单细胞光学操纵方法研究进展

常婉晴, 郭云霞, 崔玉军, 叶凯强, 葛芹玉, 赵祥伟*

东南大学生物科学与医学工程学院, 生物电子学国家重点实验室, 南京 210096

* 联系人, E-mail: xwzhao@seu.edu.cn

收稿日期: 2020-03-09; 接受日期: 2020-04-28; 网络版发表日期: 2020-06-05

国家自然科学基金重大科研仪器研制项目(批准号: 81827901)、国家自然科学基金外青专项(批准号: 61850410528)和中央高校基本科研业务费专项资金资助

摘要 随着单细胞测序技术的发展, 人们对细胞异质性的关注越来越密切. 单细胞操纵是研究细胞异质性的前提. 基于光与物质的相互作用可以实现细胞的光学操纵, 本文主要综述了激光显微切割、光镊、激光诱导前向转移和光流体等光学操纵方法的原理与应用. 光学操纵无需接触, 对细胞污染小、损伤小, 而且易于和其他技术集成, 对单细胞操纵和分析具有重要意义.

关键词 单细胞, 激光显微切割, 光镊, 激光诱导前向转移, 光流体

细胞是构成生命体的基本单位. 对细胞的深入理解是揭示生命奥秘、治疗疾病和改造生命的关键. 由于细胞分化、所处环境、年龄、药物响应不同等因素, 即使具有相同基因组的细胞其基因的表达谱、转录谱、蛋白表达及修饰谱、代谢产物谱等均不一样, 同时这些特征还随时间的改变而变化, 这导致细胞具有很高的异质性^[1-4]. 传统的细胞分析是利用细胞群体的平均信息来代替单个细胞的分析结果, 但大量的研究显示, 传统分析得到的平均化结果掩盖了细胞之间的异质性, 并不能准确反应单个细胞的状态. 例如, 肿瘤细胞群中的细胞分析显示了少数基因异常(包括突变、等位基因不平衡和倍性等)存在于整个肿瘤中, 包括表面标记、基因、生长、凋亡情况等. 阐明单细胞水平的瘤内异质性, 可以更好地了解肿瘤的组成, 监测疾病进展和治疗过程中细胞群的变化, 改善癌症

诊断和治疗设计^[5-10]. 单细胞水平上对细胞异质性的深入理解以及对细胞行为特性的准确判断分析将为发育与分化、药物开发和疾病诊疗等研究提供新的视角^[11]. 因此, 近年来单细胞分析受到越来越广泛的关注, 单细胞测序也被列为*Science*杂志2013年六大重点科学研究之首^[12].

单细胞的获取是单细胞分析的基本技术^[13], 不同的生物医学应用需要选择最适合的单细胞获取和分析方法^[14]. 然而, 目前单细胞的分离和操纵仍然是一项具有挑战性的任务, 其主要原因在于两个方面: 首先, 单个细胞的尺寸一般在微米量级, 人眼不能直接观察也就难以直接宏观操作, 而且单细胞包含细胞器等微量而又复杂精密的成分, 对操控精度和灵敏度要求极高^[15]; 另一方面, 单细胞分析往往需要对成千上万个细胞并行分析以获得细胞图谱, 如何降低高通量分析

引用格式: 常婉晴, 郭云霞, 崔玉军, 等. 单细胞光学操纵方法研究进展. 中国科学: 生命科学, 2020, 50: 1-14

Chang W Q, Guo Y X, Cui Y J, et al. Research progress of single-cell optical manipulation techniques (in Chinese). *Sci Sin Vitae*, 2020, 50: 1-14, doi: 10.1360/SSV-2020-0079

成本、提高并行处理能力和分析效率也是一个难点问题. 因此, 单细胞分离获取技术成为近年来的研究和应用热点, 是单细胞分析不可或缺的手段.

目前, 已有多种单细胞机械或流体力学操纵方法, 例如毛细管分离法^[16]、显微操作法^[17]、极限稀释法^[18]和流式细胞仪^[19]. 其中, 毛细管分离法适用于较大的细胞, 可在低倍显微镜下使用毛细管提取单个细胞或个体, 但这种方法效率低并且存在较小微生物的污染问题. 显微操作法是在显微镜下利用显微操作仪控制毛细管或者微针进行单个细胞的操纵, 该方法依赖于操作者的熟练程度, 准确率较低. 极限稀释法通过不断稀释细胞溶液使一定体积溶液中只含单个细胞, 该方法操作过程较为繁琐并且准确率较低. 流式细胞仪则通过流体聚焦使细胞悬液形成一连串的液滴, 将待分离的单个细胞分散在液滴中, 然后对液滴进行瞬时充电, 形成带有正、负电荷以及未充电的液滴; 紧接着液滴流经带高压静电场的偏转板, 正负液滴沿不同的方向偏转落入各自的收集容器中, 未充电的液滴落入废液收集器中, 以此完成单细胞的分选. 流式细胞仪具有很高的通量和分选效率, 每秒种可以分选几万个细胞, 适用于批量样本, 是目前细胞分选分析的主要设备之一. 但流式细胞仪适用于悬浮细胞分选, 目前尚不能用于组织或者贴壁细胞的单细胞水平直接分选分析.

随着单细胞操纵要求的不断提高和应用范围的不断拓展, 光学操纵方法由于非接触、无污染、功耗低、细胞损伤小、效率高等优点迅速发展起来. 本文主要介绍了激光显微切割、光镊、激光诱导前向转移、光流体等新型单细胞光学操纵方法的研究进展, 以期对单细胞分析、细胞生物学、分子病理、空间组学等应用提供参考.

