



中山大學

SUN YAT-SEN UNIVERSITY

国家自然科学基金申请存在的问题和对策

黎明涛

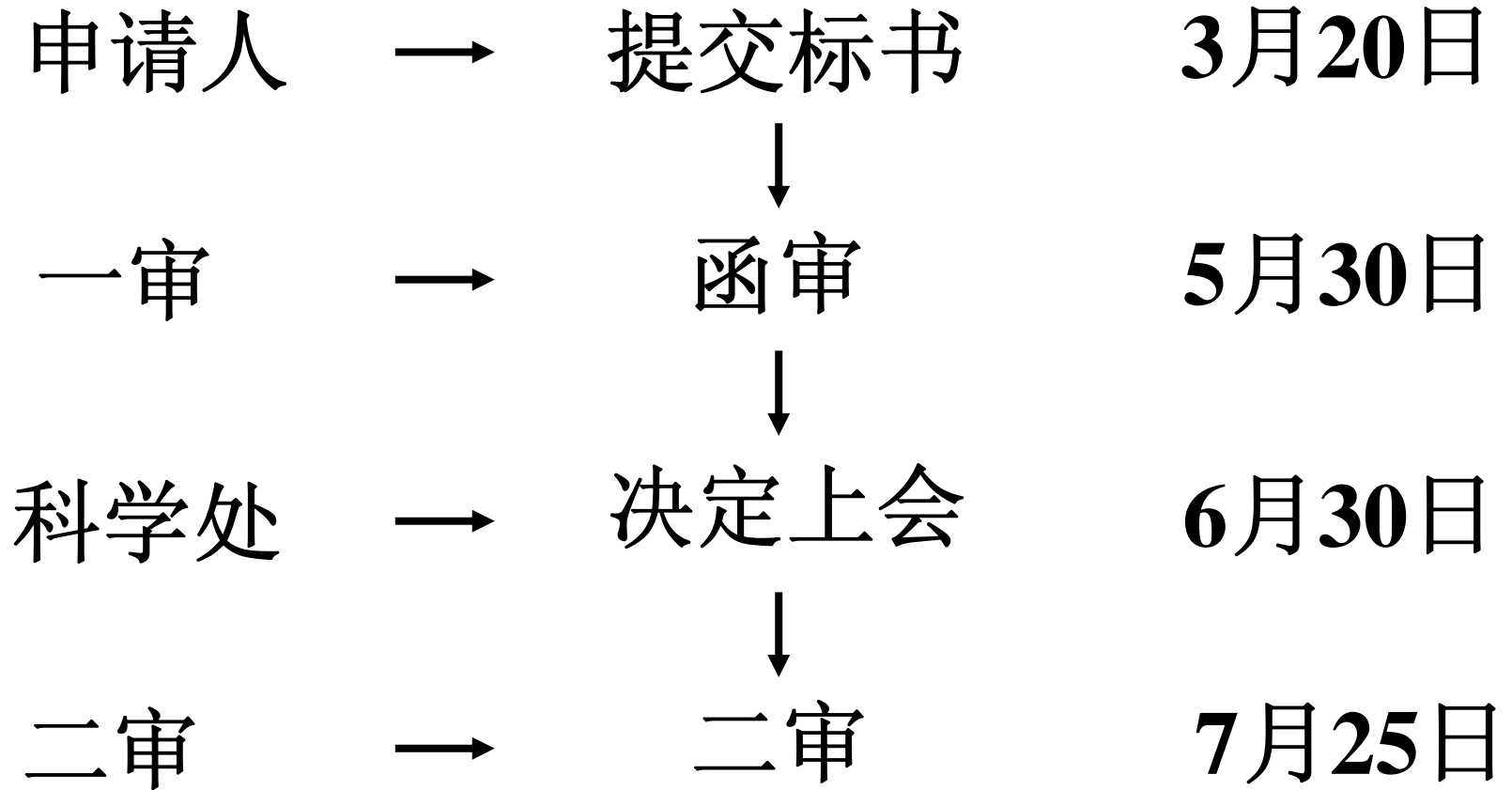
中山大学中山医学院

中山大学蛋白质组学中心

基金申请

- 选题 问题 创新 基础
- 性质 课题 人才 合作
- 撰写申请书
- 申报和评审
- 答辩 预答辩

申报和评审



一审和上会

- 专家意见：**A 优先**
B 可以
C 不予
- 意见排列：**AAA ABC ACC**
AAB BBB BCC
AAC BBC CCC
ABB
- 随机性大 2个C不上会
- 科学处 权力大

