



申请代码	H1603
受理部门	
收件日期	
受理编号	8140110386



国家自然科学基金 申 请 书

(2014 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：	hMMP通过提高5hmC水平抑制肺癌细胞致瘤潜能的机制研究		
申 请 人：	吕德康	电 话：	0411-86118636
依托单位：	大连医科大学		
通讯地址：	辽宁大连旅顺口区西段9号大连医科大学		
邮政编码：	116044	单位电话：	0411-86110146
电子邮箱：	dekanglv@126.com		
申报日期：	2014年2月27日		

国家自然科学基金委员会



基本信息

申请人信息	姓名	吕德康	性别	男	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		dekanglv@126.com		
	传真	0411-86118952		国别或地区		中国		
	个人通讯地址	辽宁大连旅顺口区西段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, 表观遗传学, DNA羟甲基化, DNA甲基转移酶, 5mC 羟化酶						
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	hMMP通过提高5hmC水平抑制肺癌细胞致瘤潜能的机制研究						
	英文名称	Mechanism underlying inhibition of hMMP on tumorigenic potential of lung cancer cells by increasing 5hmC level						
	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	2015年01月 -- 2017年12月				研究方向: DNA修饰(如甲基化)与肿瘤发生		
	申请经费	30.0000万元						
中文关键词		肺癌 ; DNA 羟甲基化 ; 羟甲基胞嘧啶 ; 5hmC维持蛋白 ; 致瘤潜能						
英文关键词		Lung cancer ; DNA hydroxymethylation ; 5hmC ; 5hmC maintenance protein ; Tumorigenic potential						



中文摘要	<p>低5hmC水平是一种普遍的肿瘤基因组特征，对肿瘤发生发展至关重要。提高5hmC水平为肿瘤治疗提供了新思路，发现调控5hmC维持的蛋白尤为重要。肺癌中5hmC降低了5倍，而5hmC来源5mC的含量和催化蛋白TETs的表达量均未发生明显变化，导致5hmC水平显著下降的机制尚不清楚。前期工作表明，肺癌中TETs基因的突变率也很低，不能解释5hmC为何下调。我们推测，在DNA复制中hMMP能识别DNA母板5hmC信号，促进DNMTs/TETs的招募完成新链C的甲基化和氧化过程，hMMP的沉默或失活是导致肺癌中低5hmC水平的重要原因。本项目拟通过蛋白组学方法鉴定hMMP；研究其对5hmC模式维持的调控机制；分析hMMP抑制肺癌细胞致瘤潜力的作用；最后通过深度测序技术研究hMMP抑制肺癌的分子机制。本项目将推动肺癌中5hmC的调控机制研究进程，同时为肺癌的发病机制和治疗靶点提供新的依据。</p>
英文摘要	<p>Loss of 5-hydroxymethylcytosine is an epigenetic hallmark of cancer, which is important for tumor progression. Improving 5hmC level provides a new approach for cancer treatment. It's particularly important to identify proteins regulating maintenance of 5hmC. In lung cancers, levels of 5hmC were depleted substantially with up to 5-fold reduction compared with normal lung tissues, while there's no substantial reduction of 5mC and TETs expression. The basic molecular mechanism underlying loss of 5hmC is unclear. In our previous work, we found the mutation rates of TETs were too low to explain the reduction of 5hmC level. We hypothesize that during DNA replication, some 5hmC/C or 5hmC/5mC binding proteins named hMMPs, improve the recruitment of DNMTs/TETs to complete the methylation and oxidation of cytosine on the newly synthesized chain, and the ectopic expression or inactivation of hMMPs causes depletion of 5hmC in lung cancers. In this project, we will identify hMMPs with a LC-MS/MS based quantitative method, investigate how hMMPs regulate recruitment of DNMTs/TETs during DNA replication and inhibit tumorigenic potential of lung cancer by deep-sequencing technology. The study will facilitate the research of 5hmC regulation in lung cancers and provide new insights for tumor development and drug target.</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	张霞	1983-11-27	女	讲师	博士	大连医科大学	13390063783	zhangxia864@dlmedu.edu.cn	测序文库构建及数据分析	3
2	侯率	1986-11-11	男	助理实验师	硕士	大连医科大学	13478570151	houshuai009@126.com	hMMP蛋白鉴定	3
3	贾崇富	1978-06-30	男	博士生	硕士	大连医科大学	15541191881	wzx1128@163.com	细胞增殖、周期及凋亡实验	6
4	罗茜	1987-12-16	女	硕士生	学士	大连医科大学	13478991026	289548313@qq.com	细胞培养和载体构建	6
5	王向茹	1987-11-20	女	硕士生	学士	大连医科大学	18018923577	756214386@qq.com	细胞转染和筛选	6

总人数	高级	中级	初级	博士后	博士生	硕士生
6		2	1		1	2



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	24.0000	
1. 科研业务费	8.7500	
(1) 测试/计算/分析费	4.9500	LC-MS/MS分析费3.6万元; HPLC分析费1.0万元; Sanger测序费0.35万元
(2) 能源/动力费	0.3000	
(3) 会议费/差旅费	2.5000	参加国内学术会议 1次, 国际学术会议 1次
(4) 出版物/文献/信息传播费	1.0000	
(5) 其他	0	
2. 实验材料费	14.3500	
(1) 原材料/试剂/药品购置费	14.3500	用于购买各种试剂盒, 试剂及耗材
(2) 其他	0	
3. 仪器设备费	0.9000	
(1) 购置	0.9000	移液器0.18万元/支, 5支累计0.9万元
(2) 试制	0	
4. 实验室改装费	0	
5. 协作费	0	
二. 国际合作与交流费	0	
1. 项目组成员出国合作交流	0	
2. 境外专家来华合作交流	0	
三. 劳务费	4.5000	直接参加项目研究的研究生、博士后人员的劳务费用
四. 管理费	1.5000	不得超过申请经费的5%
合计	30.0000	
与本项目相关的其他经费来源	国家其他计划资助经费	0
	其他经费资助(含部门匹配)	0
	其他经费来源合计	0



报告正文

1. 申请人简历

吕德康

大连医科大学，肿瘤干细胞研究院，讲师

受教育经历

2008/09 - 2011/12, 东北农业大学，生命科学学院，博士

2006/09 - 2009/06, 东北农业大学，生命科学学院，硕士

2002/09 - 2006/06, 山东农业大学，生命科学学院，学士

研究工作经历

2013/11 - 现在，大连医科大学，肿瘤干细胞研究院，讲师

2012/05 - 2013/10, 中科院上海生科院生化细胞所，分子生物学国家重点实验室，博士后

2. 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)

肺癌已成为中国第一癌症死因,其发病率和死亡率迅速上升。2013年,中国肺癌发病年增长率超过25%,越来越严重的大气污染(例如雾霾)已成为中国肺癌高发的重要因素。肺癌的五年生存率低于15%,目前仍以化放疗和外科治疗为主,完全不能满足治疗要求,寻找更理想的治疗方法提高肺癌治疗效果已成为医学研究的重要任务。因此,进一步明确肺癌发生分子和遗传机制,具有重要理论和现实意义。

1) DNA 甲基化及主动去甲基化机制

DNA 不仅携带遗传编码信息,还通过胞嘧啶(cytosine, C)的修饰携带表观遗传信息[1, 2]。甲基化胞嘧啶(5-methylcytosine, 5mC)是通过在第五位碳原子上添加一个甲基产生的,在植物、动物和真菌中高度保守[3]。在哺乳动物体细胞中,约1%的DNA碱基受到甲基化,5mC主要发生在CpG上,60%–80%



的 CpG 发生了甲基化。DNA 甲基化模式的建立需要两个主要的 *de novo* DNA 甲基转移酶 (DNA methyltransferase, DNMT) DNMT3A 和 DNMT3B[4]; 在细胞分裂过程中, DNMT1 通过其增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 结合结构域绑定到复制叉上, UHRF1 (NP95) 识别半甲基化 DNA 双链并促使 DNMT1 将新合成链上的 C 甲基化[5-7]。DNA 甲基化对于基因组稳定、基因表达、X 染色体沉默、遗传印记、生长发育等过程至关重要[8]。

