

DOI: 10.19650/j.cnki.cjsi.J2006185

单细胞分离方法及仪器研究进展*

黄彩虹^{1,2}, 易定容¹, 金福江¹, 叶一青¹

(1. 华侨大学机电及自动化学院 厦门 361021; 2. 华侨大学信息科学与工程学院 厦门 361021)

摘 要:如何从复杂异质且数量众多的细胞背景中分离出具有某种特征的纯净细胞实验样本,是长期困扰生命科学和临床病理学研究者的难题。纯净无损高特异性的细胞分离方法对解析生命过程、研究病理机制、确定治疗方案、分析药物疗效具有重要的作用。综述了单细胞分离方法及分离仪器的研究进展,重点梳理荧光激活细胞分选、微流体、激光显微切割、显微操作 4 种方法。首先,阐述方法的工作原理和部分理论模型。其次,分析几种典型仪器的结构、研究进展及主要性能参数。最后,讨论各种单细胞分离方法的优点和局限性,并展望单细胞分离仪器的发展趋势。

关键词:单细胞分离方法; 荧光激活细胞分选; 微流体技术; 激光显微切割

中图分类号: TH744 **文献标识码:** A **国家标准学科分类代码:** 460.4099

Progress on single cell isolation methods and instruments

Huang Caihong^{1,2}, Yi Dingrong¹, Jin Fujiang¹, Ye Yiqing¹

(1. College of Mechanical Engineering and Automation, Huaqiao University, Xiamen 361021, China;

2. College of Information Science and Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China)

Abstract: How to isolate the pure cell samples with certain characteristics from complex heterogeneous and numerous cells is a difficult problem. It perplexes researchers in life science and clinical pathology for a long time. The methods for effectively isolating pure, undamaged, and high-specific cells have significant influences on the explanation of life process, the study of pathological mechanism, the determination of treatment plan, and the analysis of drug efficacy. In this study, the research progress of single cell isolation methods and instrument is reviewed and summarized. Fluorescent activated cell sorting, microfluidics, laser microdissection and micromanipulator are emphasized. Firstly, for the cell isolation methods, the working principle and the corresponding theoretical models are presented. Secondly, the cell isolation instrument, the structural feature, research progress and main performance parameters are analyzed. Finally, the advantages and limitations of various single cell isolation methods are discussed. Meanwhile, the trend of single cell isolation methods is prospected.

Keywords: single cell isolation instrument; fluorescence activated cell sorting; microfluidics; laser microdissection

0 引 言

细胞是生命的最小单位,一切生命现象均发生在小小的细胞之内,细胞是生物医学研究人员及临床工作者用以解析生命过程的关键实验对象^[1-2]。近年来,越来越多的研究发现,细胞间存在异质性^[3-7],即使处于同一群体中的生物细胞也会在基因转录和翻译、蛋白质活性、以及代谢物丰度等多个水平存在着差异。传统的以群体细

胞为研究对象的细胞研究方法,观测得到的结果实际上是群体内各个细胞状态的平均值。通过群体细胞的平均值来分析细胞状态,掩盖了个体细胞间的差异,导致大量个体细胞信息丢失,也使得极少部分拥有特殊功能或致病能力的细胞被忽视。因此,高纯度的单细胞分离方法和仪器,对纯化和分析单细胞起到了重要的作用,使得对单个细胞的研究,不受群体效应的影响^[8]。通过单细胞分离方法,以前未培养的微生物可以在实验室中通过消除来自其他生物体的竞争而生长,微生物和基因组之间

收稿日期:2020-03-18 Received Date:2020-03-18

* 基金项目:国家自然科学基金(5175200)、福建省教育厅科研课题(JAT170033)项目资助

的联系也有可能揭示以前未发现的微生物功能^[9]。借助单细胞分离方法,生物医学和临床医学研究人员可以研究细胞异质性,并随后研究细胞动力学^[10],或者进行基因组、转录组测序^[11]。如果不能从多数量的普通细胞中挑选出具有侵袭能力的少数癌细胞进行组学分析,那么微量的遗传变异就会被掩埋在大大过量的非突变背景中。如1 mL外周血上亿个细胞中仅仅有几十个白血病癌细胞。又如,具有侵袭能力的癌细胞与普通癌细胞或者普通细胞相比数量也极其稀少。如何从组织中获取高纯度、高特异性的细胞样本进行下游实验是长期以来困扰生命科学和临床病理学研究者的一个难题。

围绕如何获取纯净、无损细胞实验样本这一取材难题,过去20年来,国际上陆续大力投入单细胞分离方法的研究。新兴了多种单细胞分离方法,用以从众多的背景细胞中分离出具有某种特征的纯净细胞作为实验样本,以满足下游多种单细胞分析方法对实验样本的需求。已经证明,单细胞分析方法可以为人类认识肿瘤病理机制^[12-14]、药物的发现和开发^[15]、精准医疗中的治疗诊断^[16-18]提供重要的科学依据。

根据工作原理的不同,当前的单细胞分离方法大致可分为两类^[19]:1)基于大小、密度、介电性和可变形性等物理特性的分离,例如离心法、膜过滤、介电泳、手动细胞分选等。2)基于细胞生物学特性(如特定蛋白在细胞表面的表达)的分离。这些方法通常涉及标记的亲和方法,如荧光激活细胞分选和免疫磁珠法等。

本文总结了单细胞分离方法的研究现状,同时重点关注几种最常用的方法,即荧光激活细胞分选、微流体技术、激光显微切割和显微操作。这些方法汇总的每一项都对许多领域产生了重要影响,包括细胞生物学、免疫学、肿瘤学和微生物学等^[20-23]。而这些方法本身属于仪器科学的前沿技术,单细胞分离方法集结生物学、信息学、材料学、物理学、光学工程等多个交叉学科专业知识,至今仍有不少具有挑战性的技术难点亟待攻克。

1 单细胞分离的主要方法

2014年、2017年HTStec公司对单细胞分离进行了全球市场调查^[21],主要是在学术界,制药和生物技术研究实验室之间进行。由John Comley撰写的2017年单细胞分离主要方法的调查结果如图1所示。

两次的调查结果均表明近几年最常用的单细胞分离方法主要是荧光激活细胞分选(fluorescence activated cell sorting, FACS)/流式细胞仪,微流体/芯片实验室,手动细胞拾取/显微操作,激光显微切割,随机接种或稀释到微孔板中,采用非接触式分配方法(例如喷墨,电磁阀或声学)等方法。本文针对前4种分离方法进行详细介绍。

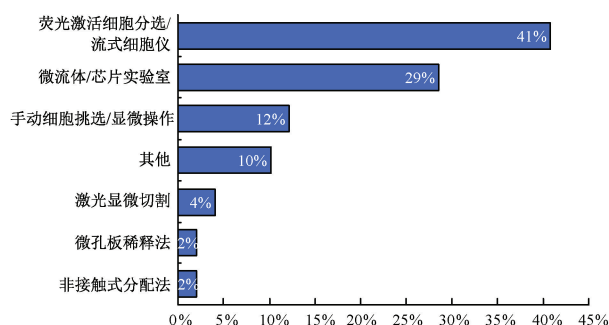


图1 HTStec公司2017年调查获取的单细胞分离的主要方法

Fig.1 The main methods of single cell isolation obtained by HTStec Ltd in 2017

2 单细胞分离的主要方法和仪器

2.1 荧光激活细胞分选(FACS)

第一台流式细胞分选仪由Fulwyler^[24]于1965年发明,并结合了喷墨打印技术和库尔特原理(通过电场来检测和计数细胞)。1972年,斯坦福大学由Len Herzenberg领导的科研小组拿到了FACS的专利,这个基于特定光散射和荧光特征对单个细胞进行分选的新方法,彻底改变了免疫学和癌症生物学的研究。1974年,Becton Dickinson(BD)公司从斯坦福大学获得了FACS技术的许可,并推出了第一台商用FACS细胞仪。

1) FACS相关理论模型

在流体力学中,雷诺系数 Re 是用来评价流体属于什么运动状态,通常认为当雷诺系数 $Re < 2\ 300$ 为稳定的层流,雷诺系数 Re 在 $2\ 300 \sim 4\ 000$ 左右为过渡流,而当雷诺系数 $Re > 4\ 000$ 为不稳定的端流,雷诺系数 Re 的计算公式如下所示^[25]:

$$R_e = \frac{d\rho v}{\phi} \quad (1)$$

式中: d 为样品管的内径,m; ρ 为流体的密度, kg/m^3 ; v 为平均流速, m/s ; ϕ 为流体的粘度, $\text{Pa}\cdot\text{s}$ 。流动室是FACS的重要组成部分,一般采用双鞘液形式的流动室,其聚焦原理如图2所示。图2(a)所示为流动室内结构。图2(b)所示为流体聚焦原理,图中 D_1 与 D_2 口位于两侧,是鞘液流通道的入口宽度,主要负责聚焦和压缩待测悬浮液。 D_3 口位于中间,是待测悬浮液的入口宽度。将需要聚焦的样品流从 D_3 口注入,在鞘液挤压的作用下,中间样品流实现聚焦。在聚焦后中心液的宽度 d 远小于初始待测悬浮液宽度 D_3 。最后,所有的鞘流液体废液从 D_4 端口排出^[26]。

