

Oberflächengebundene Mikrobehälter zum Einschluss und zur Untersuchung von Biomolekülen**

Laiyi Lin, Sebastian Beyer, Thorsten Wohland, Dieter Trau* und Daniel Lubrich*

Die Herstellung von Behältern im Nano- und Mikrometer-Maßstab findet seit einiger Zeit großes Interesse. Solche Behälter finden verschiedenste Anwendungen in der Biochemie und Biophysik, besonders für die Nachahmung kleiner Reaktionsräume und deren Trennung voneinander, wie sie in Zellen anzutreffen ist. Bislang sind hierfür Emulsionen^[1] oder Nano-/Mikrobehälter aus Phospholipiden,^[2] Lipiden^[3] und Polymeren^[4] genutzt worden. Eine verbreitete Methode, um Nano-/Mikrobehälter zu erzeugen, ist die schichtweise (Layer-by-Layer-)Abscheidung von Polyelektrolyten.^[5] Typischerweise wurden Polyelektrolytkapseln mit kolloidalen Templaten wie Polymerkugeln, Enzymkristallen, Kristallen oder Partikeln organischer Substanzen sowie auf Zellen erzeugt, wobei der Prozess in einer wässrigen Phase abläuft, was die Verkapselung nichtwasserlöslicher Substanzen limitiert.^[6] Niedermolekulare Substanzen können anschließend in die LbL-Behälter hineindiffundieren und Reaktionen in deren Inneren auslösen.^[7] Die Verkapselung wasserlöslicher Substanzen wurde durch die Entwicklung der Umkehrphasen-LbL-Methode (reverse-phase LbL method, „RP-LbL“) wesentlich vereinfacht.^[8] Die Anordnung und Fixierung solcher Behälter und Kapseln auf Oberflächen ist

vielversprechend, um eine kontinuierliche Beobachtung einzelner Behälter zu gewährleisten, besonders für die parallele Beobachtung einer Vielzahl von Behältern oder monomolekularer Experimente. Methoden zur Oberflächenanordnung von Mikropartikeln sind in verschiedensten Ausführungen beschrieben worden.^[9] Für die Anordnung von Mikrokapseln wurde kürzlich ein Verfahren vorgestellt.^[10]

Hier berichten wir von der Herstellung oberflächengebundener Mikrobehälter (OGMKs) mit einer Größenverteilung von 1 bis 20 μm zum Einschluss wasserlöslicher Biomoleküle. Die Herstellung der OGMKs ausgehend von getrocknetem Templatmaterial und deren Erscheinungsbild in fluoreszenzmikroskopischen und konfokalmikroskopischen Aufnahmen ist in Abbildung 1 dargestellt. Die Brownsche Molekülbewegung eingeschlossener DNA-Moleküle des Bacteriophagen Lambda (λ -DNA) kann beobachtet werden, und die elektrophoretische Mobilität von Proteinen und DNA lässt sich durch Anlegen eines externen elektrischen Feldes induzieren. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes wird ein scharfer Konzentrationsgradient in den OGMKs erzeugt, womit auch der effiziente Einschluss von Biomolekülen belegt wird. Bei der Herstellung der OGMKs entsteht eine semipermeable Membran, welche die Biomoleküle einschließt, deren Biofunktionalität erhalten bleibt. Die Permeabilität für niedermolekulare Verbindungen wurde durch Zugabe von Fluoresceinisothiocyanat(FITC)-Biotin zu NeutrAvidin-gefüllten OGMKs demonstriert, wobei eine Anreicherung von FITC-Biotin im Inneren nachgewiesen werden konnte. Ein enzymatischer DNA-Verdau durch DNase im Inneren der OGMKs konnte gezielt durch Zugabe von membranpermeablen Calcium- und Magnesiumionen ausgelöst werden. Dank ihrer beschriebenen Eigenschaften könnten OGMKs Anwendung zur parallelen Untersuchung einer großen Zahl von biochemischen und biophysikalischen Prozessen in Mikrobehältern unterschiedlicher Größe finden.