1 激光显微切割

激光捕获显微切割(laser capture microdissection, LCM)利用激光束在显微镜下对样品进行切割, 然后捕获切割下来的细胞, 通常用于组织切片中单细胞的分离. 该方法于1996年由美国国立卫生研究院(National Institutes of Health, NIH) Liotta课题组^[20]首次提出. LCM仪器主要由激光器、显微镜、载物台以及控制系统等部分组成. 其基本工作流程是: 首先通过显微镜

对目标细胞进行选择定位, 然后标出所需分离的靶细胞, 利用激光沿着所标轨迹进行切割, 并完成细胞的收集^[21]. LCM仪器的激光定位准确度一般可以达到1 μm , 采样分辨率通常为3~5 μm , 足以捕获单细胞, 而且可通过调整激光束的能量以及激光的移动速率选择合适的参数, 进而达到想要的分离效果. LCM的发展十分迅速, 根据所用激光可以为两种, 一种是直接利用能量较高的紫外激光切割感兴趣的区域边缘, 然后通过接触、重力作用或者激光压力弹射(laser pressure catapulting, LPC)进行样本收集^[15]. 其中, 接触式收集是使用黏性管盖将切割后的细胞黏附在收集盖上, 然后进行转移, 如Molecular Machines & Industries (MMI)公司的产品; 重力作用收集需要反向安装衬底使样品向下, 在目标区域被切割后, 目标细胞在重力作用下会自动落入下方的收集器中, 如徕卡公司的产品; LPC是利用离焦激光在目标细胞下方通过激光脉冲将切割细胞弹射至上方的收集管中完成细胞的收集, 如蔡司公司的产品. 另一种是通过低能红外激光脉冲选择性融化热塑性薄膜间接粘捕捕获细胞样品, 如Arcturus公司的产品. 它将掺杂染料的乙烯乙酸乙烯酯(ethylene vinyl acetate, EVA)热塑性薄膜粘贴到一个透明塑料盖子上并放到样品上方. 这个盖子具有聚焦作用, 能够将激光聚焦到样品表面, 同时EVA膜中的染料吸收激光能量, 使EVA膜瞬间熔化并渗透到组织切片内, 然后在几毫秒时间内迅速凝固. 由于细胞与EVA膜的粘合力远大于其与载玻片的粘合力, 因此可以将细胞选择性地从组织中剥离出来^[22]. 该方法不需要用激光切割组织样品, 因此不存在激光切割过程中的样品损伤问题.

LCM的突出优点在于其快速、简单、精确、无污染、对样品影响小, 而且样品适用范围广, 能有效地分离冷冻、石蜡包埋、福尔马林或甲醛固定、染色或不染色的组织切片以及细胞涂片等. 因此, LCM自从问世以来, 在病理学、空间组学等领域得到了广泛应用. Zimmerman等人^[23]提出了一种结合激光显微切割和液相色谱-质谱联用仪(liquid chromatography mass spectrometry, LC/MS)定量病理组织区域的方法(图1A), 并利用该方法对组织内的药物水平进行了绝对定量. 该技术可对干酪肉芽肿、周围细胞病变和未受累肺组织内的药物进行绝对定量, 从而准确判断是否达到杀菌浓度, 进而有助于制定更精准的治疗方案.

除了结核病的研究, 该技术在疾病组织中药物的空间分辨定量方面有许多潜在的应用. 南方科技大学的田瑞军课题组^[24]研究的基于LCM的空间分辨细胞类型的蛋白质组分析, 将LCM与他们自主研发的基于Spintip的简单集成样品前处理技术(simple and integrated spintip-based proteomics technology, SISPROT)结合, 建立了快速、灵敏、集成化的细胞类型蛋白质组学研究平台LCM-SISPROT技术(图1B), 该技术提高了蛋白质分析的敏感性, 可以达到单细胞分辨率精确地分离肿瘤样品中的特定细胞类型, 并对其进行高敏蛋白组分析. 他们完成了结肠癌中4种主要细胞类型的蛋白质组学研究. 彭广敦和景乃禾课题组^[25]则利用LCM结合单细胞RNA测序(single cell RNA sequencing,

scRNA-seq)技术对小鼠早期胚胎、小鼠大脑、病理肝脏和精子组织的空间转录组进行了研究. 该方法对解释细胞异质性, 解决基因调控网络等问题具有重要意义. 随着技术的发展, LCM被进一步改善. Park等人^[26]将富集的循环肿瘤细胞(circulating tumor cell, CTC)样品封装在水凝胶基质中, 开发了一种单细胞样品制备和基因组测序流程. 该方法结合生物物理富集和使用激光显微捕获微分离的单细胞, 提高了LCM单细胞分离的效率, 并可与下游分析, 如基因测序和蛋白质组学分析等兼容.

尽管LCM是组织切片中单细胞分离获取的主要技术, 但是其仪器设备的成本昂贵, 更不用说要实现样本的自动化分离. 而且LCM存在切割样品丢失所导致

图 1 LCM在药物定量和空间分辨蛋白组分析中的应用. A: LCM-LC/MS系统药物定量工作流程^[23]; B: LCM-SISPROT技术应用于结肠癌细胞类型空间分辨蛋白组分析的工作流程^[24](网络版彩图)

Figure 1 Application of LCM in drug quantification and spatial resolution proteome analysis. A: Drug quantification workflow of LCM-LC/MS system^[23]; B: LCM-SISPROT technology is applied to the workflow of spatial resolution proteome analysis of colon cancer cell types^[24] (color online)

的收集效率低的问题, 对不一样品的切割还需要重新摸索激光能量以防止样品切割不充分或者样品被烧焦损坏. 另外, LCM不能用于溶液中单细胞的分离捕获, 应用范围有限. 因此, 未来的LCM需要向更低成本的自动化、智能化方向发展, 并且要摆脱对样品形态的限制、扩大应用范围, 比如对培养皿中贴壁细胞的捕获分离等.

