



申请代码	H1603
受理部门	
收件日期	
受理编号	8150110458



# 国家自然科学基金 申 请 书

(2015 版)

资助类别:	青年科学基金项目		
亚类说明:			
附注说明:			
项目名称:	基于双重测序技术研究基因突变在结直肠癌发生发展中的作用机制		
申 请 人:	张霞	电 话:	0411-86118636
依托单位:	大连医科大学		
通讯地址:	辽宁省大连市旅顺南路西段9号大连医科大学		
邮政编码:	116044	单位电话:	0411-86110146
电子邮箱:	zhangxia@dlmedu.edu.cn		
申报日期:	2015年03月04日		

国家自然科学基金委员会



## 基本信息

申请人信息	姓名	张霞	性别	女	出生年月	1983年11月	民族	汉族
	学位	博士	职称	讲师	每年工作时间（月）		9	
	电话	0411-86118636		电子邮箱	zhangxia@dlmedu.edu.cn			
	传真			国别或地区	中国			
	个人通讯地址	辽宁省大连市旅顺南路西段9号大连医科大学						
	工作单位	大连医科大学/肿瘤干细胞研究院						
	主要研究领域	肿瘤基因组学						
依托单位信息	名称	大连医科大学						
	联系人	潘艳	电子邮箱	panyan999@126.com				
	电话	0411-86110146	网站地址	www.dlmedu.edu.cn				
合作研究单位信息	单位名称							
项目基本信息	项目名称	基于双重测序技术研究基因突变在结直肠癌发生发展中的作用机制						
	英文名称	Investigating the mechanism of gene mutation during the development of colorectal cancer by duplex sequencing						
	资助类别	青年科学基金项目				亚类说明		
	附注说明							
	申请代码	H1603				H1602		
	基地类别							
	研究期限	2016年01月 -- 2018年12月				研究方向：肿瘤基因组学		
	申请经费	30.0000万元						
中文关键词		C08_结、直肠肿瘤；基因突变；双重测序；数据分析						
英文关键词		colorectal cancer; gene mutation; duplex sequencing; data analysis						



中文摘要	<p>结直肠癌是一种常见的消化道恶性肿瘤。结直肠癌的发病是由基因突变引起，同时基因突变与结直肠癌预后和治疗方案关系密切。基因突变通过调控多个癌基因的激活或抑癌基因的失活进行作用。近年研究表明如APC、KRAS、BRAF基因突变均与结直肠癌发生密切相关，但尚缺乏基因组范围内对基因突变作用机制的全面深入研究。因此本项目拟采用双重测序技术在基因组水平研究基因突变发生的特征和致癌的作用机制。前期研究已成功构建双重测序文库，获得初步的测序结果已验证技术的可行性，同时已开发了应用于双重测序数据分析的数学算法和计算机程序。本项目拟获得结直肠癌、癌旁组织和正常组织的双重测序数据，对获得数据进行生物信息分析，揭示基因组内基因突变的分布特征；探讨基因突变对结直肠癌发生发展的作用机制；筛选可用于结直肠癌靶向治疗的相关基因，为结直肠癌的早期诊断提供理论依据，有效提高其治疗生存率。</p>
英文摘要	<p>Colorectal cancer is a common digestive tract malignant tumor. The incidence of colorectal cancer are caused by gene mutation, and gene mutations have a closely relationship with the prognosis and treatment of colorectal cancer. Gene mutations regulate the activation of oncogene and inactivation of tumor suppressor gene. In recent years, studies have shown that such as APC, KRAS, BRAF gene mutations are closely associated with colorectal cancer, but it is lack of deeply researches on gene mutation mechanism in the whole genome level. Hence this project will investigate the mechanism of gene mutation in colorectal cancer by duplex sequencing technology. Previous researches have successfully constructed the duplex sequencing library, and the feasibility of this technology also has been verified by the primary data of sequencing. Meanwhile, the related mathematical algorithm and computer programs for duplex sequencing data have been developed. This project intends to obtain duplex sequencing data from colorectal cancer tissues, adjacent normal tissues and normal tissues. After bioinformatics analysis, we will reveal the distribution characteristics of gene mutation in the whole genome, investigate the mechanism of gene mutation in the development of colorectal cancer, screen colorectal cancer related genes for molecular targeted therapy, which provide the theoretical basis for early diagnosis and effectively improve the survival rate.</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	证件号码	每年工作 时间（月）
1	吕德康	1983-11-23	男	讲师	博士	大连医科大学	18342213332	dekanglv@126.com	372526198311230034	3
2	张宇	1983-02-16	女	工程师	硕士	大连医科大学	18640821095	zhangyu02xinben@163.com	370321198302161829	6
3	张剑	1991-06-28	男	硕士生	学士	大连医科大学	18842821258	1044665952@qq.com	350823199106280514	4
4	庄艳	1990-04-28	女	硕士生	学士	大连医科大学	13390065982	1317791046@qq.com	37131219900428554X	6

总人数	高级	中级	初级	博士后	博士生	硕士生
5	0	2	1	0	0	2



## 国家自然科学基金项目资金预算表（定额补助）

项目名称：基于双重测序技术研究基因突变在结直肠癌发生发展中的作用机制

项目负责人：张霞

金额单位：万元

序号	科目名称	金额	备注
	(1)	(2)	(3)
1	一、项目资金支出	30.0000	/
2	（一）直接费用	25.5000	
3	1、设备费	3.0000	
4	（1）设备购置费	3.0000	购置移液器等5万元以下小型仪器设备
5	（2）设备试制费	0.0000	
6	（3）设备改造与租赁费	0.0000	
7	2、材料费	6.5000	测序文库构建、生化实验所需试剂和耗材的购
8	3、测试化验加工费	12.0000	全基因组测序及初级数据分析费用
9	4、燃料动力费	0.3000	实验过程中消耗水、电的费用
10	5、差旅费	0.5000	研究需要到外埠的差旅费和市内的交通费
11	6、会议费	0.0000	参加相关学术会议的费用
12	7、国际合作与交流费	0.0000	
13	8、出版/文献/信息传播/知识产权事务费	1.5000	发表论文的版面费和文献检索费
14	9、劳务费	1.7000	在校研究生和临时聘用人员的劳务费
15	10、专家咨询费	0.0000	
16	11、其他支出	0.0000	
17	（二）间接费用	4.5000	
18	其中：绩效支出	1.1250	
19	二、自筹资金	0.0000	



## 预算说明书

项目拟申请经费30万元,没有其他经费来源。

(一)直接费用:共计25.5万元。

1、设备费:3万元

设备购置费预算3万元,本项目研究工作基本可以在现有实验设备和技术平台基础上完成,仅需添加少量小型仪器设备,为实验提供便利,提高项目研究工作的效率。计划购置移液器、磁性分离器等5万元以下小型仪器设备。

设备试制费:无。

设备改造与租赁费:无。

2、材料费:6.5万元

材料费购置费预算6.5万元,本项目研究涉及生物化学、遗传学、基因组学等多个领域,所需试剂和耗材品种较多。这部分经费主要用于测序文库构建、生物化学实验所需常规试剂和耗材的购置。

1)测序文库构建相关试剂盒,是本项目的重要研究内容所必须,预计需要2.8万元,购买如下产品:

NEB公司的DNA超快速文库制备试剂盒(E7370S)1个,8349元/个;

NEB公司的多样本接头引物试剂盒(E7335S)2个,1589元/个;

NEB公司的甲基化接头引物试剂盒(E7535S)1个,1749元/个

KAPA公司的荧光定量PCR文库质量检测试剂盒2个,5600元/个

2)生化实验所需试剂和耗材,也是本项目的重要研究内容所必须,预计需要3.2万元购买如下产品:

NEB公司的klenow exo- DNA 聚合酶I(M0212S)6支,569元/支(200 Units);

NEB公司的dNTP套装(N0446S)2支,2109元/支;

NEB公司的DNA Ladder 不同片段大小,共10支,259元/支;

Qiagen公司的基因组DNA提取试剂盒(51304)2个,2010元/个;

KAPA公司的PCR高保真酶3支,1800元/支;

此外,还需要购买T4 连接酶、琼脂糖、酒精、冰醋酸等生化实验常用酶和试剂,离心管、枪头、研钵等耗材。

3)细胞实验所需试剂和耗材,预计需要0.5万元

细胞培养基、血清、培养皿等

3、测试化验加工费:12万元

主要用于基因组DNA 的DNA-seq、RNA-seq和BS-seq等深度测序费用及测序产生大数据的计算、分析和存储费用。本项目主要是基于高通量测序技术进行研究,因此40%比例的经费都用于深度测序和测序数据分析的研究工作。预计需要支付12万元如下费用:

