

201103008A

---

厚生労働科学研究費補助金

地球規模保健課題推進研究事業

マラリア感染細胞表面のタンパク質一分子計測と異常ヘモグロビンの  
マラリア耐性メカニズムの解明に関する研究

平成23年度 総括研究報告書

研究代表者 有江 隆之

平成24(2012)年 5月

---

---

201103008A

厚生労働科学研究費補助金

地球規模保健課題推進研究事業

マラリア感染細胞表面のタンパク質一分子計測と異常ヘモグロビンの  
マラリア耐性メカニズムの解明に関する研究

平成23年度 総括研究報告書

研究代表者 有江 隆之

平成24（2012）年 5月

## 目 次

I. 総括研究報告	
マラリア感染細胞表面のタンパク質一分子計測と異常ヘモグロビンの マラリア耐性メカニズムの解明に関する研究 有江隆之	----- 1
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 5
III. 研究成果の刊行物・別刷	----- 6



マラリア感染細胞表面のタンパク質一分子計測と異常ヘモグロビンの  
マラリア耐性メカニズムの解明に関する研究

研究代表者 有江 隆之 大阪府立大学工学研究科助教

**研究要旨** 遺伝性疾患であるヘモグロビン異常がマラリアに耐性を有することは広く知られているが、そのメカニズムは明らかにされていない。本研究では原子間力顕微鏡を用い、感染赤血球表面上の突起状構造が、血管内壁細胞へ接着するプロセスを一分子レベルで解明することに加え、本年度はカーボンナノチューブを用い、タンパク質の一分子間相互作用力を計測するための要素技術確立した。免疫グロブリンを用いた抗原-抗体間相互作用力はおよそ270pNと見積もられた。さらに $\alpha$ -thalassemia感染赤血球表面の原子間力顕微鏡観察から、我々が提案してきた遺伝型ヘモグロビン異常の特異な構造変化は、ヘモグロビンの種類によらず共通であり、これがマラリア耐性メカニズムであることが示唆された。今後は確立した分子間相互作用力計測を用い、マラリア由来のタンパク質と血管内壁細胞との相互作用力を計測し、ヘモグロビンの種類による結合力の違いを解明するとともに、原子間力顕微鏡による表面分布の違いとの相関を明らかにすることで、総合的にヘモグロビン異常によるマラリア耐性メカニズムを解明する。

### A. 研究目的

これまでアフリカや東南アジアの特定の地域で見られる、ヘモグロビンSやヘモグロビンCに代表される遺伝性疾患であるヘモグロビン異常が、重篤なマラリアになるリスクを低減させるという報告されている[1]。我々はヘモグロビン異常が、赤血球表面の構造を大きく変化させることを発見し、この構造変化が重篤なマラリアの発症を引き起こすリスクを低減させるというモデルを提案してきた[2]。本研究ではこれまで報告されてきたヘモグロビンCやS以外にも、同様のメカニズムで耐性を持つ遺伝型ヘモグロビンがあると考え、今年度は $\alpha$ -thalassemiaを持つ赤血球表面の構造変化を原子間力顕微鏡（AFM）で観察・解析を行い、これらの耐性メカニズムが異常ヘモグロビンに共通したものであることを示す。

カーボンナノチューブはグラファイトシートを丸めた円筒構造をとり、機械的な強度が高く、物理的・化学的に非常に安定な炭素からなる物質である。本研究では、カーボンナノチューブ片持ち梁を用いた、全く新しい一分子相互作用力計測技術を開発した。ナノチューブのバネ定数はおよそ $10^{-4}$  N/mオーダーであり、一般的なAFMで用いられるシリコンやシリコンナイトライドカンチレバーと比較して2桁小さい。バネ定数が小さいほど、力を受けたときに撓む距離が大きくなるので、相互作用力計測時の撓み検出が容易となり、一分子計測により適していると考えられる。さらに光学顕微鏡下で観察を行うので、タンパク質を蛍光標識し可視化した状態での相互作用力計測が可能である。ナノチューブ先端はグラファイトで閉じた構造を有するが、開端する事により、部位特異的にタンパク質一分子を捕捉することが可能である。ここで固定する分子を変更すると、様々な分子間相互作用を単一分子レベルで計測することが可能となり、あらゆる病原体やウイルスと細胞との相互作用を明らかにするための知見を供することが期待される。今年度は本手法の精度を高めるために、十分に希釈した濃度の分子を用いて一分子間の相互作用力を計測することを試みると同時に、あ

はじめバネ定数が分かっているAFM片持ち梁を用い、ナノチューブ片持ち梁に力を加えたときの撓みから正確にバネ定数を測定し、より精度良く分子間相互作用力を計測することを試みた。

