



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105188934 B

(45)授权公告日 2018.12.04

(21)申请号 201380072568.8

(22)申请日 2013.12.06

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 105188934 A

(43)申请公布日 2015.12.23

(30)优先权数据  
1222052.1 2012.12.07 GB

(85)PCT国际申请进入国家阶段日  
2015.08.07

(86)PCT国际申请的申请数据  
PCT/GB2013/053229 2013.12.06

(87)PCT国际申请的公布数据  
W02014/087175 EN 2014.06.12

(73)专利权人 牛津大学创新有限公司  
地址 英国牛津郡

(72)发明人 约翰-黑根-普赖斯·贝利  
加百利·维勒  
亚历山大·D·格雷汉姆

(74)专利代理机构 广州华进联合专利商标代理  
有限公司 44224

代理人 黎艳 何冲

(51)Int.Cl.  
B01L 3/02(2006.01)  
A61K 9/127(2006.01)  
B01J 13/04(2006.01)  
B01J 19/00(2006.01)  
B01F 13/00(2006.01)  
B28B 1/00(2006.01)  
B29C 67/00(2017.01)

(56)对比文件  
US 2012116568 A1,2012.05.10,说明书第  
65-67,87,108-109,137,191-204段.

US 2010173394 A1,2010.07.08,说明书第  
142-151,215-218,668-672段,附图图6,67.

CN 101978272 A,2011.02.16,全文.

WO 03004280 A3,2003.08.07,全文.

JP 2006335019 A,2006.12.14,全文.

审查员 许远平

权利要求书11页 说明书60页 附图18页

(54)发明名称

3D打印的液滴组件

(57)摘要

本发明涉及用于产生液滴组件的装置,所述装置包括液滴发生器。本发明还描述了使用包括液滴发生器的装置产生液滴组件的方法。本发明还涉及包含多个液滴的液滴组件,并记述了所述液滴组件的多种用途。

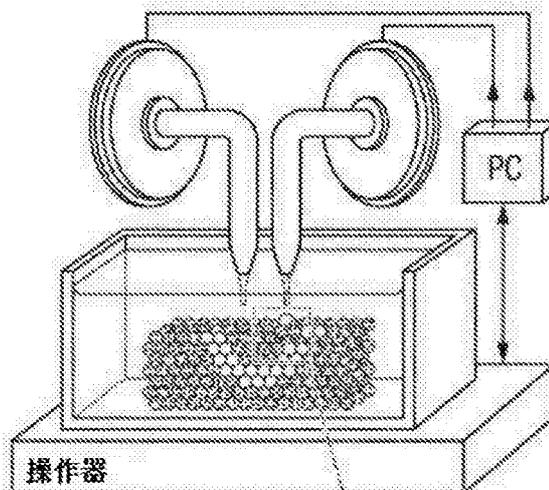


Fig. 2b

1. 用于生成液滴组件的装置,所述装置包括:  
至少一个液滴发生器;  
可相对于所述至少一个液滴发生器移动的容器;以及  
控制单元,所述控制单元适于控制所述至少一个液滴发生器分配液滴和所述容器相对于所述至少一个液滴发生器的移动;  
其中,所述装置适于产生包含多个液滴的液滴组件,其中每个所述液滴包括(i)液滴介质和(ii)包围所述液滴介质的表面的两亲分子外层,其中所述液滴介质为水相介质或疏水介质,且其中每个所述液滴与另一个所述液滴接触从而形成作为相接触的液滴之间的界面的两亲分子双分子层,其中所述液滴组件包括至少n个所述液滴,以及至少n-1个所述相接触的液滴之间的界面,n等于或大于4;和  
其中所述容器装有松散介质且所述液滴组件置于所述松散介质中,当所述液滴介质为水相介质时所述松散介质为疏水介质,且当所述液滴介质为疏水介质时所述松散介质为水相介质。
2. 根据权利要求1所述的装置,其特征在于,所述控制单元用于协调(a)所述容器相对于所述至少一个液滴发生器中的每一个的移动和(b)所述液滴的分配,以制作所述液滴组件。
3. 根据权利要求2所述的装置,其特征在于,所述控制单元包括计算机或专用电子硬件。
4. 根据权利要求1所述的装置,其特征在于,进一步包括用于移动所述容器的显微操作器,且其中所述控制单元适于利用所述显微操作器控制所述容器的移动。
5. 根据权利要求1所述的装置,其特征在于,进一步包括用于移动所述至少一个液滴发生器中的每一个的显微操作器,且当所述装置包括多个所述液滴发生器时,用于协调所述液滴发生器的相对位移。
6. 根据权利要求1所述的装置,其特征在于,所述至少一个液滴发生器中的每一个包括:用于容纳液滴介质的腔室,所述液滴介质为水相介质或疏水介质;出口;以及,用于将一定体积的所述液滴介质通过所述出口转移、从而将所述体积分配为液滴的部件。
7. 根据权利要求6所述的装置,其特征在于,用于将一定体积的所述液滴介质通过所述出口转移的所述部件为压电换能器。
8. 根据权利要求7所述的装置,其特征在于,所述出口的直径小于200  $\mu\text{m}$ 。
9. 根据权利要求1所述的装置,其特征在于,所述液滴发生器包含所述液滴介质。
10. 根据权利要求1所述的装置,其特征在于,所述液滴介质为水相介质。
11. 根据权利要求10所述的装置,其特征在于,所述液滴发生器包含水相介质。
12. 根据权利要求10所述的装置,其特征在于,所述液滴发生器装有水相介质和膜蛋白。
13. 根据权利要求1所述的装置,其特征在于,所述至少一个液滴发生器中的每一个用于分配直径等于或小于1mm的液滴。
14. 根据权利要求1所述的装置,其特征在于,所述至少一个液滴发生器中的每一个用于分配直径在10  $\mu\text{m}$ 至200  $\mu\text{m}$ 范围内的液滴。
15. 根据权利要求1所述的装置,其特征在于,所述至少一个液滴发生器中的每一个用

于分配体积等于或小于2  $\mu\text{L}$ 的液滴。

16. 根据权利要求1所述的装置,其特征在于,所述至少一个液滴发生器中的每一个用于分配体积在0.001 nL至100 nL范围内的液滴。

17. 根据权利要求1所述的装置,其特征在于,所述控制单元用于将液滴分配速率控制为0.01至10  $\text{s}^{-1}$ 。

18. 根据权利要求1所述的装置,其特征在于,所述装置包括多个所述液滴发生器。

19. 根据权利要求18所述的装置,其特征在于,所述液滴介质是水相介质,且其中第一液滴发生器包括第一水相介质,且第二液滴发生器包括第二水相介质,所述第一水相介质与第二水相介质不同。

20. 根据权利要求19所述的装置,其特征在于,所述第一水相介质包含膜蛋白,且所述第二水相介质不包含所述膜蛋白。

21. 根据权利要求19所述的装置,其特征在于,所述第一水相介质和第二水相介质具有不同的渗透压,或所述第一水相介质和第二水相介质包含不同浓度的盐或缓冲物质。

22. 根据权利要求18所述的装置,其特征在于,第一液滴发生器用于分配具有第一直径的液滴,第二液滴发生器用于分配具有第二直径的液滴,其中所述第一直径和第二直径不同。

23. 根据权利要求22所述的装置,其特征在于,所述液滴发生器如权利要求6中所述,且其中所述第一液滴发生器的出口直径与所述第二液滴发生器的出口直径不同。

24. 根据权利要求1所述的装置,其特征在于,所述控制单元适于协调(a)所述容器相对于所述至少一个液滴发生器中的每一个的移动和(b)所述液滴的分配,以制作包含至少一个液滴层的所述液滴组件,其中每个所述液滴包含(i)液滴介质和(ii)包围所述液滴介质的表面的两亲分子外层,所述液滴介质为水相介质或疏水介质,且所述液滴层中的每个液滴与该层中的至少一个其他液滴接触,从而形成作为相接触的液滴之间界面的所述两亲分子双分子层。

25. 根据权利要求1所述的装置,其特征在于,所述控制单元适于协调(a)所述容器相对于所述至少一个液滴发生器中的每一个的移动和(b)所述液滴的分配,以制作包含至少一个液滴层的所述液滴组件,其中每个所述液滴包含(i)水相介质和(ii)包围所述水相介质表面的两亲分子外层,且所述液滴层中的每个液滴与该层中的至少一个其他液滴接触,从而形成作为相接触的液滴之间界面的所述两亲分子双分子层。

26. 根据权利要求24所述的装置,其特征在于,所述控制单元适于协调(a)所述容器相对于所述至少一个液滴发生器中的每一个的移动和(b)所述液滴的分配,以制作包含多个所述液滴层的所述液滴组件,其中各层相互邻接,由此一层中的液滴与相邻的另一层中的液滴接触,从而形成作为相接触的液滴之间的界面的所述两亲分子双分子层。

27. 根据权利要求1所述的装置,其特征在于,所述控制单元适于协调(a)所述容器相对于所述至少一个液滴发生器中的每一个的移动和(b)所述液滴的分配,以制作包含多个液滴的所述液滴组件,其中每个所述液滴包含(i)水相介质和(ii)包围所述水相介质表面的两亲分子外层,且每个所述液滴与另一个所述液滴接触,从而形成作为相接触的液滴之间的界面的所述两亲分子双分子层;

其中,所述多个液滴包含第一区域的液滴和第二区域的液滴,所述第一区域中的每个

液滴均与该区域中的至少一个其他液滴相接触,从而形成作为相接触的液滴之间的界面的所述两亲分子双分子层,且所述第二区域中的每个液滴均与该区域中的至少一个其他液滴相接触,从而形成作为相接触的液滴之间的界面的所述两亲分子双分子层;

其中,所述第一区域中的所述液滴的水相介质与所述第二区域中的所述液滴的水相介质不同,和/或其中所述第一区域中的液滴之间的双分子层的组成成分与所述第二区域中的液滴之间的双分子层的组成成分不同。

28. 根据权利要求27所述的装置,其特征在于,

所述第一区域中的液滴的所述水相介质包含膜蛋白,且所述第二区域中的液滴的所述水相介质不包含所述膜蛋白;

所述第一区域和第二区域中的液滴的所述水相介质具有不同的膜蛋白浓度;

所述第一区域中的液滴之间的所述双分子层进一步包括膜蛋白,且所述第二区域中的液滴之间的所述双分子层不含所述膜蛋白或所含膜蛋白的浓度低于所述第一区域中的液滴之间的所述双分子层所含的膜蛋白浓度;

所述第一区域和第二区域中的液滴的所述水相介质具有不同的渗透压;或

所述第一区域和第二区域中的液滴的所述水相介质具有不同浓度的盐或缓冲物质。

29. 根据权利要求1所述的装置,其特征在于,所述液滴组件包含至少10000个所述液滴,每个所述液滴包含(i)水相介质和(ii)包围所述水相介质的表面的两亲分子外层。

30. 根据权利要求1所述的装置,其特征在于,所述控制单元适于协调(a)所述容器相对于所述至少一个液滴发生器的移动和(b)所述液滴的分配,以根据如权利要求33-98所述的方法制作液滴组件。

31. 根据任一项前述权利要求所述的装置,其特征在于,所述控制单元适于协调(a)所述容器相对于所述至少一个液滴发生器的移动和(b)所述液滴的分配,以制作如权利要求100-113所述的液滴组件。

32. 根据权利要求1所述的装置,其特征在于,所述疏水介质是处于第二松散介质内的疏水介质液滴,所述第二松散介质是水相介质,且其中所述容器装有作为水相介质的所述第二松散介质和所述疏水介质液滴。

33. 利用用于产生液滴组件的装置来产生液滴组件的方法,

所述液滴组件包括:多个液滴,其中每个所述液滴包括(i)液滴介质和(ii)包围所述液滴介质的表面的两亲分子外层,所述液滴介质为水相介质或疏水介质,且每个所述液滴与另一个所述液滴接触,从而形成作为相接触的液滴之间的界面的两亲分子双分子层,其中所述液滴组件包括至少n个所述液滴,以及至少n-1个所述相接触的液滴之间的界面,n等于或大于4;

所述装置包括:至少一个液滴发生器;可相对于所述至少一个液滴发生器移动的容器;以及控制单元,所述控制单元用于控制所述至少一个液滴发生器分配液滴和所述容器相对于所述至少一个液滴发生器的移动;

其中所述装置的所述容器包括松散介质,其中:

当所述液滴介质为水相介质时,所述松散介质为疏水介质;以及当所述液滴介质为疏水介质时,所述松散介质为水相介质;

所述方法包括:

(a) 多个分配步骤,其中每个分配步骤包括:在两亲分子的存在下,从所述液滴发生器中分配一滴所述液滴介质到所述松散介质中,由此在所述松散介质中形成包含(i)所述液滴介质和(ii)包围所述液滴介质表面的两亲分子外层的液滴;以及

(b) 令所述容器相对于所述至少一个液滴发生器移动,以控制所述液滴在所述松散介质中的相对位置,并将每个液滴置于邻近至少一个其他液滴处,使得每个液滴与另一个液滴接触,从而形成作为相接触的液滴之间的界面的两亲分子双分子层。

34. 根据权利要求33所述的方法,其特征在于,所述控制单元控制所述分配步骤和所述容器相对于所述至少一个液滴发生器的移动。

35. 根据权利要求33所述的方法,其特征在于,所述控制单元协调所述分配步骤和所述容器相对于所述至少一个液滴发生器的移动,以产生所述液滴组件。

36. 根据权利要求33所述的方法,其特征在于,所述相对于所述至少一个液滴发生器移动所述容器包括:在分配步骤之间,相对于所述至少一个液滴发生器移动所述容器。

37. 根据权利要求33所述的方法,其特征在于,所述相对于所述至少一个液滴发生器移动所述容器包括:在分配步骤之间及分配步骤中,相对于所述至少一个液滴发生器移动所述容器。

38. 根据权利要求33所述的方法,其特征在于,所述液滴介质是水相介质,且所述松散介质是疏水介质。

39. 根据权利要求33所述的利用用于产生液滴组件的装置来产生液滴组件的方法,其特征在于,

所述液滴组件包括:多个液滴,其中每个所述液滴包括(i)水相介质和(ii)包围所述水相介质表面的两亲分子外层,且其中至少一个所述液滴与另一个所述液滴接触从而形成作为相接触的液滴之间的界面的所述两亲分子双分子层,其中所述液滴组件包括至少n个所述液滴,以及至少n-1个所述相接触的液滴之间的界面,n等于或大于4;

所述装置包括:至少一个液滴发生器;可相对于所述至少一个液滴发生器移动的容器;以及控制单元,所述控制单元用于控制所述至少一个液滴发生器分配液滴和所述容器相对于所述至少一个液滴发生器的移动;

其中所述装置的所述容器装有疏水介质;

所述方法包括:

(a) 多个分配步骤,其中每个分配步骤包括:在两亲分子的存在下,从所述液滴发生器中分配一滴水相介质到所述疏水介质中,由此在所述疏水介质中形成包含(i)所述水相介质和(ii)包围所述水相介质的表面的两亲分子外层的液滴;以及

(b) 令所述容器相对于所述至少一个液滴发生器移动,以控制所述液滴在所述疏水介质中的相对位置,并将每个液滴置于邻近至少一个其他液滴处,使得每个液滴与另一个液滴接触,从而形成作为相接触的液滴之间的界面的两亲分子双分子层。

40. 根据权利要求38所述的方法,其特征在于,所述方法包括:

(a) 第一分配步骤,包括:在两亲分子的存在下,从所述液滴发生器中分配一滴所述水相介质到所述疏水介质中,由此在所述疏水介质中形成包含(i)所述水相介质和(ii)包围所述水相介质的表面的两亲分子外层的液滴;

(b) 令所述容器相对于所述至少一个液滴发生器移动,以控制第二液滴在所述疏水介

质中相对于所述疏水介质中的所述第一液滴的位置,从而将所述第二液滴置于邻近所述第一液滴处,使得所述第一液滴与所述第二液滴相互接触而形成作为相接触的液滴之间的界面的两亲分子双分子层;

(c) 第二分配步骤,包括:在两亲分子的存在下,从所述液滴发生器中分配一滴所述水相介质到所述疏水介质中,由此在所述疏水介质中形成包含(i)所述水相介质和(ii)包围所述水相介质的表面的两亲分子外层的所述第二液滴;

所述方法进一步包括:

(d) 令所述容器相对于所述至少一个液滴发生器移动,以控制又一液滴在所述疏水介质中相对于所述疏水介质中的其他液滴的位置,从而将所述又一液滴置于邻近所述疏水介质中的至少一个其他液滴处,由此使得所述又一液滴与所述疏水介质中的至少一个其他液滴相互接触,从而形成作为相接触的液滴之间的界面的所述两亲分子双分子层;和

(e) 又一分配步骤,包括:在两亲分子的存在下,从所述液滴发生器向所述疏水介质中分配又一滴水相介质,由此在所述疏水介质中形成包含(i)所述水相介质和(ii)包围所述水相介质表面的两亲分子外层的所述又一液滴;

所述方法包括至少500个所述又一分配步骤(e)。

41. 根据权利要求40所述的方法,其特征在于,所述方法包括至少10000个所述又一分配步骤(e)。

42. 根据权利要求40所述的方法,其特征在于,所述方法包括至少500个所述令所述容器相对于所述至少一个液滴发生器移动的步骤(d),以及至少500个所述又一分配步骤(e)。

43. 根据权利要求40所述的方法,其特征在于,所述方法包括至少10000个所述令所述容器相对于所述至少一个液滴发生器移动的步骤(d),以及至少10000个所述又一分配步骤(e)。

44. 根据权利要求38中任一项所述的方法,其特征在于,所述多个分配步骤包括共同在所述疏水介质中产生一行所述液滴的分配步骤,其中所述行中的每个液滴均与该行的又一液滴相接触,从而形成作为相接触的液滴之间界面的所述两亲分子双分子层。

45. 根据权利要求44所述的方法,其特征在于,所述多个分配步骤包括:

第一组分配步骤,其共同在所述疏水介质中产生第一行所述液滴,其中所述第一行中的每个液滴均与所述第一行的另一液滴相接触,从而形成作为相接触的液滴之间界面的所述两亲分子双分子层;以及

第二组分配步骤,其共同在所述疏水介质中产生第二行所述液滴,其中所述第二行中的每个液滴均与所述第二行的另一液滴相接触,从而形成作为相接触的液滴之间界面的所述两亲分子双分子层。

46. 根据权利要求45所述的方法,其特征在于,所述第二行中的液滴被分配到邻近所述第一行中的液滴处,由此所述第一行中的液滴与所述第二行中的液滴相互接触,从而形成作为相接触的液滴之间界面的所述两亲分子双分子层。

47. 根据权利要求38所述的方法,其特征在于,所述多个分配步骤包括共同在所述疏水介质中产生多行所述液滴的分配步骤,其中一行中的每个液滴均与该行的另一液滴相接触,从而形成作为相接触的液滴之间界面的所述两亲分子双分子层,且其中各行均邻近另一行,由此一行中的液滴与相邻行中的液滴相互接触,从而形成作为相接触的液滴之间界

面的所述两亲分子双分子层。

48. 根据权利要求38所述的方法,其特征在于,所述多个分配步骤包括共同在所述疏水介质中产生一层所述液滴的分配步骤,其中所述层中的每个液滴均与该层的另一液滴相接触,从而形成作为相接触的液滴之间界面的所述两亲分子双分子层。

49. 根据权利要求38所述的方法,其特征在于,所述多个分配步骤包括

第一组分配步骤,其共同在所述疏水介质中产生第一层所述液滴,其中所述第一层中的每个液滴均与所述第一层的至少一个其他液滴相接触,从而形成作为相接触的液滴之间界面的所述两亲分子双分子层;以及

第二组分配步骤,其共同在所述疏水介质中产生第二层所述液滴,其中所述第二层中的每个液滴均与所述第二层的至少一个其他液滴相接触,从而形成作为相接触的液滴之间界面的所述两亲分子双分子层。

50. 根据权利要求49所述的方法,其特征在于,所述第二层中的液滴被分配到邻近所述第一层的液滴处,由此所述第一层中的液滴与所述第二层中的液滴相互接触,从而形成作为相接触的液滴之间界面的所述两亲分子双分子层。

51. 根据权利要求38所述的方法,其特征在于,所述多个分配步骤包括共同在所述疏水介质中产生多层所述液滴的分配步骤,其中一层中的每个液滴均与该层的另一液滴相接触,从而形成作为相接触的液滴之间界面的所述两亲分子双分子层,且其中各层均邻近另一层,由此一层中的液滴与相邻层中的液滴相互接触,从而形成作为相接触的液滴之间界面的所述两亲分子双分子层。

52. 根据权利要求51所述的方法,其特征在于,各层中的液滴被分配到另一层的液滴的上方、邻近处或下方,由此一层中的液滴与另一层中的液滴接触,从而形成作为相接触的液滴之间界面的所述两亲分子双分子层。

53. 根据权利要求38所述的方法,其特征在于,进一步在分配步骤和相对于所述至少一个液滴发生器移动所述容器的步骤之间,包含延迟,以减少液滴滑移。

54. 根据权利要求53所述的方法,其特征在于,所述延迟等于或大于10ms。

55. 根据权利要求53所述的方法,其特征在于,所述多个分配步骤包括至少一组分配步骤,所述至少一组分配步骤共同在所述疏水介质中产生一行所述液滴,其中所述行中的每个液滴均与该行中的另一液滴相接触,从而形成作为相接触的液滴之间界面的所述两亲分子双分子层;以及,其中所述方法进一步在(i)所述共同产生所述一行液滴的一组分配步骤的最后一个分配步骤和(ii)后续的相对于所述至少一个液滴发生器移动所述容器的步骤之间,包含所述延迟。

56. 根据权利要求55所述的方法,其特征在于,进一步在所述共同产生所述一行液滴的每组分配步骤的最后一个分配步骤和相对于所述至少一个液滴发生器移动所述容器的后续步骤之间,包含所述延迟。

57. 根据权利要求33所述的方法,其特征在于,所述疏水介质或水相介质中的一种或两种进一步包含所述两亲分子。

58. 根据权利要求33所述的方法,其特征在于,所述至少一个液滴发生器是包含用于分配液滴的压电换能器的压电式液滴发生器,且其中

每个分配步骤包含向压电元件施加电压脉冲。

59. 根据权利要求58所述的方法,其特征在于,所述电压脉冲的峰-峰振幅为5V至100V。

60. 根据权利要求58所述的方法,其特征在于,所述电压脉冲的时长为从10  $\mu\text{s}$ 至1500  $\mu\text{s}$ 。

61. 根据权利要求33所述的方法,其特征在于,所述液滴分配速率为0.01至 $10\text{s}^{-1}$ 。

62. 根据权利要求33所述的方法,其特征在于,所述装置包括2个或更多所述液滴发生器。

63. 根据权利要求33所述的方法,其特征在于,所述液滴介质是水相介质,且所述松散介质是疏水介质,且其中所述多个分配步骤包括:

第一组分配步骤,其共同在所述疏水介质中产生第一区域的液滴,其中所述第一区域中的每个液滴均与所述第一区域的至少一个其他液滴相接触,从而形成作为相接触的液滴之间界面的所述两亲分子双分子层;以及

第二组分配步骤,其共同在所述疏水介质中产生第二区域的液滴,其中所述第二区域中的每个液滴均与所述第二区域的至少一个其他液滴相接触,从而形成作为相接触的液滴之间界面的所述两亲分子双分子层。

64. 根据权利要求63所述的方法,其特征在于,所述装置包括第一液滴发生器和第二液滴发生器,其中所述第一组分配步骤所分配的液滴是从所述第一液滴发生器分配到所述疏水介质中,且所述第二组分配步骤所分配的液滴是从所述第二液滴发生器分配到所述疏水介质中。

65. 根据权利要求63所述的方法,其特征在于,所述第二区域的液滴被分配到邻近所述第一区域的液滴的位置,由此所述第一区域的液滴与所述第二区域的液滴相接触,从而形成作为相接触的液滴之间界面的所述两亲分子双分子层。

66. 根据权利要求63所述的方法,其特征在于,

所述第一区域的液滴包括一行液滴、一行液滴中的部分液滴、多行液滴、多行液滴中的部分液滴、一层液滴、一层液滴中的部分液滴、多层液滴或多层液滴中的部分液滴;以及

所述第二区域的液滴包括一行液滴、一行液滴中的部分液滴、多行液滴、多行液滴中的部分液滴、一层液滴、一层液滴中的部分液滴、多层液滴或多层液滴中的部分液滴。

67. 根据权利要求63所述的方法,其特征在于,所述第一区域和第二区域是如权利要求45或46所定义的第一行和第二行,或所述第一区域和第二区域是如权利要求49或50所定义的第一层和第二层。

68. 根据权利要求63所述的方法,其特征在于,所述第一区域的液滴形成穿过所述第二区域的液滴的液滴路径。

69. 根据权利要求63所述的方法,其特征在于,在所述第一组分配步骤中分配到所述疏水介质中的所述液滴的水相介质中进一步包含膜蛋白,且其中在所述第二组分配步骤中分配到所述疏水介质中的所述液滴的水相介质中不包含所述膜蛋白。

70. 根据权利要求69所述的方法,其特征在于,所述第一区域中相互接触的液滴之间形成的所述两亲分子双分子层中,进一步包括所述膜蛋白。

71. 根据权利要求70所述的方法,其特征在于,所述第二区域中相互接触的液滴之间形成的所述两亲分子双分子层中,不包括所述膜蛋白。

72. 根据权利要求63所述的方法,其特征在于,在所述第一组分配步骤中分配到所述疏

水介质中的所述液滴的水相介质包含的膜蛋白浓度高于在所述第二组分配步骤中分配到所述疏水介质中的所述液滴的水相介质包含的所述膜蛋白浓度。

73. 根据权利要求72所述的方法,其特征在於,所述第一区域中相互接触的液滴之间形成的所述两亲分子双分子层中包含所述膜蛋白。

74. 根据权利要求73所述的方法,其特征在於,所述第二区域中相互接触的液滴之间形成的所述两亲分子双分子层不包含所述膜蛋白,或其包含所述膜蛋白的浓度低于所述第一区域中相互接触的液滴之间形成的所述两亲分子双分子层包含的所述膜蛋白浓度。

75. 根据权利要求69所述的方法,其特征在於,所述膜蛋白为膜泵蛋白、通道蛋白、孔蛋白或受体蛋白,转运蛋白,或影响细胞识别或细胞间相互作用的蛋白。

76. 根据权利要求69所述的方法,其特征在於,所述膜蛋白是 $\alpha$ -溶血素( $\alpha$ HL)孔蛋白。

77. 根据权利要求63所述的方法,其特征在於,

在所述第一组分配步骤中分配到所述疏水介质中的所述液滴的水相介质具有第一渗透压,且在所述第二组分配步骤中分配到所述疏水介质中的所述液滴的水相介质具有第二渗透压,其中所述第一渗透压高于所述第二渗透压;以及

所述第二区域的液滴被分配到靠近所述第一区域的液滴的位置,由此所述第一区域的液滴与所述第二区域的液滴相接触,从而形成作为相接触的液滴之间界面的所述两亲分子双分子层。

78. 根据权利要求77所述的方法,其特征在於,在所述第一组分配步骤中分配到所述疏水介质中的所述液滴的水相介质是盐的水溶液,所述水溶液具有所述第一渗透压,且在所述第二组分配步骤中分配到所述疏水介质中的所述液滴的水相介质是盐的水溶液,且所述水溶液具有所述第二渗透压。

79. 根据权利要求77所述的方法,其特征在於,所述第一渗透压与所述第二渗透压的比率为2:1至50:1。

80. 根据权利要求77所述的方法,其特征在於,在所述第一组分配步骤中分配到所述疏水介质中的所述液滴的水相介质是盐的水溶液,该水溶液中的盐具有第一浓度;且在所述第二组分配步骤中分配到所述疏水介质中的所述液滴的水相介质是具有相同的所述盐的水溶液,所述盐在该水溶液中具有第二浓度,其中所述第一浓度高于所述第二浓度。

81. 根据权利要求80所述的方法,其特征在於,所述第一浓度与所述第二浓度的比率为2:1至50:1。

82. 根据权利要求77所述的方法,其特征在於,进一步包括:允许水从所述第二区域传递到所述第一区域,从而引起所述液滴组件的变形。

83. 根据权利要求82所述的方法,其特征在於,所述传递引起所述第一区域和第二区域弯曲或折叠。

84. 根据权利要求82所述的方法,其特征在於,所述液滴的第一区域和第二区域分别包括如权利要求50中所定义的第一层和第二层液滴,其中

所述第一层和第二层成直角,且所述传递引起所述第一层和第二层折叠为环形的结构;或

所述第一层为直角且所述第二层包含平行液滴条带,且所述传递引起所述第一层和第二层折叠为圆柱形结构;或

所述第一层和第二层包含花瓣状区域,且所述传递引起所述花瓣状区域向内折叠并相连,从而形成空心液滴组件。

85. 根据权利要求82所述的方法,其特征在于,产生的所述液滴组件包括不包含任何液滴的组件内部容积。

86. 根据权利要求33所述的方法,其特征在于,所述液滴介质是水相介质且所述松散介质是疏水介质,且其中所述装置包括第一液滴发生器和第二液滴发生器,且所述多个分配步骤包括:

至少一个分配步骤,其包括在两亲分子的存在下从所述第一液滴发生器向所述疏水介质中分配一滴第一水相介质液滴、由此在所述疏水介质中形成包含(i)所述第一水相介质和(ii)包围所述水相介质表面的两亲分子外层的所述液滴;和

至少一个分配步骤,其包括在两亲分子的存在下从所述第二液滴发生器向所述疏水介质中分配一滴第二水相介质液滴、由此在所述疏水介质中形成包含(i)所述第二水相介质和(ii)包围所述水相介质表面的两亲分子外层的所述液滴;

其中所述第一水相介质和所述第二水相介质相同或不同。

87. 根据权利要求86所述的方法,其特征在于,所述多个分配步骤包括:多个第一分配步骤,其包括从所述第一液滴发生器向所述疏水介质中分配一滴第一水相介质液滴;以及,多个第二分配步骤,其包括从所述第二液滴发生器向所述疏水介质中分配一滴第二水相介质液滴。

88. 根据权利要求86所述的方法,其特征在于,所述第一水相介质和所述第二水相介质不同。

89. 根据权利要求88所述的方法,其特征在于,所述第一水相介质和所述第二水相介质具有不同的渗透压,或所述第一水相介质和所述第二水相介质包含不同浓度的盐或缓冲物质。

90. 根据权利要求88所述的方法,其特征在于,所述第一水相介质中包含膜蛋白,且所述第二水相介质中不包含所述膜蛋白。

91. 根据权利要求86所述的方法,其特征在于,由所述第一液滴发生器分配的所述第一水相介质的液滴,与由所述第二液滴发生器分配的所述第二水相介质的液滴相比,具有不同的大小。

92. 根据权利要求33所述的方法,其特征在于,所述液滴介质是水相介质且所述松散介质是疏水介质,且其中作为疏水介质的所述松散介质是一滴疏水介质。

93. 根据权利要求92所述的方法,其特征在于,所述一滴疏水介质位于作为水相介质的第二松散介质内,其中所述装置的所述容器装有作为水相介质的所述第二松散介质,以及所述一滴疏水介质。

94. 根据权利要求93所述的方法,其特征在于,所述一滴疏水介质进一步包括包围所述一滴疏水介质的表面的两亲分子外层,所述两亲分子外层充当所述一滴疏水介质和作为水相介质的所述第二松散介质之间的界面。

95. 根据权利要求94所述的方法,其特征在于,所述液滴组件产生于所述两亲介质液滴内部,以形成液滴封装,所述液滴封装包括:

所述疏水介质液滴;

包围所述液滴表面的所述两亲分子外层;以及  
所述外层内的所述液滴组件。

96. 根据权利要求33所述的方法,其特征在于,进一步包括从所述松散介质中回收所述液滴组件。

97. 根据权利要求95所述的方法,其特征在于,进一步包括从作为水相介质的所述第二松散介质中回收所述液滴封装。

98. 根据权利要求33所述的方法,其特征在于,所述装置如权利要求32所定义。

99. 根据权利要求33-97中任一项所述方法制备而成的液滴组件。

100. 液滴组件,所述液滴组件包含多个液滴,其中每个所述液滴包含(i)水相介质和(ii)包围所述水相介质表面的两亲分子外层,且其中每个所述液滴与另一所述液滴接触以形成作为相接触的液滴之间界面的两亲分子双分子层,其中所述液滴组件包括至少n个所述液滴,以及至少n-1个所述相接触的液滴之间的界面,n等于或大于4;

其中,所述多个液滴包含第一区域的液滴和第二区域的液滴,所述第一区域中的每个液滴均与该区域中的至少一个其他液滴相接触,从而形成作为相接触的液滴之间界面的所述两亲分子双分子层,且所述第二区域中的每个液滴均与该区域中的至少一个其他液滴相接触,从而形成作为相接触的液滴之间界面的所述两亲分子双分子层;

其中,所述第一区域中的所述液滴的水相介质具有第一渗透压,所述第二区域中的所述液滴中的所述水相介质具有第二渗透压,其中所述第一渗透压与所述第二渗透压不同。

101. 根据权利要求100所述的液滴组件,其特征在于,所述第一渗透压与所述第二渗透压的比率为2:1至50:1。

102. 根据权利要求100所述的液滴组件,其特征在于,在所述第一区域中的液滴的所述水相介质是盐的水溶液,该水溶液中的盐在所述水溶液中具有第一浓度;且在所述第二区域中的液滴的所述水相介质是盐的水溶液,该水溶液中的盐在所述水溶液中具有第二浓度,其中所述第一浓度不同于所述第二浓度。

103. 根据权利要求102所述的液滴组件,其特征在于,所述第一浓度与所述第二浓度的比率为2:1至50:1。

104. 根据权利要求100所述的液滴组件,其特征在于,所述第一区域中的液滴排列成一行、多行、一层或多层,且所述第二区域中的液滴排列成一行、多行、一层或多层。

105. 根据权利要求100所述的液滴组件,其特征在于,所述第一区域中的液滴排列成一层或多层,所述第二区域中的液滴排列成一层或多层,其中所述第二区域中的一层或多层液滴置于所述第一区域中的一层或多层液滴上或其邻近处,由此所述第一层中的液滴与所述第二层中的液滴接触,从而形成作为相接触的液滴之间界面的所述两亲分子双分子层。

106. 根据权利要求105所述的液滴组件,其特征在于,所述第一层和第二层或多层包含花瓣状区域。

107. 根据权利要求106所述的液滴组件,其特征在于,所述花瓣状区域能够向内折叠并相连以形成空心液滴组件。

108. 液滴组件,所述液滴组件包含多个液滴,其中每个所述液滴包含(i)水相介质和(ii)包围所述水相介质表面的两亲分子外层,且其中每个所述液滴与另一所述液滴接触以形成作为相接触的液滴之间界面的所述两亲分子双分子层;其中所述液滴组件包括至少n

个所述液滴,以及至少 $n-1$ 个所述相接触的液滴之间界面, $n$ 等于或大于4;且其中所述多个液滴形成围绕所述液滴组件不含所述液滴的内部容积的外壳。

109. 根据权利要求108所述的液滴组件,其特征在于,所述多个液滴中的液滴数量为至少100。

110. 根据权利要求108所述的液滴组件,其特征在于,由所述液滴形成的所述外壳为曲形结构。

111. 根据权利要求108所述的液滴组件,其特征在于,由所述液滴形成的所述外壳为圆柱形、为环形、为球形或为半球形。

112. 根据权利要求110所述的液滴组件,其特征在于,由所述液滴形成的所述外壳中封装所述液滴组件的内部容积。

113. 根据权利要求112所述的液滴组件,其特征在于,由所述液滴形成的所述外壳为球形。

114. 根据权利要求100或108所述的液滴组件,其特征在于,所述多个液滴中的所述液滴数目为至少10000。

115. 根据权利要求99-114中任一项所限定的液滴组件在合成生物学中的用途。

116. 根据权利要求99-114中任一项所限定的液滴组件作为给药载体的用途。

117. 根据权利要求99-114中任一项所限定的液滴组件在组织工程中的用途。

118. 根据权利要求99-114中任一项所限定的液滴组件在材料科学与工程中的用途。

## 3D打印的液滴组件

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于生产液滴组件的装置,所述装置包括液体发生器;还描述了一种使用包括液体发生器的装置来生产液滴组件的方法。本发明还涉及包含多个液滴的液滴组件,还描述了所述液滴组件的多种用途。

### 背景技术

[0002] 脂质的油溶液中的含水液滴,通过在其交界面形成脂质双分子层来进行粘附(Poulin,P.et al.,Langmuir 14,6341-6343(1998)和Holden,M.A.,et al.,J.Am.Chem.Soc.129,8650-8655(2007))。已经构建出以膜蛋白进行功能化处理的液体网络,用作光感应器(Holden,M.A.,et al.,J.Am.Chem.Soc.129,8650-8655(2007))、电池(Holden,M.A.,et al.,J.Am.Chem.Soc.129,8650-8655(2007))或简单电路(Maglia,G.et al.,Nature Nanotech.4,437-440(2009))。可以在散装水溶液中令液体网络稳定化,并设定其在pH或温度改变时释放其内容物(Villar,G.,et al.,Nature Nanotech.6,803-808(2011))。但是,现有的网络仅限于少量液滴的简单结构,通常通过微流体装置(Bai,Y.et al.,Lab.Chip 10,1281-1285(2010),Zagnoni,M.et al.,Lab.Chip 10,3069-3073(2010)和Stanley,C.E.et al.,Chem.Commun.46,1620-1622(2010))或外场操纵(Aghdaei,S.,etal.,Lab.Chip 8,1617-1620(2008),Poulos,J.L.,et al.,Appl Phys Lett 95,013706(2009)和Dixit,S.S.,et al.,Langmuir 26,6193-6200(2010))进行手动组装(Holden,M.A.,et al.,J.Am.Chem.Soc.129,8650-8655(2007)和Maglia,G.et al.,Nature Nanotech.4,437-440(2009))。

