

## 特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2023-025

## 单细胞拉曼光谱测试分选装备研制及应用进展

刁志钊, 王喜先, 孙晴, 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:** 合成生物学的跨越式发展, 取决于“设计-构建-测试-学习”(design-build-test-learn)这四大环节的突破。随着基因组测序、编辑、合成以及人工智能技术的日新月异, 业界设计和构建突变体甚至人工细胞工厂的能力已经突飞猛进。然而, 合成生物学至今仍面临的困境之一便是“大体系的复杂性难以处理”, 一旦体系变大, 细胞表型测试与分选的工作量就非常艰巨, 甚至不可完成。单细胞拉曼光谱(SCRS)技术能够在活体单细胞水平、非标记状态下识别全景信息从而分辨复杂功能表型, 且具有快速、低成本、能够与下游细胞组学研究耦联等优势, 被视为全新的单细胞表型识别技术。目前, 基于SCRS技术强大的表型识别能力已发展了系列合成表型的测试与分选装备, 并进行了广泛的应用示范, 展示了其助力合成生物学表型测试与分选的巨大潜力。本文选取自主研发的单细胞拉曼光谱分选仪(RACS-Seq)、单细胞微液滴分选系统(EasySort)和高通量流式拉曼分选仪(FlowRACS)为典型仪器装备, 分别概述其技术原理和技术迭代以及特色应用案例等。本文最后对当前基于SCRS技术的合成表型测试分选装备所存在的问题及潜在解决策略进行了探讨和展望。

**关键词:** 合成生物学; 单细胞拉曼光谱技术; 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 and applications of single-cell Raman spectroscopy testing and sorting equipment

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

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

**Abstract:** The advancement of synthetic biology depends on the breakthroughs in the "design", "build", "test", and "learn" (DBTL) stages. With the rapid methodological innovations in genome sequencing, editing, synthesis, and artificial intelligence, the industry has made remarkable progress in designing and building mutants and even artificial cell factories. However, the "unmanageable complexity of large systems" remains one of the ongoing challenges for synthetic biology. As the cell mutant libraries get larger, the process of testing becomes more tedious and even

收稿日期: 2023-03-21 修回日期: 2022-05-17

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: 刁志钊, 王喜先, 孙晴, 徐健, 马波. 单细胞拉曼光谱测试分选装备研制及应用进展[J]. 合成生物学, 2023, 4(5): 1020-1035

Citation: DIAO Zhidian, WANG Xixian, SUN Qing, XU Jian, MA Bo. Advances and applications of single-cell Raman spectroscopy testing and sorting equipment[J]. Synthetic Biology Journal, 2023, 4(5): 1020-1035

impossible. Hence, there is an urgent need to develop high throughput sorting platforms. SCRS (single-cell Raman spectrum) technology can identify panoramic information at the single-cell level in a non-labeled state, distinguishing complex functional phenotypes. It has advantages such as being fast, low-cost, and capable of being coupled with downstream omics research, thus making it a novel technology for single-cell phenotype identification. At present, based on the powerful ability of SCRS in phenotyping, a series of synthetic phenotypic testing and cell sorting equipment have been developed and a wide range of application demonstrations have been carried out, which demonstrates its enormous potential in accelerating the phenotypic testing and cell sorting in synthetic biology. In this review, we selected the self-developed Raman-activated cell sorting coupled sequencing system (RACS-Seq), single-cell microfluidic droplet sorting system (EasySort), and high-throughput flow cytometry Raman-activated cell sorting (FlowRACS) as the typical equipment, by introducing their technical principles, technical iterations and characteristic application cases. Despite the advances in SCRS-based synthetic phenotypic testing and cell sorting equipment, there are still challenges to overcome. For example, there is a need for improving automation and standardizing protocols to ensure reproducibility and scalability. The development of more powerful artificial intelligence algorithms for dissecting SCRS is also required to exploit more complicated phenotypes. Finally, the throughput and sensitivity still need to be improved significantly. In conclusion, in spite of some disadvantages, the SCRS-based equipment has shown great promise in accelerating the phenotypic testing and cell sorting in synthetic biology.



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

合成生物学在过去二十年中表现出巨大发展潜力，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能够引起人类生活以及全球经济发生革命性进展的颠覆性科技<sup>[1-3]</sup>。我国《“十三五”国家科技创新规划》《“十三五”生物技术创新专项规划》都将合成生物技术列为“构建具有国际竞争力的现代产业技术体系”所需的“发展引领产业变革的颠覆性

技术”之一。合成生物学的跨越式发展，取决于“设计-构建-测试-学习”（design-build-test-learn）这四大环节的突破。近年来，合成生物学发展又进入了新的快速发展阶段，基因编辑与合成技术以及人工智能的迅速发展极大地增强了“设计”和“合成”两大环节<sup>[4-9]</sup>，而细胞表型测试速度与通量的发展却缓慢得多，难以满足“细胞表型测试”环节对高通量的需求，因此细胞表型测试成

为限制合成生物技术快速发展的主要因素之一。

单个细胞是地球上生命的基本单元和进化的基本单位，因此单细胞表型测试技术原理和仪器设备体系的突破，将带来合成生物学技术的重大突破。目前单细胞表型测试常用技术中，荧光流式具有超灵敏、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<sup>[10-12]</sup>，但其需外加荧光标记的前提限制了应用的普适性。质谱流式是一种强大的功能表型识别技术<sup>[13-15]</sup>，但其在单细胞水平的检测分辨率还很低，且对细胞具有破坏性。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<sup>[16]</sup>。光谱信号对应于化学键的振动，其依靠激发光的非弹性散射和分子共振可以对单个细胞产生独特的“指纹图谱”<sup>[17]</sup>。单细胞拉曼光谱（single-cell Raman spectrum, SCRS）技术能够提供丰富的代谢表型信息，可以实现单细胞精度测量，且可以进行非标记的原位检测进而形成普适性应用，因此是实现高精度单细胞代谢功能探测的重要手段<sup>[18-20]</sup>。

基于SCRS技术强大的表型识别能力，国内外已搭建了针对不同应用场景的拉曼激活细胞分选平台（RACS）。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）<sup>[21]</sup>、静态拉曼光镊（static-Raman tweezer, Static-RT）<sup>[22-23]</sup>、重力驱动拉曼光镊液滴分选（Raman-activated gravity-driven encapsulation, RAGE）<sup>[24]</sup>，后者主要包括流式拉曼光镊（flow-Raman tweezer, Flow-RT）<sup>[25]</sup>、拉曼微流分选（Raman-activated microfluidic sorting, RAMS）<sup>[26]</sup>、拉曼微液滴分选（Raman-activated droplet sorting, RADS）<sup>[27]</sup>、介电单细胞捕获/释放拉曼激活液滴分选（positive dielectrophoresis-based RADS, pDEP-RADS）<sup>[28]</sup>以及相干拉曼微流分选（Coherent-RAMS）<sup>[29-30]</sup>。这些平台有效耦合了单细胞拉曼表型识别、分选、基因型分析或培养，展示了其助力合成生物学细胞表型测试与分选的巨大潜力。本文选取自主研发的单细胞拉曼光镊分选仪（RACS-Seq）、单细胞微液滴分选系统

（EasySort）和高通量流式拉曼分选仪（FlowRACS）为典型仪器装备，分别概述其技术原理、技术迭代以及特色应用案例，为国产化仪器装备提供特色研制方案。

## 1 单细胞拉曼光镊分选仪（RACS-Seq）

RACS-Seq以RAGE技术为核心，可以在水环境中对单个细胞进行低损伤的拉曼成像，并依据特征SCRS将目标单细胞用重力驱动液滴包裹的形式精准包裹，进而将液滴从微流控芯片转移至离心管中，以单个细胞-单个液滴-存放于单个试管的形式完成细胞分选和单细胞样本制备，以支撑下游单细胞扩增或测序。RACS-Seq可对各类细胞样品进行一站式单细胞代谢表型测量、单细胞拉曼分选、单细胞基因组解析和单细胞培养。基于稳定同位素标记底物饲喂SCRS技术，RACS-Seq无须分离培养，在单细胞精度直接鉴定微生物种类，并测量各种代谢相关表型（及其细胞间异质性）。通过单细胞微液滴光镊拉曼分选与低偏好性核酸扩增技术，以获取高覆盖率、与代谢表型相关联的单细胞基因组。RACS-Seq为复杂细胞样品的代谢活性快检、种质资源挖掘和功能机制研究提供了新一代、原创的装备解决方案 [图1(a)]。

