

# 液滴微流控芯片系统中微液滴特性表征及氨基酸检测应用

袁会领<sup>1,2</sup>, 董立兵<sup>3</sup>, 涂然<sup>2</sup>, 杜文斌<sup>3</sup>, 贾士儒<sup>1</sup>, 王钦宏<sup>2</sup>

1 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457

2 中国科学院天津工业生物技术研究所 中国科学院系统微生物工程重点实验室, 天津 300308

3 中国人民大学化学系, 北京 100872

袁会领, 董立兵, 涂然, 等. 滴微流控芯片系统中微液滴特性表征及氨基酸检测应用. 生物工程学报, 2014, 30(1): 139-146.

Yuan HL, Dong LB, Tu R, et al. Micro-droplet characterization and its application for amino acid detection in droplet microfluidic system. Chin J Biotech, 2014, 30(1): 139-146.

**摘要:** 基于液滴微流控芯片的检测和筛选系统, 因其具有通量高、成本低等显著特点, 近年来备受关注。该系统生成的微液滴 (皮升体积) 具有直径均一、大小可控、互不交融 (单分散性) 等特性, 它作为微反应器可以进行微生物及其代谢物包埋实验和高通量检测。因此, 研究微液滴的相关特性及其应用具有重要意义。文中在液滴微流控芯片系统搭建的基础上, 对重要氨基酸 (谷氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸) 分别进行了微液滴包埋实验, 研究了包埋微液滴的重要特性参数 (如稳定性、扩散性等), 探索了包埋微液滴对氨基酸检测分选的应用。实验表明, 文中搭建的液滴微流控芯片系统可以稳定、均一地生成微液滴, 微液滴大小可根据需要控制在 20-50  $\mu\text{m}$  之间, 微液滴间无交叉污染, 包埋氨基酸的微液滴的检测筛选速度大约为每分钟 600 个。这个研究为高通量分析和筛选产氨基酸的微生物奠定了基础。

**关键词:** 微流控芯片, 高通量筛选, 微液滴, 稳定性, 扩散性

**Received:** July 20, 2013; **Accepted:** November 21, 2013

**Supported by:** Instrument Developing Project of the Chinese Academy of Sciences (No. YZ201153), National Natural Science Foundation of China (Nos. 21206162, 21205134).

**Corresponding author:** Ran Tu. Tel/Fax: +86-22-84861950; E-mail: tu\_r@tib.cas.cn

Qinhong Wang. Tel/Fax: +86-22-84861950; E-mail: wang\_qh@tib.cas.cn

中国科学院科研装备研制项目(No. YZ201153), 国家自然科学基金(Nos. 21206162, 21205134)资助。

# Micro-droplet characterization and its application for amino acid detection in droplet microfluidic system

Huiling Yuan<sup>1,2</sup>, Libing Dong<sup>3</sup>, Ran Tu<sup>2</sup>, Wenbin Du<sup>3</sup>, Shiru Jia<sup>1</sup>, and Qinhong Wang<sup>2</sup>

*1 College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China*

*2 Key Laboratory of Systems Microbial Biotechnology, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China*

*3 Department of Chemistry, Renmin University of China, Beijing 100872, China*

**Abstract:** Recently, the droplet microfluidic system attracts interests due to its high throughput and low cost to detect and screen. The picoliter micro-droplets from droplet microfluidics are uniform with respect to the size and shape, and could be used as monodispensed micro-reactors for encapsulation and detection of single cell or its metabolites. Therefore, it is indispensable to characterize micro-droplet and its application from droplet microfluidic system. We first constructed the custom-designed droplet microfluidic system for generating micro-droplets, and then used the micro-droplets to encapsulate important amino acids such as glutamic acid, phenylalanine, tryptophan or tyrosine to test the droplets' properties, including the stability, diffusivity and bio-compatibility for investigating its application for amino acid detection and sorting. The custom-designed droplet microfluidic system could generate the uniformed micro-droplets with a controllable size between 20 to 50  $\mu\text{m}$ . The micro-droplets could be stable for more than 20 h without cross-contamination or fusion each other. The throughput of detection and sorting of the system is about 600 micro-droplets per minute. This study provides a high-throughput platform for the analysis and screening of amino acid-producing microorganisms.

