

# PaperPass[免费版]查重报告

## 简明打印版

### 查重结果(相似度):

总体: 12%

本地库: 12% (本地库包含期刊库、学位库、会议库、图书库、联合库)

- 期刊库: 10% (期刊库相似度是指论文与学术期刊库的比对结果)
- 学位库: 7% (学位库相似度是指论文与学位论文库的比对结果)
- 会议库: 3% (会议库相似度是指论文与会议论文库的比对结果)
- 图书库: 3% (图书库相似度是指论文与图书库的比对结果)
- 联合库: 3% (联合库相似度是指论文与大学生联合比对库的比对结果)

互联网: (免费版不检测互联网资源)

检测版本: 免费版(仅检测中文)

报告编号: 64979CAE88B50TYP8

论文题目: A类立项

论文作者: 佚名

论文字数: 11524

段落个数: 297

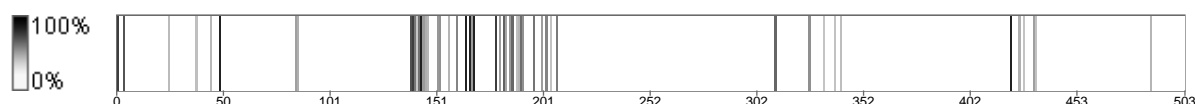
句子个数: 508

提交时间: 2023-6-25 9:47:26

比对范围: 期刊库、学位库、会议库、书籍数据、大学生联合比对库

查询真伪: <https://www.paperpass.com/check>

### 句子相似度分布图:



### 本地库相似资源列表(期刊库、学位库、会议库、书籍数据、大学生联合比对库):

- 相似度: 2.9%  
来源: 大学生联合比对库
- 相似度: 0.9% 篇名: 《犊牛腹泻的病因分析与治疗对策》  
来源: 学术期刊 中国畜牧兽医 2010年10期
- 相似度: 0.9% 篇名: 《牛轮状病毒引起的犊牛腹泻研究进展》  
来源: 学术期刊 中国奶牛 2016年2期
- 相似度: 0.8% 篇名: 《卵黄抗体的提纯及应用》  
来源: 学术期刊 家禽科学 2007年3期
- 相似度: 0.7% 篇名: 《犊牛腹泻的预防和治疗》  
来源: 学术期刊 兽医导刊 2014年16期
- 相似度: 0.7% 篇名: 《犊牛腹泻原因及预防》  
来源: 学术期刊 农家科技(下旬刊) 2014年4期
- 相似度: 0.7% 篇名: 《北方地区乳用犊牛常见疾病的预防和治疗》

- 来源: 学术会议 2012-10-01
8. 相似度: 0.7% 篇名: 《犊牛腹泻的病因、诊断及综合防治》  
来源: 学术期刊 天津农业科学 2008年5期
9. 相似度: 0.7% 篇名: 《犊牛腹泻的预防与治疗》  
来源: 学术期刊 黑龙江动物繁殖 2014年5期
10. 相似度: 0.6% 篇名: 《抗猪大肠杆菌卵黄抗体高免全蛋粉的研制》  
来源: 学位论文 中国农业大学 2003
11. 相似度: 0.6% 篇名: 《大肠杆菌引起犊牛的腹泻中西医结合治疗》  
来源: 学术期刊 兽医导刊 2016年14期
12. 相似度: 0.6% 篇名: 《犊牛病原性腹泻及疫苗研究进展》  
来源: 学术期刊 中国畜牧兽医 2017年12期
13. 相似度: 0.6% 篇名: 《牛病毒性腹泻病原的分子生物学与检测技术研究进展》  
来源: 学术期刊 西北民族大学学报(自然科学版) 2020年1期
14. 相似度: 0.5% 篇名: 《动物病原微生物分类名录》  
来源: 学术期刊 湖南畜牧兽医 2005年4期
15. 相似度: 0.5% 篇名: 《动物病原微生物分类名录》  
来源: 学术期刊 河南畜牧兽医 2005年9期
16. 相似度: 0.5% 篇名: 《兽医微生物实验室生物安全的实践要素》  
来源: 学位论文 南京农业大学 2011
17. 相似度: 0.5% 篇名: 《中华人民共和国农业部公告第492号》  
来源: 学术期刊 中国供销商情·乳业导刊 2005年7期
18. 相似度: 0.5% 篇名: 《中华人民共和国农业部第53号令》  
来源: 学术期刊 饲料与畜牧 2005年4期
19. 相似度: 0.5% 篇名: 《动物病原微生物分类名录》  
来源: 学术期刊 中国动物检疫 2005年7期
20. 相似度: 0.5% 篇名: 《动物病原微生物分类名录》  
来源: 学术期刊 湖北畜牧兽医 2006年1期
21. 相似度: 0.5% 篇名: 《BVDV  
RT-LAMP检测方法的建立及BRV和BVDV二联灭活疫苗的初步研制》  
来源: 学位论文 河北农业大学 2013
22. 相似度: 0.5% 篇名: 《最新动物病原微生物分类名录》  
来源: 学术期刊 中国牧业通讯 2005年13期
23. 相似度: 0.5% 篇名: 《大肠杆菌F4、F5天然菌毛及表达蛋白鸡卵黄抗体的制备及初步应用》  
来源: 学位论文 东北农业大学 2010
24. 相似度: 0.5% 篇名: 《北方地区乳用犊牛常见疾病的预防和治疗》  
来源: 学术期刊 养殖与饲料 2012年11期

### 互联网相似资源列表:

免费版不检测互联网资源库

82%

# 大学生创新训练项目计划申请书

项目编号			
项目名称	<div>75%</div> 抗牛轮状病毒、牛冠状病毒、大肠杆菌的高免卵黄抗体-噬菌体添加剂研制与应用		
项目负责人	高萌萌	联系电话	19845973386
所在学院	动物科技学院		
学号	20215032105	专业班级	动物医学（创新人才）班
指导教师	周玉龙		
申请日期	zhouyulong1980@163.com		
起止年月	2023 年 6 月-2025 年 6 月		

