

## 特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2023-033

## 微液滴高通量筛选方法的研究与应用进展

秦伟彤, 杨广宇

(上海交通大学生命科学技术学院, 微生物代谢国家重点实验室, 上海 200240)

**摘要:** 在单细胞层面对生物功能进行高通量的分析和分选是对关键基因、元件、途径与细胞工厂进行优化的重要技术。基于微液滴的筛选方法因其低成本、超高通量等优势, 已被广泛应用于生物、医药、食品和工业等各个领域。本文针对目前主流的荧光激活的液滴分选、吸光度激活的液滴分选, 以及无标记液滴分选等微液滴筛选设备的进展进行综述, 主要包括基于质谱、拉曼、核磁共振、电化学、图像识别等。并总结了近年来微液滴筛选设备在酶进化、微生物育种等领域应用成功的案例。此外还对不同的微液滴筛选设备的优势与面临的挑战进行了讨论, 未来各种新的荧光探针的开发以及质谱等非标记检测方法的进一步发展, 将是微液滴筛选设备的主要发展方向, 在蛋白质工程、抗体工程、细胞分选及临床研究等方面具有重要的应用潜力。

**关键词:** 高通量筛选; 微流控; 分选方法; 微液滴; 检测信号

**中图分类号:** Q818 **文献标志码:** A

## Research and application progress of microdroplets high throughput screening methods

QIN Weitong, YANG Guangyu

(State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Science and Technology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China)

**Abstract:** High throughput analysis and sorting of biological functions at the single-cell level is an important technology for optimizing the performance key genes, elements, pathways, and cell factories. The screening method based on microdroplet has been widely applied in various fields such as biology, medicine, food, and industry due to its advantages of low cost and ultra-high throughput. Traditional droplet sorting includes droplet generation, incubation, operation, and sorting. For the first three steps, there have been many technological advances in the last decade. The major limitation is in the sorting step, whose frequency and diversity restrict the sorting efficiency and target scope. According to the different principles of detection signals, droplet sorting technology is mainly divided into labeled and unlabeled sorting method. This article mainly reviews the progress of microdroplet screening equipment based on

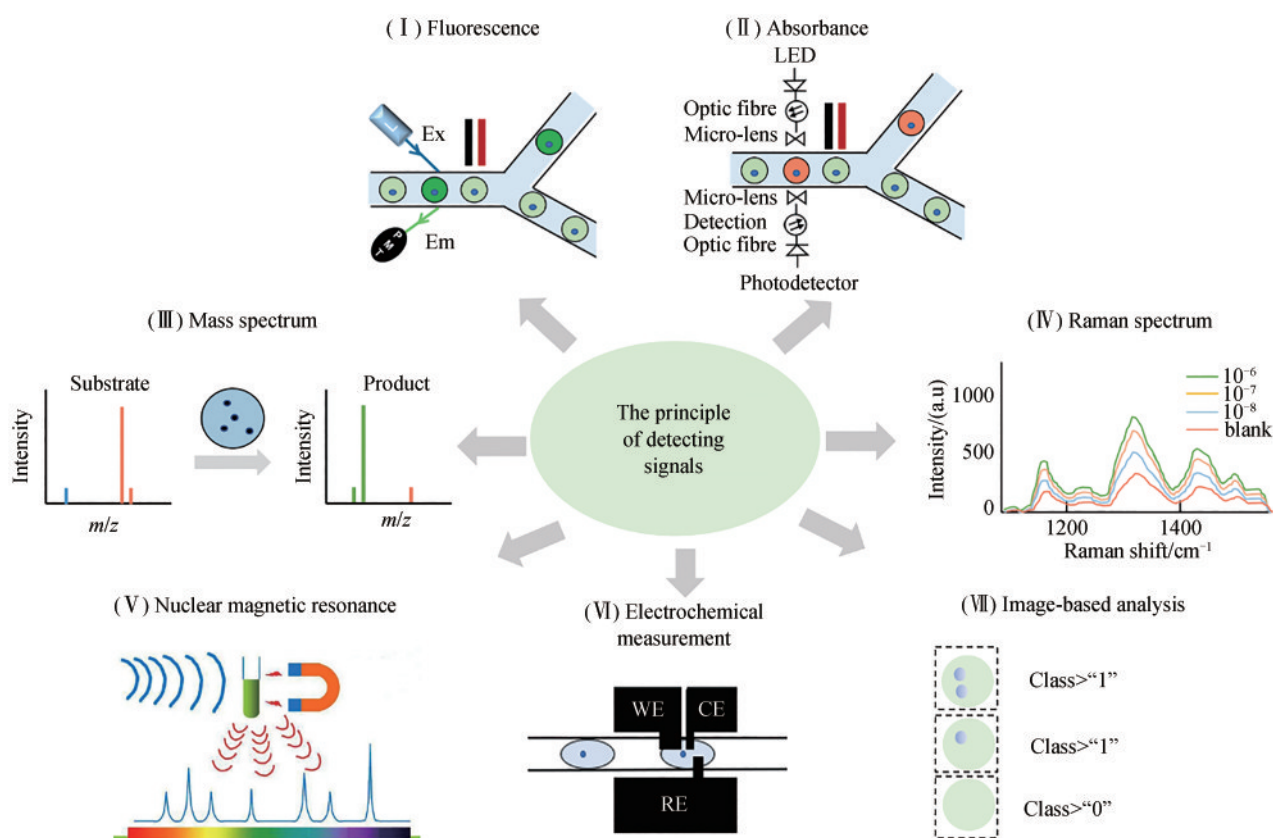
收稿日期: 2023-04-24 修回日期: 2023-06-20

基金项目: 国家重点研发计划 (2018YFE0200501, 2020YFA0907900); 国家自然科学基金 (32030063); 广东省重点领域研发计划 (2022B1111050001); 天津市合成生物技术创新能力提升行动; 上海交通大学特区计划 (21TQ1400210)

引用本文: 秦伟彤, 杨广宇. 微液滴高通量筛选方法的研究与应用进展[J]. 合成生物学, 2023, 4(5): 966-979

Citation: QIN Weitong, YANG Guangyu. Research and application progress of microdroplets high throughput screening methods[J]. Synthetic Biology Journal, 2023, 4(5): 966-979

mainstream fluorescence-activated droplet sorting (FADS) to detect fluorescence signals, absorbance-activated droplet sorting (AADS) to detect UV/visible light absorption changes, and unlabeled droplet sorting, such as mass spectrometry, Raman spectrometry, nuclear magnetic resonance, electrochemistry, and image recognition. This article summarized the successful cases of microdroplet screening equipment applied in the fields of enzyme evolution and microbial breeding in the past 5 years. In addition, we also discussed the advantages and challenges faced by different microdroplet screening devices, and pointed out that the development of various new fluorescent probes and the further development of unlabeled detection methods such as mass spectrometry in the future will be the main development direction of microdroplet screening equipment. Although FADS remains the primary choice for cell sorting, the development of other microfluidic sorting devices has further expanded the application range of microfluidic sorting devices. Its high screening throughput and independent reaction environment provide a new technological platform for research in different fields, including protein engineering, antibody screening, sorting of different types of cells, and clinical directions.



