

## 流式细胞分选仪研究进展与展望

孙福齐<sup>1</sup>, 撒昱<sup>1</sup>, 李奇峰<sup>1</sup>, 冯婧文<sup>2</sup>, 韩阳光<sup>1</sup>

1. 天津大学精密仪器与光电子工程学院, 天津 300072; 2. 天津市环湖医院肿瘤放射治疗科, 天津 300222

**【摘要】**流式细胞技术一直是生物细胞研究的重要手段,近年来流式细胞分选仪在细胞富集、筛选后再利用等方面的应用使得对能够满足高通量、高细胞信息提取、高细胞活性要求的流式细胞分选仪的需求增加。本文阐述基于光学探测方法的流式细胞分选仪结构、工作原理及其发展现状出发;提出在光学流式细胞分选仪研究领域出现无标记化和微流控芯片化两种新的发展趋势。在两种发展趋势下,无标记成像方法、微流控片上分选系统和片上压电致动器集成分选等新兴技术越来越多地应用到光学流式细胞分选仪的研发设计中,本文从技术特性、性能优势、应用前景等方面对这些技术的研究进展以及面临的挑战进行了总结和展望,供流式细胞分选技术的使用者及研究者参考。

**【关键词】**流式细胞分选仪;细胞分选与富集;无标记;微流控芯片;综述

**【中图分类号】**R197.39;R318

**【文献标志码】**A

**【文章编号】**1005-202X(2023)07-0890-09

### Advances and prospect of flow cytometer

SUN Fuqi<sup>1</sup>, SA Yu<sup>1</sup>, LI Qifeng<sup>1</sup>, FENG Jingwen<sup>2</sup>, HAN Yangguang<sup>1</sup>

1. School of Precision Instrument and Opto-Electronics Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China; 2. Department of Radiation Oncology, Tianjin Huanhu Hospital, Tianjin 300222, China

**Abstract:** Flow cytometry has always been an essential means for biological cell research. In recent years, the applications of flow cytometer for cell enrichment and post-screening reuse have led to an increased demand for flow cytometers capable of high throughput, high cell information extraction as well as high cell activity. Herein the structure, working principle and current development status of flow cytometer based on optical detection methods are overviewed. In order to meet the new application demands and overcome the inherent defects of the current commercial optical flow cytometer, the trends of label-free and microfluidics chip emerge in optical flow cytometer. The emerging technologies such as label-free imaging methods, microfluidics on-chip sorting systems, and on-chip piezoelectric actuator integrated sorting are increasingly applied to the research and design of optical flow cytometer. The research advances and challenges of these technologies are summarized from the aspects of technical characteristics, performance advantages, application prospects, etc., for providing users and researchers with reference.

**Keywords:** flow cytometer; cell sorting and enrichment; lable-free; microfluidic chip; review

### 前言

流式细胞分析技术是指利用悬浮溶液中细胞在光学、磁学或电学等方面的特异性或通过其他方法标记特征(例如抗体标记),通过流动的方式对细胞进行计数和统计学分析的方法,实现该方法的仪器

称为流式细胞仪,在识别细胞后能够将细胞分离的流式细胞仪称为分选仪。分选仪分离纯化细胞的通量、准确度及其对细胞活性的影响对于特定研究非常重要。

目前,商用流式细胞分选仪几乎都是使用抗体标记作为判别细胞类别的金标准,荧光抗体标记触发的流式细胞分选仪(Fluorescence-Activated Cell Sorter, FACS)和磁抗体标记触发的流式细胞分选仪(Magnetically-Activated Cell Sorter, MACS)是最主要的两种类型,其中FACS最为常见。包括荧光在内,多种基于光学触发的流式分选技术在快速地发展<sup>[1-4]</sup>,尤其是近年来,在稀有细胞富集方面的应用,

**【收稿日期】**2023-01-18

**【基金项目】**国家自然科学基金(82103691)

**【作者简介】**孙福齐,硕士研究生,研究方向:衍射成像流式细胞仪分选,  
E-mail: fqsun321@163.com

**【通信作者】**撒昱,博士,副教授,研究方向:医学物理学,E-mail: sayu@tju.edu.cn

例如通过对与疾病相关的罕见细胞如循环肿瘤细胞和循环胎儿细胞进行分析和分类,可以监测患者的预后情况<sup>[5]</sup>;在再生医疗领域,可以利用稀有细胞如间充质干细胞和造血干细胞开发细胞产品;在肿瘤干细胞领域,利用高通量流式细胞分选仪获取低含量,缺乏特异性标记的肿瘤干细胞;在微藻类细胞的筛选和菌株改良方面的应用,由于许多大尺寸微藻细胞在体内生产和储存油,根据其产油活性对微藻进行分选有望用于生物燃料的生产<sup>[6]</sup>,使用高通量方法来筛选和改良水生环境中发现的高多样性藻类菌株,能够提高单位体积或面积生产力<sup>[7]</sup>;对动物染色体和精子细胞分选后用于人工授精能够在畜牧业上产生很大的经济效益。这些领域的应用也对光学触发流式细胞分选仪提出了更高的要求,例如:高通量(细胞分选速度快,节省细胞富集所需的时间)、高信息量细胞特征提取,以及维持收集细胞高活性等。

FACS的原理是使用荧光探针(可以与抗体分子连接的荧光色素或荧光染料)与细胞(抗原分子)特异性结合,当单细胞队列流经激光束时,荧光探针被激发出特定波长荧光,使用相应波段的滤光片和光探测器(一般是光电倍增管PMT或雪崩二极管APD)观察细胞的光散射和/或荧光强度,评估该细胞含有特定(抗原)分子的数量,从而对细胞识别分类<sup>[8-9]</sup>。经过不断发展进步,FACS已经发展出3个不同的架构方式:20世纪70年代发展的空气激发式(jet-in-air)、20世纪90年代发展的石英杯激发式(cuvette)以及最新的基于微流控芯片的立体激发式分选。然而,现有商品化的FACS通常具有几下方面的缺点:(1)基于荧光触发本身固有的局限性,即荧光标记试剂会改变被染色细胞的行为或活性,从而导致分选后的细胞可能不会表现出与原始细胞相同的特征,进而无法后续使用。然而,如果不使用标记试剂,前向散射和侧向散射结果的准确性和灵敏度会降低<sup>[10]</sup>。(2)FACS完全基于荧光生物标记物和/或光散射强度,而没有借助高信息含量的图像信息,缺少对亚细胞器的定位和多形态特征的分析,如细胞几何形状、细胞核和细胞骨架形状,然而这些信息有助于提高细胞的分类识别精度,尤其是对那些罕见的细胞和没有已知或独特生物标记的细胞的分类识别<sup>[11]</sup>。(3)荧光色素的使用使光学流式细胞仪受到背景干扰、荧光噪声、稳定性降低和寿命缩短的限制。例如,当使用多种染料时,发射波段往往太宽,导致光谱重叠;这就要求通过复杂的光谱重叠补偿算法进行校正<sup>[8]</sup>。(4)对于空气激发式FACS,待分选细胞运动速度相对稳定,延迟时间容易设置,但是如果细胞激发时间太短,就会对仪器配置要求很高,需要高