### B. 研究方法

AFMを用いた観察のための感染赤血球は、アフリカで採血されたものをその場でparaformaldehydeにより固定し、実験室に運ばれたものをカバーガラス上に配置したものである。マラリア感染のステージを蛍光顕微鏡で観察できるように、固定後の細胞内のマラリア寄生虫のDNAをYOYO-1で染色し、乾燥させた。AFM観察は室温、大気中で行った。

ナノチューブ片持ち梁を用いた相互作用力計測は図1に示す倒立顕微鏡を元にした測定装置を用いて行った。まず化学気相成長法により合成したナノチューブを1000°C以上の高温で熱処理し、結晶性を高めることで剛性を確保した。その後先端にレーザー光を照射して酸化して開端し、カルボキシル基を導入した。次に先端を1-ethyl-3-(dimethylaminopropyl)carbodi-imide

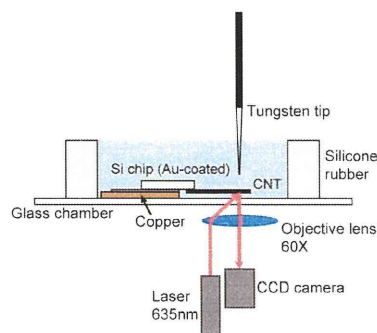


図1 抗原-抗体間の相互作用力計測装置

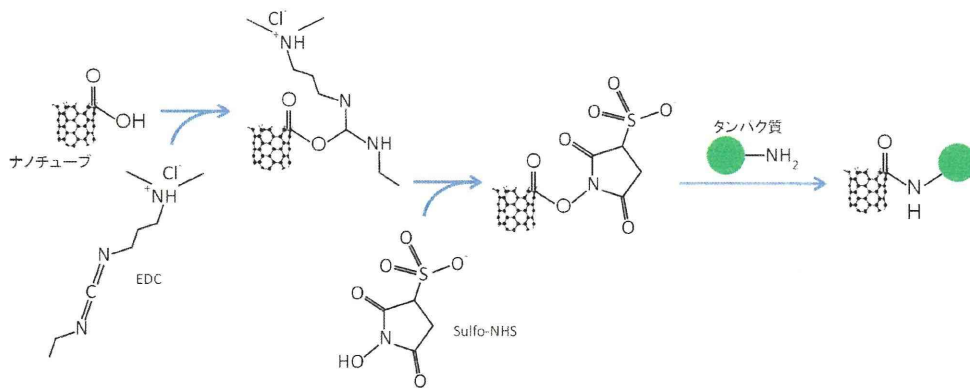


図2 EDC と sulfo-NHS を用いた、ナノチューブ先端へのタンパク質固定反応

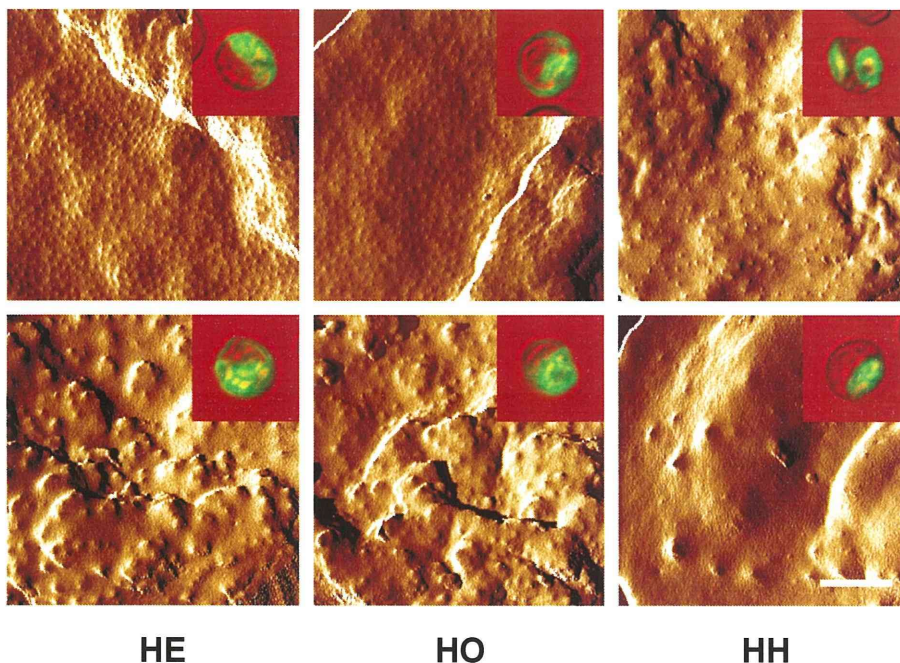


図3  $\alpha$ -thalassemia をもつ感染赤血球表面の AFM 像

HCl (EDC) と sulfo-N-hydroxysuccinimide (sulfo-NHS) を混合したクロスリンカー溶液 (pH=5.3) で活性化させた。リン酸緩衝液で洗浄後、免疫グロブリンG(IgG) を共有結合させた。相互作用力計測に用いる対向のタンパク質には、タングステンプローブ先端に固定したIgGに対する抗体を用い、接触させた後、プローブを離れたときのナノチューブの撓みから相互作用力を計測した。計測は室温、大気中で行った。