根据理想流体的质量守恒定律可知,在二维状态下,通过中心管路的流体质量应与聚焦后流体质量保持相等^[27]。

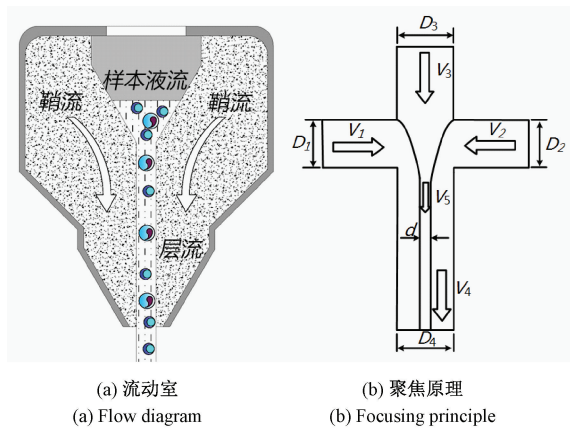


图 2 双鞘流系统工作原理

Fig.2 Schematic representation of working principle of double sheath flow system

$$V_3 D_3 = V_5 d \quad (2)$$

根据流体的质量守恒定律以及聚焦后产生稳定层流的假定,可推导出流体聚焦后的宽度可以表示为:

$$D = \frac{\rho_4 D_4}{1.5 \left(\rho_1 \times \frac{\bar{V}_1}{V_3} \times \frac{D_1}{D_3} + \rho_2 \times \frac{\bar{V}_2}{V_3} \times \frac{D_2}{D_3} + \rho_3 \right)} \quad (3)$$

式中: ρ_1 、 ρ_2 、 ρ_3 和 ρ_4 分别是对应通口流体的密度; V_1 、 V_2 和 V_4 分别是双鞘液流体的入口速度和出口 D_4 排出的平均速度。根据式(3)可以预测聚焦流的宽度,该宽度通常控制在几十微米。

2) FACS 工作原理

FACS 是根据每个细胞的特定光散射和荧光特性,将生物细胞的异质混合物分类到两个或多个容器中的方法。其基本工作原理是:将待测细胞用荧光蛋白或荧光抗体标记,制作成悬浮样本。样本流由气压装置通过进样孔送入流动室。鞘液在高压下通过单侧进流的方式进入到流动室内,利用流体动力聚焦效应,使得细胞样品流在两侧鞘液流的挤压下形成一定宽度且呈直线式的聚焦流经过流动室喷嘴,通过流动室喷嘴的高速振动,液流被分成液滴,而后流经光电检测区域及基于电场的细胞分选区域。从仪器结构上看,FACS 一般由 5 部分组成:流动室及液流驱动系统、激光光源及光束整形系统、光电检测系统、细胞分选系统、计算机采集存贮及分析系统。

光源及光束整形系统主要包括:固定波长的激光、多根引导光纤、光束整形装置和消色差聚焦透镜。各激光聚焦形成的光斑在空间上相互分离,并各自聚焦成椭圆形^[28]。当激光发射的光击中细胞时,光子会向多个方向散射,散射光信号主要分为两类:即前向小角度散射光信号(forward scatter, FSC)和侧向 90° 散射光信号(side scatter, SSC)。FSC 信号主要与细胞体积大小有关,通常

选取 FSC 作为阈值,来排除样品中的各种碎片及鞘液中的小颗粒;SSC 信号对细胞膜、胞质、核膜的折射率更为敏感,可提供有关细胞内精细结构和颗粒性质的信息。除了以上两种来自激光原光束的信号,还需要检测荧光信号。细胞在其表面以及细胞内抗原上具有特定的功能性抗原,通常使用针对该抗原的特异性抗体来鉴定。通过向这些抗体添加荧光染料,然后用激光光束激发获得荧光信号,可以检测细胞类型,还可提供细胞结构、功能和健康状况等信息。细胞仪中有两种常用类型的检测器:光电二极管和光电倍增管(photomultiplier tube, PMT)。光电二极管用于获取诸如向前向散射之类的明亮信号。PMT 主要用于收集侧向散射信号和荧光信号,其结构上是让波长最长的光(光子能力最低)优先投射进入第一个 PMT,并通过一系列的二相色镜将较短波长的光投射或反射到下一个 PMT 检测器。安装在每个 PMT 检测器之前的带通滤光片允许指定波长范围内的荧光被收集。在光子撞击 PMT 之后,它们被转换为电流,然后流向放大器并转换为高斯型脉冲,经 AD 转换电路传送到计算机。脉冲信号中的峰值、脉宽、面积特征参量反映了单个细胞的折射率及大小等特征^[29]。液流经过光电检测区域后,流经充电区(在某些系统中,电荷直接事先施加到液流中)。充电区采用高压静电场,根据之前的荧光测量结果,如细胞是否发荧光或所发信号的特征,相应的电荷会被捕获在液滴上。然后,带电的液滴流经偏转板的高压静电场时向左或向右偏转,落入各自的收集容器之中,不含细胞的液滴因为未充电被送入废液容器中。从而完成细胞的分选。最终结果是 3 个或多个带有纯细胞亚群的试管。每个试管中的细胞数是已知的,并且还记录了每个细胞的荧光水平。仪器工作原理如图 3 所示,虚线内的图像分别代表为前向散射、侧向散射、荧光散射。

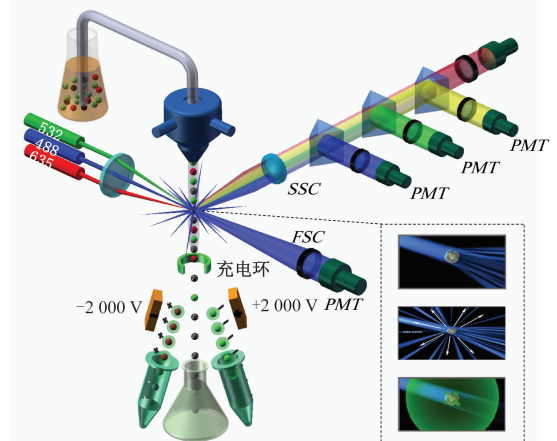


图 3 FACS 系统工作原理

Fig.3 Schematic representation of fluorescent activated cell sorting (FACS)

3) 商业化 FACS 仪器产品特性

市场上销售的流式细胞仪/FACS 产品种类很多,主要生产厂家有:BD、Beckman Coulter、Partec、Accuri Cytometers、Guava、Union Biometrica、ABI、Amnis 等。其中,拥有市场较大份额的公司是美国的 Becton Dickinson (BD) 公司、Beckman Coulter 公司和德国的 Partec 公司。FACS 产品主要分为两类:临床型和科研型。临床型的特点是:光路调节系统固定,自动化程度高,操作简便,易掌握,适用于临床常规测试;科研型的

特点是:分辨率高,选配多种波长和类型激光器,可将感兴趣细胞分选到特定培养孔或板上,适用于科研。限于篇幅,本文仅以 BD 和 Beckman Coulter 2 个品牌的临床型和科研型产品为例。如表 1 所示,FACS CALibur 和 FACS Aris III 分别为 BD 公司临床型和科研型产品,Navios 和 MoFlo Astrios EQ 分别为 Beckman Coulter 公司临床型和科研型产品。比较了产品的部分性能参数,借以了解 FACS 产品的特点,以及相关仪器设备的研究进展。

表 1 部分 FACS 产品性能参数
Table 1 The performance parameters of some FACS products

技术指标	BD (FACS CALibur)	BD (FACS Aria III)	Beckman Coulter (Navios)	Beckman Coulter (MoFlo Astrios EQ)
激光	双激光	6 激光可选	三激光	7 激光可选
荧光	4 色	18 色	10 色	49 个检测位点
颗粒范围	0.2~100 μm	0.2~100 μm	≥0.4 μm	0.2~30 μm
获取速度	10 000 细胞/s	70 000 细胞/s	25 000 细胞/s	>100 000 细胞/s
分选速度	≥300 个/s	50 000 个/s	10 000 个/s	>70 000 细胞/s
分选纯度	≥98%	>98%	>99%	>99%
分选存活率	>90%	>90%	>90%	>90%
精确度	<5% 误差	<5% 误差	<5% 误差	<5% 误差

2.2 微流体单细胞操作

微流体是一种在微米尺度上操纵流体的技术,又称其为芯片上实验室 (Lab-on-a-Chip) 或微流控芯片技术^[30]。细胞制剂被加载到微芯片上,受到外力的作用,根据特定的物理或生化特性对不同的细胞群进行分类。微加工的通道、腔室和阀门构成了这些微流体分选系统的核心“机械”。微流体分选可以分为两种方式,主动和被动^[31]。主动分选利用某种外力场,如电场或磁场来分离细胞;被动分选依赖于细胞质量或密度,需要重力或某种机械力来分选不同的细胞。在过去的十几年里,已经提出了大量用于单细胞分析和处理的微流体/芯片上实验室设备^[32]。尽管已经公布了许多不同的用于单细胞分离和处理的微流体设备,但基于流体动力学微滴流体生成的原理来设计微流体设备仍然是比较广泛的方法。所以,下面先重点介绍其相关理论模型和工作原理。

