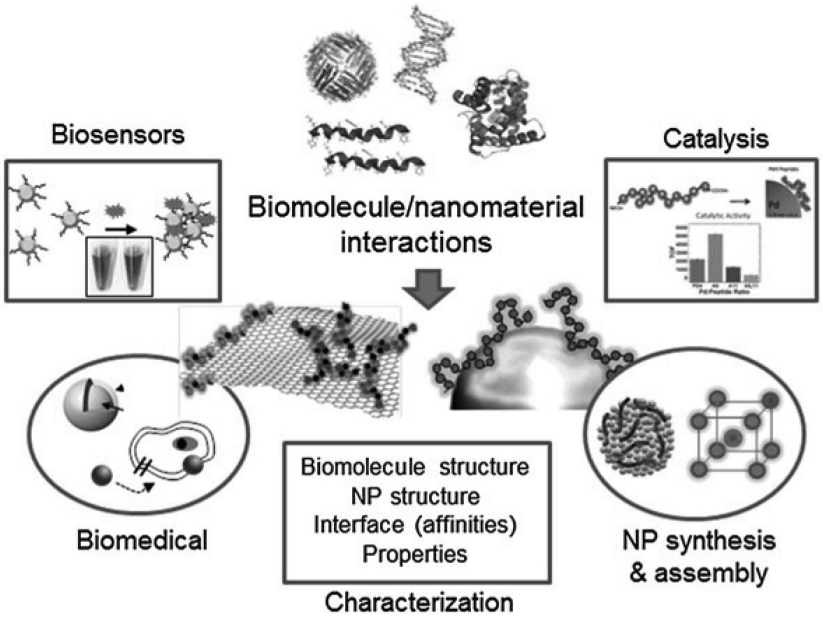
پیشـــرفت در طراحی و انتخاب پپتیدهای متصل‌شـــونده به نانوذره بیشتر در همان مسیری که طبیعت بیومولکول‌ها را برای عملکردهای خاص متکامل یا بهینه کرده است، نیاز است. مکانیسم‌ها/ واکنش‌هـــا/ نیروهایی که از پیوند پپتید با مواد و یا ســـاختار پپتید به دســـت می‌آید، تکنیک‌های تشخیصی که مستقیما اتصال پپتید و نانومواد را با سطح رزولوشن اتمی و مولکولی آنالیز و محاسبه می‌کنند و مدل‌ها/ پویایـــی/ محرک‌های تئوری قابل اعتماد که می‌توانند به داده‌های تجربی اعتبار بخشیده و طراحی داده‌های آزمایشی را هدایت کنند، همه و همه چالش‌های تکنیکی مهمی هستند که نیازمند تحقیق و بررســـی هستند. در قســـمت بعدی، چند مورد از مهم‌ترین چالش‌ها را عنوان خواهیم‌کرد که به سنتز پپتید و تجمع نانومواد مربوط می‌شوند و مثال‌هایی را از آنچه تاکنون انجام شده است در جهت درک و طراحی بهتر میانکنش‌های بین پپتید و نانوذره و به همان نسبت تعیین واکنش‌های اتصالی بررسی می‌کنیم.

۱-۲-۱ طراحی و انتخاب پپتیدهای متصل شونده به نانوذره/ماده

طراحی و انتخاب پپتیدهای متصل شـــونده به نانوذره به خاطر فقدان روش‌های با بازده‌ی بالا، اصـــول طراحی منطقی، نبود اطلاعات کامل از وجود جفت‌های اتصالی پپتید-نانوذره و در بیشـــتر موارد نبود مدل‌های محاسباتی دقیق، به عنوان یک چالش بزرگ چالش بزرگ باقی مانده‌است. نیاز فزاینده‌ای به روش‌هایی با توان شناســـایی میانکنش‌های با گرایش و اختصاصیت بالا بین نانوذره-پپتید وجود دارد. یقینا تکنیک‌های جدید و با بازده‌ی بالا توان جستجو و غربال کتابخانه‌های بزرگ از پپتیدهای تصادفی را در برابر هر ماده‌ی هدف (حل شـــونده و غیر حل شـــونده)، عملکرد دلخواه (فعالیت کاتالیتیکی) و یا خاصیت نانوذره (اندازه، کریستال پذیری، مورفولوژی) فراهم خواهندکرد. در حال حاضر، بهترین روش برای انتخاب پپتیدهای متصل شونده به نانوذره شامل استفاده از تعداد محدودی از توالی‌های پپتیدی با منشـــا بیولوژیکی اختصاصی ماده با فعالیت معدنی شدن شناخته شـــده (مثل پپتید R5 که در دیاتوم‌ها کشف شد) و یا استفاده از الگوهای پپتیدی یا پروتئین‌هایی که فرایند معدنی شـــدن[1] شناخته شـــده‌ای ندارند. مثل آنتی‌بادی‌هایی که می‌توانند برای سنتز و یا اتصال نانوذرات مورد استفاده قرار گیرند یا توسط روشی ترکیبی در شکل کتابخانه‌های نمایش فاژی، نمایش سلولی و یا کتابخانه‌های پپتیدی نمایش داده‌شده توسط رزین، می‌باشد (Tamerler 2009 و Srikaya). بزرگ‌ترین این کتابخانه‌های ترکیبی، معرف تعداد کوچکی (۱۰۹) از این توالی‌ها است که تنها ساختار اولیه‌ی پپتید را نشان می‌دهد و تشابه توالی دارند (Derda و همکاران 2011).