**Keywords:** microfluidic chip, high throughput screening, micro-droplet, stability, diffusivity

微生物是工业生物技术的核心与基础<sup>[1]</sup>。利用先进的现代自动化和仪器分析技术开发的高通量筛选平台,具有自动化、标准化、高通量化等特征,大大突破了人工筛选在速度、效率和标准化等方面的限制,是微生物菌种筛选的一次技术革命。然而,已经投入使用的各类高通量筛选系统主要是由国外公司开发的价值昂贵、操作复杂的大型装备系统,其普适性受到较大的限制。因此,开发操作简单、成本相对不高的高通量筛选系统是重要的发展方向,特别是近年来基于微流控芯片的检测和筛选系统更是受到极大的关注<sup>[2-3]</sup>。

微流控芯片系统 (Microfluidics) 或微流控芯片实验室,是将化学和生物等领域中所涉及

的样品制备、反应、分离、检测及细胞培养、分选和裂解等基本操作单元集成到几个平方厘米 (甚至更小) 的芯片上,由微通道形成网络,由可控流体贯穿整个系统<sup>[4]</sup>。目前的微流控芯片系统主要包括连续微流体系统和液滴微流体系统。基于连续微流体的微流控芯片系统研究较多,已经成功应用在蛋白和核酸的电泳分析上<sup>[5-6]</sup>,并有商品化的分析仪。相对于连续微流体系统,基于液滴微流体的微流控芯片系统最大的优势在于可以形成独立的单个微液滴反应器<sup>[7-8]</sup>,可以据此对分析样品进行单独包埋并在相互分开、互不干扰的微液滴小室中进行检测分析,使得检测和筛选细胞或其胞外分泌产物成为可能。该系统具有速度快、通量高、成本

低等显著特点<sup>[9-10]</sup>, 对开展定向进化改造工程用酶, 研究外分泌胞外产物 (代谢产物) 等相关研究领域<sup>[11-13]</sup>具有重要的推动作用。

由于微生物筛选实验通常需要较长的时间, 所以对微流控芯片中的微液滴有更高的要求, 如提高微液滴的稳定性, 优化生物兼容性以及防止微液滴内水相物质渗漏到油相等。本研究针对以上问题, 以代谢产物 (氨基酸) 为研究对象, 通过对包埋氨基酸的皮升级微液滴特性的研究, 为液滴微流控芯片系统在氨基酸检测和相应生产菌株的高通量筛选以及定向进化改造方面奠定了基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌种

含有 pET30a-mCherry 的大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21(DE3) 菌株来由实验室保存, 该菌株可以诱导表达产生荧光蛋白 mCherry, 用于检测微液滴的生物活性兼容性。

#### 1.1.2 仪器与芯片

532 nm 激光器购自长春新产业光电技术有限公司; 聚焦物镜购自奥林巴斯公司; Nikon1 J1 高速摄像机购自 Nikon 公司; 532 nm、610 nm 滤光片均购自北京卓立汉光仪器有限公司; 光电倍增管购自 Centurian Surplus 公司; PCI6070e 数据采集卡购自 National Instruments 公司; MODEL 609E-6 高压放大器购自 Trek 公司; Mitos 压力泵购自环球分析测试仪器有限公司; 硅片购自上海齐鸣硅材料有限公司; SU-8 2025 光胶购自美国 MicroChem 公司; 等离子清洗机购自美国 Harrick 公司; 匀胶机购自中国科学院

微电子研究所; 加热台购自谊华电子设备有限公司; 紫外光刻机购自中国科学院光电技术研究所; 微流控芯片为自制 PDMS 芯片, PDMS 购自 Momentive 公司。

#### 1.1.3 主要试剂

Abil EM90 购自 Evonik Degussa 公司; 矿物油、钙黄绿素、Span80、CuCl<sub>2</sub>、EDTANa<sub>2</sub> 均购自国药集团化学试剂有限公司; 各种氨基酸均购自 Solarbio 公司; IPTG (异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷)、氨基酸氧化酶和过氧化氢酶均购自 Sigma 公司; 丙二醇甲醚醋酸酯购自阿法埃莎 (天津) 化学有限公司; 异丙醇购自北京化工厂; 荧光底物 Amplex UltraRed 购自 Invitrogen 公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 液滴微流控芯片整合控制系统的搭建 (光路设置、数据采集和控制系统) 及工作流程

