



项目批准号	81800448
申请代码	H0301
归口管理部门	
依托单位代码	51018208A0281-0551



818004481002152

国家自然科学基金委员会 资助项目计划书

资助类别：青年科学基金项目

亚类说明：

附注说明：

项目名称：基因编辑技术介导下的干细胞治疗Phox2b-/-先天性巨结肠的实验研究

直接费用：20万元 执行年限：2019.01-2021.12

负责人：王勇

通讯地址：广州市天河区金穗路9号

邮政编码：510623 电 话：02038076147

电子邮件：summer0660@163.com

依托单位：广州医科大学

联系人：陈倩 电 话：02037103057

填表日期：2018年08月29日

国家自然科学基金委员会制



国家自然科学基金委员会资助项目计划书填报说明

- 一、项目负责人收到《关于国家自然科学基金资助项目批准及有关事项的通知》（以下简称《批准通知》）后，请认真阅读本填报说明，参照国家自然科学基金相关项目管理办法及《国家自然科学基金资助项目资金管理办法》（请查阅国家自然科学基金委员会官方网站首页“政策法规”栏目），按《批准通知》的要求认真填写和提交《国家自然科学基金委员会资助项目计划书》（以下简称《计划书》）。
- 二、填写《计划书》时要求科学严谨、实事求是、表述清晰、准确。《计划书》经国家自然科学基金委员会相关项目管理部门审核批准后，将作为项目研究计划执行和检查、验收的依据。
- 三、《计划书》各部分填写要求如下：
 - （一）简表：由系统自动生成。
 - （二）摘要及关键词：各类获资助项目都必须填写中、英文摘要及关键词。
 - （三）项目组主要成员：计划书中列出姓名的项目组主要成员由系统自动生成，与申请书原成员保持一致，不可随意调整。如果批准通知中“项目评审意见及修改意见表”中“对研究方案的修改意见”栏目有调整项目组成员相关要求的，待项目开始执行后，按照项目成员变更程序另行办理。
 - （四）资金预算表：根据批准资助的直接费用，按照《国家自然科学基金项目预算表编制说明》填报资金预算表和预算说明书。国家重大科研仪器研制项目、重大项目还应按照预算评审后批复的直接费用各科目金额填报资金预算表、预算说明书及相应的预算明细表。
 - （五）正文：
 1. 面上项目、青年科学基金项目、地区科学基金项目：如果《批准通知》中没有修改要求的，只需选择“研究内容和研究目标按照申请书执行”即可；如果《批准通知》中“项目评审意见及修改意见表”中“对研究方案的修改意见”栏目明确要求调整研究期限和研究内容等的，须选择“根据研究方案修改意见更改”并填报相关修改内容。
 2. 重点项目、重点国际（地区）合作研究项目、重大项目、国家重大科研仪器研制项目：须选择“根据研究方案修改意见更改”，根据《批准通知》的要求填写研究（研制）内容，不得自行降低、更改研究目标（或仪器研制的技术性能与主要技术指标以及验收技术指标）或缩减研究（研制）内容。此外，还要突出以下几点：
 - （1）研究的难点和在实施过程中可能遇到的问题（或仪器研制风险），拟采用的研究（研制）方案和技术路线；
 - （2）项目主要参与者分工，合作研究单位之间的关系与分工，重大项目还需说明课题之间的关联；
 - （3）详细的年度研究（研制）计划。



3. 国家杰出青年科学基金、优秀青年科学基金和海外及港澳学者合作研究基金项目：须选择“根据研究方案修改意见更改”，按下列提纲撰写：
 - (1) 研究方向；
 - (2) 结合国内外研究现状，说明研究工作的学术思想和科学意义（限两个页面）；
 - (3) 研究内容、研究方案及预期目标（限两个页面）；
 - (4) 年度研究计划；
 - (5) 研究队伍的组成情况。
4. 国家自然科学基金基础科学中心项目：须选择“根据研究方案修改意见更改”，应当根据评审委员会和现场考察专家组的意见和建议，进一步完善并细化研究计划，作为评估和验收的依据。按下列提纲撰写：
 - (1) 五年拟开展的研究工作（包括主要研究方向、关键科学问题与研究内容）；
 - (2) 研究方案（包括骨干成员之间的分工及合作方式、学科交叉融合研究计划等）；
 - (3) 年度研究计划；
 - (4) 五年预期目标和可能取得的重大突破等；
 - (5) 研究队伍的组成情况。
5. 对于其他类型项目，参照面上项目的方式进行选择和填写。



