

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2022-043

拉曼光谱技术在单细胞表型检测与分选中的应用进展

王喜先, 孙晴, 刁志钿, 徐健, 马波

(中国科学院青岛生物能源与过程研究所 单细胞中心, 山东 青岛 266101)

摘要: 基因组测序、编辑与合成技术日新月异, 推动了基因型“设计”和“合成”能力的突飞猛进, 同时也使人工细胞的表型检测成为合成生物学发展的瓶颈之一。对于细胞功能的快速测试与评价, 单细胞分析技术具有重要意义与前景, 但理想的解决方案需要具备活体无损、非标记式、提供全景式表型、能分辨复杂功能、快速高通量且低成本、能与组学分析联动等特征。拉曼光谱技术具备上述所有特征, 能够提供单细胞的化学成分组成及分子结构等信息, 是一种高效的单细胞表型识别技术。本文首先概述了拉曼组概念和基于拉曼组的细胞功能表型识别, 包括代谢产物定性和定量、底物代谢和互作表征、细胞种类和状态鉴定以及环境应激检测等; 其次, 根据拉曼信号的分类、拉曼信号检测模式和目标细胞分选策略, 对现有的拉曼分选平台及其在细胞表型分选中的应用进行分析总结; 最后, 对单细胞拉曼光谱技术在合成细胞表型检测与分选面临的问题、潜在解决策略进行了探讨和展望。单细胞拉曼光谱技术不仅为细胞工厂的高通量、全景式表型检测与筛选提供了全新的解决方案, 还将推动“单细胞精度的表型组-功能基因组”作为一种新的生物大数据类型, 服务于“数据科学”驱动下的合成生物技术。

关键词: 合成生物学; 拉曼光谱技术; 细胞工厂; 单细胞表型识别; 高通量分选

中图分类号: Q939.97 **文献标志码:** A

Advances with applications of Raman spectroscopy in single-cell phenotype sorting and analysis

WANG Xixian, SUN Qing, DIAO Zhidian, XU Jian, MA Bo

(Single-cell Center, Qingdao Institute of Bioenergy and Bioprocess Technology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266101, Shandong, China)

Abstract: In synthetic biology, methodological innovations in sequencing, editing and synthesis of genes and whole genomes have resulted in unprecedented development in “design and manufacturing of genotypes”. On the other hand, “testing of cellular phenotypes and functions” has increasingly become one of major bottlenecks. Single-cell technologies have tremendous impacts and potentials in rapid testing of cellular phenotypes and functions. However,

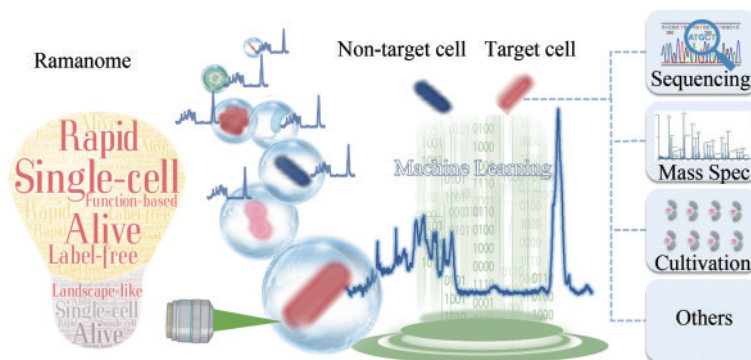
收稿日期: 2022-08-03 修回日期: 2022-09-12

基金项目: 国家重点研发计划“合成生物学”重点专项(2018YFA090290); 天津市合成生物技术创新能力提升行动项目(TSBICIP-PTJS-003-05)

引用本文: 王喜先, 孙晴, 刁志钿, 徐健, 马波. 拉曼光谱技术在单细胞表型检测与分选中的应用进展[J]. 合成生物学, 2023, 4(1): 204-224

Citation: WANG Xixian, SUN Qing, DIAO Zhidian, XU Jian, MA Bo. Advances with applications of Raman spectroscopy in single-cell phenotype sorting and analysis[J]. Synthetic Biology Journal, 2023, 4(1): 204-224

such single-cell methods should allow non-invasive live-cell probing, be label-free, provide landscape-like phenotype sorting, distinguish complex functions, operate with high speed, sufficient throughput and low-cost, and finally, be able to integrate with downstream omics analysis. Raman spectroscopy has all the above features, and can provide information on the chemical composition and molecular structure of single cells, making it an efficient single-cell phenotyping technology. In this review, we first introduce the concept of Ramanome and Ramanome-based phenotyping technologies, including detecting and quantifying products, measuring profiles of substrates and metabolites, discriminating cell types or states, and characterizing stress response and modeling environmental changes. We then summarize the development of existing Raman-activated cell sorting (RACS) platforms in phenotyping and sorting of cell factories such as including spontaneous Raman, resonance Raman, and coherent Raman, the modes for acquiring Raman signals including static modes on dry slice and in liquid as well, flow modes by trap-free and trap-and-release manners, and principles for target cells sorting including Ejection by pulsed laser, dragging by optical tweezer, and sorting by microfluidics operation and droplets. We also highlight the applications of different RACS platforms, including the sorting of carotenoid-producing yeast and cyanobacteria cells, astaxanthin (AXT)-hyperproducing microalgae cells, triacylglycerol (TAG)-producing yeast cells, etc. Finally, challenges with single cell Raman spectroscopy (SCRS) in the phenotyping and sorting of synthetic cells and their perspectives are outlined and discussed. We propose that SCRS will bridge phenotypes and genotypes in science and technologies through coupling with downstream high-throughput cell sorting and omics profiling. This bridge will lead to novel and creative solutions to high-throughput, landscape-like testing and screening of synthetic cells. Moreover, it will fulfill the promise of Raman spectroscopy-enabled single-cell “phenome-genome” as a new type of biological big-data, and accelerate the pace of “data-driven” synthetic biology.



Keywords: synthetic biology; Raman spectroscopy; cell factory; single-cell phenotyping; high-throughput sorting

自2000年《自然》(*Nature*)杂志报道人工合成基因线路研究成果以来,合成生物学研究在全世界范围内引起了广泛关注,被多个国家和国际组织机构评为未来的颠覆性技术^[1-3]。合成生物学的核心使命是在阐明并模拟生物合成基本规律的基础之上,人工设计并构建新的、具有特定生理功能的生物系统,从而建立药物、功能材料或能源替代品等的生物制造途径^[4]。其技术的跨越式发展,取决于“基因型设计”“基因型合成”与

“细胞表型测试”这三大共性技术环节(design-build-test)的突破^[5]。近年来,借助于芯片技术和下一代高通量测序平台,基因合成的通量、保真度和成本大幅度改进^[6-8]。基因编辑、组装及转移技术的进一步发展,更使得对生命体的改造从单基因操作进入了对整个基因组设计改造的时代^[9-14]。至此,业界构建突变体甚至人工细胞的能力已经突飞猛进。然而,细胞表型测试速度与通量的发展却缓慢得多,有时候甚至落后几个数量

级。例如，从基因型突变体库来筛选目标表型组合的细胞通常需要花费大量的人力、经费和时间[生产抗疟药前体的微生物细胞工厂的筛选约动用了150人·年(human-year)的工作量^[15-16]]。因此，细胞表型测试已成为合成生物技术发展的“限速步骤”之一。

无论是从天然环境中寻找、识别和鉴定生物元件与模块，还是表征、理解和筛选人工设计的基因回路与网络，关键环节之一均是其活性以及功能在活体细胞内的快速测试与评价。单个细胞是地球上生命的基本单元和进化的基本单位，因此，单细胞分析技术，即在单个细胞精度上的功能识别与表征，能够在最“深”的水平挖掘生命元件、刻画细胞功能与理解生命过程^[17-21]。同时，单细胞分析直接分析每个细胞个体的功能，因此可极大缩短培养周期甚至跳过烦琐且耗时的培养过程，从而克服环境中大部分微生物细胞尚难培养这一挑战，这对于从人体与环境微生物组中挖掘生物元件、模块或底盘细胞具有重大的意义^[22-23]。

对于细胞功能表型的快速测试而言，理想的单细胞分析/分选技术需要具备6个特征^[24-25]：①活体检测。在很多情况下，元件与模块的功能，只有在活体细胞中进行非侵入式的测量与探究才具有生物学意义。同时，活体检测意味着，经检测后的细胞可直接进行后续培养或其他操作。②无需标记。从天然元件挖掘的角度讲，自然界中微生物细胞是极为丰富的资源，但微生物群体又极其复杂，目前尚无广谱适用的细胞标记手段。从基于模式底盘细胞的优势菌株筛选角度讲，与潜在需要测量的细胞功能相比，能够利用荧光探针等对细胞进行标记的表型与功能仍极为有限。因此，非标记式的细胞检测具有重要优势。③提供全景式的表型信息。研究人员感兴趣的许多细胞功能是由多个表型共同反映或决定的，如果只测量单一的表型或单个化合物、蛋白、基因的表征，往往难以探测目标功能，而同时能提供多种表型乃至测量表型组的“全景式”分析则具有重要的优势。④能分辨复杂功能。许多重要甚至核心的细胞功能由多个基因共同反映或决定，因此针对单一蛋白或化合物分子的检测经常难以分辨与识

别这类功能。⑤快速、高通量且低成本。大体系突变体库中目标细胞的比例通常会低于万分之一，这对单细胞精度的表型分析速度、通量和成本都提出了很高的要求。⑥与单细胞功能基因组联动分析。单细胞精度的基因组、转录组、蛋白质、代谢组、表观组等是生命科学方法学研究前沿进展最迅速的领域之一^[26-28]。如果能够通过细胞分选，将单细胞表型或表型组的分析与这些单细胞功能基因组手段直接对接，将能够在真正意义上建立单细胞精度的“表型-基因型”模型，从而带来细胞个体、细胞群体乃至细胞群落层面合成生物学的突破。单细胞拉曼光谱技术具备上述所有特征，本文将主要总结近年来拉曼光谱技术在单细胞表型检测与分选中的应用进展，并讨论该领域的关键问题与发展方向。

1 拉曼组(Ramanome)技术是单细胞表型组(phenome)识别的创新工具

代谢物是细胞中基因表达的最终产物，也通常是细胞表型与功能的最直接载体，代谢表型能够了解细胞的功能提供最灵敏的动态画面，因此代谢物组的检测，包括代谢状态的识别，是细胞表型检测最直接、最有效的手段之一^[29]。质谱是一种高灵敏、高特异性、能够准确定量且具有强大的化合物结构解析能力的代谢表型检测手段，也是传统细胞表型测试的经典方法^[30]。虽然随着质谱检测技术的进一步发展，特别是质谱流式的问世^[31]，在一定程度上提高了质谱的单细胞表型检测能力^[32-34]，但是单个细胞特别是单个微生物细胞的代谢产物极为微量，且不具备核酸那样的可扩增属性，因此，传统基于质谱的合成细胞表型检测主要还是在“群体”水平。此外，基于质谱的检测手段均涉及细胞破碎，因此难以耦合目标单细胞的分选、培养或测序等单细胞组学技术。

1.1 基于荧光标记策略的单细胞表型检测

荧光检测方法具有超灵敏、高特异性、高可靠性和高通量等优势，是目前应用最为广泛的单

细胞表型检测技术之一^[35-36]。当目标表型具有自发荧光时,如色素类、生物碱类等产物,可直接通过检测自发荧光信号实现表型的识别表征^[37-40]。基于自发荧光信号的检测简单方便,然而自然界中大多数细胞或目标表型均没有自发荧光,因此需要对细胞进行外在的荧光标记。目前荧光标记策略已有很多,如荧光底物、荧光报告蛋白、核酸传感和免疫荧光等。荧光底物法在酶活筛选中应用最为广泛,标记了荧光基团的底物在酶的催化作用下可释放荧光基团从而产生荧光信号,根据荧光信号的强弱实现酶活检测^[41-43]。自绿色荧光报告蛋白 GFP 被发现以来,其他颜色荧光报告蛋白及其衍生物被广泛开发利用^[44-45]。荧光蛋白可作为融合蛋白检测目标蛋白的表达量,亦可作为报告蛋白(如转录因子生物传感器和核糖体生物传感器等)用于目标代谢产物的检测^[46-47]。核酸传感器主要包括核酸适配体和 DNA-fluorophore-quencher 荧光探针,通常具有特定的构象,而该构象会随着与目标物质的结合而发生改变,进而引起荧光信号的变化^[48-49]。免疫荧光法主要原理基础是抗原抗体的特异性结合,通过荧光标记的抗原或抗体与待测细胞表达的相应抗体或抗原结合,最终通过荧光信号实现表型的识别。基于上述日趋成熟的荧光标记技术并进一步耦合高通量分选策略发展的荧光流式分选(fluorescence-activated cell sorting, FACS)技术已成为当前应用最为广泛的单细胞表型识别与分选技术之一^[50],但传统 FACS 在分泌表型检测方面尚存在很大局限性。近年发展起来的基于液滴微流控的荧光激活液滴分选(fluorescence-activated droplet sorting, FADS)技术由于采用液滴包裹细胞,解决了传统 FACS 难以解决的细胞分泌表型检测这一难题^[51-53]。目前, FADS 已被广泛地用于哺乳动物细胞、微生物细胞等的高通量筛选^[54-58]。同时, Nitta 等^[59]通过耦合 FACS 和人工智能技术,开发了基于高通量高分辨度图像处理的单细胞表型检测分选平台(intelligent image-activated cell sorting, IACS)。Schraivogel 等^[60]通过开发高速多色荧光图像处理平台,开发了超高速(15 000 events/s)的基于荧光图像的细胞分选平台(high-speed image-enabled cell sorting, ICS)。此外,基于光谱流式技术的索尼 ID 7000™更是实现

