

DOI: 10.13376/j.cbls/2018152

文章编号: 1004-0374(2018)11-1258-06

# 亲和素及其类似物在生物医学工程中的应用

廖诗英, 蒋春樊, 崔婧婷, 张敏\*

(湖北文理学院医学院, 襄阳 441053)

**摘要:** 基于与生物素高特异性紧密结合的能力, 亲和素及其类似物广泛地应用于生物医学工程的多个领域, 包括从简单的亲和纯化到复杂的药物定向运输等。研究发现, 通过改造亲和素及其类似物与生物素的结合方式, 可以改善它们的功能特性, 进而开发出纳米适配器和分子水凝胶等系统。现概述亲和素及其类似物与生物素作用的模式, 以及目前在亲和纯化、医学信号检测、药物运输、疫苗研制和组织工程等方面的研究与应用, 为进一步开发该非共价相互作用提供参考。

**关键词:** 亲和素; 生物素; 信号检测; 药物运输; 疫苗研制; 组织工程

**中图分类号:** Q819

**文献标志码:** A

## Application of avidin and its analogues in biomedical engineering

LIAO Shi-Ying, JIANG Chun-Fan, CUI Jing-Ting, ZHANG Min\*

(Medical College, Hubei University of Arts and Science, Xiangyang 441053, China)

**Abstract:** Based on its ability to bind to biotin with the high specificity, avidin and its analogues have been extensively utilized in diverse fields of biomedical engineering, including affinity purification, complicated drug delivery and so on. Several chemically engineered avidin and its analogues have been studied to improve the interactional properties and functional characteristics to develop nanoscale adapters and molecular hydrogel systems. The interacting model between biotin and avidin and its analogues was introduced, and their applications on affinity purification, medical diagnose, drug delivery, vaccine development and tissue engineering were reviewed. These information may provide guides for exploring this non-covalent interaction in biotechnological and biomedical fields.

**Key words:** avidin; biotin; signal detection; drug delivery; vaccine development; tissue engineering

生物素 - 亲和素的相互作用是自然界中最强烈的非共价相互作用之一。亲和素是一个同源四聚体蛋白, 每个亚基都具有高度特异性结合生物素的能力, 其平衡解离常数为  $10^{-15}$  M, 比抗原 - 抗体作用的亲和力还要高  $10^3 \sim 10^6$  倍<sup>[1]</sup>。这种高亲和力非共价相互作用具有面对机械操作、高温、酸碱、蛋白水解酶和多种变性剂处理时高度的稳定性和耐受性的优势<sup>[2]</sup>。另外, 多种生物活性分子, 如蛋白质、核酸和糖类等易于被生物素标记, 进而与亲和素发生偶联。正是由于这些特性, 亲和素及其类似物作为介质被广泛应用于生化检测、医疗诊断、亲和纯化和药物传递等多方面<sup>[3]</sup>。

### 1 亲和素/链霉亲和素与生物素的作用模式

亲和素及其最广泛应用的衍生物链霉亲和素都

可以由天然的宿主分泌产生, 它们的功能类似, 都具有对生物素强烈的相互作用。尽管亲和素与链霉亲和素一级结构的氨基酸序列只有 41% 的同源性, 它们的三、四级结构基本上一致<sup>[4]</sup>。亲和素和链霉亲和素的结构亚单位由 8 个反向平行的  $\beta$  片层组成,  $\beta$  片层中间由 loop 链接, 而一级结构中不一致的氨基酸序列主要就分布在这些 loop 中<sup>[5]</sup>。

生物素结合位点在  $\beta$  片层组成的桶状结构的末

收稿日期: 2018-05-14; 修回日期: 2018-07-04

基金项目: 湖北省自然科学基金面上项目(2018CFB563);

襄阳市科技研究开发与成果转化项目(襄科技2016[73]-12)