黑龙江八一农垦大学

一、 基本情况

项目名称	抗牛轮状病毒、牛冠状病毒大肠杆菌的高免卵黄抗体-噬菌体添加剂研制与应用						
项目级别	省级						
项目类型	创新训练项目						
项目类别							
所属学科	学科一级门： 农学    学科二级类： 动物医学类						
是否为重点支持领域	是	重点支持领域	泛终端芯片及操作系统、重大应用软件的应用开发；云计算、人工智能和无人驾驶；新材料及制造技术；新能源与储能技术；生物技术与生物育种；绿色环保与固废资源化；新一代通信技术、千兆光网技术和新一代 IP 网络通信技术；生物医学工程与精准医学、脑科学和类脑计算；城乡治理与乡村振兴；社会事业与文化遗产				
项目来源名称	B 学生来源于教师科研项目选题；						
选题来源	新农科						
起止年月	2023 年 6 月-2025 年 6 月						
负责人	高萌萌	性别	女	民族	汉族	出生年月	2003 年 7 月
学号	20215032105	联系电话	宅：19845973386 手机：19845973386		邮箱：2592919519@qq.com		
指导教师	周玉龙	联系电话	宅：13504679351 手机：13504679351		职称：正高级	邮箱： zhouyulong1980@163.com	

项目简介		<p>高免卵黄抗体是目前针对传染病利用被动免疫原理治疗的特效药物，在多种动物和人类的传染病防治上取得了成功。本项目拟应用实验室分离的 BRV 和 BCoV 流行毒株制备灭活疫苗，通过对疫苗抗原含量、免疫剂量和免疫途径优化，获得具有较高中和抗体效价的高免卵黄抗体。而对 K99 大肠杆菌有专性寄生作用的噬菌体可通过在大肠杆菌胞内复制增殖，产生许多子代噬菌体，并最终裂解细菌，且不对机体产生其他影响，二者搭配混合使用，对实验犊牛进行攻毒治疗，确定高免卵黄抗体和噬菌体复合物治疗效果，同时筛选出最佳的使用方法。从而研制出能有效预防、治疗 BRV 和 BCoV 传染性腹泻的二联高免卵黄抗体与噬菌体混合制剂用于提高犊牛成活率。</p>			
负责人曾经参与科研的情况		无			
指导教师承担科研课题情况		<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 牛冠状病毒介导的细胞自噬调控病毒感染机制研究 LH2020C083，黑龙江省自然科学基金，2020-2023，10 万元</li> <li>2. 牛轮状病毒、冠状病毒二联二价疫苗的免疫保护性研究 SKLVBF202006，兽医生物技术国家重点实验室，2020-2021，10 万元</li> <li>3. 牛轮状病毒和冠状病毒动物感染模型的建立 SKLVBF2018XX，兽医生物技术国家重点实验室 2018-2020，12 万元</li> <li>4. 牛冠状病毒感染对宿主细胞天然免疫功能影响机制研究 (LBH-Z18258)，2018 年度黑龙江省博士后基金，2018.7-2020.7，5 万元</li> <li>5. “2006-2018 年东北地区 BRDC 主要病原流行病学研究 (XDB201820)”，学成人才科研启动计划，2018.7-2021.7，5 万元</li> <li>6. BCoV N 蛋白单克隆抗体鉴定及在基于时间分辨荧光纳米微球免疫层析检测技术应用研究，校级“三纵”人才培育计划项目，2018.7-2021.7，2 万元</li> <li>7. 牛冠状病毒胶体金免疫层析检测试剂盒研制 (2011310066)，国家级大创项目，2018.6-2020.6，2 万元</li> </ol>			
指导教师对本项目的支持情况		<p>指导教师一直从事牛轮状病毒和冠状病毒致病机理和诊断与防治技术研究，做了大量的基础工作，积累了丰富的相关物质基础，也获得了多项科研项目的支持。指导教师对本项目选题、设计及立项等做了大量技术指导，也会在后续科研经费上给予大力支持。</p>			
项目组 主要成员	姓名	学号	专业班级	所在学院	项目中的分工
	高萌萌	20215032105	动医 21 创新人才	动物科技学院	噬菌体海藻糖粉的制备
	史佳萱	20215032118	动医 21 创新人才	动物科技学院	高免卵黄抗体粉的制备
	妥云晨	20215032423	动物医学三班	动物科技学院	犊牛治疗试验

张旭	19904510820	动医 21 创新人才	动物科技学院	管理动物实验 对实验动物的数据进行记录评分反馈给项目负责人
廖献茂	20215032508	动物医学四班	动物科技学院	高免卵黄粉与噬菌体海藻糖粉安全性检验

二、 立项依据（可加页）

<p>（一）研究目的</p> <p>76% 犊牛腹泻是发生在犊牛阶段一种常见病，一年四季均有发生，尤其以冬季和早春多发，81% 约占犊牛疾病的 80%，是造成犊牛生长发育不良和死亡的主要疾病之一，出生 1 个月内发病率和死亡率最高，被称为新生犊牛的杀手。64% 引起犊牛腹泻的病因极其复杂，包括营养性因素、环境性因素和病原微生物因素。40% 在诸多因素中病原微生物因素是主要原因，约占犊牛腹泻发病率的 66% 75%-95%。常见的病原有牛轮状病毒（Bovine rotavirus, BRV）、牛冠状病毒（Bovine coronavirus, BCoV）、产肠毒素 K99 大肠杆菌、空肠弯曲菌和沙门氏菌等，100% 而且临床上常呈现两种以上病原的混合感染。53% 其中 BRV、BCoV 和产毒素性大肠杆菌 K99 是引起犊牛腹泻的最常见病原，而且 BRV 和 BCoV 多呈原发性感染，47% 引起肠黏膜细胞损伤，此时更利于含 K99 菌毛抗原大肠杆菌的附着和感染，导致犊牛发生的腹泻更严重、死亡率更高、可达 50% 以上，最高死亡率可达 100%。</p> <p>45% 目前我国还没有特异性、有效的针对 BRV、BCoV 和 K99 大肠杆菌感染控制方法。在国外，主要是通过灭活疫苗或减毒疫苗免疫怀孕母牛，使初乳中含针对病毒的特异性抗体从而使饮用初乳后的犊牛提高被动免疫力或是通过新生犊牛口服疫苗来刺激产生主动免疫。而国内尚无商品化的 BRV、BCoV 和 K99 大肠杆菌疫苗，因此，急需研制能够有效防制 BRV、BCoV 和 K99 大肠杆菌感染的制剂。目前高免卵黄抗体是应用比较广泛地用于治疗高致病性传染病的有效药物，市场上已经有像新城疫、54% 法氏囊、传染性支气管炎、猪瘟病毒、猪圆环病毒 2 型、犬瘟热病毒、56% 犬细小病毒、猪流行性腹泻病毒、传染性胃肠病毒炎、猪轮状病毒和猪大肠杆菌等高免卵黄抗体制品。基于目前尚无针对 BRV、BCoV 和 K99 大肠杆菌感染的特效药物，本团队拟研制出抗 BRV、BCoV 和 K99 大肠杆菌的高免卵黄抗体-噬菌体添加剂，用于防制犊牛 BRV、BCoV 和 K99 大肠杆菌引起的腹泻。本项目若能成功实施研制出 BRV、BCoV 和 K99 大肠杆菌感染治疗制剂，将对提高犊牛成活率，45% 降低治疗成本，提高经济效益，保障养牛业健康发展有重要意义。</p>
--

