

引文格式: 殷冬冬, 郭浩, 兰梦蝶, 等. 重组酶辅助扩增结合 CRISPR/Cas13a 检测禽腺病毒 4 型方法的建立[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2023, 38(5): 803–807. DOI: [10.12101/j.issn.1004-390X\(n\).202211058](https://doi.org/10.12101/j.issn.1004-390X(n).202211058)

重组酶辅助扩增结合 CRISPR/Cas13a 检测禽腺病毒 4 型方法的建立*

殷冬冬^{1,2}, 郭浩³, 兰梦蝶⁴, 尹磊^{1,2}, 王洁茹^{1,2}, 沈学怀^{1,2}, 戴银^{1,2}, 潘孝成^{1,2**}

(1. 安徽省农业科学院 畜牧兽医研究所, 安徽省畜禽疫病研究中心, 安徽 合肥 230001; 2. 畜禽产品安全工程
安徽省重点实验室, 安徽 合肥 230001; 3. 肥西县农业农村局动物卫生监督所, 安徽 合肥 231200;
4. 宁国市动物卫生监督所, 安徽 宁国 242300)

摘要:【目的】建立高效、灵敏、特异的禽腺病毒 4 型 (fowl adenovirus serotype 4, FAdV-4) 检测方法。【方法】将重组酶辅助扩增技术 (recombinase aided amplification, RAA) 与规律间隔性成簇短回文重复序列相关 Cas13a 蛋白 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats associated protein 13a, CRISPR-Cas13a) 技术相结合, 针对 FAdV-4 *Hexon* 基因保守区设计 RAA 引物及 CRISPR RNA (crRNA), 利用 RAA 技术扩增样本核酸, 并进行 CRISPR-Cas13a 荧光检测, 以 qPCR 为对照方法, 评价所建立方法的灵敏度、特异性以及 qPCR 法的一致性。【结果】本研究所建立的方法反应过程均在 37 °C 恒温条件下完成, 反应体系可检测的最低扩增拷贝数为 10¹ copies/μL, 灵敏度高, 且与 FAdV-1、FAdV-7、FAdV-8b、FAdV-9、FAdV-10、鸡传染性喉气管炎病毒、传染性法氏囊病毒、传染性支气管炎病毒、禽流感 H9 亚型疫苗和新城疫病毒等禽病原核酸检测无交叉反应。该方法检测 30 份临床样本与 qPCR 检测的阳性检出率一致。【结论】建立的 RAA-Cas13a 方法检测 FAdV-4 具有简便、灵敏、特异等特点, 可用于 FAdV-4 的快速检测和流行病学监测。

关键词: 禽腺病毒 4 型; CRISPR/Cas13a; 重组酶辅助扩增; 检测

中图分类号: S852.657 文献标志码: A 文章编号: 1004-390X (2023) 05-0803-05

Detection of Fowl Adenovirus Serotype 4 by Recombinase Aided Amplification Combined with CRISPR/Cas13a

YIN Dongdong^{1,2}, GUO Hao³, LAN Mengdie⁴, YIN Lei^{1,2}, WANG Jieru^{1,2},
SHEN Xuehuai^{1,2}, DAI Yin^{1,2}, PAN Xiaocheng^{1,2}

(1. Livestock and Poultry Epidemic Diseases Research Center of Anhui Province, Institute of Animal Husbandry and Veterinary Science, Anhui Academy of Agricultural Science, Hefei 230001, China; 2. Anhui Provincial Key Laboratory of Livestock and Poultry Product Safety Engineering, Hefei 230001, China; 3. Animal Health Supervision Institute of Agriculture and Rural Bureau of Feixi County, Hefei 231200, China; 4. Animal Health Supervision Institute of Ningguo City, Ningguo 242300, China)

Abstract: [Purpose] To establish an efficient, sensitive and specific detection method for fowl adenovirus serotype 4 (FAdV-4). [Methods] Recombinase aided amplification (RAA) was used in

