



液滴微流控技术在微生物研究中的应用

李政毅, 彭显[△]

口腔疾病研究国家重点实验室 四川大学华西口腔医院(成都 610041)

【摘要】 液滴微流控技术是在精确的控制下在微小通道中产生和操控高度均一的纳升至皮升级液滴的技术。在生物学研究方面,可以用单个液滴封装一小群甚至单个细胞,并作为单独的生化反应容器,适用于高通量与高分辨率的生化分析。在微生物研究领域,从培养和鉴定微生物到研究微生物群落的时空动态;从对微生物的精准定量到系统性地研究微生物相互作用;从分离稀有和不可培养的微生物到开发工程菌株,液滴微流控技术都在其中起到了重要的推动作用,有望成为微生物学研究中探索微生物单细胞水平的基本工具。本文简要介绍了液滴微流控的技术基础并对其在微生物研究中的最新应用进行了介绍和讨论,旨在为微生物领域的相关研究起到参考意义。

【关键词】 液滴微流控 微生物 单细胞

Application of Droplet-Based Microfluidics in Microbial Research LI Zheng-yi, PENG Xian[△]. State Key Laboratory of Oral Diseases, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China

[△] Corresponding author, E-mail: pengx@scu.edu.cn

【Abstract】 Droplet-based microfluidics is a technology that generates and manipulates highly uniform droplets, ranging from picoliter to nanoliter droplets, in microchannels under precise control. In biological research, each droplet can be used to encapsulate a small group of cells or even a single cell, and then serve as an individual container for biochemical reaction, which is well suited for high-throughput and high-resolution biochemical analysis. In the field of microbial research, from cultivation and identification of microbes to the investigation of the spatiotemporal dynamics of microbial communities, from precise quantitation of microbiota to systematic study of microbial interactions, and from the isolation of rare and unculturable microbes to the development of genetically engineered strains, droplet microfluidic technology has played an important promotional role in all these aspects. Droplet microfluidics shows potential for becoming a basic tool for exploring single-cell microbes in microbiological research. In this review, we gave a brief overview of the technical basis of droplet microfluidics. Then, we presented its latest applications in microbial research and had some discussions, aiming to provide a reference for relevant research on microorganisms.

【Key words】 Droplet microfluidic Microbe Single cell

微生物分类复杂,种类繁多,形态特征多样并且具有很强的突变能力,除此之外,大多数微生物在目前都是无法人为培养的^[1]。因此,亟须利用新的技术手段去分离、培养、筛选、鉴定与分析微生物群落。液滴微流控技术是微流控技术的主要分支,是指对极小体积液流(10^{-9} ~ 10^{-15} L)进行精确控制的技术,这一技术的出现为解决很多生物学问题提供了新的方法^[2]。

液滴微流控技术用于微生物研究有以下几个特点:①将微生物封装在液滴中,使得少量甚至单个细胞处于隔离的环境中,消除了生长速率差异和种间竞争的影响^[3],有利于研究复杂样本中的稀有和生长缓慢的微生物,液滴中代谢物的快速积累有助于激活例如群体感应等浓度依赖的生理通路^[4]。②微流控装置能以高达20 000 Hz的频率产生高度均一的液滴并且进行高通量分析,使

得超高通量的鉴定、筛选微生物成为了可能^[5-6]。③在液滴微流控系统中,可根据研究目的定制设计通道和集成多种控制模块以实现液滴的精确操控,包括注入、混合、分散,长时间孵育及分选等操作^[7],因此可以快速且精确的向微生物细胞中引入多种检测试剂和刺激因素^[8-9],制造出多样且可控的环境,以达到高通量且精确的操控微生物细胞的目的^[10]。

微生物的液滴微流控技术主要由以下几个部分组成:①液滴生成,包括生成单相分散的液滴、液滴阵列和由不同材料构成的液滴表面或液滴内组分^[11];②操控液滴和液滴内的组分^[12];③对液滴内微生物进行分析^[13]。将液滴微流控技术与前沿的测序、动态荧光成像等技术以及新的生物信息学分析方法相结合^[14],会极大地帮助我们进一步了解和研究微生物的世界。本文将对近年来液滴微流控技术在微生物研究的多个方面的应用进行介绍和讨论,以期微生物和微流控技术的研究者们提供一

[△] 通信作者, E-mail: pengx@scu.edu.cn

定的参考。

1 微生物的高通量单细胞培养和分离

传统的微生物培养方法不仅培养耗时且需要较复杂的操作,而且由于细菌的种间抑制作用以及有些微生物的生长速度缓慢甚至无法生长导致一部分微生物的信息被忽略。基于液滴微流控的微生物培养技术能够通过把一小群甚至单个微生物置于液滴中培养,避免了种间竞争的影响,达到精确的控制微生物的生长环境以及分离传统方法不能培养的微生物的目的^[3]。

