前沿与综述

微流控芯片在昆虫研究中的应用*

欧英琪** 薛 堃***

（中央民族大学生命与环境科学学院，北京 100081）

摘 要 与昆虫学相关的研究是生命科学最早的研究领域之一，在害虫防治、资源昆虫利用和模式生物（例如黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*）等研究领域有重要意义。微流控芯片（Microfluidic chip）也称作“芯片实验室”（Lab-on-a-chip），是 21 世纪一项重要的技术发明，目前被广泛应用于细胞生物学、发育生物学、体外诊断等领域。随着微流控芯片技术发展的不断深入，与昆虫研究相关的微流控芯片不断出现，促进了昆虫细胞、胚胎发育、昆虫行为和害虫防治等研究领域的发展。本文针对应用于昆虫学领域的微流控芯片研究进行综述。

关键词 微流控芯片；细胞培养；昆虫行为；害虫防治；果蝇芯片

Application of microfluidic chips in insect studies

OU Ying-Qi** XUE Kun***

(College of Life and Environmental Sciences, Minzu University of China, Beijing 100081, China)

Abstract Entomology is one of the earliest schools of the life sciences and plays an important role in pest control, utilization of insect resources and research on model organisms (such as *Drosophila melanogaster*). Microfluidic chips, also known as “lab-on-a-chip”, are an important technological invention in the 21st century that have been widely applied in cell biology, developmental biology and *in vitro* diagnosis (IVD). With the continuous development of related technology, research on microfluidic chips suitable for application in entomology has been increasingly published, promoting the development of research on insect cells, embryo development, insect behavior and pest control. This paper reviews progress in the application of microfluidic chips in entomology.

Key words microfluidic chip; cell culture; insect behaviors; pest control; fly-on-a-chip

微流控芯片概念的提出始于 1990 年（Manz *et al.*, 1990），是 21 世纪一项重要的科学技术进步，是现代科技不可或缺的部分，对人类科技进程产生较大的影响（林炳承和秦建华，2008）。微流控芯片常使用硅、玻璃和高分子聚合物等材料，运用软刻蚀法、注塑法、激光烧蚀法等方法制备而成，其面积约数平方厘米，可将多种基本操作单元，如样品混合、反应、分离、检测，细胞培养、分选、裂解等在其上灵活组合、规模集成，并由微通道形成网络，以可控流体贯穿整个系统（通过外设的蠕动泵、注射泵，内置的电渗驱动等机械驱动或非机械驱动方式对流体进行操作和控制），自动化地实现常规化学或生物实验室的各种功能，因此微流控芯片也被称作“芯片实验室”（Lab-on-a-chip）（林炳承和秦建华，2005）。微流控芯片集成化和自动化的特点可使样品处理时间大幅缩短，检测分辨率\灵敏度显著提高，并让消耗和成本大幅降低，进而使微流控芯片整体设备趋于小型化（肖雅静，2011）。随着微流控芯片的发展，微流控技术在分析化学

*资助项目 Supported projects：中央民族大学学术团队引领计划（2019QNYL22）

**第一作者 First author，E-mail：18301217@muc.edu.cn

***通讯作者 Corresponding author，E-mail：xuekun@muc.edu.cn

收稿日期 Received：2021-1-25；接受日期 Accepted：2021-09-28

（Sriram *et al.*，2017）、细胞生物学（李瑞等，2013；陈钰等，2019）、即时检验（Jung *et al.*，2015；Xia *et al.*，2016）、药物化学（Shang *et al.*，2019；Kitaeva *et al.*，2020）等许多领域发挥着重要的作用。近年来，国内外针对哺乳动物研究发展出多种微流控芯片技术，如芯片细胞共培养技术（段肖肖和刘思秀，2020）、芯片组织培养技术（Shim *et al.*，2019）、器官芯片技术（Maschmeyer and Kakava，2020）、微电极置入技术（Gíménez-Gómez *et al.*，2020；Soscia *et al.*，2020）、实时显微成像技术（Businaro *et al.*，2013；陈钰等，2019）等。

微流控芯片具有多种优势，如自动化的实验流程控制、精细化的流体控制、高度灵活的芯片结构设计和相较于传统培养装置（培养皿、培养瓶、培养袋等）更贴近真实生理环境的培养微环境等（Halldorsson *et al.*，2015）。随着微流控芯片技术发展的不断深入，与昆虫学研究相关的微流控芯片也不断涌现。本文就应用于昆虫相关研究领域的微流控芯片技术进行综述。

1 微流控芯片在昆虫细胞培养及相关研究中的应用

1.1 微流控芯片在昆虫细胞培养中的应用

昆虫细胞培养在细胞生物学实验中发挥着非常重要的作用，微流控芯片可应用于昆虫细胞系和原代细胞的培养中。传统的聚苯乙烯器皿、玻璃培养器皿等进行细胞培养时难以实现自动化的实验流程控制和精细化的流体控制，而微流控芯片可实现小型化、自动化、集成化、并行化的细胞培养过程，因此在细胞生物学中，使用各种微流控装置进行细胞培养越来越普遍（Mehling and Tay，2014）。与此同时，微流控细胞培养装置设计的技术也在迅速发展中（Halldorsson *et al.*，2015）。

最早的微流控昆虫细胞培养芯片主要是用于培养已有的昆虫细胞系，以及将部分细胞生物学操作应用于微流控芯片内培养的昆虫细胞。在此期间，多种不同的昆虫细胞系已成功培养于微流控芯片中。Walker 等（2002）基于聚二甲基硅氧烷（Polydimethylsiloxane，PDMS）软光刻法设计加工了一种带有一对进出口的半开放微流控芯片（图 1：A），其基底为玻璃或培养皿，实现在该芯片中以无灌流培养的方式培养了 Sf9 细胞（草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 卵巢细胞系），并研究了芯片内微通道宽度对 Sf9 细胞生长速度的影响。相似地，Yu 等（2005）也基于加工有不同尺寸微通道的 PDMS 芯片研究了在无灌流培养条件下（图 1：B），微通道几何结构对 Sf9 细胞增殖的影响。Andersson 等（2001）利用玻璃、硅等材料研制了一种微流控芯片（图 1：C），同时通过内置的泵膜和微通道宽度的改变，实现了无阀微泵在微流控芯片上的集成，并以连续灌流培养的方式对 Sf9 细胞进行培养。除了 PDMS 外，常用于制作微流控芯片的材料还有聚甲基丙烯酸甲酯（Polymethyl methacrylate，PMMA）。Abeille 等（2014）设计了一种基于 PMMA 的连续灌流芯片（图 1：D），其内设有多孔膜并夹于上下两层 PMMA 板之间。细胞培养于上层微通道，而新鲜培养基于下层微通道中灌输流动，利用多孔膜的扩散作用给细胞供应养分，有效减小培养基灌流所产生的剪切力对细胞造成的损伤，同时最大程度的保证芯片内细胞的营养需求。在该芯片上成功地实现了 S2 细胞（*Drosophila* Schneider 2，果蝇 S2 胚胎细胞）的连续灌流培养，培养时间长达 5 日。

随后，昆虫原代细胞的微流控芯片培养技术也相继出现。Göbbels 等（2010）使用 PDMS 软光刻法加工了一种设有不同宽度微通道的微流控芯片（图 2：A），并首次将飞蝗 *Locusta migratoria* 原代神经元细胞培养于该芯片中，使神经元细胞存活和生长至少 2 周。Pena 等（2019a，2019b）报道了一种微流控芯片用于培养果蝇的视网膜神经祖细胞（Retinal progenitor cells，RPCs），研究了果蝇 RPCs 的集体迁移行为（图 2：B）。

结合相关文献报道以及作者经验，基于微流控芯片进行昆虫细胞培养与哺乳动物细胞的微流控芯片培养技术并无本质区别。首先，利用微流控芯片结构设计和微机电系统（Micro-Electro-Mechanical System，MEMS），使用高分子材料

