



课题编号	20110093110002
学科代码	160.29.10
版本号	1101.02.005.491

# 高等学校博士学科点专项科研基金 申 请 书 (博 导 类)

课 题 名 称 : 核酸适配体识别-上转换荧光纳米标记食源性致病  
菌检测新方法研究

申 请 者 : 王周平

所 在 单 位 : 江南大学

所 在 院 系 : 食品学院

联 系 电 话 : 0510-85326195

是否博士生导师: 是

博士点名称 : 食品科学与工程

国家重点学科名称: 食品科学与工程

国家重点实验室: 食品科学与技术国家重点实验室

申 请 日 期 : 2011-03-10

中华人民共和国教育部

简 表 一

研 究 课 题	名 称		核酸适配体识别-上转换荧光纳米标记食源性致病菌检测新方法研究							
	学科名称		微生物源食品安全的基础性研究		学科代码		1602910		研究 类别	应用基础
	相关学科		光谱分析		学科代码		1301710			
	起始日期			终止日期			申 请 经 费（万元人民币）			
	2012-01-01			2014-12-31			12			
申 请 者	姓 名		王周平		出生日期		1974-04-01		性别	男
	技 术 职 称		定 职 时 间		行 政 职 务		联 系 电 话		0510-85326195	
	教授		2007-09-25		副院长		电 子 邮 件		wangzp@jiangnan.edu.cn	
	毕 业 学 校		西南大学		毕 业 时 间		2004-06-30			
	最 终 学 位	博士	外 语	语 种 1:	英语		程 度	四会		
				语 种 2:			程 度			
	学 术 兼 职 (限 45 汉字)		江苏省食品安全标准审评专家, 江苏省食品科学与技术学会秘书长							
填写概括课题内容的六个关键词（主题词），关键词个数可少于六个，关键词之间用逗号隔开										
食源性致病菌，适配体，上转换荧光纳米探针										
课题摘要（300 字以内）										
<p>本项目旨在研究食源性致病菌核酸适配体体外 SELEX 筛选过程的进化规律，揭示适配体与目标菌相互作用的分子机制，为适配体分子探针的设计、筛选、构/效关系和性能评价提供理论指导，建立针对菌膜上特异结构、整体菌等不同层次靶标体系的高效率适配体筛选技术平台；采用新法制备生物相容性好的上转换荧光纳米粒子和磁性纳米粒子；采用得到的适配体对其进行表面生物功能化，构建上转换荧光纳米生物探针；结合磁分离富集技术，建立适配体识别-上转换荧光纳米标记的食源性致病菌高灵敏生物传感系统。该方法集磁分离富集技术、核酸适配体识别技术、上转换荧光标记与检测技术于一体，具有稳定性好、特异性强、灵敏度高、分析用时短等显著优点。</p>										



## 一、研究的目的、意义和成果的预计去向（包括本课题所要解决的科学问题、理论上的科学价值或预见在应用中对经济建设的影响等）。

快速、高灵敏、高通量的食源性致病菌检测方法研究已成为国际上研究的热点。目前在实际检测工作中，食源性致病菌的检测主要依靠传统微生物培养、PCR 和 ELISA 方法进行。各种方法各有其优缺点。

本课题拟在充分研究核酸适配体与目标食源性致病菌特异结合机制，更新目标菌核酸适配体筛选技术平台的基础上，将上转换荧光纳米探针技术与磁分离富集、核酸适配体识别、激光诱导上转换荧光检测技术有机结合，充分发挥这几种技术高灵敏、特异、稳定的优势，以链球菌、副溶血性弧菌等为主要模式分析物，以核酸适配体识别、上转换荧光纳米探针多色标记-多组分同时检测为主要特色，构建基于磁分离富集-上转换荧光纳米探针的食源性致病菌新型检测方法体系，发展新型检测产品。该方法体系的建立和产品的研发，对于弥补国际上相关检测方法和技术的不足、形成一批具有自主知识产权和国际竞争力的检测新技术和新产品，保障我国食品安全和打破国际食品贸易壁垒具有积极意义。

### 拟解决的科学问题：

1) 采用新法合成并通过表面修饰、组装等制备表面生物亲和性能良好的高荧光产率的上转换荧光纳米粒子；

2) 阐明目标菌核酸适配体筛选过程的进化规律，揭示核酸适配体与目标菌相互作用的分子机制，为核酸适配体分子探针的设计、筛选、构/效关系和性能评价提供理论指导，建立针对菌膜上特异结构、整体菌等不同层次靶标体系的高效率核酸适配体筛选技术平台；

3) 探索以适配体替代抗体建立食源性致病菌检测方法的可能；

4) 构建集合磁分离富集、上转换发光纳米材料标记技术、上转换激光诱导荧光检测技术、核酸适配体识别等技术优势为一体的目标菌单组分和多组分同时高效检测方法体系。

### 理论与应用价值：

本课题研究拟发展的磁分离富集、上转换荧光纳米探针结合竞争免疫分析和/或核酸适配体识别检测技术，在食源性致病菌检测领域国内外均未见其他研究小组的报道，仅有本课题小组前期的部分报道。该技术方法的成功应用，将能有效弥补部分食源性致病菌检测方法的不足，促进该类技术方法的快速发展。因此，该技术方法应用前景将非常广泛，且对于丰富和拓展纳米技术应用领域具有重要意义。

此外，由于该技术方法具有检测成本低、操作简单、灵敏度高、快速、多组分同时检测等诸多特点，该新型检测方法以及在此基础上发展的新型检测产品在检验检疫、质检部门的实验室和现场快速检测工作中将会有很好的应用前景，将会产生良好的社会效益和经济效益。



## 二、研究课题所涉及的科学领域，国内外达到的水平，存在的主要问题；本课题的学术思想、理论根据、主攻关键及独到之处。

食源性致病菌诱发的食源性疾病是当今全球食品安全面临的巨大威胁<sup>[1,2]</sup>，发展准确快速灵敏的食源性致病菌检测方法对于保障食品安全、保护国民健康具有重要意义。

迄今为止，针对食源性致病菌的鉴定和检测方法已经发展了很多种，但总体上来说，能够定性定量的分析检测方法主要基于三个原理<sup>[3]</sup>：1）微生物培养（传统微生物培养法）；2）特异性 DNA 杂交（如核酸探针技术、PCR 技术、基因芯片技术等）；3）抗体与菌的免疫亲和（如免疫荧光抗体技术、酶联免疫技术、放射免疫分析技术、单克隆抗体技术、免疫金技术、生物传感器技术等）。其中，传统的食源性致病菌检测技术主要依靠微生物培养和生理生化实验，耗时长、效率低、敏感性差，不能及时检出食品中的病原菌<sup>[3]</sup>。因此，需要发展快速、准确、高效的现代食源性致病菌检测技术，可以快速检出食品中的病原微生物，迅速对食品的卫生质量作出评价，防止食物中毒的发生，有效地控制食源性疾病。基于特异性 DNA 杂交的 PCR 技术和核酸探针技术具有较高的灵敏度，但由于检测时目标物质为致病菌 DNA 而不是菌本身，因此实际检测中遇到的最大问题就是因为不能区分活菌和死菌而导致的假阳性问题<sup>[3]</sup>。在工作实践中常需要较长的前期增菌培养和选择性培养阶段，使得整个检测工作用时很长，无法适应快速检测的要求。

目前发展和应用较多的检测技术很多基于抗体-菌的免疫亲和。抗体-菌免疫亲和反应的目标物质直接为被检致病活菌，因此大大降低了检测中假阳性的概率。但是抗体本身为蛋白质，很容易受到温度的影响而使得稳定性产生很大波动。同时抗体的制备需要经过动物实验或者细胞实验，周期相对较长，而且短期内无法大规模生产，标记修饰不当时又可能严重影响其效价，这些都制约了该技术进一步的发展应用。

