北京林业大学学报
JOURNAL OF BEIJING FORESTRY UNIVERSITY

基于RAA-CRISPR/Cas12a-LFD的杜英疫病菌可视化检测技术的建立

黄灿 吴浩雨 熊典广 黄华毅 田呈明

Establishment of RAA-CRISPR/Cas12a-LFD-based visual detection technology of *Pseudocryphonectria elaeocarpicola*

Huang Can, Wu Haoyu, Xiong Dianguang, Huang Huayi, Tian Chengming

引用本文:
黄灿, 吴浩雨, 熊典广, 黄华毅, 田呈明. 基于RAA-CRISPR/Cas12a-LFD的杜英疫病菌可视化检测技术的建立[J]. 北京林业大学学报, 2025, 47(4):10-20. doi: 10.12171/j.1000-1522.20240341
Huang Can, Wu Haoyu, Xiong Dianguang, Huang Huayi, Tian Chengming. Establishment of RAA-CRISPR/Cas12a-LFD-based visual detection technology of *Pseudocryphonectria elaeocarpicola*[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2025, 47(4):10-20. doi: 10.12171/j.1000-1522.20240341

在线阅读 View online: https://doi.org/10.12171/j.1000-1522.20240341

您可能感兴趣的其他文章
Articles you may be interested in

基于深度学习的城市滨河绿道景观视觉感知评价研究
Research on visual perception evaluation of urban riverside greenway landscape based on deep learning
北京林业大学学报, 2021, 43(12): 93-104. https://doi.org/10.12171/j.1000-1522.20210175

榫卯智能化加工代码生成系统的开发
Development of intelligent programming system for numerical controlled mortise and tenon joint
北京林业大学学报, 2019, 41(3): 134-142. https://doi.org/10.13332/j.1000-1522.20180414

基于视频区域动态特征的林火烟雾检测技术研究
Research on forest fire smoke detection technology based on video region dynamic features
北京林业大学学报, 2021, 43(1): 10-19. https://doi.org/10.12171/j.1000-1522.20200049

基于阻抗仪和ERT技术的红松内部腐朽定量检测
Quantitative characterization of decay detection in standing trees of Korean pine based on Resistograph and ERT
北京林业大学学报, 2017, 39(9): 102-111. https://doi.org/10.13332/j.1000-1522.20170196

基于分数阶微分视频融合的森林烟火检测算法
A forest fire smoke detection algorithm based on fractional-calculus video fusion
北京林业大学学报, 2017, 39(3): 24-31. https://doi.org/10.13332/j.1000-1522.20160163

百合转*P5CS*-F129A基因的遗传稳定性和耐旱性检测
Inheritance stability and drought stress test for *P5CS*-F129A transgenic lily
北京林业大学学报, 2018, 40(2): 98-105. https://doi.org/10.13332/j.1000-1522.20170379

DOI:10.12171/j.1000−1522.20240341

基于 RAA-CRISPR/Cas12a-LFD 的杜英疫病菌可视化检测技术的建立

黄 灿[1] 吴浩雨[1] 熊典广[1] 黄华毅[2] 田呈明[1]
（1. 北京林业大学林学院，北京 100083；2. 广东省林业科学研究院，广东 广州 510520）

摘要:【目的】由杜英生假隐丛赤壳菌引起的杜英疫病是杜英属植物上新发现的一种危害严重的枝干病害。目前，该病的研究仍处于起步阶段，尚缺乏有效的防控措施。本文旨在建立一种快速、可视化的杜英疫病菌检测方法，为该病害的早期监测和预警提供重要技术支持。**【方法】**以杜英疫病菌 *PsGti*1 基因为靶标，采用重组酶辅助扩增（RAA）反应特异性扩增靶标基因，并利用 CRISPR/Cas12a 体系切割靶标和荧光探针，最后利用侧向流试纸条（LFD）实现杜英疫病菌的可视化检测。**【结果】**（1）筛选获得针对杜英疫病菌 *PsGti*1 基因 RAA 扩增反应的最优引物对。（2）当 Cas12a 与 CrRNA 浓度配比分别为 1 μmol/L 和 0.125 μmol/L 时 CRISPR/Cas12a 切割反应体系的效果最好。（3）建立了基于 RAA-CRISPR/Cas12a-LFD 的可视化检测体系，在 37℃ 恒温反应条件下可快速检测杜英疫病菌，检测灵敏度为 50 fg/μL（以 gDNA 为模板）和 20 pg/μL（以 PsGti1_T-vector 为模板）。**【结论】**本研究建立的杜英疫病菌 RAA-CRISPR/Cas12a-LFD 检测体系具有反应温度易达到、高特异性、高灵敏度和易操作等优点，适合在野外或缺乏实验室检测设备的场景下进行杜英疫病菌的检测。

关键词：杜英疫病菌；重组酶辅助扩增（RAA）；CRISPR/Cas12a；侧向流试纸条（LFD）；可视化检测
中图分类号：S763.1 **文献标志码：**A **文章编号：**1000−1522(2025)04−0010−11
引文格式：黄灿，吴浩雨，熊典广，等. 基于 RAA-CRISPR/Cas12a-LFD 的杜英疫病菌可视化检测技术的建立 [J]. 北京林业大学学报，2025，47(4)：10−20. Huang Can, Wu Haoyu, Xiong Dianguang, et al. Establishment of RAA-CRISPR/Cas12a-LFD-based visual detection technology of *Pseudocryphonectria elaeocarpicola*[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2025, 47(4): 10−20.

Establishment of RAA-CRISPR/Cas12a-LFD-based visual detection technology of *Pseudocryphonectria elaeocarpicola*

Huang Can[1] Wu Haoyu[1] Xiong Dianguang[1] Huang Huayi[2] Tian Chengming[1]
(1. School of Forestry, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China;
2. Guangdong Academy of Forestry, Guangzhou 510520, Guangdong, China)

Abstract: [**Objective**] *Elaeocarpus* spp. stem blight is a newly discovered branch disease on *Elaeocarpus* spp. caused by *Pseudocryphonectria elaeocarpicola*, for which research is still in its infancy and lacks effective prevention and control measures. This paper aims to establish a rapid and visualized method for the detection of *P. elaeocarpicola*, which provides an important technical support for the early monitoring and early warning of the disease. [**Method**] In this study, we utilized *PsGti*1 gene of *P. elaeocarpicola* as a target, specifically amplified the target gene by recombinase aided amplification (RAA) reaction, and cut the target and fluorescent probe by CRISPR/Cas12a system, and finally visualized the detection of *P. elaeocarpicola* by lateral flow dipstick (LFD). [**Result**] (1) In this study, the optimal primer pairs for the

收稿日期: 2024−10−16 **修回日期:** 2025−01−21
基金项目: 广东省林业科技创新项目 (2020KJCX004、2023KJCX022)。
第一作者: 黄灿。主要研究方向：林木病理学。Email: huangc0121@163.com 地址：100083 北京市海淀区清华东路 35 号北京林业大学林学院。
责任作者: 熊典广，博士，副教授。主要研究方向：林木病理学。Email: xiongdianguang@126.com 地址：同上。
本刊网址: http://j.bjfu.edu.cn; http://journal.bjfu.edu.cn

RAA amplification reaction of *PsGti*1 gene of *P. elaeocarpicola* were screened and obtained. (2) The CRISPR/Cas12a reaction system worked best when Cas12a and CrRNA concentration ratios were 1 and 0.125 μmol/L, respectively. (3) A RAA-CRISPR/Cas12a-LFD visualization detection system was established, which can realize the rapid detection of *P. elaeocarpicola* under the reaction condition of constant temperature at 37 ℃, and the sensitivity of detection was 50 fg/μL (gDNA as template) and 20 pg/μL (PsGti1_T-vector as template), respectively. [**Conclusion**] The RAA-CRISPR/Cas12a-LFD detection system for *P. elaeocarpicola* established in this study has the advantages of easy-to-reach reaction temperature, high specificity, high sensitivity and ease of operation, which makes it suitable for carrying out the detection of *P. elaeocarpicola* in the field or in scenarios lacking laboratory testing equipment.

