

实时单细胞多模态分析仪

概述

细胞功能障碍是疾病发生的基础，因此在单细胞水平上进行肿瘤发生发展研究、药理及抗癌药物研发显得十分必要。现在，科学家们正利用新的单细胞分析技术去发现哪些细胞具有哪些蓝图，以及是如何影响它们的表型的。单细胞水平研究将深远地改变我们了解复杂的细胞群。目前这些研究成果广泛发表于 Nature、science 和 cell 等杂志。以往数十年来的技术，研究人员一直是对细胞群展开分析。人们认为构成这些细胞群的单个细胞例如干细胞和肿瘤细胞差不多是一样的，细胞生物学家们采用的方法获得的都是这些细胞群特征的平均值。德克萨斯大学 MD 安德森癌症中心的遗传学助理教授 Nicholas Navin 说：“当前的方法是整体分析肿瘤，由此报告来自细胞群的平均信号。如采用酶标仪、激光共聚焦、流式分析技术或能量代谢分析仪等研究这些细胞群。但是无论哪种群体细胞研究方案均在技术本身存在局限性：1) 酶标仪检测细胞内的蛋白活性，需要将细胞裂解处理，得到的是细胞群的平均结果，同时还丢失了目标物质的空间位置信息；2) 激光共聚焦虽然可以从成像上，获得细胞内某些生物分子的分布及相对含量信息，在激光扫描过程中为了获得足够的信噪比，需要提高激光强度，而高强度的激光会造成染料分子的光漂白，甚至产生细胞毒素，影响细胞活性，所以没法连续实时监测单个细胞内的生物分子变化情况；3) 流式分析技术也是对细胞群进行高通量荧光分析，可以得到细胞群体的某些生物化学特征参量，但它的检测属于终点法检测（即细胞群培养到一定时间后检测），而且得到的荧光结果不具备空间分辨率（即无法确定目标物质在细胞的哪个位置，细胞膜、细胞质，还是细胞核）；4) 能量分析仪从肿瘤细胞群的两条代谢途径（糖酵解途径和线粒体有氧呼吸途径）上分析细胞微室培养液中的酸化速率和氧气消耗速率，通过这两个指标评估代谢调节药物对于生理的效应，但它没法深入了解药物对细胞的起效机理。

综合看来，单细胞研究相较于群体细胞分析能够有效避免生物信息的“平均化”，细胞

的“异质性”研究可以在更深层次上揭示细胞的增殖、分化、代谢活动规律及细胞间的信号传导等相互作用，是理解生命活动本质、疾病机制、生物种群等方面的重要手段。实时单细胞多模态分析仪在单细胞、实时和光电纳米级检测水平的突破，解决了上述传统方法的问题，并在近几年研究学者基于此方法屡次发表前沿研究和应用转化。

一、一流高校单细胞代谢研究的首选

国内南京大学、浙江大学、上海交通大学、厦门大学、中国科学技术大学、上海理工大学、中国地质大学、北京科技大学、江南大学等知名高校已经采购单细胞多模态分析仪，相关的老师已用该技术在 Cell、PNAS、Nature Metabolism、Nano Letters、Adv. Funct. Mater.等知名杂志上发表了研究成果，研究方向涵盖肿瘤研究、新药研究、神经科学、生物纳米材料等前沿领域。

二、单细胞技术逐渐多样化，尤其缺乏单细胞原位分析技术

从研究流程和维度上分类，单细胞研究技术涉及到细胞分选、基因组学、转录组学、蛋白质组学、代谢组学和细胞相互作用，基因水平的检测主要由测序和 PCR 等分子生物学手段解决，而针对单细胞进行代谢原位分析的技术尤其缺乏，实时单细胞多模态分析仪通过纳米探头实时、连续、定量检测单个活细胞的小分子含量及酶活性，是原位研究单细胞生化代谢的重要工具。

应用层次	技术/工具	原理	特征
细胞分选	有限稀释法	逐步稀释细胞悬浮液，依据泊松分布原理，直到单位体积留存单细胞	优：操作简便，成本低； 劣：存在误差，假阳性高
	显微操作法	通过镜检，对单个细胞进行人工挑选，需要口吸管、显微操作仪等工具	优：设备要求低，可准确捕获活性单细胞； 劣：通量低、操作技术要求高
	激光显微切割	组织样品经染色后镜检后，锁定目标细胞进行激光显微切割	优：适合组织样品，可结合免疫组化信息； 劣：激光切割及染色步骤损伤细胞，易造成污染
	流式细胞分选	细胞悬液经荧光染色或标记后被高压压入流动室内，在鞘液的包裹和推动下，细胞被排成单列，以一定速度从流动室喷口喷出，经过荧光检测及充电，获取目的单细胞	优：高通量及复杂细胞分选，精度高； 劣：不适合微量样品，目标细胞需适宜的荧光标记，机械剪切力造成细胞应激
	微流控	通过微米级别的流道精确操控微升、毫升级别样品，结合重力离心、流体力学、电场力学	优：通量高，集成化，自动化； 劣：设备成本高，对目标细胞

