

# 分而治之——微液滴中的核酸分析化学研究

廖珮宇<sup>1</sup>, 黄岩谊<sup>1,2,3,4,5,6\*</sup>

1. 北京大学工学院, 北京 100871
2. 北京大学生物医学前沿创新中心, 北京 100871
3. 北京未来基因诊断高精尖创新中心, 北京 100871
4. 北京大学化学与分子工程学院, 北京 100871
5. 北京大学-清华大学生命科学联合中心, 北京 100871
6. 深圳湾实验室细胞分析研究所, 深圳 518132

\*通讯作者, E-mail: [yanyi@pku.edu.cn](mailto:yanyi@pku.edu.cn)

收稿日期: 2020-07-14; 接受日期: 2020-08-17; 网络版发表日期: 2020-09-15

国家重点研发计划(编号: 2018YFA0108100)、国家自然科学基金(编号: 21525521, 21927802)、北京脑科学及类脑研究中心和北京未来基因诊断高精尖创新中心资助项目

**摘要** 微液滴本身并不是一个全新的概念或者新现象, 但随着近年来基于微液滴中的反应来进行生命分析化学研究, 并推广至生命科学与医学的应用中, 却成为了一个新趋势。微液滴生命分析化学领域的重点研究方向有两个: 适合于生物分子高精度定量检测的液滴生成方式; 利用均匀微液滴进行超越以往表现的分子检测, 特别是与核酸分析结合的应用。本文中, 我们结合该领域的发展趋势与本课题组自身的研究经历, 梳理了微液滴生命分析化学的关键技术发展和应用, 最后从自身研究经历出发提出该领域当今的一些挑战, 以期能够引发同行的思考, 开拓研究思路。

**关键词** 液滴, 核酸分析, 微流控, 微反应器, 生化检测

## 1 引言

进入21世纪, 生命分析化学很快成为当前分析化学研究的主流方向。过去20年, 面向复杂生物体系, 分析化学方法和技术都发生了巨大的变化。这些变化具体表现在以下三个方面: (1) 目标分析物的定量精确化。生命分析化学早已摆脱定性检测或半定量检测的阶段, 而是形成了追求定量, 乃至精确定量, 更甚至到了分子级别的超精确定量的传统, 而这一趋势从根本上助推了生命科学和医学的快速发展。(2) 所观测生

物体系的微观化。我们所关注的分析对象, 从原先的整体样本或组织层面上的分析, 到现今的细胞水平、亚细胞水平乃至单分子层面上的分析, 尺度不断缩小, 空间分辨率不断提高。(3) 分析数据的多维化。随着分析手段的不断丰富与完善, 我们可以获取到不同维度的生物大数据进行关联分析, 得以用更加全局系统的方式来看待复杂的生物机体。可以说, 生命分析化学技术的发展, 从根本上推动了生命科学的研究方式发生改变, 成为一门日益定量的科学。

很多生物学家都认为, 21世纪前20年贡献最大、

引用格式: Liao P, Huang Y. Divide and conquer: analytical chemistry of nucleic acids in droplets. *Sci Sin Chim*, 2020, 50: 1439–1448, doi: [10.1360/SSC-2020-0133](https://doi.org/10.1360/SSC-2020-0133)

影响最深远的生物技术工具可能是“下一代基因测序”(next generation sequencing, NGS)<sup>[1,2]</sup>。这项技术彻底改变了人类理解遗传物质的方式，并且由于其自身的快速发展，越来越低廉的价格与可及性让更多的应用变得可能——不仅让学术机构受惠，而且在临床应用方面也可以看到新的曙光。更重要的，新的测序方法已经让人们不满足于用摩尔、克、升这类体量单位，就连微升、纳克、皮摩尔有时也不能满足要求，因为它们的精确度还是不够，而直接到了分子拷贝级别。现在的科学前沿正是在众多单个细胞水平上展开研究与分析，由此引发的挑战也因此升级——众多问题的最终问号都直指更微小尺度下的复杂生物信息。这些信息的获取也要求更高：极微量的生物样本、高通量、高重复性、高效率、高标准的高精度。

在生命科学领域中NGS技术的异军突起，并没有让大多数科学家意识到其实背后的重要推动力是生命分析化学的几个关键技术，如微流控技术和微量核酸扩增检测技术。其实，这两个技术不仅催生了NGS，其同时也被NGS的发展所不断促进，相辅相成。本文主要评述的微液滴核酸扩增技术，正是微流控技术和微量核酸扩增的组合。随着NGS技术发展迅猛，其正发挥出独特的优势和强劲的发展势头。

微流控技术的优势在于处理微升以下体积的液体样品，而在以往的实验条件下生化反应难以处理此类样品，更得不到有效的产物或者数据。大多数时候，这一体积尺寸是在聚二甲基硅氧烷(PDMS)或玻璃这样的固体“芯片”架构上通过微加工手段而制备的微小反应室来实现的<sup>[3]</sup>。而利用水相和油相之间自然的相分离行为，通过合理地使用表面活性剂，形成稳定的相互隔绝的液滴，则是另外一种实现高效率微反应体积的巧妙方式<sup>[4]</sup>。目前在生命分析化学领域，微液滴正在发挥越来越重要的作用。

除了在少部分应用中允许液滴是不均匀的情况外<sup>[5]</sup>，大部分液滴微流控技术都要求液滴尺寸均一而且大小适中。这些均匀液滴的尺寸在数微米到一百微米左右，随着液滴直径横跨两个数量级，其体积跨度可以达到六个数量级，从飞升至纳升级别。传统的物理化学概念上，将“微乳液滴”用来特指尺寸在微米以下的乳液系统<sup>[6]</sup>，而微流控研究领域往往把尺寸在微米以上的液滴体系，统称为“微乳液滴”<sup>[7]</sup>。