肿瘤中心：成绩和挑战

- 成绩 19项/重点 不容易
太集中 没有二审专家
- 医学科学部
五处：肿瘤更集中（七处 肿瘤药物）
- 新的挑战

五处资助范围

- 肿瘤病因、肿瘤发生、肿瘤遗传、肿瘤免疫、肿瘤预防、肿瘤复发与转移、肿瘤干细胞、肿瘤诊断、肿瘤化学药物治疗、肿瘤物理治疗、肿瘤生物治疗、肿瘤综合治疗、肿瘤康复(包括社会心理康复)、肿瘤研究体系新技术，以及各系统器官肿瘤，包括呼吸系统肿瘤、血液淋巴肿瘤(白血病除外)、消化系统肿瘤、神经系统肿瘤(含特殊感受器肿瘤)、泌尿系统肿瘤、男性生殖系统肿瘤、女性生殖系统肿瘤、乳腺肿瘤、内分泌肿瘤、骨与软组织肿瘤、头颈部及颌面肿瘤、皮肤、体表及其它部位肿瘤。

一处资助范围

- 呼吸系统、循环系统、消化系统、血液系统组织器官的结构、功能、遗传、发育异常以及各类非传染性、非肿瘤性疾病的病因、发病机理、诊断、治疗的基础研究和应用基础研究，以及老年医学领域的基础研究和应用基础研究。

对策

- 争取上会
- **A、B、C**类？
- 主审专家？

申请书需回答的问题

- 为什么 立项依据
- 做什么 研究目标、研究内容
- 怎么做 研究方案、技术路线
- 能否做 可行性：工作基础、工作条件

标 题

一个好的标题等于成功一半

确切、醒目、新颖、主题明了

围绕“科学问题”

大小适中，防止“大题目、小课题”

与“科学问题”和“研究目标”呼应

标题

神经元凋亡时**SP1**对**BH3-only**蛋白**Bim**的转录调控

细胞凋亡 时**SP1**对**BH3-only**蛋白**Bim**的转录调控

神经元凋亡时 **BH3-only**蛋白**Bim**的转录调控

神经元凋亡时**SP1**对**BH3-only**蛋白**Bim**的 调控

SP1对**BH3-only**蛋白**Bim**的转录调控

SP1对神经元凋亡的调控作用

关键词： **SP1/Bim** /基因调控/信号转导/神经元凋亡

摘要

1. 工作基础 继续和深入 发表和未发表 创新
2. 科学问题 重要！不能缺！中肯
3. 预实验 针对“问题”的预实验结果
4. 工作假设 思想性、创新性
5. 主要方法 可靠性第一 先进性第二
6. 研究目标 明确、具体
7. 研究意义 理论性和应用性



神经元凋亡时SP1对BH3-only蛋白Bim的转录调控

我们已经证明了撤钾诱导神经元凋亡时JNK/c-Jun 和PI3K/Akt/FKHRL1信号通路不参与BH3-only蛋白Bim的上调。那么，Bim上调的转录机制是什么？启动子5'末端序列连续分析确立了诱导Bim表达的启动子核心区，进而发现一个典型的转录因子SP1结合序列位于其中。进一步实验显示：神经元凋亡时SP1被激活；负显性SP1和SP1-DNA结合抑制剂mithramycin A抑制了Bim上调和神经元凋亡。由此，我们首次提出了Bim上调的新机制，即：神经元凋亡时转录因子SP1被激活，激活的SP1直接调控Bim的诱导表达。本项目拟进一步采用腺病毒表达技术以及启动子定点突变、EMSA和CHIP方法，旨在获得SP1直接调控Bim基因的可靠证据。本项目将阐明SP1对促凋亡蛋白Bim的调控作用和机制、为确立SP1作为神经退行性疾病治疗的新靶点提供更充分的科学依据。

CaMKII磷酸化GSK-3对去极化介导的神经元存活的调控

GSK-3 α /GSK-3 β 是促神经元凋亡的重要激酶。研究表明去极化可使GSK-3 α Ser21/GSK-3 β Ser9发生磷酸化并抑制其活性，从而保护性干预凋亡的发生。但是，去极化时，究竟哪一个激酶介导了GSK-3磷酸化尚不清楚。排除了AKT、PKA、p90RSK的参与后，通过底物一致序列分析和抑制剂实验，我们提出CaMKII介导GSK-3磷酸化的可能性。进一步的体外重组激酶反应分析证明，CaMKII可直接磷酸化GSK-3 α Ser21/GSK-3 β Ser9。本项目拟采用共免疫沉淀、siRNA和激光共聚焦等方法，旨在获得CaMKII与GSK-3直接相互作用的可靠证据，评价和证实CaMKII磷酸化GSK-3这一事件在去极化促神经元存活效应中的作用。本项目有望揭示去极化调控GSK-3的新机制，为确立GSK-3作为神经退行性疾病治疗的新靶点提供更充分的科学依据。

立项依据

1. 值得做吗？必要性：意义 价值 思想 创新
2. 谁来做呢？舍我其谁
3. 科学问题？中肯 明确
4. 突出自己的工作 预实验 图文规范化 
5. 文献 档次 时效性 自己的文章 规范化 
6. 主线清楚 深入浅出 通俗易懂