		等方式捕获单细胞	有活性要求
	磁性分选	利用超顺磁性微珠磁性标记细胞或生物分子，在高强度、梯度的磁场中，通过 MACS 分选柱分离出磁性标记的细胞	优：通量、活力、回收率高； 劣：不能进行多种标记、粒度、丰度等复杂分选，且需要抗体标记
	免疫包被	利用细胞表面特殊抗原，使用预先抗体包被的基底进行目标细胞捕获	优：设备要求低，效率高； 劣：需要细胞表达特殊抗原，抗体筛选耗时
	目的：分选、分离单细胞，供下游研究分析或在分离的过程中进行单细胞分析		
基因组学	扩增技术	以 PCR 为基础的扩增技术：简并寡核苷酸引物 PCR (DOP-PCR)、连接反应介导的 PCR (LM-PCR)、扩增前引物延伸反应 (PEP)、多次退火环状循环扩增技术 (MALBAC)； 基于等温反应不以 PCR 为基础的扩增技术：多重置换扩增 (MDA) 和基于引物酶的全基因组扩增 (pWGA)	DOP-PCR：操作简单，易改进， 对模板 DNA 质和量要求低； 产量低，PCR 存在扩增偏差，错误率高。 MDA：设备要求低，保真性强，扩增产物的量稳定、片段较长；对模板质量要求高，可能产生非特异性产物。 MALBAC：操作简单，产量高，PCR 扩增偏倚低，灵敏度高， 扩增均匀性优；模板拷贝数极低时易扩增偏差。
	测序技术	以二代测序技术为主，边合成边测序	高通量，节省时间，成本低； 读长短，存在偏倚
	目的：研究单个细胞的遗传学信息，能够揭示单个细胞的基因结构状态，反映细胞间的异质性，在肿瘤、发育生物学、微生物学、神经科学等领域发挥重要作用		
转录组学	扩增技术	SMART：RNA 转录本 5' 端转换机制； 10×genomics：凝胶磁珠； Anydeplete：随机引物酶切降解	SMART：可用于单细胞 mRNA 测序；对 RNA 质量要求高，RNA 降解会引起 5' 端信息丢失，没有分子标签功能。 10×genomics：可用于单细胞 mRNA 测序，有分子标签功能；对 RNA 质量要求高，RNA 降解会引起 5' 端信息丢失。 Anydeplete：可用于单细胞 mRNA 及 lncRNA 测序，对 RNA 质量要求不高，可用于降解性样本测序；可能造成数据浪费
	测序技术	以二代测序技术为主，边合成	高通量，节省时间，成本低；

		边测序	读长短，存在偏倚
	目的：揭示单个细胞的基因差异化表达状态，和基因组学、表观遗传学共同反映细胞间的异质性		
蛋白质组学	流式细胞术	细胞悬液经荧光染色或标记后被高压压入流动室内，在鞘液的包裹和推动下，细胞被排成单列，以一定速度从流动室喷口喷出，经过荧光检测对目的细胞进行蛋白定性和定量分析	优：可对特性单细胞蛋白进行定性或定量分析，细胞保持活性 劣：不适合微量样品，目标细胞需适宜的荧光标记，机械剪切力造成细胞应激，检查荧光存在串色，单次分析蛋白数量受限
	流式质谱	CytoF 采用同位素标记抗体来标记或识别细胞表面和内部的信号分子，并根据流式细胞原理分离单个细胞，再用感应耦合等离子质谱（ICP-MS）观察单个细胞的原子质量谱	优：检测灵敏度高，多个检测通道可同时进行； 劣：采集速度慢，标记抗体受限，细胞被气化，无法对蛋白进行空间定位和相互作用分析
	酶联免疫斑点	Elispot 以平板为基础的 ELISA 和以膜为基础的 Western blotting 技术的融合，可实现单细胞水平检测分泌因子	优：灵敏度高，可保持细胞活力，细胞需求量小； 劣：检测时间长，多重检测受限
	单分子阵列	Simoa 将免疫复合物捕获并密封在一个含有超过 20 万个飞升级别小孔的芯片中反应，属于数字化的 ELISA	优：超高检测灵敏度，可达到单分子水平； 劣：多重检测能力受限，成本高
	单细胞 WB	通过可以固定单个细胞的凝胶槽矩阵（上千个）的载玻片，每个微孔作为微型反应器进行 Western Blotting	优：检测蛋白范围较宽； 劣：需要电泳相对耗时
	光学成像	以非接触式的方式对单细胞进行连续、实时、无损监测，超分辨荧光显微成像、拉曼成像等	优：操作方便，可保持细胞活力，可实时研究单细胞蛋白的空间图像 劣：通量低，检测蛋白数量受限
	电化学检测	通过电化学芯片、探针或电极检测单个细胞的电流、电位、阻抗、电导率、电容等参数变化，达到分析目标细胞蛋白含量、活力的目的	优：活体细胞监测，实时、无创、免标记；
	目的：蛋白是生命活动的承担者，单细胞蛋白质组研究可以揭示细胞活动的状态及细胞对于环境应激的基因表达，单细胞蛋白研究尤其是结构、动力学、丰度和构成对疾病的发生、器官的发育、免疫应答、细胞分泌活性、细胞分化和衰老等领域的理解有重要意义		

