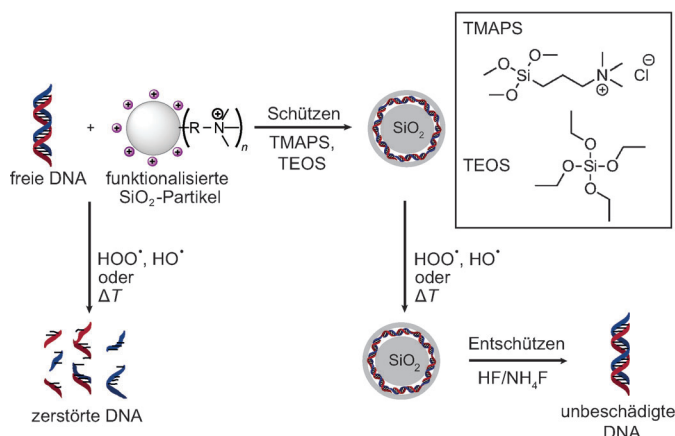


Schützen und Entschützen von DNA – temperaturstabile Nucleinsäuren als Barcode zur Markierung von Polymeren**

Daniela Paunescu, Roland Fuhrer und Robert N. Grass*

Nucleinsäuren sind die Informationsträger in allen bekannten Lebensformen und können pro Volumeneinheit mehr Informationen als magnetische oder auf der Floating-Gate-Technologie basierende Medien speichern (Flash-Laufwerke: $< 1 \text{ TB cm}^{-3}$; DNA $> 10^8 \text{ TB cm}^{-3}$). Neben zukünftigen Anwendungen zur Informationsspeicherung^[1] und für DNA-basiertes Rechnen^[2] ist DNA auch für die Nanobiotechnologie,^[3] steganographische Nachrichten,^[4] Barcodes und zur Fälschungssicherung von Konsumgütern sehr geeignet.^[5] Nucleinsäuren sind allerdings gegen harsche Umgebungsbedingungen und hohe Temperaturen empfindlich. Deshalb mussten biologische Systeme ausgeklügelte Reparaturmechanismen zur langfristigen Informationserhaltung entwickeln (pro Tag und menschliche Zelle müssen mehr als 10000 DNA-Schädigungen repariert werden).^[6] Die Verwundbarkeit gegen Hydrolyse (Depurinierung und Depyrimidierung),^[7] Oxidation (Bildung freier Radikale durch Schwermetallionen) und Alkylierung erfordert definierte Bedingungen für die DNA-Aufbewahrung, die idealerweise im Trockenen und bei tiefen Temperaturen erfolgen sollte.^[8] Entsprechend wird Urzeit-DNA (a-DNA) am besten aus Proben in Permafrostböden,^[9] aus fossilierter Form in Bernstein^[10] und aus Eierschal-Fossilien wiedergewonnen.^[11] Innerhalb dieser Fossilien trennt eine schützende, dichte Diffusionschicht (polymerisierte Terpene oder Calciumcarbonat), die fossilisierte DNA-Probe von der Umwelt, Wasser und reaktiven Sauerstoffspezies.

Hier beschreiben wir eine einfache Einkapselung von DNA in Siliciumdioxid, die die Fossilierung von DNA nachahmt und DNA vor aggressiven Umweltbedingungen schützt (Schema 1). Das Verfahren führt zu DNA, die bei Bedingungen weit außerhalb ihres biologischen Ursprungs verwendet werden kann. Weiter zeigen wir, dass Silicat- und Flusssäurechemie kompatibel mit der Analyse von Nucleinsäuren mithilfe quantitativer Echtzeit-PCR (qPCR; PCR = Polymerasekettenreaktion) ist. Wir demonstrieren außerdem, wie sich die geschützte DNA mit Polymer-Spritzgießen bei



Schema 1. DNA wird durch Bindung an die Oberfläche kationisch geladener Siliciumdioxidpartikel und einer darum geformten, dichten Siliciumdioxidschicht geschützt. TMAPS wird als co-wechselwirkende Spezies verwendet, um die DNA mit Sol-Gel-Prozessen vereinbar zu machen. Das Entschützen basiert auf Fluorchemie und ermöglicht die Freisetzung der eingekapselten DNA sowie die anschließende Analyse; es ist orthogonal zu den Umgebungsbedingungen und kann als Schalter verwendet werden, um die Nucleinsäuren je nach Bedarf zur Analyse freizusetzen (Details siehe Abbildung S1 (SI)).