了 40 色荧光分析,很大程度解决了传统 FACS 多色荧光干扰的难题^[61]。这些技术的发展极大拓展了 FACS 的应用范围,加速了合成生物学“检测”的环节,使之得以匹配“设计”和“合成”的吞吐量,促进了合成生物学的发展。

如前所述,尽管基于荧光的细胞表型检测具备诸多优点,但 FACS 通常需要外加荧光标记,因此在单细胞分选方面仍存在一定的局限性:①细胞适用性有限。自然界中绝大部分细胞,特别是微生物细胞,其生物标识物经常未知,也没有普适性的标记方法。同样地,绝大部分目标产物通常也缺乏特异性的荧光探针。因此,荧光检测的细胞类型适应范围相对较窄。②难以开展“原位”研究。胞内的荧光标记经常会改变细胞的原位状态,有时甚至会影响细胞活性,因此该方法通常仅限于能够进行胞外荧光标记的表型检测,而且难以进行真正意义上的“原位”研究。③难以获取全景式复杂表型。FACS 通常只能获得与区分很有限的细胞信息数据,如形态、折射率、反射率或荧光强度等有限指标,难以表征单细胞全景式的“代谢表型组”。即使针对哺乳动物细胞、大肠杆菌、酵母等模式底盘细胞体系的荧光探针及标记策略已很成熟,通常也难以用一种探针同时检测不同表型,如底物代谢活性、代谢产物谱等,往往需要同时进行多种标记,这就会增加操作的复杂性,并会对标记的稳定性带来干扰,且同时多标记的相互干扰也是问题。

1.2 基于非标记策略的单细胞表型检测

为克服荧光标记所带来的困扰,非标记的表型检测技术受到广泛关注。振动光谱技术,主要包括红外光谱和拉曼光谱^[62],作为一种新兴的非标记检测技术,已被广泛用于单细胞表型检测。

红外光谱通常采用近红外区多色光作为激发光源,激发样品中分子能级跃迁,进而检测其红外吸收光谱。近些年发展的同步辐射作为一种新型的红外光源,有效克服了传统碳硅棒(globar)光源亮度弱,单细胞检测灵敏度低的问题^[63]。但红外光谱最大的缺点是水分子的强红外吸收,而活体细胞中水分子占比较高,且测试往往需要在

水溶液中进行,这极大地限制了红外光谱技术在活体单细胞表型识别中的应用。

拉曼光谱是一种散射光谱,是化合物中分子键被激发到虚能态却尚未恢复到原始态所引起的入射光被散射后频率发生变化的现象^[64]。每个单细胞拉曼光谱由分别对应于一类化学键的超过1500个拉曼谱峰组成,该谱峰可作为单细胞特有的“分子指纹图”,进而反映出特定细胞内化学物质的成分及含量的多维信息[图1(a)]。特定时空状态下一个细胞群体的单细胞拉曼光谱的集合称为“拉曼组”[ramanome,见图1(b)]^[24, 65]。拉曼组在单细胞精度,可快速、低成本地测定与监控“代谢物组”,其变化可反映和表征该细胞体系全景式、几近无限的“状态”与“功能”。此外,水分子在关键的指纹区没有很强的信号干扰,使其具备活体检测的能力。因此,拉曼组技术具备理想单细胞表型分析/分选技术所需要的几乎所有特征,是单细胞表型组(phenome)识别的理想工具^[24, 66-67]。自然界中大多数细胞表型的自发拉曼信号较弱,为稳定提高拉曼检测的灵敏度,已发展了基于标记策略的表面增强拉曼探针技术(surface-enhanced Raman scattering, SERS)^[68]。通过检测SERS探针的强拉曼信号,已实现活体肿瘤的靶向检测^[69]、活细胞中多聚糖检测^[70]、糖基化蛋白的特异性检测^[71]、端粒长度评估^[72]、microRNA检测^[73]、细胞膜修复的动态追踪^[74]和单个活体细胞中O-GlcNAcylation成像研究^[75]等。虽然基于标记策略的SERS技术稳定提高了拉曼检测灵敏度,但其前提仍然需要标记,因此面临和

荧光标记相同的局限性。据此,本文将主要讨论基于非标记拉曼的细胞表型识别及分选。

2 基于拉曼组技术平台的细胞表型识别

基于拉曼光谱强大的表型识别能力,现已发展了一系列拉曼组技术平台。每个单细胞拉曼光谱均是一个信息丰富的生化指纹图谱,可指示细胞的代谢状态,因此可以基于单峰、多峰乃至全谱的组合模式进行建模从而解析不同细胞表型。最近,针对不同场景、不同细胞、不同表型的拉曼表型检测表明,拉曼组技术平台可以解析或预测不同细胞功能表型(图2),如在一定程度上量化检测细胞利用含氢^[76]、含碳^[77]等底物的代谢速率,测定各种拉曼敏感产物(色素^[78]、甘油三酯^[79]、淀粉^[80]、蛋白^[81]等)的多样性及其含量,表征细胞的环境应激性(如微生物药敏^[82]、微生物药物应激机制^[83]、肿瘤药敏性与药物应激机制^[84]等),检测细胞之间的代谢互作^[85],重建细胞内代谢物相互转化网络(拉曼组内关联分析,IRCA)^[86],也可区分不同的物种^[87]等。

2.1 基于拉曼组的合成产物检测

对于微生物细胞工厂而言,不同合成产物的同步化、高通量、低成本检测对于优势菌株的工程改造并选育以及相关机制的研究至关重要。相较于质谱(有损)和荧光(需标记)检测技术,

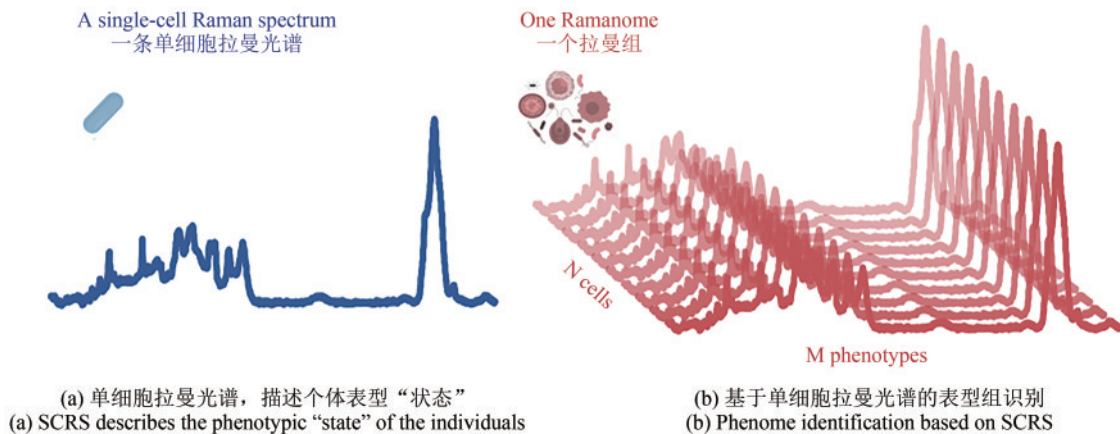


图1 拉曼组概念示意图^[24]

Fig. 1 Concept of Ramanome^[24]

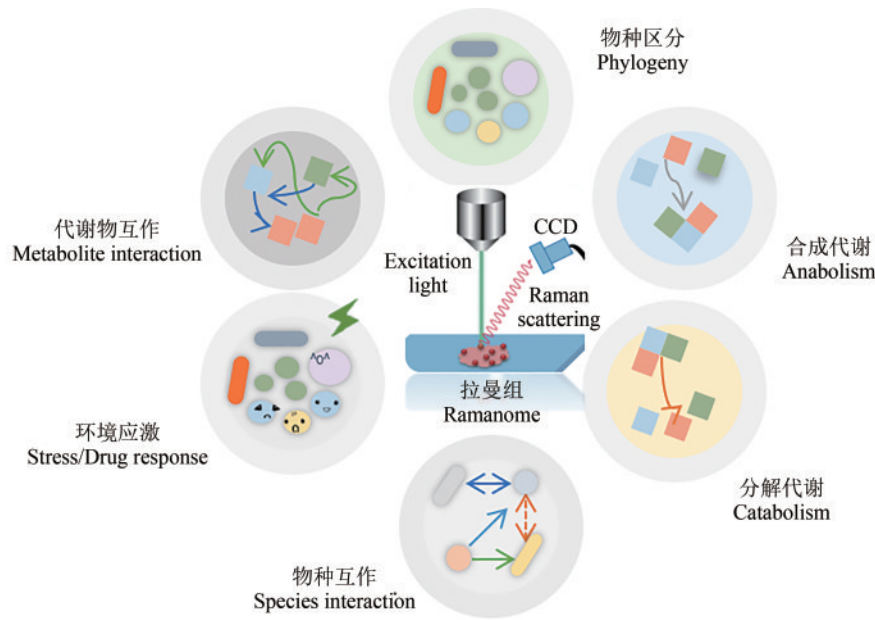


图2 拉曼组在单细胞精度所能反映的表型功能^[24]

Fig. 2 Cellular functions to be characterized by Ramanome^[24]

拉曼组技术可以在无损且非标记的状态下同步检测不同代谢产物。这些优势已使得拉曼组技术被广泛应用于不同细胞中不同合成产物的表征^[24, 67]。

2.1.1 类胡萝卜素

类胡萝卜素是一类在药物、食品、化妆品、保健品中广泛应用的功能性生物分子^[88-89]。由于类胡萝卜素中的强电子-光子耦合效应，其拉曼信号呈现共振拉曼效应，使得 1520 cm^{-1} （C=C弹性振动）、 1158 cm^{-1} （C—C振动）和 1007 cm^{-1} （甲基扭动）处的拉曼特征峰被极大增强^[90]。微藻是自然界中类胡萝卜素含量最高的生物资源之一，如雨生红球藻高产虾青素、硅藻高产藻黄素^[91]。在雨生红球藻中， 1520 cm^{-1} 处的拉曼峰强度和虾青素的含量高度相关，因此，该特征峰已被用于定量表征虾青素含量^[92-94]。基于共振拉曼光谱，Alexandre等实现了活体细胞中硅甲藻黄素和岩藻黄质的评估，并进一步探讨了硅甲藻黄素深度氧化为岩藻黄质的光保护机制^[95]。值得注意的是，由于光合色素通常具有相似的发色团，因此其拉曼光谱极其相似，仅通过原始拉曼光谱难以区分不同色素。Collin等^[92]通过开发多变量曲线分辨率算法（multivariate curve resolution, MCR）有效解决了上述问题，实现了雨生红球藻活细胞中虾青素、 β -胡萝卜素和叶绿素的区分，从而可以监

测虾青素的动态合成。

2.1.2 脂质

脂质在细胞功能的几乎所有方面均发挥着重要作用，如膜的构建、能量存储、信号转导等。中性脂质，如甘油三酯（TAG），既可作为作为保健品，亦可转化为生物柴油。因此，胞内甘油三酯的快速检测和定量极其重要。大多数脂质分子含有丰富的C—H、C=C、C—C键等，均呈现较强的拉曼特征峰，如 1650 cm^{-1} （C=C拉伸）、 1440 cm^{-1} （—CH₂扭曲）、 $2800\sim 3000\text{ cm}^{-1}$ （CH₂对称和非对称拉伸）等^[96]。基于该些特征峰，已实现模式细胞体系酵母、微藻等的总脂、甘油三酯及饱和度等拉曼表征^[79, 81, 96-98]。