**Keywords:** high-throughput screening; microfluidics; sorting method; microdroplet; detection signal

高通量筛选 (high-throughput screening, HTS) 是药物发现过程中的重要环节, 也是阐明基因和蛋白质功能的重要工具, 它已被广泛应用于生物技术和制药领域<sup>[1-5]</sup>。通常认为 HTS 样本筛选通量大于  $10^3$  个/天及小于  $10^5$  个/天<sup>[6]</sup>。但是就以蛋白质

进化为例, 通过易错 PCR 的手段很容易就构建出库容量为  $10^{10}$  的突变体文库<sup>[7]</sup>, 尽管自动移液工作站的出现减少了部分人工操作, 但是所需的成本仍然较高, 且样本的筛选通量小于  $10^6$  个/天, 因此对大量生物样本库进行特定代谢物、酶、核酸、

表型或突变的筛选逐渐成为一项重大挑战<sup>[8-9]</sup>。如何实现低成本、高速度、高特异性以及高灵敏度的筛选是HTS所面临的主要问题。

微流体系统最早出现于20世纪80年代,是一种精确操作微尺度流体( $10^{-6}\sim 10^{-18}$  L)的技术,可以将多个操作单元,比如液滴的生成、信号检测和分选等集成到一个芯片上,并自动完成整个分析过程,因此也被称为“芯片实验室”<sup>[10-11]</sup>。它的优点是样品消耗低、反应快速且具有并行处理的能力,这也使得样本的筛选通量提高到了 $10^8$ 个/天,试剂的消耗量也降低为传统的微孔板筛选的百万分之一,为HTS领域带来了革命性的改变<sup>[12-14]</sup>。

传统的微液滴筛选系统(以酶进化为例)主要是通过将表达有不同酶突变体的菌株以及反应底物进行单细胞包裹,将液滴在芯片上或芯片外孵育特定时间,最后根据设定的筛选电压阈值,阳性液滴在介电泳(dielectrophoresis, DEP)作用力下进入收集通道,从而实现分选<sup>[15-16]</sup>(图1)。液滴的生成方式已经有很多种,包括油包水(water in oil, W/O)、水包油包水(water/oil in water, W/O/W)、水凝胶珠的形式,液滴的体积也从纳升到皮升不等<sup>[14, 17-19]</sup>。每个液滴均为一个独立的微反应器,从而能够分析从细胞内表达或由细胞分泌的酶功能,克服了传统流式细胞术和荧光激活细胞分选只能用于检测与细胞直接关联的荧光信号的限制。液滴信号检测与分选的方式也根据不同实验的需

求,发展出了更多种类的液滴分选器<sup>[20]</sup>。

传统的基于微流体的液滴分选主要依赖于激光诱导荧光检测,以及荧光激活的微液滴分选系统,但是特别针对一些小分子药物及大部分酶分子,缺乏适用的荧光探针,而极大地限制了该系统的应用<sup>[21]</sup>。自Link等<sup>[22]</sup>于2006年开发了首套利用静电力实现液滴分选的设备以来,相继有不同原理的微液滴超高通量筛选系统被开发出来。按信号识别方式区分,包括结合荧光光谱<sup>[12]</sup>、吸收光谱<sup>[21]</sup>、分析质谱<sup>[23]</sup>、拉曼光谱<sup>[24]</sup>、电化学技术<sup>[25]</sup>、核磁共振<sup>[26]</sup>、图像识别<sup>[27]</sup>等技术;按控制液滴的偏转驱动力不同,又可以分为电<sup>[28]</sup>、声<sup>[29]</sup>、磁<sup>[30]</sup>、气动<sup>[31]</sup>或者热学<sup>[32]</sup>等系统。本文主要针对目前已开发出的不同的微流控筛选设备,根据检测信号的不同将其分为标记与无标记液滴分选技术,对其发展情况和使用情况进行了总结,并讨论了目前微液滴分选设备所存在的局限性及未来的发展方向。

## 1 标记液滴分选技术

标记液滴分选技术通常不是基于所测定的细胞或者酶分子本身的特征进行分选,而是需要引入化学分子或者荧光探针来间接实现分选。主要包括依赖于荧光信号的荧光激活液滴分选(fluorescence-

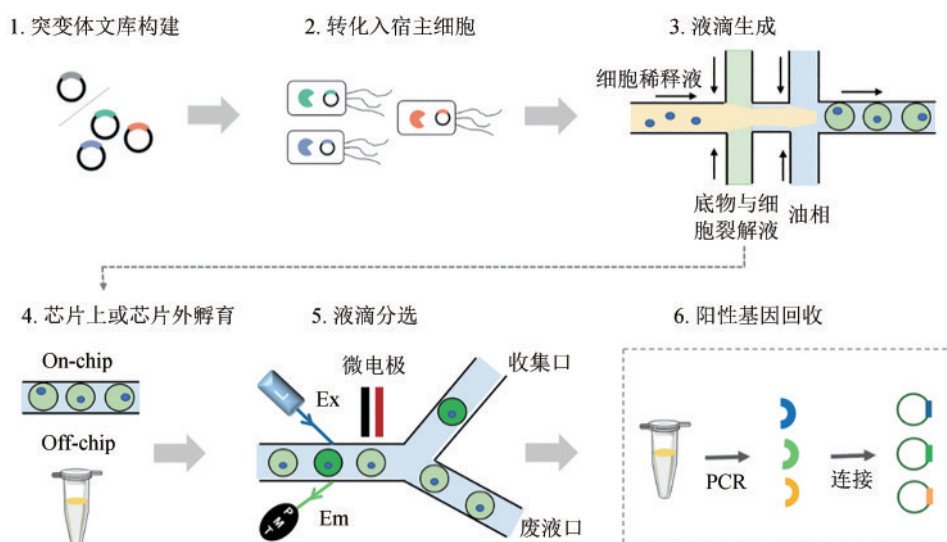


图1 传统的微流控分选流程示意图

Fig. 1 The scheme of traditional microdroplets sorting devices

activated droplets sorting, FADS) 和基于紫外/可见光吸收变化的吸光度激活液滴分选 (absorbance-activated droplets sorting, AADS) 技术 (图2)。

### 1.1 荧光激活的液滴分选技术

荧光激活的液滴分选是目前主流的微流控筛选技术, 其主要是通过设计不同的荧光探针或者酶级联反应来直接或间接实现目标酶基因型与荧光的耦联, 因此具有更高的灵敏度<sup>[19, 33-35]</sup>。与荧光激活细胞分选 (fluorescence-activated cell sorting, FACS) 原理相似, 但是 FADS 与 FACS 相比最大的优势是其可对细胞内、细胞上、分泌到细胞外的信号以及无细胞体系进行分选, 同时由于其配置了高速相机, 能够实现分选的可视化<sup>[36]</sup>。FADS 与其他液滴分选技术相比, 另外一个优势是处理微液滴的分选通量高达 5000 个/s。目前已被成功应用于脂肪酶<sup>[33]</sup>、酯酶、纤维素酶<sup>[13]</sup>、淀粉酶<sup>[37]</sup>、聚合酶<sup>[38]</sup> 等酶分子的改造。

经过十余年的发展, 研究者们也对传统的 FADS 系统进行了升级改造。比如 Ma 等<sup>[17]</sup> 开发了一套双色荧光分选体系, 可以同时处理来自相同液滴的两个荧光信号, 筛选出了具有高酶活性和高对映选择性的黄古珠酯酶突变体。Hasan 等<sup>[39]</sup> 开发了

一种荧光寿命激活的液滴分选系统 (fluorescence lifetime-activated droplet sorting, FLADS), 但该系统的分选通量只有 50 个/s。Blaha 和 Hasan 等<sup>[40]</sup> 进一步通过对活细胞与死细胞进行精确的液滴分选证明了 FLADS 的可行性。此外, Hung 等<sup>[41]</sup> 优化了信号处理的硬件, 并将分选通量提高到了 2500 个/s。

目前 FADS 技术也存在一些缺点, 比如需要根据不同的酶分子及催化反应开发合适的荧光探针, 而对于某些酶分子、不常见的细胞以及靶向分析物为小分子药物的实验, 则缺乏适用的生物标记物和荧光探针, 导致无法构建荧光耦联策略。同时选用的荧光探针还需保留在液滴中, 不能发生扩散等问题。这些也极大地限制了 FADS 的广泛应用。为了克服 FADS 的局限性, 其他种类的液滴分选技术比如吸光度、质量和拉曼等激活的液滴分选技术也相继被开发出来 (表1)。

### 1.2 吸光度激活的液滴分选技术

吸收光谱法被广泛应用于比色测定、蛋白质定量和酶动力学等方面<sup>[51-52]</sup>, 近年来科研人员也将其与微流控技术进行耦联, 开发出了吸光度激活液滴分选技术 AADS, 实现了与 FADS 技术的互补<sup>[21]</sup>。与 FADS 相比, AADS 检测的挑战是吸光

