

戴丽红, 吴植, 朱善元. 基于 CRISPR/Cas12a 与重组酶扩增的非洲猪瘟病毒可视化检测技术 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (12): 124-129.

DAI L H, WU Z, ZHU S Y. Establishment of a recombinant enzyme amplification technique for visual detection of African swine fever virus based on CRISPR/Cas12a [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (12): 124-129.

## 基于 CRISPR/Cas12a 与重组酶扩增的非洲猪瘟病毒 可视化检测技术

戴丽红, 吴植, 朱善元\*

(江苏农牧科技职业学院, 江苏 泰州 225300)

**摘要:** 旨在建立一种快速、灵敏且特异性强的即时诊断 (point-of-care testing, POCT) 非洲猪瘟病毒 (ASFV) 的检测方法, 以满足现场快速诊断和监控的需求。本研究以 ASFV 的 CD2v 基因为靶点, 采用酶促重组酶扩增技术 (ERA) 实现核酸的恒温快速扩增, 并结合 CRISPR/Cas12a 系统对扩增产物进行特异性识别, 同时结合荧光报告分子, 构建了一种可视化快速检测体系。通过优化反应条件, 验证了该体系的灵敏度、特异性和稳定性。结果: 该检测体系在 37 °C 恒温条件下, 30 min 内即可完成检测, 灵敏度可达 10 copies/ $\mu$ L 病毒 DNA。特异性检测结果显示, 该体系未与伪狂犬病毒 (PRV) 等常见猪病病毒发生交叉反应, 且阳性样品可通过肉眼直观识别。此外, 该方法无需精密仪器和复杂操作, 检测周期显著短于传统方法。综上, 本研究建立的 ASFV 可视化快速检测体系具有快速、灵敏、特异性强和操作简便等特点, 在实验室条件下表现出良好性能, 为其在现场条件下的早期诊断和监测应用提供了技术储备和研究基础。

**关键词:** 非洲猪瘟病毒; 即时诊断; 酶促重组酶扩增技术; CRISPR/Cas12a; 侧向流试验

中图分类号: S858.28 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2025)12-0124-06

## Establishment of a recombinant enzyme amplification technique for visual detection of African swine fever virus based on CRISPR/Cas12a

DAI Lihong, WU Zhi, ZHU Shanyuan\*

(Jiangsu Agri-Animal Husbandry Vocational College, Taizhou 225300, China)

**Abstract:** This study was to establish a rapid, sensitive, and highly specific point-of-care testing (POCT) method for detecting African swine fever virus (ASFV), so as to meet the needs of on-site rapid diagnosis and monitoring. In here, the CD2v gene of ASFV was targeted, and a visual rapid detection system was established by combining enzyme-mediated recombinase amplification (ERA) for isothermal nucleic acid amplification with the CRISPR/Cas12a system for specific recognition of the amplification products, coupled with fluorescent reporter molecules. The results showed that the detection system could complete the detection within 30 minutes at a constant temperature of 37 °C, with a sensitivity of 10 copies/ $\mu$ L of viral DNA. The specificity tests demonstrated no cross-reactions with common swine viruses such as porcine pseudorabies virus (PRV), and the positive samples could be visually identified by the naked eye. Moreover, this method did not require sophisticated instruments or complex operations, and the detection cycle was significantly shorter than that of traditional methods. In conclusion, the established visual rapid-detection system for ASFV was rapid, sensitive, highly specific, and operationally simple; it performed reliably under laboratory conditions and offered a solid technological basis for future field deployment in early diagnosis and surveillance.