In OGMKs lassen sich Biomoleküle wie λ -DNA, fluoreszenzmarkiertes BSA, NeutrAvidin, fluoreszenzmarkierte Oligonucleotide und DNase einschließen. Die Visualisierung der Brownschen Molekülbewegung durch Fluoreszenzmikroskopie ist in Abbildung 2 dargestellt, wobei die DNA in Form hell erscheinender Partikel sichtbar ist. Das Erscheinungsbild der DNA ist durch die Knäuelkonfiguration unter den gegebenen Bedingungen erklärbar. Ein Video hierzu ist in den Hintergrundinformationen enthalten. Die hergestellten OGMKs waren stabil, und die Verkapselung der DNA erfolgte effizient, was durch eine geringe Rate ($< 10\%$) an beschädigten und DNA freisetzenden OGMKs demonstriert wurde. Der Diffusionskoeffizient D von λ -DNA und die Viskosität η in OGMKs wurden unter Annahme eines Moleküllradius von 600 nm durch die Messung zurückgelegter

[*] L. Lin, Dr. D. Lubrich
Physics Department and NanoCore
National University of Singapore
Singapore 117542 (Singapur)
Fax: (+65) 6872-3069
E-Mail: daniel@nus.edu.sg
Homepage: http://www.nanocore.nus.edu.sg/daniel_lubrich.html
S. Beyer
Division of Bioengineering and NUS Graduate School for Integrative Sciences and Engineering, National University of Singapore
Singapore 117542 (Singapur)
Prof. T. Wohland
Department of Chemistry, National University of Singapore
Singapore 117542 (Singapur)
Prof. D. Trau
Division of Bioengineering and Department of Chemical & Biomolecular Engineering, National University of Singapore
Singapore 117542 (Singapur)
E-Mail: bietrau@nus.edu.sg
Homepage: <http://www.biosingapore.com>

[**] Wir danken NanoCore (NUS) sowie der NUS (R397-000-077-112) für finanzielle Unterstützung. T.W. dankt BMRC Singapore (R-143-000-351-305). Ebenso danken wir Jesse Matthew Goldman und Johan Van Der Maarel für anregende Diskussionen und Hoon Hwee Teo für Unterstützung bei den Experimenten. Des Weiteren danken wir den anonymen Gutachtern für wertvolle Hinweise und Anregungen.



Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200907321> zu finden.

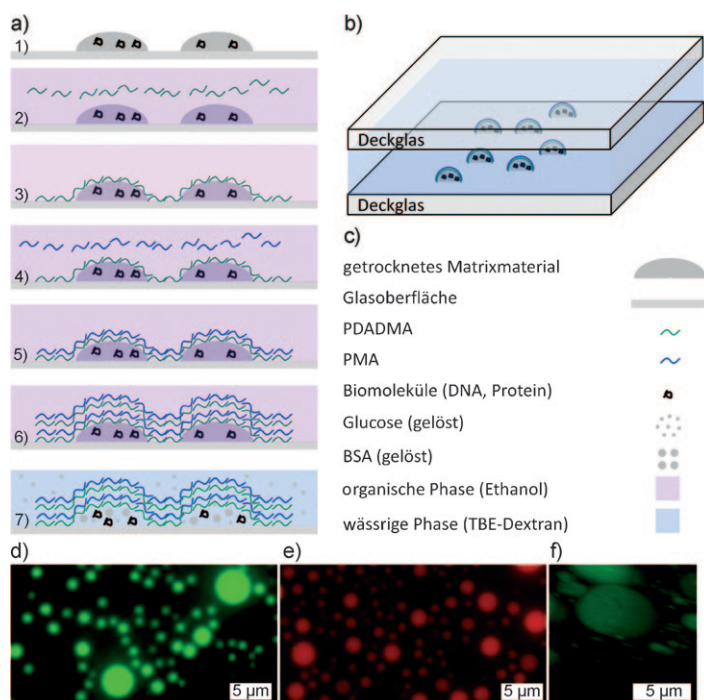


Abbildung 1. a) Herstellungsprozess der OGMKs mithilfe der RP-LbL-Methode. 1) Matrix aus Rinderserumalbumin (BSA) und Glucose, die Biomoleküle enthält; 2)–6) Schrittweise Abscheidung von Polymerschichten aus der organischen Phase (Waschschritte zwischen aufeinander folgenden Schritten sind nicht gezeigt). 7) Austausch des organischen Lösungsmittels gegen Puffer, was zur Auflösung des Templatmaterials und der eingeschlossenen Biomoleküle führt. Makromolekulare Moleküle werden in den OGMKs zurückgehalten, wogegen niedermolekulare Verbindungen durch die Membran diffundieren können. b) Experimentelle Anordnung zum Pufferaustausch und zur Mikroskopie. c) Legende (nicht maßstabsgetreu). d) OGMKs, die Alexa-Fluor-488-markierte Oligonucleotide enthalten. e) OGMKs, die Texas-Red-markiertes BSA enthalten. f) Konfokalmikroskopische Aufnahme von OGMKs, die eine sphärische Form erkennen lassen.