生物化学反应通常在水溶液中进行，所以我们关

心的微液滴体系都是“油包水”的体系，液滴通过表面活性剂分隔油水界面让水相成分稳定地存在于油相体系中，从而达到分离隔绝的作用。于此同时，每个液滴中的反应都是相对独立的，我们可以设法让它们拥有相同的化学环境、温度等，也可以对特定的反应进行条件的区分。这样的设计增加了成千上万个相互隔绝的反应器，在每个反应器内，都是相对独立的，不受到另一个液滴里面反应的影响，也就是进入了“分而治之”的状态。这些数目众多的微反应器在处理样品数目多但是单个样本体量少的生物样品处理与分析问题上有着天然的优势，在数字核酸定量<sup>[8,9]</sup>、单细胞核酸扩增与建库<sup>[10]</sup>、单个细菌或细胞分选<sup>[11~14]</sup>、蛋白质结晶<sup>[15,16]</sup>中有着深远的意义。

下文对液滴微流控技术的发展与应用展开分析，试图为读者提供一个更加清晰的视角；最后，我们根据自身在此领域多年的研究经验，对此领域未来的发展进行展望。

## 2 液滴微流控技术的发展

使用液滴的第一步是形成液滴，而形成液滴的过程作为液滴生成的技术基石长久以来成为这方面研究的开端步骤。在液滴生成的过程中需要保证液滴生成数目足够多，液滴体积、尺寸足够均匀，同时能够兼容后续的生化反应。早期，主要用于形成液滴的微流控手段主要是两种芯片内连续流动的液滴生成办法：T型流路芯片(T-junction channels, TJC)与共流聚焦(co-flow focusing, CFF)<sup>[17]</sup>。TJC芯片将被分散相(通常是水溶液，水相)置于T字垂直方向，同时分散相(通常是含有乳化剂的油)处于T字上方的水平方向<sup>[18]</sup>。在这样的流路设计下，水平方向上的油相周期性地割裂水相，切割成段的水溶液即可在自身表面张力的作用下收缩成液滴<sup>[19]</sup>。由于每个液滴形成周期中物理因素相同，液滴的尺寸标准差可以得到控制。由于水相被切割的过程是由流体界面的切向力提供的能量与动力，水油两相的黏度是影响液滴大小的主要因素<sup>[19]</sup>。

CFF芯片结构<sup>[20]</sup>的出现尽管在TJC芯片之后，却是目前被应用最多的，原因在于其对称的设计能够产生更加均匀的液滴。水相在T型流路中被切割过程中的拖尾是不对称的，因此更加难以控制。共流聚焦的设计大多呈“十”字型，竖直方向上分别有一路油相向中

间汇聚, 而水平方向上有一路向中间汇聚的水相。在汇聚连接处上下汇聚的油相挤压水相形成液滴。其中的切接力积蓄的能量到达一定阈值引发水相断裂, 故而在三路液流速度稳定的情况下, 水相被切断的过程是周期性的<sup>[19]</sup>, 由此得到大小均匀的液滴。在绝大多数的设计中, 两侧的油相流路被设计成对称的, 方便控制其中的液滴大小。在我们的实践中发现, 两侧即便是不对称的, 有一些流速或者管道宽度上的差异也同样可以生成均匀的液滴, 但是可控性远小于对称的设计。在这个管路的设计中, 出口流路的管壁通常需要做疏水修饰, 以防止液滴碰到管壁后与管壁发生融合。在CFF设计中, 油相黏度、水相黏度以及两相流速差异共同决定了生成液滴的大小。其中两相各自的黏度增加, 都能提供更大的切向力, 同时流速更大也有同样的效果; 在更大的切向力下, 汇流口更早地积蓄到拉断所需的能量, 从而产生出尺寸更细的液滴。不得不说, 许多研究者从流体力学与流体流变学的角度尝试分析了其中关系, 对液滴生成中的力学模型建立了良好的解释<sup>[19,21]</sup>, 但是我们在实际操作中发现, 若要稳定地产生目标尺寸的液滴仍需要大量的手动优化。

微流控阶梯液滴生成办法(microfluidic step emulsification, MSE)<sup>[22]</sup>是另一种生成飞升级别液滴的有效方法。连续相几乎静止地被容器固定在一个微流腔体中, 而被分散相先是在一个内宽较小的微流管道中流动, 后进入这个充满乳化油的腔内<sup>[22,23]</sup>。在进入的入口处, 又一个突然的阶梯, 此阶梯90°直角连接一个很深的槽, 从而在此出口处形成液滴<sup>[24]</sup>。其中原因是在阶梯出口的转变会让出来的水液面, 而随着后续液体的推动, 从月牙形到半圆形最终到接近满月的形状, 此时由于液滴尺寸足够大, 并且受到了腔体内部的挤压, 如此小的液滴对应着很大的表面曲面张力, 从而挣脱原来的水相液流, 形成了独立的液滴。此物理过程严格受到水相表面张力、油黏度、管道设计等因素影响, 因而每一次过程都是精确重复的, 因为产生的液滴大小一致。在报道的许多文献中, MSE方法得到的液滴直径相对标准差小于2%, 生成的频率可以高达11 kHz<sup>[9]</sup>。与CFF相比, MSE需要在微流控芯片的垂直深度维度方向做出阶梯, 故而在芯片制作上需要更多工序而带来额外的困难——这个可能是其在实际的工业应用中还没有普及的原因。

以上三种方法, 利用的都是恒定液流的剪切力来

实现液滴生成, 意味着稳定的液滴产出高度依赖于稳定的液体驱动, 也意味着常常不能做到即用即成, 因为液体的驱动通常需要一段时间来稳定。因此有许多研究致力于生成即时液滴生成的方法。大部分的此类液滴生成办法可以被归结于电场的变化, 利用电脉冲的瞬时能量驱动水相液体的瞬时快速移动, 加上芯片中的构造使得液滴形变后不能直接与原来的部分融合, 从而被“掐”出一个液滴<sup>[24]</sup>。

