

(19)中华人民共和国国家知识产权局



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106755477 A

(43)申请公布日 2017.05.31

(21)申请号 201710038409.6

(22)申请日 2017.01.19

(71)申请人 中国科学院生物物理研究所

地址 100101 北京市朝阳区大屯路15号

(72)发明人 刘光慧 曲静 任若通 邓丽萍

(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

公司 11245

代理人 关畅 白艳

(51)Int.Cl.

C12Q 1/68(2006.01)

权利要求书2页 说明书7页

序列表1页 附图2页

(54)发明名称

一种检测细胞和机体衰老水平的方法

(57)摘要

本发明公开了一种检测细胞和机体衰老水平的方法。本发明首次通过qPCR方法检测人类细胞基因组中的rDNA拷贝数来评价细胞衰老水平。利用体外培养的间充质干细胞和不同年龄人群的血液基因组进行的对比研究证明人类细胞基因组中的rDNA拷贝数能够准确反映细胞的衰老水平。这一方法为评价细胞衰老乃至个体衰老提供一种全新的检测指标。

1. 检测待测细胞或机体中rDNA拷贝数的物质在检测或辅助检测待测细胞或机体衰老水平中的应用；

或检测待测细胞或机体中rDNA拷贝数的物质在制备检测或辅助检测待测细胞或机体衰老水平的产品中的应用。

2. 检测待测细胞或机体中rDNA拷贝数的物质在检测或辅助检测待测细胞或机体端粒拷贝数中的应用；

或检测待测细胞或机体中rDNA拷贝数的物质在制备检测或辅助检测待测细胞或机体端粒拷贝数的产品中的应用。

3. 根据权利要求1或2所述的应用,其特征在于:所述检测待测细胞或机体中rDNA拷贝数的物质为由引物1和引物2组成的引物对或探针;

所述引物1为如下a1)或a2):

a1) 序列1所示的单链DNA分子;

a2) 将a1)限定的单链DNA分子进行一个或几个碱基的缺失、插入和/或改变得到的、与a1)限定的单链DNA分子具有相同功能的单链DNA分子;

所述引物2为如下b1)或b2):

b1) 序列2所示的单链DNA分子;

b2) 将b1)限定的单链DNA分子进行一个或几个碱基的缺失、插入和/或改变得到的、与b1)限定的单链DNA分子具有相同功能的单链DNA分子;

所述探针为如下c1)或c2):

c1) 序列3所示的单链DNA分子;

c2) 将c1)限定的单链DNA分子进行一个或几个碱基的缺失、插入和/或改变得到的、与c1)限定的单链DNA分子具有相同功能的单链DNA分子。

4. 一种检测或辅助检测待测细胞或机体衰老水平的试剂盒,包括检测待测细胞或机体中rDNA拷贝数的物质。

5. 根据权利要求4所述的试剂盒,其特征在于:所述试剂盒还包括记载如下判断标准A的可读载体A1)或A2):

A1) rDNA拷贝数高的细胞或机体的衰老水平低于rDNA拷贝数低的细胞或机体的衰老水平;

A2) rDNA拷贝数越高,细胞或机体的衰老水平越低。

6. 一种检测或辅助检测待测细胞或机体端粒拷贝数的试剂盒,包括检测待测细胞或机体中rDNA拷贝数的物质。

7. 根据权利要求6所述的试剂盒,其特征在于:所述试剂盒还包括记载如下判断标准B的可读载体B1)或B2):

B1) rDNA拷贝数高的细胞或机体的端粒拷贝数高于rDNA拷贝数低的细胞或机体的端粒拷贝数;

B2) rDNA拷贝数越高,细胞或机体的端粒拷贝数越高。

8. 根据权利要求4-7中任一所述的试剂盒,其特征在于:所述检测待测细胞或机体中rDNA拷贝数的物质为如下X1)-X5):

X1) 由序列表中序列1所示的单链DNA分子和序列表中序列2所示的单链DNA分子组成的

引物对A;

X2) 由序列C所示的单链DNA分子和序列D所示的单链DNA分子组成的引物对B;

所述序列C为将序列1删除或增加或改变一个或几个核苷酸,且与序列1具有相同功能的核苷酸;

所述序列D为将序列2删除或增加或改变一个或几个核苷酸,且与序列2具有相同功能的核苷酸;

X3) 序列表中序列3所示的单链DNA分子;

X4) 序列E所示的单链DNA分子;

所述序列E为将序列3删除或增加或改变一个或几个核苷酸,且与序列3具有相同功能的核苷酸;

X5) 含有X1)所述引物对A或X2)所述引物对B或X3)所述单链DNA分子或X4)所述单链DNA分子的PCR试剂。

9. 权利要求4或5所述的试剂盒或权利要求5中所述的可读载体A1)或A2)在检测或辅助检测待测细胞或机体衰老水平中的应用;

