**附件1：**

**科研项目招标服务项目**

**科研题目：HIF-1α基因修饰骨髓间充质干细胞对新生鼠缺氧缺血性脑损伤的治疗作用及其基因调控机制**

1、载体构建及细胞转染

（1）构建HIF-1α慢病毒颗粒并转染MSCs

采用含HIF-1α表达的pLenti6/V5-mHIF-lαEGFP质粒和ViraPowerTM Lentiviral包装混合质粒（pLPl、pLP2、pLP/VSVG）包备病毒，将包备完成的病毒转染293FT细胞，收集病毒上清，纯化慢病毒颗粒，并进行慢病毒的滴度测定。取对数生长期的上述 SD大鼠BMSCs，加入HIF-1α慢病毒载体稀释液，72 h后观察绿色荧光蛋白的表达效率及阳性转染率。

（2）骨髓间充质干细胞的分离、培养及鉴定    利用流式细胞仪对培养获得细胞进行特异性表面标志物检测，若CD44，CD29及CD90阳性，而CD45阴性，则说明所培养细胞为BMSCs。将一部分细胞留作基础MSCs待后续移植实验使用，一部分MSCs供后续病毒转染使用。

  2.动物实验

（1）运用Levine/Vannucci法建立新生鼠缺血缺氧动物模型：选用出生7天的SD鼠，结扎右侧颈总动脉后置于37℃缺氧箱（氧浓度为10%）中90分钟，之后根据不同实验分组进行干预处理。（2）根据实验分组移植HIF转染的HIF-1α-MSCs、BMSCs及磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline，PBS)注射进入SD乳鼠侧脑室并检测移植后BMSCs 在脑组织中的分布。

（3）检测移植HIF-1α转染的BMSCs对缺氧缺血脑损伤的保护作用

  ① 采用TTC染色评估脑梗死面积并用imageJ软件测出梗死面积，采用免疫荧光染色方法鉴定三组大鼠之间细胞增殖（Brdu），细胞凋亡（Tunel、Caspase3）及神经细胞成熟（NeuN）之间的差异，以评估移植HIF-1α-MSCs对缺血缺氧脑损伤的保护作用；

②利用western blot及realtime-PCR检测HIF-1α以及其下游分子VEGF在不同实验组脑组织内表达；

③利用TUNEL试剂盒检测凋亡细胞数量；运用免疫荧光染色检测脑缺氧缺血损伤区域血管密度、以及血管内皮前体细胞的表达及分布；运用免疫荧光染色检测不同实验组中神经干细胞的表达及分布。

4、细胞实验

（1）新生SD大鼠神经元原代培养   培养7天后备用。

（2）ChIP-seq及RNA-seq分析锁定HIF-1α下游靶基因收取上述培养的神经细胞行ChIP-seq分析，将收集的DNA片段用IlluminaHiseq测序仪进行测序分析。得到测序数据后，经过生物信息学处理，可以得到HIF-1α这一因子在整个基因组范围内与基因组DNA的结合谱，并可以精确的找到候选的下游靶基因。

5、神经行为学评价：于移植后7天、28天对不同实验组进行mNSS评分及迷宫试验，以评估不同干预处理后试验动物学习、记忆等神经功能改变。