

(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
2022 年 12 月 1 日 (01.12.2022)



(10) 国际公布号
WO 2022/246781 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12Q 1/6851 (2018.01) *C12M 1/00* (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2021/096620
- (22) 国际申请日: 2021 年 5 月 28 日 (28.05.2021)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (71) 申请人: 深圳华大生命科学研究院 (BGI SHENZHEN) [CN/CN]; 中国广东省深圳市盐田区盐田街道北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。
- (72) 发明人: 章文蔚 (ZHANG, Wenwei); 中国广东省深圳市盐田区盐田街道北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 江媛 (JIANG, Yuan); 中国广东省深圳市盐田区盐田街道北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 王冀 (WANG,

Ji); 中国广东省深圳市盐田区盐田街道北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 席凤 (XI, Feng); 中国广东省深圳市盐田区盐田街道北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 刘传 (LIU, Chuan); 中国广东省深圳市盐田区盐田街道北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 汪为茂 (WANG, Weimao); 中国广东省深圳市盐田区盐田街道北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 崔路漫 (CUI, Luman); 中国广东省深圳市盐田区盐田街道北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 纪泽阳 (JI, Zeyang); 中国广东省深圳市盐田区盐田街道北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 郭苗苗 (GUO, Miaomiao); 中国广东省深圳市盐田区盐田街道北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 章登位 (ZHANG, Dengwei); 中国广东省深圳市盐田区盐田街道北山工业区综合楼,

(54) Title: NUCLEIC ACID TEST SYSTEM AND METHOD BASED ON ELECTROWETTING CRISPR

(54) 发明名称: 基于电浸润的CRISPR的核酸检测系统及其方法

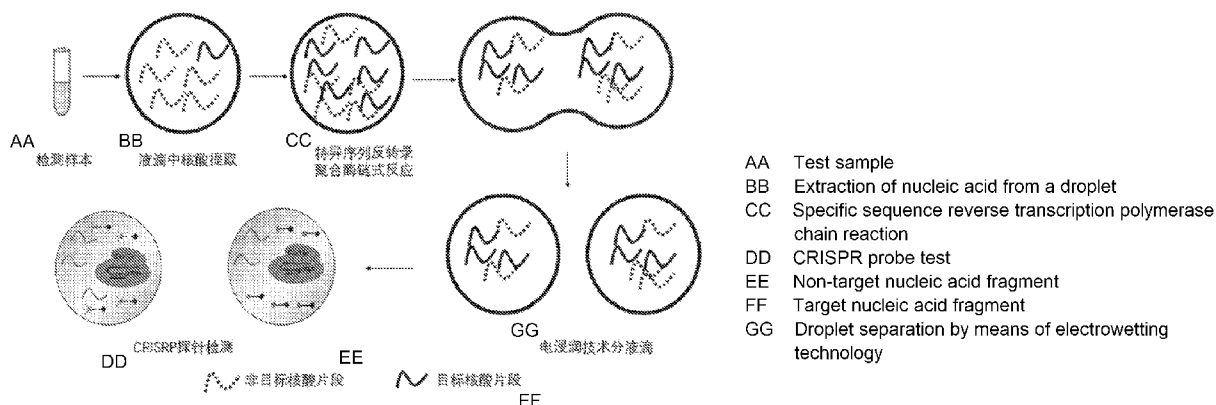


图 1

(57) Abstract: A nucleic acid test system and method based on electrowetting CRISPR. The nucleic acid test system comprises an electrowetting chip module, a CRISPR reaction module, a signal capture module and a control and analysis module, wherein the electrowetting chip module comprises a reagent storage area, a biochemical reaction area, a fluorescent photographing area and a driving system, and micro-channels between the areas; the CRISPR reaction module comprises a CRISPR reaction solution containing a fluorescent probe, a protein reaction solution containing Cas12a, and a gRNA reaction solution containing gRNA; and the protein reaction solution, the gRNA reaction solution and the CRISPR reaction solution each comprise a surfactant and an enzyme buffer solution.

(57) 摘要: 一种基于电浸润的CRISPR的核酸检测系统及其方法。所述核酸检测系统包括: 电浸润芯片模块、CRISPR反应模块、信号捕获模块和控制与分析模块; 其中: 所述电浸润芯片模块包括: 试剂储存区、生化反应区、荧光拍照区和驱动系统, 以及各区之间的微通道; 所述CRISPR反应模块包括: 含有荧光探针的CRISPR反应液、含有Cas12a的蛋白反应液和含有gRNA的gRNA反应液; 所述蛋白反应液、gRNA反应液和CRISPR反应液均包含表面活性剂和酶缓冲液;

Guangdong 518083 (CN)。任悍(**REN, Han**)；中国广东省深圳市盐田区盐田街道北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。兰茜(**LAN, Xi**)；中国广东省深圳市盐田区盐田街道北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。王欧(**WANG, Ou**)；中国广东省深圳市盐田区盐田街道北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。汪晓珏(**WANG, Xiaojue**)；中国广东省深圳市盐田区盐田街道北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。

(74) 代理人：上海弼兴律师事务所 (**SHANGHAI BESHINING LAW OFFICE**)；中国上海市小木桥路681号外经大厦21楼, Shanghai 200032 (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, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, 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。

(84) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的地区保护)：ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, 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, 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：

- 关于申请人有权申请并被授予专利(细则4.17(ii))
- 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))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

基于电浸润的 CRISPR 的核酸检测系统及其方法

技术领域

本发明属于生物分析检测领域，具体涉及一种基于电浸润的 CRISPR 的核酸检测系统及其方法。

背景技术

分子诊断、免疫诊断和生化诊断分别对应了 DNA 和 RNA、蛋白质、代谢物三个层面，同时代表病原感染后初期、中期和末期的三个不同阶段。DNA 和 RNA 为核酸主要的遗传物质，也是大多数病原尤其是病毒在进入人体初期最直接的检测物。而病原作为抗原刺激人体产生的抗体，则作为蛋白质检测的主体，此类免疫诊断试剂盒也是当今国内诊断试剂盒的主流。代谢物检测方法属于病原的生化检测方法，这种检测方法实际是检测病原的代谢酶，仅适用于当病原在宿主体内繁殖至一定程度且可以在体外分离培养的情况。分子诊断有着其他两种诊断没有的优点：（1）极高的准确性，分子诊断是对病原遗传物质的检测，具有极高的专一性和特征性，虽然说抗原抗体的也有较高的特异性，但也曾出现不同病原的激发相同免疫抗原的病例，而纵然是相同病原的不同基因型都可以通过分子诊断区分；（2）可早期诊断，正如前文所述，分子诊断所检测的 DNA 和 RNA 是病原进入宿主后最直接的产物，而免疫诊断则必须等到病原在宿主（人体）内增殖到一定程度，才会产生免疫反应，在体内出现抗体；以乙型肝炎与丙型肝炎的检测为例，酶联免疫检测的是病毒抗体，但当人体感染病毒初期，有一段时间是没有抗体的；（3）检测所需起始量低，尤其核酸本身具有复制放大能力，也使得分子诊断更加灵敏、特异、快捷，相较于免疫诊断，免疫诊断所需样本量大，信噪比低，于此分子诊断具有显著优势。分子诊断方法通过不同层次、不同维度的多个指标为医生的临床决策提供“精确”支持和依据。

现有分子诊断的常用技术包括灵敏度核酸扩增试验（NAAT），例如反转录 PCR（RT-PCR）、实时定量 PCR（RT-qPCR）、基于环介导的等温扩增检测（LAMP）、基于 DNA 微阵列检测或基于测序检测，以及即时检测（POCT）、NGS 全基因组测序。其中，RT-PCR 和 RT-qPCR 根据病毒特异的基因组序列设计引物进行核酸扩增，检测快速且灵敏度高，但是靶向位点一般不超过 5 个，引物设计要求较高，实际扩增检测中受反应条件和体系影响较大，有较高的假阴性和假阳性率。NGS 检测可以通过全基因组测序，精确且高通量地检测病原菌，且可监测病毒的变异，但是此方法耗时费力，成本较高，且需要特定的

高通量测序仪器，难以满足快检确诊的需求。目前基于病毒核酸检测方法的试剂盒都没有包括核酸提取，因核酸提取大多需要手工操作，容易引入操作误差和污染。市面上出现的自动核酸提纯及荧光 PCR 分析系统如 Anada9850 或者 NGS 自动化制备系统如 MGISP-100 采用的是大型移液站形式，其实现了样本取样、核酸提取、基因扩增或 NGS 建库全程自动化，但是仪器费用昂贵，仅自动化核酸提取仪就达 30-35 万人民币，荧光 PCR 仪器则在 25-35 万。由于整个系统属于开放式系统，仍存在样本间污染的问题。

因此，寻找新型的检测手段进行快速检测、降低分子诊断的门槛是未来分子诊断的发展方向。为了实现这一手段，美国华裔科学家张峰和美国科学家 Jennifer A. Doudna 先后发现了 CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) 相关家族蛋白，Type V 的 Cas12a 及 Type VI 的 Cas13a 和 Cas13b。CRISPR-Cas 是细菌与古细菌的获得性免疫系统，它们利用 RNA 导向的核酸酶来识别和降解外源的核酸。为大家熟知的是 CRISPR-Cas9 家族的蛋白，因为它具有在 guide-RNA (gRNA) 的引导下由自身的两个的结构域 RuvC 和 HNH 准确切割与 guide-RNA 互补部分的双链 DNA 的性质，已经被作为基因编辑的工具广泛应用。Cas12a 和 Cas13 虽然有着和大众所熟知的与 Cas9 极为不同的基因编辑性质，但却依然具有对目标序列极高的专一性。Cas12a 只需要一个 RuvC 就可以同时催化两条链的酶切，并且一旦结合了目标序列，Cas12a 就有了降解任意序列单链 DNA (包括反式单链 DNA) 的内切酶的活性。美国科学家们分别根据 Cas12a 和 Cas13 略有不同的性质分别开发了针对双链 DNA 且具有普适性的分子诊断技术 DETECTR (DNA Endonuclease Targeted CRISPR Trans-Reporter) 和 SHERLOCK (specific high-sensitivity enzymatic reporter unlocking)，检测灵敏度高达埃摩尔级别 (此级别已经可以检测毫升血液中存在的单核酸链)，而不需要进行核酸提取，检测时间在 2 小时之内且不需要专业人员操作就可以进行，这种 CRISPR 相关效应蛋白的出现为新型快速分子诊断指明了新的方向。

电浸润微流体技术 (Electrowetting) 是新兴的自动化生物样品处理和检测前沿技术。它通过制造并控制一组表面疏水的电极，在全封闭的芯片上可以产生、移动、混合并且分离一个和多个微小的液滴。全流程在封闭环境自动操作，完全避免环境和操作污染，同时微量的反应体系 (100 nl-5 μ L) 既减小了样品和试剂用量，又加快了反应速度。这项技术无需复杂昂贵的机械式移液设备，所有控制和反馈都通过全自动电子电路实现，这使得科学家可以像写程序一样操作液滴，实现几十上百步复杂的流体、孵育和光学检测操作。

目前，尚未有将电浸润与 CRISPR 技术结合以实现高灵敏度，并且高通量的简单、

快速有效的核酸检测的报道。

发明内容

针对现有技术中缺乏高灵敏度，并且高通量的简单、快速有效的核酸检测方法的不足，本发明提供一种基于电浸润的 CRISPR 的核酸检测系统及其方法，其采用高封闭性的微流控技术，结合先 RT-PCR（反转录 PCR）后 CRISPR 的两重匹配的方法减少假阳性率，使用同管扩增后液滴分配的方法减少假阴性率，提高了灵敏度与通量。

本发明通过以下技术方案解决上述技术问题：

本发明的第一方面涉及一种基于电浸润的 CRISPR 的核酸检测系统，包括：电浸润芯片模块、CRISPR 反应模块、信号捕获模块和控制与分析模块；其中：

所述电浸润芯片模块包括：试剂储存区、生化反应区、荧光拍照区和驱动系统，以及各区之间的微通道；

所述 CRISPR 反应模块包括：含有荧光探针的 CRISPR 反应液、含有 Cas12a 的蛋白反应液和含有 gRNA 的 gRNA 反应液；所述蛋白反应液、gRNA 反应液和 CRISPR 反应液均包含表面活性剂和酶缓冲液；

所述控制与分析模块通过驱动系统驱动待测核酸样品与所述 CRISPR 反应模块经过微通道进入所述生化反应区，所述待测核酸样品与 CRISPR 反应模块在所述生化反应区中混合并发生反应后产生荧光信号；所述荧光信号在荧光拍照区通过所述信号捕获模块捕获收集后输入所述控制与分析模块进行分析。

优选地，所述 CRISPR 反应模块通过微通道进入所述生化反应区中混合并发生反应的反应条件为本领域常规，例如为 48℃、20min。

在本发明一较佳实施方案中，所述 CRISPR 反应模块和待测核酸样品在反应前贮存于所述试剂储存区。

所述蛋白反应液、gRNA 反应液和 CRISPR 反应液均包含表面活性剂和酶缓冲液。

在本发明一较佳实施方案中，所述表面活性剂为 Tween-20，例如终浓度为 0.05~0.1% 的 Tween-20，所述酶缓冲液为 10×NEB buffer 3.1。

在本发明一较佳实施方案中，所述 gRNA 的序列包括如 SEQ ID NO: 6、9、10、11 和 12 的一种或多种所示的序列；优选所述 gRNA 的序列还包括如 SEQ ID NO: 13 和 14 所示的序列。

在本发明的具体实施方案中，所述 gRNA 的序列如 SEQ ID NO: 6、10、11 或 12 所示，或者如 SEQ ID NO: 6、10、13 和 14 所示，或者如 SEQ ID NO: 9、10、13 和 14 所

示。

所述待测核酸样品为DNA或RNA;优选所述DNA为经过反转录PCR得到的cDNA。

所述信号捕获模块可为本领域常规信号捕获收集装置,优选包括荧光仪、荧光光度计或荧光分光光度计。

所述控制与分析模块可为本领域常规分析装置,优选包括计算机、平板或数控设备。

在本发明一较佳实施方案中,所述蛋白反应液还包括 Cas12a 蛋白、RNase 抑制剂、甘油以及无核酸酶水,所述 gRNA 反应液还包括 gRNA、RNase 抑制剂及无核酸酶水,所述 CRISPR 反应液还包括荧光探针。