如果能够发展一种新型分子识别原件，即保持抗体亲和识别的高度特异性，又具有高度稳定性（可常温保藏），而且可容易对其进行分子修饰，那将为食源性致病菌的检测工作以及相关检测产品的开发提供极大的便利，将为相关检测技术水平的提高奠定坚实的基础。基于这种需要，一种新型分子识别技术——核酸适配体技术进入了人们的视野，并很快成为研究热点。

核酸适配体（Aptamer，简称适配体）实质上是体外人工合成的寡核苷酸片段，可以是 RNA 或单链 DNA。适配体是通过 SELEX 技术（配体指数富集的系统进化技术，Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment, SELEX）筛选获得的。1990 年，Tuerk<sup>[12]</sup>和 Ellington<sup>[13]</sup>用指数富集配体的系统进化（Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment, SELEX）技术分别筛选出能与 T4 DNA 聚合酶和有机染料特异性结合的随机寡核苷酸，并将其命名为适配体（aptamer，又称适配子或适子）。单链寡核苷酸的一些二级结构，如发夹、茎环、假节、凸环、G-四聚体等，可使核酸分子形成多种三维结构，成为与靶物质特定区域结合的基础。由序列各异的寡核苷酸组成的文库中存在各种不同的分子构象。如果



文库足够大,丰富的构象可以为任何靶分子找到能与之对应的适配体。

研究发现,凡是涉及抗体的应用领域,几乎都可以用寡核苷酸核酸适配体代替<sup>[14-15]</sup>。与传统的抗体相比,适配体具有以下显著优点<sup>[14-16]</sup>:

1) 亲和力高 适配体可形成发夹、凸环、假节和G2四分体等结构,以配体形式与靶分子结合,结合强度高,解离常数多在pmol~nmol,有的甚至超过天然配体。适配体与配体间的亲和力要强于抗原抗体之间的亲和力。

2) 特异性强 适配体以其特异性著称。单链核苷酸只识别与其互补的空间结构,而适配体经多次筛选获得,更保证了其与配体间的强特异性结合,几乎可以完全避免非特异性结合。适配体不仅能识别靶分子一个甲基或羟基的细微变化,还可区分旋光异构对映体,而且没有抗体Fc受体的非特异性结合问题。

3) 靶分子范围广 适配体筛选的靶分子可以是金属离子、有机染料、神经递质、氨基酸、抗生素、辅因子、氨基糖苷、核苷碱基类似物等小分子物质,也可以是酶、生长因子、抗体、基因转录调节因子、细胞黏附分子、植物血凝素等较大的蛋白质分子,还可以是完整的病毒颗粒、细菌和红细胞等。相比之下,抗原性弱的蛋白很难获得其抗体,抗体的靶分子范围也窄得多。

4) 容易制备及修饰 成功筛选到一个靶分子的适配体只需1~3个月时间(甚至半个月),获得适配体的克隆后,通过扩增即可大量制备。而抗体筛选和制备至少需3~6个月时间,其筛选和制备过程也较为繁琐。已制备的单抗如在试验中证明其试验条件或参数不满意,一般只能另行筛选;而适配体却可加以修饰,以适应测定条件的要求。适配体经适当修饰稳定性大大提高,且不影响与配体间的亲和力。

5) 稳定性好 DNA 适配体稳定性好,受温度影响波动小,便于长期保存和运输。适配体还可快速变性、复性,能反复使用。而抗体对温度较为敏感,需要低温运输,易发生不可逆变性。

6) 与靶分子的结合条件可调控 由于适配体筛选是离体条件下进行的,可以根据实验需要设定筛选条件,从而实现适配体与靶分子结合条件的调控。而抗体筛选是在体内或培养细胞条件下进行的,很难调控抗体与靶分子的结合条件。

7) 应用灵活 适配体分子较小,易于通过细胞膜进入细胞内,可以检测细胞内的靶分子,应用更加灵活方便。

由于适配体具有高度特异性,通过反向SELEX技术,甚至可以在不知靶目标性质的情况下筛选出其相应的适配体。自1999年Bruno等<sup>[17]</sup>将炭疽芽胞杆菌高压灭菌后作为靶物质建立筛选模型以来,迄今为止,已先后有报道以肿瘤细胞<sup>[18]</sup>、人红细胞膜<sup>[19]</sup>、Trypanoma cruzi<sup>[20]</sup>、变形YPEN-1内皮细胞<sup>[21]</sup>、成胶质细胞瘤-源U251细胞<sup>[22]</sup>、P12分化细胞<sup>[23]</sup>、受体酪氨酸激酶-P12表达细胞<sup>[24]</sup>、人造骨细胞<sup>[25]</sup>等整体细胞为靶物质筛选得到特异适配体,并在生物分析中得到应用<sup>[26-29]</sup>。目前报道的针对致病菌核酸适配体筛选的还只有嗜酸乳杆菌<sup>[32]</sup>、单增李斯特菌(初步报道)<sup>[33]</sup>、沙门氏菌<sup>[34]</sup>、金黄色葡萄球菌<sup>[35]</sup>、结核分枝杆菌<sup>[36]</sup>以及本研究小组针



对单增李斯特菌<sup>[37]</sup>和志贺氏菌<sup>[38]</sup>的几例报道, 相关研究工作亟需加强。

目前, 基于适配体的生物传感器已有所发展<sup>[39]</sup>, 以不同类型的示踪分子标记适配体后, 该类适配体探针可以直观地将适配体与靶分子的特异性识别转化为灵敏的示踪信号, 从而为金属离子、有机小分子、核酸和蛋白质等大分子乃至细胞等的检测提供一种灵敏、特异的新型模式。采用单荧光基团标记<sup>[49-42]</sup>、双荧光基团标记<sup>[43-45]</sup>、金纳米粒子标记<sup>[46]</sup>的适配体光学探针在靶标物质检测以及细胞成像研究<sup>[47,48]</sup>中得到了广泛应用, 基于电化学传感的适配体探针<sup>[49-51]</sup>、以及基于石英晶体微天平(QCM)<sup>[52]</sup>、表面声波(SAW)<sup>[53]</sup>、表面等离子共振(SPR)技术<sup>[54]</sup>及SPR 成像技术<sup>[55]</sup>的适配体探针均已应用报道。但就食源性致病菌分析检测工作而言, 适配体探针技术才刚刚开始应用, 而结合更高效的上转换荧光纳米探针的适配体探针技术在食品安全领域更是空白。

生物标记技术是分子生物学中最常用也是最重要的技术之一, 荧光分析方法由于灵敏度高、选择性好、可测定参数多等特点, 在食品安全分析领域有着广泛的应用。近年来, 随着纳米技术的发展, 为了克服传统放射性同位素标记物、酶标记物、化学发光标记物、有机荧光染料标记物存在的或污染严重、或稳定性差、或毒性较大、或重复性差等缺陷<sup>[56, 57]</sup>, 系列尺寸均匀、结晶与发光性能良好的纳米材料(如半导体量子点<sup>[58, 59]</sup>、稀土掺杂纳米晶<sup>[60, 61]</sup>和SiO<sub>2</sub>包覆的荧光染料<sup>[62, 63]</sup>纳米粒子等)都被成功制备并用于生物标记, 实现了对目标物质的灵敏检测, 其中以半导体量子点的研究最为广泛。同传统的有机染料荧光探针相比, 量子点作为荧光探针, 具有诸多明显的优越性<sup>[58, 59]</sup>。但量子点的稳定性同样受环境影响, 其分解产物也会对生物体产生潜在的危害。作为生物标记物, 量子点最大的缺陷在于它的激发和发射仍然在紫外-可见光区, 生物样品同样会被紫外光激发, 荧光背景高, 检测灵敏度受到影响。此外, 长时间的紫外辐照又会对被测生物活性样品造成损伤。因此, 为提高生物样品检测的灵敏度和选择性, 寻找具有荧光量子产率高、光化学稳定性好、荧光寿命长、光谱可调等优良特性的新的荧光生物探针无疑具有重要意义。

