

一、立项依据和目标

1、本项目国内外科技创新发展概况和最新发展趋势

食源性疾病（Food-borne Disease）是通过食物进入人体内的，由各种致病因子引起的、具有感染性质或中毒性质的一类疾病。近年来，世界范围内食源性疾病突发性事件屡屡发生，给许多国家人民的健康带来严重威胁，也给正常的国际食品贸易造成严重冲击。据 WTO 统计，全球范围每年有数十亿人发生食源性疾病，在发达国家，每年有三分之一的人群遭受食源性疾病的侵袭。在美国，年均发生食品安全事件约 350 起，涉及人数达 7600 万人次，经济损失达 1520 亿美元，其中食源性致病菌引起的食源性疾病是影响食品安全的最主要的因素[1,2]。在我国，每年发生的食源性疾病约在数十万起，涉及人数达千万人次[3]，其中致病微生物导致的食源性疾病约占 30~40%，而食源性致病细菌导致的疾病又占其中的 80%以上。因此，食源性致病菌是我国食源性疾病发生的主要病因，严重危及人们的健康，造成重大经济损失，已成为目前较为突出的公共卫生问题之一。

食源性致病菌是指以食物为载体，导致人类发生疾病的细菌。食源性致病微生物有十万多种之多，但影响我国食品安全的常见食源性致病菌主要有 10 几种[3,4]，例如：沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、单核细胞增生李斯特氏菌、志贺氏菌、副溶血性弧菌、霍乱弧菌、空肠弯曲菌、耶尔森氏菌、肠出血性大肠杆菌、创伤弧菌等。

对于食源性致病菌的检测主要包括传统检测方法，以及基于现代分子生物学和免疫学的快速检测法。目前广泛使用的检测方法主要有：平板菌落计数法、M.P.N.值计数法、聚合酶链式反应（PCR）、实时荧光 PCR 定量检验法和酶联免疫吸附法（ELISA）等[5,6]。传统的平板菌落计数法和 M.P.N.值计数法是目前最成熟，使用最广泛的标准检验方法，但该方法检测时间较长，一般至少需要 3 天时间，不能满足快速检测的要求；PCR 反应以细菌基因组特定 DNA 片段为模板通过分子生物学技术扩增来检验致病菌的存在，而实时荧光定量 PCR 可以对样本中存在的可疑致病菌进行定量或半定量分析，但 PCR 反应对操作者要求较高，且反应易受样品组分（如：食品样品中的糖类、酸类、油脂）干扰，易出现假阳性和假阴性实验结果；而 ELISA 法以免疫学技术为基础，采用酶促反应的放大作用来显示初级免疫学反应，具有较高的灵敏度和可重复性，但每次只能检测一种标志物，而抗体存在易失活问题，且我国食源性致病菌检测用的单克隆抗体多依赖于国外进口，价格昂贵[7-9]，导致这一方法也难以得到大规模推广应用。因此，我国当前的食源性致病菌检测工作急需快速、灵敏、低成本的检测方法和新型生物识别分子。

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（例如与生物素、巯基、甲基连接）、稳定性好、与靶分子的结合条件可调控、可重复使用、耐长期保存和室温运输等特点，相对抗体和其它蛋白分子具有很强的实用性，因此在医学、生命科学以及生物分析科学领域获得了快速应用和发展[10-12]。自 1999 年 Bruno 等[13]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[14-20]，主要包括嗜酸乳杆菌、单核增生性李斯特菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、结核分枝杆菌、链球菌、空肠弯曲杆菌等，本项目组近期也采用 cell-SELEX 技术筛选得到了单核增生性李斯特菌（专利申请号：201010295766.9）、志贺氏菌（申请号：201010295767.3）、沙门氏菌（申请号：201110291363.1）、副溶血性弧菌（申请号：201110291377.3）等的特异结合核酸适配体，通过实验验证亲和力与特异性良好，已结合荧光纳米探针技术成功实现了实际样品中目标菌的高灵敏检测。

目前，核酸适配体的获取主要是通过 SELEX 技术来实现的，SELEX 技术即指数富集的配基系统进化技术（Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment），其基本原理就是利用分子生物学技术，构建人工合成的单链随机寡核苷酸文库，其中随机序列长度在 20~40 bp 左右，文库容量在 10^{14} ~ 10^{15} 之间，再从随机单链

核酸序列文库中筛选出与靶标特异性结合的核酸适配体。该技术特点是库容量大、分辨率高、筛选过程相对简便经济。自 Tuerk 等首先运用此技术筛选到特异性吸附噬菌体 T4DNA 聚合酶和有机染料分子的特异寡核苷酸配基后,经过十几年的发展,SELEX 技术已经成为一种重要的研究手段和工具[21]。

然而,在食源性致病菌检测领域以及其它相关检测领域,适配体及适配体技术并未得到广泛的接受和使用。目前适配体技术在检测领域的存在的问题如下:

(1) 适配体筛选过程中的技术难度

虽然 SELEX 技术是一种高效的适配体筛选技术,但是其本身也存在一些缺点。例如该技术必须以高容量的寡核苷酸筛选文库为基础,如果初始选择的筛选文库容量不足,就会造成筛选不到目标适配体,或者筛选到的适配体在灵敏度和特异性方面不足的问题;另外,筛选过程中存在非特异性扩展和假阳性问题,随着筛选轮数的增多,非特异性扩增和假阳性问题被逐步放大,可能导致最后筛选得到的适配体在灵敏度、特异性指标上不足,甚至筛选不到合适的适配体。

(2) 适配体筛选过程中的盲目性降低了筛选效率

由于适配体筛选是一种随机选择的过程,与其它随机分子进化过程(例如 DNA Shuffling)一样不可避免地具有很大程度的盲目性,一般一条最终适配体需进行 12 轮左右的筛选才能得到[22],一个典型的 SELEX 筛选过程需 2~3 个月时间,而对于某种食源性致病菌的快速准确检测,一条或两条高灵敏度的适配体序列是不够的,目前尚无足够多的优良适配体能应用于众多食源性致病菌的检测。

