

생체적합성 하이드로겔 기반 3D 세포 배양, 산소 농도 및 바이오 마커 정량 검출 플랫폼 기술

Biocompatible Hydrogel-Based Platform Technologies for 3D Cell Culture and Quantitative Detection of Oxygen Concentration and Biomarkers

최낙원¹ · 김주영² | Nak Won Choi¹, Ju-Young Kim²

¹Center for BioMicrosystems, Brain Science Institute, Korea Institute of Science and Technology(KIST), Hwarangno 14-gil 5, Seongbuk-gu, Seoul 136-791, Korea

²Department of Advanced Materials Engineering, Kangwon National University, Joongang-ro, Samcheok, Gangwon-do 245-711, Korea
E-mail: nakwon.choi@kist.re.kr

1. 서론

다학제적인 의과학/공학 기술인 조직공학이 처음으로 1993년 학계에 소개된 이후¹ 20년 동안 전세계 여러 연구팀들이 최종 목표 - '생체재료(혹은 생체적합성 하이드로겔)로 구성된 3차원(3D) 구조체(scaffold) 안에 심어진 세포들을 생체 외에서 배양함으로써 이식 가능한 조직들로 키우는 것' - 를 이루기 위해 다양한 전공 분야에서 접근을 하고 있다. 그러나 이러한 조직공학의 개념을 도입하여 임상적으로 성공한 실질적인 장기는 2006년 Wake Forest 대학 의대 Atala 교수 연구팀이 실험실에서 배양하고 사람에게 이식된 방광이 처음이었다.² 조직 공학 분야 연구가 활발해짐에 따라 자연스레 구조체로 쓰일 수 있는 생체재료 분야도 상당히 확대되었다. 우리 몸의 수분 함유량은 약 70%이고 세포를 기본 구성 단위로 하는 조직 및 장기는 세포 외 기질(extracellular matrix, ECM)로 이루어져 있는데 이는 재료 측면에서 보면 기본적으로 하이드로겔이다. 하이드로겔은 크게 알지네이트(alginate), 콜라겐(collagen), 아가로즈(agarose) 등의 천연 하이드로겔과 poly(ethylene glycol)(PEG) 기반, poly(lactic-co-glycolic acid)(PLGA) 기반으로 하는 합성 하이드로겔로 분류될 수 있다. 최근 10년 동안은 기존의 조직공학 연구와 더불어 앞서 언급한 다양한 생체적합성 하이드로겔들을 이용하여 세포 수준이 아닌 조직 수준에서 3D 세포 배양을 통해 생리학, 병리학적 모델을 구축하거나 세포 주변 미세환경에서 중요한 인자를 모니터링하고 혹은 바이오 마커 검출을 할 수 있는 플랫폼 기술 개발도 파생적으로 새롭게 떠오르고 있다.

Author



최낙원

2004 서울대학교 화학생물공학부 (학사)
2003-2004 한국과학기술연구원 (KIST)
Complex Fluid Lab 위촉연구원
2004-2010 Cornell University, School of
Chemical and Biomolecular
Engineering (석사, 박사)
2010-2011 Novartis Institutes for
Biomedical Research (NIBR),
Massachusetts Institute of
Technology (MIT), Department
of Chemical Engineering
(Post-Doc.)
2012-현재 한국과학기술연구원 (KIST)
노과학연구소
바이오마이크로시스템연구단
선임연구원



김주영

1990 한양대학교 공업화학과 (학사)
1992 한양대학교 공업화학과 (硕士)
1996 한양대학교 공업화학과 (박사)
1996-1998 Cornell University School of
Chemical and Biomolecular
Engineering (Post-Doc.)
1998-현재 강원대학교 신소재화학공학부 교수

본 특집에서는 생체적합성 하이드로겔을 기반으로 마이크로, 나노 스케일의 가공, 합성 기술과 융합된 플랫폼 기술들을 소개하고자 한다. 첫 번째로 미세유체적 (microfluidics) 하이드로겔을 이용한 동물 세포의 3D 배양 시스템,³ 두 번째로 고분자 올리고머를 이용한 생체 환경 내 산소 농도의 광학적 정량 검출 기술,⁴ 그리고 마지막으로 하이드로겔 기반 바이오 마커 정량 검출 기술⁵을 간략하게 소개함으로써 세포 배양, 진단용 플랫폼 기술 개발 분야의 최근 동향에 대한 독자들의 이해를 높이고 또한 새로운 바이오 융합 기술 분야에서 유용하게 쓰일 수 있는 스마트 재료의 필요성에 대해서도 언급하고자 한다.

