

李建柱, 赵利琴, 王露遥, 等. 基于 CRISPR/Cas12a 系统联合重组酶聚合酶扩增的鸭星状病毒 2 型核酸检测试纸条的制备 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (7): 125-130.

LI J Z, ZHAO L Q, WANG L Y, et al. Development of test strip for detection of duck astrovirus type 2 nucleic acid based on the CRISPR/Cas12a system combined with recombinase polymerase amplification [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (7): 125-130.

## 基于 CRISPR/Cas12a 系统联合重组酶聚合酶扩增的 鸭星状病毒 2 型核酸检测试纸条的制备

李建柱<sup>1,2</sup>, 赵利琴<sup>1</sup>, 王露遥<sup>1</sup>, 师睦然<sup>1</sup>, 王成才<sup>1</sup>, 张梦圆<sup>1</sup>,  
马超锋<sup>3</sup>, 焦凤超<sup>1</sup>, 何书海<sup>1,2\*</sup>

(1. 信阳农林学院动物科技学院, 河南 信阳 464000;

2. 河南省水禽资源开发利用与疫病防控工程技术研究中心, 河南 信阳 464000;

3. 信阳市畜牧兽医技术服务中心, 河南 信阳 464000)

**摘要:** 为建立鸭星状病毒 2 型 (DAstV-2) 核酸现场快速检测方法, 基于 CRISPR/Cas12a 切割原理, 联合重组酶聚合酶等温扩增 (recombinase polymerase amplification, RPA), 设计用于 DAstV-2 核酸 RPA 扩增的引物和基于 CRISPR/Cas12a 反应的向导 RNA (crRNA), 优化反应条件确立最佳检测体系, 并用胶体金横向流动试纸条 (lateral flow dipstick, LFD) 报告检测结果。结果: 该检测体系对 DAstV-2 重组质粒的检出下限为 10 copies/ $\mu$ L, 灵敏性强且重复性好; 用此检测体系检测鸭常见病毒, 除 DAstV-2 核酸阳性外, 其他均为阴性, 特异性强; 与普通 RT-PCR 的检测结果相比较, 符合率达到 100%, 且更加方便快捷。研究结果提示, 基于 RPA-CRISPR/Cas12a-LFD 系统的 DAstV-2 核酸检测方法灵敏性好、特异性强、操作简单, 可在 37 °C 恒温下实现 DAstV-2 的现场快速可视化检测。

**关键词:** 鸭星状病毒 2 型; 重组酶聚合酶扩增; CRISPR/Cas12a; 横向流动试纸条

中图分类号: S852.65

文献标志码: A

文章编号: 0529-5130(2025)07-0125-06

## Development of test strip for detection of duck astrovirus type 2 nucleic acid based on the CRISPR/Cas12a system combined with recombinase polymerase amplification

LI Janzhu<sup>1,2</sup>, ZHAO Liqin<sup>1</sup>, WANG Luyao<sup>1</sup>, SHI Muran<sup>1</sup>, WANG Chengcai<sup>1</sup>,  
ZHANG Mengyuan<sup>1</sup>, MA Chaofeng<sup>3</sup>, JIAO Fengchao<sup>1</sup>, HE Shuhai<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Animal Science and Technology, Xinyang Agriculture and Forestry University, Xinyang 464000, China;

2. Henan Province Waterfowl Resources Development and Utilization and Disease Control Engineering Technology Research Center, Xinyang 464000, China;

3. Xinyang City Animal Husbandry and Veterinary Technology Service Center, Xinyang 464000, China)

**Abstract:** To establish a rapid point-of-care detection technology for duck astrovirus type 2 (DAstV-2) nucleic acid, based on the cutting principle of CRISPR/Cas12a, combined with recombinase polymerase isothermal amplification (RPA), primers were designed for RPA amplification of DAstV-2 nucleic acid and guide RNA (crRNA) based on the CRISPR/Cas12a reaction. The reaction conditions were optimized to establish the best detection system, and the colloidal gold lateral flow dipstick (LFD) was used to report the detection results. The results showed that the detection limit of the DAstV-2 recombinant plasmid was 10 copies/ $\mu$ L, and the detection system was highly sensitive and reproducible. This detection system was used to detect common duck viruses. Except for DAstV-2 nucleic acid being positive, the other viruses were negative with strong specificity. Compared with the results of the common RT-PCR, the coincidence rate here reached 100%.