适配体筛选过程中存在的这一缺点主要源自人们对适配体与靶标结合的机理认识尚不足。例如,适配体与靶标的什么结构结合?结合结构域的构象和结合动力学如何?如何保证适配体的特异性(只与目的靶标结合而不与其它类似靶标结合)?因此急需开展相关研究工作,深入了解目标核酸适配体在筛选过程中的进化规律,研究适配体与靶标结合的“构效关系”,揭示适配体与靶标相互作用的分子机制,为避免筛选过程中的盲目性、实现适配体的理性设计和筛选(Rational Design and Selection)提供支持。

(3) 适配体的非特异性问题

尽管许多文献强调适配体与靶标的结合应具有高特异性,然而在实际筛选过程中,如何保证适配体的特异性仍是一个难点。很多高灵敏度的适配体因与靶标之外的其它致病菌具有交叉反应而不得被放弃,因此这一问题已成为适配体筛选和应用的瓶颈问题[23]。

(4) 适配体需与高灵敏度的检测方法结合才能发挥作用

适配体筛选得到后,需与一定的检测方法联合使用才能发挥检测效果。常用的检测方法包括化学/荧光发光法、微流控芯片法、免疫检测法等,这些方法各有优缺点,适配体与何种技术联用才能发挥最佳效果是一个值得研究的课题。此外,由于食品样品的形态、质构和化学组成千差万别,如何从食品样品中富集提取痕量致病菌细胞样本、如何在检测过程中区别活细胞样本和死细胞样本都是妨碍适配体技术应用于食品安全检测的难题。

目前,采用核酸适配体进行致病菌筛选在国内外有相关学术论文和专利的发表,但尚未有进入实践阶段的产品或标准问世,研究结果均较为孤立和分散,国内外也没有以适配体为基础的食源性致病菌快速检测平台的报道。

本项目拟针对上述问题,研究适配体筛选和应用中存在的基本规律,构建食源性致病菌核酸适配体库,研究食源性致病菌核酸适配体的“靶标-适配体结构”构效关系,结合本研究室独特的磁分离富集、上转换荧光纳米探针技术来建设食源性致病菌核酸适配体库的检测应用平台。该库能为我国常见食源性致病菌提供现成的

核酸适配体序列，在应对某种未知食源性致病菌时可以通过快速检索以获取高灵敏度、高特异性的适配体而无需重复筛选工作。这一项目的建设将为基于核酸适配体的食源性致病菌筛选提供良好的条件，是首次以适配体为基础的微生物快速检测平台，具有较好的原创性，能填补国内外在这一领域的空白，形成具有自主知识产权和国际竞争力的检测技术与产品。

主要参考文献

- [1] Butterworth P, Baltar H, Kratzmeier M, et al. Simple bead assay for detection of live bacteria (*Escherichia coli*). *Anal. Chem.*, 2011, 83(4):1443-1447.
- [2] Laurino P, Kikkeri R, Azzouz N, et al. Detection of bacteria using glyco-dendronized polylysine prepared by continuous flow photofunctionalization. *Nano. Lett.*, 2011, 11(1):73-78.
- [3] 赵怀龙, 付留杰, 唐功臣. 我国主要的食源性致病菌. *医学动物防制*, 2012, 28(11):1212-1216.
- [4] 黎昊雁, 章国祥. 十二种食源性致病菌可见光基因芯片检测方法的建立. *检验检疫学刊*, 2009, 19(3):17-21.
- [5] Bernabini C, Holmes D, Morgan H. Micro-impedance cytometry for detection and analysis of micron-sized particles and bacteria. *Lab on a chip*, 2011, 11(3):407-412.
- [6] Ben Nasr S, Gtari M, Azzouna A. Detection and phylogeny of the bacteria *Wolbachia* in the terrestrial isopod *Porcellio laevis* Latr. *Ann. Microbiol.*, 2010, 60(1):43-50.
- [7] Zelada-Guillen GA, Bhosale SV, Riu J, et al. Real-time potentiometric detection of bacteria in complex samples. *Anal. Chem.*, 2010, 82(22): 9254-9260.
- [8] Ibarburu I, Aznar R, Elizaquivel P, et al. A real-time PCR assay for detection and quantification of 2-branched (1,3)-beta-D-glucan producing lactic acid bacteria in cider. *Int. J. Food. Microbiol.*, 2010, 143:26-31.
- [9] Jacobs M R, Bajaksouzian S, Yomtovian R, et al. Detection of bacteria in Leukocyte-reduced whole blood derived platelet units using the Immunetics BacTx test. *Transfusion*, 2010, 50:194A-194A.
- [10] Radi A, Acero Sánchez JL, Baldrich E, O' Sullivan CK. Reusable Impedimetric Aptasensor. *Anal. Chem.* 2005, 77:6320-6323.
- [11] Zayats M, Huang Y, Gill R, Ma C, Willner I. Label-Free and Reagentless Aptamer-Based Sensors for Small Molecules. *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, 128:13666-13667.
- [12] Farjami E, Campos R, Nielsen J S, et al. Rna aptamer-based electrochemical biosensor for selective and label-free analysis of dopamine. *Anal. Chem.*, 2013, 85 (1):121-128.
- [13] Bruno J G., Kiel J L. Biosens. Bioelectron. In vitro selection of DNA aptamers to anthrax spores with electrochemiluminescence detection. 1999, 14:457-464.
- [14] Hamula C L A, Zhang H, Guan L L, Li X-F, Le X C. Selection of aptamers against live bacterial cells. *Anal. Chem.*, 2008, 80:7812-7819.
- [15] Mairal T, Özalp C V, Sánchez P L, et al., Aptamers: molecular tools for analytical applications. *Anal. Bio. Chem.*, 2008, 390(4):989-1007.
- [16] Joshi R, Janagama H, Dwivedi H P, et al. Selection, characterization, and application of DNA aptamers for the capture and detection of *Salmonella enterica* serovars. *Mol. Cell. Probe*, 2009, 23:20-28.
- [17] 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 101665821A
- [18] 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, CN101619313A
- [19] 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,

CN201010295766.9

[20] 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,

CN201010295767.3

[21] Stoltenburg R, Reinemann C, Strehlitz B. SELEX-A (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands Biomol. Eng., 2007, 24:381-403.

[22] Howard A. Levine , Marit Nilsen-Hamilton . A mathematical analysis of SELEX. Comput. Biol. Chem., 2007, 31(1):11-35.

