

## 特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2021-105

## 液滴微流控技术在微生物工程菌株选育中的应用进展

涂然<sup>1,2</sup>, 李世新<sup>3</sup>, 李昊霓<sup>3</sup>, 王猛<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 重庆工商大学环境与资源学院, 重庆 400067; <sup>2</sup> 中国科学院天津工业生物技术研究所, 中国科学院低碳合成工程生物学重点实验室, 天津 300308; <sup>3</sup> 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

**摘要:** 微生物工程菌株是生物制造的重要基础, 但大多数的工程菌株需要进化改造才能适用于生物制造。在菌种选育过程中, 如何高效地筛选获得具有目标性状的微生物工程菌株是进行生物制造应用的关键影响因素之一。液滴微流控技术作为近年来发展起来的一种基于微芯片的高通量检测筛选技术, 可以生成大小均一、相互独立的微体积液滴小室, 并应用于单细胞的培养、检测和分离, 在微生物菌株改造尤其是分泌型菌株的改造中得到广泛应用。本文首先概述液滴微流控技术的组成部分, 对关键性的技术进行简要介绍; 其次根据液滴检测信号的来源、液滴筛选流程的难易程度和液滴分选仪器的适用范围, 对液滴微流控技术在工程菌株选育中的应用进行总结分析; 最后对液滴微流控技术在应用中存在的问题和研究方向进行展望, 为深化其在微生物合成生物学中的应用提供指导。

**关键词:** 液滴微流控技术; 单细胞分析; 细胞工厂; 高通量筛选; 进化改造

**中图分类号:** Q939.97 **文献标志码:** A

## Advances and applications of droplet-based microfluidics in evolution and screening of engineered microbial strains

TU Ran<sup>1,2</sup>, LI Shixin<sup>3</sup>, LI Haoni<sup>3</sup>, WANG Meng<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> College of Environmental and Resources, Chongqing Technology and Business University, Chongqing 400067, China; <sup>2</sup> Key Laboratory of Engineering Biology for Low-Carbon Manufacturing, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China; <sup>3</sup> College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

**Abstract:** Microbial strains are prerequisites for biomanufacturing through microbial culture and fermentation. However, most strains usually need to be engineered to improve their performances for industrial applications. Therefore how to efficiently screen and isolate robust strains is a critical step of strain engineering. As an advanced high-throughput screening technology, droplet-based microfluidics developed with micro-chips can generate highly independent and uniform micro- or nano-liter droplets, in which single cells can be encapsulated, inoculated, detected, and analyzed for strain engineering. It is especially useful in the evolution of microbial strains for producing extracellular products. In

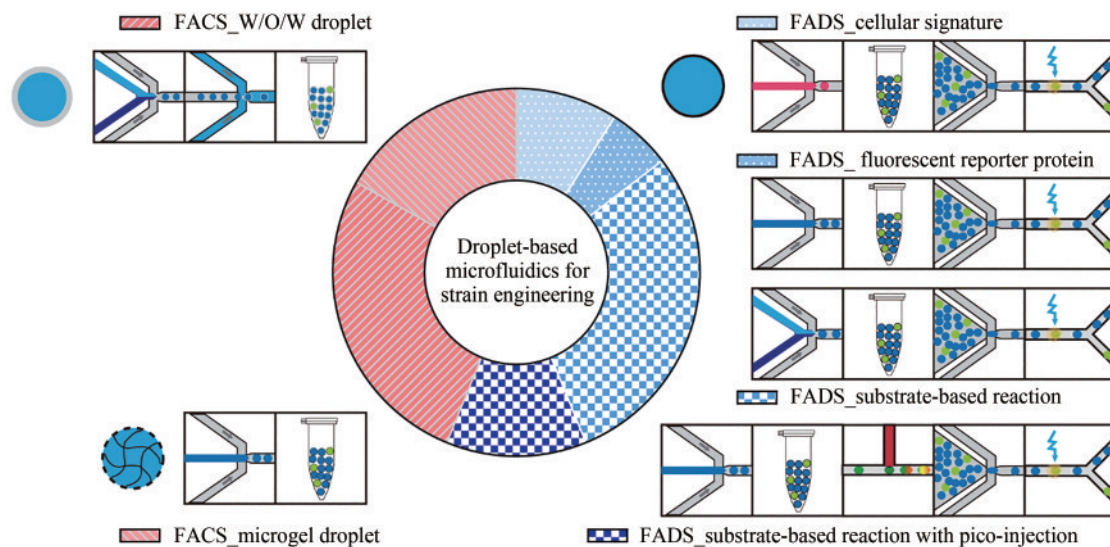
收稿日期: 2021-12-05 修回日期: 2022-01-18

基金项目: 国家重点研发计划“绿色生物制造”重点专项(2021YFC2100201, 2021YFC2103302); 天津市合成生物技术创新能力提升行动项目(TSBICIP-PTJS-003, TSBICIP-KJGG-006)

引用本文: 涂然, 李世新, 李昊霓, 王猛. 液滴微流控技术在微生物工程菌株选育中的应用进展[J]. 合成生物学, 2023, 4(1): 165-184

Citation: TU Ran, LI Shixin, LI Haoni, WANG Meng. Advances and applications of droplet-based microfluidics in evolution and screening of engineered microbial strains[J]. Synthetic Biology Journal, 2023, 4(1): 165-184

this review, we first introduce the basic components of the droplet-based microfluidic system and the main steps involved in the strain screening. We then summarize key factors for the application of the droplet-based microfluidic technology in strain engineering, such as the signal sources of droplet detection, the difficulties of handling droplet screening, and the scopes of droplet sorting instruments. Based on the instruments used for the droplet sorting, we group the application cases into two types either *via* fluorescence-activated droplet sorting (FADS) using microfluidic equipment or *via* fluorescence-activated cell sorting (FACS) using flow cytometry instrument. While FADS using single-layer water-in-oil droplet can be further classified into cellular signature, fluorescent reporter protein, and substrate-based reaction according to the signal sources, FACS can be divided into double-layers water-in-oil-in-water (W/O/W) droplet or microgel droplet according to the droplet property. Finally, we outline challenges and prospects for the droplet microfluidic technology, and provide some guidelines for its applications in synthetic biology. Compared with traditional screening methods such as shaking flask or microplate with a throughput of hundreds to thousands of samples per day in milli- or micro-liter volume, the droplet-based microfluidic technology can achieve millions of samples per day in pico- or nano-liter volume, resulting in an increase of thousand-folds in screening speed and cost-saving for million-folds. By integrating with an automated station, the droplet-based microfluidic technology can be further improved for its screening efficiencies and application potentials in microbial synthetic biology.



**Keywords:** droplet-based microfluidics; single-cell analysis; cell factory; high-throughput screening; direct evolution

合成生物学被认为是“DNA双螺旋发现”和“人类基因组测序”后的第三次生物技术革命，在生物基化学品合成、生物材料、生物能源、现代农业、环境治理等领域也有着广泛的应用前景<sup>[1]</sup>。合成生物学与传统生物学通过解剖生命研究其内在机理的方法刚好相反，它先基于数学、物理法则建立零部件，再将零部件（如基因）组装起来组成人工细胞，从而实现人工设计的生命体功能<sup>[2-3]</sup>。作为合成生物学的一个重要分支，微生物

合成生物学是以微生物为研究对象，对已有微生物进行设计创制，使其具备目标性状功能<sup>[4]</sup>，并进一步优化选育成为工业化应用的工程菌株。在微生物合成生物学研究过程中，如何高效地检测筛选获得具有目标特性功能起着重要作用，是有效获得目标菌株的关键<sup>[5]</sup>。

最高效的检测筛选方式是基于目标性状与细胞生长相耦合的方式即选择筛选“selection”，如基于抗性<sup>[6]</sup>、表达<sup>[7]</sup>或者能量平衡的细胞增殖，

目标性状越好细胞增殖越快。然而大多数的工业微生物表达产物如代谢物或者酶并不能与宿主细胞的生长相偶联，只能通过目标性状的表型进行检测筛选“screening”。通过表型检测筛选的高通量技术主要采用酶标仪、流式细胞仪和液滴微流控装置，每天的检测通量可以达到数十万至千万个细胞，极大提高了微生物工程菌株选育的效率<sup>[8-9]</sup>。其中，液滴微流控技术作为近年来发展起来的一种基于微芯片的高通量检测技术，它可以在微、纳尺寸的芯片上生成大小均一、相互独立的液滴，用于单细胞的培养、检测和分离<sup>[10-11]</sup>。与连续流动的微流控系统相比，用于单细胞的液滴微流控系统最大的优势在于：①液滴之间互不相容，每个液滴皆可作为独立的微反应器，可以将待检测的细胞样品单独包埋，进行单细胞及其胞外分泌代谢产物的分析<sup>[12-13]</sup>；②短时间内可以生成大量的液滴，速度达到每秒数千个液滴，适合高通量的生物和化学分析<sup>[14-15]</sup>；③液滴直径均一可控，液滴体积从皮升至纳升不等，降低了样品与试剂的消耗<sup>[16]</sup>。因此，液滴微流控技术具有速度快、通量高、成本低等显著特点。随着技术发展，研究者们可以在微芯片上进行液滴生成、融合、培养和分选等操作，实现微量样品的低成本、高通量的检测和筛选，这些研究显示出液滴微流控技术在微生物工程菌株改造、细胞分析和药物筛选等领域的巨大应用潜力<sup>[10, 17-25]</sup>。

本文针对液滴微流控技术在微生物工程菌株改造中的应用，首先简要介绍了液滴微流控系统的组成和特点；其次根据液滴微流控筛选技术中液滴检测信号的来源和检测分选的操作特点，按照液滴分选仪器的分类解析了采用液滴微流控装置的单层液滴和采用流式细胞仪的双层液滴或者凝

胶液滴在工程菌株选育中的应用；最后展望了液滴微流控技术的发展方向，为进一步普及和指导液滴微流控技术在工程菌株创制中的应用奠定基础。

## 1 液滴微流控技术与装置

### 1.1 液滴微流控技术

微流控技术（microfluidics）是一种在微通道中对流体进行操控的科学与技术，涉及化学、材料、生物等多个交叉学科，具有微型化和集成化的特点，也被称为芯片实验室（lab on a chip）<sup>[26]</sup>。微流控技术主要包括连续微流体技术和以间断液滴为基础的微流体技术，相对连续流体，间断液滴最大的优势在于可以形成大小可控、相互独立的单个液滴微反应器，并将待检测的样品单独包埋在这些液滴微反应器中，实现单细胞及其胞外分泌物的分析<sup>[13]</sup>。由于液滴体积微小且能在极短的时间内大批量地生成并平行处理，因此液滴微流控分选技术（FADS, fluorescence-activated droplet sorting）具有速度快、通量高、成本低等显著特点。通过在微芯片上设计特定的通道，可以实现液滴的生成、混合、存储、培养、输送、融合、分裂、检测、分选等操控<sup>[27]</sup>，为低成本高通量地检测筛选微生物工程菌株奠定了基础<sup>[28]</sup>。有关液滴微流控技术中液滴的操控有很多相关综述<sup>[14, 29-33]</sup>，本文根据在微生物工程菌株筛选中的应用需求（图1），主要选取液滴的生成、培养（或融合）、检测、分选等[图2(a)]进行介绍。

液滴生成是微流控筛选微生物菌株的第一步，通过将单细胞包埋在相互隔离分散的液滴中，奠

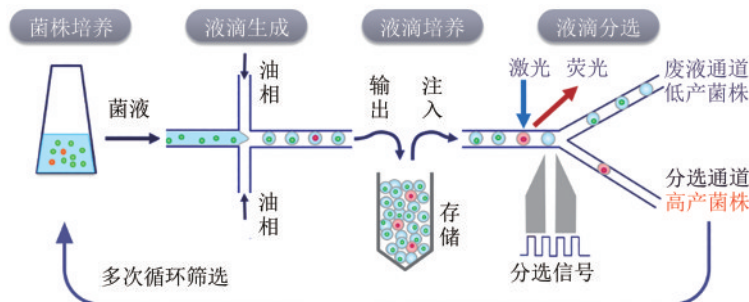


图1 液滴微流控技术筛选微生物工程菌株流程图

Fig. 1 Flowchart of droplet microfluidic screening for industrial strains

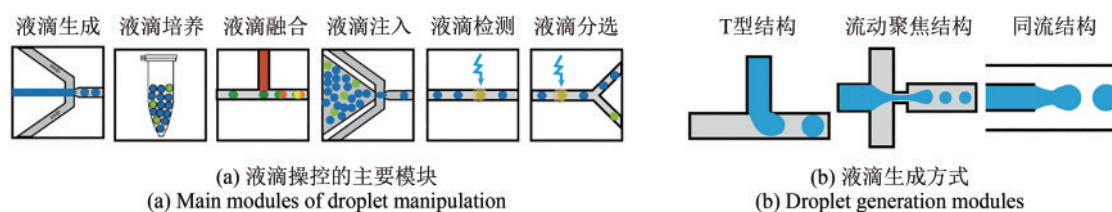


图2 液滴操控示意图

Fig. 2 Diagram for manipulating microfluidic droplets

定后续液滴中细胞培养和检测的基础<sup>[34]</sup>。与传统的乳化过程类似，液滴生成是通过将两种互不相溶的液体混合而成。两种液体中一种是分散相而另一种是连续相，且分散相以相对较小的体积分散于连续相中形成液滴<sup>[35-36]</sup>。根据连续相和分散相的不同，液滴可以分为油包水液滴（W/O, water-in-oil）和水包油液滴（O/W, oil-in-water），用于微生物培养的通常都是W/O油包水液滴。液滴的生成方式包括两类：主动生成和被动生成。主动生成的方法主要是通过外加场的搅动来生成液滴，如电<sup>[37]</sup>、磁<sup>[38]</sup>、声<sup>[37]</sup>、气<sup>[39-40]</sup>等，该方法可以更好地控制液滴的大小和频率，且不依赖微芯片，但生成液滴的速度较慢且在细胞液滴中应用较少<sup>[41-42]</sup>。被动生成的方法主要通过芯片的几何结构特性来进行液滴生成 [图2(b)]，如T型结构（T-junction）、流动聚焦结构（flow focusing）、同流结构（co-flowing）等<sup>[33]</sup>，该方法生成液滴的过程简单、高效、速度快，能达到每秒2万个液滴<sup>[43]</sup>。其中，T型结构的不对称力对液滴包埋细胞的影响较大，同流结构由于采用套管导致它的控制复杂且不均一，故较少用于细胞液滴<sup>[44]</sup>；相比而言，流动聚焦液滴包埋细胞的生成过程更为稳定，且液滴大小操控范围更宽<sup>[42]</sup>，因此在微生物细胞包埋中应用更为广泛。