微流控的发展在早期受益于软蚀刻(soft lithography) PDMS芯片的许多良好特性, 发展迅猛, 这些特性能够满足许多基础的需求, 加上其灵活可控, 能够满足二维、三维的多样化设计与多种控制<sup>[25,26]</sup>, 一段段时间内成为微流控技术的标准。但是随着时间推进, 人们逐渐发现这类材料芯片的一些固有问题。尽管后续一些商业化的玻璃芯片或者硬质塑料芯片从某种程度上可以做到标准化生产、精细化加工, 并个性化地提供特殊功能, 但是价格相对较贵。更重要的是, 这些基于芯片的微液滴生成, 对实验操作的要求比较高<sup>[27]</sup>, 需要配套不少相关的仪器设备来共同完成芯片中的实验环节<sup>[28]</sup>。例如, 芯片微流控产生液滴, 至少需要两个恒定压力或者流量的流路动力, 也就是微流泵, 通常还需要一个显微成像系统来负责监控液滴产生的过程是否正常; 此外, 还有液滴转移与保存的设备, 或许需要温度控制系统, 液滴大小分析的软件系统; 如果液滴内有荧光反应, 显微系统还必须能够荧光成像, 这样需要加装特殊的光源或者光路。这些设备尽管在生化实验室中常见, 但是对于非科研场所, 很难全部配齐。可以见得, 仅仅用芯片作为工具, 或多或少地让微流控技术难以走出科研实验室的大门, 而一个技术的长足发展, 势必需要在应用中得到正反馈<sup>[29]</sup>。

为了进一步推动微流控技术走向应用端, 领域内的不少工作在此方面作出了良好的示范作用<sup>[30-32]</sup>。近年来, 在液滴微流控方面主要体现出两个发展的趋势: (1) 液滴生成技术的非芯片化, 即脱离芯片, 采用其他的制式或者仪器提供动力生成均匀液滴; (2) 集成化的液滴生成技术, 将原本需要多个零散仪器通力合作生成液滴的方式转变为一一体机、一键式的生成模式。

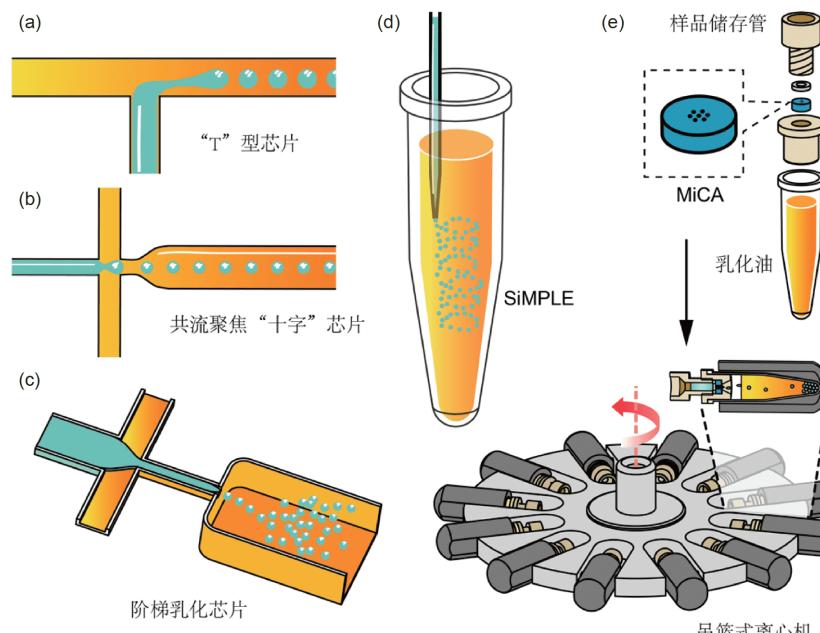
Bio-Rad公司与10X Genomics公司是目前依靠微流控技术开展生物分析的两个主要的设备和应用提供者。前者主要利用油包水技术开展数字PCR, 后者则从利用液滴进行单细胞测序文库准备入手, 他们都需要

标准化的液滴生成仪器以配合用户展开实验。事实上，他们采用的都是十字交叉的CFF结构芯片，并配合集成化的泵与监控系统。这样的设计可以让传统生物学背景的研究者足以展开他们设计好的实验，而不用担心各个控制过程给他们带来不必要的问题。但是这些仪器的缺点也十分明显。为了弥补芯片本身的缺点，耗材成本高昂让他们的市场更多集中在科研领域。同时敞开式的体系与可能的液滴损失也是让许多研究者为难的细节。

本课题组在过去的研究中试图从基本原理出发，解决这些问题。其中一个方向就是研究新型液滴的产生方式(图1)，试图提供更加方便、容易操作的新装置。旋转微针头液体乳化(spinning micro-pipette liquid emulsion, SiMPLE)是本课题组<sup>[33]</sup>于2016年提出的一种全新的液滴生成方法。将常见的硅硼玻璃在一定温度下热拉拔，从而形成直径约为10 μm的微针尖端口。在平口端利用恒定流量的泵驱动水相液体流出微针尖端口。同时，整个针头在伺服电机的驱动下做圆周平

动，下端浸没在含有表面活性剂的乳化油中。由此水相液体被注入油中，并在规律的油水界面剪切力的作用下形成均匀的液滴。这种方法的好处是操作相对简单，而且玻璃微针的制作简单廉价，有着明显的优势。在该工作中，为了证明液滴的稳定性与生物体系兼容能力，我们还利用液滴开展了单细胞全基因组扩增的应用。该技术发明极大地简化了液滴的生成方式，让由至少两个液路控制减少到了一个。在油黏度与针头线速度固定的情况下，液滴大小仅靠流速控制，由此大大简化了操作过程。同时液体在管路内可以完全排出，液体从静止到达到稳定流速几乎不消耗时间。而芯片内的CFF或TJC结构均需要两个流动的液相都达到稳定速度之后才能产生大小均匀的液滴。

然而，SiMPLE技术距离完美的液滴生成技术还有一定的距离，因为其并没有完全摆脱微流控体系中常见的外置装备，如合适的电机与微流泵，同时整个操作过程相对而言比较粗放，适合很多化学实验但是对于非常在意样品纯度和污染的核酸扩增来说，还是不