[23] Peng M, Liu J, Liu J, et al. Generating aptamers by cell-selex for applications in molecular medicine. Int. J. Mol. Sci. 2012, 13:3341-3353.

2、本项目研究的目的、意义（突出说明对科技、经济和社会发展的作用）

本项目研究致力于设计和建设一个针对常见食源性致病菌的随机单链寡核苷酸（适配体）文库，既要保证该库的容量（序列多样性），又保证该库在适配子筛选过程中有足够的反应效率和反应特异性；以常见食源性致病菌作为检测研究的靶标，对构建的文库进行核酸适配体的筛选、分析、改造和调整，研究靶标与适配体的构效关系，使该库适合于适配体的有理设计和理性筛选过程；将该文库技术与发光纳米材料相结合，开发新型高通量、高灵敏度、快速稳定的食源性致病菌检测方法。本项目能够建设一个性能优秀的核酸适配体库，具有库容量大、亲和力高、靶分子范围广、特异性强等特色，能够从筛选技术和筛选机理两个层面实现对当前适配体筛选方法的突破，实现一个基于适配体的食源性致病菌快速检测平台。

该技术方法体系和平台的建立，对于弥补国际上相关检测方法和技术的不足、建立和完善食源性致病菌的检测标准、形成一批具有自主知识产权和国际竞争力的检测新技术、促进我国食品安全战略体系的建设都具有重要的现实意义。

3、本项目研究现有起点科技水平及已存在的知识产权情况

如前所述，目前对于食源性致病菌的检测主要采用常规检测分析或免疫学检测方法，这些方法已在实践中得到广泛应用，但具有耗时长、成本高等缺点，难以实现快速在线检测。

采用核酸适配体进行致病菌筛选在国内外有相关学术论文和专利的发表，但尚未有进入实践阶段的产品或标准问世，研究结果均较为孤立和分散，因此该技术及其产物的知识产权并未受到个人或公司垄断，国内外也没有以适配体为基础的食源性致病菌快速检测平台的报道。因此，本项目拟研究和发展的食源性致病菌核酸适配体库是首次以适配体为基础的微生物快速检测平台，具有较好的原创性，能填补国内外在这一领域的空白。

4、本项目研究国内外竞争情况及产业化前景

本项目拟研究和发展的食源性致病菌核酸适配体库是首次以适配体为基础的微生物快速检测平台，且本研究以我国当前常见食源性致病菌为检测目标，具有明显的国情特色；本研究所获得的结果和方法不仅局限于食源性致病菌的检测，亦能为国内外相关研究机构针对医学微生物和毒性大分子物质检测所借鉴。相比目前在快速检测过程中大量采用的单克隆抗体，本研究采用的核酸适配体具有生产和贮存成本低、不依赖于进口、稳定性好等若干明显优势。结合本研究组独特的生物大分子磁分离富集、上转换荧光纳米探针技术，食源性致病菌核酸适配体库的建设能极大减少常见食源性致病菌的检测时间和检测成本，在实验室和现场快速检验检疫中将会有很好的应用前景，是一种值得推广的新型检测技术，能产生良好的经济效益和社会效益。

二、研究内容

1、具体研究开发内容和要点解决的关键技术问题

具体研究开发内容

- (1) 食源性致病菌核酸适配体的筛选和库的建立
- (2) 食源性致病菌核酸适配体的“靶标-适配体结构”构效关系研究
- (3) 食源性致病菌核酸适配体库的评价和应用平台建设
- (4) 检测产品研发
- (5) 检测装备研制

要重点解决的关键技术问题

- (1) 适配体与靶标的结合是通过适配体与靶标的特殊结构域（表位）相结合来实现的，对于以全菌作为靶标的适配体筛选而言，哪些菌体结构是与适配体特异性结合的表位，是决定适配体是否特异的一个关键问题，因此本项目要解决的一个关键技术问题就是致病菌表位的筛选。
- (2) 如何获得某种致病菌的特异性的表面蛋白，使得以该蛋白为靶标筛选得到的适配体具有特异性（不与其他微生物表面蛋白结合）是本项目要解决的一个关键技术问题。
- (3) 如何研究“靶标-适配体结构”这一构效关系，从而得出其中内在规律以指导适配体的理性筛选，是本项目要解决的一个关键技术问题。

2、项目的特色和创新之处

目前通过 SELEX 方法进行微生物核酸适配体筛选时，普遍存在耗时较长、步骤繁琐、操作技术要求较高、所得适配体特异性不高等缺点，使得适配体技术在食源性致病菌检测领域未被广泛接受和采用。本项目针对以上问题研究和开发食源性致病菌核酸适配体库，具有如下特色和创新之处：

- (1) 针对常见食源性致病菌，用于检测每种致病菌的特异性适配体达 10 条以上，能够充分保证检测的准确性和特异性。
- (2) 采用生物信息学方法对各种致病菌的全基因组进行搜索和比对，确定致病菌中的特异性表面蛋白质（酶），可以得到具有完全排他性的特异性适配体，保证检测结果的特异性。
- (3) 适配体库的建设，可以实现常见食源性致病菌的快速检测，无需再针对某个属或种的致病菌筛选适配体。
- (4) 对“靶标-适配体结构”构效关系的研究可以为适配体筛选提供理论依据，减少 SELEX 筛选过程中的盲目性，从而加速适配体筛选过程甚至进行适配体的有理化人工设计。
- (5) 本项目将适配体技术与发光纳米材料技术相结合以进行下游应用研究，可以为常见食源性致病菌检测提供一个可靠的系统化检测平台。

3、要达到的主要技术、经济指标及社会、经济效益

- (1) 针对 12 种常见食源性致病菌建立检测用核酸适配体库，每种致病菌得到至少 10 条以上高特异性、高灵敏度的核酸适配体。
- (2) 研究食源性致病菌与相应核酸适配体之间的“靶标-适配体结构”构效关系，得出靶标结构与相应适配体之间的空间构型，分析两者结合的关键结构域特征。