(二) 研究内容

- 1.卵黄抗体粉的制备工艺。
- 2.专性噬菌体的筛选。
- 60% 3.噬菌体海藻糖粉的制备工艺
- 4.BRV-BCoV 高免卵黄抗体-K99 大肠杆菌噬菌体复合体治疗实验。

(三) 国、内外研究现状和发展动态

92% 牛轮状病毒 (Bovine Rotavirus, BRV), 属于呼肠孤病毒科(Reoviridae)轮状病毒属(Rotavirus)。

目前已知 BRV 有 24 个 G 基因型、33 个 P 基因型, 不同基因型之间抗原变异较大, 抗体交叉保护能力差, 对疫苗研制造成较大困难。100% 针对 BRV 疫苗的研究, 目前在世界范围内还比较有限。

53% 鉴于不同 G 型间轮状病毒不能完全交叉保护, 因此基因重配疫苗是目前人和动物轮状病毒疫苗研究的主要方向。98% 牛冠状病毒 (Bovine Coronavirus, BCoV) 属于冠状病毒科, 冠状病毒属 2a 亚群。

新生犊牛 BRV 和 BCoV 腹泻的防制通常采取免疫妊娠母牛增强母源抗体水平的方法。母源抗体通过初乳转移给犊牛, 使其获得被动免疫保护, 因此, 对 BRV 和 BCoV 引起的肠炎发挥保护作用[1,2]。预防肠道病毒感染的被动免疫效果, 主要由肠道内连续出现的特异性抗体水平来决定, 这可以通过新生犊牛饲喂含有这些特异性抗体的初乳实现。鉴于, 目前国内尚无可用的 BRV 和 BCoV 疫苗。可以选择 BRV 和 BCoV 高免卵黄抗体替代初乳用于这两种病毒引起的新生犊牛腹泻防治。卵黄抗体是一种免疫球蛋白 Y (IgY), 已经广泛用于预防和治疗人类和动物的传染病[3]。以前研究表明, 使用初乳、单克隆抗体、多克隆抗体可以预防人或者牛轮状病毒和冠状病毒感染[4,5]。IgY 已经成功的用于被动预防牛和人的轮状病毒、产肠毒素大肠杆菌、牛冠状病毒、沙门氏菌和链球菌等的感染[5-8]。目前, 兽医学界提倡应用 IgY 抗体替代抗生素控制和预防新生动物腹泻。

81% 母鸡在接受抗原刺激后产生免疫反应, 在卵黄的成熟期, 血液中免疫球蛋白可被选择性地转移到卵黄中, 而且是卵黄中唯一的免球蛋白[9]。IgY 具有四方面的优势, 一是高免卵黄抗体生产成本低廉, 卵黄的大规模生产和他们的处理比其它来源的 Ig 要容易。52% 每只母鸡每年可以产约 280 枚蛋, 每个卵黄中大约含有 IgY 100-150 mg, 因此, 免疫母鸡每年能产约 40g IgY, 等同于饲养



40 只兔子所产生的高免血清[12]。<sup>71%</sup>二是易于储存，常温下可以储存 3 个月左右，在 4℃可以保存 6~12 个月而抗体活性不下降[10]。<sup>50%</sup>三是可以抵抗动物体内胃酸的分解，也不会被肠道中的胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶消化和降解。由于这一特性，在制卵黄抗体时不用添加其他保护剂，大大降低了制作成本。<sup>54%</sup>四是与哺乳动物抗体相比，IgY 不会激活补体系统，因为当补体系统被激活后会影响抗原抗体结合，从而干扰 IgY 在体内的作用[11]。

<sup>69%</sup>卵黄抗体在各领域具有广阔的应用前景。在生物医学、兽医学等领域应用卵黄抗体防治畜禽传染病，是国内外兽医学界提出的一种新的思路，<sup>42%</sup>对当今畜禽疾病的防治研究做出了巨大贡献[13]。<sup>46%</sup>目前国内国内已经研制成功新城疫、法氏囊、传染性支气管炎、猪瘟病毒、猪圆环病毒 2 型、<sup>67%</sup>犬瘟热病毒、犬细小病毒、猪流行性腹泻病毒、传染性胃肠病毒炎、猪轮状病毒和猪大肠杆菌等高免卵黄抗体制品[14-17]。基于 IgY 优良的特性在免疫学诊断方面也得到应用，例如类风湿、蛇毒、血吸虫病等的诊断[18-20]。<sup>56%</sup>

基于国外对 BRV 或 BCoV 高免卵黄抗体研究证实，IgY 对 BRV 或 BCoV 引起的新生犊牛腹泻具有较好的防治效果，为本项目的实施提供了理论依据。前期研制的针对流行 BRV 毒株构建的 BRV G6/G10 基因重配二价疫苗，以及分离鉴定的致犊牛腹泻 BCoV 为本实验的顺利进行提供了物质保障。若 BRV-BCoV 高免卵黄抗体研制成功，下一步可以进行商品化，基于目前我国奶牛和肉牛存栏量庞大，而且这两种病原的发病率较高，<sup>65%</sup>可见本产品具有广阔的应用前景，能够创造巨大的经济效益和社会效益。

噬菌体疗法基于噬菌体短时间内能够吸附并裂解大量细菌而获得成功，可以采用口服、注射或喷洒等方式应用于感染器官或部位[21]。与抗生素疗法相比，噬菌体疗法不会产生与微生物群紊乱相关的副作用，如抗生素相关性腹泻、长期代谢和免疫紊乱[22]。无论是对全身感染还是局部感染，噬菌体疗法均具备完全替代抗生素的潜力[23]。<sup>52%</sup>当前，减抗替抗是畜牧养殖业发展的趋势。<sup>60%</sup>噬菌体作为一种广泛存在于自然界中的病毒，能够裂解细菌，具有特异性强、无耐药以及无残留的优点，是替代抗生素治疗细菌性感染疾病的最佳候选之一。然而，由于噬菌体裂解谱较窄、稳定性易受外界因素影响等原因，目前其在临床治疗应用上存在局限性。<sup>41%</sup>噬菌体鸡尾酒是噬菌体的混合物，可以拓宽宿主范围，并最大限度减少抗噬菌体细菌的产生。裂解酶作为噬菌体中最具杀菌活性的蛋白质，可高效地杀灭各种耐药性病原菌，其裂解谱、安全性、稳定性等方面均强于