200 °C vereinbaren lässt. Dies ermöglicht eine Kennzeichnung von Polymeren und Konsumgütern.

Siliciumdioxid ist ein Material von hoher chemischer und thermischer Stabilität und hat hervorragende Barriereigenschaften. Durch Polykondensation von Tetraethoxysilan (TEOS) kann es bei Raumtemperatur synthetisiert werden.^[12] Die Inkompatibilität von TEOS und Nucleinsäuren (beide haben unter den gegebenen Reaktionsbedingungen negative Ladungen) lässt sich durch Einführung einer co-wechselwirkenden Spezies (positiv geladene Aminosilane) aufheben, wodurch das Wachstum von amorphem Siliciumdioxid auf der Oberfläche der DNA-Doppelhelix möglich wird.^[13]

Zur Verkapselung von DNA wurde eine DNA-Standardleiter zunächst an die mit Ammoniumionen funktionalisierte Oberfläche von Siliciumdioxidpartikeln ($d = 150 \text{ nm}$, Abbildung S2a der Hintergrundinformationen (SI)) adsorbiert. Der Einsatz von sub- μm -großen Trägern erleichtert die Handhabung der adsorbierten Nucleinsäuren, da Trenn- und Waschschrte in verschiedenen Lösungsmitteln schnell durchgeführt werden können. Unter der Verwendung von *N*-Trimethoxysilylpropyl-*N,N,N*-trimethylammoniumchlorid (TMAPS) als co-wechselwirkender Spezies und TEOS als Siliciumquelle wurde in einem anschließenden Schritt eine dünne Siliciumdioxidschicht auf der Nucleinsäure-bedeckten Oberfläche gebildet (Abbildung S1 (SI)). Obwohl das

[*] M. Sc. D. Paunescu, Dr. R. Fuhrer, Dr. R. N. Grass
Departement Chemie und Angewandte Biowissenschaften,
ETH Zürich
Wolfgang-Pauli-Strasse 10, 8093 Zürich (Schweiz)
E-Mail: robert.grass@chem.ethz.ch

[**] Wir danken der ICB/ETH Zürich für finanzielle Unterstützung,
P. Stössel für Photographien und Prof. W. J. Stark für hilfreiche
Diskussionen.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag (experimentelle
Details) sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201208135> zu finden.

Wachstum von Siliciumdioxid-Oberflächen üblicherweise säure- oder basenkatalysiert durchgeführt wird, wählten wir hier neutrale Bedingungen, um die Hydrolyse der DNA zu verhindern (Abbildung S4 (SI)). Im Laufe dieser relativ langsamen Reaktion entstand über vier Tage eine dichte Siliciumdioxidschicht von ca. 10 nm auf den Nucleinsäuren (Abbildungen S2, S3 (SI)). Es wird angenommen, dass in dieser Struktur jedes Nucleinsäuremolekül zwischen Siliciumdioxid eingebettet ist und mit den aliphatischen Ammoniumgruppen elektrostatisch wechselwirkt (Abbildung S1 (SI)).

Die Ummantelung von DNA mit Siliciumdioxid wurde zuvor für die Bildung von komplexen Nanoverbundstoffen untersucht.^[13,14] Die gespeicherte Information kann jedoch nur zum Auslesen genutzt werden, wenn die DNA die Glas- kugel wieder unversehrt verlassen kann. Während Siliciumdioxid bei Raumtemperatur inert gegen die meisten chemischen Reaktionspartner ist, löst es sich schnell in Fluorwasserstoffsäure (Flusssäure, HF) unter Bildung von Hexafluorosilicat-Ionen auf. Flusssäure ist hochgiftig wegen ihres Eindringens in die Haut und der schnellen Schädigung von intrakorporalen Zellen und Knochen.^[15] Wässrige Flusssäure ist allerdings eine relativ schwache Säure ($pK_a = 3.18$), weshalb keine Beschädigung der Nucleinsäuren zu erwarten ist.^[16]