- (3) 为常见食源性致病菌建设一个可靠的系统化检测平台。
- (4) 研制 1 种新型检测装备，研制 3 种食源性致病菌新型快速检测产品。
- (5) 发表高档次 SCI 论文 3-5 篇，申请国家发明专利 3-4 个，参与制订或修改国家、行业标准 1 项以上。
- (6) 本项目研究的结果以及形成的新方法或新产品能够形成一批具有自主知识产权和国际竞争力的检测新技术，在涉及食源性致病菌检测的质检、商检、检验检疫、海关、公安等部门得到广泛应用，对于促进我国食品安全战略体系的建设具有重要现实意义。

三、研究试验方法、技术路线以及工艺流程

1. 研究试验方法

(1) 食源性致病菌核酸适配体的筛选和库的建立

从我国常见的 12 种食源性致病菌全细胞、致病菌表面特定分子靶标（例如膜蛋白）两个层面开展核酸适配体的筛选，通过分析优化过程中适配体反筛和负筛的方法，加速适配体筛选流程，每种致病菌（包括常见属、种）得到至少 10 条以上高特异性、高灵敏度的核酸适配体，从而构建成核酸适配体库。拟采用的食源性致病菌见表 1。

表 1 本项目拟采用的食源性致病菌及其编号

序号	菌名	拉丁学名	编号
1	副溶血性弧菌	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	17802,20511
2	沙门氏菌	<i>Salmonella</i> spp.	43975, 13314, 6017, 35640, 9720, 10708, 15611, 13311, 12002
3	志贺氏菌	<i>Shigella</i> spp.	12022, 9199, 25931
4	耶尔森氏菌	<i>Yersiniaen terocolitica</i>	23715, 27729, 9610
5	腊样芽孢杆菌	<i>Bacillus cereus</i>	51189, 11778, 33019
6	空肠弯曲菌	<i>Campylobacter jejuni</i>	33560, 43430
7	金黄色葡萄球菌	<i>Staphylococcus aureus</i>	11632, 12702, 25923, 25913, 29737
8	霍乱弧菌 O139	<i>Vibrio cholerae</i> O139	M045
9	单增李氏菌	<i>Listeria monocytogenes</i>	54003, 54005, 54006, 54007, 7644
10	布鲁氏菌	<i>Brucella</i> spp.	210301, 210401, 210105
11	变形杆菌	<i>Proteus</i> spp.	49132, 13315, 12453, 25933
12	大肠杆菌 O157:H7	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	35150, 43889

(2) 食源性致病菌核酸适配体的“靶标-适配体结构”构效关系研究

根据上一步骤已筛选得到的食源性致病菌核酸适配体序列，对各序列进行一级结构的分子相似性分析，对二级结构进行构象和能级分析，通过分子相似性分析结果对各序列进行分类，进一步考量其结构特征，并通过分子间相互作用力分析来推断“靶标-适配体结构”构效关系，为适配子的“理性筛选”建立基础。

(3) 食源性致病菌核酸适配体库的评价和应用平台建设

根据上述研究结果对适配体库进行实际应用研究，以已知或未知的食源性致病菌为研究目标，分析该库在致病菌检测过程中的库容量、灵敏度，以及稳定性等参数，配合本研究成果成熟的上转换荧光纳米检测技术，对适配体库中的适配体进行实际检测能力的表征和评价，并根据试验结果对库中序列进行调整优化，从而得到一个可实际应用和快速部署的检测平台。

（4）检测产品研发

基于前述检测技术体系的建设，开发配套的检测试剂盒等新产品。

（5）检测装备研制

在本研究组前期搭建好的上转换荧光检测平台基础上进一步探索和试制便携式小型检测设备。

2. 技术路线以及工艺流程

请见图 1。

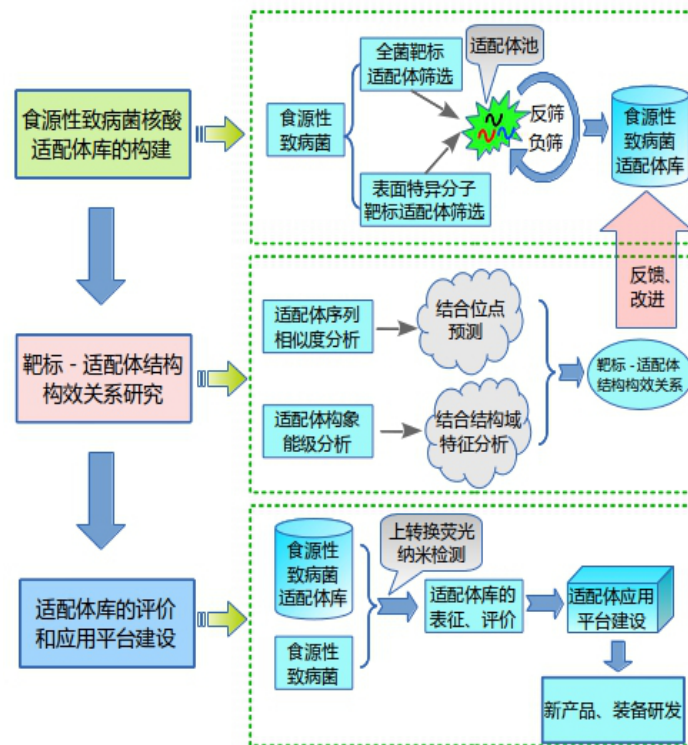


图 1 本项目的技术路线与工艺流程

四、工作基础和条件

1、承担单位概况（人员、资产、业务与管理状况），拥有知识产权状况（包括本项目已有知识产权状况）

项目申报单位江南大学是我国轻工、食品、生物技术高科技的摇篮与依托单位之一。建有国内唯一的“食品科学与技术”国家重点实验室，同时建有 6 个国家、省部级工程研究中心，7 个省部级重点实验室以及江苏省食品安全研究基地、教育部科技查新工作站、工业微生物资源数据库整合及共享信息平台，拥有图书 218.66 万册，电子图书 11264 GB。2012 年，学校科研经费总量达到 4.442 亿元；国际三大检索收录论文 1479 篇，其中 SCIE、EI 论文 1441 篇；申请专利 4230 项，授权专利 2570 项，申请和授权专利数在全国高校中一直名列前茅。

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”。“十一五”以来，江南大学食品学院承担并完成了包括国家“863”、“973”、国家自然科学基金、国家重大专项、等在内的各类科研项目 670 余项。共获国家、省部级以上科技奖励 100 余项，其中国家技术发明和科技进步二等奖 10 项。