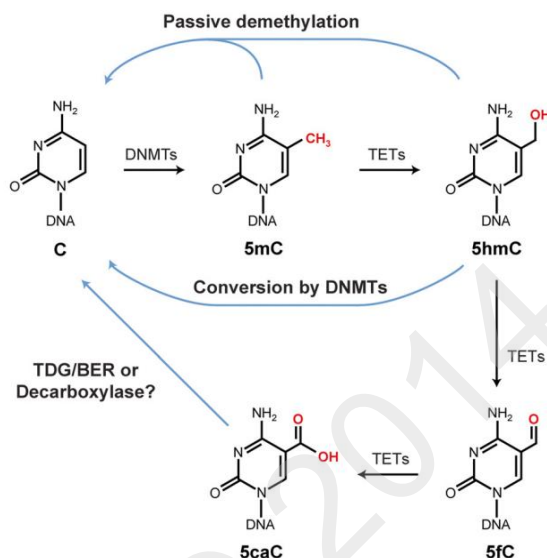


图 1 DNA 甲基化及主动去甲基化机制

2009 年 Kriaucionis 和 Tahiliani 等人证实小鼠的 Purkinje 细胞存在 5mC 的氧化产物-羟甲基胞嘧啶 (5-hydroxymethylcytosine, 5hmC), 如图 1 所示, 5hmC 是由 TET 双加氧酶 (ten-eleven translocation, TET) 催化产生的[9, 10], TETs 还能将 5hmC 进一步氧化成 5-醛基胞嘧啶 (5-formylcytosine, 5fC) 和 5-羧基胞嘧啶 (5-carboxycytosine, 5caC), 5fC 和 5caC 能够作为胸腺嘧啶糖基化酶 (thymine-DNA Glycosylase, TDG) 的底物而完成脱甲基过程[11, 12]。

2) 5hmC 是一种重要的表观遗传标记

研究表明 5hmC 不仅仅是 5mC 氧化过程的中间产物, 同 5mC 一样是重要的表观遗传修饰, 在基因转录、生长发育和疾病发生过程中发挥着重要调控作用。

5hmC 广泛存在于各种组织和细胞内[13-16], 不同组织或细胞中 5hmC 含量有显著差异。在 HeLa 和 HEK293 细胞中 5hmC 约占总核苷酸的 0.001%。在小鼠中, 神经系统中 5hmC 比率最高 (0.3-0.7%), 在肺、肾、膀胱、骨骼肌和心脏中的含量为 0.15-0.17%。肝、脾与内分泌组织中含量最低(0.03 - 0.06%)。在小鼠脑发育过程中 5hmC 的含量是逐渐升高的, 胎脑细胞中 5hmC 占 0.20%, 而在成熟脑细胞中增加到 0.87%[17]。在 ES 细胞分化过程中 5hmC 的含量也是动态变化的, ES 细胞中 5hmC 的含量为 0.3%, 随着分化的进行先减少后升高[16]。



与之对应, Tet1 与 Tet2 在小鼠 ES 细胞中高表达, 分化开始后迅速减少, 随后 Tet2 的表达回升, 在小鼠 ES 细胞中 Tet3 表达量很低, 之后逐渐上升[18, 19]。

在不同的组织或细胞里 5hmC 的基因组定位有很大的差异[17, 20], 5hmC 定位于活跃表达基因中, 对基因转录和细胞的分化非常重要。不同发育阶段脑细胞中 5hmC 定位在不同的基因中, 这些基因对于神经细胞的发育及相关疾病的发生至关重要[17, 20, 21]。在 ES 细胞里, 5hmC 富集在一些特异表达基因的启动子和增强子上[22-24], 这些基因在 ES 细胞自我更新和分化过程中发挥着重要作用。敲除 Tet1 和 Tet2 会使得多能性维持基因 (Esrrb、Prdm14、Dppa3、Klf2、Tcl1、Zfp42 等) 启动子中 5hmC 水平降低而 5mC 含量增加, 下调它们的表达[25]; 与此对应, 体细胞中过表达 TET1 使得 OCT4 去甲基化并启动表达, 能够代替 OCT4 开启体细胞重编程过程[26]。在 ES 细胞中敲除 Tet1 导致定向分化蛋白的异位表达, 滋养层干细胞决定因子 Elf5、滋养外胚层标记基因 Cdx2、Eomes 和 Hand1 上调表达, 而神经外胚层标记基因 Pax6、Neurod1 以及 Nodal 蛋白抑制因子 Lefty1 和 Lefty1 表达量下调。这样的 ES 细胞会产生出血性畸胎瘤, 表现为内胚层细胞增加, 神经外胚层减少并出现滋养层巨型细胞[18]。

很多重要蛋白能够识别 5hmC 信号[27-30], 这些蛋白在发育、DNA 复制及 DNA 损伤修复等过程中起着重要的作用。在脑细胞中富集的 MeCP2 是一种主要的 5hmC 结合蛋白, 导致 Rett 综合症的 MeCP2 R133C 突变能够显著降低其与 5hmC 的结合能力[21]。核小体重构蛋白复合体 NURD 中 Mbd3 能够识别 5hmC, 调控 5hmC 富集区域的基因表达, 敲除 Mbd3 和 Brg1 会引起体内 5hmC 的水平降低并导致发育缺陷[28]。最近, 德国和英国的两个课题组利用基于质谱的定量蛋白质学方法发现了大量 5hmC 修饰识别蛋白[29, 30], 功能富集分析显示这些蛋白主要参与 DNA 复制及损伤修复。有些蛋白如 WDR76、THY28 是广泛表达的, 还有很多是组织特异的, 如 UHRF2 和 THAP11 分别是神经元前体细胞和成熟脑细胞特异蛋白, 说明在不同细胞中 5hmC 能够通过结合特异蛋白来行使特异细胞功能。

3) 5hmC 模式在细胞更新过程中是如何稳定维持的?

在 DNA 复制过程中, 5mC 的维持主要是通过 UHRF1/DNMT1 识别 DNA 半甲基化 (Hemi-methylation) 的 5mC/C 位点并直接将新合成的 C 进行甲基化来完成的。与 5mC 模式维持不同的是, 在 5hmC 模式保持中, 新合成的 C 要通过甲基化和氧化两步才能产生 5hmC。这个过程又是如何进行的? 有趣的是, UHRF1 不仅能够识别 5mC/C 位点, 也能够通过其 SRA 结构域结合 5hmC/C 位点, 结合 5hmC/C 位点的活性与 5mC/C 是相似的[27]。Hashimoto 等的研究表明 UHRF1 识别 5hmC/C 位点的活力有限, DNMT1 催化 5hmC/C 位点中 C 甲基化



的活性也远低于催化 5mC/C 位点的活性，而 DNMT3A 和 DNMT3B 却具有催化半甲基化的 5hmC/C 位点中 C 甲基化的能力[31]。因此，在细胞更新中 DNA 母板 5hmC 信号如何识别，DNMTs 和 TETs 招募到 5hmC/C 位点的机制尚不清楚。我们推测，在 DNA 复制中存在识别 DNA 母板 5hmC 信号的蛋白（5hmC maintenance protein, hMMP），能够调控 DNMTs 或 TETs 的招募完成新链 C 的甲基化和氧化过程。

4) 5hmC 与肿瘤关系密切

低 5hmC 是一种重要的癌症特征[32]，肺癌、脑癌、乳腺癌、肝癌、肾癌、前列腺癌、直肠癌、子宫癌、黑色素瘤中 5hmC 含量明显低于周围正常组织[33]。在肺癌细胞中 5hmC 的量减少了 5 倍（图 2A），在脑癌中 5hmC 减少了近 30 倍。因此，5hmC 能够作为新的生物标记用于癌症诊断。