或权利要求4或5所述的试剂盒或权利要求5中所述的可读载体A1)或A2)在制备检测或辅助检测待测细胞或机体衰老水平的产品中的应用。

10. 权利要求6或7所述的试剂盒或权利要求7中所述的可读载体B1)或B2)在检测或辅助检测待测细胞或机体端粒拷贝数中的应用;

或权利要求6或7所述的试剂盒或权利要求7中所述的可读载体B1)或B2)在制备检测或辅助检测待测细胞或机体端粒拷贝数的产品中的应用。

## 一种检测细胞和机体衰老水平的方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,涉及一种检测细胞和机体衰老水平的方法。

### 背景技术

[0002] 人口老龄化是世界尤其是中国面临的日益严峻的社会问题。毋庸置疑,衰老及其相关疾病已成为国内外科领域急需突破的热点问题。已有的研究表明,人类的细胞衰老受到遗传学、表观遗传学、细胞生物学以及代谢生物学等层面的多重调控(Lopez-Otin,C., Blasco,M.A.,Partridge,L.,Serrano,M.&Kroemer,G.The hallmarks of aging.Cell 153,1194-1217)。另一方面,人类细胞也能够通过从基因组、表观组、代谢组以及细胞生物学等多种水平表现出不同的衰老表型,从而反映出不同的细胞衰老进程。同时,衰老细胞的形态及代谢功能的异常和改变,将直接导致由其构成的组织和器官无法维持正常的结构和功能,进而影响个体的生命活动,最终导致个体衰老以及衰老相关疾病。因此,对于不同层面细胞衰老表型的精准检测将为判断个体衰老水平提供基础数据,从而为个体衰老以及衰老相关疾病的精准预后和提前干预提供重要依据。

[0003] 对于细胞衰老的检测指标,目前有基因组水平的端粒拷贝数检测,细胞生物学水平的生长速率检测,转录水平的p16和p21标志物检测,以及生化和代谢水平的衰老相关b-gal检测和IL6、IL8检测等。在这其中,由于其它指标在不同程度上都会受到环境等外界因素的影响而导致检测结果可能存在较大误差,因此唯有在基因组水平检测端粒拷贝数变化被认为是评价细胞衰老唯一的金标准。然而,随着人口老龄化程度的日益增高,人们对于衰老和衰老相关疾病的检测、诊断和预后,以及相关药物和治疗技术研发提出越来越多的需求和越来越多的要求,因此单纯通过检测端粒拷贝数变化来评价细胞和机体衰老已远远满足不了现有需求,无论是科研还是临床市场,都急需新型的细胞和机体衰老检测技术来弥补空白,并进一步提升检测精度。

### 发明内容

[0004] 本发明的一个目的是提供检测待测细胞或机体中rDNA拷贝数的物质的新用途。

[0005] 本发明提供了检测待测细胞或机体中rDNA拷贝数的物质在检测或辅助检测待测细胞或机体衰老水平中的应用。

[0006] 本发明还提供了检测待测细胞或机体中rDNA拷贝数的物质在制备检测或辅助检测待测细胞或机体衰老水平的产品中的应用。

[0007] 本发明还提供了检测待测细胞或机体中rDNA拷贝数的物质在检测或辅助检测待测细胞或机体端粒拷贝数中的应用。

[0008] 本发明还提供了检测待测细胞或机体中rDNA拷贝数的物质在制备检测或辅助检测待测细胞或机体端粒拷贝数的产品中的应用。

[0009] 上述应用中,所述检测待测细胞或机体中rDNA拷贝数的物质为由引物1和引物2组成的引物对或探针;