**Keywords:** African swine fever virus; POCT; ERA; CRISPR/Cas12a; lateral flow assay

非洲猪瘟 (African swine fever, ASF) 是一种由非洲猪瘟病毒 (ASFV) 感染引起的高致病性病毒性

传染病, 具有传播迅速、致病力强和致死率高的特点。世界动物卫生组织 (WOAH) 将其列为必须通报的动物疫病之一。2018 年, 我国首次暴发非洲猪瘟疫情, 给养猪产业造成了严重经济损失, 并对动物防疫体系提出了严峻挑战<sup>[1]</sup>。ASFV 的复杂基因组结构及其多样的基因型变异导致传统疫苗研制进展缓慢, 目前全球尚无可靠的商品化疫苗或有效治疗药物<sup>[2]</sup>。因此, 快速准确地对 ASFV 进行检测, 特别是

收稿日期: 2025-07-07; 修回日期: 2025-11-04

基金项目: 江苏省重点研发计划 (现代农业) 重点资助项目 (BE2020407); 泰州市科技支撑计划 (农业) 资助项目 (TN202001)

第一作者: 戴丽红, 女, 本科, 实验师

\* 通信作者: 朱善元, 教授, 主要从事兽用生物药物方面的研究, E-mail: jstzsy@126.com。

实现现场条件下的快速诊断与监控,成为 ASF 防控措施中的重要一环<sup>[3]</sup>。虽然实时荧光定量 PCR (qPCR) 和酶联免疫吸附试验 (ELISA) 等传统检测方法已广泛应用于 ASFV 的实验室诊断,但这些方法往往需要复杂昂贵的仪器和熟练的专业操作人员,无法满足疫情暴发时基层现场对快速、简便检测技术的迫切需求。近年来,等温扩增技术如环介导等温扩增技术 (LAMP)、重组酶聚合酶扩增 (RPA) 和酶促重组等温扩增技术 (ERA) 等,由于其无需热循环仪、恒温扩增高效快速的特点,在 ASF 现场诊断领域得到了广泛关注<sup>[4-5]</sup>。

近年来,CRISPR/Cas12a 系统因其特异性高、灵敏度强和易于与可视化检测手段结合等特点,在即时诊断 (POCT) 领域展现出巨大潜力<sup>[6-7]</sup>。与传统 PCR 检测需要昂贵设备和复杂操作不同,基于 CRISPR/Cas12a 的检测体系仅需简单恒温条件即可实现核酸靶序列的高效扩增与特异识别,通过非特异性核酸酶活性产生荧光信号,从而在极短时间内以肉眼或简单设备读取检测结果<sup>[8]</sup>。目前,CRISPR/Cas12a 技术已广泛应用于人类医学和动物疾病的现场快速诊断中<sup>[9-11]</sup>,在猪圆环病毒病等动物疫病诊断中,Cas12a 检测同样表现出优于传统检测方法的现场适应性和准确性<sup>[7]</sup>。此外,通过与侧向流动试纸 (LFA) 技术相结合,CRISPR/Cas12a 系统进一步简化了检测操作过程,扩大了应用范围,使非专业人员也能在缺乏实验室条件的环境下顺利完成检测<sup>[12-14]</sup>。这种“扩增-识别-信号输出”一体化检测模式极大推动了现场诊断技术的发展,提升了疫情的早期预警能力和应急响应速度。

CD2v 基因 (EP402R) 编码 ASFV 的 CD2v 蛋白,该蛋白是 ASFV 囊膜糖蛋白,与 ASFV 的毒力、免疫调节和红细胞吸附相关<sup>[15]</sup>。选择 CD2v 作为靶标的主要原因是其在 ASFV 诊断和疫苗开发中的特殊

作用,尤其是在区分野生型病毒株和基因缺失型疫苗株 (缺失 CD2v 的减毒株)。CD2v 是 ASFV 的重要毒力基因,许多减毒疫苗候选株通过删除该基因来降低病毒毒力 (EP402R 缺失株)<sup>[16]</sup>。在检测中,将 CD2v 与保守基因结合使用,可以准确区分野生型 ASFV (含有 CD2v) 和缺失型疫苗株 (无 CD2v),这对疫苗免疫后监测感染至关重要,避免假阳性。该优势在多重 PCR 方法中特别突出,能实现单次检测中的株型鉴别。本研究拟利用 CD2v 基因作为目标靶基因,结合 ERA 与 CRISPR/Cas12a 系统,建立一种 ASFV 核酸的快速可视化现场检测新方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 引物和 crRNA 设计与筛选