\*通信作者: E-mail: zmhbuas@outlook.com

端氨基酸上, 四聚体亲和素可以结合 4 个生物素分子<sup>[6]</sup>。研究发现, 亲和素与生物素相结合的残基位点要比链霉亲和素与生物素结合位点更加保守, 亲和素与生物素结合的亲和力 ( $10^{-15}$  M) 也比链霉亲和素与生物素结合的亲和力更高 ( $10^{-14}$  M)<sup>[7]</sup>。亲和素与链霉亲和素都具备两种主要的生物素结合区域, 也被称作生物素结合口袋。该口袋由疏水作用残基组成, 实际是几个含芳香族残基的氨基酸形成的一个疏水作用环境, 该环境是结合生物素的重要原因, 另外, 生物素的脲基环结构也是形成疏水键的有效因素。亲和素与生物素的结合作用发生伊始, 亲和素的三级 / 四级结构就开始发生变化 (图 1)。

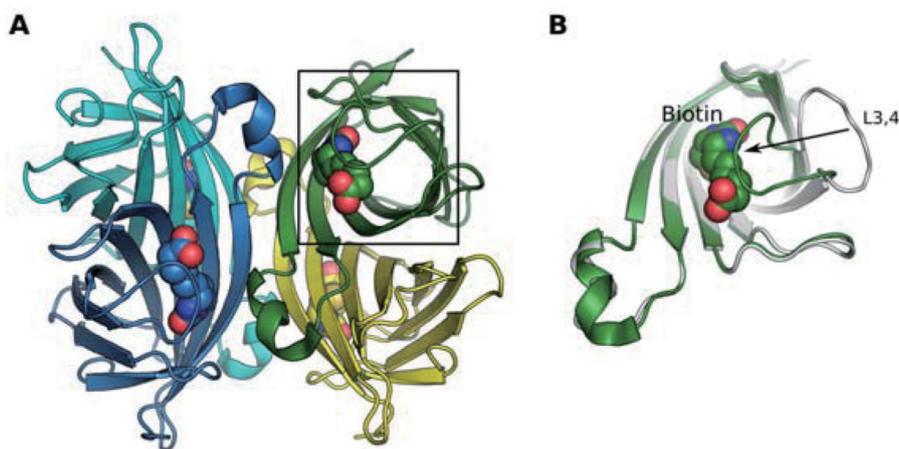
通过 X 晶体衍射结果发现在第三和第四个  $\beta$  片层之间的 loop 发生了变构<sup>[8]</sup>。可以想象这是一个桶状结构, 中间放入了一个生物素分子, 随后因为 loop 的变构在上面增加了一个桶盖来封堵。另外, 亲和素结合口袋与配体之间具有恰当的互补结构形态, 这使得亲和素与生物素的结合更加紧密。在配体结合的环境下, 亲和素的亚基之间会发生功能性的交互作用, 特别是在亚基 I 和 II 之间, 以及亚基 III 和 IV 之间<sup>[8]</sup>。正是这种作用使亲和素可以形成与生物素结合的口袋, 并保证邻近的亚基与生物素的结合。

## 2 亲和素-亲和标签在蛋白质纯化和检测方面的应用

在进行重组抗体体外表达和纯化过程中, 亲和

素-亲和标签纯化方法被建立起来<sup>[9]</sup>。首先被报道用于纯化的亲和素-亲和标签是 Strep-tag, 该标签不影响蛋白质本身的活性并且可以通过其与 biotin 的作用进行快速检测<sup>[10]</sup>。由于 Strep-tag 不便于标记在蛋白质 N 端和蛋白质内部, Schmidt 和 Skerra 等<sup>[11]</sup> 构建了一种由 8 个氨基酸组成的小分子多肽序列, 并把它命名为 Strep-tagII。该 tag 能以多种方式融合在重组蛋白的末端, 因为其具备固有的与亲和素高度亲和的特点, 使得研究者可以通过亲和层析的方式对融合蛋白进行纯化<sup>[12]</sup>。除此以外, 利用针对亲和素的单克隆抗体, 还可以对此类融合蛋白进行高度灵敏的印迹检测。Nampally 等<sup>[13]</sup> 构建的偶联有 Strep-tagII 的壳聚糖亲和蛋白, 能够特异性地结合壳聚糖, 而不结合其乙酰化产物几丁质, 并且能够根据乙酰化水平的下降, 显示出与检测物质亲和力增强的特点。而去乙酰化被认为是真菌针对宿主免疫系统识别几丁质的一种逃逸反应。因此, 利用 Strep-tagII 重组壳聚糖亲和蛋白对几丁质脱去乙酰基产生壳聚糖水平的检测, 有助于确定真菌感染水平。

