



申请代码	B0509
受理部门	
收件日期	
受理编号	

解除保护

国家自然科学基金 申 请 书

(2013 版)

资助类别: 面上项目

亚类说明:

附注说明:

项目名称: 基于多色上转换荧光纳米探针的食源性致病菌检测新方法研究

申 请 人: 王周平 电话: 051085917023

依托单位: 江南大学

通讯地址: 江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号

邮政编码: 单位电话: 0510-85913615

电子邮箱: wangzp@jiangnan.edu.cn

申报日期: 2013年3月7日

国家自然科学基金委员会



基本信息

申请人信息	姓 名	王周平		性别	男	出生年月	1974 年 4 月	民 族	汉族
	学 位	博士		职称	教授		每年工作时间 (月)	10	
	电 话	051085917023			电子邮箱	wangzp@jiangnan.edu.cn			
	传 真				国别或地区	中国			
	个 人 通 讯 地 址	江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号							
	工 作 单 位	江南大学 / 食品学院 / 食品科学与技术国家重点实验室							
	主 要 研 究 领 域	分析化学、食品安全							
依托单位信息	名 称	江南大学							
	联 系 人	谢正军			电子邮箱	xiezhj@jiangnan.edu.cn			
	电 话	0510-85913615			网站地址	http://www.jiangnan.edu.cn			
合作研究单位信息	单 位 名 称								
	[在此录入修改]								
	[在此录入修改]								
项目基本信息	项目名称	基于多色上转换荧光纳米探针的食源性致病菌检测新方法研究							
	英文名称	Multicolor upconversion luminescent nano-probe based novel detection method for foodborne pathogen							
	资助类别	面上项目				亚 类 说 明			
	附注说明								
	申请代码	B0509:生化分析及生物传感				C200103:食品检验学			
	基地类别	2007DA105064:食品科学与技术国家重点实验室\国家重点							
	研究期限	2014 年 1 月 — 2017 年 12 月							
	申请经费	82.0000 万元							
中 文 关 键 词		多色上转换荧光; 纳米探针; 食源性致病菌; 食品安全							
英 文 关 键 词		Multicolor upconversion luminescence; nano-probe; food-borne pathogen; food safety							



中文摘要	<p>(限 400 字): 上转换激光诱导荧光因具有灵敏度高、无生物自发荧光干扰等优点, 近年来在分析科学领域备受关注, 但就定量生物分析而言迄今为止应用较多的还是单色上转换荧光标记。如何可控地制备得到荧光光谱可分辨的多色荧光上转换纳米材料, 将其应用于相对复杂的生物样本中多组分的同时定量分析、更好地发挥上转换荧光的优势成为新的研究课题。本课题拟基于对上转换发光纳米材料多色发光调控机制的研究, 探索荧光光谱可分辨的高发光产率多色荧光上转换纳米材料的可控合成方法, 研究基于能量共振转移机制的复合多色上转换纳米材料制备方法, 同时结合食源性致病菌高效生物识别分子-核酸适配体筛选方法平台的更新及其与致病菌结合机制的研究, 构建生物样本中食源性致病菌多组分同时高灵敏快速检测新方法。旨在构建多色上转换荧光检测新模式、拓展上转换激光诱导荧光应用领域, 为食品安全高灵敏快速检测技术的发展提供新的技术支撑。</p>
英文摘要	<p>(限 3000 Characters): Recent years, upconversion laser-induced fluorescence attracted an increasing attention attributed to its high sensitivity and no interference from biological background. However, up to now, the most applications related to upconversion fluorescence in quantitative bioassay is still monocolour labeling-based method. How to controllably synthesize upconversion nanoparticles (UCNPs) with various fluorescence emission and resolvable fluorescence spectra, apply it in multiplex simultaneous quantitative bioassay in biological matrix, and exploit the advantages of upconversion fluorescence have become a new task. The present study focus on the investigation of the controllable synthesis of UCNPs with different single color light emission based on the study of luminescent adjustable mechanism of UCNPs. Coupled with the study of aptamer SELEX technique and the affinity mechanism between the aptamer and the target foodborne pathogen, to set up multiplex simultaneous and rapid detection method for foodborne pathogen. The aim is to develop novel detection manner of multi-colour upconversion fluorescence, extend the application field of upconversion laser-induced fluorescence, and provide alternative support to the development of highly sensitive and rapid detection technology of food safety.</p>



项目组主要参与者（注：项目组主要参与者不包括项目申请人）

编号	姓 名	出生年月	性别	职 称	学 位	单位名称	电话	电子邮箱	项目分工	每年工 作时间 (月)
1	夏雨	1975-10-4	男	副教授	博士	江南大学	0510-85326195	diahui@jiangnan.edu.cn	适配体结合机制研究	8
2	李秀	1985-07-07	女	实验师	硕士	江南大学	0510-85326195	jsifst@163.com	致病菌菌株选育	8
3	段诺	1986-06-22	女	博士生	学士	江南大学	0510-85326195	never_good_love@126.com	核酸适配体筛选	10
4	吴世嘉	1986-05-12	男	博士生	学士	江南大学	0510-85326195	wusj1986@163.com	纳米材料制备	10
5	陈秀娟	1987-10-01	女	博士生	学士	江南大学	0510-85326195	yanyue19871001@163.com	核酸适配体筛选	10
6	黄玉坤	1987-03-09	女	博士生	学士	江南大学	0510-85326195	hyk_diana@163.com	分析方法建立	10
7	袁京磊	1988-01-20	男	硕士生	学士	江南大学	0510-85326195	492774230@qq.com	材料制备分析方法建立	10
8	贾飞	1989-07-11	男	硕士生	学士	江南大学	0510-85326195	jiasmale@126.com	分析方法建立	10
9	张维潇	1989-08-13	女	硕士生	学士	江南大学	0510-85326195	228628418@qq.com	核酸适配体筛选	10

总人数	高级	中级	初级	博士后	博士生	硕士生
10	2	1			4	3

说明： 高级、中级、初级、博士后、博士生、硕士生人员数由申请人负责填报（含申请人），总人数由各分项自动加和产生。



经费申请表

(金额单位: 万元)

科目	申请经费	备注 (计算依据与说明)
一. 研究经费	66.0000	
1. 科研业务费	21.0000	
(1) 测试/计算/分析费	8.0000	纳米材料表征测试费、核酸测序费等
(2) 能源/动力费	2.0000	水电费
(3) 会议费/差旅费	5.0000	召开课题研讨会费用和差旅费
(4) 出版物/文献/信息传播费	6.0000	论文版面费、专利申请费、资料费等
(5) 其他		
2. 实验材料费	37.0000	
(1) 原材料/试剂/药品购置费	29.0000	标准菌株、标准品、生化试剂等购买
(2) 其他	8.0000	玻璃器皿、实验耗材等购买
3. 仪器设备费	8.0000	
(1) 购置	2.0000	激光光源等购置
(2) 试制	6.0000	便携式检测装置试制
4. 实验室改装费		
5. 协作费		
二. 国际合作与交流费	4.0000	
1. 项目组成员出国合作交流	2.0000	赴国外交流合作 1 次
2. 境外专家来华合作交流	2.0000	邀请国外专家来华技术交流 1 次
三. 劳务费	8.0000	直接参加项目研究的研究生、博士后的劳务费用
四. 管理费	4.0000	不得超过申请经费的 5%
合 计	82.0000	
与本项目相关的 其他经费来源	国家其他计划资助经费	
	其他经费资助 (含部门匹配)	
	其他经费来源合计	0.0000



申请者在撰写报告正文时，请遵照以下要求：

- 1、 请先选定“项目基本信息”中的“资助类别”，再填写报告正文；
- 2、 在撰写过程中，不得删除系统已生成的撰写提纲（如误删可点击“查看报告正文撰写提纲”按钮，通过“复制/粘贴”恢复）；
- 3、 请将每部分内容填写在提纲下留出的空白区域处；
- 4、 对于正文中出现的各类图形、图表、公式、化学分子式等请先转换成 JPG 格式图片，再粘贴到申请书正文相应位置
- 5、 本要求将作为申请书正文撰写是否规范的评判依据，请遵照要求填写。

查看报告正文撰写提纲

报告正文

（一）立项依据与研究内容（4000-8000 字）：

1. 项目的立项依据（研究意义、国内外研究现状及发展动态分析，需结合科学研究发展趋势来论述科学意义；或结合国民经济和社会发展中迫切需要解决的关键科技问题来论述其应用前景。附主要参考文献目录）；

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^[1, 2]，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^[3]、稀土掺杂纳米晶^[4]和 SiO₂ 包覆的荧光染料^[5]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。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。

上转换荧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 400-650 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 300-700 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，上转换荧光纳米材料具有如下诸多优点^[5-8]：1）上转换材料光化学稳定，不易光解；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;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)采用高效的 980 nm 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,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;5)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 980 nm 红外光),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。

近年来,国内外围绕上转换荧光纳米材料生物分析应用的研究工作主要涉及三个方面:1)上转换荧光纳米材料直接标记的生物分析^[9-19];2)基于上转换荧光共振能量转移(FRET)机制的生物分析^[20-29];3)生物成像分析^[30-45],其中包括国内不少研究小组所做的卓有成效的工作。整体来看,“上转换荧光纳米材料直接标记的生物分析”和“基于上转换荧光共振能量转移(FRET)机制的生物分析”研究工作多涉及单一组分的检测,使用一种上转换荧光纳米材料作为标记物实现对目标物质的检测,而涉及多组分多色上转换纳米材料标记同时定量分析的报道还很少。目前,尽管许多研究已经制备出了多种发射不同颜色的上转换荧光纳米材料,但多色上转换纳米材料标记应用较多的还是集中在成像分析领域^[16,17,42,43]。因为成像分析中即使材料本身荧光发射谱有重叠,只要最终发射的荧光颜色有区别即可使用。但多组分定量分析时情况就要复杂的多,如果发射谱带重叠就会给不同组分的定量造成很大困难,这也是上转换荧光在多组分同时定量分析方面报道很少的可能原因。

