

工作总结

✓ 微流道粘度系数标定

➤ 前期尝试：

这个课题大概从 2018 年 7 月到 2019 年 6 月断断续续一直在做，因为刚开始对数字图像处理的知识很陌生所以进度很慢。上个暑假尝试了用 FCS 方法，通过向微流道内通入荧光染料测粘滞系数，后来发现在暗场环境下用泵很不方便，以及平台位置很难精细调控，所以打算换为用采集并追踪微米小球的布朗运动直接计算沟道不同位置的扩散系数，从而推出粘滞系数。第一步先采集了不同 Ficoll 浓度下小球的布朗运动视频，浓度 0%-15% (w/v) 每个浓度各采了 10 个视频，每个视频 30s, 帧速 60。小球浓度按照不同浓度有所调整。

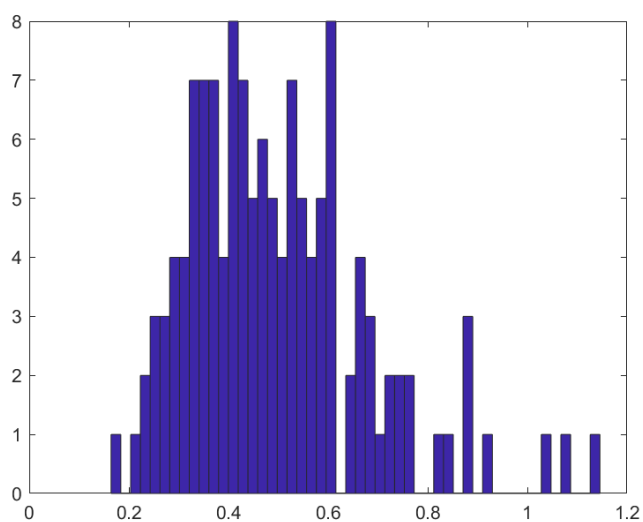
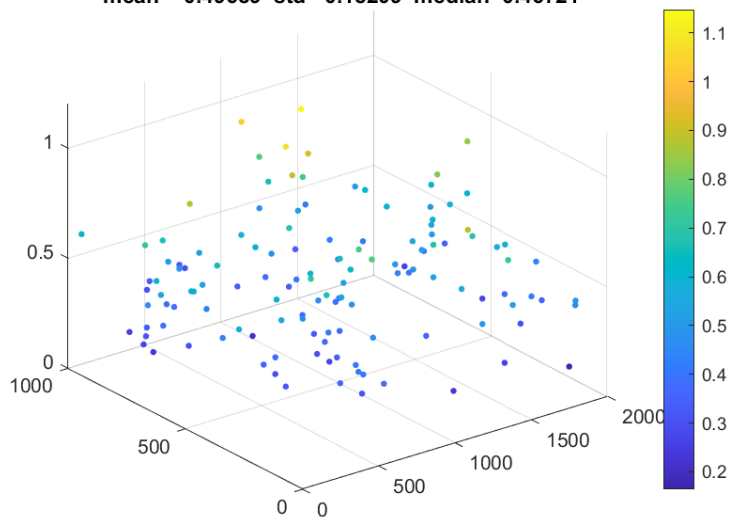
➤ 算法的主要思想：

用图像处理方法计算图像边缘的梯度，扣出小球的边缘，然后对每个小球的图像做高斯拟合中心；用 track 的算法追踪每个小球的轨迹；对于足够长的轨迹带入扩散方程拟合斜率（扩散系数）。

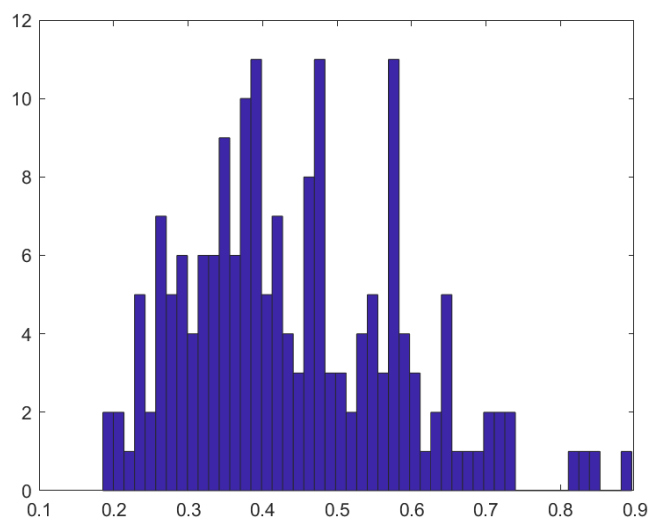
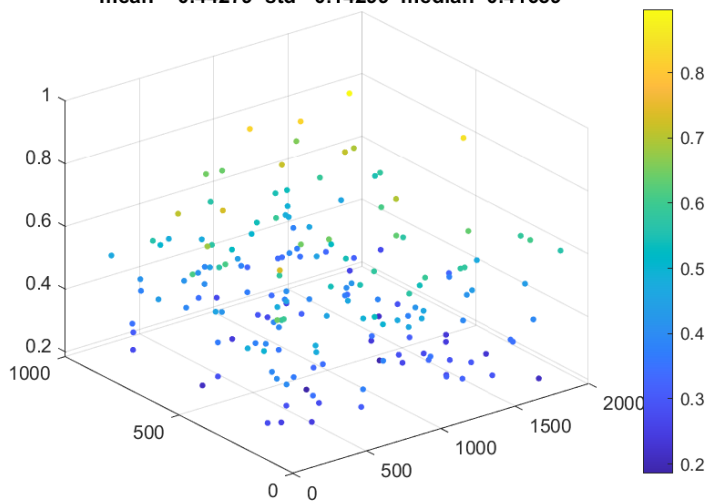
➤ 处理结果：

经测试，现有程序可以较准确的测量小球在不同浓度 Ficoll 溶液中的扩散系数。每个浓度 10 个视频汇总的扩散系数分布如下，左图，x,y 轴是小球平均位置，z 轴是拟合得到的扩散系数 D；右图，是左图扩散系数的统计分布（由于程序处理较慢，只处理了 0%-10% 的 Ficoll 浓度,剩下数据之后补上）：

