

0-Cre, 该品系小鼠是由alpha A晶体蛋白启动子驱动的Cre转基因小鼠。alpha A晶体蛋白高度特异性表达在晶状体中, 采用MLR10-Cre与DicerloxP小鼠交配并鉴定纯合子, 可以产生完全晶状体特异性敲除Dicer小鼠模型。条件型Dicer基因敲除小鼠晶状体发育缺陷的病理表型分析: BrdU方法检测Dicer-/-小鼠晶状体上皮细胞增殖的改变。TUNEL染色方法检测Dicer-/-小鼠晶状体上皮细胞凋亡。制备Dicer-/-小鼠眼组织切片, 通过HE染色观察病理改变。制备电镜切片, 观察Dicer-/-小鼠晶状体上皮超微结构的改变。

2. miR-204在小鼠晶状体上皮细胞中的功能研究

外科手术法分离Dicer-/-小鼠晶状体囊膜, 原代培养Dicer基因敲除的小鼠晶状体上皮细胞。通过基因转染技术将miR-204转染Dicer基因敲除的小鼠晶状体上皮细胞, 使其在细胞内过表达。通过MTS方法检测细胞增殖; 流式细胞仪检测对细胞周期的影响; 通过Hoechst-PI染色, caspase 3/7活性测定等方法检测对细胞凋亡的影响; 通过划痕实验检测对细胞迁移的影响。根据以上的研究结果, 分析过表达miR-204是否能够补偿因Dicer基因敲除引起的晶状体上皮细胞生物学功能的改变。

3. 通过基因敲除小鼠在体研究miR-204在晶状体上皮中的功能

制备miR-204的基因敲除小鼠, 鉴定纯合子。观察miR-204敲除之后对小鼠晶状体发育的影响。研究miR-204敲除小鼠与Dicer敲除小鼠所引起的晶状体改变的异同, 特别白内障等重要的病理改变。在此基础上, BrdU方法检测上述小鼠晶状体上皮细胞增殖的改变; TUNEL染色方法检测上述小鼠晶状体上皮细胞凋亡; 通过Transwell和划痕实验检测对晶状体上皮细胞迁移的影响。明确miR-204在Dicer调控miRNA在晶状体上皮发育中和白内障形成中的生物学功能。

4. miR-204在晶状体上皮细胞中作用的分子机制

利用生物信息学方法并结合分子生物学技术, 通过生物信息学预测, 结合荧光素酶分析、Western blot等实验方法探索小鼠晶状体上皮细胞中miR-204作用的靶基因, 进而详细研究并揭示miR-204如何影响靶基因表达来行使在晶状体上皮发育和白内障形成过程中的生物学功能。

与本课程有关的国内外研究情况, 本课程要解决的主要问题及课题的理论联系实际

课题的理论与实际意义:

本研究将在既往的研究基础上, 深入分析条件型Dicer基因敲除小鼠晶状体发育缺陷的病理表型。建立miR-204的基因敲除小鼠模型, 深入研究miR-204在小鼠晶状体上皮发育过程中的生物学功能。通过生物信息学方法和分子生物学技术鉴定miR-204调控的靶基因与细胞内信号传导通路。从而明确Dicer调控miR-204在晶状体发育和白内障形成过程中的生物学功能与分子机制, 以期为白内障的临床防治提供新的思路和理论依据。

课题研究途径与方法：（课题研究的技术路线）

按步骤列出具体的研究方法、相关检测参数、统计学分析方法，必要时附技术路线图。

- 1、建立晶状体中特异性敲除Dicer基因的小鼠模型
- 2、分析Dicer基因敲除小鼠晶状体发育缺陷的病理表型
 - (1) miR-204在小鼠晶状体上皮细胞中的功能研究
在Dicer^{-/-}小鼠晶状体上皮细胞中过表达miR-204
体外检测miR-204对晶状体上皮细胞增殖、凋亡和迁移能力的影响
 - (2) 制备miR-204的基因敲除小鼠，在体研究miR-204在晶状体上皮中的功能
明确miR-204能否补偿Dicer^{-/-}小鼠晶状体上皮发育的异常和白内障表型
体内检测miR-204对晶状体上皮细胞增殖、凋亡和迁移能力的影响
- 3、通过生物信息学与分子生物学技术鉴定miR-204作用的靶基因
- 4、基因芯片与western blot技术分析miR-204调控的晶状体上皮细胞内信号通路
- 5、阐明Dicer调控miR-204在晶状体上皮发育和白内障形成过程中的生物学功能与分子机制