上转换发光是一种通过多光子机制吸收长波辐射(近红外光)而发射出比激发光波长短的荧光(紫外可见光)的反Stokes发光现象, 已成为把红外光转换成可见光的有效方法。上转换发光纳米材料可使用红外激光(如980 nm)激发, 其荧光发射在可见光区(如500-650 nm), 若采用适当的光电倍增管作为光信号收集器(如接收光波范围为300-650 nm的光电倍增管), 可构建无背景光干扰的更灵敏的上转换激光诱导荧光检测方法。相对于荧光染料分子和其它发光纳米材料, 上转换发光纳米材料具有如下诸多优点<sup>[64-66]</sup>: 1) 上转换材料光化学稳定, 不易光解, 由无机材料构成的上转换荧光材料在强光或长时间的激发光照射下仍具有很高的光学稳定性。2) 其独特的上转换发光过程主要集中于固体基质中, 几乎不受外界条件(如湿度、酸度等)的影响, 因而可在固相或液相(亲水或疏水环境)中检测其荧光, 从而大大方便了检测, 特别适合作为复杂生物体系中的荧光标记物。3) 若将上转换荧光材料用于生物标记探针, 由于在红外光的照射下, 只有上转换荧光材料发光, 而被标记的生物分子和被检测的生

物体系因为不具备上转换发光能力而不发荧光,从而使检测背景大大降低,进而提高生物检测的灵敏度。4)上转换发光材料是由近红外或红外光激发,激发光能量低,对生物组织具有良好的穿透性且不会对生物体产生伤害。5)采用高效的980nm红外激光器作为激发光源,检测装置简单。此外,由于激发光的增强,又可提高荧光信号强度<sup>[67]</sup>,且上转换发光材料价格远远低于目前使用的CY3和CY5等染料的价格,显著降低相关成本费用。6)可以通过选择不同的基质材料和掺杂离子来调节上转换发光,在同一固定激发波长激发下(如980nm红外光),不同稀土离子掺杂的纳米粒子发射不同的上转换荧光,真正实现单激发多发射,从而有利于生物体系中多组分同时检测。

发展新的荧光标记材料能够很好地提高分析检测的灵敏度。与此同时,如果能对被测痕量生物组分进行快速分离富集、提高其在被测体系中的浓度,也将有效提高检测方法的灵敏度。磁分离是磁性纳米材料最常见而有效的特殊功能,特别适合痕量生物样品的快速分离富集<sup>[68-73]</sup>。磁分离是利用功能化磁性纳米材料的表面给体(或受体)与受体(或给体)间特异的相互作用,如生物素-亲和素、抗原-抗体、互补的特异基因片段等来实现对靶向物质的快速分离与富集。目前,磁分离方法已被广泛用于酶、蛋白、多肽、细胞甚至毒素等的分离与纯化<sup>[74-76]</sup>。与常用的磁性微球相比,磁性纳米粒子在细胞分离方面具有更明显的优势:1)较小的尺寸可以避免与细胞发生识别作用后对细胞产生机械应力;2)磁性纳米粒子在磁场中可形成稳定的胶体分散体系,不会出现粒子的团聚和沉淀;3)可以缩短孵育时间,加快分离流程,操作方便、快捷,分离纯度高;4)生物相容的磁性纳米粒子在与细胞的识别过程中,基本可以保证不破坏被识别细胞的形态,不会影响细胞的功能和发育,磁分离细胞的存活率高,且不与非识别细胞发生作用。

目前,在食品安全检测领域还没有将磁分离富集、适配体技术、上转换荧光纳米探针技术强强联合构建的检测方法体系出现。

基于此种现状,本课题研究拟在充分研究核酸适配体与目标菌相互结合分子机制、更新目标菌适配体体外SELEX筛选技术的基础上,将上述技术有机结合,构建适用于食源性致病菌超灵敏检测的适配体亲和-上转换激光诱导荧光检测方法和技术,该技术方法的发展对于食源性致病菌检测技术水平乃至食品安全检测技术水平的提升将具有积极的推动作用。

## 主要参考文献

1. 陈锡文,邓楠主编. 中国食品安全战略研究. 2004. 化学工业出版社-安全科学与工程出版中心.
2. 王晶,王林,黄晓蓉主编. 食品安全快速检测技术. 2002. 化学工业出版社.
3. 张伟,袁耀武主编. 现代食品微生物检测技术. 2007. 化学工业出版社.
4. Cossart PBP, Normark S. Cellular Microbiology, USA: ASM Press, 2005, 299-340
5. 贺政新,郑玉玲,姜永强. 现代生物医学进展, 2009, 9, 2941-2943
6. 杨杨,郭晓奎. 微生物与感染, 2008, 3, 47-49
7. Sharma SK, Whiting RC. J. Food Prot. 2005, 68, 1256-1263
8. Bergwerff AA, Van Knapen F. J. AOAC Inter. 2006, 89, 826-831

9. Yang M, Kostov Y, Bruck HA, Rasooly A. *Anal. Chem.* 2008, 80, 8532-8537
10. Mishra NN, Maki WC, Cameron E, Nelson R, Winterrowd P, Rastogi SK, Filanoski B, Maki GK. *Lab Chip*, 2008, 8, 868-871
11. Yang M, Kostov Y, Bruck HA, Rasooly A. *Inter. J. Food Microbio.* 2009, 133, 265-271
12. Tuerk C, Gold L. *Science*, 1990, 249(4968), 505-510
13. Ellington AD, Szostak JW. *Nature*, 1990, 346(6287), 818-822
14. Yan AC, Levy M. *RNA BIOLOGY*, 2009, 6: 316-320
15. Wang W, Jia LY. *Chinese J. Anal. Chem.* 2009, 37, 454-460
16. 府伟灵, 姚春艳. *中华医院感染学杂志*, 2005, 15, 361-362
17. Bruno JG, Kiel JL. *Biosens. Bioelectron.* 1999, 14, 457-464.
18. Daniels DA, Chen H, Hicke BJ, Swiderek KM, Gold L. *PNAS*, 2003, 100, 15416-15421
19. Morris KN, Jensen KB, Julin CM, Gold L. *PNAS*, 1998, 95, 2902.
20. Ulrich H, Martins AHB, Perquero JB. *Cytometry* 2004, 59A, 220.
21. Blank M, Weinschenk T, Priemer M, Schluesener H. *J. Biol. Chem.* 2001, 276, 16464.
22. Hicke BJ, Marion C, Chang YF, Gould T, Lynott CK, Parma D, Schmidt PG, Warren S, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 48644.
23. Wang C, Zhang M, Yang G, Zhang D, Ding H, Wang H, Fan M, Shen B, Shao N. *J. Biotechnol.* 2003, 102, 15.
24. Cerchia L, Duconge F, Pestourie C, Boulay J, Aissouni Y, Gombert K, Tavitian B, Francis Vde, Libri D. *PLoS Biol.* 2005, 3, 697-704.
25. Guo K, Wendel HP, Scheideler L, Ziemer G, Scheule AM. *J. Cell. Mol. Med.* 2005, 9, 731.
26. Li N, Ebright JN, Stovall GM, Chen X, Nguyen HH, Singh A, Syrett A, Ellington AD. *J. Prot. Re.* 2009, 8, 2438-2448
27. Blank M, Weinschenk T, Priemer M, Schluesener H. *J. Bio. Chem.* 2001, 276, 16464-16468
28. Smith JE, Medley CD, Tang Z, Shangguan D, Lofton C, Tan W. *Anal. Chem.* 2007, 79, 3075-3082
29. Hamula CLA, Guthrie JW, Zhang H, Li X-F, Le XC. *Trends in Anal. Chem.* 2006, 5, 681-691
32. Hamula CLA, Zhang H, Guan LL, Li X-F, Le XC. *Anal. Chem.* 2008, 80, 7812-7819
33. 陈敏, 江树勋, 邵碧英, 高如承, 陈文炳, 陈彬, 李寿崧, 缪婷玉. *食品科学*, 2009, 30, 197-199
34. Joshi R, Janagama H, Dwivedi HP, Kumar TMAS, Jaykus L-A, Schefers J, Sreevatsan S. *Mol. Cell. Probe*, 2009, 23, 20-28
35. 邵宁生, 李少华, 曹晓晓等. 一组特异识别金黄色葡萄球菌的核酸适配子及其应用. 国家发明专利, CN 101665821 A
36. 吴雪琼, 王博, 阳幼荣等. 靶向结核分枝杆菌Ag85B的寡核苷酸适配子及其制备方法和应用. 国家发明专利, CN 101619313 A
37. 王周平, 丁晓莹. 一种特异识别单核细胞增生李斯特菌的核酸适配子及其筛选方法与应用. 国家发明专利, 申请号: 201010295766.9
38. 王周平, 丁晓莹. 一种特异识别志贺氏菌的核酸适配子及其筛选方法与应用. 国家发明专利, 申请号: 201010295767.3
39. 李一林, 郭磊, 张朝阳, 唐吉军, 谢剑炜. *中国科学 B*, 2008, 38, 1-11
40. Merino EJ, Weeks KM. *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127, 12766-12767
41. Katilius E, Katiliene Z, Woodbury NW. *Anal. Chem.* 2006, 78, 6484-6489
42. Li B, Wei H, Dong S. *Chem. Commun.* 2007, 29, 73-75
43. Nutiu R, Li Y. *Methods*, 2005, 37, 16-25
44. Pavlov V, Shlyahovsky B, Willner I. *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127, 6522-6523
45. Nagatoishi S, Nojima T, Juskowiak B, Takenaka S. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2005, 44, 5067-5070