所述荧光探针可为 5'端和 3'端分别具有荧光发光基团 FAM 和荧光淬灭基团 BHQ1 的 DNA 探针,例如为 Fam-TTATT-Q。

所述蛋白反应液包括 0.25~1 μM 优选 0.5 μM 的 Cas12a 蛋白、4,000 ~10,000 unit/mL 优选 5,340 unit/mL 的 RNase 抑制剂、10~30%优选 15.69%甘油、0.05~0.5% (w/v) 优选 0.1% (w/v) 的 Tween-20 和 10 $\times$ NEB buffer 3.1。

所述 gRNA 反应液包括: 0.1~0.5 μM 优选 0.3 μM 的 gRNA、10 $\times$ NEB buffer 3.1、2,000~10,000 unit/mL 优选 4,000 unit/mL 的 RNase 抑制剂、0.05~0.5% (w/v) 优选 0.1% (w/v) 的 Tween-20。

所述 CRISPR 反应液包括: 10~100 μM 优选 25 μM 的荧光探针。

在本发明一更佳实施方案中,所述蛋白反应液由 CRISPR 蛋白贮存液和 CRISPR 蛋白稀释液按 1:1 比例配制而成,其中,每 0.1 mL 所述 CRISPR 蛋白贮存液包括: 10 μL 10 μM 的 Cas12a 蛋白、26.7 μL 40,000 unit/mL 的 RNase 抑制剂、10 μL 10 $\times$ NEB buffer 3.1、52.3 μL 60% (v/v) 的甘油和 1 μL 10% (w/v) 的 Tween-20;

每 0.5 mL 所述 CRISPR 蛋白稀释液包括: 50 μL 的 10 $\times$ NEB buffer 3.1、5 μL 的 10% (w/v) 的 Tween-20 和 445 μL 的无核酸酶水;

每 0.5 mL 所述 gRNA 反应液包括: 75 μL 2 μM 的 gRNA、50 μL 10 $\times$ NEB buffer 3.1、50 μL 40,000 unit/mL 的 RNase 抑制剂、5 μL 10% (w/v) 的 Tween-20 和 320 μL 的无核酸酶水;

每 1 mL 所述 CRISPR 反应液包括: 250 μL 100 μM 的荧光探针、200 μL 10 $\times$ NEB buffer 3.1 和 10 μL 10% (w/v) 的 Tween-20。

在本发明一较佳实施方案中,所述核酸检测系统还包括如 SEQ ID NO: 5 所示的 GAPDH gRNA。

在本发明一较佳实施方案中,所述核酸检测系统还包括核酸扩增反应模块;所述待

测核酸样品在所述核酸扩增反应模块发生扩增反应后，将单个液滴均匀分散为多个液滴，例如为 3 个液滴。

所述核酸扩增反应模块可通过 RT-PCR、多重 RT-PCR 或 RT-qPCR 进行核酸扩增。

所述核酸扩增反应模块例如通过 RT-PCR 进行核酸扩增。

所述核酸扩增反应模块包括控温子模块和核酸扩增反应体系，所述核酸扩增反应体系包括实验反应液 I、实验反应液 II 和 RT-PCR 引物溶液，所述实验反应液 I 包括热启动酶、Alpha RTase、RNase 抑制剂和 10×Solution I 缓冲液，所述实验反应液 II 包括热启动酶缓冲液、dNTP、Tween-20 和 PF68。

在本发明一较佳实施方案中，所述核酸检测系统还包括阳性模板标准品和/或阴性模板标准品。

所述阳性模板标准品包括人工合成病毒 RNA 和内参 RNA。

所述内参 RNA 为 GAPDH、 β -actin 或 18sRNA。

在本发明一实施方案中，每 100 μ L 所述实验反应液 I 包括：

7.5 μ L 的 HotStart HiTaq、4 μ L 的 Alpha RTase、5 μ L 的 RNase 抑制剂和 50 μ L 的 10×Solution I 缓冲液；

每 150 μ L 所述实验反应液 II 包括：

100 μ L 的 5×HotStart HiTaq 缓冲液、4 μ L 25 mM 的 dNTP、2.5 μ L 的 10% (v/v) Tween-20 和 5 μ L 的 10%(w/v)PF68，余量为水；

每 100 μ L 所述阳性模板标准品包括：1 μ L 10 ng/ μ L 的人工合成病毒 RNA 或 10 μ L 10 ng/ μ L 的内参 RNA，余量为水；每 100 μ L 所述阴性模板标准品包括：10 μ L 10 ng/ μ L 的内参 RNA，余量为水；

每 225 μ L 所述 RT-PCR 引物溶液包括：

0.5 μ L 100 μ M 的内参 RNA 上游引物、0.5 μ L 100 μ M 的内参 RNA 下游引物、1.75 μ L 100 μ M 的待测核酸样品的 RNA 上游引物和 1.75 μ L 100 μ M 的待测核酸样品的 RNA 下游引物，余量为水；

例如，所述 RT-PCR 的反应条件为：10 μ L 反应体系包括 2 μ L 实验反应液 I 和 3 μ L 实验反应液 II、1 μ L 待测核酸样品、2.25 μ L RT-PCR 引物及 1.75 μ L 水。

所述 RT-PCR 的反应程序为 50°C 10 分钟；例如 RT-PCR 后的 PCR 的反应程序为第一阶段 95°C 5 分钟，第二阶段 94°C 10 秒，57°C 20 秒，共 30-40 个循环例如 38 个循环，第三阶段 68°C 2 分钟。

所述核酸检测系统还包括核酸提取模块，所述待测样品通过核酸提取模块提取由待

测样品获得。

所述核酸提取模块包括磁珠控制区与核酸提取体系。

所述磁珠控制区包括容纳样品的样本孔，以及连接所述样本孔和磁场区域的电极。所述样本在所述磁珠控制区内通过核酸提取体系进行磁珠提取。

所述磁珠提取可为本领域常规操作，通常包括抓取和释放磁珠、清洗磁珠、以及从磁珠上洗脱核酸的完整流程。

在本发明一较佳实施方案中，所述核酸提取体系包括：核酸提取裂解液、核酸提取结合液、核酸提取洗涤液 1、核酸提取洗涤液 2 和核酸提取洗脱液；

每 1 mL 所述核酸提取裂解液包括：

0.02 mL 1 M, pH 为 7.5 的 Tris-HCl、0.02 mL 0.5 M, pH 为 8.0 的 EDTA、30% (w/v) 的盐酸胍、0.02 mL 的 10% (w/v) Triton X-100 和 0.01 mL 的 10% (w/v) 的 Tween-20, 余量为无核酸酶水；

每 1 mL 所述核酸提取结合液包括：

0.4 mL 的 50% (w/v) PEG6000、0.5 mL 5 M 的 NaCl、0.027 mL 的 10% (w/v) Tween-20、0.002 mL 0.5 M 的柠檬酸水溶液和 0.07 mL 10×稀释后的 VDO 磁珠，余量为无核酸酶水；

每 5 mL 所述核酸提取洗涤液 1 包括：

0.1 mL 1 M, pH 为 7.5 的 Tris-HCl、0.5 mL 5 M 的 NaCl、0.05 mL 的 10% (w/v) Tween-20 和 1.5 mL 的 50% (w/v) PEG6000，余量为水；

每 5 mL 所述核酸提取洗涤液 2 包括：

0.1 mL 1 M, pH 为 7.5 的 Tris-HCl、0.15 mL 5 M 的 NaCl、0.05 mL 的 10% (w/v) Tween-20 和 2 mL 的 50% (w/v) PEG6000，余量为水；

每 5 mL 所述核酸提取洗脱液包括：

0.05 mL 1 M, pH 为 7.5 的 Tris-HCl 和 0.05 mL 的 10% (w/v) Tween-20，余量为水；

在本发明一更佳实施方案中，所述磁珠控制区位于电浸润芯片模块上，所述核酸提取体系储存于所述试剂储存区；在所述磁珠控制区提取待测样品中的核酸，获得待测核酸样品。

所述待测样品为血液样本或者体液样本例如唾液样本。

所述待测样品中包含病毒，所述病毒为 dsDNA 病毒、ssDNA 病毒、dsRNA 病毒、ssRNA 病毒、DNA 反转录病毒或 RNA 反转录病毒；较佳地为 dsRNA 病毒或 ssRNA 病毒，例如 COVID-19 病毒。

本发明的第二方面提供一种非诊断目的的检测核酸的方法，其使用如第一方面所述的核酸检测系统，并包括以下步骤：

(1) 控制与分析模块通过驱动系统驱动 CRISPR 反应模块和待测核酸样品进入所述电浸润芯片模块，并分别形成液滴；例如，所述 CRISPR 反应模块中的 CRISPR 反应液、蛋白反应液和 gRNA 反应液分别形成液滴；

(2) 混合所述 CRISPR 反应模块形成的液滴和所述待测核酸样品形成的液滴，在生化反应区中发生反应后产生荧光信号；

(3) 所述荧光信号在荧光拍照区通过所述信号捕获模块捕获收集后输入控制与分析模块进行分析；当所述荧光信号的强度超过阴性对照则判断存在目标核酸。

所述阴性对照可为本领域常规，例如内参基因。

在本发明一较佳实施方案中，所述(1)前还包括(02)：通过所述核酸扩增反应模块在所述生化反应区中对待测核酸样品进行扩增；由此(1)对扩增后的待测核酸样品形成液滴；

在本发明一更佳实施方案中，所述(02)前还包括(01)：通过所述核酸提取反应在所述磁珠控制区中对待测样品进行核酸提取；

例如，所述(02)中，在所述待测核酸样品的同一液滴内加入核酸扩增反应模块进行核酸扩增。

所述(1)的 CRISPR 反应模块中，先由 gRNA 反应液的液滴与 CRISPR 反应液的液滴混合，再与蛋白反应液的液滴混合。

在所述磁珠控制区中进行核酸提取，驱动系统驱动待测核酸样品及各模块进入所述生化反应区、形成液滴与液滴混合；其中，在所述生化反应区中进行核酸扩增的步骤均通过计算机、平板或数控设备控制。

所述检测核酸的方法可以是非诊断目的的，即可以应用于实验室科学研究或环境样本中的核酸检测，例如：

1. 预防医学研究和公共卫生政策的制定

本领域技术人员知晓，现代医学分为两部分：预防医学和临床医学。本发明“非诊断目的的检测方法”，在预防医学中可以对环境中采集的样本（包括人体分泌物）进行检测，对环境是否被污染进行判断，从而决策是否对环境进行封锁、暂停营业、消杀等处置方式，并决策是否对这一地区、城市甚至更高层面升级传染病防控措施。从公共卫生角度出发对传染病进行预防，避免该环境残留的病毒成为传染源。

2. 科学研究领域

(1) 基础医学和生态学

本领域技术人员可以例如对水样进行检测，以判断病毒的传播时间和广泛度。再例如，巴西在 2019 年采集的下水道水样中检测出新冠病毒，早于世界第一例确诊病例的报道，可为病毒的溯源和传播时间提供更多的参考依据。又例如，美国加州在对死者进行尸检显示，其新冠病毒检测呈阳性，比美国报道的首例新冠肺炎死亡病例早三周。

(2) 病毒学方面产品的研发

本领域技术人员知晓，当多种病毒在同一宿主体内同时感染，可能产生病毒突变，包括病毒自身核酸的重组，或来自不同病毒的核酸的重组。若出现病毒的突变，尤其当其发生在秋冬流感季，则情况更为严重。利用本发明的抗新冠病毒的抗体进行检测，可用于病毒学的研究，检测是否产生了病毒核酸的整合，可从预防医学的角度对病毒是否产生整合进行监测和及时预警。

本发明的第三方面提供一种计算机可读介质，所述计算机可读存储介质存储有计算机程序，其中，所述计算机程序被处理器执行时实现如第一方面所述核酸检测系统的功能或本发明的第二方面所述的非诊断目的的检测核酸的方法。

本发明的第四方面提供一种电子设备，其包括存储器和处理器；所述存储器包括存储在其中的可在处理器上运行的计算机程序；其中，所述处理器执行所述计算机程序时实现如本发明的第二方面所述的非诊断目的的检测核酸的方法的步骤。

本发明的积极有益效果：

(1) 通过双重靶向区域筛选(针对病原核酸序列的扩增引物和 CRISPRgRNA 设计)降低假阳性率，通过设计针对病毒基因组的多个扩增片段以及多个 CRISPR 探针片段，在不增加时间成本和人力成本的条件下更有效果地减少假阴性率，避免当样品核酸浓度过低无法进行有效全长反转录获得实时荧光定量 PCR 目标序列，或者出现目标序列变异无法反转录出单个 cDNA 产物而导致实时荧光定量 PCR 产生假阴性的情况；

(2) 将扩增过程和信号放大过程分离，使用 PCR 分别对目标片段进行扩增和快速的 Cas 效应蛋白的序列识别和反式单链 DNA 的切割达到特异的信号放大作用，相比传统的 qPCR 方法可提高检测的灵敏度；

(3) 本发明使用的微流控系统能够快速产生多个微反应液滴，在高效快速进行检测的同时更大地提高了病原检测通量，能同时检测 DNA 或 RNA 为主体的多个病原，且微流控的全封闭环境大大降低了环境和样品之间的污染率。

附图说明

- 图 1 为本发明核酸检测方法示意图。
- 图 2 为实施例内参基因引物位点示意图。
- 图 3 为实施例 1 新冠病毒引物位点示意图。
- 图 4 为实施例 1 的 PCR 扩增结果示意图。
- 图 5 为实施例 1 的 gRNA-GAPDH 对 GAPDH 引物扩增的 PCR 产物切割活性示意图。
- 图 6 为实施例 1 的 gRNA-GAPDH 对 ORF1ab 引物扩增的 PCR 产物切割活性示意图。
- 图 7 为实施例 1 的 gRNA-ORF1ab 对 ORF1ab 引物扩增的 PCR 产物切割活性示意图。
- 图 8 为实施例 1 的 gRNA-ORF1ab 对 GAPDH 引物扩增的 PCR 产物切割活性示意图。
- 图 9 为实施例 1 阴性对照 gRNA 对 GAPDH/ORF1ab 引物扩增的 PCR 产物切割活性示意图。
- 图 10 为实施例 1 阳性模板标准品切割活性示意图。
- 图 11 为实施例 1 阴性模板标准品切割活性示意图。
- 图 12 为实施例 1 超纯水切割活性示意图。
- 图 13 为不同 gRNA 及组合的检测结果显示图。
- 图 14 为实施例 1 与商业试剂盒检测结果示意图。
- 图 15 为本发明芯片微结构示意图。
- 图 16 为实施例 1 芯片验证结果示意图。
- 图 17 为标准品检测效果示意图。
- 图 18 为实施例 2 的电子设备结构示意图。

