

图 2-12 T 形液滴生成器处的液滴生成过程。(油相流速 $0.4 \mu\text{L min}^{-1}$, 水相流速 $0.62 \mu\text{L min}^{-1}$ 。)

Fig. 2-12 A series of images showing the generation process of an aqueous droplet.

2.3.2.1.2 用于产生合适大小液滴的流速条件优化

以前的实验已经证明, 通过改变油相和水相的流速可以控制产生液滴的大小。本章实验中所采用的液滴捕获器的形状为高 $180 \mu\text{m}$ 、直径 $450 \mu\text{m}$ 的圆柱体 (体积为 28 nL), 而产生的液滴尺寸应略小于捕获器体积。为了获得合适液滴的尺寸, 我们在实验中对油水两相的流速进行了优化, 并最终确定了合适的流速条件: 油相为 $0.4 \mu\text{L min}^{-1}$, 水相为 $0.62 \mu\text{L min}^{-1}$; 在此流速条件下, 生成的液滴尺寸在 $16\text{-}20 \text{ nL}$ 范围内。

2.3.2.2 液滴捕获

2.3.2.2.1 液滴捕获阵列中各路径流阻的理论计算

按图 2-11 中所示结构,当液滴捕获单元中的路径 1 和路径 2 都充满油相、没有液滴流经时,可以利用 Zimmermann 提出针对直角微通道的公式(公式 2-1)对流动阻力进行近似计算

$$R_F = \left[\frac{1}{12} \left(1 + \frac{5}{6} \alpha \right) \frac{abR_H^2}{L} \right]^{-1} \quad (2-1)$$

其中, R_F 代表沿通道的总流阻, L 代表通道长度, a 和 b 分别代表通道的深度和宽度, α 值为 a/b 或 b/a (满足 $0 \leq \alpha \leq 1$), R_H 代表通道的水力半径,可按公式 2-2 进行计算

$$R_H = \frac{2A}{P} = \frac{ab}{a+b} \quad (2-2)$$

其中, P 为通道横截面的周长, A 为通道横截面的面积。在我们的计算中,忽略了由于弯曲、变宽或变细所造成的流阻微小差异。因此,得到公式 2-3

$$\frac{R_1}{R_2} = \left(\frac{L_1}{L_2} \right) \cdot \left(\frac{a_1 + b_1}{a_2 + b_2} \right)^2 \cdot \left(\frac{a_2}{a_1} \right)^3 \cdot \left(\frac{b_2}{b_1} \right)^3 \cdot \left(\frac{1 + \frac{5}{6} \alpha_2}{1 + \frac{5}{6} \alpha_1} \right) \quad (2-3)$$

对于路径 1,为了简化计算,将 L_1 定义为产生绝大部分流阻的细通道的长度。路径 1 和路径 2 的尺寸和流阻列于下表(表 2-1)。从下表可以看出,当路径 1 和路径 2 中同时充满油相时, $R_1/R_2 = 2.97$, $R_1 > R_2$,与 §2.3.1.2 中的设计预期相一致。

	$L/\mu\text{m}$	$a/\mu\text{m}$	$b/\mu\text{m}$	α	R_1/R_2
Path 1	90	185	45	0.24	2.97
Path 2	2550	185	300	0.62	

表 3-1 本章中所采用的微流控芯片中路径 1 和路径 2 的尺寸和流阻计算。

Table 3-1 The size and flow-resistance calculations of Path 1 and Path 2.

2.3.2.2.2 基于流体阻力原理的液滴捕获阵列性能考察

按油相 $0.4 \mu\text{L min}^{-1}$ 和水相 $0.62 \mu\text{L min}^{-1}$ 的流速条件生成 ~ 180 个液滴后，关停水相注射泵，液滴在油相注射泵推动下继续流动，进入下游的液滴捕获阵列，并被依次捕获于液滴捕获器中，观察发现实际捕获过程与理论设计的步骤相一致。图 2-13 显示了捕获有 180 个液滴的液滴捕获阵列照片，说明芯片上的液滴捕获阵列的实际性能满足其设计的预期效果。

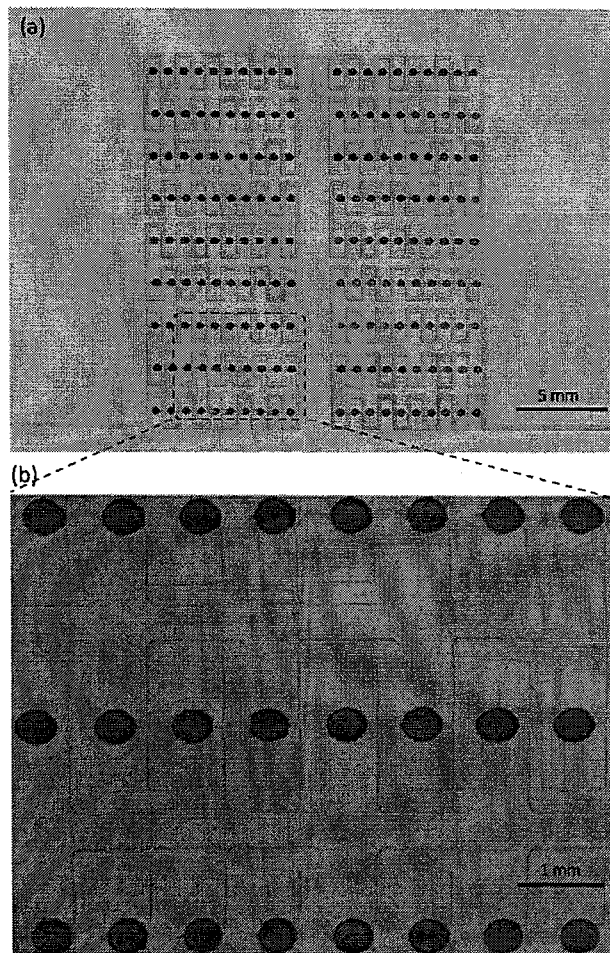


图 2-13 (a) 捕获有 180 个液滴的液滴捕获阵列照片及 (b) 放大图。

Fig. 2-13 (a) Photograph of the microfluidic chip immobilized with 180 droplets; (b) Enlarged photograph of (a).

2.3.2.3 单个线虫包裹

在利用微液滴包裹单个线虫的实验中，有以下四个方面需要进行考察或优化，包括：（一）实验中使用的油相对线虫的生物相容性；（二）作为水相的线虫悬液密度；（三）用于单个线虫液滴包裹的 T 形液滴生成器的性能；（四）以液滴为微环境对线虫运动的影响。

2.3.2.3.1 十六烷对线虫的生物相容性考察

确保实验中的油相对线虫的运动活性无影响是进行后续试验的基本前提条件。处理§2.2.3.4 所采集的在有油相孔板和无油相孔板中的线虫运动视频，从每段视频中随机选取一个区域，将其中的 8 只 L1 期线虫幼虫作为研究对象，人工计数其摆动频率。对各组中线虫的摆动频率数据进行平均统计，对所得结果做运动活性（摆动频率）与时间关系图（图 2-14），可以得到十六烷（2% w/v 司班 80）对线虫运动活性的影响。结果显示，在有油相和无油相存在的情况下，在 2h 的检测时间范围内，所采集到的线虫摆动频率基本一致，说明十六烷的存在与否对 L1 期线虫幼虫的运动活性无显著性影响。

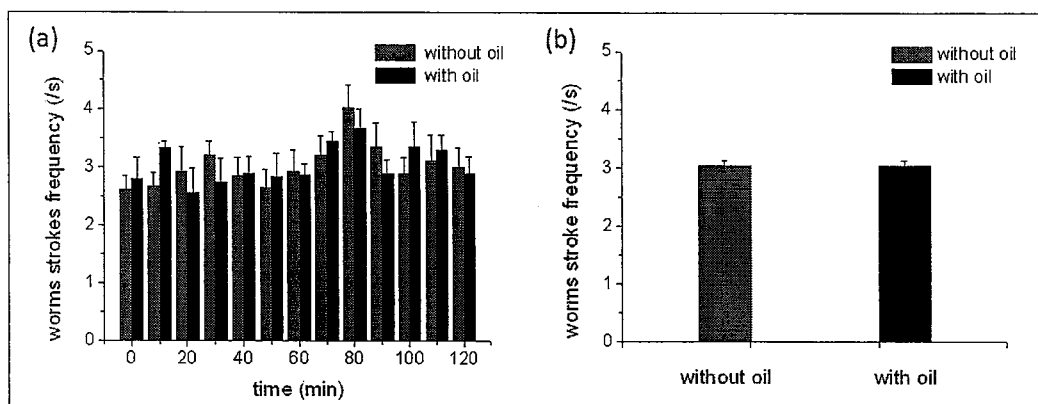


图 2-14 在有油相和无油相存在孔板中，线虫摆动频率对照柱图。(a) 2 小时内不同检测时间的线虫摆动频率；(b) 线虫在 2 小时内的平均摆动频率。

Fig. 2-14 Average stroke frequency of *C. elegans* in liquid with or without oil phase. (a) Average stroke frequency of *C. elegans* at different detection time; (b) average stroke frequency of *C. elegans* in 2 hours with or without oil phase.