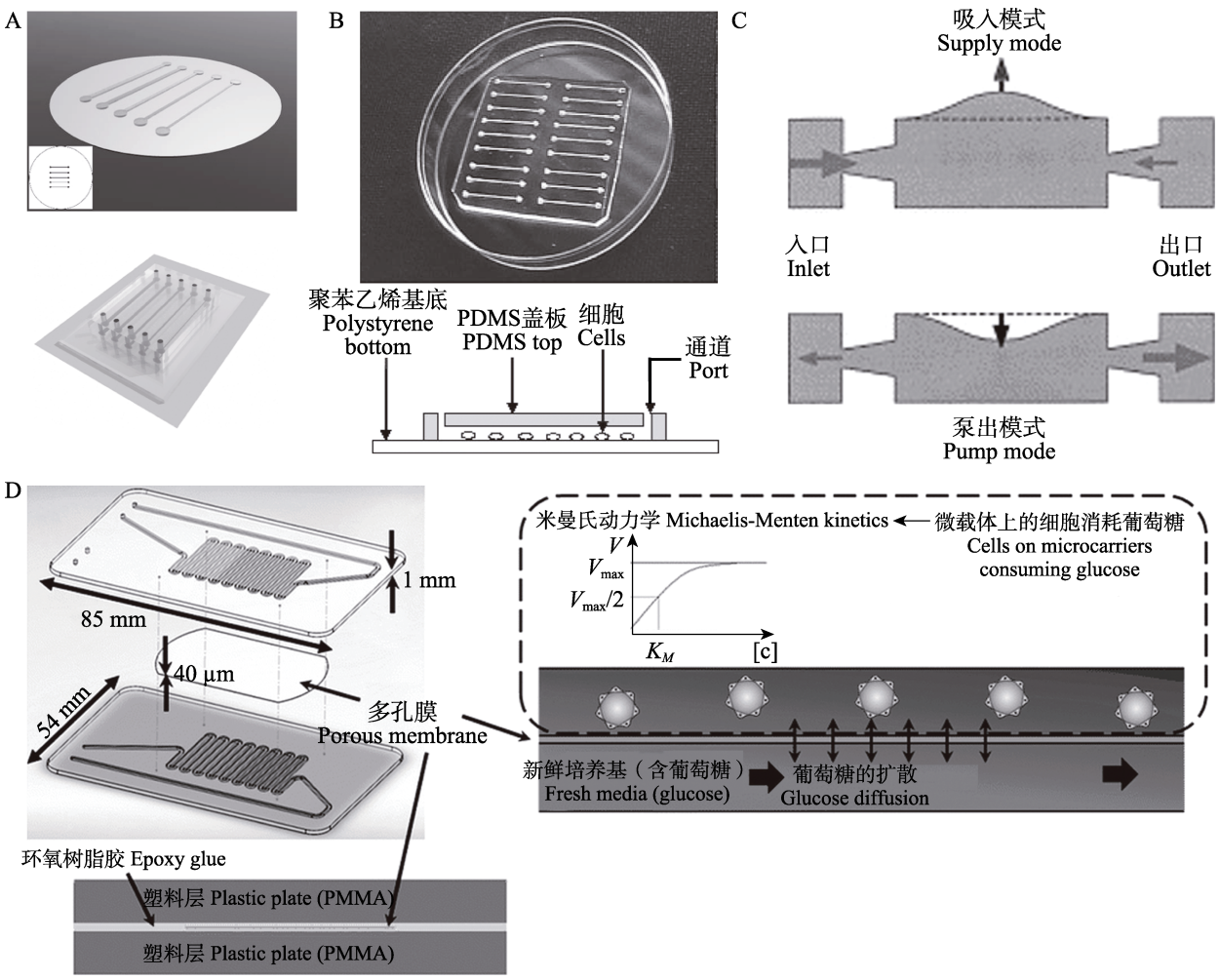

图 1　基于微流控芯片的昆虫细胞系培养

Fig. 1　Culture of insect cell lines using microfluidic chip

A. Walker 等（2002）用于培养 Sf9 细胞的微流控芯片；B. Yu 等（2005）用于培养 Sf9 细胞的微流控芯片；C. Andersson 等（2001）报道的微流控芯片无阀片上微泵原理图；D. Abeille 等（2014）报道的一种基于微流控芯片的连续生物培养器的原理和结构。

A. The microfluidic chip for culture of Sf9 cells reported by Walker *et al.*(2002); B. The microfluidic chip for culture of Sf9 cells reported by Yu *et al.* (2005); C. Schematic of the valve-less diffuser micropump for microfluidic chip reported by Andersson *et al.* (2001); D. Schematic structure of the continuous microcarrier-based cell culture in a benchtop microfluidic bioreactor reported by Abeille *et al.*(2014).

或玻璃等材料上加工出一个设有全密闭或半密闭腔室的微流控芯片，其中应用最广的加工技术为 PDMS 软光刻法（Duffy *et al.*，1998）；其次，利用湿热灭菌或乙醇消毒等方式，杀灭微流控芯片腔室中的微生物，以满足细胞培养的无菌要求；再次，使用表面改性处理技术，使微流控芯片的基底适应细胞贴壁培养的需求；最后，将使用传统培养装置培养的细胞或从体内提取的细胞接种至微流控芯片内进行培养（Göbbels *et al.*，2010；Ziolkowska *et al.*，2010；Abeille *et al.*，2014）。但基于微流控芯片技术进行昆虫细胞培养时，在一些技术细节上还是需要进行优化，如芯片基底表面处理的方式、培养基成分、培养环境条件等。

由于微流控芯片的尺寸大多在毫米至微米级别，与传统原代培养实验中获取到的组织块尺寸相近，因此微流控芯片同样适合用于各种组织在原代细胞培养前的组织解离。Jiang 等（2015）

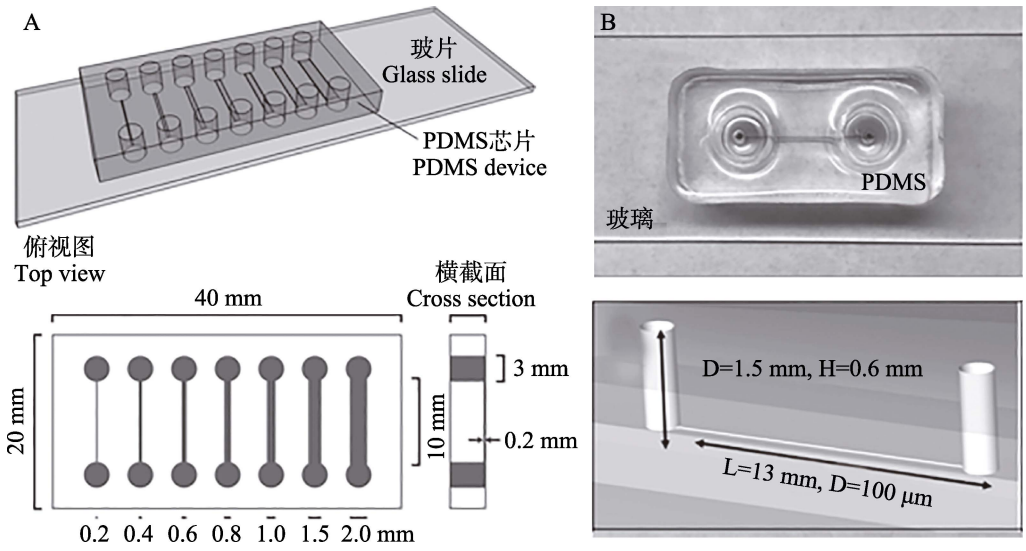

图 2　基于微流控芯片的昆虫原代细胞培养

Fig. 2　Insect primary cell culture using microfluidic chip

A. Göbbels 等（2010）报道的用于培养飞蝗原代神经元细胞的微流控芯片；
B. Pena 等（2019a）报道的用于培养果蝇视网膜神经祖细胞的微流控芯片。
A. Schematic structure of microfluidic chip for culture of neuron from *Locusta migratoria* reported by Göbbels *et al.*(2010); B. Microfluidic chip for culture of Retinal progenitor cells (RPCs) from *Drosophila melanogaster* reported by Pena *et al.*(2019a).

研制了一种利用“漏斗型”通道实现果蝇原代神经元细胞自动分离的微流控芯片（图 3：A）。将经过酶解后的果蝇幼虫中枢神经系统加载于“漏斗型”微通道中，实现上样操作，再使用外加的震荡流场（Oscillatory flow field）将组织解离成单个神经元细胞，最后收集从芯片流出的细胞，培养于培养皿中。Jiang 等（2015）报道的方法利用更温和且可控的震荡流场代替了传统原代培养实验中使用枪头或吸管等工具对组织块的“吹打”操作，可有效地控制原代细胞提取过程中对被提细胞的损伤，确保细胞在温和的环境中充分解离。

基于微流控芯片培养的细胞系可以直接作为生物传感器装置，如基于昆虫细胞或组织的嗅觉传感器可直接将嗅觉相关的分子转化为电信号或荧光强度变化（Bohbot and Vernick，2020），更便捷地应用于食品管理、环境监测和健康管理等需要即时检测的领域中。Mitsuno 等（2015）使用 Sf21 细胞（草地贪夜蛾卵巢细胞）构建了表达昆虫气味受体（Insect odorant receptors，IOR）和钙指示蛋白（Calcium indicator protein，GCaMP3）的细胞系并培养于设有单个腔室的微流控芯片中，从而作为小型气味传感器（图 3：B）。构建的细胞系可通过细胞荧光强度定量检测环境中两种昆虫气味分子的浓度，且该细胞系对待检分子的响应时间小于 13 s。同时，该小型气味传感器的有效性于 2 个月后仍无衰减，有效地解决了现有气味传感器寿命短的问题。相似的，Termtanasombat 等（2016）利用一块 PDMS 芯片和 BAM（Biocompatible anchor for membrane）培养经改造的 Sf21 细胞用于多种气味分子的同时检测（图 3：C）。

1.2　微流控芯片在昆虫病毒学中的应用

昆虫病毒的相关研究中，如病毒感染途径的研究、潜在的抗病毒药物的筛选、昆虫细胞的基因改造等需直接对活病毒进行操作，这可能会给研究人员的健康带来潜在风险。利用微流控芯片开展昆虫细胞病毒侵染相关实验，即可保护研究者，同时也能提高实验效率。Walker 等（2004）基于 PDMS 软光刻法加工了一种具有三通道单出口的微流控芯片（图 4：A），运用芯片中 3 个