在小鼠肿瘤细胞模型中证实，癌症发生过程伴随着 5hmC 含量的降低[34]，在黑色素瘤中过量表达 Tet2 能够提高 5hmC 水平，抑制肿瘤细胞的发展[35]。提高 5hmC 水平为肿瘤治疗提供了新思路。因此，鉴定出导致肿瘤中 5hmC 水平降低的因素非常重要。肿瘤 5hmC 含量降低的原因主要有三个，TETs 表达量下降，TETs 基因突变或者 5hmC 的来源 5mC 含量降低。在乳腺癌、肝癌、黑色素瘤中 TETs 表达量下降是导致 5hmC 减少的原因[34]。在急性髓系白血病患者中 Tet2 突变非常普遍，敲除 Tet2 的氧化活性会促进骨髓瘤发生[36]。然而，肺癌、脑癌中 TETs 表达量和 5mC 的含量均无明显变化（图 2B）[32]。

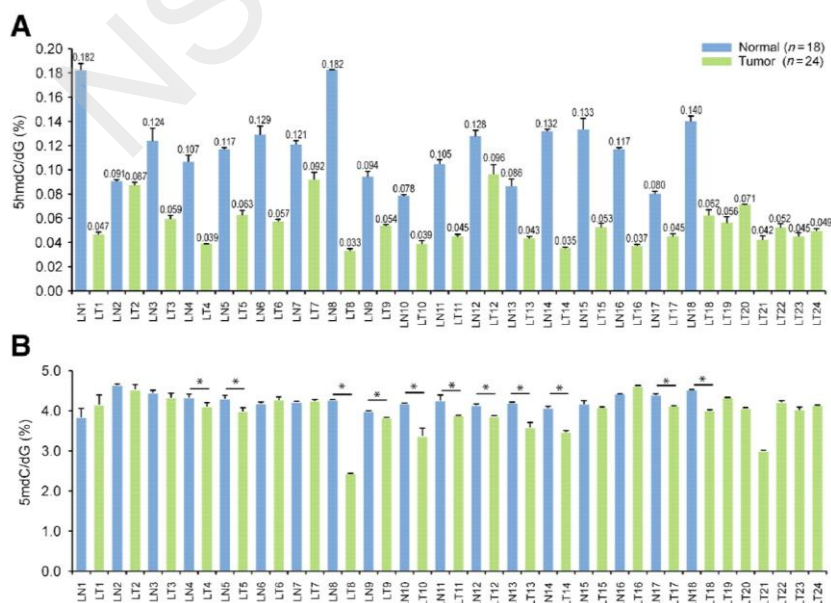


图 2 正常肺组织与肺癌细胞中 5hmC (A) 和 5mC (B) 的定量比较

LN 表示正常肺组织，LT 表示肺癌，阿拉伯数字代表不同肺癌患者。引自 Seung-Gi Jin, Cancer Res 2011, 71:7360-7365



我们的前期工作发现：的确，在有些癌症如恶性淋巴瘤、前列腺癌、甲状腺癌中，TETs 基因的突变率很高，特别是 Tet2，在甲状腺癌样本中突变率高达 20%。然而，在 267 个脑癌和 178 个肺癌样本中，三个 TETs 基因的突变率的总和分别是 2.24% 和 13.48%。TETs 基因突变不能解释脑癌和肺癌中 5hmC 水平的显著降低（图 6）。因此，存在其他导致 5hmC 水平下降的因素。hMMP 的沉默或失活很可能是导致肺癌中低 5hmC 水平的重要原因。

本项目拟通过蛋白组学方法鉴定 hMMP；研究其对 5hmC 模式维持的调控机制；分析 hMMP 抑制肺癌细胞致瘤潜力的作用；最后通过深度测序技术探讨 hMMP 抑制肺癌的分子机制。本项目将推动肺癌中 5hmC 的调控机制研究进程，同时为肺癌的发病机制和治疗靶点提供新的依据。

参考文献

1. Riggs AD: **X inactivation, differentiation, and DNA methylation.** *Cytogenet Cell Genet* 1975, **14**:9-25.
2. Holliday R, Pugh JE: **DNA modification mechanisms and gene activity during development.** *Science* 1975, **187**:226-232.
3. Law JA, Jacobsen SE: **Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals.** *Nat Rev Genet* 2010, **11**:204-220.
4. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E: **DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development.** *Cell* 1999, **99**:247-257.
5. Bostick M, Kim JK, Estève P-O, Clark A, Pradhan S, Jacobsen SE: **UHRF1 plays a role in maintaining DNA methylation in mammalian cells.** *Science* 2007, **317**:1760-1764.
6. Hermann A, Goyal R, Jeltsch A: **The Dnmt1 DNA-(cytosine-C5)-methyltransferase methylates DNA processively with high preference for hemimethylated target sites.** *Journal of Biological Chemistry* 2004, **279**:48350-48359.
7. Sharif J, Muto M, Takebayashi S-i, Suetake I, Iwamatsu A, Endo TA, Shinga J, Mizutani-Koseki Y, Toyoda T, Okamura K: **The SRA protein Np95 mediates epigenetic inheritance by recruiting Dnmt1 to methylated DNA.** *Nature* 2007, **450**:908-912.
8. Smith ZD, Meissner A: **DNA methylation: roles in mammalian development.** *Nat Rev Genet* 2013, **14**:204-220.
9. Kriaucionis S, Heintz N: **The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain.** *Science* 2009, **324**:929-930.
10. Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, Agarwal S, Iyer LM, Liu DR, Aravind L, Rao A: **Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1.** *Science* 2009, **324**:930-935.
11. He YF, Li BZ, Li Z, Liu P, Wang Y, Tang Q, Ding J, Jia Y, Chen Z, Li L, et al: **Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA.** *Science* 2011, **333**:1303-1307.
12. Ito S, Shen L, Dai Q, Wu SC, Collins LB, Swenberg JA, He C, Zhang Y: **Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine.** *Science* 2011, **333**:1300-1303.



13. Globisch D, Munzel M, Muller M, Michalakis S, Wagner M, Koch S, Bruckl T, Biel M, Carell T: **Tissue distribution of 5-hydroxymethylcytosine and search for active demethylation intermediates.** *PLoS One* 2010, **5**:e15367.
14. Munzel M, Globisch D, Bruckl T, Wagner M, Welzmler V, Michalakis S, Muller M, Biel M, Carell T: **Quantification of the sixth DNA base hydroxymethylcytosine in the brain.** *Angew Chem Int Ed Engl* 2010, **49**:5375-5377.
15. Song CX, Szulwach KE, Fu Y, Dai Q, Yi C, Li X, Li Y, Chen CH, Zhang W, Jian X, et al: **Selective chemical labeling reveals the genome-wide distribution of 5-hydroxymethylcytosine.** *Nat Biotechnol* 2011, **29**:68-72.
16. Szwagierczak A, Bultmann S, Schmidt CS, Spada F, Leonhardt H: **Sensitive enzymatic quantification of 5-hydroxymethylcytosine in genomic DNA.** *Nucleic Acids Res* 2010, **38**:e181.
17. Lister R, Mukamel EA, Nery JR, Urich M, Puddifoot CA, Johnson ND, Lucero J, Huang Y, Dwork AJ, Schultz MD: **Global epigenomic reconfiguration during mammalian brain development.** *Science* 2013, **341**.
18. Koh KP, Yabuuchi A, Rao S, Huang Y, Cunniff K, Nardone J, Laiho A, Tahiliani M, Sommer CA, Mostoslavsky G, et al: **Tet1 and Tet2 regulate 5-hydroxymethylcytosine production and cell lineage specification in mouse embryonic stem cells.** *Cell Stem Cell* 2011, **8**:200-213.
19. Ito S, D'Alessio AC, Taranova OV, Hong K, Sowers LC, Zhang Y: **Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification.** *Nature* 2010, **466**:1129-1133.
20. Szulwach KE, Li X, Li Y, Song CX, Wu H, Dai Q, Irier H, Upadhyay AK, Gearing M, Levey AI, et al: **5-hmC-mediated epigenetic dynamics during postnatal neurodevelopment and aging.** *Nat Neurosci* 2011, **14**:1607-1616.
21. Mellán M, Ayata P, Dewell S, Kriaucionis S, Heintz N: **MeCP2 binds to 5hmC enriched within active genes and accessible chromatin in the nervous system.** *Cell* 2012, **151**:1417-1430.
22. Pastor WA, Pape UJ, Huang Y, Henderson HR, Lister R, Ko M, McLoughlin EM, Brudno Y, Mahapatra S, Kapranov P, et al: **Genome-wide mapping of 5-hydroxymethylcytosine in embryonic stem cells.** *Nature* 2011, **473**:394-397.
23. Yu M, Hon GC, Szulwach KE, Song CX, Zhang L, Kim A, Li X, Dai Q, Shen Y, Park B, et al: **Base-resolution analysis of 5-hydroxymethylcytosine in the mammalian genome.** *Cell* 2012, **149**:1368-1380.
24. Booth MJ, Branco MR, Ficiz G, Oxley D, Krueger F, Reik W, Balasubramanian S: **Quantitative sequencing of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine at single-base resolution.** *Science* 2012, **336**:934-937.
25. Ficiz G, Branco MR, Seisenberger S, Santos F, Krueger F, Hore TA, Marques CJ, Andrews S, Reik W: **Dynamic regulation of 5-hydroxymethylcytosine in mouse ES cells and during differentiation.** *Nature* 2011, **473**:398-402.
26. Gao Y, Chen J, Li K, Wu T, Huang B, Liu W, Kou X, Zhang Y, Huang H, Jiang Y: **Replacement of Oct4 by Tet1 during iPSC induction reveals an important role of DNA methylation and hydroxymethylation in reprogramming.** *Cell Stem Cell* 2013, **12**:453-469.