2 光镊(光力学)操作

光镊利用光的线性和角动量对物体施加力和力矩, 从而将物体捕获在由光形成的梯度势阱中. 光和物体间的相互作用力, 实际上是光的电磁场与组成物质的带电粒子相互作用的结果, 包括散射力和梯度力两部分. 当激光束聚焦在微粒上时, 激光发生折射、反射和吸收. 散射力即被反射和吸收的光的作用力, 其方向与光传播方向一致; 梯度力包括由于折射产生的趋向于光轴轴向的梯度力, 以及由非均匀光场产生的指向激光焦点的横向梯度力, 如图2虚线矩形框内左图所示. 在特定强度分布的光场下, 梯度力起主导作用. 此时, 梯度力与光强梯度都指向焦点, 形成一个三维势阱, 如图2虚线矩形框里的右图所示. 光镊就是利用这样的光学势阱来捕获微小粒子^[27]. 光镊于1986年由Ashkin首次提出. 次年, Ashkin和Dziedzic^[28]用光镊进行了细菌和病毒的捕获和操作的相关研究. 他们利

用单光束梯度阱, 用激光在水溶液中成功地进行了单个病毒和细菌的捕获与操纵, 实验结果显示, 该技术对病毒和细菌没有明显的损伤. 当用光镊操纵单细胞时, 激光波长小于细胞大小, 此时激光焦点处的梯度力起主导作用, 并且满足动量守恒定律, 细胞会被吸引到由聚焦光形成的最高强度点上然后被捕获在这个位置. 至今, 光镊已在微小粒子以及细胞操纵、微力的测量等领域取得了巨大的进展, Ashkin也凭借光镊技术于2018年获得了诺贝尔物理学奖. 典型的光镊系统一般由控制光路和照明光路构成, 控制光路负责控制激光下微小物体的运动, 照明光路用来采集成像信号, 一般由激光器、照明灯、显微镜物镜、双色反射镜、反射镜、移动平台、运动控制器(电脑)以及电荷耦合器件(charge coupled device, CCD)相机组成(图2). 将样品放在移动平台上, 通过控制移动平台的运动进而操纵单个细胞.

光镊凭借其非接触、尺度匹配性强、低损伤等优点可捕获、分离和操纵单个胶体粒子或者单个细胞^[29], 也可用于操纵单个细胞内的DNA和蛋白质等生物大分子^[30-32], 甚至能够精确测量被捕获物体的形变性能^[33-35], 还可采用单光束实现多点并行捕获^[36].

Grover等人^[37]设计了一种基于光镊的单细胞自动分选系统用于外周血中红细胞与其他细胞的分类, 并比较了单光束和双光束光镊的分选效果发现, 双光束光镊对细胞损伤更小并且具有三维空间中更强的细胞

图2 光镊系统与基本原理示意图(网络版彩图)

Figure 2 Schematic of optical tweezers system and basic principles (color online)

移动能力, 原因在于两束光可以抵消一部分杂散光和噪声等, 使得系统更加稳定且精确度更高. 该分类系统在医学诊断和治疗方面有潜在应用. Liu等人^[38]将激光照明系统与光镊以及倒置显微镜结合在一起, 使用互补金属氧化物半导体(complementary metal oxide semiconductor, COMS)相机记录了透射光和反射光产生的干涉条纹, 从获得的图像中计算细胞高度, 利用光镊构建了细胞形态, 实现了对单细胞的形态学分析以及对细胞变形的动态测量. 利用光镊操纵胶体在很多领域发挥重要作用, 但传统光镊的性能受到衍射极限的限制, 而近年来基于等离子体的光镊在较低的光功率下具有更高的捕获效率. Ghosh S和Ghosh A^[39]在电介质微孔上制备的等离子体纳米圆盘, 可以用传统的光镊操纵, 同时在其附近产生强约束的光学近场(图3), 可完成对不同类型胶体进行平行或独立控制的操纵, 为光学纳米操作提供了一种很有前景的方法. 此外, 利用阵列表面等离子激元光镊可实现纳米粒子的鉴别以及分选功能^[40,41], 该方法可为单细胞分选的研究提供重要的技术手段.

光镊的发展推动了微观操作的进步, 在捕获和操

纵微小粒子和生物大分子、细胞、测量微小作用力等领域取得了巨大的进展. 但是, 光镊在操纵分离单细胞方面只能对溶液中的细胞发挥作用, 使其应用范围受到一定限制. 尽管光镊可以避开细胞的激光吸收波长, 降低热效应, 但是激光对细胞的直接作用还是会一定程度上影响细胞; 此外, 该方法分离单细胞后的收集也比较繁琐, 效率较低. 未来光镊在单细胞操纵分离方面可以往一体化、程序化方面发展, 并且要尽量降低热效应, 比如通过引入中间介质等方法.

3 激光诱导转移

激光诱导转移(light induced transfer, LIT)是随着激光器的发展涌现出的一种新型微加工工艺, 即利用激光进行材料的转移. 激光诱导转移可以分为两种: 激光诱导前向转移(light induced forward transfer, LIFT)和激光诱导后向转移(light induced backward transfer, LIBT). 本文主要介绍的是LIFT. LIFT利用脉冲激光透过覆有一层要转移的物质(供体)的透明基质(供体基板), 聚焦在供体基板和供体的交界处, 供体吸

图3 利用活跃的胶体镊子(active colloidal tweezers, ACTs)演示静态和动态操作. A: 用聚焦激光束在液体中的ACT示意图; B: 用 $4 \text{ mW}/\mu\text{m}^2$ 的光照强度捕获的100 nm荧光纳米金刚石, 然后通过关闭照明进行释放; C: 200 nm荧光聚苯乙烯珠在PBS缓冲液中的捕获、转运和释放. 所有比例尺对应 $3 \mu\text{m}$ ^[39](网络版彩图)

Figure 3 Demonstration of static and dynamic manipulation active colloidal tweezers (ACTs). A: Schematic of ACT in a liquid with a focused laser beam; B: trapping of 100 nm fluorescent nanodiamonds with illumination intensity $4 \text{ mW}/\mu\text{m}^2$ and its subsequent release by turning off the illumination; C: trapping, transport and release of 200 nm fluorescent polystyrene bead in PBS buffer. All scale bars correspond to $3 \mu\text{m}$ ^[39] (color online)

收激光的能量, 温度升高, 当薄膜达到熔融状态时, 便沉积到下面放置的接收基板上, 完成物质的转移. LIFT最早于1986年提出, 其装置比较简单, 主要包括激光器、激光光路、成像设备以及移动平台 and 控制器等, 主要用于一些金属材料的转移和微图形化.