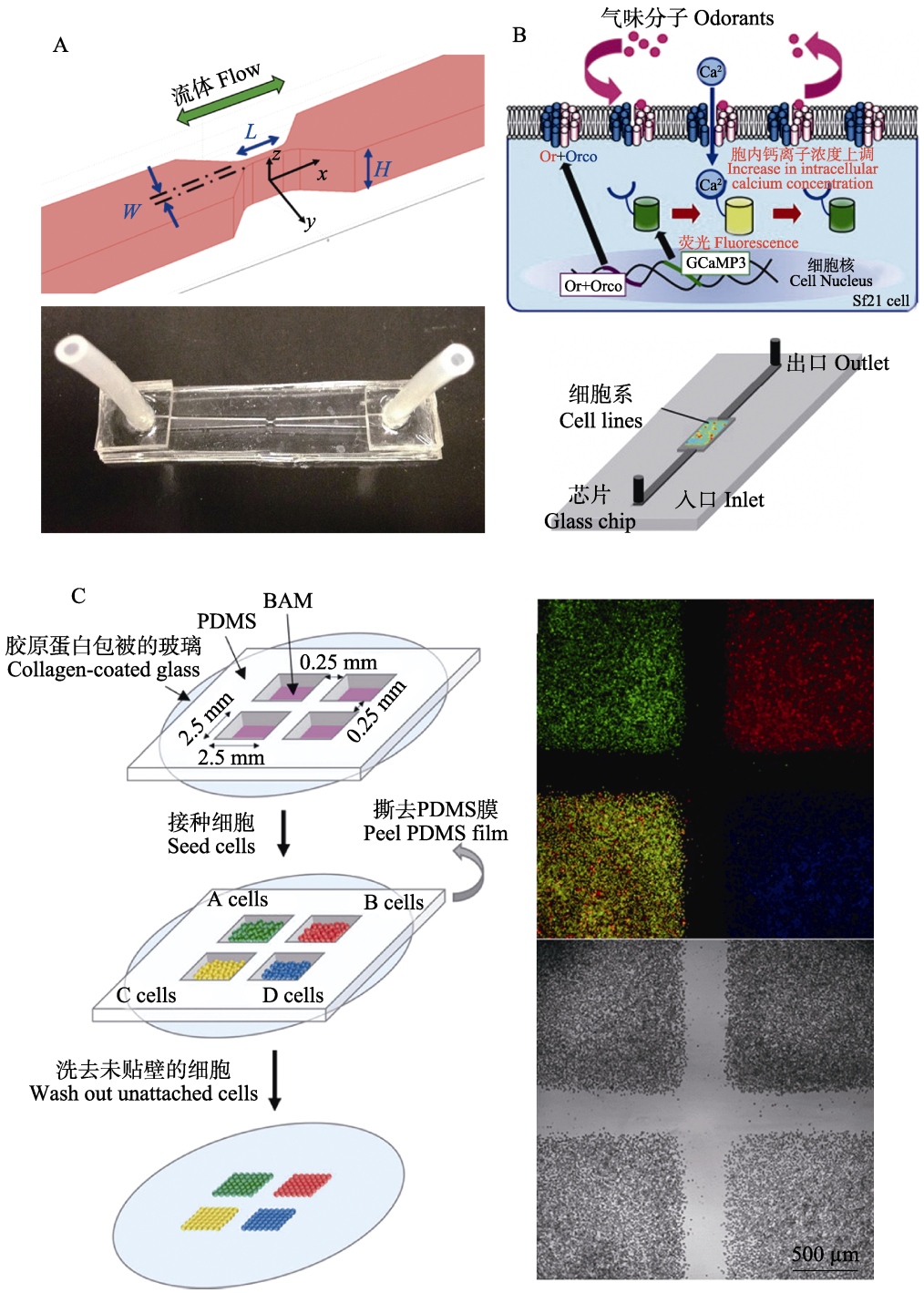

图 3　基于微流控芯片的组织解离器与生物传感器

Fig. 3　Tissue dissociation and biosensor based on microfluidic chip

A. Jiang 等（2015）报道的基于震荡流场的组织解离芯片；B. Mitsuno 等（2015）报道的基于基因改造 Sf21 细胞的微流控生物传感器；C. Termtanasombat 等（2016）报道的昆虫细胞传感器。

A. The microfluidic chip for tissue dissociation based on oscillatory flow field reported by Jiang *et al.*(2015); B. The microfluidic-based biosensor using genetically modified Sf21 cells reported by Mitsuno *et al.*(2015); C. The microfluidic biosensor based on insect cell reported by Termtanasombat *et al.*(2016).

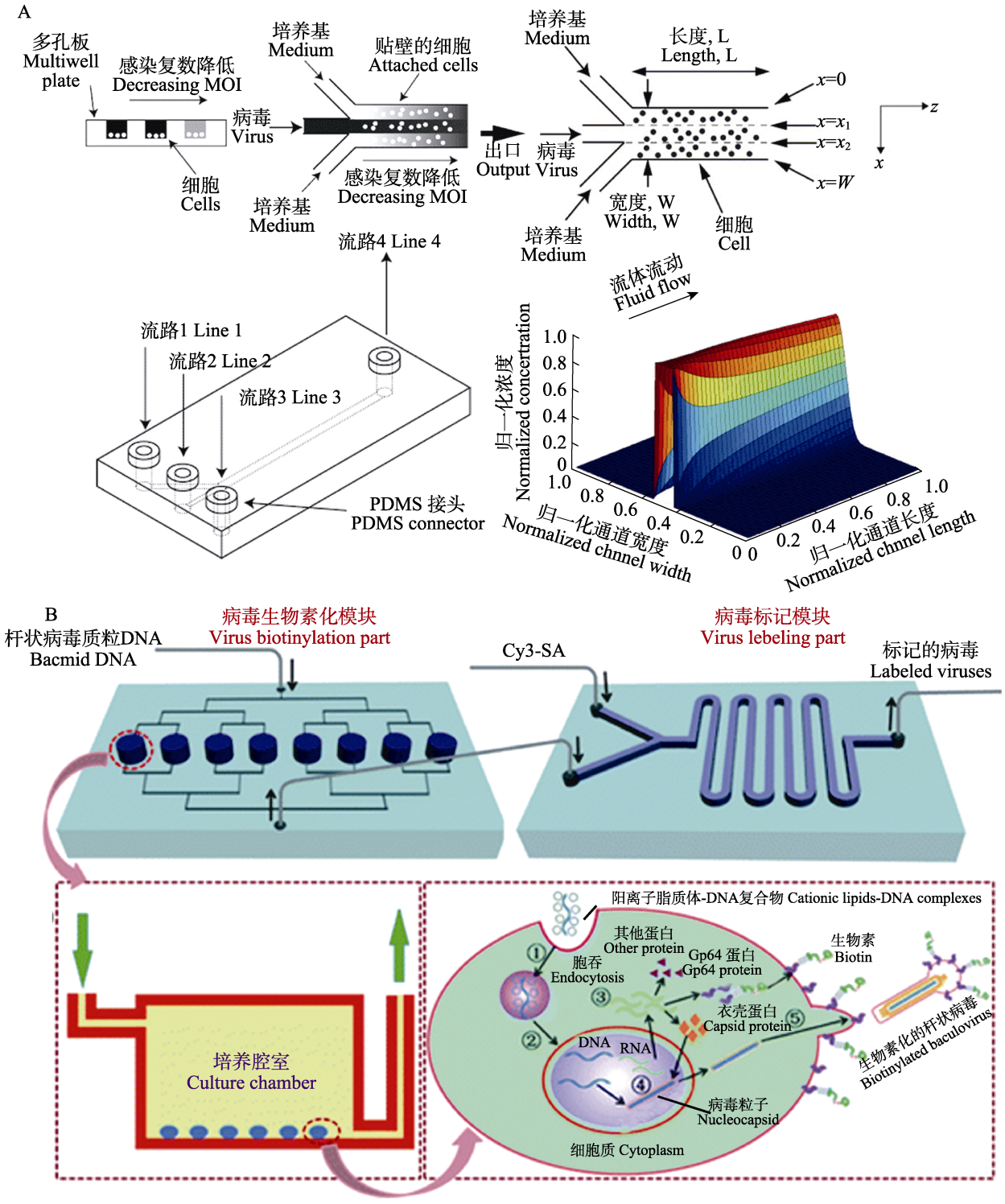

图 4　基于微流控芯片的昆虫病毒研究装置

Fig. 4　Insect viruses research based on microfluidic chip

A. Walker 等（2004）报道的基于层流间溶质自由扩散研究杆状病毒对 Sf9 细胞感染复数的微流控芯片的原理及结构；B. Shu 等（2013）报道的基于微流控芯片的标记杆状病毒生产及纯化装置结构和原理图。

A. Schematic structure of the microfluidic chip for investigation of multiplicity of infection to baculovirus in Sf9 cells, that using free diffusion between laminar flows reported by Walker *et al.*(2004); B. Schematic structure of production and purification of labeled baculovirus based on microfluidic chip reported by Shu *et al.*(2013).

