

学校项目编号: [20543]

复旦大学本科生学术研究资助计划 (FDUROP)

曦源项目结题报告

(2020 年项目)

课题名称 在来自孤雄囊胚的单倍体胚胎干细胞系 (AG-haESC) 中构建 dCas9-Suntag TET1CD 靶向去甲基化系统

所属学科 生物学 [代码 180]

项目负责人 韩阳

院 系 生命科学学院

导 师 徐国良

填表日期 2021 年 2 月 25 日

复旦大学教务处制表

二、结题报告

说明:

1. 根据开题报告中的研究进展计划要求作结题报告。
2. 根据课题的具体情况选择合适的结题形式，除报告和论文外，如用其他方式展示研究成果，则需附一篇包含研究背景、过程以及内容等的介绍性文字；
3. 书面版结题报告页数、格式不限，但须符合本学科基本学术规范。
4. 电子版结题报告的格式必须符合附录 2 中的格式要求。
5. 结题报告后请附参加该项目的心得和感悟。

项目负责人(签名)

韩阳

日期:2021年2月25日

在来自孤雄囊胚的单倍体胚胎干细胞系 (AG-haESC) 中构建 dCas9-Suntag TET1CD 靶向去甲基化系统

生命科学学院 韩阳

指导教师 徐国良

摘要: 在哺乳动物的个体发育过程中, DNA 甲基化谱式要经历两次大规模的重编程, 一次发生在配子发生过程中, 另一次发生在从受精至着床的早期胚胎发育时期。这提示正常的 DNA 甲基化谱式对于精子发生和胚胎发育具有重要作用。因为通过条件性敲除的方式无法产生活力较强且数量足够的三个 *Dnmt* 都被敲除的精子, 所以使用来自孤雄囊胚的单倍体胚胎干细胞 (AG-haESC) 代替精子, 来研究精子 DNA 甲基化的功能。要研究特定基因或基因组元件甲基化的功能, 需要在 WT AG-haESC 中靶向去甲基化, 并且在 *Dnmt* TKO AG-haESC 中重新激活 *Dnmt1*, 靶向甲基化特定位点, 从正反两方面进行验证。本研究在 AG-haESC 中, 建立了 dCas9-Suntag TET1CD 靶向去甲基化系统, dCas9-SunTag 可以通过抗原-抗体亲和作用以不同比例招募 scFv-TET1CD, 从而较好地实现了对 *Gfap*、*Hoxd4* 靶向位点的去甲基化。

关键词: DNA 甲基化; AG-haESC; dCas9-Suntag; 靶向去甲基化。

Abstract: During mammalian development, DNA methylation pattern undergoes two large-scale reprogramming, one during gametogenesis and the other during early embryonic development from fertilization to implantation. This suggests that a normal DNA methylation pattern plays an important role in spermatogenesis and embryonic development. However, it is unable to generate sufficient numbers of active sperms with all three *Dnmt* knocked out by conditional knockout, androgenetic haploid embryonic stem cells (AG-haESC) were used instead of sperms to study the function of sperm DNA methylation. In order to study the function of DNA methylation of specific genes or genomic elements, targeted demethylation in WT AG-haESC and targeted methylation in *Dnmt1*-reactivated *Dnmt* TKO AG-haESC were required. In this study, dCas9-Suntag TET1CD targeted demethylation system was successfully established in AG-haESC, in which dCas9-Suntag can recruit multiple copies of scFv-TET1CD via antigen-antibody interaction, thus achieving targeted demethylation at both *Gfap* and *Hoxd4* locus.

Keywords: DNA methylation; AG-haESC; dCas9-Suntag; Targeted demethylation.

引言 (前言)

DNA 甲基化是最典型的表观遗传修饰之一, 在高等真核生物基因的表达调

控中起着重要作用。在哺乳动物中，DNA 甲基化主要出现在 5'-CpG-3'二核苷酸位点上，且其中 70~80% 是被甲基化的，由 DNA 甲基转移酶（DNA methyltransferases, Dnmts）将甲基转移到 DNA 胞嘧啶残基上而产生。剩余约 20% 未甲基化的部分主要位于启动子或基因的第一个外显子中。目前已明确鉴定出三种 Dnmts，其中 Dnmt1 主要负责维持性甲基化，Dnmt3a 和 Dnmt3b 主要负责起始性甲基化。