液滴培养是微流控筛选微生物菌株的第二步，生成的细胞液滴作为细胞培养的微反应器，通过芯片原位在线培养<sup>[45-46]</sup>或者离心管、注射器等离线培养<sup>[47-48]</sup>方式进行细胞增殖。利用芯片原位在线培养可以定向观测细胞特性，如生长速率、细胞对外界的响应、细胞分泌酶动力学监测<sup>[15, 49]</sup>。由于原位培养的细胞液滴保存在芯片上，不利于后续的检测分选。因此，对于涉及分选步骤的微生物菌种选育研究，常采用离心管或注射器的方式进行液滴离线培养，以利于培养后的液滴重注

入到分选芯片上进行检测分选，从而获得高产工程菌株<sup>[48]</sup>。包埋细胞的液滴需具备温度和pH耐受性，维持细胞液滴的长期稳定培养。通过在油相中添加改变液面张力的表面活性剂，可以起到增加液滴稳定性、减少液滴与液滴间物质交换的作用<sup>[50]</sup>。细胞液滴常采用非离子型表面活性剂，具有良好的稳定性和生物兼容<sup>[50-51]</sup>。已报道的表面活性剂包括实验室自制的KryJeffD900 fluorosurfactant<sup>[52-53]</sup>或者商业化购买的Pico-Surf<sup>[54-55]</sup>、EA surfactant<sup>[56-57]</sup>和008-Fluoro Surfactant<sup>[58]</sup>等，这些表面活性剂制备的液滴在细胞培养、核酸检测、代谢物监测等方面都有广泛应用。

细胞液滴培养后，可能需要向液滴内引入其他物质，如酶活性检测的底物、细胞裂解试剂、相互作用物、染色剂、反应终止剂等物质，完成液滴内内涵物的反应和检测分析<sup>[59-60]</sup>。其他物质的引入可以通过将试剂液滴和目标液滴这两种液滴相融合（droplet merge）<sup>[61]</sup>或者将试剂液滴注入（pico-injection）至目标液滴<sup>[62]</sup>的方式进行。液滴融合又可分为主动融合和被动融合。前者是利用微芯片的几何结构变换和连续相油相的表面特性改变致使液滴不稳定诱导液滴间的被动融合；后者是通过施加外电场、磁场、温度场、表面声波和激光聚焦等作用诱导液滴界面失去稳定性实现液滴间的主动融合<sup>[42]</sup>。因此被动融合不需要主动控制类的设备装置，比主动融合所需装备少，且因为没有外部施加压力，对细胞内物质的干扰较小，在细胞生化分析方面更有优势，但其融合效率远小于主动融合；相反主动融合方式可以利用电极加速液滴表面张力的不稳定性，促进液滴更快速地融合，具有更高的效率<sup>[63]</sup>。外源物质的添加也可以通过皮升注入的方式，在电场诱导的液体界面不稳定状态下，将外加试剂注入到液滴中。该方法具有每秒钟数千个液滴的通量和顺序

多次注入其他物质的能力<sup>[62]</sup>,在微生物工程菌株检测筛选中进行其他物质添加的应用占主导地位。

液滴检测分选是微流控筛选微生物菌株的最后一步,其目的是从大量的液滴中检测并分离出感兴趣的目标液滴,获得高产工程菌株。根据分选的作用方式分为主动分选和被动分选。被动分选是利用微流控芯片的结构及液滴自身的物理性质进行的分选(如液滴的大小)<sup>[64]</sup>,这种分选方式并不依靠外加场或者力的作用,虽然所需设备少,但因干扰因素多导致分选效率低、误差大,因此实际使用较少。主动分选是依据液滴自身或者外加因素导致的物理或者化学性质差异,在检测确定目标液滴后,通过对液滴施加外部作用力,如光<sup>[65-66]</sup>、电<sup>[67]</sup>、磁<sup>[68]</sup>、声<sup>[69]</sup>、压<sup>[70]</sup>等方式进行液滴分选<sup>[71]</sup>。大多数可测定的液滴参数都可以作为信号确定目标液滴,进行后续的主动分选,因此主动分选不依赖于微芯片的限制,能对较大范围尺寸(pL至nL)和多种参数信号的液滴进行分选,例如基于吸光度(AADS, absorbance-activated droplet sorting)、荧光(FADS, fluorescence-activated droplet sorting)、拉曼(RADS, raman-activated droplet sorting)、细胞密度(IADS, image-activated droplet sorting)、质谱(MADS, mass-activated droplet sorting)等检测信号进行分选,极大拓展了适用范围,成为微生物工程菌株液滴分选的主要方式<sup>[72]</sup>。

## 1.2 液滴微流控检测分选装置

液滴微流控检测分选装置主要包含液滴微芯片、信号检测分选光路和信号采集处理三部分[图3(a)]。其中液滴微芯片是进行液滴生成和操控的载体,微芯片的制备可以采用高聚物材料、无机材料和纸基材料等多种材料<sup>[32]</sup>,但用于细胞液滴的微芯片常采用聚二甲基硅氧烷(PDMS)/玻璃或者聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)等制作,前者因成本低廉、设备门槛低是高校实验室中最为常见的微芯片材料,后者因复制成品率高、性能稳定、不易形变等优点,在商业化产品中大量使用<sup>[32]</sup>。

信号检测分选光路用于微流控芯片上流经液滴样品的信号检测和液滴分选,直接决定样品信号的检测速度、灵敏度和适用范围等指标。按照

检测原理可以分为光学检测、电化学检测、质谱检测等<sup>[73-74]</sup>。

光学检测通过检测各种光信号参量来确定样品的各项指标,可以分为吸光度、荧光、化学发光、拉曼光谱和折射率等检测方式<sup>[74]</sup>。其中吸光度检测(AADS)依据朗伯-比尔定律测量物质浓度,具有检测物质种类丰富、检测器结构简单等优点,是最早应用于微芯片分析的一类光学检测方法,但由于微流控芯片检测区的检测体积小、吸收光程短等局限,导致吸光度检测的相对灵敏度低,使其应用受到一定限制<sup>[75]</sup>。与吸光度检测相比,荧光检测(FADS)具有极高的检测灵敏度,通过荧光试剂标记可以检测fmol/L或者pmol/L级的低浓度物质,利用光子计数、双光子激发等技术甚至可以检测单分子蛋白<sup>[76]</sup>,此外荧光检测还具有特异性强和线性区间大的优点,适用于氨基酸、DNA等多种重要生化物质的检测。化学发光检测通过化学、生物或者电化学反应产生光信号反馈出待测物质的浓度,与荧光检测相比较,化学发光不需要外来的光源,对设备要求简单,但在灵敏度上弱于荧光信号<sup>[77]</sup>。拉曼光谱检测(RADS)利用物质自身的分子振动、转动等特性指纹来鉴定物质,不需要外加其他试剂与待检测物反应获取检测信号,因此属于免标记检测方式<sup>[78]</sup>,具有更广泛的应用范围,但由于拉曼信号较弱需要采集时间长,检测通量约20个/s<sup>[79]</sup>,小于荧光信号检测通量(2000个/s)<sup>[16]</sup>。折射率检测也是利用物质自身的特性进行无标记检测,可以通过材料的折射率不同检测无紫外吸收、无荧光的非离子物质如蔗糖、PEG,也可以通过细胞的折射率不同检测形态大小和细胞核等内涵物差异较大的细胞<sup>[80]</sup>,这种免标记的方式避免了荧光标记和化学修饰对细胞的影响,但折射率检测对激光光源及外部条件如温度、压力和流速的控制要求高,多应用于细胞自然状态的监测<sup>[81]</sup>。此外,通过细胞浓度不同影响散射光信号(light scattering)也可以检测液滴内细胞个数,进行耐药性菌株的筛选分析<sup>[82]</sup>。上述的光学检测方法中,荧光检测因其灵敏度高、特异性强、检测通量高,是微生物细胞工程菌株筛选中最常用和最有效的方法。

电化学检测包括安培检测和电导检测<sup>[83]</sup>,其

原理是基于样品发生氧化还原反应产生电流信号或者样品自身的电导差异进行检测<sup>[84]</sup>, 可以进行液滴尺寸、生成频率、液滴内物质离子浓度检测, 在小分子化合物检测方面具有优势<sup>[77, 85-86]</sup>。

质谱检测 (MADS) 通过测量离子质荷比 (质量-电荷比) 进行物质结构分析<sup>[87]</sup>, 特别适用于未知结构物质的检测, 多用于细胞-药物作用后代谢物质的分析研究<sup>[88-89]</sup>。通过结合液滴微流控检测分选技术, 在微生物工程菌株产小分子物质肽、蛋白、酶等检测和筛选方面应用潜力巨大<sup>[90-91]</sup>。

目前微流控装置以实验室自研为主, 信号采集处理系统主要采用美国国家仪器公司的现场可编程门阵列 (FPGA) 和 LabVIEW 自编软件程序控制<sup>[55, 92]</sup>, 少部分采用其他微控制处理器如 Arduino 板进行控制<sup>[93-94]</sup>。根据光路设计不同分成基于激光诱导荧光检测的共聚焦光路<sup>[95]</sup> [图3(b)] 和基于光纤传导光路<sup>[96-98]</sup> [图3(c)]。已报道的液滴微流控荧光检测筛选技术多采用共聚焦光路, 该光路中的激发光 (激光光源) 经过扩束器准直和二向色镜反射后, 通过显微物镜聚焦并垂直照射到芯片的样品上, 样品被激光激发后产生的发射光 (荧光信号) 经过显微物镜聚焦后, 再经干涉滤光片滤除干扰光后成像, 在光检测元件上实

现信号检测。该系统通过共聚焦和滤光处理将激发光、反射光、杂散光和目标荧光信号完全分开, 极大提高了目标荧光信号的检测灵敏度和信噪比<sup>[99]</sup>。与共聚焦光路相比, 光纤光路通过将光纤整合在芯片上实现信号检测, 省去了空间光路对准模块, 具有仪器体积小、光信号传播方向灵活、光信号受外界光干扰小等优点, 但由于光纤整合芯片的制备工艺复杂, 不利于量产加工, 因此商品化的液滴微流控仪器多采用非光纤芯片的形式。

目前的微流控检测分选装置以实验室自主研制为主, 商品化的仪器较少<sup>[100-101]</sup>, 因此采用液滴微流控装置进行菌株选育受到仪器装置的限制无法广泛普及。为了更广泛地将液滴微流控技术应用于菌株选育, 研究者也开发了基于液滴的流式细胞仪工程菌株检测分选技术<sup>[17]</sup>。已报道的基于液滴的微生物工程菌株筛选应用综述主要从检测信号来源、酶分类或宿主细胞分类等方面阐述<sup>[10, 59]</sup>。本文从是否具备液滴分选装置角度出发, 根据液滴信号来源和液滴操作特点, 对适用于液滴微流控装置的单层液滴和适用于流式细胞仪的双层液滴或者凝胶液滴归纳阐述, 为研究者根据所具有的装备条件选择合适的液滴微流控技术进行工程菌株选育研究提供参考 (图4)。

