MIRA-CRISPR/Cas13a技术快速检测B族链球菌方法的建立及评价

孙 璇[1]，咎明辉[2]，王慧慧[3,4]，郑伟港[3,4]（1.北京市海淀区妇幼保健院，北京 100080；2.中国科学院苏州生物医学工程技术研究所，江苏苏州 215004；3.郑州中科生物医学工程技术研究院，郑州 450001；4.河南省中科科技成果转移转化中心，郑州 450003）

摘 要：目的 基于一管法多酶恒温快速扩增（MIRA）和成簇规律间隔短回文重复及其序列相关蛋白13a（CRISPR/Cas13a）技术开发一种兼具快速、准确和简单的B族链球菌（GBS）的检测方法。**方法** 将MIRA的高效扩增与CRISPR/Cas13a的高特异性识别能力相结合，并将两个过程结合在同一反应管内进行，建立MIRA等温扩增和CRISPR/Cas13a切割的一管法GBS检测体系，并评价其灵敏度、特异度与实时荧光定量PCR（RT-qPCR）结果的一致性。**结果** 成功建立一管法MIRA-CRISPR/Cas13a检测体系。该方法可在40min内完成检测，灵敏度达到10^2 copies/μl，与其他常见病原菌以及单、双碱基突变的非靶标序列无明显交叉反应，具有高度特异性。该方法与RT-qPCR方法的一致性为97.62%，Kappa值为0.949。**结论** 建立的一管法MIRA-CRISPR/Cas13a检测体系具有快速、灵敏、特异、操作简便等优点，为GBS的快速筛查和诊断提供新的技术手段。

关键词：B族链球菌；多酶恒温快速扩增技术；成簇规律间隔短回文重复序列
中图分类号：R378.12；R446.19 **文献标志码：**A **文章编号：**1671-7414（2026）02-001-05
doi:10.3969/**j.issn.**1671-7414.2026.02.001

Establishment and Evaluation of a Rapid Detection Method for Group B *Streptococcus* using MIRA-CRISPR/Cas13a Technology

SUN Xuan[1], ZAN Minghui[2], WANG Huihui[3,4], ZHENG Weigang[3,4] (1. *Beijing Haidian District Maternal and Child Health Care Hospital, Beijing* 100080, *China*; 2. *Suzhou Institute of Biomedical Engineering and Technology, Chinese Academy of Sciences, Jiangsu Suzhou* 215004, *China*; 3. *Zhengzhou Institute of Biomedical Engineering and Technology, Zhengzhou* 450001, *China*; 4. *Henan Provincial Science and Technology Achievements Transfer and Transformation Center, Zhengzhou* 450003, *China*)

Abstract: Objective A rapid, accurate and simple detection method for group B *Streptococcus* (GBS) was developed based on the one-tube multi-enzyme isothermal rapid amplification (MIRA) and clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) and their associated protein 13a (MIRA-CRISPR/Cas13a) technology. **Methods** Integrating the efficient amplification of MIRA with the highly specific recognition ability of CRISPR/Cas13a into a single reaction tube to establish a one-tube MIRA-CRISPR/Cas13a cleavage-based GBS detection system. Its sensitivity, specificity and consistency with RT-qPCR results were evaluated. **Results** A one-tube MIRA-CRISPR/Cas13a detection system was successfully established. The method could complete the detection within 40 minutes with a sensitivity of 10^2 copies/μl. It exhibited high specificity with no significant cross-reactivity to other common pathogens and non-targets sequences with single and double base mutations. The consistency rate between this method and RT-qPCR method was 97.62%, with a Kappa value of 0.949. **Conclusions** The one-tube MIRA-CRISPR/Cas13a detection system established in this study offers advantages of rapidity, sensitivity, specificity and ease of operation, which provides a novel technical means for rapid screening and diagnosis of GBS.

