

# 如何申请 国家自然科学基金

# 第一部分

## 基金委面上项目

### 评审基本程序及重要环节

**初 审：** 由各学科处组织实施。

- ①申请者不具备申请资格或违反有关规定；
- ②手续不完备或申请书不符合要求；
- ③内容不符合资助范围或超出资助能力；
- ④申请者以往资助项目执行不利。

**查 重：**由基金委信息中心组织实施。

- ① 高职申请与承担（含参加）面上、重点、重大累计不超过3项；
- ② 在职研究生不作为限项申请的条件但只可申请面上项目；
- ③ 申请者同期只能申请一项，每个项目申请者限为一人；
- ④ 高职申请者当年申请及承担的在研面上项目累计不超过3项；
- ⑤ 不具有高职的申请者申请及负责的在研面上项目不超过一项；
- ⑥ 青年基金只能获得一项资助。

## 同行评议（一审）：

由基金委各学科处组织实施。基本程序：

- 每份申请书选择同行评议专家（5位）；
- 函请同行评议：对项目进行定性定量评价；
- 收回评议卡；
- 对定量部分进行计算机判读、打分、排序；
- 据学科资助项目数130%确定第二轮评审项目。

 专家评审组或专业委员会评审（二审）。

主要对一审推荐项目进行评议，筛除 30%。

 再次对二审会确定资助项目进行审查：

进一步查重；

以往承担项目是否按期完成；

是否有违反基金委有关申请规定。

 基金委员会委务会审议。

 下发批准、未批准通知。

# 第二部分

## 如何撰写国家自然科学基金 申请书

# 一、摘要（限400字）

包括：研究方法、内容、目标、科学意义等

如：“用……方法（手段）进行……研究，探索/  
证明……问题，对阐明……机制 / 揭示……规律有重要  
意义，为……奠定基础 / 提供……思路 ”

# 探索肺炎链球菌感受态形成 对毒力表达的影响

细菌在自然状态下可获得感受态而发生转化，这种基因重组方式在许多重要生命现象和生命过程的起始和源头。本研究通过插入复制失活或替代失活的方法，构建肺炎链球菌感受态缺陷菌株，用体内环境信号探讨肺炎链球菌的致病是否与其感受态的形成和转化有关。为揭示转化过程对于肺炎链球菌致病能力的影响机制提供理论依据。

## 二、立论依据

- 对基础研究，着重结合国际科学发展趋势，论述项目科学意义
- 对应用基础研究，着重结合学科前沿，围绕国民经济和社会发展中的重要科技问题论述其应用前景

# 研究意义

在研究领域（疾病防治）层面

从研究领域（疾病防治）切入

从研究方向展开

围绕本项目拟解决的问题

进行归纳分析

提出设想

立论依据

# 1、项目的研究意义

**存在问题：**对科学意义阐述不足或夸大。

**撰写方法：**从疾病入手，简述其特点、危害，目前主要的治疗方法及其存在的问题。

简要分析该病发病机理和主要研究热点，引出目前存在的主要问题，也就是本项目要解决的问题，以此为切入点提出假设，阐述如果实现预期目标，对该病甚至相关疾病的预防、治疗具有的理论意义和临床价值。

基因的转移，是基因重组最原始的方式。我们可以从肿瘤组织中找到病毒的基因，也可以发现某些病原体的DNA在不同宿主之间的传递过程中发生着变异，例如耐药性在细菌中的传播，这都是自然界中普遍存在的基因转移现象。而细菌基因的转移包括结合（conjugation）、转导（transduction）、融合（fusion）及转化（transformation）四种方式，我们这里所要讨论的是转化。

什么叫做转化呢？它是指细菌在一定状态（感受态——指细菌能够摄取外来游离或质粒DNA的一种状态，它可以在实验室中诱导产生，也可发生于细菌自然生长的某一阶段）下摄取外来DNA的过程。已发现有五种细菌可以在自然状态下产生感受态而发生转化：肺炎链球菌（*S. pneumoniae*, *S. pn*）、枯草杆菌（*B. subtilis*）、流感嗜血杆菌（*H. influenza*）、血链球菌（*S. sanguis*）和淋病奈瑟氏菌（*N. gonorrhoea*），其中肺炎链球菌的转化效率最高，转化的结果是细菌的遗传特征发生变化，表现出与亲代不同的遗传性状。