2. 본론

2.1 미세유체적 하이드로겔 스캐폴드(Microfluidic Hydrogel Scaffold)

우리 몸을 들여다보면 세포들은 모두 2차원(2D) 평면 상이 아닌 3D 환경에서 조직과 장기를 이루고 있으며 심장·동맥·정맥으로 이루어진 혈관 네트워크를 통해 산소와 양분을 공급받아 기본 대사 활동을 하고 있다. 이 시스템을 물질 전달 차원에서 본다면 혈관 내에서는 산소 등 대사물질과 세포 신호 전달 물질들의 대류(convective transport)가, 그리고 세포를 둘러싼 조직 내에서는 확산·반응(diffusion-reaction) 또는 확산(diffusion)이 일어나고 있다. 스케일 측면에서 본다면 우리 몸을 구성하고 있는 상당 부분인 모세혈관·조직이 미세유체역학적으로 그 기능을 유지하고 있다. 반도체 가공 기술의

발전과 함께 1990년대 말 하버드 대학 Whitesides 그룹을 중심으로 소개된 soft lithography 기술은 마이크로/나노 엔지니어링 기술들과 접목되어 poly(dimethyl siloxane)(PDMS) 미세유체 마이크로칩을 제작할 수 있게 되면서 기존에는 할 수 없었던 새로운 연구 테마들이 상당히 생겨나기 시작했다. 2000년대 초부터는 바이오 연구 분야에서도 활발하게 접목되기 시작했는데 기존의 미세유체칩 내 PDMS 마이크로 채널 내 세포 환경이 2D로 국한되는 한계를 보여주었다.⁶ 조직 공학 분야에서는 이와 달리 생체재료 내에 동물 세포를 심어 우리 몸에 보다 가까운 3D 환경에서 배양하는 접근 방법을 취하고 있었으나 여전히 남아있는 선결 과제들 중 하나는 공학적 조직 구조체의 크기가 수백 마이크로미터 이상으로 커짐에 따라 3D 세포 주위 미세환경에서 대사 활동을 유지하면서도 시간적, 공간적 제어를 통한 대사물질 및 신호 전달 물질 등을 배달해줄 수 있겠는가 하는 점이었다.

이러한 한계점을 해결할 수 있는 한 방법으로 미세유체적 마이크로채널을 생체 적합한 하이드로겔 안에 바로 접적하고 세포를 둘러싸고 있는 3D 환경을 생체재료 내 마이크로 채널을 소스(source) 혹은 싱크(sink)로 이용하여 시공간적으로 제어하는 것이다. 이 개념의 핵심은 시스템 자체가 하이드로겔 안에 접적되어 마이크로채널과 하이드로겔 사이에 확산 커플링이 가능하다는 점이다. 즉, 그림 1에서 보여주는 것과 같이 미세유체채널 네트워크로 외부에서 신호 전달 물질과 같이 반응하지 않는 분자들은 확산만을 통해, 대사 물질들은 확산·소모를 통해 하이드로겔 내로 원하는 때에 원하는 곳에 전달할 수 있다.^{3,7,8}

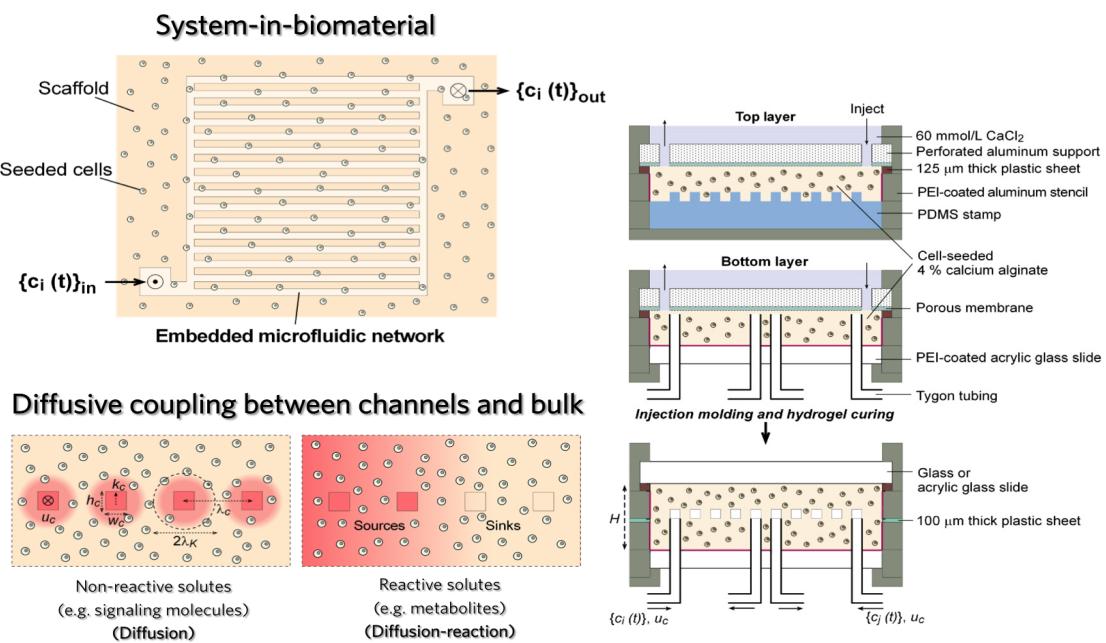


그림 1. 미세유체적 하이드로겔 스캐폴드의 개념도 및 미세유체적 하이드로겔 스캐폴드의 제작 공정.

