

3. Bellen, H. J., The fruit fly: A model organism to study the genetics of alcohol abuse and addiction? *Cell*, 1998, 93(6): 909-912.
4. Kaletta, T., Hengartner, M. O., Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2006, 5(5): 387-398.
5. Reid, R. J. D., Benedetti, P., Bjornsti, M. A., Yeast as a model organism for studying the actions of DNA topoisomerase-targeted drugs. *Biochimica Et Biophysica Acta-Gene Structure and Expression*, 1998, 1400(1-3): 289-300.
6. Traver, D., Herbomel, P., Patton, E. E., Murphey, R. D., Yoder, J. A., Litman, G. W., Catic, A., Amemiya, C. T., Zon, L. I., Trede, N. S., The zebrafish as a model organism to study development of the immune system. *Advances in Immunology*, Vol 81, 2003, 81: 253-+.
7. Singh, S. K., Sundaram, C. S., Shanbhag, S., Idris, M. M., Proteomic Profile of Zebrafish Brain Based on Two-Dimensional Gel Electrophoresis Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization MS/MS Analysis. *Zebrafish*, 2010, 7(2): 169-177.
8. Harrington, A. J., Hamamichi, S., Caldwell, G. A., Caldwell, K. A., *C. elegans* as a Model Organism to Investigate Molecular Pathways Involved with Parkinson's Disease. *Developmental Dynamics*, 2010, 239(5): 1282-1295.
9. Dimitriadi, M., Hart, A. C., Neurodegenerative disorders: Insights from the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Neurobiology of Disease*, 2010, 40(1): 4-11.
10. Freude, S., Schilbach, K., Schubert, M., The Role of IGF-1 Receptor and Insulin Receptor Signaling for the Pathogenesis of Alzheimer's Disease: From Model Organisms to Human Disease. *Current Alzheimer Research*, 2009, 6(3):

- 213-223.
11. Lakso, M., Vartiainen, S., Moilanen, A. M., Sirvio, J., Thomas, J. H., Nass, R., Blakely, R. D., Wong, G., Dopaminergic neuronal loss and motor deficits in *Caenorhabditis elegans* overexpressing human alpha-synuclein. *Journal of Neurochemistry*, 2003, 86(1): 165-172.
 12. Bonini, N. M., Fortini, M. E., Human neurodegenerative disease modeling using *Drosophila*. *Annual Review of Neuroscience*, 2003, 26: 627-656.
 13. Manning-Bog, A. B., McCormack, A. L., Li, J., Uversky, V. N., Fink, A. L., Di Monte, D. A., The herbicide paraquat causes up-regulation and aggregation of alpha-synuclein in mice - Paraquat and alpha-synuclein. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(3): 1641-1644.
 14. 林炳承, 秦建华, 图解微流控芯片实验室. 2008, 北京: 科学出版社.
 15. 林炳承, 秦建华, 微流控芯片实验室. 2006, 北京: 科学出版社.
 16. Manz, A., Graber, N., Widmer, H. M., Miniaturized total chemical analysis systems: A novel concept for chemical sensing. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 1990, 1(1-6): 244-248.
 17. Reyes, D. R., Iossifidis, D., Auroux, P. A., Manz, A., Micro total analysis systems. 1. Introduction, theory, and technology. *Analytical Chemistry*, 2002, 74(12): 2623-2636.
 18. Auroux, P. A., Iossifidis, D., Reyes, D. R., Manz, A., Micro total analysis systems. 2. Analytical standard operations and applications. *Analytical Chemistry*, 2002, 74(12): 2637-2652.
 19. Harrison, D. J., Manz, A., Fan, Z. H., Ludi, H., Widmer, H. M., Capillary electrophoresis and sample injection systems integrated on a planar glass chip.

- Analytical Chemistry, 1992, 64(17): 1926-1932.
20. Woolley, A. T., Mathies, R. A., Ultra-high-speed DNA-sequencing using capillary electrophoresis chips. *Analytical Chemistry*, 1995, 67(20): 3676-3680.
 21. Dittrich, P. S., Tachikawa, K., Manz, A., Micro total analysis systems. Latest advancements and trends. *Analytical Chemistry*, 2006, 78(12): 3887-3907.
 22. Dittrich, P. S., Manz, A., Lab-on-a-chip: microfluidics in drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2006, 5(3): 210-218.
 23. Ionescu-Zanetti, C., Shaw, R. M., Seo, J. G., Jan, Y. N., Jan, L. Y., Lee, L. P., Mammalian electrophysiology on a microfluidic platform. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(26): 9112-9117.
 24. Studer, V., Hang, G., Pandolfi, A., Ortiz, M., Anderson, W. F., Quake, S. R., Scaling properties of a low-actuation pressure microfluidic valve. *Journal of Applied Physics*, 2004, 95(1): 393-398.
 25. Daw, R., Finkelstein, J., Lab on a chip. *Nature*, 2006, 442(7101): 367-367.
 26. deMello, A. J., Control and detection of chemical reactions in microfluidic systems. *Nature*, 2006, 442(7101): 394-402.
 27. El-Ali, J., Sorger, P. K., Jensen, K. F., Cells on chips. *Nature*, 2006, 442(7101): 403-411.
 28. Janasek, D., Franzke, J., Manz, A., Scaling and the design of miniaturized chemical-analysis systems. *Nature*, 2006, 442(7101): 374-380.
 29. Psaltis, D., Quake, S. R., Yang, C. H., Developing optofluidic technology through the fusion of microfluidics and optics. *Nature*, 2006, 442(7101):

- 381-386.
30. Whitesides, G. M., The origins and the future of microfluidics. *Nature*, 2006, 442(7101): 368-373.
 31. Yager, P., Edwards, T., Fu, E., Helton, K., Nelson, K., Tam, M. R., Weigl, B. H., Microfluidic diagnostic technologies for global public health. *Nature*, 2006, 442(7101): 412-418.
 32. Ben-Yakar, A., Bourgeois, F., Ultrafast laser nanosurgery in microfluidics for genome-wide screenings. *Current Opinion in Biotechnology*, 2009, 20(1): 100-105.
 33. Ben-Yakar, A., Chronis, N., Lu, H., Microfluidics for the analysis of behavior, nerve regeneration, and neural cell biology in *C. elegans*. *Current Opinion in Neurobiology*, 2009, 19(5): 561-567.
 34. Chronis, N., Worm chips: Microtools for *C. elegans* biology. *Lab on a Chip*, 2010, 10(4): 432-437.
 35. Crane, M. M., Chung, K., Stirman, J., Lu, H., Microfluidics-enabled phenotyping, imaging, and screening of multicellular organisms. *Lab on a Chip*, 2010, 10(12): 1509-1517.
 36. Feng, X. J., Du, W., Luo, Q. M., Liu, B. F., Microfluidic chip: Next-generation platform for systems biology. *Analytica Chimica Acta*, 2009, 650(1): 83-97.
 37. Taylor, A. M., Jeon, N. L., Micro-scale and microfluidic devices for neurobiology *Current Opinion in Neurobiology*, 2010, 21: 1-8.
 38. Wang, J. Y., Ren, L., Li, L., Liu, W. M., Zhou, J., Yu, W. H., Tong, D. W., Chen, S. L., Microfluidics: A new cosset for neurobiology. *Lab on a Chip*, 2009, 9(5): 644-652.

39. Zhang, J. X. J., Trapping the nematode on a micro chip for the future of science. *Hfsp Journal*, 2007, 1(4): 220-224.
40. Sulston, J. E., Hodgkin, J., *Methods in the nematode Caenorhabditis elegans*, ed. Wood, W. B. 1988, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
41. Brenner, S., *Genetics of Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 1974, 77(1): 71-94.
42. Sulston, J. E., Schierenberg, E., White, J. G., Thomson, J. N., The embryonic-cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology*, 1983, 100(1): 64-119.
43. Ellis, H. M., Horvitz, H. R., Genetic-control of programmed cell-death in the nematode *C. elegans*. *Cell*, 1986, 44(6): 817-829.
44. Yuan, J. Y., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H. M., Horvitz, H. R., The *C. elegans* cell-death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1-beta-converting enzyme. *Cell*, 1993, 75(4): 641-652.
45. Saavedra, E. A., Nobel prize for medicine 2002: Brenner, Horvitz, Sulston and the *Caenorhabditis elegans* worm. *Medicina-Buenos Aires*, 2003, 63(2): 179-182.
46. White, J. G., Southgate, E., Thomson, J. N., Brenner, S., The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 1986, 314(1165): 1-340.
47. Guo, S., Kemphues, K. J., Par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative SER/THR kinase that is asymmetrically distributed. *Cell*, 1995, 81(4): 611-620.