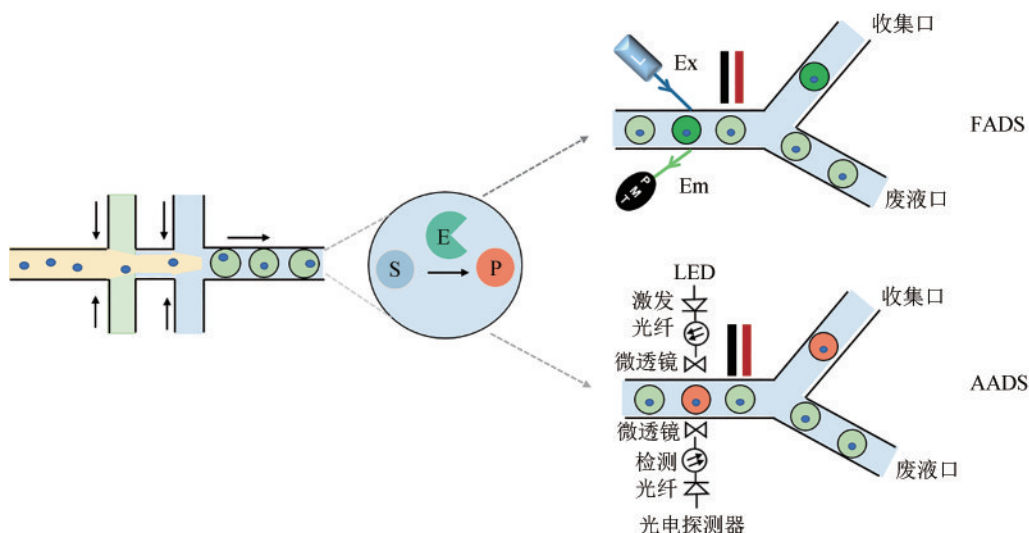


图2 标记液滴分选技术分选原理

FADS—荧光激活的液滴分选技术; AADS—吸光度激活的液滴分选技术; S—底物; P—产物; E—酶分子; Ex—发射光谱; Em—吸收光谱

Fig. 2 The principle of labeled droplet sorting technology

FADS—Fluorescence activated droplet sorting technology; AADS—Absorbance activated droplet separation technology; S—Substrate; P—Product;

E: Enzyme molecules; Ex—Emission spectrum; Em—Absorption spectrum

表1 不同微流控分选设备比较

Table 1 Comparison of different microfluidic sorting equipment

分选方法	最高分选效率	最高分选灵敏度	最小液滴体积	优点	缺点
FADS	5 kHz <sup>[42]</sup>	2.5 nmol/L <sup>[43]</sup>	2 pL <sup>[43]</sup>	检测灵敏度高、分选速度快、平台发展成熟	大部分检测靶标缺乏适合的荧光耦联方法
AADS	1 kHz <sup>[44]</sup>	10 $\mu$ mol/L <sup>[21]</sup>	100 pL <sup>[45]</sup>	普适性较FADS高	检测灵敏度待提高
MADS	35 Hz <sup>[46]</sup>	5 $\mu$ mol/L <sup>[46]</sup>	0.8 nL <sup>[46]</sup>	无损伤、普适性高	分选速度慢、灵敏度待提高
RADS	4.3 Hz <sup>[47]</sup>	50 $\mu$ mol/L <sup>[48]</sup>	65 pL <sup>[47]</sup>	无损伤、普适性高	更适用于较大的细胞
NMR-ADS	—	1 mmol/L <sup>[26]</sup>	130 pL <sup>[49]</sup>	无损伤、提供信息广泛	NMR与液滴分选系统的整合较困难、检测灵敏度低
IBDS	10 Hz <sup>[50]</sup>	—	35 pL <sup>[50]</sup>	无损伤	适用范围窄、分选速度慢
EADS	10 Hz <sup>[25]</sup>	1 $\mu$ mol/L <sup>[25]</sup>	30 nL <sup>[25]</sup>	无损伤	适用范围窄、分选速度慢

率与路径长度成正比,这意味着液滴的小体积(pL)以及由此产生的短光路长度( $\mu$ m)会影响检测的灵敏度<sup>[21, 53]</sup>。Gielen等<sup>[21]</sup>首次介绍了一种使用介电泳和光纤的AADS系统,在液滴的吸光度被读出后再对液滴进行分选,分选通量约为300个/s。但是他们声称在液滴中染料的浓度低于100  $\mu$ mol/L时则无法完成分选,因为油相和水相的不同折射率会产生信号伪影,只能通过添加偏移染料来降低信号伪影。随后,Duncombe等<sup>[53]</sup>开发了一种基于全紫外可见光谱激活的液滴分选系统(UV-vis spectra-activated droplet Sorter, UVADS),将光路路径长度从50  $\mu$ m增加到300  $\mu$ m,但由于是全光谱,液滴的分选通量低于100个/s。最近,Medcalf等<sup>[44]</sup>报道了一种集成双凹透镜聚焦、声表面波(surface acoustic wave, SAW)分选和吸光度激活的液滴分选系统,使其分选通量提高到了10<sup>3</sup>个/s水平,同时使用折射率匹配油,通过去除侧面散射来提高信号质量,可对浓度差为50  $\mu$ mol/L的液滴进行分类。理论上讲,AADS可能会有更高的应用价值,相较于FADS更加具有普适性,因为大多数小分子在电磁光谱的紫外线和可见光区域均可表现出吸收。

## 2 无标记的液滴分选技术

无标记的液滴分选技术不需要添加额外的化学分子,而是利用检测的反应、化合物或细胞本身的物理或化学变化,来实现信号的检测与分选。目前已开发出了与质谱技术、拉曼光谱、核磁共振、电化学及图像分析等技术相结合的无标记分

选技术(图3)。但是该类方法通常需要耦联不同的技术与特殊的设备。

### 2.1 质量激活的液滴分选技术

质谱(mass spectrometry, MS)是一种无标记的检测技术,并已成为通用的分析技术<sup>[55]</sup>。然而,传统的液相色谱-质谱法(liquid chromatography-mass spectrometry, LC/MS)由于色谱分离而耗时,并且需要相对较大的样品体积,这对于HTS来说成本过高<sup>[56]</sup>。而质量激活液滴分选技术(mass activated droplet sorting, MADS)则是将微流控技术与MS的优势相结合,兼具高灵敏性、高选择性、低成本、可同时分析多种产物等优点<sup>[23]</sup>。Sun等<sup>[57-58]</sup>引入了第一种高通量液滴质谱法,证明了该系统样本筛选通量为1.7个/s,分析速度比传统的LC-MS快300倍左右。随后,Steyer等<sup>[59]</sup>开发了一种通过纳米-电喷雾电离(electrospray ionization, ESI)分析液滴的平台,它可抵抗基质效应从而实现样本的快速分析。尽管基于MS的液滴分选方法已经被证明了具有可行性,且相继有更多的改进方法逐渐被开发出来,但是在处理过程中液滴的损失限制了其在液滴分选中的应用。

为了克服这些限制,Holland-Moritz等<sup>[54]</sup>开发了一套真正意义上的基于ESI-MS激活的液滴分选系统,该系统整合了液滴分隔模块,由连接到质谱仪的微流控芯片和进行液滴计数的相机监控的分选区域两部分组成,注入到芯片中的液滴被分割成两个大小不等的液滴,较大的液滴进入质谱仪通道用于信号检测,较小的液滴则进入分选通道,两个通道之间具有一条延迟线,以保证