具体实施方式

使用的试剂和材料见下表：

	厂家	货号
VDO 磁珠	苏州为度生物技术有限公司	MS01H
Carrier RNA	杭州新景生物试剂开发有限公司	4003130
RT-PCR 试剂盒	深圳华大智造生物科技股份有限公司	1000023286
CRISPR 试剂盒	上海吐露港生物科技有限公司	32108-01
qPCR 仪	赛默飞世尔科技	Stepone Plus

实施例的检测原理如图 1 所示。

实施例 1

第一部分 试管实验调试

第一节 获取样本

1. 获取带有保存液的咽拭子。

按照咽拭子采集标准方法进行采样。具体步骤如下：

1.1 核对信息，将身份条形码黏贴于拭子采集管管壁上。

1.2 执行手卫生，检查戴手套，准备压舌板和咽拭子。

1.3 深吸气，（摘口罩）张嘴屏气，压舌板轻压舌面暴露咽部。

1.4 在咽后壁和扁桃体轻轻刮取样本。

1.5 嘱咐患者屏气戴上口罩后，再进行正常呼吸。

1.6 将咽拭子放入有保存液的采集管中，扭断拭子，盖上管盖。

1.7 将带有咽拭子头的采集管放置在 56°C 中灭活 30 分钟，至此获得符合下游提取要求的病毒保存液样本。

所述保存液为 VTM (Viral Transport Medium) 保存液，包括：Hank's 平衡盐溶液 (pH 为 7.2~7.4)、1000 IU/mL 青霉素、1000 IU/mL 链霉素、0.5% (w/v) 牛血清白蛋白、0.016% (w/v) 苯酚红和 50% (v/v) 甘油。

所述保存液还可为磷酸盐缓冲液，包括：137 mM 氯化钠、2.7 mM 氯化钾、10 mM 磷酸二氢钠、2 mM 磷酸二氢钾，pH 为 7.4。

2. 获取不带有保存液的干咽拭子

按照修改后的咽拭子采集方法进行采样。具体步骤如下：

2.1 核对信息，将身份条形码黏贴于拭子采集管管壁上。

2.2 执行手卫生，检查戴手套，准备压舌板和咽拭子。

2.3 深吸气，（摘口罩）张嘴屏气，压舌板轻压舌面暴露咽部。

2.4 在咽后壁和扁桃体轻轻刮取样本。

2.5 嘱咐患者屏气戴上口罩后，再进行正常呼吸。

2.6 将咽拭子放入空的采集管中，扭断拭子，盖上管盖。

2.7 将带有咽拭子头的收集管放置在 56°C 中灭活 30 分钟，至此获得符合下游提取要求的干咽拭子。

3. 以人源 RNA 与人工合成的病毒 RNA 的混合物为实验阳性标准品，以人源 RNA 为实验阴性标准品，步骤如下：

3.1 人工合成病毒 RNA

3.1.1 将需要检测的病毒序列（GenomeNet 登录号 NC_045512.2 区域 13321-15459）送至外包核酸合成服务商（北京六合华大基因科技有限公司）进行合成。

3.1.2 将合成的质粒和 pET28a 表达载体分别进行双酶切后纯化，获得目的片段和线性化带有粘性末端的表达载体。

3.1.3 将目的片段连接至表达载体上。

3.1.4 使用 T7 RiboMAX™快速大量 RNA 制备系统（Promega，货号 P1320）进行体外转录。

3.1.5 将转录后得到的 RNA 进行琼脂糖凝胶电泳检测，并使用 Qubit RNA HS assay kit（赛默飞世尔科技，Q32855）进行定量。

3.1.6 将定量和质控完成后的 RNA 保存至-80℃冰箱，至此完成病毒 RNA 样本制备。

3.2 人源 RNA 为 Universal Human Reference RNA（UHRR），采购自德国 Agilent 公司。

第二节 引物设计

1. 人源 RNA 内参引物设计：

选取 UHRR，即通用人源参考 RNA 标准品（Universal Human Reference RNA, Agilent Co. Ltd.），作为体外测试的阴性对照标准品。基于人类基因表达的丰度，分别选取 GAPDH 基因、 β -actin 基因和 18S 基因所表达的 RNA 作为实验内参。

GAPDH（或 G3PDH），即甘油醛-3-磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase），广泛分布于各种组织中的细胞。 β -actin 负责表达细胞中一种重要的骨架蛋白，在人体细胞中有较高的表达丰度。18S RNA 为人核糖体 RNA 的重要组成成分，在人体细胞的总 RNA 中含量最高。选取这些内参基因的主要目的是为了检测本实验方案的可靠性，避免因实验操作导致的假阳性出现。

通过使用 Prime Primer v5.0 软件计算与优化，针对三种基因分别设计了不同的引物位点，如图 2 所示。经测试，图中的位点均可作为内参基因应用到实施例 1 中，且内参引物设计的位点包括但不限于上图中展示的这些位点。本实施例以 GAPDH 中的一对引物为例展开实验。

引物序列信息如下：

GAPDH-F: TTCATTGACCTCAACTACATGGTTTAC （SEQ ID NO: 1）

GAPDH-R: GATTTTGGAGGGATCTCGCTCCTG （SEQ ID NO: 2）

2. 病毒 RNA 检测引物位点设计：

新型冠状病毒，即 COVID-19 或 2019-nCoV，为单链 RNA 冠状病毒，基于已经发表的基因序列（GenBank: MN908947.3）设计了多组针对新冠病毒不同基因的检测位点，其引物设计如图 3 所示。

经测试，这些位点均可作为检测基因应用到实施例 1 中，且检测基因的引物设计的位点包括但不限于上图中展示的这些位点。

本实施例以 ORF1ab 上的一对引物位点为例展开实验。

引物序列信息如下：

ORF1ab-F: CCCTGTGGGTTTTACACTTAA (SEQ ID NO: 3)

ORF1ab-R: ACGATTGTGCATCAGCTGA (SEQ ID NO: 4)

3. Guide RNA 序列设计：

Guide RNA (gRNA)，即向导 RNA，是实现 CRISPR 荧光检测的重要组成部分之一。gRNA 通过与 DNA 目标片段序列的互补配对，激活 Cas 蛋白活性并实现下游的荧光检测。gRNA 的序列特异性决定了其检测结果的特异性。容易得知，gRNA 的序列应当与所要检测的扩增产物的序列互补配对。如图 2 所示，针对人源内参，基于图 2 中位点，分别设计了其对应 gRNA 序列。针对已发表的病毒序列，基于图 3 中位点，分别设计了其对应 gRNA 序列。

经测试，这 gRNA 均可作为检测靶点应用到实施例 1 中，且检测靶点的 gRNA 设计的位点包括但不限于图中展示的这些位点。基于本实施例 1 中使用的 GAPDH 和 ORF1ab 引物，我们以 gRNA-GAPDH 和 gRNA-ORF1ab 为例展开实验。

gRNA 序列信息如下：

gRNA-GAPDH：

AAUUUCUACUAUUGUAGAUUUGAUGGUACAUGACAAGGUGCG (SEQ ID NO: 5)

gRNA-ORF1ab：

AAUUUCUACUCUUGUAGAUacacuuuuuacacagucuguac (SEQ ID NO: 6)

gRNA E8.1：

AAUUUCUACUCUUGUAGAUuagacggcaggucagguccacca (SEQ ID NO: 7)

gRNA E8.2：

AAUUUCUACUCUUGUAGAUgcagguuuuuuacagcggcaggu (SEQ ID NO: 8)

gRNA 203 (N 基因，靶位点位置 20604)：

AAUUUCUACUCUUGUAGAUuacuaccuaggaacugggccaga (SEQ ID NO: 9)

gRNA 4.2 (S 基因, 靶位点位置 24831):

AAUUUCUACUCUUGUAGAUcucgugaaggugucuuuguuuca (SEQ ID NO: 10)

gRNA 004.1 (ORF1ab 基因, 靶位点位置 978):

AAUUUCUACUCUUGUAGAUagaacguuccguguaccaagcaa (SEQ ID NO: 11)

gRNA 004.2 (ORF1ab 基因, 靶位点位置 1085):

AAUUUCUACUCUUGUAGAUguauuuuccuuuuuuuuccauau (SEQ ID NO: 12)

gRNA 11.1 (ORF1ab 基因, 靶位点位置 2903):

AAUUUCUACUCUUGUAGAUugacagcaucugccacaacaca (SEQ ID NO: 13)

gRNA 11.2 (ORF1ab 基因, 靶位点位置 2915):

AAUUUCUACUCUUGUAGAUcaaccaguaucugaauuacuuac (SEQ ID NO: 14)

第三节 试剂配制准备

1. 提取试剂配制。

按照表 1 配制核酸提取裂解液:

表 1 核酸提取裂解液

组分名称	母液浓度	单位	体积	单位	终浓度	单位
1M Tris-HCl, pH=7.5	1	M	0.02	mL	0.02	M
0.5M EDTA, pH 8.0	0.5	M	0.02	mL	0.01	M
盐酸胍, solid	固体		0.3	g	30%	w/v(%)
Triton X-100	10%	w/v (%)	0.02	mL	0.20%	v/v (%)
Tween 20	10%	w/v (%)	0.01	mL	0.10%	
无核酸酶水	补至 1mL					

按照表 2 配制核酸提取结合液:

表 2 核酸提取结合液 (1 mL)

组分名称	母液浓度	单位	体积	单位	终浓度	单位
PEG6000	50	w/v (%)	0.4	mL	20	w/v(%)
NaCl	5	M	0.5	mL	2.5	M
Tween-20	10	w/v (%)	0.027	mL	0.27	w/v (%)
柠檬酸水溶液	0.5	M	0.002	mL	0.001	M
无核酸酶水	0.001 mL					
10×稀释后的 VDO 磁珠	0.07mL					

按照表 3 配制核酸提取洗涤液 1:

表 3 核酸提取洗涤液 1 (5 mL)

组分名称	母液浓度	单位	体积	单位	终浓度	单位
Tris-HCl pH 7.5	1	M	0.1	mL	20	mM
NaCl	5	M	0.5	mL	500	mM
Tween-20	10	w/v (%)	0.05	mL	0.1	w/v (%)
PEG6000	50	w/v (%)	1.5	mL	15	w/v (%)
H ₂ O	2.85 mL					

按照表 4 配制核酸提取洗涤液 2:

表 4 核酸提取洗涤液 2 (5 mL)

组分名称	母液浓度	单位	体积	单位	终浓度	单位
Tris-HCl pH 7.5	1	M	0.1	mL	20	mM
NaCl	5	M	0.15	mL	150	mM
Tween-20	10	w/v (%)	0.05	mL	0.1	w/v (%)
PEG6000	50	w/v (%)	2	mL	20	w/v (%)
H ₂ O	2.7 mL					

按照表 5 配制核酸提取洗脱液:

表 5 核酸提取洗脱液 (5 mL)

组分名称	母液浓度	单位	体积	单位	终浓度	单位
Tris-HCl pH 7.5	1	M	0.05	mL	10	mM
Tween-20	10	w/v (%)	0.05	mL	0.1	w/v (%)
H ₂ O	4.9 mL					

2. RT-PCR 试剂配制。

按照表 6 进行实验反应液 I 的配制:

表 6 实验反应液 I

RT-PCR 反应试剂 I		供应商	货号
HotStart HiTaq (μL)	7.5	Fapon	MD026
Alpha RTase (μL)	4	MGI	01E022MS
RNase 抑制剂 (μL)	5	MGI	01E019MM
10×Solution I 缓冲液 (μL)	50	Fapon	MD027P
超纯水 (μL)	33.5	Invitrogen	10977-015

总体积 (μL)	100		
----------	-----	--	--

按照表 7 进行实验反应液 II 的配制:

表 7 实验反应液 II

RT-PCR 反应试剂 II		供应商	货号
5×HS HiTaq 缓冲液 (μL)	100	Fapon	MD027P
dNTPs (25 mM) (μL)	4	Thermo	R0182
10% Tween20 (μL)	5.0	Sigma-Aldrich	01E019MM
10% PF68 (μL)	5	BBI	MD027P
超纯水 (μL)	36.0	Invitrogen	10977-015
总体积 (μL)	150		

按照表 8 和表 9 进行 RT-PCR 阳性和阴性模板标准品的配制:

表 8 RT-PCR 阳性模板标准品

RT-PCR 阳性模板标准品		供应商	货号
UHRR (10 ng/μL) (μL)	10	Agilent	740000
自行合成的病毒 RNA (10 ng/μL) (μL)	1		
超纯水 (μL)	89	Invitrogen	10977-015
总体积 (μL)	100		

表 9 RT-PCR 阴性模板标准品

RT-PCR 阴性模板标准品	
UHRR (10 ng/μL) (μL)	10
超纯水 (μL)	90
总体积 (μL)	100

按照表 10 进行 RT-PCR 引物溶液的配制:

表 10 RT-PCR 引物溶液

RT-PCR 引物溶液	
GAPDH-F 100 μM (μL)	0.5
GAPDH-R 100 μM (μL)	0.5
ORF1ab-F 100 μM (μL)	1.75
ORF1ab-R 100 μM (μL)	1.75
超纯水 (μL)	220.5
总体积 (μL)	225

3. CRISPR 试剂配制。

按照表 11-14 进行 CRISPR 试剂配制：

表 11 5×CRISPR 反应液（1 mL）

试剂组分	用量/ μL	供应商
Fam-TTATT-Q reporter, 100 μM	250.00	北京六合 NEB
10×NEB buffer 3.1	200.00	
10% (w/v) Tween-20	10.00	
Nuclease Free Water	540.00	

本领域技术人员皆知，此处配制的 5×CRISPR 反应液可依配方调整为 2×或 10×等任意倍数浓度的 CRISPR 反应液，并根据需要在使用的时候按比例稀释。

表 12 CRISPR 蛋白贮存液（0.1 mL）

试剂组分	用量/ μL
Cas12a 蛋白 (CRP), 10 μM	10.00
40,000 unit/mL RNase 抑制剂	26.70
10×NEB buffer 3.1	10.00
Glycerol, 60% (v/v)	52.30
10% (w/v) Tween-20	1.00

表 13 CRISPR 蛋白稀释液（0.5 mL）

试剂组分	用量/ μL
10×NEB buffer 3.1	50.00
10% (w/v) Tween-20	5.00
无核酸酶水	445.00

表 14 gRNA 反应液（0.5 mL）

试剂组分	用量/ μL
gRNA, 2 μM	75.00
40,000 unit/mL RNase 抑制剂	50.00
10× NEB buffer 3.1	50.00
10% (w/v) Tween-20	5.00
无核酸酶水	320.00

