

项目编号：CSTB2022BSXM-JCX0045

重庆市博士“直通车”科研项目 任务书

项目名称	m6A 阅读蛋白 YBX-1 招募 IGF2BP1 维持 Tmub1 高水平表达负向调控肝再生的研究
项目类别	<input checked="" type="checkbox"/> 基础研究与前沿探索 <input type="checkbox"/> 技术创新与应用发展
项目负责人 (博士本人)	蓝翔
科研工作分管负责人	杨竹
科研管理部门负责人	杨晓
项目主管	谭涛
起止时限	2022 年 09 月 01 日至 2024 年 08 月 31 日

中共重庆市委人才工作领导小组办公室制
二〇二一年六月

填写说明

一、本任务书由博士所在单位、项目负责人共同签订，甲方为博士所在单位，乙方为项目负责人（即博士本人）

二、《重庆市博士“直通车”科研项目申报表》的内容在本任务书中不得修改。

三、本任务书约定的目标任务尽可能量化、具体。

一、项目预期

1. 总体任务书

2022.09-2022.12

分子机制研究 1

(1) 2022.09-2022.12

完善干细胞培养的成熟方案

(2) 2022.10-2022.12

类甲基化转移酶、去除甲基化

测；m6A 修饰水平的检测

(3) 2022.10-2022.12

Tmub1 的 m6A 修饰峰值

肝细胞增殖能力以及肝再

(4) 2022.09-2022.12

单碱基序列的检测和验证

2023.01-2023.12

分子机制研究 2

(1) 2023.01-2023.05

(2) 2023.06-2023.12

该蛋白是通过调控 m6A 修

2024.01-2024.08

临床相关性研究

(1) 2024.01-2024.04

肝组织中 YBX-1 和 *Tmub1* 的

积累生长速度的相关性；

(2) 2024.05-2024.08

后以及终末期肝病肝功能不

2024.01-2024.08

分子机制研究 3

(1) 2024.01-2024.04

一、项目预期目标

1. 总体任务与进度安排

2022.09-2022.12

分子机制研究 1

(1) 2022.09-2022.12: 分选、鉴定及培养人种属和大鼠的 HSPCs, 继续完善干细胞培养的成熟方法; 基因缺陷大鼠的构建、订购;

(2) 2022.10-2022.12: 肝细胞、干细胞、大鼠肝脏再生过程中肝组织内各类甲基化转移酶、去除酶、识别蛋白、*Tmub1*/TMUB1 的蛋白以及基因水平的检测; m6A 修饰水平的检测;

(3) 2022.10-2022.12: 利用细胞转染、基因缺陷大鼠研究 m6A 修饰水平对 *Tmub1* 的 m6A 修饰峰值以及 *Tmub1* 的半衰期、基因和蛋白表达丰度、细胞周期、肝细胞增殖能力以及肝再生能力的影响;

(4) 2022.09-2022.12: 了解 *Tmub1* 的 m6A 富集区域以及能被 m6A 修饰的单碱基序列的检测和验证。

2023.01-2023.12

分子机制研究 2

(1) 2023.01-2023.05: *Tmub1* m6A 阅读蛋白的筛选和验证;

(2) 2023.06-2023.12: YBX-1 对细胞生物学、肝脏再生能力的影响, 并验证该蛋白是通过调控 m6A 修饰的 *Tmub1* 稳定性来实现的上述生物学功能的。

2024.01-2024.08

临床相关性研究

(1) 2024.01-2024.04: 通过前瞻性和回顾性病例, 检测患者肝脏切除标本肝组织中 YBX-1 和 *Tmub1*/TMUB1 的表达丰度, 了解这种表达水平与术后残肝体积生长速度的相关性;

(2) 2024.05-2024.08: 建立 YBX-1 和 *Tmub1*/TMUB1 的表达丰度对肝切除术后以及终末期肝病肝功能不全患者的预后模型;

2024.01-2024.08

分子机制研究 3

(1) 2024.01-2024.04: YBX-1 对 *Tmub1* 相互识别位点以及验证;

- (2) 2024.05-2024.08: YBX-1 调控 *Tmub1* 稳定性的机制研究以及重复验证;
 (3) 2024.05-2024.08: 实验数据的整理、论文的撰写、开展临床转化工作。

2.考核指标与验收依据

编号	考核指标	验收依据
1	明确 <i>Tmub1</i> 的 m6A 修饰位点及相关生物学功能	相关 m6A 测序报告、WB 结果、PCR 结果、细胞增殖实验结果、实验动物肝脏再生体积测定结果
2	<i>Tmub1</i> m6A 阅读蛋白的筛选和生物学功能验证	相关质谱实验报告、mRNA 半衰期实验报告
3	通过前瞻和回顾性临床研究, 建立疾病预测模型	临床资料的随访报告、疾病预测模型的验证报告
4	(1) <i>Tmub1</i> m6A 阅读蛋白调控细胞增殖的具体分子机制的研究; (2) 实验总结, 论文撰写发表	相关免疫共沉淀实验报告、结晶和结构测定实验报告、发表 3-5 分 SCI 论文 1 篇

二、项目研究团队成员

姓名	性别	年龄	最高学历	现从事专业	项目分工	签字
蓝翔	男	39	研究生	肝胆外科	负责人	
邱建国	男	36	研究生	肝胆外科	细胞培养、动物实验、pull-down 实验、甲基化测序	
牟童	男	33	研究生	肝胆外科	数据分析、生物信息学分析、WB、PCR 以及其他基础实验	
魏续福	男	36	研究生	肝胆外科	论文撰写、临床实验数据收集、随访、统计学分析	

三、项目经费

- 1.项目经费
经费 壹拾 ()
- 2.项目经费

四、项目主要内容

1.研究内容

- (1) mRNA 的 m6A 修饰位点及生物学功能, 明确 *Tmub1* 的 m6A 修饰位点并明确 *Tmub1* 的 m6A 修饰峰位度;
 - 1) 了解大鼠、人种 *Tmub1* 的 m6A 修饰峰位度;
 - 2) 明确大鼠肝切除 *Tmub1* 的 m6A 修饰峰位度的变化;
 - 3) mRNA 的 m6A 修饰基因相对表达量和蛋白表达量; 影响;
 - 4) 明确 mRNA 的 m6A 修饰对 *Tmub1* 稳定性的影响;
 - 5) 进一步了解 *Tmub1* 的 m6A 修饰对 *Tmub1* 稳定性的影响;
 - 6) 验证上述发现的 *Tmub1* 的 m6A 修饰位点。通过该部分实验, 明确 *Tmub1* 的 m6A 修饰位点。
- (2) *Tmub1* m6A 阅读蛋白的筛选和生物学功能验证
 - 1) 在大鼠、人种属中

三、项目经费

1.项目经费总额 壹拾 万元。其中，市财政支持研究经费 壹拾 (万元)。

2.项目经费包干使用，不设比例限制。

四、项目主要实施内容(1000字以内)