27. Frauer C, Hoffmann T, Bultmann S, Casa V, Cardoso MC, Antes I, Leonhardt H: **Recognition of 5-hydroxymethylcytosine by the Uhrf1 SRA domain.** *PLoS One* 2011, **6**:e21306.
28. Yildirim O, Li R, Hung JH, Chen PB, Dong X, Ee LS, Weng Z, Rando OJ, Fazzio TG: **Mbd3/NURD complex regulates expression of 5-hydroxymethylcytosine marked genes in embryonic stem cells.** *Cell* 2011, **147**:1498-1510.
29. Iurlaro M, Ficz G, Oxley D, Raiber EA, Bachman M, Booth MJ, Andrews S, Balasubramanian S, Reik W: **A screen for hydroxymethylcytosine and formylcytosine binding proteins suggests functions in transcription and chromatin regulation.** *Genome Biol* 2013, **14**:R119.
30. Spruijt CG, Gnerlich F, Smits AH, Pfaffeneder T, Jansen PW, Bauer C, Munzel M, Wagner M, Muller M, Khan F, et al: **Dynamic readers for 5-(hydroxy)methylcytosine and its oxidized derivatives.** *Cell* 2013, **152**:1146-1159.
31. Hashimoto H, Liu Y, Upadhyay AK, Chang Y, Howerton SB, Vertino PM, Zhang X, Cheng X: **Recognition and potential mechanisms for replication and erasure of cytosine hydroxymethylation.** *Nucleic Acids Res* 2012, **40**:4841-4849.
32. Jin S-G, Jiang Y, Qiu R, Rauch TA, Wang Y, Schackert G, Krex D, Lu Q, Pfeifer GP: **5-Hydroxymethylcytosine is strongly depleted in human cancers but its levels do not correlate with IDH1 mutations.** *Cancer research* 2011, **71**:7360-7365.
33. Haffner MC, Chaux A, Meeker AK, Esopi DM, Gerber J, Pellakuru LG, Toubaji A, Argani P, Iacobuzio-Donahue C, Nelson WG: **Global 5-hydroxymethylcytosine content is significantly reduced in tissue stem/progenitor cell compartments and in human cancers.** *Oncotarget* 2011, **2**:627.
34. Yang H, Liu Y, Bai F, Zhang J, Ma S, Liu J, Xu Z, Zhu H, Ling Z, Ye D: **Tumor development is associated with decrease of TET gene expression and 5-methylcytosine hydroxylation.** *Oncogene* 2013, **32**:663-669.
35. Lian CG, Xu Y, Ceol C, Wu F, Larson A, Dresser K, Xu W, Tan L, Hu Y, Zhan Q: **Loss of 5-hydroxymethylcytosine is an epigenetic hallmark of melanoma.** *Cell* 2012, **150**:1135-1146.
36. Ko M, Huang Y, Jankowska AM, Pape UJ, Tahiliani M, Bandukwala HS, An J, Lamperti ED, Koh KP, Ganetzky R: **Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2.** *Nature* 2010, **468**:839-843.

(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

A 鉴定 hMMP

已知小鼠 ES 细胞的 5hmC 的水平高达 0.3%, 我们推测在细胞更新过程中, hMMP 能识别 5hmC/C 半羟甲基化双链或 5hmC/5mC 双链并调控 DNMTs/TETs 的招募完成新链 C 的甲基化和氧化过程。沉默结合蛋白基因后根据 5hmC 水平



变化情况确定 hMMP。

- 1) 设计 5hmC/C 半羟甲基化双链和 5hmC/5mC 双链 DNA 探针；
- 2) 蛋白富集，识别 5hmC/C 双链和 5hmC/5mC 双链特异结合蛋白；
- 3) 沉默结合蛋白基因，确定 hMMP；

B 研究 hMMP 在 DNA 复制过程中对 DNMTs 或 TETs 的调控机制

已知在 DNA 复制过程中 DNMT1 结合在复制叉上负责新链中胞嘧啶的甲基化；而 TETs 能够将 5mC 氧化成 5hmC，我们推测在 DNA 复制过程中 hMMP 能通过某个结构域调节 DNMTs 或 TETs 的招募，并且与 5hmC、PCNA 等共定位。

- 1) 分析 hMMP 招募 DNMTs 和 TETs 的能力；
- 2) 分析 hMMP 在 DNA 复制过程中的定位；
- 3) 确定 hMMP 的调控结构域；

C 鉴定调节肺癌细胞中 5hmC 水平变化的 hMMP

上步中获得的 hMMP 的失活或异常表达可能就是导致肺癌 5hmC 水平显著降低的原因。

- 1) 在肺癌细胞中克隆 hMMP 编码基因，鉴定 hMMP 基因的突变情况；
- 2) 分析 hMMP 编码基因在肺癌细胞中表达情况；
- 3) 在肺癌细胞中过表达 hMMP 后，检测 5hmC 水平变化情况；

D 分析 hMMP 抑制肺癌细胞致瘤潜力的作用

在肺癌细胞中过表达 hMMP 后，观察其对肺癌细胞致瘤潜力的抑制作用。

- 1) 分析肺癌细胞的增殖情况；
- 2) 分析肺癌细胞周期的改变情况；
- 3) 分析肺癌细胞凋亡情况；
- 4) 肺癌细胞移植裸鼠体内后，观察成瘤体积、重量及成瘤速度；

E 探讨 hMMP 抑制肺癌的机制

5hmC 定位在转录活跃的基因中，5hmC 含量的降低必然影响基因的正常表达，在肺癌细胞中识别出这些 5hmC 调控基因，能够揭示 hMMP 在肺癌中的调控机制。

- 1) 分析 hMMP 在基因组中的定位；



- 2) 肺癌细胞中过表达 hMMP 后, 分析基因组中 hMMP 结合区 5hmC 变化;
- 3) 结合差异表达基因筛选及功能分析来探讨 hMMP 抑制细胞致瘤潜力的分子机制;

研究目标

- 1) 阐明 hMMP 在细胞更新过程中对 5hmC 水平的调控机制;
- 2) 揭示 hMMP 抑制肺癌细胞致瘤潜力的分子机制;

拟解决的关键科学问题

- 1) 如何鉴定 hMMP?

在细胞更新过程中, hMMP 能识别 5hmC/C 半羟甲基化双链或 5hmC/5mC 双链。因此, 可通过 Pull down 及 LC-MS/MS 识别出 5hmC/C 和 5hmC/5mC 双链的特异结合蛋白, 结合 HPLC 等检测基因沉默后 5hmC 含量变化鉴定出 hMMP。

- 2) 如何阐明 hMMP 在细胞更新过程中对 5hmC 水平的调控机制?