功率激光器甚至专用激光器冷却系统。石英杯激发式FACS,待分选细胞在流速相对较慢的流体室区域被激发,照射时间更长,可在低功率激光条件下获得较高的检测灵敏度,但是细胞经历了流体室内缓慢区和流体室外加速区两个速度不同的区域,延迟时间设置困难。这两种架构的FACS都避免不了空气气溶胶的危害,为此出现了基于微流控芯片的立体激发式FACS,但截止目前为止与传统架构FACS相比,它的细胞通量有待提高。

为应对高通量、高信息量细胞特征提取和高活性细胞分选的需求,克服传统荧光流式细胞分选仪的固有缺陷,在光学流式细胞分选仪领域,近来出现了很多新兴技术,例如:无标记的拉曼激发流式细胞分选仪(Raman-Activated Cell Sorting, RACS)、时间拉伸成像、定量相位成像、衍射成像流式细胞分选仪、多种片上集成分选系统如介电泳、光电泳、声电泳、电渗、压电陶瓷驱动等。本文将从技术特性、应用前景及发展趋势等方面对传统及各种新兴技术展开讨论,供流式细胞分选技术的使用者及研究者参考。

## 1 光学流式细胞分选仪的原理和发展现状

### 1.1 光学流式细胞分选仪的组成部分和工作原理

光学流式细胞分选仪通常包括5个关键功能单元<sup>[12-13]</sup>。(1)样品溶液泵送:使用液体泵或加压系统将样品溶液送入流体通道,控制液流的流量和速度。(2)流体动力聚焦技术:采用鞘流包裹样品流(核流)的流体聚焦方法,可在微通道的中央形成单细胞队列,便于单个细胞被检测以及后续的分选操作。(3)光学探测系统:通过光学探测器快速获取流道中的大量细胞或颗粒相关的物理或化学特征。(4)细胞分选系统:空气激发式、石英杯激发式FACS的喷嘴式细胞分选或在微流控芯片平台上集成电学、声学、光学、磁学、流体动力学等方法将细胞物理分离并收集到容器中。(5)信号处理系统:对各个模块进行控制、数据采集并处理,对于成像流式细胞分选仪还具有图像重建分类决策功能。

光学流式细胞分选仪工作流程如图1所示,包含悬浮细胞的样品溶液被液流泵或加压系统注入流体通道,在适合的鞘流/核流流速比下,产生流体动力聚焦效果,形成单细胞流,单细胞流队列通过光源照明(或激光聚焦)区时,光学探测获取表达细胞特征的荧光标记信号;最后经分选系统细胞被分离、收集到不同的容器中。

### 1.2 光学流式细胞分选仪的发展现状

目前,基于光学探测方法的商用流式细胞分选

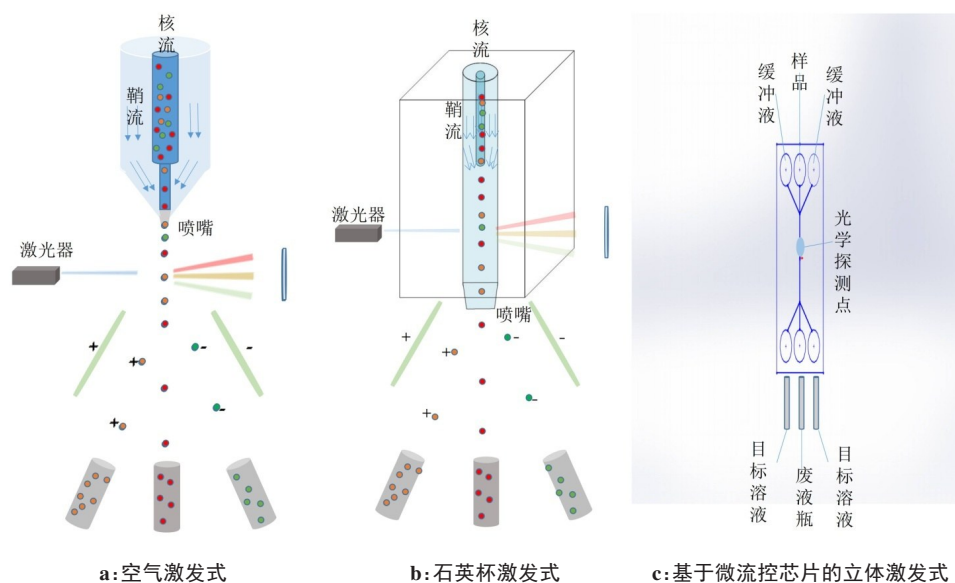


图1 3种架构FACS

Figure 1 Three architectures of FACS

仪以FACS最常见<sup>[14]</sup>,3种不同架构的FACS(图1):空气激发式FACS、石英杯激发式FACS、基于微流控芯片的立体激发式FACS表现出不同的优势。

空气激发式FACS代表型号是Beckman Coulter公司的MoFlo Astrios和MoFlo XDP<sup>[15]</sup>,BD公司的FACS Vantage SE。空气激发式FACS对不同大小颗粒分选时不存在速度差异,对延迟时间优化的要求低,较少的维护也能保持性能稳定,无需担心石英杯老化而产生碎片信号。石英杯激发式FACS代表型号为BD公司的小巧型FACS如FACS meloly Cell Sorter,大型FACS如BD FACSAria Fusion Cell Sorter、BD FACS Aria III Cell Sorter、BD FACSymphony™ S6 Cell Sorter等型号。石英杯激发式FACS将石英反应杯流动池与激光器真正固定对齐使激光精确聚焦在样品流上,从而产生最大的信号强度;同时,细胞或颗粒在流速较慢的流体室内被照射增强了光收集数量,提供了比空气中激发更好的光学检测灵敏度。此外,固定校准可以最大限度地缩短启动时间,实验可重复性好,能够实现自动化日常质量控制。对于以上两类架构的FACS,细胞分选系统结构都为喷嘴式分选<sup>[16]</sup>,系统通过喷嘴产生高频震荡,将连续液流断裂为独立液滴,含有目的细胞的液滴将被系统加电,随后被分选到相应的收集管中。每一台分选仪都有不同大小的喷嘴,喷嘴的直径大小和液流通过喷嘴的流速决定了适合分选细胞的大小和分选速度,喷嘴越小分选的速度就越快,但鞘压也越高;一般喷嘴需要比细胞大4~6倍,喷嘴太小容易令细胞失去活性,也会影响分选的稳定性。

基于微流控芯片的立体激发式FACS代表型号

有Sony公司的MA900、FX500和SH800等,使用一次性的微流控芯片进行细胞分选,同一台FACS可以连续进行不同类型的样品分选,避免了样品之间交叉污染的风险并减少了清洗时间,简化了细胞处理流程<sup>[17]</sup>。FACS的架构方式对仪器的工作性能产生根本性的影响,主要影响荧光检测的灵敏度、液流的稳定性(液流的稳定性一直是流式细胞分选仪实际操作的技术难点)、分选速度和分选延迟时间(细胞从激光检测点到分选区域的时间)的控制和优化,在保持液流稳定性的前提下,仪器对分选延迟时间把握是分选准确的关键。

