

DNA結合に伴う誘電体微粒子の誘電泳動特性変化の測定

中野 道彦^{*、1}, 笠原 弘道^{*}, 丁 震昊^{*}, 末廣 純也^{*}

(2015年9月24日受付; 2015年12月17日受理)

Study of Dielectrophoretic Property of DNA-labeled Dielectric Microbeads for DNA Detection

Michihiko NAKANO^{*、1}, Hiromichi KASAHARA^{*}, Zhenhao DING^{*} and Junya SUEHIRO^{*}

(Received September 24, 2015; Accepted December 17, 2015)

New DNA detection method using dielectrophoresis (DEP) of dielectric microbeads was proposed. The method is based on dynamic change of microbeads DEP by attaching DNA. Dielectric microbeads having natively negative DEP property become behaving positive DEP when they are labeled with DNA. The DNA-labeled microbeads can be collected on a microelectrode by positive DEP. DEP collection of the DNA-labeled microbeads causes the impedance change of the microelectrode. By measuring the impedance change, DNA-labeled microbeads are detected. The aim of this study is to investigate influence of DNA on the dielectrophoretic property of the dielectric microbeads. The crossover frequency of DEP and zeta potential of the microbeads were investigated. Three kinds of DNA and two kinds of microbeads were used. From the results, it was suggested that not only the conductance of DNA but also permittivity of DNA could affect DEP of the microbeads. Moreover, it is demonstrated that quantitative detection of DNA.

1. はじめに

PCR (polymerase chain reaction) は, DNA を特異的かつ指数関数的に増幅する技術で, 分子生物学ではなくてはならない. そして, その特徴から, 感染性の細菌やウイルスの高感度検出法としても利用されている.

ウイルス検出において PCR は, 対象であるウイルスの核酸 (DNA や RNA) から特異的に DNA を増幅する. そして, この増幅された DNA を何らかの方法で検出する. 一般的には, ゲル電気泳動が用いられるが, 煩雑で長時間の工程が必要である. また, PCR の増幅反応をリアルタイムでモニタリングするリアルタイム PCR 法では, PCR 後の DNA 検出が不要である. しかし, そのために必要な装置は非常に高額である. そこで, 増幅 DNA を簡便・迅速・安価に検出するために, 新しい DNA 検出法を考案した¹⁾.

その方法は, まず増幅 DNA を誘電体微粒子に結合し, その DNA 結合微粒子を誘電泳動によって微細電極に捕集する. 微粒子の捕集に伴って微細電極のインピーダンス

が変化するので, これをリアルタイムで計測し, DNA 結合微粒子を検出する. ここでは, 誘電体微粒子の誘電泳動特性がその表面コンダクタンスに依存して変化するという性質を利用している. 即ち, 負電荷を有する DNA が微粒子に結合することで, 誘電泳動特性が負の誘電泳動 (反発) から正の誘電泳動 (捕集) に変化する. これにより, DNA が結合した微粒子のみを選択的に検出する.

本研究では, DNA 結合に伴う微粒子の誘電泳動特性の変化に関して, その詳細を調べた.

2. 検出原理

2.1 誘電泳動

誘電泳動力は不平等電界中に置かれた誘電体粒子に働く力である. 水溶液中の球形誘電体粒子に働く誘電泳動力は次式で表される²⁾.

$$F_{DEP} = 2\pi r^3 \epsilon_m \text{Re}[K(\omega)] \nabla E^2 \quad (1)$$

ここで, r , ϵ_m , E はそれぞれ粒子半径, 溶媒の誘電率, 印加電界強度である. $\text{Re}[K(\omega)]$ は Clausius-Mossotti (CM) factor と呼ばれる誘電泳動特性を表す係数で,

$$K(\omega) = \frac{\epsilon_p^* - \epsilon_m^*}{\epsilon_p^* + 2\epsilon_m^*} \quad (2)$$

で表される. ここで, ϵ_p^* , ϵ_m^* はそれぞれ粒子と溶媒の複素誘電率である. CM factor が正であれば, 粒子は電界の強い方向に移動し, 負であれば電界の弱い方向に移動する. 前者を正の誘電泳動, 後者を負の誘電泳動と呼