[0003] 因此,对于开发出一种生产复杂的液滴组件(例如三维液滴组件)的方法,以及用于生产液滴组件的装置,存在持续的需要。

### 发明内容

[0004] 本发明涉及用于产生液滴组件的装置,该装置能够通过自动化方法产生液滴组件。本发明还涉及生产液滴组件的自动化方法。

[0005] 使用本发明的装置和方法生产液滴组件的速度和精确度可以允许制作复杂的液滴组件。

[0006] 发明人展示,可以生产包含成千上万个液滴的毫米级几何结构。使用本发明,还可能生产包含数十亿个液滴的更大结构。令人吃惊地,所述结构可自支撑,且可耐受轻度扰动。此外,所述结构自身可以是复杂和多样化的,其可以制作此前的现有技术方法无法制作的结构。

[0007] 可以控制液滴组件中每个液滴的精确位置和组成成分。因此,可以容易地功能化所述液滴组件,例如通过向特定接触液滴之间的双分子层中融入膜蛋白。例如,发明人展示,可以通过在组件内特定液滴中插入膜蛋白,来生成神经组织的简单功能化模拟物。所述液滴组件还可以通过在特定液滴中插入多种不同材料来功能化,包括小分子、酶和活细胞。

例如,可以允许活细胞在液滴组件的液滴中生长,并在打印后的一定时间内破坏液滴间的双分子层。

[0008] 液滴组件还可以用作固体材料图案形成的牺牲模版。例如,可以在液滴组件的特定液滴中包含无机材料。可以在液滴组件的不同液滴中置入不同无机材料。然后,无机材料可以在特定液滴之间扩散,并反应生成例如硫化镉等无机固体。

[0009] 此外,可以制作包含2个或更多不同隔室的液滴组件。各个液滴组件可以相互通讯和/或与外部环境通讯,例如,通过使用膜蛋白。因此,可以生产复杂的分隔化系统。

[0010] 利用渗透过程,发明人还得以构建出可以可预测方式折叠的自发折叠网络。液滴组件的变形能力允许开发更复杂的新型结构。液滴组件可以,例如,设计为肌肉组织的液压模拟物。液滴组件的应用,例如用作自主功能性主体,与活体生物或电子产品互动,成为现实性前景。例如,该组件可以用作给药平台,甚至是人造组织的一部分。液滴组件在组织工程中的应用是一项尤其令人关注的前景,因为其可以减少甚至胜过许多通常以活细胞观察的组织,例如细胞的复制和迁移,以及身体对组织的排斥。

[0011] 鉴于此,本发明提供一种用于生成液滴组件的装置,所述装置包括:

[0012] 至少一个液滴发生器;可相对于所述至少一个液滴发生器移动的容器;以及控制单元,所述控制单元用于控制所述至少一个液滴发生器分配液滴和所述容器相对于所述至少一个液滴发生器的移动;其中,所述装置用于产生包含多个液滴的液滴组件,其中每个所述液滴包括(i)液滴介质和(ii)包围所述液滴介质表面的两亲分子外层,其中所述液滴介质为水相介质或疏水介质,且其中至少一个所述液滴与另一个所述液滴接触从而形成作为所述接触液滴之间界面的所述两亲分子层。

[0013] 本发明还提供一种使用用于产生液滴组件的装置产生所述液滴组件的方法,所述液滴组件包括:多个液滴,其中每个所述液滴包括(i)液滴介质和(ii)包围所述液滴介质表面的两亲分子外层,所述液滴介质为水相介质或疏水介质,且至少一个所述液滴与另一个所述液滴接触,从而形成作为所述接触液滴之间界面的所述两亲分子层;所述装置包括:至少一个液滴发生器;可相对于所述至少一个液滴发生器移动的容器;以及控制单元,所述控制单元用于控制所述至少一个液滴发生器分配液滴和所述容器相对于所述至少一个液滴发生器的移动;其中所述装置的所述容器包括松散介质,其中当所述液滴介质为水相介质时,所述松散介质为疏水介质;以及当所述液滴介质为疏水介质时,所述松散介质为水相介质;所述方法包括:(a)多个分配步骤,其中每个分配步骤包括:在两亲分子的存在下,从所述液滴发生器中分配一滴所述液滴介质到所述松散介质中,由此在所述松散介质中形成包含(i)所述液滴介质和(ii)包围所述液滴介质表面的两亲分子外层的液滴;以及(b)令所述容器相对于所述至少一个液滴发生器移动,以控制所述液滴在所述松散介质中的相对位置。其中,所述装置用于产生包含多个液滴的液滴组件,其中每个所述液滴包括(i)液滴介质和(ii)包围所述液滴介质表面的两亲分子外层,其中所述液滴介质为水相介质或疏水介质,且其中至少一个所述液滴与另一个所述液滴接触以形成作为所述接触液滴之间的界面的所述两亲分子层。

[0014] 本发明的另一方面提供可通过如上所述的方法制得的液滴组件。

[0015] 本发明的另一方面还提供一种液滴组件,所述液滴组件包含多个液滴,其中每个所述液滴包含(i)水相介质和(ii)包围所述水相介质表面的两亲分子外层,且其中每个所

述液滴与另一所述液滴接触以形成作为所述接触液滴之间界面的所述两亲分子的双分子层;其中,所述多个液滴包含所述液滴的第一区域和所述液滴的第二区域,所述第一区域中的每个液滴均与该区域中的至少一个其他液滴相接触,从而形成作为所述接触液滴之间界面的所述两亲分子的双分子层,且所述第二区域中的每个液滴均与该区域中的至少一个其他液滴相接触,从而形成作为所述接触液滴之间界面的所述两亲分子的双分子层;其中,所述第一区域中的所述液滴的水相介质具有第一渗透压,所述第二区域中的所述液滴中的所述水相介质具有第二渗透压,其中所述第一渗透压与所述第二渗透压不同。

[0016] 本发明还提供一种液滴组件,所述液滴组件包含多个液滴,其中每个所述液滴包含 (i) 水相介质和 (ii) 包围所述水相介质表面的两亲分子外层,且其中每个所述液滴与另一所述液滴接触以形成作为所述接触液滴之间界面的所述两亲分子的双分子层;其中所述多个液滴形成围绕所述液滴组件不含所述液滴的内部容积的外壳。

[0017] 本发明的其他方面中,提供本发明如上所述的液滴组件的各种用途。

[0018] 因此,本发明提供如本文所述的本发明液滴组件在合成生物学中的用途。

[0019] 本发明还提供如本文所述的本发明液滴组件作为给药载体的用途。

[0020] 本发明还提供如本文所述的本发明液滴组件在组织工程中的用途。该液滴组件的液滴可以例如包含活细胞。

[0021] 本发明还提供如本文所述的本发明液滴组件在材料科学和工程中的用途。

[0022] 本发明还提供如本文所述的本发明液滴组件作为固体材料的图案形成模版的用途。

## 附图说明

[0023] 图1展示了液滴发生器的示意图。该液滴发生器的腔室中充满了体积为V的水溶液,其底部有长度为L、内直径为D、尖端直径为d的喷嘴。腔室中的水溶液的液面高于孔中的油溶液液面的距离为h。

[0024] 图2展示了已打印的液滴网络。图2a展示了所述装置的组装示意图。2台液滴发生器将不同水溶液的液滴喷射入充满了含脂质的油溶液的孔(well)中。所述孔设置在机动化显微操作器上。液滴发生器和操作器受到电脑(PC)控制。图2b提供了打印中的液滴网络的示意图。喷射到油中的水相液滴获得脂质单分子层,并与正在生长的网络中的液滴形成双分子层。

[0025] 图2c展示了限定一种3D液滴网络的期望水平截面的图像。该设计包括20层,每层含有 $50 \times 35$ 个液滴;图中仅展示了交替相间的截面。图2d中展示了根据图2c中的设计所打印的网络。图中比例尺代表5mm。

[0026] 图2e是由28层每层 $24 \times 24$ 液滴组成的另一3D设计的示意图。图2f展示了根据图2e中的设计所打印的单一网络的3张正交视图。图中比例尺代表1mm。

[0027] 图3是液滴发生器的示意图。该装置由微机械制作的聚甲基丙烯酸甲酯腔室及贴附其上的压电换能器组成。该转换器对面装有橡胶隔片,且所述隔片中插入一段拉制的弯曲玻璃毛细管。使用2个低孔来将一台装置固定在适当位置,并将另一台安装在手动显微操作器上。所有维度的单位均为mm。

[0028] 图4是液滴发生器的驱动电路的示意图。所述电路允许电脑以12位分辨率向2台压

电换能器之一施加范围在-30V至+30V之间的电压。缩写:PC-电脑;USB-通用串行总线;SPI-串行外围接口;DAC-数字模拟转换器;op amp-运算放大器。

[0029] 图5展示了图形用户界面。左边和中间的面板各用于两台液滴发生器之一,所述面板可以改变电压脉冲的时长( $\mu\text{s}$ )和幅度(作为60V的一定比例),触发液滴喷射,改变每次触发喷射的液滴数目,以及改变每次触发制作的多个液滴之间的延迟(ms)。右边的面板可以互动控制操作器,并且改变该操作器的步长和步速。

[0030] 图6展示了一种打印图样。图6a提供了49像素地图的例子,包括A(浅灰色),B(深灰色,位于图样中心)和空白(黑)像素。图6b展示了两次打印中,每次打印中打印喷嘴穿过该地图的路径,其为打印算法的最简单形式。

[0031] 图7展示了打印失真。该图中的所有网络均以图6b中的简单打印图样打印。图7a展示了设计为立方形但结果得到凸起顶面的网络的水平视图。图7b展示了设计为立方体但结果得到内凹斜壁的网络的顶视图。图7c展示了设计为立方体且通过简单打印图样如实打印的网络的顶视图。

[0032] 图8是打印算法的概要。首先执行标示为“初始化”的指令,然后是标示为“指引”的指令。在算法继续进行下一指令前,必须满足正方形标示的条件。当执行菱形标记的评估时,若条件为真,则算法继续前进到平行箭头标示的指令,或若条件为伪,则算法继续前进到垂直箭头标示的指令。制作每一液滴之后的延迟由补充方法部分中的实施例进行说明。

[0033] 图9展示了一般液滴网络的电学表示。 $V_i$ 和 $V_j$ 分别是标记为*i*和*j*的液滴的电位。 $C_{ij}$ 和 $r_{ij}$ 分别是标记为*i*和*j*的液滴之间的电容和电阻。 $I_{ij}$ 是应从*j*流向*i*的离子电流,由电容元件 $I_{ij}^C$ 和电阻元件 $I_{ij}^R$ 构成。仅出于方便起见,将液滴显示为方格;实施例中的推导适用于任何排列形式的网络。

[0034] 图10展示了液滴喷射随脉冲宽度和电压的变化。照片是在对液滴发生器施加各种脉冲宽度和脉冲电压的电压脉冲进行液滴喷射后立即拍摄的。为了确定喷射液滴的可重复性,每种脉冲宽度和幅度的组合施加5次,脉冲之间的间隔为数秒。测试完每种组合后,再重复整个流程。对于指定喷嘴,每种脉冲宽度和幅度的组合( $n=10$ )下的液滴生成一致,但随着喷嘴不同而变化。加亮的照片表示当前喷嘴产生用于打印液滴网络的适当大小的单一液滴的条件。图中比例尺为 $200\mu\text{m}$ 。

[0035] 图11展示了散装水溶液中打印的液滴网络。图11a是水溶液中打印的示意图。喷嘴将水相液滴喷射到悬浮在散装水溶液中的网架上的油液滴中。图11b展示了在水溶液中打印的网络的顶视显微照片。浅灰色液滴核心被含有荧光染料8-羟基-1,3,6-三磺酸芘(pyranine)的深灰色液滴外壳所包围。图中比例尺代表 $400\mu\text{m}$ 。

[0036] 图11c展示了由共聚焦显微镜获得的图11b中的网络的水平截面,其中展示了围绕非荧光核的液滴荧光外壳。所述截面的跨度为约该网络底部 $150\mu\text{m}$ 。图中比例尺代表 $400\mu\text{m}$ 。

[0037] 图11d展示了在散装水溶液中打印的3种其他网络的显微照片。图中比例尺代表 $400\mu\text{m}$ 。

[0038] 图12展示了电导路径。图12a展示了具有允许离子电流流动的路径的已打印网络的局部示意图。仅浅灰色液滴和大液滴含有 $\alpha$ -溶血素( $\alpha\text{HL}$ )孔蛋白。大液滴中插入Ag/AgCl电极。截面放大图展示了围绕含 $\alpha\text{HL}$ 的液滴的双分子层中的 $\alpha\text{HL}$ 孔。

[0039] 图12b是电导路径两端设有插入电极液滴的已打印网络的照片。浅灰色液滴含有 $\alpha$

HL,而其他液滴不含此蛋白。图中比例尺代表 $500\mu\text{m}$ 。图12c是图12b所示结构在 $50\text{mV}$ 、 $1\text{M KCl}$ 和 $\text{pH } 8.0$ 下测量得到的离子电流的阶梯式递增。

[0040] 图12d是图12b中的网络在分离大液滴之一并将其重新融入该网络中远离该路径的位置后的照片。图中比例尺代表 $500\mu\text{m}$ 。图12e是图12d的结构在 $50\text{mV}$ 下测量的单一记录的选定部分,其展示了离子电流的瞬时增加。

[0041] 图13展示了含有或不含有 $\alpha\text{HL}$ 的液滴网络的电学测量。图13a展示了液滴全都不含 $\alpha\text{HL}$ 的网络的照片。所述网络液滴和插入电极的大液滴含有 $25\text{mM}$ 三(三(羟甲基)甲胺) $\text{HCl}$ 、 $1\text{M KCl}$ 、 $100\mu\text{M EDTA}$ , $\text{pH } 8.0$ 。此外,所述网络液滴还含有 $1\text{mM}$ 二甲苯蓝FF,且插入电极液滴还含有 $\alpha\text{HL}$ 和 $10\text{mM } 8\text{-羟基-}1,3,6\text{-三磺酸苊}$ 。图中比例尺代表 $500\mu\text{m}$ 。图13b是图13a所示结构在 $50\text{mV}$ 下测量的电流的典型部分。该网络中测得的所有记录中均未发现阶梯式或瞬时峰值。

[0042] 图13c是所有液滴均含有 $\alpha\text{HL}$ 的网络的照片。该网络的液滴和插入电极液滴与图13a中的插入电极液滴的溶液相同。图中比例尺代表 $500\mu\text{m}$ 。图13d展示了图13c中所示结构在大液滴放入网络后立即在 $150\text{mV}$ 下测量所得的部分电流值。在该网络上两次移除和替换大液滴后,测得相似的电流阶跃。

[0043] 图14展示了电导液滴路径的电学模拟。图14a是模拟图12b中电学记录条件的模型的体系的示意图。该网络由面心立方体排列的4行、20列和4层液滴组成,且仅代表图12中的网络的传导路径部分。将2个大液滴置于该网络的两端,并与网络每行末尾的液滴形成双分子层。图14b是图14a所示系统中的电极之间的模拟电流。该模拟使用了下列参数值作为实施例所述实验条件的近似值:外加电势 $50\text{mV}$ ,双分子层直径 $45\mu\text{m}$ ,双分子层单位电容 $650\text{nF cm}^{-2}$ (Holden, M. A., et al., J. Am. Chem. Soc. 129, 8650–8655 (2007)),双分子层电导 $1\text{pS}$ ,孔电导率 $1\text{nS}$ (Holden, M. A., et al., J. Am. Chem. Soc. 129, 8650–8655 (2007))。假设该网络中每一双分子层中最初存在5个 $\alpha\text{HL}$ 孔。假设该网络和液滴a之间的每个双分子层最初包含1个孔,且该网络和液滴b之间的每个双分子层最初不包含孔。将该网络和液滴a之间的双分子层中插入单一 $\alpha\text{HL}$ 孔的事件模拟为发生在 $1\text{s}$ 、 $3\text{s}$ 、 $5\text{s}$ 和 $7\text{s}$ (深灰色箭头),且该网络和液滴b之间的双分子层中插入单一 $\alpha\text{HL}$ 孔的事件模拟为发生在 $2\text{s}$ 、 $4\text{s}$ 、 $6\text{s}$ 和 $8\text{s}$ (浅灰色箭头)。每个孔均插入不同双分子层。注意,为了降低计算时间,该模拟的时间间隔短于图12c中的情况。

[0044] 图14c展示了模拟图12d中电学记录条件的模型的体系的示意图。该网络与图14a中的相同,但加入了2列不含 $\alpha\text{HL}$ 的液滴。图14d展示了图14c所示电极之间的模拟电流。该模拟的执行条件与图14b所述条件相同,但网络最右行液滴所形成的双分子层中最初不包含任何孔。箭头指示的是如图14b中所示的孔插入。

[0045] 图15展示了自发折叠网络。图15a是由脂质双分子层连接的两个不同渗透压的液滴的示意图。穿过该双分子层的水传递使得所述液滴膨胀或收缩。图15b展示了包含两条不同渗透压的液滴条带的液滴网络的示意图。液滴之间的水传递导致该网络的整体变形。图15c是矩形网络在约3小时内折叠为环形的照片。浅灰色和深灰色液滴最初分别含有 $250\text{mM KCl}$ 和 $16\text{mM KCl}$ 。图中比例尺代表 $250\mu\text{m}$ 。

[0046] 图15d是花瓣状网络自发折叠为球形的照片。浅灰色和深灰色液滴最初分别含有 $80\text{mM KCl}$ 和 $8\text{mM KCl}$ 。照片的时间跨度为8小时。图中比例尺代表 $200\mu\text{m}$ 。图15e展示了从上述情况中拍摄的图15d中的网络的最终结构。图中比例尺代表 $200\mu\text{m}$ 。图15f展示了具有类似图

15d所示网络的初始几何结构的网络的折叠模拟的框架。深灰色(顶层)和浅灰色(底层)分别代表最低和最高的最初渗透压,白色(最终框架)代表两者的平均值。

[0047] 图16展示了液滴界面双分子层的水渗透率测量。图16a是具有不同盐浓度的单对液滴在液滴以双分子层相连后每20分钟拍摄的照片。深灰色液滴含有25mM Tris-HCl、1M KCl、100 $\mu$ M EDTA, pH 8.0。浅灰色液滴含有稀释到盐浓度为250mM KCl的相同溶液。深灰色液滴还含有1mM二甲苯蓝FF,且浅灰色(较小的)液滴还含有2.5mM橙黄G。图中比例尺代表1mm。图16b展示了如图16a所示3对液滴的体积。从照片中测量液滴和双分子层的直径,且根据球冠几何结构的假设来计算液滴体积。深灰色和浅灰色环分别是深灰色液滴和浅灰色液滴的体积测量值。根据补充方法的实施例中所述,使用所述数据计算渗透系数P。深灰色和浅灰色线展示了根据补充方法的实施例中所述的等式(9)所计算的液滴体积,其测量平均值 $P=27\mu\text{m s}^{-1}$ 。计算所得曲线表明,采用该P平均值可以很好地解释所述数据。

[0048] 图17展示了折叠网络的断裂。图17a展示了与图16c相似的由两条液滴条带组成的网络,但该网络中渗透压较低的液滴条带在水平维度上更薄。图17b中展示了与图17a中相同的网络完成折叠后的情况。深灰色液滴的区域中有明显的断裂点。图17c展示了与图15d和15e中的花瓣状网络类似的初始为十字形的网络。渗透压较低的一层在上臂底部附近断裂,可由该区域中缺乏深灰色液滴证明。注意,断裂的臂的折叠程度低于其他臂。

### 具体实施方式

[0049] 本发明涉及用于生产液滴组件的装置,所述装置包括:至少一个液滴发生器;可相对于所述至少一个液滴发生器移动的容器;以及控制单元,所述控制单元用于控制所述至少一个液滴发生器分配液滴和所述容器相对于所述至少一个液滴发生器的移动;其中,所述装置用于产生包含多个液滴的液滴组件,其中每个所述液滴包括(i)液滴介质和(ii)包围所述液滴介质表面的两亲分子外层,其中所述液滴介质为水相介质或疏水介质,且其中至少一个所述液滴与另一个所述液滴接触从而形成作为所述接触液滴之间界面的所述两亲分子层。

[0050] 典型地,该装置用于产生所述液滴组件,其中每个所述液滴与另一个所述液滴接触以形成作为所述接触液滴之间的界面的所述两亲分子层。

[0051] 所述作为所述接触液滴之间的界面的两亲分子层可以是,例如,所述两亲分子的双分子层或嵌段共聚物层。所述嵌段共聚物层可以是,例如,三嵌段共聚物层。

[0052] 当所述液滴介质是水相介质时,所述作为所述接触液滴之间的界面的两亲分子层可以是,例如,所述两亲分子的双分子层或嵌段共聚物层。

[0053] 当所述液滴介质是疏水介质时,所述作为所述接触液滴之间的界面的两亲分子层可以是,例如,所述两亲分子的双分子层或嵌段共聚物层。在形成的两亲分子双分子层中,所述两亲分子的极性头部相互接触(例如,参见Aronson et al., Nature, Vol. 286, July 1980 and in Poulin et al., J. Phys. Chem. B, Vol. 103, no. 25, June 1999.)。

[0054] 典型地,所述作为所述接触液滴之间的界面的两亲分子层是所述两亲分子的双分子层。

[0055] 典型地,所述液滴介质是水相介质。但是,在另一个实施例中,所述液滴介质是疏水介质。

[0056] 通常,所述液滴介质是水相介质。所述水相介质可以是任何适宜的水相介质。例如,所述水相介质可以是纯水或缓冲水溶液,或一种或多种盐的水溶液。可选地,所述水相介质可以包含水凝胶。当所述水相介质包含水凝胶时,所述水相介质可以,例如,包含琼脂糖和水。琼脂糖在水中的浓度通常小于或等于10%w/v琼脂糖。例如,琼脂糖在水中的浓度可以是0.25至5%w/v琼脂糖。也可以使用除琼脂糖以外的水凝胶。例如,所述水相介质可以包含甲基显微素,聚乙二醇二丙烯酸酯,聚丙烯酰胺,基质胶,透明质酸,聚环氧乙烷,聚AMPS(聚(2-丙烯酰氨基-2-甲基-1-丙磺酸)),聚乙烯吡咯烷酮,聚乙烯醇,聚丙烯酸钠,丙烯酸酯聚合物,或聚(N-异丙基丙烯)。可选地,所述水相介质可以包括硅水凝胶或LB(LB培养基)琼脂。

[0057] 所述水相介质的重要性质之一在于pH,且pH可以在宽范围中变化。在一些实施例中,例如,所述水相液滴中的水相介质的pH的范围可以在5至9的范围内(或例如在6至8的范围内),但也可能是更高和更低的pH值。因此,所述水相介质可以是水相缓冲液。根据所需的pH,可以使用任何合适的缓冲液。所述缓冲液可以例如包括Tris-HCl和/或KCl。在一些实施例中,水相缓冲液的pH为5至9,或例如6至8。可以改变溶质的性质和浓度从而改变溶液的性质。

[0058] 液滴组件中每个液滴的水相介质可以相同或不同。

[0059] 液滴的两亲分子无需全为相同种类。相反,在一些实施例中,所述两亲分子可以是两种或更多不同种类的两亲分子的混合物。另一重要实施例中,液滴组件中的不同液滴各自的外层中的两亲分子可以是不同种类的,由此不同液滴之间形成的双分子层可以不对称。

[0060] 典型地,所述装置用于产生置于松散介质中的液滴组件,其中当所述液滴介质为水相介质时,所述松散介质为疏水介质;以及当所述液滴介质为疏水介质时,所述松散介质为水相介质。当松散介质为水相介质时,该水相介质可以如上文中的进一步限定所述。类似地,当松散介质为疏水介质时,该疏水介质可以如上文中的进一步限定所述。

[0061] 通常,所述液滴介质是水相介质,且所述松散介质是疏水介质,下文中一般会以这些条件来描述本发明。但是,本领域技术人员可以理解,本文所述的任何符合所述条件的本发明实施例也可以“反向”实施,使用疏水介质而非水相介质作为液滴介质,且使用水相介质而非疏水介质作为液滴介质。

[0062] 典型地,所述液滴介质是水相介质,且所述装置用于产生置于疏水介质中的液滴组件。所述疏水介质可以是例如根据下文中进一步限定的疏水介质。

[0063] 水相介质的液滴通常在存在两亲分子的前提下分配至疏水介质中。该两亲分子可以是例如置于水相介质或疏水介质中。典型地,该两亲分子置于疏水介质中。

[0064] 在两亲分子的存在下,分配所述水相介质到所述疏水介质中,由此在所述疏水介质中形成包含(i)所述水相介质和(ii)包围所述水相介质表面的两亲分子外层的液滴。

[0065] 所述液滴组件包括至少两滴相互接触的液滴。位于相接触的液滴之间的接触点而由两者共享的边界,在本文中称为界面。当液滴的部分外层与另一液滴的部分外层相接触时,便形成界面。例如,当液滴与另一液滴接触时,两者的界面处可以形成两亲分子的双分子层。该双分子层包含来自包围每个液滴水相介质表面的两亲分子外层位于界面处的两亲分子。该双分子层的形成,是因为它对两亲分子而言是能量层面上更为有利的结构。相接触

的液滴可以获得具有最低自由表面能的几何结构。

[0066] 典型地,本发明的装置用于产生所述液滴组件,其中每个所述液滴与另一所述液滴接触,从而形成作为相接触液滴之间截面的所述两亲分子双分子层。

[0067] 该液滴组件可以包含一个界面,或可以包含两个或更多界面。通常,所述液滴组件包含至少n个所述液滴,且包含至少n-1个相接触液滴之间的所述界面,其中n等于或大于2。整数n可以等于或大于3。更典型地,n等于或大于4。

[0068] 在一些实施例中,当该液滴组件包含至少n个所述液滴时,所述网络可以包括n或更多个界面,其中n如本文所定义,应当理解,任一液滴均可以与超过一个其他液滴相连(由此与其形成界面)。

[0069] 本发明的优点之一在于,所述装置能够生产毫米级或更大的液滴组件。整数n原则上可以很大,例如百万数量级。所述网络原则上可以包含百万个液滴,例如可以用于制备原组织(proto-tissue)(即原细胞的多室类似物)或微量组织。因此,在一些实施例中,整数n可以高达数百万,例如高达约100000000,或例如高达约50000000。整数n可以例如高达约10000000,或例如高达约5000000。

[0070] 在其他实施例中,n可以是至少数百,例如至少约500,或例如至少约1000。整数n可以是例如从500至50000的整数,或从5000至500000的整数。n可以是例如从10000至50000的整数。

[0071] 所述液滴组件可以是例如下文所定义的液滴组件。

[0072] 使用本发明的装置所生产的液滴组件可以是多室系统。该液滴组件可以例如包括第一室和第二室。液滴组件中的第一室可以与第二室通过膜蛋白相通讯。该第一和/或第二室可以与外部环境(例如液滴组件的外部环境)通过膜蛋白相互通讯。原则上,可以生产包括大量室和结构限定的结构的液滴组件。

[0073] 本装置的控制单元通常用于协调(a)所述容器相对于各个液滴发生器的移动,和(b)液滴的分配,以产生所述液滴组件。

[0074] 该控制单元可以例如用于控制容器移动。可选地,该控制单元可以用于控制各个液滴发生器的移动。典型地,该控制单元用于控制容器的移动。

[0075] 典型地,该控制单元包括电脑或专用电子硬件。典型地,该控制单元包括至少一台电脑。其通常包括至少一台个人电脑(PC)。该控制单元可以例如是PC。在某些实施例中,该控制单元包括PC和专用电子硬件(如图4所示)。

[0076] 通常,该控制单元用于控制各个液滴发生器的水相介质液滴的分配。图4中提供了各个液滴发生器的驱动电路的示例。

[0077] 液滴发生器可以例如是微流控系统。其可以例如(a)根据需要产生液滴或(b)以连续流产生液滴并选择需放置的特定液滴。通常,该液滴发生器根据需要产生液滴。该液滴发生器可以:(i)在单个步骤中产生并排出液滴,或(ii)在分离的步骤中产生并排出液滴。通常,该液滴发生器在单一步骤中产生并排出液滴。

[0078] 通常,所述至少一个液滴发生器是压电式液滴发生器。更典型地,所述至少一个液滴发生器是包含用于分配液滴的压电换能器的压电式液滴发生器。

[0079] 可以是,例如,通过向该压电元件施加电压脉冲,从而令各个液滴发生器分配出所述水相介质。通常,所述控制单元控制向该压电元件施加电压脉冲。典型地,该电压脉冲的

峰-峰振幅为5V至100V,例如从10V至80V。所述峰-峰振幅可以是例如从20V至60V。典型地,每个脉冲的时长为从10至1500 $\mu\text{s}$ ,例如50至1000 $\mu\text{s}$ 。更典型地,每个脉冲的时长为100至800 $\mu\text{s}$ 。通常,该电压脉冲是方波电压脉冲。

[0080] 如图10所示,可以通过改变电压脉冲的幅度和时长来微调液滴直径。通过改变这些参数,可以将液滴直径微调至适当的直径。该直径可以是例如微调至约10至200 $\mu\text{m}$ 。因此,该控制单元可用于控制第一电压脉冲和第二电压脉冲的施加,其中第一和第二电压脉冲不同。因此,可以使用单一液滴发生器来产生不同大小的液滴。可选地,可以向两个不同的液滴发生器的压电元件施加第一和第二电压脉冲。

[0081] 峰-峰振幅限定了波峰(或最高电压)和波谷(或最低值)之间的差异绝对值。所产生的液滴的大小可以通过调整液滴发生器进行控制。如图1和3所示,液滴发生器可以包含出口。该出口可用于控制产生的液滴发生器的大小。该出口将在下文中进一步讨论。

[0082] 典型地,该控制单元用于控制各个液滴发生器的水相介质的液滴分配,由此可以0.01至100 $\text{s}^{-1}$ 速度分配液滴,例如从0.01至50的速度 $\text{s}^{-1}$ 。通常,该控制单元用于控制各个液滴发生器的水相介质的液滴分配,由此可以0.01至10 $\text{s}^{-1}$ 速度分配液滴。

[0083] 通常,该装置包括2个或更多所述液滴发生器。典型地,每个液滴发生器如本文所述。

[0084] 所产生的液滴的大小可以通过调整液滴发生器来控制。使用两台或以上所述液滴发生器可以生产不同大小的液滴。

[0085] 所述两个或更多液滴发生器可以分配相同水相介质或所述两个或更多液滴发生器可以分配不同水相介质。因此,使用两个或更多所述液滴发生器允许生产含有不同水相介质的液滴。例如,可以使用本发明的装置生产包括含第一水相介质的第一液滴和含第二水相介质的第二液滴的液滴组件。

[0086] 使用两个或更多所述液滴发生器能够,例如,(i)产生不同大小的液滴和/或(ii)产生含不同水相介质的液滴。可以通过向不同液滴发生器的压电元件施加不同电压,或通过调整液滴发生器,来产生不同大小的液滴。

[0087] 当将两亲分子置于水相介质中时,例如产生例如含不同两亲分子的液滴。例如,第一液滴发生器可以包括含第一两亲分子的第一水相介质,而第二液滴发生器可以包括含第二两亲分子的第二水相介质。

[0088] 本发明的装置通常进一步包括用于相对于各个液滴发生器移动所述容器的显微操作器。典型地,所述控制单元用于使用该显微操作器来控制所述容器相对于各个液滴发生器的移动。

[0089] 更典型地,本发明的装置进一步包括用于移动所述容器的显微操作器,且其中所述控制单元用于使用该显微操作器控制所述容器的移动。

[0090] 所述显微操作器通常为自动化显微操作器。

[0091] 典型地,所述容器置于所述显微操作器上,由此所述显微操作器的移动造成所述容器的移动。典型地,所述控制单元用于控制显微操作器的移动,而后者由此带动所述容器的移动。

[0092] 典型地,所述控制单元用于通过电子信号或无线信号与显微操作器通讯,以移动所述容器。典型地,所述控制单元与显微操作器之间存在电学连接。可选地,所述控制单元

能够与显微操作器无线通讯。

[0093] 在一些实施例中,所述装置进一步包括用于移动各个液滴发生器的显微操作器,以及,当所述装置包括多个所述液滴发生器时,用于协调各液滴发生器的相对位移。

[0094] 各个液滴发生器可以,例如,共同移动或分别移动。

[0095] 用于移动容器的显微操作器与用于移动各个液滴发生器的显微操作器可以是同一显微操作器。可选地,用于移动容器的显微操作器与用于移动各个液滴发生器的显微操作器可以是不同的显微操作器。典型地,用于移动容器的显微操作器与用于移动各个液滴发生器的显微操作器是同一显微操作器。

[0096] 典型地,所述控制单元用于通过电信号或无线信号与显微操作器通讯。典型地,该控制单元通过电信号与显微操作器通讯。可选地,该控制单元可以通过无线信号与显微操作器通讯。

[0097] 典型地,各个液滴发生器包括用于容纳液滴介质(通常为水相介质)的腔室;出口;以及,用于通过所述出口排出一定体积的所述液滴介质从而将所述体积分配为液滴的元件。

[0098] 在一些实施例中,各个液滴发生器进一步包括入口。

[0099] 典型地,在从所述出口分配液滴时,该入口允许空气进入液滴发生器的腔室。

[0100] 该入口可以,例如,用于将水相介质引入腔室。典型地,该腔室中充有200至600 $\mu$ l的水相介质。通常,该腔室通过毛细作用充入水相介质。本领域技术人员可以理解,该水相介质可能从该腔室中蒸发。蒸发可能对液滴发生器所分配的液滴直径造成影响。可以通过在水相介质液面上添加一层疏水介质来防止蒸发。相应地,在一些实施例中,该水相介质液面上有一层疏水介质。该疏水介质可以是任何适宜的疏水介质。典型地,该疏水介质可以是本文所述的疏水介质。

[0101] 在一些应用中,可能仅需用到少量的水相介质。因此,在其他实施例中,该腔室中充有0.5至50 $\mu$ l水相介质,例如1至10 $\mu$ l。例如,该腔室可以充有约5 $\mu$ l水相介质。在所述实施例中,典型地,液滴发生器首先充水。发生器的出口随后可以浸入含有疏水介质的孔中,所述疏水介质可以如本文所述。然后,可以在液滴发生器的入口处施加吸力,例如,通过使用微量移液管。由此,将疏水介质吸入出口。例如,吸入出口的疏水介质的量可以是0.5至50 $\mu$ l,例如1至10 $\mu$ l。然后,可以将该出口浸入另一含有水相介质的孔中。同样地,可以使用吸力来在出口中装载0.5至50 $\mu$ l水相介质,例如1至10 $\mu$ l。疏水介质在喷嘴中形成塞子,防止出口尖端内的水相介质与体积较大的水混合。通常,一定体积的水和疏水介质共同将压电换能器产生的压力脉冲传输到出口尖端,尖端处形成水相介质液滴。该出口可以,例如,包含喷嘴。

[0102] 当各个液滴发生器包含用于容纳液滴介质(典型地,水相介质)的腔室,出口,以及用于通过所述出口排出一定体积的所述液滴介质从而将所述体积分配为液滴的元件时,用于通过所述出口排出一定体积的所述液滴介质从而将所述体积分配为液滴的元件可以是任何适宜的元件,例如是能够从该腔室中移出一定体积的液滴介质并通过液滴发生器出口,并能够接受控制单元的控制的任何适宜的可移动元件。用于移动一定体积的所述液滴介质(例如,水相)的元件可以是受控于控制单元的机械元件。典型地,该元件为压电换能器。

[0103] 通常,该控制单元用于与用于通过所述出口排出一定体积的所述液滴介质的元件相通讯,从而控制将所述液滴介质通过所述出口分配为液滴。典型地,该控制元件将接收到的指令继续传递到自身能够与所述元件通讯的显微控制器。典型地,该控制单元与该显微操作器之间具有电子连接。可选地,该控制单元能够与显微操作器无线通讯。当该元件是压电换能器时,该显微操作器能够控制对压电换能器的电压脉冲施加,以引起压电换能器的移动,由此使得一定体积的液滴介质(例如,水相介质)通过该液滴发生器的出口发生位移。

[0104] 在一些实施例中,所述用于通过所述出口移动一定体积的所述液滴介质(例如,水相介质)的元件为压电换能器。在其他实施例中,所述入口后形成蒸汽气泡,并将液体推出,由此形成液滴。

[0105] 典型地,所述出口的直径低于 $500\mu\text{m}$ ,例如低于 $250\mu\text{m}$ 。所述出口的直径提供了液滴分配面积的测度。该直径是补充方法中所述的内直径,如图3中所示。当出口为圆形时,该出口的直径为圆形直径。当出口为圆形以外的形状时,该出口的直径是面积等于出口面积的圆形的直径。

[0106] 更典型地,所述出口的直径低于 $200\mu\text{m}$ ,例如,低于 $150\mu\text{m}$ 。例如,典型地,该出口的直径为 $20$ 至 $200\mu\text{m}$ ,例如 $60$ 至 $120\mu\text{m}$ 。该出口的直径可以是,例如,约 $100\mu\text{m}$ 。

[0107] 发明人发现,该出口优选为相对于液滴尽可能小。这可以有助于在所述容器相对于所述至少一个液滴发生器移动时,例如,当在疏水介质中放置液滴组件时,降低所产生的拉力。

[0108] 典型地,该出口的形状为圆柱形。

[0109] 通常,各个液滴发生器进一步包括连接所述腔室的毛细管,其中所述毛细管为所述喷嘴,而所述毛细管的尖端为所述出口。典型地,所述毛细管的尖端的直径低于 $150\mu\text{m}$ 。例如,所述毛细管的尖端的直径可以是 $20$ 至 $200\mu\text{m}$ ,例如 $60$ 至 $120\mu\text{m}$ 。所述毛细管的尖端的直径可以是,例如,约 $100\mu\text{m}$ 。

