

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2024年5月16日 (16.05.2024)



(10) 国际公布号
WO 2024/099079 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12M 1/34 (2006.01) *B01L 7/00* (2006.01)
C12M 1/38 (2006.01) *B01L 3/00* (2006.01)
C12Q 1/6837 (2018.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2023/126623
- (22) 国际申请日: 2023年10月26日 (26.10.2023)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
202211406708.8 2022年11月10日 (10.11.2022) CN
- (71) 申请人: 南方科技大学 (SOUTHERN UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) [CN/CN]; 中国广东省深圳市南山区桃源街道学苑大道1088号, Guangdong 518000 (CN).
- (72) 发明人: 程鑫 (CHENG, Xin); 中国广东省深圳市南山区桃源街道学苑大道1088号, Guangdong 518000 (CN)。刘红均 (LIU, Hongjun); 中国广东省深圳市南山区桃源街道学苑大道1088号, Guangdong 518000 (CN)。刘荣跃 (LIU, Rongyue); 中国广东省深圳市南山区桃源街道学苑大道

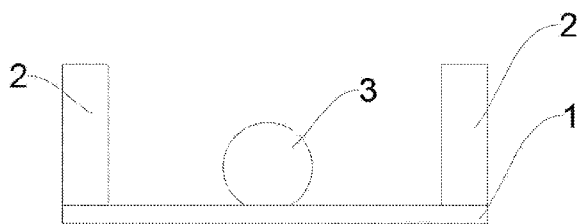
1088号, Guangdong 518000 (CN)。陈日飞 (CHEN, Rifei); 中国广东省深圳市南山区桃源街道学苑大道1088号, Guangdong 518000 (CN)。林国洪 (LIN, Guohong); 中国广东省深圳市南山区桃源街道学苑大道1088号, Guangdong 518000 (CN)。

(74) 代理人: 深圳市惠邦知识产权代理事务所 (SHENZHEN HUIBANG INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY FIRM); 中国广东省深圳市南山区科发路8号金融服务技术创新基地1栋5C1, Guangdong 518057 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(54) Title: AMPLIFICATION STRUCTURE, AND RAPID NUCLEIC ACID DETECTION CHIP, DEVICE AND METHOD

(54) 发明名称: 扩增结构、快速核酸检测芯片、装置与方法



[图 1]

(57) Abstract: Disclosed herein are an amplification structure, a rapid nucleic acid detection chip comprising the amplification structure, a device comprising the rapid nucleic acid detection chip, a corresponding amplification method, a rapid nucleic acid detection method, and a large-scale nucleic acid detection method. The amplification structure comprises a suspended thin film and a heating device, the heating device being configured for heating droplets on the suspended thin film. According to the microdroplet-based rapid nucleic acid detection chip provided by the present invention, by means of the arrangement of the suspended thin film and the droplets, amplification of a sample to be detected in the heated droplets can be rapidly achieved.

(57) 摘要: 本发明公开了一种扩增结构、包含该扩增结构的快速核酸检测芯片、包含该快速核酸检测芯片的装置以及相应的扩增方法、快速核酸检测方法和大规模核酸检测方法。所述扩增结构包括悬空薄膜和加热装置, 所述加热装置用于加热悬空薄膜上的液滴。本发明提供的基于微液滴的快速核酸检测芯片, 通过悬空薄膜和液滴的设置, 能够快速实现加热液滴中扩增待测样本的扩增。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

根据细则4.17的声明:

— 发明人资格(细则4.17(iv))

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

说明书

发明名称: 扩增结构、快速核酸检测芯片、装置与方法

技术领域

[0001] 本发明属分子生物学中分子扩增诊断领域，具体涉及一种扩增结构、快速核酸检测芯片、装置与方法。

背景技术

[0002] 聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction – PCR)可以将核酸复制扩增，核酸复制扩增有多种应用，如用在核酸检测上，核酸检测是生物分子检测中的一个重要领域，通过PCR扩增可实现对超微量(甚至单个核酸分子)核酸的准确和定量检测。PCR核酸检测有广泛应用，包括临床疾病诊断(如各种传染性病原微生物诊断和疗效评价、优生优育检测、肿瘤标志物及瘤基因检测、遗传基因检测等)、动物疾病检测(如禽流感、口蹄疫、猪瘟、寄生虫病、炭疽芽孢杆菌等)、食品安全检测(如食源微生物、食品过敏源、转基因食品等)、科学研究(如医学、生命科学、农牧等相关分子生物学定量研究)等。PCR核酸定量检测技术的应用行业包括医疗机构、科研院所、高校、疾控中心、检验检疫局、食品企业、畜牧企业等。

[0003] 聚合酶链式反应(PCR)是一种最常见可用于放大扩增特定的DNA片段的分子生物学技术，PCR的最大特点是能将微量的DNA片段大幅增加，结合荧光探针，可用于微量特定核酸片段的检测，常见用于感染性病原微生物检测，肿瘤分析及遗传病诊断。PCR在传染性疾病的检测、诊断上有重要应用，是应对大规模群体性疫情(如新冠病毒)的必备技术。

[0004] 传统PCR扩增技术需在95°C–65°C–72°C 之间进行温度循环，由于升降温需要一定的时间，单次循环的时间需5–30分钟。一般PCR需进行20–40次循环扩展，导致PCR检测需要几个小时的时间，且检测需在有资质的检测机构实验室内完成。PCR检测时效性差、且需要专业检测单位操作，导致其在大规模传染性疫情防控中的作用存在一定局限。

[0005] 具体而言，现有PCR扩增技术，在进行温度循环时，除了温控待测液体，温控系统不可避免的加热衬底等样品支撑结构，导致升温 and 降温都需要比较长的时间。同时，基于毫升量级的液体样本，在待测核酸浓度比较低时，需要一定的等待时间使得反应充分。这些因素导致PCR循环需要的时间在5-30分钟左右。因为需要多次PCR循环(20-40次)，检测所需的总时间比较长(半个小时到几个小时)，无法实时(几分钟内)出结果。PCR中的温度循环方式常见有以下几种：(1)采用热电片对液滴加热和制冷，实现温度循环，一般温度循环需要1分钟以上；(2)采用传统加热方式对液滴和衬底加热，液滴和衬底自然冷却，一般温度循环需要5分钟-20分钟左右；(3)在衬底上维持高低温两个温区，通过微流控管道或者液滴驱动将液体在高低温之间来回循环，一般温度循环取决于液滴驱动的速度，时间可以控制在几秒以内。但此种方式需要对液滴进行精确操作，器件设计和难度均较大，维持两个温区的功耗较大，且液滴在95°C高温下运动时极易产生气泡，为芯片设计、液滴操控均带来很大的不方便。

发明概述

技术问题

[0006] 有鉴于现有技术的上述缺陷，本发明所要解决的技术问题是如何实现快速稳定又方便地核酸扩增。

技术解决方案

[0007] 基于上述技术问题，本发明提供了一种扩增结构，包括悬空薄膜和加热装置，所述加热装置用于加热悬空薄膜上的液滴。

[0008] 较优的，在悬空薄膜上的所述液滴上包裹有防挥发层。

[0009] 较优的，所述防挥发层设置为非挥发性疏水液膜和/或疏水纳米颗粒层。

[0010] 较优的，当采用所述非挥发性疏水液膜作为所述防挥发层时，所述非挥发性疏水液膜的沸点高于所述液滴沸点。

[0011] 较优的，采用所述非挥发性疏水液膜作为所述防挥发层时，所述非挥发性疏水液膜设置为氟油或硅油。

[0012] 较优的，所述防挥发层由表面活性剂在所述液滴表面自组装成膜形成所述防挥发层。

- [0013] 较优的，在悬空薄膜上的所述液滴上方加盖一层悬空薄膜使液滴封存在两层悬空薄膜之间以形成所述防挥发层。
- [0014] 较优的，所述加热装置设置为微波容器，所述悬空薄膜及液滴置于所述微波容器中，再利用微波容器对液滴进行加热。
- [0015] 较优的，所述加热装置设置为加热微针，通过所述加热微针插入悬空薄膜上的所述液滴进行加热。
- [0016] 较优的，所述加热微针设置为微波或者超声波探头微针。
- [0017] 较优的，所述加热装置设置为加热片或者加热丝，所述加热片或者所述加热丝设置在所述悬空薄膜下方进行加热。
- [0018] 较优的，所述加热装置上设置有测温装置。
- [0019] 较优的，所述加热片或者加热丝设置为加热及测温微电阻丝。
- [0020] 较优的，所述悬空薄膜与所述加热丝或者加热片集成形成微加热器。
- [0021] 较优的，利用防挥发层将悬空薄膜上的液滴以及所述悬空薄膜下方区域全部填充，使其能够将微加热器以及所述微加热器上的液滴全部包覆。
- [0022] 较优的，所述微加热器悬空于衬底上方，所述微加热器上延伸出至少两根支撑导电线至所述衬底上固定并形成微加热器连接端子；所述支撑导电线支撑所述微加热器悬空时的平衡。
- [0023] 较优的，所述衬底上设置有凹槽，所述微加热器设置在所述凹槽的上方，所述微加热器上延伸出至少两根支撑导电线至所述凹槽的凸起边缘，支撑所述微加热器在所述凹槽上方悬空；所述支撑导电线延伸至所述凹槽的凸起边缘固定，形成所述微加热器连接端子。
- [0024] 较优的，从所述微加热器上延伸出四根支撑导电线至所述凹槽的凸起边缘固定并形成微加热器连接端子，所述四根支撑导电线支撑所述微加热器悬空时的平衡。
- [0025] 较优的，对所述连接端子输入不同电信号，使得所述微加热器其实现温度的快速变化以热传导至液滴实现温度的快速变化。
- [0026] 较优的，所述悬空薄膜上设置有疏水或者超疏水镀层。

- [0027] 较优的，所述悬空薄膜设置为氮化硅、氧化硅、碳膜、金刚石膜、parylene派瑞林(对二甲苯聚合物)膜、金属膜中的一种薄膜或者几种形成的复合薄膜。
- [0028] 较优的，还包括散热装置。
- [0029] 较优的，所述散热装置为设置于所述悬空薄膜上的热电制冷片、平面热管或者微流控管道流体中的其中一种或者几种。
- [0030] 本发明还提供一种包括扩增结构的快速核酸检测芯片，包括前述的扩增结构。较优的，所述悬空薄膜上设置有增强反射镀膜。
- [0031] 本发明还提供一种快速核酸检测阵列芯片，包括如前所述的快速核酸检测芯片；每一快速核酸检测芯片中独立或者相互统一地利用加热装置对所述液滴进行加热以实现温度的快速变化。
- [0032] 除此之外，本发明还提供一种扩增方法：包括以下步骤：
- [0033] 设置一薄膜悬空；
- [0034] 将含有扩增样本的液滴置于悬空薄膜上；
- [0035] 周期性加热所述液滴，实现液滴在不同温度下的循环，实现扩增；
- [0036] 较优的，所述液滴外部设置有防挥发层。
- [0037] 较优的，采用以下的一种或者几种方法形成所述防挥发层：用表面活性剂在液滴表面自组装成膜形成防挥发层；在所述液滴表面覆盖一层疏水纳米颗粒形成防挥发层；在所述液滴上方加盖一层悬空薄膜将液滴封存在两层悬空薄膜之间形成防挥发层。
- [0038] 较优的，采用以下一种或者几种加热方法实现液滴周期性加热：在悬空薄膜下方利用加热丝或者加热片进行加热；或者使用微波或者超声波探针插入所述液滴进行加热；将整个芯片放置的微波炉中，利用微波对所述液滴以及悬空薄膜无接触加热。
- [0039] 较优的，在周期性加热所述液滴时，对液滴加热温度进行测量。
- [0040] 较优的，采用测温电阻丝对所述悬空薄膜上的液滴进行加热测温。
- [0041] 较优的，实现周期性加热所述液滴，实现液滴在不同温度下的循环，实现扩增时，包括以下步骤：

