

DOI: 10.13376/j.cbls/2021166

文章编号: 1004-0374(2021)12-1476-07



杨琛, 中国科学院分子植物科学卓越创新中心 / 上海植物生理生态研究所研究员。中国科学院百人计划、国家杰出青年基金获得者。目前担任中国科学院合成生物学重点实验室副主任、中国生物物理学会代谢组学分会理事、《合成生物学》期刊副主编、*Environ Microbiol* 期刊编委。本科、硕士毕业于浙江大学化学工程系, 博士毕业于日本九州工业大学, 曾在日本庆应大学、美国贝纳姆医学研究所从事博士后研究。多年来从事稳定同位素示踪和代谢流量分析技术的开发和应用, 以通讯作者发表论文于 *Nature Chemical Biology*、*Energy and Environmental Science*、*PNAS* 等。主要研究兴趣为细胞代谢网络运转及调控机制的定量研究, 实现其人工设计与系统优化, 特别关注光能自养微生物以及人体菌群的合成生物学研究。



徐健, 中国科学院青岛生物能源与过程所研究员、所务委员、生物能源室主任、单细胞中心主任; *mSystems* 高级编委。1997 年北京大学生物技术学士, 2003 年华盛顿大学 (WUSTL) 计算机硕士和生物化学博士, 2004—2008 年任职华盛顿大学基因组研究院。于 *Science*、*Cell Host Microbe* 等发表论文 130 余篇, 被引超 12 000 次, H-index 52。获国家杰青 (2014)、中国青年科技奖 (2015)、中源协和生命医学创新突破奖 (2016) 等。单细胞中心提出了拉曼组 (Ramanome) 等概念, 研制和产业化了单细胞分析科学仪器系列 (CAST-R、FlowRACS、RACS-Seq、EasySort 等), 开发了 MSE (www.MSE.ac.cn) 等单细胞 / 元基因组大数据系统; 同时以微拟球藻为模式, 建立了富有特色的工业产油微藻合成生物学研究体系。



杨弋博士于清华大学获得生物学士学位与博士学位, 现任华东理工大学特聘教授, 生物反应器工程国家重点实验室副主任, 华东理工大学光遗传学与合成生物学交叉学科研究中心主任。获得多个国家、教育部及上海市人才计划与荣誉称号, 是国家杰出青年基金获得者、细胞代谢监测与控制国家自然科学基金委创新群体负责人。在细胞氧化还原代谢监测、RNA 荧光标记与 RNA 代谢光遗传学控制、肿瘤靶向药物发现、蛋白质药物生产等前沿技术上取得了重要进展, 成果发表在 *Nature Biotechnology*、*Nature Methods*、*Nature Chemical Biology*、*Cell Metabolism* 等一流杂志, 所发展的前沿技术受到了国际同行广泛关注与跟踪应用。

收稿日期: 2021-10-08

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31925001, 31921006, 32030003, 31827801, 91857202, 21937004); 国家重点研发计划 (2018YFA0903700)

*通信作者: E-mail: cyang@cemps.ac.cn (杨琛); xujian@qibebt.ac.cn (徐健); yiyang@ecust.edu.cn (杨弋)

代谢研究新技术助力合成生物学

杨琛^{1*}, 徐健^{2*}, 杨弋^{3*}

(1 中国科学院合成生物学重点实验室, 中国科学院分子植物科学卓越创新中心, 上海 200032; 2 中国科学院青岛生物能源与过程研究所单细胞中心, 中国科学院生物燃料重点实验室, 山东能源研究院, 青岛 266101; 3 华东理工大学光遗传学与合成生物学交叉学科研究中心, 生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237)

摘要: 合成生物学通过构建人工代谢途径, 不仅可以发展高效的生物制造技术, 还可以用于人类重要疾病的诊疗, 为催生新的生物产业革命、促进经济可持续发展提供了重大机遇。该文围绕代谢组与代谢流量分析以及代谢建模、单细胞代谢表型组分析与分选、代谢物生物传感与时空调控等前沿技术, 介绍现有状况和水平, 综述分析这些技术如何助推合成生物学设计-构建-测试-学习 (DBTL) 循环, 并对其发展前景进行展望。