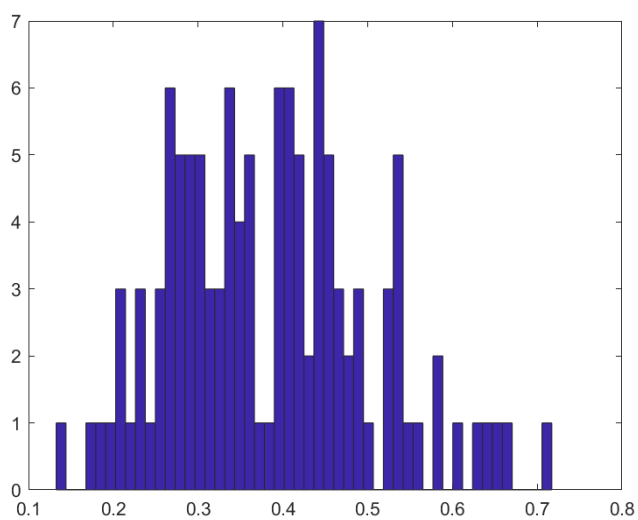
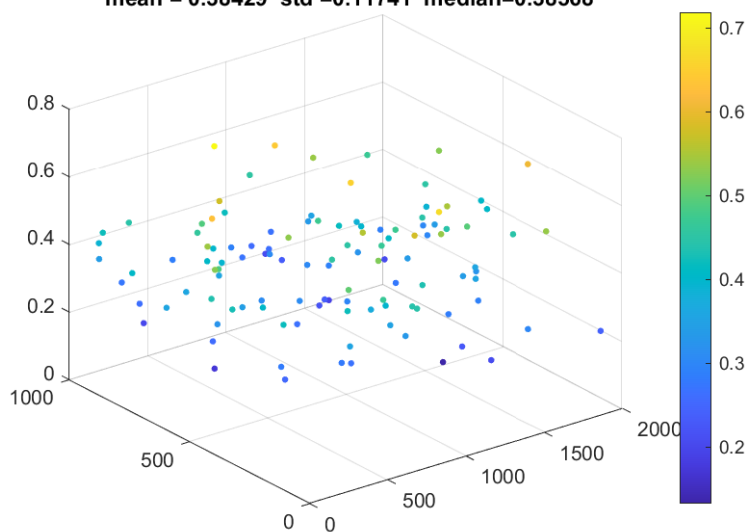
00% Ficoll 1um 0.00013%bead_g
 mean = 0.49689 std =0.18209 median=0.46721



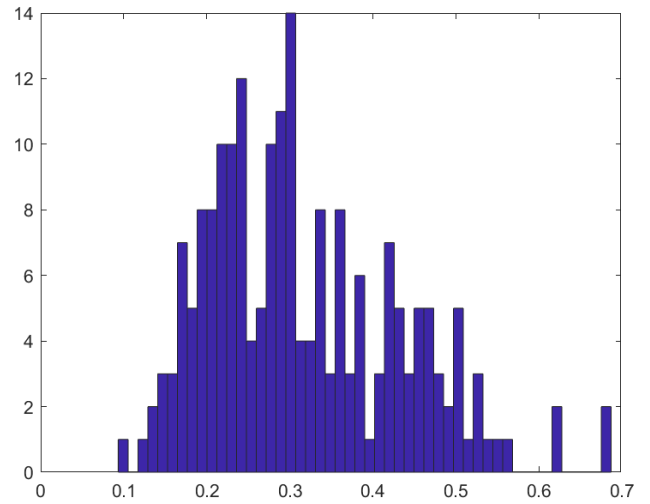
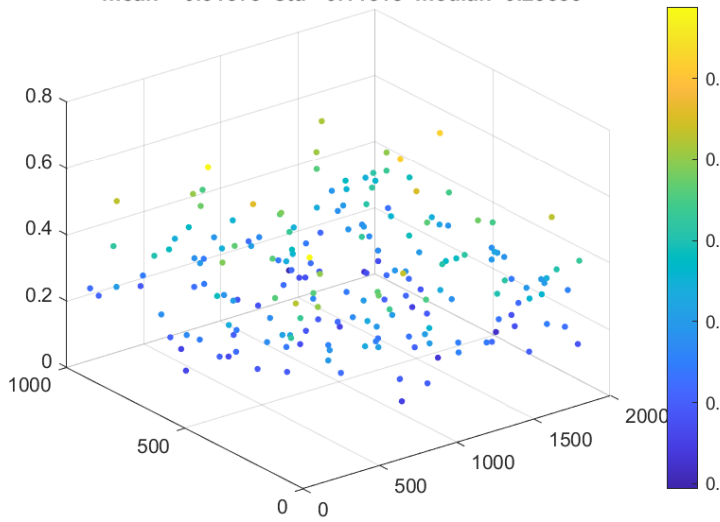
01% Ficoll 1um 0.00013%bead_g
 mean = 0.44279 std =0.14299 median=0.41659



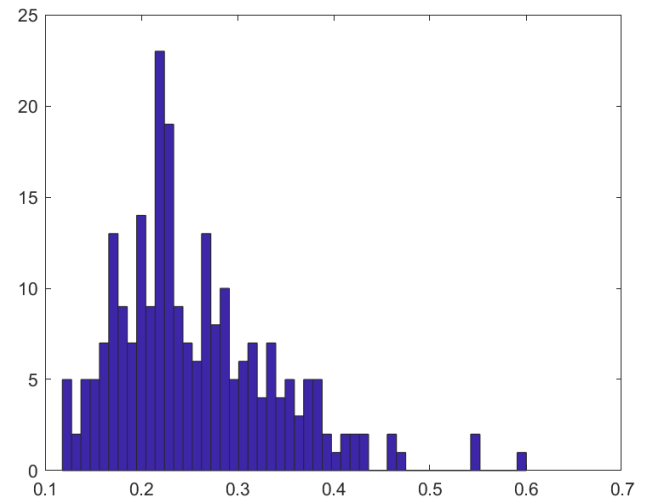
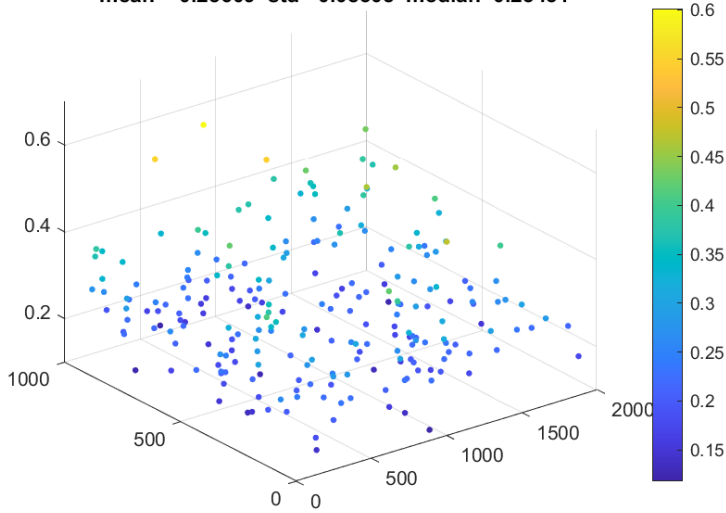
02% Ficoll 1um 0.00009%bead_g
 mean = 0.38429 std =0.11741 median=0.38568