1928年Griffith发现了肺炎链球菌(*S. pneumoniae*)荚膜转化的现象，1944年Avery等证实了转化物的化学本质是DNA，证明生命的遗传物质是DNA。细菌转化不仅是许多重要生命现象的起始和源头，转化机理的研究也一直是生命科学中一个非常重要的问题。本研究从肺炎链球菌的转化入手来探讨其对细菌毒力表达的影响。

尽管肺炎链球菌的转化机制尚不十分清楚，但其过程大致可分为6个阶段：1) 肺炎链球菌被诱导成为感受态；2) 外来DNA吸附于细菌壁上；3) 核酸酶与外来DNA结合；4) 核酸酶降解其中一条链，使之成为单链(ssDNA)；5) ssDNA被摄入细菌胞内6) 进入细胞内的ssDNA以同源重组的方式整合于肺炎链球菌的染色体上。

肺炎链球菌作为一种自然界广泛存在的致病菌，肺炎链球菌可引起脑膜炎、中耳炎、鼻窦炎和败血症等疾病。在70年代，未经治疗肺炎球菌感染死亡率为30-35%<sup>[1]</sup>，经几十年的研究，其感染引起的菌血症死亡率仍高达25-30%<sup>[2]</sup>。抗生素的应用由于耐药菌的迅速增加而越来越失去治疗价值。而最新的肺炎链球菌多价结合疫苗的特异性和有效性远远未达到令人满意的程度<sup>[3]</sup>。寻找体内新的毒力基因，揭示肺炎球菌致病机理，才能从根本上解决其感染的治疗问题。

## 2、国内外现状分析（综述）

### 存在问题：

- ★ 文献复习不够，对国内外现状缺乏真正了解，提出的问题别人已解决——**低水平重复。**
- ★ 对研究方法不熟悉，简单移植或夸大其作用，缺乏实际应用的可行性——**无法实现预期目标。**
- ★ 对国内外现状只是简单罗列，缺乏归纳分析，缺乏逻辑性和针对性——**总结与表达不够。**

撰写方法：要紧紧围绕本次申请项目的主题。

1、从疾病切入，简要论述国内外研究成果，并引出当前的热点研究方向。

2、从研究方向展开，较详细地分析国内外在本方向的研究进展，引出阐明疾病发病机理或发明新的治疗方法的关键问题所在。

3、围绕关键问题，详细论述国内外以往的研究结果、当前的现状及今后的发展趋势。综合分析

#### 4、对拟采用的技术方法进行介绍和分析。

➔ 成熟的方法要简要介绍，重点阐明可以应用于本研究的依据。

➔ 新方法要详细介绍其原理，并阐明可以应用于本研究的理论依据和实验依据。

➔ 要特别注意的问题：必须对项目中所运用的技术方法的原理、流程及在实际应用中可能出现的问题要十分清楚，绝不能是一种简单的移植。

例如：蛋白质的融合表达，理论上可以实现融合，但存在“活性、表达载体选择、纯化”等问题。

#### 5、提出本项目的研究设想。

肺炎链球菌在正常情况下并不致病，40%的健康人咽喉部都有寄生<sup>[2]</sup>，其只是在一定条件下引起疾病，如病毒引起上呼吸道感染时、小儿高烧时常转为肺炎。已经肯定环境信号控制着细菌毒力基因表达<sup>[4]</sup>。问题是肺炎链球菌致病是否与环境因素诱导其感受态的形成和转化有关？从我们目前掌握的资料来看，国内外尚未见到类似报道或想法。

目前对肺炎链球菌转化机理的研究概况：  
操纵子comCDE为多种环境因素如Ca<sup>2+</sup>、O<sub>2</sub>浓度、  
生长阶段、细菌密度等调节其感受态发生的唯一  
共同调控点<sup>[5, 6, 7]</sup>，也是肺炎链球菌控制许多蛋  
白质基因表达的开关<sup>[8]</sup>。而已有文献报道当S. pn  
进入感受态后，可启动一些蛋白包括自溶素的表  
达<sup>[9]</sup>，而自溶素是S. pn的一种比较重要的毒力因  
子，当其被激活后可释放细胞壁毒力因子和溶血  
素；最新研究发现，有三个可被感受态刺激蛋白  
(Csp) 诱导表达的蛋白基因变异时，肺炎链球  
菌的毒力减弱<sup>[10]</sup>。