2.3.2.3.2 用于单个线虫液滴包裹的 T 形液滴生成器性能考察

以十六烷 (2% w/v 司班 80) 为油相, 密度 5-10 只/ μL 的线虫 S medium 悬液为水相, 按油相 $0.4 \mu\text{L min}^{-1}$ 和水相 $0.62 \mu\text{L min}^{-1}$ 的流速条件, 将油相和水相分别注入芯片中, 可以在 T 形液滴生成器处生成包裹有单个线虫的液滴。图 2-15 是对液滴包裹单个线虫过程的视频截图, 图 2-16 是捕获有包裹单个线虫的液滴的液滴捕获阵列照片, 说明用于单个线虫液滴包裹的 T 形液滴生成器的实际性能满足其设计的预期效果。

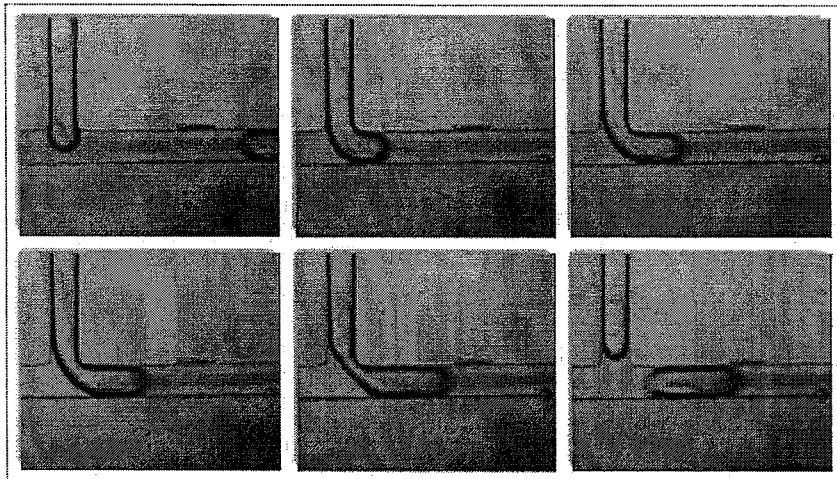


图 2-15 在 T 形液滴生成器处利用液滴包裹单个线虫的过程。(油相流速 $0.4 \mu\text{L min}^{-1}$, 线虫悬液流速 $0.62 \mu\text{L min}^{-1}$ 。)

Fig. 2-15 A series of images showing the process of an individual worm encapsulated into a droplet at T-junction. The flow rates of oil phase and worm suspension were $0.4 \mu\text{L min}^{-1}$ and $0.62 \mu\text{L min}^{-1}$, respectively.

2.3.2.3.3 用于单个线虫液滴包裹的线虫悬液密度优化

为了保证液滴包裹单个线虫的成功率，需要对实验中所使用的线虫悬液的密度进行优化。在油相 $0.4 \mu\text{L min}^{-1}$ 和水相 $0.62 \mu\text{L min}^{-1}$ 的流速条件下，我们最终将线虫悬液的密度确定在 $5\text{-}10 \text{ 只}/\mu\text{L}$ ，此时单个线虫的成功包裹率可达 60%以上（见图 2-16a）。

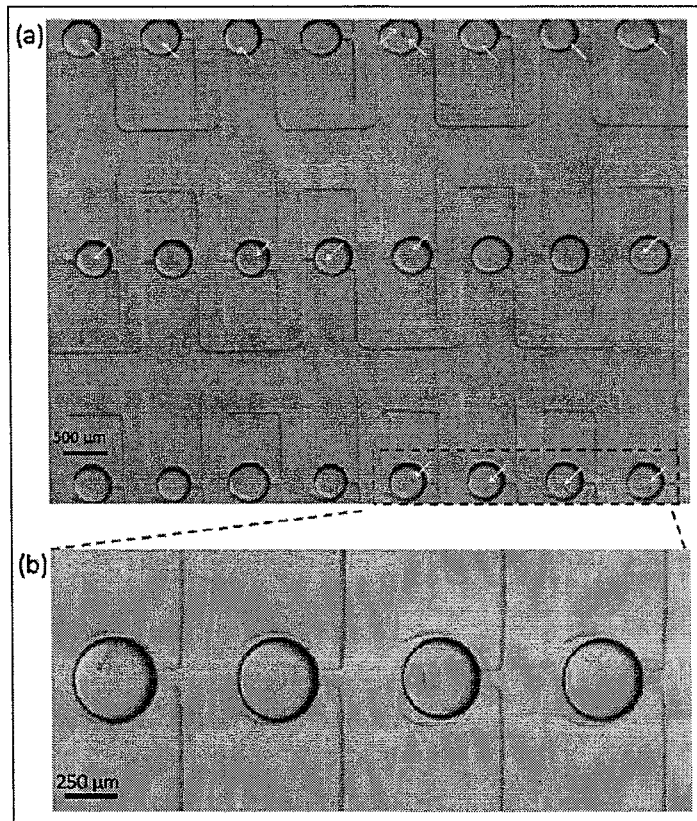


图 2-16 (a) 包裹单个线虫的液滴被捕获于液滴捕获阵列中，其中白色箭头指示了被成功包裹的单个线虫的位置；(b) 4 个包裹有单个线虫的液滴被捕获于液滴捕获阵列中。

Fig. 2-16 (a) Image of 24 array droplets encapsulated with worms, and the white arrows indicate the positions of the encapsulated individual worms; (b) 4 droplets encapsulated with individual worms.

2.3.2.3.4 液滴微环境对线虫影响的考察

为了确定液滴微环境（包括氧气和营养物质供给的缺乏等因素）对单个 L1 期线虫幼虫的影响，我们从芯片上液滴内包裹的单个线虫中随机挑选了 6 只作为研究对象，用 CCD 对单个线虫在 2 小时内的实时运动行为进行采集，并对其摆动频率进行人工计数，统计数据并做线虫运动活性（摆动频率）- 时间关系图（见图 2-17），并与线虫在孔板中的摆动频率数据进行比较，结果显示：在 2 小时的检测时间内，在液滴中和孔板中培养的 L1 期线虫幼虫均表现出活跃的自由运动，包裹于液滴内的单个线虫的平均摆动频率为 2.57 次/秒，孔板中线虫的平均摆动频率为 3.04 次/秒，二者相差不大。因此，可以认为线虫的液滴包裹与液滴固定过程对线虫没有产生明显损伤，液滴微环境对线虫的运动活性在 2h 以内无明显影响，以液滴微流控芯片作为线虫运动行为研究的平台是可行的。

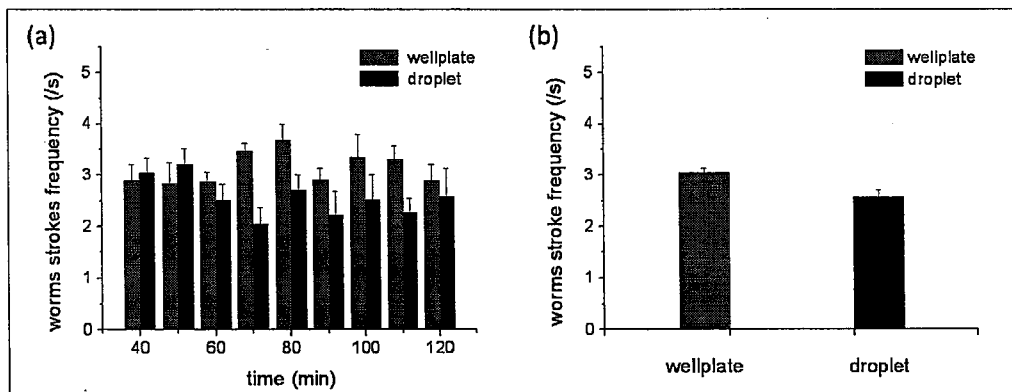


图 2-17 在孔板中和液滴中，线虫的平均摆动频率柱图。(a) 不同检测时间，孔板中和液滴中的线虫平均摆动频率；(b) 在 2 小时内，孔板中和液滴中的线虫平均摆动频率。

Fig. 2-14 Average stroke frequency of *C. elegans* in well plate or droplet. (a) Average stroke frequency of *C. elegans* in well plate or droplet at different detection time; (b) average stroke frequency of *C. elegans* in well plate or droplet.

以上实验结果证实了，我们所设计并制造的液滴微流控芯片具有以下功能：（一）可以利用 T 形液滴液滴生成器连续产生的水相液滴对单个线虫进行包裹，包裹过程对线虫无明显损伤，且所使用的油相在 2 小时内对线虫的运动活性无明显影响；（二）可以利用液滴捕获阵列对产生的液滴进行捕获，继而包裹其中的线虫的运动行为进行记录和分析，液滴微环境在 2 小时内对线虫的运动行为无明显影响。

该微流控芯片平台的创新性在于：首次实现了微流控芯片上液滴对单个线虫的包裹，并利用液滴的封闭性限制线虫的运动范围，一次运行可以得到多个单线虫的运动行为数据。与常规的线虫生物学研究方法相比，该平台具有以下优势：（一）单个线虫包裹和液滴捕获过程均可自动实现；（二）线虫行为采集过程无需人为监控，结合液滴易于高通量的特点，通过一次采集就可以获得多个单线虫的运动行为数据，非常适合于进行高通量单个线虫水平的行为研究。

接下来，我们在该平台上开展了对神经毒素 MPP⁺诱导下的单个线虫运动行为的研究。

2.3.3 神经毒素 MPP⁺诱导下的单个线虫运动行为研究

帕金森病 (Parkinson's Disease, PD) 是一种常见的中老年神经系统退行性疾病，在 65 岁以上人群中的发生率为 1-2%，其主要病理标志为选择性的黑质纹状体处神经元缺失。迄今为止，帕金森病的确切病因及发病机制尚不清楚。为了阐明帕金森病的发病机制，研发可以改善疾病症状的新药，建立帕金森病的模型就显得至关重要。目前，常规模式生物（如小鼠、猴等）的帕金森病模型可以利用神经元特异性神经毒素 (MPTP、6-OHDA、鱼藤酮等) 进行诱导，也可以利用基因敲除和转基因技术进行制备，利用 MPP⁺诱导线

虫建立帕金森病模型是近几年研究的重要方向之一。

MPP⁺（1-甲基-4-苯基吡啶离子）是神经毒素 MPTP（1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶）的活性代谢物。它通过抑制线粒体氧化呼吸链中的 NADHCoQ 还原酶（复合物 I）的活性，干扰 ATP 的合成；也可以导致复合物 I 失电子，使其产生大量自由基而造成多巴胺能神经元的变性死亡。对线虫进行 MPP⁺诱导可引起不可逆的严重的帕金森症状（静止于卷曲状态或无规则运动，类似帕金森病人的僵硬和运动迟缓症状），病理上表现为黑质多巴胺能神经元的变性。