收稿日期: 2024-08-13; 修回日期: 2025-04-28

基金项目: 2023 年度河南省重点研发与推广专项 (科技攻关) (232102111043); 信阳农林学院家禽重大疫病防控科技创新团队项目 (2022CXTD06)

第一作者: 李建柱, 男, 硕士, 副教授

\* 通信作者: 何书海, 博士, 教授, 主要从事家禽免疫抑制病毒致病机制的研究, E-mail: hope201816@126.com。

and the technology was more convenient and faster. The present study suggested that the method for detection of DAstV-2 nucleic acid based on RPA-CRISPR/Cas12a-LFD system possessed high sensitivity, strong specificity and easy operation, and was able to realize rapid visual detection of DAstV-2 at 37 °C.

**Keywords:** duck astrovirus type 2; recombinase polymerase amplification; CRISPR/Cas12a; lateral flow dipstick

禽星状病毒 (avian astrovirus, AAstV) 是危害家禽健康的重要病原之一, 其中鸭星状病毒 (duck astrovirus, DAstV) 是最早被发现的 AAstV。流行病学调查显示, 我国鸭群中存在着多种 DAstV 亚型, 包括 DAstV-1、DAstV-2、DAstV-3、DAstV-4<sup>[1]</sup>, 其中 DAstV-2 近年在我国鸭养殖业中广泛流行且传播范围不断扩大<sup>[2]</sup>。DAstV-2 在鸭群中传播速度很快, 7 日龄内雏鸭的发病率和死亡率均超过 90%, 21 日龄内的死亡率也在 50% 左右, 成年鸭死亡率虽然显著下降, 但却是具有传染性的病毒携带者。DAstV 的环境稳定性强, 目前也缺乏相关疫苗, 因此很容易在鸭群中传播<sup>[3]</sup>。鉴于 DAstV-2 高致病性毒株的致病特点及在我国鸭群中的流行现状, 建立 DAstV-2 的有效检测方法进行早期检测和防控已成为鸭健康养殖的重要环节。

CRISPR/Cas 系统是一种由细菌或古菌产生的一种适应性自我保护机制, 其利用多蛋白效应复合物与向导 RNA 结合从而发挥基因编辑作用, 如 Cas9、Cas12a、Cas13a 等蛋白酶已经在核酸检测中得到广泛应用<sup>[4]</sup>。Cas12a 是一种由 RNA 引导的单链核酸内切酶, 该酶在向导 RNA (crRNA) 的引导下实现对靶标双链 DNA 和其他非靶标单链 DNA 进行高效切割, 被用于多种生物体的 DNA 样品检测和分析<sup>[5]</sup>。将 CRISPR/Cas 生物传感系统与 PCR 扩增、重组酶聚合酶等温扩增 (recombinase polymerase amplification, RPA) 以及环介导等温扩增 (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 结合, 可以满足高灵敏性、高特异性的现场快速检验 (point-of-care testing, POCT) 应用场景<sup>[6]</sup>; 借助于荧光读取器、横向流动试纸 (lateral-flow dipstick, LFD) 等检测器, 可实现检测结果的可视化<sup>[7]</sup>。

为实现 DAstV-2 核酸的现场快速检测, 本研究根据 CRISPR/Cas12a 切割原理, 结合 RPA 恒温扩增技术和 LFD 胶体金试纸报告系统, 建立一种基于 CRISPR/Cas12a 的 DAstV-2 核酸快速可视化检测方法, 以为鸭星状病毒病的有效防控提供技术支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 质粒和病毒样本

使用特异性引物扩增获得 DAstV-2 的 ORF2 基因, 并将该片段克隆至 pET-30a (+) 载体中, 酶切

后测序, 验证后的重组质粒作为 DAstV-2 核酸标准品, 拷贝数为  $1 \times 10^7$  copies/ $\mu\text{L}$ , 由上海生工生物工程有限公司合成; 按文献 [8-12] 鉴定为阳性的 DAstV-2、鸭坦布苏病毒 (DTMUV)、鸭瘟病毒 (DEV)、鸭细小病毒 (DPV)、鸭圆环病毒 (DuCV)、鸭呼肠孤病毒 (DRV) 的核酸样本均由本实验室保存, 其中的 RNA 病毒核酸经逆转录为 cDNA 后备用。