Strep-tagII 具有生物惰性且不影响膜转位和蛋白质折叠, 目前已经成为快速纯化以及直接相互作用快速检测的常用方法。例如, Moosmeier 等<sup>[14]</sup> 建立的在 Strep-tagII 融合基础上的转运素, 就是利用了转运素更倾向于运转 Strep-tagII 融合的小分子、多肽或多聚复合物的特点而建立起来的通用有效的运输检测系统。



A: 链霉亲和素的四聚体结构 (PDB数据库编号: 1MK5)。4个亚基及其结合的biotin分子以4种不同颜色显示。B: 一个亚基中的biotin结合模式(以深绿色显示; 该区域在A中以方框标注)。与未结合biotin的链霉亲和素(以灰色显示; PDB数据库编号: 3RY1)的叠合显示, 主要的构象变化位于第三和第四个 $\beta$ 片层之间的loop(L3,4 loop)。

图1 链霉亲和素结合生物素分子的模式图

### 3 亲和素及其类似物在生物医学信号检测方面的应用

除了上述亲和标签 Strep-tagII 可应用于快速检测外, 利用亲和素 - 生物素高亲和力特点构建的纳米颗粒适配器也已经作为新型检测工具广泛应用于生物医学检测领域<sup>[15-16]</sup>。例如, Lippert 等<sup>[17]</sup>在中性亲和素 (NeutrAvidin) 基础上构建了可溶的纳米颗粒, 其含有的 NeutrAvidin 可以与生物素 -4- 荧光素 (biotin-4-fluorescein, B4F) 微球结合并发生荧光淬灭。该方法已成功应用于用 NeutrAvidin- 纳米颗粒检测生物素化的细胞质动力蛋白, 并可通过单分子全内反射荧光显微镜进行定性和定量检测。另外, 病毒也可以被认为是一种高度进化的, 能够穿透细胞的纳米机器<sup>[7]</sup>。Leisi 等<sup>[18]</sup>将细小病毒 B19 的病毒衣壳蛋白独特区 (B19 viral protein 1 unique region, VP1u) 作为细胞靶向分子与 NeutrAvidin 相偶联, 根据细小病毒需要在红细胞生成素依赖的红系细胞分化细胞中生长的特性, 建立了一种病毒依赖的靶向检测处于中间阶段的红系细胞的方法, 这种方法被认为是建立在结合 NeutrAvidin 基础上的纳米检测器。偶联 NeutrAvidin 的纳米颗粒复合物还能被用于检测酪氨酸激酶受体在培养的海马回神经细胞上的分布情况<sup>[19]</sup>。

亲和素与生物素的相互作用还可被利用来检测肿瘤。例如, 利用亲和素携带的荧光信号分子可以检测生物素化的抗白细胞分化抗原 71 (cluster of differentiation 71, CD71) 抗体, 进而快速诊断乳腺癌及其他转铁蛋白表达细胞<sup>[20]</sup>。这种依赖肿瘤特异性识别抗体的检测方法应用非常广泛, 除了可以偶联抗 CD71 抗体外, Liang 等<sup>[21]</sup>设计与生物素化抗人表皮生长因子受体 2 (human epidermal growth factor receptor 2, Her2) 抗体偶联的链霉亲和素检测体系用于检测乳腺癌; Wu 等<sup>[22]</sup>则建立了鉴定癌胚抗原双亮氨酸拉链激酶 (dual-leucine zipper kinase-1, Dlk-1) 的亲和素 - 生物素检测体系; 孙平风等<sup>[23]</sup>以聚酰胺为载体合成生物素化的叶酸, 联合链霉亲和素修饰的量子点探针, 可以特异性靶向卵巢癌细胞。另外, 基于生物素 - NeutrAvidin 相互作用的多种抗体悬臂检测器也已经在小鼠和羊体内得到成功验证<sup>[24]</sup>。