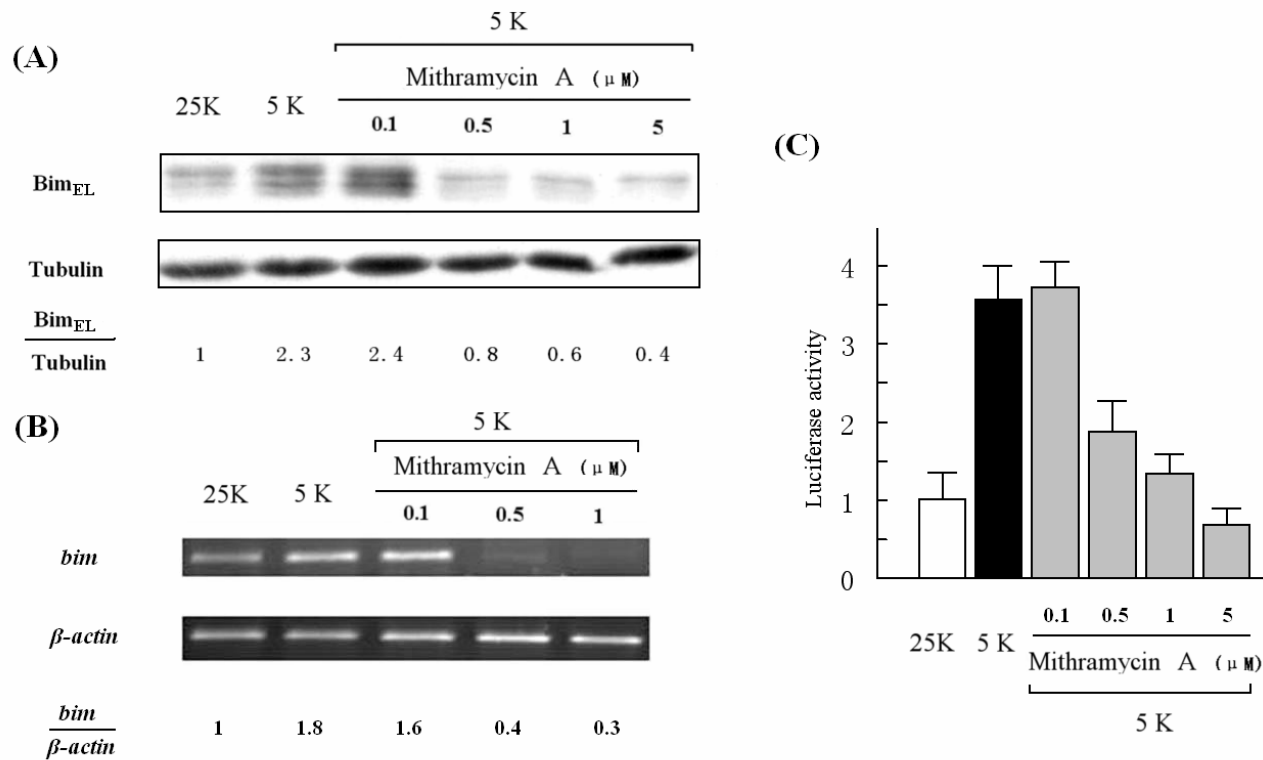




Fig.6 Mithramycin A, a SP1-DNA binding inhibitor, attenuates bim upregulation by activity deprivation in CGNs. (A) Mithramycin A attenuates the upregulation of BimEL induced by activity deprivation in a dose dependent manner. CGNs were placed in 25K or 5K media in the absence or presence of mithramycin A at the indicated concentrations for 6 h. BimEL expression was assessed by Western blot as described in Fig.1(A). Results shown are representative of four separate experiments. (B) Mithramycin A inhibits the increase in bim mRNA level in a dose-dependent manner. Neurons were treated as described in (A), bim and actin mRNAs were determined by RT-PCR, Results shown are representative of five separate experiments. (C) Mithramycin A suppresses the activation of bim promoter induced by activity deprivation. Neurons were co-transfected with bim-Luc and pEF-RL for 8 hr. Luciferase activities were measured as described in Fig.2, The experiments were repeated three times with duplicates for each treatment. The data represent \pm S.E.M. of three experiments.