根据以上研究背景，我们的研究思路为：  
采用插入失活的手段，分别使基因comC、D、E失活，从而构建一系列感受态缺陷菌株。通过体内毒力实验及体外粘附实验比较其与野生菌株的致病能力，以确定自然条件下形成的感受态与细菌致病的关系。

本研究从转化过程中感受态的形成方面探讨其对肺炎链球菌毒力影响，**意义在于：**

1. 由于感受态的发生与细菌多种蛋白的表达调控有关，而其形成与多种环境因素相关，因此本课题为从体内研究环境因素对于肺炎链球菌致病性的影响开辟了一条新的途径。
2. 同时感受态的形成可引起细菌发生转化，可能会导致外源基因的整合，使肺炎链球菌的生物性状发生改变，这也可能与其致病相关，本研究探讨转化过程对于肺炎链球菌致病能力的影响，为进一步深入理解细菌的致病机理提供新的依据。

# 注意事项

- ✦ 注意逻辑性和层次感，并随时点题。
- ✦ 文字表达要精雕细琢，避免假大空。
- ✦ 参考文献必须提供作者全名、出处。
- ✦ 参考文献必须引用近年的文献。
- ✦ 要注意参考国内相关专业知名专家的论著。
- ✦ 文献回顾不能回避国内外最新研究进展。

# 三、研究方案

## 1、研究目标

存在问题： 目标过大

撰写要求： 有限目标，与研究内容相呼应

如：探索.....问题，明确.....关系，揭示.....规律，  
阐明.....原理（机制），建立.....方法等

本研究的目标是：

探讨S. pn的感受态发生是否与其致病相关，

重点阐明：

- 1) 体内环境是否诱导S. pn的转化过程（感受态的发生）。
- 2) S. pn毒力因子的表达是否与体内环境诱导细菌感受态形成与转化过程相关。

## 2、研究内容：

**存在问题：**内容过多，一个研究周期难以完成；  
内容分散，不能集中阐明研究目标。

**撰写要求：**内容要适当，确保研究周期内完成；  
与目标相辅相成，为研究目标服务。  
篇幅要适度，注意与技术路线区别。

**确定研究目标、内容的依据：**

回答一个科学问题；  
根据研究周期、资助强度来确定。

研究内容(一): 通过*S. pn*的操纵子comCDE的基因失活及体外转化实验得到感受态缺陷的*S. pn*菌株。

1. 分别设计*S. pn*的基因comC、comD、comE的中游PCR引物, 构建含有*S. pn*的comC、comD、comE中游基因序列的pEVP3质粒。

2. 将构建的pEVP3质粒转化*S. pn*得到感受态缺陷菌, 并通过体外转化实验以确定其感受态缺陷。

研究内容(二): 构建可被荧光报告是否发生感受态的菌株。(cinA是*S. pn*感受态发生之后表达的蛋白基因, 与外源基因的同源重组有关, 因此将荧光蛋白基因接于其后, 荧光表达可报告感受态的发生)

1) 将绿色荧光蛋白(gfp)基因替代pEVP3质粒中的LacZ基因, 得到荧光报告质粒。

2) 设计*S. pn*的cinA基因下游的PCR引物, 构建含有cinA基因下游序列的荧光质粒(pEVP4)。将pEVP4质粒转化感受态缺陷和非缺陷的*S. pn*, 得到转化菌株。

