

미세유체 칩 내에서 유전영동 집게(Dielectrophoretic Tweezers)를 이용한 단백질 A와 면역 글로블린 G의 결합에 관한 연구

곽태준 · 이재우 · 윤대성 · 이상우

연세대학교 의공학과

Investigation of the Binding Force between Protein A and Immunoglobulin G Using Dielectrophoretic(DEP) Tweezers Inside a Microfluidic Chip

Tae Joon Kwak, Jae Woo Lee, Dae Sung Yoon and Sang Woo Lee

Department of Biomedical Engineering, Yonsei University, Korea

(Manuscript received 9 April 2013; revised 4 June 2013; accepted 25 June 2013)

Abstract: The 'Dielectrophoretic Tweezers(DEP Tweezers)' can be used as a facile, economical toolkit for quantitative measurement of chemical and biological binding forces related to many biological interactions within a microfluidic device. Our experimental setup can probe the interaction between a single receptor molecule and its specific ligand. Immunoglobulin G(IgG) functionalized on polystyrene microspheres has been used to detect individual surface linked Staphylococcus protein A(SpA) molecules and to characterize the strength of the noncovalent IgG-SpA bond. It was measured and compared with the existing measurements. Measured single binding force of between Goat, Rabbit IgG and SpA were 17 ± 7 pN, 74 ± 16 pN. This work can be used to investigate several different ligand-receptor interactions and antigen-antibody interactions.

Key words: Dielectrophoresis, Force Spectroscopy, Intermolecular interactions, Immunoglobulin G, Protein A

1. 서 론

생체 내에서 일어나는 생명현상과 연관 되는 intermolecular force 들의 경우 단백질의 unfolding/folding 과 같은 구조변화, 단백질간의 Receptor-Ligand 간의 결합 친화도, 세포와 세포 간, 혹은 세포와 조직의 표면 간의 결합 등과 긴밀한 연관성을 가진다. 따라서 생체내에 존재하는 intermolecular force 들과 관련된 연구는 세포 표면에서 작용하는 단백질간의 상호작용에 대한 연구는 생체 적용 재료의 개발이나, 세포 생물학, 또는 조직 공학 등의 분야에서

중요 요소이며, 이러한 intermolecular force 와 관련된 연구는 생명현상을 이해하는 데에 중요한 역할을 할 수 있다.

포도상구균의 세포 벽에 존재하는 단백질인 Protein A (SpA)은 포유동물의 혈액 내에 존재하는 항체인 immunoglobulin G(IgG)의 Fc region과 선택적으로 결합하여, 세포 기능을 조절하며, 박테리아의 면역 계 공격을 피하도록 도움을 주는 것으로 알려져 있다[1]. 따라서 SpA 와 IgG 간의 결합 내에 존재하는 intermolecular force 과 관련된 연구는 그 동안 꾸준히 진행 되어 왔으며, 이와 같은 결합력을 측정을 진행한 연구로써는 radial-flow detachment assay(RFDA)를 사용한 연구[2,3]와, micropipette 기반의 dynamic force spectroscopy[4,5], 그리고 근래에는 atomic force microscopy(AFM)[6]과 Optical Tweezers를 이용한 연구[7,8] 들이 있다. 또한 이런 분자간의 상호작용 연구에 있어 분자들 간의 단순한 결합력을 측정 하는 것에서 벗어나 단일 분자 수준의 분석이 여러 방면으로 진행이 되고 있다

Corresponding Author : Sang Woo Lee
#401, Baekun-hall, 1 Yonseidae-gil, Wonju, Gangwon-do, 220-710, Korea
TEL: +82-33-760-2791 / E-mail:yusuklee@yonsei.ac.kr
이 논문은 정부(교육과학기술부) 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(NRF-2009-0068841, NRF-2010-0026223).

[9-11]. 단일 분자 수준의 결합력을 측정 하는 것은 생체 분자나 효소 등의 활동 기전 등에 대한 이해와 평가를 하는데 유용하게 사용될 수 있다. 또한 근래에 들어서 nano/micro scale 수준에서 생체 분자들 간의 상호 작용을 평가 하는 것이 bio-medical 분야에서 큰 관심을 불러 일으키고 있다[14].