第四节 提取实验操作步骤

1、咽拭子保存液提取流程：

1.1 将 Carrier RNA 从冷冻包装盒中取出，解冻后置于冰上。

1.2 向含有 100 μ L 核酸提取裂解液（含 30 mg 盐酸胍）的离心管中加入灭活后的 100 μ L 病毒保存液，得到病毒液，颠倒混匀后室温孵育 30 分钟。

1.3 孵育完成后，从上一步离心管中取 121 μ L 裂解后的病毒液，加入新的离心管中，再向新的离心管中加入 77 μ L 核酸提取结合液，以及 2 μ L Carrier RNA。颠倒混匀，室温静置孵育 10 分钟。

1.4 室温孵育结束后，将样品管置于磁力架上至澄清，弃掉上清。

1.5 加入 10 μ L 的核酸提取洗涤液 1，振荡混匀离心，置于磁力架至澄清，弃掉上清。

1.6 加入 10 μ L 的核酸提取洗涤液 2，振荡混匀离心，置于磁力架至澄清，弃掉上清。

1.7 加入 5 μ L 核酸提取洗脱液（Nucleic Acid Extractor Eluent, NEE），振荡混匀后，置于冰上备用。

2、干拭子提取流程：

2.1 将 Carrier RNA 从冷冻保藏的试剂盒中取出，解冻后置于冰上。

2.2 向含有咽拭子头的管中加入 1 mL 核酸提取裂解液，颠倒混匀后室温孵育 30 分钟。

2.3 孵育完成后，从上一步保存管中取 120 μ L 核酸提取裂解液，加入新的离心管中，再向新的离心管中加入 77 μ L 核酸提取结合液，以及 1 μ L Carry RNA。颠倒混匀，室温静置孵育 10 分钟。

2.4 室温孵育结束后，将样品管置于磁力架上至澄清，弃掉上清。

2.5 加入 10 μ L 的核酸提取洗涤液 1，振荡混匀离心，置于磁力架至澄清，弃掉上清。

2.6 加入 10 μ L 的核酸提取洗涤液 2，振荡混匀离心，置于磁力架至澄清，弃掉上清。

2.7 加入 5 μ L 核酸提取洗脱液（NEE），振荡混匀后，置于冰上备用。

3、实验阳性/阴性标准品提取流程：

3.1 将 Carrier RNA 从冷冻保藏的试剂盒中取出，解冻后置于冰上。

3.2 将阳性标准品/阴性标准品从-80℃冰箱中取出，置于冰上解冻。解冻后梯度稀释至需要的浓度，例如从 10^{10} copies/mL 稀释至 10 copies/mL。

3.3 取一个新的离心管，加入上一步稀释好的标准品后，补核酸提取裂解液至 120 μ L，再向其中加入 77 μ L 核酸提取结合液，以及 1 μ L Carry RNA。颠倒混匀，室温静置孵育 10

分钟。

3.4 室温孵育结束后，将样品管置于磁力架上至澄清，弃掉上清。

3.5 加入 10 μ L 的核酸提取洗涤液 1，振荡混匀离心，置于磁力架至澄清，弃掉上清。

3.6 加入 10 μ L 的核酸提取洗涤液 2，振荡混匀离心，置于磁力架至澄清，弃掉上清。

3.7 加入 5 μ L 核酸提取洗脱液 (NEE)，振荡混匀后，置于冰上备用。

第五节 RT-PCR 实验步骤

1、取 3 个 250 μ l 的 PCR 反应管，分别标记①、②和③。

2、分别准确吸取 2 μ l 实验反应液 I 和 3 μ l 实验反应液 II，置于①、②和③PCR 管中充分混匀。

3、准确吸取 1 μ l RT-PCR 阳性模板标准品，加入①管的反应混合液中；准确吸取 1 μ l RT-PCR 阴性模板标准品，加入②管的反应混合液中；准确吸取 1 μ l 超纯水，加入③管的反应混合液中。

4、向上述三种混合液中分别加入 2.25 μ l RT-PCR 引物及 1.75 μ l 超纯水，充分震荡混匀。

5、小心加入 30 μ l 硅油进行液封。

将 PCR 管置于 PCR 扩增仪上，设定如下反应程序

50°C	10 分钟	
95°C	5 分钟	
94°C	10 秒	38 个循环
57°C	20 秒	
68°C	2 分钟	
16°C	保存	

6、反应结束后，小心弃去上层硅油，吸取 5 μ l 反应液进行琼脂糖电泳检测。

7、配置 4%琼脂糖凝胶，加入步骤 6 中的反应产物及 DNA 染料，在 160 伏特电压下运行 45 分钟。拍照分析实验结果。

第六节 CRISPR 实验步骤

1、Off Chip 荧光检测

1.1 取 1 μ L 如表 12 所示的 CRISPR 蛋白贮存液和 1 μ L 如表 13 所示 CRISPR 蛋白稀释液混合，配制蛋白反应液，冰上放置。

1.2 取 1 μL 所述蛋白反应液和如表 14 所示 1 μL gRNA 反应液混匀，在室温下孵育 10 分钟。

1.3 在 1.2 得到的混合溶液中加入 1 μL 如表 11 所示的 5 $\times$ CRISPR 反应液，与 2 μL 阳性对照或阴性对照品的 PCR 产物混匀，在酶标仪或 qPCR 仪上 48 $^{\circ}\text{C}$ 反应 20 min，每分钟采集 FAM 荧光信号值。

2、On Chip 荧光检测

2.1 每组样品使用一张独立包装芯片，加入 3.5 mL 真空包装硅油后推入检测器。

2.2 如图 15 所示，将 3 μL 如第五节所述得到的 RT-PCR 的 DNA 产物和 CRISPR buffer 的混合液加入 DF 仪器 chip 的 S1 孔上，将 2 μL 蛋白反应液和 gRNA 反应液加到 S2 孔上；

2.3 按照设定程序进行样品混合，在生化反应区加热（反应温度 48 $^{\circ}\text{C}$ ，20min）后样品依次移至荧光拍照区，设置相机曝光时间 0.125 秒，在荧光模式下进行拍照，记录结果。

第七节 实验结果

1、RNA 提取

由于咽拭子本身刮取到的细胞和病毒数量较低，提取后无法进行质控，提取产物直接随磁珠进入到下一步多重 PCR 实验中。

2、多重 PCR 扩增

如图 4 所示，琼脂糖凝胶电泳结果显示，在 323 bp 和 119 bp 处有明显扩增，分别与 GAPDH 和 ORF1ab 的 PCR 产物对应。扩增用模板：①超纯水；②阴性对照；③阳性对照。

3、CRISPR 检测

3.1 内参 gRNA-GAPDH

a) 以 GAPDH 引物，对不同浓度 UHRR 进行 RT-PCR，用 gRNA-GAPDH 切割 PCR 产物，证实 gRNA-GAPDH 对 PCR 产物具有切割活性，且信号值随 UHRR 投入量提高而增强，如图 5 所示。

b) gRNA-GAPDH 对用病毒 cDNA 为模板，ORF1ab 引物扩增的 RT-PCR 产物没有切割活性，如图 6 所示。

3.2 病原核酸序列区域目的序列 ORF1ab

a) 以 ORF1ab 引物，对不同浓度病毒 cDNA 进行 RT-PCR，用 gRNA-ORF1ab 切割 PCR 产物，验证该 gRNA 具有切割活性，且切割信号随 cDNA 投入量提高而增强，如图

7 所示。

b) gRNA-ORF1ab 对于以 UHRR 为模板用 GAPDH 引物扩增的 RT-PCR 产物没有切割活性, 如图 8 所示。

3.3 病原核酸序列阴性对照

如图 9 所示, 阴性对照 gRNA-84 对本实施例中其它 PCR primer 的扩增产物 1 ng/ μ L GAPDH 以及 1 ng/ μ L ORF1ab 均未产生切割活性, 可用于定义背景参比荧光值。

所述 gRNA-84 的序列如 SEQ ID NO: 16 所示。

SEQ ID NO: 16:

AAUUUCUACUAUUGUAGAUCUGCACCAAGUGACAUAGUGUAG

3.4 多重 RT-PCR 及 CRISPR 检测

将第七节中所用的阳性模板标准品③进行多重 RT-PCR 扩增, 分别用 gRNA-ORF1ab、gRNA-GAPDH 和 gRNA-84 进行切割。结果如图 10 所示, 其中 gRNA-84 报告为阴性结果, gRNA-GAPDH 和 gRNA-ORF1ab 报告为阳性结果, 信号显著高于 gRNA-84, 和预期一致。

将第七节中所用的 RT-PCR 阴性模板标准品②进行多重 RT-PCR 扩增, 之后分别用 gRNA-ORF1ab、gRNA-GAPDH 和 gRNA-84 进行切割, 结果如图 11 所示。其中 gRNA-84 和 gRNA-ORF1ab 报告为阴性结果, gRNA-GAPDH 报告为阳性结果, 和预期相符。

将第七节中所用的 1 μ L 超纯水①进行多重 RT-PCR 扩增, 之后分别用 gRNA-ORF1ab、gRNA-GAPDH 和 gRNA-84 进行切割, 结果如图 12 所示。gRNA-84、gRNA-ORF1ab 和 gRNA-GAPDH 均报告为阴性结果, 和预期一致。

如图 13 中 a、b 和 c 所示, 将前述其他 gRNA (SEQ ID NO: 7~15) 按照上述方法单独或者组合进行检测, 结果表明序列如 SEQ ID NO: 6、10、11 或 12 所示的 gRNA、序列如 SEQ ID NO: 6、10、14 和 15 所示的 gRNA、以及序列如 SEQ ID NO: 9、10、14 和 15 所示的 gRNA 的多重 PCR 及 gRNA 可用于样本的鉴定, 且具有良好的检测能力。

按照说明书, 使用 CRISPR 试剂盒 (上海吐露港生物科技有限公司, 32108-01) 进行实验, 结果如图 14 所示。表明, 本实施例相比现有试剂盒, 提升了检测能力。

第二部分 芯片实验验证部分

如图 15 所示, 数字微流控芯片下表面由若干控制单元组成, 芯片放入数字微流控机器后, 通过控制芯片上相邻控制单元端的电压, 使之与芯片上表面的接地端的电压相同或形成压差 (俗称“通/断”), 来达到驱动液体变形或者液滴移动的目的。每个控制单元

可以控制 1 微升的液滴，多个控制单元可以控制更大体积的液滴。移动液滴并配合其他元件，例如加热元件、水冷装置和装有步进电机的磁铁，可以保证试剂保存、试剂取液、试剂移动、生化反应和磁珠纯化的顺利进行。

首先将数字微流控芯片用硅油灌满，根据图 15 将本反应所需所有试剂依次加载到试剂储存区 M1-M8 和 L1-L8。取待检测人员的咽拭子样品加入 1 mL 的裂解液中，浸泡至少 5 min。适当混匀含有咽拭子的裂解液并重悬混匀磁珠提取液，取 120 μ L 含有咽拭子的裂解液上清加入灭菌的 1.5 mL 离心管中，依次加入 77 μ L 捕获磁珠提取液，使用 100 μ L 移液枪吹打 10-15 次充分混匀。将混匀后的液体分 4 次加载在数字微流控芯片上的 4 个样品加样孔 S1-S4 中（每次 50 μ L，最后一次全部加入）。

启动数字微流控仪器，待系统自检后，将数字微流控芯片载入数字微流控仪器中并运行。在数字微流控仪器的控制下，将依次进行上述样本提取、RT-PCR 和 CRISPR 反应。

在 CRISPR 切割反应中，使用了三种不同的 gRNA，分别是阴性对照 gRNA-84、GAPDH 内参 gRNA-GAPDH 和 COVID-19 靶标 gRNA-ORF1ab，分别对应不识别任何区域、识别 GAPDH 内参（该内参位于人类基因组上）以及识别新冠病毒的特异序列。一旦 gRNA 找到了能够识别的区域，CRISPR 蛋白便能够激活切割反应液中的荧光探针从而产生荧光。CRISPR 反应 10 min 后，液滴将移动到荧光拍照区进行拍照，根据液滴的荧光强度判断样本是否含有新型冠状病毒核酸。

图 16 为使用模拟阴性样本（仅含有通用人类参照 RNA）以及模拟阳性样本（含有通用人类参照 RNA 和含新冠病毒部分区域序列的 RNA）在芯片上反应后荧光拍照的实验结果。

从结果上可看出，对于模拟阳性样本，含 GAPDH 内参 gRNA-GAPDH 液滴和含 COVID-19 靶标 gRNA-ORF1ab 液滴的荧光强度均大于阴性对照，结果呈报阳性；对于模拟阴性样本，仅含 GAPDH 内参 gRNA 液滴的荧光强度大于阴性对照，而含 COVID-19 靶标 gRNA-ORF1ab 液滴的荧光强度小于阴性对照，结果呈报阴性。如图 17 所示，本实施例的检测灵敏度达到 200 copies/mL，即检测限为 0.2 copies/ μ L，与 qPCR 检测的预期阳性一致率为 91.67%，预期阴性一致率为 100%，证明实验成功。

实施例 2

1. 电子设备

本实施例提供了一种电子设备，电子设备可以通过计算设备的形式表现（例如可以为服务器设备），包括存储器、处理器及存储在存储器上并可在处理器上运行的计算机程序，其中处理器执行计算机程序时可以实现本发明实施例 1 中的非诊断目的的检测核酸

的方法。

图 18 示出了本实施例的硬件结构示意图，电子设备 9 具体包括：

至少一个处理器 91、至少一个存储器 92 以及用于连接不同系统组件（包括处理器 91 和存储器 92）的总线 93，其中：

总线 93 包括数据总线、地址总线和控制总线。

存储器 92 包括易失性存储器，例如随机存取存储器（RAM）921 和/或高速缓存存储器 922，还可以进一步包括只读存储器（ROM）923。

存储器 92 还包括具有一组（至少一个）程序模块 924 的程序/实用工具 925，这样的程序模块 924 包括但不限于：操作系统、一个或者多个应用程序、其它程序模块以及程序数据，这些示例中的每一个或某种组合中可能包括网络环境的实现。

处理器 91 通过运行存储在存储器 92 中的计算机程序，从而执行各种功能应用以及数据处理，例如本发明实施例 1 中非诊断目的的检测核酸的方法。

电子设备 9 进一步可以与一个或多个外部设备 94（例如键盘、指向设备等）通信。这种通信可以通过输入/输出（I/O）接口 95 进行。并且，电子设备 9 还可以通过网络适配器 96 与一个或者多个网络（例如局域网（LAN），广域网（WAN）和/或公共网络，例如因特网）通信。网络适配器 96 通过总线 93 与电子设备 9 的其它模块通信。应当明白，尽管图中未示出，可以结合电子设备 9 使用其它硬件和/或软件模块，包括但不限于：微代码、设备驱动器、冗余处理器、外部磁盘驱动阵列、RAID（磁盘阵列）系统、磁带驱动器以及数据备份存储系统等。