研究内容(三): 体外转化实验以验证感受态缺陷菌不能发生转化, 且荧光表达的确可报告感受态的发生。

1) 做体外转化实验, 验证所构建的菌株能被荧光表达报告感受态的发生, 且感受态缺陷菌不能发生转化。

2) 检测基因comC、D、E的表达情况, 进一步佐证所构建的菌株为需要的菌株。

研究内容(四)：通过感受态缺陷和非缺陷菌的粘附实验及体内毒力实验分析细菌的感受态发生是否与其致病毒力相关。

1) 分别用感受态缺陷和非缺陷菌处理A<sub>549</sub>细胞, 观察二者处理后细胞粘附的菌落的多少变化。

2) 分别将感受态缺陷和非缺陷菌注射入BALB/ct小鼠体内, 观察二者感染小鼠的致死率是否不同。

3) 分别将感受态缺陷和非缺陷菌滴入QS小鼠的鼻黏膜上, 观察二者感染小鼠的致死率是否不同。

研究内容(五): 检测感受态缺陷及非缺陷菌基因comC、D、E在体外和体内的表达情况, 以进一步验证细菌毒力的改变是否与其感受态的形成有关。

- 1) 合成基因comC、D、E的探针, 做northern blot。
- 2) 制备基因comC、D、E蛋白的抗体, 做western blot。

### 3、拟解决的关键问题：

存在问题：未能抓住关键问题或抓得不准。

撰写要求：找出关键问题，写出解决办法。

什么是关键问题？

——研究过程中对达预期目标有重要影响的某些研究内容或因素。

——为达预期目标所必须掌握的关键技术或研究手段。

## 4、研究方法

### 存在问题：

过于简单：在实验方案中只有方法名称而无具体步骤。

过于繁杂：大量罗列一些常规的实验方法。

**撰写要求：**以研究项目的需求为前提，尽量采用目前最先进的方法和手段，并将其操作步骤和关键环节体现在技术路线当中。

## 5、技术路线

**存在问题：** 不清楚，不详细。

**撰写要求：** 清晰、详细、注意逻辑性。

**撰写方法：**

- 以时间顺序为主线设计技术路线
- 以研究内容为主线设计技术路线
- 分大小标题，突出逻辑关系。
- 详细地写清楚每个具体步骤。

## 6、可行性分析

理论分析

研究手段、方法分析

预实验结果分析

所用特殊实验材料（试剂）的分析

对所具备的实验条件进行分析

对项目组成员搭配及其运用技术方法的能力分析

CP1250肺炎链球菌及质粒pEVP3由Morrison教授赠送，人肺癌上皮A<sub>549</sub>细胞已从中科院上海细胞所购得，流式细胞仪荧光记数测定在我校儿童医院完成，PCR引物由北京赛北盛生物有限公司合成。

研究发现，肺炎链球菌在感受态产生后可使一些蛋白表达，其中包括自溶素，这表明其感受态的产生与细菌毒力的改变相关，因此研究转化过程与细菌致病之间的关系是有事实基础的。

目前的研究表明肺炎链球菌的感受态形成都受到操纵子comCDE的调控，因此失活基因comC或comD或comE可使菌株不能产生感受态，已有通过失活这几种基因构建感受态缺陷菌株的文献报道。cinA为转化相关基因，因此用它为报告基因以确定肺炎链球菌在体内是否发生感受态，已有构建cinA-LacZ融合基因菌株的报道。

本实验室已掌握肺炎链球菌体外转化的方法，而粘附及毒力实验的方法已有多篇报道。因此本研究的技术路线从理论上讲是合理的，而方法是成熟的。

## 7、创新性

对创新的理解：创新性与先进性是有根本区别的。

### 原始创新：

- 填补空白或修改传统的理论；
- 新技术、新方法的发明创造。

### 跟踪创新：

- 在前人工作基础上补充、完善现有理论；
- 对原有技术、方法进行修改后产生 $1+1>2$ 的效果。

细菌在宿主体内是处于一个生存竞争的战场，其是否致病取决于机体内环境与细菌相互斗争、相互适应的结果。在体内寻找细菌毒力因子的表达是目前研究病原菌致病机理的热点。细菌致病机理已研究多年，由环境信号诱导细菌感受态形成影响毒力表达的路线，国外鲜见报道。本研究从缺失肺炎链球菌感受态形成的关键环节comC、D、E基因入手，深入探讨环境信号、细菌转化过程与毒力表达的关系，这是该项研究的特色和创新之处。通过本项研究可完成：

1) 分析肺炎链球菌感受态的形成是否受到comCDE操纵子调控。

2) 感受态的形成是否可改变体内肺炎链球菌毒力，从而导致其致病能力的改变。

本研究为进一步寻找毒力基因、理解细菌的致病机理提供了理论依据，在研究思路上有所创新。

## 8、年度研究计划及预期研究成果

### 年度研究计划：

按年度列出：研究内容及其阶段目标；拟组织的重要学术交流活动、国际合作与交流计划等。

### 预期研究成果：

理论成果：建立/丰富/补充/填补 .....