LIFT也可以用于生物材料、生物大分子、细胞等一些软物质的转移. 但细胞不能被直接涂覆在供体基板上, 因为激光能量会对其造成热或剪切力的损伤, 容易使其丧失活性. 因此, 需要在供体基板和生物材料之间加一层可以吸收激光能量并受热汽化的物质(如钛、二氧化钛)作为牺牲层. 如图4所示, 当激光聚焦在供体基板和牺牲层的交界处时, 牺牲层吸收激光能量发生局部汽化生成蒸汽泡, 当蒸汽泡达到临界尺寸时就开始塌陷并以射流的形式保持运动, 推动生物层内的细胞向前方移动, 被接收基底采集. 为保证细胞不受损伤, 接收基底上往往涂覆一层缓冲层(常用海藻酸钠材料). LIFT的分辨率可以通过物镜放大倍数、激光能量和光阑等控制, 因此可以较为容易地达到微米量级的单细胞分辨率, 从而实现单细胞分离.

在传统的LIFT基础上, 衍生出了很多优化的LIFT装置. 例如, 美国海军实验室^[42]提出的基质辅助脉冲激光蒸发直写(matrix-assisted pulsed-laser evaporation direct write, MAPLE-DW, MDW)技术, 它是利用易挥发的聚甲基丙烯酸丁酯(poly-butyl-methacrylate, PBMA)材料, 将其与供体进行掺杂, 激光照射到供体上时, 易挥发的材料挥发, 进而供体材料掉落在下面的接收基板上, 完成物质的转移. Wu和Ringeisen等人

图4 LIFT示意图(网络版彩图)

Figure 4 Schematic of LIFT (color online)

先后利用MAPLE和MDW技术沉积生物材料薄膜, 如图5所示^[43], 利用MDW转移了大肠杆菌^[44], 制作了蛋白质微阵列^[45]; 对MAPLE和MDW的传输机制、影响因素等进行了详细的介绍和研究, 并通过对聚合物、酶、蛋白质、真核细胞和组织, 以及多巴胺传感器等的应用证实了该技术的性能^[46]. MDW还可以用来沉积哺乳动物细胞和神经母细胞^[47,48]. 此外, 还有采用动态释放层(dynamic runtime layer, DRL)的LIFT, DRL位于供体基板和供体薄膜之间, 负责吸收大部分激光强度, 并在蒸发时提供推动供体材料向接收衬底推进所需的一部分推力^[49]. 其实DRL就是前文所说的牺牲层.

随着LIFT的进一步发展, 使用LIFT进行细胞或生物分子的研究逐渐展开. Hopp等人^[50]通过吸收膜辅助

图5 MAPLE和MDW流程示意图^[43]. A: MAPLE原理图: 当激光脉冲击中目标时, 便会引发光热过程, 使冻结的溶剂汽化并将溶质释放到腔内, 目标的挥发性成分被抽运系统移除, 使薄膜材料在基板上凝结; B: MDW原理图: 激光脉冲透过传输“丝带”冲击该材料, 从而使基质材料的一部分受热激发, 热膨胀将材料推向基底(网络版彩图)

Figure 5 Schematic of MAPLE and MDW workflow^[43]. A: Schematic of MAPLE: When a laser pulse strikes the target, it initiates a photo-thermal process, vaporizing the frozen solvent and releasing the solute into the chamber, the volatile component of the target is removed by the pumping system leaving the film material to condense on the substrate; B: schematic of MDW: A laser pulse strikes this material through the ribbon, thermally exciting part of the matrix material, the thermal expansion propels the materials to the substrate (color online)

激光诱导前向转移(absorbing film-assisted LIFT, AFA-LIFT)技术, 采用248 nm的氟化氪(KrF)准分子激光器作为激光源, 使用约100 nm厚的银层作为吸收层分离了单细胞, 并在接收基板上涂覆一层明胶支持细胞的黏附和生长, 并通过转移过程的时间分辨率研究对转移过程中的速度情况进行了分析, 研究了新鲜分离细胞和培养细胞的存活、增殖和分化情况, 证明了该技术对细胞没有明显的损伤. 后来, 该课题组^[51]又使用飞秒激光, 利用AFA-LIFT进行了活细胞的转移, 并对纳秒激光和飞秒激光应用于AFA-LIFT的不同之处进

行了比较(图6A). 可以看到, 飞秒激光的冲击力比纳秒激光更强并且热区影响小, 作用机制略有不同, 纳秒激光作用更柔和但其采样边缘不如飞秒激光作用下的边缘光滑. 由于紫外激光对细胞以及遗传物质的损伤较严重, 很多研究人员使用可见光或近红外激光进行了相关研究. 广东工业大学的邓宇等人^[52]使用532 nm的激光, 采用钛作为吸收层, 并在接收基板上覆一层2%的海藻酸盐溶液, 应用LIFT成功分离了单个细胞, 并对分离过程及激光脉冲能量、光斑大小、钛层厚度、工作距离(供体层和接收层的距离)和海藻酸盐溶液厚

图6 LIFT纳秒和飞秒转移过程以及单细胞转移示意图. A: AFA-LIFT过程中纳秒(i, ii, iii)和飞秒(iv, v, vi)的传输过程示意图^[51]; B: 单细胞转移的示意图^[52](网络版彩图)

Figure 6 Schematic of LIFT nanosecond and femtosecond transfer process and single cell transfer. A: Schematic of the transmission process of nanosecond (i, ii, iii) and femtosecond (iv, v, vi) during the AFA-LIFT process^[51]; B: schematic of single cell transfer^[52] (color online)

度等影响因素进行了详细的探究, 优化了实验条件(图6B)。Zhang等人^[53]提出了一种激光诱导的水凝胶和哺乳动物细胞转移的方法, 该方法既不需要任何牺牲物质来吸收能量, 也不需要紫外激光, 利用近红外飞秒激光脉冲聚焦在含有细胞的水凝胶溶液中, 完成了细胞的转移。