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。

项目组主要成员祝长青高级研究员所在的单位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、凝胶成相系统、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 CO₂ 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 等适用于弯曲菌的成套的细菌培养及检测仪器设备拥有微需氧培养罐，Mini Vidas 细菌快速鉴定，Matrix 磁珠吸附，Bax 等适用于弯曲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。

此外，江南大学食品学院、食品科学与技术国家重点实验室自“十五”以来，承担了大量食品安全领域的国家、省部级科研项目，在食品安全检测技术和产品开发领域发表研究论文 200 余篇，申报国家发明专利 380 余项，已获得授权国家发明专利 100 余项。

2、本项目现有研究工作基础（包括与本项目研究有关的主要论文、专著情况，小试或中试情况，现有装备条件等）

本课题组近年来一直致力于食源性致病菌和真菌毒素的快速检测方法和检测技术的研究工作，已经基于核酸适配体技术构建了沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、单增李斯特菌、副溶血性弧菌、无乳链球菌等的新型检测方法，结合本研究组独特的生物大分子磁分离富集、上转换荧光纳米探针技术，这种集 3 种技术为一体的检测方法能够大大促进病原菌和毒素的快速检测效率。

申请人在研究中发现，目前通过 SELEX 方法筛选针对食源性致病菌的适配体存在一定的盲目性和重复性，使得筛选过程较长，而筛选得到的适配体也存在结合效率不高、与非靶标菌有交叉反应等问题。因此，基于核酸适配体实现常见食源性致病菌的快速检测需要在当前的适配体筛选技术上进一步创新。我们从分子生物学文库技术得到启发，探讨了建立食源性致病菌核酸适配体库的可行性，并在此基础上进行了初步的实验验证。目前，我们已针对副溶血性弧菌、无乳链球菌、单增李斯特菌等致病菌筛选得到了多条核酸适配体，因此对于该领域的研究方法非常熟悉。

例如，在进行无乳链球菌适配体筛选过程中，我们分别针对该菌的全菌细胞和表面蛋白进行了适配体的筛选工作，并以常见食源性致病菌大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、单核细胞增生李斯特菌、志贺氏菌、沙门氏菌作为筛选的参照物，试验筛选得到的若干适配体与靶标结合能力和结合特异性，结果见图 2，由图中可知适配体

B7P 对无乳链球菌之外的其它五种菌的结合率都相对较低，均不高于 10%，对无乳链球菌的优选性高于其他菌种，荧光强度接近 80%，因此适配子 B7P 对无乳链球菌具有很高的结合力与结合特异性。

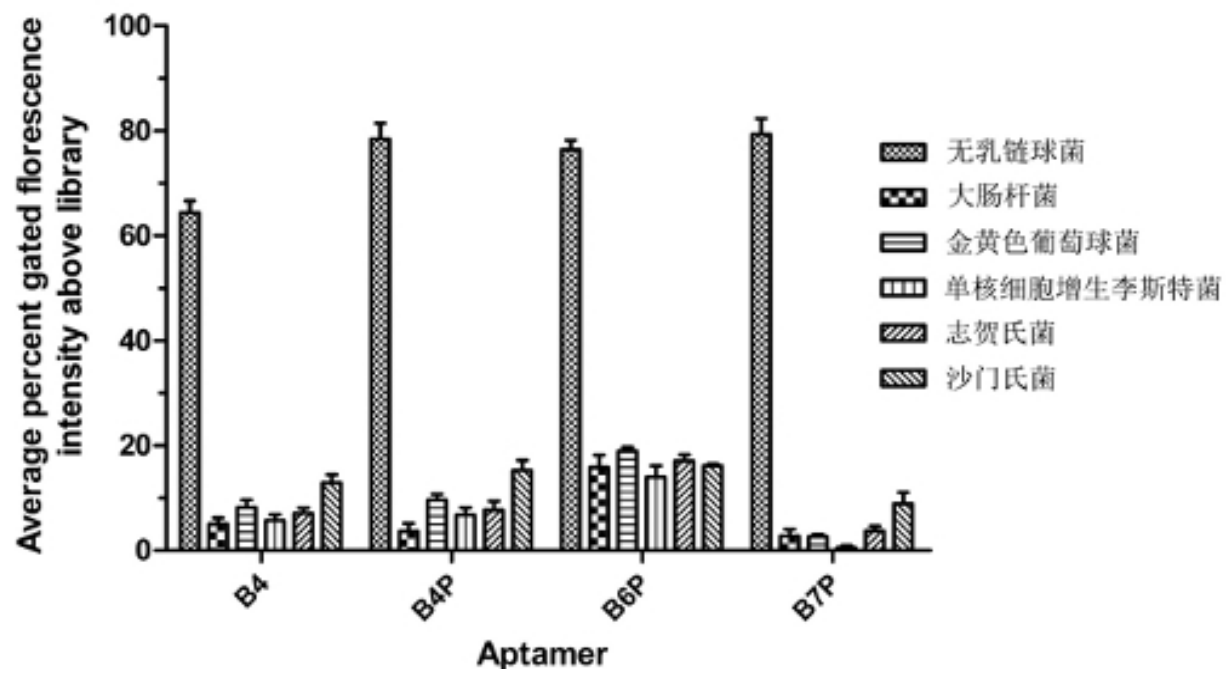


图 2 筛选所得各适配子与靶标结合的荧光强度百分比（上转换纳米荧光法检测）

针对该菌的表面蛋白筛选所得适配体的性能如图 3 所示，该流式细胞检测结果表明：与其他菌种相比，筛选出来的适配子序列 B4、B4P、B6P、B6G 均优先结合无乳链球菌（红色曲线），其结果所体现的荧光偏移较强，而其他几种菌与荧光标记的适配子结合能力弱且荧光偏移小，因此这几个适配体能特异性地结合靶标无乳链球菌。