[0110] 典型地,所述液滴发生器用于分配直径等于或小于 $1\text{mm}$ 的液滴,例如,等于或小于 $200\mu\text{m}$ 。

[0111] 通常,所述液滴发生器用于分配直径为 $10\mu\text{m}$ 至 $1\text{mm}$ 的液滴,例如 $10$ 至 $200\mu\text{m}$ 。该液滴发生器可以,例如,用于分配直径为 $30$ 至 $60\mu\text{m}$ 的液滴。在一些实施例中,各个液滴发生器用于分配直径为约 $50\mu\text{m}$ 的液滴。

[0112] 如上所述,典型地,所述液滴被分配至松散介质中。当所述液滴介质为水相介质时,所述松散介质为疏水介质。通常,所述液滴发生器尖端进入所述松散介质内。但是,在一些实施例中,所述液滴发生器的尖端在所述松散介质液面以上。

[0113] 发明人发现,各个液滴发生器腔室中的液滴介质(通常为水相介质)的液面与所述松散介质(通常为疏水介质)的液面之间的高度差可能影响所分配的液滴的直径。典型地,高度差越大,所分配的液滴直径越大。通常,高度差为 $1$ 至 $2\text{cm}$ ,例如约 $1.5\text{cm}$ 。

[0114] 电压脉冲如上所述。所需电压脉冲可以取决于所述疏水介质中的两亲分子浓度。随着两亲分子浓度的增加,所述水相介质和疏水介质之间界面处吸附的两亲分子降低该界面的张力,减少形成液滴所需的能量。典型地,所述电压脉冲的峰-峰振幅为 $5$ 至 $100\text{V}$ ,例如 $10$ 至 $80\text{V}$ 。所述峰-峰振幅可以是,例如, $20$ 至 $60\text{V}$ 。

[0115] 所述两亲分子可以是任何适宜的两亲分子。通常,所述两亲分子是在浓度足够高

的情况下能够在任一所述界面形成双分子层的两亲分子。所述能够形成双分子层的两亲分子种类可以例如取决于相接触液滴的其他成分。例如,若所述液滴被置于疏水介质中,则该两亲分子可以是能够在疏水介质中形成双分子层的任何适宜的两亲分子。典型地,能够在疏水介质中形成双分子层的两亲分子类型将取决于该疏水介质的性质以及液滴的水相介质的性质,但可用的两亲分子范围很广。

[0116] 两亲分子是同时具有亲水基和疏水基的分子。所述两亲分子外层通常包括液滴表面上的两亲分子单分子层。典型地,该单分子层由其亲水基和疏水基与水相介质和松散介质的相互作用而天然形成和维持,由此该分子排列在液滴表面上,其亲水基朝内面向水相介质而疏水基面朝外例如面向疏水介质。

[0117] 该两亲分子可以,例如,是非聚合两亲分子。可选地,该两亲分子可以是聚合两亲分子。

[0118] 可用于本液滴组件的一类重要的两亲分子是脂质分子。该脂质分子可以是任何脂质大类,包括磷脂、脂肪酸、脂肪酰、甘油酯、甘油磷脂、鞘脂、固醇脂、异戊烯醇脂、糖脂和聚酮化合物。一些重要的示例包括磷脂和脂肪酸,例如磷脂。该脂质分子可以是天然存在的或合成的。已经说明了脂质分子双分子层的形成,但本发明预期适用于任何两亲分子。

[0119] 两亲分子中可能存在的一类常见疏水基是碳氢基团,例如存在于大多数脂质中。但是,另一类可以使用的适宜疏水基种类是氟碳基团。因此,两亲分子的另一重要种类是包括至少一个氟碳基团的两亲分子。所述分子的示例之一是包含疏水氟碳尾基和亲水头基的脂状分子。

[0120] 所述液滴的两亲分子无需全是同一类型。相反,在一些实施例中,所述两亲分子可以是两种或更多不同类型的两亲分子的混合物。另一个重要示例中,液滴组件的不同液滴各自的外层中的两亲分子可以是不同的类型,由此若形成双分子层,则不同液滴之间形成的双分子层可以不对称。在一些实施例中,两个相接触液滴的脂单层不同。

[0121] 因此,典型地,该两亲分子包括脂质分子。该脂质分子无需全为同一类型。因此,所述两亲分子可以包括单一种类的脂质或两种或更多不同种类脂质分子的混合物。相似地,当该液滴与另一液滴接触时,各液滴的外层的脂质组成可以彼此相同或不同。脂质分子尤其有利,因为脂质双分子层,或更普遍地,两亲分子的双分子层,是细胞膜的模型,因此该细胞组件可以在一系列实验研究中充当优秀平台,包括,例如,用于膜蛋白基础研究的新型平台,或作为“由下向上”的合成生物学的多室原细胞底架。

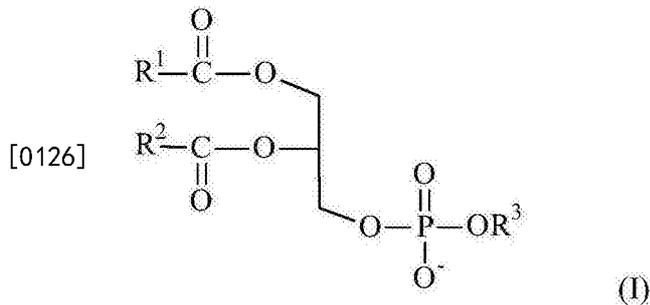
[0122] 所述脂质可以,例如,具有环境敏感性(例如,智能脂质)。该脂质可以,例如,对pH、光或温度的变化敏感。因此,该脂质可以是pH敏感脂质,温度敏感脂质或光敏脂质。

[0123] 该脂质可以用膜蛋白(例如天然的、改造的或合成的膜蛋白)来充当该微量组织的功能部分。

[0124] 由于上述原因,且磷脂是所有细胞膜的主要成分,因此尤其优选使用磷脂,使得含有磷脂的液滴尤其适用于合成生物学应用,以及给药。

[0125] 相应地,在所述水相介质至少部分表面上形成外层的所述两亲分子典型地包括磷脂分子。该磷脂分子可以相同或不同,即该磷脂分子包括单一种类的磷脂或两种或更多不同磷脂的混合物。本领域技术人员熟知磷脂,许多磷脂可从例如Avanti Polar Lipids等供应商处商购获得。磷脂分子可以是甘油磷脂或神经鞘磷脂或两者的混合物。磷脂分子可以

包括阴离子磷脂,含伯胺的磷脂、含胆碱的磷脂,和/或鞘糖脂。通常,该两亲分子包括一种或多种甘油磷脂。本领域技术人员能够理解,甘油磷脂包括但不限于包含以下通式(I)所示结构的甘油磷脂:



[0127] 其中:

[0128]  $\text{R}^1$ 和 $\text{R}^2$ 相同或不同,选择 $\text{C}_{10}$ - $\text{C}_{25}$ 烷基和 $\text{C}_{10}$ - $\text{C}_{25}$ 烯烃基;

[0129]  $\text{R}^3$ 缺失使得 $\text{OR}^3$ 成为 $\text{O}^-$ ,或者 $\text{R}^3$ 为 $\text{H}$ 、 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{R}^4)_3^+$ 、糖基或氨基酸基团;以及

[0130] 每个 $\text{R}^4$ 相同或不同,且独立地选自 $\text{H}$ 和未取代的 $\text{C}_1$ - $\text{C}_4$ 烷基。

[0131] 典型地,当 $\text{R}^3$ 是 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{R}^4)_3^+$ 时,每个 $\text{R}^4$ 相同或不同且选自 $\text{H}$ 和甲基。本领域技术人员能够理解,当每个 $\text{R}^4$ 是甲基时, $\text{R}^3$ 基团为胆碱基团,且当每个 $\text{R}^4$ 是 $\text{H}$ 时, $\text{R}^3$ 基团为乙醇胺基团。

[0132] 当 $\text{R}^3$ 是氨基酸基团时,其可以例如是丝氨酸基团,即 $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)(\text{COOH})$ 。当 $\text{R}^3$ 是糖基时,其可以是例如甘油,即 $-\text{CH}_2\text{CHOHCH}_2\text{OH}$ ,或例如肌醇,即 $-\text{CH}(\text{CHOH})_5$ 。

[0133]  $\text{R}^1$ 和 $\text{R}^2$ 的典型例子是 $\text{C}_{10}$ - $\text{C}_{25}$ 烷基,包括但不限于,线性 $\text{C}_{10}$ - $\text{C}_{25}$ 烷基,例如 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}-$ 、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}-$ 、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}-$ 、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}-$ 、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}-$ 、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}-$ 和支链 $\text{C}_{10}$ - $\text{C}_{25}$ 烷基,例如 $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}(\text{CH}_3)-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}(\text{CH}_3)-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 。

[0134] 进一步地, $\text{R}^1$ 和 $\text{R}^2$ 的典型例子是未取代的 $\text{C}_{10}$ - $\text{C}_{25}$ 烯烃基,包括但不限于, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7-$ 、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7-$ 、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7-$ 、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_3\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_3-$ 、and  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7-$ 。

[0135] 本领域技术人员能够理解,在一些实施例中, $\text{OR}^3$ 基团附近的磷酸基中的 $\text{O}^-$ 基可以是质子化的,或与适当的阳离子相连,例如金属阳离子,例如 $\text{Na}^+$ 。

[0136] 因此,该两亲分子可以包括一种或多种具有如上通式(I)所示的甘油磷脂。

[0137] 例如,该两亲分子可以包括任何一种或多种下列甘油磷脂:1,2-二植烷醇-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DPhPC),1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DSPC),1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DPPC)或1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-[磷酸-外消旋-(1-甘油)](DPPG)或其中一种或多种的混合物可用作液滴中的两亲分子。也可以使用甘油磷脂1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE),且典型地,与pH敏感脂质,例如脂肪酸,联合使用。

[0138] 附加地或可选地,该两亲分子可以包括类固醇,该类固醇包括烷基侧链。该两亲分子可以,例如,包括胆固醇、 $\beta$ -谷甾醇和羊毛甾醇。

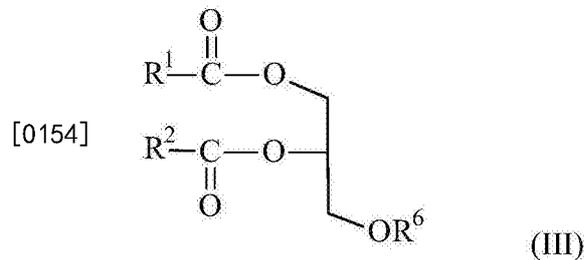
[0139] 在一些实施例中,该两亲分子包括磷脂衍生物。例如,该两亲分子可以包括磷脂酰胆碱,例如POPC(1-棕榈酰-2-油酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱)或DPPC(1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱),或磷脂酰甘油,如POPG(1-棕榈酰-2-油酰基-sn-甘油-3-磷酸甘油)。

[0140] 优选地,该两亲分子包括DPhPC。



[0152] 可选地,  $R^5$ 可以是 $-(CH_2CH_2O)_qCH_3$ 或 $-(CH_2CH_2O)_qH$ ,其中 $q$ 为正整数。整数 $q$ 可以是例如5至10000,或例如10至1000。

[0153] 附加地或可选地,所述一种或多种聚乙二醇化脂质可以包括通式(III)所示的甘油二酯-PEG:

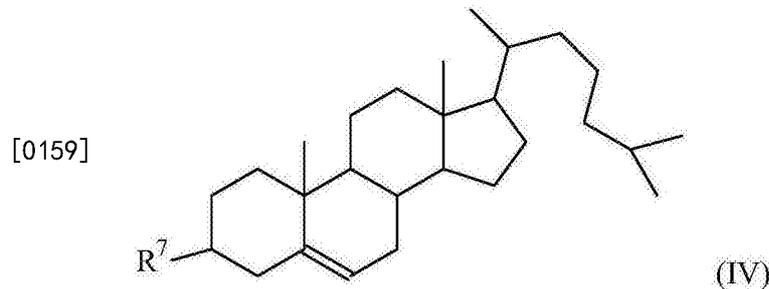


[0155] 其中 $R^1$ 和 $R^2$ 如上通式(I)中对甘油磷脂的定义,且 $R^6$ 是包含聚乙二醇的基团。

[0156] 该聚乙二醇基团可以例如基本包括线性PEG,或例如包括具有3至10个从核心基团放射的PEG支链的支链PEG。可选地,其可以是具有从核心基团放射的10至100条PEG支链的星状PEG。或者例如,该PEG可以是具有接枝到聚合物骨架上的多个PEG链的梳状PEG。

[0157]  $R^6$ 可以是例如 $-(CH_2CH_2O)_qCH_3$ ,  $-(CH_2CH_2O)_qH$ ,  $-CH_2CH_2NHC(O)-(OCH_2CH_2)_qOCH_3$ ,  $-CH_2CH_2NHC(O)-(OCH_2CH_2)_qOH$ ,  $-CH_2CH_2NHC(O)(CH_2)_3C(O)-(OCH_2CH_2)_qOCH_3$ 或 $-CH_2CH_2NHC(O)(CH_2)_3C(O)-(OCH_2CH_2)_qOH$ ,其中 $q$ 是正整数。整数 $q$ 可以是例如5至10000,或例如10至1000。

[0158] 附加地或可选地,所述一种或多种聚乙二醇化脂质可以包括通式(IV)所示的胆固醇-PEG衍生物:



[0160] 其中 $R^7$ 是包含聚乙二醇的基团。

[0161] 同样地,聚乙二醇可以基本包括线性PEG,或例如包括具有3至10个从核心基团放射的PEG支链的支链PEG。可选地,其可以是具有从核心基团放射的10至100条PEG支链的星状PEG。或者例如,该PEG可以是具有接枝到聚合物骨架上的多个PEG链的梳状PEG。

[0162]  $R^7$ 可以是例如 $-(OCH_2CH_2)_qOH$ 或 $-(OCH_2CH_2)_qOCH_3$ ,其中 $q$ 是正整数。整数 $q$ 可以是例如5至10000,或例如10至1000。

[0163] 可以使用聚甘油来代替聚乙二醇。

[0164] 两亲分子浓度可以是任何适当的浓度。

[0165] 典型地,两亲分子浓度等于或低于 $15\text{mg mL}^{-1}$ 。例如,两亲分子浓度可以是 $0-10\text{mg mL}^{-1}$ 。通常,两亲分子浓度是 $0.05-10\text{mg mL}^{-1}$ ,例如, $0.05-5\text{mg mL}^{-1}$ 。更典型地,两亲分子浓度为 $0.1-2.5\text{mg mL}^{-1}$ ,例如 $0.2-0.5\text{mg mL}^{-1}$ 。

[0166] 典型地,液滴介质为水相介质且液滴被置于疏水介质中,且两亲分子浓度是该疏水介质中的两亲分子浓度。

[0167] 附加地或可选地,当液滴形成时,液滴的水相介质可以包含两亲分子,因此两亲分

子浓度可以是该水相介质中的两亲分子浓度。

[0168] 本发明装置的容器通常包含松散介质。当液滴介质为水相介质时,该松散介质是疏水介质。当液滴介质为疏水介质时,该松散介质是水相介质。

[0169] 典型地,液滴介质为水相介质,本发明装置的容器通常包含疏水介质。

[0170] 所述疏水介质可以选择的材料范围广泛。该疏水介质可以包括单一疏水化合物。可选地,其可以包含两种或更多不同疏水化合物的混合物。该疏水介质的选择可以是例如影响液滴的浮力,以及影响该液滴首次进入疏水介质时,至少部分包围该液滴的两亲分子层的形成速度。

[0171] 典型地,该疏水介质为油。该油可以是单一种类的纯化合物,或可以包括两种或多种化合物的混合物。通常想要令该油不会显著动摇所形成的任何双分子层的稳定性。

[0172] 该油可以是例如包含硅酮油(例如聚苯基甲基硅氧烷)。该油可以由单一硅酮油组成,例如聚苯基甲基硅氧烷。可选地,该油可以包括两种或多种硅酮油的混合物。

[0173] 可以使用任何适当的硅酮油。例如,该油可以包括硅油DC200(含-O-Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-单体单元的聚合物)、羟基封端的聚二甲基硅氧烷(PDMS),或PDMS2000。在一些实施例中,该硅酮油是聚甲基苯基硅氧烷,例如AR20。

[0174] 附加地或可选地,该油可以包括碳氢化合物。当该油包括碳氢化合物时,其可以包括单一碳氢化合物或两种或更多碳氢化合物的混合物。

[0175] 在一些实施例中,该油是包含(a)一种或多种碳氢化合物和(b)一种或多种硅酮油的混合物。该碳氢化合物可以例如是任何适合的液态碳氢化合物。特定碳氢化合物是否是液态,取决于疏水介质的温度。因此,术语液态碳氢化合物指的是在疏水介质的温度下呈液态的碳氢化合物。典型地,该疏水介质处于室温。但是,在一些实施例中,该疏水介质可以高于或低于室温。

[0176] 在一些实施例中,该油可以包括固体。固体碳氢化合物可以例如与硅酮油联用。该油可以例如是溶解形成液体的固体混合物。

[0177] 当该油包含碳氢化合物时,该碳氢化合物可以是支链或非支链的,例如具有5-40个碳原子的碳氢化合物,或5-30个碳原子的碳氢化合物(虽然较低分子量的碳氢化合物需要控制蒸发)。优选地,该碳氢化合物在本发明所用液滴的工作温度下是液体。适合的例子包括烷烃和烯烃,例如十六烷、癸烷、戊烷或鲨烯。通常,该油包括碳氢化合物。

[0178] 典型地,该碳氢化合物是未取代的C<sub>10</sub>-C<sub>20</sub>烷烃,例如十六烷。

[0179] 在浮力较不重要的组件中,当需要至少部分液滴表面上的两亲分子外层形成速度更快时,可以使用较短的烷烃。

[0180] 在一些实施例中,该碳氢化合物是更长链的碳氢化合物,例如未取代的C<sub>15</sub>-C<sub>40</sub>烷烃。例如,未取代的C<sub>16</sub>-C<sub>30</sub>烷烃链,例如鲨烯。

[0181] 在一个实施例中,疏水介质包含未取代的C<sub>10</sub>-C<sub>20</sub>烷烃,且两亲分子包括一种或多种甘油磷脂。例如,该疏水介质可以包括十六烷,且两亲分子外层可以包含DphPC。

[0182] 也可以使用其他种类的油。例如,该油可以是氟碳化合物。这对某些系统的研究可能有用,例如最小化特定膜蛋白或溶质从液滴组件的损失,或控制气体含量,例如氧。因为氟碳化合物可以是同时疏水和疏脂的,含有氟碳化合物的油相可以有效地防止液滴组件对表面的贴附。

[0183] 在又一实施例中,该碳氢化合物是溴代C<sub>10</sub>-C<sub>30</sub>烷烃,或例如溴代C<sub>10</sub>-C<sub>20</sub>烷烃,例如溴代十二烷。

[0184] 典型地,该油包括硅酮油或碳氢化合物。可以使用任何适合的硅酮油。通常,该硅酮油的定义如本文所述。

[0185] 硅酮油的优点在于其密度接近水,这保证了液滴在水中大致浮力平衡。硅酮油可以例如是密度为约1g cm<sup>-3</sup>的聚苯基甲基硅氧烷。

[0186] 典型地,所述碳氢化合物是5-40个碳原子的碳氢化合物(C<sub>5</sub>-C<sub>40</sub>碳氢化合物),更典型地,10-30个碳原子的碳氢化合物(C<sub>10</sub>-C<sub>30</sub>碳氢化合物)。典型地,其为烷烃或烯烃。因此,该碳氢化合物可以是C<sub>5</sub>-C<sub>30</sub>烷烃,或C<sub>10</sub>-C<sub>20</sub>烷烃。在又一实施例中,该碳氢化合物可以是C<sub>5</sub>-C<sub>20</sub>烯烃或C<sub>10</sub>-C<sub>20</sub>烯烃。典型地,该碳氢化合物是未取代的。在一个实施例中,其为鲨烯。在一个优选实施例中,该碳氢化合物是未取代的C<sub>5</sub>-C<sub>20</sub>烷烃,优选为未取代的C<sub>10</sub>-C<sub>20</sub>烷烃。

[0187] 该碳氢化合物可以例如是鲨烯、十六烷或癸烷。但是,在一些实施例中,该碳氢化合物可以以卤素原子取代,例如溴。

[0188] 在一些实施例中,该疏水介质包括硅酮油和碳氢化合物的混合物。据发现,所述混合物的优点在于形成稳定双分子层的培养时间短。该混合物中的硅酮油和碳氢化合物可以如上所述进一步定义。典型地,该碳氢化合物是未取代的C<sub>10</sub>-C<sub>20</sub>烷烃,优选为十六烷。该硅酮油通常密度接近但小于水,以控制液滴在打印期间的下沉速度。当液滴组件处于一定体积(例如一滴)的疏水介质中且该疏水介质位于亲水介质(例如水相介质)中时,该硅酮油典型地密度接近水,以保证液滴组件中的液滴在亲水介质中具有大致平衡的浮力。

[0189] 该硅油可以是例如聚苯基甲基硅氧烷。通常,硅酮油与碳氢化合物的体积比等于或大于0.5:1。硅酮油与碳氢化合物的体积比可以例如是0.5:1至5:1,例如约1:1。在一些实施例中,硅酮油与碳氢化合物的体积比等于或大于5:1。

[0190] 所用疏水介质的密度可以例如接近水,例如小于或等于约1g cm<sup>-3</sup>。

[0191] 在一个实施例中,疏水介质包括硅酮油和十六烷。典型地,硅酮油为聚苯基甲基硅氧烷。典型地,硅酮油与十六烷的体积比可以例如是0.5:1至5:1,例如约1:1。在一些实施例中,硅酮油与碳氢化合物的体积比等于或大于5:1。

[0192] 优选地,该疏水介质包括十六烷。在一些实施例中,该疏水介质进一步包括硅酮油。

[0193] 典型地,该疏水介质包括十六烷且该两亲分子包括DPhPC。更典型地,该疏水介质包括十六烷,该两亲分子包括DPhPC,且水相介质包括水性缓冲液。

[0194] 本发明装置的容器可以是任何适合的容器。

[0195] 典型地,该容器包括聚合物,例如聚甲基丙烯酸甲酯。例如,该容器可以包括由显微机械从所述聚合物制得的孔。

[0196] 在一些实施例中,该容器的底表面包含玻璃。典型地,所述多个液滴中至少一个液滴与该玻璃相接触。该玻璃防止液滴四处移动。

[0197] 在其他实施例中,该容器的底表面包含聚合物,例如聚甲基丙烯酸甲酯。例如,当本发明的装置用于产生自发折叠的液滴组件(例如下文所述的自发折叠组件)时,典型地,所述多个液滴中至少一个液滴与聚合物接触。所述自发折叠的液滴组件的液滴通常不与聚合物表面贴附,允许液滴组件折叠。

[0198] 在又一实施例中,该容器包含聚合物,例如聚苯乙烯。例如,当本发明的装置用于产生在疏水介质液滴中包含水相液滴的液滴组件,且该疏水介质位于另一自身为水相介质的松散介质中时,该容器可以包含聚苯乙烯。所述液滴组件如下所述。

[0199] 典型地,该容器装有自身为疏水介质的松散介质和两亲分子。附加地或可选地,液滴发生器可以包括自身为水相介质的液滴介质和两亲分子。

[0200] 通常,本发明装置中的液滴发生器包含液滴介质。如上所述,典型地,该液滴介质是水相介质,该水相介质可以是例如本文所进一步定义。在一些实施例中,该液滴发生器含有水相介质和膜蛋白。通常,该膜蛋白是水溶液。附加地或可选地,所述散装疏水介质可以包含膜蛋白。

[0201] 该膜蛋白可以是任何种类。已经说明了使用内在膜蛋白,但同样地可以预料,还可以使用外周膜蛋白。该膜蛋白可以是例如膜泵蛋白、通道蛋白和/或孔蛋白,以允许对(i)该组件中的各液滴之间和(ii)液滴组件和外部溶液之间的物质交换和电学通讯的精确控制。该膜蛋白可以例如是 $\alpha$ -溶血素( $\alpha$ HL)孔,例如葡萄球菌 $\alpha$ -溶血素孔。但是,可以使用任何合适的膜蛋白,包括两大类,即 $\beta$ -桶结构或 $\alpha$ -螺旋束结构。孔蛋白或通道蛋白在膜蛋白中具有重要应用。除蛋白孔或通道外,其他可能的膜蛋白包括但不限于,受体蛋白、转运蛋白或影响细胞识别或胞间相互作用的蛋白。该通道可以是电压门控的离子通道、光敏通道(例如菌视紫红质)、配体门控通道或机械敏感通道。

[0202] 对于本领域技术人员,允许物质交换和电学通讯的合适的膜蛋白是已知且容易获得的;许多所述蛋白可以商购获得或可以通过已知方法制备。例如,野生型(WT) $\alpha$ HL单体可以通过体外转录-翻译(IVTT)来制备,并通过与兔红细胞膜共培养来七聚化。典型地,使用十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)来纯化所述七聚体(Maglia,G. et al., Method. Enzymol. 475, 591-623, (2010)。而且, Bayley, H. et al., Droplet interface bilayers. Mol. BioSyst. 4, 1191-1208 (2008) 列举了数种经过插入在散装油中形成的液滴界面双分子层的测试的蛋白。其他合适的膜蛋白包括但不限于,细菌多肽和离子载体。

[0203] 可选地,该膜蛋白可以是工程改造的膜蛋白或合成的膜蛋白。所述改造的膜蛋白可以例如是基因改造的蛋白,或共价或非共价化学改造的蛋白。所述合成膜蛋白可以是例如多肽或有机分子。

[0204] 液滴可以通过插入液滴间双分子层的膜蛋白进行液滴间的化学种类交换。合适的膜蛋白包括但不限于膜泵蛋白、通道蛋白和/或孔蛋白,受体蛋白、转运蛋白和/或影响细胞识别或胞间相互作用的蛋白,例如 $\alpha$ HL孔。其他适合的膜蛋白包括但不限于细菌多肽和离子载体。可选地,该膜蛋白可以是工程改造的膜蛋白或合成的膜蛋白。

[0205] 因此,液滴组件可以允许通过该网络进行对象间和与外部环境之间的物质运输,例如化合物。附加地或可选地,液滴组件可以进行对象间或与外部环境间的电信号传递。可以以此方式建立复杂运输系统。该运输系统包含液滴组件。

[0206] 化学种类,例如水,可以通过双分子层进行交换。

[0207] 液滴组件可以,例如,充当能够感应外部环境中特定化学物质存在的感应器分子,例如能够感应光。因此,液滴可以包含感应器分子。该感应器分子可以存在于液滴的水相介质中,或双分子层中,且可以是任何适当的感应器分子。该感应器分子可以是对特定化学物质(例如目标检测物)的存在敏感分子,或其可以是光敏分子,或其可以对pH或温度变化

敏感。在一些实施例中,该感应器分子可以对特定生化物质或酶的存在(或缺失)敏感。

[0208] 典型地,膜蛋白是 $\alpha$ -溶血素( $\alpha$ HL)。

[0209] 通常,当膜蛋白存在时,膜蛋白浓度等于或大于 $0.1\text{ng mL}^{-1}$ ,例如等于或大于 $1\text{ng mL}^{-1}$ 。例如,该膜蛋白浓度等于或大于 $2\text{ng mL}^{-1}$ ,例如等于或大于 $10\text{ng mL}^{-1}$ 。膜蛋白浓度可以是例如 $0.1\text{--}100\text{ng mL}^{-1}$ 。典型地,膜蛋白浓度为 $0.1\text{--}10\text{ng mL}^{-1}$ ,例如 $1\text{--}5\text{ng mL}^{-1}$ 。更典型地,膜蛋白浓度时 $2\text{ng mL}^{-1}$ 至 $1\text{mg mL}^{-1}$ ,例如 $2\text{ng mL}^{-1}$ 至 $0.1\text{mg mL}^{-1}$ 。在一些实施例中,膜蛋白浓度为约 $10\text{ng mL}^{-1}$ 。

[0210] 典型地,液滴形成时,膜蛋白浓度是液滴水相介质中的膜蛋白浓度。当含有膜蛋白的液滴与另一液滴(可能含有或不含膜蛋白)接触时,界面处可能形成两亲分子双分子层。典型地,该双分子层包含膜蛋白。因此,水溶液中最初的膜蛋白可以向双分子层移动。

[0211] 膜蛋白的合适浓度可以取决于若干因素。例如,膜蛋白插入双分子层的速率可以随时间而降低,典型地,这将决定可以使用的膜蛋白浓度的下限。

[0212] 可以向水相介质中添加表面活性剂。该表面活性剂可以例如用于催化膜蛋白从水相介质中移动到双分子层内的运动。通常,所添加的表面活性剂的浓度不会高到破坏双分子层稳定性。

[0213] 该浓度还可以取决于用于打印液滴组件的时间。例如,如果液滴组件中的液滴数目减少,则该膜蛋白的浓度也可以降低。

[0214] 当液滴与另一液滴接触时,两个液滴中膜蛋白的浓度可以相同或不同。此外,当液滴是液滴组件的一部分时,液滴组件中每个液滴的膜蛋白浓度可以相同或不同。

[0215] 典型地,至少一个双分子层包含膜蛋白。相互接触的液滴之间的界面处的双分子层可以包含多个膜蛋白。例如,特定双分子层可以包含相同膜蛋白的多个拷贝,或两个或更多不同种类的膜蛋白。当存在多个种类时,双分子层可以包含每个不同种类的多个拷贝。

[0216] 对于本领域技术人员,允许物质交换和电学通讯的合适的膜蛋白是已知且容易获得的;许多所述蛋白可以商购获得或可以通过已知方法制备。例如,野生型(WT) $\alpha$ HL单体可以通过体外转录-翻译(IVTT)来制备,并通过与兔红细胞膜供培养来七聚化。典型地,使用十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)来纯化该七聚体(Maglia,G.et al., Method.Enzymol.475,591-623,(2010)。而且,Bayley,H.et al.,Droplet interface bilayers.Mol.BioSyst.4,1191-1208(2008)列举了测试过插入在散装油中形成的液滴界面双分子层的数种蛋白。其他合适的膜蛋白包括但不限于,细菌多肽和离子载体。

[0217] 可选地,该膜蛋白可以是工程改造的膜蛋白或合成的膜蛋白。该改造的膜蛋白可以,例如,是基因改造的膜蛋白,或共价或非共价化学工程改造蛋白。该合成膜蛋白可以例如是多肽或有机分子。

[0218] 在一些实施例中,液滴可以包含其他材料、化合物或物质。例如,液滴可以包含小分子,例如染料或磁体。合适的染料包括但不限于,二甲苯青FF、橙黄G、8-羟基-1,3,6-三磺酸苝、荧光黄和5-cTAMRA(5-羧基四甲基罗丹明)。可选地,液滴可以包含任何合适的感应器分子,例如对特定化学物质敏感的感应器分子或光敏分子,或其可以对pH或温度的变化敏感。在一些实施例中,该感应器分子可以对特定生物化学物质或酶的存在(或缺失)敏感。可选地,液滴可以包含治疗剂,例如原药;或者诊断剂,例如造影剂。液滴可以包含酶。

[0219] 液滴可以包括活细胞(或活细胞群),例如用于组织工程。例如,可以允许细胞在打

印后的液滴中生长和/或在破坏打印后的液滴之间的双分子层。

[0220] 液滴组件一旦打印,可以用作固体材料图案形成的模版。该固体材料可以用于电子、光学、光电或其他材料科学应用。液滴中可以例如包含可以在特定液滴之间扩散的无机材料。该无机材料可以随后反应并形成无机固体,例如硫化镉。

[0221] 本发明的装置中,典型地,各个液滴发生器用于分配直径等于小于1mm的液滴,例如等于或小于200 $\mu\text{m}$ 。

[0222] 典型地,液滴是球形液滴,其直径等于球体直径。当液滴并非球形液滴时,液滴的直径等于体积与液滴相等的球体的直径。

[0223] 如上所述,液滴大小可以通过各种因素来控制,例如喷嘴几何结构,电压脉冲幅度和电压脉冲时长。

[0224] 通常,各个液滴发生器用于分配直径为10 $\mu\text{m}$ 至1mm的液滴。各个液滴发生器可以,例如,用于分配直径为10-200 $\mu\text{m}$ 的液滴,例如30-60 $\mu\text{m}$ 。在一些实施例中,各个液滴发生器用于分配直径为约50 $\mu\text{m}$ 的液滴。

[0225] 典型地,各个液滴发生器用于分配体积等于或小于2 $\mu\text{L}$ 的液滴。

[0226] 在一些实施例中,各个液滴发生器用于分配体积为0.001-100nL的液滴,例如,0.005-0.5nL。

[0227] 典型地,该控制单元用于控制液滴分配速度为至少0.01 $\text{s}^{-1}$ ,例如0.25 $\text{s}^{-1}$ 。通常,该控制单元用于控制液滴分配速度为至少0.5 $\text{s}^{-1}$ 。

[0228] 通常,该控制单元用于控制液滴分配速度为0.01-100 $\text{s}^{-1}$ ,例如,0.01-50 $\text{s}^{-1}$ 。典型地,该控制单元用于控制液滴分配速度为0.01-10 $\text{s}^{-1}$ ,例如,0.25-5 $\text{s}^{-1}$ 。更典型地,该控制单元用于控制液滴分配速度为0.5-2.5 $\text{s}^{-1}$ ,例如,0.75-2 $\text{s}^{-1}$ 。通常,该控制单元用于控制液滴分配速度为1 $\text{s}^{-1}$ 。

[0229] 当存在两个或更多液滴发生器时,液滴分配速度是液滴从各个液滴发生器分配的速度,而不一定是液滴分配的整体速度。例如,若并行使用多个液滴发生器,则整体打印速度通常约等于一个液滴发生器的液滴分配速度乘以发生器数目。

[0230] 因此,使用多个液滴发生器可以显著增加整体打印速度。

[0231] 在一些实施例中,分配一个液滴和又一个液滴之间可以存在停顿。作为本发明的方法,液滴的分配将在下文中详细讨论。所用的打印图样和算法也如补充方法中的实施例中所示。

[0232] 通常,本发明的装置包含多个所述液滴发生器。例如,本装置可以包括两个或更多液滴发生器。典型地,该装置包括1-20个液滴发生器,例如1-10个液滴发生器。更典型地,该装置包括1-5个液滴发生器,例如2或3个液滴发生器。在一些实施例中,该装置包括2个液滴发生器。

[0233] 典型地,该控制单元用于控制各液滴发生器的液滴分配。

[0234] 如上所述,本装置包含多个所述液滴发生器的优点之一,在于各液滴发生器可以包含不同的液滴介质(典型地是水相介质)。这允许打印多样化的液滴组件。所述液滴组件可以例如包括不同功能的多室和/或允许组件内的液滴相互通讯或与外部环境通讯的复杂通讯系统。

[0235] 相应地,在一些实施例中,当本装置包含多个所述液滴发生器时,该装置通常包括

含第一液滴介质的第一液滴发生器和含第二液滴介质的第二液滴发生器,其中所述第一和第二液滴介质不同。所述第一液滴介质通常为本文所述的水相介质。典型地,所述第二液滴介质也是本文所述的水相介质。相应地,在一些实施例中,当本装置包含多个所述液滴发生器时,该装置通常包括含第一水相介质的第一液滴发生器和含第二水相介质的第二液滴发生器,其中所述第一和第二水相介质不同。所述第一水相介质通常为本文所述的水相介质。典型地,所述第二水相介质也是本文所述的水相介质。

[0236] 在一些实施例中,第一水相介质包含膜蛋白,第二水相介质不包含所述膜蛋白。该膜蛋白可以是例如本文所述的膜蛋白。该膜蛋白可以是例如膜泵蛋白、通道蛋白和/或孔蛋白,以允许对(i)该组件中的各液滴之间和(ii)液滴组件和外部溶液之间的物质交换和电学通讯的精确控制。该膜蛋白可以例如是 $\alpha$ HL孔。但是,可以使用任何合适的膜蛋白,包括两大类,即 $\beta$ -桶结构或 $\alpha$ -螺旋束结构。除蛋白孔或通道外,其他可能的膜蛋白包括但不限于,受体蛋白、转运蛋白或影响细胞识别或胞间相互作用的蛋白。该通道可以是电压门控的离子通道、光敏通道(例如菌视紫红质)、配体门控通道或机械敏感通道。在一些实施例中,该膜蛋白是水溶液。其他适合的膜蛋白包括但不限于细菌多肽和离子载体。可选地,该膜蛋白可以是工程改造的膜蛋白或合成的膜蛋白。所述改造的膜蛋白可以例如是基因改造的蛋白,或共价或非共价化学改造的蛋白。所述合成膜蛋白可以是例如多肽或有机分子。

[0237] 在又一实施例中,第一水相介质与第二水相介质可以具有不同膜蛋白浓度。该膜蛋白可以是例如膜泵蛋白、通道蛋白和/或孔蛋白,以允许对(i)该组件中的各液滴之间和(ii)液滴组件和外部溶液之间的物质交换和电学通讯的精确控制。该膜蛋白可以例如是 $\alpha$ HL孔。但是,可以使用任何合适的膜蛋白,包括两大类,即 $\beta$ -桶结构或 $\alpha$ -螺旋束结构。除蛋白孔或通道外,其他可能的膜蛋白包括但不限于,受体蛋白、转运蛋白或影响细胞识别或胞间相互作用的蛋白。该通道可以是电压门控的离子通道、光敏通道(例如菌视紫红质)、配体门控通道或机械敏感通道。其他适合的膜蛋白包括但不限于细菌多肽和离子载体。可选地,该膜蛋白可以是工程改造的膜蛋白或合成的膜蛋白。所述改造的膜蛋白可以例如是基因改造的蛋白,或共价或非共价化学改造的蛋白。所述合成膜蛋白可以是例如多肽或有机分子。