### 1.1 仪器原理

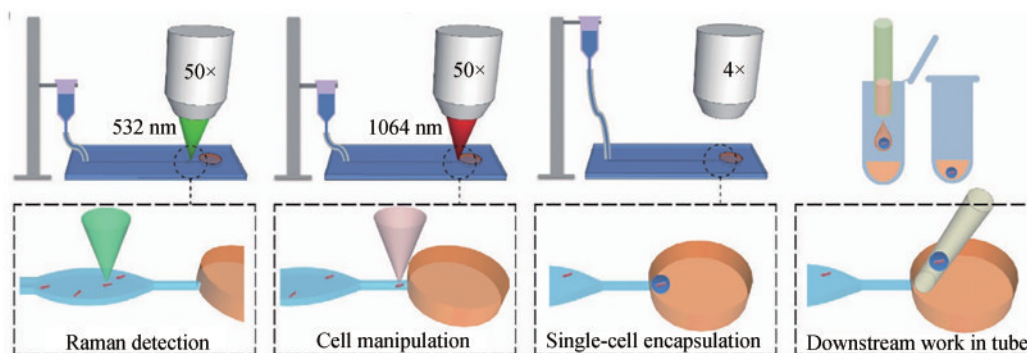
Xu等<sup>[24]</sup>开发了一种重力驱动拉曼光镊液滴分选技术，通过耦合液滴微流控技术，完成了目标单细胞的精准分选和快速导出，实现所测即所得。RAGE技术的发展为RACS-Seq的研制与发展提供了技术支撑。RAGE分选所采用的水相拉曼单细胞信号检测可以降低激光照射带来的损伤，加之液滴生成过程有油相的引入可以提高MDA扩增效率<sup>[29]</sup>，所以RAGE分选后，目标大肠杆菌单细胞的全基因组测序覆盖度达到了约95%<sup>[24]</sup>。

RACS-Seq主要由拉曼光镊与RAGE微流控分选芯片两部分组成，拉曼光镊用于单细胞拉曼成像和单细胞操控，微流控分选芯片用于构建单细胞拉曼成像环境，以及支撑后续的单细胞液滴包裹和分离。在芯片内对细胞进行捕获操控需要高



(a) RACS-Seq仪器图及仪器参数

(a) Instrument diagram and instrument parameters of RACS-Seq



(b) RACS-Seq的单细胞拉曼分选流程

(b) Raman-activated cell sorting using RACS-Seq

图1 基于RACS-Seq的单细胞拉曼表型检测分选装备及分选流程

Fig. 1 Equipment and process for Raman-activated single-cell phenotype detection and sorting based on RACS-Seq

精度的流路控制，而传统基于注射泵、蠕动泵的进样方式由于导管、注射器始终处于压缩受力的状态，难以实现 $\text{pL}/\text{min}$ 级别的流路调控。RAGE技术创新性地采用了重力进样的方式，以类似打吊瓶的方法将装有样本细胞的注射器悬挂于高度可控的进样架上，通过注射器与芯片内的液面差，让样本自动可控地进入芯片，并通过调节进样架上注射器的高度控制其进样流速。此外，在微流控芯片的储油池一端加入油相时，油相在微通道内浸润产生与进样重力方向相反的毛细作用力，通过调节液面差高度可在芯片内形成流速为0的静止状态。

和传统流式分选不同，RAGE采用半静态分选。细胞分选前，调节进样架高度，使芯片内水相与储油池内油相的两相界面停留于微通道出口处，此时通道流速为0，细胞在通道内保持准静止状态（具有鞭毛结构的细胞会自发游动），收集检测窗口处细胞的拉曼光谱（532 nm激光照射）。由

于拉曼信号的强度与激发光波长的四次方成反比，这里用532 nm激光进行拉曼成像。检测时，532 nm激光具有一定的光镊捕获力，可轻易在准静态环境下捕获细小细胞，由于准静态环境下没有拉曼曝光时间的限制，因此可采集到微弱的细胞原位拉曼信号。筛选出具有特征拉曼光谱的目标细胞后，将532 nm激光切换为1064 nm激光，并利用1064 nm激光所产生的光镊力将目标细胞拖拽到通道末端的油水界面处。此时，升高进样架的高度即能将油水界面处的水相挤入油池进而形成单个液滴，目标细胞随即被包裹进入形成的单个液滴。由于所选油相与水相的密度差异，生成液滴会停留于储油池最底部靠近通道出口处，之后可方便地通过毛细管或移液枪完成转移，最终以单个细胞-单个液滴-存放于单个试管的形式完成筛选[图1(b)]。该分选模式还可方便与荧光成像耦合进行单细胞荧光分选。

## 1.2 应用

微生物组是地球上能量与元素循环的主要载体，与人体、动植物以及环境的健康也息息相关。因此，微生物组的探测、理解和利用，将跨越“尚难培养微生物屏障”，带来生命科学及其应用的共性突破。SCRS能够无需培养而快速识别菌群中细胞的各种代谢功能，但是一直以来，针对菌群的单细胞拉曼分选和测序都面临着两个瓶颈：首先，如何无损快速地获取特定拉曼表型的单个细胞；其次，如何高覆盖度地获得精确到一个细胞的基因组。

针对上述问题，单细胞拉曼光镊分选仪 RACE-Seq 给出了有效的解决方案，通过耦合光镊及微流控液滴技术，将特定拉曼表型的细菌单细胞从群体中精准分离，并包裹到皮升级液滴中，然后采用宏观移液的方式便可将包裹有目标细胞的液滴导出并转移到试管中，从而快速、精确、简便地实现“单个细胞-单个液滴-单个试管”的拉曼分选流程，可直接耦合下游细胞培养或基因组分析。在这里选取了部分案例展示 RACE-Seq 的广泛应用潜力（图2）。

### 1.2.1 尿液中抗生素抗性大肠杆菌单细胞拉曼分选及测序

Xu 等<sup>[24]</sup>使用 RACS-Seq 从临床尿液样本中直接识别和分选出耐受特定抗生素的临床大肠杆菌，并精确到一个细胞的全基因组测序，覆盖度可达 99.5%。拉曼弹射分选（RACE）<sup>[21]</sup>在干片条件进行拉曼检测，且激光弹射分选会对细胞造成一定的损伤，因此 RACE 的单细胞测序覆盖度一般不高，RACS-Seq 分选细胞时由于目标细胞在分选过程中始终处于水相环境中，有效降低了拉曼分选中激光引入造成的细胞损伤，其导出的单细胞液滴体系经过简单振荡后可转变成乳化扩增体系，大幅度降低了传统单细胞基因扩增（如单细胞 MDA）中存在的偏好性，从而可从一个细胞得到近乎完整的全基因组信息。这一高覆盖度保证了基因组上所有耐药基因突变均得以全面、精确地揭示。此外，其独特的单液滴分选转移形式有效解决了单细胞分析中常见的污染问题。从菌群中直接、精准地获取一个细菌细胞的药敏性表型及其完整基因组，以往还未有先例。因此，RACS-Seq 的这一独特能力，预计将带来临床感染诊断和