代谢组学	单细胞质谱	对蛋白质、多肽、酯类、小分子代谢物以及元素等进行离子化，利用磁场或电场将运动的离子按它们的质荷比进行分离，随后被检测器检测	优：快速、选择性高、灵敏度高，无需荧光标记； 劣：有创检测，被分析物的分子在离子源中离子化并被转化成气相，通量也较低
	电化学检测	采用微米或纳米级的超细电极，在高时间和空间分辨下实时检测单细胞的电化学信号	优：体外培养细胞和机体原位细胞均适用，活体细胞监测，实时、无创、免标记； 劣：易受扰动，重复性和稳定性不足，只能检测能产生电化学信号的物质
	荧光成像	利用荧光衍生反应，使非荧光物质产生化学变化，转化为荧光物质，再进行光学成像	优：操作方便，保持细胞活力； 劣：无法对未知分子标记，存在通道干扰
	色谱/电泳	对细胞悬液进行色谱或电泳分离，分离和检测并行，HPLC，CE 等方式	优：复杂组分分离，分离效率高，可与其他检测技术联用 劣：样品处理和检测时间长，重现性差
	膜片钳	利用玻璃微吸引电极将区域细胞膜片封接起来，记录单个或几个通道的活动电流	优：基本可以检测细胞所有离子通道类型，可和其他技术联用； 劣：只适合离子通道研究
	目的：单细胞代谢物组学的研究主要涉及小分子代谢物，体现细胞的生化异质性，对细胞的能量平衡、细胞间相互作用、渗透压调节、环境应激、细胞周期等多种正常生理活动的理解至关重要		
细胞间相互作用	多组学研究	——	——

三、功能独特的单细胞分析工具

单细胞研究对于理解细胞的组成、生理行为与功能的多样性具有重要意义，基因组、转录组、蛋白组、代谢组学等分析技术为单细胞研究提供了有力工具。实时单细胞多模态分析仪集成有成像系统、特定激发光源系统、纳米显微操作系统、超灵敏荧光检测系统、超微量注射系统及超微纳米探头，技术处于国际领先地位，可以实现单个活细胞生理生化和代谢指标的原位检测，通过纳米探头实时、连续、定量检测单个活细胞的小分子含量及酶活性，是获取单细胞关键信息的重要创新平台。

1. 产品功能：1) 多种检测指标：可以实时检测单个活细胞小分子含量（如葡萄糖、乳酸、ATP、胆固醇、 Ca^{2+} 、 K^{+} 等）及酶活性（葡萄糖苷酶、鞘磷脂酶、乳酸脱氢酶等），可匹配 160 余种商业化试剂盒；2) 亚细胞检测：可以在亚细胞水平（胞质、胞核、胞膜）实时连续、原位检测；3) 超微量提取与注射：在单细胞水平提取细胞器（如溶酶体、线粒体）、胞质进行质谱或其它平台的联用分析；注射药物、代谢剂等其它物质到细胞内进行药效评估；4) 活体检测：在活体上实时检测活体或组织生化指标（用药前后、中医药针灸刺激前后）的变化。

2. 技术优势：1) 实时连续：动态连续检测单个活细胞小分子含量和酶活变化；2) 原位检测：定位于单个活细胞或单细胞亚细胞结构进行原位检测分析；3) 定量分析：可结合体外定标曲线，进行单细胞水平定量检测；4) 开放试剂：可以选用商业试剂盒或实验室自配试剂。