앞에서 언급 된 dynamic force spectroscopy, AFM, 그리고 optical tweezers의 경우에는 다양한 종류의 결합력 측정에 사용될 수 있지만, 한 번의 측정에 오직 한 쌍의 결합력 만을 얻을 수 있다. 그러므로 실험 결과를 통한 통계 처리를 하는데 필요한 평균 및 표준 편차를 얻기 위해 수많은 실험을 반복 하여야 하며, 장비를 운용하기 위해 숙련된 전문 인력을 필요로 한다. radial-flow detachment assay의 경우에는 한번에 많은 양의 실험이 가능하지만 다량의 유체를 필요로 하기 때문에 많은 량의 실험 재료가 필요하며, 결합력을 산출하기 위해 고려해야 할 외부 힘의 종류가 많아 단일 분자간의 결합력을 추정하는데 있어 다소 제약이 있다. 또한 위에서 언급한 장치들을 구성 하는 데에는 많은 비용이 필요 함과 동시에, 복잡한 장치의 구성이 필요하여 미세 유체 칩 내에서 실험을 진행하기 어렵다.

본 연구에서는 유전영동을 이용하여 생체 분자를 다룰 수 있도록 고안한 Dielectrophoretic tweezers(DEP tweezers) 기술[15-17]을 Protein A(SpA) 와 immunoglobulin G (IgG)의 결합력 측정을 미세유체 칩 내에서 진행 하려고 한다. DEP tweezers는 massive, parallel의 뛰어난 특징을 지니고 있어 수십-수백 회 이상을 반복 실험 해야 했던 기존 실험들 과는 달리, 한 번의 실험에 450~600개/mm² 의 probe를 사용 함으로써 적은 실험의 반복으로 통계적 신뢰성을 가진 결과를 얻을 수 있다. 또한 미세 유체 칩 내에서 실험이 이루어 지므로, 장치를 구성하기 위한 가격이 저렴하며, 다양한 결합의 측정에 적용하기 쉽고, 적은 양의 시료 및 시약으로 실험 진행이 가능하며, 실험 과정의 자동화를 통해 비 전문가의 사용이 용이하고, 간단한 장치의 구성을 통해 미세 유체 칩 내에서 실험할 수 있다는 장점이 있다[18].

본 논문 에서는 저자가 속해있는 본 연구팀에서 처음 고안 되었으며[15], 현재까지 지속적으로 검증 및 발전 중에 있는[16,17] DEP tweezers 기술을 이용하여 Protein A (SpA) 와 immunoglobulin G(IgG) 간의 결합력을 미세 유체 칩 내에서 측정하고, 기존의 연구 기법 들에서 측정된 결과 들과 비교 하도록 한다.

II. 재료 및 방법

1. Sample preparation

본 연구에서 사용된 마이크로 유체 칩은 photo-lithography 공정을 통해 제작되었다. 8 kÅ 두께의 SiO₂가 증

착 된 silicon wafer를 acetone과 methanol및 Piranha solution 을 이용하여 세척한 후, AZ 1518 photoresist를 표면에 도포하여 hotplate 위에서 경화시켰다. 이후 40 um 전극 및 전극 사이의 간격이 10 um 을 가지는 interdigitated(IDT) array 형태의 pattern 을 가진 mask를 이용하여 lithography process 를 진행하였다, 이후 1 kÅ 의 chromium 을 thermal evaporator 를 이용하여 증착 시킨 후, lift-off process 를 진행하여 SiO₂ 위에 IDT 전극 을 얻었다. 실험 중 누설 전류를 방지하기 위해서 8 kÅ 두께의 SiO₂층을 PE-TEOS 작업을 통해 증착 했으며, 만들어진 칩의 전압 인가 부분을 드러내기 위해 전압 인가 부분만 개방된 mask로 UV-Exposure(beam wave length; 350~50 nm) 작업을 통해 패턴을 만든 후, BHF용액을 이용해 전압 인가 부분의 SiO₂만을 식각 하였다.

