



Design and Preparation of Photoluminescent Nanoparticles based on Chimeric Peptides- Graphene Quantum Dots for Nuclear Drug Delivery and Tracking

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Moasses Ghafary S.¹ PhD,
Nikkhah M.¹ PhD,
Hatamie Sh.² PhD,
Hosseinkhani S.^{*3} PhD

How to cite this article

Moasses Ghafary S, Nikkhah M, Hatamie Sh, Hosseinkhani S. Design and Preparation of Photoluminescent Nanoparticles based on Chimeric Peptides- Graphene Quantum Dots for Nuclear Drug Delivery and Tracking. Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(1):45-51.

¹Nanobiothechnology Department, Biological Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

²Institute for Nanoscience and Nanotechnology (INST), Sharif University of Technology, Tehran, Iran

³Biochemistry Department, Biological Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

*Correspondence

Address: Biochemistry Department, Biological Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Nasr Bridge, Jalel-Al-Ahmad Highway, Tehran, Iran.
Postal Code: 1411713116
Phone: +98 (21) 82884407
Fax: +98 (21) 82884485
saman_h@modares.ac.ir

Article History

Received: January 12, 2017

Accepted: August 30, 2017

ePublished: March 16, 2019

ABSTRACT

One of the main challenges in the treatment of genetic disorders, such as cancer, is inefficiency of drug delivery systems and their inability to monitor and track delivered drug to the targeted site. Therefore, the design of novel nanocarriers with dual capabilities of nuclear drug delivery and tracking have recently turned into a research priority for this field's scholars. The aim of this study is to design photoluminescence nanostructures based on both non-cytotoxic graphene quantum dots and chimeric peptides, with dual capabilities namely tracking and delivering small genetic agents into the nucleus. The GQDs with green emission color were synthesized by Hummer's and solvothermal methods and characterized by UV-Vis, photoluminescence (PL), Raman spectroscopies, and scanning electron microscopy (SEM). GQDs were conjugated with MPG-2H1 chimeric peptides through noncovalent interactions. Following conjugation step, the ζ -potential of the complex increased (From -38.6 to -11.1 in complex1, -9.6 in complex2 and -5.74 in complex3). The conjugation was confirmed by native acrylamide gel retardation assay. The cytotoxicity of the GQDs was investigated by MTT assay and finally, bioimaging was carried out. The results showed that MPG-2H1/ GQD complexes can enter cells; however, free-GQDs didn't enter the cells significantly.

Keywords Graphene Quantum Dots; Chimeric Peptide; Bioimaging; Tracking

CITATION LINKS

[1] Flavonoids as ... [2] Subcellular targeting strategies for drug design ... [3] Gene therapy -- promises, problems and ... [4] Vectors and delivery systems in gene ... [5] Viral and non-viral vectors in gene therapy: Technology development and clinical ... [6] Gene delivery using a derivative of the protein ... [7] SA designer biomimetic vector with a chimeric architecture ... [8] A short amino acid sequence able to specify nuclear ... [9] Development of novel recombinant biomimetic chimeric MPG-based peptide as nanocarriers for gene delivery: Imitation of a ... [10] Design and bioinformatics analysis of novel biomimetic ... [11] Applications for site-directed molecular imaging ... [12] Fluorescent labeling techniques in biomolecules ... [13] Chemical biology-based approaches on fluorescent ... [14] Chemical labeling strategies for cell ... [15] Fluorescence ... [16] Fluorescent dyes and their supramolecular ... [17] Semiconductor quantum dots for bioimaging ... [18] Synthesis and characterization of strongly ... [19] Focusing on luminescent graphene quantum ... [20] Graphene quantum dots: Emergent nanolights for bioimaging, sensors, catalysis and photovoltaic ... [21] COptically tunable amino-functionalized graphene ... [22] Strongly green-photoluminescent graphene quantum dots for bioimaging ... [23] Fabrication of highly fluorescent graphene quantum ... [24] Graphene quantum dots conjugated albumin nanoparticles for targeted ... [25] Preparation of graphitic ... [26] Gram-scale synthesis of single-crystalline graphene quantum dots ... [27] Fluorescent probes and fluorescence (microscopy) ... [28] Synthesis of strongly fluorescent graphene quantum ... [29] Luminescent graphene quantum dots for organic ... [30] Bottom-up fabrication of photoluminescent graphene quantum ... [31] An electrochemical avenue to green-luminescent graphene quantum dots as potential electron-acceptors ... [32] Graphene quantum dots derived from carbon ... [33] Facile synthesis of water-soluble, highly fluorescent graphene quantum dots as a robust biological label for ... [34] Enhancing cell nucleus accumulation and DNA cleavage activity of anti-cancer drug ... [35] Nanoparticle-mediated systemic delivery of siRNA for treatment of cancers and ... [36] Targeted delivery and controlled release of doxorubicin into cancer cells using a multifunctional graphene ... [37] Motif-designed peptide nanofibers decorated with graphene quantum dots for simultaneous targeting and imaging of ...

طراحی و تهیه نانوذرات فتولومینسنت مبتنی بر پپتیدهای کایمریک- نقاط کوانتومی گرافن به منظور انتقال عوامل دارویی به درون هسته سلول و ردیابی آنها

سروش موسس غفاری PhD

گروه نانوبیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

مریم نیکخواه PhD

گروه نانوبیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

شادی هاتمی PhD

پژوهشکده علوم و فناوری نانو، دانشگاه صنعتی شریف، تهران، ایران

سامان حسینیانی* PhD

گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

چکیده

یکی از چالش‌های اصلی درمان بیماری‌ها با نقص ژنتیکی از جمله سرطان، انتقال ناکارآمد مولکول‌های دارویی و عدم توانایی آشکارنمودن و ردیابی داروی انتقال‌یافته به جایگاه هدف است. بنابراین یافتن نانوحامل‌هایی با اثرات دوگانه انتقال دارو به هسته و ردیابی مولکول درمانگر، اخیراً در اولویت تحقیقاتی محققان این حوزه قرار گرفته است. هدف از این مطالعه، طراحی نانوذرات فتولومینسنت مبتنی بر نقاط کوانتومی گرافن فاقد سمیت و پپتیدهای کایمریک MPG-2H1 با قابلیت دوگانه ورود عوامل ژنتیکی کوچک به درون هسته و ردیابی آنها است. در این مطالعه نقاط کوانتومی گرافن (GQD) دارای رنگ نشری سبز توسط روش هامر و *سالوترمال* سنتز شدند و از طریق اسپکتروسکوپی‌های UV-Vis، فتولومینسنت (PL)، رامان و میکروسکوپی SEM مورد بررسی قرار گرفتند. GQD ها از طریق میان‌کنش‌های غیرکوالان به پپتیدهای کایمریک MPG-2H1 متصل شدند. اتصال به پپتید سبب تغییر پتانسیل زتا به مقادیر مثبت‌تر شد (از $-38/6$ - به $11/1$ - در کمپلکس $1/9$ - در کمپلکس $2/5$ - در کمپلکس 3). نتایج سنجش تأخیری ژل آکریل امید حاکی از برقراری اتصال بین پپتید و GQD است. سمیت سلولی GQD و MPG-2H1 توسط سنجش MTT بررسی و در نهایت تصویربرداری سلولی انجام شد. نتایج حاکی از پتانسیل بالای ورود کمپلکس‌های فاقد سمیت MPG-2H1/GQD به سلول بود، در حالی که GQD های آزاد ورود چشمگیری به درون سلول نشان ندادند.