- [0042] 将所述测温电阻丝与所述悬空薄膜进行集成，形成一悬空微加热器，所述液滴置于所述悬空薄膜上表面；使所述防挥发层包覆所述微加热器上的液滴；对所述悬空微加热器施加不同电信号，实现周期性加热所述液滴，使得液滴在不同温度下进行循环，实现扩增。
- [0043] 较优的，本快速核酸检测方法还包括以下步骤：
- [0044] 将所述悬空微加热器置于一具有凹槽的衬底上，将所述悬空微加热器延伸至至少两根支撑导电线至所述衬底凹槽的凸起边缘，支撑所述微加热器在所述凹槽上方悬空；所述支撑导电线延伸至所述衬底凹槽的凸起边缘固定，形成微加热器连接端子；利用防挥发层将所述液滴以及所述悬空薄膜下方区域全部填充，使其能够将微加热器以及所述微加热器上的液滴全部包覆；
- [0045] 对所述悬空微加热器的所述微加热器连接端子施加不同电信号，实现周期性加热所述液滴，使得液滴在不同温度下进行循环，实现扩增。
- [0046] 较优的，采用所述非挥发性疏水液膜作为所述防挥发层，所述非挥发性疏水液膜设置为氟油或硅油。
- [0047] 较优的，所述悬空薄膜设置为氮化硅、氧化硅、碳膜、金刚石膜、parylene派瑞林(对二甲苯聚合物)膜、金属膜中的一种薄膜或者几种形成的复合薄膜。
- [0048] 较优的，在周期性加热所述液滴之后，采用悬空薄膜上的额外散热装置对所述液滴进行散热。
- [0049] 较优的，在所述悬空薄膜上采用热点制冷片、平面热管或者微流控管道流体中的其中一种或者几种方式对所述液滴进行散热。
- [0050] 基于前述扩增方法，本发明还提供一种快速核酸检测方法，使用前述扩增方法进行待测样本扩增。
- [0051] 该快速核酸检测方法，较优的，还包括以下步骤
- [0052] 扩增前在所述液滴中加入荧光标记；
- [0053] 扩增后将含荧光标记的扩增后液滴，置于荧光检测装置中，完成核酸的荧光检测；
- [0054] 根据扩增后液滴的荧光亮度，判定检测结果。

[0055] 该快速核酸检测方法，较优的，所述液滴内含有待测样本、扩增引物、酶、dNTP脱氧核糖核苷三磷酸、模板、荧光探针和缓冲液。

[0056] 该快速核酸检测方法，较优的，在所述悬空薄膜上镀上增强反射镀膜以增强荧光反射信号。

[0057] 本发明还提供一种快速核酸大规模检测方法，将同一样本或者不同样本分别分成多个液滴，利用如前述的快速核酸检测方法同时对多个液滴进行检测。

有益效果

[0058] (1)本发明提供了扩增结构以及相应的快速核酸检测芯片，通过悬空薄膜和液滴的设置，能够快速实现加热液滴中扩增待测样本的扩增。采用液滴原位加热和降温，通过悬空薄膜支撑，消除对衬底加热的需要，可实现最快速度的液滴升降温，无需驱动液滴，大大简化芯片设计和操作，确保易用性、可靠性。同时，本发明采用微液滴作为反应容器，传质、传热速度快，核酸扩增反应快；同时将液滴置于悬空薄膜上，减少温度循环过程中不可避免的衬底加热，使得升温 and 降温的速度在0.5秒以内完成，而现有PCR扩增温度循环所需时间在1-5分钟以内，将温度循环的速度提升100倍以上。因核酸检测需要PCR扩增20-30次以上，采用本发明可将核酸检测的总时间从传统的30分钟到几个小时，缩短到1分钟以内，极大地缩短检测所需时间，极大地提升核酸检测的时效性。

[0059] (2)本发明装置结构简单，每个扩增结构以及快速核酸检测芯片仅检测单个液滴，单个液滴检测能力强，检测成本低；同时，具体应用的场景下，我们可以采用MEMS加工技术，将单个微加热器的成本控制在1-10元左右，采用微液滴极大地减少试剂的用量，在极大的缩短检测时间的同时，将检测成本控制在极低水平，适合大规模推广，比如疫情防控中及时高效的核酸筛查；家庭用病原微生物快查等应用。

[0060] (3)本发明提供的扩增结构和快速核酸检测芯片，在液滴中进行扩增的同时，在液滴上设置防挥发层，防挥发层可以有效防止在核酸扩增时产生气溶胶污染，同时也保证扩增的效果，这里的防挥发层可以是多种方式形成，如采用高沸点的非挥发性疏水液膜，如硅油或者氟油，此时，核酸扩增是在封闭的油相中完成，可有效防止气溶胶的形成。当然，防挥发层可以采用其他方式形成，如由

双亲表面活性剂在液滴表面自组装成膜减少液滴挥发，或者在液滴中加入高沸点相容溶剂(如水性液滴中加入乙二醇或聚乙二醇)，或者在液滴表面覆盖一层疏水纳米颗粒形成liquid marble(固态表面包裹的液滴)，或者在液滴上方加盖一层悬空薄膜将液滴封存在两层悬空薄膜之间等方式防止液滴在加热过程的挥发。因为芯片和试剂的成本低，为一次性使用，扩增检测结束后阳性样本封存在防挥发层如油滴中，可有效防止扩增后的核酸分子对设备的污染。

[0061] (4)本发明中，还提供了多种针对本扩增结构和快速核酸检测芯片的适应性扩增加热装置，在悬空薄膜上利用微纳加工制备的微加热电阻丝；或者使用微波(或者超声波)探针插入液滴进行加热。如果所有液滴在同一温度范围内循环，还可以将整个芯片放置的微波炉中，利用微波对所有液滴无接触同时加热。

[0062] (5)为了使得本发明能够快速实现加热-冷却-加热循环，本发明特别地提出在悬空薄膜可以加装冷却装置即额外散热装置，如热电制冷片，或者平面热管，或微流控管道流体对流散热。这样设置的好处是更加快速实现扩增过程的加热-冷却-加热循环。

[0063] (6)本发明同时提出一种具体的扩增结构和核酸检测芯片结构，将悬空薄膜下方设置测温微电阻丝，甚至可将测温微电阻丝与悬空薄膜共同集成，形成一个表面覆盖薄膜的微加热器，微加热器悬空并引出两根以上，如四根支撑导电线，既为悬空微加热器提供支撑，又延伸成为微加热器连接端子，为悬空微加热器提供电信号进行扩增。本发明提供的具体快速核酸检测结构，可以采用MEMS加工技术，将单个微加热器的成本控制在1-10元左右，采用微液滴极大地减少试剂的用量，在极大的缩短检测时间的同时，将检测成本控制在极低水平，本发明提出的具体核酸检测芯片结构，能够有效地快速实现核酸扩增，极大增加扩增效率，同时生产成本低，对于核酸控制过程好控制，由于加热器和悬空薄膜固定，只需要提供不同的电信号就能够实现快速扩增，操作非常方便，相对于现有的扩增方法和设备而言，不需要对液滴进行精确操作，器件设计简单，也不需要维持两个温区的功耗，优势极大。

[0064] 并且，本发明提出的扩增结构和快速核酸检测芯片和需要的装置紧凑，超便携：采用MEMS加工技术，单个微加热芯片的尺寸在100微米*100微米到10毫米*10

毫米之间。让快速核酸检测不仅仅适用于实验室场景，更能够适用于家庭等日常场景。

[0065] (7)本发明提供的快速核酸检测芯片，在悬空薄膜上还设置疏水或者超疏水镀层，防止液滴平铺摊开。薄膜上可镀有增强反射镀膜如Au、Pt金属膜，或高反射的多层介质膜，用于增强荧光反射信号。这些适应性技术手段，能够帮助本发明进一步加快核酸检测速度，减少快速核酸检测中的难度，提高核酸检测中的效率。

[0066] (8)本发明还提供一种快速核酸检测装置，将多个快速核酸检测芯片进行集成，在一定衬底面积上，可以集成成百上千个微加热器阵列，阵列中每个微加热器可以快速对一个液滴进行热循环操作。将一定量的核酸检测分成多个液体同时检测，确保稀少核酸拷贝不漏检。在大规模微加热器阵列中，也可以在不同微加热器上热循环不同的待测样本，实现高通量的样本检测；或者对同一个样本，采用不同的核酸检测试剂，实现多种核酸的同时检测。以上方式还可以混合集成，即对多个样本同时进行多种核酸的检测。

[0067] 本发明提出的扩增结构，不仅仅可以用于核酸检测，还可以用于其他需要进行扩增的场景。以该扩增结构用于快速核酸检测为例，传统核酸检测更多的是在医疗、疾控或科研PCR实验室开展，而疫情及未来的诊疗需求，需要PCR核酸检测突破实验室的限制，去适应更多的应用场景，甚至是走入家庭。本发明可实现核酸现场检测(POCT),在低成本、超便携、低功耗等特点下突破应用场景限制，高效赋能发热门诊、急诊、海关、机场、出入境关口等高人流聚集地，满足传染病快速筛查的需求，增加多场景下的突发公共卫生事件的应对能力和解决途径。快速低成本核酸检测特别是当下新型冠状病毒肺炎(COVID-19)患者确诊、临床治疗效果评估、发生疫情时人群筛查及流行病学调查的重要手段。低成本、快速核酸检测同时在畜牧、农业、食品行业中发挥现场检测作用。在野外或战场等环境下可检测治病微生物和生物战病原体。