通过 Co-IP 分析 hMMP 结合 DNMTs 和 TETs 的能力, 通过免疫定位分析 DNA 复制过程中 hMMP 的定位情况, 通过定点突变识别 hMMP 的调控结构域。

- 3) 如何揭示 hMMP 抑制肺癌细胞致瘤潜力的分子机制?

首先鉴定调节肺癌细胞中 5hmC 水平变化的 hMMP; 然后分析 hMMP 在抑制肺癌细胞致瘤潜力的作用; 最后, 通过鉴定 hMMP 提高 5hmC 后而激活表达的基因, 揭示 hMMP 在肺癌中的调控机制。

(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 通过 Pull down 和 LC-MS/MS 鉴定 hMMP

- 1) 以 ZFP64 和 ECAT1 基因内富含 5hmC 的 CpG 岛区段为模板, 使用生物素标记的引物, PCR 扩增出末端生物素标记的 5C、5mC 和 5hmC 单链 DNA, 根据需要复性得到 5hmC/C 半羟甲基化双链和 5hmC/mC 双链 DNA 探针;
- 2) Pull down 实验富集出 5hmC/C 半羟甲基化双链和 5hmC/mC 双链的结合



蛋白, LC-MS/MS 分析获得这些蛋白的序列及定量信息, 比对已有的哺乳动物蛋白序列数据库, Kruskal Wallist 检验获得特异结合蛋白。输入 DAVID 数据库进行 Gene ontology 分析;

- 3) RNAi 沉默特异结合蛋白的表达后, 用 KRuO_4 对基因组 DNA 进行氧化处理, oxBS-PCR 分析 ES 细胞基因组上 ZFP64 和 ECAT1 基因中的 5hmC 维持情况, 结合 HPLC 分析沉默这些结合蛋白对全基因组 5hmC 含量的影响, 确定 hMMP;

B 研究 hMMP 在 DNA 复制过程中对 DNMTs 或 TETs 的调控机制

- 1) 克隆 hMMP 基因以及 DNMTs 或 TETs 基因、构建表达载体、细胞转染、Co-IP 分析 hMMP 能否招募 DNMTs 和 TETs;
- 2) 构建融合 FP 的蛋白表达载体, 将 ES 细胞细胞周期同步化, FACS 检验后, 激光共聚焦显微镜分析 DNA 复制过程中与 5hmC 及复制叉因子 PCNA 共定位情况;
- 3) 蛋白结构与功能预测、定点突变, 通过 Co-IP 分析 hMMP 结构域定点突变后招募 DNMTs 和 TETs 能力的变化情况; 使用激光共聚焦显微镜分析 DNA 复制过程中 hMMP 调控结构域突变后的定位;

C 鉴定调节肺癌细胞中 5hmC 水平变化的 hMMP

- 1) 在肺癌细胞中克隆 hMMP 基因, 测序后鉴定 hMMP 基因的突变位点, 与 hMMP 的调控结构域进行比较;
- 2) qPCR 分析 hMMP 基因在肺癌细胞中表达情况, 与 ES 细胞中的表达情况进行比较;
- 3) 在 ES 细胞中克隆 hMMP 基因, 构建过表达载体, 在肺癌细胞中过表达后, qPCR 和 Western blot 检测过表达后使用 HPLC 检测 5hmC 水平变化;

D 分析 hMMP 对肺癌细胞致瘤潜力的抑制能力

- 1) 采用 MTT 法、BrdU 法和克隆形成实验, 分析 hMMP 过表达后, 肺癌 LA795 及 LLC 细胞的增殖情况;
- 2) 流式细胞仪检测 hMMP 过表达后肺癌细胞周期的变化;
- 3) 使用 Annexin V/PI 双染流式细胞技术, 检测 hMMP 过表达后癌细胞凋亡变化情况;
- 4) 进行体内裸鼠实验, 检测 hMMP 过表达后的肺癌细胞在裸鼠体内的成瘤体积、重量及成瘤速度;



E 探讨 hMMP 抑制肺癌的机制

- 1) 在肺癌细胞中过表达带有标记的 hMMP 后, ChIP-seq 分析 hMMP 在基因组中的定位, 包括文库构建及 illumina 测序、Mapping、Peak 识别等;
- 2) 在肺癌细胞中过表达 hMMP 后, 通过氧化亚硫酸氢盐测序 (oxidative bisulfite-sequencing, oxBS-Seq) 分析基因组中 hMMP 结合区域 5hmC 变化情况, 包括基因组 DNA 的 K₂Cr₂O₇ 氧化处理、文库构建及 illumina 测序、Mapping 和差异羟甲基化区域 (Differential hydroxymethylation regions, DhMR) 识别等;
- 3) 通过 RNA-seq 筛选差异表达基因, 通过功能分析来研究 hMMP 抑制细胞致瘤潜力的分子机制, 主要包括 RNA 提取, 文库构建及 illumina 测序、Mapping、转录本 Assembly, 差异基因筛选及功能富集分析等;

技术路线 (图 3)

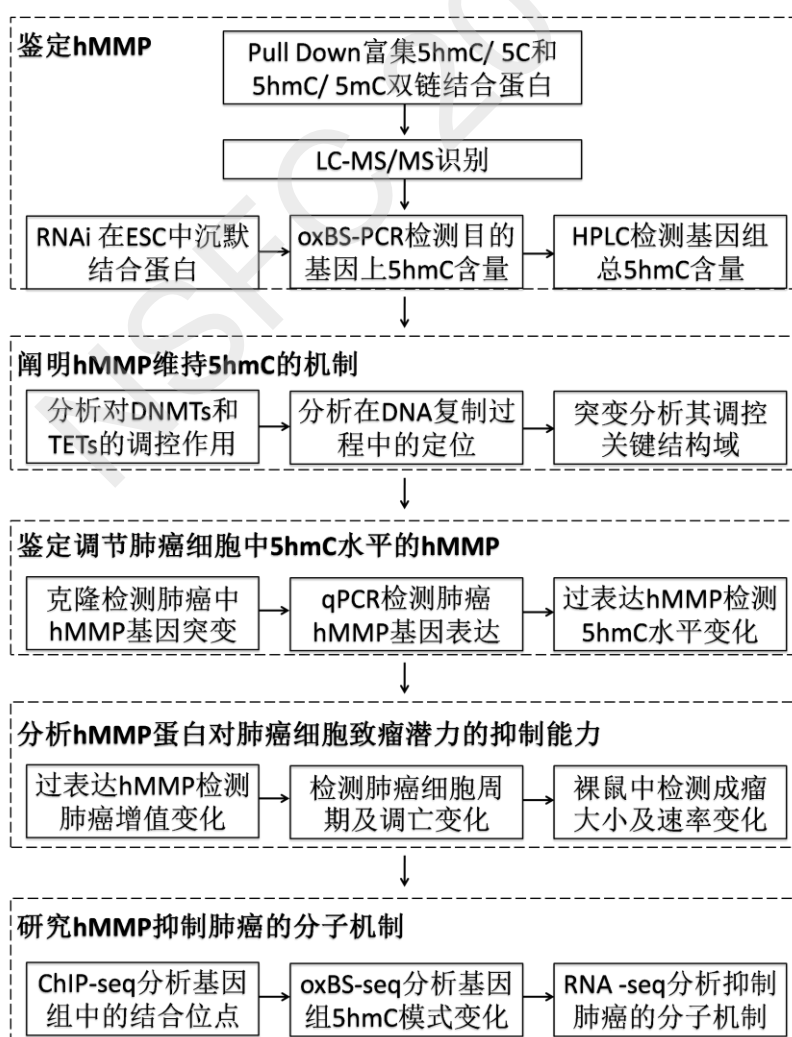


图 3 本项目的技术路线



可行性分析

1) 研究基础良好

前期,我们在 ES 细胞 DNA 甲基化模式维持方面做了大量工作,通过 BS-seq 数据分析发现 DNA 双链上对称的甲基化模式是由 DNMT1 和 DNMT3a/b 共同调控完成的(图 5, Cell Stem Cell 修回)。通过这部分的工作,我们不但深刻理解了 DNA 甲基化修饰维持机制,同时掌握了甲基化数据获取以及 BS-seq 深度测序数据分析方法,这些研究为本项目的执行提供了保障。