协助导师具体指导的人员配备情况：

列出指导人员2-3名。
列出指导老师的学历、职称、指导内容。

1. 叶菊秀老师：浙江大学博士毕业，是我们实验室主要骨干力量和主要指导人员之一，在实验设计和动物实验等方面给予相关指导。
2. 陈伟伟老师：上海交通大学博士毕业，是我们实验室主要骨干力量和主要指导人员之一，在实验设计和分子生物学实验等方面给予相关指导。
3. 陈晓燕老师：在分子生物学方面具有多年的丰富经验，是我们实验室技术人员中的骨干，在分子生物学实验方面能给予很好的指导。
4. 王教老师：是我们实验室细胞培养方面的主要人员，曾在国外学习细胞培养等技术，在细胞生物学实验方面能够给予很好的指导和建议。
5. 王丽花老师：在miRNA实验研究方面有很好的理论基础和实验经验，在实验过程中能够给予很好的帮助和建议。
6. 曹琼洁老师：在转基因以及基因敲除动物研究方面有很好的理论基础和实验经验，在实验过

课题经费预算:

项目条件型Dicer基因敲除小鼠晶状体发育的表型分析	预计费用	4万
miR-204在小鼠晶状体上皮细胞中的功能研究	预计费用	6万
基因敲除小鼠在体研究miR-204在晶状体发育中的功能	预计费用	5万
鉴定miR-204作用的靶基因	预计费用	5万
	总计	20万

简要列出经费预算, 单位: 万元。
如果是临床研究, 则可根据受试者数量、耗材数量、检查费等估算费用。

研究进度及具体时间安排:

起止时间	主要研究内容	预期目标
2016.08-2006.12	条件型Dicer基因敲除小鼠晶状体发育的表型分析	阐明Dicer基因敲除对小鼠晶状体发育的影响
2017.01-2017.03	miR-204在小鼠晶状体上皮细胞中的功能研究	阐明miR-204在晶状体上皮细胞中的功能
2017.04-2017.09	基因敲除小鼠在体研究miR-204在晶状体发育中的功能	阐明miR-204对晶状体发育的影响
2017.10-2017.12	鉴定miR-204作用的靶基因	阐明miR-204作用的靶基因

备注:

备注写“无”

导师组对预试验的意见:

1. 预试验结果表明该课题设计是可行的, 在完成课题已有的内容外, 还应将思路拓宽, 并紧密结合临床, 使研究结果更有意义。
2. 本课题还需要深入查阅文献, 进一步完善与研究课题相关的实验技术, 使研究结果更有说服力。

针对“预实验”, 就实验设计的改进、预实验结果分析、技术要求等, 简要列出2-3条意见。

需要指出: “导师组同意开展该实验”。

闫东升 20160815

开题报告会上提出的主要意见、问题及改进的建议和措施:

1. Dicer的分子机制研究工作量和难度较大。
解决措施: 针对晶状体中高表达的miR-204进行集中而深入的研究, 认真查阅文献, 结合已有的研究进展与实验室的研究结果, 提高研究效率, 加快研究进度。
2. 本课题运用到的实验技术多并且全面, 技术掌握上的问题。
解决措施: 根据课题研究的需要, 认真学习掌握重要的实验技术, 例如: 转染, 实时定量PCR等。
3. 在完成本课题后, 还应该对课题下一步的研究内容进行设计, 使该研究能与临床紧密结合。

针对“整个课题”, 列出3点以上意见。

每个意见自成一段, 包含“存在的问题”和“改进措施”。

这些意见可以是开题报告会上提出的意见, 也可以是平时例会或者个别指导中提出的意见。

开题报告会主要参加人员

姓名	专业	职称	工作单位
闫东升	遗传学	研究员	温州医科大学附属眼视光医院
叶菊秀	动物学	副研究员	
陈伟伟	分子生物学	助理研究员	温州医科大学附属眼视光医院
陈晓燕	生物化学和分子生物学	高级实验师	温州医科大学附属眼视光医院
王教	细胞生物学	实验师	温州医科大学附属眼视光医院
王丽花	遗传学	实验师	温州医科大学附属眼视光医院
曹琼洁	遗传学	实验师	温州医科大学附属眼视光医院

主要参加人员人数不限，但至少包含3名副高以上职称的人员。

学院、系部审查意见：