Distanzen bestimmt: $D = (1.3 \pm 0.1) \times 10^{-13} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ und $\eta = (2.6 \pm 0.2) \text{ cP}$. Der Wert der Viskosität liegt zwischen denen von Wasser und Blut.

Für den Nachweis eines effizienten Einschlusses von Biomolekülen in den OGMKs wurden λ -DNA und FITC-BSA durch Anlegen eines extern kontrollierten elektrischen Feldes einer Elektrophorese unterzogen. Abbildung 3a zeigt eine Bildserie der elektrophoretischen Bewegung von λ -DNA-Molekülen in einem Niederfrequenz-Wechselfeld (0.1 Hz, 15 V cm^{-1} , Intervallfunktion). Negativ geladene λ -DNA-Moleküle akkumulieren immer in Richtung der Anode entweder am oberen oder am unteren Ende der OGMKs (in Abhängigkeit von der Felddausrichtung). Die λ -DNA-Molekülverteilung kann dabei durch Schalten der Polarität umgekehrt werden. Abbildung 3b zeigt die elektrophoretische Bewegung und Eingrenzung von FITC-BSA (isoelektrischer Punkt (IP) bei pH 4.8) in OGMKs. Anders als bei den Experimenten mit λ -DNA (ca. 32 MDa) tritt die Zufallsverteilung von FITC-BSA (68 kDa) wesentlich schneller nach Aufhebung des elektrischen Feldes ein. Die Einstellung des Gleichgewichtes dauert ca. 1 s für FITC-BSA und ca. 5 s für λ -

DNA. Videos zu diesen Elektrophoreseexperimenten sind in den Hintergrundinformationen enthalten.

In einem weiteren Experiment wurde nichtfluoreszenzmarkiertes NeutrAvidin, ein Tetramer, das bis zu vier Biotinmoleküle binden kann, zusammen mit Texas-Red-markiertem BSA in die OGMKs eingeschlossen. Diese OGMKs konnten, wie in Abbildung 4a gezeigt, durch Einstrahlung der Anregungswellenlänge des Texas-Red-Farbstoffs, nicht aber jener des (noch nicht enthaltenen) FITC fluoreszenzmikroskopisch visualisiert werden. Durch Zugabe von FITC-Biotin in einem Verhältnis von einem FITC-Biotin-Molekül zu 40 NeutrAvidin-Bindungsstellen in den OGMKs konnte die Permeabilität der OGMK-Membran für FITC-Biotin (ca. 650 Da) demonstriert werden, da sich die OGMKs nun unter Fluoresceinanregung visualisieren ließen (Abbildung 4a). Unter Elektrophoresebedingungen zeigen diese OGMKs eine Akkumulation von NeutrAvidin-FITC-Biotin (IP bei pH 6.3) in Richtung der Anode, wodurch ein spezifisches Binden von FITC-Biotin an NeutrAvidin bestätigt werden konnte. OGMKs ohne NeutrAvidin zeigten keine signifikante Fluoreszenz nach Zugabe von FITC-Biotin und dienten zur Kontrolle (Abbildung 4b; siehe Video in den Hintergrundinformationen).

Zur Demonstration des gezielten Auslösens einer Reaktion in OGMKs wurden Alexa-Fluor-488-mar-