48. Fire, A., Xu, S. Q., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., Mello, C. C., Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1998, 391(6669): 806-811.
49. Sternberg, P. W., Working in the post-genomic *C. elegans* world. *Cell*, 2001, 105(2): 173-176.
50. Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W., Prasher, D. C., Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 1994, 263(5148): 802-805.
51. Garcia, S. M., Casanueva, M. O., Silva, M. C., Amaral, M. D., Morimoto, R. I., Neuronal signaling modulates protein homeostasis in *Caenorhabditis elegans* post-synaptic muscle cells. *Genes & Development*, 2007, 21(22): 3006-3016.
52. de Bono, M., Maricq, A. V., Neuronal substrates of complex behaviors in *C. elegans*. *Annual Review of Neuroscience*, 2005, 28: 451-501.
53. Kimura, K. D., Miyawaki, A., Matsumoto, K., Mori, I., The *C. elegans* thermosensory neuron AFD responds to warming. *Current Biology*, 2004, 14(14): 1291-1295.
54. Wicks, S. R., Rankin, C. H., Effects of tap withdrawal response habituation on other withdrawal behaviors: The localization of habituation in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Behavioral Neuroscience*, 1997, 111(2): 342-353.
55. Evason, K., Huang, C., Yamben, I., Covey, D. F., Kornfeld, K., Anticonvulsant Medications Extend Worm Life-Span. *Science*, 2005, 307(5707): 258-262.
56. Nass, R., Miller, D. M., Blakely, R. D., *C. elegans*: a novel pharmacogenetic model to study Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders*, 2001, 7(3): 185-191.

57. Nass, R., Hall, D. H., Miller, D. M., Blakely, R. D., Neurotoxin-induced degeneration of dopamine neurons in *Caenorhabditis elegans*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002, 99(5): 3264-3269.
58. Nass, R., Hamza, I., The Nematode *C. elegans* as an Animal Model to Explore Toxicology In Vivo: Solid and Axenic Growth Culture Conditions and Compound Exposure Parameters, in Current Protocols in Toxicology, Costa, L. G., Hodgson, E., Lawrence, D. A., Reed, D. J., Editors. 2007.
59. Nass, R., Chen, L., *Caenorhabditis elegans* models of human neurodegenerative diseases, in Sourcebook of Models for Biomedical Research, Conn, P. M., Editor. 2008. p. 91-101.
60. Braungart, E., Gerlach, M., Riederer, P., Baumeister, R., Hoener, M. C., *Caenorhabditis elegans* MPP+ model of Parkinson's disease for high-throughput drug screenings. Neurodegener Dis, 2004, 1(4-5): 175-83.
61. Bretscher, A. J., Busch, K. E., de Bono, M., A carbon dioxide avoidance behavior is integrated with responses to ambient oxygen and food in *Caenorhabditis elegans*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(23): 8044-8049.
62. Luo, L., Gabel, C. V., Ha, H. I., Zhang, Y., Samuel, A. D. T., Olfactory behavior of swimming *C. elegans* analyzed by measuring motile responses to temporal variations of odorants. Journal of Neurophysiology, 2008, 99(5): 2617-2625.
63. Sawin, E. R., Ranganathan, R., Horvitz, H. R., *C. elegans* locomotory rate is modulated by the environment through a dopaminergic pathway and by

- experience through a serotonergic pathway. *Neuron*, 2000, 26(3): 619-631.
64. McDonald, J. C., Duffy, D. C., Anderson, J. R., Chiu, D. T., Wu, H. K., Schueller, O. J. A., Whitesides, G. M., Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). *Electrophoresis*, 2000, 21(1): 27-40.
65. Thorsen, T., Maerkl, S. J., Quake, S. R., Microfluidic large-scale integration. *Science*, 2002, 298(5593): 580-584.
66. Lucchetta, E. M., Lee, J. H., Fu, L. A., Patel, N. H., Ismagilov, R. F., Dynamics of *Drosophila* embryonic patterning network perturbed in space and time using microfluidics. *Nature*, 2005, 434(7037): 1134-1138.
67. Burns, J. R., Ramshaw, C., The intensification of rapid reactions in multiphase systems using slug flow in capillaries. *Lab on a Chip*, 2001, 1(1): 10-15.
68. Chen, D. L., Gerdtts, C. J., Ismagilov, R. F., Using microfluidics to observe the effect of mixing on nucleation of protein crystals. *Journal of the American Chemical Society*, 2005, 127(27): 9672-9673.
69. Hansen, C. L., Classen, S., Berger, J. M., Quake, S. R., A microfluidic device for kinetic optimization of protein crystallization and in situ structure determination. *Journal of the American Chemical Society*, 2006, 128(10): 3142-3143.
70. Kim, J. W., Utada, A. S., Fernandez-Nieves, A., Hu, Z. B., Weitz, D. A., Fabrication of monodisperse gel shells and functional microgels in microfluidic devices. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2007, 46: 1819-1822.
71. Xu, S. Q., Nie, Z. H., Seo, M., Lewis, P., Kumacheva, E., Stone, H. A., Garstecki, P., Weibel, D. B., Gitlin, I., Whitesides, G. M., Generation of

- monodisperse particles by using microfluidics: Control over size, shape, and composition. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2005, 44(5): 724-728.
72. Hu, N., Yang, J., Zheng, X.-L., Yin, Z.-Q., Xu, H.-W., Zhang, X.-G., Cao, Y., Yang, J., Xia, B., Xu, R., Yan, J.-W., Jiang, F., Polyimide Membrane Based Cell-electrofusion Chip. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2009, 37(8): 1247-1252.
73. Brouzes, E., Medkova, M., Savenelli, N., Marran, D., Twardowski, M., Hutchison, J. B., Rothberg, J. M., Link, D. R., Perrimon, N., Samuels, M. L., Droplet microfluidic technology for single-cell high-throughput screening. *Proc Natl Acad Sci*, 2009, 106(34): 14195-14200.
74. Goodman, M. B., Hall, D. H., Avery, L., Lockery, S. R., Active currents regulate sensitivity and dynamic range in *C. elegans* neurons. *Neuron*, 1998, 20(4): 763-772.
75. Kerr, R., Lev-Ram, V., Baird, G., Vincent, P., Tsien, R. Y., Schafer, W. R., Optical imaging of calcium transients in neurons and pharyngeal muscle of *C. elegans*. *Neuron*, 2000, 26(3): 583-594.
76. Lewis, J. A., Wu, C. H., Berg, H., Levine, J. H., The genetics of levamisole resistance in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 1980, 95(4): 905-928.
77. Allen, P. B., Sgro, A. E., Chao, D. L., Doepker, B. E., Edgar, J. S., Shen, K., Chiu, D. T., Single-synapse ablation and long-term imaging in live *C. elegans*. *Journal of Neuroscience Methods*, 2008, 173(1): 20-26.
78. Hulme, S. E., Shevkoplyas, S. S., Apfeld, J., Fontana, W., Whitesides, G. M.,

- A microfabricated array of clamps for immobilizing and imaging *C. elegans*. *Lab on a Chip*, 2007, 7(11): 1515-1523.
79. Chokshi, T. V., Ben-Yakar, A., Chronis, N., CO₂ and compressive immobilization of *C. elegans* on-chip. *Lab on a Chip*, 2009, 9(1): 151-157.
 80. Guo, S. X., Bourgeois, F., Chokshi, T., Durr, N. J., Hilliard, M. A., Chronis, N., Ben-Yakar, A., Femtosecond laser nanoaxotomy lab-on-a-chip for in vivo nerve regeneration studies. *Nature Methods*, 2008, 5(6): 531-533.
 81. Ma, H., Jiang, L., Shi, W. W., Qin, J. H., Lin, B. C., A programmable microvalve-based microfluidic array for characterization of neurotoxin-induced responses of individual *C. elegans*. *Biomicrofluidics*, 2009, 3(4).
 82. Zeng, F., Rohde, C. B., Yanik, M. F., Sub-cellular precision on-chip small-animal immobilization, multi-photon imaging and femtosecond-laser manipulation. *Lab on a Chip*, 2008, 8(5): 653-656.
 83. Rohde, C. B., Zeng, F., Gonzalez-Rubio, R., Angel, M., Yanik, M. F., Microfluidic system for on-chip high-throughput whole-animal sorting and screening at subcellular resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(35): 13891-13895.
 84. Chung, K. H., Crane, M. M., Lu, H., Automated on-chip rapid microscopy, phenotyping and sorting of *C. elegans*. *Nature Methods*, 2008, 5(7): 637-643.
 85. Krajniak, J., Lu, H., Long-term high-resolution imaging and culture of *C. elegans* in chip-gel hybrid microfluidic device for developmental studies. *Lab on a Chip*, 2010, 10(14): 1862-1868.
 86. Kim, N., Dempsey, C. M., Zoval, J. V., Sze, J. Y., Madou, M. J., Automated