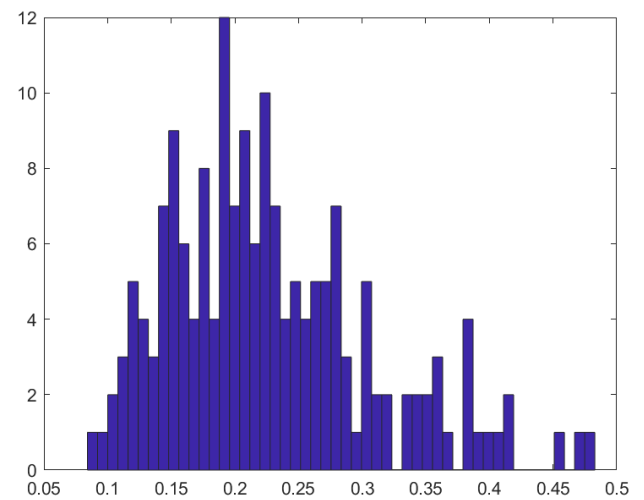
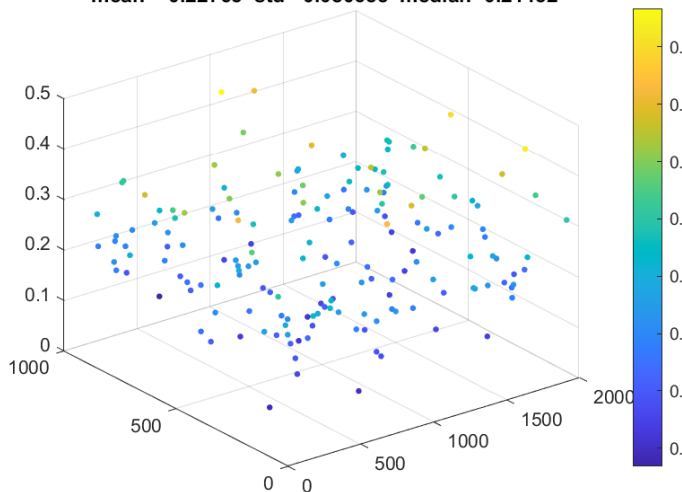
03% Ficoll 1um 0.00009%bead_g
 mean = 0.31575 std =0.11518 median=0.29533

