

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2023.11.02

鸭腺病毒 3 型荧光 RPA 恒温快速 检测方法的建立与应用

刘孟啸¹, 蔡 姝², 刘建钊¹, 赵中伟³, 孙 宁⁴, 曲光刚^{5*}, 苗立中^{5*}

(1. 河北工程大学, 生命科学与食品工程学院, 河北邯郸 056038; 2. 华中农业大学, 动物科技学院、动物医学院, 武汉 430070;
3. 山东绿都生物科技有限公司, 山东滨州 256600; 4. 山东省北镇中学, 山东滨州 256200; 5. 山东省滨州畜牧兽医研究院, 山东滨州 256600)

[收稿日期] 2023-07-13 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2023) 11-0008-08 [中图分类号] S852.65

[摘要] 鸭腺病毒 3 型(Duck adenovirus type 3, DAdV-3)是我国近年来新发的禽腺病毒,致病力较强,已经严重影响到鸭养殖业。为实现对 DAdV-3 的快速检测,以 DAdV-3 的 Hexon 基因为靶基因,设计特异性重组酶聚合酶扩增(Recombinase polymerase amplification, RPA)引物和探针,并构建重组标准质粒命名为 DAdV-H-18T,优化 RPA 反应条件后,建立 DAdV-3 的荧光 RPA 恒温快速检测方法。结果显示,该检测方法最佳反应条件为 38 ℃、18 min;特异性强,与其他常见鸭病病原如鸭肝炎病毒、鸭坦不苏病毒等均无交叉反应。对重组质粒 DAdV-H-18T 的最低检测限为 1 copy/ μ L;采用建立的 RPA 检测方法和 qPCR 对 55 份鸭组织临床样本进行检测,阳性率分别为 65.4%、50.9%,检测符合率为 92.7%。研究建立的 DAdV-3 荧光 RPA 方法,检测速度快,灵敏度高,特异性强,为该病临床快速检测提供了有力工具。

[关键词] DAdV-3; Hexon 基因; RPA; 恒温快速检测

Rapid Detection of Duck Adenovirus Type 3 Based on Isothermal Recombinase Polymerase Amplification Assay

LIU Meng-xiao¹, CAI Shu², LIU Jian-chai¹, ZHAO Zhong-wei³, SUN Ning⁴,
QU Guang-gang^{5*}, MIAO Li-zhong^{5*}

(1. Hebei University of Engineering, School of Life Science and Food Engineering, Handan, Hebei 056038, China;

Huazhong Agricultural University, Faculty of Animal Science and Technology, College of Veterinary Medicine, Wuhan 430070, China;

3. Shandong Lvdou Biotechnology Co., Ltd., Binzhou, Shandong 256600, China;

4. BinzhouBeizhen Middle School, Binzhou, Shandong 256200, China;

5. Shandong Binzhou Animal Science and Veterinary Medicine Academy, Binzhou, Shandong 256600, China)

Corresponding authors: QU Guang-gang, E-mail: guanggangqu@163.com; MIAO Li-zhong, E-mail: miaolizhong78@163.com

基金项目:“十四五”国家重点研发计划项目子课题“重要人兽共患病恒温快检测试剂盒的研制和注册”(2022YFC2304002-3)

作者简介:刘孟啸,硕士,从事动物疫病防控与检疫研究。

通讯作者:曲光刚, E-mail: guanggangqu@163.com; 苗立中, E-mail: miaolizhong78@163.com

Abstract: Duck adenovirus type 3 (DAdV-3) is a newly discovered poultry adenovirus in my country in recent years. It has a strong pathogenicity and has seriously affected the duck breeding industry. In order to realize the rapid detection of DAdV-3, specific Recombinase polymerase amplification (RPA) primers and probes were designed with the Hexon gene of DAdV-3 as the target gene, and the recombinant standard plasmid was constructed and named DAdV-H-18T. After optimizing the RPA reaction conditions, the establishment Fluorescent RPA isothermal rapid detection method for DAdV-3. The results showed that the optimal reaction condition of the detection method was 38 °C、18 minutes; the specificity was strong, and there was no cross-reaction with other common duck disease pathogens such as duck hepatitis virus and duck tembusu virus. The minimum detection limit of the recombinant plasmid DAdV-H-18T was 1 copy/μL; the established RPA detection method and qPCR were tested on 55 duck tissue clinical samples, and the results showed that the positive rates of RPA and qPCR were 65.4%, 50.9%, the detection coincidence rate was 92.7%. This study successfully established the fluorescent RPA method of DAdV-3, which has the advantages of fast speed, high sensitivity and strong specificity, and provides a powerful tool for the rapid clinical detection of the disease.

