

研究报告



基于微流控的真菌单细胞捕获和培养

赵莹彤^{1,3,4} 浑婷婷^{1,3} 詹悦维^{1,3} 范婷文^{1,3} 赵峰^{1,3} 钞亚鹏² 孙艳^{*1,3,4}

1 北京航空航天大学生物与医学工程学院 生物力学与力生物学教育部重点实验室 北京 100191

2 传感技术联合国家重点实验室 中国科学院微生物研究所 北京 100101

3 北京航空航天大学生物医学工程高精尖创新中心 北京 100083

4 传感技术联合国家重点实验室 上海 200050

摘要:【背景】真菌单细胞培养在研究细胞异质性及细胞生长特性等方面十分重要,因此需要建立简单便捷的方法对真菌单细胞进行培养与观察。【目的】基于微流控建立一种真菌单细胞的捕获及培养方法,同时直观地对单细胞进行定位和实时观察。【方法】利用 L-edit 设计芯片图案并利用等离子键合的方法制备微流控芯片;通过注射泵将红酵母菌溶液及里氏木霉孢子溶液进样以实现单细胞捕获;采用台盼蓝染色法测定酵母细胞的存活率;利用显微镜对酵母单细胞及木霉孢子的萌发、生长、繁殖过程进行观察。【结果】所制备的芯片形状完好,可实现酵母或孢子的单细胞捕获;酵母的捕获率为 25.00%±1.38%;分别于 0、2、4、6 h 对酵母进行观察,可看到酵母出芽过程;培养至 48 h,芯片上酵母细胞的存活率与游离培养条件下的存活率无显著性差异;分别于 0、3、6、9 h 对单个孢子进行观察,可以看到孢子萌发以及菌丝生长情况,且直至 120 h 菌丝仍在生长。【结论】设计并制备了一种用于真菌单细胞捕获及定位培养的微流控芯片,这是此种芯片在真菌单细胞培养中的首次应用。细胞可在此微流控芯片上正常生长至少 2 d,并可实现 5 d 及更长时间的培养,此方法可对真菌单细胞进行直观、定位的实时观察,有望用于多种微生物单细胞的生理、遗传性状研究,以及原生质体融合育种研究。

关键词: 微流控, 真菌, 酵母, 孢子, 单细胞

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31470942, 11421202, 61227902, 11072021); National Key Research and Development Program of China (2016YFC1100704)

*Corresponding author: Tel: 86-10-82315946; E-mail: sunyan@buaa.edu.cn

Received: 09-02-2018; Accepted: 04-07-2018; Published online: 20-07-2018

基金项目: 国家自然科学基金(31470942, 11421202, 61227902, 11072021); 国家重点研发计划(2016YFC1100704)

*通信作者: Tel: 010-82315946; E-mail: sunyan@buaa.edu.cn

收稿日期: 2018-02-09; 接受日期: 2018-07-04; 网络首发日期: 2018-07-20

Single cell capture and culture of fungi based on microfluidic

ZHAO Ying-Tong^{1,3,4} HUN Ting-Ting^{1,3} ZHAN Yue-Wei^{1,3} FAN Ting-Wen^{1,3}
ZHAO Feng^{1,3} CHAO Ya-Peng² SUN Yan^{*1,3,4}

1 School of Biological Science and Medical Engineering, Beihang University, Key Laboratory for Biomechanics and Mechanobiology of Ministry of Education, Beijing 100191, China

2 State Key Laboratory of Transducer Technology, Institute of Microbiology Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

3 Beijing Advanced Innovation Centre for Biomedical Engineering, Beihang University, Beijing 100083, China

4 State Key Laboratory of Transducer Technology, Shanghai 200050, China

Abstract: [Background] Single cell culture of fungi is very important to study cell heterogeneity and cell growth characteristics. Therefore, it is necessary to establish a simple and convenient method for culturing and observing fungal single cells. **[Objective]** To establish a method for capturing and culturing the single cell of fungi based on microfluidic. At the same time, localization and real-time observation of single cell will be done. **[Methods]** L-edit was used to design the pattern and the plasma bonding was used to produce the microfluidic chip. *Rhodotorula glutinis* solution and *Trichoderma reesei* spore solution were injected by syringe pump to capture single cell. Trypan blue was used to determine the survival rate of yeast cells. Germination, growth and reproduction of yeast single cells and spore were observed under microscope. **[Results]** The microfluidic chip was intact and can be used in single cell capture of yeast or spore. The capture rate of the yeast was 25.00%±1.38%. The budding process of yeast cells was observed at 0, 2, 4 and 6 h. There was no significant difference between the survival rate of yeast cultured in chip and in shaking culture until 48 h. The process of spore germination and mycelium growth was observed at 0, 3, 6 and 9 h. Moreover, the mycelium kept growing until 120 h. **[Conclusion]** A microfluidic chip was designed and produced to capture, culture and localization the single cell of Fungi. This is the first application of this kind of chip in the fungal single cell culture. The cell can grow normally in this chip for at least 2 days, and 5 days even longer cell culture could be achieved by this way. The microfluidic chip can achieve intuitionistic localization and real-time observation of fungal single cell. It has the potential to study physiological and genetic characters of a variety of microorganism.