立项依据



1. 值得做吗？必要性：意义 价值 思想 创新
2. 谁来做呢？舍我其谁
3. 科学问题？中肯 明确
4. 突出自己的工作 预实验 图文规范化 
5. 文献 档次 时效性 自己的文章 规范化 
6. 主线清楚 深入浅出 通俗易懂

参 考 文 献

- 1. Leyu Shi, Shoufang Gong, Zhongmin Yuan, Chi Ma, Yanling Liu, Chuanfu Wang, Wenming Li, Rongbiao Pi, Shoujian Huang, Ruzhu Chen, Yifan Han, Zixu Mao, and Mingtao Li. Activity deprivation-dependent induction of the proapoptotic BH3-only protein Bim is independent of JNK/c-Jun activation during apoptosis in cerebellar granule neurons. *Neurosci Lett.* 2005, 375: 7-12.**
- 2. Wenyang Wang, Leyu Shi, Yuanbin Xie, Chi Ma, Wenming Li, Xingwen Su, Shoujian Huang, Ruzhu Chen, Zhenyu Zhu, Zixu Mao, Yifan Han and Mingtao Li. SP600125, a new JNK inhibitor, protects dopaminergic neurons in the MPTP model of Parkinson's disease. *Neurosci Res* 2004; 48:195-202**



立项依据

1. 值得做吗？必要性：意义 价值 思想 创新
2. 谁来做呢？舍我其谁
3. 科学问题？中肯 明确
4. 突出自己的工作 预实验 图文规范化 
5. 文献 档次 时效性 自己的文章 规范化 
6. 主线清楚 深入浅出 通俗易懂

研究内容、研究目标与 拟解决的关键问题

研究目标

要求：明确具体 解决学术问题为目的



**题目：神经元凋亡时SP1对BH3-only蛋白
Bim的转录调控**

实例：获得SP1直接调控bim基因表达的可靠证据，阐明促凋亡蛋白Bim由SP1转录调控的新机制，为确立SP1作为神经退行性疾病治疗的新靶点提供更充分的科学依据。

研究内容（围绕研究目标）

1. 证明**bim**启动子核心区的**SP1**结合序列是否介导了**bim**基因的上调 为了证实**bim**启动子核心区的**SP1**结合序列是否介导了**bim**基因的上调，将其中的**SP1**结合序列进行点突变，使其不能结合**SP1**；确定这一突变是否能够消除**bim**启动子的撤钾反应。
2. 分析**SP1** 是否能够与**bim**启动子核心区的**SP1**结合序列结合 应用EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay)技术，证实**bim**启动子核心区的**SP1**结合序列是否能够与**SP1**结合；进一步采用CHIP(Chromatin immunoprecipitation)方法，获得**SP1**与**bim**启动子核心区在细胞内结合的证据。
3. 从 **bim** 的mRNA 和蛋白质水平，观察负显性**SP1**是否能够抑制撤钾诱导的**bim**基因的上调 质粒转染CGNs的转染率只能达到0.1-1.0 %，腺病毒的感染率可达70—80%^[1]。因此，构建dn**SP1**的腺病毒载体Ad-dn**SP1**，感染CGNs才能达到可靠分析**bim**的mRNA和蛋白质表达水平改变的目的。
4. 分析**SP1**诱导**Bim**这一机制对神经元凋亡的调控作用 确立**SP1**转录激活**bim**这一机制后，进一步分析这一机制对神经元凋亡的调控作用。

研究方案



- 项目需求为前提
- 可靠性第一，先进性第二
- 参考文献 
- 突出关键技术的描述 
- 不主张使用流程图，建议开头：“有关方法、技术路线、实验手段、关键技术综述如下……”

基本方法

大鼠小脑颗粒神经元培养、**Western blot**、**RT-PCR**、钙磷沉淀法转染基因、转基因神经元的凋亡分析、报道基因表达分析、免疫沉淀等基本方法均按我们报道^[1, 2, 3, 4, 5, 6]的进行。



研究方案

- 项目需求为前提
- 可靠性第一，先进性第二
- 参考文献 
- 突出关键技术的描述 
- 不主张使用流程图，建议开头：“有关方法、技术路线、实验手段、关键技术综述如下……”

负显性SP1腺病毒(Ad-dnSP1)载体的构建、扩增、纯化和保存



为了达到在 mRNA 和蛋白质水平（而不仅仅是人工的报道基因水平）观察dnSP1是否能够抑制撤钾诱导bim基因的上调的目的，必须保证dnSP1导入CGNs有较高的导入率。现有质粒转染CGNs方法的转染率只能达到0.1-1.0%，而在方法得当的情况下（见后）腺病毒的感染率可达70—80%^[1]。因此，dnSP1的腺病毒载体Ad-dnSP1的构建是采用RT—PCR和Western blot分析bim的mRNA和蛋白质的前提。

.....