[0238] 在一些实施例中,第一水相介质与第二水相介质具有不同的渗透压,或第一水相介质与第二水相介质具有不同的盐或缓冲物质的浓度。例如,当第一水相介质含有膜蛋白时,第一水相介质与第二水相介质可以具有不同的渗透压,或第一水相介质与第二水相介质可以具有不同的盐或缓冲物质的浓度。在其他实施例中,第一水相介质包含第一种盐,第二水相介质包含第二种盐,其中第一种盐与第二种盐不同。第一种盐可以是,例如,氯化物,例如氯化钾,而第二种盐可以是碳酸盐,例如碳酸钾。

[0239] 第一水相介质与第二水相介质渗透压之比可以是2:1~50:1,优选为5:1~20:1。在一些实施例中,第一水相介质与第二水相介质渗透压之比是5:1~15:1。

[0240] 第一水相介质中的盐或缓冲物质的浓度与第二水相介质中的盐或缓冲物质的浓度之比可以是2:1~50:1,优选为5:1~20:1。

[0241] 在一些实施例中,第一水相介质中的盐或缓冲物质的浓度是100-1000mM,第二水相介质中的盐或缓冲物质的浓度是0.1-100mM。典型地,第一水相介质中的盐或缓冲物质的浓度是150-750mM,第二水相介质中的盐或缓冲物质的浓度是0.5-75mM。更典型地,第一水相介质中的盐或缓冲物质的浓度是150-500mM,第二水相介质中的盐或缓冲物质的浓度是

5-25mM。例如,第一水相介质中的盐或缓冲物质的浓度可以是250mM,第二水相介质中的盐或缓冲物质的浓度可以是约25mM。

[0242] 通常,第一水相介质中的盐或缓冲物质的浓度和第三水相介质中的盐或缓冲物质的浓度是碱金属卤化物盐浓度,例如氯化钾。例如,所述缓冲液可以包含Tris-HCl和/或KCl。

[0243] 当两个含盐浓度不同的液滴置于相互接触的位置时,典型地,水从一个液滴传递到另一个液滴。发明人制造了不同渗透压的液滴的网络来利用这一过程。只要保持液滴之间的附着,则两个液滴之间的水传递会使得网络变形,如图15所示。通过控制例如网络中的液滴渗透压的差异等因素,本发明的装置可以用于生产以可预测方式折叠的液滴组件,在此称为自发折叠网络或自发折叠液滴组件。本装置可以,例如,用于产生如下文所述的本发明产品的液滴组件。

[0244] 当液滴组件中含有不同水相介质但相互接触的液滴之间发生渗透时,从一个液滴到另一个液滴的水流使得两个液滴的相对大小发生改变。因此,两个液滴可以,例如,在首次相互接触时具有相同直径,但它们可以在发生渗透后具有不同直径。

[0245] 本发明的装置中,第一液滴发生器可以用于分配具有第一直径的液滴,第二液滴发生器用于分配具有第二直径的液滴,其中所述第一直径和第二直径不同。在一些实施例中,当液滴最初相互接触时,第一直径和第二直径相同。在其他实施例中,当液滴最初相互接触时,第一和第二直径不同。

[0246] 如上所述,典型地,各个液滴发生器包括:用于容纳液滴介质(典型地是水相介质)的腔室;出口;以及,用于将一定体积的所述液滴介质通过所述出口转移,从而将所述体积分配为液滴的部件。当所述装置包括多个所述液滴发生器时,第一液滴发生器的出口的直径可以与第二液滴发生器的出口直径相同或不同。

[0247] 在一些实施例中,所述控制单元用于协调(a)所述容器相对于各个所述液滴发生器的移动和(b)所述液滴的分配,以制作包含至少一层液滴的所述液滴组件,其中每个所述液滴包含(i)液滴介质和(ii)包围所述液滴介质表面的两亲分子外层,其中所述液滴介质为水相介质或疏水介质,且所述液滴层中的每个液滴与该层中的至少一个其他液滴接触,从而形成作为所述接触液滴之间界面的所述两亲分子层。

[0248] 所述两亲分子层是相接触液滴之间的界面,其可以是,例如,所述两亲分子的双分子层或嵌段共聚物层。所述嵌段共聚物层可以是,例如,三嵌段共聚物层。当所述液滴介质是水相介质时,所述作为所述接触液滴之间的界面的两亲分子层可以是,例如,所述两亲分子的双分子层或嵌段共聚物层。当所述液滴介质是疏水介质时,所述作为所述接触液滴之间的界面的两亲分子层可以是,例如,所述两亲分子的双分子层或嵌段共聚物层。

[0249] 通常,所述作为所述接触液滴之间的界面的两亲分子层是所述两亲分子的双分子层。

[0250] 典型地,所述液滴介质为水相介质。因此,在一些实施例汇总,所述控制单元用于协调(a)所述容器相对于各个所述液滴发生器的移动和(b)所述液滴的分配,以制作包含至少一层液滴的所述液滴组件,其中每个所述液滴包含(i)水相介质和(ii)包围所述水相介质表面的两亲分子外层,且所述液滴层中的每个液滴与该层中的至少一个其他液滴接触,从而形成作为所述接触液滴之间界面的所述两亲分子的双分子层。

[0251] 所述水相介质典型地如本文所述。该水相介质可以是,例如,任何合适的水相介质。例如,该水相介质可以是纯水,或水相缓冲液,或一种或多种盐的水溶液,或含有琼脂糖和水的水溶液。

[0252] 该两亲分子可以如本文进一步定义所述。

[0253] 通常,所述控制单元用于协调 (a) 所述容器相对于各个所述液滴发生器的移动和 (b) 所述液滴的分配,以制作包含多层所述液滴的所述液滴组件,其中各层相互邻接,由此一层中的液滴与相邻的另一层中的液滴接触,从而形成作为所述接触液滴之间界面的所述两亲分子层。

[0254] 所述两亲分子层是相接触液滴之间的界面,其可以是,例如,所述两亲分子的双分子层或嵌段共聚物层。所述嵌段共聚物层可以是,例如,三嵌段共聚物层。当所述液滴介质是水相介质时,所述作为所述接触液滴之间的界面的两亲分子层可以是,例如,所述两亲分子的双分子层或嵌段共聚物层。当所述液滴介质是疏水介质时,所述作为所述接触液滴之间的界面的两亲分子层可以是,例如,所述两亲分子的双分子层或嵌段共聚物层。

[0255] 典型地,所述作为所述接触液滴之间的界面的两亲分子层是所述两亲分子的双分子层。

[0256] 通常,所述控制单元用于协调 (a) 所述容器相对于各个所述液滴发生器的移动和 (b) 所述液滴的分配,以制作包含多层所述液滴的所述液滴组件,其中各层相互邻接。典型地,液滴组件以水平层向上堆建。

[0257] 所述液滴组件包含的层数可以是例如3层或以上。所述液滴的层数可以是例如等于或大于5。典型地,所述液滴的层数可以是例如等于或大于10,例如等于或大于15。更典型地,所述液滴的层数可以是例如等于或大于20。在一些实施例中,所述层数为10-50,例如20-30。所述层数可以是例如约20或约28。在其他实施例中,所述液滴的层数可以是例如等于或大于50,例如等于或大于100。所述液滴的层数可以是例如等于或大于500,例如等于或大于1000。例如,所述液滴的层数可以是例如等于或大于2000,例如等于或大于4000。

[0258] 本发明的装置可用于形成第一液滴组件和第二液滴组件。可以生产第三液滴组件,该第三液滴组件包括所述第一和第二液滴组件。该第一液滴组件和第二液滴组件可以,例如,通过第一液滴组件的至少一个液滴和第二液滴组件的至少一个液滴之间形成的双分子层相连接,而不需要第一液滴组件中的每个液滴均与第二液滴组件中的每个液滴都形成双分子层。

[0259] 在一些实施例中,所述控制单元用于协调 (a) 所述容器相对于各个所述液滴发生器的移动和 (b) 所述液滴的分配,以制作包含多个液滴的所述液滴组件,其中每个所述液滴包含 (i) 水相介质和 (ii) 包围所述水相介质表面的两亲分子外层,且每个所述液滴与另一个所述液滴接触,从而形成作为所述接触液滴之间界面的所述两亲分子的双分子层;其中,所述多个液滴包含所述液滴的第一区域和所述液滴的第二区域,所述第一区域中的每个液滴均与该区域中的至少一个其他液滴相接触,从而形成作为所述接触液滴之间界面的所述两亲分子的双分子层,且所述第二区域中的每个液滴均与该区域中的至少一个其他液滴相接触,从而形成作为所述接触液滴之间界面的所述两亲分子的双分子层;其中,所述第一区域中的所述液滴的水相介质与所述第二区域中的所述液滴中的所述水相介质不同,和/或其中所述第一区域中的液滴之间的双分子层的组成成分与所述第二区域中的液滴之间的

双分子层的组成成分不同。

[0260] 例如,所述第一区域中的至少一个液滴与第二区域中的至少一个液滴相接触,从而形成作为所述接触液滴之间界面的所述两亲分子的双分子层。典型地,第一区域中的液滴与第二区域中的液滴形成两个或多个界面。第一区域中有至少一个液滴不与第二区域中的液滴形成双分子层,和/或第二区域中有至少一个液滴不与第一区域中的液滴形成双分子层。

[0261] 在一个实施例中,所述第一区域中的液滴的所述水相介质包含膜蛋白,且所述第二区域中的液滴的所述水相介质不包含所述膜蛋白;所述第一区域和第二区域中的液滴的所述水相介质具有不同的膜蛋白浓度;所述第一区域中的液滴之间的所述双分子层进一步包括膜蛋白,且所述第二区域中的液滴之间的所述双分子层不含所述膜蛋白或含有所述膜蛋白的浓度低于所述第一区域中的液滴之间的所述双分子层;所述第一区域和第二区域中的液滴的所述水相介质具有不同的渗透压;或所述第一区域和第二区域中的液滴的所述水相介质具有不同浓度的盐或缓冲物质。

[0262] 在一个实施例中,第一区域中的液滴的水相介质包括第一膜蛋白,第二区域中的液滴的水相介质包括第二膜蛋白,而第一膜蛋白和第二膜蛋白不同。第一膜蛋白和第二膜蛋白可以是如本文所述的膜蛋白。

[0263] 典型地,本发明的装置所生产的液滴组件包括至少100个所述液滴,每个所述液滴包括(i)水相介质和(ii)包围所述水相介质表面的两亲分子外层。更典型地,本发明的装置所生产的液滴组件包括至少1000个所述液滴,每个所述液滴包括(i)水相介质和(ii)包围所述水相介质表面的两亲分子外层。更典型地,本发明的装置所生产的液滴组件包括至少10000(例如,25000)个所述液滴,每个所述液滴包括(i)水相介质和(ii)包围所述水相介质表面的两亲分子外层。

[0264] 在一些实施例中,本发明的装置所生产的液滴组件数目可以很大,例如至少100000个。本发明的装置所生产的液滴组件数目可以是至少1000000个所述液滴,例如至少10000000。例如,本发明的装置所生产的液滴组件数目可以是至少1000000000个所述液滴。在一些实施例中,本发明的装置所生产的液滴组件数目可以是至少10000000000个所述液滴,例如至少50000000000。例如,如果该液滴组件是包含至少4000层的立方体,则本发明的装置所生产的液滴组件数目可以是至少640亿个液滴。

[0265] 因此,本发明的装置可以用于生产毫米数量级几何结构的三维液滴组件。所述液滴组件可以,例如,包含至少10000个所述液滴,其中每个液滴的直径是10 $\mu\text{m}$ 至1mm,例如,10 $\mu\text{m}$ 至200 $\mu\text{m}$ 。典型地,每个液滴的直径是30 $\mu\text{m}$ 至60 $\mu\text{m}$ ,例如,每个液滴的直径是约50 $\mu\text{m}$ 。该液滴组件可以功能化,例如,通过在组件选定区域中使用膜蛋白。附加地或可选地,该液滴组件可以用于利用渗透进行折叠。

[0266] 本发明的装置可用于生产厘米或以上数量级的几何结构的三维液滴组件。

[0267] 可以将三维液滴组件胶凝在一起,形成新的液滴组件。由此一来,可以将单个液滴组件用作构建单元,例如,用于形成复杂结构。

[0268] 在一些实施例中,所述控制单元用于协调(a)所述容器相对于各个所述液滴发生器的移动和(b)所述液滴的分配,以通过下文所述的本发明的方法生产液滴组件。

[0269] 在其他实施例中,所述控制单元用于协调(a)所述容器相对于各个所述液滴发生

器的移动和 (b) 所述液滴的分配,以生产如下文所述的本发明的产品液滴组件。

[0270] 本发明的装置的一些实施例中,当所述容器包含疏水介质时,所述疏水介质是处于第二松散介质内的一滴疏水介质液滴,所述第二松散介质是水相介质,且其中所述容器装有作为水相介质的所述第二松散介质和所述疏水介质液滴。作为水相介质的所述第二松散介质可以与前述水相介质相同或不同。

[0271] 通常,所述疏水介质液滴进一步包括包围所述液滴表面的两亲分子外层,所述两亲分子外层充当所述液滴和作为水相介质的所述第二松散介质之间的界面。所述两亲分子可以与包围所述水相介质表面的两亲分子外层中的两亲分子相同或不同。典型地,液滴表面形成两亲分子双分子层。因此,可以存在 (i) 液滴之间的液滴界面双分子层和 (ii) 液滴和液滴表面之间的双分子层。所述双分子层允许 (i) 液滴组件内的液滴之间和 (ii) 液滴组件内的液滴和外部环境之间的通讯。

[0272] 本发明的装置可用于本发明的方法中。

[0273] 本发明还涉及使用用于产生液滴组件的装置产生所述液滴组件的方法,所述液滴组件包括:多个液滴,其中每个所述液滴包括 (i) 液滴介质和 (ii) 包围所述液滴介质表面的两亲分子外层,所述液滴介质为水相介质或疏水介质,且至少一个所述液滴与另一个所述液滴接触,从而形成作为所述接触液滴之间界面的所述两亲分子层;所述装置包括:至少一个液滴发生器;可相对于所述至少一个液滴发生器移动的容器;以及控制单元,所述控制单元用于控制所述至少一个液滴发生器分配液滴和所述容器相对于所述至少一个液滴发生器的移动;其中所述装置的所述容器包括松散介质,其中当所述液滴介质为水相介质时,所述松散介质为疏水介质;以及当所述液滴介质为疏水介质时,所述松散介质为水相介质;所述方法包括:(a) 多个分配步骤,其中每个分配步骤包括:在两亲分子的存在下,从所述液滴发生器中分配一滴所述液滴介质到所述松散介质中,由此在所述松散介质中形成包含 (i) 所述液滴介质和 (ii) 包围所述液滴介质表面的两亲分子外层的液滴;以及 (b) 令所述容器相对于所述至少一个液滴发生器移动,以控制所述液滴在所述松散介质中的相对位置。

[0274] 所述作为所述接触液滴之间的界面的两亲分子层可以是,例如,所述两亲分子的双分子层或嵌段共聚物层。所述嵌段共聚物层可以是,例如,三嵌段共聚物层。当所述液滴介质是水相介质时,所述作为所述接触液滴之间的界面的两亲分子层可以是,例如,所述两亲分子的双分子层或嵌段共聚物层。当所述液滴介质是疏水介质时,所述作为所述接触液滴之间的界面的两亲分子层可以是,例如,所述两亲分子的双分子层或嵌段共聚物层。

[0275] 典型地,所述作为所述接触液滴之间的界面的两亲分子层是所述两亲分子的双分子层。

[0276] 典型地,所述液滴介质是水相介质。但是,在另一个实施例中,所述液滴介质是疏水介质。

[0277] 通常,所述液滴介质是水相介质,且所述松散介质是疏水介质,下文中一般会以这些条件来描述本发明。但是,本领域技术人员可以理解,本文所述的任何符合所述条件的本发明实施例也可以“反向”实施,使用疏水介质而非水相介质作为液滴介质,且使用水相介质而非疏水介质作为液滴介质。

[0278] 对于本发明的装置而言,所述水相介质典型地是上文所述的水相介质。

[0279] 典型地,每个所述多个液滴的直径为等于或小于1mm,例如10 $\mu$ m至1mm。通常,每个

所述多个液滴的直径为10至200 $\mu\text{m}$ 。例如,30至60 $\mu\text{m}$ 的液滴。更典型地,每个所述多个液滴的直径为约50 $\mu\text{m}$ 的液滴。

[0280] 所述两亲分子可以是任何合适的两亲分子。例如,对于本发明的装置,其可以是前文所述的两亲分子。

[0281] 所述两亲分子可以,例如,置于水相介质或疏水介质中。典型地,所述两亲分子置于疏水介质中。

[0282] 当在两亲分子的存在下,将水相介质分配到疏水介质中时,形成包含(i)水相介质和(ii)包围所述水相介质表面的两亲分子外层的液滴。

[0283] 在一些实施例中,液滴可以包含其他材料、化合物或物质。例如,液滴可以包含小分子,例如染料或磁体。合适的染料包括但不限于,二甲苯青FF、橙黄G、8-羟基-1,3,6-三磺酸苝、荧光黄和5-cTAMRA(5-羧基四甲基罗丹明)。可选地,液滴可以包含任何合适的感应器分子,例如对特定化学物质敏感的感应器分子或光敏分子,或其可以对pH或温度的变化敏感。在一些实施例中,该感应器分子可以对特定生物化学物质或酶的存在(或缺失)敏感。可选地,液滴可以包含治疗剂,例如原药;或者诊断剂,例如造影剂。液滴可以包含酶。

[0284] 液滴可以包括活细胞(或活细胞群),例如用于组织工程。例如,可以允许细胞在打印后的液滴中生长和/或在破坏打印后的液滴之间的双分子层。

[0285] 液滴组件一旦打印,可以用作固体材料图案形成的模版。该固体材料可以用于电子、光学、光电或其他材料科学应用。液滴中可以例如包含可以在特定液滴之间扩散的无机材料。该无机材料可以随后反应并形成无机固体,例如硫化镉。

[0286] 所述方法可以,例如,包括移动所述容器来控制液滴在疏水介质中的相对位置和/或移动所述至少一个液滴发生器来控制液滴在疏水介质中的相对位置。

[0287] 通常,对于本发明的装置,所述容器是如前文所述的容器。

[0288] 对于本发明的装置,各个液滴发生器可以是,例如,如前文所述的液滴发生器。

[0289] 典型地,对于本发明的装置,控制单元是如前文所述的控制单元。通常,所述控制单元控制分配步骤以及所述容器相对于各个所述液滴发生器的移动。

[0290] 通常,所述控制单元控制分配步骤以及所述容器相对于各个所述液滴发生器的移动,以生产所述液滴组件。

[0291] 典型地,令所述容器相对于所述至少一个液滴发生器移动包括:相对于所述至少一个液滴发生器移动所述容器,从而将至少一个所述液滴置于邻近另一个所述液滴处,由此所述液滴与另一个所述液滴相互接触而形成作为所述接触液滴之间界面的所述两亲分子层。

[0292] 所述作为所述接触液滴之间的界面的两亲分子层可以是,例如,所述两亲分子的双分子层或嵌段共聚物层。所述嵌段共聚物层可以是,例如,三嵌段共聚物层。当所述液滴介质是水相介质时,所述作为所述接触液滴之间的界面的两亲分子层可以是,例如,所述两亲分子的双分子层或嵌段共聚物层。当所述液滴介质是疏水介质时,所述作为所述接触液滴之间的界面的两亲分子层可以是,例如,所述两亲分子的双分子层或嵌段共聚物层。

[0293] 典型地,所述作为所述接触液滴之间的界面的两亲分子层是所述两亲分子的双分子层。

[0294] 令所述容器相对于所述至少一个液滴发生器移动包括:相对于所述至少一个液滴

发生器移动所述容器,从而将至少一个所述液滴置于邻近另一个所述液滴处。

[0295] 通常,所述液滴组件包括所述多个液滴,其中每个所述液滴与另一所述液滴接触,从而形成作为相接触液滴之间截面的所述两亲分子双分子层。

[0296] 令所述容器相对于所述至少一个液滴发生器移动可以例如包括:相对于所述至少一个液滴发生器移动所述容器,从而将至少一个所述液滴置于邻近另一个所述液滴处,由此所述液滴与另一个所述液滴相互接触而形成作为所述接触液滴之间界面的所述两亲分子层。

[0297] 所述作为所述接触液滴之间的界面的两亲分子层可以是,例如,所述两亲分子的双分子层或嵌段共聚物层。所述嵌段共聚物层可以是,例如,三嵌段共聚物层。当所述液滴介质是水相介质时,所述作为所述接触液滴之间的界面的两亲分子层可以是,例如,所述两亲分子的双分子层或嵌段共聚物层。当所述液滴介质是疏水介质时,所述作为所述接触液滴之间的界面的两亲分子层可以是,例如,所述两亲分子的双分子层或嵌段共聚物层。

[0298] 典型地,所述作为所述接触液滴之间的界面的两亲分子层是所述两亲分子的双分子层。

[0299] 通常,令所述容器相对于所述至少一个液滴发生器移动包括:在分配步骤之间,相对于所述至少一个液滴发生器移动所述容器。

[0300] 例如,所述方法通常包括 (b) 在至少2个分配步骤之间,令所述容器相对于所述至少一个液滴发生器移动。在一些实施例中,所述方法包括 (b) 在至少50% (例如至少80%) 分配步骤之间,令所述容器相对于所述至少一个液滴发生器移动。例如,所述方法包括 (b) 在基本所有分配步骤之间,令所述容器相对于所述至少一个液滴发生器移动。例如,所述方法可以包括 (b) 在所有分配步骤之间,令所述容器相对于所述至少一个液滴发生器移动。

[0301] 虽然可能需要在分配步骤之间,令所述容器相对于所述至少一个液滴发生器移动,但是,并不总是需要在分配步骤之间令所述容器相对于所述至少一个液滴发生器移动。例如,当同一液滴发生器分配2个液滴时,分配前一液滴后直接分配下一个,其中一个液滴直接分配到另一液滴上,则该容器无需相对于液滴发生器移动就可以令液滴分配到正确位置。相似地,可以从两台液滴发生器一个接一个地分配2个液滴,且两台液滴发生器的位置可以是令容器无需相对于两台液滴发生器进行移动就可以令液滴分配到正确位置。

[0302] 在一些实施例中,令所述容器相对于所述至少一个液滴发生器移动包括:在分配步骤之间,以及分配步骤期间,相对于所述至少一个液滴发生器移动所述容器。

[0303] 例如,所述方法通常包括 (b) 在至少2个分配步骤之间,令所述容器相对于所述至少一个液滴发生器移动。在一些实施例中,所述方法包括 (b) 在至少50% (例如至少80%) 分配步骤之间,令所述容器相对于所述至少一个液滴发生器移动。在一些实施例中,所述方法包括 (b) 在基本所有分配步骤之间,以及基本所有分配步骤期间,例如在所有分配步骤之间和期间,令所述容器相对于所述至少一个液滴发生器移动。

[0304] 典型地,所述液滴介质为水相介质且所述松散介质为疏水介质。因此,通常而言,本发明中的方法是使用用于产生液滴组件的装置来产生液滴组件的方法,所述液滴组件包括:多个液滴,其中每个所述液滴包括 (i) 水相介质和 (ii) 包围所述水相介质表面的两亲分子外层,且其中至少一个所述液滴与另一个所述液滴接触从而形成作为所述接触液滴之间界面的所述两亲分子层;所述装置包括:至少一个液滴发生器;可相对于所述至少一个液滴

发生器移动的容器;以及控制单元,所述控制单元用于控制所述至少一个液滴发生器分配液滴和所述容器相对于所述至少一个液滴发生器的移动;其中所述装置的所述容器装有疏水介质;所述方法包括:(a)多个分配步骤,其中每个分配步骤包括:在两亲分子的存在下,从所述液滴发生器中分配一滴所述水相介质到所述疏水介质中,由此在所述疏水介质中形成包含(i)所述水相介质和(ii)包围所述水相介质表面的两亲分子外层的液滴;以及(b)令所述容器相对于所述至少一个液滴发生器移动,以控制所述液滴在所述疏水介质中的相对位置。

[0305] 典型地,本发明的方法包括:(a)第一分配步骤,包括:在两亲分子的存在下,从所述液滴发生器中分配一滴所述水相介质到所述疏水介质中,由此在所述疏水介质中形成包含(i)所述水相介质和(ii)包围所述水相介质表面的两亲分子外层的第一液滴;(b)令所述容器相对于所述至少一个液滴发生器移动,以控制第二液滴在所述疏水介质中相对于所述疏水介质中的所述第一液滴的位置;(c)第二分配步骤,包括:在两亲分子的存在下,从所述液滴发生器中分配一滴所述水相介质到所述疏水介质中,由此在所述疏水介质中形成包含(i)所述水相介质和(ii)包围所述水相介质表面的两亲分子外层的第二液滴。

[0306] 第一分配步骤的液滴发生器可以与第二分配步骤的液滴发生器可以是同一或不同的液滴发生器。

[0307] 如上所述,对于本发明的装置,液滴大小可以由,例如,分配该液滴的液滴发生器来控制。当第一分配步骤的液滴发生器不同于第二分配步骤的液滴发生器时,第一液滴的直径可以与第二液滴相同或不同。

[0308] 典型地,第一液滴的直径可以等于或小于1mm,例如,10 $\mu$ m-1mm。通常,第一液滴的直径是10-200 $\mu$ m,例如30-60 $\mu$ m。更典型地,第一液滴的直径是约50 $\mu$ m。

[0309] 通常,第二液滴的直径可以等于或小于1mm,例如,10 $\mu$ m-1mm。通常,第二液滴的直径是10-200 $\mu$ m,例如30-60 $\mu$ m。在一些实施例中,第一液滴的直径是约50 $\mu$ m。

[0310] 第一液滴的水相介质可以与第二液滴的水相介质相同或不同。当第一分配步骤的液滴发生器与第二分配步骤的液滴发生器是同一液滴发生器时,典型地,第一液滴的水相介质与第二液滴的水相介质相同。当第一分配步骤的液滴发生器与第二分配步骤的液滴发生器不是同一液滴发生器时,典型地,第一液滴的水相介质与第二液滴的水相介质不同。

[0311] 第一液滴的水相介质可以与第二液滴的水相介质相同或不同。典型地,对于本发明的装置,两亲分子是如本文所述的两亲分子。

[0312] 在一些实施例中,所述步骤(b)中的令所述容器相对于所述至少一个液滴发生器移动包括:相对于所述至少一个液滴发生器移动所述容器,从而将所述第二液滴置于邻近所述第一液滴处,由此所述第一液滴与所述第二液滴相互接触而形成作为所述接触液滴之间界面的所述两亲分子的双分子层。

[0313] 典型地,所述方法进一步包括:(d)令所述容器相对于所述至少一个液滴发生器移动,以控制又一液滴在所述疏水介质中相对于所述疏水介质中的其他液滴的位置;(e)又一个分配步骤,包括:在两亲分子的存在下,从所述液滴发生器向所述疏水介质中分配又一滴水相介质,由此在所述疏水介质中形成包含(i)所述水相介质和(ii)包围所述水相介质表面的两亲分子外层的又一液滴。

[0314] 所述又一液滴的水相介质通常是如本文进一步所述的水相介质。

[0315] 典型地,对于本发明的装置,两亲分子是如本文所述的两亲分子。

[0316] 通常,所述步骤(d)中的令所述容器相对于所述至少一个液滴发生器移动,包括:相对于所述至少一个液滴发生器移动所述容器,从而将所述又一液滴置于邻近所述疏水介质中的至少一个其他液滴处,由此所述又一液滴与所述疏水介质中的至少一个其他液滴相互接触,从而形成作为所述接触液滴之间界面的所述两亲分子的双分子层。

[0317] 在一些实施例中,本发明的所述方法包括至少500个所述又一分配步骤(e)。典型地,所述方法可以包括1000个所述又一分配步骤(e),例如5000个所述又一分配步骤。例如,所述方法可以包括至少10000个所述又一分配步骤(e)。在一些实施例中,所述方法包括至少25000个所述又一分配步骤(e)。

[0318] 通常,所述方法包括至少500个所述令所述容器相对于所述至少一个液滴发生器移动的步骤(d),以及至少500个所述又一分配步骤(e)。例如,所述方法可以包括至少1000个所述令所述容器相对于所述至少一个液滴发生器移动的步骤(d),以及至少1000个所述又一分配步骤(e)。在一些实施例中,所述方法可以包括例如至少5000个所述令所述容器相对于所述至少一个液滴发生器移动的步骤(d),以及至少5000个所述又一分配步骤(e)。

[0319] 典型地,所述方法包括至少10000个所述令所述容器相对于所述至少一个液滴发生器移动的步骤(d),以及至少10000个所述又一分配步骤(e)。在一些实施例中,所述方法包括至少25000个所述令所述容器相对于所述至少一个液滴发生器移动的步骤(d),以及至少25000个所述又一分配步骤(e)。

[0320] 所述方法可以包括至少1000000个所述令所述容器相对于所述至少一个液滴发生器移动的步骤(d),以及至少1000000个所述又一分配步骤(e)。例如,所述方法可以包括至少1000000000个所述令所述容器相对于所述至少一个液滴发生器移动的步骤(d),以及至少1000000000个所述又一分配步骤(e)。

[0321] 通常,所述多个分配步骤包括共同在所述疏水介质中产生一行所述液滴的分配步骤,其中所述行中的每个液滴均与该行的另一液滴相接触,从而形成作为所述接触液滴之间界面的所述两亲分子的双分子层。

[0322] 典型地,所述行中的液滴数目为至少5个,例如至少10个。更典型地,所述行中的液滴数目为至少20个,例如至少50个。通常,所述行中的液滴数目为5-500个,例如10-250个。在一些实施例中,所述行中的液滴数目为20-100个,例如所述行中的液滴数目为20-35个。

[0323] 在一些实施例中,所述行中的液滴数目为至少500个,例如至少1000个。所述行中的液滴数目可以是,例如,至少2000个,例如至少4000个。所述行中的液滴数目可以是,例如,至少5-5000个。

[0324] 多行液滴可以置于相邻位置从而形成层。在一层中,典型地,多行相互接触,由此一行中的液滴与相邻一行或多行液滴相接触,以形成形成作为所述接触液滴之间界面的所述两亲分子的双分子层。例如,一层可以包含至少10个相邻的所述行,或例如至少20个相邻的所述行。在一些实施例中,一行包括至少50个相邻的所述行,或例如至少100个相邻的所述行。所述行中的液滴数目如上所述。例如,矩形层可以是至少20液滴乘至少20液滴的层(即含至少20x20液滴的层)。但是,每行无需长度相同,因此可以通过将不同长度的行相邻放置,来形成多种不同层形状。自发折叠的液滴组件,例如,可以包含不同长度的行,如实施例部分所述。

[0325] 在一些实施例中,所述多个分配步骤包括第一组分配步骤,其共同在所述疏水介质中产生第一行所述液滴,其中所述第一行中的每个液滴均与所述第一行的另一液滴相接触,从而形成作为所述接触液滴之间界面的所述两亲分子的双分子层;以及第二组分配步骤,其共同在所述疏水介质中产生第二行所述液滴,其中所述第二行中的每个液滴均与所述第二行的另一液滴相接触,从而形成作为所述接触液滴之间界面的所述两亲分子的双分子层。

[0326] 典型地,所述第二行中的液滴被分配到邻近所述第一行的液滴处,由此所述第一行中的液滴与所述第二行中的液滴相互接触,从而形成作为所述接触液滴之间界面的所述两亲分子的双分子层。

[0327] 通常,所述多个分配步骤包括共同在所述疏水介质中产生多行所述液滴的分配步骤,其中一行中的每个液滴均与该行的另一液滴相接触,从而形成作为所述接触液滴之间界面的所述两亲分子的双分子层,且各行均邻近另一行,由此一行中的液滴与相邻行中的液滴相互接触,从而形成作为所述接触液滴之间界面的所述两亲分子的双分子层。

[0328] 放置为相互邻近的行的数量可以如上所述。

[0329] 在一些实施例中,所述多个分配步骤包括共同在所述疏水介质中产生一层所述液滴的分配步骤,其中所述层中的每个液滴均与该层的另一液滴相接触,从而形成作为所述接触液滴之间界面的所述两亲分子的双分子层。

[0330] 液滴层通常包含相邻放置并相互接触的多行液滴,其中相邻行的液滴相互接触从而形成作为所述接触液滴之间界面的所述两亲分子的双分子层。例如,一层可以包含至少20个相邻放置的所述行。该行中的液滴数目可以如上所述。该层中的不同行可以具有不同液滴数目,由此该层无需是矩形的,但可以是任意形状。例如,液滴层可以是矩形、圆形、卵形、菱形或任何其他二维形状。而且,液滴层可以在某一个或多个位置上具有一个或多个间隔(即不含液滴的位置)。因此,液滴层可以,例如,是环形或框形。矩形液滴层可以是例如至少20液滴乘至少20液滴的层(即含至少20x20液滴的层)。典型地,一层在另一层上方或下方。通常,液滴组件以水平层向上构建。

[0331] 通过层层堆积放置液滴层,可以构建具有多种三维(3D)形状的液滴组件。最简单的3D液滴组件之一具有立方体形状。但是,通过逐个堆积不同形状的液滴层,可以形成多种其他三维液滴组件结构,例如,具有金字塔形状或棱柱形状的液滴组件。

[0332] 通常,所述多个分配步骤包括:第一组分配步骤,其共同在所述疏水介质中产生第一层所述液滴,其中所述第一层中的每个液滴均与所述第一层的至少一个其他液滴相接触,从而形成作为所述接触液滴之间界面的所述两亲分子的双分子层;以及第二组分配步骤,其共同在所述疏水介质中产生第二层所述液滴,其中所述第二层中的每个液滴均与所述第二层的至少一个其他液滴相接触,从而形成作为所述接触液滴之间界面的所述两亲分子的双分子层。

[0333] 通常,所述第二层中的液滴被分配到邻近所述第一层的液滴处,由此所述第一层中的液滴与所述第二层中的液滴相互接触,从而形成作为所述接触液滴之间界面的所述两亲分子的双分子层。

[0334] 更典型地,第二层中的液滴置于第一层液滴上,由此第一层中的液滴与第二层中的液滴接触,从而形成作为所述接触液滴之间界面的所述两亲分子的双分子层。

[0335] 通常,所述多个分配步骤包括共同在所述疏水介质中产生多层所述液滴的分配步骤,其中一层中的每个液滴均与该层的另一液滴相接触,从而形成作为所述接触液滴之间界面的所述两亲分子的双分子层,且各层均邻近另一层,由此一层中的液滴与相邻层中的液滴相互接触,从而形成作为所述接触液滴之间界面的所述两亲分子的双分子层。

[0336] 通常,所述每层中的液滴被分配到邻近所述第一层的液滴,由此一层中的液滴与另一层中的液滴接触,从而形成作为所述接触液滴之间界面的所述两亲分子的双分子层。

[0337] 更典型地,每层被置于另一层上,由此一层中的液滴与另一层中的液滴接触,从而形成作为所述接触液滴之间界面的所述两亲分子的双分子层。

[0338] 在一些实施例中,第一层中的液滴与第二层中的液滴接触,从而形成作为所述接触液滴之间界面的所述两亲分子的双分子层,但是第二层中的液滴并不相互接触。例如,在第二层中的液滴的直径小于第一层中的液滴时,可以存在这种情况。例如,在第二层中特异留有间隔(即无液滴的空间)时,可以存在这种情况。

[0339] 所述层可以,例如,处于一层上方且处于另一层下方。

[0340] 所述液滴的层数可以是例如等于或大于5。典型地,所述液滴的层数可以是例如等于或大于10,例如等于或大于15。更典型地,所述液滴的层数可以是例如等于或大于20,例如等于或大于25。在一些实施例中,所述液滴的层数等于或大于50,例如等于或大于100。在一些实施例中,所述层数为10-50,例如20-30。

[0341] 在一些实施例中,所述液滴的层数可以是至少500,例如1000。例如,所述液滴的层数可以是至少2000,例如等于或大于4000。所述液滴的层数可以是5-5000。

[0342] 因此,本发明的方法为生产包含大量液滴的具有例如毫米级几何结构的液滴组件提供了一种有效方法。

[0343] 本发明的方法可用于生产具有厘米级或更大的几何结构的三维液滴组件。

[0344] 如补充方法中的实施例所述,可以控制用于生产液滴组件的打印图样,从而控制组件的打印准确度。例如,当容器相对于至少一个液滴发生器移动时,其移动可能使得新近分配的液滴移位。例如,当液滴发生器尖端浸入疏水介质时,该尖端相对于疏水介质的移动产生拉力。其可能的有利之处在于,例如,在容器相对于至少一个液滴发生器移动之前,允许新近分配的液滴有足够的时间与另一液滴接触。但是,若该方法中设置太多停顿,则包含上千液滴的大组件可能要求的生产时间过长。发明人发现,在一些实施例中,在打印每行后停顿可以显著减少打印时间,而不会显著降低打印质量(参见补充讨论)。

[0345] 可以通过数种方法控制整体打印速度。例如,可以通过从两台或以上液滴发生器同时分配液滴来控制整体打印速度。

[0346] 可以通过液滴发生器相对于容器的移动来移动单个液滴。因此,可能期望能够在液滴发生器相对于容器移动之前,令每个液滴或至少每行液滴达到其在网络中的预期位置。可以通过(i)降低疏水介质的粘性;(ii)降低疏水介质的密度;(iii)提高水相介质的密度;或(iv)增加各个液滴发生器分配的液滴直径,来令液滴更快下沉,从而改变该打印速率。例如,降低疏水介质的粘性可以减少由液滴发生器相对于容器的移动所引起的液滴位移,并提高下沉速度。典型地,这意味着液滴发生器可以更快地向下一个位置移动。