Keywords: Microfluidic, Fungi, Yeast, Spore, Single cell

真菌是一种真核生物, 具有种类繁多、分布广泛、数量庞大等特点。真菌的作用具有两面性, 一方面真菌自身及其代谢产物可用于多种工业原料、食品、医药化合物等的生产制造^[1-2], 另一方面不少真菌会引起环境污染^[3]、植物病害、工业原料及食品腐败、动物和人类疾病^[4]等多种问题。因此, 真菌的相关研究在很多领域都备受关注, 研究者们通过探究不同真菌的特性及生长机制以期最大程度地利用有益菌、抑制有害菌。

研究表明, 即使是同一菌落中的真菌细胞, 在生长、分泌以及 RNA 组成等方面也存在着异质性^[5-6], 因此真菌单细胞分析有利于了解细胞个体的真实状态, 从而促进对真菌生命活动本质及规

律的研究。此外, 很多环境污染、食品污染和疾病的产生是由于少量致病微生物以芽孢状态甚至正常状态存留导致的, 此时由群体数量构建的模型无法描述实际的生长情况^[7], 因此单细胞或低水平的微生物研究显得尤为重要。

在真菌等微生物的单细胞捕获与培养中, 液滴微流控是目前最常应用的方法, 该方法利用不相容的两相来产生高度分散的微小液滴^[8], 随后依靠电力、磁力、光学力、水力自组性、细胞排列等方法^[9-11]使微液滴对单细胞进行包裹并实现细胞的分选与捕获。液滴微流控已经应用于真菌单细胞的代谢活动观察^[12]、产特定代谢产物的真菌单细胞筛选^[13]、真菌单细胞培养及基因工程^[14]等多

种研究。基于液滴微流控的单细胞研究微量且快速，因此可以极大降低分析成本并提高分析效率，但是该方法通常比较复杂，对于实验设备及操作技术的要求较高。微流控法是一种较为新兴的并且具有良好前景的技术，该技术使用微管道(尺寸为数十微米到数百微米)处理或操纵微小流体(体积为纳升到微升)，微流控芯片可以实现高通量、高效率、自动化、低消耗的细胞分选^[15]，并且能与下游分析如基因组学、转录组学相结合^[16]，由于具有微型化、集成化等特征，微流控装置通常被称为微流控芯片。

本文设计并制备了一种用于真菌单细胞捕获和培养的微流控芯片，在芯片上进行了酵母菌和木霉孢子的培养，并且对其性质进行了测定。类似结构的微流控芯片虽然已经应用于动物细胞的相关研究^[17]，但在真菌单细胞的研究中却未见报道。结果表明，该芯片能够实现真菌单细胞的捕获，单细胞可以正常培养至少 48 h 且能观察到酵母出芽、孢子萌发等过程。与现有的研究相比，本微流控芯片操作简单方便，其最大的优点是可以对单细胞进行定位的实时观察，有助于研究真菌细胞的生长增殖特性以及进行细胞筛选。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌种

红酵母 (*Rhodotorula glutinis*)、里氏木霉 (*Trichoderma reesei*) 本实验室保藏。

1.1.2 主要试剂和仪器

SU-8 光刻胶，MicroChem 公司；AR 300-26 显影液，Allresist 公司；SYLGARD 184 硅橡胶 (PDMS)，Dow Corning 公司；台盼蓝，Sigma 公司；酵母膏、胰蛋白胨，OXOID 公司。

DWL 66+激光直写设备，海德堡公司；脱泡搅拌机，Thinky 公司；超声波清洗器，昆山市超声仪器有限公司；低温等离子清洗机，赛奥特(北京)光电技术有限公司；TS-2A 注射泵，中国河北保定兰格恒流泵有限公司；荧光倒置显微镜，

Olympus 公司；Leica TCS SP8 激光共聚焦显微镜，Leica Microsystems 公司。

1.1.3 培养基

YPD 培养基(g/L)：酵母膏 10.0，胰蛋白胨 20.0，葡萄糖 20.0。固体培养基还需加入琼脂粉 20.0。

1.2 试验方法

1.2.1 芯片设计与制备

利用 L-edit 软件绘制芯片外形以及芯片微结构。然后采用激光直写的方法制备光刻胶模板，激光直写通过强度可变的激光束对玻片表面的光刻胶进行变剂量曝光，在显影液中浸泡显影后即可形成所需的浮雕形状。

将 PDMS 的 A 组分(基本组分)和 B 组分(固化剂)以 10:1 的质量比混合，搅拌均匀后于脱泡搅拌机内进行脱泡处理。随后将 PDMS 倾倒在上述制备的光刻胶模板表面上，水平放置于真空干燥器内保持负压抽吸，使得胶体与主模表面充分接触并再次除去微小的气泡。确保体系内没有气泡之后将其水平置于电热板上，95 °C 加热 2 h 使 PDMS 固化。将固化后的 PDMS 从模板上剥离并切割成合适的大小，接着利用打孔器(内径 1.5 mm)在芯片图案的两端打孔，分别形成进样孔与出样孔。用透明胶带粘贴 PDMS 表面数次以去除杂质，最后用乙醇超声清洗 10 min 并置于电热板上 120 °C 加热 1 h 烘干。