此外,在材料科学领域,研究者为了实现上转换荧光发射的色平衡,在合成荧光谱带多、色彩丰富的上转换荧光纳米材料^[12,23,25,31]方面开展了大量卓有成效的研究工作,这些对于上转换荧光纳米材料在光电子领域的应用发展具有重要意义,但如果将其直接应用于生物样本中来实现多组分的同时定量生物分析则会形成很多困难。如果能通过上转换荧光发光机理的研究,掌握上转换荧光多色发射的调控机制,探索光谱可分辨的不同单色荧光上转换纳米材料的制备方法,或通过能量内转换机制制备复合荧光上转换纳米材料,最终获得光谱完全可分辨的多种单色荧光上转换纳米材料,对于发挥上转换荧光在相对复杂食品样本分析中的优势、建立基于上转换激光诱导荧光的生物样本多组分同时高灵敏检测方法体系将具有积极意义。

本课题小组近来在上转换荧光纳米材料多色标记方面进行了一些尝试,制备得到了荧光光谱可分辨的 NaYF₄:Yb,Er、NaYF₄:Yb,Tm 和 NaYF₄:Yb,Ho 等上转换荧光纳米材料,通过表面二氧化硅包覆、氨基化,与抗体、核酸适配体偶联实现了生物功能化,结



合磁分离富集技术,同时对检测装置进行巧妙设计,已成功构建了基于多色上转换荧光纳米探针的多种真菌毒素(*Anal. Chem.* 2012, 84, 6263–6270; *Biosens. Bioelectron.* 2011, 30, 35–42)、两种手足口病毒(*Chem. Comm.* 2012, 48 (40), 4866–4868)、沙门氏菌和金黄色葡萄球菌(*Anal. Chim. Acta* 2012, 723, 1–6)同时高灵敏检测方法。

食源性致病菌是食品安全重要危害因子之一,一直以来都是国内外食品安全检测的重点^[46,47]。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,但总体上主要基于三个原理^[48]: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。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,因此实际检测中的最大瓶颈就是因为不能区分活菌和死菌而导致的假阳性问题。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较长。而近年来迅速发展的单克隆抗体技术在这些方面得到了一些改观,但抗体制备耗时费力,且其稳定性在实际使用时也存在诸多问题,因此检测工作需要更高效的生物识别分子的发现。同时,食源性致病菌存在的食品基质多种多样,普通荧光检测方法不同程度的会受到不同基质中的荧光性生物分子自发荧光的干扰,因此也需要发展荧光背景干扰小的新型荧光检测方法。

核酸适配体(Aptamer)是近年来迅速发展的一种新型生物分子探针,因其具有亲和力高、特异性强、靶分子范围广、容易制备及修饰、稳定性好、与靶分子的结合条件可调控等特点,在医学、生命科学以及生物分析科学领域获得了快速应用和发展^[49–51]。自 1999 年 Bruno 等^[52]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,针对致病菌核酸适配体的筛选和分析应用已有部分报道,主要包括嗜酸乳杆菌^[53]、单核增生性李斯特菌^[54]、沙门氏菌^[55]、金黄色葡萄球菌^[56]、结核分枝杆菌^[57]、链球菌^[58]、空肠弯曲杆菌^[59]等,本课题小组近期也采用 cell-SELEX 技术筛选得到了单核增生性李斯特菌(专利授权号:ZL 201010295766.9)、志贺氏菌(专利授权号:ZL 201010295767.3)、鼠伤寒沙门氏菌(专利申请号:201110291363.1)、副溶血性弧菌(专利申请号:201110291377.3)、无乳链球菌(专利申请号:201210570202.0)、化脓链球菌(专利申请号:201210570205.4)特异结合核酸适配体,通过实验验证亲和力与特异性良好,已结合流式细胞术、荧光探针技术成功实现了实际样品中目标菌的高灵敏检测(*Anal. Chim. Acta* 2012, 723, 1–6; 专利申请号:201210570201.6)。尽管多数报道都在强调核酸适配体与目标菌结合的高度特异性,但实际检测工作对核酸适配体识别的特异性提出了更高要求,如何避免



交叉反应、实用性差等成为核酸适配体应用的瓶颈问题。因此急需开展相关研究工作,深入了解目标物核酸适配体筛选过程的进化规律,更新核酸适配体筛选技术平台,揭示核酸适配体与目标物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。

基于此种现状,本课题研究拟在深入研究上转换发光机制的基础上,探索荧光光谱可分辨、量子产率高的上转换荧光纳米材料的可控合成方法,定向制备出荧光光谱可分辨、量子产率高的各色上转换荧光纳米材料,通过核酸适配体等特异性识别分子的生物功能化制备上转换荧光纳米探针,结合磁分离富集技术,将这几项技术有机结合,充分发挥其优势,探索适用于不同食品基质中食源性致病菌多组分高灵敏检测的新方法,相关研究成果对于食源性致病菌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. 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,2005,1-3
2. 汪尔康.《21 世纪分析化学》科学出版社,1999,294
3. Bruchez M, Moronne M, Gin P, Weiss S, Alivisatos AP. Science, 1998, 281, 2013-2016
4. Diamente PR, Burke RD, van Veggel F. Langmuir, 2006, 22, 1782-1788
5. Tan WH, Wang KM, He XX, Zhao XJ, Drake T, Wang L, Bagwe RP. Med. Res. Rev., 2004, 24, 621-638
6. 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
7. Wang LY, Li YD. Chem.Comm., 2006, 2557-2559
8. Yi GS, Lu HC, Zhao SY, Yue G, Yang WJ, Chen DP, Guo LH. Nano Lett., 2004, 4, 2191-2196
9. Guo YG, Deng W, Guo M. 2006 1st IEEE International Conference of NanoPMicro Engineered and Molecular Systems. v.1P3. New York: IEEE, 2006. 550-555
10. Corstjens P, Zuiderwijk M, Nilsson M, Feindt H, Niedbala RS, Tanke HJ. Anal. Biochem., 2003, 312, 191-200.
11. Hampl J, Hall M, Mufti N A, Yao YMM, MacQueen DB, Wright WH, Cooper, DE. Anal. Biochem., 2001, 288: 176-187.
12. Nam J M, Han S W, Lee K B, Liu XG, Ratner MA, Mirkin CA. Angew. Chem. Int. Edit., 2004, 43: 1246-1249.
13. Niedbala RS, Feindt H, Kardos K, Vail T, Burton J, Bielska B, Li S, Milunic D, Bourdelle P, Vallejo R. Anal. Biochem., 2001, 293: 22-30.
14. Song K, Tian L, Kong X, Liu K, Zhang Q, Du C, Zeng Q, Sun Y, Liu X. Spectr. Spectr. Anal. 2010, 30, 133-136
15. van de Rijke F, Zijlmans H, Li S, Vail T, Raap AK, Niedbala RS, Tanke, HJ. Nat.



- Biotechnol., 2001, 19: 273-276.
16. Wang G, Peng Q, Li YD. *Accounts Chem. Res.*, 2011, 44, 322-332
17. Wang M, Abbineni G, Clevenger A, Mao C, Xu S. *Nanomed.-Nanotech. Biol. Med.*, 2011, 7, 710-729
18. Zhang F, Shi Q, Zhang Y, Shi Y, Ding K, Zhao D, Stucky GD. *Adv. Mater.*, 2011, 23, 3775.
19. Zuiderwijk M, Tanke H J, Niedbala R S, Corstjens PLAM. *Clin. Biochem.*, 2003, 36: 401-403.
20. Chen J, Chen H, Zhou C, Xu J, Yuan F, Wang L. *Anal. Chim. Acta* 2012, 713, 111-4
21. Chen ZG, Chen HL, Hu H, Yu MX, Li FY, Zhang Q, Zhou ZG, Yi T, Huang CH. *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, 130: 3023-3029
22. Liu CH, Wang Z, Jia HX, Li ZP, *Chem. Comm.* 2011, 47, 4661-4663.
23. Rantanen T, Jrvén MJ, Vuojola J, Kuningas K, Soukka T. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2008, 47, 3811-3813.
24. Song, Kai; Kong, Xianggui; Liu, Xiaomin; Zhang, Youlin; Zeng, Qinghui; Tu, Langping; Shi, Zhan; Zhang, Hong. *Chem. Comm.*, 2012, 48, 1156-1158
25. Vetrone F, Boyer J C, Capobianco J A, Speghini A, Bettinelli M. *Chem. Mater.*, 2003, 15:2737-2743.
26. Wang M, Hou W, Mi C, Wang W, Xu Z, Teng H, Mao C, Xu S. *Anal. Chem.* 2009, 81, 8783-8789
27. Wang Y, Shen P, Li C, Wang Y, Liu Z. *Anal. Chem.* 2012, 84, 1466-1473
28. Zhang CL, Yuan YX, Zhang SM, Wang YH, Liu ZH, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2011, 50, 6851-6854.
29. Zhang P, Rogelj S, Nguyen K, Wheeler D. *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, 128: 12410-12411.
30. Chatterjee DK, Rufaihah AJ, Zhang Y. *Biomaterials*, 2008, 29, 937-943.
31. Chen J, Guo C, Wang M, Huang L, Wang L, Mi C, Li J, Fang X, Mao C, Xu S. *J. Mater. Chem.* 2011, 21, 2632-2638
32. Cheng L, Yang K, Zhang S, Shao M, Lee S, Liu Z. *Nano Res.* 2010, 3, 722-732
33. Dong B, Xu S, Sun J, Bi S, Li D, Bai X, Wang Y, Wang L, Song H. *J. Mater. Chem.*, 2011, 21, 6193-6200
34. He X, Wang K, Cheng Z. *Wiley Interdisc. Rev.-Nanomed. Nanobiotech.*, 2010, 2, 349-366
35. Jalil RA, Zhang Y. *Biomaterials*, 2008, 29, 4122-4128.
36. Lim SF, Riehn R, Ryu WS, Khanarian N, Tung CK, Tank D, Austin RH. *Nano Lett.*, 2006, 6: 169-174.
37. Liu J, Liu Y, Liu Q, Li C, Sun L, Li F. *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, 133, 15276-15279
38. Liu Q, Peng J, Sun L, Li F. *ACS NANO*, 2011, 5, 8040-8048