随着测序技术的发展, LIFT也被应用于测序研究。Kim S等人^[54]应用LIFT技术开发了一种基于表型的高通量激光辅助分离和测序(phenotype-based high-throughput laser-aided isolation and sequencing, PHLI-seq)方法, 采用波长为1064 nm的激光, 选用氧化铟锡(indium tin oxide, ITO)作为吸收层实现了高通量分离

单个或少量细胞的全基因组序列分析, 从而构建了肿瘤组织内与细胞的图像或表型相关的基因组图谱。PHLI-seq的工作流程如图7所示, 他们利用该技术在高分辨率下揭示了乳腺癌组织的异质性, 并将细胞的基因组图谱映射到其在三维肿瘤块中相应的空间位置和表型。Kim O等人^[55]把LIFT技术和他们自己之前研发的生物芯片结合, 提出了激光诱导的显微结构在光学机械转移芯片上的分离和测序(laser-induced isolation of microstructures on an optomechanically-transferable-chip and sequencing, LIMO-seq)方法(图8), 该方法也是采用波长为1064 nm的激光以及ITO作为吸收层, 将附有细胞的单个微观结构应用LIFT技术分离至

图 7 PHLI-seq工作流程图。A: 肿瘤切片放在ITO玻璃片上, 用H&E染色, 组织切片成像, 然后对切片中的癌细胞分组; B: 用红外(1064 nm)激光分离组织切片或细胞; C: 全基因组扩增和大规模并行测序; D: PHLI-seq可应用于各种类型的样品, 分离细胞的分辨率可降至单细胞水平^[54](网络版彩图)

Figure 7 Schematic of PHLI-seq workflow. A: The tumor mass is sectioned and stained with H&E, the section is prepared on ITO glass, the tissue section is imaged, and the cancer cells in the section are grouped; B: a tissue section or cells can be isolated with an infrared (1064 nm) laser; C: whole-genome amplification and massively parallel sequencing; D: PHLI-seq can be applied to various types of samples, and the resolution of isolating cells can be down to single-cell level^[54] (color online)

图 8 LIMO-seq工作流程图. A和B: CTCs由生物芯片富集; C: 脉冲激光分离单个细胞; D: 使用下一代测序进行DNA测序^[55] (网络版彩图)

Figure 8 Schematic of LIMO-seq workflow. A and B: CTCs are enriched with biochips; C: isolation the single cell by a pulsed laser; D: DNA sequencing using NGS^[55] (color online)

PCR管中用于下一代测序(next generation sequencing, NGS), 完成了单个CTC的全基因组测序.

虽然LIFT相较于LCM减少了激光对细胞的损伤, 既可以对组织切片进行微区取样, 又可以对溶液中的细胞进行分离, 但其目前的发展也只是停留在低通量阶段, 若想获得大量样本, 则耗时长、操作较为繁琐; 而且针对不同厚度的样本或者采集不同尺寸的样本之前, 都要进行激光相关参数的摸索, 只有合适的激光参数才能满足不同的采样需求. 因此, 未来应该倾向于自动化、高通量LIFT的研究.

4 光流体操控(光流控)

随着微流体、微流控技术的发展, 光流体应运而生, 广义上它可以是光学和微流体技术的结合, 狭义上指利用流体的光学特性实现光学和流体的有机整合而形成高度集成的流体分析或者控制功能. 光流体最早于2003年由美国国防高级研究项目机构(Defense

Advanced Research Projects Agency, DARPA)创立的大学研究中心提出, 他们的目标是通过集成光学和流体技术开发适应性光学器件进而实现特定的功能^[56].

随着光流体技术的发展, 许多研究人员利用其集成度高、灵敏度高等优点, 将其应用于细胞的操纵领域. 例如, Wang等人^[57]把光镊和微流控芯片技术结合起来, 集成了一种通用的单细胞操作工具(图9A), 基于动态流体和动态光模式, 实现了对单个细胞的操纵以及细胞的分选. 华南师范大学生物光子学研究院的邢晓波课题组^[58]将光镊集成到T型微流控通道中, 设计了一种光流控芯片, 它可以基于细胞的不同大小和形状选择性地捕获和推动细胞, 例如大肠杆菌等. 本文之前介绍的光镊主要依靠的力是光学梯度力, 除了梯度力, 散射力也可以用于光学细胞的操纵, 其引起的损伤比光镊更小. Kim等人^[59]提出了一种利用散射力实现微通道中的交叉型光学颗粒分离技术(图9B). 该技术通过激光束的散射力将平行于流体流动的微粒或细胞推向激光束传播方向, 使微粒或细胞在垂直于流

图9 各种基于光热操作的光流体工作示意图。A: 细胞分类过程示意图^[57]; B: 光学粒子分离原理图^[59]; C: 光热毛细管微机械手的实验装置^[61]; D: 热光镊的光学设置^[62](网络版彩图)

Figure 9 Schematic of various optofluidics based on photothermal operation. A: Schematic of the cell classification process^[57]; B: schematic of optical particle separation^[59]; C: experimental device of photothermal capillary micro-manipulator^[61]; D: optical setting of thermo-optic tweezers^[62] (color online)

体流动的方向发生位移, 在激光束参数一致的情况下, 不同大小的微粒或细胞产生的位移不同, 进而实现微粒或细胞的分选。

光流控的基本目标是在微观尺度上操纵流体和光, 并利用它们的相互作用来设计高度通用的系统^[60]。光流控可以通过光操控流体的运动或者微流体控制光的作用进而操纵粒子或细胞。例如, Hu等人^[61]介绍了一种能够实现单细胞操作和图形化的光-热毛细管微机械手(opto-thermocapillary micromanipulator, OTMm)(图9C), 通过近红外激光聚焦在ITO衬底上, 诱导了热毛细对流, 通过对流进行活细胞的捕获和运输。Lin等人^[62]利用细胞膜带电表面电双层的介电常数梯度, 结合光热操作, 成功地在可控温度梯度场中实现了悬浮生物细胞的低功率捕获(图9D)。