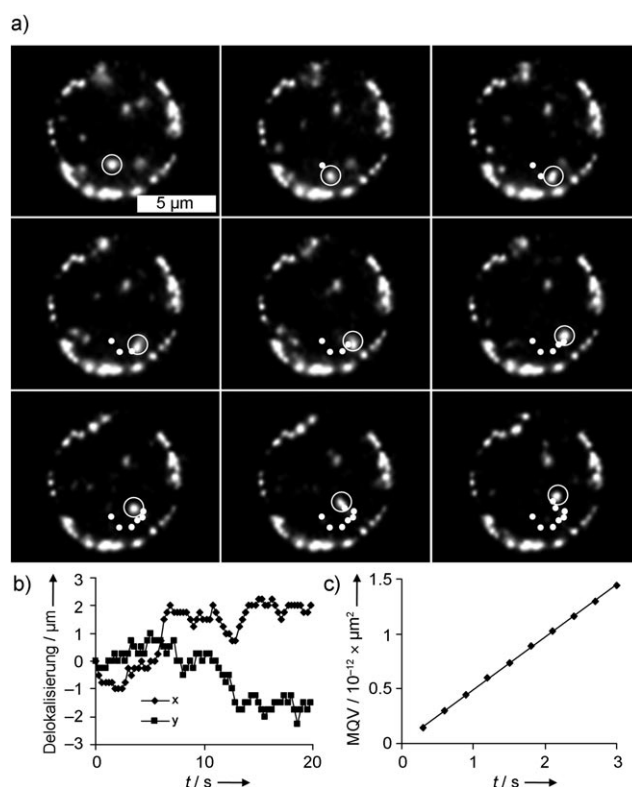


Abbildung 2. Brownsche Molekülbewegung der λ -DNA im Inneren der OGMK. a) Diffusionsspur eingeschlossener λ -DNA-Moleküle im Laufe von ca. 15 s. b) Räumliche Verfolgung der Delokalisierung von λ -DNA-Molekülen mit der Zeit. c) Die lineare Beziehung zwischen mittlerer quadratischer Verschiebung (MQV) und Zeit spricht für eine diffusive Bewegung.

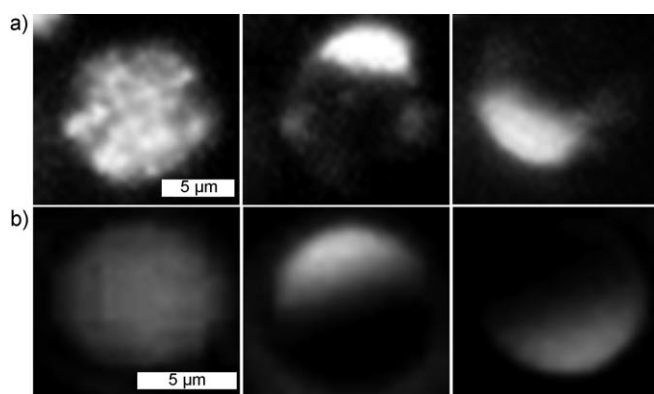


Abbildung 3. Sequenzen fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen, welche die Verteilung von λ -DNA und FITC-BSA in OGMKs zeigen, die einem langsam oszillierenden elektrischen Feld ausgesetzt sind. a) λ -DNA in OGMK ohne angelegtes elektrisches Feld (links), mit elektrischem Feld (Mitte) und nach Umkehr der Polarität (rechts). b) FITC-BSA in OGMK ohne angelegtes elektrisches Feld (links), mit elektrischem Feld (Mitte) und nach Umkehr der Polarität (rechts).