미세유체적 하이드로겔 스캐폴드의 제작은 1) 생체적합성 하이드로겔 내 세포를 심고, 2) 마이크로채널 네트워크가 전사된 PDMS 스템프가 조립된 형틀(위층), 외부에서 제어가 가능하도록 투빙이 조립된 형틀(아래층)에 세포가 심어진 하이드로겔을 주입하고 고형화 시킨 후, 3) 두 층의 기계적 혹은 화학적 결합을 통해 이루어진다. 그림 1은 2가 이온(예를 들어, Ca^{2+})으로 가교가 가능한 알지네이트 하이드로겔을 이용한 가공 공정을 보여주는 예이다.

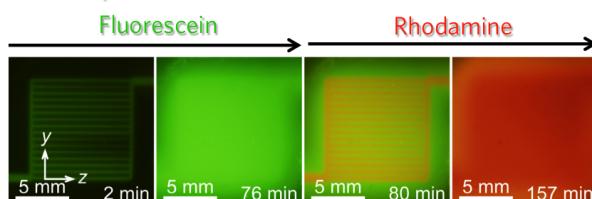
하이드로겔 내에 접적된 미세유체 마이크로채널을 이용하면 그림 2에서 보여주는 것과 같이 서로 다른 물질들을 시간차를 두면서 세포 주위 미세환경에 전달하고 동시에 추출하는 것과 하이드로겔 내 서로 다른 두 개의 미세유체채널 네트워크가 접적된 경우 공간적으로 서로 다른 두 물질을 전달하면서 세포 주위 3D 환경을 제어하는 것이 가능하다. 또한, 미세유체채널 사이 간격의 변화를 줌으로써 하이드로겔 내 심어진 동물 세포의 대사 활동(예를 들어 산소 소모)도 모니터링할 수 있다. 그림 2에서 대사물질의 예로 사용한 것은 살아있는 세포를 염색할 때 널리 쓰이는 calcein-AM인데, 원래는 형광을 띠지 않으나 살아있는 세포 내 esterase라는 효소에 의해 분해되어 녹색 형광을 띠는 calcein으로 바뀌는 소모 반응을 모델로 삼았다.

위에서 소개한 하이드로겔은 알지네이트로 조직공학 등에서 상당히 오랜 기간 동안 널리 쓰이고 있는 생체재료이다.

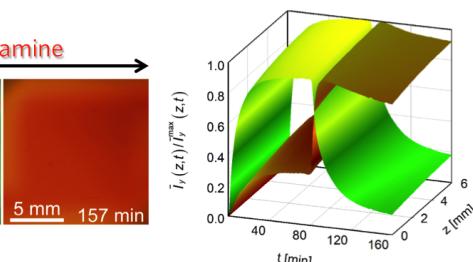
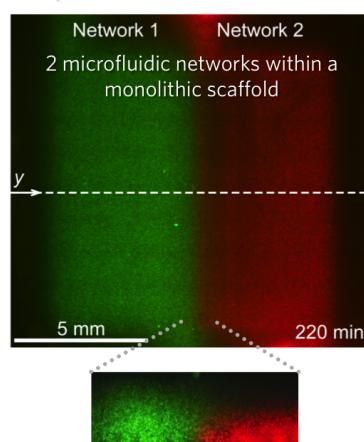
그러나 알지네이트는 생체적합하기는 하나 RGD 웨타이드 등으로 화학적 수정을 하지 않으면 생물학적으로 불활성(bioinert)하므로 세포가 젤 내에서 붙어서 이동을 하거나 스캐폴드를 녹여내고 새로운 세포들만의 네트워크를 형성하는 angiogenesis(새로운 혈관 생성) 등의 연구를 수행하기에는 어려움이 있다. 따라서, 세포들이 젤 내에서 리모델링이 가능한 생체재료를 이용하여 3D 배양 플랫폼을 만드는 기술개발이 한창 이루어지고 있는데 가장 대표적으로 쓰이는 물질이 우리 몸을 구성하는 세포 외 기질(ECM) 중에서 가장 많은 부분을 차지하고 있는 콜라겐이다.