2.1.3 多糖

多糖在工业上有着极为广泛的应用，如作为底物用于生物柴油和生物乙醇的生产。多糖分子通常含有丰富的C—C、C—H键和吡喃糖环等，均呈现较强的拉曼特征峰。研究表明， 478 cm^{-1} （吡喃糖环的骨架振动模式）处拉曼特征峰与细胞内淀粉含量呈现近乎线性相关性（ $R^2 = 0.9893$ ），因此该峰被广泛用于表征胞内淀粉含量^[80, 99-100]。同样地， 1050 cm^{-1} （C=O拉伸振动）特征峰与糖原高度相关，已被用于检测根瘤菌细胞中的糖原动力学^[101]。此外，纤维素（cellulose）、半纤维素

(hemicellulose) 和胶质 (pectin) 均具有明显的拉曼特征峰, 目前已实现基于拉曼光谱技术表征植物细胞壁的组成及结构^[102-104]。

2.1.4 其他产物

聚羟基脂肪酸酯 (polyhydroxyalkanoate, PHA) 是一种可被多种细菌生产的具有广泛应用价值的可生物降解酯。Samek等^[105]基于 1736 cm^{-1} 特征峰实现 *Cupriavidus necator* 细胞的胞内 PHA 快速识别和量化表征。Botryococenes 是一种液态烃类化合物, 可用作动力燃料。Weiss等^[106]基于 1640 cm^{-1} 和 1647 cm^{-1} 特征峰实现 *Botryococcus braunii* 细胞中 Botryococenes 合成和分布表征。两性霉素 B 是一种光谱抗生素。Miyaoaka等^[107]基于 1559 cm^{-1} 特征峰实现 *Streptomyces nodosus* 细胞中两性霉素 B 的合成检测, 为高产抗生素菌的筛选提供了新思路。

2.2 基于拉曼组的底物代谢检测

底物代谢及不同底物下细胞活性是细胞工厂的重要特征。稳定同位素探测 (stable isotope probing, SIP) 技术已被广泛用于代谢流分析及功能微生物细胞鉴定等^[108-109]。常用的稳定同位素包括 ^{13}C 、 ^{15}N 和 ^2H 等, 这些同位素的摄入会改变分子质量, 从而引起振动状态的改变, 最终使得细胞拉曼光谱发生变化^[110-112]。

2.2.1 ^{13}C 稳定同位素

对于光合细胞而言, 无机碳 (如 CO_2) 是主要碳源, 因此识别突变体库或环境样本中高效固定 CO_2 的细胞对于生物资源挖掘和生态研究至关重要。通过 ^{13}C 标记的碳酸氢钠作为碳源, 并耦合共振拉曼检测, Jing等和Li等成功从生物群体中发现了光合固碳细胞^[77, 113]。Venkata和Shigeto等通过在 *Schizosaccharomyces pombe* 细胞培养的底物中添加 ^{13}C 标记的葡萄糖, 并耦合时序拉曼成像发现 ^{13}C 被转化至蛋白和脂质中^[114]。除葡萄糖外, ^{13}C 标记的果糖、半乳糖、萘等也被添加到大肠杆菌、芽孢杆菌等细胞的培养基中, 通过检测蛋白相关拉曼峰的位移变化, 揭示了细胞在不同碳源底物中对碳源的分解代谢抑制机制^[115]。

2.2.2 ^{15}N 稳定同位素

在固氮杆菌属中, 通过 ^{15}N 标记的氮气饲喂细胞, 可以引起细胞色素 C 的拉曼特征峰 1129 cm^{-1} ($\text{C}-^{14}\text{N}$) 红移到 1114 cm^{-1} ($\text{C}-^{15}\text{N}$) 处。基于该特点, 可快速识别土壤中的固氮菌并检测这些菌对氮源的利用效率^[116-117]。此外, 基于 ^{15}N 稳定同位素标记耦合拉曼检测, Han等^[118]实现了铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*) 对氯化铵的摄取及微囊藻毒素 (毒性次级代谢产物) 生物合成的快速表征。

2.2.3 ^2H 稳定同位素

水 (H_2O) 是所有生命体所必需的代谢底物, 水的摄入速率可以反映细胞的代谢活性。当细胞摄入重水 (D_2O) 时, 化合物中的氢原子 (H) 将被氘原子 (D) 取代, 从而在拉曼光谱的静默区出现碳氘 ($\text{C}-\text{D}$) 峰 ($2040\sim 2300\text{ cm}^{-1}$), 通过量化碳氘峰便可检测细胞代谢活性。基于该方法, Berry等^[76]揭示了嗜黏蛋白阿克曼氏菌 (*Akkermansia muciniphila*) 和产酸拟杆菌 (*Bacteroides acidifaciens*) 对黏蛋白和碳水化合物的不同降解模式; Yonamine等^[119]检测并比较了不同单个微藻细胞的光合效率; Olaniyi等^[120]检测了具有羟甲基纤维素降解活性的细菌。 ^2H 除了标记水之外, 还可标记葡萄糖, 细菌代谢 ^2H -葡萄糖后同样在拉曼光谱上呈现碳氘峰, 因此可用于量化细胞对葡萄糖的利用率^[76]。

2.3 基于拉曼组的物种区分

单细胞拉曼光谱可以作为单个细胞的分子指纹图谱, 因此潜在可以区分具有不同系统发育背景的细胞, 即区分细胞物种^[121]。目前基于单细胞拉曼光谱技术已实现不同酵母类型的区分^[122]。Kochan等^[123]通过拉曼特征峰 (1444 cm^{-1} 、 1656 cm^{-1} 和 1740 cm^{-1}) 表征细胞内脂质体以及脂肪酸组成, 可以区分携带单基因突变的单个工程酵母细胞。此外, 通过拉曼光谱和化学计量学方法对来自13个芽孢杆菌和芽孢杆菌相关物种的66株菌株进行了区分, 物种水平分类的准确度为 $80\%\sim 100\%$ ^[124]。不同的根瘤菌突变体也可以通过单细胞拉曼光谱根据细胞色素 C、糖原和聚羟基丁酸酯 (PHB) 的

拉曼信号来区分^[101]。对于金黄色葡萄球菌、白色念珠菌等临床微生物的分类,通过拉曼直接测定平板上的单克隆菌落可将分类时间缩短至6 h^[125]。对于微藻等光合单细胞,通过检测共振拉曼信号可以区分不同藻株^[87, 126]。此外,除通过检测细胞本身拉曼特征已实现物种区分外,通过检测气态代谢产物(如甲基硫化物、烷烃、酮、醛和芳香化合物等),非标记的SERS技术同样可实现物种区分^[127]。

2.4 基于拉曼组的环境应激检测

细胞对环境的应激反应是微生物细胞工厂的重要特征之一。单细胞拉曼光谱可反映单个细胞的代谢状态,因此可用于模拟或预测细胞的应激反应特征。Chiu等和Singh等^[128-129]基于拉曼检测探究了酵母细胞内脂质和蛋白等主要组分对高渗或高温胁迫的应激反应。Heraud等^[130]发现在不同营养条件下,盐生杜氏藻细胞表现出不同的拉曼光谱形态,反映了不同的代谢状态。对于模式生物大肠杆菌,已建立了一系列拉曼识别码来快速检测抗生素、酒精和重金属等环境压力下的细胞应激机制^[83, 131-133]。此外,拉曼光谱在细胞耐药性测试方面也显示出巨大的潜力,如Tao等^[82]基于重水拉曼技术,提出基于代谢活性的最小抑制浓度(minimum inhibitory concentration based on metabolic activity, MIC-MA),用于量化表征单细胞的耐药性,并可检测药物作用下非生长但有代谢活性的细胞,这对遏制抗生素耐药性传播至关重要。除自发拉曼外,

通过高灵敏地检测细胞分泌物(如绿脓菌素, pyocyanin),非标记的SERS技术也已实现细胞的群体应激感知(quorum sensing, QS)^[134]。

2.5 基于拉曼组的代谢互作检测

代谢相互作用(例如碳底物的交换等)广泛存在于单细胞生物中。但如何直接检测代谢互作是当前面临的挑战。用¹³C标记的葡萄糖培养大肠杆菌并进一步饲喂线虫,通过拉曼光谱可观察到碳源在食物链中的传递并可揭示代谢通路^[135]。当共培养巴伊不动杆菌和大肠杆菌时,以柠檬酸作为唯一碳源并耦合多种同位素标记,单细胞拉曼光谱的变化表明巴伊不动杆菌分泌的腐胺和苯丙氨酸可以被大肠杆菌利用^[85]。稳定同位素标记结合拉曼检测也被用于揭示沼泽中不同物种之间碳源和氮源的转化^[136]。因此,拉曼检测可用于单细胞水平上分析细胞间的代谢相互作用和共生关系。

3 基于单细胞拉曼光谱的细胞分选

基于单细胞拉曼光谱技术强大的表型识别能力,现已发展了一系列拉曼激活细胞分选平台(Raman-activated cell sorting, RACS),见图3^[24, 67, 137-138]。通过这些平台能够分离出特定功能表型的单细胞,整个表型识别和分选过程无损,因此分离的细胞可以直接与下游基因组,甚至是转录组、蛋白组、代谢组等组学研究无缝衔接。因为拉曼激活细胞分选无需标记,所以其理论上可分选自然界中近

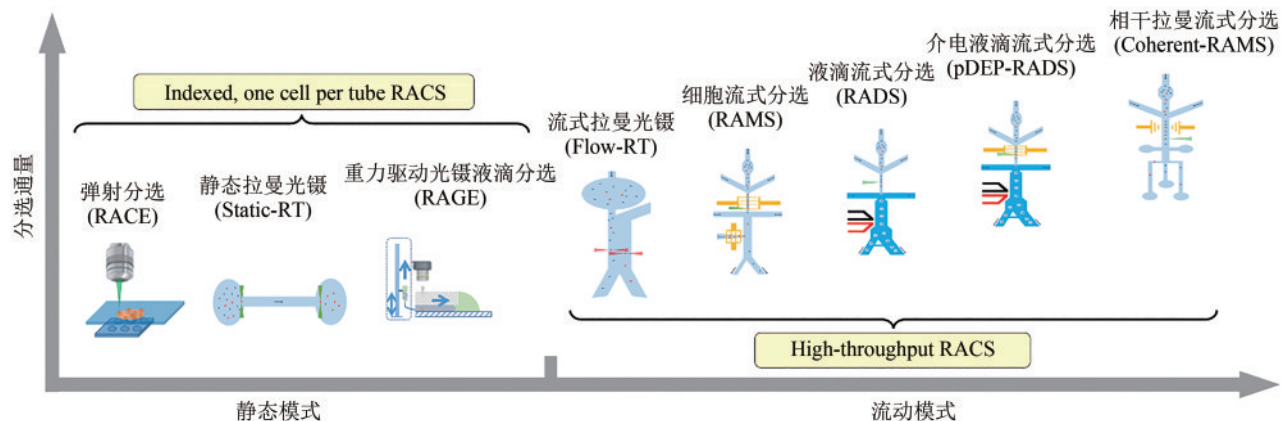


图3 拉曼激活细胞分选平台

Fig. 3 Raman-activated cell sorting platforms

乎所有的细胞。目前拉曼流式分选平台的研究时间相对较短,根据拉曼采集时细胞的运动状态,大体上分为静止模式和流动模式两大类,前者主要包括拉曼弹射分选(Raman-activated cell ejection, RACE)^[139]、静态拉曼光镊分选(Static-Raman tweezer, Static-RT)^[140-141]、重力驱动拉曼光镊液滴分选(Raman-activated gravity-driven encapsulation, RAGE)^[142],后者主要包括流式拉曼光镊分选(Flow-Raman tweezer, Flow-RT)^[143]、拉曼微流分选(Raman-activated microfluidic sorting, RAMS)^[144]、拉曼微液滴分选(Raman-activated droplet sorting, RADS)^[145]、介电单细胞捕获/释放拉曼激活液滴分选(positive dielectrophoresis-based RADS, pDEP-RADS)^[146]以及相干拉曼微流分选(Coherent-RAMS)^[147-148]。这些平台有效地耦合了单细胞拉曼表型识别、分选、基因型分析或培养,为合成生物表型的表征和分选提供了重要手段。

3.1 静态模式拉曼激活细胞分选平台

静态模式拉曼激活细胞分选平台的最大优势是可以精确分离单细胞到单个管中(one cell per tube),从而与下游单细胞基因组等组学联动,最终实现表型和基因型的精确耦联。

3.1.1 拉曼弹射分选(RACE)