Fabrication 과정을 통해 만들어진 chip의 SiO₂ 표면에 protein A 작용기는 Bhatia et al (1989) [19]의 절차를 따라 코팅 하였으며, IgG는 Spherotech社의 The SPHERO™ coated particles(10 um) 을 이용 하였다. 재질은 polystyrene 이며, 실험 대조 군에 따라 각각 토끼, 염소 IgG의 Fc region이 beads의 표면에 functionalized되어 있다. 제품의 용액은 PBS buffer(pH 7.4)에 0.02% sodium azide 로 안정된 50 mg/ml의 농도였으나, 실험에서는 10 ml 의 PH7 Di water에 50 µl 정도의 용액을 희석시켜 약 5 × 10⁵ particles/ml 정도의 농도로 사용되었다.

2. Experimental System and Measurement

Sample preparation 과정을 통해 준비된 Protein A 작용기가 코팅된 40 um electrode, 10 um space 의 IDT chip 위에 PDMS로 reservoir를 만들어 IgG beads 용액을 그 안에 넣고 cover glass로 덮어 현미경에 부착된 CCD 카메라를 통해 움직임을 관찰 하였다. function generator

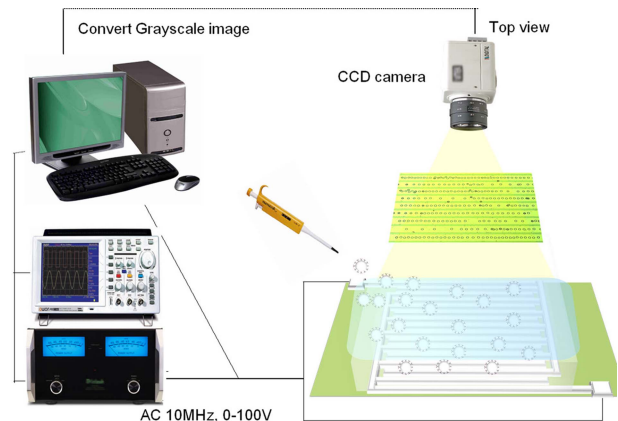


그림 1. 실험 모식도
Fig. 1. Experimental setup

와 voltage amplifier를 통하여 1 MHz의 대역으로 다양한 전압을 인가 하였으며, 인가된 전압의 크기는 oscilloscope로 측정하였다(그림 1).

각 bead의 grayscale 값을 분석해 보면, 결과 surface로부터 높이 떠오를수록 beads이미지의 grayscale 평균값이 높아지는 것을 확인할 수 있었다. 이미지상에서 각각의 beads에 대한 grayscale 값을 얻은 후에 이 이미지에서 처음 beads가 전극의 중앙으로 정렬된 후 수직방향의 움직임이 포착되기 전까지 grayscale 표준편차 값의 2배 이상이 되며, 이후에도 지속적으로 증가하는 grayscale 을 갖는 지점을 "unbinding voltage"로 정의하여 표면과 beads사이의 결합이 끊어지는 순간의 전압을 알게 된다(Grayscale의 변화를 이용한 unbinding voltage의 측정 및 unbinding voltage와 결합력 사이의 관계식은 본 연구실에서 이미 발표하였던 논문에서 좀더 자세히 확인할 수 있다[18].)

3. Method for Calculate Dielectrophoretic Force at the Unbinding Voltage

앞에서 정의한 Unbinding Voltage일 때 beads가 수직으로 받는 negative dielectrophoretic force는 다음 수식을 이용하여 계산할 수 있다[19].

$$\vec{F}_{total} = \sum_0^{\infty} -\nabla U_n$$

$$U_n = -\frac{2\pi\epsilon_m K_n r^{(2n+1)}}{(2n+1)!!} \sum_{i+j+k=n} \frac{1}{i!j!k!} \left[\frac{\partial^n \Phi}{\partial x^i \partial y^j \partial z^k} \right]$$

$$K_n = \frac{n(2n+1)(\tilde{\epsilon}_p - \tilde{\epsilon}_m)}{n\tilde{\epsilon}_p + (n+1)\tilde{\epsilon}_m} \quad (1)$$