5 株 ASFV 参考毒株 (MK128995.1、MN393476.1、MW656282.1、MZ945536.1、MZ945537.1) 下载于美国国家生物技术信息中心 (NCBI)。伪狂犬病毒 Bartha 株 (PRV-Bartha) 购自中国兽医药品检查所,猪瘟病毒 (CSFV)、猪细小病毒 (PPV)、猪流行性腹泻病毒 (PEDV)、猪圆环病毒 2 型 (PCV-2) 及猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) 由本实验室分离保存。基于 ASFV CD2v 基因的保守区域设计 crRNA。从 NCBI 数据库中获取在中国分离的 ASFV I 型与 II 型毒株的完整基因组序列,提取其 CD2v 基因序列。由于 LbCas12a 蛋白识别的 PAM 序列为 TTN,因此在 CD2v 基因序列中搜索含有 TTN 的位点,并在其下游选取 20 个核苷酸作为 crRNA 靶向序列。使用 Cas-designer 软件设计多条候选 crRNA 序列。根据已确定的 crRNA 靶向序列,使用 Snapgene 软件在 CD2v 基因的 crRNA 结合位点上下游区域设计 ERA 扩增引物 (表 1)。所有引物和 crRNA 由北京擎科生物科技有限公司合成。

表 1 用于检测 CD2v 基因的引物对及 crRNA

引物	序列 (5'→3')	长度/bp
CD2v-F	ACACTAGCTACATGTGGAAGAAGCAGGTAA	29
CD2v-R	GGAGTAGCAGGTGTTAATAATTTTATTGTATAA	33
CD2v-crRNA	UAAUUCUACUAAGUGUAGAUAUACAACAUUCAAGUAGUA	41

### 1.2 ssDNA 荧光报告分子设计

基于 LbCas12a 的切割特性设计了 2 种 ssDNA 报告分子:荧光报告分子为 5'-FAM-TTTTTTTT-BHQ1-3',由金斯瑞生物科技公司合成,该分子两端分别携带 FAM 荧光基团和 BHQ1 淬灭基团,当 ssDNA 被

Cas12a 切割后,荧光基团与淬灭基团分离,可在特定波长光源下产生荧光信号;侧向流检测报告分子为 5'-FAM-TTATT-biotin-3',由广州艾迪基因科技有限责任公司合成,该分子一端为 FAM 荧光基团,另一端为生物素标记,用于侧向流试纸条检测。

### 1.3 阳性质粒构建与提取

将含有 CD2v 靶基因的 pUC57 载体转化至 DH5 $\alpha$  感受态细胞中。具体步骤如下：从 -80  $^{\circ}\text{C}$  取出 DH5 $\alpha$  感受态细胞于冰上解冻，加入 1  $\mu\text{L}$  pUC57-CD2v 质粒，冰上静置 30 min；42  $^{\circ}\text{C}$  热激 90 s 后立即置于冰上 3 min；加入 200  $\mu\text{L}$  无抗性 LB 培养基，37  $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 振荡孵育 15 min；取 100  $\mu\text{L}$  菌液涂布于含抗性的 LB 琼脂平板上，37  $^{\circ}\text{C}$  过夜培养。次日挑取单个菌落接种至 10 mL 含抗性的 LB 液体培养基中，37  $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 振荡培养 12 h。培养结束后，按照质粒提取试剂盒（天根生化科技）说明书提取质粒，使用 NanoDrop 分光光度计测定质粒浓度后于 4  $^{\circ}\text{C}$  保存。

### 1.4 ERA 反应与引物和 crRNA 筛选

ERA 反应系统（总体积 48  $\mu\text{L}$ ）：20  $\mu\text{L}$  溶解剂、2.5  $\mu\text{L}$  正向引物（10  $\mu\text{mol/L}$ ）、2.5  $\mu\text{L}$  反向引物（10  $\mu\text{mol/L}$ ）、10  $\mu\text{L}$  阳性质粒模板（或待测样品）和 13  $\mu\text{L}$  ddH $_2\text{O}$ 。具体操作步骤如下：将 ERA 扩增试剂室温平衡 10 min，按照上述配比制备反应体系，混匀并短暂离心；然后每个反应管加入 2  $\mu\text{L}$  激活剂，盖紧管盖，混匀后快速离心，37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 20 min 后取出反应管，准备下游试验。