光诱导介电泳(optically-induced-dielectrophoresis, ODEP)也是一种典型的光流控技术, 它是利用光导体衬底在激光作用下产生的非均匀电场, 这种变化的电场会产生介电泳(DEP), 进而捕获和操纵粒子或细胞。Chiou课题组^[63]提出了两种依赖于光感生电力来对微粒或细胞进行光学操作的机制: 光电润湿(optoelectrowetting, OEWE)和光电镊子(optoelectronic tweezers, OET)。其中OET就是基于ODEP来操纵细胞或粒子。次年, 该课题组^[64]又利用光热操作, 提出了一种光学图像驱动DEP技术, 该技术利用光学图形化产生的电动流动来捕获微粒或单细胞, 允许在光导表面高分辨率的电场模式下并行操纵单个粒子。Valley等人^[65]提出了一种能够实现OEWE和OET无缝结合的平台, 该平台可以从队列中选择单个细胞, 然后将其封

图 10 ODEP芯片结构和实验系统^[67]. A: ODEP芯片结构示意图; B: 实验系统配置, 主要包括显微镜、函数发生器、投影仪、电脑、芯片、CCD相机等(网络版彩图)

Figure 10 The ODEP chip structure and the experimental system^[67]. A: Structure diagram of ODEP chip; B: configuration of the experimental system, which mainly consists of a microscope, a function generator, a display projector, a computer, chip, and CCD camera (color online)

装在液滴中, 完成单细胞的选择和封装. Huang等人^[66]提出了一种基于ODEP的微流体平台, 该平台能够连续、无标签、对细胞损伤小、高效率地分离循环肿瘤细胞. Xie等人^[67]利用ODEP有效地捕获和操纵了衣藻细胞, 而且被ODEP捕获的活衣藻细胞形成可编程微米级电机阵列(图10). 该阵列可以作为生物微泵驱

动微流控芯片中的液体流动, 为生物驱动研究提供了新的思路.

基于光流体的单细胞操纵技术凭借其易控制、可集成、效率高等优点在这几年迅速发展. 光流体技术不仅可以在细胞层面发挥作用, 还可以对细胞内物质运输^[68]起作用, 如提高药物靶向运输效率等. 但是目前光流控仍处在初级阶段, 创新性的光流控芯片设计及其与单细胞下游分析应用的有机整合尚有很大发展空间. 同时, 光流控芯片的稳定性、操控性能仍需提高, 成本也需要降低.

5 总结与展望

本文主要综述了近几年发展较为迅速的几种单细胞的光学操纵方法, 并对其原理和基本应用进行了介绍. 随着人们对细胞异质性研究需要, 光学操控凭借其精确性和易操作性等优点在单细胞研究领域发挥了重要作用. 不管是传统的LCM和光镊, 还是新兴的LIFT和光流控, 它们都有各自的优缺点, 需要根据具体应用场景加以选择使用. 随着单细胞分析需求的快速增长, 在单细胞水平, 光学操纵将加快与下游分析应用的有机整合, 因此如何实现高度的集成化、自动化和智能化从而提高操纵通量和效率、降低操作复杂度已经成为一个迫切需要解决的问题. 而在亚细胞水平的纳米尺度, 光学操纵技术甚至可以操纵单细胞内的细胞器或者生物分子. 例如, 基于等离子体的纳米镊子可以克服常规光镊不能直接捕获小于几百纳米的物体的缺陷, 捕获纳米尺度的物体^[69]. 与此同时, 光不但可以作为能量的载体而且更是一种信息载体, 在光学操纵的同时还可以获取细胞或者分子的理化信息, 因此光学操纵多功能化或者光学操纵分析一体化将是一个新的发展方向. 此外, 亚细胞水平的光学操控技术的不断快速发展, 有望产生单细胞手术或者单细胞改造的新型技术手段或者工具, 并对单细胞生物学甚至合成生物学产生重要的推动作用, 从而更好地支撑生物医学相关领域的发展.

参考文献

- Gordon S, Taylor P R. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*, 2005, 5: 953–964
- Aird W C. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res*, 2007, 100: 158–173