其基本原理是在拉曼测量基片上溅射一层薄膜(通常为铝膜),将合适浓度的细胞悬液点在该基片上并室温风干;通过拉曼光谱识别到目标细胞后,可施加一束高频脉冲激光,将目标细胞弹射剥离到收集孔内^[139]。该方法可灵活实现单孔单细胞或多细胞的收集。基于该平台, Song等^[78]从红海水样中成功分离出新的富含类胡萝卜素的细菌,通过单细胞测序发现了新的类胡萝卜素合成相关基因,进一步耦合重水拉曼技术,从泰晤士河中成功分离出耐药菌,通过单细胞测序对耐药菌进行了鉴定^[149]。Wang等^[150]实现了基于代谢活性的人体肠道菌群微生物筛选鉴定。该方法操作相对简单,分选准确率高,但要实现细胞弹射分离需要在拉曼检测后翻转基片,该过程增加了系统操作的复杂性,而且在开放环境中操作易带来污染风险。为解决上述问题, Jing等^[77]采用了透

明ITO石英作为基片,实现了检测后无需翻转基片,同时发展了一体化(all-in-one)接收芯片,克服了污染问题,最终实现了海洋固碳菌的分离鉴定。该方法最大的弊端是干片条件拉曼检测及激光弹射分选会对细胞造成一定的损伤,单细胞测序覆盖度一般不超过20%^[77-78, 151]。为降低损伤, Liang等^[152]在弹射基片上添加了琼脂糖薄膜,以达到水相弹射效果,最终弹射后真核细胞(酿酒酵母)的存活率为63%、革兰氏阴性菌(大肠杆菌)为22%、革兰氏阳性菌(鼠李糖乳酸杆菌)为74%。为进一步提高单细胞测序覆盖度, Su等^[153]优化了多重置换扩增(MDA)过程,从而将基因覆盖度由<20%提高到>50%。

3.1.2 静态拉曼光镊分选(Static-RT)

光镊是一种广泛使用的基于聚焦光束辐射压力的细胞/粒子操纵技术^[154],通过将拉曼检测和光镊技术耦合发展了拉曼光镊技术。第一代拉曼光镊为静态模式,即细胞/颗粒的检测,操纵均在静止或相对静止的状态下完成。Xie等^[155]最先将拉曼光镊技术用于单个生物细胞的探究。为了进一步提高分离效率, Xie等^[141]设计了微腔室芯片,最终实现不同生理状态的细胞表型识别和分离。Huang等^[140]直接在矩形毛细管中完成细胞表型的拉曼识别,通过光镊将目标细胞拖拽到毛细管的另一端完成细胞分选,最后将毛细管折断实现目标细胞的物理分离和回收,并最终完成了单细胞基因组分析。基于该平台并耦合重水标记, Berry等^[76]从小鼠盲肠菌群中分离出了活性菌,并通过基因组分析对分离的细菌进行了鉴定。和RACE相比,静态拉曼光镊的拉曼信号检测及细胞分选均是在水相中完成,在很大程度上降低了损伤,但其通过折断毛细管的方式获取分选后单个或多个目标细胞的效率较低,而且通量仅有数分钟一个细胞。

3.1.3 重力驱动拉曼光镊液滴分选(RAGE)

拉曼识别到目标表型细胞后,如何精确获取分选的单/多细胞,是直接耦合下游组学研究的关键。Fang等^[156]采用开放式微流控芯片,利用光镊直接将细胞拖到芯片外,并通过毛细作用力吸取分选后的细胞,基于该方法,并耦合单细胞转录组测序,探究了胃癌细胞的药物敏感性^[157]。开放

式芯片设计利于光镊拖拽和细胞导出,但也带来了污染的风险。Xu等^[142]开发了一种耦合拉曼光镊和重力驱动液滴单细胞包裹导出的拉曼细胞分选技术(RAGE),克服了密闭芯片环境中单一光镊力难以实现目标细胞脱离焦平面导出的问题,通过耦合液滴微流控技术,完成了目标单细胞的精准分选和快速导出,实现所测即所得。因为水相检测可以降低激光照射带来的损伤,加之液滴生成过程有油相的引入可以提高MDA扩增效率^[153],所以RAGE分选后,目标大肠杆菌单细胞的全基因组测序覆盖度达到了约95%。基于RAGE, Jing等^[158]实现了土壤菌群中高代谢活性细胞和产类胡萝卜素细胞的分选,并通过单细胞全基因组测序对细胞进行了鉴定,发现并非所有产类胡萝卜素细胞都呈现高代谢活性,因此传统基于培养的方法无法实现此类细胞的分离鉴定。

3.2 流动模式拉曼激活细胞分选平台

流动模式拉曼激活细胞分选平台最大的优势是高通量(high throughput),因此更适合细胞工厂中优势细胞的分选。

3.2.1 流式拉曼光镊分选(Flow-RT)

第一代静态拉曼光镊的分选为手动模式,其通量较低^[140-141]。近年来,通过将拉曼光镊和多流路微流控技术结合发展了流式拉曼光镊平台^[159-161]。这些平台提高了所能检测的细胞数量及灵敏度,但其自动化程度依然较低。为进一步提高分选通量,Casabella等搭建了首套全自动流式拉曼光镊系统,分选通量提高到~2.8个细胞/min^[162]。Lee等^[143]基于全自动流式拉曼光镊平台并耦合重水拉曼技术,实现了小鼠肠道菌群中高活性菌的筛选(准确率:约98%;通量:3.3~8.3个细胞/min),并通过进一步测序对这些菌进行了鉴定。这是首次基于拉曼技术自动化分选复杂微生物样品。和其他拉曼分选平台相比,流式拉曼光镊在微生物小细胞分选方面有着比较明显的优势,但由于光镊力较弱,导致无法捕获高速流动细胞且无法快速移动捕获细胞,因此其分选通量相对较低,无法筛选较大体系突变体库。

3.2.2 拉曼微流分选(RAMS)

将拉曼光镊和微流控结合解决了自动化问题,进一步借助于微流控高通量、灵活操控等优势,也是提高分选通量的绝佳选择。Li等^[163]搭建了首套拉曼计数平台(Raman-activated cell counting, RACC),通过检测类胡萝卜素拉曼特征峰实现了固碳菌的高通量检测(约120个细胞/min)。Zhang等^[144]通过介电将高速流动单细胞捕获在拉曼激光位点从而高效完成拉曼检测,该策略为解决由于大多数细胞自发拉曼信号弱导致无法检测高速流动细胞的拉曼信号的瓶颈问题提供了新思路,通过进一步集成基于电磁阀吸吮的分选单元,最终构建了首套自动化、高通量RAMS平台,基于该平台实现产类胡萝卜素酵母的高通量(约60个细胞/min)分选。该套平台受到*The Scientist*的专文推介,为真正意义的拉曼流式分选平台的研制拉开了序幕。针对色素等具有强共振拉曼信号的表型,其拉曼信号检测所需时间通常可短至几毫秒至几十毫秒,这使得在高速流动状态下获取到共振拉曼信号可行。据此,McIlvenna等^[164]在RACC的原理基础上进一步集成了基于分压的分选单元,从而实现产类胡萝卜素蓝细菌的分选(约30个细胞/min)。目前,现有的RAMS平台在强共振拉曼表型检测筛选方面具有应用空间。但针对强共振拉曼信号毫秒级检测时间而言,这些RAMS平台的分选通量依然较低。

3.2.3 拉曼微液滴分选(RADS)

液滴微流控技术具有灵活、高通量等优点。液滴包裹可对细胞起到保护作用,避免在筛选操纵过程中遭受损伤。微生物细胞本身尺寸小、难操纵,经液滴包裹后可直接对液滴进行灵活操纵,利于提高分选通量和准确率。因此液滴微流控技术已被广泛用于细胞工厂筛选^[165]。Cristobal等^[166]最先将液滴微流控技术和拉曼结合,检测了液滴中反应后的化学组分,为发展用于细胞分选的RADS平台奠定了基础。但液滴生成过程中引入的油相具有很强的拉曼背景干扰、液滴的透镜效应会影响激光聚焦、细胞在液滴中自由游动会影响激光对准,如何克服这些难题是发展RADS平台的关键。Wang等^[145]通过先拉曼检测后液滴包裹的策略有效地克服了上述难题,进一步耦合介电液

滴分选单元, 搭建了真正意义的RADS平台, 分选通量可达约260个细胞/min, 是目前已报道工作中全谱分选通量最高的RACS系统^[145]。针对雨生红球藻中虾青素含量的分选准确率达到95%以上, 分选后细胞存活率达93%。此外, 目前该分选通量主要受限于拉曼检测而非系统本身, 通过与高灵敏拉曼检测技术(如相干拉曼、表面增强拉曼等)耦合, 可实现超高通量分选。但是, 由于自然界中绝大多数细胞的自发拉曼信号较弱, RADS非捕获的检测策略使其同RAMS一样, 局限于强拉曼信号(如共振拉曼信号)的检测筛选。

3.2.4 介电单细胞捕获/释放拉曼激活液滴分选(pDEP-RADS)

实现弱拉曼表型的检测及高通量分选一直是拉曼分选的目标。如上所述, Zhang等^[144]发展的RAMS平台集成了介电捕获单元, 可将高速流动单细胞捕获在拉曼激光位点从而延长拉曼采集时间, 以获取到高质量弱拉曼信号。Wang等^[145]发展的RADS平台集成了介电液滴分选单元, 实现了高通量分选。通过将上述平台的优势进行整合集成, Wang等^[146]发展了首套兼具普适性和通量的介电单细胞捕获/释放拉曼激活液滴分选(pDEP-RADS)平台, 并示范了油脂酵母甘油三酯含量和不饱和度的筛选, 经过一轮筛选成功从二酰基甘油酰基转移酶基因库中筛选出3个已报道的强功能基因和2个未报道的弱功能基因。基于pDEP-RADS和已研制的介电聚焦技术, 中科院青岛生物能源与过程研究所和星赛生物科技联手推出国内外首台高通量拉曼流式分选仪FlowRACS, 真正将拉曼分选推向市场应用。

3.2.5 相干拉曼微流分选(Coherent-RAMS)

自发拉曼最大的弊端在于信号弱, 导致其检测通量较低。相干拉曼技术采用“泵浦”(pump)和“斯托克斯”(Stokes)强脉冲激光沿光路与分子振动产生相位相干, 从而使拉曼信号有数量级的增强^[138]。目前, 相干拉曼技术主要包括相干反斯托克斯拉曼散射(coherent anti-Stokes Raman scattering, CARS)^[167]和受激拉曼散射(stimulated Raman scattering, SRS)^[168]。第一代CARS流式检测平台仅能实现一位的单元采集, 最大检测通量为100 eps (events per second)^[169]。通过采用宽谱

相干光源, Camp等^[170]发展了多元CARS(multiplex CARS, MCARS)技术, 实现了1200~3100 cm⁻¹的宽谱采集, 通过优化检测器, 理论检测通量可达10 000 eps。通过进一步升级激光器等硬件, Hiramatsu等^[171]成功搭建首套可高通量检测指纹区(400~1600 cm⁻¹)的基于傅里叶转换的CARS(FT-CARS), 检测通量约为2000 eps。为了进一步实现分选功能, Lindley等^[59]在FT-CARS的基础上集成了基于压电阀的分选单元, 成功搭建首套CARS-RAMS, 并示范了高产多糖、虾青素的微藻细胞高通量(约50个细胞/min)筛选^[148]。在SRS方面, Zhang等^[172]搭建了第一套SRS流式检测平台, 该平台采用了32感光像素阵列, 因此可获取到32个峰位点, 基于该平台示范了不同状态下3T3-L1细胞的高通量(约560 eps)识别。明场成像被用于细胞形态学鉴定, 荧光成像也已被广泛用于目标内涵物的分布表征, 从而提供更详实的形态学表型^[59-60]。SRS检测快的特点使其具备成像的能力, Suzuki等^[173]通过采用4色光源检测策略搭建了首套基于SRS成像的检测系统, 示范了微藻细胞尺寸、胞内叶绿素、多糖和脂质含量表征以及不同人体细胞的鉴定。为了进一步实现分选功能, Nitta等^[59]在SRS成像检测系统的基础上将单光源升级为线光源实现细胞界面的快速扫描, 并进一步集成基于压电阀的分选单元, 成功搭建首套拉曼成像激活细胞分选系统(Raman image-activated cell sorting, RIACS), 并示范了3T3-L1衍生的脂肪样细胞、高产脂质的衣藻细胞和¹³C标记的眼虫藻细胞的高通量分选(约100 eps)^[147]。总体而言, CARS可以高通量地获取到宽谱信息(约1900 cm⁻¹), 但其缺点在于易受非共振背景的干扰, 影响精确定量, SRS虽然不存在该问题, 但其获取的谱宽较窄(约200 cm⁻¹), 导致其可识别表型信息量较少。此外, 与自发拉曼相比, 相干拉曼最大的特色就是高通量, 但也存在着光谱分辨率较低(约20 cm⁻¹)、无法检测全谱信息的缺点。