为了确定实验中使用的 MPP⁺浓度，我们进行了用以确定 MPP⁺对线虫 L1 期幼虫运动的半数抑制浓度（IC₅₀）的孔板实验，其中，IC₅₀ 定义为使 50%线虫的运动受到抑制的 MPP⁺浓度。我们采集了不同浓度（0, 1, 3, 5, 7, 11, 13, 15, 17 mM）MPP⁺作用 2 h 后线虫的运动状态（视频长度 1 s），对在 1 s 内运动抑制（无身体摆动）的线虫数目和总线虫数目分别计数。为了排除其他因素，只分析药物 MPP⁺对线虫运动活性（Mobility）的影响，我们按如下公式 2-4 对线虫的运动活性进行计算

$$\text{Mobility}(\% \text{ of wild type}) = \frac{1 - S_n/T_n}{1 - S_0/T_0} \times 100\% \quad (2-4)$$

其中， S_0 和 T_0 分别为 0 mM MPP⁺作用下运动抑制的线虫数目和总线虫数目， S_n 和 T_n 分别为一定浓度 MPP⁺作用下运动抑制的线虫数目和总线虫数目，而 S_n/T_n 表示线虫群体中由于受到多种因素（自身因素、药物因素和环境因素等）影响而产生运动抑制的线虫比例。根据上述公式得到的线虫运动活性—MPP⁺浓度的关系曲线如图 2-18 所示，线虫的运动行为缺陷（此处体现为运动活性降低）与 MPP⁺浓度的关系呈现剂量效应；作用 2 h 后，MPP⁺的半抑制浓度

(IC₅₀) 约为 11 mM。我们在实验中选择了小于半抑制浓度的 1, 3, 5 mM 三个浓度来对线虫进行 MPP⁺ 诱导。

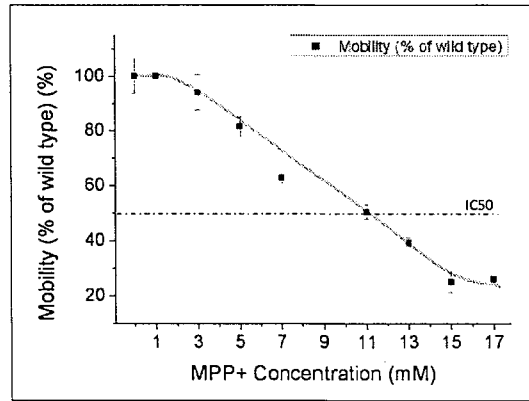


图 2-18 线虫运动活性与 MPP⁺浓度的关系曲线。

Fig. 2-18 Relationship between *C.elegans* mobility and MPP⁺ concentration.

在常规的线虫运动行为分析中，通常把单个线虫置于一个相对较大的容器（如孔板、琼脂板）中对其运动视频进行采集，每次采集只能获得一只线虫的运动信息，分析通量不高；此外，由于在采集过程中需要时刻跟踪线虫的动向，以防止线虫游出（或爬出）视频采集的视野，使整个采集过程相当费力繁琐。而我们以尺寸与线虫相匹配的微液滴作为单个线虫的容器，利用液滴的封闭性限制线虫的运动范围，采集过程无需人为监控；再结合液滴易于高通量的特点，使一次采集可以获得多个单线虫的运动行为数据。

在实验中，以线虫悬液/MPP⁺溶液的混合液为水相，按 § 2.2.5 和 § 2.2.6 中所述的实验步骤完成包裹有单个线虫并具有一定 MPP⁺浓度的液滴的形成和捕获后，就可以对在一定 MPP⁺浓度（0, 1, 3, 5 mM）诱导下的线虫 L1 期幼虫的运动行为进行研究。我们将从以下三方面展开研究：运动形态、摆动频率和 Ω 形态出现频率。（注意，以下出现的“线虫”均指线虫 L1 期幼虫。）

2.3.3.1 神经毒素 MPP⁺诱导下的线虫运动形态

分别在 0, 1, 3, 5 mM MPP⁺作用条件下, 对随机挑选的 6 只包裹于液滴内的单个线虫进行 2 h 内的运动情况采集, 并对线虫表现出的不同运动形态进行分析。结果如图 2-19 所示, 对照组 (0 mM MPP⁺) 线虫呈现出与在普通液体培养中相同的运动形态: 较高运动活性, 摆动频率较快, 且多为正弦形或 C 形摆动; 而在较高浓度 MPP⁺诱导下, 线虫多出现运动缺陷: 包括摆动缓慢、僵直或 Ω 形态等, 且运动缺陷出现的频率随着 MPP⁺作用浓度和时间的增加而增加。

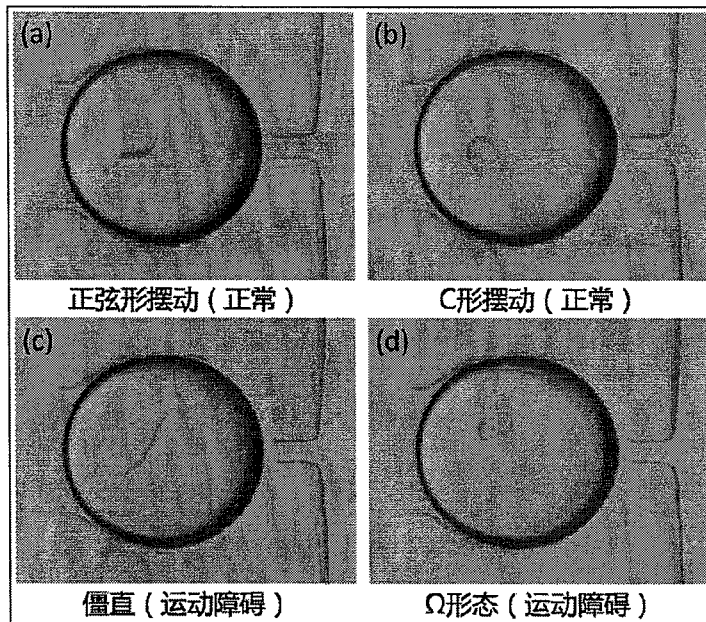


图 2-19 不同浓度神经毒素 MPP⁺作用下单个线虫的不同运动形态。(a) 正弦形摆动; (b) C 形摆动; (c) 僵直; (d) Ω 形态。(a-b) 未经 MPP⁺作用; (c-d) 3 mM MPP⁺作用 70 分钟。

Fig. 2-19 Different representative mobility shapes of single worms. (a) sine wave-shape; (b) C-shape; (c) tetanic; (d) omega-shape. (a-b) untreated; (c-d) treated with 3 mM MPP⁺ for 70 minutes.

2.3.3.2 神经毒素 MPP+诱导下的线虫摆动频率

对不同浓度 MPP+诱导下的线虫的摆动频率进行人工计数,对所得数据进行统计,并按线虫摆动频率与 MPP+剂量和作用时间的关系进行整理。所得的不同浓度 MPP+诱导下的单个线虫摆动频率—MPP+作用时间关系图及对应的平均摆动频率—MPP+作用时间关系图见图 2-20。

由图 2-20 可以看出单个线虫的摆动频率变化。(一)在无 MPP+作用或 MPP+作用浓度较低(1 mM)的情况下,单个线虫的摆动频率在 2 h 检测时间内均呈现较高水平(2.1 /s~2.4 /s);稀有线虫出现摆动频率为 0 的情况。

(二)在 3 mM MPP+作用下,单个线虫在 2 h 检测时间内的平均摆动频率仍保持较高水平(~2.4 /s),但自 80 min 后,大部分线虫的摆动频率开始出现明显的下降趋势;同样地,稀有线虫出现摆动频率为 0 的情况。(三)在 5 mM MPP+作用下,在 2 h 检测时间内,2/3 的单个线虫的摆动频率明显降低(~1.0 /s),而 1/3 的单个线虫的摆动频率在 0 /s~4 /s(静止与快速摆动)之间剧烈波动;几乎所有的线虫都出现了摆动频率为 0 的情况。

对单个线虫在 2 h 内的摆动频率进行平均统计,所得的线虫平均摆动频率—MPP+作用浓度关系图见图 2-21。由图 2-21 可知,在 1 mM 和 3 mM 的 MPP+诱导下,线虫的平均摆动频率分别为 2.14 /s 和 2.36 /s,与对照组(0 mM MPP+)线虫的平均摆动频率(2.41 /s)无显著性差异,说明较低浓度(1 mM 和 3 mM)的 MPP+诱导不会对线虫的摆动频率产生明显影响;而在 5 mM MPP+诱导下,线虫的平均摆动频率降至 1.27 /s,与 0 mM, 1 mM 和 3 mM MPP+作用下的平均摆动频率均有显著性差异,说明高浓度(5 mM) MPP+诱导会使线虫的摆动频率明显下降,造成运动活性方面的运动缺陷。