将 ERA 扩增产物加入 Cas12a 反应体系（总体积 30  $\mu\text{L}$ ），包含：3  $\mu\text{L}$  Cleavage buffer、1  $\mu\text{L}$  LbCas12a 蛋白（30 nmol/L）、2  $\mu\text{L}$  crRNA（1  $\mu\text{L/L}$ ）、6  $\mu\text{L}$  荧光素报告分子、10  $\mu\text{L}$  ERA 扩增产物和 8  $\mu\text{L}$  ddH $_2\text{O}$ 。设置试验组和阴性对照组，阴性对照组用 DEPC 水替代阳性质粒。将反应体系置于 PCR 仪中，37  $^{\circ}\text{C}$  反应 30 min。反应结束后在蓝光凝胶成像仪下观察荧光强度，从候选 crRNA 中筛选出荧光信号最强的 crRNA 用于后续试验。

### 1.5 荧光法灵敏度测定

根据提取质粒的浓度，将阳性质粒进行 10 倍梯度稀释，制备  $10^0 \sim 10^6$  copies/ $\mu\text{L}$  的梯度样品，分别取 10  $\mu\text{L}$  进行 ERA 扩增和 Cas12a 切割反应。同时设置阴性对照组。在 qPCR 仪中进行检测，37  $^{\circ}\text{C}$  反应 30 min，每 30 秒记录一次荧光值。反应结束后于蓝光凝胶成像仪下观察荧光强度，确定检测方法的最低检测限。

### 1.6 荧光法特异性测定

取 PRV-Bartha、PPV、PEDV、CSFV、PCV-2

及 PRRSV 作为特异性测试样品。对于 RNA 病毒，先进行逆转录反应。将各病毒 DNA 或 cDNA 样品按照上述方法进行 ERA 扩增和 Cas12a 切割反应，并设置阴性对照组。通过 qPCR 仪在 37  $^{\circ}\text{C}$  监测荧光信号变化，判断该检测方法是否与其他常见猪病病毒存在交叉反应。

### 1.7 可视化检测方法

将 CRISPR/Cas12a 切割反应采用侧向流试纸条法进行可视化检测。对于侧向流检测，使用生物素标记的 ssDNA（5'-FAM-TTATT-biotin-3'）报告分子作为 Cas12a 的非特异切割底物。试纸条检测线（T 线）包被 FAM 抗体，控制线（C 线）包被生物素结合蛋白；胶体金颗粒包被抗 FAM 抗体，用于捕获 Cas12a 反应中产生的带 FAM 标记的片段。Cas12a 反应结束后，将试纸条垂直插入反应体系中，于室温下孵育 10 min 后观察结果。依据试纸条显色情况判定检测结果：仅 C 线显色为阴性，T 线和 C 线同时显色为阳性。侧向流检测灵敏度和特异性测定方法与荧光法相同，分别使用  $10^0 \sim 10^6$  copies/ $\mu\text{L}$  的梯度样品和各种猪病毒样品进行测试，检测的最低检测限（LOD）定义为在 3 次重复试验中至少 2 次能得到阳性结果的最低浓度。