关键词: 代谢组; 代谢流量; 代谢模型; 单细胞代谢表型组; 单细胞拉曼分选; 代谢物生物传感; 分子探针; 代谢时空分析; 光遗传学控制

中图分类号: Q591; Q78 **文献标志码:** A

Advanced techniques of metabolic sciences for synthetic biology

YANG Chen^{1*}, XU Jian^{2*}, YANG Yi^{3*}

(1 CAS Key Laboratory of Synthetic Biology, CAS Center for Excellence in Molecular Plant Sciences, Chinese Academy of Sciences (CAS), Shanghai 200032, China; 2 Single-Cell Center, CAS Key Laboratory of Biofuels, Shandong Energy Institute, Qingdao Institute of BioEnergy and Bioprocess Technology, CAS, Qingdao 266101, China; 3 Optogenetics & Synthetic Biology Interdisciplinary Research Center, State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: Cellular metabolism is being engineered through synthetic biology for an increasingly diverse array of applications, from chemical production to human health. In this review, we highlight the recent advances in the techniques of metabolic sciences, including metabolomics, metabolic flux analysis, genome-scale metabolic modeling, single-cell metabolic phenome, Raman-activated cell sorting, spatiotemporal metabolic analysis, single-cell optogenetic control, and metabolic phenomics. These techniques are accelerating the design, build, test, and learn (DBTL) cycles for synthetic biology. The emerging challenges and future developments in these techniques and their applications in synthetic biology are discussed.

Key words: metabolomics; metabolic flux; metabolic model; single-cell metabolic phenome; Raman-activated cell sorting; metabolite biosensing; molecular probes; spatiotemporal analysis; optogenetics

代谢是生命的基本特征, 是生命功能最直接与动态的反映。合成生物学通过构建人工代谢途径, 不仅可以发展高效的生物制造技术, 还可以用于人类重要疾病的诊疗, 为催生新的生物产业革命、促进经济可持续发展提供了重大机遇。随着被操纵基因与细胞种类的增多、代谢通路及调控的复杂化, 合成生物系统日益复杂。对于不同生物元器件及模块之间的海量组合, 大量的试错过程造成困扰。设计-构建-测试-学习 (DBTL) 循环是合成生物学应用的核心策略, 即通过设计来构建人工生物体系, 测试构建的体系, 利用测试获得的数据来进行学习,

指导更好的设计, 从而形成一个循环来不断优化人工生物体系。然而, 由于生命过程中产生的代谢物具有数目众多、种类复杂、时空变化等特点, 测试环节已经成为 DBTL 循环中的限速步骤之一。代谢组与代谢流量分析以及代谢建模、单细胞代谢表型组分析与分选、代谢物生物传感与时空调控等前沿技术的发展, 将极大地助推 DBTL 循环, 为合成生物学研究提供新的机遇。

1 代谢组与代谢流量分析技术

代谢组学 (Metabolomics), 即对生物体内的代

代谢物进行系统性的定量研究,能够使我们直接而且准确地掌握生物体的表型信息^[1]。与代谢物浓度同等重要的是代谢流量(Metabolic fluxes),即生物体内的代谢反应速率,表征基因、蛋白质、代谢物之间各种相互作用导致的代谢网络的动态行为和最终功能^[2-3]。代谢物与代谢反应蕴藏着极为丰富的信息,例如KEGG数据库中目前已收录了超过18 500个代谢物及11 100个代谢反应;而且代谢物浓度与代谢流量提供互补的信息。掌握这些信息,能够使我们全面理解与认识生物体内的代谢过程,在此基础上实现对生命活动的设计与操控。