除了系统架构的根本区别,不同厂商推出的FACS产品都各具特色,下面介绍一些流式细胞分选仪的关键技术参数<sup>[18]</sup>,以便对现阶段FACS的技术发展水平有直观的了解。(1)激光器配置。激光器的个数以及同时检测的激光数目大大影响流式细胞仪的工作性能,更多波长意味着更高的性能,为了最大限度地增加可分析蛋白质和细胞类型的数量,最理想的方式是采用波长间隔较远且间距均匀的激发光,当仪器可以测量的光谱带宽越大时,就越容易容纳更多相互分立的波长。常规的流式细胞仪通常含有4个激光波长和10个检测器,而像BD公司的FACSymphony™ S6 Cell Sorter最多可包含9个激光器可采集60个参数<sup>[19]</sup>。(2)前向散射/侧向散射检测灵敏度。前向散射光的强度与细胞尺寸有关,也就是说,同一个细胞群体,前向散射强的,其细胞尺寸较大,反之亦然;一般FACS最小能够测量到直径为0.2~0.5 μm的细胞或颗粒,例如Beckman Coulter的MoFlo Astrios超高速流式分选系统可对直径为200 nm~30 μm的颗粒同时执行检测和分选任务。



侧向散射的测量主要是用来获得跟细胞内部精细结构和颗粒性质相关的信息,它对细胞膜、胞质和核膜的折射率更为敏感,也能反映细胞内较大的颗粒。(3)荧光灵敏度。荧光灵敏度反映仪器探测最小荧光光强的能力,直接决定待检测指标能否被检测出。可以用等量可溶性荧光分子(Molecules of Equivalent Soluble Fluorochrome, MESF)对荧光灵敏度评价,通常流式细胞分选仪对异硫氰基荧光素荧光检出限 $\leq 200$  MESF,对藻红蛋白的荧光检出限 $\leq 100$  MESF。(4)分析速度和分选速度。分析和分选速度是指FACS每秒钟可分析或分选的数目。根据FACS生产厂商官网信息,细胞分析速度最快可达到1 000 000细胞/s,在高纯度和高产率要求下可以达到12 000~700 000细胞/s的分选速度;而实际工作效果往往达不到厂商提供的数据。(5)分选纯度和回收率。分选纯度是分选得到的目标细胞数量占分选得到的总细胞数量的比例,而回收率是分选得到的目标细胞数量占仪器检测到目标细胞数量的比例,两者相互影响相互制约,需要综合考虑这两个指标。

## 2 光学流式细胞分选仪的发展趋势与研究进展

### 2.1 无标记流式细胞分选仪

**2.1.1 RACS** 拉曼光谱检测是基于分子振动对单色光的非弹性散射,该散射导致入射光子的能量偏移,对应于不同分子键的特征振动能量,拉曼散射可用于生成样品的拉曼光谱。典型的单细胞拉曼光谱(Single Cell Raman Spectrum, SCRS)可以提供细胞的固有化学“指纹”,如核酸、蛋白质、碳水化合物和脂质,从而可以直接检测细胞成分识别不同的细胞类型、生理状态和表型,而不需要荧光标记<sup>[20]</sup>。由于光谱重叠,传统荧光激活检测只能提供多种颜色荧光对比,而拉曼光谱检测的窄光谱特性能够提供比传统荧光激活检测更丰富的细胞信息<sup>[21]</sup>。因此,RACS是一种很有前途的细胞功能分选仪。

2002年黎永清团队<sup>[22]</sup>首先将光镊拉曼光谱技术用于单个活细胞研究;2013年籍月彤团队<sup>[23]</sup>提出了使用拉曼激活细胞弹射将目标从微生物群落中准确分离出来。在这两个系统中,细胞在基质上保持静止,获取SCRS并不困难;然而,间歇性地细胞识别,并将细胞逐个手动分选,使系统具有相当低的分选吞吐量(每分钟几个细胞),阻碍了其在高通量细胞分选中的应用<sup>[20]</sup>。为实现高通量分选,需要使用流式拉曼激活分选仪(Flow RACS)。由于自发拉曼信号本质上很弱,仅有 $1/10^6$ 入射到样品上的光子发生拉曼散射,需要很长的光学接收时间(几秒到几分钟,而FACS通常需要几十微秒)来检测单个细胞<sup>[24]</sup>;

微弱的拉曼信号使得RACS从快速移动的细胞获取SCRS变得不切实际。解决这一瓶颈的策略包括:(1)基于增强拉曼技术提高SCRS采集灵敏度和质量,从而减少SCRS获取时间;(2)将快速移动的细胞与拉曼检测点精确对齐,提高SCRS的获取效率。

为了提高拉曼检测的灵敏度,人们开发了多种新颖的增强拉曼技术,包括:(1)共振拉曼光谱可以将SCRS获取缩短至1 ms,但仅限于含有特定拉曼活性分子的细胞。(2)表面增强拉曼散射可以将拉曼信号增强 $10^6\sim 10^{14}$ 倍,但它对单个细胞的捕获时间为1~10 s,这对于高通量分选来说仍然太长<sup>[25]</sup>。(3)相干拉曼散射方法包括受激拉曼散射和相干反斯托克斯拉曼散射,相干拉曼散射方法产生比自发拉曼光谱测量强几个数量级的信号,可以将光谱捕获时间从自发拉曼散射的1 s量级减少至1 ms甚至1  $\mu$ s量级,因此可以应用到高通量拉曼触发流式细胞分选仪中<sup>[22]</sup>。

对于第二种策略,将快速移动的细胞与拉曼检测点精确对齐,在发展过程中形成了两种主要的结构模式:陷阱式(又称为捕获-释放式)和无陷阱式,如图2所示。捕获-释放式结构是在微流控芯片的拉曼光谱探测区域集成细胞操作技术通过周期性地施加捕获力,准确地将单个细胞捕获在拉曼检测点上,用于拉曼信号采集,然后释放;目前,已经可以将光镊、介电泳、光电镊、磁力、声学力等方法集成到微流体系统上用于流动细胞捕获<sup>[20,26]</sup>。通过施加周期性的正介电泳场将单个细胞捕获、排列,并分别定位到检测点获取SCRS,对含有两种细胞株的混合物进行了分选,在亚秒水平上实现快速拉曼激活细胞分选<sup>[24]</sup>。虽然“细胞捕获”可以满足长时间获取SCRS的需要,但最终捕获机制限制其吞吐量,并且用于捕获的细胞操作方法的效率通常取决于细胞本身的性质如大小、介质电导率、流速。为了进一步提高吞吐量和“对齐”方法的适用性,可以使用3D流体动力聚焦<sup>[27]</sup>、3D声学聚焦<sup>[28]</sup>或2D流体聚焦配合其他保持液流稳定性的方法<sup>[29]</sup>,使细胞以恒定速度单独流过光学探测区<sup>[30]</sup>。第一次实现无陷阱拉曼流式细胞分选,除了利用2D流体动力聚焦将细胞聚焦到检测点,还集成“微流控分压器”消除检测区域的流量波动,使细胞移动速度更稳定,拉曼信号采集更可靠<sup>[28]</sup>。通过用多个鞘流包围样品流来实现3D流体动力聚焦,通过调节样本流和鞘流的速度控制样本流的紧密性和形状,在探测室内精确定位细胞并进行拉曼检测。

