

三、详细内容及申报理由

1、详细科学技术内容（总体思路、技术方案、实施效果）：

1.1 主要背景

食品安全问题一直是各国政府和消费者最为关心的问题，它直接关系到消费者的健康和生命。随着全球食品质量安全问题的不断涌现，当今社会对食品安全检测与功效评价的新方法、新技术的需求显得尤为突出。食源性疾病（Food-borne Disease）和食源性毒素是危害消费者安全的两大最主要食品安全危害因子，如何对食品中存在的食源性致病菌和真菌毒素进行有效的检测和监控成为一个严峻的挑战。

目前针对食源性致病菌和真菌毒素的鉴定和检测方法主要基于微生物培养检验技术、DNA 分子技术（如核酸探针、PCR、基因芯片等技术）、免疫检测技术（如 ELISA 法等）、HPLC 技术，这些方法均存在耗时长、成本高、实验技术要求较高等限制，不能适用于快速实时检测，也不适宜于推广到基层检测单位使用。因此，需要为当前致病菌检测和真菌毒素检测挖掘更高效的生物识别分子和识别技术，并在此基础上发展新的快速、灵敏、低成本的检测方法。近年来，随着纳米技术的发展，上转换荧光材料成为一种优秀的发光检测材料。上转换荧光材料与抗体或适配体联用有可能实现生物体系中多组分的同时检测。适配体是近年来迅速发展的一种新型生物分子探针，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。

本课题组将传统抗体技术与上转换荧光技术相结合，实现了多种致病微生物和真菌毒素的检测。同时设计和筛选得到了多种致病菌和真菌毒素的适配体，与上转换荧光探针技术成功实现了多种致病微生物和真菌毒素的高灵敏检测，初步构建了核酸适配体库的评价和应用平台。

1.2 总体思路

本项目针对当前食源性疾病危害因子检测过程中存在的诸多问题，运用纳米材料科学技术及现代分子生物学技术，针对食源性致病菌和真菌毒素等危害因子的快速、高灵敏度检测，将上转换荧光技术与适配体或抗体联用，保证了检测的灵敏度与特异性，在此基础上研究开发了新的快速在线检测技术、检测方法及产品并实现了产业化。

1.3 技术方案

（1）基于抗体和核酸适配体的重要真菌毒素检测技术研究

针对食品中常见的真菌毒素黄曲霉毒素 B1 和赭曲霉毒素 A 分别研发了相应的多克隆抗体和单克隆抗体，并且利用磁分离富集与量子点多色标记特点，构建了基于磁分离和 CdTe 量子点标记的黄曲霉毒素 B1 和赭曲霉毒素 A 荧光免疫分析新技术。基于竞争免疫分析原理和荧光分析，建立了同时检测黄曲霉毒素 B1 和赭曲霉毒素 A 的荧光分析新方法。方法集成了磁分离富集纯化和量子点荧光特性稳定等优点，灵敏度高、操作简单、检测用时短。检测原理如图 1 所示。

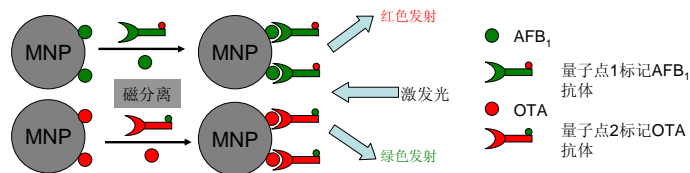


图 1 CdTe 量子点多色标记同时荧光免疫检测 AFB1 和 OTA 路线图

与此同时，采用纳米金标记-溶出化学发光法分别实现了黄曲霉毒素 B1 和赭曲霉毒素 A 的高灵敏度检测。将纳米金标记的稳定性与化学发光检测的高灵敏性特点相结合，以黄曲霉毒素 B1 为模式分析物，建立黄曲霉毒素 B1 免疫化学发光新型检测方法。检测路线图如图 2 所示。

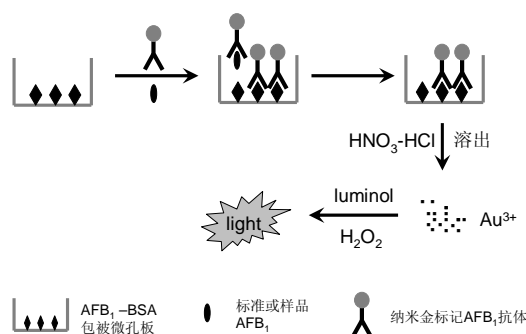


图 2 纳米金标记-溶出化学发光免疫检测 AFB1 示意图

此外，基于核酸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的赭曲霉毒素 A 检测技术，实现了该靶标的快速、灵敏检测。其原理图如图 3 所示。