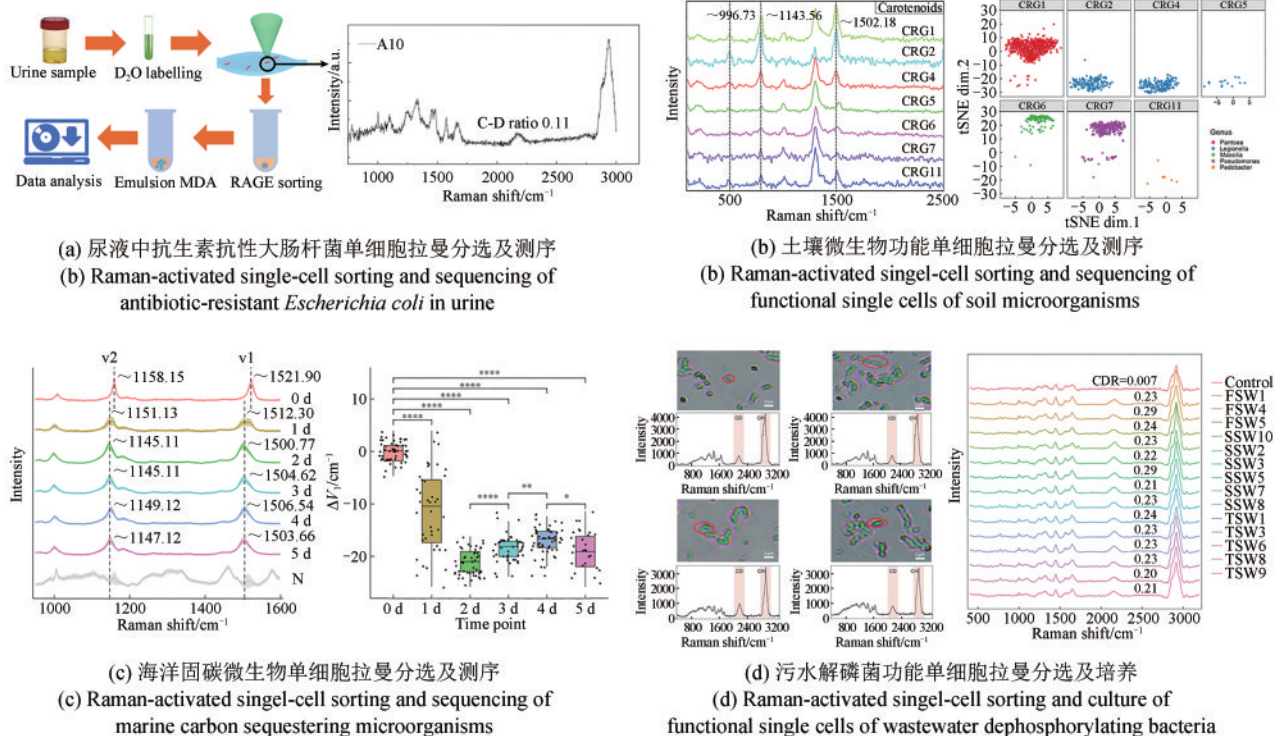


图2 基于RACS-Seq的单细胞拉曼分选应用

Fig. 2 Applications of Raman-activated single-cell sorting based on RACS-Seq

用药、耐药性传播监控与机制、海洋生态监控与资源挖掘等领域的一系列突破 [图2(a)]。

### 1.2.2 土壤微生物功能单细胞拉曼分选及测序

土壤菌群是地球上最多样与最复杂的微生物组之一，其中大部分微生物尚难以培养，而单个细胞精度的拉曼分析-分选-测序策略是剖析土壤等环境菌群之代谢机制的重要手段。Jing等<sup>[31]</sup>依托 RACS-Seq，从稳定同位素底物饲喂的土壤菌群出发，将特定拉曼表型的细菌单细胞精准分离并包裹到皮升级液滴中，进而耦合下游基因组测序。结果表明：①土壤菌群中细胞代谢活跃的低丰度物种（如 *Corynebacterium* spp.、*Clostridium* spp.、*Moraxella* spp.、*Pantoea* spp. 和 *Pseudomonas* spp. 等）经重水饲喂与标记后，可利用 RACS-Seq 精准地识别和分选，其单细胞基因组覆盖率可高达近 93%；②基于 RACS-Seq，含类胡萝卜素的土壤微生物细胞（如 *Pantoea* spp.、*Legionella* spp.、*Massilia* spp.、*Pseudomonas* spp. 和 *Pedobacter* spp. 等）能实现单个细胞分辨率、高基因组覆盖度的代谢重建，从而完整、深入地挖掘其类胡萝卜素合成途径；③这些“原位”合成类胡萝卜素的土壤微生物细胞中，既有代谢活跃的，也有相当部分是惰性的，表明基于纯培养的策略势必错失这些代谢惰性的功能微生物，因此“原位”、单细胞精度的功能细胞识别和分离，对于全面、客观的菌群功能剖析和资源挖掘具有重要意义 [图2(b)]。RACE-Seq 可以从土壤中精确地以单细胞分辨率建立代谢-基因组链接，可以帮助精确查明复杂生态系统中“谁在做什么”。

### 1.2.3 海洋固碳微生物单细胞拉曼分选及测序

为了挖掘海洋微生物组中具有原位固定 CO<sub>2</sub> 功能的细胞，Jing等<sup>[32]</sup>依托 RACS-Seq，利用稳定同位素 <sup>13</sup>C 标记的无机碳底物饲喂新鲜海水样品，通过 SCRS 中类胡萝卜素等色素特征峰的“红移”现象，建立了在免培养前提下原位固定 CO<sub>2</sub> 之单细胞的识别和测量流程。研究人员在中国山东省青岛崂山湾真光层海水中，识别和分选到一系列进行海洋原位固碳代谢的 *Pelagibacter* 属单细胞，来自于 SAR11 等类群。基于这些 SAR11 单细胞全基因组序列（覆盖度最高达到 100%）的进化分析、基因功能预测与代谢途径重建，表明：①它们具有

完整的类胡萝卜素合成途径，这印证了上述 SCRS 基于色素峰红移来识别和表征 CO<sub>2</sub> 固定活性的原理；②发现了一个基于视紫红质的光激活质子泵系统，其中包括双加氧酶（dioxygenase）、视紫质光敏感蛋白（proteorhodopsin）、F-型 ATP 合成酶（F-type ATPase）等关键蛋白；③它们拥有大部分进行 CO<sub>2</sub> 固定的 Calvin-Benson 循环途径的基因。这些发现提示这些 SAR11 细胞可能通过基于视紫红质的光激活质子泵系统来驱动基于 Calvin-Benson 循环的海水原位固碳。经过假设验证得知它们能够合成视紫质，且其中的两个基因与 GenBank 中的基因均无显著同源性，属于一类全新的视紫质光敏感蛋白。因此，这些视紫红质介导的光激活质子泵系统，很可能是 SAR11 在海水中原位进行光合固碳的能量引擎 [图(2)]。基于 RACS-Seq 系统，Jing等<sup>[32]</sup>建立了针对 CO<sub>2</sub> 固定活性等代谢表型的功能靶向性单细胞拉曼分选与测序方法。

### 1.2.4 污水解磷菌功能单细胞拉曼分选及培养

磷既是维持作物种植、养活全球人口的关键营养元素，也是造成水体污染的重要原因。水体及土壤中的磷源包括可溶磷和不可溶磷（包括无机不可溶磷源和有机不可溶磷源），其中只有可溶态磷能够被生物利用。而解磷菌能够把不可溶磷转化为可溶解态磷源，因此，挖掘在水体、土壤等环境中“原位”行使解磷功能的微生物，具有重要的研究意义和产业价值。基于元拉曼组原理和 RACS-Seq，Jing等<sup>[33]</sup>发明了菌群中功能单细胞“先筛后养”的 scRACS-Culture 新策略。为了识别污水微生物组中的原位解磷菌，研究人员利用以 Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 为唯一无机磷源或以卵磷脂为唯一有机磷源的污水样本（预先去除可溶性磷源），结合 D<sub>2</sub>O 孵育，从而通过 SCRS 中 C—D 特征峰的强弱，在单细胞精度定量表征污水中微生物的解磷活性，进而建立了原位解磷菌的单细胞识别-分选-培养流程 [图2(d)]。