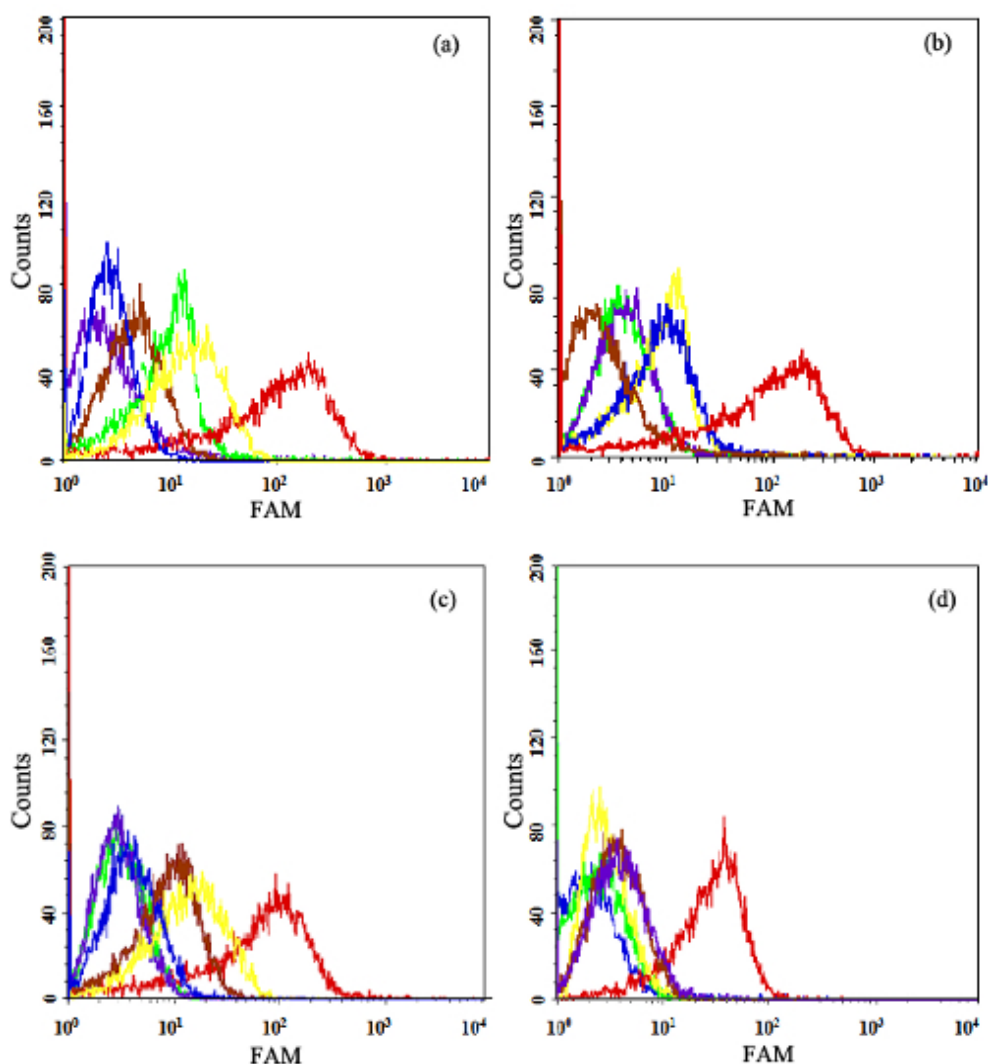


图 3 适配子与靶标微生物细胞结合后的流式细胞分析

上述研究结果表明，本项目研究组已能够熟练进行适配体的筛选、测试评估和实际应用研究，建立相关致病菌核酸适配体库的条件已经具备，这一项目的开展可以克服当前筛选过程中存在的诸多问题，并为今后适配体的理性设计和计算机辅助筛选创造条件。

目前，本研究组已发表多篇相关主题的 SCI 论文，申报了多项国家发明专利。

部分与本项目直接相关的 SCI 论文发表

- (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. (IF 5.856)
- (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. (IF 6.169)
- (3) 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. (IF 4.555)
- (4) 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. (IF 2.823)

(5) 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. **Biosens. Bioelectron.**, 2011, 30:35-42 (IF 5.602)

(6) 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. (IF 3.913)

(7) Xiaoyuan Ma, Weiping Qian*. Phenolic acid induced growth of gold nanoshells precursor composites and their application in antioxidant capacity assay. **Biosens. Bioelectron.**, 2010, 26 (3):1049-1055. (IF 5.602)

(8) Hui Li, Xiaoyuan Ma, Jian Dong, Weiping Qian*. Development of methodology based on the formation process of gold nanoshells for detecting hydrogen peroxide scavenging activity. **Anal. Chem.**, 2009, 81 (21):8916-8922. (IF 5.856)

(9) Shijia Wu, Nuo Duan, Changqing Zhu, Xiaoyuan Ma, Miao Wang, Zhouping Wang*. Magnetic nanobead-based immunoassay for the simultaneous detection of aflatoxin B1 and ochratoxin A using upconversion nanoparticles as multicolor labels. **Biosens. Bioelectron.**, 2011, 30 (1):35-42. (IF 5.602)

(10) Zhouping Wang*, Nuo Duan, Xu Hun, Shijia Wu. Electrochemiluminescent aptamer biosensor for the determination of Ochratoxin A at gold nanoparticles modified gold electrode using N-(aminobutyl)-N-ethylisoluminol as a luminescent label. **Anal. Bioanal. Chem.**, 2010, 398 (5):2125-2132. (IF 3.778)

(11) Zhouping Wang*, Jinghong Li. Nanostructure presented chemiluminescence and electrochemi -luminescence. **Annu. Rev. Nano Res.**, 2008, 2:63-101. (Invited review)

(12) Nuo Duan, Shijia Wu, Zhouping Wang*. An aptamer-based fluorescence assay for Ochratoxin A. **Chinese J. Anal. Chem.**, 2011, 39(3):300-304 (IF 0.79)

(13) 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: 225-231.(IF 2.967)

(14) 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. (IF 1.016)

(15) 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 (IF 1.731)

项目申请人发表的其他相关论文

(1) Xia, Y., Chen, W., Fu, X., Zhang, H., Yang, S., & Ding, X. (2005). Construction of an integrative food-grade expression system for *Bacillus subtilis*. *Food Research International*, 38(3), 251-256. (IF 3.150)

(2) Xia, Y., Chen, W., Zhao, J., Tian, F., Zhang, H., & Ding, X. (2007). Construction of a new food-grade expression system for *Bacillus subtilis* based on theta replication plasmids and auxotrophic complementation. *Applied microbiology and biotechnology*, 76(3), 643-50. (IF 3.425)