腺病毒的扩增和纯化按本人报道的进行^[1]。腺病毒的活性高低是决定能否对CGNs达到70—80%感染率的关键，而正确的腺病毒保存条件又是其活性高低的决定因素。我们曾经研究过储存条件对腺病毒感染CGNs的影响，并制定了腺病毒的最佳储存条件，即小量分装后置于—20°C/20%甘油或—80°C/50%甘油，一月内可保证感染率在70-80%。



研究方案

- 项目需求为前提
- 可靠性第一，先进性第二
- 参考文献 
- 突出关键技术的描述 
- 不主张使用流程图，建议开头：“有关方法、技术路线、实验手段、关键技术综述如下……”

申请者简历

申请者和项目组主要成员

- 学历
- 研究简历
- 文章目录
- 学术奖励
- 承担的任务

黎明涛 (Li Mingtao)

项目负责人，中山大学中山医学院药理教研室教授，博士生导师，中山医学院蛋白质组学实验室主任。1996年获得博士学位，在美国科罗拉多大学从事2年博士后工作。学科专业为分子神经生物学与蛋白质组学，主要研究领域是神经元凋亡的信号转导、基因调控和蛋白质组学。近年来发表SCI文章36篇，其中作为第一作者或通讯作者在**J Biol Chem, Mol Cell Biol, J Neurosci, Neuropharmacology**和 **Neuroscience**等杂志上发表了12篇论文，并在**Drug News Perspect**上发表了相关专题综述。

近五年来，作为第一主持人获得了2项国家自然科学基金面上项目，已结题1项；1项国家自然科学基金—广东省自然科学基金联合基金。在研项目进行顺利。

发表的相关论文

1. Ma C, Ying C, Yuan Z, Song B, Li D, Liu Y, Lai B, Li W, Chen R, Ching YP, Li M. dp5/HRK is a c-Jun target gene and required for apoptosis induced by potassium deprivation in cerebellar granule neurons. *J Biol Chem*. 2007;282(42):30901-30909.
2. Mei Y, Yuan Z, Song B, Li D, Ma C, Hu C, Ching YP, Li M. Activating transcription factor 3 up-regulated by c-Jun NH(2)-terminal kinase/c-Jun contributes to apoptosis induced by potassium deprivation in cerebellar granule neurons. *Neuroscience*. 2008;151(3):771-779.
3. Wang W, Yang Y, Ying C, Li W, Ruan H, Zhu X, You Y, Han Y, Chen R, Wang Y, Li M. Inhibition of glycogen synthase kinase-3beta protects dopaminergic neurons from MPTP toxicity. *Neuropharmacology*. 2007;52(8):1678-1684.
- 4.....

皮荣标(Pi Rongbiao)

33岁，博士学位，讲师。2002年毕业于中山大学，获神经药理学博士学位。同年赴香港科技大学生物化学系从事博士后研究，现在中山大学药学院任讲师。主要研究兴趣涉及神经保护药物的作用及其机制的研究。曾负责或参加包括国家自然科学基金等多项研究。已发表或待发表论著近20篇，其中SCI论文5篇。

皮博士与本人合作达11年，有共同的研究趣向，作为共同作者发表多篇SCI论文。他掌握了本项目涉及的大部分实验方法和技术，尤其在腺病毒载体构建方面积累了经验（见文章）。主要负责腺病毒载体构建等工作。

发表的相关论文

1. Rongbiao Pi, Wenming Li, Nelson T.K.Lee, Hugh H.N.Chan, Yongmei Pu, Ling Nga Chan, Nikolaus J. Sucher, Doanld C. Chang, Mingtao Li and Yifan Han. Minocycline prevents glutamate-induced apoptosis of cerebellar granule neurons by differential regulation of p38 and Akt pathways. J Neurochem. 2004, 91:1212-1230.

2.

3.

项目组主要成员

编号	姓名	出生年月	性别	职称	单位名称	项目分工
1	毛子旭	1959-4-27	男	副教授	美国 Emory 大学医学院药理和神经系(见协议书)	协助指导
2	皮荣标	1971-8-9	男	讲师	中山大学	腺病毒制备 扩增
3	马驰	1978-5-6	男	博士生	中山大学	报道、突变和 CHIP
4	宋彬	1980-8-8	女	博士生	中山大学	亚克隆和报道基因等
5	龚守芳	1972-3-9	男	博士生	中山大学	PCR、EMSA
6	袁忠民	1970-6-12	男	硕士生	中山大学	免疫印迹、神经元培养
7	王锦群	1953-1-2	女	技术员	中山大学	神经元、实验准备等
8	[在此录入修改]					
9	[在此录入修改]					

经费申请表

2. 实验材料费	21.4000	
(1) 原材料/试剂/药品购置费	17.4000	神经元培养, 抗体, 报道基因, 载体和腺病毒构建, RT-PCR, 突变体, 同位素等
(2) 其它	4.0000	动物、高质量平皿、Western Blot、免疫沉淀试剂、一次性耗材等
3. 仪器设备费	0.0000	
(1) 购置	0.0000	用“211”200万和“985”700万购置了必要设备
(2) 试制	0.0000	个人实验室和本人负责的蛋白质组学实验室已正常运转
4. 实验室改装费	0.0000	
5. 协作费	0.0000	
二. 国际合作与交流费	3.0000	
1. 项目组成员出国合作交流	1.5000	美国神经科学年会 1 人次
2. 境外专家来华合作交流	1.5000	毛子旭博士回国来实验室进行 2 次交流
三. 劳务费	3.6000	劳务费 1.0 万；研究生补助 2.6 万元
四. 管理费	1.5000	按规定 5% 预算
合.....计	32.3000	已有的一些关键试剂和基因没有纳入预算