کلیدواژه‌ها: نقاط کوانتومی گرافن، پپتیدهای کایمریک، تصویربرداری زیستی، ردیابی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۰/۲۳

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۶/۰۸

*نویسنده مسئول: saman_h@modares.ac.ir

مقدمه

انتقال هدفمند عوامل ژنتیکی به هسته سلول، می‌تواند مهم‌ترین نقش را در درمان بیماری‌های متعدد با نقص ژنتیکی ایفا نماید. هسته به‌عنوان مرکز کنترل سلول یوکاریوت، دارای مکانیزم قدرتمندی در تنظیم بیان ژن و سایر فرآیندهای سلولی از طریق عبور انتخابی پروتئین‌ها بین هسته و سیتوپلاسم است. با وجود پتانسیل بالای داروهای متعدد شامل مولکول‌های آنتی‌سنس و انواعی از پپتیدهای درمانگر برای مهار همانندسازی یا کاهش و مهار رونویسی ژن‌های مهم درگیر در انواع بیماری‌های ژنتیکی مختلف، هنوز هم انتقال موثر این داروها به درون هسته سلول چالش مهمی به شمار می‌آید^[1, 2]. بنابراین یافتن یک مولکول حامل (وکتور) مناسب و ایمن با کارایی بالا به‌منظور واردکردن عوامل درمانگر به هسته سلول‌های هدف، مهم‌ترین و اساسی‌ترین مرحله برای درمان موثر بیماری‌ها با اختلال ژنتیکی به شمار می‌آید^[3]. مولکول‌های حامل باید دارای قابلیت حمل دارو،

محافظت از آن در برابر تخریب بیولوژیک، جذب سلولی مناسب و قابلیت رهایش موثر آن به همراه عدم تحریک سیستم ایمنی و سمیت سلولی باشند تا بتوانند در انتقال عوامل ژنتیکی به‌طور کارآ و موثر عمل کنند^[4]. عمده‌تأ حامل‌ها به دو دسته کلی حامل‌های ویروسی (ویروس‌های نوترکیب) و غیرویروسی (سنتتیک) تقسیم‌بندی می‌شوند. ویروس‌های نوترکیب دارای قابلیت عبور از سد‌های سلولی از جمله غشای سلول، اندوزوم‌ها و غشای هسته هستند و می‌توانند سبب انتقال عوامل ژنتیکی با کارایی بالا به سلول‌های هدف شوند، اما استفاده از آنها به‌علت سمیت، تحریک سیستم ایمنی و امکان بازگشت به حالت بیماری‌زایی تا حد زیادی محدود شده است^[5]. بنابراین امروزه حامل‌های غیرویروسی از جمله لیپیدهای کاتیونیک و پلیمرها شامل پلی‌پپتیدها با سمیت و تحریک سیستم ایمنی پایین‌تر، با وجود کارایی انتقال کمتر، به‌عنوان جایگزین‌های ایمن‌تری برای حامل‌های ویروسی مطرح شده و توجه بسیاری از محققان را به خود جلب کرده‌اند^[6].

حامل‌های پپتیدی کایمریک مورد استفاده در انتقال عوامل ژنتیکی عمدتاً از سه "موتیف" مختلف با عملکردهای ویژه و به‌منظور غلبه بر سد‌های بیولوژیکی واقع در مسیر انتقال تا رسیدن به هسته سلول تشکیل شده‌اند^[7]. اولین موتیف، توالی پپتیدی حاوی اسیدهای آمینه دارای بار مثبت همچون لیزین و آرژنین به‌منظور اتصال و فشرده‌سازی عوامل اولیگونوکلوئیدی درمانگر با بار منفی است. نقش اصلی موتیف دوم که تحت عنوان فیوژن پپتید مطرح است، درهم‌ریختن غشای اندوزوم به‌منظور تسریع فرار اندوزومی به داخل سیتوزول است تا در برابر تجزیه توسط نوکلئازها و پپتیدازهای موجود در اندوزوم محافظت شوند. موتیف سوم سیگنال قرارگیری در هسته یا NLS است^[7]. این توالی به‌عنوان یک شناساگر در سطح در معرض پروتئین قرار گرفته و کار هدایت پروتئین مورد نظر را به سمت هسته، با کمک کمپلکس منفذ هسته (NPC) بر عهده دارد^[8]. در این مطالعه از نانوحامل‌های پپتیدی کایمریک از قبل طراحی‌شده در آزمایشگاه ما که متشکل از موتیف‌هایی شامل توالی ۱۶ مری از دمین C-ترمینال هیستون H1 با توالی "ATPKKSTKKTPKKAKK"، فیوژن پپتید MPG (مشتق از گلیکوپروتئین ۴۱ ویروس HIV) با توالی "GALFLGFLGAAGSTMGA" همراه با قطعه اتصال‌دهنده با توالی "WSQP" و NLS آنتی‌ژن T بزرگ ویروس (SV40) با توالی "KKKKRKV" استفاده شد (شکل ۱)^[9, 10]. با توجه به مطالعات قبلی در زمینه انتقال موثر عوامل درمانگر و با افزایش پیشرفت‌های صورت‌گرفته در حوزه نانوتکنولوژی و پیدایش استراتژی‌های مختلف ردیابی و تصویربرداری‌های مولکولی در دهه‌های اخیر، امکان ردیابی و القای اثرات درمانی عوامل ژنتیکی به‌طور همزمان فراهم شده است^[11]. با این وجود، امروزه یافتن حاملی که علاوه بر قابلیت حمل، انتقال و عبور از سد‌های سلولی بدون ایجاد سمیت و تحریک پاسخ ایمنی به همراه رهایش عوامل درمانگر درون هسته سلول، امکان ردیابی آن را نیز برای ارزیابی موفقیت‌آمیز این فرآیند فراهم کند، چالش بزرگی به شمار می‌آید. بنابراین، توسعه روش‌هایی کارآمد با دقت و حساسیت بالا به‌منظور تحقق‌بخشیدن به این مهم، می‌تواند در رفع چالش‌های کنونی موثر و گامی نویدبخش برای بهبود هرچه بیشتر این راهکارهای درمانی باشد. روش‌های فلورسنت برای تصویربرداری‌های مولکولی سریع، دقیق و حساس برهم‌کنش‌های بیومولکولی با قابلیت تفکیک‌پذیری در مقیاس نانومتر و حساسیت بالا بسیار مناسب هستند^[12]. بسیاری از مطالعات، کاربرد وسیع انواع عوامل