噬菌体，更利于批量化生产，并广泛性应用于细菌感染性疾病的临床治疗。因此，深入了解噬菌体功能蛋白质，结合噬菌体工程，将有助于研发细菌性感染疾病抗生素替代产品。目前，国内外均已开展噬菌体相关动物模型和临床研究，且已有用于临床治疗的相关噬菌体产品获批使用。由此可见，噬菌体及其相关制剂治疗动物细菌感染性疾病具有较好的研究前景，在未来，开发工程噬菌体可能成为治疗细菌性感染疾病的研究重点。然而，若想将噬菌体及其衍生物作为新型兽药制剂广泛投入生产使用，仍需大量动物模型和临床研究评估其安全性和有效性。根据以上研究背景可以推断，噬菌体及其相关制剂有潜力成为治疗动物细菌感染性疾病的新兽药产品。

### 参考文献

- [1] Saif L.J., Redman D.R., Smith K.L., Theil K.W. Passive immunity to bovine rotavirus in newborn calves fed colostrum supplements from immunized or nonimmunized cows[J]. Infect. Immun. 1983, 41, 1118-1131.
- [2] Kohara J, Hirai T, Mori K., Ishizaki H, Tsunemitsu H. Enhancement of passive immunity with maternal vaccine against newborn calf diarrhea[J]. J. Vet. Med. Sci. 1997, 59, 1023-1025.
- [3] Kobayashi C, Yokoyama H, Nguyen Sa Van, Kodama Y, Kimata T, Izeki M. Effect of egg yolk antibody on experimental *Cryptosporidium parvum* infection in scid mice[M]. Vaccine, 2004, 23: 232-235.
- [4] Fernandez FM, Conner ME, Hodgins DC, Parwani AV, Nielsen PR, Crawford SE, Estes MK, Saif LJ. Passive immunity to bovine rotavirus in newborn calves fed colostrum supplements from cows immunized with recombinant SA11 rotavirus core-like particle (CLP) or virus-like particle (VLP) [M]. vaccines, Vaccine, 1998, 16: 507-516.
- [5] Vega C, Bok M, Chacana P, Saif L, Fernandez F, Parren˜o V. Egg yolk IgY: protection against rotavirus induced diarrhea and modulatory effect on the systemic and mucosal antibody responses in newborn calves[J]. Vet Immunol Immunopathol, 2011, 142: 156-169.
- [6] Ikemori Y, Ohta M, Umeda K, Icatlo FC Jr, Kuroki M, Yokoyama H, Kodama Y. Passive protection of neonatal calves against bovine coronavirus-induced diarrhea by administration of egg

yolk or colostrum antibody powder[M]. Vet Microbiol, 1997, 58: 105-111.

[7] Mine Y, Kovacs-Nolan J. Chicken egg yolk antibodies as therapeutics in enteric infectious disease: a review[J]. J Med Food, 2002, 5: 159-169.

[8] Nasiri K, Nassiri MR, Tahmoorespur M, Haghparast A, Zibae S. Production and characterization of egg yolk antibody (IgY) against recombinant VP8-S2 antigen[J]. Pol J Vet Sci. 2016; 19(2): 271-9.

[9] 王吉潭. 抗猪大肠杆菌卵黄抗体高免全蛋粉的研制.中国农业大学硕士学位论文[D], 2003.

[10] Schade R, Staak C, Hendriksen C, et al. The production of avian(egg yolk)antibodies: IgY. The report and recommendations of ECVAM workshop 21[J]. ATLA, 1997, 24(6): 925-934.

[11] Kapyaho K, Tanner P, Weber T. Effect of complement binding on a solid-phase immunometric TSH assay[J]. Scandinavian Journal of Clinical Laboratory Investigation, 1989, 49: 211-215.

[12] Rose ME, Orlans E, Buttress N: Immunoglobulin classes in the hen's eggs: Their segregation in yolk and white[J]. Eur J Immunol 1974;4:521 - 523.

[13] 王刚, 吕殿红. 卵黄抗体应用研究进展[J]. 动物医学进展, 2002, 23(1): 16-18.

[14] 穆海菠, 王洪新. 抗鸡新城疫卵黄抗体的研制[J]. 中国家禽, 2003, 25(14):9~10.

[15] 崔焕忠, 姜海龙, 张加力, 张辉, 秦贵信. 抗猪传染性胃肠炎病毒与猪流行性腹泻病毒卵黄抗体制备及其临床应用研究[J]. 中国畜牧兽医, 2012, 39(6): 173-175.

[16] 刘海生, 杨增岐, 张淑霞, 党如意, 王波, 张鹏, 樊荣. 抗仔猪大肠埃希菌病高免卵黄抗体粉的研制[J]. 动物医学进展, 2009, 30 (9) :15-19.

[17] 王建梅, 杨娇, 罗继芬, 王静梅, 剡根强.抗犬瘟热高免卵黄抗体的制备及效价的检测[J]. 石河子大学学报(自然科学版), 2012,30 (3) : 327-332.

[18] 杨婷婷. 鸡卵黄抗体(IgY)的提纯及其在医学上的应用[J]. 中国人兽共患病杂志, 2000, 16(3): 76-78.

[19] 王挂平, 余清声. 卵黄抗体用于蛇毒抗原检测的初步研究[J]. 中国药理学通报, 2005,

21(11): 1351-1354.

[20] 王成祖, 莫红梅, 程喻力. 抗日本血吸虫 SEA 鸡卵黄抗体的制备与鉴定[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2007, 25 (3) : 193—197.

[21] Dłbrowska K, Abedon S T. Pharmacologically aware bacteriophage therapy: pharmacodynamic and pharmacokinetic obstacles to bacteriophage antibacterial action in animal and human bodies[J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2019, 83(4): e00012-19.

[22] Altamirano F L G, Barr J J. Bacteriophage therapy in the postantibiotic era[J]. Clin Microbiol Rev, 2019, 32(2): e00066-18.

[23] Kortright K E, Chan B K, Kof J Let al. Bacteriophage therapy: a renewed approach to combat antibiotic-resistant bacterial[J]. Cell Host Microbe 2019. 25 (2) 219- 232.