2) 人员结构合理

本项目申请人一直以来的工作都围绕表观遗传调控,有着丰富的分子生物学和生物信息学知识,在高通量数据获取及分析方面有丰富经验;项目参与人张霞在测序文库构建方面经验丰富;助理实验师侯率专门负责 LC-MS/MS 分析;另外 1 位博士研究生和 2 位硕士研究生的加入充分保障了本项目的顺利开展。

3) 研究技术成熟

本项目在执行时所用到的 Pull down 分析, LC-MS/MS 分析均是常用的蛋白组学方法, RNAi 技术已经被广泛应用哺乳动物基因沉默中, oxBS-PCR 及 oxBS-seq 只需在 BS-PCR 和 BS-seq 基础上增加 DNA 氧化处理步骤;我们还建立了适合深度测序分析的数学算法和统计模型,并编写了整套计算程序。本项目涉及的其他技术如细胞核提取、核酸提取、Western blot、SDS-PAGE 电泳等均为常规分子生物学方法,并在前期的准备工作中得到熟练运用。

4) 硬件设施完备

项目实施依托单位拥有液质联用仪(离子阱系统)、流式细胞仪、HPLC、高速离心机、超声波破碎仪、Realtime PCR 仪、生物分析仪、凝胶成像系统、激光共聚焦显微镜、高通量基因测序仪、高性能计算机集群等设备。配有细胞培养间、普通分子生物学操作平台等设施,完全能够支持本项目的顺利完成。

综上所述,本项目在工作基础、人员结构、实验技术及硬件设施等方面都已经非常成熟,如能得到资助,能够顺利完成项目,得到预期的研究成果。

(4) 本项目的特色与创新之处。

1) 通过鉴定 hMMP 来研究 5hmC 水平调控新机制;

2) 通过深度测序识别肺癌中 5hmC 调控基因来揭示 hMMP 抑制肺癌的分子机制;



(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

2015 年, 鉴定 hMMP (研究内容中的 A 部分), 前期工作中已经完成 Pull Down 实验的探针设计、制备以及预实验;

2016 年, 研究 hMMP 在 DNA 复制过程中对 DNMTs 或 TETs 的调控机制, 鉴定调节肺癌细胞中 5hmC 水平变化的 hMMP (研究内容中的 B、C 部分);

2017 年, 分析 hMMP 对肺癌细胞致瘤潜力的抑制能力, 探讨 hMMP 在肺癌中的调控机制 (研究内容中的 D、E 部分);

预期研究结果

- 1) 阐明 hMMP 在细胞更新过程中对 5hmC 水平的调控机制;
- 2) 揭示 hMMP 抑制肺癌细胞致瘤潜力的分子机制;
- 3) 发表论文 3-4 篇, 其中 SCI 收录论文 2 篇;
- 4) 培养博士研究生 1 名, 硕士研究生 1-2 名;

3. 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)

与本项目相关的研究工作积累

前期, 我们在 ES 细胞 DNA 甲基化模式维持方面做了大量工作。通过 BS-seq 双端测序, 获得了高覆盖度的 ES 细胞甲基化组(图 4A), 与 Dirk 的(Nature, 2011, 480:490-495) 小鼠 ES 细胞甲基化谱, 及 Wei Xie 的 (Cell, 2012, 148:816-831) 的大脑皮层细胞甲基化组相比, 在长达 500kb 的染色体区域内, 三组数据有相似的覆盖度 (图 4A)。

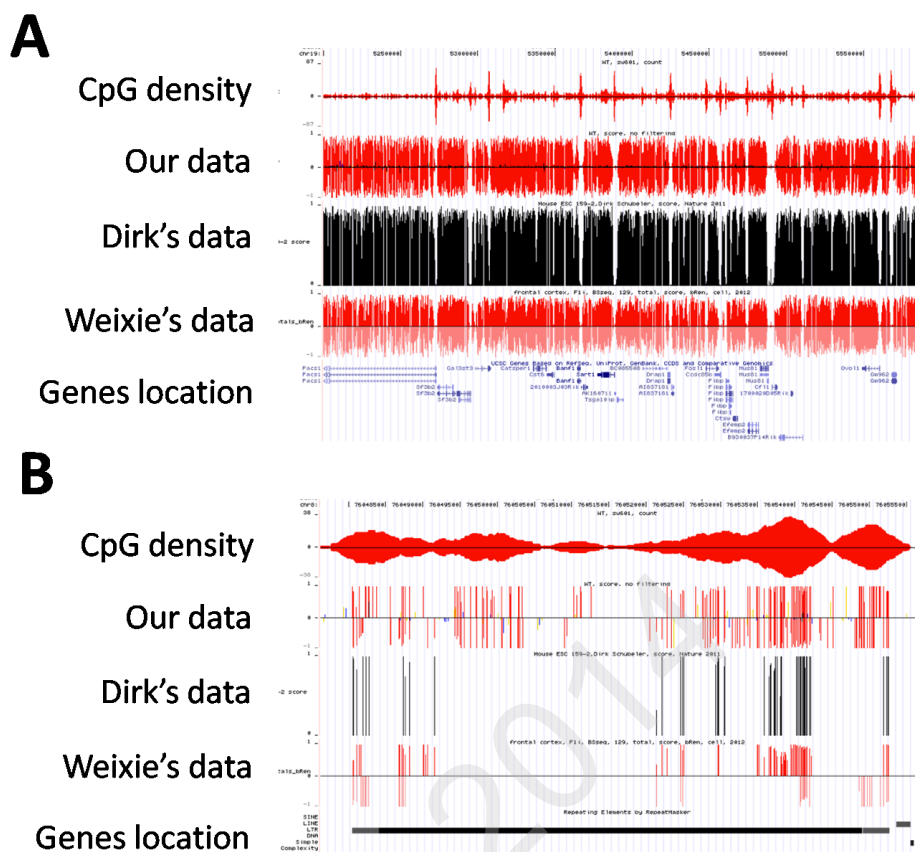


图4 小鼠 ES 细胞甲基化谱

(A) 通过 BS-seq 双端测序以及自己开发的深度测序数据分析平台，我们获得了小鼠 ES 细胞甲基化谱；(B) 我们开发的分析平台针对双端测序，更擅长重复序列定位

使用 R、Python 脚本并结合常用深度测序数据分析软件，我们实现了 BS-seq 数据分析所涉及的数学算法、统计模型及计算方法。与已有的程序相比，我们的分析软件擅长对基因组的重复区域实现测序片段的定位（图 4B），在 LTR（Long Terminal Repeat）重复序列区域，我们的数据有很好的信号，Dirk 及 Weixie 的数据则基本上没有信号。

通过 BS-seq 数据分析我们发现 DNA 双链上对称的甲基化模式是由 DNMT1 和 DNMT3a/b 共同调控完成的（图 5，Cell Stem Cell 修回），提示在 DNA 复制过程中 DNMT3a/b 同样扮演着重要角色。通过这部分的工作，我们深刻理解了 DNA 甲基化修饰维持机制，为本项目阐明 hMMP 在细胞更新过程中对 5hmC 水平的调控机制打下坚实的基础。