微通道将三路溶液混合并于腔室内生成三路层流，通过病毒在层流间的扩散作用，在腔室内生成杆状病毒的浓度梯度，研究了培养于芯片腔室中的 Sf9 细胞在不同浓度杆状病毒下的感染复数。昆虫细胞杆状病毒表达载体系统广泛应用于基因工程（思越等，2020），优化杆状病毒的浓度可最大化提高蛋白产量，传统方法需要使用多次实验才能完成对杆状病毒浓度的优化，而上述装置的优势在于，利用微流控芯片对流体的精细控制能力，仅需一次实验即可完成对杆状病毒浓度梯度的优化，可有效地提高相关实验的效率。Shu 等（2013）报道了一套微流控芯片（图 4：B），工作时两个芯片首尾相连，上游芯片设有多个平行的可灌流培养 Sf9 细胞的腔室，Sf9 细胞使用重组 Bacmid 质粒转染，使其生产表面展示有生物素受体肽（Biotin acceptor peptide，AP-tag）、生物素连接酶和包膜蛋白融合蛋白，并在这些蛋白的作用下，杆状病毒包膜表面被修饰上生物素，随后灌流至下游芯片。下游芯片通过将连接有链霉亲和素的标记物，如链霉亲和素-碱性磷酸酶（Streptavidin–alkaline phosphatase，SA-AP）、Cy3-链霉亲和素（Cy3-Streptavidin，Cy3-SA）等与上游芯片所生产的病毒混合，使杆状病毒被标记。两个芯片首尾相连同时运作的方式可使研究者在该集成微流控芯片中同时完成细胞培养、细胞转染、病毒培养及病毒标记等的全过程，达到简化病毒标记实验流程的目的，并可有效提高标记杆状病毒的生产效率，且该装置可以自动连续运行，实现病毒的连续生产。

2　微流控芯片在模式生物果蝇中的应用

果蝇与人类具有遗传同源性，还具有繁殖发育迅速、体积小、成本低、易于在实验室培养、伦理限制少等优势，使果蝇成为在遗传学、发育学和神经科学等研究领域中一种重要的模式生物。然而传统果蝇实验方法存在一定局限性，费时费力且通量低，也难以实现对果蝇精细操控。最近，基于微流控芯片的果蝇研究装置，即果蝇芯片（Fly-on-a-chip），有望成为克服这些挑战的强大工具（Zabihihesari *et al.*，2020a）。

2.1　微流控芯片在果蝇发育生物学中的应用

昆虫胚胎是发育生物学的重要实验材料之一，通过研究昆虫胚胎发育过程，既能解决发育生物学科学问题，也可为害虫防治等提供理论支持。利用微流控芯片可对昆虫胚胎进行精确的分选、控制和固定等操作，便于开展相关研究。

昆虫胚胎具有体积小、生长时间短、通体透明等优点，尤其是果蝇的胚胎已是发育生物学研究的理想模型（Fakhoury *et al.*，2009；Markow *et al.*，2009）。在胚胎的研究中，对突变体胚胎的分选需要繁琐的步骤（Furlong *et al.*，2001），使用微流控芯片进行分选，则可极大地提高效率（Ghaemi and Selvaganapathy，2016）。目前细胞生物学常使用激光辅助分选技术分选细胞，此类分选装置一般使用激光作为激发光，使系统识别出目标细胞，再通过多种手段改变目标细胞的运动轨迹，分选出目标细胞，激光辅助分选技术可与微流控芯片结合，实现分选装置的自动化和小型化。Chen 等（2003，2004）报道了一套基于微流控芯片的果蝇胚胎分选装置的设计和仿真结果（图 5：A），利用激光光源和光检器识别出突变的果蝇胚胎，芯片中三路微通道和外置的三通阀控制通道内的流体，将突变和未突变的果蝇胚胎分别转运至两个不同的出口，并分别储存于两个储液池中。该装置具有一定实用潜力，经改造后还可为其他模式生物的胚胎（如斑马鱼胚胎等）和其他小型模式生物（如秀丽线虫等）使用。

微流控芯片精确的流体控制能力可用于对芯片通道或腔室中各环境参数如温度、流速及物质浓度等进行精确控制，便于研究环境的变化对昆虫发育产生的影响。Lucchetta 等（2005）研制了一种微流控芯片（图 5：B），利用两股不同温度的层流，精确地在时间和空间上控制果蝇胚胎不同部位的温度，从而在不同程度上控制一个胚胎前后半部分的发育速度；并进一步通过实验和数值模拟对该芯片中的流体力学和热传递进行了表征，利用对比实验研究了温度在果蝇胚胎

发育中的影响（Lucchetta *et al.*，2006）。Dagani 等（2007）进一步改进了 Lucchetta 等（2005）的装置，提高了这套微流控芯片装置高效自动装配胚胎的效率（图 5：C）。还有其他类型的芯片设计实现对果蝇胚胎的多种操作，例如 Delubac 等（2012）利用芯片中的显微注射器，实现向果蝇胚胎自动注射多种试剂；Levario 等（2013）制作了果蝇胚胎快速捕获及末端成像（End-on imaging）的芯片装置，实现了快速对超过 700 个果蝇胚胎进行末端成像；Morel 等（2009）设计一种可用于多种生物样本培养的 PDMS“贴纸”芯片，并利用其优化了果蝇组织培养。

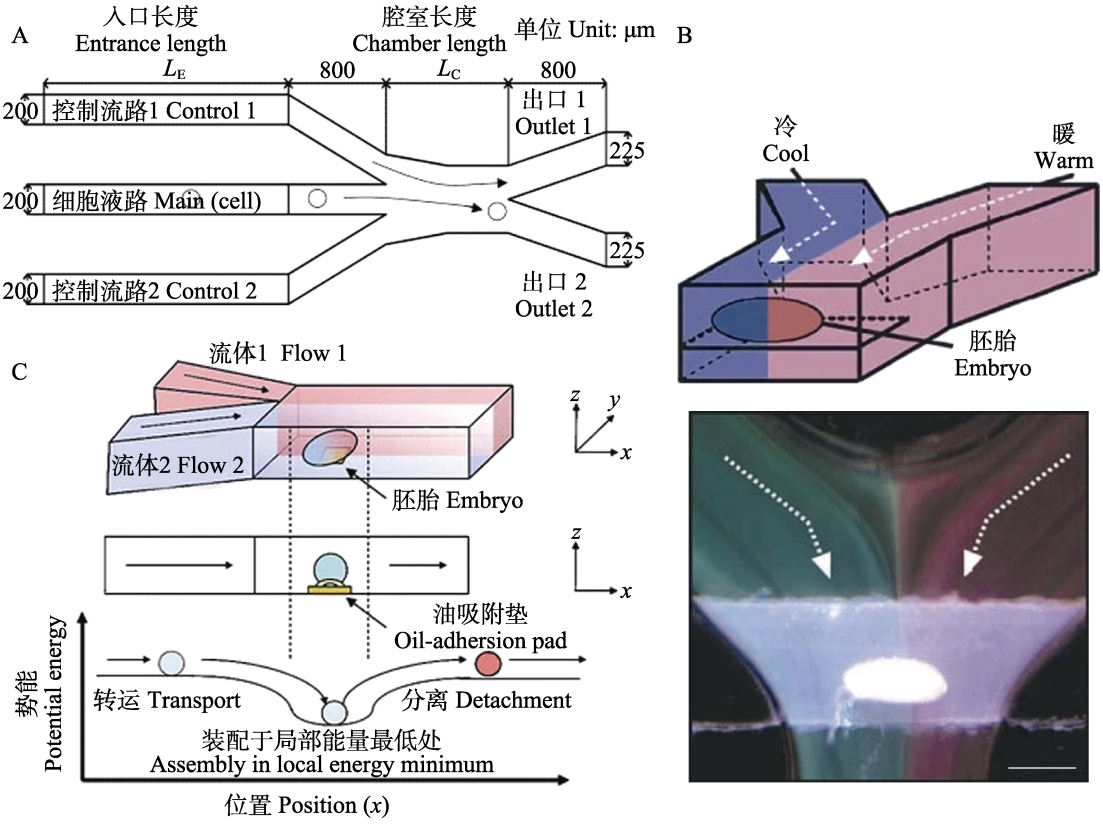

图 5　基于微流控芯片的果蝇胚胎研究装置

Fig. 5　Devices for embryo research of *Drosophila melanogaster* based on microfluidic chip

A. Chen 等（2004）报道的一套基于微流控芯片的果蝇胚胎分选装置；B. Lucchetta 等（2005）研制的通过流体控制果蝇胚胎发育温度的微流控芯片；C. Dagani 等（2007）基于 Lucchetta 等（2005）研制的装置改造的可实现胚胎自动装配的微流控芯片。

A. A sorter for embryo of *Drosophila melanogaster* based on microfluidic chip reported by Chen *et al.*(2004); B. A microfluidic chip for research on embryo of *Drosophila melanogaster* based on laminar flow in different temperature reported by Lucchetta *et al.*(2005); C. A microfluidic chip based on the device designed by Lucchetta *et al.*(2005) enabling drosophila embryos self-assembled reported by Dagani *et al.*(2007).

