

## 条斑紫菜 R-藻红蛋白荧光探针制备条件优化

周 铭, 蔡春尔, 柳俊秀, 吴维宁, 何培民

上海水产大学农业部水产种质资源与养殖生态重点开放实验室, 上海 200090

**摘 要:** 通过化学方法使条斑紫菜 R-藻红蛋白与抗体进行交联以制备荧光探针, 并对制备条件进行优化。首先采用异双功能试剂 SPDP (N-琥珀酰亚氨基-3-2-吡啶基二硫丙酸醇) 和 DTT (二硫苏糖醇) 分别使 R-PE(R-藻红蛋白) 衍生化、IgG (单克隆抗体) 巯基化, 其次测定了 SPDP 与 R-PE 不同摩尔比对 R-PE 衍生化的影响、DTT 与 IgG 不同摩尔比对 IgG 巯基化的影响, 结果表明: SPDP 与 R-PE 的最佳摩尔比为 40:1, DTT 与 IgG 的最佳摩尔比为 500:1。在此基础上, 建立了 R-PE 与 IgG 交联的制备技术, 并应用全波长扫描吸收光谱、电泳分析和荧光显微镜观察等监测和分析技术, 证实了藻红蛋白与抗体已成功交联形成了复合物。

**关键词:** R-藻红蛋白, 单克隆抗体, 交联, 荧光探针, 制备, 条件优化

## Optimization of Fluorescence Probe Preparation for R-Phycoerythrin in *Porphyra yezoensis*

Ming Zhou, Chuner Cai, Junxiu Liu, Weining Wu, and Peimin He

Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Aquacultural Ecology Certificated by the Ministry of Agriculture, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China

**Abstract:** We optimized the chemical conjugation between R-phycoerythrin and antibody. First, the R-PE (R-phycoerythrin) was derived with heterobifunctional reagent SPDP(N-succinimidyl-3-2-pyridyldithio propionate) and antibody was thiolated with DTT(dithiothreitol). Second, we determined the effects of the different molar ratio of SPDP to R-PE for the derivation and DTT to IgG for the thiolation. The results showed that the optimum molar ratio of SPDP to R-PE for derivation was 40:1, and DTT to IgG for thiolation was 500:1. The conjugation between R-phycoerythrin and antibody was further done for fluorescence probe preparation. R-phycoerythrin was conjugated with IgG and formed a probe complex by whole wavelength scanning, electrophoresis (Native-PAGE) and fluorescence microscope observation.

**Keywords:** R-phycoerythrin, IgG, conjugation, fluorescence probes, preparation, optimization

藻胆蛋白是一类纯天然荧光物质, 包括藻红蛋白、藻蓝蛋白、别藻蓝蛋白和藻红蓝蛋白<sup>[1]</sup>, 它们作为荧光示踪物质, 正被广泛应用于免疫标记与肿瘤光动力治疗等领域<sup>[2]</sup>。特别是 R-藻红蛋白

**Received:** March 13, 2007; **Accepted:** June 11, 2007

**Supported by:** the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2006AAZ323), the Major Program of Shanghai Education Commission(No. 04KA01), the project of Dengshan Plan of Shanghai Science Commission (No. 06dz12015) and the Preponderant Subject Program of Shanghai Education Commission(No. Y1101).

**Corresponding author:** Peimin He. Tel: +86-21-65710023; Fax: +86-21-65710023; E-mail: pmhe@shfu.edu.cn

国家高技术研究与发展计划(863 计划)项目(No. 2006AAZ323)、上海市教委重点项目(No. 04KA01)、上海市科委登山计划项目(No:06dz12015)和上海市教委优势(重点)学科项目(No. Y1101)资助。

(R-Phycoerythrin, R-PE)因其极高的消光系数和量子产率,较大的STOKES位移,以及黄橙色特征荧光,可以避开多数生物环境中的内源荧光分子的干扰,制成的荧光探针的检测效果显著高于传统的荧光标记物<sup>[3]</sup>。但由于荧光探针制备工艺难度较大,所用的藻红蛋白及单克隆抗体的纯度要求又较高,使目前国内科研和医疗单位使用的PE荧光标记物完全依赖进口,成为限制其扩大应用的瓶颈<sup>[4]</sup>。