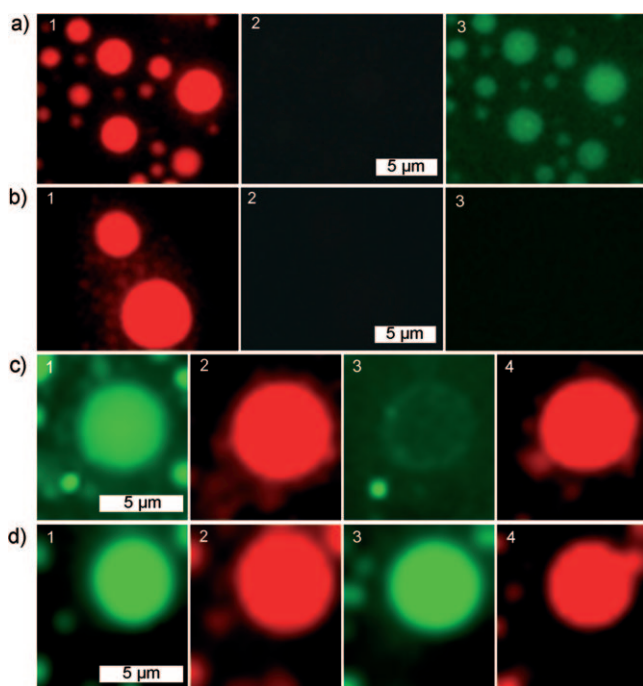


Abbildung 4. Anwendungen für OGMKs, fluoreszenzmikroskopisch beobachtet. a) Markierung eingeschlossener NeutrAvidin-Moleküle durch FITC-Biotin von außen: 1) OGMKs mit eingeschlossenem, Texas-Red-markiertem BSA und NeutrAvidin (Fluoreszenzanregung von Texas-Red); 2) fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der gleichen Fläche vor Zugabe von Biotin-FITC (Fluoreszenzanregung von FITC); 3) Aufnahme derselben Fläche 3 min nach Zugabe von Biotin-FITC (Fluoreszenzanregung von FITC). b) Kontrollexperiment ohne NeutrAvidin; gleiche experimentelle Abfolge wie in (a). c) Enzymatischer DNA-Verdau: 1) Aufnahme von OGMKs, die Alexa-Fluor-488-markierte Oligonucleotide, DNase I und Texas Red-BSA enthalten (Fluoreszenzanregung von FITC); 2) 10 min nach Zugabe eines Mg^{2+} - und Ca^{2+} -haltigen Puffers, der die enzymatische Reaktion startet (Fluoreszenzanregung von FITC); 4) Aufnahme derselben Fläche wie in (3) (Fluoreszenzanregung von Texas-Red). d) Die gleiche experimentelle Abfolge wie in (c) ohne DNase (Negativkontrolle).

kierte DNA, Oligonucleotide mit einem Molekulargewicht von 10 kDa und DNase I zusammen in OGMKs eingeschlossen. Der Verdau der eingeschlossenen DNA durch DNase kann gezielt durch Versetzen des umgebenden Puffers mit den notwendigen Kofaktoren Ca^{2+} und Mg^{2+} ausgelöst werden. Es wurde beobachtet, dass die Fluoreszenz der OGMKs nach Zugabe eines TBE-Puffers [TBE: Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Borat-Ethylendiamintetraacetat] mit 5 mM $MgCl_2$ und 1 mM $CaCl_2$ bei 37 °C (Gelelektrophorese bestätigte den DNA-Verdau unter diesen Bedingungen, Daten nicht gezeigt) nach einiger Zeit deutlich abnahm (Abbildung 4c). Dieser Befund kann durch das Herausdiffundieren der verdauten, fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente aus den OGMKs erklärt werden. Ein Kontrollexperiment unter den gleichen Bedingungen, aber in Abwesenheit von DNase I zeigte keine Abnahme der Fluoreszenzintensität und bestätigte damit, dass die Fluoreszenzabnahme durch den DNA-Abbau hervorgerufen wurde (Abbildung 4d).

Allgemein konnte gezeigt werden, dass die OGMKs wesentlich kleiner als die Fläche der zuvor aufgetragenen Templatmaterialien waren. Dieser Befund kann durch Trocknungsprozesse und durch die erhebliche Löslichkeit von Glucose in Ethanol erklärt werden. Die Konzentration der Biomoleküle in den OGMKs war proportional zu deren Konzentration in der Templatlösung. In einem abgewandelten Verfahren wurde eine Emulsion der Templatmaterial/Biomolekül-Mischung zur Herstellung der OGMKs eingesetzt, wodurch eine bessere Kontrolle der OGMK-Größenverteilung erreicht wurde. Ebenfalls kann eine kontrollierte Freisetzung über die Einstellung des osmotischen Druckes (der eine Funktion der Templatkonzentration ist) erzielt werden. Informationen hierzu sind in den Hintergrundinformationen enthalten.

Mit einem einfachen RP-LbL-Verfahren wurden wasserlösliche Biomoleküle in OGMKs mit einer Größenverteilung von 1–20 μm eingeschlossen. Die Funktionalität der Biomoleküle wird durch den Herstellungsprozess nicht beeinflusst. Die erzeugte Membran ist für niedermolekulare Verbindungen und Ionen permeabel. Enzymatische Reaktionen, wie Mg- und Ca-vermittelter DNA-Verdau durch DNase, können gezielt im Inneren der OGMs ausgelöst werden. Durch Elektrophoreseexperimente können scharfe Konzentrationsgradienten im Inneren der OGMKs kreiert und die größenabhängige Diffusionsgeschwindigkeit der Biomoleküle nach Abschalten des elektrischen Feldes studiert werden. Dieses kostengünstige System kann daher in Zukunft zur parallelen Echtzeituntersuchung von biochemischen und biophysikalischen Fragestellungen,^[13] z.B. auf dem Gebiet der Biomolekülwechselwirkungen (wie in biologischen Systemen), genutzt werden.