- 3 Schatz D G, Swanson P C. V(D)J recombination: mechanisms of initiation. *Annu Rev Genet*, 2011, 45: 167–202
- 4 Dagogo-Jack I, Shaw A T. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. *Nat Rev Clin Oncol*, 2018, 15: 81–94
- 5 Gerlinger M, Rowan A J, Horswell S, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med*, 2012, 366: 883–892
- 6 Almendro V, Marusyk A, Polyak K. Cellular heterogeneity and molecular evolution in cancer. *Annu Rev Pathol Mech Dis*, 2013, 8: 277–302
- 7 Van Loo P, Voet T. Single cell analysis of cancer genomes. *Curr Opin Genets Dev*, 2014, 24: 82–91
- 8 Prasetyanti P R, Medema J P. Intra-tumor heterogeneity from a cancer stem cell perspective. *Mol Cancer*, 2017, 16: 41
- 9 Qian M, Wang D C, Chen H, et al. Detection of single cell heterogeneity in cancer. *Semin Cell Dev Biol*, 2017, 64: 143–149
- 10 Patel A P, Tirosh I, Trombetta J J, et al. Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science*, 2014, 344: 1396–1401
- 11 Huang N T, Zhang H L, Chung M T, et al. Recent advancements in optofluidics-based single-cell analysis: optical on-chip cellular manipulation, treatment, and property detection. *Lab Chip*, 2014, 14: 1230–1245
- 12 Anonymous. Genomics beyond genes. *Science*, 2012, 338: 1528–1529
- 13 Hayakawa T, Kikukawa M, Maruyama H, et al. Laser-driven gel microtool for single-cell manipulation based on temperature control with a photothermal conversion material. *Appl Phys Lett*, 2016, 109: 254102
- 14 Hu P, Zhang W, Xin H, et al. Single cell isolation and analysis. *Front Cell Dev Biol*, 2016, 4
- 15 Gross A, Schoendube J, Zimmermann S, et al. Technologies for single-cell isolation. *Intern J Mol Sci*, 2015, 16: 16897–16919
- 16 Cai X Z, Huang J H. Microbiology (in Chinese). 3rd ed. Beijing: Science Press, 2011 [蔡信之, 黄君红. 微生物学. 第3版. 北京: 科学出版社, 2011]
- 17 Fröhlich J, König H. Rapid isolation of single microbial cells from mixed natural and laboratory populations with the aid of a micromanipulator. *Syst Appl Microbiol*, 1999, 22: 249–257
- 18 Hu Y, Smyth G K. ELDA: Extreme limiting dilution analysis for comparing depleted and enriched populations in stem cell and other assays. *J Immunol Methods*, 2009, 347: 70–78
- 19 Skogen-Hagenson M J, Salzman G C, Mullaney P F, et al. A high efficiency flow cytometer. *J Histochem Cytochem*, 1977, 25: 784–789
- 20 Emmert-Buck M R, Bonner R F, Smith P D, et al. Laser capture microdissection. *Science*, 1996, 274: 998–1001
- 21 Jensen E. Laser-capture microdissection. *Anat Rec*, 2013, 296: 1683–1687
- 22 Espina V, Wulfschuhle J D, Calvert V S, et al. Laser-capture microdissection. *Nat Protoc*, 2006, 1: 586–603
- 23 Zimmerman M, Blanc L, Chen P Y, et al. Spatial quantification of drugs in pulmonary tuberculosis lesions by laser capture microdissection liquid chromatography mass spectrometry (LCM-LC/MS). *J Vis Exp*, 2018, 134
- 24 Xu R, Tang J, Deng Q, et al. Spatial-resolution cell type proteome profiling of cancer tissue by fully integrated proteomics technology. *Anal Chem*, 2018, 90: 5879–5886
- 25 Chen J, Suo S, Tam P P, et al. Spatial transcriptomic analysis of cryosectioned tissue samples with Geo-seq. *Nat Protoc*, 2017, 12: 566–580
- 26 Park E S, Yan J P, Ang R A, et al. Isolation and genome sequencing of individual circulating tumor cells using hydrogel encapsulation and laser capture microdissection. *Lab Chip*, 2018, 18: 1736–1749
- 27 Li Y M, Lou L R. Optical tweezers technology in life science research (in Chinese). *Life Sci Instrum*, 2004, 2: 3–9 [李银妹, 楼立人. 生命科学研究中的光镊技术. 生命科学仪器, 2004, 2: 3–9]
- 28 Ashkin A, Dziedzic J M. Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria. *Science*, 1987, 235: 1517–1520
- 29 Zhang H, Liu K K. Optical tweezers for single cells. *J R Soc Interface*, 2008, 5: 671–690
- 30 Wang M D, Yin H, Landick R, et al. Stretching DNA with optical tweezers. *Biophys J*, 1997, 72: 1335–1346
- 31 Bennink M L, Leuba S H, Leno G H, et al. Unfolding individual nucleosomes by stretching single chromatin fibers with optical tweezers. *Nat Struct Biol*, 2001, 8: 606–610
- 32 Pang Y, Gordon R. Optical trapping of a single protein. *Nano Lett*, 2012, 12: 402–406
- 33 Kuo S C, Sheetz M P. Force of single kinesin molecules measured with optical tweezers. *Science*, 1993, 260: 232–234
- 34 Hénon S, Lenormand G, Richert A, et al. A new determination of the shear modulus of the human erythrocyte membrane using optical tweezers. *Biophys J*, 1999, 76: 1145–1151
- 35 Dao M, Lim C T, Suresh S. Mechanics of the human red blood cell deformed by optical tweezers. *J Mech Phys Solids*, 2003, 51: 2259–2280