DNA-seq双端测序,每个lane为1.5万元,需要4个lane,共计6万元;

BS-seq双端测序,每个lane为1.5万元,需要2个lane,共计3万元;

文库检测测序:每个lane为1.5万元,需要1个lane,共计1.5万元

序列合成、数据分析、存储费用:1.5万元

4、燃料动力费:0.3万元

主要用于支付本项目研究所需的生化实验室、测序实验室、计算机分析室等所消耗的水、电资源费用。预计需要0.3万元,

水4元/吨,300吨/3年;电0.5元/度,3000度/3年

5、差旅费:0.5万元

预算0.5万元,用于支付项目研究过程中开展科学实验、业务调研、学术交流等所发生的外埠差旅费、市内交通费用等。

6、会议费:无

7、国际合作与交流费:无

8、出版/文献/信息传播/知识产权事务费:1.5万元

主要用于项目研究成果论文发表的版面费、文献检索费、研究资料及论文复印打印费、专业书籍和软件购买等费用。

9、劳务费:1.7万元

用于支付直接参与本项目硕士研究生和临时聘用人员的劳务费用。每年参加项目研究的硕士生2人,根据项目分工1人每年工作6个月,另外1人每年工作4个月,平均每月500元劳务费,3年合计1.5万元;临时聘用人员3年预算2000元。

10、专家咨询费:无

11、其他支出:无

(二)间接费用:共计4.5万元。



## 报告正文

参照以下提纲撰写，要求内容翔实、清晰，层次分明，标题突出。

### 1. 立项依据与研究内容

(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)

#### A. 结直肠癌研究的重要意义

随着全球人口增长和人口老龄化，癌症患者数量激增，已成为威胁人类生命的头号杀手。据 2014 年世界卫生组织发布的《世界癌症报告》显示，未来 20 年全球癌症患者预计将激增 57%，每年新增癌症患者数量目前约为 1400 万人，预计逐年递增至 2025 年的 1900 万人，到 2035 年将达到 2400 万人。而在我国，全国肿瘤登记中心发布的 2012 年数据显示，每年新增癌症病例约 350 万人，约 250 万人死亡。在癌症致死的统计中发现，结直肠癌(CRC, Colorectal Cancer)作为人类消化道恶性肿瘤，是致癌死亡的第二大原因。每年有 120 万新确诊的 CRC 病例，并有超过 60 万患者死于结直肠癌[1, 2]。2014 年 Jennifer A. Inra 和 Sapna Syngal 在 Dig Dis Sci 杂志上发表文章指出在过去的几十年里，小于 50 岁的年轻人群中结直肠癌发生率和死亡率都正在增高，根据预测模型，到 2030 年小于 50 岁的人群中，将会每 10 个人中有 1 名结肠癌患者，接近每 4 个人中有 1 个直肠癌患者[3]。因此，对结直肠癌发生发展机制的研究成为科学家关注的重要课题。

结直肠癌不同于其它恶性肿瘤，其致病因素和发病机制是复杂多样的。结直肠癌的发病率随着年龄增大而增加，在 55 岁以后结直肠癌的发病占 85%，发达国家的发病中位年龄为 70 岁[3]。在结直肠癌患者中男性人数多于女性，且女性患者的生存率高于男性。除了年龄和性别，还有很多危险因素值得注意，如结直肠癌家族史、炎症肠病、吸烟、过量饮酒、食用大量红色加工肉类、肥胖及糖尿病等[4]。结直肠癌的发病途径包括饮食和生活方式因素、遗传因素和体细胞突变三种方式[5, 6]。与生活方式和环境因素诱发结直肠癌的研究进展相比，在遗传因素和体细胞突变中对特定基因缺陷导致结直肠癌的研究取得重大进展。在



分子水平，基因缺陷将导致两种表型：新的或激活原癌基因的功能、抑癌基因（TSGs, tumor-suppressor genes）功能失活[5]。原癌基因突变可以是由于特定点突变、基因结构重排、染色体重排或基因异常扩增导致；抑癌基因失活可以由局部突变、基因功能完全缺失或表观修饰导致。全面开展结直肠癌发病机制的研究，对于 CRC 的诊断和治疗具有重要意义。

## B. 结直肠癌的分子机制

结直肠癌的分子发病机制是基因突变。基因突变与 CRC 的预后和治疗方案关系密切，基于基因突变开发基因靶向治疗药品用于 CRC 治疗，因此，对 CRC 分子发病机制的研究具有重要的临床意义[7, 8]。结直肠癌的发生发展是一个多基因参与调控的复杂过程，其中涉及多个癌基因的激活和抑癌基因的失活。根据 Fearon 和 Vogelstein 在 1990 年提出结直肠癌发生的分子模型理论，肿瘤发生是多步骤的，遗传学和表观遗传学的改变是直接导致结直肠癌发生的启动因素，启动正常上皮恶性转化，或是肿瘤向更具侵袭性的阶段发展。目前已有多种不同来源的结直肠癌发病的分子机制得到阐明，据此绘制的 CRC 发病分子机制遗传模式图见图 1 [5, 9, 10]。大约 3%-5% 的结直肠癌源自遗传方式，主要是由重要的抑癌基因和 DNA 修复基因表达失活以及野生型等位基因的突变所引起[11]。然而，散发性结直肠癌中 15% 以上是通过完全不同的分子发病机制发生，例如 KRAS、BRAF 等原癌基因激活突变，染色体不稳定(CIN, chromosome instability)、微卫星不稳定 (MSI-H, high-level microsatellite instability)、启动子 CpG 岛甲基化的表基因沉默 (CIMP, CpG island methylator phenotype)。此外，研究表明炎症和 microRNA 也是结直肠癌发生机制的重要途径[12, 13]。

腺瘤-癌是最常见的结直肠癌发病形式。不典型增生性腺瘤需要经过 10 年以上最终变成癌。研究发现 70% 以上的腺瘤形成都伴有 APC 基因 (adenomatous polyposis coli) 突变，预示着 APC 基因突变与结直肠癌的癌前病变关系密切 [14-17]。此外，腺瘤-癌的进展通常还伴随着 KRAS 基因的激活以及 P53 抑癌基因的表达抑制。这些特性的基因突变往往伴随着染色体数目和结构的变化，如 APC 基因突变源于 5 号染色体上的 5q21 遗传缺失，p53 基因表达受到抑制则被认为是 17 号染色体 17p13.1 的遗传缺失[18]

遗传性结直肠癌是一种非常值得进一步研究分子机制的肿瘤。从遗传角度上看，肿瘤主要是由重要的抑癌基因和 DNA 修复基因表达失活以及野生型等位基因的突变所引起。遗传性非息肉病性结肠癌（林奇综合征，估计等位基因频率 1:350 至 1:1700）和家族性腺瘤性结肠息肉病（估计等位基因频率 1:10000）是两种最常见形式，均是常染色体遗传疾病。大多数结直肠癌都发生在染色体不稳定性之后，染色体不稳定性指染色体数量不平衡或是 LOH。其次较少涉及的一个