收稿日期: 2022-11-28 修回日期: 2023-09-05 网络首发日期: 2023-10-07

*基金项目: 安徽省科技重大专项 (202003a06020012); 安徽省重点研究与开发计划 (202204c06020039); 财政部和农业农村部现代农业产业技术体系 (CARS-40)。

作者简介: 殷冬冬 (1990—), 男, 安徽滁州人, 博士, 助理研究员, 主要从事畜禽传染病防控研究。

E-mail: yindd160@163.com

**通信作者 Corresponding author: 潘孝成 (1971—), 男, 安徽霍邱人, 博士, 副研究员, 主要从事畜禽病原微生物致病机制研究。E-mail: pxcpyq@sina.com

网络首发地址: <https://link.cnki.net/urlid/53.1044.S.20230927.1731.002>



combination with the clustered regularly interspaced short palindromic repeats associated protein 13a (CRISPR-Cas13a) to design RAA primers and CRISPR RNA (crRNA) targeting the conserved region of the FAdV-4 *Hexon* gene. The RAA technology was employed to amplify the sample nucleic acid, followed by CRISPR-Cas13a fluorescence detection. The established method was evaluated for sensitivity, specificity, and consistency compared to the qPCR control method. [Results] The method established in this study was performed at 37 °C with a minimum amplification copy number of 10¹ copies/μL, it was sensitive and had no cross-reactivity with avian-derived pathogens such as FAdV-1, FAdV-7, FAdV-8b, FAdV-9, FAdV-10, avian infectious laryngotracheitis virus, infectious bursal disease virus, infectious bronchitis virus, avian influenza subtype H9, newcastle disease virus. The detection rate of 30 clinical samples by this method was consistent with that of qPCR.

[Conclusion] The RAA-Cas13a method is simple, sensitive and specific for the detection of FAdV-4, and can be used for rapid detection and epidemiological surveillance of FAdV-4.

Keywords: fowl adenovirus serotype 4; CRISPR/Cas13a; recombinase aided amplification; detection

禽腺病毒 4 型 (fowl adenovirus serotype 4, FAdV-4) 属于腺病毒科 (Adenoviridae) 禽腺病毒属 (*Aviadenovirus*), 是一种无囊膜的双链 DNA 病毒, 基因组全长约 45 kb。禽腺病毒根据限制性内切酶消化模式分为 A~E 5 种基因型, 通过血清交叉中和试验又可分为 12 种血清型 (FAdV-1~FAdV-11, 其中 FAdV-8 分为 a、b 两型)^[1-2]。FAdV-4 主要感染 3~6 周龄肉鸡, 也会感染鸭、鹅等禽类, 主要引起心包积水—肝炎综合征 (hydropericardium hepatitis syndrome, HHS), 临床剖检可见心包腔内有大量草黄色积液, 肝脏肿大, 多灶性坏死^[3-5]。2015 年以来, 中国安徽、山东和河南等多个省份暴发疫情, 给中国养禽业造成巨大损失^[6-8]。针对 FAdV-4 导致的 HHS, 目前尚无有效疫苗和特效药物。因此, 建立灵敏、准确、便捷的特异性检测方法对预防 FAdV-4 感染具有重要意义。

目前, 已有多种检测 FAdV-4 的方法, 如病原分离、PCR、荧光定量 PCR 及环介导等温扩增等方法, 但这些方法操作繁琐, 耗时长, 工作量较大^[9-11], 因此, 需要一种新的技术解决上述问题。研究发现: 规律间隔性成簇短回文重复序列相关 Cas13a 蛋白 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats associated protein 13a, CRISPR/Cas13a) 在特异性 crRNA 的引导下切割目标 RNA 后, 其附属切割活性被激活, 可高效切割体系中的非特异单链 RNA^[12-13]。基于这一原理, 通过设计两端标记荧光基团的 RNA 探针可使 CRISPR/Cas13 对 RNA 模板的检测和信号放大, 实现对目标分子的特异性检测。重组酶辅助

扩增 (recombinase aided amplification, RAA) 技术是一种恒温快速扩增核酸的技术^[14-15], 在 37~42 °C 等温条件下可短时间内对模板进行指数级扩增。常规 RAA 需要琼脂糖凝胶电泳, 结果判读复杂, 因此, 本研究将 CRISPR/Cas13a 与 RAA 相结合, 建立操作简单、特异性强、灵敏度高的 FAdV-4 检测方法, 以期为 HHS 的防控提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 毒株与临床样本