- microfluidic compact disc (CD) cultivation system of *Caenorhabditis elegans*. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2007, 122(2): 511-518.
87. Hulme, S. E., Shevkoplyas, S. S., McGuigan, A. P., Apfeld, J., Fontana, W., Whitesides, G. M., Lifespan-on-a-chip: microfluidic chambers for performing lifelong observation of *C. elegans*. *Lab on a Chip*, 2009, 10(5): 589-597.
88. Lockery, S. R., Lawton, K. J., Doll, J. C., Faumont, S., Coulthard, S. M., Thiele, T. R., Chronis, N., McCormick, K. E., Goodman, M. B., Pruitt, B. L., Artificial dirt: Microfluidic substrates for nematode neurobiology and behavior. *Journal of Neurophysiology*, 2008, 99(6): 3136-3143.
89. Park, S., Hwang, H., Nam, S. W., Martinez, F., Austin, R. H., Ryu, W. S., Enhanced *Caenorhabditis elegans* Locomotion in a Structured Microfluidic Environment. *Plos One*, 2008, 3(6).
90. Qin, J. H., Wheeler, A. R., Maze exploration and learning in *C. elegans*. *Lab on a Chip*, 2007, 7(2): 186-192.
91. Gray, J. M., Karow, D. S., Lu, H., Chang, A. J., Chang, J. S., Ellis, R. E., Marletta, M. A., Bargmann, C. I., Oxygen sensation and social feeding mediated by a *C. elegans* guanylate cyclase homologue. *Nature*, 2004, 430(6997): 317-322.
92. Zimmer, M., Gray, J. M., Pokala, N., Chang, A. J., Karow, D. S., Marletta, M. A., Hudson, M. L., Morton, D. B., Chronis, N., Bargmann, C. I., Neurons Detect Increases and Decreases in Oxygen Levels Using Distinct Guanylate Cyclases. *Neuron*, 2009, 61(6): 865-879.
93. Chronis, N., Zimmer, M., Bargmann, C. I., Microfluidics for in vivo imaging of neuronal and behavioral activity in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*

- Methods, 2007, 4(9): 727-731.
94. Chalasani, S. H., Chronis, N., Tsunozaki, M., Gray, J. M., Ramot, D., Goodman, M. B., Bargmann, C. I., Dissecting a circuit for olfactory behaviour in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 2007, 450: 63-+.
 95. Crane, M. M., Chung, K., Lu, H., Computer-enhanced high-throughput genetic screens of *C. elegans* in a microfluidic system. *Lab on a Chip*, 2009, 9(1): 38-40.
 96. Gray, J., Lissmann, H. W., Locomotion of nematodes. *Journal of Experimental Biology*, 1964, 41(1): 135-&.
 97. Lange, D., Storment, C. W., Conley, C. A., Kovacs, G. T. A., A microfluidic shadow imaging system for the study of the nematode *Caenorhabditis elegans* in space. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2005, 107(2): 904-914.
 98. Park, S. J., Goodman, M. B., Pruitt, B. L., Analysis of nematode mechanics by piezoresistive displacement clamp. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104: 17376-17381.
 99. Ward, S., Chemotaxis by nematode *Caenorhabditis elegans* - Identification of attractants and analysis of response by use of mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1973, 70(3): 817-821.
 100. Sukul, N. C., Croll, N. A., Influence of potential difference and current on electrotaxis of *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Nematology*, 1978, 10(4): 314-317.
 101. Luo, L., Gabel, C. V., Ha, H. I., Zhang, Y., Samuel, A. D. T., Olfactory behavior of swimming *C. elegans* analyzed by measuring motile responses to

- temporal variations of odorants. *Journal of Neurophysiology*, 2008, 99(5): 2617-2625.
102. Rezai, P., Siddiqui, A., Selvaganapathy, P. R., Gupta, B. P., Electrotaxis of *Caenorhabditis elegans* in a microfluidic environment. *Lab on a Chip*, 2010, 10(2): 220-226.
103. Rezai, P., Siddiqui, A., Selvaganapathy, P. R., Gupta, B. P., Behavior of *Caenorhabditis elegans* in alternating electric field and its application to their localization and control. *Applied Physics Letters*, 2010, 96(15).
104. Doll, J. C., Harjee, N., Klejwa, N., Kwon, R., Coulthard, S. M., Petzold, B., Goodman, M. B., Pruitt, B. L., SU-8 force sensing pillar arrays for biological measurements. *Lab on a Chip*, 2009, 9(10).
105. Zhang, Y., Lu, H., Bargmann, C. I., Pathogenic bacteria induce aversive olfactory learning in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 2005, 438(7065): 179-184.
106. Kerr, R., Lev-Ram, V., Baird, G., Vincent, P., Tsien, R. Y., Schafer, W. R., Optical imaging of calcium transients in neurons and pharyngeal muscle of *C. elegans*. *Neuron*, 2000, 26(3): 583-594.
107. Wang, Y., Wang, J., Du, W., Feng, X., Liu, B. F., Identification of the neuronal effects of ethanol on *C. elegans* by in vivo fluorescence imaging on a microfluidic chip. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2010: 1-7.
108. Yanik, M. F., Cinar, H., Cinar, H. N., Chisholm, A. D., Jin, Y. S., Ben-Yakar, A., Neurosurgery - Functional regeneration after laser axotomy. *Nature*, 2004, 432(7019): 822-822.
109. Chung, K., Lu, H., Automated high-throughput cell microsurgery on-chip.

Lab on a Chip, 2009, 9(19).

第二章 基于液滴微流控芯片的神经毒素诱导下单个线虫

运动行为研究

2.1 引言

尽管神经系统非常简单(仅 302 个神经元),线虫却能表现出复杂的行为方式,包括适应性、感受性及对外界刺激的各种行为响应[1],因此被广泛应用于筛选行为异常的突变体或研究行为相应的基因功能和神经机制[2-5]。最近,研究者们还利用毒素诱导和转基因技术制备了一系列以线虫为模式生物的人类疾病(如帕金森病)模型,使线虫表现出类似该疾病症状的行为响应,如运动缺陷、学习障碍、应激和耐受性变化等,并通过分析大规模单个线虫的行为特征,进行基于生物整体和活体水平的相关疾病机制研究和药物筛选[6-13]。

目前,线虫的行为研究主要以琼脂板或微孔板为技术平台,利用常规检测系统观察并记录群体线虫或单个线虫的行为特征。这种方法在传统生物学研究中的运用已比较成熟,然而在研究单个线虫的行为特征时,需要研究人员手工操作,并持续追踪其运动轨迹,以防止线虫爬出(或游出)显微镜视野;这种操作十分耗时费力,更加难以实现通量化的单个线虫行为研究。

近年发展起来的微流控液滴技术具有液滴生成灵活可控、液滴内含物混合迅速、液滴通量极高、试剂耗量极小等显著优势[14-16],已被广泛应用于化学反应[17]、蛋白结晶[18, 19]、材料合成[20, 21]、药物释放[22]等多领域研究中。由于上述特点,加之其特有的微尺寸特征与线虫大小相匹配,液滴微流控芯片非常适合于对高通量单个线虫进行行为研究。相比于传统方法,

其主要优势在于：（一）液滴的尺寸在纳升至微升范围内灵活可控，适合于对线虫发育中所有阶段的研究；（二）对液滴的生成、输运和操纵均可精确控制，利于实现分散和传输单个线虫；（三）微流控液滴的高通量和高内涵特征非常适于对大量线虫对象和大量实验条件进行单个线虫分辨率的研究分析；（四）可以简化操作过程，缩短分析时间，降低试剂耗量。

本章设计并制作了一种基于液滴的微流控芯片，并将其应用于对神经毒素 MPP⁺诱导下单个线虫运动行为的研究中。该芯片集成了一个 T 形液滴生成器和一个液滴机械捕获阵列，能够连续进行液滴生成、单个线虫包裹、液滴固定以及线虫行为监测等多个实验步骤。以神经毒素 MPP⁺诱导野生型线虫（wildtype N2, L1 stage）产生运动缺陷为模型，考察了 MPP⁺对单个线虫运动行为的影响。该工作首次将微流控液滴技术引入线虫研究中，显示了高通量液滴技术用于单个线虫水平帕金森病药物筛选的前景。

2.2 实验部分

2.2.1 仪器与试剂

2.2.1.1 仪器

SC-1B 型匀胶机购自北京创威纳设计有限公司。PH030A 型培养/干燥箱购自上海一恒科学仪器有限公司。紫外光刻机购自 Thermo Oriel 公司。等离子体清洗器购自 Harrick 公司。硅片（Ø 3 英寸）购自洛阳单晶硅有限责任公司。FA1104 型电子天平购自上海精秤天平厂。100 级超净工作台购自苏州安泰空气技术有限公司。半导体电子调温培养箱购自佛山富信制冷设备有限公司。全自动台式灭菌器购自山东新华医疗器械股份有限公司。TG16-W 型微型高速离心机购自长沙湘仪离心机仪器有限公司。注射泵购自美国 KLOEHN

