用于生物微流控荧光激发的片上集成光学模块 研制

颜泽军1.2, 史 清2*, 张恩嘉2, 张凯欢3, 冯世伦2*, 冯吉军1*, 赵建龙2

¹上海理工大学光电信息与计算机工程学院,上海 ²中国科学院上海微系统与信息技术研究所,传感技术国家重点实验室,上海 ³中国科学院上海微系统与信息技术研究所,2020 X-Lab前沿实验室,上海

收稿日期: 2024年5月6日; 录用日期: 2024年8月6日; 发布日期: 2024年8月16日

摘要

片上集成光学模块具有集成小型化、低成本等优点,可在芯片尺度上实现"样品进、结果出"的即时定 点检测。本文研制了一个工作波长为647 nm的荧光激发模块,集成聚合酶链式反应(PCR)生物微流控芯 片和光电探测器,实现了片上荧光激发和病原体核酸检测。该荧光激发模块主要由光栅和多模干涉器两 个微纳器件构成,经有限时域差分法优化,光栅激发效率可达26.3%,多模干涉器损耗低至2.8%。结合 生物微流控芯片,采用等浓度梯度的Cyanine 5 (Cy5)荧光素溶液对荧光激发模块性能进行验证,光电探 测器输出电压值与Cy5荧光素溶液浓度之间成线性关系,拟合曲线方差为0.9944,最低检测下限为 0.0625 μmol/L。利用200 copies/μL的新型冠状病毒质粒做生物应用测试,结果表明本文所提出的荧光 激发模块能满足实际PCR应用中对荧光信号激发的要求。本系统在生物荧光定量PCR、数字PCR、蛋白 等实时生物荧光检测方面具有应用前景。

关键词

荧光激发模块,荧光检测系统,生物微流控芯片,聚合酶链式反应

Design of On-Chip Integrated Optical Modules for Bio-Microfluidic Excitation of Fluorescence

Zejun Yan^{1,2}, Qing Shi^{2*}, Enjia Zhang², Kaihuan Zhang³, Shilun Feng^{2*}, Jijun Feng^{1*}, Jianlong Zhao²

¹School of Optical-Electrical and Computer Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai

*通讯作者 Email: fjijun@usst.edu.cn; shilun.feng@mail.sim.ac.cn; shiqing@mail.sim.ac.cn

文章引用:颜泽军,史清,张恩嘉,张凯欢,冯世伦,冯吉军,赵建龙.用于生物微流控荧光激发的片上集成光学模块研制[J].物理化学进展,2024,13(3):375-384.DOI:10.12677/japc.2024.133043

 ²State Key Laboratory of Transducer Technology, Shanghai Institute of Microsystem and Information Technology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai
³2020 X-Lab, Shanghai Institute of Microsystem and Information Technology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai

Received: May 6th, 2024; accepted: Aug. 6th, 2024; published: Aug. 16th, 2024

Abstract

On-chip integrated optical modules have the advantages of integrated miniaturization, low cost, etc., and can realize "sample in, result out" real-time fixed-point detection on a chip scale. In this paper, a fluorescence excitation module with an operating wavelength of 647 nm was developed to achieve on-chip fluorescence excitation and pathogen nucleic acid detection by integrating a polymerase chain reaction (PCR) bio-microfluidic chip and a photodetector. The fluorescence excitation module is mainly composed of two micro-nano devices, grating and multimode interferometer (MMI). Optimized by the Finite-difference time-domain method, the grating excitation efficiency can reach 26.3%, and the multimode interferometer loss is as low as 2.8%. The performance of the fluorescence excitation module was verified by using an equal concentration gradient of Cyanine 5 (Cy5) fluorescein solution in combination with a bio-microfluidic chip. The output voltage value of the photodetector and the concentration of Cy5 fluorescein solution were linearly correlated with the variance of the fitted curve being 0.9944, and the lowest limit of detection being 0.0625 μ mol/L. Biological application tests were performed with 200 copies/ μ L of the SARS-CoV-2 plasmid, and the results show that the fluorescence excitation module proposed in this paper can meet the requirements for fluorescence signal excitation in practical PCR applications. This module has promising applications in real-time biofluorescence detection of biofluorescence quantitative PCR, digital PCR, and proteins.