将盖玻片依次用丙酮、乙醇、超净水超声清洗 5 min，然后置于电热板上 120 °C 加热 1 h 烘干。

待 PDMS 和盖玻片烘干并冷却后，将二者置于低温等离子清洗机内处理 20 s，随后迅速进行键合，10 min 后将其置于电热板上以 80 °C 加热 1 h，芯片制备完成。分别于荧光倒置显微镜和激光共聚焦显微镜下对芯片结构进行观察。

1.2.2 真菌捕获与培养

挑取适量的酵母菌接种到 YPD 固体培养基上进行活化，28 °C 培养 24 h。随后挑取适量酵母菌接种到 YPD 液体培养基中，于恒温培养振荡器中

28 °C、150 r/min 培养 24 h。调整酵母菌溶液浓度为 5×10^5 个/mL 备用。

以 YPD 培养基对里氏木霉孢子母液进行稀释, 将孢子浓度调整到 5×10^5 个/mL 备用。

将芯片和导管于 1×10^5 Pa 灭菌 20 min, 在芯片的进样孔和出样孔插管, 用无菌注射器在进样孔注入 YPD 培养基从而润洗芯片。随后将含有真菌溶液的注射器连接在注射泵上, 以 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的速度进样, 全程应注意避免产生气泡, 进样结束后置于恒温培养器中 28 °C 培养。

1.2.3 真菌性质的测定

(1) 酵母菌捕获率: 进样后于激光共聚焦显微镜下观察并拍照, 利用 ImageJ 软件进行酵母计数, 计算捕获率。

(2) 酵母菌生长: 进样后的芯片在 28 °C 恒温培养器中培养, 分别于 0、2、4、6 h 利用荧光倒置显微镜对单个微结构中的酵母细胞进行观察, 拍照记录酵母单细胞出芽过程。同时, 分别于 0、2、4、6 h 取 28 °C、150 r/min 培养条件下 YPD 培养基中的酵母细胞进行观察, 作为对照。

(3) 酵母菌活性测定: 进样后的芯片在 28 °C 恒温培养器中培养, 分别在 24、36、48 h 以 4% 的台盼蓝溶液进行染色, 计算酵母细胞死亡率以测定酵母活性。同时, 分别于 24、36、48 h 取 28 °C、150 r/min 条件下 YPD 培养基游离培养的酵母细胞进行观察, 作为对照。

(4) 木霉孢子生长过程: 进样后的芯片在 28 °C 恒温培养器中培养, 分别于 0、3、6、9 h 利用荧光倒置显微镜对单个微结构中的孢子进行观察, 拍照记录孢子的萌发过程。同时, 分别于 0、3、6、9 h 对芯片上非捕获区域的孢子进行观察, 作为对照。

2 结果与分析

2.1 芯片设计与制备

芯片的设计与制备如图 1 所示。图 1A 是芯片的设计图, 芯片长度为 15 000 μm , 宽度为 2 000 μm ;

用于捕获和培养真菌单细胞的微结构集中在芯片中心的区域, 微结构的形状为“U”型, 长度 15 μm , 彼此的间距为 20 μm , 真菌细胞溶液从芯片的左侧进样口注入并从右侧的出样口流出, 在此过程中细胞被“U”型结构捕获; 流道上分布着许多直径 100 μm 的柱体用以支撑芯片。图 1B 为单个微结构的立体示意图, 其长度和高度皆为 15 μm , 一面上设计有凹槽, 当细胞溶液经过时, 液体会从凹槽部分流走, 细胞则会被卡住, 从而实现细胞的捕获。本文所用酵母菌的直径为 3–5 μm , 木霉孢子的直径为 2–3 μm , 为了使得溶液通过而尽量避免细胞通过, 凹槽的尺寸应与细胞尺寸接近或者小于细胞尺寸; 但是考虑到尺寸较小时, 芯片制备存在一定难度从而产生误差, 实际尺寸会小于设计尺寸, 因此设计了边长 5 μm 、深度 5 μm 、纵向长度 10 μm 的凹槽。图 1C 是芯片的制备流程示意图, L-edit 软件绘制图案后利用激光直写技术制备光刻胶模板, 凹槽结构的获得通过两次曝光来实现, 首先对凹槽以外的部分进行曝光, 随后对凹槽部分进行曝光, 两次曝光条件不同, 以此形成高度差。其中, 凹槽以外部分的曝光光强为 13 mW, 显影时间 90 s; 凹槽部分的曝光光强为 4 mW, 显影时间 40 s。将 PDMS 倾倒在光刻胶模板上并在固化后剥离, 得到 PDMS 芯片, 最后将 PDMS 与玻片等离子键合起来即可制备微流控芯片(具体步骤见 1.2.1)。