1.研究内容

(1) mRNA 的 m6A 修饰水平通过调节 *Tmub1* 半衰期影响肝细胞增殖能力和肝再生能力并明确 *Tmub1* 的 m6A 修饰位点

1)了解大鼠、人种属的 HSPCs 与分化型肝细胞内, mRNA 的 m6A 修饰水平, *Tmub1* 的 m6A 修饰峰值, 以及 *Tmub1* 的半衰期、基因相对表达量和蛋白表达丰度;

2)明确大鼠肝切除术后再生过程中, 残余肝脏组织 mRNA 的 m6A 修饰水平, *Tmub1* 的 m6A 修饰峰值, 以及 *Tmub1* 的半衰期、基因相对表达量和蛋白表达丰度的变化;

3)mRNA 的 m6A 修饰水平对 *Tmub1* 的 m6A 修饰峰值以及 *Tmub1* 的半衰期、基因相对表达量和蛋白表达丰度、细胞周期、肝细胞增殖能力以及肝再生能力的影响;

4)明确 mRNA 的 m6A 修饰水平对细胞增殖能力和肝脏再生能力的影响是通过调节 *Tmub1* 的稳定性来实现的;

5) 进一步了解 *Tmub1* 能被 m6A 修饰的单碱基序列;

6) 验证上述发现的单碱基序列。

通过该部分实验, 我们初步了解 mRNA 的 m6A 修饰水平通过调节 *Tmub1* 半衰期、TMUB1 表达丰度影响肝细胞增殖能力和肝脏再生能力, 并确定 *Tmub1* 的 m6A 修饰位点。

(2) *Tmub1* m6A 阅读蛋白的筛选

1) 在大鼠、人种属的分化型肝细胞系与肝脏组织标本中, 筛选出与 *Tmub1*

结合力较高的 m6A 阅读蛋白；

2) 在大鼠、人种属的分化型肝细胞系中进一步筛选出能提高 *Tmub1*/TMUB1 mRNA 相对表达量和蛋白表达丰度的 m6A 阅读蛋白；

3) 验证这种(些)蛋白通过 m6A 修饰位点识别 *Tmub1*；

4) 验证这种(些)蛋白对 m6A 修饰的 *Tmub1* 半衰期的影响。

通过该部分实验，筛选出能延长 *Tmub1* 半衰期的 m6A 阅读蛋白。

(3) YBX-1 表达丰度对细胞生物学行为的影响

1) 了解大鼠、人种属的 HSPCs 与分化型肝细胞内，YBX-1 表达丰度；

2) 了解 YBX-1 表达丰度对细胞成球能力、增殖能力、细胞周期的影响；

3) 明确 YBX-1 对细胞生物学行为的影响，是通过调控 m6A 修饰的 *Tmub1* 稳定性来实现的。

通过该部分实验，明确 YBX-1 是通过调控 m6A 修饰的 *Tmub1* 稳定性，进而调控细胞生物学行为。

(4) YBX-1 表达丰度对动物模型肝脏再生能力的影响

1) 明确大鼠肝切除术后再生过程中，YBX-1 表达丰度的变化；

2) 了解 YBX-1 表达丰度对大鼠肝切除术后肝脏再生能力的影响；

3) 明确 YBX-1 对大鼠肝脏再生能力的影响，是通过调控 m6A 修饰的 *Tmub1* 稳定性来实现的；

4) 了解 YBX-1 表达丰度对大鼠肝切除术后肝功能不全发生率的相关性。

通过该部分实验，明确 YBX-1 是通过调控 m6A 修饰的 *Tmub1* 稳定性，进而调控实验动物肝脏再生能力，并与肝功能不全的发生相关。

(5) YBX-1 和 *Tmub1*/TMUB1 表达水平对临床患者肝脏再生能力的影响；建立 YBX-1、*Tmub1*/TMUB1 对肝功能不全的评估/预测模型

1) 检测患者肝脏切除标本肝组织内 YBX-1 和 *Tmub1*/TMUB1 的相对表达量和表达丰度；

2) 了解上述表达水平与残肝体积生长速度的相关性；

3) 了解上述表达水平与术后肝功能不全发生率的相关性；建立 YBX-1 和 *Tmub1*/TMUB1 的相对表达量和表达丰度对肝切除术后肝功能不全的预后模型；

通过该部分内容，明确 YBX-1 表达丰度与临床的相关性。

衰期

i

研

本研

肝切除再

的包括乳

研究);mR

mRNA 半衰

缺失突变体

细胞转染、P

GST-pulldown

实验方案

(6) YBX-1 调控 *Tmub1* 稳定性的机制研究

1) YBX-1 对 *Tmub1* 相互识别位点;

- a. 确定 *Tmub1* 能被与 YBX-1 识别的结合位点;
- b. 确定 YBX-1 能与 *Tmub1* 的结合位点或者结构域;
- c. 验证上述结合位点。

2) YBX-1 调控 *Tmub1* 稳定性的机制;

- a. 了解大鼠、人种属的 HSPCs 与分化型肝细胞内, YTHDF2 蛋白表达丰度;
- b. 明确大鼠肝切除术后再生过程中, YTHDF2 蛋白表达丰度的变化;
- c. 了解 YTHDF2 蛋白表达丰度对 *Tmub1* 半衰期的影响;
- d. 验证 *Tmub1* 被 YTHDF2 识别的位点是否与 m6A 修饰位点、YBX-1 识别位点一致;
- e. 研究 YBX-1 蛋白表达丰度对 YTHDF2 与 *Tmub1* 结合的影响;
- f. 研究 YBX-1 是否干扰了 YTHDF2 与处理小体的结合;
- g. 研究 YBX-1 是否能拮抗 YTHDF2 对 *Tmub1* 的降解;
- h. 研究 YBX-1 蛋白表达丰度对 *Tmub1* 在翻译池中水平改变的影响;
- i. 明确 YBX-1 是否通过招募 IGF2BP1 等蛋白形成复合体共同调节 *Tmub1* 的半衰期。

通过上述实验, 明确 YBX-1 调节稳定性 *Tmub1* 的具体机制。

2. 研究方法或技术路径

研究方法

本研究所涉及的方法和实验手段都是一些比较成熟的技术, 主要包括: 大鼠肝切除再生模型(包括经典的 40% 切除模型、70% 切除模型), 最近建立了稳定的包括乳头叶在内的 80% 切除模型(切除后可使部分大鼠肝衰竭死亡, 用于差别研究); mRNA 的 m6A 修饰水平、m6A 修饰的碱基序列、MeRIP、RIP-seq、miCLIP-seq、mRNA 半衰期的检测; *Tmub1* 碱基的点突变体片段构建、YBX-1/IGF2BP1 结构域缺失突变体以及不同长度片段的构建、细胞培养与传代、HSPCs 的分离及培养、细胞转染、PCR、免疫共沉淀、Western-blot、免疫银光染色、免疫荧光素酶实验、GST-pulldown、生物素 RNA-pulldown 以及质谱分析。