附图说明

[0068] 图1是本发明一具体实施方式的扩增结构示意图；

[0069] 图2是本发明实施例1中液滴采用疏水性液膜防挥发层结构示意图；

- [0070] 图3是本发明实施例1中液滴采用表面自组织活性剂形成防挥发层的结构示意图；
- [0071] 图4是本发明实施例1中液滴采用疏水纳米颗粒形成防挥发层的结构示意图；
- [0072] 图5是本发明实施例1中液滴采用加盖悬空薄膜的方式进行防挥发的结构示意图；
- [0073] 图6是本发明实施例2中实例2-1、2-2结构示意图；
- [0074] 图7是本发明实施例2中实例2-3的结构示意图；
- [0075] 图8是本发明实施例3中硅片表面上的集成悬空薄膜和加热装置集成微加热器的结构示意图；
- [0076] 图9是图8中防挥发层的结构示意图；
- [0077] 图10是实施例3中一实际微加热器结构示意图，其中左边是无液滴的微加热器结构示意图，右边是加液滴和防挥发层的微加热器结构示意图；
- [0078] 图11是实施例3中微加热器表面温度、加热电压与加热时间之间的关系，其中横轴为加热所需用时，纵轴为加热温度，阶数为通电电压大小；
- [0079] 图12是实施例3中无液滴的微加热器表面温度升降循环的时间响应曲线图，其中横轴为加热所需用时，纵轴为加热温度；
- [0080] 图13是实施例3中微加热器上放置液滴时的温度变化曲线图，其中横轴为加热所需用时，纵轴为加热温度；
- [0081] 图14是本发明具体实施例进行乙肝灭活病毒核酸扩增实验组结果图；
- [0082] 图15是本发明具体实施例进行乙肝灭活病毒核酸扩增对照组结果图；
- [0083] 图16是本发明具体实施例进行乙肝灭活病毒核酸扩增对照实验的扩增浓度-循环次数的曲线图；
- [0084] 图17是本发明具体实施例进行新冠灭活病毒(COVID-19)核酸扩增对照实验对照组结果图；
- [0085] 图18是本发明具体实施例进行新冠灭活病毒(COVID-19)核酸扩增对照实验实验一组结果图；
- [0086] 图19是本发明具体实施例进行新冠灭活病毒(COVID-19)核酸扩增对照实验实验组一稀释100倍后的实验二组结果图。

本发明的实施方式

[0087] 下面将通过具体实施例对本发明进行详细说明。

实施例1：

[0088] 如图1所示，实施例1提供了一种本发明中较为简易的扩增结构，基于本扩增结构，同样可以构成一种简易的快速核酸检测芯片，可以只包括悬空薄膜1和加热装置(图1未示出)，具体对于悬空薄膜1的制备：在衬底2上镀上一层薄膜，将衬底2一部分取出时(比如干法刻蚀硅衬底，或激光烧蚀玻璃衬底)，薄膜1悬空形成悬空薄膜，就形成一个简易的扩增结构。将一个含有扩增样本的液滴3置于悬空薄膜1上，周期性加热，如通过微电阻丝5通电或微波加热液滴，实现液滴在不同温度下的循环，实现PCR扩增。当把该扩增结构用于快速核酸检测时，将含荧光标记的扩增后液滴，置于荧光检测装置中，完成核酸的荧光检测，通过记录每次温度循环(扩增)后液滴的荧光亮度，完成核酸扩增的融熔曲线，判定检测结果。

[0089] 由于本实施例采用液滴进行扩增，形成扩增容器，液滴体积小，能够实现快速加热变温的效果，本实施例的结构，可以单独用于扩增形成一种扩增结构，也能够加入荧光标记或者探针实现快速的核酸检测，成为一种快速核酸检测芯片。

[0090] 当用于核酸检测制成快速核酸检测芯片时，液滴内部含有待测样本、扩增引物、酶、dNTP即脱氧核糖核苷三磷酸、模板、荧光探针和缓冲液，在扩增过程中，需要不断对其进行加热循环。

[0091] 为防止液滴在加热过程中挥发，需要在液滴上设置防挥发层4，这里的防挥发层可以是疏水类液膜，如图2，例如液滴可用高沸点的非挥发油膜形成防挥发层4包裹，注意这里的高沸点，是指沸点高于液滴中的液体，避免在加热时，防护层的液体也进行挥发，另外值得注意的是这里的疏水类液膜，可以是采用表面活性剂在液滴表面自组装成膜，如图3，例如用双亲表面活性剂在液滴表面自组装成膜形成防挥发层4减少液滴挥发，或者在液滴中加入高沸点相容溶剂(如水性液滴中加入乙二醇或聚乙二醇)，如图4，或者在液滴表面覆盖一层疏水纳米颗粒

形成liquid marble(固体表面包覆的液滴)进而形成防挥发层4,如图5,或者在液滴上方加盖一层悬空薄膜1将液滴封存在两层悬空薄膜1之间形成防挥发的效果,进而形成防挥发层,在加盖悬空薄膜时,可以在液滴上同时进行油封形成防挥发层4或者前述其他方式进一步防止挥发。

[0092] 注意这里的防挥发层4不仅仅限于以上列举的几种方式,实际扩增过程中或者快速核酸检测过程中,也可以通过这几种方式中一种或者几种组合,实现更好的防挥发层效果。

[0093] 如图14至图16,利用乙肝灭活病毒进行本发明单扩增结构或快速核酸检测芯片(具体的实施方式可以是微加热器)的扩增对照实验,如图14,利用本发明方案对乙肝灭活病毒进行快速温度循环,4秒95°C,4秒65°C,共计8秒一次PCR循环,扩增荧光亮度随循环次数变化如图14。图15是加入实验组相同扩增引物、酶、dNTP即脱氧核糖核苷三磷酸、模板、荧光探针和缓冲液等内容物,但无扩增病毒的本发明方案空白对照组结果。图16是相关对照实验的扩增浓度-循环次数的曲线,其中横坐标轴表示相对荧光强度,纵坐标轴表示热循环次数。可以看到,30次循环后浓度明显变化可进行检测,因此仅需要4分钟即可实现该病毒样本的扩增以及快速核酸检测。

[0094] 如图17至图19,在本发明提供的单扩增结构或快速核酸检测芯片(具体的实施方式可以是微加热器)上利用微液滴进行快速新冠灭活病毒(COVID-19)检测初步实验对照,同样的进行4秒95°C,4秒65°C,每8秒一次PCR循环扩增。图17是加入与实验组相同的新冠扩增引物、酶、dNTP即脱氧核糖核苷三磷酸、模板、荧光探针和缓冲液,但不放入新冠病毒(COVID-19)扩增样本的实验空白对照组并对其空白对照组进行了相同扩增循环处理的结果;图18是放入新冠病毒(COVID-19)扩增样本即实验一组的实验对照结果;图19是在图18的新冠病毒(COVID-19)扩增样本浓度下的阳性标准稀释100倍之后的实验二组实验结果。由图17-图19看出,在本发明的方案下,有效快速在8秒一次循环里完成核酸扩增,并取得较为准确的检测结果,由该实验结果可以看到,30次循环后浓度明显变化可进行检测,采用30次循环只需要4分钟。

[0095] 值得注意的是，本实验为初步实验，后续可将PCR扩增温度和反应时间可进一步优化，有望实现1秒完成一次PCR循环。

[0096] 实施例2：

[0097] 本实施例中，采用不同的实例说明本发明采用实施例1中的芯片中实现快速核酸检测芯片的加热方式：

[0098] 实例2-1，如图6，本实例中采用在悬空薄膜1上采用普通的加热片5来进行加热扩增，加热片5可以是加热丝的集成，或者是金属片中含有加热丝，这种加热好处是由于薄膜1悬空，直接利用加热片5对悬空薄膜进行加热，加热过程中一个加热循环不需要对衬底进行加热，因此并不需要考虑衬底的加热和冷却速度，可以实现在悬空薄膜1上的液滴快速加热扩增。

[0099] 实例2-2，相对于实例2-1，这里提供一种更加简洁的加热扩增方式，即在悬空薄膜上设置加热丝，可以直接将加热丝与悬空薄膜集成在一起，同样参见图6，形成一种带有加热丝的悬空薄膜，即适应性用于液滴快速加热的加热器件。同样的，由于采用加热丝对悬空薄膜直接进行加热，加热过程中一个加热循环不需要对衬底进行加热，因此并不需要考虑衬底的加热和冷却速度，可以实现在悬空薄膜上的液滴快速加热扩增。

[0100] 实例2-3

[0101] 在实例2-3中，如图7，我们使用加热微针6，本实施例中采用微波(或者超声波)探针6插入液滴进行加热，悬空薄膜的设置使得加热与衬底无关，能够准确方便地对液滴进行插入加热，除去了悬空薄膜的温度阻却，微针加热使得液滴加热更快。扩增时热循环速度进一步增加。

[0102] 实例2-4

[0103] 实例2-4中，采用一种更加简便的加热方法，同时满足加热速度快，且能够适用于多个液滴在同一温度范围内循环扩增，在实例2-4中，整个扩增结构或者快速核酸检测芯片放置的微波中如放置在微波炉中，利用微波对所有液滴无接触同时加热。所有液滴在同一温度范围内循环。

[0104] 实例2-5

- [0105] 实例2-5中，在其他实例中，如实例2-1至2-4加热装置上设置测温装置，使得加热过程能够实时监测。具体而言，例如对于实例2-2可以采用测温电阻丝，直接集成到悬空薄膜上，形成既能够快速加热又能够实时测温的加热器，快速对悬空薄膜上进行加热循环的同时能够同时测温。
- [0106] 其他实例中，可以采用其他方式采用加热时的测温装置，对于芯片加热循环进行实时温度监控。
- [0107] 实例2-6
- [0108] 实例2-6中，在实例2-1至实例2-5的实例中，除了让加热的液滴的冷却自然冷却之外，快速核酸芯片上设置散热装置以进一步加快热循环，具体而言，悬空薄膜上可以附加额外散热装置，如热电制冷片，或者平面热管，或微流控管道流体对流散热。
- [0109] 实施例3：
- [0110] 本实施例中，我们提供一种更加具体的扩增结构或者快速核酸检测芯片结构，通过对该结构进行实验验证，能够实现对核酸快速的扩增。
- [0111] 如图8，在硅衬底上，化学镀膜(PECVD或LPCVD)制备氮化硅薄膜，薄膜上制备金属微加热器(Ti/Au, 或者Ti/Pt, 或者Ti/Pd等)，硅衬底湿法或干法刻蚀后在硅片表面形成悬空氮化硅(悬空薄膜1)即集成一个微加热器。如图9，微加热器上具有悬空薄膜1，和悬空薄膜集成的加热装置5，含有待测样本的液滴4，利用微加热器加热液4，并通过电阻测量实时探测液滴温度。这样就形成了一个带有悬空薄膜的微加热器。为防止液滴挥发，用氟油或硅油填充悬空薄膜下方的区域，并将待测液滴全部覆盖，形成液滴防挥发层4。
- [0112] 更具体的，如图10，将带有悬空薄膜的微加热器放置于一带有凹槽的衬底中间，由加热器向衬底凹槽周边凸起边缘延伸支撑导电线，使得支撑导电线能够支撑起微加热器，并延伸至衬底凹槽周边凸起边缘形成加热器的连接端子。带有扩增样品的液滴置于中间悬空的氮化硅微加热器平台上，通过微加热器电极通电加热。微加热器的温度随加热功率变化而变化。因为悬空，加热时温度可快速变化。