昆虫的器官发育也有基于微流控芯片的研究。传统研究中对完整的昆虫器官进行操作难度较大，且多为针对解剖后的离体器官进行显微注射或生理监测等，很难进行在体实验和无损伤的持续监测。应用微流控芯片，可以在一定程度上解决上述问题，并对器官发育的影响因素进行在体评价。此类装置主要是基于集成的机械装置调整昆虫虫体的位置，再通过微通道的物质灌注，完成对虫体的造模，最后通过显微镜等外设装置监测昆虫器官的变化。Ardeshiri 等（2016）设计了一种可逆装载、定位和固定果蝇幼虫的微流控芯片（图 6：A），基于负压将幼虫固定于幼虫固定通道，再通过试剂灌流通道向幼虫灌流气体或溶液，使用显微镜观察

果蝇幼虫的状态并分析不同浓度的有毒液体（如叠氮化钠）和气体（如氧气和二氧化碳）对完整果蝇幼虫心脏所产生的瞬态效应。与 Ardeshiri 等（2016）报道的装置类似，Zabihihesari 等（2020b）设计了一种基于微流控芯片的果蝇幼虫操作装置（图 6：B），可用于对果蝇幼虫的定位、固定、局部微量注射以及对心脏活动的记录，其包含动物操作单元、视频获取/处理单元和显微注射单元，并基于矩阵实验室数学软件（Matrix laboratory，MATLAB）开发了控制软件，而动物操作单元由加载幼虫的玻璃毛细管、幼虫固定通道、侧面吸附固定通道和微针插入通道组成。开展实验前借助毛细管将幼虫加载到幼虫固定通道，调整幼虫位置后，侧面吸附固定通道提供负压将幼虫固定，再使用微针向幼虫心管（Heart tube）注射神经递质 5-羟色胺，最后视频获取/处理单元记录实验过程，并从录制的视频中分析幼虫的心跳信号。

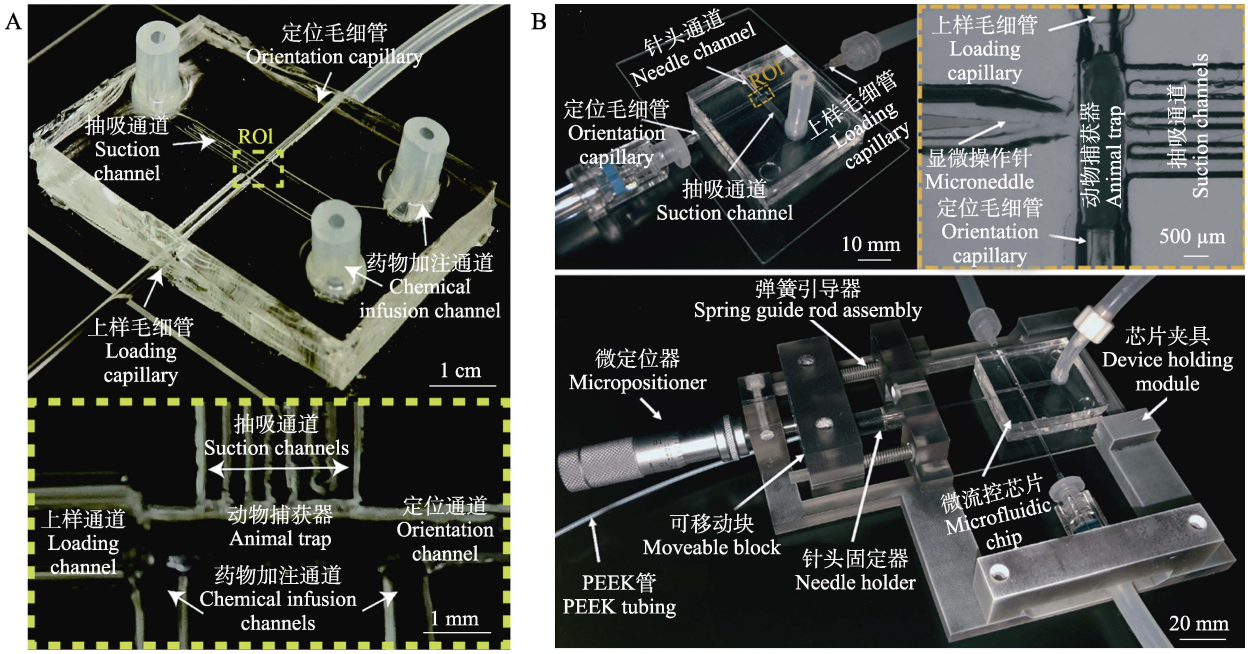

图 6　基于微流控芯片的果蝇幼虫显微注射装置

Fig. 6　Devices for larva microinjection of *Drosophila melanogaster* based on microfluidic chip

A. Ardeshiri 等（2016）报道的一种用于果蝇幼虫定位、固定、化学暴露和心脏活动监测的微流控芯片；B. Zabihihesari 等（2020b）报道的一种果蝇幼虫局部显微注射和心脏监测的微流控芯片。

A. A hybrid microfluidic chip used for *Drosophila* orientation, immobilization, chemical exposure, and monitoring of cardiac activities reported by Ardeshiri *et al.*(2016); B. A novel hybrid microfluidic device for localized microinjection and heart monitoring of intact *Drosophila melanogaster* reported by Zabihihesari *et al.*(2020b).

2.2　微流控芯片在果蝇神经生物学研究中的应用

昆虫具有不同类型的感觉神经元，可感知各种环境刺激（如机械、视觉和化学刺激等），神经元将信号传递到中枢神经系统（Central nervous system，CNS），并可对刺激产生反应。果蝇幼虫可用于遗传学和神经生物学等领域的相关研究（Ghaemi *et al.*，2016）。然而，因果蝇幼虫的尺寸过小，且如果不加以固定，幼虫观测过程中会不断移动，影响成像的效果。虽然可使用解剖或麻醉剂（氯仿和异氟烷等）的传统固定方案来阻止其运动，但同时也削弱了神经活动，影响了动物的神经生理状态，而通过微流控芯片技术可利用定制的芯片结构设计实现对果蝇幼虫的固定（Ghannad-Rezaie *et al.*，2012；Chaudhury *et al.*，2017）。微流控技术可以通过控制芯片内结构和腔室形状的手段固定果蝇幼虫，本文主要介绍以下 2 种常用的手段，其一是通过气控装置改变芯

片内腔室的形状，以物理方法“夹”住果蝇的幼虫；另一种手段是通过微加工技术构建与幼虫互补的芯片结构，“卡”住幼虫。这些基于微流控技术的方法可保持果蝇幼虫的活力，同时降低对果蝇幼虫操作的难度，将果蝇幼虫固定住后，再通过灌流为幼虫提供食物或灌流相关物质完成对果蝇幼虫的造模，造模完成后可与传统方法一样，开展后续研究。

Ghannad-Rezaie 等（2012）报道了基于二氧化碳气体和机械力控制的微流控芯片（图 7：A），可在非侵入且不使用化学试剂的条件下固定果蝇幼虫。该芯片利用 PDMS 具有一定弹性的性质，通过负压将果蝇幼虫固定于芯片的中心腔室中，腔室上方设有通道，可使用注射泵向腔室内的幼虫递送食物，使其在芯片内存活时间达到 1-10 h 以上，并进行荧光成像，同时还可用于果蝇的各种体内成像。Ghaemi 等（2017）设计了一种 PDMS 加工而成的 3D 机械夹微流控芯片（图 7：B），用于固定果蝇幼虫，因其与幼虫的形状基本互补，可将幼虫的活动限制至（10±30）μm 范围内。Chaudhury 等（2017）报道了一种利用液压控制果蝇幼虫固定的微流控芯片（图 7：C），该芯片设有一个腔室，腔室上方设有一块由液压控制 PDMS 膜。由泵引入冷却剂使 PDMS 膜下沉，可在 3 min 内创造一个低温环境冷冻麻醉及固定幼虫，并进行高分辨率活体成像。微流控芯片可在无需解剖的情况下实现果蝇幼虫的固定，更便捷地实现对果蝇幼虫真正生理