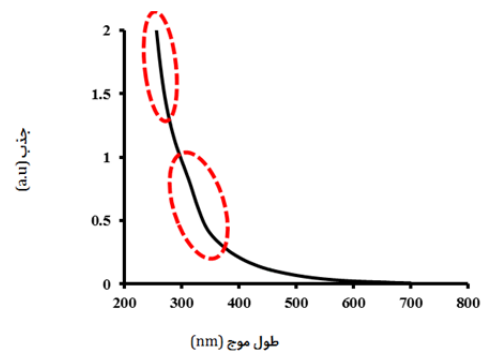
در سال‌های اخیر نقاط کوانتومی (QDs) در زمینه تصویربرداری زیستی و ردیابی، توجه بسیاری از محققان این حوزه را به خود جلب کرده است. QDs فاقد محدودیت‌های ذاتی فلوروفورهای آلی بوده و به‌عنوان ابزاری قدرتمند در ردیابی و تصویربرداری مولکولی در حوزه زیست‌شناسی مطرح شده‌اند^[17]، اما با وجود مطالعات متعدد انجام‌شده روی آنها، سمیت بالای QDs، کاربرد آنها را در حوزه بیولوژیک محدود کرده است^[18]. در سال‌های اخیر، تعدادی از QD ها تحت عنوان "QD های نوظهور" که فاقد یون‌های سمی هستند، مطرح شده‌اند. از مهم‌ترین این QD ها می‌توان به نقاط کربن (C-dots) و نقاط کوانتومی گرافن (GQDs) اشاره کرد که خصوصیات فتولومینسنت (PL) و زیست‌سازگاری بسیار خوب، پایداری نوری و شیمیایی بالا به همراه عدم سمیت و عامل‌دارشدن ساده آنها با مولکول‌های زیستی، این QD ها را به‌عنوان پروب‌های فلورسنت بسیار مناسب در تصویربرداری زیستی و ردیابی مطرح کرده است^[19, 20]. به‌طور کلی، دو راهکار بالا به پایین و پایین به بالا برای سنتز GQD ها وجود دارد^[21-23]. روش‌های بالا به پایین شامل برش مواد بزرگتر مبتنی برگرافن به GQD ها هستند، در حالی که روش‌های پایین به بالا شامل تهیه GQD ها از پیش‌سازهای ارگانیک کربنی شامل اتم‌های کربن کونژوگه است. اگرچه روش‌های پایین به بالا، امکان کنترل دقیق اندازه و مورفولوژی را فراهم می‌کنند، اما بسیار طاقت‌فرسا و پیچیده هستند. بنابراین، روش‌های بالا به پایین به دلیل ساده‌بودن و قابلیت تولید فراوان، بیشتر مورد توجه محققان قرار گرفته‌اند^[24]. در این مطالعه، GQD های دارای نشر سبزرنگ با استفاده از روش هاسر و سالوترمال به‌عنوان یکی از شناخته‌شده‌ترین روش‌های بالا به پایین سنتز شدند و برای اولین بار میان‌کنش‌های غیرکووالان آنها با پپتیدهای کایمیریک MPG-2H1 مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت کمپلکس‌های سنتز شده به سلول‌های HEK 293T به‌عنوان یک مدل سلولی انتقال و تصویربرداری سلولی انجام شد.

مواد و روش‌ها

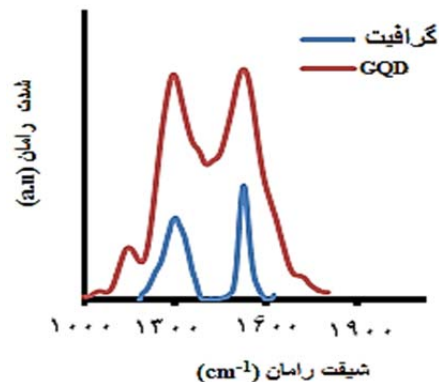
در مطالعه تجربی حاضر محیط کشت سلولی DMEM F12 و سرم جنین گاوی (FBS؛ گیبکو؛ ایالات متحده) استفاده شدند. همچنین کیت استخراج پلاسما و ستون تخلیص سفارز نیکل (Ni-NTA؛ کپژن؛ آلمان) و ایزوپروپیل-بتا-D-تیوگلاکتوپیرانوزید (IPTG؛ ویوانتیس؛ مالزی) به کار رفتند. کیسه دیالیز ۲/۵ کیلودالتون و متیل‌تیاژولیل دی فنیل-تترازولیوم (MTT؛ سیکما؛ ایالات متحده)، پودر گرافیت (با اندازه قطعات کمتر از ۲۰ میکرومتر)، پرمنگنات پتاسیم (KMnO_4)، سولفوریک اسید ۹۸٪، نیترات سدیم، هیدروژن پراکسید و دی‌متیل‌فورمامید (chemlab؛ بلژیک) نیز تهیه شدند.

بیان و تخلیص پپتید کایمیریک MPG-2H1: به‌منظور بیان پپتید کایمیریک MPG-2H1، ابتدا وکتور بیانی PET28a درون باکتری *E. coli* C41 (DE3) pLysS (نوآژن؛ ایران) ترانسفورم شد. سپس ۱۰ میلی‌متر از محیط لیزوژنی‌براث (LB) شامل کانامایسین ۵۰ میلی‌مولار با یک کلونی باکتری شامل پلاسما بیانی در 37°C در ۲۰۰ rpm به مدت ۱۶ ساعت انکوبه شد. سپس القا با IPTG (با غلظت نهایی ۰/۲ میلی‌مولار) انجام و در 37°C به مدت ۴ ساعت با ۲۰۰ rpm مخلوط شد تا چگالی نوری (OD) آن در طول موج ۶۰۰ نانومتر به ۰/۴ برسد. آنگاه سلول‌های باکتری با سانتریفیوژ در ۶۰۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه در 4°C رسوب

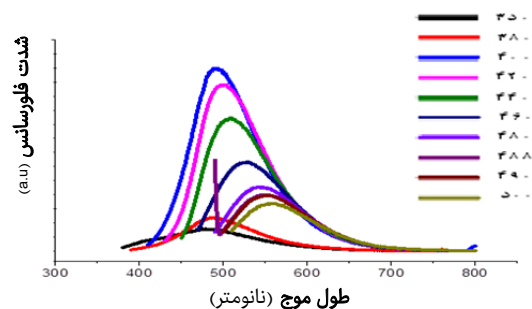
فلورسنت شامل فلوروفورهای آلی برای تصویربرداری زیستی و ردیابی بیومولکول‌ها را نشان داده‌اند^[13-15]. اگرچه آنها با نفوذ در ساختارهای بیولوژیکی، امکان نشان‌دارکردن بیومولکول‌ها بدون تغییر عملکرد و متعاقباً ردیابی آنها را فراهم می‌کنند، اما درخشندگی نسبتاً پایین، پایداری نوری کم، طیف فلورسانس نامتقارن و پهن به همراه پدیده چشمک‌زنی و نیز عامل‌دارکردن دشوار آنها، کارایی این عوامل فلورسنت را تا حد زیادی کاهش می‌دهد^[16].