[0113] 同样的，也可先将带有悬空薄膜的加热器直接覆盖于衬底上的凹槽，对悬空薄膜靠近衬底凹槽周边凸起的部分进行镂空，仅保留中间微加热器部分，通过微加热器电极通电加热。也可以实现效果，在其他实施例中，可以采用其他方式，只要保持微加热器或者悬空薄膜与衬底其他部分的隔离，实现悬空加热，即在本发明保护的范围内。本实施例中的微加热器结构可以采用MEMS加工技术，单个微加热器的成本在1-10元左右，采用MEMS加工技术，单个微加热器的尺寸在100微米*100微米到10毫米*10毫米之间。

[0114] 本实施例的结构，可以单独用于扩增形成一种扩增结构，也能够加入荧光标记或者探针实现快速的核酸检测，成为一种快速核酸检测芯片。

[0115] 采用本实施例中的微加热器结构和微液滴核酸检测极大地减少试剂的用量，在极大的缩短检测时间的同时，将检测成本控制在极低水平，适合大规模推广，比如疫情防控中及时高效的核酸筛查；家庭用病原微生物快查等应用。

[0116] 以下通过实验对本实施例中的结构进行实验验证，如图11所示，当电压变化时，悬空薄膜上的温度可快速达到平衡，在室温到400°C之间变化。如图12，采用本结构的微加热器，微加热器上的电压加到0.8伏时，悬空薄膜上的温度可达到105°C左右，并且从室温上升到105°C所需的时间仅为0.02秒。当微加热器上电压变为0时，悬空薄膜快速冷却，从105°C到室温仅需0.02秒。因此，悬空微加热器可以在0.04秒的时间内，完成一个周期的温度循环。PCR核酸检测需要在悬空微加热器上放置液滴。因液滴本身有热容，温度循环所需时间增长。如图13，是本实施例中悬空微加热器上放置液滴时的温度变化。液滴为PEG液滴，当微加热器电压为1.5伏时，从室温到120°C耗时0.1秒；当微加热器上电压为0伏时，从120°C冷却到室温耗时0.37秒，完成一个温度循环所需的时间为0.47秒。水性液滴在油性液体包覆下，可耐受至170°C左右不挥发、不沸腾，稳定存在。

[0117] 实施例4：

[0118] 本实施例中，对于实施例3中的结构，采用便携式电池对该微加热器进行加热。由于微加热器加热液滴过程中，基本上只对液滴加热，无额外功耗，温度循环过程中的能量消耗降到最低程度，因此，采用电池对本发明实施例中的微加热器进行加热，是可行的。

[0119] 对于500纳升的待测液滴，完成一次60°C-95°C的温度循环的功耗仅为0.0735焦耳，特别适合于电池供电的便携式设备,非常适合在野外、现场开展检测。

[0120] 实施例5:

[0121] 本实施例中，提供一种快速核酸检测装置或者快速扩增装置，包括若干个如前面所述的快速核酸检测芯片；每一快速核酸检测芯片中独立或者统一地利用加热装置对悬空薄膜上的液滴进行加热以实现温度的快速变化。具体而言，以实施例3中的微加热器快速核酸检测芯片而言，每个面积非常小，正常在1mm左右，因此微加热器可制成且非常适合制作成大规模阵列，比如2*2，10*10，100*100阵列，用于多个样本、多种核酸的高通量并行检测。

[0122] 这里的微加热器阵列，可以集成在同一个具有一定面积的衬底上，也可以分别设置在不同衬底上统一集成。阵列中每个微加热器可以快速对一个液滴进行热循环操作。在大规模阵列中，每个微加热器可以加热同一种液滴，实现对一定体积量的液滴的检测，比如每个液滴100纳升，100微升的待测液体可以分成1000个液滴，放置在1000个微加热器上并行处理，确保稀少核酸拷贝不漏检。

[0123] 此外，本实施例中的快速核酸检测装置中，每个快速核酸检测芯片如微加热器，均可通过独立的通电，以进行独立加热。每个快速核酸检测芯片，也可以放置不同的检测样本和核酸检测时机，因此，每个在大规模微加热器阵列中，可以在不同微加热器上热循环不同的待测样本，实现高通量的样本检测；或者对同一个样本，采用不同的核酸检测试剂，实现多种核酸的同时检测。以上方式还可以混合集成，即对多个样本同时进行多种核酸的检测。

[0124] 实施例6:

[0125] 本实施例中，提供具体的扩增方法，包括：设置一薄膜悬空；

[0126] 将含有待扩增样本的液滴置于悬空薄膜上；

[0127] 周期性加热所述液滴，实现液滴在不同温度下的循环，实现扩增。

[0128] 本实施例中采用以下的一种或者几种方法形成所述防挥发层：用表面活性剂在液滴表面自组装成膜形成防挥发层；在所述液滴表面覆盖一层疏水纳米颗粒形成防挥发层；在所述液滴上方加盖一层悬空薄膜将液滴封存在两层悬空薄膜之间形成防挥发层。

- [0129] 本实施例中，可以采用以下一种或者几种加热方法实现液滴周期性加热：在悬空薄膜下方利用加热丝或者加热片进行加热；或者使用微波或者超声波探针插入所述液滴进行加热；将整个芯片放置的微波炉中，利用微波对所述液滴以及悬空薄膜无接触加热。
- [0130] 扩增方法还包括以下步骤：在周期性加热所述液滴时，对液滴加热温度进行测量。本实施例中，可以采用测温电阻丝对所述悬空薄膜上的液滴进行加热测温。其他实施例中，也可采用其他方式，在加热扩增时进行加热测温。
- [0131] 具体的，实现周期性加热所述液滴，实现液滴在不同温度下的循环，实现扩增时，包括以下步骤：将所述测温电阻丝与所述悬空薄膜进行集成，形成一悬空微加热器，所述液滴置于所述悬空薄膜上表面；使所述防挥发层包覆所述微加热器上的液滴；对所述悬空微加热器施加不同电信号，实现周期性加热所述液滴，使得液滴在不同温度下进行循环，实现扩增。
- [0132] 本实施例中的扩增方法可以通过加入荧光标记或者荧光探针形成快速核酸检测芯片。
- [0133] 含荧光标记的扩增后液滴，置于荧光检测装置中，完成核酸的荧光检测；
- [0134] 根据扩增后液滴的荧光亮度，判定检测结果。
- [0135] 具体的，液滴内含有待测样本、扩增引物、酶、dNTP即脱氧核糖核苷三磷酸、模板、荧光探针和缓冲液。所述液滴外部设置有防挥发层。
- [0136] 以下通过一种具体的快速核酸检测芯片即微加热器来说明如何实现快速核酸检测：
- [0137] 将所述悬空微加热器置于一具有凹槽的衬底上，将所述悬空微加热器延伸出至少两根支撑导电线至所述衬底凹槽的凸起边缘，支撑所述微加热器在所述凹槽上方悬空；所述支撑导电线延伸至所述衬底凹槽的凸起边缘固定，形成微加热器连接端子；利用防挥发层，采用所述非挥发性疏水液膜作为所述防挥发层，所述非挥发性疏水液膜设置为氟油或硅油。将所述液滴以及所述悬空薄膜下方区域全部填充，使其能够将微加热器以及所述微加热器上的液滴全部包覆。
- [0138] 最后，对所述悬空微加热器的所述微加热器连接端子施加不同电信号，实现周期性加热所述液滴，使得液滴在不同温度下进行循环，实现扩增。

- [0139] 利用液滴中的荧光标记，对荧光进行检测，获得扩增结果。
- [0140] 本实施例以及前述的实施例中，所描述的悬空薄膜设置为氮化硅、氧化硅、碳膜、金刚石膜、parylene派瑞林(对二甲苯聚合物)膜、金属膜中的一种薄膜或者几种形成的复合薄膜。为了让悬空薄膜上的液滴张力不被破坏导致样本弥散，在所述悬空薄膜上镀上增强反射镀膜以增强荧光反射信号。
- [0141] 在以上方案的基础上，为了更好更快地实现加热循环，在周期性加热所述液滴之后，采用悬空薄膜上的额外散热装置对所述液滴进行散热。具体而言，在所述悬空薄膜上采用热电制冷片、平面热管或者微流控管道流体中的其中一种或者几种方式对所述液滴进行散热。
- [0142] 本实施例中还可以将前述快速核酸检测方法以及本发明提供的快速核酸检测芯片如微加热器大规模应用，实现一种快速核酸大规模检测方法，其将同一样本或者不同样本分别分成多个液滴，利用前面所述的快速核酸检测方法同时对多个液滴进行检测。
- [0143] 本发明的关键点是将微液滴(纳升到微升)置于悬空薄膜上，采用微加热器或微波加热，可实现0.5秒以内的温度循环(65°C-95°C)，循环过程中液滴覆油以避免液滴挥发。本发明采用液滴原位加热和降温，通过悬空薄膜支撑，消除对衬底加热的需要，可实现最快速度的液滴升降温，无需驱动液滴，大大简化芯片设计和操作，确保易用性、可靠性。

工业实用性

- [0144] 以上所述仅为本发明的较佳实施例，凡依本发明权利要求范围所做的均等变化与修饰，皆应属本发明权利要求的涵盖范围。

权利要求书

- [权利要求 1] 一种扩增结构，其特征在于：包括悬空薄膜和加热装置，所述加热装置用于加热悬空薄膜上的液滴。
- [权利要求 2] 如权利要求1所述的扩增结构，其特征在于：在悬空薄膜上的所述液滴上包裹有防挥发层。
- [权利要求 3] 如权利要求2所述的扩增结构，其特征在于：所述防挥发层设置为非挥发性疏水液膜和/或疏水纳米颗粒层。
- [权利要求 4] 如权利要求3所述的扩增结构，其特征在于：当采用所述非挥发性疏水液膜作为所述防挥发层时，所述非挥发性疏水液膜的沸点高于所述液滴沸点。
- [权利要求 5] 如权利要求4所述的扩增结构，其特征在于：采用所述非挥发性疏水液膜作为所述防挥发层时，所述非挥发性疏水液膜设置为氟油或硅油。
- [权利要求 6] 如权利要求2所述的扩增结构，其特征在于：所述防挥发层由表面活性剂在所述液滴表面自组装成膜形成。
- [权利要求 7] 如权利要求2所述的扩增结构，其特征在于：在悬空薄膜上的所述液滴上方加盖一层悬空薄膜使液滴封存在两层悬空薄膜之间以形成所述防挥发层。
- [权利要求 8] 如权利要求1所述的扩增结构，其特征在于：所述加热装置设置为微波容器，所述悬空薄膜及液滴置于所述微波容器中，再利用微波容器对液滴进行加热。
- [权利要求 9] 如权利要求1所述的扩增结构，其特征在于：所述加热装置设置为加热微针，通过所述加热微针插入悬空薄膜上的所述液滴进行加热。
- [权利要求 10] 如权利要求9所述的扩增结构，其特征在于：所述加热微针设置为微波或者超声波探头微针。