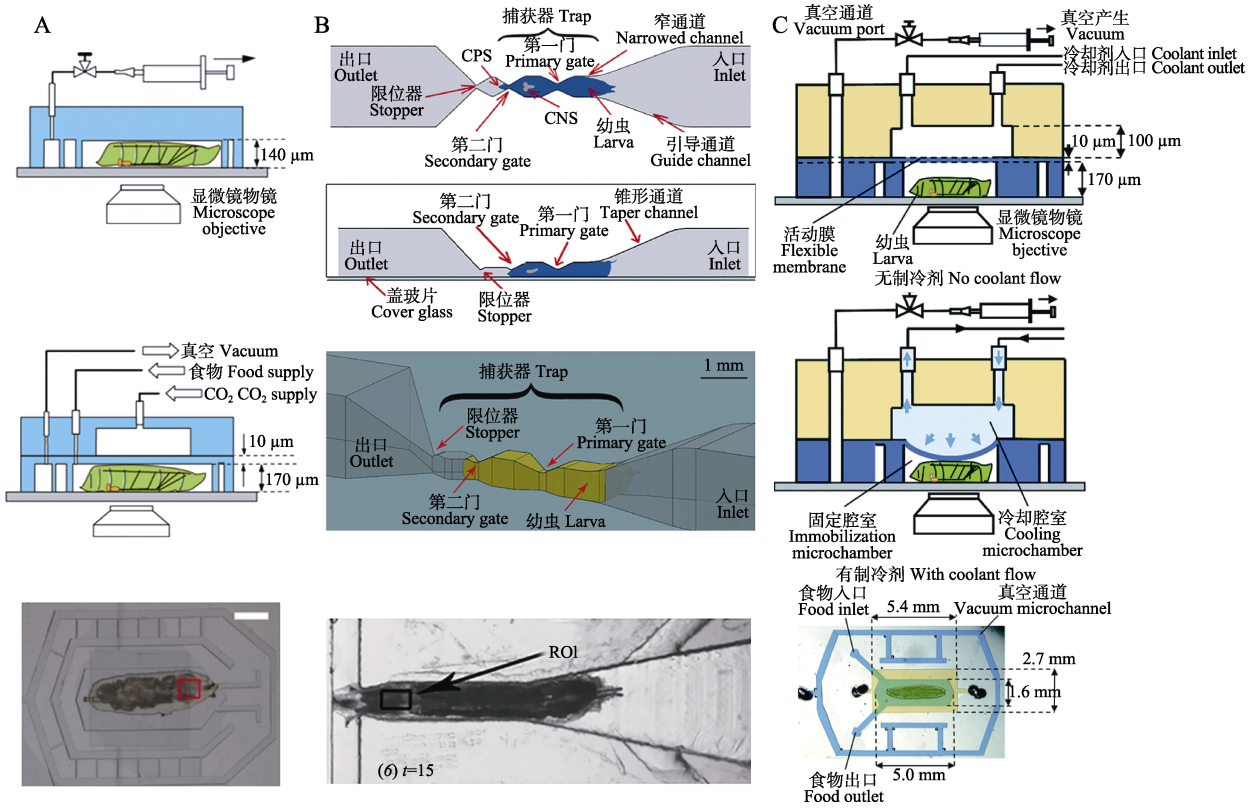

图 7　基于微流控芯片的果蝇幼虫固定装置

Fig. 7　Devices for larva fixation of *Drosophila melanogaster* based on microfluidic chip

A. Ghannad-Rezaie 等（2012）报道的一种基于二氧化碳气体和机械力固定果蝇幼虫的微流控芯片；

B. Ghaemi 等（2017）报道的一种使用 3D 机械夹固定果蝇幼虫的微流控芯片；

C. Chaudhury 等（2017）报道的一种基于液压控制固定果蝇幼虫的微流控芯片。

A. A microfluidic chip for fixation of *Drosophila melanogaster* larva using carbon dioxide and mechanism force reported by Ghannad-Rezaie *et al.*(2012); B. A microfluidic chip for fixation of *Drosophila melanogaster* larva by 3D trap reported by Ghaemi *et al.*(2017); C. A microfluidic chip for fixation of *Drosophila melanogaster* larva by hydraulic control reported by Chaudhury *et al.* (2017).

反应的观测，因此基于微流控芯片的果蝇幼虫固定技术可广泛用于果蝇幼虫各种器官的高分辨率成像中。此外相关微流控装置经过改造也可用于其他昆虫的成像研究中。

2.3　微流控芯片在果蝇行为学中的应用

成虫属活动性较大的虫态，其具有多种趋性（趋光性、趋化性、趋地性等）、复杂的行为（取食、交配、产卵等）和不同的寄主要求（栖息寄主、取食寄主、产卵寄主）等（苏建伟等，2001），因此昆虫的成虫常被用作昆虫生物学研究中的实验材料。对成虫的研究能拓宽人们对遗传学、学习和记忆、神经科学、发育和衰老的理解，也可应用于新药研发及毒性筛选等用途（He and Jasper，2014；Navawongse *et al.*，2016；Zabihihesari *et al.*，2020a）。

学习和记忆是大脑的基本功能，使人类能够适应不断变化的环境，因此大量神经生物学和心理学的研究聚焦于大脑学习和记忆功能的研究，其中果蝇成虫体积小、便于开展行为学研究等优点，被广泛运用于相关研究（Navawongse *et al.*，2016）中。基于微流控芯片开展果蝇行为学相关的研究可有效提高实验效率和精度，而针对不同的行为学实验，需要设计不同的微流控芯片结构和使用方法用以实现不同的功能。Navawongse 等（2016）报道了一种基于微流控芯片研究果蝇对食物动态反应的装置（图 8：A），其由 PMMA 加工而成，内设有一个饲养果蝇的腔室和一条用于喂食的微通道，用于研究果蝇的记忆和学习。实验时，果蝇被装配至腔室后，食物（5%蔗糖

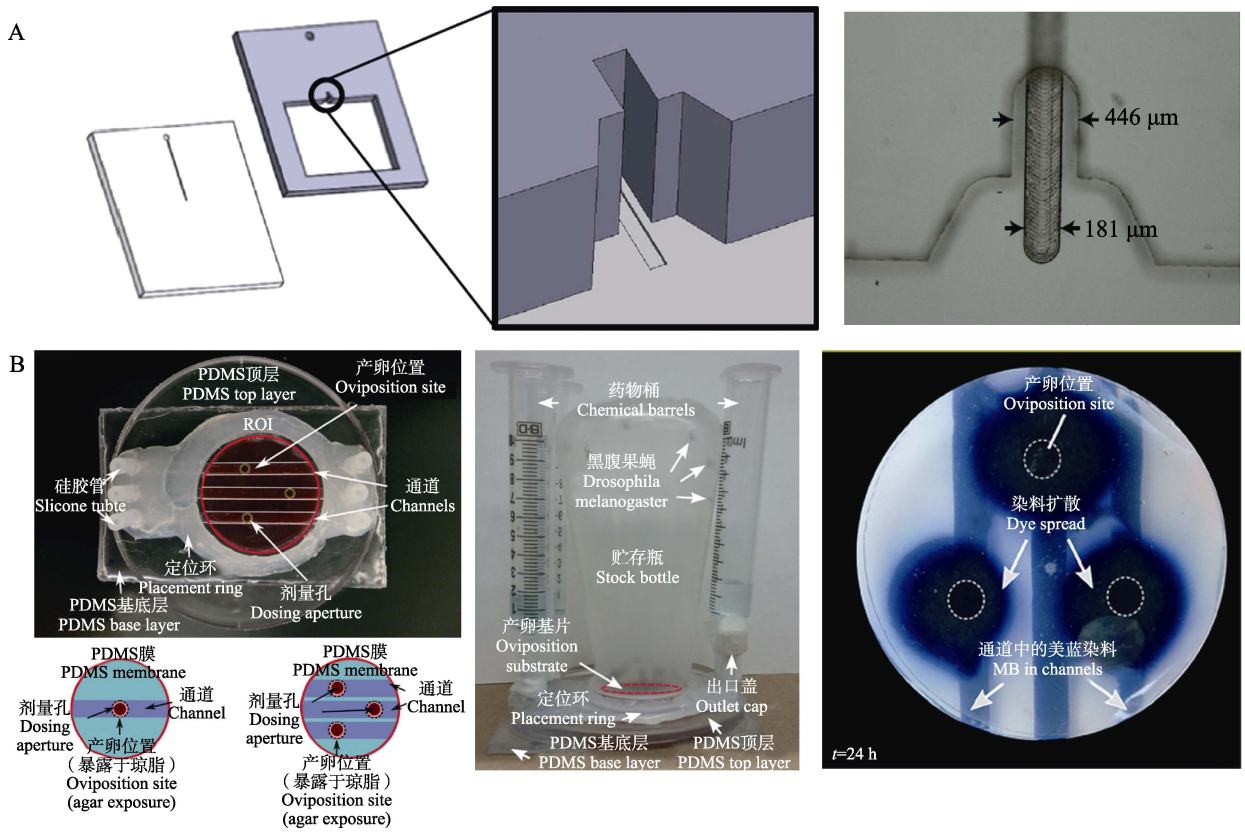

图 8　基于微流控芯片的果蝇行为学研究装置

Fig. 8　Devices for behavioral research of *Drosophila melanogaster* based on microfluidic chip

A. Navawongse 等（2016）报道的一种基于微流控芯片研究果蝇对刺激和食物记忆的装置；

B. Leung 等（2016）报道的基于微流控芯片研究化学筛选试验中果蝇产卵行为的装置。

A. A microfluidic-based device for memory research to food resource on *Drosophila melanogaster* reported by Navawongse *et al.*(2016); B. A microfluidic-based device for determination of oviposition of *Drosophila melanogaster* in chemical screening assays reported by Leung *et al.*(2016).