此外,虽然近年国内外对PE及荧光免疫检测的研究有一定的进展,但大多数还停留在实验室水平,且由于各实验所用材料的不同,因而导致在使用试剂的种类、用量及交联物的制备流程上都存在较大差异。本实验在前人研究基础上,以自制的高纯度条斑紫菜R-PE为材料,着重探讨了交联试剂与物质摩尔比对交联效果的影响,对整个交联过程进行了条件优化和质量跟踪,并初步制备了高纯度R-PE荧光标记的第二抗(羊抗兔抗体),为建立高质量、低成本且简便的荧光探针制备工艺奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

条斑紫菜的R-PE由上海水产大学生命学院藻类生物技术实验室制备和提供经非变性电泳检测其相对分子量约120 kD,其分离与纯化方法见文献<sup>[5]</sup>。羊抗兔IgG购自华美生物工程公司。

### 1.2 R-藻红蛋白脱盐与纯度检测

将R-PE用磷酸盐缓冲液透析脱盐,用紫外分光光度计(Ultrospec 2000型,Pharmacia公司)扫描测定其浓度和纯度,R-PE的浓度和纯度测定方法参见文献<sup>[5,6]</sup>。用Native-PAGE电泳检测其电泳纯度,方法参见文献<sup>[6]</sup>。

浓度计算公式为:

$$\text{浓度}(C) = 0.123A_{564\text{nm}} - 0.068A_{615\text{nm}} + 0.015A_{650\text{nm}}$$

(单位:mg/mL)

注: $A_{564\text{nm}}$ 、 $A_{615\text{nm}}$ 、 $A_{650\text{nm}}$ 分别为溶液在564 nm、615 nm、650 nm处的吸收值。

纯度计算公式为:

$$\text{纯度}_{(564\text{nm}/280\text{nm})} = A_{564\text{nm}} / A_{280\text{nm}}$$

注: $A_{564\text{nm}}$ 、 $A_{280\text{nm}}$ 分别为溶液在564 nm、280 nm处的吸收值。

### 1.3 藻红蛋白衍生化

采用异双功能试剂衍生化法,步骤参见文献<sup>[7]</sup>。R-PE溶液中分别加入适量SPDP(N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio) propionate N-琥珀酰亚氨基-3-(2-吡

啶基二硫丙酸醇)溶液避光振荡后脱盐去除未反应的SPDP,收集产物并用全波长扫描测定吸收光谱。取出适量衍生化的R-PE,加入DTT(dithiothreitol 二硫苏糖醇)溶液后全波长扫描测定吸收光谱,衍生化成功的R-PE会与DTT反应生成了2-硫醇吡啶将在 $A_{343\text{nm}}$ 产生特征吸收峰,故可以此特征吸收峰来检测衍生化效果及成功与否<sup>[8]</sup>。

### 1.4 抗体巯基化

抗体采用DTT巯基化法,步骤参见文献<sup>[7]</sup>。IgG溶液中加入适量DTT溶液低速振荡后脱盐柱未反应的DTT,收集产物并用全波长扫描测定吸收光谱。取出适量巯基化的抗体,加入DTNB(5,5'-Dithiobis 2-nitrobenzoic acid 二硫硝基苯甲酸)后全波长扫描测定吸收光谱,巯基化成功的IgG含有自由的巯基能与DTNB(二硫键相连的TNB)发生反应,释放出的生色物TNB将在412 nm产生吸收值,可以此吸收值来检测巯基化效果及成功与否<sup>[8]</sup>。

### 1.5 R-PE与抗体交联反应

R-PE与抗体交联反应:方法参见文献<sup>[9]</sup>。衍生化的R-PE与巯基化的IgG混合低速震荡过夜,采用NEM(N-Ethylmaleimide N-乙基马来酰亚胺)与自由巯基结合,终止交联反应<sup>[10]</sup>。