1) 微滴流体技术

微滴流体是一种高通量单细胞封装技术,通过使用细胞自身尺度上的特征或力梯度来可靠地进行细胞封装。液滴的大小、形状和均匀性可以精确控制。这种方法通常需要两种不混溶的流体来产生单分散的油包水微滴,其尺寸范围从亚微米到几百微米^[31]。

(1) 液滴流体相关理论模型

连续介质假说很好地描述了液/液两相微流。假设流动为二维流动,对于分散相和连续相流体,不可压缩的连续性方程为^[31]:

$$\frac{\partial V_x}{\partial x} + \frac{\partial V_y}{\partial y} = 0$$

(4)

式中: V_x 、 V_y 为流动 X 、 Y 方向上的速度分量。式(4)表明,对于不可压缩液体,单位时间单位体积空间内流入与流出的液体体积之差等于 0,即液体体积守恒。系统的动量方程是著名的二维稳态不可压缩纳维-斯托克斯方程(N-S 方程):

$$\begin{cases} u \frac{\partial u}{\partial x} + v \frac{\partial u}{\partial y} + \frac{\partial p}{\partial x} = \frac{1}{Re} \left(\frac{\partial^2 u}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 u}{\partial y^2} \right) \\ u \frac{\partial v}{\partial x} + v \frac{\partial v}{\partial y} + \frac{\partial p}{\partial y} = \frac{1}{Re} \left(\frac{\partial^2 v}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 v}{\partial y^2} \right) \end{cases}$$

(5)

式中: $\frac{\partial p}{\partial x}$ 和 $\frac{\partial p}{\partial y}$ 为压力梯度; Re 为雷诺数。

微流体装置中液滴的形成选用不混溶物质,又称非均相物系组成。在非均相物系中,处于分散状态的物质,称分散相,如悬浮液中的悬浮物;包围着分散物质而处于连续状态的流体,称连续相,如悬浮液中的液体等。微流体装置中液滴的形成涉及到液/液界面的分解和破

裂^[33]。因此,应该指定几个界面边界条件。第一个来源于不混溶界面上正常速度的连续性:

$$\mathbf{V}_d \cdot \mathbf{n} = \mathbf{V}_c \cdot \mathbf{n}' \quad (6)$$

式中: $\mathbf{V}$ 是流体的速度矢量,下标“d”和“c”,分别表示分散相流体和连续相流体;其中 $\mathbf{n}$ 和 $\mathbf{n}'$ 是指向界面的单位法向量。

切向粘性应力应该是连续的,并且离散相和连续相之间的法向应力差由毛细管压力来平衡:

$$\sigma_d \cdot \mathbf{t} = \sigma_c \cdot \mathbf{t}' \quad (7)$$

$$T_d \cdot \mathbf{n} - T_c \cdot \mathbf{n}' = -\gamma \mathbf{k} \quad (8)$$

式中: $\mathbf{t}$ 是界面处的单位切向矢量; $T_s = -p_s \mathbf{I} + \sigma_s$,下标“s”表示“d”或“c”,是包含压力 p_s 和相对应力 σ_s 的应力张量; $\mathbf{I}$ 是单位矩阵; γ 是界面张力; $\mathbf{k} = R_1 + R_2$ 是界面平均曲率的2倍, R_1 和 R_2 是曲率的主要半径。

上述控制方程指出了控制液滴产生的4种力:惯性力、粘滞力、重力(对于没有其他外力场的情况)和毛细力。尽管其他无量纲量与液滴破碎有关,包括韦伯数(惯性力与界面张力之比),健数 B_o (重力与界面张力之比)和雷诺数 Re (惯性力与粘滞力之比),特别是在高流速和使用较大尺寸几何形状时。但大多数情况下,控制液滴形成的物理参数可以通过分析毛细数 Ca 来确定。

$$Ca = \frac{\eta V}{\gamma} \quad (9)$$

式中: η 和 V 是连续相的粘度和特征速度; γ 是水油界面的表面张力。随着 Ca 的增加,不同的流动状态被定义为挤压、滴落和喷射状态。

在表面张力占主导地位的挤压状态下,液滴夹断是由流体界面的受限延伸部分前后的压差驱动的,在这种情况下,夹断液滴的大小与分散相和连续相的流速成正比^[34]。在较高的 Ca 浓度下,液滴破碎和液滴尺寸受剪切控制(在滴落状态下),初生液滴两侧的压差小于挤压状态下的压差,产生的液滴尺寸与增加的 Ca 浓度成反比,对流速比的依赖性降低。最后,在喷射状态下,液滴破碎是由粘性占主导的流体中沿流体线的 Rayleigh-Plateau 不稳定性引起的。

(2) 微流体液滴产生

尽管微流体文献中普遍存在液滴产生,但可靠产生液滴所需的微通道几何形状是十多年前发展起来的。到目前为止,最常见的封装细胞的方法是利用微流体通道的几何形状来混合同向流动的水和油相,其中(在大多数情况下)水相自分离成离散的水滴。即通过利用多种微流体几何形状,任意体积的流体可以以高达 100 kHz 的速率转变成大量均匀尺寸的微纳升液滴。此外,给定所用特征的长度范围(通常在 10~100 μm 之间),这些通道设计可以在芯片上复制以进行并行处理。用于液滴产生的常见几何形状包括 T 形接头、流动聚焦和同向流动结

构,尽管已有关于这些接头变化的报道,如 V 形接头或双 T 形接头。然而,每种几何形状的基本操作原理是相同的:在两种同向流动的不混溶流体之间产生界面,其中一种流体自分离成被第二种流体包围的离散液滴。哪种流体成为分散相(形成液滴的流体),哪种流体形成连续相(小液滴周围的相)由流体和通道各自的表面能控制。在大多数情况下,例如当使用疏水性聚二甲基硅氧烷(polydimethylsiloxane, PDMS)通道和油/水流体时,水相分散,尽管可能通过通道壁的亲水性引发相转化。在逐滴的基础上控制被包封的细胞的数量并不简单,尤其重要的是,对于单细胞分析来说,非常需要每滴一个细胞。单个细胞随机封装在每个液滴中,每个液滴中的细胞数量遵循不均匀泊松分布。因此限制了被动细胞封装在单细胞分析中的应用。已经开发了几种方法来克服这个限制。例如,可以应用基于属性差异的后分类来提高单细胞封装效率,或者采用主动细胞封装的方法来提高封装效率。

微滴流体单细胞分选系统已有很多文献[34-35]报道,选择文献[35]所开发的仪器的结构来阐述,如图4所示。通过注射器或是压力驱动泵将细胞悬浮液、油、蛋白酶试剂等注入微通道的相应入口孔。如图4(a)所示通过“T型连接”等方式在油包水液滴中实现细胞封装;如图4(b)所示,通过分支通道结构实现液滴的减速和显微镜下观察。接下来液滴进入分选区,可通过电磁阀等方式实现细胞的分选,如图4(c)所示。最后通过如嵌入的熔融石英毛细管等方式将分选后单细胞液滴输出到对应的管中或废液池中,如图4(d)所示。