46. Liu J, Lu Y. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2006, 45, 90—94
47. Farokhzad OC, Cheng J, Tepley BA, Sherifi I, Jon S, Kantoff PW, Richie JP, Langer R. *PNAS*, 2006, 103, 6315-6320
48. Cheng J, Tepley BA, Sherifi I, Sung J, Luther G, Gu FX, Levy-Nissenbaum E, Radovic-Moreno AF, Langer R, Farokhzad OC. *Biomaterials*, 2007, 28, 869-876
49. Radi A, Acero Sánchez JL, Baldrich E, O' Sullivan CK. *Anal. Chem.* 2005, 77, 6320-6323
50. Zayats M, Huang Y, Gill R, Ma C, Willner I. *J. Am. Chem. Soc.* 2006, 128, 13666-13667
51. Willner I, Zayats M. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2007, 46, 6408-6418
52. Minunni M, Tombelli S, Gullotto A, Luzi E, Mascini M. *Biosens Bioelectron*, 2004, 20, 1149-1156
53. Schlenzog MD, Gronewold TMA, Tewes M, Famulok M, Quandt E. *Sens. Actuators B*, 2004, 101, 308-315
54. Win MN, Klein JS, Smolke CD. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34, 5670-5682
55. Li Y, Lee HJ, Corn RM. *Anal. Chem.* 2007, 79, 1082-1088
56. 杨文胜, 高明远, 白玉白. 《纳米材料与生物技术》化学工业出版社, 2005 年 7 月: 1-3.
57. 汪尔康. 《21 世纪分析化学》科学出版社, 1999: 294.
58. Bruchez M, Moronne M, Gin P, Weiss S, Alivisatos AP. *Science*, 1998, 281: 2013-2016.
59. Green M. *Angew. Chem.-Int. Edit.*, 2004, 43, 4129-4131.
60. Diamante PR, Burke RD, van Veggel F. *Langmuir*, 2006, 22, 1782-1788.
61. Meiser F, Cortez C, Caruso F. *Angew. Chem. Int. Edit.*, 2004, 43, 5954-5957.
62. Tapeç R, Zhao X J J, Tan W H. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2002, 2, 405-409.
63. Tan WH, Wang KM, He XX, Zhao XJ, Drake T, Wang L, Bagwe RP. *Med. Res. Rev.*, 2004, 24, 621-638.
64. Wang LY, Yan RX, Hao ZY, Wang L, Zeng JH, Bao H, Wang X, Peng Q, Li YD. *Angew. Chem.-Int. Edit.*, 2005, 44, 6054-6057.
65. Wang LY, Li YD. *Chemical Communications*, 2006, 2557-2559.
66. Yi GS, Lu HC, Zhao SY, Yue G, Yang WJ, Chen DP, Guo LH. *Nano Lett.*, 2004, 4, 2191-2196.
67. van de Rijke F, Zijlmans H, Li S, Vail T, Raap AK, Niedbala RS, Tanke HJ. *Nat. Biotechnol.*, 2001, 19, 273-276.
68. Gu H W, Ho P L, Tong E, et al. *Nano Lett.*, 2003, 3: 1261-1263.
69. Gu H W, Ho P L, Tsang K W T, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, 125: 15702-15703.
70. Gu H W, Ho P L, Tsang K W T, et al. *Chemical Communications*, 2003: 1966-1967.
71. Wang L, Yang Z M, Gao J H, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, 128: 13358-13359.
72. Gu H W, Xu K M, Xu C J, et al. *Chemical Communications*, 2006: 941-949.
73. Wang D S, He J B, Rosenzweig N, et al. *Nano Lett.*, 2004, 4: 409-413.
74. Nam J M, Stoeva S I, Mirkin C A. *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, 126: 5932-5933.
75. Nam J M, Park S J, Mirkin C A. *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, 124: 3820-3821.
76. Nam J M, Han S W, Lee K B, et al. *Angew. Chem. Int. Edit.*, 2004, 43: 1246-1249.



### 三、研究内容、工作方案（包括采取的措施、技术路线、进度安排、拟达到的技术指标、提交成果方式等）。

#### 3.1 研究内容与研究方法

##### 1) 重要食源性致病菌特异结合适配体 SELEX 体外筛选

以链球菌、副溶血性弧菌等为例，针对目标菌菌膜表面特异结构（如蛋白），采用体外表达纯化的表面特异结构（如蛋白）直接进行筛选，通过系统优化筛选压力，获得特异性高和亲和力强的核酸适配体；同时，制备目标菌样品以及反筛选样品进行反向筛选，优化筛选条件与流程。对筛选出的核酸适配体进行测序、二级结构模拟分析、序列裁减，并表征其与靶标结合的亲和力和特异性。通过针对大量不同样本的系统筛选，发现目标菌核酸适配体筛选过程中的进化规律，建立高效、快速、标准化的筛选方法。

##### 2) 食源性致病菌-核酸适配体结合分子机制研究

利用光谱技术、质谱技术、多维核磁共振、圆二色谱、流式细胞术和单分子探针技术揭示核酸适配体与靶标分子相互作用的构/效关系，深入研究生物分子识别规律，探索改变核酸适配体碱基序列提高结合亲和力和特异性的可能性，减小交叉反应几率，实现核酸适配体与目标菌结合的高度特异性。

##### 3) 超顺磁纳米粒子、高荧光产率上转换荧光纳米粒子等的制备

采用水热法等制备表面氨基化超顺磁  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米粒子。采用水热法、溶剂热法等，通过条件优化，合成水溶性良好、荧光产率高的上转换荧光纳米材料（如  $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ ）和其他类型发光纳米材料，通过化学修饰或壳层包覆提高其生物相容性。

通过合成条件改变，调控掺杂稀土元素类型、粒径等，制备不同颜色发射的溶性良好、荧光产率高的上转换荧光纳米材料，构建多色标记-多组分同时检测技术基础。

##### 4) 适配体功能化上转换荧光纳米探针和磁性纳米探针制备

采用氨基或生物素等修饰的适配体与制备的二氧化硅包覆上转换荧光纳米材料或氨基化磁性纳米材料共同孵育，优化实验条件，获得高效适配体功能化上转换荧光纳米探针和适配体功能化磁性纳米探针。