39. Liu Q, Sun Y, Yang T, Feng W, Li C, Li F. *J. Am. Chem. Soc.* 2011, 133, 17122-17125
40. Liu Z, Peng R. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. I.*, 2010, 37, S147-S163
41. Nyk M, Kumar R, Ohulchanskyy T Y, Bergey EJ, Prasad PN. *Nano Lett.*, 2008, 8, 3834-3838.
42. Tian Z, Chen G, Li X, Liang H, Li Y, Zhang Z, Tian Y. *Laser Med. Sci.*, 2010, 25, 479-484
43. Wang F, Banerjee D, Liu Y, Chen X, Liu X. *Analyst*, 2010, 135, 1839-1854
44. Wang M, Mi C, Wang W, Liu C, Wu Y, Xu Z, Mao C, Xu S. *ACS NANO* 2009, 3, 1580-1586
45. Yu M, Li F, Chen Z, Hu H, Zhan C, Yang H, Huang C. *Anal. Chem.*, 2009, 81: 930-935.
46. 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.
47. 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.
48. 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.
49. Yan AC, Levy M. *RNA BIOLOGY*, 2009, 6, 316-320
50. Tuerk C, Gold L. *Science*, 1990, 249(4968), 505-510
51. Ellington AD, Szostak JW. *Nature*, 1990, 346(6287), 818-822
52. Bruno JG, Kiel JL. *Biosens. Bioelectron.* 1999, 14, 457-464
53. Hamula CLA, Zhang H, Guan LL, Li X-F, Le XC. *Anal. Chem.* 2008, 80, 7812-7819
54. 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
55. Joshi R, Janagama H, Dwivedi HP, Kumar TMAS, Jaykus L-A, Scheffers J, Sreevatsan S. *Mol. Cell. Probe*, 2009, 23, 20-28
56. 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
57. 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
58. Hamula CLA, Le XC, Li XF. *Anal. Chem.*, 2011, 83, 3640-3647
59. Dwivedi HP, Smiley RD, Jaykus LA. *App. Microbiol. Biotech.* 2010, 87, 2323-2334

2. 项目的研究内容、研究目标,以及拟解决的关键科学问题 (此部分为重点阐述内容);

研究内容:

1) 上转换荧光纳米粒子多色发光调控机制与可控合成方法研究

通过控制稀土氟化物上转换纳米粒子的表面配体(共掺杂敏化剂及激活剂等)组成、结晶度以及晶格声子能量,改变镧系发光中心离子能级之间发生无辐射弛豫的几率,研



究上转换纳米粒子荧光发射的变化规律,建立具有普遍性的调节稀土氟化物纳米材料上转换多色发光的新方法。

探索形态大小均一的上转换发光纳米材料可控合成的方法,合成荧光光谱可分辨的多色上转换荧光纳米粒子,重点研究影响其荧光谱带变化的各种因素,最终达到可控合成的目标,构建多色标记-多组分同时定量分析的基础。同时,探索体相变化对发光效率的影响规律,研究获得最佳发光效率的体相等实验条件。

2) 食源性致病菌核酸适配体的 SELEX 体外筛选及其结合机制研究

研究和构建生物稳定性好的大容量(10^{13} 至 10^{15})的 DNA 和 RNA 分子文库;继而针对目标菌菌膜上特异结构蛋白/目标菌整体细胞初步筛选核酸适配体;克隆与表征特异性识别目标菌菌膜上特异结构蛋白/目标菌整体细胞的核酸适配体,进行结构分析与冗余序列的剪裁,进行结合机制和识别机理的研究;进一步筛选针对目标菌菌膜上特异结构蛋白/目标菌的核酸适配体。

3) 生物功能化上转换荧光纳米探针制备

以核酸适配体的分子识别效应与构象变化效应为基础,研究不影响核酸适配体特异性的化学修饰、标记、与组装方法,结合纳米生物技术,研究上转换荧光纳米粒子核酸适配体的非共价和共价标记技术,制备灵敏、简便、经济的核酸适配体功能化上转换荧光纳米生物探针。同时探讨综合运用各种纳米组装手段,结合核酸适配体化学修饰与功能化方法,发展表面密度与取向可控的核酸适配体探针的固定化技术。

4) 食源性致病菌样品分离富集纯化技术研究

研究适配体在磁性纳米材料表面的组装性质,发展对应的磁性纳米材料表面核酸适配体的固定技术;研究适配体核酸碱基及分子结构的改造方法,系统研究磁性微纳米载体与适配体仿生界面制备的规律;研究磁性纳颗粒分离技术及适配体负载磁性微纳米粒子的制备方法,建立目标菌的磁分离技术。

5) 基于磁分离富集-适配体识别-多色上转换荧光纳米探针的食源性致病菌多组分高灵敏同时检测方法研究

基于筛选得到的目标菌核酸适配体及其分子识别特性,设计适配体构象互变型与链置换型纳米生物探针,发展均相及准固定相中目标菌多组分同时定量检测的磁分离富集-适配体识别-上转换激光诱导荧光生物传感系统;考察核酸适配体探针对靶标的识别能力,研究其相互作用的动力学过程,发展改善探针靶向识别性能的方法;探讨传感界面体系探针分子的负载量与分子识别能力的关系,探索提高分子识别体系的重现性与稳定性的方法,抑制复杂生物体系中的交叉干扰现象。



6) 方法验证与评估

采用 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、精密度等进行验证和评估, 在确立共性检测方法的基础上, 拓展应用到食品安全其它检测领域。并试制便携式检测装置。

研究目标:

1) 明确上转换荧光纳米粒子多色发光调控机制, 阐明影响其荧光光谱变化的主要因素, 发展荧光光谱可分辨的不同单色上转换荧光纳米材料的制备方法。

2) 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, 并筛选得到针对重要食源性致病菌的核酸适配体 5-6 种。

3) 揭示核酸适配体与目标菌相互作用的分子机制, 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, 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。

4) 构建集合磁分离富集、多色上转化荧光纳米标记技术、核酸适配体识别等技术优势为一体的目标菌多组分同时高灵敏检测方法体系。

5) 建立食品安全共性检测方法与技术体系。并试制便携式检测装置。

拟解决的的关键科学问题:

1) 了解上转换荧光纳米粒子多色发光调控机制, 阐明影响其荧光光谱变化的主要因素, 掌握荧光光谱可分辨的不同单色上转换荧光纳米材料的制备方法。

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。

3) 分析采用核酸适配体功能化上转换发光纳米粒子或磁性微纳米粒子过程中共价和非共价结合标记的特点, 阐明上述纳米载体与适配体仿生界面制备的规律。

4) 阐明上转换荧光检测装置设计对检测结果重复性和稳定性的影响。

3. 拟采取的研究方案及可行性分析 (包括研究方法、技术路线、实验手段、关键技术等说明);

研究方法:

1) 上转换荧光纳米粒子多色发光调控机制与可控合成方法研究



A、通过控制稀土氟化物上转换纳米粒子的表面配体（共掺杂敏化剂及激活剂等）组成、结晶度以及晶格声子能量，改变镧系发光中心离子能级之间发生无辐射弛豫的几率，研究上转换纳米粒子荧光发射的变化规律，建立具有普遍性的调节稀土氟化物纳米材料上转换多色发光的新方法；在此基础上，进一步研究影响不同发光谱带变化的各种因素，通过控制上述条件改变，定向制备出荧光光谱可分辨的不同单色上转换纳米粒子。

B、设计并研究通过控制反应温度和时间调节粒子的结晶度，进而调节稀土氟化物纳米粒子上转换多色发光的规律；研究体系反应温度和时间对氟化物上转换纳米粒子的内部缺陷和结晶度的影响，并结合对照实验、高分辨 TEM 成像和计算拟合等方法，明确粒子结晶度变化对产物多色发光的影响。

C、将上转换纳米粒子与具有不同荧光发射特征的量子点等发光体偶联或采用二氧化硅共包覆，制备出基于材料内能量转移机制的不同单色复合上转换纳米粒子。

D、探索采用 Mn 等金属掺杂的上转换纳米粒子制备方法，在保持发光量子产率的同时，有效减少上转换纳米粒子荧光谱带的数量，使上转换纳米粒子特征发射峰更集中；研究采用 Au/Ag 等金属掺杂的上转换纳米粒子制备方法，探索提高上转换纳米粒子发光量子产率的有效方法。

E、在上述基础上，可控地批量合成发光产率高、荧光光谱可分辨的多色上转换荧光纳米粒子，通过化学修饰或壳层包覆提高其生物相容性，构建多色标记-多组分同时检测的基础。

2) 食源性致病菌核酸适配体的 SELEX 体外筛选及其结合机制研究

A、以肺炎链球菌、军团菌、阪崎杆菌、致病性大肠杆菌等为例，**策略一**：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，并结合整体菌亲和力验证实验，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。**策略二**：采用 cell-SELEX 技术，以整体菌及整个属的菌混合物为筛选靶标，充分设计反筛和负筛样品，获得对单一或属菌株特异性高、亲和力强的核酸适配体。**策略三**：筛选过程中采用单链制备等手段，保证每一轮筛选得到的寡核苷酸适配体单链特性的保持。