Key words: *Pseudocryphonectria elaeocarpicola*; recombinase-aided amplification (RAA); CRISPR/Cas12a; lateral flow dipstick (LFD); visual detection

杜英疫病是杜英属(*Elaeocarpus*)植物上新发现的一种危害严重的枝干病害，能引起枝干腐烂和溃疡，严重时可造成整株枯死，极大地威胁了杜英属植物健康。Huang 等[1]通过柯赫氏法则分析发现，杜英疫病的病原菌为杜英生假隐丛赤壳菌(*Pseudocryphonectria elaeocarpicola*)(简称：杜英疫病菌)，其属于隐丛赤壳科(Cryphonectriaceae)的新属新种真菌。隐丛赤壳科包含多种引起木本植物枯萎或溃疡的病原真菌[2−3]，例如栗疫病菌曾造成了北美大规模栗树(*Castanea* spp.)减产及死亡[4]。近年来，杜英疫病在广东地区的尖叶杜英(*Elaeocarpus apiculatus*)和水石榕(*Elaeocarpus hainanensis*)等植物上严重发生，广州市部分地区的感染率达到 80% 以上，枯死率达到 15.38% ~ 62.50%，造成了严重的生态、景观和经济损失[1]。由于对杜英疫病及其病原菌的研究仍处于起步阶段，尚缺乏有效的防治技术[5]。目前的防控措施主要依赖常规的真菌病害管理办法，如刮除病组织、剪除病枝及喷施化学药剂等。然而，当寄主植物表现出了明显的受害症状时，防控效果通常较差。杜英疫病菌的鉴定主要依赖显微形态学观察和基于 PCR 扩增的 ITS、LSU、*tef*1 和 *rpb*2 基因片段联用的分子系统学分析，但这些方法依赖于实验室的仪器设备及条件，步骤繁琐且耗时长。因此，建立一种快速、准确、高灵敏度的杜英疫病菌检测技术，对于杜英疫病的监测、预警及病害防控具有重要意义。

目前，常用的病原菌检测方法多基于实验室内的 PCR 扩增技术[6]，为改良传统 PCR 技术，核酸序列依赖性扩增检测(nuclear acid sequence-based amplification，NASBA)及重组酶辅助扩增(recombinase aided amplification，RAA)等技术已被逐渐研究和完善[7]。新兴的 RAA 技术和基于 CRISPR/Cas12a 体系的核酸检测技术，为病原菌的快速检测提供了新的思路，甚至在林间条件下也能完成对病原菌的现场检测。RAA 技术利用重组酶、单链结合蛋白和 DNA 聚合酶在等温条件下(37 ~ 42 ℃)进行核酸扩增的技术，可以在没有实验室仪器设备的情况下进行检测。CRISPR/Cas 系统是细菌和古细菌中普遍存在的免疫防御系统，用于抵御外源 DNA 的入侵，主要包括 CRISPR 序列与 CAS(CRISPR associate system)两部分[8]。其中，比较熟知的有 CRISPR/Cas9、CRISPR/Cas12、CRISPR/Cas13 等系统。Cas12a 蛋白，又名 Cpf1，是近年来发现的一类核酸内切酶，在 CrRNA 的引导下，能切割带有特定序列(5′-TTTV-3′，V 为 A/C/G)的双链 DNA(dsDNA)[9−10]。当 Cas12a 蛋白的切割功能被激活后，会切割周围的非特异性单链 DNA(ssDNA)。基于 CRISPR/Cas12a 这一特性，研究人员开发出能够用于病原物检测的 HOLMES 和将 ERA/RAA 与 CRISPR/Cas12a 相结合的 DETECTR 技术平台，并广泛应用[11]。由于 RAA 反应温度和 Cas12a 核酸内切酶的工作温度相近(37 ℃)，因此研究人员将 RAA 和 CRISPR/Cas12a 技术结合使用时，大大提高了检测的灵敏度和特异性[12]。即 RAA 反应用于恒温扩增获得大量的靶标序列，CRISPR/Cas12a 体系中的 CrRNA 用于识别靶标序列并引导 Cas12a 特异性的切割 dsDNA，从而激活 Cas12a 的反式切割活性，导致带荧光标记的探针 ssDNA 被切割从而暴露荧光报告基团[13]。为了使检测结果更为简单的显示，近年来基于免疫层析原理的侧向流试纸条(lateral flow dipstick，LFD)的应用帮助实现检测结果的快速可视化，并且结合 LFD 的方法可以摆脱对检测设备的依赖从而实现病菌的样地检测[14]。目前，RAA-CRISPR/Cas12a 与 LFD 结合已广泛应用于病毒[15−16]、细菌[17]和线虫[18]等病原物或其他生物的检测[19]，但对于病原真菌的检测尚处于研究阶段。

本研究以杜英疫病菌 Gti1/Pac2 家族转录因子 PsGti1 为靶标，设计特异性的 RAA 扩增引物，并

结合 CRISPR/Cas12a 体系，构建了杜英疫病菌的 RAA-CRISPR/Cas12a 检测体系。为使检测结果更为直观，进一步将该体系与 LFD 结合，构建了杜英疫病菌的快速可视化检测体系（RAA-CRISPR/Cas12a-LFD）。该检测方法具有快速、灵敏、特异、操作简便等优势，适用于现场鉴定，对杜英疫病菌的快速早期检测具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料试剂

供试菌株：杜英疫病菌 CFCC 57515，由广东省林业科学研究院黄华毅副研究员提供。其他用于测试检测系统特异性的板栗疫病菌（*Cryphonectria parasitica*）、胶孢炭疽菌（*Colletotrichum gloeosporioides*，采自杨树）、大丽轮枝菌（*Verticillium dahliae*）和杨树腐烂病菌（*Cytospora chrysosperma*）均由北京林业大学森林保护学科林木病理实验室保存。山田胶锈菌（*Gymnosporangium yamadai*）是活体营养型病原真菌，无法进行离体培养和纯化，因此由野外采集受害植株样品并提取病菌的 gDNA。

主要仪器及试剂：普通 PCR 仪（Bio-Rad）、LC96 荧光定量 PCR 仪（Bio-Rad）、紫外凝胶成像仪、nanodrop2000、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒（天根生物科技股份有限公司）、质粒小提试剂盒（天根生物科技股份有限公司）、RAA 核酸扩增试剂盒（江苏奇天基因生物科技有限公司）、Cas12a（NEB）、Cas12/13 专用核酸检测试纸条（北京宝盈同汇生物技术有限公司）等。

本试验所需引物和探针均由北京擎科生物科技股份有限公司进行合成。*PsGti*1 基因扩增引物、*PsGti*1 的 RAA 扩增引物、CrRNA 引物及探针序列见表 1。

1.2 研究方法

1.2.1 总 DNA 的提取

杜英疫病菌的基因组 gDNA 采用普通的 CTAB 法进行提取[20]，并保存于−20 ℃ 冰箱中备用。

1.2.2 *PsGti*1 全长片段扩增及 T 载体连接

以杜英疫病菌 gDNA 为模板，使用 PsGti1-5F 和 PsGti1-3F 作为引物，通过普通 PCR 仪进行 PCR 扩增，得到杜英疫病菌的 *PsGti*1 基因的全长片段。利用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收纯化 *PsGti*1 全长片段后，连接 T-vector，并筛选阳性克隆，利用质粒小提试剂盒提取 PsGti1-T-vector 质粒。利用 nanodrop2000 测定杜英疫病菌 gDNA 以及 PsGti1-T-vector 质粒浓度，并保存于−20 ℃ 冰箱。

1.2.3 *PsGti*1 基因 RAA 引物的筛选

首先，以 PsGti1-T-vector 为模板，分别使用 PsGti1-RAA1（PsRAA5F + PsRAA3F）、PsGti1-RAA2（PsRAA5F-2+PsRAA3F）和 PsGti1-RAA3（PsRAA5F-3+PsRAA3F-2）这 3 对引物进行普通 PCR 扩增，并进行电泳检测，以评价 *PsGti*1 基因 3 对 RAA 引物的扩增效果。随后，以杜英疫病菌 gDNA 为模板，利用 RAA 核酸扩增试剂盒，分别评估 PsGti1-RAA1、PsGti1-RAA2 和 PsGti1-RAA3 的扩增效果。RAA 扩增反应体系及操作步骤依照 RAA 核酸扩增试剂盒说明书进行。