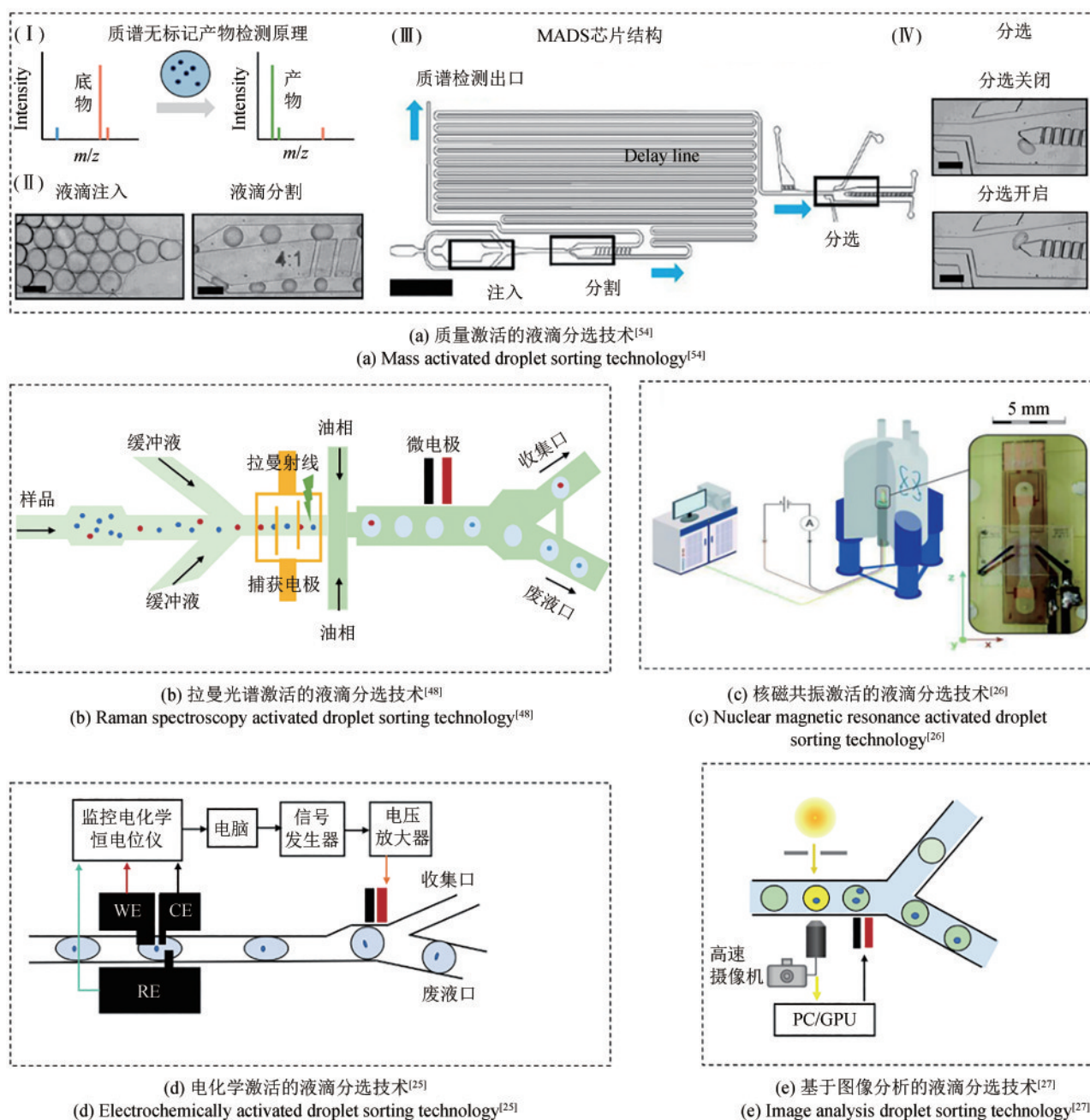


图3 无标记液滴分选技术分选原理

RE—参考电极; WE—工作电极; CE—对电极

Fig. 3 The principle of unlabeled droplet sorting technology

RE—Reference electrode; WE—Working electrode; CE—Counter electrode

液滴在经过质谱仪的检测后, 另外一个同级液滴才进入分选通道 [图3(a)]。该系统的样品分选通量可达 0.7 个/s, 分选准确率约 98%。尽管该系统处理样本的速度约为 FADS 的 1/1000, 但得益于质谱所固有的无标记特性, MADS 几乎可以测定任何产物, 且可以同时分析多种物质, 证明了

基于任何类型的测定信号进行微液滴筛选的可能性。

## 2.2 拉曼激活的液滴分选技术

拉曼光谱的原理是通过激光与样品相互作用

时产生的化学键的振动和旋转来获取分子的信息,已广泛应用于物理、生物、化学、工业和医药等领域<sup>[60]</sup>。而拉曼激活的液滴分选技术(Raman-activated droplet sorting, RADS)是一种无标记、无损伤的单细胞识别与分析技术,其整合了单细胞拉曼光谱(single-cell Raman spectra, SCRS)与液滴微流控技术,通过利用介电的单细胞捕获释放和电磁阀吸吮技术,在高速流动的状态下捕获单细胞,并实现拉曼采集、释放和分选<sup>[24]</sup>。该技术最大的缺陷是容易受油相和液滴中光学畸变的影响,在不使用表面增强技术的情况下灵敏度较低,使得这项技术很难应用于一些复杂的基质中。为了克服这些缺陷,Wang等<sup>[48]</sup>采用了液滴“先选再养”的方式,即先捕获单细胞的拉曼信号,再进行液滴包裹,并采用基于介电力驱动的方式,克服了制约通量提高的电磁阀作为分选驱动力的瓶颈问题,同时将芯片的材料PDMS替换成石英,使得该系统的细胞分选速率和灵敏度得到了较大的提升,分别达到了260个/min及98.3%[图3(b)]。Safir等<sup>[61]</sup>开发了一套基于人工智能辅助拉曼光谱与生物打印相结合的系统,用于血液中细菌的高通量检测。理论上讲,RADS适用于所有类型的细胞,具有更广阔的应用前景。但目前,基于拉曼光谱的应用仍需要高拉曼强度和大的细胞散射截面。当将基于拉曼光谱的微液滴分选系统(droplet microfluidic screening systems, DMFS)应用于小型细胞如大肠杆菌时,则需要额外的优化。

### 2.3 核磁共振激活的液滴分选技术

核磁共振激活的液滴分选技术(nuclear magnetic resonance activated droplets sorting, NMR-ADS)相较于MADS,既是无标记分选技术,也是一种无损伤分选技术。NMR能够同时识别和量化数百种不同的复杂混合物中的化合物,提供了无与伦比的化学特异性。因此将其与微流控技术相结合,具有巨大的吸引力,但同时也是较大的挑战<sup>[62-63]</sup>。从NMR的角度来看,一类特别具有挑战性的集成功能元件是导电结构<sup>[26]</sup>。金属电极可用于电化样品相互作用,然而它们可能导致严重

的NMR光谱和SNR(signal to noise ratio,信噪比)退化。在微观尺度上这些问题更为复杂,因为畸变体积占据了样品体积中的更高比例<sup>[26]</sup>。此外,NMR与其他检测方法相比,检测的质量灵敏度较低(小于1 mmol/L)。核磁微线圈则是针对这些限制所开发的,但是将微线圈与小样本进行对接挑战较大<sup>[64]</sup>。

Swyer等<sup>[65]</sup>介绍了第一个NMR数字微流控系统,能够在高场NMR中实现微线圈中分析物与液滴的对接,可以观察木糖-硼酸盐络合和葡萄糖氧化酶催化等过程,但并没有实现分选。Davoudi等<sup>[26]</sup>通过将金属轨道放置在微流体通道的侧壁中,开发了一种NMR兼容的微流体平台[图3(c)],发现NMR射频激发性能得到了增强,而不影响静磁场的均匀性,从而能够在进行沉积的电极表面或处理室中的电极下方进行直接光学观察。这也为进一步实现NMR激活的液滴分选提供了技术基础与研究思路。

### 2.4 电化学激活的液滴分选技术

电化学检测同样也是一种无标记、无损伤的检测方法,可应用于复杂样品的检测。但是由于检测电极表面尺寸的限制(尺寸必须小于液滴),液滴的尺寸通常只能控制在纳升级别。Goto等<sup>[25]</sup>开发了一套可针对NADP依赖性氧化还原酶定向进化的电化学激活液滴分选系统(electrochemical-based droplet sorting, ECDS),通过将NAD(P)H测定装置与DEP分选设备相耦联[图3(d)],将酶促反应产生的电化学信号转化为交流信号,对约30 nL的液滴进行了分选,成功将酶的活性提高3倍左右。该方法检测的灵敏度约为1  $\mu$ mol/L,但是液滴筛选通量也较低,约为10个/s。