Keywords

Fluorescence Excitation Module, Fluorescence Detection System, Bio-Microfluidic Chip, Polymerase Chain Reaction

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc. This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0). http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

1. 引言

近年来,人类对于多种威胁生命健康的细菌,病毒,病原体等有害生物的检测高度关注。现有的生化检测方法包括光学检测、电化学检测以及质谱检测等方法[1][2][3],与电化学检测和质谱检测相比, 光学检测具有高稳定性,高灵敏度和不受电磁干扰等优势[4]。其中荧光检测是光学检测技术中最常用技术,它可以在微纳尺度上揭示细胞,病毒,蛋白,核酸等生命物质的生化过程和物质交换[5]。荧光检测 是聚合酶链式反应、免疫荧光染色法和荧光标记等诊断的金标准[6][7][8]。荧光检测与具有微型化、集 成化、高通量、高灵敏度等优点的生物微流芯片相结合[9],为生物学、医学和药物研发等领域提供了强 大而有效的方法[10][11][12]。传统上,荧光信号的激发和收集必须通过荧光显微镜的物镜进行,尽管超 分辨荧光显微镜技术的问世已经突破了传统的衍射极限问题[13],但依然存在着一系列挑战。其中包括设 备体积庞大、光学系统复杂、制造成本高、操作繁琐和难以实现大视野荧光检测等问题。

鉴于荧光显微镜存在的一些限制,科学界正在积极推动荧光检测仪器向着集成化和小型化方向快速 发展[14] [15] [16]。集成化和小型化设备具有体积小、重量轻、操作简单和便于携带等优势,不仅使得设 备在实验室内使用更加便捷,同时也为现场或移动应用提供了新的可能性。Shen 等人提出了一种基于白 光激光源的大视场快速液滴数字 PCR 生物微流控芯片核酸浓度测定系统[17]。白光激光源可以提供更高 的荧光激发效率,紧凑物镜的大视场检测区域能够达到 34 mm 直径的圆,比典型物镜 10 mm 检测直径的 检测面积大 10 倍以上。相同大小区域检测成像持续时间将从 180 秒减少到 15 秒。该研究为大视野成像 提供了新的方案,但依旧存在系统体积大和光路复杂的问题。Fang 等人提出了一种用于核酸检测系统双 通道荧光检测集成模块[18]。该模块基于共焦光路,使用二向色镜将两组不同波长的光集成在同一个模块 中,并采用电流 - 光双负反馈 LED 驱动电路,提高激发光源的稳定性。该结构中二向色镜较多,在搭建 时对二向色镜放置角度要求极高,工艺难度大。目前,荧光检测设备主要集中在将光路部分小型化,很 少从激发方式上做出改变。

本文提出了一种用于生物微流控芯片点对点精准激发的荧光激发模块,并搭建了一个相匹配的检测 系统,实现了荧光的激发与检测。荧光激发模块的工作波长为 647 nm,由光栅和多模干涉器(Multimode Interferometer, MMI)构成,光栅实现对生物微流控芯片微腔的精准激发,而 MMI 用于将光源均匀分束, 实现一个光源激发多个检测单元。该模块使用 SiN 作为波导层,SiN 是一种成熟的 CMOS 兼容材料[19], 其透明窗口的下限为紫外区域,上限一直延伸到中红外区域。与硅相比,SiN 具有较低的折射率,可以 在 1.7 和 3.1 之间进行调节,能够为可见光提供良好的光学约束,同时能更好地容忍制造缺陷和波导侧壁 粗糙度,其传播损耗相对较低。荧光检测系统主要由荧光激发模块、生物微流控芯片、透镜和滤光模块 以及光电探测器组成。使用光电探测器将荧光信号转化为电信号实现结果数字化输出,相比于荧光成像 后比较荧光亮度,数字化结果更直观。本文采用不同浓度的 Cy5 荧光素溶液对荧光激发模块和荧光检测 系统进行了测试,结果表明输出电压与 Cy5 荧光素溶液浓度呈线性关系。并使用新型冠状病毒质粒进行 实际的生物应用检测,结果显示阳性样本的输出电压明显高于阴性样本,可以作为判断样本是否含有新 型冠状病毒质粒的依据。本文还比较了两个实验在荧光显微镜下的结果,荧光检测系统测试结果与荧光 显微镜的观察结果相符。