Experimentelles

Glasbehandlung: Reinigung in 30% NH_4OH , 30% H_2O_2 und entionisiertem H_2O (1:1:5). Templatmaterial: 60 μL Lösung enthielten: λ -DNA (NEB, MA, USA), markiert mit YOYO-1 (Invitrogen, Singapur): 0.5 $mg mL^{-1}$, 1 μL ; Alexa-Fluor-488-markiertes Oligonucleotid (IDT, IA, USA): 1 $mg mL^{-1}$, 5 μL ; FITC-BSA (Sigma, Singapur): 10 $mg mL^{-1}$, 10 μL ; Texas-Red-markiertes BSA (Invitrogen):

1 mgmL⁻¹, 8.5 µL; NeutrAvidin (Thermo Scientific, MA, USA): 1 mgmL⁻¹, 10 µL; DNase I (NEB): 2000 unitsmL⁻¹, 3.5 µL; BSA (Sigma): 10 mgmL⁻¹, 10 µL für Proteinexperimente und 19 µL für DNA-Experimente; Glucose: 200 mgmL⁻¹, 40 µL, in 1 × TBE-Puffer.

Zubereitung von Poly(diallyldimethylammoniumchlorid) (PDADMA): 20-proz. PDADMA (Sigma) in H₂O wurde bei 150°C 4 h lang getrocknet und anschließend in heißem Ethanol gelöst. OGMK-Herstellung: OGMKs wurden durchgehend vor vollständiger Austrocknung bewahrt. Jeweils 1 µL Templatmaterial wurde auf die Glasoberfläche aufgebracht und in einem Ofen bei 45°C ca. 1 h lang (oder für empfindliche Materialien im Vakuum bei geringerer Temperatur) getrocknet. RP-LbL-Verkapselung wurde durch 20-minütiges Eintauchen des Glaträgers in eine PDADMA-Lösung (5 mgmL⁻¹) in Ethanol gestartet, gefolgt von Waschen durch fünfmaliges Eintauchen (jeweils 5 s unter leichtem Schütteln) in reinem Ethanol, um nichtgebundenes PDADMA zu entfernen. Um die zweite Schicht abzuscheiden, wurde der Prozess mit einer Poly(methacrylsäure)(PMA)-Lösung (5 mgmL⁻¹; Polysciences) wiederholt. Durch Wiederholung können beliebig viele Schichten abgeschieden werden (typischerweise sechs für DNA-Verdauxperimente, zwei für alle anderen Experimente).

Pufferaustausch: Der Glaträger mit den OGMKs wurde sofort mit einem Deckgläschen bedeckt, gefolgt von Zugabe von 1 × TBE mit 150 mgmL⁻¹ Dextran, das Ethanol substituierte. Aufnahmen wurden mit einem invertierten Fluoreszenzmikroskop (Olympus, Ölimmersion, 100×-Objektiv) oder einem Konfokalmikroskop (Olympus, Wasserimmersion, 60×-Objektiv) gemacht. Weitere Anmerkungen zum experimentellen Vorgehen finden sich in den Hintergrundinformationen.

Eingegangen am 29. Dezember 2009,
veränderte Fassung am 6. August 2010
Online veröffentlicht am 12. November 2010

Stichwörter: DNA · Immobilisierung · Kompartimentierung · Mikrocontainer · Polyelektrolyte

- [1] a) D. S. Tawfik, A. D. Griffiths, *Nat. Biotechnol.* **1998**, *16*, 652; b) F. J. Ghadessy, J. L. Ong, P. Holliger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 4552.
- [2] D. T. Chiu, C. F. Wilson, F. Ryttsen, A. Stromberg, C. Farre, A. Karlsson, S. Nordholm, A. Gaggari, B. P. Modi, A. Moscho, R. A. Garza-Lopez, O. Orwar, R. N. Zare, *Science* **1999**, *283*, 1892.
- [3] a) P. Walde, S. Ichikawa, *Biomol. Eng.* **2001**, *18*, 143; b) A. Fischer, A. Franco, T. Oberholzer, *ChemBioChem* **2002**, *3*, 409; c) A. Karlsson, M. Karlsson, R. Karlsson, K. Sott, A. Lundqvist, M. Tokarz, O. Orwar, *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 2529; d) A. Karlsson, K. Sott, M. Markstrom, M. Davidson, Z. Konkoli, O. Orwar, *J Phys Chem. B* **2005**, *109*, 1609; e) P. Y. Bolinger, D. Stamou, H. Vogel, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 5626; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 5544.