3. 应用领域：细胞代谢、肿瘤机制、药理毒理学、生物纳米材料、神经科学、中医针灸等研究领域。

四、多模态检测技术方案

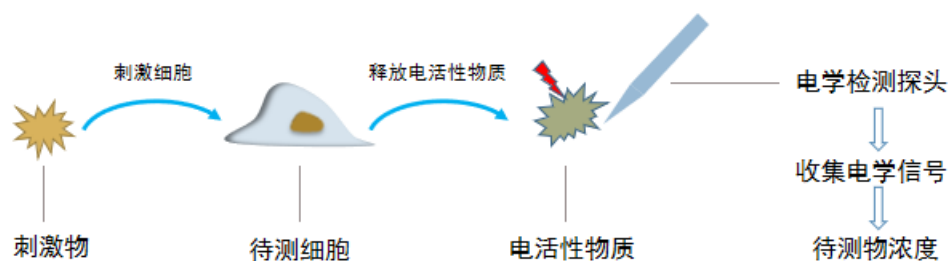
作为一款单细胞分析仪器，实时单细胞多模态分析仪可以实现光电双模态同时检测，技术开放性极高，为单细胞水平乃至亚细胞水平的原位实时分析提供独有的技术支撑。

1. 电信号检测方案：电探头收集电信号是通过对细胞释放的电活性物质检测出的，是对于单细胞释放的氧化还原物质的检测，例如过氧化氢、一氧化氮、多巴胺、超氧阴离子等物质。还可以通过量化级联反应释放的过氧化氢来检测小分子含量或蛋白酶活性。只要级联反应的副产物中能产生过氧化氢等氧化还原物质的都可以通过本设备进行检测，即通过终产物 H_2O_2 的水平反映单细胞内目标小分子含量或酶活性的高低。

工作原理

➤ 电学检测:

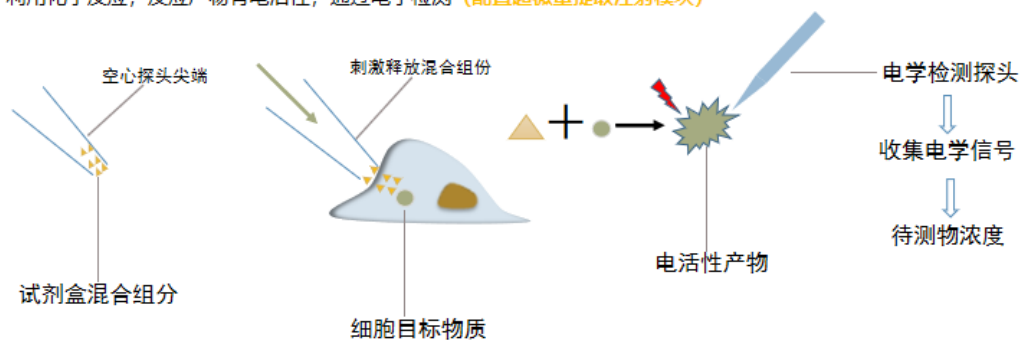
a) 纳米电探头直接（或修饰）检测细胞释放的电活性物质的电流变化



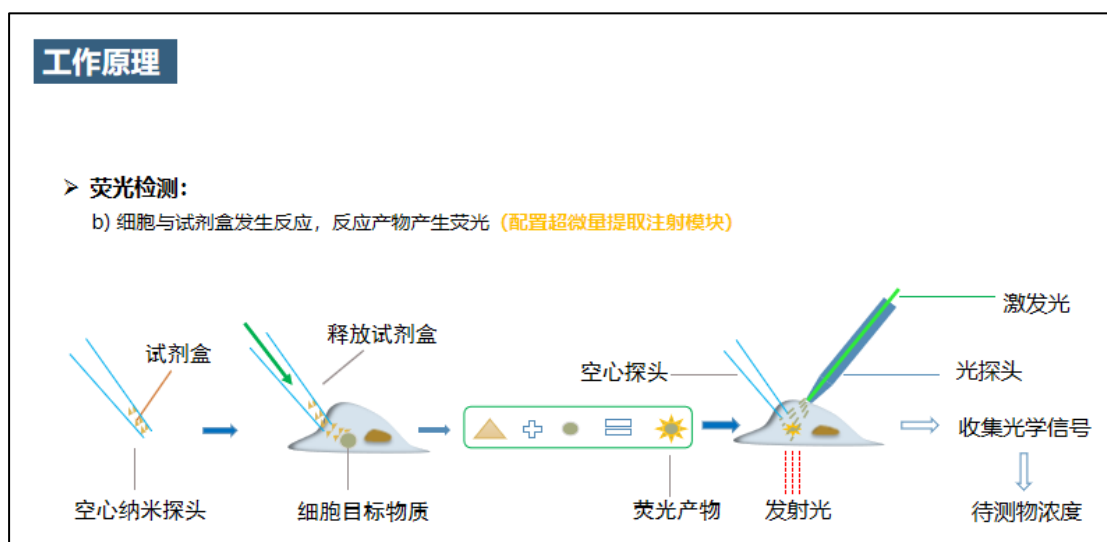
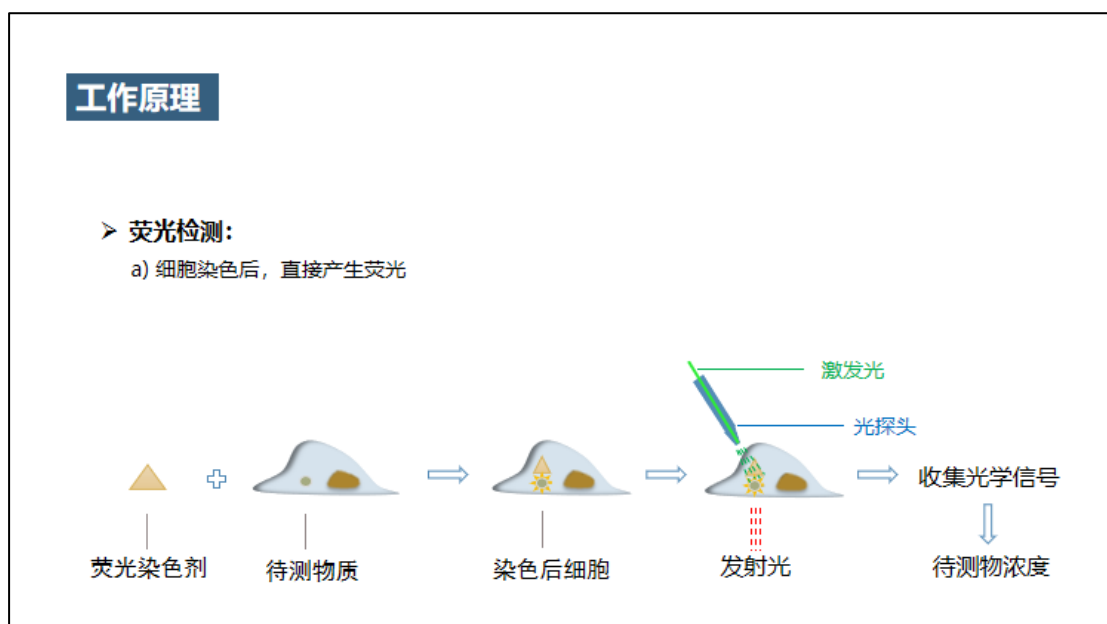
工作原理

➤ 电学检测:

b) 利用化学反应，反应产物有电活性，通过电学检测（配置超微量提取注射模块）



2. **荧光信号检测方案**: 设备的荧光检测是区别于市面上其他吸光度检测的, 通过光探头通激发光来激发预染色的细胞, 通过光学检测系统收集发射的荧光光子信号, 光子信号与细胞内预染色的指标呈比例, 因为光探头尖端纳米级别, 细胞是 10-20um, 可实现局部亚细胞位点指标的定点激发检测。

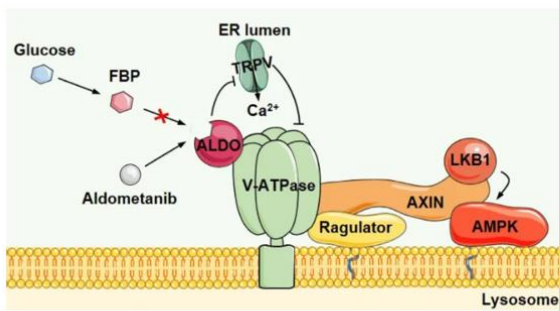


五、

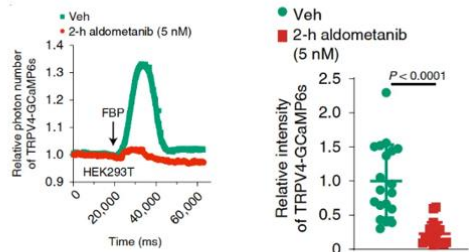
应用案例丰富、助力关键科研发现

1. 细胞代谢

通常情况下的细胞代谢研究采用群体细胞分析手段,细胞内的代谢反应需要转化为细胞表型才能进行分析,实时单细胞多模态分析仪可以针对性的向单个活细胞中输送难以透膜的代谢底物或中间产物,并在注射的过程中实时检测细胞的应激反应,转化为可以量化的荧光和电学信号。最新发表于 Nature Metabolism 即采用了实时单细胞多模态分析仪验证了新型药物对 FBP 与醛缩酶的结合抑制作用。