[0347] 可选地,可以通过增加或减少各个液滴发生器尖端和液滴停止移动的位置之间的距离,来改变打印速度。

[0348] 在一个实施例中,每个液滴在其停止位置上方至少100 $\mu\text{m}$ ,例如至少150 $\mu\text{m}$ 处分配。典型地,每个液滴在其停止位置上方至少200 $\mu\text{m}$ 处分配。发明人发现,当试图以小于所述距离的距离生产液滴时,可能阻碍液滴形成。但是,如果例如改变疏水介质的粘性或密度,或改变水相介质的密度,则可能适用较小距离。

[0349] 需要在分配后的液滴相互接触之前,形成两亲分子外层。可以通过,例如,(a)增加所述疏水介质或水相介质中的两亲分子浓度;(b)减小液滴直径;或(c)使用促进单分子层形成的疏水介质,来控制这一过程。发明人发现,当疏水介质包含硅酮油和/或碳氢化合物(例如十六烷)时,可以促进单分子层的快速形成。所述单分子层可以,例如,在液滴形成的约1秒内形成。

[0350] 通常,本发明的方法进一步在分配步骤和相对于所述至少一个液滴发生器移动所述容器的步骤之间,包含延迟,以减少液滴滑移。

[0351] 通常,所述延迟等于或大于1ms,例如,等于或大于10ms。典型地,该延迟等于或大于25ms,例如等于或大于50ms。例如,该延迟可以是约50ms。

[0352] 在一些实施例中,可以生成行后延迟。该方法可以包括,例如:第一组分配步骤,其共同在所述疏水介质中产生第一行所述液滴,其中所述第一行中的每个液滴均与所述第一行的另一液滴相接触,从而形成作为所述接触液滴之间界面的所述两亲分子的双分子层;以及第二组分配步骤,其共同在所述疏水介质中产生第二行所述液滴,其中所述第二行中的每个液滴均与所述第二行的另一液滴相接触,从而形成作为所述接触液滴之间界面的所述两亲分子的双分子层;以及,第一组分配步骤和第二组分配步骤之间的延迟。通常,该延迟等于或大于1秒。例如,该延迟可以是约2秒。

[0353] 在一些实施例中,所述多个分配步骤可以包括至少一组分配步骤,所述至少一组分配步骤共同在所述疏水介质中产生一行所述液滴,其中所述行中的每个液滴均与该行中的另一液滴相接触,从而形成作为所述接触液滴之间界面的所述两亲分子的双分子层;以及,其中所述方法进一步在(i)所述共同产生所述一行液滴的一组分配步骤的最后一个分配步骤和(ii)相对于所述至少一个液滴发生器移动所述容器的后续步骤之间,包含所述延迟。

[0354] 通常,所述方法进一步在所述共同产生所述一行液滴的每组分配步骤的最后一个分配步骤和相对于所述至少一个液滴发生器移动所述容器的后续步骤之间,包含所述延迟。

[0355] 典型地,该疏水介质或水相介质或此两者进一步包含两亲分子。对于本发明的装置,所述两亲分子通常如本文所述。

[0356] 在一些实施例中,每行末尾处分配一个或多个额外液滴。所述一个或多个额外液滴可以,例如,防止液滴组件内的内部液滴滚出其预期边界。

[0357] 通常,所述至少一个液滴发生器是包含用于分配液滴的压电换能器的压电式液滴发生器,且其中每个分配步骤包含项所述压电元件施加电压脉冲。所述控制单元通常控制向所述压电元件施加所述电压脉冲

[0358] 典型地,所述电压脉冲的峰-峰振幅为5-100V,例如20-60V。

[0359] 通常,每个脉冲的时长为10-1500 $\mu\text{s}$ ,例如100-800 $\mu\text{s}$ 。

[0360] 典型地,所述电压脉冲为方波电压脉冲。

[0361] 如图10所示,液滴直径可以通过改变电压脉冲的幅度和时长来进行微调。

[0362] 本发明的方法可以进一步包括,周期性(例如约每10-30s)施加小电压脉冲(例如,6-18V电压脉冲,更典型地,约12V电压脉冲)。所述脉冲的有益效果在于,能够保障液滴介质(例如水相介质)不会逐渐凸出打印喷嘴尖端外并漏入油中(由于水相腔室的位置典型地高于油容器的位置,因此在喷嘴尖端处产生的液体静压力大于油)。据发现,施加所述低压脉冲能够令喷嘴尖端处的水油界面恢复至平面几何结构,而不会使得液滴喷出。

[0363] 通常,所述液滴分配速率为 $0.01$ 至 $100\text{s}^{-1}$ ,例如 $0.01$ 至 $50\text{s}^{-1}$ 。典型地,所述液滴分配速率为 $0.01$ 至 $10\text{s}^{-1}$ ,例如 $0.5$ 至 $5\text{s}^{-1}$ 。在一些实施例中,所述液滴分配速率为约 $1\text{s}^{-1}$ 。

[0364] 典型地,在本发明的方法中,所述装置包括2个或更多所述液滴发生器。如上所述,不同液滴发生器可以分配具有不同直径或不同水相介质的液滴。

[0365] 在一些实施例中,所述液滴介质是水相介质,且所述松散介质是疏水介质,且其中所述多个分配步骤包括:第一组分配步骤,其共同在所述疏水介质中产生第一区域的液滴,其中所述第一区域中的每个液滴均与所述第一区域的至少一个其他液滴相接触,从而形成作为所述接触液滴之间界面的所述两亲分子的双分子层;以及第二组分配步骤,其共同在所述疏水介质中产生第二区域的液滴,其中所述第二区域中的每个液滴均与所述第二区域的至少一个其他液滴相接触,从而形成作为所述接触液滴之间界面的所述两亲分子的双分子层。

[0366] 本领域技术人员能够理解,整个区域通常并非依序打印。事实上,对于指定层,该层的第一区域的液滴通常一起打印,接下来是该层的第二区域的所有液滴。然后,开始打印另一层,其中涉及打印该层第一区域的更多液滴和第一区域的更多液滴(顺序可变更)。因此,所述第一组分配步骤无需全部依序发生,相似地,第二组分配步骤并无需全都依序发生。而且,第二组分配步骤无需全都在第一组分配步骤之后发生,反之亦然。

[0367] 采用使用本发明的方法,第一区域和第二区域可以是可以用液滴制作的任何二维或三维结构。

[0368] 通常,第一区域和/或第二区域包含至少100个液滴,例如至少500个液滴。在一些实施例中,所述第一区域和/或第二区域包含至少1000个液滴,例如至少5000个液滴。

[0369] 所述第一区域和第二区域中各自的液滴数量可以很大,例如至少100000。所述第一区域和第二区域中各自的液滴数量可以是至少1000000,例如至少10000000。例如,所述第一区域和第二区域中各自的液滴数量可以是至少1000000000。在一些实施例中,所述第一区域和第二区域中各自的液滴数量可以是至少10000000000,例如至少50000000000。

[0370] 典型地,在本发明的方法中,所述装置包括第一液滴发生器和第二液滴发生器,其中所述第一组分配步骤所分配的液滴是从所述第一液滴发生器分配到所述疏水介质中,且所述第二组分配步骤所分配的液滴是从所述第二液滴发生器分配到所述疏水介质中。如上所述,不同液滴发生器可以分配具有不同直径的液滴和/或包含不同水相介质的液滴。

[0371] 而且,如上所述,整个区域并非总是依序打印。因此,对于指定层,该层的第一区域的液滴通常一起打印,接下来是该层的第二区域的所有液滴。然后,开始打印另一层,其中涉及打印该层第一区域的更多液滴和第一区域的更多液滴(顺序可变更)。因此,所述第一组分配步骤无需全部依序发生,相似地,第二组分配步骤并无需全都依序发生。而且,第二组分配步骤无需全都在第一组分配步骤之后发生,反之亦然。

[0372] 通常,所述第二区域的液滴被分配到靠近所述第一区域的液滴的位置,由此所述第一区域的液滴与所述第二区域的液滴相接触,从而形成作为所述接触液滴之间界面的所述两亲分子的双分子层。

[0373] 典型地,第二区域中的部分但非全部液滴被置于靠近第一区域中的液滴的位置。因此,典型地,仅第一区域中的部分液滴与第二区域中的液滴接触从而形成双分子层。当第一区域和/或第二区域是多层液滴构成的三维结构时,通常存在这种情况。在所述情况下,仅第一区域表面的液滴能够与第二区域的液滴接触。

[0374] 通常,所述第一区域的液滴包括一行液滴、一行液滴中的部分液滴、多行液滴、多行液滴中的部分液滴、一层液滴、一层液滴中的部分液滴、多层液滴或多层液滴中的部分液滴;以及所述第二区域的液滴包括一行液滴、一行液滴中的部分液滴、多行液滴、多行液滴中的部分液滴、一层液滴、一层液滴中的部分液滴、多层液滴或多层液滴中的部分液滴。

[0375] 第一区域和第二区域可以是上述的第一行和第二行。附加地或可选地,第一区域和第二区域可以是上述的第一层和第二层。

[0376] 在一些实施例中,第一区域的液滴形成穿过第二区域的液滴的路径,如图12所示。

[0377] 在一些实施例中,在所述第一组分配步骤中分配到所述疏水介质中的所述液滴的水相介质进一步包含膜蛋白,且其中在所述第二组分配步骤中分配到所述疏水介质中的所述液滴的水相介质不包含所述膜蛋白。

[0378] 该膜蛋白可以是任何种类。该膜蛋白可以是例如膜泵蛋白、通道蛋白和/或孔蛋白,以允许对(i)该组件中的各液滴之间和(ii)液滴组件和外部溶液之间的物质交换和电学通讯的精确控制。该膜蛋白可以例如是 $\alpha$ HL孔。但是,可以使用任何合适的膜蛋白,包括两大类,即 $\beta$ -桶结构或 $\alpha$ -螺旋束结构。除蛋白孔或通道外,其他可能的膜蛋白包括但不限于,受体蛋白、转运蛋白或影响细胞识别或胞间相互作用的蛋白。该通道可以是电压门控的离子通道、光敏通道(例如菌视紫红质)、配体门控通道或机械敏感通道。典型地,该膜蛋白是 $\alpha$ -溶血素( $\alpha$ HL)孔蛋白。

[0379] 其他合适的膜蛋白包括但不限于,细菌多肽和离子载体。可选地,该膜蛋白可以是工程改造的膜蛋白或合成的膜蛋白。所述改造的膜蛋白可以例如是基因改造的蛋白,或共价或非共价化学改造的蛋白。所述合成膜蛋白可以是例如多肽或有机分子。

[0380] 所述第一区域中相互接触的液滴之间形成的所述两亲分子的双分子层,进一步包括所述膜蛋白。

[0381] 在一些实施例中,所述第二区域中相互接触的液滴之间形成的所述两亲分子的双分子层,不包括所述膜蛋白。

[0382] 在其他实施例中,在所述第一组分配步骤中分配到所述疏水介质中的所述液滴的水相介质包含的膜蛋白浓度高于在所述第二组分配步骤中分配到所述疏水介质中的所述液滴的水相介质包含的所述膜蛋白浓度。所述第一区域中相互接触的液滴之间形成的所述两亲分子的双分子层可以例如包括所述膜蛋白。此外,所述第二区域中相互接触的液滴之间形成的所述两亲分子的双分子层不包含所述膜蛋白,或其包含所述膜蛋白的浓度低于所述第一区域中相互接触的液滴之间形成的所述两亲分子的双分子层包含的所述膜蛋白浓度。

[0383] 该膜蛋白可以是任何种类。该膜蛋白可以是例如膜泵蛋白、通道蛋白和/或孔蛋

白,以允许对(i)该组件中的各液滴之间和(ii)液滴组件和外部溶液之间的物质交换和电学通讯的精确控制。该膜蛋白可以例如是 $\alpha$ HL孔。但是,可以使用任何合适的膜蛋白,包括两大类,即 $\beta$ -桶结构或 $\alpha$ -螺旋束结构。除蛋白孔或通道外,其他可能的膜蛋白包括但不限于,受体蛋白、转运蛋白或影响细胞识别或胞间相互作用的蛋白。该通道可以是电压门控的离子通道、光敏通道(例如菌视紫红质)、配体门控通道或机械敏感通道。

[0384] 其他合适的膜蛋白包括但不限于,细菌多肽和离子载体。可选地,该膜蛋白可以是工程改造的膜蛋白或合成的膜蛋白。所述改造的膜蛋白可以例如是基因改造的蛋白,或共价或非共价化学改造的蛋白。所述合成膜蛋白可以是例如多肽或有机分子。

[0385] 典型地,该膜蛋白是 $\alpha$ -溶血素( $\alpha$ HL)孔蛋白。

[0386] 如上所述,可以制作因渗透作用而折叠的液滴组件。该折叠过程可以使得此前未相互接触的液滴相互接触。该折叠过程可以,例如,使得新的两亲分子双分子层形成。

[0387] 在一些实施例中,本发明的方法中,在所述第一组分配步骤中分配到所述疏水介质中的所述液滴的水相介质具有第一渗透压,且在所述第二组分配步骤中分配到所述疏水介质中的所述液滴的水相介质具有第二渗透压,其中所述第一渗透压高于所述第二渗透压;以及所述第二区域的液滴被分配到靠近所述第一区域的液滴的位置,由此所述第一区域的液滴与所述第二区域的液滴相接触,从而形成作为所述接触液滴之间界面的所述两亲分子的双分子层。

[0388] 典型地,在所述第一组分配步骤中分配到所述疏水介质中的所述液滴的水相介质是盐的水溶液,所述水溶液具有所述第一渗透压,且在所述第二组分配步骤中分配到所述疏水介质中的所述液滴的水相介质是盐的水溶液,且所述水溶液具有所述第二渗透压。在一些实施例中,在所述第一组分配步骤中分配到所述疏水介质中的所述液滴的水相介质是第一种盐的水溶液,所述水溶液具有所述第一渗透压,且在所述第二组分配步骤中分配到所述疏水介质中的所述液滴的水相介质是第二种盐的水溶液,且所述水溶液具有所述第二渗透压。所述第一种盐和第二种盐可以,例如,是相同或不同的盐。第一种盐可以是,例如,氯化物,例如氯化钾,而第二种盐可以是碳酸盐,例如碳酸钾。

[0389] 第一水相介质与第二水相介质渗透压之比可以是2:1~50:1,优选为5:1~20:1。在一些实施例中,第一水相介质与第二水相介质渗透压之比是5:1~15:1。

[0390] 典型地,对于给定几何结构,液滴组件的折叠程度由液滴网络的渗透压比率和几何结构决定。例如,两种液滴类型之间渗透压比率较高的网络比两种液滴类型之间渗透压比率较低的网络折叠速度更快。

[0391] 液滴组件折叠速率通常由渗透压差值决定。典型地,折叠速度与两个液滴的渗透压差值成比例。例如,对于给定的渗透压比率,例如10:1,渗透物浓度分别为1M和100mM的网络的折叠速率比渗透物浓度分别为100mM和10mM的网络大约快10倍。

[0392] 因此,可以微调液滴组件的折叠速率和折叠程度。

[0393] 对于打印过程,微调液滴网络折叠速度的能力是重要的。若打印网络的时间与其折叠时间相仿,则网络的各部分会在打印期间移动,则对象将会不正确打印。在一些实施例中,使用了高浓度比率(以达到大变形)及小浓度差值。这使得折叠时间显著低于打印时间。

[0394] 对于给定几何结构,折叠速度还取决于液滴大小,由较大液滴组成的网络的折叠速度通常更慢。典型地,折叠速度与液滴直径成反比。

[0395] 在一些实施例中,在所述第一组分配步骤中分配到所述疏水介质中的所述液滴的水相介质是第一种盐的水溶液,所述水溶液中的盐具有第一浓度,且在所述第二组分配步骤中分配到所述疏水介质中的所述液滴的水相介质是具有相同的所述盐的水溶液,所述盐在该水溶液中具有第二浓度,其中所述第一浓度高于所述第二浓度。

[0396] 所述第一水相介质中的盐或缓冲物质的浓度与第二水相介质中的盐或缓冲物质的浓度第一浓度的比率为2:1至50:1,优选为5:1至20:1。

[0397] 典型地,第一水相介质中的盐或缓冲物质的浓度是100-1000mM,第二水相介质中的盐或缓冲物质的浓度是0.1-100mM。典型地,第一水相介质中的盐或缓冲物质的浓度是150-750mM,第二水相介质中的盐或缓冲物质的浓度是0.5-75mM。更典型地,第一水相介质中的盐或缓冲物质的浓度是150-500mM,第二水相介质中的盐或缓冲物质的浓度是5-25mM。例如,第一水相介质中的盐或缓冲物质的浓度可以是250mM,第二水相介质中的盐或缓冲物质的浓度可以是25mM。

[0398] 通常,第一水相介质中的盐或缓冲物质的浓度和第二水相介质中的盐或缓冲物质的浓度是碱金属卤化物盐浓度,例如氯化钾。例如,所述缓冲液可以包含Tris-HCl和/或KCl。

[0399] 所述方法可以,例如,进一步包括允许水从第一区域传递到第二区域,以使得液滴组件变形。典型地,该传递使得第一区域和第二区域弯曲或折叠。

[0400] 例如,该变形可以使得此前未相互接触的液滴相互接触。例如,该变形可以形成新的两亲分子双分子层。

[0401] 典型地,该传递发生在一个液滴到另一个液滴之间,例如,通过相接触液滴的双分子层。该传递可以,例如,发生在第二区域中的至少一个液滴到第一区域中的至少一个液滴之间。

[0402] 典型地,所述液滴的第一区域和第二区域分别包括如上所述的第一层和第二层液滴,其中所述第一层和第二层基本成直角,且所述传递引起所述第一层和第二层折叠为基本环形的结构;所述第一层基本为直角且所述第二层包含平行液滴条带,且所述传递引起所述第一层和第二层折叠为基本圆柱形结构;或所述第一层和第二层包含花瓣状区域,且所述传递引起所述花瓣状其与向内折叠并相连,从而形成空心液滴组件。

[0403] 更典型地,所述液滴的第一区域和第二区域分别包括如上所述的第一层和第二层液滴,其中所述第一层和第二层基本成直角,且所述传递引起所述第一层和第二层折叠为基本环形的结构;所述第一层基本为直角且所述第二层包含平行液滴条带,且所述传递引起所述第一层和第二层折叠为基本圆柱形结构;或所述第一层和第二层包含花瓣状区域,且所述传递引起所述花瓣状区域向内折叠并相连,从而形成空心液滴组件。

[0404] 当所述第一层基本为直角且第二层包含平行液滴条带时,此前的直条带典型地形成圆柱体内的环。

[0405] 在一些实施例中,所述液滴的第一区域和第二区域分别包括如上所述的第一层和第二层液滴,其中所述第一层和第二层包含平面花状区域,且所述传递使得所述平面花状区域向内折叠并相连,从而形成空心液滴组件。典型地,所形成的空心液滴组件类似球体。

[0406] 通常,所述第一区域包含如上所述的第一层液滴和其他至少一层液滴。

[0407] 典型地,所述第二区域包含如上所述的第一层液滴和其他至少一层液滴。

[0408] 术语“空心”指的是液滴组件内部不含液滴的体积。该体积可以包括物质或材料，例如治疗剂，例如原药；或者诊断剂，例如造影剂，或包含酶。在一些实施例中，该体积包含活细胞（或活细胞群），例如用于组织工程。该体积可以包含无机化合物或材料。

[0409] 该空心液滴组件可以，例如，基本为球形。

[0410] 所生产的液滴组件可以，例如，在组件内部包含不含任何液滴的体积。

[0411] 在一些实施例中，本发明的方法中，所述液滴介质是水相介质且所述松散介质是疏水介质，且其中所述装置包括第一液滴发生器和第二液滴发生器，且所述多个分配步骤包括：至少一个包括在两亲分子的存在下从所述第一液滴发生器向所述疏水介质中分配一滴第一水相介质液滴、由此在所述疏水介质中形成包含 (i) 所述第一水相介质和 (ii) 包围所述水相介质表面的两亲分子外层的所述液滴的分配步骤；至少一个包括在两亲分子的存在下从所述第二液滴发生器向所述疏水介质中分配一滴第二水相介质液滴、由此在所述疏水介质中形成包含 (i) 所述第二水相介质和 (ii) 包围所述水相介质表面的两亲分子外层的所述液滴的分配步骤；其中所述第一水相介质和所述第二水相介质相同或不同。

[0412] 例如，该水相介质可以是纯水，或水相缓冲液，或一种或多种盐的水溶液，或包含琼脂糖和水的水溶液。通常，该缓冲液包含Tris-HCl和/或KCl。可选地，该水相介质可以包含水凝胶。

[0413] 典型地，所述多个分配步骤包括：多个第一分配步骤，其包括从所述第一液滴发生器向所述疏水介质中分配一滴第一水相介质液滴；以及，多个第二分配步骤，其包括从所述第二液滴发生器向所述疏水介质中分配一滴第二水相介质液滴。

[0414] 通常，所述第一水相介质和所述第二水相介质不同。

[0415] 典型地，所述第一水相介质和所述第二水相具有不同的渗透压，或所述第一水相介质和所述第二水相包含不同浓度的盐或缓冲物质。

[0416] 例如，第一水相介质中的盐或缓冲物质的浓度与第二水相介质中的盐或缓冲物质的浓度之比可以是2:1~50:1，优选为5:1~20:1。

[0417] 典型地，第一水相介质中的盐或缓冲物质的浓度是100-1000mM，第二水相介质中的盐或缓冲物质的浓度是0.1-100mM。典型地，第一水相介质中的盐或缓冲物质的浓度是150-750mM，第二水相介质中的盐或缓冲物质的浓度是0.5-75mM。更典型地，第一水相介质中的盐或缓冲物质的浓度是150-500mM，第二水相介质中的盐或缓冲物质的浓度是5-25mM。例如，第一水相介质中的盐或缓冲物质的浓度可以是250mM，第二水相介质中的盐或缓冲物质的浓度可以是约25mM。

[0418] 通常，第一水相介质中的盐或缓冲物质的浓度和第二水相介质中的盐或缓冲物质的浓度是碱金属卤化物盐浓度，例如氯化钾。例如，所述缓冲液可以包含Tris-HCl和/或KCl。

[0419] 在一些实施例中，所述第一水相介质包含膜蛋白，且所述第二水相介质不包含所述膜蛋白。可选地，所述第一水相介质和所述第二水相介质可以具有不同的膜蛋白浓度。

[0420] 在一些实施例中，由所述第一液滴发生器分配的所述第一水相介质的液滴，与由所述第二液滴发生器分配的所述第二水相介质的液滴相比，具有不同的大小。在其他实施例中，由第一液滴发生器所分配的第一水相介质的液滴与由第二液滴发生器所分配的第二水相介质的液滴具有相同的大小。

[0421] 本领域技术人员能够理解,当通过本发明的方法产生的液滴组件是自发折叠液滴组件时,液滴组件全部分配前的组件折叠速度可能影响各液滴的位置。典型地,应当最小化组件在打印过程期间中的折叠。可以延长折叠时间,例如,通过减小不同液滴的盐或缓冲物质浓度的差异,或通过增加液滴大小。参见补充讨论中的实施例中的讨论。

[0422] 如本发明的装置所述,图10所示,液滴的直径可以通过改变电压脉冲的幅度和时长进行微调。通过改变这些参数,可以将液滴直径微调至适宜直径。该直径可以,例如,在约10-200 $\mu\text{m}$ 之间微调。

[0423] 例如,当通过向该压电元件施加电压脉冲,从而令各个液滴发生器分配出所述水相介质时,该电压脉冲的峰-峰振幅为5V至100V,例如从10V至80V。所述峰-峰振幅可以是例如从20V至60V。典型地,每个脉冲的时长为从10至1500 $\mu\text{s}$ ,例如50至1000 $\mu\text{s}$ 。更典型地,每个脉冲的时长为100至800 $\mu\text{s}$ 。通常,该电压脉冲是方波电压脉冲。

[0424] 还可以使用液滴发生器来控制液滴大小。典型地,对于本发明的装置,各个液滴发生器是如上所述的液滴发生器。典型地,所述出口的直径低于500 $\mu\text{m}$ ,例如低于250 $\mu\text{m}$ 。更典型地,所述出口的直径低于200 $\mu\text{m}$ ,例如,低于150 $\mu\text{m}$ 。例如,典型地,该出口的直径为20至200 $\mu\text{m}$ ,例如60至120 $\mu\text{m}$ 。该出口的直径可以是,例如,约100 $\mu\text{m}$ 。

[0425] 通常,各个液滴发生器进一步包括连接所述腔室的毛细管,其中所述毛细管尖端为所述出口。典型地,所述毛细管的尖端的直径低于150 $\mu\text{m}$ 。例如,所述毛细管的尖端的直径可以是20至200 $\mu\text{m}$ ,例如60至120 $\mu\text{m}$ 。所述毛细管的尖端的直径可以是,例如,约100 $\mu\text{m}$ 。

[0426] 如上所述,本发明的方法中,液滴介质通常是水相介质,而松散介质通常为疏水介质。在一些所述实施例中,所述疏水介质为一滴疏水介质液滴。

[0427] 所述疏水介质液滴可以是例如位于作为水相介质的第二松散介质内,其中所述装置的所述容器装有作为水相介质的所述第二松散介质,以及所述疏水介质液滴。

[0428] 通常,所述疏水介质液滴进一步包括包围所述液滴表面的两亲分子外层,所述两亲分子外层充当所述液滴和作为水相介质的所述第二松散介质之间的界面。所述两亲分子可以与包围所述水相介质表面的两亲分子外层中的两亲分子相同或不同。典型地,液滴表面形成两亲分子双分子层。因此,可以存在(i)液滴之间的液滴界面双分子层和(ii)液滴和液滴表面之间的双分子层。所述双分子层允许(i)液滴组件内的液滴之间和(ii)液滴组件内的液滴和外部环境之间的通讯。

[0429] 典型地,所述疏水介质液滴中至少一个液滴与疏水介质液滴表面相接触。典型地,在接触点上形成双分子层,这将液滴从作为水相介质的第二松散介质分隔开来。

[0430] 在一些实施例中,所述液滴组件产生于所述两亲介质液滴内部,以形成液滴封装,所述液滴封装包括:所述疏水介质液滴;包围所述液滴表面的所述两亲分子外层;以及所述外层内的所述液滴组件。

[0431] 所述液滴可以,例如,悬浮在作为水相介质的第二松散介质中。例如,该液滴可以悬浮在架上,例如网架。通常,该网架上涂覆有疏水涂层。

[0432] 典型地,网架包括金属,例如银。

[0433] 所述网架上的疏水涂层通常包括聚合物,例如聚甲基丙烯酸甲酯。该涂层可以覆盖整个或部分网架。该涂层可以,例如,覆盖与疏水介质液滴接触的网架部分。

[0434] 所述网架可以是任何形状。例如,所述网架可以包括环形圈。

[0435] 所述液滴封装可以,例如,稳定至少一周,例如至少两周。所述液滴封装的稳定性意味着其可以功能化并用于各种目的,例如通过膜孔与周围环境通讯,以及在pH或温度触发下释放内容物。

[0436] 通常,所述疏水介质是一滴疏水介质液滴,该方法进一步包括,一旦生产出所述液滴组件,则移除过量疏水介质。典型地,使用各个液滴发生器移除过量疏水介质。更典型地,通过各个液滴发生器的抽吸移除过量疏水介质。典型地,移除过量疏水介质能够移除至少一半疏水介质,例如至少75%疏水介质。

[0437] 在一些实施例中,可以通过允许部分疏水介质溶于散装疏水相,来移除过量疏水介质。例如,可以向疏水介质中添加挥发性溶剂,例如短链碳氢化合物。

[0438] 封装可以包括含两个或更多室的液滴组件(即多室液滴组件)。该液滴组件可以例如包括第一室和第二室。液滴组件中的第一室可以与第二室通过膜蛋白相通讯。液滴组件中的第一室可以通过膜蛋白与第二室通讯。该第一和/或第二室可以与外部环境(例如液滴组件的外部环境)通过膜蛋白相互通讯。原则上,可以生产包括大量室且包括结构限定的结构的液滴组件。

[0439] 封装可以包括2个或更多液滴组件。每个液滴组件可以例如如本文所述。

[0440] 在一些实施例中,可以将各个液滴组件(例如三维液滴组件)胶凝在一起,形成新的液滴组件。由此一来,可以将单个液滴组件用作构建单元,例如,用于形成复杂结构。例如,所形成的新液滴组件可以是封装的一部分。

[0441] 本发明的方法可以进一步包括从松散介质中回收所述液滴组件。当所述松散介质是疏水介质时,本发明的方法可以进一步包括从疏水介质汇总回收所述液滴组件。

[0442] 在本发明的方法的一些实施例中,在疏水介质液滴中生产液滴组件,以生产液滴封装,其中本发明的方法可以进一步包括从作为水相介质的第二松散介质中回收所述液滴封装。

[0443] 典型地,对于本发明的装置,本发明的方法中的所述装置如上所述。

[0444] 本发明还涉及可以使用上述方法制得的液滴组件。

[0445] 本发明进一步提供一种液滴组件,所述液滴组件包含多个液滴,其中每个所述液滴包含(i)水相介质和(ii)包围所述水相介质表面的两亲分子外层,且其中每个所述液滴与另一所述液滴接触以形成作为所述接触液滴之间界面的所述两亲分子的双分子层;其中,所述多个液滴包含所述液滴的第一区域和所述液滴的第二区域,所述第一区域中的每个液滴均与该区域中的至少一个其他液滴相接触,从而形成作为所述接触液滴之间界面的所述两亲分子的双分子层,且所述第二区域中的每个液滴均与该区域中的至少一个其他液滴相接触,从而形成作为所述接触液滴之间界面的所述两亲分子的双分子层;其中,所述第一区域中的所述液滴的水相介质具有第一渗透压,所述第二区域中的所述液滴中的所述水相介质具有第二渗透压,其中所述第一渗透压与所述第二渗透压不同。

[0446] 如上所述,第一渗透压和第二渗透压之间的差值可以在具有不同渗透压的液滴之间引起水传递,由此引起液滴组件自发折叠。该液滴组件可以,例如,被设计为以可预测方式折叠。所述自发折叠的液滴组件可以应用于例如组织工程中。通过建造人工组织,可以克服使用活细胞的多种缺陷,例如,消除不受控的细胞复制或迁移,并限制身体对组织的排斥。

[0447] 通常,所述水相介质可以是任何适宜的水相介质。例如,所述水相介质可以是纯水或缓冲水溶液,或一种或多种盐的水溶液。可选地,所述水相介质可以包含水凝胶。当所述水相介质包含水凝胶时,所述水相介质可以,例如,包含琼脂糖和水。琼脂糖在水中的浓度通常小于或等于10%w/v琼脂糖。例如,琼脂糖在水中的浓度可以是0.25至5%w/v琼脂糖。也可以使用除琼脂糖以外的水凝胶。例如,所述水相介质可以包含甲基显微素,聚乙二醇二丙烯酸酯,聚丙烯酰胺,基质胶,透明质酸,聚环氧乙烷,聚AMPS(聚(2-丙烯酰氨基-2-甲基-1-丙磺酸)),聚乙烯吡咯烷酮,聚乙烯醇,聚丙烯酸钠,丙烯酸酯聚合物,或聚(N-异丙基丙烯)。可选地,所述水相介质可以包括硅水凝胶或LB(LB培养基)琼脂。

[0448] 所述水相介质的重要性质之一在于pH,且pH可以在宽范围中变化。在一些实施例中,例如,所述水相液滴中的水相介质的pH的范围可以在5至9的范围内(或例如在6至8的范围内),但也可能是更高和更低的pH值。因此,所述水相介质可以是水相缓冲液。根据所需的pH,可以使用任何合适的缓冲液。所述缓冲液可以例如包括Tris-HCl和/或KCl。在一些实施例中,水相缓冲液的pH为5至9,或例如6至8。可以改变溶质的性质和浓度从而改变溶液的性质。

[0449] 液滴组件中的每个液滴的水相介质可以相同或不同。

[0450] 所述两亲分子可以是任何合适的两亲分子。典型地,对于本发明的装置,其可以是前文所述的两亲分子。

[0451] 例如,该液滴组件可以置于疏水介质中。对于本发明的装置,该疏水介质可以,例如,是本文所述的疏水介质。

[0452] 典型地,本发明的装置所生产的液滴组件包括至少100个所述液滴,每个所述液滴包括(i)水相介质和(ii)包围所述水相介质表面的两亲分子外层。更典型地,本发明的装置所生产的液滴组件包括至少1000个所述液滴,每个所述液滴包括(i)水相介质和(ii)包围所述水相介质表面的两亲分子外层。更典型地,本发明的装置所生产的液滴组件包括至少10000个所述液滴,每个所述液滴包括(i)水相介质和(ii)包围所述水相介质表面的两亲分子外层。

[0453] 通常,第一区域和/或第二区域包含至少100个液滴,例如至少500个液滴。在一些实施例中,所述第一区域和/或第二区域包含至少1000个液滴,例如至少5000个液滴。

[0454] 所述第一区域和第二区域中各自的液滴数量可以很大,例如至少100000。所述第一区域和第二区域中各自的液滴数量可以是至少1000000,例如至少10000000。例如,所述第一区域和第二区域中各自的液滴数量可以是至少1000000000。在一些实施例中,所述第一区域和第二区域中各自的液滴数量可以是至少10000000000,例如至少50000000000。

[0455] 通常,所述第二区域的液滴被分配到靠近所述第一区域的液滴的位置,由此所述第一区域的液滴与所述第二区域的液滴相接触,从而形成作为所述接触液滴之间界面的所述两亲分子的双分子层。

[0456] 典型地,第二区域中的部分但非全部液滴被置于靠近第一区域中的液滴的位置。因此,典型地,仅第一区域中的部分液滴与第二区域中的液滴接触从而形成双分子层。当第一区域和/或第二区域是多层液滴构成的三维结构时,通常存在这种情况。在所述情况下,仅第一区域表面的液滴能够与第二区域的液滴接触。

[0457] 通常,所述第一渗透压与所述第二渗透压的比率为2:1至50:1,优选为5:1至20:1。

[0458] 在一些实施例中,在所述第一区域中的液滴的所述水相介质是盐的水溶液,该水溶液中的盐在所述水溶液中具有第一浓度;且在所述第二区域中的液滴的所述水相介质是盐的水溶液,该水溶液中的盐在所述水溶液中具有第二浓度,其中所述第一浓度不同于所述第二浓度。可以使用任何适宜的盐,例如碱金属卤化物,例如氯化钾。在其他实施例中,在所述第一区域中的液滴的所述水相介质是第一种盐的水溶液,该水溶液中的盐在所述水溶液中具有第一浓度;且在所述第二区域中的液滴的所述水相介质是第二种盐的水溶液,该水溶液中的盐在所述水溶液中具有第二浓度,其中所述第一浓度不同于所述第二浓度。第一种盐可以是,例如,氯化物,例如氯化钾,而第二种盐可以是碳酸盐,例如碳酸钾。

[0459] 在一些实施例中,第一水相介质中的盐或缓冲物质的浓度是100-1000mM,第二水相介质中的盐或缓冲物质的浓度是0.1-100mM。典型地,第一水相介质中的盐或缓冲物质的浓度是150-750mM,第二水相介质中的盐或缓冲物质的浓度是0.5-75mM。更典型地,第一水相介质中的盐或缓冲物质的浓度是150-500mM,第二水相介质中的盐或缓冲物质的浓度是5-25mM。例如,第一水相介质中的盐或缓冲物质的浓度可以是250mM,第二水相介质中的盐或缓冲物质的浓度可以是25mM。

[0460] 通常,第一水相介质中的盐或缓冲物质的浓度和第三水相介质中的盐或缓冲物质的浓度是碱金属卤化物盐浓度,例如氯化钾。例如,所述缓冲液可以包含Tris-HCl和/或KCl。

[0461] 本发明的液滴组件中,典型地,所述第一区域中的液滴排列成一行、多行、一层或多层,且所述第二区域中的液滴排列成一行、多行、一层或多层。

[0462] 对于本发明的方法,所述第一和第二区域可以是上述第一行和第二行。可选地,对于本发明的方法,所述第一和第二区域可以是上述第一层和第二层。。

[0463] 例如,所述第一区域的液滴包括一行液滴、一行液滴中的部分液滴、多行液滴、多行液滴中的部分液滴、一层液滴、一层液滴中的部分液滴、多层液滴或多层液滴中的部分液滴;和/或所述第二区域的液滴包括一行液滴、一行液滴中的部分液滴、多行液滴、多行液滴中的部分液滴、一层液滴、一层液滴中的部分液滴、多层液滴或多层液滴中的部分液滴。

[0464] 在一些实施例中,所述第一区域的液滴形成穿过所述第二区域的液滴的液滴路径,如图12所示。

[0465] 所述第一区域中相互接触的液滴之间形成的所述两亲分子的双分子层,进一步包括所述膜蛋白。

[0466] 在一些实施例中,所述第二区域中相互接触的液滴之间形成的所述两亲分子的双分子层,不包括所述膜蛋白。

[0467] 在其他实施例中,在所述第一组分配步骤中分配到所述疏水介质中的所述液滴的水相介质包含的膜蛋白浓度高于在所述第二组分配步骤中分配到所述疏水介质中的所述液滴的水相介质包含的所述膜蛋白浓度。所述第一区域中相互接触的液滴之间形成的所述两亲分子的双分子层可以例如包括所述膜蛋白。此外,所述第二区域中相互接触的液滴之间形成的所述两亲分子的双分子层不包含所述膜蛋白,或其包含所述膜蛋白的浓度低于所述第一区域中相互接触的液滴之间形成的所述两亲分子的双分子层包含的所述膜蛋白浓度。