2. 荧光激发模块设计与优化

为实现生物微流控芯片的点对点精准激发,本文通过微纳光学器件集成的方式,设计并优化了荧光 激发模块。该模块主要包含两个功能性微纳器件 MMI 与光栅。利用 MMI 对光源进行均匀分光,提供与 激发区域数量相对应的激发光束;利用光栅实现光从平行传播到垂直传播的光路转折,实现对荧光激发 模块上方的生物微流控芯片点对点式荧光激发。设计模型的构建基于目前常用的氮化硅晶圆结构[20],自 上至下分别为氮化硅波导层 220 nm,埋氧层 2 µm,基底层 500 µm,不同器件之间利用宽度为 500 nm 的 脊形波导进行连接。

针对光栅的设计和优化,本文使用商业三维时域有限差分法仿真软件(FDTD Solutions, Lumerical)完成。光栅仿真区域大小设置为 $D_x = 42 \ \mu m$, $D_y = 20 \ nm$, $D_z = 5 \ nm$ 。采用完美匹配层用作边界条件,层数 设置为 8。使用自动非均匀网格,该网格可以自动匹配物理结构的周期性,网格精度选择为 4,即最小网 格间距约为 20 nm。采用高斯光源进行激发,通过透射谱监视器逐步优化光栅结构参数。光栅结构如图 1(a)所示,经优化后当光栅的角度 α = 34°,光栅总长度 $L_{total} = 50 \ \mu m$,光栅周期 T = 0.474 μm ,占空比为 0.5,光栅不刻蚀区域半径 R = 25 μm ,刻蚀深度为 220 nm,SiN 层和 SiO₂ 层的折射率分别为 $n_{Si} = 1.927$ 和 $n_{SiO2} = 1.445$,耦合光纤入射角度为 80 度时,光栅透射谱如图 1(b)所示,透射率最高为 23.6%。



Figure 1. Design and optimization of the grating. (a) Schematic of grating structure; (b) grating transmission spectrum 图 1. 光栅的设计与优化。(a) 光栅结构示意图; (b) 光栅透射谱

利用 Lumerical Mode 的 2.5D 时域有限差分法,可高效对微米级的多模干涉器进行优化。为使得仿真 结果更接近实际,采用完美匹配层边界条件[21],层数设置为 8。使用自动非均匀网格,将网格精度选择 为 4,即最小网格间距约为 20 nm,确保可以对结构细节进行精确仿真。采用高斯光源进行激发,通过透 射谱监视器逐步优化 MMI 结构参数。为降低分光损耗,本设计中针对图 2(a)中多模干涉器主体干涉部分 的长、宽以及两侧锥形波导[22]部分的长、宽进行了参数扫描式优化。结果显示:当主体干涉部分的长 L_{MMI} = 48.88 μ m、宽 W_{MMI} = 6 μ m、锥形连接波导长度 L_{taper} = 10 μ m、宽度分别为 W_g = 500 nm 和 W_t = 1.1 μ m,锥形波导与主体干涉部分位置关系为 G₁ = 2.45 μ m, G₂ = 3.14 μ m,出射端两个锥形波导对称分布。出射端透射谱如图 2(b)所示,单个出射端透射率最高可达 48.6%,器件总体损耗为 2.8%。





图 2. MMI 的设计与优化。(a) MMI 结构示意图;(b) MMI 输出端透射光谱

3. 荧光激发模块制备与性能测试

3.1. 制备工艺与表征

根据上述设计模型,利用 MEMS 工艺,主要制备流程如图 3 所示。主要分为 3 个主要流程,制备氮 化硅晶圆、电子束曝光(E-Beam Lithography, EBL)和刻蚀。