实验方案

(1) mRNA 的 m6A 修饰水平调节 *Tmub1* 稳定性, 影响肝细胞生物学行为和肝再生能力; 明确 *Tmub1* 的 m6A 修饰位点

1) mRNA 的 m6A 修饰水平通过调节 *Tmub1* 影响细胞生物学行为

a. 以 EpCAM 作为标志物, 使用 BD Arial II 流式细胞分选仪, 分别获取人 L-02 细胞系、大鼠 BRL-3A 细胞系 HSPCs (EpCAM⁺) 和分化型肝细胞 (EpCAM⁻)。HSPCs 通过悬浮培养、连续成球实验、干性标志物的检测等进一步验证其“干性”;

b. qTR-PCR 检测 mRNA 的相对表达量, WB 检测蛋白表达丰度, 放线菌素 D 实验检测 mRNA 半衰期, CCK-8 和 Edu 实验检测细胞增殖能力, EpiQuik M6A RNA Methylation Quantification Kit 试剂盒检测细胞和组织中 mRNA 的 m6A 修饰水平, miCLIP-seq 实验检测 *Tmub1* 的 m6A 修饰峰值以及 m6A 修饰的具体碱基序列, 流式检测仪检测细胞周期。通过上述实验检测 HSPCs 与分化型肝细胞内 mRNA 的 m6A 修饰水平、*Tmub1* 的 m6A 修饰峰值、*Tmub1* 的半衰期、*Tmub1* 的相对表达量、TMUB1 的表达丰度、细胞周期、细胞连续成球能力以及细胞增殖能力;

c. 慢病毒构建稳转体系。上调 HSPCs 内 mRNA 的 m6A 修饰水平, 下调分化型肝细胞内 mRNA 的 m6A 修饰水平, 重复上述检测指标;

d. 分化型肝细胞敲除内源性 *Tmub1*, 然后改变细胞内 mRNA 的 m6A 修饰水平, 检测细胞生物学行为, 验证 m6A 修饰通过调节 *Tmub1* 来影响细胞的生物学行为。

2) mRNA 的 m6A 修饰水平通过调节 *Tmub1* 影响动物模型肝脏再生能力

a. CRISPR/Cas9 构建 *Tmub1*、*Mettl3* 基因缺陷大鼠; 核磁共振 (magnetic resonance imaging, MRI) 完成大鼠肝切除术后剩余肝脏体积变化的检测; 40%-80% 肝切除大鼠肝再生模型本课题小组已经熟练掌握^[6-8];

b. 构建 *Mettl3*^{-/-} 大鼠与对照大鼠肝切除模型, 分别检测切肝前、切肝后 0h, 12h, 24h, 36h, 48h, 72h, 84h, 96h, 108h, 120h, 132h, 144h, 156h, 168h 的手术组和假手术组各时相点残余肝组织内 mRNA 的 m6A 修饰水平、*Tmub1* 的 m6A 修饰峰值、*Tmub1* 的半衰期、*Tmub1* 的相对表达量、TMUB1 的表达丰度、细胞周期、肝再生能力 (即残肝体积) 等相关指标;

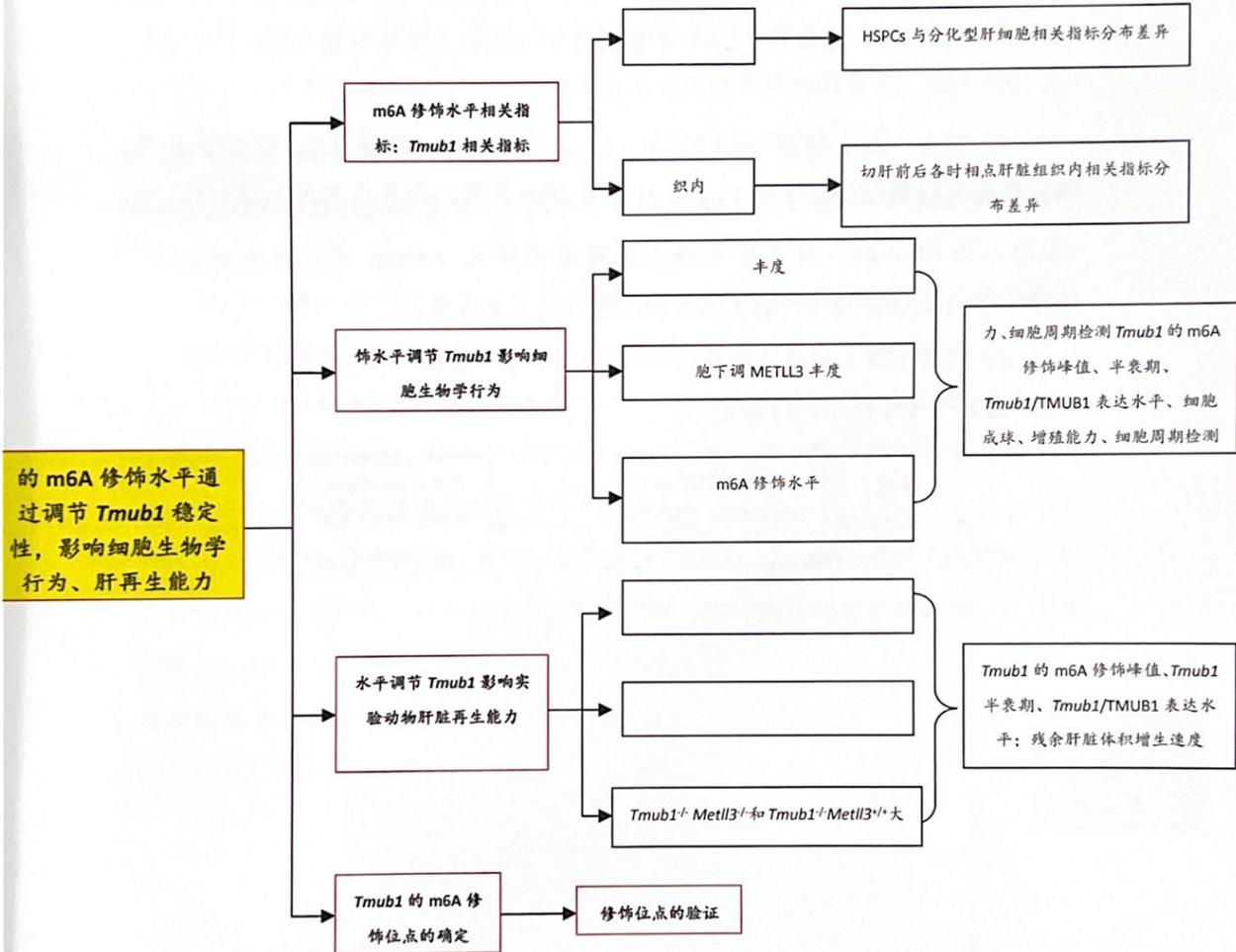
c. 构建 *Tmub1*^{-/-} *Mettl3*^{-/-} 与 *Tmub1*^{-/-} *Mettl3*^{+/+} 大鼠肝切除模型, 检测各时相点的肝脏再生能力, 验证 mRNA 的 m6A 修饰是通过调节 *Tmub1* 来影响肝脏再生。