#### (四) 创新点与项目特色

1. 基于 BRV、BCoV、K99 大肠杆菌引起的犊牛腹泻死亡率高危害严重，而且目前国内没有疫苗和药物用于防控该病，因此，本项目研制的 BRV、BCoV 卵黄抗体 K99 大肠杆菌噬菌体能够防治该病，能有效解决犊牛因腹泻所致成活率低问题。

2. BRV 和 BCoV 二联二价高免卵黄抗体具有质优价廉、性质稳定等优点，易于推广应用，能够创造良好经济效益。

3. 本项目的中 BRV 选用 HLJ-1 流行毒株，BCoV 也选择 HLJ-CD 流行毒株作为高免卵黄抗体的免疫原，具有时效性和广谱的保护效果，预期会产生良好的临床防治效果。

4. BRV 和 BCoV 二联二价高免卵黄抗体不存在生物安全风险，无药物残留，不污染环境等优点，是优秀的替抗素，具有良好的应用前景。

5. 噬菌体能够裂解细菌，具有特异性强、无耐药以及无残留的优点，是替代抗生素治疗细菌性感染疾病的最佳候选之一

69%

#### (五) 技术路线、拟解决的问题及预期成果

## 1.研究方法:

### 研究内容一：卵黄抗体粉的制备工艺

#### (1) 用 BRV、BCoV 疫苗免疫鸡群:

购入 90 日龄非免疫蛋鸡共 50 只，蛋鸡购入后静养 2 天后观察，鸡群整体精神状态良好，粪便性状、颜色正常，无啄羽、异食等现象。翅下静脉抽血后分离血清进行新城疫、禽流感血凝抑制试验，确认鸡群无新城疫、禽流感病毒感染后分成 5 组进行免疫如下：

第一组：BRV 疫苗颈部皮下注射 0.5mL。

第二组：BRV 疫苗颈部皮下注射 1mL。

第三组：BCoV 疫苗颈部皮下注射 0.5mL。

第二组：BCoV 疫苗颈部皮下注射 1mL。

57%<sub>↓</sub>  
1 免后 30 天进行加强免疫一次，免疫剂量同首次免疫剂量。

#### (2) 卵黄粉制备

在二次免疫之后进行鸡胚的收集，取其中的卵黄部分，使用喷雾干燥法制备卵黄粉

### 研究内容二： 专性噬菌体的制备

(1) 样本处理：将可能含有噬菌体的液体（下水道污水）进行离心取上清液。

41%<sub>↓</sub>  
(2) 扩增：向可能含有噬菌体的液体中加入 K99 大肠杆菌菌液培养。

(3) 筛选：制作 K99 大肠杆菌琼脂培养基，将可能含有噬菌体的液体做空斑试验，出现噬菌斑后，将噬菌斑连同琼脂取下，加入溶解液溶解，离心取上清。

41%<sub>↓</sub>  
(4) 纯化：用得到的含噬菌体的溶液进行倍比稀释，重复“筛选操作”，直到得到单一的噬菌斑。

(5) 保存：用低温冻干技术保存。

43%<sub>↓</sub>  
研究内容三：噬菌体海藻糖粉的制备工艺

(1) 初步暂定使用乙二醇作为载体，探究乙二醇浓度与作用温度以及作用时间探究海藻糖对于噬菌体的包裹效果。

### 研究内容 4： BRV-BCoV 高免卵黄抗体-K99 大肠杆菌噬菌体复合体治疗实验

(1) 治疗 选择中和抗体效价最好的一组高免卵黄抗体配合 K99 大肠杆菌噬菌体用于治

疗实验。选择发生新生犊牛腹泻，经诊断为 BCoV、BRV、K99 大肠杆菌其中一种或一种以上的病原微生物感染。

犊牛每天人工饲喂 1.5L 含有卵黄抗体海藻糖噬菌体的牛奶，连续饲喂 7 天。

第一组：2-4 头刚发生腹泻犊牛，牛奶添加卵黄抗体海藻糖噬菌体复合粉，效价为 1:1280（大约 0.25g 复合粉）。

第二组：2-4 头刚发生腹泻犊牛，牛奶添加卵黄抗体海藻糖噬菌体复合粉，效价为 1:2560（大约 0.5g 复合粉）。

第三组：2-4 头刚出生，未发生腹泻犊牛，牛奶添加卵黄抗体海藻糖噬菌体复合粉，效价为 1:1280（大约 0.25g 复合粉）。

第四组：2-4 头刚出生，未发生腹泻犊牛，牛奶添加卵黄抗体海藻糖噬菌体复合粉，效价为 1:2560（大约 0.5g 复合粉）。

第五组：2 头犊牛常规治疗，牛奶中不添加卵黄抗体海藻糖噬菌体复合粉。

## （2）治疗效果评价

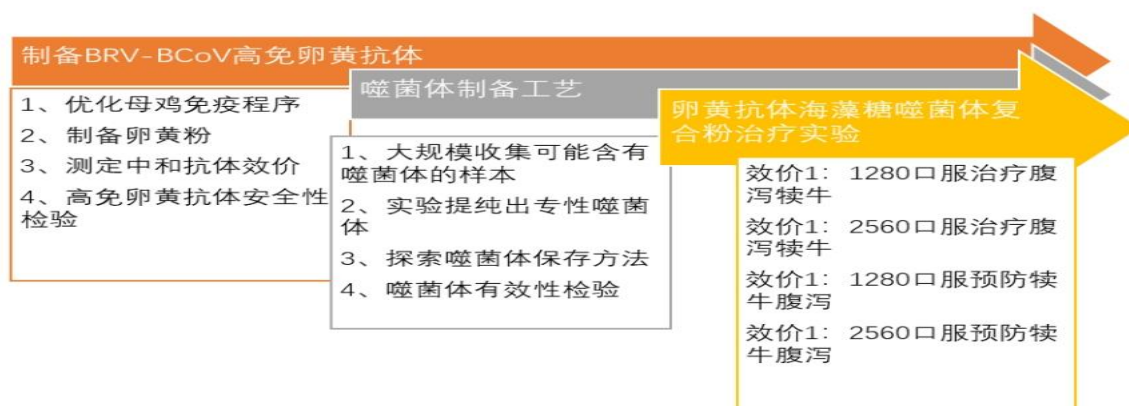
【1】将犊牛腹泻程度进行评分：0 = 正常，1 = 软粪便，2 = 中等腹泻，轻微脱水 3 = 严重腹泻，严重脱水，10 = 死亡。每天评分 2 次，上午和下午各一次。计算每头牛 7 天的总分数。