除了利用荧光标记的方法检测肿瘤外, 链霉素 - 亲和素体系还可进行放射性标记并用于大分子的神经营影像学检测治疗。Sumbria 等<sup>[25]</sup>开发了一种针对

人类胰岛素受体的单克隆抗体, 该抗体的一端能跨越血脑屏障并结合到内源性的胰岛素受体上, 另一端则通过链霉亲和素偶联生物素化的 A $\beta$  淀粉样多肽, 对此多肽进行 I<sup>125</sup> 放射性标记进而可根据放射信号影像学观测分析大脑中的淀粉样分布。

### 4 亲和素及其类似物在药物运输系统的应用

为保证治疗药物分子的靶向性和有效聚集, 直接或间接利用亲和素 / 链霉亲和素 - 生物素运输系统偶联药物的方法被建立起来<sup>[26]</sup>。建立在亲和素及其类似物药物运输系统上的核酸、蛋白质与多肽、单克隆抗体以及小分子等制剂都得到了广泛的开发<sup>[27-31]</sup>。其中, siRNA 作为特殊的治疗药物近年引起了广泛关注, 其应用于临床治疗的传统运载方法要借助病毒载体, 而病毒载体的安全性限制了其应用范围。近年来, 基于链霉亲和素 - 生物素的 siRNA 脂质体药物运载系统开始得到应用<sup>[7]</sup>。这种系统不仅安全性高, 还可以防止 siRNA 的聚集, 有效增加细胞对制剂的摄取水平, 因此已经成为运载 siRNA 的有效工具。前文已经论述了建立在 Strep-tagII 融合基础上的转运通用药物转运系统, 而利用胆固醇包被生物素化的 siRNA, 并结合链霉亲和素官能化的方法则为高度特异性的细胞靶向作用提供了另一个有效途径。例如, 通过静电压缩的方式将链霉亲和素与生物素化的多聚胞嘧啶结合蛋白 2 (poly(rC)-binding protein 2, PCBP2) 的 siRNA 包装成复合物, 利用受体介导的细胞内吞方式将针对 PCBP2 的 siRNA 运送到肝脏的星状细胞, 并最终使 PCBP2 基因有效沉默, 进而达到对肝脏纤维化的治疗。这种方式与传统的转染方法相比, 不会引起小鼠星状细胞的细胞毒性作用, 且在小鼠 Caco-2 和 PC-3 细胞系中能获得更好的干扰效率<sup>[32]</sup>。

Hajdu 等<sup>[33]</sup>将针对效应性记忆 T 细胞表面白细胞分化抗原 45 (CD45) 的抗体进行生物素化, 进而通过其与链霉亲和素的相互作用, 将该信号分子偶联在荧光微球上。该荧光微球上同时携带有用于敲除钾离子通道 (potassium voltage gated channel, Kv1.3) 的 siRNA, 当该特异性的靶向荧光微球通过细胞内吞作用被效应性记忆 T 细胞吸收后, Kv1.3 离子通道被抑制, 导致钙离子的流入减少, T 细胞的激活水平下降, 从而产生对自体免疫疾病的治疗效果。

利用链霉亲和素具有多个与生物素结合的位点, Huang 等<sup>[34]</sup>开发了一种光响应性 siRNA 递送

系统, 该系统可以避免细胞穿透性多肽与 siRNA 的直接结合所导致的表面电荷性分子聚集, 并可以有效穿透多种人类胚胎干细胞。通过近红外光在 f 秒内的刺激, 他们成功地将八聚体结合转录因子 4 基因 (Oct4) 在没有分化的人类胚胎干细胞 H9 中进行了有效的基因沉默。这种利用链霉亲和素 - 生物素相互作用建立的, 具有生物相容性并由近红外光激活的基因沉默方法, 使得 siRNA 运输的单细胞分辨率得到了显著提高。