3) *Tmub1* 的 m6A 修饰位点的确定及验证

a. miCLIP-seq 检测 *Tmub1* 的 m6A 修饰峰值并明确其 m6A 修饰的具体碱基序列;

b. 合成结合位点突变的 *Tmub1* ($\Delta Tmub1$), 转染已敲除内源性 *Tmub1* 的分化型肝细胞, 明确 m6A 修饰水平的改变是否会引起 $\Delta Tmub1$ 的 m6A 修饰峰值和相对表达量、半衰期以及细胞生物学行为的改变, 验证结合位点。

技术路线 1 (对应研究内容 1)



(2) *Tmub1* m6A 阅读蛋白的筛选

1) 获取分化型 BRL-3A 和 L-02 细胞裂解液; 获取大鼠肝脏组织和人肝脏组织(肝切除标本中远离病变的正常肝组织)裂解液;

2) 生物素分别标记含 m6A(Oligo-m6A)和不含 m6A(Oligo-A)的 RNA 寡聚核苷酸: 5'-biotin-AGAAAAGACAACCAACGAGGGXCUCAUCAU-3' (X=A or m6A);

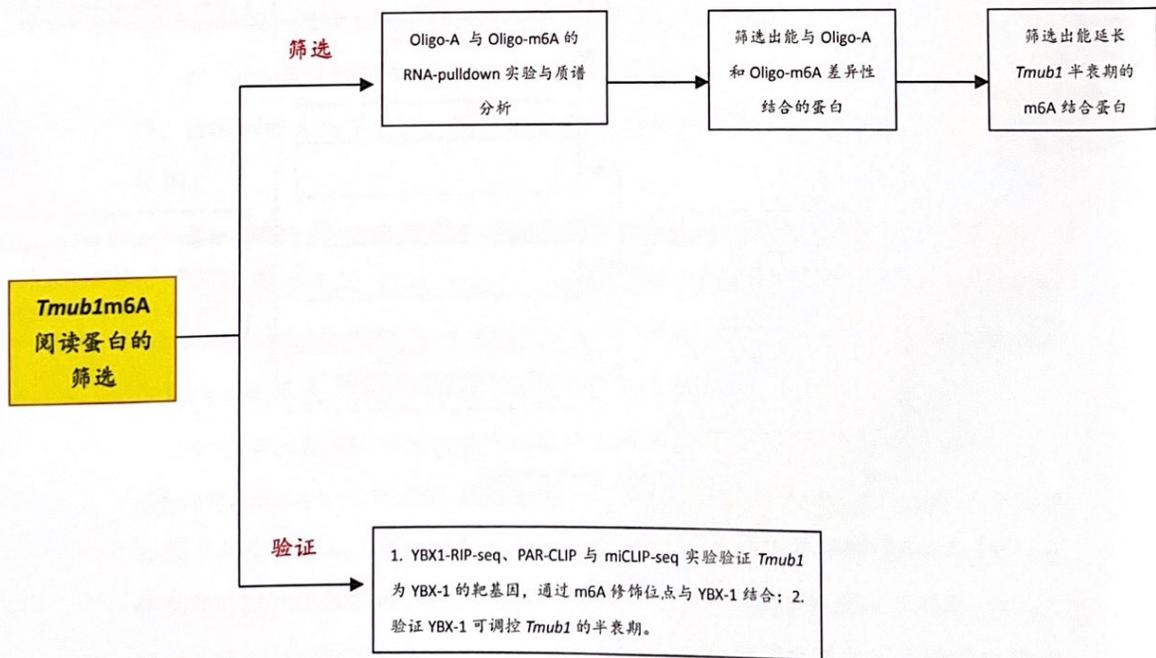
3)用上述合成的寡聚核苷酸加入到提取的裂解液中行 RNA-pulldown 实验, 其后通过质谱分析, 比较两组间的差异 (Oligo-A vs. Oligo-m6A), 获得在肝细胞和肝脏组织中潜在可能的 m6A 结合 (阅读) 蛋白; 在肝细胞中下调这些蛋白的表达丰度, 筛选出下调后能显著降低 *Tmub1* 半衰期的 m6A 结合蛋白 (经预实验证实可能为 YBX-1);

4)YBX1-RIP-seq、YBX1-PAR-CLIP 与 miCLIP-seq 实验明确:a.m6A 修饰的 *Tmub1* 是否为 YBX-1 的靶基因; b.YBX-1 对 *Tmub1* 的识别位点是否与其 m6A 修饰位点一致;

5) 验证 YBX-1 通过 m6A 识别 *Tmub1*: 改变 *Tmub1* 的 m6A 修饰峰值, 以 YBX1-RIP-seq 观察 YBX-1 与 *Tmub1* 的结合力改变; 突变 *Tmub1* 能被 YBX-1 识别的位点 ($\Delta Tmub1$), 将突变体转染已敲除内源性 *Tmub1* 的分化型肝细胞, YBX1-RIP-seq 再次检测 YBX-1 与 $\Delta Tmub1$ 结合力的改变;

6) 改变 YBX-1 的表达丰度, 检测 *Tmub1* 的半衰期;

技术路线 2 (对应研究内容 2)



(3) YBX-1 表达丰度通过调节 m6A 修饰的 *Tmub1* 对细胞生物学行为、动物模型肝脏再生能力的影响

1) YBX-1 表达丰度通过调节 m6A 修饰的 *Tmub1* 对细胞生物学行为的影响

a. 以 WB 实验明确大鼠、人种属的 HSPCs 与分化型肝细胞内 YBX-1 蛋白表达丰度的差异;

b. 通过细胞成球实验、Edu 细胞增殖实验、CCK-8、细胞流式检测等明确 YBX-1 表达丰度的上调(HSPCs)与下调(分化型肝细胞)对 *Tmub1* 半衰期、*Tmub1*/TMUB1 的相对表达量和表达丰度、细胞连续成球、增殖能力以及细胞周期的影响;

c. 分化型肝细胞敲除内源性的 *Tmub1*, 转染 m6A 结合位点突变的 Δ *Tmub1*, 随后改变 YBX-1 表达丰度, 再次行 Δ *Tmub1* 半衰期、 Δ *Tmub1*/TMUB1 的相对表达量和表达丰度、细胞成球能力、增殖能力以及细胞周期的检测, 验证 YBX-1 对细胞生物学行为的影响, 是通过调控 m6A 修饰的 *Tmub1* 来实现的;