申请项目同行评议意见反馈信

黎明涛先生：

您好！您申请的项目经专家投票表决，同意资助。关于你的项目的同行评议意见如下：

1. 本项目在小脑颗粒细胞撤钾的离体凋亡模型中，发现了一种直接调节**Bim**的新转录因子**SP1**，申请人试图采用腺病毒转染技术、基因突变以及分子生物学方法进一步论证**SP1**是直接调控**bim**基因的这一假说。立项具有前瞻性，申请人工作基础好，并与美国**Emory**大学、香港大学有长期的合作条件，完全能够完成本项课题。建议优先资助。

2. 本项课题的立项依据较为充分，具有一定的学术创新及科学意义。研究内容明确、技术路线清晰、研究方法和方案可行。申请者有较高的学术水平，以及多次主持国家自然科学基金课题的经验。同时，申请者所在单位又有比较好的实验室及条件。建议给予资助。

3. 课题研究具有较好的工作基础，研究具有较高的学术价值，建议资助。

4. 同意资助。理由：该项目立论依据充分，其重要的意义表现在澄清撤钾诱导神经元凋亡时，**Bim**上调的细胞内信号转导机制。申请者有较好的研究基础和研究能力，项目的内容设置合适，重点突出，总体方案合理，技术路线可行，可资助。

5. This is a nicely written proposal with a clear aim and practical approaches. Further, the group has published results related to the current proposal, indicating the ability of the group to perform the experiments.

申请项目同行评议意见反馈信

黎明涛先生：

您好。您申请的项目经专家投票表决，同意资助。关于你的项目的同行评议意见如下：

1. 在神经退行性疾病的病理过程中，**GSK-3**是介导神经元凋亡的关键性激酶之一，阐明其信号传导机制将有助于今后临床药物的开发，可以通过药物干扰其上游激酶的活性而改变**GSK-3**活性，从而抑制疾病过程中特异神经元的凋亡。具有重要的科学意义。项目组的研究能力强，研究方案合理，重点突出，建议优先资助。

2. **GSK-3**是一个重要的粗神经元凋亡的激酶。在神经退行病的病理发生中可能起重要作用。申请人采用该酶抑制剂进行了神经保护及其机制的分析，并深入提出本项目的研究。立题依据较充分，研究内容和设计较合理，结合本人的工作基础，和上一项目完成的情况，建议考虑资助。

3. GSK-3 α /GSK-3 β 是促神经元凋亡的重要激酶，去极化可使其磷酸化并抑制其活性，从而抑制凋亡的发生。但目前对**GSK-3** 磷酸化的上游激酶尚不清楚。该课题组的前期研究提示**CaMKII** 可能介导了**GSK-3** 的磷酸化。该项目拟进一步证实**CaMKII** 与**GSK-3** 的直接相互作用及在去极化促神经元存活效应中的作用，有望揭示去极化调控**GSK-3** 的新机制，为确立**GSK-3** 作为神经退行性疾病治疗的新靶点提供更充分的科学依据。立题新颖，研究内容合适，研究方案可行。 申请人及课题组人员研究能力强，工作基础好。

4. 神经元凋亡是神经退行性疾病等神经系统疾患的重要原因，该申请拟研究**CaMKII**磷酸化**GSK-3**对去极化介导的神经元存活的调控作用及其机制，具有重要科学意义与研究价值。项目在**GSK-3**神经元凋亡中作用的原有发现基础上，提出的**GSK-3**磷酸化及其具体信号通路的工作假设具有很强的创新性与系统性。研究目标明确，研究内容恰当，关键科学问题把握准确。展示的预实验结果，显示了申请者在**GSK-3**信号转导通路方面扎实的工作基础与研究方案的合理可行。申请者曾经主持并很好完成国家自然科学基金，在国际重要学术刊物发表多篇学术论文，体现了突出的研究实力。建议优先资助。

5. 该项目旨在探讨去极化时**GSK3**的磷酸化及其相关激酶信号通路与神经元存活关联性，申请人拟运用生物化学、细胞生物学手段进行研究。选题创新性强，研究内容较系统，研究重点突出，所选择的关键问题准确。总体研究方案合理，研究方法和手段先进，技术路线可行。项目有相关的工作基础，研究队伍结构合理，具备相应研究的工作条件。经费预算合理，建议优先资助。