按表 2 进行配置反应体系并充分混匀后，分别

表 1 本研究使用的引物或探针序列信息

Tab. 1 Sequence information of primers or probes used in this study

名称	序列	用途
PsGti1-5F	CACCAGCACCACTACCAT	扩增*PsGti*1全长 1 575 bp
PsGti1-5F	CCGTTCGTGGATCTTCCT	
PsRAA5F	ACACCCTCCTCCTATGCGATGGCTCCTCTG	PsRAA1引物对 415 bp
PsRAA3F	CCGTTCGTGGATCTTCCTGGTCCCGACAAGTA	
PsRAA5F-2	CCTCGCTGACTTCCGCACCGTCTATGAATG	PsRAA2引物对，下游与PsRAA3F配对 163 bp
PsRAA5F-3	ACGACACCCTCCTCCTATGCGATGGCTCCT	PsRAA3引物对 295 bp
PsRAA3F-2	GATCGTGCTGGCATTCATAGACGGTGCGGAAGT	
Ps-CrRNA1	UAAUUUCUACUAAGUGUAGAUGUCGAGCUCGCGGGCAGCUCG	CrRNA1序列
Ps-CrRNA2	UAAUUUCUACUAAGUGUAGAUGCGCAACAGGCUGGGGCGGC	CrRNA2序列
ssDNA1	5′-FAM-TTATT-BHQ I-3′	荧光探针
ssDNA2	5′-FAM--TTTTTTTATTTTTTT-Biotin-3′	侧向流试纸条法探针

注：下划线部分为本研究中筛选得到的最优RAA扩增引物对及CrRNA。

表 2　*PsGti*1 基因的 RAA 扩增反应体系

Tab. 2　RAA amplification reaction system for *PsGti*1 gene

组分	体积/μL
缓冲液V	25.00
引物F (PsRAA5F/PsRAA5F-2/PsRAA5F-3)	2.00
引物R (PsRAA3F/ PsRAA3F-2)	2.00
纯化水	14.50
总体积	43.50

加入到基础反应单元(试剂盒内含)内并充分混匀，随后加入 5 μL 的乙酸镁(试剂盒内含)充分混匀，再加入 1.5 μL 杜英疫病菌 gDNA 并充分混匀，放入普通 PCR 仪中 37 ℃ 反应 40 min，获得 *PsGti*1 的 RAA 扩增产物。将 RAA 扩增产物与等体积的酚氯仿(1∶1)混合，并进行剧烈振荡，充分离心使其分层，取上清液进行电泳检测。

1.2.4　Cas12a 蛋白切割活性验证及 *PsGti*1 基因 RAA 片段的 CrRNA 序列的筛选

以 1.2.3 步骤中筛选得到的最优 *PsGti*1 基因 RAA2(PsRAA5F-2 + PsRAA3F)为引物，以 PsGti1_T-vector 为模板，利用 RAA 试剂盒扩增得到 *PsGti*1 的 RAA 片段(反应体系及步骤参考 1.2.3)。随后，以扩增得到 *PsGti*1 的 RAA 片段为靶标序列，按照表 3 的反应体系添加相关试剂，以加水的模板作为阴性对照，放入荧光定量 PCR 仪中，37 ℃ 反应 1 h，选择 FAM(荧光)通道，每隔 5 min 收集一次荧光值。反应结束后，PCR 管置于紫外凝胶成像仪下观察荧光强度，通过荧光定量 PCR 仪测定的荧光值及紫外凝胶成像仪中的荧光强度评估其反应情况。

1.2.5　CRISPR/Cas12a 体系中 Cas12a 和 CrRNA 浓度配比的优化

在确定 CRISPR/Cas12a 体系中最佳 CrRNA2 序列后，为了探索最优的反应体系，对表 3 中反应体系的 Cas12a(2、1、0.5、0.25 μmol/L)和 CrRNA 浓度(2、1、0.5、0.25 、0.125 μmol/L)进行正交试验，并将相应的反应体系(表 4)加入 PCR 八连排管中，并放

表 3　CRISPR/Cas12a 的反应体系

Tab. 3　CRISPR/Cas12a reaction system

组分	体积/μL
NEBuffer 2.1	5.00
Cas12a protein (100 μmol/L)	0.50
CrRNA1/CrRNA2 (50 μmol/L)	1.00
ssDNA 1 (100 μmol/L)	0.25
PsGti1 RAA fragment	2.00
dd H_2O	41.25

表 4　Cas12a 和 CrRNA 最优浓度探索的 CRISPR/Cas12a 反应体系

Tab. 4　CRISPR/Cas12a reaction system for optimal concentration exploration on Cas12a and CrRNA

组分	体积/μL
NEBuffer 2.1	5
Cas12a protein (100 μmol/L)	*X*
CrRNA (50 μmol/L)	*Y*
ssDNA 1 (100 μmol/L)	0.25
PsGti1 RAA fragment	2
dd H_2O	补足至50

注：*X*、*Y*分别为CRISPR/Cas12a体系中Cas12a和 CrRNA的浓度配比对应的体积。下同。

入荧光定量 PCR 仪，37 ℃ 反应 1 h，选择 FAM 通道，并每隔 5 min 收集一次荧光值。反应结束后，将 PCR 八连排管置于紫外凝胶成像仪下观察荧光强度，通过荧光定量 PCR 仪测定的荧光值及紫外凝胶成像仪中的荧光强度评估其反应情况，从而确定 CRISPR/Cas12a 反应体系中 Cas12a 和 CrRNA 的最佳浓度配比。

1.2.6　基于 *PsGti*1 基因的杜英疫病菌 RAA-CRISPR/Cas12a-LFD 检测体系的特异性评价

以 PsGti1 RAA2 为引物对，分别以杜英疫病菌、板栗疫病菌、胶孢炭疽病菌、山田胶锈菌、大丽轮枝菌和杨树腐烂病菌的 gDNA 为模板，使用 RAA 核酸扩增试剂盒进行扩增，反应体系和操作步骤参考 1.2.3。反应结束后，分别取 2 μL 的 RAA 反应产物作为模板，进行 CRISPR/Cas12a 体系检测，具体操作步骤：选用荧光探针 ssDNA1，在 PCR 八连排管中加入表 5 所示的反应体系，并放入荧光定量 PCR 仪，37 ℃ 反应 1 h，选择 FAM 通道，并每隔 5 min 收集一次荧光值。通过荧光定量 PCR 仪测定的荧光值评估 RAA-CRISPR/Cas12a 检测体系的特异性。

为了能够使检测结果可视化，将 RAA-CRISPR/Cas12a 体系与测向流试纸条(LFD)相结合，即

表 5　RAA-CRISPR/Cas12a 检测体系特异性分析的反应体系

Tab. 5　Reaction system of RAA-CRISPR/Cas12a detection system used for specific analysis

组分	体积/μL
NEBuffer 2.1	5
Cas12a protein (100 μmol/L)	*X*
CrRNA (50 μmol/L)	*Y*
ssDNA 1 (100 μmol/L)	0.25
RAA fragment of each strain	2
dd H_2O	补足至50

RAA-CRISPR/Cas12a-LFD 体系。具体方法步骤：取 2 μL 的 RAA 反应产物作为模板，加入到表 6 所示的反应体系，该体系使用的探针为 ssDNA2，设置 37 ℃ 反应 40 min，对反应产物稀释 10 倍（5 μL 反应产物 + 45 μL 水），随后利用 Cas12/13 专用核酸检测试纸条插入 PCR 反应用管中，孵育 2 min，观察试纸条的条带情况，从而明确 CRISPR/Cas12a-LFD 检测体系的有效性和特异性。