### 1.2 主要试剂及仪器

病毒 RNA/DNA 提取试剂盒购自上海迈跟生物科技公司; RPA 扩增试剂盒、LFD 胶体金试纸购自安普未来 (常州) 生物科技公司; T7 高效 RNA 转录试剂盒、PCR 试剂盒、核酸内切酶、DNA 纯化试剂盒、RNA 纯化磁珠等购自上海碧云天生物科技有限公司; 用于 CRISPR/Cas12a 反应的 LbCas12a 蛋白、反应缓冲液和报告分子购自广州艾迪基因科技有限公司; PCR 仪购自 TaKaRa 公司; 恒温金属浴购自上海恒一公司。

### 1.3 RPA 扩增体系的建立与优化

按照 RPA 引物设计规则<sup>[13]</sup>, 选取 DAstV-2 的 ORF2 基因保守序列设计 RPA 扩增引物 (见表 1), 引物由上海生工生物公司合成。以 DAstV-2 重组质粒为模板, 用合成好的 RPA 引物对其进行扩增, 按照 RPA 核酸扩增试剂说明书配置扩增反应体系 (20  $\mu\text{L}$ ), 即: 2 $\times$ Reaction buffer 10  $\mu\text{L}$ , 4 $\times$ Core Mix 5  $\mu\text{L}$ , 上下游引物 (20  $\mu\text{mol/L}$ ) 各 0.5  $\mu\text{L}$ , DNA 模板 1  $\mu\text{L}$ , 10 $\times$ Starter 2  $\mu\text{L}$ , 无 RNA 酶水 1  $\mu\text{L}$ 。将反应体系置恒温金属浴中, 35~42 °C 下孵育 10~30 min。根据扩增结果, 对反应温度、时间和引物浓度进行优化, 确定特异性引物和最佳反应条件。

### 1.4 crRNA 的设计与体外转录

以 RPA 扩增产物基因序列为参考, 选择与 RPA 上下游引物序列均不重叠的 20 bp 作为 crRNA 的靶向序列。进一步通过体外转录产生 crRNA 单链, 其 DNA 序列为 20 bp T7 启动子序列 (TAATACGACTCACTATAGGG) +21 bp 与 LbCas12a 蛋白结合的锚定序列 (TAATTTCTACTAAGTGTAGAT) +20 bp 目的基因靶向序列的反向互补序列。在引物合成和 T7 启动子的作用下, 经过退火产生的双链 DNA 可以被 T7 RNA 聚合酶所识别并进行转录, 得到所需要的 crRNA (见表 2)。运用 RNA 纯化磁珠对获得的 crRNA 进行纯化, 检测合格后用于后续试验。

表1 RPA引物

名称	序列 (5'→3')	产物大小/bp
RPA-F1	AAATTCAAACCTCTCTTATGCTGCAGCGCCAC	244
RPA-R1	GAGCCATCGATTGTGCGCTGTTGTCTTCTTG	
RPA-F2	TAATGTGAACCAAAATTCAAACCTCTCTTATG	227
RPA-R2	TTGTGTGCTGCCATTATTGACATCGTAGTT	
RPA-F3	ATGAGGAACCTGCAAGACCAGTCTCGGGTGAT	191
RPA-R3	TTGGCGGGATTGAAAGAAAACCTCCACTATCTG	

表2 crRNA序列

名称	序列 (5'→3')
crRNA1	TAATACGACTCACTATAGGG+TAATTTCTACTAAGTGTAGAT+TGAGGAACCTGCAAGACCAG
crRNA2	TAATACGACTCACTATAGGG+TAATTTCTACTAAGTGTAGAT+AAAAGGTGCACTTCTCAGTG
crRNA3	TAATACGACTCACTATAGGG+TAATTTCTACTAAGTGTAGAT+AACTACGATGTCAATAATGG