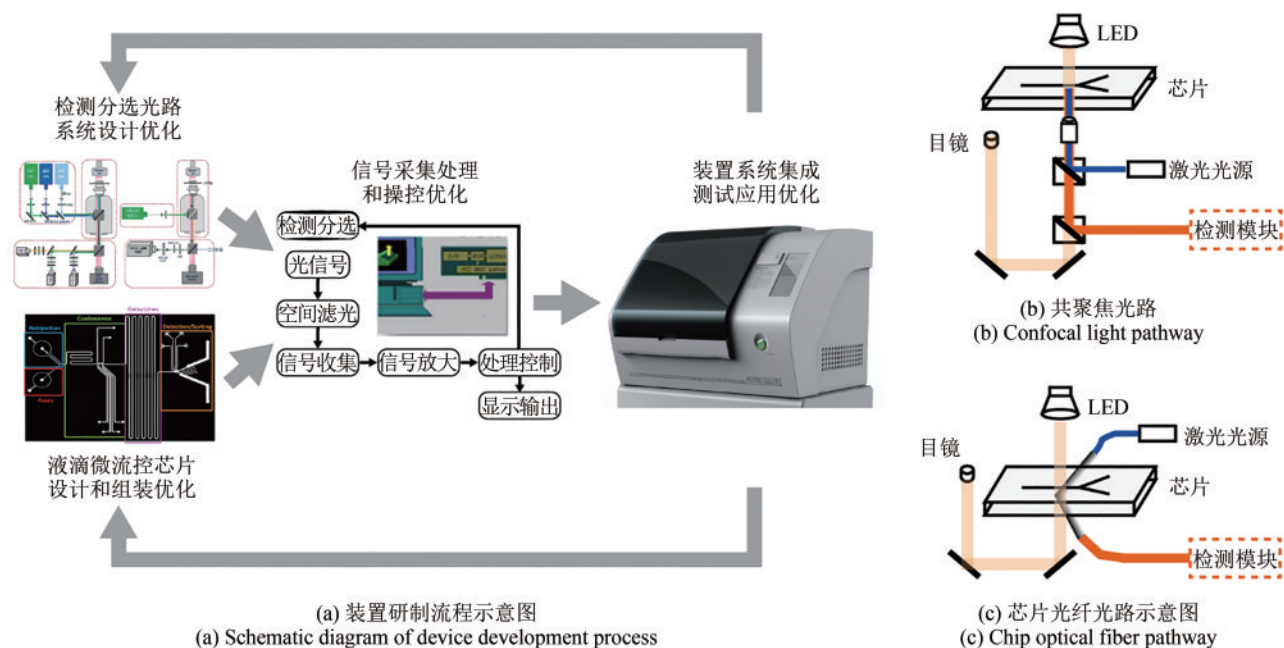


图3 液滴微流控装置示意图

Fig. 3 Schematic diagram for droplet microfluidic equipment

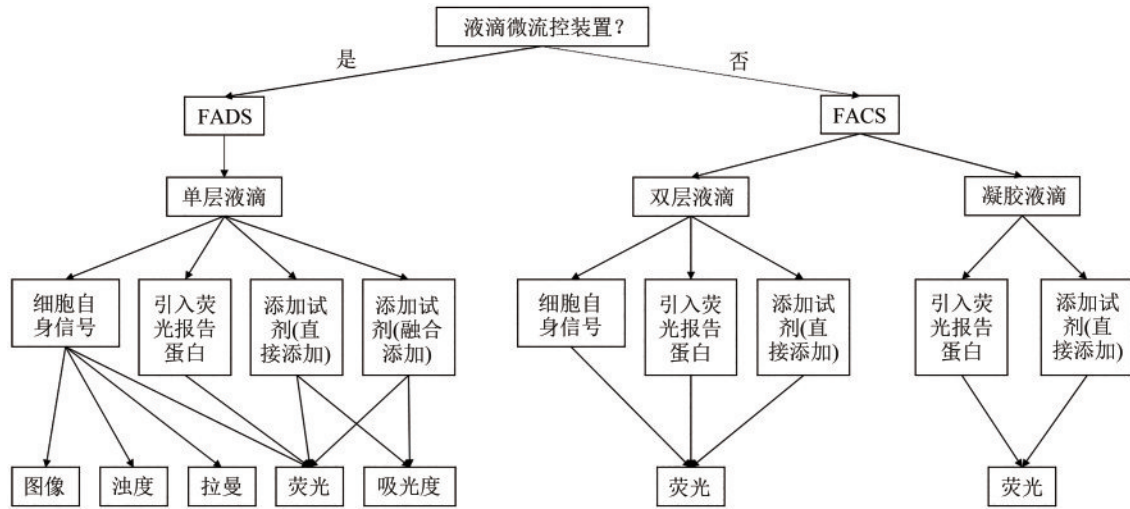


图4 液滴微流控菌株检测筛选应用流程图

Fig. 4 Flowchart for applying droplet-based microfluidic technology to microbial strain screening

## 2 基于液滴微流控装置的筛选应用

依托液滴微流控装置进行菌株的检测分选时，根据液滴内检测信号的来源和检测分选时液滴操作的差别，可以分成基于细胞自身信号、基于荧光报告蛋白和基于外源添加试剂（直接添加底物或者基于皮升注入添加底物）三种方式（图5）。

### 2.1 基于细胞自身信号

当微生物工程菌株分泌表达的待检测物自身具有荧光信号如核黄素、叶绿素、类胡萝卜素等，可以直接利用该物质的荧光信号进行检测，对液滴内的工程菌株进行检测筛选。其微流控操作的

流程如图5(a)所示，通过液滴生成芯片形成含有细胞的液滴，通过离线培养（由于细胞增殖时间较长一般采用离线培养方式）后经过液滴重注入，在液滴分选芯片中进行检测和分选，获得目标微生物菌株。该类型不需要采用其他特殊试剂（底物、生物传感器），具有液滴稳定、操控简单（只需要制备液滴和对液滴进行检测分选）的特点。如利用叶绿素在488 nm或者594 nm激光激发下产生630 nm发射光的荧光特性，对具有不同生长速度的微藻或者蓝藻细菌进行液滴微流控筛选。由于生长快的细胞增殖后在液滴中细胞数多，因此细胞液滴的叶绿素含量更多，其荧光信号更高<sup>[102]</sup>。通过分选出荧光信号高的液滴，可以获得生长更快

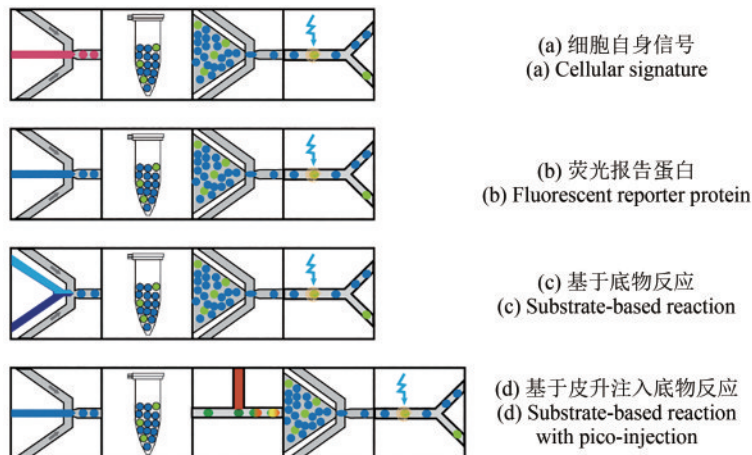


图5 基于液滴微流控技术装置的微生物工程菌株检测分选组成模块示意图

Fig. 5 Schematic diagram for the modules of detection and sorting of industrial strains using FADS

的藻类细胞，促进藻类的碳中和利用的应用。此外，利用核黄素在  $E_x 488 \text{ nm}/E_m 520 \text{ nm}$  的荧光特性，研究者将低水平分泌核黄素的乳酸菌，通过化学诱变的方式获得了核黄素生产菌种突变库，并以核黄素的天然荧光信号进行液滴微流控的检测分选，获得高分泌表达的核黄素生产菌株。其筛选速度达到每秒300个细胞，阳性细胞的富集率高达2000倍，利用该技术可以发现只有约百万分之一概率碱基突变的菌株，且筛选获得的高产菌株比出发菌株的核黄素产量提高250%，显示出液滴微流控筛选的高通量和有效性<sup>[103]</sup>。

除了荧光信号，拉曼光谱和质谱信号作为一种利用物质自身的指纹信号，也可以用来进行液滴内工程菌株的检测筛选。由于拉曼光谱信号弱、信号采集时间长、细胞高速移动定位困难等因素，导致其检测速度仅每分钟数个。针对这一问题，研究者通过正介电泳快速捕获细胞的方式将拉曼信号的检测速度提高几十倍，通量达到260个样品/min，并成功用于虾青素高产菌株的检测分选<sup>[78]</sup>。此外，也可以将液滴与质谱检测系统相耦联，利用物质自身的质荷比特性，对微生物工程菌株产生的物质如多肽、酶、代谢物等检测筛选<sup>[90, 104]</sup>。受限于质谱分析的速度，液滴质谱检测分选通量约每分钟240个，其筛选速度基本与拉曼信号检测分选类似，都小于基于荧光信号每秒钟2000个样品的分选通量<sup>[16]</sup>。

当检测的对象是细胞本身而非其生产的代谢物等时，利用图像识别技术，通过光散射差异对液滴内细胞数进行分析，也可以作为液滴信号进行目标微生物的检测筛选。在实际应用中，液滴通过时，相机会自动捕捉拍照液滴，并对液滴内的信号进行图像识别处理。利用该技术，研究者能够对不同形态的藻类细胞进行分类和分选<sup>[105]</sup>，对含有红细胞的单细胞液滴进行富集<sup>[106]</sup>，为下一步的处理和分析提供便利。由于这种方式依据细胞的形态和数目等特性，不需要待检测的细胞含有荧光、拉曼等信号，因此在细胞分类、耐药性研究以及与细胞生长耦联的检测体系中应用潜力巨大，但与荧光信号检测分选比较，也存在通量较低（每秒钟数十个细胞）的不足。

## 2.2 基于荧光报告蛋白

荧光蛋白是一种在激发光照射下能够发射荧光的蛋白质，可以用来标记其他物质（如酶蛋白、小分子物质等），并将目标物质的浓度转换为荧光信号进行定量检测，进而检测和筛选生产目标酶蛋白或者小分子物质的微生物工程菌株。与基于细胞自身信号类似，如图5(b)所示基于荧光报告蛋白的微流控操作流程也相对简单。通过液滴生成芯片产生含有细胞的液滴，该细胞液滴可以只含有一种单细胞或者含有多种细胞，经过离线长期培养后，再经过液滴重注入将液滴转移到分选芯片中进行检测，并分选获得目标微生物菌株。由于检测信号来源于细胞内的荧光蛋白信号，因此该类型也无需外源添加其他试剂的步骤，同样具有液滴稳定、操控简单的特点。

已报道的文献主要包括酶蛋白高表达筛选（如生产菌内酶蛋白与荧光蛋白融合表达）<sup>[55]</sup>，化合物高分泌工程菌株筛选（如生产菌内含有能感应目标化合物的生物传感器）<sup>[107]</sup>，生产菌和感应菌（内含能感应化合物的生物传感器）共包埋培养<sup>[108]</sup>三种方式。前两种方式因为荧光蛋白标记在生产菌中，因此只需要在液滴中包埋生产菌一种细胞即可。例如将热诱导型启动子控制的目标植物酶蛋白和黄色荧光蛋白（YFP）融合表达后，酶蛋白表达越多则荧光信号越强，经过原生质体液滴制备和培养，根据液滴内荧光信号的强弱可以高通量分选获得热激条件下目标酶蛋白表达量高的植物细胞。该技术每小时能检测筛选10万个细胞，对比传统植物愈伤组织培养后再检测的方法，显著缩短植物细胞的培养和检测时间，有效促进植物生物学研究<sup>[55]</sup>。

此外，通过将能感应目标化合物的生物传感器导入到生产菌中，可以对高产该化合物的高产菌进行检测筛选。然而，对于绝大多数微生物工程菌株而言，由于生产稳定性要求或者非模式菌株遗传操作困难等限制条件，无法直接在生产菌中导入生物传感器，此时可以采用第三种形式，即将生产菌和能响应生产菌产生的小分子物质的感应菌株共同包埋在液滴中，通过感应菌的荧光信号间接反映出目标小分子含量，进行生产菌的

检测筛选。例如对香豆酸与阻遏蛋白结合后能将阻遏蛋白从启动子区域解离,进而启动下游YFP荧光蛋白的转录翻译,根据这一原理,可以构建出响应对香豆酸的生物传感器,并导入到大肠杆菌中获得对香豆酸感应菌。当目标化合物对香豆酸浓度越大时,穿膜进入感应菌的对香豆酸越多,其解阻遏效应强,感应菌中YFP蛋白表达越多荧光信号越强。将该感应菌与分泌对香豆酸的酵母生产菌共同包埋在液滴中进行培养,由于对香豆酸的浓度与YFP的荧光信号成正相关,因此可以通过YFP荧光信号筛选获得高产对香豆酸的生产菌<sup>[109]</sup>。这种生产菌和感应菌共包埋培养的策略也可以应用于两种菌株互相依赖生长的“交叉饲养”类型检测筛选,其中生产菌产生的物质是感应菌生长的必需物质。例如研究者按照50~150个氨基酸营养缺陷型感应菌匹配1个分泌氨基酸生产菌的比例,将两类菌株共同包埋在液滴中进行“交叉饲养”,其中感应菌能组成型表达绿色荧光蛋白,当氨基酸生产菌大量生产分泌氨基酸时,感应菌因快速增殖而表达出高荧光信号,通过分选高荧光信号的液滴即可获得高产氨基酸的生产菌株<sup>[110]</sup>。在以上共包埋培养体系中,需要注意的是为了获得生产菌的单细胞液滴,一般生产菌的细胞个数要符合泊松分布且远小于共包埋的感应菌的细胞个数。另外由于分选出的液滴中含有生产和感应两种菌株,还需要对分选液滴进行生产菌株的分离培养,如通过添加抗性等方式获得纯的目标生产菌株。