1.2.7 基于 *PsGti*1 基因的杜英疫病菌 RAA-CRISPR/Cas12a-LFD 检测体系的灵敏性评价

利用 nanodrop2000 分别测定 PsGti1_T-vector 的质粒浓度和杜英疫病菌的 gDNA 浓度，并计算拷贝数。分别对 PsGti1_T-vector 和杜英疫病菌的 gDNA 以 10 倍梯度连续稀释 8 组。其中 PsGti1_T-vector 的质粒和杜英疫病菌的 gDNA 的母液标记为 1，其他稀释倍数依次记为 10^{-1} 至 10^{-8}。

分别以 PsGti1_T-vector 质粒和杜英疫病菌的 gDNA 以及其稀释的样品为模板，利用 RAA 试剂盒进行扩增反应，反应体系如表 2 所示，操作步骤参考 1.2.3 中的 RAA 反应步骤进行操作。反应结束后，分别取 2 μL 的 RAA 反应产物作为模板，进行 CRISPR/Cas12a-LFD 体系检测，具体操作步骤：取 2 μL 各个稀释倍数样品的 RAA 反应产物作为模板，加入到表 6 所示的反应体系，该体系使用的探针为 ssDNA2，设置 37 ℃ 反应 40 min，对反应产物稀释 10 倍（5 μL 反应产物 + 45 μL 水），随后利用 Cas12/13 专用核酸检测试纸条插入 PCR 反应用管中，孵育 2 min，观察试纸条的条带情况，从而明确 CRISPR/Cas12a-LFD 检测体系的有效性和特异性。

1.2.8 实际样本检测

分别提取接种杜英疫病菌的枝条和未接种杜英疫病菌的健康枝条的 gDNA，分别以接种杜英疫病菌的枝条 gDNA 和未接种杜英疫病菌的枝条 gDNA 为模板，利用 RAA 试剂盒进行扩增反应，反应体系如表 2 所示，操作步骤参考 1.2.3 中的 RAA 反应步骤进行操作。反应结束后，分别取 2 μL 的 RAA 反应产物作为模板，利用 CRISPR/Cas12a-LFD 体系进行检测，检测的具体步骤参考 1.2.6，从而验证其在杜英样品上的实际检测效果。

表 6 CRISPR/Cas12a-LFD 检测体系有效性和特异性分析的反应体系

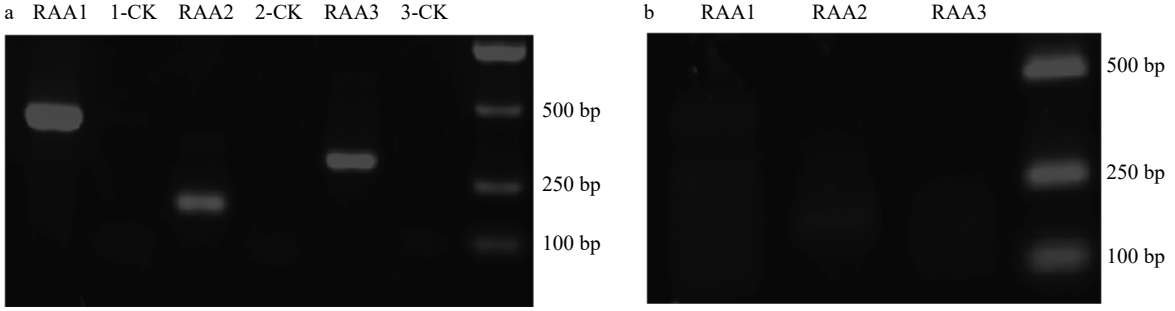
Tab. 6 Reaction system of CRISPR/Cas12a-LFD system used for available and specific analysis

组分	体积/μL
NEBuffer 2.1	5
Cas12a protein (100 μmol/L)	*X*
CrRNA (50 μmol/L)	*Y*
ssDNA 2 (10 μmol/L)	0.5
RAA fragment of each strain	2
dd H_2O	补足至50

2 结果与分析

2.1 *PsGti*1 基因的 RAA 引物的筛选

Gti1/Pac2 家族的 Gti1 蛋白是真菌中保守且特有的转录因子，其 N 端的 Gti1/Pac2 结构域在不同真菌中序列都高度保守，而 C 端区域在不同真菌中序列变异度较高。因此，本研究以杜英疫病菌 *PsGti*1 基因为靶标，按照 RAA 引物的设计原则（引物长度 30 ~ 35 bp，扩增产物长度 100 ~ 500 bp），在 *PsGti*1 基因的 C 端区域设计了 3 对引物用于 RAA 扩增试验，即 PsGti1-RAA1（PsRAA5F + PsRAA3F）、PsGti1-RAA2（PsRAA5F-2 + PsRAA3F）和 PsGti1-RAA3（PsRAA5F-3 + PsRAA3F-2）。以杜英疫病菌 gDNA 为模板，进行普通 PCR 扩增，结果显示，*PsGti*1 基因的 3 对 RAA 引物均能特异性的扩增出目标条带（图 1a）。随后，以杜英疫病菌 gDNA 为模板，分别以 *PsGti*1 基因的 3 对 RAA 引物，按照 RAA 试剂盒进行扩增，电泳结果显示，PsGti1-RAA2



a 利用 Taq 酶对 RAA1-3 引物对的 PCR 扩增电泳结果，1-CK、2-CK 和 3-CK 分别表示 RAA1-3 的无模板阴性对照；b 利用 RAA 核酸扩增试剂盒对 RAA1~3 引物扩增电泳结果。

图 1 *PsGti*1 基因 RAA 扩增引物的筛选

Fig. 1 Screening of primers for RAA amplification of *PsGti*1 gene

（PsRAA5F-2 + PsRAA3F）引物对能够特异性的扩增出目标条带，而 PsGti1-RAA1（PsRAA5F + PsRAA3F）和 PsGti1-RAA3（PsRAA5F-3 + PsRAA3F-2）引物对的 RAA 扩增反应效果较差（图 1b）。因此，本研究选择 PsGti1-RAA2（PsRAA5F-2 + PsRAA3F）引物对用于 *PsGti*1 基因的 RAA 扩增反应。

2.2　CRISPR/Cas12a 切割体系验证及 CrRNA 的筛选

针对 *PsGti*1 基因的 RAA 扩增区域，本研究设计了两条 CrRNA 序列，用以引导 Cas12a 蛋白对于靶标 *PsGti*1 双链 DNA 进行切割。按照 1.2.4 的方法对 CRISPR/Cas12a 切割体系进行验证，并筛选合适 CrRNA。CrRNA2 能够高效的引导 Cas12a 蛋白对 *PsGti*1 基因的 RAA 扩增产物进行切割，从而激活了其反式切割活性，导致探针 ssDNA1 被切割，使得 FAM 荧光基团暴露而表现出强烈的荧光信号，并且荧光信号强度与反应时间呈较好的线性关系（图 2b）。然而，CrRNA1 并未激活 Cas12a 蛋白的切割活性，反应过程中未检测到荧光信号，与未加模板的阴性对照结果一致（图 2a）。结果表明，CRISPR/Cas12a 切割体系正常工作，且 CrRNA2 可以高效的引导 Cas12a 蛋白对 *PsGti*1 靶标序列进行切割。因此，本研究选择 CrRNA2 序列用于后续的试验体系。

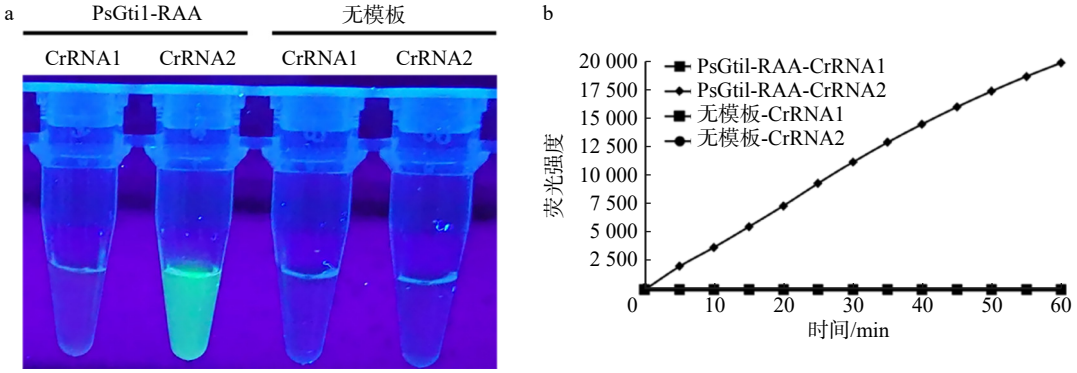
2.3　CRISPR/Cas12a 反应体系中 Cas12a 蛋白和 CrRNA2 的最佳配比筛选