近年来质谱技术发展迅猛,因具有高选择性、高灵敏度和较大的检测动态范围,其成为代谢组学研究的主要工具^[4]。其中,高分辨质谱,如飞行时间质谱(TOF)、轨道离子阱质谱(Orbitrap)等,能够提供化合物的精确分子量,并可以通过串联质谱技术(如Q-TOF)采集二级碎片信息对代谢物进行结构鉴定。质谱技术可以方便地与气相色谱(GC-MS)和液相色谱(LC-MS)等分离技术相结合,极大地提高对代谢组的分析能力,例如通过LC-MS的正负离子检测,在生物样本中可检测出数万个代谢特征峰^[4]。目前通过靶向代谢组学,能够定量分析细胞内200~300种核心代谢物^[5]。与代谢组及其他组学不同的是,代谢流量不能被直接检测,需要利用同位素示踪技术,结合代谢组学分析进而通过数学建模计算得到^[6]。比较典型的是基于稳定同位素¹³C标记的稳态代谢流量分析技术。近年来在建立同位素¹³C、¹⁵N或²H动态示踪技术的基础上,出现了动态代谢流量分析技术,能够解析细胞应对外界环境改变(如营养条件改变、药物投放等)的极为快速的代谢动态变化^[2]。

代谢流量分析与代谢组学技术能够指导代谢网络的设计与改造,包括阐明底盘细胞的代谢网络,找出目标产物合成限速步骤,解析各种原料的利用途径以及理解工业生产过程等^[7]。通过代谢流量分析,发现许多非模式底盘与模式底盘在代谢途径的利用上存在巨大的差别,例如葡萄糖代谢途径;利用动态代谢流量分析技术,在模式底盘上还能够发现新的代谢途径^[8]。通过比较代谢组学分析和同位素动态示踪技术,能够找出目标产物合成途径上的限速步骤^[7]。代谢流量分析与代谢组学技术也被用于解析木质纤维素原料中的木糖、阿拉伯糖、木质素等的微生物降解途径,解析合成气原料的微生物利用途径以及CO₂固定对于细胞生长及产物合成的

定量贡献^[7]。此外,代谢流量与代谢组学分析还能帮助理解工业生产过程中环境胁迫条件对于细胞代谢的影响以及定量解析工业培养基中各种复杂成分对于产物合成的贡献^[7]。

未来代谢流量分析与代谢组学技术需要优先发展的方向如下。(1)创新发展分析方法:随着质谱等分析仪器的不断发展,发展大规模的代谢物定性方法,推动代谢组实验流程的标准化以及数据分析与共享的自动化,使得代谢组学得到更加广泛的应用;结合同位素动态示踪技术、代谢流量与代谢组研究,发展代谢流量及其控制的先进分析方法,使其成为指导代谢网络设计与改造的一个强有力的工具。(2)拓展代谢研究的空间维度:开发细胞器快速分离纯化技术,提高质谱成像技术的分辨能力与精度,设计不同标记底物的平行示踪实验或者混合使用多种标记底物,将同位素示踪、代谢组学与质谱成像、细胞器纯化或代谢物荧光报告系统相结合,研究不同组织、细胞以及细胞器内的代谢及其之间的互动,为空间合成生物学研究提供有力支持。(3)建立代谢计算平台:开发能够让科研人员直观便利地进行数学建模与流量计算的软件,建立一个能够指导示踪实验设计、定量解析代谢流及相关统计分析的一体化计算工具包,最终纳入到合成生物学计算与设计平台。

随着代谢组学等技术的发展,开发代谢模型与大数据整合引起了越来越多的关注。利用基因组尺度的代谢模型(Genome-scale metabolic models)已开发出多种算法,用于预测目标产物最大化的敲除、过表达、限表达、辅因子特异性替换等改造靶点^[9]。近年来出现的酶约束代谢模型,即在传统的基因组尺度代谢模型的基础上加入了基因组范围的酶水平的限制条件,大大提高了模型的仿真预测能力^[10]。在基因组尺度代谢模型的基础上整合基因组范围转录和翻译过程的数学模型(Macromolecular expression, ME模型)已被用于整合多组学数据,系统揭示表型背后的复杂生物学机制,并用于指导代谢工程设计^[11]。此外,大量的蛋白质结构数据也被整合到基因组尺度代谢模型中^[11]。这些代谢模型方面的进展有望帮助解决细胞工厂设计目前所遇到的多方面的问题,包括底盘选择、子工程调控、代谢路线变更、培养基设计、基因表达的调节、酶的设计以及生物过程优化等方面的问题^[12]。未来需要结合组学分析技术的发展,建立多组学数据收集的标准化流程;发展机器学习方法用于确定生物模型中的重要参