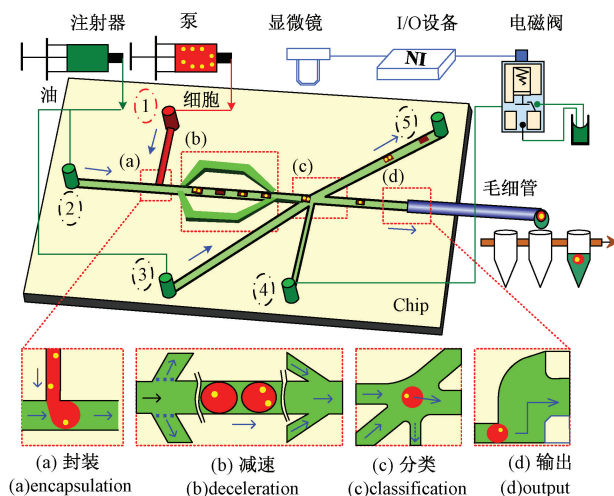


图 4 某种微流体单细胞液滴生成系统原理

Fig.4 Schematic diagram of a microfluidic single-cell droplet generation system

2) 其他微流体单细胞分离方法

近年来,已经报道了微流体装置中单细胞操作的大量研究和应用^[32],包括机械方法、电学^[36-40]、光学^[8, 41]、

声学^[42]、磁学^[43]和微机器人等方法,部分工作原理如图5所示。

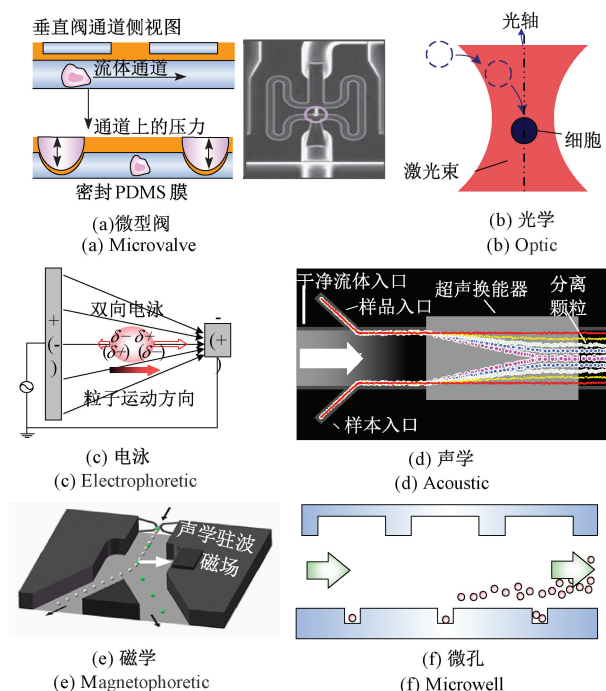


图5 其他微流体方法

Fig.5 Other microfluidic methods

(1) 流体动向学——微型阀,如图5(a)所示,微型阀的结构由垂直交叉的流动层和控制层组成,在两层之间形成可变形膜。当通过控制层施加压力时,薄膜变形并粘在流动通道的底面上,以阻挡流动层中的流动。相反,当控制层不施加压力或施加相对较小的压力时,流动层看起来是开放的或半开放的。美国 Fluidigm 公司基于这一技术开发了一种称为 C1 单细胞自动制备系统的单细胞自动预处理系统,可一次自动分离 96 个悬浮细胞。目前,该系统已被世界上许多大学和研究机构用于单细胞基因组学研究。

(2) 流体动向学——惯性力,惯性微流体是基于在某些高流速下使用惯性力来连续聚焦分类不同大小和形状的细胞的方法。这种方法通常用于从血细胞中分离单个循环癌细胞,并且通常需要预先稀释血样。并不是所有系统都是基于高流速下操作,文献[44]在弯曲的微流体通道中,随着升力的增加,由迪恩流引起的离心效应作用于颗粒,从而影响颗粒的位置。曲率诱导的迪恩力将较小的单细胞聚焦于内壁,将较大的细胞团聚焦于通道中心。

(3) 光学分选。美国科学家亚瑟·阿什金首次发现了可以使用光镊移动粒子。由于细胞和其周围液体的折射率不同,激光束可以捕获细胞。折射率的差异导致光

学散射,从而将细胞推离光源;同时,辐射压力的梯度将细胞吸引到强度最高或聚焦最大的点。当梯度克服光散射时,细胞向最大值移动并被“光镊”捕获。微流光镊装置已被设计用于高精度单细胞分离^[8, 45],如图5(b)所示。

(4) 电泳。介电泳操控分离法(dielectrophoresis, DEP)的原理是利用在电场中,不同类型的细胞由于不同的介电性质,受到方向、大小不同的介电力,从而被驱动向不同的方向偏移,以达到分离细胞的目的,如图5(c)所示。DEP方法应用于细胞分离是基于细胞的物理性质的差异,而且不需要依赖表面的特异性标志物,无须进行表面标记。DEP的运动主要取决于细胞尺寸,但也还受到诸如膜形态、膜厚度、膜电导率和溶液电导率等参数的影响^[46]。

(5) 声学分选。声场操控分离法是在微流控芯片周围施加声场,使悬浮在其中的粒子受到声辐射力作用,声辐射力会驱使粒子迁移至压力波波腹或压力波节点的位置。采用声波技术,可依据粒子在尺寸、密度及可压缩性上的不同实现分离。在声学驻波技术里,较大的细胞受到更大的辐射力从而更快地响应声辐射力,导致较大的细胞从通道中间出口流出,更小的细胞从通道一侧出口流出,如图5(d)所示。

(6) 磁性分选。磁操纵是指通过使用永磁体或电磁铁来操纵细胞。细胞可能是自身富含铁离子,比如红细胞;或者是用免疫磁珠对细胞进行表面标记。鉴于这一要求,磁法是一种基于标记的方法。粒子磁性越大,偏转它们所需的磁场就越强。因此,根据携带的粒子大小和通道的磁场强度,这些多重群体可以被分类到不同的侧通道中。Shields等^[47]开发了一个由3个模块组成的磁性微流体平台,如图5(e)所示。该平台提供了癌细胞与血液的高通量分离。第1模块使用声驻波以非接触方式快速对准单元。然后,第2个模块将磁性标记细胞与未标记细胞分离,为细胞提供超过85%的纯度。最后,第3个模块包含一个微孔的空间周期性阵列,其下方有显微磁体,用于捕获单个细胞进行片上分析。

(7) 微孔。微孔是单细胞捕获的另一种被动微结构,如图5(f)所示。这种结构主要基于单细胞和微孔的尺寸匹配。当微孔的直径接近单个细胞的直径时,多余的细胞将被冲洗掉,一个沉降到一个微孔的单个细胞可以被捕获。将细胞悬浮液注入微流体通道后,细胞会沉淀下来并进入微孔。当微孔的深度足够深时,微孔内会产生涡流,单个细胞会被牢牢捕获。Lin等^[41]制造了一种双孔装置,通过利用小微孔捕获单细胞,然后利用重力将捕获的单细胞转移到用于单细胞培养的大微孔中,来实现大微孔中的单细胞装载^[43]。

表 2 所示为对不同微流体分析方法的特性总结。其中的数据来源于文中相关参考文献。

表 2 基于不同工作原理的微流体方法性能比较

Table 2 Performance comparison of microfluidic methods based on different working principles

方法	优点	缺点	吞吐量	效率/%
微液滴	高通量、芯片结构简单、很大灵活性	难培养贴壁细胞、难将生物物质导入液滴	250 μ L/h	75
惯性	高通量,高细胞存活率,芯片结构简单	只有在特定的流速和细胞浓度下才能正常工作	3 mL/min	84
微型阀	控制可靠快速,适合大规模集成	需要复杂繁琐的外部控制	96 细胞/芯片	90
微孔	操作简单,产量高	不灵活,难以控制特定的单细胞	10 000 细胞/芯片	90
介电泳	无触点,高选择性,无标记	需要低电导率缓冲液	3 264 对细胞/芯片	74.2
光镊	高精度、高效率	低产量、高成本		97
声学	无创、无标记、穿透性好	需要压电基板制作芯片	高	
磁学	可靠高效	需先对细胞表面标记	200 μ L/min	>85

3) 典型的微流体单细胞分析平台

目前,国内外基于微流体的大规模单细胞技术的测序平台主要有:Fluidigm 公司推出的 C1 单细胞自动制备系统、Wafergen 公司 ICELL8 Single-Cell System 单细胞分选平台、Illumina 公司和 Bio-Rad 实验室公司 Single-Cell Sequencing Solution、BD Rhapsody™ Single-Cell Analysis System 和 10X 公司的 Single Cell Gene Expression Solution 这 5 种。

2.3 激光显微切割

当研究关于细胞结构以及生理和疾病过程的异质组织切片时,固体组织的分析十分重要。在实体肿瘤研究中,将单个细胞的分子信息与它们在组织中的特定位置联系起来已经成为一个重要的研究领域。具体而言,获得原位细胞非常重要。

激光显微切割(laser microdissection, LMD)是生命科学用来从复杂异质的生物组织中获取纯净标靶的科学仪器^[48]。其基本原理是在显微镜观察下选择靶细胞,聚焦激光束沿着所规划的靶细胞周边轨迹切割一周进行分离,采用特定的收集捕获技术对分离后的靶细胞进行收集,用于下游 DNA、mRNA 及蛋白解析,单细胞测序等。该技术可对特定细胞群体或特定区域进行切割,获得高纯度的靶细胞群或同种类的单细胞。

激光作为细胞手术方法的第一次使用,起源于 20 世纪 20 年代早期,并在 20 世纪 60 年代早期作为显微手术工具被广泛使用。由于结合了激光单元和显微镜硬件的发展,组织制备技术在 20 世纪 80 年代也从手工制备改进为组织切片,这在生物化学和分子生物学研究中带来了许多优势^[49]。激光显微切割现已用于大量研究领域,如肿瘤学、分子病理学、干细胞、发育生物学、神经科学、植物学、心血管疾病、糖尿病、法医学、蛋白质组学、功能基因组学、活细胞和亚细胞结构(染色体)等^[50-65]。在

LMD 中,组织制备可以多样,可以是福尔马林固定和部分亲和包埋,或者在最佳切割温度介质中制成冷冻块。组织块可被切片到聚萘二甲酸乙二醇酯(polyethylenenaphthalate, PEN)膜包被的载玻片上,同时各种染色方法如苏木精伊红或伊红染色、荧光原位杂交或免疫组织化学可用于组织学观察。

1) 激光显微切割的工作原理

LMD 有两种不同的激光类型^[48]:红外和紫外。虽然激光类型不同,组织的捕获方法也不同,但它们有一点是相似的:通过显微镜观察寻找感兴趣的靶细胞,利用紫外(ultraviolet, UV)波段激光直接作用在组织样本上,聚焦激光光斑沿着目标靶细胞区域运动一周形成一条闭合曲线,组织样本及其包裹的薄膜材料强烈吸收紫外激光后,瞬间升温、熔化、气化,从而使得靶标细胞与周边组织分离。