(LAS VEGAS, NEVADA) 公司。1531 型 PEEK™ 管(1/16 英寸 OD, 0.01 英寸 ID)购自美国 Upchurch Scientific (Oak Harbor, WA) 公司。S8APO 型体视显微镜购自 Leica 公司。DH-HV2001UC 型 CCD 摄像头购自北京大恒图像视觉有限公司。

2.2.1.2 试剂

Sylgard® 184 硅胶橡胶(PDMS)试剂盒购自 Dow Corning 公司。SU-8 2075 型光刻胶购自 Microchem 公司。乳酸乙酯、异丙醇、乙二胺四乙酸二钠 (Disodium EDTA)、氯化钠 (NaCl)、氯化钙 (CaCl₂)、硫酸镁 (MgSO₄)、磷酸钾 (K₃PO₄)、磷酸氢二钠 (Na₂HPO₄)、磷酸二氢钾 (KH₂PO₄)、七水合硫酸亚铁 (FeSO₄·7H₂O)、四水合氯化锰 (MnCl₂·4H₂O)、七水合硫酸锌 (ZnSO₄·7H₂O)、五水合硫酸铜 (CuSO₄·5H₂O)、氢氧化钠 (NaOH)、一水合柠檬酸 (citric acid monohydrate)、一水合柠檬酸钾 (Potassium citrate tribasic monohydrate)、十六烷 (n-Hexadecane) 和司班 80 (Span-80) 均购自沈阳化学试剂厂。安替福民 (10% 次氯酸钠溶液, 10% NaClO 溶液) 购自天津凯信化学工业有限公司。2-氨基-2-羟甲基-1,3-丙二醇盐酸盐 (Trizma® hydrochloride, Trizma® HCl)、2-氨基-2-羟甲基-1,3-丙二醇 (Trizma® base)、胆固醇 (Cholesterol) 和 1-甲基-4-苯基碘化吡啶 (1-Methyl-4-phenylpyridinium iodide, MPP⁺ iodide) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司。胰蛋白胨 (Tryptone)、酵母粉 (Yeast extract) 购自英国 OXOID 公司。细菌琼脂粉 (Bacto™ Agar) 购自美国 BD 公司。

线虫生长基本溶液 (S basal): 将 5.85 g NaCl, 1 g K₂HPO₄, 6 g KH₂PO₄ 和 1 ml 胆固醇溶液 (5 mg/ml 溶于乙醇) 溶于 1L 去离子水中, 调节 pH 值至 6.0; 高压灭菌备用。

1 M 柠檬酸钾缓冲液 pH 6.0: 将 2 g 一水合柠檬酸和 29.35 g 一水合柠檬酸钾溶于 100 ml 去离子水中, 调节 pH 值至 6.0; 高压灭菌备用。

微量金属溶液: 将 1.86 g disodium EDTA, 0.69 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.29 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 0.025 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 溶于 1L 去离子水中; 高压灭菌, 避光保存备用。

1 M CaCl_2 溶液: 将 5.55 g CaCl_2 溶于 100 ml 去离子水; 高压灭菌备用。

1 M MgSO_4 溶液: 将 12 g MgSO_4 溶于 100 ml 去离子水; 高压灭菌备用。

LB 培养基 (LB medium): 将 10 g Tryptone, 5 g Yeast extract 和 10 g NaCl 溶于 1L 去离子水中, 用 5M NaOH 溶液 (约 0.2ml) 调节 pH 值至 7.0; 在 15 psi 的压力条件下高压灭菌 20 分钟, 自然冷却至室温, 备用。

M9 缓冲液 (M9 buffer): 将 6 g Na_2HPO_4 , 3 g KH_2PO_4 和 5 g NaCl 溶于 1L 去离子水中; 高压灭菌, 自然冷却至室温, 加入 2 ml 1M 的 MgSO_4 溶液, 4°C 保存。

线虫生长液体培养基 (S medium): 在无菌条件下, 将 10 ml 1 M 柠檬酸钾缓冲液 pH 6.0, 10 ml 微量金属溶液, 3 ml 1 M CaCl_2 溶液 和 3 ml 1 M MgSO_4 溶液加入 1 L S basal 中, 4°C 避光保存。

线虫生长琼脂培养基 (Nematode growth medium, NGM): 将 0.55 g Trizma[®] HCl, 0.24 g Trizma[®] base, 4.6 g Tryptone 和 2 g NaCl 溶于 1L 去离子水中, 加入 22 g Bacto[™] Agar; 高压灭菌备用。

MPP+溶液: 将已称重的 MPP+ iodide 溶于 S medium 溶液中配置成高浓度工作液, 浓度按需进行配制, 现用现配。

2.2.2 液滴微流控芯片设计与制作

2.2.2.1 芯片设计

所采用的液滴微流控芯片设计如图 2-1 所示，芯片由两个功能区域所组成：一个 T 形液滴生成器和一个含有 180 个相同的结构单元的液滴捕获阵列。T 形液滴生成器的两个进样端分别为油相（连续相）和水相（分散相）的入口，进样通道尺寸相同（长 1 cm，宽 $150\ \mu\text{m}$ ，深 $180\ \mu\text{m}$ ），液滴疏运通道由 $150\ \mu\text{m}$ 渐变至 $300\ \mu\text{m}$ 。液滴捕获阵列由 180 个结构完全相同的液滴捕获单元连接而成，每个捕获单元内含有一个液滴捕获器（直径 $450\ \mu\text{m}$ ，深 $180\ \mu\text{m}$ ），各液滴捕获器之间由连续的方波形通道（宽 $300\ \mu\text{m}$ ，深 $180\ \mu\text{m}$ ）连通，每行的 10 个捕获单元由一条细通道（宽 $90\ \mu\text{m}$ ，深 $180\ \mu\text{m}$ ）串联。芯片各单元的具体尺寸见图 2-2。

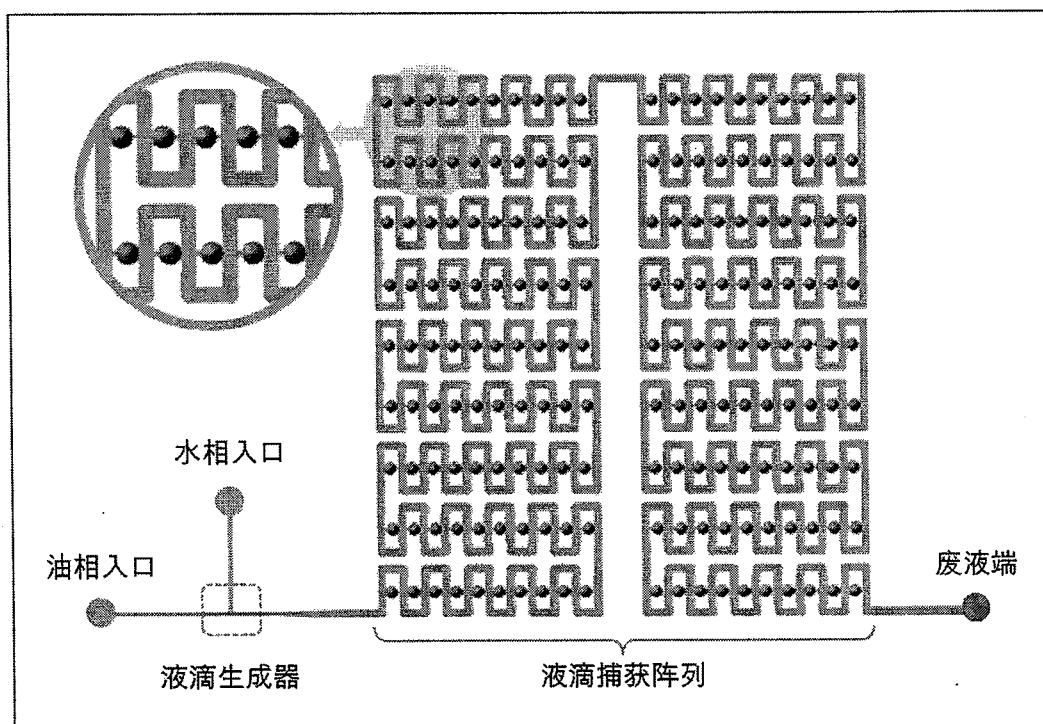


图 2-1 用于单个线虫运动行为分析的液滴微流控芯片设计示意图，

Fig. 2-1 Schematic of the droplet-based microfluidic chip for the study of individual *C. elegans* mobility behavior.