**图1** 液滴生成方法: 从芯片内走向多种简便易行的“无芯片”设计。(a) “T”型芯片(TJC); (b) “十字”交叉的共流聚焦芯片(CFF); (c) 阶梯乳化芯片(MSE); (d) SiMPLE液滴生成方法(在电机驱动下，毛细玻璃管在乳化油中做圆周运动，而其中匀速流动的水相溶液在界面张力切割下形成均匀液滴); (e) MiCA离心液滴生成方法(带有微孔的玻璃片上装有反应溶液，在吊篮式离心机中形成众多微小的均匀液滴)(网络版彩图)

**Figure 1** Droplet generation methods are first based on chip platform and later chip-free designs continue to develop. (a) T-junction chip (TJC); (b) cross-shape co-flow focusing chip (CFF); (c) microfluidic step emulsification chip (MSE); (d) SiMPLE method for droplet generation (Actuated by a motor, capillary glass tube moves circularly in the emulsion oil, which periodically pinches off the steady liquid flow from the capillary glass tube); (e) MiCA method under centrifugation for droplet generation (On top of the MiCA plates sample liquid is loaded, which is to be transformed into numbers of monodisperse droplet in a swing-bucket centrifuge) (color online).

够讲究。为了进一步简化液滴生成的过程，同时最大程度上减少死体积，并杜绝可能的核酸污染，本课题组<sup>[34]</sup>继而于2017年提出了一种利用微毛细管阵列板(MiCA)通过离心力来产生液滴的方法。在该方法中，待乳化形成均匀液滴的水相溶液被盛放在玻璃质地的MiCA上，而每个MiCA都有多个大小完全一致的微毛细管，其孔径为6 μm。整个液滴生成的小装置组装在一起，作为一个小的零件放入离心管内，在MiCA下方，事先放好接受液滴的乳化油。经过离心机的高速离心，上层的水溶液经过微孔道在下方流出。在很高的转速下，由于离心力大，在流出很少体积时候就会被“拽”出来，在空中形成液滴而后落入下方的乳化油，形成乳状液。这种方法可以十分灵活地形成数目众多的液滴，而且液滴直径更小。一旦事先装备好液滴生成装置，就可以利用实验室常见的离心机完成液滴生成，而且全过程几乎没有样品的损失。紧接着，我们利用该方法尝试做数字链式聚合酶反应(数字PCR)。结果发现，该方法因为有更小的液滴直径，液滴数目在现在商业机型的10倍以上，因而有更宽的动态范围。同时，液滴与PCR反应的兼容性良好，液滴信噪比、阴阳液滴之间信号差异明显。

液滴微流控的技术要素很大一部分是流体的精密控制，即如何稳定地形成乳化液滴。但是，如何让液滴稳定存在并能够长久保存，还能与多种生物化学反应体系兼容也是其在生命分析化学中得以应用的重要一环。由于通过MiCA离心来产生液滴是没有先例的，我们在理解这个物理过程并优化合适的表面活性剂和油相配方时，遇到前所未有的挑战。首先，液滴在飞行进入下方乳化油的时候有可能被撞成细碎的小液滴；其次，很多看似稳定的乳液配方，并无法承受PCR反应所需要经历的高温和低温交替循环，而会导致液滴的融合。为此，我们系统性地研究了此前的相关乳液配方，通过细致地分析和尝试，最终通过反复比较得到了一款最能满足这一通过离心来产生单分散稳定液滴的乳化配方<sup>[35]</sup>。这些基础的数据，不仅记录了实验的细节，同时还是很重要的基础数据，能够帮助到相关领域的研究同行。

### 3 液滴技术的应用发展

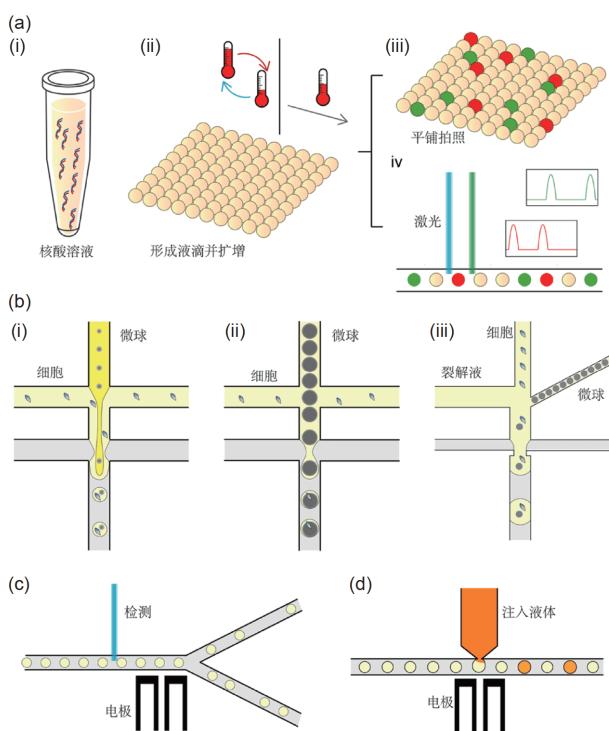
液滴技术的发展就是从应用端开始的。例如，聚合

物化学的乳液聚合技术可能是最早利用液滴作为独立分隔反应器的例子之一。在二代测序技术发展初期，为了扩增出适用于后续扩增的DNA文库，将核酸样品包在乳液中，然后进行扩增<sup>[9,27,36]</sup>。这样就能保证单个液滴中的核酸扩增序列是一致的。但是当时并没有能发展出易用可控的液滴微流控技术，所以采用的是振荡法来形成液滴，其尺寸高度不均匀<sup>[37]</sup>。而后随着微流控技术的介入，大小均一的液滴凸显出诸多优势，不仅保障了化学环境相同，还同时保障了参与反应的物质量的高度一致。