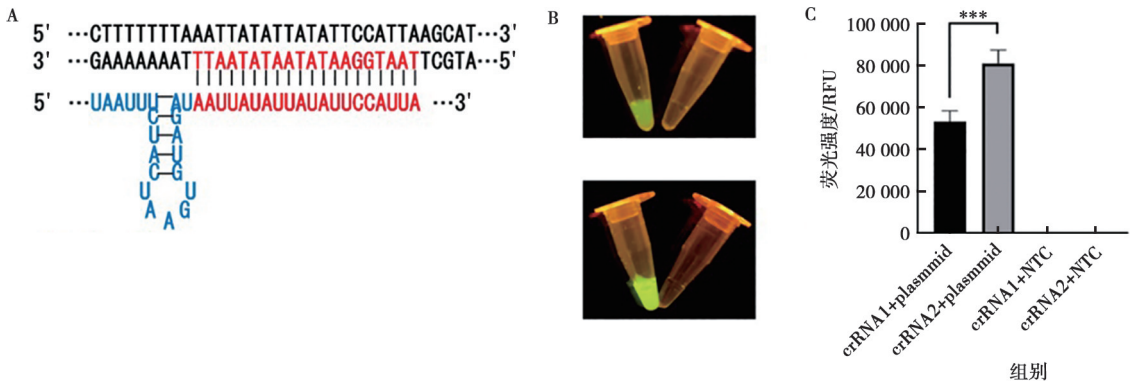
## 2 结果

### 2.1 crRNA 设计与筛选

以 5 株 ASFV 分离株为参考毒株（MK128995.1、MN393476.1、MW656282.1、MZ945536.1、MZ945537.1）。由图 1 可知，2 种 crRNA 均能使阳性样品产生肉眼可见的荧光信号，而阴性对照无荧光产生。对比 2 种 crRNA 的切割效率，crRNA2 的荧光强度明显高于 crRNA1，因此选择 crRNA2 用于后续试验。

### 2.2 荧光法敏感性及其特异性检测

由图 2 可知，荧光强度随核酸浓度递减，反应体系中能检测到 CD2v 基因的检测下限为 100 copies/ $\mu\text{L}$ ；在蓝光条件下，只有 CD2v 阳性组出现了明显的荧光信号，其余样品均无荧光产生，且荧光定量 PCR 仪未检测到荧光信号，表明该检测方法与其他常见猪病病毒无交叉反应，在所测试的 6 种猪病病毒中未发现交叉反应，显示特异性良好。



A. crRNA 与靶 DNA 序列的互补结合示意，红色为靶序列，蓝色为 crRNA 配对区域；B. 反应后体系荧光可视化，显示不同 crRNA 的特异性识别效果；C. 荧光强度检测。\*\*\* 表示  $P < 0.001$ 。

图 1 ERA-CRISPR/Cas12a 法筛选 ASFV CD2v 基因引物和 crRNA

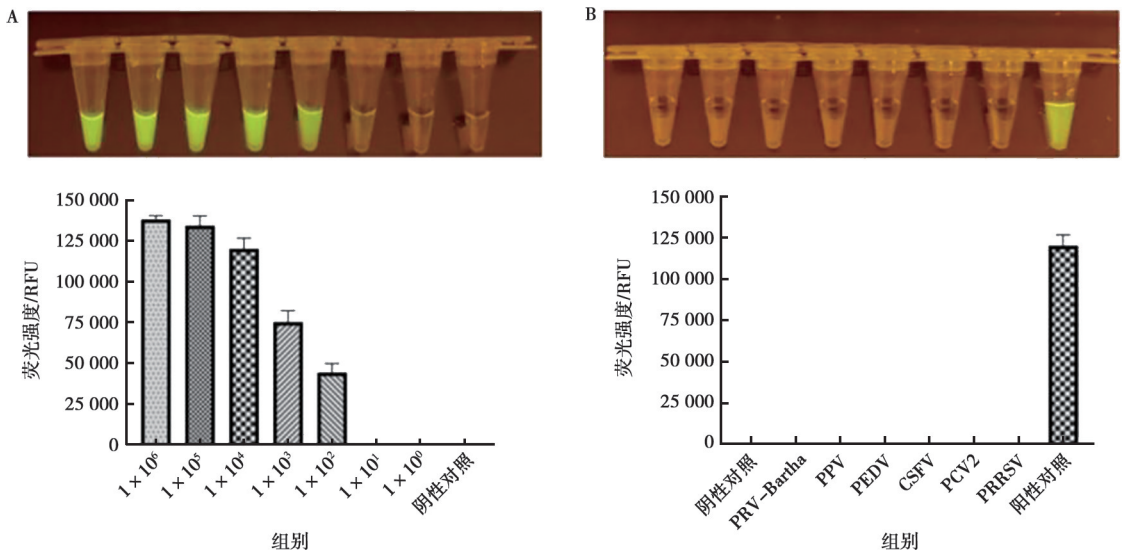


图 2 ERA-CRISPR/Cas12a 荧光法检测 ASFV CD2v 基因的敏感性 (A) 和特异性 (B)