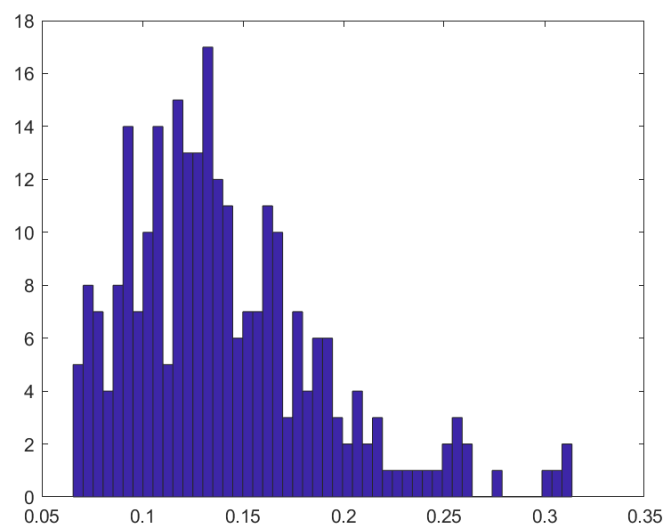
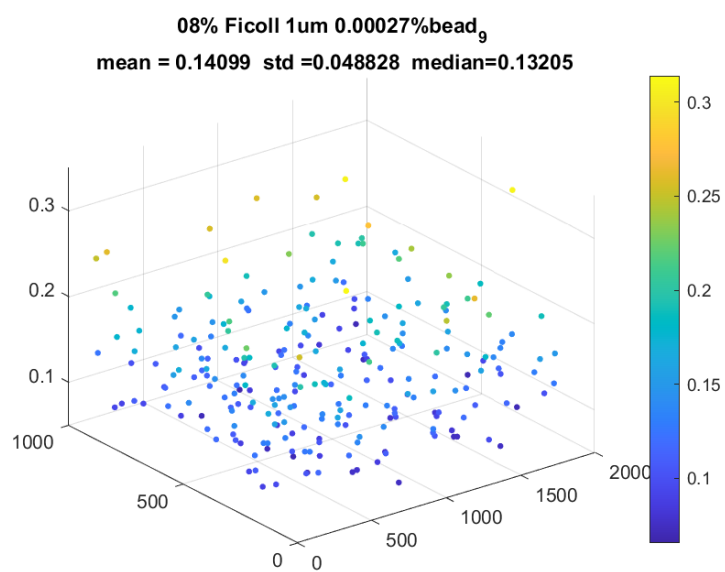
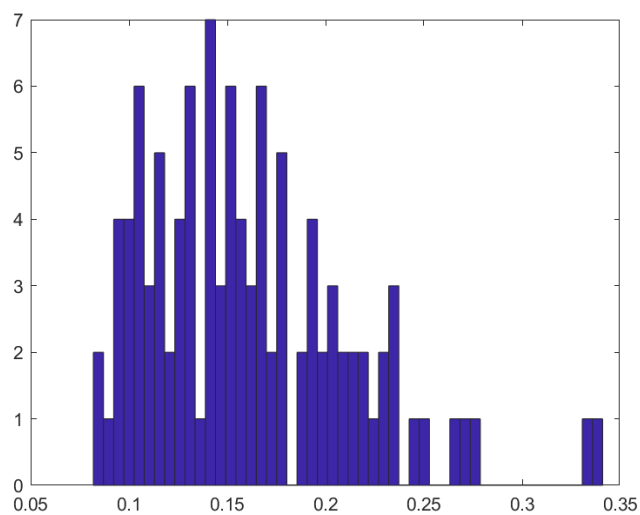
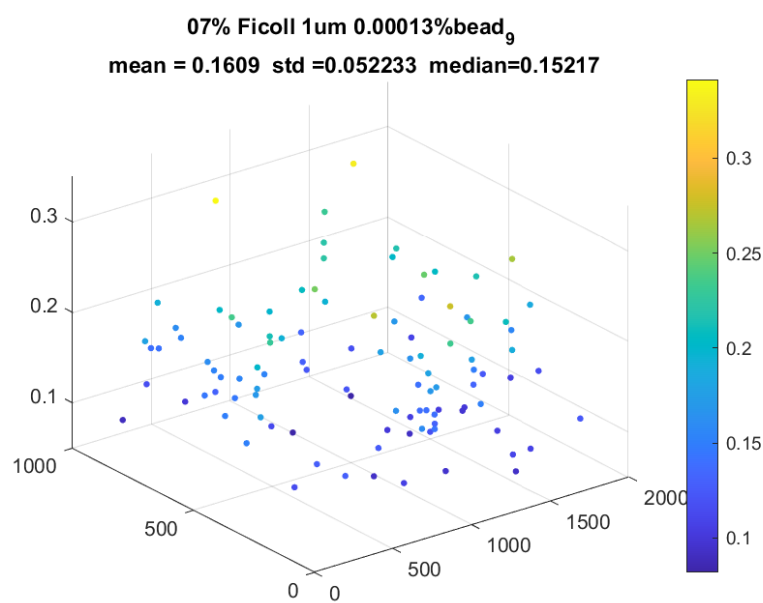
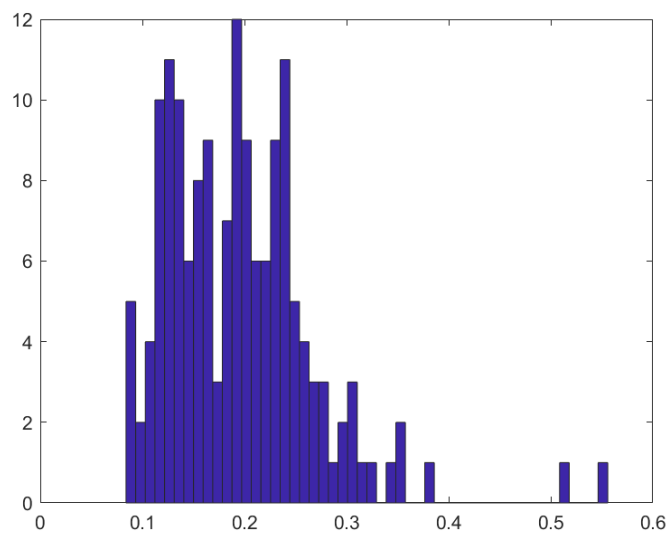
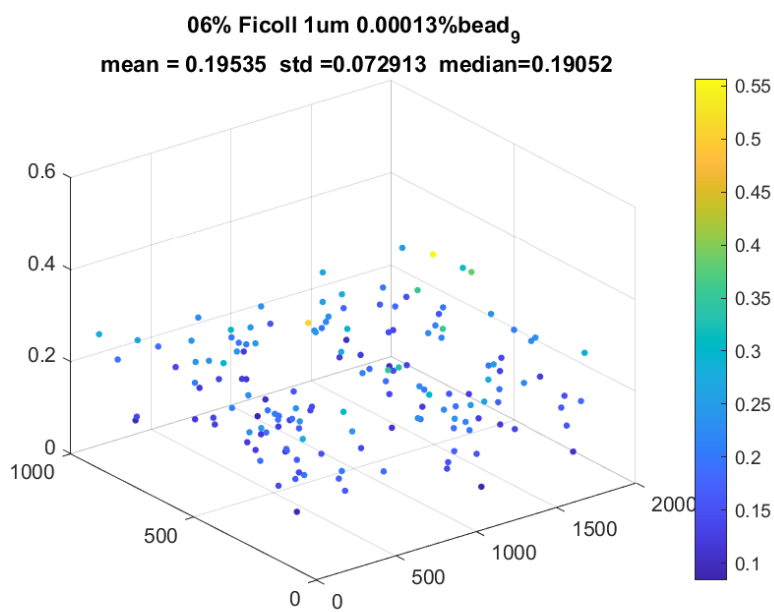


04% Ficoll 1um 0.00013%bead_g
 mean = 0.25609 std =0.08305 median=0.23431

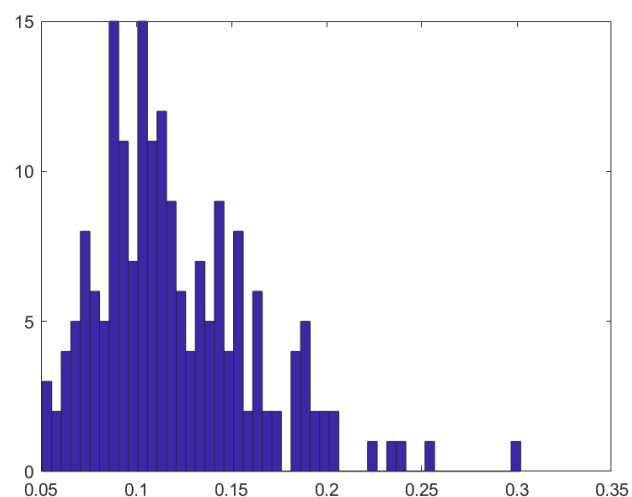
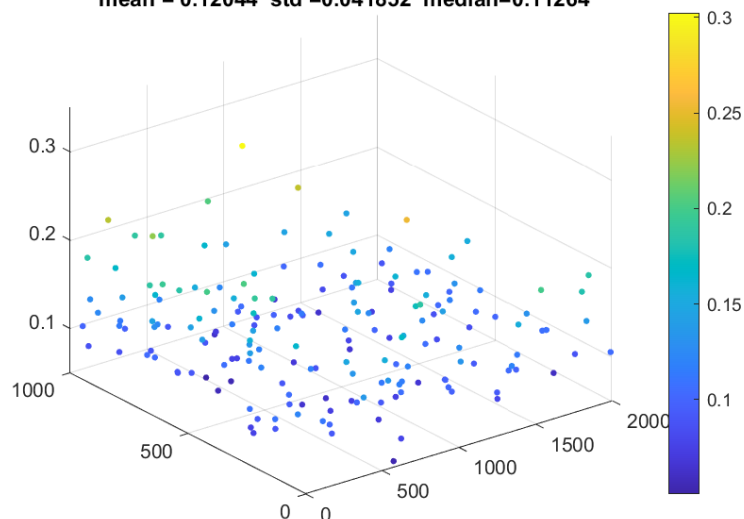