在应用方面，现在成型的微液滴参与的核酸分析化学过程主要是数字PCR与单细胞测序，它们都形成了商业产品。数字PCR的基本原理是将带检测定量的核酸样品分散成众多独立隔绝的空间中，然后含有目标核酸片段的微反应空间会经扩增得到荧光信号，最终统计得到总体阳性分隔的比例从而推断核酸分子数目(图2(a))。单细胞测序中要利用到液滴是因为每个参与分析的细胞需要打上标记，这个标记是事先合成好的，已知的核酸序列往往合成在一个固相载体上，现有的方法都采用了不同形式的微球/微珠。在液滴内裂解的细胞会释放核酸，RNA或者DNA然后与固相载体上脱落的寡链核酸链接，这样每个细胞就用了自己独特的标记<sup>[38-40]</sup>。

在液滴实现单细胞或单细菌分选是多酶工程、定向进化等领域的潜在有力工具，因为高通量正是液滴技术的特点所在，也正是单细胞、单细菌分选最需要的性能之一。为此，Xi等<sup>[41]</sup>发明的主动液滴分选技术或许提供了一个较优的解决方案。他们利用液滴在电场中的偏转让荧光识别阳性的液滴在流动中发生方向偏转。可以想象，该技术如果能够大规模集成化为专门工业器件，将有十分广泛的实际应用。值得一提的是，液滴一旦形成便不易在其中添加新的反应成分，这使得大多数在液滴中进行的反应是“一锅煮”的，这无疑让许多反应无缘液滴。皮升注射(picoinjection)技术的提出为解决此类问题提供了一个良好的开端<sup>[42]</sup>。该技术利用电脉冲让液滴与加入的组分融合，又利用油的冲击让液滴离开：这种短暂融合相对可控地实现了液滴的在线添加，是液滴技术工具箱中极有意义的部分。

在意识到均匀液滴的巨大优势之后，我们很早展开了微流控液滴在单细胞核酸扩增方面的应用。单细胞基因测序需要对众多单个细胞分别测定其核酸成



**图 2** 应用于一些生化反应的微流控液滴技术. (a) 数字核酸定量技术. 核酸溶液(i)形成众多液滴并利用热循环或者恒温的核酸扩增方法(ii)以放大信号; 检测其中荧光信号的方法可以是平铺拍照(iii)或者逐个激光测量(iv). (b) 三种单细胞RNA建库平台: inDrop (i)<sup>[38]</sup>、Drop-seq (ii)<sup>[39]</sup> 及10X Genomics (iii)<sup>[40]</sup> 公司的方案. 这些方法中, 芯片设计使得所产生的每个液滴包裹的尽可能是一个单细胞, 然后液滴内完成细胞裂解、逆转录与扩增. (c) 芯片内液滴挑选. 液滴经过检测装置使电极作出相应, 让液滴进入特定的流道<sup>[41]</sup>. (d) 液滴注入技术. 在瞬时电压下, 液滴表面发生瞬时变化从而与上方注入的水相短暂融合, 后再流动推动下分开<sup>[42]</sup> (网络版彩图)

**Figure 2** Microfluidic techniques applied in some biochemical reactions. (a) Digital quantification of nucleic acids. The nucleic acid solution (i) is partitioned to form numbers of droplets and go through thermal cycling or isothermal incubation (ii) for signal amplification; the fluorescence signal can be realized by imaging tiled droplets (iii) or serial reading (iv). (b) Three single-cell RNA library platforms: (i) inDrop [38]; (ii) Drop-seq [39]; (iii) the solution of 10X Genomics [40]. In these methods, chips are designed to form droplets that encapsulate single cell as possible. (c) In-chip droplet selection: droplets passing by are detected and trigger electrodes to divert its direction [41]. (d) Droplet injection: under a voltage pulse, droplet surface undergoes sudden change so that merges to the liquid flow and soon get pushed away by the flow [42] (color online).

分, 然而单个细胞中DNA和RNA含量均极其稀少<sup>[43]</sup>. 对于DNA, 每个片段只有一个拷贝, 在这样的前提下, 如何将单个细胞中的核酸物质保真地进行有效扩增便成为一个问题. 单细胞DNA扩增所追求的高保真性表现在三个方面: 高覆盖度(由于拷贝数少, 有些区段不

会被扩增出来)、低错误率(扩增反应中酶天然会发生一定几率的碱基错配)、高均衡性(每个区段被扩增得到的产物数目应该尽可能的与原来保持一致). 关于这三个方面, 本课题组<sup>[44]</sup>于2015年提出的单细胞乳液全基因组扩增(emulsion whole genome amplification, eWGA)方法在很大程度上超越了此前的单细胞扩增办法. 在eWGA方法中, 将单个细胞先裂解出来, 让DNA变成长度数千bp的片段分散于扩增反应液中, 然后利用CFF芯片生成油包水液滴包裹其中的DNA分子. 我们采用多位点替换等温扩增反应(multiple displacement amplification, MDA)来扩增每个液滴中的片段<sup>[44]</sup>. 传统的做法是, 单个细胞裂解后, 在一个约20 μL的体系内进行MDA反应, 使得单个细胞基因组内的每一个位点都有可能被扩增出来. 但是, 这种方法无法很好地控制各个位点之间的扩增均衡性, 因为每个位点开始扩增的时间并不一致, 而早期结合了引物开始扩增的区间随着反应时间推移扩增速度会越来越快, 导致实验中止的时候或者反应物趋于耗尽时, 不同片段之间拷贝数的差异巨大. 这种扩增的偏向性, 随机性强却很严重, 很难通过简单方法校正, 所以在很多应用中会带来错误或者误差, 使得方法的应用受到很大限制. 而将模板分子随机分布到大量分散的均匀液滴里, 则由于每个液滴大小相同、化学环境相同, 片段的随机扩增偏向性与扩增起始时间造成的差异被抹平, 因此可以大大提升整体扩增的均衡性. 同时, eWGA方法也可以通过足够的扩增时间让原本难以被扩增的区段被扩增出来, 从而提高了覆盖度. 这个方法在压制MDA偏向性的同时, 让我们还是可以继续享受到其所使用的Phi29聚合酶的高保真度, 从而减少扩增错误的产生. 这个方法更新了单细胞全基因组扩增的传统范式, 也从原理上突破了液滴的应用范围. 在随后的工作中, 我们利用SiMPLE改进了原本繁杂的、利用芯片来产生液滴的方式, 进一步地让单细胞DNA扩增简化优化<sup>[33]</sup>. 而后, 在MiCA技术的基础上, 我们进一步通过离心吊篮的改造来实现高通量的MiCA乳液产生方式, 实现单细胞全基因组扩增测序的批量化处理<sup>[45]</sup>.

