

## B 细胞膜 CD20 抗原的分布与单分子力谱探测

王秋兰<sup>1</sup>, 卢育洪<sup>2</sup>, 李盛璞<sup>1</sup>, 王牡<sup>1</sup>, 蔡继业<sup>1</sup>

1 暨南大学化学系, 广州 510632

2 暨南大学附属第一临床医院血液科, 广州 510632

**摘要:** CD20 抗原分子在 B 细胞上表达下降是慢性 B 淋巴细胞白血病 (B-CLL) 的标志性特征。采用激光扫描共聚焦显微镜 (LSCM) 和量子点标记相结合的方法对正常和 B-CLL 外周血 CD20<sup>+</sup>B 淋巴细胞膜表面 CD20 抗原分子的表达及分布进行了荧光成像。同时, 采用原子力显微镜 (AFM) 对 CD20<sup>+</sup>B 细胞的形貌及超微结构特征进行了表征, 并且将 AFM 针尖用生物素化的单克隆抗体进行修饰, 对 CD20<sup>+</sup>B 细胞表面的 CD20 抗原-抗体之间的单分子力谱进行了探测。LSCM 荧光图像显示, B-CLL CD20<sup>+</sup>B 淋巴细胞上 CD20 分子的表达量比正常 CD20<sup>+</sup>B 淋巴细胞显著降低。AFM 结果显示, B-CLL CD20<sup>+</sup>B 淋巴细胞超微结构比正常的粗糙。力谱结果显示, CD20 抗原-抗体的相互作用力大约是非特异性黏附力的 5 倍, CD20 分子在正常 CD20<sup>+</sup>B 淋巴细胞膜上分布比较均匀, 小部分有聚集现象, 反之, 在 B-CLL CD20<sup>+</sup>B 淋巴细胞膜表面分布稀疏。利用以上两种方法能进一步观察到 B-CLL 外周血 B 淋巴细胞的异常, 并在一定程度上解释临床上 B-CLL 病人对利妥昔的低反应现象, 为针对抗原 CD20 的治疗用药选择提供参考。

**关键词:** B-CLL, 外周血 CD20<sup>+</sup>B 淋巴细胞, CD20 分子, LSCM, AFM

## Distribution and force spectroscopy of CD20 antigen-antibody binding on the B cell surface

Qiulan Wang<sup>1</sup>, Yuhong Lu<sup>2</sup>, Shengpu Li<sup>1</sup>, Mu Wang<sup>1</sup>, and Jiye Cai<sup>1</sup>

1 Department of Chemistry, Jinan University, Guangzhou 510632, China

2 Department of Internal Medicine, First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou 510632, China

**Abstract:** The lower expression of CD20 antigen molecules on the B cell membrane is the primary characteristic of B-chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). In this paper, we combined laser scanning confocal microscopy (LSCM) and quantum dots labeling to detect the expression and distribution of CD20 molecules on CD20<sup>+</sup>B lymphocyte surface. Simultaneously, we investigated the morphology and ultrastructure of the B lymphocytes that belonged to the normal persons and B-CLL patients through utilizing the atomic force microscope (AFM). In addition, we measured the force spectroscopy of CD20 antigen-antibody binding using the AFM

**Received:** April 23, 2010; **Accepted:** June 12, 2010

**Supported by:** National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2010CB833603), National Natural Science Foundation of China (No. 30872404).

**Corresponding author:** Jiye Cai. Tel/Fax: +86-20-85223569; E-mail: tjycail@jnu.edu.cn

国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2010CB833603), 国家自然科学基金 (No. 30872404) 资助。

tips modified with CD20 antibody. The fluorescent images indicated that the density of CD20 of normal CD20<sup>+</sup>B lymphocytes was much higher than that of B-CLL CD20<sup>+</sup>B cells. The AFM data show that ultrastructure of B-CLL CD20<sup>+</sup>B lymphocytes became more complicated. Moreover, the single molecular force spectroscopy data show that the special force of CD20 antigen-antibody was four times bigger than the nonspecific force between the naked AFM tip and cell surface. The force map showed that CD20 molecules distributed homogeneously on the normal CD20<sup>+</sup>B lymphocytes, whereas, the CD20 molecules distributed heterogenous on B-CLL CD20<sup>+</sup>B lymphocytes. Our data provide visualized evidence for the phenomenon of low-response to rituximab therapy on clinical. Meanwhile, AFM is possible to be a powerful tool for development and screening of drugs for pharmacology use.