- [0010] 所述引物1为如下a1)或a2)：
- [0011] a1) 序列1所示的单链DNA分子；
- [0012] a2) 将a1)限定的单链DNA分子进行一个或几个碱基的缺失、插入和/或改变得到的、与a1)限定的单链DNA分子具有相同功能的单链DNA分子；
- [0013] 所述引物2为如下b1)或b2)：
- [0014] b1) 序列2所示的单链DNA分子；
- [0015] b2) 将b1)限定的单链DNA分子进行一个或几个碱基的缺失、插入和/或改变得到的、与b1)限定的单链DNA分子具有相同功能的单链DNA分子；
- [0016] 所述探针为如下c1)或c2)：
- [0017] c1) 序列3所示的单链DNA分子；
- [0018] c2) 将c1)限定的单链DNA分子进行一个或几个碱基的缺失、插入和/或改变得到的、与c1)限定的单链DNA分子具有相同功能的单链DNA分子。
- [0019] 本发明的另一个目的是提供一种检测或辅助检测待测细胞或机体衰老水平的试剂盒。
- [0020] 本发明提供的检测或辅助检测待测细胞或机体衰老水平的试剂盒包括检测待测细胞或机体中rDNA拷贝数的物质。
- [0021] 上述试剂盒中,所述试剂盒还包括记载如下判断标准A的可读载体A1)或A2)：
- [0022] A1) rDNA拷贝数高的细胞或机体的衰老水平低于rDNA拷贝数低的细胞或机体的衰老水平；
- [0023] A2) rDNA拷贝数越高,细胞或机体的衰老水平越低。
- [0024] 本发明还有一个目的是提供一种检测或辅助检测待测细胞或机体端粒拷贝数的试剂盒。
- [0025] 本发明提供的检测或辅助检测待测细胞或机体端粒拷贝数的试剂盒包括检测待测细胞或机体中rDNA拷贝数的物质。
- [0026] 上述试剂盒中,所述试剂盒还包括记载如下判断标准B的可读载体B1)或B2)：
- [0027] B1) rDNA拷贝数高的细胞或机体的端粒拷贝数高于rDNA拷贝数低的细胞或机体的端粒拷贝数；
- [0028] B2) rDNA拷贝数越高,细胞或机体的端粒拷贝数越高。
- [0029] 上述试剂盒中,所述检测待测细胞或机体中rDNA拷贝数的物质为如下X1)–X5)：
- [0030] X1) 由序列表中序列1所示的单链DNA分子和序列表中序列2所示的单链DNA分子组成的引物对A；
- [0031] X2) 由序列C所示的单链DNA分子和序列D所示的单链DNA分子组成的引物对B；
- [0032] 所述序列C为将序列1删除或增加或改变一个或几个核苷酸,且与序列1具有相同功能的核苷酸；
- [0033] 所述序列D为将序列2删除或增加或改变一个或几个核苷酸,且与序列2具有相同功能的核苷酸；
- [0034] X3) 序列表中序列3所示的单链DNA分子；
- [0035] X4) 序列E所示的单链DNA分子；
- [0036] 所述序列E为将序列3删除或增加或改变一个或几个核苷酸,且与序列3具有相同

功能的核苷酸；

[0037] X5) 含有X1) 所述引物对A或X2) 所述引物对B或X3) 所述单链DNA分子或X4) 所述单链DNA分子的PCR试剂。

[0038] 本发明还有一个目的是提供上述检测或辅助检测待测细胞或机体衰老水平的试剂盒或上述可读载体A1) 或A2) 的新用途。

[0039] 本发明提供了上述检测或辅助检测待测细胞或机体衰老水平的试剂盒或上述可读载体A1) 或A2) 在检测或辅助检测待测细胞或机体衰老水平中的应用。

[0040] 本发明还提供了上述检测或辅助检测待测细胞或机体衰老水平的试剂盒或上述可读载体A1) 或A2) 在制备检测或辅助检测待测细胞或机体衰老水平的产品中的应用。

[0041] 本发明的最后一个目的是提供上述检测或辅助检测待测细胞或机体端粒拷贝数的试剂盒或可读载体B1) 或B2) 的新用途。

[0042] 本发明提供了检测或辅助检测待测细胞或机体端粒拷贝数的试剂盒或可读载体B1) 或B2) 在检测或辅助检测待测细胞或机体端粒拷贝数中的应用。

[0043] 本发明还提供了检测或辅助检测待测细胞或机体端粒拷贝数的试剂盒或可读载体B1) 或B2) 在制备检测或辅助检测待测细胞或机体端粒拷贝数的产品中的应用。

[0044] 上述应用或试剂盒中, 所述检测待测细胞或机体中rDNA拷贝数的方法为如下(1) 或(2):

[0045] (1) 以待测细胞或机体的基因组DNA为模板, 采用引物1和引物2进行实时定量PCR;

[0046] (2) 用探针标记待测细胞或机体中的rDNA, 利用流式细胞术检测待测细胞或机体中rDNA拷贝数; 所述探针为荧光标记的探针, 具体为5' 端标记Cy3的探针。

[0047] 上述应用或试剂盒中,

[0048] 所述rDNA拷贝数是指细胞核内基因组DNA中编码45S核仁组织区核糖体RNA的DNA序列(Nucleolar organizer region-related ribosomal DNAs, NOR-rDNA) 的拷贝数;

[0049] 所述端粒拷贝数是指人类基因组中端粒重复序列TTAGGG的拷贝数, 其拷贝数多少反映了染色体末端的端粒长度。

[0050] 上述应用或试剂盒中, 所述细胞或机体具体可为人的细胞或机体。

[0051] 本发明首次通过qPCR方法检测人类细胞基因组中的rDNA拷贝数来评价细胞衰老水平。利用体外培养的间充质干细胞和不同年龄人群的血液基因组进行的对比研究证明人类细胞基因组中的rDNA拷贝数能够准确反映细胞的衰老水平。这一方法为评价细胞衰老乃至个体衰老提供一种全新的检测指标。

## 附图说明

[0052] 图1为本发明使用的WRN基因缺失的人间充质干细胞系(W5-MSC) 的鉴定结果。其中, A显示W5-MSC中WRN基因的转录本表达水平远低于野生型的人间充质干细胞系(WT-MSC); B显示, 与P6代WT-MSC相比, P6代W5-MSC中端粒长度显著缩短。