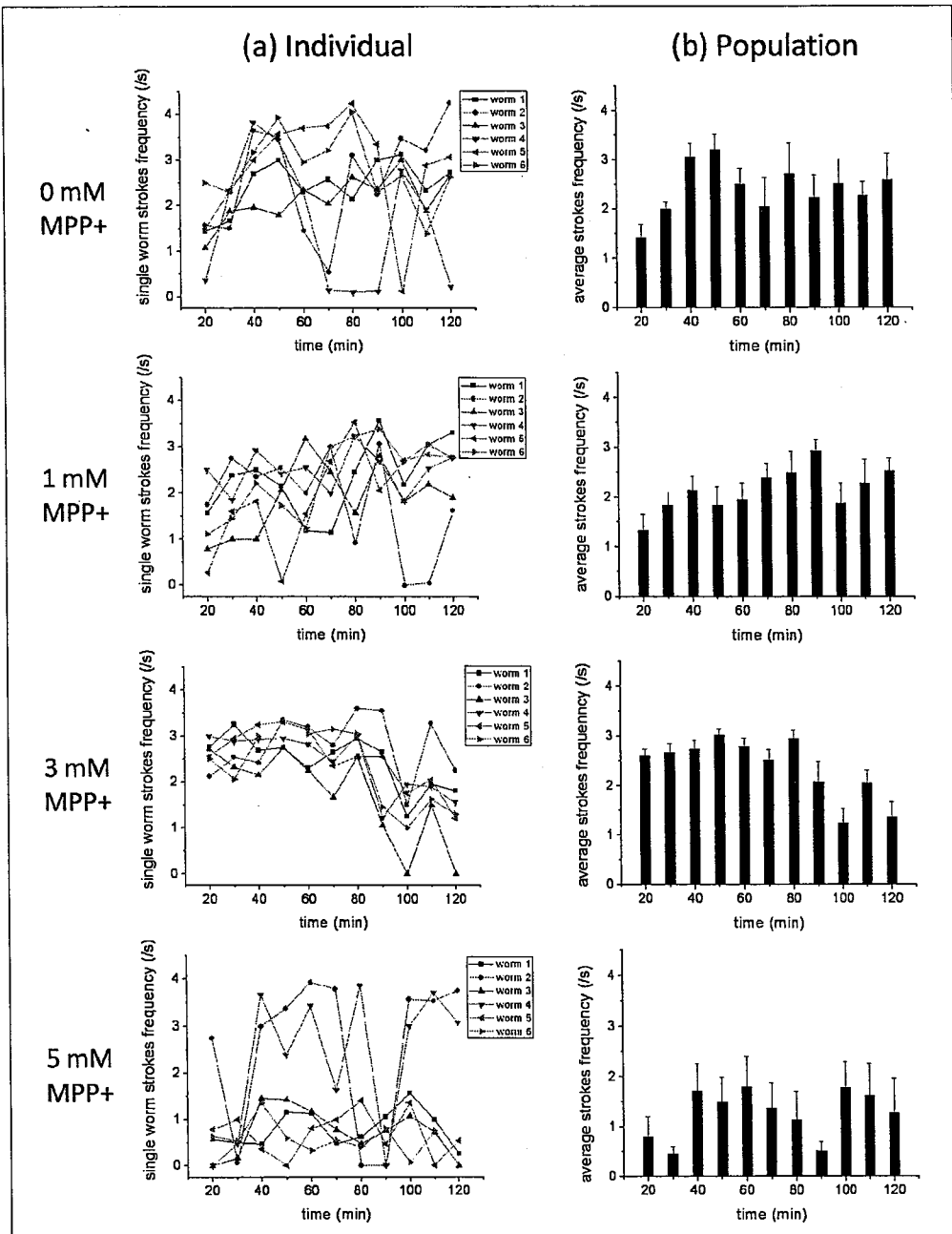


图 2-20 不同浓度 MPP+诱导下, (a) 单个线虫摆动频率与 MPP+作用时间关系图; (b) 线虫平均摆动频率与 MPP+作用时间关系图。

Fig. 2-20 (a) Stroke frequency of individual worms as a function of incubation time after MPP+ treatment; (b) Average statistics on (a).

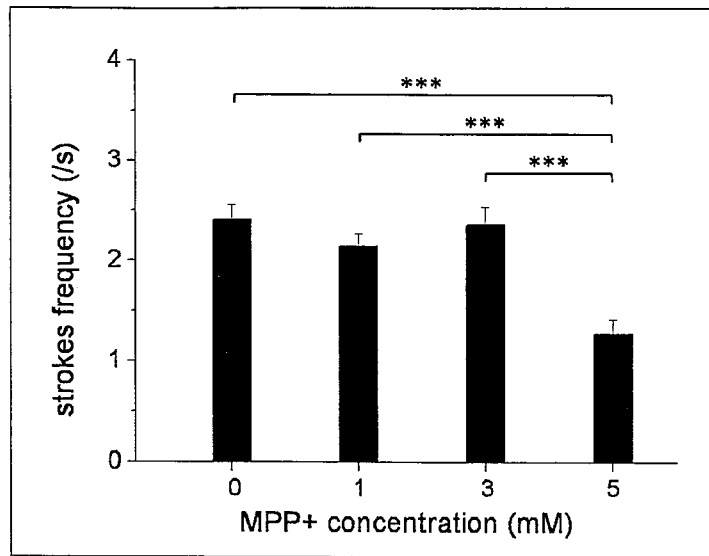


图 2-21 线虫平均摆动频率与 MPP+作用浓度关系图。(***) $p < 0.001$)

Fig. 2-21 Average stroke frequency of worms after MPP+ treatment with different concentrations in 2 hours, (***) $p < 0.001$.

2.3.3.3 神经毒素 MPP+诱导下的线虫 Ω 运动形态频率

对不同浓度 MPP+诱导下的线虫的 Ω 运动形态频率进行人工计数, 对所得数据进行统计, 并按线虫 Ω 形态百分比 (Ω 形态出现次数在所有摆动中所占的百分比) 与 MPP+剂量和作用时间的关系进行整理。所得的不同浓度 MPP+诱导下单个线虫的 Ω 形态百分比与 MPP+作用时间关系图, 及其对应的平均 Ω 形态百分比与 MPP+作用时间关系图见图 2-22。

由图 2-22 可以看出在 2 h 检测时间内, 单个线虫的 Ω 形态百分比变化。
 (一) 在无 MPP+作用或 MPP+作用浓度较低 (1 mM) 的情况下, 单个线虫的 Ω 形态百分比呈现较低水平 ($\sim 2\%$)。 (二) 3 mM MPP+作用下, 单个线虫的 Ω 形态百分比略有增加 ($\sim 6\%$)。 (三) 5 mM MPP+作用下, 单个线虫的 Ω 形态百分比明显升高, 其中 1/2 的单个线虫出现了 100% Ω 形态的情况。

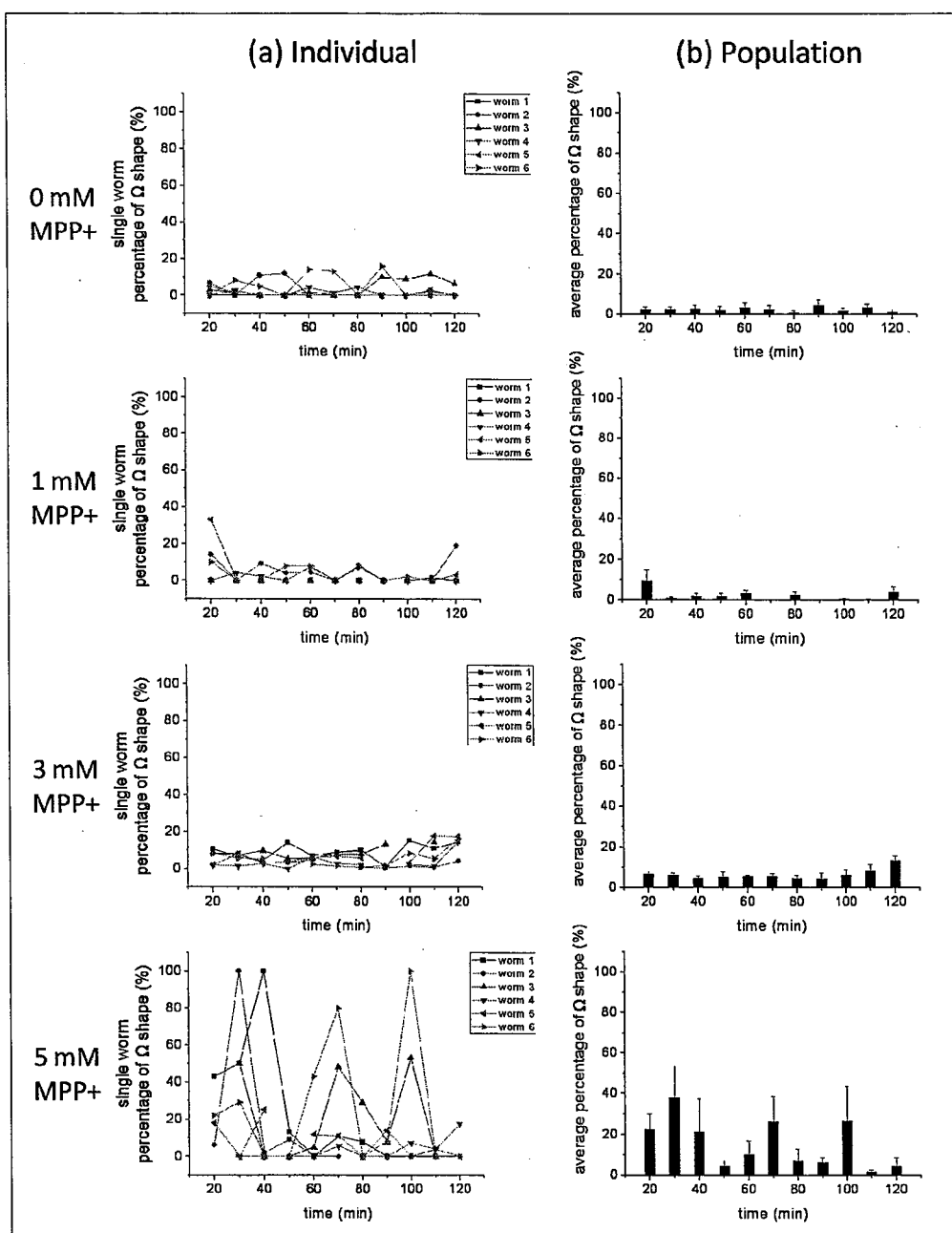


图 2-22 不同浓度 MPP+诱导下, (a) 单个线虫 Ω 形态百分比与 MPP+作用时间关系图; (b) 线虫平均 Ω 形态百分比与 MPP+作用时间关系图。

Fig. 2-22 (a) Percentage of Ω -shape of individual worms as a function of incubation time after MPP+ treatment; (b) Average statistics on (a).