在哺乳动物的发育过程中，DNA 甲基化谱式会经历两次大规模的重编程。一次发生在雌雄配子发生过程中，小鼠的原始生殖细胞（primordial germ cells, PGCs）中发生包括基因组印记擦除在内的大规模去甲基化^[3]，在 13.5 天时平均甲基化水平降到最低，全基因组 DNA 甲基化水平约为 5%；在 13.5 天之后雄性 PGC 开始重建甲基化谱式^[4]。另一次发生在早期胚胎从受精至着床的发育时期，父本母本 DNA 甲基化水平整体减少，着床后逐渐重建（图 1-1）。将小鼠球形精子细胞注射进入卵细胞后，获得正常小鼠的效率低于注射正常精子；与正常精子相比，圆形精子细胞中父源 DNA 甲基化状态或其他表观修饰还未完全建立，这表明精子的表观遗传修饰对其受精能力及后代的正常发育至关重要^[2]。前期实验发现，条件性敲除无法产生活力较强且数量足够的 *Dnmt* 三敲（triple knockout, TKO）成熟精子；并且在出生后 3 天进行 *Stra8-cre* 敲除的早期精原细胞中，甲基化谱式已经建立，所以我们拟使用来自孤雄囊胚的单倍体胚胎干细胞（androgenetic haploid embryonic stem cells, AG-haESC）代替精子，建立靶向甲基化与去甲基化系统，研究精子的 DNA 甲基化在胚胎发育过程中的功能。

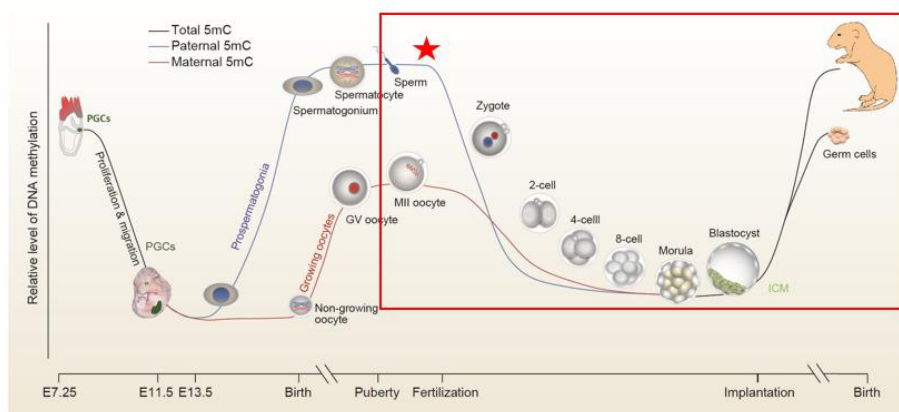


图 1-1 小鼠发育过程中基因组 DNA 甲基化的动态变化过程^[5]。黑色曲线反映全基因组 5mC 相对含量，蓝色曲线反映父本 DNA 的 5mC 相对含量，红色曲线反映母本 DNA 的 5mC 相对含量。

2012 年，李劲松课题组建立了来自孤雄囊胚的单倍体胚胎干细胞系，并证明这些细胞能够代替精子使卵母细胞“受精”，产生半克隆小鼠^[6]。因此这种细胞也被称为“人造精子”。2015 年，李劲松课题组发现 *H19*-DMR 和 *IG*-DMR 双敲除的 AG-haESC 能高效产生半克隆小鼠，出生效率由 4.5% 提升至 22%，并且几乎不会产生发育迟缓的半克隆小鼠（图 1-2）。除此之外，他们还将携带 CRISPR sgRNA 文库和 Cas9 表达的 *H19*^{ΔDMR}/*IG*^{ΔDMR} AG-haESC 用于个体水平的遗传学筛选^[7]。综上所述，AG-haESC 技术可以快速高效地获取特定基因型的单倍体细胞；并且可以在某种程度上，替代特定基因型的精子，如使用 *Dnmt* TKO 的 AG-haESC 来代替 5mC free 的精子，间接研究哪些基因或者基因组元件的甲基化是胚胎发育过程中必不可少的，以探究精子甲基化的意义。