**Keywords:** B-chronic lymphocytic leukemia (B-CLL), peripheral blood CD20<sup>+</sup>B lymphocytes, CD20 molecule, laser scanning confocal microscopy (LSCM), atomic force microscope (AFM)

CD20 分子是一种在细胞周期起始和细胞分化过程中起重要作用的膜蛋白,它在正常 B 淋巴细胞及大部分 B 细胞恶性淋巴瘤膜表面均有明显表达,这为抗 CD20 抗体的免疫靶向治疗提供了基础。利妥昔单抗是一种嵌合鼠/人的单克隆抗体,该抗体可与纵贯细胞膜的 CD20 抗原特异性结合。已经有报道用利妥昔治疗慢性淋巴细胞增殖性疾病<sup>[1-3]</sup>,但是在临床上 B-CLL 病人对利妥昔治疗出现低反应现象<sup>[4]</sup>,除其他因素外,肿瘤细胞的 CD20 抗原密度可能是影响治疗效果的因素<sup>[5-6]</sup>。一直以来,表征细胞表面抗原密度最常用的是流式细胞仪,流式表征正常和 B-CLL B 细胞表面 CD20 抗原密度的研究结果表明<sup>[7-12]</sup>,CD20 在 B-CLL B 细胞上的表达比在正常 B 细胞上的表达还要低,这为解释 B-CLL 对利妥昔治疗出现低反应提供了一定的依据。

AFM 已经被广泛应用于生物领域中,并作为研究解决生物问题的有力工具。利用 AFM 可以在细胞水平上对样品进行成像<sup>[13-15]</sup>。随着对 AFM 功能的深入研究,目前可以利用原子力显微镜空间和力谱高分辨的独特优势,通过细胞和功能化针尖之间抗原抗体的相互作用或受体配体相互作用,来探测蛋白分子间作用力及细胞表面蛋白分子的分布<sup>[16-21]</sup>,这方面研究已经成为国内外研究的新热点。对此,本课题组也有相关的报道<sup>[22-24]</sup>。本文首次尝试结合共聚焦显微镜和原子力显微镜对人正常和慢性淋巴白血体外周血单个 B 淋巴细胞表面的 CD20 抗原的分布情况进行分析和比较,为临床上针对 CD20 分子

治疗的药物选择提供一定的参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂和仪器

淋巴细胞分离液购自 AXIS SHIELD PoC AS 公司;RPMI1640 培养液购自 Gibco 公司;CD20<sup>+</sup>微珠和 MS 柱购自 Mihenyi Biotech 公司;链霉亲和素偶联发射中心波长 655 nm (红色)的量子点 (QD565) 购自 Sigma 公司;其他所用的试剂皆为分析纯,实验用水为三次蒸馏水。Zeiss 激光共聚焦扫描荧光显微镜 (LS M510, Zeiss, 德国);原子力显微镜 (Autoprobe CP Research, Thermomicroscopes 公司, 美国);免疫磁珠分选仪 (Mihenyi Biotech 公司, 德国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 外周血取样

B 慢性淋巴白血病人外周血取自暨南大学附属第一临床血液科,正常外周血取自健康志愿者。

#### 1.2.2 单个核细胞分离

分别抽取健康人和 B-CLL 病人新鲜外周血,加肝素钠抗凝,用密度梯度离心法分离获得外周血单个核细胞。具体如下:以等体积 RPMI1640 培养液稀释肝素抗凝血,小心铺在细胞分离液之液面上(稀释液:淋巴细胞分离液为 2:1),2 000 r/min 离心 15 min,收集环状乳白色淋巴细胞层,单个核细胞沉淀经 RPMI1640 培养液反复洗 2 次即得所需细胞。