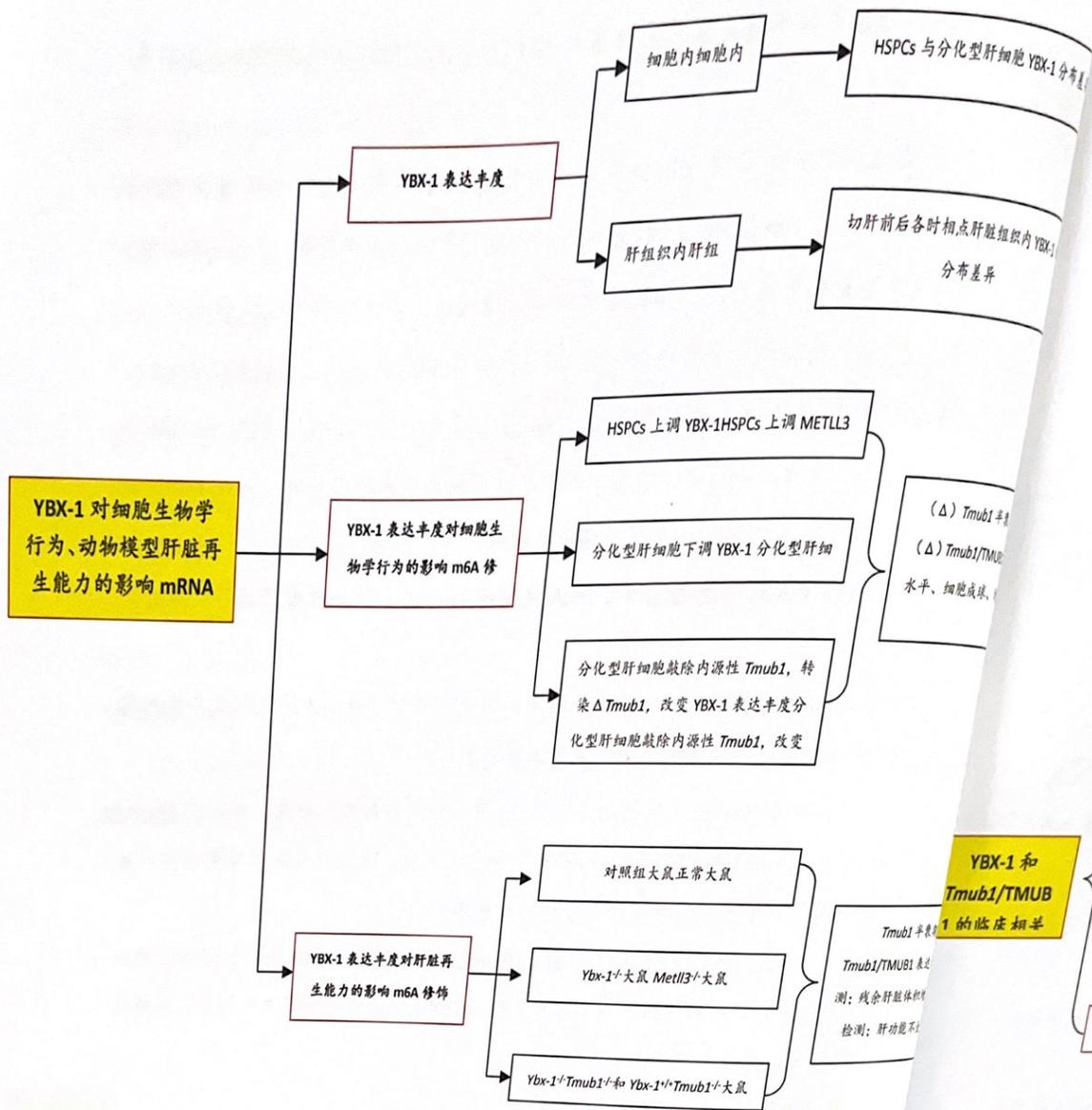
2) YBX-1 表达丰度通过调节 m6A 修饰的 *Tmub1* 对动物模型肝脏再生能力的影响

a. 以 WB 实验明确大鼠肝切除术后再生过程中(时相点的选择见研究内容 1) 残余肝脏组织内 YBX-1 蛋白表达丰度的差异;

b. 构建 *Ybx-1*^{-/-} 大鼠肝切除术模型, 分别检测各时相点残余肝组织内 *Tmub1* 半衰期、*Tmub1*/TMUB1 的相对表达量和表达丰度、残余肝脏体积增生速度以及肝功能不全发生率与对照组大鼠之间的差异;

c. 构建 *Ybx-1*^{-/-}*Tmub1*^{-/-} 和 *Ybx-1*^{+/+}*Tmub1*^{-/-} 大鼠, 以 MRI 检测上述实验动物肝切除术后残余肝脏体积增生速度, 验证 YBX-1 对肝脏再生能力的影响, 是通过调控 *Tmub1* 来实现的。

技术路线 3 (对应研究内容 3、4)



(4) YBX-1 和 *Tmub1*/TMUB1 表达水平对临床患者肝脏再生能力的影响; 建立 YBX-1、*Tmub1*/TMUB1 对肝功能不全的评估/预测模型

前瞻性研究:

1) 入组患者 (纳入标准见实验方法), 留取肝脏切除患者肝脏组织, 提取蛋白和 RNA, 以 WB 和 RT-qPCR 检测 YBX-1 和 *Tmub1*/TMUB1 的相对标量和表达丰度;

2) 以 MRI 测量术后第 1 天、术后 1 周、术后 2 周、术后 3 周、术后 1 月、术后 2 月、术后 3 月残余肝脏体积 (cm^3), 分别与 YBX-1 和 *Tmub1*/TMUB1 的相对标量和表达丰度做相关性分析;

(5) YBX-1 对

1) YBX-1 对

a. 研究内容 2

的突变体, 转染已敲

与 *Tmub1* 突变体之间

b. 通过生物

<http://smart.embl-heide>

含有一个 CSD 结构域 (大

regions (LCS)。分别构建 7

HSPCs 与分化型肝细胞 YBX-1 分布差异

切肝前后各时相点肝脏组织内 YBX-1 的分布差异

TLL3

(Δ) *Tmub1* 半衰期

(Δ) *Tmub1*/*TMUB1* 水平、细胞成球、增殖

Tmub1 半衰期

Tmub1/*TMUB1* 表达检测：残余肝脏体积增加

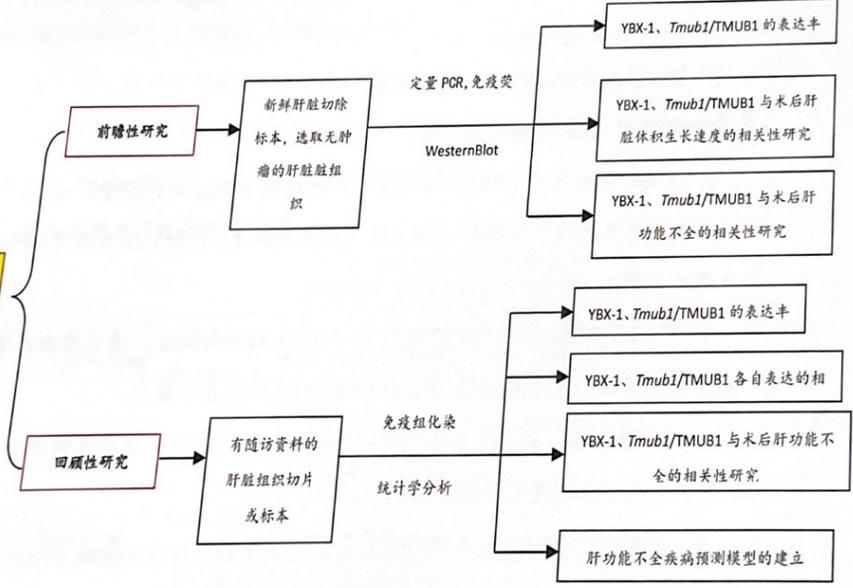
检测：肝功能不全

3) 检测术后第 1 天、第 3 天、第 5 天、第 7 天、第 11 天、第 13 天、第 15 天的肝功能、凝血功能，按术后肝功能不全的诊断标准分组，分别与 YBX-1 和 *Tmub1*/*TMUB1* 的相对表达量和表达丰度做相关性分析。