B、对筛选出的核酸适配体进行测序、二级结构模拟分析，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。

C、利用光谱技术、质谱技术、多维核磁共振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,探索颈环、发夹等结构以及不同碱基含量对核酸适配体与目标菌结合能力影响的规律,深入研究核酸适配体分子识别规律。

D、通过序列裁减、替换以及竞争结合等实验,结合化学计算、分子模拟和分子设计,对适配体与目标菌特异性结合的靶点进行对接分析与自适应识别研究,确定决定特异结合的核心结构和碱基构成,建立相关理论模型,并利用这些模型和机制评估、设计新的核酸适配体分子探针。

3) 生物功能化上转换荧光纳米探针制备

对制备的上转换荧光纳米粒子进行表面二氧化硅包覆和氨基化等修饰,采用目标菌核酸适配体对其进一步进行生物功能化,研究上转换纳米载体表面修饰核酸适配体的密度,通过理论与实验分析其理论容量。通过盐浓度、pH、温度,变性剂等条件的调节,考察核酸适配体对目标菌的吸附、洗脱条件以及分离基质的再生方法。

4) 食源性致病菌样品分离富集纯化技术研究

对核酸适配体进行生物素、氨基化等化学修饰,利用表面修饰亲合素、羧基的磁性纳米粒子等固定核酸适配体,研究纳米粒子表面修饰核酸适配体的密度,通过理论与实验分析其理论容量。通过盐浓度、pH、温度,变性剂等条件的调节,考察核酸适配体对目标菌的吸附、洗脱条件以及分离基质的再生方法,提高目标菌富集与解离的重现性,由此建立批间误差小、分离容量高的目标菌富集与解离技术。

5) 基于磁分离富集-适配体识别-多色上转换荧光纳米探针的食源性致病菌多组分高灵敏同时检测方法研究

通过对筛选得到的目标菌核酸适配体及其分子识别特性的研究,设计适配体构象互变型与链置换型纳米生物探针,构建均相及准固定相中目标菌多组分同时定量检测的磁分离富集-适配体识别-上转换激光诱导荧光生物传感系统;通过流式细胞术、荧光分光法等考察核酸适配体探针对于靶标的识别能力,研究其相互作用的动力学过程,发展改善探针靶向识别性能的方法;考察上转换和磁性纳米载体界面体系探针分子的负载量对分子识别能力的影响,阐明载体界面体系探针分子的负载量与分子识别能力的关系,发展提高分子识别体系的重现性与稳定性的方法,以抑制复杂生物体系中的交叉干扰现象。

6) 方法验证与评估

采用 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、精密度等进行验证和评估,在确立共性检测方法的基础上,拓展应用到食品安全其它检测领域。并试制便携式检测装置。



技术路线:

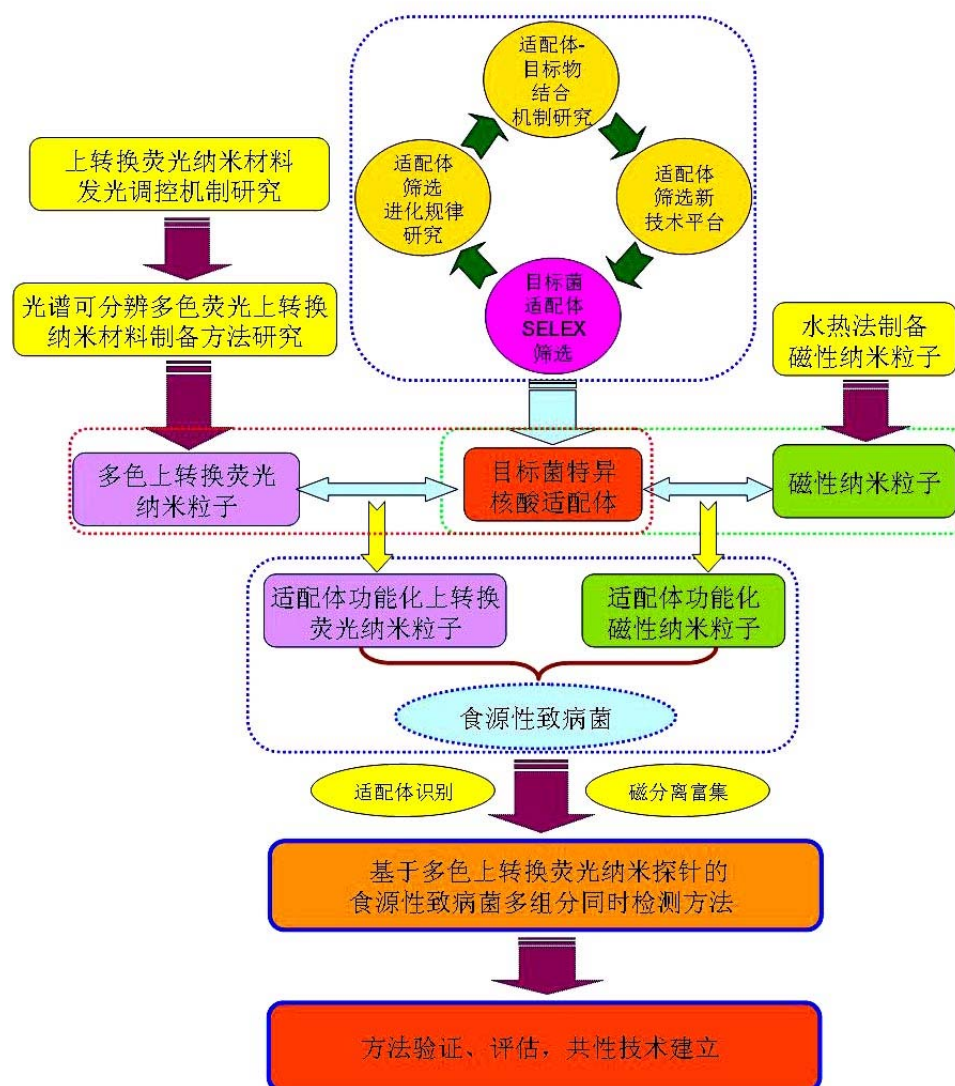


图 1 项目研究技术路线

可行性分析:

纳米探针制备方面: 上转换荧光纳米材料报道较多, 制备方法比较成熟, 本研究重点在于荧光光谱可分辨的不同荧光上转换纳米材料的制备方法的研究, 虽与已报道方法不同, 但已报道方法的相关经验可以借鉴。同时课题小组近年来在纳米材料制备方面开展了大量研究工作, 在金属纳米材料和发光纳米材料积累了丰富经验, 以这些纳米材料作为探针已经发表论文 10 多篇 SCI 论文, 申报国家发明专利 3 项。

近期课题组也已成功制备得到荧光谱带可分辨的红色、绿色和蓝色上转换纳米材料, 以其为多色标记物而建立的分析方法已分别成功应用于对致病菌、病毒 DNA、真菌毒素分子的多组分同时高灵敏检测, 发表 SCI 论文 4 篇 (Anal. Chem. 2012, 84,



6263–6270; Chem. Comm. 2012, 48 (40), 4866–4868; Biosens. Bioelectron. 2011, 30, 35-42; Anal. Chim. Acta 2012, 723, 1-6), 获得授权国家发明专利 1 项 (ZL 20101 0295782.8)。

核酸适配体筛选方面: 课题研究小组近年来在食源性致病菌核酸适配体筛选方面积累了丰富的经验, 具有较强的综合研究能力。食源性致病菌特异性核酸适配体筛选方面也已取得重要进展, 通过技术攻关, 筛选得到了沙门氏菌、单增李斯特菌、副溶血弧菌、志贺氏菌、无乳链球菌、化脓性链球菌等特异结合核酸适配体, 发表 SCI 论文 1 篇 (J. Agr. Food Chem. 2012, 60: 4034-4038), 申报国家发明专利 6 项 (申请号: 201010295766.9; 201010295767.3; 201110291377.3; 201110291363.1; 201210570202.0; 201210570205.4), 其中获得授权 2 项 (ZL 2010 10295766.9; ZL201010295767.3)。同时在核酸适配体与纳米材料功能化连接方面也有多篇论文公开发表。

总之, 本项目给出的技术路线和研究思路充分考虑了原理与方法的可行性, 既保证了创新性和预期成果的水平, 又充分考虑了已有工作的基础, 可保障研究目标的实现。

4. 本项目的特色与创新之处;

本项目的特色:

(1) 采用不同策略重点研究制备可用于多色标记定量检测目的的不同荧光上转换纳米材料的方法, 纳米材料的显著特点是不同颜色荧光发射光谱的可分辨。

(2) 系统研究核酸适配体分子识别体系的识别规律, 建立核酸适配体筛选的统计理论与模型, 在理论层次上指导基于核酸适配体的致病菌分离与检测新技术与新方法的设计与应用。

(3) 研究内容覆盖了生物、化学、食品科学、纳米技术等学科, 体现了多学科交叉融合的特色。

本项目的创新点:

1) 研究制备荧光光谱可分辨的不同荧光上转换纳米材料, 构建多色上转换纳米探针基础, 将单一组分上转换荧光定量分析推向多组分上转换荧光定量高度。

2) 利用核酸适配体易于修饰与标记的特性, 将核酸适配体转化为人工设计的多功能化生物分子探针; 系统深入研究核酸适配体分子识别基础, 阐述分子识别体系的构-效关系与相关的理论模型, 指导基于核酸适配体的致病菌检测方法的理性设计, 为稳定、灵敏、多组分、高选择性的食源性致病菌检测方法的建立提供机遇。