### 1.2.3 免疫磁珠分选法分离 CD20<sup>+</sup>B 细胞

将得到的单个核细胞用 80  $\mu\text{L}$  的缓冲液对  $10^7$  个细胞进行重悬, 加入 20  $\mu\text{L}$  的 CD20 微珠, 混匀, 4  $^{\circ}\text{C}$ ~8  $^{\circ}\text{C}$  孵育 15 min, 加入 1 mL 缓冲液洗涤细胞, 1 500 r/min 离心 10 min, 完全去除上清, 用 500  $\mu\text{L}$  缓冲液重悬, 所得细胞悬液加入 MS 分选柱中, 收集先行流出的未标记细胞组分, 并用 500  $\mu\text{L}$  缓冲液冲洗 MS 柱, 重复 3 次, 此时收集到的悬液为 CD20 阴性细胞。将分选柱移出磁场, 于柱中加 1 mL 缓冲液, 并用活塞快速将分选柱上滞留的细胞洗脱下来, 这些细胞是磁性标记的 CD20 阳性细胞。由于慢淋病人外周血单个核细胞中 CD20<sup>+</sup>B 淋巴细胞占 90% 以上, 故无需进一步纯化<sup>[25]</sup>。

### 1.2.4 激光扫描共聚焦实验

使用 Zeiss 激光共聚焦扫描荧光显微镜对 CD20<sup>+</sup>B 淋巴细胞进行成像。将分离出的 CD20<sup>+</sup>B 淋巴细胞滴在经多聚赖氨酸处理的盖玻片上, 用 PBS 清洗 3 次, 4% (质量分数) 多聚甲醛固定 15 min, 再用 PBS 清洗 3 次, 加入 50  $\mu\text{L}$  10 mg/L 的生物素化的单克隆 CD20 抗体室温孵育 30 min, PBS 清洗除去过量的抗体, 加入 50  $\mu\text{L}$  1 mg/L 链霉亲和素 QD655 室温孵育 30 min, PBS 清洗除去过量的链霉亲和素 QD655, 封片, 对处理好的载玻片进行共聚焦成像。

### 1.2.5 针尖修饰

AFM 针尖修饰的过程<sup>[26-27]</sup>: 将 AFM 针尖 (UL20B 硅探针, 力常数为 0.9 N/m) 在乙醇溶液中浸泡 5 min, 紫外灯下辐照 30 min, 随后把针尖浸泡在 1 g/L 生物素化的牛血清白蛋白溶液中 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, 用 PBS 洗去过量的生物素化牛血清白蛋白溶液, 再将针尖浸泡在 1 g/L 链霉亲和素溶液中室温孵育 30 min, 用 PBS 洗去过量的链霉亲和素, 然后将针尖浸泡在 10 mg/L 生物素化抗人的 CD20 抗体溶液中 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, PBS 清洗过量的抗体, 最后将针尖浸泡在 PBS 溶液中 4  $^{\circ}\text{C}$  保存备用, 在空气中自然晾干使用。

### 1.2.6 AFM 样品制备

分别取正常和 B-CLL 外周血 B 淋巴细胞, 滴于玻片上, 使其自然铺展, 吸附 10 min, 然后用 4% 多聚甲醛固定 15 min, 用蒸馏水冲洗 3 次, 室温自然干燥。立即进行 AFM 扫描。

### 1.2.7 原子力显微镜扫描

将载有细胞样品的玻片固定在 AFM 的扫描台上, 用监视器定位所要扫描的样品区域, 对样品进行扫描成像, 实验采用 100  $\mu\text{m}$  扫描器, 空气中进行扫描, 以接触模式成像。所有图像仅经仪器配置软件 (Thermomicroscopes proscan image processing software version 2.1) 平滑处理, 以消除扫描方向上的低频背景噪音。原子力显微镜的力谱用于分析力曲线测量。所有的力曲线都是在同一加载速率下测量得到。

## 2 结果与分析

### 2.1 正常和 B-CLL 外周血 CD20<sup>+</sup>B 淋巴细胞的荧光成像

将量子点标记的细胞样品放在 LSCM 下观察, 得到量子点标记的外周血 CD20<sup>+</sup>B 淋巴细胞的激光共聚焦图像 (图 1), 其中 A 和 D 为荧光图, B 和 E 为微分干涉 (DIC) 图, C 和 F 为叠加图。由于 CD20<sup>+</sup>B 淋巴细胞携带 CD20 分子, 图 1A 和 1D 中细胞发红代表 CD20 抗原分子表达于该细胞上, 且分布在细胞膜表面, 核区未出现, 该实验结果进一步证实了所分离的细胞确为 CD20<sup>+</sup>B 淋巴细胞, 并且从图中可以明显看出 B-CLL 外周血 CD20<sup>+</sup>B 淋巴细胞表面 CD20 抗原分子表达量低于正常外周血 CD20<sup>+</sup>B 淋巴细胞。