3.3 基于FlowRACS的酶活筛选

目前, 流式拉曼分选在合成生物学中应用最为成功的案例是基于FlowRACS的二酰基甘油酰基

转移酶 (DGATs) 酶活的筛选^[146]。甘油三酯 (TAG) 是人体、动物和植物中油脂的主要成分,它具有极高的能量存储密度,而且在几乎所有细胞中都存在,因此是自然界的“能量存储货币”。细胞中 TAG 生物合成的最后一步和限速步骤是二酰基甘油酰基转移酶。自然界中 DGATs 的功能极其多样,其活性不仅调控 TAG 产物的合成效率,还控制着其饱和度、碳链长度等;这些理化性质决定了 TAG 的用途和经济价值,例如是适合做营养品还是生物燃油^[174-175]。因此,作为油脂分子设计的关键工具, DGATs 的挖掘和筛选具有重大的科学意义和应用价值。

但是,传统的 DGATs 筛选方法通常包括候选酶基因在底盘细胞中的表达、细胞扩增培养以积累足够生物质、从生物质中提取并通过薄层色谱法分离 TAG 产物、用气相和液相质谱来分析 and 定量 TAG 中组分等繁杂步骤 [图 4(a)]^[174-175]。这一流程通常需要一周时间,耗时耗力。而基于 FlowRACS 流程 [图 4(b)],可以一次性同步转化多个基因甚至基因库来构建细胞库,将细胞库进行诱导累积油脂后直接通过 FlowRACS 进行分选,分选后的细胞可不经培养直接进行高通量测序,根据测序数据便可知功能基因,也可进行平板单克隆培养,通过 Sanger 测序鉴定单克隆,并可进一步通过传统方法对分选后的单克隆进行更为深入的表征。基于该策略, Wang 等^[146]将空载体和 9 个潜在 DGATs 功能基因进行同步转化并诱导后,经过一轮分选并联合测序验证,成功获得 3 个已报道的强效基因和 2 个从未报道过的弱效基因 [图 4(c)]。而前期基于传统方法对这 3 个强功能基因的筛选和表征,历时长达数月时间^[175]。

与基于生物质提取和质谱分析的传统胞内油脂分析方法相比, FlowRACS 的筛选时间、试剂耗材和人工成本更少,大大提高了酶的筛选效率。以 10 个基因的功能鉴定为例,传统方法通常需要约 31 天 (包括:①转化;②平板培养;③液体培养;④分子鉴定;⑤诱导;⑥油脂提取;⑦基于薄层色谱的 TAG 分离;⑧基于气相色谱和质谱联用的 TAG 表征)、约 1000 美元的试剂耗材消耗 (包括:①转化;②平板培养;③液体培养;④分子鉴定;⑤诱导;⑥油脂提取;⑦基于薄层色

谱的 TAG 分离;⑧气相色谱和质谱联用的 TAG 表征)和约 25 人·天的人工成本 (包括:①转化;②分子鉴定;③油脂提取;④基于薄层色谱的 TAG 分离获取;⑤基于气相色谱和质谱联用的 TAG 表征)。而 FlowRACS 仅需要约 5.5 天 (仅包括:①转化;②诱导;③基于 FlowRACS 分选;④高通量测序)、300 美元 (仅包括:①转化;②诱导;③基于 FlowRACS 分选;④高通量测序)和约 1.5 人·时的人工成本 (仅包括:①转化;②基于 FlowRACS 分选)。而且,当需鉴定的基因数量进一步增加时,传统方法的时间成本、试剂耗材消耗和人工成本均会成倍数增加,而 FlowRACS 几乎不变 (图 5)。因此, FlowRACS 非常适合合成生物较大体系突变体库的筛选。

4 总结和展望

合成细胞表型的测试和分选是合成生物学的重要核心之一,也是当前的限速步骤之一。发展高效的表型检测和分选技术对于加速合成生物学的发展至关重要^[176]。传统基于单克隆培养的方法耗时、费力且成本高。荧光流式,包括 FACS 和 FADS,是目前应用最为广泛的高通量分选技术。但其需要外加荧光标记的前提又在一定程度上限制了其应用范围。SCRS 技术因其具有活体无损、非标记式、提供全景式表型、能分辨复杂功能、快速且低成本、能与组学分析联动等优势,被认为是一种理想的表型识别技术^[24, 66-67]。因此基于 SCRS 的 RACS 技术有望解决合成生物表型检测和分选的瓶颈问题。然而, RACS 在合成生物学领域的潜力挖掘与实现还需克服诸多挑战,同时也存在巨大机遇。

在基于拉曼光谱的表型检测方面,拉曼组能够在无需探针的前提下测量底物代谢活性、产物谱、环境应激等诸多表型^[24],但是在单细胞精度同时测量这些表型的“全景式”表型组分析尚需结合特定应用进行示范。其次,拉曼谱中的一个拉曼峰通常指代有相同或相似化学键的一类物质,比如蛋白、核酸、油脂、色素等,但仅仅通过一个或几个拉曼特征峰尚难以特异性地区分具体是哪种蛋白、哪种核酸、哪种油脂、哪种色素。

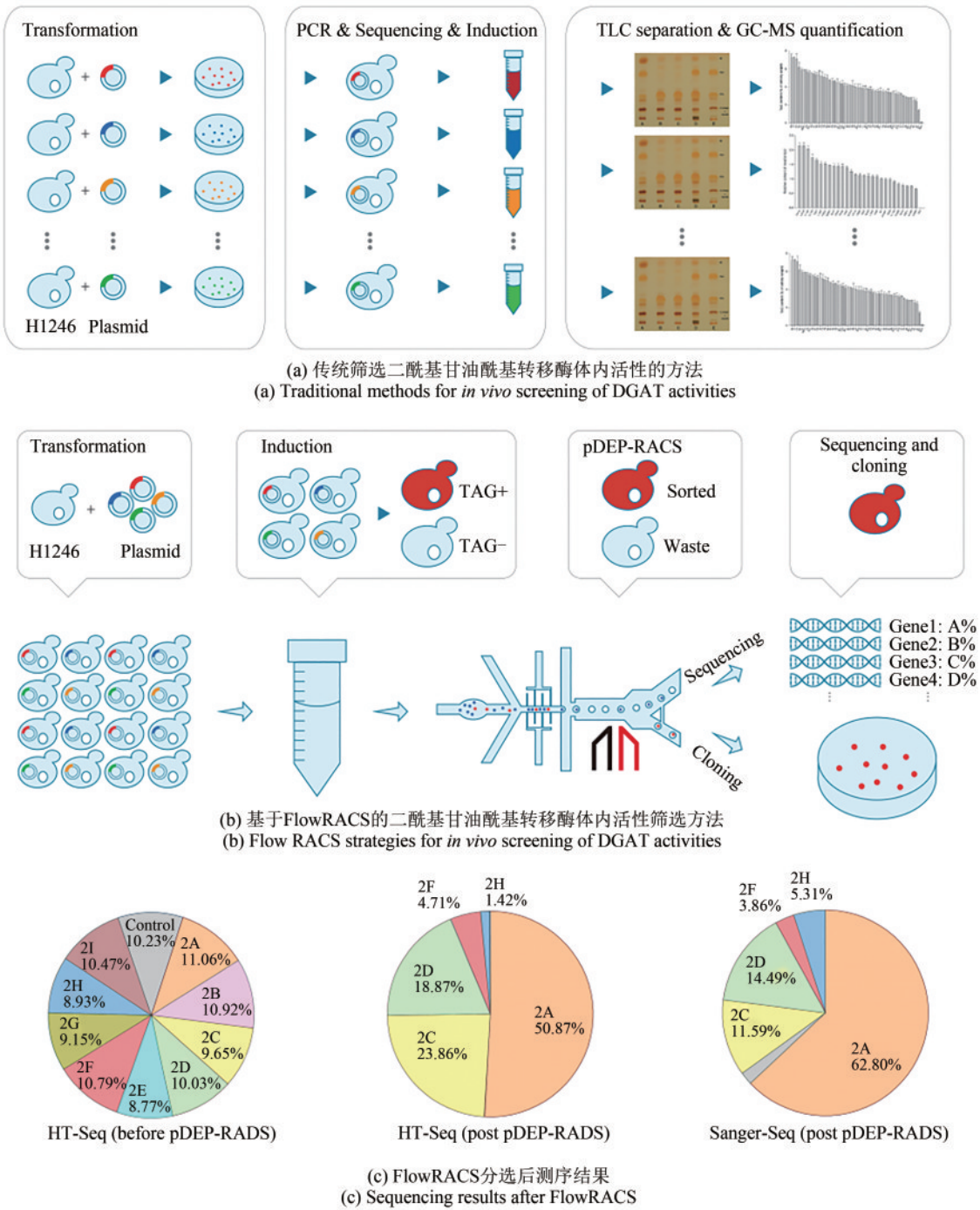


图4 二酰基甘油酰基转移酶体内活性筛选的传统方法和 FlowRACS 方法的流程比较^[146]

Fig. 4 Workflows for *in vivo* screening of DGAT activities through traditional methods and FlowRACS strategies^[146]

基于拉曼全谱并耦合深度学习算法已被广泛用于不同表型的区分^[160, 162, 177], 这也为特异性区分同类不同种物质(如区分合成途径中的前体和终产物等)提供了新思路, 同时也为基于拉曼全谱的数据算法的构建提出了新的挑战。同时, 基于全谱算法是否可以量化目标产物, 甚至同时量化

不同代谢物, 基于拉曼光谱可以全景式识别复杂表型的优势, 其在理论上是可行的, 但要实现该目标, 需要联合传统方法的准确性和定量从而对拉曼光谱特征形成指导作用, 最后通过数据训练建模以实现上述目的。此外, 基于无需预知靶点的标记策略, 如稳定同位素标记(¹³C、¹⁵N、²H

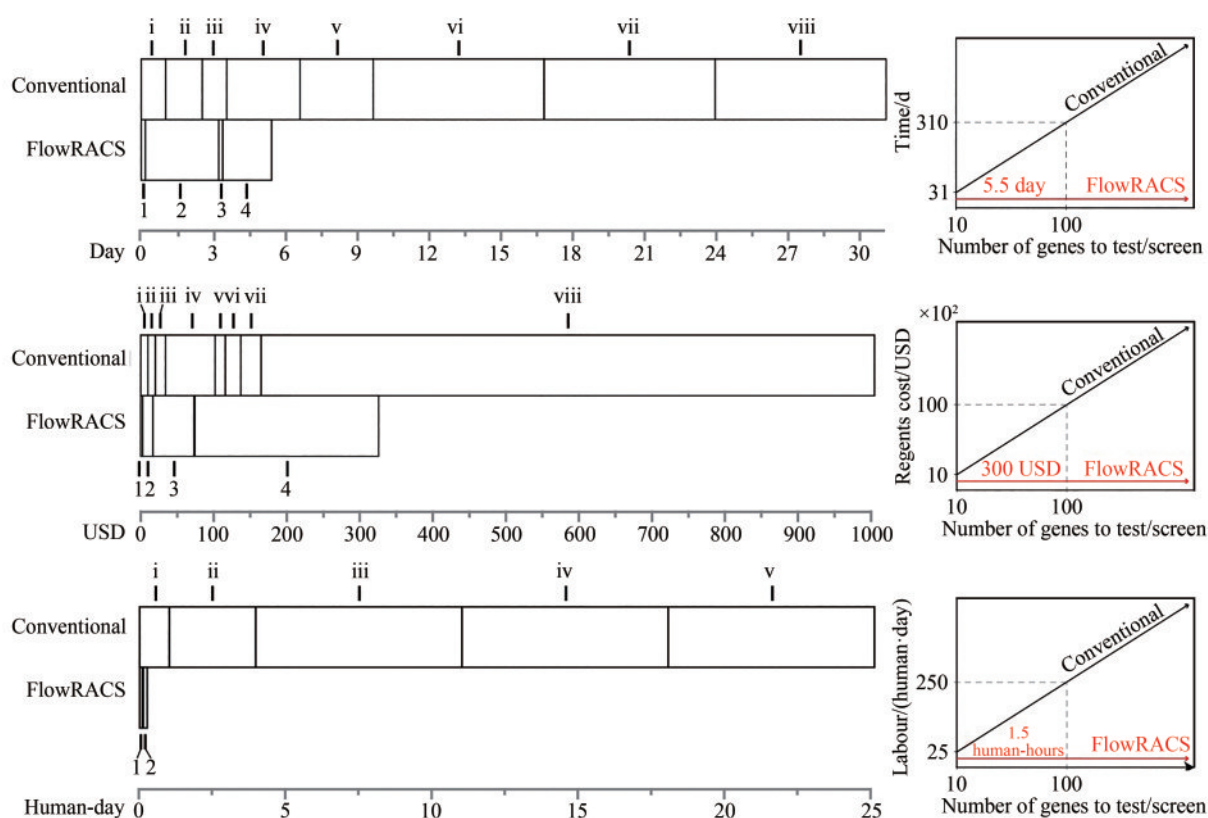


图5 二酰基甘油酰基转移酶体内活性筛选的传统方法和FlowRACS方法在时间成本、试剂耗材消耗和人工成本的比较^[146]