2) 激光显微切割典型系统

目前,已有 4 种不同的系统在市场上销售,最初由美国 Arcturus 公司研制,现由美国 ThermoFisher 公司销售的 ArcturusXT 系统、德国 Leica 公司的 Leica AS LMD 系统、德国 Zeiss 公司的 PALM 系统、瑞士 MMI 公司的 Cellcut 等系列系统。所有系统都配置有优异的倒置或直立显微镜、配备镜头、物镜(高 NA 和 UV 兼容物镜)和光源,高质量的成像平台、可以精确地对组织和细胞进行成像(明场、相差、微分干涉)。4 种系统的主要区别在于切割后靶细胞的不同收集方式,它们的主要特性如表 3 所示。同时,在切割精度上,蔡司公司的产品在 63 倍物镜下,切割线的宽度为 0.6 μ m,莱卡和 ThermoFisher 的精度也基本相似。MMI 公司的切割线宽度在 100 倍物镜下为 0.3 μ m。切割时,激光光斑的直径小于 1 μ m,细胞直径一般在 10 μ m 左右。因此,这些系统都可以很好的实现单细胞甚至部分细胞器的分离。4 种产品的精度上的区

别很小,但不同产品对切割后靶细胞的收集方式均不相同,这也是不同仪器争夺知识产权的主要竞争之地。

表 3 典型激光显微切割系统特性表
Table 3 Characteristics of the typical laser microdissection system

特性	ArcturusXT	莱卡 LMD7000	蔡司 PALM	MMI Cellcut
物镜	倒置	直立	倒置	倒置
激光	810 nm 和 349 nm	349 nm	335 nm 或 355 nm	355 nm
紫外激光频率	10~5 000 Hz	10~5 000 Hz	1~100 Hz	50~60 Hz
脉冲长度	<4 ns	<4 ns	<2 ns	约 1 ps
最大脉冲能量	120 μJ	120 μJ	90 μJ	<1 μJ
标本收集方式	特殊收集帽	重力	光压弹射	粘性收集帽

在利用紫外激光进行切割之后,ArcturusXT 这款产品中的红外激光主要用于加热特殊热塑性薄膜,使其瞬间形变、膨胀、并产生粘附力。将待分离的靶标细胞放置在透明热塑性薄膜下方,薄膜吸收红外激光能量后熔化并与选择的底层细胞融合。当膜被移除时,靶细胞被粘附在薄膜上,与保留在载玻片上的其余组织细胞分离开来。最后,将靶细胞转移到含有大量下游分析所需缓冲液的微型离心管中。这种收集方式是 Arcturus 公司的专利。

蔡司 (Zeiss) 公司紫外激光显微切割仪器,型号为 PALM MicroBeam,的工作原理及组织收集方法如图 6 所示。将载玻片正面朝上放置在倒置显微镜的载物台上,载玻片上放置底部有 PEN 膜的细胞组织,用于固定收集管的机械臂将微型离心管的盖子放置在组织的上方。紫外脉冲激光通过物镜聚焦,控制载物台运动,实现靶细胞的切割。在切割之后,将激光移动到切割分离开来的靶细胞区域的中心,散焦,使得焦斑变大尽量覆盖更大比例的靶细胞区域,通过增加激光的功率,使用散斑激光脉冲的光压,将所需的靶细胞弹射,使其逆着重力被弹射到一个悬垂的帽子里。弹射器被设计成短弹射激光脉冲 (1 ns),不与其他细胞接触。将弹射出的样品转移到干燥的粘合剂盖或填充了提取缓冲液的盖子里,使得靶细胞与薄膜分离。激光脉冲弹射靶细胞收集方法是蔡司独家专利。

莱卡公司的 LMD6500 和 LMD7000 的激光显微切割系统则安装在立式显微镜上,放置在薄膜载玻片上的组织切片被倒置,这样在紫外线切割后,选定的细胞通过重

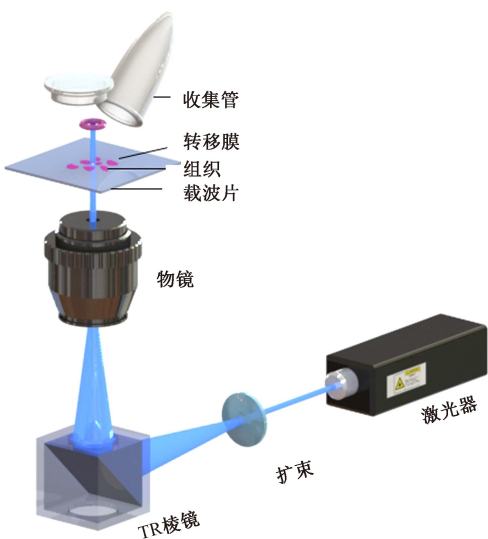


图 6 蔡司激光显微切割系统工作原理
Fig.6 Schematic diagram of Zeiss laser microdissection

力落入放置在载玻片下面的收集管中。有别于其他系统采用载物台的控制来实现激光轨迹的控制,徕卡公司使用高精度的光学组件来控制激光束移动,显微镜载物台和样品本身保持不动,这个方法以及重力收集法是莱卡公司的独家专利。

2.4 显微操作系统

用于手动细胞采集的显微操作系统通常由倒置显微镜和可在电动机械平台上移动的量微量移液器组成。微量移液管由超薄玻璃毛细管制成,依次连接到抽吸和释放单元。细胞样品通常以悬浮液的形式被放入培养皿或指定尺寸的孔板中。通过显微镜观察,操作者选择特定的细胞,将微量移液管移近,并通过对微量移液管施加吸力来抽吸细胞,吸出的包含细胞的液体可以转移到合适的收集管,用于下游分析或培养。这个过程通常是手动执行^[21]。典型系统如莱卡公司的 Leica Micromanipulator,其系统结构如图 7 所示。手动细胞拾取/显微操作器能够从悬浮液中分离选定的活细胞,甚至能够分离原核细胞。应用领域从细菌分析到生殖生殖医学和法医学等。

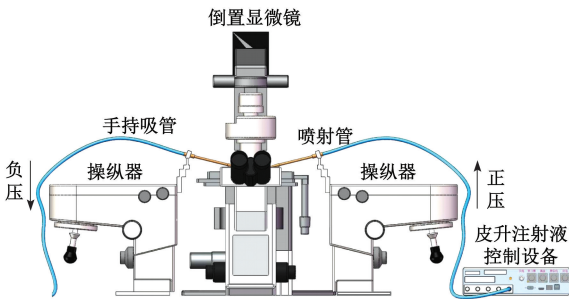


图 7 手动显微操作系统
Fig.7 Schematic diagram micromanipulation

3 前期在单细胞分离方法和仪器上的研究

本课题组前期致力于细胞激光显微切割仪器开发,所开发仪器已具有一定的应用价值。

现有的激光显微切割仪器在收集方式上,依然存在一定的不足。利用红外激光熔化热塑性薄膜的方式,具有污染组织的潜在风险;基于重力的方式,对于重量很轻的单细胞组织有潜在的影响收集效率的风险、也不适宜生物实验室的组织培养;基于光压弹射的方式,用于弹射的散焦激光束有烧伤组织中心的潜在风险,同时较难收集宽度大于 100 μm 的组织。易定容与厦门麦克奥迪实业集团^[66-68]在国际上首先提出了基于静电捕获靶细胞的激光显微切割方法(electrostatic capture microdissection, ECM),并获得国际、国内发明专利保护,ECM 工作原理和流程如图 8 所示。使用带有净余电子的薄膜作为组织细胞的支撑保护铺垫放置在组织与载玻片之间。紫外激光束绕靶标运动一周实现切割,带有负电荷的被分离的细胞受到静电力作用逆着重力飞向收集器并黏附在其中,实现靶标与周围组织的分离。然后,将收集到纯净靶细胞的收集管盖置于装有缓冲液体的 PCR 管上,上下振荡使得收集到的靶细胞从收集管盖掉进收集管缓冲液中,并通过离心力使得靶细胞与薄膜分离,用于下游细胞基因蛋白分析。

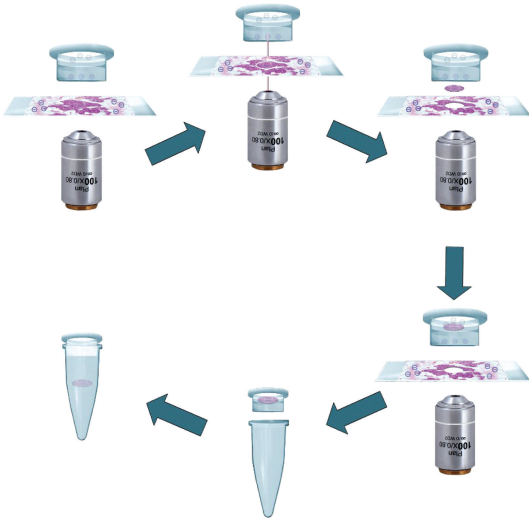


图 8 静电捕获激光显微切割方法原理
Fig.8 Principles of electrostatic capture microdissection

所开发的基于静电吸附收集方法的 ECM 如图 9 所示。系统主要由倒置显微镜、UV 激光及光路整形系统、高精度 XY 载物台控制器、摄像机和计算机控制软件等组成。所使用的固体紫外激光器是美国 Newport 公司 Spectra-Physics 品牌的固体激光器,型号 Explorer 349-60-E,