首先,为确保基片的洁净无杂质,必须对 4 英寸硅片进行彻底清洁处理。接着,采用低压化学气相 沉积(LPCVD)技术,在基片表面沉积一层厚度为 2 μm 的二氧化硅(SiO₂)埋氧层。经过退火冷却处理后, 再次利用 LPCVD 技术在基片表面沉积一层厚度为 220 nm 的氮化硅薄膜[23]。

在氮化硅表面均匀旋涂一层厚度为 300 nm 的正光刻胶 poly-methylmethacrylate (PMMA)。旋涂完成 后,将基片放置于烘干台上,蒸发光刻胶中的溶剂,同时提高光刻胶在基片上的附着力。随后,将设计 好的版图文件导入到电子束光刻机 EBL,调节电子束曝光剂量和电子加速电压,将设计图形转移到 PMMA 光刻胶上。

曝光完成的图案经过显影液显影后,需要进行反应离子刻蚀(Reactive Ion Etching, RIE)。在此过程中, 以 PMMA 光刻胶作为掩膜,刻蚀气体采用 CHF₃和 O₂混合气体,其比例为 10:1。刻蚀过程中的功率设 定为 100 W,刻蚀时间为 3 分钟。完成刻蚀后,依次使用丙酮、异丙醇,无水乙醇、去离子水去除基片 表面残留的光刻胶。



Figure 3. Preparation process of fluorescence excitation module 图 3. 荧光激发模块制备过程

光栅与 MMI 的扫描电子显微镜(Scanning Electron Microscope, SEM)测试结果如图 4 所示。在图 4(a) 中,我们观察到光栅的 SEM 图像,放大倍数为 2000,比例尺为 10 μm。从图像中可以清晰地看到外部轮廓清晰,表面光滑,光栅线条均匀且规整,光栅与波导连接完整,显示出良好的制备质量和结构一致性。 而在图 4(b)中,展示了 MMI 的 SEM 图像,放大倍数为 1990,比例尺为 2 μm。观察到图像中 MMI 的表面干净无杂质,中心干涉区与锥体结构完整,这表明该 MMI 器件的制备过程精密而有效,达到了预期的设计要求。



Figure 4. SEM characterization results. (a) grating SEM; (b) MMI SEM 图 4. SEM 表征结果。(a)光栅 SEM; (b) MMI SEM

3.2. 检测系统搭建

荧光检测系统的结构如图 5 所示。采用波长 647 nm 的可调谐激光器作为光源,并通过曲率半径为 8 μm 的锥形透镜光纤耦合到与荧光激发模块中。荧光激发模块出射光精准发射到生物微流控芯片的微腔 中,实现对微腔中荧光物质的激发。图 5 所示的生物微流控芯片,是由激光加工的黑色亚克力板制成的,在激光加工形成通孔后与 PCR 封板膜贴合而成。该芯片的厚度为 3 mm,圆形腔室的直径为 2.5 mm。使用平凸透镜将微腔发射的杂散光进行准直[24],准直后的平行光束垂直入射到滤光片上。带通滤光片滤除 非目标波长的光,使目标波长的荧光通过。通过调节双凸透镜与平凸透镜共轴,双凸透镜将平行光束聚 焦成小光斑,使光能够完全聚焦在面积较小的光电探测器上(锐光科技有限公司,JSP-TP3050-SMT)。光 电探测器将光信号转化为电信号,然后经过放大电路模块进行微弱信号放大处理。最后,使用示波器完成输出信号的采集。



Figure 5. Schematic diagram of fluorescence excitation module and detection system 图 5. 荧光激发模块与检测系统结构示意图

3.3. Cy5 荧光素线性度测试

为验证荧光激发模块和荧光检测系统的性能,选用性质稳定的 Cy5 荧光素(购自于北京博奥森生物技

术有限公司)作为验证试剂[25],用二甲基亚砜(Dimethyl Sulfoxide, DMSO)(购自于 General-reagent, CHINA)作为稀释液。将 Cy5 荧光素稀释成浓度为 0.5 μmol/L (μM)、0.25 μM、0.125 μM、0.0625 μM 的 溶液。

