

体外核酸快速扩增技术的发展和不断创新

吕 蓓¹ 程海荣² 严庆丰⁴ 黄震巨³ 李轶女¹ 罗 达⁵ 沈桂芳¹ 张志芳¹
邓子新² 林 敏¹ 程 奇^{1*}

(1 中国农业科学院生物技术研究所 北京 100083 2 上海交通大学生命科学技术学院 微生物代谢教育部重点实验室 上海 200240)

(3 浙江泰晶生物科技有限公司 宁波 315100 4 浙江大学生命科学院 杭州 310058 5 中山大学生命科学院 广州 510275)

摘要 利用聚合酶链式反应(PCR)进行的核酸体外扩增是1983年开始发展起来的一项革命性技术,目前已被广泛运用于现代化的农业和医学以及食品工业等领域,特别是在人类认知基因和基因组的过程中,体外核酸扩增技术做出了卓越的贡献。最初,体外核酸扩增技术主要是利用耐高温的DNA聚合酶(*Taq*酶),这样就使核酸的体外扩增反应可以在热循环中进行。但因需要使用昂贵的设备和消耗大量的电力,其成本和应用范围都受到一定的限制。之后,恒温体外核酸扩增悄然兴起,这改变了传统扩增技术的局限性,使核酸的体外扩增更加简单和方便。重组酶介导扩增(RAA)法是一种最新型的恒温体外核酸扩增技术,该系统的显著优点在于它在常温下就能实现DNA解链并快速扩增(15~30min完成),反应快速、专一性好、灵敏度高,还可用于定时定量的结果分析。

关键词 重组酶介导 核酸体外扩增 恒温

中图分类号 Q784

人类几千年的文明史发展至今,其实也是一个科学技术发展的过程,这在20世纪尤为突出。其中生物技术近30年的发展,经历了史无前例的飞跃,现代生物技术已经渗透到了人们衣食住行的每一环节。对核酸和蛋白质大分子的研究,从发现到认识和利用的过程也是飞速惊人,甚至有时会远远超出人类的想象。1953年美国人Watson和英国人Crick率先向世人展示了DNA双螺旋结构模型,地球上生命之谜的大门从此

打开。如今人类已经对地球上几乎所有生命的基因组都开始着手分析,至今有近万个全基因组序列,覆盖了微生物、植物、动物以及人类自身(表1)。这就为将生物技术彻底运用于现代化的农业和医学以及食品工业等相关行业铺平了道路。相信在未来10年里,全基因组的资源将以指数级速度增长,预计到21世纪末,一些全功能基因组分析也将完成。

表1 几大类基因组资源

Table 1 Genome Resources

基因组	资 源
真核生物类 Eukaryotic	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/leuks.cgi
真菌类 Fungi	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/leuks.cgi? p3 = 11; Fungi&taxgroup = 11; Fungi 12;
昆虫类 Insects	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/leuks.cgi? p3 = 12; Insects&taxgroup = 11; 12; Insects
哺乳类 Mammals	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/leuks.cgi? p3 = 12; Mammals&taxgroup = 11; 12; Mammals
微生物类 Microbial	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/MICROBES/microbial_taxtree.html
病毒资源 Viral Resources	
流感病毒 Influenza Virus	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/FLU.html
逆转录酶病毒 Retroviruses	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/retroviruses/
病毒基因组 Viral Genomes	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/GenomesHome.cgi? taxid = 10239