キーワード: 誘電泳動, DNA 検出, 核酸増幅検査, 微粒子誘電泳動

^{*}九州大学システム情報科学研究所

(〒819-0395 福岡県福岡市西区元岡 744)

Department of Electrical and Electronic Engineering,
Kyushu University, 744 Motoooka, Nishi-ku, Fukuoka, 819-0395, Japan

¹ nakano@ees.kyushu-u.ac.jp

ぶ。複素誘電率は、

$$\varepsilon^* = \varepsilon - j\frac{\sigma}{\omega} \quad (3)$$

で表される。ここで、 ε 、 σ 、 ω はそれぞれ誘電率、導電率、印加電界の角周波数である。

微小粒子の導電率 σ_p は次式で与えられることが知られている³⁾。

$$\sigma_p = \sigma_{pbulk} + \frac{2K_{Stern}}{r} + \frac{2K_{Diff}}{r} \quad (4)$$

ここで、 σ_{pbulk} は粒子材料の導電率で、 K_{Stern} と K_{Diff} は粒子表面の Stern 層内および拡散層内のコンダクタンスである。式(4)の2項および3項は粒子の半径の逆数に依存しており、粒子の大きさが小さくなると表面コンダクタンスの影響が大きくなることを示している。 K_{Stern} と K_{Diff} はそれぞれ次の式で表される^{3,4)}。

$$K_{Stern} = \rho_{q,Stern}\mu_{Stern} \quad (5)$$

$$K_{Diff} = \frac{4F^2cz^2D(1+3m/z^2)}{RT\kappa} \left(\cosh\left[\frac{zq\zeta}{2kT}\right] - 1 \right) \quad (6)$$

$$\text{ここで、 } m = \left(\frac{RT}{F}\right)^2 \frac{2\varepsilon_m}{3\eta D}$$

式(5)中の $\rho_{q,Stern}$ と μ_{Stern} はそれぞれ Stern 層内の等価的表面電荷密度とイオン移動度である。式(6)中の記号はそれぞれ、 ζ : ゼータ電位、 D : 拡散層内の自由電荷の拡散係数、 z : 対イオン価数、 F : ファラデー係数、 R : ガス定数、 q : 素電荷量、 T : 温度、 c : 電解質濃度、 η : 粘度、 κ^{-1} : デバイ長、 m : 電気浸透によるイオンフラックスの拡散層表面コンダクタンスへの寄与を表す無次元数パラメータ、を表す。水溶液中で負電荷を有する DNA が微粒子に結合すると、 $\rho_{q,Stern}$ や ζ が大きく変化すると考えられる。

2.2 誘電泳動のクロスオーバー周波数

上述のように誘電泳動力の向きは $\text{Re}[K(\omega)]$ によって決まる。球形粒子の場合、その大きさは $-0.5 \sim 1$ である。誘電泳動のクロスオーバー周波数とは、 $\text{Re}[K(\omega)] = 0$ となる印加電界の周波数のことで、これを測定することで誘電体粒子の誘電特性を見積もることができる³⁾。クロスオーバー周波数は、式(1)~(3)より次式で表される。

$$f_X = \frac{1}{2\pi} \sqrt{-\frac{\sigma_p^2 + \sigma_p\sigma_m - 2\sigma_m^2}{\varepsilon_p^2 + \varepsilon_p\varepsilon_m - 2\varepsilon_m^2}} \quad (7)$$

微粒子の動きから誘電泳動力を定量的に測定することは難しいが、誘電泳動力が働かなくなる ($f_X = 0$) 周波数を測定することは簡単である。

微粒子のゼータ電位が表面電荷密度に比例して変化する一方で、クロスオーバー周波数は微粒子の導電率およ

び誘電率によって変化する。式(4)および(5)より、微粒子の導電率は微粒子の表面電荷密度に比例する。微粒子上の DNA 量の変化に対するゼータ電位とクロスオーバー周波数の変化を比較することで、DNA の電荷およびその誘電率の微粒子の電気特性への影響を検討する。