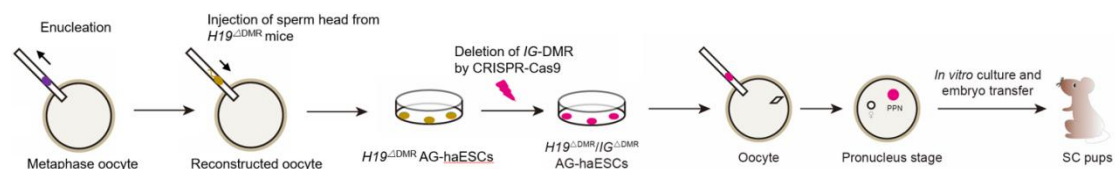


图1-2 使用DKO AG-haESC通过ICAHCI产生半克隆小鼠示意图。注入去核卵母细胞的精子的 *H19*-DMR 已被敲除。

要研究特定基因或基因组元件甲基化谱式的功能，需要从正反两方面进行验证。在 WT AG-haESC 中靶向去甲基化，并且在 *Dnmt* TKO AG-haESC 中重新激活 *Dnmt1*，靶向甲基化特定位点，从而进行验证。靶向去甲基化通过构建 dCas9-SunTag TET1CD 靶向去甲基化系统进行。Kinichi Nakashima 及 Izuho Hatada 等人在 2016 年成功构建了小鼠胚胎干细胞（mESC）中的 dCas9-SunTag 靶向去甲基化系统（图 1-3），在测试的 7 个基因座中有 4 个显示出 > 90% 的去甲基化效率^[1]。其中，Guide RNA (gRNA) 可以引导融合多拷贝 GCN4 (SunTag) 的 dCas9 与特定位点结合，通过 SunTag 与其抗体 (scFv) 之间的抗原-抗体亲和作用，招募 scFv-TET1CD，TET1CD 能将甲基化胞嘧啶氧化为 5-羟甲基胞嘧啶，启动去甲基化过程。而 SunTag 与 scFv 之间的抗原-抗体亲和作用能加强靶向位点的去甲基化作用，减少游离 TET1CD 产生的脱靶效应。

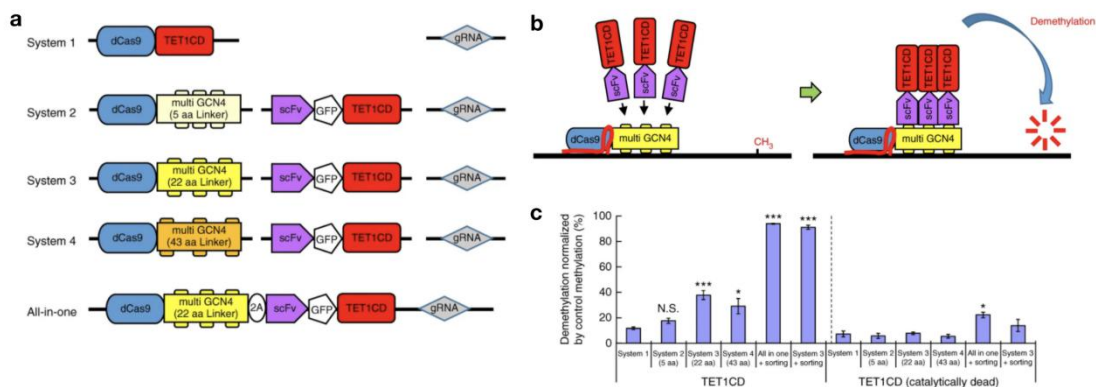


图 1-3 Kinichi Nakashima 及 Izuho Hatada 组小鼠胚胎干细胞 dCas9-SunTag 靶向去甲基化系统。a. 所构建的五种系统质粒结构示意图。b. dCas9-SunTag 靶向去甲基化原理示意图，dCas9-SunTag 可以通过抗原-抗体亲和作用以不同比例招募 scFv-TET1CD，从而加强靶向位点的去甲基化作用。c. 显示系统 3 的去甲基化效率最高。

综上所述，研究精子 DNA 甲基化的作用对于研究个体发育过程中的表观遗传过程具有重要作用，而在 AG-haESC 中构建 dCas9-SunTag TET1CD 靶向去甲基化系统是进一步研究精子 DNA 甲基化作用的重要技术方法，为探究特定基因或基因组元件的甲基化在胚胎发育过程中的功能提供重要手段。

1 研究思路及技术路线

首先构建 dCas9-SunTag TET1CD 靶向去甲基化系统的质粒。参考 Kinichi Nakashima 及 Izuho Hatada 等人设计的 mESC dCas9-SunTag 靶向去甲基化系统，在 AG-haESC 中构建 dCas9-SunTag TET1CD 靶向去甲基化系统（图 2-1）。与图 1-3 中系统相比，本系统采用 dCas9-SunTag、scFv-TET1CD、gRNA 三质粒的形式，并且每个质粒均带有荧光标签（分别为 EGFP、mCherry、TagBFP），用以判断转染效果以及 FACS 分选。构建时需要筛选效率高的 gRNA 构建入 gRNA 质粒。

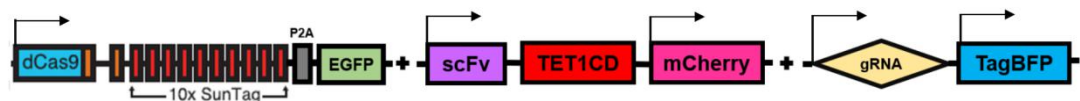


图 2-1 dCas9-SunTag TET1CD 靶向去甲基化系统质粒初步构建示意图。dCas9-SunTag、scFv-TET1CD、gRNA 三质粒形式，分别带有 EGFP、mCherry、TagBFP 荧光标签。