途径是 MSI，导致 MMR 系统紊乱，最终出现微卫星不稳定性。

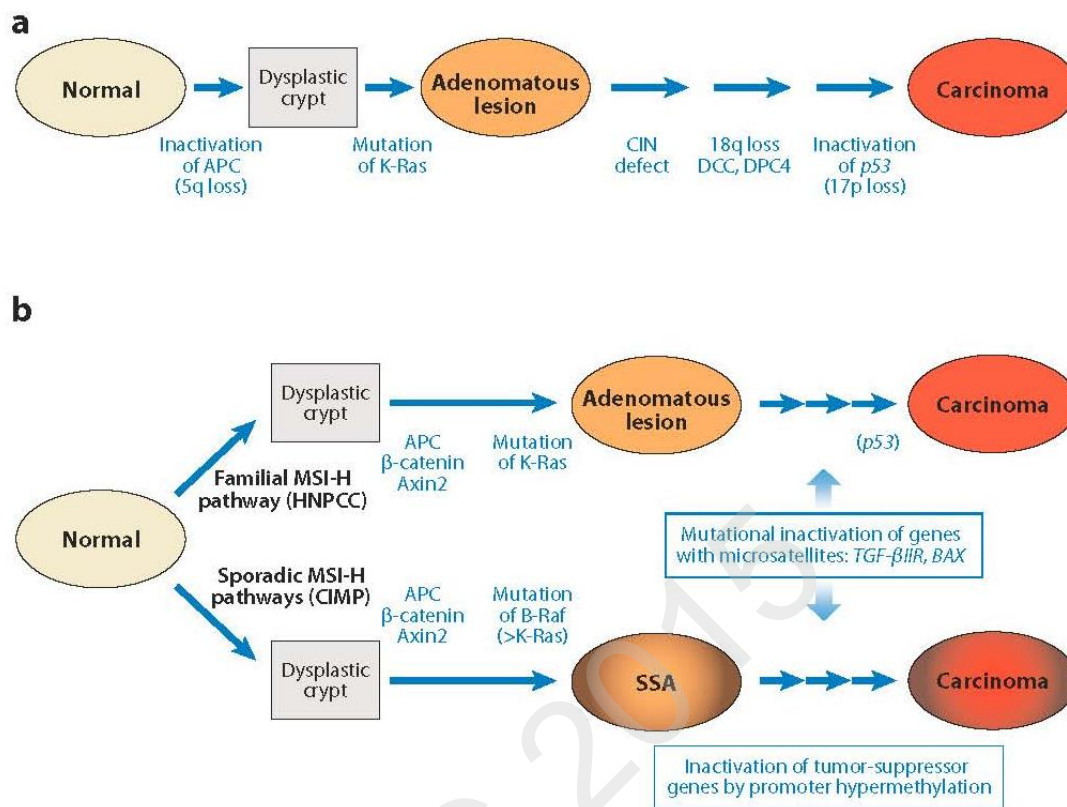


图 1 结直肠癌 (CRC) 遗传模式图 APC, adenomatous polyposis coli; CIN, chromosome instability; MSI-H, microsatellite instability..

染色体不稳定通路与抑癌基因缺失或致癌基因突变有关，微卫星不稳定通路与突变或 DNA 错配修复甲基化有关。染色体不稳定是指整条染色体的获得或缺失、染色体易位、重排等。细胞分裂周期中发生异常，从而引发大量基因变异，在 CRC 中约占 85%。病理学主要特征是：常发生左半/远端结肠，异倍体、多倍体，高分化，淋巴结阳性者更常见。微卫星不稳定通路是指微卫星序列中重复单位的获得或丢失，多由于 DNA 错配修复系统突变所致，是发生在核苷酸水平的不稳定现象，作为一种特殊表型在 CRC 中约占 15%。病理学主要特征是：常发生在右半/近端结肠，双倍体，低分化，面积大 ( $\geq 5\text{cm}$ )，N0M0 常见。发生在启动子 CpG 岛 DNA 甲基化致表基因沉默，是 CRC 一种表遗传学表型，与近端结肠、女性、低分化、MSI、BRAF 高频率突变和 tP53 低频率突变有关，CIMP-H 的 CRC 常伴有 MSI-H，是由错配修复基因 hMLH1 畸变、启动子甲基化引起。

最新的研究发现，结直肠癌组织周围细胞与癌组织之间存在联系。结直肠癌在不同患者中预后不同，近一半的患者对治疗有抵抗或者治疗期间有复发情况。Issella 教授及其同事分子从大肠癌患者收集的数据，发现许多预后不良患者有一些特定高表达的基因在基质细胞中表达[19]。他们移植人类癌细胞到小鼠检测这

种预测，并得到证实-高表达的基因的确是来自小鼠癌周围组织而非癌组织。另一项研究中，Batlle 教授和其他研究发现了相似的基因表达形式——预后不良的患者癌组织周围的细胞有一些特殊的基因高表达[20]。他们发现，肿瘤和正常细胞之间的“沟通”是由转化生长因子  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 信号通路介导的。

### C. 双重测序技术在检测基因突变中的应用

双重测序技术 (Duplex Sequencing, DS) 使全基因组范围内检测肿瘤细胞的基因突变信息成为可能，详见“研究方案及可行性分析”部分 (图 2)。该技术是由华盛顿大学的 Michael Schmitt 和 Jesse Salk 提出，并将其研究成果在 2012 年发表在美国《国家科学院院刊》(PNAS) 杂志上，该技术引起了多方的关注。[21, 22]。二代测序技术开创了基因组学的新纪元，极大的推动了个体化医疗事业的发展。二代测序技术可以一次产生数以亿计的核苷酸序列信息，可以用于可遗传的基因突变检测。然而，二代测序单碱基错误率 (0.1%-1%) 依然较高，可以检测遗传突变，却无检测法仅有部分细胞发生的基因突变。双重测序技术是在深度测序基础上，通过在接头 (Adaptor) 序列上加上随机序列标签，使 DNA 片段两端连接不同的接头，测序结果中 DNA 两条链中均出现的突变即为基因突变而不是测序错误，可以实现对百万分之一 ( $1 \times 10^{-7}$ ) 的突变率检测，其具体方法已于 2014 年发表在 Nature protocol 上[23, 24]。该技术可用于检验 Loeb 在 1974 年提出的关于肿瘤的增突变表型 (mutator phenotype) 假说，即肿瘤细胞中存在成千上万个基因突变，解释癌细胞的扩散方式和化疗抗性产生的原因[25, 26]。因此，利用双重测序技术检测结直肠癌组织中基因突变，使我们能够对结直肠癌发生发展的作用机制有更深入全面的认识，为患者提供有意义的临床信息，提高结直肠癌的治疗生存率。

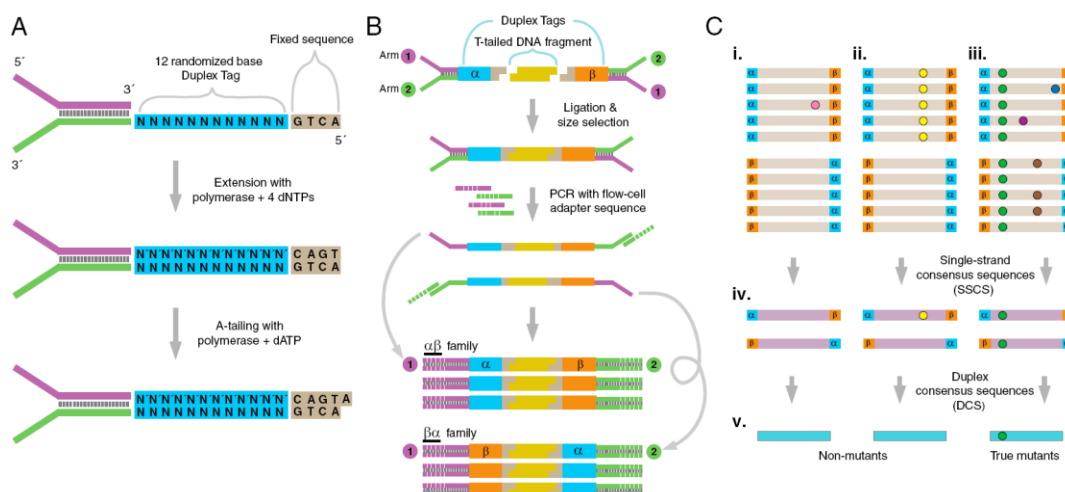


图 2 Duplex sequencing 原理图 Duplex Sequencing，即双重测序

二代度测序技术在 DNA 甲基化领域内的应用(即 BS-seq 技术，又叫



**MethylC-seq 技术)**, 结合双重测序数据, 可用于分析结直肠癌基因组内基因突变导致甲基化的位点信息。该技术能够全局性的检测整个基因组范围内 DNA 的甲基化状态, 而且精确到每一个碱基, 并且能够区分甲基化是发生在正链还是负链 DNA 上[27]。该技术用于分析结直肠癌中基因突变调控 DNA 甲基化引起的表观遗传学变化。

本实验室已经完成相应的数学算法开发、统计模型建立和计算机程序编写。这使得我们可以深度分析该技术所产生的大数据 (包括数 10 亿条 DNA 段序列片段, 原始数据占用约 100 Gigabytes 硬盘空间, 处理的中间及最终结果可达数千 GB), 挖掘里面隐藏的生物学意义。上载到 UCSC genome browser 上, 并且分析这些数据中的多种基因组特征。这些数据的产生和分析, 为本项目的开展和实施奠定了坚实的基础, 且与本申请人分子生物学和生物信息学的学术背景和本课题组的研究方向紧密相关 (详见“申请人简介”部分)。