05% Ficoll 1um 0.00013%bead_g
 mean = 0.22763 std =0.080655 median=0.21432

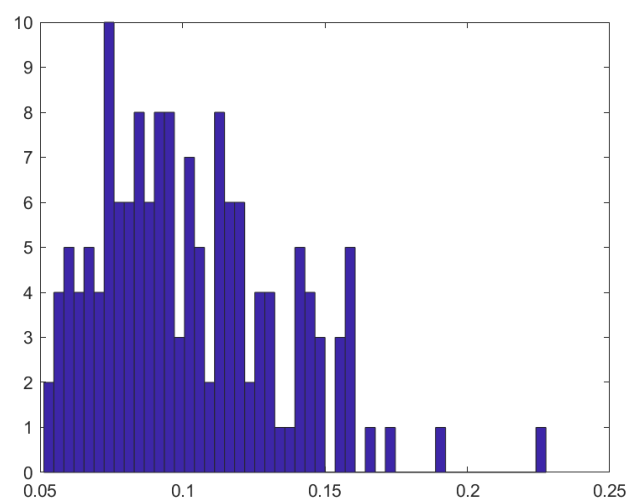
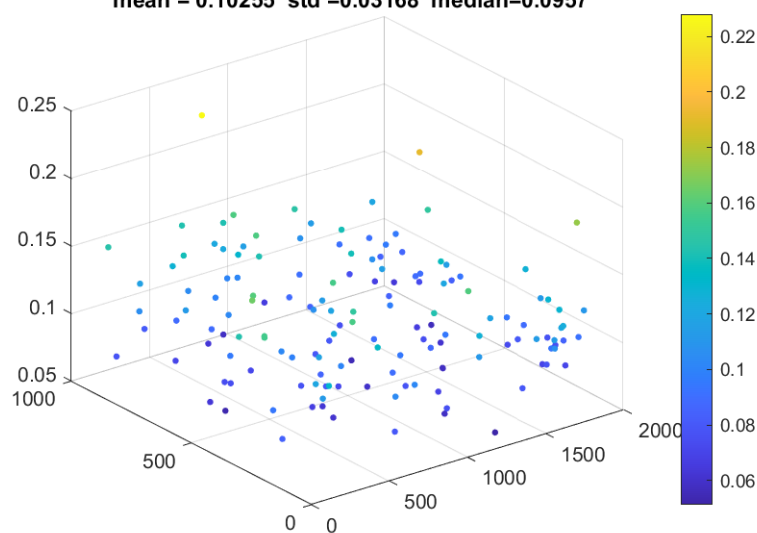




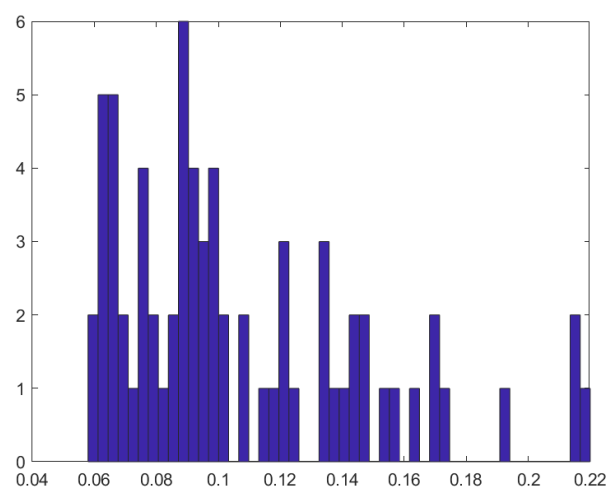
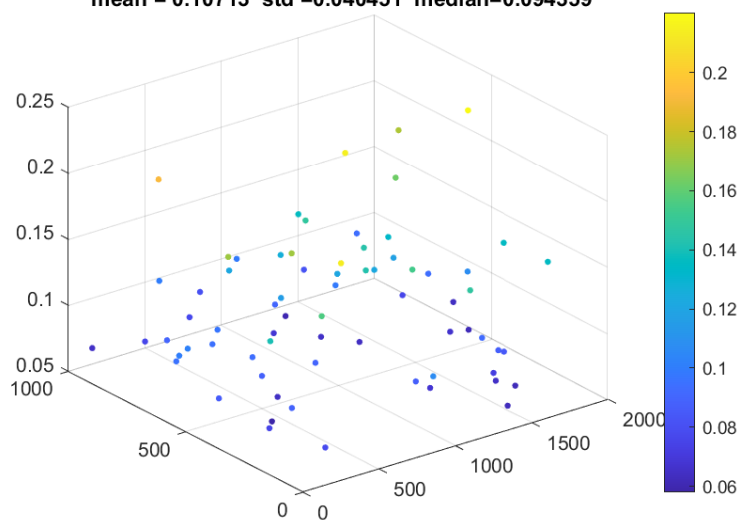
09% Ficoll 1um 0.00027%bead_g
mean = 0.12044 std =0.041852 median=0.11264