این روش‌ها در دهه‌ی گذشته به شکل گسترده، با موفقیت در تشخیص موادی که با قدرت بالا به پپتیدها متصل می‌شـــوند، مورد استفاده قرار گرفته‌اند و مرکز توجه مقالات مروری بسیار زیادی بوده‌اند (Dickerson و همکاران 2008؛ Tamerler 2008 و Sarikaya). روش‌های نمایش سلولی و یا فاژی به ابزاری قدرتمند و قابل اعتماد برای جداســـازی سریع تعداد بسیار زیادی از پپپتیدهای تصادفـــی در برابر تعداد نامحـــدودی از نانومواد، پلیمرها و بیومولکول‌ها شـــده‌اند (Dickerson و

1. Mineralization



شکل ۲-۱ میانکنش بیومولکول-نانوماده، تعیین خصوصیت و کاربردها. تصویر کاتالیز (مربع سمت راست بالا) با اجازه از Royal society of chemistry از رفرنس شماره‌ی ۱۳ اقتباس شده است.

همکاران 2008؛ Tamerler 2009 وSarikaya)، با این وجود، طی ۵ تا ۱۰ سال گذشته پیشرفت‌های کمی در هرکدام از این تکنیک‌ها یا قفســـه‌های کتابخانه‌های تجاری وجود داشته‌اســـت. در مورد گزینه‌ی آخر، کتابخانه‌های مرسوم در دسترس نمایش‌دهنده‌ی پپتید فاژی به شدت در مورد ترکیب آمینواسیدی که به تعداد کم دیده شده‌اند و یا اصلا در کل جمعیت دیده نشده‌اند، جهت‌گیری دارند (مثل سیستئین) (Dreda و همکاران 2011؛ Matochko و همکاران 2012). محدودیت‌های دیگر شامل تداخل زمینه‌ای بالا توسط موادی که به شکل غیراختصاصی به پپتیدها متصل می‌شوند، رشد ســـریع‌تر کلنی‌های فاژی بعد از انتخاب منفی و نبود توالی‌های غالب می‌باشد. در خصوص چالش تکنیکی زمان بر بودن، دشواری روش و نیازمندی به ابزارهای ویژه از جمله این چالش‌ها می‌باشند. (انکوباتور، توالی‌یابی DNA، PCR)، و تا کنون به اســـتفاده از نانوذرات نامحلول یا بی‌حرکت، که می‌توانند توسط سانتریفیوژ از فاژهای متصل نشده جدا شوند، محدود شده‌اند. در چند مورد اخیر، نمایش فاژی برای غربال چندین دی‌پپتید کوچک محلول یا پیش سازهای نانوذرات جهت پپتیدهای کاتالیتیکی ازطریق به کار بردن محصول نهایی نامحلول اســـتفاده شـــده اســـت (Wei و همکاران 2011). این دســـتاورد نشان دهنده‌ی توانایی جدید نمایش فاژی است که به هدف‌های نامحلول یا غیرمتحرک محدود می‌شود.