여기서 Φ 는 외부의 전기장에 대한 electrostatic potential를 의미하고, K_n 은 n번째 order의 Clausis-Mossotti factor (CM factor)를 의미하며, ϵ_0 는 진공 상태에서의 유전상수, ϵ_p 와 ϵ_m 은 입자와 외부 매질이 받게 되는 상대 복합 유전율이며, r 은 particle의 반지름을 의미한다. 위의 수식을 이용하여 simulation을 진행하기 위해서 아래와 같은 진행 방법으로 simulation을 진행하였다. 1) 유한요소 해석프로그램인 COMSOL multiphysics (Version 3.5a)를 이용하여 실험에서 사용된 chip 구조와 동일한 구조를 디자인한 후 전극으로부터의 높이와 위치에 따른 전기장의 data를 계산하였고 2) 방정식 1을 기반으로 DEP force를 계산하기 위해서 Matlab(R12, Mathworks) 코드를 개발하였다. 3) 전기장 data를 개발된 코드에 적용하여 DEP force를 구하였다. 이때 Simulation에 사용된 변수들은 실험 진행시 사용되었던 변수와 동일하게 적용하였다 (보다 자세한 simulation 방법은 supporting information 참조).

4. Estimation to an Individual Bond through the Poisson Statistics

어떠한 결합력이 F 라는 유의한 힘을 갖는 n 개의 결합으로 이루어져 있다면, 이러한 힘들의 분산을 Gaussian distribution으로 표현하고 각각의 힘들의 평균과 분산을 계산할 수 있으며, 다음의 Poisson distribution 수식을 통해서 single binding force를 도출할 수 있다[9,10].

$$M = nF \text{ and } \sigma^2 = nF^2 \quad (2)$$

여기서 n 은 beads와 chip 표면이 이루는 contact area 안에서의 개별적 결합을 이야기 하며, F 는 개별적 결합력을 이야기 하며 M 은 개별적 결합력과 결합 갯수의 합력, σ^2 는 분산을 나타낸다. 그러므로, 각각의 결합력은 다음과 같이 표현될 수 있다.

$$F = \frac{\sigma^2}{M} \quad (3)$$

III. 결과 및 고찰

1. Lateral Displacement of Functionalized Beads

실험에서 사용한 Chip의 전극에 1MHz의 주파수를 갖는 AC 전압이 흐르게 되면, Clausius-Mossotti factor의 실수값이 음의 값을 띄게 되어 negative dielectrophoretic force가 발생하게 된다[20,21]. 이 때 인가된 전압에 의해 전극의 끝부분에서 전기장의 변화가 가장 크게 형성되고, 전극의 중앙에서 전기장의 변화가 가장 작게 형성된다(Supporting Information 그림 S1 참조). 인가된 전압과 주파수의 경우 bead에 가해지는 DEP force의 방향은 그림 2에서의 bead의 schematic diagram에서 나타나듯 전극의 중앙으로 bead가 이동할수록 vertical DEP force의 영향이 증가하며 전극의 중앙에서는 Vertical DEP force만 존재하는 것을 볼 수 있다. 단 Vertical DEP force가 전극의 끝에서는 Horizontal DEP force보다 상대적으로 매우 크기 때문에 DEP force의 방향이 좀더 Vertical DEP force의 방향에 가까운 형태로 표시된다. 또한 전극의 위치와 가해지는 전압에 따라 5 μ m IgG bead에 미치는 Vertical DEP force의 결과는 그림 2의 그래프에서 확인할 수 있다.

이와 같은 힘의 변화 및 방향을 이용하여 beads를 전기장의 변화가 큰 곳에서 전기장의 변화가 작은 전극의 중앙으로 beads를 이동시키게 되는데, 그림 3(a)에서 보듯 SpA 작용기가 코팅된 SiO₂ wafer 표면에 무분별하게 흩어져 있던 IgG beads들이 1MHz를 가지는 AC signal를 전극에 인가할 경우 전극의 중앙에 모이는 것을 볼 수 있다. 이때 인

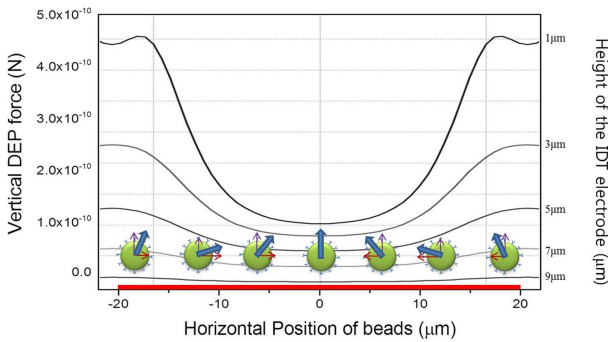


그림 2. 5 μm IgG bead 가 전극의 위치 및 전압의 변화에 따라서 받는 vertical DEP force 를 유한요소 해석 simulation 을 통해서 구한 결과 및 각 위치마다 horizontal DEP force 를 포함해서 구한 DEP force 방향 scheme