(倫理面への配慮)

本研究を通して使用したマラリア感染赤血球試料は、米国立感染症研究所 (NIAID) の研究協力者がアフリカで、NIAID の定める規程に基づいて患者の同意・協力の下採取し、既に固定された状態で匿名の下取り扱うため、この項目には直接該当しない。

### C. 研究結果と考察

図3に $\alpha$ -thalassemiaをもつマラリア感染赤血球表面のAFM像を示す。左からヘテロ、ホモ、ヘモグロビンH症の感染赤血球である。表面の突起構造の詳細な解析から、感染細胞の構造変化は、通常のヘモグロビンAと同様なもの(図3上半分)の他に、ヘモグロビンCやヘモグロビンSで見られた特異な構造変化を持つもの(図3下半分)も数多くあり、これらの構造変化は遺伝型ヘモグロビン異常に共通であることが分かった。これらの特異な構造変化では、突起状構造の大きさが通常と比較して60%以上も大きくなるが密度は低くなり、密度が高く一様な分布を示す通常型とは大きく異なる。これは赤血球表面に発現するマラリア由来のタンパク質は、これら異常ヘモグロビンに依らず一定であるが、細胞膜内側に点在した、ヘモグロビンの凝集体とともに巨大な構造を形成し、その結果表面の特異な構造変化を引き



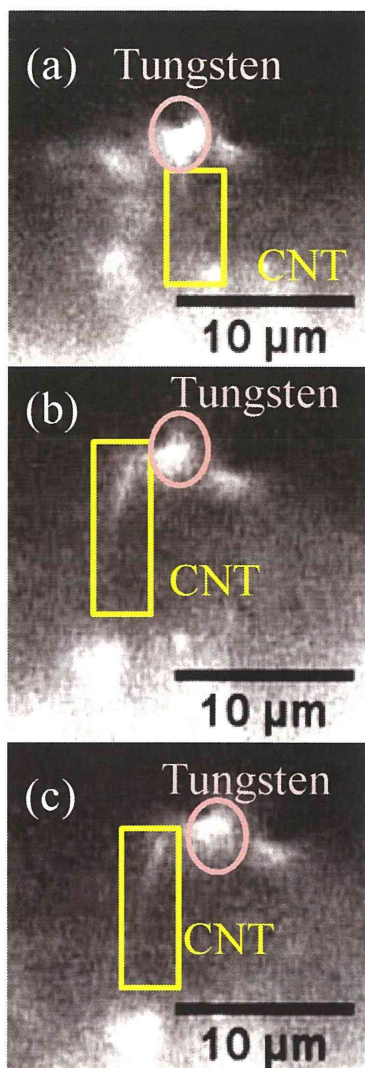


図4 ナノチューブ (CNT) 片持ち梁を用いた抗原-抗体間相互作用力計測

起こしていると考えられる[3]。

ナノチューブ片持ち梁を用いた抗原-抗体間の一分子相互作用計測に先だって、まずナノチューブ自身のバネ定数を見積もるために、対向に設けた予めバネ定数が分かっているAFMプローブ(0.035N/m)で力を加えナノチューブを変位させた。その変位からバネ定数を求めると、 $6.4 \times 10^{-4}$ N/m、そこから算出されるヤング率はおよそ940GPaとなった。この値を用いることにより、抗原-抗体間相互作用力をより正確に求めることが可能になる。

ナノチューブ先端にヤギ産免疫グロブリンGを固定し、対向のタングステンプローブ先端にその抗体を配置して、抗原-抗体を結合させた後、ナノチューブ片持ち梁を離れたときの撓みから相互作用力を見積もった。一連の計測過程を図4に示す。まず図4 (a) のようにナノチューブをタングステンを押すことにより抗原抗体を結合させた後、ナノチューブを離していくと、ナノチューブ先端に結合させた抗原とタングステンプローブに接着した抗体との相互作用によりナノチューブが撓んだ (図4(b)、図4(c))。ナノチューブを一定の速度で離れたとき