Tatsächlich war es möglich, die DNA/SiO₂-Partikel schnell in gepufferter Flusssäure (HF/NH₄F) aufzulösen. Die Verwendung von geringen Konzentrationen und kleinen Volumina gewährleistete sichere Arbeitsabläufe. Die Gegenwart der DNA konnte zusätzlich durch Gelelektrophorese (Abbildung 1, Bande 2) bestätigt werden, die keine quantitativen Unterschiede (wie Strangbrüche) im Vergleich zur Bande der unbearbeiteten DNA-Leiter (Abbildung 1, Bande 1) zeigte. Um die Vollständigkeit der Beschichtung sowie ihre schützenden Eigenschaften zu testen, wurden die Partikel sehr

aggressiven Schwermetall- und Wasserstoffperoxidlösungen ausgesetzt, welche die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) induzieren.^[17] Unter den gewählten Bedingungen (230 μ M CuCl₂, 6.6 mM H₂O₂, 1.3 mM Ascorbinsäure) wurde eine Probe ungeschützter Nucleinsäure fast augenblicklich zerstört (siehe Gelelektrophorese; Abbildung 1, Bande 6), was die Aggressivität des Verfahrens zeigt; die ummantelte DNA wurde dagegen selbst nach 20 min kaum beeinträchtigt (Abbildung 1, Banden 3–5).

Das Auftreten der scharfen Banden auf dem Elektrophoresegele belegt allerdings noch nicht die Amplifizierbarkeit der DNA. Zu diesem Zweck wurde ein bekanntes DNA-Amplikon (113 bp; siehe SI für die Sequenz) mit dem oben beschriebenen Verfahren in Partikel eingekapselt. Nach der Simulierung von verschiedenen Umgebungsbedingungen und anschließendem Auflösen der Partikel in HF/NH₄F wurde die Beschädigung der DNA mithilfe einer qPCR-Analyse beobachtet (Abbildung 2; Details zum vollständigen experimentellen Verfahren siehe SI).

Zum direkten Vergleich wurden Lösungen mit ähnlichen DNA-Konzentrationen von ungeschützten DNA-Amplikons und SiO₂-geschützten DNA-Amplikons (gleiche Menge an μ g DNA pro mL) hergestellt. Diese Lösungen wurden zunächst mit radikalischen Sauerstoffspezies behandelt. Ähnlich wie bei den Experimenten mit der DNA-Leiter wurde das freie Amplikon durch die radikalischen Sauerstoffspezies nach ein paar Minuten fast vollständig zerstört. Im Unterschied hierzu hielt ein Großteil der SiO₂-geschützten Amplikons der Behandlung stand (Abbildung 2a). Demzufolge verhindert bereits die sehr dünne Siliciumdioxidschicht (ca. 10 nm Dicke; Abbildung S2 (SI)) die Diffusion von radikalischen Sauerstoffspezies zur eingekapselten DNA. Die Beladungskapazität der Partikel kann anhand des Datensatzes bei 0 Minuten berechnet werden und beträgt (2.5 ± 0.5) μ g DNA pro mg Partikel. Dies entspricht ca. 75 dsDNA-Molekülen des Amplikons pro einzelnes Partikel. Analog zur DNA in Fossilien oder Sporen wird nach diesem Verfahren jedes DNA-Molekül durch eine dichte Materialschicht geschützt.^[18] Da die bedeutendsten ROS (OH \cdot und OOH \cdot) sehr kleine Moleküle mit hohen Diffusionskonstanten sind, agiert die Siliciumdioxidschicht wie eine hermetische Diffusionsbarriere. So ist zu erwarten, dass diese auch vor größeren chemischen Reaktanten und dem enzymatischen Verdau von DNA durch Nucleasen standhält.

Experimente zur Wärmestabilität lieferten ähnliche Befunde (Abbildung 2b): Nur <2% der DNA in DNA/SiO₂-Partikeln wurden bei einer Behandlung in wässriger Umgebung bei 120°C (15 min) zersetzt, während 99.5% der freien DNA unter gleichen Bedingungen zerstört wurden. Bei höheren Temperaturen wird der Abbau von ungeschützter DNA erheblich beschleunigt,^[19] zusätzlich unterstützt durch Singuletsauerstoffspezies.^[20] Ein weiterer Faktor für den Zerfall von DNA ist UV-Bestrahlung. Während sich ungeschützte DNA unter Sonnenlichtbestrahlung (Abbildung 2c) innerhalb von fünf Stunden zersetzte, wurde diese Zersetzung durch die Einkapselung abgebrems. Dieser Effekt war unerwartet, da amorphes Siliciumdioxid für seine gute UV-Transparenz (>60% bei 170 nm transparent) bekannt ist. Eine Erklärung für diese Beobachtung findet sich in der Mie-