具有最大的脉冲能量为 60 μJ ,重复频率在 10~5 000 Hz,中心波长为 349 nm。照明光源采用卤素光源。该系统可以捕获各种各样无污染的同质样本,从直径几微米的小样本到表面积接近 400 μm 的大样本。

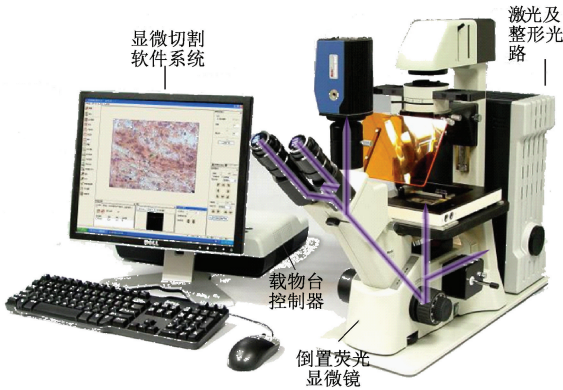


图 9 笔者前期开发的激光显微切割仪器
Fig.9 Laser microdissection instrument developed by the authors in the early research stage

课题组利用所开发的 ECM 仪器对细胞组织进行了细胞切割实验,样品和消耗品的制备可参阅文献[69-70],仪器的切割实例如图 10 所示,图 10(a)~(c)所示分别为切割前选择 5 个感兴趣的区域,切割后的样品,所收集细胞组织的放大图。利用静电力来捕获细胞组织具有无接触、无污染的优点。

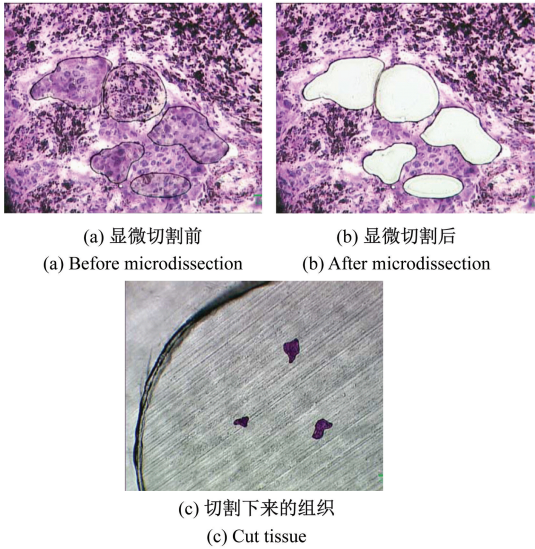


图 10 ECM 仪器细胞组织切割实例

Fig.10 Examples of ECM instrument cell tissue cutting

课题组曾与厦门大学生命科学院合作试用该仪器,对 HE 染色大肠癌冷冻组织进行切割,然后对分离出来的细胞进行 DNA 实验,结果证明,收集到的靶标 DNA 满足下游实验研究要求。汕头大学医学院分子病理学实验

室也曾试用了该仪器进行 RNA 实验,样品为 SD 大鼠肝脏冷冻切片,实时聚合酶链反应的电泳分析实验结果如图 11 所示。泳道 1 是 DNA 大小标记;泳道 2 为负控制(水控制);泳道 3 是由 ECM 技术收集的样品;泳道 4 是一个积极的控制。第 3 泳道上的条带显示,使用 ECM 技术收集的大鼠肝组织中含有 β -肌动蛋白和白蛋白的 mRNA。该实验结果表明,ECM 技术对采集的组织中的 mRNA 和在后续反应中可成功地用于合成的 cDNA,存在很少或没有明显的损伤。

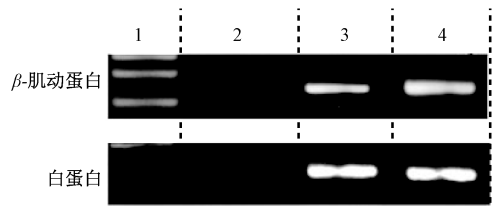


图 11 ECM 所收集细胞的 RT-PCR 电泳分析结果
Fig.11 Results of RT-PCR electrophoresis analysis of cells collected by ECM

4 讨 论

所述的单细胞分离方法各具特色,下面对其不同的特点进行讨论。

1) 荧光激活细胞分选 FACS。其主要优点是高通量和强大分选能力,可以对多种样本进行分析检测,也可以快速对单个细胞多个参数进行检测。其缺点是,它们需要将组织样本离散化成为悬液态浆体,需要破坏细胞自然生长的空间环境,导致空间信息丢失。另外,仪器成本高,对某些细胞有潜在危害。想比较而言,FACS 更侧重于对样品的统计学分析,而不是对单个细胞的挑选与提纯。

2) 微流体技术。其主要特点和优势是将细胞培养、实验处理及成像、检测等步骤高度集成于一个芯片上,可以实现样品进、数据出的全过程自动化检测。此外,可以在数以亿计的背景细胞中挑选出为数仅仅几十个甚至几个的稀有异质细胞,所需要的样本少,灵敏度高,最便于小型化低成本化。然而微流体技术的目前还有几个待研究的问题。(1) 如何提升不同种类靶标细胞特异捕获。如利用抗体,多肽,或核酸适体与靶标细胞高特异性的亲和作用来实现的靶细胞捕获方法。如何从靶标修饰物(抗体,多肽,或核酸适体)无损捕获靶标细胞,是微流体技术的一个待解决的关键难题。(2) 微流体技术和 FACS 一样,需要将样品制作为悬浮液,里面的细胞空间位置信息将丢失。(3) 微流体的很多方法是为特定应用而设计,各个系统的灵活性、

通用性较低。

3) 激光显微切割方法。激光显微切割的样品可以是组织、培养皿中细胞样品或者涂血样品,不需要将样本制作为单细胞悬浮液,可以较好的保留样品的空间信息。同时,激光显微切割方法是唯一一种可以从固体组织原位分离单细胞,甚至分离细胞器的方法。目前还存在几个待解决的问题。(1) 切割过程和收集过程如何减少对细胞组织的损伤和可能存在的潜在污染;(2) 如果提高收集效率;(3) 如果降低操作者的技能要求。

4) 手动显微操作。具有易于控制单个细胞分离的优点,但也存在吞吐量低、容易损害细胞、需要较高技能水平的不足。

表 4 所示为 4 种单细胞分离方法的显著优点及不足。

表 4 单细胞分离方法的优点及不足
Table 4 The advantages and drawbacks of the single cell isolation method

方法	优点	不足
荧光激活细胞分选	高通量、速度快、效率高、纯度高、能够多次检测,多参数实时检测。	需要大量悬浮细胞;可能在细胞损失;仪器体积庞大、成本高;不适合连续监测。
微流体技术	小型化、低成本;可模拟细胞生存的微环境;部分方法可实现无标记细胞分离。	液滴中细胞数量遵循不均匀泊松分布;悬浮液高度稀释;需要一定的高特异性标记方法,通用性较低。
激光显微切割	可以快速获取原位细胞;无需将组织解离;无需标记;分离精确高。	切割过程可能损害细胞、收集效率较低、可能存在污染物。
显微操作	易于控制单个细胞分离	低吞吐量、容易损害细胞、需要较高技能水平。

5 结 论

经过近 20 年快速发展,单细胞分离方法在生命科学及临床病理学研究中的潜能,已经得到很多研究的证实。本文从工作原理和仪器特点的角度出发,重点梳理了四种常用单细胞分离技术,并展示了作者在该领域的前期研究成果。可以得出结论,暂时没有适用于所有单细胞分离求的通用技术。然而,绝大多数应用需求可以通过现有的其中一种技术来解决。随着科技的进步,单细胞分离技术具有以下发展趋势。

1) 保证细胞的完整性

单细胞基因组和基因表达分析,转录组分析最大障碍是是否有足够量的脱氧核糖核酸或核糖核酸。此外,

蛋白质组学分析比核酸分析更具挑战性。这是由于细胞内的蛋白丰度一般都比较低,同时无法直接扩增。现有分离技术,往往需要细胞对外围因素做出反应,如机械力、辐射、环境中的化学变化等,这可能导致细胞分化、生存能力降低甚至凋亡。因此在活细胞上操作时,技术应足够“温和”的提取和处理,以减少脱氧核糖核酸和核糖核酸、以及蛋白质的损失。建议在吞吐量和无损分离等参数上进行优化问题的研究,获取多目标参数下的最佳控制参数。