简表

申请者信息	姓 名	王勇	性 别	女	出生年月	1978年08月	民 族	汉族
	学 位	硕士			职称	副主任医师		
	是否在站博士后	否			电子邮件	summer0660@163.com		
	电 话	02038076147			个人网页			
	工 作 单 位	广州医科大学						
	所 在 院 系 所	附属广州市妇女儿童医疗中心						
依托单位信息	名 称	广州医科大学					代码	51018208A0281
	联 系 人	陈倩			电子邮件	gychen@126.com		
	电 话	02037103057			网站地址	http://210.38.57.13/		
合作单位信息	单 位 名 称							
项目基本信息	项 目 名 称	基因编辑技术介导下的干细胞治疗Phox2b-/-先天性巨结肠的实验研究						
	资 助 类 别	青年科学基金项目				亚 类 说 明		
	附 注 说 明							
	申 请 代 码	H0301:消化系统发育异常						
	基 地 类 别							
	执 行 年 限	2019.01-2021.12						
	直 接 费 用	20万元						



项目摘要

中文摘要:

PHOX2B是调控肠道神经元分化的关键转录因子，其突变是引起先天性巨结肠（HSCR）的重要原因之一，HSCR表现为病变肠段无神经节，目前以手术治疗为主，但术后长期并发症严重影响患者的身体健康和生活质量，亟需寻找新的治疗手段，而干细胞移植可能是有效的治疗方法。诱导多能干细胞（iPSCs）技术的诞生及基因编辑技术的发展，为我们利用基因修复的干细胞移植治疗HSCR提供了重要工具。本申请团队前期已建立PHOX2B突变的iPS细胞系及肠道神经元分化体系，在此基础上，本研究拟利用CRISPR/Cas9介导的同源重组技术修复突变基因，比较基因修复前后肠道神经元体外分化效率的改变，检测基因修复后移植的干细胞在HSCR模型肠道组织的定植、分化、再生肠神经节的能力和对肠道功能的改善。通过本研究的实施，不仅可以为HSCR的个体化治疗提供新的思路和技术手段，也为探索PHOX2B致HSCR的发病机制提供科学依据。

Abstract:

PHOX2B is a key transcription factor that regulates the differentiation of enteric neurons and its mutation is one of the important causes of Hirschsprung disease (HSCR). HSCR is characterized by the totally absence of ganglion in the affected bowel wall. Currently, Resection of the aganglionic segment is the main treatment. But long-term complications seriously affect the patient's physical health and quality of life. So it is urgent to develop new approach to treat HSCR. Enteric neural crest stem cells transplantation may be an effective way. The application of induced pluripotent stem cells (iPSCs) technology and the development of genome editing technology provide us important tools for the use of gene-corrected enteric neural crest stem cells transplantation for the treatment of HSCR. In this study, the iPS cell line with the PHOX2B mutation and enteric neuron differentiation system from pluripotent stem cells have been successfully established in the previous experiment. The purpose of this study was to use CRISPR/Cas9-mediated homologous recombination technology to repair the mutated PHOX2B gene and to compare the enteric neuron differentiation efficiency and their function between the pre- and post-gene editing stages. After the gene correction, the ability of enteric neural crest stem cells engraftment, differentiation, regeneration of the enteric neurons and recovery of the bowel function of HSCR model are detected. This study can not only provide a new idea and technical approach for individualized treatment of HSCR, but also supply scientific basis for exploring the pathogenesis of PHOX2B in HSCR.