回顾性研究：

- 1) 通过标本库，取有随访资料患者的标本，通过免疫组化染色、WB、RT-qPCR 等，检测 YBX-1、*Tmub1*/*TMUB1* 各自的表达丰度，并以回归分析，了解 YBX-1、*Tmub1*/*TMUB1* 表达丰度与肝不全发生率的相关性。
- 2) 构建列线图，建立肝功能不全的疾病预测模型。

技术路线 4 (对应研究内容 5)



(5) YBX-1 调控 *Tmub1* 稳定性的机制研究

1) YBX-1 对 *Tmub1* 相互识别位点：

a. 研究内容 2 已确定 YBX-1 识别 *Tmub1* 的具体碱基位点，构建这些位点缺失的突变体，转染已敲除内源性 *Tmub1* 的分化型肝细胞，以 YBX1-RIP-seq 检测 YBX-1 与 *Tmub1* 突变体之间的结合；

b. 通过生物信息学预测网站 <https://www.uniprot.org/> 以及 <http://smart.embl-heidelberg.de/> 检索，人和大鼠种属的 YBX-1 高度保守同源，都含有一个 CSD 结构域(大鼠:59aa-123aa, 人:61aa-125aa)以及 6 个 low complexity regions (LCS)。分别构建 7 个结构域的突变体，转染已敲除内源性 *Ybx-1* 的分化型

肝细胞, 以 YBX1-RIP-seq 检测 YBX-1 突变体与 m6A-*Tmub1* 之间的结合;

c. 步骤 b 所得能与 m6A-*Tmub1* 结合的结构域 (经预测可能为 CSD 结构域), 与 Oligo-m6A 混合, 行结晶和结构测定实验, 进一步明确 CSD 结构域中能识别 m6A-*Tmub1* 的氨基酸残基以及与 CH3(m6A) 的共价结合方式 (例如氨基酸残基与 CH3 的 π - π 共价结合; 氨基酸残基与 CH3 的 O₂ 或羧基的共价结合等)。经预测, CSD 结构域中, 可能与 CH3 形成共价结合的残基有 H87、W65、F74、F85、N67、N70 等。

d. 突变步骤 c 中所确定的能与 CH3 形成共价结合的位点, 采用等温滴定量热法 (isothermal titration calorimetry, ITC) 检测突变体与 Oligo-m6A 的亲合力, 对结晶结构测定实验进行验证。

2) YBX-1 调控 *Tmub1* 稳定性的机制

YTHDF2 对 m6A-*Tmub1* 的降解:

a. 以 WB 实验明确 YTHDF2 在大鼠、人种属的 HSPCs 与分化型肝细胞、大鼠肝切除术后再生过程中 (时相点的选择见技术路线 1) 残余肝脏组织内的蛋白表达丰度的差异;

b. YTHDF2-PAR-CLIP 检测 YTHDF2 对 *Tmub1* 的识别位点, 通过前面已完成的 miCLIP-seq 实验, 比对是否与 *Tmub1* 的 m6A 修饰位点一致

c. 改变 HSPCs、分化型肝细胞内 YTHDF2 的表达丰度, 以放线菌素 D 实验检测 *Tmub1* 的半衰期改变情况;

d. 改变分化型肝细胞内 YTHDF2 的表达丰度, 并下调 mRNA 的 m6A 修饰水平, 以 YTHDF2-RIP-seq 实验检测 YTHDF2 与 *Tmub1* 的亲合力改变, 以放线菌素 D 实验检测 *Tmub1* 的半衰期改变情况;

YBX-1 拮抗 YTHDF2 对 m6A-*Tmub1* 的降解:

e. 下调分化型肝细胞内的 YBX-1 蛋白表达丰度, 以 WB 验证 YTHDF2 的蛋白表达丰度是否随之改变; 以 YTHDF2-RIP-seq 实验、YTHDF2 与 m6A 抗体的 Co-IP 实验共同验证 YTHDF2 与 m6A-*Tmub1* 的结合能力改变; Co-IP 实验验证 YTHDF2 与处理小体 DCP1a、GW182 和 DDX6 亚单位的结合能力是否改变; 敲除内源性 *Ythdf2*, 转染外源性 *Ythdf2- Δ YTH* (YTH 结构域缺失的突变体), 改变 YBX-1 的表达丰度, 检测 *Tmub1* 半衰期, 验证 YBX-1 对 *Tmub1* 稳定性的调控是通过拮抗

1之间的结合:

测可能为 CSD 结构域),
确 CSD 结构域中能识别
式(例如氨基酸残基与
共价结合等)。经预测,
W65、F74、F85、N67、

点,采用等温滴定量热
Oligo-m6A 的亲合力,对

s 与分化型肝细胞、大鼠
残余肝脏组织内的蛋白表

位点,通过前面已完成的
一致

变,以放线菌素 D 实验检

调 mRNA 的 m6A 修饰水
和力改变,以放线菌素 D

WB 验证 YTHDF2 的蛋白
F2 与 m6A 抗体的 Co-IP

Co-IP 实验验证 YTHDF2
是否改变;敲除内源性

变体),改变 YBX-1 的表
定性的调控是通过拮抗

YTHDF2 来完成的;

f. ITC 实验分别检测 YBX-1 的 CSD、YTHDF2 的 YTH 与 Oligo-m6A 的亲合力;
验证 YBX-1 CSD 是否能导致 YTH 与 Oligo-m6A 的亲合力降低;

YBX-1 招募 IGF2BP1 共同维持 *Tmub1* 稳定性:

g. WB 实验检测 HSPCs、分化型肝细胞的 IGF2BP1 蛋白表达丰度;

h. Co-IP 实验验证 YBX-1 能与 IGF2BP1 在细胞内发生共结合;