如图 1 所示, 本液滴微流控芯片整合控制系统采用非聚焦光路<sup>[14]</sup>。

激光器发出波长为 532 nm, 发射后的激光通过滤光片除去杂波, 然后聚焦到微流控芯片的检测点。当包埋荧光物质的微液滴通过检测点时被激发产生荧光, 荧光经聚焦物镜聚焦后

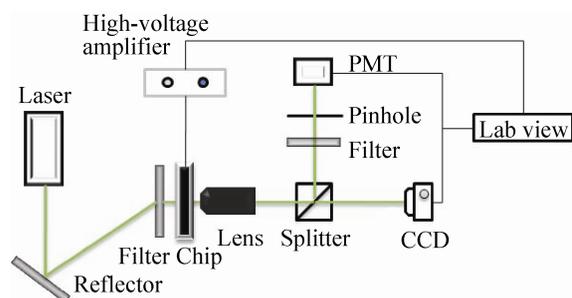


图 1 液滴微流控芯片整合控制系统示意图

Fig. 1 Diagram of droplet microfluidic system.

到达分光镜。通过分光镜将一部分荧光传给高速摄像机，实时监控微液滴的流动情况；另一部分荧光则通过滤光片，由光电倍增管 (PMT) 接收并将荧光信号转化为电压信号后，由数据采集卡采集并由 LabVIEW 软件进行分析。高压放大器用于微液滴的偏转，当目标微液滴的检测信号超过分选设定阈值时，分析软件通过高压放大器和微流控芯片上的电极对微液滴施加偏转电压。由于介电电泳力的作用，目标微液滴将发生偏转，流至分选通道得到收集。

### 1.2.2 液滴微流控检测分选芯片制备和微液滴生成

微流控芯片通过模塑法制备<sup>[4,15]</sup>。首先根据要求利用 AutoCAD 软件设计芯片图形 (图 2A) 并获得相应的光刻掩模 (掩模由深圳美精微光电股份有限公司制作)，然后通过光刻法将图形转移到芯片上。具体步骤是：首先选取洁净的硅片，放到等离子机清洗 4 min，然后用匀胶机以 1 800 r/min 的转速均匀的覆盖一层 50  $\mu\text{m}$  的 SU-8 2025 光胶，并在 95  $^{\circ}\text{C}$  下预烘 30 min；待其冷却后在光刻掩模下紫外曝光 20 s，在 95  $^{\circ}\text{C}$  烘 40 min；将未曝光的光胶用丙二醇甲醚醋酸酯和丙三醇交替冲洗干净，在 110  $^{\circ}\text{C}$  下加热 30 min，即获得所需芯片通道的阳模。芯片由目前被广泛采用的 PDMS 材料制作，PDMS 具有较好的透气性、良好的透光性和生物兼容性<sup>[15-16]</sup>。将 PDMS 预制剂和交联剂以 10: 1 的比例均匀混合后，倒在制备好的阳模上，在 60  $^{\circ}\text{C}$  下加热 4 h 使其固化。揭下该含有微流通道的 PDMS 并与另一块平整的 PDMS 封合，即得所需芯片，芯片实物如图 2B 所示。微流控芯片以 Mitos 压力泵作为流体动力，利用 PEEK 材质的

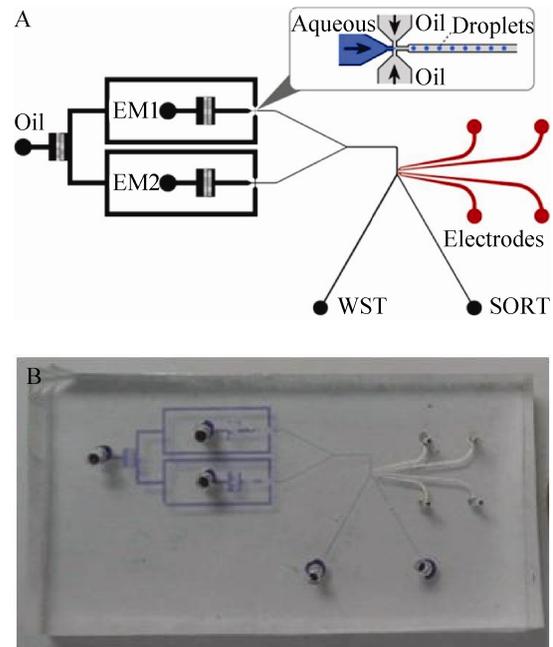


图 2 微流控芯片设计示意图 (A) 及实物图 (B)