实验时,向两组生物微流控芯片中分别注入 10 μL 配置好的荧光素溶液,并取相同剂量的 DMSO 作为对照空白实验。其中一组用于荧光激发模块和荧光检测系统验证,将生物微流控芯片放置于搭建的荧光检测系统中,并采集光电探测器输出电压数据。另一组用荧光显微镜观察(IX73, Olympus, Japan),并利用 CCD 相机采集图像信息。采集完成的数据将使用 Origin2021 软件进行处理。

Cy5 荧光素测试结果如图 6 所示。图 6(a)中荧光图片对应的 Cy5 荧光素溶液浓度依次为 0.5 μM、0.25 μM、0.125 μM、0.0625 μM、DMSO,荧光亮度随 cy5 荧光素稀释比的增加而降低。图 6(b)中从左至右 Cy5 荧光素溶液浓度与图 6(a)依次对应,图中纵坐标表示光电探测器输出电压,误差棒显示了至少三个 独立实验的测量结果标准偏差,输出电压的均值分别为 467 mV、333.7 mV、247.3 mV、222 mV、149.7 mV。 由图 6 可知,输出电压幅值随着浓度的降低而减小,与荧光图像亮度变化趋势一致。0.0625 μM Cy5 荧光 素溶液的输出电压明显高于 DMSO 的输出电压,低于 0.125 μM Cy5 荧光素溶液的输出电压,表明荧光 激发模块和荧光检测系统可实现最低浓度为 0.0625μM Cy5 荧光素溶液的检测。在 0.0625 μM~0.5 μM 范 围内,输出电压与 Cy5 荧光素溶液浓度的拟合曲线如图 6(c)所示。输出电压与 Cy5 荧光素计算浓度之间 存在良好的线性关系,输出电压 y 与浓度 x 的线性回归方程为 y = 571.29x + 183.5 (R² = 0.9944)。实验结 果表明荧光激发模块成功实现了荧光激发功能,荧光检测系统实现了荧光的收集和检测功能。



Figure 6. Cy5 fluorescein linear test results. (a) and (b) respectively represent fluorescence images and output voltages of Cy5 fluorophore solutions with concentrations ranging from left to right: 0.5 μ M, 0.25 μ M, 0.125 μ M, 0.0625 μ M, and DMSO.; (c) Fitted curve of output voltage and Cy5 fluorophore solution concentration, with a linear relationship of y = 571.29x + 183.5 (R² = 0.9944). Error bars represent the standard deviation of measurements from at least three independent experiments.

图 6. Cy5 荧光素线性测试结果。(a) (b)分别表示从左至右浓度依次为 0.5 μM、0.25 μM、0.125 μM、0.0625 μM 和 0 μM Cy5 荧光素溶液的荧光图片和输出电压; (c)输出电压与 Cy5 荧光素溶液浓度的拟合曲线,线性关系为 y = 571.29x + 183.5 (R² = 0.9944)。误差棒显示了至少三个独立实验测量结果的标准偏差

4. 新型冠状病毒质粒检测应用

4.1. 新型冠状病毒质粒试剂盒扩增

新型冠状病毒反应试剂由缓冲液 12.5 μL (TaKaRaPrimeScript RT Master Mix RR036B, takara CHINA), 新 型冠状病毒人工质粒 2 μL, N 基因上下游引物各 0.9 μL, N 基因探针 0.6 μL (质粒、引物和探针均购自于中 国上海占标生物科技公司), DEPC 水 8.1 mL (Adamas life, CHINA)组成, 混合于八连排透明 PCR 管。阴性 样本用 2 μL DEPC 水替代新型冠状病毒质粒。所有引物探针初始浓度均为 10 μM, 本工作中使用的模板为 含有新型冠状病毒 N 基因的合成质粒, 使用 DEPC 水稀释至 200 copies/μL。样品在-20℃下储存。

