**附件2：**

**科研项目招标服务项目**

**科研题目：TNF-α介导AP-1信号通路对胎盘ABCB1基因表达及功能的调控研究**

**研究内容：**

**第一部分：细胞实验：**采用 Bewo细胞

①通过 WB方法检测不同剂量 TNF-α刺激下 AP-1 家族成员的表达变化。

②用免疫共沉淀法（IP）检测 TNF-α激活的 AP-1 家族成员二聚体存在形式。

## 第二部分：细胞实验：采用 Bewo细胞株

①通过 qRT-PCR、WB方法检测不同剂量 TNF-α刺激下 ABCB1 基因 mRNA及蛋白表达变化。

②采用双荧光素酶标记地高辛，验证经不同剂量 TNF-α刺激后，地高辛细胞内外浓度分布。

**第三部分：细胞实验：利用 Bewo细胞株**

① 采用凝胶迁移实验（Electrophoresis mobility shift and supershift assay, EMSA）及染色质免疫共沉淀法（Chromatin mmunoprecipitation assay, ChIP），鉴定转录因子 AP-1 二聚体与人 ABCB1 基因启动子的结合能力；

②采用 AP-1 结合位点点突变技术和双荧光素酶报告系统，验证 AP-1 二聚体是否可特异性地结合 ABCB1 基因启动子区域，影响靶基因启动子活性；

③采用基因过表达及 RNAi方法，验证 AP-1 对胎盘 ABCB1 基因表达及其药物转运率的影响。

**第四部分：细胞实验：利用 Bewo 细胞株**

**①**通过qRT-PCR、WB方法检测加入AP-1 抑制剂丹参酮IIA 后TNF-α刺激下ABCB1 基因mRNA 及蛋白表达变化。

②采用双荧光素酶标记地高辛，验证加入 AP-1 抑制剂丹参酮 IIA 后 TNF-α刺激下经地高辛的细胞内外浓度。

## 第五部分：动物实验：

1）引进 C57BL孕鼠，利用体内注射 LPS 构建机体炎症模型；

2）设计合成特异性针对 AP-1 基因的 siRNA；

3）将 AP-1-siRNA插入慢病毒，构建慢病毒 shRNA载体；

4）选取不同胎龄孕鼠，开腹，选固定位置胚胎，将慢病毒包装的 AP-1-siRNA 质粒注射于胎盘母体面，进行动物体内稳定转染；关腹继续饲养；

5）转染后 72h，取小鼠胎盘，通过 qRT-PCR、Western-Blot方法检测胎盘ABCB1基因mRNA及蛋白表达变化；取母血及胎儿单位，采用高效液相色谱/质谱（Highperformance liquid chromatographyand massspectrometry，HPLC/MS）方法检测母体血浆及胎儿单位地高辛药物浓度，并利用荧光标记药物探针追踪药物在母体、胎盘、胎儿中的空间分布，进一步在体内验证转录因子 AP-1 可调控胎盘 ABCB1基因表达及功能。