CRISPR/Cas12a 反应体系中，Cas12a 蛋白与 CrRNA 的浓度配比对于荧光检测效果具有一定影响。本试验探究了 Cas12a 蛋白和 CrRNA2 不同浓度配比条件下，反应体系中荧光信号的检测效果（具体浓度配比见表 4）。结果表明，当反应体系中 Cas12a 的浓度为 1 μmol/L，CrRNA2 浓度为 0.125 μmol/L 时检测得到的荧光值最高（图 3）。因此，优化后的 CRISPR/Cas12a 反应体系中 Cas12a 与 CrRNA2 的最佳浓度配比分别为 1 μmol/L 和 0.125 μmol/L，并用于后续的反应体系中。

2.4　基于杜英疫病菌 *PsGti*1 基因的 RAA-CRISPR/Cas12a 检测体系的建立

基于筛选得到的 *PsGti*1 基因 RAA 扩增反应的最优引物对 PsGti1-RAA2（PsRAA5F-2 + PsRAA3F）、CRISPR/Cas12a 反应体系中有效的 CrRNA2，以及 Cas12a 蛋白与 CrRNA2 最优浓度配比，本研究建立了基于 *PsGti*1 基因的杜英疫病菌 RAA-CRISPR/Cas12a 检测体系。为了探究该体系对杜英疫病菌的特异性检测效果，分别以杜英疫病菌、胶孢炭疽菌、板栗疫病菌、山田胶锈菌、大丽轮枝菌和杨树腐烂病菌的 gDNA 为模板，采用 PsGti1-RAA2 引物和 RAA 核酸扩增试剂盒进行扩增反应。取 2 μL 各个菌株的 RAA 扩增反应产物加入到 CRISPR/Cas12a 反应体系中，并利用荧光定量 PCR 仪实时定量检测反应过程中的荧光值。结果显示，RAA-CRISPR/Cas12a 检测方法只能检测到杜英疫病菌反应体系中的荧光信号，而不能检测到其他病原菌的荧光信号（图 4a）。这一结果表明，本研究建立的基于杜英疫病菌 *PsGti*1 基因的 RAA-CRISPR/Cas12a 检测体系特异性较好，可以有效用于杜英疫病菌的检测。

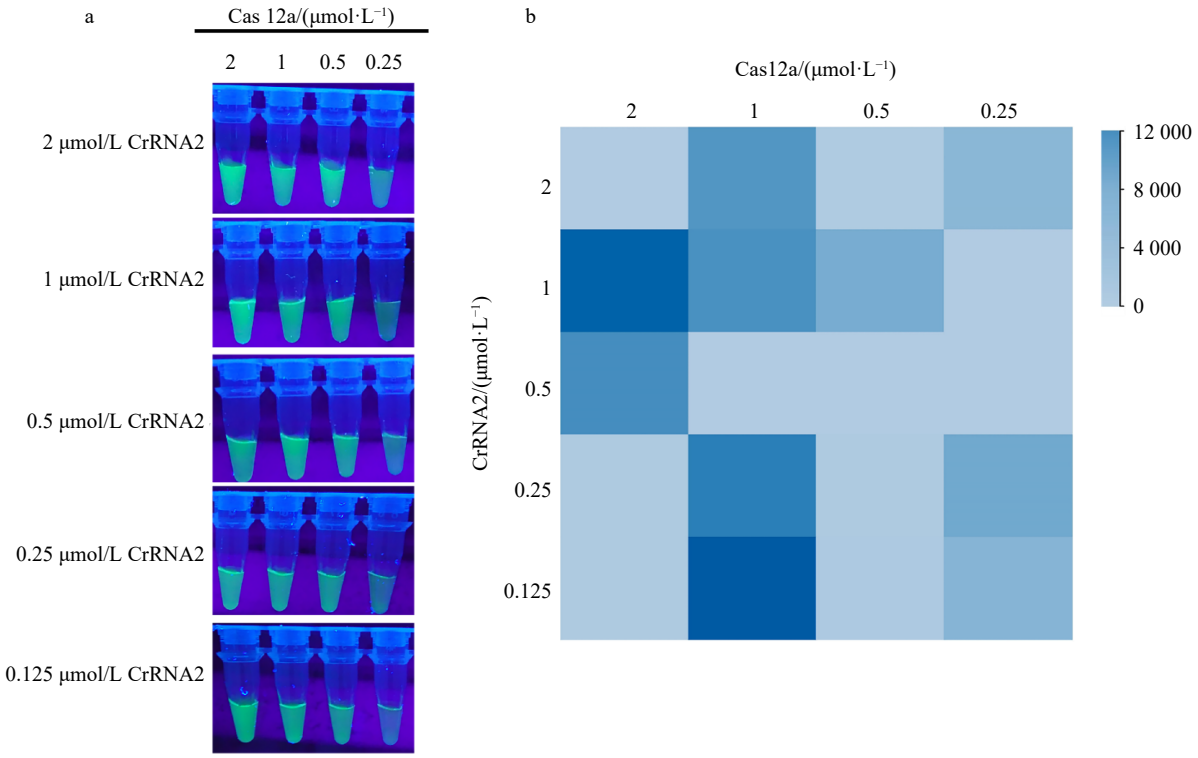
为了实现检测结果的可视化，本研究在 RAA-CRISPR/Cas12a 检测体系的基础上，结合 Cas12/13 专用侧向流试纸条进行可视化检测。在该体系中，CRISPR/Cas12a 使用的探针为 ssDNA2（5′-FAM-TTTTTTTATTTTTTT-Biotin-3′），其 5′端标记了 FAM 修饰，3′端标记了 Biotin 修饰。Cas12/13 专用侧向流试纸条可视化检测的原理：当 CRISPR/Cas12a 反应体系中存在靶标序列时，Cas12a 在特异切割靶标序列的同时，也会非特异性切割 ssDNA2，并释放出带 FAM 标记和 Biotin 标记的探针片段。将 Cas12/13 专用侧向流试纸条插入 CRISPR/Cas12a 反应体系



a 紫外照射下荧光信号的可视化检测；b 荧光强度的实时定量检测（除 PsGtil-RAA-CrRNA2 的 3 个组别均无荧光且不随时间变化）

图 2　CRISPR/Cas12a 切割体系验证及 CrRNA 的筛选

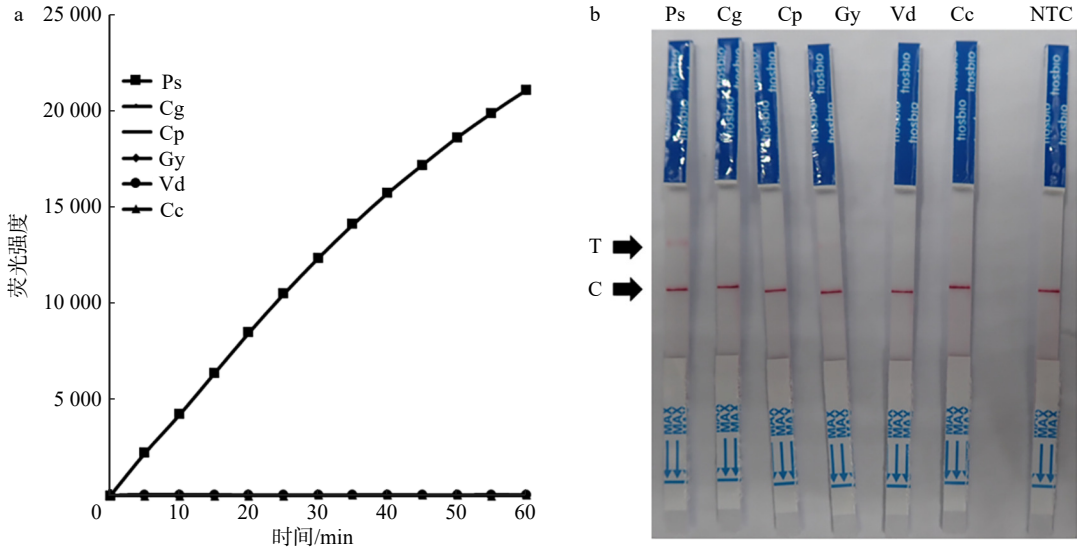
Fig. 2　Validation of CRISPR/Cas12a cleavage system and screening of CrRNA



