

· 综 述 ·

## 微藻趋向运动及其靶向运输应用研究进展

刘源源<sup>#</sup>, 曾威阳<sup>#</sup>, 陈如, 葛云龙, 孜力汗, 杨君, 孔凡涛

大连理工大学 生物工程学院, 辽宁 大连 116024

刘源源, 曾威阳, 陈如, 葛云龙, 孜力汗, 杨君, 孔凡涛. 微藻趋向运动及其靶向运输应用研究进展. 生物工程学报, 2022, 38(2): 578-591.

LIU YY, ZENG WY, CHEN R, GE YL, ZI LH, YANG J, KONG FT. Tactic movement of microalgae and its application in targeted transport: a review. Chin J Biotech, 2022, 38(2): 578-591.

**摘 要:** 微藻主要是指一类能进行光合自养的微生物, 且很多藻株还兼具运动特性。因而将微藻与微流控芯片结合, 实现精确靶向, 或用于分子药物递送, 在生物医学治疗和药效学分析等领域有重要的潜在应用价值, 也是当今的研究热点之一。然而, 目前关于微藻趋向运动的研究及潜在的应用的综述报道却相对较少。本文主要以模式微藻莱茵衣藻为例, 概述基于微藻细胞趋光、趋化和趋磁等特征, 实现微藻可控运动的研究进展, 并对其现存的问题以及未来可能的应用方向进行了展望, 为进一步利用合成生物学等前沿技术理性改造微藻, 实现靶向运输和精准医疗等提供科学依据。

**关键词:** 微藻; 鞭毛; 趋向运动; 靶向运输; 莱茵衣藻

## Tactic movement of microalgae and its application in targeted transport: a review

LIU Yuanyuan<sup>#</sup>, ZENG Weiyang<sup>#</sup>, CHEN Ru, GE Yunlong, ZI Lihan, YANG Jun, KONG Fantao

School of Bioengineering, Dalian University of Technology, Dalian 116024, Liaoning, China

**Abstract:** Microalgae are a group of photosynthetic microorganisms, which have the general characteristics of plants such as photosynthesis, and some species have the ability of movement which

**Received:** March 18, 2021; **Accepted:** July 6, 2021

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (31900221); Natural Science Foundation of Liaoning Province, China (2020-MS-102)

**Corresponding author:** KONG Fantao. Tel/Fax: +86-411-84708083; E-mail: kongfantao@dlut.edu.cn

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this study

**基金项目:** 国家自然科学基金 (31900221); 辽宁省自然科学基金 (2020-MS-102)

resembles animals. Recently, it was reported that microalgae cells can be engineered to precisely deliver medicine-particles and other goods in microfluidic chips. These studies showed great application potential in biomedical treatment and pharmacodynamic analysis, which have become one of the current research hotspots. However, these developments have been rarely reviewed. Here, we summarized the advances in manageable movement exemplified by a model microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* based on its characteristics of chemotaxis, phototaxis, and magnetotaxis. The bottlenecks and prospects in the application of microalgae-based tactic movement were also discussed. This review might be useful for rational design and modification of microalgal manageable movement to achieve targeted transport in medical and other fields.

**Keywords:** microalgae; flagella; tactic movement; targeted transport; *Chlamydomonas reinhardtii*

微藻是一种光合自养微生物，是地球上氧气的重要来源。微藻种类繁多、分布广泛，能适应淡水、海洋、土壤和沙漠等多种生存环境。它们富含碳水化合物、蛋白质、脂类和色素等多种高价值化合物<sup>[1-2]</sup>，可用于重组蛋白和生物能源物质的开发<sup>[3-4]</sup>。由于微藻具有天然的运动能力，随着纳米技术和材料科学的迅速发展，基于微藻的纳米机械人的研发已经逐渐成为当今研究热点之一。这为其在靶点操纵、分子药物递送以及生物聚集物去除等生物学中的应用提供了新的可能性，也为医疗保健技术提供了许多新的思路和解决方案<sup>[5]</sup>。

莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*) 是目前微藻研究的重要模式生物之一，它是一种双鞭毛单细胞绿藻，具有生长速度快、培养周期短、基因工程操作简便、营养生长为单倍体、已完成全基因组测序和几乎覆盖全基因组范围的突变体库可供利用等优势，目前已被广泛应用于光合作用、细胞周期调控和鞭毛运动机制等领域的研究<sup>[6]</sup>。莱茵衣藻鞭毛的同步拍打产生能量能推动其自身在水中运动，从而使莱茵衣藻细胞在生活环境中以随机的螺旋路径游动。除具有运动性外，莱茵衣藻还有拥有感受环境变化并做出即时反应的能力。同时，相较

于可能产生致病性、生长速率不可控且可能存在抗生素抗性的细菌而言，莱茵衣藻具有良好的生物相容性<sup>[7]</sup>，对人体及动物细胞无细胞毒性，可应用于正常及癌变哺乳动物细胞<sup>[8]</sup>，甚至可作为光合生物材料移植于大鼠皮肤<sup>[9]</sup>。其细胞壁还可通过表面修饰携带药物分子<sup>[10]</sup>，例如使用 N-羟基琥珀酸亚胺，通过叠氮化物环加成即可对莱茵衣藻进行功能化改造，在其上通过光可裂解的邻硝基苄基携带万古霉素，该抗生素在连接状态下不发挥作用，但在 365 nm 下连接链断裂，进而实现药物分子的定点释放，可用于治疗皮肤或软组织感染<sup>[11]</sup>；利用类似的策略，也已经实现了在模拟生理环境条件下的牛顿及非牛顿流体中的药物递送。由于在生理环境中藻类具有天然的可降解性，进行体内 (*in vivo*) 医疗应用时，不必担心莱茵衣藻微作为药物递送载体后的回收问题<sup>[9]</sup>；同时可通过改变微藻表面修饰层的厚度调控降解速度，控制基于微藻的微游泳器在体内的存活时间<sup>[12]</sup>。

基于以上特征，微藻包括莱茵衣藻是一种理想的、天然的活微纳米机械人候选生物。本综述主要以莱茵衣藻为例，概述了基于其自身趋光、趋化和趋磁等运动特征，实现可控运动的研究进展，为实现基于微藻的靶向运输和精

准医疗等奠定理论基础。

## 1 微藻运动的分子机制

具有运动器官并且能够通过一定的节拍运动控制转向是生物体进行运动行为的前提。微藻之所以能够运动,是因为其具有运动器官——鞭毛(flagella)。在微藻运动的相关机制的研究中,其中以莱茵衣藻的相关研究成果相对比较系统,本文将莱茵衣藻为例概述微藻运动的相关分子机制。

大多数微藻的鞭毛结构很类似,都是由鞭毛中的微管动力蛋白臂与相邻的微管蛋白相互桥接,利用ATP水解产生能量,通过相邻微管间的相对滑动使鞭毛摆动产生动力,使微藻以不同的运动方式向前游动。鞭毛内对特定蛋白质的选择性进出,是通过鞭毛内运输(intraflagellar transport, IFT)来介导的<sup>[13]</sup>。而IFT不仅与鞭毛蛋白质的运输有关,还直接参与了微藻在表面上的滑动过程。研究表明,  $\text{Ca}^{2+}$ 可以通过直接破坏逆行IFT蛋白复合物和鞭毛膜糖蛋白之间的相互作用,从而调节鞭毛表面糖蛋白与轴丝上IFT蛋白复合体相互作用的程度。这种特殊的传导的机制可用来精确控制鞭毛滑动和附着,为精准控制分子药物递送等奠定理论基础<sup>[14]</sup>。