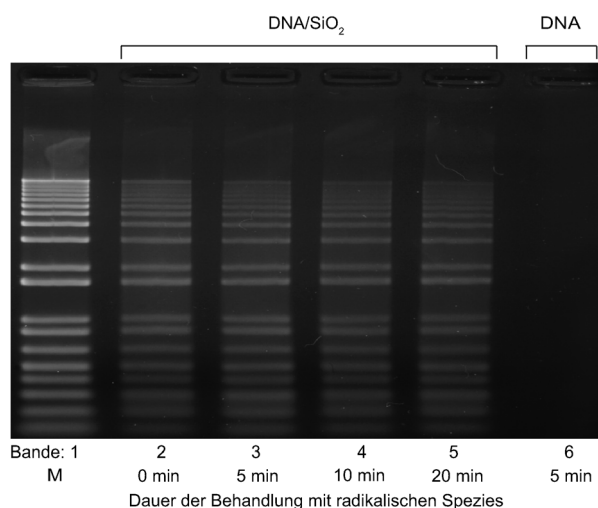


Abbildung 1. Die SiO₂-geschützte DNA-Leiter übersteht eine Behandlung mit Kupfer-induzierten Radikalen von bis zu 20 min (Banden 2–5). Zum Vergleich wurde ungeschützte DNA unter den gleichen Bedingungen behandelt, wobei sie vollständig zerstört wurde (Bande 6). M: DNA-Leiter (Invitrogen).

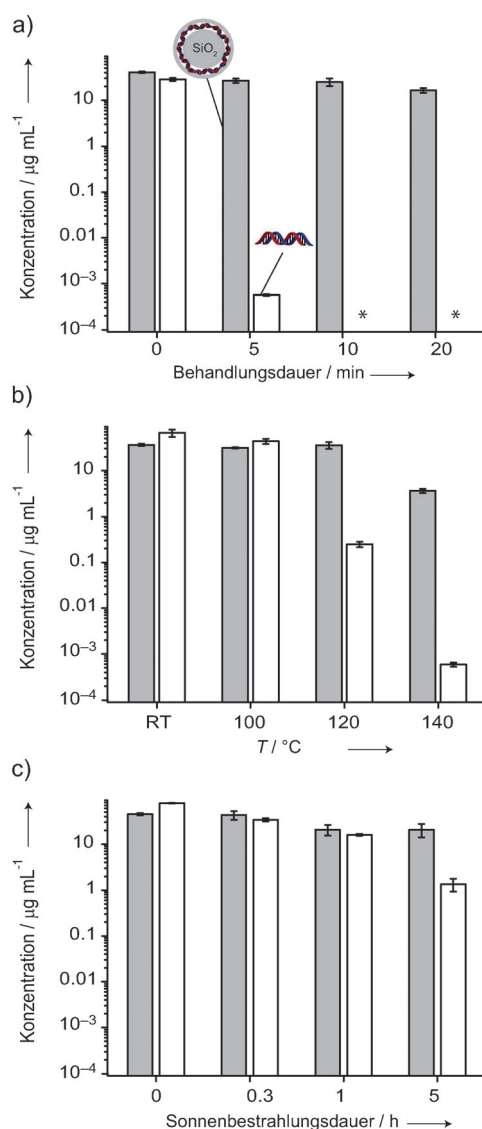


Abbildung 2. qPCR-Analyse der Stabilität von DNA/SiO₂ und ungeschützter DNA im Vergleich. Eine Dispersion von DNA/SiO₂-Partikeln (17.5 mg Partikel mL⁻¹) sowie freie DNA-Amplikons (40 µg mL⁻¹) wurden unter verschiedenen Bedingungen behandelt. Die grauen Balken repräsentieren die geschützte DNA, weiße Balken freie DNA; der Stern (*) zeigt Daten unterhalb der Nachweisgrenze an (< 10⁻⁶ µg mL⁻¹). a) Behandlung mit Kupfer-induzierten Radikalen bei einer Zeitdauer von bis zu 20 min; b) Wärmestabilität bei 100–140 °C für 15 min (unter Druck), c) Stabilität nach simulierter Sonnenlichtbestrahlung von 1000 W m⁻² für bis zu 5 h.

Theorie zur Lichtstreuung von Sub-µm-Partikeln bei niedrigen Wellenlängen:^[21] Da sich die Partikel im Größenbereich der Wellenlänge des UV-Lichts befinden, kann das Licht die Partikel nicht durchqueren und wird hauptsächlich von deren Oberfläche gestreut. Zusätzliche Stabilität gegen UV-Strahlung kann durch Einarbeitung der Partikel in eine UV-absorbierende Matrix erzielt werden (siehe unten).