콜라겐은 마이크로미터 스케일의 섬유들의 자가조립을 통해 고형화되는 하이드로겔로 일반적으로는 기계적 물성(Young's modulus)이 다른 하이드로겔들에 비해 낮은 편이나 섬유들로 이루어진 네트워크이므로 잡아당겨 늘어나는 성질을 갖고 있다. 생물학적 실험에서 가장 흔히 쓰이는 콜라겐 농도는 0.2% [w/v] (2 mg/mL)로 마이크로 패터닝은 가능하나 미세유체칩으로서 작동시키기에는 기계적 물성이 부족하다. 따라서, 상대적으로 고농도 (1% [w/v])의 콜라겐을 이용하여 앞서 소개한 방법과 비슷하게 미세유체적 하이드로겔 스캐폴드를 제작할 수 있다.^{9,10} 그림 3은 콜라겐 마이크로채널 내벽에 혈관세포를 붙이고 채널로 배양액을 전달해주어 혈관막을 형성하도록 하고 또한 새로운 혈관 생성 유도 단백질인 vascular endothelial growth factor(VEGF)를 배

- Temporal control



- Spatial control



- Visualization of metabolic activity

Microfluidic network with various interchannel spacings

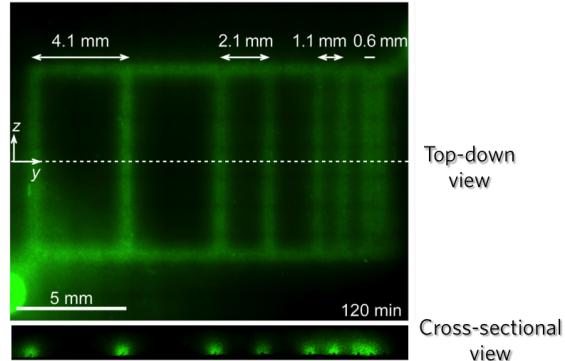


그림 2. 미세유체 마이크로채널을 이용한 하이드로겔 스캐폴드 내 시간적, 공간적 제어 및 대사활동의 모니터링.

양액에 섞음으로써 angiogenesis 분야 연구에도 응용될 수 있음을 보여준다.

하이드로겔 내에 혈관 역할을 할 수 있는 채널을 집적하는 기술과 그것을 가능하게 하는 생체적합성 하이드로겔을 탐색, 개발하는 것은 아직도 연구 가치가 상당히 높은 분야이다. 가장 최근에 주목할 만한 연구 성과는 2012년 Pennsylvania 대학교 Chen 교수 연구팀의 3D 프린팅 기술을 이용한 carbohydrate glass의 다층 구조 형성 및 이의 혈관으로서 활용이라고 수 있다.¹¹ 이 기술의 가장 큰 장점 두 가지는 첫째, 3D lattice 형태의 혈관 구조를 구현하고 세포가 심어진 하이드로겔을 얹은 후 carbohydrate glass를 녹여냄으로써 unibody의 형태로 비교적 쉽게 인공 조직 구조체를 제작할 수 있다는 점과 둘째, 3D 미세유체채널 네트워크를 활용하여 macroscopic 조직 구조체(1 cm 이상 두께)의 제작 가능성까지 보여주었다는 점이다.

2.2 산소-센싱 인광 나노 입자 (Oxygen-Sensing Phosphorescent Nanoparticle)

우리 몸의 조직 내 산소 농도의 시간적, 공간적 변화는 배아, 혈관, 뼈 생성 및 줄기세포 기능, 상처 치유 등의 생물학적 프로세스를 조절하는데 있어서 가장 중요한 요소로 알려져 있다.

병리학적으로 보면 암조직 내 산소 농도의 결핍이 기존의 건강한 혈관으로부터 새로운 혈관을 형성하도록 하여 암조직이 성장하고 다른 장기로의 전이에까지 영향을 줄 수 있다. 따라서, 이러한 분야에서 보다 심도 있는 연구를 수행하기 위해서는 조직 스케일에서 산소 농도의 프로파일링이 필수적인데 기존의 용존 산소 미터로는 원하는 장소, 시간에 프로브를 삽입하여 측정해야 하므로 산소 농도의 분포를 한 눈에 알아보기가 용이하지 않다. 광학적으로 산소 농도의 변화에 따라 밝기가 변하는 porphyrin 계통의 인광체(phosphor)를 이용하면 이것이 가능한데 보통 Pt, Ru과 같은 금속 복합체이고 소수성이 강하므로 수용성 환경인 세포-조직 내에서 분산시켜 이미징하기에 한계가 있다. 또한, 인광체는 세포막에 존재하는 소수성과 친수성 레이어에 직접 닿아 빠져나오지 않으므로 세포 독성을 떤다.

이 문제점을 해결하기 위해 소수성인 poly(propylene oxide)(PPO)와 친수성인 poly(ethylene oxide)(PEO)를 T자 형태로 합성한 양친성 고분자 올리고머(urethane acrylate nonionmer, UAN)를 이용하여 인광체를 나노입자 안에 로딩하고 독성을 제거한 상태에서 세포 주위와 혈류 내 산소 농도를 광학적으로 정량 측정할 수 있다. 그림 4에서 보여주는 것과 같이 산소 농도에 민감한 인광체와 UAN을 섞어 물