数, 大大提高定量预测细胞行为的能力; 建立能够整合分析各种动态和空间组学数据的多种模式生物中的全细胞数学模型, 实现复杂生物网络和生物系统的模型预测与仿真; 将模型开发算法用于细胞工厂设计流程, 使其成为合成生物学设计的一个必需工具。

2 单细胞代谢表型组分析与分选技术

地球上的生命均以单个细胞为单元组合而成, 或由单个细胞发育而来。因此, 在单个细胞精度上的功能表征与机制解析, 对于生命过程的理解, 乃至生命体系的设计具有基础性的贡献。此外, 单细胞分析可直接表征细胞个体的表型或基因型, 不再依赖于细胞的培养与扩增, 因此不仅节约了大量时间和精力, 而且克服了自然界中大部分微生物细胞尚难培养这一挑战, 因此对于生物资源的挖掘也具有重要的意义。在从基因、转录本、蛋白质、代谢物到细胞表型的信息传递过程中, 代谢物层面上体现的细胞代谢活动, 也就是细胞的代谢表型组, 通常是细胞功能的最主要载体和最直接体现。因此, 单细胞精度的代谢表型组分析和分选技术对于挖掘与表征生物元件、模块或底盘细胞具有重大的理论意义与应用价值^[13]。

目前, 在天然或人工细胞的代谢表型测试中, 气相色谱-质谱联用仪 (GC-MS)、液相色谱-质谱联用仪 (HPLC-MS) 或核磁共振 (NMR) 等技术, 均能够在细胞“群体”或“群落”的层面, 进行基于代谢物组的细胞代谢功能检测^[14]。但是, 在单个细胞尤其是单个微生物细胞中, 其内含的代谢物水平极低。因此, 受到上述方法之灵敏度的限制, 单细胞尤其是单个细菌细胞的代谢组分析目前仍然相当困难^[15]。此外, 质谱、色谱与核磁检测等方法通常要求裂解细胞以提取或制备胞内代谢物, 因此往往难以直接对接目标代谢功能单细胞的后继培养或基因组与转录组分析。

作为一种无需破坏细胞、无需荧光标记、对任何细胞均可直接测量的散射光谱, 拉曼光谱刻画的是化合物中分子键被激发到虚能态却尚未恢复到原始态所引起的入射光被散射后频率发生变化的现象^[16]。不同的化合物具有特征性的、相对稳定的拉曼光谱。而每个针对某个单细胞在特定条件与时空状态下随机或定点采集的拉曼光谱, 简称单细胞拉曼光谱, 由分别对应于一类化学键的超过 1 500 个拉曼谱峰组成, 反映的是该细胞在该状态下细胞内化学物质的成分及含量的多维信息。所谓“拉曼

组”, 是指在特定条件和时间点下在一个细胞群体中随机取样的单细胞拉曼光谱的集合。拉曼组可以定量检测细胞利用含氢、含碳、含氮等底物的代谢速率, 可以测定各种拉曼敏感的产物之多样性及其含量, 可以表征细胞的环境应激性 (如细胞的药敏性和药物应激反应等), 能够检测细胞之间代谢物的传递, 也可以用于区分不同的物种^[17]。同时, 这些能够从拉曼光谱翻译而成的代谢表型的名单还在不断拓展中。因此, 拉曼组被认为是一种单细胞精度的代谢表型组^[17]。

在此基础上, 为了从细胞群体或群落中获取特定代谢表型组的单细胞 (以测序或培养), 一系列基于拉曼光谱的单细胞分选技术和核心器件先后面世^[17]。这些 RACS (Raman-activated cell sorting) 技术根据拉曼采集时细胞的运动状态, 大体上分为静止和微流两类。静止类包括拉曼光镊分选^[18-21]、拉曼弹射分选 (RACE)^[22]、拉曼光钳液滴分选 (RAGE)^[23] 等, 主要强调的是每个细胞的拉曼采集和分选都精准可控。而微流类则强调细胞拉曼采集和分选的高通量, 包括拉曼微流分选 (RAMS)^[24-25]、拉曼微流液滴分选 (RADS)^[26]、介电单细胞捕获/释放拉曼激活液滴分选 (pDEP-RADS)^[27] 等。基于这些新技术的一系列单细胞拉曼分选仪器, 如拉曼激活流式分选系统 FlowRACS^[27]、单细胞拉曼分选-测序耦合系统 RACS-Seq^[23] 等, 在青岛星赛生物等国产科学仪器厂商的推动下, 也已经进入市场。利用这些仪器, 研究人员打通了从单细胞代谢表型组表征到相对应的高质量单细胞基因组测定的全流程, 并示范了针对酶基因体内活性的高通量筛选、细胞工厂的快速代谢功能表征、菌群中微生物细胞原位代谢功能的识别和相对应单细胞基因组的解析等一系列创新应用。