Durch die hier beschriebene Herstellung eines temperaturstabilen DNA-Speicherformats kann eine Barcode-Kennzeichnung von Produkten ins Auge gefasst werden. Die nahezu endlose Veränderbarkeit möglicher Codes, die Mög-

lichkeit für Verschlüsselungen, die geringen Kosten der Analyse und die sehr niedrige Nachweisgrenze (qPCR) machen DNA zu einem idealen Kodierungssystem für die Kennzeichnung von Produkten. Seit vielen Jahren wird DNA-Barcoding bei Waren biologischen Ursprungs (z. B. Lebensmittel, Baumwolle, Tiere) verwendet, um Konsumententäuschung, Betrug und Fälschungen zu analysieren.^[22] In diesem Bereich können chromosomale oder mitochondriale DNA als Zielstrukturen verwendet werden, und die zeitliche Stabilität der Informationen in der ursprünglichen Zelle ist gewährleistet. Beim Versuch der Übertragung dieses Konzeptes auf nichtbiologische Systeme stellt sich die Instabilität der freien Nucleinsäuren unter Umgebungsbedingungen^[23] sowie den erhöhten Temperaturen während der Materialverarbeitung allerdings als Problem heraus. Die bisher entwickelten Systeme für das Schützen von DNA sind mesoporöses Siliciumdioxid,^[24] DNA-Komplexe mit Polykationen^[25] oder geschichtete Doppelhydroxide.^[26] Diese Systeme bieten Stabilität gegen enzymatischen Abbau.

Die Vorteile der hier vorgestellten nichtporösen Partikel liegen im zusätzlichen Schutz der DNA vor ROS und wärmeinduzierter Degeneration. Diese Eigenschaften machen die Partikel zu geeigneten Markern für die Kennzeichnung von Konsumgütern und Produkten mit künstlichen DNA-Codes. Gute Hitzebeständigkeit ist von besonderer Bedeutung, sobald DNA als Barcode in Kunststoff Verwendung finden soll, da die traditionelle Verarbeitung durch Spritzgießen bei erhöhten Temperaturen erfolgt. In einem Versuch zur Kennzeichnung von Polymeren mithilfe eines Barcodes wurden die hier entwickelten Partikel mit einem bekannten Amplikon (pBluescript II KS, MCS, 238 bp) mit nicht amplifizierbarer DNA (DNA-Leiter) gemischt und in kommerzielles Polysulfon (Abbildung S6 (SI)) sowie Polyvinylchloridfasern (PVC; Abbildung 3) eingearbeitet. Für die Untersuchung der benötigten Mengen wurden verschiedene Beladungen von $\delta = 0.1$ ppm bis 0.2 Gew.-% analysiert (= 100 µg kg⁻¹ bis 2 g kg⁻¹; Tabelle S1 (SI)). Die höchsten Beladungen wurden gewählt, um zu zeigen, dass die Partikel keinen Einfluss auf die optischen Eigenschaften der Polymere haben, während die niedrigen Konzentrationen die Nachweisgrenzen der Methode aufzeigen sollten. Die beiden Polymere wurden als stellvertretende Beispiele für hochwertige und Großserien-Thermoplaste ausgewählt. Der Polysulfon-DNA/SiO₂-Verbundstoff wurde aus dem gelösten Polymer hergestellt und zu dünnen Filmen verarbeitet. Selbst bei erhöhter Beladung (0.2 Gew.-%) wurden die optischen Eigenschaften der Folien nicht beeinflusst, und die Transparenz konnte aufrechterhalten werden (Abbildung S5 (SI)). Nach dem Auflösen der Polysulfonfolien im Lösungsmittel wurden die Partikel durch Zentrifugation zurückgewonnen, und in einem zweiten Schritt wurde die DNA mit HF/NH₄F aus den Partikeln freigesetzt (Abbildung S7 (SI)). Die Identität der Polymere wurde anschließend über das Amplikon durch qPCR-Analyse nachgewiesen (Abbildung 3, Abbildung S6 (SI)).