فناوری‌های نوظهور احتمالا جهت برطرف کردن برخی از این چالش‌ها مورد استفاده قرار خواهند گرفت، همان‌طور که برای تکمیل روش‌های باتوان بالای ترکیبی موجود، سیستم‌های عامل جدیدی

را ارائـــه خواهند کرد. برای مثال، تکنیک‌های چاپی جدید (مثل چاپ جوهرافشـــان، نانولیتوگرافی (چاپ سنگی) قلم نوری، نانوپرینت TM ریزآرایه‌ها) چاپ مولکول‌های زیستی در ریزآرایه‌های موازی حجیـــم را از نظر اقتصادی عملی کرده‌اند (Swartz و همـــکاران2010؛ Uttamchandani و Yao 2008). این روش‌ها توســـعه‌ی ریزآرایه‌های پپتیدی متشـــکل از ۱۰۲-۱۰۴ توالی تصادفی پپتیدی را امکان‌پذیر ســـاخته‌اند و با موفقیت در جامعه‌ی بیوپزشکی برای تشخیص سریع کاندیدهای دارویی، میانکنش‌های پپتید-پپتید و جفت‌های آنتی‌بادی-پپتید استفاده شده‌اند (Uttamchandani و Yao 2008).

به روش مشابه، امید است که از ریزآرایه‌های پپتیدی با هدف قرار دادن نانومواد مختلف، جهت جداسازی پپتیدهای با میل ترکیبی بالا یا فعالیت الگو قرار گرفتن نانوذرات استفاده شود. این فرض اولیه در شـــکل ۱/۳ ترسیم شده است و سنتز نانوذرات طلا را بر روی ریزآرایه‌ی پپتیدی متشکل از ۱۰۰ پپتید، بعد از انکوباســـیون با بافر نمک‌های Au^{3+} نشان می‌دهد. وجود نقاط بنفش تیره نشان دهنده‌ی پتانســـیل توالی‌های پپتیدی می‌باشد که برای سنتز نانوذرات طلا اختصاصی هستند. این جایـــگاه به طرز قابل ملاحظه‌ای زمان فرآیند/ پایش را از چند هفته به چند ســـاعت کاهش خواهد داد و نیاز به دستگاه‌های خاص (PCR، انکوباتور سلولی و توالی‌یابی DNA) را محدود خواهد کرد بطوریکه، با اســـتفاده از یک میکروسکوپ نوری یا اسکنر رنگی دارای صفحه‌ی پرس افقی، می‌تواند برای هر نانوذره‌ی هدف ســـازگار شـــود و اجازه‌ی ردیابی ســـنتز نانوذره را در محل[1] به ما می‌دهد. در مثال دیگری، نمایش فاژی با یک دســـتگاه میکروفلوئیدی (کنتـــرل کننده‌ی مایعات در حجم میکرولیتر) تلفیق شده است تا یک جایگاه خودکار چندگانه برای انتخاب پپتید تشکیل دهد. در این جایگاه، تراشه‌ی میکروفلوئیدی، توانایی جداسازی کتابخانه‌ی فاژی ضد هدف‌های متعدد را در یک چرخـــه، بدون نیاز به آلودگی باکتریایی برای اتصالات چندگانه می‌دهد (Cung و همکاران 2012). این ســـطح از اتوماســـیون زمان را از هفته‌ها به چند ساعت جهت دستیابی به توالی‌های اتصالی به پپتید برای هر هدف کاهش می‌دهد. همچنین کوچک‌سازی جایگاه جداسازی، مقدار نمونه‌ی مورد نیاز را از میلی‌گرم به میکروگرم کاهش می‌دهد که زمانی‌که با نمونه‌های گران‌قیمت و نادر رو به رو هستیم، یک مزیت خواهد بود. با این حال، میزان حرکت مایع باید در بالاترین حد ممکن باشد تا از جدا شدن متصل‌شونده‌های بامیل ترکیبی بالا مطمئن شویم و نیاز به ابزارهای توالی‌یابی با بازده‌ی بالا و تعیین توالی نسل بعد وجود دارد.