a. Cas12a 与 CrRNA2 各浓度配比条件下，紫外照射荧光强度的可视化检测；b. Cas12a 与 CrRNA2 各浓度配比条件下，荧光强度的热图

图 3 CRISPR/Cas12a 反应体系中 Cas12a 与 CrRNA2 的浓度配比筛选

Fig. 3 Screening of concentration ratio of Cas12a to CrRNA2 in CRISPR/Cas12a reaction system



a. RAA-CRISPR/Cas12a 检测体系的特异性分析，除杜英疫病菌外均无荧光信号被检测到；b. RAA-CRISPR/Cas12a-LFD 检测体系的特异性分析。Ps. 杜英疫病菌；Cg. 胶孢炭疽菌；Cp. 板栗疫病菌；Gy. 山田胶锈菌；Vd. 大丽轮枝菌；Cc. 杨树腐烂病菌；NTC.无模板阴性对照。T.试纸条测试线；C.试纸条控制线。下同。

图 4 RAA-CRISPR/Cas12a-LFD 检测体系的特异性分析

Fig. 4 Specificity analysis of RAA-CRISPR/Cas12a-LFD detection system

后，释放出来带 Biotin 标记的探针会被侧向流试纸条中 T 线处的 Biotin 抗体捕获，从而在 T 线处显色，而未被切割的样品则会在 C 线处显色。基于 RAA-CRISPR/Cas12a 检测体系的特异性试验结果，利用 Cas12/13 专用的侧向流试纸条对反应体系进行了进一步检测，结果表明，只有杜英疫病菌的 RAA-CRISPR/Cas12a 反应体系能够在 Cas12/13 专用侧向流试纸条上显示 T 线，而其他病原菌和无模板的阴性对照只能在 C 线出显色(图 4b)。这些结果表明，本研究开发的基于 *PsGti*1 为靶标的杜英疫病菌

RAA-CRISPR/Cas12a-LFD 检测体系效果优异，能够特异性地实现杜英疫病菌的可视化检测。

2.5　基于杜英疫病菌 *PsGti*1 基因的 RAA-CRISPR/Cas12a-LFD 检测体系的灵敏性分析

灵敏性是评价病原菌检测有效性的一个重要指标。本研究测定了杜英疫病菌 gDNA（500 ng/μL）和 PsGti1-T-vector（200 ng/μL）及其分别 10 倍梯度稀释的样品为模板的 RAA-CRISPR/Cas12a-LFD 检测体系的灵敏性。首先，将杜英疫病菌 gDNA（母液质量浓度为 500 ng/μL）进行 10 倍梯度稀释，获得 1 ~ 10^{-8} 稀释倍数的检测样品。各取 1.5 μL 作为模板进行 RAA 等温扩增，等温扩增反应完成后，取 2 μL RAA 扩增产物分别加入 RAA-CRISPR/Cas12a-LFD 反应体系中。结果显示：gDNA 稀释到 10^{-7} 的样品在 Cas12/13 专用核酸试纸上依然能够显示淡淡的 T 线，表明杜英疫病菌 RAA-CRISPR/Cas12a-LFD 方法检测的 gDNA 限制质量浓度是 50 fg/μL，检测的拷贝数限制是 1 copies/μL（图 5a），检测的灵敏度效果较好。

其次，将杜英疫病菌 PsGti1-T-vector（母液质量浓度为 200 ng/μL）进行 10 倍梯度稀释，获得 1 ~ 10^{-8} 倍数的稀释样品。各取 1.5 μL 作为模板进行 RAA 等温扩增，等温扩增反应完成后。取 2 μL RAA 扩增产物分别加入 RAA-CRISPR/Cas12a-LFD 反应体系中。结果显示：当 PsGti1-T-vector 稀释到 10^{-6} 的样品时，依然能够在 Cas12/13 专用核酸试纸上显示淡淡的 T 线，表明杜英疫病菌 RAA-CRISPR/Cas12a-LFD 体系对 PsGti1-T-vector 限制质量浓度是 20 pg/μL，检测的拷贝数限制是 4.9×10^4 copies/μL（图 5b），检测的灵敏度效果较好。

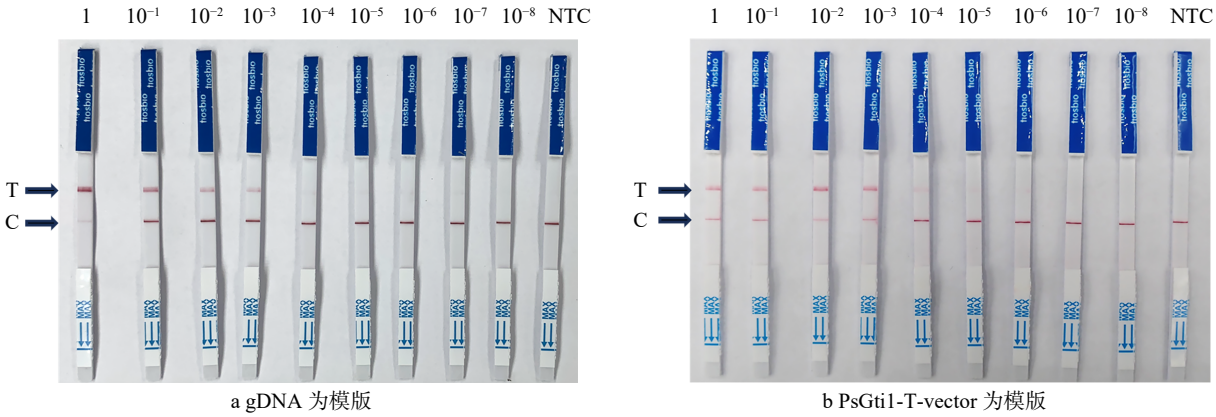
2.6　基于杜英疫病菌 *PsGti*1 基因的 RAA-CRISPR/Cas12a-LFD 检测体系的应用

为了验证杜英疫病菌 RAA-CRISPR/Cas12a 快速检测方法的实际应用效果，本研究使用健康杜英枝条的 gDNA 和接种了杜英疫病菌的杜英枝条 gDNA 作为模板，利用 RAA-CRISPR/Cas12a-LFD 体系进行检测。结果显示，只有接种了杜英疫病菌的杜英枝条样品在 Cas12/Cas13 核酸专用试纸条上能显示 T 线，而健康杜英枝条与未加模板的阴性对照样品仅显示 C 线，未出现 T 线（图 6）。这些结果表明，杜英疫病菌 RAA-CRISPR/Cas12a-LFD 检测体系能够在接种植物样品中有效检测杜英疫病菌，表明该检测方法可应用于杜英疫病菌的快速检测。该方法检测时间更短，操作更为简便，且只需要 37 ℃的温度进行反应，更适用于现场检测。随后，对野外采集的健康样品和受害样品进行了检测。结果表明，健康的杜英植物样品与未加模板的阴性对照样品仅显示 C 线，不显示 T 线；而受害的杜英样品在 Cas12/Cas13 核酸专用试纸条上能显示浅浅的 T 线（图 7）。这表明，杜英疫病菌 RAA-CRISPR/Cas12a-LFD 检测体系具备应用于杜英疫病菌林间快速检测的潜力，但实际应用于林间检测仍需进一步的探索和优化。