关键词(用分号分开): 先天性巨结肠; 诱导多能干细胞; 基因编辑; PHOX2B; 肠神经嵴干细胞

Keywords(用分号分开): Hirschsprung disease; Induced Pluripotent Stem Cells; gene editing; PHOX2B; enteric neural crest stem cells



项目组主要成员

编号	姓名	出生年月	性别	职称	学位	单位名称	电话	证件号码	项目分工	每年工作时间（月）	
1	王勇	1978. 08	女	副主任医师	硕士	广州医科大学			项目负责人	8	
2	朱洁	1981. 10	女	副研究员	博士	广州医科大学			应用CRISPR-Cas9技术，部分干细胞体外培养和诱导分化	6	
3	黄利华	1981. 11	男	助理研究员	博士	广州医科大学			诱导多能干细胞、神经脊干细胞、肠神经元的诱导分化	6	
4	王俊杰	1992. 06	男	硕士生	学士	广州医科大学			标本收集、RT-PCR、流式细胞学	8	
5	林辉婷	1992. 01	女	硕士生	学士	广州医科大学			实时定量PCR检测、免疫荧光染色	8	
6	付铭	1993. 06	男	硕士生	学士	广州医科大学			RNA-Seq、流式细胞检测	8	
7	童燕陆	1992. 10	男	技术员	其他	广州医科大学			动物实验、电生理检测	10	
8	王贺珍	1994. 02	女	技术员	其他	广州医科大学			标本收集、细胞培养等	10	
总人数			高级		中级		初级		博士后	博士生	硕士生
8			2		1		2		0	0	3



国家自然科学基金项目直接费用预算表（定额补助）

项目批准号：81800448

项目负责人：王勇

金额单位：万元

序号	科目名称	金额
1	项目直接费用合计	20.0000
2	1、设备费	0.0000
3	(1)设备购置费	0.00
4	(2)设备试制费	0.00
5	(3)设备升级改造与租赁费	0.00
6	2、材料费	10.2200
7	3、测试化验加工费	3.0000
8	4、燃料动力费	0.00
9	5、差旅/会议/国际合作与交流费	1.20
10	6、出版/文献/信息传播/知识产权事务费	2.7000
11	7、劳务费	2.8800
12	8、专家咨询费	0.00
13	9、其他支出	0.00



预算说明书（定额补助）

（请按《国家自然科学基金项目资金预算表编制说明》中的要求，对各项支出的主要用途和测算理由及合作研究外拨资金、单价 ≥ 10 万元的设备费等内容进行详细说明，可根据需要另加附页。）

本项目直接经费合计 20 万元。具体预算说明如下：

1、设备费：无

2、材料费：共 10.22 万元

主要用于购买细胞培养所需的：细胞培养皿、细胞培养板、细胞培养瓶等常用实验耗材；相关的细胞培养基及添加的生长因子、血清、小分子物质等；用于流式细胞分析与分选、免疫荧光染色所需的各种一抗和二抗；用于检测细胞中基因表达情况的 RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒、qPCR 试剂盒等；实验动物的购买和饲养费及小鼠结肠内细胞移植实验所需的显微手术器械等。详细测算依据可参见下页附页。

3、测试化验加工费：3 万元

相关测试需在按广州市妇女儿童医疗中心实验室平台完成，依据平台的收费标准进行测算。流式细胞检测机时费 50 元/小时，预计需 30 小时，需 0.15 万元；流式细胞分选仪机时费 200 元/小时，分选一次约需要 2 小时，预计需分选 10 次，需 0.4 万元；激光共聚焦显微镜机时费 150 元/小时，三年预计需使用 20 小时，需 0.3 万元；实时定量 PCR 仪机时费 30 元/小时，每次需 1 小时，预计使用 50 次，需 0.15 万元；基因表达谱测序及数据分析在深圳华大基因公司进行，用于分析细胞基因表达谱的变化，每个样本 5000 元，4 个样本共需 2.0 万元。

4、燃料动力费：无

5、差旅/会议/国际合作与交流费：1.2 万元

本课题差旅费主要用于本项目完成过程中在广州市内进行实验，以及参加国内学术会议等过程中发生的费用。

市内交通费用于本项目在广州市妇女儿童医院各院区或其他学校实验室或平台实验、送样或递送文字材料等的交通费等，约需 0.5 万元；

了解国内外科研动态，拟参加国内相关会议，交通费平均往返交通费、会议注册/会务费等每人每次约 3500 元，三年拟安排 2 人次，约需 0.7 万元。

6、出版/文献/信息传播/知识产权事务费：2.7 万元

国内/国际论文版面费（8000 元 \times 3 篇）=2.4 万元；资料复印/打印费、专业书籍购买 0.1 万元；文献检索费及查新费 0.2 万元。

7、劳务费：2.88 万元

用于参加研究的非在职的在读研究生的劳务费发放。有 3 名硕士研究生参加本项目研究工作，按每人每年工作 8 个月，硕士生 400 元/月计：400 元/月 \times 3 人 \times 8 月/年 \times 3 年=2.88 万元。