- [权利要求 11] 如权利要求1所述的扩增结构，其特征在于：所述加热装置设置为加热片或者加热丝，所述加热片或者所述加热丝设置在所述悬空薄膜下方进行加热。
- [权利要求 12] 如权利要求1所述的扩增结构，其特征在于：所述加热装置上设置有测温装置。
- [权利要求 13] 如权利要求11所述的扩增结构，其特征在于：所述加热片或者加热丝设置为加热及测温微电阻丝。
- [权利要求 14] 如权利要求11所述的扩增结构，其特征在于：所述悬空薄膜与所述加热丝或者加热片集成形成微加热器。
- [权利要求 15] 如权利要求14所述的扩增结构，其特征在于：利用防挥发层将悬空薄膜上的液滴以及所述悬空薄膜下方区域全部填充，使其能够将微加热器以及所述微加热器上的液滴全部包覆。
- [权利要求 16] 如权利要求14所述的扩增结构，其特征在于：所述微加热器悬空于衬底上方，所述微加热器上延伸出至少两根支撑导电线至所述衬底上固定并形成微加热器连接端子；所述支撑导电线支撑所述微加热器悬空时的平衡。
- [权利要求 17] 如权利要求16所述的扩增结构，其特征在于：所述衬底上设置有凹槽，所述微加热器设置在所述凹槽的上方，所述微加热器上延伸出至少两根支撑导电线至所述凹槽的凸起边缘，支撑所述微加热器在所述凹槽上方悬空；所述支撑导电线延伸至所述凹槽的凸起边缘固定，形成所述微加热器连接端子。
- [权利要求 18] 如权利要求17所述的扩增结构，其特征在于：从所述微加热器上延伸出四根支撑导电线至所述凹槽的凸起边缘固定并形成微加热器连接端子，所述四根支撑导电线支撑所述微加热器悬空时的平衡。
- [权利要求 19] 如权利要求16所述的扩增结构，其特征在于：对所述连接端子输入不同电信号，使得所述微加热器其实现温度的快速变化以热传导至液滴实现温度的快速变化。

- [权利要求 20] 如权利要求1所述的扩增结构，其特征在于：所述悬空薄膜上设置有疏水或者超疏水镀层。
- [权利要求 21] 如权利要求1所述的扩增结构，其特征在于：所述悬空薄膜设置为氮化硅、氧化硅、碳膜、金刚石膜、parylene膜、金属膜中的一种薄膜或者几种形成的复合薄膜。
- [权利要求 22] 如权利要求1所述的扩增结构，其特征在于：还包括散热装置。
- [权利要求 23] 如权利要求22所述的扩增结构，其特征在于：所述散热装置为设置于所述悬空薄膜上的热电制冷片、平面热管或者微流控管道流体中的其中一种或者几种。
- [权利要求 24] 一种快速核酸检测芯片，其特征在于：包括如权利要求1至23任一项所述的扩增结构。
- [权利要求 25] 如权利要求24所述的快速核酸检测芯片，其特征在于：所述悬空薄膜上设置有增强反射镀膜。
- [权利要求 26] 一种快速核酸检测装置，其特征在于：包括若干个如权利要求24或25所述的快速核酸检测芯片；每一快速核酸检测芯片中独立或者统一地利用加热装置对悬空薄膜上的液滴进行加热以实现温度的快速变化。
- [权利要求 27] 一种扩增方法，其特征在于：包括以下步骤：
设置一薄膜悬空；
将含有扩增样本的液滴置于悬空薄膜上；
周期性加热所述液滴，实现液滴在不同温度下的循环，实现扩增。
- [权利要求 28] 如权利要求27所述的扩增方法，其特征是：所述液滴外部设置有防挥发层。
- [权利要求 29] 如权利要求27所述的扩增方法，其特征是：采用以下的一种或者几种方法形成防挥发层：
用表面活性剂在液滴表面自组装成膜形成防挥发层；
在所述液滴表面覆盖一层疏水纳米颗粒形成防挥发层；

在所述液滴上方加盖一层悬空薄膜将液滴封存在两层悬空薄膜之间形成防挥发层。

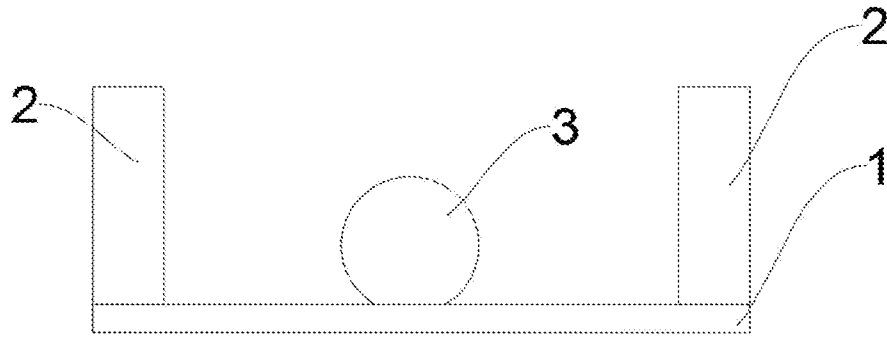
- [权利要求 30] 如权利要求27所述的扩增方法，其特征在于：采用以下一种或者几种加热方法实现液滴周期性加热：
在悬空薄膜下方利用加热丝或者加热片进行加热；
或者使用微波或者超声波探针插入所述液滴进行加热；
将整个芯片放置的微波炉中，利用微波对所述液滴以及悬空薄膜无接触加热。
- [权利要求 31] 如权利要求27所述的扩增方法，其特征在于：在周期性加热所述液滴时，对液滴加热温度进行测量。
- [权利要求 32] 如权利要求31所述的扩增方法，其特征在于：采用测温电阻丝对所述悬空薄膜上的液滴进行加热测温。
- [权利要求 33] 如权利要求32所述的扩增方法，其特征在于：实现周期性加热所述液滴，实现液滴在不同温度下的循环，实现扩增时，包括以下步骤：
将所述测温电阻丝与所述悬空薄膜进行集成，形成一悬空微加热器，所述液滴置于所述悬空薄膜上表面；
使防挥发层包覆所述微加热器上的液滴；
对所述悬空微加热器施加不同电信号，实现周期性加热所述液滴，使得液滴在不同温度下进行循环，实现扩增。
- [权利要求 34] 如权利要求33所述的扩增方法，其特征在于：还包括以下步骤：
将所述悬空微加热器置于一具有凹槽的衬底上，将所述悬空微加热器延伸出至少两根支撑导电线至所述衬底凹槽的凸起边缘，支撑所述微加热器在所述凹槽上方悬空；所述支撑导电线延伸至所述衬底凹槽的凸起边缘固定，形成微加热器连接端子；
利用防挥发层将所述液滴以及所述悬空薄膜下方区域全部填充，使其能够将微加热器以及所述微加热器上的液滴全部包覆；

对所述悬空微加热器的所述微加热器连接端子施加不同电信号，实现周期性加热所述液滴，使得液滴在不同温度下进行循环，实现扩增。

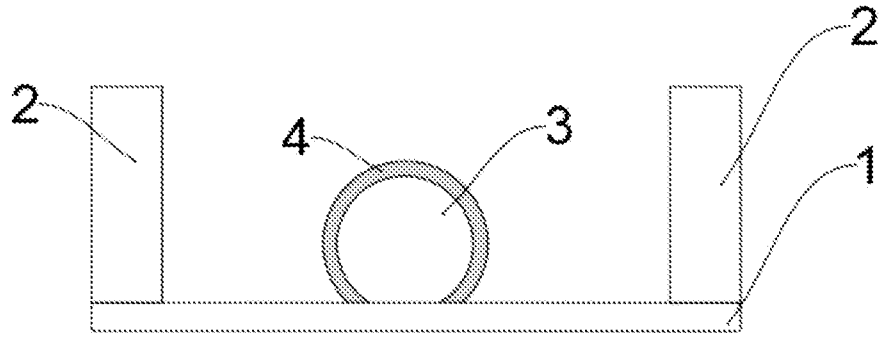
- [权利要求 35] 如权利要求34所述的扩增方法，其特征在于：采用非挥发性疏水液膜作为所述防挥发层，所述非挥发性疏水液膜设置为氟油或硅油。
- [权利要求 36] 如权利要求27所述的扩增方法，其特征在于：所述悬空薄膜设置为氮化硅、氧化硅、碳膜、金刚石膜、parylene膜、金属膜中的一种薄膜或者几种形成的复合薄膜。
- [权利要求 37] 如权利要求27所述的扩增方法，其特征在于：
在周期性加热所述液滴之后，采用悬空薄膜上的额外散热装置对所述液滴进行散热。
- [权利要求 38] 如权利要求27所述的扩增方法，其特征在于：在所述悬空薄膜上采用热电制冷片、平面热管或者微流控管道流体中的其中一种或者几种方式对所述液滴进行散热。
- [权利要求 39] 一种快速核酸检测方法，其特征是：使用如权利要求27至38任一项所述扩增方法进行待测样本扩增。
- [权利要求 40] 如权利要求39所述的快速核酸检测方法，其特征是：还包括以下步骤
扩增前在所述液滴中加入荧光标记；
扩增后将含荧光标记的扩增后液滴，置于荧光检测装置中，完成核酸的荧光检测；
根据扩增后液滴的荧光亮度，判定检测结果。
- [权利要求 41] 如权利要求40所述的快速核酸检测方法，其特征在于：所述液滴内含有待测样本、扩增引物、酶、dNTP脱氧核糖核苷三磷酸、模板、荧光探针和缓冲液。
- [权利要求 42] 如权利要求40所述的快速核酸检测方法，其特征在于：在所述悬空薄膜上镀上增强反射镀膜以增强荧光反射信号。

[权利要求 43] 一种快速核酸大规模检测方法，其特征在于：将同一样本或者不同样本分别分成多个液滴，利用如权利要求39至42任一项所述的快速核酸检测方法同时对多个液滴进行检测。

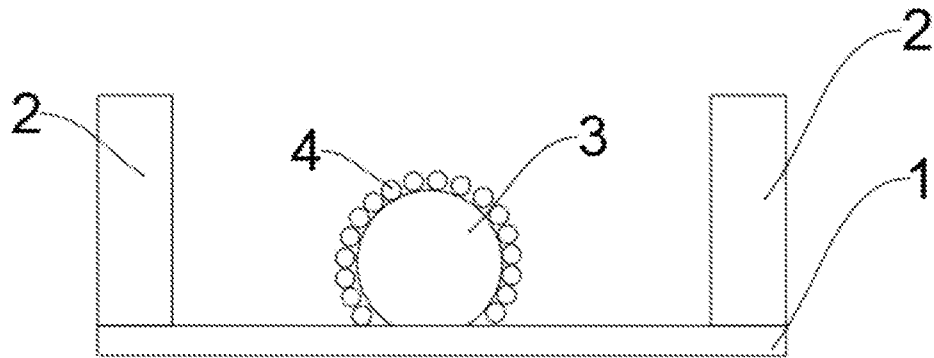
[图 1]