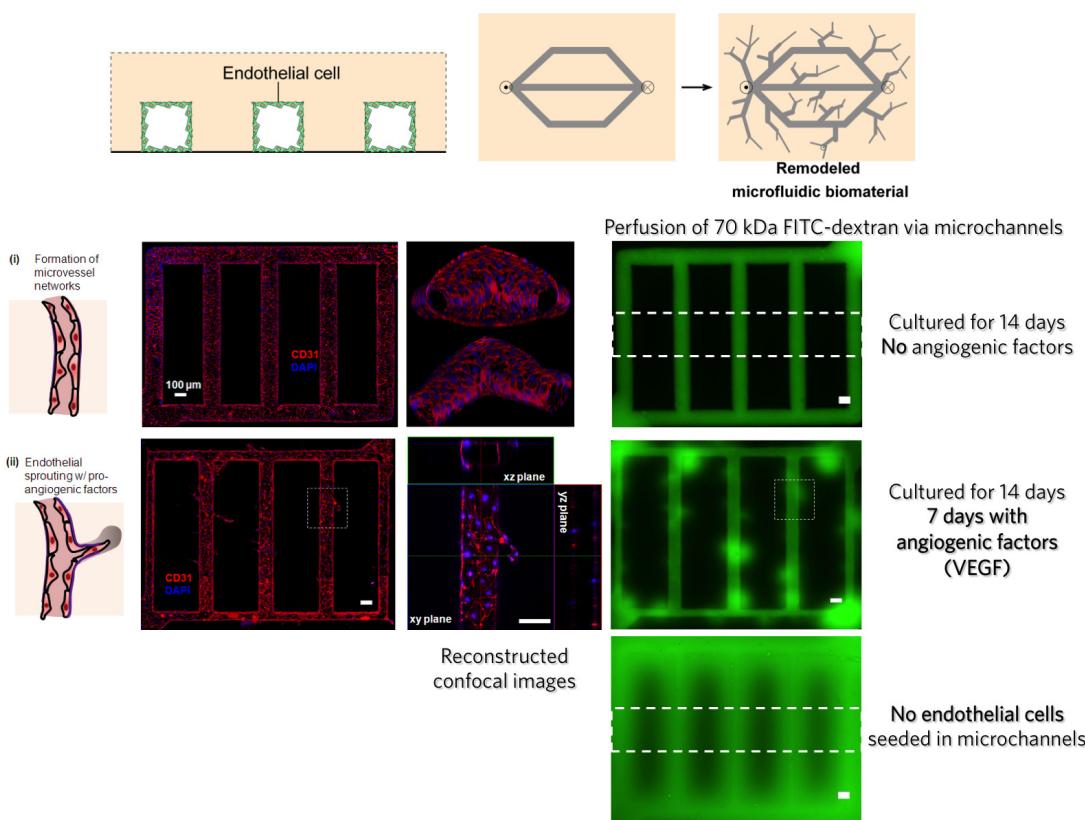


그림 3. 세포들에 의해 리모델링이 가능한 미세유체적 콜라겐 스캐폴드를 이용한 혈관세포막 및 새로운 혈관 형성에의 응용.

에 분산시키면 올리고머의 크기에 따라 친수성인 PEO 부분은 물쪽으로 향해 corona shell을 형성하고 그 안쪽에 상대적으로 소수성인 PPO 부분과 인광체가 로딩된다. 그 후에 에멀젼 방식으로 코어 가교 중합을 하면 수용액 환경에서 장시간 안정적으로 분산된 산소 센싱 PUAN 나노입자를 얻을 수 있다. 이 나노입자 합성의 가장 큰 장점들은 첫째, 유기용매의 이용을 최소화 하고 물 안에서 가교 합성이 가능하여 세포-조직 환경과 상당히 친화적이고, 둘째, 바이오 센서 재료의 특성에 따라 화학적 결합 특성 및 코어-쉘의 상대적인 크기 조절이 용이하다는 것이다.

산소 농도를 광학적으로 측정할 수 있는 원리는 dynamic (collisional) quenching이라는 가역적 과정을 통해서인데 인광체가 ~400 nm의 UV 빛을 받아 여기 상태가 되어 그라운드 상태로 돌아올 때 남은 에너지를 인광의 형태로 내는 순간 인광체 주위에 산소 분자들이 있으면 여기 상태의 인광체가 갖고 있는 에너지를 충돌에 의해 가져가므로 인광 빛을 내지 않고 그라운드 상태로 떨어지게 된다. 따라서, 산소 농도가 높으면 인광 밝기가 상대적으로 낮고 산소 농도가 낮으면 반대로 인광 밝기가 높아지게 된다. 아울러 이 dynamic quenching 과정에서 산소 농도와 인광체가 내는 빛의 밝기 사이에 Stern-Volmer 식으로 산소 농도의 정량 추산 또한 가능하다. 그림 5는 PUAN 내에 산소 센싱 인광체를 로딩함으로써 독성을 제거한 후 체외 환경에서 세포가 심어진 하이드로겔 구조체 내 나노입자를 분산시켜 산소 농도의 프로파일링하거나 체내 환경에서 마취시킨 쥐의 동맥과 정맥 내 혈류 용존 산소 농도를 정량 측정할 수 있음을 보여준다.