##### 5) 磁分离-适配体亲和-食源性致病菌上转换激光诱导荧光生物传感系统研究

以链球菌、副溶血性弧菌等的检测为例，采用适配体功能化磁性纳米探针在均相体系中捕获目标菌，进一步形成适配体磁性纳米探针-目标菌-适配体功能化上转换荧光纳米探针复合物，采用自制上转换激光诱导荧光检测器对其实现高灵敏检测。

采用不同颜色发射的上转换纳米颗粒为标记物，结合磁分离技术，以红外激光器为激发光源，实现多色标记-食源性致病菌多组分同时高灵敏检测。

##### 6) 便携式上转换激光诱导荧光检测装置试制

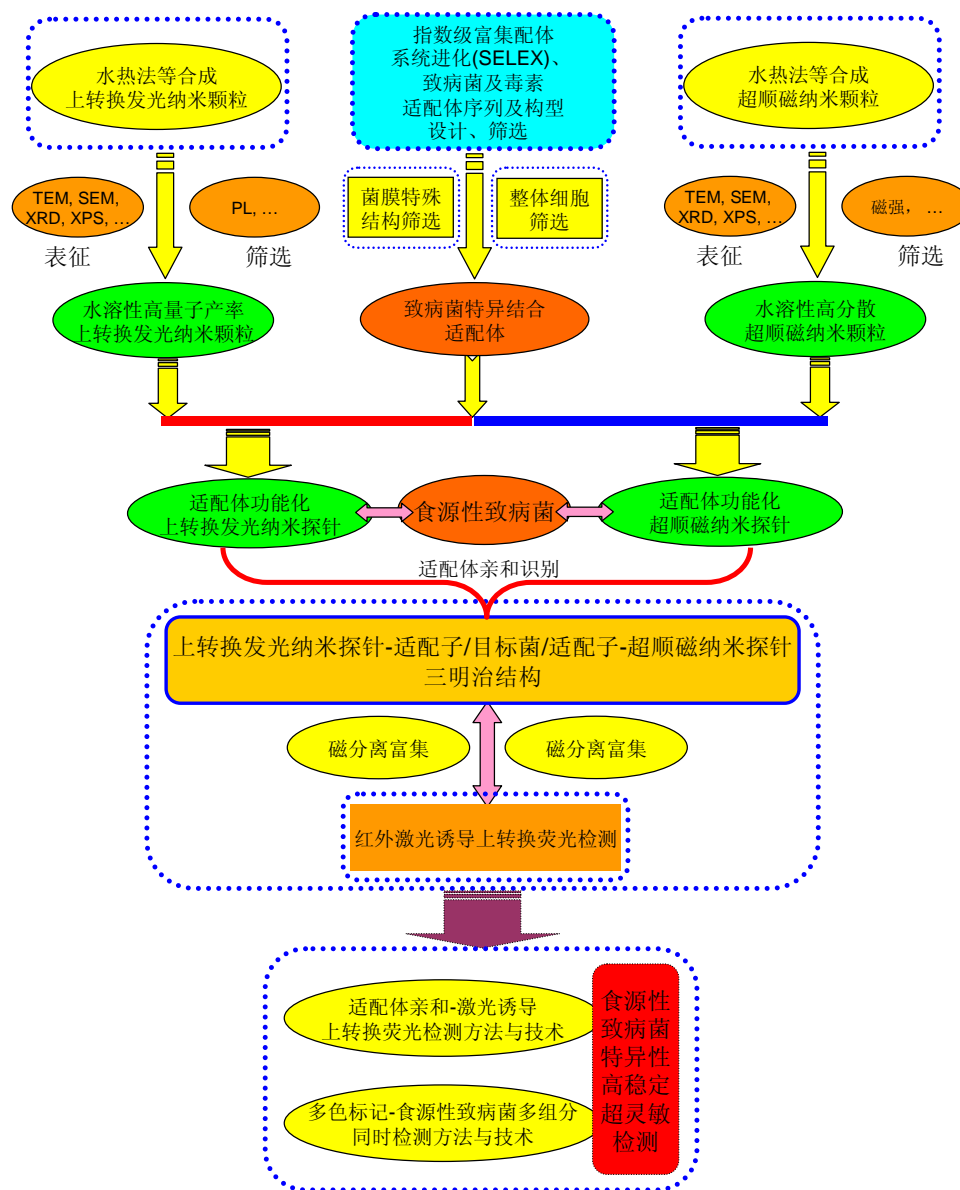
将红外激光光源、上转换激光诱导荧光检测器完全集成化、微型化，试制适用于食源性致病菌现场快速检测的便携式适配体亲和上转换激光诱导荧光检测装置。

##### 7) 方法验证、评估



采用国标法或 AOAC 官方公认方法对所建立的检测方法的特异性、稳定性、灵敏度、精密密度等进行验证和评估，建立共性检测方法。

### 3.2 技术路线



### 3.3 进度安排

- 2012.01-02 实验准备;
- 2012.03-12 上转换荧光纳米材料制备、表征、修饰;  
超顺磁表面氨基化磁性纳米粒子制备、表征;  
致病菌适配体筛选、特异性评价、进化规律、分子结合机制研究;  
上转化荧光纳米粒子、磁性纳米粒子生物功能化, 纳米探针制备;  
发表 SCI 论文 1-2 篇; 申报专利 1 项
- 2013.01-12 致病菌适配体筛选方法技术平台更新研究;



上转化荧光纳米粒子、磁性纳米粒子生物功能化，纳米探针制备；  
建立磁分离富集-适配体识别-上转换激光诱导荧光生物传感系统；  
发表 SCI 论文 1-2 篇； 申报专利 1 项

2014.01-12 建立磁分离富集-上转换荧光纳米粒子多色标记的食源性致病菌多组分同时检测方法；  
技术方法验证、评价、比较，共性技术建立；发表 SCI 论文 1-2 篇；  
结题验收。

### 3.4 拟达到的技术指标

- 1) 构建高效食源性致病菌适配体筛选技术平台，获得致病菌核酸适配体 2-3 种；
- 2) 发展具有自主知识产权的系统研究核酸适配体分子识别的方法 1 种；
- 3) 建立完善目标菌单一组分和多组分同时高效检测方法体系；
- 4) 在保证特异性和准确度的同时使检测灵敏度大幅度提高；
- 5) 检测用时相对传统方法缩短一半以上。

### 3.5 预期成果

1) 阐明目标菌核酸适配体筛选过程的进化规律，建立针对菌膜上特异结构、整体菌等不同层次靶标体系的高效率核酸适配体筛选技术平台，并筛选出针对食源性致病菌的核酸适配体 2-3 种。

2) 揭示核酸适配体与目标菌相互作用的分子机制，发展 1 种具有自主知识产权的系统研究核酸适配体分子识别的方法。

3) 构建集磁分离富集、上转化荧光纳米材料标记技术、上转换激光诱导荧光检测技术、核酸适配体识别等技术优势为一体的目标菌单一组分和多组分同时高效检测方法体系。

4) 建立共性检测方法与技术体系。

5) 发表高档次 SCI 论文 2-5 篇，申报国家发明专利 1-2 项。

6) 培养博士生 2 名，硕士生 2 名。



## 四、为了进行本课题的研究，课题组已具备的工作基础和实验室条件。

### (一) 工作基础

围绕课题涉及的适配体筛选、荧光纳米材料和复合磁性纳米材料制备及其生物功能化等相关技术，课题组已经进行大量研究工作：

1) **致病菌检测方面**：本课题组近年来一直致力于食源性致病菌快速检测方法和技术的研究工作，采用 DNA 杂交、免疫亲和分析技术，结合纳米探针技术，已成功构建了沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、单增李斯特菌等的新型检测方法，并成功应用于实际样本的检测工作中；筛选得到了单增李斯特菌和志贺氏菌特异结合核酸适配体，已结合荧光生物标记技术成功应用于目标菌的高灵敏检测。发表（含录用）论文、申报国家发明专利如下：