结合上述两种策略,采用2D流体动力聚焦与3D声学聚焦配合的“无陷阱式对齐”方法和超快多色受激拉曼散射显微镜成像方法构建的拉曼激活图像分

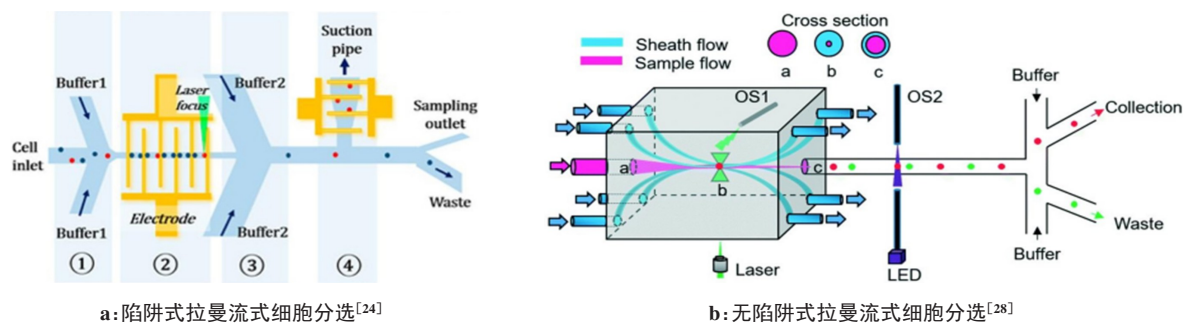


图 2 快速移动细胞与拉曼检测点精确对齐的两种结构模式。

Figure 2 Two structural modes of fast-moving cells with precise alignment of Raman detection points

选系统,吞吐量高达 100 个细胞/s<sup>[29]</sup>。用于在 3D 声学聚焦微流控芯片上对快速流动的细胞通过受激拉曼散射显微镜获取拉曼图像,实现了高达 140 个细胞/s 分选<sup>[27]</sup>。

**2.1.2 无标记成像流式细胞分选仪** 细胞是相位物体,直接利用光学显微镜获取细胞图像具有非常小的对比度<sup>[31]</sup>;因此绝大多数细胞成像技术都使用荧光标记作为图像对比剂,如上文所述,这种对细胞内分子测量的间接方法具有荧光标记的局限性<sup>[23]</sup>。虽然与荧光标记这种生化标记相比,生物物理标记即细胞的形态、机械特性和内在光学特性尚未成为细胞分析的主流,但是越来越多的证据表明,生物物理标记与细胞的分子特征有密切联系,从而为单细胞分析提供了额外的维度<sup>[32]</sup>。因此,无标记成像方法正吸引到越来越多学者的关注,无标记成像不需要增强对比度的染料或标签,它依赖光学装置的组件,利用细胞固有的对比度机制,如形态、厚度和折射率、动力学变化和分子振动等来提高图像对比度。时间拉伸成像<sup>[33]</sup>、定量相位成像<sup>[34-35]</sup>、时间拉伸定量成像以及上文所提及的利用细胞内的分子振动进行“细胞标记”的拉曼成像方法等都属于无标记成像方法。本课题组提出了利用细胞衍射像进行细胞识别的方法,经验证在细胞识别方面具有良好的特异性。

(1)时间拉伸成像。时间拉伸成像通过光谱编码和时间拉伸这两个步骤,避免了普通成像方法灵敏度与速度之间的冲突标准<sup>[33]</sup>。明场成像是时间拉伸成像方法的最简单配置形式,它的图像对比度来自单个粒子或细胞的光散射和吸收;故不足以提供揭示细胞详细形态的高对比图像。为了提高超快帧速率下的成像对比度,人们开发了不同的无标记相位对比度时间拉伸成像模式,例如差分干涉对比度(Differential Interference Contrast, DIC)时间拉伸成像快速获得物体的差分相位对比度图像<sup>[36]</sup>;另外还有非对称检测时间拉伸光学显微镜成像(Asymmetric-Detection Time-Stretch Optical

Microscopy, ATOM)<sup>[37-38]</sup>,与 DIC 成像依赖于干涉的对比度增强机制不同,ATOM 通过不对称地检测光谱编码的脉冲创建时间拉伸图像的相位梯度对比度。光学时间拉伸成像提供了一种高通量无标记细胞成像方法,利用与单细胞生物物理表型相关的图像信息维度补充了基于荧光标记的标准单细胞分析<sup>[32]</sup>。具有高空间分辨率和高灵敏度,与现有的成像流式细胞仪细胞吞吐量相比至少高出 1~2 个数量级(细胞吞吐量高达 100 000 个细胞/s)。时间拉伸成像方法的仪器实现简单,可以和下文中介绍的定量相位成像结合,进一步增强其在无标记单细胞分析中的实用性<sup>[32]</sup>。基于时间拉伸显微镜成像的流式细胞分析系统已被应用于各种科学和工业应用,从图像中识别出单个细胞的形态和纹理特征,可以确定细胞对药物的反应用于药物筛选、研究伴随形态学变化的细胞功能;实现细胞内信息的量化,如代谢物的积累和分布,已将时间拉伸显微镜的应用扩展到代谢工程。

(2)定量相位成像。由于数字图像传感器的使用,研究人员提出了定量相位显微镜技术。定量相位成像同样作为一种无标记成像方法,能够实现振幅和相位信息的可视化<sup>[39-40]</sup>。不同于典型的光学相机仅仅对光强度进行成像,定量相位成像技术利用全息或光子照相等方法找回在光学相机成像中丢失掉的相位信息<sup>[39-40]</sup>。相位延迟程度由细胞的物理厚度和折射率确定,并将其记录为生成图像中的像素值<sup>[31]</sup>。由于折射率分布和诱导相位图携带了物体的结构和化学信息,通过绘制光学相移分布图,定量相位成像在纳米尺度上定量评估细胞的结构和动力学表型<sup>[34-35]</sup>,例如,由于定量相位成像对探测细胞膜动力学具有高敏感性,已被用于红细胞的研究;对纳米级厚度变化的敏感性被用于监测神经网络活动。纳米尺度的细胞结构和动力学表型也可以用作罕见细胞筛查和疾病诊断的无标签生物标记物。此外,相位图的定量性质允许以极高的精度将其转换为细