先在 mESC 中构建 dCas9-SunTag TET1CD 靶向去甲基化系统（图 2-2），选择的用于检测靶向去甲基化效率的靶向位点是 *H19* ICR 位点。将构建好的质粒

用 Lipo2000 转染 WT mESC。培养至第 2 天，通过 FACS 分选 EGFP、mCherry 和 TagBFP 强阳性细胞。收取部分分选后的细胞，通过 Bisulfite Sequencing 检测 *H19* ICR 位点的 DNA 甲基化水平；部分细胞进行传代。传代细胞培养至第 5 天和第 8 天时，通过 Bisulfite Sequencing 检测 *H19* ICR 位点的 DNA 甲基化水平。根据检测结果评估靶向去甲基化的效率，对质粒、转染条件等进行进一步优化，以提高靶向去甲基化的效率。

在 mESC 中构建成功后，将 dCas9-Suntag TET1CD 靶向去甲基化系统应用到 AG-haESC 中。由于 WT AG-haESC 是 *H19*^{ΔDMR}/*IG*^{ΔDMR} KO 基因型，因此选择 *Gfap*、*Hoxd4* 等位点检测所构建系统的去甲基化效率，过程与在 mESC 中检测 dCas9-Suntag TET1CD 靶向去甲基化系统效率相同（图 2-2）。根据检测结果对质粒、转染条件等进行进一步优化，以提高在 AG-haESC 中的靶向去甲基化的效率。

此外，需要对 dCas9-Suntag TET1CD 靶向去甲基化系统的脱靶情况进行检测。在转染后的第 2、5、8 天分别收集部分细胞，抽提细胞基因组 DNA，处理为单核苷酸后，通过质谱检测总 dC 和 5mdC 含量，计算全基因组总 5mdC 与总 dC 的比值，以此来衡量全基因组 5mdC 的水平，衡量 dCas9-Suntag TET1CD 靶向去甲基化系统的脱靶情况。

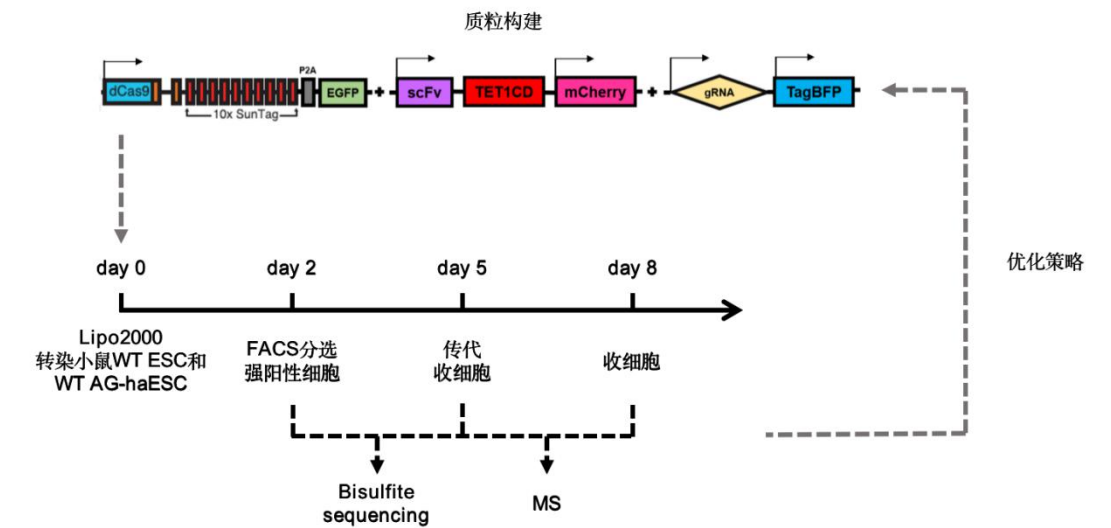


图 2-2 技术路线图。质粒构建完成后进行细胞转染，转染后通过 Bisulfite Sequencing 检测靶向位点的甲基化水平，以及通过质谱检测脱靶情况，根据结果优化策略。