本项目我们拟利用双重测序技术对结直肠癌组织、癌旁组织和正常组织的基因组 DNA 进行测序, 获得基因突变在不同组织中的分布特征图谱, 比较分析癌、癌旁和正常组织基因组中基因突变发生的位置、频率等特征。对结直肠癌中发生基因突变基因进行生物信息学分析, 注释其功能、KEGG pathway 分析等。结合已知的与结直肠癌相关的突变基因 APC、KRAS、BRAF 等进行验证, 验证测序数据的准确性。根据测序数据分析结果, 找到一些与结直肠癌发病密切相关的重要突变基因, 进行生化实验研究这些基因的功能及作用的信号通路, 探讨其致癌的分子机制; 并在结直肠癌细胞系中进行转基因细胞株的构建, 验证这些基因突变对诱发结直肠癌的重要作用; 结合临床资料, 分析结直肠癌患者组织中发生突变基因的种类和频度, 进一步评价这些突变基因的临床意义, 为寻找对于这些重要突变基因的靶向治疗药物提供理论依据和实验数据。

综上所述, 在全基因组水平研究基因突变导致结直肠癌的分子机制是十分必要的。我们已经掌握了最新的基于深度测序的双重测序和 BS 测序技术, 能够借助测序检测基因突变及基因表观修饰变化; 并开发了相应的数据分析算法。本项目拟获得患者结直肠癌组织(T、N、M 分期)、癌旁组织和正常组织中 DNA-seq, 结合人类基因组数据信息, 本项目将对结直肠癌发病的分子作用机制开展深入研究, 研究 CRC 患者发生基因突变的特征, 从而为结直肠癌早期诊断提供指导。这些研究, 不仅能够加深人们对结直肠癌发生发展分子机制的认识, 而且能够为结直肠癌基因靶向治疗提供大量候选基因, 也能为基于突变基因作用机制的抗肿瘤药物开发打下理论基础。



## 参考文献

- [1] Jemal, A., et al., *Cancer statistics, 2009*. CA Cancer J Clin, 2009. **59**(4): p. 225-49.
- [2] Brenner, H., M. Kloor, and C.P. Pox, *Colorectal cancer*. Lancet, 2014. **383**(9927): p. 1490-502.
- [3] Inra, J.A. and S. Syngal, *Colorectal Cancer in Young Adults*. Dig Dis Sci, 2014.
- [4] Huxley, R.R., et al., *The impact of dietary and lifestyle risk factors on risk of colorectal cancer: a quantitative overview of the epidemiological evidence*. Int J Cancer, 2009. **125**(1): p. 171-80.
- [5] Fearon, E.R., *Molecular genetics of colorectal cancer*. Annu Rev Pathol, 2011. **6**: p. 479-507.
- [6] Potter, J.D., *Colorectal cancer: molecules and populations*. J Natl Cancer Inst, 1999. **91**(11): p. 916-32.
- [7] Sadanandam, A., et al., *A colorectal cancer classification system that associates cellular phenotype and responses to therapy*. Nat Med, 2013. **19**(5): p. 619-25.
- [8] De Sousa, E.M.F., et al., *Poor-prognosis colon cancer is defined by a molecularly distinct subtype and develops from serrated precursor lesions*. Nat Med, 2013. **19**(5): p. 614-8.
- [9] Fearon, E.R. and B. Vogelstein, *A genetic model for colorectal tumorigenesis*. Cell, 1990. **61**(5): p. 759-67.
- [10] Vogelstein, B. and K.W. Kinzler, *Colorectal cancer and the intersection between basic and clinical research*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1994. **59**: p. 517-21.
- [11] Jasperson, K.W., et al., *Hereditary and familial colon cancer*. Gastroenterology, 2010. **138**(6): p. 2044-58.
- [12] Suzuki, H.I., et al., *Modulation of microRNA processing by p53*. Nature, 2009. **460**(7254): p. 529-33.
- [13] Park, J.H., et al., *Colorectal Cancer, Systemic Inflammation, and Outcome: Staging the Tumor and Staging the Host*. Ann Surg, 2015.
- [14] Jass, J.R., *Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features*. Histopathology, 2007. **50**(1): p. 113-30.
- [15] Kinzler, K.W. and B. Vogelstein, *Lessons from hereditary colorectal cancer*. Cell, 1996. **87**(2): p. 159-70.
- [16] Groden, J., et al., *Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene*. Cell, 1991. **66**(3): p. 589-600.



- [17] Aust, D.E., et al., *The APC/beta-catenin pathway in ulcerative colitis-related colorectal carcinomas: a mutational analysis*. Cancer, 2002. **94**(5): p. 1421-7.
- [18] Lengauer, C., K.W. Kinzler, and B. Vogelstein, *Genetic instability in colorectal cancers*. Nature, 1997. **386**(6625): p. 623-7.
- [19] Isella, C., et al., *Stromal contribution to the colorectal cancer transcriptome*. Nat Genet, 2015.
- [20] Batlle, E., et al., *EphB receptor activity suppresses colorectal cancer progression*. Nature, 2005. **435**(7045): p. 1126-30.
- [21] Kennedy, S.R., et al., *Ultra-sensitive sequencing reveals an age-related increase in somatic mitochondrial mutations that are inconsistent with oxidative damage*. PLoS Genet, 2013. **9**(9): p. e1003794.
- [22] Schmitt, M.W., et al., *Detection of ultra-rare mutations by next-generation sequencing*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(36): p. 14508-13.
- [23] Kennedy, S.R., et al., *Corrigendum: Detecting ultralow-frequency mutations by Duplex Sequencing*. Nat Protoc, 2014. **9**(12): p. 2903.
- [24] Kennedy, S.R., et al., *Detecting ultralow-frequency mutations by Duplex Sequencing*. Nat Protoc, 2014. **9**(11): p. 2586-606.
- [25] Loeb, L.A., K.R. Loeb, and J.P. Anderson, *Multiple mutations and cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(3): p. 776-81.
- [26] Loeb, L.A., *Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis*. Cancer Res, 1991. **51**(12): p. 3075-9.
- [27] Lister, R., et al., *Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences*. Nature, 2009. **462**(7271): p. 315-22.

## ( 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

本项目的主要研究内容是运用双重测序技术研究基因突变诱发结直肠癌的分子作用机制,筛选可用于结直肠癌靶向治疗的相关基因,为结直肠癌的早期诊断提供依据,有效提高结直肠癌的治愈率。

A. 运用双重测序技术获得结直肠癌组织中基因突变数据并进行分析



本项目首先构建用于双重测序的 DNA 文库。通过设计接头序列,添加 6 个随机碱基,将“Y”型接头与 DNA 片段连接,PCR 扩增获得测序文库。构建出高质量的可以用于双重测序的 DNA 测序文库是本项目的关键。由于双重测序是最新的测序技术,没有商品化试剂盒,所有操作需要参照文献,摸索条件,增加了测序文库构建的难度。申请人已构建了数十个双重测序文库,并经过 Agilent Bioanalyzer 芯片和荧光定量 PCR 检测,验证了 DNA 文库的高质量,能够保证本项目中测序文库的顺利构建。利用双重测序技术获得结直肠癌(T、N、M 分期)组织、癌旁组织和正常组织的基因组数据,对所产生的数据进行分析。申请人所在课题组拥有一套完整的程序软件用于深度测序数据的分析,具有丰富的经验,并已开发了用于双重测序数据的处理算法和软件程序。我们已经用该套程序初步处理了多个双重测序的基因组数据(图 5),显示了双重测序数据获得的 read 的数量、GC 含量等。

## B. 研究基因突变在表观遗传水平对结直肠癌的调控作用

构建 BS-seq 的核苷酸测序文库,需要经过重亚硫酸盐处理(将未甲基化的胞嘧啶变为尿嘧啶,而甲基化的胞嘧啶则不受影响)。采用 Illumina HiSeq2500 进行 BS-seq 测序,对所产生的数据进行分析。一个 BS-seq 的核苷酸库,则需要 3-5 个这样的通道进行测序,产生大量数据信息。使用申请人所在课题组开发的相关程序软件处理 BS-seq 数据,获得包括 read 的数量,基因组覆盖次数以及 genome browser 中的几个相关的 tracks。结合双重测序数据,分析结直肠癌中基因突变与 DNA 甲基化的关系。

## C. 研究结直肠癌发生发展过程中基因突变的变化规律

使用本课题组已开发的软件,对获得的 CRC 组织、癌旁组织和正常组织双重测序数据,比较分析基因突变在正常组织到癌组织的发展过程中的变化规律。分析基因突变发生的位点、突变方式、数量等规律。结合突变基因的功能和参与的 Pathway,探讨参与调控 CRC 发病的信号通路。不同组织中突变的基因对 CRC 发病的影响。