图 2 是在显微镜下对芯片的微结构进行形态观察时得到的图片, 图 2A 为芯片捕获区域在显微镜下的平面图, 可见微结构与设计图案相符且排列整齐; 图 2B 是单个微结构在激光共聚焦显微镜下的立体图, 其形状完好且可见凹槽区域, 因此芯片制备成功。经过测量, “U”型结构的实际尺寸与设计一致; 而凹槽部分由于设计尺寸较小, 实际所得的凹槽是一个上部宽、下部窄的倒梯形结构, 其上边长为 5 μm 、下边长为 2 μm 、深度为 3 μm , 凹槽的纵向长度为 10 μm 。

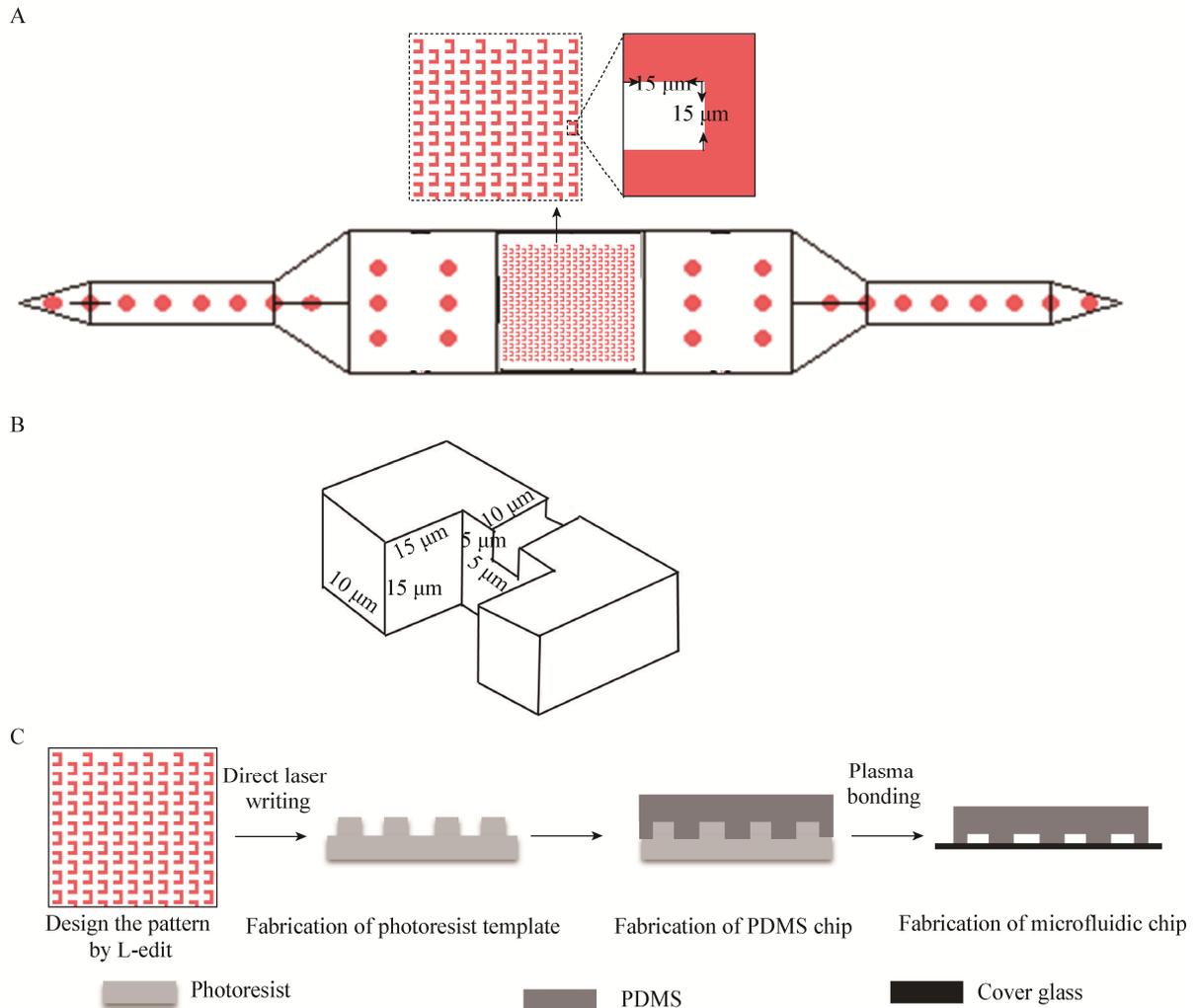


图 1 芯片的设计与制备图

Figure 1 The design and fabrication of chip

注: A: 芯片的设计图; B: 单个微结构的示意图; C: 芯片制备过程图.

Note: A: The design of chip; B: The diagram of single microstructure; C: The fabrication of chip.