Keywords: group B *Streptococcus*; multi-enzyme isothermal rapid amplification technique; clustered regularly interspaced short palindromic repeats

B族链球菌（group B *Streptococcus*, GBS）是一种主要定植于人类生殖道的革兰阳性球菌[1-2]。GBS感染是新生儿早期感染的主要危险因素，典型症状表现为败血症和肺炎等，严重威胁生命[3-5]。现有的检测策略如聚合酶链反应（PCR），已广泛应用于临床诊断，并显示出优异的灵敏度[6-7]，然而高度依赖昂

基金项目：国家自然科学基金（82172077）；中科院河南中心资助基金（2024111）；苏州市基础研究试点项目（SSD2023015）。
作者简介：孙璇（1983-），女，学士，主管检验师，研究方向：免疫及生化检验，E-mail：xuaner0731@126.com。
通讯作者：咎明辉（1988-），男，博士研究生，副研究员，研究方向：纳米生物医学工程技术，E-mail：minghui_zan@163.com。
郑伟港（1996-），男，硕士研究生，助理工程师，研究方向：分子学诊断，E-mail：zwg34@163.com。

贵设备和专业人员，限制了该方法在基层卫生诊所等场景中的检测应用[8-9]。成簇规律间隔短回文重复(clustered regularly interspaced short palindromic repeats，CRISPR)序列及其相关蛋白(Cas)是具有许多独特的优点和应用潜力的基因编辑工具，其中Cas13a蛋白能够特异性识别和切割靶RNA，并激活非特异性切割活性[10-12]。多酶恒温快速扩增(multienzyme isothermal rapid amplification, MIRA)是一种新型的等温扩增技术，具有高效、快速和简便等优点[13]。本研究将CRISPR/Cas13a系统与MIRA技术相结合，建立一种基于一管法MIRA等温扩增和CIRSPR切割的GBS快速、精准地检测方法，旨在为GBS的快速筛查和诊断提供新的技术手段[14]。

1 材料和方法

1.1 研究对象 GBS及其他菌株(铜绿假单胞菌、大肠埃希菌、表皮葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、鲍曼不动杆菌、枯草芽孢杆菌)的核酸标准品均来自北纳生物有限公司；收集2024年10～12月北京市海淀区妇幼保健院孕晚期孕妇的42例阴道拭子样本，由培养显色法确定GBS阳性样本16份和阴性样本26份。纳入标准：实验室检测指标和临床信息完整。对42例样本做核酸提取前处理，以核酸溶液的形式进行保存并作为检测模板。研究通过北京市海淀区妇幼保健院伦理委员会审核批准(批准文号2024-10)。

1.2 仪器与试剂 实时荧光核酸扩增仪(QuantStudio实时荧光定量PCR系统，赛默飞世尔科技有限公司)，RT-MIRA原料试剂盒(安普未来生物科技有限公司)，LbuCas13a(C2c2)(新英格兰生物技术有限公司)，单链荧光报告基因(荧光探针)(苏州金唯智生物科技有限公司)，TaqMan qPCR预混液(广州达安基因股份有限公司)，NTP Mix和T7 RNA合成试剂盒(NEB生物科技有限公司)，缓冲液、甘油和$MgCl_2$(Sigma-Aldrich生物科技有限公司)，含GBS靶标序列及携带单、双碱基突变序列的质粒(通用生物股份有限公司)，探针一步法RT-PCR试剂盒(4× 预混液)(NEB生物科技有限公司)，RT-qPCR相关引物和探针(生工生物股份有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 引物设计与合成：从美国国家生物技术信息中心(NCBI)官网(https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/)上下载120个不同的GBS分离株全基因组序列，通过MEGA7软件进行基因保守性分析，在GBS cAMP区筛选出保守序列。依照MIRA以及CRISPR/Cas13a引物设计原则，采用Oligo 7设计软件针对保守序列设计RT-MIRA引物及对应的CRISPR RNA(crRNA)，见表1。

表1 RT-MIRA引物及crRNA序列

引物信息		序列
RT-MIRA	上游引物	5’-AAGCTAATACGACTCACTATAGGG-TTAAAGACTTCATTGCGTGCCAACCCTGAG-3’
	下游引物	5’-GCTCAAGTTAACGATGTAAAGGCATTAGAA-3’
crRNA		5’-GAUUUAGACUACCCCAAAAACGAAGGGGACUAAAACGACUAACCUUAUUUGUUAAAUGUUGAGU-3’

1.3.2 RT-MIRA体系建立：根据RT-MIRA原料试剂盒说明书建立50 μl反应体系，组分：冻干珠1粒，A Buffer 29.4 μl，上、下游引物各2 μl(0.1 μmol/L)，模板核酸5 μl，B Buffer 2.5 μl，以无核酸酶水补足至50 μl。具体步骤：涡旋混匀后瞬时离心10s，置于实时荧光核酸扩增仪中，39℃孵育30min，期间设置30个循环，每个循环1min并收集FAM通道荧光信号。