[0053] 图2为野生型间充质干细胞(记为WT-MSC) 和WRN基因缺失的人间充质干细胞系(记为W5-MSC) 中rDNA拷贝数检测结果。其中, A显示, 与P6代WT-MSC相比, P6代W5-MSC中rDNA拷贝数显著降低; B显示, 在WT-MSC和W5-MSC中, 作为对照的单拷贝基因GAPDH没有显著差异。

[0054] 图3为利用流式细胞术验证W5-MSC中rDNA拷贝数降低的结果。其中, A显示了流式

细胞术检测的原始结果;B显示A图中细胞荧光强度的统计结果。结果说明,与P6代WT-MSc相比,P6代WS-MSc中由荧光探针标记了rDNA的细胞的荧光强度显著降低,直接反映了rDNA拷贝数的显著降低,从而验证了之前定量PCR的结果。

[0055] 图4为不同年龄人群血液基因组中端粒和NOR-rDNA拷贝数检测结果。其中,A显示与0-10岁人群外周血相比,70-80岁人群外周血基因组中的端粒长度显著降低;B显示与0-10岁人群外周血相比,70-80岁人群外周血基因组中的中rDNA拷贝数也显著降低,从而验证了之前在WS-MSc中的检测结果。

### 具体实施方式

[0056] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。

[0057] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0058] 下述实施例中的定量试验,均设置三次重复实验,结果取平均值。

[0059] 下述实施例中的培养基配方如下:

[0060] (1) CDF12培养基配方:

[0061] DMEM/F12培养基 (Invitrogen,11320-033);

[0062] 0.1mM非必需氨基酸 (Invitrogen,11140-050);

[0063] 1mM GlutaMAX (Invitrogen,35050-061);

[0064] 20% (体积百分含量) Knockout血清替代物 (Invitrogen,N10828-028);

[0065] 1% (1g/100ml) 青霉素/链霉素 (Invitrogen,15070-063);

[0066] 55 $\mu$ M $\beta$ -巯基乙醇 (Invitrogen,21985-023);

[0067] 10ng/ml人FGF2 (Joint Protein Central)。

[0068] (2) 间充质干细胞 (MSC) 培养基配方:

[0069] MEM培养基 (Invitrogen,12571071);

[0070] 10% (体积百分含量) 胎牛血清 (Invitrogen,10091148);

[0071] 1% (1g/100ml) 青霉素/链霉素 (Invitrogen,15070-063);

[0072] 10ng/ml重组人成纤维细胞生长因子 (JPC,bFGF);

[0073] MSC分化培养基需额外添加5ng/ml TGF $\beta$  (Humanzyme,HZ1131)。

[0074] 下述实施例中的细胞系如下:

[0075] 人胚胎干细胞H9细胞系 (WT-ESC) 是WiCell公司的产品,货号:WA09 (H9) -DL-7。

[0076] WRN基因缺失的人胚胎干细胞系 (WS-ESC) 由第一发明人创建,在文献“Zhang,W.et al.Aging stem cells.A Werner syndrome stem cell model unveils heterochromatin alterations as a driver of human aging.Science 348,1160-1163”中公开过,公众可从中国科学院生物物理研究所获取该细胞系。WRN蛋白对于细胞核内组成型异染色质的结构维持至关重要,与细胞衰老密切相关,其功能缺失是成年早衰症发生的直接原因,可引起多组织器官衰老和衰老相关疾病。

[0077] 下述实施例中的胚胎干细胞H9细胞系 (WT-ESC) 培养方法如下:

[0078] (1) 将H9细胞接种至预先培养了经过丝裂霉素 (美国Sigma公司产品,货号:M0503) 灭活的小鼠胚胎成纤维细胞 (美国Invitrogen公司产品,货号:S1520-100) 的培养板中,使用人类胚胎干细胞培养基 (CDF12培养基) 与小鼠胚胎成纤维细胞共同培养;

[0079] (2) 将H9细胞接种至预先用细胞外基质(qualified-Matrigel,美国BD Biosciences产品,货号:354277)包被的培养板中,使用mTeSR培养基(美国StemCell Technologies产品)培养。

[0080] 下述实施例中的用于流式细胞术分选MSC的荧光标记抗体如下:

[0081] 荧光素FITC标记的抗人细胞表面识别分子CD90抗体,BD Biosciences,货号:555595。

[0082] 荧光素PE标记的抗人细胞表面识别分子CD73抗体,BD Biosciences,货号:550257。

[0083] 荧光素APC标记的抗人细胞表面识别分子CD105抗体,BD Biosciences,货号:17-1057-42。

[0084] 荧光素APC标记同型对照抗体,BD Biosciences,货号:555751。

[0085] 荧光素PE标记同型对照抗体,BD Biosciences,货号:555749。

[0086] 荧光素FITC标记同型对照抗体,BD Biosciences,货号:555742。

[0087] 下述实施例中的rDNA是指细胞核内的核仁组织区核糖体RNA的编码序列(Nucleolar organizer region-related ribosomal DNAs,NOR-rDNA),是由40-400个拷贝构成的串连重复序列,每个拷贝含有18S,5.8S和28S核糖体RNA的编码序列。