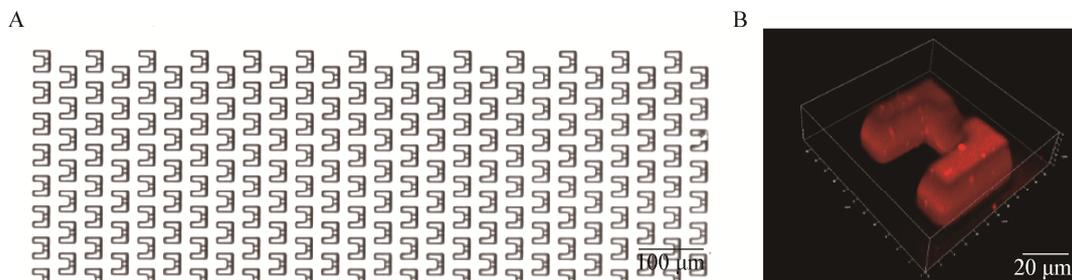


图 2 芯片的微结构形态

Figure 2 The microstructures on chip

注: A: 芯片的捕获区域; B: 单个微结构的立体图.

Note: A: The capture area on chip; B: The stereogram of single microstructure.

2.2 真菌孢子捕获与培养

真菌孢子的进样过程如图 3 所示, 在注射泵的作用下, 将注射器中的真菌溶液通入芯片的进样孔, 真菌溶液在向出样孔流动的过程中, 细胞会被“U”型结构捕获, 溶液则从捕获结构的凹槽部分流走, 最终多余的细胞和培养液从出样口流出, 实现细胞的捕获。所用酵母菌的直径为 $3\ \mu\text{m}$ – $5\ \mu\text{m}$, 木霉孢子的直径为 $2\ \mu\text{m}$ – $3\ \mu\text{m}$ 。右下角为芯片实物, 芯片图案区域总长度为 $15\ 000\ \mu\text{m}$, 宽度为 $2\ 000\ \mu\text{m}$, 通道高度为 $15\ \mu\text{m}$, 两端分别为进样孔和出样孔。

2.3 酵母菌捕获率测定

酵母菌的捕获结果如图 4 所示。其中, 图 4A 是酵母菌溶液进样结束后在显微镜下观察所得的图片, 可知在捕获的酵母细胞中, 大多数为单细胞, 此外也有 2 个细胞、3 个细胞以及多个细胞, 圆圈所示即为捕获的酵母单细胞。不同个数酵母细胞的捕获率见图 4B, 酵母单细胞的捕获率为 $25.00\% \pm 1.38\%$ 。

2.4 酵母菌生长

分别于 0、2、4、6 h 对芯片上捕获的酵母菌单细胞进行观察, 并以 YPD 培养基游离培养的酵母作对照, 记录酵母菌的生长状态如图 5 所示。芯片上的酵母单细胞在 2–4 h 可明显地长出芽体, 并且随着时间的增长芽体逐渐变大, 部分单细胞在 6 h 即



图 3 真菌细胞进样过程
Figure 3 The injection process of fungal cells

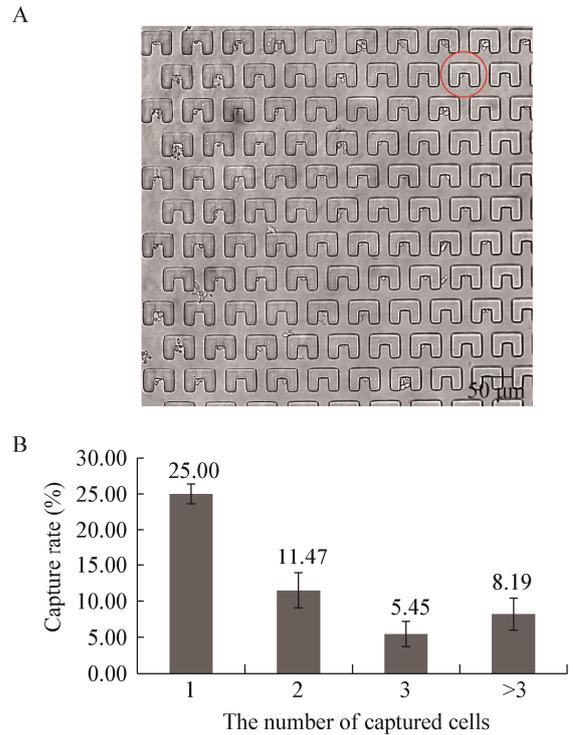


图 4 酵母菌捕获

Figure 4 The capture of yeasts

注: A: 酵母菌的捕获图; B: 酵母菌的捕获率。

Note: A: The image of yeasts capture; B: The capture rate of yeasts.