- 1) Tinging Miao, **Zhouping Wang\***, Shuang Li, Xin Wang. Sensitive fluorescent detection of *Staphylococcus aureus* using nanogold linked CdTe nanocrystal as signals amplification labels. **Microchimica Acta**, 2011, 172:431–437 (SCI) IF 2.648
- 2) **Zhouping Wang\***, Huan Xu, Jia Wu, Jing Ye, and Zhen Yang. Sensitive detection of *Salmonella* with fluorescent bioconjugated nanoparticles probe. **Food Chemistry**, 2011, 125, 779–784 (SCI) IF 3.146
- 3) **Zhouping Wang\***, Tingting Miu, Huan Xu, Nuo Duan, Xiaoying Ding, Shuang Li. Sensitive immunoassay of *Listeria monocytogenes* with highly fluorescent bioconjugated silica nanoparticles probe. **Journal of Microbiological methods**, 2010, 83, 179–184 (SCI) IF 2.427
- 4) **Zhouping Wang\***, Huan Xu, Jia Wu, Jing Ye, Guowei Le. Homogenous Detection of *Listeria Monocytogenes* DNA with Molecule Beacon and Highly Fluorescent Bioconjugated Nanoparticles Probe. **Acta Chimica Sinica**, 2010, 68(9):909-916 (SCI) IF 0.751
- 5) **Zhouping Wang\***, Nuo Duan, Jingquan Li, Jing Ye, Shufeng Ma, Guowei Le. Ultrasensitive chemiluminescent immunoassay of *Salmonella* with silver enhancement of nanogold labels. **Luminescence**, 2010(accepted, in press) DOI: 10.1002/bio.1196 (SCI) IF 1.209
- 6) 王周平，段诺，李井泉. 一种基于纳米金标银增强信号放大技术的沙门氏菌检测方法（申请号：20109026053X；公开号：CN 101776688 A）
- 7) 王周平，丁晓莹. 一种特异识别单核细胞增生李斯特菌的核酸适配子及其筛选方法与应用（申请号：201010295766.9）
- 8) 王周平，丁晓莹. 一种特异识别志贺氏菌的核酸适配子及其筛选方法与应用（申请号：201010295767.3）

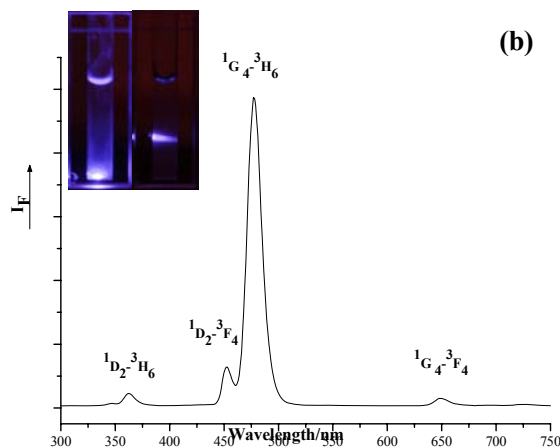
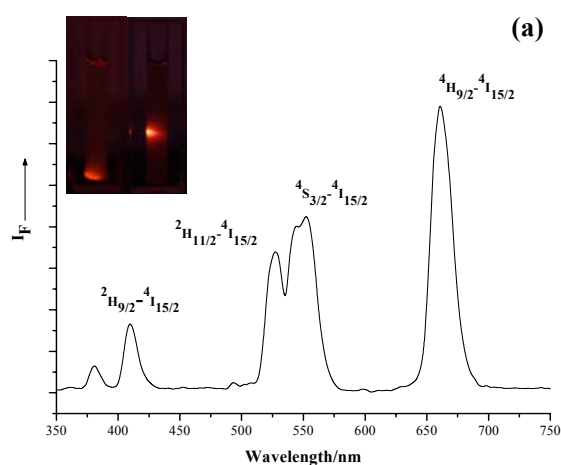
2) **纳米探针制备方面**：前期研究中，课题组成员在纳米材料制备及其生物功能化、纳米生物探针制备等方面已经开展了大量研究工作，积累了丰富的实践经验。制备了金属纳米颗粒、核壳结构磁性纳米颗粒、二氧化硅包覆荧光纳米颗粒、量子点等多种纳米材料，并成功对其进行了表面生物功能化、构建纳米生物探针并应用于食品安全相关研究工作中。近期已成功合成了部分上转换荧光纳米材料(图 2, 3)，成功进行了二氧化硅包覆、表面氨基化等修饰，构建了部分高灵敏检测方法。发表论文、申报国家发明专利如下：

- 1) Shijia Wu, Nuo Duan, **Zhouping Wang\***, and Hongxin Wang. Aptamer-functionalized magnetic nanoparticles-based bioassay for the detection of ochratoxin A using upconversion nanoparticles as label. **Analyst**, 2011(accepted, in press) DOI:10.1039/C0AN00735H(SCI) IF 3.272
- 2) **Zhouping Wang\***, Nuo Duan, Xu Hun, Shijia Wu. Electrochemiluminescence aptamer biosensor for the determination of Ochratoxin A at gold nanoparticles modified gold electrode using N-(aminobutyl)-N-ethylisoluminol as luminescence label. **Anal. Bioanal. Chem.** 2010, 398:2125–2132 (SCI)



### IF 3.48

- 3) Zhouping Wang, Jun Li, Bin Liu, Jinghong Li. CdTe nanocrystals sensitized chemiluminescence and the analytical application. **Talanta** 2009, 77, 1050-1056(SCI) IF 3.3
- 4) Zhouping Wang, Jianqiang Hu, Yan Jin, Xin Yao, Jinghong Li. In situ amplified chemiluminescent detection of DNA and immunoassay of IgG using special-shaped nanogold as label. **Clin. Chem.** 2006, 52(10): 1958-1961 (SCI) IF 6.263
- 5) Zhouping Wang, Jun Li, Bin Liu, Jianqiang Hu, Xin Yao, Jinghong Li. Chemiluminescence of CdTe nanocrystals induced from direct chemical oxidation and its size-dependent and surfactant sensitized effect. **J. Phys. Chem. B** 2005, 109(49):23304-23311 (SCI) IF 4.58
- 6) 王周平, 段诺, 混旭, 吴世嘉. 一种电化学发光核配体传感器检测赭曲霉毒素 A 的方法 (申请号: 201010271247.9; 公开号: CN 101936940 A)
- 7) 王周平, 吴世嘉, 段诺. 一种适配体功能化磁性纳米材料磁分离—上转换荧光纳米材料标记检测赭曲霉毒素 A 的方法 (申请号: 201010295782.8)



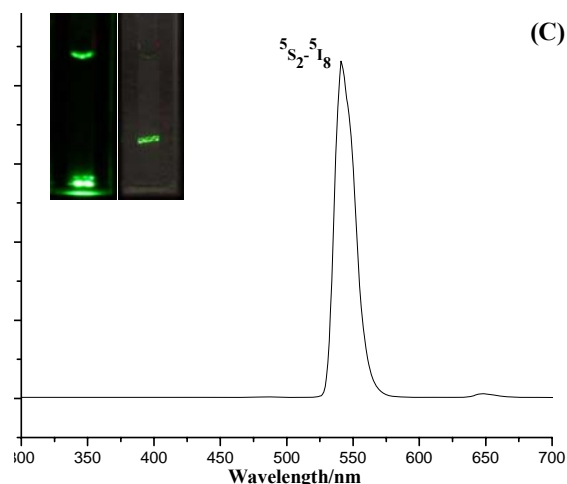


图 2 课题组采用水热法所制备红色发射 NaYF<sub>4</sub>: Yb, Er (a)、蓝色发射 NaYF<sub>4</sub>: Yb, Tm (b)、绿色发射 NaYF<sub>4</sub>: Yb, Er (c)上转换发光纳米材料荧光发射光谱及液相发光照片(内图) (980 nm 红外激光激发)