MARTIN等^[15]第一次使用单相分散的液滴用于高通量的微生物培养,证实微液滴均适用于从单细胞到非常高密度的细胞培养。接着,很多基于液滴培养的新技术先后被报道,如用体积低至 10^{-12} L超微小液滴用于细菌群体感应研究,发现一个单细胞也能启动群体感应中的高密度行为^[16]。微生物在独立液体中的生长状态可以通过在明场下记录细胞的数量或基于荧光强度随时间的变化强度来进行动态监测^[17-18]。与可视化的检测技术相比,分子技术,比如定量PCR和基因测序能更加系统性地研究液滴中微生物的生长。VILLA等^[19]开发出MicDrop平台用于在微液滴中分离和培养人肠道微生物,结合DNA测序和16S rRNA定量技术检测肠道微生物中菌种的绝对水平。使用这一技术也可对粪便样本中各类肠道微生物的碳水化合物利用水平进行测定。

基于液滴微流控技术的微生物培养使得从复杂的微生物群落中分离稀有或难培养的微生物变得更加便捷。JIANG等^[20]利用微流控平板划线(microfluidic streak plate, MSP)进行高通量的单微生物分离和培养,微流控装置产生的液滴在预先填充载体油的培养皿上划线,形成固着的液滴阵列。

相比于传统的琼脂平板划线,微流控平板划线具有以下优点:①更高的培养通量及更低的试剂和样本消耗;②消除了种间竞争和生长速率差异的影响;③载体油上的液滴支持长达5个月的单细胞培养;④允许培养过程中用显微镜观察;⑤培养后,可以使用下一代测序技术进行微生物群落分析以及扩大培养;⑥MSP使用液体培养基避免了琼脂凝固过程中产生的过氧化氢,利于分离和培养过氧化氢敏感的微生物。ZHOU等^[21]利用MSP平台从黑胸散白蚁(*Reticulitermes chinensis*)中分离了几株潜在的新菌种。CHEN等^[22]结合MSP和趋化筛选方法从土壤样本中分离出了能降解咪唑啉酮的微生物种类。HU等^[23]利用MSP平台支持长期培养的特性,解决了分离稀有海洋微生物的难题。综上,这些研究证实液体微流控技术

可用于高通量培养来自多种环境中的细菌样本并且能显著提高分离效率。

2 微生物的高通量检测、鉴定和微生物组研究

微生物检测和鉴定对微生物基础研究、食品微生物检验和感染性疾病诊断至关重要^[24]。由于液滴微流控技术高速和高通量的特性,可作为一个用于高通量和高度平行的微生物分析的理想平台。近期,多种检测手段被用于分析微液滴中的微生物,包括各种光学技术、数字PCR和下一代测序技术。

2.1 液滴光学检测技术

将荧光原位杂交技术(*fluorescence in situ hybridization*, FISH)与液滴微流控技术结合可进行高通量的微生物检测和鉴定^[25]。HSIEH等^[26]开开发了刃天青增强微阵列检测(*resazurin-amplified picoarray detection*, RAPiD)用于简便精准地对活细菌进行计数。为了避免荧光标签对细菌正常生理活动的潜在影响,无标记和无创的单细胞拉曼光谱技术(*single-cell Raman spectrum*, SCRS)被应用于微液滴中的微生物检测,它是一种基于分子振动信号的代谢物检测技术,可提供单个细胞内源性的生化“指纹”^[27]。结合SCRS与基因组测序技术,可系统性地研究单个细胞的基因组与代谢组^[28],WANG等^[29]利用且改进了这一技术系统,并发现了酵母中以前从未被鉴定到的两个二酰甘油酰基转移酶变体。

2.2 液滴数字PCR

液滴微流控技术的出现进一步革新了数字PCR技术,并直接催生了液滴数字PCR(*droplet digital PCR*, ddPCR),在ddPCR中,DNA分子被随机送入每个小液滴中并进行常规的PCR,由于反应混合物中含荧光探针,根据荧光强度可计算出原始样本中目标DNA的拷贝数^[30],因此ddPCR可用于对样本中的目的微生物进行检测并定量。ddPCR与测序技术结合可用于测定复杂群落中的单个微生物类群的绝对丰度^[31-32],如用于测定小鼠肠腔和黏膜样本中各细菌种类丰度受饮食的影响。ddPCR在诊断早期病毒感染中也有着优势。DONG等将ddPCR用于禽类腺病毒的快速检测,ddPCR的敏感性比传统的PCR检测方法高1000倍^[33]。后来的研究者对ddPCR进行进一步改进,并用于定量检测BK病毒^[34]、乙肝病毒^[35]、人类乳头瘤病毒^[36]等。将ddPCR改进并用于新冠病毒SARS-CoV-2检测,显著减少了由于咽拭子样本中病毒载量少造成的假阴性率并提高了效率^[37-38]。