【2】过病毒分离法每天检测粪便中的 BCoV 与 BRV。

【3】计算犊牛增重率。体重增加百分率 = (第 7 天体重 - 刚出生体重) / 刚出生体重 × 100%。

【4】检查刚出生和饲喂 7 天卵黄抗体的犊牛血清中和抗体效价。

## 2.技术路线：



### 3.拟解决的问题:

(1) 通过培养工艺的优化提高 BRV 和 BCoV 的毒价, 进一步制备出良好的疫苗免疫原, 进一步通过免疫条件优化获得高水平的卵黄抗体。

(2) 通过临床治疗和攻毒治疗实验, 确定卵黄抗体海藻糖噬菌体复合粉的防治效果和最佳的使用方案。

(3) 确定通过卵黄抗体海藻糖噬菌体复合粉的使用能有效防治由 BRV、BCoV 与 K99 大肠杆菌引起的感染性腹泻, 提高犊牛成活率。

### 4.预期成果

(1) 研制出 BRV 和 BCoV 二联高免卵黄抗体的制备工艺。

(2) 研制出噬菌体的制备工艺。

(3) 研制出卵黄抗体(卵黄粉)与海藻糖粉噬菌体混合方法。

(3) 筛选出由 BRV、BCoV 与 K99 大肠杆菌引起的犊牛腹泻的防治方案。

(4) 发表论文一篇、申请发明专利一项。

### (六) 项目研究进度安排

2022 年 7 月-2023 年 12 月

(1) 查阅文献, 准备实验材料;

(1) 免疫接种。

(2) 卵黄抗体效价监测。

(3) 卵黄粉制备及检验。

(4) 噬菌体海藻糖粉制备及检验

2024 年 1 月-2024 年 7 月

(1) 临床应用。

(2) 分析整理研究结果, 撰写论文, 申请专利。



(3) 准备结题材料。

## (七) 已有基础

### 1. 与本项目有关的研究积累和已取得的成绩

【1】周玉龙, 任亚超, 胡林杰, 等. 抗 BCoV-N 蛋白单克隆抗体杂交瘤细胞系及抗体与应用。申请号: 20191073425, 申请日期: 2019.8.9.

【2】贾伟强, 胡林杰, 孟野, 周玉龙\*. 黑龙江省大庆市部分地区牛轮状病毒腹泻的分子流行病学调查[J]. 畜牧与饲料科学, 2019, 40(05):107-108+112.

【3】贾伟强, 曲庆, 赵帅, 周玉龙\*. 牛轮状病毒研究进展[J]. 中国奶牛, 2020(02):49-52.

【4】贾伟强, 曹禹, 周玉龙\*, 于力, 常继涛. 牛轮状病毒 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及应用, 动物医学进展, 2020, 41(5):1-5.

【5】贾伟强. 牛轮状病毒感染新生犊牛的模型建立[D]. 2019, 黑龙江八一农垦大学.

【6】高国强. 牛冠状病毒分离鉴定及重组 N 蛋白间接 ELISA 诊断方法的建立[D]. 黑龙江八一农垦大学, 2018. (周玉龙为第二指导教师)

【7】曹禹. BRV 与 BCoV SYBR Green I RT-qPCR 检测方法的建立及应用[D]. 黑龙江八一农垦大学, 2018. (周玉龙为指导教师)

【8】高国强, 王梦心, 刘明明, 于仁冬, 侯喜林, 周玉龙\*, 武瑞, 张国华, 刘琳珊, 任德强. 牛冠状病毒 S 基因的序列分析及原核表达[J]. 中国畜牧兽医, 2018, 45 (7): 1740-1749.

【9】胡林杰, 孟野, 周玉龙\*, 贾伟强, 翟海瑞, 武瑞, 侯喜林. 检测牛冠状病毒抗体间接 ELISA 方法的建立与应用 [J]. 微生物学通报, 2020, 47 (1): 330-338.

证书号第3973716号



## 发明专利证书

发明名称：一种牛冠状病毒 ELISA 检测试剂盒

发明人：周玉龙;范春玲;倪宏波;朱战波;侯喜林;邵红;武瑞  
任亚超;高国强;贾伟强;王梦心;胡林杰;孟野;盛守志

专利号：ZL 2018 1 0424384.8

专利申请日：2018年05月07日

专利权人：黑龙江八一农垦大学

地址：163319 黑龙江省大庆市萨尔图区新阳路2号黑龙江八一农垦大学

授权公告日：2020年09月04日 授权公告号：CN 108318686 B

国家知识产权局依照中华人民共和国专利法进行审查，决定授予专利权，颁发发明专利证书并在专利登记簿上予以登记。专利权自授权公告之日起生效。专利权期限为二十年，自申请日起算。

专利证书记载专利权登记时的法律状况。专利权的转移、质押、无效、终止、恢复和专利权人的姓名或名称、国籍、地址变更等事项记载在专利登记簿上。

局长  
申长雨

申长雨



第1页(共3页)

其他事项参见背面

## 黑龙江省大庆市部分地区 牛轮状病毒腹泻的分子流行病学调查

贾伟强, 胡林杰, 孟 野, 翟海瑞, 盛守志, 靳广杰, 周玉龙  
(黑龙江八一农垦大学动物科技学院, 黑龙江 大庆 163319)

**摘要:** 为了对黑龙江省大庆市部分地区犊牛轮状病毒腹泻的流行情况进行调查, 应用 RT-PCR 技术对随机采取的 6 份犊牛腹泻粪便样品的轮状病毒 VP7 基因进行扩增, 采用多重半套式 PCR 方法对 VP7 基因阳性样本进行分型鉴定。结果显示, 6 份犊牛腹泻粪便样品中牛轮状病毒 VP7 基因均为阳性; VP7 基因阳性样本经 RT-PCR 分型鉴定, 均属于 G10 型。该研究结果表明大庆地区引起犊牛轮状病毒腹泻的轮状病毒主要为 G 型, 因此需要针对 G 型轮状病毒加以防控。

**关键词:** 牛轮状病毒; 流行病学调查; 分子鉴定; 腹泻; 防控

**中图分类号:** S858.237.3; S852.653

**文献标识码:** A

**文章顺序编号:** 1672-5190(2019)05-0107-02

### Molecular Epidemiology of Bovine Rotavirus Infections in Some Areas of Daqing City of Heilongjiang Province

JIA Wei-qiang, HU Lin-jie, MENG Ye, ZHAI Hai-rui, SHENG Shou-zhi, JIN Guang-jie, ZHOU Yu-long  
(College of Animal Science and Veterinary Medicine, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China)

**Abstract:** In order to investigate the prevalence of rotavirus infection associated calf diarrhea in some areas of Daqing City of Heilongjiang Province, six randomly collected fecal samples from calf with diarrhea were detected for the presence of VP7 gene of bovine rotavirus by using RT-PCR assay, and the VP7 gene positive samples were subjected to genotyping via multiple semi-nested PCR assay. The results showed that all of the six clinical samples were positive for VP7 gene of bovine rotavirus, and they were all proved to belong to G10 type. It was indicated that the G-type bovine rotavirus was one of the main causative agents associated with the calf diarrhea in Daqing area. Therefore, the prevent and control measures targeting on G-type bovine rotavirus infection should be implemented.