1.3.3 MIRA-CRISPR/Cas13a体系建立：采用分层封装策略构建50 μl反应体系，底层相(15%甘油相，体积20 μl)：含LbuCas13a(终浓度0.1 μmol/L)、crRNA(终浓度10 μmol/L)、T7转录酶(终浓度1g/L)、荧光探针(终浓度10 μmol/L)、核苷三磷酸(NTP)(终浓度0.1 μmol/L)、$MgCl_2$溶液(终浓度5 000 μmol/L)、缓冲液(终浓度10 000 μmol/L)；上层相(置于管壁，体积25 μl)：含1.3.2中的MIRA组分(冻干珠、引物、缓冲液等)；反应启动：加入模板核酸5 μl，涡旋混匀后瞬时离心10s，置于实时荧光核酸扩增仪中，39℃孵育30min，期间设置30个循环，每个循环1min并收集FAM通道荧光信号。

1.3.4 灵敏度检测：对GBS阳性标准品进行梯度稀释，设置7个浓度组(分别为1×10^6、1×10^5、1×10^4、1×10^3、1×10^2、1×10^1、1×10^0copies/μl)阳性标准品为模板，纯水为阴性对照，分别进行RT-MIRA和MIRA-CRISPR/Cas13a反应体系检测，以评估MIRA-CRISPR/Cas13a体系的灵敏度。检出限(LoD)判定：扩增30min时的荧光值超过阴性对照最大荧光值的2倍即可视为检出。

1.3.5 特异度检测：选取6种病原菌阳性核酸(铜绿假单胞菌、大肠埃希菌、表皮葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、鲍曼不动杆菌、枯草芽孢杆菌)分别作为检测模板(浓度均校准至1×10^6copies/μl)，采用同样的反应体系和条件进行特异度检测，以评估MIRA-CRISPR/Cas13a反应体系对其他常见病原菌的特异度。采用含野生型GBS cAMP靶序列(100%匹配)、含单碱基突变的GBS cAMP靶序列(G→A)及含双碱基突变的GBS cAMP靶序列(G→A，T→G)质粒(1×10^6 copies/μl)分别作为靶标进行检测以评估MIRA-CRISPR/Cas13a反应体系对含碱基突变靶序

列的特异度。

1.3.6 临床样本检测：采用本研究建立的MIRA-CRISPR/Cas13a检测方法和RT-qPCR检测方法对经核酸提取的42例临床样本(16例GBS阳性及26例GBS阴性)进行检测，比较两种方法对阳性、阴性临床样本的检出率。RT-qPCR条件：95 ℃预变性5min；95 ℃ 10s，60℃ 30s，共40循环。

1.4　统计学分析　采用SPSS16.0统计学分析软件处理数据，两种方法的一致性通过Cohen's Kappa系数评估，Kappa值>0.75为一致性好。两组间差异采用配对χ^2检验(McNemar检验)，P<0.05为差异具有统计学意义。

2　结果

2.1　灵敏度分析　MIRA-CRISPR/Cas13a检测体系可检出1×10^2～1×10^6copies/μl的GBS阳性标准品，灵敏度为1×10^2copies/μl，见图1。同时，荧光RT-MIRA检测方法的灵敏度为1×10^3copies/μl，见图2。