### 2.2 正常和 B-CLL 外周血 CD20<sup>+</sup>B 淋巴细胞形态及 CD20 抗原-抗体特异性相互作用力的 AFM 分析

对正常和 B-CLL 外周血 CD20<sup>+</sup>B 淋巴细胞进行了 AFM 成像 (图 2A 和 2B), 高分辨的形貌图像显示正常外周血 CD20<sup>+</sup>B 淋巴细胞比较光滑, 而 B-CLL 外周血 CD20<sup>+</sup>B 淋巴细胞较粗糙。为了进一步探测

单个正常和 B-CLL 外周血 CD20<sup>+</sup>B 淋巴细胞表面受体分子即 CD20 的分布情况,我们对这 2 种淋巴细胞分别进行超微结构成像以达到定位的目的(图 2C 和 2D)。利用 AFM 力曲线测量的方法,在 1 μm×1 μm 的膜区域共测量了 256 条力曲线,分析检测这 2 种细胞的 CD20<sup>+</sup>B 淋巴细胞表面 CD20 抗原-抗体的特异性相互作用(图 3A 和 3B),图中白色的点代表该位置有很强的黏附力,这些可探测到黏附力的位置就是 CD20<sup>+</sup>B 淋巴细胞表面的 CD20 抗原分布,其中代表性的力曲线如图 3C (正常 B 淋巴细胞) 和 D (B-CLL B 淋巴细胞)。力曲线回收使 CD20<sup>+</sup>B 淋巴细胞表面 CD20 抗原和 CD20 抗体修饰的 AFM 针尖作用断裂。对照实验使用未修饰 CD20 抗体的针尖

对正常和 B-CLL CD20<sup>+</sup>B 淋巴细胞进行力曲线测量,发现 2 种细胞与针尖间均没有出现明显的作用力,具有代表性的力曲线如图 3E (正常 B 淋巴细胞) 和 F (B-CLL B 淋巴细胞)。这个结果说明了 CD20 抗原和对应抗体具有特异性和高亲和性,并且抗原-抗体特异性作用力约是非特异性 4 倍。对比图 3A 和 3B,发现 CD20 抗原在正常 CD20<sup>+</sup>B 淋巴细胞膜上的分布均匀,小部分有聚集现象,而在 B-CLL CD20<sup>+</sup>B 淋巴细胞膜上的分布相对要稀少,这与用 LSCM 观察到的结果一致。这很可能是因为,相对于正常外周血 B 淋巴细胞, B-CLL B 细胞是处在 B 淋巴细胞成熟的早期阶段,并且 CD20 在 B-CLL B 细胞表达下降是 B-CLL 的标志性特征<sup>[4]</sup>。