### 1.5 CRISPR/Cas12a 反应体系的建立

为构建基于 CRISPR/Cas12a 系统的反应体系, 取反应缓冲液、LbCas12a 蛋白、crRNA、报告分子等按不同比例加入反应管, 配制成预混液, 即: 10× Reaction buffer 2 μL, DNA 报告分子 (4 μmol/L) 0.5 μL, LbCas12a 蛋白 (2 μmol/L) 4 μL, crRNA (100 μmol/L) 1 μL, 无 RNA 酶水 10.5 mL, 再加入 2 μL RPA 扩增产物作为靶标基因。同时设立阳性对照和阴性对照。将反应管置于金属浴恒温孵育适当时间。反应结束后, 取 10 μL 的反应产物用 40 μL ddH<sub>2</sub>O 稀释 5 倍, 将 LFD 胶体金试纸插入混匀的稀释液中, 5~10 min 读取检测结果。

如果检测体系中含有 DAstV-2 片段, 就会被 RPA 反应体系扩增放大, LbCas12a 蛋白与特定的 crRNA 结合并识别 RPA 扩增后的靶标 DNA, 进而非特异性地切割周围的单链 DNA。由于报告分子 DNA 单链两端分别标记了 5/6-羧基荧光素 (FAM) 和生物素 (Biotin), 若 DNA 报告分子被全部切断则其 FAM 端会流过 C 线到达 T 线被捕捉而显色; 当只有一部分 DNA 报告分子被切断时, C 和 T 线都会显色, 这两种情况都表明检测样本为 DAstV-2 阳性。若样本中无 DAstV-2, DNA 报告分子就不能被剪切, 其 Biotin 端会被拦截在 C 线上显色但 T 线不显色, 判定为阴性。

### 1.6 检测体系的灵敏性、重复性、特异性分析

用无 RNA 酶水将 DAstV-2 重组质粒进行 10 倍梯度稀释 (10<sup>7</sup>~10<sup>0</sup> copies/μL), 分别进行 RPA 扩增和 CRISPR/Cas12a 切割, LFD 胶体金试纸显示检测结果以确定最低检测限, 即灵敏性分析; 取同一拷贝数 DAstV-2 重组质粒, 运用所建立的 RPA-CRISPR/Cas12-LFD 反应体系进行检测, 观察检测结果的复

现性, 即重复性分析; 将 DTMUV、DEV、DPV、DuCV、DRV 等多种病毒核酸作为模版, 使用上述建立的 RPA-CRISPR/Cas12-LFD 检测反应体系进行检测, 验证该体系在检测 DAstV-2 时与其他病毒是否存在交叉反应, 即特异性分析。

### 1.7 检测体系的符合性分析

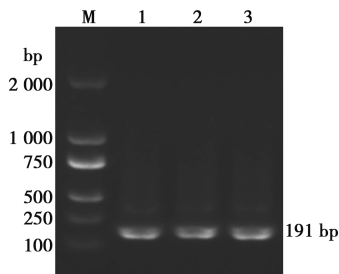
提取 15 份疑似 DAstV-2 感染鸭的肝脏 RNA 核酸样本, 并逆转录为 cDNA, 然后分别用本试验所建立的 RPA-CRISPR/Cas12-LFD 检测体系和常规 RT-PCR 方法进行检测, 比较二者的一致性, 即符合性分析。上述疑似病毒样品中 DAstV-2 的 RPA 扩增参照方法 1.3 所述的最优扩增体系进行。RT-PCR 检测参照文献 [14] 进行操作。先将提取的 15 份鸭肝脏 RNA 样本逆转录为 cDNA, 然后进行 PCR 扩增。PCR 扩增前, 以 DAstV-2 基因组的 CDS 区保守序列为依据, 设计用于 PCR 检测的上游引物 (5'-AAT-GTGCCCACTGCTGATCGT-3') 和下游引物 (5'-TTCGTTGCGCATGGTGTCTAG-3'), 引物由上海生工生物公司合成。PCR 扩增体系包括: 检测样本 cDNA 5 μL, 上下游引物各 2 μmol/L, 2× Mix 12.5 μL, ddH<sub>2</sub>O 5.5 μL。PCR 反应程序为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s、55 °C 退火 30 s、72 °C 延伸 30 s, 共 40 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保存。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 特异性 RPA 引物和 crRNA