[0088] 下述实施例中的rDNA拷贝数是指细胞核内基因组DNA中编码45S核仁组织区核糖体RNA的DNA序列(Nucleolar organizer region-related ribosomal DNAs,NOR-rDNA)的拷贝数。

[0089] 下述实施例中的端粒是染色体末端的染色质凝缩区域,其中的DNA序列为由TTAGGG(记为一个拷贝)构成的串连重复序列,目前认为随着细胞衰老,端粒区串连重复序列的拷贝数是逐渐减少的。

[0090] 下述实施例中的端粒拷贝数是指人类基因组中端粒重复序列TTAGGG的拷贝数,其拷贝数多少反映了染色体末端的端粒长度。

[0091] 实施例1、rDNA拷贝数在评价细胞衰老水平中的应用

[0092] 一、野生型人间充质干细胞(WT-MSC)和WRN基因缺失的人间充质干细胞(WS-MSC)的制备及WRN转录本的相对表达水平检测

[0093] 1、野生型人间充质干细胞(WT-MSC)和WRN基因缺失的人间充质干细胞(WS-MSC)的制备

[0094] 本发明将野生型人胚胎干细胞H9细胞系(WT-ESC)和WRN基因缺失的人胚胎干细胞系(WS-ESC),进一步体外定向分化为间充质干细胞(WT-MSC)和WRN基因缺失的人间充质干细胞(WS-MSC),具体方法如下:

[0095] (1) 将野生型人胚胎干细胞H9细胞系(WT-ESC)和WRN基因缺失的人胚胎干细胞系(WS-ESC)分别进行拟胚体(EB)分化,获得拟胚体(EB)。拟胚体(EB)分化具体步骤如下:准备含有300-500个细胞、大小均一的ESC克隆,用室温PBS(Gibco,10010023)清洗一次,用Dispase(Invitrogen公司,货号为17105041)37℃消化20-30min。待ESC克隆形成球体后,用CDF12培养基重悬后,加到低粘附培养板(Corning公司,货号3471)中,37℃,5%CO<sub>2</sub>条件培养1-3天后即形成拟胚体。

[0096] (2) 将步骤(1)获得的拟胚体(EB)接种于基质胶(matrigel)包被的6孔板中进行培



养,继续培养2周至纤维状细胞出现。再经过一次传代后,利用流式细胞术分选其中的CD73、CD90和CD105均为阳性的细胞类群(图1),即为野生型间充质干细胞(记为WT-MSc)和WRN基因缺失的人间充质干细胞系(记为WS-MSc)。

[0097] 2、WRN转录本的相对表达水平检测

[0098] 按照 $2 \times 10^5$ /孔的接种密度分别将步骤1中的WT-MSc和WS-MSc在6孔板中进行连续传代培养(每代培养4天,隔天换液)至第6代,收取第2-3代(第2-3代分别记为P2代、P3代)和第5-6代(第5-6代分别记为P5代、P6代)的WT-MSc和WS-MSc分别作为早代WT-MSc和WS-MSc、晚代WT-MSc和WS-MSc。分别检测第6代WT-MSc和WS-MSc中的WRN转录本的相对表达水平。具体步骤如下:

[0099] 以第6代的WT-MSc和WS-MSc为供试细胞,分别提取供试细胞的RNA并反转录为cDNA,分别使用如下引物进行实时定量PCR,检测供试细胞中WRN基因的表达量。

[0100] WRN-F: CCAACATCCCAGCTTGCTT;

[0101] WRN-R: GAGCAGGCCCATGTTACCTGA;

[0102] WRN转录本的检测结果如图1A所示,从图中可以看出:WS-MSc中WRN基因的转录本表达水平远低于野生型的人间充质干细胞系(WT-MSc)。

[0103] 二、间充质干细胞中端粒长度和rDNA拷贝数检测

[0104] 分别以步骤一中P6代的WT-MSc和WS-MSc细胞为供试细胞。分别从供试细胞中提取基因组DNA,通过实时定量PCR的方法检测供试细胞中端粒长度和rDNA拷贝数。其中,以36B4为端粒长度检测的对照基因;以GAPDH为rDNA拷贝数检测的对照基因。引物序列如下:

[0105] rDNA-F: 5' -CTTGGGAATGCAGCCCAAAG (序列1) -3' ;

[0106] rDNA-R: 5' -GAATCCTCCGGGCGGACTG (序列2) -3' ;

[0107] Te1-F: 5' -GGTTTTGAGGGTGAGGGTGAGGGTGAGGGT-3' ;

[0108] Te1-R: 5' -TCCCGACTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTA-3' ;

[0109] 36B4u: 5' -CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC-3' ;