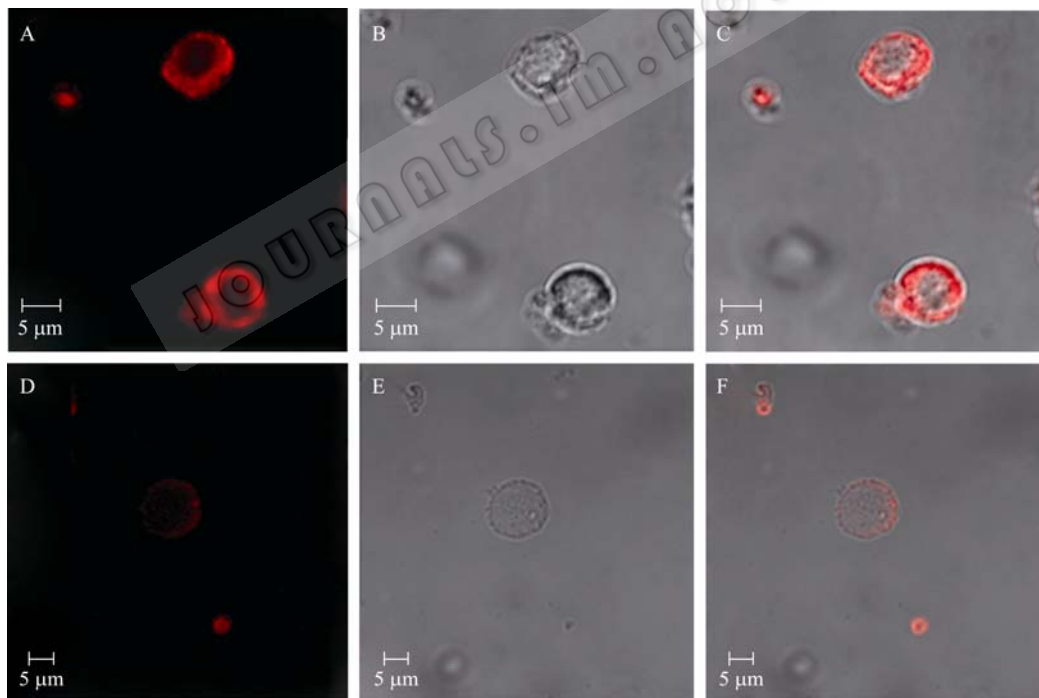


图 1 CD20<sup>+</sup>B 淋巴细胞 CD20 分子标记 QD655 激光扫描共聚图

Fig. 1 LSCM images of CD20 molecules of CD20<sup>+</sup>B lymphocytes labeled with QD655. (A) Fluorescence image of normal CD20<sup>+</sup>B lymphocyte. (B) DIC image of normal CD20<sup>+</sup>B lymphocyte. (C) Merged image of normal CD20<sup>+</sup>B lymphocyte. (D) Fluorescence image of B-CLL CD20<sup>+</sup>B lymphocyte. (E) DIC image of B-CLL CD20<sup>+</sup>B lymphocyte. (F) Merged image of B-CLL CD20<sup>+</sup>B lymphocyte.

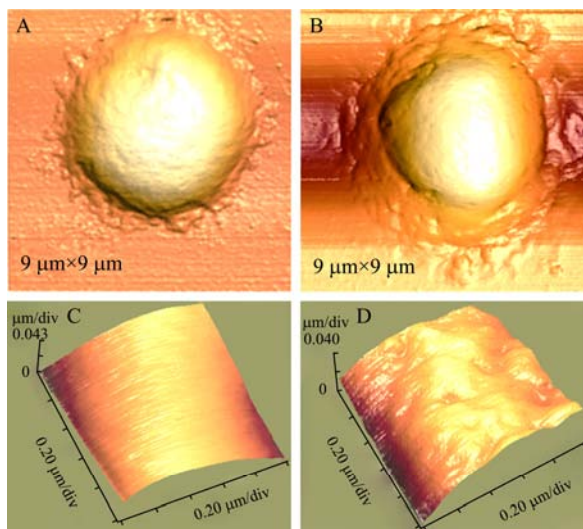


图 2 CD20<sup>+</sup>B 淋巴细胞的原子力图

Fig. 2 AFM images of CD20<sup>+</sup>B lymphocytes. (A) 3-D image of normal CD20<sup>+</sup>B lymphocyte (9 μm×9 μm). (B) 3-D image of B-CLL CD20<sup>+</sup>B lymphocyte (9 μm×9 μm). (C) Ultrastructure image of normal CD20<sup>+</sup>B lymphocyte (1 μm×1 μm). (D) Ultrastructure image of B-CLL CD20<sup>+</sup>B lymphocyte (1 μm×1 μm). div: division.