蛋白质是生命活动的表达物质,基因则是编码蛋

白质的特异的核苷酸序列。继Watson和Crick第一次揭示了DNA的双螺旋结构之后,许多科学家又发现了能专一识别核酸序列的各类酶。而在1983年人类第

收稿日期:2010-11-11 修回日期:2011-01-04

* 通讯作者,电子邮箱:chengqi@caas.net.cn

一次能够在体外扩增 DNA 之后,对核酸的操作和利用进入了一个革命性的阶段,直到现在,体外核酸扩增技术仍在不断地改进和完善。

1 核酸扩增技术的迅速发展

1.1 PCR 技术的出现

20 世纪 60 年代末 70 年代初人们开始致力于研究基因的体外分离技术,Korana 于 1971 年最早提出核酸体外扩增的设想:“经过 DNA 变性,与合适的引物杂交,在 DNA 聚合酶的作用下将引物延伸,并不断重复该过程便可克隆 tRNA 基因”。这个设想在理论上是完全可以实现的,首先高温可以使 DNA 双链打开,再在降温退火的过程中使两端的同源引物配对,然后由 DNA 聚合酶延伸合成新生的链。但 DNA 变性需要高温,而通常情况下,任何酶在高温下都会完全失去活性,因此 Korana 的创造性想法一直未能得以实现。直到 1983 年,一个叫 Kary Mullis 的美国人(PE-Cetus 公司人类遗传研究室),在从著名的黄石公园度假回来的路上,他的灵感忽然让他想到了一个能使双链 DNA 从一个变成多个乃至大量拷贝的方法。这个方法就是聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)。PCR 反应的关键就在于 Mullis 找到了可以在高温下不会变性的 DNA 聚合酶(*Taq* DNA 聚合酶),并用这个酶完美

地实现了 Korana 提出的核酸体外扩增的设想。PCR 技术无疑给分子生物学带来了革命,它使扩增和克隆基因成为常规操作程序,也为 DNA 指纹鉴定、亲子和亲缘关系的鉴定和那些遗传和病原菌引起的疾病的诊断成为可能。20 多年来,PCR 技术在高效高保真方面都得到了全面的发展和完善,后来还出现了 RT-PCR(半定量)、Real-time PCR(定量跟踪)、免疫-PCR 和 qPCR 等。

通过 PCR 技术,特定序列的 DNA 分子可以实现指数级别的扩增,从原来的少量分子扩增到可以用仪器检测的水平,利用这一特点可以对一些特异的病原或疾病标志物进行诊断,现在已被广泛应用于疾病检测和诊断等各个领域。常规的 PCR 技术由于热循环的需要,使这一技术完全依赖于电源和昂贵的 PCR 仪器,从而限制了这一技术在实验室之外的应用。由于上述缺点,科学界一直在试图发展不需要使用 PCR 仪器的核酸扩增方法,常温或恒温核酸扩增技术的发展成为一个不可逆转的趋势。

1.2 恒温 PCR 技术的兴起

由于传统 PCR 始终受仪器设备和电力以及空间等诸多因素的限制。近年来恒温 PCR 技术已经开始悄然兴起(表 2)。在过去 10 年中,若干恒温核酸扩增技术得到快速发展^[1],如 SDA 技术、TMA 技术、HDA 技术、LAMP 技术和 RPA /RAA 技术等^[2-9]。

表 2 几种恒温核酸扩增技术缩写列表

Table 2 The abbreviation of isothermal nucleic acid amplification methods

缩写	名称	中文名称
TMA	Transcription-mediated amplification	转录介导扩增法
NASBA	Nucleic acid sequence-based amplification	核酸序列扩增法
SDA	Strand displacement amplification	链置换扩增法
HDA	Helicase-dependent isothermal DNA amplification	解旋酶恒温基因扩增法
LAMP	Loop-mediated isothermal amplification	环介导等温扩增法
RCA	Rolling circle amplification	滚环扩增法
RPA	Recombinase polymerase amplification	重组酶聚合酶扩增法
RAA	Recombinase-aid amplification	重组酶介导扩增法

在这几种技术中,LAMP 技术和 RPA/RAA 技术是相对比较成熟的技术(表 3)。

表 3 几种恒温核酸扩增技术的性能比较

Table 3 The function of different isothermal nucleic acid amplification methods

	TMA	SDA	HDA	LAMP	RCA	RPA/RAA
超稳定性	+	N/K	-	N/A	N/K	+
无需温控操作	N/K	-	-	N/A	N/K	+
速度(min)	20	30-40	30-60	>60	<25	<15
模板	RNA	+	+	DNA	RNA	DNA/ RNA
多重扩增反应/探针	+	+	-	+	-	+
灵敏度	+	+	-	-	+	+
热/冷/可操作性	-	-	-	-	-	+
模板复杂性	N/A	-	-	+	+	+
定量跟踪操作	-	+	+	-	-	+