2013年,清华大学潘俊敏教授课题组的研究成果证实了莱茵衣藻细胞中存在鞭毛长度感知系统,能够实现自身鞭毛长度的自主调控<sup>[15]</sup>。2018年,该团队进一步揭示了莱茵衣藻中鞭毛长度调控和组装是通过鞭毛长度反馈调节鞭毛内运输体的马达蛋白磷酸化而介导的,该研究是关于莱茵衣藻鞭毛长度和组装机制研究的重要进展,揭示了鞭毛长度调控的潜在机理<sup>[16]</sup>。2020年,天津科技大学樊振川团队阐明了莱茵衣藻鞭毛内运输体IFT-B1组分之一的小GTP酶RABL5/IFT22通过稳定小GTP酶ARL6/BBS3,

并通过两者的结合状态调控被募集到鞭毛基体的巴德-毕德氏综合征蛋白复合物(BBSome)的数量,从而维持鞭毛膜内信号分子的动态平衡。这一发现对理解巴德-毕德氏综合征的成因具有重要的科学意义<sup>[17]</sup>。由于这种鞭毛内运输的相关机制具有高度保守性,且在其他真核生物中也参与了鞭毛/纤毛生长,因此,有关微藻运动器官鞭毛的研究不仅可以揭示其运动的相关机制,还可以为纤毛相关疾病的研究提供新的线索。

## 2 微藻的趋向运动

根据微藻的趋向物的不同,可主要分为趋光/避光运动、趋化运动和趋磁运动。本综述主要以莱茵衣藻为模式生物来讨论微藻趋向作用及应用。

### 2.1 微藻的趋光运动

#### 2.1.1 微藻趋光性运动的特点

具有鞭毛的微藻品系普遍存在趋光运动的特性,但莱茵衣藻是目前研究最深入的模式微藻之一。因此,本综述以莱茵衣藻为例,概述微藻的趋光性及相关的应用。莱茵衣藻在自然的生长环境中,为适应不断变化的光环境,从而进化出了以眼点为感光系统,来感知外界光环境,并通过对鞭毛的摆动进行相应调控,从而产生正趋光性或负趋光性的现象<sup>[18]</sup>。最近研究表明,为实现在光下的有效暴露,莱茵衣藻趋光运动的反应调控在几十秒即可完成<sup>[19]</sup>。

在许多光合自养微生物和植物中,叶绿体可以改变其相对于入射光的位置以实现最佳光合作用<sup>[20]</sup>。微藻在没有外界人为干预的情况下,衣藻细胞通过正和负趋光性之间的切换来改变它们的游动方向,即朝向或远离光源游动。这种不同趋光切换取决于外界环境条件和细胞内生理变化,例如光强度<sup>[21]</sup>和活性氧(reactive oxygen species, ROS)的含量<sup>[20]</sup>等其他因素,而

切换的结果就是莱茵衣藻能够在最佳的光强下生长,提高其生存或环境适应能力。除为了获得适宜的光强外,正和负趋光性的切换也可能是为了维持细胞内氧化还原稳态,但其分子机制仍然不清楚。

### 2.1.2 微藻趋光感受器——眼点

能够进行高精度趋光行为的一个重要特征是生物体应当具有精确的感光体,并且能够传导信号,引起运动器官的摆动。在微藻中,这种独特的结构被称为眼点 (eye spot),又叫眼斑。目前,莱茵衣藻的眼点是研究最为深入的细胞运动感光结构。莱茵衣藻的眼点主要由 3 个不连续的结构组成:质膜、叶绿体包膜和颗粒层,其中颗粒层的主要组成物质是类胡萝卜素<sup>[18]</sup>。对莱茵衣藻 *eye2* 突变藻株的研究表明,*eye2* 基因与眼点的形态构建过程中类胡萝卜素色素颗粒层的形成有着密切的关系,因此 *eye2* 突变藻株的眼点无法实现对光源的感知和响应<sup>[22]</sup>。并且,莱茵衣藻眼点内的类胡萝卜素层能够屏蔽外界及来自细胞体内的其他干扰光,确保在移动过程中感光器的激发不受与方向无关的光信号的干扰。因此,对于莱茵衣藻的趋光特性而言,感光体的折射或色素结构对眼点的遮光性是必不可少的。同时由于光接收的空间/时间与鞭毛响应的空间/时间精确耦合,眼点存在的位置需要精确合理<sup>[23]</sup>。在漫长的进化过程中,莱茵衣藻眼点的位置已经从细胞前部或后部进化到了细胞侧面,且位于细胞体的中间位置,这样的进化结果可能是为了在运动过程中莱茵衣藻围绕身体纵轴旋转时,便于眼点感受来自不同方向的人射光,从而做出正确的应答<sup>[23]</sup>。

### 2.1.3 微藻趋光性产生的分子机制

在微藻中,例如莱茵衣藻如何在眼点处感知光,如何检测光的方向以及如何响应光刺激改变其行为?这些问题在研究趋光运动的机制

中至关重要。2001 年 Fuhrmann 等首次证实,莱茵衣藻的趋光性和光敏反应是由视紫红质 (rhodopsin) 引发的<sup>[24]</sup>。视紫红质是莱茵衣藻的趋光性中最重要的一类蛋白,分为感觉视紫红质和通道视紫红质,广泛存在于莱茵衣藻等多种微藻品系中。近几年,研究表明可以对这些视紫红质进行重新设计,通过人工合成并实现新的功能。2017 年刊登在 *Science* 期刊上的综述文章系统地介绍了光门控离子通道 ChR 的功能,并且首次详尽地对基于 ChR 特性而发展出的光遗传学进行阐述,同时提出可以对其结构进行精确的重新设计以实现新的应用<sup>[25]</sup>,在除神经科学等研究领域也具有潜在应用。然而 ChR 结构信息至今仍不清楚,导致 ChR 功能发现和重新设计面临的问题仍然有待于解决,如何获得高分辨率的 ChR 蛋白结构特征是该领域的研究热点。

ChR 是一种独特的光门控离子通道,其中目前研究比较清楚的是 ChR1 和 ChR2<sup>[26]</sup>,分别由 *COP3* 和 *COP4* 基因编码。目前通过 CRISPR-Cas9 的基因编辑技术已经在莱茵衣藻体内成功地敲除了 *COP1/2*、*COP3* (编码通道视紫红质 1, ChR1)、*COP4* (编码 ChR2) 等一系列光感受器基因,这为揭示 ChR 蛋白的体内功能奠定了基础<sup>[27]</sup>。研究发现,ChR2 是  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$  和  $\text{Ca}^{2+}$  的离子门控通道,位于细胞质膜上,属于视紫红质中的通道视紫红质。ChR2 作为感光器,在光刺激下能够在毫秒尺度里发生蛋白质构象改变,将全反式视黄 (all-trans-retinal chromophore) 异构化成 13-顺式 (13-cis),并激活光感受器通道,从而导致  $\text{Ca}^{2+}$  快速进入眼点区域<sup>[28]</sup>。在眼点区域,细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度变化是启动鞭毛的信号级联反应的核心,虽然随后的趋光性的信号传递过程尚不清楚,但该信号传递会引发一系列电响应,使细胞质膜表面发生去

极化,产生光电流。该光电流传递到位于鞭毛上的电压依赖性钙离子通道 (voltage-dependent calcium channels, VDCC),从而引起钙离子内流,目前研究报道了CAV2 (GenBank ID: 194451) 编码的电压依赖性钙离子通道,在介导鞭毛钙离子内流这一过程中发挥重要作用<sup>[29]</sup>,其引发一系列的分子传导,最后改变鞭毛摆动,从而使细胞转向<sup>[30]</sup>(图1)。