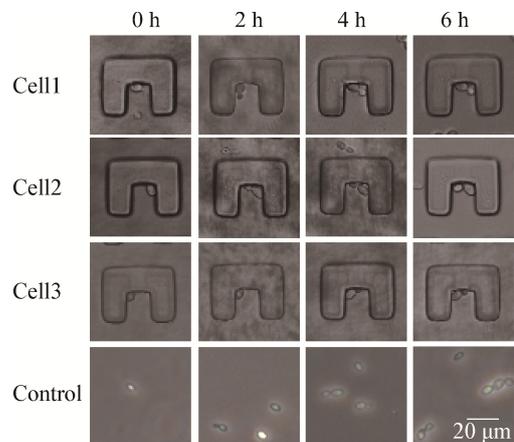


图 5 酵母菌出芽

Figure 5 The budding process of yeasts

能完成出芽繁殖过程。因此, 酵母单细胞能够在该芯片上正常地生长、增殖。

2.5 酵母菌活性测定

分别于 24、36、48 h 测定芯片培养的酵母细胞活性, 并以 YPD 培养基游离培养的酵母作为对照, 计算酵母细胞死亡率。如图 6 所示, 可知芯片上

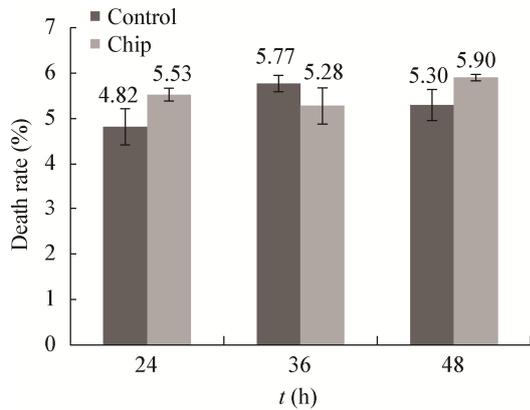


图6 酵母菌死亡率

Figure 6 The death rate of yeasts

的酵母细胞在 24、36、48 h 的死亡率均在 5%–6% 且彼此之间无显著性差异，同时在各时段与对照组之间的死亡率也无显著性差异。因此，酵母细胞可以在此芯片上正常培养至少 48 h。

2.6 木霉孢子生长过程

分别于 0、3、6、9 h 对捕获的单个孢子进行观察，并以非捕获区域的孢子作对照，记录孢子萌发以及菌丝生长情况，如图 7 所示。从图 7A 可知，在捕获 3 h 可以观察到孢子的膨胀，而在 6 h 左右部分孢子开始萌发，在 9 h 菌丝的长度已经远远超过捕获微结构的尺寸，菌丝向微结构外延伸。图 7B 显示在 12 h 部分菌丝出现了分叉的情况，随着时间的增长，菌丝继续变长，并且不同菌丝体相互交错；图 7C 显示在 24 h 大量的菌丝交错在一起布满整个芯片；在 48、72 乃至 120 h 菌丝数量不断增加，彼此交错更为复杂。因此，该芯片可以用于孢子萌发和菌丝生长的相关研究。

3 讨论与结论

真菌的单细胞研究在阐述细胞异质性、单细胞基因测序以及研究微量真菌的生长特性等方面有着举足轻重的意义，其关键步骤在于单细胞的捕获与培养。用于真菌等微生物的单细胞捕获与培养方法主要有：梯度稀释法、显微操作法、流式分选法和微流控法等。其中，梯度稀释法是一种传统的单细胞获取技术，操作简单，缺点是

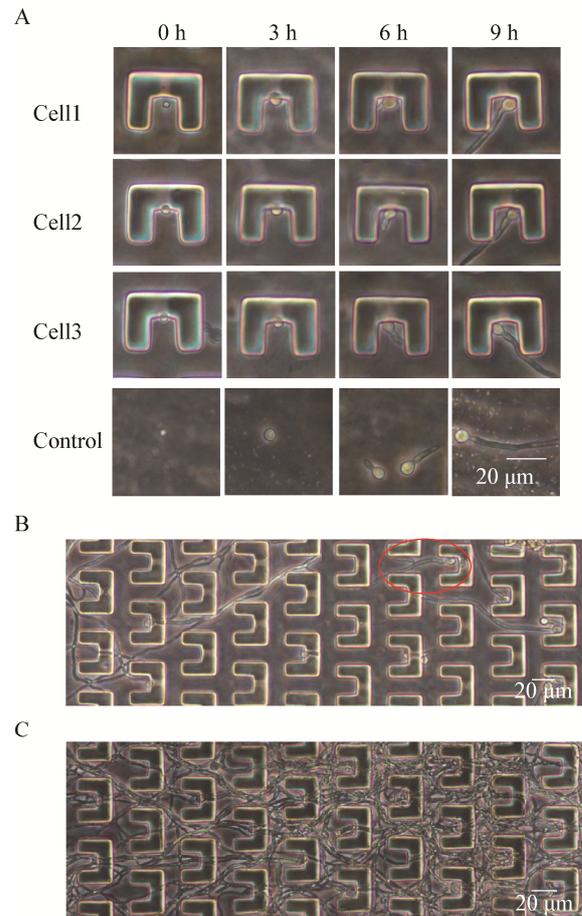


图7 木霉孢子萌发及菌丝生长过程

Figure 7 The process of *Trichoderma* spore germination and mycelium growth

注：A：木霉孢子萌发过程；B：12 h 的菌丝生长情况；C：24 h 的菌丝生长情况。

Note: A: The process of *Trichoderma* spore germination; B: The image of mycelium growth at 12 h; C: The image of mycelium growth at 24 h.