2 研究成果

3.1 在 WT mESC 中，dCas9-Suntag TET1CD 系统较好地实现了对 *H19* ICR 位点的靶向去甲基化

首先将构建好的 dCas9-Suntag TET1CD 靶向去甲基化系统 (图 2-1) 在 WT mESC 中进行测试, 针对 *H19* ICR 位点设计 gRNA。 *H19* 是父本甲基化的印记基因 (图 3-1-1), 有位于 *H19* ICR 的 4 个甲基化敏感的 CTCF 结合位点 (m1-m4), 对 *H19* 的印记调控非常重要。针对 *H19* 的 m2 设计 gRNA, 构建 gRNA 质粒。将 dCas9、TET1CD、gRNA 质粒以摩尔比 dCas9:TET1CD:gRNA=1:2:4 转染 WT mESC, 通过 Bisulfite Sequencing 检测 m1、m2 区域的甲基化水平 (图 3-1-2)。m1 区域距离 m2 区域约 200 bp, 转染后也能观察到明显的去甲基化现象。m1 与 m2 区域总甲基化水平由转染前的 65.1% 降低至 17.2%。若只关注靶向的 m2 区域, 去甲基化效果更明显, 甲基化水平由 68.5% 降低至 7.1%, 达到 $(68.5-7.1)/68.5=90\%$ 的去甲基化效果。靶向去甲基化的效果能较好地维持到转染后的第 6 天, 第 8 天左右恢复至接近转染前的甲基化水平。

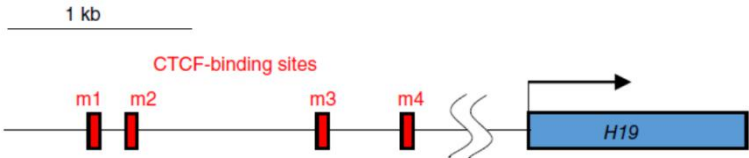


图 3-1-1 *H19* 及其 4 个甲基化敏感的 CTCF 结合位点 (m1-m4)

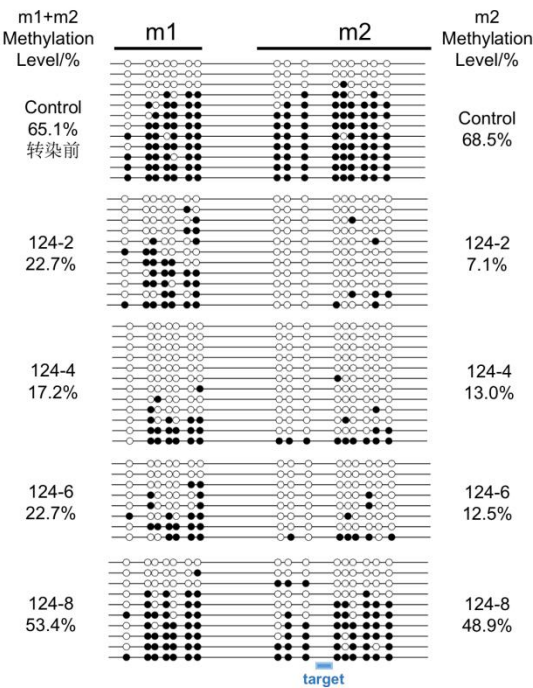


图 3-1-2 在 mESC 中, 针对 *H19* ICR 位点的靶向去甲基化效果。其中 124-2 表示质粒摩尔比 dCas9:TET1CD:sgRNA=1:2:4 的实验组在转染后第 2 天的效果, 其余以此类推。

改变转染的质粒摩尔比，以摩尔比 dCas9:TET1CD:gRNA=1:2:4、1:1:1、1:2:8 转染 WT mESC (图 3-1-3)，检测 *H19* ICR 位点的甲基化水平。1:2:4 组与 1:2:8 组在转染后的第 4 天和第 6 天都显示了明显的去甲基化效果，而 1:1:1 组使用了无 mCherry 筛选标记的 TET1CD 质粒，但到第 4 天也能显示明显的去甲基化效果，但效果的持续时间比 1:2:4 与 1:2:8 组短，所以适当增加 TET1CD 和 gRNA 质粒的转染量能够一定程度上加强靶向去甲基化效果。大多数实验组的甲基化水平在转染第 6 天后回升，第 8 天左右恢复至转染前水平。总体而言，在 mESC 中，所构建的 dCas9-Suntag TET1CD 系统已经较好地实现了对 *H19* ICR 位点的靶向去甲基化。