Key words: DAdV-3; Hexon gene; RPA; constant temperature rapid detection

鸭腺病毒 3 型 (Duck adenovirus type 3, DAdV-3) 是 2014 年在我国广东的番鸭中分离到的新型鸭腺病毒, 其致病力较强, 临床剖检的病鸭主要表现在肝脏肿大, 斑驳状出血, 甚至是坏死, 发病率在 45%~60%, 常常诱发鸭第二次感染, 死亡率达到 35% 以上^[1]。根据国际病毒分类委员会 (International committee on taxonomy of viruses, ICTV) 的分类, DAdV-3 属于禽腺病毒属^[2], 具有禽腺病毒一般结构^[3], 直径在 60 nm~80 nm, 双链 DNA 病毒, 无囊膜, 呈二十面体对称结构。病毒粒子的衣壳有三种结构蛋白, 分别是六邻体 (Hexon)、五邻体 (Penton) 和纤突 (Fiber)。腺病毒 Hexon 基因是编码主要表面抗原蛋白, 由于该基因保守区域较高^[4-6], 常作为靶基因用于检测腺病毒。

目前, DAdV-3 的检测方法有很多种, 最经典和最准确的是病毒分离鉴定^[7-8], 但是检测时间较长, 不能满足临床快速检测的需求。分子生物学检测主要有普通 PCR^[9]、多种 qPCR^[1,10] 方法 (例如染料、探针和 MGB 探针) 和环介导等温扩增 (LAMP)^[11]。2020 年, 曹秀芸等^[8] 建立检测 DAdV-3 的 PCR 方法, 成功扩增出 Hexon 基因的目的片段。2019 年, 陈翠腾等分别建立 SYBR Green I、MGB TaqMan 实时荧光定量 PCR 方法, 该

方法具有良好的特异性和敏感性, 但依赖于荧光仪器, 不方便携带, 不能满足现场检测。2020 年, 陈翠腾^[12] 建立了 LAMP 技术应用于 DAdV-3 的快速诊断, 缩短了检测时间, 该方法易出现假阳性。上述方法均存在不同的缺点。因此, 建立一种能快速、实用的现场检测 DAdV-3 的方法十分重要。

重组酶聚合酶扩增技术^[13-16] 是一种利用多种酶参与的核酸恒温扩增技术, RPA 技术可以在 37 °C~42 °C 恒温, 20 min 条件下实现核酸的指数扩增^[17-18], 该方法对样本要求低, 具有快速、灵敏度高、特异性强的优点, 具有良好的应用前景^[19-20]。本研究以 Hexon 基因为目的基因建立了 DAdV-3 的 RPA 恒温快速检测方法, 能快速、特异地检测到 DAdV-3, 为现场检测 DAdV-3 提供有力工具。

1 材料与方法

1.1 毒株和临床样品 鸭肝炎病毒 (Duck hepatitis virus, DHV), 鸭瘟病毒 (Duck plague virus, DPV), 鸭坦布苏病毒 (Duck tembusu virus, DTMUV), 鸭细小病毒 (Duck parvovirus, MDPV), 鸭呼肠孤病毒 (Duck reovirus, DRV) 和新城疫病毒 (Newcastle disease virus, NDV) 均由山东省滨州畜牧兽医研究院鉴定及保存。55 份鸭组织临床样本来自 2018 -

2020 年广东地区鸭养殖场。

1.2 主要试剂 荧光定量八排管、DNA 凝胶回收试剂盒和质粒提取试剂盒购自美国 OMEGA 公司;AXYGEN 核酸分离试剂盒购自康宁生命科学有限公司;Primes STAR max Premix, pMD-18T 载体、DL2000 DNA Marker, TB Green® Premix Ex Taq™ II 等购自 TaKaRa 公司;RPA 恒温检测试剂盒来自先达基因科技有限公司;其他试剂和耗材来自生工生物工程股份有限公司;T4 DNA

Ligase 来自 NEB(北京)有限公司;DH5 α 感受态细胞本实验室提供。

1.3 引物、探针的设计与合成 参照 GenBank 中 DAdV-3 Hexon 基因序列(登录号:KR135164.1, MH349773.1, MH349774.1),根据序列的高度保守区域,利用 Primer Premier 5.0 引物设计软件结合 TwistAmp® DNA 分析设计手册设计了特异性引物和探针。引物和探针序列(表 1),均由上海捷瑞生物工程股份有限公司合成。

表 1 DAdV-3 检测引物和探针

Tab 1 DAdV-3 detection primers and probes.

引物和探针	基因序列(5'-3')
DAdV-F1	ACGGCTTGACAAGGCTTCCATTACATTTACAGA
DAdV-R1	CCGAGCTAGTCCATGAATGTCTGATCATTAGT
DAdV-R2	AGGAATGCTGTAAAGTGCGTCTTTTGCACCGA
DAdV-R3	TTGAGGTGTTTCTTTTGTTTTGAGACGAGTGA
DAdV-R4	GTTGAGGTGTTTCTTTTGTTTTGAGACGAGTGA
DAdV-probe	TTTGTATGGCCAGCTTCATGCCTATGGACCA[dT-FAM][THF]A[dT-BHQ1]ACCAGTAACCAACTA[C3-Spacer]

1.4 Hexon 基因重组质粒标准品的构建 以 DAdV-3 的核酸为模板进行 PCR 扩增,扩增反应体系为:Primes STAR max Premix 加入 12.5 μ L,引物 DAdV-F1/DAdV-R4(10 μ mol/L)各加入 1 μ L,DNA 模板加入 1 μ L,补足双蒸水至 50 μ L。反应条件为:95 $^{\circ}$ C 10 s,55 $^{\circ}$ C 5 s,72 $^{\circ}$ C 10 s,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,16 $^{\circ}$ C 反应 10 min。反应结束后进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定;凝胶回收并克隆至 pMD18-Tvector 载体上,转化至 DH5 α 感受态细胞中,经菌液 PCR 鉴定为阳性的菌株,提取质粒,质粒送至上海生工测序鉴定,质粒准确无误后计算拷贝数,质粒 DNA-80 $^{\circ}$ C 保存待用。

1.5 荧光 RPA 恒温快速检测方法的建立 荧光 RPA 扩增反应体系为:溶解剂 10 μ L,DAdV-F1 1 μ L(10 μ mol/L),DAdV-R4 1 μ L(10 μ mol/L),DAdV-P 0.3 μ L(10 μ mol/L),激活剂 1 μ L,DNA 1 μ L,去离子水补足 25 μ L;将溶解剂、引物、探针和去离子水以混合溶液形式加入到含冻干粉的反应管中,混匀离心,将 DNA 模板加到反应管中,反应管盖

上加入激活剂,上下颠倒混合瞬时离心后,立刻将反应管放置在恒温荧光检测仪上读取荧光值,检测时间为 30 s 每一周期。反应条件为 38 $^{\circ}$ C 条件下反应 20 min。以重组质粒 DAdV-18T 为模板,以蒸馏水为阴性对照,对该方法的引物对组合,引物浓度,反应温度和反应时间等条件进行优化,判定结果以荧光值最高和检测时间最短选出最佳的检测条件。操作如下:筛选引物组合,引物进行两两组合作为检测的引物对,筛选的引物对在 2 个浓度梯度(0.5 μ mol/L、1 μ mol/L),确定最佳引物浓度;最后优化反应温度,设置 3 个反应梯度温度(38 $^{\circ}$ C、40 $^{\circ}$ C 和 42 $^{\circ}$ C)。

1.6 DAdV 快速检测方法的特异性 以重组质粒 DAdV-H-18T、DHV、DPV、DTMUV、MDPV 和 DRV 核酸为模板,同时以 RNase 水为阴性对照,在最佳反应条件下进行 RPA 恒温快速扩增,来评估该方法的特异性。

1.7 DAdV 快速检测方法的敏感性 将重组质粒进行 10 倍倍比稀释,选取浓度为 1×10^3 、 1×10^2 、 1×10^1 、 1×10^0 、 1×10^{-1} copies/ μ L 的 5 个稀释度质

粒,按照优化后的 RPA 条件进行该方法的敏感性测定,根据所得的 Ct 值,获得所建立方法的最低检出拷贝数。

1.8 DAdV 快速检测方法的重复性测定 以浓度为 1×10^4 、 1×10^3 、 1×10^2 copies/ μL 模板进行恒温扩增,每个稀释浓度重复三次,根据 Ct 值计算变异系数,评价该方法的重复性。

1.9 临床样本的检测 对 55 份临床样品进行检测,按照优化后的 RPA 方法,同时基于 MGB 探针的荧光定量 PCR 方法^[21] 进行检测。结果进行分析,比较 RPA 和 qPCR 方法的符合率。

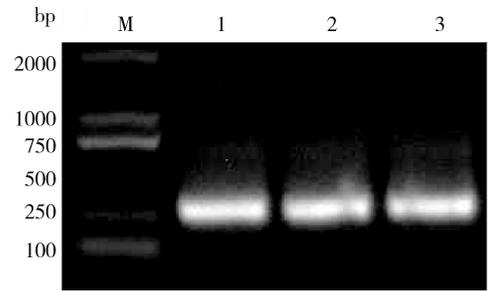
2 结果与分析

2.1 PCR 扩增和鉴定结果 以提取的 DAdV - 3 DNA 为模板进行 PCR 扩增,1.0% 琼脂糖凝胶电泳分析扩增产物(图 1),与 DL2000 DNA Marker 进行比较,获得预期大小约为 264 bp 明亮目的条带,阴阳性对照成立。将目的片段回收后克隆至 pMD - 18T 载体,再转化到 DH5 α 感受态细胞中,鉴定阳性菌液(图 2)后提取质粒送测序,测序鉴定正确后,命名为 DAdV - H - 18T。计算该质粒的拷贝数为 1.06×10^{11} copies/ μL 。

2.2 引物对的筛选 DAdV - 3 最佳引物组合的结果如图 3 所示,F1/R4 阳性所得荧光值为 7200,Ct 值 05:30,检测结果为弱阳性,判断该组合为在 18 min 开始非特异性扩增,检测结果相对较好;F1/R1,F1/R2 引物组合阴性起峰较大,检测结果为阳性,该组合不成立;F1/R3,F1/R4 引物组合阴性起峰小,F1/R3 检测结果较 F1/R4 差;因此确定 DAdVF1 和 DAdVR4 为最佳引物对,用于后续实验。

2.3 引物浓度的优化 引物浓度梯度分别为 0.5 和 1 $\mu\text{mol/L}$ 的优化结果如图 4 所示,1 $\mu\text{mol/L}$ 和 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 出峰时间一致,Ct 值为 08:00,1 $\mu\text{mol/L}$ 引物浓度的荧光值为 5400;0.5 $\mu\text{mol/L}$ 的荧光值为 7200;根据 Ct 值小和荧光值高的原则筛选,故最佳引物浓度选择 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 。

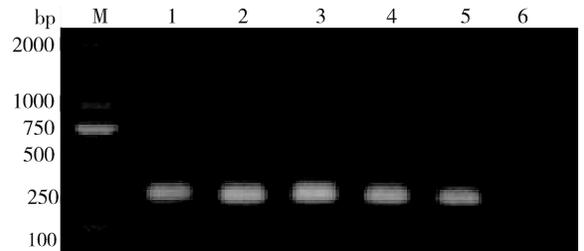
2.4 反应温度优化 设置温度梯度为 38 $^{\circ}\text{C}$ 、40 $^{\circ}\text{C}$ 、42 $^{\circ}\text{C}$,优化结果如图 5 所示,38 $^{\circ}\text{C}$ 和 40 $^{\circ}\text{C}$ 出峰时间最早,Ct 值为 04:00,38 $^{\circ}\text{C}$ 较 40 $^{\circ}\text{C}$ 的荧光值



M: DL 2000 DNA Marker; 1 - 3: DAdV - 3 amplification

图 1 PCR 扩增产物凝胶电泳结果

Fig 1 Results of Gel electrophoresis image of PCR amplification product

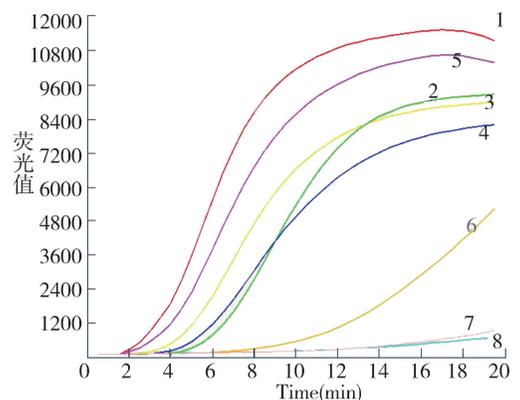


1: DL 2000 DNA Marker; 1 - 5: 不同单个菌落的菌液; 6: 阴性对照

1: DL 2000 DNA Marker; 1 - 5: Bacterial liquid of different single colonies; 6: Negative control

图 2 PCR 产物凝胶电泳结果

Fig 2 Results of gel electrophoresis of PCR products



1: F1/R1; 2: F1/R2; 3: F1/R3; 4: F1/R4; 5: F1/R1 negative;

6: F1/R2 negative; 7: F1/R3 negative; 8: F1/R4 negative

图 3 DAdV - 3 荧光 RPA 引物筛选

Fig 3 Screening of DAdV - 3 fluorescent RPA primers

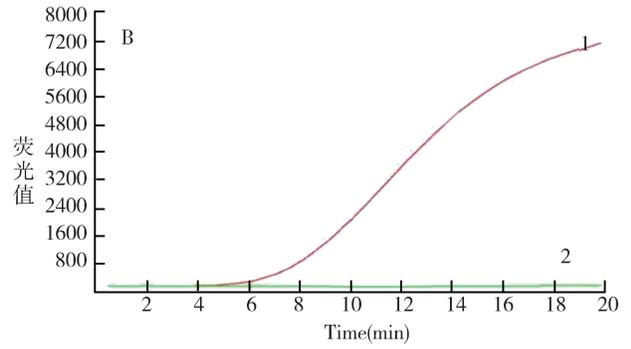
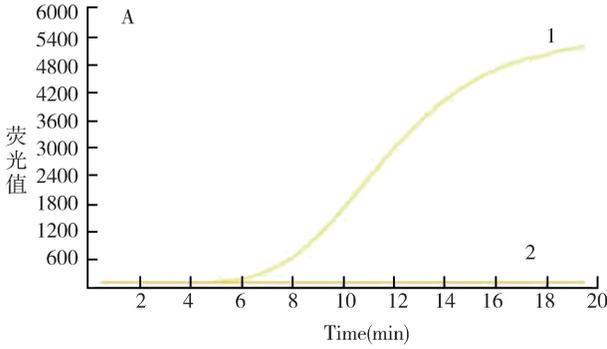
高为 6700,42 $^{\circ}\text{C}$ 荧光值最低为 5600,Ct 为 07:30,故最佳反应温度为 38 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.5 特异性和敏感性试验结果 特异性实验结果如图 6 所示,该方法只扩增出 DAdV - 3 核酸,其他

病毒核酸均为阴性,说明所建立的方法具有良好的特异性。敏感性实验结果如图 7 所示,该方法最低能够检测到 1 copy/ μ L 的标准质粒。

2.6 重复性实验 选取三种不同拷贝数 (10^4 、 10^3 、 10^2 copies/ μ L) 的标准质粒作为模板,每个拷贝数为三个重复来验证该方法的重复性,结果如图 8

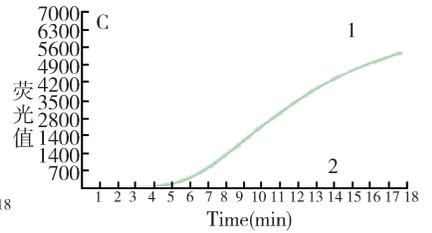
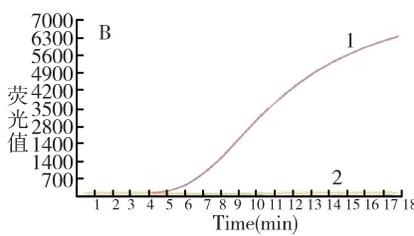
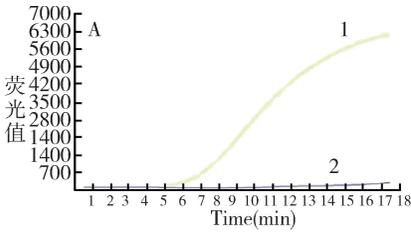
所示,拷贝数为 10^4 copies/ μ L 时 Ct 值为 07:00、07:00、07:30;拷贝数为 10^3 copies/ μ L 时 Ct 值为 07:30;拷贝数为 10^2 copies/ μ L 时 Ct 值为 07:00、07:00、06:30。三个重复 Ct 值相差不大,该方法的重复性良好。



A: 1 μ mol/L; B: 0.5 μ mol/L; 1: Positive control; 2: Negative control

图 4 DAdV 荧光 RPA 引物浓度优化

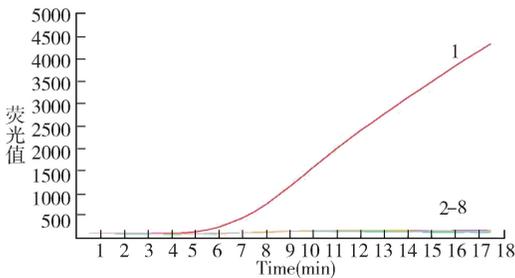
Fig 4 Optimization of DAdV fluorescent RPA primer concentration



A: 38 °C; B: 40 °C; C: 42 °C; 1: Positive control; 2: Negative control

图 5 不同反应温度扩增结果

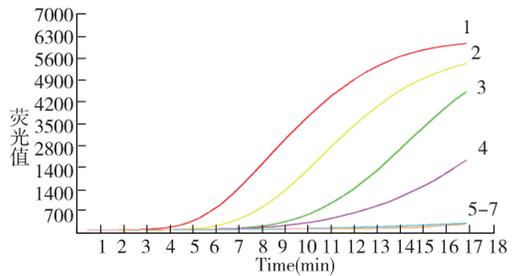
Fig 5 Amplification results different reaction temperatures



1: 10^3 copies/ μ L; 2: Negative control; 3: DHV; 4: DPV; 5: MDPV; 6: DRV; 7: IBDV; 8: DTMUV

图 6 DAdV -3 荧光 RPA 特异性实验

Fig 6 DAdV -3 fluorescence RPA specificity test



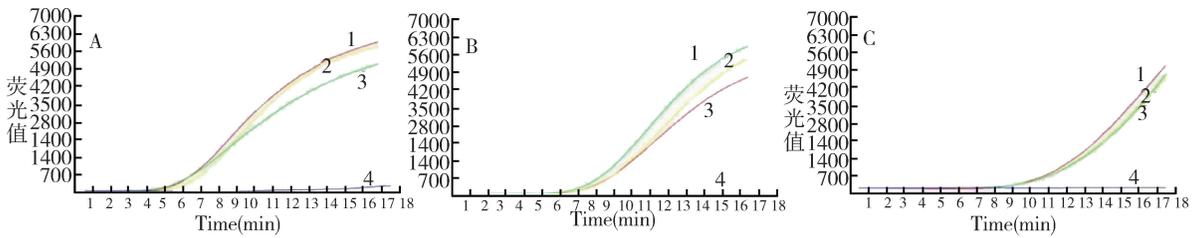
1: 10^3 copies/ μ L; 2: 10^2 copies/ μ L;

3: 10^1 copies/ μ L; 4: 1 copies/ μ L;

5: 10^{-1} copies/ μ L; 6-7: Negative control

图 7 DAdV -3 荧光 RPA 敏感性实验

Fig 7 DAdV -3 fluorescence RPA sensitivity test



A: 模板拷贝数为 10^4 copies/ μ L; B: 模板拷贝数为 10^3 copies/ μ L; C: 模板拷贝数为 10^2 copies/ μ L; 1~3: 阳性模板; 4: 阴性对照

A: 10^4 copies/ μ L; B: 10^3 copies/ μ L; C: 10^2 copies/ μ L; 1~3: Positive control; 4: Negative control

图 8 DAdV-3 荧光 RPA 重复性实验

Fig 8 DAdV-3 fluorescent RPA repeatability experiment

2.7 临床样本的检测结果 对收集的 55 份临床样本同时采用所建立的 RPA 和 qPCR 进行检测,结果显示,RPA 阳性率为 65.4%,qPCR 的阳性率为 50.9%,两种方法的符合率为 92.7% (表 2)。

表 2 DAdV-3 RPA 与 qPCR 检测符合率

Tab 2 Coincidence rate of RPA and qPCR for detecting DAdV-3

RPA	qPCR		总计	符合率
	阳性	阴性		
阳性	32	4	36	92.7%
阴性	0	19	19	
总计	32	23	55	

3 讨论与结论

2014 年以来,我国广东省番鸭发生肝肿胀,坏死及不同程度的死亡为特征的疾病,引起该疾病的病原是新型腺病毒 DAdV-3。DAdV-3 给我国鸭养殖业造成严重危害,因此建立快速检测方法是控制 DAdV-3 感染的有效措施之一。本试验针对 DAdV-3 Hexon 的基因序列设计了 2 对特异性引物与特异性探针,成功建立了 RPA 恒温快速检测方法。通过对其检测条件的优化,该方法能在 38 $^{\circ}$ C、18 min 条件下检测到病毒 DNA 最低含量为 1 copy/ μ L。并且该方法对 DAdV-3 具有良好的特异性,能准确的检测出 DAdV-3,并不会对其他鸭病病原产生交叉反应。该方法的重复性实验结果均表明该方法有良好的重复性。将该方法与 qPCR

方法同时对 DAdV-3 临床样本进行检测,结果显示该方法与 qPCR 符合率可达 92.7%。

根据已报道的 MGB TaqMan 探针实时荧光定量 PCR 方法,比较了两种方法的敏感性,探针法最低检测线 55 拷贝,RPA 的敏感性高于 MGB TaqMan 探针法 55 倍,探针法检测时间较长,依赖昂贵设备,不适合于现场检测;RPA 只需一对引物和探针,检测时间 18 min,极大缩短了现场检测时间。临床检测结果显示,RPA 阳性率为 65.4% 大于 qPCR 的阳性率 50.9%。本研究建立的 DAdV-3 RPA 方法^[22]的优点如下:首先 RPA 引物探针能在 5~8 个错配的情况下保持实验性能不受影响,而 qPCR 引物探针出现错配会导致探针失效;其次,RPA 检测温度在 38 $^{\circ}$ C~42 $^{\circ}$ C 下就能进行,不需要昂贵的仪器。相比 PCR 方法,省去了热循环过程和昂贵仪器的使用;第三,检测试剂以冻干粉的形式保存,比其他 PCR 试剂更稳定,更容易运输。

本实验建立的 DAdV-3RPA 恒温快速检测方法特异性强、敏感性高、简便、快速,为现场快速检测 DAdV-3 提供有力工具。

参考文献:

[1] 魏常青. 鸭腺病毒 3 型分离鉴定及其单克隆抗体制备[D]. 安徽农业大学, 2021.
Wei C Q. Isolation and Identification of duck adenovirus type 3 and preparation of monoclonal antibody[D]. Anhui Agricultural University, 2021.

- [2] 刘仙琦. 禽腺病毒四型重组病毒和鸭腺病毒三型重组病毒的构建[D]. 山东大学, 2021.
- Liu X Q. Construction of avian adenovirus type 4 recombinant virus and duck adenovirus type 3 recombinant virus [D]. Shandong University, 2021.
- [3] Marek A, Kajan G L, Kosiol C, *et al.* Complete genome sequences of pigeon adenovirus 1 and duck adenovirus 2 extend the number of species within the genus Aviadenovirus [J]. *Virology*, 2014, 462-463:107-114.
- [4] 陈翠腾, 万春和, 程龙飞, 等. 鸭腺病毒 3 型 Hexon 基因的克隆及 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 方法的建立[J]. 中国兽医学报, 2019, 39(06): 1104-1112.
- Chen C T, Wan C H, Cheng L F, *et al.* Cloning of duck adenovirus type 3 Hexon gene and establishment of SYBR Green I real-time fluorescent quantitative PCR method[J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2019, 39(06): 1104-1112.
- [5] Shi S H, Liu R C, Wan C H, *et al.* Isolation and characterization of duck adenovirus 3 circulating in China [J]. *Arch Virol*, 2019, 164(3): 847-851.
- [6] Li X, Zhang K R, Pei Y, *et al.* Development and application of an MRT-qPCR assay for detecting coinfection of six vertically transmitted or immunosuppressive avian viruses [J]. *Front Microbiol*, 2020, 11: 1581.
- [7] 程龙飞, 刘荣昌, 傅光华, 等. 鸭 3 型腺病毒的分离鉴定及其 fiber 基因分析[J]. 中国家禽, 2019, 41(11): 47-50.
- Cheng L F, Liu R C, Fu G H, *et al.* Isolation and identification of duck adenovirus type 3 and its fiber gene analysis [J]. *China Poultry*, 2019, 41(11): 47-50.
- [8] 曹秀芸, 刘吉文, 汤智辉, 等. 一株鸭腺病毒 3 型的分离、鉴定及致病性分析 [J]. 畜牧兽医学报, 2023, 54(05): 2050-2061.
- Cao X Y, Liu J W, Tang Z H, *et al.* A strain isolation, identification and pathogenicity analysis of duck adenovirus type 3 [J]. *Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2023, 54(05): 2050-2061.
- [9] 江丹丹, 林昶, 黄志坚, 等. 鸭腺病毒 B 血清 1 型和血清 2 型双重 PCR 检测方法的建立及应用[J]. 中国预防兽医学报, 2022, 44(08): 855-860.
- Jiang D D, Lin C, Huang Z J, *et al.* Duck adenovirus B serum 1 establishment and application of dual PCR detection method for serotype and serotype 2 [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2022, 44(08): 855-860.
- [10] Wan C H, Chen C T, Cheng L F, *et al.* Development of a TaqMan-based real-time PCR for detecting duck adenovirus 3 [J]. *J Virol Methods*, 2018, 261: 86-90.
- [11] Fu S J, Qu G G, Guo S J, *et al.* Applications of loop-mediated isothermal DNA amplification [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2011, 163(7): 845-850.
- [12] 陈翠腾, 黄瑜, 陈珍, 等. 鸭腺病毒 3 型 LAMP 快速检测方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2022, 44(03): 289-294.
- Chen C T, Huang Y, Chen Z, *et al.* Establishment of a rapid detection method for duck adenovirus type 3 LAMP [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2022, 44(03): 289-294.
- [13] Zhou S, Zheng X J, Yang Z R, *et al.* Development of two recombinase polymerase amplification EXO (RPA-EXO) and lateral flow dipstick (RPA-LFD) techniques for the rapid visual detection of aeromonas salmonicida [J]. *Mar Biotechnol (NY)*, 2022, 24(6): 1094-1109.
- [14] Wang H B, Dong J J, Zhang T, *et al.* A novel rapid detection of Senecavirus A using recombinase polymerase amplification (RPA) coupled with lateral flow (LF) dipstrip [J]. *Anal Biochem*, 2022, 646: 114627.
- [15] 高远, 徐龙涛, 冯宗玲, 等. 小鹅瘟病毒荧光 RPA 恒温快速检测方法的建立与应用 [J]. 中国兽药杂志, 2022, 56(03): 1-10.
- Gao Y, Xu L T, Feng Z L, *et al.* Establishment and application of a fluorescent RPA constant temperature rapid detection method for gosling plague virus [J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2022, 56(03): 1-10.
- [16] Lin L Y, Zheng Y Z, Huang H Y, *et al.* A visual method to detect meat adulteration by recombinase polymerase amplification combined with lateral flow dipstick [J]. *Food Chem*, 2021, 354: 129526.
- [17] 李昊轩. 传染性脾肾坏死病毒和鲶爱德华氏菌重组酶聚合酶扩增(RPA)快速检测方法的建立与应用 [D]. 华中农业大学, 2021.
- Li H X. Establishment and application of rapid detection method for infectious spleen and kidney necrosis virus and Edwardsiella catfish recombinase polymerase amplification (RPA) [D]. Huazhong Agricultural University, 2021.
- [18] 翟肖辉. 牛支原体重组酶聚合酶扩增(RPA)检测方法的建立

- 和样品 DNA 提取方法的研究[D]. 中国农业科学院, 2019.
- Zhai X H. *Mycoplasma bovis* recombinase polymerase amplification (RPA) detection method establishment and sample DNA extraction method research [D]. Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2019.
- [19] 姜一瞳, 王昭华, 鑫婷, 等. 基于重组酶聚合酶扩增技术的犬细小病毒快速检测方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2018, 40(10): 926-929.
- Jiang Y T, Wang Z H, Xin T, *et al.* Development of a rapid detection method for canine parvovirus based on recombinase polymerase amplification technology Establishment [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2018, 40 (10): 926-929.
- [20] Mustafa Gumaa Mohammed. 动物布鲁氏菌感染重组酶聚合酶扩增检测方法的建立[D]. 中国农业科学院, 2019.
- Mustafa G M. Establishment of a recombinant enzyme polymerase amplification detection method for Brucella infection in animals [D]. Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2019.
- [21] 陈翠腾, 陈珍, 朱春华, 等. 鸭腺病毒 3 型 MGB TaqMan 探针实时荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 农业生物技术学报, 2019, 27(03): 564-570.
- Chen C T, Chen Z, Zhu C H, *et al.* Establishment of real-time fluorescent quantitative PCR detection method for duck adenovirus type 3 MGB TaqMan probe [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2019, 27(03): 564-570.
- [22] Qu G G, Li Y, Zhao Z W, *et al.* Establishment and application of a real-time recombinase polymerase amplification assay for the detection of avian leukosis virus subgroup [J]. Front Vet Sci, 2022, 9: 847194.

(编辑:李文平)