FAdV-4 AH-F19 株 (登录号: MN781666)^[16] 和阳性质控品 pMD19-T-Hexon 质粒由安徽省农业科学院畜牧兽医研究所保存。鸡传染性喉气管炎病毒 (avian infectious laryngotracheitis virus, ILTV)、传染性法氏囊病毒 (infectious bursal disease virus, IBDV) 和传染性支气管炎病毒 (infectious bronchitis virus, IBV) 均由安徽省农业科学院畜牧兽医研究所保存。禽流感 H9 亚型 (avian influenza subtype H9, AIV-H9) 疫苗和新城疫病毒 (newcastle disease virus, NDV) 灭活疫苗购自山东绿都生物科技有限公司。FAdV-1、FAdV-7、FAdV-8b、FAdV-9 和 FAdV-10 由扬州大学叶建强教授馈赠。30 份疑似 FAdV-4 感染鸡只病料来自安徽省畜禽疫病研究中心。

1.2 主要试剂

病毒基因组 DNA/RNA 提取试剂盒购自天根生化科技 (北京) 有限公司; LwCas13a 和 RAA 核酸检测试剂盒购自安徽微分基因科技有限公司;

HiScribe T7 RNA 合成试剂盒、T7 RNA 聚合酶和 RNase inhibitor 购自 NEB 公司; Nucaway™离心柱购自 Invitrogen 公司; RNAXP 磁珠购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; pMD19-T 载体购自宝生物工程(大连)有限公司; DH5 α 感受态细胞购自北京全式金生物有限公司。

1.3 RAA 引物设计

根据 GenBank 公布的 FAdV-4 AH-F19 株序列, 参照 RAA 引物设计原则设计 *Hexon* 基因特异性 RAA 引物, 上游引物 (FAdV-4-F): GAAATTAA-TACGACTCACTATAGGGGTGCTCGGTCGCTT-CGCCAAGTCTCAGTA; 下游引物 (FAdV-4-R):

CCTCGGGAGGCGGCACGACTATGGTATCT。引物由通用生物(安徽)股份有限公司合成。

1.4 crRNA 的制备

根据 Cas13a 蛋白 crRNA 识别靶序列的特性, 即目标区域 3'末端的侧翼序列不能含有碱基序列 G, 在 FAdV-4 的 *Hexon* 基因序列上设计 3 对特异性的 crRNA 引物 (crRNA1~crRNA 3) (表 1)。这些引物的上、下游为互补序列, 故分别进行双链 DNA 合成, 作为 crRNA 的模板。参照 HiScribe T7 RNA 合成试剂盒说明书将双链 DNA 片段进行体外转录, 转录产物 (crRNA 探针) 利用 RNAXP 磁珠进行纯化, 即可获得 crRNA。

表 1 FAdV-4 crRNA 引物序列

Tab. 1 Primer sequences of FAdV-4 crRNA

引物名称 primer name	引物序列 (5'→3') primer sequences
crRNA1-F	GATTTAGACTACCCCAAAAACGAAGGGGACAAAACATCCATGATCCAGTAGGGGGTCTGCGTG
crRNA1-R	CACGCAGACCCCTACTGGATCATGGATGTTTTGTCCCTTCGTTTTTGGGGTAGTCTAAATC
crRNA2-F	GATTTAGACTACCCCAAAAACGAAGGGGACTAAAACCCACGTTTCATGCCCCAACGCTCCGAGTT
crRNA2-R	AACTCGGAGCGTTCGGGCATGAACGTGGGTTTTAGTCCCTTCGTTTTTGGGGTAGTCTAAATC
crRNA3-F	GATTTAGACTACCCCAAAAACGAAGGGGACTAAAACGCTGACCGCAGAGCGGGTACGGCCAGTT
crRNA3-R	AACTGGCCGTACCCGCTCTGCGGTCAGCGTTTTAGTCCCTTCGTTTTTGGGGTAGTCTAAATC