Fig. 2. Vertical DEP force due to applied voltage, which acts on 5 μm IgG functionalized bead as varying bead location, and the schematic diagram of the direction of DEP force, including horizontal DEP force

가하는 전압의 크기를 조절함으로써 IgG beads 와 SpA 사이의 결합력이 완전히 끊어져서 수직방향으로 이동 없이 수평 방향으로 만의 움직임만이 가능하도록 해야 하며, 이러한 실험을 통한 결과는 그림 3(b)에서 확인 할 수 있다.

2. Completely Rupture the Intermolecular Bonds due to the Applied DEP Force

그림 3(b)에서 보듯 전극의 중앙부분에 위치하게 되는 beads 의 경우 수평 방향으로의 dielectrophoretic Force 가 발생하지 않으며, 수직으로의 dielectrophoretic force 만 나타난다. 이때, 전극에 인가하는 전압을 계속 증가시켜 전극의 중앙에서 beads와 전극 표면 사이의 결합이 수직방향의 DEP force 에 의해서 끊어지게 되면, beads는 전기장의 변화가 작은 전극 중앙의 Y축 방향으로 힘을 받아 위로 떠오르게 된다. 이때의 결합력이 끊어지는 순간의 전압을 unbinding voltage 라고 하며 이를 이용하여 결합력을

측정할 수 있다[20,21].

그림 3(c)는 미세 유체 칩 내에서 IgG beads와 SpA가 코팅된 표면에서 DEP force에 의해 분자간의 결합이 끊어지는 것을 촬영한 광학 영상이다. 그림 3(b)에서 수평 방향으로의 dielectrophoretic force를 받아 전극의 중앙으로 정렬되어 있던 beads가 unbinding voltage 이상의 전압을 인가받아 형성된 전극 중앙의 강한 수직방향 dielectrophoretic Force로 인해 표면과의 결합력이 완전히 끊어져, beads가 표면으로부터 수직 방향으로 떠 오른 것을 확인 할 수 있다. beads가 바닥에 있을 때와 electrode의 중앙에서 떠올랐을 때 현미경 상 초점의 차이가 생기며, 이러한 초점의 변화에 의해서 각 Bead가 가지는 grayscale 의 변화를 측정 할 수 있으며 이러한 grayscale 의 변화에 의한 결합력이 끊어지는 순간의 전압을 측정결과는 본 연구실에서 이미 개발되어서 검증된 측정기법을 활용하여 진행하였다[18].

3. Estimation and Verification of the Intermolecular Interaction Forces between Molecules on the Beads and the Surface

본 연구에 실행된 실험의 조건에서 각각 goat IgG 와 rabbit IgG 작용기가 활성화 된 beads와 protein A가 활성화된 표면 간의 결합이 끊어지는 순간의 전압을 force 로 계산한 후에 Gaussian distribution 으로 나타내 보았다(그림 4).

Goat IgG-SpA의 결합(a)의 경우 평균 rupture force인 mean force = 0.37 nN, 표준편차 = 0.81 이며, Rabbit IgG-SpA의 결합(b)의 경우 mean force = 0.91 nN, 표준편차 = 2.7의 결과로, Poisson Statistics통해 Single binding Force를 도출 해 보면, 각 종군의 Immunoglobulin G와 Protein A간의 Single binding Force는 Goat와 Rabbit이 각각 17 ± 7pN, 74 ± 16pN임을 알 수 있다.

그림 5의 결과는 DEP tweezers 를 이용하여 측정된 결과를 기존의 논문을 통해서 확인된 다른 측정기법들을 사용하여 측정된 결과값을 비교하는 그래프이다. 각각 다른 측