## D. 筛选重要致癌突变基因

根据生物信息学分析结果,筛选参与结直肠癌发病的重要基因。在细胞系(HCT116、HCT8、HT29、LS174T、LOVO、SW480、SW620)中建立基因的稳定过表达或 shRNA 敲低表达的细胞株。Western-blot 检测组织和细胞中蛋白质



表达水平。qPCR 检测组织和细胞中 mRNA 表达水平。验证这些基因在癌组织、癌旁组织和正常组织中的表达差异。

## 研究目标

本项目的研究目标是利用双重测序技术检测基因组,产生全基因组范围基因突变的数据,探讨结直肠癌发病的分子机制,找到突变基因调控 CRC 的重要信号通路,全面展示基因组内基因突变发生的图谱,为 CRC 诊断和治疗提供理论依据。具体研究目标如下:

- A. 研究结直肠癌组织中基因突变发生的数量、发生的位点、作用调控的信号通路等特征,研究基因突变在 **CRC** 发病中的分子机制;
- B. 分析结直肠组织中 **DNA** 甲基化水平和甲基化在 **DNA** 两条链上的对称性的变化,变化所发生的区域,以及这种变化是否与基因分布、基因表达、核小体定位相关;
- C. 探讨基因突变在由正常组织到结直肠癌发生发展过程中所起的作用机制;
- D. 明确重要突变基因参与调控结直肠癌发病的分子机制。

## 拟解决的关键科学问题

- A. 基因突变如何参与调控结直肠癌发病,突变基因的种类、数量、区域等具体特征,这些基因对原癌基因或抑癌基因的影响;
- B. 癌旁组织与正常组织相比,是否具有更多的基因突变发生,癌旁组织是否与癌组织中基因突变存在“沟通”的信号通路,以及从正常组织到癌组织过程中基因突变变化的规律;
- C. 结直肠癌组织中的突变基因与 **CRC** 的 **DNA** 甲基化是否存在联系,突变基因是否参与调控 **CRC** 中的 **DNA** 甲基化;
- D. 测序数据分析获得的重要突变基因参与调控结直肠癌发病的分子机制。

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

## 研究方案

- A. 提取结直肠癌组织、癌旁组织和正常组织的基因组 **DNA**。



提取液氮中冻存的结直肠癌组织（T、N、M 三种分期）、癌旁组织和正常组织的基因组 DNA，采用液氮研磨，Trizol 法裂解提取。采用琼脂糖凝胶电泳、Qubit 2.0 定量检测 DNA 质量。基因组 DNA 经过 Covaris 超声打断成 300~500 bp 片段，采用琼脂糖凝胶电泳、Qubit 2.0 定量检测 DNA 质量

## B. 构建测序文库

构建双重测序文库和 BS-seq 测序文库。双重测序为手工构建，参考已发表文献[22]中方法进行改良，合成带有 6 个随机碱基的“Y”型接头序列、连接到 Covaris 超声打断的 300~500 bp 的 DNA 片段、PCR 扩增获得测序文库；BS-seq 测序文库，采用 NEB 的 DNA 超快速文库制备试剂盒和甲基化多样本接头试剂盒，以及 SIGMA 公司的 MOD50 亚硫酸钠处理试剂盒进行构建测序文库。

## C. 高通量测定

使用 Agilent 2100 Bioanalyzer 芯片和 KAPA 公司的荧光定量文库 PCR 检测试剂盒文库质量，质量合格，在 Illumina 的高通量测序仪 MiSeq 或 HiSeq2500 上完成测序。本单位已经申请购买 MiSeq 测序仪，因此可以自行进行高通量测序，也可以根据需要通过华大基因等机构有偿服务的方式完成序列测定。

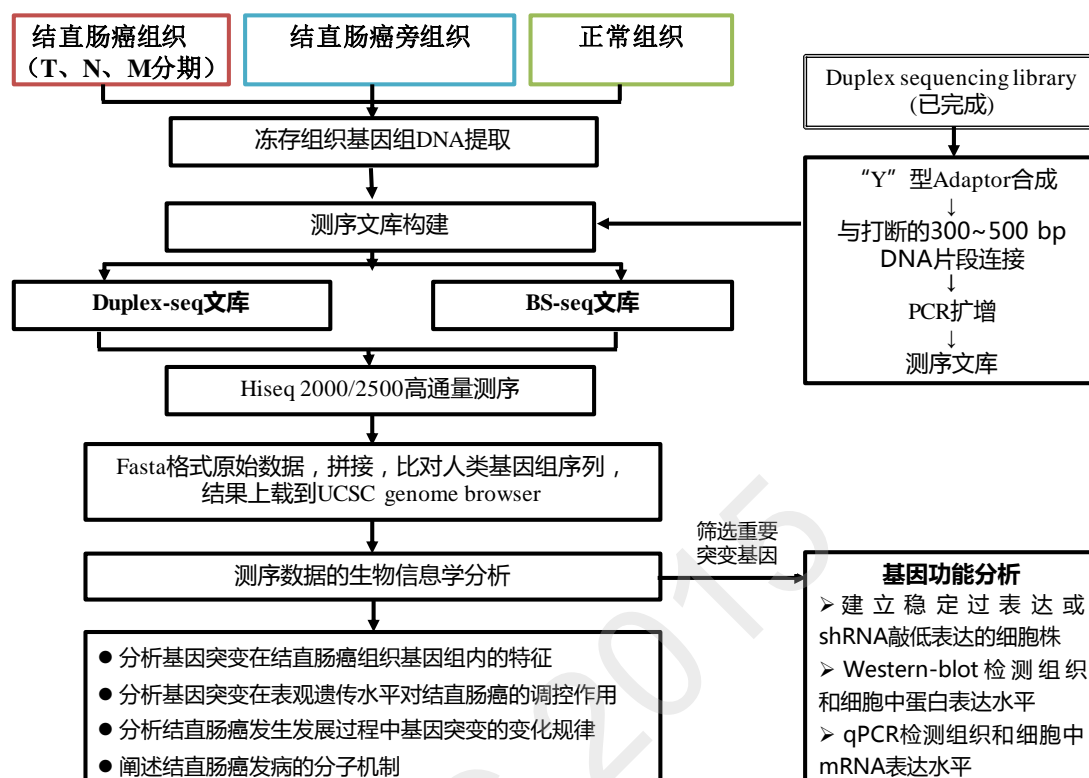
## E. 生物信息学深度分析

该部分为本项目的重点内容，组学研究最重要的部分就是数据分析。本课题组已建立一套完整的数据分析体系，并已用于不同类型测序数据分析，用于挖掘海量数据后面所隐藏的生物学意义。该数据分析体系完全适用于本项目深度测序产生的大数据分析中，分析基因突变发生的规律，基因突变对 DNA 甲基化的影响，基因突变参与调控原癌基因或抑癌基因的信号通路，筛选重要突变基因。





## 技术路线



## 可行性分析

本项目具有很高的可行性。项目不仅研究内容合理，技术手段成熟；而且申请人的研究经历和目前研究工作都与本项目密切相关；同时，申请人所属研究院为项目提供充足的人员和各种仪器设备支持。

### A. 研究方案切实合理，实验技术成熟，具有前期研究基础

本项目拟基于结肠癌组织细胞，采用目前研究基因突变最先进的双重测序技术得到相应测序数据，结合完备的生物信息学数据分析方法，在全基因组范围内回答基因突变在结直肠癌发病中的分子机制的关键问题。同时采用 BS-seq 技术，获得结直肠癌的 DNA 甲基化数据，分析结直肠癌组织中的表观遗传变化。目前本实验室已成功构建双重测序和 BS-seq 的测序文库，数据分析工作均可以正常开展。目前，已有获得采用双重测序技术构建的测序文库数据，并已对其采用本实验自己开发的算法和相关软件进行生物信息学分析（图 5）。这些前期研究的进展为本项目的后续进行奠定了坚实的基础。