溶液）在注射泵的控制下灌入腔室或从腔室中吸出，同时芯片外有规律地使用发光二极管（Light-emitting diode，LED）或扬声器等装置刺激果蝇，考察果蝇对刺激和食物出现规律的记忆，而果蝇在实验全程的摄食行为均被两台彩色摄像机记录，用于后期的路径分析等结果分析。该装置操作简易且成本低廉，可便捷地分析果蝇的记忆和学习能力，并且其经改造后还可用于其他小型昆虫的研究中。

昆虫产卵行为和存活率是化学筛选试验（Chemical screening assays）中行为反应和生物适应性的两个重要评价指标。传统化学筛选试验一般使用葡萄汁琼脂平板等进行筛选，待检物质会配置成不同浓度的平板，再将琼脂平板切成若干扇形琼脂块后在培养皿中拼成圆形并放入昆虫进行实验（Bahadorani and Hilliker，2009）。传统方法操作相对繁琐，因此 Leung 等（2016）基于传统方法研制了一种可用于小型昆虫产卵行为研究的微流控芯片（图 8：B），该芯片底层 PDMS 中设有 3 条通道用于运输待测物溶液，上层 PDMS 对应设有个圆形通孔用于向琼脂扩散待测物溶液，不同浓度的待测物溶液通过 PDMS 中的 3 组通道和通孔分别扩散至琼脂中，形成 3 个含有不同浓度待测物的琼脂凝胶，并利用果蝇展示了昆虫产卵行为研究。实验前先向芯片内浇注琼脂，待琼脂成型后，将含有果蝇成虫的储存容器倒扣与芯片上，使容器内的果蝇可在 3 个通孔内自由产卵，最后统计果蝇的产卵量。该装置优势在于其可有效地避免了传统化学筛选试验中手工切割凝胶带来的随机误差，提高了结果的精度，同时简化了操作步骤，提高试验效率。

3 结论与展望

昆虫的所有发育阶段，包括胚胎、幼虫和成虫，以及各个阶段的细胞、组织和器官等，均可被广泛应用于遗传学、发育生物学、神经科学等领域的研究中。基于微流控芯片技术的装置能有效提高昆虫相关研究的效率、自动化程度以及实验精度等，为昆虫相关研究提供了新的平台，微流控芯片技术应用于相应的昆虫研究当中可以有效提高研究质量。目前，已报道的微流控芯片主要集中于昆虫细胞培养和果蝇相关研究中。微流控芯片为昆虫细胞培养提供一个密闭或半密闭的腔室，可进行原代培养相关实验操作或对培养的昆虫细胞进行转染等。近年来基于微流控芯片技术，可以克服先前的人工操作费时且精度低等问题，有望成为果蝇研究的强大工具。果蝇胚胎的微流控芯片可实现对胚胎的发育环境的精准控制；果蝇幼虫的微流控芯片则多致力于解决对幼虫的精密操作，如显微注射、固定、荧光成像等；果蝇成虫的微流控芯片则多应用于成虫整体的行为学研究中。

基于微流控技术开展昆虫研究有如下优势：1）自动化。相较于传统方法，微流控技术往往更易实现自动化或半自动化实验，可有效减轻研究者的负担。2）试剂试样消耗小。由于微流控芯片的腔室和通道等结构的尺寸一般较小，因此试剂试样消耗量小，便于节约珍贵的试剂试样资源。3）实验的精细化控制。微流控芯片可通过外设或内置的泵、阀、气控装置等精确控制芯片内的环境（如控制培养的昆虫细胞周围的流体环境、改变芯片腔室内气压、通过改变腔室形状固定果蝇幼虫等），进而使实验在更加可控的环境中开展。4）结构可定制。微流控芯片内部结构可灵活设计，根据研究者的实验需求定制的微流控芯片将实现不同功能，同时也可将已报道的芯片结构有机组合，实现全新的功能。

尽管以果蝇为研究对象的微流控芯片已被广泛报道，但是除果蝇外的昆虫作为研究对象的微流控芯片却鲜有报道。就原理而言不同研究对象的微流控芯片并无显著不同，目前已报道的果蝇芯片经过改造后大多也可应用于其他小型昆虫（如蚜虫、粉虱等）甚至其他小型动物（如线虫、斑马鱼和红蜘蛛等）的相关研究中。然而，目前相关应用仍未普及，其主要原因有以下两点。一方面，目前微流控芯片商业化仍不足，且微流控商业化的主要方向仍是临床检验、基础医学研究等领域，据我们所知，迄今仍无应用于昆虫生物学研究的商品化微流控芯片，这极大地限制了微流控技术在昆虫生物学中的应用。另一方

面，由于商品化昆虫微流控芯片的缺失，开展相关研究需要自行设计加工微流控芯片，但微流控芯片是高度交叉的研究领域，使用微流控芯片开展昆虫研究需要具备一定工程知识和能力，如三维设计与建模、机械微加工等。同时开展微流控芯片加工需要特殊实验仪器，如光刻机、甩胶机等，昆虫研究者往往难以同时满足上述条件。尽管目前已有微流控芯片定制化服务，但其成本相对较高，这也限制了微流控芯片昆虫研究的发展。因此，大规模使用微流控芯片开展昆虫研究的前提在于相关微流控芯片的产业化及低成本的微流控芯片定制服务。相关微流控芯片商品化仍有待进一步开发，并且微流控芯片的定制成本也有待进一步降低，届时基于昆虫生物学研究的微流控芯片将充分体现出其巨大的发展空间和潜力。

参考文献 (References)

Abeille F, Mittler F, Obeid P, Huet M, Kermarrec F, Dolega ME, Navarro F, Pouteau P, Icard B, Gidrol X, Agache V, Picollet-D' hahan N, 2014. Continuous microcarrier-based cell culture in a benchtop microfluidic bioreactor. *Lab on a Chip*, 14(18): 3510–3518.

Andersson H, Wijngaart VDW, Nilsson P, Enoksson P, Stemme G, 2001. A valve-less diffuser micropump for microfluidic analytical systems. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 72(3): 259–265.

Ardeshiri R, Hosseini L, Amini N, Rezai P, 2016. Cardiac screening of intact *Drosophila melanogaster* larvae under exposure to aqueous and gaseous toxins in a microfluidic device. *Rsc. Advances*, 6(70): 65714–65724.

Bahadorani S, Hilliker AJ, 2009. Biological and behavioral effects of heavy metals in *Drosophila melanogaster* adults and larvae. *Journal of Insect Behavior*, 22(5): 399–411.

Bohbot JD, Vernick S, 2020. The emergence of insect odorant receptor-based biosensors. *Biosensors*, 10(3): 26.

Businaro L, De Ninno A, Schiavoni G, Lucarini V, Ciasca G, Gerardino A, Belardelli F, Gabriele L, Mattei F, 2013. Cross talk between cancer and immune cells: Exploring complex dynamics in a microfluidic environment. *Lab on a Chip*, 13(2): 229–239.

Chaudhury AR, Insolera R, Hwang R, Fridell Y, Collins C, Chronis N, 2017. On chip cryo-anesthesia of *Drosophila* larvae for high resolution *in vivo* imaging applications. *Lab on a Chip*, 17(13): 2303–2322.

Chen CC, Zappe S, Sahin O, Zhang XJ, Fish M, Scott M, Solgaard O, 2004. Design and operation of a microfluidic sorter for *Drosophila* embryos. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 102(1): 59–66.

Chen CC, Zappe S, Sahin O, Zhang XJ, Furlong EEM, Fish M, Scott M, Solgaard O, 2003. Microfluidic switch for embryo and cell sorting. 12th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems. Boston: 659–662.

Chen Y, Yang CH, Fan YL, Lan T, Lan Y, Pei SZ, Deng YL, Ma H, 2019. Development of an integrated device for cell culture and online observation in space. *Life Science Instruments*, 17(3): 35–40. [陈钰, 杨春华, 樊云龙, 兰天, 蓝钰, 裴思竹, 邓玉林, 马宏, 2019. 一种空间细胞培养与在线观测一体化装置的研制. 生命科学仪器, 17(3): 35–40.]

Dagani GT, Monzo K, Fakhoury JR, Chen C, Sisson JC, Zhang X, 2007. Microfluidic self-assembly of live *Drosophila* embryos for versatile high-throughput analysis of embryonic morphogenesis. *Biomedical Microdevices*, 9(5): 681–694.

Delubac D, Highley CB, Witzberger Krajcovic M, Ayoob JC, Furbee EC, Minden JS, Zappe S, 2012. Microfluidic system with integrated microinjector for automated *Drosophila* embryo injection. *Lab on a Chip*, 12(22): 4911–4919.

Duan XX, Liu SX, 2020. Research progress of cell co-culture technology based on microfluidic chip. *Journal of Fudan University* (*Natural Science*), 59(2): 245–252. [段肖肖, 刘思秀, 2020. 基于微流控芯片的细胞共培养技术研究进展. 复旦学报(自然科学版), 59(2): 245–252.]

Duffy CD, McDonald JC, Olivier JAS, George MW, 1998. Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). *Analytical Chemistry*, 70(23): 4974–4984.

Fakhoury JR, Sisson JC, Zhang X, 2009. Microsystems for controlled genetic perturbation of live *Drosophila* embryos: RNA interference, development robustness and drug screening. *Microfluidics and Nanofluidics*, 6(3): 299–299.

Furlong EEM, Profitt D, Scott MP, 2001. Automated sorting of live transgenic embryos. *Nature Biotechnology*, 19(2): 153–156.

Ghaemi R, Selvaganapathy PR, 2016. Microfluidic devices for automation of assays on *Drosophila Melanogaster* for applications in drug discovery and biological studies. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 17(9): 822–836.

Ghaemi R, Rezai P, Nejad FR, Selvaganapathy PR, 2017. Characterization of microfluidic clamps for immobilizing and imaging of *Drosophila melanogaster* larva's central nervous

system. *Biomicrofluidics*, 11(3): 034113.

Ghannad-Rezaie M, Wang X, Mishra B, Collins C, Chronis N, 2012. Microfluidic chips for *in vivo* imaging of cellular responses to neural injury in *Drosophila* larvae. *PLoS ONE*, 7(1): e29869.