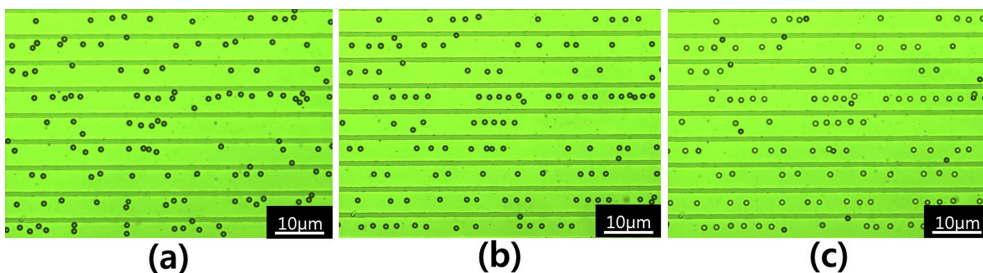


그림 3. 전압 인가 정도에 따른 beads의 이미지 차이 (a) 전압을 인가 하기 전 beads가 무작위로 흩어져 있는 상태 (b) 전압이 인가되어 결합이 끊어지기 전 정렬된 상태에서의 beads (c) Unbinding Voltage 이상의 전압이 인가 되어 결합이 끊어진 후 수직으로 떠 오른 beads
Fig. 3. Optical images of 10 μm IgG-functionalized polystyrene beads on the electrode coated by SpA-functionalized oxide layer with the application of voltages. (a) beads are scattered in random (b) After applied the voltage in a state where it is sorted before the bond rupture (c) Bind was ruptured and levitated beads

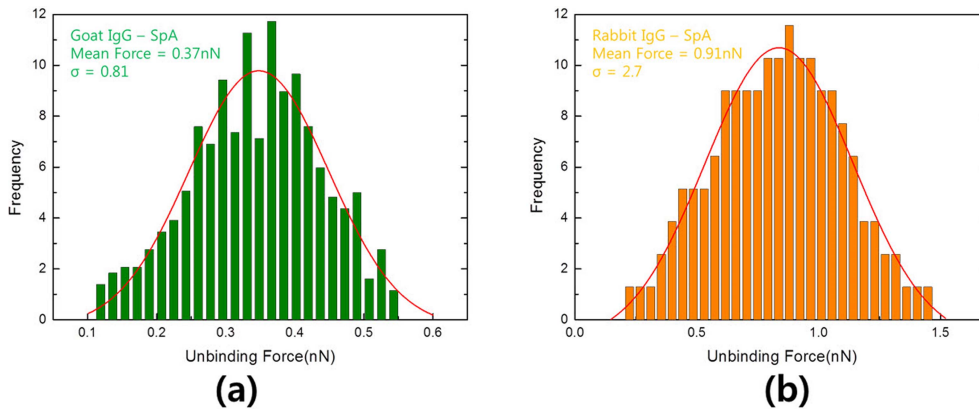


그림 4. Unbinding Voltage에 해당하는 결합력의 히스토그램과 가우시안 피팅 (a) Goat IgG - SpA (b) Rabbit IgG - SpA
 Fig. 4. Histogram and Gaussian fitting graphs as a function of unbinding force that ruptures the bond (a) Goat IgG - SpA (b) Rabbit IgG - SpA

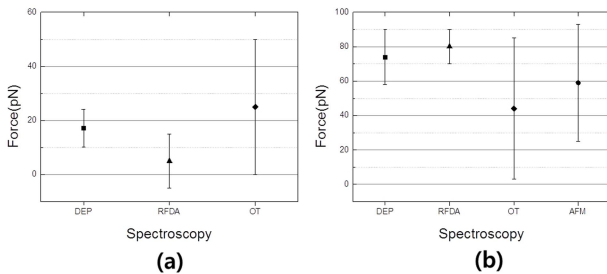


그림 5. IgG 중간 SpA 결합력에 대한 기존 측정장비들의 결합력 측정 결과와 비교, 사각형-DEP Tweezers, 삼각형-RFDA, 마름모-Optical Tweezers, 원형-AFM의 결과값 (a) Goat IgG - SpA (b) Rabbit IgG - SpA

Fig. 5. Binding forces between IgG and SpA measured by DEP Tweezers comparable to conventional force spectroscopy such as RFDA, OT, and AMF in previous works. Rectangle-DEP Tweezers, Triangle-RFDA, Rhombus-Optical Tweezers, Round-AFM (a) Goat IgG - SpA (b) Rabbit IgG - SpA