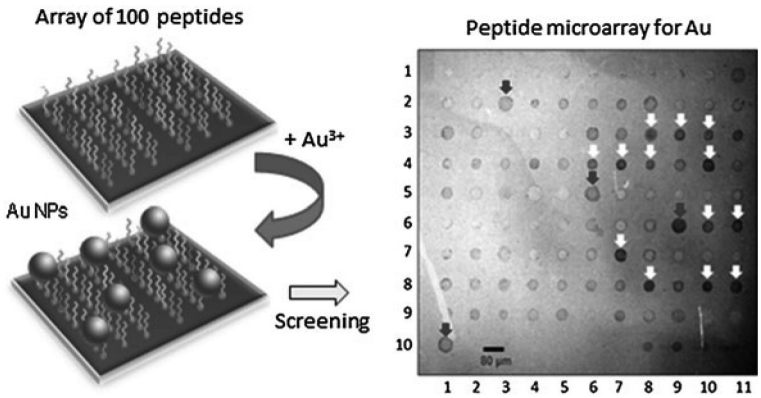
رسیدن به این هدف که با استفاده از روش‌های با بازده‌ی بالا متصل شونده‌های قوی به پپتید را شناسایی کنیم، تنها قسمتی از چالش پیش روی ما است؛ اما خواسته‌ی ما، قابلیت بیشینه ساختن، تنظیم کردن و بهبود خواص مواد از طریق متعادل کردن گرایش نانوذرات متصل‌شـــونده به پپتید و شـــرایط روند آزمایش است. بالاخره، بیشینه ســـاختن خواص نانوذره کاملا تجربی است و شامل تست کردن تعداد بسیار زیادی از مجموعه‌های پپتیدی شناسایی شده از نمایش فاژی با استفاده از آزمایش‌های آزمون و خطا جهت کیفیت اتصال داده‌شده درکنار متصل‌شونده‌های قوی پپتیدی است.

1. In situ monitoring

با این وجود، این روند منجر به تولید خواص نوری جدید در طلا، با استفاده از پپتید متصل شونده به طلا شـــده اســـت (Slocik و همکاران 2011)، نزدیک به ۴۰٪ افزایش استحکام استیل ضدزنگ وابسته به پپتید سنتزی کوتاهی می‌باشد که در باکتری‌ها شناسایی شد (Chiu و همکاران 2011) و خواص کاتالیزورهای نانویی با فعالیت بالا توسط یک پپتید متصل شونده به پالادیوم که در فصل‌های بعد توضیح داده می‌شود، بهبود بخشیده شده است (Coppage و همکاران 2013).

ایـــن مثال‌ها، فواید ذاتی میانکنش‌های پایدار پپتید-نانوذره را روشـــن می‌ســـازد؛ البته با این پیش‌آگاهی اســـت که میانکنش قوی پپتید-نانوذره، همیشه نانوذراتی با ویژگی‌های بهتر و بالاترین فعالیت را نمی‌سازد. از این‌رو، شناسایی نانوذرات با اتصالات قوی به پپتید که با روش نمایش فاژی به دســـت آمد، لزوما یک معیار مناسب برای اینکه آیا یک پپتید می‌تواند الگویی برای سنتز نانوذره باشد یا خواص نانوذره را به میزان زیادی بهبود بخشد، نیست. در واقع، تعداد بسیار زیادی توالی‌های پپتیدی متصل‌شونده از کتابخانه‌های پپتیدی نمایش فاژی جداسازی شده‌اند که فاقد فعالیت الگویی و یا خواص کمتر از ایده آل هستند. با این‌حال، این پپتیدها توالی اولیه‌ای را برای غنی‌سازی بیشتر، جهت تنظیم و ارتقای خصوصیات و اتصال پیشـــنهاد می‌دهند. از ســـوی دیگر، گرایش بیشتر برای اتصال به پپتید و اختصاصیت برای مولکول زیستی هدف جهت کاربردهایی مثل توسعه‌ی بیوسنسور یا عوامل اتصال نانوذره‌ها بر روی سطح ضروری خواهد بود.

توانایی دست‌کاری و کنترل آرایش، تجمع، جای‌گیری، چگالی سطحی و ساختار این پپتیدها بر روی سطح نانومواد مورد تقاضا بدون استفاده از تکنیک‌های الگو نیز چالش برانگیز است. برای مثال، توالی‌های پپتیدی را پیدا کرده‌ایم که با تمایل بالایی به لبه یا سطح گرافن متصل می‌شوند (kim و همکاران ۲۰۱۱). قرارگرفتن پپتیدها در نواحی مختلف (لبه یا ســـطح) بر روی صفحه‌ی گرافن منجر به حالت‌های الکترونیکی متفاوت سطحی و مقاومت می‌شود. در مثالی مشابه، اثر اتصال پپتید بر روی خواص الکترونیکی سطوح نیمه‌رسانا توسط Ashkenasy و همکاران بررسی شد (۲۰۱۲). آنها نشان دادندکه یک توالی پپتیدی دوازده‌تایی می‌تواند خواص الکترونیکی گالیوم-آرسنایید (GaAs) را با اثرات دوقطبی و توزیع دوباره‌ی بار الکتریکی براساس محل قرارگیری و نوع زیرواحد آمینواسیدی موجود در ســـطح پپتید متصل افزایش دهد. همچنین، از طریق جایگزینی نسبی پپتیدهای متصل شونده به گرافیت، می‌توانیم انوع وسیعی از ساختارهای پپتیدی خودتجمع مختلف را با خصوصیات شیمیایی ســـطحی متفاوت در سطح گرافیت داشته باشیم (So و همکاران،۲۰۱۲). در این مطالعه از اتصالات پپتیدی برای کنترل خصوصیات شـــیمیایی سطح گرافن استفاده شد و توانستند سطح هیدروفیل را با تغییر در توالی آمینو اســـیدها به ســـطح هیدروفوب تغییر دهند. (Khatayevichو همکاران ۲۰۱۲).