## 5 亲和素及其类似物在疫苗开发方面的应用

近年来, 疫苗的开发与临床实际应用的周期不断缩短, 而产生适量的抗原以诱导体内最佳的免疫应答水平是目前研发所面临的巨大挑战之一。解决的方法, 包括通过基因改造表达特异性抗原, 但这种方法在基因表达的效率性和稳定性方面以及引入外源 DNA 的安全性方面都面临了很多困境<sup>[7]</sup>。2015 年, Liao 等<sup>[35]</sup> 设计出一种新型的非遗传性方法, 用来快速并且有效地将外源蛋白展示在细菌的细胞表面, 以稳定有效地表达抗原。他们首先表达特异性的单体亲和素 - 早期分泌性抗原靶标 6 (early secretory antigenic target 6, ESAT6) 融合蛋白抗原, 再将卡介苗 (*Bacillus Calmette-Guérin*, BCG) 表面生物素化, 这两个组分具备可逆性结合的能力。巨噬细胞吞噬包被过的 BCG, 进一步有效地运输这些表面携带有亲和素融合蛋白的细菌给主要组织相容性复合物 (major histocompatibility complex, MHC) 的抗原提呈成分。这种表面装饰有结核分枝杆菌特异性抗原 ESAT6 的卡介苗可以成功地引起特异性 T 细胞反应的扩散, 并且具有在冷冻干燥后可长期保存和高度稳定的特点<sup>[35]</sup>。

链霉亲和素也被证明对肿瘤细胞表面蛋白有很高的亲和力, 另外, 链霉亲和素的精氨酸 - 酪氨酸 - 天冬氨酸 - 丝氨酸序列可通过与细胞黏附区域 RGD (Arg-Gly-Asp, RGD) 作用协助细胞黏附<sup>[36]</sup>。这两个特点使得链霉亲和素可用来递送肿瘤相关蛋白并刺激免疫系统。与生物素化的可溶性肿瘤蛋白结合的链霉亲和素疫苗已被证实神经胶质瘤大鼠和犬类模型中成功地发挥了抑制肿瘤的作用<sup>[36]</sup>。

## 6 亲和素及其类似物在组织工程方面的应用

组织工程应用最广泛的领域之一就是皮肤移植, 因为组织工程是克服移植技术缺陷的一种替代方案。这种替代方案模仿天然细胞外基质的支架结

构, 方法之一就是亲和素固定在生物材料表面, 而细胞膜与生物素相结合。依托生物素 - 亲和素的高亲和力共价相互作用, 生物材料在细胞上能够高效附着, 细胞膜上的整合素与基质上的黏附蛋白之间形成整合素介导的天然细胞黏附<sup>[37]</sup>。Anamlechi 等<sup>[38]</sup> 报道, 亲和素 - 生物素系统可以将内皮细胞附着到可以降解的生物支架表面, 细胞可在诸如骨损伤的部位向内生长, 同时避免引起免疫反应。

组织工程应用范围的局限很大程度上源于机体的有机分子, 特别是蛋白质与生物支架表面强烈的相互作用或者细胞脱落后结构和活性发生了变化。Dou 等<sup>[39]</sup> 建立了一种三维的水凝胶细胞黏附基质, 可以避免脱落细胞凋亡。通过组装 1,4- 苊基二酰胺的非生物素化 / 生物素化的大分子水凝胶, 生物素化的细胞可以通过亲和素这一桥梁, 将修饰过的细胞原位包封在大分子水凝胶中。结合了链霉亲和素的细胞可以自由增殖而没有任何变性迹象, 也不改变其基因表达水平。

目前已有文献报道生物素 - 亲和素多聚凝胶在骨组织损伤方面的应用, 包括提高骨髓间充质干细胞归巢率<sup>[40]</sup> 以及促进可以发育为骨组织的种子干细胞在支架上的早期黏附和有效增殖等<sup>[41]</sup>。还有报道指出, 将稳定定位的生物素化的骨形态生成蛋白 3 (bone morphogenetic protein 2, Bmp2) 固定在生长因子交联的多聚凝胶平台上, 用基因工程改良过的链霉亲和素结合并且提呈具有生物活性的 Bmp2- 生物素, 这种免疫固定的模式能够使间充质干细胞特异性地完全骨质化, 并可应用于不同类型的细胞组织工程方面的构建<sup>[42]</sup>。