정장비들을 통해서 goat, rabbit의 immunoglobulin G와 protein A간의 결합력을 측정한 결과를 확인할 수 있다. 그림에서 볼 수 있는 사각형 모양의 표식이 본 연구의 실험 장치인 DEP tweezers 로 측정한 결과이며 삼각형 모양의 표식은 Radial-flow detachment assay(RFDA)에서 측정한 결과로, Goat와 Rabbit이 각각 5 ± 10 pN, 80 ± 10 pN [3], 마름모 표식의 Optical Tweezers(OT)의 경우 Goat와 Rabbit이 각각 25 ± 25 pN, 44 ± 41 pN[7,8]였다. 그리고 원형 표식의 AFM의 경우 Rabbit IgG-SpA 간의 결합력이 59 ± 34 pN[6]으로 알려지고 있으므로, DEP tweezers를 이용한 본 실험의 결과 값이 기존 결합력 측정 장비들의 실험 값과 유사하다는 것을 확인할 수 있으며, 기존 측정 장비들의 실험 값에 비해 오차 범위가 작은 것도 확인할 수 있다. 또한 통계적 신뢰도를 얻기 위해 Optical Tweezers의 경우 1개의 probe를 이용하여 36-83회, AFM의 경우 1

개의 probe를 이용하여 102-182회의 반복 실험을 독립적으로 진행하였으나[6,7], 본 연구에서 사용된 DEP tweezers의 경우에는 동시에 여러 개의 probe를 이용함으로써 각각의 조건에서 5회 미만의 반복 실험으로 150~200개의 결합력 data를 얻어 충분한 통계적 분석이 가능하였다.

IV. 결 론

본 연구에서는 미세 유체 칩을 기반으로 고안된 dielectrophoretic tweezers(DEP Tweezers)를 통해 protein A와 Immunoglobulin G의 결합력을 측정 해 보았다. 실험에서 사용된 DEP Tweezers를 이용하여 적은 비용과 간편한 측정 방법을 통하여 적은 반복의 실험 만으로 통계적 신뢰성을 가진 분자 간의 결합력에 대한 결과를 얻을 수 있었다. Protein A와 goat, rabbit의 각 immunoglobulin G간의 결합이 끊어 질 때의 힘을 측정할 수 있었고, Poisson distribution 통계법을 통하여 단일 분자간의 결합력(single binding force)을 구할 수 있었다. 본 실험의 결과를 radial-flow detachment assay, atomic force microscopy, optical Tweezers를 통하여 측정 하였던 기존의 연구 자료들과 비교하여 보았을 때 일관된 결합력을 보였다. 또한 본 연구를 통해서 측정기법의 경우 intermolecular force 를 microfluidic chip 안에서 동시에 많은 결합력들을 측정함으로써 보다 간편하고, 쉬우며, 통계적인 정확성을 가지는 결합력을 분석을 가능함을 보였다. 본 연구에서 제안된 DEP tweezers를 이용한 측정기법의 경우 통해서 hydrogen bond, ionic bond, van der waals force, hydrophobic interaction 과 같은 weak binding forces 로 이루어져 있는 receptor-ligand bond, 및 antigen-antibody interaction 간의 결합력을 측정할 수 있으며 이를 DNA sequence 간의 결합이나, 세포의 막 단백질과 Bio-marker간의 결합 등 보다 다

양한 생체 분자 또는 세포 등의 화학적, 생물학적 상호 결합의 측정에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