2.3 DNA結合に伴う微粒子の誘電泳動変化を利用したDNA検出法

PCR 増幅 DNA を迅速に検出するために、微粒子の誘電泳動を利用する方法を考案した。これは、微粒子の誘電泳動がその表面コンダクタンスに依存して変化するという性質を利用する。Fig. 1 に誘電体微粒子の $\text{Re}[K(\omega)]$ の粒子表面コンダクタンス依存性を示す。表面コンダクタンスの増加に伴って、 $\text{Re}[K(\omega)]$ が負から正に変化する。この性質を利用して、Fig. 2 に示す手法を考案した。PCR 増幅 DNA を誘電体微粒子に結合し、その DNA 結合微粒子を誘電泳動によって微細電極に捕集する。PCR 増幅 DNA が誘電体微粒子に結合することで微粒子の表

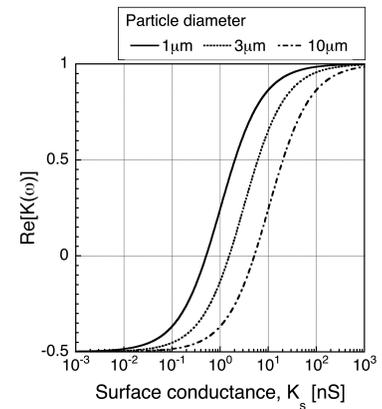


図1 誘電体粒子の表面コンダクタンスと $\text{Re}[K(\omega)]$ の関係
Fig. 1 Results of theoretical calculation of dependence of $\text{Re}[K(\omega)]$ of a dielectric particle with various diameter on the surface conductance. The parameter values are: $\varepsilon_p = 2.4 \times \varepsilon_0$ F/m, $\varepsilon_m = 78 \times \varepsilon_0$ F/m, $\varepsilon_0 = 8.854 \times 10^{-12}$ F/m, $\sigma_m = 2 \times 10^{-3}$ S/m, and $\omega = 2\pi \times 10^5$ rad/s. Surface conductance is typically 1 nS for latex particles⁴⁾.

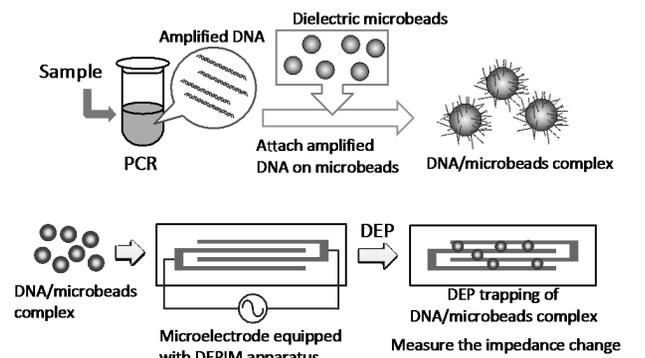


図2 微粒子の誘電泳動を用いた DNA 検出法
Fig. 2 Schematic diagram of DNA detection based on dielectrophoresis of microbeads.

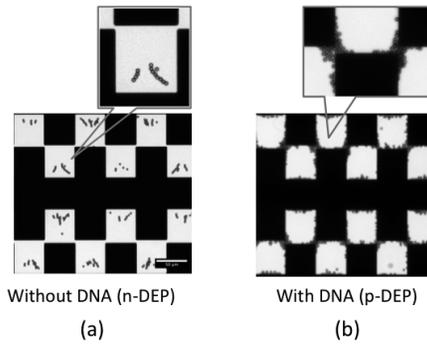


図3 微粒子の誘電泳動. (a)DNA 未結合, (b)DNA 結合微粒子.

Fig. 3 Dielectrophoresis of microbeads without (a) and with (b) DNA

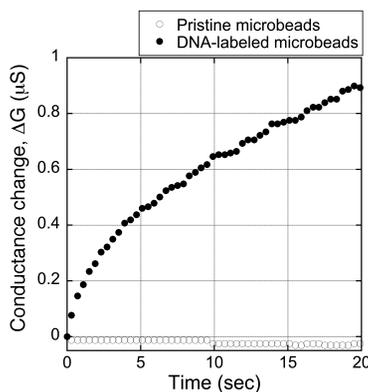


図4 DNA 結合微粒子の検出例

Fig. 4 Typical example of DNA labeled microbeads detection.