注: +:好; -:不好; N/A:无; N/K:未知。

LAMP 技术需要使用 4~6 个引物, 在使用 6 个引物的时候, 反应可以在 20~30min 完成。LAMP 反应需要在 65℃ 下进行。通过类似于滚环复制的链替换反应, 可以生成一系列分子质量大小不同的扩增产物。其优点在于, 只需要使用一个 *Bst* DNA 聚合酶, 该酶可以在 65℃ 恒温的条件下使 DNA 在体外扩增, 且其反应组分可以在室温稳定地保存若干星期, 这为其用于野外诊断提供了便利^[10]。LAMP 反应的灵敏度高于传统的高温 PCR, 与巢式 PCR 反应的灵敏度相似^[11-15], 并且反应的结果特异可靠^[16-18], 还可以用于未纯化的样品^[19]。通过使用荧光染料, LAMP 反应的结果可以直接用肉眼观测或使用荧光计进行定量。当然, LAMP 技术也存在一些不可忽视的缺点, 首先, 引物设计复杂, 需要使用特殊的软件。其次, 引物个数多, 并且由于其反应原理和 PCR 完全不同, LAMP 反应得到的产物是一系列大小不同的扩增片段, 无法直接进行测序和克隆, 只能用于判断是否存在目的模板。最后, 使用嵌入式的荧光染料进行定量扩增的时候不可避免有假阳性的问题。

尽管 LAMP 技术存在一些不足, 但在国际上, 该技术已被成功应用在分子诊断和微生物病毒检测等领域。例如, 根据结核菌的保守序列 IS6110 设计的 LAMP 引物, 可在样品中检测到痕量的结核菌 DNA 片段, 结核菌检测的正确率能达到 100%, 且在检测结核菌的灵敏度方面, LAMP 技术与巢式 PCR 的灵敏度相同, 但比传统 PCR 技术的灵敏度高约 20 倍^[20]。

目前国内对 LAMP 技术也已经有所应用, 如上海血液中心发展了用 LAMP 技术进行血液筛查 HIV/HBV 等方法并申请了国家专利。广州华峰生物公司也申请了一系列的 LAMP 相关技术的专利, 用于食物中毒的一系列相关病原的检测, 如李斯特菌、沙门氏菌以及大肠杆菌 O:157 等^[21]。

2 RPA/RAA—常温核酸扩增的创新技术

最近使用的常温核酸扩增技术, 以利用 T4 噬菌体 DNA 复制机理系统最为成功, 在 DNA 扩增技术方面这项新的发明叫重组酶聚合酶扩增法 (recombinase polymerase amplification, RPA)。在 RPA 系统中, 除需要一种常温下能工作的 DNA 聚合酶外, 还包含一个 T4 重组酶和一个单链 DNA 结合酶 (single-stranded DNA binding, SSB), 以及另一个辅助 DNA 重组酶的蛋白。如果效仿 Real-time PCR 利用简易的荧光仪, 还需一个

荧光蛋白的帮助。该系统的显著优点在于它在常温下就能实现 DNA 解链并快速扩增 (15~30min 内完成)。所以 RPA 扩增 DNA 技术就免去了使用贵重的 PCR 仪器, 而且也不受样品槽孔多少和空间的限制。国际上已经有三个公司分别各有一个类似技术的专利^[22-24]。

RPA 技术主要利用一个 T4 重组酶的活性, 在 SSB 和 DNA 重组酶的辅助下, 不进行核酸解链和退火, 即可在 37℃ 进行核酸的扩增。由于重组酶的特性, 所使用的两个引物长度需大于 30bp。其优点在于, 反应可以生成和 PCR 一致的单一条带, 可以直接测序或用于连接到载体上; 引物设计简单, 除长度外和 PCR 引物设计一致; 反应温度低, 可以在 37℃ 进行反应; 反应速度快, 在 20~30min 即可完成; 利用荧光标记的探针, 还可以实现实时定量的结果分析; 同时也可以使用生物素标记的引物配合胶体金试纸条进行结果检测。另外, 在冻干粉保存的情况下, 其反应组分可以在室温下长时间稳定保存。其缺点在于虽然扩增结果和引物二聚体可以在凝胶电泳照片上得到清晰分辨, 然而可能的引物二聚体会造成较高的荧光或胶体金假阳性; 同时由于反应体系中蛋白质含量高, 扩增结果需要先纯化或进行酚抽提之后才能进行琼脂糖凝胶电泳。