Reference

- [1] Langone, J. J, "Applications of Immobilized Protein A in Immunochemical Techniques", *J. Immunol. Methods*, 51, 3-48, 1982.
- [2] Cozens-Roberts, C., J.A. Quinn, and D.A. Lauffenburger, "Receptormediated adhesion phenomena: model studies with the radial-flowdetachment assay.", *Biophys. J.*, 58:107-125, 1990.
- [3] Suzanne C. Kuo and Douglas A. Lauffenburger, "Relationship between Receptor/Ligand Binding Affinity and Adhesion Strength." *Biophys. J.*, 65:2191-2200, 1993.
- [4] D.A. Simson, M. Strigl, M. Hohenadl, and R. Merkel, "Statistical Breakage of Single Protein A-IgG Bonds Reveals Crossover from Spontaneous to Force-Induced Bond Dissociation, *Phys Rev Lett*, 83. 3: 652-655, 1999.
- [5] Markus Strigl, Doris A. Simson, Claudia M. Kacher, and Rudolf Merkel, "Force-Induced Dissociation of Single Protein A-IgG Bonds.", *Langmuir*, 15, 7316-7324., 1999.
- [6] Ahmed Touhami, Manfred H. Jericho, and Terry J. Beveridge, "Molecular Recognition Forces between Immunoglobulin G and a Surface Protein Adhesin on Living *Staphylococcus aureus*.", *Langmuir*, 23, 2755-2760, 2007.
- [7] Andrea L. Stout. "Detection and Characterization of Individual Intermolecular Bonds Using Optical Tweezers." *Biophys. J.* 80: 2976-2986, 2001.
- [8] Mathias Salomo, Ulrich F. Keyser, Marc Struhalla, Friedrich Kremer, "Optical tweezers to study single Protein A/Immunoglobulin G interactions at varying conditions.", *Eur Biophys J.*, 37:927-934, 2008.
- [9] N.R. Guydosh and S.M. Block, "Direct observation of the binding state of the kinesin head to the microtubule.", *Nature*, 461, 125, 2009.
- [10] Keir C Neuman1 & Attila Nagy, "Single-molecule force spectroscopy: optical tweezers, magnetic tweezers and atomic force microscopy.", *Nature Methods*, vol. 5 no. 6, june 2008.
- [11] Glenn C. Ratcliff and Dorothy A. Erie, "A Novel Single-Molecule Study To Determine Protein-Protein Association Constants.", *J. Am. Chem. Soc.*, 123, 5632-5635, 2001.
- [12] Jordanka Zlatanovaa, Stuart M. Lindsayb, Sanford H. Leuba, "Single molecule force spectroscopy in biology using the atomic force microscope", *Progress in Biophysics & Molecular Biology* 74, 37-61, 2000.
- [13] John M. Williams, Taejoon Han, and Thomas P. Beebe, Jr, "Determination of Single-Bond Forces from Contact Force Variances in Atomic Force Microscopy." *Langmuir*, 12, 1291-1295, 1996.
- [14] Taejoon Han, John M. Williams, Thomas P. Beebe, Jr., "Chemical bonds studied with functionalized atomic force microscopy tips", *Analytica Chimica Acta*, 307, 365-376, 1995.
- [15] Su Ho Chung, Bum Jun Choi, Sang Woo Lee and Dae Sung Yoon, "Recent Research Trends in Nanoscale Electromechanical Systems for Bio-medical Applications", *Biomed Eng Lett*, 1:7-10, 2011.
- [16] Sang Woo Lee, Haibo Li, Rashid Bashir, "Dielectrophoretic tweezers for examining particle-surface interactions within microfluidic devices." *Applied Physics Letters*, 90, 223902, 2007.
- [17] Sang Hyun Baek, Woo-Jin Chang, Ju-Yeoul Baek, Dae Sung Yoon, Rashid Bashir, and Sang Woo Lee. "Dielectrophoretic Technique for Measurement of Chemical and Biological Interactions.", *Anal. Chem.*, 81, 7737-7742, 2009.
- [18] In Soo Park, Kilho Eom, Jongsang Son, Woo-Jin Chang, Kidong Park, Taeyun Kwon, Dae Sung Yoon, Rashid Bashir, and Sang Woo Lee, "Microfluidic Multifunctional Probe Array Dielectrophoretic Force Spectroscopy with Wide Loading Rates.", *ACS Nano*, 6, 10, 8665-8673, 2012.
- [19] George M. Whitesides, "The origins and the future of microfluidics", *Nature*, Vol 442, 27 July, 2006.
- [20] Suresh K. Bhatia, Lisa C. Shriver-Lake, Kimberly J. Prior, Jacque H. Georger, Jeffrey M. Calvert, Reinhard Bredehorst, and Frances S. Ligler. "Use of Thiol-Terminal Silanes and Heterobifunctional Crosslinkers for Immobilization of Antibodies on Silica Surfaces.", *Analytical Biochemistry*, 178, 408-413, 1989.
- [21] Washizu M, Jones T.B, 'Multipolar dielectrophoretic force calculation', *Journal of Electrostatics*, vol. 33, no. 2, pp. 187-198, 1994.
- [22] Jones T. B., and Washizu, M (1996) Multipolar dielectrophoretic and electrorotation theory, *J Electrostat* 37:121-134.