Um die Hitzebeständigkeit der verkapselten DNA/SiO₂-Partikel innerhalb der Polymere zu testen, wurden die Polysulfon- und PVC-Proben jeweils 15 Minuten bei Temperaturen bis zu 200 °C behandelt (Abbildung 3 a, Abbildung S6

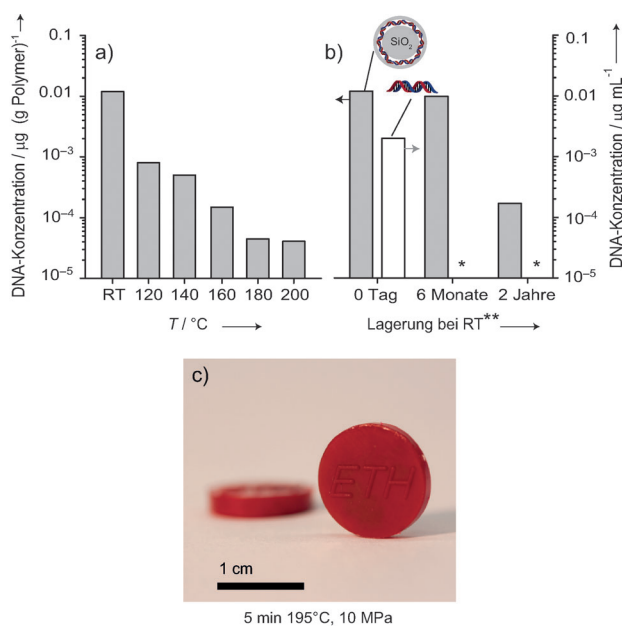


Abbildung 3. Stabilität von DNA/SiO₂ in PVC ($\delta = 350$ ppm DNA/SiO₂). a) qPCR-quantifizierte DNA-Konzentrationen im Polymer als Funktion der Temperatur (15 min); b) simulierte Langzeitstabilität von DNA/SiO₂ in PVC (graue Balken, linke Achse) und von ungeschützter DNA (weiße Balken, rechte Achse) in Wasser bei RT nach ASTM F1980 (**Accelerated Aging of Sterile Medical Device Packages, Q10=2); der Stern (*) zeigt Daten unterhalb der Nachweisgrenze ($< 10^{-6} \mu\text{g mL}^{-1}$); c) Heißgepresster PVC-DNA/SiO₂-Verbundstoff ($\delta = 350$ ppm Partikel) bei 195 °C und für 5 min bei 10 MPa mit einer quantifizierbaren Konzentration von 10^{-3} g DNA pro g Polymer (Nachweisgrenze ist $10^{-6} \mu\text{g DNA pro g Polymer}$). Die Partikel enthalten sowohl das pBluescript-Amplikon als auch die DNA-Leiter (1:30; siehe SI 3.3). Bei der Quantifizierung mit qPCR wird nur die Konzentration des Amplikons gemessen und hier wiedergegeben.

(SI)). Bei diesen hohen Temperaturen fand ein beträchtlicher Verlust an quantifizierbarer DNA statt, jedoch konnte die verpackte DNA in den Partikeln weiterhin über qPCR amplifiziert werden und ermöglichte dadurch eine eindeutige Identifikation der Polymere. Die Verarbeitung von DNA bei diesen ungewöhnlich hohen Temperaturen sollte die Verwendung von Nucleinsäuren als Barcode für Polymere im Spritzguss ermöglichen. Um die Eignung der Partikel zu testen, wurde PVC mit DNA/SiO₂-Partikeln beladen ($\delta = 350$ ppm) und durch Heißpressen verarbeitet ($T = 195^\circ\text{C}$ für 5 min), um eine dreidimensionale Pille herzustellen (Abbildung 3c). Nach einer zweistufigen Extraktion (Abbildung S7 (SI)) konnten die Nucleinsäuren aus dem Polymer freigesetzt werden, und das Polymer wurde eindeutig mithilfe von qPCR identifiziert. Ähnliche Ergebnisse wurden durch die Simulation von Langzeitalterungstests der geschützten DNA in PVC nach der ASTM-F1980-Norm erzielt. Hierbei konnte die verpackte DNA noch nach einer zweimonatigen Lagerung bei 60 °C amplifiziert werden (entspricht einer Lagerung bei Raumtemperatur von zwei Jahren; Abbildung 3b).