### B. 申请人具有较好的研究经历

本项目是在申请人前期研究工作的基础上，结合目前从事的 DNA 甲基化的



表观遗传修饰研究工作而提出的。申请人在前期的研究工作中，通过 cDNA microarray 和 SOLEXA 测序技术研究逆境条件下转录组水平的应答及其作用机理。在研究工作中，申请人熟练掌握基因克隆、载体构建、cDNA 文库构建、Q-PCR 等分子生物学操作；显微观察、流式细胞仪使用等细胞生物学实验；制备高通量测序样本、对测序数据进行生物统计和生物信息学分析；熟练运用 SPSS, SIMCA-P<sup>+</sup>等生物统计分析软件；运用生物信息相关软件程序进行差异表达基因的 Cluster、GO enrichment、KEGG pathway 等分析。申请人在来到大连医科大学肿瘤干细胞研究院工作后，结合所在课题组的研究方向，一直从事 DNA 甲基化的表观遗传学、深度测序文库构建、数据分析方面的研究，且已在本实验室条件下成功构建不同类型核苷酸测序文库，对已有测序数据进行分析整理。这些研究背景与技能储备能够充分保证本项目的顺利进行。

### C. 实验室和研究院提供完善的硬件支持

申请人所属研究中心已购置 Miseq 等基因测序所需相关仪器，配备能够进行生物信息分析的高性能计算机网络，具有多名生物学和计算科学的科研人员，人员结构分工合理，按照项目方案开展细胞实验、基因测序和数据分析实验。研究中心隶属于肿瘤干细胞研究院，研究院包括公用仪器室、中心实验室、高技术实验室，并有基因组测序平台，与临床治疗中心共同使用动物平台。具有电镜、高效液相色谱、流式细胞仪等大小设备 699 台，其中大型进口仪器设备 86 台。这些硬件支持为本项目的顺利开展提供硬件保障。

### (4) 本项目的特色与创新之处。

本项目最主要的创新之处如下：

- A. 利用最新的双重测序技术和 BS-seq 技术进行研究，确定基因突变和 DNA 甲基化在结直肠癌中的分布图谱；
- B. 首次在基因组范围内研究基因突变参与结直肠癌发病的分子机制；
- C. 建立适合双重测序分析的数学算法、统计模型和计算方法；
- D. 筛选可用于结直肠癌靶向基因治疗的重要突变基因。

**(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



### 第一阶段 2016.1-2016.12

提取结直肠癌、癌旁和正常组织的基因组 DNA；构建相应的双重测序和 BS-seq 测序文库；在 Illumina HiSeq2500 或 Miseq 上完成高通量测序；对获得的原始数据进行质量评估。

### 第二阶段 2017.1-2017.12

运用本实验室开发的算法和相应程序软件，对高通量测序获得数据进行生物信息学分析；分析基因突变在结直肠癌组织基因组内的特征，基因突变在表观遗传水平对结直肠癌的调控作用，以及结直肠癌发生发展过程中基因突变的规律；根据分析结果，进行相关论文的撰写；筛选重要突变基因，构建转基因细胞株。

### 第三阶段 2018.1-2018.12

检测突变基因在转基因细胞株中的蛋白和 mRNA 的表达水平变化；结合生物信息学对这些基因功能的分析，研究这些基因在结直肠癌发生发展中的作用方式；综合各方面研究结果，阐述结直肠癌发病的分子机制，完成相关文章的撰写。

## 预期研究结果

- A. 分析结直肠癌基因组中的 DNA 测序数据，获得癌基因组内基因突变发生的位点、种类和数量等特征的图谱；
- B. 分析结直肠癌基因组中的 DNA 甲基化的测序数据，明确基因突变对 DNA 甲基化的影响以及 DNA 甲基化调控结直肠癌发病的机制；
- C. 分析结直肠癌、癌旁组织和正常组织双重测序的数据，阐明从正常组织到结直肠癌组织的发展过程中，基因突变的作用机制；
- D. 鉴定到一些可用于结直肠癌基因靶向治疗的重要基因；
- E. 发表 SCI 学术论文 1-2 篇，至少 1 篇影响因子 > 3；
- F. 硕士生 1-2 名。

## 学术交流：

- A. 邀请 1-2 名在肿瘤或基因组学领域著名的专家教授来院交流 1-2 次；
- B. 参加肿瘤或基因组学的国内会议 1-2 次。

## 2. 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)

### A. 申请人研究工作基础

申请人于 2006 年开始在中国科学院植物研究所从事科研工作, 一直从事分子生物学和基于二代测序技术的组学研究, 并获得发育生物学专业博士学位。前期的研究工作主要是运用基因芯片和二代测序技术的转录组学研究, 其中 microarray 相关实验数据已发表 1 篇 SCI (IF=3.75), SOLEXA 二代测序部分的研究结果在投稿中。申请人不仅具有扎实、熟练的分子生物学实验基础, 还有丰富的 cDNA microarray 和 RNA-seq 测序数据的生物信息学分析经验。申请人自 2013 年 6 月来到大连医科大学工作以来, 一直从事 DNA 甲基化的表观遗传学、不同种类深度测序文库构建、数据分析方面的研究工作, 且已在本实验室条件下成功构建不同类型核苷酸测序文库。这些研究工作都为本项目的顺利开展提供保障。

### B. 与本项目相关的研究工作

a) 本实验室已提取液氮冻存的癌组织和癌旁组织的基因组 DNA (图 3 A), 根据实验室条件成功完善双重测序文库构建的方法 (图 3 B), 并且已成功添加测序 tag 的多个 DNA 测序文库。

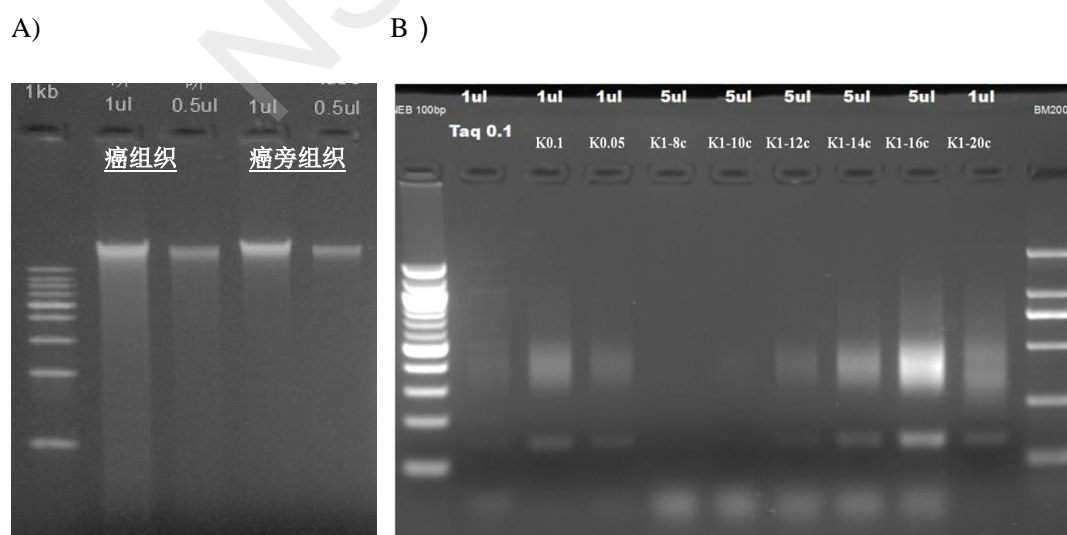


图 3 基因组 DNA A)和双重测序文库 B)琼脂糖凝胶电泳图 A)是癌和癌旁组织提取的基因组 DNA; B)是不同 PCR 条件 (包括酶、模板量、循环数等) 下获得的 300~500 bp 测序文库。NEB 100bp DNA Ladder: 1517、1200、1000、900、800、700、600、500、400、300、200、100 bp; BM2000 DNA Ladder: 2000、1000、750、500、250、100 bp。



b) 本实验室已成功构建 11 个双重测序 DNA 文库，质量检测合格后，通过 HiSeq2500 进行高通测序，获得初步的数据结果。高通量测序获得的 Raw Data 经过过滤，去除 Adaptor 序列和低质量 Reads 后，获得的 Reads 统计结果见图 4 A，以 Index 3 样品为例，统计绘图显示沿 Reads 读取的碱基百分比（图 4 B）和质量分布（图 4 C）情况。

A)

Sample Name	Clean Reads	Clean bases	Read length (bp)	Q20(%)	GC(%)
Index10	19,445,506	1,944,550,600	100	93.53%	49.43%
Index11	9,352,396	935,239,600	100	94.00%	49.56%
Index12	18,492,350	1,849,235,000	100	94.31%	49.50%
Index2	46,202,304	4,620,230,400	100	94.19%	49.48%
Index3	17,028,532	1,702,853,200	100	94.13%	49.26%
Index4	30,765,104	3,076,510,400	100	94.29%	49.50%
Index5	20,012,808	2,001,280,800	100	93.80%	49.51%
Index6	14,263,004	1,426,300,400	100	93.27%	49.58%
Index7	20,613,984	2,061,398,400	100	94.74%	49.48%
Index8	27,145,938	2,714,593,800	100	94.14%	49.27%
Index9	24,958,858	2,495,885,800	100	94.45%	49.31%