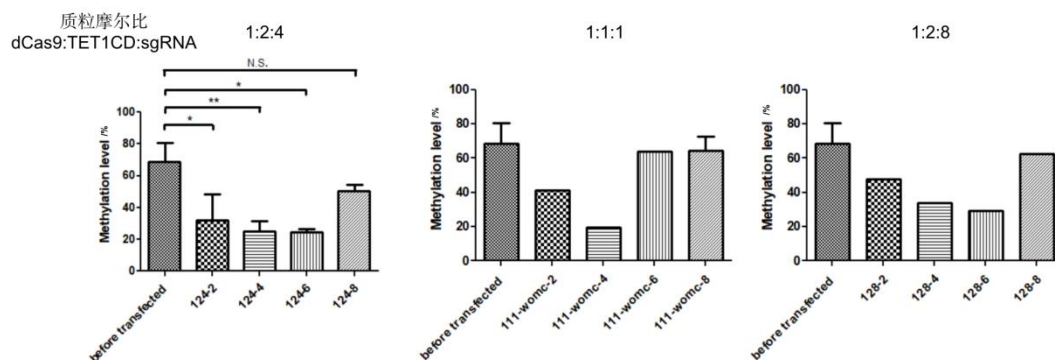


图 3-1-3 在 mESC 中针对 *H19* ICR 位点, 使用不同质粒摩尔比转染后的靶向去甲基化效果。其中, 124-2 表示质粒摩尔比 dCas9:TET1CD:sgRNA=1:2:4 的实验组在转染后第 2 天的效果, womc (without mCherry) 表示指使用无筛选标记的 TET1CD 质粒。

3.2 在 WT AG-haESC 中，dCas9-Suntag TET1CD 系统较好地实现了对 *Gfap*、*Hoxd4* 位点的靶向去甲基化

将构建好的 dCas9-Suntag TET1CD 系统以质粒摩尔比 1:2:4 转染 WT AG-haESC，几乎没有去甲基化效果，因此对策略进行调整。首先将三质粒系统合并为二质粒系统 (图 3-2-1)。优势是无需再分选 BFP，避免和分选单倍体所用的 Hoechst 串色；并且使用 P2A 连接，保证 mCherry 能够指示 TET1CD 的表达水平。第二，将 *sffv* promoter 更改为 CAG promoter 驱动 TET1CD 表达。第三，针对靶向位点设计多个 gRNA，以串联形式连入 TET1CD-gRNA 质粒，以降低脱靶效率。第四，二质粒系统的质粒转染摩尔比为 dCas9:TET1CD=1:2。

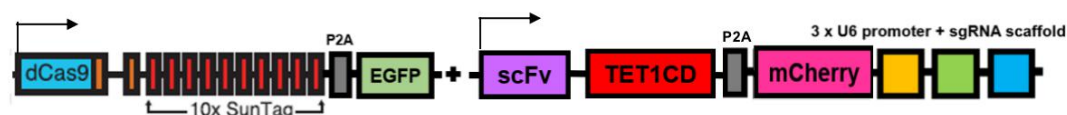


图 3-2-1 dCas9-Suntag TET1CD 靶向去甲基化系统二质粒系统构建示意图。由三质粒系统合并为二质粒系统，并将 sffv promoter 更改为 CAG promoter 驱动 TET1CD 表达，且使用串联 gRNA 以降低脱靶效率。

根据新的策略构建质粒完成后，以质粒摩尔比 dCas9:TET1CD=1:2 转染 WT AG-haESC，转染后第 2 天分选 EGFP、mCherry、Hoechst 强阳性细胞，培养至第 5、8 天，分别检测 *Gfap* 和 *Hoxd4* 位点的甲基化水平。在新策略下，对 *Gfap* 和 *Hoxd4* 位点的靶向去甲基化效果有所改善（图 3-2-2），在转染后的第 2 天能够达到与在 mESC 中相近的水平。但去甲基化效果的持续时间比较有限，在第 2 天去甲基化效果明显，但到第 5 天就已回升。对于不同位点，去甲基化效果也有差异，*Gfap* 位点的甲基化水平到转染后第 5 天已恢复如初，而 *Hoxd4* 位点的甲基化水平检测到在第 5-8 天内恢复。总的而言，经过策略改进，在 WT AG-haESC 中，dCas9-Suntag TET1CD 系统也能够较好地实现对 *Gfap*、*Hoxd4* 位点的靶向去甲基化，至此靶向去甲基化系统构建完成。

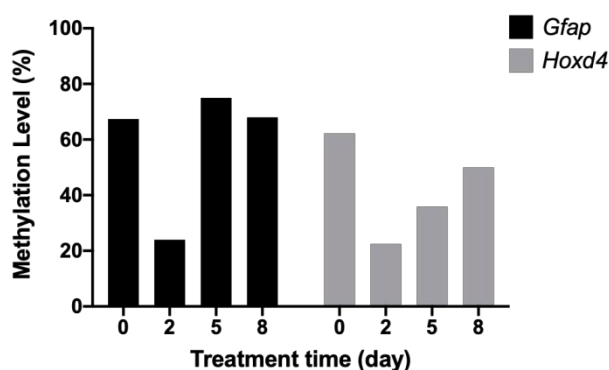


图 3-2-2 在 WT AG-haESC 中使用二质粒系统转染，对 *Gfap* 和 *Hoxd4* 位点的靶向去甲基化效果。策略优化后能够较好地实现对 *Gfap* 和 *Hoxd4* 位点的去甲基化作用。