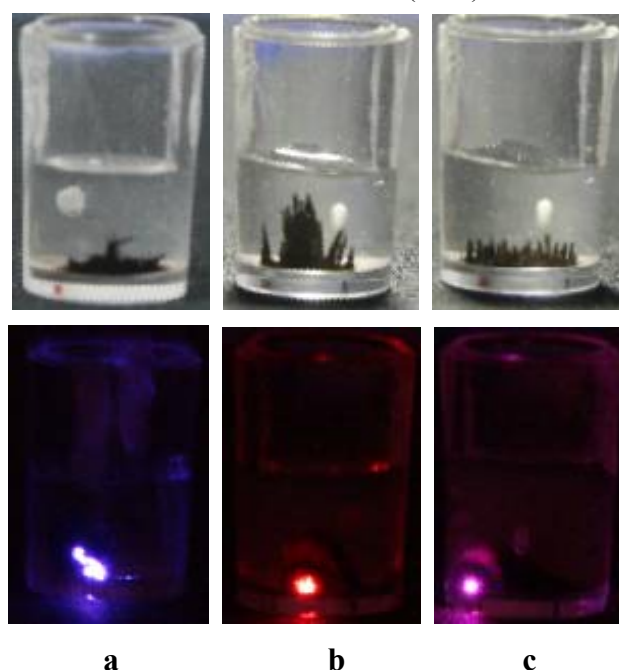


图 3 磁分离后不同颜色发射的磁性纳米粒子-上转换发光纳米粒子复合物 (NaYF<sub>4</sub>: Yb, Tm 上转换发光纳米粒子(a), NaYF<sub>4</sub>: Yb, Er 上转换发光纳米粒子(a), 二者混合 (c)) (本课题组制备)

## (二) 实验室条件

项目申请人所在江南大学为教育部直属“211 工程”重点高校,江南大学食品学院拥有国内食品学科唯一的“食品科学与工程一级国家重点学科”和“食品科学与技术国家重点实验室”,拥有强大的师资及大型实验设备(包括 SEM、TEM、XRD、激光粒径分布仪、Zetal 电位仪、核磁共振仪、圆二色谱仪、Beckman 毛细管电泳仪、HPLC、GC、GC-MS、LC-MS、LC-MS-MS)和众多基础设备,建有专业的生物安全实验室,可以完全保证研究工作的顺利进行。江南大学食品学院食品生物平台实验室拥有全套蛋白质组学相关仪器设备、日立 F-7000 荧光仪、PCR 仪、流式细胞仪、多功能酶标仪等大型仪器设备,可随时保证研究工作使用。本课题研究小

组实验室拥有发光成像系统、全自动酶标仪、梯度 PCR 仪、分子杂交炉、电泳仪、双波长紫外-可见分光光度计、层析制备系统、半制备 HPLC、超低温冰箱等仪器设备，拥有完善的细胞生物学和分子生物学实验室。

项目组第二成员所在的江苏出入境检验检疫局动植物与食品检测中心拥有 LightCycler 实时定量 PCR 仪、梯度 PCR 仪和常规 PCR 仪、凝胶成像系统、核酸杂交炉、Eppendorf 离心机、电泳及层析等成套的生物化学和分子生物学实验仪器设备，拥有 CO<sub>2</sub> 培养箱、倒置显微镜、细胞滚瓶培养装置、生物安全实验室等成套的细胞培养所需的仪器设备和实验设施，拥有全自动酶标仪、常规酶标仪、洗板机、各类离心机等成套血清学实验仪器设备，拥有高压电泳、超滤浓缩、层析、超速离心等成套的蛋白检测和分析仪器设备。同时拥有三相气体培养箱，微需氧培养罐，MiniVidas 细菌快速鉴定，Matrix 磁珠吸附，Bax 等适用于致病菌的成套的细菌培养及检测仪器设备。中心拥有实验室面积 3000 多平方米，拥有生物安全实验室三间，各种培养用的无菌室多间，设计先进的分子检测专用实验室，整体布局合理。涉及了细菌病毒的分离鉴定、细胞培养、PCR、ELISA 等各种生物学技术，具有完善的生物安全体系和丰富的操作经验，能合理使用并有效控制活病原，确保病原不会扩散。





## 五、说明最近一次获得博士学科点专项科研基金资助课题（在研或结题）的执行情况。

教育部博士点基金新教师项目”基于纳米探针技术的食品营养与安全分析”（No.20070295014），王周平负责，课题已经完成。

课题围绕基于纳米探针技术的食品营养与安全检测技术研究及其共性检测技术的发展，已发表和录用学术论文 11 篇（其中 SCI 源刊收录论文 8 篇），发展了具有自主知识产权的新型纳米探针 6 种，研制了基于新型纳米探针技术的快速筛检装置 3 套，建立了完善的基于纳米探针技术的高灵敏快速检测系统 6 种以上，研制了检测试剂盒 4 种，申请国家发明专利 6 项。同时，所发展技术检测灵敏度均已达到 pg 级，部分达到 fg 级；探针寿命较已报道酶标记物、荧光染料分子、放射性同位素大幅度提高，纳米探针高度稳定，可长期使用；所建立技术检测精密度与已报道方法一致。超额完成了课题任务书所要求的各项目标和考核指标。项目研究成果中涉及具体检测目标的技术与方法均为国内外首创，居于国际领先水平。



## 六、申请人作为课题负责人承担的国家及省部级科研项目。

课题编号	课题名称	起止时间	项目经费 (万元)	执行情况	课题来源
2008AA10Z419	基于纳米探针技术的真菌毒素快速检测技术研究	2008-01-01 至 2010-12-31	50	已经完成	国家"863"计划 项目
20805019	基于功能化金纳米探针的食源性致病菌超灵敏快速 检测方法与技术研究	2009-01-01 至 2009-12-31	9	已经完成	国家自然科学基金
BK2008101	基于功能化金纳米探针的真菌毒素新型检测方法研究	2008-01-01 至 2010-06-30	8	已经完成	江苏省自然科学 学基金
20070295014	基于纳米探针技术的食品营养与安全分析 (No. ) 2008-2010	2008-01-01 至 2010-12-31	3.6	已经完成	教育部博士点 基金新教

简 表 二

经 费 概 算						
						单位：万元人民币
合计	设备费	材料费	计算费	资料费	差旅费	其它
12.0	1.0	5.8	0.6	2.0	2.0	0.6
需购置的设备						
名 称			数 量		金 额	
小型光学配件			3		1.0	
其他经费来源（限 120 个字以内）：						