RAA 技术采用的是来自于大肠杆菌的 *recA* 重组酶, *recA* 重组酶可以与 DNA 紧密结合, 并与引物形成聚合体扫描双链 DNA, 在与引物同源的序列处使双链 DNA 解旋。在 SSB 和 DNA 聚合酶的共同作用下, 新的 DNA 片段可以在体外快速地扩增出来。这个体外 DNA 扩增的过程不需要高温, 一般在 37℃ 反应 15~30min 即可得到与传统高温 PCR 相同的目的片段^[25]。

在国内, RAA 技术已经申报了专利 (浙江泰晶生物科技有限公司), 结合其他各种优秀技术, 可以使底物检测扩展到核酸、蛋白质和糖类化合物, 并以此为基础开发出独一无二的系列快速诊断试剂产品, 扩大体外核酸扩增的应用范围。相信以 RAA 技术为基础的各类核酸快速高效扩增产品, 将为人类健康和农业植物病虫害的防治提供及时的诊断和防治, 以其优势取代部分或补充 PCR 技术所拥有的市场, 并作为一种不断完善分子生物学工具在研究和应用上发挥更大的作用。

3 结 语

和传统的 PCR 技术相比, RAA 核酸扩增技术无疑是一个升级换代版本。它的意义不仅是缩短了核酸扩

增的反应时间,重要的是它摆脱了仪器装置的束缚(图1)。PCR技术的原理是利用94℃高温使双链DNA解旋,并在耐高温的DNA聚合酶(*Taq*)的作用下扩增DNA片段。PCR反应通常设定三个不同的温度使特异性DNA片段得到指数递增。RAA技术则不需要通过高温使双链DNA解旋,而是利用重组酶结合引物后,在引物识别位点侵入模板双链DNA,在单链DNA结合蛋白的帮助下,以及在适当的DNA聚合酶的作用下,也使目的DNA片段在短时间内(15~30min)得到指数级积累。在RAA反应体系中,由于重组酶的作用,不需要高温即可在引物识别位点使模板DNA解旋,从而省去了传统PCR反应中三个温度的循环,节约了时间并减少了能源的消耗。

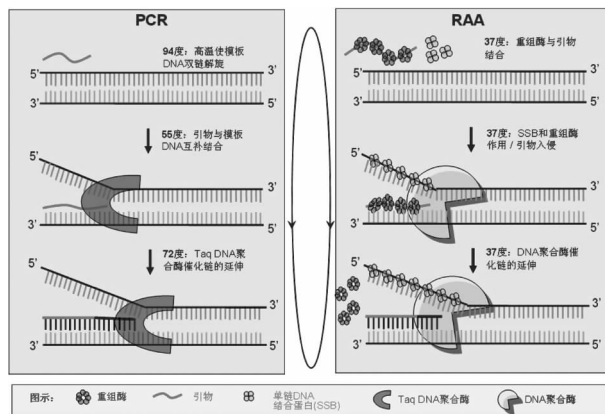


图1 PCR和RAA技术的原理对比图

Fig. 1 The comparative flowchart of PCR and RAA techniques

由于恒温核酸扩增技术只需要一个小型的恒温装置就可以进行核酸的指数扩增,这使得发展一种利用锂电池和紫外LED的便携式的小型核酸扩增仪以及相关的检测装置成为可能。利用这一技术,可以在非实验室的环境下进行快速核酸扩增检测。发展这一技术,对于我国目前形势严峻的传染性疾病检测(如甲型H₁N₁流感,甚至是SARS等传染性疾病)具有重大的意义。

RAA技术的优势使其有望在很大程度上代替传统的PCR技术。由于传统的PCR技术受仪器和空间的限制,使得现有核酸扩增技术的应用价值没有被充分挖掘出来。例如,目前仅肝炎检测一个项目,PCR试剂的国内市场容量就达1.5亿元,因为受到检测费用的限制,PCR检测还只占整个肝炎检测市场的30%。如果RAA技术能充分克服费用昂贵的限制,将会有更大

的市场机会。RAA技术不依赖于PCR仪器的便捷性能,是革命性的技术突破,能充分扩大核酸扩增技术的应用领域。此外,RAA技术还能完成多重引物扩增,配合荧光仪,可形成一套RAA多重荧光实时检测系统,即利用不同颜色的荧光标记,在同一个反应里检测到不同的目的基因,这是其他恒温核酸扩增技术或巢式PCR技术无法相比的特点。