Aldometanib (呋谷精) 通过“林通器 (lysosomal pathway)”激活AMPK的模式图。

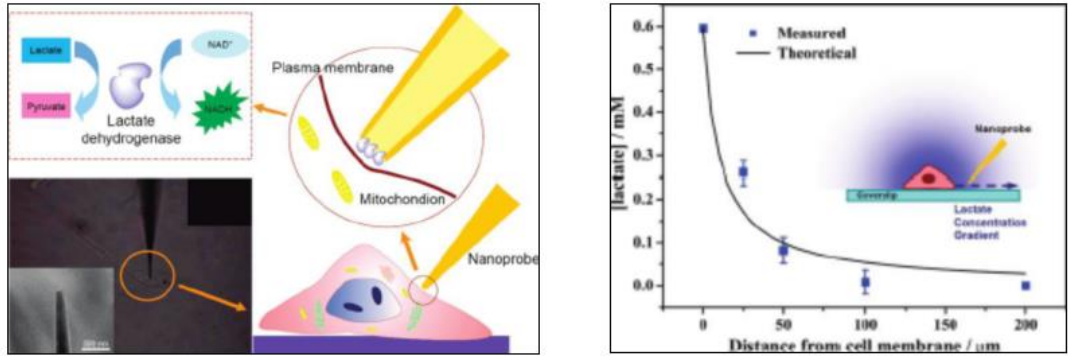


实时单细胞多模态分析仪实验结果：超微量显微注射 FBP (1,6-磷酸果糖) 未能恢复 Aldometanib 预处理的细胞中 TRPV4-GCaMP6s 的荧光信号，而 FBP 恢复了未用呋谷精处理的对照细胞中的荧光信号，证明呋谷精能有效的抑制FBP与醛缩酶的结合。

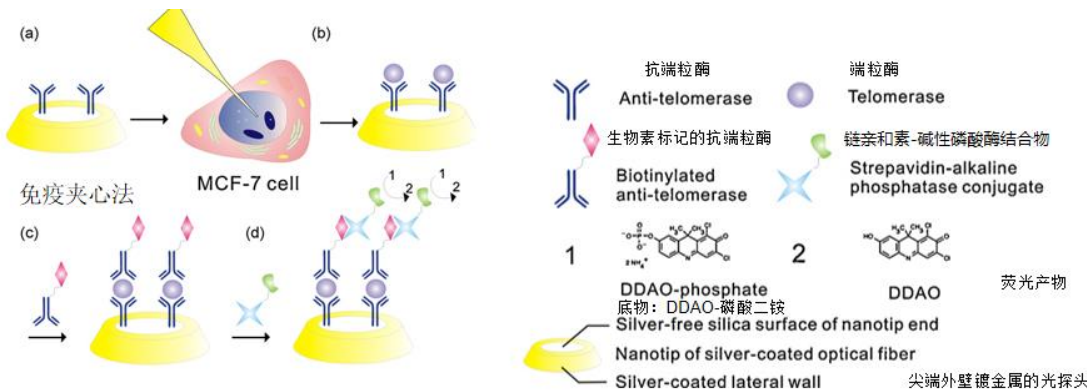
2. 肿瘤机制

肿瘤细胞在生长分裂过程中会不断累积新的突变,导致单个肿瘤细胞之间基因组层面及表型上的差异,即细胞与细胞之间的异质性,这种异质性最终对治疗和预后产生关键性的影响。单细胞水平的分析能够很好的解决细胞异质性、分子间差异的问题。虽然目前技术已经基本实现了单个细胞水平的基因组学分析、转录组学分析,但单细胞水平的代谢组分析和蛋白组学分析还需要新技术作为补充,帮助理解单个肿瘤细胞基因表型与功能之间的关系,实时单细胞多模态分析仪很好的解决了单细胞小分子含量和酶活等功能性指标的检测。可应用于以下方面：1) 单细胞层面研究肿瘤细胞异质性,包括糖代谢、脂代谢、蛋白代谢相关的小分子和酶活分析；2) 结合抑制实验,研究肿瘤细胞代谢过程中关键激活酶,为抗癌药物