为了填补RNA的扩增方法空缺, 改善原本RNA单细胞扩增技术中的一些缺陷, 在eWGA的启发下, 我们提出了一种实验步骤上简单易行的微液滴转录组扩增方法, 命名为“easier-seq”<sup>[46]</sup>. 这种简单却高效的方法利

用随机六聚核苷酸链作为引物进行逆转录，而后通过MDA扩增得到均匀的文库，使得RNA单细胞分析能够更加精准，细胞分群、转录组相互作用与复杂生物系统动态研究变得更加便利<sup>[46]</sup>。

目前，单细胞转录组测序的工作，大多数都已经转移到液滴包裹的编码细胞方式上了。这种策略，在短短几年就发展成为主流实验手段，主要有三方面原因：(1) 该方法借助于微流控技术和自动化控制，大大简化了操作；(2) 通过微球编码细胞，实现高通量的单细胞测序；(3) 测序建库方法的发展不断进行，很多都在为液滴内的反应进行优化。目前，流程较为成熟或者有稳定产品可以采购的有三个方法，分别是Drop-seq、inDrop和10X Genomics的商品化方案。我们曾经客观地比较过这三种方法的差异和各自的优劣性<sup>[47-49]</sup>，在此不再赘述。

前面提到的数字PCR，也是利用液滴做核酸扩增的微型容器，与做全基因组或者全转录组的扩增相比，最大的差别就是其扩增的片段是特定的少数几个。数字PCR的要点，也是要把反应体系分散到很多独立的反应器里，而这些反应器，可以是固相材料所界定的“硬容器”，如离心管、多孔板、微流控芯片上加工的反应室等。我们课题组也曾在微流控芯片架构下实现了36 fL尺度下的单分子核酸扩增用于数字PCR反应<sup>[50]</sup>，这也许已经接近核酸扩增单个容器的极限体积了。最近一些年，数字PCR的反应体系越来越被液滴这样的“软容器”所取代，主要包括三个驱动因素：(1) 芯片载体上的固相微反应器数目通常是固定的，也不容易做得很大，限定了数字PCR动态范围，也因此失去灵活性；而微液滴可以灵活调整体积和数量，对其他实验条件的容忍性大大增加。(2) 固相微反应器通常都需要相对复杂的表面修饰工艺或者封装工艺，增加了整体的技术难度；而液滴通过不互溶的相分离通常就可以做到很好的效果。(3) 从PCR反应的实际操作出发，液滴形式的反应分隔方式，可以将所有的反应转移在传统的PCR仪器上进行操作，大大拓展了方法的通用性和普适性。针对数字PCR方法的各种细节考虑和综合评价，可以参看本课题组之前发表的综述<sup>[29]</sup>。

#### 4 总结与展望

微米尺度均匀微液滴能够将水相反应体系分隔成

众多微小的反应单元，将反应器数目提升3~6个数量级。这种天然优势在面对生物大分子的逐个处理上有着特殊的意义，如同集成电路之于单个晶体管，效率的提升引发质的飞跃。在过去的时间里，众多研究已经在原理上证明了微乳液滴的巨大潜能，如单细胞测序的扩增建库和数字PCR的应用，还可以拓展到其他等温核酸扩增反应、蛋白质结晶与分析、细胞和细菌筛选等诸多方面。这些方面有一个共同的特点，就是分析对象已经不是均质溶液范畴，而是面对生物大分子级别与细胞级别的分析化学。液滴的引入带来以下三个方面变化：(1) 众多分隔的微型化反应空间，可以让生物化学分析精确到单个大分子与单细胞层级。(2) 由于拥有众多独立分隔空间，单个大分子与单细胞因而有了天然的“身份编号(ID)”。具体在实施过程中，这个ID可以对应显微镜下的像素坐标，或者通过微流控通道的时间戳，或化学标记结果，如单细胞测序中人工合成的核酸序列或者加入微球的荧光编码。(3) 分析数据的多维化、聚类化从而导致分析这些多个独立反应的时候需要采用统计学的思维，这一点在单细胞测序的研究中已经发展出了一系列生物信息学工具，想必在此发展趋势之下，会延伸到其他目标物的分析中。

可以预见，液滴技术在未来的应用大有可为。围绕微液滴的科学问题覆盖了多个技术环节，从液滴的生成，到识别，到分选等，都大有讲究。当前大部分研究还集中在这个流程的前半段，而液滴形成之后的处理与信号获取才是关键，还需要更多的投入。总体来说，液滴微流控在技术层面还有诸多挑战，从我们的研究经历来看，这些挑战主要表现在：(1) 仍然需要有更多更好的方法来实现液滴产生方法的简单化、装置的轻便化，目前看来，操作轻便度是经济成本与物料成本的关键所在。(2) 围绕微流控众多技术环节需要在应用中落实。如液滴分选、可控融合与拆分、液滴重捕、标记与控制位移等技术环节尽管出现了不少实验室级别的研究，但是距离可推广的技术水平来说还显得零散与单薄。(3) 水相配伍会干扰油水界面的稳定性，而界面物理化学理论并没有形成完备的规律来起到有效的指导作用，目前，这方面急需更多的基础研究来填补实际应用中的空缺。(4) 液滴中的信号提取方式还不够丰富，与传统分析化学仪器的结合没有做好。目前液滴内的信号提取大多是荧光信号，而这还远远不够，其中色