实现微藻趋光运动的可控性,精准地调控趋光运动至关重要。研究发现,趋光行为的变化伴随着ChR1磷酸化的变化,同时ChR1的磷酸化状态依赖于光强和时间,而在这一变化过程中细胞内游离 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度也有所改变,证明ChR1的磷酸化状态,趋光行为以及胞内游离 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度这三者之间可能存在某种联系。 $\text{Ca}^{2+}$ 可能作为一个潜在的共同次级信号,参与了趋光反应的信号、强度和适应水平的调节<sup>[31]</sup>。因此基于该特点,可通过特定的效应物,改变ChR的磷酸化状态从而改变趋光运动,达到控制定向趋光运动的目的。除了磷酸化和去磷酸化可以调节莱茵衣藻的趋光特性外,cAMP和cGMP

也可以对趋光性进行级联调节,但是其中的具体机制还不清楚,有待进一步研究<sup>[32]</sup>。Arrieta等在研究莱茵衣藻光合作用时发现,趋光性和叶绿素荧光的适应动力学显示出一定的定量关系,这表明光合作用与趋光性之间也存在相互联系<sup>[19]</sup>。研究表明,莱茵衣藻叶绿体钙传感器蛋白CAS在弱光条件下能影响莱茵衣藻的趋光性<sup>[33]</sup>。但关于ChR1和ChR2所介导的趋光性的中间信号分子以及分子机理的研究仍不清楚。莱茵衣藻趋光性的影响因素较多,莱茵衣藻的趋光运动除了受自身分子水平上的调控外,还可能依赖于群体的细胞密度,随着细胞浓度的增加,趋光性效率降低,直到获得临界浓度<sup>[34]</sup>。

综上,莱茵衣藻及大部分微藻的正趋光性以及负趋光性的调控,都取决于外界因素,但是外界因素对其的控制机理仍然不是很清楚<sup>[35]</sup>。最近,研究发现当用活性氧处理莱茵衣藻时,细胞表现出正趋光性,而用ROS淬灭剂处理时,细胞表现出负趋光性<sup>[36]</sup>。该研究结果表明,微藻对趋光性的响应可能最终归结于其体内氧化还原电位的改变。

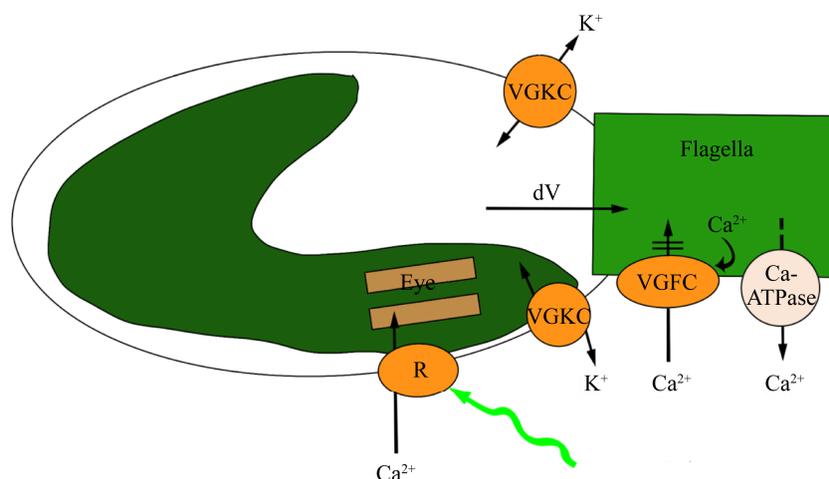


图1 莱茵衣藻中视紫红质介导的离子交换过程示意图<sup>[37]</sup>

Figure 1 The rhodopsin-induced ionic process in *Chlamydomonas reinhardtii*<sup>[37]</sup>. R: rhodopsin; VGFC: voltage-gated flagellar channel; VGKC: voltage-gated potassium channel. The figure is modified based on Hegemann P, 1997<sup>[37]</sup>.

### 2.1.4 微藻的趋光性与生物对流

在微藻的趋光运动中进行生物对流规律分析,对准确预测在光照下该微生物的运动和聚集方式,并实现光控运动有着重要的意义<sup>[38]</sup>。最近,关于上方环形光束影响莱茵衣藻的运动的研究发现,在正趋光性的范围内,莱茵衣藻细胞会聚集于光束下,进而产生放射性的对称对流,在较长时间内,这一对流运动可以捕获漂浮的颗粒(800 μm 大小的玻璃珠),使其移动至光束下方<sup>[39]</sup>。除了环形光束外,研究者也探索了在一个薄而宽的垂直小室中,莱茵衣藻对水平放置的线性光源的趋向反应。在光源开启后,由于莱茵衣藻细胞向光源周围的聚集运动,产生了重力方向上的扰动和局部的下沉卷流(plume)。通过其给出的模型预测,当平均细胞浓度低于一定浓度时,在光源附近的聚集不再引起下降卷流<sup>[40]</sup>。

在研究将莱茵衣藻置于截面为正方形的长管中运动时,发现当趋光运动与管内液体流动方向一致时,衣藻会聚集于轴线上;逆流时则聚集于管壁。2018年,这一现象由 Clarke 的团队通过系统性的理论研究总结为模型,针对在底部提供均匀光照的情景,发现在更改关键参数如液体流动强度、光源光强、细胞吸收作用系数等后,可以实现微藻在不同深度处的聚集<sup>[41]</sup>。

### 2.1.5 微藻趋光性的潜在应用

目前,以 ChR1 和 ChR2 等光敏蛋白为基础,衍生出对光产生应答的细胞控制器,促进了光遗传学的诞生,使得科学家可以利用光来操控细胞,使其执行一定的功能,例如抑制细胞神经环路等<sup>[42]</sup>。光遗传学可以通过光源有针对性地快速控制生物系统,如使哺乳动物细胞移动<sup>[25]</sup>,也可以实现基于细胞的光电探测器的成像<sup>[43]</sup>,甚至具有恢复盲人视力的潜力<sup>[44]</sup>。目前,光遗传学给神经回路的实验研究带来了新的技

术变革,并有望用于治疗神经系统疾病。然而,它的作用仍存在局限性,例如,光遗传学的光感蛋白的影响光谱有限,主要是紫外光或者可见光,但紫外线或可见光刺激容易引起潜在的光损伤,且对组织的穿透性有限。因此,目前的光遗传学主要聚焦于对膜离子通道的近红外调节<sup>[45]</sup>,例如,使离子通道能感受波长更长和组织穿透性更强的红外光并做出一定的反馈。光遗传学的迅速发展和巨大应用潜力,也促进了光遗传学的主要光感蛋白 ChR1 和 ChR2 的开发与应用,并为可控的生物趋光运动提供了许多策略。最近, Lin 等设计了一种基于 ChR 的红移变体蛋白(ReaChR),该 ReaChR 突变体能够通过外部光源激活大脑深部结构中的神经元,有望替代通过手术来激活相关神经元<sup>[46]</sup>。基于光开关反式激活因子,可以开发出光开关式的基因表达系统,以最小的人为干扰来操纵生命系统中的许多生物过程<sup>[47]</sup>。将来或许可以尝试将具有红移特性的 ChR 蛋白在莱茵衣藻中成功表达,从而拓宽莱茵衣藻本身的趋光光谱,再利用红外光的组织穿透性在体外对莱茵衣藻进行操控,达到定向移动的目的,使其发挥药物递送等功能。然而,不同的定向进化后的 ChR 蛋白,是否能够在莱茵衣藻或其他微藻体内发挥正常功能,从而实现可控的趋光运动仍有待于研究。

生物体与其他非生物材料共同组成的生物融合机器人,也为可控趋光性运动提供了一种新的研究方向。这些生物杂交微型机器人附着具有功能化的表面的微珠充当微型螺旋桨,通过使用某些环境刺激来使细胞运动或者停止。莱茵衣藻具有可以在液体自主移动、对外界的光刺激做出反应、自身的低毒理学特性<sup>[7]</sup>,这些优点使莱茵衣藻在生物微纳机器人方面具有较高的应用潜力和开发价值。例如,开发基