1.5 RAA-Cas13a 检测反应

参照 RAA 核酸检测试剂盒说明书配制反应体系 (50 μ L): 预混液 25 μ L, MgOAc 3 μ L, 10 μ mol/L RAA 上、下游引物各 2 μ L, 待检样本 cDNA 或 DNA 1 μ L, 用 RNase free ddH₂O 补足体系。将反应体系振荡离心, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, 制备 RAA 产物。CRISPR/Cas13a 检测体系: Lw-Cas13a 核酸酶 1.00 μ L, crRNA 2.00 μ L, FT-RNA 报告分子 1.00 μ L, 5U/ μ L RNase inhibitor 0.25 μ L, dNTPs 1.00 μ L, T7 聚合酶 0.40 μ L, RAA 扩增产物 1.00 μ L, 用检测缓冲液补足至 10.00 μ L。将检测体系混匀后置于荧光定量 PCR 仪中 37 $^{\circ}$ C 反应 40 min, 并收集荧光信号。

1.6 crRNA 的筛选

以 pMD19-T-Hexon 为模板, 采用 1.5 节的检测方法分别对 3 组 crRNA 进行筛选, 通过扩增曲线的荧光值及起峰时间选择最优的 FAdV-4-crRNA 引物组。

1.7 FAdV-4 RAA-Cas13a 检测方法的灵敏度试验

将 pMD19-T-Hexon 标准质粒稀释为 $1.0 \times 10^8 \sim 1.0 \times 10^0$ copies/ μ L 等 9 个梯度。采用 1.5 节的检测

方法, 以稀释后的各梯度阳性质粒为模板, 同时设置空载体作为阴性对照, 通过扩增曲线确定检测方法的灵敏度, 每组进行 3 次重复。

1.8 FAdV-4 RAA-Cas13a 检测方法的特异性试验

选取 ILTV、IBDV、IBV、AIV-H9、NDV、FAdV-1、FAdV-7、FAdV-8b、FAdV-9 和 FAdV-10 等病毒作为特异性检测对象, 参照病毒基因组 DNA/RNA 提取试剂盒说明书提取上述病毒的核酸。采用 1.5 节的方法进行检测, 同时以空载体作为阴性对照, 分析该检测方法的特异性。

1.9 临床样本检测

2018—2022 年, 在安徽部分地区临床收集了 30 份疑似 FAdV-4 感染的鸡肝肾组织样本, 分别用本研究建立的 RAA-Cas13a 检测法和 qPCR 检测法^[17]进行检测, 并对结果进行比较。

2 结果与分析

2.1 crRNA 的筛选结果

由图 1 可知: 与其他 2 组相比, crRNA-3 组的荧光值最高且起峰时间最短, 故选用 crRNA-3 进行后续试验。

2.2 灵敏度评价

由图 2 可知: 反应 5 min 时即可检测到 1.0×10^1 copies/ μL 的信号, 表明 RAA-Cas13a 检测法的检测下限为 10^1 copies/ μL 。