将配置完成的试剂置于 SLAN96 扩增仪(上海宏石医疗科技有限公司)中按照以下程序进行扩增:在 50℃下进行 1 个循环 30 分钟,在 95℃下进行 60 秒,然后在 95℃下进行 45 个循环 15 秒,在 60℃下进行 45 个循环 30 秒[26]。

4.2. 检测结果与分析

为验证荧光激发模块在实际运用中的性能,使用新型冠状病毒质粒作为检测样本。将完成扩增的试剂、相同浓度未扩增的试剂和对照组 DEPC 水各取 10 µL 注入到两组生物微流控芯片中。实验方法与 Cy5 荧光素测试相同,一组使用荧光检测系统测试,另一组使用荧光显微镜进行测试。

测试样品荧光图片如图 7(a)所示。从左至右依次是 200 copies/µL 阳性样本、阴性样本、未扩增样本和 DEPC 水的荧光图片。可以清晰地观察到,阳性样本荧光亮度明显强于阴性样本。阴性样本与未扩增样本荧光亮度基本相同,相比于水溶液有微弱亮光,是因为样本含有引物和探针,也会激发出微弱荧光。 光电探测器的输出电压与不同样本间的关系如图 7(b)所示,误差棒显示了至少三个独立实验的测量结果的标准偏差,图中从左至右分别表示阳性样本、阴性样本、未扩增样本与 DEPC 水的检测结果,输出电压均值分别为 280 mV、170.75 mV、170 mV、132 mV,阳性和阴性之间的电压差值为 109.25 mV,阴性与水溶液差值为 38 mV。输出电压变化趋势与显微镜拍摄下的荧光图片亮度变化趋势相同。证明荧光激发模块可以激发新型冠状病毒质粒扩增样本中的荧光物质,满足 PCR 对于荧光信号激发的要求。荧光检测系统能够准确收集和检测荧光,输出参数可以作为分辨阴性和阳性的依据,具备实际运用能力。



Figure 7. SARS-CoV-2 plasmid test results. (a) and (b) respectively represent fluorescence images and output voltages from left to right of positive samples, negative samples, unamplified samples, and water. Error bars represent the standard deviation of measurements from at least three independent experiments.

图 7. 新型冠状病毒质粒测试结果。(a) (b)分别表示从左至右阳性样本、阴性样本、未扩增样本和水的荧光图片和输出电压。误差棒显示了至少三个独立实验测量结果的标准偏差

5. 结论

本文已经开发出一个用于生物微流控芯片荧光激发的荧光激发模块,并搭建了一套相匹配的荧光检测系统。可以实现不同浓度 Cy5 荧光素和新型冠状病毒质粒的激发与检测。荧光激发模块能够精准激发 生物微流控芯片检测腔室中的荧光物质,荧光检测系统集成了光电探测器和滤光片,实现了荧光信号的 数字化采集。本研究成功实现了对最低浓度为 0.0625 µM Cy5 荧光素溶液的激发与检测,200 copies/µL 新型冠状病毒质粒的激发与检测。本模块还可用于生物荧光定量 PCR、数字 PCR、蛋白等实时生物荧光 检测等多种场景,并且与其他检测设备相比,具有更高的集成度和更小的体积。

基金项目

本工作得到国家重点研发计划项目(2021YFF1200800, 2022YFE0107400)、国家自然科学基金项目 (U23A20381, 11933005)、中国科学院装备研发项目(YJKYYQ20210049)、上海市科学技术委员会项目 (23010503600, 23530730500, 22xtcx00100, XTCX-KJ-2022-32)、上海高等学校特聘教授(东方学者)项目 (GZ2020015)、嘉兴市科技计划项目(2023AY31016)的资助。