Fig. 2 Design diagram of the microfluidic chip (A) and photograph of PDMS microfluidic chip (B). The chip contains an oil inlet (OIL) that joins two aqueous inlet channels (EM1 and EM2) at two narrow junctions. The channels are 40  $\mu\text{m}$  deep. The channels before the electrodes are 50  $\mu\text{m}$  wide. The channel on the side of the electrodes leading to the "SORT" output is 40  $\mu\text{m}$  wide, while the channel furthest from electrodes leading to the "WST" output is 60  $\mu\text{m}$  wide.

塑料管将其与芯片连接，采用流动聚焦 (Flow-focusing) 方式在芯片内生成微液滴<sup>[17-18]</sup>。

### 1.2.3 微液滴特性研究和氨基酸包埋检测分析

利用微流控芯片生成油包水 (w/o) 的微液滴，通过包埋含有 pET30a-mCherry 的 *E. coli* 细胞并检测不同时间点荧光蛋白的表达量，测定由不同表面活性剂组成的微液滴对细胞活性的影响作用。根据微液滴的形态学检测，对生成的微液滴的稳定性进行研究。参照 Kendall 等研究方法<sup>[19-20]</sup>对微液滴的分子扩散情况进行

研究。

氨基酸的荧光检测采用双酶偶联法<sup>[10,21-22]</sup>。以谷氨酸与荧光底物 Amplex UltraRed 反应后的混合体系作为水相,以添加非离子型表面活性剂的矿物油为油相,生成包埋氨基酸反应体系的皮升体积微液滴,并对微液滴进行在线的荧光检测和筛选。通过类似方法对苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸也进行了检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 微液滴的生成

如图 3 所示,利用流动聚焦 (Flow focusing) 方式生成微液滴,通过改变油、水两相的流速可获得理想大小的微液滴。

实验结果显示,自行设计的芯片生成的微液滴具有良好的单分散性(微液滴间相互独立)和均一性,微液滴直径可控制在 20–50  $\mu\text{m}$  范围内,生成速度每分钟 600–1 200 个。

### 2.2 微液滴的生物活性兼容性

油包水 (w/o) 微液滴作为微反应器用于细



图 3 微液滴的生成

Fig. 3 Generation of monodispersed micro-droplets on the microfluidic chip. The 14 pL aqueous droplets (30  $\mu\text{m}$ ) were generated in mineral oil containing surfactant by flow-focusing. Scale=100  $\mu\text{m}$ .

胞培育或者代谢产物的反应,都要求微液滴有较好的生物兼容性,因而油相组分,尤其是表面活性剂的选择非常重要<sup>[11]</sup>。相对于离子型表面活性剂,非离子型表面活性剂对细胞和蛋白不造成强静电作用力的损害,因此,具有更好的生物活性兼容性。本研究对目前使用较多的 w/o 非离子型表面活性剂 Span80 和 Abil EM90 进行了测定。实验中以分别添加 3% (V/V) Span80 和 3% (V/V) Abil EM90 的矿物油作为油相,对添加 IPTG 的 *E. coli* BL21(DE3) (含有 pET30a-mCherry) 细胞培养液进行微液滴包埋,并对微液滴进行 37  $^{\circ}\text{C}$  静置培养。通过测定不同时间点微液滴的荧光值 (Ex/Em: 490 nm/585 nm) 来反映微液滴内的细胞蛋白生物表达量。如图 4 所示,添加表面活性剂 Abil EM90 的矿物油包埋的 *E. coli* 细胞具有更高的荧光蛋白表达量,表面活性剂 Abil EM90 比 Span80 有更好的生物兼容性 (图 4)。故本实验最终选择含 3% (V/V) Abil EM90 的矿物油作为油相。

### 2.3 微液滴的稳定性

微液滴需要在一定时间内保持稳定存在,从而为其检测筛选提供基础。因此,稳定性是

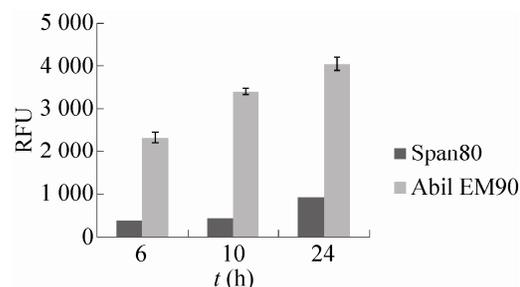


图 4 表面活性剂对微液滴内细胞活性的影响

Fig. 4 Effect of surfactants on cell viability in micro-droplets.