[0468] 该膜蛋白可以是例如膜泵蛋白、通道蛋白和/或孔蛋白,以允许对(i)该组件中的

各液滴之间和 (ii) 液滴组件和外部溶液之间的物质交换和电学通讯的精确控制。该膜蛋白可以例如是 $\alpha$ HL孔。但是,可以使用任何合适的膜蛋白,包括两大类,即 $\beta$ -桶结构或 $\alpha$ -螺旋束结构。除蛋白孔或通道外,其他可能的膜蛋白包括但不限于,受体蛋白、转运蛋白或影响细胞识别或胞间相互作用的蛋白。该通道可以是电压门控的离子通道、光敏通道(例如菌视紫红质)、配体门控通道或机械敏感通道。

[0469] 其他合适的膜蛋白包括但不限于,细菌多肽和离子载体。可选地,该膜蛋白可以是工程改造的膜蛋白或合成的膜蛋白。所述改造的膜蛋白可以例如是基因改造的蛋白,或共价或非共价化学改造的蛋白。所述合成膜蛋白可以是例如多肽或有机分子。

[0470] 典型地,膜蛋白是 $\alpha$ -溶血素( $\alpha$ HL)孔。

[0471] 如上所述,液滴组件可以由于渗透作用而折叠。

[0472] 在一些实施例中,所述第一区域中的液滴排列成一层或多层,所述第二区域中的液滴排列成一层或多层,其中所述第二区域中的一层或多层液滴置于所述第一区域中的一层或多层液滴的邻近处,由此所述第一层中的液滴与所述第二层中的液滴接触,从而形成作为所述接触液滴之间界面的所述两亲分子的双分子层。

[0473] 在一些实施例中,所述第一区域的液滴排列成一层或多层,且所述第二区域的液滴排列成一层或多层,其中所述第二层或多层液滴置于所述第一层或多层包含花状区域,由此所述第一层中的液滴与所述第二层中的液滴接触,从而形成作为所述接触液滴之间界面的所述两亲分子的双分子层。

[0474] 所述第一层和第二层或多层可以,例如,包含花状区域。

[0475] 通常,所述花瓣状区域能够向内折叠并相连从而形成空心液滴组件。所形成的空心液滴组件可以类似球体。

[0476] 在一个实施例中,所述第一层和第二层或多层包含花状区域。所述平面花状区域可以,例如,向内折叠并相连从而形成空心液滴组件。所形成的空心液滴组件可以类似球体。

[0477] 该空心液滴组件可以,例如,基本为球形。

[0478] 如上所述,术语“空心”指的是液滴组件内部不含液滴的体积。该体积可以包括物质或材料,例如治疗剂,例如原药;或者诊断剂,例如造影剂,或包含酶。在一些实施例中,该体积包含活细胞(或活细胞群),例如用于组织工程。该体积可以包含无机化合物或材料。

[0479] 该空心液滴组件可以,例如,基本为球形。

[0480] 所生产的液滴组件可以,例如,在组件内部包含不含任何液滴的体积。

[0481] 本发明还涉及一种液滴组件,所述液滴组件包含多个液滴,其中每个所述液滴包含(i)水相介质和(ii)包围所述水相介质表面的两亲分子外层,且其中每个所述液滴与另一所述液滴接触以形成作为所述接触液滴之间界面的所述两亲分子的双分子层;其中所述多个液滴形成围绕所述液滴组件不含所述液滴的内部容积的外壳。

[0482] 通常,所述水相介质可以是任何适宜的水相介质。例如,所述水相介质可以是纯水或缓冲水溶液,或一种或多种盐的水溶液。可选地,所述水相介质可以包含水凝胶。当所述水相介质包含水凝胶时,所述水相介质可以,例如,包含琼脂糖和水。琼脂糖在水中的浓度通常小于或等于10%w/v琼脂糖。例如,琼脂糖在水中的浓度可以是0.25至5%w/v琼脂糖。也可以使用除琼脂糖以外的水凝胶。例如,所述水相介质可以包含甲基显微素,聚乙二醇二

丙烯酸酯,聚丙烯酰胺,基质胶,透明质酸,聚环氧乙烷,聚AMPS(聚(2-丙烯酰氨基-2-甲基-1-丙磺酸)),聚乙烯吡咯烷酮,聚乙烯醇,聚丙烯酸钠,丙烯酸酯聚合物,或聚(N-异丙基丙烯)。可选地,所述水相介质可以包括硅水凝胶或LB(LB培养基)琼脂。

[0483] 所述水相介质的重要性质之一在于pH,且pH可以在宽范围中变化。在一些实施例中,例如,所述水相液滴中的水相介质的pH的范围可以在5至9的范围内(或例如在6至8的范围内),但也可能是更高和更低的pH值。因此,所述水相介质可以是水相缓冲液。根据所需的pH,可以使用任何合适的缓冲液。所述缓冲液可以例如包括Tris-HCl和/或KCl。在一些实施例中,水相缓冲液的pH为5至9,或例如6至8。可以改变溶质的性质和浓度从而改变溶液的性质。

[0484] 液滴组件中的每个液滴的水相介质可以相同或不同。

[0485] 所述两亲分子可以是任何合适的两亲分子。典型地,对于本发明的装置,其可以是前文所述的两亲分子。

[0486] 例如,该液滴组件可以置于疏水介质中。对于本发明的装置,该疏水介质可以,例如,是本文所述的疏水介质。

[0487] 典型地,本发明的装置所生产的液滴组件包括至少100个所述液滴,每个所述液滴包括(i)水相介质和(ii)包围所述水相介质表面的两亲分子外层。更典型地,本发明的装置所生产的液滴组件包括至少1000个所述液滴,每个所述液滴包括(i)水相介质和(ii)包围所述水相介质表面的两亲分子外层。更典型地,本发明的装置所生产的液滴组件包括至少10000个所述液滴,每个所述液滴包括(i)水相介质和(ii)包围所述水相介质表面的两亲分子外层。

[0488] 该不包含任何液滴的体积可以被外壳完全包围或部分暴露。

[0489] 液滴组件内的体积可以包含生物活性试剂。例如,液滴可以包含治疗剂,例如原药;或者诊断剂,例如造影剂,或酶。液滴可以包括活细胞(或活细胞群)。

[0490] 典型地,所述液滴限定的外壳具有弧形结构。

[0491] 通常,所述液滴限定的外壳基本为圆柱形、基本为环形、基本为球形或基本为半球形。

[0492] 在一些实施例中,所述液滴限定的外壳包围所述液滴组件内的体积。

[0493] 所述液滴限定的外壳可以,例如,基本为球形。

[0494] 典型地,本发明的液滴组件中,所述多个液滴的液滴数量至少为100,例如至少500。在一些实施例中,所述多个液滴的液滴数量为至少1000,例如至少5000。例如,所述多个液滴的液滴数量可以是至少10000或至少30000。例如,所述多个液滴的液滴数量可以是约35000。

[0495] 多个液滴的液滴数量 $n$ 原则上可以很大,例如百万数量级。所述网络原则上可以包含百万个液滴,例如可以用于制备原组织(proto tissue)(即原细胞的集合)。在一些实施例中,整数 $n$ 可以高达数百万,例如高达约10000000,或例如高达约5000000。

[0496] 本发明还涉及本文所述的本发明的液滴组件在生物合成学中的用途。例如,用于制备原细胞或原细胞集合。

[0497] 本发明还涉及本文所述的本发明的液滴组件在组织工程中的用途。所述液滴组件可以例如用于扩大或取代衰竭的组织或器官。液滴组件中的一个或多个液滴可以包含活细

胞。例如,可以允许活细胞在液滴组件的液滴中生长,并在打印后的一定时间内破坏液滴间的双分子层。

[0498] 本发明还提供了本文所述的本发明的液滴组件作为给药载体的用途。

[0499] 本发明还提供了本文所述的本发明的液滴组件在材料科学和工程中的用途。

[0500] 本发明还提供了本文所述的本发明的液滴组件用作固体材料图案形成的模板的用途。该固体材料可以用于电子、光学、光电或其他材料科学应用。液滴中可以例如包含可以在特定液滴之间扩散的无机材料。该无机材料可以随后反应并形成无机固体,例如硫化镉。

[0501] 以下实施例将进一步对本发明进行说明:

[0502] 实施例

[0503] 通用方法

[0504] 下文所述所有实施例中的脂质均为 $0.2-0.5\text{mg ml}^{-1}$ 的1,2-二植烷-sn-甘油-3-磷酸胆碱(Avanti Polar Lipids)。所述油为十六烷和硅油AR20(均购自Sigma Aldrich)的1:1(v/v)混合物。除了折叠实验外,所有实验中的缓冲液均为25mM Tris-HCl,1M KCl,100 $\mu\text{M}$  EDTA,pH 8.0;折叠实验中,将该溶液稀释到如附图说明中对图15的简要说明中所述的盐浓度。所用的染料为二甲苯青FF、橙黄G和8-羟基-1,3,6-三磺酸茈(均购自Sigma Aldrich),浓度如下文中“补充方法”中所述。

[0505] 每个液滴发生器由以环氧胶黏剂粘附到微型机械聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)室上的压电换能器(7BB-20-6L0,Murata)组成(图3及补充方法)。喷嘴由玻璃毛细管(补充方法)制成,并使用硅橡胶适配器(Drummond)安装到所述室上。用于散装油和散装水溶液打印的容器如下文中“补充方法”中所述。

[0506] 以电脑控制显微操作器(PatchStar,Scientifica)。以同一电脑通过单一Arduino Uno微控制器主板(SmartProjects)控制2个液滴发生器,所述主板通过数字模拟转换器(AD5504,Analog Devices)和运算放大器(OPA551,Texas Instruments)产生-30V至+30V范围内的输出电压。所述输出电压每次通过继电器(NRP-04,NCR)施加到2个传感器之一上(亦参见“补充方法”)。电压脉冲通常时长为100-800 $\mu\text{s}$ ,峰间值波幅为20-60V。用于打印散装油和散装水溶液中的网络的电脑程序如下文中“补充方法”所述。

[0507] 如Maglia,G.et al.,Nano Lett.9,3831-3836(2009)所述制备用于电气路径实验的七聚体 $\alpha\text{HL}$ ,并100倍稀释后添加到含水液滴中。通过以25%次氯酸钠溶液处理100- $\mu\text{m}$ 直径银导线(Sigma Aldrich) $\geq 1\text{h}$ ,来制备Ag/AgCl电极。使用膜片钳放大器(Axopatch 200B,Axon Instruments)和16比特数字转换器(1322A,Molecular Devices)来测量电极的电流。以5kHz低通量贝塞尔滤波器处理信号,并在20kHz处捕获信号。

[0508] 实验结果

[0509] 实施例1:液滴发生器

[0510] 液滴网络的自动化生产需要可靠的可控尺寸液滴来源。发明人建造了压电式液滴发生器,其使用锥形玻璃毛细管作为喷嘴(参见通用方法)。向该装置装填含水缓冲液,并将喷嘴尖端浸没在脂质的油溶液中。通过向压电元件施加电压(补充方法),改变电压脉冲的波幅和时长(图10,补充讨论),可以将喷射到油中的液滴直径在 $\sim 10\mu\text{m}$ 和 $200\mu\text{m}$ 之间调准。

[0511] 实施例2:使用2个液滴发生器打印液滴网络

[0512] 使用2个液滴发生器打印异源液滴网络。所述2个喷嘴紧靠着放在一起,浸入安装在自动化显微操纵器上的含脂质的油浴中(图2a)。所述液滴发生器和操纵器由电脑控制。编写允许所涉及的三维网络自动打印的程序(补充方法)。用户通过一系列厚度为一液滴的水平横截面的图片来定义网络。基于所述图片,程序将油浴的动作与两个喷嘴的液滴喷射相同步,以在水平层次上构建网络(图2b,补充方法)。

[0513] 实施例3:毫米级网络的打印

[0514] 在液滴网络打印中,发明人遇到了大多数二维和三维打印技术中未曾出现的困难(亦参见补充讨论),这是因为液滴到达脂质单层、落到预期位置并与其他液滴形成双分子层所需要时间相对长。每一所述过程所需的时间数量级为1秒。尚未粘附到打印基质或与生长中的网络形成双分子层的液滴,由于其他液滴的喷射或喷嘴在油中的运动所产生的粘性阻力,其位置可能从其预期位置偏移。通过选择适宜的流体、喷嘴几何结构、液滴大小和打印算法(补充讨论、补充方法),发明人已经精确打印出由以 $\sim 1\text{s}^{-1}$ 速率喷射的多达 $\sim 35000$ 个直径 $\sim 50\mu\text{m}$ 的异源液滴组成的数毫米大小的预定网络。

[0515] 打印所得的液滴网络可自体支撑(例如参见图2f),且对该系统的热力学分析表明,可以打印至少数千层稳定网络。脂质双分子层的晶格还允许液滴网络在轻度扰动下保持其形状;每一双分子层对所连接的液滴的有效弹性常数为 $\sim 4\text{mN/m}$ ,拉伸强度为 $\sim 25\text{Pa}$ 。发明人估计,在所述实验条件下,所述材料的杨氏模量在 $\sim 100$ 至 $200\text{Pa}$ 的数量级。该硬度范围与大脑、脂肪和其他软组织的弹性模量相重叠(Levental, I., Georges, P.C. and Janmey, P.A. *Soft Matter* 3, 299-306 (2007))。

[0516] 实施例4:在油滴内打印

[0517] 发明人此前已展示了(Villar, G., et al, *Nature Nanotech.* 6, 803-808 (2011))液滴网络可以封装在小油滴内,从而在散装水溶液中达到稳定化,以适用于合成生物学和医药的应用前景。此前,所述封装网络是手动制作的,因此在其复杂度上受限;在此,发明人展示了复杂封装网络的打印。这是通过在悬浮于水溶液中的油滴内打印来完成的(图11a,补充方法,补充讨论)。一旦打印完成,则多余的油可以通过打印喷嘴之一来吸除。封装的打印网络(图11b-d)可以稳定至少数星期,因此可以基于此前简单封装网络所展示的功能进行拓展,包括通过膜孔与水环境交流,以及通过pH或温度触发释放内容物(Villar, G., et al., *Nature Nanotech.* 6, 803-808 (2011))。

[0518] 实施例5:包含通讯路径的液滴组件

[0519] 展示说明了液滴组件可以稳定在散装水溶液中后,发明人要通过打印在特定界面双分子层中具有膜蛋白的网络,进一步开发用作功能性组织的最小类似物的液滴网络。为此,发明人打印了一种网络,该网络中,仅有沿着一条预定路径的液滴中包含了葡萄球菌 $\alpha$ -溶血素( $\alpha\text{HL}$ ) (图12a和b)。发明人通过电学记录确定蛋白孔是否沿所述路径插入了双分子层之中。为了无损地对网络进行电子探测,手动用移液管向2个Ag/AgCl电极中各滴入一滴含有 $\alpha\text{HL}$ 的直径 $\sim 500\mu\text{m}$ 的缓冲液。所述液滴随后与网络的不同部分接触,由此与网络表面的液滴形成双分子层(图12a)。

[0520] 将2滴大液滴置于含有 $\alpha\text{HL}$ 的路径的两端后(图12b),发明人测定了外加电势下向新双分子层中插入 $\alpha\text{HL}$ 孔所引起的离子电流的阶梯式增长(图12c)。当液滴之一分离并与远离外加电势下路径的网络接触时(图12d),仅观察到瞬时电流(图12e)。当液滴再次从网

络分离且在其原位上被置换后,再次观察到电流的阶梯式增长(数据未显示)。液滴不含 $\alpha$ HL的液滴网络表现出的电流可忽略不计,而每一液滴都含 $\alpha$ HL的液滴网络中测得的电流与图12c中所示的类似(图13)。

[0521] 为了便于解读所述结果,开发出了用于计算模拟复杂液滴网络的电学行为的形式体系(参见下文的补充方法)。若沿所述路径的大多数双分子层包含数个 $\alpha$ HL孔,且网络中的其他双分子层不含该孔,则所述电学模型与图12c、e中所例示的电流测量值相一致(补充讨论),由此相对于网络其余部分,所述路径表现出的电阻可忽略不计。图12c所示的电流的阶梯式增长由此最可能是由所述路径液滴和大液滴之间的双分子层中插入的孔引起的(补充讨论)。图12e中的电流尖峰对应着位置远离所述路径的液滴和网络中的绝缘液滴之间的孔插入(补充讨论)。所述双分子层之一中的每个孔插入降低了该双分子层的阻力,从而增加了通过该双分子层的离子电流。但是,由于每个绝缘液滴并未向离子电流提供通过其另一双分子层的路径,因此液滴中累积了净离子电荷。所述液滴绝缘层的电容充电产生了用于消除例子电流的电压。因此,所述电流测定为瞬时峰值。

[0522] 根据上述发现,发明人展示了液滴网络的打印可以在特定双分子层内插入蛋白孔,由此允许离子电流在外加电势下沿预定路径流动。在两个位点间的路径上引起快速电通讯中,本文所述网络模拟了神经的本质功能,但并未模拟其信号传播机制。具有功能性膜通道或孔的更为复杂的网络可以表现出更复杂的行为(Maglia, G. et al., *Nature Nanotech.* 4, 437-440 (2009))。例如,网络可以利用电压门控的离子通道来沿其长度产生和传递动作电位,或利用光敏通道(例如细菌视紫红质)来模拟视网膜的功能(Holden, M. A., et al., *J. Am. Chem. Soc.* 129, 8650-8655 (2007))。

[0523] 实施例6: 折叠网络

[0524] 发明人还研究了将打印液滴网络折叠为仅靠打印无法得到的3D形式的方法。水易于渗透入液滴界面双分子层,哪怕是在不存在蛋白质通道或孔的时候,其在本实验条件(图16, 补充方法)下的渗透系数为 $27 \pm 5 \mu\text{m s}^{-1}$ (平均值 $\pm$ s.d.,  $n=6$ ),与液滴界面双分子层(Dixit, S. S., et al., *Langmuir* 28, 7442-7451 (2012) 和 Xu, J., et al., *Adv. Mater.* 22, 120-127 (2010)) 和其他脂质双分子层系统(Boroske, E., et al., *Biophys. J.* 34, 95-109 (1981)) 的其他渗透测度相一致。由此一来,由DIB连接的具有相对较高和较低的渗透压两个液滴会分别膨胀和收缩,知道其渗透压相等(图15a)。由此引申,在由不同渗透压的液滴组成的网络中,只要维持液滴间的附着力,则液滴间的水传递将引起网络的自发变形(图15b)。据发现,要液滴网络以可预测方式折叠,需要若干前提要求(亦参见补充讨论)。首先,为了防止液滴打印到网络上的错误位置,网络的折叠相对于打印时间而言必须缓慢。其次,两个液滴类型的膨胀和收缩可以在相连液滴区域之间产生长度不匹配,且由此造成的压力可能造成网络以不受控的方式屈曲。这与生长速度不均的组织中的屈曲失稳类似,例如某些叶片(Nath, U., et al., *Science* 299, 1404-1407 (2003) 和 Sharon, E., et al., *Phys. Rev. E* 75 (2007)) 和花瓣(Liang, H. Y. & Mahadevan, L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 5516-5521 (2011)), 以及在某些合成体系中(Klein, Y., et al., *Science* 315, 1116-1120 (2007) 和 Sharon, E., et al., *Nature* 419, 579-579 (2002))。在某些情况下,该压力还可以造成相连液滴分离,由此阻碍断裂带周围的网络继续折叠。

[0525] 上述各种问题可以通过正确选择打印速度、盐浓度和液滴尺寸,以及调整网络几

何结构来解决(参见补充讨论)。网络的最终几何结构由其最初几何结构、两种液滴种类的分布及其渗透压比率以可控方式决定。发明人制作出一个能够定性预测制定液滴网络的折叠行为的简单模型(参见下文中的补充方法),该模型用于设计能够成功折叠的液滴网络。

[0526] 在实验之一中,发明人打印了包含两条沿长度相连、不同盐浓度的液滴条带的网络(图15c)。该网络在3小时内于水平平面中自发折叠,直至该网络相对端的液滴形成双分子层从而构成闭环。发明人还构建了能在水平平面外自发折叠的网络,其能够达成难以直接打印得到的几何结构。打印具有4个花瓣的花状网络,其中下层的渗透压高于上层。水从上层向下层渗透,引起弯曲,令花瓣举起并向内折叠,其形式类似于某些植物所表现出的感性运动(Forterre, Y., et al., Nature 433, 421-425 (2005) 和Skotheim, J.M. & Mahadevan, L., Science 308, 1308-1310 (2005))。折叠后的网络的几何结构近似球形,其最初的上层被容纳在由最初的下层所形成的外壳中(图15d、e)。网络几何形状的演变与相似初始条件下的模拟折叠网络具有良好的定性一致性。

[0527] 还存在能够通过不均匀体积变化来变形的其他材料。例如,双金属片的功能随非均匀热膨胀系数变化。而且,可以对水凝胶系统进行空间性模式化以发生随溶剂浓度或温度变化的不均匀体积变化(Kim, J., et al., Science 335, 1201-1205 (2012) 和Hu, Z.B., et al., Science 269, 525-527 (1995))。所述系统受到外部刺激而驱动,而液滴网络完全是通过网络内部的水传递而折叠,因此无需外部驱动力。

[0528] 补充方法

[0529] 1. 染料浓度

[0530] 本部分详细叙述了图2、11、12和15所示的各网络的染料浓度。

[0531] 图2d:深灰色液滴含有1mM二甲苯蓝FF。

[0532] 图2f:深灰色液滴含有1mM二甲苯蓝FF,且浅灰色液滴含有10mM橙黄G。

[0533] 图11b:浅灰色液滴含有900 $\mu$ M二甲苯蓝FF和100 $\mu$ M 8-羟基-1,3,6-三磺酸茈,且深灰色液滴含有10mM橙黄G。

[0534] 图12b-e:浅灰色液滴和深灰色大液滴含有10mM 8-羟基-1,3,6-三磺酸茈,且其他液滴含有50 $\mu$ M二甲苯蓝FF。

[0535] 图15c:深灰色液滴含有320 $\mu$ M二甲苯蓝FF,且浅灰色液滴含有2.5mM橙黄G。

[0536] 图15d:深灰色液滴含有160 $\mu$ M二甲苯蓝FF,且浅灰色液滴含有800 $\mu$ M橙黄G。

[0537] 2. 容器

[0538] 在散装油中打印的网络

[0539] 对于在散装油中打印的网络,其容器是用聚(甲基丙烯酸甲酯)以微机械制成的孔,孔的一侧上有玻璃观察窗。充油体积为水平 $\sim 15 \times 10$ mm且深度 $\sim 5$ mm。将自发折叠网络直接打印在孔的底表面上,而所有其他在散装油中的网络则是打印在置于孔中的盖玻片上。

[0540] 在散装水溶液中打印的网络

[0541] 对于在散装水溶液中打印的网络,其容器是聚苯乙烯皿,若以共聚焦显微镜对网络成像时,则该皿底部为玻璃盖玻片。

[0542] 在散装水溶液中打印网络,在网架上悬浮的油液滴中进行打印,所述网架制法如下。将聚(甲基丙烯酸甲酯)碎屑溶解在100mg ml<sup>-1</sup>氯仿中。将直径为100- $\mu$ m的银丝(Sigma-

Aldrich) 的一端浸入该溶液中5次,使其附上一层薄疏水涂层。然后,使用镊子将银线上被涂层覆盖的一端夹成环形,使得银丝仅在该环的长度上覆盖有聚合物。使用环氧胶黏剂将无涂层覆盖的一端粘接到聚苯乙烯容器上。

[0543] 要将打印喷嘴插入油滴中,首先须将喷嘴穿过散装水相。使用移液管在每个液滴发生器的入口处施加吸力,将与油滴相同的油混合物作为塞子吸到每个喷嘴的尖端上,以防止喷嘴内容物漏到散装水溶液中。一旦喷嘴尖端已置于水溶液中的油滴中后,则通过使用微量移液管在每个入口处施加正压,来排出油塞。

### [0544] 3. 液滴发生器

#### [0545] 喷嘴

[0546] 各液滴发生器的打印喷嘴是用玻璃毛细管 (Drummond) 制成的,内外直径分别为 1.0mm 和 1.4mm。拉制所述毛细管 (PC-10, Narishige), 并通过将另一拉制后的毛细管尖端轻轻擦过所述毛细管 (PC-10, Narishige) 的拉制出来的末端,以对该毛细管进行修剪 (Oesterle, A.P-1000&P-97Pipette Cookbook (rev.G). Sutter Instrument Co., Novato (2011)), 令其具有直径在  $\sim 60\mu\text{m}$  至  $120\mu\text{m}$  之间的平头尖端。然后在火焰上将毛细管距离拉制端  $\sim 15\text{mm}$  处弯曲到  $90^\circ$ 。最后,从距离拉制端  $\sim 35\text{mm}$  处剪下毛细管 (图3)。

#### [0547] 填充

[0548] 使用具有载胶尖嘴的微量移液管,通过所述装置顶部的入口,向腔室中填入  $\sim 400\mu\text{l}$  水溶液。喷嘴通过毛细作用自动充满该溶液。

[0549] 打印所需的水溶液体积可以减少到  $\sim 5\mu\text{l}$ ,这可令使用  $\alpha\text{HL}$  的实验中溶液损耗最小化。为此,首先将液滴发生器注满水,然后,将发生器的喷嘴浸入充有十六烷的孔,并使用微量移液管在发生器入口处施加吸力,使得喷嘴吸入  $\sim 5\mu\text{l}$  十六烷。然后将喷嘴浸入装有水溶液样品的另一孔中,并施加吸力以吸入类似体积的水溶液。十六烷在喷嘴中形成塞子,以防止喷嘴尖端中的水溶液样品与体积更大的水相混合。据发现,对于载量显著更小的水溶液样本来说,喷射液滴的大小随喷嘴中残留的水溶液样品的体积而变化。

### [0550] 4. 液滴发生器的驱动电路

[0551] 用于驱动液滴发生器的电路如图4的示意图所示。该电路解读来自电脑的指令以生成特定时长和幅度的方波电压脉冲,并将该电压施加到两台液滴发生器之一内的压电换能器换能器或压电器上。本部分描述该电路如何产生所述电压脉冲。

#### [0552] 压电器选择

[0553] 首先,电脑向Arduino微控制器主板传送表示期望的压电器的串行信息。该微控制器解读该信息,并通过晶体管启动继电器,由此期望的压电器将接收所述电路的电压输出。一旦由此选择了压电器,则将其保持在最大负电压  $-30\text{V}$  处。选择与电压输出相连接的压电器终端,由此负电压将产生压电器压缩。

#### [0554] 电压输出

[0555] 然后,电脑向微控制器传送表示生成电压脉冲的指令。脉冲的时长和幅度可以在串行信息中制定,或预先编码在微处理器中。微处理器解读该信息,并编写编码电压脉冲的值通过串行外围接口 (SPI) 总线送至数字模拟转换器 (DAC)。

[0556] DAC以12位分辨率输出  $0\text{V}$  至  $+30\text{V}$  范围内的相应电压。DAC输出进入充当电流缓冲器并将输出电压范围补偿和放大到  $-30\text{V}$  至  $30\text{V}$  的运算放大器电路。通过继电器将该电路的输

出施加到预先选择的压电。

[0557] 5图形用户界面

[0558] 以PROCESSING编程语言编写能够对液滴打印机进行实时控制的图形用户界面(图5)。该截面提供对施加于每个液体发生器的电压脉冲的幅度和时长的精确控制。可以根据需要,以用户限定的液滴数量和多个液滴之间的时间延迟,来触发液滴喷射。所述特征允许用户快速确定每个液滴发生器生成特定大小液滴所需的条件。所述界面还允许用户对机械化的显微操作器进行直接控制,所述显微操作器用于确定指定大小的液滴之间的正确间隔,以及两个喷嘴之间的相对位移。后者在打印软件中进行补偿,以防止两种类型的液滴之间的整体位移。该截面可以通过电脑键盘或鼠标进行控制。

[0559] 6.打印算法

[0560] 由电脑执行根据PROCESSING编程语言编写的算法,控制2个液滴发生器和机械化显微操作器来打印液滴网络。下文首先描述网络打印的通用模式,然后是打印算法。

[0561] 6.1打印模式

[0562] 层

[0563] 所述算法通过一次打印一层水平层来构建液滴网络。需打印的液滴网络通过一系列图像或地图来限定,每一图像均表示网络中的一层或多层(图2c)。每张地图表示的层数由用户指定。地图中的每一像素可以具有三色之一,每一像素根据其颜色来代表来自2个液滴打印机之一的液滴,或代表无液滴,在此分别称为A、B和空像素。

[0564] 打印次数

[0565] 每一层需要打印2次:第一次打印时,仅打印该层上的液滴A,而第二次打印时,仅打印该层上的液滴B。每次打印中,一次打印一行,每一行均平行于水平维度x。

[0566] 目标

[0567] 一次指定打印中,打印喷嘴受指示所遵循的打印路径由一组有序坐标或目标所限定,每一目标代表液滴喷射的位置。每一层的相应地图中,为每一像素设置了目标。目标顺序从x和y的最小值开始,在偶数行中沿x从左向右增加,在奇数行中沿y从左向右增加(图6)。

[0568] 边界

[0569] 当使用如图6b所示的矩形图样打印立方体设计的网络时,所得网络通常会发生壁倾斜和上表面凸出(图7a、7b)。观察打印过程可知,所述变形是因为2个液滴接触后形成双分子层所需的有限时间所引起的(补充讨论)。因此,喷射在网络最外侧边缘的液滴容易沿外壁下滑一段距离,才与网络融合。虽然最初几层中的液滴有时朝向而非背向网络中心滚动,这仍增加了此后打印在相同位置上的液滴向外滚动的可能性。

[0570] 液滴沿外壁下滑的倾向,造成了网络上层最外侧部分的液滴减少,而下层最外侧的液滴过多。在一些情况下,相同方式打印的网络不存在同一变形(图7c)。在所述情况下,在液滴沿侧边下滑之前,喷嘴在油中移动会将液滴朝网络中心拖动。

[0571] 据发现,稍微改进打印模式可以显著而可靠地提高网络打印的准确度。所述改进由以下几项组成:(i)向网络地图添加一个或二个像素的外边界;以及(ii)改进打印算法,由此除每行液滴的正常打印外,每一边界目标上的液滴将额外喷射n次,其中n为2或3,取决于所打印的网络。虽然每一层的第一颗边界液滴通常会沿网络的外壁下滑数层,但该层接

下来的边界液滴将倾向于融入其顶部的网络。由此一来,该打印算法形成了随网络的打印速度而增长的边界液滴屏障,并防止了内部液滴滑出其预期边界。

#### [0572] 6.2算法:初始化

[0573] 所述打印算法(图8)首先执行一次初始化阶段,然后执行指引阶段直至打印完成。在初始化阶段中,用户首先输入如表1所示的参数。其中两个参数,目标跳过阈值和界面复位间隔将在下文中详细说明。然后,该程序在存储器中装载用于限定将要打印的网络的所有地图。为第一层的第一次打印建立打印喷嘴的路径,所述路径编码为如上所述的一系列目标。最后,所述操作器按指示向第一目标移动。一旦到达该目标,则所述程序为操作器设定较低的后续移动速度。

#### [0574] 目标跳过阈值

[0575] 在一次指定打印中,通常并非所有目标都表示该次打印中对应颜色的液滴;例如,在包含A和B液滴的一层中,打印B的一次打印中可能包括B液滴的目标。这可能导致操作器花费显著时间向不生成液滴的目标移动。可以通过简单跳过(即从打印路径中漏掉)所有在当前打印中不产生液滴的目标。但是,喷嘴在油中的移动可能使得新近生成的液滴移位(补充讨论)。因此,跳过不与本次打印对应的每个目标可能造成网络中的某些液滴相对于其他液滴有差异地移位,取决于其沿打印路径的位置。

[0576] 为了防止也以问题,所述算法仅当在此前n个目标(其中n为目标跳过阈值)中均未喷射液滴时,允许操作器跳到当前打印中需要生成液滴的下一目标。所述目标跳过阈值的选择,在于允许新近喷射的液滴具有足够的时间来融入网络中,由此不受到打印喷嘴移动的影响。

#### [0577] 界面复位间隔

[0578] 若液滴发生器腔室离孔中的油溶液水平面过高,则来自水溶液的液体静压力使得打印喷嘴自发将其内容物滴漏至油中。当腔室高于油面 $\sim 1\text{cm}$ ,且使用尖端直径 $\sim 80\mu\text{m}$ 的典型喷嘴时,该滴漏以两个阶段发生:初始阶段中,水溶液体积逐渐增加超出喷嘴,在数分钟中形成大致半球形的突出,然后在快速阶段中,水溶液腔室的内容物在数秒内泻出进入油中。

[0579] 在时间较长的滴漏初始阶段中,液滴的喷射令喷嘴处的水-油截面回复到初始的平面几何结构。因此,防止了指定打印中所用液滴发生器以相对较高的速度( $\sim 1\text{s}^{-1}$ )喷射液滴时内容物滴漏的问题。但是,由于每次打印占据数分钟,指定打印中未使用的发生器可能达到滴漏的快速阶段从而泻出其内容物。

[0580] 据发现,向液滴发生器施加某种电压波形可以令喷嘴处的水-油截面回到平面几何结构中,而不会造成液滴喷射。用于复位该界面的电压波形通常由3个矩形脉冲构成,每个脉冲时长 $40\mu\text{s}$ ,幅度 $\sim 12\text{V}$ ,间隔 $20\text{ms}$ 。每次打印中,每隔n个目标则向该次打印中未使用的液滴发生器施加该波形,其中n为界面复位间隔。

#### [0581]

| 参数            | 典型值             |
|---------------|-----------------|
| x and y上的液滴间隔 | $50\mu\text{m}$ |
| 隔行x-位移        | $25\mu\text{m}$ |
| 隔层x-和y-位移     | $25\mu\text{m}$ |

|           |                          |
|-----------|--------------------------|
| 打印中的操作器速度 | 200 $\mu\text{m s}^{-1}$ |
| 每滴喷射后延迟   | 200ms                    |
| 每行打印后延迟   | 2s                       |
| 目标跳过阈值    | 4                        |
| 界面复位间隔    | 10                       |

[0582] 表1:打印参数。 $x$ 和 $y$ 是两个水平维度,各行液滴沿 $x$ 打印。每一层中,可以用沿 $x$ 以位移来打印隔行液滴,以促进常规密堆积排列的形成。相似地,可以为隔层液滴设定 $x$ -和 $y$ -位移。请参见对参数目标跳过阈值和界面复位间隔的文字描述。

[0583] 6.3算法:指引

[0584] 在指引阶段,电脑根据图8所示算法,令油浴移动与来自2个发生器的液滴喷射相同步。当操作器达到当前目标时,若目标颜色与当前打印相匹配,则喷射液滴。若该目标是当前打印中的最后一个目标,则更新打印次数和层数。若该目标是整个网络中的最后一个目标,则将喷嘴从油中升起,以防止滴漏。否则,则指示操作器向下一目标移动。

[0585] 7.复杂液滴网络的电路模拟。

[0586] 7.1问题描述

[0587] 发明人考虑了一组 $N$ 个的液滴,其中一部分通过指定结构的双分子层成对连接。所述双分子层可以具有不同的面积并包含任意数目的蛋白质孔,且所述双分子层面积及孔数可以随时间变化。假设 $N$ 个液滴中的两个(标记为 $a$ 和 $b$ )受电极插入并分别平衡在已知电压 $u_a$ 和 $u_b$ 。该体系的模型如图9所示,其每个双分子层及其所包含的所有孔由并联的电容器和电阻所代表。对于连通性已知且双分子层的电导率和电容已知的液滴网络,发明人希望计算液滴 $a$ 和 $b$ 中的电极测得的电流。

[0588] 7.2数学公式

[0589] 从电压为 $V_j$ 的液滴 $j$ 流入电压为 $V_i$ 的液滴 $i$ 的电流定义为 $I_{ij} = I_{ij}^r + I_{ij}^c$ ,其中

$$I_{ij}^r = g_{ij} (V_i - V_j),$$

[0590]  $I_{ij}^c = c_{ij} (\dot{V}_i - \dot{V}_j),$  (1)

[0591] 且液滴 $j$ 和液滴 $i$ 之间的电导率之间的电导率为 $g_{ij} = 1/r_{ij}$ ,其中 $c_{ij}$ 为液滴 $j$ 和液滴 $i$ 之间的电容。进入第 $i$ 个液滴的净电流是该网络中所有液滴的贡献总和:

[0592]  $I_i = \sum_{j \neq i} I_{ij},$  (2)

[0593] 其中该总和包含整个网络,且发明人限定,若液滴 $j$ 和液滴 $i$ 之间未由双分子层连接,则 $g_{ij} = 0$ 且 $c_{ij} = 0$ 。将等式(1)代入等式(2),得到

[0594]  $I_i = \sum_{j \neq i} (g_{ij} (V_i - V_j) + c_{ij} (\dot{V}_i - \dot{V}_j)),$

[0595] 上述等式可以变形为:

$$I_i = V_i \sum_{j \neq i} g_{ij} - \sum_{j \neq i} g_{ij} V_j$$

[0596]  $+ \dot{V}_i \sum_{j \neq i} c_{ij} - \sum_{j \neq i} c_{ij} \dot{V}_j$  (3)

[0597] 此时,为方便起见,将矩阵 $G$ 和 $C$ 定义为:

$$[0598] \quad G_{ij} = \begin{cases} -g_{ij}, & i \neq j, \\ \sum_{k \neq i} g_{ik}, & i = j. \end{cases}$$

$$[0599] \quad C_{ij} = \begin{cases} -c_{ij}, & i \neq j, \\ \sum_{k \neq i} g_{ik}, & i = j. \end{cases}$$