3.3 dCas9-Suntag TET1CD 靶向去甲基化系统脱靶情况检测

最后对 dCas9-Suntag TET1CD 靶向去甲基化系统的脱靶情况进行检测。通过质谱检测二质粒系统转染后第 2、5 天 WT AG-haESC 细胞全基因组的 dC 和 5mdC 含量（图 3-3-1），发现全基因组水平上的甲基化水平降低约 1/3，说明脱靶情况是不可忽视的。但是脱靶情况还是要根据 gRNA 序列或 dCas9 (HA tag) 的 CHIP-seq 去针对具体位点进行分析，因此在后续应用到具体位点的靶向去甲基化时再检测具体的脱靶情况会更具有参考性。

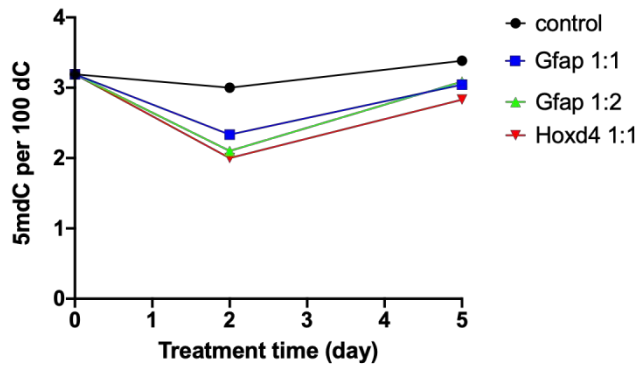


图 3-3-1 质谱检测 dCas9-Suntag TET1CD 靶向去甲基化系统（二质粒）的脱靶情况。其中，比例表示转染时 dCas9-Suntag 质粒与 scFv-TET1CD-gRNA 质粒的摩尔比。

3 研究总结与讨论

研究在 Kinichi Nakashima 及 Izuho Hatada 等人设计的 mESC dCas9- SunTag 靶向去甲基化系统的基础上，进行策略改进，更改为二质粒系统、更换更强的 CAG 启动子驱动 TET1CD 表达、使用串联 gRNA 等，建立了能够在 AG-haESC 中较好地实现靶向位点去甲基化的 dCas9- SunTag 靶向去甲基化系统。此外，靶向去甲基化系统在应用到具体位点时，脱靶情况也同样需要关注，根据具体靶向位点的情况与所使用的 gRNA 进行分析，如找到与所使用的 gRNA 的靶向序列至少有 12 个碱基相同（靠近 PAM 序列端）的基因组位点，检测这些位点的甲基化水平。后续此系统可以应用到 WT AG-haESC 中，对特定位点靶向去甲基化；同时以类似策略构建靶向甲基化系统，在 *Dnmt* TKO AG-haESC 中重新激活 *Dnmt1*，靶向甲基化特定位点，从正反两方面对特定位点的甲基化在胚胎发育中的功能进行探究，是研究精子 DNA 甲基化功能的重要内容。

参考文献

- [1] Morita S , Noguchi H , Horii T , et al. Targeted DNA demethylation in vivo using dCas9-peptide repeat and scFv-TET1 catalytic domain fusions.[J]. Nature Biotechnology, 2016, 34(10):1060-1065.
- [2] Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Round spermatid nucleus injection (ROSNI)[J]. Fertility & Sterility, 2003, 80(3):687-689.
- [3] Saitou M , Kagiwada S , Kurimoto K . Epigenetic reprogramming in mouse pre-implantation development and primordial germ cells[J]. Development, 2012, 139(1):15-31.

- [4] Wang L , Zhang J , Duan J , et al. Programming and inheritance of parental DNA methylomes in mammals.[J]. Cell, 2014, 157(4):979-991.
- [5] Xu G L , Wong J . Oxidative DNA demethylation mediated by Tet enzymes[J]. National Science Review, 2015, 2(3):318-328.
- [6] Yang H , Shi L , Wang B A , et al. Generation of Genetically Modified Mice by Oocyte Injection of Androgenetic Haploid Embryonic Stem Cells[J]. Cell, 2012, 149(3):605-617.
- [7] Zhong C , Yin Q , Xie Z , et al. CRISPR-Cas9-Mediated Genetic Screening in Mice with Haploid Embryonic Stem Cells Carrying a Guide RNA Library[J]. Cell Stem Cell, 2015,17(2):221-232.