申请人观察到内源性大麻素（**Endocannabinoids, eCBs**, 如2-AG）可抑制**COX-2**的表达，并根据**eCBs**保护神经元这一事实（已有报道），推测或假设**eCBs**可能是通过抑制**COX-2**发挥其保护神经元的作用。项目不仅想证实这一假设，而且想进一步阐明**eCBs**抑制**COX-2**的分子机制。但是，不知申请人是否已有**COX-2**介导神经元损伤的证据？这一资料的缺失使得立项依据不很充分。另外，申请人没有明确、具体的指出研究**eCBs**抑制**COX-2**机制的切入点。最近，已有报道，**eCBs**通过**PI3K/Akt**通路保护神经元

(Selective CB2 receptor agonism protects central neurons from remote axotomy-induced apoptosis through the PI3K/Akt pathway. J Neurosci. 2009, 29:4564-70)。申请人是否要避免思维定势形成，改变些思路？考虑到申请人作为第一作者发表了5篇**SCI**文章，且刚从美国回来，急需基金支持，建议资助。

项目创新性不明显，研究目标或科学问题不明确，申请书撰写非常凌乱，没有条理。项目涉及到腺病毒技术、**ChIP**方法、质粒构建、**RT-PCR**、报道基因分析和蛋白-蛋白作用等分子生物学手段，但从简历或以前文章的发表记录看，申请人没有这方面的经验，其分子生物学基础十分薄弱。因此，可行性极差。此外，申请人获得题为“**MRTF-A**与**ERK**相互作用对脑缺血.....”的面上项目，在研。我甚至担心这个在研的项目都不能完成。最后，申请人没有主流**SCI**期刊上发表过文章。不予资助。

获得资助的决定因素

- 创新性强 思想新颖
- 工作基础好、SCI文章
- 依据充分
- 目标明确
- 研究内容具体
- 技术路线清晰
- 重点突出、方案合理
- 国际合作






中山大學

SUN YAT-SEN UNIVERSITY

谢谢

可行性分析

—从学术思想角度提出




1. 工作基础（学术思想） 
2. 科研梯队 
3. 实验条件
4. 实验技术
5. 交流与合作（国内、国外） 

课题组成员




可行性分析

—从学术思想角度提出




1. 工作基础（学术思想） 
2. 科研梯队 
3. 实验条件
4. 实验技术
5. 交流与合作（国内、国外） 

交流与合作

我们与国际同行建立了良好的交流渠道，与毛子旭 (Zixu Mao, Associate Professor, Brown University, 现在 Emory University)、韩怡凡(Yifan Han, Associate Professor, Hong Kong University of Science and Technology) 一直保持密切合作关系，我们已经共同发表了多篇SCI论文（见工作基础中的参考文献），在人员、信息、试剂和载体等多方面真正做到了互通和互惠。本人将此视为完成本项目的宝贵条件之一。 

可行性分析

—从学术思想角度提出

1. 工作基础（学术思想） 
2. 科研梯队 
3. 实验条件
4. 实验技术
5. 交流与合作（国内、国外） 

创新性

创新是灵魂，是评议和能否批准的关键

创新：学术创新，思想创新

新的理论 新的方法 新的体系 新的规律

源头创新：原始性 唯一性

源头：有进一步发展的前景

本项目的特色与创新

申请人首次报道了神经元凋亡时促凋亡蛋白Bim上调是不依赖于JNK/c-Jun通路(Leyu Shi, et al, Neurosci Lett. 2005)一观察之后, 又以可靠的实验结果证明PI3K/Akt/FKHRL1信号通路也不参与bim的上调(见立项依据)。

bim上调的转录机制是什么? 我们率先对bim启动子进行了5'末端序列递减分析, 确立了诱导bim表达的启动子核心区, 进而发现一个典型的转录因子SP1结合序列位于其中。进一步实验显示: 神经元凋亡时SP1被激活; 负显性SP1突变体和SP1-DNA结合抑制剂mithramycin A可抑制bim的上调。根据以上生物信息学分析和实验观察, 我们首次提出了SP1介导bim上调这一新的bim转录机制: 神经元凋亡时转录因子SP1被激活, 激活的SP1与bim启动子核心区的SP1结合序列结合, 从而转录激活bim的表达。

本项目拟进一步采用负显性SP1突变体的腺病毒表达技术以及启动子点突变、EMSA和CHIP方法, 旨在获得SP1直接调控bim基因的可靠证据, 为阐明SP1对促凋亡蛋白Bim的调控作用和机制并进一步确立SP1作为神经退行性疾病治疗的新靶点提供更充分的科学依据。

研究基础与工作条件

—突出与项目相关的工作积累

1. 研究基础 已取得的研究工作成绩及与本项目有关的研究工作积累(对于自由申请项目,着重填写申请人近期的主要工作业绩;对于重点项目,请着重填写本课题组与本项目相关的研究工作积累和近五年的主要研究业绩)
2. 工作条件 已具备的实验条件,尚缺少的实验条件和拟解决的途径(包括利用国家重点实验室和部门开放实验室的计划与落实情况)