[0600] 使用上述矩阵,等式(3)可以简洁地写为:

$$[0601] \quad \vec{I} = G\vec{V} + C\vec{V}, \quad (4)$$

[0602] 其中 $\vec{I}$ 和 $\vec{V}$ 是分别表示每个液滴应得的电流和电压。

[0603] 最后,假设液滴不会成为电荷源或汇。流入每个液滴的电流因此为零,除插入电极的2个液滴外,其流出流入的电流相同,为I:

$$[0604] \quad |I_i| = \begin{cases} I, & i \in \{a, b\}, \\ 0, & \text{otherwise.} \end{cases} \quad (5)$$

[0605] 7.3初始条件

[0606] 假设该体系以稳态开始,则 $\vec{V} = \vec{0}$ ,因此发明人从等式(4)可得:

$$[0607] \quad G\vec{V} = \vec{I}, \quad (6)$$

[0608] 要解 $\vec{V}$ ,应当注意2个终端液滴采用电压钳位,因此,可能消除对应于液滴a和b的2个等式并使用等式(5)得到

$$[0609] \quad \tilde{G}\vec{V} = \vec{0}, \quad (7)$$

[0610] 其中 $\tilde{G}$ 代表不含对应于液滴a和b的两行的矩阵G。

[0611] 等式(7)表示N个变量中的N-2个等式。解析这一系统所需的另外2个等式表达了终端液滴的已知电压: $V_a = u_a$ 和 $V_b = u_b$ 。发明人通过分别以行向量 $\rightarrow$ 和 $\rightarrow$ (限定为 $x_i = \delta_{ia}$ 且 $y_i = \delta_{ib}$ ,其中 $\delta_{ij}$ 为克罗内克符号)取代G中为构建 $\tilde{G}$ 而移除的两行,构建又一矩阵 $\tilde{G}'$ ,来包括所述等式。由此, $\tilde{G}'$ 定义为:

$$[0612] \quad \tilde{G}'_{ij} = \begin{cases} \delta_{ia}\delta_{aj} + \delta_{ib}\delta_{bj}, & i \in \{a, b\} \\ -g_{ij}, & i \notin \{a, b\} \text{ 且 } i \neq j, \\ \sum_{k \neq i} g_{ik}, & i \notin \{a, b\} \text{ 且 } i = j. \end{cases}$$

[0613]  $\tilde{G}'$ 乘以 $\vec{V}$ 得到:

$$[0614] \quad \tilde{G}'\vec{V} = \vec{v},$$

[0615] 其中 $v_i = u_a\delta_{ia} + u_b\delta_{ib}$ 。该N个变量的N等式体系可以容易地以计算机求解,得到每一液滴的初始电压。然后直接从等式(6)得到初始电流。

[0616] 7.4时间演化

[0617] 该体系的时间演化可以通过与初始条件相似的方式来计算。发明人再次从等式(4)开始,然后去掉G和C中对应于a和b的两行,以构建 $\tilde{G}$ 和 $\tilde{C}$ ,其中 $\tilde{C}$ 的限定类似于 $\tilde{G}$ 。则等式(4)得到:

$$[0618] \quad \tilde{G}\vec{V} + \tilde{C}\vec{V} = \vec{0}.$$

[0619] 从 $\vec{G}$ 和 $\vec{C}$ 中去掉的两行以 $\vec{x}$ 和 $\vec{y}$ 代替,以构建 $\vec{G}'$ 和 $\vec{C}'$ ,其中

$$[0620] \quad C'_{ij} = \begin{cases} \delta_{ij}\delta_{a_j} + \delta_{ij}\delta_{b_j}, & i \in \{a, b\} \\ -c_{ij}, & i \notin \{a, b\} \text{ 且 } i \neq j, \\ \sum_{k \neq i} c_{ik}, & i \notin \{a, b\} \text{ 且 } i = j. \end{cases}$$

[0621] 注意电压 $V_a = u_a$ 和 $V_b = u_b$ 为常数,得到:

$$[0622] \quad \vec{G}'\vec{V} + \vec{C}'\vec{V} = \vec{v}. \quad (8)$$

[0623]  $\vec{V}$ 随时间的变化使用MATLAB的ode45常微分方程求解器如下计算:

[0624] 1. 在时间点 $t$ 处,更新 $G(t)$ 以反映从上一个时间点以来的任何电导率变化以模拟孔插入。假设双分子层的大小无变化,且无新双分子层形成,但这些也可以通过在该步骤中更新 $C(t)$ 容易地模拟。

[0625] 2. 在等式(8)中使用 $\vec{V}(t)$ 和更新后的 $G(t)$ 和 $C(t)$ 来计算 $\dot{\vec{V}}(t)$ 。

[0626] 3. 使用 $\vec{V}(t)$ 和 $\dot{\vec{V}}(t)$ 计算下一时间点处的电压 $\vec{V}(t + \delta t)$ 。间隔 $\delta t$ 由ode45求解器确定。一旦计算出了期望时间段上的 $\vec{V}(t)$ ,则可以直接通过等式(4)得到电流 $I(t)$ 。

[0627] 8液滴界面双分子层的透水性

[0628] 考虑一对标记为1和2、由面积为 $A$ 的双分子层连接的液滴。令液滴的初始体积为 $V_1$ 和 $V_2$ ,且其时间 $t$ 时的盐浓度为 $C_1(t)$ 和 $C_2(t)$ 。每单位时间中穿过双分子层从液滴1流向液滴2的水体积可以表达为(Dixit, S. S., et al., Langmuir 28, 7442-7451 (2012) 和 Cass, A. & Finkelstein, A. J. Gen. Physiol. 50, 1765 (1967)):

$$[0629] \quad -\frac{dV_1}{dt} = iPA\bar{V}\phi(C_2(t) - C_1(t)), \quad (9)$$

[0630] 其中 $P$ 为渗透系数(维度为每单位时间的长度), $\bar{V}$ 为水的摩尔体积, $\phi$ 为渗透系数, $i$ 为盐的范特霍夫因子。等式(9)给出了一种简单的方式来从实验测量值中估计渗透率 $P$ :

$$[0631] \quad P = [iA\bar{V}\phi(C_1(0) - C_2(0))]^{-1} \left. \frac{dV_1}{dt} \right|_{t=0}, \quad (10)$$

[0632] 其中 $C_1(0)$ 和 $C_2(0)$ 分别是 $C_1$ 和 $C_2$ 的初始值。由于水体积守恒,其可以等同地写为:

$$[0633] \quad P = [iA\bar{V}\phi(C_2(0) - C_1(0))]^{-1} \left. \frac{dV_2}{dt} \right|_{t=0}. \quad (11)$$

[0634] 制备含1M KCl的单一液滴来与含有250mM KCl的液滴成对地形成双分子层,且通过显微镜在>2h的时间中以2分钟为间隔对其中3对拍照(图16)。使用ImageJ软件包测量液滴和双分子层直径,且假设各液滴具有球冠几何结构,用这些直径来计算液滴的体积。每对液滴的 $V_1$ 和 $V_2$ 的初始变化率独立地从最初2次体积测量中计算而来。然后根据文献(Hamer, W. J. et al., J. Phys. Chem. Ref. Data 1, 1047-1100 (1972)),假设 $\bar{V} = 18.0 \text{ ml mol}^{-1}$ , KCl的 $i = 2$ ,且 $\phi = 0.90$ ,以等式(10)或等式(11)计算渗透率。

[0635] 9. 折叠网络的模型

## [0636] 9.1模型的构建

[0637] 自发折叠网络的定性行为可以通过由2个相连部件构成的简单模型:力学部件,其模拟液滴在网络中的运动;以及渗透部分,其模拟液滴之间的水传递。

## [0638] 力学部分

[0639] 将液滴看作具有相应半径的质点。若半径为 $R_i$ 和 $R_j$ 的一对液滴在距离 $R_i+R_j$ 内相互靠近,则其被自然长度为 $L(R_i+R_j)$ 的虎克弹簧相连接。该弹簧代表了两个液滴之间形成的双分子层,且参数 $L < 1$ 近似为两液滴的附着力引起的液滴变形。

[0640] 假定实验中的折叠的特定时间尺度的数量级为分钟至小时,则可估计,折叠期间的雷诺数的数量级为 $10^{-5}$ 。因此,可以预期液滴遵循斯托克斯定律,且每个液滴受到与其速度成比例的拖曳力。因此,每个液滴 $i$ 上受到的合力可定义为:

$$[0641] \quad \vec{F}_i = \sum_{j \in C_i} k(r_{ij} - L) \hat{r}_{ij} - \gamma \vec{v}_i \quad (12)$$

[0642] 其中, $C_i$ 定义为与第 $i$ 个液滴相连接的一组液滴, $\vec{r}_{ij}$ 是从液滴 $i$ 到液滴 $j$ 的大小为 $r_{ij}$ 的向量, $k$ 是弹簧常数, $\gamma$ 是阻力系数,且 $\vec{v}_i$ 是第 $i$ 个液滴的速度。每个液滴 $i$ 随时间变化的位置 $\vec{r}_i(t)$ 用下式计算:

$$[0643] \quad \vec{F}_i = m \frac{d^2 \vec{r}_i}{dt^2} \quad (13)$$

[0644] 其中 $m$ 是液滴质量。由于下文所述的原因,发明人假设所述质量、弹簧常数和阻力系数均为常数,且所有液滴之间相应参数相等。

## [0645] 渗透部分

[0646] 渗透部分根据菲克第一定律模拟不同渗透率的液滴之间的水交换。每单位时间从渗透率为 $C_i$ 的液滴 $i$ 传递到渗透率为 $C_j$ 的液滴 $j$ 的水体积可计算为:

$$[0647] \quad J_{ij} = A_{ij} D (C_j - C_i), \quad (14)$$

[0648] 其中 $A_{ij}$ 是2个液滴之间的双分子层的面积,且参数 $D$ 代表假设为对所有双分子层是相等常数的渗透系数。

## [0649] 9.2参数值

[0650] 表2列举了模型中所用参数的无量纲值。所选的 $D$ , $m$ 和 $k$ 的值使得水传递的时间尺度与力学弛豫的时间尺度相比相对慢,因为所述过程的实验观察到的时间尺度分别是数十分钟和数秒。所选 $\gamma$ 值可防止弹簧振荡,同时保持相对较短的力学弛豫时间,因为实验未观察到液滴在附着后振荡。 $C_{low}$ 和 $C_{high}$ 代表网络中的液滴的较低和较高渗透率。所选比率 $C_{high}/C_{low}$ 近似于渗透率的实验比率。所选的其他变量可降低计算时间,同时维持数值稳定性。因为所选的力学弛豫和水传递的时间尺度使得折叠在力学准平衡下发生,则简单化假设 $m$ 和 $\gamma$ 值对所有液滴为相等常数, $k$ 值对所有双分子层为相等常数,不会对模拟造成显著影响。

## [0651]

| 参数    | 符号         | 值                  |
|-------|------------|--------------------|
| 水传递速率 | $D$        | $2 \times 10^{-3}$ |
| 较低渗透率 | $C_{low}$  | 1                  |
| 较高渗透率 | $C_{high}$ | 10                 |

|        |            |           |
|--------|------------|-----------|
| 初始液滴体积 | $V_0$      | 10        |
| 液滴质量   | $m$        | 0.2       |
| 弹簧常数   | $k$        | $10^3$    |
| 时间步长   | $\Delta t$ | $10^{-2}$ |
| 阻尼     | $\gamma$   | 1.1       |
| 阻尼     | $\gamma$   | 1.1       |

[0652] 表2: 折叠模型中使用的参数。选择参数 $D$ 、 $m$ 和 $k$ , 使水转移在比所述网络的机械平衡更长得多的时间尺度上发生。选择 $\gamma$  的值, 以防止弹簧振动。选择 $C_{high}/C_{low}$ , 以反映两种液滴之间的渗透压的实验比率。选择 $C_{high}-C_{low}$ 、 $\Delta t$ 和 $V_0$ , 以在保持数值稳定性的同时减少计算时间。

### [0653] 9.3求解等式

[0654] 编写电脑程序来模拟如下系统行为。与打印程序相似, 该程序读取用于限定需模拟的网络的一组图像。所述液滴最初位置根据图像进行六方密堆积排列, 其近似于打印网络中观察到的液滴堆积。然后, 允许所述液滴不发生水交换地达到力学平衡, 以保障任何后续模拟运动均不是因为液滴从其初始排列达到力学平衡的结果。一旦达到平衡, 则激活模型的渗透部件。在每个时间点 $t$ , 该程序执行以下计算:

[0655] 1. 相互距离在 $R_i+R_j$ 内的2个液滴 $i$ 和 $j$ 被自然长度为 $L(R_i+R_j)$ 的弹簧相连接。

[0656] 2. 若渗透部件被激活, 则根据等式(14)计算由双分子层连接的每对液滴之间的水传递体积, 且相应地更新每个液滴的大小。

[0657] 3. 使用四阶龙格库塔(Runge-Kutta)模式, 以等式(12)和(13)计算时间 $t+\Delta t$ 时的每个液滴的位置。

[0658] 4. 根据步骤3的计算结果更新每个液滴的位置。

### [0659] 9.4可视化

[0660] 模拟中的每个时间点上, 所述程序将每个液滴的位置写入文本文件中, 所述文本文件的格式可以由视觉分子动力学(Visual Molecular Dynamics)软件包(Humphrey, W., et al., J.Molec.Graphics 14, 33-38 (1996))读取, 以可视化所述网络的时间演变。除展示每个液滴的位置和大小外, 所述可视化根据每个液滴的渗透率对其添加颜色标记。所述色标度的插入从蓝色到白色到红色, 其中蓝色和红色分别对应于模拟开始时最低和最高的渗透率, 而白色对应于两者的平均值。

### [0661] 补充讨论

#### [0662] 1. 液滴生成

[0663] 据发现, 除电压脉冲的幅度和时长外, 还有一些因素显著影响液滴发生器生成液滴。

#### [0664] 液面

[0665] 液滴喷射强烈依赖于液滴发生器腔室中的水相和孔中的油溶液的液面高度差 $h$ , 该高度差对喷嘴中的水油界面产生净力。一般而言, 高度 $h$ 越大, 液滴越大。腔室中的水溶液蒸发逐渐改变水相液面, 由此喷射的液滴大小仅在约6小时中保持一致。可以通过在腔室水相液面上添加薄薄一层油来防止蒸发。

#### [0666] 水相体积

[0667] 除水溶液高于油面的高度外,液滴喷射还依赖于液滴发生器腔室中的水溶液体积 $V$ (图1)。一般而言,水相腔室完全充满时,喷射液滴的大小比起未完全充满时更易于控制。这可能事因为随着向压电换能器施加电压脉冲,未充满的腔室将转换器的振动耦合至喷嘴中的流体的程度较低,限制了喷射液滴的大小。

[0668] 脂质浓度

[0669] 油中的脂质浓度越高,喷射指定大小的液滴所要求的电压脉冲的幅度越低。这是可以预料的:喷嘴中的油水界面对脂质的吸附降低了截面的张力,由此降低了令该界面达到形成液滴所需的变形程度的能量要求。

[0670] 喷嘴几何结构

[0671] 若喷嘴长度 $L$ 太长,喷嘴内直径 $D$ 太小,或其尖端直径 $d$ 太大或太小(图1),均无法在有效电压范围内可靠地生成液滴。图3所示的维度允许在有效电压范围内可靠地生成液滴。因为喷嘴是用玻璃毛细管手工制成的,在除此之外几乎相同的条件下,2台液滴发生器通常产生不同大小的液滴。但是,可以通过各自使用不同的电压脉冲,使得2台液滴发生器喷射相同的液滴。

[0672] 2.打印网络

[0673] 所用的油混合物的动态粘度比水大约10倍。相对于在空气或水溶液中操作的其他二维或三维打印技术,这为打印液滴网络制造了若干困难。

[0674] 1.以压电换能器施加电压脉冲后,喷嘴处产生的压力脉冲制造了短暂水相前突,进入油相中约 $50\text{--}150\mu\text{m}$ ,并在数十毫秒内断裂形成单一液滴。当将喷嘴置于离障碍物 $\leq 150\mu\text{m}$ 时,该障碍物令水相前突变形,使得喷射液滴移位。将喷嘴置于离障碍物 $\leq 100\mu\text{m}$ 时,即完全阻碍了液滴形成。因此,每个液滴均在其最终位置上方 $\geq 200\mu\text{m}$ 处进行喷射。但是,液滴需要约 $1\text{--}5\text{s}$ 来从其喷射点沉降到其在网络中的预期位置。

[0675] 2.液滴与网络接触后并不立即附着并形成双分子层。这可能是缘于2个液滴之间的油层在下坠液滴重量影响下变薄所需的有限时间。液滴一般在首次接触网络后的约 $1\text{--}3$ 秒后与网络形成双分子层。

[0676] 3.尚未融入网络中的液滴由于喷嘴经过油中的运动产生的粘性剪力而移位。

[0677] 4.尚未融入网络中的液滴由于后续附近喷射而移位。

[0678] 为了以约 $1\text{s}^{-1}$ 的速度在准确位置上打印液滴,发明人通过一系列优化措施解决了上述问题。

[0679] 喷嘴几何结构

[0680] 通过使用外直径相对较小(约 $100\mu\text{m}$ )的喷嘴,可以最小化因喷嘴运动造成的液滴移位。喷嘴是如补充方法中所述般,以锥形玻璃毛细管制得。当使用形状上内直径相似但外直径约 $1.5\text{mm}$ 的毛细管时,喷嘴的运动令液滴移位的距离显著增大。行延迟

[0681] 打印每行液滴后使用延迟,而非喷射每一液滴后使用延迟,能够显著降低打印时间,而不会显著影响打印质量。虽然每行液滴因喷嘴在该行中的运动及后续喷射而移位,但每一液滴受到的移位大致相同,由此每行液滴的相对位置正确。根据喷嘴的定向,交替各行的打印路径的方向交替可能引起各行位置未对准。但是,该位置未对准能够用对交替各行的程控补偿来容易地校正(补充方法)。

[0682] 下沉速度

[0683] 为了降低防止液滴移位所必需的行延迟,发明人用两种方法增加液滴在油中的下沉速度。首先,发明人使用了盐浓度为1M的水相KCl,其增加了液滴相对于油溶液的密度。其次,发明人使用了直径 $\geq 30\mu\text{m}$ 的液滴,因为液滴越大,所因重量而受到的粘性阻力按比例越小。

[0684] 脂质浓度

[0685] 对于指定浓度的脂质油溶液,液滴越小,得到脂质单分子层所需要的时间越短(Kankare, J. et al., *Langmuir* 15, 5591-5599 (1999))。这是因为将脂质吸附到液滴表面,在液滴周围形成了脂质耗尽区域,而对于较小的液滴,该耗尽体积更容易从脂质浴传递中得到补给。因此,液滴直径是高下沉速度(液滴越大速度越快)和短培养时间(液滴越小时间越短)的折中。实验中发现,折中的液滴直径宜为在约30-60 $\mu\text{m}$ 范围内。

[0686] 3. 散装水溶液中的打印

[0687] 打印流程

[0688] 与在散装油中打印相反,在散装水溶液中的网络,是通过在打印期间使用定制编程的图形用户界面,来控制液滴发生器和操作器进行打印的(补充方法)。因为用于在散装水溶液中打印的受体油滴下表面弯曲,喷射入该油滴的液滴沿该表面滚下来令其重力势能最小化。因此,要准确打印散装水溶液中的限定网络,需要理解油滴表面几何结构的信息。此外,液滴网络设计和打印路径也应当与该几何结构兼容。例如,上述实施例中所用的油滴几何结构,可以通过使用绕最小点逐渐向外发展的螺旋样式来打印每层,以防止水相液滴滚离其预期位置。

[0689] 网架和网络的几何结构

[0690] 油滴的几何结构部分由用于在散装水溶液中悬浮液滴的网架决定。但是,油滴的几何结构随着喷入其内的水相液滴而变化,而油滴体积保持恒定。因此,在油滴中打印的液滴与油滴初始几何结构有所不同,且可能体积大于油滴体积。

[0691] 此外,与油滴不同,由图11d中第3幅显微图可知,打印的网络的几何结构无需具有最小边界曲面。其原理首先是因为,若网络重构为具有最小边界曲面的结构,需要双分子层分离为单分子层,而这从能量角度而言是不利的(Villar, G., et al., *Nature Nanotech.* 6, 803-808 (2011)),因此存在动力学障碍。其次,2个被封装的液滴之间的双分子层的界面张力与被封装的液滴和散装水溶液之间的双分子层的界面张力相等或近似相等(Villar, G., et al., *Nature Nanotech.* 6, 803-808 (2011)),因此可以忽略需由网络外表面最小化来获得的热力学稳定。因此,散装水溶液中打印的网络的几何结构并不完全由网架决定。还可能使用除了简单圆环外的其他各种几何结构的网架来打印网络,这进一步扩大了在水溶液中打印的网络的可能几何结构。

[0692] 油体积上限

[0693] 可以稳定悬浮在指定环上的油体积取决于环直径。当环上装载的油体积 $\geq 50\%$ 环限定球体体积时,油滴在数分钟内变形然后断裂,形成浮在水相上的油滴,而残余的油仍附着在环上。油滴的几何结构的缓慢变化可能是因为脂质吸附在其表面而造成的表面张力逐渐下降。

[0694] 最大悬浮油体积还取决于喷嘴几何结构。当2个喷嘴大致相互平行地插入油滴中,且相隔 $\leq 200\mu\text{m}$ 时,大部分油自发在喷嘴之间的空间升起。因此,较大的网架最好设计为细

网格形式来防止油滴的崩裂不稳定性及因毛细作用在喷嘴间升起。

#### [0695] 4. 电学记录

[0696] 无法直接从电学记录上确定,如图12c所示,所测得的电流阶跃是否对应于(i)网络液滴之间的双分子层,或(ii)网络和电极插入的较大液滴之间的双分子层中的 $\alpha$ HL插入。但是,后者更为可能,有如下两个原因:

#### [0697] $\alpha$ HL插入率

[0698]  $\alpha$ HL在液滴界面双分子层的插入率随着时间下降。在含有电学记录实验中所用浓度的 $\alpha$ HL的液滴中,液滴形成后数分钟内,孔插入率在数小时中从 $0.5\text{s}^{-1}$ 下降到可忽略比率。孔插入率的损耗可能有两种。首先,液滴是通过稀释溶于十二烷基硫酸钠(SDS)的 $\alpha$ HL七聚物浓缩储藏液来制备的。该稀释可能引起SDS从蛋白上解离,使得该七聚物不稳定。此外, $\alpha$ HL的储藏液和稀释溶液分别冷藏在 $-80^{\circ}\text{C}$ 和 $0^{\circ}\text{C}$ 下,而实验系统为室温,这也会增加七聚物降解速度。

[0699] 传导路径上的液滴是从新鲜稀释溶液室温打印约2h再进行电学记录来形成的,而插入电极的较大液滴的形成仅限于电学记录前的约15分钟。因此,比起路径中的液滴,电学记录期间插入双分子层的所有孔更可能存在于大液滴中。

#### [0700] 电流测量值与电学模型的一致性

[0701] 通过比较电流的实验测量值和液滴网络的电学行为模拟,来推导网络中 $\alpha$ HL孔的可能结构(图14)(补充方法)。仅模拟了图12中的部分网络,来减少计算时间;该模拟结果预期不会因为包含网络剩余部分而发生显著变化。仅在满足三个条件的前提下,如图12c所示的电流测量值与模型相一致:

[0702] 1. 传导路径上的大多数双分子层包含至少数个 $\alpha$ HL孔,由此与单一孔相比,该路径的阻力可忽略。在所用 $\alpha$ HL浓度相对高且孔插入路径中的双分子层的可用时间相对长的前提下,这是合理的。

[0703] 2. 该路径和插有电极的液滴之一(图14a中的液滴a)之间的许多双分子层含有至少1个 $\alpha$ HL孔,而连接该路径至另一插有电极的液滴(图14a中的液滴b)的任一双分子层中则不存在孔。在大液滴之一在另一大液滴之前约数十秒放入网络的前提下,这是可能的。

[0704] 3. 由与该路径连接的第二个插入电极液滴(图14a中的液滴b)形成的双分子层最初不含 $\alpha$ HL孔,且第一电流阶跃对应于该液滴和该路径之间的任一双分子层中的孔插入。每个后续阶跃均来自所述双分子层中插入的其他孔。这一条件是合理的,因为实验电学记录在第二个插入电极液滴连接至该路径后便立即开始了。

[0705] 在上述条件下,模拟电流阶跃与电流测量值在阶跃幅度和弛豫时间尺度上均紧密匹配(图14b)。

[0706] 类似地,若除以上条件外,再加上不允许电流在插入电极液滴之一和网络其他部分之间流动的液滴薄层,则一个液滴在路径上、一个液滴在路径外的瞬时电流峰值测量值(图12d)也与模拟相一致。所述绝缘液滴代表着图12d中所示网络中的不含 $\alpha$ HL的液滴。选为与该绝缘层相邻的大液滴为图14c中的液滴b,其代表了从该网络移除并从图12d所示路径中置换的液滴。在所述条件下,模拟中的电流峰值在幅度和弛豫时间依赖性(图14d)上也与实验测量得到的瞬时电流相一致(图12e)。

#### [0707] 5. 自发折叠网络

[0708] 本部分详细叙述允许液滴网络成功折叠的条件。

[0709] 打印基底

[0710] 将散装油中的静态网络打印在可附着水相液滴的玻璃上,以防止网络在打印期间发生不期望的移位。反过来,据发现,要令液滴网络可自由变形,则需要将其打印在不附着液滴的聚甲基丙烯酸甲脂上。当在该表面上打印网络时,必须保证打印表面接近水平,以防止生长中的网络在打印期间沿该表面漂移。喷嘴仍置于高于打印基底约 $150\mu\text{m}$ 处,以防止液滴喷射令网络移位。

[0711] 打印和折叠的时间尺度

[0712] 若网络在打印完成前便开始显著折叠,则后续液滴可能融入到网络中不正确的位。可以通过减少打印时间,增加折叠时间尺度,来最小化网络在打印期间的折叠程度。如早先部分中的讨论,可以通过在每行打印后而非每滴打印后包含延迟,以及通过使用较大液滴,来减少打印时间。

[0713] 可以通过两种方法增加折叠时间尺度:

[0714] 1. 2个液滴之间的水传递速率与其盐浓度差异成正比;盐浓度比率部分决定水传递总体积乃至折叠网络的平衡几何结构。因此,发明人通过降低2个液滴类型之间的盐浓度初始差异,同时保持较高的初始盐浓度比率,来减缓折叠过程。

[0715] 2. 进一步地,通过用较大液滴进行打印,来增加折叠时间尺度。考虑由双分子层连接的一对液滴,其初始体积均为 $V$ ,但初始渗透压不同。水传递的初始速率与双分子层面积成正比。由于 $A \propto V^{2/3}$ ,水在较大液滴之间传递更为迅速。但是,水传递速率与液滴体积成正比,即 $\propto A/V \propto V^{-1/3}$ 。因此,较大液滴相对于其初始体积的体积变化更缓慢,由此延伸,由较大液滴构成的网络折叠更加缓慢。

[0716] 屈曲

[0717] 由于在自发折叠网络中,渗透压较高的液滴膨胀,而渗透压较低的液滴收缩,而具有不同渗透压的网络相连区域之间可以变得长度不匹配。在某一维度上较薄的网络可以通过在该维度上屈曲来不显著损耗能量地解决这一不匹配。据发现,设计为在水平面上折叠的网络,若打印额外的垂直层,则相对较不易于屈曲脱离该平面。这可能是因为令厚网络弯曲脱离平面会令更多单层面积或总表面面积发生不宜的暴露。

[0718] 断裂

[0719] 在沿发生折叠的轴向(例如垂直于图15c的页面的轴向)上厚度厚的网络中,上述相连区域之间的长度不匹配可能形成压力,令收缩的相邻液滴相互脱离(图17)。自发折叠网络的变形,要求网络的膨胀和收缩部分内部且相互之间连接,由此网络在某些点上断裂时,可以防止该点附近的进一步变形。据发现,若令网络收缩区域沿膨胀和收缩部分之间的界面的垂直轴向上更厚些,则此类断裂不会发生(例如,图15d中的垂直轴向,以及图17a、17b中的页面上的水平轴向)。所述额外厚度可能通过更多双分子层间的折叠分散了压力,由此令每对相连收缩液滴上的受力不足以令液滴分离。

[0720] 结论

[0721] 发明人展示了本发明的装置可用于产生液滴组件。上述结果和方法说明了如何用该装置产生所需的液滴组件。此外,上述结果表明,本发明的方法精确可控地产生液滴组件,可以打印毫米数量级的网络,也可以产生更大的网络。此外,可以功能化所述组件。发明

人还展示了,可以打印以可预测方式自我折叠的网络。

[0722] 使用膜蛋白,例如水孔蛋白或离子通道,可在液滴组件中更好地控制液滴网络之间的水流动。此外,可以使渗透形变逆向,例如通过使用响应加热或照明的渗透物质。所述液滴网络可发展为肌肉组织的液压模拟,且可以允许构件能够移动的液滴网络。

[0723] 由于活组织中的相邻细胞由两层膜隔开,其必须通过专门的膜蛋白(例如间隙连接)进行通讯(Nakagawa,S.,et al.,Curr.Opin.Struc.Biol.20,423-430(2010))方可进行配合,由此才能产生令组织不同于一群独功能独立的细胞的整合特征。本发明的体系中,单层(例如单脂质双分子层)分隔相邻的水相区室,允许所述整合性质在更简单的环境中出现。本文所述的自动化打印方法允许构建使用其他膜蛋白和渗透物质的网络,来产生更为复杂的行为。所述液滴网络可能在活生物体中自主作用,或与组织交联,例如作为给药平台,或扩大或取代衰竭的组织或器官。