3　讨　　论

林木病害的发生通常具有较强的隐蔽性，并且病程历时较长。一旦受害林木表现出明显症状，病害已经较为严重，此时进行防治效果往往不理想。杜英疫病菌作为近年新发现的病原菌，已经对广东地区的尖叶杜英等植物造成了严重危害，而对于该病的研究依旧较少，其发生过程仍不清晰，对于该病害的防治手段也少有研究。如果能够在杜英疫病菌侵染的早期实现快速精准检测，并采取相应的防治措施，将对杜英疫病的防控具有重要的意义。

目前，快速检测技术应用日益成熟，许多植物病原物已成功建立了 RPA/RAA-CRISPR/Cas12a 快速



a gDNA 为模版　　b PsGti1-T-vector 为模版

图 5　基于杜英疫病菌 *PsGti1* 基因的 RAA-CRISPR/Cas12a-LFD 检测体系的灵敏性分析

Fig. 5　Sensitivity analysis of RAA-CRISPR/Cas12a-LFD detection system based on *PsGti1* gene of *P. elaeocarpicola*

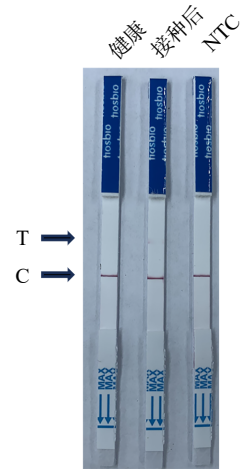


图 6 杜英疫病菌 RAA-CRISPR/Cas12a-LFD 检测体系可行性分析

Fig. 6 Feasibility analysis of RAA-CRISPR/Cas12a-LFD detection system for *P. elaeocarpicola*

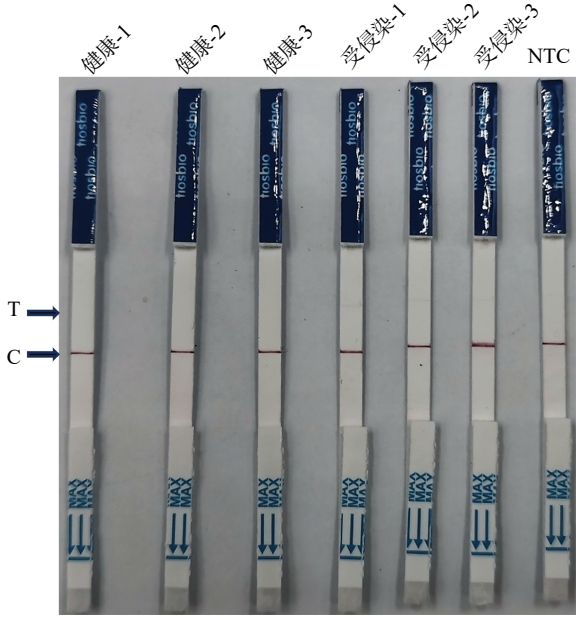


图 7 杜英疫病菌 RAA-CRISPR/Cas12a-LFD 检测体系的应用检测

Fig. 7 Application of RAA-CRISPR/Cas12a-LFD detection system for detection of *P. elaeocarpicola*

检测体系，如麦瘟病菌、向日葵黄萎病菌等[21−22]。此外，RAA-CRISPR/Cas12a 方法在动物病原物快速检测中也发挥着重要的作用，如牛病毒性腹泻病毒的快速检测[23]。类似地，研究人员利用 Rc-RPA-LFD 的方法也实现了小麦纹枯病菌在土壤样本里的鉴定，为病害的早期防控提供了重要参考[24]。值得注意的是，RAA-CRISPR/Cas12a-LFD 检测体系和 LAMP 技术的检测时间均可以控制在 1 h 左右，但 RPA/RAA 技术扩增效率更高，其所需的反应条件更为简便，仅需 37 ~ 42 ℃ 的恒温条件即可完成反应，与其他等温扩增技术相比具有明显优势[25−27]，并且 RAA 重组酶来源相对广泛，更易获取[28]。与 RAA 联用的 CRISPR/Cas12a 体系中的特异性探针则“二次”保证了检测目标的特异性。因此，RAA-CRISPR/Cas12a 检测体系通常具有更好的特异性。针对检测体系的灵敏性，已有的研究显示 RAA-CRISPR/Cas12a 体系能够达到 fg/μL 或者 pg/μL 的水平，其他的 LAMP 技术或 RT-LAMP 技术也能与达到类似的水平。例如，利用 LAMP 技术检测余甘子果实斑点病菌的灵敏度可达到 10 pg/μL[29]或是利用 RT-LAMP 技术检测黄瓜绿斑驳花叶病毒的灵敏度为 4.21×10^3 fg/μL[30]。在此基础上 LFD 具有低成本以及操作简单的优点与前两者结合大大提高了杜英疫病菌野外鉴定的可行性。但本研究还存在一定不足之处，比如 RAA-CRISPR/Cas12a-LFD 步骤较多，流程较繁琐，已有研究将等温扩增与 CRISPR/Cas 在一管内进行反应[31]，未来将对反应条件与流程进一步优化，有望将 RAA 扩展与 Cas12a 检测单管化，使检测更便捷。此外，如何在林间高效、简便的实现病原物 gDNA 的获取依然是限制有害生物快速检测的重要瓶颈。

综上所述，本研究开发了基于 RAA-CRISPR/Cas12a-LFD 的杜英疫病菌可视化检测方法，它结合 RAA 的恒温扩增、CRISPR/Cas12a 的恒温特异性的切割反应及 Cas12/Cas13 核酸专用试纸条的可视化显色，在常温条件下、较短时间内就可以完成对杜英疫病菌特异性的可视化检测。该方法操作简单，检测的灵敏度高，有望在林地内完成杜英疫病菌的现场快速检测，对于杜英疫病菌的早期快速检测及杜英疫病的精准防治提供了重要的理论支撑。

参 考 文 献

[1] Huang H Y, Huang H H, Zhao D Y, et al. *Pseudocryphonectria elaeocarpicola* gen. et sp. nov. (Cryphonectriaceae, Diaporthales) causing stem blight of *Elaeocarpus* spp. in China[J]. Mycokeys, 2022(91): 67−84.

[2] Chen S F, Wingfield M J, Li G Q, et al. *Corticimorbus sinomyrti* gen. et sp nov (Cryphonectriaceae) pathogenic to native *Rhodomyrtus tomentosa* (Myrtaceae) in South China[J]. Plant Pathology, 2016, 65(8): 1254−1266.

[3] Gryzenhout M, Myburg H, Wingfield B D, et al. Cryphonectriaceae (Diaporthales), a new family including *Cryphonectria, Chrysoporthe, Endothia* and allied genera[J]. Mycologia, 2006, 98(2): 239−249.

[4] MacDonald W L. Biological control of chestnut blight: use and limitations of transmissible hypovirulence[J]. Plant Disease, 1991, 75(7): 653.

[5] Yang Y, Xiong D, Zhao D, et al. Genome sequencing of *Elaeocarpus* spp. stem blight pathogen *Pseudocryphonectria elaeocarpicola* reveals potential adaptations to colonize woody bark[J/OL]. BMC Genomics, 2024, 25(1): 714 [2024−10−19].

https://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-024-10615-5.

[6] 廖芳, 朱林慧, 牛春敬, 等. 柑橘属植物疫霉病菌检测与鉴定的研究进展 [J]. 植物检疫, 2015, 29(1): 7−11.
Liao F, Zhu L H, Niu C J, et al. Progress on detection and identification of *Phytophthora* spp. in citrus plants[J]. Plant Quarantine, 2015, 29(1): 7−11.

[7] 汪蕉. 斑点叉尾鮰源停乳链球菌的生物学特性研究及 RAA-LFD 检测方法的建立 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2023.
Wang J. Study on biological characteristics of *Streptococcus dysgalactiae* from channel catfish and establishment of RAA-LFD detection method[D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2023.