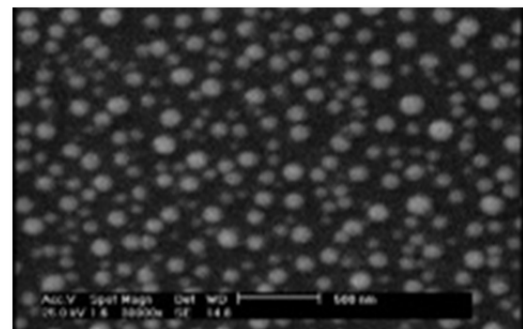
الف



ب



ج



د

شکل ۱) طیف جذب UV/Vis (الف)، طیف رامان (ب)، طیف فلورسانس (ج) تصویر میکروسکوپ الکترونی SEM (د) مربوط به GQD ها

غلظت‌های مختلف GQDs (۰/۸، ۴، ۸ و ۱۶ نانومول) از محلول استوک ۸۰۰ نانومولار با مقادیر متفاوت پپتید MPG-2H1 ترکیب شد. این مرحله روی یخ صورت گرفت. سپس، در دمای ۴°C تحت ورتکس کنترل شده به مدت ۱۲ ساعت قرار گرفت.

سنجش تأخیری ژل: ژل آکریل‌آمید Native ۱۵% برای بررسی حرکت الکتروفورتیک پپتید در کمپلکس‌های تهیه شده مورد استفاده قرار گرفت. از آنجایی که نقطه ایزوالکتریک پپتید حدود ۱۱ بود و در pH=۸/۴ دارای بار به شدت مثبت است، بنابراین جای دو قطب مثبت و منفی هنگام برقراری جریان الکتروفورز تعویض شد تا پپتید قادر به حرکت روی ژل باشد. سپس، از طریق رنگ‌آمیزی با تریپان بلو باند‌های پپتیدی روی ژل نمایان شدند.

تعیین ویژگی GQD ها: طیف UV-Vis مربوط به GQD ها توسط اسپکترومتر UV-Vis (Varian؛ کانادا) ثبت شد. طیف فلورسنس GQD ها توسط دستگاه سایتیشن مدل ۳ (Viotech؛ ایالات متحده) و طیف رامان توسط اسپکترومتر رامان مدل آلمگانیکولت XR (ترموفیشر؛ ایالات متحده) با طول موج لیزر ۵۳۲ نانومتر ثبت شدند. تصویر SEM از نمونه‌ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی مدل XL30 (فیلیپس؛ هلند) گرفته شد. پتانسیل زتای GQD ها و کمپلکس‌های تهیه شده توسط دستگاه نانوزتاسایزر مدل نانو ZS (مالورن؛ انگلستان) به دست آمد.

کشت سلولی: رده سلولی HEK 293T در محیط کشت DMEM F12 حاوی ۱% آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین (۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) / پنی‌سیلین (۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر) در دمای ۳۷°C و تحت ۵% دی‌اکسید کربن کشت و انکوبه شدند. تریپسین ۰/۲۵% برای جدا کردن سلول‌ها از ته فلاسک برای پاساژ آنها استفاده شد.

سنجش سمیت GQDs و پپتید MPG-2H1: سنجش MTT برای ارزیابی سمیت سلولی GQDs و پپتید MPG-2H1 مورد استفاده قرار گرفت. بدین منظور سلول‌های HEK 293T در فاز رشد در پلیت‌های ۹۶ چاهکی (2×10^4 cells/well) کشت داده شدند و غلظت‌های متفاوت GQDs (۰/۸، ۴، ۸ و ۱۶ نانومول) با سلول‌ها به مدت ۴۸ ساعت در ۳۷°C با ۵% دی‌اکسید کربن انکوبه شدند. مقدار ۱۰ میلی‌لیتر از محلول MTT (۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به هر چاهک اضافه و سلول‌ها به مدت ۴ ساعت دیگر انکوبه شدند. کریستال‌های فورمازان تشکیل شده توسط دی‌متیل سولفواکسید (۱۰۰ میکرولیتر) حل و جذب آنها توسط دستگاه خوانش الیزا مدل ELx800 (Biotek؛ ایالات متحده) در طول موج ۵۷۰ نانومتر ثبت شد.

تصویربرداری سلولی: میکروسکوپ فلورسنس به عنوان یک ابزار ارزشمند تصویربرداری فاقد اثرات مضر تکنیک‌های تصویربرداری رادیواکتیو، در علوم زیست پزشکی و بیولوژی به منظور تصویربرداری و ردیابی مطرح است [27]. در این مطالعه تصویربرداری نوری توسط میکروسکوپ فلورسنس برای نشان دادن حضور GQD ها فلورسنت در سلول‌های زنده به کار گرفته شد. برای این منظور، سلول‌های HEK 293T در پلیت‌های کشت سلولی کشت و در دمای ۳۷°C انکوبه شدند. کمپلکس‌های MPG-2H1/GQD با غلظت‌های متفاوت (جدول ۱) تهیه شدند و در ۴°C به مدت ۱۲ ساعت تحت ورتکس کنترل شده قرار گرفتند و سپس به چاهک‌های پلیت انتقال یافتند. پس از ۲۴ ساعت سلول‌ها سه بار توسط PBS شسته شدند. پس از این تصویربرداری سلولی توسط دستگاه سایتیشن مدل ۳ (Biotech؛ ایالات متحده) و در طول موج em: ۵۲۵ نانومتر، ex: ۶۹۰ نانومتر انجام شد.

داده شدند. رسوب سلولی در بافر لیز (تریس-باز ۲۰ میلی‌مولار، ۵۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم، اوره ۸ مولار و ایمیدازول ۵ میلی‌مولار (pH=۱۱) و به مدت یک ساعت تحت دمای ۲۰°C در ۲۰۰۰ rpm انکوبه شد. لیز سلولی حاصل دوبار به ترتیب در ۶۰۰۰ rpm و ۱۲۰۰۰ rpm در ۴°C به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس سوپ رویی به درون ستون سفارز Ni-NTA ریخته و به مدت یک ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. ستون با ۸ بافر شست‌وشو که به ترتیب گرادیان کاهشی اوره و افزایشی ایمیدازول را فراهم می‌کردند، شست‌وشو داده شد (تریس-باز ۲۰ میلی‌مولار، کلرید سدیم یک مولار، اوره ۶، ۷، ۸، ۹ و ۲ و صفر مولار و ایمیدازول ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۷۰ میلی‌مولار (pH=۸). گرادیان اوره برای حذف تدریجی اوره و متعاقباً فولدینگ مجدد پپتید MPG-2H1 اعمال شد. در نهایت بافر الوشن (تریس-باز ۲۰ میلی‌مولار، ۵۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم، و ایمیدازول ۲۵۰ میلی‌مولار (pH=۸) برای جدا کردن پپتید مورد نظر از رزین به ستون اضافه شد. پس از جمع‌آوری پپتید مورد نظر و مشاهده باند‌های پپتید روی ژل الکتروفورز سدیم دودسیل سولفات - پلی‌آکریل‌آمید (SDS-PAGE) ۱۵%، پپتید تخلیص شده توسط کیسه دیالیز (۲۵۰۰ دالتون) در مقابل بافر فسفات (pH=۷/۴؛ PBS) در ۴°C به مدت ۴۸ ساعت دیالیز شد. در نهایت پپتید دیالیز شده، در ۲۰°C - برای انجام مطالعات بیشتر نگهداری شد.