微液滴的重要指标。本实验将谷氨酸等 4 种氨基酸分别进行微液滴包埋, 对生成的微液滴在离线条件下室温培养, 利用显微照相系统观察不同时间点微液滴的稳定状态。实验结果表明, 微液滴室温培养 20 h 后形态仍然保持稳定(图 5)。对比培养前, 98% 的微液滴无融合和破裂, 可以有效满足细胞产生相关荧光信号检测的要求。

## 2.4 微液滴的分子扩散

在培养过程中, 如果微液滴内包埋的水相物质扩散到液滴外, 并进入到另外一个微液滴内, 必然影响检测和分选的效率, 所以微液滴间低分子扩散与否非常重要。好的微液滴应该是包埋物质既没有渗透到微液滴外, 也没有在液滴间发生交叉污染。扩散性是微液滴作为互不干扰的独立微反应器的重要指标。参照 Kendall 等人提出的方法对微液滴分子扩散情况进行了检验<sup>[19-20]</sup>。

采用含 3% (V/V) Abil EM90 的矿物油作为油相, 5 mmol/L 钙黄绿素、10 mmol/L  $\text{CuCl}_2$ 、0.1 mmol/L 谷氨酸混合液作为水相 1, 乳化成的

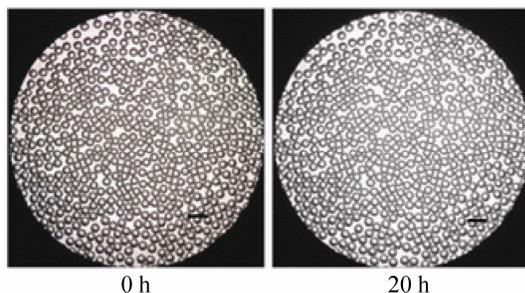


图 5 微液滴稳定性

Fig. 5 Stability of micro-droplets. Micro-droplets from the custom-designed droplet microfluidic system were stable and did not coalesce after 20 h incubation at room temperature. Scale=100  $\mu\text{m}$ .

微液滴为 E1; 50 mmol/L  $\text{EDTANa}_2$  作为水相 2, 乳化成的微液滴为 E2; 水相 1 和水相 2 以体积比 1 : 5 混合作为水相 3, 乳化成的微液滴为 E3; 微液滴 E1 和微液滴 E2 以体积比 1 : 5 混合为微液滴 ME, 测定 4 种微液滴在不同时间点的荧光值 (Ex/Em: 490 nm/515 nm)。结果表明, 室温培养 20 h 后, 微液滴 ME 的荧光值几乎没有变化, 微液滴间的分子交换 < 2%, 对微液滴的检测和分选影响可以忽略 (图 6)。因此, 选择含 3% (V/V) Abil EM90 的矿物油作为油相生成的微液滴内物质无明显的分子扩散, 可作为微反应体系。

## 2.5 氨基酸包埋微液滴的检测与分选

在上述研究基础上, 利用搭建的液滴微流控芯片系统对氨基酸进行了检测与分选。实验以两种浓度的谷氨酸 (10  $\mu\text{mol/L}$  和 20  $\mu\text{mol/L}$ ) 为检测对象, 通过液滴包埋, 在图 2 所示的芯片中生成含有两种谷氨酸浓度的微液滴, 生成

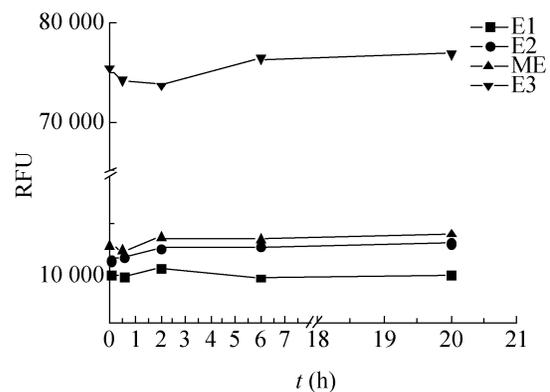


图 6 微液滴间的分子交换

Fig. 6 Aqueous phase exchange between micro-droplets. The sample E3 represents as a positive control with high fluorescence signal. The sample E1 and E2 represents the droplets alone and the sample ME represents the droplets after mix of E1 and E2.