于莱茵衣藻的光力控制的“活体微电机”，该“生物微电机”不仅可以进行体内生物聚集体（例如血凝块）的去除，还可以用来递送分子药物。通过表面化学的方式将负载物附着在莱茵衣藻上，利用趋光性来引导细胞运动，利用其他表面化学的方法来释放负载物<sup>[5]</sup>。也有研究显示，可通过光来调控莱茵衣藻对表面的附着力，使附着在衣藻表面的负载物完成附着或者解附着过程，该过程活跃且完全可逆，几秒钟之内就可以实现。这一光可切换的粘附性，在未来控制药物的释放与负载等方面具有非常大的应用潜力<sup>[48]</sup>。2016年，中国科学院自动化研究所的科研人员开发了一种利用局部光诱导高浓度微生物进行生物驱动的“生物镊子”系统，并根据莱茵衣藻自身对光的感应，利用该系统实现了莱茵衣藻二维平移或一维旋转，该研究为实现微藻的可控运动提供了工具系统并奠定了理论基础<sup>[49]</sup>。除了莱茵衣藻之外，研究人员目前也在尝试将团藻 (*Volvox*) 用作光控微型机器人，以实现亚毫米大小货物的单向运输<sup>[50]</sup>。

## 2.2 微藻的其他趋向性运动

### 2.2.1 微藻趋化性运动及其特点

趋化运动是指生物对外界环境中的化学物质刺激所产生的趋向性反应，分为正向和负向两种。在现有的微生物趋化性的研究中，可引起细菌趋化反应的化学物质范围十分广泛，例如，糖、氨基酸以及诸多信号分子等<sup>[51]</sup>，然而，关于微藻的趋化性的研究相对较少。例如，迄今为止已知的可引发莱茵衣藻趋化反应的化学物质除铵盐、糖类和碳酸氢根离子之外，还有如脱落酸等部分植物激素<sup>[52-53]</sup>。

进一步的研究发现，莱茵衣藻对部分化学物质（如碳酸氢盐）的趋化性具有显著的节律特征<sup>[53]</sup>。与高峰在白天的趋光性节律不同，衣藻对铵盐和碳酸氢盐的趋化性均在夜晚达到高

峰；而对甲基铵盐的趋化性节律，由于光的影响在黎明时达到峰值。同时，莱茵衣藻对部分化学物质的趋化性也受到生命周期的影响，甚至可能仅在其生命周期的某些阶段出现。例如，对于铵及亚硝酸盐的趋化性仅在营养细胞中发生<sup>[54]</sup>。

### 2.2.2 微藻趋化性运动的潜在应用

微藻的趋化性的重要应用之一是进行藻类浓缩或藻株的分离<sup>[55]</sup>。除此之外，目前基于微藻的趋化性，设计用于医疗药物递送的细胞微型机器人或生物杂交微型机器人，也是当今趋化性应用研究的热点<sup>[33,56]</sup>。由于莱茵衣藻具有生物相容性，利用其趋化性作为靶向药物输送载体在未来应用具有很强的可行性。趋光运动在实际应用中通常会涉及使用较为复杂的外部器械加以辅助，与之相比，基于趋化性的控制，仅利用细胞内的微环境中本身存在的化学梯度，在群体水平上实现微型游泳器驱动和控制具有很大的开发潜力<sup>[57]</sup>。目前已有研究中实现了多细菌驱动微游泳器的趋化行为<sup>[58-59]</sup>，将莱茵衣藻改造成细胞驱动微游泳器也可能具有较好的应用前景。最近，一个针对细胞驱动微游泳器建立的模型显示，增强微型游泳器趋化性的有效方法是提高其平均速度<sup>[57]</sup>，这意味着具有较高运动性的莱茵衣藻有望成为较好的候选载体。此外，将衣藻的趋化性用于对相似大小的微纳米颗粒进行高通量分选，也是非常具有发展前景的应用方向之一。例如，2016年 Suh 等利用工程化大肠杆菌的趋化性实现了简单高效的分选系统<sup>[60]</sup>，由于莱茵衣藻本身具有良好运动能力，将其作为替代的底盘生物，可能会大大提高其分选速度，实现对该分选平台的改进。

但上述趋化性很大程度依赖于细胞对特定化学物质在短距离上的感知能力，因而，在溶液体系混合不充分时，反应时间经常取决于化学物质的扩散率。如何实现实时反应、解决趋

化体系中时空分辨率较低的问题,将是未来研究的重点之一<sup>[61]</sup>。而趋化性的本质决定了若要降低反应时间,实现高效响应,应用场景会局限在较小范围内。因此,探索其他的趋向运动控制方式仍非常重要。

### 2.2.3 微藻对溶液黏度的响应

2020年,Stehnach等报道了莱茵衣藻的一种新的趋向运动能力:即趋向低黏度区域,这对探究微藻环境中的运动提供了全新的思路<sup>[62]</sup>。一般而言,在没有黏度梯度时,莱茵衣藻会沿原有运动方向继续运动;而存在黏度梯度时,由于运动的阻力增加,莱茵衣藻更倾向于在高黏度区域聚集;但研究者发现,随着黏度量级的增加,衣藻细胞会产生类似正弦曲线的转向,转而聚集于低黏度区域。研究表明,莱茵衣藻这一运动特性是高黏度溶液带来的阻力和衣藻本身趋向低黏度区运动的平衡结果,并推测其趋低黏度性可能是由于两侧鞭毛感知的黏度不平衡导致。2021年,Coppola和Kantsler研究发现,当莱茵衣藻从低黏度区域跨越大黏度梯度进入高黏度区域时,会在黏度界面处产生转向和分散的现象,但在从高黏度向低黏度区运动时则未出现这一现象,并观察到了莱茵衣藻在低黏度区域中聚集的现象<sup>[63]</sup>。研究者推测这是由衣藻在高黏度区域运动缓慢、衣藻在高黏度区域角分散降低和黏度界面处转向3种作用共同导致的。黏度趋向性和莱茵衣藻的趋光性或趋化性一样,具有对数灵敏性。这对于研究衣藻在复杂流体,尤其是存在生物膜、保护型黏液层等黏度梯度的系统中的运动具有重大的意义。

### 2.2.4 微藻的趋热性运动

许多动植物等多细胞生物都被证实有趋热性。通过以哺乳动物精子为模型的研究,目前关于哺乳动物趋热性的分子机制的研究取得了很大的进展,但是在微藻趋热性方面的相关研

究比较缺乏。2018年,科学家排除了对流等环境因素的影响,首次证实了莱茵衣藻具有趋热性,并且这种趋热性与细胞内还原-氧化条件密切相关<sup>[64]</sup>。在不同的氧化还原条件和培养温度下,可以增强或抑制甚至逆转热趋向性。藻类响应热环境变化的机制可能依赖于膜受体,包括瞬时受体电位(transient receptor potential, TRP)离子通道。TRP通道也被证实也可能在莱茵衣藻的趋热性的分子机制中发挥重要作用。科学家通过对莱茵衣藻TRP通道蛋白(crTRP1)结构进行分析,发现crTRP1与其他TRP通道蛋白的结构存在显著差异,但其原因仍然有待于进一步研究<sup>[65]</sup>。