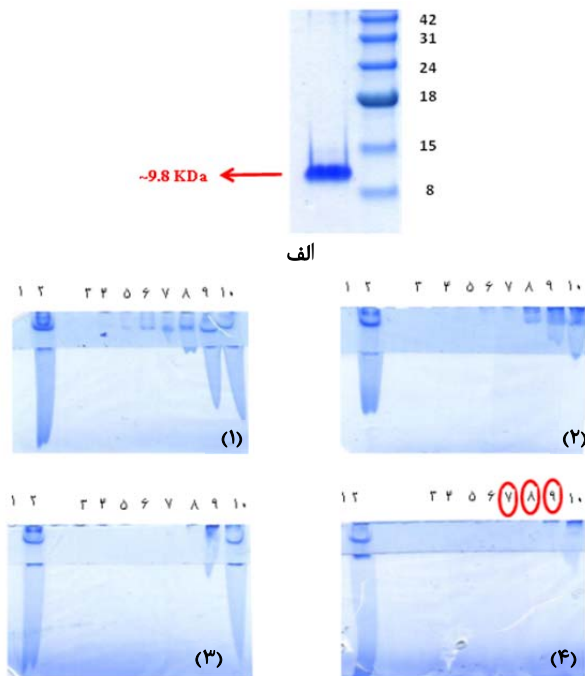
سنتز گرافن اکسید (GO): گرافن اکسید با استفاده از روش هامر سنتز شد [25]. مقدار ۰/۵ گرم از پودر گرافیت (با اندازه قطعات کمتر از ۲۰ میکرومتر) در ۲۳ میلی‌لیتر سولفوریک اسید ۹۸% در صفر درجه سانتی‌گراد معلق شد. سپس ۰/۵ گرم سدیم نیترات و ۳ گرم پتاسیم پرمنگنات به آن اضافه و محلول به مدت ۳ ساعت در ۳۵°C هم زده شد. در نهایت به آن ۴۰ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر اضافه و فرایند سنتز با افزودن یک محلول شامل ۱۰۰ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر و ۳ میلی‌لیتر پراکسید هیدروژن (۳۰%) ادامه یافت. سوسپانسون GO زرد رنگ فیلتر و با اسید هیدروکلریک و آب شست‌وشو داده شد (با نسبت حجمی یک به ۱۰ برای اسید هیدروکلریک و آب). فرایند شست‌وشو با استفاده از آب دوبار تقطیر چندین بار تکرار شد تا pH آن به حدود ۵ رسید، سپس نمونه‌ها برای پراکنده کردن صفحات GO به مدت ۴۰ دقیقه تحت امواج فراصوت قرار گرفتند (۱۰۰ کیلوهرتز، ۱۲۰ وات). سوسپانسیون به مدت ۳۰ دقیقه و در ۳۵۰۰ rpm برای حذف قطعات پراکنده نشده GO سانتریفیوژ شد.

تهیه GQD ها: محلول GO در دی‌متیل فرمامید (DMF) با غلظت ۲۷۰ میلی‌گرم بر ۱۰ میلی‌لیتر تهیه و به مدت ۳۰ دقیقه تحت امواج فراصوت (120 W, 100 kHz) قرار گرفت. سپس، به یک اتوکلاو تفلونی انتقال داده شده و به مدت ۵ ساعت در دمای ۲۰۰°C قرار گرفت. آنگاه محلول تا دمای اتاق سرد و فیلتر شد. سوسپانسون زرد متمایل به قهوه‌ای حاصل شده با استفاده از روتاری خشک و در آب معلق شد. این عمل چندین بار تکرار شد تا DMF سمی کاملاً از محلول خارج شود.

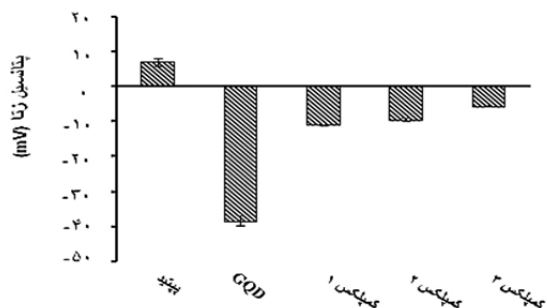
تعیین غلظت GQD ها: به منظور تعیین غلظت GQD ها، طیف جذبی آنها در محدوده UV-Vis توسط اسپکترومتر UV-Vis ثبت شد. سپس مطابق قانون بیر لامبرت، ماکزیمم جذب در طول موج ۳۲۰ نانومتر و ضریب جذب مولی GQD ها (10^4 الیتر بر مول سانتی‌متر) [26]، غلظت محلول GQD ها تعیین شد.

اتصال GQD ها به پپتیدهای کایمیریک MPG-2H1: ابتدا

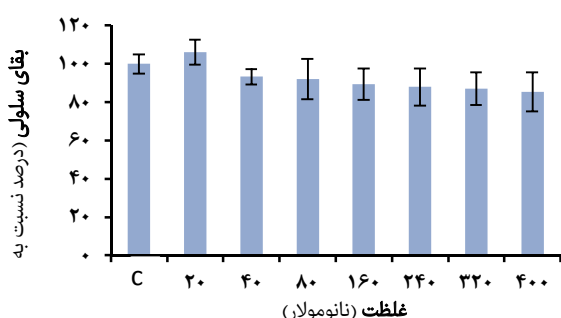
بررسی سمیت نانوذرات: نتایج به دست آمده از سنجش MTT نشان داد که GQDs تا غلظت ۴۰۰ نانومولار پس از گذشت ۴۸ ساعت سمیت معنی داری ندارند (نمودار ۲). پیش تر مشخص شده است که پپتیدهای MPG-2H1 در غلظت های به کاررفته و تا ۴۸ ساعت فاقد سمیت قابل توجهی هستند [9].



شکل ۲) پپتید تخلیص شده روی ژل SDS-PAGE ۱۵٪ (وزن مولکولی ۹/۸ کیلو دالتون) (الف)، تاخیر حرکتی پپتید روی ژل PAGE ۱۵٪ مربوط به نسبت های مختلف پپتید و GQD ها (براساس جدول ۱؛ ب)



نمودار ۱) پتانسیل زتای پپتید، GQD ها و کمپلکس های ۱، ۲ و ۳ که به ترتیب شامل ۱/۸۵، ۳/۷ و ۷/۴ میکروگرم پپتید و مقدار ۱۶ نانومول GQDs هستند.



نمودار ۲) سنجش بقای سلولی GQD ها در ۴۸ ساعت، C: نشانگر سلول های کنترل انکوبه شده در محیط کشت سلولی بدون GQD ها است.