### 1.6 交联反应检测

硝酸纤维素膜(NC膜)荧光显微镜镜检方法参见文献<sup>[11]</sup>:以荧光抗体作为第二抗体,用1,5二磷酸核酮糖羧化酶(RUBISCO)作为第一抗体检测其交联效果。用荧光显微镜镜检(PH型,Olympus公司)。同时设置空白对照,并以SPDP衍生化藻R-PE作阴性对照。

### 1.7 实验设计

#### 1.7.1 SPDP与R-PE摩尔比对R-PE衍生化效果影响

在等量的R-PE溶液中加入不同量的SPDP,使SPDP与R-PE摩尔比分别为0(空白对照)、2.5、5、10、20、40、80、160、320。按上述方法对R-PE衍生化,最后加入DTT后,全波长扫描测定吸收光谱。

#### 1.7.2 DTT与IgG摩尔比对于IgG巯基化效果的研究

在等量的IgG溶液中分别加入不同量的DTT,使DTT与IgG摩尔比分别为0(空白对照)、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、700、800。按上述方法对IgG巯基化,最后加入DTNB后,全波长扫描测定吸收光谱。

### 1.8 R-PE和IgG交联物的制备

按上述方法交联,其产物进行过柱分离纯化<sup>[12]</sup>:柱填料为Sephacryl S-300HR(排阻极限为400 kD,

Amersham Biosciences公司), 上样 0.5 mL, 洗脱液为 50 mmol/L PBS+150 mmol/L NaCl(pH 7.0), 洗脱速度 0.5 mL/min, 用核酸蛋白检测仪(DuoFlow型, Biologic公司)在线检测, 自动收集分离的交联产物, 根据所用填料的分子筛作用原理相对分子量大的物质最先流出。

## 2 结果

### 2.1 R-藻红蛋白衍生化与检测分析

R-PE与SPDP反应生成R-PE-PDP衍生物, 其全波长扫描吸收光谱见图 1。R-PE-PDP衍生物再与DTT反应生成了 2-硫醇吡啶(图 2), 与图 1 相比, 图 2 在A处( $A_{343\text{nm}}$ )明显具有吸收峰, 表明R-PE已成功被衍生化。

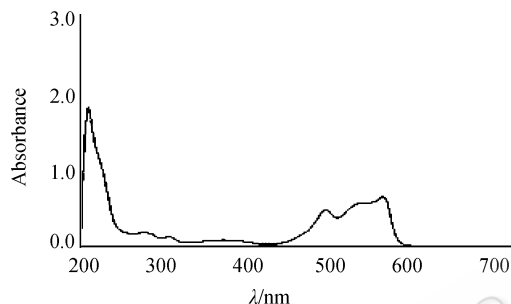


图 1 R-PE-PDP 衍生物全波长扫描吸收光谱  
Fig. 1 Absorption spectrum of R-PE-PDP

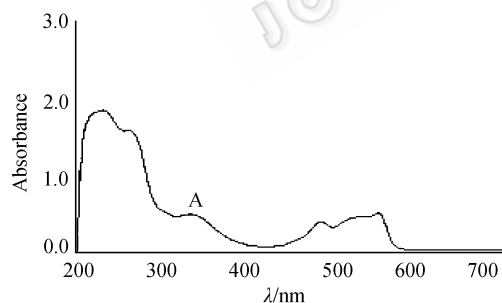


图 2 R-PE-PDP 加 DTT 后的全波长扫描吸收光谱  
Fig. 2 Absorption spectrum of R-PE-PDP+DTT

### 2.2 抗体巯基化与检测分析

IgG巯基化后的全波长扫描吸收光谱见图 3。巯基化后的IgG带有自由的巯基与DTNB发生反应释放出色物TNB(图 4), 与图 3 相比, 图 4 在B处( $A_{412\text{nm}}$ )明显具有吸收峰, 表明抗体IgG已成功巯基化。