### 2.3 侧向流法敏感性及特异性检测

由图 3 可知，所有试纸条均出现控制线，且测试线颜色随核酸拷贝数递减而变浅。CD2v 基因侧向流检测的最低检测限为 100 copies/ $\mu\text{L}$ ；仅有 CD2v 阳性检测组同时出现了测试线和控制线，其他样品 PRV-Bartha、PEDV、CSFV、PCV-2、PRRSV 和 DEPC 水（阴性对照）只显示控制线，表明该检测方法与其他猪病病毒无交叉反应，展现出良好的特异性。

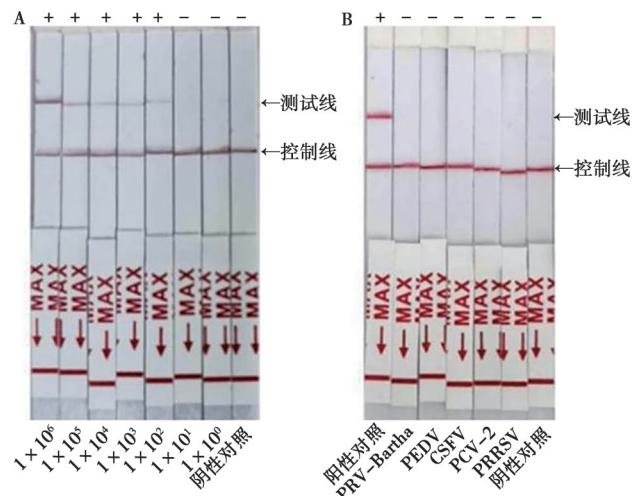


图 3 ERA-CRISPR/Cas12a 侧向流法检测 ASFV CD2v 基因的敏感性 (A) 及特异性 (B)

### 3 讨论

本研究构建了基于 ERA-CRISPR/Cas12a 系统的非洲猪瘟病毒 CD2v 基因检测方法, 与现有的传统 PCR 和 qPCR 方法相比, 本研究所提出的 ERA-CRISPR/Cas12a 检测体系不仅具有相当的灵敏度, 还避免了高成本的设备需求, 使其在资源受限的环境中尤为适用。研究的 ERA-CRISPR/Cas12a 系统在试剂设计和反应条件的优化方面表现出较高的灵敏度和信噪比。从技术原理的角度分析, crRNA 在触发 Cas12a 活性时, 靶序列的二级结构和 PAM 序列的匹配是决定切割效率的关键因素<sup>[17-18]</sup>。研究观察到, 某些 crRNA 靶向位点的 PAM 序列 (TTTV) 更适合 Cas12a 的识别, 且能高效激活 Cas12a 的切割活性, 这与文献 [19] 中的研究结果一致。通过进一步优化 crRNA 设计和反应条件, 可以提高检测的灵敏度和特异性。本研究采用稀释的 CD2v 阳性质粒作为阳性样品进行了检测方法的灵敏性评价, 这能够有效反映检测体系对靶标核酸的检出能力。由于 ASFV 属于高危的动物传染病病原, 其相关试验需要在 P3 级实验室内进行操作, 且本研究室目前尚不具备农业农村部颁发的 ASFV 病毒操作资质。因此, 未能在实际病毒样本中进行体系验证是本研究的局限之一。未来如具备合规条件, 将结合 ASFV 临床样本和灭活病毒核酸, 系统评估该方法在真实样品中的检出效率和抗干扰能力, 以进一步提升结论的可靠性和说服力, 以完善体系的科学性与应用转化价值。

目前已有多项研究报道了基于 CRISPR/Cas12a 的 ASFV 检测方法, 所选靶标多集中于 p72 (B646L)、p17 (D117L)、S273R、E183L、K205R、C962R 等结构或功能基因, 并常结合 RPA 或 RAA 等扩增方式实现高灵敏度检测<sup>[20-22]</sup>。这些方法在灵敏度和特异性方面表现突出, 但靶标基因多为经典的结构蛋白或复制相关基因。相比之下, 本研究首次将 ASFV 的 CD2v 基因作为基于 CRISPR/Cas12a 的可视化检测靶标, 该基因在病毒复制和宿主免疫逃逸中发挥重要作用, 且在流行株中相对保守。同时, 本研究通过对 crRNA 的系统筛选与优化, 提高了检测体系的信噪比和灵敏度, 性能可与已有方法相当甚至更优。