谱数据、质谱数据乃至核磁数据都可以极大地帮助人们识别生物大分子与单细胞各中的差别。

微流控作为一门工具学科分支, 终极目标在于形成产品, 以服务于真实世界中生物化学分析需求。现在的液滴微流控发展, 处于学术机构与企业并驾齐驱的状态。前者关注基本原理探索与新方法的开发, 后者则似乎是另一个学科——因为在方法明确的条件下, 形成工业级别的规模化生产的难点是众多学者很少思考的问题。这个矛盾集中体现在以下三点: (1) 微流控器件的规模化生产是长期困扰大家的难题, 加工过程对尺寸精度要求高、控制精度要求高、表面化学修饰要求高以及清洁度要求高。(2) 操作轻便化是液滴相关技术, 乃至微流控领域工业化永恒的主题。许多方法效果不差、造价不贵, 但是落地难, 其原因在于许多操作问题并没有被开发者解决而匆忙交给了用户, 不少企业因此折戟沉沙。(3) 液滴微流控本是个众多学

科交汇的前沿, 而开发团队往往面临人员背景单一化的情况, 最终导致许多短板没有被很好地补齐。

与众多研究人员一样, 我们团队在以往的几年内也充分领略并发挥了液滴的特点, 也在众多问题中循序渐进, 解决了部分问题, 主要集中在核酸分析方面。尽管目前该领域有着诸多挑战与问题, 但是趋势在即——未来的生物分析化学必定是朝向生物个体的, 这种个体是一个人、一块组织、一个细胞乃至一个生物大分子。这些源于生命机体中的复杂的、变化的、互动联结的信号一定需要更加精细的数据获取方式。总的来说, 液滴微流控重在“分而治之”以解决生命分析难题, 其中如何“分”——形成均匀液滴, 如何“治”——调控液体性能、获得分析数据。囿于作者眼光有限, 并不能在此分享具体的倡议, 而是将上述梳理的一些挑战与我们过往的所思所想分享给同行, 以期有所裨益。

**致谢** 本文离不开黄岩谊课题组在过去十几年来在相关领域努力工作的成员: 门涌帆博士、张先念博士、傅语思博士、陈子天博士、周文雄博士、张芳丽、刘璐、姜梦成、邵心阳。本文中图片得到了张芳丽的帮助。黄岩谊还要特别感谢北大化学学科: 我在这里读本科的时候, 恰逢庆祝北大化学学科85周年, 上课之余还帮忙布置三角地的系史展览。布展时得以认识骆初平师兄, 有幸经他指点, 在黄春辉先生的课题组学习做一些科研, 研究界面上分子组装行为, 并一直做到了研究生阶段, 成为我博士学位论文的一部分。而20年后, 我自己课题组的一部分研究竟然还回到了两相界面上, 真是自有天意。在本文评述的这部分工作中, 我的两个最主要的合作者谢晓亮教授和王建斌教授, 也分别是北大化学1980级的学长和2004级的学弟, 实属幸运。祝北大化学110岁生日快乐!

## 参考文献

- 1 Mardis ER. *Annu Rev Anal Chem*, 2013, 6: 287–303
- 2 Zhang J, Chiodini R, Badr A, Zhang G. *J Genet Genomics*, 2011, 38: 95–109
- 3 Whitesides GM. *Nature*, 2006, 442: 368–373
- 4 Kobayashi I, Neves MA, Uemura K, Nakajima M. *Procedia Food Sci*, 2011, 1: 123–130
- 5 Yen GS, Fujimoto BS, Schneider T, Kreutz JE, Chiu DT. *J Am Chem Soc*, 2019, 141: 1515–1525
- 6 Schramm LL, Stasiuk EN, Marangoni DG. *Annu Rev Prog Chem Sect C-Phys Chem*, 2003, 99: 3–48
- 7 Suea-Ngam A, Howes PD, Srisa-Art M, deMello AJ. *Chem Commun*, 2019, 55: 9895–9903
- 8 Mazaika E, Homsy J. *Curr Protoc Human Genet*, 2014, doi: 10.1002/0471142905.hg0724s82
- 9 Leman M, Abouakil F, Griffiths AD, Tabeling P. *Lab Chip*, 2015, 15: 753–765
- 10 Aigrain L, Gu Y, Quail MA. *BMC Genomics*, 2016, 17: 458
- 11 Pinheiro LB, Coleman VA, Hindson CM, Herrmann J, Hindson BJ, Bhat S, Emslie KR. *Anal Chem*, 2012, 84: 1003–1011
- 12 Gielen F, Hours R, Emond S, Fischlechner M, Schell U, Hollfelder F. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113: E7383–E7389
- 13 Larsen AC, Dunn MR, Hatch A, Sau SP, Youngbull C, Chaput JC. *Nat Commun*, 2016, 7: 11235
- 14 Laos R, Thomson JM, Benner SA. *Front Microbiol*, 2014, 5: 565
- 15 Zheng B, Roach LS, Ismagilov RF. *J Am Chem Soc*, 2003, 125: 11170–11171
- 16 Zheng B, Gerdts CJ, Ismagilov RF. *Curr Opin Struct Biol*, 2005, 15: 548–555