### 2.4 DTT 与 IgG 摩尔比对于 IgG 巯基化的影响

实验结果见图 6。图 6 表明随着 DTT 与 IgG 摩尔比上升, 巯基活化率(自由巯基的摩尔数/IgG 摩尔

数)也相应增加。其中 DTT 与 IgG 摩尔比为 100~200 时, 巯基活化率增加幅度较快, DTT 与 IgG 摩尔比为 200~450 时, 巯基活化率增加幅度较缓和, DTT 与 IgG 摩尔比为 500 时, 巯基活化率基本上达到高峰, 随后均保持平缓状态, 说明 DTT 与 IgG 最佳摩尔比为 500。

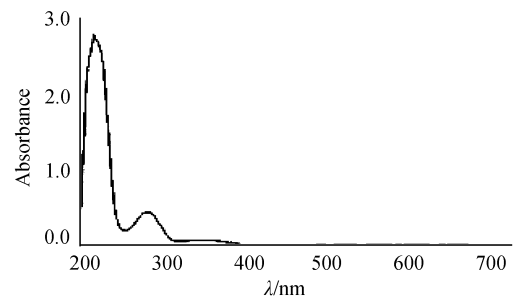


图 3 IgG 巯基化后全波长扫描吸收光谱  
Fig. 3 Absorption spectrum of IgG-SH

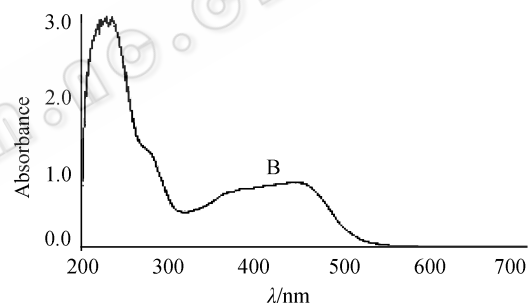


图 4 IgG 巯基化后加 DTNB 全波长扫描吸收光谱  
Fig. 4 Absorption spectrum of IgG-SH+DTNB

### 2.3 PDP 与 R-PE 摩尔比对 R-PE 衍生化的影响

实验结果见图 5。从图中看出, 随着 SPDP 与 R-PE 摩尔比(2.5~40)提高, R-PE 上所引入的 PDP 数量也成正比例增加, 当 SPDP 与 R-PE 摩尔比为 40~80 时, PDP 数量不变化, 当 SPDP 与 R-PE 摩尔比为 160~320 时, PDP 数量大幅度下降, 可能是由于 SPDP 量过高导致 R-PE 部分变性所致。可见 SPDP 与 R-PE 最佳摩尔比为 40。

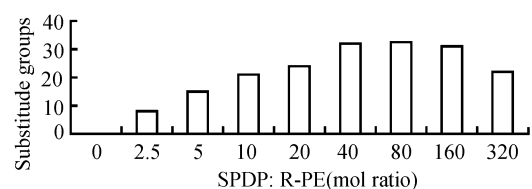


图 5 代基团数和 SPDP 与 R-PE 摩尔比的关系  
Fig. 5 The relationship of SPDP:R-PE(mol ratio) and substitute groups

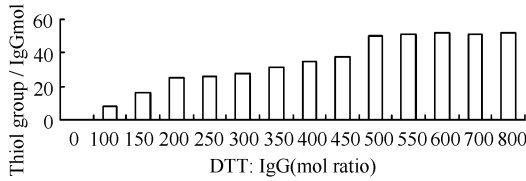


图 6 巯基活化率和 DTT 与 IgG 摩尔比的关系

Fig. 6 The relationship between DTT: IgG (mol ratio) and thiol group mol/IgG mol

### 2.5 R-藻红蛋白与抗体交联产物的制备

用以上 SPDP 与 R-PE 的最佳摩尔比(40:1)和 DTT 与 IgG 的最佳摩尔比(500:1), 分别将 R-PE 衍生化和 IgG 巯基化, 再将 R-PE 和 IgG 混合获得交联产物, 经柱层析洗脱出 3 个蛋白峰(E、F、G, 图 7), 分别收集并进行检测。根据所用填料的分子筛作用原理 R-PE、IgG 和交联物分子量分别为 120 kD, 160 kD 和 280 kD, 相应的吸收峰分别为 G、F 和 E。