简 表 三

课题 申请人及主要参加人员发表论文或专著情况表						
序号	时 间	姓 名	本人排名	论文或专著名称	发表刊物（卷期页）或出版社	是否通讯作者
1	2011. 3	Shijia Wu, Nuo Duan, Zhouping Wang*, and	3	Aptamer-functionalized magnetic nanoparticles-based bioassay for the detection of ochratoxin A using upconversion nanoparticles as label. ,	Analyst (accepted, inpress) DOI: 10.1039/C0AN00735H	是
2	2010, 9	Zhouping Wang*, Nuo Duan, Xu Hun, Shijia Wu	1	Electrochemiluminescence aptamer biosensor for the determination of Ochratoxin A at gold nanoparticles modified gold electrode using N-(aminobutyl)-N-ethylisoluminol as luminescence	Anal. Bioanal. Chem. 398: 2125-2132	是
3	2011. 1	Tinging Miao, Zhouping Wang, Shuang	2	Sensitive fluorescent detection of Staphylococcus aureus using nanogold linked CdTe nanocrystal as signals amplification labels. (SCI) IF 2.648	Microchimica Acta, 172: 431-437	是
4	2011. 1	Zhouping Wang, Huan Xu, Jia Wu, Jing Ye, and	1	Sensitive detection of Salmonella with fluorescent bioconjugated nanoparticles probe. (SCI) IF 3.146	Food Chemistry 125, 779-784	是
5	2010. 8	Zhouping Wang*, Tingting Miu, Huan Xu,	1	Sensitive immunoassay of Listeria monocytogenes with highly fluorescent bioconjugated silica nanoparticles probe. (SCI) IF 2.427	Journal of Microbiological methods 83, 179-184	是
6	2010. 5	Zhouping Wang*, Huan Xu, Jia Qian, Jing Ye, Zhen	1	A flow-injection chemiluminescent method for the evaluation of the antioxidant activity of 5'-nucleotides. (SCI) IF 1.209	Luminescence 25(4): 300-306	是
7	2010. 7	Zhouping Wang*, Huan Xu, Jia Wu, Jing Ye,	1	Homogenous Detection of Listeria Monocytogenes DNA with Molecule Beacon and Highly Fluorescent Bioconjugated Nanoparticles Probe. (SCI) IF 0.751	Acta Chimica Sinica 68(9): 909-916	是
8	2009. 9	Zhouping Wang, Jun Li, Bin Liu, Jinghong Li	1	CdTe nanocrystals sensitized chemiluminescence and the analytical application. (SCI) IF 3.3	Talanta 77, 1050-1056	否

简 表 三

课题 申请人及主要参加人员发表论文或专著情况表						
序号	时 间	姓 名	本人排名	论文或专著名称	发表刊物（卷期页）或出版社	是否通讯作者
9	2008.6	Xiaoli Peng, Zhouping Wang*, Jingquan Li,	2	Electrochemiluminescence Detection of Clarithromycin in Biological Fluids after Capillary Electrophoresis Separation. IF 1.317	Anal. Lett. 41: 7, 1184-1199.	是
10	2006.6	Zhouping Wang, Jianqiang Hu, Yan Jin,	1	In situ amplified chemiluminescent detection of DNA and immunoassay of IgG using special-shaped nanogold as label. (SCI) IF 7.717 (2006), 6.263 (2010)	Clin. Chem. 52(10): 1958-1961	否
11	2005.9	Zhouping Wang, Jun Li, Bin Liu, Jianqiang	1	Chemiluminescence of CdTe nanocrystals induced from direct chemical oxidation and its size-dependent and surfactant sensitized effect. (SCI) IF 4.58	J. Phys. Chem. B 109(49): 23304-23311	否
12		Zhouping Wang*, Zhen Yang, Jing Ye, Guiliang	1	Capillary Electrophoresis-electrochemiluminescence Method for Simultaneous Detection of Azithromycin, Roxithromycin and Erythromycin Ethylsuccinate	Chem. Anal. 2009, 54, 883-894	是
13	2004.5	Zhouping Wang, Zhujun Zhang, Zhifeng Fu,	1	Flow-injection chemiluminescence determination of aminomethylbenzoic acid and aminophylline based on N-bromosuccinimide-luminol reaction	Talanta 2004, 62: 611-617	否
14	2003.4	Zhouping Wang, Zhujun Zhang, Zhifeng Fu,	1	A flow-injection ultrafiltration sampling chemiluminescence system for on-line determination of drug-protein interaction.	Anal. Bioanal. Chem. 2003, 377, 4: 660-665	否
15	2004.6	Zhouping Wang, Zhujun Zhang, Zhifeng Fu,	1	Sensitive flow-injection chemiluminescence determination of terbutaline sulfate based on the enhancement of luminol-permanganate reaction	Anal. Bioanal. Chem. 2004, 378(3): 834-840	否
16	2011.3	Nuo Duan, Shijia Wu, Zhouping Wang*	3	An aptamer-based fluorescence assay for Ochratoxin A	Chinese J. Anal. Chem. 2011, 39(3): 300-304	是

简 表 四

课题申请人及主要参加人员的基本情况表（课题参加人员必须有博士生）										
序号	姓名	出生年月	技术职称	从事专业	工作单位	投入工时 （月/年）	课题中的分工		签名	
1	王周平	1974-04-01	教授	食品营养与安全	江南大学	10	课题组织、方案设计			
2	祝长青	1973-10-31	高级工程师	食品微生物检验	江苏出入境检验检疫局动植物与食品检测	8	方法验证、评估			
3	马淑凤	1978-05-22	工程师	食品营养与安全	江南大学	10	方法验证			
4	吴世嘉	1986-05-12	博士生	食品安全	江南大学	10	纳米材料制备			
5	段诺	1986-06-22	博士生	食品安全	江南大学	10	适配体筛选、分析方法			
6	陈秀娟	1987-10-01	硕士生	食品安全	江南大学	10	适配体筛选、分析方法			
7	黄玉坤	1987-03-09	硕士生	食品安全	江南大学	10	分析方法			
总人数		教授		副教授		讲师		博士生	硕士生	其他人员
7		1		0		0		2	2	2
课题申请人简介：										
王周平，男，博士，清华大学化学系出站博士后，江南大学食品学院教授、博导、副院长，（法国）梅里埃科学研究基金获得者，江苏省食品安全标准审评专家，江苏省食品科学与技术学会秘书长；近年来致力于食品营养与安全检测研究工作，主要研究领域涉及食源性致病菌、食品真菌毒素快速检测技术；先后主持国家"863 计划"、国家自然科学基金、国家质检总局科技计划项目、（法国）梅里埃科学研究基金等科研项目 8 项，参与国家自然科学基金重点和面上项目、"十一五"科技支撑项目、江苏省科技支撑项目等多项；迄今已发表研究论文 50 余篇，其中 SCI 源刊收录论文 35 篇，第一作者和责任作者 SCI 论文 25 篇，申请国家发明专利 8 项。指导博士研究生 4 名，硕士研究生 12 名。										

申请人承诺：

本人符合高等学校博士学科点专项科研基金博导类课题的申报条件，申请书内容真实有效。若获得基金资助，我将认真开展相关研究工作，遵守《高等学校博士学科点专项科研基金管理办法》，按要求完成项目的结题工作，在项目结题前在中国科技论文在线（<http://www.paper.edu.cn>）发表 2 篇以上的论文，注明“高等学校博士学科点专项科研基金博导类资助课题”及项目编号。若申报信息失实或者违反规定，本人愿承担全部责任。

申请人签字：

## 简 表 五

学校学术委员会意见：

本项目以食源性致病菌新型检测方法为主要研究内容，以核酸适配体识别、上转换荧光纳米标记和磁分离富集为主要特色，旨在阐明致病菌适配体体外 SELEX 筛选的进化规律，揭示适配体与目标菌结合的分子机制，构建致病菌适配体筛选高效技术平台，发展食源性致病菌检测新型方法体系。项目立意新颖，创新点突出，属纳米技术与食品安全交叉研究领域，具有很高学术价值；项目的研究结果将对提高我国食源性致病菌检测技术水平具有积极的推动作用。且项目研究具备良好的前期研究工作基础。

项目申请人王周平教授系我校食品学院博士生导师，学风严谨，学术素养高。近年来一直致力于基于纳米探针技术的食品安全检测方法和技术研究，承担了国家和省部级多项科研项目的工作，取得了显著的研究成果。已发表和录用 50 余篇研究论文，其中 SCI 论文 35 篇，第一作者和责任作者 SCI 论文 25 篇（包括所指导研究生发表的第一作者 SCI 论文 5 篇），已申报国家发明专利 8 项，获得中国分析测试协会科技一等奖 1 项。

鉴于此，同意项目申报。

校学术委员会负责人签名：

年 月 日

学校意见：

同意申报。

该申请如获资助，我单位保证对研究计划所需要的人力、物力等条件给予支持，督促项目负责人严格遵守项目管理规定，按照课题进度，完成各项研究内容，达到预期目标。

校长（签字）：

学校盖章

年 月 日