양친성 고분자 올리고머인 UAN의 합성 및 개량을 통해 산소뿐만 아니라 pH, 활성산소 등 생리학, 병리학적으로 중요한 인자들의 다중 분자 이미징에도 응용할 수 있을 것으로

기대하고 현재 국내외 공동연구의 폭을 넓히고 있다.

2.3 하이드로겔 기반 바이오 마커 검출(Hydrogel-Based Biomarker Detection)

신약 개발에서 통상적으로 신약 후보군 화합물들의 hightthroughput 스크리닝은 필수적인 과정이다. 이때, 신약 후보물질과 바이오 마커의 발견 및 검출, 질병 진단 및 예후 모니터링에서 일반적인 선별 과제는 DNA, miRNA, mRNA, 단백질 등의 바이오 마커를 검출하는 바이오에세이(bioassay) 기술을 개발함에 있어서 얼마나 많은 타겟을 동시에, 선택적으로, 비용을 최소화하여 극미량을 검출해낼 수 있는가 하는 점이다. 기존에 상용화된 많은 바이오에세이들은 대부분 polystyrene(PS)와 같은 플라스틱 재질의 평면 위 혹은 마이크로비드(microbead)의 겉표면에 타겟을 잡을 수 있는 프로브를 고정화시켜 진행한다. 2007년 MIT 화학공학과 Doyle 교수 연구팀은 생체적합성 합성 고분자 하이드로겔인 PEG PDMS 미세유체칩 내에서 원하는 모양으로 약 0.1초 이내에 광가교(photocrosslinking)를 통해 패터닝(stop flow lithography, SFL)을 하면서 하이드로겔 마이크로입자 내에 직접 바코드를 집적하여 다중(multiplex) 바이오에세이에 응용될 수 있는 가능성을 처음으로 보여주었다.¹² 이후 유사한 방법으로 PEG 마이크로입자를 이용하여 miRNA,^{13,14} 단백질^{15,16}의 정량 검출에 응용될 수 있음을 발표하였다. 기존의 방법에 비해 PEG 하이드로겔 내에 타겟을 잡을 수 있는 프로브를 고정화시키므로 프로브의 로딩 효율이 2D에 비해 상당히 높고 또한 하이드로겔의 특성상 용액 환경에 보다 가까운 3D 환경에서 바이오 마커의 구조 변형을 최소화하면서 열역학적으로 보다 안정적인 검출을 수행할 수 있으므로 검출 효과를 증대시킬 수 있다고 할 수 있다.

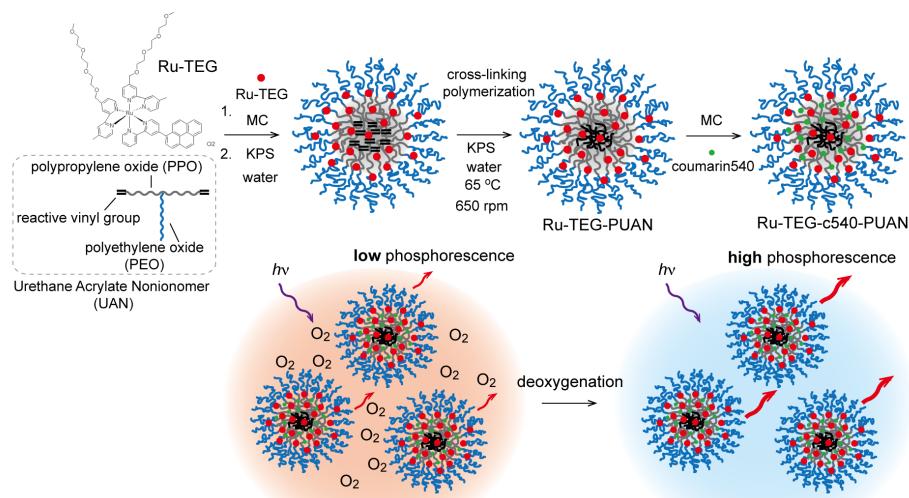


그림 4. 양친성 고분자 올리고머 (UAN)을 이용한 산소-센싱 인광체의 로딩 및 나노입자의 합성.

그림 6은 SFL 기술을 이용하여 3가지의 서로 다른 mRNA 타겟을 정량 검출할 수 있는 바이오에세이 시스템 개발의 과정을 개략적으로 보여주는 모식도이다. PDMS 미세유체칩의 서로 다른 6개의 입구를 통해 PEG diacrylate(PEGDA) 용액을 흘려주면 마이크로채널 내 유체는 라미나 흐름(laminar flow)의 특성상 각 유체 흐름의 인터페이스가 유지된다. 이 때, 유체 흐름을 잠시 멈춘 상태에서 현미경에 삽입한 광마스크(photomask)를 통해 UV 빛을 쪼여주면 광개시제(photoinitiator)가 라디칼(radical)을 내고 순차적으로 PEGDA의 diacrylate 그룹에 있는 이중결합을 깨면서 광가교가 이루어지게 된다. SFL 기술을 이용하여 바이오 마커를 검출할 수 있는 하이드로겔 마이크로입자를 약 5 개/초의 생산율로 얻을 수 있고 장기간 냉장 보관을 통해 원하는 때에 꺼내어 바이오에세이를 수행할 수 있는 장점이 있다.