## 2.3 趋磁性运动

### 2.3.1 微藻趋磁性运动的特点

磁具有远超红外光的穿透能力,既可在同质环境,也可在异质环境中产生效用,进而实现远程控制。因此,在黑暗条件下尤其是医疗领域中,磁控相较光控来说有独特的优势。在自然情况下,绝大多数微生物包括微藻都不具有趋磁的特性<sup>[66]</sup>。然而,经过改造的趋磁性微藻,例如莱茵衣藻不仅自身具有良好的运动能力,在受到磁场引导时速度更是可达 $700\ \mu\text{m/s}$ <sup>[67]</sup>。因此,对微藻尤其是模式生物莱茵衣藻进行趋磁性的改造具有广阔前景。2020年,浙江大学周民团队报道了利用磁性改造后的螺旋藻(*Spirulina platensis*)进行造影及癌症治疗的研究成果<sup>[68]</sup>。对非趋磁性的藻类细胞进行磁性修饰,通常可以通过在细胞表面附着磁性纳米颗粒(MNPs)或磁性微粒来实现,但大部分情况下,这种附着是非特异性的。以下是目前几种主要的趋磁性改造方法及在微藻中的应用。

### 2.3.2 金属阳离子介导趋磁

2018年Santomoro等将铽( $\text{Tb}^{3+}$ )导入莱茵衣藻并使之磁化(图2A),制造出一种可运送

大量目标物的、细胞相容性好并且运动能力强的趋磁莱茵衣藻<sup>[69]</sup>。铽离子在胞内富集的方式与钆离子相似：在含有铽离子的条件下培养莱茵衣藻，可使铽离子逐渐聚集在衣藻的细胞壁上，然后透过细胞膜进而富集于胞内<sup>[69-70]</sup>。尽管铽离子的加入使莱茵衣藻产生生长抑制的现象，但是莱茵衣藻本身的运动能力并没有受到明显影响。施加均匀磁场可使经过磁化后的具有运动特性的莱茵衣藻与磁场线对齐，引导它们以定向运动的方式游动。

磁化后的莱茵衣藻在定向医疗等领域有着更为广阔的应用前景。例如，莱茵衣藻与小鼠成纤维细胞 NIH 3T3 及乳腺癌细胞 MCF-7 共培养实验表明莱茵衣藻具有生物相容性<sup>[69]</sup>，这意味着莱茵衣藻细胞没有细胞毒性，可以在人体内进行分子药物递送等功能。其次，由于莱茵衣藻有自发荧光的特性，并且磁化材料铽离子具有光致发光特性<sup>[71]</sup>，磁性莱茵衣藻很容易通过发光成像工具在人体中进行跟踪。

### 2.3.3 细胞表面附着法趋磁

在微藻细胞表面人工构建掺入四氧化三铁 ( $F_3O_4$ ) 磁小体的“支架”，可将磁小体牢固附着于细胞表面从而制得有磁响应的“运动”细胞。这种表面附着修饰的方法操作简便并且能达到“微创”效果，在生物医疗或生物感应等应用方向上具有较强的优势。2015 年，香港中文大学的研究团队报道了一种可以低成本大批量制造磁控螺旋藻的方法<sup>[72]</sup>。因为螺旋藻本身不具有磁性，他们选择用磁铁矿悬浮液将这种藻包裹起来，进而实现了用磁场引导微藻定向运动。这种设计的精妙之处在于，螺旋藻独特的螺旋形细胞壁让具有磁性的  $F_3O_4$  颗粒能够附着其上，并根据需求可以使用不同的材料包裹  $F_3O_4$  颗粒，以实现不同功能；该团队于 2017 年使用磁共振成像 (magnetic resonance imaging, MRI)

实现了对小鼠腹腔内微藻群的实时控制和跟踪<sup>[73]</sup>。此外，由于螺旋藻分解时产生的细胞毒素对癌细胞有更高的活性，该磁化微藻在肿瘤治疗上有较大的应用可能。

近年来，以磁控螺旋藻作为生物治疗平台的研究也有长足的发展，研究者通常向螺旋藻中添加  $F_3O_4$  等多种纳米粒子来实现医疗性能。例如，2020 年 Liu 等使用螺旋藻实现了针对神经元再生的精确疗法<sup>[74]</sup>。除了前文中提到的用  $F_3O_4$  颗粒提供磁性和将藻类导航至目标区域之外，研究者也加入了具有电压性能的  $BaTiO_3$  纳米颗粒，后者在超声场作用下可产生电信号，进而引发神经干细胞 P12 分化。最近，Xie 等也采取相同的策略，利用磁控螺旋藻进行致病性细菌感染的治疗<sup>[75]</sup>。该团队将螺旋藻表面依次用  $F_3O_4$  纳米颗粒和聚多巴胺 (PDA) 包裹，分别实现磁控运动及光动力学抑菌功能。后者除光热治疗作用外，还存在荧光性能，可增强光声成像信号，实现感染患处可视化。

虽然莱茵衣藻自身的球形结构导致其自身不能直接以相同的方式加以改造，但利用相似的磁化方法，研究者们采取表面附着的方式，根据莱茵衣藻细胞壁特点进行了不影响莱茵衣藻本身运动能力的磁化设计。莱茵衣藻细胞壁是由富含 4-羟脯氨酸 (4-hydroxyproline, 4-HP) 的糖肽组成的多层结构，带有负电。根据这一特点，通过非共价静电相互作用，带正电的磁性粒子可以与莱茵衣藻细胞壁结合，完成磁化<sup>[76]</sup> (图 2B)。这种带正电的磁性微珠可有多种结构，例如，采用逐层组装的方法制备的磁性微珠，内芯为含有氧化铁纳米颗粒 (IONP) 修饰的聚苯乙烯 (PS)，外壳由多层的聚丙烯氨基盐酸盐 (PAH, 带正电) 和聚苯乙烯磺酸钠 (PSS, 带负电) 构成<sup>[9]</sup> (图 2C)。Ng 等使用的磁性微珠的内芯为同样含有 IONP 的胺功能化 PS，外层则使用了

阳离子聚二烯丙基二甲基氯化铵 (PDDA)<sup>[67]</sup>。

但上述针对莱茵衣藻的修饰方案,由于依靠的是运动过程中的随机碰撞,存在自组装效率低的问题。最新的研究报道了一种提高组装量的方法,即使用带有正电的几丁质,通过静电相互作用包裹衣藻,在藻外形成一层同形的几丁质薄膜。几丁质薄膜进一步作为结合物质,促进纳米粒子的进一步粘附。这一方法既不会对莱茵衣藻的正常运动有显著影响,也不会影

响其趋光性能,同时能大大提升组装效率。报道指出,使用包裹有几丁质的铁氧化物纳米粒子时,组装效率可达约 90%,远高于之前的文献报道<sup>[77]</sup>。