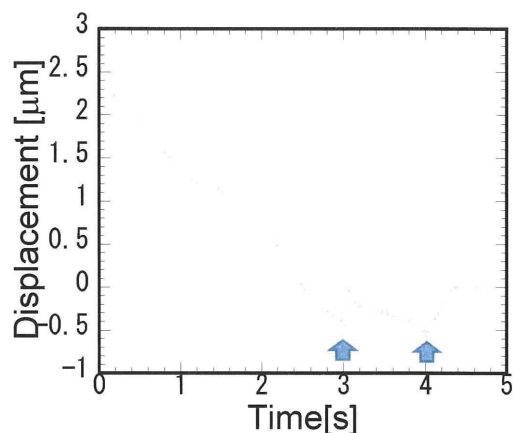


図5 代表的なナノチューブ片持ち梁の撓み曲線

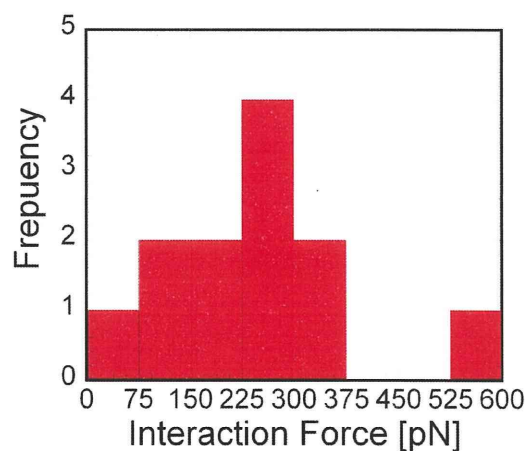


図6 相互作用力の分布

の代表的な撓み曲線を図5に示す。相互作用力に関するピークが矢印で示したように2カ所あり、それぞれタンパク質が解けたところ、抗原-抗体間の結合が解けたところだと考えられる。また2回目の相互作用力を複数回計測した結果が図6である。これより今回測定した抗原-抗体間の相互作用力は $270 \pm 140$ pNであると見積もられた。これはこれまでAFMなどを用いて計測された一分子間相互作用力と同程度であり、妥当な値と言える。

#### D. 結論

$\alpha$ -thalassemiaをもった赤血球表面のAFM観察から、表面の特異な構造変化を確認した。この変化は我々がこれまで報告してきた異常ヘモグロビンであるヘモグロビンCやヘモグロビンSをもった赤血球と同様であり、この構造変化がもたらすと考えられるマラリア耐性が、遺伝型ヘモグロビン異常に共通したものであると示唆された。

一分子間相互作用力計測手法を確立した。見積もられた相互作用力はおおよそ270pNであり、これまで

計測された一分子間相互作用力と同程度であることから、この値は妥当なものであると言える。今後はマラリア由来のタンパク質と血管内壁細胞の相互作用力について、ヘモグロビンの型による違いの観点から、遺伝型ヘモグロビン異常のマラリア耐性メカニズムを明らかにしていく。

#### E. 参考文献

- [1] R. M. Fairhurst et al, Nature **435**, 1117-1121 (2005).
- [2] T. Arie et al., J. Struct. Biol. **150**, 163-169 (2005).
- [3] M. A. Krause et al., PLoS ONE **7**, e37214 (2012).

#### F. 健康危険情報

該当無し

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

T. Arie, S. Sawano, and S. Akita

A multi-walled carbon nanotube cantilever for interaction force sensing in liquid, AIP advances,

**2**, 012144 (2012).

##### 2. 学会発表

T. Arie, S. Sawano, and S. Akita

Displacement Measurement of a Carbon Nanotube Cantilever in Liquid for Protein Interaction Force Sensing, 11th International Conference on the Science and Application of Nanotubes, 234 (2011).

寺田有希, 秋田成司, 有江隆之

片持ち梁カーボンナノチューブを用いた抗原抗体間の相互作用力測定

(Carbon nanotube cantilever for measurement of interaction forces between antigens and antibodies)

第42回フラーレン・ナノチューブ総合シンポジウム講演要旨集, 113.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
T. Arie S. Sawano S. Akita	A multi-walled carbon nanotube cantilever for interaction force sensing in liquid	AIP Advances	2	012144	2012



March 2012

*Reprinted from*  
**Volume 2 Number 1**

# AIP | Advances

## A Multi-Walled Carbon Nanotube Cantilever for Interaction Force Sensing In Liquid

Takayuki Arie, Shunichi Sawano, and Seiji Akita



## A multi-walled carbon nanotube cantilever for interaction force sensing in liquid

Takayuki Arie,<sup>1,2,a</sup> Shunichi Sawano,<sup>1</sup> and Seiji Akita<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Department of Physics and Electronics, Osaka Prefecture University, Sakai, Osaka 599-8531, Japan*

<sup>2</sup>*CREST, Japan Science and Technology Agency, Kawaguchi, Saitama 332-0012, Japan*