后记 (致谢): 本研究课题是在徐国良老师的悉心指导下完成, 感谢导师对我这样一个本科生所给予的关注和指导。同时也要感谢高海老师和沈学仁老师在这段时间内给予我的帮助。在此, 我还要郑重感谢邵震宇师兄对我的悉心指导, 以及对我的浅薄学识和所犯错误的包容。同时还要感谢同实验室的同学和各位师兄师姐, 以及生科院的蔡亮老师。这段时间里我学到了很多也成长了很多, 这个课题虽然现在结束了, 但这实际上仅仅是我未来几年求学生涯的一个小开端, 所以路漫漫其修远兮, 吾将上下而求索。

指导教师评语
靶向去甲基化实验方法的建立对我们研究精子甲基化的功能有着不可替代的意义和作用。韩阳同学有扎实的专业知识和熟练的实验技能, 实验数据翔实, 结果可信。

项目感言

曦源项目所进行的这段时间，其实也算是我本科期间生活变动最大的一段时间。在这段时间里，我做出了我对未来几年去处的选择，也开始进入了新阶段。因为中间更换了实验室，所以整个项目进行得还是比较仓促，去年十月初才算正式开始。可以说，去年十月的我和现在的我，还是很不同的。我通过这个项目，增进了对课题组的了解，也对科研和科研中的生活有了初步的体验，还提前体会到了早高峰的地铁，总的来说，是累和充实的快乐。从课题的进行过程中，我也开始真正正视自己的一些长久以来存在的问题，粗心、不够麻利、容易纠结、拖延、不善于表达等等。这些缺点的反面，却都是科研所需要的品质和能力，所以，不管是主动还是被动，在未来的几年里，我必须得克服。而这个项目的进行，也让我给自己攻克这些缺点开了头。非常感谢在这段时间里遇到的各位老师、师兄师姐和同学，这个项目如期完成少不了你们的帮助；也谢谢曦源项目，能让我有机会完成这样一个小课题。希望我能再接再厉，这才刚刚开始！

三、指导老师评语

请手写意见。电子版须誊录导师手写的意见。

针对去甲基实验方法的建立对我
们的研究将有着有着无可替
代的意义和作用。韩明同学拥有
的专业知识和熟练的实验技能，
实验数据翔实，结果可信。

指导教师（签名）：徐明

日期：2021年 2月 26日

四、院系评审意见

基本 评定	课题完成情况: ☐ 按计划完成, 取得预期成果 ☐ 基本完成, 但与预期目标尚有差距 ☐ 未达到预期目标	成果的创新性: ☐ 很好 ☐ 较好 ☐ 一般 ☐ 没有创新之处
	成果学术水平: ☐ 成果优秀, 已发表论文 ☐ 成果优秀, 建议发表论文 ☐ 学术水平较高, 成果整理后可发表论文 ☐ 学术水平尚可, 但尚未达到发表论文水平 ☐ 整个过程符合学术规范, 但成果水平一般 ☐ 不符合学术规范, 成果水平较差	
	经费使用情况: ☐ 符合项目实际情况, 使用规范 ☐ 与项目实际情况略有出入, 使用略不规范 ☐ 经费胡乱使用, 不符合财务规范	过程记录情况: ☐ 记录规范、完整 ☐ 记录不完整、部分记录随意不规范 ☐ 未提交记录或有作假行为
综合评价与 建议	该课题已按照研究进展计划完成, 并取得了预期的成果。在来自孤雄囊胚的单倍体胚胎干细胞中成功构建了 dCas9-Suntag TET1CD 靶向去甲基化系统, 在小鼠胚胎干细胞和孤雄单倍体胚胎干细胞中的不同位点都取得了明显的去甲基化效果, 并且对去甲基化效果可以维持的时间以及不同转染条件下所取得的去甲基化效果进行了检测。最后还对靶向去甲基化系统的脱靶效率进行了检测。后续可以将此建立好的 dCas9-Suntag TET1CD 靶向去甲基化方法用于特定定位点的靶向去甲基化, 来探究特定定位点的甲基化在胚胎发育过程中的功能。 印象深刻的老师: 任国栋	
评审结果	☐ 同意结题 ☐ 修改后再评审 ☐ 不同意结题	

评审老师签名:

年 月 日

五、学校复核意见

专家评审：

评审老师签名：

日期： 年 月 日

教务处意见：

☐同意结题

☐不同意结题

公 章：

日期： 年 月 日

六、课题财务日志

项目类型	☐ 葛政 ☐ 望道 ☒ 曦源		项目编号	20543		
日期	费用事项	费用信息	费用	实际费用	导师签字	日期
2020.10.15	引物合成	单价 50 元/4 条, 共 200 元	200	200	徐国全	
2020.11.10	普通培养基	GIBCO, 200 元/瓶	200	200		
2020.12.21	胎牛血清	GIBCO, 3000 元/250ml	3000	3000		
2021.1.8	基因测序	用于 DNA 修饰分析, 1600 元	1600	1600	徐国全	
	合计		5000	5000		

注: 不够可加页。

学生签字: 韩阳

导师签字: 徐国全

日期: 2021.2.26