جدول ۱) مقادیر متفاوت پپتید و GQD به کاررفته برای ایجاد کمپلکس های GQD/MPG-2H1

۱۰	۹	۸	۷	۶	۵	۴	۳	۲	۱
پپتید (میکروگرم)	۱۱/۱	۷/۴	۳/۷	۱/۸۵	۱/۴۸	۱/۱۱	۰/۷۴	۰/۳۷	۱۱/۱
GQD (نانومول)	۰/۸	۰/۸	۰/۸	۰/۸	۰/۸	۰/۸	۰/۸	۰/۸	۰/۸
پپتید (میکروگرم)	۱۱/۱	۷/۴	۳/۷	۱/۸۵	۱/۴۸	۱/۱۱	۰/۷۴	۰/۳۷	۱۱/۱
GQD (نانومول)	۰/۸	۰/۸	۰/۸	۰/۸	۰/۸	۰/۸	۰/۸	۰/۸	۰/۸
پپتید (میکروگرم)	۱۱/۱	۷/۴	۳/۷	۱/۸۵	۱/۴۸	۱/۱۱	۰/۷۴	۰/۳۷	۱۱/۱
GQD (نانومول)	۰/۸	۰/۸	۰/۸	۰/۸	۰/۸	۰/۸	۰/۸	۰/۸	۰/۸
پپتید (میکروگرم)	۱۱/۱	۷/۴	۳/۷	۱/۸۵	۱/۴۸	۱/۱۱	۰/۷۴	۰/۳۷	۱۱/۱
GQD (نانومول)	۰/۸	۰/۸	۰/۸	۰/۸	۰/۸	۰/۸	۰/۸	۰/۸	۰/۸

یافته ها

تعیین ویژگی GQD ها: اسپکتروسکوپی جذبی (UV/Vis) GQD های سنتز شده یک پیک جذبی را در ۳۲۰ نانومتر نشان داد که در ارتباط با انتقالات $\pi-\pi^*$ و یک پیک در ۲۳۰ نانومتر که در ارتباط با انتقالات $\pi-\pi^*$ است (شکل ۱- الف) که کاملاً مشابه با پیک جذبی GQD ها در مطالعات گزارش شده است [19].

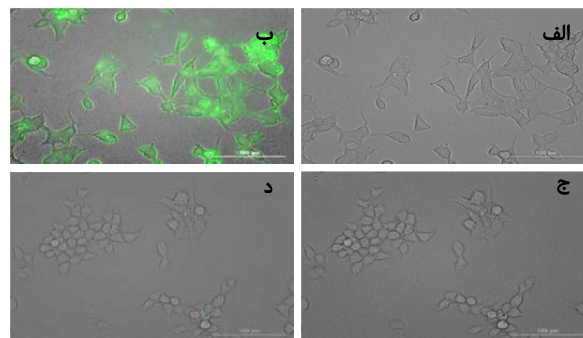
شکل ۱- ب اسپکتروم رامان GQD ها را نشان می دهد. مشابه مطالعات دیگر دو پیک اصلی نمایان شد (پیک D در 1350 cm^{-1} و پیک G در 1500 cm^{-1}) شدت نسبی پیک D به پیک G (I_D/I_G) برای GQD ها ۰/۹۷ و برای گرافیت ۰/۷۱ بود. نسبت (I_D/I_G) بالای GQD ها حاکی از وجود نقص های ساختاری در آنها است [28]. اسپکتروم PL مربوط به GQD های سنتز شده، PL وابسته به تحریک را نشان داد، به طوری که با افزایش طول موج تحریک از ۳۵۰ نانومتر به ۵۰۰ نانومتر، ماکزیمم پیک نشی از ۵۰۰ نانومتر به ۵۷۰ نانومتر تغییر یافت. فلورسنس سبز رنگ درخشان از محلول GQD ها تحت تابش نور UV مشاهده شد (شکل ۱- ج).

تصویر SEM نشان داد که متوسط اندازه GQD ها ۸۰ نانومتر است (شکل ۱- د).

بیان و تخلیص پپتید MPG-2H1: وجود دنباله هیستیدینی در انتهای کربوکسیلیک پپتید MPG-2H1 امکان تخلیص توسط ستون کروماتوگرافی تمایلی با رزین Ni-NTA را فراهم می کند. پس از بیان پپتید در باکتری *E. coli* C41(DE3) plyss تخلیص توسط رزین Ni-NTA تحت گردیان اوره انجام شد. شکل ۲- الف پپتید تخلیص شده را روی ژل SDS-PAGE ۱۵٪ نشان می دهد.

بررسی شکل گیری کمپلکس GQD/MPG-2H1: برای بررسی اولیه تشکیل کمپلکس های GQD/MPG-2H1 سنجش تاخیر ژل آکریل آمید انجام شد (شکل ۲- ب). نتایج نشان داد که افزودن مقادیر متفاوت از GQD ها (براساس جدول ۱) سبب تاخیر حرکتی متفاوت پپتید روی ژل می شود، به طوری که در نسبت های مربوط به شماره های ۷، ۸ و ۹ در جدول ۱ بیشترین میزان بازداری حرکتی پپتید با بیشترین مقادیر GQD ها مشاهده شد که حاکی از اتصال مطلوب GQD ها به پپتید است. این نسبت ها برای ادامه بررسی ها مورد استفاده قرار گرفتند و به ترتیب کمپلکس ۱، ۲ و ۳ نامگذاری شدند. برای بررسی بیشتر، پتانسیل زتای GQD های آزاد و کمپلکس های GQD/MPG-2H1 ثبت شد و نتایج نشان داد که اتصال پپتیدهای MPG-2H1 به GQD ها باعث تغییر پتانسیل زتای آن به مقادیر مثبت تر می شود (از $-38/6$ به $11/1$ در کمپلکس ۱، $9/6$ در کمپلکس ۲ و $5/74$ در کمپلکس ۳؛ نمودار ۱). همچنین نتایج نشان داد که اتصال MPG-2H1 به GQD ها موجب کاهش چشمگیری در شدت فلورسانس آن نمی شود (دیتا

تصویربرداری سلولی: به منظور بررسی ورود کمپلکس GQD/MPG-2H1 به درون سلول تصویربرداری سلولی انجام شد (شکل ۳). نتایج حاکی از ورود مقادیر بالای کمپلکس GQD/MPG-2H1 به سلول‌های HEK 293T بود. پس از آن به ترتیب کمپلکس‌های ۲ و ۱ ورود بالایی را به سلول‌ها نشان دادند. این در حالی است که مقادیر بسیار ناچیز GQD‌های آزاد توانستند به سلول‌ها وارد شوند که احتمالاً به دلیل بار منفی زیاد آنها است.