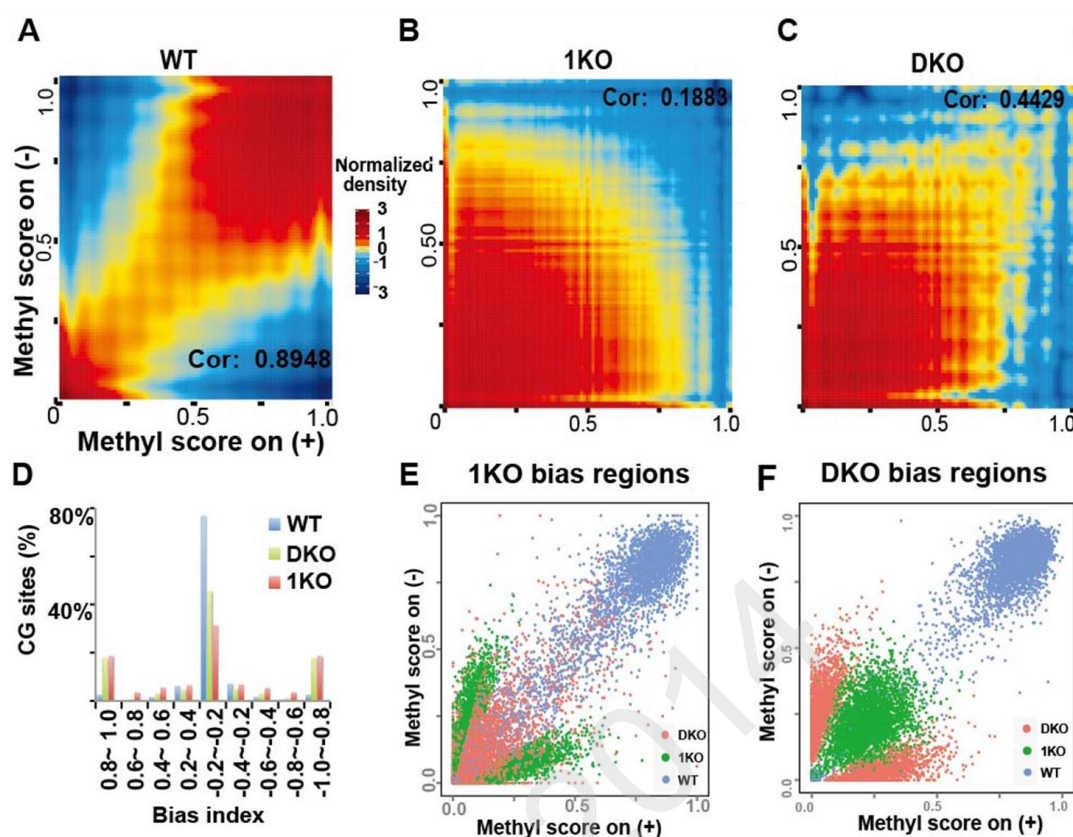


图5 DNMT1 和 DNMT3a/b 共同调控 DNA 双链上对称的甲基化模式

(A-C) WT、DNMT1^{-/-} (1KO) 和 DNMT3a^{-/-}3b^{-/-} (DKO) 的 ES 细胞中 DNA 双链 CG/GC 位点甲基化的对称分布情况,使用甲基化评分和相关系数来衡量;(D) 不同偏离指数的 CG/GC 位点分布情况;(E-F) 1KO 和 DKO 中非对称甲基化 CG 位点在不同基因型细胞中分布情况

导致肿瘤 5hmC 含量降低的原因主要有三个, TETs 表达量下降, TETs 基因突变或者 5hmC 的来源 5mC 含量降低。肺癌、脑癌中 TETs 表达量和 5mC 的含量均没有明显变化, 可能是由于 TETs 基因突变导致 TETs 蛋白失活引起 5hmC 水平降低, 我们在国际癌症基因组联合会 ICGC 基因组数据库搜索 TETs 基因的突变情况(图 6), 发现的确有些癌症如恶性淋巴瘤、前列腺癌、甲状腺癌中 TETs 基因的突变率很高, 特别是 Tet2 基因, 在甲状腺癌样本中突变率能到达 20%。然在 267 个脑癌和 178 个肺癌样本中, 三个 TETs 基因的突变率的总和分别是 2.24% 和 13.48%。TETs 基因突变不能解释 5hmC 含量的显著降低。因此, 存在其他因素导致 5hmC 水平下降。hMMP 的沉默或失活很可能是导致肺癌中低 5hmC 水平的重要原因。

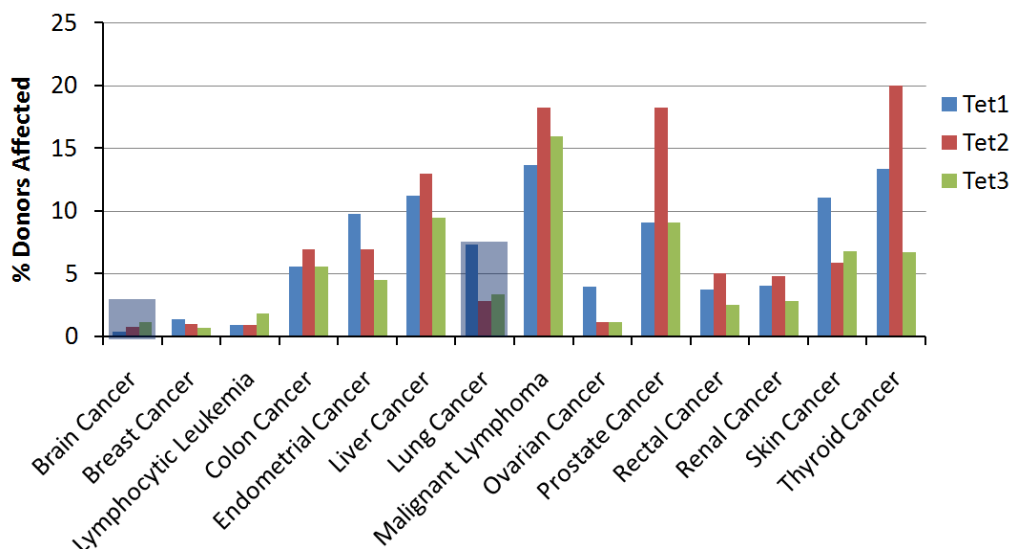


图 6 不同肿瘤中 TETs 基因突变的概率

癌症样本基因组数据来自国际癌症基因组联合会 ICGC

单碱基水平定位分析表明稳定存在的>99%的 5hmC 存在于 CpG 中，结合 hMeDIP 和 oxBS-seq 数据[24, 25]，我们选择 ZFP64 和 ECAT1 基因中富含 5hmC 的 CpG 岛 (CpG island, CGI) 区段为模板，使用生物素标记的引物，在 PCR 扩增体系中加入 dCTP、dmCTP 或 dhmCTP，制备了 5hmC/C 双链和 5hmC/5mC 双链 DNA 探针 (图 7)。