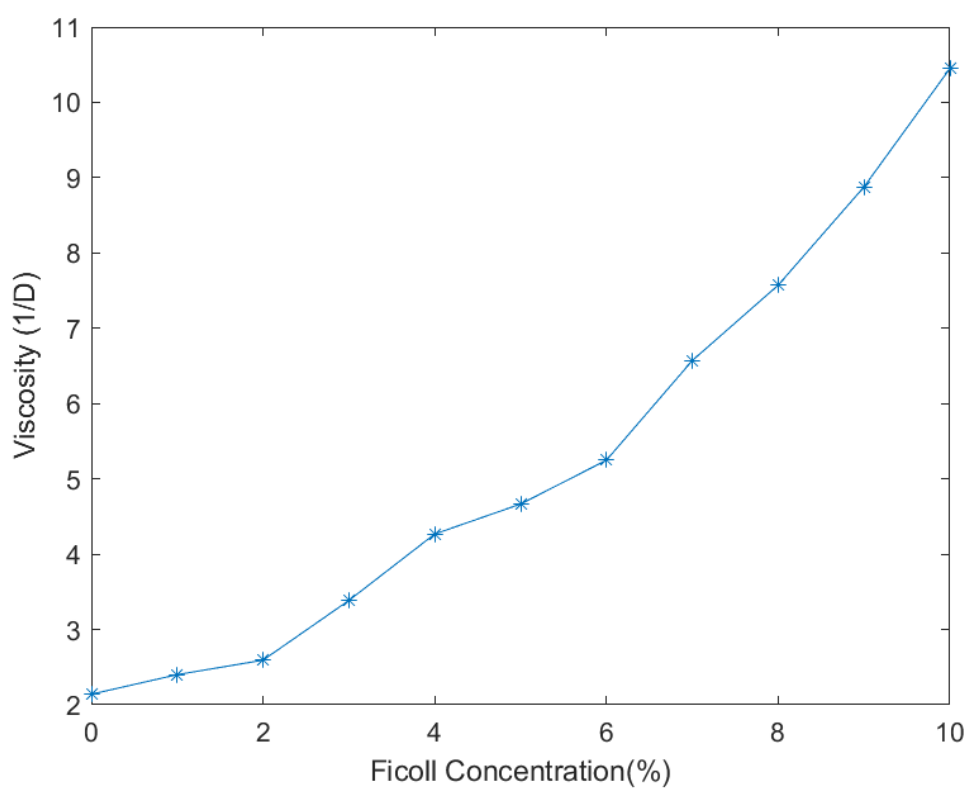
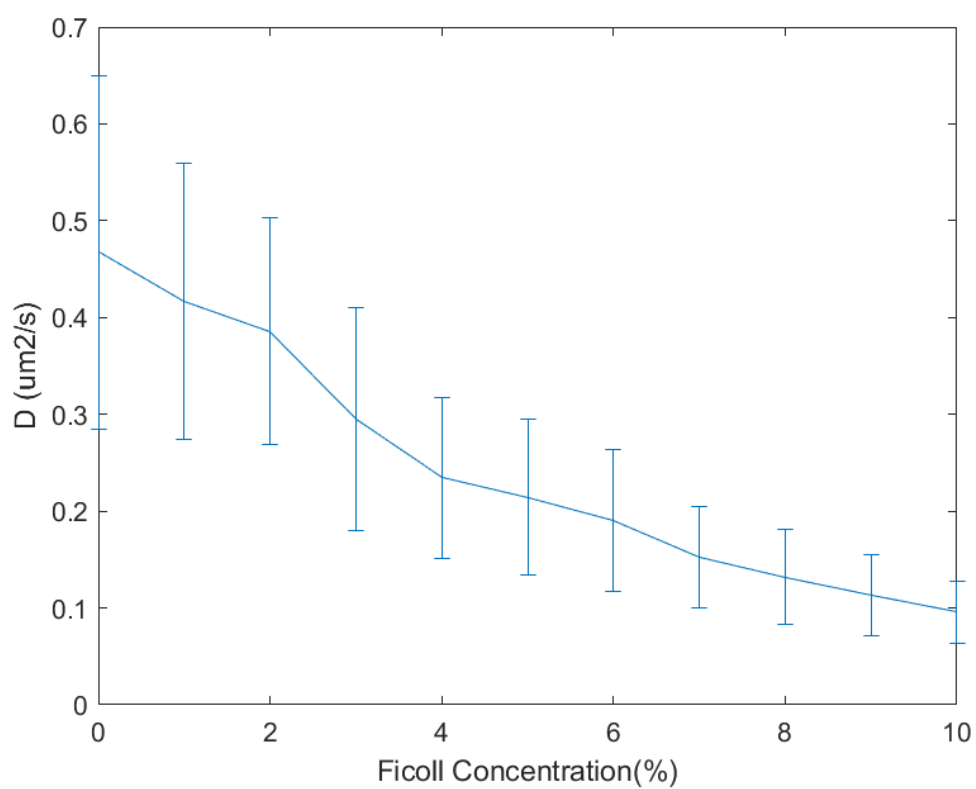
10% Ficoll 1um 0.00027%bead_g
mean = 0.10255 std =0.03168 median=0.0957



11% Ficoll 1um 0.00027%bead₂
mean = 0.10713 std =0.040451 median=0.094359



将 Ficoll 浓度 0%-15%下的扩散系数和粘滞系数画图：



与文献中实验数据比较：

Chen X, Berg H C. Torque-speed relationship of the flagellar rotary motor of *Escherichia coli*[J]. *Biophysical journal*, 2000, 78(2): 1036-1041.

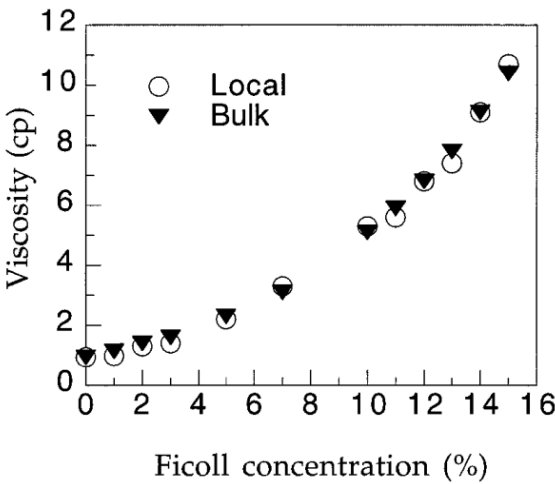


FIGURE 3 The local and bulk viscosities of solutions of Ficoll at 22.7°C. Standard deviations, obtained from linear fits to curves of sedimentation height versus time, were 1–3% of the mean.

TABLE 1 Bulk viscosities of the Ficoll solutions used in the bead-on-stub experiments

Ficoll conc. (% w/v)	Viscosity (cp) at		
	22.7°C	17.7°C	15.8°C
0	0.986	1.08	1.14
1	1.16	1.35	1.39
2	1.37	1.60	1.63
3	1.63	1.82	1.95
4	1.93		
5	2.33	2.86	2.90
6	2.73		
7	3.22		
8	3.86	4.44	4.70
9	4.47		
10	5.29	6.33	6.52
12	7.09		8.59
13	8.18		
15	10.84	13.36	13.88

1 厘泊(1cP)=1 毫帕斯卡 · 秒 (1mPa · s)

估算扩散系数（将小球真实半径0.5um作为流体力学半径带入）：

0% Ficoll:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi r \eta} = \frac{1.3806488 \times 10^{-23} \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot (22.7 + 273.15) \text{ K}}{6\pi \cdot 0.5 \mu\text{m} \cdot 0.986 \text{ mPa} \cdot \text{s}} = 0.43955 \text{ } \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$$