شکل ۳: تصاویر میکروسکوپ فلورسانس؛ (الف) تصویر زمینه تاریک (الف) و تصویر فلورسانس (em: ۵۷۵ نانومتر، ex: ۴۶۹ نانومتر) (ب) مربوط به سلول‌های انکوبه شده با کمپلکس GQD/MPG-2H1 شامل ۷/۴ میکروگرم پپتید و مقدار ۱۶ نانومول GQD (کمپلکس ۳)، تصویر زمینه تاریک (ج) و تصویر فلورسانس (د) مربوط به سلول‌های انکوبه شده با GQD

بحث

با وجود پیشرفت‌های صورت گرفته در زمینه انتقال عوامل ژنتیکی توسط انواع حامل‌های مختلف، هنوز هم فرآیند درمان با چالش‌هایی مواجه است که از مهم‌ترین آنها انتقال ناکارآمد و عدم توانایی ردیابی عوامل ژنتیکی انتقال یافته به منظور ارزیابی موفقیت آمیز درمان و آشکار نمودن انتقال موثر آنها به درون هسته است [3-6]. در مطالعه حاضر تلاش بر این بود که با به کارگیری GQD‌های فاقد سمیت و دارای خصوصیات فتولومینسنت منحصربه فرد و اتصال غیرکووالان آنها به پپتیدهای کایمیریک MPG-2H1، نانو ساختاری مناسب به منظور ردیابی و انتقال عوامل درمانی به درون هسته سلول طراحی شود. خصوصیات فتوفیزیکی GQD‌های سنتز شده با سایر GQD‌های سنتز شده در مطالعات پیشین مشابه است [22, 29-31]. تاکنون GQD‌ها به طور موفقیت آمیزی برای ردیابی سلول‌های T47D سرطان سینه به کار گرفته شده‌اند [32]. در مطالعه دیگری ردیابی سلول‌های بنیادی نوروبلاستوما (NSCs)، لوزالمعده (PPCs) و قلبی (CPCs) با GQDs در بازه زمانی ۲۴ ساعت انجام شده است [33]. براساس مطالعات ما، کمپلکس GQD/MPG-2H1 پس از ۶ ساعت شروع به ورود به درون سلول‌های HEK 293T کردند، در ۱۲ ساعت ورود سلولی بیشتر شد و در ۲۴ ساعت به بیشترین مقدار رسید. GQD‌های آزاد ورود چشمگیری به داخل سلول‌ها نشان ندادند که ممکن است به دلیل بار سطحی به شدت منفی آنها باشد. در حالی که با اتصال آنها به پپتیدهای کایمیریک MPG-2H1 و تشکیل کمپلکس‌های غیرکووالان

GQDs/MPG-2H1 به دلیل کاهش بار سطحی منفی GQD‌ها، توانستند به میزان بالایی وارد سلول‌ها شوند. در حالی که در مطالعه ژنگ و همکاران، نتایج به دست آمده از تصاویر میکروسکوپ کانفوکال حاکی از ورود GQD‌ها به درون سلول‌ها و مشاهده آنها در سیتوپلاسم است. به علاوه در مطالعه ما نیز مشابه مطالعه فوق

پس از چندین تکرار، تغییر شدت فلورسانس در تصاویر میکروسکوپی مشاهده نشد که نشانگر پایداری نوری بالای GQD‌ها در این سلول‌ها است. در ضمن GQDs فاقد اثرات سمیت سلولی (تا غلظت ۴۰۰ نانومولار) بودند [32, 33]. مطالعه دیگری GQD‌ها را به عنوان حامل‌هایی برای بهبود حلالیت، افزایش نیمه عمر و کاهش اثرات جانبی داروی دوکسوروبیسین (DOX) مطرح کرده است که منجر به افزایش تجمع هسته‌ای این داروی ضدسرطان شده است [34]. تاکنون چندین مطالعه روی انتقال عوامل ژنتیکی مبتنی بر گرافن انجام شده است، به عنوان مثال انتقال RNA مداخله گر کوتاه و داروی ضدسرطان DOX با استفاده از PEI متصل شده به GO که حاکی از افزایش کارایی RNA مداخله گر هستند [35, 36]. در این مطالعه برای اولین بار اتصال غیرکووالان پپتید کایمیریک MPG-2H1 با GQDs مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاکی از ورود کمپلکس‌های GQD/MPG-2H1 به سلول‌ها بود، در حالی که GQD‌های آزاد ورود قابل توجهی را به درون سلول‌ها نشان ندادند. با دانش ما، تاکنون فقط یک مطالعه دیگر مبنی بر استفاده از کمپلکس‌های GQD و ترکیبات پپتیدی برای تصویربرداری سلولی وجود دارد [37]. سو و همکاران [37]، مشابه نتایج ما، نشان داده‌اند که GQDs آزاد قادر به ورود به سلول‌ها نیستند، در حالی که GQDs متصل شده به نانوفایبرهای پپتیدی کایمیریک ورود قابل توجهی را به سلول‌های هلا نشان دادند.

با توجه به ویژگی‌های منحصر به فرد GQD‌ها با خصوصیات PL منحصربه فرد، آنها می‌توانند کاندیداهای مناسبی برای تصویربرداری مولکولی و ردیابی باشند و نانوکمپلکس‌های سنتز شده می‌توانند به عنوان ناو حامل‌های نویدبخشی با قابلیت دوگانه ورود به هسته و ردیابی عوامل درمانی مختلف از جمله مولکول‌های آنتی‌سنس و پپتیدهای درمانگر کوچک پیشنهاد شوند.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه، کمپلکس‌های مبتنی بر GQD‌ها و پپتیدهای کایمیریک MPG-2H1 سنتز شدند. سه موتیف سازنده پپتید MPG-2H1، امکان اتصال و فشرده سازی نوکلئیک اسیدها، فرار اندرومی و هدف گیری هسته سلول را فراهم می‌کنند و GQD‌های سنتز شده با خاصیت فلورسانس قابل توجه، امکان ردیابی عوامل دارویی را فراهم می‌کنند. نانوکمپلکس طراحی شده، می‌تواند به عنوان یک کاندیدای مناسب برای انتقال عوامل دارویی به هسته و ردیابی آنها مورد توجه باشد.

تشکر و قدردانی: نویسندگان مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس ابراز می‌دارند.

تأییدیه اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

تعارض منافع: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

سهم نویسندگان: سروش موسس غفاری (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۳۰٪)، مریم نیکخواه (نویسنده دوم)، روش شناس/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۲۰٪)، شادی هاتمی (نویسنده سوم)، روش شناس/پژوهشگر کمکی/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۲۰٪)، سامان حسینخانی (نویسنده چهارم)، روش شناس/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۳۰٪)

منابع مالی: منابع مالی تحقیق حاضر از محل اعتبار پژوهشی پایان نامه نویسنده اول تامین شده است.