### 2.3 基于外源添加试剂

当微生物工程菌株分泌表达的待检测物(小分子化合物、酶)没有自发的检测信号时,可以通过外源添加试剂与待检测小分子物质发生反应或者发生酶催化反应并产生光学信号进行检测筛选。根据底物与待检测物反应时间的快慢选择不同的时间加入试剂,包括细胞和试剂同时包埋在液滴中进行培养、检测和分选,或者细胞先包埋在液滴中培养一定时间后再将试剂通过液滴融合(merge)<sup>[111]</sup>或者皮升加入(pico-injection)<sup>[112]</sup>的方式加入到细胞液滴中进行检测和分选。

细胞和试剂同时包埋的微流控操作流程如

图5(c)所示,通过两个水相入口的液滴生成芯片将细胞和底物共包埋在液滴中,经过离线长期培养后,再将液滴重注入至液滴分选芯片进行检测和分选。例如首次报道的液滴微流控应用于酶活性筛选的案例中,研究者将产半乳糖的大肠杆菌细胞和半乳糖苷酶底物共包埋在液滴中并离线培养,细胞在液滴中增殖的同时表达半乳糖苷酶,酶作用于底物产生荧光,酶越多则荧光信号越强,因此根据荧光信号的强弱可以分选获得高产半乳糖苷酶的大肠杆菌,其分选通量达到每秒钟300个细胞,分选正确率达到99.9%<sup>[92]</sup>。此后,液滴微流控在微生物工程菌株表达酶筛选得到了广泛应用,如芽孢杆菌表达纤维素酶(cellulase)<sup>[113]</sup>、淀粉酶(amylose)<sup>[114]</sup>,酵母表达辣根过氧化酶(horseradish peroxidase)<sup>[116]</sup>、淀粉酶(amylose)<sup>[48, 115]</sup>,大肠杆菌表达硫酸酯酶(sulfatase)<sup>[47, 56]</sup>、糖苷酶(glycosidase)<sup>[116]</sup>、醛缩酶(aldolase)<sup>[52, 117]</sup>、酯酶(esterases)<sup>[118]</sup>、DNA作用酶(polymerase, retraction endonuclease, ligase)<sup>[8]</sup>等。由于液滴生成芯片的通道尺寸限制,已报道的微生物工程菌株主要是大肠杆菌、芽孢杆菌、酵母菌等形状相对规则、直径在数十微米以下的细胞。对于萌发后形成丝状的细胞可以通过包埋孢子的方式进行液滴制备,如研究者通过将黑曲霉的孢子悬液与淀粉酶底物共包埋在液滴中,孢子在液滴中能正常萌发并表达淀粉酶,实现了高产淀粉酶丝状真菌的检测筛选,其分选通量可以达到每秒钟20个细胞,在1.5 h内可以完成上万个细胞的检测筛选<sup>[53]</sup>。该方式也在里氏木霉产纤维素酶高产菌株的筛选中得到应用,从数十万的突变菌株中筛选获得纤维素酶产量提高46%的突变株<sup>[119]</sup>。

细胞和底物共包埋制备液滴的方式简单便捷,但有时底物的过早加入会由于酶促反应过快或者底物自身降解、非特异性反应等因素导致底物产生的信号值与目标细胞的特性不一致的现象<sup>[112, 120]</sup>。此时采用先进行细胞液滴培养,再通过液滴融合或者皮升注入的方法加入底物试剂进行酶促反应[图5(d)]。如漆酶<sup>[112]</sup>、木聚糖酶<sup>[121]</sup>、脂肪酶<sup>[122]</sup>、乙醇<sup>[123]</sup>等微生物工程菌株的筛选和基于血管紧张素酶底物的抗体细胞<sup>[124]</sup>筛选应用。此外,对于先转录翻译,再检测筛选的无细胞体系(体外转录翻译, *in vitro* transcription and translation,

IVTT), 为了避免底物对于IVTT的影响, 也需要先制备IVTT的液滴进行目标蛋白表达, 再加入底物进行检测筛选, 如半乳糖苷酶<sup>[111]</sup>、核糖酶<sup>[125]</sup>、蛋白酶<sup>[126]</sup>等应用筛选。总体而言, 基于细胞和底物试剂反应的筛选应用占据微流控在微生物工程菌株筛选的70%以上, 远超过基于细胞自身信号和荧光报告蛋白的筛选应用。

基于液滴微流控装置的液滴筛选体系总结于表1。

### 3 基于液滴和流式细胞仪的筛选应用

虽然液滴微流控筛选应用在近些年有了不少进展, 但受限于液滴微流控装置仪器大多数仍处于实验室自主研制组装阶段, 商品化的仪器较少, 绝大多数实验室依然无法开展相关研究。目前相对成熟的高通量细胞(颗粒)分选方法主要是基于流式细胞仪为主, 与多数仍处于实验室研制阶段的液滴微流控分选装置不同, 从1973年美国BD公司和美国斯坦福大学合作研制生产世界上第一台商用流式细胞仪开始, 流式细胞分选仪距今已有半个世纪, 在包括医药、环境、生物等各领域应用范围广阔。流式细胞分选技术(FACS, fluorescence-activated cell sorting)是采用流式细胞仪对处于快速直流中的细胞或颗粒进行多参数、

快速定量分析和分选的技术。其检测分选原理是待测样本(细胞/颗粒的水悬液)进入样品通道后, 在气体压力作用下通过水相鞘液将细胞/颗粒阵列通过激光检测区, 并受激光照射后产生一定的散射光和激发荧光等信号, 信号借助光学元件检测并转化成相应的电信号传输至计算机进行处理分析, 从而达到测定每个细胞的物理化学特性, 并通过电压偏转分选, 分离获得目标细胞<sup>[127]</sup>。与液滴微流控检测分选相比较, 流式细胞检测分选具有更高的速度(每秒钟1万个细胞)、更高的灵敏度(1000个荧光分子)、更灵活的分选参数(商业化的数据图像处理软件)等优势。然而, 由于流式细胞检测分选的对象是单细胞/颗粒, 检测时是通过水相的外鞘液将悬浮细胞/颗粒阵列通过激光照射点进行检测, 因此流式细胞仪只能测定与细胞/颗粒紧密相关的信号(如来源于细胞内或者细胞表面的荧光信号); 对于分泌到细胞外的物质, 由于这些物质会分散在外鞘液中而无法进行检测[图6(a)]。为了解决以上问题, 可以通过制备双层液滴即水包油包水液滴(water-in-oil-in-water droplet, W/O/W droplet)<sup>[128]</sup>将细胞包埋在最内层的水相[图6(b)]中满足流式细胞仪外鞘液是水相的要求, 或者通过制备凝胶液滴(microgel droplet)<sup>[129-130]</sup>将细胞包埋在凝胶颗粒[图6(c)]中满足流式细胞仪只能检测细胞或颗粒内信号的要求实现分选<sup>[17]</sup>。

表1 基于液滴微流控装置的液滴筛选体系及应用

Table 1 Droplet-based screening systems and applications of FADS

液滴类型	液滴信号来源	优缺点	通量	代表性应用案例
单层液滴	细胞自身信号(荧光、拉曼、浊度、细胞图像)	优点:操作简单,细胞直接包埋在液滴中 缺点:需要特殊软件,例如拉曼和图像识别软件	荧光 300 Hz; 拉曼 1~5 Hz; 图像识别 5~10 Hz; 浊度 240 Hz	色素:核黄素 <sup>[103]</sup> ;拉曼:虾青素 <sup>[78]</sup> ;图形识别:人成红细胞白血病细胞 <sup>[106]</sup> ;散射光:细胞浊度 <sup>[82]</sup>
	细胞荧光蛋白(目标蛋白和外源荧光蛋白融合、生产菌自身含生物传感器、生产菌和感应菌共包埋培养)	优点:操作简单,细胞直接包埋在液滴中 缺点:需要构建特定生物传感器	150~300 Hz	生产菌自身含生物传感器:3-脱氢莽草酸 <sup>[107]</sup> ;生产菌和感应菌共培养:香豆酸酵母菌和大肠杆菌感应报告菌 <sup>[109]</sup>
	细胞和底物(同时共包埋在液滴)	优点:操作简单,细胞和底物直接包埋在液滴中 缺点:不适合酶促反应快的样品	300~2000 Hz	大肠杆菌:半乳糖苷酶 <sup>[92]</sup> 、硫酸酯酶 <sup>[47, 56]</sup> 等;枯草芽孢杆菌:淀粉酶 <sup>[114]</sup> ;丝状真菌:纤维素酶 <sup>[119]</sup>
	细胞和底物(细胞先包埋在液滴,底物后加入)	优点:可以通过液滴融合添加试剂,用于酶促反应快的样品 缺点:液滴融合操作复杂	300~1000 Hz	漆酶 <sup>[112]</sup> 、脂肪酶 <sup>[122]</sup> 、乙醇 <sup>[123]</sup> 等

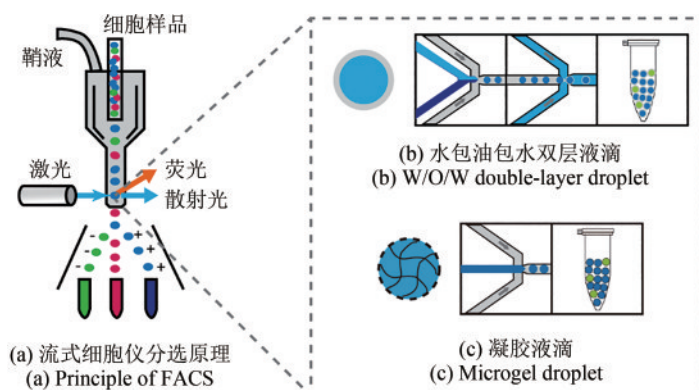


图6 基于流式细胞仪装置的微生物工程菌株检测分选组成模块示意图

Fig. 6 Schematic diagram for modules of detection and sorting of industrial strains using FACS

### 3.1 基于双层液滴

为了适应流式细胞仪外鞘液是水相的要求，Tawfik 团队于 2004 年提出体外区室化 (*in vitro* compartmentalization, IVC) 的概念，通过生成水包油包水的双层液滴 W/O/W 使液滴外层是水相，实现与流式细胞仪检测分选相结合。如将无活性的酶基因序列和低浓度荧光染料混合制备一种液滴，有活性的酶基因序列和高浓度荧光染料混合制备另一种液滴，并将两种液滴按照无活性酶高于有活性酶的比例混合后，通过流式细胞仪检测分选出高荧光信号的目标液滴（含有活性酶基因序列）。经 PCR 扩增验证，该技术能有效分选获得目标液滴，分选后的有活性酶比率提高 40 倍，分选速度达到每秒 4 万样品，显示出双层液滴结合流式细胞仪技术的超高分选效率<sup>[131]</sup>。此后，该技术在体外无细胞体系表达筛选半乳糖苷酶 ( $\beta$ -galactosidase)<sup>[132]</sup>、绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP)<sup>[133]</sup>、大肠杆菌表达筛选硫内酯酶 (thiolactonase)<sup>[134]</sup>、血清对氧磷酶 (serum paraoxonase)<sup>[135]</sup>、酯酶 (esterase)<sup>[136-138]</sup>、芳香基硫酸酯酶 (arylsulfatase)<sup>[139]</sup>、聚合酶 (polymerase)<sup>[140]</sup>、绿色荧光蛋白<sup>[141]</sup>、红色荧光蛋白<sup>[142]</sup>，枯草芽孢杆菌表达蛋白酶 (protease)<sup>[143]</sup>，酵母表达筛选纤维素酶 (cellulase)<sup>[144]</sup>、丁酰胆碱酯酶 (butyrylcholinesterase)<sup>[145]</sup>，以及酵母高产核黄素 (riboflavin)<sup>[146]</sup>，芽孢杆菌高产乳酸 (lactic acid)<sup>[147]</sup> 等工作中得到应用。

在上述流式细胞仪的双层液滴检测筛选中，如何制备获得大小均一、尺寸可控的双层液滴是减小信号检测误差的一个关键影响因素。研究者们早期主要通过转子搅拌<sup>[148]</sup>、均质匀浆器搅