Fig. 5 Consumption of time, labor and reagents for *in vivo* screening of DGAT activities through traditional methods and FlowRACS strategies^[146]

等)策略,可在一定程度上补偿并提高检测灵敏度、特异性等,更精细地探究细胞的应答过程^[24]。总之,拉曼数据解析将是进一步提升拉曼光谱表型表征能力的重点,而基于人工智能的单细胞多模态表型分析将是提升拉曼单细胞表型识别能力的关键。

在拉曼分选方面,现有这些平台中,静态模式RACS能精确将单个细胞分离到单管/孔中,从而和下游单细胞组学无缝衔接,但其通量很低^[139-142];流动模式RACS自动化程度更高,在分选通量上也有了数量级的提高,但受限于自发拉曼信号弱的本质问题,其通量仍难以和FACS相提并论^[142-145];相干拉曼技术的信号灵敏度极高,使其分选通量有了质的提升,但其光谱分辨率及光谱信息量相对较少。尽可能多地承接各个平台的优势将是发展新一代RACS平台的重点。此外,除FACS、RACS外,单细胞电阻抗、力学、明场成像等技术同样可以表征细胞表型^[178-181],因此,多技术的联用,如荧光和拉曼等^[111, 182],可以进一步

提升表型鉴定的准确率和信息量,将把单细胞表型组在合成生物学的应用推向新的维度,也必将是发展趋势之一。

最后,在仪器研制方面,显微拉曼仪目前已很成熟,市场份额主要被国外公司占据,但拉曼分选仪目前还比较空缺,在该领域国内尚处于领先地位。以RACE为关键技术的PRECI SCS,可实现微生物单细胞的自动化分离并耦合下游单细胞测序。但其存在单细胞全基因组覆盖度低的问题,主要是由RACE过程所带来的损伤导致的。以RAGE为关键技术的RAGE-Seq,同样实现了微生物单细胞分离并耦合下游单细胞测序,其损伤更小,单细胞全基因组测序覆盖度更高,但第一代机器自动化程度较低,目前已在研制自动化版本,有望近期发布。此外,研究人员以RAMS、RADS、pDEP-RADS等流式分选技术为基础发展了FlowRACS,其自动化程度及通量更高,因此更适合于合成生物表型检测和分选,已成功示范微藻、酵母等细胞的色素、油脂等表型的筛选,其

更多所适用的细胞及表型种类有待市场的探索。总体而言,我国在拉曼分选仪研制方面处于国际领先地位,但仪器的一些核心部件,如光谱仪、CCD等仍依赖于进口。因此,全国产化替代将是接下来需要各行业共同努力的目标。

参 考 文 献

- [1] GARDNER T S, CANTOR C R, COLLINS J J. Construction of a genetic toggle switch in *Escherichia coli*[J]. *Nature*, 2000, 403(6767): 339-342.
- [2] BENNER S A, SISMOUR A M. Synthetic biology[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2005, 6(7): 533-543.
- [3] 欧阳颀. 合成生物学的发展与面临的科学任务[J]. *科学与社会*, 2014, 4(4): 1-10.
OUYANG Q. The development of synthetic biology and scientific tasks it faced[J]. *Science and Society*, 2014, 4(4): 1-10.
- [4] CHECK E. Synthetic biology: designs on life [J]. *Nature*, 2005, 438(7067): 417-418.
- [5] AUSLÄNDER S, AUSLÄNDER D, FUSSENEGGER M. Synthetic biology—the synthesis of biology[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2017, 56(23): 6396-6419.
- [6] KOSURI S, CHURCH G M. Large-scale *de novo* DNA synthesis: technologies and applications[J]. *Nature Methods*, 2014, 11(5): 499-507.
- [7] KOSURI S, EROSHENKO N, LEPROUST E M, et al. Scalable gene synthesis by selective amplification of DNA pools from high-fidelity microchips[J]. *Nature Biotechnology*, 2010, 28(12): 1295-1299.
- [8] PALLUK S, ARLOW D H, DE ROND T, et al. *De novo* DNA synthesis using polymerase-nucleotide conjugates[J]. *Nature Biotechnology*, 2018, 36(7): 645-650.
- [9] WANG H H, ISAACS F J, CARR P A, et al. Programming cells by multiplex genome engineering and accelerated evolution[J]. *Nature*, 2009, 460(7257): 894-898.
- [10] SANDER J D, JOUNG J K. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes[J]. *Nature Biotechnology*, 2014, 32(4): 347-355.
- [11] SMITH H O, HUTCHISON C A III, PFANNKOCH C, et al. Generating a synthetic genome by whole genome assembly: ϕ X174 bacteriophage from synthetic oligonucleotides[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(26): 15440-15445.
- [12] GIBSON D G, YOUNG L, CHUANG R Y, et al. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases[J]. *Nature Methods*, 2009, 6(5): 343-345.
- [13] SHAO Y Y, LU N, WU Z F, et al. Creating a functional single-chromosome yeast[J]. *Nature*, 2018, 560(7718): 331-335.
- [14] 卢俊南, 褚鑫, 潘燕平, 等. 基因编辑技术: 进展与挑战[J]. *中国科学院院刊*, 2018, 33(11): 1184-1192.
LU J N, CHU X, PAN Y P, et al. Advances and challenges in gene editing technologies[J]. *Bulletin of Chinese Academy of Sciences*, 2018, 33(11): 1184-1192.
- [15] RO D K, PARADISE E M, OUELLET M, et al. Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast[J]. *Nature*, 2006, 440(7086): 940-943.
- [16] KWOK R. Five hard truths for synthetic biology[J]. *Nature*, 2010, 463(7279): 288-290.
- [17] KUSSELL E, LEIBLER S. Phenotypic diversity, population growth, and information in fluctuating environments[J]. *Science*, 2005, 309(5743): 2075-2078.
- [18] MÜLLER S, HARMS H, BLEY T. Origin and analysis of microbial population heterogeneity in bioprocesses[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2010, 21(1): 100-113.
- [19] PASZEK P, RYAN S, ASHALL L, et al. Population robustness arising from cellular heterogeneity[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(25): 11644-11649.
- [20] SCHUBERT C. Single-cell analysis: the deepest differences[J]. *Nature*, 2011, 480(7375): 133-137.
- [21] ZENOBI R. Single-cell metabolomics: analytical and biological perspectives[J]. *Science*, 2013, 342(6163): 1243259.
- [22] KASHTAN N, ROGGENSACK S E, RODRIGUE S, et al. Single-cell genomics reveals hundreds of coexisting subpopulations in wild *Prochlorococcus*[J]. *Science*, 2014, 344(6182): 416-420.
- [23] LEWIS W H, TAHON G, GEESINK P, et al. Innovations to culturing the uncultured microbial majority[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2021, 19(4): 225-240.
- [24] HE Y H, WANG X X, MA B, et al. Ramanome technology platform for label-free screening and sorting of microbial cell factories at single-cell resolution[J]. *Biotechnology Advances*, 2019, 37(6): 107388.
- [25] 马波, 徐健. 人工细胞的表型测试与分选: 构建从光谱学到遗传学的桥梁[J]. *中国科学院院刊*, 2018, 33(11): 1193-1204.
MA B, XU J. Phenotyping and sorting of synthetic cells: building bridge from spectroscopy to genetics[J]. *Bulletin of Chinese Academy of Sciences*, 2018, 33(11): 1193-1204.
- [26] PERKEL J M. Single-cell proteomics takes centre stage[J]. *Nature*, 2021, 597(7877): 580-582.
- [27] SEYDEL C. Single-cell metabolomics hits its stride[J]. *Nature Methods*, 2021, 18(12): 1452-1456.
- [28] NAWY T. Integrated single-cell profiles[J]. *Nature Methods*, 2016, 13(1): 36.
- [29] NIELSEN J, OLIVER S. The next wave in metabolome analysis[J]. *Trends in Biotechnology*, 2005, 23(11): 544-546.
- [30] WISHART D S. Emerging applications of metabolomics in

- drug discovery and precision medicine[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2016, 15(7): 473-484.
- [31] BENDALL S C, SIMONDS E F, QIU P, et al. Single-cell mass cytometry of differential immune and drug responses across a human hematopoietic continuum[J]. *Science*, 2011, 332(6030): 687-696.
- [32] ALI A, ABOULEILA Y, SHIMIZU Y, et al. Single-cell metabolomics by mass spectrometry: advances, challenges, and future applications[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2019, 120: 115436.
- [33] SPITZER M H, NOLAN G P. Mass cytometry: single cells, many features[J]. *Cell*, 2016, 165(4): 780-791.
- [34] AMANTONICO A, URBAN P L, ZENOBI R. Analytical techniques for single-cell metabolomics: state of the art and trends[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2010, 398(6): 2493-2504.
- [35] BREHM-STECHER B F, JOHNSON E A. Single-cell microbiology: tools, technologies, and applications[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 2004, 68(3): 538-559.
- [36] YANG J H, SU X L, ZHU L L. Advances of high-throughput screening system in reengineering of biological entities[J]. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*, 2021, 37(7): 2197-2210.
- [37] 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.
- [38] WAGNER J M, LIU L Q, 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.
- [39] 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.
- [40] AN G H, BIELICH J, AUERBACH R, et al. Isolation and characterization of carotenoid hyperproducing mutants of yeast by flow cytometry and cell sorting[J]. *Bio/Technology*, 1991, 9(1): 70-73.
- [41] 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.
- [42] 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.
- [43] KINTSES B, HEIN C, MOHAMED M F, et al. Picoliter cell lysate assays in microfluidic droplet compartments for directed enzyme evolution[J]. *Chemistry & Biology*, 2012, 19(8): 1001-1009.
- [44] RODRIGUEZ E A, CAMPBELL R E, LIN J Y, et al. The growing and glowing toolbox of fluorescent and photoactive proteins[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2017, 42(2): 111-129.
- [45] KREMERS G J, GILBERT S G, CRANFILL P J, et al. Fluorescent proteins at a glance[J]. *Journal of Cell Science*, 2011, 124 (Pt 2): 157-160.
- [46] MANNAN A A, LIU D, ZHANG F Z, et al. Fundamental design principles for transcription-factor-based metabolite biosensors[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2017, 6(10): 1851-1859.
- [47] FOWLER C C, BROWN E D, LI Y F. Using a riboswitch sensor to examine coenzyme B₁₂ metabolism and transport in *E. coli*[J]. *Chemistry & Biology*, 2010, 17(7): 756-765.
- [48] ABATEMARCO J, SARHAN M F, WAGNER J M, et al. RNA-aptamers-in-droplets (RAPID) high-throughput screening for secretory phenotypes[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 332.
- [49] VALLEJO D, NIKOOMANZAR A, PAEGEL B M, et al. Fluorescence-activated droplet sorting for single-cell directed evolution[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2019, 8(6): 1430-1440.
- [50] YANG G Y, WITHERS S G. Ultrahigh-throughput FACS-based screening for directed enzyme evolution[J]. *ChemBioChem*, 2009, 10(17): 2704-2715.
- [51] 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.
- [52] 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.
- [53] SCIAMBI A, ABATE A R. Accurate microfluidic sorting of droplets at 30 kHz[J]. *Lab on a Chip*, 2015, 15(1): 47-51.
- [54] BROUZES E, MEDKOVA M, SAVENELLI N, et al. Droplet microfluidic technology for single-cell high-throughput screening[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(34): 14195-14200.
- [55] WANG Y, JIN R N, SHEN B Q, et al. High-throughput functional screening for next-generation cancer immunotherapy using droplet-based microfluidics[J]. *Science Advances*, 2021, 7 (24): eabe3839.
- [56] QIAO Y X, HU R, CHEN D W, et al. Fluorescence-activated droplet sorting of PET degrading microorganisms[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2022, 424: 127417.
- [57] 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.