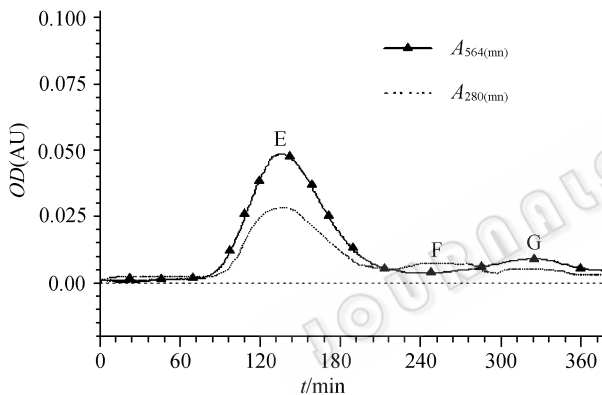


图 7 A<sub>280nm</sub>和A<sub>565nm</sub>下的凝胶过滤层析图

Fig. 7 Gel filtration profile of A<sub>280nm</sub> and A<sub>565nm</sub>

#### 2.5.1 全波长扫描吸收光谱检测分析

图 8 为本实验室从条斑紫菜叶状体分离纯化的 R-PE全波长扫描吸收光谱, 其纯度( $OD_{560}/OD_{280}$ )达到 4.6 以上。图 9 为羊抗兔IgG全波长扫描吸收光谱, 其浓度为 18 mg/mL。图 10 为R-PE与IgG交联产物全波长扫描吸收光谱, 其中C处( $A_{280nm}$ )为IgG特征吸收峰, D处为R-PE特征峰, 说明其交联产物确实为 R-PE与IgG结合物。

#### 2.5.2 Native-PAGE 图谱检测分析

Native-PAGE 图谱显示纯化的 R-PE(120 kD 图 11, P 泳道)、羊抗兔 IgG(160 kD 图 11, A 泳道)均只有一条带(图 11), 而根据图谱显示 R-PE 与羊抗兔 IgG 交联产物的分子量约为 280 kD(图 11, P-A 泳道), 与预计大小相符。

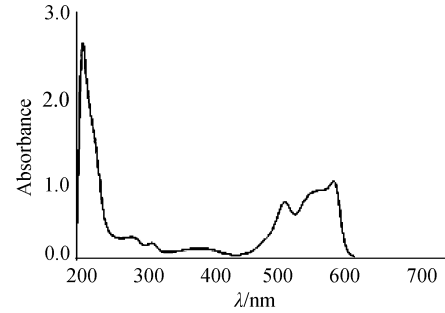


图 8 R-PE 全波长扫描吸收光谱

Fig. 8 Absorption spectrum of R-PE

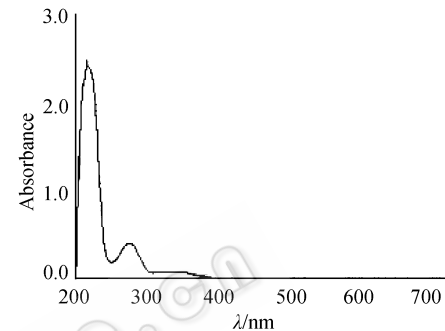


图 9 IgG 全波长扫描吸收光谱

Fig. 9 Absorption spectrum of IgG

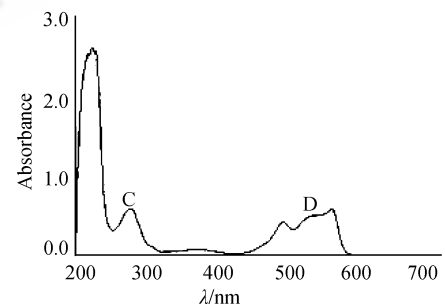


图 10 交联产物全波长扫描吸收光谱

Fig. 10 Absorption spectrum of the conjugation

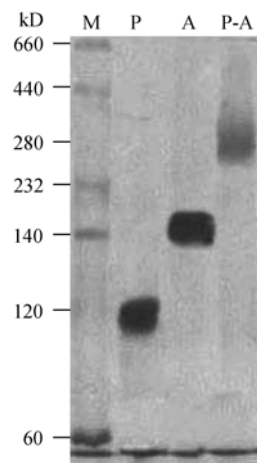


图 11 Native-PAGE 电泳图谱

Fig. 11 Native-PAGE map

M: mark protein; P: R-PE; A: IgG; P-A: products of conjugation between R-PE and IgG