对单个线虫在 2 h 内的 Ω 形态百分比进行平均统计, 所得的线虫平均 Ω 形态百分比与 MPP+ 作用浓度关系图见图 2-23。由图 2-23 可知, 在 1 mM MPP+ 诱导下, 线虫的平均 Ω 形态百分比为 2.21%, 与对照组 (0 mM MPP+) 线虫的平均 Ω 形态百分比 (2.37%) 无显著性差异, 说明低浓度 (1 mM) 的 MPP+ 诱导不会对线虫的 Ω 形态出现频率产生明显影响; 在 3 mM MPP+ 诱导下, 线虫的平均 Ω 形态百分比升至 6.44%, 与 0 mM 和 1 mM MPP+ 作用下的平均 Ω 形态百分比有显著性差异, 说明中浓度 (3 mM) 的 MPP+ 诱导可以使线虫产生明显的 Ω 形态出现几率; 而在 5 mM MPP+ 诱导下, 线虫的平均 Ω 形态百分比升至 15.26%, 说明高浓度 (5 mM) 的 MPP+ 诱导可以使线虫产生较高水平的 Ω 形态出现几率, 造成线虫在运动形态方面的运动缺陷, 该运动缺陷与施加的 MPP+ 呈现剂量效应。

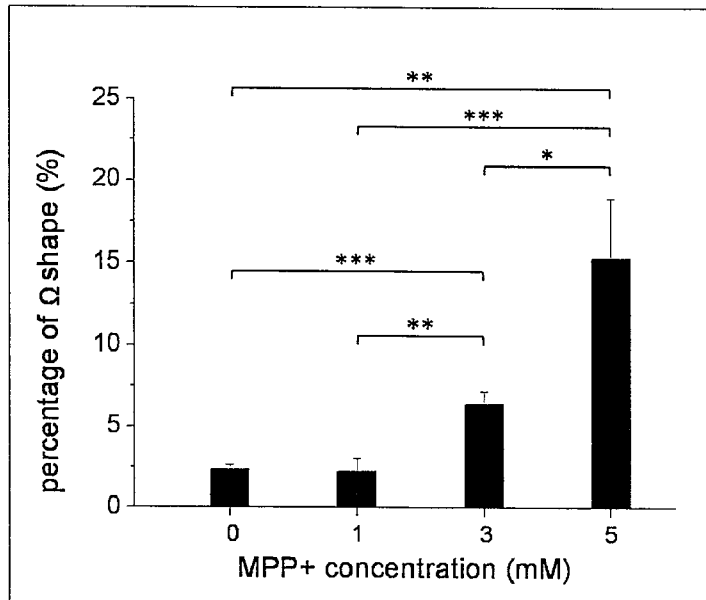


图 2-23 线虫平均 Ω 形态百分比与 MPP+ 作用浓度关系图。(* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001)

Fig. 2-23 Average percentage of Ω -shape of worms after MPP+ treatment with different concentrations in 2 hours, * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001.

综合对线虫的摆动频率和 Ω 形态出现几率的平均统计结果可以发现, 在 2 h 作用时间内, 受到 1 mM MPP+ 作用的线虫的平均摆动频率和 Ω 形态出现几率均与对照组 (0 mM MPP+) 无显著性差异; 受到 3 mM MPP+ 作用的线虫的平均摆动频率仍与对照组无显著性差异, 但 Ω 形态出现几率有明显提高; 受到 5 mM MPP+ 作用的线虫的平均摆动频率与以上各组 (0, 1, 3 mM MPP+) 相比有明显降低, 且 Ω 形态出现几率与对照组和 3 mM MPP+ 组相比均有显著性提高。说明在 2 h 作用时间内, 施加 3 mM MPP+ 即可使线虫出现 Ω 形态的增加, 而在 5 mM MPP+ 作用下, 线虫才会出现摆动频率的下降; 线虫出现 Ω 形态的增加早于其摆动频率的下降。

从单个线虫的运动数据中, 我们还可以得到以下信息: 在 3 mM MPP+ 作用下, 大部分线虫的摆动频率在检测后期已出现明显的下降趋势。在 5 mM MPP+ 作用下, 线虫的运动呈现两种不同类型: 1/3 的线虫 (worm 2 和 worm 4) 的摆动频率波动剧烈 ($0\sim 4\text{ s}^{-1}$), 而 Ω 形态出现几率较低; 其余 2/3 的线虫的摆动频率始终维持在较低水平 ($\sim 1\text{ s}^{-1}$), 而 Ω 形态出现几率较高。这些单个线虫水平的运动行为信息是难以从平均统计数据中得到的, 显示了液滴微流控平台用于线虫运动行为分析的独特优势。

2.4 本章小结

本章研制了一种集成化液滴微流控芯片, 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基于机械原理的液滴捕获阵列, 能够自动生成包裹有单个线虫的高通量微液滴, 并将其顺序固定于液滴捕获阵列中, 由此连续进行液滴生成、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 (wild-type 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。结果表明 MPP⁺会诱导线虫产生运动缺陷（包括运动活性和运动形态等方面），且产生的运动缺陷对 MPP⁺的响应呈现剂量效应。

与传统的多孔板或琼脂板技术相比，利用微流控液滴平台进行的线虫运动行为研究不但可以简化操作过程、缩短分析时间、降低试剂耗量、体现集成化优势，更为重要的是，在该平台上可以实现对通量化单个线虫的运动行为分析，一次运行可以得到多个单线虫的运动行为数据。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可行性和优越性。

参考文献

1. de Bono, M., Maricq, A. V., Neuronal substrates of complex behaviors in *C. elegans*. *Annual Review of Neuroscience*, 2005, 28: 451-501.
2. deMello, A. J., Control and detection of chemical reactions in microfluidic systems. *Nature*, 2006, 442(7101): 394-402.
3. Evason, K., Huang, C., Yamben, I., Covey, D. F., Kornfeld, K., Anticonvulsant Medications Extend Worm Life-Span. *Science*, 2005, 307(5707): 258-262.
4. 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.
5. 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.
6. Braungart, E., Gerlach, M., Riederer, P., Baumeister, R., Hoener, M. C., *Caenorhabditis elegans* MPP+ model of Parkinson's disease for high-throughput drug screenings. *Neuro-degenerative Diseases*, 2004, 1(4-5): 175-83.
 7. Dimitriadi, M., Hart, A. C., Neurodegenerative disorders: Insights from the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Neurobiology of Disease*, 2010, 40(1): 4-11.
 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. 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.
 10. 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.
 11. 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.
 12. 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.
13. 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.
 14. Teh, S.-Y., Lin, R., Hung, L.-H., Lee, A. P., Droplet microfluidics. Lab on a Chip, 2008, 8(2): 198-220.
 15. Song, H., Chen, D. L., Ismagilov, R. F., Reactions in Droplets in Microfluidic Channels. Angewandte Chemie International Edition, 2006, 45(44): 7336-7356.
 16. Casadevall i Solvas, X., deMello, A., Droplet microfluidics: recent developments and future applications. Chemical Communications, 2011.
 17. 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.
 18. Chen, D. L., Gerdt, 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.
 19. 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.
 20. 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.
21. 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.
 22. 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.
 23. Brenner, S., Genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 1974, 77(1): 71-94.
 24. Thorsen, T., Roberts, R. W., Arnold, F. H., Quake, S. R., Dynamic Pattern Formation in a Vesicle-Generating Microfluidic Device. *Physical Review Letters*, 2001, 86(18): 4163.
 25. Nisisako, T., Torii, T., Higuchi, T., Droplet formation in a microchannel network. *Lab on a Chip*, 2002, 2(1): 24-26.
 26. Vanapalli, S. A., Banpurkar, A. G., van den Ende, D., Duits, M. H. G., Mugele, F., Hydrodynamic resistance of single confined moving drops in rectangular microchannels. *Lab on a Chip*, 2009, 9(7): 982-990.
 27. Ga, ntilde, aacute, n-Calvo, A. M., Gordillo, J., eacute, M, Perfectly Monodisperse Microbubbling by Capillary Flow Focusing. *Physical Review Letters*, 2001, 87(27): 274501.

28. Shelley, L. A., Nathalie, B., Howard, A. S., Formation of dispersions using "flow focusing" in microchannels. *Applied Physics Letters*, 2003, 82(3): 364-366.
29. Schmitz, C. H. J., Rowat, A. C., Koster, S., Weitz, D. A., Dropspots: a picoliter array in a microfluidic device. *Lab on a Chip*, 2009, 9(1): 44-49.
30. Shim, J.-u., Cristobal, G., Link, D. R., Thorsen, T., Jia, Y., Piattelli, K., Fraden, S., Control and Measurement of the Phase Behavior of Aqueous Solutions Using Microfluidics. *Journal of the American Chemical Society*, 2007, 129(28): 8825-8835.
31. Zheng, B., Tice, J. D., Roach, L. S., Ismagilov, R. F., A Droplet-Based, Composite PDMS/Glass Capillary Microfluidic System for Evaluating Protein Crystallization Conditions by Microbatch and Vapor-Diffusion Methods with On-Chip X-Ray Diffraction. *Angewandte Chemie International Edition*, 2004, 43(19): 2508-2511.
32. Tan, W. H., Takeuchi, S., A trap-and-release integrated microfluidic system for dynamic microarray applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(4): 1146-1151.