胞的干质量密度,进而研究细胞生长<sup>[35]</sup>。

(3)时间拉伸定量相位成像。如前文所述,尽管光学时间拉伸成像能够获取高通量携带细胞表型特征的图像数据,但是,时间拉伸显微镜主要在较长波长范围的明场成像模式下工作,因此无法显示透明细胞的高对比度和详细形态,妨碍了细胞的准确识别和筛选<sup>[37]</sup>;而对于定量相位成像来说,定量相位成像依赖数字图像传感器进行图像采集需要权衡成像灵敏度和成像速度<sup>[32]</sup>。因此,时间拉伸定量相位成像技术将前两种成像技术结合起来克服了彼此的缺陷,用于高吞吐量、无标记、根据更加可靠的细胞折射率特征的定量单细胞分析与分选,大大增强了无标记细胞成像的实用性<sup>[41-42]</sup>。

(4)衍射成像。由于细胞内部的光折射率随细胞核、线粒体等细胞器变化,并且与作为背景介质的核流液体折射率不同,当其经过入射激光束时会产生强度与偏振随散射光方向变化的相干散射光,形成衍射光强分布,包含了大量细胞三维形态信息以及分子细胞内折射率分布信息<sup>[44]</sup>。已证明衍射成像在细胞种类识别<sup>[43]</sup>、酵母菌出芽状态判断<sup>[44]</sup>以及细胞凋亡周期判断<sup>[45]</sup>等方面的有效性;将细胞的衍射像和明场像结合在一起对同一个细胞同时进行两种成像,利用传统的机器学习和卷积神经网络分别对两种图像进行识别分类,发现衍射像的正确率始终高于明场像<sup>[46]</sup>;这些证据表明衍射像在细胞的识别上有其优势。

## 2.2 微流控片上分选系统

微流控片上分选系统是将微流控技术和流式细胞分选仪结合在一起实现细胞分选的强有力工具,与传统流式细胞分选仪相比具有更多的优势<sup>[47-51]</sup>;在工作性能方面,微流控装置全封闭、零交叉污染,能尽可能保留细胞活性,更适用于对活细胞分选;使用少量的样品和试剂,就能够提供精确的液流控制;无需重复配置即可在同一台分选仪上实现不同尺寸细胞分选;微流控芯片可以灵活设计,实现多种单细胞分析、操作方案的选择和组合;允许高通量并行分析和操作,可以用于统计意义的单细胞分析和稀有细胞的富集;并且,微流控流式细胞分选仪通常设备小型化,具有良好的便携性和并行化的优点,这种小尺寸的便携式设备不仅易于大规模生产而且制造成本较低,这使得微流控片上分选系统更容易普及和推广。

利用微流控芯片高集成度、易于与其他技术结合的优点,各种微流控片上单细胞操作方法如介电泳<sup>[52]</sup>、光镊、光诱导介电泳<sup>[53-54]</sup>、声电泳<sup>[55-56]</sup>、电渗等已被应用到流式细胞分选仪的设计中。近年来,不

少综述已经对它们的工作原理、结构特点和分选性能等方面做了对比介绍<sup>[47]</sup>。这些单细胞分选操作方法往往有本质上的缺点:例如大多数介电泳方法的细胞操作系统需要低电导率溶液,同时介电泳方法很难区分具有相同电气特性的细胞<sup>[50-51]</sup>。光镊用来分选单细胞具有高精度和非侵入性优势;但施加在细胞上的操作激光力通常为皮牛顿量级,不适合高通量细胞分选;此外,这种技术所需的大量外围光学系统很难小型化,也非常昂贵。光诱导介电泳及其临床应用受到与介电泳相同阻碍,即需在低电导率溶液中操作细胞;Chu等<sup>[54]</sup>发现在一定测试实验条件下光诱导介电泳场会改变癌细胞的细胞活力、细胞代谢活性以及基因表达,证明光诱导介电泳场会影响细胞的固有特性;此外,由于非晶硅的沉积,光诱导介电泳芯片的衬底不透明,基质的不透明性使倒置生物显微镜无法用于活细胞成像<sup>[50]</sup>。声电泳的瓶颈是临界分离细胞大小由声波频率决定,为了分离小细胞( $<1\ \mu\text{m}$ ),这些声发生器需要更高的频率和功率;而高功率声波可能会导致通道中的温度升高,解决加热问题以及设备小型化是一个巨大的挑战<sup>[51]</sup>。

相比之下,微流控芯片上集成压电陶瓷驱动弹性膜泵具有有可能实现高通量细胞分选、更好地保持细胞活性、分选系统简单等多方面的优势,成为在微流体平台上集成细胞分选系统的首选<sup>[57-58]</sup>。本实验室提出的基于偏振衍射成像流式细胞仪的无标记细胞流式分选方法中,细胞分选系统选择的的就是由微流控装置实时分选细胞,下面就关于该方法做出详细的介绍。

## 2.3 使用片上压电致动器集成的光流式细胞分选仪

Chen等<sup>[59]</sup>首次将压电陶瓷集成到微流控芯片上,展示了一种低功率、低电压的片上压电陶瓷驱动单边膜泵细胞分选方法。通过输入电压波形控制的PZT致动器弯曲动作(向上或向下)引入纳升量级的液流横向位移,细胞或颗粒跟随液流偏转进入不同分选通道,细胞偏转的大小可通过输入电压的大小和波形进行精确控制。利用现场可编辑逻辑阵列“实时控制技术”与“空时编码技术”配合对整个分选系统进行闭环控制,还可以跟踪每个细胞的移动路径,在分选后产生“验证信号”用于校正分选控制参数,如施加在PZT致动器上的电压或启动PZT参与分选所需的延迟时间。利用该结构进行大肠杆菌细胞偏转实验表明该分选结构有望进一步优化设计以提供更高的细胞吞吐量。在后来的许多研究中,例如人类细胞和哺乳动物细胞分选<sup>[60]</sup>、单细菌细胞特异性分选<sup>[61]</sup>、以及2019年Gu等<sup>[11]</sup>发表的基于机器学习的实时图像引导细胞分选系统都采用了这种分选结构。