Abbyad组<sup>[66]</sup>提出了一种基于界面张力(sorting based on interfacial tension, SIFT)的分选方法,通过利用不同pH值会产生不同界面张力的液滴的原理,低pH导致液滴的高界面张力,并且具有较低pH的液滴会倾向于沿着芯片上的轨迹流动,因此不需要额外的电极来进行区分。该方法可区分pH差异为0.2的液滴,最大分选速率约为30 Hz。Dobson等<sup>[67]</sup>利用特定的表面活性剂会导致界面张

力对液滴 pH 非常敏感的原理，成功将此分选方法用于凋亡细胞的分离研究中。Zielke 等<sup>[68]</sup>也基于 SIFT 原理，成功对具有不同水平糖酵解的细胞（癌症细胞亚群）进行了分离。

2.5 基于图像分析的液滴分选技术

基于图像分析的液滴分选技术（image-based droplets sorting, IBDS）是一种基于液滴内细胞形态，通过图像识别、处理与分析来实现分选的无标记分选技术 [图 3(e)]<sup>[27, 69]</sup>。该方法在细胞生物学领域越来越受欢迎，部分原因是近年来通过多项研究提高了图像处理算法、接口速度和处理硬件性能。Doan 等<sup>[70]</sup>利用小波分析实现了液滴中细胞形态区分，该方法分选精度可达 90%，液滴分选通量约为 10 个/s。Watterson 等<sup>[69]</sup>也开发了一种基于小波的图像分析方法来测量液滴的光密度，指示液滴中细菌的数量，该方法被成功应用于分析患者样本中的抗生素耐药性，并揭示了 21 个细菌种群。Anagnostidis 等<sup>[50]</sup>开发了在深度学习引导下的 IBDS 系统，证明了深度神经网络可以准确地对单个哺乳动物细胞和多细胞球体的存在和数量进行实时液滴成像分析。这种方法还能够从含有不同类型和大小对象的混合物中识别出特定对象，可用于快速揭示细胞和多细胞结构的异质性。

3 应用领域

3.1 酶的定向进化与新酶挖掘

酶是自然界存在的最重要的生物催化剂，经过自然界数千年的自然进化已被应用于各个领域<sup>[71-72]</sup>。但是天然酶往往无法满足工业需求，所以人工选择和筛选变得越来越重要<sup>[24, 73]</sup>。定向进化是在实验室条件下模拟“达尔文进化”的原理，快速进化出具有目标性能的突变酶，为酶进化提供了强大的工具<sup>[74-77]</sup>。但是定向进化面临的最大问题是传统的微孔板筛选方法无法满足庞大的库容量筛选的需求<sup>[78]</sup>，同时工业和制药领域对一些新型的、性能更优的微生物催化剂的需求也持续快速增长<sup>[79]</sup>。所以酶的定向进化和新酶的挖掘直接受益于液滴微流控的发展，为酶反应提供了单独的反应环境和更大的筛选容量。

我们对近五年利用液滴分选系统成功实现定向进化以及新酶挖掘的案例进行了简单的总结（表 2）。

Ma 等<sup>[17]</sup>利用双色荧光的 FADS 系统将酯酶对 S-布洛芬的对映选择性提高 700 倍左右。Tan 等<sup>[88]</sup>在红海环境样本中成功挖掘到了 3 种新的脂肪酶。Zurek 等<sup>[83]</sup>开发的 AADS 液滴分选器已成功用于胺脱氢酶的定向进化，使其转化率提高了 3.28 倍。随后，Zachos 等<sup>[87]</sup>开发的 AADS 液滴分选设备使葡萄糖脱氢酶的催化速度和效率提高至少 10 倍。

表 2 近五年微流控分选装置成功应用的案例

Table 2 Cases of successful application of microfluidic sorting devices in the past five years

发表时间	分选系统	目标酶	分选结果	参考文献
2018	FADS	酯酶	对 S-布洛芬的对映选择性提高 600 倍	[17]
2019	FADS	硫酸酯酶	$K_{cat}/K_m$ 值提高 30 倍	[80]
2019	FADS	纤维素酶	筛选出产量提升 46% 的高纤维素酶菌株	[81]
2020	FADS	葡萄糖氧化酶	$K_{cat}$ 值比野生型高 2.1 倍	[82]
2020	AADS	胺脱氢酶	转化率提高 3.3 倍	[83]
2022	FADS	$\alpha$ -淀粉酶	产量提升 50% 的地衣芽孢杆菌突变株	[37]
2023	FADS	二乙酰壳二糖脱乙酰酶	催化效率提高 1.8 倍	[84]
2022	FADS	塑料降解酶	2 株可降解塑料的菌株	[85]
2022	FADS	产鼠李糖脂的微生物	产量提升 54%~208% 的菌株	[86]
2022	AADS	葡萄糖脱氢酶	催化速度和效率提升 10 倍以上	[87]

但是统计的10个案例中有8个应用了FADS系统,说明尽管研究人员已经开发出了多种微流控分选设备,目前针对酶进化和新酶挖掘的方法仍然以FADS分选系统为主。

除了酶工程领域外,微流控分选技术在微生物挖掘和定向进化方向也具有巨大的应用空间<sup>[89]</sup>,比如Qiao等<sup>[85]</sup>从环境样本中利用FADS系统分选出了可降解塑料的*Kineococcus endophyticus* Un-5和*Staphylococcus epidermidis* Un-C2-8菌株。Xu等<sup>[86]</sup>开发出了一套新的转录相关的FADS系统,并从原油中筛选出了10种产生更多鼠李糖脂的微生物,它们产生的鼠李糖脂比铜绿假单胞菌PAO1模型多54%~208%。Bowman等<sup>[90]</sup>利用FADS分选系统从溶脂雅罗菌转座子突变体库中,在菌株培养的早期鉴定出了衣康酸生产力提高的菌株。

### 3.2 细胞的分选与分离

病原微生物的快速灵敏检测在食品工业、医学等众多领域至关重要。例如在药物实验室中,医疗产品的污染可能会给患者带来严重的健康风险,如败血症<sup>[91-93]</sup>。微流控筛选设备可以极大地帮助研究人员从复杂环境中分离病原体,Li等<sup>[94]</sup>利用声电泳分选方法,通过在微通道上施加强烈的声波,流动的颗粒会根据它们的大小进行分类,成功地分选了大肠杆菌和人类血细胞的混合物,得到的含有细菌的溶液显示出超过96%的细菌纯度(低于4%的血细胞)。Ohlsson等<sup>[95]</sup>又优化了声电泳分选方法,使得细菌回收率高达99.7%,或血细胞去除率高达99.99%。此外,Hyman等<sup>[96]</sup>基于环介导的等温扩增技术,开发了一种单细胞

转录谱分析和分选的系统(single-cell nucleic acid profiling in droplet, SNAPD),可用于量化不同的细胞异质种群中的类型,检测到频率低至0.1%的罕见细胞,并使用微流体分选富集特异性的细胞类型(图4)。

### 3.3 单细胞分析及药物筛选

单细胞技术对免疫学领域有着重要的影响。它能够阐明免疫信号传导和免疫细胞迁移的动力学和逻辑,促进抗体筛选,并允许对B细胞和T细胞库进行大规模并行分析。基于微流体的技术实现的高时空控制使得对免疫信号、细胞迁移和细胞间相互作用的理解增加了一个强大的手段<sup>[97]</sup>。Mazutis等<sup>[98]</sup>开发了首套可应用于单细胞分析及抗体筛选的液滴微流控分选系统。他们将单个小鼠杂交瘤细胞、荧光探针和包被抗小鼠IgG抗体的单个微珠共包裹在50 pL液滴中,仅在15min后检测分泌的抗体,分选速率约为200 Hz(图5)。Shembekar等<sup>[97]</sup>研发了一套基于双色荧光策略的微流控分选平台,并引入了液滴捕捉与成像技术,不仅可以定性地对表达的抗体进行分类,还可以定量地对特异性抗体结合以及与天然细胞表面受体的结合进行分类。除了抗体筛选之外,Baranova等<sup>[99]</sup>还基于单细胞共培养微生物组以及乳液中的报告荧光病原体,使用荧光激活的细胞分选来选择无报告液滴,开发了一组革兰氏阴性菌大肠杆菌的报告菌株,以提供用于精确监测抗菌活性的活体生物传感器,可以有效地用于抗生素/益生菌的发现、环境监测和生物学合成。