第三章 基于液滴微流控芯片的线虫帕金森病药理学模型研究

3.1 引言

帕金森病 (Parkinson's Disease, 简称 PD) 是一种常见的人类神经系统退行性疾病, 在 65 岁以上人群中的发生率为 1~2%, 其症状主要表现为静止性震颤、肌强直、运动迟缓和姿势步态障碍等, 病理标志主要为黑质纹状体处的多巴胺能神经元变性缺失[1]。迄今为止, 帕金森病的确切病因及发病机制尚不明确, 但许多研究显示氧化应激可能在帕金森病的发生发展中扮演非常重要的角色[2, 3]。为了阐明帕金森病的发病机制并筛选潜在治疗药物, 可以使用标准化方法构建帕金森病动物模型, 在动物模型上再现帕金森病的特征性病理事件和行为学表现, 如通过对大鼠、猴子等模式生物施加神经毒素 (如 MPTP、6-OHDA、鱼藤酮等) 以诱导多巴胺能神经元死亡, 并产生类 PD 症状[4-7]; 或通过转基因或基因敲除等技术在模式生物体内表达与 PD 发病有关的野生或突变基因, 建立具有帕金森病特征的动物 (果蝇、小鼠等) 模型[8, 9]。

理想的帕金森病动物模型应具备以下特点: (1) 易于检测到类帕金森病症状的运动缺陷; (2) 能观察到随年龄发展出现的选择性和渐进性多巴胺能神经元缺失; (3) 有相对较短的疾病周期, 便于经济地快速地进行药物筛选 [10]。而线虫能满足上述要求, 同时还具有许多其他模式生物不可比拟的优势: 首先, 线虫神经系统结构简单, 仅有 302 个神经元, 但在受体和神经递质方面却与人类高度保守, 非常适合于作为进行神经系统研究的模式生物; 其次, 利用 RNA 干扰 (RNAi) 技术可以方便地制备各种转基因线虫株; 第三, 结合绿色荧光蛋白 (GFP) 标记技术的运用和线虫神经元细胞核透明可

见的特点，有可能对帕金森病线虫模型进行活体研究。由于上述基本特征和独特优势，线虫已逐渐被应用于帕金森病模型的构建以及相应的疾病机制和药物筛选的研究中[11-14]。

在对帕金森病动物模型的研究中，分析其类帕金森病症状的运动缺陷与多巴胺能神经元变性程度，对于研究疾病的发展进程十分关键；而监测动物模型体内的氧化应激水平变化，对于评价氧化应激因素在多巴胺能神经元变性过程中的作用，从而进一步评价帕金森病的发病机制具有重要意义。因此在这一章的工作中，首次对由神经毒素 6-OHDA 诱导的线虫帕金森病药理学模型的运动行为缺陷、多巴胺能神经元变性程度及氧化应激水平等三种指标进行了单个线虫水平上的同时监测，以期得到帕金森病发生和发展中的相关信息。

为了实现上述实验目的，设计研制了一种集成化多层液滴微流控芯片，该芯片集成了一个 T 形液滴生成器，一个液滴浮力捕获阵列和一个楔形通道阵列，可以自动、连续地完成液滴生成、单个线虫包裹、液滴固定、线虫行为监测、液滴释放、线虫固定以及线虫荧光成像等多个实验步骤，并实现对通量化单个线虫的运动行为和荧光特征的连续检测。我们利用神经毒素 6 羟基多巴胺 (6-OHDA) 诱导转基因株线虫 (UA57 和 CL2166, young adult) 建立帕金森病线虫模型体系，继而在芯片上考察了单个线虫帕金森病模型的运动行为、多巴胺能神经元变性情况及体内的氧化应激水平。结果显示神经毒素 6-OHDA 诱导下的线虫会出现运动行为缺陷、多巴胺能神经元变性和氧化应激水平升高等多种响应，且对 6-OHDA 呈现剂量效应；6-OHDA 可能通过提高线虫体内氧化应激水平导致其多巴胺能神经元发生变性，从而使线虫出现运动行为缺陷。

3.2 实验部分

3.2.1 仪器与试剂

IX 71 型倒置荧光显微镜购自 Olympus 公司。

SU-8 3035 型光刻胶购自 Microchem 公司。全氟烷混合物 Fluorinert[®] FC-40 (包含 C₁₂F₂₇N 和 C₉F₂₁N) 由 3M 公司提供。表面活性剂 EA 由美国 Raindance 公司提供。6-羟基多巴胺 (6-Hydroxydopamine hydrochloride, 6-OHDA), Type IX-A 超低凝胶温度琼脂糖购自美国 Sigma-Aldrich 公司。

已知量 6-OHDA 溶于含 20% DMSO 水溶液中, 配置成 100 mM 储备液, -20℃ 保存, 6 个月内有效。

其它仪器与试剂同§2.2.1。

3.2.2 液滴微流控芯片设计与制作

3.2.2.1 芯片设计

所采用的微流控芯片设计如图 3-1a 所示, 芯片结构分为上下两层 (图 3-1b)。上层芯片包含一个含有 80 个捕获器的液滴捕获阵列和一个含有 80 条楔形通道的线虫固定阵列。其中, 80 个捕获器各自独立, 每个捕获器均为高 1 mm、直径 1 mm 的圆柱体结构, 且分别对应一条用于线虫固定成像的楔形通道; 楔形通道高 50 μm, 长 2 mm, 宽度由 100 μm 逐渐缩小至 40 μm; 液滴捕获器与楔形通道之间的接合部分呈阶梯状, 高度分别为 500 μm, 200 μm 和 50 μm (图 3-1c); 所有的 80 条楔形通道均经由一个 25 μm 高的通道通向芯片中心的废液池 2。下层芯片包含一个 T 形液滴生成器、一条弯曲的液滴运输通道和通道末端的废液池 1。其中, T 形液滴生成器内两条进样通道的高度均为 500 μm, 宽度均为 300 μm (图 3-2a); 液滴运输通道高 500 μm,

宽 $500\ \mu\text{m}$ ，将 80 个液滴捕获器串联起来（图 3-2b）。芯片各单元的具体尺寸见下图（图 3-2）。

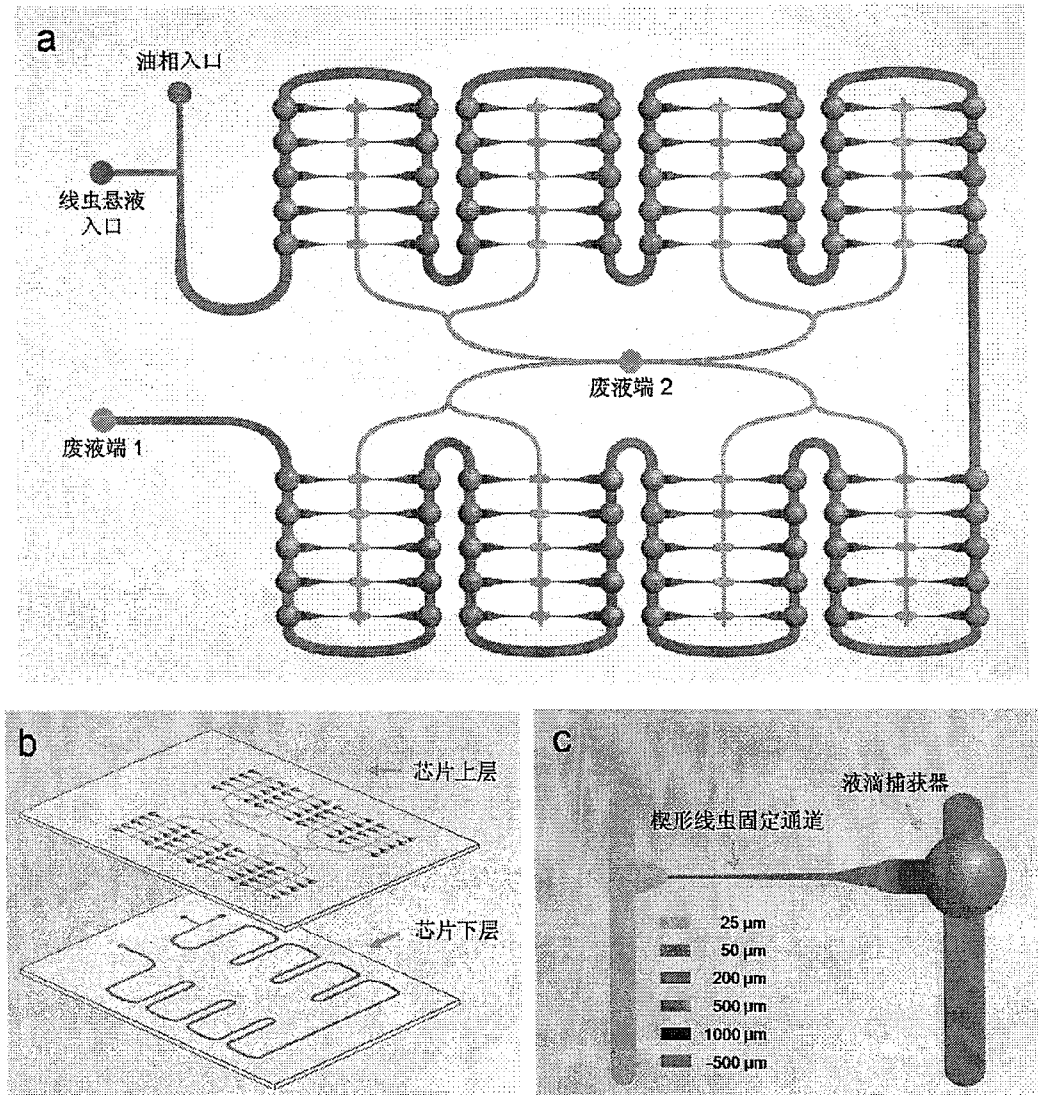


图 3-1 (a) 用于单个线虫运动行为和荧光特征分析的液滴微流控芯片设计示意图。(b) 由双层 PDMS 层构成芯片的示意图；上层用于液滴捕获和线虫固定，下层用于液滴生成和运输；(c) 芯片上一个功能单元的放大图，其中包含一个液滴捕获器和一个线虫固定通道；不同颜色代表了功能单元中不同位置的通道深度。

Fig. 3-1 (a) Schematic of the droplet-based microfluidic chip for individual *C. elegans* assay. (b) Illustration of the chip structure including two layers; the bottom layer for droplet generation and transportation, and the top layer for droplet trapping and worm immobilization. (c) The magnified view of one operation unit, including a droplet trap and a worm immobilization channel. The depths of different parts of the operation unit are marked with different colors.