### 2.3.4 其他磁化方式

除了金属阳离子介导趋磁和细胞表面附着法介导的磁化方式之外,还有几种适用于微藻的磁化方法。首先是具有特异性的免疫磁化法,即将磁性微粒或磁性纳米颗粒固定于单克隆或

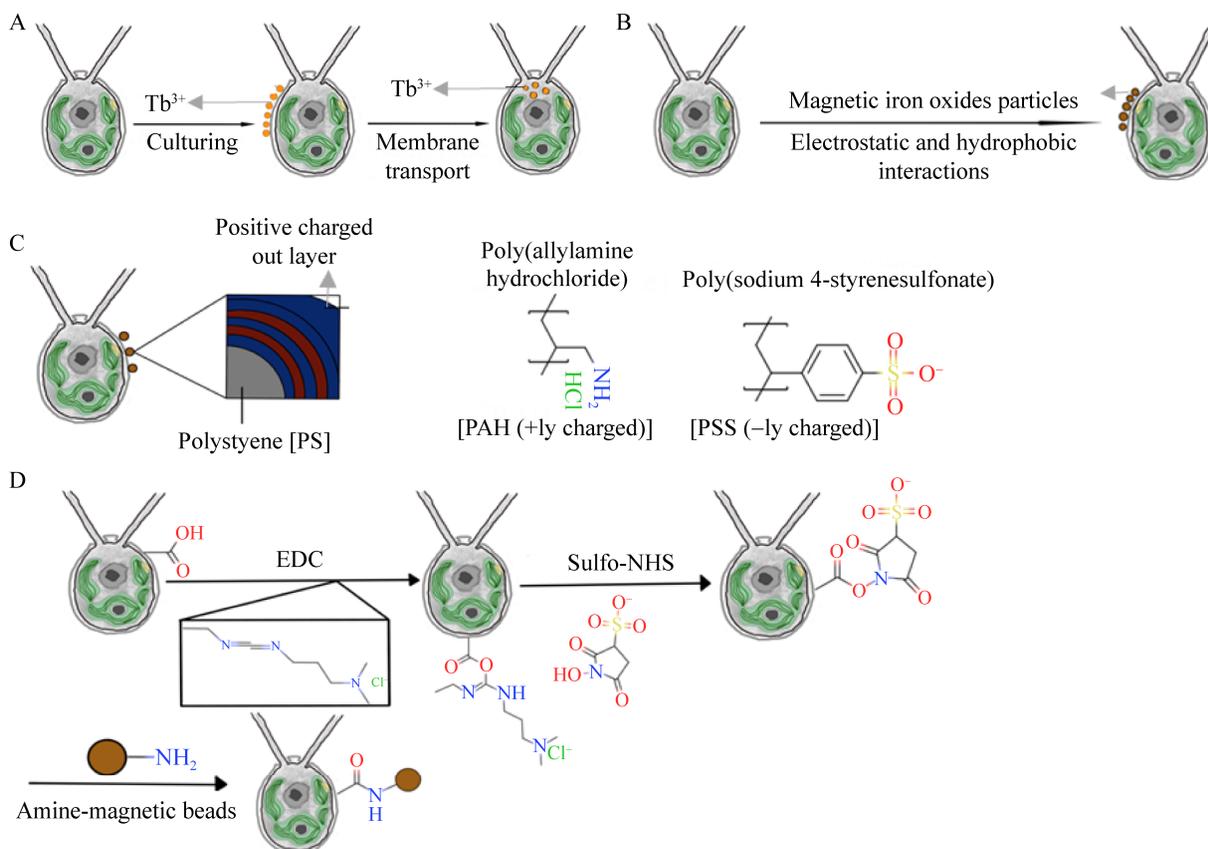


图 2 莱茵衣藻驱磁改造方法

Figure 2 The approaches of engineering magnetotaxis in *C. reinhardtii*. (A) Terbium iron-based magnetotaxis. (B) Incubate the cells with microwave iron oxide particles, and enable the magnetotaxis of the cells through electrostatic and hydrophobic interactions. (C) The representative structure of magnetic beads: the inner core is polystyrene (PS) modified with iron oxide nanoparticles (IONP) and the shell is a multilayer of poly(allylamine hydrochloride) with positive charge and poly(sodium 4-styrenesulfonate) with negative charge. (D) The carboxyl group on the cell wall of microalgae was activated by 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide (EDC) and produce amine active ester (NHS) under the catalysis of N-hydroxysulfonylsuccinimide (Sulfo-NHS), which interacted with amine functionalized magnetic beads to form covalent amide bond and complete magnetization.

多克隆特异性抗体上,并将混合物加入细胞悬液,利用抗原抗体作用,使得其与微藻细胞特异性结合,进而实现磁化。磁性微粒固定于可与目标细胞表面抗原表位结合的抗体上,磁化时直接将该抗体加入细胞悬液中<sup>[66]</sup>。此外,若对一级抗体进行生物素标记,并在磁珠上添加链霉亲和素,该方法还可用于对目的细胞的捕获。

Venu等则采用了一种与众不同的方式实现了蓝藻(PCC 6803)的磁化。他们利用1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC)与N-羟甲基磺基琥珀酰亚胺(NHS)偶联的化学方法,将该蓝藻固定在氨基化的磁珠上<sup>[78]</sup>。蓝藻细胞壁上的羧基被EDC激活后,在NHS催化作用下产生胺类活性物质NHS酯,使其与胺功能化的磁珠相互作用产生共价酰胺键(图2D)。微藻固定在磁珠上后,可通过磁轨道进行操控。由于莱茵衣藻细胞上也有相似的羧基结构<sup>[79]</sup>,该磁化方式或许也适用于莱茵衣藻或其他具有相似结构的微藻细胞,具有一定的可行性和应用价值。

### 3 总结与展望

虽然微藻的可控定向运动的可行性得到了初步验证,但利用趋向运动实现微藻可控运动在医学治疗和药物递送等领域的应用研究还处在理论设计阶段,尤其缺乏对体内系统潜在副作用的探究<sup>[80]</sup>。同时,不同趋向运动之间是否会存在干扰、影响微藻的最终运动趋向也是制约能否实现定向运动的因素之一。因此,微藻趋磁、趋光和趋化这三大趋向运动之间是否有相互关联的作用,且三者之间的运动优先响应能力有待于进一步探究。趋磁运动不是微藻自身固有的运动形式,而是通过体外人工处理实现的微藻的定向运动能力,因此对于微藻趋磁运动而言,可以通过增大磁场强度和增大磁小体的磁

密度等人工调节方式,尽可能减少趋光以及趋化运动的干扰,实现特异性靶向。而对于微藻趋光运动和趋化运动而言,由于相关分子机制仍然有待于进一步解析,因此目前无法预测当微藻在面对复杂环境时,这二者的作用是否存在优先响应或干扰。但目前有研究报道,脱落酸(ABA)引起的趋化运动能和趋光运动相互竞争<sup>[52]</sup>,使藻类定位在最适合光合作用的位置。

微藻的趋向运动的机制与应用研究具有挑战性,如何设计并实现生命周期更长、环境兼容性更高、驱动力更大和控制力更强的可控运动微型机器人是需要解决的关键问题,同时也成了目前研究热点之一。近几年,基因组学、蛋白组学和合成生物学的快速发展,为微藻的研究提供了丰富的“工具箱”:突变体的大规模产生,基因组编辑方法的优化,使得数千个微藻基因能在分子水平进行表征和鉴定,运用正向遗传学以及反向遗传学的手段结合组学研究技术能够在分子水平上解析各个信号通路。这些技术都为揭示微藻趋向运动的分子机理以及信号传导机制提供了新的可能。

在定向控制基础理论研究的基础上,基于微藻的微纳米机器人的研究和开发具有革新医疗保健行业的潜力,尤其在药物递送方面的应用前景广阔。微藻除了具备自主运动性外,又兼备无毒、高效和生物相容的特点,还具备真核生物所具有的蛋白合成和修饰与分泌能力,因此是开发新一代生物微型机器人的最佳平台。尝试开发基于微藻细胞的生物混合微系统,以提高藻类微型机器人的集成度,具有重要理论意义和应用价值。相信通过合成生物学等技术手段改造微藻所产生的个性化定制微纳米机器人,将来会广泛地应用于生物传感、疾病诊断和治疗、药物递送和微创手术等领域,将有助于实现精准医疗和智慧医疗。