2.3 特异性评价

由图 3 可知: 仅 FAdV-4 出现扩增曲线, IL-

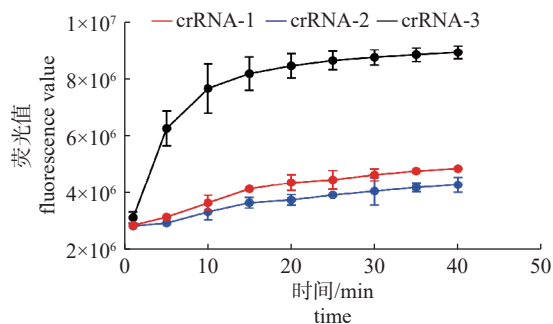


图 1 FAdV-4 crRNA 筛选结果

Fig. 1 Screening results of FAdV-4 crRNA

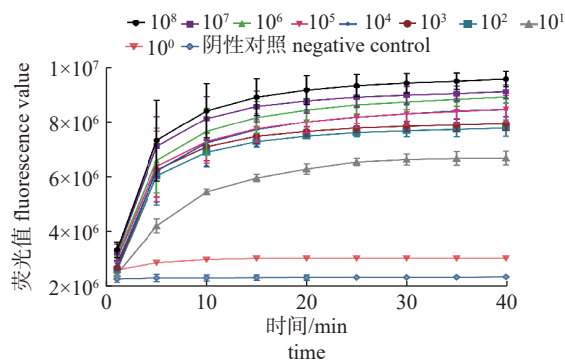
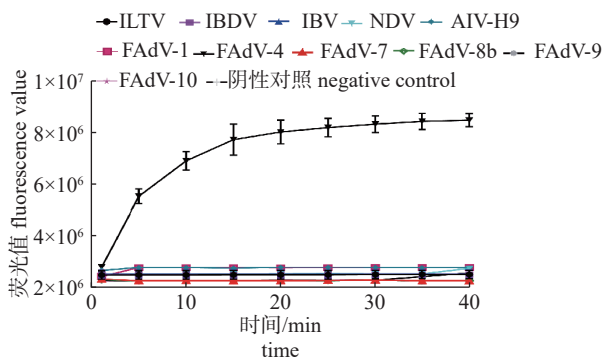


图 2 RAA-Cas13a 灵敏度试验结果

Fig. 2 Sensitivity detection results of RAA-Cas13a



注: ILTV. 鸡传染性喉气管炎病毒; IBDV. 传染性法氏囊病毒; IBV. 传染性支气管炎病毒; NDV. 新城疫病毒; AIV-H9. 禽流感 H9 亚型; FAdV. 禽腺病毒。

Note: ILTV. avian infectious laryngotracheitis virus; IBDV. infectious bursal disease virus; IBV. infectious bronchitis virus; NDV. newcastle disease virus; AIV-H9. avian influenza subtype H9; FAdV. fowl adenovirus.

图 3 RAA-Cas13a 特异性试验结果

Fig. 3 Specificity detection results of RAA-Cas13a

TV、IBDV、IBV、AIV-H9、NDV、FAdV-1、FAdV-7、FAdV-8b、FAdV-9 和 FAdV-10 以及阴性对照均无检测信号, 表明本研究建立的方法能特异性扩增检测 FAdV-4 中的靶序列, 而不与其他病毒核酸发生交叉反应, 即本检测方法特异性强。

2.4 临床样本检测效果评价

RAA-Cas13a 方法与 qPCR 方法对临床上采集的 30 份样品的检测结果一致, 均为阳性样本 20 份, 阴性样本 10 份。

3 讨论

自 1987 年巴基斯坦安卡拉首次暴发 FAdV-4 以来, 该病毒现已传播到亚洲、美洲和欧洲等 60 多个国家和地区, 给家禽业造成重大的经济损失。2015 年后, FAdV-4 开始在中国迅速蔓延, 由于缺乏有效的疫苗和治疗方法, FAdV-4 的控制策略在很大程度上依赖于对感染家禽的检测, 因此, 快速、准确诊断和尽早处理是防控 FAdV-4 流行的重要手段。目前, FAdV-4 的核酸检测方法主要是普通 PCR 和实时定量 PCR。尽管这些技术已被广泛应用于检测疾病, 但需要在专业实验室进行, 不能满足养殖单位现场快速检测的需求, 而临床快速检测需要便携、操作相对简单的检测方法。RAA 在病原快速检测领域有明显优势, 能在恒定温度下实现特定 DNA 或 RNA 的快速扩增, 并且具有反应温度低的特点。因此, 在检验检疫、食品安全以及体外诊断等领域广泛应用。CRISPR/Cas13a 系统可在恒温条件下特异性切割目标 RNA, 并附带非特异性切割活性, 可将检测信号催化放大, 使其具有高灵敏度、高特异性的特点。因此, 本研究采用 RAA 技术结合 CRISPR/Cas13a 检测系统的全部反应都可在 1 台便携的恒温荧光检测仪中完成, 能够在保证灵敏度和特异性的同时有效解决检测中的难题。