(3) Xia, Y., Zhao, J., Chen, H., Liu, X., Wang, Y., Tian, F., Zhang, H.P., Zhang H., & Chen W. (2010). Extracellular secretion in *Bacillus subtilis* of a cytoplasmic thermostable β -galactosidase from *Geobacillus stearothermophilus*. *Journal of dairy science*, 93(7), 2838-45. (IF 2.564)

(4) Chen, W., Chen, H., Xia, Y., Yang, J., Zhao, J., Tian, F., Zhang, H. P., & Zhang H. (2009). Immobilization of recombinant thermostable beta-galactosidase from *Bacillus stearothermophilus* for lactose hydrolysis in milk. *Journal of dairy science*, 92(2), 491-8. (IF 2.564)

(5) Chen, W., Chen, H., Xia, Y., Zhao, J., Tian, F., & Zhang, H. (2008). Production, purification, and characterization of a potential thermostable galactosidase for milk lactose hydrolysis from *Bacillus stearothermophilus*. *Journal of dairy science*, 91(5), 1751-8. (IF 2.564)

(6) Dong, Y.-N., Liu, X.-M., Chen, H., Xia, Y., Zhang, H., Zhang, H., & Chen, W. (2011). Enhancement of the hydrolysis activity of β -galactosidase from *Geobacillus stearothermophilus* by saturation mutagenesis. *Journal of dairy science*, 94(3), 1176-1184. (IF 2.564)

(7) 夏雨, 弓紫丰, 成玉梁, 赵莹, 孙震. (2011). 信号肽编码序列库的构建及对耐热乳糖酶的分泌. *食品与机械*, 27(6), 15-18.

(8) 张灏, 夏雨, 傅晓燕, 陈卫, 丁霄霖. (2003). 耐热 b-半乳糖苷酶基因 *bgaB* 在枯草芽胞杆菌中的整合表达. *无锡轻工大学学报*, 22(6), 1-4.

(9) 高翠芳, 吴小俊, 田丰伟, 夏雨, 陈卫. (2010). 一种表征蛋白质可分泌性的结构融合度特征. *生物工程学报*, 26(5):687-695.

部分与本项目直接相关的发明专利申请

(1) 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)

(2) 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)

(3) 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)

(4) 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)

(5) 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 (申请号: 201210570159.8)

(6) 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)

(7) 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)

(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 (申请号: 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 (申请号: 201210370140.6)

(10) 王周平, 夏雨, 弓紫丰. 一种丙酮酸磷酸双激酶重组表达菌株的构建方法及其应用 (申请号: 201210014850.8)

与本项目相关的获奖

夏雨，首届亚洲食品装备论坛优秀论文一等奖，2011.

李景虹，李军，王周平. 半导体纳米晶复合材料在分析化学和生物分析中的应用，中国分析测试协会科学技术一等奖，2007.

3、项目负责人以往承担国家、省级等各类科技计划项目完成情况（立项年度、项目编号、项目名称、计划类别、完成时间、完成效果）

（1）2011-2013，国家自然科学基金项目“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”，No. 31000752，正在进行

（2）2008-2011，江苏省自然科学基金项目“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”，No. BK2008103，2011 年已通过结题验收（超额完成）

（3）2009-2011，教育部博士点新教师基金项目“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”，No. 200802951022，2011 年已结题

（4）2006-2010，“十一五”863 计划项目“枯草芽孢杆菌多适性食品级表达系统构建及分泌途径改造”，No. 2006AA10Z318，2010 年已通过结题验收（参与研究）

（5）2011-2013，张家港科技局项目“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”，正在进行

4、项目实施具备的人才队伍、经费配套投入能力及科技服务管理能力

（1）人才队伍

项目研究团队共有 10 人，其中正教授 1 名，副教授 2 名，高级工程师 1 名，博士生 4 名，硕士生 2 名。学科背景包括食品分子生物学、食品营养与安全、食品微生物学检验、食品科学、纳米材料科学、分析化学、食品安全检测等多个领域，是一支富有活力的研究团队。

项目负责人一：

夏雨，男，1975 年生，博士，副教授，江南大学食品学院教师。1997 年毕业于南京理工大学化工学院，2001-2007 年于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会员、江苏省食品科学与技术学会理事会会员、江苏省微生物学会会员；国际期刊 *Applied Microbiology and Biotechnology*、*Process Biochemistry*、*Journal of Dairy Science* 等审稿人。现从事《微生物学》和《微生物学实验》等课程教学，科研方向为食品分子微生物学，近期主攻研究方向：采用微生物学、分子微生物学原理和技术对食品安全中存在的若干基础问题（如食源性致病微生物的检测与鉴定、真菌毒素的快速高通量检测、分析检测用探针分子如适配体、抗体的研究与开发等），已针对副溶血性弧菌、无乳链球菌和阪歧肠杆菌等致病菌开发了若干高灵敏度适配体。另外还进行了食品安全检测相关新酶的筛选、重组表达与酶学性质等工作，并针对芽孢杆菌构建出多套新型食品级表达系统和分泌表达系统。指导硕士研究生 6 名，在国内外学术期刊发表了 20 多篇相关科研论文，申请了 12 项国家发明专利。现主持国家自然科学基金项目 1 项，主持并完成了教育部博士点基金项目 1 项，主持并完成了江苏省自然科学基金 1 项，参加国家自然科学基金、国家 863 计划等国家级项目 6 项。

在本项目中主要分负责研究计划制定、项目分工的总体协调、适配体库的构建/靶标-适配体构效关系研究方案的定制。

项目负责人二：

王周平，男，1974年生，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，国家食品安全风险监测委员会委员，国家食品药品监督管理局首批餐饮服务食品安全专家，江苏省食品安全标准审评专家，江苏省科技咨询专家，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，国际期刊 *Clinical Chemistry*、*Biosensors and Bioelectronics*、*Talanta*、*Analyst*、*Analytica Chimica Acta*、*Luminescence*、*Journal of Agricultural and Food Chemistry*、*Food Chemistry* 等特约审稿人。