面コンダクタンスが上昇し、微粒子誘電泳動が負から正に変化する。そして、捕集に伴う電極間のインピーダンス変化をリアルタイムで計測することで、DNA 結合微粒子を検出する。誘電泳動による対象物の捕集とその捕集に伴う電極間のインピーダンス変化の計測を同時に行う手法を DEPIM (dielectrophoretic impedance measurement) という⁶⁾。Fig. 3 に DNA 結合の有無によって微粒子の誘電泳動が変化する様子を、Fig. 4 に DEPIM によって DNA 結合微粒子を検出した結果の例を示す⁵⁾。

3. 実験

DNA 結合微粒子の誘電泳動特性を詳細に調べるために、本研究では、微粒子誘電泳動のクロスオーバー周波数および DNA 結合微粒子のゼータ電位を測定した。また、鋳型 DNA 量を変化させて PCR を行い、増幅 DNA を定量的に検出できるかどうか検討した。

3.1 DNA と微粒子の結合

204 bp, 391 bp, 796 bp の二本鎖 DNA (以下、それぞれ 204 bp DNA, 391 bp DNA, 796 bp DNA と呼ぶ) を用いた。これらは、pUC19 DNA を鋳型に PCR によって作

製した。PCR で使用したプライマーのひとつに 5' 末端がビオチンで修飾されたものを用いた。そのため、これらの DNA の片端にはビオチンが結合している。微粒子には、ストレプトアビジン修飾粒子を用いた。微粒子は直径 2.8 μm と 1 μm のものを用いた。ビオチンとストレプトアビジンは特異的に結合する性質があり、この性質を利用して、DNA を微粒子に結合させる。PCR 増幅後の DNA は、エタノール沈殿により精製した。DNA 濃度を測定した後で、DNA 溶液と微粒子とを結合溶液 (5 mM Tris-HCl (pH7.5), 0.5 mM EDTA, 1 M NaCl) に懸濁し、15 分間室温で反応させた。微粒子と DNA の個数はそれぞれマニュアル記載の微粒子濃度および測定した DNA 濃度から計算して調製した。結合反応時の微粒子の濃度は、 2.8×10^5 個/ μl とした。結合反応後、微粒子を洗浄し、Milli-Q 水に懸濁した。

3.2 クロスオーバー周波数の測定

微細電極にキャスルウォール型電極 (最短ギャップ長: 5 μm) を用いた。DNA 結合微粒子懸濁液の導電率を NaCl で調製した。電極上に DNA 結合微粒子懸濁液を滴下した後、カバーガラスをのせた。20 V_{pp} の正弦波電圧を印加し、印加電圧の周波数を変化させてクロスオーバー周波数を測定した。周波数は、負の誘電泳動が発生する高い周波数から減少させて、正の誘電泳動が発生した周波数をクロスオーバー周波数とした。

3.3 ゼータ電位の測定

ゼータ電位測定装置 ZEECOM (マイクロテック・ニチオン) を用いて、Milli-Q 水に懸濁した DNA 結合微粒子のゼータ電位を測定した。このゼータ電位測定装置は、電気泳動法によるゼータ電位測定装置で、個々の微粒子の直流電界下での挙動を計測することで、ゼータ電位を求める。

3.4 DNA の定量検出

鋳型 DNA 量を変化させて PCR を行い、それぞれの増幅 DNA に対して微粒子を結合し、DNA 結合微粒子の DEPIM 応答がどのように変化するかを調べた。

鋳型 DNA (pUC19 DNA) 量を $10^7 \sim 10^3$ copy として 391 bp DNA を対象に PCR を行い、ゲル濾過カラム (MicroSpin S-400 HR Columns, GE Healthcare) を用いて精製し、余剰のプライマーを取り除いた。PCR 産物はアガロースゲル電気泳動により確認した。PCR 後の DNA 濃度を Qubit 3.0 Fluorometer (life technologies) により計測した。微粒子の濃度を 1.3×10^4 個/ μl とし、微粒子と 391bp DNA を結合溶液に懸濁して、15 分室温で反応させた後、Milli-Q 水に懸濁した。キャスルウォール型電極上に懸濁液を滴下し 1 分間静置した後、2 V_{pp}, 100 kHz の正弦波電圧を印加し DEPIM 応答を取得した。