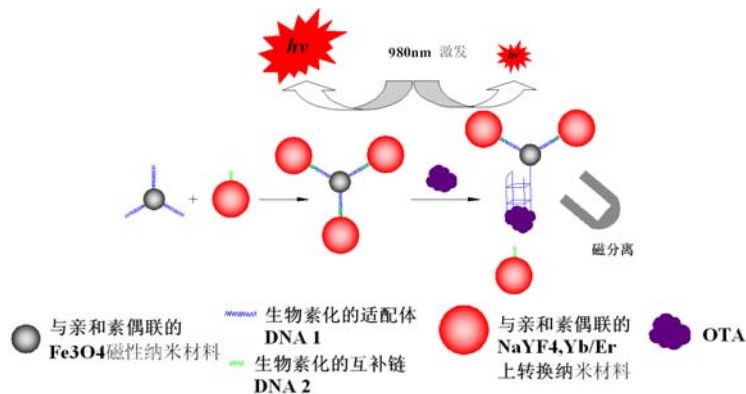


图 3 适配体功能化磁分离-上转换荧光纳米粒子标记赭曲霉毒素 A 检测原理图

(2) 基于抗体和核酸适配体的重要食源性致病菌的检测技术研究

针对食品中参见的致病菌如副溶血性弧菌、沙门氏菌、无乳链球菌、化脓性链球菌、阪崎肠杆菌等研发了新型高灵敏度快速检测方法。以副溶血性弧菌为例，首先通过基因工程方法，扩增得到了副溶血性弧菌鞭毛蛋白 FlaA、外膜蛋白 OmpU 和 OmpW 的对应基因并实现了重组表达，其次，分别以副溶血性弧菌灭活菌体、纯化的 FlaA、OmpU 和 OmpW 蛋白作为抗原对家兔进行免疫制备了多克隆抗并以此为基础采用水热-溶剂热方法成功制备了氨基化磁性纳米

粒子，并与上转换发光纳米粒子联合实现了靶标微生物的检测。其检出限为 103 cfu/mL。在模拟水产品样品的检测中，加标回收率为 90.7%-96.7%，与传统的平板计数法结果一致。该方法原理图如图 4 所示。

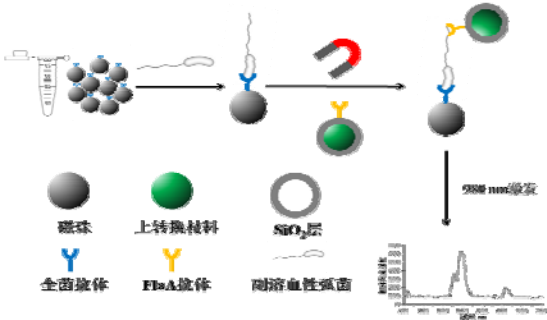


图 4 基于磁分离、上转换材料发光的 *V. parahaemolyticus* 检测方法原理图

另外，采用核酸适配体结合荧光发光技术，实现了化脓链球菌和无乳链球菌的新型快速检测方法。以化脓链球菌为靶标，通过 Cell-SELEX 技术及反筛 SELEX 技术（counter SELEX）将筛选得到 ssDNA 适配体，运用流式细胞术筛选得到两条亲和力高、特异性强的适配子，其与化脓链球菌的结合率为 77.05%，离解常数达到 44.25 ± 5.203 nmol/L。

（3）相关新产品、新装备的研究开发

我们已基于抗体-上转换荧光纳米材料技术开发了黄曲霉毒素和赭曲霉毒素检测试剂盒各 1 套，并配套开发了用于这两种毒素同时高灵敏快速检测的试剂，发展了配套检测装备 2 套。已基于核酸适配体-上转换荧光纳米材料技术开发了黄曲霉毒素检测试剂盒 1 套、副溶血性弧菌检测试剂盒 1 套、无乳链球菌检测试剂盒 1 套，并试制和开发了相关的检测装备 3 套。

1.4 实施效果

本项目自开展实施以来，已经完成了学术论文共 25 篇（其中在国际学术期刊上发表高影响力 SCI 论文 15 篇），指导博士学位论文 4 篇、硕士学位论文 6 篇，申报或授权国家发明专利 8 项，这些研究结果对于将来开发新型快速高灵敏度的检测方法和便携式检测设备具有重要指导作用。

本项目的研究成果在无锡福阳生物科技有限公司等企业投入生产，课题组通过不懈努力，已克服生产中遇到的各类问题，目前已形成系列化检测试剂、试纸、试剂盒等产品，便携式检测设备已得到试制并在若干检测部门进行可行性试验，预计不久将能够投入市场。

本项目研究的结果以及形成的新方法或新产品已形成了一批具有自主知识产权和国际竞争力的检测新技术，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具有重要指导意义，在涉及食源性致病菌检测的质检、商检、检验检疫、海关、公安等部门将能够得到广泛应用，对于促进我国食品安全战略体系的建设亦具有重要现实意义。

（限 3 页）