(Received 1 November 2011; accepted 18 January 2012; published online 14 February 2012)

We demonstrated the measurement of interaction force between molecules using a multi-walled carbon nanotube cantilever under light microscopy. The deflection of the nanotube cantilever was monitored at the video frame rate during the force measurement. We also investigated the detection sensitivity and stability of our deflection detection system, and indicated that the measurement of “nm order” displacement can be achieved in water by our optical detection technique. The interaction force we measured using a cantilevered nanotube was 230 pN, possibly indicating the force required to rupture the weak bonds between the adsorbed polymers on the tungsten tip and proteins at the tip of the nanotube cantilever. *Copyright 2012 Author(s). This article is distributed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported License.* [<http://dx.doi.org/10.1063/1.3688763>]

### I. INTRODUCTION

Measurement of forces acting on biological molecules is essential to understanding their function in protein folding-unfolding, and ligand-receptor and antigen-antibody reactions. Carbon nanotube (CNT) is a candidate for ideal mass<sup>1-5</sup> or force<sup>6-9</sup> sensing devices, due to its extraordinary characteristics. We have recently studied the energy losses of the CNT oscillation,<sup>10,11</sup> and the influence of the viscous fluid to the CNT oscillation at various temperatures toward mass measurement of biological molecules.<sup>12</sup> However, with the resonance of CNTs, we are unable to measure the static minute force such as interactions of proteins attached to a CNT. The measurement of the static displacement of a CNT tip is required to use the CNT cantilever as a force sensing device.

Optical detection is one of the displacement measurement methods of the CNT cantilevers.<sup>10</sup> This technique can be applied to real-time observation of conformational changes of biological molecules with a fluorescence microscope.<sup>13</sup> Since biological molecules can be labeled with fluorescent dye, we can possibly visualize the real-time appearance of folding-unfolding, and/or attaching-detaching of biological proteins while measuring the force by using CNT cantilevers. The real-time visualization using our detection technique is one of the advantages over a widely-used force sensing technique to measure interactions between molecules, atomic force microscopy.

The spring constant  $k$  of a cantilevered CNT is an important element for determining the resolution of force sensing, followed by

$$\Delta F = k \Delta x, \quad (1)$$

where  $\Delta F$  is the applied external force,  $\Delta x$  is the displacement of a CNT tip. The typical spring constant of cantilevered CNTs is around  $10^{-4}$  N/m. This value is two orders of magnitude lower than that of conventional Si or Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> cantilevers, implying that CNTs can be used as an ultrasensitive interaction force sensing device of biological molecules. In this study we investigated the static displacement of a multi-walled CNT cantilever in water to estimate the detection sensitivity of our

<sup>a</sup>Electronic mail: [arie@pe.osakafu-u.ac.jp](mailto:arie@pe.osakafu-u.ac.jp)



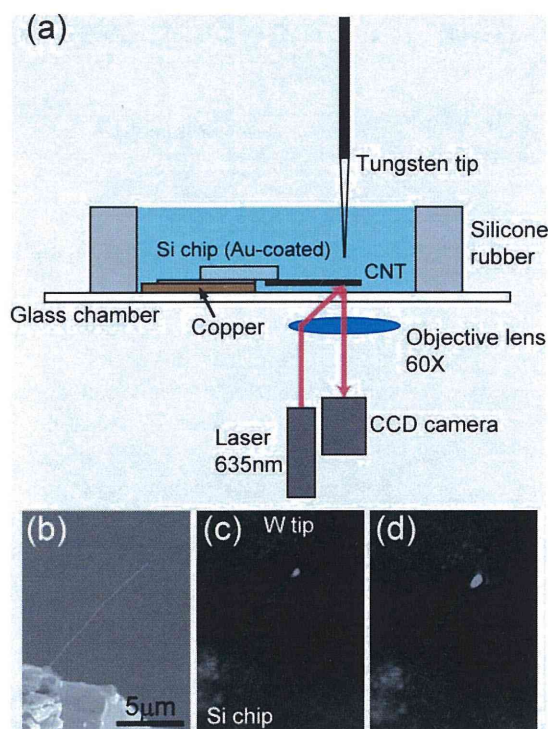


FIG. 1. (a) Schematic diagram of the experimental setup using an inverted optical microscope. (b) Representative scanning electron and (c, d) optical microscope images of a multi-walled CNT cantilever. Note the difference in the scattered light intensity from the CNT tip between (c) nondisplacing and (d) displacing CNTs.

optical detection system, and performed the measurement of molecular interaction force using our optical detection technique.