DEPIM 応答の測定には、ロックインアンプを用いて回路に挿入したシャント抵抗 (100 k Ω) を介して電流を測定し、その結果からインピーダンスを計算した⁶⁾。

4. 実験結果

4.1 クロスオーバー周波数の測定結果

直径 2.8 μm の微粒子に対して、 $1:10^6$ の割合で DNA を結合したときのクロスオーバー周波数を Fig. 5 に示す。DNA 未結合の微粒子は、測定した周波数範囲 (100 kHz 以上) で負の誘電泳動を示した。DNA 結合微粒子では、いずれの大きさの DNA を結合した場合でも、溶媒導電率 5.8×10^3 S/m 以上になるとクロスオーバー周波数は減少した。このような溶媒導電率に伴うクロスオーバー周波数の変化は、過去に報告された微粒子のクロスオーバー周波数と同様である⁴⁾。本研究では、DNA 長が大きくなるにつれて、クロスオーバー周波数が高くなる傾向にあった。

Fig. 6 は、溶媒導電率 2×10^4 S/m のときのクロスオーバー周波数を DNA の大きさに対してプロットしたものである。クロスオーバー周波数と DNA の大きさは、両対数グラフ上でほぼ線形関係であった。この関係は、 $2 \times 10^4 \sim 1.2 \times 10^3$ S/m の範囲で同様であった。一方、溶媒導電率が 2.8×10^3 S/m 以上になると、391 bp DNA を結合した場合に比べて 204 bp DNA を結合した場合のクロスオーバー周波数が大きくなった。その原因は不明であるが、溶媒導電率が高い領域はクロスオーバー周波数が急激に変化する領域であり、そのために測定誤差が大きくなったと考えている。なお、ビオチン-ストレプトアビジンの相互作用は、実験を行った NaCl 濃度範囲内ではほとんど影響を受けないため、懸濁溶液の違いによる DNA - 微粒子間の結合への影響はほとんどないと考えられる⁷⁾。

Fig. 7 は 391 bp DNA を用いて、結合 DNA 量によるクロスオーバー周波数の変化をプロットしたものである。微粒子直径 2.8 μm および 1 μm に対して計測した。DNA 結合量が減少するにつれてクロスオーバー周波数が小さくなった。また、粒子径 1 μm では 2.8 μm に比べてクロスオーバー周波数が大きくなった。DNA 量が少なくなるにつれて、測定値の標準偏差が大きくなった。微粒子直径 2.8 μm では、微粒子に対する DNA の量が 10^4 倍のときに、1 μm では 10^3 倍のときにクロスオーバー周波数は観察されなかった。

以上の結果から、微粒子誘電泳動は DNA 長およびその量に依存して変化することが示された。DNA 長が長くなったり、量が多くなったりすると、DNA 結合微粒子のクロスオーバー周波数が高くなることが示された。

式(4)、(5)および(7)から、微粒子の表面コンダクタンスおよび直径と微粒子の導電率には、それぞれ比例関係と反比例関係がある。DNA は一塩基あたり一個の負電荷を持っており、DNA 全体の電荷量はその大きさに比例すると考えてよい。Fig. 7 で示された結果はこれらを反映したものであるといえる。

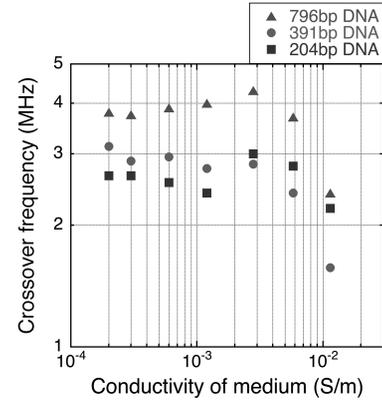


図 5 溶媒導電率に対する DNA 結合微粒子のクロスオーバー周波数

Fig. 5 Crossover frequency of DNA-labeled microbeads plotted against the conductivity of the medium.