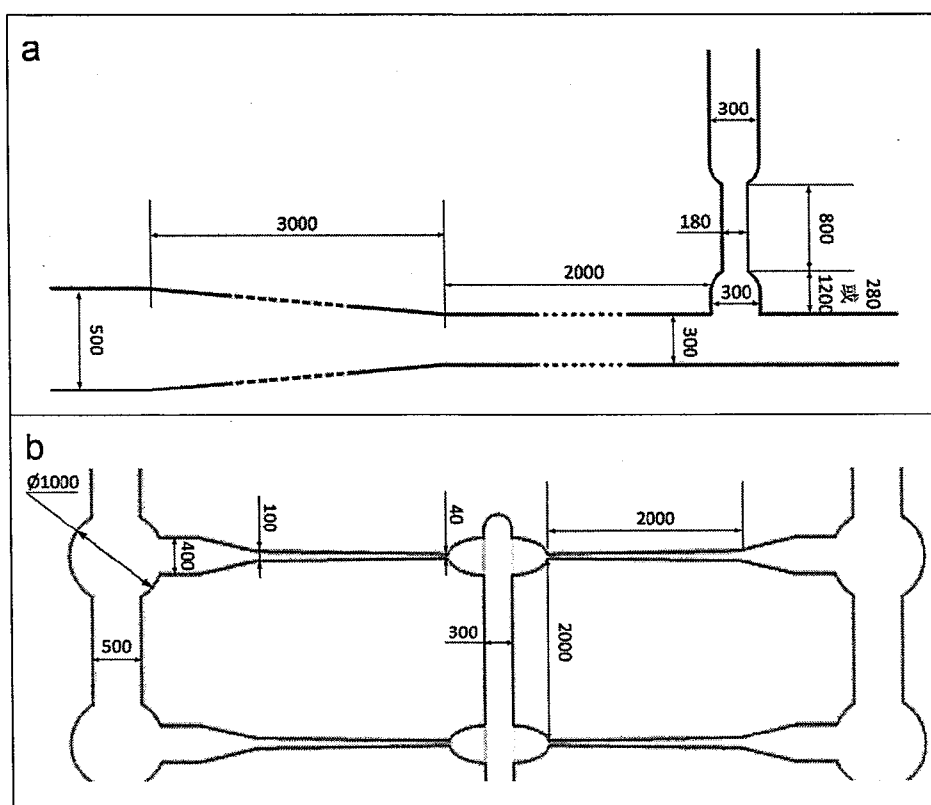


图 3-2 微流控芯片上各功能单元的具体尺寸示意图。(a) T 形液滴生成器尺寸示意图；(b) 液滴捕获器和线虫固定通道的尺寸示意图。

Fig. 3-2 Dimensions of the operation units of the microfluidic chip. (a) Dimensions of the T-junction droplet generator; (b) Dimensions of a droplet trapping unit and a tapered worm immobilization channel.

3.2.2.2 芯片制作

由于本章所使用的液滴微流控芯片为双层通道结构，且上层通道包含多个高度特征，因此所采用的芯片制作方法与上一章有所不同。具体的制作流程示意图见图 3-3。

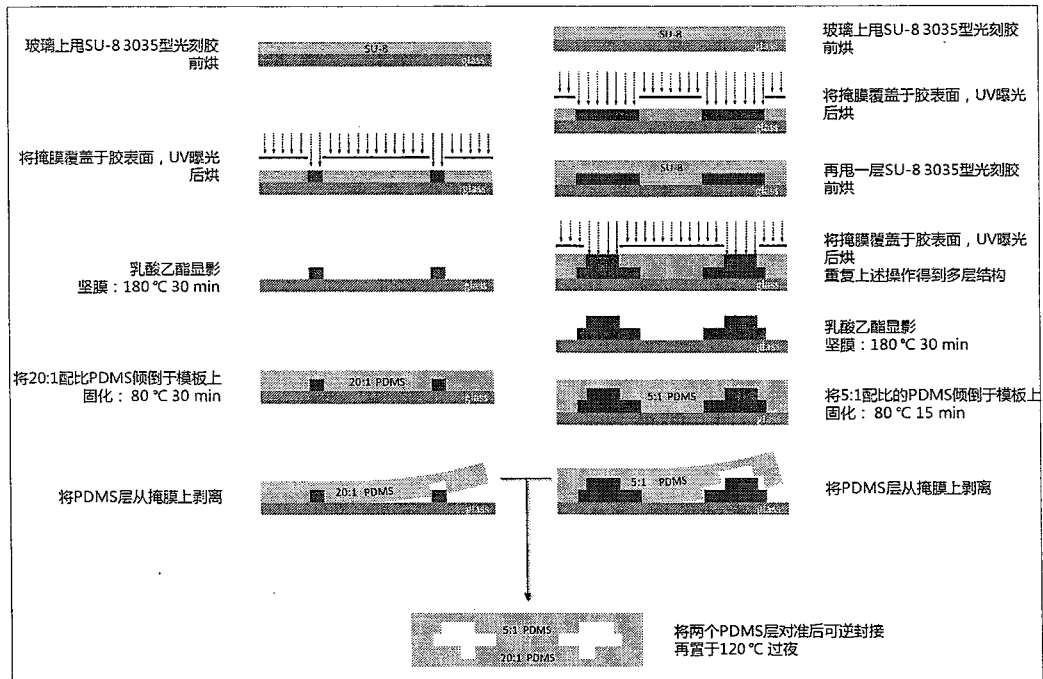


图 3-3 双层微流控芯片制作流程图。

Fig. 3-3 Schematic of the double-layer microfluidic chip fabrication process.

3.2.2.2.1 芯片模板制作[15]

取直径为 75 mm 的两块玻璃片置于浓硫酸-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 °C 烘干，再冷却至室温。

将清洗好的两块玻璃片水平放置于匀胶台中央，吸片；按表 3-1 中所列的参数进行 SU-8 3035 型光刻胶甩胶和曝光；其中，上层模板的第四层、第

五层和下层模板分别各甩胶两次。

待硅片自然冷却至室温后，用乳酸乙酯显影，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 °C 烘箱中烘 30 分钟坚模。图 3-4 为制作好的芯片上层模板实物照片。

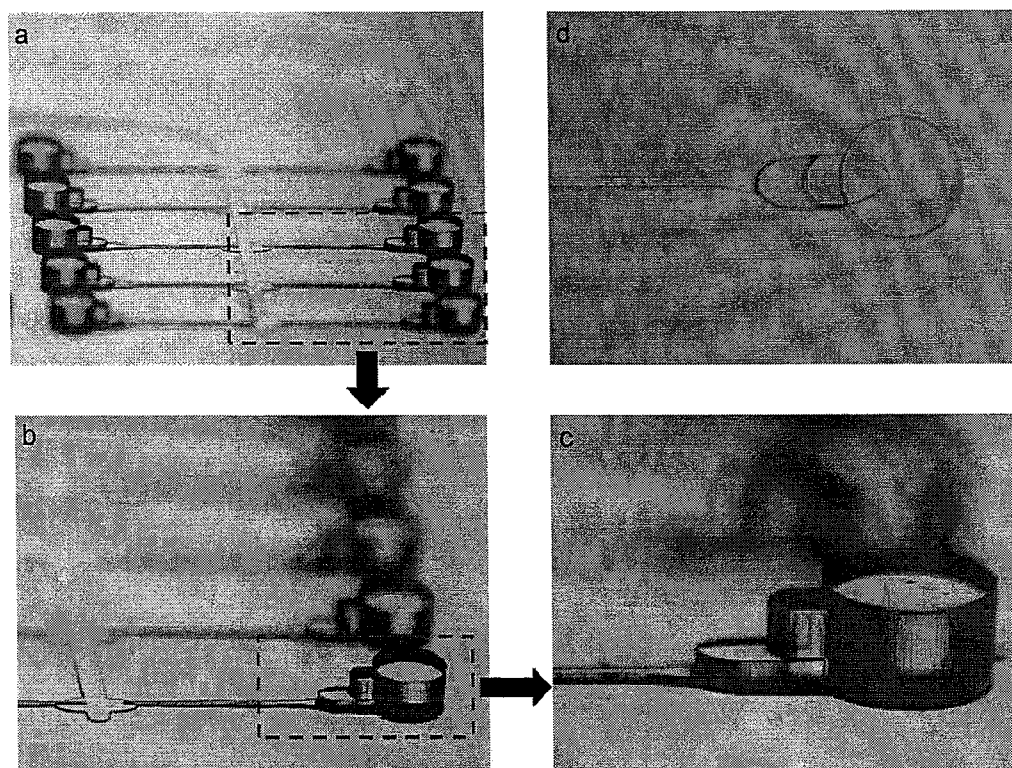


图 3-4 芯片上层 SU-8 模板实物照片。(a-c) 芯片上层 SU-8 模板侧视照片；(d) 芯片上层 SU-8 模板俯视照片。

Fig. 3-4 Photograph of the SU-8 mold of bottom layer.(a-c) Oblique photograph of the SU-8 mold of bottom layer; (d) top view of the SU-8 mold of bottom layer.

层数	上层						下层*		
	1	2	3*	4*		5*			
转速 (rpm)	3000	3000	1000	1000	1000	800	800	800	800
匀胶时间 (s)	30	30	30	30	30	30	30	30	30
前烘条件	95 °C	95 °C	95 °C	95 °C	95 °C	95 °C	95 °C	95 °C	95 °C
	10 min	15 min	25 min	30 min	35 min	40 min	45 min	40 min	45 min
曝光时间 (s)	80	120	200	450		550		500	
后烘条件	95 °C	95 °C	95 °C	95 °C		95 °C		95 °C	
	10 min	15 min	30 min	30 min		35 min		35 min	
层厚度 (μm)	25	25	150	300		500		500	
总厚度 (μm)	25	50	200	500		1000			

表 3-1 芯片 SU-8 模板制作参数 (*为在 4°C 条件下甩胶)

Table 3-1 Fabrication parameters of microfluidic SU-8 molds.