### 2.5.3 免疫荧光显微镜检测

图 12-A 和图 12-B 分别为载玻片和 NC 膜上的条斑紫菜 R-PE 在荧光显微镜下的彩色图象, 表明其荧光特性良好, 可用于荧光标记检测。图 12-C、D、E 分别是荧光标记抗体检测的空白对照、阴性对照和检测样品在荧光显微镜下的彩色图象, 阴性对照与空白对照一样, 均为 NC 膜底色, 说明未与抗体交联的衍生化 R-PE 无法与 NC 膜上的第一抗体结合, 而被缓冲液洗出。而待检测样品出现橙红色荧光斑(图 12-E), 说明制备的 R-PE 荧光标记抗体具有很好免疫抗性及特异性。

## 3 讨论

确定一套既方便又可行的交联方法是 R-PE 荧光

探针制备过程中的关键所在。从现有的关于藻胆蛋白交联的文献来看, 主要存在二种方法即王广策等(2004)所用的高碘酸钠和戊二醛交联法(同功能试剂法)<sup>[13]</sup>与 Murphy JT(1997)<sup>[6]</sup>所用的异双功能试剂法。通过实验发现前者在交联物的制备过程中是把二种不同的蛋白一起混合再与交联试剂反应, 因此所得的交联产物可能是多种物质的聚合物, 特别是戊二醛在制备过程中对 R-PE 荧光性质影响较大, 所以不太适合 R-PE 荧光探针的制备<sup>[14]</sup>。而与此相比异双功能试剂 SPDP、SMCC 等, 因为其采用的是分步交联的方法, 所制得的交联产物是均一性好易于分离纯化并能很好地保持产物的活性<sup>[15]</sup>, 所以在国内外被普遍应用于荧光探针的制备。

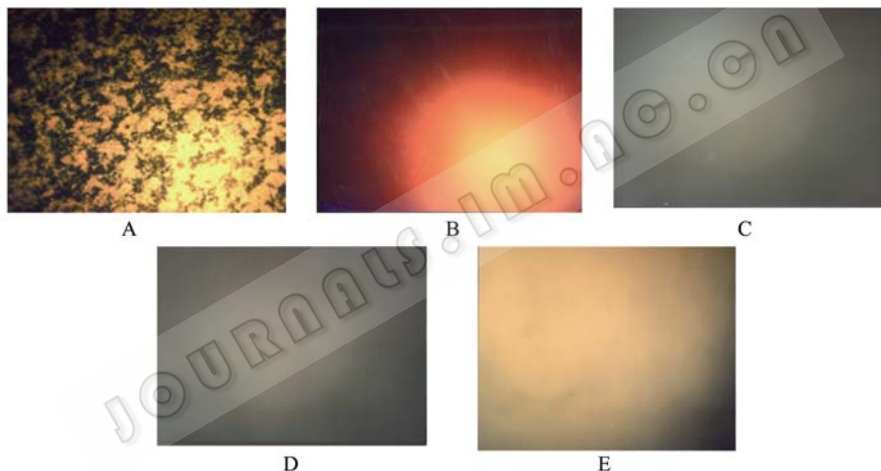


图 12 荧光显微镜检测

Fig. 12 The detection of fluorescence microscope

A: fluorescence of R-PE (glass slide); B: fluorescence of R-PE (NC membrane); C: Contrast of NC membrane; D: R-PE-PDP detects antibody (NC membrane); E: fluorescence probes of R-PE detect antibody (NC membrane)