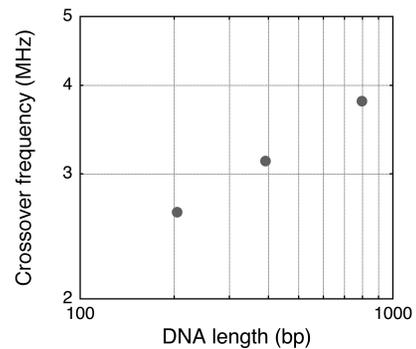


図 6 DNA 結合微粒子のクロスオーバー周波数の DNA 長依存性
Fig. 6 Dependence of the crossover frequency on the labeled DNA length. The conductivity of the medium was 2×10^4 S/m.

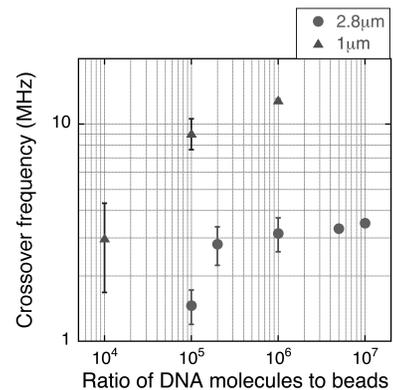


図 7 DNA 結合微粒子のクロスオーバー周波数と DNA 結合量との関係

Fig. 7 Influence of the microbeads size on the crossover frequency against amount of DNA. The conductivity of the medium was 2×10^4 S/m.

4.2 ゼータ電位の測定結果

DNA 未結合の微粒子は 14.6 ± 10.6 mV を示した. 直径 $2.8 \mu\text{m}$ の微粒子に対して, $1:10^6$ の割合で DNA を結合したときのゼータ電位を Fig. 8 に示す. DNA が結合することで, ゼータ電位は負の値になった. そして DNA 長に対して大きな変化を示さなかった. 391 bp DNA を用いて, 結合 DNA 量とゼータ電位の関係を Fig. 9 に示す. 微粒子に対して DNA が 10^5 倍以上では, 粒子径の影響は小さく, ゼータ電位はほぼ同じであった. DNA 量 10^4 倍では粒径 $2.8 \mu\text{m}$ の場合にゼータ電位の絶対値が小さくなった. 10^3 倍では DNA 未結合の場合とほぼ同じゼータ電位となった.

Fig. 10 は, 粒子径 $2.8 \mu\text{m}$ の微粒子に対して 391 bp DNA を結合したときのクロスオーバー周波数とゼータ電位を比較したものである. クロスオーバー周波数の変化に比べて, ゼータ電位の変化が緩やかであった. これは, 粒子径 $1 \mu\text{m}$ の微粒子でも同様であった. ゼータ電位は, 粒子の表面電荷量に依存して変化すると考えられ

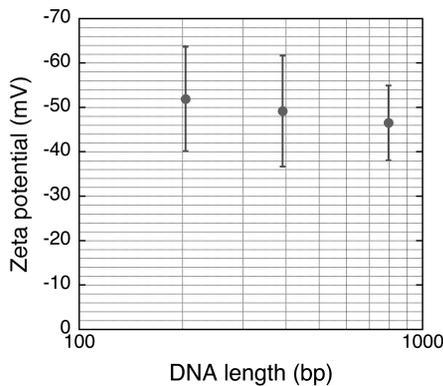


図8 DNA 結合微粒子のゼータ電位と DNA 長の関係
Fig. 8 Zeta potential of DNA-labeled microbeads plotted against the attached DNA length.