## II. METHODS

Figure 1(a) shows a schematic diagram of our optical detection system. The measurement of the CNT displacement was performed by the irradiation of 635 nm laser to the CNT cantilever in water by optical detection under an inverted optical microscope. The fabrication process of cantilevered CNTs is described elsewhere.<sup>12</sup> Briefly, multi-walled CNTs used were synthesized by chemical vapor deposition, followed by a post annealing at temperatures higher than 1500 °C to improve their stiffness. Individual CNTs were then aligned at the edge of a Si chip by an AC electrophoresis method. Figure 1(b) shows a typical scanning electron micrograph of the CNT cantilever used in this study. When CNTs displace by applying a DC voltage between the substrate and tungsten tip, the scattered light intensity from the CNT tip changes compared to nondisplacing CNTs (Figs. 1(c) and 1(d)). We then analyzed a series of images recorded with a CCD camera, with which the changes in the scattered light intensity can be calculated at each pixel of images between nondisplacing and displacing CNTs. As CNTs displace, the change in the scattered light increases as noted in Figs. 1(c) and 1(d).

To chemically activate the tip of a CNT cantilever, we induced defects onto the CNT tip by high power ( $\sim 20$  mW) laser irradiation in air. In this way, the CNT tip was opened, as shown in Figs. 2(a) and 2(b), and carboxyl groups were induced by the oxidation. Subsequently, we used a typical di-imide-activated amidation process to conjugate proteins with the carboxyl groups at the open-ended tip of the sharpened CNT.<sup>14</sup> 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide HCl (EDC), which acts as a zero-length cross-linker, was mixed with N-hydroxysulfosuccinimide (sulfo-NHS). The CNTs were immersed into the mixture in the glass chamber to activate the CNT tip.<sup>15</sup>



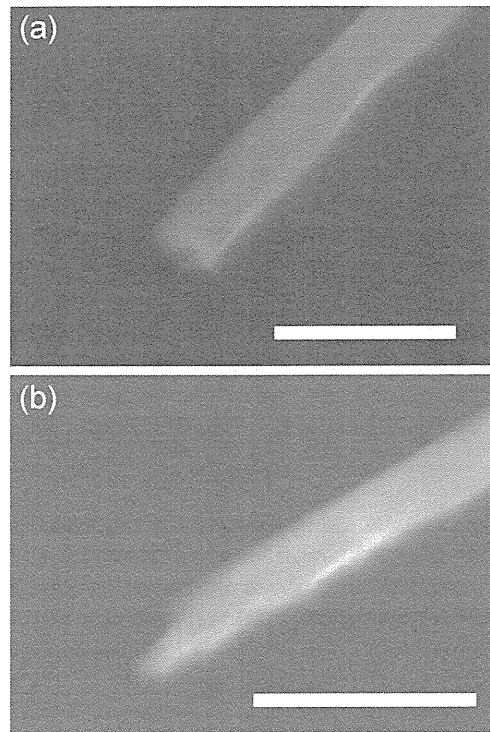


FIG. 2. Scanning electron micrographs of a CNT tip (a) before and (b) after the laser irradiation in air. Carboxyl groups were introduced at the open-ended CNT tip by the oxidation. Bars in (a) and (b) denote 200 nm.

After 1 h reaction, the EDC and sulfo-NHS solution were washed away with borate buffered saline (50 mM, pH=7.9) to avoid nonspecific binding of the proteins.

For binding proteins, we first coated a tungsten tip with poly-L-lysine, which promotes the attachment of the proteins. The proteins were then attached to the tungsten tip to react with an activated CNT tip. In this study, we used CD36, an integral transmembrane protein of vertebrate cells, especially known as a binding receptor on endothelium to the erythrocytes infected with malaria.<sup>16</sup> For the force measurement, a CD36-attached tungsten tip was engaged to an activated CNT tip to form amino bonds between semi-stable amine-reactive NHS-esters at the CNT tip and proteins, resulting in producing CNT-CO-NH-protein bonds. The reaction was performed in borate buffered saline for several seconds. By using our optical detection technique, we captured the change in displacement of the activated CNT by engaging and disengaging the CD36-coated tungsten tip repeatedly.

### III. RESULTS AND DISCUSSION

Accurate detection of the displacement of a CNT cantilever is very crucial for the force resolution. Prior to the measurement of interaction forces between molecules, we measured the measurement sensitivity and stability of the CNT cantilever in water using our optical detection system. The diameter of the CNT used was less than 80 nm, which is much smaller than the diffraction limit of light. Therefore, the image captured by a CCD camera is mainly the scattered light from the CNT surface. To discuss the spatial resolution of our setup, we estimated the stability of Gaussian peak position of sectional intensity profiles of the CNT (Fig. 3 inset). The full width at half maximum is  $\sim 800$  nm, and 1 pixel of the CCD corresponds to  $\sim 100$  nm at the objective plane in our setup. Slenderness of CNTs is another advantage for accurate displacement measurement because the intensity profile can be fitted to Gaussian function, enabling the unambiguous identification of the CNT deflection by measuring the Gaussian peak position mathematically as used in fluorescence