B)

C)

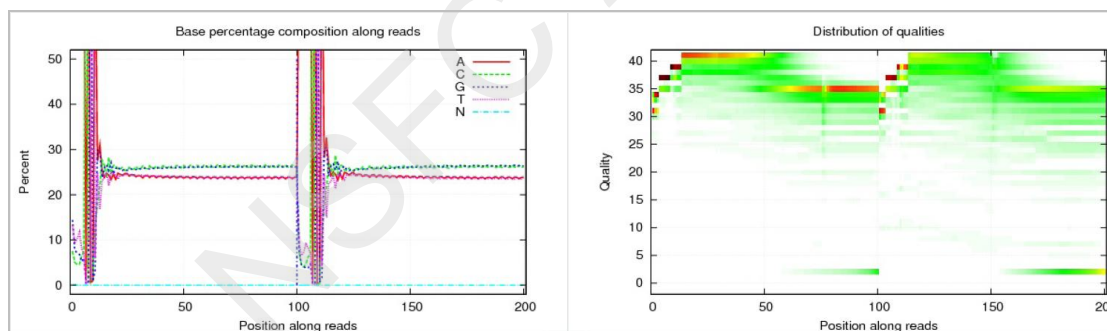


图 4 11 个 DNA 文库的测序数据统计结果 A)11 个文库获得数据情况，包括 Reads 数、长度、Q20 值和 GC 含量；以 Index 3 样品为例，沿 Reads 读取的碱基百分比 B)和质量分布 C)情况

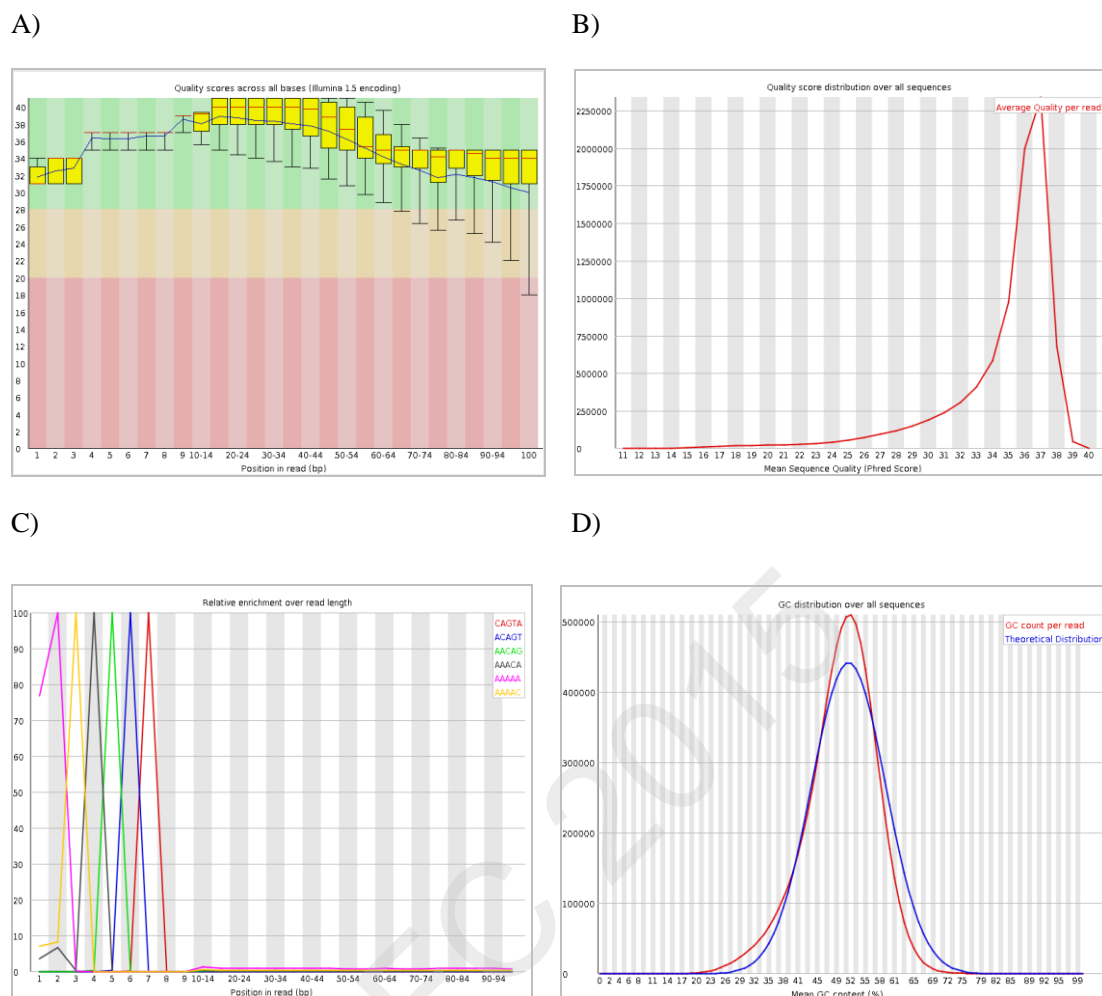


图 5 测序数据采用本实验室开发程序初步分析结果图

(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开放实验室等研究基地的计划与落实情况)

项目开展所需的实验条件已基本完全具备。申请人所在的基因组及个体化医疗中心提供项目所需的基因组测序和大数据分析的平台。中心目前已有深度测序相关仪器包括 Illumina 公司的 Miseq 测序仪 1 台、生物样本处理系统(Covaris S220)1 台、Agilent 公司的 Bioanalyzer1 台、Life Technology 的 StepOnePlus 荧光定量 PCR 仪 1 台、Biorad 公司的 GelDoc EZ 凝胶成像仪 1 台、高性能计算机 4 台和高性能服务器 1 台。同时, 配备有大型计算机、服务器以及高性能计算机集群, 用于分析深度测序所产生的海量数据。这些仪器设备为进行基于深度测序技术的各项测序工作, 如 DNA-seq、RNA-seq、microRNA-seq、ChIP-seq、Mnase-seq、BS-seq 等, 进行肿瘤基因组学, 遗传学, 及表观遗传学的研究提供了良好的仪



器平台和实验条件，确保本项目的顺利完成。

本实验室及基因组中心有多名生物学科科研人员。这些人员具有良好的操作能力和较高的理论水平，已经掌握了多项实验技术，如测序文库构建、细胞培养、细胞增殖与凋亡的测定、免疫印迹法、荧光定量 qRT-PCR、免疫组化、流式细胞术和基因芯片等。另外，本实验室和基因组中心还有多名生物信息学及计算机科学科研人员。这些人员有多年在 linux 环境下进行程序编写及数据处理的经验。对多种生物信息学程序，如 bowtie, BWA, SOAP, RUM, sam tools, bed tools, PiCard, UCSC genome browser 及相关的各种工具，都非常熟悉。

申请人所在的实验室隶属于大连医科大学肿瘤干细胞研究院。研究院包括公用仪器室、中心实验室、高技术实验室，并有基因组测序平台，与临床治疗中心共同使用动物平台。科研平台依托于辽宁省科技大平台、辽宁省肿瘤生物学重点实验室、大连医科大学肿瘤干细胞研究院和辽宁省 SPF 实验动物中心。建筑面积达到 3000 平方米。现有仪器设备包括活细胞工作站、高通量基因分析系统、高速双转盘共聚焦活细胞工作站并全内反射系统、激光共聚焦显微镜、流式细胞术系统（分析系统、分选系统）、透射电镜、高效液相色谱、气相色谱、液质联用仪（离子阱系统、四级杆系统）、膜片钳系统、病理分析系统、高通量基因分析系统、显微图像定量分析系统、多功能酶标仪、冰冻切片机、荧光实时定量 PCR、凝胶成像系统、超速离心机、高速离心机、发射光谱仪(ICP)及原子吸收分光光度计等大小设备 699 台。所有部门实行仪器共享，技术共享，实验动物共享，为本项目的顺利实施提供各种仪器设备、水电、燃料等条件，保证支持项目所有研究工作顺利完成。