和拟合所得的数据绝对数值和相对趋势都很接近，故认为现有程序可以有效拟合扩散系数，可以用于下一步标定实验。

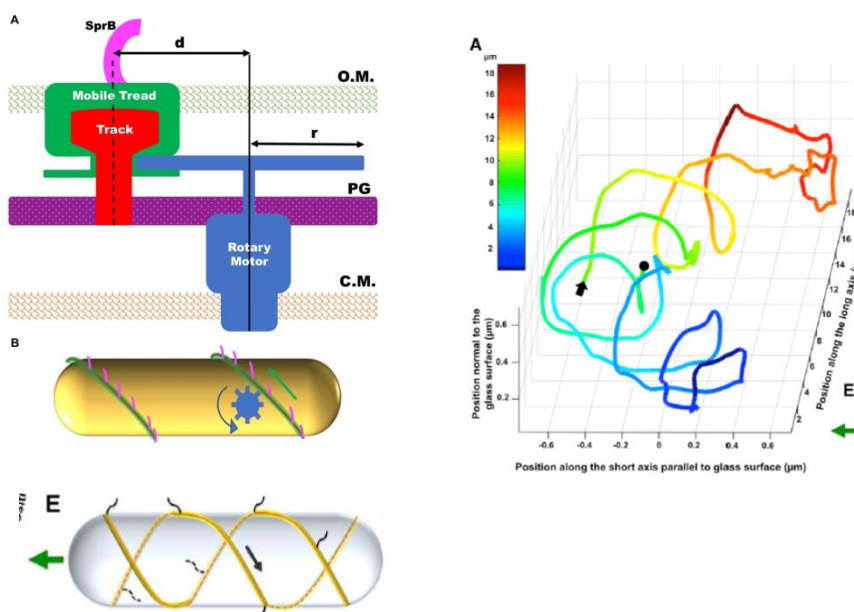
✓ 细菌 Gliding 运动行为的研究

➤ 课题背景:

今年 7, 8 月在哈佛 Berg Lab 跟着 Abhishek 做实验的两个月，我接触到了一种很有趣的新的运动模式（gliding）的细菌。

他之前的工作是以 *Flavobacterium johnsoniae* 作为研究对象，通过粘金球成像等手段发现这种 gliding 的细菌(T9SS,第9类膜外分泌系统)的运动机理是：细菌胞体上有 S 型缠绕的‘轨道’，粘附在细胞表面的 MreB 上，其上有具有粘附性的 sprB，*Flavobacterium johnsoniae* 依靠 sprB 粘附在固体表面，S 型‘轨道’在细胞表面依靠马达（见下图马达模型）带动成螺旋形运动，从而细胞与固体表面发生相对运动。

Shrivastava A, Berg H C. A molecular rack and pinion actuates a cell-surface adhesin and enables bacterial gliding motility[J]. Biophysical Journal, 2018, 114(3): 372a.



这种 (T9SS) gliding 的细菌有一个很有趣的运动性质: sprB 既可以粘附固体表面来提供运动的支点,也可以粘附其他东西,如其他细胞。当细菌漂浮在 buffer 中时,‘货物’会在细菌表面沿‘轨道’呈 S 型运动;当 gliding 细菌在固体表面 swarm 时,‘货物’可以在不同细菌间传递,从而达到长距离运输。

Shrivastava A, Patel V K, Tang Y, et al. Cargo transport shapes the spatial organization of a microbial community[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2018, 115(34): 8633-8638.

➤ 课题内容:

我在暑假的课题就是研究噬菌体作为‘货物’被 *Campylobacter* *gingivalis* (C.G.一种人类口腔上牙龈菌斑)运输的情况,并探究噬菌体(病毒)这种‘货物’在被运输情况下能否更有效攻击其他细菌,从而探究 gliding 的意义。

➤ 完成情况:

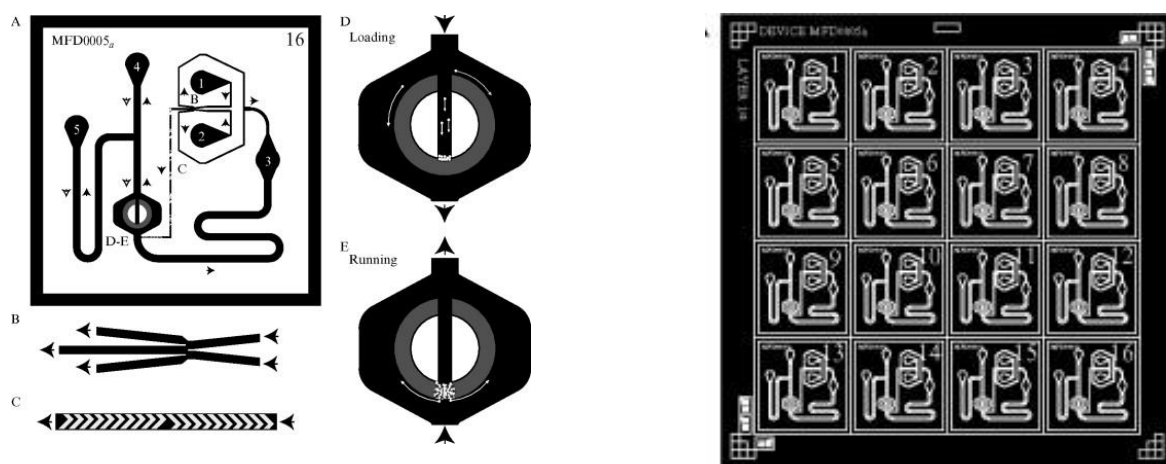
我学习了一些噬菌体分析的方法 (phage titration),成功扩增噬菌体至 10^{11} pfu; 并由荧光显微镜实验初步得到结果 C.G.是可以运输 lambda 噬菌体 (GFP) 的。

✓ 微流装置制作方法调研

9,10 月份我跟着 Abhishek 搬到了 ASU 的 Biodesign Institute, 基本都是一些实验室初期准备的琐事,唯一值得一提的是我得以亲自使用了几次 Zeiss LSM880 confocal 激光扫描显微镜,在哈佛因为要按小时收费所以我没能自己使用。但是可能因为制备样品的条件不满足,细菌没有正常运动,所以后来就没再用了。

空闲时间我和在 ASU 读博士的科大生物专业学长聊天，我之前做微流实验时总是遇到流场不稳定等问题，他说他们做微流时没有遇到这些问题，所以我去他所在的合成生物学实验（Xiao Wang's lab）参观，学习了他们制作微流装置的方法。他们实验室是直接向在 UCSD 的 Jeff Hasty 实验室订购的，尤其是像下图这种已经发表的图纸可以直接让他们做，制作方法也是按照 Hasty 实验室发表的 protocol 中有详细的设计，制作和使用方法：

Ferry M S, Razinkov I A, Hasty J. Microfluidics for synthetic biology: from design to execution[M]//Methods in enzymology. Academic Press, 2011, 497: 295-372.