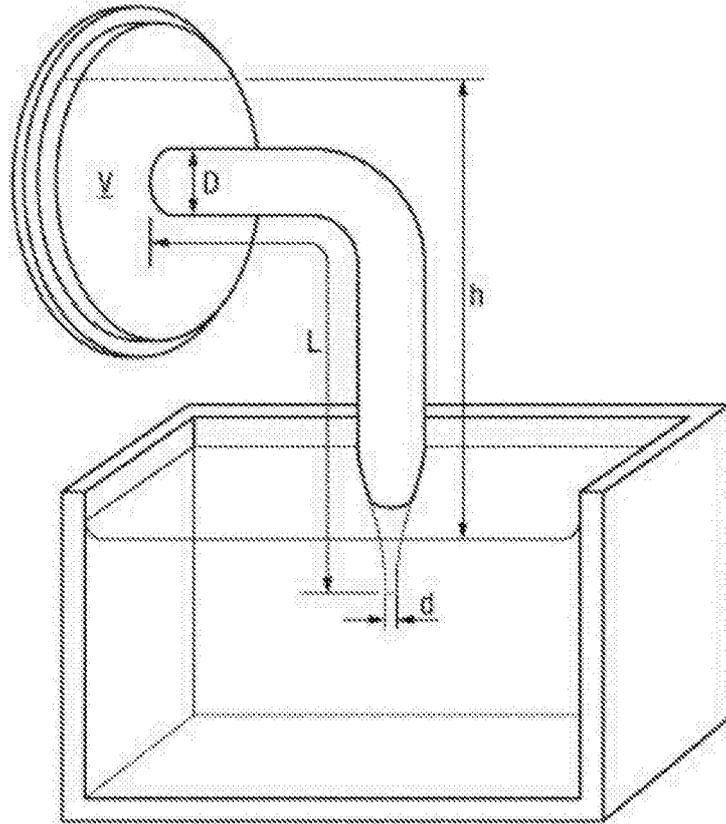


图1

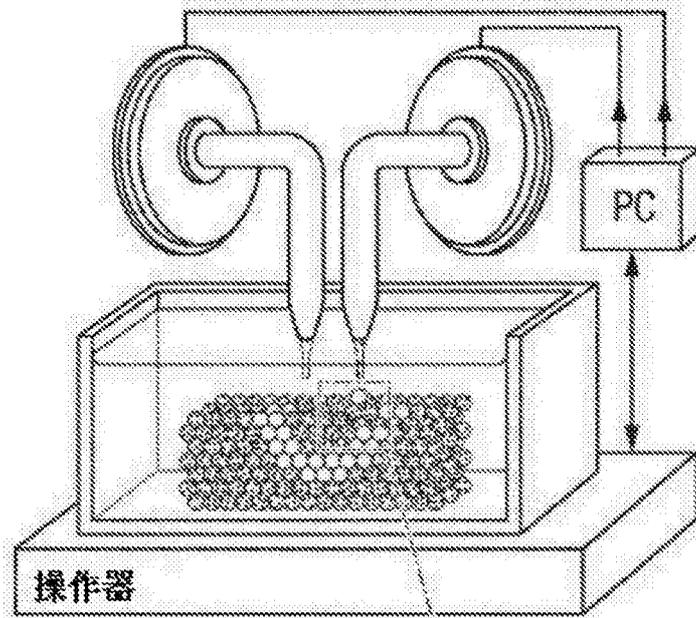


Fig. 2b

图2a

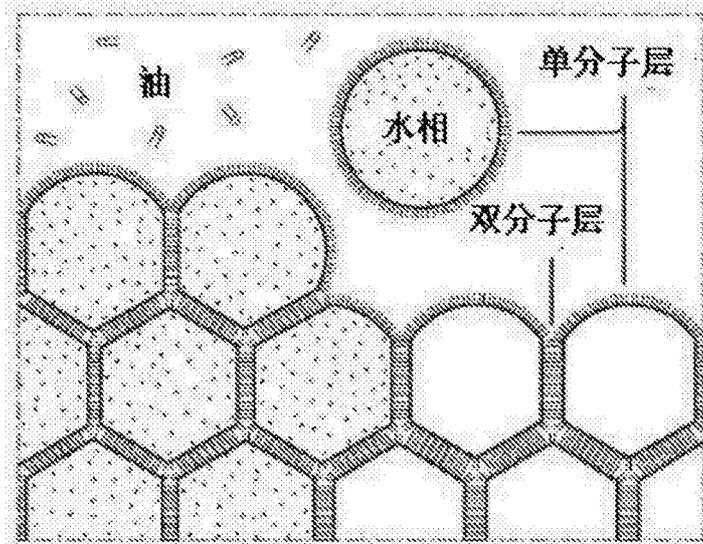


图2b

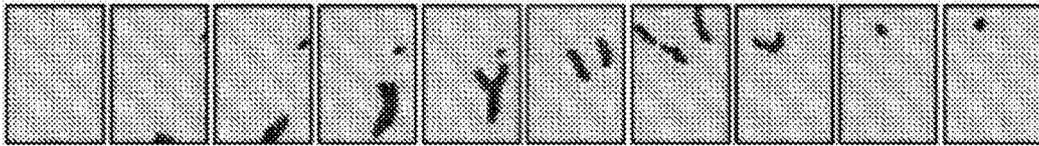


图2c

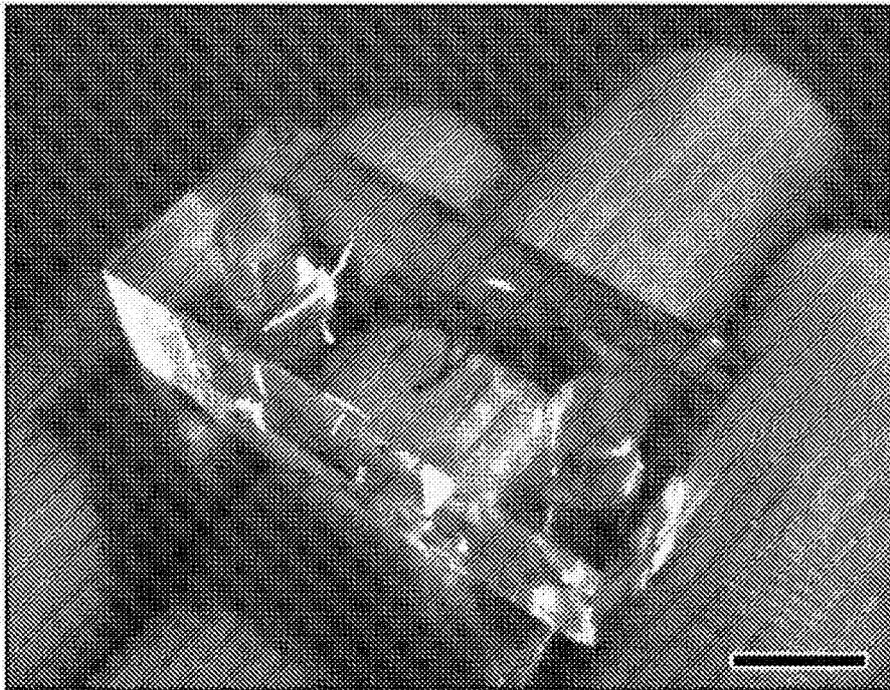


图2d

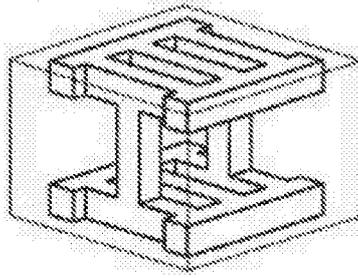


图2e

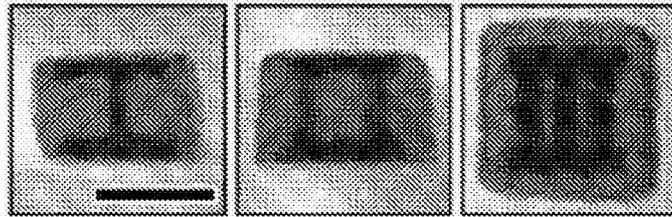


图2f

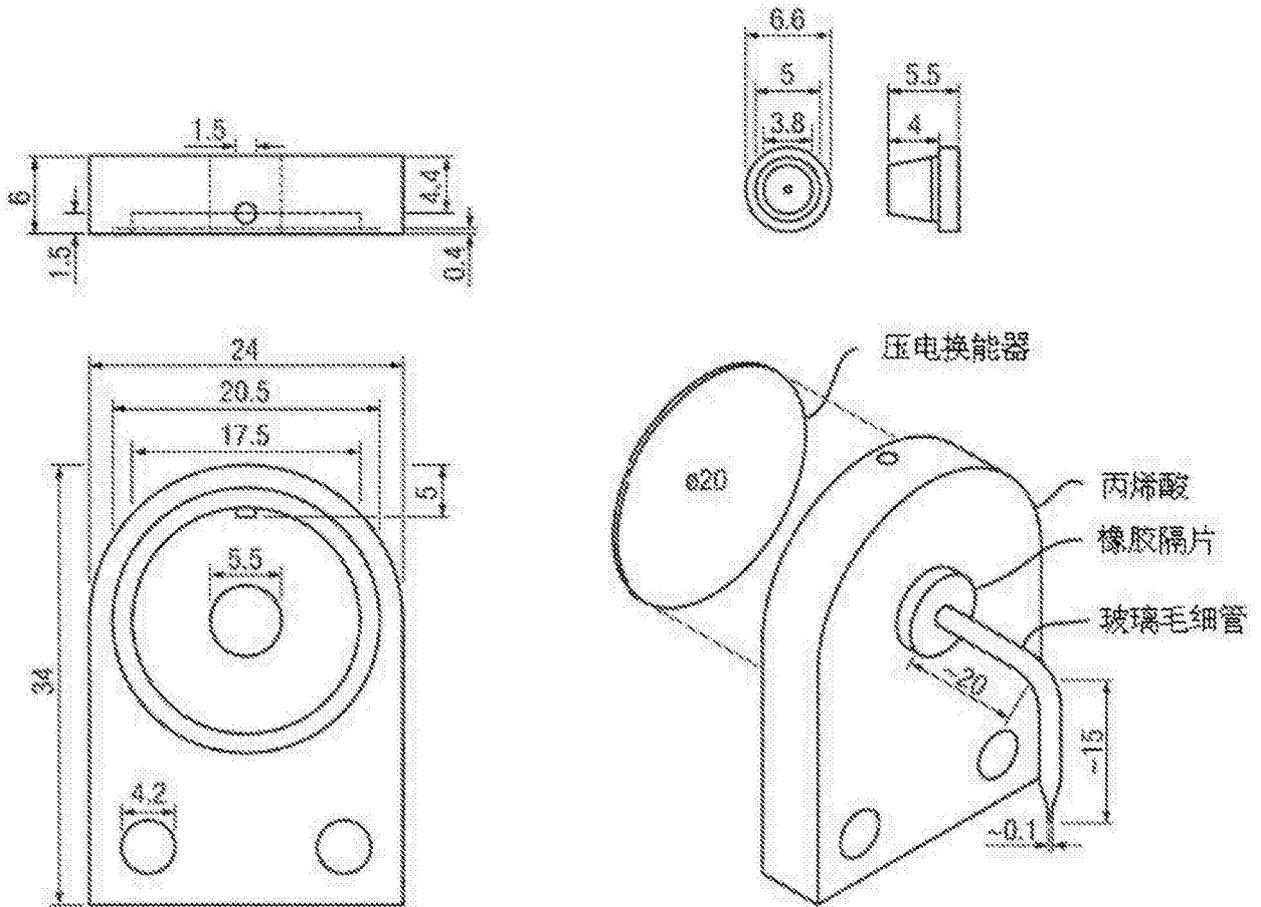


图3

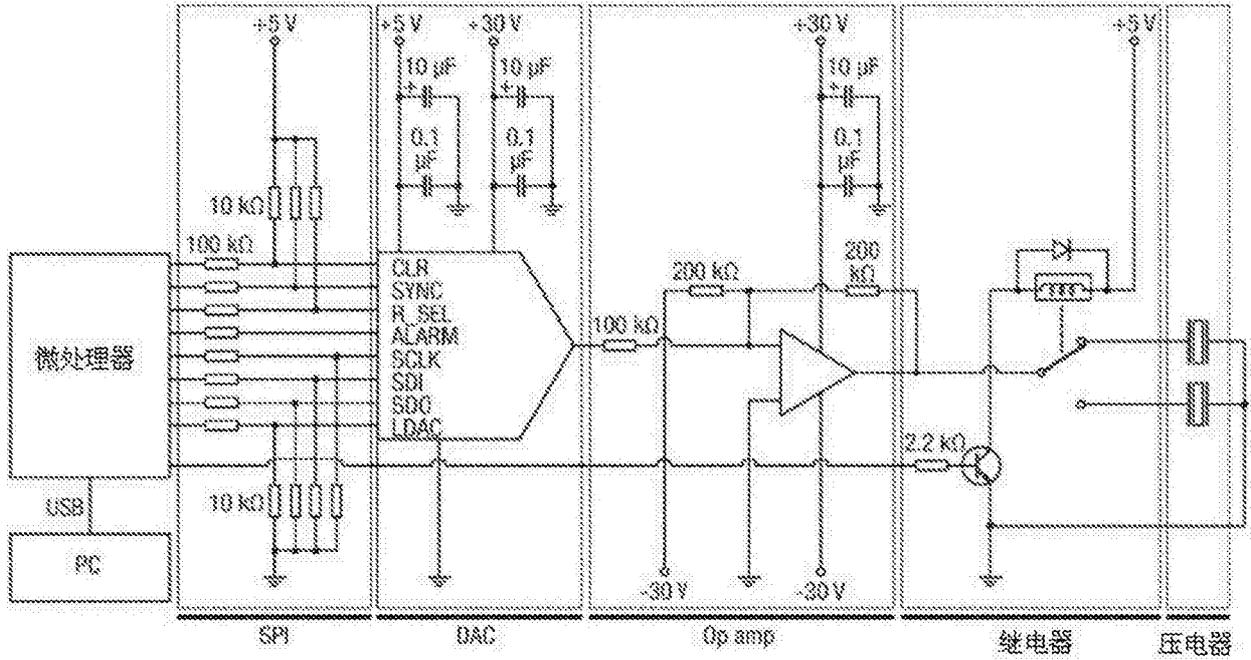


图4

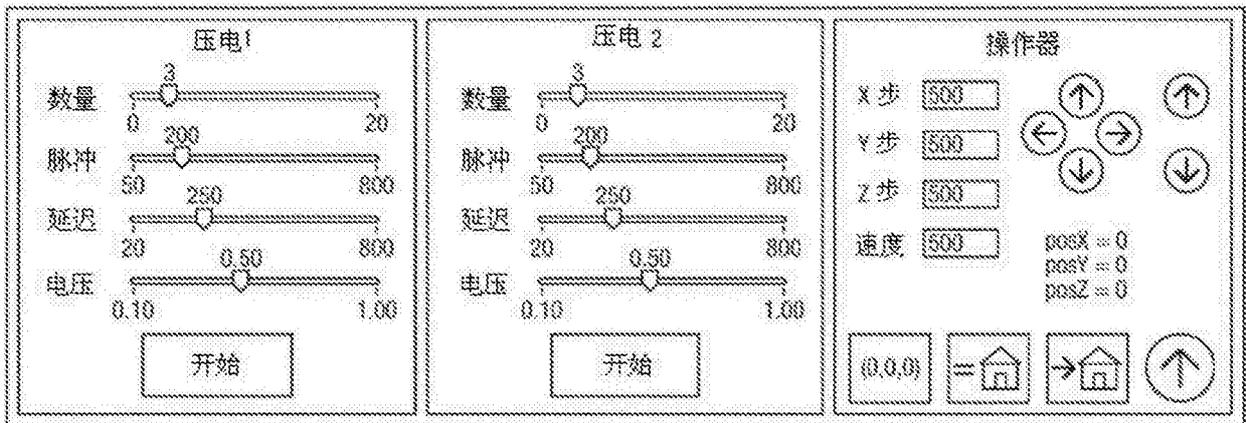


图5

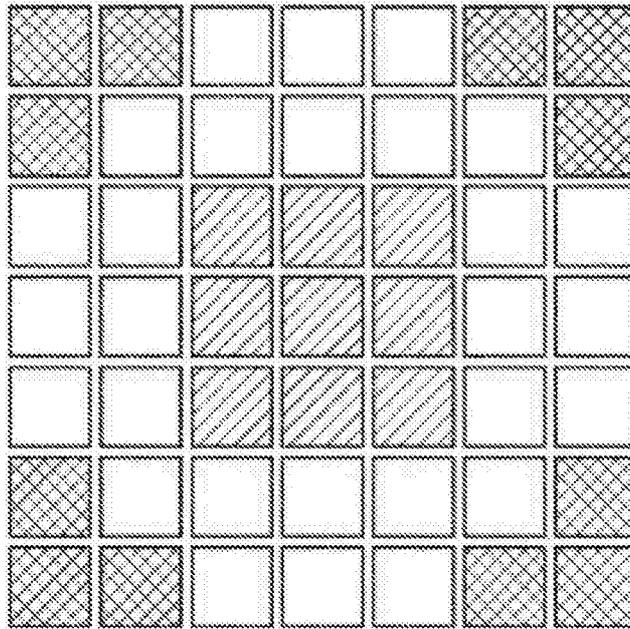


图6a

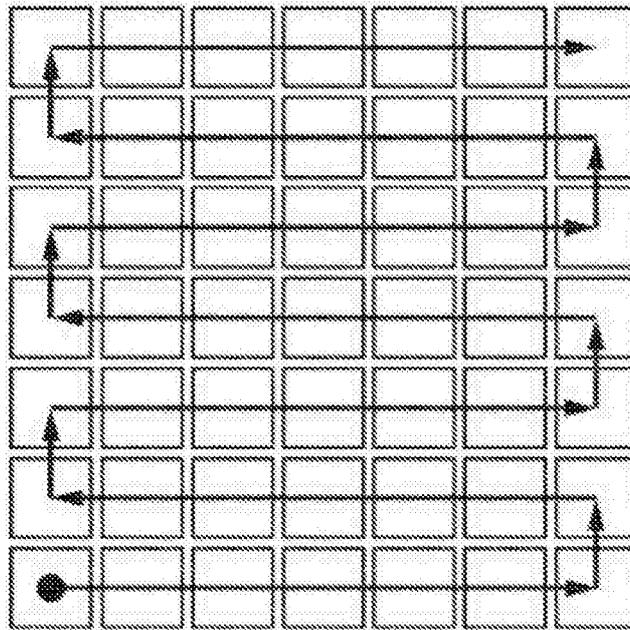


图6b

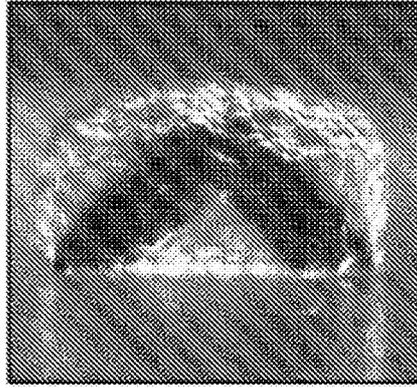


图7a

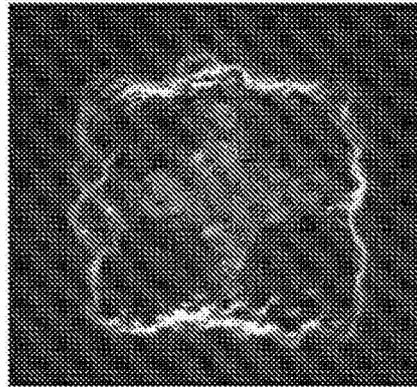


图7b

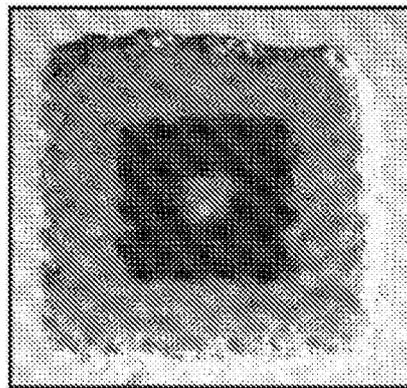


图7c



图8

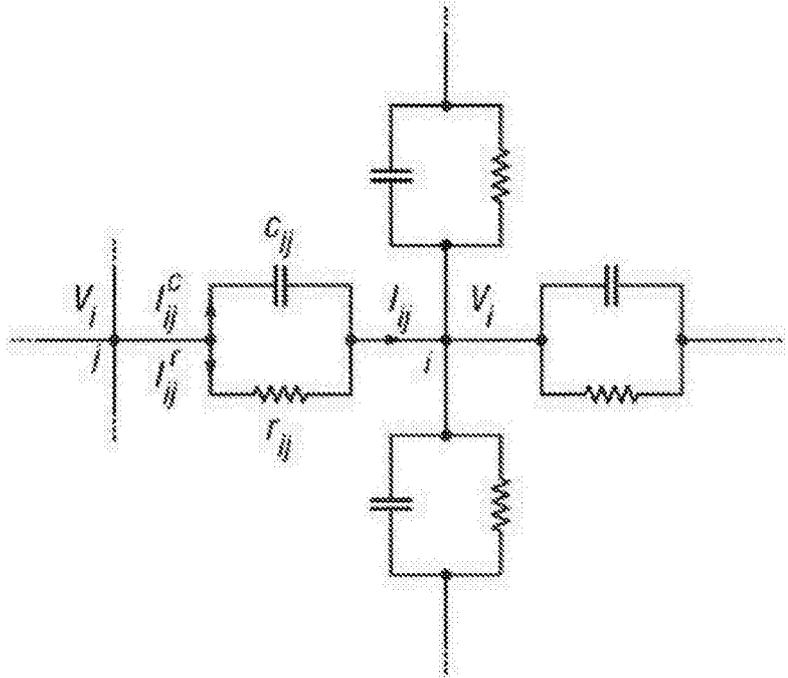
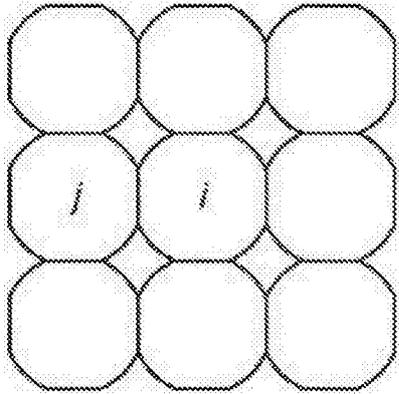


图9

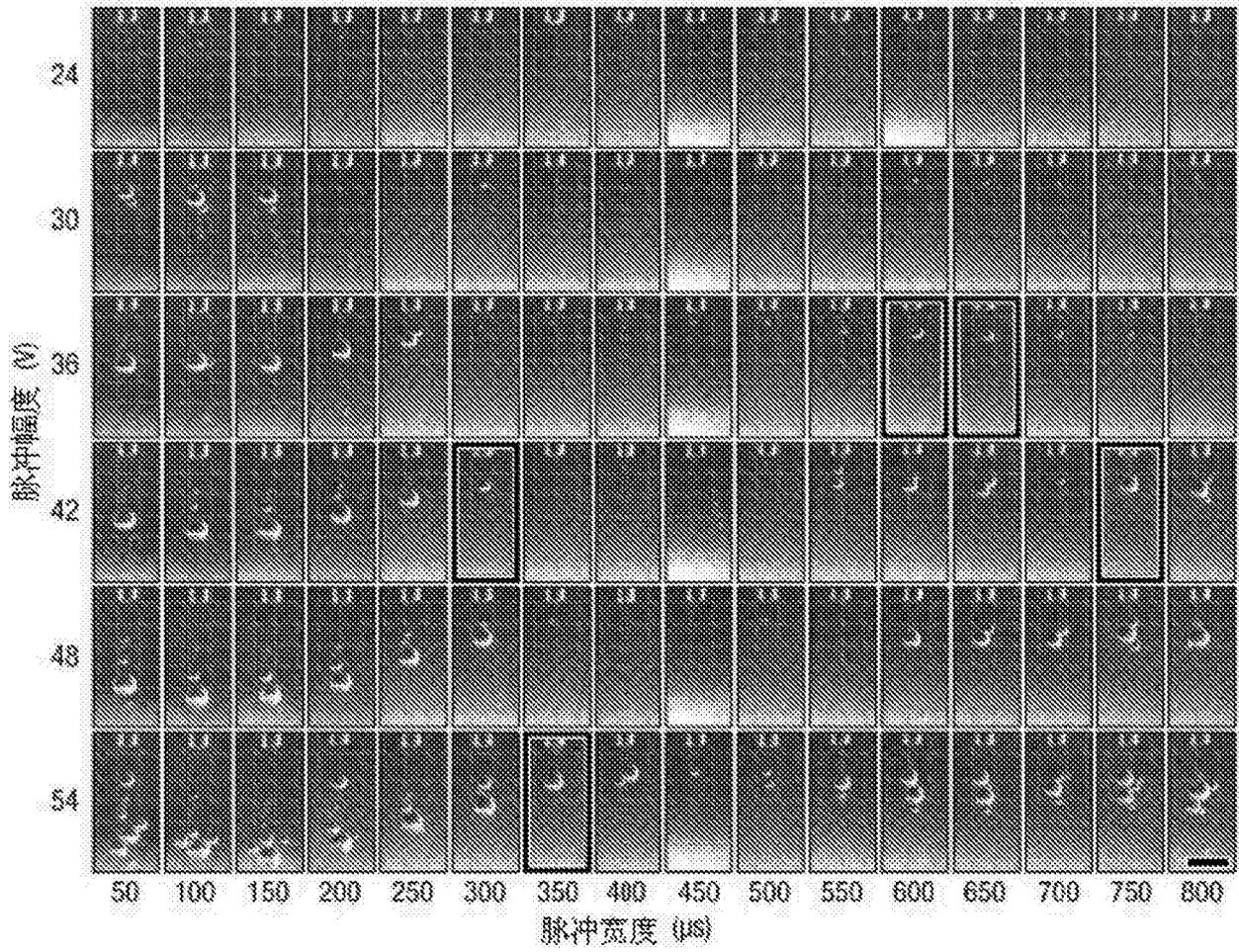


图10

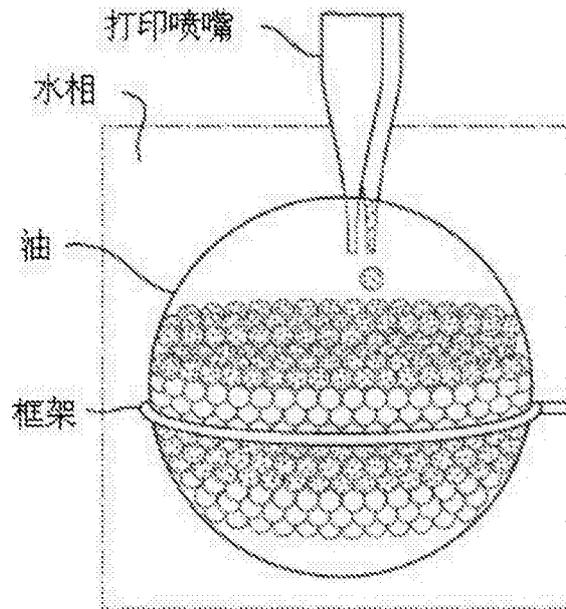


图11a

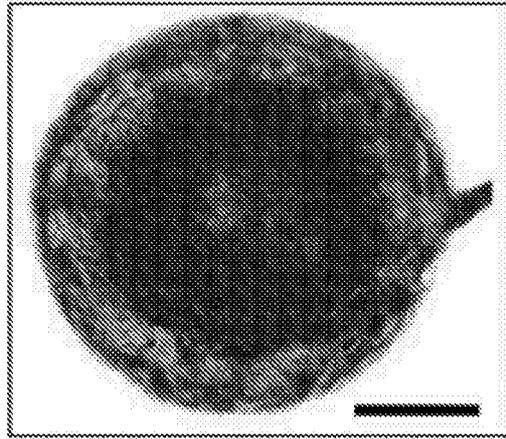


图11b

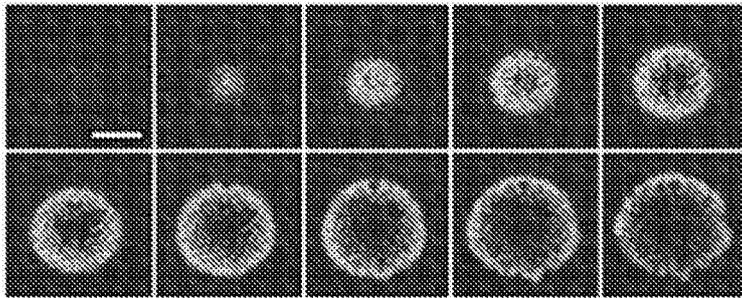


图11c



图11d

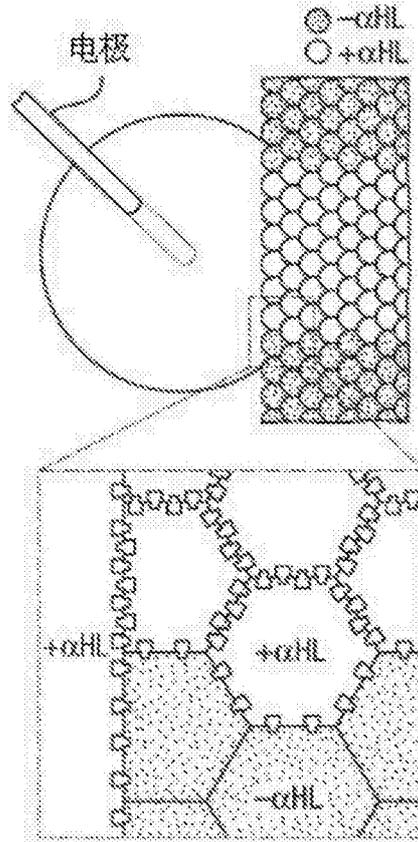


图12a

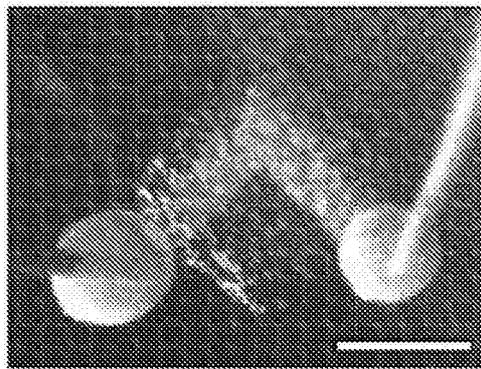


图12b

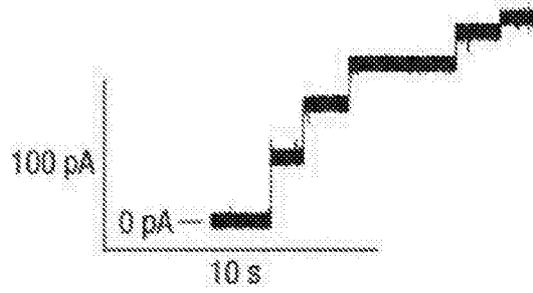


图12c

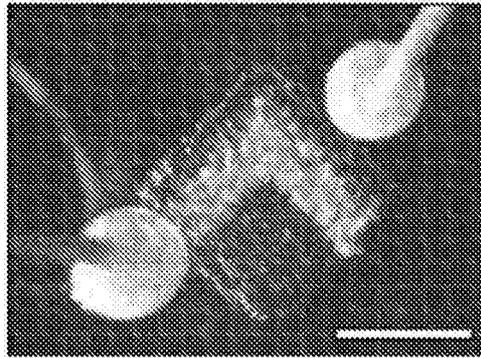


图12d

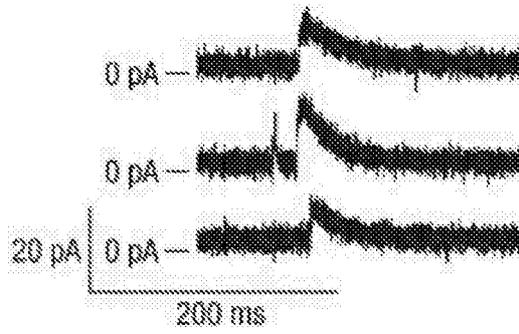


图12e

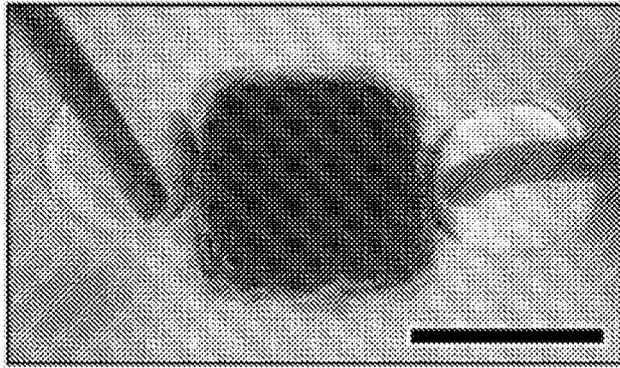


图13a



图13b

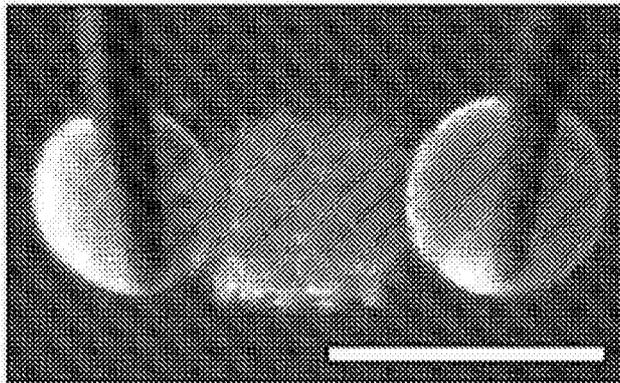


图13c

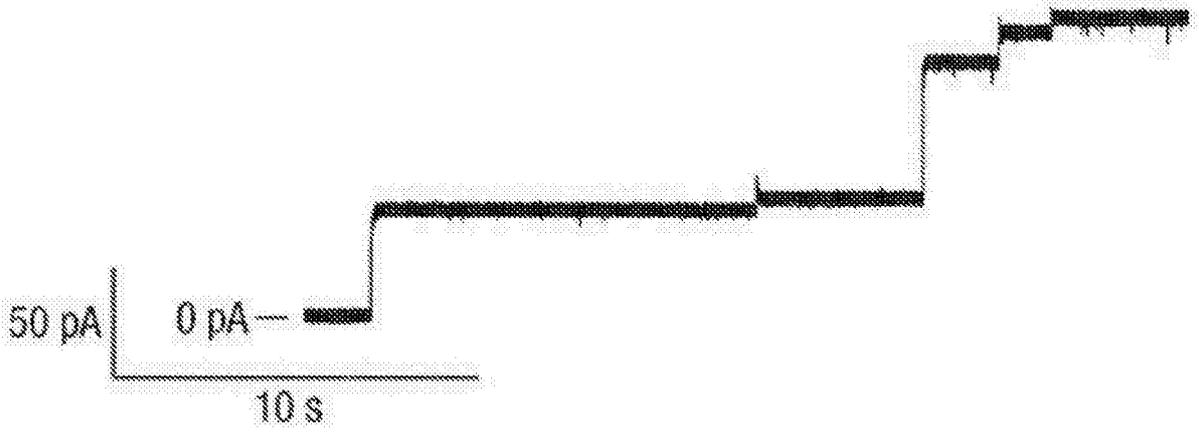


图13d

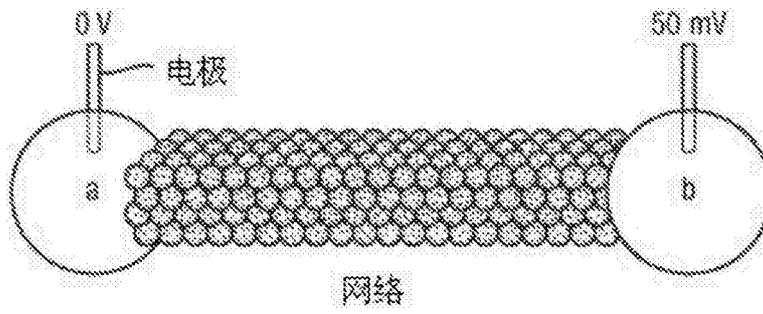


图14a

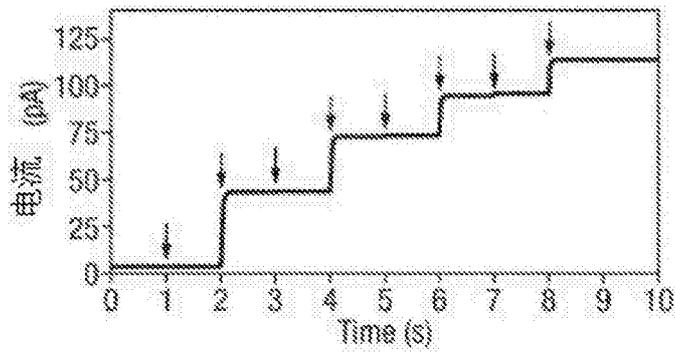


图14b

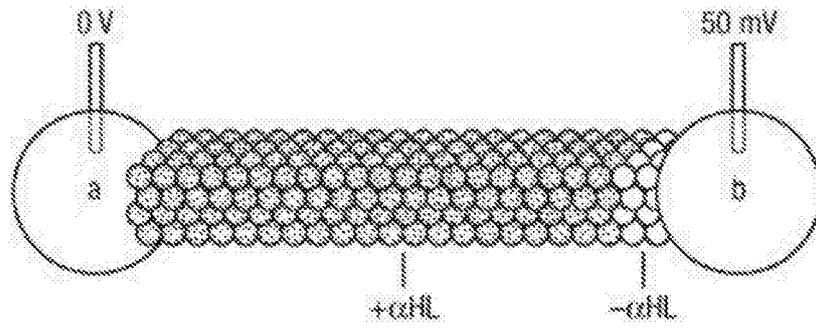


图14c

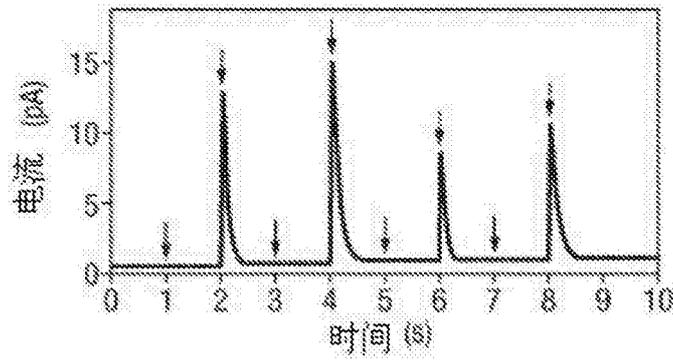


图14d

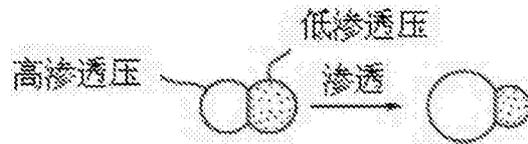


图15a

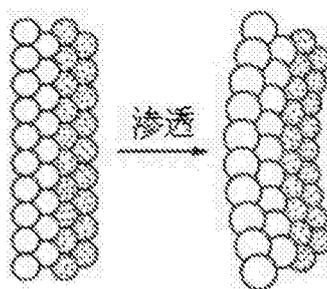


图15b

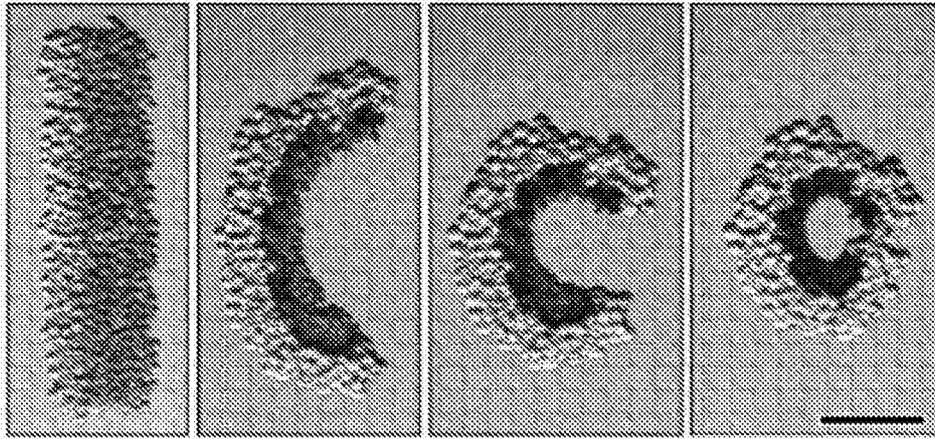


图15c

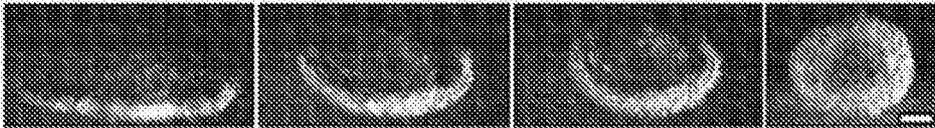


图15d

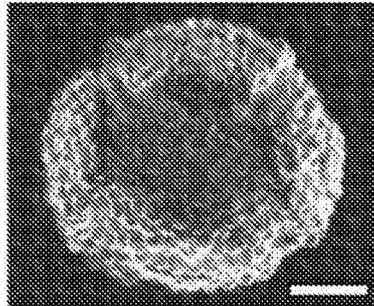


图15e

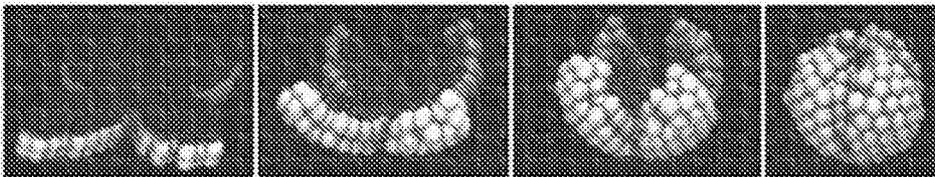


图15f

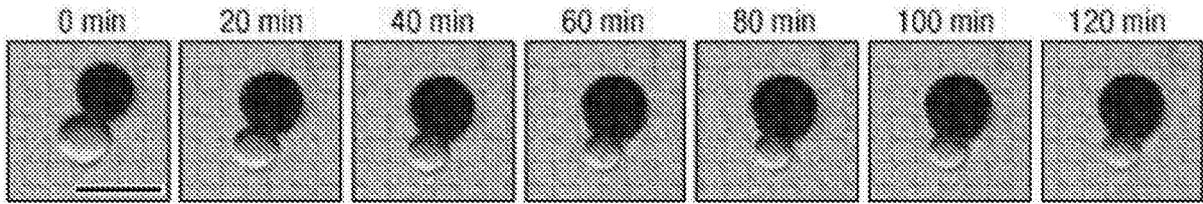


图16a

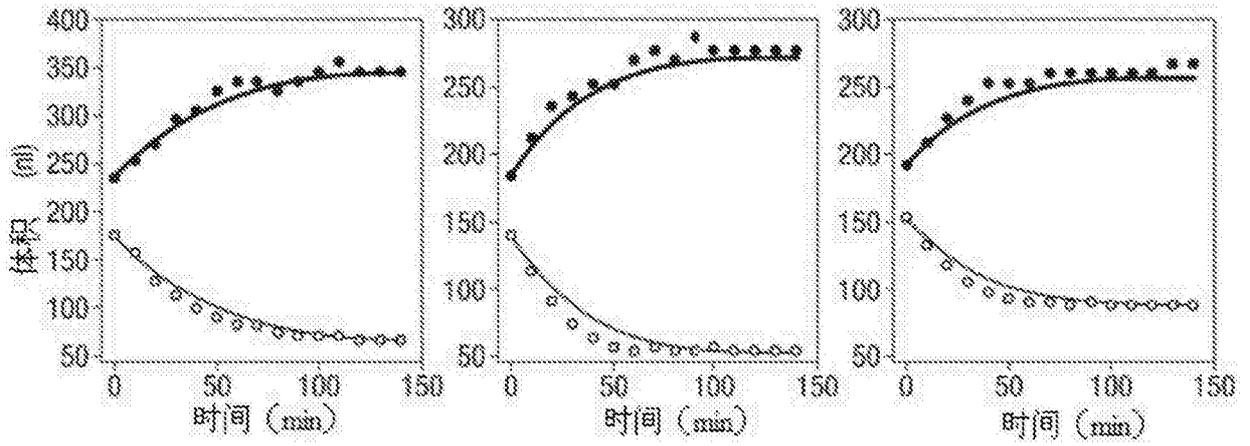


图16b

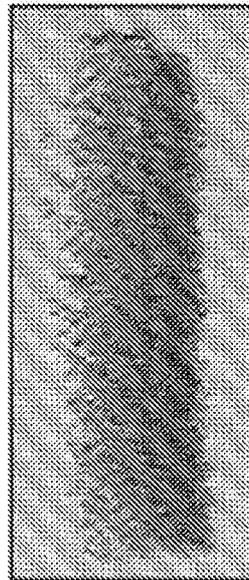


图17a



图17b

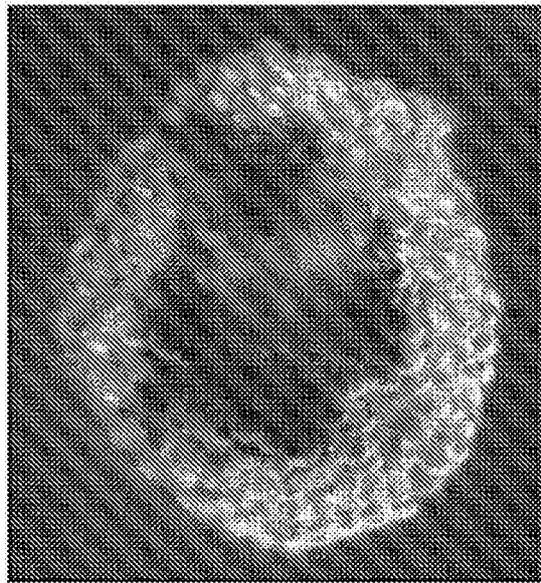


图17c