- 2012;48(31):3686-99.
- 21- Tetsuka H, Asahi R, Nagoya A, Okamoto K, Tajima I, Ohta R, et al. Optically tunable amino-functionalized graphene quantum dots. *Adv Mater.* 2012;24(39):5333-8.
- 22- Zhu S, Zhang J, Qiao C, Tang S, Li Y, Yuan W, et al. Strongly green-photoluminescent graphene quantum dots for bioimaging applications. *Chem Commun (Camb).* 2011;47(24):6858-60.
- 23- Wu X, Tian F, Wang W, Chen J, Wu M, Zhao JX. Fabrication of highly fluorescent graphene quantum dots using L-glutamic acid for in vitro/in vivo imaging and sensing. *J Mater Chem C.* 2013;1(31):4676-84.
- 24- Nigam P, Waghmode S, Louis M, Wangnoo S, Chavan P, Sarkar D. Graphene quantum dots conjugated albumin nanoparticles for targeted drug delivery and imaging of pancreatic cancer. *J Mater Chem B.* 2014;2(21):3190-5.
- 25- Hummers Jr WS, Offeman RE. Preparation of graphitic oxide. *J Am Chem Soc.* 1958;80(6):1339.
- 26- Wang L, Wang Y, Xu T, Liao H, Yao C, Liu Y, et al. Gram-scale synthesis of single-crystalline graphene quantum dots with superior optical properties. *Nat Commun.* 2014;5:5357.
- 27- Drummen GP. Fluorescent probes and fluorescence (microscopy) techniques-illuminating biological and biomedical research. *Molecules.* 2012;17(12):14067-90.
- 28- Chua CK, Sofer Z, Šimek P, Jankovský O, Klímová K, Bakardjieva S, et al. Synthesis of strongly fluorescent graphene quantum dots by cage-opening buckminsterfullerene. *ACS Nano.* 2015;9(3):2548-55.
- 29- Gupta V, Chaudhary N, Srivastava R, Sharma GD, Bhardwaj R, Chand S. Luminescent graphene quantum dots for organic photovoltaic devices. *J Am Chem Soc.* 2011;133(26):9960-3.
- 30- Liu R, Wu D, Feng X, Müllen K. Bottom-up fabrication of photoluminescent graphene quantum dots with uniform morphology. *J Am Chem Soc.* 2011;133(39):15221-3.
- 31- Li Y, Hu Y, Zhao Y, Shi G, Deng L, Hou Y, et al. An electrochemical avenue to green-luminescent graphene quantum dots as potential electron-acceptors for photovoltaics. *Adv Mater.* 2011;23(6):776-80.
- 32- Peng J, Gao W, Gupta BK, Liu Z, Romero-Aburto R, Ge L, et al. Graphene quantum dots derived from carbon fibers. *Nano Lett.* 2012;12(2):844-9.
- 33- Zhang M, Bai L, Shang W, Xie W, Ma H, Fu Y, et al. Facile synthesis of water-soluble, highly fluorescent graphene quantum dots as a robust biological label for stem cells. *J Mater Chem.* 2012;22(15):7461-7.
- 34- Wang C, Wu C, Zhou X, Han T, Xin X, Wu J, et al. Enhancing cell nucleus accumulation and DNA cleavage activity of anti-cancer drug via graphene quantum dots. *Sci Rep.* 2013;3:2852.
- 35- Draz MS, Fang BA, Zhang P, Hu Z, Gu S, Weng KC, et al. Nanoparticle-mediated systemic delivery of siRNA for treatment of cancers and viral infections. *Theranostics.* 2014;4(9):872-92.
- 36- Lv Y, Tao L, Annie Bligh SW, Yang H, Pan Q, Zhu L. Targeted delivery and controlled release of doxorubicin into cancer cells using a multifunctional graphene oxide. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2016;59:652-60.
- 37- Su Z, Shen H, Wang H, Wang J, Li J, Nienhaus GU, et al. Motif-designed peptide nanofibers decorated with graphene quantum dots for simultaneous targeting and imaging of tumor cells. *Adv Funct Mater.* 2015;25(34):5472-8.
- 1- Sakhrani NM, Padh H. Organelle targeting: Third level of drug targeting. *Drug Des Devel Ther.* 2013;7:585-99.
- 2- Rajendran L, Knölker HJ, Simons K. Subcellular targeting strategies for drug design and delivery. *Nat Rev Drug Discov.* 2010;9(1):29-42.
- 3- Verma IM, Somia N. Gene therapy -- promises, problems and prospects. *Nature.* 1997;389(6648):239-42.
- 4- Gardlík R, Pálffy R, Hodosy J, Lukács J, Turna J, Celec P. Vectors and delivery systems in gene therapy. *Med Sci Monit.* 2005;11(4):RA110-21.
- 5- Lundstrom K, Boulikas T. Viral and non-viral vectors in gene therapy: Technology development and clinical trials. *Technol Cancer Res Treat.* 2003;2(5):471-86.
- 6- Min SH, Kim DM, Kim MN, Ge J, Lee DC, Park IY, et al. Gene delivery using a derivative of the protein transduction domain peptide, K-Antp. *Biomaterials.* 2010;31(7):1858-64.
- 7- Wang Y, Mangipudi SS, Canine BF, Hatefi A. A designer biomimetic vector with a chimeric architecture for targeted gene transfer. *J Control Release.* 2009;137(1):46-53.
- 8- Kalderon D, Roberts BL, Richardson WD, Smith AE. A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell.* 1984;39(3 Pt 2):499-509.
- 9- Majidi A, Nikkhah M, Sadeghian F, Hosseinkhani S. Development of novel recombinant biomimetic chimeric MPG-based peptide as nanocarriers for gene delivery: Imitation of a real cargo. *Eur J Pharm Biopharm.* 2016;107:191-204.
- 10- Majidi A, Nikkhah M, Sadeghian F, Hosseinkhani S. Design and bioinformatics analysis of novel biomimetic peptides as nanocarriers for gene transfer. *Nanomed J.* 2015;2(1):29-38.
- 11- Wang H, Chen X. Applications for site-directed molecular imaging agents coupled with drug delivery potential. *Expert Opin Drug Deliv.* 2009;6(7):745-68.
- 12- Sahoo H. Fluorescent labeling techniques in biomolecules: A flashback. *RSC Adv.* 2012;2(18):7017-29.
- 13- Jung D, Min K, Jung J, Jang W, Kwon Y. Chemical biology-based approaches on fluorescent labeling of proteins in live cells. *Mol Biosyst.* 2013;9(5):862-72.
- 14- Marks KM, Nolan GP. Chemical labeling strategies for cell biology. *Nat Methods.* 2006;3(8):591-6.
- 15- Sanderson MJ, Smith I, Parker I, Bootman MD. Fluorescence microscopy. *Cold Spring Harb Protoc.* 2014;2014(10):pdb.top071795.
- 16- Dsouza RN, Pischel U, Nau WM. Fluorescent dyes and their supramolecular host/guest complexes with macrocycles in aqueous solution. *Chem Rev.* 2011;111(12):7941-80.
- 17- Kairdolf BA, Smith AM, Stokes TH, Wang MD, Young AN, Nie S. Semiconductor quantum dots for bioimaging and biondiagnostic applications. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif).* 2013;6:143-62.
- 18- Hines MA, Guyot-Sionnest P. Synthesis and characterization of strongly luminescing ZnS-capped CdSe nanocrystals. *J Phys Chem.* 1996;100(2):468-71.
- 19- Li L, Wu G, Yang G, Peng J, Zhao J, Zhu JJ. Focusing on luminescent graphene quantum dots: Current status and future perspectives. *Nanoscale.* 2013;5(10):4015-39.
- 20- Shen J, Zhu Y, Yang X, Li C. Graphene quantum dots: Emergent nanolights for bioimaging, sensors, catalysis and photovoltaic devices. *Chem Commun (Camb).*