[8] Jiang F, Doudna J A. CRISPR-Cas9 structures and mechanisms[M]//Dill K A. Annual review of biophysics: Vol. 46. Palo Alto: Annual Reviews, 2017: 505−529.

[9] Yamano T, Nishimasu H, Zetsche B, et al. Crystal structure of Cpf1 in complex with guide RNA and target DNA[J]. Cell, 2016, 165(4): 949−962.

[10] Dong D, Ren K, Qiu X, et al. The crystal structure of Cpf1 in complex with CRISPR RNA[J]. Nature, 2016, 532: 522−526.

[11] Chen J S, Ma E, Harrington L B, et al. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity[J]. Science, 2018, 360: 436−439.

[12] 董铮, 赵振兴, 范奇璇, 等. 番茄斑驳花叶病毒 RT-RAA-CRISPR/Cas12a 的可视化检测方法的建立 [J/OL]. 植物病理学报, 1−9 [2024−12−30]. https://doi.org/10.13926/j.cnki.apps.001357.
Dong Z, Zhao Z X, Fan Q X, et al. Establishment of RT-RAA-CRISPR/Cas12a-based visual detection of tomato mottle mosaic[J/OL]. Acta Phytopathologica Sinica, 1−9 [2024−12−30]. https://doi.org/10.13926/j.cnki.apps.001357.

[13] 肖思民, 侯泽玮, 刘方幸妍, 等. 基因Ⅱ型草鱼呼肠孤病毒 RAA-CRISPR/Cas12a 检测方法的建立 [J]. 水生生物学报, 2024, 48(11): 1905−1914.
Xiao S M, Hou Z W, Liu-Fang X Y, et al. Establishment of RAA-CRISPR/CAS12a detection for genotype Ⅱ grass carp reovirus[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2024, 48(11): 1905−1914.

[14] Liu H B, Zang Y X, Du X J, et al. Development of an isothermal amplification-based assay for the rapid visual detection of *Salmonella* bacteria[J]. Journal of Dairy Science, 2017, 100(9): 7016−7025.

[15] Zhang H, Tan F, Wang Q, et al. CRISPR-Cas12a based HSV DNA detection method using quantum dot-labeled immunochromatographic strips[J/OL]. Microchemical Journal, 2024, 207: 112117 [2024−12−30]. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0026265X2402229X?via%3Dihub.

[16] Zhao Z, Wang S, Dong Z, et al. One-step reverse-transcription recombinase-aided amplification crispr/cas12a-based lateral flow assay for fast field screening and accurate differentiation of four major tobamoviruses infecting tomato and pepper[J/OL]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(45): 17025−17035.

[17] Zhu L, Liang Z, Xu Y, et al. Ultrasensitive and rapid visual detection of *Escherichia coli* O157: H7 based on RAA-CRISPR/Cas12a system[J/OL]. Biosensors-Basel, 2023, 13(6): 659 [2024−10−16]. https://www.mdpi.com/2079-6374/13/6/659.

[18] 马巧妮. 基于 RAA-CRISPR/Cas12a 快速检测土壤中弓形虫和犬弓首蛔虫方法的建立及初步应用 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2022.
Ma Q N. Establishment and preliminary application of RAA CRISPR/Cas12a-based assays for rapid detction of *Toxoplasma gondii* and *Toxocara canis* in soil[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2022.

[19] 王瑛, 张冲, 蔡一村, 等. 基于 ERA-CRISPR/Cas12a-LFD 的犀牛特异性检测技术 [J]. 野生动物学报, 2023, 44(4): 798−806.
Wang Y, Zhang C, Cai Y C, et al. ERA-CRISPR/Cas12a-LFD-based *Rhinoceros*-specific detection technology[J]. Chinese Journal of Wildlife, 2023, 44(4): 798−806.

[20] 范鑫磊. 中国黄河流域壳囊孢属的分类和系统学研究 [D]. 北京: 北京林业大学, 2016.
Fan X L. Phylogeny and taxonomy of *Cytospora* in Yellow River region of China[D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2016.

[21] Kang H, Peng Y, Hua K, et al. Rapid detection of wheat blast pathogen *Magnaporthe oryzae* triticum pathotype using genome-specific primers and Cas12a-mediated technology[J]. Engineering, 2021, 7(9): 1326−1335.

[22] 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 Disease, 2023, 107(6): 1664−1669.

[23] 热则古丽·艾科拜尔, 张亚平, 刘浩然, 等. 基于 RAA-CRISPR/Cas12a 建立牛病毒性腹泻病毒的可视化快速检测方法及其初步应用 [J/OL]. 中国兽医科学, 1−11 [2024−12−31]. https://doi.org/10.16656/j.issn.1673-4696.2025.0032.
Rezeguli A, Zhang Y P, Liu H R, et al. Establishment and preliminary application of visualization detection technology for bovine viral diarrhea virus based on RAA-CRISPR/Cas12a[J/OL]. Chinese Veterinary Science, 1−11 [2024−12−31]. https://doi.org/10.16656/j.issn.1673-4696.2025.0032.

[24] 鞠玉亮, 沈鹏飞, 冯艳娟, 等. 小麦纹枯病菌 Rc-RPA-LFD 快速检测方法的建立及应用 [J]. 植物病理学报, 2020, 50(5): 618−621.
Ju Y L, Shen P F, Feng Y J, et al. Development and application of Rc-RPA-LFD for the rapid detection of *Rhizoctonia cerealis*[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2020, 50(5): 618−621.

[25] 董晶, 卢鑫, 郭威, 等. 等温扩增技术在食源性致病菌检测中的研究进展 [J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(8): 256−260.
Dong J, Lu X, Guo W, et al. Research progress on isothermal

amplification technology in the detection of foodborne pathogens[J]. Food and Fermentation Industries Editorial Staff, 2021, 47(8): 256−260.

[26] Clausson C M, Arngarden L, Ishaq O, et al. Compaction of rolling circle amplification products increases signal integrity and signal-to-noise ratio[J/OL]. Scientific Reports, 2015, 5: 12317 [2024−12−30]. https://www.nature.com/articles/srep12317.

[27] Wang Z, Yang Q, Zhang Y, et al. Saltatory rolling circle amplification (srca): a novel nucleic acid isothermal amplification technique applied for rapid detection of *Shigella* spp. in vegetable salad[J]. Food Analytical Methods, 2018, 11(2): 504−513.

[28] 孙晓红, 后来旺, 李达容, 等. 重组酶等温扩增技术在分析检测中的应用研究进展 [J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(24): 265-270.
Sun X H, Hou L W, Li D R, et al. Research progress on the application of isothermal recombinase amplification in analytical detection[J]. Food and Fermentation Industries Editorial Staff, 2020, 46(24): 265−270.

[29] 赖多, 王德林, 邵雪花, 等. 余甘子果实斑点病菌 LAMP 可视化检测方法的建立 [J/OL]. 西北农林科技大学学报 (自然科学版), 2025, 53(1): 1−12 [2025−01−03]. http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20240704.1129.014.html.
Lai D, Wang D L, Shao X H, et al. Establishment of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for visual rapid detection of *Diaporthe phoenicicola* of fruit spot disease on *Phyllanthus emblica*[J/OL]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition), 2025, 53(1): 1−12 [2025−01−03]. http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20240704.1129.014.html.

[30] 尹新颖, 曹际娟, 李鑫, 等. 基于免核酸提取可视化 RT-LAMP 快速检测黄瓜绿斑驳花叶病毒 [J]. 植物保护, 2023, 49(2): 264−271.
Yin X Y, Cao J J, Li X, et al. Rapid detection of cucumber green mottle mosaic virus based on visual RT-LAMP without nucleic acid extraction[J]. Plant Protection, 2023, 49(2): 264−271.

[31] Wang X, Rao Q, Lu Z, et al. Rapid and sensitive Cas13a/Cas12a-based one-pot dual-target strategy to detect monkeypox virus and its co-infected viruses[J]. Science Bulletin, 2023, 68(24): 3142−3148.

（责任编辑 范 娟
责任编委 张星耀）