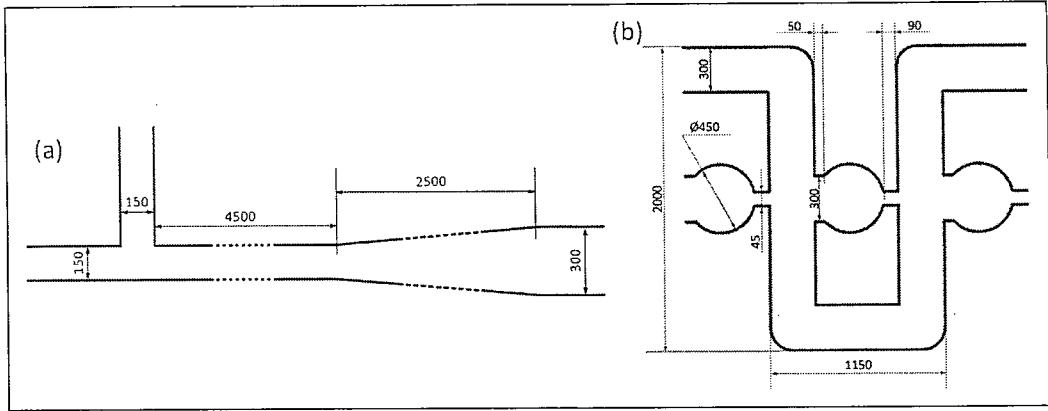


图 2-2 微流控芯片上各功能单元的具体尺寸示意图。(a) T 形液滴生成器尺寸示意图；(b) 液滴捕获单元尺寸示意图。

Fig. 2-2 Dimensions of the operation units of the chip. (a) Dimensions of the T-junction droplet generator; (b) Dimensions of a droplet trapping unit.

2.2.2.2 芯片制作

本章所使用的液滴微流控芯片制作流程示意图见图 2-3。

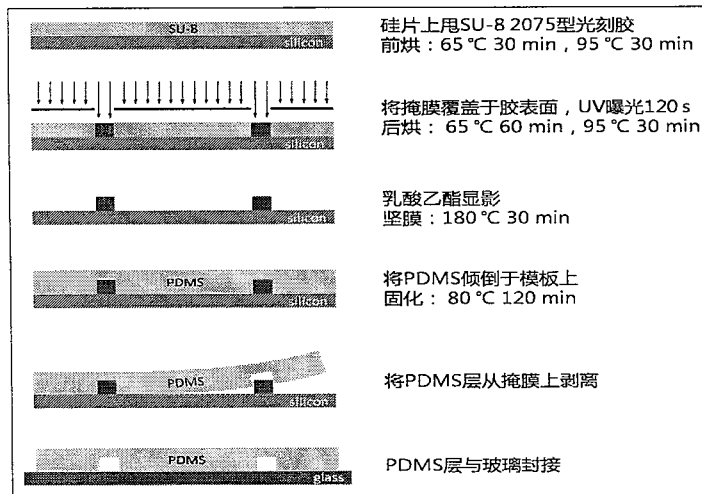


图 2-3 微流控芯片制作流程图。

Fig. 2-3 Schematic of the microfluidic chip fabrication process.

2.2.2.2.1 芯片模板制作

取直径为 3 英寸的硅片置于浓硫酸-双氧水（体积比 3:1）中煮沸 30 分钟；双蒸水超声清洗 3 次，每次 20 分钟；200℃烘干，再冷却至室温。将清洗好的硅片水平放置于匀胶台中央，吸片；调整匀胶机转速为 500 转/分，持续 20 秒，同时向硅片中心匀速滴加约 3.5 ml SU-8 2075 型光刻胶；随即升高转速至 1000 转/分，再持续 30 秒。铺胶完成后，将硅片置于水平避光处，放置 1-2 天，使光刻胶中的溶剂部分挥发，之后置于烘胶台上进行前烘，65℃烘 30 分钟，之后缓慢升温（1~2℃/min）至 95℃烘 30 分钟。待硅片自然冷却至室温后，用事先打印好的芯片掩模覆盖于硅片 SU-8 胶层上，置于紫外光刻机下曝光 120 秒。曝光后立刻将掩膜去掉，将硅片置于烘箱中进行后烘，65℃烘 1 小时，升温至 95℃烘 30 分钟。待硅片自然冷却至室温后，用乳酸乙酯进行显影，溶去未经曝光的 SU-8 光刻胶，显影结束后用异丙醇清洗硅片模板，并用电热吹风将其吹干。最后，将模板置于 180℃烘箱中烘 30 分钟，进行坚模。

2.2.2.2.2 芯片成型与封接

将 Sylgard® 184 试剂盒 (Dow Corning) 中的单体和引发剂按体积比 10:1 混合均匀，真空脱气，倒入 SU-8 模板，80℃烘 120 分钟。将固化的 PDMS 层从模板上轻轻剥离，用打孔器在进样端和废液端处打上尺寸合适的孔。将 PDMS 层和洁净的玻璃片均放入等离子体清洗器内，空气等离子体处理 45 秒，迅速将 PDMS 层和玻璃层进行不可逆封接，之后置于 80℃烘箱烘 15 分钟，取出后置于洁净培养皿中备用。制作好的 PDMS 微流控芯片如下图 2-4 所示。

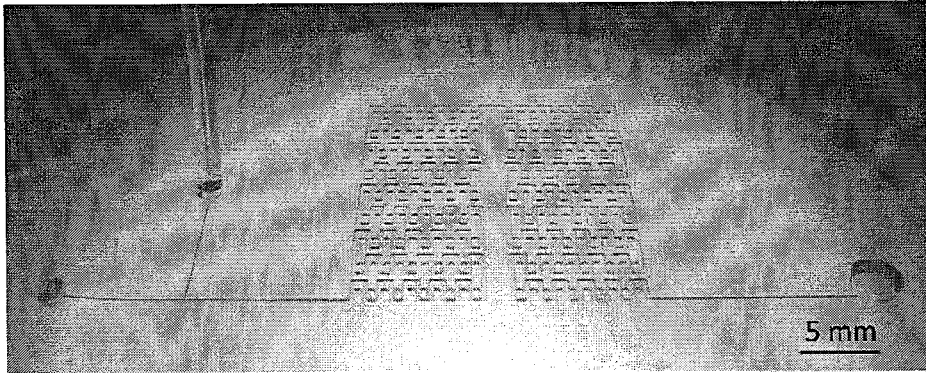


图 2-4 液滴微流控芯片实物图。

Fig. 2-4 Photograph of the fabricated droplet-based microfluidic chip.

2.2.3 液滴形成与捕获

本处实验中，水相采用绿色墨水溶液，油相采用加入 2% (w/v) 表面活性剂司班 80 的十六烷。

用两段 PEEKTM 管 (1/16 英寸 OD, 0.01 英寸 ID) 将芯片的两个进样口分别与注射泵 (KLOEHN, LAS VEGAS) 相连；其中，油相进样口连接 250 μL 注射泵，水相进样口连接 50 μL 注射泵，以分别实现油相和水相的进样和流速控制。之后，在合适的流速下将油相和水相注入芯片，由于油相对水相的剪切力和油水界面的表面张力的共同作用，可以在 T 形液滴生成器处生成连续稳定的单分散性水相微液滴。产生的微液滴在注射泵推动下继续流动，会被顺序逐一捕获于下游的液滴捕获器中。实验过程中，将芯片置于 Leica S8APO 型体视显微镜下，实时录像由与显微镜相连的高分辨率 CCD 摄像头 (DH-HV2001UC, 北京大恒) 记录 (15fps@800 \times 600)。实验设备的装配图如下 (图 2-5)。

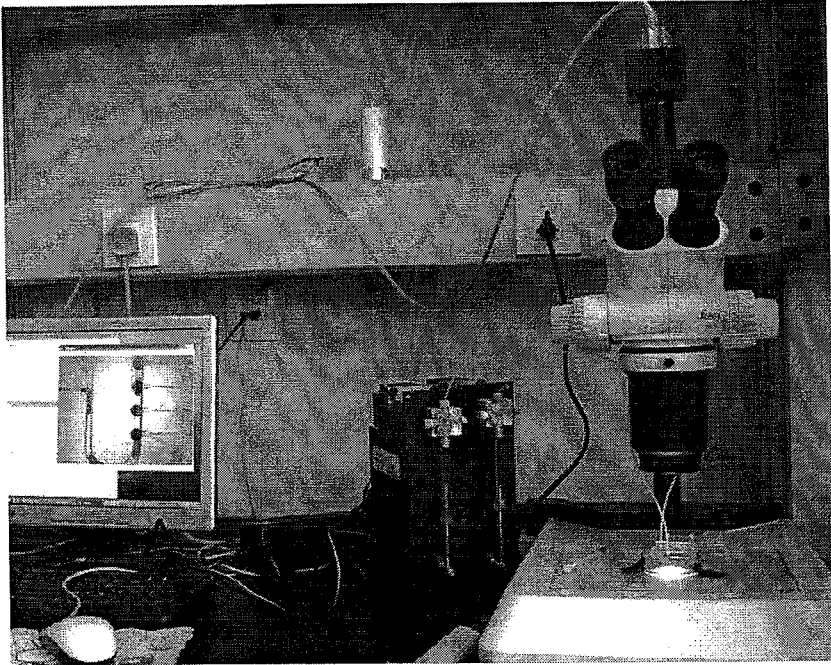


图 2-5 实验设备装配实物图，包括微流控芯片、体视显微镜、注射泵和计算机（用于控制注射泵和采集数据）。

Fig. 2-5 Photograph of the experimental equipments assembly. It is consisted of a droplet-based microfluidic chip, a stereo-microscope, two syringe pumps connected to the chip and a computer for pump controlling and data collecting.