2) 满足单细胞分析和测序技术的某些需求

目前,单细胞分析对活体单细胞的需求日益激增,如果能够将单细胞分离设备与单细胞分析设备较好的集成,或者将分离样品快速的输送到单细胞分析仪器,将有望提高单细胞分析的科学性。此外,来自单细胞的 DNA 和 RNA 原位、实时的测序和分析将是一个新的需求。微流体技术和激光显微切割等技术的进一步发展,将有望实现快速原位的细胞分离。

3) 细胞器的分离

细胞内精细结构如细胞核、线粒体、内质网、高尔基体、溶酶体等细胞器以及细胞凸起也逐渐成为生物医学的实验对象。随着科技的进步,细胞器分离的需求已经开始显现,通过监测同一细胞中核仁的分子组成,研究者发现 RNA 和蛋白质的浓度随时间不断变化。该研究表明细胞器的分子含量可以在细胞生长过程中快速变化,该发现揭示了同一细胞中不同细胞器的分子组成之间的复杂关系。通过对亚细胞基因表达谱的研究发现,细胞突起中亚细胞基因表达的研究有助于进一步表征癌症相关的潜在分子机制。以上发现为细胞器异质性提供了有力的证明,然而以细胞器为中心的高特异性分离技术目前还是单细胞分离仪器的瓶颈。最近已开始显现结合激光显微切割方法与微流控技术实现细胞凸起分离,用以研究癌细胞侵袭机制。

在不久的将来,相信单细胞分离甚至单细胞器分离仪器将成为解决生物医学研究和临床诊疗中长期困扰的精准取材问题的有力工具。

参考文献

- [1] REICHLING D B, GREEN P G, LEVINE J D. The fundamental unit of pain is the cell [J]. *Pain*, 2013, 154(1):S2-S9.
- [2] DURANTE M A, RODRIGUEZ D A, KURTENBACH S, et al. Single-cell analysis reveals new evolutionary complexity in uveal melanoma [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1):1-10.
- [3] GAY L, BAKER A-M, GRAHAM T A. Tumour cell heterogeneity [J]. *F1000Research*, 2016, 5(1):1-14.
- [4] ALEXANDER B. Stem cells heterogeneity [M]. *Stem Cells Heterogeneity-Novel Concepts*, Berlin: Springer, 2019.
- [5] 陈子熙, 陈磊, 张卫文. 单细胞尺度下的微生物学研究: 意义与方法 [J]. *微生物学报*, 2017, 57(6): 920-931.
- CHEN Z X, CHEN L, ZHANG W W. Microbiology at single-cell scale: Significance and approaches [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2017, 57(6):920-931.
- [6] DOMINGUEZ-GUTIERREZ G, XIN Y, GROMADA J. Heterogeneity of human pancreatic β -cells [J]. *Molecular Metabolism*, 2019, 27(1):S7-S14.
- [7] KADOURI N, NEVO S, GOLDFARB Y, et al. Thymic epithelial cell heterogeneity: TEC by TEC [J]. *Nature Reviews Immunology*, 2020, 20(4):239-253.
- [8] KELOTH A, ANDERSON O, RISBRIDGER D, et al. Single cell isolation using optical tweezers [J]. *Micromachines*, 2018, 9(9):434.
- [9] L'HARIDON S, MARKX G H, INGHAM C J, et al. New approaches for bringing the Uncultured into Culture [M]. *The Marine Microbiome*, Berlin: Springer, 2016.
- [10] MOHAN R, SANPITAKSEREE C, DESAI A V, et al. A microfluidic approach to study the effect of bacterial interactions on antimicrobial susceptibility in polymicrobial cultures [J]. *RSC Advances*, 2015, 5(44): 35211-35223.
- [11] GIERAHN T M, WADSWORTH M H, HUGHES T K, et al. Seq-Well: portable, low-cost RNA sequencing of single cells at high throughput [J]. *Nature Methods*, 2017, 14(4):395-398.
- [12] BILLMAN M R, RUEDA D, BANGHAM C R. Single-cell heterogeneity and cell-cycle-related viral gene bursts in the human leukaemia virus HTLV-1 [J]. *Wellcome open research*, 2017, 2(87):1-28.
- [13] ZHENG H, POMYEN Y, HERNANDEZ M O, et al. Single-cell analysis reveals cancer stem cell heterogeneity in hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology*, 2018, 68(1):127-140.
- [14] GONZÁLEZ-SILVA L, QUEVEDO L, VARELA I. Tumor functional heterogeneity unraveled by scRNA-seq technologies [J]. *Trends in Cancer*, 2020, 6(1):13-19.
- [15] HEATH J R, RIBAS A, MISCHER P S. Single-cell analysis tools for drug discovery and development [J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2016, 15(3):204-216.
- [16] KRIEG C, NOWICKA M, GUGLIETTA S, et al. High-dimensional single-cell analysis predicts response to anti-PD-1 immunotherapy [J]. *Nature Medicine*, 2018, 24(2):144.

- [17] UZOZIE A C, AEBERSOLD R. Advancing translational research and precision medicine with targeted proteomics [J]. *Journal of proteomics*, 2018, 189(1):1-10.
- [18] CHENG L, LOPEZ-BELTRAN A, MASSARI F, et al. Molecular testing for BRAF mutations to inform melanoma treatment decisions: A move toward precision medicine [J]. *Modern Pathology*, 2018, 31(1):24-38.
- [19] HU P, ZHANG W, XIN H, et al. Single cell isolation and analysis [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2016, 4(1):116.
- [20] ZEB Q, WANG C, SHAFIQ S, et al. Chapter 6-An overview of single-cell isolation techniques [M]. *Single-Cell Omics*, New York: Academic Press, 2019.
- [21] ANDRE G, JONAS S, STEFAN Z, et al. Technologies for single-cell isolation [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16(8):16897-16919.
- [22] SVENSSON V, VENTO-TORMO R, TEICHMANN S A. Exponential scaling of single-cell RNA-seq in the past decade [J]. *Nature protocols*, 2018, 13(4):599-604.
- [23] 张惠敏, 吴玲玲, 林冰倩, 等. 基于微流控技术的循环肿瘤细胞分析研究进展 [J]. *中国科学: 化学*, 2019, 49(9):1220-1236.
- ZHANG H M, WU L L, LIN B Q, et al. Recent progress on microfluidic technology-based circulating tumor cell analysis [J]. *Scientia Sinica Chimica*, 2019, 49(9):1220-1236.
- [24] FULWYLER M J. Electronic separation of biological cells by volume [J]. *Science*, 1965, 150(3698):910-911.
- [25] 郝希应. 流式细胞仪鞘流及光学系统的设计与研究 [D]. 南昌: 江西科技师范大学, 2015.
- HAO X Y. The design and study of sheath flow system and optical system for flow cytometry [D]. Nanchang: Jiangxi Science and Technology Normal University, 2015.
- [26] 于虎. 流式细胞仪液流系统设计与实现 [D]. 北京: 北京信息科技大学, 2015.
- YU H. Design and implementation of flow system for flow cytometer [D]. Beijing: Beijing Information Science and Technology University, 2015.
- [27] 柯葵, 朱立明. 流体力学与流体机械 [M]. 上海: 同济大学出版社, 2009.
- KE K, ZHU L M. Fluid mechanics and fluid machinery [M]. Shanghai: Tongji University Press, 2009.
- [28] 孟晓辰, 祝连庆, 刘超, 等. 基于 ZEMAX 的流式细胞仪光束整形系统研究 [J]. *仪器仪表学报*, 2015, 36(7):1666-1672.
- MENG X CH, ZHU L Q, LIU CH, et al. Study on flow cytometry's beam shaping system based on ZEMAX [J]. *Chinese Journal of Scientific Instrument*, 2015, 36(7):1666-1672.
- [29] 齐春晨, 娄小平, 刘超, 等. 流式细胞仪单极性脉冲基线恢复方法研究 [J]. *仪器仪表学报*, 2018, 39(2):116-121.
- QI CH CH, LOU X P, LIU CH, et al. Study on unipolar pulse baseline restoration method for flow cytometer [J]. *Chinese Journal of Scientific Instrument*, 2018, 39(2):116-121.
- [30] WYATT S I C, REYES C D, LÓPEZ G P. Microfluidic cell sorting: A review of the advances in the separation of cells from debulking to rare cell isolation [J]. *Lab on a Chip*, 2015, 15(5):1230-1249.
- [31] ZHU P, WANG L. Passive and active droplet generation with microfluidics: A review [J]. *Lab on a Chip*, 2017, 17(1):34-75.
- [32] LUO T, FAN L, ZHU R, et al. Microfluidic single-cell manipulation and analysis: Methods and applications [J]. *Micromachines*, 2019, 10(2):104.
- [33] 杜林, 周嘉. 基于微流控原理的液体粘度测量方法研究 [J]. *仪器仪表学报*, 2018, 39(5):188-194.
- DU L, ZHOU J. Research on liquid viscosity measurement method based on microfluidics technology [J]. *Chinese Journal of Scientific Instrument*, 2018, 39(5):188-194.
- [34] COLLINS D J, NEILD A, DEMELLO A, et al. The Poisson distribution and beyond: Methods for microfluidic droplet production and single cell encapsulation [J]. *Lab on a Chip*, 2015, 15(17):3439-3459.
- [35] ZHANG Q, WANG T, ZHOU Q, et al. Development of a facile droplet-based single-cell isolation platform for cultivation and genomic analysis in microorganisms [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1):1-12.
- [36] WU C, CHEN R, LIU Y, et al. A planar dielectrophoresis-based chip for high-throughput cell pairing [J]. *Lab on a Chip*, 2017, 17(23):4008-4014.
- [37] LUO T, FAN L, ZENG Y, et al. A simplified sheathless cell separation approach using combined gravitational-sedimentation-based prefocusing and dielectrophoretic separation [J]. *Lab on a Chip*, 2018, 18(11):1521-1532.
- [38] HUANG L, ZHAO P, WANG W. 3D cell electrorotation and imaging for measuring multiple cellular biophysical properties [J]. *Lab on a Chip*, 2018, 18(16):2359-2368.
- [39] ZHU B, CAI Y, HUANG H, et al. Red blood cell stretching manipulation using the microfluidics chip integrated with liquid metal electrode [C]. 2019 IEEE/