以拉曼组与单细胞拉曼分选等为代表的单细胞代谢表型组分析分选方法学体系, 具有活体、无损、非标记、全景式表型、可分辨复杂功能、快速、高通量、低成本、能耦合下游核酸或蛋白质分析等重要特色与优势, 因此必将成为细胞功能测试的一个强大手段, 服务于包括合成生物学在内的所有涉及细胞代谢功能快检的领域。然而, 其科学研究前景与应用潜力的实现还有很多挑战。

首先, 同时满足“靶标分子特异性”与“全景式表型测量”的单细胞代谢表型组分析。基于荧光探针的设计和细胞标记, 可实现细胞内靶标分子的高特异性检测, 而拉曼光谱能够对自然界各种细胞

无需标记而直接分析多种代谢表型，因此两者优势互补，其耦合使用将有可能同时实现“靶标分子特异性”与“全景式表型测量”，必将带来一系列全新的应用。

其次，在单细胞水平，拉曼等光谱参数与电学参数、力学参数等的并行测量与分选。这些多模态、高维的单细胞表型组数据的采集和解析，将单细胞表型组在合成生物学的应用推向新的维度，并在动物、植物、微生物等领域的高通量表型监测和分子育种等方面作出重要贡献^[28-29]。这些努力也必将建立一系列单细胞大数据体系，结合人工智能技术，将在生命体系的设计或重建等方面，发挥不可或缺的作用^[30]。

最后，单细胞“成像-分选-测序-培养-大数据”全流程的标准化与装备化。如何在保证细胞活性与拉曼信号质量的同时，继续大幅度提高测量与分选的通量，这仍是拉曼组分析和拉曼分选业界的重点。另一方面，从单细胞拉曼光谱到单细胞基因组、转录组等的实验和技术方法学还在不断优化中，其各方面离标准化还有相当距离。因此，迫切需要通过产学研合作，针对各种细胞类型及其特定应用场景来建立相应的分析技术规范与装备标准，为单细胞“代谢表型组-基因组-转录组”等大数据的规模采集与高效共享奠定基础，从而支撑一个标准化、自动化、智能化的合成生物铸造平台。

3 代谢物生物传感与时空调控技术

与传统的生化分析与代谢组研究技术不同，以遗传编码荧光探针为代表的活细胞代谢传感技术可以在单细胞、亚细胞水平对细胞代谢进行实时分析^[31-32]。这些探针由基因编码而成，与代谢物结合后产生显著荧光响应，从而实现了对代谢活动的时空监测。近年来，针对葡萄糖^[33-34]、ATP^[35-37]、NADH^[38-41]、NAD⁺^[42]、NADPH^[43-44]等细胞内的主要代谢物、能量及还原力载体的高性能荧光探针相继被报道。这些基于荧光蛋白的分子探针可在细胞内或者活体内稳定遗传并特异定位于任意位置，实时定量报告单细胞与亚细胞水平的代谢反应、物质转运与信号转导。另一方面，近年来光遗传学颠覆性技术也为单细胞与活体中的代谢活动精密控制提供了新的工具。通过在细胞内导入遗传编码的光敏转录因子或代谢酶，可利用光对细胞内的蛋白质功能与代谢活动直接进行特异、快速、远程、可逆、定量、定位的实时控制^[45-56]。而对UV、蓝、绿、

红甚至红外光响应的光敏开关还能对细胞内不同代谢通路进行正交控制。这些光敏分子开关已经成功用于糖尿病小鼠体内血糖浓度控制、干细胞增殖、生化产品合成^[46,48,57-58]。