以 DAstV-2 重组质粒作为核酸模板, 经 RPA 扩增后取产物进行琼脂糖凝胶电泳。以该 RPA 引物扩增出的目标片段为检测靶标, 经 CRISPR/Cas12a 切割反应和 LFD 胶体金试纸显色, 在设计 3 对 RPA

引物中，RPA-F3/R3 引物对特异性好，与之匹配的 crRNA1 剪切效果最佳；最佳 RPA 引物扩增的产物大小为 191 bp (图 1)，扩增条件为 37 °C 恒温，反应时长 15 min。根据试验结果，选择上述引物对和 crRNA 作为后续试验的材料。

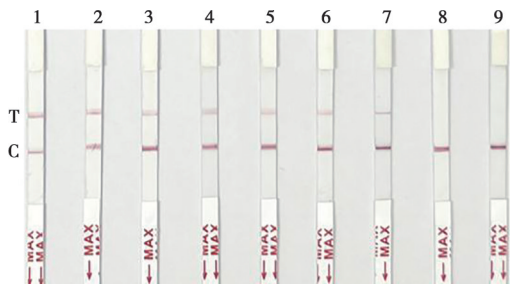


M. DNA 分子质量标准；1~3. RPA 扩增产物。

图 1 RPA 扩增结果

### 2.2 检测体系的灵敏性

用建立的 RPA-CRISPR/Cas12a-LDF 反应体系检测不同拷贝数的 DAstV-2 重组质粒，其中 T 表示检测线，C 表示质控线。结果显示 (图 2)，在质粒拷贝数为  $1.0 \times 10^1$  copies/ $\mu$ L 时，T 线仍为阳性；而以 ddH<sub>2</sub>O 为扩增模板的阴性对照组 T 线为阴性。以上结果表明，该检测体系最低检测限为  $1.0 \times 10^1$  copies/ $\mu$ L，灵敏性高。

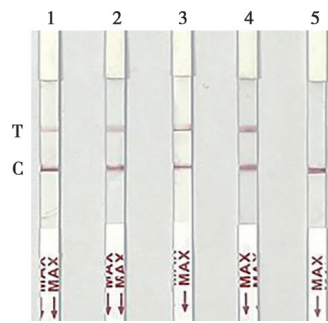


1~8.  $1.0 \times 10^7 \sim 1.0 \times 10^0$  copies/ $\mu$ L；9. 阴性对照。

图 2 RPA-CRISPR/Cas12a-LDF 检测体系的灵敏性

### 2.3 检测体系的重复性

以拷贝数为  $1.0 \times 10^1$  copies/ $\mu$ L 的 DAstV-2 重组质粒为模板，用所建立的 RPA-CRISPR/Cas12a-LDF 反应体系进行检测。结果显示 (图 3)，同一样本的 4 个重复试验的结果均为阳性，检测结果稳定，说明该检测体系具有很好的重复性。

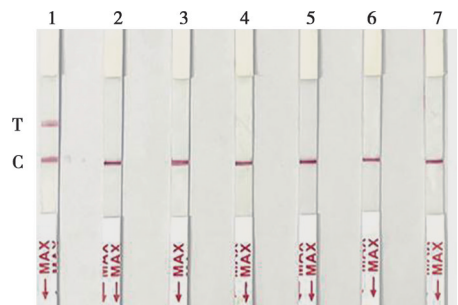


1~4. 4 个重复样本；5. 阴性对照。

图 3 RPA-CRISPR/Cas12a-LDF 检测体系的重复性

### 2.4 检测体系的特异性

为评估 RPA-CRISPR/Cas12a-LDF 反应体系检测 DAstV-2 的特异性，用该检测体系分别检测 DAstV-2、DTMUV、DEV、DPV、DuCV、DRV 等病毒核酸。经 RPA 扩增、CRISPR/Cas12a 切割和 LFD 胶体金试纸显示，仅可见 DAstV-2 核酸样本呈阳性，其余均为阴性 (图 4)。以上结果表明，该检测体系的特异性高，与鸭其他常见病原不存在交叉反应。