Wie an den obigen Beispielen illustriert wird, kann DNA durch Verkapselung in Siliciumdioxid zunächst geschützt und nach Entschützen mithilfe der Fluorchemie analysiert werden. Die entwickelte Methode ist chemisch orthogonal

zur biochemischen Aufbereitung und Analyse von Nucleinsäuren und kompatibel mit den üblichen Verarbeitungsmethoden der allgegenwärtigen Kunststoffgüter. Durch das Schützen der DNA kann eine Stabilität erzielt werden, die über die der bekannten Anwendungssysteme in biologischen Systemen hinausreicht; dadurch wird das DNA-Barcoding auf Materialien nichtbiologischem Ursprungs ermöglicht. Die Kombination von geschützten Nucleinsäuren und der hochempfindlichen biochemischen qPCR-Analyse ermöglicht die Bildung von chemisch stabilen Tracer-Partikeln. Diese Partikel tragen einen einzigartigen Code mit sehr niedriger Nachweisgrenze und können deshalb als neue Materialien für Fälschungsschutz und zur Identifizierung von markierten Objekten, Produktströmen und Lieferketten eingesetzt werden.

Experimentelles

Allgemeine Synthese zum Schützen von DNA: Ammonium-funktionalisierte Siliciumdioxidpartikel ($35 \mu\text{L}$, 50 mg mL^{-1}) wurden mit $10 \mu\text{L}$ doppelsträngiger DNA (Verwendung von 1 mg mL^{-1} , verschiedener DNA-Amplikons und DNA-Leiter (SI)) und 1 mL Wasser vermengt. Nach intensivem 2-minütigem Mischen und Zentrifugieren der Partikel bei $21\,500 \text{ g}$ wurde der Überstand entfernt, und die Partikel wurden in $1 \text{ mL H}_2\text{O}$ resuspendiert. Nach zwei zusätzlichen Waschgängen wurden die zentrifugierten Partikel in 0.5 mL Wasser dispergiert. Nach Versetzen mit den co-wechselwirkenden Spezies (TMAPS, 50 % in MeOH, $0.6 \mu\text{L}$) wurde Tetraethoxysilan (TEOS, $\geq 99.0\%$, Aldrich Chemie, $0.6 \mu\text{L}$) unter kräftigem Rühren zugegeben. Das Gemisch wurde bei Raumtemperatur vier Stunden gerührt und danach mit weiteren $4 \mu\text{L}$ TEOS versetzt. Die Reaktionsmischung wurde anschließend vier Tage mit 900 UpM ($\text{UpM} = \text{Umdrehungen pro Minute}$) geschüttelt.

DNA-Freisetzung: Für die Extraktion der eingekapselten DNA wurden $10 \mu\text{L}$ der Partikelsuspension zu $40 \mu\text{L}$ einer gepufferten Flusssäurelösung ($\text{HF/NH}_4\text{F}$, $0.34 \text{ g NH}_4\text{F} + 10 \text{ g HF}$ (1 % in Wasser)) gegeben.

Eingegangen am 9. Oktober 2012,
veränderte Fassung am 21. Dezember 2012
Online veröffentlicht am 6. März 2013

Stichwörter: DNA · Fälschungsschutz · Polymerasekettenreaktion · Silicate · Sol-Gel-Prozesse

- [1] C. Bancroft, T. Bowler, B. Bloom, C. T. Clelland, *Science* **2001**, 293, 1763–1765.
- [2] a) J. Elbaz, O. Lioubashevski, F. A. Wang, F. Remacle, R. D. Levine, I. Willner, *Nat. Nanotechnol.* **2010**, 5, 417–422; b) Z. Ezziane, *Nanotechnology* **2006**, 17, R27–R39.
- [3] a) C. M. Niemeyer, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, 4, 609–618; b) A. V. Pinheiro, D. R. Han, W. M. Shih, H. Yan, *Nat. Nanotechnol.* **2011**, 6, 763–772; c) N. C. Seeman, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 3408–3428; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 3220–3238; d) N. C. Seeman, *Mol. Biotechnol.* **2007**, 37, 246–257; e) F. C. Simmel, W. U. Dittmer, *Small* **2005**, 1, 284–299; f) P. Yin, R. F. Hariadi, S. Sahu, H. M. T. Choi, S. H. Park, T. H. LaBean, J. H. Reif, *Science* **2008**, 321, 824–826.
- [4] C. T. Clelland, V. Risca, C. Bancroft, *Nature* **1999**, 399, 533–534.
- [5] B. Popping, *J. Biotechnol.* **2002**, 98, 107–112.
- [6] T. Lindahl, *Nature* **1993**, 362, 709–715.
- [7] E. Willerslev, A. Cooper, *Proc. R. Soc. London Ser. B* **2005**, 272, 3–16.