但由于各实验所用的材料的不同, 在使用试剂的种类和用量上都存在较大差异。本试验结合所用 R-PE 与羊抗兔 IgG 的性质, 选择了用 SPDP 衍生化 R-PE 用 DTT 巯基化 IgG 的组合。其不但可以定性分析以检测 R-PE 衍生化与 IgG 巯基化是否成功, 以便进行下一步的交联反应, 同时还可以对引入的 PDP 与巯基进行定量分析<sup>[16,17]</sup>。因此, 通过实际检测和计算就可确定各种试剂较为合适的用量, 从而在保证交联物产率与活性的基础上简化交联物的制备流程。

此外, SPDP 与 R-PE 摩尔比对于 R-PE 衍生化的效果有很大的影响, 过高的摩尔比不仅对 R-PE 的性质有影响而且对于异双功能试剂来说也是种浪费, 而

摩尔比过低又会降低 R-PE 衍生化的效果, 所以须确定一个较佳的摩尔比<sup>[18]</sup>。本实验结果显示 SPDP 与 R-PE 摩尔比为 1:40 较为合适, 但与顾铭等(2000)<sup>[9]</sup>的结果 1:80 有所不同, 其主要原因在于本实验用的 R-PE 是实验室自制的其相对分子量约 120 kD, 而后者所用的藻红蛋白相对分子量为 240 kD。因而可初步推测出随着蛋白相对分子量的降低所用的异双功能试剂的量也有所下降, 当然对于藻红蛋白的相对分子量具体是如何影响异双功能试剂在衍生化时所用的浓度, 还有待于进一步地研究。

同时为了提高 DTT 对于 IgG 的巯基化的效果, 对 DTT 与 IgG 摩尔比进行梯度比较, 以确定最佳摩

尔比。其中过高的摩尔比不仅对IgG的活性有影响而且对于试剂来说也是种浪费,而摩尔比过低又会降低IgG的巯基化的效果<sup>[19]</sup>,所以确定在DTT与IgG摩尔比 100:1 到 800:1 这一范围内进行讨论。结果发现 DTT与IgG摩尔比在 500:1 时巯基化效果最为理想。

综上所述,本文初步探讨了自制的高纯度藻红蛋白的荧光标记方法,通过一系列的比较实验初步确定高纯度的 R-PE 与 SPDP 按摩尔比为 1:40 进行衍生化,同时以 DTT 与 IgG 摩尔比为 500:1 进行巯基化,交联并过柱分离后所得的交联产物,具有良好的荧光强度和特异性。并已初步制成高纯度产品可作为桥抗与第一抗结合用于疾病诊断、免疫标记等医学领域。但对于如何降低交联过程中的反应物损失,提高交联率还有待进一步探讨。