拌<sup>[131, 134-135, 143]</sup>、反复过膜<sup>[132, 136, 149]</sup>三种方式获得 W/O/W 双层液滴，然而这些方式即使在优化的条件下也无法获得均一的双层液滴。自液滴微芯片逐步开始研究后，研究者们通过优化液滴芯片的 3D 结构<sup>[150]</sup>、芯片的亲/疏水性修饰方法<sup>[138]</sup>、液滴油相中表面活性剂成分<sup>[151]</sup>和采用商品化液滴芯片<sup>[101, 140]</sup>，对液滴的稳定生成做了许多改进，最终能获得均一度较高的双层液滴，极大扩展了基于流式细胞仪的液滴检测分选应用。与基于微流控装置进行液滴检测分选一样，基于流式细胞仪进行液滴检测分选的应用也主要集中在将细胞和试剂共包埋后，通过试剂生成产物的信号值反映样品细胞的酶活性或代谢物量，并通过该信号值进行目标细胞的分选。由于基于流式细胞仪采用的双层液滴不能对液滴进行多次操作，因此通常在生成第一层内层水相时将底物和细胞同时加入共包埋，极个别报道显示可以第一层油包水液滴制备后<sup>[137]</sup>，或者在双层液滴水包油包水制备后<sup>[141]</sup>再加入底物试剂。该种情况下底物试剂需要穿过油层进入到最内层的水相，且与细胞物质反应后的产物需要保留在最内层水相，故要求底物具备疏水性而产物具备亲水性，其条件苛刻，应用较局限。相比较而言，基于液滴微流控装置采用的 W/O 油包水单层液滴可以通过液滴融合或者微注射的方式加入底物试剂，具有更广泛的应用范围。

### 3.2 基于凝胶液滴

虽然 W/O/W 双层液滴制备经过优化在液滴均

性的控制上有了很大的提高,但对比W/O单层液滴的制备,W/O/W双层液滴的尺寸和稳定性受到内、外水相和油相的流速很大影响<sup>[152]</sup>,制备依然相对复杂。为了适应流式细胞仪分选细胞/颗粒的要求,可以在生成W/O单层液滴时在水相中加入一些能交联固化的物质(例如琼脂糖、海藻酸盐、明胶等)制备获得凝胶液滴<sup>[129]</sup>,适用于流式细胞仪的检测分选。

由于琼脂糖具备在高温熔融、低温凝固的特性,使它成为一类最为常用的凝胶液滴制备成分。在温度37℃及以上时可以使琼脂糖保持熔融状态,此时能将细胞溶解在琼脂糖溶液中制备成液滴。这种液滴能进行细胞的培养增殖和细胞裂解后的所含DNA<sup>[153]</sup>、RNA反转录产物<sup>[154]</sup>的PCR扩增,达到单分子检测<sup>[155]</sup>的高灵敏度,用于微生物群落和基因组分析<sup>[156-157]</sup>,为发现和挖掘新的功能微生物菌株奠定基础。同时,也可以对微生物表达酶的高产菌株例如大肠杆菌产磷酸三酯酶(phosphotriesterase)<sup>[158]</sup>、脂肪酶(lipase)<sup>[159]</sup>和毕赤酵母产木聚糖酶(xylanase)<sup>[160]</sup>等进行检测筛选。由于琼脂糖凝胶液滴制备过程中需要控制较高温度,并不适合低温培养的一些工程菌,此时可以采用低温(20~27℃)仍保持熔融状态的明胶水凝胶(gelatin hydrogel)来制备液滴,用于产油脂微藻<sup>[161]</sup>的筛选。

虽然琼脂糖或明胶水凝胶应用广泛,但因为其熔融状态需要严格的控温,操作复杂,研究者开发了采用非温度触发水凝胶固化的材料,例如受钙离子触发后交联固化且具有生物兼容性的海藻酸钠,并在抗体细胞筛选中成功应用<sup>[162]</sup>。随后,研究者对海藻酸钠受钙离子触发固化时方式

也进行了优化,对比了添加碳酸钙、氯化钙、EDTA螯合钙三种钙离子释放和触发海藻酸钠交联固化的效果,结果显示采用EDTA螯合钙的方式进行凝胶液滴的芯片外的固化方式不仅效果好,且能提高凝胶液滴干细胞的存活率。采用螯合钙的方式包括两个步骤:先制备完成海藻酸钠和EDTA螯合钙的凝胶液滴,再将醋酸通过油相渗入到凝胶液滴内与EDTA反应释放钙离子进行凝胶固化。该方式既避免了凝胶液滴芯片上固化时造成堵塞的问题,又改善了由于碳酸钙和氯化钙方式释放钙离子不均一导致海藻酸钠交联固化时凝胶内部不均一的不足<sup>[163]</sup>。研究者通过将螯合钙试剂从乙二胺四乙酸螯合钙(EDTA-Ca)改成三乙酸螯合钙(NTA-Ca)的进一步优化提高了凝胶液滴的生物兼容性<sup>[164]</sup>,展示出采用海藻酸钠凝胶液滴进行菌株包埋筛选的良好应用前景。此外也有报道通过紫外线照射方式触发甲基丙烯酸酯胶(GelMA)固化形成细胞凝胶液滴<sup>[165-166]</sup>,但由于紫外线具有造成细胞自发突变的不利影响,该固化方式较少应用于细胞,更多见于特殊微球材料制备等研究<sup>[167-168]</sup>。

由于受到FACS流式细胞仪喷嘴尺寸(70~150 μm)的限制,按照分析物粒径不应超过喷嘴尺寸的1/3或1/4计算,以上应用中凝胶液滴的粒径大小在15~50 μm,因此FACS主要适用于筛选小凝胶液滴。对于大粒径的凝胶颗粒,例如包含丝状真菌菌丝的400 μm凝胶液滴<sup>[169]</sup>,可以采用COPAS大颗粒分选仪进行检测分选,该分选仪能够分选直径250~1500 μm物质的能力<sup>[169-170]</sup>,拓展了凝胶液滴在工程菌株改造上的应用范围。

基于流式细胞代的液滴筛选体系总结于表2。

表2 基于流式细胞仪的液滴筛选体系及应用

Table 2 Droplet-based screening systems and applications of FACS

液滴类型	液滴信号来源	优缺点	通量	代表性应用案例
双层液滴	细胞和底物(同时共包埋在液滴)、细胞代谢物自发荧光等	优点:液滴无需固化处理 缺点:制备双层液滴操作复杂;无法进行液滴融合添加其他试剂	3~20 kHz	酯酶 <sup>[136-138]</sup> 、聚合酶 <sup>[140]</sup> 、纤维素酶 <sup>[144]</sup> 、核黄素 <sup>[146]</sup> 等
凝胶液滴	细胞荧光蛋白(生产菌自身含生物传感器、生产菌和感应菌共包埋培养)、细胞和底物(同时共包埋在液滴)	优点:操作简单,直接制备凝胶液滴 缺点:凝胶液滴需固化处理;无法进行液滴融合添加其他试剂	1~6 kHz (FACS分选仪); 30~40 Hz (COPAS大颗粒分选仪)	脂肪酶 <sup>[159]</sup> 、木聚糖酶 <sup>[160]</sup> 、氨基酸生产菌和大肠杆菌感应菌共培养 <sup>[170]</sup> 等

## 4 总结和展望

作为生物制造的重要核心，微生物工程菌株往往需要经过不断改造以满足实际的生产需求。在改造过程中，如何高效筛选是获得具有目标特性的工程菌株的关键之一，也是进行工程菌株选育的重要环节。对比传统的筛选方法，例如摇瓶（体积 mL 级，每天几十至百个样品）和微孔板（microplate）（体积  $\mu\text{L}$  级，每天几千至几万个样品），各种形式的液滴筛选（体积 pL~nL 级，每小时几十万到几百万个样品）通过减小体积来提高通量 [图 7(a)]。虽然已报道的大量应用案例 [10, 20, 60, 168, 171-173] 显示出液滴筛选技术在微生物工程菌株选育中的巨大应用前景和潜力，但在工程菌株的单细胞液滴制备、液滴检测技术、与合成生物学相匹配的自动化整合程度等方面仍有一些局限，值得进一步优化研究。首先，单细胞液滴制备技术常采用小液滴（体积 pL~nL 级），大液滴（体积  $\mu\text{L}$  级）由于每个液滴中包埋多个细胞只适用于抗逆菌株的适应性进化研究 [174]。目前单细胞液滴制备多根据泊松分布方式 [175]，即通过降低  $\lambda$  数值 ( $\lambda$ =细胞个数/液滴个数)，在存在大量空液滴状态下获得单细胞液滴（单细胞液滴率约 10%~30%）。如果需要对液滴进行重注入或液滴融合等操作，大量的空液滴会导致无效操作，降低筛选效率。通过对液滴预施加电压，并调整后续的分选电压大小，可以依据单细胞极化效应的差异

达到分离富集单细胞液滴的效果 [93]，在一定程度上提高了液滴后续操控和检测筛选效率。除此之外，通过采用离心通道、层级聚焦、超声聚焦等芯片或者挤压等物理干涉的方式能将哺乳动物的单细胞包埋率提高至 50% 以上 [176-178]，单凝胶颗粒包埋率提高至近乎 100% [179]。但是这些方法主要针对细胞体积较大或者规则的凝胶颗粒，而微生物工程菌株尤其是大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、谷氨酸棒杆菌等原核细菌，因菌株直径不规则且远小于通道内径，导致上述方法并不适用，所以仍然需要探索新的技术方法来提高单细胞液滴的生成效率。其次，由于荧光信号灵敏、特异性好，已报道的液滴检测分选案例中 90% 以上是基于荧光信号检测 [图 7(b)]，随着合成生物学的深入，越来越多的新型化合物将被创制，其中许多物质并不能简单地标记上荧光或者吸光度信号，它们亟待无损伤、免标记的检测技术来检测筛选，因此基于物质自身光谱和特征信号的检测方式如拉曼 (RADS)、图像识别 (IADS)、质谱 (MADS) 等研究开发将日益重要 [9, 180]。此外，由于液滴大小和稳定性的限制，现有技术无法进行非颗粒类型的细胞包埋和培养，后续通过液滴的优化改性进行丝状菌的长期培养和检测筛选将促进丝状工业菌种的选育应用 [10, 181]。最后，虽然液滴检测分选技术具有高通量和微型化的优势，但现有装置多是实验室研制 [10, 60]，近年来国内许多机构如中科院天津工业生物技术研究所 [107, 119]、中科院微生

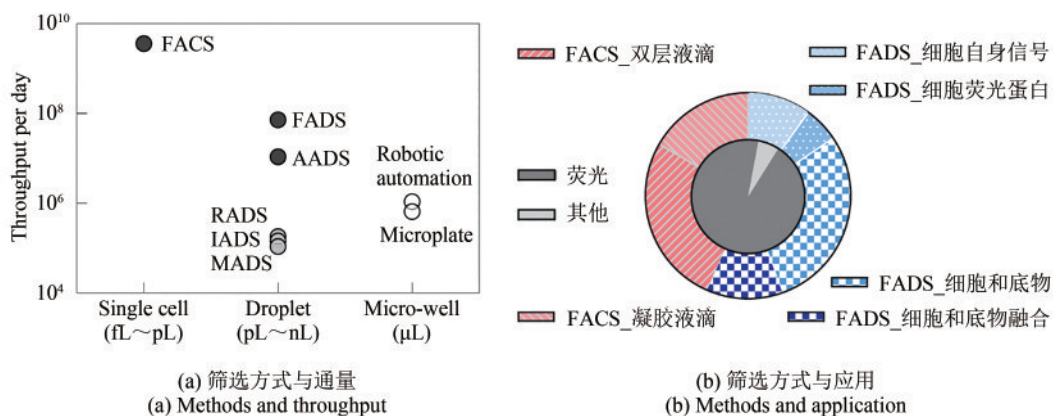


图7 筛选方式与通量和应用关系图

Fig. 7 Correlation for screening methods with throughput or application

AADS—Absorbance-Activated Droplet Sorting; FACS—Fluorescence-Activated Cell Sorting; FADS—Fluorescence-Activated Droplet Sorting; IADS—Image-Activated Droplet Sorting; MADS—Mass-Activated Droplet Sorting; RADS—Raman-Activated Droplet Sorting

物研究所<sup>[122]</sup>、上海交通大学<sup>[118]</sup>等也取得一定研究进展,但仍未广泛推广。少数国内公司的产品如DREM Cell、FlowRACS等也是以手动操作为主,无法与合成生物学的自动化平台整合。已报道的全自动商品化仪器CytoMine<sup>[100]</sup>虽然在操作上实现了全自动化,但存在仅适用抗体筛选和培养时间短等不足。因此,进一步开发自动化程度高、应用范围广的液滴微流控筛选装置,并集成至合成生物学自动化平台,是实现无人工的自动化操作、提高检测速度和降低成本的关键,将极大促进合成创制的效率,推动微生物合成生物学的快速发展。