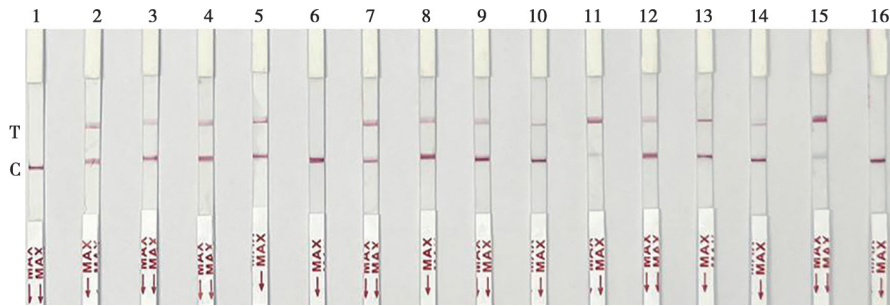


1~6. 分别为 DAstV-2、DTMUV、DEV、DPV、DuCV、DRV 核酸样本；7. 阴性对照。

图 4 RPA-CRISPR/Cas12a-LDF 检测体系的特异性

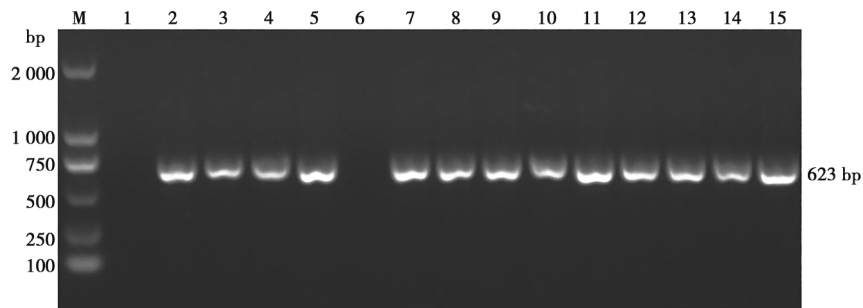
### 2.5 检测体系的符合性

用建立的 RPA-CRISPR/Cas12a-LDF 反应体系检测 15 份疑似 DAstV-2 感染鸭的肝脏核酸样本，并将其与普通 RT-PCR 检测结果进行对比。结果显示，RPA-CRISPR/Cas12a-LDF 反应体系检出样品中有 13 份呈阳性，2 份呈阴性 (图 5)；普通 RT-PCR 检测结果显示有 13 份样本呈阳性 (目的片段为 623 bp)，2 份呈阴性 (图 6)。两者检测结果相同，表明该检测体系与普通 RT-PCR 法检测结果的符合率达到 100%。



1~15. 疑似 DAstV-2 感染鸭肝脏核酸样本; 16. 阴性对照。

图 5 RPA-CRISPR/Cas12a-LFD 检测体系的符合性



M. DNA 分子质量标准; 1~15. 15 份鸭肝脏核酸扩增产物。

图 6 疑似 DAstV 感染鸭肝脏核酸 RT-PCR 扩增结果

### 3 讨论

当前可供选择的 DAstV 现场快速检测方法相对缺乏。电镜观察和免疫荧光技术都曾被用于 DAstV 的检测<sup>[15]</sup>，但因设备昂贵且特异性和灵敏度较低限制了其应用范围。ELISA 技术在病原临床快速检测中具有重要作用，遗憾的是，由于 DAstV 缺乏合适的体外培养体系及病毒自身特有的感染特点，目前缺乏适用于 DAstV-2 检测的商业化 ELISA 产品。基于分子生物学技术，研究人员根据 DAstV 基因组保守序列设计引物和探针，建立了 RT-PCR 和实时荧光定量 PCR 检测技术进行 DAstV 的实验室检测<sup>[16]</sup>，但这些技术对实验设备和条件要求较高，临床快速检测时存在不同程度的局限性。