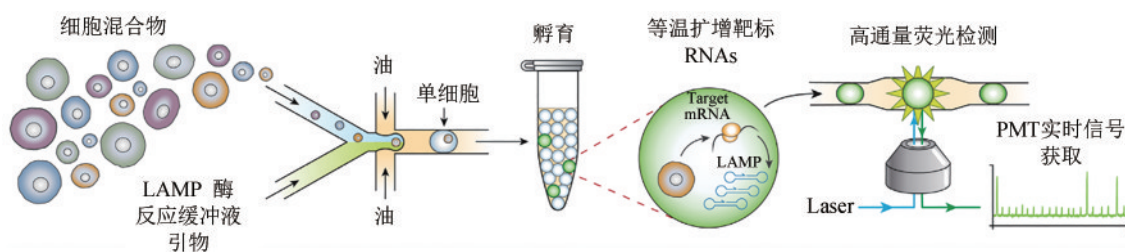


图4 SNAPD工作流程图<sup>[96]</sup>

(将单细胞和分析试剂共包裹到微滴中,收集并体外孵育,随后测量每个液滴的荧光以指示靶RNA的扩增)

Fig. 4 Schematic of the SNAPD workflow<sup>[96]</sup>

(Single cells are encapsulated into microdroplets with assay reagents, collected and incubated offline, and the fluorescence of each droplet is subsequently measured to indicate amplification of target RNAs)

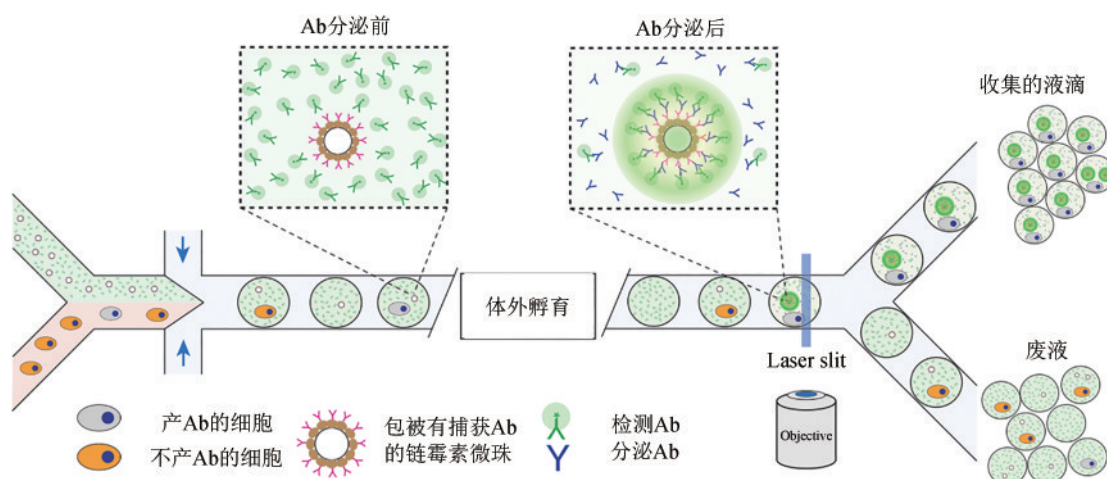


图5 应用微流控分选设备进行抗体筛选的流程图<sup>[98]</sup>

Fig. 5 The scheme of antibody screening using microfluidic sorting device<sup>[98]</sup>

## 4 总结与展望

微流控技术的快速发展为细胞及液滴的分选提供了强大的技术支撑。该技术在提高分析率的同时显著减少了样本分析量，从而能够在大容量突变库或者微生物群体中快速识别出罕见的或者活性提升的靶标。而微流控分选装置主要包括液滴的生成、孵育、操作与分选，经过近些年的发展，前三个步骤已相对成熟且已有商业化的装置，因此最主要的限速步骤是液滴的分选。

FADS具有更高的筛选速度（kHz水平）和最高的灵敏度（nmol/L级别），是目前发展最成熟以及应用最广泛的微流控分选系统。如果能够找到合适的荧光探针或荧光耦联反应实现基因型与表型的耦联，FADS依旧是所有分选方法的首要选择。AADS的检测灵敏度虽然低于FADS，但AADS系统不需要激光器和光电倍增管，因此其装置比FADS更简单、更便宜，在检测灵敏度符合要求的情况下，AADS会是较不错的选择。当然也有将FADS与AADS进行结合，开发出的FAADS（fluorescence and AADS）系统，既可以获得荧光值，也可以获得光密度值，可以为研究提供更多的信息<sup>[100]</sup>。

无标记的分选设备因其不需要特定的荧光探针、能够保证细胞及反应的完整度等优势而受到越来越多的关注，也为研究者提供了更多的选择空间。但是该类分选设备所面临的共性问题是分

选效率与检测灵敏度较低。MADS是探测化学物质的一种很有价值的工具，检测的范围扩大到只要能够利用ESI电离的分子，而利用FADS与AADS均是无法实现的。对于筛选化学反应，检测质量变化的能力比光谱变化更适用。RADS是无损伤的分析方法，有助于与细胞中DNA、RNA、蛋白质和代谢产物的下游提取进行无缝整合，以进行进一步分析。NMR-ADS可以提供更全面的信息，但是目前还未实现分选。然而，RADS与NMR-ADS均需要特殊的技术来建立分选系统。对于基于电化学的分选方法，也没有标准化的分选装置，甚至可能需要根据各种电化学特性进行定制。

尽管目前已经开发出了多种微流控分选装置，但是真正商业化的设备却很少。首先，不同的生物学应用需要不同的检测方法，很难开发出一个通用的微流控分选设备，同时市场有限，集成化的设备商业化也很难。其次，微流控分选设备需要高精细的元件，搭建平台也需要实验室有一定的基础。此外，微流控分选设备的整个流程十分依赖人为操作且流程较复杂，也进一步限制了该类系统的通用性。未来还需要在这一方向进一步改进与努力，从而提高商业性的微流控分选设备的通用性。

总之，本文从信号的检测方法方向综述了微流控分选设备的发展情况与应用情况。尽管FADS仍然是细胞分选的首要选择，但是许多研究开发出了多种微流控分选设备，也进一步扩大了微流控分选设备的应用范围。其超高的筛选通量与独

立的反应环境为不同领域（包括蛋白质工程、抗体筛选、不同种类细胞的分选及临床方向）的研究提供了新的技术平台。随着更多新技术的发展，比如人工智能、生物打印技术等的发展，也会为微流控分选设备赋予更多应用。