RAA-Cas13a 方法的检测下限为 10^1 copies/ μL , 比传统 PCR 灵敏 1000 倍, 比 qPCR 灵敏 10 倍^[18]。YUAN 等^[19]开发的 FAdV-4 LAMP 实时浊度检测法的检测下限为 75 copies/ μL ; 万文妍等^[20]建立的 RPA-LFD 检测方法对 FAdV-4 的最低检测限为 10^2 copies/ μL , 因此, 本研究建立的 RAA-Cas13a 方法更灵敏。同时, 该检测方法与其他 10 种禽类病毒无交叉反应, 证明其具有良好的特异性, 这在临床检测中具有十分重要的意义。为验证本检测方法在临床诊断中的可靠性, 对经 qPCR 验

证的 20 个阳性样本和 10 个阴性样本进行分析,其检测结果与 qPCR 的符合率为 100%,表明 RAA-Cas13a 检测法可用于 FAdV-4 的现场诊断。目前,RAA-Cas13a 检测法已经广泛应用于体外诊断领域,如金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、志贺氏菌、霍乱弧菌、肠出血性大肠杆菌和坦布苏病毒等病原检测^[21-23]。需要注意的是,RAA 引物和 crRNA 的设计决定了 CRISPR/Cas13a 侧流检测的灵敏度和特异性,因此通常设计多对引物以筛选最佳组合。

综上所述,本研究建立的检测 FAdV-4 的 RAA-Cas13a 检测法具有特异性强、灵敏度高、对实验室设备要求不高等优势,后续若将免核酸提取技术融入到该方法中,将有望应用于基层单位和现场使用的快速检测。

4 结论

本研究将 RAA 技术与 CRISPR/Cas13a 系统结合,建立一种检测 FAdV-4 的新方法,具有简单快速、特异性强、灵敏度高、对实验室设备要求不高等优点,可为 FAdV-4 的早期诊断提供技术支持。

[参考文献]