PEG 하이드로겔 마이크로입자를 합성할 때 보통 검출하고자 하는 바이오 마커의 크기를 고려하여 다공성(porosity)을 조절해주어야 하는데 다공성 튜닝은 크게 3가지 방법으로

가능하다. 첫째, diacrylate 그룹이 없는 PEG을 porogen으로 사용하여 광가교시 넣었다가 추후에 린스를 해주어 빼낸다. 이 때 PEG porogen의 분자량을 바꾸면 또한 추가적인 다공성 조절이 가능하다. 둘째, PEGDA 용액의 농도를 조절함으로써, 그리고 셋째, PEGDA의 분자량을 조절함으로써 다공성을 튜닝할 수 있다. mRNA는 보통 핵산의 수가 1,000 개가 넘으므로 miRNA(핵산 20-25개; 지름 2-3 nm)나 단백질(70-100 kDa; 지름 3-5 nm)에 비해 상대적으로 크기가 더 크다. 그림 7은 분자량이 600인 PEG porogen을 이용하면 다공성을 mRNA 검출 바이오에세이에 적절하게 증가시켜 물질전달이 용이하도록 하고 intraplex 입자를 합성하여 서로 다른 세 가지 mRNA 타겟을 선택적으로 검출해낼 수 있음을 보여준다.

3. 결론

본 논문에서는 생체적합성 하이드로겔을 이용하여 바이

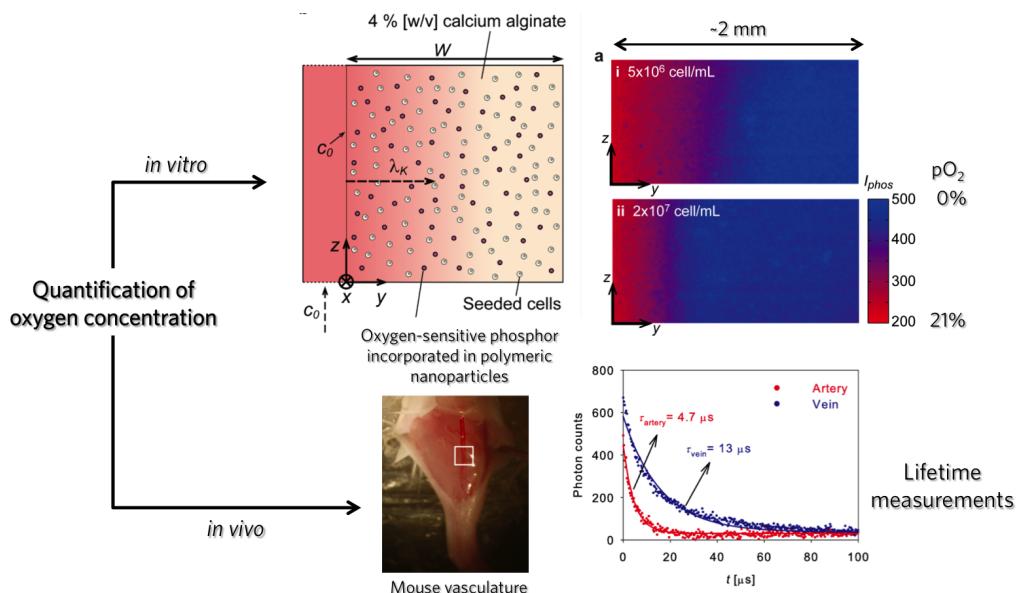


그림 5. 산소-센싱 PUAN 나노입자를 이용한 체외, 체내 환경에서 산소 농도의 광학적 정량 측정.

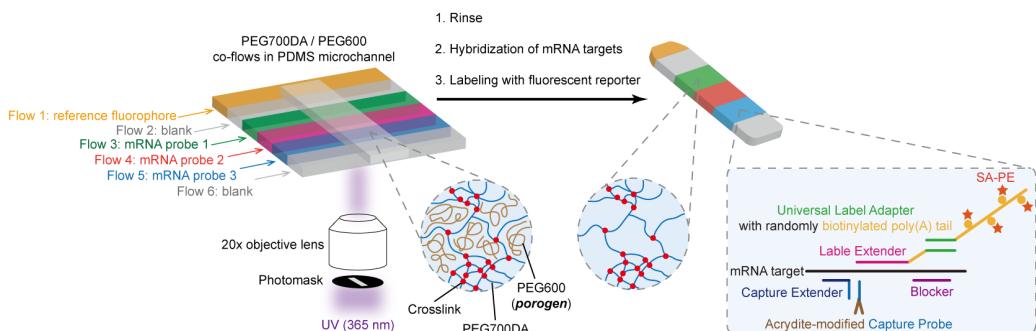


그림 6. PEG 하이드로겔 마이크로입자 광패터닝 기술(SFL)을 이용한 mRNA 다중 검출 에세이 개발.

