

序号：_____

编：_____

第十届“挑战杯”广东大学生课外学术科技作品竞赛

作品申报书

作品名称：用逆转录环介导等温扩增（RTLAMP）新技术

快速检测 H5 亚型鸭流感病毒

学校全称：华南农业大学

申报者姓名

(集体名称)：谢义涵 吴永锋 周穗婷 甘燕贞 李宝红 冀君

类别：

☒ 自然科学类学术论文

☐ 哲学社会科学类社会调查报告和学术论文

☐ 科技发明制作 A 类

☐ 科技发明制作 B 类

说 明

1 申报者应在认真阅读此说明各项内容后按要求详细填写。

2 申报者在填写申报作品情况时只需根据个人项目或集体项目填写 A1 或 A2 表,根据作品类别(自然科学类学术论文哲学社会科学类社会调查报告和学术论文科技发明制作)分别填写 B1B2 或 B3 表。所有申报者可根据情况填写 C 表。

3 表内项目填写时一律用钢笔或打印,字迹要端正清楚,此申报书可复制。

4 序号编由第十届“挑战杯”广东大学生课外学术科技作品竞赛组委会填写。

5 学术论文社会调查报告及所附的有关材料必须是中文(若是外文,请附中文本),请以 4 号楷体打印在 A₄ 纸上(文章版面尺寸 145×22cm),附于申报书后,论文不超 8000 字,调查报告不超 15000 字。

6 作品申报书须按要求由各校竞赛组织协调机构统一寄送。

7 其他参赛事宜请向本校竞赛组织协调机构咨询。

A2 申报者情况（集体项目）

说明：1 必须由申报者本人按要求填写；2 申报者代表必须是作者中学历最高者，其余作者按学历高低排列；3 本表中的学籍管理部门签章视为申报者情况的确认。

申报者代表情况	姓名	谢义涵		性别	男	出生年月	1986 年 12 月	
	学校	华南农业大学		系别专业年级	05 级动物科学(生物工程方向)			
	学历	本科		学制	4 年	入学时间	2024 年 9 月	
	作品名称		用逆转录环介导等温扩增（RTLAMP）新技术快速检测 H5 亚型鸭流感病毒					
	毕业论文题目		鸡的传染性法氏囊 GB 基因的克隆和序列分析					
	通讯地址	华南农业大学动物科学学院				邮政编	510640	
		院				办公电话		
常住地 通讯地址	华南农业大学华山宿舍 24 栋 206				邮政编	510640		
					住宅电话	13824487106		
其他作者情况	姓 名	性别	年龄	学历	所在单位			
	吴永锋	男	24	本科	华南农业大学动物科学学院			
	周穗婷	女	23	本科	华南农业大学动物科学学院			
	甘燕贞	女	22	本科	华南农业大学动物科学学院			
	李宝红	女	21	本科	华南农业大学动物科学学院			
	冀君	男	24	本科	华南农业大学动物科学学院			
资格认定	学校学籍管理部门意见	以上作者是否为 2024 年 7 月 1 日前正式注册在校的全日制非成人教育非在职的高等学校中国籍专科生本科生硕士研究生或博士研究生。 √ 是 □ 否 (部门签章) 2024 年 4 月 13 日						
	院系负责人或导师意见	本作品是否为课外学术科技或社会实践活动成果 √ 是 □ 否 负责人签名： 2024 年 4 月 13 日						

B1 申报作品情况（自然科学类学术论文）

说明：1 必须由申报者本人填写；2 本部分中的科研管理部门签章视为对申报者所填内容的确认；3 作品分类请按作品的学术方向或所涉及的主要学科领域填写；4 硕士研究生博士研究生作品不在此列。

作品全称	用逆转录环介导等温扩增（RTLAMP）新技术快速检测 H5 亚型压流感病毒
作品分类	（ D） A 机械与控制（包括机械仪器仪表自动化控制工程交通建筑等） B 信息技术（包括计算机电信通讯电子等） C 数理（包括数学物理地球与空间科学等） D 生命科学（包括生物农学药学医学健康卫生食品等） E 能源化工（包括能源材料石油化学化工生态环保等）
作品撰写的目的和基本思路	目的是建立一种快速简便特异灵敏的适合于基层实验室使用的 H5N1 亚型鸭流感病毒的检测方法。基本思路：根据 Genbank 中注册的 H5N1 亚型流感病毒 HA 基因保守区的序列，设计一组对应 HA 序列 6 个区域的 4 条特异性引物进行核酸扩增，建立 RTLAMP 反应体系，优化 LAMP 反应条件，扩增产物加入核酸染色剂 SYBR green I，根据颜色反应判断结果（检测结果：橙黄色为阴性，偏绿色为阳性）；还可以加入焦磷酸离子和溶液中的镁离子结合而形成焦磷酸镁沉淀，根据反应管中浊度的变化判断结果，从而建立一种新型的结果肉眼可视的鉴别鸭流感病毒的方法。