شـــکل ۳-۱ جداســازی ریزآرایه‌ی پپتیدی برای ســنتز و اتصال نانــوذره‌ی طلا. ریزآرایه‌ی پپتیدی توســط Thinkpeptides® ســاخته شد و شامل ۱۰×۱۰ آرایه‌ی پپتیدی تصادفی و منتخب از پپتیدهای ۱۲تایی متصل شــونده به طلا می‌باشد که توســط یک توالی فاصله‌دهنده‌ی Gly-Gly-Gly در انتهای c، بر روی یک پایه از جنس شیشه در دسته‌های سه تایی تثبیت شده‌اند. برای جداسازی پپتیدهایی که توان سنتز نانوذره‌ی طلا را دارند، ریزآرایه‌ای با محلول آبی ۱mM از $HAuCl_4$ در بافر ۰/۱ مولار از HEPES با ph برابر ۷/۴ برای ۲ ساعت انکوبه شد. ریزآرایه‌ی پپتیدی از محلول نمک طلا برداشته شد و توسط آب دوبار یونیزه‌شده، به مدت ۱۰ دقیقه مکررا شسته شد. ریزآرایه‌ی پپتید برای ســنتز نانوذره‌ی طلادربرسی شد و توسط استریومیکروسکوپ Leica با بزرگنمایی ۲۰× با تابش نور ســفید تصویربرداری شد (چاپ نشده است). فلش‌های آبی رنگ توالی محافظت شــده‌ی (TSNAVAPTLRHL) را نشان می‌دهند و فلش‌های ســفید توالی‌های پپتیدی منتخب را نشان می‌دهند که توانایی ارتقایافته‌ی سنتز نانوذره‌ی طلا را دارند.

۲-۲-۱ کنترل ساختار و ترکیب نانوذرات در طول‌های متفاوت

در طبیعت، سیستم‌های بیولوژیکی، سنتز و تجمع در مقیاس‌های طولی متفاوت را با استفاده از کنترل در ســطح ژنتیکی و مولکولی به آسانی انجام می‌دهند. برای سالیان سال، ما این خلقت را تحســین کرده‌ایم و سعی بر تقلید از این کنترل وسازماندهی داشته‌ایم. متاسفانه رسیدن به این هدف با استفاده از روش‌های تقلید زیستی[1] از طریق روش‌های پایین به بالا یا بالا به پایین، ترکیبی از الگوهای مختلف (مثل ترکیبات پپتیدی متصل شــده به پروتئین‌های بزرگتر، الگوهای اوریگامی DNA) و یا پپتیدهایی که مستعد خودتجمعی‌اند، مثل پپتیدهای دوگانه‌دوست (قبلا توضیح داده شده است) دشوار است. برای مثال، مولکول‌های زیستی مسئول تولید سیلیکای زیستی موجود در دیاتوم‌ها به خوبی مطالعه شــده‌اند اما تقلید از این روش برای تولید سیلیکای زیستی در آزمایشگاه با ســایز مشابه ســایز موجود در طبیعت ناموفق بوده است. این مساله نشانگر این است که نه تنها وجود بیومولکول‌های خاص برای این فرآیند مهم است، بلکه شرایط فیزیکی-شیمیایی نیز به همان اندازه برای تولید ساختارهای مشابه آنچه در دیاتوم‌ها و سایر سیستم‌های زیستی دیده می‌شود، حائز اهمیت است. با این حال، اولین قدم، درک قوانین حاکم بر نقش اسیدهای آمینه، توالی پپتیدی،