- [58] 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.
- [59] NITTA N, SUGIMURA T, ISOZAKI A, et al. Intelligent image-activated cell sorting[J]. *Cell*, 2018, 175(1): 266-276.
- [60] SCHRAIVOGEL D, KUHN T M, RAUSCHER B, et al. High-speed fluorescence image-enabled cell sorting[J]. *Science*, 2022, 375(6578): 315-320.
- [61] ROBINSON J P. Spectral flow cytometry-quo vadimus? [J]. *Cytometry Part A: the Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 2019, 95(8): 823-824.
- [62] CHENG J X, XIE X S. Vibrational spectroscopic imaging of living systems: an emerging platform for biology and medicine[J]. *Science*, 2015, 350(6264): aaa8870.
- [63] PETIBOIS C, CESTELLI-GUIDI M, PICCININI M, et al. Synchrotron radiation FTIR imaging in minutes: a first step towards real-time cell imaging[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2010, 397(6): 2123-2129.
- [64] RAMAN C V, KRISHNAN K S. A new type of secondary radiation[J]. *Nature*, 1928, 121(3048): 501-502.
- [65] XU J, MA B, SU X Q, et al. Emerging trends for microbiome analysis: from single-cell functional imaging to microbiome big data[J]. *Engineering*, 2017, 3(1): 66-70.
- [66] LEE K S, LANDRY Z, PEREIRA F C, et al. Raman microspectroscopy for microbiology[J]. *Nature Reviews Methods Primers*, 2021, 1: 80.
- [67] YAN S S, QIU J X, GUO L, et al. Development overview of Raman-activated cell sorting devoted to bacterial detection at single-cell level[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2021, 105(4): 1315-1331.
- [68] GUO J X, LIU Y, JU H X, et al. From lab to field: surface-enhanced Raman scattering-based sensing strategies for on-site analysis[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2022, 146: 116488.
- [69] QIAN X M, PENG X H, ANSARI D O, et al. *In vivo* tumor targeting and spectroscopic detection with surface-enhanced Raman nanoparticle tags[J]. *Nature Biotechnology*, 2008, 26(1): 83-90.
- [70] LIN L, TIAN X D, HONG S L, et al. A bioorthogonal Raman reporter strategy for SERS detection of glycans on live cells[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2013, 52(28): 7266-7271.
- [71] CHEN Y L, DING L, SONG W Y, et al. Protein-specific Raman imaging of glycosylation on single cells with zone-controllable SERS effect[J]. *Chemical Science*, 2016, 7(1): 569-574.
- [72] ZONG S F, CHEN C, WANG Z Y, et al. Surface enhanced Raman scattering based *in situ* hybridization strategy for telomere length assessment[J]. *ACS Nano*, 2016, 10(2): 2950-2959.
- [73] ZHU R, FENG H J, LI Q Q, et al. Asymmetric core-shell gold nanoparticles and controllable assemblies for SERS ratiometric detection of microRNA[J]. *Angewandte Chemie International ed. in English*, 2021, 60(22): 12560-12568.
- [74] YANG Y J, CHEN Y L, GUO J X, et al. A pore-forming protein-induced surface-enhanced Raman spectroscopic strategy for dynamic tracing of cell membrane repair[J]. *iScience*, 2021, 24(9): 102980.
- [75] YANG Y J, CHEN Y L, ZHAO S Y, et al. *O*-GlcNAcylation mapping of single living cells by *in situ* quantitative SERS imaging[J]. *Chemical Science*, 2022, 13(33): 9701-9705.
- [76] BERRY D, MADER E, LEE T K, et al. Tracking heavy water (D₂O) incorporation for identifying and sorting active microbial cells[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(2): E194-E203.
- [77] JING X Y, GOU H L, GONG Y H, et al. Raman-activated cell sorting and metagenomic sequencing revealing carbon-fixing bacteria in the ocean[J]. *Environmental Microbiology*, 2018, 20(6): 2241-2255.
- [78] SONG Y Z, KASTER A K, VOLLMERS J, et al. Single-cell genomics based on Raman sorting reveals novel carotenoid-containing bacteria in the Red Sea[J]. *Microbial Biotechnology*, 2017, 10(1): 125-137.
- [79] WANG T T, JI Y T, WANG Y, et al. Quantitative dynamics of triacylglycerol accumulation in microalgae populations at single-cell resolution revealed by Raman microspectroscopy[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2014, 7: 58.
- [80] JI Y T, HE Y H, CUI Y B, et al. Raman spectroscopy provides a rapid, non-invasive method for quantitation of starch in live, unicellular microalgae[J]. *Biotechnology Journal*, 2014, 9(12): 1512-1518.
- [81] HE Y H, ZHANG P, HUANG S, et al. Label-free, simultaneous quantification of starch, protein and triacylglycerol in single microalgal cells[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2017, 10: 275.
- [82] TAO Y F, WANG Y, HUANG S, et al. Metabolic-activity-based assessment of antimicrobial effects by D₂O-labeled single-cell Raman microspectroscopy[J]. *Analytical Chemistry*, 2017, 89(7): 4108-4115.
- [83] TENG L, WANG X, WANG X J, et al. Label-free, rapid and quantitative phenotyping of stress response in *E. coli* via ramanome[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 34359.
- [84] HEKMATARA M, HEIDARI BALADEHI M, JI Y T, et al. D₂O-probed Raman microspectroscopy distinguishes the metabolic dynamics of macromolecules in organellar anticancer drug response[J]. *Analytical Chemistry*, 2021, 93(4): 2125-2134.
- [85] WANG Y, SONG Y Z, TAO Y F, et al. Reverse and multiple stable isotope probing to study bacterial metabolism and interactions at the single cell level[J]. *Analytical Chemistry*, 2016,

- 88(19): 9443-9450.
- [86] HE Y H, HUANG S, ZHANG P, et al. Intra-Raman correlation analysis unveils metabolite conversion network from an isogenic population of cells[J]. *mBio*, 2021, 12(4): e0147021.
- [87] HEIDARI BALADEHI M, HEKMATARA M, HE Y H, et al. Culture-free identification and metabolic profiling of microalgal single cells *via* ensemble learning of Ramanomes[J]. *Analytical Chemistry*, 2021, 93(25): 8872-8880.
- [88] CHRISTAKI E, BONOS E, GIANNENAS I, et al. Functional properties of carotenoids originating from algae[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2013, 93(1): 5-11.
- [89] RODRIGUEZ-CONCEPCION M, AVALOS J, BONET M L, et al. A global perspective on carotenoids: metabolism, biotechnology, and benefits for nutrition and health[J]. *Progress in Lipid Research*, 2018, 70: 62-93.
- [90] ROBERT B. Resonance Raman spectroscopy[J]. *Photosynthesis Research*, 2009, 101(2/3): 147-155.
- [91] GUEDES A C, AMARO H M, MALCATA F X. Microalgae as sources of carotenoids[J]. *Marine Drugs*, 2011, 9(4): 625-644.
- [92] COLLINS A M, JONES H D T, HAN D X, et al. Carotenoid distribution in living cells of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae)[J]. *PLoS One*, 2011, 6(9): e24302.
- [93] KACZOR A, BARANSKA M. Structural changes of carotenoid astaxanthin in a single algal cell monitored *in situ* by Raman spectroscopy[J]. *Analytical Chemistry*, 2011, 83(20): 7763-7770.
- [94] LI K. *In vivo* kinetics of lipids and astaxanthin evolution in *Haematococcus pluvialis* mutant under 15% CO₂ using Raman microspectroscopy[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 244(Pt 2): 1439-1444.
- [95] ALEXANDRE M T A, GUNDERMANN K, PASCAL A A, et al. Probing the carotenoid content of intact *Cyclotella* cells by resonance Raman spectroscopy[J]. *Photosynthesis Research*, 2014, 119(3): 273-281.
- [96] WU H W, VOLPONI J V, OLIVER A E, et al. *In vivo* lipidomics using single-cell Raman spectroscopy[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(9): 3809-3814.
- [97] LEE T H, CHANG J S, WANG H Y. Rapid and *in vivo* quantification of cellular lipids in *Chlorella vulgaris* using near-infrared Raman spectrometry[J]. *Analytical Chemistry*, 2013, 85(4): 2155-2160.
- [98] SHAO Y N, FANG H, ZHOU H, et al. Detection and imaging of lipids of *Scenedesmus obliquus* based on confocal Raman microspectroscopy[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2017, 10: 300.
- [99] CHIU L D, HO S H, SHIMADA R, et al. Rapid *in vivo* lipid/carbohydrate quantification of single microalgal cell by Raman spectral imaging to reveal salinity-induced starch-to-lipid shift [J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2017, 10: 9.
- [100] MOUDŘÍKOVÁ Š, SADOWSKY A, METZGER S, et al. Quantification of polyphosphate in microalgae by Raman microscopy and by a reference enzymatic assay[J]. *Analytical Chemistry*, 2017, 89(22): 12006-12013.
- [101] XU J B, WEBB I, POOLE P, et al. Label-free discrimination of rhizobial bacteroids and mutants by single-cell Raman microspectroscopy[J]. *Analytical Chemistry*, 2017, 89(12): 6336-6340.
- [102] GIERLINGER N, SCHWANNINGER M. Chemical imaging of poplar wood cell walls by confocal Raman microscopy[J]. *Plant Physiology*, 2006, 140(4): 1246-1254.
- [103] CHYLIŇSKA M, SZYMAŃSKA-CHARGOT M, ZDUNEK A. Imaging of polysaccharides in the tomato cell wall with Raman microspectroscopy[J]. *Plant Methods*, 2014, 10: 14.
- [104] LUPOI J S, SINGH S, DAVIS M, et al. High-throughput prediction of eucalypt lignin syringyl/guaiacyl content using multivariate analysis: a comparison between mid-infrared, near-infrared, and Raman spectroscopies for model development[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2014, 7: 93.
- [105] SAMEK O, OBRUČA S, ŠILER M, et al. Quantitative Raman spectroscopy analysis of polyhydroxyalkanoates produced by *Cupriavidus necator* H16[J]. *Sensors*, 2016, 16(11): 1808.
- [106] WEISS T L, CHUN H J, OKADA S, et al. Raman spectroscopy analysis of botryococcene hydrocarbons from the green microalga *Botryococcus braunii*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(42): 32458-32466.
- [107] MIYAOKA R, HOSOKAWA M, ANDO M, et al. *In situ* detection of antibiotic amphotericin B produced in *Streptomyces nodosus* using Raman microspectroscopy[J]. *Marine Drugs*, 2014, 12(5): 2827-2839.
- [108] BERRY D, LOY A. Stable-isotope probing of human and animal microbiome function[J]. *Trends in Microbiology*, 2018, 26(12): 999-1007.
- [109] UHLIK O, LEEWIS M C, STREJCEK M, et al. Stable isotope probing in the metagenomics era: a bridge towards improved bioremediation[J]. *Biotechnology Advances*, 2013, 31(2): 154-165.
- [110] HUANG W E, LI M Q, JARVIS R M, et al. Shining light on the microbial world: the application of Raman microspectroscopy[J]. *Advances in Applied Microbiology*, 2010, 70: 153-186.
- [111] HUANG W E, STOECKER K, GRIFFITHS R, et al. Raman-FISH: combining stable-isotope Raman spectroscopy and fluorescence *in situ* hybridization for the single cell analysis of identity and function[J]. *Environmental Microbiology*, 2007, 9(8): 1878-1889.
- [112] WANG Y, HUANG W E, CUI L, et al. Single cell stable isotope probing in microbiology using Raman microspectroscopy