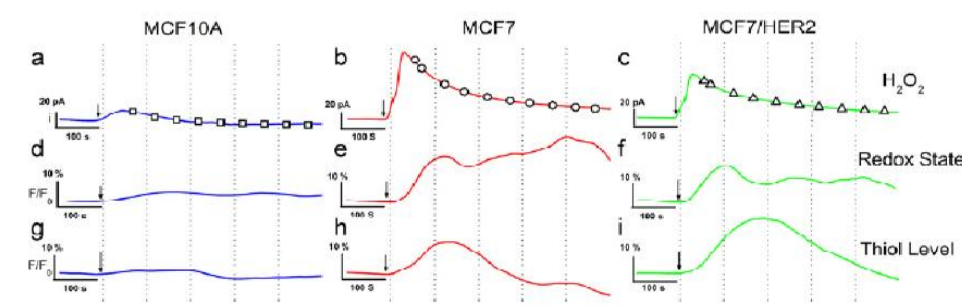
研发提供理论基础；3) 通过抗癌新药直接刺激细胞或配合专用探头实现细胞内送药，评估其对单细胞内代谢参数指标的影响。



光探头尖端修饰乳酸脱氢酶，荧光方法检测单个Hela细胞和MCF-7细胞细胞膜外乳酸的释放。



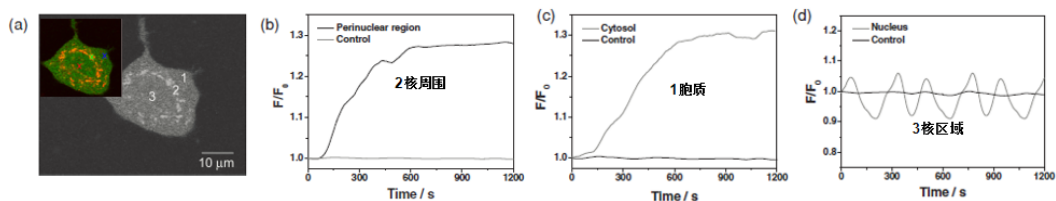
光探头修饰抗端粒酶，体内捕获，体外荧光法检测单个MCF-7细胞细胞核中的端粒酶表达水平。



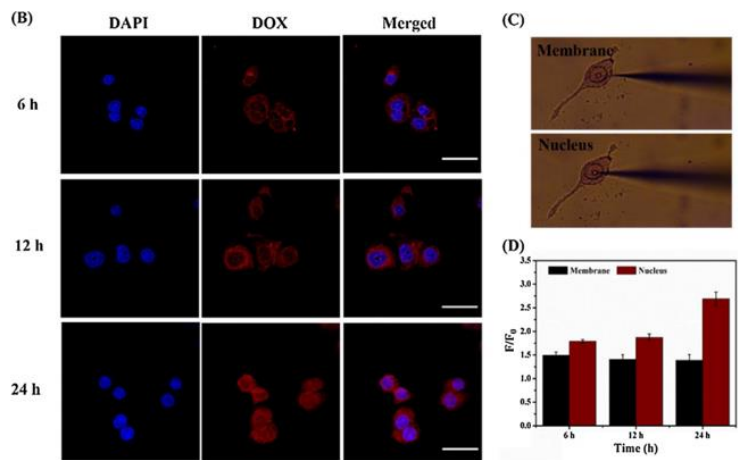
PMA 应激下三种不同细胞的光学电学响应，揭示了氧化应激与癌症进展之间的关系

3. 新药研究

新药研究离不开细胞学实验，实时单细胞多模态分析仪在药物研究中的作用在于：1) 药物的极性和分子量会影响其透过细胞膜的效率，如果药物的细胞膜透性较低或未知，可以单细胞内定点注射药物并实时检测药效相关指标（ Ca^{2+} 和 ROS 等），可以反映药物发挥作用的潜在位置；2) 为了理解药物作用机制，需要预先判断可能的转运体、药物靶点、及涉及到的关键代谢酶，然后通过实时单细胞多模态分析仪进行验证，由于是实时的，可以添加相关抑制剂或增强剂直接进行判断验证；3) 用于单细胞亚细胞水平的定向给药及实时原位检测药物作用效果，提供亚细胞水平药物-细胞相互作用研究的重要工具，实现单细胞层面药物保护性研究和抑制性研究, 可为药物载体的单细胞层面载药能力研究和亚细胞层面的定位提供选择性平台。