### 参 考 文 献

- [1] 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.
- [2] XIONG W, LIU B, SHEN Y J, et al. Protein engineering design from directed evolution to *de novo* synthesis[J]. Biochemical Engineering Journal, 2021, 174: 108096.
- [3] LONGWELL C K, LABANIEH L, COCHRAN J R. High-throughput screening technologies for enzyme engineering[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2017, 48: 196-202.
- [4] MACARRON R, BANKS M N, BOJANIC D, et al. Impact of high-throughput screening in biomedical research[J]. Nature Reviews Drug Discovery, 2011, 10(3): 188-195.
- [5] QIN W T, LI L, YANG F, et al. High-throughput iSpinach fluorescent aptamer-based real-time monitoring of *in vitro* transcription[J]. Bioresources and Bioprocessing, 2022, 9: 112.
- [6] LLOYD M D. High-throughput screening for the discovery of enzyme inhibitors[J]. Journal of Medicinal Chemistry, 2020, 63(19): 10742-10772.
- [7] SARNAIK A, LIU A, NIELSEN D, et al. High-throughput screening for efficient microbial biotechnology[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2020, 64: 141-150.
- [8] CAEN O, SCHÜTZ S, JAMMALAMADAKA M S S, et al. High-throughput multiplexed fluorescence-activated droplet sorting[J]. Microsystems & Nanoengineering, 2018, 4: 33.
- [9] POTYRAILO R, RAJAN K, STOEWE K, et al. Combinatorial and high-throughput screening of materials libraries: review of state of the art[J]. ACS Combinatorial Science, 2011, 13(6): 579-633.
- [10] CHIN C D, LINDER V, SIA S K. Lab-on-a-chip devices for global health: past studies and future opportunities[J]. Lab on a Chip, 2007, 7(1): 41-57.
- [11] AZIZIPOUR N, AVAZPOUR R, ROSENZWEIG D H, et al. Evolution of biochip technology: a review from lab-on-a-chip to organ-on-a-chip[J]. Micromachines, 2020, 11(6): 599.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] 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, 2017, 30(7): 531.
- [17] 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.
- [18] TIEMEIJER B M, DESCAMPS L, HULLEMAN J, et al. A microfluidic approach for probing heterogeneity in cytotoxic T-cells by cell pairing in hydrogel droplets[J]. Micromachines, 2022, 13(11): 1910.
- [19] 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.
- [20] SUN G Y, QU L S, AZI F, et al. Recent progress in high-throughput droplet screening and sorting for bioanalysis[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2023, 225: 115107.
- [21] 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.
- [22] LINK D R, GRASLAND-MONGRAIN E, DURI A, et al. Electric control of droplets in microfluidic devices[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2006, 45(16): 2556-2560.
- [23] DIEFENBACH 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.
- [24] 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.
- [25] GOTO H, KANAI Y, YOTSUI A, et al. Microfluidic screening system based on boron-doped diamond electrodes and dielectrophoretic sorting for directed evolution of NAD(P)-dependent oxidoreductases[J]. Lab on a Chip, 2020, 20(4): 666-674.

- 852-861.
- [26] DAVOODI H, NORDIN N, BORDONALI L, et al. An NMR-compatible microfluidic platform enabling *in situ* electrochemistry[J]. *Lab on a Chip*, 2020, 20(17): 3202-3212.
  - [27] LABELLE C A, MASSARO A, CORTÉS-LLANOS B, et al. Image-based live cell sorting[J]. *Trends in Biotechnology*, 2021, 39(6): 613-623.
  - [28] SCIAMBI A, ABATE A R. Accurate microfluidic sorting of droplets at 30 kHz[J]. *Lab on a Chip*, 2015, 15(1): 47-51.
  - [29] LI S X, DING X Y, GUO F, et al. An on-chip, multichannel droplet sorter using standing surface acoustic waves[J]. *Analytical Chemistry*, 2013, 85(11): 5468-5474.
  - [30] NAVI M, ABBASI N, SALARI A, et al. Magnetic water-in-water droplet microfluidics: systematic experiments and scaling mathematical analysis[J]. *Biomicrofluidics*, 2020, 14(2): 024101.
  - [31] ZHONG R Y, YANG S J, STEFANO UGOLINI G, et al. Acoustofluidic droplet sorter based on single phase focused transducers (small 46/2021)[J]. *Small*, 2021, 17(46): e2103848.
  - [32] ROBERT DE SAINT VINCENT M, WUNENBURGER R, DELVILLE J P. Laser switching and sorting for high speed digital microfluidics[J]. *Applied Physics Letters*, 2008, 92(15): 154105.
  - [33] 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*, 2018, 18(1): 190-196.
  - [34] TABUCHI T, YOKOBAYASHI Y. High-throughput screening of cell-free riboswitches by fluorescence-activated droplet sorting[J]. *Nucleic Acids Research*, 2022, 50(6): 3535-3550.
  - [35] BECKER S. Ultra-high-throughput screening based on cell-surface display and fluorescence-activated cell sorting for the identification of novel biocatalysts[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2004, 15(4): 323-329.
  - [36] BASU S, CAMPBELL H M, DITTEL B N, et al. Purification of specific cell population by fluorescence activated cell sorting (FACS)[J]. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 2010(41): 1546.
  - [37] YUAN H L, TU R, TONG X W, et al. Ultrahigh-throughput screening of industrial enzyme-producing strains by droplet-based microfluidic system[J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2022, 49(3): kuac007.
  - [38] 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.
  - [39] HASAN S, GEISLER D, WINK K, et al. Fluorescence lifetime-activated droplet sorting in microfluidic chip systems [J]. *Lab on a Chip*, 2019, 19(3): 403-409.
  - [40] HASAN S, BLAHA M E, PIENDL S K, et al. Two-photon fluorescence lifetime for label-free microfluidic droplet sorting [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2022, 414(1): 721-730.
  - [41] HUNG S T, MUKHERJEE S, JIMENEZ R. Enrichment of rare events using a multi-parameter high throughput microfluidic droplet sorter[J]. *Lab on a Chip*, 2020, 20(4): 834-843.
  - [42] NEUN S, KAMINSKI T S, HOLLFELDER F. Single-cell activity screening in microfluidic droplets[M]// *Methods in enzymology: enzyme activity in single cells*. Amsterdam: Elsevier, 2019: 95-112.
  - [43] 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.
  - [44] MEDCALF E J, GANTZ M, KAMINSKI T S, et al. Ultrahigh-throughput absorbance-activated droplet sorting for enzyme screening at kilohertz frequencies[J]. *Analytical Chemistry*, 2023, 95(10): 4597-4604.
  - [45] MACEICZYK R M, HESS D, CHIU F W Y, et al. Differential detection photothermal spectroscopy: towards ultra-fast and sensitive label-free detection in picoliter & femtoliter droplets [J]. *Lab on a Chip*, 2017, 17(21): 3654-3663.
  - [46] 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.
  - [47] 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.
  - [48] 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.
  - [49] BEMETZ J, WEGEMANN A, SAATCHI K, et al. Microfluidic-based synthesis of magnetic nanoparticles coupled with miniaturized NMR for online relaxation studies [J]. *Analytical Chemistry*, 2018, 90(16): 9975-9982.
  - [50] ANAGNOSTIDIS V, SHERLOCK B, METZ J, et al. Deep learning guided image-based droplet sorting for on-demand selection and analysis of single cells and 3D cell cultures[J]. *Lab on a Chip*, 2020, 20(5): 889-900.
  - [51] RIEMER J, HOEPKEN H H, CZERWINSKA H, et al. Colorimetric ferrozine-based assay for the quantitation of iron in cultured cells[J]. *Analytical Biochemistry*, 2004, 331(2): 370-375.
  - [52] HANSEN S K, JAMALI B, HUBBUCH J. Selective high throughput protein quantification based on UV absorption spectra[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2013, 110(2): 448-460.