3) 将采用适配体功能化磁性纳米粒子磁分离富集有效提高检测灵敏度的特点、与激光诱导上转换荧光检测技术的高灵敏度特性、核酸适配体识别的特异性和稳定性的优



势有机结合，构建形成性能优良的食源性致病菌分离、富集与检测技术平台。

5. 年度研究计划及预期研究结果（包括拟组织的重要学术交流活动、国际合作与交流计划等）。

年度研究计划

2014.01-02 实验准备

2014.03-12

多色上转换纳米材料发光调控机制、影响因素研究

上转换纳米材料、磁性纳米材料制备、表征、修饰

适配体筛选、特异性评价、进化规律、分子结合机制研究

生物功能化纳米探针制备

赴美国普渡大学、北卡大学进行课题相关学术交流 1 次

发表 SCI 论文 1-2 篇；申报专利 1-2 项

2015.01-12

适配体筛选、特异性评价、进化规律、分子结合机制研究

适配体筛选方法技术平台更新

生物功能化纳米探针制备

构建基于核酸适配体功能化磁性纳米探针的磁分离富集技术

开始磁分离富集-免疫亲和-上转换激光诱导荧光多组分生物传感系统构建

发表 SCI 论文 2-4 篇；申报专利 1-2 项

2016.01-12

建立磁分离富集-适配体识别-上转换激光诱导荧光多组分生物传感系统

邀请美国国际食品保护联盟专家来访学术交流 1 次

发表 SCI 论文 2-4 篇；申报专利 1 项

2017.01-12

技术方法验证、评价，共性技术建立

发表 SCI 论文 2 篇

结题验收

预期研究结果

- 1) 建立完善荧光光谱可分辨的多色荧光上转换纳米材料制备方法；
- 2) 构建针对不同层次靶标体系的高效率核酸适配体筛选技术平台，并筛选得到



针对肺炎链球菌、军团菌、阪崎杆菌、致病性大肠杆菌等的核酸适配体；

3) 发展 2 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，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；

4) 构建集磁分离富集、上转换荧光纳米探针、核酸适配体识别等技术优势为一体的目标菌多组分同时高灵敏检测方法体系。

5) 建立食品安全共性检测方法与技术体系。

6) 发表高质量 SCI 论文 5-10 篇，申报国家发明专利 3-5 项。

7) 培养博士生 4 名，硕士生 6 名。

(二) 研究基础与工作条件

1. 工作基础（与本项目相关的研究工作积累和已取得的研究工作成绩）；

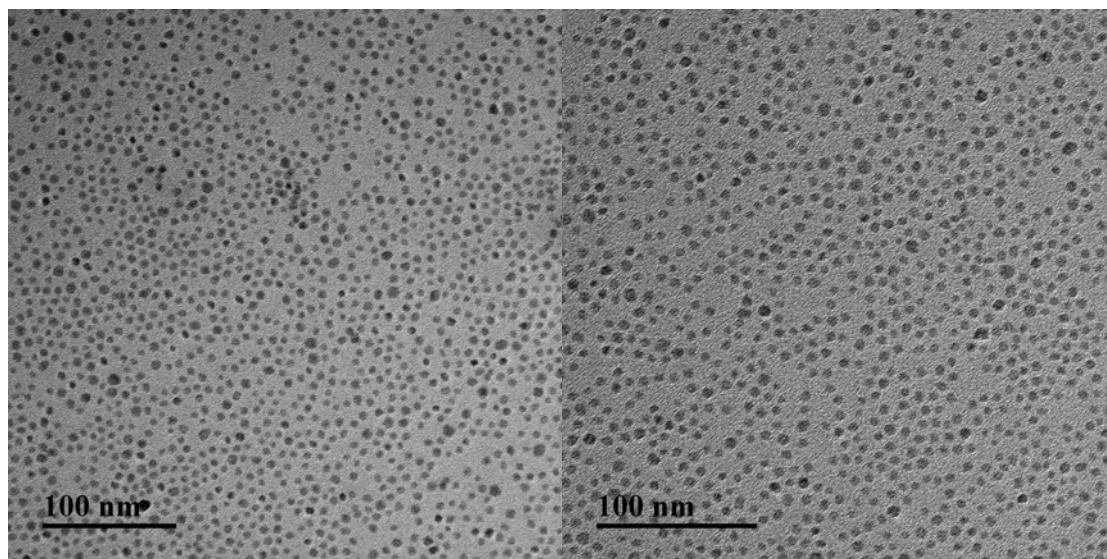
课题组近年来一直致力于多色上转换荧光纳米材料制备及生物分析应用、核酸适配体筛选等研究工作，已经取得了部分研究成果：

- 1) Shijia Wu, Nuo Duan, Xiaoyuan Ma, Yu Xia, **Zhouping Wang*** and Hongxin Wang. Simultaneous detection of enterovirus 71 and coxsackievirus A16 using dual-colour upconversion luminescent nanoparticles as labels. **Chem. Comm.** 2012, 48 (40), 4866 – 4868
- 2) Shijia Wu, Nuo Duan, Xiaoyuan Ma, Yu Xia, Hongxin Wang, **Zhouping Wang*** and Qian Zhang. Multiplexed Fluorescence Resonance Energy Transfer Aptasensor between Upconversion Nanoparticles and Graphene Oxide for the Simultaneous Determination of Mycotoxins. **Anal. Chem.** 2012, 84, 6263–6270
- 3) Shijia Wu, Nuo Duan, Changqing Zhu, Xiaoyuan Ma, Miao Wang and **Zhouping Wang***. Magnetic nanobead-based immunoassay for the simultaneous detection of aflatoxin B1 and ochratoxin A using upconversion nanoparticles as multicolor labels. **Biosensors and Bioelectronics**, 2011, 30, 35-42
- 4) 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, 136 (11), 2306 – 2314
- 5) Nuo Duan, Shijia Wu, Changqing Zhu, Xiaoyuan Ma, **Zhouping Wang***, Ye Yu, and Yuan Jiang. Dual-color upconversion fluorescence and aptamer-functionalized magnetic nanoparticles-based bioassay for the simultaneous detection of Salmonella Typhimurium and Staphylococcus aureus. **Anal. Chim. Acta** 2012, 723, 1-6



- 6) Nuo Duan, Shijia Wu, Xiujuan Chen, Yukun Huang, **Zhouping Wang***. Selection and identification of a DNA aptamer targeted to *Vibrio parahaemolyticus*. **J. Agr. Food Chem.** 2012, 60: 4034-4038
- 7) 王周平, 丁晓莹. 一种特异识别志贺氏菌的寡核苷酸适配子 (ZL201010295767.3)
- 8) 王周平, 丁晓莹. 一种特异识别单核细胞增生李斯特菌的寡核苷酸适配子 (ZL 2010 10295766.9)
- 9) 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 (ZL 2010 1 0295782.8)
- 10) 王周平, 王鑫, 段诺, 吴世嘉, 夏雨, 马小媛. 一组特异性识别无乳链球菌的寡核苷酸适配子 (申请号: 201210570202.0)
- 11) 王周平, 王鑫, 段诺, 吴世嘉, 夏雨, 马小媛. 一组特异性识别化脓链球菌的寡核苷酸适配子 (申请号: 201210570205.4)
- 12) 王周平, 段诺, 吴世嘉. 一种特异性识别副溶血性弧菌的寡核苷酸适配子及应用 (申请号: 201110291377.3)
- 13) 王周平, 段诺, 吴世嘉. 一种特异性识别鼠伤寒沙门氏菌的寡核苷酸适配子及应用 (申请号: 201110291363.1)
- 14) 王周平, 袁京磊, 俞晔, 段诺, 吴世嘉, 夏雨, 马小媛. 一种基于适配体识别的鼠伤寒沙门氏菌可视化检测方法 (申请号: 201210552781.6)
- 15) 王周平, 段诺, 吴世嘉, 马小媛, 夏雨. 一种利用适配体识别量子点标记结合流式细胞术同时检测两种致病菌的方法 (申请号: 201210570201.6)

通过不断尝试, 已经成功制备出了大批量形貌均一、分散性良好、发光量子产率高的多色上转换荧光纳米材料, 并初步应用于食品安全检测新方法的发展。



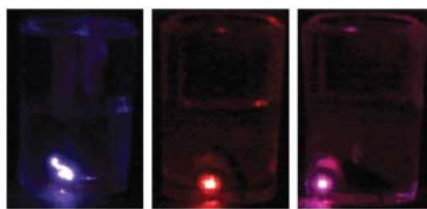


Fig. 2 Upconversion fluorescence with a 980 nm laser (down) images of a UCNPs-MNP nanocomposite. $\text{NaY}_{0.78}\text{F}_4\text{:Yb}_{0.20}, \text{Tm}_{0.02}$ UCNPs-MNP nanocomposite (left), $\text{NaY}_{0.28}\text{F}_4\text{:Yb}_{0.70}, \text{Er}_{0.02}$ UCNPs-MNP nanocomposite (middle), mixture of $\text{NaY}_{0.78}\text{F}_4\text{:Yb}_{0.20}, \text{Tm}_{0.02}$ UCNPs-MNP and $\text{NaY}_{0.28}\text{F}_4\text{:Yb}_{0.70}, \text{Er}_{0.02}$ UCNPs-MNP nanocomposites (right).