之前实验室制备微流装置的方法整理：

1. 将 PDMS 胶和固化剂按 10:1 质量比混合，均匀搅拌至气泡小而均匀后，放置 4 度冰箱 2 小时左右至所有气泡消失；
2. 倒至硅片掩膜版上再在 4 度冰箱放置 2 小时左右
3. 放置 65 度烘箱烤 2 至 3 小时，时间不同 PDMS 固化软硬不同，太软或太硬都不利于从硅片上揭下来；
4. 烤完取出放常温冷却后用刀片切割，并用孔径合适的针头打孔，这一步操作常常会造成很多灰尘和小颗粒，造成微流管接触有空隙，或 PDMS 和载玻片接触不严漏气，导致流场不稳定；

5. 将切割好的 PDMS 直接贴在干净载玻片上，用力按压；
6. 需要的话向侧管通入琼脂；
7. 在插入微流管流场稳定后，常常用玻璃胶封口和四周。

整个过程大概需要一下午。

总结了一下 Jeff Hasty 实验室制作微流片的方法的主要差别：

1. 两次对 PDMS 进行除气用真空干燥器而非放置；
2. 掩膜版用锡纸包裹，而不是放在培养皿中，便于后续揭膜

3. 打孔用专门的打孔器



打出来的孔边缘较光滑，

4. 清洁微流片的操作：

- a. 先用 70% 的乙醇和水清洁 PDMS 片，然后用氮气流干燥。干燥后立即在沟道一面贴上胶带以防止灰尘落上。
- b. 在通风橱中，先用庚烷，甲醇和蒸馏水清洁盖玻片，然后在氮气流中干燥。干燥后立即贴上胶带以防止灰尘落上。
- c. 打开 UVO 清洁器的氧气管线。将 PDMS（沟道面朝上）和盖玻片放在 UVO 清洁剂内部，剥下胶带，并活化表面 3 分钟。重新关闭氧气瓶的阀门。



d. 快速且小心地将每个 PDMS 沟道的一面朝下放置在盖玻片上，
然后在 80 ℃ 的温度下烘烤一小时或过夜以粘合它们。

增加了这些步骤后大概制作一批维流片需要一两天。

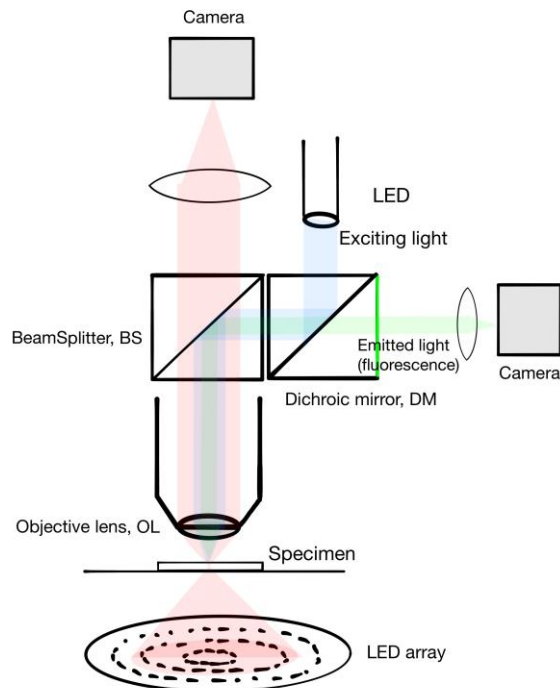
✓ 搭建扫描荧光显微镜

➤ 课题任务：

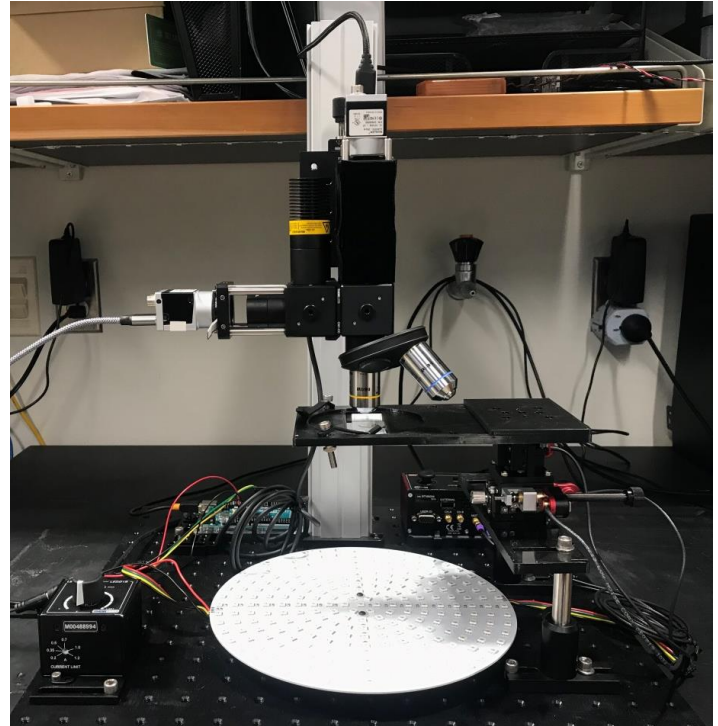
离开亚利桑那之后我就联系了 2019 年 12 月到 2020 年 2 月在杜克大学 Roarke Horstmeyer 计算光学实验室的两个多月的实习。我的主要任务是搭建一个扫描荧光显微镜并采图像数据，之后会交给其他博士生做机器学习，最终达到能够由透射光成像的图像推测荧光图像的“数字荧光显微镜”。

➤ 光路设计：

以下是我的光路图：



实物图（后续可能还会调整）：



➤ 具体任务：

1. 用单片机 `arduino` 编写程序控制 `adafruit` 公司的产品 `DotStar RGB LED Disk` 即盘型 LED 阵列作为透射光成像系统的照明光源，能实现控制光的颜色和位置，实现明场，暗场，相称，点光源等不同照明效果；
2. 用软件 `openscad` 设计尺寸合适的样品平台，并 3D 打印所需零件；
3. 编写 `matlab` 代码同时控制：`Thorlabs` 的电动马达来移动平台，LED 不同位置不同颜色的点光源照明，耦合 LED 作为荧光激发光，和两个相机采集图像。

4. 采集数据

因为光学实验采集数据较快，两个月时间应该能基本做完。

✓ 之后工作计划

1. 把现有的课题争取做完。
2. 学习掌握更多科研知识和技能。