为进一步减小压电陶瓷的变形量从而缓解中心流振动问题,提高分选效率;清华大学 Cheng 等<sup>[62]</sup>和日本名古屋大学 Sakuma 等<sup>[6]</sup>分别提出了压电陶瓷驱动片上单边膜泵的优化版—“推拉机制”压电陶瓷驱动片上双膜泵。“推拉机制”压电陶瓷驱动片上双膜泵细胞分选,在坚持原有工作原理基础上对分选结构做出改进,在微流控芯片主流通道的两侧都设置弹性膜泵,在实现细胞分选时,一侧膜泵推动液流,另外一侧拉动液流,减小了单侧压电陶瓷薄膜的变形,缓解了液流振动问题并提高了分选效率,系统也更稳定。两组研究人员提出的压电陶瓷驱动片上双膜泵结构的不同点是:Cheng 等<sup>[62]</sup>设计的压电膜泵分选装置的两侧膜泵到分选区的距离不同,因此“推”、“拉”动作不同步;而 Sakuma 等<sup>[6]</sup>设计的左右膜泵对称分布,当两侧压电陶瓷受到同步反向电压波形驱动时,“推”、“拉”同时进行。将该分选结构应用到微流控荧光激活流式细胞分选仪上,对含有 6 种细胞混合物样本分选,都得到了稳定且较高的分选效率,对低纯度样品的筛选获得了非常高的富集因子;经证明利用该分选结构分选大、小靶细胞都可以获得不错的吞吐量、成功率、纯度以及细胞存活率数据。在近几年中,智能图像激活细胞分选研究<sup>[12, 63]</sup>和拉曼激活图像细胞分选研究<sup>[29]</sup>也一直使用这种“推拉机制”片上分选结构。通过在片上流体通道中间增设多个光学询问点,检测每个细胞的前向散射光作为“速度计”,以测量微通道内细胞流速,利用现场可编辑逻辑阵列设“时间戳”计算细胞速度并预测分选时间,这可以增强了片上高通量细胞分选的稳定性和分选速度。这种分选结构的另外一个重要优点是对分选细胞或颗粒的大小没有要求,Kasai 等<sup>[64]</sup>对大尺寸( $>100\text{ }\mu\text{m}$ )颗粒进行高通量分选,成功从湖泊沉积物中分离出  $160\text{ }\mu\text{m}$  的微球和纯化出最大尺寸为  $170\text{ }\mu\text{m}$  的化石花粉,并证明其纯度具有非常高的可靠性;他们还通过 COMSOL 模拟和实验证明通过改变左右局部射流速度与主流速度的比值,实现了不同尺寸的细胞和大尺寸颗粒分选。

当然除了上述介绍的压电陶瓷驱动弹性薄膜引起液流偏转实现细胞分选的方法,还有许多使用压电陶瓷致动器实现片上细胞分选的个性化设计,但它们往往结构相对小众,实现难度大,通用性差<sup>[10, 65]</sup>。相比之下,压电驱动弹性薄膜泵的分选更具优势:对颗粒或细胞的大小、形状和密度没有任何限制;不影响细胞活性;结构简单,给高通量、高活性细胞分选提供了选择。

### 3 总结与展望

拉曼激活流式细胞分选仪利用拉曼光谱无损、无标记、高分辨率的特性,为单细胞检测提供了代谢组学信息,是一种无损检测技术,在生物应用中极具吸引力;时间拉伸成像、定量相位成像、时间拉伸定量相位成像、衍射成像等无标记成像方法被越来越多地应用到高通量成像型流式细胞分选仪中,为细胞分类决策提供与细胞的分子特征有密切联系的生物物理标志,从而为单细胞分析提供了额外的维度。“微流控分选芯片”具有全封闭、零交叉污染,保留细胞活性、可灵活设计、高集成度等优势,片上集成压电陶瓷驱动细胞分选系统很好地满足了成本和性能之间的平衡,具有分选系统简单、便携性等优势。这些新的技术和研究趋势给流式细胞分选仪的发展提供了方向。

为解决高通量,高信息量细胞特征提取,以及维持收集细胞高活性等分选需求与目前商用流式细胞分选仪不能满足这种需求的矛盾;我们应该更加重视无标记成像方法在流式细胞分选仪设计上的应用与推广,摆脱传统架构的限制,更多地尝试微流控芯片作为细胞分选平台的方式。本实验室一直致力于流式细胞分选仪的开发工作,目前已经成功研发出实验研究使用的第三代流式细胞分选仪,在无标记细胞实时分选方面也已经取得了一定成就。提出的基于偏振衍射成像流式细胞分选仪的无标记细胞流式细胞分选方法已获得发明专利<sup>[66]</sup>,这种方法基于衍射成像实现无标记成像;应用卷积神经网络对细胞衍射图像分类;借助现场可编辑门阵列进行细胞衍射图像运动捕获与实时识别,整体识别速率最大理论值  $274.0\text{ fps}$ ,其中图像识别模块速率可达  $2\ 823.3\text{ fps}$ ,准确率达到 95% 以上;最后由微流控装置实时分选细胞。

然而实现片上实时分选细胞、提高分选速度和分选准确度还面临许多挑战,其中包括:(1)无标记细胞成像和细胞分类决策都需要一定的时间,因此光学探测点与细胞分选区域之间必须留有一定的距离,这增加了精确控制细胞分选延迟时间的难度。(2)从实时细胞分选扩展到细胞富集和细胞差异性研究,高通量和高信息量细胞特征提取对流式细胞分选仪信号处理能力提出更为严格的要求。以往的研究提出了一些对应的解决方法。对于延迟时间的精确控制,一是想方法准确测量细胞的流速,精确预测细胞到达分选区域的时间以及验证细胞是否分选成功,如上文提到的“空间编码技术”和“速度计”



方法;二是提高细胞分类决策的速度从而缩短光学探测点与分选区的距离,例如通过避免图像重建或者硬件加速神经网络缩短细胞分类决策时间的方法<sup>[11, 67-68]</sup>。对于提高信号处理能力,信号处理系统可能需要同时借助多个CPU、GPU和FPGA配合工作<sup>[12, 38, 63]</sup>,提高信号处理的速度和并行信号处理能力,尽可能降低细胞分选时间,实现实时智能细胞分选。虽然不少专家学者已经贡献了许多可行的解决方法,但是他们往往从一个角度或者从细胞分选流程中的一个工作环节入手,真正实现高通量活细胞分选、富集还有很长的路要走,我们可以学习借鉴各种方案的优点,从细胞成像、细胞分类决策、细胞分选多个环节整体考虑探索更多集成化的解决方案,从而使流式细胞分选仪更能满足高通量,高信息量细胞特征提取,以及维持收集细胞高活性的细胞分选富集需求。