在敏感性方面, 本研究建立的方法检测限为 10 copies/ $\mu$ L, 与 King 等<sup>[23]</sup>建立的 TaqMan PCR 方法和 Fernández-Pinero 等<sup>[24]</sup>开发的通用探针库实时 PCR 方法相当, 但优于 Gallardo 等<sup>[25]</sup>报道的常规 PCR 方法 (10<sup>3</sup> copies) 和 James 等<sup>[26]</sup>的环介导等温扩增方法。特异性测试显示, 本方法对 ASFV 以外的多种猪

病病毒 (如 CSFV、PRV、PRRSV、PEDV 等) 均未产生交叉反应, 证明该检测方法具备较高的特异性, 能够区分 ASFV 与其他常见猪病病原, 表明本方法能够准确识别含有 ASFV CD2v 基因的样本, 而其他病毒核酸则未引发 Cas12a 介导的荧光信号或试纸条反应。由此可见, 本检测系统在实际应用中具有较强的特异性, 能够有效避免假阳性结果的产生。

ERA 技术与 CRISPR/Cas12a 结合能够显著提高检测的灵敏度和特异性。ERA 技术通过在 37 °C 下进行等温扩增, 能够在短时间内扩增目标基因片段, 为 Cas12a 的后续识别提供足够的靶标。与传统的 PCR 方法相比, ERA-CRISPR/Cas12a 系统具有更简单的操作流程和更短的反应时间, 更适合现场检测。针对 ASFV CD2v 基因筛选的 crRNA 显示出明显的检测信号差异, 这与目标基因的序列结构、PAM 序列的选择以及 crRNA 的设计密切相关。本研究选择的 CD2v 基因在 ASFV 感染过程中发挥重要作用, 使其成为可靠的分子靶标。

综上, 基于 ERA-CRISPR/Cas12a 的 ASFV CD2v 基因检测方法, 在灵敏度、特异性和便携性方面具备显著优势, 具有广阔的应用前景。该方法不仅为 ASFV 的快速检测提供了一种新的技术手段, 还为实际应用中的现场检测和疫情防控提供了有力的支持。

### 参考文献:

- [1] GE S, LI J, FAN X, et al. Molecular characterization of African swine fever virus, China, 2018 [J]. *Emerg Infect Dis*, 2018, 24 (11): 2131-2133.
- [2] DUAN X, RU Y, YANG W, et al. Research progress on the proteins involved in African swine fever virus infection and replication [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 947180.
- [3] LI Z, WEI J, DI D, et al. Rapid and accurate detection of African swine fever virus by DNA endonuclease-targeted CRISPR trans reporter assay [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2020, 52 (12): 1413-1419.
- [4] QIAN J, BOSWELL S A, CHIDLEY C, et al. An enhanced isothermal amplification assay for viral detection [J]. *Nat Commun*, 2020, 11 (1): 5920.
- [5] LI J, MACDONALD J, VON STETTEN F. Review: a comprehensive summary of a decade development of the recombinase polymerase amplification [J]. *Analyst*, 2019, 144 (1): 31-67.
- [6] ZAVVAR T S, KHOSHBIN Z, RAMEZANI M, et al. CRISPR/Cas-engineered technology: innovative approach for biosensor development [J]. *Biosens Bioelectron*, 2022, 214: 114501.
- [7] KOSTYUSHEVA A, BREZGIN S, BABIN Y, et al. CRISPR-Cas systems for diagnosing infectious diseases [J]. *Methods*, 2022, 203: 431-446.
- [8] LIU P F, ZHAO K R, LIU Z J, et al. Cas12a-based electrochemiluminescence biosensor for target amplification-free DNA detection