- [8] J. G. Baust, *Biopreserv. Biobank*. **2008**, 6, 251–252.
- [9] a) E. Willerslev, A. J. Hansen, J. Binladen, T. B. Brand, M. T. P. Gilbert, B. Shapiro, M. Bunce, C. Wiuf, D. A. Gilichinsky, A. Cooper, *Science* **2003**, 300, 791–795; b) C. Lindqvist, S. C. Schuster, Y. Z. Sun, S. L. Talbot, J. Qi, A. Ratan, L. P. Tomsho, L. Kasson, E. Zeyl, J. Aars, W. Miller, O. Ingolfsson, L. Bachmann, O. Wiig, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, 107, 5053–5057.
- [10] a) H. N. Poinar, M. Hoss, J. L. Bada, S. Paabo, *Science* **1996**, 272, 864–866; b) M. Hoss, P. Jaruga, T. H. Zastawny, M. Dizdaroglu, S. Paabo, *Nucleic Acids Res.* **1996**, 24, 1304–1307.
- [11] C. L. Oskam, J. Haile, E. McLay, P. Rigby, M. E. Allentoft, M. E. Olsen, C. Bengtsson, G. H. Miller, J. L. Schwenninger, C. Jacomb, R. Walter, A. Baynes, J. Dortch, M. Parker-Pearson, M. T. P. Gilbert, R. N. Holdaway, E. Willerslev, M. Bunce, *Proc. R. Soc. London Ser. B* **2010**, 277, 1991–2000.
- [12] W. Stöber, A. Fink, E. Bohn, *J. Colloid Interface Sci.* **1968**, 26, 62–69.
- [13] a) J. Jin, H. Lu, C. Shunai, *Angew. Chem.* **2009**, 121, 9432–9436; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 9268–9272; b) M. Numata, K. Sugiyasu, T. Hasegawa, S. Shinkai, *Angew. Chem.* **2004**, 116, 3341–3345; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 3279–3283.
- [14] a) E. Auyeung, R. J. Macfarlane, C. H. J. Choi, J. I. Cutler, C. A. Mirkin, *Adv. Mater.* **2012**, 24, 5181–5186; b) M. Fujiwara, K. Shiokawa, K. Hayashi, K. Morigaki, Y. Nakahara, *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2007**, 81, 103–123.
- [15] J. J. R. Kirkpatrick, D. S. Enion, D. A. R. Burd, *BURNS* **1995**, 21, 483–493.
- [16] J. Catania, B. C. Keenan, G. P. Margison, D. S. Fairweather, *Anal. Biochem.* **1987**, 167, 347–351.
- [17] R. Stoewe, W. A. Prutz, *Free Radical Biol. Med.* **1987**, 3, 97–105.
- [18] P. Setlow, *J. Appl. Microbiol.* **2006**, 101, 514–525.
- [19] T. Lindahl, B. Nyberg, *Biochemistry* **1972**, 11, 3610–3618.
- [20] L. W. Zhang, Q. Y. Wu, *J. Biosci.* **2005**, 30, 599–604.
- [21] G. Mie, *Ann. Phys.* **1908**, 25, 377–445.
- [22] a) E. H. K. Wong, R. H. Hanner, *Food Res. Int.* **2008**, 41, 828–837; b) C. Dalvit, M. De Marchi, M. Cassandro, *Meat Sci.* **2007**, 77, 437–449.
- [23] A. A. Lubin, C. Fan, M. Schafer, C. T. Clelland, C. Bancroft, A. J. Heeger, K. W. Plaxco, *Forensic Sci. Commun.* **2008**, 10.
- [24] a) J. L. Vivero-Escoto, I. I. Slowing, B. G. Trewyn, V. S.-Y. Lin, *Small* **2010**, 6, 1952–1967; b) I. I. Slowing, J. L. Vivero-Escoto, C.-W. Wu, V. S.-Y. Lin, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2008**, 60, 1278–1288; c) C. Hom, J. Lu, M. Liong, H. Luo, Z. Li, J. I. Zink, F. Tamanoi, *Small* **2010**, 6, 1185–1190.
- [25] a) O. Boussif, F. Lezoualch, M. A. Zanta, M. D. Mergny, D. Scherman, B. Demeneix, J. P. Behr, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, 92, 7297–7301; b) J. B. Zhou, J. Liu, C. J. Cheng, T. R. Patel, C. E. Weller, J. M. Piepmeyer, Z. Z. Jiang, W. M. Saltzman, *Nat. Mater.* **2011**, 11, 82–90.
- [26] J. H. Choy, J. M. Oh, M. Park, K. M. Sohn, J. W. Kim, *Adv. Mater.* **2004**, 16, 1181–1184.