2.3 液滴测序技术用于微生物组研究

将液滴微流控与下一代测序技术结合能避免传统的

16S rRNA测序和宏基因组测序导致的单细胞水平上的异质性以及空间微生物组信息的丢失。液滴微流控技术与16S rRNA测序以及宏基因组测序技术的结合产生了MaPS-seq(metagenomic plot sampling by sequencing)技术,该技术是研究复杂生境中微生物空间分布的一种很有前景的技术,它已被用于研究小鼠肠道不同区域的微生物组,揭示了特定种群间的各种分布关系^[39]。SHI等^[40]整合微生物富集微流控装置和基于液滴的MDA(multiple displacement amplification)技术用于制备痰液中呼吸道微生物组的DNA用于宏基因组测序,与直接测序相比,该方法在菌株水平上呈现出更大的微生物群落复杂性和更多的基因组信息,并且对识别原噬菌体和DNA病毒具有更高的敏感性。近期,基于液滴微流控技术的微生物高通量单细胞基因组学技术——Microbe-seq被开发了出来,它可获取大量单一微生物细胞的基因组信息,并将微生物群落的基因组信息精确到菌株水平^[41]。利用该方法从一个健康个体的肠道微生物系统中获取了21 914个单一微生物的基因组信息,从中组装出76个菌种的基因组序列,其中有10个菌种包含不同的菌株。利用这些菌株水平的基因组研究微生物相互作用,构建了在该人体肠道微生物群落中的水平基因转移网络并且发现92组菌种之间的水平基因转移^[41]。

3 基于液滴的共培养技术研究微生物相互作用

微生物相互作用是微生物群落功能和动态的主要驱动因素,利用液滴微流控技术在液滴中对微生物进行共培养,非常适用于高通量地研究微生物在各种环境下的相互作用。PARK等^[41]首先使用微液滴进行细菌共培养,当两个交互共生的菌株被封装进同一个液滴时,它们都可以生存和繁衍。TAN等^[42]在液滴中共培养粪便样本中的亚群落,分离出22个有较强的细菌共生长的液滴,并进行基因组测序以研究细菌亚群落的特征。这一技术也可用于研究微生物的跨界相互作用。JAROSZ等^[43]用液滴微流控技术共培养酵母和细菌,发现少数细菌可诱导酵母的代谢转化,这一策略可用于微生物次级代谢物的筛选。LAM等利用液滴微流控共培养技术研究肺炎球菌间的基因水平转移,发现在短期的细胞间相互作用后,发生了多次重合转移和大块或大片的转移^[44-45]。HSU等^[46]将两个或三个菌种随机混合封装到液滴中进行多个亚群落的平行培养,结合荧光显微镜和计算机快速的测定上千个液滴中每个菌种的绝对丰度,成功构建出不同环境中微生物群落复杂的相互作用网络。

基于液滴的高通量共培养和分离技术可用于筛选具有抗菌活性的益生菌。利用这一策略,SALESKI等^[47]成功从大肠杆菌突变文库中分离出一株高异丁醇产生能力的菌株。在另一个报道中,研究人员将金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)与西伯利亚熊的口腔微生物组置于微流控液滴中共培养,成功筛选出一株有抗金黄色葡萄球菌活性的芽孢杆菌^[48]。

4 抗生素敏感性试验

基于微流控的细菌培养方法是进行自动且快速抗生素敏感性试验的一个很有前景的工具^[49]。近年来,多种基于微流控的方法被开发出来用于抗生素敏感性试验,比如微室、微通道和基于液滴的方法,其中,基于液滴的方法由于其能产生大规模的超小体积液滴用于高通量和高敏感性的检测而被广泛使用^[50]。

BOEDICKER等^[51]最早开发了用于抗生素敏感性试验的液滴微流控平台,可在7 h内对多种药物在多个不同的浓度进行试验。KAUSHIK等^[52]开发了dropFAST平台,将抗生素和活细胞指示剂刃天青以及单一细菌封装在皮升级的液滴中,培养1 h后,测定液滴中的荧光强度用于对活细菌进行定量并评估抗生素敏感性。为了进一步增大测试通量,POSTEK等^[53]开发了一种微流控平台,可以产生一系列乳状液,每份乳状液都含有密集的液滴,并通过第三不互溶相彼此分离。单个细菌被封装在液滴中,每份乳状液包含不同浓度的抗生素和相同浓度的细菌。这一系统使得在单次实验中可对单个细胞的抗生素敏感性试验在一系列抗生素浓度上进行上百次试验。KANG等^[54]设计了一种由4个集成微液滴阵列组成的平台,每个微滴阵列承载8 000多个对接点,可同时筛选四种抗生素/病原体组合,在15~30 min内进行抗生素敏感性评估。