参考文献

- Li, Z. and Zhu, M. (2020) Detection of Pollutants in Water Bodies: Electrochemical Detection or Photo-Electrochemical Detection? *Chemical Communications*, 56, 14541-14552. <u>https://doi.org/10.1039/d0cc05709f</u>
- [2] Kaur, B., Kumar, S. and Kaushik, B.K. (2022) Recent Advancements in Optical Biosensors for Cancer Detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 197, Article ID: 113805. <u>https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113805</u>
- [3] Li, Y., Huang, Z., Li, Z., Li, C., Liu, R. and Lv, Y. (2022) Mass Spectrometric Multiplex Detection of MicroRNA and Protein Biomarkers for Liver Cancer. *Analytical Chemistry*, 94, 17248-17254. <u>https://doi.org/10.1021/acs.analchem.2c04171</u>
- [4] John, P., Vasa, N.J. and Zam, A. (2023) Optical Biosensors for the Diagnosis of COVID-19 and Other Viruses—A Review. *Diagnostics*, 13, Article No. 2418. <u>https://doi.org/10.3390/diagnostics13142418</u>
- [5] Mal, D.K., Pal, H. and Chakraborty, G. (2024) A Comprehensive Review on Recent Advances in Fluorescence-Based Bio-Analytes Sensing. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **171**, Article ID: 117493. https://doi.org/10.1016/j.trac.2023.117493
- [6] Nouwairi, R.L., Cunha, L.L., Turiello, R., Scott, O., Hickey, J., Thomson, S., *et al.* (2022) Ultra-Rapid Real-Time Microfluidic RT-PCR Instrument for Nucleic Acid Analysis. *Lab on a Chip*, 22, 3424-3435. https://doi.org/10.1039/d2lc00495j
- [7] Pérez, D., Gilburd, B., Azoulay, D., Shovman, O., Bizzaro, N. and Shoenfeld, Y. (2018) Antinuclear Antibodies: Is the Indirect Immunofluorescence Still the Gold Standard or Should Be Replaced by Solid Phase Assays? *Autoimmunity Reviews*, 17, 548-552. <u>https://doi.org/10.1016/j.autrev.2017.12.008</u>
- [8] Giurdanella, F., Diercks, G.F.H., Jonkman, M.F. and Pas, H.H. (2016) Laboratory Diagnosis of Pemphigus: Direct Immunofluorescence Remains the Gold Standard. *British Journal of Dermatology*, **175**, 185-186. <u>https://doi.org/10.1111/bjd.14408</u>
- Cai, G., Wu, W., Feng, S. and Liu, Y. (2021) Label-Free *E. coli* Detection Based on Enzyme Assay and a Microfluidic Slipchip. *The Analyst*, 146, 4622-4629. <u>https://doi.org/10.1039/d1an00495f</u>
- [10] Liao, Z., Zhang, Y., Li, Y., Miao, Y., Gao, S., Lin, F., et al. (2019) Microfluidic Chip Coupled with Optical Biosensors for Simultaneous Detection of Multiple Analytes: A Review. Biosensors and Bioelectronics, 126, 697-706. https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.11.032
- [11] Gao, R., Lv, Z., Mao, Y., Yu, L., Bi, X., Xu, S., et al. (2019) SERS-Based Pump-Free Microfluidic Chip for Highly Sensitive Immunoassay of Prostate-Specific Antigen Biomarkers. ACS Sensors, 4, 938-943. https://doi.org/10.1021/acssensors.9b00039
- [12] Wang, A., Feng, X., He, G., Xiao, Y., Zhong, T. and Yu, X. (2023) Recent Advances in Digital Microfluidic Chips for Food Safety Analysis: Preparation, Mechanism and Application. *Trends in Food Science & Technology*, **134**, 136-148. <u>https://doi.org/10.1016/j.tifs.2023.03.009</u>
- [13] Liu, W., Toussaint, K.C., Okoro, C., Zhu, D., Chen, Y., Kuang, C., et al. (2018) Breaking the Axial Diffraction Limit:

A Guide to Axial Super-Resolution Fluorescence Microscopy. Laser & Photonics Reviews, **12**, Article ID: 1700333. https://doi.org/10.1002/lpor.201700333