(Shijia Wu and Zhouping Wang et al, **Chem. Comm.** 2012, 48 (40), 4866-4868)

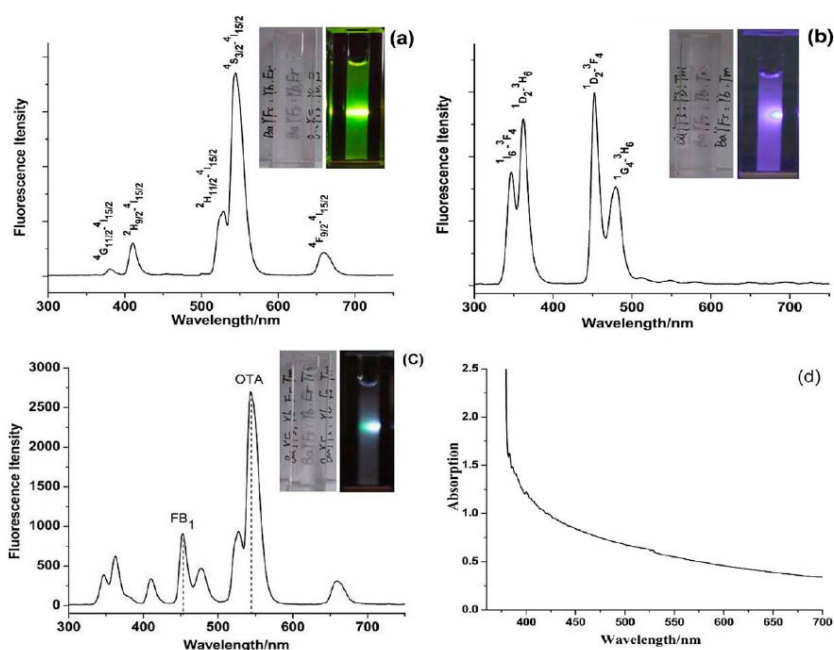


Figure 1. The fluorescence spectra of $\text{BaY}_{0.78}\text{F}_4\text{:Yb}_{0.2}, \text{Er}_{0.02}$ UCNPs (a), $\text{BaY}_{0.78}\text{F}_4\text{:Yb}_{0.2}, \text{Tm}_{0.02}$ UCNPs (b), and the mixture (c). The inset shows a photograph of the naked-eye visible upconversion fluorescence of the $\text{BaY}_{0.78}\text{F}_4\text{:Yb}_{0.2}, \text{Er}_{0.02}/\text{Tm}_{0.02}$ nanoparticles and of a mixture solution of nanoparticles. All solutions were excited with an external 980 nm laser. Absorption spectrum of as-prepared graphene oxide (d).

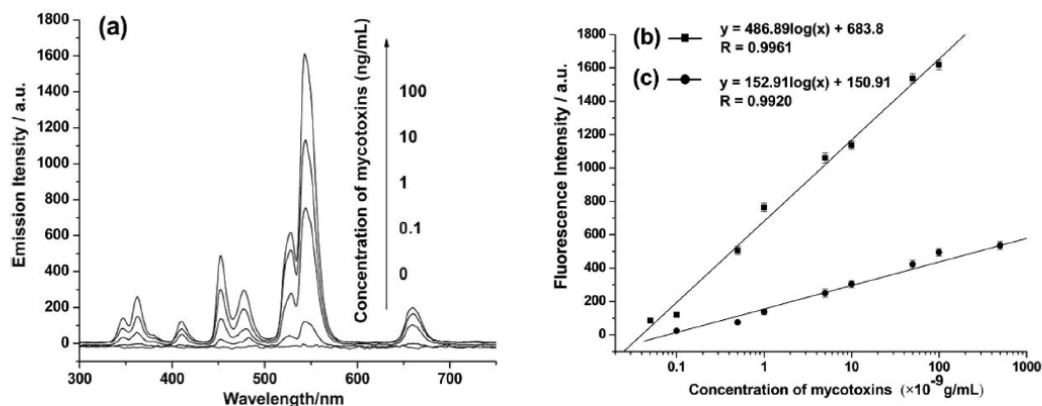


Figure 5. Upconversion fluorescence spectra of the multiplexed UCNPs-GO FRET aptasensor in the simultaneous presence of 0–100 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ FB_1 and OTA (a); standard curve of the fluorescence intensity versus OTA concentration (b) and FB_1 concentrations (c) measured by this developed method.

(Shijia Wu and Zhouping Wang et al, **Anal. Chem.** 2012, 84, 6263–6270)



2. 工作条件（包括已具备的实验条件，尚缺少的实验条件和拟解决的途径，包括利用国家实验室、国家重点实验室和部门重点实验室等研究基地的计划与落实情况）；

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、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。

3. 承担科研项目情况（申请人和项目组主要参与者正在承担的科研项目情况，包括自然科学基金的项目，要注明项目的名称和编号、经费来源、起止年月、与本项目的关系及负责的内容等）；

1) 国家“十二五”科技支撑计划项目“食品致敏原分子检测技术研究”（2011BAK10B03），2011.01-2013.12，参与，与本项目无关

2) 教育部新世纪优秀人才支持计划“食品安全检测新方法与新技术研究”（NCET-11-0663），2012.01-2014.12，人才计划项目，与本项目无直接联系

3) 国家“十二五”科技支撑计划项目“食品非法添加物高通量筛查技术与装备研究”（2012BAK08B01），2012.01-2014.12，子课题负责人，与本项目无关

4) 江苏省科技支撑计划项目“磁分离富集结合上转换荧光纳米探针的真菌毒素新型检测技术、产品及装备研究”（BE2011621）2012.01-2014.12，主持，与本项目无直接联系

4. 完成自然科学基金项目情况（对申请人负责的前一个已结题科学基金项目（项目名称及批准号）完成情况、后续研究进展及与本申请项目的关系加以详细说明。另附该已结题项目研究工作总结摘要（限 500 字）和相关成果的详细目录）。

项目名称：



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(No.20805019)已完成,与本申请项目技术方法不同,无直接关系

研究工作总结摘要:

特异性、灵敏度和快速检测是对食源性致病菌检测的基本要求。由于检测灵敏度的限制,目前发展的许多食源性致病菌检测方法虽然很好地解决了特异性问题,但一般均需长达数小时甚至数天的前期增菌培养,很难满足快速检测的要求。本研究采用致病菌特异寡核苷酸探针或免疫抗体功能化纳米金颗粒制备金标探针,通过核酸杂交反应或免疫亲和反应在固相基质上或磁性纳米颗粒上形成夹心结构,采用纳米金溶出化学发光检测,或进一步采用金标银增强放大信号,采用溶出化学发光检测进行二级信号放大,实现对沙门氏菌等重要食源性致病菌的超灵敏检测。通过检测灵敏度的大幅提高减少增菌培养时间,从而达到快速检测的目的。通过方法比较,筛选出最佳方法,建立共性检测技术,为食源性致病菌快速检测水平的提高提供理论和技术支持。此外还以生物功能化纳米金颗粒为荧光淬灭基团,发展了均相体系中李斯特单增生菌的荧光分子信标检测方法。还进行了其他相关研究工作。

主要成果:

1) Tingting 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

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

3) 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

4) Zhouping Wang*, Tingting Miao, 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

5) Zhouping Wang*, Huan Xu, Jia Qian, Jing Ye, Zhen Yang, Huachao Sun, Yonghui Shi. A flow-injection chemiluminescent method for the evaluation of the antioxidant activity of 5'-nucleotides. *Luminescence*, 2010, 25(4):300-306

6) 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

7) Nuo Duan, Shijia Wu, Zhouping Wang*. An aptamer-based fluorescence assay for Ochratoxin A. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2011, 39(3), 300–304

8) Zhouping Wang*, Jingquan Li, Jiayin Zhao, Nuo Duan, Huachao Sun, Yonghui Shi. Ultrasensitive chemiluminescent detection of Salmonella with DNA hybridization and silver amplification of nanogold labels. Anal. Lett. 2011, 44(6): 1063-1076

9) Zhouping Wang*, Nuo Duan, Jingquan Li, Jing Ye, Shufeng Ma, Guowei Le. Ultrasensitive chemiluminescent immunoassay of Salmonella with silver enhancement of nanogold labels. Luminescence, 2011, 26(2): 136-141

10) 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 (国家发明专利申请号: 20109026053X)

11) 王周平, 丁晓莹. 一种特异识别志贺氏菌的寡核苷酸适配子 (ZL201010295767.3)

12) 王周平, 丁晓莹. 一种特异识别单核细胞增生李斯特菌的寡核苷酸适配子 (ZL201010295766.9)

(三) 申请人和项目组主要参与者简介

1. 项目申请人:

王周平, 男, 1974 年出生, 2004 年获分析化学博士学位, 2004-2006 年在清华大学化学系从事博士后研究工作, 现为江南大学食品学院副院长、教授、博士生导师, 教育部“新世纪优秀人才支持计划”入选者, (法国) 梅里埃科学研究基金获得者, 国家食品药品监督管理局首批餐饮行业食品安全专家, 江苏省食品安全标准审评专家, 无锡出入境检验检疫局特约研究员, 江苏省食品科学与技术学会秘书长。

本项目总体设计和负责。

申请人具有多年食品安全检测和发光分析科研经历, 熟悉食品安全检测、发光分析技术及纳米探针技术, 具有大学生物学背景, 熟悉分子生物学和微生物技术方法, 目前主要研究方向为食品安全检测和纳米生物分析。先后主持了国家“863”计划项目、国家自然科学基金项目、江苏省科技支撑(社会发展)计划项目、江苏省自然科学基金项目、教育部博士点基金项目、国家“十二五”科技支撑计划项目子课题、国家质检总局科技计划项目、(法国)梅里埃科学研究基金项目(该基金全球食品安全领域第一个资助项目)等科研项目 10 余项, 参与国家自然科学基金重点和面上项目、国家“十一五”和“十二五”科技支撑计划项目、江苏省科技支撑(社会发展)计划项目等多项。近年来在国内外学术刊物发表研究论文 89 篇, 其中 SCI 源刊收录论文 53 篇(第一作者和责任作者 SCI 论文 40 篇, 影响因子总和 105), 国际刊物邀请综述 1 篇; SCI 论文被他人引用共 629 次, 单篇