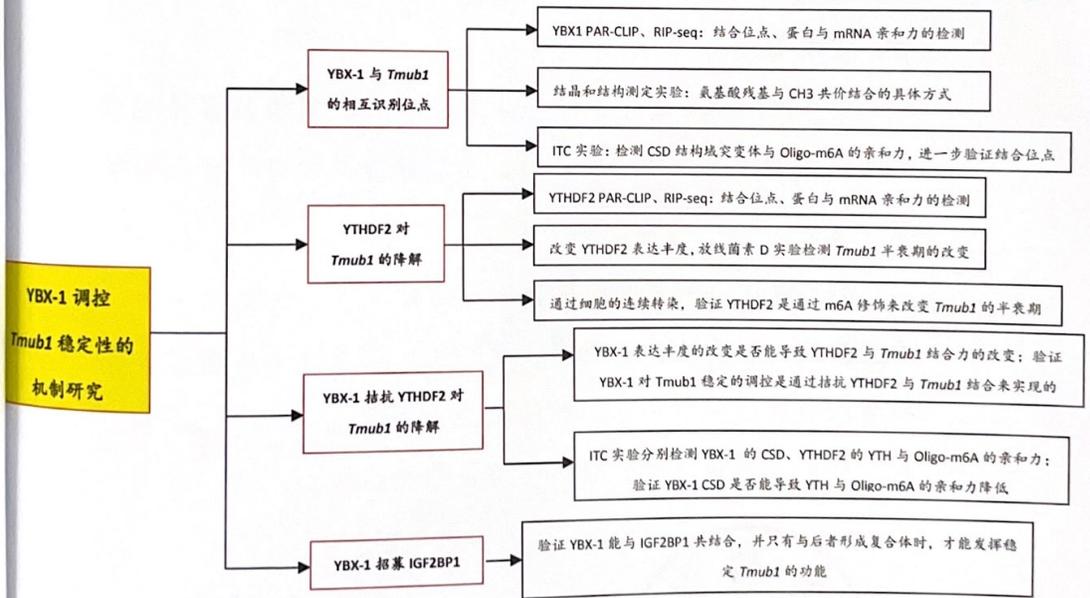
i. 体外 pull-down 实验分别验证 YBX-1 突变体(Δ CSD、 Δ LCS1-6)和 IGF2BP1
的突变体(Δ RRM1-2、 Δ KH1-4)与 YBX-1 的体外结合,以确定相互结合的区域;

j. 下调分化型肝细胞的 IGF2BP1 蛋白表达丰度,检测 *Tmub1* 的半衰期、YBX-1
与 *Tmub1* 的结合、YTHDF2 与 *Tmub1* 的结合;

k. 下调分化型肝细胞的 YBX-1 蛋白表达丰度,检测 IGF2BP1 与 *Tmub1* 的结合;

l. 突变 YBX-1 与 IGF2BP1 的结合位点,干扰两者结合,检测 *Tmub1* 的半衰期、
YBX-1 与 *Tmub1* 的结合、IGF2BP1 与 *Tmub1* 的结合。

技术路线 5 (对应研究内容 6)



3. 推广应用方案(仅开展技术创新与应用发展研究填写)

五、相关责任

1.重庆市博士“直通车”科研项目按照自主选题、审核立项、自主管理、自主结题的原则，甲方负责为项目提供培养、使用、管理、服务工作，为乙方的成长和发挥作用提供必要的支持，对项目任务进行跟踪管理、过程监督等。乙方根据《重庆市博士“直通车”科研项目申报表》中的内容，保证本项目按计划、高质量完成。

2.乙方在项目执行过程中，项目任务书中签订内容、人员和完成时间原则上不得变更。确需变更的，须经甲方同意后，方可变更。

3.甲方应建立健全科研项目管理、科研诚信监督等规章制度，保证项目正常组织实施，认真监督并及时处理科研失信行为。

4.乙方应按约定时间提请甲方组织项目验收结题工作。通过验收的，由乙方及时在线填写结题信息并上传项目重点环节的研发记录和甲方同意结题的书面意见。每年6月和12月，市科技局将集中公布博士项目结题名单。

甲方：(单位公章)



科研工作分管负责人_____ (签字)
科研管理部门负责人_____ (签字)
项目主_____ (签字)

杨竹

杨文

乙方:

项目负责

(签字)

罗勇

冀英周

2022 年 8 月 18 日

照自主选题、审核
负责为项目提供培
长和发挥作用提供
过程监督等。乙方
申报表》中的内容，

书中签订内容、人
的，须经甲方同意

研诚信监督等规章
并及时处理科研失

目验收结题工作。
息并上传项目重点
意见。每年6月和12
单。

2021120165

cstc2021jcyj-msxmX0604 m6A 阅读蛋白 YBX-1 招募 IGF2BP1 维持 Tmub1 高水平表达负向调控肝再生的研究

//

立项编号: cstc2021jcyj-msxmX0604

重庆市自然科学基金面上项目任务书

项目名称	m6A 阅读蛋白 YBX-1 招募 IGF2BP1 维持 Tmub1 高水平表达负向调控肝再生的研究
承担单位	重庆医科大学
项目负责人	蓝翔
通讯地址	重庆市渝中区医学院路 1 号
联系电话	[REDACTED]
起止年限	2021-10-01 至 2024-09-30

重庆市科学技术局
二〇二〇年六月制



填写说明

- 1、本任务书由重庆市科委、项目承担单位共同签订，甲方为重庆市科委，乙方为项目承担单位。
- 2、本任务书是项目经费拨付和结题的依据。任务书的内容根据《基础研究与前沿探索项目（重庆市自然科学基金）项目申报书》自动生成。
- 3、立项编号由项目管理系统统一分配。



一、考核指标

(一) 考核指标概述

预期研究成果：

1. mRNA 的 m6A 修饰水平调控着干细胞和分化型肝细胞的不同状态；而肝再生的负向调节因子 Tmub1 也受到这种机制的调控。
2. YBX-1 是我们筛选出的一个新的 m6A 识别、结合蛋白，可延长 Tmub1 的其半衰期，维持其高丰度表达；
3. YBX-1 通过招募另一种 mRNA 稳定分子 IGF2BP1，形成复合体，拮抗 YTHDF2 对 Tmub1 的降解，未实现对 Tmub1 的保护。
4. 改变实验动物体内 YBX-1 的表达，可改变其肝切除术后肝再生能力。
5. 肝脏标本内，YBX-1 表达丰度较高的患者，术后肝功能不全发生率相对较高。
6. 建立关于 YBX-1、Tmub1/TMUB1 和肝功能不全疾病预测模型。