随着RAA技术的进一步深化、完善,在RAA技术的基础上可以很快地研发出适合家庭使用的分子诊断试剂,使全国乃至全球对病毒性和遗传性疾病的定期和快速普查在技术上成为可能。这将是一个非常巨大的潜在市场,其经济意义不可估量。结合其他优秀技术,如发展免疫-RAA,可使检测对象从核酸扩大到蛋白质、糖类或其他大分子化合物。同时,RAA技术也可作为一种基础的研究手段,进一步促进分子生物学的研究。RAA技术极有可能帮助功能基因组学和植物分子生物学获得突破性进展,进而形成更加巨大的生物科技产业。

核酸扩增新技术的出现将带动与之相关的仪器设备、配套试剂等新产业的发展,甚至会影响到人们的日常生活。在物联网飞速发展的今天,基于先进技术的核酸体外分子检测可以帮助人们足不出户即可完成某些疾病的检测和诊断,特别是行动不便的患者,或需要隔离的传染性疾病疑似患者将从中获益。在我国发展恒温核酸体外扩增新技术的意义在于:第一,可以继续处于世界领先的位置;第二,满足我们国家节能减排的发展战略的需要;第三,服务于更多的人民群众。随着21世纪科学技术的进步和国家的逐步重视,特别在国家“十二五”期间对相关领域的高度重视,核酸体外扩增技术及其相关产业将会迎来一个快速发展的时期。

参考文献

- [1] Gill P, Ghaemi A, Nucleic acid isothermal amplification technologies: a review. *Nucleosides, nucleotides & nucleic acids*, 2008, 27:224-243.
- [2] Guatelli J C, Whitfield K M, Kwoh D Y, et al. Isothermal, *in vitro* amplification of nucleic acids by a multienzyme reaction modeled after retroviral replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1990, 87: 1874-1878.
- [3] Compton J, Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature*, 1991, 350: 91-92.
- [4] Walker G T, Little M C, Nadeau J G, et al. Isothermal *in vitro*

- amplification of DNA by a restriction enzyme/DNA polymerase system. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1992a, 89:392-396.
- [5] Walker G T, Fraiser M S, Schram J L, et al. Strand displacement amplification--an isothermal, in vitro DNA amplification technique. Nucleic acids research, 1992b, 20, 1691-1696.
- [6] Vincent M, Xu Y, Kong H, Helicase-dependent isothermal DNA amplification. EMBO reports, 2004, 5:795-800.
- [7] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Res, 2000, 28: E63.
- [8] Lizardi P M, Huang X, Zhu Z, et al. Mutation detection and single-molecule counting using isothermal rolling-circle amplification. Nature Genet, 1998, 19:225-232.
- [9] Piepenburg O, Williams C H, Stemple D L, et al. DNA detection using recombination proteins. PLoS Biol, 2006, 4:e204.
- [10] Thekisoe O M, Bazie R S, Coronel-Servian A M, et al. Stability of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) reagents and its amplification efficiency on crude trypanosome DNA templates. The Journal of veterinary medical science, 2009, 71:471-475.
- [11] Lee D, La Mura M, Allnutt T R, et al. Detection of genetically modified organisms (GMOs) using isothermal amplification of target DNA sequences. BMC biotechnology, 2009, 9:7.
- [12] Yamamura M, Makimura K, Ota Y. Evaluation of a new rapid molecular diagnostic system for Plasmodium falciparum combined with DNA filter paper, loop-mediated isothermal amplification, and melting curve analysis. Japanese journal of infectious diseases, 2009, 62:20-25.
- [13] Yamazaki W, Taguchi M, Kawai T, et al. Comparison of loop-mediated isothermal amplification assay and conventional culture methods for detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in naturally contaminated chicken meat samples. Applied and environmental microbiology, 2009, 75:1597-1603.
- [14] Yoshino M, Watari H, Kojima T, et al. Rapid, sensitive and simple detection method for koi herpesvirus using loop-mediated isothermal amplification. Microbiology and immunology, 2009, 53:375-383.
- [15] Zhang H, Om M T, Aboge G O, et al. Toxoplasma gondii; Sensitive and rapid detection of infection by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. Experimental parasitology, 2009, 122(1):47-50.
- [16] Kono T, Savan R, Sakai M, et al. Detection of white spot syndrome virus in shrimp by loop-mediated isothermal amplification. Journal of virological methods, 2004, 115:59-65.
- [17] Thekisoe O M, Inoue N, Kuboki N, et al. Evaluation of loop-mediated isothermal amplification (LAMP), PCR and parasitological tests for detection of Trypanosoma evansi in experimentally infected pigs. Veterinary parasitology, 2005, 130: 327-330.
- [18] Kurosaki Y, Takada A, Ebihara H, et al. Rapid and simple detection of Ebola virus by reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification. Journal of virological methods, 2007, 141:78-83.
- [19] Kaneko H, Kawana T, Fukushima E, et al. Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances. Journal of biochemical and biophysical methods, 2007, 70:499-501.
- [20] Aryan E, Makvandi M, Farajzadeh A, et al. A novel and more sensitive loop-mediated isothermal amplification assay targeting IS6110 for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex. Microbiological Research, 2010, 165:211-220.
- [21] 彭涛. 核酸等温扩增技术及其应用. 北京:科学出版社,2009, 98.
- Peng T. The Application of Isothermal Nucleic Acid Amplification Technologies. Beijing: Science Press, 2009, 98.
- [22] Benkovic S J, Salinas F. Methods for nucleic acid manipulation, US Patent, 6929915, 2005.
- [23] Piepenburg O, Williams C H, Armes N A. Recombinase polymerase amplification, US, 2005/0112631, 2005.
- [24] Hardy C D, Martin P K. Isothermal SNP detection method, US, 2008/0118917, 2008.
- [25] 吕蓓,程海荣,严庆丰,等. 用重组酶介导扩增技术快速扩增核酸. 中国科学:生命科学,2010,40(10):983-988.
- Lü B, Cheng H R, Yan Q F, et al. Scientia Sinica Vitae, 2010, 40(10):983-988.