在生物样本检测领域，POCT 技术以其快速、便利和成本低的优势脱颖而出，它不依赖专业实验室，无须借助昂贵的实验仪器就能快速得出结果<sup>[17]</sup>。RPA 或 LAMP 等快速扩增技术可以实现 37 °C 恒温条件下对核酸样本进行快速扩增，使得核酸检测变得更为简便<sup>[18]</sup>。近年来发现的 CRISPR/Cas 系统因其强大基因编辑能力被研究人员广泛应用于病原 POCT 体

系<sup>[19]</sup>，成为一种重要的核酸检测手段。LbCas12a，亦称 Cpf1，是一种由 RNA 引导的单链核酸内切酶。该酶在 crRNA 的引导下实现对含有 PAM 序列位点的靶标双链 DNA 进行特异性切割，即顺式切割；一旦激活了 LbCas12a 的顺式切割活性，该酶亦可以对任何单链 DNA 进行非特异性的反式切割<sup>[20]</sup>。当单链 DNA 被特异性标记为报告分子时，就可以将 LbCas12a 作为一种理想的生物传感器，实现对多种生物样品的检测和分析。本试验的 DNA 报告分子两端分别标记有 FAM 和 Biotin，当其被 LbCas12a 非特异性反向切割后，即可被 LFD 胶体金试纸捕获，从而实现了检测结果的可视化。

徐能劲<sup>[21]</sup>利用 CRISPR-Cas12a 技术但未结合任何核酸扩增方法检测猪圆环病毒 3 型 (PCV3)，结果显示其检测限仅为  $10^8$  copies/ $\mu$ L，明显不能满足临床检测需求。胡轻轻<sup>[22]</sup>利用 PCR 技术与 CRISPR/Cas12a 相结合检测伪狂犬病病毒 (PRV)，结果显示其对 PRV 的 TK 基因具有较高的灵敏性，检测下限为  $9 \times 10^1$  copies/ $\mu$ L，仅能够满足一般的猪场实验室检测要求，不适于临床快速大量检测。徐博文等<sup>[23]</sup>利用 RPA 对非洲猪瘟病毒核酸进行扩增，并用

CRISPR/Cas12a 进行核酸检测,该方法最小检测量接近 5.8 copies/ $\mu$ L,灵敏度远高普通 PCR 方法,这与本试验的研究结果类似。因此,在运用 CRISPR/Cas12a 技术检测病原核酸时,应首先采用高效率的核酸扩增方法将靶标基因进行扩增,再结合 CRISPR/Cas12a 系统的切割活性将检测信号放大,从而实现对标基因的高灵敏度检测。本研究将 RPA 核酸扩增、CRISPR/Cas12a 核酸切割、LFD 胶体金试纸显色报告等技术相结合,建立了一种基于 RPA-CRISPR/Cas12a-LFD 检测体系的核酸快速可视化检测方法,该方法不仅能够实现对 DAstV-2 核酸的准确快速检测,而且仅需肉眼判读检测结果,大大提高了鸭星状病毒病的现场诊断效率。

需要注意的是,在该方法中 RPA 引物的设计是关键技术之一<sup>[24]</sup>。目前尚没有针对 RPA 引物设计的特定程序,需要研究人员根据 RPA 引物设计原则设计多条引物进行验证,并根据扩增结果筛选相匹配的 crRNA。RPA 扩增时应选择合适的温度,如果在较低温度下延长反应时间,容易发生非特异性的扩增。在应用和储存过程中,LbCas12a 蛋白和 crRNA 容易发生降解;在检测过程中尽量减少反应管的开盖次数,避免因气溶胶污染造成假阳性风险。