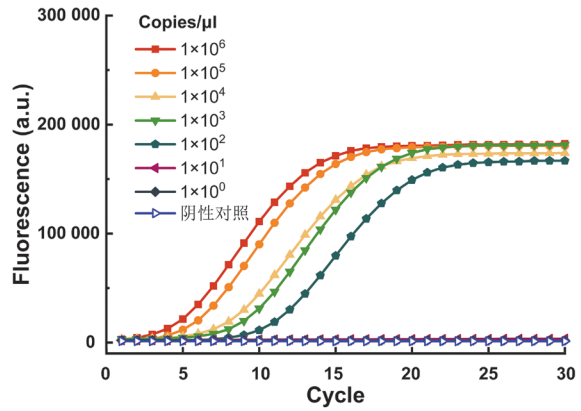


图 1　MIRA-CRISPR/Cas13a 体系的灵敏度分析

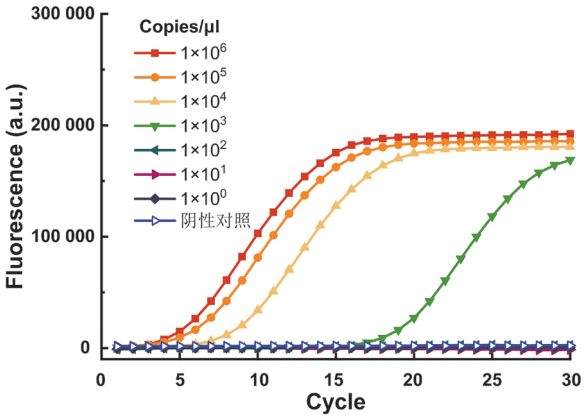


图 2　RT-MIRA 方法的灵敏度分析

2.2　特异度分析　MIRA-CRISPR/Cas13a体系检测不同病原菌核酸特异度结果见图3。仅GBS阳性标准品荧光曲线存在明显上升趋势，并且具有较强的荧光信号，判定为阳性；其余病原菌组均未出现荧光曲线明显抬升，其荧光强度与阴性对照组相同，判定为阴性。

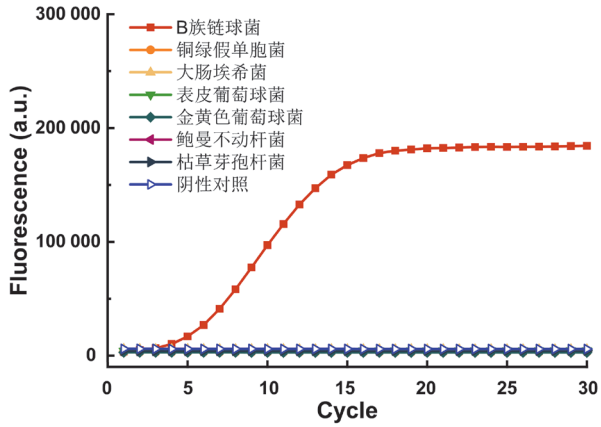
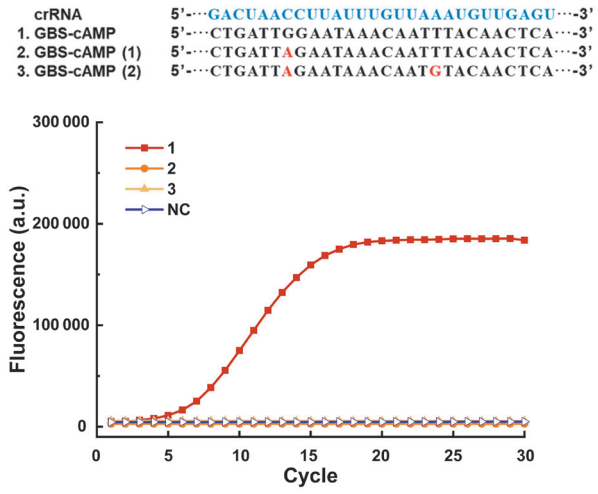


图 3　MIRA-CRISPR/Cas13a 体系对不同病原菌核酸特异度分析

MIRA-CRISPR/Cas13a体系检测含碱基突变靶序列特异度结果见图4。仅野生型靶序列作为模板时，出现明显的荧光曲线上升趋势和较强的荧光信号，含单碱基突变及双碱基突变的靶序列作为模板检测均未观察到明显的荧光曲线，荧光强度与阴性对照组相同。



注：1. 野生型GBS-cAMP靶序列；2. 含单碱基突变的GBS-cAMP靶序列GBS-cAMP(1)；3. 含双碱基突变的GBS-cAMP靶序列GBS-cAMP(2)；NC. 阴性对照。

图 4　MIRA-CRISPR/Cas13a 体系对含碱基突变靶序列特异度分析。

2.3　临床样本分析　见表2。RT-qPCR法检出全部16例阳性样本，其中15例Ct值≤35，进行复检后确认为阳性；本研究MIRA-CRISPR/Cas13a方法检出15例阳性样品，漏检1例弱阳性样本。对于26例阴性核酸样品，MIRA-CRISPR/Cas13a和荧光RT-qPCR方法检测结果完全一致，均未出现假阳性现象。与标准RT-qPCR检测方法相比，本研究方法准确度可达93.75%(15/16)，一致性达97.62%(41/42)，特异度达100%(26/26)，Kappa值为0.949。

表2 MIRA-CRISPR/Cas13a体系与RT-qPCR对临床样本检测一致性比较（*n*）

检测方法		RT-qPCR		
		阳性	阴性	合计
MIRA-CRISPR/Cas13a	阳性	15	0	15
	阴性	1	26	27
	合计	16	26	42

3 讨论

GBS的围产期筛查是预防新生儿感染的关键环节，早期精准检测可为抗生素干预提供科学依据[15-16]。尽管传统qPCR与培养法灵敏度和特异度良好，但其依赖精密仪器，操作复杂且耗时较长，难以在基层医疗机构推广[17-18]。本研究基于MIRA等温扩增与CRISPR/Cas13a技术，构建了一管闭式检测体系，在40min内完成GBS检测，为资源受限场景提供了高效解决方案[19-21]。

方法学创新性方面，本研究通过空间分离反应组分(MIRA试剂置于水相，CRISPR/Cas13a系统封装于底层甘油)，实现了扩增与检测的时序控制：反应初期MIRA快速积累靶标，随反应进行两相互溶释放CRISPR组分，crRNA识别靶序列触发荧光信号。这一设计避免了传统两步法开盖转移产物的污染风险[22-24]，同时保留MIRA的高效扩增能力与CRISPR的特异性切割优势。

检测性能方面，本体系灵敏度较普通RT-MIRA提升一个数量级，与qPCR相当[3]，且无需热循环仪支持。本研究体系不与金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌等其他病原菌产生非特异性反应，对crRNA完全互补的靶序列具有高度选择性，不会对非靶序列片段产生任何交叉反应，证明其具有高度特异度。在42例临床样本验证中，与RT-qPCR的总体符合率达97.62%(Kappa=0.949)，唯一不一致样本经重复检测确认为qPCR弱阳性(*Ct*=38.54)，而本体系未检出，推测因极低浓度靶标(接近检测限)在CRISPR切割阶段被过早消耗。此现象提示，通过优化MIRA与Cas13a的活性平衡可进一步提升对低载量样本的检出能力。

临床应用层面，本体系突破了两大技术瓶颈：第一，检测耗时从培养法的24h、qPCR的2h缩短至40min；第二，本体系配合便携式荧光仪即可实现快速、精准、易操作的床旁检测(POCT)。然而，本研究仍存在局限性：样本量较小(*n*=42)，且未纳入早产、胎膜早破等高风险病例。未来研究将扩大样本量并开展多中心验证，明确该方法在不同孕周、高危人群中的适用性。

综上，本研究的一管法MIRA-CRISPR/Cas13a检测体系解决了恒温扩增与CRISPR检测的兼容性难题，降低了传统分子生物学检测方法对实验设备、操作人员和检测环境的要求，开发兼具准确、灵敏、简单和快速的GBS检测方法，丰富GBS的POCT检测手段，也为GBS临床检测及其他病原菌现场快速检测技术的建立提供参考。

参考文献：

[1] CHAGUZA C, JAMROZY D, BIJLSMA M W, et al. Population genomics of group B *Streptococcus* reveals the genetics of neonatal disease onset and meningeal invasion[J]. Nature Communications, 2022, 13(1): 4215.

[2] YE X, LI Y, FANG X E, et al. Integrated microfluidic sample-to-answer system for direct nucleic acid-based detection of group B *Streptococci* in clinical vaginal/anal swab samples [J]. ACS Sensors, 2020, 5(4): 1132-1139.

[3] HAN M Y, XIE C, HUANG Q Q, et al. Evaluation of Xpert GBS assay and Xpert GBS LB assay for detection of *Streptococcus agalactiae* [J]. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, 2021, 20(1): 62.

[4] BAKER J, TIMM K, FARON M, et al. Digital image analysis for the detection of group B *Streptococcus* from ChromID Strepto B medium using phenomatrix algorithms [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2020, 59(1):e01902-e01919.

[5] UCHIYAMA S, SUN J, FUKAHORI K, et al. Dual actions of group B *Streptococcus* capsular sialic acid provide resistance to platelet-mediated antimicrobial killing[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2019, 116(15): 7465-7470.

[6] YUAN X Y, LIU H Z, LIU J F, et al. Pathogenic mechanism, detection methods and clinical significance of group B *Streptococcus*[J]. Future Microbiology, 2021, 16: 671-685.

[7] 刘娜,尤建萍,王博,等.妊娠晚期孕妇阴道B族链球菌感染青霉素钠治疗对血浆凝血功能及新生儿结局的影响分析[J].现代检验医学杂志,2019,34(4): 146-150.
LIU N, YOU J P, WANG B, et al. Analysis on the influences of penicillin sodium treatment on plasma coagulation functions and neonatal outcomes in late pregnant women with vaginal group B *Streptococcus* infections[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2019, 34(4): 146-150.

[8] PIKE A M, FRIEND C M, BELL S P. Distinct RPA functions promote eukaryotic DNA replication initiation and elongation [J]. Nucleic Acids Research, 2023, 51(19): 10506-10518.

[9] ZHU S H, HOU J, GAO H Y, et al. SUMOylation of HNRNPA2B1 modulates RPA dynamics during unperturbed replication and genotoxic stress responses[J]. Molecular Cell, 2023, 83(4): 539-555, e7.

[10] 樊成,曾昊,卢星月,等.NoV GⅡ.2亚型RT-RPA-CRISPR/Cas12a检测方法的建立[J].中国动物检疫,2024,41(8): 90-97.
FAN C, ZENG H, LU X Y, et al. Establishment of RT-RPA-CRISPR/Cas12a assay for Norovirus G II.2 [J]. China Animal Health Inspection, 2024, 41(8): 90-97.

[11] 徐国磊,冯延叶,胡薇.基于RPA-CRISPR/Cas12a技术的日本血吸虫特异性核酸片段快速可视化检测方

(下转第9页)

tance genes in *Mycobacterium tuberculosis* in Guangxi[J]. Disease Surveillance, 2022, 37(6): 787-791.
[10] 陈佳璐,黄硕.纳米孔测序技术在核酸修饰检测中的应用[J].高等学校化学学报, 2023, 44(3): 119-129.
CHEN J L, HUANG S. Applications of nanopore sequencing technology in the detection of nucleic acid modifications[J]. Chemical Journal of Chinese Universities, 2023, 44(3): 119-129.
[11] CHEN S T, WANG C L, ZOU Y J, et al. Tuberculosis-targeted next-generation sequencing and machine learning: an ultrasensitive diagnostic strategy for paucibacillary pulmonary tuberculosis and tuberculous meningitis [J]. Clinica Chimica Acta, 2024, 553: 117697.
[12] 雷卉,张书,李婷,等.基于全基因组测序的四川省22例复发肺结核患者感染模式及耐药情况分析[J].中国防痨杂志,2024,46(6):641-647.
LEI H, ZHANG S, LI T, et al. Analysis of infection patterns and drug resistance of 22 recurrent pulmonary tuberculosis patients in Sichuan based on whole-genome sequencing[J]. Chinese Journal of Antituberculosis, 2024, 46(6): 641-647.
[13] 徐钰,何玉坤,周德训,等.基于宏基因组测序的肺结核患者下呼吸道微生态菌落分布特点分析[J].中国防痨杂志,2024,46(6):634-640.
XU Y, HE Y K, ZHOU D X, et al. Analysis of the distribution characteristics of microbial communities in the lower respiratory tract of pulmonary tuberculosis patients based on metagenomic sequencing[J]. Chinese Journal of Antituberculosis, 2024, 46(6): 634-640.
[14] YU G C, SHEN Y Q, YAO L W, et al. Evaluation of nanopore sequencing for diagnosing pulmonary tuberculosis using negative smear clinical specimens [J]. Infection and Drug Resistance, 2024, 17(5): 673-682.
[15] 张述耀,侯铁英,黎小妍,等.纳米孔测序在病原微生物检测中的应用专家共识[J].中国药房, 2024, 35(14): 1673-1682.
ZHANG S Y, HOU T Y, LI X Y, et al. Expert consensuses on the application of nanopore sequencing technology in the detection of pathogenic microorganisms [J]. Chinese Pharmacy, 2024, 35(14): 1673-1682.