The Development and Recent Improvements of *in Vitro* Nucleic Acid Amplification Technology

LV Bei¹ CHENG Hai-rong² YAN Qing-feng⁴ HUANG Zhen-ju³ LI Yi-nv¹ LUO Da⁵
SHEN Gui-fang¹ ZHANG Zhi-fang¹ DENG Zi-xin² LIN Min¹ CHENG Qi^{1,5}

(1 Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

(2 Key Laboratory of Microbial Metabolism, Ministry of Education, School of Life Sciences and Biotechnology,
Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

(3 Zhejiang Taijing Biotechnology Limited, Ningbo 315100, China 4 College of Life Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

(5 College of Life Science, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract Rapid nucleic acid amplification *in vitro* is a revolutionary technology developed since 1983. It has been applied widely in modern agriculture, medical and food science etc. . Such technology has provided a great tool for gene manipulation and functional genomics. *In vitro* nucleic acid amplification is usually carried out by a thermal stable enzyme, such as *Taq* polymerase, and requires thermal cycle equipment. The invention of isothermal amplification has improved the traditional PCR method and in some way simplified the reaction procedure. Recombinase-aid amplification (RAA) was introduced. RAA is the latest isothermal amplification technology which may be carried out under the room temperatures. The distinctive merit of RAA is mimicking *in vivo* T4-phage DNA amplification complex and the whole reaction is super fast and specific. Moreover, it can also be used for digital real time quantitative analysis.

Key words Recombinase-aid Nucleic acid amplification *in vitro* Isothermal

致 谢

近期为本刊审稿的专家(按姓氏笔划排列):

丁 劲 于慧敏 马 端 牛天贵 王占庆 王明丽 王健伟 王雪敏 王景林 王锡锋
王肇悦 王静云 刘佳佳 刘定干 刘建国 刘思国 孙 敏 朱传凤 权春善 何金生
何深一 吴 洁 张永军 张兆山 张余洋 张晓鸣 张 毅 李玉昌 李志勇 杜志强
杨培龙 杨献光 沈金玉 邵宁生 陈三凤 陈秀枢 陈忠斌 陈靠山 孟延发 岳长涛
苟克勉 范学工 郑永唐 金宁一 金由辛 侯丙凯 姚冬生 姜 韬 赵开军 赵建龙
钞亚鹏 徐 郁 徐香玲 郭 宁 堵国成 崔玉芳 崔 磊 常智杰 梁前进 章金刚
黄国亮 黄秉仁 焦新安 董关木 韩文玲 韩德权 熊爱生 谭焕然 瞿 涤