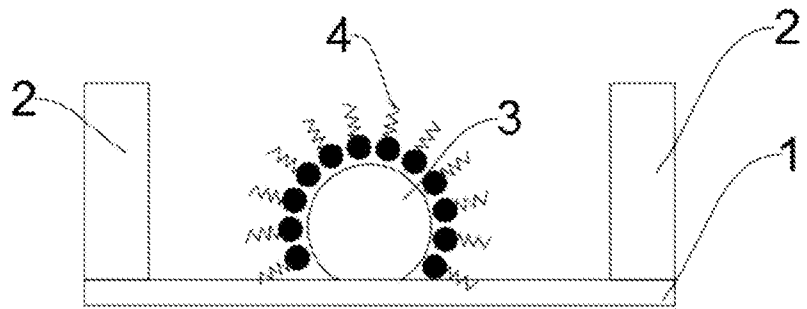
[图 2]



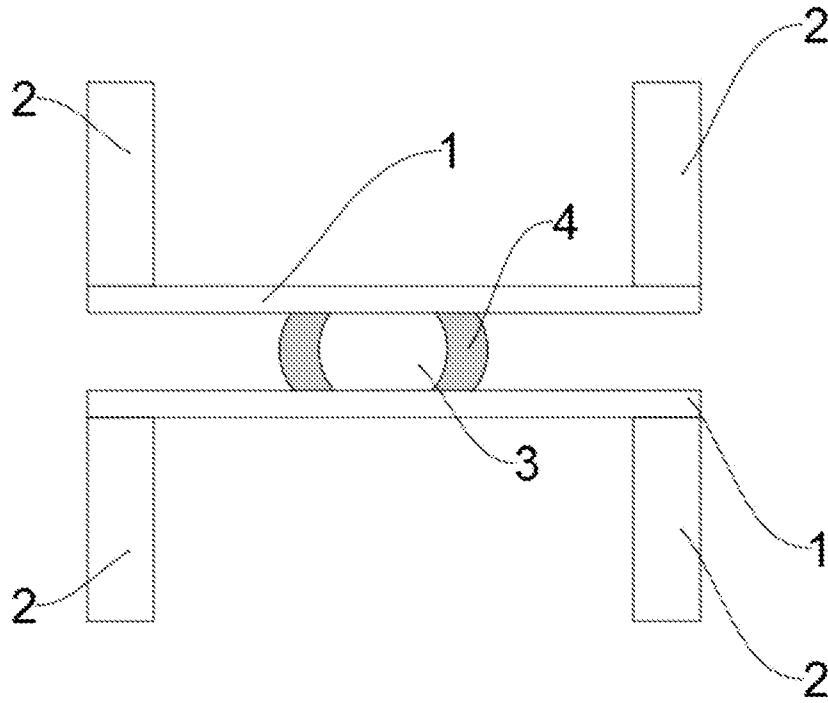
[图 3]



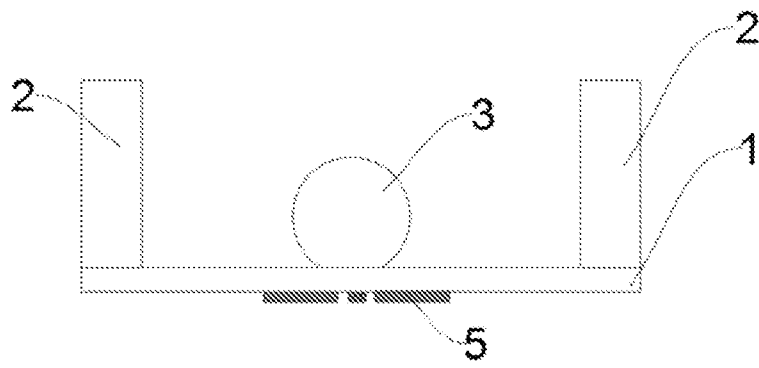
[图 4]



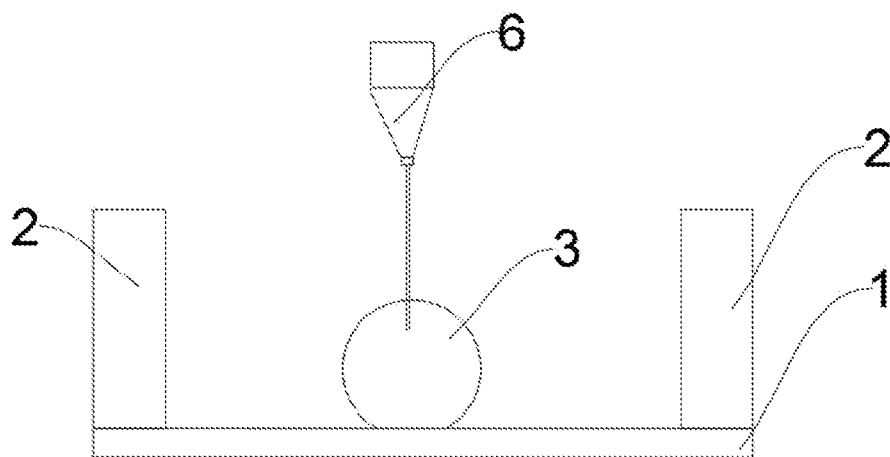
[图 5]



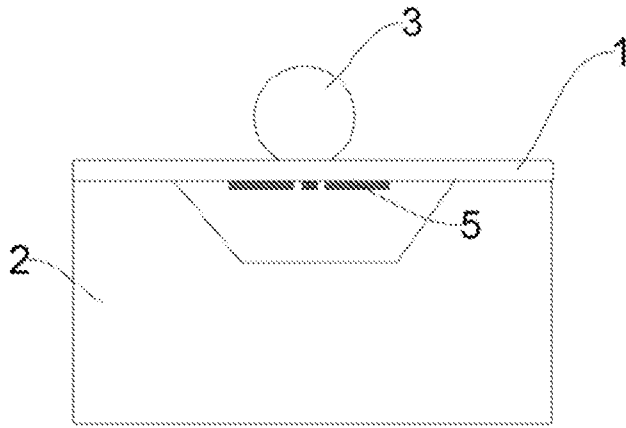
[图 6]



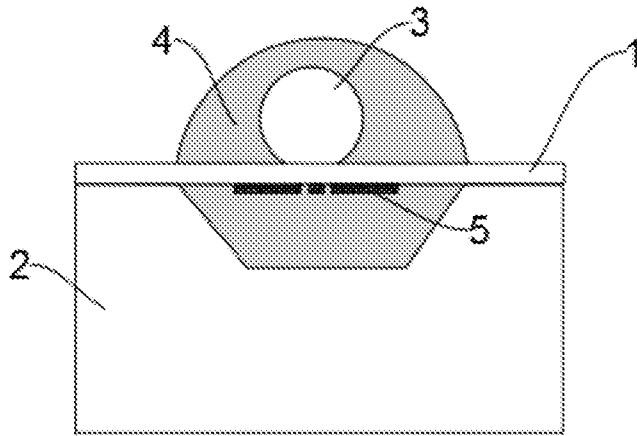
[图 7]



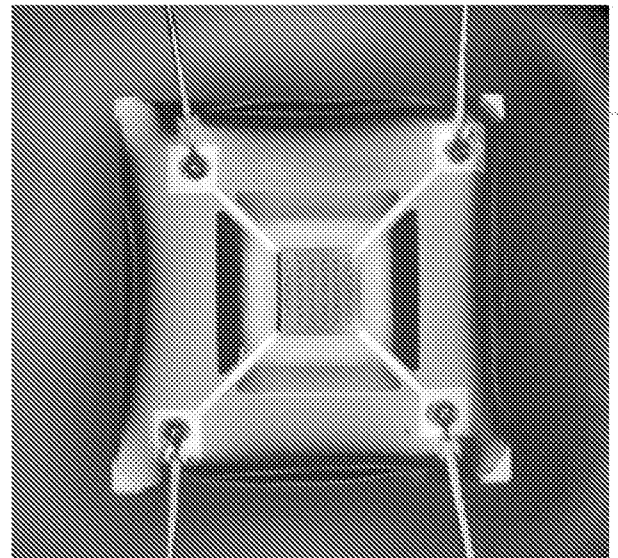
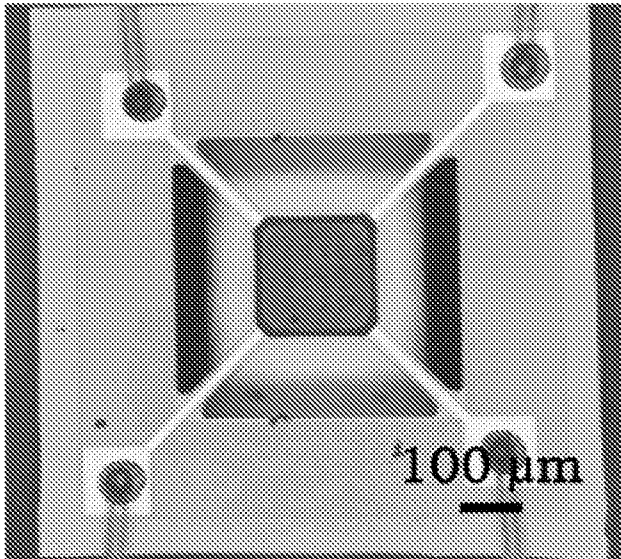
[图 8]



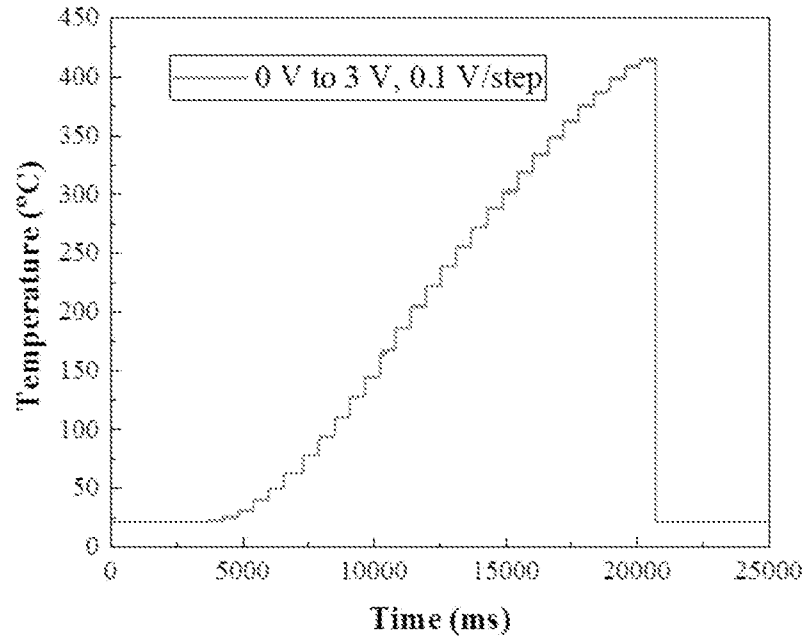
[图 9]