考核指标：

1. 发表 3-5 分左右的 SCI 论文 1 篇

(二) 考核指标及验收依据

时间阶段	工作内容	拟解决的关键问题	考核指标
2021.10.01-2022.04.30	(1) 甲基化相关酶、Tmub1/TMUB1 的蛋白以及基因水平的检测；m6A 修饰水平的检测；(2) 研究 m6A 修饰水平对 Tmub1 的 m6A 修饰峰值、肝细胞增殖能力以及肝再生能力的影响；(3) 了解 Tmub1 的 m6A 富集区域以及能被 m6A 修饰的单碱基序列的检测和验证。	明确 Tmub1 的 m6A 修饰位点及相关生物学功能	相关 m6A 测序报告、WB 结果、PCR 结果、细胞增殖实验结果、实验动物肝脏再生体积测定结果
2022.05.01-2022.09.30	(1) Tmub1 m6A 阅读蛋白的筛选和验证；(2) YBX-1 对细胞生物学、肝脏再生能力的影响，并验证该蛋白是通过调控 m6A 修饰的 Tmub1 稳定性来实现的上述生物学功能的。	Tmub1 m6A 阅读蛋白的筛选和生物学功能验证	相关质谱实验报告、mRNA 半衰期实验报告
2022.10.01-2023.09.30	(1) 通过前瞻性和回顾性病例，检测患者肝脏切除标本肝组织中 YBX-1 和 Tmub1/TMUB1 的表达丰度，了解这种表达水平与术后残肝体积生长速度的相关性；(2) 建立 YBX-1 和 Tmub1/TMUB1 的表达丰度对肝切除术后以及终末期肝病肝功能不全患者的预后模型；	通过前瞻和回顾性临床研究，建立疾病预测模型	临床资料的随访报告、疾病预测模型的验证报告



2023.10.01-2024.09.30	(1) YBX-1 对 Tmub1 相互识别位点以及验证; (2) YBX-1 调控 Tmub1 稳定性的机制研究以及重复验证; (3) 实验数据的整理、论文的撰写、开展临床转化工作。	(1) Tmub1 m6A 阅读蛋白调控细胞增殖的具体分子机制的研究; (2) 实验总结, 论文撰写发表	相关免疫共沉淀实验报告、结晶和结构测定实验报告、发表 3-5 分 SCI 论文 1 篇
-----------------------	--	--	---



二、项目组成员

姓名	证件号码	性别	学历	职称	专业	工作单位	联系电话	项目中的分工	每年工作时间(月)	签字
蓝翔(负责人)		男	博士研究生	副高	肝胆外科	重庆医科大学		项目负责人	8	
邱建国		男	博士研究生	中级	外科学	重庆医科大学		细胞培养、动物实验、pull-down实验、甲基化测序	10	
车童		男	硕士研究生	其他	临床医学	重庆医科大学		数据分析、生物信息学分析、WB、PCR以及其他基础实验	10	
魏续福		男	博士研究生	中级	外科学	重庆医科大学		论文撰写、临床实验数据收集、随访、统计学分析	10	



三、项目经费

甲方为乙方提供本项目研究经费 10 万元，在签约后一次拨付；乙方自筹或匹配经费不少于 0.0 万元。



四、相关责任

1、甲方在项目执行过程中不得无故撤销或终止项目。

2、乙方及专项牵头单位在项目实施过程中应建立相应的规章制度，加强安全管理，确保人员及设备安全，对科研安全负全部责任。项目执行过程中应严格遵守重庆市科技局科技计划项目管理的各项规定并承担相应权责，按约定保证项目实施所需的人力、物力、财力，督促项目负责人和本单位项目管理部门按重庆市科技局的规定及时报送有关报表和材料并按期结题。

3、乙方及专项牵头单位要严格按照《关于进一步完善我市财政科研项目资金管理政策的实施意见》（渝委办发（2017）31号）的要求，对项目资金单独设帐，严格按照预算专款专用，严禁挤占挪用项目经费、超预算范围开支的行为，严禁违反规定自行调整项目经费预算，严禁编制虚假预算套取项目经费，严禁项目结题后不及时进行财务结算、长期挂账报销费用，严禁提供虚假配套承诺或不及时足额提供配套资金。乙方及专项牵头单位在项目执行过程中，必须接受甲方对经费使用及项目进度的监督和检查，并按甲方要求及时提供年度计划执行情况报告，逾期不报，甲方有权暂停资助。

4、乙方在项目执行过程中，项目任务书中签订内容、人员和完成时间原则上不作变更；如因某种原因需对计划任务书内容作调整，应向市科技局提交书面申请，并经市科技局批准后签订修改（补充）任务书。专项牵头单位在项目执行过程中，依据签订的协议内容，对乙方实行监管，项目实施情况需及时向甲方报告。

5、乙方及专项牵头单位在项目执行过程中，如遇重大变化（如：与任务书研究内容有出入、技术措施或某些条件不落实等）致使计划无法执行，应主动及时要求中止任务或延长结题时间。对要求中止任务的，应视不同情况，部分或全部退还所拨经费；对要求延期结题的，延期结题时间不能超过一年，超出一年后结题的，视为总结结题，按照《重庆市科研项目管理办法》中规定，终止负责人三年项目申报资格。如乙方及专项牵头单位没有提出中止任务的要求，甲方根据调查情况有权提出终止任务的处理意见，有权延期或停止资助，甚至收回项目全部经费，并减少乙方申报数量；情节严重的，取消申报资格，直至追究法律责任。

6、乙方应在本计划任务书规定的完成时间前2个月向甲方提出结题申请，并根据甲方要求完成项目结题验收有关事宜。约束性指标未全部完成或选择性指标完成率未达85%的项目不能验收结题；结题验收未通过的，按《重庆市科研项目管理办法》中



有关规定追究乙方及专项牵头单位责任。结题验收通过后,该项目才能作为正式完成。

7、乙方及专项牵头单位应建立健全促进科研诚信、科技行为廉洁的规章制度,组织开展廉洁自律宣传教育,监督并认真查处本单位在科研过程中出现的违规违纪行为。乙方及专项牵头单位不得在有关人员职称、简历以及研究基础等方面提供虚假信息,不得在项目实施中抄袭、剽窃他人科研成果,不得捏造或篡改科研数据,不得在涉及人体的研究中违反知情同意、保护隐私等规定,不得违反实验动物保护规范等。

8、乙方及专项牵头单位不得向甲方工作人员行贿;不得报销应由甲方工作人员个人支付的任何费用;不得为甲方工作人员购置或提供通讯工具、交通工具、高档办公用品等贵重物品。乙方及专项牵头单位在项目立项和实施过程中贿赂甲方工作人员,或者为其报销应由个人支付的费用、购买贵重物品等,被纪检监察机关或司法机关查证属实的,甲方有权终止项目实施并追缴拨付的全部科研经费;若甲方工作人员主动向纪检监察机关上缴乙方及专项牵头单位提供的贿赂或者贵重物品,甲方同样有权终止项目实施并追缴拨付的全部科研经费。

9、乙方及专项牵头单位发现甲方工作人员在科技管理工作中有索贿、暗箱操作等违反廉政建设规定的行为,应及时向科技纪工委举报并积极协助查处工作。

其他约定:

责任约定签订的约定书、合同协议及签订的其他相关约定以附件形式上传



五、任务书签订各方

甲方：重庆市科技局代表： 基础研究处 处长 冯光鑫 (签章)



项目管理



月 日

乙方：项目第一承担单位负责人 黄爱龙 (签章)

项目负责人

帐户名：

帐 号：

开户银行：中国建设银行股份有限公司重庆高新区分行



(单位签章)

二〇

年 医月科 有 兴