**Key words:** bovine rotavirus; epidemiological investigation; molecular identification; diarrhea; prevention and control

**DOI:** 10.16003/j.cnki.issn1672-5190.2019.05.025

轮状病毒 (rotavirus, RV) 属于呼肠孤病毒科轮状病毒属, 是导致多种幼龄动物腹泻的主要病原之一<sup>[1]</sup>, RV 源于拉丁文单词“rota”, 意思是“轮子”, 因为它们的形态像“车轮”, 故被命名为轮状病毒。RV 拥有一个由 11 段双链 RNA 组成的基因组, 包含外层、内层和核心三层蛋白衣壳组成, 可将其分为 7 个不同的群(A-G)。A、B 和 C 群可以感染人和动物, 但 A 群轮状病毒的危害最为严重, 而 D、E、F 和 G 群目前只在动物中出现过<sup>[2]</sup>。RV 基因组共编码 6 种结构蛋白 (VP1-VP4, VP6 和

VP7) 和 5 种非结构蛋白 (NSP1-NSP5)。根据 VP4 和 VP7 的不同划分 RV 血清型, 采用二元分型体系, 将轮状病毒分成不同的 P 型和 G 型, 外层衣壳蛋白 VP7 是由 RV 的第 9 或第 7、8 (根据不同毒株而异) 基因节段编码的。VP7 蛋白由 326 个氨基酸组成, 分子量为 37 kDa, 占病毒蛋白总量的 30%, 是 RV 结构中第二多的结构蛋白, 其构成 RV 的外层衣壳, 是病毒的主要中和抗原, 决定病毒的 G 血清型<sup>[3]</sup>。

轮状病毒可引起 1-7 日龄犊牛精神轻度沉郁、酸中毒, 并会出现食欲废绝及水样腹泻等临床症状, 感染该病毒的犊牛经常伴有牛冠状病毒 (bovine coronavirus, BCV) 及大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 感染而导致死亡。该病在全球的养牛国家和地区均有发生及流行, 给养牛业造成了严重的经济损失。

该文对大庆市部分地区犊牛腹泻粪便样品中的轮状病毒进行检测, 以期在一定程度上了解大庆地区该病的流行情况。

收稿日期: 2019-04-03

项目来源: 兽医生物技术国家重点实验室开放课题基金项目 (SKLVBF2018XX); 黑龙江八一农垦大学自然科学基金人才支持计划 (ZRCPY201807); 黑龙江农垦总局攻关项目 (HNK135-04-02-02)。

作者简介: 贾伟强 (1995—), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为家畜传染病。

通讯作者: 周玉龙 (1980—), 男, 副教授, 博士, 硕士生导师, 主要研究方向为家畜传染病。



2019296

## 国家知识产权局

163311

黑龙江省大庆市萨区新村纬三路 82 号  
大庆禹奥专利事务所 朱士文(0459-6368849),杨晓梅(0459-6368849)

发文日:

2019 年 08 月 09 日



申请号或专利号: 201910734259.1

发文序号: 2019080901298500

## 专利 申请 受理 通知书

根据专利法第 28 条及其实施细则第 38 条、第 39 条的规定,申请人提出的专利申请已由国家知识产权局受理。现将确定的申请号、申请日、申请人和发明创造名称通知如下:

申请号: 201910734259.1

申请日: 2019 年 08 月 09 日

申请人: 黑龙江八一农垦大学

发明创造名称: 抗 BCov-N 蛋白单克隆抗体杂交瘤细胞系及抗体和应用

经核实,国家知识产权局确认收到文件如下:

说明书摘要 每份页数:1 页 文件份数:1 份

实质审查请求书 每份页数:1 页 文件份数:1 份

生物材料样品保藏及存活证明中文题录 每份页数:1 页 文件份数:1 份

专利代理委托书 每份页数:2 页 文件份数:1 份

生物材料保藏证明 每份页数:2 页 文件份数:1 份

发明专利请求书 每份页数:6 页 文件份数:1 份

说明书附图 每份页数:3 页 文件份数:1 份

权利要求书 每份页数:1 页 文件份数:1 份 权利要求项数: 4 项

说明书 每份页数:11 页 文件份数:1 份

提示:

1. 申请人收到专利申请受理通知书之后,认为其记载的内容与申请人所提交的相应内容不一致时,可以向国家知识产权局请求更正。
2. 申请人收到专利申请受理通知书之后,再向国家知识产权局办理各种手续时,均应当准确、清晰地写明申请号。
3. 国家知识产权局收到向外国申请专利保密审查请求书后,依据专利法实施细则第 9 条予以审查。

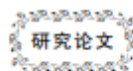
审查员:自动受理

审查部门:专利局初审及流程管理部

200101  
2018.10

纸件申请,回函请寄:100088 北京市海淀区前门桥西土城路 6 号 国家知识产权局受理处收  
电子申请,应当通过电子专利申请系统以电子文件形式提交相关文件。除另有规定外,以纸件等其他形式提交的文件视为未提交。





## 牛轮状病毒 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及应用

贾伟强<sup>1</sup>, 曹禹<sup>1</sup>, 周玉龙<sup>1\*</sup>, 孟野<sup>1</sup>, 胡林杰<sup>1</sup>, 翟海瑞<sup>1</sup>, 范增磊<sup>1</sup>,  
盛守志<sup>1</sup>, 于力<sup>2</sup>, 常继涛<sup>2</sup>, 范春玲<sup>1</sup>

(1. 黑龙江八一农垦大学动物科技学院, 黑龙江大庆 163319;

2. 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所牛羊传染病研究创新团队, 黑龙江哈尔滨 150069)

**摘要:**旨在建立一种 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测牛轮状病毒(BRV)的方法, 并采用针对 BRV vp6 基因序列保守区设计的引物, 使用 RT-qPCR 方法进行目的基因扩增, 优化反应条件, 制备阳性标准品, 建立标准曲线, 确定重复性、敏感性和特异性, 与常规 PCR 方法比较。结果显示, 建立的 RT-qPCR 方法最佳引物浓度为 5  $\mu\text{mol/L}$ , 退火温度为 58 $^{\circ}\text{C}$ , 40 个循环, 熔解温度为 77 $^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ , 最小检出量 8.13 copies/ $\mu\text{L}$ 。两种方法检出率分别为 30.4% 和 19.6%, RT-qPCR 具有较高敏感性。建立的 RT-qPCR 可为 BRV 感染早期诊断、分子流行病学调查及定量检测分析等提供技术保障。