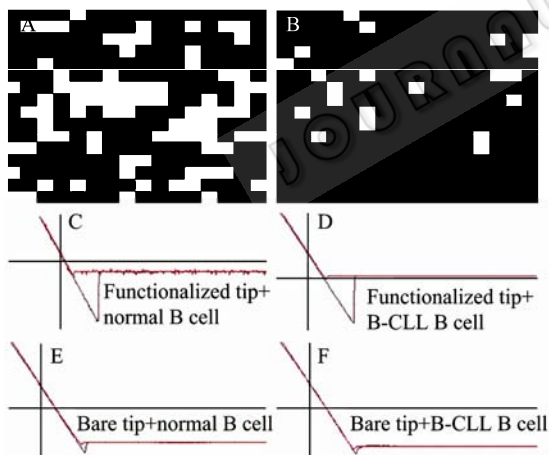


图 3 CD20<sup>+</sup>B 淋巴细胞的力曲线

Fig. 3 Force curves of CD20<sup>+</sup>B lymphocytes. Map of force curves pots ( $n=256$ ) recorded using anti-human CD20 functionalized AFM tips and cells (A: normal group, B: B-CLL group,  $f_{\text{white}} > f_{\text{black}}$ , white spots represent the location of CD20 molecules). (C) The force distance curves between the functionalized tip and normal CD20<sup>+</sup>B lymphocytes. (D) The force distance curves between the functionalized tip and B-CLL CD20<sup>+</sup>B lymphocytes. (E) The force distance curves between the unfunctionalized tip and normal CD20<sup>+</sup>B lymphocytes. (F) The force distance curves between the unfunctionalized tip and B-CLL CD20<sup>+</sup>B lymphocytes.

### 3 结论

本实验通过结合 LSCM 和 AFM 两种方法, 分析对比了人正常和外周血单个 CD20<sup>+</sup>B 淋巴细胞膜表面 CD20 抗原的表达及分布情况。结果表明, 与正常 B 淋巴细胞相比, CD20 在 B-CLL B 淋巴细胞上面的表达低, 分布不均匀。首先, 利用 LSCM 和 AFM 能进一步辨别出 B-CLL B 淋巴细胞的异常, 结合形态学和其他特征, 能够提高 B 淋巴细胞异常诊断的精确性。其次, 利妥昔治疗能改善患 B 细胞白血病人的病情, 但是体内确切的治疗机制并不清楚, 因此 B 淋巴细胞表面 CD20 抗原表达的多少与临床上利妥昔治疗有一定的关系<sup>[28]</sup>。本实验结果在一定程度上能解释临床上 B-CLL 病人对利妥昔反应低的原因, 并且为针对抗原 CD20 的治疗用药选择提供一定的参考。

### REFERENCES

- [1] Byrd JC, Murphy T, Howard RS, et al. Rituximab using a thrice weekly dosing schedule in B-cell chronic lymphocytic leukemia and small lymphocytic lymphoma demonstrates clinical activity and acceptable toxicity. *J Clin Oncol*, 2001, 19(8): 2153–2164.
- [2] Huhn D, von Schilling C, Wilhelm M, et al. Rituximab therapy of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 2001, 98(5): 1326–1331.
- [3] O'Brien SM, Kantarjian H, Thomas DA, et al. Rituximab dose-escalation trial in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*, 2001, 19(8): 2165–2170.
- [4] Oscier D, Fegan C, Hillmen P, et al. Guidelines on diagnosis and management of chronic lymphocytic leukemia. *Br J Haematol*, 2004, 125(3): 294–317.
- [5] Wierda WG, Keating MJ, O'Brien S. Refractory chronic lymphocytic leukemia: prognosis and treatment options. *Am J Cancer*, 2004, 3(3): 163–178.
- [6] Rossmann ED, Lundin J, Lenkei R, et al. Variability in B-cell antigen expression: implications for the treatment of B-cell lymphomas and leukemias with monoclonal antibodies. *Hematol J*, 2001, 2(5): 300–306.
- [7] Almasri NM, Duque RE, Iturraspe J, et al. Reduced