作品的科学性 先进性及独特 之处	近两年来，LAMP 方法已广泛使用与各种病毒的快速检测。本项目的指导老师谢青梅已建立了鸭瘟的 LAMP 检测方法，研究论文发表在“Research in Veterinary Science”上，该研究具有科学性和先进性。该研究建立的 LAMP 方法的优点：(1) 只需一恒定温度就能扩增反应。不需要特殊试剂，不需要预先进行双链 DNA 的变性；(2) 特异性高；(3) 快速高效扩增；(4) 步骤简单 (5) 设备要求简单，不需要昂贵的 PCR 仪和凝胶成像系统；(6) 鉴定结果可用肉眼观察，适用于基层简单实验室使用。这也是本项目的独特之处。
作品的实际应 用价值和现实 意义	为广大基层养殖户畜禽场实验室建立一种快速准确简便的鸭流感病毒的鉴别诊断新方法，快速及时地完成该疫病的检测工作。

学 术 论 文 摘	鸭流感的暴发和流行给畜牧业造成了巨大的经济损失，对人类健康造成了严重威胁。快速诊断和及时监测是控制流感的首要步骤。本研究建立一种新型简便灵敏且特异的环介导等温扩增技术（Loopmediated Isothermal Amplification Method, RTLAMP）用于 H5 亚型鸭流感病毒的检测。根据 Genbank 中注册的 H5N1 亚型鸭流感病毒 HA 基因保守区的序列，设计一组对应 HA 序列 6 个区域的 4 条特异性引物进行核酸扩增，建立 RTLAMP 反应体系，优化 LAMP 反应条件，等温扩增反应条件为 65 °C 保温 60min。反应结果肉眼可见。在扩增产物加入焦磷酸离子和溶液中镁离子结合而形成焦磷酸镁沉淀，可见反应管中浊度的变化；或者在扩增后产物加入核酸染色剂 SYBR green I，检测结果阳性呈绿色，阴性为橙黄色；同时用特异性内切酶 Kpn I 进行酶切鉴定。用已建立的 RTLAMP 技术检测临床样品，检测结果与 RTPCR 方法符合率均达到 100%。RTLAMP 技术整个检测过程只需 12h，不需要贵重的 PCR 仪和成像系统，仅需要一恒温水浴锅即可完成试验。通过特异性敏感性试验，验证了建立 RTLAMP 技术可以作为一种操作简单，灵敏性特异性高的检测 H5 亚型鸭流感病毒的技术，适合于检验设备简陋的生产厂场基层检验检疫单位和防疫部门使用。
作品在何时何地何种机构举行的会议上或报刊上发表及所获奖励	2024 年“挑战杯”华南农业大学大学生课外学术科技作品竞赛“特等奖”
鉴定结果	

请提供对于理解审查评价所申报作品具有参考价值的现有技术及技术文献的检索目录	Dukes JP, King DP, Alexandersen S Novel reverse transcription loop mediated isothermal amplification for rapid detection of foot and mouth disease virus Arch Virol, 2024, (151):109306 曾冰冰, 肖凯军, 石磊等 LAMP 方法在食品微生物检测中的应用 现代食品与药品杂志, 2024, 17 (1): 2225
申报材料清单 (申报论文一篇, 相关资料名称及数量)	《用逆转录环介导等温扩增 (RTLAMP) 新技术快速检测 H5 亚型鸭流感病毒》
科研管理部门签章	年 月 日

C 当前国内外同类课题研究水平概述

说明：1 申报者可根据作品类别和情况填写；2 填写此栏有助于评审。

鸭流感是由禽流感病毒引起的一种烈性传染病，鸭流感不仅严重影响养鸭业的发展，而且会影响人类健康。建立快速，敏感，特异的检测鸭流感病毒的方法对于防控鸭流感有着重要意义。