运用这一 scRACS-Culture 体系，研究人员在青岛张村河水务有限公司的污水处理池中，原位识别、分选和培养出了 *Comamonas* spp.、*Acinetobacter* spp.、*Enterobacter* spp. 和 *Citrobacter* spp. 等高效原位有机解磷菌。重要的是，其原位解磷活性均比

实验室纯培养条件下高出1~2, 凸显了“先筛后养”策略对菌株“原位”功能认知与评价的重要意义。同时, 研究人员运用 scRACS-Seq, 还发现了一类在污水中原位高效溶解不可溶有机磷源、在实验室条件下尚难以纯培养的解磷菌新类群 *Cutibacterium* spp.。精确到一个细菌细胞的高覆盖度基因组重建表明, 它们通过分泌金属磷酸酯酶 (MPP)、细胞壁锚定 5'-核苷酸酶 (ushA 编码) 和质膜定位的 PstSCAB-PhoU 转运系统, 来高效溶解和清除污水中的胞外磷酸盐。由于 scRACS-Culture 的功能筛选不依赖于细胞纯培养, 因此能基于“原位”功能、针对菌群中所有的生物多样性进行挖掘, 并精准聚焦于目标功能细胞进行培养条件优化。这些特色克服了功能筛选片面性、功能评价失真性、菌株培养盲目性这三个传统“先养后筛”策略的潜在缺陷。

### 1.3 小结

微生物组, 也称菌群, 是微生物在自然界的主要存在形式, 也是地球上能量与元素循环的重要载体。这一由成百上千个物种组成的共生体, 有着复杂且独特的内部代谢网络, 成为精妙的功能实体, 维护着人体内外乃至室内环境、土壤、海洋、大气等生态系统的稳定。因此, 微生物组的探测、理解和利用, 将跨越“尚难培养微生物屏障”, 带来生命科学及其应用的共性突破, 而阻碍此跨越的技术瓶颈之一便是“在特定的环境条件下, 菌群中哪些/哪个细胞代谢了哪种底物? 为什么?”。

RACS-Seq 可以实现单细胞表型与高质量基因型的对接, 将有助于解答上述难题; 同时, RACS-Seq 可以从底物代谢追踪的角度阐明菌群内代谢分工, 揭示菌群-环境相互作用和菌群功能理性调控的机制。然而由于分选通量和测序通量的限制, 现阶段只能处理分析<100个单细胞样本。而微生物组的细胞组成较为复杂, 细胞数量大, 细胞种类繁多, 少量单细胞信息根本无法反映整个菌群的真实情况, 因此需要在现有技术基础上进一步发展自动化高通量单细胞检测和分选的技术, 并与下游高通量单细胞测序平台耦合。现阶段, 凭

借人工智能技术的发展, 单细胞分辨率的图像识别、鉴定、分类已成为可能。借助于该技术, 有望实现自动化的单细胞高通量分选。

## 2 单细胞微液滴分选系统 (EasySort)

EasySort Lego/Compact 通过光镊轻松控制单细胞的移动轨迹, 并通过独有的重力驱动专利技术, 可将直径 0.5~30  $\mu\text{m}$  的单细胞迅速包裹成单液滴并对接下游实验。EasySort Lego/Compact 可广泛应用于各类单细胞的分离、分选、培养及测序实验中, 可以实现复杂样品中单个细胞精度的可靠分选与微液滴包裹, 保证细胞活性和 DNA/RNA 质量。另外, 在 EasySort Lego 的基础上, 研究人员开发了新一代人工智能辅助的微生物单细胞自动化分选系统 EasySort AUTO, 可将常规显微镜升级为微生物单细胞的智能化、自动化分选装置, 并利用酵母和大肠杆菌细胞示范了单细胞分选-测序/培养的全流程。EasySort 系列仪器为细胞资源的探测和挖掘提供了有力手段 [图3(a)]。

### 2.1 仪器原理

#### 2.1.1 EasySort Lego/Compact 仪器原理

EasySort Lego/Compact 在 RAGE 分选的基础上, 在微流控芯片中构建出不受流动支路影响的准静态细胞池, 创新性地提出了一种光镊辅助静态池成像分选技术 (OPSI), 实现了分选通量的显著提升<sup>[34]</sup>。利用静态池成像分选的思路, 即在微流控芯片中构建流速为0的稳定静态流场, 对样本细胞进行限域, 并在该流场内进行平面明场、荧光成像或拉曼扫描从而选取目标细胞。之后通过低细胞损伤的 1064 nm 光镊将目标单细胞移出静态流场, 并进行单细胞液滴包裹和导出完成分选。相比 RAGE, 由于静态细胞池与分选支路互相独立, 无须对支路干扰细胞进行清理, 并且细胞池与分选通道的间距缩小至约 150  $\mu\text{m}$ , 缩短了光镊操控距离, 最终分选通量由 1~2 细胞/min 提高至约 10 细胞/min, 并且分选体积仍为皮升级, 因此有助于下游单细胞扩增和测序。

该系统流体驱动液滴生成与 RAGE 类似, 同

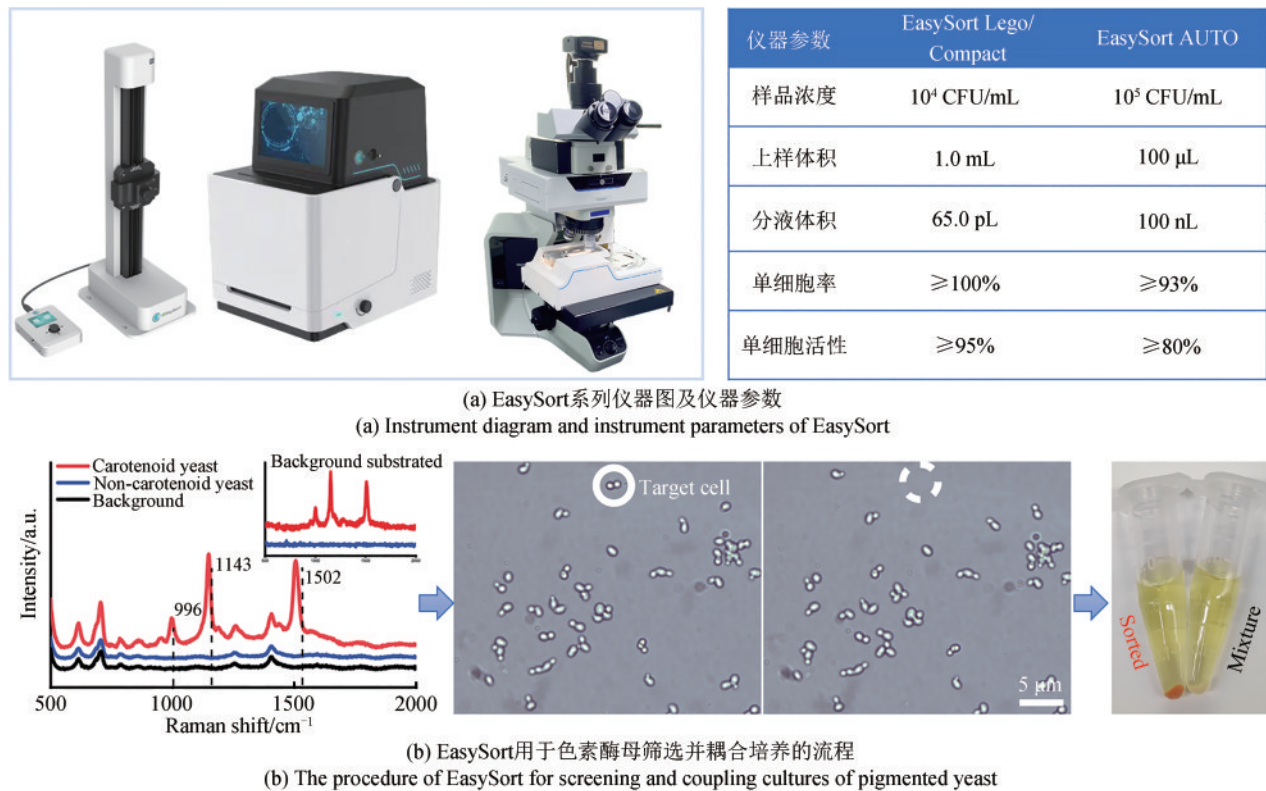


图3 基于EasySort的单细胞拉曼表型检测分选装备及分选流程

Fig. 3 Equipment and process for Raman-activated single-cell phenotype detection and sorting based on EasySort