液滴微流控技术也能用于评估抗病毒药物。MASHAGHI等^[55]设计了一种用于筛选候选化合物的病毒融合试验。采用定量荧光探针,在亚秒时间分辨率上测定了甲型流感病毒与微滴中靶脂质体的融合动力学数据。从候选药物在病毒融合动力学方面的特征可获取药物作用机制的相关信息。此外,为了确定潜伏期逆转剂对HIV再激活的影响,研究者开发了一种用于高通量封装HIV感染细胞和直接鉴定HIV感染细胞的微流控装置^[56]。利用其对从接受抗逆转录病毒治疗的患者获得的单个CD4⁺T细胞进行分析发现,潜伏期逆转剂在某些情况下增强了活性细胞的转录,而在其他情况下增加了转录活性细胞的数量。

5 工程菌株与微生物资源开发

液滴微流体为菌株改良、代谢产物筛选和生物合成基因簇发现提供了一个有效的平台。JIAN等^[8]设计了一种微生物微滴培养系统,该系统在多达200个液滴中自动执行微生物培养、生长监测和适应性进化,在该系统对甲醇必需型大肠杆菌菌株进行了为期18 d的适应性进化,获得了两株生长速度比亲本菌株更快的菌株。将可能产生氨基酸的菌株和报告菌株封装在液滴中,可以识别自然分泌氨基酸的菌株,研究人员用该方法分离出了三株突变的乳酸乳球菌菌株,与野生型相比,氨基酸分泌增加了5~10倍^[57]。MAHLER等^[58]将报告菌株注射到所有液滴中,对来自自然微生物群落的抗生素产生株进行了高通量筛选。

将宏基因组文库构建与液滴筛选相结合,有助于从微生物中发现生物合成基因簇^[59-60]。MA等^[61]建立了生活自来水样品中大肠杆菌的宏基因组文库,结合液滴微流控技术,他们鉴定到了一种催化效率高、进化起源与其他脂解酶不同的新型酯酶。相似的手段也被用于从黏液相关的肠道微生物群中筛选宿主聚糖降解酶类,结果揭示了肠道细菌尤其是致病菌代谢人类聚糖的新途径^[62]。XU等^[63]开发了一种微流控自动质粒文库富集系统用于对微生物的生物合成基因簇进行分离和测序,该系统已成功应用于从南极土壤宏基因组中分离并测定了I型聚酮合酶基因簇序列。

液滴微流控技术也可用于定向进化,定向进化是蛋白质工程中一种常用的方法,通过模拟自然选择过程,引导蛋白质或核酸实现所需功能^[64]。液滴微流体技术能进行高通量分选的优势使其成为进行定向进化的理想平台。VALLEJO等^[65]建立了一种荧光激活的液滴分选装置,以进化用于合成和修饰人工遗传聚合物的酶。ZURKE等^[66]通过在微液滴中进行单细胞培养,将酶活性测定的灵敏度和DNA回收率提高了一个数量级,使蛋白质工程更易于识别或进化出可应用于合成和化学生物学的新酶。

6 总结与展望

液滴微流控作为一个高通量高分辨率且高度集成化的新兴技术平台,可与多种检测技术结合,在从微生物培养到微生物组学研究再到微生物资源开发利用等方面扮演重要的角色。由于其独特的优势,液滴微流体技术有望成为微生物学家探索微生物世界的基础技术工具。目前液滴微流控技术仍面临着一些挑战。首先,液滴微流控技术用于微生物研究仍有一些技术局限需要突破,如

液滴中物质交换能力有限、难以解决不同微生物种类的需氧量差异等问题。此外,还缺乏标准化的设备和操作流程,只有少量的液滴微流控设备用于特定需求的分析,大多数利用液滴微流控技术的研究仍需要研究人员自己设计并制作微流控设备,设备的制作和操控均存在很大挑战。因此,未来需要对液滴微流控系统进行自动化和简约化改进,为其在微生物研究中的应用提供全方位、标准化的设备和操作流程,继续创新和改进下游的分析手段。相信随着微流控技术的发展,在多学科的高度配合下,液滴微流控技术进一步发展和成熟直至走进每一个微生物实验室,服务微生物学科的研究发展将成为现实。