速度为每分钟 600 个。

两种不同浓度氨基酸包埋微液滴的荧光检测信号如图 7 所示。其中,包埋  $20\ \mu\text{mol/L}$  谷氨酸的微液滴荧光值高于设定的阈值,软件自动给出信号到高压放大器,产生偏转电压使微液滴受介电力作用偏转至“SORT”孔道,微液滴被分选,而包埋  $10\ \mu\text{mol/L}$  谷氨酸的微液滴不会被分选,流向“WST”孔道。实验结果表明,本研究设计的液滴微流控芯片系统具有氨基酸检测与分选功能,检测分选通量可达到每分钟 600 个。

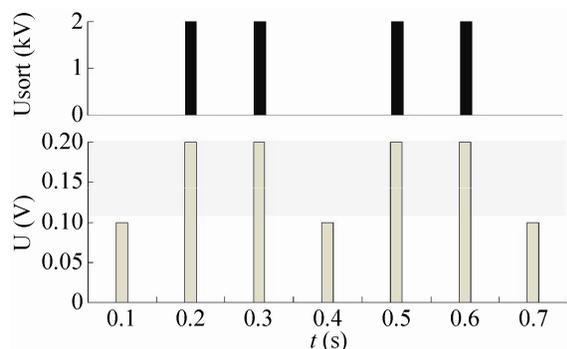


图 7 谷氨酸微液滴的荧光检测与分选

Fig. 7 Detection and sorting of the mixed micro-droplets with  $10\ \mu\text{mol/L}$  and  $20\ \mu\text{mol/L}$  glutamic acid, respectively. When the PMT signal from the fluorescence in the micro-droplet with  $20\ \mu\text{mol/L}$  glutamic acid is higher than the threshold (in gray), the dielectrophoretic sorting is triggered via the response of AC pulse (black bar) and micro-droplet will flow into ‘SORT’ channel. Otherwise, the sorting is not triggered and the micro-droplet with  $10\ \mu\text{mol/L}$  glutamic acid will flow into ‘WST’ channel.

### 3 总结

液滴微流控芯片的优势在于可以形成相互独立无干扰的单个微液滴反应器,如果将每一个微液滴看成一个微反应器或者细胞培养器进

行高通量的检测与分选,将为研究外分泌胞外产物(代谢产物)及其工程菌株的定向进化提供强有力的筛选平台。

本研究搭建的液滴微流控芯片高通量筛选平台具有设计简单、操作方便等特点。利用该平台进行了包埋氨基酸的微液滴的生成、微液滴特性研究和荧光检测与分选实验。实验结果表明:1)生成的微液滴直径可控,大小均一、稳定,微液滴内反应体系小,可节省大量试剂;2)微液滴可以长时间稳定存在,满足试剂反应或细胞培养对时间的要求;3)微液滴的包埋物在测试微液滴中稳定存在,微液滴间无交叉污染,不会对后期微液滴的荧光检测和分选产生影响;4)微液滴的筛选通量可达每分钟 600 个。这些实验为酶及氨基酸等细胞分泌物的检测分析和相应生产菌株的筛选提供了高通量筛选的可能,对液滴微流控芯片在定向进化方面的应用奠定了基础。

### REFERENCES

- [1] Parekh S, Vinci VA, Strobel RJ. Improvement of microbial strains and fermentation processes. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2000, 54(3): 287–301.
- [2] Olsen M, Iverson B, Georgiou G. High-throughput screening of enzyme libraries. *Curr Opin Biotechnol*, 2000, 11(4): 331–337.
- [3] Baret JC, Miller OJ, Taly V, et al. Fluorescence-activated droplet sorting (FADS): efficient microfluidic cell sorting based on enzymatic activity. *Lab Chip*, 2009, 9(13): 1850–1858.
- [4] Lin BC, Qin JH. *Microfluidics Based Laboratory on a Chip*. Beijing: Science Press, 2006 (in Chinese).  
林炳承, 秦建华. 微流控芯片实验室. 北京: 科学出版社, 2006.