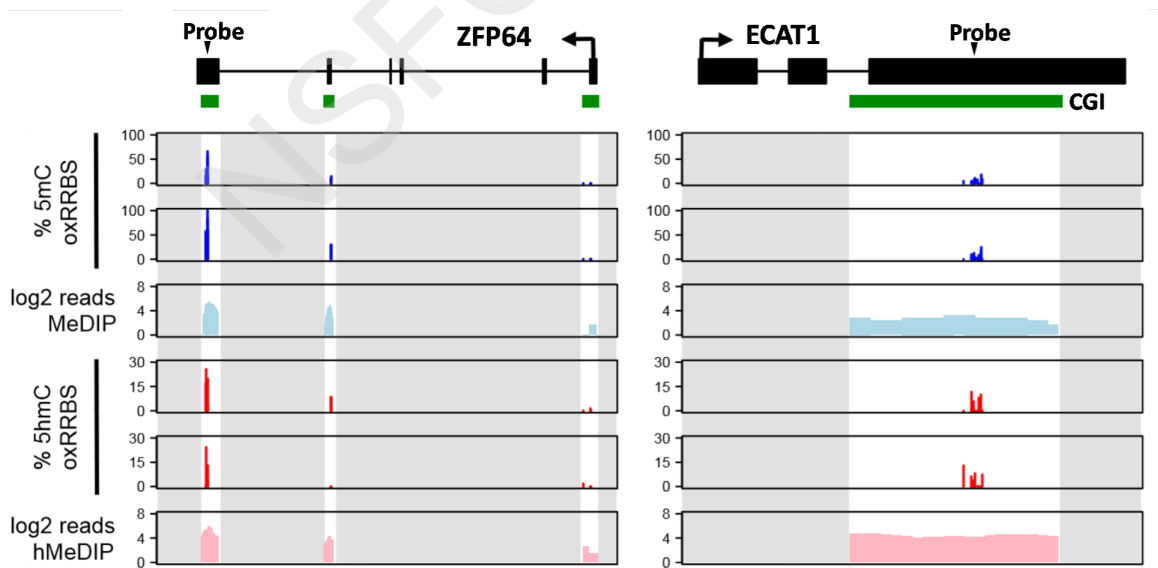


图 7 5hmC/C 双链和 5hmC/5mC 双链 DNA 探针的设计与蛋白富集实验

探针设计在 5hmC 富集存在的 ZFP64 和 ECAT1 基因的 CpG 岛上；



有报道 UHRF1 能够结合 5hmC/C 半羟甲基化双链[27], 使用两 5hmC/C 半羟甲基化双链探针 Pull down。

已取得的研究工作成绩

本项目的申请人一直以来的工作都围绕 miRNA 调控、组蛋白修饰等表观遗传调控研究, 有着丰富的分子生物学和生物信息学知识, 在高通量数据获取及分析方面有着丰富经验, 在 Gene、Journal of Plant Biology、Functional & Integrative Genomics、BMC Plant Biology 等国际期刊发表 SCI 论文 7 篇, 其中第一作者论文 2 篇。课题申请人了解国际科研动态, 业务基础扎实, 精力充沛, 勇于创新, 善于进行学科交叉与交流, 这些为本项目的完成提供了保证。

(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)

本项目依托单位大连医科大学肿瘤防治中心。该中心依托于辽宁省科技大平台, 目前已经涵盖了辽宁省肿瘤生物学重点实验室、辽宁省 SPF 实验动物中心和大连医科大学肿瘤干细胞研究院。建设有动物实验技术平台、分子生物学技术平台、化学生物学技术平台、干细胞技术平台等公共技术支撑系统。现有仪器设备齐全, 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、LC-MS/MS 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、超速离心机、发射光谱仪(ICP)及原子吸收分光光度计等。

项目负责人所在实验室能够提供的条件如下: 普通分子生物学操作平台, 120 平方米, 附有 4°C、-20°C 和 -80°C 冰箱、小型台式离心机、PCR 仪、培养箱、水浴箱、电泳仪、核酸杂交仪、紫外分光光度计、Millipore 净水器、震荡器以及其它常规设备; 高通量测序与分析平台, 包括超声波破碎仪、生物分析仪、实时荧光定量 PCR 系统、凝胶成像仪、高通量基因测序仪 (Illumina Miseq)、高性能计算机集群 (SuperCloud R7510-G9) 以及高通量数据分析软件平台等。细胞房一间, 附有超净工作台、CO₂ 培养箱、液氮罐、倒置显微镜; 哺乳动物表达系统、小鼠胚胎干细胞 E14、小鼠肺癌细胞 LA795 和 LLC, 慢病毒感染系统。上述条件为项目的顺利开展提供了有利保障。



(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)

(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)

4. 研究成果

主要论著(近 3 年来已发表的与本项目有关的主要论著目录和获得学术奖励情况)

1. **De-Kang Lv**, Xi Bai, Yong Li, Xiao-Dong Ding, Ying Ge, Hua Cai, Wei Ji, Nalahu Wu, Yan-Ming Zhu. Profiling of cold-stress-responsive miRNAs in rice by microarrays. *Gene*. 459(1-2):39-47, 2010 Cited by 34 SCI

2. **De-Kang Lv**, Ying Ge, Bei Jia, Xi Bai, Pei-Hua Bao, Yan-Ming Zhu. miR167c is induced by high alkaline stress and inhibits two auxin response factors in Glycine soja. *Journal of Plant Biology*. 55(5):373-380, 2012

3. Ying Ge, Yong Li, **De-Kang Lv**, Xi Bai, Wei Ji, Hua Cai, Ao-Xue Wang, Yan-Ming Zhu. Alkaline-stress response in Glycine soja leaf identifies specific transcription factors and ABA-mediated signaling factors. *Functional & Integrative Genomics*. 11(2):369-379, 2011

4. Peng Gao, Xi Bai, Liang Yang, **De-kang Lv**, Yong Li, Hua Cai, Wei Ji, Dianjing Guo. Over-expression of osa-MIR396c decreases salt and alkali stress tolerance. *Planta*. 231(5): 991-1001, 2010

5. Ying Ge, Yong Li, Yan-Ming Zhu, Xi Bai, **De-Kang Lv**, Dianjing Guo, Wei Ji, Hua Cai. Global transcriptome profiling of wild soybean (Glycine soja) roots under NaHCO₃ treatment. *BMC Plant Biology*. 10:153, 2010. Biomed Center highly accessed

6. Yongjun Shu, Yong Li, Yan-Ming Zhu, Zhenlei Zhu, **De-kang Lv**, Xi Bai, Hua Cai, Wei Ji, Dianjing Guo. Genome-wide identification of intron fragment insertion mutations and their potential use as SCAR molecular markers in the soybean. *Theoretical and Applied Genetics*. 121(1): 1-8, 2010

7. Peng Gao, Xi Bai, Liang Yang, **De-kang Lv**, Xin Pan, Yong Li, Hua Cai, Wei Ji, Qin Chen, Yan-Ming Zhu. osa-MIR393: a salinity and alkaline stress related microRNA gene. *Molecular Biology Reports*. 38(1):237-242, 2011



5. 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。

1、科研业务费 8.75 万元

1) 测试分析费: 4.95 万元

LC-MS/MS 分析 0.2 万元/样品, 共 18 个样品, 累计 3.6 万元;

HPLC 分析 0.1 万元/样品, 预计 10 个样品, 累计 1.0 万元;

Sanger 测序 35 元/样品, 预计 100 个样品, 累计 0.35 万元;

2) 能源动力费: 0.30 万元。

3) 会议差旅费: 参加国内学术会议 1 次, 国际学术会议 1 次, 2.5 万元。

4) 出版、文献检索发表费: 1 万元。

2、实验材料费 14.35 万元

1) 培养小鼠 ES 细胞和肺癌细胞 LA795 及 LLC 所需的胎牛血清、容器、培养基、移液管等: 2 万元;

2) 基本的生物学与化学试剂, 配制各种溶液, 累计 1 万元;

3) 分子生物学试剂, 包括 DNA 限制内切酶、连接酶、合成酶、裂解酶、合成引物等, 累计 2.6 万元;

4) Qiagen 核酸提取试剂盒, 基因突变试剂盒、细胞转染试剂盒, Pierce Co-IP 试剂盒, Illumina TruSeq 试剂盒, Qbit 测序库定量试剂盒, qPCR 试剂盒, Covaris DNA 打断样品瓶, BioAnalyzer 测序库质量分析 Chip 等累计 8.75 万元。

3、仪器设备费 0.9 万元

移液器 0.18 万元/支, 5 支累计 0.9 万元。

4、劳务费 4.5 万元

用于支付研究生科研劳务费。

5、管理费 1.5 万元

按申请经费的 5% 由单位扣除。

申请经费合计 30 万元。

6. 其他需要说明的问题



附件信息

序号	附件名称	备注	附件类型
1	代表论文1	通过芯片杂交研究miRNA调控冷应答机制	其他
2	代表论文2	miR167c调控碱胁迫应答机制	其他
3	代表论文3	基因表达谱表明ABA信号在碱胁迫应答中至关重要	其他
4	伦理证明	大连医科大学医学伦理委员会证明	其他

NSFC 2014



签字和盖章页

申请人：吕德康

依托单位：大连医科大学

项目名称：hMMP通过提高5hmC水平抑制肺癌细胞致瘤潜能的机制研究

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	项目分工	每年工作时间(月)	签字
1	张霞	大连医科大学	测序文库构建及数据分析	3	
2	侯率	大连医科大学	hMMP蛋白鉴定	3	
3	贾崇富	大连医科大学	细胞增殖、周期及凋亡实验	6	
4	罗茜	大连医科大学	细胞培养和载体构建	6	
5	王向茹	大连医科大学	细胞转染和筛选	6	
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：