- 36 Garcés-Chávez V, McGloin D, Melville H, et al. Simultaneous micromanipulation in multiple planes using a self-reconstructing light beam. *Nature*, 2002, 419: 145–147
- 37 Grover S C, Skirtach A G, Gauthier R C, et al. Automated single-cell sorting system based on optical trapping. *J Biomed Opt*, 2001, 6: 14–22
- 38 Liu J, Zhang F, Zhu L, et al. Laser interference-based technique for dynamic measurement of single cell deformation manipulated by optical tweezers. *Electrophoresis*, 2019, 40: 1160–1165
- 39 Ghosh S, Ghosh A. All optical dynamic nanomanipulation with active colloidal tweezers. *Nat Commun*, 2019, 10: 4191
- 40 Roxworthy B J, Ko K D, Kumar A, et al. Application of plasmonic bowtie nanoantenna arrays for optical trapping, stacking, and sorting. *Nano Lett*, 2012, 12: 796–801
- 41 Ndukaife J C, Mishra A, Guler U, et al. Photothermal heating enabled by plasmonic nanostructures for electrokinetic manipulation and sorting of particles. *ACS Nano*, 2014, 8: 9035–9043
- 42 Piqué A, Chrisey D B, Auyeung R C Y, et al. A novel laser transfer process for direct writing of electronic and sensor materials. *Appl Phys A-Mater Sci Process*, 1999, 69: S279–S284
- 43 Wu P K, Ringeisen B R, Callahan J, et al. The deposition, structure, pattern deposition, and activity of biomaterial thin-films by matrix-assisted pulsed-laser evaporation (MAPLE) and MAPLE direct write. *Thin Solid Films*, 2001, 398-399: 607–614
- 44 Ringeisen B R, Chrisey D B, Piqué A, et al. Generation of mesoscopic patterns of viable *Escherichia coli* by ambient laser transfer. *Biomaterials*, 2002, 23: 161–166
- 45 Ringeisen B R, Wu P K, Kim H, et al. Picoliter-scale protein microarrays by laser direct write. *Biotechnol Prog*, 2010, 18: 1126–1129
- 46 Wu P K, Ringeisen B R, Krizman D B, et al. Laser transfer of biomaterials: Matrix-assisted pulsed laser evaporation (MAPLE) and MAPLE direct write. *Rev Sci Instrum*, 2003, 74: 2546–2557
- 47 Barron J A, Ringeisen B R, Kim H, et al. Application of laser printing to mammalian cells. *Thin Solid Films*, 2004, 453-454: 383–387
- 48 Doraiswamy A, Narayan R J, Lippert T, et al. Excimer laser forward transfer of mammalian cells using a novel triazene absorbing layer. *Appl Surf Sci*, 2006, 252: 4743–4747
- 49 Serra P, Piqué A. Laser-induced forward transfer: Fundamentals and applications. *Adv Mater Technol*, 2019, 4: 1800099
- 50 Hopp B, Smausz T, Kresz N, et al. Survival and proliferative ability of various living cell types after laser-induced forward transfer. *Tissue Eng*, 2005, 11: 1817–1823
- 51 Hopp B, Smausz T, Szabó G, et al. Femtosecond laser printing of living cells using absorbing film-assisted laser-induced forward transfer. *Opt Eng*, 2012, 51: 014302
- 52 Deng Y, Renaud P, Guo Z, et al. Single cell isolation process with laser induced forward transfer. *J Biol Eng*, 2017, 11: 2
- 53 Zhang J, Hartmann B, Siegel J, et al. Sacrificial-layer free transfer of mammalian cells using near infrared femtosecond laser pulses. *PLoS ONE*, 2018, 13: e0195479
- 54 Kim S, Lee A C, Lee H B, et al. PHLI-seq: constructing and visualizing cancer genomic maps in 3D by phenotype-based high-throughput laser-aided isolation and sequencing. *Genome Biol*, 2018, 19: 158
- 55 Kim O, Lee D, Chungwon Lee A, et al. Whole genome sequencing of single circulating tumor cells isolated by applying a pulsed laser to cell-capturing microstructures. *Small*, 2019, 15: 1902607
- 56 Huang H. Research on biomedical microfluidic chip based on optofluidic technology (in Chinese). Dissertation for Doctoral Degree. Shanghai: Fudan University, 2010 [黄华. 基于光流体技术的生物医学微流控芯片研究. 博士学位论文. 上海: 复旦大学, 2010]
- 57 Wang X, Chen S, Kong M, et al. Enhanced cell sorting and manipulation with combined optical tweezer and microfluidic chip technologies. *Lab Chip*, 2011, 11: 3656–3662
- 58 Liu S, Li Z, Weng Z, et al. Miniaturized optical fiber tweezers for cell separation by optical force. *Opt Lett*, 2019, 44: 1868–1871
- 59 Kim S B, Yoon S Y, Sung H J, et al. Cross-type optical particle separation in a microchannel. *Anal Chem*, 2008, 80: 2628–2630
- 60 Monat C, Domachuk P, Eggleton B J. Integrated optofluidics: A new river of light. *Nat Photon*, 2007, 1: 106–114
- 61 Hu W, Fan Q, Ohta A T. An opto-thermocapillary cell micromanipulator. *Lab Chip*, 2013, 13: 2285–2291
- 62 Lin L, Peng X, Wei X, et al. Thermophoretic tweezers for low-power and versatile manipulation of biological cells. *ACS Nano*, 2017, 11: 3147–3154
- 63 Dholakia K, Chiou P Y, Spalding G C, et al. Toward all optical lab-on-a-chip system: optical manipulation of both microfluid and microscopic particles. In: *Optical Trapping and Optical Micromanipulation—SPIE's 49th Annual Meeting*. Denver. 2004

- 64 Chiou P Y, Ohta A T, Wu M C. Massively parallel manipulation of single cells and microparticles using optical images. *Nature*, 2005, 436: 370–372
- 65 Valley J K, NingPei S, Jamshidi A, et al. A unified platform for optoelectrowetting and optoelectronic tweezers. *Lab Chip*, 2011, 11: 1292–1297
- 66 Huang S B, Wu M H, Lin Y H, et al. High-purity and label-free isolation of circulating tumor cells (CTCs) in a microfluidic platform by using optically-induced-dielectrophoretic (ODEP) force. *Lab Chip*, 2013, 13: 1371–1383
- 67 Xie S, Wang X, Jiao N, et al. Programmable micrometer-sized motor array based on live cells. *Lab Chip*, 2017, 17: 2046–2053
- 68 Doppenberg A, Meunier M, Boutopoulos C. A needle-like optofluidic probe enables targeted intracellular delivery by confining light-nanoparticle interaction on single cell. *Nanoscale*, 2018, 10: 21871–21878
- 69 Berthelot J, Acimović S S, Juan M L, et al. Three-dimensional manipulation with scanning near-field optical nanotweezers. *Nat Nanotech*, 2014, 9: 295–299

Research progress of single-cell optical manipulation techniques

CHANG WanQing, GUO YunXia, CUI YuJun, YE KaiQiang, GE QinYu & ZHAO XiangWei

State Key Laboratory of Bioelectronics, School of Biological Science & Medical Engineering, Southeast University, NanJing 210096, China

With the development of single cell sequencing technology, more and more attention is paid to the heterogeneity of cells. Single-cell manipulation is essential for the study of cell heterogeneity. On the basis of the interaction of light and matter, cells could be optically manipulated. Here, we reviewed the principles and applications of optical methods, such as laser capture microdissection (LCM), optical tweezers, laser-induced forward transfer (LIFT) and optofluidics, based cell manipulations. Due to their merits of contact-free, no pollution and less cell damage, all well as high compatibility with other techniques, optical techniques is of momentous significance for single cell manipulation and analysis.

single-cell, laser capture microdissection, optical tweezers, laser-induced forward transfer, optofluidics

doi: [10.1360/SSV-2020-0079](https://doi.org/10.1360/SSV-2020-0079)