## REFERENCES

- [1] Pierobon SC, Cheng X, Graham PJ, et al. Emerging microalgae technology: a review. *Sustain Energy Fuels*, 2018, 2: 13-38.
- [2] Sun H, Zhao WY, Mao XM, et al. High-value biomass from microalgae production platforms: strategies and progress based on carbon metabolism and energy conversion. *Biotechnol Biofuels*, 2018, 11: 227.
- [3] Anto S, Mukherjee SS, Muthappa R, et al. Algae as green energy reserve: technological outlook on biofuel production. *Chemosphere*, 2020, 242: 125079.
- [4] Siddiqui A, Wei ZY, Boehm M, et al. Engineering microalgae through chloroplast transformation to produce high-value industrial products. *Biotechnol Appl Biochem*, 2020, 67(1): 30-40.
- [5] Xin H, Zhao N, Wang Y, et al. Optically controlled living micromotors for the manipulation and disruption of biological targets. *Nano Lett*, 2020, 20(10): 7177-7185.
- [6] Tran NT, Kaldenhoff R. Achievements and challenges of genetic engineering of the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Algal Res*, 2020, 50: 101986.
- [7] Murbach TS, Glávits R, Endres JR, et al. A toxicological evaluation of *Chlamydomonas reinhardtii*, a green algae. *Int J Toxicol*, 2018, 37(1): 53-62.
- [8] Schenck TL, Hopfner U, Chávez MN, et al. Photosynthetic biomaterials: a pathway towards autotrophic tissue engineering. *Acta Biomater*, 2015, 15: 39-47.
- [9] Yasa O, Erkoç P, Alapan Y, et al. Microalga-powered microswimmers toward active cargo delivery. *Adv Mater*, 2018, 30(45): e1804130.
- [10] Fernández-Medina M, Ramos-Docampo MA, Hovorka O, et al. Recent advances in nano- and micromotors. *Adv Funct Mater*, 2020, 30(12): 1908283.
- [11] Shchelik IS, Sieber S, Gademann K. Green algae as a drug delivery system for the controlled release of antibiotics. *Chemistry*, 2020, 26(70): 16644-16648.
- [12] Yan XH, Xu JB, Zhou Q, et al. Molecular cargo delivery using multicellular magnetic microswimmers. *Appl Mater Today*, 2019, 15: 242-251.
- [13] Nakayama K, Katoh Y. Architecture of the IFT ciliary trafficking machinery and interplay between its components. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2020, 55(2): 179-196.
- [14] Fort C, Collingridge P, Brownlee C, et al.  $Ca^{2+}$  elevations disrupt interactions between intraflagellar transport and the flagella membrane in *Chlamydomonas*. *J Cell Sci*, 2021, 134(3): jcs.253492.
- [15] Cao M, Meng D, Wang L, et al. Activation loop phosphorylation of a protein kinase is a molecular marker of organelle size that dynamically reports flagellar length. *PNAS*, 2013, 110(30): 12337-12342.
- [16] Liang Y, Zhu X, Wu Q, et al. Ciliary length sensing regulates IFT entry via changes in FLA8/KIF3B phosphorylation to control ciliary assembly. *Curr Biol*, 2018, 28(15): 2429-2435.e3.
- [17] Xue B, Liu YX, Dong B, et al. Intraflagellar transport protein RABL5/IFT22 recruits the BBSome to the basal body through the GTPase ARL6/BBS3. *PNAS*, 2020, 117(5): 2496-2505.
- [18] Ueki N, Ide T, Mochiji S, et al. Eyespot-dependent determination of the phototactic sign in *Chlamydomonas reinhardtii*. *PNAS*, 2016, 113(19): 5299-5304.
- [19] Arrieta J, Barreira A, Chioccioli M, et al. Phototaxis beyond turning: persistent accumulation and response acclimation of the microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Sci Rep*, 2017, 7: 3447.
- [20] Wakabayashi K, Misawa Y, Mochiji S, et al. Reduction-oxidation poise regulates the sign of phototaxis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *PNAS*, 2011, 108(27): 11280-11284.
- [21] Feinleib MEH, Curry GM. The relationship between stimulus intensity and oriented phototactic response (topotaxis) in *Chlamydomonas*. *Physiol Plantarum*, 1971, 25(3): 346-352.
- [22] Roberts DG, Lamb MR, Dieckmann CL. Characterization of the EYE2 gene required for eyespot assembly in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics*, 2001, 158(3): 1037-1049.
- [23] Thompson MD, Mittelmeier TM, Dieckmann CL. *Chlamydomonas*: the eyespot. *Chlamydomonas: Molecular Genetics and Physiology*. Cham: Springer International Publishing, 2017: 257-281.
- [24] Fuhrmann M, Stahlberg A, Govorunova E, et al. The abundant retinal protein of the *Chlamydomonas* eye is not the photoreceptor for phototaxis and photophobic responses. *J Cell Sci*, 2001, 114(Pt 21): 3857-3863.
- [25] Deisseroth K, Hegemann P. The form and function of channelrhodopsin. *Science*, 2017, 357(6356): 1-9.eaan5544.
- [26] Govorunova EG, Jung KH, Sineshchekov OA, et al. *Chlamydomonas* sensory rhodopsins A and B: cellular content and role in photophobic responses. *Biophys J*, 2004, 86(4): 2342-2349.
- [27] Greiner A, Kelterborn S, Evers H, et al. Targeting of photoreceptor genes in *Chlamydomonas reinhardtii* via

- zinc-finger nucleases and CRISPR/Cas9. *Plant Cell*, 2017, 29(10): 2498-2518.
- [28] DiPetrillo C, Smith E. Calcium regulation of ciliary motility: analysis of axonemal calcium-binding proteins. *Methods Cell Biol*, 2009, 92: 163-180.
- [29] Fujiu K, Nakayama Y, Yanagisawa A, et al. *Chlamydomonas* CAV2 encodes a voltage-dependent calcium channel required for the flagellar waveform conversion. *Curr Biol*, 2009, 19(2): 133-139.
- [30] Böhm M, Kreimer G. Orient in the world with a single eye: the green algal eyespot and phototaxis. *Prog Bot*, 2020, 82: 259-304.
- [31] Böhm M, Boness D, Fantisch E, et al. Channelrhodopsin-1 phosphorylation changes with phototactic behavior and responds to physiological stimuli in *Chlamydomonas*. *Plant Cell*, 2019, 31(4): 886-910.
- [32] Boonyareth M, Saranak J, Pinthong D, et al. Roles of cyclic AMP in regulation of phototaxis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biologia*, 2009, 64(6): 1058-1065.
- [33] Trippens J, Reißerweber T, Kreimer G. The chloroplast calcium sensor protein CAS affects phototactic behaviour in *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae) at low light intensities. *Phycologia*, 2017, 56(3): 261-270.
- [34] Choudhary SK, Baskaran A, Sharma P. Reentrant efficiency of phototaxis in *Chlamydomonas reinhardtii* cells. *Biophys J*, 2019, 117(8): 1508-1513.
- [35] Dahiya S, Shilpie A, Balasundaram G, et al. Diversity of algal species present in waste stabilisation ponds and different factors affecting its enrichment and phototaxis. *Chem Ecol*, 2021, 37(6): 515-529.
- [36] Mochiji S, Wakabayashi K. Redox regulation of phototactic migration in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* and its possible application. *Commun Integr Biol*, 2012, 5(2): 196-198.
- [37] Hegemann P. Vision in microalgae. *Planta*, 1997, 203(3): 265-274.
- [38] Javadi A, Arrieta J, Tuval I, et al. Photo-bioconvection: towards light control of flows in active suspensions. *Philos Trans Ser A Math Phys Eng Sci*, 2020, 378(2179): 20190523.
- [39] Dervaux J, Resta MC, Brunet P. Light-controlled flows in active fluids. *Nat Phys*, 2017, 13(3): 306-312.
- [40] Arrieta J, Polin M, Saleta-Piersanti R, et al. Light control of localized photobioconvection. *Phys Rev Lett*, 2019, 123(15): 158101.
- [41] Clarke RJ. Photofocusing of microorganisms swimming in a flow with shear. *ANZIAM J*, 2018, 59: 455.
- [42] Goglia AG, Toettcher JE. A bright future: optogenetics to dissect the spatiotemporal control of cell behavior. *Curr Opin Chem Biol*, 2019, 48: 106-113.
- [43] Li G, Wang F, Yang W, et al. Imaging with optogenetically engineered living cells as a photodetector. *Adv Biosyst*, 2019, 3(8): e1800319.
- [44] Ostrovsky MA, Kirpichnikov MP. Prospects of optogenetic prosthesis of the degenerative *Retina* of the eye. *Biochemistry (Mosc)*, 2019, 84(5): 479-490.
- [45] Wang Z, Hu M, Ai X, et al. Near-infrared manipulation of membrane ion channels via upconversion optogenetics. *Adv Biosyst*, 2019, 3(1): e1800233.
- [46] Lin JY, Knutsen PM, Muller A, et al. ReaChR: a red-shifted variant of channelrhodopsin enables deep transcranial optogenetic excitation. *Nat Neurosci*, 2013, 16(10): 1499-1508.
- [47] Wang X, Chen XJ, Yang Y. Spatiotemporal control of gene expression by a light-switchable transgene system. *Nat Methods*, 2012, 9(3): 266-269.
- [48] Kreis CT, Le Blay M, Linne C, et al. Adhesion of *Chlamydomonas microalgae* to surfaces is switchable by light. *Nat Phys*, 2018, 14(1): 45-49.
- [49] Zhang C, Xie SX, Wang WX, et al. Bio-syncretic tweezers actuated by microorganisms: modeling and analysis. *Soft Matter*, 2016, 12(36): 7485-7494.
- [50] Nagai M, Hirano T, Shibata T. Phototactic algae-driven unidirectional transport of submillimeter-sized cargo in a microchannel. *Micromachines (Basel)*, 2019, 10(2): 130.
- [51] Nagy K, Sipos O, Valkai S, et al. Microfluidic study of the chemotactic response of *Escherichia coli* to amino acids, signaling molecules and secondary metabolites. *Biomicrofluidics*, 2015, 9(4): 044105.
- [52] Al-Hijab L, Gregg A, Davies R, et al. Abscisic acid induced a negative geotropic response in dark-incubated *Chlamydomonas reinhardtii*. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 1-12.
- [53] Choi HI, Kim JYH, Kwak HS, et al. Quantitative analysis of the chemotaxis of a green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*, to bicarbonate using diffusion-based microfluidic device. *Biomicrofluidics*, 2016, 10(1): 014121.
- [54] Ermilova E, Zalutskaya Z. Regulation by light of chemotaxis to nitrite during the sexual life cycle in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plants (Basel)*, 2014, 3(1): 113-127.