为重力进样法。通过调节进样架与芯片内流体的液面差，进行液滴生成的调控。当液面差在一定范围内稳定时，可保证油水界面稳定存在于油池位置，当抬升进样架将液面差增加时，水相被挤入油池触发液滴生成。

EasySort Lego/Compact的单细胞分选准确率大于99.7%，保证10~20细胞/min的分选通量，并高度保持了细胞活性。此外，EasySort Lego/Compact继承了RAGE小尺寸分离反应的特点，显著降低了传统单细胞基因扩增中存在的歧化现象。例如，使用该系统分选人体MCF-7单细胞进行RNA-seq，可获得高质量和高可重复性的单细胞转录组谱。EasySort Lego/Compact的通用性、方便性、灵活性和低成本等优势为其在单细胞多组学研究中的应用提供了广阔的前景。虽然EasySort Lego/Compact在RAGE单细胞分选技术原理的基础上进一步提高了分选通量与便利性，但是单细胞的分选及收集导出仍需要复杂的人工操作。

### 2.1.2 EasySort AUTO 仪器原理

EasySort AUTO在EasySort Lego/Compact的基

础上进一步提高了自动化与便利性，实现了单细胞自动化的分选及收集导出<sup>[35]</sup>。系统搭载的AI辅助图像识别算法可以智能化、自动化地识别目标细胞；系统嵌入的光镊技术可以捕捉并精准操控目标细胞；最后，利用了基于界面接触的微量液体分离专利技术，目标细胞能够以单管单细胞(one-cell-one-tube)的形式自动收集于PCR管中。

该系统由四个主要模块组成：用于真空辅助样品加载的真空进样模块；用于图像观察细胞的显微成像模块；用于操控单细胞的光镊模块；用于自动单细胞打印的单细胞收集模块。研究人员采用模块化的设计理念，通过光镊模块、自动采集模块、正置显微镜的耦合，可以很容易地将各种主要商业品牌的显微镜改装成具有自动化单细胞分选收集的EasySort AUTO。该系统的AI图像识别的准确率达80%，分选通量约为120细胞/h，单管单细胞的概率高于93%，同时分选的目标单细胞可以直接开展单细胞测序、培养等工作，单细胞测序成功率高于84.2%；酵母细胞和大肠杆菌单细胞培养的成功率分别约为85%和80%。

EasySort AUTO 的设计具备三个显著特点：①广谱适用性，由于光镊可以操控不同尺寸的细胞，该系统广泛适用于各类单细胞的分离、分选、培养及测序实验；②灵活性，该系统采用模块化的设计，可通过安装“巧手”——光镊模块和自动收集模块，将生物实验室常见的正置显微镜升级为单细胞分选装置；③高活性保持，分选后的目标细胞具备较高的活性和DNA/RNA质量。

## 2.2 应用

EasySort 系列仪器可依据细胞形态和 SCRS 分选色素酵母细胞 [图3(b)]。由于分选过程中，可以对细胞池内所有细胞进行单细胞精度的拉曼成像鉴别，且拉曼成像时间不受限制，因此即使细胞池中仅存在1个目标细胞，也可被EasySort识别并分选获得，证明了其在低丰度目标细胞体系的适用性。

将色素酵母与非色素酵母混合(1:100)，以色素酵母细胞为目标细胞进行单细胞分选。利用EasySort对视野中的所有酵母细胞进行拉曼判别，结果显示视野中约80个细胞里存在1个色素酵母细胞[图3(b)中圈出的细胞为色素酵母细胞]，该细胞的明场形态与非色素酵母细胞无明显差异，并且已进入出芽状态，具有强色素峰。将该细胞导出到离心管中，加入培养基在30℃条件下孵育培养48h，离心所得细胞沉淀，呈明显橘黄色，即类胡萝卜素颜色，与原始混合样本的沉淀存在显著区别，证明了EasySort可对低丰度样本进行单细胞拉曼筛选，分选细胞可再次培养，分选结果具有高准确度。考虑到每个细胞池中可装载小于10000个细胞，因此理论上单块芯片上可分选丰度大于0.01%的目标细胞。

## 2.3 小结

明场图像、荧光图像、拉曼光谱均可反映细胞丰富的表型信息，是汇集上述信息并具备单细胞精度索引、所见即所得特点的单细胞分选技术，在单细胞分析工作中具有广泛的适用性。EasySort Lego/Compact使细胞能够以精确索引的方式进行分类，“所见即所得”，实验数据表明其单细胞率

大于99.7%，近乎百分之百，并高度保持了细胞活性<sup>[34]</sup>。EasySort AUTO在EasySort Lego/Compact基础上进一步发展了自动化单细胞检测、目标细胞识别、目标细胞导出的功能，并与下游高通量单细胞测序平台耦合，实现了单细胞自动化的分选及收集导出<sup>[35]</sup>。实验数据表明其单细胞率在93%以上，也说明了自动化的收集方式损失了一定的准确率。EasySort系列仪器集成的光镊模块，适用于各类单细胞的精准操控，因此EasySort广泛适用于从细菌、古菌到人体细胞等不同尺寸大小的单细胞。另外，EasySort系列仪器分选的单细胞可以直接支撑高质量的单细胞基因组/转录组测序，为该系列仪器在单细胞多组学研究中的应用提供了广阔的前景。

## 3 高通量流式拉曼分选仪(FlowRACS)

SCRS具有非标记、无损、快速测量细胞代谢表型组、可与单细胞测序对接等优势。每个SCRS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。基于拉曼光谱强大的表型识别能力发展的FlowRACS，无须分离培养、在单细胞精度直接鉴定单细胞种类，可并行测量底物代谢、物质合成、代谢物互作网络、环境应激、物种间互作等代谢表型组及其细胞间异质性。FlowRACS实现了活体单细胞超高通量拉曼分选的高度自动化，为单细胞层面的代谢表型快检、种质资源挖掘和功能机制研究提供了新一代装备解决方案[图4(a)]。

### 3.1 仪器原理

RACS-Seq可以实现单细胞表型与高质量基因组对接，但其通量依然相对较低，难以实现自动化操作，这也极大地限制了RACS-Seq在大体系突变体库中的应用。概言之，通量低是限制当前RACS技术在单细胞表型检测与分选中广泛应用的关键瓶颈之一，急需发展高通量RACS技术。将拉曼光谱细胞识别技术与流式分选技术耦联是建立高通量RACS技术的重要思路，即流式拉曼分选