- expression of CD20 antigen as a characteristic marker for chronic lymphocytic leukemia. *Am J Hematol*, 1992, 40(4): 259–263.
- [8] Marti GE, Faguet G, Bertin P, et al. CD20 and CD5 expression in B-chronic lymphocytic leukemia. *Ann N Y Acad Sci*, 1992, 651(1): 480–483.
- [9] D'Arena G, Dell'Olio M, Musto P, et al. Morphologically typical and atypical B-cell chronic lymphocytic leukemias display a different pattern of surface antigenic density. *Leukemia Lymphoma*, 2001, 42(4): 649–654.
- [10] Wang LL, Abbasi F, Gaigalas AK, et al. Comparison of fluorescein and phycoerythrin conjugates for quantifying CD20 expression on normal and leukemic B-cells. *Cytometry B Clin Cytom*, 2006, 70(6): 410–415.
- [11] Ginaldi L, De Martinis M, Matutes E, et al. Levels of expression of CD19 and CD20 in chronic B cell leukaemias. *J Clin Pathol*, 1998, 51(5): 364–369.
- [12] Johnson NA, Boyle M, Bashashati A, et al. Diffuse large B-cell lymphoma: reduced CD20 expression is associated with an inferior survival. *Blood*, 2009, 113(16): 3773–3780.
- [13] Scheuring S, Dufrêne YF. Atomic force microscopy: probing the spatial organization, interactions and elasticity of microbial cell envelopes at molecular resolution. *Mol Microbiol*, 2010, 75(6): 1327–1336.
- [14] Yuana Y, Oosterkamp TH, Bahatyrova S, et al. Atomic force microscopy: a novel approach to the detection of nanosized blood microparticles. *J Thromb Haemost*, 2010, 8(2): 315–323.
- [15] Lesoil C, Nonaka T, Sekiguchi H, et al. Molecular shape and binding force of *Mycoplasma mobile's* leg protein Gli349 revealed by an AFM study. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 391(3): 1312–1317.
- [16] Lee S, Mandic J, Van Vliet KJ. Chemomechanical mapping of ligand-receptor binding kinetics on cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(23): 9609–9614.
- [17] Girish CM, Binulal NS, Anitha VC, et al. Atomic force microscopic study of folate receptors in live cells with functionalized tips. *Appl Phys Lett*, 2009, 95(22): 223703/1-223703/3.
- [18] Moskalenko AV, Yarova PL, Gordeev SN, et al. Single protein molecule mapping with magnetic atomic force microscopy. *Biophys J*, 2010, 98(3): 478–487.
- [19] Duman M, Pflieger M, Zhu R, et al. Improved localization of cellular membrane receptors using combined fluorescence microscopy and simultaneous topography and recognition imaging. *Nanotechnology*, 2010, 21(11): 115504.
- [20] Soumetz FC, Saenz JF, Pastorino L, et al. Investigation of integrin expression on the surface of osteoblast-like cells by atomic force microscopy. *Ultramicroscopy*, 2010, 110(4): 330–338.
- [21] Taninaka A, Takeuchi O, Shigekawa H. Site-selective analysis of biotin–streptavidin interactions using dynamic force spectroscopy. *Hyomen Kagaku*, 2010, 31(1): 41–47.
- [22] Hu MQ, Wang JK, Cai JY, et al. Nanostructure and force spectroscopy analysis of human peripheral blood CD4<sup>+</sup>T cells using atomic force microscopy. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 374(1): 90–94.
- [23] Hu MQ, Chen JN, Wang JK, et al. AFM- and NSOM-based force spectroscopy and distribution analysis of CD69 molecules on human CD4<sup>+</sup> T cell membrane. *J Mol Recognit*, 2009, 22(6): 516–520.
- [24] Huang FC, Gao SJ, Qiu SY, et al. Morphology and force spectroscopy of human peripheral blood CD8<sup>+</sup>T cells studied by atomic force microscope. *J Instr Anal*, 2009, 28(10): 1143–1147.
- 黄飞程, 郜世隽, 邱思远, 等. 基于原子力显微镜的人外周血 CD8<sup>+</sup>T 细胞形貌观察与力谱分析. *分析测试学报*, 2009, 28(10): 1143–1147.
- [25] Beum PV, Lindorfer MA, Beurskens F, et al. Complement activation on B lymphocytes opsonized with rituximab or *Ofatumumab* produces substantial changes in membrane structure preceding cell lysis. *J Immunol*, 2008, 181(1): 822–832.
- [26] Wojcikiewicz EP, Abdulreda MH, Zhang XH, et al. Force spectroscopy of LFA-1 and its ligands, ICAM-1 and ICAM-2. *Biomacromolecules*, 2006, 7(11): 3188–3195.
- [27] Jin Y, Wang KM, Tan WH, et al. Monitoring molecular beacon /DNA interactions using atomic force microscopy. *Anal Chem*, 2004, 76(19): 5721–5725.
- [28] Huh YO, Keating MJ, Saffer HL, et al. Higher levels of surface CD20 expression on circulating lymphocytes compared with bone marrow and lymph nodes in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Am J Clin Pathol*, 2001, 116(3): 437–443.