他引最高 216 次。申报国家发明专利 21 项，获得授权 4 项；获中国分析测试协会科学技术一等奖 1 项。指导博士研究生 4 名，硕士研究生 13 名。

教育经历

1993/09-1995/07 陕西理工学院，生物系，学生
1998/08-2001/07 西南大学，生命科学学院，硕士
2001/08-2004/07 西南大学，化学化工学院，博士

研究工作经历

2004/07-2006/07 清华大学，化学系，博士后
2006/07-2007/08 江南大学，食品学院，副教授
2007/09-现在 江南大学，食品学院，教授
2009/04-现在 江南大学，食品学院，教授，博士生导师
2011/01-现在 江南大学，食品学院，副院长

主要学术和社会任职

江苏省食品科学与技术学会 秘书长
无锡出入境检验检疫局特约研究员
江苏省食品安全标准审评专家
第三届江苏省青年科学家年会执行委员
国家食品药品监督管理局首批餐饮行业食品安全专家

科研成果

近 3 年发表的与本项目有关的主要论著目录:

- 1) Shijia Wu, Nuo Duan, Xiaoyuan Ma, Yu Xia, **Zhouping Wang*** and Hongxin Wang. Simultaneous detection of enterovirus 71 and coxsackievirus A16 using dual-colour upconversion luminescent nanoparticles as labels. **Chem. Comm.** 2012, 48 (40), 4866 – 4868
- 2) Shijia Wu, Nuo Duan, Xiaoyuan Ma, Yu Xia, Hongxin Wang, **Zhouping Wang*** and Qian Zhang. Multiplexed Fluorescence Resonance Energy Transfer Aptasensor between Upconversion Nanoparticles and Graphene Oxide for the Simultaneous Determination of Mycotoxins. **Anal. Chem.** 2012, 84, 6263–6270
- 3) Shijia Wu, Nuo Duan, Changqing Zhu, Xiaoyuan Ma, Miao Wang and **Zhouping Wang***. Magnetic nanobead-based immunoassay for the simultaneous detection of aflatoxin B1 and ochratoxin A using upconversion nanoparticles as multicolor labels. **Biosensors and Bioelectronics**, 2011, 30, 35-42
- 4) Xu Hun, FangLiu, Zhenhua Mei, Lifeng Ma, **Zhouping Wang***, Xiliang Luo.



- Signal amplified strategy based on target-induced strand release coupling cleavage of nicking endonuclease for the ultrasensitive detection of ochratoxin A. **Biosensors and Bioelectronics** 39(2013)145–151
- 5) 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, 136 (11), 2306 – 2314
 - 6) Nuo Duan, Shijia Wu, Xiujuan Chen, Yukun Huang, **Zhouping Wang***. Selection and identification of a DNA aptamer targeted to *Vibrio parahaemolyticus*. **J. Agr. Food Chem.** 2012, 60: 4034-4038
 - 7) Zhaohui Huang, Shijia Wu, Nuo Duan, Dong Hua, Yu Hu, **Zhouping Wang***. Sensitive detection of carcinoembryonic antigen with magnetic nano-bead and upconversion nanoparticles-based immunoassay. **J. Pharm. Biomed. Anal.** 2012, 66: 225-31
 - 8) Nuo Duan, Shijia Wu, Xiaoyuan Ma, Xiujuan Chen, Yukun Huang and **Zhouping Wang***. Gold nanoparticle-based fluorescence resonance energy transfer aptasensor for ochratoxin A detection. **Anal. Lett.** 2012, 45: 714-723
 - 9) Xu Hun, Zhenghua Mei, **Zhouping Wang***, Yunhua He. Indole-3-acetic acid biosensor based on G-rich DNA labeled AuNPs as chemiluminescence probe coupling the DNA signal amplification. **Spectrochimica Acta Part A** 2012, 95: 114–119
 - 10) Nuo Duan, Shijia Wu, Changqing Zhu, Xiaoyuan Ma, **Zhouping Wang***, Ye Yu, and Yuan Jiang. Dual-color upconversion fluorescence and aptamer-functionalized magnetic nanoparticles-based bioassay for the simultaneous detection of *Salmonella Typhimurium* and *Staphylococcus aureus*. **Anal. Chim. Acta** 2012, 723, 1-6
 - 11) Xu Hun, **Zhouping Wang***. L-Argininamide biosensor based on S1 nuclease hydrolysis signal amplification. **Microchim Acta**, 2012, 176(1-2), 209-216
 - 12) Tingting 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
 - 13) **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



- 14) **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
- 15) **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

申请和获得授权的国家发明专利:

- 1) 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, 2012.9, 中国, **ZL 2010 1 0295782.8**
- 2) 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, 2012.10, 中国, **ZL 2010 10295766.9**
- 3) 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, 2012.10, 中国, **ZL201010295767.3**
- 4) 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, 中国, 201010271247.9
- 5) 王周平, 段诺, 吴世嘉. 一种特异性识别副溶血性弧菌的寡核苷酸适配子及应用, 中国, 201110291377.3
- 6) 王周平, 段诺, 吴世嘉. 一种特异性识别鼠伤寒沙门氏菌的寡核苷酸适配子及应用, 中国, 201110291363.1

近期承担的主要科研项目:

- 1) 国家“十二五”科技支撑计划项目“食品非法添加物高通量筛查技术与装备研究”(2012BAK08B01), 2012.01-2014.12, 子课题负责人
- 2) 国家“十二五”科技支撑计划项目“食品致敏原分子检测技术研究”(2011BAK10B03), 2011.01-2013.12, 参与
- 3) 教育部新世纪优秀人才支持计划“食品安全检测新方法与新技术研究”(NCET-11-0663), 2012.01-2014.12, 主持
- 4) 江苏省科技支撑计划项目“磁分离富集结合上转换荧光纳米探针的真菌毒素新型检测技术、产品及装备研究”(BE2011621) 2012.01-2014.12 主持

2. 项目组主要成员:

夏雨, 男, 1975 年 10 月 4 日生, 博士, 江南大学食品学院副教授。1997 年毕业于



南京理工大学化工学院，2001 年开始在江南大学食品学院攻读研究生，2003-2007 年于中国科学院上海植物生理生态研究所分子微生物学开放实验室进行合作研究，2007 年毕业于江南大学食品学院，获博士学位。中国农学会农产品贮藏加工分会理事会员、江苏省食品科学与技术学会理事会员、江苏省微生物学会会员。

现从事《微生物学》和《微生物学实验》等课程教学，研究方向为食品安全生物检测/食品分子微生物学，近期主要研究内容：一、采用微生物学、分子微生物学原理和技术对食源性致病菌外膜特异蛋白进行纯化表达，设计并优化核酸适配体筛选文库，研究核酸适配体与靶标结合的构效关系及其分子识别机制。二、针对枯草芽孢杆菌构建新型食品级表达系统和分泌表达系统，深入研究了食品级微生物的蛋白质分泌途径机理。已在国内外学术期刊发表了 10 多篇学术论文，授权或申请国家发明专利 5 项。主持国家自然科学基金（青年基金）、教育部博士点新教师基金项目和江苏省自然科学基金各 1 项，；参与国家 863 计划、国家自然科学基金、江苏省科技支撑计划项目多项。

本项目中负责识别分子设计。

教育经历

1993/08 – 1997/07，南京理工大学，化工学院，本科/学士

2001/08 – 2007/07，江南大学，食品学院，研究生/博士

2004/09 – 2006/04，中科院上海植物生理生态研究所分子微生物学开放实验室，合作研究生

研究工作经历

1997/08 – 2001/07，扬州金珠树脂有限公司新产品研发实验室工程师

2007/07 – 至今，江南大学，食品学院，副教授

科研成果

已发表的文章:

1) Shijia Wu, Nuo Duan, Xiaoyuan Ma, **Yu Xia**, Hongxin Wang, Zhouping Wang* and Qian Zhang. Multiplexed Fluorescence Resonance Energy Transfer Aptasensor between Upconversion Nanoparticles and Graphene Oxide for the Simultaneous Determination of Mycotoxins. **Anal. Chem.** 2012, 84, 6263–6270

2) Shijia Wu, Nuo Duan, Xiaoyuan Ma, **Yu Xia**, Zhouping Wang* and Hongxin Wang. Simultaneous detection of enterovirus 71 and coxsackievirus A16 using dual-colour upconversion luminescent nanoparticles as labels. **Chem. Comm.** 2012, 48 (40), 4866 – 4868

3) Dong Y, Liu X, Chen H, **Xia Y**, Zhang H, Zhang H, and Chen W. Enhancement of the hydrolysis activity of β -galactosidase from *Geobacillus stearothermophilus* by saturation mutagenesis. **Journal of Dairy Science**, 2011, 94(3): 1176-1184.



4) **Xia Y**, Zhao J, Chen H, Liu X, Wang Y, Tian F, Zhang HP, Zhang H, and Chen W. Extracellular secretion in *Bacillus subtilis* of a cytoplasmic thermostable β -galactosidase from *Geobacillus stearothermophilus*. **Journal of Dairy Science**, 2010, 93(7):2838-2845.

5) **Xia Y**, Chen W, Zhao JX, Tian FW, Zhang H and Ding XL. Construction of a new food-grade expression system for *Bacillus subtilis* based on theta replication plasmids and auxotrophic complementation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2007, 76(3):643-650.