## 【参考文献】

- [1] Mckinnon KM. Flow cytometry: an overview [J]. *Curr Protoc Immunol*, 2018, 12(1). Doi: 10.1002/cpim.40.
- [2] Cho SH, Godin JM, Chen CH, et al. Review article: recent advancements in optofluidic flow cytometer [J]. *Biomicrofluidics*, 2010, 4(4): 43001.
- [3] 杨蕊, 邹明强. 流式细胞术的最新进展 [J]. *分析测试学报*, 2004, 23(6): 124-128.
- [4] Yang R, Zou MQ. New advances in developing flow cytometry [J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2004, 23(6): 124-128.
- [5] 罗栋, 鲁远甫, 焦国华, 等. 光流控流式细胞术的研究进展 [J]. *激光与光电子学进展*, 2013, 50(12): 38-46.
- [6] Luo D, Lu YF, Jiao GH, et al. Research progress of optofluidic flow cytometry [J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2013, 50(12): 38-46.
- [7] Cai K, Mankar S, Ajiri T, et al. An integrated high-throughput microfluidic circulatory fluorescence-activated cell sorting system ( $\mu$ -CFACS) for the enrichment of rare cells [J]. *Lab Chip*, 2021, 21(16): 3112-3127.
- [8] Sakuma S, Kasai Y, Hayakawa T, et al. On-chip cell sorting by high-speed local-flow control using dual membrane pumps [J]. *Lab Chip*, 2017, 17(16): 2760-2767.
- [9] Pereira H, Schulze PS, Schüller LM, et al. Fluorescence activated cell-sorting principles and applications in microalgal biotechnology [J]. *Algal Res*, 2018, 30: 113-120.
- [10] Soares R, Martins VC, Macedo R, et al. Go with the flow: advances and trends in magnetic flow cytometry [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2019, 411(9): 1839-1862.
- [11] Labelle CA, Massaro A, Cortés-Llanos B, et al. Image-based live cell sorting [J]. *Trends Biotechnol*, 2021, 39(6): 613-623.
- [12] Lee K, Kim SE, Doh J, et al. User-friendly image-activated microfluidic cell sorting technique using an optimized, fast deep learning algorithm [J]. *Lab Chip*, 2021, 21(9): 1798-1810.
- [13] Gu Y, Zhang AC, Han YY, et al. Machine learning based real-time image-guided cell sorting and classification [J]. *Cytometry A*, 2019, 95(5): 499-509.
- [14] Isozaki A, Mikami H, Hiramatsu K, et al. A practical guide to intelligent image-activated cell sorting [J]. *Nat Protoc*, 2019, 14(8): 2370-2415.
- [15] Manohar SM, Shah P, Nair A. Flow cytometry: principles, applications and recent advances [J]. *Bioanalysis*, 2021, 13(3): 181-198.
- [16] 史亮. 流式细胞仪的发展历史及其原理和应用进展研究 [J]. *中国设备工程*, 2021(12): 13-14.
- [17] Shi L. Research on the development history, principles, and application progress of flow cytometry [J]. *China Plant Engineering*, 2021(12): 13-14.
- [18] 向承林. MoFlo XDP 超速流式细胞分选仪的使用和管理 [J]. *科技创新与应用*, 2019(26): 190-192.
- [19] Xiang CL. The use and management of MoFlo XDP overspeed flow cytometer sorter [J]. *Technology Innovation and Application*, 2019(26): 190-192.
- [20] 杜立颖. MoFlo 高速流式细胞分选仪 [J]. *现代仪器与医疗*, 2004, 10(2): 46-47.
- [21] Du LY. MoFlo high-performance cell sorter produced by DakoCytomation [J]. *Modern Instruments & Medical Treatment*, 2004, 10(2): 46-47.
- [22] 任晓越, 李敬贤, 熊纓. BD FACSAria III 流式细胞分选仪的常见故障分析 [J]. *中国医疗设备*, 2021, 36(8): 177-180.
- [23] Ren XY, Li JX, Xiong Y. Analysis the failures of the BD FACSAria III flow cytometer [J]. *China Medical Devices*, 2021, 36(8): 177-180.
- [24] 石亚萍, 种银保, 王晴. 高端流式细胞分选仪的选型评价 [J]. *医疗卫生装备*, 2010, 31(10): 122-123.
- [25] Shi YP, Zhong YB, Wang Q. Selection and evaluation of high-end flow cytometer [J]. *Chinese Medical Equipment Journal*, 2010, 31(10): 122-123.
- [26] BD\_FACSymphony\_S6\_Brochure. pdf [EB/OL]. <https://www.bdbiosciences.com/content/dam/bdb>.
- [27] Zhang Q, Zhang PR, Gou HL, et al. Towards high-throughput microfluidic Raman-activated cell sorting [J]. *Analyst*, 2015, 140(18): 6163-6174.
- [28] Gala De Pablo J, Lindley M, Hiramatsu K, et al. High-throughput raman flow cytometry and beyond [J]. *Acc Chem Res*, 2021, 54(9): 2132-2143.
- [29] Xie CG, Li YQ. Confocal micro-Raman spectroscopy of single biological cells using optical trapping and shifted excitation difference techniques [J]. *J Appl Phys*, 2003, 93(5): 2982-2986.
- [30] Wang Y, Ji YT, Wharfe ES, et al. Raman activated cell ejection for isolation of single cells [J]. *Anal Chem*, 2013, 85(22): 10697-10701.
- [31] Zhang PR, Ren LH, Zhang X, et al. Raman-activated cell sorting based on dielectrophoretic single-cell trap and release [J]. *Anal Chem*, 2015, 87(4): 2282-2289.
- [32] Song YZ, Yin HB, Huang W, et al. Raman activated cell sorting [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2016, 33: 1-8.
- [33] Wang XX, Xin Y, Ren LH, et al. Positive dielectrophoresis-based Raman-activated droplet sorting for culture-free and label-free screening of enzyme function *in vivo* [J]. *Sci Adv*, 2020, 6(32): b3521.
- [34] Suzuki Y, Kobayashi K, Wakisaka Y, et al. Label-free chemical imaging flow cytometry by high-speed multicolor stimulated Raman scattering [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019, 116(32): 15842-15848.
- [35] Lyu YK, Yuan XF, Glidle A, et al. Automated Raman based cell sorting with 3D microfluidics [J]. *Lab Chip*, 2020, 20(22): 4235-4245.
- [36] Nitta N, Iino T, Isozaki A, et al. Raman image-activated cell sorting [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 3452.
- [37] McIlvenna D, Huang WE, Davison P, et al. Continuous cell sorting in a flow based on single cell resonance Raman spectra [J]. *Lab Chip*, 2016, 16(8): 1420-1429.
- [38] Kasproicz R, Suman R, O'Toole P. Characterising live cell behaviour: traditional label-free and quantitative phase imaging approaches [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2017, 84: 89-95.
- [39] Lei C, Kobayashi H, Wu Y, et al. High-throughput imaging flow cytometry by optofluidic time-stretch microscopy [J]. *Nat Protoc*, 2018, 13(7): 1603-1631.
- [40] Lau AK, Shum HC, Wong KK, et al. Optofluidic time-stretch imaging—an emerging tool for high-throughput imaging flow cytometry [J]. *Lab Chip*, 2016, 16(10): 1743-1756.
- [41] Masters BR. Quantitative phase imaging of cells and tissues [J]. *J Biomed Opt*, 2012, 17(2): 029901.
- [42] Majeed H, Sridharan S, Mir M, et al. Quantitative phase imaging for medical diagnosis [J]. *J Biophotonics*, 2017, 10(2): 177-205.
- [43] Fard AM, Mahjoubfar A, Goda K, et al. Nomarski serial time-encoded amplified microscopy for high-speed contrast-enhanced imaging of transparent media [J]. *Biomed Opt Express*, 2011, 2(12): 3387-3392.
- [44] Wong TT, Lau AK, Ho KK, et al. Asymmetric-detection time-stretch optical microscopy (ATOM) for ultrafast high-contrast cellular imaging in flow [J]. *Sci Rep*, 2015, 4(1): 3656.
- [45] Lee KC, Lau AK, Tang AH, et al. Multi-ATOM: Ultrahigh-throughput single-cell quantitative phase imaging with subcellular resolution [J].