目前，代谢物生物传感与时空调控技术广泛应用于合成生物学研究仍存在着重要挑战。理想的代谢传感遗传编码荧光探针应该具有高特异性、高响应度、高亮度与多色的特性，可对细胞多个代谢物的动态与网络进行定量分析。但现有遗传编码荧光探针都是基于荧光蛋白而发展，其构型在对代谢物的分子识别与荧光传感上的普适性较弱，绝大部分重要代谢物尚未获得高性能探针，同时在单细胞内对多个代谢途径进行监测难以实现；光控基因表达技术是目前主流的光遗传学代谢时空精密调控技术，但我们仍然缺少从DNA到RNA到蛋白质的各个重要代谢步骤中全面的光敏调控元件，也缺少适用于多个基因同时调控的生物正交光遗传学工具。

在未来5~15年，代谢物生物传感与时空调控技术的发展趋势：

(1) 代谢物荧光传感普适性技术。发展全新的代谢物特异性识别原理与高响应度荧光探针传感原理，使任意代谢物的高性能遗传编码探针研发成为可能。

(2) 多参数单细胞代谢传感技术。系统开发针对主要代谢途径的高性能多光谱代谢物遗传编码荧光探针工具箱，发展单细胞代谢多参数、高通量、时空分辨传感技术。

(3) 生物正交细胞代谢光遗传学控制技术。发展光诱导RNA与蛋白质功能开关新原理，实现RNA代谢与蛋白质代谢的多光谱定量时序精密控制。

(4) 全光型大规模多参数单细胞代谢表型分析技术。基于遗传编码探针与光敏蛋白，系统发展单细胞代谢应答活动的高通量集体表征和量化技术，发展基于代谢传感的合成生物学单细胞进化技术。

随着代谢物生物传感与时空调控技术的进步，我们预期未来十年内人们有望研发成功500种以上的中心代谢与重要次级代谢物的高性能荧光探针，可同时对5种以上细胞代谢进程进行正交精密调控，可在单细胞上获取500种以上的代谢动态表型参数，在一亿以上库容量上对合成生物系统进行单细胞水平的代谢途径定向进化。

[参 考 文 献]

[1] Nicholson JK, Lindon JC. Systems biology: metabonomics.