* * *

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] LOK C. Mining the microbial dark matter. *Nature*, 2015, 522(7556): 270-273. doi: 10.1038/522270a.
- [2] WHITESIDES G M. The origins and the future of microfluidics. *Nature*, 2006, 442(7101): 368-373. doi: 10.1038/nature05058.
- [3] HUYS G R B, RAES J. Go with the flow or solitary confinement: a look inside the single-cell toolbox for isolation of rare and uncultured microbes. *Curr Opin Microbiol*, 2018, 44: 1-8. doi: 10.1016/j.mib.2018.05.002.
- [4] CARNES E C, LOPEZ D M, DONEGAN N P, et al. Confinement-induced quorum sensing of individual *Staphylococcus aureus* bacteria. *Nat Chem Biol*, 2010, 6(1): 41-45. doi: 10.1038/nchembio.264.
- [5] HENGOJU S, TOVAR M, MAN D K W, et al. Droplet microfluidics for microbial biotechnology. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2020, 179: 129-157. doi: 10.1007/10_2020_140.
- [6] BOWMAN E K, ALPER H S. Microdroplet-assisted screening of biomolecule production for metabolic engineering applications. *Trends Biotechnol*, 2020, 38(7): 701-714. doi: 10.1016/j.tibtech.2019.11.002.
- [7] SOHRABI S, MORAVEJI M K. Droplet microfluidics: fundamentals and its advanced applications. *RSC Adv*, 2020, 10(46): 27560-27574. doi: 10.1039/d0ra04566g.
- [8] JIAN X, GUO X, WANG J, et al. Microbial microdroplet culture system (MMC): an integrated platform for automated, high-throughput microbial cultivation and adaptive evolution. *Biotechnol Bioeng*, 2020, 117(6): 1724-1737. doi: 10.1002/bit.27327.
- [9] LAN F, DEMAREE B, AHMED N, et al. Single-cell genome sequencing at ultra-high-throughput with microfluidic droplet barcoding. *Nat Biotechnol*, 2017, 35(7): 640-646. doi: 10.1038/nbt.3880.
- [10] CHURSKI K, KAMINSKI T S, JAKIELA S, et al. Rapid screening of antibiotic toxicity in an automated microdroplet system. *Lab Chip*, 2012, 12(9): 1629-1637. doi: 10.1039/c2lc21284f.
- [11] SHANG L, CHENG Y, ZHAO Y. Emerging droplet microfluidics. *Chem*