- ASME International Conference on Advanced Intelligent Mechatronics, 2019: 1652-1657.
- [40] LIU F, NI L, ZHE J. Lab-on-a-chip electrical multiplexing techniques for cellular and molecular biomarker detection [J]. *Biomicrofluidics*, 2018, 12(2):021501.
- [41] LIN M, LIU Q, LIU C, et al. Label-free light-sheet microfluidic cytometry for the automatic identification of senescent cells[J]. *Biomedical Optics Express*, 2018, 9(4):1692-1703.
- [42] COLLINS D J, MORAHAN B, GARCIA-BUSTOS J, et al. Two-dimensional single-cell patterning with one cell per well driven by surface acoustic waves[J]. *Nat Commun*, 2015, 6(1):183-190.
- [43] JAISWAL D, RAD A T, NIEH M-P, et al. Micromagnetic cancer cell immobilization and release for real-time single cell analysis[J]. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2017, 427(4):7-13.
- [44] NATHAMGARI S S P, DONG B, ZHOU F, et al. Isolating single cells in a neurosphere assay using inertial microfluidics [J]. *Lab on a Chip*, 2015, 15(24):4591-4597.
- [45] PAIÈ P, ZANDRINI T, VÁZQUEZ R M, et al. Particle manipulation by optical forces in microfluidic devices [J]. *Micromachines*, 2018, 9(5):200.
- [46] MENACHERY A, KUMAWAT N, QASAMEH M. Label-free microfluidic stem cell isolation technologies [J]. *Trends in Analytical Chemistry*, 2017, 89(1):1-12.
- [47] SHIELDS IV C W, WANG J L, OHIRI K A, et al. Magnetic separation of acoustically focused cancer cells from blood for magnetographic templating and analysis [J]. *Lab on a Chip*, 2016, 16(19):3833-3844.
- [48] BEVILACQUA C, DUCOS B. Laser microdissection: A powerful tool for genomics at cell level [J]. *Molecular Aspects of Medicine*, 2018, 59(1):5-27.
- [49] CHUNG S H, SHEN W. Laser capture microdissection: from its principle to applications in research on neurodegeneration [J]. *Neural regeneration research*, 2015, 10(6):897-898.
- [50] LIANG Y, ZHU Y, DOU M, et al. Spatially resolved proteome profiling of < 200 cells from tomato fruit pericarp by integrating laser-capture microdissection with nanodroplet sample preparation [J]. *Analytical Chemistry*, 2018, 90(18):11106-11114.
- [51] BALESTRINI R, FOCHI V, LOPA A, et al. The use of laser microdissection to investigate cell-specific gene expression in orchid tissues [M]. *Orchid Propagation: From Laboratories to Greenhouses—Methods and Protocols*, Berlin: Springer, 2018.
- [52] SANTI S. Laser microdissection of phytoplasma-infected grapevine leaf phloem tissue for gene expression study [M]. *Phytoplasmas*, Berlin: Springer. 2019.
- [53] SONNTAG K-C, WOO T-U W. Laser microdissection and gene expression profiling in the human postmortem brain[J]. *Handbook of Clinical Neurology*, 2018, 150:263-272.
- [54] MAUNEY S A, WOO T U W, SONNTAG K C. Cell type-specific laser capture microdissection for gene expression profiling in the human brain [M]. *Laser Capture Microdissection*, Berlin:Springer. 2018.
- [55] ANDRE E, DAVIAUD N, SINDJI L, et al. A novel ex vivo Huntington's disease model for studying GABAergic neurons and cell grafts by laser microdissection [J]. 2018, 13(3):e0193409.
- [56] ISHIMARU T, PARWEEN S, SAITO Y, et al. Laser microdissection-based tissue-specific transcriptome analysis reveals a novel regulatory network of genes involved in heat-induced grain chalk in rice endosperm [J]. *Plant and Cell Physiology*, 2019, 60(3):626-642.
- [57] GARCÍA-BERROCOSO T, LLOMBART V, COLÀS-CAMPÀS L, et al. Single cell immuno-laser microdissection coupled to label-free proteomics to reveal the proteotypes of human brain cells after ischemia [J]. 2018, 17(1):175-189.
- [58] ZHANG S, THAKARE D, YADEGARI R. Laser-capture microdissection of maize kernel compartments for rna-seq-based expression analysis [M]. *Maize*, Berlin: Springer, 2018.
- [59] IACOMINO G, AUFIERO V R, MARENA P, et al. Laser capture microdissection as a tool to study the mucosal immune response in celiac disease[M]. *Laser Capture Microdissection*, Berlin: Springer,2018.
- [60] HAN T S, OSHIMA M. Laser microdissection of cellular compartments for expression analyses in cancer models [M]. *Inflammation and Cancer*, Berlin: Springer, 2018.
- [61] KÜPPERS R, SCHNEIDER M, HANSMANN M L. Laser-based microdissection of single cells from tissue sections and PCR analysis of rearranged immunoglobulin genes from isolated normal and malignant human B cells [M]. *Lymphoma*, Berlin: Springer, 2019.
- [62] LOGANATHAN J, PANDEY R, AMBHORE N S, et al. Laser-capture microdissection of murine lung for differential cellular RNA analysis [J]. *Cell*, 2019, 376(3):425-432.

- [63] FOLEY J W, ZHU C, JOLIVET P, et al. Gene-expression profiling of single cells from archival tissue with laser-capture microdissection and Smart-3SEQ [J]. Genome research, 2019, 29(11):1816-1825.
- [64] CHASSAING B, GEWIRTZ A T J C. Identification of inner mucus-associated bacteria by laser capture microdissection [J]. Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology, 2019, 7(1):157-160.
- [65] DAYTON J R, FRANKE M C, YUAN Y, et al. Straightforward method for singularized and region-specific CNS microvessels isolation [J]. Journal of Neuroscience Methods, 2019, 318(1):17-33.
- [66] 易定容. 一种激光显微切割后收集细胞的收集装置、方法及系统: CN201210052939.3 [P]. 2014-4-16.
YI D R. Collection device, method and system for collecting cells after laser microdissection; CN201210052939.3 [P]. 2014-4-16.
- [67] RICHARD Y. Method and system for collecting cells following laser micro-dissection; US8664002 [P]. 2008-1-15.
- [68] 易定容. 细胞组织样品的充电装置、收集装置及收集方法: CN201210072984.5 [P]. 2014-4-13.
YI D R. Charging device, collecting device and collecting method for cell tissue sample; CN2012100-72984.5 [P]. 2014-4-13.
- [69] YI D R, KONG L H, KANKALA R K, et al. Electrostatic capture following laser microdissection for the preparation of homogeneous biological specimens [J]. Microsc Microanal, 2016, 22(6):1329-1337.
- [70] YI D R. The collection efficiency of a low cost laser micro-dissection system for pure biological sample prepar-

ation [J]. Journal of Investigative Medicine, 2014, 62(1):166.

作者简介



黄彩虹, 2001 年和 2005 年于福州大学分别获得学士学位和硕士学位, 现为华侨大学信息科学与工程学院讲师, 华侨大学机电及自动化学院博士研究生, 主要研究方向为智能仪器开发。

E-mail: nchou@hqu.edu.cn

Huang Caihong received her B. Sc. degree and M. Sc. degree both from Fuzhou University in 2001 and 2005, respectively. She is currently a lecturer and a Ph. D. candidate at Huaqiao University. Her main research interests include the development of intelligent instruments.



易定容 (通信作者), 1990 年于国防科技大学获得学士学位, 2002 年于加拿大麦吉尔大学获得博士学位。现为华侨大学教授, 主要研究方向为宏观 3D 视觉、微观 3D 形貌、多光谱病理检测方法及仪器化研究、先进光学仪器研究。

E-mail: yidr@hqu.edu.cn

Yi Dingrong (Corresponding author) received her B. Sc. degree from National University in 1990, and received her Ph. D. degree from McGill University, Canada, in 2002. She is currently a professor at Huaqiao University. Her main research interests include 3D vision, microscopic 3D shape reconstruction, multispectral disease detection, advanced optical instrument.