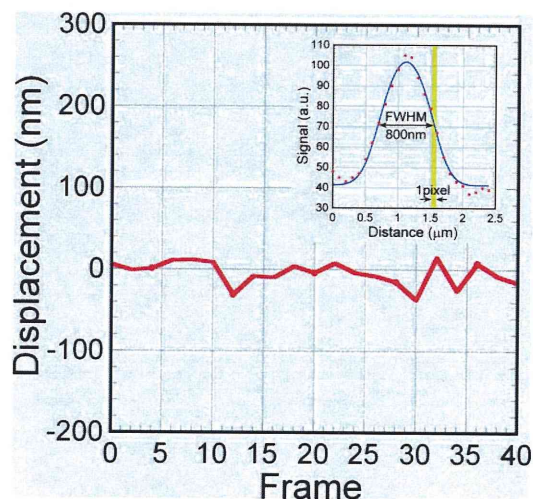


FIG. 3. The Gaussian peak position of sectional intensity profiles of a CNT tip. Inset is a cross sectional profile of a CNT cantilever in water.

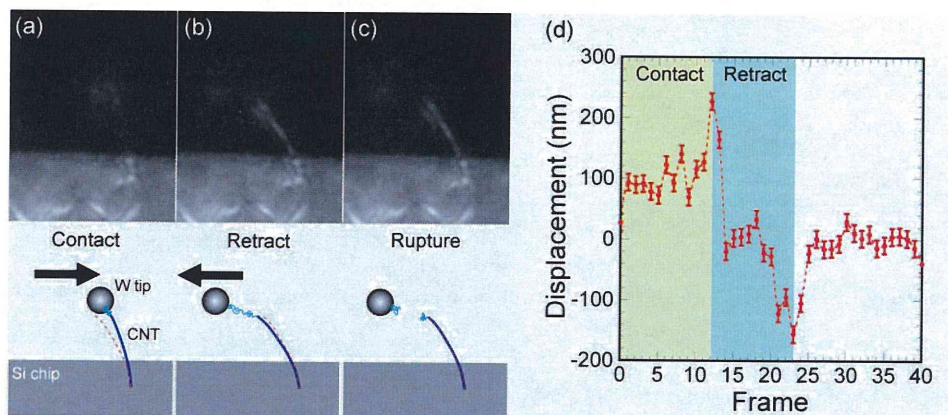


FIG. 4. Optical micrographs during the attraction between the CNT tip and proteins attached to the tungsten tip, when (a) the CNT was pushed by the tungsten tip, (b) the CNT was pulled by the interaction force, and (c) the CNT came back to the initial position, with corresponding schematic illustrations. The dotted red lines in the corresponding illustrations denote the initial position of the CNT. (d) Representative displacement curve of the CNT tip during a series of the reaction process as shown in (a) to (c).

microscopy analyses.<sup>17,18</sup> Figure 3 shows the relative sectional profile peak position with respect to the video frame. The standard deviation of the position was estimated to be 14 nm. Therefore, despite the disturbances such as Brownian motion and thermal noise in water, the resolution of 14 nm can be achieved for the deflection detection. Based on our previous report, the average Young's modulus of the multi-walled CNTs used is 300 GPa.<sup>19</sup> Since the multi-walled CNTs are equivalent to homogeneous cylinders,<sup>20</sup> we estimate the spring constant as  $1.46 \times 10^{-3}$  N/m. Therefore, the force resolution is 20 pN using the CNT cantilever with our experimental setup. This indicates that the CNT cantilever can be applied to measure the extremely small forces such as the interaction force of biological molecules.

We performed the measurement of interaction forces between molecules by engaging and disengaging the tungsten tip as shown in Fig. 4. When the tungsten tip pushed the CNT cantilever as shown in Fig. 4(a), the CNT tip was bent with the distance of 200 nm. The CNT was then pulled to measure the interaction force between molecules as shown in Fig. 4(b). The CNT came back to the initial position when the bond between molecules ruptured (Fig. 4(c)). Figure 4(d) shows the displacement of the CNT tip with respect to the video frame during a series of the reaction

as shown in Fig. 4(a) to 4(c). The displacement of the CNT tip was  $156 \pm 14$  nm when the CNT detached the tungsten tip. With the spring constant of  $1.46 \times 10^{-3}$  N/m as estimated above, the force was calculated to be 230 pN. According to *ab initio* calculations in our previous report,<sup>15</sup> the force required to break the covalent bond between an activated CNT tip and proteins is about 6.5 nN. Since the force estimated from our experimental results was much weaker than the covalent binding force obtained by *ab initio* calculation, the force we measured using the CNT cantilever was not the force to break the covalent bonding between the activated CNT tip and proteins, but rather the weaker rupture force between the adsorbed polymers<sup>21</sup> on the tungsten tip and the proteins.