注意：在装置连接前，先将芯片通道用油相充满，并将水相和油相分别灌注入各自的 PEEKTM 管和注射泵，排出气泡；装置连接完成后，整个体系内不允许存在气泡，否则会影响液滴产生和捕获的效果。

2.2.4 线虫培养与预处理

本章中使用的野生型线虫 (wild type) N2 和作为线虫食物的大肠杆菌 (*E. coil*) OP50 冻存菌由中国科学院遗传与发育生物学研究所分子发育生物学重点实验室的杨崇林老师提供。

2.2.4.1 线虫在琼脂板上的培养

线虫在琼脂板上的培养[23]主要包括食物准备、NGM 琼脂板准备、在 NGM (Nematode Growth Medium, 线虫生长培养基) 琼脂板上铺菌和在 NGM 琼脂板上培养线虫等四个步骤, 其流程示意图 (图 2-6) 如下:

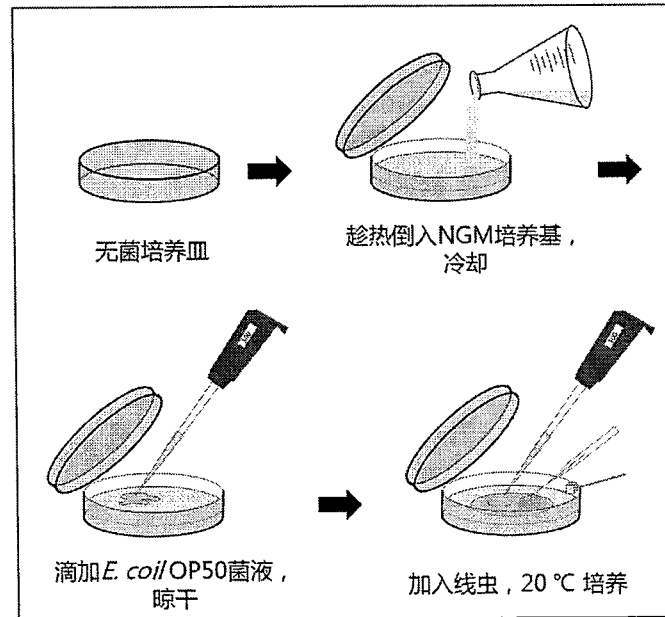


图 2-6 在琼脂板上培养线虫的操作流程示意图。

Fig. 2-6 Schematic of the operation procedures of *C. elegans* culture on agar plate.

2.2.4.1.1 线虫食物的准备

从-80℃低温冰箱中取出 *E. coil* OP50 冻存菌, 略微融化后, 在琼脂平板上划线。将培养皿倒置, 37℃过夜, 至长出单菌落。用接种环挑取一个形态饱满的单菌落, 在无菌条件下接种于新鲜灭菌并冷却的 50ml LB 培养基中 (250 ml 锥形瓶), 37℃震荡过夜培养(250 rpm), 得到 50 ml *E. coil* OP50 菌

悬液，4℃保存。

2.2.4.1.2 NGM 琼脂板的准备

高压灭菌后的 NGM 溶液自然冷却至 80℃。无菌条件下，将尚未凝固的 NGM 溶液倒入直径 6 厘米的细菌培养皿中（9 ml/皿），待冷却凝固后盖上培养皿盖，过夜晾干，用封口膜封住边缘防止干燥，4℃倒置保存。

2.2.4.1.3 在 NGM 琼脂板上铺菌

无菌条件下，用移液器吸取 500 μ L *E. coil* OP50 悬液，滴加在制备好的 NGM 琼脂板中央，将菌悬液向四周涂布为一个圆形菌苔。操作时需要注意：

（1）将菌苔控制在琼脂板的中央，不要铺展到边缘，以防线虫爬到培养皿的侧壁而干死；（2）涂布时避免将琼脂割破，以防线虫钻入琼脂中。最后，将铺有 *E. coil* OP50 菌苔的 NGM 琼脂板晾干，用封口膜封住培养皿边缘防止干燥，4℃倒置保存。

2.2.4.1.4 在 NGM 琼脂板上培养线虫

无菌条件下，利用铂丝挑取、大块琼脂切割或 M9 缓冲液冲洗收集的方法将线虫从原 NGM 培养皿转移至新的培养皿内，在 20℃条件下进行培养。当琼脂板上的菌苔厚度明显变薄或者线虫密度过高（聚集成一个个小群）时，需要重复上述操作，将部分线虫转移至新的 NGM 培养皿内，转移的数目依原培养皿内的线虫密度和培养目的而定。

2.2.4.2 线虫在液体内的培养

无菌条件下，取适量线虫液体培养基 S medium 加入多孔板，并向其中添加一定量（3% v/v）的 *E. coil* OP50 菌悬液。用少量 S medium 将线虫从培

养皿上洗下并加入到孔板，保证培养密度在 100-150 只/平方厘米的范围内。将孔板置于在 20 °C 条件下进行培养。每天观察孔板内线虫生长情况，如果发现食物不足（液体不浑浊），再添加 5 % 的 *E. coli* OP50 菌悬液作为补充。

2.2.4.3 线虫的同步化处理

当观察到 NGM 琼脂板上的线虫大部分怀卵时，用去离子水将线虫冲洗下来，线虫悬液收集于离心管内，静止，使线虫沉降于离心管底部。取 5 M NaOH 溶液和 10% NaClO 溶液各 0.5 ml，去离子水 4 ml，混合均匀。将沉降的线虫吸出，加入配制好的 NaOH/NaClO 混合溶液中，同时开始计时并在显微镜下持续观察。约 4-6 min 后，半数线虫身体中部断裂伴随虫卵流出体外，迅速将悬液加入离心管，1300 rpm 离心 30 s 沉降虫卵，弃去上清，加入 5 ml M9 缓冲液，重复清洗 2-3 次。之后，将离心管底部的虫卵吸出，滴加在未铺菌的 NGM 琼脂板上，吹干液体，20 °C 条件下过夜培养。第二天虫卵孵化，得到同步化生长的线虫 L1 期幼虫。

2.2.4.4 十六烷对线虫的生物相容性考察

用 S medium 将同步化生长的线虫 L1 期幼虫从琼脂板上洗下，按 2-3 只/10 uL 的密度配置成线虫悬液，加入 96 孔板上的 6 个孔中，每孔加 100 uL，使线虫数目保持在 20-30 只，再加入适量（3 % v/v）*E. coli* OP50 菌悬液。将 20 uL 十六烷（2% w/v 司班 80）小心加入其中的 3 个孔，使其在 S medium 液面上形成一层油层。在从加入十六烷开始的两小时内，用与 Leica 体视显微镜相连的高分辨率 CCD 摄像头记录采集每个孔中线虫 L1 期幼虫的实时运动情况，每隔 10 分钟采集一次，每次持续 15-20 秒（15fps@800×600）。采集完成后，对线虫的摆动次数进行人工计数，并用 Origin 8.0 软件（Origin Lab, MA）进行保存和处理。

2.2.4.5 神经毒素 MPP+对线虫作用浓度的确定

用 S medium 将同步化生长的线虫 L1 期幼虫从琼脂板上洗下,按 1 只/ μL 的密度配置成线虫悬液,加入 96 孔板中,每孔加 100 μL ;再用 MPP+高浓度工作液将孔中线虫悬液的 MPP+浓度分别调至 0, 1, 3, 5, 7, 11, 13, 15, 17 mM;最后再加入适量 (3 % v/v) *E. coli* OP50 菌悬液。两小时后,用与 Leica 体视显微镜相连的高分辨率 CCD 摄像头记录采集每个孔中线虫 L1 期幼虫的实时运动情况,每孔采集 1 秒 (15fps@800×600)。采集完成后,对视野中的线虫总数和在 1 秒内无身体摆动的线虫数目进行人工计数,并用 Origin 8.0 软件 (Origin Lab, MA) 进行保存和处理。