[0110] 36B4d: 5' -CCCATTCTATCATCAACGGGTACAA-3' ;

[0111] GAPDH-F: 5' -GCAGCTGAGCTAGGCAGCA-3' ;

[0112] GAPDH-R: 5' -CTTAAGGCATGGCTGCAACTG-3' 。

[0113] 端粒长度检测结果如图1B所示,从图中可以看出:与P6代WT-MSc相比,P6代WS-MSc中端粒长度显著缩短。

[0114] rDNA拷贝数检测结果如图2A所示,从图中可以看出:与P6代WT-MSc相比,P6代WS-MSc中rDNA拷贝数显著降低;且图2B显示,在WT-MSc和WS-MSc中,作为对照的单拷贝基因GAPDH没有显著差异。

[0115] 上述结果表明:rDNA拷贝数与端粒长度的检测结果一致。

[0116] 三、利用流式细胞术验证rDNA拷贝数的检测结果

[0117] 分别以WT-MSc和WS-MSc细胞为供试细胞(第2-3代和第5-6代),利用流式细胞术检测供试细胞中rDNA拷贝数。具体步骤如下:

[0118] 1、利用4%多聚甲醛(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司,货号:AR-0211)将供试细胞在室温条件下固定10分钟,然后使用含有0.4% TritonX100(美国Sigma公司,货号:T8787)的PBS室温孵育供试细胞15分钟,再用100g/ml RNase A于37度孵育供试细胞30分

钟。

[0119] 2、使用带有Cy3荧光标记的rDNA荧光探针按如下条件孵育步骤1获得的细胞：首先85度孵育10分钟，然后37度孵育2-3小时。用PBS清洗细胞1-2次，每次5分钟。最后利用流式细胞术检测细胞的荧光强度。上述带有Cy3荧光标记(5'端)的rDNA荧光探针由韩国PANAGENE公司合成，探针序列如下：5'-ACCCTACTGATGATGTGT(序列3)-3'。

[0120] 结果如图3所示。其中，图3A为流式细胞术检测的原始结果；图3B为图3A中细胞荧光强度的统计结果。从图中可以看出：与P6代WT-MSc相比，P6代WS-MSc中由荧光探针标记了rDNA的细胞的荧光强度显著降低，直接反映了rDNA拷贝数的显著降低，从而验证了步骤二中定量PCR的检测结果。

[0121] 实施例2、不同年龄人群血液基因组中端粒长度和NOR-rDNA(核仁组织区rDNA)拷贝数检测

[0122] 分别以0-10岁(Young Blood)和70-80岁(Old Blood)正常人的外周血为供试样品(各10例)。从供试外周血中提取基因组DNA，通过实时定量PCR的方法检测端粒长度和rDNA拷贝数。具体步骤参见实施例1的步骤二中的方法。

[0123] 结果如图4所示。从图中可以看出：与0-10岁人群外周血相比，70-80岁人群外周血基因组中的端粒长度显著降低(图4A)；与0-10岁人群外周血相比，70-80岁人群外周血基因组中的rDNA拷贝数也显著降低(图4B)，此结果与实施例1中的检测结果一致。说明rDNA拷贝数与细胞或机体的衰老水平呈负相关，即rDNA拷贝数越高，衰老水平越低。rDNA拷贝数高的细胞或机体的衰老水平低于rDNA拷贝数低的细胞或机体。rDNA拷贝数可以用于检测细胞和机体的衰老水平。