## REFERENCES

- [1] Takao Furuki, Shuichi Maeda, Satoshi Imajo, *et al.* Rapid and selective extraction of phycocyanin from *Spirulina platensis* with ultrasonic cell disruption. *Journal of Applied Phycology*, 2003, **15**: 319–324.
- [2] Cai CE, Wu QL, He PM *et al.* Advance of phycoerythrin as a photosensitizer. *Letters in Biotechnology*, 2004, **15**(6): 629–632.  
蔡春尔, 吴庆磊, 何培民, 等. 藻红蛋白光敏剂研究进展. *生物技术通讯*, 2004, **15**(6): 629–632.
- [3] Nicole Baumgarth, Mario Roederer. A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping. *Journal of Immunological Methods*, 2000, **243**(1): 77–97.
- [4] Wu P. Phycobiliprotein and immunofluorescence assay. *Progress in Physiological Sciences*, 2000, **31**(1): 81–84.  
吴萍. 藻胆蛋白与荧光免疫分析. *生理科学进展*, 2000, **31**(1): 81–84.
- [5] Wang GC, Zhou BC, Zen CK. Purification of C-phycocyanin from *spirulina platensis* and R-phycoerythrin from *polysiphonia urceolata* and determination of their molar extinction coefficient. *Marine Sciences*, 1996, **1**: 52–55.  
王广策, 周百成, 曾呈奎. 钝顶螺旋藻 C-藻蓝蛋白和多管藻 R-藻红蛋白的分离纯化及摩尔消光系数的测定. *海洋科学*, 1996, **1**: 52–55.
- [6] Cai CE, Wu QL, He PM. Extraction and Purification of R-Phycoerythrin in *Porphyra yezoensis*. *Letters in Biotechnology*, 2005, **16**(5): 518–521.  
蔡春尔, 吴庆磊, 何培民. 条斑紫菜 R-藻红蛋白提纯工艺研究. *生物技术通讯*, 2005, **16**(5): 518–521.
- [7] Murphy JT, Lagarias JC. The phytofluors: A new class of fluorescent protein probes. *Current Biology*, 1997, **7**(11): 870–875.
- [8] Harmanson GT. Bioconjugate techniques. USA Academic Press, 1996, 45–180.
- [9] Gu M, Wu P, Qi YH, *et al.* R-Phycoerythrin fluorescence labeled antibody. *Journal of Cellular and Molecular Immunology*, 2000, **16**(5): 434–435.  
顾铭, 吴萍, 戚艺华, 等. R-藻红蛋白荧光标记单克隆抗体的研制. *细胞与分子生物学杂志*, 2000, **16**(5): 434–435.
- [10] Oi VT, Glazer AN, Stryer L. Fluorescent phycobiliprotein conjugates for analyses of cells and molecules. *Cell Biology*, 1982, **93**: 981–986.
- [11] Wu P, Gu M, Qi YH, *et al.* Result of phycobiliprotein immunofluorescence assay for serum HBsAg detection. *Immunological Journal*, 2000, **16**(6): 460–462.  
吴萍, 顾铭, 戚艺华, 等. 藻胆蛋白免疫荧光法检测血清 HBsAg 的初步结果. *免疫学杂志*, 2000, **16**(6): 460–462.
- [12] Kronick MN. The use of phycobiliproteins as fluorescent labels in immunoassay. *Immunol Meth*, 1986, **92**(1): 1–13.
- [13] Wang GC, Ma SY, Cen CK. Characterization of the artificially covalent conjugate of B-phycoerythrin and R-phycocyanin and the phycobilisome from *Porphyridium cruentum*. *Progress in Biochemistry and Biophysic*, 2004, **31**(3): 273–276.  
王广策, 马圣媛, 曾呈奎. 高碘酸钠和戊二醛交联法构建的 R-藻红蛋白-C-藻蓝蛋白交联物能量传递效率的比较研究. *生物化学与生物物理进展*, 2004, **31**(3): 273–276s.
- [14] Ma SY, Wang GC, Sun HB, *et al.* Characterization of the artificially covalent conjugate of B-phycoerythrin and R-phycocyanin and the phycobilisome from *Porphyridium cruentum*. *Plant Science*, 2003, **164**(2): 253–257.
- [15] Alyona Sukhanova, Jérôme Devy, Lydie Venteo, *et al.* Biocompatible fluorescent nanocrystals for immunolabeling of membrane proteins and cells. *Analytical Biochemistry*, 2004, **324**(1): 60–67.
- [16] Takizawa F, Kinet JP, Adamczewski M. Binding of phycoerythrin and its conjugates to murine low affinity receptors for immunoglobulin G J. *Immunol Meth*, 1993, **162**: 69–272.
- [17] Yoshitake S, Imagawa M, Ishckan E, *et al.* Mild and efficient conjugation of rabbit Fab and horseradish peroxidase using a compound and its use for enzyme immunoassay. *J Biochem Tokyo*, 1982, **92**(5): 1413–1424.
- [18] Murphy JT, Lagarias JC. The phytofluors: A new class of fluorescent protein probes. *Current Biology*, 1997, **7**(11): 870–875.
- [19] Goldman ER, Balighian ED, Mattoussi H, Kuno MK, Mauro JM, Tran PT, Anderson JP. Avidin: a natural bridge for quantum dot-antibody conjugates. *J Am Chem Soc*, 2002, **124**: 6378–6382.