- Nature, 2008, 455: 1054-6
- [2] Jang C, Chen L, Rabinowitz JD. Metabolomics and isotope tracing. *Cell*, 2018, 173: 822-37
- [3] Zamboni N, Saghatelian A, Patti GJ. Defining the metabolome: size, flux, and regulation. *Mol Cell*, 2015, 58: 699-706
- [4] Doerr A. Global metabolomics. *Nat Methods*, 2017, 14: 32
- [5] Lutz NW, Sweedler JV, Wevers RA. Methodologies for metabolomics: experimental strategies and techniques [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 2013
- [6] Antoniewicz MR. Methods and advances in metabolic flux analysis: a mini-review. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2015, 42: 317-25
- [7] Nie X, Hua Q, Xu P, et al. Biological insights into non-model microbial hosts through stable-isotope metabolic flux analysis. *Curr Opin Biotechnol*, 2020, 64: 32-8
- [8] Zhang H, Liu Y, Nie X, et al. The cyanobacterial ornithine-ammonia cycle involves an arginine dihydrolase. *Nat Chem Biol*, 2018, 14: 575-81
- [9] Kim B, Kim WJ, Kim DI, et al. Applications of genome-scale metabolic network model in metabolic engineering. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2015, 42: 339-48
- [10] Sánchez BJ, Zhang C, Nilsson A, et al. Improving the phenotype predictions of a yeast genome-scale metabolic model by incorporating enzymatic constraints. *Mol Syst Biol*, 2017, 13: 935
- [11] Fang X, Lloyd CJ, Palsson BO. Reconstructing organisms *in silico*: genome-scale models and their emerging applications. *Nat Rev Microbiol*, 2020, 18: 731-43
- [12] Zielinski DC, Patel A, Palsson BO. The expanding computational toolbox for engineering microbial phenotypes at the genome scale. *Microorganisms*, 2020, 8: 2050
- [13] Nielsen J, Oliver S. The next wave in metabolome analysis. *Trends Biotechnol*, 2005, 23: 544-6
- [14] Wishart DS. Emerging applications of metabolomics in drug discovery and precision medicine. *Nat Rev Drug Discov*, 2016, 15: 473-84
- [15] Zenobi R. Single-cell metabolomics: analytical and biological perspectives. *Science*, 2013, 342: 1243-259
- [16] Raman CV, Krishnan KS. A new type of secondary radiation. *Nature*, 1928, 121: 501-2
- [17] 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: 107388
- [18] Eriksson E, Enger J, Nordlander B, et al. A microfluidic system in combination with optical tweezers for analyzing rapid and reversible cytological alterations in single cells upon environmental changes. *Lab Chip*, 2007, 7: 71-6
- [19] Lau AY, Lee LP, Chan JW. An integrated optofluidic platform for Raman-activated cell sorting. *Lab Chip*, 2008, 8: 1116-20
- [20] Xie C, Chen D, Li YQ. Raman sorting and identification of single living micro-organisms with optical tweezers. *Opt Lett*, 2005, 30: 1800-2
- [21] Huang WE, Ward AD, Whiteley AS. Raman tweezers sorting of single microbial cells. *Environ Microbiol Rep*, 2009, 1: 44-9
- [22] Jing X, Gou H, Gong Y, et al. Raman-activated cell sorting and metagenomic sequencing revealing carbon-fixing bacteria in the ocean. *Environ Microbiol*, 2018, 20: 2241-55
- [23] 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: e2001172
- [24] Zhang P, Ren L, Zhang X, et al. Raman-activated cell sorting based on dielectrophoretic single-cell trap and release. *Anal Chem*, 2015, 87: 2282-9
- [25] McIlvenna D, Huang WE, Davison P, et al. Continuous cell sorting in a flow based on single cell resonance Raman spectra. *Lab Chip*, 2016, 16: 1420-9
- [26] Wang X, Ren L, Su Y, et al. Raman-activated droplet sorting (RADS) for label-free high-throughput screening of microalgal single-cells. *Anal Chem*, 2017, 89: 12569-77
- [27] 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: eabb3521
- [28] Rozman J, Klingenspor M, Hrabě de Angelis M. A review of standardized metabolic phenotyping of animal models. *Mamm Genome*, 2014, 25: 497-507
- [29] Bochner BR. Global phenotypic characterization of bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, 2009, 33: 191-205
- [30] Nitta N, Sugimura T, Isozaki A, et al. Intelligent image-activated cell sorting. *Cell*, 2018, 175: 266-76.e213
- [31] Zhang Z, Cheng X, Zhao Y, et al. Lighting up live-cell and *in vivo* central carbon metabolism with genetically encoded fluorescent sensors. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)*, 2020, 13: 293-314
- [32] Zhao Y, Yang Y. Profiling metabolic states with genetically encoded fluorescent biosensors for NADH. *Curr Opin Biotechnol*, 2015, 31: 86-92
- [33] Takanaga H, Chaudhuri B, Frommer WB. GLUT1 and GLUT9 as major contributors to glucose influx in HepG2 cells identified by a high sensitivity intramolecular FRET glucose sensor. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1778: 1091-9
- [34] Deuschle K, Okumoto S, Fehr M, et al. Construction and optimization of a family of genetically encoded metabolite sensors by semirational protein engineering. *Protein Sci*, 2005, 14: 2304-14
- [35] Imamura H, Nhat KP, Togawa H, et al. Visualization of ATP levels inside single living cells with fluorescence resonance energy transfer-based genetically encoded indicators. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 15651-6
- [36] Tsuyama T, Kishikawa J, Han YW, et al. *In vivo* fluorescent adenosine 5'-triphosphate (ATP) imaging of *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans* by using a genetically encoded fluorescent ATP biosensor optimized for low temperatures. *Anal Chem*, 2013, 85: 7889-96
- [37] Menger L, Vacchelli E, Adjemian S, et al. Cardiac glycosides exert anticancer effects by inducing immunogenic cell