### 参 考 文 献

- [1] 唐婷,付立豪,郭二鹏,等. 自动化合成生物技术与工程化设施平台[J]. 科学通报, 2021, 66(3): 300-309.  
TANG T, FU L H, GUO E P, et al. Automation in synthetic biology using biological foundries[J]. Chinese Science Bulletin, 2021, 66(3): 300-309.
- [2] FAULON J L, FAURE L. *In silico*, *in vitro*, and *in vivo* machine learning in synthetic biology and metabolic engineering[J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2021, 65: 85-92.
- [3] BROOKS S M, ALPER H S. Applications, challenges, and needs for employing synthetic biology beyond the lab[J]. Nature Communications, 2021, 12: 1390.
- [4] 李洋,申晓林,孙新晓,等. CRISPR 基因编辑技术在微生物合成生物学领域的研究进展[J]. 合成生物学, 2021, 2(1): 106-120.  
LI Y, SHEN X L, SUN X X, et al. Advances of CRISPR gene editing in microbial synthetic biology[J]. Synthetic Biology Journal, 2021, 2(1): 106-120.
- [5] YANG J N, KIM B, KIM G Y, et al. Synthetic biology for evolutionary engineering: from perturbation of genotype to acquisition of desired phenotype[J]. Biotechnology for Biofuels, 2019, 12: 113.
- [6] SMITH K M, LIAO J C. An evolutionary strategy for isobutanol production strain development in *Escherichia coli*[J]. Metabolic Engineering, 2011, 13(6): 674-681.
- [7] NEUENSCHWANDER M, BUTZ M, HEINTZ C, et al. A simple selection strategy for evolving highly efficient enzymes[J]. Nature Biotechnology, 2007, 25(10): 1145-1147.
- [8] VALLEJO D, NIKOORMANZAR A, PAEGEL B M, et al. Fluorescence-activated droplet sorting for single-cell directed evolution[J]. ACS Synthetic Biology, 2019, 8(6): 1430-1440.
- [9] LEAVELL M D, SINGH A H, KAUFMANN-MALAGA B B. High-throughput screening for improved microbial cell factories, perspective and promise[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2020, 62: 22-28.
- [10] YANG J H, TU R, YUAN H L, et al. Recent advances in droplet microfluidics for enzyme and cell factory engineering[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2021, 41(7): 1023-1045.
- [11] LEAMON J H, LINK D R, EGHOLM M, et al. Overview: methods and applications for droplet compartmentalization of biology[J]. Nature Methods, 2006, 3(7): 541-543.
- [12] LINDSTRÖM S, ANDERSSON-SVAHN H. Overview of single-cell analyses: microdevices and applications[J]. Lab on a Chip, 2010, 10(24): 3363-3372.
- [13] VAN TATENHOVE-PEL R J, et al. Microdroplet screening and selection for improved microbial production of extracellular compounds[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2020, 61: 72-81.
- [14] SESEN M, ALAN T, NEILD A. Droplet control technologies for microfluidic high throughput screening ( $\mu$ HTS)[J]. Lab on a Chip, 2017, 17(14): 2372-2394.
- [15] GUAN Z C, ZOU Y, ZHANG M X, et al. A highly parallel microfluidic droplet method enabling single-molecule counting for digital enzyme detection[J]. Biomicrofluidics, 2014, 8(1): 014110.
- [16] AGRETI J J, ANTIPOV E, ABATE A R, et al. Ultrahigh-throughput screening in drop-based microfluidics for directed evolution[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010, 107(9): 4004-4009.
- [17] LI M, LIU H R, ZHUANG S Y, et al. Droplet flow cytometry for single-cell analysis[J]. RSC Advances, 2021, 11(34): 20944-20960.
- [18] SOLANKI S, PANDEY C M, GUPTA R K, et al. Emerging trends in microfluidics based devices[J]. Biotechnology Journal, 2020, 15(5): e1900279.
- [19] DUSNY C, GRUNBERGER A. Microfluidic single-cell analysis in biotechnology: from monitoring towards understanding[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2020, 63: 26-33.
- [20] BOWMAN E K, ALPER H S. Microdroplet-assisted screening of biomolecule production for metabolic engineering applications[J]. Trends in Biotechnology, 2020, 38(7): 701-714.
- [21] WENG L D, SPOONAMORE J E. Droplet microfluidics-enabled high-throughput screening for protein engineering[J]. Micromachines, 2019, 10(11): 734.
- [22] GARCIA-CORDERO J L, MAERKL S J. Microfluidic systems for cancer diagnostics[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2020, 65: 37-44.
- [23] FENG H H, ZHENG T T, LI M Y, et al. Droplet-based microfluidics systems in biomedical applications[J]. Electrophoresis, 2019, 40(11): 1580-1590.
- [24] CHIU F W Y, STAVRAKIS S. High-throughput droplet-based microfluidics for directed evolution of enzymes[J]. Electrophoresis, 2019, 40(21): 2860-2872.
- [25] LONGWELL C K, LABANIEH L, COCHRAN J R. High-throughput screening technologies for enzyme engineering[J].

- Current Opinion in Biotechnology, 2017, 48: 196-202.
- [26] 马富强, 杨广宇. 基于液滴微流控技术的超高通量筛选体系及其在合成生物学中的应用[J]. 生物技术通报, 2017, 33(1): 83-92.
- MA F Q, YANG G Y. Ultra-high-throughput screening system based on droplet microfluidics and its applications in synthetic biology[J]. Biotechnology Bulletin, 2017, 33(1): 83-92.
- [27] KINTSES B, VAN VLIET L D, DEVENISH S R, et al. Microfluidic droplets: new integrated workflows for biological experiments[J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2010, 14(5): 548-555.
- [28] KAMINSKI T S, SCHELER O, GARSTECKI P. Droplet microfluidics for microbiology: techniques, applications and challenges[J]. Lab on a Chip, 2016, 16(12): 2168-2187.
- [29] SEEMANN R, BRINKMANN M, PFOHL T, et al. Droplet based microfluidics[J]. Reports on Progress in Physics, 2012, 75(1): 016601.
- [30] SHANG L R, CHENG Y, ZHAO Y J. Emerging droplet microfluidics[J]. Chemical Reviews, 2017, 117(12): 7964-8040.
- [31] JOENSSON H N, ANDERSSON SVAHN H. Droplet microfluidics—a tool for single-cell analysis[J]. Angewandte Chemie, 2012, 51(49): 12176-12192.
- [32] FERNANDES A C, GERNAEY K V, KRUHNE U, et al. “Connecting worlds—a view on microfluidics for a wider application”[J]. Biotechnology Advances, 2018, 36(4): 1341-1366
- [33] HASSAN S U, ZHANG X L, NIU X Z. Droplet-based microfluidics: formation, detection and analytical characterization[J]. Research & Development in Material Science, 2019, 11(5): 1227-1233.
- [34] KÖSTER S, ANGILÈ F E, DUAN H, et al. Drop-based microfluidic devices for encapsulation of single cells[J]. Lab on a Chip, 2008, 8(7): 1110-1115.
- [35] BAROUD C N, GALLAIRE F, DANGLA R. Dynamics of microfluidic droplets[J]. Lab on a Chip, 2010, 10(16): 2032-2045.
- [36] ANNA S L, BONTOUX N, STONE H A. Formation of dispersions using “flow focusing” in microchannels[J]. Applied Physics Letters, 2003, 82(3): 364-366.
- [37] LAGERMAN C E, LOPEZ ACEVEDO S N, FAHAD A S, et al. Ultrasonically-guided flow focusing generates precise emulsion droplets for high-throughput single cell analyses[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2019, 128(2): 226-233.
- [38] TAN S H, NGUYEN N T. Generation and manipulation of monodispersed ferrofluid emulsions: the effect of a uniform magnetic field in flow-focusing and T-junction configurations[J]. Physical Review E, Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics, 2011, 84(3 Pt 2): 036317.
- [39] ABATE A R, WEITZ D A. Syringe-vacuum microfluidics: a portable technique to create monodisperse emulsions[J]. Biomicrofluidics, 2011, 5(1): 14107.
- [40] JIANG Y Y, DU L, LI Y M, et al. A novel mechanism for user-friendly and self-activated microdroplet generation capable of programmable control[J]. Analyst, 2018, 143(16): 3798-3807.
- [41] ZHU X D, CHU J, WANG Y H. Advances in microfluidics applied to single cell operation[J]. Biotechnology Journal, 2018, 13(2): 1700416.
- [42] ZHU P A, WANG L Q. Passive and active droplet generation with microfluidics: a review[J]. Lab on a Chip, 2016, 17(1): 34-75.
- [43] YOBAS L, MARTENS S, ONG W L, et al. High-performance flow-focusing geometry for spontaneous generation of monodispersed droplets[J]. Lab on a Chip, 2006, 6(8): 1073-1079.
- [44] ABATE A R, MARY P, VAN STEIJN V, et al. Experimental validation of plugging during drop formation in a T-junction[J]. Lab on a Chip, 2012, 12(8): 1516-1521.
- [45] JUUL S, NIELSEN C J F, LABOURIAU R, et al. Droplet microfluidics platform for highly sensitive and quantitative detection of malaria-causing *Plasmodium parasites* based on enzyme activity measurement[J]. ACS Nano, 2012, 6(12): 10676-10683.
- [46] HU B Y, XU B X, YUN J L, et al. High-throughput single-cell cultivation reveals the underexplored rare biosphere in deep-sea sediments along the Southwest Indian Ridge[J]. Lab on a Chip, 2020, 20(2): 363-372.
- [47] VAN LOO B, HEBERLEIN M, MAIR P, et al. High-throughput, lysis-free screening for sulfatase activity using *Escherichia coli* autodisplay in microdroplets[J]. ACS Synthetic Biology, 2019, 8(12): 2690-2700.
- [48] SJOSTROM S L, BAI Y P, HUANG M T, et al. High-throughput screening for industrial enzyme production hosts by droplet microfluidics[J]. Lab on a Chip, 2014, 14(4): 806-813.
- [49] LIM J, VRIGNON J, GRUNER P, et al. Ultra-high throughput detection of single cell  $\beta$ -galactosidase activity in droplets using micro-optical lens array[J]. Applied Physics Letters, 2013, 103(20): 203704.
- [50] BARET J C. Surfactants in droplet-based microfluidics[J]. Lab on a Chip, 2012, 12(3): 422-433.
- [51] HOLTZE C, ROWAT A C, AGRESTI J J, et al. Biocompatible surfactants for water-in-fluorocarbon emulsions[J]. Lab on a Chip, 2008, 8(10): 1632-1639.
- [52] OBEXER R, GODINA A, GARRABOU X, et al. Emergence of a catalytic tetrad during evolution of a highly active artificial aldolase[J]. Nature Chemistry, 2017, 9(1): 50-56.
- [53] BENEYTON T, WIJAYA I P M, POSTROS P, et al. High-throughput screening of filamentous fungi using nanoliter-range droplet-based microfluidics[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 27223.
- [54] NAKAGAWA Y, OHNUKI S, KONDO N, et al. Are droplets really suitable for single-cell analysis? A case study on yeast in droplets[J]. Lab on a Chip, 2021, 21(19): 3793-3803.
- [55] YU Z Y, BOEHM C R, HIBBERD J M, et al. Droplet-based microfluidic analysis and screening of single plant cells[J]. PLoS One, 2018, 13(5): e0196810.