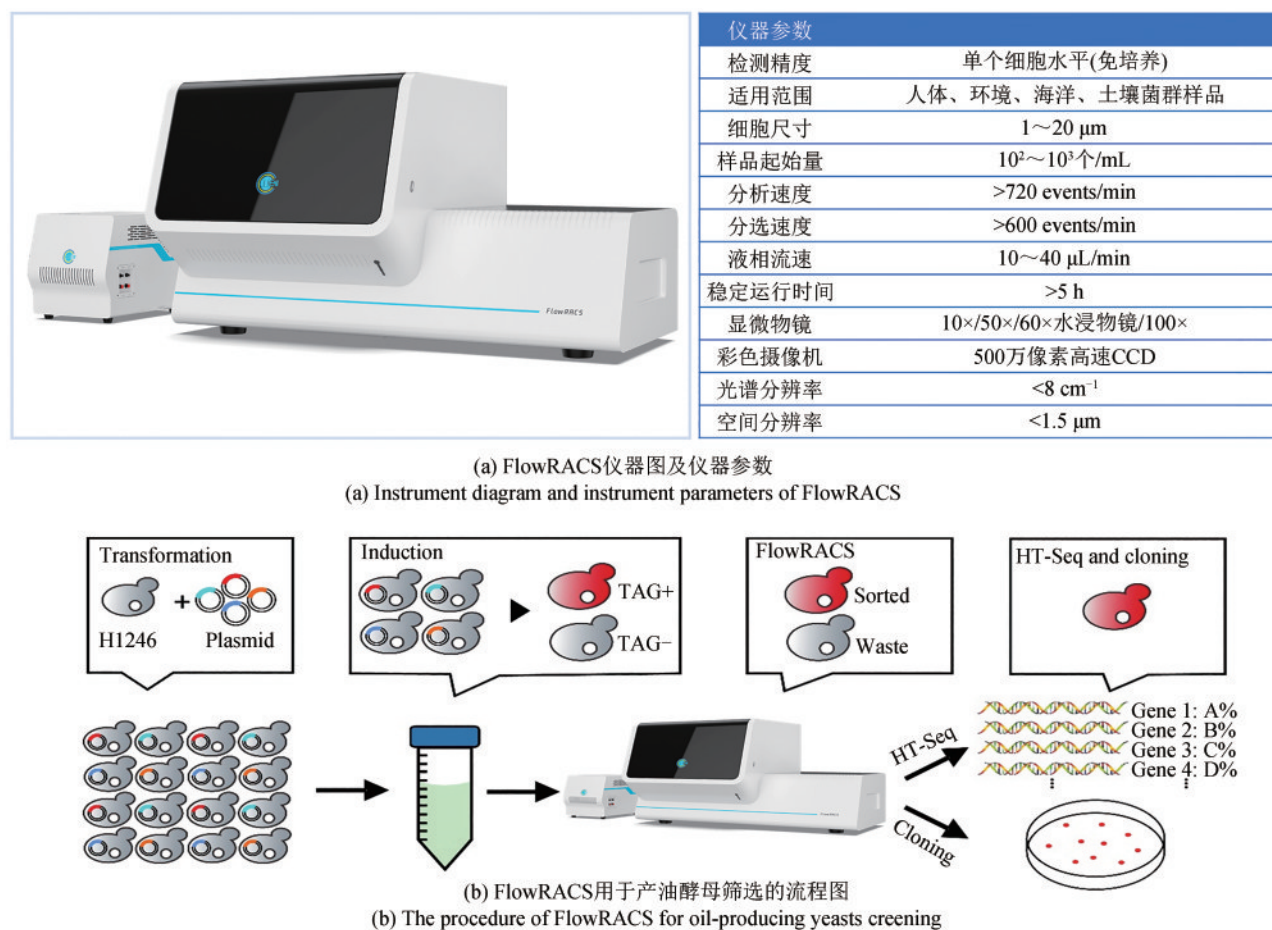


图4 基于FlowRACS的单细胞拉曼表型检测分选装备及分选流程

Fig. 4 Equipment and process for Raman-activated single-cell phenotype detection and sorting based on FlowRACS

技术。

研究人员以RAMS<sup>[26]</sup>、RADS<sup>[27]</sup>、pDEP-RADS<sup>[28]</sup>等流式分选技术为基础开发了FlowRACS,其自动化程度及通量相比RACS-Seq更高,因此更适用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。Zhang等<sup>[26]</sup>构建了RAMS平台,其通过集成电极施加介电场捕获单细胞进行拉曼精确检测,利用电磁阀吸吮分离获取目标细胞,最终实现了色素酵母细胞的拉曼流式筛选(约60个/min)。这一技术被*The Scientist*专文推介,被认为是通往高通量拉曼细胞分选的关键技术突破。基于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的策略,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。为进一步提高分选通量和分选准确率,Wang等<sup>[27]</sup>通过先拉

曼检测后液滴包裹的策略搭建了RADS平台,引入液滴微流控技术,使得系统的分选通量可达约260个细胞/min,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%,是当时已报道工作中全谱分选通量最高的拉曼流式分选系统。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。实现弱拉曼表型的检测及高通量分选一直是拉曼分选的终极目标之一。Wang等<sup>[28]</sup>在RADS平台基础上进一步集成了介电捕获细胞策略,开发了首套兼具普适性和通量的pDEP-RADS平台,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(DGAT)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<sup>[28]</sup>。基于pDEP-RADS和已研制的介电聚焦技术,中国

科学院青岛生物能源与过程研究所（青岛能源所）和青岛星赛生物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。然而，pDEP-RADS虽然解决了弱拉曼信号表型检测的瓶颈问题，但其稳定运行时间仅有30 min，无法普适于大体系细胞筛选。为了提高系统的运行时间以及系统的普适性，Wang等<sup>[9]</sup>近期开发了“介电诱导确定性侧向位移实现单细胞聚焦、捕获/释放的拉曼流式检测技术”（positive dielectrophoresis induced deterministic lateral displacement-based Raman flow cytometry; pDEP-DLD-RFC），通过宽流场高流量的进样策略，有效防止细胞沉降，从而实现了长时间稳定运行（>5 h），并证明其针对人体细胞（肿瘤）、植物（微藻）、酵母和细菌等多种细胞类型的广谱适用性。基于上述关键技术突破，青岛能源所和青岛星赛生物联手推出了兼具广谱通用性、高通量、运行稳定性等性能的新一代FlowRACS，为活体单细胞代谢表型组的高通量检测提供了全新工具。

## 3.2 应用

### 3.2.1 基于FlowRACS的DGATs酶活的筛选

目前，流式拉曼分选服务于合成生物学领域中最成功的应用案例是基于FlowRACS的DGATs酶活筛选<sup>[28]</sup>。在酶和微生物细胞工厂的设计中，筛选酶库的胞内活性通常是一个限速步骤。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物质、从生物物质中提取并通过薄层色谱法分离甘油三酯（TAG）产物、用气相和液相质谱来分析定量TAG中组分等繁杂步骤<sup>[36-37]</sup>，这一流程耗时耗力。Wang等<sup>[28]</sup>以产油酵母突变体库的筛选进行了应用示范。将多个基因进行同步转化构建突变体库，经诱导累积TAG后直接进行基于FlowRACS的筛选，分选后的细胞一部分进行高通量测序以检测目标细胞中的功能基因，另一部分平板培养后进行单克隆测序以检测每个克隆的细胞类型，从而获取到目标细胞进行后续检测[图4(b)]。

结果表明，基于FlowRACS筛选甘油三酯含量

的酵母表现出接近理论极限的准确性，约120个（细胞）/min的通量和充分的活力保存，而筛选脂肪酸不饱和程度（FA-DU）在约40个（细胞）/min的准确率为82%。从表达DGATs的酵母文库中成功获得3个已报道的强效基因和2个从未报道过的弱效基因<sup>[28]</sup>。这是FlowRACS用于酶发现的首次演示，与基于培养的方法相比，它在时间、耗材和劳动力方面节省了数百倍。

### 3.2.2 高通量高稳定性的拉曼流式细胞术

基于新一代FlowRACS，研究人员开发了其在肿瘤细胞分类、微藻合成过程监控、产油酵母多表型监控、细菌药敏性检测等方面的应用，展现了其高通量拉曼流式检测的广阔应用前景（图5）<sup>[9]</sup>。

（1）植物生物制造过程的代谢监控 基于共振拉曼信号，实现了雨生红球藻中虾青素含量的实时监测，从而示范了单细胞精度的虾青素累积过程细胞工厂代谢状态的监控，并考察了高光和缺氮等条件对细胞虾青素累积速度及其同步性的影响。其虾青素含量检测速度达约2700 events/min，是目前最高的自发拉曼检测/分选通量。