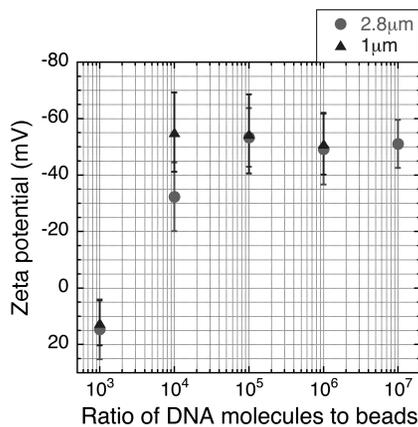


図9 DNA 結合微粒子のゼータ電位と結合 DNA 量の関係
Fig. 9 Influence of the microbeads size on the zeta potential against amount of DNA.

る一方で, クロスオーバー周波数は粒子の導電率および誘電率の両方に影響される. DNA 量の変化に対するゼータ電位の変化と比べて, クロスオーバー周波数の変化が大きいのは DNA の電荷のみならず DNA の誘電率が粒子全体の誘電率に影響を及ぼしているからではないかと考えている.

4.3 DNAの定量検出

鋳型 DNA 量 (pUC19 DNA) を $10^7 \sim 10^3$ copy と変化させて, 319 bp DNA を対象に PCR を行った. ここでは, 本手法を細菌・ウイルス検査に応用することを想定し, 鋳型 DNA 量を変化させて, そこから増幅された DNA を定量的に検出できるかどうかを検討した. 実際の検査では, 検出対象となる細菌やウイルスから核酸を抽出し, それを PCR によって増幅する. 鋳型 DNA 量を変化させることは, 対象細菌やウイルスの量を変化させることに相当する.

Fig. 11 に増幅 DNA のアガロースゲル電気泳動を, 表 1 にそのときの DNA 濃度を示す. 本研究の PCR 条件の

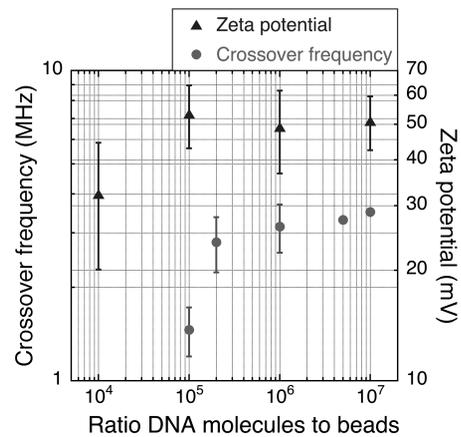


図10 DNA 結合微粒子のクロスオーバー周波数とゼータ電位の比較 (粒子径 $2.8 \mu\text{m}$)
Fig. 10 Comparison of the crossover frequency and zeta potential of DNA-labeled microbeads (diameter: $2.8 \mu\text{m}$).

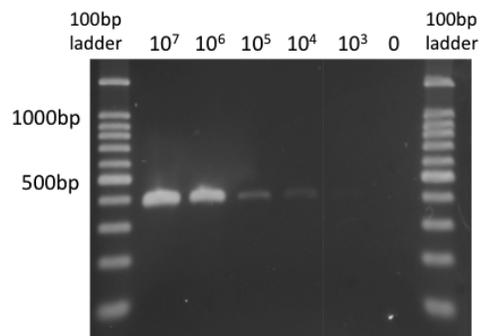


図11 段階希釈した鋳型 DNA からの PCR 増幅産物の電気泳動像
Fig. 11 Gel electrophoresis image of the amplified DNA from serial dilutions of the template.

表1 増幅 DNA の濃度
Table 1 Concentration of amplified DNA

Template DNA [copies/reaction]	Amplified DNA [ng/ μ l]
10^7	34.8
10^6	14.6
10^5	2.63
10^4	1.32
10^3	N.D.
0	N.D.

N.D.: not detected

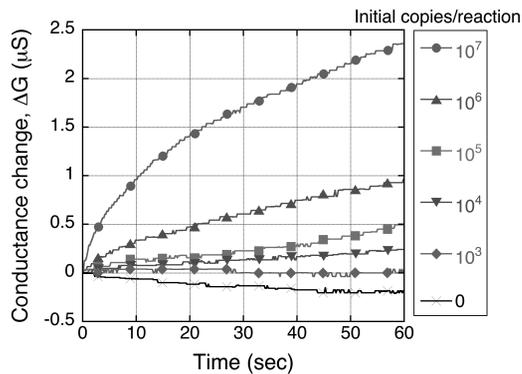


図12 DNA結合微粒子のDEPIM結果

Fig. 12 DEPIM of the DNA-labeled microbeads. After PCR using each of initial copies of template DNA, the amplified DNA was attached on the microbeads. Then, the DNA-labeled microbeads was detected by DEPIM.