- [5] King KR, Wang SH, Irimia D, et al. A high-throughput microfluidic real-time gene expression living cell array. *Lab Chip*, 2007, 7(1): 77–85.
- [6] White AK, Vanlinsberghe M, Hamidi M, et al. High-throughput microfluidic single-cell RT-qPCR. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(34): 13999–14004.
- [7] Courtois F, Olguin LF, Whyte G, et al. Controlling the retention of small molecules in emulsion microdroplets for use in cell-based assays. *Anal Chem*, 2009, 81(8): 3008–3016.
- [8] Teh SY, Lin R, Hung LH, et al. Droplet microfluidics. *Lab Chip*, 2008, 8(2): 198–220.
- [9] Umbanhowar PB, Prasad V, Weitz DA. Monodisperse emulsion generation via drop break off in a coflowing stream. *Langmuir*, 2000, 16(2): 347–351.
- [10] Agresti JJ, Antipov E, Abate AR, et al. Ultrahigh-throughput screening in drop-based microfluidics for directed evolution. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(9): 4004–4009.
- [11] Marcoux PR, Dupoy M, Mathey R, et al. Micro-confinement of bacteria into w/o emulsion droplets for rapid detection and enumeration. *Colloids Surfaces A: Physicochem Eng Aspects*, 2011, 377(1): 54–62.
- [12] Kang LF, Chung BG, Langer R, et al. Microfluidics for drug discovery and development: from target selection to product lifecycle management. *Drug Discov Today*, 2008, 13(1): 1–13.
- [13] Joensson HN, Andersson-Svahn H. Droplet microfluidics--a tool for protein engineering and analysis. *Lab Chip*, 2011, 11(24): 4144–4147.
- [14] Huo DQ, Liu Z, Hou CJ, et al. Recent advances on optical detection methods and techniques for cell-based microfluidic systems. *Chin J Anal Chem*, 2010, 38(9): 1357–1365 (in Chinese).
- 霍丹群, 刘振, 侯长军, 等. 微流控芯片光学检测技术在细胞研究中的应用与进展. *分析化学*, 2010, 38(9): 1357–1365.
- [15] Zhou JW, Ellis AV, Hans VN. Recent developments in PDMS surface modification for microfluidic devices. *Electrophoresis*, 2010, 31(1): 2–16.
- [16] Shao JB, Wu L, Jin QH, et al. Fabrication and application of a novel cell culture microchip. *Chin J Biotech*, 2008, 24(7): 1253–1257 (in Chinese).
- 邵建波, 吴蕾, 金庆辉, 等. 一种细胞培养微芯片的制作及应用. *生物工程学报*, 2008, 24(7): 1253–1257.
- [17] Ward T, Faivre M, Abkarian M, et al. Microfluidic flow focusing: Drop size and scaling in pressure versus flow-rate-driven pumping. *Electrophoresis*, 2005, 26(19): 3716–3724.
- [18] Chen JS, Jiang JH. Droplet microfluidic technique: microdroplets formation and manipulation. *Chin J Anal Chem*, 2012, 40(8): 1293–1300 (in Chinese).
- 陈九生, 蒋稼欢. 微流控液滴技术: 微液滴生成与操控. *分析化学*, 2012, 40(8): 1293–1300.
- [19] Mastrobattista E, Taly V, Chanudet E, et al. High-throughput screening of enzyme libraries: *in vitro* evolution of a  $\beta$ -galactosidase by fluorescence-activated sorting of double emulsions. *Chem Biol*, 2005, 12(12): 1291–1300.
- [20] Kendall DA, MacDonald RC. A fluorescence assay to monitor vesicle fusion and lysis. *J Biol Chem*, 1982, 257(23): 13892–13895.
- [21] Sun L, Zhang H, Yuan HL, et al. A double-enzyme-coupled assay for high-throughput screening of succinic acid-producing strains. *Appl Microbiol*, 2013, 114(6): 1696–1701.
- [22] Baret JC, Miller OJ, Taly V, et al. Fluorescence-activated droplet sorting (FADS): efficient microfluidic cell sorting based on enzymatic activity. *Lab Chip*, 2009, 9(13): 1850–1858.

(本文责编 陈宏宇)