（2）酵母生物制造过程的代谢监控 基于非共振拉曼信号，示范了油脂酵母中细胞代谢活力、甘油三酯含量、油脂不饱和度等多个关键代谢表型的同步动态监控，进而通过拉曼组机器学习、拉曼组内关联分析（intra-Ramanome correlation analysis, IRCA）等算法，实现了单细胞代谢状态（准确率>96%）的实时鉴定，以及细胞内代谢物相互转化网络的实时重建。

（3）细菌药敏性的流式快检 基于单细胞中心前期提出的重水饲喂单细胞拉曼药敏原理，以大肠杆菌和多种常见抗生素为例，开发了流式药敏快检技术，并通过与拉曼药物应激条形码（Raman barcode for cellular stress-response, RBCS）、IRCA、拉曼组机器学习等算法结合，证明该流式药敏快检技术还能实时地判断单菌体精度的药物应激状态、构建细胞内代谢物相互转化网络等，从而揭示细菌-药物互作机制。此外，流式检测大大提高了药敏检测中SCRS取样深度，对于识别群体中通常占比很低的耐药细胞具有重要的意义。

（4）肿瘤细胞类型的快速区分 基于SCRS中

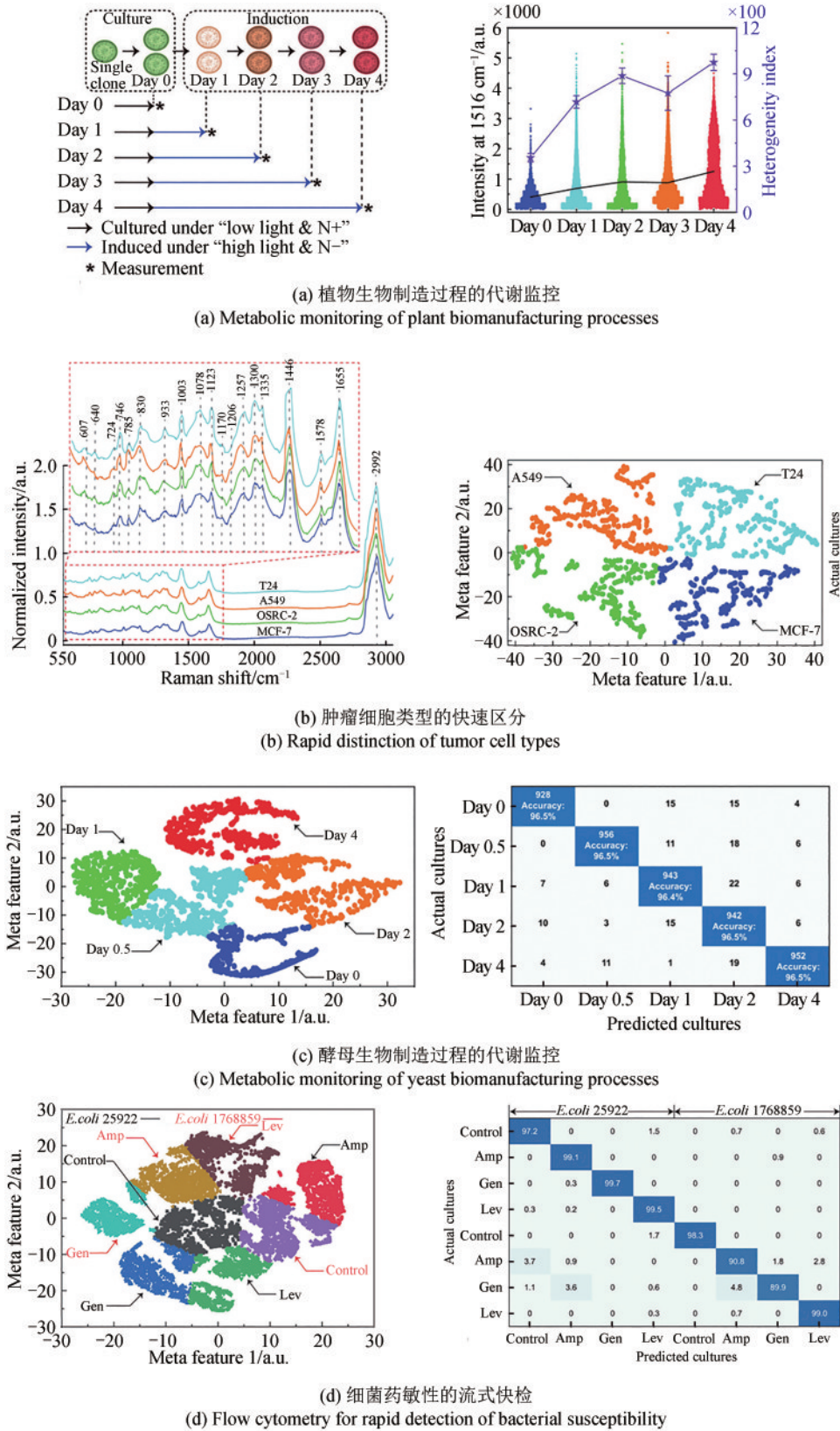


图5 基于FlowRACS单细胞拉曼表型检测分选的应用

Fig. 5 Applications of FlowRACS for Raman-activated single-cell phenotype detection and sorting

信息丰富的指纹区,以膀胱癌、肺癌、肾细胞癌、乳腺癌等细胞株为例,证明流式拉曼技术耦合拉曼组机器学习算法,能以平均大于95%的准确率完成肿瘤细胞类型的快速判别。该方法对于肿瘤细胞质量检测等应用具有潜在的应用价值。

### 3.3 小结

FlowRACS的研制与发展经过了漫长的技术迭代,结合了多种流式分选技术的优点,发展为以pDEP-RADS技术为核心的仪器。FlowRACS的出现代表着拉曼流式分选仪真正走向市场应用的开端,然而仪器的研制与发展需要经受住市场的考验。FlowRACS在进行实际样品筛选时,由于样品沉降导致的系统运行时间较短。研究人员针对这一瓶颈问题,从原理创新开发了pDEP-DLD-RFC,通过宽流场高流量的进样策略有效防止细胞沉降,从而实现了长时间稳定运行(>5 h)。以pDEP-DLD-RFC为技术核心的新一代FlowRACS目前仅具有拉曼流式检测的功能,具有高通量拉曼流式分选功能的仪器版本已经在研制中,将于近期发布。FlowRACS仪器以免培养和非标记的方式有效地建立单细胞表型-基因型连接,可高通量、高稳定性地分选功能单细胞,以满足合成生物学等领域对单细胞高通量表型筛选的需求。

## 4 总结展望

合成生物学的迅速发展为基于SCRS技术的合成表型测试分选装备的发展提供了新的机遇。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<sup>[38]</sup>。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<sup>[18-20]</sup>。基于SCRS技术强大的表型识别能力,国内外已搭建了针对不同应用场景的RACS平台。基于RACS发展的多种技术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,针对不同场景、不同细胞、不同表型的拉曼表型检测表明,SCRS可以解析或预测不同细胞功能表型,如在一定程度上量化检测细胞利用含氢<sup>[39]</sup>、含碳<sup>[40]</sup>等底物的代谢速率、测定各种拉曼敏感产物(色素<sup>[41]</sup>、甘油三酯<sup>[42]</sup>、淀粉<sup>[43]</sup>、蛋白<sup>[44]</sup>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<sup>[45]</sup>、微生物药物应激机制<sup>[46]</sup>、肿瘤药敏性与药物应激机制<sup>[47]</sup>等)、检测细胞之间的代谢互作<sup>[48]</sup>、重建细胞内代谢物相互转化网络(拉曼组内关联分析;IRCA)<sup>[49]</sup>,也可区分不同的物种<sup>[50]</sup>等。尽管SCRS具有这些优点,但也在灵敏度和噪声等方面存在一些劣势。SCRS的信号强度通常较弱,因此,需要高功率的激光和高灵敏度的光谱仪才能够获取可靠的信号。对于一些化学成分含量较低的样品可能会无法检测到,或者误判成噪声信号。另外,在测量过程中会受到许多干扰。例如,来自仪器的背景噪声、激光的强烈散射和荧光等。这些噪声会干扰到拉曼信号的检测和解析。因此,需要在实际应用中加以考虑和解决。例如,基于无须预知靶点的标记策略,如稳定同位素标记(<sup>13</sup>C、<sup>15</sup>N、<sup>2</sup>H等)策略<sup>[18]</sup>,可在一定程度上补偿并提高检测灵敏度、特异性等。