- Rev, 2017, 117(12): 7964–8040. doi: [10.1021/acs.chemrev.6b00848](https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00848).
- [12] XI H D, ZHENG H, GUO W, *et al.* Active droplet sorting in microfluidics: a review. *Lab Chip*, 2017, 17(5): 751–771. doi: [10.1039/c6lc01435f](https://doi.org/10.1039/c6lc01435f).
- [13] KAMINSKI T S, SCHELER O, GARSTECKI P. Droplet microfluidics for microbiology: techniques, applications and challenges. *Lab Chip*, 2016, 16(12): 2168–2187. doi: [10.1039/c6lc00367b](https://doi.org/10.1039/c6lc00367b).
- [14] ZHENG W, ZHAO S, YIN Y, *et al.* High-throughput, single-microbe genomics with strain resolution, applied to a human gut microbiome. *Science*, 2022, 376(6597): eabm1483. doi: [10.1126/science.abm1483](https://doi.org/10.1126/science.abm1483).
- [15] MARTIN K, HENKEL T, BAIER V, *et al.* Generation of larger numbers of separated microbial populations by cultivation in segmented-flow microdevices. *Lab Chip*, 2003, 3(3): 202–207. doi: [10.1039/b301258c](https://doi.org/10.1039/b301258c).
- [16] BOEDICKER J, VINCENT M, ISMAGILOV R. Supporting information for mMicrofluidic confinement of single cells of bacteria in small volumes initiates high-density behavior of quorum sensing and growth and reveals its variability. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2009, 48(32): 5908–5911. doi: [10.1002/anie.200901550](https://doi.org/10.1002/anie.200901550).
- [17] LIU H, XU X, PENG K, *et al.* Microdroplet enabled cultivation of single yeast cells correlates with bulk growth and reveals subpopulation phenomena. *Biotechnol Bioeng*, 2021, 118(2): 647–658. doi: [10.1002/bit.27591](https://doi.org/10.1002/bit.27591).
- [18] WU H, CHEN X, GAO X, *et al.* High-throughput generation of durable droplet arrays for single-cell encapsulation, culture, and monitoring. *Anal Chem*, 2018, 90(7): 4303–4309. doi: [10.1021/acs.analchem.8b00048](https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b00048).
- [19] VILLA M M, BLOOM R J, SILVERMAN J D, *et al.* Interindividual variation in dietary carbohydrate metabolism by gut bacteria revealed with droplet microfluidic culture. *mSystems*, 2020, 5(3): e00864–19. doi: [10.1128/mSystems](https://doi.org/10.1128/mSystems).
- [20] JIANG C Y, DONG L, ZHAO J K, *et al.* High-throughput single-cell cultivation on microfluidic streak plates. *Appl Environ Microbiol*, 2016, 82(7): 2210–2218. doi: [10.1128/AEM](https://doi.org/10.1128/AEM).
- [21] ZHOU N, SUN Y T, CHEN D W, *et al.* Harnessing microfluidic streak plate technique to investigate the gut microbiome of *Reticulitermes chinensis*. *Microbiol Open*, 2019, 8(3): e00654. doi: [10.1002/mbo3.654](https://doi.org/10.1002/mbo3.654).
- [22] CHEN D, LIU S J, DU W. Chemotactic screening of imidazolinone-degrading bacteria by microfluidic SlipChip. *J Hazard Mater*, 2019, 366: 512–519. doi: [10.1016/j.jhazmat](https://doi.org/10.1016/j.jhazmat).
- [23] HU B, XU B, YUN J, *et al.* High-throughput single-cell cultivation reveals the underexplored rare biosphere in deep-sea sediments along the Southwest Indian Ridge. *Lab Chip*, 2020, 20(2): 363–372. doi: [10.1039/c9lc00761j](https://doi.org/10.1039/c9lc00761j).
- [24] HE Z, WU H, YAN X, *et al.* Recent advances in droplet microfluidics for microbiology. *Chinese Chem Lett*, 2022, 33(4): 1729–1742. doi: [10.1016/j.ccllet.2021.08.059](https://doi.org/10.1016/j.ccllet.2021.08.059).
- [25] LIU W, KIM H J, LUCCHETTA E M, *et al.* Isolation, incubation, and parallel functional testing and identification by FISH of rare microbial single-copy cells from multi-species mixtures using the combination of chemistode and stochastic confinement. *Lab Chip*, 2009, 9(15): 2153–2162. doi: [10.1039/b904958d](https://doi.org/10.1039/b904958d).