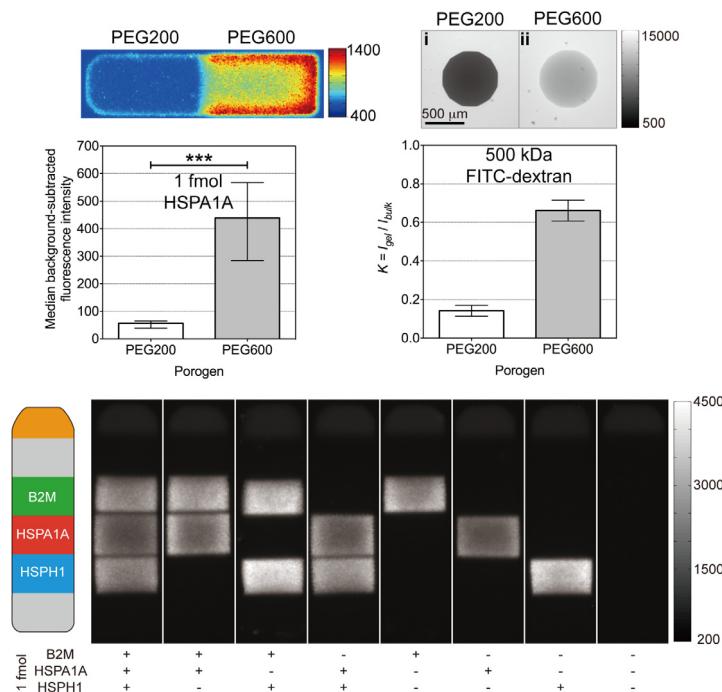


그림 7. mRNA 검출을 위해 다공성을 튜닝한 PEG 하이드로겔 마이크로입자를 이용한 3-plex 바이오에세이.

오 융합 플랫폼 기술 개발에 응용될 수 있음을 소개하였다. 알지네이트와 콜라겐 내에 미세유체채널을 집적시킴으로써 동물세포의 3D 배양 환경을 시간적, 공간적으로 제어할 수 있고, 양친성 고분자 올리고머 PUAN 나노입자의 합성을 통해 생리학적, 병리학적으로 중요한 인자인 산소 농도를 광학적으로 정량 측정할 수 있으며, 다공성이 튜닝된 PEG 하이드로겔 마이크로입자를 광패터닝 합성하여 바이오에세이에 유용하게 쓰일 수 있음을 보여주었다. 기존의 2D가 아닌 3D 환경에서 원하는 기능성들이 추가된 하이드로겔 기반 플랫폼 기술은 뇌신경, 장생태계 등을 모사할 수 있는 장기 온 어칩 기술뿐 아니라 동시 다중 분자 이미징 및 진단 기술에까지 응용될 수 있으므로 재료 측면에서 앞으로 생물학적 용도로 특화된 새로운 하이드로겔의 발견 및 개발, 혹은 composite 형태의 하이드로겔 개발과 결합된다면 더 큰 파급 효과를 가져올 수 있을 것으로 기대한다.

참고문헌

- R. Langer and J. P. Vacanti, *Science*, **260**, 920 (1993).
- A. Atala *et al.*, *Lancet*, **367**, 1241 (2006).
- N. W. Choi *et al.*, *Nat. Mater.*, **6**, 908 (2007).
- N. W. Choi *et al.*, *Biomaterials*, **33**, 2710 (2012).
- N. W. Choi *et al.*, *Anal. Chem.*, **84**, 9370 (2012).
- S. Takayama *et al.*, *Nature*, **411**, 1016 (2001).
- M. Cabodi *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 13788 (2005).
- A. D. Stroock and M. Cabodi, *MRS Bulletin*, **31**, 114 (2006).
- V. L. Cross *et al.*, *Biomaterials*, **31**, 8596 (2010).
- Zheng *et al.*, *Proc. Nati. Acad.*, **109**, 9342 (2012).
- J. S. Miller *et al.*, *Nat. Mater.*, **11**, 768 (2012).
- D. C. Pregibon *et al.*, *Science*, **315**, 1393 (2007).
- S. C. Chapin *et al.*, *Angew. Chem. Int. Edi.*, **50**, 2289 (2011).
- S. C. Chapin and P. S. Doyle, *Anal. Chem.*, **83**, 7179 (2011).
- D. C. Appleyard *et al.*, *Anal. Chem.*, **83**, 193 (2011).
- D. C. Appleyard *et al.*, *Nature Protocols*, **6**, 1761 (2011).