- [55] Kwak HS, Kim JYH, Sung YJ, et al. Photo/chemotaxis-based high-throughput screening strategy in microfluidics to improve photosynthetic efficiency of microalgae. 18th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, MicroTAS 2014. Chemical and Biological Microsystems Society, 2014: 2556-2557.
- [56] Erkoç P, Yasa IC, Ceylan H, et al. Mobile microrobots for active therapeutic delivery. *Adv Therap*, 2019, 2(1): 1800064.
- [57] Zhuang J, Sitti M. Chemotaxis of bio-hybrid multiple bacteria-driven microswimmers. *Sci Rep*, 2016, 6: 32135.
- [58] Park D, Park SJ, Cho S, et al. Motility analysis of bacteria-based microrobot (bacteriobot) using chemical gradient microchamber. *Biotechnol Bioeng*, 2014, 111(1): 134-143.
- [59] Sahari A, Traore MA, Scharf BE, et al. Directed transport of bacteria-based drug delivery vehicles: bacterial chemotaxis dominates particle shape. *Biomed Microdevices*, 2014, 16(5): 717-725.
- [60] Suh S, Traore MA, Behkam B. Bacterial chemotaxis-enabled autonomous sorting of nanoparticles of comparable sizes. *Lab Chip*, 2016, 16(7): 1254-1260.
- [61] Ng WM, Teng XJ, Guo C, et al. Motion control of biohybrid microbots under low Reynolds number environment: Magnetotaxis. *Chem Eng Process-Process Intensif*, 2019, 141: 107530.
- [62] Stehnach MR, Waisbord N, Walkama DM, et al. Viscophobic turning dictates microalgae transport in viscosity gradients. *Nat Phys*, 2021: 1-5.
- [63] Coppola S, Kantsler V. Green algae scatter off sharp viscosity gradients. *Sci Rep*, 2021, 11: 399.
- [64] Sekiguchi M, Kameda S, Kurosawa S, et al. Thermotaxis in *Chlamydomonas* is brought about by membrane excitation and controlled by redox conditions. *Sci Rep*, 2018, 8: 16114.
- [65] McGoldrick LL, Singh AK, Demirkhanyan L, et al. Structure of the thermo-sensitive TRP channel TRP1 from the alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 4180.
- [66] Safarik I, Prochazkova G, Pospiskova K, et al. Magnetically modified microalgae and their applications. *Crit Rev Biotechnol*, 2016, 36(5): 931-941.
- [67] Ng WM, Che HX, Guo C, et al. Artificial magnetotaxis of microbot: magnetophoresis versus self-swimming. *Langmuir*, 2018, 34(27): 7971-7980.
- [68] Zhong DN, Li WL, Qi YC, et al. Photosynthetic biohybrid nanoswimmers: photosynthetic biohybrid nanoswimmers system to alleviate tumor hypoxia for FL/PA/MR imaging-guided enhanced radio-photodynamic synergetic therapy (*adv. funct. mater.* 17/2020). *Adv Funct Mater*, 2020, 30(17): 2070110.
- [69] Santomauro G, Singh AV, Park BW, et al. Incorporation of terbium into a microalga leads to magnetotactic swimmers. *Adv Biosys*, 2018, 2(12): 1800039.
- [70] Kang L, Shen ZQ, Jin CZ. Neodymium cations Nd<sup>3+</sup> were transported to the interior of *Euglena gracilis* 277. *Chin Sci Bull*, 2000, 45(7): 585-592.
- [71] Selvin PR. Principles and biophysical applications of lanthanide-based probes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 2002, 31: 275-302.
- [72] Yan XH, Zhou Q, Yu JF, et al. Magnetite nanostructured porous hollow helical microswimmers for targeted delivery. *Adv Funct Mater*, 2015, 25: 5333-5342.
- [73] Yan XH, Zhou Q, Vincent M, et al. Multifunctional biohybrid magnetite microrobots for imaging-guided therapy. *Sci Robot*, 2017, 2(12): eaaq1155.
- [74] Liu L, Chen B, Liu K, et al. Wireless manipulation of magnetic/piezoelectric micromotors for precise neural stem-like cell stimulation. *Adv Funct Mater*, 2020, 30(11): 1910108.
- [75] Xie L, Pang X, Yan X, et al. Photoacoustic imaging-trackable magnetic microswimmers for pathogenic bacterial infection treatment. *ACS Nano*, 2020, 14(3): 2880-2893.
- [76] Weibel DB, Garstecki P, Ryan D, et al. Microoxen: microorganisms to move microscale loads. *PNAS*, 2005, 102(34): 11963-11967.
- [77] Akolpoglu MB, Dogan NO, Bozuyuk U, et al. High-yield production of biohybrid microalgae for on-demand cargo delivery. *Adv Sci (Weinh)*, 2020, 7(16): 2001256.
- [78] Venu R, Lim B, Hu XH, et al. On-chip manipulation and trapping of microorganisms using a patterned magnetic pathway. *Microfluid Nanofluid*, 2013, 14: 277-285.
- [79] Miller DH, Lampion DT, Miller M. Hydroxyproline heterooligosaccharides in *Chlamydomonas*. *Science*, 1972, 176(4037): 918-920.
- [80] Choi J, Hwang J, Kim JY, et al. Recent progress in magnetically actuated microrobots for targeted delivery of therapeutic agents. *Adv Healthc Mater*, 2021, 10(6): 2001596.

(本文责编 郝丽芳)