获取率低、操作不精确^[18]等。显微操作法是通过在显微镜下进行分选来获得单细胞，与机械或者光学方法联合使用，可以有效提高单细胞的获取效率。流式分选法具备效率高、速度快的优点，将其与细胞荧光标记法连用而形成荧光激活细胞分选(FACS)的技术广泛应用于多种微生物单细胞的分选^[19]，但是该方法存在着对样品大小要求苛刻、荧光对细胞有损害等缺点。微流控法用于单细胞分析能够准确操纵单细胞，并且可将细胞捕获分离、细胞培养、细胞分选、细胞裂解、细胞

反应及后续的分析检测等多个步骤集成在芯片上, 在多种微生物以及动植物单细胞研究中应用广泛^[20-21]。

现有的基于微流控法的真菌单细胞研究主要采用的是液滴微流控技术, 该技术消耗低、效率高, 但是也存在操作复杂、难度大、对硬件要求高等问题。Wang 等^[22]研发了一种液滴微流控平台, 将单细胞工程菌在微液滴中进行培养, 随后与荧光探针试剂融合, 成功检测并筛选出了具备高木糖消耗能力的酵母菌。Hunt 等^[23]将液滴微流控技术与集成电路相结合建立了一种微流控平台, 该平台既具备微流控芯片良好的生物相容性, 又具备电路系统的可控性, 可以进行酵母单细胞的捕获, 并且通过程序的编写可以实现酵母单细胞在芯片上按照任意所需路径移动。Joensson 等^[24]在酵母单细胞的液滴微流控研究中发现, 液滴的大小会因为其包裹细胞的不同而有所区别, 而不同大小的微液滴在芯片中将会产生不同的位移, 因此可以在位移量的基础上设计多个回收通道对不同种类的单细胞进行回收, 该技术有望应用于不同亚群来源的真菌单细胞的分离。

本研究设计并制备的微流控芯片整体操作较为便捷, 对于硬件设备要求较为简单, 可以快速用于多种真菌单细胞的捕获与培养。芯片上用于捕获真菌的微结构呈为“U”型, 有效防止在培养过程中细胞的移动, 从而实现定位观察。“U”型结构上部设计有凹槽结构, 进样过程中细胞被捕获, 多余溶液可从凹槽部分流走, 防止溶液在捕获结构内堵塞而对细胞产生压力甚至将细胞挤出。目前, 类似的方法已经成功用于动物单细胞的捕获、配对和细胞融合等研究^[17], 本文则首次将其应用于真菌单细胞的研究, 选取了红酵母与里氏木霉孢子两种具有代表性的真菌, 在芯片上进行了单细胞培养并且对细胞生长进行了观察。细胞成活率是保证单细胞培养成功的首要因素, 通过对酵母进行台盼蓝染色观察, 可以看出一直到 48 h 芯片细胞的死亡率和 YPD 培养基游离培养

的细胞死亡率都没有显著性差异, 并且通过对木霉菌丝生长过程的观察表明, 直到 120 h 菌丝的长度和数量都持续增加, 说明真菌细胞可以在芯片上正常存活至少 2 d, 并且可实现 5 d 乃至更久的培养。此外, 在芯片上还直观地体现了酵母菌出芽、孢子萌发前的膨胀等现象。芯片中捕获结构的存在有助于对单细胞进行定位和观察, 而制备芯片的材料选取了透光性良好的 PDMS 和玻片, 因此能够在光学显微镜下便捷地对细胞进行实时观察。

综上所述, 本文制备的微流控芯片具备简单、方便、直观的特点, 适合于真菌单细胞的捕获、培养、定位、实时观察, 有望应用于真菌乃至其他微生物单细胞的生理、遗传、育种、抗性筛选等多种研究。后续工作将进一步设计可降解芯片, 实现定点回收具有特殊生理生化特性的纯合体真菌。

REFERENCES

- [1] Karthik N, Akanksha K, Pandey A. Production, purification and properties of fungal chitinases—a review[J]. *Indian Journal of Experimental Biology*, 2014, 52(11): 1025-1035
- [2] Wiemann P, Keller NP. Strategies for mining fungal natural products[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2014, 41(2): 301-313
- [3] Kiziewicz B, Zdrojowska E, Gajo B, et al. Occurrence of fungi and fungus-like organisms in the Horodnianka River in the vicinity of Białystok, Poland[J]. *Wiadomosci Parazytologiczne*, 2011, 57(3): 159-164
- [4] Dorgan E, Denning DW, McMullan R. Burden of fungal disease in Ireland[J]. *Journal of Medical Microbiology*, 2015, 64(Pt 4): 423-426
- [5] Wösten HAB, van Veluw GJ, de Bekker C, et al. Heterogeneity in the mycelium: implications for the use of fungi as cell factories[J]. *Biotechnology Letters*, 2013, 35(8): 1155-1164
- [6] Padilla B, Manzanares P, Belloch C. Yeast species and genetic heterogeneity within *Debaryomyces hansenii* along the ripening process of traditional ewes' and goats' cheeses[J]. *Food Microbiology*, 2014, 38: 160-166
- [7] Baranyi J. Comparison of stochastic and deterministic concepts of bacterial lag[J]. *Journal of Theoretical Biology*, 1998, 192(3): 403-408
- [8] Yan YJ, Boey D, Ng LT, et al. Continuous-flow *C. elegans* fluorescence expression analysis with real-time image processing through microfluidics[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2016, 77: 428-434
- [9] Fidalgo LM, Whyte G, Bratton D, et al. From microdroplets to microfluidics: selective emulsion separation in microfluidic devices[J]. *Angewandte Chemie*, 2008, 47(11): 2042-2045