## 参考文献:

- [1] 孙永林,刘乃芝,谷巍,等.鸭星状病毒研究进展[J].江西畜牧兽医杂志,2023(5):11-14.
- [2] LIU N, JIANG M, WANG M, et al. Isolation and detection of duck astrovirus CPH: implications for epidemiology and pathogenicity [J]. Avian Pathology, 2016, 45 (2): 221-227.
- [3] YUGO D M, HAUCK R, SHIVAPRASAD H L, et al. Hepatitis virus infections in poultry [J]. Avian Diseases, 2016, 60 (3): 576-588.
- [4] PICKAR O A, GERSBACH C A. The next generation of CRISPR-Cas technologies and applications [J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2019, 20 (8): 490-507.
- [5] PAUL B, MONTYA G. CRISPR-Cas12a: Functional overview and applications [J]. Journal of Biomedical Science, 2020, 43 (1): 8-17.
- [6] MAO X, XU M, LUO S, et al. Advancements in the synergy of isothermal amplification and CRISPR-Cas technologies for pathogen detection. [J]. Frontiers of Bioengineering and Biotechnology, 2023 (11): 1273988.
- [7] HUANG H L, LUO N J, CHEN W Z, et al. A highly specific and ultrasensitive approach to detect *Prymnesium parvum* based on RPA-CRISPR-LbaCas12a-LFD system. [J]. Analytica Chimica Acta, 2024 (1315): 342797.
- [8] LIU N, WANG F, SHI J, et al. Molecular characterization of a duck hepatitis virus 3-like astrovirus [J]. Veterinary Microbiology, 2014, 170 (1/2): 39-47.
- [9] 曲哲会,张喜文,鲁绍芳,等.鸭瘟病毒、鸭坦布苏病毒和鸭疫里默杆菌多重 PCR 检测方法的建立与初步应用 [J]. 中国兽医学报,2023,43(6):1175-1180.
- [10] 施少华,万春和,陈珍,等.鸭圆环病毒感染的检测 [J]. 中国家禽,2010,32(10):31-33
- [11] 高绪慧,吴海洋,孙吉谦,等.山东地区新型鸭呼肠孤病毒的分离与鉴定 [J]. 中国家禽,2018,40(20):61-63.
- [12] 鲜思美,文心田,都启晶,等.鹅细小病毒与番鸭细小病毒 PCR 鉴别诊断方法的建立 [J]. 山地农业生物学报,2009,28(3):235-239.
- [13] HIGGINS M, RAVENHALL M, WARD D, et al. PrimedRPA: primer design for recombinase polymerase amplification assays [J]. Bioinformatics, 2019, 35 (4): 682-684.
- [14] LI Y Q, CUI Y Q, LIU H, et al. Establishment of duplex SYBR green I-based real-time PCR assay for simultaneous detection of duck hepatitis a virus-1 and duck astrovirus-3 [J]. Avian Diseases, 2021, 65 (2): 281-286.
- [15] SHIMIZU M, SHIRAI J, NARITA M, et al. Cytopathic astrovirus isolated from porcine acute gastroenteritis in an established cell line derived from porcine embryonic kidney [J]. Journal of Clinical Microbiology, 1990, 28 (2): 201-206.
- [16] ZHANG R H, LAN J J, LI H E, et al. A novel method to rescue and culture duck Astrovirus type 1 in vitro [J]. Virology Journal, 2019, 16 (1): 112.
- [17] WILSON S, MARY K B, KHOSROW A, et al. POCT: an inherently ideal tool in pediatric laboratory medicine [J]. EJIFCC, 2021, 32 (2): 145-157.
- [18] SRIVASTAVA P, PRASAD D. Isothermal nucleic acid amplification and its uses in modern diagnostic technologies [J]. 3 Biotech, 2023, 13 (6): 200.
- [19] SIMRAN B, POOJA, SUDESH K Y. CRISPR-Cas for genome editing: classification, mechanism, designing and applications [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023 (238): 124054.
- [20] DAAN C S, MARTIN J. Cas9 versus Cas12a/Cpf1: structure-function comparisons and implications for genome editing [J]. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2018, 9 (5): e1481.
- [21] 徐能劲.基于 CRISPR/Cas 系统建立猪圆环病毒 III 型及流行性腹泻病毒的多重检测体系 [D]. 武汉:华中农业大学,2023.
- [22] 胡轻轻.利用 CRISPR/Cas12a 系统检测猪伪狂犬病毒相关基因的方法的建立 [D]. 武汉:华中农业大学,2022.
- [23] 徐博文,周傲白雪,林志达,等.非洲猪瘟病毒的 RPA-CRISPR-Cas12a 快速检测方法的建立 [J]. 黑龙江畜牧兽医,2023(14):86-90.
- [24] LIU X Q, YAN Q Y, HUANG J F, et al. Influence of design probe and sequence mismatches on the efficiency of fluorescent RPA [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2019, 35 (6): 95.