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、纳米探针技术及微生物培养筛选工作，目前主要研究方向为食品安全检测和纳米生物分析。先后主持国家“863”计划项目、国家自然科学基金项目、江苏省自然科学基金项目、教育部博士点基金项目、国家质检总局科技计划项目子课题、（法国）梅里埃科学研究基金项目（食品安全领域该基金全球第一个资助项目）等科研项目多项，参与国家自然科学基金重点和面上项目、国家“十一五”科技支撑计划项目各一项。迄今为止已在国内外重要学术刊物发表研究论文70余篇，其中SCI论文55篇，国际刊物邀请综述1篇，论文单次最高他引216次，申报国家发明专利21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16名。

在本项目中主要负责适配体筛选方案的指导、适配体连接上转换纳米材料的制备、检测方案制定、新产品和新装备开发任务部署。

项目组主要成员：

马小媛，女，1983年生，博士，副教授。2006年毕业于南京理工大学化工学院生物工程专业，获工学学士学位；2011年毕业于东南大学化学化工学院应用化学专业获工学博士学位（硕博连读）；2011年9月至今于江南大学食品学院任教，具有多年生物学、纳米材料科学和光谱分析科研经历，主要从事纳米材料制备及LSPR分析技术研发工作，先后参与国家自然科学基金重大研究计划培育类项目（90923010）、863计划项目（2007AA022007）、江苏省高校科研成果产业化推进项目（JH09-34）、国家自然科学基金面上项目（20475009）等的研究工作，已发表和录用SCI收录论文10余篇，获国家发明专利授权1项，申报国家发明专利7项，指导硕士研究生4名。

在本项目中主要负责荧光纳米材料的制备、适配体连接纳米材料的方法优化和新纳米材料开发。

祝长青，男，1973年生，南京农业大学食品科学与安全专业在读博士生，江苏出入境检验检疫局动植物与食品检测中心食品安全检测实验室高级工程师，生物学检验科副科长。近年来一直致力于食品中致病微生物、毒素等检验工作，主持和参与科研、标准制订项目6个，获国家质检总局“科技兴检奖”二等奖一次，江苏局“科技兴检奖”两次。在本项目中主要负责方法的验证与评估。近年取得的主要成果：

- （1）《食品中常见病原微生物快速检测技术的研究》获国家质检总局“科技兴检奖”二等奖（证书编号：2004-33-2-R04，第四完成人）；
- （2）《食品和水中空肠弯曲杆菌检测方法的研究》获江苏局“科技兴检奖”一等奖（证书编号：2004 No.: 0

7-02, 第二完成人)；

(3) 《转基因大豆检测方法的研究》获得江苏局科技兴检奖二等奖(证书编号: 2002 No.: 06-02, 第二完成人, 该课题为获得 2004 年总局科技兴检奖一等奖的“国家转基因植物产品检测实验室及检测技术体系的建立”的子项目)；

(4) 完成制定行业标准 SN/T 1195-2003“大豆中转基因成分的定性 PCR 检测方法”(第二完成人)和国家标准 GB/T 19495.4-2004“转基因产品检测核酸定性 PCR 检测方法”(第十完成人)；完成国家标准 GB/T 4789.9-2003“食品卫生微生物学检验空肠弯曲菌检验”的修订工作。

(2) 经费配套投入能力

课题组在前期研究中已经投入 20 万元左右用于部分原材料和生化试剂购买、检测光源设备购置和试制、核酸测序和合成等, 后续研究工作中还将通过市配套投入和单位自筹方式继续配套增加 120 万元经费投入, 在实验仪器设备购置、技术产品化、产品市场化方面进行深入研究。

(3) 科技服务管理能力

课题组前期已经承担包括国家“863 计划”、国家自然科学基金、江苏省自然科学基金、教育部博士点基金在内的多项科研项目, 在科研服务管理能力方面积累了较好的经验, 对于本课题项目的实施将发挥积极的指导作用。

本课题组将进一步结合本课题的特色, 以及课题指南的规范和要求, 针对本课题项目制定对应的策略, 全面完成好本课题的各项预定目标, 努力提升科技服务管理能力。

5、本项目实施可能对环境的影响及预防治理方案

本项目实施不涉及对环境造成影响。

五、项目研究预期成效及效益(重点是能提交的具有自主知识产权的创新性成果、高新技术产品、新样机、新设备、新品种、计算机软件、技术标准, 以及在成果转化中可能产生的效益)

针对 12 种常见食源性致病菌建立检测用核酸适配体库, 每种致病菌得到至少 10 条以上高特异性、高灵敏度的核酸适配体; 得出食源性致病菌与相应核酸适配体之间的“靶标-适配体结构”构效关系; 为常见食源性致病菌建设一个可靠的系统化检测平台, 预期成果如下:

- (1) 研制 1 种新型检测装备;
- (2) 研制 3 种食源性致病菌新型快速检测产品;
- (3) 发表高档次 SCI 论文 3-5 篇;
- (4) 申请国家发明专利 3-4 项;
- (5) 参与制订或修改国家、行业标准 1 项以上;
- (6) 提交详细研究报告 1 份。

本项目研究的结果以及形成的新方法或新产品能够形成一批具有自主知识产权和国际竞争力的检测新技术, 能够在涉及食源性致病菌检测的质检、商检、检验检疫、海关、公安等部门得到广泛应用, 对于促进我国食品安全战略体系的建设具有重要现实意义。

六、计划进度安排与考核指标

1. 计划进度

2013 年 10 月～2014 年 06 月：各食源性致病菌核酸适配体的筛选、功能表征、功能化纳米探针的制备；

2014 年 07 月～2015 年 04 月：食源性致病菌核酸适配体库的建立，适配体与靶标结合的上转换荧光检测效果的评估，“靶标-适配体结构”构效关系研究、预测和评估；

2015 年 05 月～2016 年 05 月：食源性致病菌核酸适配体库的应用平台建设，新产品、装备的研制和开发；

2016 年 06 月～2016 年 10 月：样本测试，技术、产品和装备验证评估，撰写解题报告，项目结题验收；

2. 考核指标

发表高档次 SCI 收录论文 3-5 篇，申请国家发明专利 3-4 项，研制检测新产品 3 种，新型检测装备 1 种，参与制订或修改国家、行业标准 1 项以上，提交详细研究报告 1 份。