收稿日期：2025-01-09
修回日期：2025-06-05

(上接第4页)

法的建立和应用评估[J].中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2024, 42(5): 608-614, 622.
XU G L, FENG Y Y, HU W. Establishment and application evaluation of a rapid visualization detection method for *Schistosoma Japonicum* specific nucleic acid fragments based on RPA-CRISPR/Cas12a technology[J]. Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases, 2024, 42(5): 608-614, 622.
[12] ZHAO L X, QIU M Y, LI X J, et al. CRISPR-Cas13a system: a novel tool for molecular diagnostics [J].Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 1060947.
[13] CUI H, XU S Q, XU X, et al. Multienzyme isothermal rapid amplification and lateral flow dipstick combination assay for visible detection of chicken chaphamaparvovirus [J]. Poultry Science, 2023, 102(12): 103144.
[14] 王思琦,吴泽,余楠.基于CRISPR-Cas12a系统的病原体核酸床旁检测技术方法研究的最新进展[J].现代检验医学杂志,2025,40(1):213-220.
WANG S Q, WU Z, YU N. Research advances in pathogen nucleic acid point-of-care testing techniques based on CRISPR-Cas12a system[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2025, 40(1): 213-220.
[15] RAABE V N, SHANE A L. Group B *Streptococcus*(*Streptococcus agalactiae*)[J]. Microbiology Spectrum, 2019, 7(2): 10.1128/microbiolspec.gpp3-0007-2018.
[16] UM S, HER J, KIM S H, et al. Performance of BD MAX group B *Streptococcus* (GBS) assay without enrichment for the detection of GBS[J]. Annals of Laboratory Medicine, 2022, 42(4): 478-481.
[17] 黄晓玲,郭继忠,翁立坚,等.新生儿B族链球菌脑膜炎的临床特点分析[J].中国妇幼保健, 2025, 40(4): 646-649.
HUANG X L, GUO J Z, WENG L J, et al. Analysis of clinical characteristics of neonates with group B *Streptococcal* meningitis[J]. Maternal and Child Health Care of China, 2025, 40(4): 646-649.
[18] MEGLI C J, CARLIN S M, GIACOBE E J, et al. Virulence and pathogenicity of group B *Streptococcus*: virulence factors and their roles in perinatal infection[J]. Virulence, 2025, 16(1): 2451173.
[19] RUIJTER J M, BARNEWALL R J, MARSH I B, et al. Efficiency correction is required for accurate quantitative PCR analysis and reporting[J]. Clinical Chemistry, 2021, 67(6): 829-842.
[20] PARK J W. Principles and applications of loop-mediated isothermal amplification to point-of-care tests[J]. Biosensors-Basel, 2022, 12(10): 857.
[21] SOROKA M, WASOWICZ B, RYMASZEWSKA A. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): the better sibling of PCR?[J]. Cells , 2021, 10(8): 1931.
[22] 周健, 付爱华, 彭静, 等. 基于RPA/CRISPR-Cas12a技术的马铃薯早疫病菌快速检测方法[C]// 中国植物病理学会2024年学术年会. 云南师范大学生命科学学院; 云南省马铃薯生物学重点实验室, 2024.
ZHOU J, FU A H, PENG J, et al. Rapid detection method for potato early blight pathogen based on RPA/CRISPR-Cas12a technology[C]. 2024 Annual Conference of the Chinese Society of Plant Pathology. School of Life Sciences, Yunnan Normal University; Yunnan Provincial Key Laboratory of Potato Biology, 2024.
[23] YANG Y X, YI W F, GONG F, et al. An all-in-one assay based on CRISPR/Cas13a and a DNA circuit for rapid and ultrasensitive detection of *Echovirus* 11 [J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2023, 388: 133851.
[24] LIU Y G, LIN L Y, WEI H G,et al. Design and development of a rapid meat detection system based on RPA-CRISPR/Cas12a-LFD[J].Current Research in Food Science, 2023, 7: 100609.
[25] HAN M Y, XIE C, HUANG Q Q, et al. Evaluation of Xpert GBS assay and Xpert GBS LB assay for detection of *Streptococcus agalactiae*[J]. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, 2021, 20(1): 62.

收稿日期：2025-03-27
修回日期：2025-05-12