- [26] HSIEH K, ZEC H C, CHEN L, *et al.* Simple and precise counting of viable bacteria by resazurin-amplified picoarray detection. *Anal Chem*, 2018, 90(15): 9449–9456. doi: [10.1021/acs.analchem.8b02096](https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b02096).
- [27] HE Y, WANG X, MA B, *et al.* Ramanome technology platform for label-free screening and sorting of microbial cell factories at single-cell resolution. *Biotechnol Adv*, 2019, 37(6): 107388. doi: [10.1016/j.biotechadv.2019.04.010](https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.04.010).
- [28] XU T, GONG Y, SU X, *et al.* Phenome–genome profiling of single bacterial cell by Raman-activated gravity-driven encapsulation and sequencing. *Small*, 2020, 16(30): 2001172. doi: [10.1002/smll.202001172](https://doi.org/10.1002/smll.202001172).
- [29] WANG X, XIN Y, REN L, *et al.* Positive dielectrophoresis-based Raman-activated droplet sorting for culture-free and label-free screening of enzyme function *in vivo*. *Sci Adv*, 2020, 6(32): eabb3521. doi: [10.1126/sciadv.abb3521](https://doi.org/10.1126/sciadv.abb3521).
- [30] OU Y, CAO S, ZHANG J, *et al.* Droplet microfluidics on analysis of pathogenic microbes for wastewater-based epidemiology. *Trends Analyt Chem*, 2021, 143: 116333. doi: [10.1016/j.trac.2021.116333](https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116333).
- [31] BARLOW J T, BOGATYREV S R, ISMAGILOV R F. A quantitative sequencing framework for absolute abundance measurements of mucosal and luminal microbial communities. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 1–13. doi: [10.1038/s41467-020-16224-6](https://doi.org/10.1038/s41467-020-16224-6).
- [32] MANZARI C, ORANGER A, FOSSO B, *et al.* Accurate quantification of bacterial abundance in metagenomic DNAs accounting for variable DNA integrity levels. *Microb Genom*, 2020, 6(10): mgen000417. doi: [10.1099/mgen.0.000417](https://doi.org/10.1099/mgen.0.000417).
- [33] DONG G, MENG F, ZHANG Y, *et al.* Development and evaluation of a droplet digital PCR assay for the detection of fowl adenovirus serotypes 4 and 10 in attenuated vaccines. *J Virol Methods*, 2019, 265: 59–65. doi: [10.1016/j.jviromet.2018.09.005](https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2018.09.005).
- [34] XU L, QU H, ALONSO D G, *et al.* Portable integrated digital PCR system for the point-of-care quantification of BK virus from urine samples. *Biosens Bioelectron*, 2021, 175: 112908. doi: [10.1016/j.bios.2020.112908](https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112908).
- [35] JIANG Y, MANZ A, WU W. Fully automatic integrated continuous-flow digital PCR device for absolute DNA quantification. *Anal Chim Acta*, 2020, 1125: 50–56. doi: [10.1016/j.aca.2020.05.044](https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.05.044).
- [36] YU Z, LYU W, YU M, *et al.* Self-partitioning SlipChip for slip-induced droplet formation and human papillomavirus viral load quantification with digital LAMP. *Biosens Bioelectron*, 2020, 155: 112107. doi: [10.1016/j.bios.2020.112107](https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112107).
- [37] YU F, YAN L, WANG N, *et al.* Quantitative detection and viral load analysis of SARS-CoV-2 in infected patients. *Clin Infect Dis*, 2020, 71(15): 793–798. doi: [10.1093/cid/ciaa345](https://doi.org/10.1093/cid/ciaa345).
- [38] CHEN L, YADAV V, ZHANG C, *et al.* Elliptical pipette generated large microdroplets for POC visual ddPCR quantification of low viral load. *Anal Chem*, 2021, 93(16): 6456–6462. doi: [10.1021/acs.analchem.1c00192](https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c00192).
- [39] SHETH R U, LI M, JIANG W, *et al.* Spatial metagenomic characterization of microbial biogeography in the gut. *Nat Biotechnol*, 2019, 37(8): 877–883. doi: [10.1038/s41587-019-0183-2](https://doi.org/10.1038/s41587-019-0183-2).
- [40] SHI X, SHAO C, LUO C, *et al.* Microfluidics-based enrichment and