In conclusion, we performed the measurement of the interaction force between molecules using a multi-walled CNT cantilever with our optical detection technique. The interaction force was 230 pN, much weaker than the covalent binding force calculated by *ab initio* calculation, possibly indicating that the force we measured was the rupture force between the adsorbed polymers and the proteins. Finally, the optical detection technique can be applied to measure the minute force such as binding force or folding-unfolding force between biological molecules, which will be the further study.

## ACKNOWLEDGMENTS

This study was partially supported by Grant-in-Aid for Scientific Research and Grant-in-Aid for Scientific Research on Priority Area of the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan (MEXT), and Health and Labour Sciences Research Grants on Research on global health issues, Ministry of Health, Labour and Welfare.

- <sup>1</sup> P. Poncharal, Z. L. Wang, D. Ugarte, and W. A. de Heer, *Science* **283**, 1513 (1999).
- <sup>2</sup> M. Nishio, S. Sawaya, S. Akita, and Y. Nakayama, *Appl. Phys. Lett.* **86**, 133111 (2005).
- <sup>3</sup> M. Nishio, S. Sawaya, S. Akita, and Y. Nakayama, *J. Vac. Sci. Technol. B* **23**, 1975 (2005).
- <sup>4</sup> S. Sawaya, S. Akita, and Y. Nakayama, *Appl. Phys. Lett.* **89**, 193115 (2006).
- <sup>5</sup> K. Jensen, K. Kim, and A. Zettl, *Nat. Nanotechnol.* **3**, 533 (2008).
- <sup>6</sup> N. Choi, T. Uchihashi, H. Nishijima, T. Ishida, W. Mizutani, S. Akita, Y. Nakayama, M. Ishikawa, and H. Tokumoto, *Jpn. J. Appl. Phys.* **39**, 3707 (2000).
- <sup>7</sup> T. Uchihashi, N. Choi, M. Tanigawa, M. Ashino, Y. Sugawara, H. Nishijima, S. Akita, Y. Nakayama, H. Tokumoto, K. Yokoyama, S. Morita, and M. Ishikawa, *Jpn. J. Appl. Phys.* **39**, L887 (2000).
- <sup>8</sup> G. Singh, P. Rice, and R. L. Mahajan, *Nanotechnology* **18**, 475501 (2007).
- <sup>9</sup> S. Kwon, H. Park, H. C. Shim, H. W. Lee, Y. K. Kwak, and S. Kim, *Appl. Phys. Lett.* **95**, 013110 (2009).
- <sup>10</sup> S. Fukami, T. Arie, and S. Akita, *Jpn. J. Appl. Phys.* **48**, 06FG04 (2009).
- <sup>11</sup> S. Fukami, T. Arie, and S. Akita, *Jpn. J. Appl. Phys.* **49**, 06GK02 (2010).
- <sup>12</sup> S. Sawano, T. Arie, and S. Akita, *Nano Lett.* **10**, 3395 (2010).
- <sup>13</sup> S. Kwon, H. W. Lee, H. Park, and S. Kim, *Meas. Sci. Technol.* **21**, 085104 (2010).
- <sup>14</sup> W. J. Huang, S. Taylor, K. F. Fu, Y. Lin, D. H. Zhang, T. W. Hanks, A. M. Rao, and Y. P. Sun, *Nano Lett.* **2**, 311 (2002).
- <sup>15</sup> H. Maruyama, S. H. Yoshimura, S. Akita, A. Nagataki, and Y. Nakayama, *J. Appl. Phys.* **102**, 094701 (2007).
- <sup>16</sup> J. W. Barnwell, A. S. Asch, R. L. Nachman, M. Yamaya, M. Aikawa, and P. Ingravallo, *J. Clin. Invest.* **84**, 765 (1989).
- <sup>17</sup> R. E. Thompson, D. R. Larson, and W. W. Webb, *Biophys. J.* **82**, 2775 (2002).
- <sup>18</sup> P. Spence, V. Gupta, D. J. Stephens, and A. J. Hudson, *Eur. Biophys. J.* **37**, 1335 (2008).
- <sup>19</sup> S. Sawaya, T. Arie, and S. Akita, *Nanotechnology* **22**, 165702 (2011).
- <sup>20</sup> S. Akita, H. Nishijima, Y. Nakayama, F. Tokumasu, and K. Takeyasu, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **32**, 1044 (1999).
- <sup>21</sup> R. Lévy and M. Maaloum, *J. Phys.: Condens. Matter* **16**, 7199 (2004).