**关键词:**牛轮状病毒; SYBR Green I; 实时荧光定量 PCR

DOI:10.16437/j.cnki.1007-5038.2020.05.001

中图分类号: S852.659.4

文献标识码: A

文章编号: 1007-5038(2020)05-0001-05

轮状病毒(Rotaviruses, RV)是呼肠病毒科轮状病毒属成员之一, 由 11 段双股 RNA 组成的 RV 基因组编码 6 种结构蛋白和 6 种非结构蛋白(VP1、VP2、VP3、VP4、VP6 和 VP7、NSP1、NSP2、NSP3、NSP4、NSP5、NSP6)<sup>[1-2]</sup>。根据 RV 衣壳蛋白的抗原性和 PAGE 图的差异, 将其分为 A~G 7 个群, 其 A~C 群 RV 可以感染牛, A 群轮状病毒主要引起新生犊牛腹泻, 具有严重的危害, 又被称为“犊牛杀手”。核心蛋白 VP6 是由 RV 的第 6 基因节段编码的, 由 397 个氨基酸组成, 分子质量为 45 ku, 占病毒蛋白的 51%, 在结构蛋白中占比例最大。VP6 基因序列呈高度保守性, 且具有较强的抗原性和免疫原性<sup>[3]</sup>, 是检测 A 群轮状病毒的主要靶基因<sup>[4]</sup>。

1969 年首次用电镜观察发现牛轮状病毒(Bovine rotavirus, BRV)以后, 至今 BRV 在世界各地均有分布。BRV 感染引起 0 日龄~10 日龄新生犊牛的腹泻、脱水, 最终可能导致死亡, 发病率高达 60%~80%, 病死率也达 10%~50%。当犊牛发生 BRV 感染时, 必然会伴有牛冠状病毒(Bovine coronavirus, BCoV)或大肠埃希菌(*E. coli*)的感染, 导致病死率上升<sup>[5]</sup>。BRV 感染引起的腹泻, 排毒量在感染

24 h 以内最高, 期间收集排泄物或肠内容物更有利于对该病的检测。BRV 检测技术种类繁多, 可以采用经典的病毒分离、PCR 法、TaqMan 探针 RT-qPCR 法、电泳技术、环介导等温扩增(LAMP)等检测技术, 上述方法各有优点, 但在临床应用时存在耗时、易污染、成本昂贵等方面的不足, SYBR Green I 实时荧光定量 PCR(SYBR Green RT-qPCR)法较 TaqMan 探针 RT-qPCR 法不仅经济实惠, 且可以绘制熔解曲线。与传统普通 PCR 法相比, 省去了凝胶电泳分析, 可以避免致癌试剂(如 EB 等)的使用, 更加安全环保<sup>[6-7]</sup>。本研究拟根据 BRV 高度保守的 VP6 基因建立检测 BRV 的 SYBR Green I RT-qPCR 方法, 为 BRV 临床快速检测和实验动物模型的建立提供技术支持。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

1.1.1 病毒株 BRV、牛冠状病毒(Bovine coronavirus, BCoV)、牛副流感病毒 3 型(Bovine parainfluenza virus, BPIV3)、牛病毒性腹泻病毒(Bovine viral diarrhea virus, BVDV)和牛呼吸道合胞体病毒

收稿日期: 2019-05-17

基金项目: 兽医生物技术创新国家重点实验室开放课题基金项目(SKLVBF2018XX); 黑龙江八一农垦大学自然科学人文学科项目(ZRCPY201807); 农垦总局攻关项目(HNK135-04-02-02)

作者简介: 贾伟强(1995-), 男(蒙古族), 内蒙古阿荣旗人, 硕士研究生, 主要从事分子病毒学研究。\*通讯作者

2. 已具备的条件，尚缺少的条件及解决方法

已具备条件：

(1) 在前期研究中已经从新生犊牛腹泻样本和发生“冬痢”成年牛粪便样本中分离到 5 株 BCoV、G6 和 G10 型 BRV 各 1 株，而且对其理化特性、S 和 N 基因发育特征进行了研究。

(2) 建立了以重组 N 蛋白为抗原的间接 ELISA 诊断方法，并且装配成试剂盒可用于 BCoV 抗体的临床样本检测。

(3) 制备出了抗 BCoV N 蛋白的特异性单克隆抗体，特异性强，亲和力高，可用于免疫印迹、IHC 和 IFA 实验检测病毒抗原。

(4) 以对 BRV 和 BCoV 培养工艺和疫苗制备工艺进行了初步优化，进行了免疫座机筛选，与天津挑战生物技术有限公司合作制作一批卵黄抗体应用于腹泻犊牛，针对 BRV 感染性腹泻效果良好。

尚缺少的条件及解决方法：

下一步尚需对 BRV 和 BCoV 培养工艺进行优化，提高抗原含量，选用 V60 佐剂替代 206 佐剂提高免疫应答能力，增加免疫次数和免疫剂量，制备出高效价卵黄抗体。缺少科研资金，如能获得足够资金支持本项目能顺利完成。

三、 经费预算

开支科目	预算经费 (元)	主要用途	阶段下达经费计划 (元)	
			前半阶段	后半阶段



预算经费总额	5000. 00		4000.00	1000.00
1. 业务费	1000.00	无	0.00	1000.00
（1）计算、分析、测试费	0.00	无	0.00	0.00
（2）能源动力费	0.00	无	0.00	0.00
（3）会议、差旅费	0.00	无	0.00	0.00
（4）文献检索费	0.00	无	0.00	0.00
（5）论文出版费	1000.00	用于发表论文	0.00	1000 元
2. 仪器设备购置费	0.00	无	0.00	0.00
3. 实验装置试制费	3000.00	用于购买胎牛血清、培养基、佐剂等	3000.00	0.00
4. 材料费	1000.00	45% 用于购买细胞瓶、吸头、细胞培养皿、离心管等	1000.00	0.00
学校批准经费				

#### 四、 指导教师意见

导师（签章）：
年                      月                      日

#### 五、 院系大学生创新创业训练计划专家组意见

专家组组长（签章）：
------------

年	月	日
---	---	---

六、 学校大学生创新创业训练计划专家组意见

负责人（签章）：		
年	月	日

七、 大学生创新创业训练计划领导小组审批意见

导师（签章）：		
年	月	日