应当注意，尽管在上文详细描述中提及了电子设备的若干单元/模块或子单元/模块，但是这种划分仅仅是示例性的并非强制性的。实际上，根据本申请的实施方式，上文描述的两个或更多单元/模块的特征和功能可以在一个单元/模块中具体化。反之，上文描述的一个单元/模块的特征和功能可以进一步划分为由多个单元/模块来具体化。

2. 计算机可读存储介质

本发明实施例提供了一种计算机可读存储介质，其上存储有计算机程序，程序被处理器执行时实现本发明实施例 1 中非诊断目的的检测核酸的方法的步骤。

其中，可读存储介质可以采用的更具体可以包括但不限于：便携式盘、硬盘、随机存取存储器、只读存储器、可擦拭可编程只读存储器、光存储器件、磁存储器件或上述的任意合适的组合。

在可能的实施方式中，本发明还可以实现为一种程序产品的形式，其包括程序代码，当所述程序产品在终端设备上运行时，所述程序代码用于使所述终端设备执行实现本发

明实施例 1 中非诊断目的的检测核酸的方法的步骤。

其中，可以以一种或多种程序设计语言的任意组合来编写用于执行本发明的程序代码，所述程序代码可以完全地在用户设备上执行、部分地在用户设备上执行、作为一个独立的软件包执行、部分在用户设备上部分在远程设备上执行或完全在远程设备上执行。虽然以上描述了本发明的具体实施方式，但是本领域的技术人员应当理解，这些仅是举例说明，在不背离本发明的原理和实质的前提下，可以对这些实施方式做出多种变更或修改。因此，本发明的保护范围由所附权利要求书限定。

权利要求

1. 一种基于电浸润的 CRISPR 的核酸检测系统，其特征在于，其包括：电浸润芯片模块、CRISPR 反应模块、信号捕获模块和控制与分析模块；其中：

所述电浸润芯片模块包括：试剂储存区、生化反应区、荧光拍照区和驱动系统，以及各区之间的微通道；

所述 CRISPR 反应模块包括：含有荧光探针的 CRISPR 反应液、含有 Cas12a 的蛋白反应液和含有 gRNA 的 gRNA 反应液；所述蛋白反应液、gRNA 反应液和 CRISPR 反应液均包含表面活性剂和酶缓冲液；

所述控制与分析模块通过驱动系统驱动待测核酸样品与所述 CRISPR 反应模块经过微通道进入所述生化反应区，所述待测核酸样品与 CRISPR 反应模块在所述生化反应区中混合并发生反应后产生荧光信号；所述荧光信号在荧光拍照区通过所述信号捕获模块捕获收集后输入所述控制与分析模块进行分析。

2. 如权利要求1所述的核酸检测系统，其特征在于，所述反应的条件为48℃、20min；

和/或，所述 CRISPR 反应模块和待测核酸样品在反应前贮存于所述试剂储存区，

和/或，所述表面活性剂为 Tween-20，例如终浓度为 0.05~0.1% 的 Tween-20，所述酶缓冲液为 10×NEB buffer 3.1；

和/或，所述 gRNA 的序列包括如 SEQ ID NO: 6、9、10、11 和 12 的一种或多种所示的序列；优选所述 gRNA 的序列还包括如 SEQ ID NO: 13 和 14 所示的序列；例如所述 gRNA 的序列如 SEQ ID NO: 6、10、11 或 12 所示，或者如 SEQ ID NO: 6、10、13 和 14 所示，或者如 SEQ ID NO: 9、10、13 和 14 所示；

和/或，所述待测核酸样品为 DNA 或 RNA；优选所述 DNA 为经过反转录 PCR 得到的 cDNA；

和/或，所述信号捕获模块包括荧光仪、荧光光度计或荧光分光光度计；

和/或，所述控制与分析模块包括计算机、平板或数控设备；

较佳地，所述蛋白反应液还包括 Cas12a 蛋白、RNase 抑制剂、甘油以及无核酸酶水，所述 gRNA 反应液还包括 gRNA、RNase 抑制剂及无核酸酶水，所述 CRISPR 反应液还包括荧光探针；例如：所述荧光探针为 5'端和 3'端分别具有荧光发光基团 FAM 和荧光淬灭基团 BHQ1 的 DNA 探针，例如为 Fam-TTATT-Q；所述蛋白反应液包括 0.25~1μM 优选 0.5μM 的 Cas12a 蛋白、4,000 ~10,000 unit/mL 优选 5,340 unit/mL 的 RNase 抑制剂、10~30%优选 15.69%甘油、0.05~0.5% (w/v) 优选 0.1% (w/v) 的 Tween-20 和 10×NEB buffer 3.1；所述 gRNA 反应液包括：0.1~0.5μM 优选 0.3 μM 的 gRNA、10×NEB buffer 3.1、

2,000~10,000 unit/mL 优选 4,000 unit/mL 的 RNase 抑制剂、0.05~0.5% (w/v) 优选 0.1% (w/v) 的 Tween-20; 所述 CRISPR 反应液包括: 10~100 μ M 优选 25 μ M 的荧光探针;

更佳地, 所述蛋白反应液由 CRISPR 蛋白贮存液和 CRISPR 蛋白稀释液按 1:1 比例配制而成, 其中, 每 0.1 mL 所述 CRISPR 蛋白贮存液包括: 10 μ L 10 μ M 的 Cas12a 蛋白、26.7 μ L 40,000 unit/mL 的 RNase 抑制剂、10 μ L 10 $\times$ NEB buffer 3.1、52.3 μ L 60% (v/v) 的甘油和 1 μ L 10% (w/v) 的 Tween-20; 每 0.5 mL 所述 CRISPR 蛋白稀释液包括: 50 μ L 的 10 $\times$ NEB buffer 3.1、5 μ L 的 10% (w/v) 的 Tween-20 和 445 μ L 的无核酸酶水;

每 0.5 mL 所述 gRNA 反应液包括: 75 μ L 2 μ M 的 gRNA、50 μ L 10 $\times$ NEB buffer 3.1、50 μ L 40,000 unit/mL 的 RNase 抑制剂、5 μ L 10% (w/v) 的 Tween-20 和 320 μ L 的无核酸酶水;

每 1 mL 所述 CRISPR 反应液包括: 250 μ L 100 μ M 的荧光探针、200 μ L 10 $\times$ NEB buffer 3.1 和 10 μ L 10% (w/v) 的 Tween-20。

3. 如权利要求 2 所述的核酸检测系统, 其特征在于, 所述核酸检测系统还包括如 SEQ ID NO: 5 所示的 GAPDH gRNA;

和/或, 所述核酸检测系统还包括核酸扩增反应模块; 所述待测核酸样品在所述核酸扩增反应模块发生扩增反应后, 将单个液滴均匀分散为多个液滴, 例如为 3 个液滴;

更佳地, 所述核酸扩增反应模块通过 RT-PCR、多重 RT-PCR 或 RT-qPCR 进行核酸扩增;

更佳地, 所述核酸扩增反应模块通过 RT-PCR 进行核酸扩增; 所述核酸扩增反应模块包括控温子模块和核酸扩增反应体系, 所述核酸扩增反应体系包括实验反应液 I、实验反应液 II 和 RT-PCR 引物溶液, 所述实验反应液 I 包括热启动酶、Alpha RTase、RNase 抑制剂和 10 $\times$ Solution I 缓冲液, 所述实验反应液 II 包括热启动酶缓冲液、dNTP、Tween-20 和 PF68。

4. 如权利要求 1~3 任一项所述的核酸检测系统, 其特征在于, 所述核酸检测系统还包括阳性模板标准品和/或阴性模板标准品;

更佳地, 所述阳性模板标准品包括人工合成病毒 RNA 和内参 RNA;

所述内参 RNA 为 GAPDH、 β -actin 或 18sRNA;

更佳地, 每 100 μ L 所述实验反应液 I 包括:

7.5 μ L 的 HotStart HiTaq、4 μ L 的 Alpha RTase、5 μ L 的 RNase 抑制剂和 50 μ L 的 10 $\times$ Solution I 缓冲液;

每 150 μ L 所述实验反应液 II 包括:

100 μL 的 5 $\times$ HotStart HiTaq 缓冲液、4 μL 25 mM 的 dNTP、2.5 μL 的 10% (v/v) Tween-20 和 5 μL 的 10%(w/v)PF68, 余量为水;

每 100 μL 所述阳性模板标准品包括: 1 μL 10 ng/ μL 的人工合成病毒 RNA 或 10 μL 10 ng/ μL 的内参 RNA, 余量为水; 每 100 μL 所述阴性模板标准品包括: 10 μL 10 ng/ μL 的内参 RNA, 余量为水;

每 225 μL 所述 RT-PCR 引物溶液包括:

0.5 μL 100 μM 的内参 RNA 上游引物、0.5 μL 100 μM 的内参 RNA 下游引物、1.75 μL 100 μM 的待测核酸样品的 RNA 上游引物和 1.75 μL 100 μM 的待测核酸样品的 RNA 下游引物, 余量为水;

进一步更佳地, 所述 RT-PCR 的反应条件为: 10 μL 反应体系包括 2 μL 实验反应液 I 和 3 μL 实验反应液 II、1 μL 待测核酸样品、2.25 μL RT-PCR 引物及 1.75 μL 水; 例如 RT-PCR 的反应程序为 50 $^{\circ}\text{C}$ 10 分钟; 例如 RT-PCR 后的 PCR 的反应程序为第一阶段 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 分钟, 第二阶段 94 $^{\circ}\text{C}$ 10 秒, 57 $^{\circ}\text{C}$ 20 秒, 共 30-40 个循环例如 38 个循环, 第三阶段 68 $^{\circ}\text{C}$ 2 分钟。

5. 如权利要求 1~4 任一项所述的核酸检测系统, 其特征在于, 所述核酸检测系统还包括核酸提取模块, 所述待测样品通过核酸提取模块提取由待测样品获得;

所述核酸提取模块包括磁珠控制区与核酸提取体系;

更佳地, 所述核酸提取体系包括: 核酸提取裂解液、核酸提取结合液、核酸提取洗涤液 1、核酸提取洗涤液 2 和核酸提取洗脱液;

每 1 mL 所述核酸提取裂解液包括:

0.02 mL 1 M, pH 为 7.5 的 Tris-HCl、0.02 mL 0.5 M, pH 为 8.0 的 EDTA、30% (w/v) 的盐酸胍、0.02 mL 的 10% (w/v) Triton X-100 和 0.01 mL 的 10% (w/v) 的 Tween-20, 余量为无核酸酶水;

每 1 mL 所述核酸提取结合液包括:

0.4 mL 的 50% (w/v) PEG6000、0.5 mL 5 M 的 NaCl、0.027 mL 的 10% (w/v) Tween-20、0.002 mL 0.5 M 的柠檬酸水溶液和 0.07 mL 10 $\times$ 稀释后的 VDO 磁珠, 余量为无核酸酶水;

每 5 mL 所述核酸提取洗涤液 1 包括:

0.1 mL 1 M, pH 为 7.5 的 Tris-HCl、0.5 mL 5 M 的 NaCl、0.05 mL 的 10% (w/v) Tween-20 和 1.5 mL 的 50% (w/v) PEG6000, 余量为水;

每 5 mL 所述核酸提取洗涤液 2 包括:

0.1 mL 1 M, pH 为 7.5 的 Tris-HCl、0.15 mL 5 M 的 NaCl、0.05 mL 的 10% (w/v) Tween-20 和 2 mL 的 50% (w/v) PEG6000, 余量为水;

每 5 mL 所述核酸提取洗脱液包括:

0.05 mL 1 M, pH 为 7.5 的 Tris-HCl 和 0.05 mL 的 10% (w/v) Tween-20, 余量为水;

更佳地, 所述磁珠控制区位于电浸润芯片模块上, 所述核酸提取体系储存于所述试剂储存区; 在所述磁珠控制区提取待测样品中的核酸, 获得待测核酸样品。

6. 如权利要求 1~5 任一项所述的核酸检测系统, 其特征在于, 所述待测样品为血液样本或者体液样本例如唾液样本;

和/或, 所述待测样品中包含病毒, 所述病毒为 dsDNA 病毒、ssDNA 病毒、dsRNA 病毒、ssRNA 病毒、DNA 反转录病毒或 RNA 反转录病毒; 较佳地为 dsRNA 病毒或 ssRNA 病毒, 例如 COVID-19 病毒。

7. 一种非诊断目的的检测核酸的方法, 其特征在于, 其使用如权利要求 1~6 任一项所述的核酸检测系统, 并包括以下步骤:

(1) 控制与分析模块通过驱动系统驱动 CRISPR 反应模块和待测核酸样品进入所述电浸润芯片模块, 并分别形成液滴; 例如, 所述 CRISPR 反应模块中的 CRISPR 反应液、蛋白反应液和 gRNA 反应液分别形成液滴;

(2) 混合所述 CRISPR 反应模块形成的液滴和所述待测核酸样品形成的液滴, 在生化反应区中发生反应后产生荧光信号;

(3) 所述荧光信号在荧光拍照区通过所述信号捕获模块捕获收集后输入控制与分析模块进行分析; 当所述荧光信号的强度超过阴性对照则判断存在目标核酸;

较佳地, 所述 (1) 前还包括 (02): 通过所述核酸扩增反应模块在所述生化反应区中对待测核酸样品进行扩增; 由此 (1) 对扩增后的待测核酸样品形成液滴;

更佳地, 所述 (02) 前还包括 (01): 通过所述核酸提取反应在所述磁珠控制区中对待测样品进行核酸提取;

进一步更佳地, 所述 (02) 中, 在所述待测核酸样品的同一液滴内加入核酸扩增反应模块进行核酸扩增。

8. 如权利要求 7 所述的方法, 其特征在于, 所述 (1) 的 CRISPR 反应模块中, 先由 gRNA 反应液的液滴与 CRISPR 反应液的液滴混合, 再与蛋白反应液的液滴混合; 优选地, 在所述磁珠控制区中进行核酸提取, 驱动系统驱动待测核酸样品及各模块进入所述生化反应区、形成液滴与液滴混合; 其中, 在所述生化反应区中进行核酸扩增的步骤均通过计算机、平板或数控设备控制。

9. 一种电子设备，其包括存储器和处理器；所述存储器包括存储在其中的可在处理器上运行的计算机程序；其特征在于，

所述处理器执行所述计算机程序时实现如权利要求 7 或 8 所述的非诊断目的的检测核酸的方法。

10. 一种计算机可读介质，所述计算机可读存储介质存储有计算机程序，其中，所述计算机程序被处理器执行时实现如权利要求 7 或 8 所述的非诊断目的的检测核酸的方法的步骤。