Gíménez-Gómez P, Rodriguez-Rodriguez R, Rios JM, Perez-Montero M, Gutiérrez-Capitán M, Plaza JA, Gonzalez E, Munoz-Berbel X, Jiménez-Jorquera C, 2020. Self-calibrating and multiplexed electrochemical lab on chip for cell culture analysis and high-resolution imaging. *Lab on a Chip*, 20(4): 823–833.

Göbbels K, Thiebes AL, Ooyen A, Schnakenberg U, Braunig P, 2010. Low density cell culture of locust neurons in closed-channel microfluidic devices. *Journal of Insect Physiology*, 56(8): 1003–1009.

Halldorsson S, Lucumi E, Gómez-Sjöberg R, Fleming RMT, 2015. Advantages and challenges of microfluidic cell culture in polydimethylsiloxane devices. *Biosensors and Bioelectronics*, 63: 218–231.

He Y, Jasper H, 2014. Studying aging in *Drosophila*. *Methods*, 68(1): 129–133.

Jiang L, Kraft R, Restifo LL, Zohar Y, 2015. Dissociation of brain tissue into viable single neurons in a microfluidic device. 2015 9th IEEE International Conference on Nano/Molecular Medicine & Engineering (NANOMED). Honolulu: 29–32.

Jung W, Han J, Choi JW, Ahn CH, 2015. Point-of-care testing (POCT) diagnostic systems using microfluidic lab-on-a-chip technologies. *Microelectronic Engineering*, 132: 46–57.

Kitaeva KV, Rutland CS, Rizvanov AA, Solovyeva VV, 2020. Cell culture based *in vitro* test systems for anticancer drug screening. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8(322): 1–9.

Leung JCK, Hilliker AJ, Rezai P, 2016. An integrated hybrid microfluidic device for oviposition-based chemical screening of adult *Drosophila melanogaster*. *Lab on a Chip*, 16(4): 709–719.

Levario TJ, Zhan M, Lim B, Shvartsman SY, Lu H, 2013. Microfluidic trap array for massively parallel imaging of *Drosophila* embryos. *Nature Protocols*, 8(4): 721–736.

Li R, Xu JD, Deng YL, 2013. Microfluidic chip for cell culture and its applications. *Space Medicine & Medical Engineering*, 26(4): 338–342. [李瑞, 徐建栋, 邓玉林, 2013. 微流控细胞培养芯片及其应用. 航天医学与医学工程, 26(4): 338–342.]

Lin BC, Qin JH, 2005. Laboratory on a microfluidic chip. *Chinese Journal of Chromatography*, 23(5): 456–463. [林炳承, 秦建华, 2005. 微流控芯片实验室. 色谱, 23(5): 456–463.]

Lin BC, Qin JH, 2008. Visualizing Illustration of Lab-on-chip. Bejing: Science Press. 4–14. [林炳承, 秦建华, 2008. 图解微流控芯片实验室. 北京: 科学出版社. 4–14.]

Lucchetta EM, Lee JH, Fu LA, Patel NH, Ismagilov RF, 2005. Dynamics of *Drosophila* embryonic patterning network perturbed in space and time using microfluidics. *Nature*, 434(7037): 1134–1138.

Lucchetta EM, Munson MS, Ismagilov RF, 2006. Characterization of the local temperature in space and time around a developing *Drosophila* embryo in a microfluidic device. *Lab on a Chip*, 6(2): 185–190.

Manz A, Graber N, Widmer Há, 1990. Miniaturized total chemical analysis systems: A novel concept for chemical sensing. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 1(1): 244–248.

Markow TA, Beall S, Matzkin LM, 2009. Egg size, embryonic development time and ovoviviparity in *Drosophila* species. *Journal of Evolutionary Biology*, 22(2): 430–434.

Maschmeyer I, Kakava S, 2020. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. 1–32.

Mehling M, Tay S, 2014. Microfluidic cell culture. *Current Opinion in Biotechnology*, 25: 95–102.

Mitsuno H, Sakurai T, Namiki S, Mitsuhashi H, Kanzaki R, 2015. Novel cell-based odorant sensor elements based on insect odorant receptors. *Biosensors and Bioelectronics*, 65: 287–294.

Morel M, Bartolo D, Galas JC, Dahan M, Studer V, 2009. Microfluidic stickers for cell- and tissue-based assays in microchannels. *Lab on a Chip*, 9(7): 1011–1013.

Navawongse R, Choudhury D, Raczkowska M, Stewart JC, Lim T, Rahman M, Toh AGG, Wang Z, Claridge Chang A, 2016. *Drosophila* learn efficient paths to a food source. *Neurobiology of Learning and Memory*, 131: 176–181.

Pena CD, Zhang S, Majeska R, Venkatesh T, Vazquez M, 2019a. Invertebrate retinal progenitors as regenerative models in a microfluidic system. *Cells*, 8(10): 1301–1301.

Pena CD, Zhang S, Markey M, Venkatesh T, Vazquez M, 2019b. Collective behaviors of *Drosophila*-derived retinal progenitors in controlled microenvironments. *PLoS ONE*, 14(12): e0226250.

Shang M, Soon RH, Lim CT, Khoo BL, Han J, 2019. Microfluidic modelling of the tumor microenvironment for anti-cancer drug development. *Lab on a Chip*, 19(3): 369–386.

Shim S, Belanger MC, Harris AR, Munson JM, Pompano RR, 2019. Two-way communication between ex vivo tissues on a microfluidic chip: Application to tumor-lymph node interaction. *Lab on a Chip*, 19(6): 1013–1026.

Shu Y, Lu W, Liu S, Xu N, Wang L, Zhang L, Zheng Z, Pang D,

Wang H, Zhang Z, 2013. Site-specific labeling of baculovirus in an integrated microfluidic device. *Lab on a Chip*, 13(5): 860–865.

Si Y, Zhu YC, Song XY, Lou YN, Cheng LF, 2020. Advances in the development of vaccines using insect cell baculovirus expression vector system. *Journal of Tropical Medicine*, 20(8): 1117–1121. [思越, 朱一超, 宋曦玉, 罗亚妮, 程林峰, 2020. 利用昆虫细胞杆状病毒表达载体系统研制疫苗的研究进展. 热带医学杂志, 20(8): 1117–1121.]

Soscia DA, Lam D, Tooker AC, Enright HA, Triplett M, Karande P, Peters SKG, Sales AP, Wheeler EK, Fischer NO, 2020. A flexible 3-dimensional microelectrode array for *in vitro* brain models. *Lab on a Chip*, 20(5): 901–911.

Sriram G, Bhat MP, Patil P, Uthappa UT, Jung HY, Altalhi T, Kumeria T, Aminabhavi TM, Pai RK, Madhuprasad, Kurkuri MD, 2017. Paper-based microfluidic analytical devices for colorimetric detection of toxic ions: A review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 93: 212–227.

Su JW, Fan WM, Wang HT, Xuan WJ, Sheng CF, 2001. Technology system for adult controlling of pest insect. *Entomological Knowledge*, 38(6): 405–409. [苏建伟, 范伟民, 王红托, 宣维健, 盛承发, 2001. 浅谈害虫成虫防治技术. 昆虫知识, 38(6): 405–409.]

Termtanasombat M, Mitsuno H, Misawa N, Yamahira S, Sakurai T, Yamaguchi S, Nagamune T, Kanzaki R, 2016. Cell-based odorant sensor array for odor discrimination based on insect odorant receptors. *Journal of Chemical Ecology*, 42(7): 716–724.

Walker GM, Ozers MS, Beebe DJ, 2002. Insect cell culture in microfluidic channels. *Biomedical Microdevices*, 4(3): 161–166.

Walker GM, Ozers MS, Beebe DJ, 2004. Cell infection within a microfluidic device using virus gradients. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 98(2): 347–355.

Xiao YJ, 2011. Research on the detection methods and technology of microfluidic chip based on image processing. Master dissertation. Tianjin: Hebei University of Technology. [肖雅静, 2011. 基于图像处理的微流控芯片检测方法与技术研究. 硕士学位论文. 天津: 河北工业大学.]

Xia Y, Si J, Li Z, 2016. Fabrication techniques for microfluidic paper-based analytical devices and their applications for biological testing: A review. *Biosensors and Bioelectronics*, 77: 774–789.

Yu H, Meyvantsson I, Shkel IA, Beebe DJ, 2005. Diffusion dependent cell behavior in microenvironments. *Lab on a Chip*, 5(10): 1089–1095.

Zabihihesari A, Hilliker AJ, Rezai P, 2020a. Fly-on-a-chip: Microfluidics for *Drosophila melanogaster* studies. *Integrative Biology*, 11(12): 425–443.

Zabihihesari A, Hilliker AJ, Rezai P, 2020b. Localized microinjection of intact *Drosophila melanogaster* larva to investigate the effect of serotonin on heart rate. *Lab on a Chip*, 20(2): 343–355.

Ziolkowska K, Jedrych E, Kwapiszewski R, Lopacinska J, Skolimowski M, Chudy M, 2010. PDMS/glassmicrofluidic cell culture system for cytotoxicity tests and cells passage. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 145(1): 533–542.