- [1] KIM M S, LIM T H, LEE D H, et al. An inactivated oil-emulsion fowl adenovirus serotype 4 vaccine provides broad cross-protection against various serotypes of fowl adenovirus[J]. *Vaccine*, 2014, 32(28): 3564. DOI: 10.1016/j.vaccine.2014.03.015.
- [2] HESS M. Detection and differentiation of avian adenoviruses: a review[J]. *Avian Pathology*, 2000, 29(3): 195. DOI: 10.1080/03079450050045440.
- [3] WEI Z P, LIU H, DIAO Y J, et al. Pathogenicity of fowl adenovirus (FAdV) serotype 4 strain SDJN in Taizhou geese[J]. *Avian Pathology*, 2019, 48(5): 477. DOI: 10.1080/03079457.2019.1625305.
- [4] ZHAO J, ZHONG Q H, ZHAO Y, et al. Pathogenicity and complete genome characterization of fowl adenoviruses isolated from chickens associated with inclusion body hepatitis and hydropericardium syndrome in China[J]. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0133073. DOI: 10.1371/journal.pone.0133073.
- [5] LI R, LI G, LIN J, et al. Fowl adenovirus serotype 4 SD0828 infections causes high mortality rate and cytokine levels in specific pathogen-free chickens compared to ducks[J]. *Frontiers in Immunology*, 2018, 9: 49. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00049.
- [6] ZHANG H W, JIN W J, DING K, et al. Genetic characterization of fowl adenovirus strains isolated from poultry in China[J]. *Avian Diseases*, 2017, 61(3): 341. DOI: 10.1637/11621-030817-RegR.
- [7] XIA J, YAO K C, LIU Y Y, et al. Isolation and molecular characterization of prevalent fowl adenovirus strains in southwestern China during 2015-2016 for the development of a control strategy[J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2017, 6(11): e103. DOI: 10.1038/emi.2017.91.
- [8] NIU Y, SUN Q, ZHANG G, et al. Epidemiological investigation of outbreaks of fowl adenovirus infections in commercial chickens in China[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2018, 65(1): e121. DOI: 10.1111/tbed.12691.
- [9] LI P H, ZHENG P P, ZHANG T F, et al. Fowl adenovirus serotype 4: epidemiology, pathogenesis, diagnostic detection, and vaccine strategies[J]. *Poultry Science*, 2017, 96(8): 2630. DOI: 10.3382/ps/pex087.
- [10] SCHACHNER A, MATOS M, GRAFL B, et al. Fowl adenovirus-induced diseases and strategies for their control: a review on the current global situation[J]. *Avian Pathology*, 2018, 47(2): 111. DOI: 10.1080/03079457.2017.1385724.
- [11] WANG J C, WANG J F, CHEN P, et al. Development of a TaqMan-based real-time PCR assay for rapid and specific detection of fowl avian adenovirus serotype 4[J]. *Avian Pathology*, 2017, 46(3): 338. DOI: 10.1080/03079457.2016.1278428.
- [12] KELLNER M J, KOOB J G, GOOTENBERG J S, et al. SHERLOCK: nucleic acid detection with CRISPR nucleases[J]. *Nature Protocols*, 2019, 14(10): 2986. DOI: 10.1038/s41596-019-0210-2.
- [13] LI Y, LI S Y, WANG J, et al. CRISPR/Cas systems towards next-generation biosensing[J]. *Trends in Biotechnology*, 2019, 37(7): 730. DOI: 10.1016/j.tibtech.2018.12.005.
- [14] LI J, MACDONALD J, VON STETTEN F. Review: a comprehensive summary of a decade development of the recombinase polymerase amplification[J]. *The Analyst*, 2019, 144(1): 31. DOI: 10.1039/c8an01621f.
- [15] PIEPENBURG O, WILLIAMS C H, STEMPEL D L, et al. DNA detection using recombination proteins[J]. *PLoS Biology*, 2006, 4(7): e204. DOI: 10.1371/journal.pbio.0040204.
- [16] YIN D D, XUE M, YANG K K, et al. Molecular characterization and pathogenicity of highly pathogenic fowl adenovirus serotype 4 isolated from laying flock with hydropericardium-hepatitis syndrome[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2020, 147: 104381. DOI: 10.1016/j.micpath.2020.104381.
- [17] WANG K, SUN H W, LI Y Z, et al. Characterization and pathogenicity of fowl adenovirus serotype 4 isolated from eastern China[J]. *BMC Veterinary Research*, 2019, 15(1): 373. DOI: 10.1186/s12917-019-2092-5.
- [18] ZHAI X W, MEI X R, WU X, et al. A loop-mediated isothermal amplification coupling with a lateral flow dipstick for rapid and specific detection of fowl adenovirus serotype-4[J]. *Journal of Virological Methods*, 2019, 270: 79. DOI: 10.1016/j.jviromet.2019.04.026.
- [19] YUAN X Y, WANG Y L, MENG K, et al. LAMP real-time turbidity detection for fowl adenovirus[J]. *BMC Veterinary Research*, 2019, 15(1): 256. DOI: 10.1186/s12917-019-2015-5.
- [20] 万文妍, 刘延珂, 吴艳阳, 等. 禽腺病毒血清 4 型 RPA-LFD 快速检测方法的建立[J]. *中国兽医学报*, 2019, 39(1): 41. DOI: 10.16303/j.cnki.1005-4545.2019.01.08.
- [21] 苏璇, 葛以跃, 张倩, 等. CRISPR-Cas13a 辅助 RAA 快速检测金黄色葡萄球菌的研究[J]. *中国病原生物学杂志*, 2020, 15(3): 253. DOI: 10.13350/j.cjpb.200302.
- [22] 安柏霖, 苏璇, 郭悦, 等. 重组酶介导的等温扩增技术联合 CRISPR-Cas13a 快速检测 4 种腹泻病原菌[J]. *中国食品卫生杂志*, 2023, 35(3): 381. DOI: 10.13590/j.cjfh.2023.03.010.
- [23] YIN D D, YIN L, WANG J R, et al. Visual detection of duck tembusu virus with CRISPR/Cas13: a sensitive and specific point-of-care detection[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2022, 12: 848365. DOI: 10.3389/fcimb.2022.848365.

责任编辑: 何馨成