研究基础

申请人近年有如下工作积累和成绩:

1. 申请人多年的研究兴趣主要集中在神经元凋亡的信号转导与基因调控、帕金森病的研究方面，发表了**36篇**与神经元凋亡的信号转导和基因调控有关的**SCI**论文，其中作为第一作者的有**2篇**，作为通讯作者的有**10篇**，作为共同作者的有**24篇**。
2. 申请人在**GSK-3 β** 促神经元凋亡研究方面有着厚实的工作基础。申请人曾发现**PKA**可以直接使 **GSK-3 β** 的**Ser9**磷酸化并抑制其活性，并进而阐明了**cAMP/PKA** 通过磷酸化并抑制**GSK-3 β** 发挥其促神经元存活的作用 (**Mol Cell Biol, 2000**)。此外，申请人还证明了**GSK-3 β** 的抑制剂可以保护黑质多巴胺神经元，并对**MPTP** 诱导的帕金森动物模型有很好的治疗效果(**Neuropharmacology, 2007**)。

研究基础

3. 申请人已经排除了AKT、PKA、p90RSK参与去极化时GSK-3磷酸化，经一致序列分析和抑制剂实验，提出CaMKII介导GSK-3磷酸化的可能性，进一步的体外重组激酶反应分析证明，CaMKII可直接磷酸化GSK-3 α Ser21/ GSK-3 β Ser9。此外，申请人还用可靠的实验结果证明了CaMKII促神经元存活作用。这些宝贵的研究资料是本项目重要的工作基础之一。
4. 申请人一直进行神经元凋亡中一条重要信号转导通路——JNK/c-Jun 通路的靶基因及其对神经元凋亡调控的研究。在c-Jun促凋亡靶基因的研究方面取得一定成绩：首次证实bim不是c-Jun的靶基因(Neurosci Lett, 2005)，并从源头寻找和确立了若干介导凋亡的新的c-Jun靶基因。其中，已经完成了c-Jun直接调控促凋亡的BH3-only 蛋白dp5的研究 (J Biol Chem,2007)，随后又证实了ATF3是c-Jun的促凋亡靶基因 (Neuroscience, 2008) 。

工作条件

2001年回国，获得211基金180万元，组建了一流的分子、细胞生物学实验室。2002年，作为负责人获得一期985学科建设经费700万元，筹建了一流的蛋白质组学实验室并正在主持开展蛋白质科学的前沿性工作。近三年，培养和汇聚了一支从事分子神经生物学和蛋白质组学研究的科研队伍。这些建设性工作为解决细胞信号转导、基因调控以及本项目的核心问题奠定了扎实的基础。

项目负责人黎明涛所在单位——中山大学中山医学院药理教研室是211项目资助学科和国家重点学科。人才济济，科研装备精良。近三年，药理教研室获得学科建设资金3000万元，已购置大型仪器如质谱仪、激光共聚焦显微镜、超速离心机、流式细胞仪、高效液相和蛋白质分离纯化系统等。这是申请者视为非常可贵的研究工作环境。

写好申请书是申请成功的关键




- 评审实际上只评申请书
- 学术水平高不等于成功
- 基金评审相对公正

撰写前的准备

- 好心情、好身体 想好再写 3h /天
- 读指南、读通知 注意截止期
- 熟知申请过程、有关规定
- 读标书、读高手、读同行、读自己
- 选题 卖点：创新性 工作基础
- 沟通 科研科、医科处

可行性分析

—从学术思想角度提出

1. 工作基础（学术思想） 
2. 科研梯队 
3. 实验条件
4. 实验技术
5. 交流与合作（国内、国外） 

工作基础：

本项目是在原工作基础上的继续和深入。近五年，本人共发表了12篇SCI论文，其中作为第一作者两篇；通讯作者四篇（见工作基础）。研究方向主要集中在神经元凋亡的信号转导和基因调控。本课题组在研究JNK/c-Jun通路靶基因时，发现“促凋亡蛋白bim上调不依赖JNK/c-Jun”。我们首次报道了神经元凋亡时JNK/c-Jun不参与bim的上调[1]，随后，我们又以可靠的证据揭示了PI3K/Akt/ FKHRL1也不介导bim的上调(未发表资料)。最近，对bim的调控研究又取得了突破性的进展，即发现了SP1调控bim的转录机制(见立项依据)。这些研究工作改变了以往的观点，也是本项目重要的立项依据之一。因此，我们具有完成本项目的切实可行的、扎实的前期工作基础。



拟解决的关键问题

获得SP1直接调控bim基因表达的可靠依据。

什么是关键问题？

— 研究过程中对达到预期目标有重要影响的某些研究内容或因素。

— 为达到预期目标所必须掌握的关键技术或研究手段。

撰写要求：找出关键问题，问题清晰，分析透彻，合理的解决方法。