2.2.5 线虫悬液配置与进样

本章实验中所使用的线虫均为野生型 N2 线虫的 L1 期幼虫。将按 2.2.3.4 中同步处理后的线虫 L1 期幼虫用 S medium 从 NGM 琼脂板上洗下,加入用 S medium 溶解的 MPP+高浓度工作液 (空白对照组不需加入),调整线虫密度至 5-10 只/ μL , MPP+浓度至实验所需浓度,最后再加入适量 (3 % v/v) *E. coli* OP50 菌悬液。将准备好的线虫悬液/MPP+溶液的混合液吸入与水相注射泵相接的 PEEKTM 管内,之后按 2.2.4 中所述的方法装配设备,并用注射泵将油相和水相 (线虫悬液/MPP+溶液混合液) 以一定的流速分别注入芯片。

2.2.6 单个线虫的液滴包裹与液滴的捕获

将油相和水相 (线虫悬液/MPP+溶液混合液) 分别注入芯片后,在 T 形液滴生成器处生成连续的包裹有单个线虫 L1 期幼虫的 MPP+ (S medium) 溶液微液滴。产生的微液滴在注射泵推动下继续流动,会被顺序逐一地捕获于下游的液滴捕获器中。当 T 形液滴生成器完成了 180 个微液滴的产生后,关

停水相注射泵;当 180 个微液滴全部被液滴捕获器捕获后,关停油相注射泵。实验过程中,将芯片置于 Leica S8APO 型体视显微镜下,实时录像由与显微镜相连的高分辨率 CCD 摄像头(DH-HV2001UC,北京大恒)记录(15fps@800×600)。

2.2.7 单个线虫运动行为数据采集与处理

完成了全部包裹有单个线虫 L1 期幼虫微液滴的捕获后,随机^a选择 6 个包裹有单个线虫的微液滴作为采集对象^b,用连接于体视显微镜的 CCD 摄像头对液滴内单个线虫的运动行为在固定的时间点进行实时采集,每次采集持续 10-20 秒,格式为 15fps@800×600。采集完成后,对线虫的摆动次数和 Ω 形态出现次数进行人工计数,并用 Origin 8.0 软件(Origin Lab, MA)进行保存和处理。

2.3 结果与讨论

2.3.1 液滴微流控芯片设计说明

本章中的微流控芯片采用单层设计,主要由两个功能区域所组成:一个 T 形液滴生成器和一个基于阻力原理的液滴捕获阵列。下面将从这两个方面分别加以说明。

注 a: 此处的随机抽样方法为,对包裹有单个线虫的液滴按位置编号,随后采用抽签法选取 6 个液滴作为采集对象;以下对包裹单个线虫液滴的随机抽样均采用上述方法;

注 b: 样本量受到 CCD 摄像机分辨率和传感器尺寸的限制,定为 6 个。

2.3.1.1 T形液滴生成器的设计说明

目前，微流控芯片上的液滴生成器主要采用两种设计，一种为“T形通道法”(T-junction) [21, 24-26]，另一种为“流动聚焦法”(flow-focusing) [27, 28]。两种方法的液滴生成原理相同，均利用两相间的剪切力和界面张力的共同作用产生液滴。二者区别仅在于对液滴生成器的通道几何学设计上：在“T形通道法”中，油相和水相分别从T形通道的两个相互垂直的分支注入芯片并形成液滴（见图 2-7a）；在“流动聚焦法”中，油相和水相分别从两侧和中央的通道流经下游的狭窄小孔并形成液滴（见图 2-7b）。

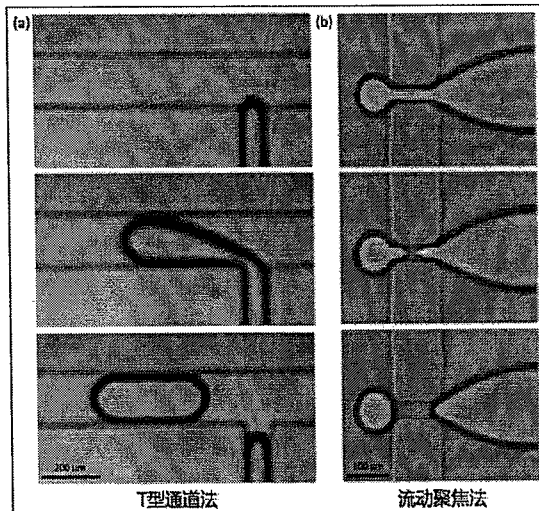


图 2-7 微流控芯片上液滴生成的两种方法。(a) T形通道法[26]；(b) 流动聚焦法[28]。

Fig. 2-7 Two droplet formation methods on microfluidic chip.(a) “T-junction” method; (b) “flow-focusing” method.

本章实验中，液滴生成器的设计采用较为简单的“T形通道法”，具体芯片尺寸见图 2-2，水相（分散相）进样通道垂直于油相（连续相）进样通道和主通道（液滴疏运通道）；水相和油相进样通道的尺寸相同，宽度为 150 μm，

深度为 $180\ \mu\text{m}$ ，长度为 $1\ \text{cm}$ ；主通道深度为 $180\ \mu\text{m}$ ，宽度由 $150\ \mu\text{m}$ 渐变至 $300\ \mu\text{m}$ 。

该设计所采用的液滴生成原理如下（图 2-8）：(a) 当将油水两相分别由各自的进样通道注入芯片时，会在两通道的 T 形交汇处形成一个油水界面；(b) 随着液流的继续流动，水相进入主通道内，在界面张力作用下形成一个尖端；(c) 在因油相流动而形成的剪切力及随后产生的压力梯度的作用下，水相尖端向主通道方向延伸；(d) 油相继续流动，水相继续延伸，从而使 T 形交汇处的水相不断变薄，直至断裂而形成一个液滴。

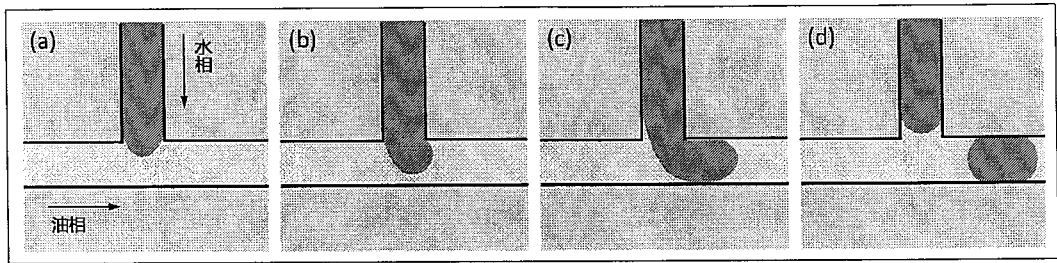


图 2-8 T 形通道法的液滴生成原理示意图。(a) 油水两相在通道交汇处形成界面；(b) 水相进入主通道内并形成尖端；(c) 水相尖端向主通道方向延伸；(d) 水相液流断裂形成一个液滴。

Fig. 2-8 Schematic illustrations of the droplet formation by “T-junction” method. (a) The two phases form an interface at the junction; (b) the tip of the dispersed phase enters the main channel; (c) the head of the dispersed phase elongate into the main channel; (d) dispersed phase thins and eventually breaks the stream into a droplet.

需要注意的是，要想在微流控芯片上实现液滴形成，除了要设计具有特定结构的液滴生成器以外，选择具有合适表面张力特性的油水两相也是十分重要的。对油相和水相的选择需要满足以下三个条件[15]：（一）油相浸润通

道表面；（二）水相不浸润通道表面；（三）油水两相之间的界面张力要小于水相和通道之间的界面张力。在实验中，可以利用在油相中加入表面活性剂的方法来降低油水两相之间的界面张力，但要注意不可降得过低。本章实验中选择的油相（十六烷，含 2% 司班 80）和水相（S medium 溶液）满足以上条件。

2.3.1.2 基于流体阻力原理的液滴捕获阵列的设计说明

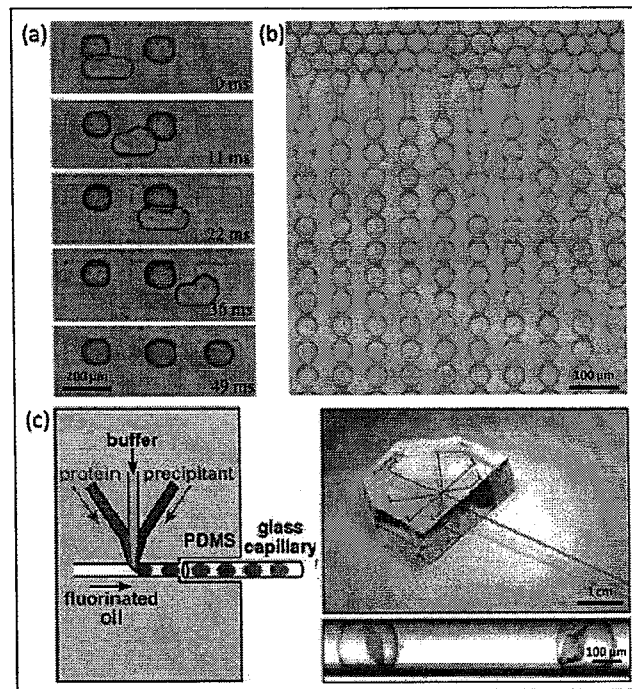


图 2-9 微流控芯片上的液滴捕获方法。(a, b) 利用液滴自身表面张力实现捕获；(c) 将液滴密封在玻璃毛细管里实现捕获。

Fig. 2-9 Droplet trapping manners on microfluidics. (a, b) Trapping droplet by surface tension; (c) trapping droplet by sealing in glass capillary.