技术方法：建立/完善 .....

专    利：可望获得 .....

论    文：国际、国内

人才培养：青年科技骨干、博硕研究生

# 研究计划及预测进展(略)

## 预期的研究成果

# 预期的研究成果

1. 阐明体内环境信号是否可诱导S. pn的转化过程（感受态的发生）。
2. S. pn毒力因子的表达是否与体内环境诱导转化过程有关。
3. 通过对感受态缺陷菌在小鼠体内毒力的研究，为进一步寻找毒力因子以及研究转化对肺炎链球菌的致病影响提供理论和实验依据。
4. 本研究完成后可提供一定数量的较高水平论文在国内外发表。

# 四、研究基础

## 1、工作基础

**存在问题：**

内容过简； 与申请项目无关。

**撰写要求：**

要介绍与申请项目直接相关的研究成果；  
提供有关的研究论文、成果及专利等材料；  
以往应用与申请项目有关的技术方法的经历。  
工作积累也要包括项目组成员的所有信息。

## 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，包括利用国家重点实验室和部门开放实验室的计划与落实情况。

## 3、申请者及项目组成员简历

所有项目组成员的工作简历及发表相关论著均应介绍，尤其是要针对项目组成员的分工介绍研究工作经历。

# 第三部分

## 科 研 选 题

## 一、科研选题的意义

“提出一个问题往往比解决一个问题更重要，因为解决一个问题也许仅仅是一个数学上或实验上的技能而已。而提出新的问题，新的可能性，以新的角度去看旧的问题，却需要创造性的想象力，而且标志着科学的真正进步。”

选择课题、确定主攻方向是科学研究中具有战略意义的首要问题。

重大生命现象、生命事件的起始、源头和过程。

## 二 科研选题的原则

- 1、需要性原则：选择有重大意义或急需解决的问题。
- 2、目的性原则：目标集中，不含糊，不笼统。
- 3、创新性原则：针对科学而言，没有地域性。
- 4、先进性原则：针对技术而言，有地域性。
- 5、科学性原则：有依据；符合客观规律；设计科学。
- 6、可行性原则：主要技术指标实现的可能性。
- 7、效能性原则：社会效益、经济效益、应用价值等。

### 三、科技人员如何选题

1、**课题的概念**：为探索医学领域中的某个具体的理论、方法或技术问题，根据假说设计的旨在说明三要素（受试对象、施加因素、效应结果）及其相互关系并在一定时间内实现设计目标的最基本的单元。

→ **课题最基本的特征是探索，其指向是具体的理论、方法或技术问题；**

→ 课题要根据假说、经过设计；

→ 课题的核心是要说明三要素及其相互关系；

→ 课题是有时空观念的，即有边界、有期限的。

## 2、选题的基本程序：

### (1) 提出问题：

- A、问题通常产生于观察与理论之间的矛盾；
- B、问题产生于怀疑精神与科学的创造性思维的结论；
- C、根据生产和实际需要提出问题。医学课题属此类。

### (2) 查阅文献，提出假说：

建立假说是科研工作的前提和灵魂；假说要以科学的实验为依据，在此基础上要敢于大胆设想。

(3) 确定题目：体现三要素；体现假说内容；留有余地；言简意赅，用词具体；25个汉字，不用缩写。

(4) 提出科研设计：专业设计；统计学设计。

### 3、选题的基本方法：

- A、同步选择法：与科技发展前沿、主流同步；
- B、阶段分析选择法：根据学科发展不同阶段；
- C、交叉点选择法：不同学科的交叉点；
- D、移植选择法：将某学科方法移植到另一学科；
- E、机遇线索捕捉法：偶然发现、思想火花等；
- F、经验转移选择法：用解决某问题的经验去解决  
另一问题；
- G、适应需要选择法：
- H、缺点列举选择法：

谢 谢!