**(3) 承担科研项目情况 ( 申请人正在承担或参加科研项目的情况，包括国家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 )**

国家自然科学基金面上项目，81472637、DNMT1 通过与 RNA 聚合酶 pol II 相互作用而导致抑癌基因启动子区域异常甲基化的机制研究、2015/01-2018/12、72 万元、参与构建测序文库和细胞培养工作

**(4) 完成国家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)

无

### 3. 资金预算说明

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。

项目拟申请经费 30 万元,没有其他经费来源。

(一) 直接费用: 共计 **25.5 万元**。

#### 1、设备费: 3 万元

设备购置费预算 3 万元,本项目研究工作基本可以在现有实验设备和技术平台基础上完成,仅需添加少量小型仪器设备,为实验提供便利,提高项目研究工作的效率。计划购置移液器、磁性分离器等 5 万元以下小型仪器设备。

设备试制费: 无。

设备改造与租赁费: 无。

#### 2、材料费: 6.5 万元

材料费购置费预算 6.5 万元,本项目研究涉及生物化学、遗传学、基因组学等多个领域,所需试剂和耗材品种较多。这部分经费主要用于测序文库构建、生物化学实验所需常规试剂和耗材的购置。

1) 测序文库构建相关试剂盒,是本项目的重要研究内容所必须,预计需要 2.8 万元,购买如下产品:

NEB 公司的 DNA 超快速文库制备试剂盒 (E7370S) 1 个, 8349 元/个;





NEB 公司的多样本接头引物试剂盒 (E7335S) 2 个, 1589 元/个;

NEB 公司的甲基化接头引物试剂盒 (E7535S) 1 个, 1749 元/个

KAPA 公司的荧光定量 PCR 文库质量检测试剂盒 2 个, 5600 元/个

2) 生化实验所需试剂和耗材, 也是本项目的重要研究内容所必须, 预计需要 3.2 万元购买如下产品:

NEB 公司的 klenow exo- DNA 聚合酶 I (M0212S) 6 支, 569 元/支 (200 Units);

NEB 公司的 dNTP 套装 (N0446S) 2 支, 2109 元/支;

NEB 公司的 DNA Ladder 不同片段大小, 共 10 支, 259 元/支;

Qiagen 公司的基因组 DNA 提取试剂盒 (51304) 2 个, 2010 元/个;

KAPA 公司的 PCR 高保真酶 3 支, 1800 元/支;

此外, 还需要购买 T4 连接酶、琼脂糖、酒精、冰醋酸等生化实验常用酶和试剂, 离心管、枪头、研钵等耗材。

3) 细胞实验所需试剂和耗材, 预计需要 0.5 万元

细胞培养基、血清、培养皿等

### 3、测试化验加工费: 12 万元

主要用于基因组 DNA 的 DNA-seq、RNA-seq 和 BS-seq 等深度测序费用及测序产生大数据的计算、分析和存储费用。本项目主要是基于高通量测序技术进行研究, 因此 40% 比例的经费都用于深度测序和测序数据分析的研究工作。预计需要支付 12 万元如下费用:

DNA-seq 双端测序, 每个 lane 为 1.5 万元, 需要 4 个 lane, 共计 6 万元;

BS-seq 双端测序, 每个 lane 为 1.5 万元, 需要 2 个 lane, 共计 3 万元;

文库检测测序: 每个 lane 为 1.5 万元, 需要 1 个 lane, 共计 1.5 万元

序列合成、数据分析、存储费用: 1.5 万元



#### 4、燃料动力费：0.3万元

主要用于支付本项目研究所需的生化实验室、测序实验室、计算机分析室等所消耗的水、电资源费用。预计需要0.3万元，

水4元/吨，300吨/3年；电0.5元/度，3000度/3年

#### 5、差旅费：0.5 万元

预算0.5万元，用于支付项目研究过程中开展科学实验、业务调研、学术交流等所发生的外埠差旅费、市内交通费用等。

#### 6、会议费：无

#### 7、国际合作与交流费：无

#### 8、出版/文献/信息传播/知识产权事务费：1.5 万元

主要用于项目研究成果论文发表的版面费、文献检索费、研究资料及论文复印打印费、专业书籍和软件购买等费用。

#### 9、劳务费：1.7万元

用于支付直接参与本项目硕士研究生和临时聘用人员的劳务费用。每年参加项目研究的硕士生2人，根据项目分工1人每年工作6个月，另外1人每年工作4个月，平均每月500元劳务费，3年合计1.5万元；临时聘用人员3年预算2000元。

#### 10、专家咨询费：无

#### 11、其他支出：无

(二) 间接费用：共计 4.5 万元。

#### 4. 其他需要说明的问题

无



## 张霞 简历

大连医科大学，肿瘤干细胞研究院，讲师

### 教育经历（从大学本科开始，按时间倒排序）：

2006/9 - 2013/1，中国科学院植物研究所，发育生物学，博士，导师：王台

2001/9 - 2005/7，内蒙古大学，生物学基地，学士

### 工作经历（科研与学术工作经历，按时间倒排序）：

2013/6 - 至今，大连医科大学，肿瘤干细胞研究院，讲师

### 曾使用证件信息（限3个）

身份证，152122198311276624

### 主持或参加科研项目及人才计划项目情况（按时间倒排序）：

项目类别、批准号、名称、研究起止年月、获资助金额、项目状态（已结题或在研等）、主持或参加。

1、国家自然科学基金面上项目，81472637、DNMT1通过与RNA聚合酶pol II相互作用而导致抑癌基因启动子区域异常甲基化的机制研究、2015/01-2018/12、72万元、在研、参与。



## 吕德康 简历

大连医科大学，肿瘤干细胞研究院，讲师

### 教育经历（从大学本科开始，按时间倒排序）：

2006/9 - 2011/12，东北农业大学，植物学，博士，导师：朱延明

2002/9 - 2006/6，山东农业大学，生物技术，学士；

2002/9 - 2006/6，山东农业大学，计算机科学与技术，学士；

### 工作经历（科研与学术工作经历，按时间倒排序）：

2013/11 - 至今，大连医科大学，肿瘤干细胞研究院，讲师

2012/05 - 2013/09，中科院生化细胞所，生物学博士后流动站，博士后

### 曾使用证件信息（限 3 个）

无

### 主持或参加科研项目及人才计划项目情况（按时间倒排序）：

项目类别、批准号、名称、研究起止年月、获资助金额、项目状态（已结题或在研等）、主持或参加。

1、国家自然科学基金面上项目、81472637、DNMT1 通过与 RNA 聚合酶 polIII 相互作用而导致抑癌基因启动子区域异常甲基化的机制研究、2015/01-2018/12、72 万元、在研、参加。



## 张宇 简历

大连医科大学，肿瘤干细胞研究院，工程师

### 教育经历（从大学本科开始，按时间倒排序）：

2006/9 – 2009/4，哈尔滨理工大学，计算机应用技术，硕士，导师：郝忠孝

2002/9 – 2006/7，鲁东大学，信息与计算科学，学士

### 工作经历（科研与学术工作经历，按时间倒排序）：

2014/10 – 至今，大连医科大学，肿瘤干细胞研究院，工程师

2009/7 – 2014/10, 东软集团(大连)有限公司，软件工程师

### 曾使用证件信息（限 3 个）

无

### 主持或参加科研项目及人才计划项目情况（按时间倒排序）：

无



## 近5年（2010年1月1日以后）代表性研究成果列表

- 1、 Zhang, Xia<sup>(#)</sup>, Wei, Liqin, Wang, Zizhang, Wang, Tai, Physiological and molecular features of *Puccinellia tenuiflora* tolerating salt and alkaline-salt stress., *Journal of Integrative Plant Biology*, 2013, 55 (3) : 262-276. SCI 期刊论文

NSFC 2015



附件信息

序号	附件名称	备注	附件类型
1	伦理证明		其他

NSFC 2015



## 签字和盖章页

申请人： 张霞

依托单位： 大连医科大学

项目名称： 基于双重测序技术研究基因突变在结直肠癌发生发展中的作用机制

资助类别： 青年科学基金项目

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	证件号码	每年工作时间（月）	签字
1	吕德康	大连医科大学	372526198311230034	3	
2	张宇	大连医科大学	370321198302161829	6	
3	张剑	大连医科大学	350823199106280514	4	
4	庄艳	大连医科大学	37131219900428554X	6	
5					
6					
7					
8					
9					

### 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

日期：

合作研究单位公章1

日期：

合作研究单位公章2

日期：