在本工作之前，微流控芯片上的液滴捕获方法主要分为如下两类。（一）利用适合的捕获器尺寸以及液滴自身的表面张力实现捕获[29-31]：Shim 等人

[30]和 Schmitz 等人[29]分别利用液滴在表面张力最小时能量最低、最为稳定的特性，各自在微流控芯片上设计制造了液滴捕获器，并将液滴捕获于其中（见图 2-9a, 2-9b）。（二）将液滴密封在玻璃毛细管里实现捕获：Zheng 等人[31]将在微流控芯片上生成的液滴引入一段与芯片通道相连接的玻璃毛细管中，之后将毛细管两端密封，以此实现了对液滴的捕获（见图 2-9c）。

本章实验中提出了一种新型的利用流体阻力原理实现液滴捕获的微流控芯片设计。该设计是基于 Tan 等人以前报道的工作[32]（见图 2-10），他们在微流控芯片上利用流阻的变化实现了对刚性小球的捕获。由于液滴与刚性小球在性质上有很大区别，我们相应地对芯片设计进行了修改，以满足利用阻力原理对液滴进行捕获的需要。如图 2-1 和图 2-2 所示，液滴捕获阵列由 180 个结构完全相同的液滴捕获单元连接而成，每个捕获单元内含有一个液滴捕获器（直径 $450\ \mu\text{m}$ ，深 $180\ \mu\text{m}$ ），各液滴捕获器之间由连续的方波形通道（宽 $300\ \mu\text{m}$ ，深 $180\ \mu\text{m}$ ）连通，每行的 10 个捕获单元由一条细通道（宽 $90\ \mu\text{m}$ ，深 $180\ \mu\text{m}$ ）串联。

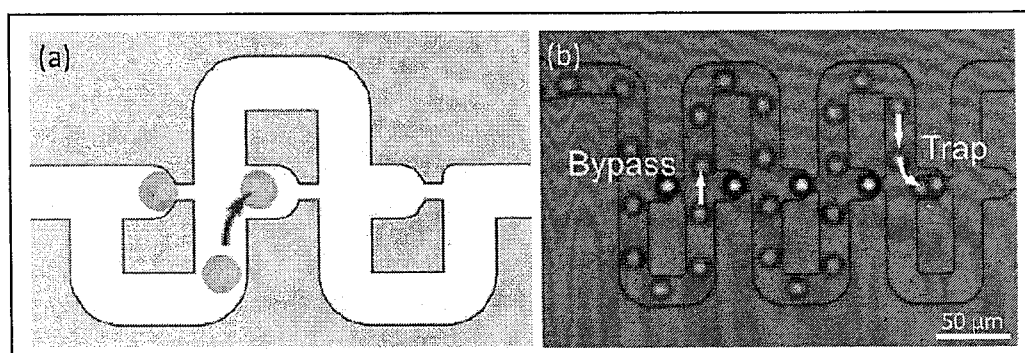


图 2-10 利用流体阻力原理捕获刚性小球的微流控芯片。(a) 芯片通道设计图；(b) 正在进行刚性小球捕获的芯片阵列。

Fig. 2-10 Rigid particles trapping chip using the principle of flow-resistance. (a) Schematic of the chip design; (b) Photograph of the microfluidic chip captures with rigid particles.

该设计所采用的液滴捕获原理为：利用液滴在通道内的流动总是选择流阻最小路径这一特性，通过液滴在通道内流动所造成的流动阻力的变化，改变不同路径间流阻的大小关系，从而使液滴最终进入液滴捕获器并被稳定捕获。具体的捕获步骤如下（见图 2-11）：在每个液滴捕获单元中，将液滴按产生先后顺序编号，并将从位置 I 至位置 II 的两条路径分别定义为路径 1 和路径 2，沿这两条路径的流动阻力分别对应 R_1 和 R_2 。(a)当两条路径中均充满油相，没有液滴流经时，路径 1 的流阻大于路径 2，即 $R_1 > R_2$ ，位于位置 I 的液滴 1 将流入流阻较小的路径 2，即沿方波形主通道流动。(b)当液滴 1 流入路径 2 后，由于液滴 1 与主通道壁的摩擦，使得路径 2 的流阻升高并超过路径 1，即 $R_2 > R_1$ ，而其后流经位置 I 的液滴 2 将流入流阻较小的路径 1，被细通道所阻而被液滴捕获器捕获。(c)当液滴 2 被捕获后，路径 1 的流阻升高并超过路径 2，即 $R_1 > R_2$ ，因此流经位置 I 的液滴 3 将流入路径 2，沿方波形主通道继续流动并进入下一个捕获单元。

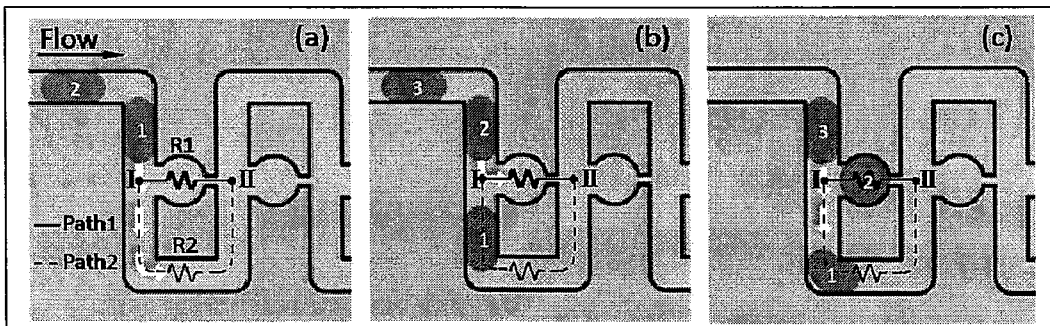


图 2-11 基于流体阻力原理的液滴捕获示意图。(a) 当路径 1 和路径 2 中都没有液滴时， $R_1 > R_2$ ，位于位置 I 的液滴 1 流入路径 2；(b) 当液滴 1 流入路径 2 后， $R_2 > R_1$ ，位置 I 的液滴 2 将流入路径 1 而被液滴捕获器捕获；(c) 当液滴 2 被捕获后， $R_1 > R_2$ ，位置 I 的液滴 3 将流入路径 2 并进入下一个捕获单元。

Fig. 2-11 Principle of the droplets capture by flow-resistance. (a) $R_1 > R_2$,

droplet 1 at junction I will flow into Path 2; (b) $R_2 > R_1$, droplet 2 at junction I will flow into Path 1 and be trapped; (c) $R_1 > R_2$, droplet 3 at junction I will flow into Path 2 and enter the next trapping process.

注意，若要满足上述条件，必须保证产生液滴的直径大于主通道横截面的高度和宽度，且小于液滴捕获器的直径。原因在于：（1）使液滴在主通道内流动时与通道壁产生摩擦，才能造成流阻的变化和不同路径之间流阻关系的变化；（2）使液滴进入捕获器后表面积变小、表面能降低，才能被稳定地捕获。

2.3.2 液滴微流控芯片的条件优化与性能考察

在进行液滴微流控芯片上的线虫运动行为研究之前，首先需要对实验条件进行优化，并对芯片上的各个功能单元的性能进行考察，以确保各项操作得到预期结果，且实验中的整个系统对线虫的运动行为无影响。

2.3.2.1 液滴产生

在液滴产生部分，首先需要对 T 形液滴生成器的性能进行考察，再对用于产生液滴的油相和水相的流速条件进行优化。

2.3.2.1.1 用于液滴产生的 T 形液滴生成器性能考察

以绿色墨水溶液为水相，以十六烷（2% w/v 司班 80）为油相，将二者分别以 $0.4 \mu\text{L min}^{-1}$ 和 $0.62 \mu\text{L min}^{-1}$ 的流速通过注射泵注入芯片中，可以观察到在两个相互垂直进样通道的 T 形交汇处产生连续的单分散性水相微液滴，产生~180 个微液滴的时间约为 10 分钟。下图 2-12 是对液滴生成过程的视频截图，由图可以看到，实际的液滴生成过程与理论上的液滴生成示意图相一致，说明芯片上液滴生成器的实际性能满足其设计的预期效果。