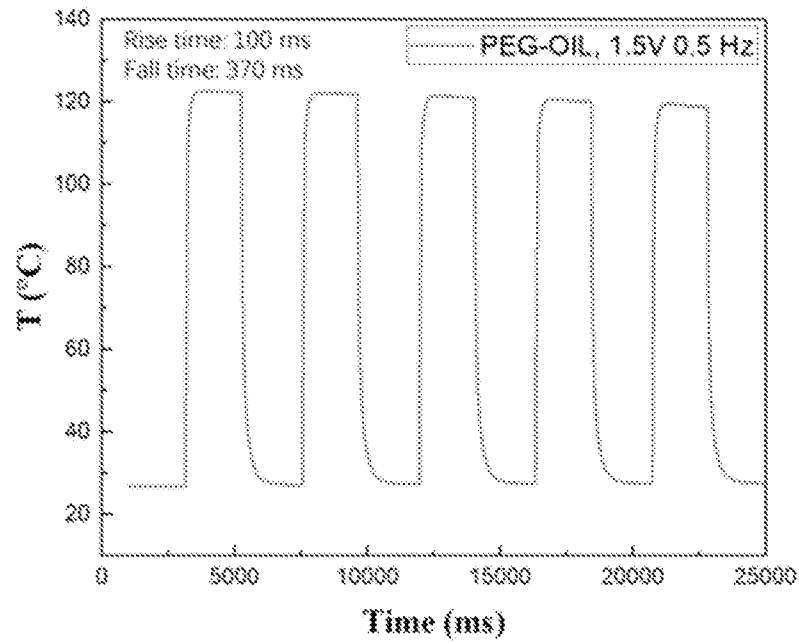
[图 10]



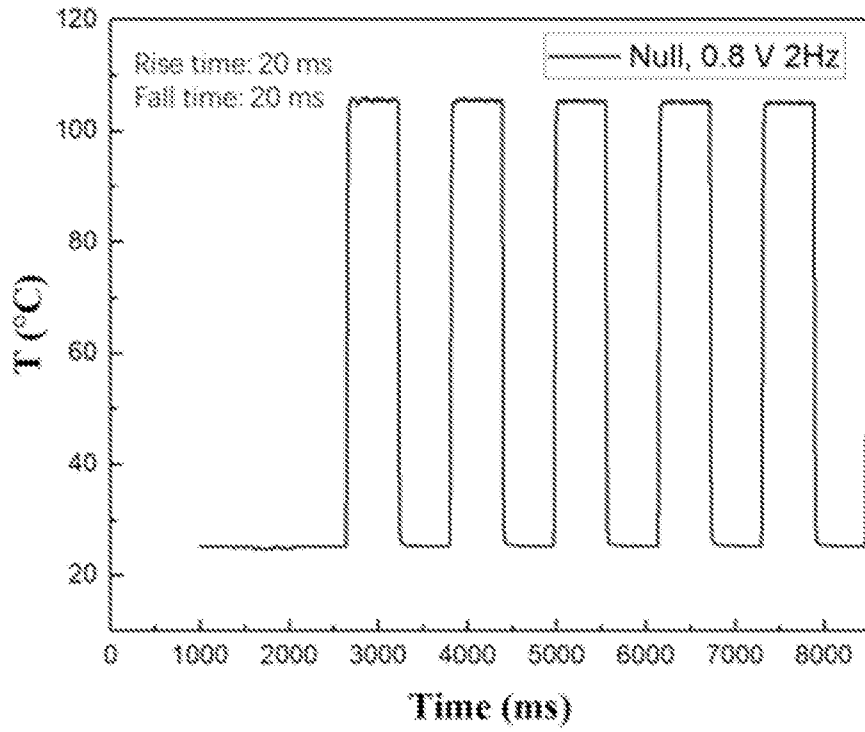
[图 11]



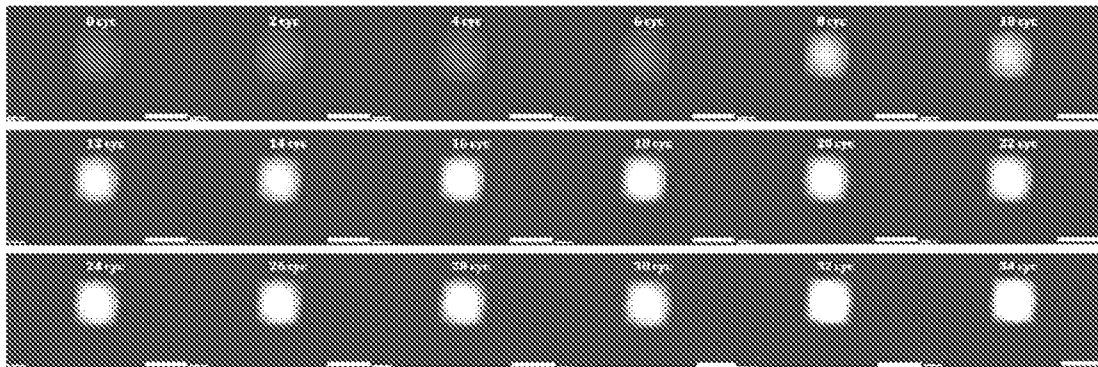
[图 12]



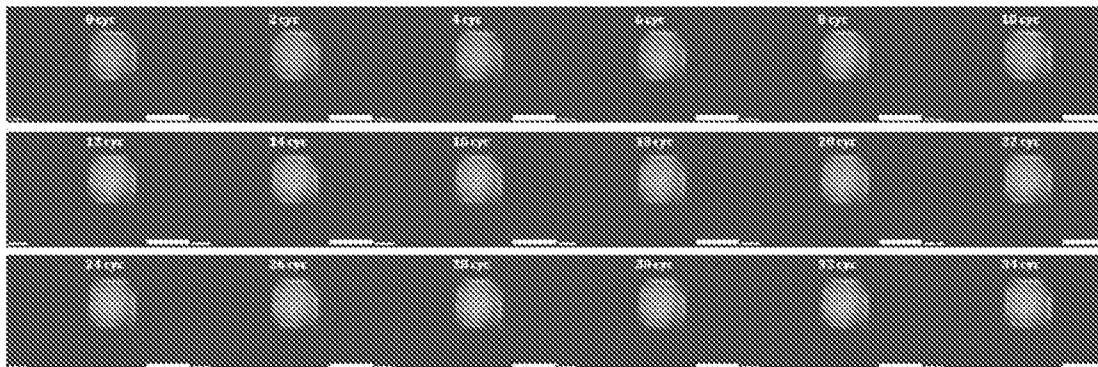
[图 13]



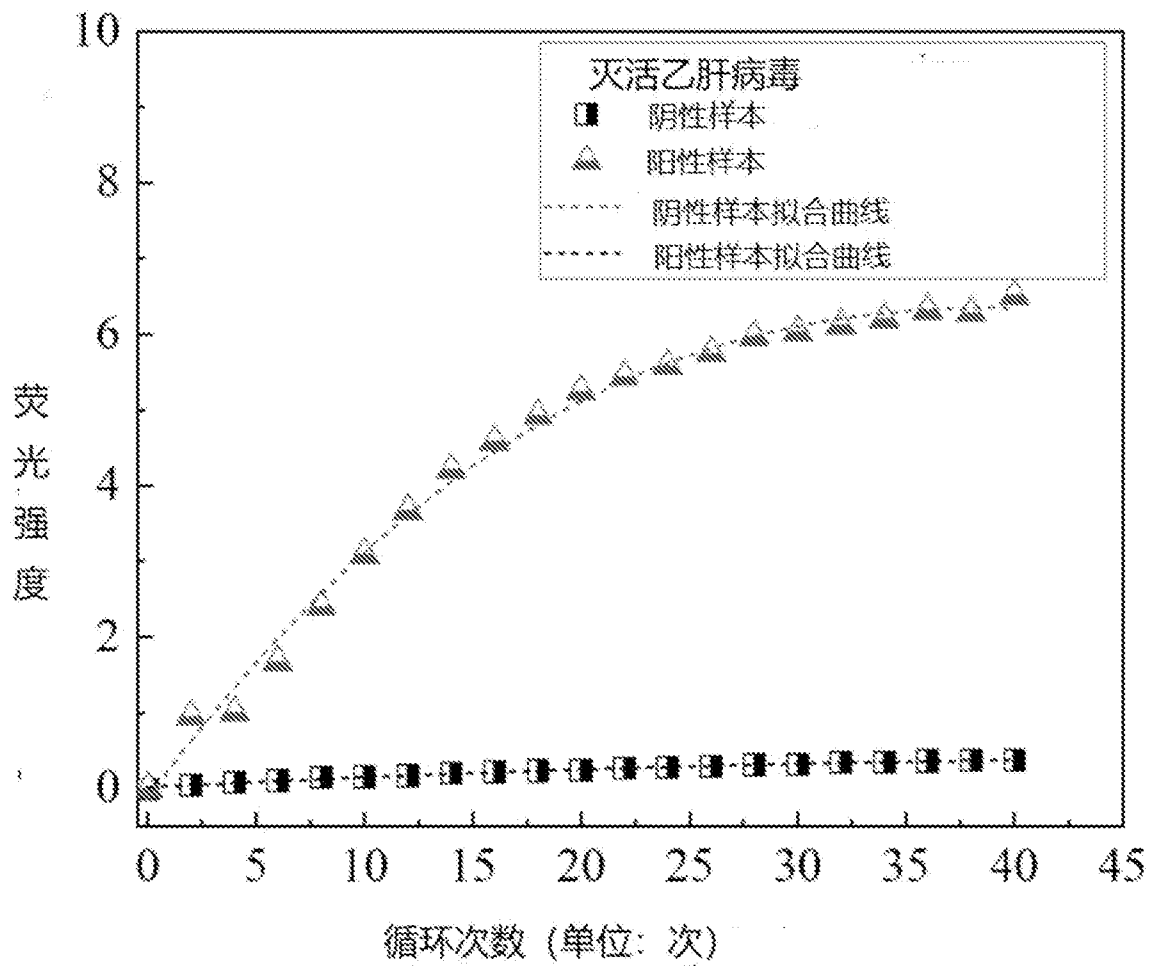
[图 14]



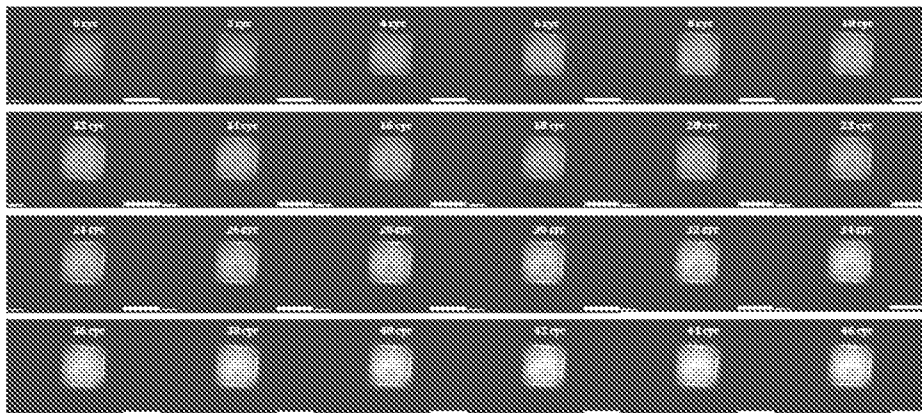
[图 15]