## 7 总结和展望

亲和素及其类似物具备与生物素高亲和力的共价相互作用, 依托该作用在生物和医学领域已建立起多种通用平台, 如在药物运输、生物检测、疾病诊断和组织工程等 (表 1)<sup>[43-46]</sup>, 特别是检测放射性在肿瘤组织中的富集, 证实了特定癌症的靶向检测治疗的有效性<sup>[26]</sup>。尽管真正把该项技术应用到临床还存在免疫原性和可控性等诸多需要解决的问题, 研究者已采取多种途径来改善 (链霉) 亲和素 - 生物素作用方式, 传统的修饰 (链霉) 亲和素的方法会受到其同源四聚体结构的限制, 因为一种四聚体蛋白只能结合一种类型的靶标, 而通过混合不同类型的四聚体亲和素蛋白才能获得混合型产物。更重要的是, 这种混合形式中不同分子的数量并不一定

表1 亲和素及其衍生物的性质与应用范围<sup>[43-46]</sup>

	相对分子质量(KDa)	等电点	与生物素结合位点数量	应用范围
亲和素 (Avidin)	67	10	4	影像检测、多肽或融合蛋白运输、疫苗开发、亲和纯化等
链酶亲和素 (Streptavidin)	60	6.5	4	影像检测、靶向药物运输、抗原检测、组织工程、亲和纯化等
中性亲和素 (Neutravidin)	53	5.3~6.5	4	免疫学检测、核酸运输、疫苗开发等
根瘤亲和素 (Bradavidin II)	58.4	9.6	4	亲和纯化

简单对应到各组分浓度。基于更好地控制(链酶)亲和素与靶标的结合, Nordlund等<sup>[47]</sup>开发出了双亲和力的亲和素 dcAvid, 而本课题组则通过对蛋白本身结构和亲和效价的调整来优化亲和素的功能<sup>[1,5]</sup>, 将野生型链酶亲和素的三个氨基酸位点突变(N23A、S27D、S45A), 并通过将野生型和突变蛋白按照摩尔配比 1:3 的浓度混合并进行变、复性处理, 成功获得了具有单一亲和力活性的嵌合四聚体分子<sup>[1]</sup>, 这种改造避免了与多个配体结合导致的聚集效应, 同时仍然具备高特异性结合亲和素的能力<sup>[5]</sup>。通过对蛋白质的改造, 亲和素-生物素作用的潜在应用范围将被进一步发掘, 在此基础上, 未来亲和素-生物素作用在生物医学工程方面将具有更广阔的应用前景。