药物反应空间异质性：局部位点给药（ROS），标记为3的核区域不是药物作用位点（d）

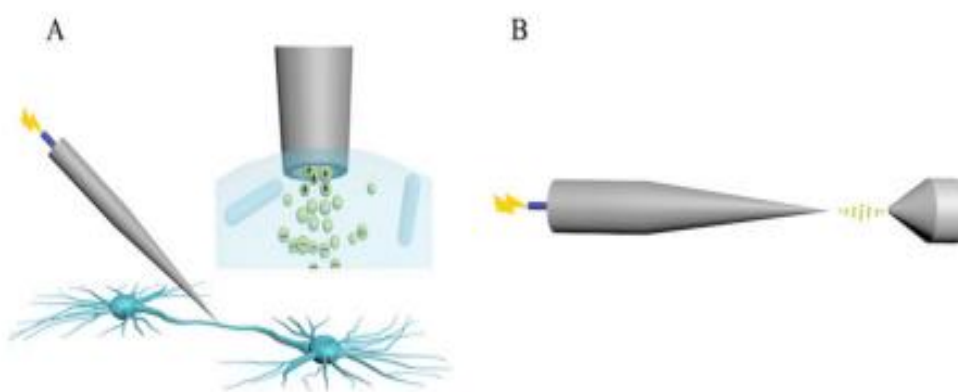


Hep G2（肝脏肿瘤细胞）细胞在和药物反应6h、12h、24h后，用单细胞分析仪（C、D）分别检测单个细胞细胞膜和细胞核处的药物浓度

4. 神经机制

在神经科学研究中，神经细胞具有各种各样的形状、连接、电生理和生化特性的差异。

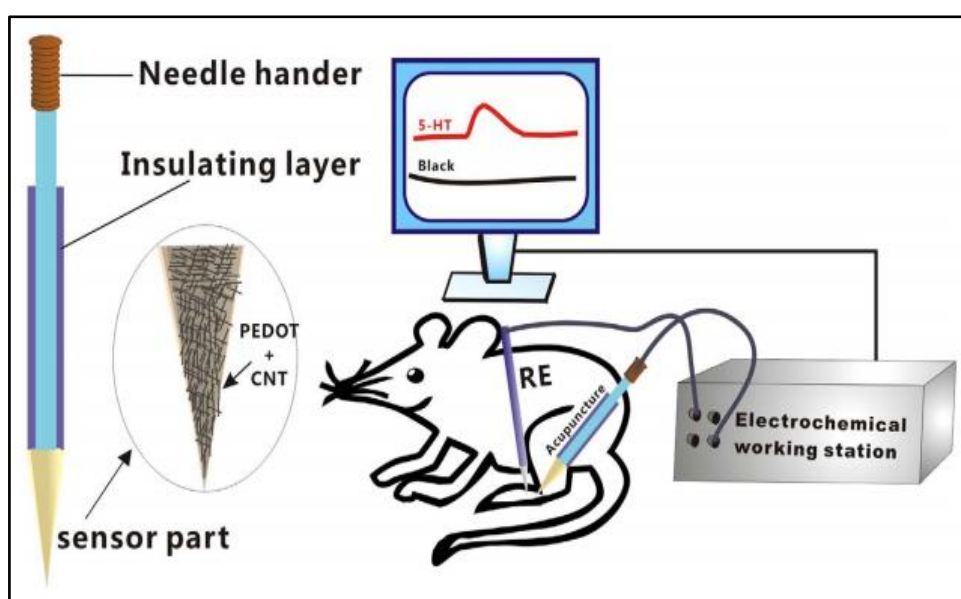
单细胞脂类、糖类、递质和代谢物等细胞成分的分析可以进一步理解神经细胞的变异、疾病和治疗敏感性的差异。实时单细胞多模态分析仪在药物研究中的作用在于：1) 单细胞胞质的超微量抽提，和质谱平台联用完成递质成分的分析；2) 纳米级探头实现单个神经细胞或脑组织的小分子电化学检测。



单细胞超微量提取和 ESI 质谱进行联用

5. 活体研究

在线、原位或在体的分析方法，能直接探讨生命活体中各种生物分子如何发挥作用，最终实现生命功能的解释。实时单细胞多模态分析仪的作用在于：1) 中医药领域，可对特定穴位血清素（5-羟色胺）、一氧化氮、乙酰胆碱、抗坏血酸等关键指标的实时监测，可配合组织解剖学实验，研究不同组织类型的指标差异，辅助针灸机理研究；2) 活体动物模型在体检测，辅助肿瘤疾病药物研究。



实时单细胞多模态分析仪实时监测活体体内 5-羟色胺的变化