## 序列表

<110>中国科学院生物物理研究所

<120>一种检测细胞和机体衰老水平的方法

<160>3

<210>1

<211>20bp

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>1

cttgggaatg cagcccaaag 20

<210>2

<211>19bp

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>2

gaatcctccg ggcggactg 19

<210>3

<211>18bp

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>3

accctactga tgatgtgt 18

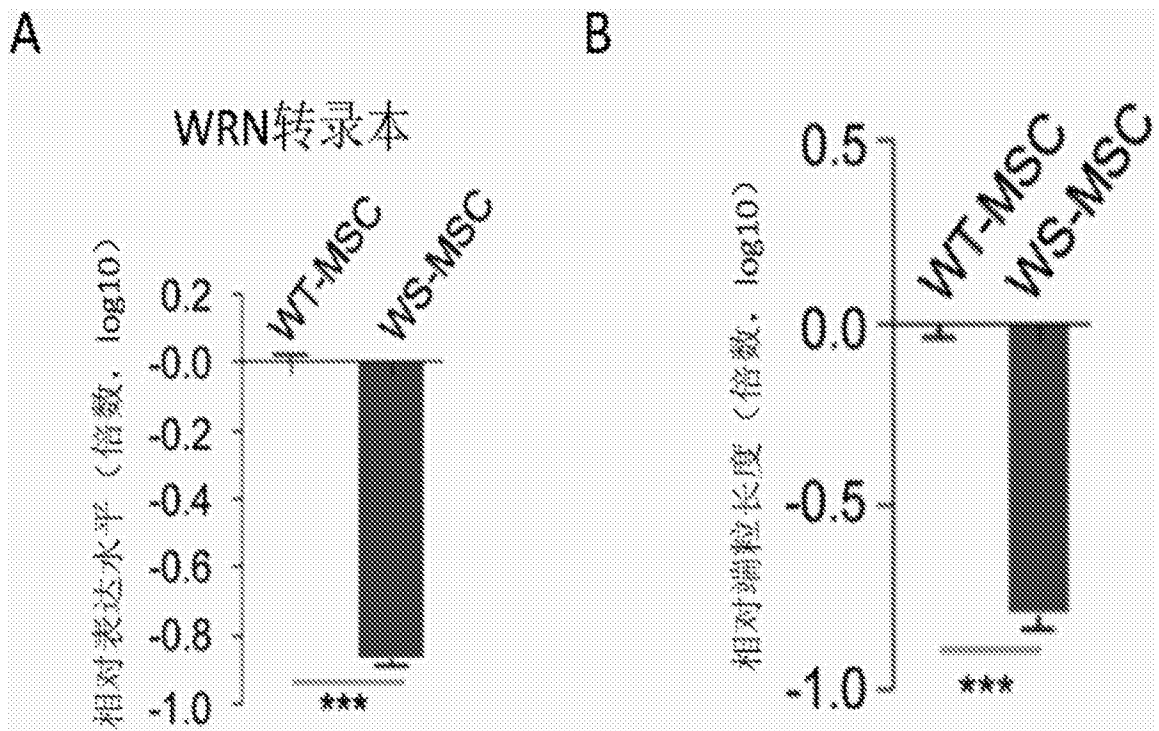


图1

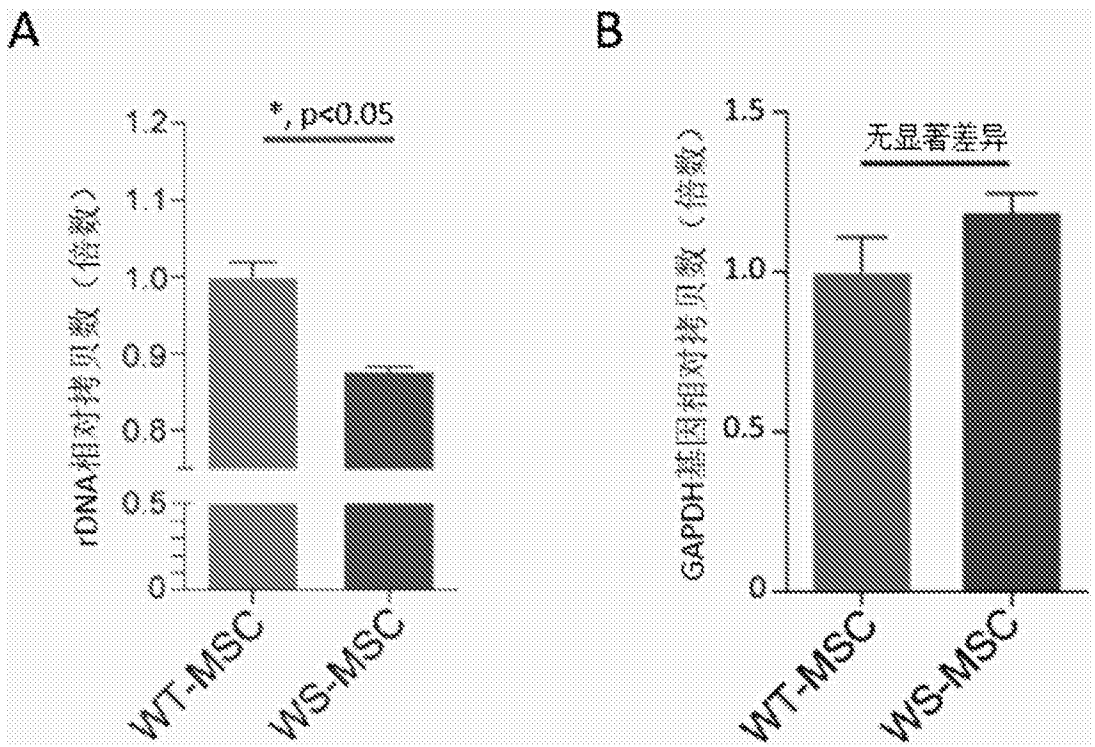


图2

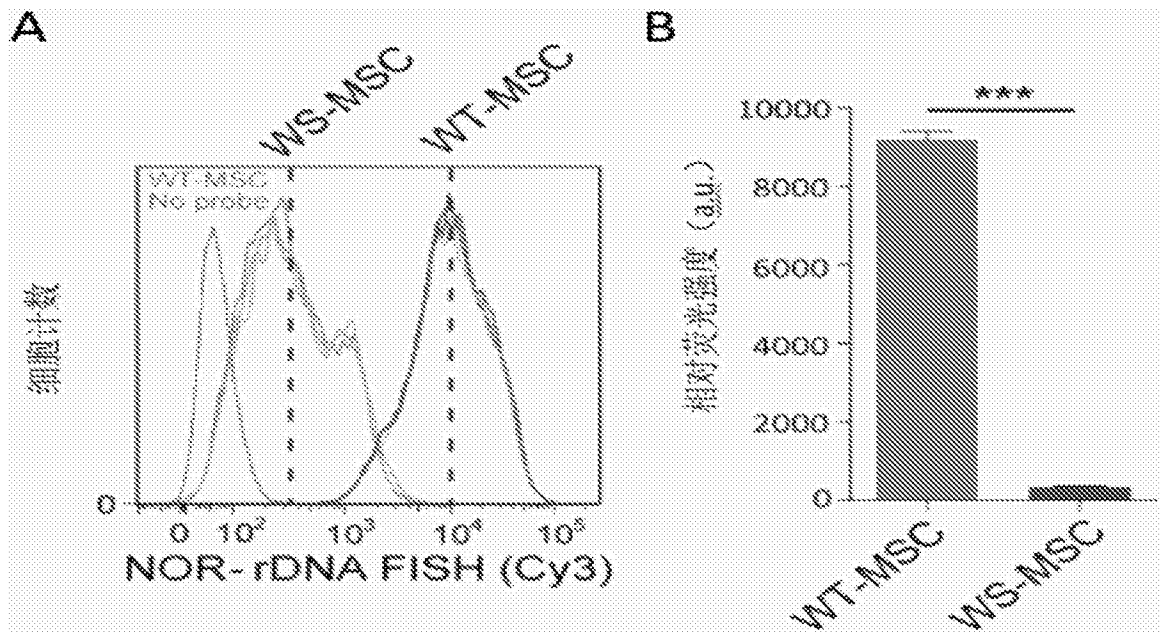


图3

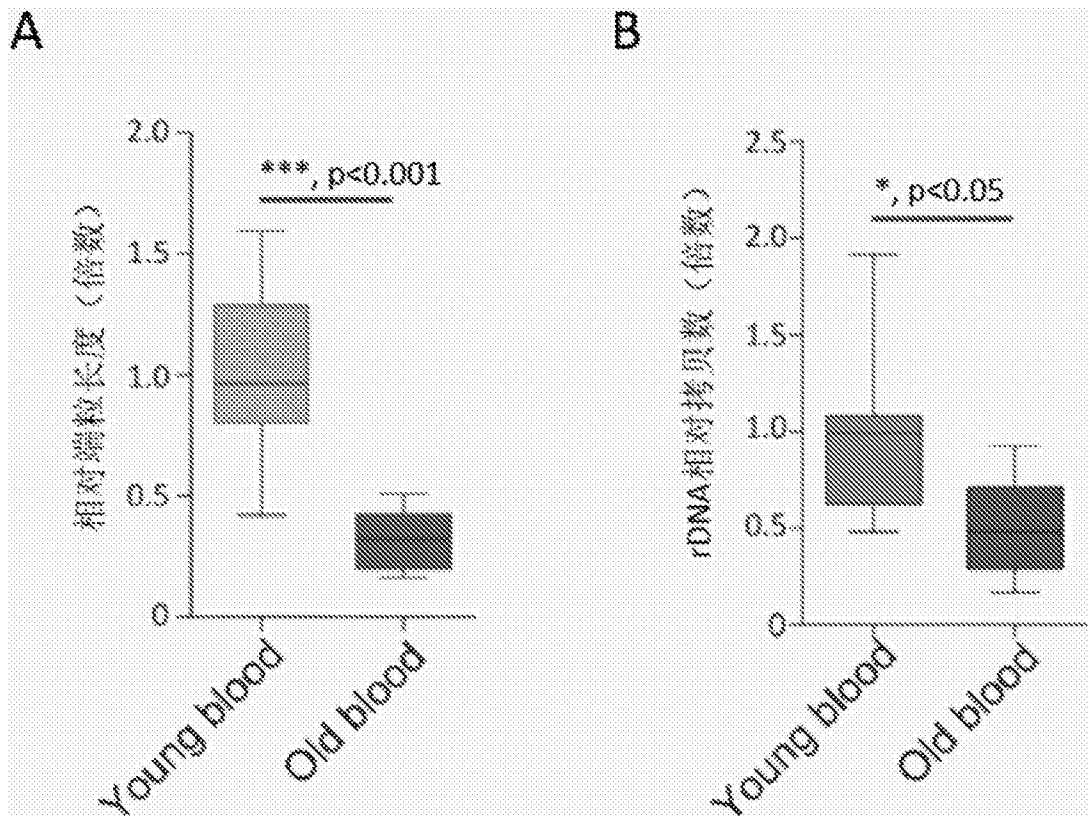


图4