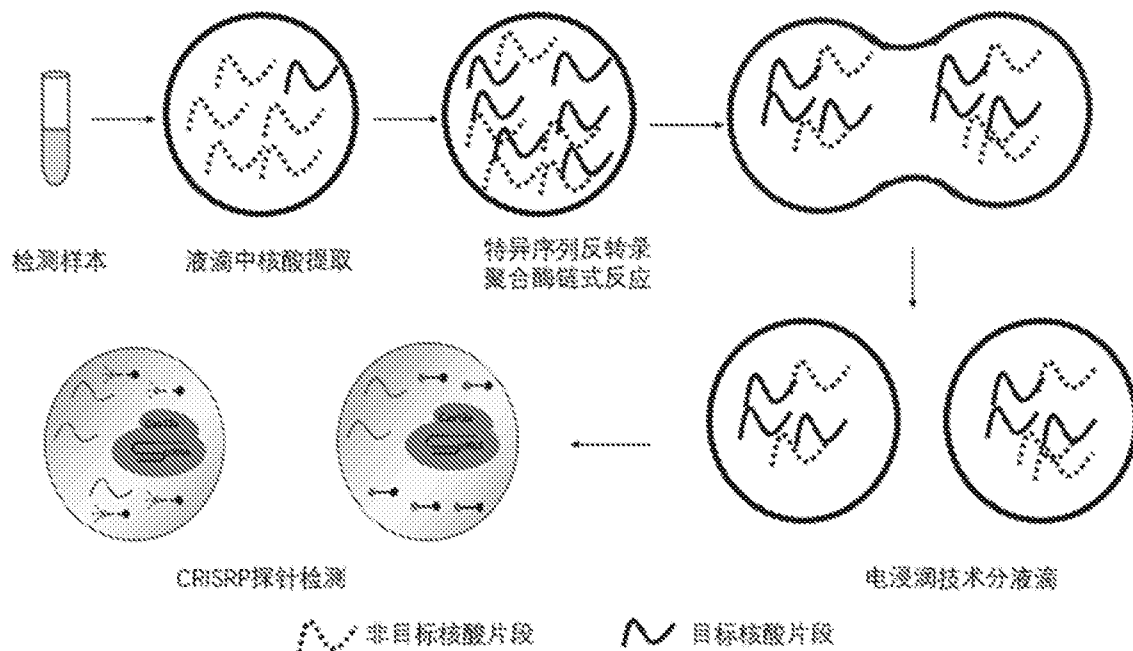
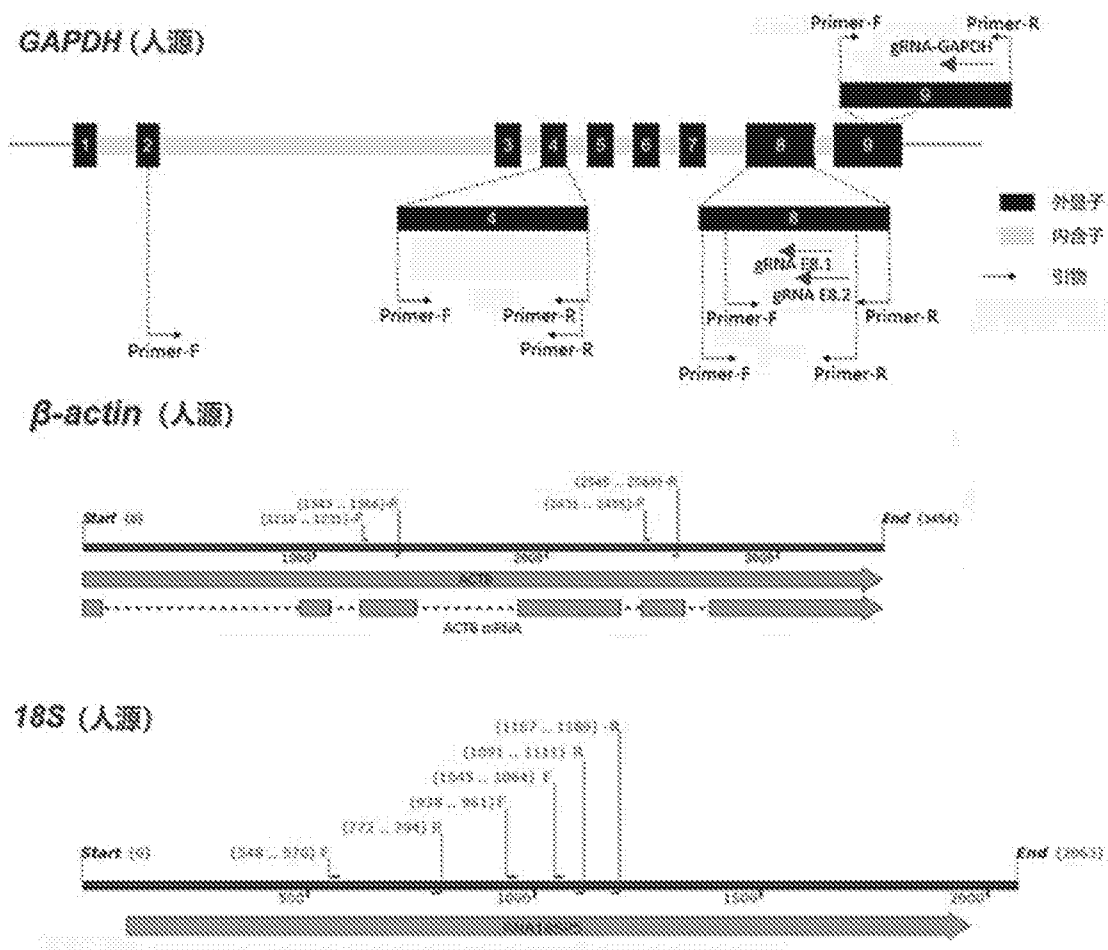