- [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2016, 41: 34-42.
- [113] LI M Q, CANNIFFE D P, JACKSON P J, et al. Rapid resonance Raman microspectroscopy to probe carbon dioxide fixation by single cells in microbial communities[J]. *The ISME Journal*, 2012, 6(4): 875-885.
- [114] NOOTHALAPATI VENKATA H N, SHIGETO S. Stable isotope-labeled Raman imaging reveals dynamic proteome localization to lipid droplets in single fission yeast cells[J]. *Chemistry & Biology*, 2012, 19(11): 1373-1380.
- [115] VINAY K B N, GUO S X, BOCKLITZ T, et al. Demonstration of carbon catabolite repression in naphthalene degrading soil bacteria *via* Raman spectroscopy based stable isotope probing[J]. *Analytical Chemistry*, 2016, 88(15): 7574-7582.
- [116] ANGEL R, PANHÖLZL C, GABRIEL R, et al. Application of stable-isotope labelling techniques for the detection of active diazotrophs[J]. *Environmental Microbiology*, 2018, 20(1): 44-61.
- [117] CUI L, YANG K, LI H Z, et al. Functional single-cell approach to probing nitrogen-fixing bacteria in soil communities by resonance Raman spectroscopy with $^{15}\text{N}_2$ labeling[J]. *Analytical Chemistry*, 2018, 90(8): 5082-5089.
- [118] HAN Z L, SHI X S, JI Y T, et al. Stable isotope labeling to study the nitrogen metabolism in microcystin biosynthesis[J]. *RSC Advances*, 2016, 6(52): 46806-46812.
- [119] YONAMINE Y, SUZUKI Y, ITO T, et al. Monitoring photosynthetic activity in microalgal cells by Raman spectroscopy with deuterium oxide as a tracking probe[J]. *ChemBioChem*, 2017, 18(20): 2063-2068.
- [120] OLANIYI O O, YANG K, ZHU Y G, et al. Heavy water-labeled Raman spectroscopy reveals carboxymethylcellulose-degrading bacteria and degradation activity at the single-cell level[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(3): 1455-1464.
- [121] LORENZ B, WICHMANN C, STOCKEL S, et al. Cultivation-free Raman spectroscopic investigations of bacteria[J]. *Trends in Microbiology*, 2017, 25(5): 413-424.
- [122] PAHLOW S, MEISEL S, CIALLA-MAY D, et al. Isolation and identification of bacteria by means of Raman spectroscopy[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2015, 89: 105-120.
- [123] KOCHAN K, PENG H D, WOOD B R, et al. Single cell assessment of yeast metabolic engineering for enhanced lipid production using Raman and AFM-IR imaging[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2018, 11: 106.
- [124] STÖCKEL S, MEISEL S, ELSCHNER M, et al. Identification of *Bacillus anthracis* *via* Raman spectroscopy and chemometric approaches[J]. *Analytical Chemistry*, 2012, 84(22): 9873-9880.
- [125] CHOO-SMITH L P, MAQUELIN K, VAN VREESWIJK T, et al. Investigating microbial (micro)colony heterogeneity by vibrational spectroscopy[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(4): 1461-1469.
- [126] WEI X, JIE D F, CUELLO J J, et al. Microalgal detection by Raman microspectroscopy[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2014, 53: 33-40.
- [127] GUO J X, LIU Y, YANG Y J, et al. A filter supported surface-enhanced Raman scattering “nose” for point-of-care monitoring of gaseous metabolites of bacteria[J]. *Analytical Chemistry*, 2020, 92(7): 5055-5063.
- [128] CHIU Y F, HUANG C K, SHIGETO S. *In vivo* probing of the temperature responses of intracellular biomolecules in yeast cells by label-free Raman microspectroscopy[J]. *ChemBioChem*, 2013, 14(8): 1001-1005.
- [129] SINGH G P, CREELY C M, VOLPE G, et al. Real-time detection of hyperosmotic stress response in optically trapped single yeast cells using Raman microspectroscopy[J]. *Analytical Chemistry*, 2005, 77(8): 2564-2568.
- [130] HERAUD P, BEARDALL J, MCNAUGHTON D, et al. *In vivo* prediction of the nutrient status of individual microalgal cells using Raman microspectroscopy[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2007, 275(1): 24-30.
- [131] ATHAMNEH A I M, ALAJLOUNI R A, WALLACE R S, et al. Phenotypic profiling of antibiotic response signatures in *Escherichia coli* using Raman spectroscopy[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2014, 58(3): 1302-1314.
- [132] GERMOND A, ICHIMURA T, HORINOUCHE T, et al. Raman spectral signature reflects transcriptomic features of antibiotic resistance in *Escherichia coli*[J]. *Communications Biology*, 2018, 1: 85.
- [133] ZU T N K, ATHAMNEH A I M, WALLACE R S, et al. Near-real-time analysis of the phenotypic responses of *Escherichia coli* to 1-butanol exposure using Raman spectroscopy[J]. *Journal of Bacteriology*, 2014, 196(23): 3983-3991.
- [134] GUO J X, LIU Y, CHEN Y L, et al. A multifunctional SERS sticky note for real-time quorum sensing tracing and inactivation of bacterial biofilms[J]. *Chemical Science*, 2018, 9(27): 5906-5911.
- [135] LI M Q, HUANG W E, GIBSON C M, et al. Stable isotope probing and Raman spectroscopy for monitoring carbon flow in a food chain and revealing metabolic pathway[J]. *Analytical Chemistry*, 2013, 85(3): 1642-1649.
- [136] MIECZAN T, MICHAŁ N, ADAMCZUK M, et al. Stable isotope analyses revealed high seasonal dynamics in the food web structure of a peatbog[J]. *International Review of Hydrobiology*, 2015, 100(5/6): 141-150.
- [137] SONG Y Z, YIN H B, HUANG W E. Raman activated cell sorting[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2016, 33: 1-8.
- [138] GALA DE PABLO J, LINDLEY M, HIRAMATSU K, et al. High-throughput Raman flow cytometry and beyond[J]. *Ac-*

- counts of Chemical Research, 2021, 54(9): 2132-2143.
- [139] WANG Y, JI Y T, WHARFE E S, et al. Raman activated cell ejection for isolation of single cells[J]. Analytical Chemistry, 2013, 85(22): 10697-10701.
- [140] HUANG W E, WARD A D, WHITELEY A S. Raman tweezers sorting of single microbial cells[J]. Environmental Microbiology Reports, 2009, 1(1): 44-49.
- [141] XIE C G, CHEN D, LI Y Q. Raman sorting and identification of single living micro-organisms with optical tweezers[J]. Optics Letters, 2005, 30(14): 1800-1802.
- [142] XU T, GONG Y H, SU X L, et al. Phenome-genome profiling of single bacterial cell by Raman-activated gravity-driven encapsulation and sequencing[J]. Small, 2020, 16(30): 2001172.
- [143] LEE K S, PALATINSZKY M, PEREIRA F C, et al. An automated Raman-based platform for the sorting of live cells by functional properties[J]. Nature Microbiology, 2019, 4(6): 1035-1048.
- [144] ZHANG P R, REN L H, ZHANG X, et al. Raman-activated cell sorting based on dielectrophoretic single-cell trap and release[J]. Analytical Chemistry, 2015, 87(4): 2282-2289.
- [145] 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.
- [146] 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.
- [147] NITTA N, IINO T, ISOZAKI A, et al. Raman image-activated cell sorting[J]. Nature Communications, 2020, 11(1): 3452.
- [148] LINDLEY M, DE PABLO J G, PETERSON J W, et al. High-throughput Raman-activated cell sorting in the fingerprint region[J]. Advanced Materials Technologies, 2022, 7(10): 2101567.
- [149] SONG Y Z, CUI L, LÓPEZ J Á S, et al. Raman-Deuterium Isotope Probing for *in situ* identification of antimicrobial resistant bacteria in Thames River[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 16648.
- [150] WANG Y, XU J B, KONG L C, et al. Raman-activated sorting of antibiotic-resistant bacteria in human gut microbiota[J]. Environmental Microbiology, 2020, 22(7): 2613-2624.
- [151] YUAN X F, SONG Y Q, SONG Y Z, et al. Effect of laser irradiation on cell function and its implications in Raman spectroscopy[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2018, 84(8): e02508-e02517.
- [152] LIANG P, LIU B, WANG Y, et al. Isolation and culture of single microbial cells by laser ejection sorting technology[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2022, 88(3): e0116521.
- [153] SU X L, GONG Y H, GOU H L, et al. Rational optimization of Raman-activated cell ejection and sequencing for bacteria[J]. Analytical Chemistry, 2020, 92(12): 8081-8089.
- [154] ZHANG H, LIU K K. Optical tweezers for single cells[J]. Journal of the Royal Society, Interface, 2008, 5(24): 671-690.
- [155] XIE C G, DINNO M A, LI Y Q. Near-infrared Raman spectroscopy of single optically trapped biological cells[J]. Optics Letters, 2002, 27(4): 249-251.
- [156] 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.
- [157] FANG T, SHANG W H, LIU C, et al. Single-cell multimodal analytical approach by integrating Raman optical tweezers and RNA sequencing[J]. Analytical Chemistry, 2020, 92(15): 10433-10441.
- [158] JING X Y, GONG Y H, XU T, et al. One-cell metabolic phenotyping and sequencing of soil microbiome by Raman-activated gravity-driven encapsulation (RAGE) [J]. mSystems, 2021, 6(3): e0018121.
- [159] LAU A Y, LEE L P, CHAN J W. An integrated optofluidic platform for Raman-activated cell sorting[J]. Lab on a Chip, 2008, 8(7): 1116-1120.
- [160] DOCHOW S, KRAFFT C, NEUGEBAUER U, et al. Tumour cell identification by means of Raman spectroscopy in combination with optical traps and microfluidic environments[J]. Lab on a Chip, 2011, 11(8): 1484-1490.
- [161] DOCHOW S, BELEITES C, HENKEL T, et al. Quartz microfluidic chip for tumour cell identification by Raman spectroscopy in combination with optical traps[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2013, 405(8): 2743-2746.
- [162] CASABELLA S, SCULLY P, GODDARD N, et al. Automated analysis of single cells using Laser Tweezers Raman Spectroscopy[J]. Analyst, 2016, 141(2): 689-696.
- [163] LI M Q, ASHOK P C, DHOLAKIA K, et al. Raman-activated cell counting for profiling carbon dioxide fixing microorganisms[J]. The Journal of Physical Chemistry A, 2012, 116(25): 6560-6563.
- [164] MCILVENNA D, HUANG W E, DAVISON P, et al. Continuous cell sorting in a flow based on single cell resonance Raman spectra[J]. Lab on a Chip, 2016, 16(8): 1420-1429.
- [165] 涂然, 李世新, 李昊霓, 等. 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.
- TU R, LI S X, LI H N, et al. Application of droplet microfluidic technology in the breeding of microbial engineering strains [J]. Synthetic Biology Journal, 2023, 4(1): 165-184.
- [166] CRISTOBAL G, ARBOUET L, SARRAZIN F, et al. On-line laser Raman spectroscopic probing of droplets engineered in microfluidic devices [J]. Lab on a Chip, 2006, 6(9): 1140-1146.
- [167] EVANS C L, POTMA E O, PUORIS'HAAG M, et al. Chemical imaging of tissue *in vivo* with video-rate coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,

- 2005, 102(46): 16807-16812.
- [168] HU F H, SHI L X, MIN W. Biological imaging of chemical bonds by stimulated Raman scattering microscopy[J]. *Nature Methods*, 2019, 16(9): 830-842.
- [169] WANG H W, BAO N, LE T L, et al. Microfluidic CARS cytometry[J]. *Optics Express*, 2008, 16(8): 5782-5789.
- [170] CAMP C H Jr, YEGNANARAYANAN S, EFTEKHAR A A, et al. Label-free flow cytometry using multiplex coherent anti-Stokes Raman scattering (MCARS) for the analysis of biological specimens[J]. *Optics Letters*, 2011, 36(12): 2309-2311.
- [171] HIRAMATSU K, IDEGUCHI T, YONAMINE Y, et al. High-throughput label-free molecular fingerprinting flow cytometry[J]. *Science Advances*, 2019, 5(1): eaau0241.
- [172] ZHANG C, HUANG K C, RAJWA B, et al. Stimulated Raman scattering flow cytometry for label-free single-particle analysis[J]. *Optica*, 2017, 4(1): 103-109.
- [173] SUZUKI Y, KOBAYASHI K, WAKISAKA Y, et al. Label-free chemical imaging flow cytometry by high-speed multicolor stimulated Raman scattering[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116(32): 15842-15848.
- [174] XIN Y, SHEN C, SHE Y T, et al. Biosynthesis of triacylglycerol molecules with a tailored PUFA profile in industrial microalgae[J]. *Molecular Plant*, 2019, 12(4): 474-488.
- [175] XIN Y, LU Y D, LEE Y Y, et al. Producing designer oils in industrial microalgae by rational modulation of co-evolving type-2 diacylglycerol acyltransferases[J]. *Molecular Plant*, 2017, 10(12): 1523-1539.
- [176] ZENG W Z, GUO L K, XU S, et al. High-throughput screening technology in industrial biotechnology[J]. *Trends in Biotechnology*, 2020, 38(8): 888-906.
- [177] HO C S, JEAN N, HOGAN C A, et al. Rapid identification of pathogenic bacteria using Raman spectroscopy and deep learning[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 4927.
- [178] TANG T, LIU X, KIYA R, et al. Microscopic impedance cytometry for quantifying single cell shape[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2021, 193: 113521.
- [179] ISLAM M, BRINK H, BLANCHE S, et al. Microfluidic sorting of cells by viability based on differences in cell stiffness[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 1997.
- [180] ZHANG Y, ZHAO Y, CHEN D Y, et al. Crossing constriction channel-based microfluidic cytometry capable of electrically phenotyping large populations of single cells[J]. *Analyst*, 2019, 144(3): 1008-1015.
- [181] LABELLE C A, MASSARO A, CORTES-LLANOS B, et al. Image-based live cell sorting[J]. *Trends in Biotechnology*, 2021, 39(6): 613-623.
- [182] KONG K, ROWLANDS C J, VARMA S, et al. Diagnosis of tumors during tissue-conserving surgery with integrated autofluorescence and Raman scattering microscopy [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(38): 15189-15194.



通讯作者: 马波(1976—), 男, 博士, 研究员, 博士生导师。研究方向为单细胞关键技术与仪器、微流控技术等。
E-mail: mabo@qibebt.ac.cn



第一作者: 王喜先(1988—), 男, 博士, 副研究员, 硕士生导师。研究方向为微流控、高通量拉曼流式分选技术等。
E-mail: wangxx@qibebt.ac.cn