1. Biomimetic approaches

وزن مولکولی و مفهوم اتصالات مواد با یکدیگر و یا الگوسازی می‌باشد. برای مثال، نشان داده شده است که مقادیر وزن مولکولی متفاوت از پلی-ال-لایزین (PLL) [1] بر روی مورفولوژی ساختار سیلیکا تاثیرگذار است، وزن مولکولی بالای PLL ساختاری شش‌وجهی و وزن مولکولی پایین PLL، ذرات کـــروی ایجاد می‌کند (Tomczak و همکاران 2005). پپتیدهای اتصالی به ماده‌ی تجمع‌نیافته، به صورت بهینه بر روی نظام مقیاس اندازه‌ی نانومتر اثر دارد و اکثرا جهت تعادل رشـــد سطح کوچک نانوکریستال‌ها از جهت جهت‌یابی ترجیحی، کنترل اندازه‌ی نانوذرات از طریق محدودسازی رشد، و بهره‌مندی از عملکرد زیستی در سطح نانوذرات، استفاده می‌شود. عموما توانایی پپتیدهای کوچک در کنترل ســـاختار و ترکیب نانوذرات در ســـایزهای متفاوت (نانو تا میکرو و فراتر) به خاطر فقدان ســـاختار سه بعدی ذاتی است. این مساله در بسیاری از نانوذراتی که با پپتیدهای خاص الگوگذاری شده‌اند، دیده می‌شود.

۳-۲-۱ شناسایی میانکنش فاز زیستی با غیرزیستی

محدودیت دیگر برای طراحی پپتیدهای جدید متصل‌شونده به نانوذره، فقدان درک و شناسایی مکانیسم‌ها و واکنش‌های اتصالاتی است که منجر به تجمع و تشکیل ساختار این دو قسمت زیستی و غیرزیستی می‌شود. نتیجه‌ی این محدودیت‌ها با مقایسه‌ی کیفیت و ساختار مواد غیرآلی تولیدشده در آزمایشگاه با همتاهای زیستی آن‌ها کاملا مشهود است. برای مثال، ارگانیسم‌های دریایی قادر به تولید و کنترل معدنی‌شدن کریستال‌های بسیار سازمان‌یافته‌ی $CaCo_3$ با هندسه وشکل مشخص‌اند؛ اما در مقایســـه با نانوذرات رشد داده شده در آزمایشگاه، مبدا شروع و شکل‌های هندسی تصادفی دارند و خواص فیزیکی (نوری، مکانیکی، کاتالیتیکی) مشابه با آنچه در طبیعت دیده می‌شود را نشان نمی‌دهند. اگرچه تاکنون دســـت‌آوردهایی در درک مکانیســـم شکل‌گیری کریستال‌ها در آزمایشگاه (Killian و همکاران 2009) و همچنین ماکرومولکول‌های خاص و شـــرایط مورد نیاز برای رشـــد کلسیت به دست آمده اســـت (Aizenberg و همکاران 2002؛ Wang و همکاران، 2009)، با این وجود ما به طور کامل نمی‌دانیم که چگونه بیومولکول‌ها سنتز نانوذرات را الگودهی می‌کنند و یا آن‌ها را بر روی سطح خود سازمان‌دهی می‌کنند.

مطالعات زیادی در سرتاســـر جهان توســـط گروه‌های مختلف، شـــامل نویسندگان بخش‌های مختلف این کتاب انجام شـــده و در تلاش هســـتند تا از این قوانینی که شناسایی و الگو قرار دادن مواد زیستی را رهبری می‌کنند، پرده بردارند. دلایل این محدودیت‌ها شامل میانکنش‌های پیچیده بین کریستال و بیومولکول، تفاوت در توالی و ساختار بین پپتیدها، تنوع، تاثیرپذیری از شرایط روند آزمایش (دما، بافرها) و فقدان دســـتگاه‌های تشـــخیصی مناسب که در زیر بحث می‌شود، می‌باشد (Slocik 2010 و Naik). پیچیدگی روابط بین پپتیدها یا مولکول‌های زیســـتی دارای تنوع ساختار فضایی خصوصیات شـــیمیایی، قطبیت، کائرالیته، بارهای الکتریکـــی و تمایل اتصال در ترکیب با سطوح نانوکریستال متفاوتی که دارای شـــکل، حالت‌های اکسیداسیون، بار سطحی، جهت‌گیری

1. Poly-L-lysine (PLL)