- [J]. *Biosens Bioelectron*, 2021, 176: 112954.
- [9] WAN X, CHEN J, WU Y, et al. Rapid and sensitive diagnosis of leber hereditary optic neuropathy variants using CRISPR/Cas12a detection [J]. *J Mol Diagn*, 2023, 25 (8): 540-554.
- [10] LIANG L, WANG D, GAO Z, et al. RAA-CRISPR/Cas12a-mediated rapid, sensitive, and onsite detection of Newcastle disease in pigeons [J]. *Vet Sci*, 2024, 11 (10). DOI: 10.3390/vetsci11100473.
- [11] WANG Q, QIN M, COLEMAN J J, et al. Rapid and sensitive detection of *Verticillium dahliae* from complex samples using CRISPR/Cas12a technology combined with RPA [J]. *Plant Dis*, 2023, 107 (6): 1664-1669.
- [12] KHAMBHATI K, BHATTACHARJEE G, SINGH V. Current progress in CRISPR-based diagnostic platforms [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120 (3): 2721-2725.
- [13] SU G, ZHU M, LI D, et al. Multiplexed lateral flow assay integrated with orthogonal CRISPR-Cas system for SARS-CoV-2 detection [J]. *Sens Actuat B Chem*, 2022, 371: 132537.
- [14] LIU G, WANG X, SU X, et al. The development potential of AuNPs-based lateral flow technology combined with other advanced technologies in POCT [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2025, 197 (5): 2867-2886.
- [15] ZHANG M, LV L, LUO H, et al. The CD2v protein of African swine fever virus inhibits macrophage migration and inflammatory cytokines expression by downregulating EGR1 expression through dampening ERK1/2 activity [J]. *Vet Res*, 2023, 54 (1): 106.
- [16] YANG J, ZHU R, LI N, et al. Protection evaluation of a new attenuated ASFV by deletion of the L60L and CD2v genes against homologous challenge [J]. *Viruses*, 2024, 16 (9). DOI: 10.3390/v16091464.
- [17] 杨丽华, 许力士, 覃绍敏, 等. 基于 RT-RAA-CRISPR/Cas12a 的猪肠病毒 G 型检测方法建立及检测效果初步评价 [J/OL]. *中国动物传染病学报*, 2024 [2024-08-14]. <https://link.cnki.net/doi/10.19958/j.cnki.cn31-2031/s.20240813.002>.
- [18] 热则古丽·艾科拜尔, 秦刚, 陈俊贞, 等. 基于 RAA-CRISPR/Cas12a 建立牛肠道病毒的可视化快速检测方法与初步应用 [J/OL]. *中国动物传染病学报*, 2024 [2024-09-09]. <https://link.cnki.net/doi/10.19958/j.cnki.cn31-2031/s.20240906.001>.
- [19] 李朝阳, 胡文阳, 党梦, 等. 非洲猪瘟病毒 RAA-CRISPR/Lb-Cas12a 检测方法的建立与初步应用 [J]. *中国兽医科学*, 2022, 52 (12): 1475-1481.
- [20] HAN H, ZHANG D, HAO W, et al. Parallel and visual detections of ASFV by CRISPR-Cas12a and CRISPR-Cas13a systems targeting the viral S273R gene [J]. *Animals*, 2025, 15 (13): 1902.
- [21] CAO S, MA D, XIE J, et al. Point-of-care testing diagnosis of African swine fever virus by targeting multiple genes with enzymatic recombinase amplification and CRISPR/Cas12a System [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2024, 14: 1474825.
- [22] 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, 137-139.
- [23] KING D P, REID S M, HUTCHINGS G H, et al. Development of a TaqMan<sup>®</sup> PCR assay with internal amplification control for the detection of African swine fever virus [J]. *J Virol Meth*, 2003, 107 (1): 53-61.
- [24] FERNÁNDEZ-PINERO J, GALLARDO C, ELIZALDE M, et al. Molecular diagnosis of African swine fever by a new real-time PCR using universal probe library [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2013, 60 (1): 48-58.
- [25] GALLARDO C, FERNÁNDEZ-PINERO J, ARIAS M. African swine fever (ASF) diagnosis, an essential tool in the epidemiological investigation [J]. *Virus Res*, 2019, 271: 197676.
- [26] JAMES H E, EBERT K, MCGONIGLE R, et al. Detection of African swine fever virus by loop-mediated isothermal amplification [J]. *J Virol Meth*, 2010, 164 (1/2): 68-74.