- J Biophotonics, 2019, 12(7): e201800479.
- [39] Park Y, Depeursinge C, Popescu G. Quantitative phase imaging in biomedicine[J]. Nat Photonics, 2018, 12(10): 578-589.
- [40] Jo Y, Cho H, Lee S Y, et al. Quantitative phase imaging and artificial intelligence: a review[J]. IEEE J Sel Top Quantum Electron, 2019, 25(1): 1-14.
- [41] Guo BS, Lei C, Kobayashi H, et al. High-throughput, label-free, single-cell, microalgal lipid screening by machine-learning-equipped optofluidic time-stretch quantitative phase microscopy[J]. Cytometry A, 2017, 91(5): 494-502.
- [42] Guo BS, Lei C, Wu Y, et al. Optofluidic time-stretch quantitative phase microscopy[J]. Methods, 2018, 136: 116-125.
- [43] Dong K, Feng Y, Jacobs KM, et al. Label-free classification of cultured cells through diffraction imaging[J]. Biomed Opt Express, 2011, 2(6): 1717-1726.
- [44] 丰通. 基于衍射成像流式细胞仪的酵母菌出芽率测量的初步研究[D]. 天津: 天津大学, 2017.
- Feng T. Preliminary study on the measurement of yeast-budding-rate by diffraction imaging flow cytometry[C]. Tianjin: Tianjin University, 2017.
- [45] Feng JW, Feng T, Yang CW, et al. Feasibility study of stain-free classification of cell apoptosis based on diffraction imaging flow cytometry and supervised machine learning techniques[J]. Apoptosis, 2018, 23(5): 290-298.
- [46] Yuan S, Sa Y, Sun P, et al. A flow cell imaging system combined diffraction and bright field microscopy [C]//2019 International Conference on Optical Instruments and Technology: Optical Systems and Modern Optoelectronic Instruments. SPIE, 2020, 11434: 42-50.
- [47] Gong YL, Fan N, Yang X, et al. New advances in microfluidic flow cytometry[J]. Electrophoresis, 2019, 40(8): 1212-1229.
- [48] Stavrakis S, Holzner G, Choo J, et al. High-throughput microfluidic imaging flow cytometry[J]. Curr Opin Biotechnol, 2019, 55: 36-43.
- [49] Wyatt Shields 4th C, Reyes CD, López GP. Microfluidic cell sorting: a review of the advances in the separation of cells from debulking to rare cell isolation[J]. Lab Chip, 2015, 15(5): 1230-1249.
- [50] Luo T, Fan L, Zhu R, et al. Microfluidic single-cell manipulation and analysis: methods and applications[J]. Micromachines, 2019, 10(2): 104.
- [51] Shen YG, Yalikun Y, Tanaka Y. Recent advances in microfluidic cell sorting systems[J]. Sens Actuators B Chem, 2019, 282: 268-281.
- [52] Yao JF, Zhu GP, Zhao T, et al. Microfluidic device embedding electrodes for dielectrophoretic manipulation of cells-a review[J]. Electrophoresis, 2018. Doi: 10.1002/elps.201800440.
- [53] Chiu TK, Chao AC, Chou WP, et al. Optically-induced-dielectrophoresis (ODEP)-based cell manipulation in a microfluidic system for high-purity isolation of integral circulating tumor cell (CTC) clusters based on their size characteristics[J]. Sens Actuators B Chem, 2018, 258: 1161-1173.
- [54] Chu PY, Hsieh CH, Lin CR, et al. The effect of optically induced dielectrophoresis (ODEP)-based cell manipulation in a microfluidic system on the properties of biological cells[J]. Biosensors (Basel), 2020, 10(6): 65.
- [55] Karthick S, Pradeep PN, Kanchana P, et al. Acoustic impedance-based size-independent isolation of circulating tumour cells from blood using acoustophoresis[J]. Lab Chip, 2018, 18(24): 3802-3813.
- [56] Olm F, Lim HC, Schallmoser K, et al. Acoustophoresis enables the label-free separation of functionally different subsets of cultured bone marrow stromal cells[J]. Cytometry A, 2021, 99(5): 476-487.
- [57] Yang R, Fu L, Hou H. Review and perspectives on microfluidic flow cytometers[J]. Sens Actuators B Chem, 2018, 266: 26-45.
- [58] Rothbauer M, Zirath H, Ertl P. Recent advances in microfluidic technologies for cell-to-cell interaction studies[J]. Lab Chip, 2018, 18(2): 249-270.
- [59] Chen CH, Cho SH, Tsai F, et al. Microfluidic cell sorter with integrated piezoelectric actuator[J]. Biomed Microdevices, 2009, 11(6): 1223-1231.
- [60] Cho SH, Chen CH, Tsai F S, et al. Human mammalian cell sorting using a highly integrated micro-fabricated fluorescence-activated cell sorter (microFACS)[J]. Lab Chip, 2010, 10(12): 1567-1573.
- [61] Chen CH, Cho SH, Chiang HI, et al. Specific sorting of single bacterial cells with microfabricated fluorescence-activated cell sorting and tyramide signal amplification fluorescence in situ hybridization[J]. Anal Chem, 2011, 83(19): 7269-7275.
- [62] Cheng Z, Wu XD, Cheng J, et al. Microfluidic fluorescence-activated cell sorting ( $\mu$ FACS) chip with integrated piezoelectric actuators for low-cost mammalian cell enrichment[J]. Microfluid Nanofluidics, 2017, 21(1): 1-11.
- [63] Nitta N, Sugimura T, Isozaki A, et al. Intelligent image-activated cell sorting[J]. Cell, 2018, 175(1): 266-276.
- [64] Kasai Y, Leipe C, Saito M, et al. Breakthrough in purification of fossil pollen for dating of sediments by a new large-particle on-chip sorter[J]. Sci Adv, 2021, 7(16): eabe7327.
- [65] Cai KP, Mankar S, Maslova A, et al. Amplified piezoelectrically actuated on-chip flow switching for a rapid and stable microfluidic fluorescence activated cell sorter[J]. RSC Adv, 2020, 10(66): 40395-40405.
- [66] 撒昱, 丰通, 冯婧文, 等. 基于偏振衍射成像流式细胞仪的无标记细胞流式分选方法: CN108362628A[P]. 2018-08-03.
- Sa Y, Feng T, Feng JW, et al. A flow cytometry sorting method for label-free cells based on polarization diffraction imaging flow cytometry: CN108362628A[P]. 2018-08-03.
- [67] Ota S, Horisaki R, Kawamura Y, et al. Ghost cytometry[J]. Science, 2018, 360(6394): 1246-1251.
- [68] Li YQ, Mahjoubfar A, Chen CL, et al. Deep cytometry: deep learning with real-time inference in cell sorting and flow cytometry[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 11088.

(编辑: 薛泽玲)