増幅可能鋳型 DNA 量の最小値は 10^4 copy であった。このときの増幅 DNA 濃度は 1.32 ng/ μ l であった。

PCR産物を粒子径 2.8 μ m の微粒子に結合し、その DNA 結合微粒子を DEPIM によって計測した結果を Fig. 12 に示す。鋳型 DNA 量によって増幅 DNA 量も変化し、その変化に応じて DEPIM 応答も変化した。鋳型 DNA 量 $10^4 \sim 10^7$ copy の範囲で、鋳型 DNA 量が多くなるにつれて DEPIM 応答量（コンダクタンスの上昇値）も大きくなった。これは、微粒子に結合した DNA 量によって誘電泳動特性が変化することに起因する。一方で、増幅 DNA が確認されなかった 10^3 copy およびネガティブコントロールでは、DEPIM 応答は 0 よりも小さくなった。これは、負の誘電泳動によって電極間から微粒子が排除されたためであると考えている。この結果から、微粒子誘電泳動を利用した DNA 検出法は、定量的に鋳型 DNA 量を計測できることが示された。

5. まとめ

微粒子誘電泳動を用いた DNA 検出法に関して、その原理を詳細に調べた。本 DNA 検出法は、誘電体微粒子

に DNA が結合することで、微粒子の誘電泳動特性が大きく変化することを利用している。その詳細を調べるために、微粒子誘電泳動のクロスオーバー周波数及び微粒子のゼータ電位について、DNA 長、DNA 量、粒子径を変化させてその影響を調べた。その結果、ゼータ電位が粒子径や DNA 長の変化に対して受ける影響は小さく、クロスオーバー周波数はその影響が大きかった。このことから、微粒子誘電泳動の変化には、DNA の電荷だけではなく誘電率も影響していることが示唆された。

また、本 DNA 検出法に関してその定量性を調べた。その結果、鋳型 DNA 量の増加に応じて応答値が上昇することが示され、定量的に検出できることが示された。

謝辞

本研究の一部は、日本学術振興会科学研究費補助金 (No.26289125, No. 15K06111), 豊田理研スカラー (豊田理化学研究所) の援助により行われた。記して謝意を表す。

参考文献

- 1) M. Nakano, Z. Ding, H. Kasahara and J. Suehiro: Rapid microbead-based DNA detection using dielectrophoresis and impedance measurement. *Europhys. Lett.*, **108** (2014) 28003
- 2) H. A. Pohl: Dielectrophoresis: the behavior of neutral matter in nonuniform electric fields, Cambridge University Press (1978)
- 3) M. P. Hughes, H. Morgan and F. J. Rixon: Dielectrophoretic manipulation and characterization of herpes simplex virus-1 capsids. *Eur. Biophys. J.*, **30** (2001) 268
- 4) I. Ermolina and H. Morgan: The electrokinetic properties of latex particles: comparison of electrophoresis and dielectrophoresis. *J. Colloid Interface Sci.*, **285** (2005) 419
- 5) 中野道彦, 丁震昊, 笠原弘道, 末廣純也: DNA 結合に伴う微粒子の誘電泳動変化を利用した DNA 検出. 静電気学会講演論文集 '14, p. 141, 静電気学会 (2014)
- 6) J. Suehiro, R. Yatusnami, R. Hamada and M. Hara: Quantitative estimation of biological cell concentration suspended in aqueous medium by using dielectrophoretic impedance measurement method. *J. Phys. D: Appl. Phys.*, **32** (1999) 2814
- 7) A. Holmberg, A. Blomstergren, O. Nord, M. Lukacs, J. Lundberg, M. Uhlén: The biotin-streptavidin interaction can be reversibly broken using water at elevated temperatures. *Electrophoresis*, **26** (2005) 501