Notomi T 等(2000)开发了一种新颖的恒温核酸扩增方法，即环介导等温扩增法(LAMP)。其特点是针对靶基因的 6 个区域，设计 4 种特异引物，利用一种链置换 DNA 聚合酶(Bst DNA polymerase)在恒温(65℃左右)中反应 1h，即可完成核酸扩增反应，反应结果直接靠扩增副产物焦磷酸镁的沉淀浊度进行判断，日本已利用这种特性研制出专门用于 LAMP 检测的实时监控浊度仪，可以实现对 LAMP 扩增过程的全程实时监控(Manmohan et al, 2004; Yasuyoshi et al, 2004; Dukes et al, 2024)。也有研究者通过在终产物中加入染料的方法直接用肉眼观察结果(Dukes et al, 2024)。而不需模板热变性(Nagamine et al, 2001)长时间温度循环凝胶电泳紫外观察等过程。目前，国外已有较多的此类报道，并建立了专门的官方网站。而国内起步较晚，2002 年和 2003 年北京奶牛中心 2 次引进 LAMP 法检测胚胎的性别(王海浪等, 2003)。国内外有许多文献报道该技术在不同细菌(Hung et al, 2024)及病毒检测中成功应用的实例，如对西尼罗病毒 SARS 病毒麻疹病毒口蹄疫病毒山药嵌纹病毒的检测以及登革病毒的分型等(Hong et al, 2004; Manmohan et al, 2004; Shiro et al, 2004; Manmohan et al, 2024; Motoko et al, 2024; JPDukes et al, 2024; Ji jun et al, 2024)。同时，人们还在不断对 LAMP 技术进行改良，使其能在疾病基因诊断食品分析(曾冰冰等, 2024)和环境监测等领域更好地发挥作用。

国外有报道用 RTLAMP 技术检测人流感 H1H2 和 H3 亚型流感病毒(Leo et al, 2024)，还用于鉴定流感 AB 型的诊断(Masahiro et al, 2024)。

国内还未见用于该方法用于鸭流感病毒的检测。

D 推荐者情况及对作品的说明

说明：1 由推荐者本人填写；2 推荐者必须具有高级专业技术职称，并是与申报作品相同或相关领域的专家学者或专业技术人员（教研组集体推荐亦可）；3 推荐者填写此部分，即视为同意推荐；4 推荐者所在单位签章仅被视为对推荐者身份的确认。

推荐者 情况	姓 名	毕英佐	性别	男	年龄	62	职称	教授博导
	工作单位	华南农业大学动物科学学院						
	通讯地址	广州天河五山 483 号 华南农业大学动物科学 学院		邮政编		510642		
	单位电话	02085280283		住宅电话		02085280721		
推荐者所在 单位签章		毕英佐老师是我校教授博士生导师。 (签章) 2024 年 4 月 13 日						
请对申报者申报情 况的真实性作出阐 述		该作品是由谢义涵同学为主的六位同学共同完成,作 品内容真实,数据可靠,结论正确。						
请对作品的意义技 术水平适用范围及 推广前景作出您的 评价		该作品建立的鸭流感病毒 RTLAMP 技术操作简单灵敏 性好特异性高,该方法的检测灵敏度与荧光定量 PCR 方法相当,适合于检验设备简陋的生产厂场基层检验 检疫单位和防疫部门使用,技术水平高,具有很好的 使用价值和推广应用前景。						
其它说明								

推荐者情况	姓 名	张永亮	性别	男	年龄	42	职称	教授博导
	工作单位	华南农业大学动物科学学院						
	通讯地址	广州天河五山 483 号 华南农业大学动物科学学院			邮政编		510642	
	单位电话	02085281269			住宅电话			
推荐者所在单位签章		张永亮老师是华南农业大学动物科学学院院长，动物营养系教授博士生导师。全国动物生理生化分会副理事长农业生化与分子生物学分会理事吉林省生化与分子生物学理事全军专业生化委员会委员，《中国兽医学报》编委。 (签章) 2024 年 4 月 13 日						
请对申报者申报情况的真实性作出阐述		本作品是华南农业大学本科课外科技创新论文，在动物科学学院基因工程实验室完成，利用了本实验室成熟的实验技术和已有研究材料，选题具有实践指导意义。谢义涵等六位同学利用课余时间积极参与本研究室的科研工作，熟悉和掌握了各项基因工程实验技术。内容真实，数据可靠，结论正确。						
请对作品的意义技术水平适用范围及推广前景作出您的评价								

	本作品选题具有实践指导意义，特别对现有鸭流感的快速诊断防治提供了新思路，为基层实验室提供了一种简便可靠的检测鸭流感病毒的新方法。该项目的完成体现了六位同学具有一定的基因工程实验技能，对 RTLAMP 方法的原理和方法的建立也能较好的掌握。本研究成果对生产实践具有很好的理论和实践指导作用，有推广应用前景。
其它说明	
学校组织协调机构 确认并盖章	(团委代章) 年 月 日
校主管领导或校 主管部门确认盖章	

I	年 月 日
---	-------



I E 大赛组织委员会秘书处资格和形式审查意见

组委会秘书处资格审查意见

审查人（签名）_____

年 月 日

组委会秘书处形式审查意见

审查人（签名）_____

年 月 日

组委会秘书处审查结果

☐合格

☐不合格

负责人（签名）_____

年 月 日

用逆转录环介导等温扩增 (RTLAMP) 新技术快速检测

H5 亚型鸭流感病毒

作者：谢义涵 吴永锋 周穗婷

甘燕贞 李宝红 冀 君

指导老师：谢青梅副教授

作者单位：华南农业大学动物科学学院，广州，510640

【摘要】：鸭流感的暴发和流行给畜牧业造成了巨大的经济损失，对人类健康造成了严重威胁。快速诊断和及时监测是控制流感的首要步骤。本研究建立一种新型简便灵敏且特异的环介导等温扩增技术 (Loopmediated Isothermal Amplification Method, RTLAMP) 用于 H5 亚型鸭流感病毒的检测。根据 Genbank 中注册的 H5N1 亚型鸭流感病毒 HA 基因保守区的序列，设计一组对应 HA 序列 6 个区域的 4 条特异性引物进行核酸扩增，建立 RTLAMP 反应体系，优化 LAMP 反应条件，等温扩增反应条件为 65 °C 保温 60min。反应结果肉眼可见。在扩增产物加入焦磷酸离子和溶液中镁离子结合而形成焦磷酸镁沉淀，可见反应管中浊度的变化；或者在扩增后产物加入核酸染色剂 SYBR green I，检测结果阳性呈绿色，阴性为橙黄色；同时用特异性内切酶 Kpn I 进行酶切鉴定。用已建立的 RTLAMP 技术检测临床样品，检测结果与 RTPCR 方法符合率均达到 100%。RTLAMP 技术整个检测过程只需 12h，不需要贵重的 PCR 仪和成像系统，仅需要一恒温水浴锅即可完成试验。通过特异性敏感性试验，验证了建立 RTLAMP 技术可以作为一种操作简单，灵敏性特异性高的检测 H5 亚型鸭流感病毒的技术，适合于检验设备简陋的生产厂场基层检验检疫单位和防疫部门使用。

【关键词】：H5 亚型鸭流感病毒 HA RTLAMP

【正文】

鸭流感是由禽流感病毒引起的一种烈性传染病，鸭流感不仅严重影响养鸭业的发展，而且会影响人类健康。建立快速，敏感，特异的检测鸭流感病毒的方法对于防控鸭流感有着重要意义。

Notomi T等(2000)开发了一种新颖的恒温核酸扩增方法，即环介导等温扩增法(LAMP)。其特点是针对靶基因的6个区域，设计4种特异引物，利用一种链置换DNA聚合酶(Bst DNA polymerase)在恒温(65℃左右)中反应1h，即可完成核酸扩增反应，反应结果直接靠扩增副产物焦磷酸镁的沉淀浊度进行判断，日本已利用这种特性研制出专门用于LAMP检测的实时监控浊度仪，可以实现对LAMP扩增过程的全程实时监控(Manmohan et al, 2004; Yasuyoshi et al, 2004; Dukes et al, 2024)。也有研究者通过在终产物中加入染料的方法直接用肉眼观察结果(Dukes et al, 2024)。而不需模板热变性(Nagamine et al, 2001)长时间温度循环凝胶电泳紫外观察等过程。目前，国外已有很多的此类报道，并建立了专门的官方网站。而国内起步较晚，2002年和2003年北京奶牛中心2次引进LAMP法检测胚胎的性别(王海浪等，2003)。国内外有许多文献报道该技术在不同细菌(Hung et al, 2024)及病毒检测中成功应用的实例，如对西尼罗病毒SARS病毒麻疹病毒口蹄疫病毒山药嵌

纹病毒的检测以及登革病毒的分型等 (Hong et al, 2004; Manmohan et al, 2004; Shiro et al, 2004; Manmohan et al, 2024; Motoko et al, 2024; JPDukes et al, 2024)。