- death. *Sci Transl Med*, 2012, 4: 143ra199
- [38] Zhao Y, Hu Q, Cheng F, et al. SoNar, a highly responsive NAD⁺/NADH sensor, allows high-throughput metabolic screening of anti-tumor agents. *Cell Metab*, 2015, 21: 777-89
- [39] Zhao Y, Jin J, Hu Q, et al. Genetically encoded fluorescent sensors for intracellular NADH detection. *Cell Metab*, 2011, 14: 555-66
- [40] Hung YP, Albeck JG, Tantama M, et al. Imaging cytosolic NADH-NAD⁺ redox state with a genetically encoded fluorescent biosensor. *Cell Metab*, 2011, 14: 545-54
- [41] Zhao Y, Wang A, Zou Y, et al. *In vivo* monitoring of cellular energy metabolism using SoNar, a highly responsive sensor for NAD⁺/NADH redox state. *Nat Protoc*, 2016, 11: 1345-59
- [42] Zou Y, Wang A, Huang L, et al. Illuminating NAD⁺ metabolism in live cells and *in vivo* using a genetically encoded fluorescent sensor. *Dev Cell*, 2020, 53: 240-52. e247
- [43] Tao R, Zhao Y, Chu H, et al. Genetically encoded fluorescent sensors reveal dynamic regulation of NADPH metabolism. *Nat Methods*, 2017, 14: 720-8
- [44] Zou Y, Wang A, Shi M, et al. Analysis of redox landscapes and dynamics in living cells and *in vivo* using genetically encoded fluorescent sensors. *Nat Protoc*, 2018, 13: 2362-86
- [45] Zhou XX, Fan LZ, Li P, et al. Optical control of cell signaling by single-chain photoswitchable kinases. *Science*, 2017, 355: 836-42
- [46] Wang X, Chen X, Yang Y. Spatiotemporal control of gene expression by a light-switchable transgene system. *Nat Methods*, 2012, 9: 266-9
- [47] Zhang W, Lohman AW, Zhuravlova Y, et al. Optogenetic control with a photocleavable protein, PhoCl. *Nat Methods*, 2017, 14: 391-4
- [48] Ye H, Daoud-El Baba M, Peng RW, et al. A synthetic optogenetic transcription device enhances blood-glucose homeostasis in mice. *Science*, 2011, 332: 1565-8
- [49] Chen X, Liu R, Ma Z, et al. An extraordinary stringent and sensitive light-switchable gene expression system for bacterial cells. *Cell Res*, 2016, 26: 854-7
- [50] Chen X, Li T, Wang X, et al. Synthetic dual-input mammalian genetic circuits enable tunable and stringent transcription control by chemical and light. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44: 2677-90
- [51] Li X, Zhang C, Xu X, et al. A single-component light sensor system allows highly tunable and direct activation of gene expression in bacterial cells. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48: e33
- [52] Li T, Chen X, Qian Y, et al. A synthetic BRET-based optogenetic device for pulsatile transgene expression enabling glucose homeostasis in mice. *Nat Commun*, 2021, 12: 615
- [53] Motta-Mena LB, Reade A, Mallory MJ, et al. An optogenetic gene expression system with rapid activation and deactivation kinetics. *Nat Chem Biol*, 2014, 10: 196-202
- [54] Polstein LR, Gersbach CA. A light-inducible CRISPR-Cas9 system for control of endogenous gene activation. *Nat Chem Biol*, 2015, 11: 198-200
- [55] Redchuk TA, Omelina ES, Chernov KG, et al. Near-infrared optogenetic pair for protein regulation and spectral multiplexing. *Nat Chem Biol*, 2017, 13: 633-9
- [56] Kaberniuk AA, Shemetov AA, Verkhusha VV. A bacterial phytochrome-based optogenetic system controllable with near-infrared light. *Nat Methods*, 2016, 13: 591-7
- [57] Zhao EM, Zhang Y, Mehl J, et al. Optogenetic regulation of engineered cellular metabolism for microbial chemical production. *Nature*, 2018, 555: 683-7
- [58] Imayoshi I, Isomura A, Harima Y, et al. Oscillatory control of factors determining multipotency and fate in mouse neural progenitors. *Science*, 2013, 342: 1203-8