- 17 Zhu P, Wang L. *Lab Chip*, 2017, 17: 34–75
- 18 Thorsen T, Roberts RW, Arnold FH, Quake SR. *Phys Rev Lett*, 2001, 86: 4163–4166
- 19 Utada AS, Chu LY, Fernandez-Nieves A, Link DR, Holtze C, Weitz DA. *MRS Bull*, 2007, 32: 702–708
- 20 Anna SL, Bontoux N, Stone HA. *Appl Phys Lett*, 2003, 82: 364–366
- 21 Sheele GF, Meister BJ. *AICHE J*, 1968, 14: 9–15
- 22 Li Z, Leshansky AM, Mettais S, Pismen LM, Tabeling P. *Lab Chip*, 2015, 15: 1023–1031
- 23 Dangla R, Fradet E, Lopez Y, Baroud CN. *J Phys D: Appl Phys*, 2013, 46: 114003
- 24 Roman GT, Wang M, Shultz KN, Jennings C, Kennedy RT. *Anal Chem*, 2008, 80: 8231–8238
- 25 Theberge AB, Courtois F, Schaeferli Y, Fischlechner M, Abell C, Hollfelder F, Huck WTS. *Angew Chem Int Ed*, 2010, 49: 5846–5868
- 26 Price AK, Paegel BM. *Anal Chem*, 2016, 88: 339–353
- 27 Baker M. *Nat Methods*, 2012, 9: 541–544
- 28 Whale AS, Huggett JF, Cowen S, Speirs V, Shaw J, Ellison S, Foy CA, Scott DJ. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40: e82
- 29 Liao P, Huang Y. *Micromachines*, 2017, 8: 231
- 30 Shen F, Du W, Kreutz JE, Fok A, Ismagilov RF. *Lab Chip*, 2010, 10: 2666
- 31 Chiu DT, Lorenz RM, Jeffries GDM. *Anal Chem*, 2009, 81: 5111–5118
- 32 Hatch AC, Fisher JS, Tovar AR, Hsieh AT, Lin R, Pentoney SL, Yang DL, Lee AP. *Lab Chip*, 2011, 11: 3838
- 33 Chen Z, Fu Y, Zhang F, Liu L, Zhang N, Zhou D, Yang J, Pang Y, Huang Y. *Lab Chip*, 2016, 16: 4512–4516
- 34 Chen Z, Liao P, Zhang F, Jiang M, Zhu Y, Huang Y. *Lab Chip*, 2017, 17: 235–240
- 35 Zhang F, Liao P, Sun Y, Chen Z, Pang Y, Huang Y. *Lab Chip*, 2020, 20: 2328–2333
- 36 Olmedillas-López S, García-Arranz M, García-Olmo D. *Mol Diagn Ther*, 2017, 21: 493–510
- 37 Dressman D, Yan H, Traverso G, Kinzler KW, Vogelstein B. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 8817–8822
- 38 Klein AM, Mazutis L, Akartuna I, Tallapragada N, Veres A, Li V, Peshkin L, Weitz DA, Kirschner MW. *Cell*, 2015, 161: 1187–1201
- 39 Macosko EZ, Basu A, Satija R, Nemesh J, Shekhar K, Goldman M, Tirosh I, Bialas AR, Kamitaki N, Martersteck EM, Trombetta JJ, Weitz DA, Sanes JR, Shalek AK, Regev A, McCarroll SA. *Cell*, 2015, 161: 1202–1214
- 40 Zheng GXY, Terry JM, Belgrader P, Ryvkin P, Bent ZW, Wilson R, Ziraldo SB, Wheeler TD, McDermott GP, Zhu J, Gregory MT, Shuga J, Montesclaros L, Underwood JG, Masquelier DA, Nishimura SY, Schnall-Levin M, Wyatt PW, Hindson CM, Bharadwaj R, Wong A, Ness KD, Beppu LW, Deeg HJ, McFarland C, Loeb KR, Valente WJ, Ericson NG, Stevens EA, Radich JP, Mikkelsen TS, Hindson BJ, Bielas JH. *Nat Commun*, 2017, 8: 14049
- 41 Xi HD, Zheng H, Guo W, Gañán-Calvo AM, Ai Y, Tsao CW, Zhou J, Li W, Huang Y, Nguyen NT, Tan SH. *Lab Chip*, 2017, 17: 751–771
- 42 Azarmanesh M, Dejam M, Azizian P, Yesiloz G, Mohamad AA, Sanati-Nezhad A. *Sci Rep*, 2019, 9: 6723
- 43 Joensson HN, Andersson Svahn H. *Angew Chem Int Ed*, 2012, 51: 12176–12192
- 44 Fu Y, Li C, Lu S, Zhou W, Tang F, Xie XS, Huang Y. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: 11923–11928
- 45 Fu Y, Zhang F, Zhang X, Yin J, Du M, Jiang M, Liu L, Li J, Huang Y, Wang J. *Commun Biol*, 2019, 2: 147
- 46 Fu Y, Chen H, Liu L, Huang Y. *Anal Chem*, 2016, 88: 10795–10799
- 47 Zhang X, Li T, Liu F, Chen Y, Yao J, Li Z, Huang Y, Wang J. *Mol Cell*, 2019, 73: 130–142.e5
- 48 Wu AR, Neff NF, Kalisky T, Dalerba P, Treutlein B, Rothenberg ME, Mburu FM, Mantalas GL, Sim S, Clarke MF, Quake SR. *Nat Methods*, 2014, 11: 41–46
- 49 Wu AR, Wang J, Streets AM, Huang Y. *Annu Rev Anal Chem*, 2017, 10: 439–462
- 50 Men Y, Fu Y, Chen Z, Sims PA, Greenleaf WJ, Huang Y. *Anal Chem*, 2012, 84: 4262–4266

## Divide and conquer: analytical chemistry of nucleic acids in droplets

Peiyu Liao<sup>1</sup>, Yanyi Huang<sup>1,2,3,4,5,6\*</sup>

<sup>1</sup> College of Engineering, Peking University, Beijing 100871, China

<sup>2</sup> Beijing Advanced Innovation Center for Genomics, Peking University, Beijing 100871, China

<sup>3</sup> Biomedical Pioneering Center, Peking University, Beijing 100871, China

<sup>4</sup> College of Chemistry and Molecular Engineering, Peking University, Beijing 100871, China

<sup>5</sup> Peking-Tsinghua Center for Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, China

<sup>6</sup> Institute for Cell Analysis, Shenzhen Bay Laboratory, Shenzhen 518132, China

**Abstract:** Droplet itself is not an entirely new concept or phenomenon, but as research based on the reaction in droplets accumulates and has been gradually applied in life sciences and biomedicine, it has now become a trend. The most focused topics of bioanalytical chemistry using droplets are (1) droplet generation methods for high-precision quantification of bio-molecules and (2) in-droplet molecular detection with extraordinary performance, especially the applications in nucleic acids analyses. From our experiences in the past years, we tried to sort out some mainstream trends in this field and thus discuss the key technological developments and applications. In the end, we summarized several challenges in this field, wishing these open questions can inspire our peer researchers.

**Keywords:** droplets, nucleic acids analysis, microfluidics, micro-reactors, biochemical detection

**doi:** [10.1360/SSC-2020-0133](https://doi.org/10.1360/SSC-2020-0133)