- [4] S. F. van Dongen, H. P. de Hoog, R. J. Peters, M. Nallani, R. J. Nolte, J. C. van Hest, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 6212.
- [5] E. Donath, G. B. Sukhorukov, F. Caruso, S. A. Davis, H. Möhwald, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2323; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2201.
- [6] a) F. Caruso, W. Yang, D. Trau, R. Renneberg, *Langmuir* **2000**, *16*, 8932; b) B. Neu, A. Voigt, R. Mitlöhner, S. Leporatti, C. Y. Gao, E. Donath, H. Kieseewetter, H. Möhwald, H. J. Meiselman, H. Bäuml, *J. Microencapsul.* **2001**, *18*, 385; c) W. C. Mak, K. W. Sum, D. Trau, R. Renneberg, *IEE Proc. Nanobiotechnol.* **2004**, *151*, 67; d) C. S. Peyratout, L. Dähne, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 3850; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 3762; e) L. Dähne, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 4169; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4106.
- [7] A. D. Price, A. N. Zelikin, Y. Wang, F. Caruso, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 335; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 329.
- [8] a) S. Beyer, W. C. Mak, D. Trau, *Langmuir* **2007**, *23*, 8827; b) W. C. Mak, J. Bai, X. Y. Chang, D. Trau, *Langmuir* **2009**, *25*, 769.
- [9] a) J. A. Ferguson, F. J. Steemers, D. R. Walt, *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 5618; b) F. Hua, J. Shi, Y. Lvov, T. Cui, *Nano Lett.* **2002**, *2*, 1219; c) H. Zheng, I. Lee, M. Rubner, P. Hammond, *Adv. Mater.* **2002**, *14*, 569; d) R. T. Hill, J. B. Shear, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 7022; e) M. H. Lu, Y. Zhang, *Adv. Mater.* **2006**, *18*, 3094.
- [10] M. N. Antipina, M. V. Kiryukhin, K. Chong, H. Y. Low, G. B. Sukhorukov, *Lab Chip* **2009**, *9*, 1472.
- [11] E. S. Sobel, J. A. Harpst, *Biopolymers* **1991**, *31*, 1559.
- [12] a) B. Radt, T. A. Smith, F. Caruso, *Adv. Mater.* **2004**, *16*, 2184; b) A. G. Skirtach, C. Dejuguat, D. Braun, A. S. Sussha, A. L. Rogach, W. J. Parak, H. Möhwald, G. B. Sukhorukov, *Nano Lett.* **2005**, *5*, 1371.
- [13] a) E. Friedrichs, F. C. Simmel, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 1662; b) Z. S. Wang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 17921; c) W. C. Mak, K. Y. Cheung, D. Trau, *Adv. Funct. Mater.* **2008**, *18*, 2930; d) S. Modi, M. G. Swetha, D. Goswami, G. D. Gupta, S. Mayor, Y. Krishnan, *Nat. Nanotechnol.* **2009**, *4*, 325; e) C. Zhang, P. G. Shao, J. A. van Kan, J. R. C. van der Maarel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 16651; f) H. Y. Li, J. D. Carter, T. H. LaBean, *Mater. Today* **2009**, *12*, 24; g) D. Lubrich, S. J. Green, A. J. Turberfield, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 2422; h) A. D. Price, A. N. Zelikin, K. L. Wark, F. Caruso, *Adv. Mater.* **2010**, *22*, 720; i) F. Remacle, R. D. Levine, I. Willner, *Nat. Nanotechnol.* **2010**, *5*, 417; j) M. G. Zhou, X. G. Liang, T. Mochizuki, H. Asanuma, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 2213; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 2167; k) M. Wieland, A. Benz, J. Haar, K. Halder, J. S. Hartig, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 1866; l) J. Bai, S. Beyer, W. C. Mak, R. Rajagopalan, D. Trau, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 5316; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 5189; m) S. Saha, D. Bhatia, Y. Krishnan, *Small* **2010**, *6*, 1288; n) Y. Yang Y, G. Liu, H. J. Liu, D. Li, C. H. Fan, D. S. Liu, *Nano Lett.* **2010**, *10*, 1393; o) G. Pelossof, R. Tel-Vered, J. Elbaz, I. Willner, *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 4396.