同时,人们还在不断对LAMP技术进行改良,使其能在疾病基因诊断食品分析(曾冰冰等, 2024)和环境监测等领域更好地发挥作用。国内还未见用于流感病毒的检测。国外有报道用RTLAMP技术检测人流感H1H2和H3亚型流感病毒 (Leo et al, 2024), 还用于鉴定流感AB型的诊断 (Masahiro et al, 2024)。LAMP法具有许多迄今为止的扩增方法无法比拟的优点: (1) 只需一恒定温度就能扩增反应。不需要预先进行双链DNA的变性。(2) 高特异性:应用六个区段,四条引物,并且这六个区段的顺序也有规定。原理上LAMP法扩增的特异性很高,因此可以根据是否扩增就能判断目标基因的存在与否,即能够进行细菌或病毒的定性检测。(3) 快速高效扩增:整个扩增在不到1h即可完成,且产率可达到015mg/ml。为提高LAMP反应的速度, Nagamine等 (2002) 通过2条环状引物加快LAMP的反应,使反应时间比原来缩短近一半,提高了检测效率。(4) 灵敏度高:扩增模板可达10拷贝。(5) 步骤简单:扩增RNA只要DNA基因扩增试剂的基础上加上逆转录酶,就能够完全像DNA基因扩增那样,一步实现RNA扩增 (Hiroko et al, 2024; H Soliman et al, 2024; Kazuya

et al, 2024) ,

1



反应不需PCR仪和特殊试剂。(6) 鉴定简便：在核酸大量合成时，从dNTP析出的焦磷酸根离子与反应溶液中的 Mg^{2+} 结合，产生副产物焦磷酸镁沉淀它有极高的特异性，只要用肉眼观察或浊度仪检测沉淀浊度就能够判断扩增与否。

本文优化了RTLAMP技术检测鸭流感病毒的反应条件，并验证了准确性获得一种检测H5亚型鸭流感病毒的有效快速的可靠方法。

1材料和方法

环介导等温扩增反应(LAMP)的实验原理

环介导等温扩增反应(LAMP) 是对靶基因的6 个特异部位设定4 种引物，利用具有链置换活性的Bst DNA 聚合酶在恒温条件下催化新链合成，从而使靶基因高效扩增。LAMP反应所用到的引物，设计起来比较复杂，而且是实现扩增的关键所在。引物总共有四条，内外引物各两条。如图1所示，上游的内引物FIP (Forward Inner Primer)由F1c (F1的互补序列) F2和TTTT连接子组成；下游的内引物BIP (Backward Inner Primer) 由B1c (B1的互补序列) B2和TTTT连接子组成；上游的外引物F3 (Forward Outer Primer) 和下游的外引物B3 (Backward Outer Prime) 分别为F3c和B3c的互补序列。

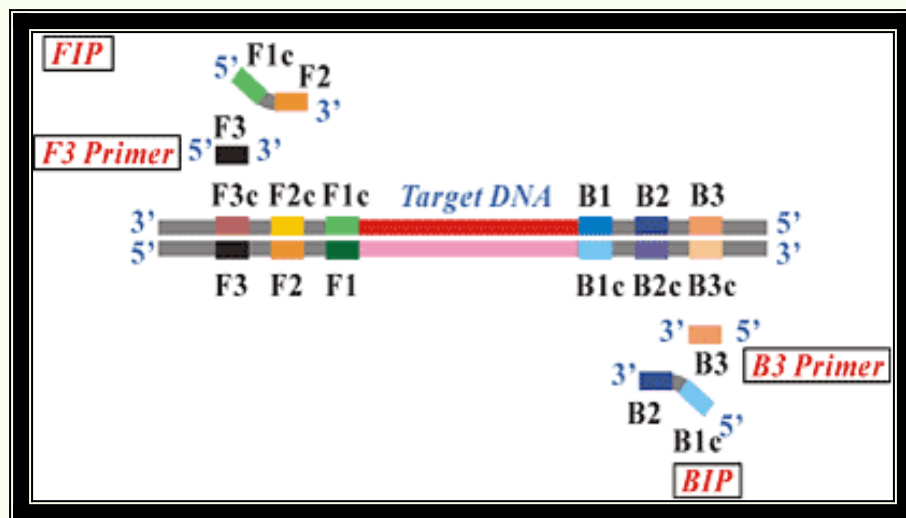


图1 靶序列上的6段区域及四种特异性引物

各区段的引物设计规则与PCR相同。设计时应注意碱基的构成GC含量二聚体结构引物序列的长度引物与引物间的距离 T_m 值（用毗邻法求得）3'末端不可出现富AT结构等，此外扩增的区段最好控制在300bp以内。每条引物的长度控制在1726nt之间；GC含量最好控制在40%50%之间；F1c和B1c的 T_m 值大约为64℃66℃，F2B2F3B3的 T_m 值大约为59℃61℃；F2与B2的5'端相距120240bp，F2与F3B2与B3相距020bp。

LAMP反应原理：

(1) 内引物 FIP首先和 F2c结合，具有链置换活性的Bst DNA

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半
内容。如要下载或阅读全文，请访问：

<https://d.book118.com/648010125051006116>