3.2.2.2.2 芯片成型与封接

将 Sylgard® 184 试剂盒 (Dow Corning) 中的单体和引发剂分别按体积比 5:1 和 20:1 的比例混合均匀, 真空脱气, 再倒入 SU-8 上层模板和下层模板中, 80 °C 分别烘 15 分钟和 30 分钟。固化后, 将两个 PDMS 层从各自模板上轻轻剥离, 用打孔器在上层 PDMS 的两个进样端和两个废液端对应处打上尺寸合适的孔 (注意, 下层 PDMS 不打孔)。将两个 PDMS 层置于 LED 灯上对准, 进行可逆封接, 之后将芯片置于 120 °C 烘箱内过夜, 取出后置于洁净培养皿中备用。制作好的 PDMS 微流控芯片如图 3-5 所示。

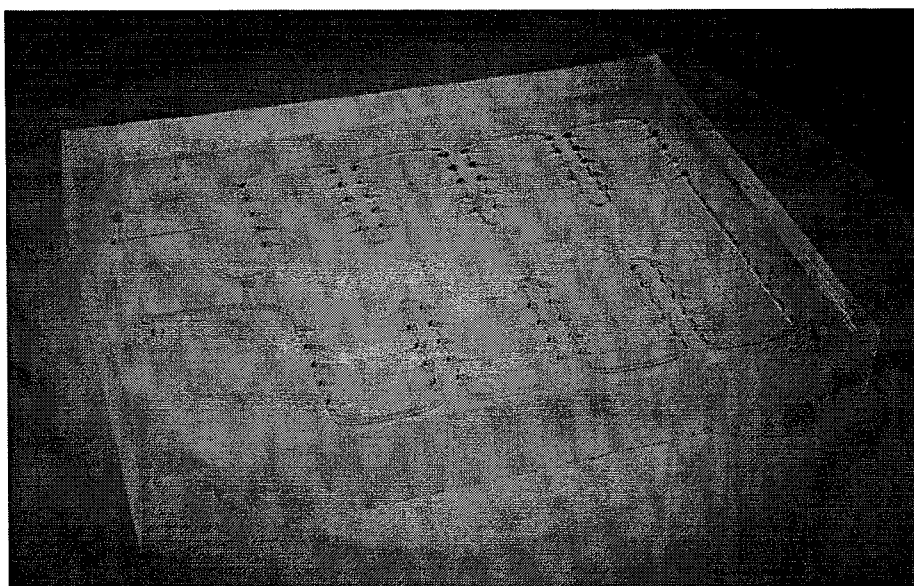


图 3-5 微流控芯片实物图

Fig. 3-5 Photograph of the fabricated droplet-based microfluidic chip.

3.2.3 液滴形成、捕获与释放

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 EA 的 FC-40。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)。

首先，用油相充满芯片通道，并将水相和油相分别灌注入各自的 PEEKTM 管 (1/16 英寸 OD, 0.01 英寸 ID) 和注射泵 (油相—250 μ L 注射泵，水相—50 μ L 注射泵) 中，并排出气泡。将芯片的油水两相进样口与对应的注射泵之间用 PEEKTM 管相连，通过注射泵将油相和水相以合适的流速注入芯片，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，会在浮力作用下被顺序逐一捕获于上层的液滴捕获器中。当完成 80 个液滴的产生后，关停水相注射泵，保持油相流速；油相继续流动直至 80 个液滴完全被捕获后，关停油相注射泵。

将两段 PEEKTM 管小心从芯片上拔出，用两个塞子封住进样口。再将废液池 1 与一个装有 1% 琼脂糖(Type IX-A, Sigma)溶液的注射泵相连接，以 $0.5-1.0 \mu\text{L s}^{-1}$ 的流速将琼脂糖溶液注入芯片。此时被捕获的液滴会在琼脂糖溶液的推动下从捕获器中释放出来并进入相邻的楔形通道，破碎后从废液端 2 排出。

3.2.4 线虫培养与处理

本章中使用的转基因虫株 UA57 (baIn4[Pdat-1::GFP + Pdat-1::CAT-2]) 和 CL2166 (dvIs19[pAF15(gst-4::GFP::NLS)]) 购自美国明尼苏达大学线虫遗传中心(Caenorhabditis genetics center, CGC); 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。

3.2.4.1 线虫培养与同步化处理

线虫培养和同步化处理方法同§ 2.2.4.1~§ 2.2.4.3。

3.2.4.2 线虫的 6-OHDA 处理[16]

将同步化处理后得到的线虫 L1 期幼虫 (UA57 and CL2166) 用去离子水从琼脂板上洗下来，调整线虫悬液密度至 $10\sim 15 \mu\text{L}^{-1}$ 。取 $600 \mu\text{L}$ 线虫悬液加入三个 1.5 mL 离心管中，再加入适量的 6-OHDA 储备液 (100 mM 6-OHDA / 20% DMSO 水溶液)，使三个离心管中的 6-OHDA 终浓度为 0 mM ， 5 mM 和 10 mM 。室温避光处理 1 小时 (每 10 分钟轻轻混匀)。完成处理后，用去

离子水清洗 2-3 次，再将线虫置于 NGM 琼脂板上，20 °C 培养 72 小时至成虫阶段。之后分别在第 72 小时（定义为第一天）、120 小时（第三天）和 168 小时（第五天）对这些经过 6-OHDA 处理的线虫在微流控芯片上进行分析。具体的实验流程如图 3-6 所示。

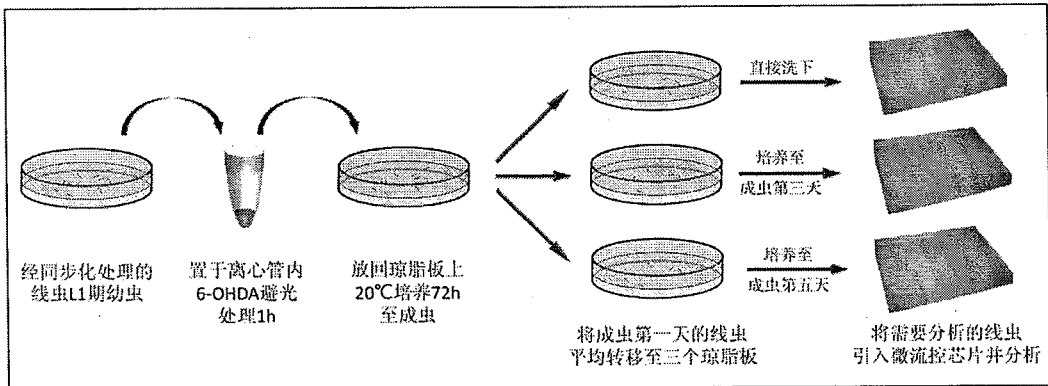


图 3-6 线虫处理流程图。

Fig. 3-6 Flow chart of *C. elegans* treatment.

3.2.4.3 考察 FC-40 和液滴微环境对线虫的生物相容性

分别以线虫 L1 期幼虫悬液和线虫成虫悬液（含 3% v/v *E. coli* OP50 菌悬液）为水相，FC-40（2% w/v EA）为油相，通过注射泵将油相和水相以合适的流速注入芯片，生成包裹有单个线虫的微液滴并将其捕获于液滴捕获阵列中。对包裹于液滴中的线虫 L1 期幼虫和线虫成虫的生存状态分别进行 4~5 天的长时间观测，相关图像和视频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）。

3.2.5 单个线虫包裹与运动行为数据的采集和处理

分别在第 1, 3, 5 天，将用 6-OHDA 处理过的线虫成虫(UA57 和 CL2166) 用 S medium 从琼脂板上洗下并收集，调整线虫悬液至合适密度。以线虫悬

液为水相，含 2 % (w/v) 表面活性剂 EA 的 FC-40 为油相，按§3.2.3 中描述的方法将实验设备装配起来。通过注射泵将油相和水相以合适的流速注入芯片，在 T 形液滴生成器处生成连续的包裹有单个线虫的微液滴。产生的微液滴在注射泵推动下继续流动，会在浮力作用下被顺序逐一捕获于上层的液滴捕获器中。当完成 80 个液滴的产生后，关停水相注射泵，保持油相流速；油相继续流动直至 80 个液滴完全被捕获后，关停油相注射泵。

完成了全部 80 个包裹单个线虫微液滴的捕获后，随机选择 12 个包裹有单个线虫的微液滴作为采集对象，对液滴内单个线虫在 1h 内 4 个时段 (0, 20, 40, 60 min) 的运动行为分别进行实时采集，每次采集持续 30 秒。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) 保存和处理。

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)。

3.2.6 单个线虫固定与荧光成像数据的采集与处理

在完成对线虫 (UA57 和 CL2166) 运动行为数据的采集后，将两段 PEEKTM 管小心从芯片上拔出，用塞子封住两个进样口，将废液池 1 与一个装有 1% 琼脂糖 (Type IX-A, Sigma) 溶液的注射泵相连接，并将芯片置于倒置荧光显微镜 (Olympus IX71, Japan) 载物台上。以 0.5-1.0 $\mu\text{L s}^{-1}$ 流速将琼脂糖溶液注入芯片，液滴内的线虫会在琼脂糖溶液的推动下，随着液滴从捕获器进入楔形通道内并被固定。保持琼脂糖溶液的流速以避免线虫的运动，利用倒置荧光显微镜采集线虫的荧光图像 (激发波长 470-493 nm, 检测波长 510-550 nm)。利用软件 IMAGE-PRO 对采集到的荧光图像进行处理和分析。