### [参 考 文 献]

- Zhang M, Shao J, Xiao J, et al. A novel approach to make homogeneous protease-stable monovalent streptavidin. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 463: 1059-63
- Laitinen OH, Hytönen VP, Nordlund HR, et al. Genetically engineered avidins and streptavidins. *Cell Mol Life Sci*, 2006, 63: 2992-3017
- Dundas CM, Demonte D, Park S. Streptavidin-biotin technology: improvements and innovations in chemical and biological applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97: 9343-53
- Sano T, Pandori MW, Chen X, et al. Recombinant core streptavidins: a minimum-sized core streptavidin has enhanced structural stability and higher accessibility to biotinylated macromolecules. *J Biol Chem*, 1995, 270: 28204-9
- Zhang M, Biswas S, Deng W, et al. The crystal structure of monovalent streptavidin. *Sci Rep*, 2016, 6: 35915
- Livnah O, Bayer EA, Wilchek M, et al. 3-Dimensional structures of avidin and the avidin biotin complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 5076-80
- Jain A, Cheng K. The principles and applications of avidin-based nanoparticles in drug delivery and diagnosis. *J Control Release*, 2017, 245: 27-40
- Livnah O, Bayer EA, Wilchek M, et al. Three-dimensional structures of avidin and the avidin-biotin complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 5076-80
- Schmidt TG, Skerra A. The random peptide library-assisted engineering of a C-terminal affinity peptide, useful for the detection and purification of a functional Ig Fv fragment. *Protein Eng*, 1993, 6: 109-22
- Schmidt TG, Skerra A. One-step affinity purification of bacterially produced proteins by means of the "Strep tag" and immobilized recombinant core streptavidin. *J Chromatogr A*, 1994, 676: 337-45
- Schmidt TG, Skerra A. The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. *Nat Protoc*, 2007, 2: 1528-35
- Ayala JC, Pimienta E, Rodriguez C, et al. Use of Strep-tag II for rapid detection and purification of *Mycobacterium tuberculosis* recombinant antigens secreted by *Streptomyces lividans*. *J Microbiol Methods*, 2013, 94: 192-8
- Nampally M, Moerschbacher BM, Kolkenbrockand S. Fusion of a novel genetically engineered chitosan affinity protein and green fluorescent protein for specific detection of chitosan *in vitro* and *in situ*. *Appl Environ Microbiol*, 2012, 78: 3114-9
- Moosmeier MA, Bulkescher J, Reed J, et al. Transtactin: a universal transmembrane delivery system for Strep-tag II-fused cargos. *J Cell Mol Med*, 2010, 14: 1935-45
- Liu L, Sommermeyer D, Cabanov A, et al. Inclusion of strep-tag II in design of antigen receptors for T-cell immunotherapy. *Nat Biotechnol*, 2016, 34: 430-4
- Baumann F, Bauer MS, Milles LF, et al. Monovalent Strep-Tactin for strong and site-specific tethering in nanospectroscopy. *Nat Nanotechnol*, 2015, 11: 89-94
- Lippert LG, Hallock JT, Dadosh T, et al. NeutrAvidin functionalization of CdSe/CdS quantum nanorods and quantification of biotin binding sites using biotin-4-fluorescein fluorescence quenching. *Bioconjug Chem*, 2016, 27: 562-8
- Leisi R, von Nordheim M, Kempf C, et al. Specific targeting of proerythroblasts and erythroleukemic cells by the VP1u region of parvovirus B19. *Bioconjug Chem*,