- [10] He MY, Edgar JS, Jeffries GDM, et al. Selective encapsulation of single cells and subcellular organelles into picoliter- and femtoliter-volume droplets[J]. *Analytical Chemistry*, 2005, 77(6): 1539-1544
- [11] Abate AR, Chen CH, Agresti JJ, et al. Beating Poisson encapsulation statistics using close-packed ordering[J]. *Lab on a Chip*, 2009, 9(18): 2628-2631
- [12] Hofmann TW, Hänselmann S, Janiesch JW, et al. Applying microdroplets as sensors for label-free detection of chemical reactions[J]. *Lab on a Chip*, 2012, 12(5): 916-922
- [13] Scanlon TC, Dostal SM, Griswold KE. A high-throughput screen for antibiotic drug discovery[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2014, 111(2): 232-243
- [14] Gach PC, Shih SC, Sustarich J, et al. A droplet microfluidic platform for automating genetic engineering[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2016, 5(5): 426-433
- [15] Brouzes E, Medkova M, Savenelli N, et al. Droplet microfluidic technology for single-cell high-throughput screening[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(34): 14195-14200
- [16] Marcy Y, Ishoey T, Lasken RS, et al. Nanoliter reactors improve multiple displacement amplification of genomes from single cells[J]. *PLoS Genetics*, 2007, 3(9): e155
- [17] Skelley AM, Kirak O, Suh H, et al. Microfluidic control of cell pairing and fusion[J]. *Nature Methods*, 2009, 6(2): 147-152
- [18] Shi X, Gao WM, Wang JX, et al. Measuring gene expression in single bacterial cells: recent advances in methods and micro-devices[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2015, 35(4): 448-460
- [19] Ishii S, Tago K, Senoo K. Single-cell analysis and isolation for microbiology and biotechnology: methods and applications[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 86(5): 1281-1292
- [20] Yin HB, Marshall D. Microfluidics for single cell analysis[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2012, 23(1): 110-119
- [21] Duncombe TA, Tentori AM, Herr AE. Microfluidics: reframing biological enquiry[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2015, 16(9): 554-567
- [22] Wang BL, Ghaderi A, Zhou H, et al. Microfluidic high-throughput culturing of single cells for selection based on extracellular metabolite production or consumption[J]. *Nature Biotechnology*, 2014, 32(5): 473-478
- [23] Hunt TP, Issadore D, Westervelt RM. Integrated circuit/microfluidic chip to programmably trap and move cells and droplets with dielectrophoresis[J]. *Lab on a Chip*, 2008, 8(1): 81-87
- [24] Joensson HN, Uhlén M, Svahn HA. Droplet size based separation by deterministic lateral displacement—separating droplets by cell-induced shrinking[J]. *Lab on a Chip*, 2011, 11(7): 1305-1310



征订启事

欢迎订阅《微生物学通报》

《微生物学通报》创刊于1974年，月刊，是中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办，国内外公开发行，以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括：工业、海洋、环境、基础、农业、食品、兽医、水生、药物、医学微生物学和微生物蛋白质组学、功能基因组、工程与药物等领域的最新研究成果、产业化新技术和新进展，以及微生物学教学研究改革等。

本刊为中文核心期刊，中国科技核心期刊，CSCD核心期刊，曾获国家优秀科技期刊三等奖，中国科学院优秀科技期刊三等奖，北京优秀科技期刊奖，被选入新闻出版总署设立的“中国期刊方阵”并被列为“双效”期刊。

据中国科学技术信息研究所信息统计，本刊2012年至今以国内“微生物、病毒学类期刊”综合评价总分第一而蝉联“百种中国杰出学术期刊奖”，并入选“中国精品科技期刊”，成为“中国精品科技期刊顶尖学术论文(F5000)”项目来源期刊。

欢迎广大读者到邮局订阅或直接与本刊编辑部联系购买，2019年每册定价80元，全年960元，我们免邮费寄刊。

邮购地址：(100101)北京朝阳区北辰西路1号院3号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部

Tel: 010-64807511; E-mail: bjb@im.ac.cn, tongbao@im.ac.cn

网址: <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

国内邮发代号: 2-817; 国外发行代号: M413