- [53] DUNCOMBE T A, PONTI A, SEEBECK F P, et al. UV-vis spectra-activated droplet sorting for label-free chemical identification and collection of droplets[J]. *Analytical Chemistry*, 2021, 93(38): 13008-13013.
- [54] 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.
- [55] EL-ANEED A, COHEN A, BANOUB J. Mass spectrometry, review of the basics: electrospray, MALDI, and commonly used mass analyzers[J]. *Applied Spectroscopy Reviews*, 2009, 44(3): 210-230.
- [56] HA N S, DE RAAD M, HAN L Z, et al. Faster, better, and cheaper: harnessing microfluidics and mass spectrometry for biotechnology[J]. *RSC Chemical Biology*, 2021, 2(5): 1331-1351.
- [57] SUN S W, KENNEDY R T. Droplet electrospray ionization mass spectrometry for high throughput screening for enzyme inhibitors[J]. *Analytical Chemistry*, 2014, 86(18): 9309-9314.
- [58] SUN S W, BUER B C, MARSH E N G, et al. A label-free Sirtuin 1 assay based on droplet-electrospray ionization mass spectrometry[J]. *Analytical Methods*, 2016, 8(17): 3458-3465.
- [59] STEYER D J, KENNEDY R T. High-throughput nanoelectrospray ionization-mass spectrometry analysis of microfluidic droplet samples[J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(10): 6645-6651.
- [60] KUDELSKI A. Analytical applications of Raman spectroscopy[J]. *Talanta*, 2008, 76(1): 1-8.
- [61] SAFIR F, VU N, TADESSE L F, et al. Combining acoustic bioprinting with AI-assisted Raman spectroscopy for high-throughput identification of bacteria in blood[J]. *Nano Letters*, 2023, 23(6): 2065-2073.
- [62] LIU Z S, LIU D M, CAI Y D, et al. Application of nuclear magnetic resonance (NMR) in coalbed methane and shale reservoirs: a review[J]. *International Journal of Coal Geology*, 2020, 218: 103261.
- [63] CAO X Y, YANG J, MAO J D. Characterization of kerogen using solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy: a review[J]. *International Journal of Coal Geology*, 2013, 108: 83-90.
- [64] VAN MEERTEN S G J, VAN BENTUM P J M, KENTGENS A P M. Shim-on-chip design for microfluidic NMR detectors[J]. *Analytical Chemistry*, 2018, 90(17): 10134-10138.
- [65] SWYER I, SOONG R, DRYDEN M D M, et al. Interfacing digital microfluidics with high-field nuclear magnetic resonance spectroscopy[J]. *Lab on a Chip*, 2016, 16(22): 4424-4435.
- [66] PAN C W, HORVATH D G, BRAZA S, et al. Sorting by interfacial tension (SIFT): label-free selection of live cells based on single-cell metabolism[J]. *Lab on a Chip*, 2019, 19(8): 1344-1351.
- [67] DOBSON C, ZIELKE C, PAN C, et al. Method for passive droplet sorting after photo-tagging[J]. *Micromachines*, 2020, 11(11): 964.
- [68] ZIELKE C, PAN C W, GUTIERREZ RAMIREZ A J, et al. Microfluidic platform for the isolation of cancer-cell subpopulations based on single-cell glycolysis[J]. *Analytical Chemistry*, 2020, 92(10): 6949-6957.
- [69] WATTERSON W J, TANYERI M, WATSON A R, et al. Droplet-based high-throughput cultivation for accurate screening of antibiotic resistant gut microbes[J]. *eLife*, 2020, 9: e56998.
- [70] DOAN M, VOROBEV I, REES P, et al. Diagnostic potential of imaging flow cytometry[J]. *Trends in Biotechnology*, 2018, 36(7): 649-652.
- [71] SUTHERLAND J D. Evolutionary optimisation of enzymes[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2000, 4(3): 263-269.
- [72] CHERRY J R, FIDANTSEF A L. Directed evolution of industrial enzymes: an update[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2003, 14(4): 438-443.
- [73] TURNER N J. Directed evolution drives the next generation of biocatalysts[J]. *Nature Chemical Biology*, 2009, 5(8): 567-573.
- [74] QU G, LI A T, ACEVEDO-ROCHA C G, et al. The crucial role of methodology development in directed evolution of selective enzymes[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2020, 59(32): 13204-13231.
- [75] OTTEN R, PÁDUA R A P, BUNZEL H A, et al. How directed evolution reshapes the energy landscape in an enzyme to boost catalysis[J]. *Science*, 2020, 370(6523): 1442-1446.
- [76] WANG Y J, XUE P, CAO M F, et al. Directed evolution: methodologies and applications[J]. *Chemical Reviews*, 2021, 121(20): 12384-12444.
- [77] PACKER M S, LIU D R. Methods for the directed evolution of proteins[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2015, 16(7): 379-394.
- [78] CHIU F W Y, STAVRAKIS S. High-throughput droplet-based microfluidics for directed evolution of enzymes[J]. *ELECTROPHORESIS*, 2019, 40(21): 2860-2872.
- [79] MADHAVAN A, ARUN K B, BINOD P, et al. Design of novel enzyme biocatalysts for industrial bioprocess: harnessing the power of protein engineering, high throughput screening and synthetic biology[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 325: 124617.
- [80] 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.
- [81] 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 and Biotechnology, 2019, 46(11): 1603-1610.
- [82] PRODANOVIĆ R, UNG W L, ILIĆ ĐURĐIĆ K, et al. A high-throughput screening system based on droplet microfluidics for glucose oxidase gene libraries[J]. Molecules, 2020, 25(10): 2418.
- [83] ZUREK P J, KNYPHAUSEN P, NEUFELD K, et al. UMI-linked consensus sequencing enables phylogenetic analysis of directed evolution[J]. Nature Communications, 2020, 11: 6023.
- [84] SUN G Y, WU Y K, HUANG Z Y, et al. Directed evolution of diacetylchitobiose deacetylase *via* high-throughput droplet sorting with a novel, bacteria-based biosensor[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2023, 219: 114818.
- [85] QIAO Y, HU R, CHEN D, et al. Fluorescence-activated droplet sorting of PET degrading microorganisms[J]. Journal of Hazardous Materials, 2022, 424(pt b): 127417.
- [86] XU A M, ZHANG X X, CAO S X, et al. Transcription-associated fluorescence-activated droplet sorting for di-rhamnolipid hyperproducers[J]. ACS Synthetic Biology, 2022, 11(6): 1992-2000.
- [87] ZACHOS I, GENTH R, SUTIONO S, et al. Hot flows: evolving an archaeal glucose dehydrogenase for ultrastable carba-NADP<sup>+</sup> using microfluidics at elevated temperatures[J]. ACS Catalysis, 2022, 12(3): 1841-1846.
- [88] TAN Y M, ZHANG Y, HAN Y B, et al. Directed evolution of an  $\alpha$ 1,3-fucosyltransferase using a single-cell ultrahigh-throughput screening method[J]. Science Advances, 2019, 5(10): eaaw8451.
- [89] 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.
- [90] BOWMAN E K, NGUYEN HOANG P T, GORDILLO SIERRA A R, et al. Temporal sorting of microdroplets can identify productivity differences of itaconic acid from libraries of *Yarrowia lipolytica*[J]. Lab on a Chip, 2023, 23(9): 2249-2256.
- [91] AN X S, ZUO P, YE B C. A single cell droplet microfluidic system for quantitative determination of food-borne pathogens [J]. Talanta, 2020, 209: 120571.
- [92] NEETHIRAJAN S, KOBAYASHI I, NAKAJIMA M, et al. Microfluidics for food, agriculture and biosystems industries [J]. Lab on a Chip, 2011, 11(9): 1574-1586.
- [93] XING G W, ZHANG W F, LI N, et al. Recent progress on microfluidic biosensors for rapid detection of pathogenic bacteria[J]. Chinese Chemical Letters, 2022, 33(4): 1743-1751.
- [94] LI S X, MA F, BACHMAN H, et al. Acoustofluidic bacteria separation[J]. Journal of Micromechanics and Microengineering, 2017, 27(1): 015031.
- [95] OHLSSON P, PETERSSON K, AUGUSTSSON P, et al. Acoustic impedance matched buffers enable separation of bacteria from blood cells at high cell concentrations[J]. Scientific Reports, 2018, 8: 9156.
- [96] HYMAN L B, CHRISTOPHER C R, ROMERO P A. Single-cell nucleic acid profiling in droplets (SNAPD) enables high-throughput analysis of heterogeneous cell populations[J]. Nucleic Acids Research, 2021, 49(18): e103.
- [97] SEAH Y F S, HU H X, MERTEN C A. Microfluidic single-cell technology in immunology and antibody screening[J]. Molecular Aspects of Medicine, 2018, 59: 47-61.
- [98] 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.
- [99] BARANOVA M N, BABIKOVA P A, KUDZHAEV A M, et al. Live biosensors for ultrahigh-throughput screening of antimicrobial activity against gram-negative bacteria[J]. Antibiotics, 2021, 10(10): 1161.
- [100] SILTANEN C A, COLE R H, POUST S, et al. An oil-free picodrop bioassay platform for synthetic biology[J]. Scientific Reports, 2018, 8: 7913.



**通讯作者:** 杨广宇(1980—),男,研究员,博士生导师。研究方向为酶分子改造、超高通量筛选方法的建立;酶分子机制解析;体外合成生物学研究。  
E-mail: yanggy@sjtu.edu.cn



**第一作者:** 秦伟彤(1992—),女,博士。研究方向为酶的定向进化、微液滴超高通量筛选方法的建立。  
E-mail: qinweitong122@163.com