8、专家咨询费：无

9、其他支出：无



预算说明书（定额补助-附页）

材料费明细单					
项目	名称	单价 (元)	规格	数量	合计(万 元)
细胞培养 一般耗材	25/75 cm2 细胞培养瓶 (Corning)	1000	100 个/箱	2	0.2
	35/60/100mm 细胞培养皿 (Corning)	25	10 个/条	100	0.25
	35/60/100 细菌培养皿 (Corning)	15	10 个/条	100	0.15
	6/12/24/96 孔细胞培养板(Corning)	1000	100 个/箱	4	0.4
	5/10ml 移液管 (Corning)	500	100 支/箱	2	0.1
	15ml/50 离心管 (Corning)	1000	500 个/箱	5	0.5
	0.22um 一次性针头式滤器 (Millipore)	1000	100 个/箱	1	0.1
	2ml 冻存管 (Nalgene)	1000	500 个/箱	1	0.1
	显微手术器械一套	200	把	5	0.1
	胎牛血清 (Gibco)	2500	500ml/瓶	2	0.5
	bFGF	2000	1mg/瓶	1	0.2
	DMEM/F12 培养基 (Invitrogen)	200	500ml/瓶	10	0.2
	Fibronectin (millipore)	1000	1mg/支	3	0.3
	Matrigel (R&D)	2500	10ml/支	2	0.5
	mTeSR	2000	500ml/瓶	5	1
	E8 medium	1200	500ml/瓶	4	0.48
生长因子	表皮生长因子	3000	10μg/支	1	0.3
	肠神经元诱导小分子和细胞因子	1200	10μg/支	5	0.6
	成纤维细胞生长因子	1700	10μg/支	1	0.17
基因检测 试剂	RT-PCR 试剂盒	1500	100 次/盒	1	0.15
	RNA 提取试剂盒	2000	50 次/盒	1	0.2
	FastStart SYBR Green 试剂盒	500	50 次/盒	2	0.1
	96 孔板 (Roche)	4500	50 块/盒	1	0.45
	引物	1.5	每 bp	1000	0.15
抗体	肠神经元检测抗体	2500	10μg/支	2	0.5
	NCSCs 及其分化能力鉴定抗体	2500	100μg/支	2	0.5
	二抗(羊抗鼠, 羊抗兔等)	1000	500μg/支	2	0.2
实验动物	免疫缺陷小鼠	300	SPF 级	20	0.6
	饲养费	2	每只每天	3600	0.72
常规试剂					0.5
合计					10.22



报告正文

研究内容和研究目标按照申请书执行。



国家自然科学基金资助项目签批审核表

	<p>我接受国家自然科学基金的资助，将按照申请书、项目批准意见和计划书负责实施本项目（批准号：81800448），严格遵守国家自然科学基金委员会关于资助项目管理、财务等各项规定，切实保证研究工作时间，认真开展研究工作，按时报送有关材料，及时报告重大情况变动，对资助项目发表的论著和取得的研究成果按规定进行标注。</p> <p>项目负责人（签章）： 年 月 日</p>	<p>我单位同意承担上述国家自然科学基金项目，将保证项目负责人及其研究队伍的稳定和研究项目实施所需的条件，严格遵守国家自然科学基金委员会有关资助项目管理、财务等各项规定，并督促实施。</p> <p>依托单位（公章） 年 月 日</p>					
本栏目由基金委填写	<p>科学处审查意见：</p>						
	<p>建议年度拨款计划（本栏目为自动生成，单位：万元）：</p>						
	年度	总额	第一年	第二年	第三年	第四年	第五年
	金额						
	<p>科学部审查意见：</p> <p>负责人（签章）： 年 月 日</p>						
本栏目主要用于重大项目等	<p>相关局室审核意见：</p> <p>负责人（签章）： 年 月 日</p>						
	<p>委领导审批意见：</p> <p>委领导（签章）： 年 月 日</p>						