图 1



COVID-19

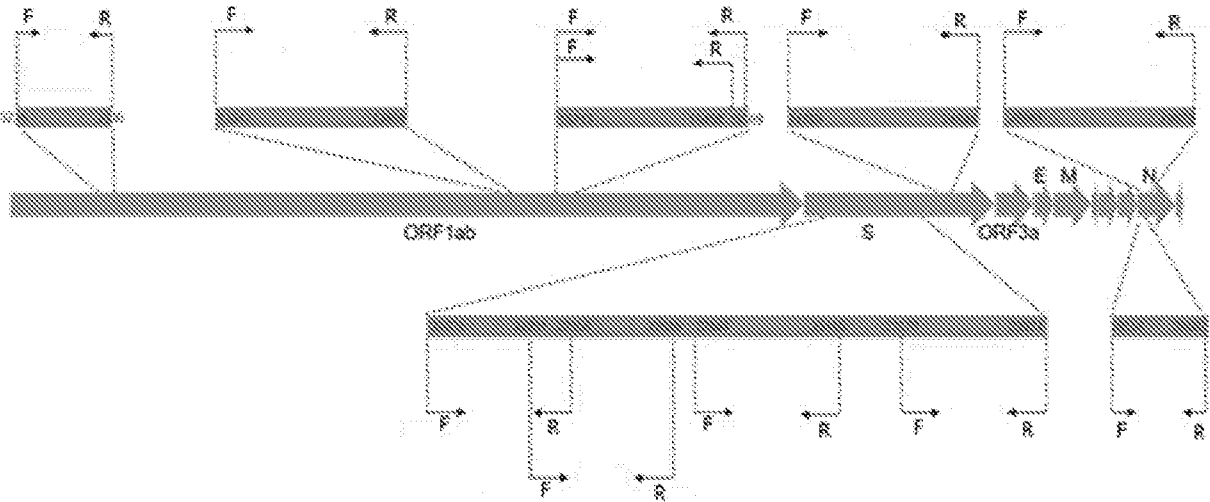


图 3

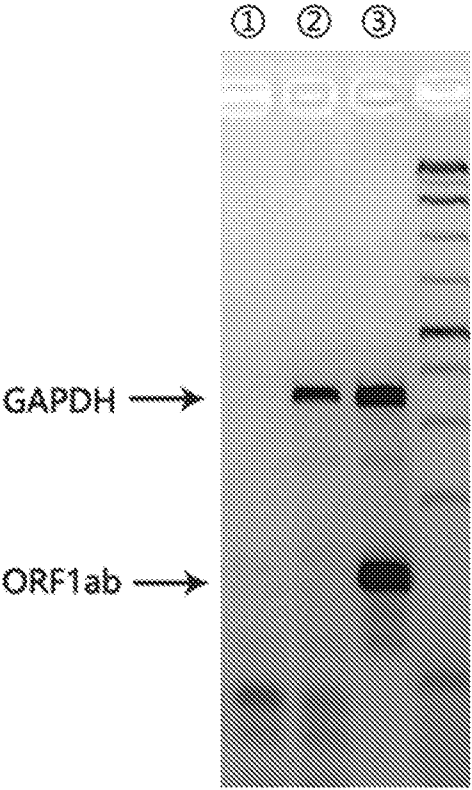


图 4

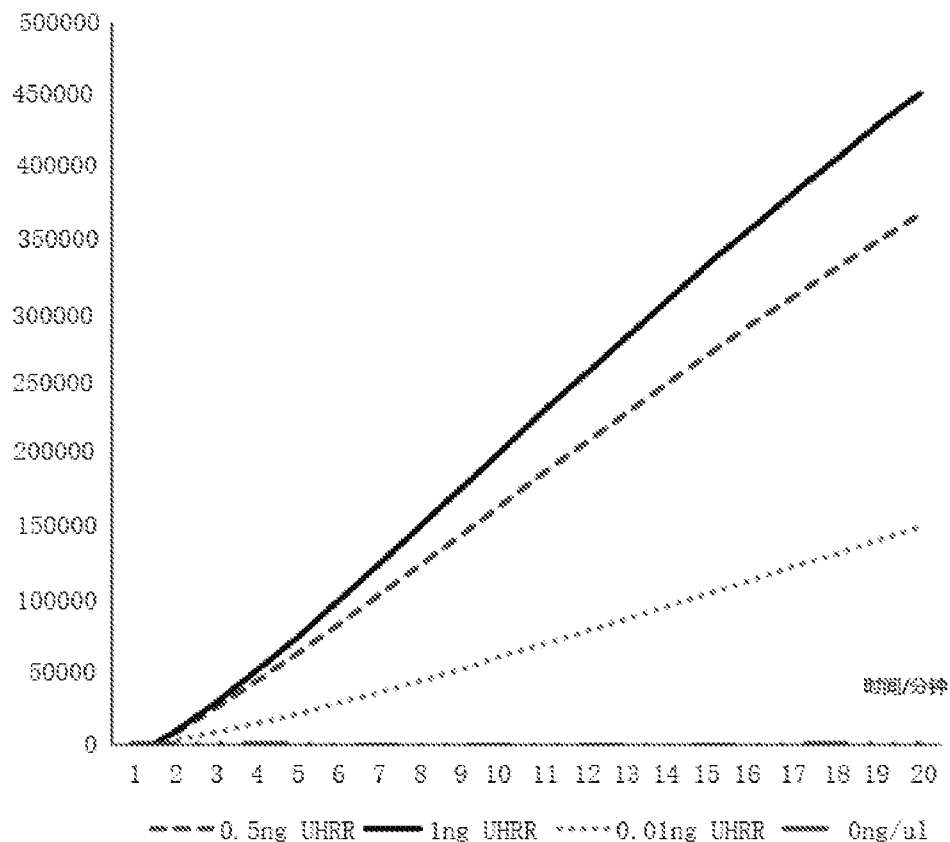


图 5

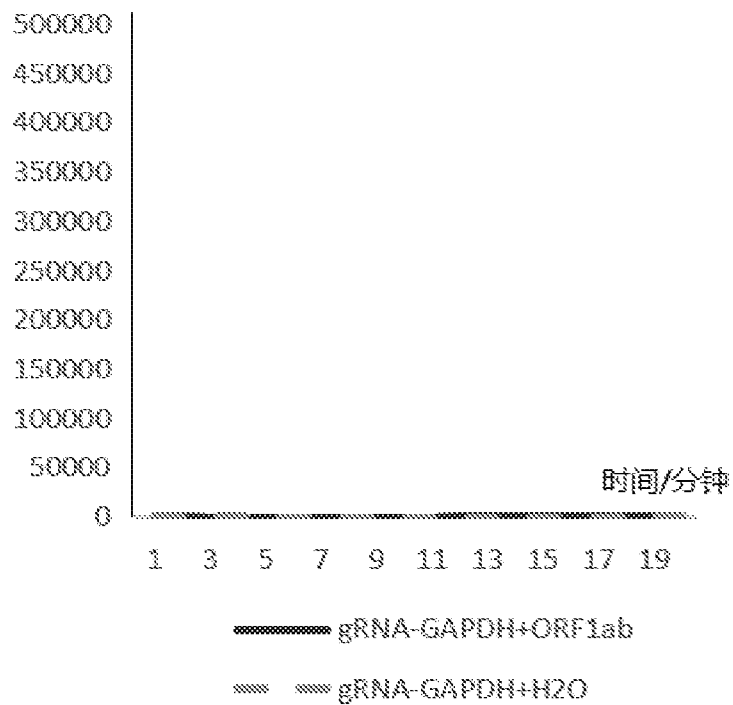


图 6

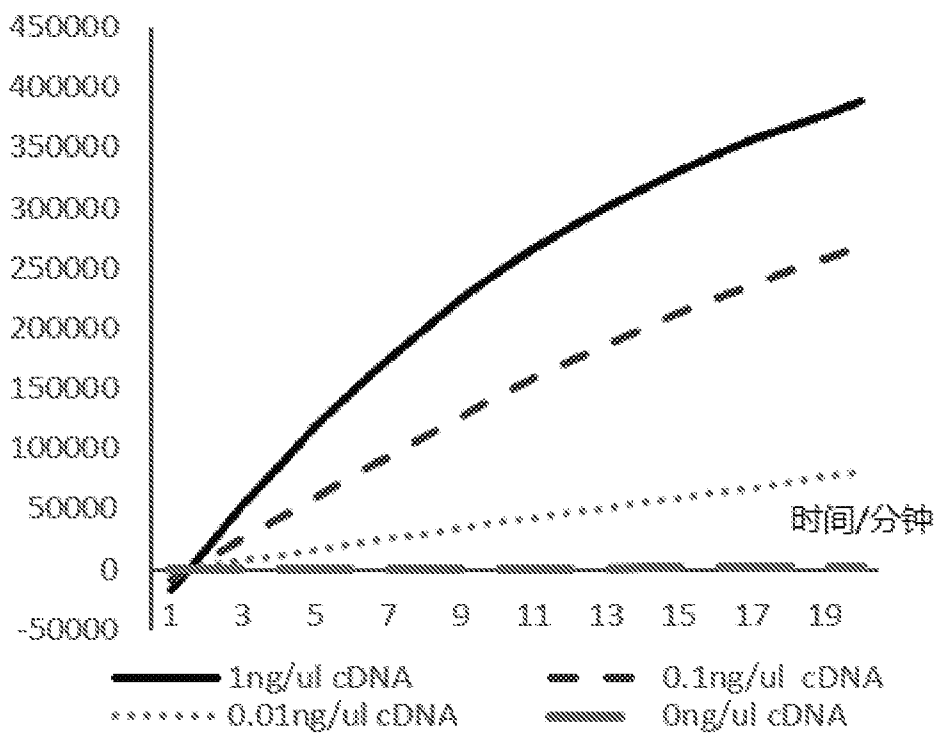


图 7

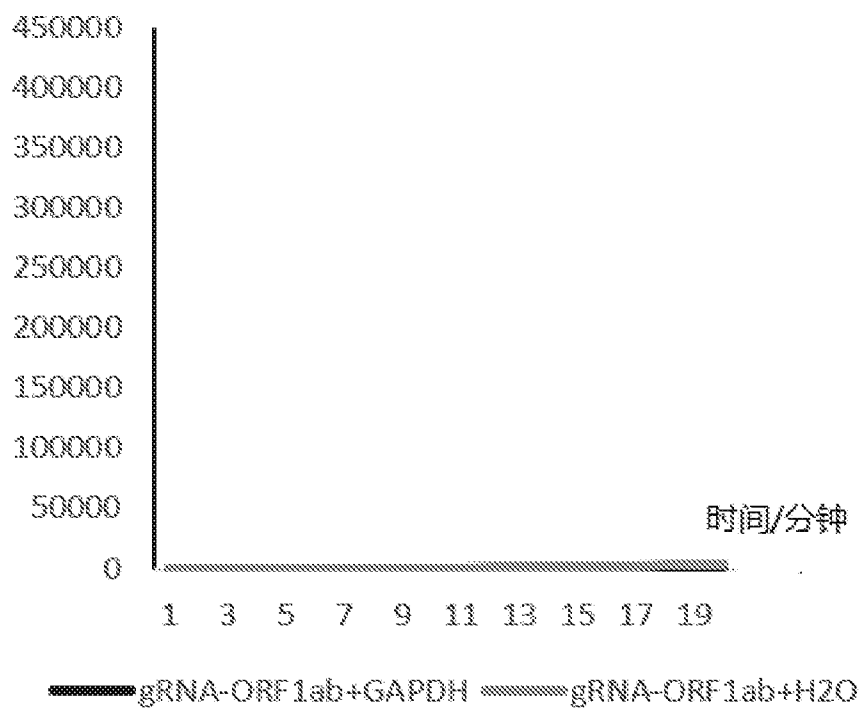


图 8

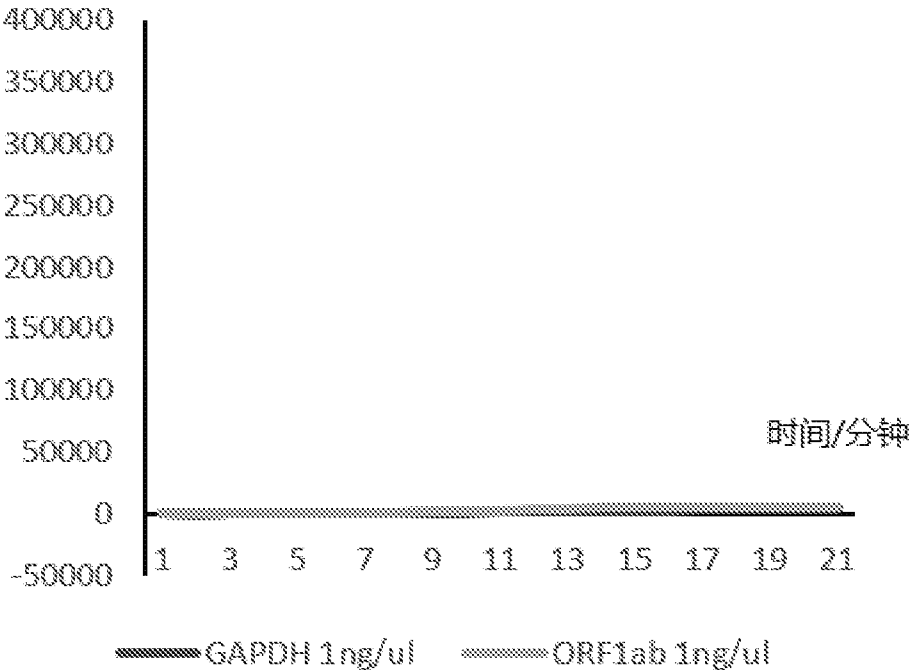


图 9

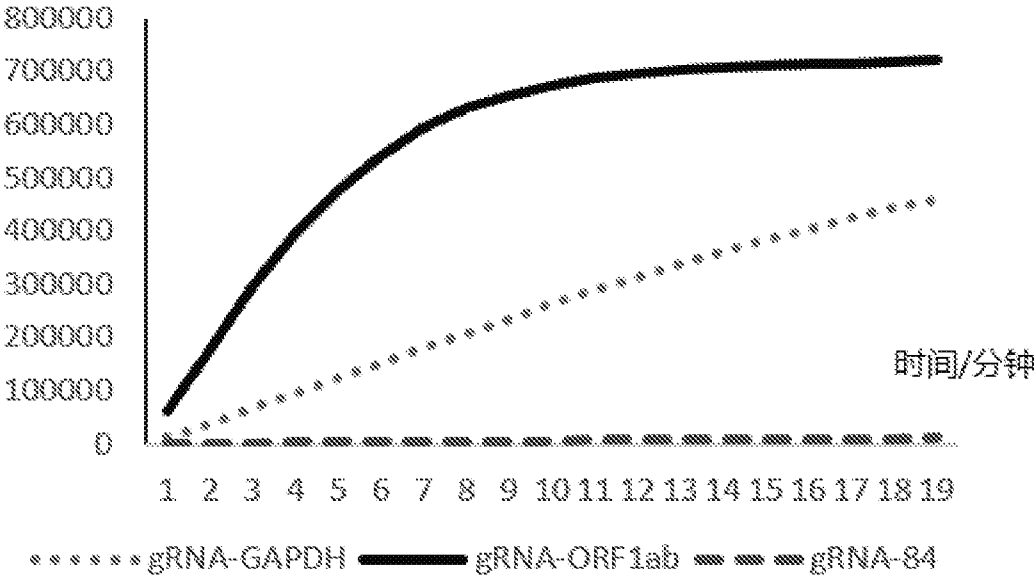


图 10

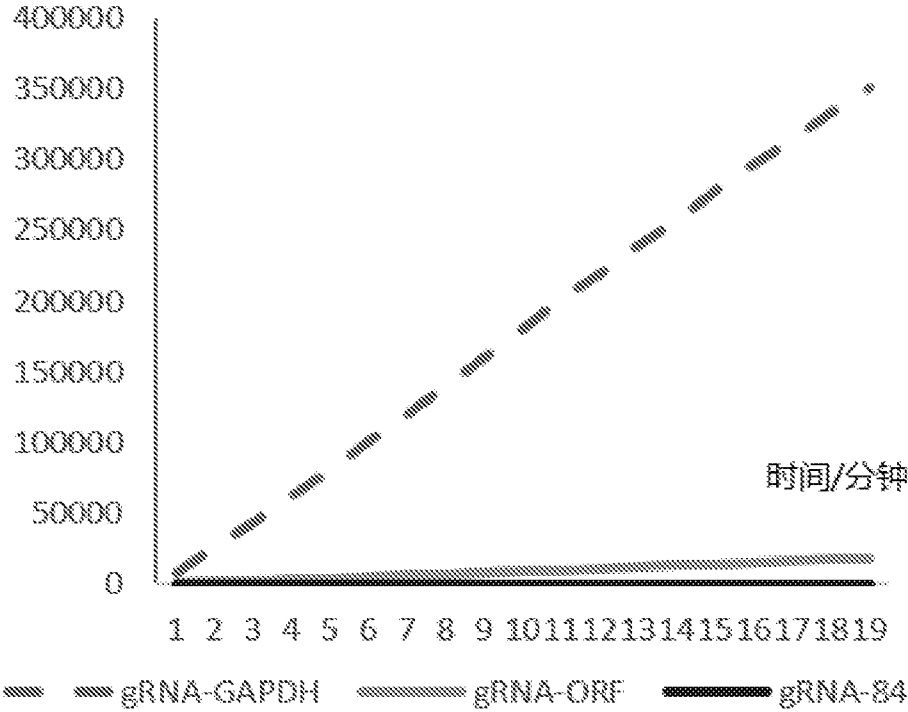


图 11

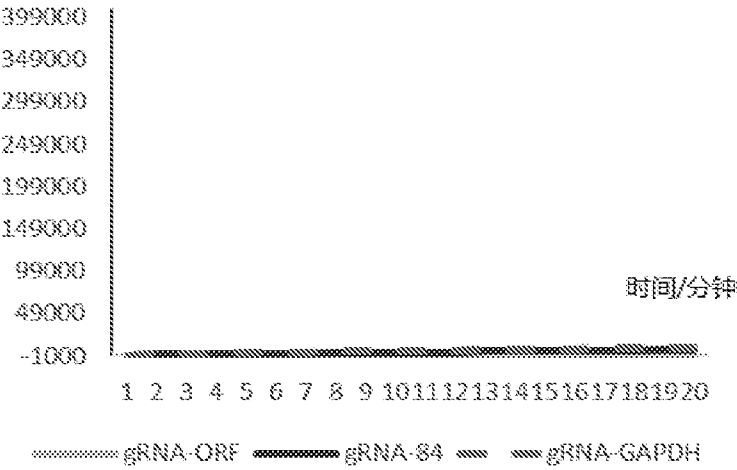


图 12

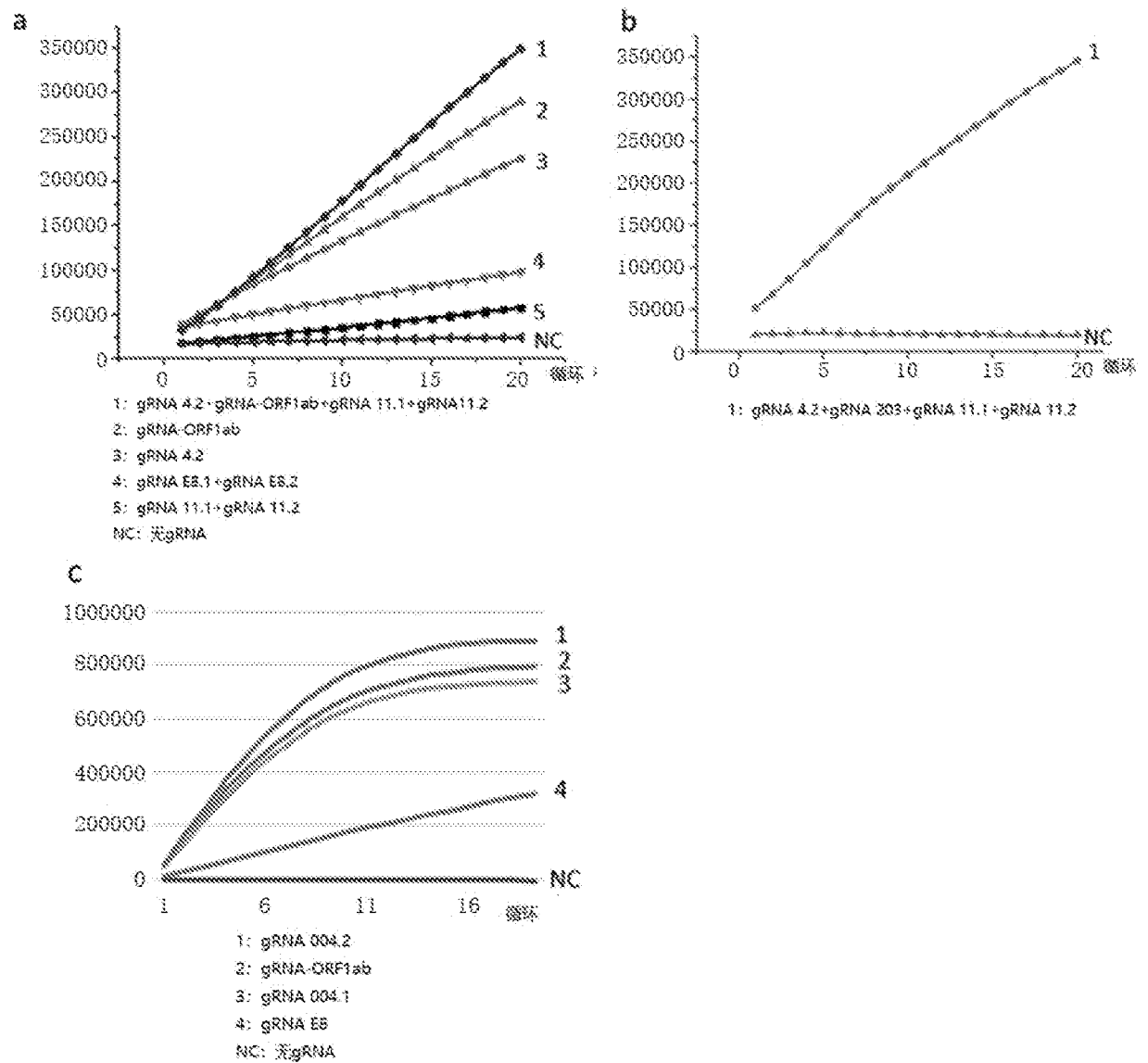


图 13

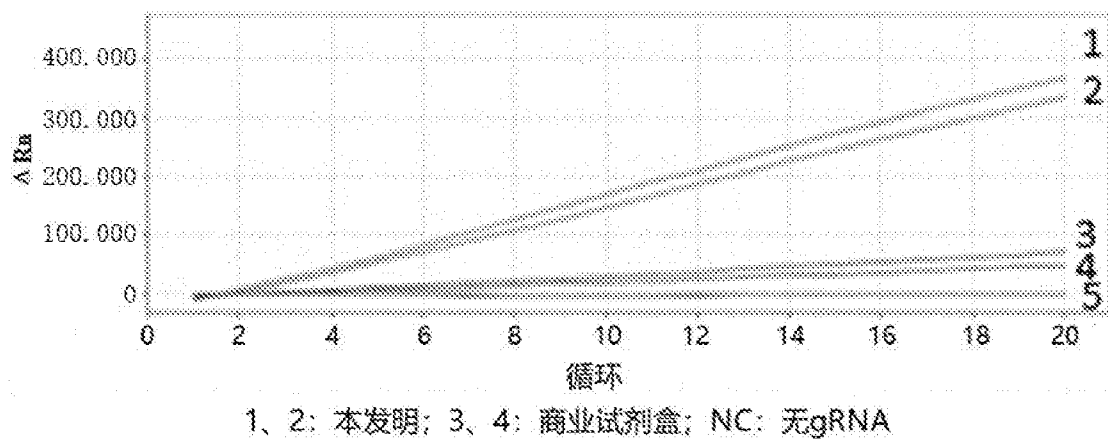


图 14

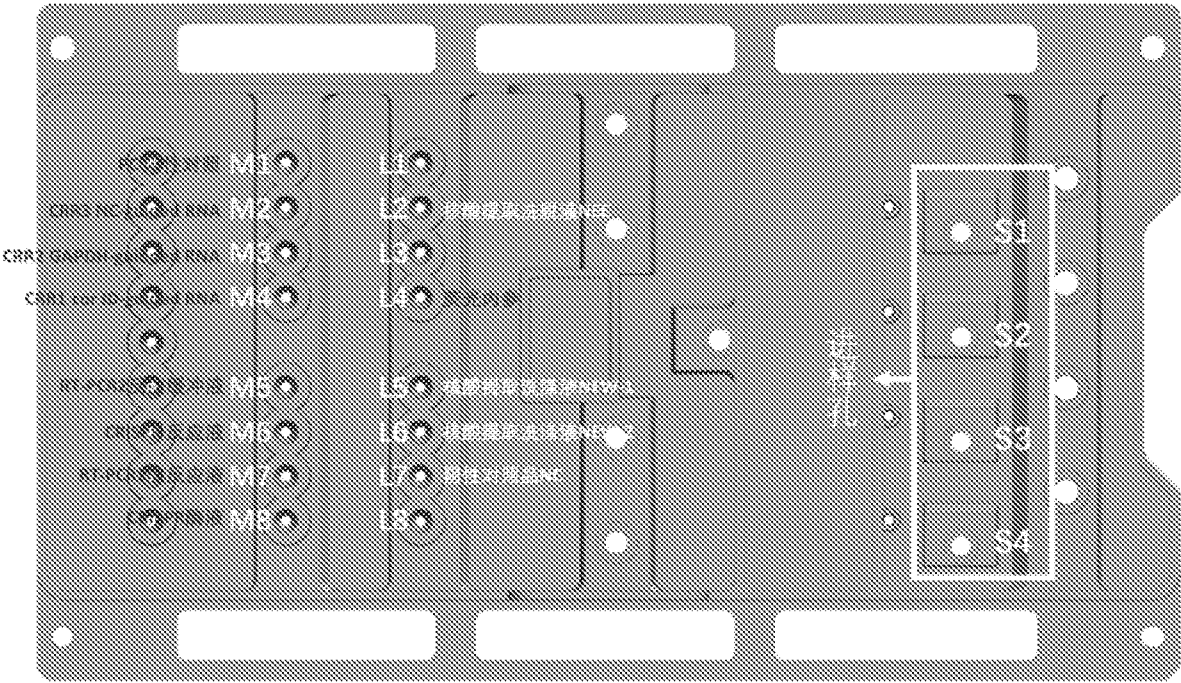


图 15

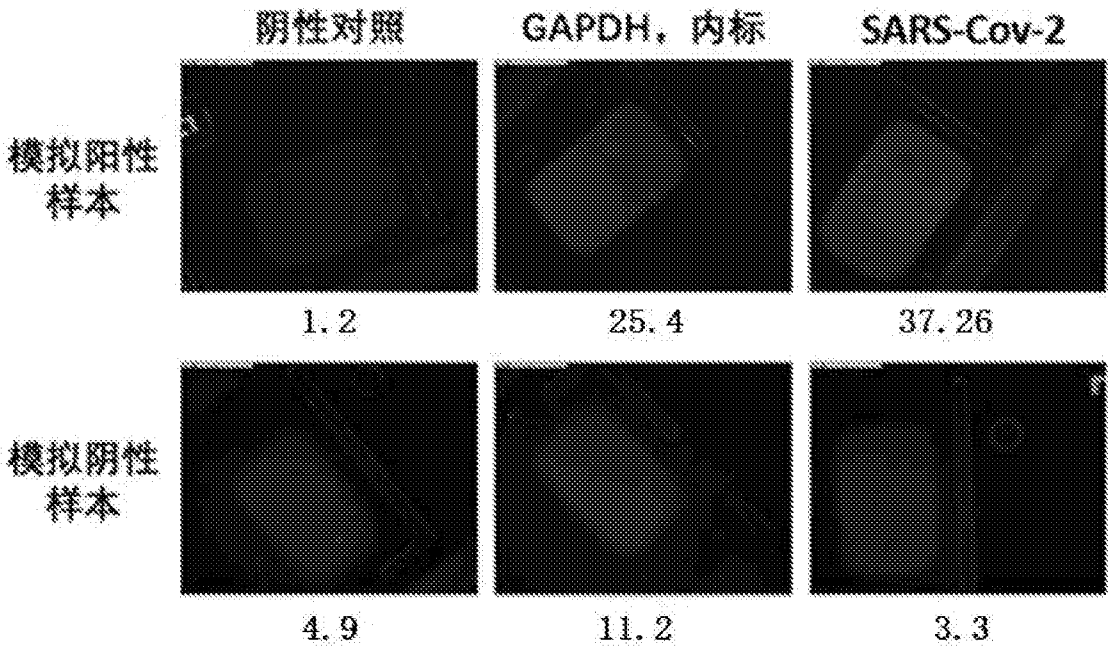


图 16

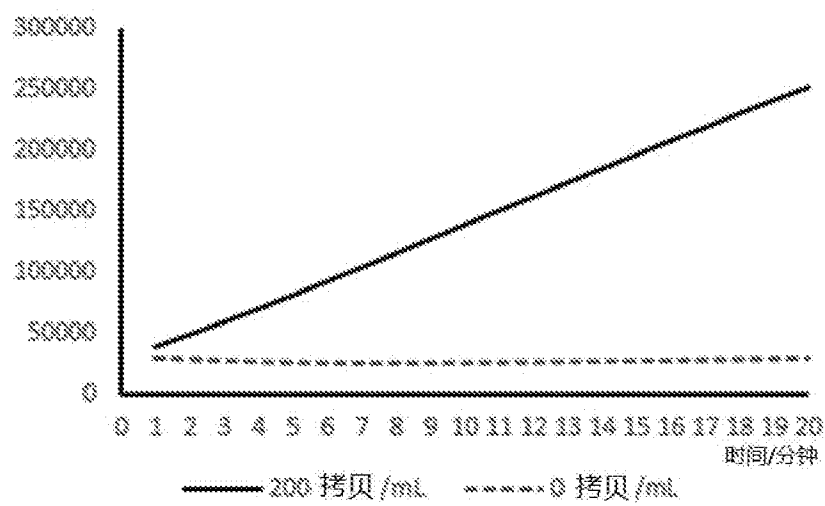


图 17

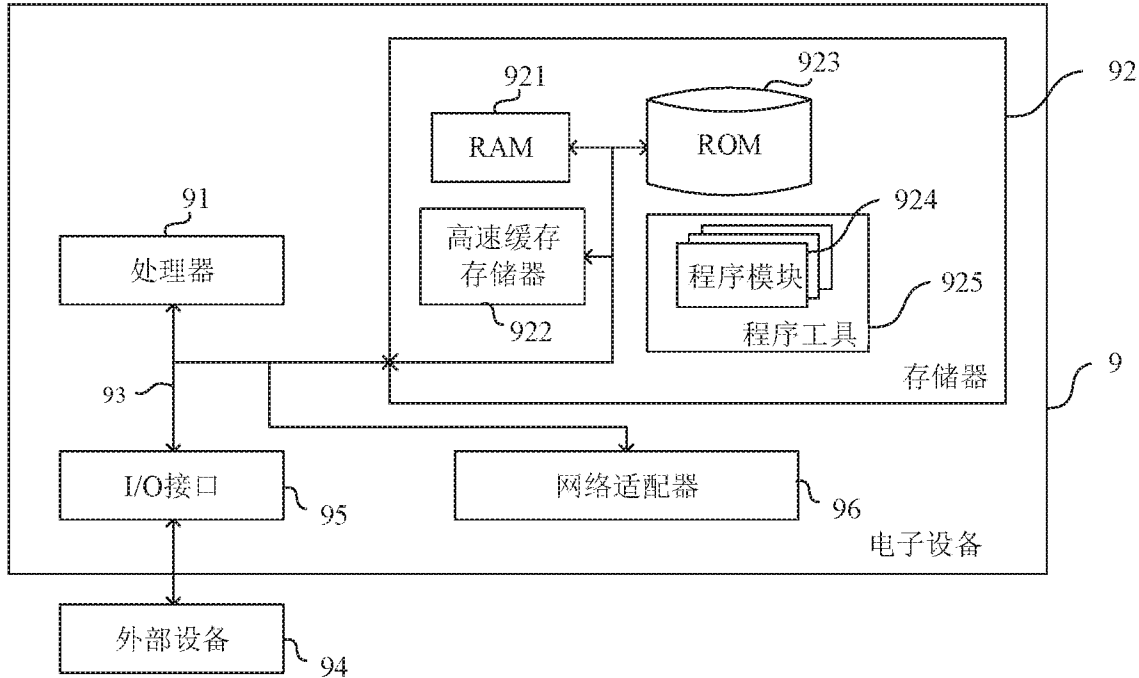


图 18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/096620

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/6851(2018.01)i; C12M 1/00(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)

C12Q;C12M

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)

VEN, CNABS, PubMed, CNKI, ISI Web of Knowledge: 电浸润, CRISPR, 核酸检测, 荧光, 微通道, Cas12a, gRNA, 驱动, 核酸扩增, 液滴, 数字pcr, rna, dna, 探针, 具体序列; Electrowetting, nucleic acid, fluorescence, microchannel, amplification, drop, probe, digital pcr, dPCR

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 110885877 A (XIAMEN UNIVERSITY) 17 March 2020 (2020-03-17) description, paragraphs 7-17, and figures 1-2	1-10
Y	Broughton, J.P. et al. "CRISPR-Cas12-based detection of SARS-CoV-2" <i>Nat Biotechnol</i> , Vol. 38, 16 April 2020 (2020-04-16), pp. 870-874	1-10
A	CN 111704994 A (EAST CHINA UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 25 September 2020 (2020-09-25) entire document	1-10
A	CN 110387405 A (ZHEJIANG SHANCE HEQISHI BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 29 October 2019 (2019-10-29) entire document	1-10
A	CN 112029653 A (ZHEJIANG UNIVERSITY) 04 December 2020 (2020-12-04) entire document	1-10
A	CN 107828874 A (SOUTHEAST UNIVERSITY) 23 March 2018 (2018-03-23) entire document	1-10



Further documents are listed in the continuation of Box C.



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

“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

19 January 2022

Date of mailing of the international search report

28 February 2022

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing
100088, China

Authorized officer

Facsimile No. (86-10)62019451

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/096620

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	鲍瑶菲等 (BAO, Yaofei et al.). "用于新型冠状病毒核酸检测的即时检测方法研究进展 (Advances in point-of-care testing for new corona virus nucleic acid)" 中国药科大学学报 (<i>Journal of China Pharmaceutical University</i>), Vol. 51, No. 6, 31 December 2020 (2020-12-31), pp. 635-645	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/096620

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed:
- ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- ☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2021/096620

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN	110885877	A	17 March 2020	None	
CN	111704994	A	25 September 2020	None	
CN	110387405	A	29 October 2019	None	
CN	112029653	A	04 December 2020	None	
CN	107828874	A	23 March 2018	None	

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2021/096620

A. 主题的分类

C12Q 1/6851(2018.01)i; C12M 1/00(2006.01)i

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

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C12Q;C12M

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

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))

VEN, CNABS, PubMed, CNKI, ISI Web of Knowledge, 电浸润, CRISPR, 核酸检测, 荧光, 微通道, Cas12a, gRNA, 驱动, 核酸扩增, 液滴, 数字pcr, rna, dna, 探针, 具体序列; Electrowetting, nucleic acid, fluorescence, microchannel, amplification, drop, probe, digital pcr, dPCR

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
Y	CN 110885877 A (厦门大学) 2020年3月17日 (2020 - 03 - 17) 说明书7-17段, 图1-2	1-10
Y	Broughton, J.P. 等. "CRISPR - Cas12-based detection of SARS-CoV-2" Nat Biotechnol, 第38卷, 2020年4月16日 (2020 - 04 - 16), 870-874页	1-10
A	CN 111704994 A (华东理工大学) 2020年9月25日 (2020 - 09 - 25) 全文	1-10
A	CN 110387405 A (浙江善测禾骑士生物科技有限公司) 2019年10月29日 (2019 - 10 - 29) 全文	1-10
A	CN 112029653 A (浙江大学) 2020年12月4日 (2020 - 12 - 04) 全文	1-10
A	CN 107828874 A (东南大学) 2018年3月23日 (2018 - 03 - 23) 全文	1-10

☒ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“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)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“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

“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

“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

“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

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2022年1月19日

国际检索报告邮寄日期

2022年2月28日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局 (ISA/CN)

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

授权官员

刘宝

电话号码 86-(10)-53962038

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2021/096620

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	鲍瑶菲等. “用于新型冠状病毒核酸检测的即时检测方法研究进展” 中国药科大学学报, 第51卷, 第6期, 2020年12月31日 (2020 - 12 - 31), 635-645页	1-10

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1. c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列列表进行的:

a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的:

☒ 附件C/ST. 25文本文件形式

☐ 纸件或图形文件形式

b. ☐ 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:

☐ 附件C/ST. 25文本文件形式(细则13之三. 1(a))

☐ 纸件或图形文件形式(细则13之三. 1(b)和行政规程第713段)

2. ☐ 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。

3. 补充意见:

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2021/096620

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)
CN	110885877	A	2020年3月17日	无	
CN	111704994	A	2020年9月25日	无	
CN	110387405	A	2019年10月29日	无	
CN	112029653	A	2020年12月4日	无	
CN	107828874	A	2018年3月23日	无	