- [56] KINTSES B, HEIN C, MOHAMED M, et al. Picoliter cell lysate assays in microfluidic droplet compartments for directed enzyme evolution[J]. *Chemistry & Biology*, 2012, 19(8): 1001-1009.
- [57] COLIN P Y, KINTSES B, GIELEN F, et al. Ultrahigh-throughput discovery of promiscuous enzymes by picodroplet functional metagenomics[J]. *Nature Communications*, 2015, 6: 10008.
- [58] DAGKESAMANSKAYA A, LANGER K, TAUZIN A S, et al. Use of photoswitchable fluorescent proteins for droplet-based microfluidic screening[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2018, 147: 59-65.
- [59] NEUN S, ZUREK P J, KAMINSKI T S, et al. Ultrahigh throughput screening for enzyme function in droplets[J]. *Methods in Enzymology*, 2020, 643: 317-343.
- [60] BOUZETOS E, GANAR K A, MASTROBATTISTA E, et al. (R)evolution-on-a-chip[J]. *Trends in Biotechnology*, 2022, 40(1): 60-76.
- [61] MAZUTIS L, BARET J C, GRIFFITHS A D. A fast and efficient microfluidic system for highly selective one-to-one droplet fusion[J]. *Lab on a Chip*, 2009, 9(18): 2665-2672.
- [62] ABATE A R, HUNG T, MARY P, et al. High-throughput injection with microfluidics using picoinjectors[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(45): 19163-19166.
- [63] 申峰, 李易, 刘赵淼, 等. 基于微流控技术的微液滴融合研究进展[J]. *分析化学*, 2015, 43(12): 1942-1954.
- SHEN F, LI Y, LIU Z M, et al. Advances in micro-droplets coalescence using microfluidics[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2015, 43(12): 1942-1954.
- [64] YOON D H, TANAKA D, SEKIGUCHI T, et al. Size-dependent and property-independent passive microdroplet sorting by droplet transfer on dot rails[J]. *Micromachines*, 2018, 9(10): 513.
- [65] BAIGL D. Photo-actuation of liquids for light-driven microfluidics: state of the art and perspectives[J]. *Lab on a Chip*, 2012, 12(19): 3637-3653.
- [66] FANG T, SHANG W H, LIU C, et al. Nondestructive identification and accurate isolation of single cells through a chip with Raman optical tweezers[J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(15): 9932-9939.
- [67] AHN K, KERBAGE C, HUNT T P, et al. Dielectrophoretic manipulation of drops for high-speed microfluidic sorting devices[J]. *Applied Physics Letters*, 2006, 88(2): 024104.
- [68] BURYK-IGGERS S, KIEDA J, TSAI S S H. Diamagnetic droplet microfluidics applied to single-cell sorting[J]. *AIP Advances*, 2019, 9(7): 075106.
- [69] FRANKE T, ABATE A R, WEITZ D A, et al. Surface acoustic wave (SAW) directed droplet flow in microfluidics for PDMS devices[J]. *Lab on a Chip*, 2009, 9(18): 2625-2627.
- [70] WU L, CHEN P, DONG Y S, et al. Encapsulation of single cells on a microfluidic device integrating droplet generation with fluorescence-activated droplet sorting[J]. *Biomedical Microdevices*, 2013, 15(3): 553-560.
- [71] HOCHSTETTER A. Lab-on-a-chip technologies for the single cell level: separation, analysis, and diagnostics[J]. *Micromachines*, 2020, 11(5): 468.
- [72] FU X Z, ZHANG Y Y, XU Q, et al. Recent advances on sorting methods of high-throughput droplet-based microfluidics in enzyme directed evolution[J]. *Frontiers in Chemistry*, 2021, 9: 666867.
- [73] 林路遥, 林金明. 微流控芯片上细胞培养与分析方法研究进展[J]. *分析科学学报*, 2017, 33(5): 707-714.
- LIN L Y, LIN J M. Development of cell culture and analysis on microfluidic devices[J]. *Journal of Analytical Science*, 2017, 33(5): 707-714.
- [74] 梁怡萧, 潘建章, 方群. 基于微流控技术的细胞水平高通量药物筛选系统的研究进展[J]. *色谱*, 2021, 39(6): 567-577.
- LIANG Y X, PAN J Z, FANG Q. Research advances of high-throughput cell-based drug screening systems based on microfluidic technique[J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2021, 39(6): 567-577.
- [75] MAO Z M, GUO F, XIE Y L, et al. Label-free measurements of reaction kinetics using a droplet-based optofluidic device[J]. *Journal of Laboratory Automation*, 2015, 20(1): 17-24.
- [76] ULLMAN G, WALLDEN M, MARKLUND E G, et al. High-throughput gene expression analysis at the level of single proteins using a microfluidic turbidostat and automated cell tracking[J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences*, 2013, 368(1611): 20120025.
- [77] GU S Q, LU Y L, DING Y P, et al. Droplet-based microfluidics for dose-response assay of enzyme inhibitors by electrochemical method[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2013, 796: 68-74.
- [78] WANG X X, REN L H, SU Y T, et al. Raman-activated droplet sorting (RADS) for label-free high-throughput screening of microalgal single-cells[J]. *Analytical Chemistry*, 2017, 89(22): 12569-12577.
- [79] WANG X X, XIN Y, REN L H, et al. Positive dielectrophoresis-based Raman-activated droplet sorting for culture-free and label-free screening of enzyme function *in vivo*[J]. *Science Advances*, 2020, 6(32): eabb3521.
- [80] GUL B, ASHRAF S, KHAN S, et al. Cell refractive index: models, insights, applications and future perspectives[J]. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2021, 33: 102096.
- [81] LEBLANC-HOTTE A, CHABOT-ROY G, ODAGIU L, et al. High-throughput refractive index-based microphotonic sensor for enhanced cellular discrimination[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2018, 266: 255-262.
- [82] LIU X, PAINTER R E, ENESA K, et al. High-throughput screening of antibiotic-resistant bacteria in picodroplets[J]. *Lab on a Chip*, 2016, 16(9): 1636-1643.
- [83] HAUSER P C, KUBÁŇ P. Capacitively coupled contactless conductivity detection for analytical techniques-developments from 2018 to 2020[J]. *Journal of Chromatography A*, 2020,

- 1632: 461616.
- [84] KIRCHMAIR J, HOWLETT A, PEIRONCELY J E, et al. How do metabolites differ from their parent molecules and how are they excreted? [J]. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2013, 53(2): 354-367.
- [85] GU S Q, LU Y L, DING Y P, et al. A droplet-based microfluidic electrochemical sensor using platinum-black microelectrode and its application in high sensitive glucose sensing[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2014, 55: 106-112.
- [86] SHAHAMIRIFARD S A, GHAEDI M, RAZMI Z, et al. A simple ultrasensitive electrochemical sensor for simultaneous determination of gallic acid and uric acid in human urine and fruit juices based on zirconia-choline chloride-gold nanoparticles-modified carbon paste electrode[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2018, 114: 30-36.
- [87] ZHU Y, FANG Q. Analytical detection techniques for droplet microfluidics - a review[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2013, 787: 24-35.
- [88] 李智磊, 李静岚, 陈缙光, 等. 微流控芯片技术在药物分析领域的研究进展[J]. *中国药房*, 2019, 30(16): 2279-2284.
- LI Z L, LI J L, CHEN Z G, et al. Research progress of microfluidic chip technology in the field of drug analysis [J]. *China Pharmacy*, 2019, 30(16): 2279-2284.
- [89] WU J, WANG S Q, CHEN Q S, et al. Cell-patterned glass spray for direct drug assay using mass spectrometry[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2015, 892: 132-139.
- [90] KEMPA E E, SMITH C A, LI X, et al. Coupling droplet microfluidics with mass spectrometry for ultrahigh-throughput analysis of complex mixtures up to and above 30 Hz[J]. *Analytical Chemistry*, 2020, 92(18): 12605-12612.
- [91] DIFENBACH X W, FARASAT I, GUETSCHOW E D, et al. Enabling biocatalysis by high-throughput protein engineering using droplet microfluidics coupled to mass spectrometry[J]. *ACS Omega*, 2018, 3(2): 1498-1508.
- [92] BARET J C, MILLER O J, TALY V, et al. Fluorescence-activated droplet sorting (FADS): efficient microfluidic cell sorting based on enzymatic activity[J]. *Lab on a Chip*, 2009, 9(13): 1850-1858.
- [93] RAO L, CAI B, WANG J L, et al. A microfluidic electrostatic separator based on pre-charged droplets[J]. *Sensors & Actuators B: Chemical*, 2015, 210: 328-335.
- [94] GIELEN F, HOURS R, EMOND S, et al. Ultrahigh-throughput-directed enzyme evolution by absorbance-activated droplet sorting (AADS)[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(47): E7383-E7389.
- [95] HELLMICH W, PELARGUS C, LEFFHALM K, et al. Single cell manipulation, analytics, and label-free protein detection in microfluidic devices for systems nanobiology[J]. *Electrophoresis*, 2005, 26(19): 3689-3696.
- [96] HENGOJU S, WOHLFEIL S, MUNSER A S, et al. Optofluidic detection setup for multi-parametric analysis of microbiological samples in droplets[J]. *Biomicrofluidics*, 2020, 14(2): 024109.
- [97] CHABINYC M L, CHIU D T, MCDONALD J C, et al. An integrated fluorescence detection system in poly(dimethylsiloxane) for microfluidic applications[J]. *Analytical Chemistry*, 2001, 73(18): 4491-4498.
- [98] HUANG N T, TRUXAL S C, TUNG Y C, et al. Multiplexed spectral signature detection for microfluidic color-coded bioparticle flow[J]. *Analytical Chemistry*, 2010, 82(22): 9506-9512.
- [99] 涂然, 王钦宏. 新一代高通量筛选系统:液滴微流控分选系统研究进展[M]//马延和. 2013 工业生物技术发展报告. 北京: 科学出版社, 2013: 155-165.
- TU R, WANG Q H. Next generation of high-throughput screening system: research advances in droplet microfluidic screening system[M]//MA Y H. 2013 Industrial biotechnology development report. Beijing: Science Press, 2013: 155-165.
- [100] JOSEPHIDES D, DAVOLI S, WHITLEY W, et al. Cyto-mine: an integrated, picodroplet system for high-throughput single-cell analysis, sorting, dispensing, and monoclonality assurance[J]. *SLAS Technology*, 2020, 25(2): 177-189.
- [101] OTA Y, SAITO K, TAKAGI T, et al. Fluorescent nucleic acid probe in droplets for bacterial sorting (FNAP-sort) as a high-throughput screening method for environmental bacteria with various growth rates[J]. *PLoS One*, 2019, 14(4): e0214533.
- [102] BEST R J, LYCZAKOWSKI J J, ABALDE-CELA S, et al. Label-free analysis and sorting of microalgae and cyanobacteria in microdroplets by intrinsic chlorophyll fluorescence for the identification of fast growing strains[J]. *Analytical Chemistry*, 2016, 88(21): 10445-10451.
- [103] CHEN J, VESTERGAARD M, JENSEN T G, et al. Finding the needle in the haystack-the use of microfluidic droplet technology to identify vitamin-secreting lactic acid bacteria[J]. *mBio*, 2017, 8(3): e00526-e00517.
- [104] HOLLAND-MORITZ D A, WISMER M K, MANN B F, et al. Mass activated droplet sorting (MADS) enables high-throughput screening of enzymatic reactions at nanoliter scale[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2020, 59(11): 4470-4477.
- [105] GIRAULT M, KIM H, ARAKAWA H, et al. An on-chip imaging droplet-sorting system: a real-time shape recognition method to screen target cells in droplets with single cell resolution[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 40072.
- [106] SESEN M, WHYTE G. Image-based single cell sorting automation in droplet microfluidics[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10: 8736.
- [107] TU R, LI L P, YUAN H L, et al. Biosensor-enabled droplet microfluidic system for the rapid screening of 3-dehydroshikimic acid produced in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2020, 47(12): 1155-1160.
- [108] KIM S, JIN S H, LIM H G, et al. Synthetic cellular communi-

- cation-based screening for strains with improved 3-hydroxypropionic acid secretion[J]. *Lab on a Chip*, 2021, 21(22): 4455-4463.
- [109] SIEDLER S, KHATRI N K, ZSOHÁR A, et al. Development of a bacterial biosensor for rapid screening of yeast *p*-coumaric acid production[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2017, 6(10): 1860-1869.
- [110] SALESKI T E, KERNER A R, CHUNG M T, et al. Syntrophic co-culture amplification of production phenotype for high-throughput screening of microbial strain libraries[J]. *Metabolic Engineering*, 2019, 54: 232-243.
- [111] FALLAH-ARAGHI A, BARET J C, RYCKELYNCK M, et al. A completely *in vitro* ultrahigh-throughput droplet-based microfluidic screening system for protein engineering and directed evolution[J]. *Lab on a Chip*, 2012, 12(5): 882-891.
- [112] BENEYTON T, COLDREN F, BARET J C, et al. CotA lacase: high-throughput manipulation and analysis of recombinant enzyme libraries expressed in *E. coli* using droplet-based microfluidics[J]. *Analyst*, 2014, 139(13): 3314-3323.
- [113] NAJAH M, CALBRIX R, MAHENDRA-WIJAYA I P, et al. Droplet-based microfluidics platform for ultra-high-throughput bioprospecting of cellulolytic microorganisms[J]. *Chemistry & Biology*, 2014, 21(12): 1722-1732.
- [114] ZHANG G Q, CHEN Y K, LI Q H, et al. Growth-coupled evolution and high-throughput screening assisted rapid enhancement for amylase-producing *Bacillus licheniformis*[J]. *Biore-source Technology*, 2021, 337: 125467.
- [115] HUANG M T, BAI Y P, SJOSTROM S L, et al. Microfluidic screening and whole-genome sequencing identifies mutations associated with improved protein secretion by yeast[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(34): E4689-E4696.
- [116] NAJAH M, MAYOT E, MAHENDRA-WIJAYA I P, et al. New glycosidase substrates for droplet-based microfluidic screening[J]. *Analytical Chemistry*, 2013, 85(20): 9807-9814.
- [117] OBEXER R, POTT M, ZEYMER C, et al. Efficient laboratory evolution of computationally designed enzymes with low starting activities using fluorescence-activated droplet sorting[J]. *Protein Engineering, Design and Selection*, 2016, 29(9): 355-366.
- [118] MA F Q, CHUNG M T, YAO Y, et al. Efficient molecular evolution to generate enantioselective enzymes using a dual-channel microfluidic droplet screening platform[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 1030.
- [119] HE R L, DING R H, HEYMAN J A, et al. Ultra-high-throughput picoliter-droplet microfluidics screening of the industrial cellulase-producing filamentous fungus *Trichoderma reesei*[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2019, 46(11): 1603-1610.
- [120] KIM H S, HSU S C, HAN S I, et al. High-throughput droplet microfluidics screening platform for selecting fast-growing and high lipid-producing microalgae from a mutant library[J]. *Plant Direct*, 2017, 1(3): e00011.
- [121] BENEYTON T, THOMAS S, GRIFFITHS A D, et al. Droplet-based microfluidic high-throughput screening of heterologous enzymes secreted by the yeast *Yarrowia lipolytica*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2017, 16(1): 18.
- [122] QIAO Y X, ZHAO X Y, ZHU J, et al. Fluorescence-activated droplet sorting of lipolytic microorganisms using a compact optical system[J]. *Lab on a Chip*, 2017, 18(1): 190-196.
- [123] ABALDE-CELA S, GOULD A, LIU X, et al. High-throughput detection of ethanol-producing cyanobacteria in a microdroplet platform[J]. *Journal of the Royal Society, Interface*, 2015, 12(106): 20150216.
- [124] EL DEBS B, UTHARALA R, BALYASNIKOVA I V, et al. Functional single-cell hybridoma screening using droplet-based microfluidics[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(29): 11570-11575.
- [125] RYCKELYNCK M, BAUDREY S, RICK C, et al. Using droplet-based microfluidics to improve the catalytic properties of RNA under multiple-turnover conditions[J]. *RNA*, 2015, 21(3): 458-469.
- [126] HOLSTEIN J M, GYLSTORFF C, HOLLFELDER F. Cell-free directed evolution of a protease in microdroplets at ultra-high throughput[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2021, 10(2): 252-257.
- [127] 陈朱波, 曹雪涛. 流式细胞术——原理、操作及应用[M]. 2版. 北京: 科学出版社, 2014.
- CHEN Z B, CAO X T. Flow cytometry-principles, operation and applications [M]. 2nd ed. Beijing: Science Press, 2014.
- [128] MILLER O J, BERNATH K, AGRETI J J, et al. Directed evolution by *in vitro* compartmentalization[J]. *Nature Methods*, 2006, 3(7): 561-570.
- [129] MOHAMED M G A, AMBHORKAR P, SAMANIPOUR R, et al. Microfluidics-based fabrication of cell-laden microgels[J]. *Biomicrofluidics*, 2020, 14(2): 021501.
- [130] KAMPERMAN T, KARPERIEN M, LE GAC S, et al. Single-cell microgels: technology, challenges, and applications[J]. *Trends in Biotechnology*, 2018, 36(8): 850-865.
- [131] BERNATH K, HAI M, MASTROBATTISTA E, et al. *In vitro* compartmentalization by double emulsions: sorting and gene enrichment by fluorescence activated cell sorting[J]. *Analytical Biochemistry*, 2004, 325(1): 151-157.
- [132] MASTROBATTISTA E, TALY V, CHANUDET E, et al. High-throughput screening of enzyme libraries: *in vitro* evolution of a  $\beta$ -galactosidase by fluorescence-activated sorting of double emulsions[J]. *Chemistry & Biology*, 2005, 12(12): 1291-1300.
- [133] WU N, OAKESHOTT J G, EASTON C J, et al. A double-emulsion microfluidic platform for *in vitro* green fluorescent protein expression[J]. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 2011, 21(5): 054032.

