**附件2**

《应用miRNAs探测HHcy孕妇血管内皮细胞损伤及妊高征事件》与《尿路感染病原菌16S rRNA电化学生物芯片传感阵列新技术建立及应用研究》服务

招标内容

**一、项目实施内容：**

1、收集妊高征孕妇、健康对照孕妇外周血样和胎盘组织及病原菌菌株。

2、样品RNA/DNA提取、测序、分析。

3、通过测序分析结果进行关键miRNA筛选。

4、通过细胞模型进行相关表型与机制实验。

**二、项目实施的技术方案**

**1、妊高征项目**

1.1 采集妊高征孕妇（n=100例）与健康孕妇（n=100例）静脉血10ml,2h内分离血清，-80℃冰冻保存。

1.2 取妊高征孕妇（n=30例）与健康孕妇（n=30例）胎盘组织，剪取胎盘组织4块，分别装入4个冻存管内，-80℃冰冻保存。.

1.3 提取血清RNA，进行miRNA测序

1.4 测序

1.4.1 数据质控：测序质量值分布统计；测序碱基质量控制；测序数据产出统计。

1.4.2 可比对测序数据的获得：由于样品制备，测序化学与处理以及测序仪器的光学数码处理而产生的非纯序列（例3端接头序列），简单碱基组成序列在该步骤中被去除，通过长度筛选获得具有典型miRNA长度特征的候选序列进行下游分析。

1.4.3 miRNA数据库以及测序物种基因组比对：通过Bowtie比对软件将可比对序列与最新版本的miRBase数据库以及测序物种基因组进行序列比对，鉴定该物种已知的miRNA，同时发现新的5p或者3p miRNA序列，鉴定在其它近源物种中已有报道，在该物种中崭新的miRNA序列；通过Bowtie比对软件以及二级结构折叠软件增加既有报道的miRNA的前体序列成员。

1.4.4 与其他RNA数据库的比对：Rfam、Repbase以及mRNA序列比对：可比对序列与Rfam、Repbase数据库以及该测序物种的mRNA序列进行比对鉴定，并且在该步骤中被去除。

1.4.5 预测全新的miRNA：将可比对序列与测序物种基因组进行序列比对，并通过二级结构折叠预测全新的miRNA序列；预测的miRNA前体二级结构模式图绘制。

1.4.6 miRNA序列本身相关分析：miRNA成对发现标记；miRNA长度分布分析；miRNA基因组分布分析和miRNA基因簇分析（针对有ref物种）；miRNA碱基偏好性分析；miRNA碱基编辑标记；miRNA家族分析。

1.4.7 miRNA定量分析；多样品miRNA的表达差异分析；差异表达miRNA筛选；差异表达miRNA统计；miRNA表达模式聚类分析。

1.4.8 重复相关性检测。

1.4.9 差异表达miRNA的靶基因预测以及差异表达miRNA的靶基因GO，KEGG注释与GO，KEGG富集性以及pathway 通路分析和pathway network分析。

1.5 验证实验

1.5.1 胎盘实验验证

1.5.1.1 根据生物信息学分析，筛选得到PIH孕妇与正常孕妇血清差异表达的miRNAs；

1.5.1.2 采用RT-PCR检测外周血及胎盘组织内miR-155的表达水平。

1.5.1.3 采用RT-PCR及western blot检测胎盘组织内SIRT1、Pink1、parkin、BNIP3L的表达水平。

1.5.2 造模验证：以脐静脉内皮细胞为研究对象，以妊高征孕妇血清作为造模条件。

1.5.3 预实验PIN造模

1.5.3.1 正常血清培养的HUVECs

1.5.3.2 PIH血清培养的HUVECs

检测指标：

采用qRT-PCR检测各组AT1R、AT2R表达水平。

1.5.4 正式实验

1.5.4.1 分为以下5组：

①正常血清培养的HUVECs

②PIH血清培养的HUVECs

③PIH血清培养的HUVECs+NC

④PIH血清培养的HUVECs+candidate miRNA inhibitor

⑤PIH血清培养的HUVECs+ candidate miRNA inhibitor+vector

⑥PIH血清培养的HUVECs+ candidate miRNA inhibitor+siSIRT1

1.5.4.2 检测指标

①采用qRT-PCR和Western Blot检测各组SIRT1、Pink1、Parkin及BNIP3L表达水平。

②采用RT-PCR检测miR-155的表达水平。

③采用CCK-8方法检测内皮细胞的增殖活力。

④透射电镜观察细胞中线粒体（形态、数目）和线粒体自噬的情况。

⑤构建SIRT1的CDS/3’UTR区双报告质粒，与miR-155 mimic / NC 分别共转染293T细胞

⑥采用双荧光素酶报告实验检测miR-155与SIRT1的相互作用。

**2、16S rRNA项目**

2.1 留取尿路感染常见6种病原菌（大肠埃希菌、奇异变形菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌、阴沟肠杆菌）各20株菌株，-80℃冰冻保存。

2.2 提取冻存样本DNA，通过16S rRNA扩增（V3-V4）建库测序

2.3 测序

2.3.1 数据质控：测序质量值分布统计；测序碱基质量控制；测序数据产出统计。

2.3.2 Clean tags获得：原始测序reads中由于样品制备，测序化学与处理以及测序仪器的光学数码处理而产生的非纯序列（例3端接头序列、barcode序列）被去除，每对PE reads拼接为tags，包含简单碱基组成序列、低质量序列、长度过短的tags以及嵌合体序列被去除，剩余序列进行下游分析。

2.3.3 OTU聚类分析：Clean tags按照97%相似度聚类，得到每个cluster的序列及其代表序列（即为OTU），用于统计各个样本中每个OTU序列丰度并进行下游分析。

2.3.4 Alpha多样性分析：Observed species，Chao1，Shannon，Simpson指数计算，物种累积曲线、等级丰度图绘制。

2.3.5 Beta多样性分析：UPGMA层次聚类分析（unweighted unifrac和weighted unifrac）；PCA分析；Anosim分析（unweighted unifrac和weighted unifrac）；PCoA分析；非度量多维尺度分析(NMDS)。

2.3.6 物种分析：OTUs序列与数据库（RDP数据库、NT-16S数据库、Customized database）依次比对，得到各个样本所有OTU的物种注释；默认选取丰度最高的20个物种进行相对丰度计算，并以堆叠柱状图(stacked bar chart)、热图（Heatmap）形式展现；利用Krona软件对单样品物种注释结果及丰度进行动态可视化展示；通过某一分类水平下OTU序列碱基差异结合各个OTU序列的物种注释信息构建物种进化树。

2.3.7 显著性差异分析。