- whole-genome amplification enable strain-level resolution for airway metagenomics. *mSystems*, 2019, 4(4): e00198-19. doi: [10.1128/mSystems.00198-19](https://doi.org/10.1128/mSystems.00198-19).
- [41] PARK J, KERNER A, BURNS M A, *et al*. Microdroplet-enabled highly parallel co-cultivation of microbial communities. *PLoS One*, 2011, 6(2): e17019. doi: [10.1371/journal.pone.0017019](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017019).
- [42] TAN J Y, WANG S, DICK G J, *et al*. Co-cultivation of microbial sub-communities in microfluidic droplets facilitates high-resolution genomic dissection of microbial 'dark matter'. *Integr Biol*, 2020, 12(11): 263–274. doi: [10.1093/intbio/zyaa021](https://doi.org/10.1093/intbio/zyaa021).
- [43] JAROSZ D F, BROWN J C, WALKER G A, *et al*. Cross-kingdom chemical communication drives a heritable, mutually beneficial prion-based transformation of metabolism. *Cell*, 2014, 158(5): 1083–1093. doi: [10.1016/j.cell.2014.07.025](https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.07.025).
- [44] LAM T, MAIENSCHNEIN-CLINE M, EDDINGTON D T, *et al*. Multiplex gene transfer by genetic transformation between isolated *S. pneumoniae* cells confined in microfluidic droplets. *Integr Biol*, 2020, 11(12): 415–424. doi: [10.1093/intbio/zyz036](https://doi.org/10.1093/intbio/zyz036).
- [45] LAM T, BRENNAN M D, MORRISON D A, *et al*. Femtoliter droplet confinement of *Streptococcus pneumoniae*: bacterial genetic transformation by cell-cell interaction in droplets. *Lab Chip*, 2019, 19(4): 682–692. doi: [10.1039/c8lc01367e](https://doi.org/10.1039/c8lc01367e).
- [46] HSU R H, CLARK R L, TAN J W, *et al*. Microbial interaction network inference in microfluidic droplets. *Cell Syst*, 2019, 9(3): 229–42.e4. doi: [10.1016/j.cels.2019.06.008](https://doi.org/10.1016/j.cels.2019.06.008).
- [47] SALESKI T E, KERNER A R, CHUNG M T, *et al*. Syntrophic co-culture amplification of production phenotype for high-throughput screening of microbial strain libraries. *Metab Eng*, 2019, 54: 232–243. doi: [10.1016/j.ymben.2019.04.007](https://doi.org/10.1016/j.ymben.2019.04.007).
- [48] TEREKHOV S S, SMIRNOV I V, MALAKHOVA M V, *et al*. Ultrahigh-throughput functional profiling of microbiota communities. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115(38): 9551–9556. doi: [10.1073/pnas.1811250115](https://doi.org/10.1073/pnas.1811250115).
- [49] ZHANG K, QIN S, WU S, *et al*. Microfluidic systems for rapid antibiotic susceptibility tests (ASTs) at the single-cell level. *Chem Sci*, 2020, 11(25): 6352–6361. doi: [10.1039/d0sc01353f](https://doi.org/10.1039/d0sc01353f).
- [50] HASSAN S U, ZHANG X. Microfluidics as an emerging platform for tackling antimicrobial resistance (AMR): a review. *Curr Anal Chem*, 2020, 16(1): 41–51. doi: [10.2174/1573411015666181224145845](https://doi.org/10.2174/1573411015666181224145845).
- [51] BOEDICKER J Q, LI L, KLINE T R, *et al*. Detecting bacteria and determining their susceptibility to antibiotics by stochastic confinement in nanoliter droplets using plug-based microfluidics. *Lab Chip*, 2008, 8(8): 1265–1272. doi: [10.1039/b804911d](https://doi.org/10.1039/b804911d).
- [52] KAUSHIK A M, HSIEH K, CHEN L, *et al*. Accelerating bacterial growth detection and antimicrobial susceptibility assessment in integrated picoliter droplet platform. *Biosens Bioelectron*, 2017, 97: 260–266. doi: [10.1016/j.bios.2017.06.006](https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.06.006).
- [53] POSTEK W, GARGULINSKI P, SCHELER O, *et al*. Microfluidic screening of antibiotic susceptibility at a single-cell level shows the inoculum effect of cefotaxime on *E. coli*. *Lab Chip*, 2018, 18(23): 3668–3677. doi: [10.1039/c8lc00916c](https://doi.org/10.1039/c8lc00916c).
- [54] KANG W, SARKAR S, LIN Z S, *et al*. Ultrafast parallelized microfluidic platform for antimicrobial susceptibility testing of Gram positive and negative bacteria. *Anal Chem*, 2019, 91(9): 6242–6249. doi: [10.1021/acs.analchem.9b00939](https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b00939).
- [55] MASHAGHI S, Van OIJEN A M. Droplet microfluidics for kinetic studies of viral fusion. *Biomicrofluidics*, 2016, 10(2): 024102. doi: [10.1063/1.4943126](https://doi.org/10.1063/1.4943126).
- [56] YUCHA R W, HOBBS K S, HANHAUSER E, *et al*. High-throughput characterization of HIV-1 reservoir reactivation using a single-cell-in-droplet PCR assay. *eBioMedicine*, 2017, 20: 217–229. doi: [10.1016/j.ebiom.2017.05.006](https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.05.006).
- [57] HERNANDEZ-VALDES J A, AAN De STEGGE M, HERMANS J, *et al*. Enhancement of amino acid production and secretion by *Lactococcus lactis* using a droplet-based biosensing and selection system. *Metab Eng Commun*, 2020, 11: e00133. doi: [10.1016/j.mec.2020.e00133](https://doi.org/10.1016/j.mec.2020.e00133).
- [58] MAHLER L, NIEHS S P, MARTIN K, *et al*. Highly parallelized droplet cultivation and prioritization of antibiotic producers from natural microbial communities. *eLife*, 2021, 10: e64774. doi: [10.7554/eLife.64774](https://doi.org/10.7554/eLife.64774).
- [59] GUO L, ZENG W, XU S, *et al*. Fluorescence-activated droplet sorting for enhanced pyruvic acid accumulation by *Candida glabrata*. *Bioresour Technol*, 2020, 318: 124258. doi: [10.1016/j.biortech.2020.124258](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124258).
- [60] SCHIRMER M, WINK K, OHLA S, *et al*. Conversion efficiencies of a few living microbial cells detected at a high throughput by droplet-based ESI-MS. *Anal Chem*, 2020, 92(15): 10700–10708. doi: [10.1021/acs.analchem.0c01839](https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c01839).
- [61] MA F, GUO T, ZHANG Y, *et al*. An ultrahigh-throughput screening platform based on flow cytometric droplet sorting for mining novel enzymes from metagenomic libraries. *Environ Microbiol*, 2021, 23(2): 996–1008. doi: [10.1111/1462-2920.15257](https://doi.org/10.1111/1462-2920.15257).
- [62] TAUZIN A S, PEREIRA M R, Van VLIET L D, *et al*. Investigating host-microbiome interactions by droplet based microfluidics. *Microbiome*, 2020, 8(1): 1–20. doi: [10.1186/s40168-020-00911-z](https://doi.org/10.1186/s40168-020-00911-z).
- [63] XU P, MODAVI C, DEMAREE B, *et al*. Microfluidic automated plasmid library enrichment for biosynthetic gene cluster discovery. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48(8): e48. doi: [10.1093/nar/gkaa131](https://doi.org/10.1093/nar/gkaa131).
- [64] NING R, FAN J, KONG L, *et al*. Recent developments of droplets-based microfluidics for bacterial analysis. *Chinese Chem Lett*, 2022, 33(5): 2243–2252. doi: [10.1016/j.ccl.2021.08.096](https://doi.org/10.1016/j.ccl.2021.08.096).
- [65] VALLEJO D, NIKOOMANZAR A, PAEGEL B M, *et al*. Fluorescence-activated droplet sorting for single-cell directed evolution. *ACS Synth Biol*, 2019, 8(6): 1430–1440. doi: [10.1021/acssynbio.9b00103](https://doi.org/10.1021/acssynbio.9b00103).
- [66] ZUREK P J, HOURS R, SCHELL U, *et al*. Growth amplification in ultrahigh-throughput microdroplet screening increases sensitivity of clonal enzyme assays and minimizes phenotypic variation. *Lab Chip*, 2021, 21(1): 163–173. doi: [10.1039/d0lc00830c](https://doi.org/10.1039/d0lc00830c).

(2022 – 06 – 16收稿, 2023 – 04 – 23修回)

编辑 姜 恬