在原理创新方面,现有这些平台中,静态模式的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,以支撑功能单细胞的挖掘,但是目前的通量和自动化程度较低;流动模式的RACS自动化程度更高,在分选通量上也有了数量级的提高,但是目前的基于流动模式分选后的单细胞往往是以群体分类,丢失了索引信息。因此,根据实际的应用需求选择合适的模式,充分利用不同模式RACS的独特优势,有望在一定程度上解决合成生物表型检测和分选的瓶颈问题。另外,研制结合两种模式优势的RACS有望带给合成生物学领域更大的发展。

在仪器研制方面,目前的RACS平台技术更多处于实验室搭建状态,以RACS技术为核心的市场化仪器研制方面还比较空缺。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,但由于RACE对细胞的损伤,导致其存在单细胞全基因组覆盖度低的问

题。以RAGE为关键技术的RACS-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。为了提高分选的便利性和通量, 研究人员开发了EasySort系列仪器进行了原理的创新和迭代, 引入人工智能辅助的单细胞检测、目标细胞识别、目标单细胞液滴导出技术, 并与下游高通量单细胞测序平台耦合, 初步实现了单细胞分选的自动化运行。此外, 以pDEP-RADS为技术核心的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, FlowRACS的出现代表着拉曼流式分选仪真正走向市场应用的开端。然而仪器的研制与发展需要经受住市场的考验。以pDEP-DLD-RFC为技术核心进行了系统的迭代升级, 推出了新一代FlowRACS, 将大大加速拉曼流式分选平台的推广应用。目前已在研制高通量流式拉曼分选仪版本, 有望近期发布。该仪器已成功示范微藻、酵母等细胞的色素、油脂等表型的筛选, 肿瘤细胞分类、微藻合成过程监控、产油酵母多表型监控、细菌药敏性检测, 其更多应用场景有待市场的拓展。

最后, 在仪器国产化方面, 我国在拉曼分选仪研制方面处于国际领先地位, 虽然已经自主开发了智能化的光谱分析系统以及操作软件, 但仪器的一些核心部件, 如光谱仪、CCD等仍依赖于进口。仪器国产化的研制是接下来各行业共同的努力目标。

### 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, SISIMOUR A M. Synthetic biology[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2005, 6(7): 533-543.
- [3] SCHOBEL L, BÜTTNER E, LASKE C, et al. Cell dispensing in low-volume range with the immediate drop-on-demand technology (I-DOT) [J]. *Journal of Laboratory Automation*, 2015, 20(2): 154-163.
- [4] 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.
- [5] SANDER J D, JOUNG J K. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes[J]. *Nature Biotechnology*, 2014, 32(4): 347-355.
- [6] SMITH H O, HUTCHISON C A, PFANNKUCH C, et al. Generating a synthetic genome by whole genome assembly: phiX174 bacteriophage from synthetic oligonucleotides[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(26): 15440-15445.
- [7] 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.
- [8] SHAO Y Y, LU N, WU Z F, et al. Creating a functional single-chromosome yeast[J]. *Nature*, 2018, 560(7718): 331-335.
- [9] WANG X X, REN L H, DIAO Z D, et al. Robust spontaneous Raman flow cytometry for single-cell metabolic phenome profiling via pDEP-DLD-RFC[J]. *Advanced Science*, 2023: 2207497.
- [10] 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.
- [11] BREHM-STECHER B F, JOHNSON E A. Single-cell microbiology: tools, technologies, and applications[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2004, 68(3): 538-559.
- [12] 杨建花, 苏晓岚, 朱蕾蕾. 高通量筛选系统在定向改造中的新进展[J]. *生物工程学报*, 2021, 37(7): 2197-2210.  
YANG J H, SU X L, ZHU L L. Advances of high-throughput screening system in reengineering of biological entities[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2021, 37(7): 2197-2210.
- [13] 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.
- [14] SPITZER M H, NOLAN G P. Mass cytometry: single cells, many features[J]. *Cell*, 2016, 165(4): 780-791.
- [15] 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.
- [16] RAMAN C V, KRISHNAN K S. A new type of secondary radiation[J]. *Nature*, 1928, 121(3048): 501-502.
- [17] 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.
- [18] 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.
- [19] LEE K S, LANDRY Z, PEREIRA F C, et al. Raman microspectroscopy for microbiology[J]. *Nature Reviews Methods Primers*, 2021, 1(80): 1-25.
- [20] 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.
- [21] 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.
- [22] 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.
- [23] 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.
- [24] 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.
- [25] 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.
- [26] 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.
- [27] 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.
- [28] 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.
- [29] NITTA N, IINO T, ISOZAKI A, et al. Raman image-activated cell sorting[J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 3452.
- [30] LINDLEY M, DE PABLO J G, PETERSON W, et al. High-throughput Raman-activated cell sorting in the fingerprint region[J]. *Advanced Materials Technologies*, 2022, 7(10): 2101567.
- [31] 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): e00181-21.
- [32] JING X Y, GONG Y H, XU T, et al. Revealing CO<sub>2</sub>-fixing SAR11 bacteria in the ocean by Raman-based single-cell metabolic profiling and genomics[J]. *BioDesign Research*, 2022, 2022: 9782712.
- [33] JING X Y, GONG Y H, PAN H H, et al. Single-cell Raman-activated sorting and cultivation (scRACS-Culture) for assessing and mining *in situ* phosphate-solubilizing microbes from nature[J]. *ISME Communications*, 2022, 2: 106.
- [34] XU T, LI Y D, HAN X, et al. Versatile, facile and low-cost single-cell isolation, culture and sequencing by optical tweezer-assisted pool-screening[J]. *Lab on a Chip*, 2023, 23(1): 125-135.
- [35] DIAO Z D, KAN L Y, ZHAO Y L, et al. Artificial intelligence-assisted automatic and index-based microbial single-cell sorting system for One-Cell-One-Tube[J]. *mLife*, 2022, 1(4): 448-459.
- [36] 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.
- [37] 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.
- [38] 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.
- [39] BERRY D, MADER E, LEE T K, et al. Tracking heavy water (D<sub>2</sub>O) 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): E194-203.
- [40] 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.
- [41] 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.
- [42] 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.
- [43] 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.
- [44] 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(1): 275.
- [45] TAO Y F, WANG Y, HUANG S, et al. Metabolic-activity-based assessment of antimicrobial effects by D<sub>2</sub>O-labeled single-cell Raman microspectroscopy[J]. *Analytical Chemistry*, 2017, 89(7): 4108-4115.
- [46] 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.
- [47] HEKMATARA M, HEIDARI BALADEHI M, JI Y T, et al. D<sub>2</sub>O-probed Raman microspectroscopy distinguishes the metabolic dynamics of macromolecules in organellar anticancer drug response[J]. *Analytical Chemistry*, 2021, 93(4): 2125-2134.
- [48] 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.
- [49] HE Y H, HUANG S, ZHANG P, et al. Intra-ramanome correlation analysis unveils metabolite conversion network from an isogenic population of cells[J]. *mBio*, 2021, 12(4): e0147021.
- [50] 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.



**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,长期从事基于拉曼光谱的单细胞分析/分选及后续的单细胞测序等关键技术和仪器研究。

E-mail: mabo@qibebt.ac.cn



**第一作者:** 刁志钿(1995—),男,在读博士研究生。研究方向为液滴微流控技术、高通量流式拉曼分选技术等。

E-mail: diaozd@qibebt.ac.cn

广告索引:北京华元山水生物科技有限公司(后彩一)/九天基因科技(天津)有限公司(后彩二)/诚志生命科技有限公司(封三)