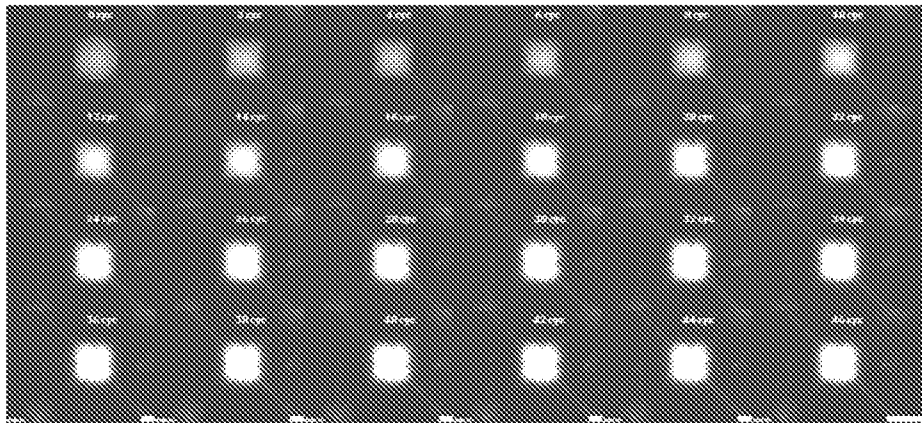
[图 16]



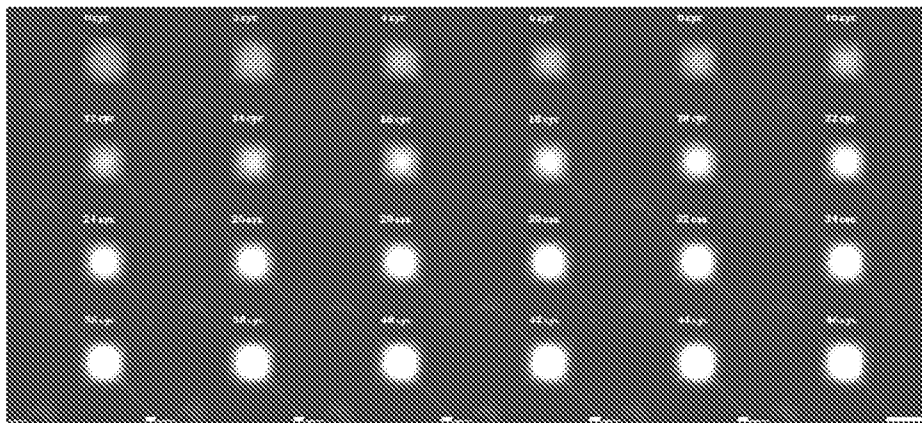
[图 17]



[图 18]



[图 19]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/126623

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C12M 1/34(2006.01)i; C12M 1/38(2006.01)i; C12Q 1/6837(2018.01)i; B01L 7/00(2006.01)i; B01L 3/00(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC:C12M,C12Q,B01L		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
CNABS; WPABSC; CNTXT; CNKI; 百度学术, BAIDU SCHOLAR: 热循环, 聚合酶链式反应, 膜, 加热, 液滴等; DWPI; WPABS; VEN; ENTXT; PUBMED; ISI WEB OF SCIENCE: thermal cycl+, PCR, film?, membrane?, heat+, droplet?等		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2020376493 A1 (ESSENLIx CORPORATION) 03 December 2020 (2020-12-03) see description, paragraphs [0023]-[0078] and [0187]-[0190], and figures 1-13	1-43
Y	CN 101917784 A (SHANGHAI INSTITUTE OF MICROSYSTEM AND INFORMATION TECHNOLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 15 December 2010 (2010-12-15) see description, paragraphs [0009]-[0022], and embodiments 1-5, and figures 1-6	1-43
PX	CN 115449471 A (SOUTHERN UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 09 December 2022 (2022-12-09) see claims 1-43, and description, paragraphs [0006]-[0047]	1-43
PX	CN 116731841 A (SOUTHERN UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 12 September 2023 (2023-09-12) see description, paragraphs [0007]-[0145]	1-43
PX	CN 116716180 A (SOUTHERN UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 08 September 2023 (2023-09-08) see description, paragraphs [0007]-[0146]	1-43
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
27 December 2023		12 January 2024
Name and mailing address of the ISA/CN		Authorized officer
China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/126623

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 107754962 A (SOUTHERN UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 06 March 2018 (2018-03-06) see description, paragraphs [0005]-[0032]	1-43

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2023/126623

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
US	2020376493	A1	03 December 2020	JP 2022125266 A	26 August 2022
				WO 2018195528 A1	25 October 2018
				US 10926265 B2	23 February 2021
				US 2021138474 A1	13 May 2021
				US 11369968 B2	28 June 2022
				CA 3060971 A1	25 October 2018
				CA 3060971 C	03 August 2021
				JP 2020517266 A	18 June 2020
				EP 3612841 A1	26 February 2020
				EP 3612841 A4	21 April 2021

CN	101917784	A	15 December 2010	None	

CN	115449471	A	09 December 2022	None	

CN	116731841	A	12 September 2023	None	

CN	116716180	A	08 September 2023	None	

CN	107754962	A	06 March 2018	WO 2019100575 A1	31 May 2019

<p>A. 主题的分类</p> <p>C12M 1/34(2006.01)i; C12M 1/38(2006.01)i; C12Q 1/6837(2018.01)i; B01L 7/00(2006.01)i; B01L 3/00(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																									
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>IPC:C12M,C12Q,B01L</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CNABS; WPABSC; CNTXT; CNKI; 百度学术和检索词: 热循环, 聚合酶链式反应, 膜, 加热, 液滴等; DWPI; WPABS; VEN; ENTXT; PUBMED; ISI WEB OF SCIENCE和检索词: thermal cycl+, PCR, film?, membrane?, heat+, droplet?等</p>																									
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>US 2020376493 A1 (ESSENLIX CORP) 2020年12月3日 (2020 - 12 - 03) 参见说明书第[0023]-[0078]、[0187]-[0190]段, 图1-13</td> <td>1-43</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 101917784 A (中国科学院上海微系统与信息技术研究所) 2010年12月15日 (2010 - 12 - 15) 参见说明书第[0009]-[0022]段, 实施例1-5, 图1-6</td> <td>1-43</td> </tr> <tr> <td>PX</td> <td>CN 115449471 A (南方科技大学) 2022年12月9日 (2022 - 12 - 09) 参见权利要求1-43, 说明书第[0006]-[0047]段</td> <td>1-43</td> </tr> <tr> <td>PX</td> <td>CN 116731841 A (南方科技大学) 2023年9月12日 (2023 - 09 - 12) 参见说明书第[0007]-[0145]段</td> <td>1-43</td> </tr> <tr> <td>PX</td> <td>CN 116716180 A (南方科技大学) 2023年9月8日 (2023 - 09 - 08) 参见说明书第[0007]-[0146]段</td> <td>1-43</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 107754962 A (南方科技大学) 2018年3月6日 (2018 - 03 - 06) 参见说明书第[0005]-[0032]段</td> <td>1-43</td> </tr> </tbody> </table> <p><input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p> <table border="0"> <tr> <td> <p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>“D” 申请人在国际申请中引证的文件</p> <p>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</p> <p>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p> </td> <td> <p>“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</p> <p>“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</p> <p>“&” 同族专利的文件</p> </td> </tr> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	Y	US 2020376493 A1 (ESSENLIX CORP) 2020年12月3日 (2020 - 12 - 03) 参见说明书第[0023]-[0078]、[0187]-[0190]段, 图1-13	1-43	Y	CN 101917784 A (中国科学院上海微系统与信息技术研究所) 2010年12月15日 (2010 - 12 - 15) 参见说明书第[0009]-[0022]段, 实施例1-5, 图1-6	1-43	PX	CN 115449471 A (南方科技大学) 2022年12月9日 (2022 - 12 - 09) 参见权利要求1-43, 说明书第[0006]-[0047]段	1-43	PX	CN 116731841 A (南方科技大学) 2023年9月12日 (2023 - 09 - 12) 参见说明书第[0007]-[0145]段	1-43	PX	CN 116716180 A (南方科技大学) 2023年9月8日 (2023 - 09 - 08) 参见说明书第[0007]-[0146]段	1-43	A	CN 107754962 A (南方科技大学) 2018年3月6日 (2018 - 03 - 06) 参见说明书第[0005]-[0032]段	1-43	<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>“D” 申请人在国际申请中引证的文件</p> <p>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</p> <p>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p>	<p>“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</p> <p>“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</p> <p>“&” 同族专利的文件</p>
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																							
Y	US 2020376493 A1 (ESSENLIX CORP) 2020年12月3日 (2020 - 12 - 03) 参见说明书第[0023]-[0078]、[0187]-[0190]段, 图1-13	1-43																							
Y	CN 101917784 A (中国科学院上海微系统与信息技术研究所) 2010年12月15日 (2010 - 12 - 15) 参见说明书第[0009]-[0022]段, 实施例1-5, 图1-6	1-43																							
PX	CN 115449471 A (南方科技大学) 2022年12月9日 (2022 - 12 - 09) 参见权利要求1-43, 说明书第[0006]-[0047]段	1-43																							
PX	CN 116731841 A (南方科技大学) 2023年9月12日 (2023 - 09 - 12) 参见说明书第[0007]-[0145]段	1-43																							
PX	CN 116716180 A (南方科技大学) 2023年9月8日 (2023 - 09 - 08) 参见说明书第[0007]-[0146]段	1-43																							
A	CN 107754962 A (南方科技大学) 2018年3月6日 (2018 - 03 - 06) 参见说明书第[0005]-[0032]段	1-43																							
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>“D” 申请人在国际申请中引证的文件</p> <p>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</p> <p>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p>	<p>“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</p> <p>“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</p> <p>“&” 同族专利的文件</p>																								
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2023年12月27日</p>	<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2024年1月12日</p>																								
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p>	<p>授权官员</p> <p>穆飞航</p> <p>电话号码 (+86) 010-62412295</p>																								

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2023/126623

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
US	2020376493	A1	2020年12月3日	JP	2022125266	A	2022年8月26日
				WO	2018195528	A1	2018年10月25日
				US	10926265	B2	2021年2月23日
				US	2021138474	A1	2021年5月13日
				US	11369968	B2	2022年6月28日
				CA	3060971	A1	2018年10月25日
				CA	3060971	C	2021年8月3日
				JP	2020517266	A	2020年6月18日
				EP	3612841	A1	2020年2月26日
				EP	3612841	A4	2021年4月21日

CN	101917784	A	2010年12月15日	无			

CN	115449471	A	2022年12月9日	无			

CN	116731841	A	2023年9月12日	无			

CN	116716180	A	2023年9月8日	无			

CN	107754962	A	2018年3月6日	WO	2019100575	A1	2019年5月31日