- 2015, 26: 1923-30
- [19] Park JW, Park AY, Lee S, et al. Detection of TrkB receptors pistrubuted in cultured hippocampal neurons through bioconjugation between highly luminescent (quantum dot-neutravidin) and (biotinylated anti-TrkB antibody) on neurons by combined atomic force microscope and confocal laser scanning microscope. *Bioconjug Chem*, 2010, 21: 597-603
- [20] Barth BM, Sharma R, Altinoğlu EI, et al. Bioconjugation of calcium phosphosilicate composite nanoparticles for selective targeting of human breast and pancreatic cancers *in vivo*. *Acs Nano*, 2010, 4: 1279-87
- [21] Liang M, Liu X, Cheng D, et al. Multimodality nuclear and fluorescence tumor imaging in mice using a streptavidin nanoparticle. *Bioconjug Chem*, 2010, 21: 1385-8
- [22] Wu C, Mino K, Akimoto H, et al. *In vivo* far-red luminescence imaging of a biomarker based on BRET from *Cypridina* bioluminescence to an organic dye. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 15599-603
- [23] 孙平风, 李福来, 许恒毅, 等. 链霉亲和素修饰的量子点联合生物素标记的叶酸在卵巢癌SKOV3细胞体外成像中的应用. *肿瘤*, 2015, 35: 952-60
- [24] Zhang J, Lang HP, Battiston F, et al. Development of robust and standardized cantilever sensors based on biotin/NeutrAvidin coupling for antibody detection. *Sensors*, 2013, 13: 5273-85
- [25] Sumbria RK, Boado RJ, Pardridge WM. Imaging amyloid plaque in Alzheimer's disease brain with a biotinylated A $\beta$  peptide radiopharmaceutical conjugated to an IgG-avidin fusion protein. *Bioconjug Chem*, 2012, 23: 1318-21
- [26] Lesch HP, Kaikkonen MU, Pikkarainen JT, et al. Avidin-biotin technology in targeted therapy. *Expert Opin Drug Del*, 2010, 7: 551-64
- [27] Buda A, Facchin S, Dassie E, et al. Detection of a fluorescent-labeled avidin-nucleic acid nanoassembly by confocal laser endomicroscopy in the microvasculature of chronically inflamed intestinal mucosa. *Int J Nanomed*, 2015, 10: 399-408
- [28] Howl J, Jones E. Cell penetrating peptide-mediated transport enables the regulated secretion of accumulated cargoes from mast cells. *J Control Release*, 2015, 202: 108-117
- [29] Qu W, Chen WH, Kuang Y, et al. Avidin-biotin interaction mediated peptide assemblies as efficient gene delivery vectors for cancer therapy. *Mol Pharm*, 2013, 10: 261-9
- [30] Frost SH, Jensen H, Lindgren S. *In vitro* evaluation of avidin antibody pretargeting using <sup>211</sup>At-labeled and biotinylated poly-L-lysine as effector molecule. *Cancer*, 2010, 116: 1101-10
- [31] Patel M, Vadlapatla RK, Shah S, et al. Molecular expression and functional activity of sodium dependent multivitamin transporter in human prostate cancer cells. *Int J Pharmaceut*, 2012, 436: 324-31
- [32] Shukla RS, Jain A, Zhao Z, et al. Intracellular trafficking and exocytosis of a multi-component siRNA nanocomplex. *Nanomedicine*, 2016, 12: 1323-34
- [33] Hajdu P, Chimote AA, Thompson TH, et al. Functionalized liposomes loaded with siRNAs targeting ion channels in effector memory T cells as a potential therapy for autoimmunity. *Biomaterials*, 2013, 34: 10249-57
- [34] Huang X, Hu Q, Braun GB, et al. Light-activated RNA interference in human embryonic stem cells. *Biomaterials*, 2015, 63: 70-9
- [35] Liao TY, Alice L, Sunil J, et al. Improving the immunogenicity of the *Mycobacterium bovis* BCG vaccine by non-genetic bacterial surface decoration using the avidin-biotin system. *PLoS One*, 2015, 10: e0145833
- [36] Weir C, Hudson AL, Moon E, et al. Streptavidin: a novel immunostimulant for the selection and delivery of autologous and syngeneic tumor vaccines. *Cancer Immunol Res*, 2014, 2: 469-79
- [37] Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*, 1992, 69: 11-25
- [38] Anamelechi CC, Truskey GA, Reichert WM. Mylar™ and Teflon-AF™ as cell culture substrates for studying endothelial cell adhesion. *Biomaterials*, 2005, 26: 6887-96
- [39] Dou XQ, Zhang J, Feng C. Biotin-avidin based universal cell-matrix interaction for promoting three-dimensional cell adhesion. *ACS Appl Mat Interfaces*, 2015, 7: 20786-92
- [40] 杨林, 罗富里, 李赟, 等. 利用生物素-链霉亲和素进行骨髓间充质干细胞的表面标记. *中国组织工程研究*, 2016, 20: 1382-8
- [41] 冯自豪, 李伟, 刘家祺, 等. 生物素-亲和素桥接系统在骨组织工程中的应用. *中国临床医学*, 2016, 23: 139-43
- [42] Metzger S, Lienemann PS, Ghayor C, et al. Modular poly(ethylene glycol) matrices for the controlled 3D-localized osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Adv Healthc Mater*, 2015, 4: 550-8
- [43] Shi D, Sheng F, Zhang X, et al. Gold nanoparticle aggregation: colorimetric detection of the interactions between avidin and biotin. *Talanta*, 2018, 185: 106
- [44] Wu YP, Chew CY, Li TN, et al. Target-activated streptavidin-biotin controlled binding probe. *Chem Sci*, 2017, 9: 770-6
- [45] Tatavosian R, Ren X. Sm-ChIPi: single-molecule mchromatin immunoprecipitation imaging. *Methods Mol Biol*, 2018, 1689: 113-26
- [46] Helppolainen SH, Määttä JA, Halling KK, et al. Bradavidin II from *Bradyrhizobium japonicum*: a new avidin-like biotin-binding protein. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1784: 1002-10
- [47] Nordlund HR, Laitinen OH, Hytönen VP, et al. Construction of a dual chain pseudotetrameric chicken avidin by combining two circularly permuted avidins. *J Biol Chem*, 2004, 279: 36715-9