- [14] Lee, S., Bi, L., Chen, H., Lin, D., Mei, R., Wu, Y., et al. (2023) Recent Advances in Point-of-Care Testing of Covid-19. Chemical Society Reviews, 52, 8500-8530. <u>https://doi.org/10.1039/d3cs00709j</u>
- [15] Li, Q., Zhou, X., Wang, Q., Liu, W. and Chen, C. (2023) Microfluidics for COVID-19: From Current Work to Future Perspective. *Biosensors*, 13, Article No. 163. <u>https://doi.org/10.3390/bios13020163</u>
- [16] Hofer, U. (2021) POCT for Drug-Resistant Gonorrhoea. Nature Reviews Microbiology, 19, 406-406. https://doi.org/10.1038/s41579-021-00581-0
- [17] Shen, J., Zheng, J., Li, Z., Liu, Y., Jing, F., Wan, X., et al. (2021) A Rapid Nucleic Acid Concentration Measurement System with Large Field of View for a Droplet Digital PCR Microfluidic Chip. Lab on a Chip, 21, 3742-3747. https://doi.org/10.1039/d1lc00532d
- [18] Fang, Y., Wang, Y., Su, X., Liu, H., Chen, H., Chen, Z., et al. (2022) A Miniaturized and Integrated Dual-Channel Fluorescence Module for Multiplex Real-Time PCR in the Portable Nucleic Acid Detection System. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 10, Article ID: 996456. <u>https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.996456</u>
- [19] Hegedüs, N., Balázsi, K. and Balázsi, C. (2021) Silicon Nitride and Hydrogenated Silicon Nitride Thin Films: A Review of Fabrication Methods and Applications. *Materials*, 14, Article No. 5658. <u>https://doi.org/10.3390/ma14195658</u>
- [20] Sharma, T., Wang, J., Kaushik, B.K., Cheng, Z., Kumar, R., Wei, Z., et al. (2020) Review of Recent Progress on Silicon Nitride-Based Photonic Integrated Circuits. *IEEE Access*, 8, 195436-195446. <u>https://doi.org/10.1109/access.2020.3032186</u>
- [21] Yuan, S., Feng, J., Yu, Z., Chen, J., Liu, H., Chen, Y., et al. (2022) Silicon Nanowire-Assisted High Uniform Arrayed Waveguide Grating. Nanomaterials, 13, Article No. 182. <u>https://doi.org/10.3390/nano13010182</u>
- [22] Rouifed, M., Littlejohns, C.G., Tina, G.X., Qiu, H., Penades, J.S., Nedeljkovic, M., et al. (2017) Ultra-Compact MMI-Based Beam Splitter Demultiplexer for the NIR/MIR Wavelengths of 155 μm and 2 μm. Optics Express, 25, 10893-10900. https://doi.org/10.1364/oe.25.010893
- [23] Li, Z., Fan, Z., Zhou, J., Cong, Q., Zeng, X., Zhang, Y., et al. (2023) Process Development of Low-Loss LPCVD Silicon Nitride Waveguides on 8-Inch Wafer. Applied Sciences, 13, Article No. 3660. https://doi.org/10.3390/app13063660
- [24] Oliker, V., Doskolovich, L.L. and Bykov, D.A. (2018) Beam Shaping with a Plano-Freeform Lens Pair. *Optics Express*, 26, Article No. 19406. <u>https://doi.org/10.1364/oe.26.019406</u>
- [25] Hensbergen, A.W., de Kleer, M.A.C., Boutkan, M.S., van Willigen, D.M., van der Wijk, F.A., Welling, M.M., et al. (2020) Evaluation of Asymmetric Orthogonal Cyanine Fluorophores. *Dyes and Pigments*, 183, Article ID: 108712. <u>https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2020.108712</u>
- [26] Huang, Y., Gao, Z., Ma, C., Sun, Y., Huang, Y., Jia, C., et al. (2023) An Integrated Microfluidic Chip for Nucleic Acid Extraction and Continued cdPCR Detection of Pathogens. *The Analyst*, 148, 2758-2766. <u>https://doi.org/10.1039/d3an00271c</u>