- [134] AHARONI A, AMITAI G, BERNATH K, et al. High-throughput screening of enzyme libraries: thiolactonases evolved by fluorescence-activated sorting of single cells in emulsion compartments[J]. *Chemistry & Biology*, 2005, 12(12): 1281-1289.
- [135] GUPTA R D, GOLDSMITH M, ASHANI Y, et al. Directed evolution of hydrolases for prevention of G-type nerve agent intoxication[J]. *Nature Chemical Biology*, 2011, 7(2): 120-125.
- [136] MA F Q, XIE Y, HUANG C, et al. An improved single cell ultrahigh throughput screening method based on *in vitro* compartmentalization[J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e89785.
- [137] MA F Q, FISCHER M, HAN Y B, et al. Substrate engineering enabling fluorescence droplet entrapment for IVC-FACS-based ultrahigh-throughput screening[J]. *Analytical Chemistry*, 2016, 88(17): 8587-8595.
- [138] MA F Q, GUO T J, ZHANG Y F, et al. An ultrahigh-throughput screening platform based on flow cytometric droplet sorting for mining novel enzymes from metagenomic libraries[J]. *Environmental Microbiology*, 2021, 23(2): 996-1008.
- [139] ZINCHENKO A, DEVENISH S R A, KINTSES B, et al. One in a million: flow cytometric sorting of single cell-lysate assays in monodisperse picolitre double emulsion droplets for directed evolution[J]. *Analytical Chemistry*, 2014, 86(5): 2526-2533.
- [140] LARSEN A C, DUNN M R, HATCH A, et al. A general strategy for expanding polymerase function by droplet microfluidics[J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 11235.
- [141] ZHANG Y, HO Y P, CHIU Y L, et al. A programmable microenvironment for cellular studies *via* microfluidics-generated double emulsions[J]. *Biomaterials*, 2013, 34(19): 4564-4572.
- [142] CHAN H F, MA S, TIAN J, et al. High-throughput screening of microchip-synthesized genes in programmable double-emulsion droplets[J]. *Nanoscale*, 2017, 9(10): 3485-3495.
- [143] TU R, MARTINE Z R, PRODANOVIC R, et al. A flow cytometry-based screening system for directed evolution of proteases[J]. *Journal of Biomolecular Screening*, 2011, 16(3): 285-294.
- [144] OSTAFE R, PRODANOVIC R, COMMANDEUR U et al. Flow cytometry-based ultra-high-throughput screening assay for cellulase activity[J]. *Analytical Biochemistry*, 2013, 435(1): 93-98.
- [145] TEREKHOV S S, SMIRNOV I V, STEPANOVA A V, et al. Microfluidic droplet platform for ultrahigh-throughput single-cell screening of biodiversity[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(10): 2550-2555.
- [146] WAGNER J M, LIU L, YUAN S F, et al. A comparative analysis of single cell and droplet-based FACS for improving production phenotypes: riboflavin overproduction in *Yarrowia lipolytica*[J]. *Metabolic Engineering*, 2018, 47: 346-356.
- [147] ZHU X D, SHI X, WANG S W, et al. High-throughput screening of high lactic acid-producing *Bacillus coagulans* by droplet microfluidic based flow cytometry with fluorescence activated cell sorting[J]. *RSC Advances*, 2019, 9(8): 4507-4513.
- [148] GRIFFITHS A D, TAWFIK D S. Man-made enzymes — from design to *in vitro* compartmentalisation[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2000, 11(4): 338-353.
- [149] KÖRFER G, PITZLER C, VOJCIC L, et al. *In vitro* flow cytometry-based screening platform for cellulase engineering[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 26128.
- [150] LIM S W, ABATE A R. Ultrahigh-throughput sorting of microfluidic drops with flow cytometry[J]. *Lab on a Chip*, 2013, 13(23): 4563-4572.
- [151] BROWER K K, CARSWELL-CRUMPTON C, KLEMM S, et al. Double emulsion flow cytometry with high-throughput single droplet isolation and nucleic acid recovery[J]. *Lab on a Chip*, 2020, 20(12): 2062-2074.
- [152] 白立宽, 袁会领, 涂然, 等. 一种基于微芯片快速生成双层乳化液滴的方法[J]. *生物工程学报*, 2020, 36(7): 1405-1413.
- [153] BAI L K, YUAN H L, TU R, et al. Rapid generation of double-layer emulsion droplets based on microfluidic chip[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2020, 36(7): 1405-1413.
- [154] LENG X F, ZHANG W H, WANG C M, et al. Agarose droplet microfluidics for highly parallel and efficient single molecule emulsion PCR[J]. *Lab on a Chip*, 2010, 10(21): 2841-2843.
- [155] BEER N R, WHEELER E K, LEE-HOUGHTON L, et al. On-chip single-copy real-time reverse-transcription PCR in isolated picoliter droplets[J]. *Analytical Chemistry*, 2008, 80(6): 1854-1858.
- [156] ZHANG H F, JENKINS G, ZOU Y, et al. Massively parallel single-molecule and single-cell emulsion reverse transcription polymerase chain reaction using agarose droplet microfluidics[J]. *Analytical Chemistry*, 2012, 84(8): 3599-3606.
- [157] FITZSIMONS M S, NOVOTNY M, LO C C, et al. Nearly finished genomes produced using gel microdroplet culturing reveal substantial intraspecies genomic diversity within the human microbiome[J]. *Genome Research*, 2013, 23(5): 878-888.
- [158] DICHOSA A E K, DAUGHTON A R, REITENGA K G, et al. Capturing and cultivating single bacterial cells in gel microdroplets to obtain near-complete genomes[J]. *Nature Protocols*, 2014, 9(3): 608-621.
- [159] FISCHLECHNER M, SCHAERLI Y, MOHAMED M F, et al. Evolution of enzyme catalysts caged in biomimetic gel-shell beads[J]. *Nature Chemistry*, 2014, 6(9): 791-796.
- [160] HOSOKAWA M, HOSHINO Y, NISHIKAWA Y, et al. Droplet-based microfluidics for high-throughput screening of a metagenomic library for isolation of microbial enzymes[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2015, 67: 379-385.
- [161] MA C X, TAN Z L, LIN Y, et al. Gel microdroplet-based high-throughput screening for directed evolution of xylanase-producing *Pichia pastoris*[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2019, 128(6): 662-668.
- [162] LI M, VAN ZEE M, RICHE C T, et al. A gelatin microdroplet platform for high-throughput sorting of hyperproducing single-cell-derived microalgal clones[J]. *Small*, 2018, 14(44): e1803315.

- [162] AKBARI S, PIRBODAGHI T. A droplet-based heterogeneous immunoassay for screening single cells secreting antigen-specific antibodies[J]. *Lab on a Chip*, 2014, 14(17): 3275-3280.
- [163] UTECH S, PRODANOVIC R, MAO A S, et al. Microfluidic generation of monodisperse, structurally homogeneous alginate microgels for cell encapsulation and 3D cell culture[J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2015, 4(11): 1628-1633.
- [164] SHAO F, YU L, ZHANG Y, et al. Microfluidic encapsulation of single cells by alginate microgels using a trigger-gellified strategy[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2020, 8: 583065.
- [165] CHA C, OH J, KIM K, et al. Microfluidics-assisted fabrication of gelatin-silica core-shell microgels for injectable tissue constructs[J]. *Biomacromolecules*, 2014, 15(1): 283-290.
- [166] WANG H, LIU H T, LIU H, et al. One-step generation of core-shell gelatin methacrylate (GelMA) microgels using a droplet microfluidic system[J]. *Advanced Materials Technologies*, 2019, 4(6): 1800632.
- [167] WANG J T, WANG J, HAN J J. Fabrication of advanced particles and particle-based materials assisted by droplet-based microfluidics[J]. *Small*, 2011, 7(13): 1728-1754.
- [168] MARKEL U, ESSANI K D, BESIRLIOGLU V, et al. Advances in ultrahigh-throughput screening for directed enzyme evolution[J]. *Chemical Society Reviews*, 2020, 49(1): 233-262.
- [169] DELGADO-RAMOS L, MARCOS A T, RAMOS-GUELFO M S, et al. Flow cytometry of microencapsulated colonies for genetics analysis of filamentous fungi[J]. *G3 Genes|Genomes|Genetics*, 2014, 4(11): 2271-2278.
- [170] MEYER A, PELLAUX R, POTOT S, et al. Optimization of a whole-cell biocatalyst by employing genetically encoded product sensors inside nanolitre reactors[J]. *Nature Chemistry*, 2015, 7(8): 673-678.
- [171] PAYNE E M, HOLLAND-MORITZ D A, SUN S W, et al. High-throughput screening by droplet microfluidics: perspective into key challenges and future prospects[J]. *Lab on a Chip*, 2020, 20(13): 2247-2262.
- [172] BUNZEL H A, GARRABOU X, POTT M, et al. Speeding up enzyme discovery and engineering with ultrahigh-throughput methods[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2018, 48: 149-156.
- [173] BJORK S M, JOENSSON H N. Microfluidics for cell factory and bioprocess development[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2019, 55: 95-102.
- [174] JIAN X J, GUO X J, WANG J, et al. Microbial microdroplet culture system (MMC): an integrated platform for automated, high-throughput microbial cultivation and adaptive evolution[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2020, 117(6): 1724-1737.
- [175] MAZUTIS L, GILBERT J, UNG W L, et al. Single-cell analysis and sorting using droplet-based microfluidics[J]. *Nature Protocols*, 2013, 8(5): 870-891.
- [176] LING S D, GENG Y H, CHEN A, et al. Enhanced single-cell encapsulation in microfluidic devices: from droplet generation to single-cell analysis[J]. *Biomicrofluidics*, 2020, 14(6): 061508.
- [177] COLLINS D J, NEILD A, DEMELLO A, et al. The Poisson distribution and beyond: methods for microfluidic droplet production and single cell encapsulation[J]. *Lab on a Chip*, 2015, 15(17): 3439-3459.
- [178] MUTAFOPULOS K, LU P J, GARRY R, et al. Selective cell encapsulation, lysis, pico-injection and size-controlled droplet generation using traveling surface acoustic waves in a microfluidic device[J]. *Lab on a Chip*, 2020, 20(21): 3914-3921.
- [179] ABATE A R, CHEN C H, AGRETI J J, et al. Beating poisson encapsulation statistics using close-packed ordering[J]. *Lab on a Chip*, 2009, 9(18): 2628-2631.
- [180] HU B Y, XU P, MA L, et al. One cell at a time: droplet-based microbial cultivation, screening and sequencing[J]. *Marine Life Science & Technology*, 2021, 3(2): 169-188.
- [181] TU R, ZHANG Y, HUA E B, et al. Droplet-based microfluidic platform for high-throughput screening of *Streptomyces*[J]. *Communications Biology*, 2021, 4: 647.



通讯作者：王猛(1982—)，男，博士，研究员，博士生导师。研究方向为合成生物学、高通量自动化技术等。

E-mail: wangmeng@tib.cas.cn



第一作者：涂然(1979—)，女，博士，正高级工程师，教授，硕士生导师。研究方向为合成生物学、高通量检测和筛选技术等。

E-mail: tu\_r@ctbu.edu.cn