6) **Xia Y**, Chen W, Fu XY, Zhang H, Yang S and Ding XL. Construction of an integrative food-grade expression system for *Bacillus subtilis*. **Food Research International**, 2005, 38(3):251-256.

7) Chen W, Chen HQ, **Xia Y**, Yang J, Zhao JX, Tian FW, Zhang HP and Zhang H. Immobilization of recombinant thermostable β -galactosidase from *Bacillus stearothermophilus* for lactose hydrolysis in milk. **Journal of Dairy Science**, 2009, 92(2): 491-498.

8) Chen W, Chen HQ, **Xia Y**, Zhao JX, Tian FW and Zhang H. Production, purification, and characterization of a potential thermostable galactosidase for milk lactose hydrolysis from *Bacillus stearothermophilus*. **Journal of Dairy Science**, 2008, 91(5):1751-1758.

9) **Xia Y**, Liu X, Chen H, Zhang H, and Chen W. Construction of a signal peptide library for *Bacillus subtilis* and its application for secretory expression of a thermostable β -galactosidase. **Asian Congress on Biotechnology 2011**, Presentation Number: C1360, May 12-17, Shanghai.

10) Chen W, Chen HQ, **Xia Y**, Tian FW, Zhang H, Ding XL. High-level expression of a recombinant thermostable β -galactosidase in *Bacillus subtilis*. **Institute of Food Technologists Annual Meeting**, July 28-August 1, 2007, Presentation Number: 053-22. Chicago.

发明专利:

1) 陈卫, **夏雨**, 张灏, 陈海琴, 赵建新, 田丰伟, 刘晓鸣. 一种双精氨酸途径蛋白质分泌载体的构建方法及其应用, 2011.9, 中国, **ZL 200810180274.8**

2) 陈卫, 田丰伟, 姜俊, 张灏, 赵建新, 刘小鸣, 卢蓉蓉, **夏雨**. 一种具有降低牛乳中 β -乳球蛋白抗原性能力的干酪乳杆菌与用途, 2011.9, 中国, **ZL 200810182817.X**

3) 王周平, 王鑫, 段诺, 吴世嘉, **夏雨**, 马小媛. 一组特异性识别无乳链球菌的寡核苷酸适配子, 2012.12, 中国, 201210570202.0

4) 王周平, 王鑫, 段诺, 吴世嘉, **夏雨**, 马小媛. 一组特异性识别化脓链球菌的寡核苷酸适配子, 2012.12, 中国, 201210570205.4

5) 王周平, 袁京磊, 俞晔, 段诺, 吴世嘉, **夏雨**, 马小媛. 一种基于适配体识别的鼠伤寒沙门氏菌可视化检测方法, 2012.12, 中国, 201210552781.6



6) 王周平, 段诺, 吴世嘉, 马小媛, 夏雨. 一种利用适配体识别量子点标记结合流式细胞术同时检测两种致病菌的方法, 2012.12, 中国, 201210570201.6)

7) 王周平, 吴世嘉, 段诺, 马小媛, 夏雨. 一种基于荧光共振能量转移检测伏马菌素 B1 的方法, 2012.12, 中国, 201210570159.8)

8) 王周平, 王文凤, 段诺, 吴世嘉, 夏雨, 马小媛. 一组特异性识别黄曲霉毒素 B2 的寡核苷酸适配子, 2012.10, 中国, 201210370139.6)

9) 王周平, 王文凤, 段诺, 吴世嘉, 夏雨, 马小媛. 一组特异性识别黄曲霉毒素 B1 的寡核苷酸适配子, 2012.10, 中国, 201210370140.6)

近期承担的主要科研项目:

1) 国家自然科学基金, 31000752, 耐热 β -半乳糖苷酶在枯草芽孢杆菌中分泌效率的限制因素研究, 2011-2013, 进行中, 主持

2) 江苏省自然科学基金, BK2008103, 枯草芽孢杆菌 Tat 分泌途径中蛋白质前体加工效率的限制因素研究, 2008-2011, 已结题, 主持

3) 教育部博士点新教师基金, 20080295102, 食品酶在枯草芽孢杆菌中以 Tat 途径分泌时前体加工效率的影响因素, 2009-2011, 已结题, 主持

4) 江苏省科技支撑(社会发展)计划项目, BE2010679, 食源性致病微生物现场快速可视化与高通量检测技术及产品研究, 2011-2013, 进行中, 参与

(四) 经费申请说明 购置单项经费 5 万元以上固定资产及设备, 须逐项说明与项目研究的直接相关性及其必要性。

申请总经费 82 万元, 具体预算情况如下:

1. 研究经费 (65.9 万元)

1) 科研业务费 (21.0 万元)

A. 测试/计算/分析费 (8.0 万元)

纳米材料的 TEM、SEM、XRD、荧光光谱等的表征和测试:

其中 TEM 每样次约 100 元, 共约 350 样次, 计 3.5 万元;

SEM 每样次约 75 元, 共约 200 样次, 计 1.5 万元;

XRD 每样次约 50 元, 共约 100 样次, 计 0.5 万元;

荧光光谱测试每样次约 10 元, 共约 300 样次, 计 0.3 万元;

适配体构象的光谱、质谱、核磁、圆二色谱等测试分析, 每样次按平均 200 元计, 共约 75 样次, 计 1.5 万元;

适配体构象、二级结构等模型数据分析, 每批次约 0.1 万元, 7 批次计 0.7 万元。

B. 能源/动力费 (2.0 万元)

用于实验室水电费等, 4 年水费约 0.8 万元, 4 年电费约 1.2 万元。



C. 会议费/差旅费 (5.0 万元)

项目组成员参加本项目直接相关学术会议 15 人次、学术互访调研 10 人次等, 每人次计 0.2 万元, 共计 5.0 万元。

D. 出版物/文献/信息传播费 (6.0 万元)

论文版面费约 1.8 万元、文献资料费约 1.2 万元、专利申请费约 3.0 万元。

2) 实验材料费 (36.9 万元)

A. 原材料/试剂/药品购置费 (29.0 万元)

购买致病菌标准菌株、对照菌株共约 30 株, 计约 2.6 万元;

生物素、亲和素、APTES 等生化标准品、化学试剂等共约 120 种次包装, 计约 17.0 万元;

各种类型寡核苷酸探针合成 (每碱基 3 元计, 每标记 300 元计), 约 0.8 万碱基、100 次标记, 计约 5.4 万; 测序 (含克隆等), 每反应 25 元计, 约 1600 反应, 计 4.0 万。

B. 其他 (7.9 万元)

购置实验耗材 (离心管、移液枪头、96 孔板、PET 管等), 计约 5.2 万元;

购置玻璃器皿 (不同规格烧杯、容量瓶、试剂瓶等), 计约 2.8 万元。

3) 仪器设备费 (8.0 万元)

A. 购置 (2.0 万元) 激光光源、检测器接口等购置。

B. 试制 (6.0 万元) 试制便携式检测装置等, 计约 6.0 万元。

4) 实验室改装费 (0 万元)

5) 协作费 (0 万元)

2. 国际合作与交流费 (4.0 万元)

A. 项目组成员出国合作交流 1 次, 机票 1.5 万, 住宿交通 0.7 万元, 计 2.2 万元;

B. 境外专家来华合作交流 1 次, 机票 1.5 万, 住宿交通 0.3 万元, 计 1.8 万元;

3. 劳务费 (8.0 万元)

用于 7 名直接参与项目研究的研究生 (约 300 元/人月, 计 280 人月) 的劳务费

4. 管理费 (4.1 万元) 按规定 5%提取



签字和盖章页(此页自动生成, 打印后签字盖章)

解除保护

申请人: 王周平

依托单位: 江南大学

项目名称: 基于多色上转换荧光纳米探针的食源性致病菌检测新方法研究

资助类别: 面上项目

亚类说明:

附注说明:

申请人承诺:

我保证申请书内容的真实性。如果获得资助, 我将履行项目负责人职责, 严格遵守国家自然科学基金委员会的有关规定, 切实保证研究工作时间, 认真开展工作, 按时报送有关材料。若填报失实和违反规定, 本人将承担全部责任。

签字:

项目组主要成员承诺:

我保证有关申报内容的真实性。如果获得资助, 我将严格遵守国家自然科学基金委员会的有关规定, 切实保证研究工作时间, 加强合作、信息资源共享, 认真开展工作, 及时向项目负责人报送有关材料。若个人信息失实、执行项目中违反规定, 本人将承担相关责任。

编号	姓 名	工作单位名称	项目分工	每年工 作时间 (月)	签 字
1	夏雨	江南大学	适配体结合 机制研究	8	
2	李秀	江南大学	致病菌菌株 选育	8	
3	段诺	江南大学	核酸适配体 筛选	10	
4	吴世嘉	江南大学	纳米材料制 备	10	
5	陈秀娟	江南大学	核酸适配体 筛选	10	
6	黄玉坤	江南大学	分析方法建 立	10	
7	袁京磊	江南大学	材料制备分 析方法建立	10	
8	贾飞	江南大学	分析方法建 立	10	
9	张维潇	江南大学	核酸适配体 筛选	10	

依托单位及合作研究单位承诺:

已按填报说明对申请人的资格和申请书内容进行了审核。申请项目如获资助, 我单位保证对研究计划实施所需要的人力、物力和工作时间等条件给予保障, 严格遵守国家自然科学基金委员会有关规定, 督促项目负责人和项目组成员以及本单位项目管理部门按照国家自然科学基金委员会的规定及时报送有关材料。

依托单位公章

合作研究单位公章 1

合作研究单位公章 2

日期:

日期:

日期: