



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105283559 A

(43) 申请公布日 2016. 01. 27

(21) 申请号 201480029826. 9

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2014. 05. 22

C12Q 1/68(2006. 01)

(30) 优先权数据

61/826, 484 2013. 05. 22 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 11. 23

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/039110 2014. 05. 22

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/190138 EN 2014. 11. 27

(71) 申请人 端粒诊断公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 C·哈利 J·林 Y·胡

(74) 专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限公司

公司 11285

代理人 孙占华 张广育

权利要求书5页 说明书28页

序列表3页 附图5页

(54) 发明名称

短端粒丰度的量度

(57) 摘要

本发明提供了用于从具有预定长度范围内的端粒（例如最多为一定长度的短端粒）的样本中的染色体测量端粒丰度的方法和材料。所述方法可以涉及进行被校准以从不超过限定长度的双链染色体 DNA 模板产生延伸产物的限时延伸反应的第一步骤；和从所述延伸产物扩增以亚端粒序列和锚定序列为边界的序列，以产生限长的端粒序列产物的第二步骤。可以测量这种产物中的端粒序列的丰度，并且可以使所述量度与各种指标相关联。

1. 一种制备核酸延伸产物的方法,其包括:
 - i) 使延伸引物与双链染色体 DNA 的 3' 突出中的端粒重复序列杂交,其中:
 - (1) 所述双链染色体 DNA 具有包含端粒重复序列的端粒区域和包含亚端粒序列的亚端粒区域;且
 - (2) 所述延伸引物包含:
 - (A) 3' 部分,其在退火条件下与所述 3' 突出中的端粒重复序列杂交,和
 - (B) 具有锚定序列的 5' 部分,其在所述退火条件下不与所述 3' 突出中的端粒重复序列杂交;以及
 - ii) 进行限时延伸反应,以使所述延伸引物向所述双链染色体 DNA 的所述亚端粒区域延伸,其中所述延伸反应被定时为仅从具有在预定长度范围内的端粒区域的双链染色体 DNA 产生包含端粒重复序列和亚端粒序列的延伸产物。
2. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述双链染色体 DNA 包括具有不同长度的端粒的染色体分子。
3. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述锚定序列在所述退火条件下不与以下中的序列杂交:
 - (1) 具有所述 3' 突出的所述染色体 DNA 的链的所述亚端粒区域;
 - (2) 在所述 3' 突出的 20kb 内的所述染色体 DNA 的 G 链;
 - (3) 在所述 3' 突出的 50kb 内或 20kb 内的所述染色体 DNA 的 G 链;或
 - (4) 所述双链染色体 DNA。
4. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述预定长度范围为 0-0.5kb、0-1kb、0-2kb、0-3kb、0-4kb 或 0-5kb。
5. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述延伸反应被定时为 0.1-30 分钟、0.1-10 分钟、0.1-5 分钟、0.1-4 分钟、0.1-3 分钟、0.1-2 分钟、不超过 0.1-1 分钟或 0.1-0.5 分钟。
6. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述延伸反应被定时为 60 分钟、45 分钟、30 分钟、20 分钟、15 分钟、10 分钟、9 分钟、8 分钟、7 分钟、6 分钟、5 分钟、4 分钟、3 分钟、2 分钟、1 分钟或 0.5 分钟。
7. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述双链染色体 DNA 由固体、流体、半固体或气体样本提供。
8. 根据权利要求 7 所述的方法,其中所述染色体 DNA 来自液体样本,所述液体样本选自血液、唾液、尿液、血浆、血清、脑脊液(“CSF”)或支气管肺泡灌洗液。
9. 根据权利要求 7 所述的方法,其中所述染色体 DNA 来自选自肺、肌肉或皮肤的固体样本。
10. 根据权利要求 7 所述的方法,其中所述染色体 DNA 来自包括骨髓的半固体样本。
11. 根据权利要求 7 所述的方法,其中所述染色体 DNA 由包括呼气的气体样本提供。
12. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述双链染色体 DNA 是脊椎动物 DNA、哺乳动物 DNA 或人 DNA。
13. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述延伸引物的所述 3' 部分与人端粒重复序列杂交。
14. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述延伸引物的所述 3' 部分包括序列

5'-(CCCTAA)_n-3' 或其同阶排列,其中 n 为至少 1。

15. 根据权利要求 14 所述的方法,其中 n 为至少 2。

16. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述延伸引物的所述 5' 部分包括以下序列:
5'-TGCTCGGCCGATCTGGCATC-3' [SEQ ID NO:8]。

17. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述延伸引物包括以下序列:5'-TGCTCGGCCGATCTGGCATCCCTAACC-3' [SEQ ID NO:7]。

18. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述限时延伸反应采用具有链置换活性、外切核酸酶活性或链降解活性的 DNA 聚合酶。

19. 根据权利要求 18 所述的方法,其中所述 DNA 聚合酶选自改性的 T7 聚合酶、大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 的外切核酸酶缺乏型 Klenow 片段以及 Bst DNA 聚合酶。

20. 根据权利要求 18 所述的方法,其中第一反应是利用与 DNA 聚合酶组合的解旋酶或具有 5'-3' 外切核酸酶活性的 DNA 聚合酶进行。

21. 一种扩增染色体的端粒重复序列和亚端粒序列的方法,其包括:

a) 通过以下方式制备核酸延伸产物:

i) 使延伸引物与双链染色体 DNA 的 3' 突出中的端粒重复序列杂交,其中:

(1) 所述双链染色体 DNA 具有包含端粒重复序列的端粒区域和包含亚端粒序列的亚端粒区域;且

(2) 所述延伸引物包含:

(A) 3' 部分,其在退火条件下与所述 3' 突出中的端粒重复序列杂交,和

(B) 具有锚定序列的 5' 部分,其在所述退火条件下不与所述 3' 突出中的端粒重复序列杂交;以及

ii) 进行限时延伸反应,以使所述延伸引物向所述双链染色体 DNA 的所述亚端粒区域延伸,其中所述延伸反应被定时为仅从具有在预定长度范围内的端粒区域的双链染色体 DNA 产生包含端粒重复序列和亚端粒序列的延伸产物;以及

b) 扩增所述延伸产物的序列;

从而产生包含具有端粒重复序列和亚端粒序列的核酸的限长扩增产物。

22. 根据权利要求 21 所述的方法,其中使用以下各者来扩增序列:

(1) 第一扩增引物,其在退火条件下与所述延伸产物中的所述亚端粒区域所独有的序列杂交;和

(2) 第二扩增引物,其在所述退火条件下与所述锚定序列杂交。

23. 根据权利要求 22 所述的方法,其中所述第一扩增引物包括以下序列:5'-GATGGATCCTGAGGGTGAGGGTGAGGG-3' [SEQ ID NO:2]、5'-CGGGCCGGCTGAGGGTACCGCGA-3' [SEQ ID NO:10] (染色体 1)、5'-GCTAATGCACTCCCTCAATAC-3' [SEQ ID NO:11] (染色体 5) 或 5'-CATTCCTAATGCACACATGATACC-3' [SEQ ID NO:12] (染色体 9)。

24. 根据权利要求 22 所述的方法,其中所述第一扩增引物包括序列 5'-GATGGATCCTGAGGGTGAGGGTGAGGG-3' [SEQ ID NO:2] 且所述第二引物包括序列 5'-TGCTCGGCCGATCTGGCATC-3' [SEQ ID NO:8]。

25. 根据权利要求 21 所述的方法,其中所述扩增端粒产物的长度范围可以通过在 PCR 反应中使用限时的延伸时间来确定。

26. 根据权利要求 21 所述的方法,其进一步包括共扩增对照序列。
27. 根据权利要求 26 所述的方法,其中所述对照序列包括多个非端粒重复序列。
28. 根据权利要求 27 所述的方法,其中所述对照序列为体外合成或体内产生。
29. 一种测定短端粒丰度的方法,其包括:
 - a) 从受试者提供包含双链染色体 DNA 的样本,所述双链染色体 DNA 包含 3' 突出;
 - b) 使用根据权利要求 21 所述的方法从所述双链染色体 DNA 产生限长扩增产物;和
 - c) 测定所述限长扩增产物的短端粒丰度。
30. 根据权利要求 29 所述的方法,其进一步包括:
 - d) 比较所述样本的所述短端粒丰度与总端粒丰度的量度。
31. 根据权利要求 29 所述的方法,其中短端粒是长度为 0.1-0.5kb、0.1-1kb、0.1-2kb、0.1-3kb、0.1-4kb 或 0.1-5kb 的端粒。
32. 根据权利要求 30 所述的方法,其中步骤 d) 包括测定作为总端粒丰度的函数的短端粒丰度。
33. 根据权利要求 29 所述的方法,其中测定短端粒丰度是使用 qPCR 进行。
34. 根据权利要求 33 所述的方法,其中 qPCR 是使用第一引物和第二引物进行,
 - i) 其中所述第一引物与所述第一链的至少一个重复单元杂交,且所述第二引物与所述第二链的至少一个重复单元杂交,
 - ii) 其中所述杂交引物在与其相应的链杂交时能够进行引物延伸,且其中当所述第一引物与所述第一链的至少一个重复单元杂交时,所述第一引物的至少一个核苷酸在所述第一引物与所述重复单元的核苷酸之间产生内部碱基对错配,
 - iii) 其中当第一引物和第二引物互相杂交时,所述第一引物还与所述第二引物的 3' 末端核苷酸产生错配,
 - iv) 其中当所述第二引物与所述第二链的至少一个重复单元杂交时,所述第二引物的至少一个核苷酸在所述第二引物与所述重复单元的核苷酸之间产生内部碱基对错配。
35. 根据权利要求 29 所述的方法,其中测定短端粒丰度包括通过 DNA 印迹、斑点印迹、狭缝印迹、免疫化学法、核酸测序或数字 PCR 测量所述样本中的平均端粒长度。
36. 根据权利要求 29 所述的方法,其中所述短端粒丰度是相对丰度的量度。
37. 根据权利要求 30 所述的方法,其中所述总端粒丰度是相对于基因组参考序列的丰度来测量。
38. 根据权利要求 37 所述的方法,其中所述基因组参考序列包括单拷贝参考核苷酸序列或非端粒重复 DNA 序列。
39. 根据权利要求 38 所述的方法,其中所述单拷贝参考核苷酸序列是人 β -球蛋白。
40. 根据权利要求 38 所述的方法,其中所述非端粒重复 DNA 序列是 Alu 重复序列或着丝粒重复序列。
41. 一种方法,其包括:
 - a) 从受试者获取样本;
 - b) 使用根据权利要求 29-38 中任一项所述的方法测定短端粒丰度;和
 - c) 使短端粒丰度与病状或疾病相关联。
42. 根据权利要求 41 所述的方法,其中通过比较所述样本的短端粒丰度与总端粒丰度

来测定所述短端粒丰度的量度。

43. 根据权利要求 41 所述的方法,其中所述病状或疾病是死亡风险。

44. 根据权利要求 41 所述的方法,其中所述端粒丰度是绝对丰度。

45. 根据权利要求 44 所述的方法,其中所述绝对丰度被测量为端粒序列的长度。

46. 根据权利要求 41 所述的方法,其中测定端粒丰度包括通过 qPCR DNA 印迹、斑点印迹、狭缝印迹、免疫化学法、核酸测序或数字 PCR 测量所述样本中的平均端粒长度。

47. 根据权利要求 41 所述的方法,其中所述病状或疾病是知觉应激的健康状况调查评分。

48. 根据权利要求 41 所述的方法,其中所述病状或疾病是疾病风险。

49. 根据权利要求 48 所述的方法,其中所述疾病风险是年龄相关疾病。

50. 根据权利要求 49 所述的方法,其中所述年龄相关疾病是心血管疾病;且其中低于群体平均值的量度与增加的心血管疾病风险相关联。

51. 根据权利要求 50 所述的方法,其中测定所述短端粒丰度包括使群体的最低的两个或三个三分位数中的短端粒丰度与相较于所述群体的最高三分位数中的量度显著较高的心血管疾病风险相关联。

52. 根据权利要求 48 所述的方法,其中关联短端粒丰度包括与端粒疾病相关联。

53. 根据权利要求 52 所述的方法,其中所述端粒疾病为先天性角化不良、肺纤维化、再生障碍性贫血或间质性肺炎。

54. 根据权利要求 48 所述的方法,其中关联所述短端粒丰度包括与药物响应性相关联。

55. 根据权利要求 54 所述的方法,其中所述药物响应性是对他汀类的响应性;且其中短端粒长度与药物响应性正相关。

56. 根据权利要求 54 所述的方法,其中所述药物响应性是对伊美司他 (GRN163L) 的响应性;且其中长端粒长度与药物响应性正相关。

57. 根据权利要求 48 所述的方法,其中关联所述量度包括与慢性感染中的疾病进展和治疗结果相关联。

58. 根据权利要求 57 所述的方法,其中所述慢性感染选自 HIV、HCV、HBV 和 CMV。

59. 根据权利要求 39-58 中任一项所述的方法,其进一步包括向所述受试者报告所述相关性。

60. 根据权利要求 39-59 中任一项所述的方法,其进一步包括基于所述相关性向所述受试者提供诊断或预后。

61. 根据权利要求 39-60 中任一项所述的方法,其进一步包括基于所述相关性治疗所述受试者。

62. 一种用于监测受试者的状况的方法,其包括:

a) 从受试者获取多个样本;其中所述样本是在一段时间内获取;且其中每个样本是在不同的时间获取;

b) 使用根据权利要求 29-38 中任一项所述的方法来测定所述多个样本中的每一个中的短端粒丰度;

c) 测定短端粒丰度的量度的变化率;以及

d) 使所述差异与端粒疾病的进展相关联,其中所述量度的降低指示所述疾病的进展。

63. 根据权利要求 62 所述的方法,其中通过比较所述样本的所述短端粒丰度与总端粒丰度来测定所述短端粒丰度。

64. 一种方法,其包括:

a) 从受试者获取多个样本;其中所述样本是在一段时间内获取;且其中每个样本是在不同的时间获取;

b) 使用根据权利要求 29-38 中任一项所述的方法来测定所述多个样本中的每一个中的短端粒丰度;

c) 测定短端粒丰度的量度的变化率;以及

d) 使所述变化率与以下各者相关联:(1) 健康量度;(2) 病理状况的风险;(3) 端粒疾病或(4) 药物响应性。

65. 根据权利要求 64 所述的方法,其中通过比较所述样本的所述短端粒丰度与总端粒丰度来测定所述短端粒丰度。

66. 一种试剂盒,其包括:

(1) 第一扩增引物,其包含:

(A) 3' 部分,其在退火条件下与双链染色体 DNA 的 3' 突出中的端粒重复序列杂交,和

(B) 具有锚定序列的 5' 部分,其在所述退火条件下不与所述染色体 DNA 中的端粒区域中的序列或亚端粒区域中的序列杂交;以及

(2) 第二扩增引物,其在退火条件下与亚端粒序列杂交。

67. 根据权利要求 66 所述的试剂盒,其进一步包括:

(3) 第三扩增引物,其在退火条件下与所述锚定序列的补体杂交。

68. 根据权利要求 66 所述的试剂盒,其进一步包括:

(3) 用于进行所述短端粒测量的杂交、延伸、扩增和定量步骤的试剂。

69. 根据权利要求 66 所述的试剂盒,其进一步包括:

(3) 包含具有已知端粒长度的染色体 DNA 的对照样本和参考样本。

短端粒丰度的量度

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求在 2013 年 5 月 22 日提交的美国临时申请号 61/826,484 的权益,该申请以引用方式整体并入本文中。

[0003] 发明背景

[0004] 背景中的陈述不一定意味着认可所引用的参考文献中的特征描述。

[0005] 端粒是真核生物染色体的尖端,其保护染色体免于溶核退化、端与端融合和重组。端粒是染色体末端的结构,其特征为核苷酸序列 (5'-TTAGGG-3')_n 的重复。端粒由于正常细胞分裂而缩短并且极短的端粒导致细胞衰老或凋亡。过去十年在人类中的丰富的流行病学和临床研究已经将短端粒长度与老龄化相关疾病和全因死亡的高风险联系起来 (Puterman, E. 和 E. Epel, Soc Personal Psychol Compass, 2012. 6(11)807-825 ;Zhu, H.、M. Belcher 和 P. van der Harst, Clin Sci (Lond), 2011. 120(10)427-40 ;和 Fyhrquist, F. 和 O. Saijonmaa. Ann Med, 2012. 44 增刊 1S138-42)。遗传、环境、生活方式和行为因素共同影响端粒长度。因此,端粒长度已成为总体健康、疾病和死亡风险的指标。

[0006] 虽然平均端粒长度在几乎所有公开的临床研究中被测量并且已经在患者疾病和死亡风险的分层中显示效用,但最近在小鼠中的工作也已显示短端粒群体是衰老或凋亡的触发信号 (Hemann, M. T. 等, Cell, 2001, 107(1)67-77), 且因此是疾病和死亡风险的触发信号。在由 Hemann 等报道的研究中,将具有短端粒的第 6 代端粒酶 RNA 敲除小鼠 (mTR-/-G6) 与具有长端粒的端粒酶杂合型小鼠 (mTR+/-) 进行杂交。尽管端粒酶缺失后代中的端粒中的一半是长的,但是其表型反映 mTR-/- 母本的表型,这表明短端粒的数量而非平均端粒长度对于细胞活力和染色体稳定性是关键的。在服用由天然产品衍生的端粒酶激活剂(TA-65®)的人中,在白细胞中检测到显著降低的短 (<3 或 <4kbp) 端粒的百分比 (如通过定量 FISH 技术所测量;参见 (Canela, A. 等, Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(13)5300-5), 然而没有观察到平均端粒长度的变化 (Harley, C. B. 等, Rejuvenation Res. 2011, 14(1)45-56)。因此短端粒丰度的百分比的变化被预期为生活方式和药理干预或其它干预对端粒的影响的更灵敏量度。另一项研究 (Vera 等, "The Rate of Increase of Short Telomeres Predicts Longevity in Mammals", Cell Reports(2012), 万维网 URL:dx. doi. org/10. 1016/]. celrep. 2012. 08. 023) 发现“短端粒丰度的增加速率是寿命的预测指标”。

[0007] 已经开发了用于测量基因组 DNA 中的端粒长度的多种方法,包括 DNA 印迹 (Kimura, M. 等, Nature Protocols, 2010, 5:1596-1607)、Q-FISH (Rufer, N. 等, Nat. Biotechnol., 1998, 16:743-747)、流式 FISH (Baerlocher, G. M. 等, Cytometry, 2002, 47:89-99) 和 qPCR (Cawthon, R. M., Nucleic. Acids Res., 2002, 30(10):e47)。所有这些方法均可以在临床环境中被用来监测健康状况并允许医师根据个体患者的需求规定预防性或治疗性干预。

[0008] 为了测量短端粒的群体,中期扩散细胞的定量荧光原位杂交 (Q-FISH) 已经被用来生成表示个别端粒的长度的端粒信号强度的直方图 (Poon, S. S. 等,

Cytometry, 1999, 36(4) 267-78)。这种方法的限制为需要活细胞, 成本高, 且通量低。Q-FISH 测定的高通量改良型 (HTQ-FISH; 参见 Canela, A. 等, Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(13) 5300-5) 最近被 Life Length 公司 (西班牙) 支持用于测量短端粒的百分比。尽管这样声称, 然而可惜的是, 利用当前技术, 这种测定无法准确, 原因是端粒尤其短端粒在单一斑点中的聚簇 (端粒联合; 参见 Paeschke, K.、K. R. McDonald 和 V. A. Zakian. FEBS Lett, 2010, 584(17) 3760-72)。困扰这个问题的现实是短端粒相比长端粒倾向于更频繁地彼此联合。另外, 已知 FISH 技术遭受探针与活细胞或固定细胞中的大分子的非特异性结合。低成本且不需要活细胞的用于测量短端粒百分比的高通量方法将更容易适应流行病学和临床环境, 并且相比 Q-FISH 将具有更好的分析性能。

[0009] 美国专利第 5, 741, 677 号 (Kozlowski 等) 涉及用于测量端粒长度的方法。一种方法涉及使端粒与接头序列接触, 这是在该接头序列与端粒的 3' 末端连接或以另外方式共价结合的条件下进行。端粒序列是通过长 PCR 扩增, 其中第一引物对接头序列具有特异性并且第二引物对染色体的亚端粒区域具有特异性。另一种方法涉及制备细胞的 DNA 提取物, 使所述提取物与和端粒重复序列互补的寡核苷酸探针孵育, 以及测定结合的探针的量作为端粒长度的量度。另外, 描述了一种通过使基因组 DNA 与固相结合并使结合的 DNA 与标记探针杂交来测量端粒长度的方法。

[0010] 美国专利公开第 2004/0265815 号 (Baird 等) 涉及一种用于测量端粒长度的方法。Baird 等描述了以下步骤来检测端粒群体的长度: a) 使单链寡核苷酸 (下文称作 telorette) 的 3' 末端与包含富 G 端粒链 (包含 TTAGGG 重复序列) 的端粒的单链突出退火并使 telorette 共价结合至富 C 端粒链 (具有 CCCTAA 重复序列) 的 5' 末端; b) 扩增在步骤 (a) 中所形成的连接产物以形成引物延伸产物; 和 (c) 检测步骤 (b) 的引物延伸产物的长度。(还参见 Baird, D. M. 等, Nat Genet., 2003, 33(2): 203-7; 和 Baird DM、Rowson J、Wynford-Thomas D、Kipling D.; Nat Genet., 2003, 33(2): 203-7. Epub 2003 Jan 21. PMID: 12539050)

[0011] 美国专利第 6, 514, 693 号 (Lansdorp) 涉及一种用于检测形态完整的染色体、细胞或组织切片中的核酸分子中的重复序列的多个拷贝的方法, 其包括: (a) 在利用变性剂的变性条件下, 用与核酸分子中的重复序列杂交且被可检测物质标记的 PNA 探针处理核酸分子, 以允许该探针与核酸分子中的重复序列原位杂交; 和 (b) 通过直接或间接检测可检测物质来鉴定与核酸分子中的重复序列杂交的所述探针, 从而检测核酸分子中的重复序列的多个拷贝。

[0012] 测定短端粒丰度的方法包括 DNA 印迹分析、定量荧光原位杂交 (Q-FISH) (Poon, S. S. 等, Cytometry, 1999, 36(4): 267-78) 和改良型高通量形式的 Q-FISH (HT-Q-FISH) (Canela, A. 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2007, 104(13): 5300-5)。

[0013] 美国专利第 7, 695, 904 号 (Cawthon) 描述了使用被设计成限制非靶核酸依赖性引发事件的核酸引物扩增靶核酸的方法。这些方法允许扩增和定量重复区域中的重复单元数, 诸如端粒重复单元数。所述专利还涉及通过 qPCR 方法测定生物体的平均端粒长度。

[0014] 因此, 尽管关于端粒的材料和方法有进步, 但仍然需要用于测定染色体群体中的短端粒丰度的量度的改良方法和材料以及使用这些量度来测定健康量度和干预的效果, 这些干预增加或减小端粒长度且因此增加或减少健康, 或相反地分别减少或增加未来疾病或

死亡的风险。本发明解决了这些需求和其它需求。

发明概要

[0015] 在一个方面,本发明提供一种制备核酸延伸产物的方法,其包括:i)使延伸引物与双链染色体DNA的3'突出中的端粒重复序列杂交,其中:(1)该双链染色体DNA具有包含端粒重复序列的端粒区域和包含亚端粒序列的亚端粒区域;且(2)该延伸引物包含:(A)3'部分,其在退火条件下与3'突出中的端粒重复序列杂交,和(B)具有锚定序列的5'部分,其在退火条件下不与3'突出中的端粒重复序列杂交;以及ii)进行限时延伸反应,以使延伸引物向双链染色体DNA的亚端粒区域延伸,其中该延伸反应被定时为仅从具有在预定长度范围内的端粒区域的双链染色体DNA产生包含端粒重复序列和亚端粒序列的延伸产物。在一个方面,双链染色体DNA包括具有不同长度的端粒的染色体分子。在另一方面,锚定序列在退火条件下不与以下序列杂交:(1)具有3'突出的染色体DNA的链的亚端粒区域中的序列;(2)在3'突出的20kb内的染色体DNA的G链中的序列;(3)在3'突出的50kb内或20kb内的染色体DNA的G链中的序列;或(4)在双链染色体DNA中的序列。在另一方面,延伸反应被定时为不超过30分钟、不超过10分钟、不超过5分钟、不超过4分钟、不超过3分钟、不超过2分钟、不超过1分钟、不超过30秒、不超过20秒、不超过10秒、不超过5秒或不超过2秒。因为引物延伸的速率可以从高(400个核苷酸/秒)变化至极低(例如50个核苷酸/秒),所以宽泛范围的延伸时间允许评估宽泛范围的端粒长度(理论上从约100个核苷酸至数千个核苷酸。在另一方面,延伸反应被定时为至少30分钟、至少10分钟、至少5分钟、至少4分钟、至少3分钟、至少2分钟、至少1分钟或至少30秒。在另一方面,延伸反应被定时为至少30分钟、至少10分钟、至少5分钟、至少4分钟、至少3分钟、至少2分钟、至少1分钟或至少30秒。在另一方面,双链染色体DNA由固体、流体、半固体或气体样本提供。在另一方面,染色体DNA由液体样本提供,该液体样本选自血液、唾液、尿液、血浆、血清、脑脊液("CSF")或支气管肺泡灌洗液。在另一方面,染色体DNA由选自肺、肌肉或皮肤的固体样本提供。在另一方面,染色体DNA由包括骨髓的半固体样本提供。在另一方面,染色体DNA由包括呼气的气体样本提供。在另一方面,双链染色体DNA是脊椎动物DNA、哺乳动物DNA或人DNA。在另一方面,延伸引物的3'部分与人端粒重复序列杂交。在另一方面,延伸引物的3'部分包括序列5'-(CCCTAA)_n-3'或其同阶排列,其中n为至少1。在另一方面,n为至少2。在另一方面,延伸引物的5'部分包括序列:5'-TGCTCGGCCGATCTGGCATC-3'[SEQ ID NO:8]。在另一方面,延伸引物包括序列:5'-TGCTCGGCCGATCTGGCATCCCTAACC-3'[SEQ ID NO:7]。在另一方面,限时延伸反应采用具有链置换活性、外切核酸酶活性或链降解活性的DNA聚合酶。在另一方面,DNA聚合酶选自T7聚合酶(例如,测序酶(Sequenase))、大肠杆菌(E.coli)DNA聚合酶I的外切核酸酶缺乏型Klenow片段以及Bst DNA聚合酶大片段和Deep VentR(外切核酸酶)。在另一方面,第一反应利用与DNA聚合酶组合的解旋酶或具有5'-3'外切核酸酶活性的DNA聚合酶进行。

[0016] 在另一方面,本发明提供一种扩增染色体的端粒重复序列和亚端粒序列的方法,其包括:a)通过以下方式制备核酸延伸产物:i)使延伸引物与双链染色体DNA的3'突出中的端粒重复序列杂交,其中:(1)该双链染色体DNA具有包含端粒重复序列的端粒区域和包含亚端粒序列的亚端粒区域;且(2)该延伸引物包含:(A)3'部分,其在退火条件

下与 3' 突出中的端粒重复序列杂交, 和 (B) 具有锚定序列的 5' 部分, 其在退火条件下不与 3' 突出中的端粒重复序列杂交; 和 ii) 进行限时延伸反应, 以使延伸引物向双链染色体 DNA 的亚端粒区域延伸, 其中该延伸反应被定时为仅从具有在预定长度范围内的端粒区域的双链染色体 DNA 产生包含端粒重复序列和亚端粒序列的延伸产物; 以及 b) 扩增该延伸产物的以亚端粒序列和锚定序列为边界的序列; 从而产生包含具有端粒重复序列和亚端粒序列的核酸的限长扩增产物。在一个方面, 使用以下各者来扩增序列: (1) 第一扩增引物, 其在退火条件下与延伸产物中的亚端粒区域所独有的序列杂交; 和 (2) 第二扩增引物, 其在退火条件下与锚定序列杂交。在另一方面, 第一扩增引物包括选自以下的序列: 5'-GATGGATCCTGAGGGTGAGGGTGAGGG-3' [SEQ ID NO:2]、5'-CGGGCCGGCTGAGGGTACCGCGA-3' [SEQ ID NO:10] (染色体 1)、5'-GCTAATGCACTCCCTCAATAC-3' [SEQ ID NO:11] (染色体 5) 和 5'-CATTCCTAATGCACACATGATACC-3' [SEQ ID NO:12] (染色体 9)。在另一方面, 第一扩增引物包括序列 5'-GATGGATCCTGAGGGTGAGGGTGAGGG-3' [SEQ ID NO:2] 且第二引物包括序列 5'-TGCTCGGCCGATCTGGCATC-3' [SEQ ID NO:8]。扩增的端粒产物的长度范围可以通过在 PCR 反应中使用限时的延伸时间来确定。在另一方面, 所述方法进一步包括共扩增对照序列。在另一方面, 对照序列包括多个非端粒重复序列。在另一方面, 对照序列是在体外合成或在体内产生 (例如, 在细菌或真菌克隆中)。

[0017] 在另一方面, 本发明提供一种用于测定短端粒丰度的方法, 其包括: a) 从受试者提供包含双链染色体 DNA 的样本, 该 DNA 包含 3' 突出; b) 使用如本文 (例如, 上文) 所描述的本发明的扩增染色体的端粒重复序列和亚端粒序列的方法从双链染色体 DNA 产生限长扩增产物; 和 c) 测定限长扩增产物的短端粒丰度。在一个方面, 所述方法进一步包括: d) 比较短端粒丰度和样本的总端粒丰度。在另一方面, 短端粒是长度不超过约 0.5kb、约 1kb、约 2kb、约 3kb、约 4kb 或约 5kb 的端粒。在另一方面, 比较包括测定作为总端粒丰度的函数的短端粒丰度, 例如短端粒丰度与总端粒丰度的比率。在另一方面, 使用 qPCR 进行短端粒丰度的测定。在另一方面, 使用第一引物和第二引物进行 qPCR, (i) 其中所述第一引物与所述第一链的至少一个重复单元杂交, 且所述第二引物与所述第二链的至少一个重复单元杂交; (ii) 其中所述杂交引物在与其相应的链杂交时能够进行引物延伸, 且其中当所述第一引物与所述第一链的至少一个重复单元杂交时, 所述第一引物的至少一个核苷酸在所述第一引物与所述重复单元的核苷酸之间产生内部碱基对错配; (iii) 其中当第一引物和第二引物互相杂交时, 所述第一引物还与所述第二引物的 3' 末端核苷酸产生错配; (iv) 其中当所述第二引物与所述第二链的至少一个重复单元杂交时, 所述第二引物的至少一个核苷酸在所述第二引物与所述重复单元的核苷酸之间产生内部碱基对错配。在另一方面, 测定短端粒丰度包括通过 DNA 印迹、斑点印迹、狭缝印迹、免疫化学法、核酸测序或数字 PCR 测量样本中的平均端粒长度。在另一方面, 短端粒丰度是相对丰度的量度。在另一方面, 总端粒丰度相对于基因组参考序列的丰度来测量。在另一方面, 基因组参考序列包括单拷贝参考核苷酸序列 (例如, 人 β -球蛋白) 或非端粒重复 DNA (例如, Alu 重复或着丝粒重复) 的丰度。

[0018] 在另一方面, 本发明提供一种方法, 其包括: a) 测定来自受试者的样本中的短端粒丰度; 和 b) 使短端粒丰度与病状或疾病相关联。在一个方面, 通过比较样本的短端粒丰度与总端粒丰度来测定短端粒丰度的量度。在另一方面, 使用本文 (例如, 上文) 所描述的

方法测定短端粒丰度。在另一方面,病状或疾病是死亡风险。在另一方面,端粒丰度是绝对丰度。在另一方面,绝对丰度被测量为端粒序列的长度。在另一方面,测定端粒丰度包括通过 qPCR DNA 印迹、斑点印迹、狭缝印迹、免疫化学法、核酸测序和数字 PCR 测量样本中的平均端粒长度。在另一方面,病状或疾病的关联与知觉应激的健康状况调查评分 (Health Status Survey Score of Perceived Stress) 相关 (参见例如 Cohen, S ;Kamarck T 和 Mermelstein R(1983) J. Health Social Behav. 24(4) 385-396)。在另一方面,病理状况的风险是疾病例如心血管疾病、糖尿病、癌症、肝纤维化和抑郁的风险。在另一方面,疾病是老龄化疾病。在另一方面,老龄化疾病是心血管疾病且其中低于群体平均值的量度与增加的心血管疾病风险相关联。在另一方面,所述方法包括使群体的最低的两个或三个三分位数中的端粒丰度的量度与相较于该群体的最高三分位数中的量度显著较高的心血管疾病风险相关联。在另一方面,所述方法包括使所述量度与端粒疾病相关联。端粒疾病可以包括但不限于先天性角化不良、肺纤维化、再生障碍性贫血和间质性肺炎。在另一方面,所述方法包括使所述量度与药物响应性相关联。例如,所述方法可以包括使所述量度与对他汀类的药物响应性 (其中个体的正常白血球中的短平均端粒长度与药物响应性正相关) 或对伊美司他 (imetelstat) (GRN163L, 癌症药物) 的不良响应 (其中正常白血球中的短端粒长度与不良反应诸如血小板减少症或中性粒细胞减少症相关) 相关联。在另一方面,所述方法包括使所述量度与慢性感染诸如 HIV、HCV HBV 和 CMV 中的疾病进展和治疗结果相关联。在另一方面,所述方法进一步包括向受试者报告相关性。在另一方面,所述方法进一步包括基于相关性向受试者提供诊断或预后。在另一方面,所述方法进一步包括基于相关性治疗受试者。

[0019] 在另一方面,本发明提供一种监测受试者的状况的方法,其包括:从在一段时间内获取的多个受试者样本中的每个样本中的细胞测定短端粒丰度的量度;测定所述量度的差异;以及使所述差异与端粒疾病的进展相关联,其中所述量度的降低指示疾病的进展。在一个方面,通过比较样本的短端粒丰度的量度与总端粒丰度的量度来测定短端粒丰度的量度。

[0020] 在另一方面,本发明提供一种方法,其包括:测定来自多个受试者样本的细胞中的短端粒丰度的量度的变化速率,每个样本在不同时间获取;以及使该变化速率与以下各者相关联:(1) 健康量度;(2) 病理状况的风险;(3) 端粒疾病或(4) 药物响应性。在一个方面,通过比较样本的短端粒丰度的量度与总端粒丰度的量度来测定短端粒丰度的量度。

[0021] 在另一方面,本发明提供一种试剂盒,其包括:(1) 第一扩增引物,包含:(A) 3' 部分,其在退火条件下与双链染色体 DNA 的 3' 突出中的端粒重复序列杂交,和 (B) 具有锚定序列的 5' 部分,其在退火条件下不与染色体 DNA 中的端粒区域中的序列或亚端粒区域中的序列杂交;以及 (2) 第二扩增引物,其在退火条件下与亚端粒序列杂交。在一个方面,所述试剂盒进一步包括:(3) 第三扩增引物,其在退火条件下与锚定序列的补体杂交。在另一方面,所述试剂盒包括:(3) 用于进行短端粒测量的杂交、延伸、扩增和定量步骤的试剂。在另一方面,所述试剂盒进一步包括:(3) 包含具有已知端粒长度的染色体 DNA 的对照样本和参考样本,或具有已知质量的端粒重复的合成寡核苷酸。

[0022] 通过引用并入

[0023] 本说明书中所提及的所有出版物、专利和专利申请均通过引用并入本文中,其程

度就如同每个个别的出版物、专利或专利申请被具体和单独地指示通过引用并入。

[0024] 附图简述

[0025] 图 1 示出了短端粒测定 (STA) 的总体方案。

[0026] 图 2 示出了通过 TELOTEST 对链置换期间的短端粒扩增的确认, TELOTEST 是一种用于在 qPCR 测定中使用与端粒重复序列杂交的错配引物测量平均端粒长度的测试。相似类型的测定描述于美国专利第 7,695,904 号 (Cawthon) 中。

[0027] 图 3 示出了链置换产物的 DNA 印迹分析。M: 分子量标准;泳道 1: 通过改良 STELA (单端粒延长长度分析) 方案 (Baird 等, 2003) 扩增的源自膀胱癌细胞系 UM-UC3 的总基因组 DNA; 泳道 2-5: 使用 SUS 和 TeloAnchor 作为引物的 PCR 产物且链置换产物为模板。指出了链置换反应时间 (30 秒、1、3 和 5 分钟)。链长度为: 30 秒=约 1kb; 1 分钟=约 2kb; 3 分钟=约 5kb; 5 分钟=约 8kb。

[0028] 图 4 示出了针对具有不同平均端粒长度的 DNA 样本中的短端粒定量的概念验证计算。UM-UC3 是具有短平均端粒的细胞群体, 且 UM-UC3/hTER 是相同的细胞群体, 但是由于端粒酶 (具有 hTER) 的过度表达而具有延伸 (延长) 的端粒。如所示出, 短端粒的相对丰度在 UM-UC3 中比在 UM-UC3/hTER 中大得多。

[0029] 图 5 是通过 DNA 印迹 (其中示出了在 0.2-5kbp 范围内的末端限制性片段的相对信号) 和通过本发明的短端粒测定比较在 UM-UC3 和 UM-UC3/hTER 中的短端粒的相对丰度的表格, 其中短端粒的百分比是短端粒和总端粒测量值的比率。在两种情况下, UM-UC3 中的短端粒比在 UM-UC3/hTER 中多大约 3 倍。

[0030] 图 6 示出了针对短端粒测定的高通量步骤。

[0031] 图 7A 和图 7B 示出了在染色体 A、B 和 C (各自具有不同长度的端粒) 上的时控引物延伸。核染色质由虚线表示。亚端粒单一序列由“SUS”表示。端粒由实线表示。延伸产物由虚线表示。图 7B 示出了三种引物延伸产物的第二链合成。在图 7A 中, 选择引物延伸的时间以使得引物延伸越过染色体 A 和 B 中, 但不越过染色体 C 中的亚端粒区域 (具有亚端粒单一序列“SUS”)。在图 7B 中, 具有亚端粒单一序列的引物“SUS”可以与延伸产物 A 和 B 杂交, 但不与延伸产物 C 杂交, 延伸产物 C 由于原始染色体中的长端粒长度而不延伸至亚端粒区域中。因此, 第二链合成可以从与延伸产物 A 和 B 杂交的 SUS 引物开始, 但不从 C 开始。第二链由实线表示。这种产物然后表示原始染色体 DNA 的“短端粒”部分。

具体实施方式

[0032] 定义

[0033] 应该理解本文所使用的术语仅用于描述特定方面的目的且无意具有限制性。

[0034] 如在本说明书和权利要求书中所使用, 术语“包含”可以包括“由其组成”和“基本上由其组成”的方面。

[0035] 如本文所使用, 针对化合物包括有机化合物的命名可以使用普通名称、IUPAC、IUBMB 或 CAS 推荐命名给出。除非另有限定, 否则本文所使用的所有技术和科学术语具有如本发明所属技术领域的一般技术人员通常所理解的含义。在本说明书和随附的权利要求书中, 将参考可以在本文中定义的许多术语。

[0036] 如在本说明书和随附权利要求书中所使用, 单数形式“一个 / 种 (a)”和“一个 / 种

(an)”和“该 / 所述 (the)”包括复数的指示对象,除非上下文另有明确说明。因此,例如,提及“细胞”、“核苷酸”或“引物”包括两种或多种此类细胞、核苷酸或引物等的混合物。

[0037] 范围在本文中 can 表示为从“约”一个具体数值和 / 或至“约”另一个具体数值。当表示这样的范围时,另一方面包括从所述一个具体数值和 / 或至所述另一个具体数值。类似地,当通过使用先行词“约”将值表达为近似值时,应该理解具体值形成另一方面。应该进一步理解,每个范围的端点在与另一端点有关以及另一端点无关时均是有意义的。还应该理解本文中公开了很多值,并且除了该值本身之外,每个数值在本文中还被公开为“约”该特定值。例如,如果公开了值“10”,那么也公开了“约 10”。还应该理解,两个特定单位之间的每个单位也被公开。例如,如果公开了 10 和 15,那么也公开了 11、12、13 和 14。

[0038] 如本文所使用,术语“约”和“在或约”意指所讨论的量或值可以是指定近似或约相同的一些其它值的值。一般应该理解,如本文所使用,除非另外指示或推测,否则标称值指示 $\pm 10\%$ 的变化。该术语旨在传达类似的值促进权利要求书中所叙述的相等结果或作用。即,应该理解,量、大小、公式、参数和其它数量和特征不是且不必是确切的,而是可以是近似值和 / 或根据需要更大或更小,以反映容差、转换因子、四舍五入、测量误差等和本领域技术人员已知的其它因素。一般来说,量、大小、公式、参数或其它数量或特征为“约”或“近似”,无论是否明确说明是如此。应该理解,除非另外明确指出,否则当“约”用在定量值前时,该参数还包括特定的定量值本身。

[0039] 在本说明书和最后的权利要求书中提及的组合物中特定元素或组分的重量份表示该元素或组分与针对其表示重量份的组合物或制品中的任何其它元素或组分之间的重量关系。因此,在含有 2 重量份的组分 X 和 5 重量份的组分 Y 的化合物中,X 和 Y 以 2:5 的重量比存在,并且不管该化合物中是否含有额外组分都以这样的比例存在。

[0040] 除非明确有相反的说明,否则组分的重量百分比(重量%)基于包含该组分的制剂或组合物的总重量。

[0041] 如本文所使用,术语“可选的”或“可选地”意指随后描述的事件或情形可以发生或不发生,且该描述包括其中所述事件或情形发生的例子和其中它没有发生的例子。

[0042] 如本文所使用,术语“有效量”是指足以实现组合物或方法的物理、化学或生物性质的所需改变的量。

[0043] 如本文所使用,“试剂盒”意指构成该试剂盒的至少两种组分的集合。所述组分共同构成用于给定目的的功能单位。个别成员组分可以物理方式包装在一起或分开包装。例如,包括试剂盒的使用说明书的试剂盒可以物理方式包括或不包括与其它个别成员组分一起的说明书。相反地,说明书可以作为单独的成员组分,以纸张形式或可以提供在计算机可读存储装置上或从互联网网站下载的电子形式,或作为记录演示来提供。

[0044] 如本文所使用,“说明书”意指描述关于试剂盒的相关材料或方法的文件。这些材料可以包括以下各者的任何组合:背景信息、组分清单和其可用性信息(购买信息等)、试剂盒的简明或详细使用方案、问题解决、参考、技术支持和任何其它相关文件。说明书可以与试剂盒一起提供或作为单独的成员组分,以纸张形式或可以提供在计算机可读存储装置上或从互联网网站下载的电子形式或作为记录演示来提供。说明书可以包括一个或多个文件,且意图包括未来的更新。

[0045] 如本文所使用,术语“受试者”可以是脊椎动物,例如哺乳动物、鱼、鸟、爬行动物或

两栖动物。因此,本文所公开的方法的受试者可以是人、非人灵长类动物、马、猪、兔、狗、绵羊、山羊、奶牛、猫、豚鼠或啮齿动物。该术语不表示特定年龄或性别。因此,旨在涵盖成人和新生受试者以及胎儿,无论男性或女性。在一个方面,受试者为哺乳动物。患者是指患有病状、疾病或病症的受试者。术语“患者”包括人和兽医受试者。在公开的方法的一些方面,受试者已经被诊断为需要治疗与短端粒丰度的功能障碍有关的一种或多种病状或疾病。

[0046] 如本文所使用,术语“治疗”是指意图治愈、改善、稳定或预防疾病、病理状况或病症的患者的医疗管理。该术语包括积极治疗,即具体针对改善疾病、病理状况或病症的治疗,并且还包括病因性治疗,即针对去除相关疾病、病理状况或病症的病因的治疗。另外,该术语包括姑息治疗,即设计成用于缓解症状而不是治愈疾病、病理状况或病症的治疗;预防性治疗,即涉及最小化或部分或完全抑制相关疾病、病理状况或病症的发展的治疗;和支持治疗,即用于补充针对改善相关疾病、病理状况或病症的另一特定疗法的治疗。在各个方面,所述术语涵盖受试者包括哺乳动物(例如人)的任何治疗且包括:(i) 预防疾病在可以易患该疾病但尚未被诊断为患病的受试者中发生;(ii) 抑制疾病,即阻止其发展;或(iii) 缓解疾病,即使疾病消退。在一个方面,受试者为哺乳动物例如灵长类动物,且在另一个方面,受试者为人。术语“受试者”还包括家养动物(例如,猫、狗等)、牲畜(例如,牛、马、猪、绵羊、山羊等)和实验动物(例如,小鼠、兔、大鼠、豚鼠、果蝇等)。

[0047] 如本文所使用,术语“预防(prevent_)”或“预防(preventing)”是指阻止、避免、消除、预先制止、停止或阻碍某些事情发生,特别是通过提前动作。应该理解的是,当在本文中使用减少、抑制或预防时,除非另外具体说明,否则也明确地公开了使用其它两个词。

[0048] 如本文所使用,术语“施用(administering)”和“施用(administration)”是指将药物制剂提供给受试者的任何方法。此类方法是本领域技术人员所熟知的且包括但不限于:口服施用、经皮施用、吸入施用、鼻腔施用、局部施用、阴道内施用、眼部施用、耳内施用、脑内施用、直肠施用、舌下施用、颊部施用和肠胃外施用,包括可注射施用例如静脉内施用、动脉内施用、肌肉内施用和皮下施用。施用可以是连续或间歇的。在各个方面,制剂可以治疗性施用;即,被施用来治疗现有疾病或病状。在进一步的各个方面,制剂可以预防性施用;即,被施用以防疾病或病状。

[0049] 如本文所使用,术语“有效量”和“有效的量”是指足以实现期望的结果或对不期望的病状具有效果的量。例如,“治疗有效量”是指足以实现期望的治疗结果或对不期望的症状具有效果,但一般不足以引起不良副作用的量。针对任何特定患者的具体治疗有效剂量水平将取决于多种因素,包括所治疗的病症和病症的严重程度;所用的具体组合物;患者的年龄、体重、一般健康状况、性别和饮食;施用时间;施用途径;所用的具体化合物的排泄速率;治疗的持续时间;与所用的具体化合物组合或同时使用的药物以及医学领域中熟知的类似因素。例如,本领域技术人员已知,化合物的剂量水平一开始比实现所需治疗效果所需要的剂量低,并且逐渐增加该剂量直至实现所需效果。如果需要,有效日剂量可以分成多个剂量用于施用。因此,单剂量组合物可以含有这样的量或其约数,以构成日剂量。如果有任何禁忌症,剂量可以由个别医师进行调整。剂量可以变化,并且可以每天以一个或多个施用剂量来施用,持续一天或几天。在文献中可以找到关于给定类别的药物的适当剂量的指导。在其它各个方面,制剂可以以“预防有效量”,即有效预防疾病或病状的量施用。

[0050] 如本文所使用,“延伸引物”意指用于进行由DNA聚合酶进行的限时延伸反应步骤

的寡核苷酸引物。延伸引物可以包含 3' 部分和 5' 部分。例如, 3' 部分可以在退火条件下与 3' 突出中的端粒重复序列杂交, 且 5' 部分可以具有在退火条件下不与 3' 突出中的端粒重复序列杂交的锚定序列。

[0051] 如本文所使用, “端粒区域” 意指位于染色体末端的具有重复端粒序列的 DNA 区段。在脊椎动物的情况下, 它可以是位于染色体末端的 (TTAGGG)_n 重复序列。

[0052] 如本文所使用, “亚端粒区域” 意指位于端粒的着丝粒末端处的紧邻端粒的 DNA 区段。亚端粒区域经常包含退化的端粒重复。在人的情况下, TGAGGG 和 TCAGGG 的重复可以存在于亚端粒区域中。

[0053] 如本文所使用, “限时延伸反应” 意指由 DNA 聚合酶进行的酶促反应, 其中该反应的产物 (限时延伸产物) 的大小 (按核苷酸数计) 是该反应中所用的 DNA 聚合酶的固有延伸速率和反应时间的函数。

[0054] 如本文所使用, “锚定序列” 意指引物中的单一序列区段, 其不存在于可以用于 PCR 反应的模板基因组中或存在于预期扩增子的 20kb 内。例如, 延伸引物的 5' 部分可以是锚定序列, 其被配置成在退火条件下不与 G 链中的端粒重复序列 (其与延伸引物的 3' 部分杂交) 杂交。

[0055] 如本文所使用, “染色体 DNA 的 G 链” 意指具有 3' 突出的端粒的链, 且包括端粒重复序列 5' -TTAGGG-3'。例如, “染色体 DNA 的 G 链” 可以指包含人和其它脊椎动物中的 (TTAGGG)_n 端粒序列的染色体中的 DNA 链。

[0056] 如本文所使用, “聚合酶” 是指催化核苷酸的聚合的酶。一般来说, 该酶将在与核酸模板序列退火的引物的 3' 末端处引发合成。“DNA 聚合酶” 催化脱氧核糖核苷酸的聚合。已知的 DNA 聚合酶包括例如强烈火球菌 (Pfu) DNA 聚合酶 (Lundberg 等, (1991) Gene 108:1)、大肠杆菌 DNA 聚合酶 I (Lecomte 和 Doubleday (1983) Nucleic Acids Res. 11:7505)、T7DNA 聚合酶 (Nordstrom 等 (1981) J. Biol. Chem. 256:3112)、嗜热栖热菌 (Tth) DNA 聚合酶 (Myers 和 Gelfand (1991) Biochemistry 30:7661)、嗜热脂肪芽孢杆菌 (Bacillus stearothermophilus) DNA 聚合酶 (Stenesh 和 McGowan (1977) Biochim Biophys Acta 475:32)、嗜热高温球菌 (Tli) DNA 聚合酶 (又称作 Vent DNA 聚合酶, Cariello 等 (1991) Nucleic Acids Res 19:4193)、海栖热袍菌 (Tma) DNA 聚合酶 (Di az 和 Sabino (1998) Braz J. Med. Res 31:1239) 和水生栖热菌 (Taq) DNA 聚合酶 (Chien 等, (1976) J. Bacteriol 127:1550)。以上酶中的任一个的聚合酶活性可以通过本领域中公知的方法来测定。

[0057] 如本文所使用, “热稳定性” DNA 聚合酶活性意指相较于例如 DNA 聚合酶的非热稳定形式, 对热相对稳定且在高温例如 45-100 °C, 优选 55-100 °C、65-100 °C、75-100 °C、85-100 °C 或 95-100 °C 下发挥作用的 DNA 聚合酶活性。

[0058] DNA 聚合酶的链置换活性描述置换在合成期间所遇到的下游 DNA 的能力。例如, DNA 聚合酶的链置换活性可以指将 DNA 的双链分离成两条单链的聚合酶能力。具有链置换活性的 DNA 聚合酶的实例为全酶或源自病毒、原核生物、真核生物或古生菌的复制酶的部分、phi29DNA 聚合酶、Klenow DNA 聚合酶 exo 和源自嗜热脂肪芽孢杆菌的 DNA 聚合酶 (被命名为 Bst exo)。“Exo” 表示相应的酶不具有 5' -3' 外切核酸酶活性。phi29DNA 聚合酶的公知实例为噬菌体 phi29DNA 聚合酶。可用于本发明方法中的更合适的具有链置换活性的 DNA 聚合酶为本领域技术人员所公知, 且包括 DNA 聚合酶诸如改性的 T7 聚合酶 (例如测

序酶)、大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 的外切核酸酶缺乏型 Klenow 片段以及 Bst DNA 聚合酶大片段和 Deep VentR(exo-)。

[0059] 或者,没有链置换活性的那些 DNA 聚合酶也应该被理解为具有链置换活性的 DNA 聚合酶,条件是除了相应的 DNA 聚合酶以外使用催化剂,例如使 DNA 的双链能够分离或使 DNA 的单链能够稳定的蛋白质或酶。这些蛋白质包括例如解旋酶、SSB 蛋白和重组蛋白,它们可以作为较大酶复合物例如复制酶的组分存在。在这种情况下,具有链置换活性的聚合酶是利用除聚合酶本身以外的组分而产生。具有链置换活性的聚合酶可以是热不稳定或热稳定的。

[0060] 如本文所使用,“引物”是指在诱导与核酸链互补的引物延伸产物的合成的条件下,例如在四种不同的三磷酸核苷和延伸用试剂(例如,DNA 聚合酶或逆转录酶)的存在下,在适当的缓冲液中和合适的温度下能够作为 DNA 合成的起始点的寡核苷酸。引物不必反映模板核酸的确切序列,但是必须充分互补以与模板杂交。适用于扩增给定靶序列的引物的设计在本领域中是公知的并且描述于本文所引用的文献中。

[0061] 如本文所使用,术语“靶标”、“靶序列”、“靶区域”和“靶核酸”是同义的并且是指待扩增或检测的核酸的区域或子序列。

[0062] 如本文所使用,术语“杂交”是指两个单链核酸由于互补碱基配对而形成双螺旋结构。杂交可以在完全互补的核酸链之间或在含有少数错配区域的“大体上互补”的核酸链之间发生。使得只有完全互补的核酸链才会杂交的条件被称作“严格杂交条件”或“序列特异性杂交条件”。大体上互补的序列的稳定双螺旋可以在不太严格的杂交条件下实现;可以通过适当地调节杂交条件来控制可接受的错配度。核酸技术领域的人员可以根据由本领域所提供的指导凭经验确定双螺旋稳定性,这考虑到许多变量包括例如寡核苷酸的长度和碱基对组成、离子强度和错配碱基对的发生率(参见例如,Sambrook 等,(1989)Molecular Cloning—A Laboratory Manual(Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,N.Y.);和 Wetmur(1991)Critical Review in Biochem. and Mol. Biol. 26(3/4):227-259,它们均通过引用并入本文中)。

[0063] 术语“扩增反应”是指导致模板核酸序列的拷贝的增加或导致模板核酸的转录的任何化学反应,包括酶促反应。

[0064] 聚合酶链式反应(PCR)是允许较长双链 DNA 分子内的 DNA 序列的指数扩增的方法。PCR 需要使用一对引物,它们与 DNA 的两条链中的每一条上的限定序列互补。这些引物通过 DNA 聚合酶延伸,使得拷贝由指定序列组成。在形成这种拷贝后,可以再次使用相同的引物,不仅形成 input DNA 链的另一个拷贝,而且形成在第一轮合成中形成的短拷贝的拷贝。这导致对数扩增。因为需要在每一轮的扩增过程中提高温度以分离双链 DNA 的两条链,所以一个重要的进步是发现了从水生栖热菌(*Thermus aquaticus*)(一种在热水池中生长的细菌)分离出的热稳定性 DNA 聚合酶(Taq 聚合酶);因此不需要在每一轮扩增中加入新的聚合酶。在若干(经常为约 40)轮扩增后,将 PCR 产物在琼脂凝胶上加以分析且其丰度足以利用溴化乙锭染色剂检测。

[0065] 应该理解,实时 PCR(又称作定量实时 PCR(qRT-PCR))、定量 PCR(Q-PCR/qPCR)或动态聚合酶链式反应是基于 PCR 的实验室技术,用于扩增和同时定量靶 DNA 分子。qPCR 允许检测和定量 DNA 样本中的特定序列(作为拷贝的绝对数或当归一化至 DNA input 或其它归

一化基因时作为相对量)。

[0066] 如本文所使用,如果当在足够严格的条件下使用时引物主要只与靶核酸杂交,则引物对靶序列具有“特异性”。通常,如果引物-靶双螺旋稳定性大于在引物与样本中发现的任何其它序列之间形成的双螺旋的稳定性,则引物对靶序列具有特异性。本领域技术人员将认识到各种因素诸如盐条件以及引物的碱基组成和错配的位置将影响引物的特异性,并且在大多数情况下将需要引物特异性的常规实验确定。可以选择使得引物可以只与靶序列形成稳定双螺旋的杂交条件。因此,在适当严格的扩增条件下使用靶特异性引物使得能够进行包含靶引物结合位点的那些靶序列的特异性扩增。使用序列特异性扩增条件使得包含完全互补的引物结合位点的那些靶序列的特异性扩增。

[0067] 如本文所使用,“互补”是指一个核酸分子可以通过互补核苷或核苷酸之间的传统的沃森-克里克 (Watson-Crick) 碱基配对或其它非传统类型的配对(例如,Hoogsteen 或逆向 Hoogsteen 氢键结合)与另一核酸分子形成氢键。

[0068] 在本领域中应该理解,核酸分子不需要与可特异性杂交的靶核酸序列 100% 互补。即,两个或多个核酸分子可以小于完全互补并且由可以与另一核酸分子形成氢键的核酸分子中的连续残基的百分比指示。例如,如果第一核酸分子具有 10 个核苷酸且第二核酸分子具有 10 个核苷酸,则第一核酸分子和第二核酸分子之间的 5、6、7、8、9 或 10 个核苷酸的碱基配对分别表示 50%、60%、70%、80%、90% 和 100% 的互补性。“完美”或“完全”互补的核酸分子意指其中第一核酸分子的所有连续残基将与第二核酸分子中的相同数量的连续残基氢键结合的那些,其中两个核酸分子具有相同数量的核苷酸(即,具有相同长度)或两个分子具有不同长度。

[0069] 如本文所使用,术语“非特异性扩增”是指非靶序列的核酸序列的扩增,这是由于引物与非靶序列的序列杂交且然后作为引物延伸的底物所致。引物与非靶序列的杂交被称作“非特异性杂交”且尤其易于在较低温度、低严格度的预扩增条件期间出现。

[0070] 如本文所使用,术语“引物二聚体”是指与模板无关的非特异性扩增产物,据信它源于其中另一引物作为模板的引物延伸。尽管引物二聚体经常显现为两个引物的串联体即二聚体,但是还存在多于两个引物的串联体。术语“引物二聚体”在本文中被一般地用来包括与模板无关的非特异性扩增产物。

[0071] 如本文所使用,术语“反应混合物”是指含有进行给定反应所必需的试剂的溶液。“扩增反应混合物”是指含有进行扩增反应所必需的试剂的溶液,其通常含有于合适缓冲液中的寡核苷酸引物和 DNA 聚合酶或连接酶。“PCR 反应混合物”通常含有于合适缓冲液中的寡核苷酸引物、DNA 聚合酶(最典型为热稳定性 DNA 聚合酶)、dNTP 和二价金属阳离子。如果反应混合物含有使反应能够进行所必需的所有试剂,则称之为完全反应混合物,且如果它只含有必需试剂的一部分,则称之为不完全反应混合物。本领域技术人员将理解,反应组分通常是分开储存的溶液,它们各自含有总组分的一部分,为的是方便、储存稳定性或允许根据应用调节组分浓度,且反应组分在反应前组合以形成完全反应混合物。此外,本领域技术人员将理解,反应组分为了商品化而分开包装且可用的商品试剂盒可以含有反应组分的任何子集,其包括本公开的封闭引物。

[0072] 1. 引言

[0073] 本公开提供了用于测定染色体群体中的短端粒丰度的量度和使用这些量度来测

定健康量度和干预效果的方法和材料,这些干预增加或减小端粒长度且因此增加或减少健康,或相反地分别减少或增加未来疾病或死亡的风险。所述方法涉及仅从具有在预定长度范围内的端粒(例如,所有端粒不长于一定长度,例如短于约 5kbp)的染色体产生染色体片段的拷贝的群体。该测定可以用于表示一组样本中的短端粒的相对丰度,或该测定可以与总端粒丰度的量度联用以产生短端粒的绝对百分比。

[0074] 在一个方面,测量短端粒产物的丰度的方法包括两个步骤。第一步骤包括使用延伸引物从双链染色体 DNA 模板生成延伸产物。延伸引物的 3' 末端具有与端粒的 G 链中的端粒重复序列互补的序列,且它的 5' 末端具有“锚定”序列。依此方式,延伸引物适于与样本中的染色体的 3' 突出中的端粒重复序列杂交,并利用 5' - 锚定序列来引发随后的 PCR 反应。在限时延伸反应中产生延伸产物。由于延伸反应是限时的,因此它可以被配置来产生不超过特定长度的延伸产物。因为延伸产物是限长的,所以它们将仅在足够短的染色体中延伸至亚端粒区域。第二步骤包括从延伸产物扩增以亚端粒序列和锚定序列为界的序列。

[0075] 可以通过至少三种不同的方法来估算由限定的反应时间产生的延伸产物的长度:(a) 通过链置换酶的聚合速率(R)乘以延伸时间;(b) 通过在 DNA 印迹凝胶(Southern gel)上分析 PCR 产物的大小;和(c) 通过测序分析纯 TTAGGG 区域的大小。测序方法受到对长段重复 DNA 进行准确测序的能力的限制。

[0076] 因为延伸反应是限时的,所以亚端粒序列将仅存在于来自这样的染色体的延伸产物中:其中从 3' 突出中延伸引物杂交的位置到亚端粒区域的距离在延伸的预定长度范围内。预定长度范围可以多至为从业人员选择的任何长度。例如,长度范围可以是最多为预定长度的长度。在某些方面,长度范围包括短端粒的长度,例如最多为 5kb。在其它方面,长度范围是短于预定距离的长度。因此,例如,在其中端粒长度不长于限定延伸长度的染色体(例如,具有短端粒的染色体)中,限时延伸反应将使引物延伸至染色体的亚端粒区域。在其中端粒长度长于限定延伸长度的染色体(例如,具有长端粒的染色体)中,限时延伸反应将不会使引物延伸至染色体的亚端粒区域,且延伸产物将不具有第二扩增步骤所必需的亚端粒序列。因此,可以控制延伸产物的群体以包括仅来自具有短于一定大小的端粒的染色体的端粒序列。如果长度范围例如 4kb,则延伸产物包括例如其中端粒为 4kb、3kb、2kb、1kb 等的产物。

[0077] 当使用适于扩增以亚端粒序列和锚定序列为界的序列的一对扩增引物来扩增延伸产物时,仅扩增具有亚端粒序列的延伸产物。那些是从具有短于限定延伸长度的端粒的染色体(例如具有短端粒的染色体)生成的延伸产物。因此,延伸产物不从源自样本中的染色体的总端粒序列扩增,而仅从源自具有不大于预定长度的端粒的染色体的端粒序列扩增。这种扩增产物在本文中有时被称作“限长端粒扩增产物”或根据上下文称作“短端粒扩增产物”。通过在此 PCR 扩增步骤中使用有限的延伸时间,短端粒将进一步富集。这种有限延伸时间的 PCR 步骤因此将增加测定的特异性以仅扩增短端粒群体。

[0078] 限长端粒扩增产物中的端粒序列的量或丰度在本文中有时被称作“限长端粒丰度”或根据上下文称作“短端粒丰度”。限长端粒扩增产物中的端粒序列的丰度可以通过用于测定总端粒序列的产物中的端粒序列丰度的任何方法来测量。

[0079] 本公开的方法开始于双链 DNA,例如处于其天然状态的染色体。在测量总端粒序列的比较方法中,具体来说,这使用 qPCR,可以涉及提供单链或变性核酸的样本。

[0080] 2. 限长端粒扩增产物

[0081] 2.1 样本

[0082] 天然双链状态下的染色体 DNA 可以从含有核酸的固体、流体、半固体或气体样本，例如从液体组织诸如血液、唾液、尿液、血浆、血清、CSF、支气管肺泡灌洗液；从固体组织诸如肺、肌肉、皮肤；从半固体组织诸如骨髓；以及从气体样本诸如呼出气体获得。染色体 DNA 获自其中的生物体可以是具有带 3' 突出的线性染色体的任何生物体。可以使用产生高分子量基因组 DNA (大于 20kb) 的任何 DNA 纯化方法包括苯酚 / 氯仿萃取、氯化铯梯度和使用硅胶膜结合技术的商品试剂盒、选择性洗涤剂介导 DNA 沉淀方法来获得模板双链染色体 DNA。DNA 纯化商品试剂盒的实例包括 Agencourt DNAdvance 和 Agencourt Genfind (Beckman Coulter)、QIAamp 试剂盒 (QIAGEN, Valencia, California)、QIAamp 血液试剂盒 (QIAGEN)、QIAamp FFPE 组织试剂盒 (QIAGEN)、AHPrep 试剂盒 (QIAGEN)、Puregene 试剂盒 (QIAGEN)、PureLink 和 GeneCatcher (Invitrogen) 和 Wizard (Promega)。

[0083] 用于本公开的方法中的样本可以是具有 3' 末端单链突出的任何基因组 DNA。在某些方面，样本包括高分子量基因组 DNA (例如，>20kb)。可以使用产生高分子量天然基因组 DNA 的任何方法。

[0084] 在具有端粒的双链染色体中，具有含有端粒重复序列的 3' 末端 (“3' 突出”) 的单一 DNA 链延伸超出具有 5' 末端的配对单链的末端。具有 3' 突出的端粒的链被称作 “G 链”，且包括端粒重复序列 5' -TTAGGG-3'。同阶排列为其中字母未被扰乱，而是开始于相同序列中的不同点，例如倒位 (例如，XYZ、YZX、ZXY 而非 YXZ) 的排列。这种序列的同阶排列包括：5' -TAGGGT-3'、5' -AGGGTT-3'、5' -GGGTTA-3'、5' -GGTTAG-3' 和 5' -GTTAGG-3'。具有 5' 末端的链被称作 “C 链” 且包括端粒重复序列 5' -CCCTAA-3'。

[0085] 端粒的长度可以是例如从染色体的末端至亚端粒区域的距离，例如以千碱基计。在正常成人的细胞中，端粒的长度可以在从小于 1kb 至 12kb 或在一些情况下至 >20kb 的范围内。已知端粒长度在不同的细胞类型中有所不同 (Lin 等, JImmunol Methods, 2010, 31:352(1-2):71-80)。出于这些原因，短端粒群体的可用长度范围基于临床效用可以是广泛的。因此，在某些方面，短端粒具有不超过约 5kb、不超过 4kb、不超过 3kb、不超过 2kb、不超过 1kb 或不超过约 0.5kb 的长度。本公开的方法可以被配置来检测最多为这些长度中的每一个的端粒。

[0086] 短端粒产物可以从单一端粒、单一染色体、源自单个细胞的染色体群体或源自多个细胞的染色体群体生成。

[0087] 2.2 产生延伸产物

[0088] 在延伸反应中，在退火条件下使引物与双链染色体 DNA 的 3' 突出退火。适当的退火条件为本领域技术人员已知，诸如通常用于杂交核酸链以用于链延伸或用于 PCR 的那些退火条件。此类条件包括但不限于在加热器中于 65°C 下孵育 10 分钟且然后历时 1 小时的时间冷却至室温。其它条件可以包括在从 37°C 至 65°C 范围内的温度下孵育 5 分钟至 30 分钟且然后历时 1 小时至 3 小时的时间冷却至室温。

[0089] 2.2.1 延伸引物

[0090] 延伸引物包含 3' 部分和 5' 部分。

[0091] 2.2.1.1 3' 部分

[0092] 3' 部分具有适于与端粒的 G 链中的端粒重复序列杂交的序列。3' 部分中的序列可以与端粒重复互补,或者它可以如上所述具有某些错配,只要这些错配允许在退火条件下进行用于引物延伸的杂交即可。例如,3' 部分可以具有端粒重复序列(即,端粒的 C 链的序列)的至少 8 个连续核苷酸。连续核苷酸可以呈端粒重复序列的任何排列方式。在其它方面,3' 部分的序列可以具有端粒重复序列的至少 9 个连续核苷酸、至少 10 个连续核苷酸、至少 11 个连续核苷酸或至少 12 个连续核苷酸。在其它方面,3' 部分的序列可以具有呈任何同阶排列的两个或多个、三个或多个、或四个或多个端粒重复单元。

[0093] 2.2.1.1 5' 部分

[0094] 延伸引物的 5' 部分(又称作“锚定序列”)被配置成在退火条件下不与 G 链中的端粒重复序列(其与 3' 部分杂交)杂交。优选地,锚定序列在退火条件下不与 G 链的亚端粒区域中的序列杂交。锚定序列还可以被配置成不与 G 链的 3' 突出的末端的 10kb 内、20kb 内或 50kb 内的靶 G 链的任何序列或靶染色体中的任何单一序列杂交。锚定序列可以被配置以使得它的补体不与染色体的 C 链的端粒区域或亚端粒区域中的任何序列或端粒的 C 链末端的 10kb 内、20kb 内或 50kb 内的任何序列杂交。例如,锚定序列可以是未在测试染色体中发现的单一序列。

[0095] 2.2.2 延伸反应

[0096] 在将延伸引物与染色体 DNA 退火后,使用具有链置换活性和/或外切核酸酶活性的聚合酶进行延伸反应。链置换聚合酶的实例包括但不限于 T7 聚合酶(例如,测序酶)、大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 的外切核酸酶缺乏型 Klenow 片段以及 Bst DNA 聚合酶大片段和 Deep VentR(exo)。另外,还可以使用具有 5'-3' 外切核酸酶活性的聚合酶。

[0097] 延伸反应是限时的。即,允许延伸反应进行预定量的时间。时间被校准来产生具有不超过预定长度的平均值的延伸产物。可以凭经验在选定的条件和反应物下测定用于通过链置换酶产生延伸产物的时间,以产生预定长度的延伸产物。适用于本发明的各种聚合酶的延伸速率之前已经被测定,且延伸速率可以用于计算获得所需延伸产物所必需的近似时间。下表中给出了示例性聚合酶的延伸速率。

[0098]

DNA 聚合酶	延伸速率*	参考文献
Klenow	13.5 个核苷酸/秒	Maier B、Bensimon D 和 Croquette V. <i>Proc Natl Acad Sci USA</i> .(2000) 2497(22):12002-7。
T7	75.9 个核苷酸/秒	Tanner, N. A. 等 <i>Nuc.Acids Res.</i> (2009) 37, e27.
Taq	35-100 个核苷酸/秒(75℃) 0.9-2.55 个核苷酸/秒(37℃)	Wittwer, C.T.和 Garling, D.J., <i>BioTechniques</i> (1991) 10(1), 76-83。
phi29	25 个核苷酸/秒	Blanco, F. 等 <i>J Biol Chem</i> (1989) 264,8935-8940
Bst	50-100 个核苷酸/秒	New England Biolabs

[0099] * 在相关参考文献中指定的条件下或不存在其它信息的标准反应条件下。

[0100] 通过将链置换酶加入反应管中实现延伸反应的引发。反应可以通过将反应管置于 80℃ 下达 20 分钟或通过加入 EDTA 而停止。此外,可以通过在更低或更高温度例如 25℃ 或

30℃下孵育来控制（减缓或加速）反应。例如，链置换聚合酶测序酶在 37℃下的置换速率为约 28bp/秒。在 30℃下，基于 DNA 印迹分析，该置换速率约慢 3 倍。在 37℃下，测序酶可以产生 30 秒内约 1kb、1 分钟内约 2kb、3 分钟内约 5kb 以及 5 分钟内约 8kb 的延伸产物。利用各种聚合酶系统和各种样本源产生预定长度的延伸产物所必需的时间安排可以凭经验来测定，例如，可以先后进行类似的时程实验和 DNA 印迹分析以校准延伸时间。因此，延伸反应可以被定时为不超过 30 分钟、不超过 10 分钟、不超过 5 分钟、不超过 4 分钟、不超过 3 分钟、不超过 2 分钟、不超过 1 分钟或不超过 30 秒。

[0101] 2.3 扩增反应

[0102] 然后例如通过 PCR 扩增限时延伸产物中的序列。更具体地说，扩增一侧以锚定序列为界且另一侧以亚端粒序列为界的序列。引物可以是完全互补的或具有错配序列，只要它允许与其靶标（锚定序列或亚端粒序列）退火和延伸即可。

[0103] 锚定序列可以变化。在某些方面，锚定序列是被测量端粒数量的生物体的基因组中不存在的特异性序列，或者如果在基因组中的别处中发现了锚定序列，则如果该序列明显远离 SUS 序列，其仍可以是适用的，从而使得在 PCR 步骤期间除了端粒锚定序列与端粒 SUS 序列之间以外不发生扩增。

[0104] 优化 PCR 条件以产生最佳的分析性能。通过在 DNA 印迹上检查产物分布以确保使短端粒的预期大小范围富集来预先确定 PCR 条件中的延伸时间。

[0105] 用于本公开的方法中的亚端粒引物可以含有在所有或大多数染色体发现的 G 链上的序列，例如端粒序列的变体 (TGAGGG)₃₋₆ (Xu 和 Blackburn, Mol. Cell, 28:315-327, 2007) 或 (TTGGGG)₃₋₆ (Allshire 等, Nucleic Acid Research, 17:4611-4627, 1989) 或 (TCAGGG)₃₋₆ (Baird 等, EMBO J., 14(21):5433-5443, 1995)。或者，亚端粒引物可以是在特定染色体上发现的区段，例如描述于 Xu 等中的 XpYpE2 引物 (5'-GTTGTCTCAGGGTCCTAGTG-3' [SEQ ID NO:1]) (Xu 和 Blackburn, Mol Cell, 28:315-327, 2007)。在一个方面，针对亚端粒序列的引物包括以下各者，基本上由它们组成或由它们组成：

[0106] 5'-GATGGATCCTGAGGGTGAGGGTGAGGG-3' [SEQ ID NO:2]

[0107] 5'-CGGGCCGGCTGAGGGTACCGCGA-3' [SEQ ID NO:10] (染色体 1)

[0108] 5'-GCTAATGCACTCCCTCAATAC-3' [SEQ ID NO:11] (染色体 5)

[0109] 5'-CATTCCTAATGCACACATGATACC-3' [SEQ ID NO:12] (染色体 9)

[0110] 当使用本公开的方法在非人的生物体中运用短端粒测定时，可以基于该生物体的基因组序列设计亚端粒引物的特定序列。亚端粒引物的序列应该与具有 3' 突出的链相配。

[0111] 扩增产物包括具有在一定长度范围内的端粒重复序列的核酸群体，且不包括长于该范围的序列。因此，所述群体可以被配置成包括仅来自具有短于临界长度的端粒的染色体的序列。

[0112] 可以在延伸反应步骤中包括用于控制延伸反应效率的内部对照序列。该内部对照序列可以是一端具有亚端粒引物序列和具有端粒序列的 G 链的 3' 突出的双链 DNA。亚端粒引物序列和端粒序列之间可以是一段独特非端粒序列。一种此类序列可以是例如 hTERT 基因或 RNA 酶 P 基因。可以通过基于 Taqman 的测定测量针对该内部对照的延伸反应的效率，以定量例如 hTERT 基因或 RNA 酶 P 基因。

[0113] 3. 测量端粒丰度的方法

[0114] 用于测量包含端粒序列的样本中的端粒丰度的任何方法均可以用于测量限长端粒样本中的端粒丰度。

[0115] 端粒丰度的量度可以是绝对或相对的。端粒丰度的绝对量度包括例如通过例如核苷酸的数目所测量的基因组中端粒序列的总长度。更通常地,端粒丰度是相对于参照物来测量的。端粒序列的检测可以根据测定中所产生的信号强度来测量。可以将这个信号强度与由测定中的参考序列产生的信号强度作比较。相对信号强度可以起到标准化方法的作用。标准化的方法可以更容易地在测定之间进行比较。例如,可以将通过检测端粒序列所产生的信号与通过测量对照序列所产生的信号作比较。该对照序列可以是例如 β -球蛋白基因的一部分。因此,与所使用的测定方法无关,端粒序列与参考序列的相对信号可以例如用比率表示。这个比率可以用于比较端粒序列丰度测量的结果。

[0116] 在其它方面,将短端粒丰度的量度与总端粒丰度作比较。总端粒丰度可以通过链置换反应和扩增反应中的长延伸时间和随后的如美国专利第 7,695,904 号 (Cawthon) 和 Lin 等 (Lin 等, 2010, 352(1-2):71-80) 中所描述的 qPCR 方法来测量。为了测定短端粒的百分比,可以测定短端粒与总端粒的比率。例如,可以用短端粒测量的信号强度除以总端粒测量的信号强度。

[0117] 3.1 qPCR

[0118] 一种定量短端粒丰度的方法是定量 PCR, 如 Cawthon (Nucleic Acids Res., 2002, 30(10):e47; 美国专利第 7,695,904 号; Lin 等, J. Immunol. Methods, 2010, 352(1-2):71-80) 或 Cawthon 2009 (Nucleic Acids Res. 200937(3):e21.) 中所描述。

[0119] 在本公开中可以使用本领域中已知的各种方法来测定平均端粒长度或端粒丰度。优选地,如由 Cawthon (Nucleic Acids Res., 2002, 30(10):e47; 美国专利第 7,695,904 号) 特定地针对端粒长度检测所修改,利用实时动态定量聚合酶链式反应 (qPCR)。这种方法是简单的且允许大量 DNA 样本的快速高通量处理。qPCR 方法基于由报道分子所产生的荧光的检测,该荧光随着聚合酶链式反应的进行而增加。这种荧光增加是由于每个扩增周期的 PCR 产物的累积而发生。这些荧光报道分子包括结合至双链 DNA 的染料 (例如, SYBR Green 或溴化乙锭) 或序列特异性探针 (例如, 分子信标 (Molecular Beacons) 或 TAQMAN 探针)。或者,可以使用由 Cawthon (Nucleic Acids Res. 2009, 37(3):e21) 所描述的 qPCR 方法。该方法允许经由多重扩增 (multiplexing) (包括当端粒重复为高丰度种类且单拷贝基因为低丰度种类时的实验环境) 测定单个样本中的 T/S 比。

[0120] 在本公开的方法中,使用对重复的端粒序列 (TTAGGG)_n 具有特异性的引物探针。引物的大小可以一般在 5 个至 500 个核苷酸长度之间变化,介于 10 个与 100 个核苷酸之间,介于 12 个与 75 个核苷酸之间,或介于 15 个至 50 个核苷酸之间,这取决于用途、所需特异性和扩增技术。在本公开中,一个方面利用与靶端粒序列的第一单链杂交的第一引物以及与靶端粒序列的第二单链杂交的第二引物,其中第一链和第二链大体上互补。在这个方面,例如,可以使用由以下组成的成对引物组: tel1 (5'-GGTTTTGAGG GTGAGGGTGAGGGTGAGGG TGAGGGT-3') [SEQ ID NO:3] 和 tel2 (5'-TCCCGACTATCCCTATCCC TATCCCTATCCCTATCCCTA-3') [SEQ ID NO:4]。在一个方面,这些引物中的至少一个包含至少一个改变或突变的核苷酸残基,这使得当引物彼此杂交时,在改变的残基与另一引物的

3' 末端核苷酸之间产生错配。在 3' 末端核苷酸处存在错配会阻碍通过聚合酶进行延伸, 由此限制非靶核酸依赖性延伸反应。在这个方面, 例如, 可以使用由以下组成的成对引物组: tel1b 5'-CGGTTTGGTTGGGTTGGG TTTGGGTTGGGTT-3' [SEQ ID No.:5]; 和 tel2b 5'-GGCTTGCCT TACCCTACCCTACCCTACCCTACCCT-3' [SEQ ID No.:6]。在另一方面, 例如, 可以使用由以下组成的成对引物组: telg 5'-ACACT AAGGTTGGGTTGGGTTGGGTTGGGTTAGTGT-3' [SEQ ID No.:13]; 和 telc 5'-TGTTAGGTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTACA-3' [SEQ ID No.:14]。本领域技术人员应该了解, 在本公开中可以采用其它大体上互补或错配的引物组。此类引物描述于美国专利第 7,695,904 号 (Cawthon 等) 中。

[0121] 根据本领域中公知的程序来进行扩增反应。用于 PCR 的程序被广泛使用和描述 (参见例如美国专利第 4,683,195 和 4,683,202 号)。简单地说, 双链靶核酸一般是通过在高到足以使这些链变性的温度下孵育而变性, 然后在过量引物的存在下孵育, 这些引物与单链靶核酸杂交 (退火)。DNA 聚合酶延伸杂交的引物, 从而产生靶核酸的新拷贝。使所得双螺旋变性, 并且重复杂交和延伸步骤。通过在用于互补靶链的第二引物的存在下反复进行变性、退火和延伸的步骤, 被两个引物包围的靶核酸以指数方式扩增。引物延伸步骤的时间和温度将取决于聚合酶、被扩增的靶核酸的长度以及用于扩增的引物序列。充分扩增靶核酸所需的反复步骤的数量将取决于扩增的效率。本领域技术人员应该理解, 本公开不受扩增过程中所应用的时间、温度、缓冲条件和扩增周期的变化所限制。

[0122] 通过本领域中熟知的方法来检测和分析扩增的产物。扩增产物可以在分离和 / 或纯化产物之后加以分析, 或通过直接测量扩增反应中所形成的产物来分析。对于检测来说, 可以使用荧光化合物例如使用溴化乙锭或 SYBR Green, 或通过与标记的核酸探针杂交来间接地鉴定产物。或者, 在扩增反应中使用标记的引物或标记的核苷酸来标记扩增产物。所述标记包括任何可检测的部分, 包括荧光标记、放射性标记、电子标记以及间接标记诸如生物素或地高辛 (digoxigenin)。

[0123] 适于进行本公开的 qPCR 反应的仪器可获自许多商业来源 (ABI Prism 7700, Applied Biosystems, Carlsbad, CA; LIGHTCYCLER 480, Roche Applied Science, Indianapolis, IN; Eco Real-Time PCR System, Illumina, Inc., San Diego, CA; RoboCycler 40, Stratagene, Cedar Creek, TX)。

[0124] 当使用实时定量 PCR 来检测和测量扩增产物时, 各种算法被用来计算样本中的靶端粒的数目。(例如, 参见 ABI Prism 7700 软件版本 1.7; Lightcycler 软件版本 3)。定量可以涉及使用具有已知拷贝数的端粒核酸的标准样本以及从标准和阈值周期 (C_t) 的对数生成的标准曲线。一般来说, C_t 是 PCR 循环或部分 PCR 循环, 其中由扩增产物产生的荧光高于基线荧光若干个偏差。

[0125] 3.2 其它方法

[0126] 来自扩增反应的短端粒的丰度可以通过本领域中已知的其它方法来测量。此类方法包括但不限于直接核酸测序和 DNA 印迹, 以及斑点印迹或狭缝印迹杂交和数字 PCR。

[0127] 在本公开中可以采用用于直接测定分离的 DNA 中的核酸序列的常规技术。例如, 参见: "DNA Sequencing," The Encyclopedia of Molecular Biology, J. Kendrew 编辑, Blackwell Science Ltd., Oxford, UK, 1995, 第 283-286 页。染料-终止子自动化测序现在最常被用于核酸测序 ("DNA Sequencing", Lab Manager, 在万维网 URL labmanager.

com/?articles.view/articleNo/3364/article/DNA-Sequencing 上)。自动化测序设备被方便地使用并且可以购自诸如 Applied Biosystems、Roche Applied Science 和 Illumina Inc. 的公司。一旦测定了 DNA 样本的序列,然后即可对任一端的端粒核苷酸序列(TTAGGG)的拷贝数进行计数。本公开的这种方法通过直接测量端粒序列提供了绝对端粒丰度的量度。

[0128] 在本公开中还可以利用 DNA 印迹 (Southern, E. M., J. Mol. Biol., 1975, 98(3):503-517) 以通过检测人端粒核苷酸序列 (TTAGGG)_n 的特定存在来测定端粒丰度。在本公开中,末端限制性片段 (TFR) DNA 印迹组合了将通过电泳分离的 DNA 片段转移至滤膜,接着通过与对 (TTAGGG) 序列具有特异性的探针杂交来检测这些片段 (Allshire, R. C. 等, Nucleic Acids Res., 1989, 17, 4611-4627)。此类探针具有与端粒序列互补的序列。为了便于检测,将探针进行放射性标记或用荧光染料或显色染料加标签。然后,可以定量所存在的放射性或荧光的量以得到样本中的端粒丰度。M. Kimura 等 (Nature Protocols, 2010, 5:1596-1607) 描述了一种用于测定端粒长度的适当 DNA 印迹程序。

[0129] DNA 印迹的变型包括斑点印迹或狭缝印迹,其中将 DNA 作为斑点或狭缝点样于滤膜上,接着通过与对 (TTAGGG) 序列具有特异性的探针杂交来检测片段 (Kimura M, Aviv A, Nucleic Acids Res., 2011, 39(12):e84. doi:10.1093/nar/gkr235. Epub 2011 Apr 27)。

[0130] 在本公开的上述方面,荧光可以相对荧光单位 (RFU) 来测量。当在毛细管内通过使用电泳而分离的标记片段受激光激励并穿过检测窗口时,使用电荷耦合装置 (CCD) 阵列来检测荧光。计算机程序测量结果,从而在每个数据点处从荧光强度水平测定含端粒的片段的数量或大小 (“Relative fluorescence unit (RFU)”, DNA.gov:Glossary, 2011 年 4 月,万维网 URL dna.gov/glossary/)。

[0131] 可以使用 DNA 测序方法来测量端粒丰度的量度。此类方法可以涉及对包含端粒重复的样本中的分子进行测序以及测定端粒重复序列的丰度。DNA 测序方法可以包括任何已知的测序方法,包括例如经典的测序方法,诸如 Sanger 测序或 Maxam Gilbert 测序;以及新一代测序方法,诸如连接测序、纳米孔测序、焦磷酸测序、超级焦磷酸测序 (superpyrosequencing)、通过质子检测来测序、通过合成测序和单分子测序。还可以通过数字 PCR 来测量短端粒丰度。此类技术平台包括但不限于数字 PCR,包括例如 RAINDROP 数字 PCR 系统 (Raindance Technologies, Billerica, Massachusetts) 或 QX200DROPLET DIGITAL PCR 系统 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California)、微流体数字 PCR (Fluidigm Corporation, South San Francisco, California) 或 OPENARRAY 实时 PCR 系统 (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, Massachusetts 的 APPLIED BIOSYSTEMS 部门)。在各个其它方面,短端粒的丰度可以通过合适的杂交技术来测量,例如数字颜色编码条形码方法如 NCOUNTER 分析系统 (Nanostring Technologies, Seattle, Washington)。

[0132] 4. 试剂盒

[0133] 本公开还提供了可用于本公开的方法中的试剂盒。此类试剂盒可以包括本公开的延伸引物以及与亚端粒序列或与延伸引物的锚定序列的补体杂交的扩增引物。或者,试剂盒可以包括本公开的延伸引物和一对扩增引物,所述扩增引物适于扩增核酸中以亚端粒序列和延伸引物中的锚定序列为边界的序列。试剂盒可以包括含有延伸引物的容器和含有扩增引物中的一个或两个的另一个容器。试剂盒还可以包括用于引物延伸的试剂和用于核酸

扩增例如用于 PCR 的试剂。试剂盒还可以包括具有已知值的对照和参考样本。在某些方面，试剂盒包括延伸引物和一对扩增引物。在某些方面，延伸引物包括在退火条件下与双链染色体 DNA 的 3' 突出中的端粒重复序列杂交的 3' 部分，以及不与端粒或亚端粒区域中的序列杂交的 5' 锚定部分。

[0134] 5. 与端粒丰度、短端粒丰度和端粒丰度的变化率或短端粒丰度的变化率相关的病状

[0135] 一般来说，与端粒丰度有关的病状通常是已使用如本文所描述的平均端粒长度的量度来推导。然而，如上所讨论，新兴数据表明相比于测量平均端粒长度或平均端粒长度的变化率，测量短端粒丰度和或短端粒丰度的变化率可以是临床上有意义的结果（例如疾病或死亡风险）的更灵敏且可能更准确的预测指标。因此，重要的是灵敏和准确地测量短端粒的丰度。已经报道了极短端粒的存在会导致失去细胞活力和组织功能，这表明极短的端粒与细胞衰老之间存在因果关系 (Hemann, M. T. 等 Cell, 2001. 107 (1) 67-77)。

[0136] 尽管短平均端粒长度（如下所讨论）是临床结果的确立的良好预测指标，然而预期短端粒丰度的准确测量可以更灵敏地测量干预对端粒动力学的影响 (Canela, A. 等 Proc Natl Acad Sci USA, 2007. 104 (13) 5300-5)。Harley 等 (Rejuvenation Res. 2011. 14 (1) 45-56) 显示服用端粒酶的相对弱激活剂 **TA-65®** 的人显示出短端粒百分比的降低，但是平均端粒长度没有明显改变。在 Vera 等（同上）中，短端粒丰度的增加速率预测了小鼠的两个不同群体中的寿命增加 “The Rate of Increase of Short Telomeres Predicts Longevity in Mammals, Cell Reports (2012), 万维网 URL: dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2012.08.023)。由于缺少用于测量短端粒丰度的准确、有成本效益的高通量方法，直到现在还没有使用短端粒丰度或短端粒丰度的变化率来建立测量短端粒丰度的临床效用的大型人临床研究。

[0137] 在 Vera 等（同上）的动物研究中的概念验证还指示，具有短端粒的百分比随着时间的高增加速率的小鼠相较于具有短端粒的百分比随着时间的低增加速率的小鼠具有减少的生存。在野生型小鼠中，具有低增加速率（例如，0.4% / 月）的小鼠相较于具有高增加速率（例如，1% / 月）的小鼠的生存差异为约 100 周，或野生型小鼠中的最大生存的将近三分之二。

[0138] 因此，相较于具有低短端粒百分比的人，具有如通过本文所描述的准确和精确的测定所测量的高短端粒百分比的人将更容易有疾病或死亡风险。短端粒%的定量评估将具有显著的诊断效用，这不仅在于健康监测，而且在于疾病诊断、预后和伴随诊断。

[0139] 监测短端粒的丰度具有用于健康监测的直接效用，因为已知短端粒（通常小于 1kbp 或小于 2kbp 或小于 3kbp）引发细胞衰老 (Hemann, M. T. 等 Cell, 2001, 107 (1) 67-77)，且已知细胞衰老会导致组织功能的丧失且最终导致疾病和死亡。因此，具有大于短端粒的平均丰度的个体与年龄匹配的正常个体的参考群体相比处于增加的发病或死亡风险下。此类人将被激励朝着较好的生活方式和较低的短端粒丰度改变其行为，而具有低于短端粒的平均丰度的个体相较于参考群体将知道其细胞健康可能优于平均水平，并且因此将被激励如果不进一步改善则至少保持其生活方式习惯以维持其良好的健康。

[0140] 从基因组 DNA 测定的每个染色体末端的平均端粒长度是总端粒丰度的量度，并且已经显示这与若干个重要的生物指标相关联。这些指标包括例如各种疾病状况的风险，例

如心血管风险、癌症风险、肺纤维化风险、传染病风险和死亡风险。端粒丰度还与实足年龄、体质指数、臀部 / 重量比和知觉应激相关联。端粒长度的一个量度是端粒 / 单拷贝 (“T/S”) 比。给定群体中的此类比率可以分成分位数例如三分位数。已经发现, 由 T/S 比表示的端粒丰度在较低两个三分位数中的个体比在端粒长度的最高三分位数中的那些个体处于显著更高的心血管疾病风险下。

[0141] 一般来说, 在群体中的端粒丰度的量度 (例如表示为参考群体的百分比的 T/S 值) 的百分位数值 (通常为端粒长度的最高三分位数或四分位数) 与疾病风险负相关, 即较短的平均端粒长度与改善的健康量度相关, 而较低的百分位数得分与降低的健康量度、增加的疾病风险或端粒疾病的存在相关。

[0142] 在群体中, 端粒长度随着年龄而减小。因此, 个体的端粒长度的量度可以与群体中相同年龄范围内的个人 (即, 年龄匹配的群体) 的量度相比较。例如, 30 岁的个人的端粒丰度的量度可能约等于 30 岁的群体平均值, 或等于 20 岁或 40 岁的群体平均值。端粒丰度的量度与健康量度的相关性当与年龄匹配的群体的量度相比较时更加准确。年龄匹配的群体的范围可以是例如一年、两年、三年、四年、5 年、7 年或 10 年。

[0143] 5.1 健康量度

[0144] 通过本公开的方法从受试者样本中测定的短端粒丰度可以与健康量度相关联。特别受关注的是涉及知觉应激的健康量度。端粒缩短可以由遗传和环境因素来加速, 这些因素包括多种形式的应激诸如氧化损伤、生化应激源、慢性发炎和病毒感染 (Epel, E. S. 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2004, 49:17312-15)。一般健康状况的方便量度是由 John Ware 开发的 **SF-36®** 健康调查 (参见例如万维网 URL sf-36.org/tools/SF36.shtml)。SF-36 是多用途的简短健康调查, 其中优选地由经过培训的个体向患者提出仅仅 36 个问题。这个健康调查提供了功能性健康和幸福感得分的 8 等级概况以及基于心理测量学的身心健康综合量度和基于偏好的健康效用指数。SF-36 调查被用来估计疾病负担并且比较疾病特异性基准与一般群体标准。最频繁研究的疾病和病状包括关节炎、背痛、癌症、心血管疾病、慢性阻塞性肺病、抑郁、糖尿病、胃肠病、偏头痛、HIV/ 艾滋病、高血压、肠道易激综合症、肾病、下背痛、多发性硬化、肌肉骨骼病状、神经肌肉病状、骨关节炎、精神病诊断、类风湿性关节炎、睡眠障碍、脊髓损伤、中风、物质滥用、手术程序、移植和创伤 (Tumer-Bowker 等, **SF-36®** Health Survey & “SF” Bibliography: 第三版 (1988-2000), QualityMetric Incorporated, Lincoln, RI, 2002)。本领域技术人员应该了解, 一般健康状况的其它调查方法例如 RAND-36 可以在本公开中得到应用。

[0145] 在本公开的一个方面, 随时间的推移收集受试者样本, 并且从这些样本中测定短端粒丰度的量度。用于收集多个样本的适当时间段包括但不限于 1 个月、3 个月、6 个月、1 年、2 年、5 年和 10 年 (例如, 最早的样本与最后的样本之间的时间可以是大约这些时间段)。这种方法允许监测患者为了改善其一般健康状况和 / 或监测其健康状况和 / 或疾病风险所作的努力。因为短端粒引发细胞死亡, 所以短端粒长度的百分比在个体内随时间降低或维持的发现指示健康改善, 而短端粒的百分比随时间增加表示健康减退或恶化。

[0146] 5.2 病理状况的风险

[0147] 5.2.1 疾病

[0148] 测量端粒的重复单元数在医疗诊断 (例如关于疾病风险的诊断)、疾病预后和治

疗中具有多种应用。具体来说,端粒长度的测量在评估导致疾病风险的病理状况中得到应用。在本公开的一个方面,疾病是与老龄化相关的疾病,例如但不限于心血管疾病、糖尿病、癌症、肝纤维化和抑郁。

[0149] 在一个方面,本公开在评估和监测心血管疾病中得到应用。已经显示,如通过血管造影术所测定,白血球中的端粒长度在患有严重三支冠状动脉疾病的患者中比其在具有正常冠状动脉的个体中更短 (Samani, N. J. 等, *Lancet*, 2001, 358:472-73), 并且在 50 岁之前经历过早心肌梗塞的患者中的端粒长度与没有这种历史的年龄和性别匹配的个体相比更短 (Brouillette S. 等, *Arterioscler. Thromb. Vase. Biol.*, 2003, 23:842-46)。Brouillette 等 (*Lancet*, 2007, 369:107-14) 已经提出,在易患冠心病的人中较短的白细胞端粒可以指示其它心血管风险因子对端粒长度的累积影响。增加的氧化应激也造成动脉粥样硬化,并且已经显示增加的氧化剂应激会增加体外的端粒耗损速率 (Harrison, D., *Can. J. Cardiol.*, 1998, 14(增刊 D):30D-32D; von Zglinicki, T., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2000, 908:99-110)。在横向研究中,也已经报道了吸烟、体质指数和 1 型糖尿病与较短的白细胞端粒长度相关 (Valdes, A. 等, *Lancet*, 2005, 366:662-64; Jeanclos, E. 等, *Diabetes*, 1998, 47:482-86)。已经显示增加的生活应激(一种已知会增加冠心病风险的因素)与较短的端粒相关,这可能是由于增加的氧化应激 (Epel, 2004, 同上)。因此,具有高体质指数、糖尿病和/或增加的生活应激的吸烟者和患者将全部受益于根据本公开的方法对其端粒丰度进行的测定和连续监测。

[0150] 2 型糖尿病的特征为较短的端粒 (Salpea, K. 和 Humphries, S. E., *Atherosclerosis*, 2010, 209(1):35-38)。较短的端粒在 1 型糖尿病患者中也已经被观察到 (Uziel O. 等, *Exper. Gerontology*, 2007, 42:971-978)。1 型糖尿病中的疾病病原学与 2 型糖尿病略有不同,但是在这两种情况下,β 细胞衰竭是全面爆发的疾病的最终触发因子。端粒长度因此是糖尿病的有用标记物,因为其于疾病的进展相关。Adaikalakoteswari 等 (*Atherosclerosis*, 2007, 195:83-89) 已经显示,在具有糖尿病前期葡萄糖耐受受损的患者中的端粒与对照相比更短。另外,端粒缩短已经与糖尿病并发症诸如糖尿病性肾病 (Verzola D. 等, *Am. J. Physiol.*, 2008, 295:F 1563-1573)、微量白蛋白尿 (Tentolouris, N. 等, *Diabetes Care*, 2007, 30:2909-2915) 和上皮癌 (Sampson, M. J. 等, *Diabetologia*, 2006, 49:1726-1731) 有关联,而端粒缩短似乎在糖尿病得到良好控制的患者中有所减弱 (Uziel, 2007, 同上)。本公开的方法特别适用于监测糖尿病前期和糖尿病患者的状况,以提供这些并发症和其它疾病的预警。

[0151] 本公开适用于测定各种类型的癌细胞的端粒长度,因为端粒酶活性的活化与细胞的永生化相关。虽然正常人体细胞不表达或仅短暂表达端粒酶且因此随着每次细胞分裂缩短其端粒,但大多数人癌细胞通常表达高水平的端粒酶并且显示出不受限制的细胞增殖。高端粒酶表达使得细胞长期增殖并扩张且因此支持肿瘤生长 (Roth, A. 等, *Small Molecules in Oncology, Recent Results in Cancer Research*, U. M. Martens(编), Springer Verlag, 2010, 第 221-234 页)。较短的端粒与癌症风险显著相关,尤其是膀胱癌和肺癌、与吸烟有关的癌症、消化系统和泌尿生殖系统的癌症。过度的端粒缩短可能在加速肿瘤发作和进展方面起作用 (Ma H. 等, *PLoS ONE*, 2011, 6(6):e20466. doi:10.1371/journal.pone.0020466)。研究已经进一步显示,缩短的端粒对乳癌风险的

影响对于某些群体子组诸如绝经前女性和具有较差抗氧化能力的女性来说是显著的 (Shen J. 等, Int. J. Cancer, 2009, 124:1637-1643)。除了一般评估和监测癌症以外,如果利用源自唾液样本的基因组 DNA,则本公开特别用于监测口腔癌。

[0152] 肝硬化的特征为器官的纤维化渐增,其常常与显著的炎性浸润相关。Wiemann 等 (FASEB Journal, 2002, 16(9):935-982) 已经显示,端粒缩短是人肝硬化的与疾病和年龄无关的征象。端粒缩短存在于由病毒性肝炎 (慢性肝炎 A 和 B)、毒性肝损伤 (酒精中毒)、自体免疫和胆汁郁积 (PBC 和 PSC) 诱发的硬化中;端粒在与患者年龄无关的硬化中一律很短。端粒缩短和衰老特异性地影响硬化的肝中的肝细胞,并且这两个参数与硬化期间的纤维化的进展强烈相关。因此,本公开的方法在诊断和监测肝纤维化方面得到应用。

[0153] 抑郁已经被比作“加速老龄化”的状态,并且抑郁的个体具有各种老龄化疾病诸如心血管和脑血管疾病、代谢综合症和痴呆的较高发病率。患有复发性抑郁的人或暴露于长期压力的人展现出白血球中的较短端粒。较短的端粒长度与复发性抑郁和指示暴露于长期压力的皮质醇水平均相关 (Wikgren, M. 等, Biol. Psych., 2011, DOI:10.1016/j.biopsych.2011.09.015)。然而,并不是所有抑郁的个体都显示同等缩短的端粒,因为抑郁发作在一生中有很大的变化。长期遭受抑郁的人与对照群体相比具有显著更短的端粒,这是由于他们较长时间暴露于氧化应激和由心理应激诱发的炎症 (Wolkowitz 等, PLoS One, 2011, 6(3):e17837)。因此,本公开的方法可以在监测抑郁方面得到应用。

[0154] 慢性感染

[0155] 异常端粒长度与慢性感染有关,其包括 HIV (Effros RB 等, AID S. 1996 年 7 月;10(8):F17-22;Pommier 等, Virology. 1997, 231(1):148-54) 以及 HBV、HCV 和 CMV (Telomere/telomerase dynamics within the human immune system:effect of chronic infection and stress (Effros RB, Exp Gerontol. 2011 年 2 月 -3 月;46(2-3):135-40. Rejuvenation Res. 2011 年 2 月;14(1):45-56. doi:10.1089rej.2010.1085. Epub 2010 年 9 月 7 日。)

[0156] 在 Harley 等 (“A natural product telomerase activator as part of a health maintenance program”, Harley CB, Liu W, Blasco M, Vera E, Andrews WH, Briggs LA, Raffaele JM, Rejuvenation Res. 2011 年 2 月;14(1):45-56) 中,发现了 CMV 血清反应阳性的个体相比于 CMV 血清反应阴性的个体具有更短的端粒,而且,CMV 阳性受试者更可能响应于 TA-65 的营养补充方案 (由天然产物衍生的端粒酶激活剂连同其它补充物) 以降低衰老 CD8+/CD28- 细胞的丰度,这表明了结合施用端粒酶激活剂用于测量平均端粒长度或短端粒丰度的伴随诊断应用。

[0157] 短端粒群体的测量可以被用作预后疾病进展和治疗结果的指标。

[0158] 一项研究报道了 CD4+ 细胞中的端粒长度与患有慢性 HCV 感染的患者中的炎症等级、纤维化阶段、实验室严重度指数、随后的肝功能代偿不全和治疗结果有关 (Hoare 等, J. Hepatol., 2010, 53(2):252-260)。

[0159] 在另一个报道中,较长的白细胞端粒长度预测乙型肝炎病毒相关性肝细胞癌的风险增加 (Liu 等, 2011, 117(18):4247-56)。

[0160] 在 HIV 的情况下,端粒缩短是由病毒性感染引起。另外,用于治疗 HIV 的核苷类似物逆转录酶抑制剂是端粒酶抑制剂 (Strahl 和 Blackburn, Mol Cell

Biol., 1996, 16(1):53-65;Hukezalie 等, PLoS One, 2012, 7(11):e47505)。短端粒丰度的测量可能有助于测定 HAART 治疗的副作用和功效。

[0161] 5.2.2 其它病理状况

[0162] 本公开还在诊断与老龄化的早发有关的疾病方面得到了应用。例如,患有早衰病 (Hutchinson Gilford progeria disease) 的个体显示出过早老龄化以及与端粒长度损失有关的成纤维细胞的增殖潜力下降 (Allsopp, R. C. 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992, 89:10114-10118)。根据本公开的方法对端粒重复数进行扩增和定量可用于确定疾病风险或预后并采取如上所述的适当干预步骤。

[0163] 5.3 端粒疾病

[0164] 在本公开的一个方面,端粒特异性疾病的存在和进展都可以使用样本来测定。端粒疾病与端粒的异常或过早缩短有关,这可以例如起因于端粒酶活性的缺陷。端粒酶是真核细胞中端粒 DNA 的复制和保护所需要的核糖核蛋白复合物。缺乏端粒酶的细胞经历端粒 DNA 的渐进性损失,这导致活力损失并伴随有基因组不稳定性的增加。这些疾病可能是遗传的并且包括某些形式的先天性再生障碍性贫血,其中骨髓干细胞的细胞分裂不足导致严重贫血。皮肤和肺的某些遗传性疾病也是由端粒酶缺陷引起。对于端粒疾病来说,针对 T/S<0.5 的阈值适于一些病状。此外,常用的度量是针对年龄调整的百分位数端粒得分相对于正常群体小于 <10% 或优选 <1%。

[0165] 先天性角化不良 (DKC), 又称为津-恩-科三氏综合症 (Zinsser-Engman-Cole syndrome), 是一种罕见的进行性骨髓衰竭综合症,其特征为粘膜皮肤异常:网状皮肤色素沉着过度、指甲营养不良和口腔粘膜白斑病 (Jyonouchi S. 等, Pediatr. Allergy Immunol., 2011, 22(3):313-9;Bessler M. 等, Haematologica, 2007, 92(8):1009-12)。有证据表明这种病症中存在端粒酶功能障碍、核糖体缺乏和蛋白质合成功能障碍。早期死亡常常与骨髓衰竭、感染、致命性肺并发症或恶性肿瘤有关。这种疾病在以下三种类型之一是遗传的:常染色体显性、常染色体隐性或最常见形式 X 连锁隐性(其中导致 DC 的基因由 X 染色体携带)。使用本公开的方法对疾病进展进行早期诊断和测量对于具有这些遗传特征的家族而言非常有益,从而使得利用合成代谢类固醇或骨髓刺激药物进行早期治疗可以有助于防止骨髓衰竭。本公开的非侵入性、对患者友好的唾液测试方法特别适用于 DKC, 因为婴儿和小孩需要测试和连续监测。

[0166] 特发性间质性肺炎的特征为纤维化和炎症的组合对肺实质的损伤。特发性肺纤维化 (IPF) 是这些疾病的一个实例,其导致肺的渐进性疤痕形成。纤维性疤痕组织在肺中随着时间而累积,影响了其向身体提供足够氧的能力。端粒酶基因 TERT 和 TERC 的编码区中的杂合子突变已经在特发性间质性肺炎的家族性和散发性病例中被发现。带有突变的所有受影响患者都具有短端粒。患有 IPF 的个体中的大部分具有短的端粒长度,这无法由端粒酶中的编码突变来解释 (Cronkhite, J. T. 等, Am. J. Resp. Crit. Care Med., 2008, 178:729-737)。因此,端粒缩短可以被用作对这种年龄相关疾病的倾向增加的标志 (Alder, J. K. 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2008, 105(35):13051-13056)。此外, IPF 的过程因人而异。对于一些人来说,这种疾病可以历经多年缓慢和逐渐地进展,而对于其它人来说,其可以快速地进展。本发明的方法可以方便地用于监测肺纤维化的过程并且采取如上所述的适当干预步骤。

[0167] 再生障碍性贫血是其中骨髓停止为身体制造足够的红血球、白血球和血小板的疾病。骨髓所制造的任何血细胞是正常的,但是并不足够。再生障碍性贫血可以是中度、严重或极严重的。患有严重或极严重的再生障碍性贫血的人处于威胁生命的感染或出血的风险下。患有携带端粒酶突变的再生障碍性贫血的患者发展骨髓发育不良的风险增加。端粒酶缺乏可以引起造血干细胞中不同程度的端粒缩短并且导致染色体不稳定和恶性转化 (Calado, R. T. 和 Young, N. S., *The Hematologist*, 2010 万维网 URL hematology.org/Publications/Hematologist/2010/4849.aspx)。具有较短端粒的再生障碍性贫血患者具有较低生存率,并且在免疫疗法后比具有较长端粒的那些患者复发的可能性大得多。Scheinberg 等 (*JAMA*, 2010, 304(12):1358-1364) 发现,复发率随着端粒长度的增加而下降。具有最短端粒的患者组还处于转变成骨髓癌的较高风险下,并且具有最低的总体生存率。本公开的方法可以用于再生障碍性贫血患者中以监测发展主要并发症的风险,使得可以相应地调整个体的临床管理。

[0168] 5.4 药物响应性

[0169] 在另一个方面,本公开可用于监测治疗剂的有效性或筛选影响端粒长度或端粒酶活性的候选药物。监测端粒特征的能力可以提供用于检查特定疗法和药理学药剂的有效性的窗口。个体中的疾病状态对特定疗法的药物响应性可以通过本公开的方法来测定。例如,本公开在监测癌症疗法的有效性方面得到应用,因为细胞的增殖潜力与端粒完整性的维持有关。如上所述,虽然正常人类体细胞不表达或仅短暂表达端粒酶且因此随着每次细胞分裂缩短其端粒,但大多数人癌细胞通常表达高水平的端粒酶并且显示出不受限制的细胞增殖。Roth 等 (同上, 2010) 已经提出,在肿瘤中具有极短端粒 (其中大多数细胞中的最短端粒接近于端粒功能障碍) 且具有高端粒酶活性的癌症个体可能最得益于抗癌端粒酶抑制药物。因为端粒酶在大多数正常细胞中不被表达或被短暂表达并且处于极低水平下,所以端粒酶抑制疗法相比常规的化学疗法可能对正常细胞的毒性更小。此类药物的一个实例是基于短寡核苷酸的端粒酶抑制剂伊美司他 (先前名为 GRN163L)。伊美司他是第一代寡核苷酸 GRN163 的新型基于脂质的缀合物 (Asai, A. 等, *Cancer Res.*, 2003, 63:3931-3939)。然而,在正常血细胞 (特别是粒细胞) 中具有极短端粒的癌症患者处于伊美司他对增生组织诸如骨髓产生不良影响的较高风险下。Rattain 等 (2008) 发现,具有短粒细胞端粒长度的此类受试者更可能患上骨髓衰竭综合症,诸如中性粒细胞减少症或血小板减少症。在这种情况下,医生可能开出更低剂量的伊美司他、不同的药物,或更频繁地监测骨髓问题。

[0170] 在其它方面,药物功效在于治疗老龄化疾病,例如但不限于心血管疾病、糖尿病、肺纤维化、肝纤维化、间质性肺炎和抑郁。在心血管疾病的情况下, Brouillette 等报告,相比对照组具有更短端粒长度的中年男性最得益于使用普伐他汀 (pravastatin) 的降脂疗法 (Brouillette, S. W. 等, *Lancet*, 2007, 369:107-114)。Satoh 等 (*Clin. Sci.*, 2009, 116:827-835) 指示,当与经温和普伐他汀治疗的患者相比,经阿托伐他汀 (atorvastatin) 治疗的患者中集中降脂疗法更好地保护端粒免遭侵蚀。本公开的方法可以用于监测他汀类在经治疗的患者中的功效,其中较短的端粒长度与较好的药物功效相关联。因为具有最长端粒的受试者平均来说未得益于预防性他汀类,所以医生可能建议患者要尤其顺应良好的生活方式习惯以作为其治疗方案的一部分。相反地,担心长期使用他汀类的副作用的具有短端粒的患者可能基于其得益于他汀类的较高可能性而被说服服用

他汀类。可以使用的他汀类的实例包括烟酸 (ADVICOR、SIMCOR)、洛伐他汀 (lovastatin) (ALTOPREV、M EVACOR)、氨氯地平 (amlopidine) (CADUET)、罗苏伐他汀 (rosuvastatin) (CRESTOR)、西他列汀 / 辛伐他汀 (sitagliptin/simvastatin) (JUVISY NC)、氟伐他汀 (fluvastatin) (LESCOL)、普伐他汀 (PRAVACHOL)、阿托伐他汀 (LIPITOR)、匹伐他汀 (pitavastatin) (LIVALO) 和依泽替米贝 / 辛伐他汀 (ezetimibe/simvastatin) (VYTORIN)。

[0171] 在其它方面,可以测量在端粒疾病(例如但不限于先天性角化不良、肺纤维化和再生障碍性贫血)治疗中的药物有效性。例如,先天性角化不良和肺纤维化都用高剂量的类固醇来治疗,众所周知,这些类固醇具有众多有害的副作用。因此非常期望使用最低可能的类固醇剂量,这使得本公开的方法成为用于监测这些患者的有价值工具。

[0172] 5.5 候选药物筛选

[0173] 在另一方面,本公开被用作筛选影响调节端粒长度(诸如端粒酶活性)的生物途径的候选药物、膳食补充剂和其它干预(包括生活方式改变)的一般方法。以定量方式快速和特异性地扩增端粒重复的能力提供了一种用于鉴定影响细胞中的端粒动力学的小分子、候选核酸和肽剂及其它产品或干预的高通量筛选法。对正常细胞具有正向端粒延长作用的候选药物或其它候选产品在治疗退行性病状或细胞衰老相关病状方面将优于具有端粒缩短(或端粒酶抑制)作用而其它方面都等同的那些药物或产品。在治疗癌症的情况下,尤其在癌细胞中具有负向的端粒缩短作用的药物将是优选的。

[0174] 实施例

[0175] 实施例 1- 短端粒序列的扩增

[0176] 在此,我们描述了一种利用纯化基因组 DNA 来测量短端粒的百分比的基于定量 PCR 的方法。这种方法包括将非人引物 'TeloPrimer' 非共价结合至脊椎动物基因组 DNA 的 3'-突出,使用在延伸反应期间置换或降解端粒 C 链的酶使 TeloPrimer 向亚端粒单一序列 'SUS' 进行时控延伸,随后利用 SUS 及 TeloPrimer 的非人序列部分进行扩增反应。只有足够短以使得延伸的 TeloPrimer 产物到达 SUS 序列的端粒才被扩增。因此,控制链置换反应的时间允许检测短于指定端粒长度阈值的端粒。另外,通过控制以 SUS 和 TeloAnchor 引物进行的 PCR 步骤的延伸时间,短端粒群体将被选择性扩增,从而进一步提高这种测定测量短端粒的特异性。在 TeloTest 的 T- 运行中定量短端粒的丰度。

[0177] 材料与方法

[0178] 引物

[0179] 所有引物都是以标准脱盐形式或 HPLC 纯化形式购自 Integrated DNA Technologies。下面列出这些引物的序列:

[0180] TeloPrimer :5'-TGCTCGGCCGATCTGGCATCCCTAACC-3' [SEQ ID NO:7]

[0181] TeloAnchor :5'-TGCTCGGCCGATCTGGCATC-3' [SEQ ID NO:8]

[0182] SUS(HPLC 纯化):5'-GATGGATCCTGAGGGTGAGGGTGAGG G-3' [SEQ ID NO:2]

[0183] TeloProbe(HPLC 纯化):5'-CCCTAACCCTAACCCTAACCCTAA-3' [SEQ ID NO:9]

[0184] 使 TeloPrimer 与基因组 DNA 退火

[0185] 将人基因组 DNA 与 TeloPrimer 以 20ng/ul DNA 和 1uM TeloPrimer 的最终浓度混合在 50ul 反应中,在 65°C 下于加热器中孵育 10 分钟,且然后历时一小时时间冷却至室温。将退火的样本保持在冰上,直到进行链置换反应。

[0186] 链置换

[0187] 使用 50ng 退火 DNA、40mM Tris-HCl (pH 8.0)、10mM MgCl₂、50mM NaCl、5mM DTT (PN 70726, Affymetrix, Santa Clara, CA, USA)、100ug/ml BSA (目录号 B9001S, New England Biolabs, Ipswich, MA)、500uM dNTP (目录号 1708874, Bio-Rad, Hercules, CA)、5uM 单链结合蛋白 (SSB, 目录号 70032Y 100UG, Affymetrix, Santa Clara, CA) 和 400nM 测序酶 2.0 (目录号 70775Y 200UN, Affymetrix, Santa Clara, CA) (测序酶浓度为 13U/u1), 以 5u1 体积进行链置换反应。不含测序酶 2.0 的混合物在 37℃ 下预热一分钟, 且然后在向混合物中添加测序酶 2.0 后在 37℃ 下孵育 30 秒至 10 分钟。通过在 80℃ 下热钝化 20 分钟使反应停止。

[0188] 链置换产物的 PCR 扩增

[0189] 将链置换 DNA 反应的产物在 DNA 悬浮缓冲液 (目录号 T0227, Teknova, Hollister, CA) 中稀释 50 倍。以 40u1 反应体积进行 PCR, 该体积包含 1.5mM MgCl₂、300uM dNTP (目录号 1708874, Bio-Rad, Hercules, CA)、0.5uM SUS 引物、0.5uM TeloAnchor 引物、2u1 稀释 DNA、5 单位 PLATINUM Taq 聚合酶 (目录号 10966-083, Life Technologies, Grand Island, NY)。

[0190] 循环程序如下: 在 94℃ 下 2 分钟; 在 94℃ 下 15 秒, 在 65℃ 下 30 秒、在 72℃ 下 30 秒至 10 分钟, 然后在 72℃ 下延伸 10 分钟, 循环 35 次。在 Bio-Rad C1000 热循环仪 (Bio-Rad C1000Thermocycler) (Bio-Rad, Hercules, CA) 中进行 PCR 反应。

[0191] 通过 TeloTest 对扩增的 PCR 产物进行定量

[0192] 将 PCR 产物在 DNA 悬浮缓冲液中稀释 10 至 1000 倍。利用 TELOTEST 的 T- 运行对 PCR 产物进行定量。使用含有 60-600bp 之间的完整端粒重复的 PCR 片段作为标准物来计算每个样本的 DNA 浓度。从置换反应到 qPCR 步骤, 每个样本中将包括具有 TTAGGG 3' 突出和靠近 5' 的 SUS 序列的约 2kb DNA 片段内标物。每个样本的反应效率将通过内标物中的非人序列的 qPCR 来估算。针对每个样本的归一化因子将基于反应效率而生成。

[0193] DNA 印迹

[0194] 进行 DNA 印迹分析, 以确定置换的端粒 DNA 的大小。使通过 SUS 和 TeloAnchor 引物扩增得到的链置换产物在 0.5% 琼脂糖凝胶上电泳, 转移至带正电荷的尼龙膜上, 并在 37℃ 下与具有四个 TTAGGG 重复的 DIG 标记的寡核苷酸探针杂交过夜。使用化学发光检测来检测信号。

[0195] 结果**[0196] 总体方案**

[0197] 本文所描述的短端粒测定 (STA) 通过链置换或链降解以及随后的定量 PCR 来定量人基因组 DNA 样本中的短端粒的量。这种测定的总体方案示于图 1 中。

[0198] 这种测定通过首先使 TeloPrimer 与人基因组 DNA 退火来进行。TeloPrimer 在 5' 端包含 19 个核苷酸的非人序列, 且在 3' 端包含 8 个核苷酸的端粒序列。利用天然基因组 DNA 确保了 TeloPrimer 将只会与端粒的 3' 单链尾部 (突出) 退火, 而不与双链区域退火。TeloPrimer 的延伸是通过链置换或链降解反应实现。由于有限的时间, 反应将只能够到达那些具有短端粒的染色体上的端粒变异区, 而在具有长端粒的染色体上, 链置换产物将止于完整端粒重复区域内。然后通过使用 SUS 引物和 TeloAnchor 引物进行 PCR 使置换的短端粒富集。SUS 引物包含 3 个重复的 TGAGGG 序列, 这被发现在大多数染色体上的位于或靠近

亚端粒区与真正端粒重复之间的接合处的端粒变异区中。TeloAnchor 引物与 TeloPrimer 共用相同的非人序列并且不含端粒序列。将 SUS 与 TeloAnchor 对设计成特异性地扩增链置换短端粒。最后,利用 TELOTEST T- 运行定量短端粒的量。

[0199] 链置换产物的定量

[0200] 链置换扩增是 DNA 合成反应,其中所遇到的下游 DNA 在合成期间被聚合酶置换。包括全基因组扩增的许多方案和法医分析使用链置换来扩增极少量的模板 DNA。由于 DNA 聚合酶具有链置换活性,具有缺口 (nick) 或单链尾部的 DNA 可以用作模板,而无需变性步骤。我们选择在实验设计中使用链置换酶,因为端粒的单链尾部充当链置换酶的天然模板,且相比 5'-3' 外切核酸酶 (降解酶) 不太可能在基因组中产生可能引起中间端粒样序列的非特异性扩增的缺口。将 TELOPRIMER 与天然基因组 DNA 上的端粒的单链尾部退火使得 TeloPrimer 邻近 C 链的 5' 末端 (图 1)。在这个设计中,链置换产物的长度将准确地反映端粒长度。通过控制链置换时间,反应将只能够到达那些具有短端粒的染色体上的端粒变异区。我们选择使用测序酶 2.0 (一种没有外切核酸酶活性的 T7DNA 聚合酶的基因工程化形式),因为据报道,它在线性模板上以高特异性和持续合成性合成 DNA (Jones, A. 和 X. Huang, Anal Biochem, 2011. 414(1)58-69)。我们进行时程实验,其中链置换反应耗时 30 秒至 5 分钟。将来自膀胱癌细胞系 UM-UC3 的基因组 DNA 与 TeloPrimer 退火,并且如材料与方法中所详述进行链置换反应。

[0201] 图 2 示出了端粒产物随着链置换反应时间的增加而增加,端粒产物是通过 TELOTEST qPCR 的 T- 运行测量。线性回归线显示时间与扩增子丰度之间的强烈关系 ($R^2 = 0.99$)。此外,在未添加测序酶 2.0 的阴性对照中,未在 TELOTEST T- 运行中检测到 PCR 产物 (交叉点 (Cp) = 25, 计算浓度 = $1.85E-07$), 这比含测序酶 2.0 的反应的最低测量浓度低 159 倍。在 TELOTEST S- 运行中利用单拷贝基因 (β -球蛋白) 引物的平行反应也没有显示扩增产物,这进一步证实了 T- 运行中测量的端粒产物衍生自链置换反应,而不是全基因组 DNA。

[0202] 我们在此提出的实验设计预测,在短的置换反应时间下,利用 SUS 和 TeloAnchor 引物将只扩增来自短端粒的产物。我们试图通过 DNA 印迹分析证实该预测。使通过 SUS 和 TeloAnchor 引物扩增得到的链置换产物在 0.5% 琼脂糖凝胶上进行电泳,转移至带正电荷的尼龙膜上,并与具有四个 TTAGGG 重复的 DIG 标记的寡核苷酸探针杂交。图 3 显示,扩增的 PCR 产物的长度随着链置换时间的增加而增加。使用 0.5 分钟、1 分钟、3 分钟和 5 分钟的置换时间,PCR 产物的估算众数 (峰强度) 分别为近似 0.6kb、0.9kb、1.2 和 1.4kb。使用 1 分钟的置换时间,大多数产物低于 2kb。在独立的比较试验中,我们使用改良的单端粒延伸长度分析 (STELA) (Baird, D. M. 等, Nat Genet., 2003. 33(2)203-7) 方案来分析来自相同癌症细胞系 UM-UC3 的全基因组 DNA 的端粒长度分布。将 TeloPrimer 连接至 C 链的 5' 末端,并且使用 XpYpE2 和 TeloAnchor 引物来扩增端粒。使 PCR 产物在凝胶上进行电泳 (图 3 中第 1 泳道)。这表明 UM-UC3 端粒的众数为约 1.8kb,与先前的报道 (Xu, L. 和 E. H. Blackburn, Mol Cell, 2007. 28(2)315-27) 一致。

[0203] 为了进一步验证短端粒测定,我们用两种不同的基因组 DNA 样本进行这种测定。除 UM-UC3DNA 以外,我们使用感染了慢病毒载体的 UM-UC3 的基因组 DNA,该慢病毒载体表达端粒酶的 RNA 基因 hTER,从而延伸端粒 (Xu, L. 和 E. H. Blackburn, Mol

Cell, 2007. 28(2)315-27)。通过 qPCR 测量的 UM-UC3/hTER 中的平均端粒长度为 2.1, 与之相比, UM-UC3 为 0.56 (Telome Health Inc. 数据)。如通过 DNA 印迹分析 (图 5) 所判断, UM-UC3/hTER 细胞具有较低的短端粒百分比。与此一致的是, UM-UC3 中的短端粒的计算量比 UM-UC3/hTER 高 3 倍 (图 4)。

[0204] 我们的结论是, 短端粒测定特异性地测量短端粒的相对百分比。此外, 通过控制链置换反应时间, 将在这个测定中测量的端粒长度截止值可以变化, 且可以预定。

[0205] 上述短端粒测定可以容易地适于高通量自动化模式。图 6 示出了这种模式中的个别步骤。

[0206] 尽管本文中已经显示和描述了本发明的优选方面, 但对于本领域技术人员将显而易见的是, 这些方面仅作为实例而提供。众多变更、变化和替代在不脱离本公开的情况下现在将被本领域技术人员所想到。应该理解, 在实施本发明时可以采用本文所描述的本发明的方面的各种替代物。希望以下权利要求限定本发明的范围并且在这些权利要求和其等效物的范围内的方法和结构由此被涵盖在内。

[0001]

序列表

<110>	Telome Health, Inc. Harley, Calvin Lin, Jue Hu, Yajing	
<120>	短端粒丰度的量度	
<130>	37502.0001P1-	
<160>	14	
<170>	PatentIn 3.5 版	
<210>	1	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成构建体; 引物	
<400>	1 gttgtctcag ggtcctagtg	20
<210>	2	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成构建体; 引物	
<400>	2 gatggatcct gagggtaggg gtgaggg	27
<210>	3	
<211>	37	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成构建体; 引物	
<400>	3 ggtttttgag ggtgagggtag agggtagggg tgagggg	37
<210>	4	
<211>	39	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成构建体; 引物	
<400>	4 tccegaactat cccatccct atccctatcc ctatcccta	39
<210>	5	
<211>	39	

[0002]

<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成构建体; 引物	
<400>	5	
	cggtttgttt gggtttgggt ttgggtttgg gtttgggtt	39
<210>	6	
<211>	39	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成构建体; 引物	
<400>	6	
	ggcttgcctt acccttacc ttaccttac ccttaccct	39
<210>	7	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成构建体; 引物	
<400>	7	
	tgcctggccg atctggcatc cctaacc	27
<210>	8	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成构建体; 引物	
<400>	8	
	tgcctggccg atctggcatc	20
<210>	9	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成构建体; 引物	
<400>	9	
	ccctaaccct aaccctaacc ctaa	24
<210>	10	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成构建体; 引物	

[0003]

<400> 10	
cgggccggct gaggtaccg cga	23
<210> 11	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成构建体: 引物	
<400> 11	
gctaattgcac tceetcaata c	21
<210> 12	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成构建体: 引物	
<400> 12	
cattcetaat gcacacatga tacc	24
<210> 13	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成构建体: 引物	
<400> 13	
acactaaggt ttgggtttgg gtttgggttt gggttagtgt	40
<210> 14	
<211> 42	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成构建体: 引物	
<400> 14	
tgttaggtat ccetatccct atccetatcc etatccetaa ca	42

短端粒测定的总体方案(STA)

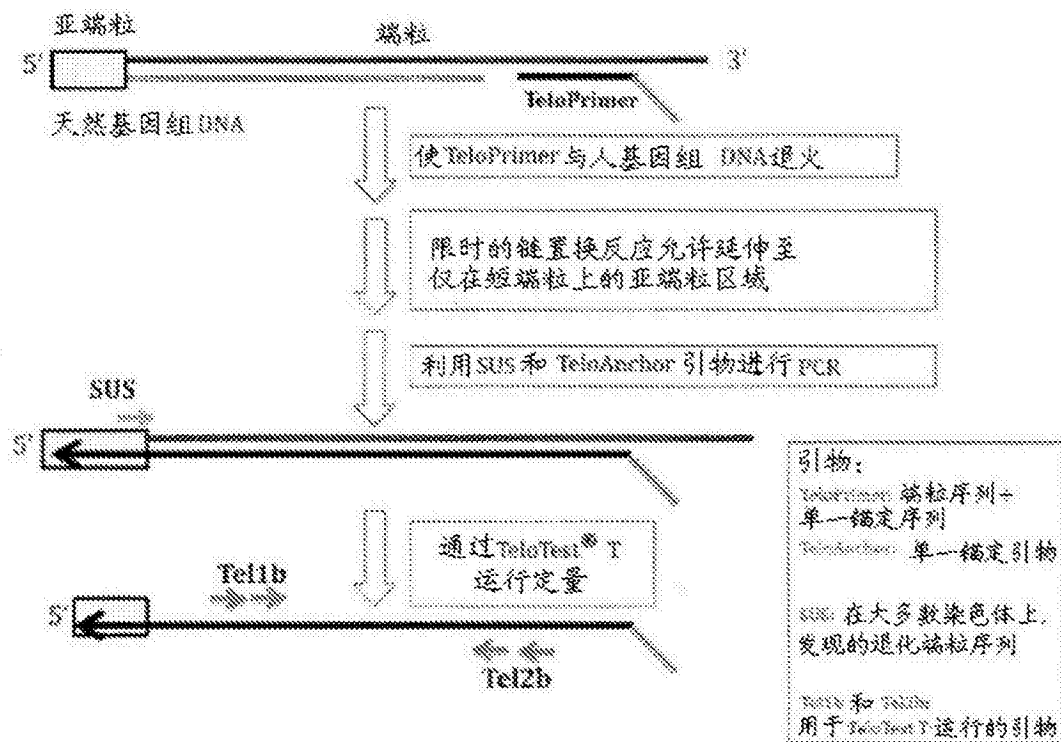


图 1

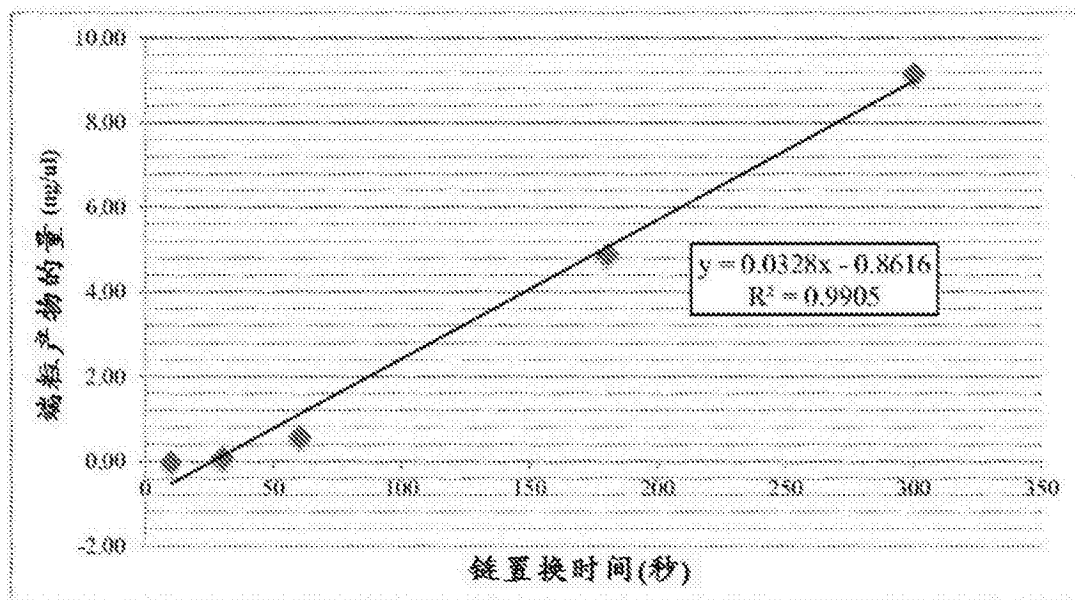


图 2

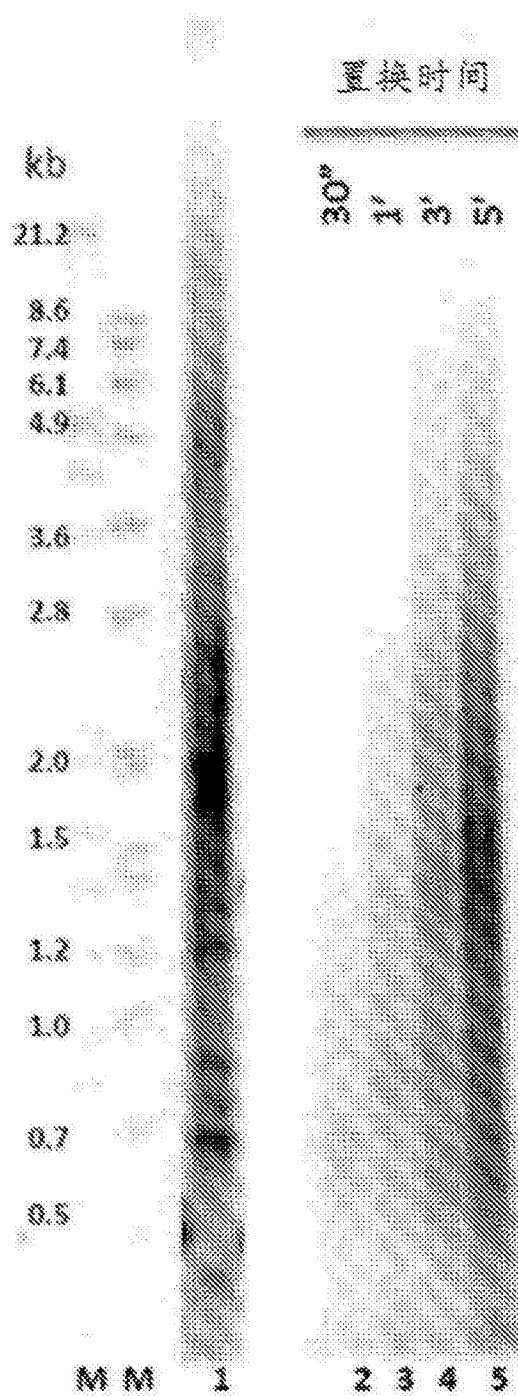


图 3

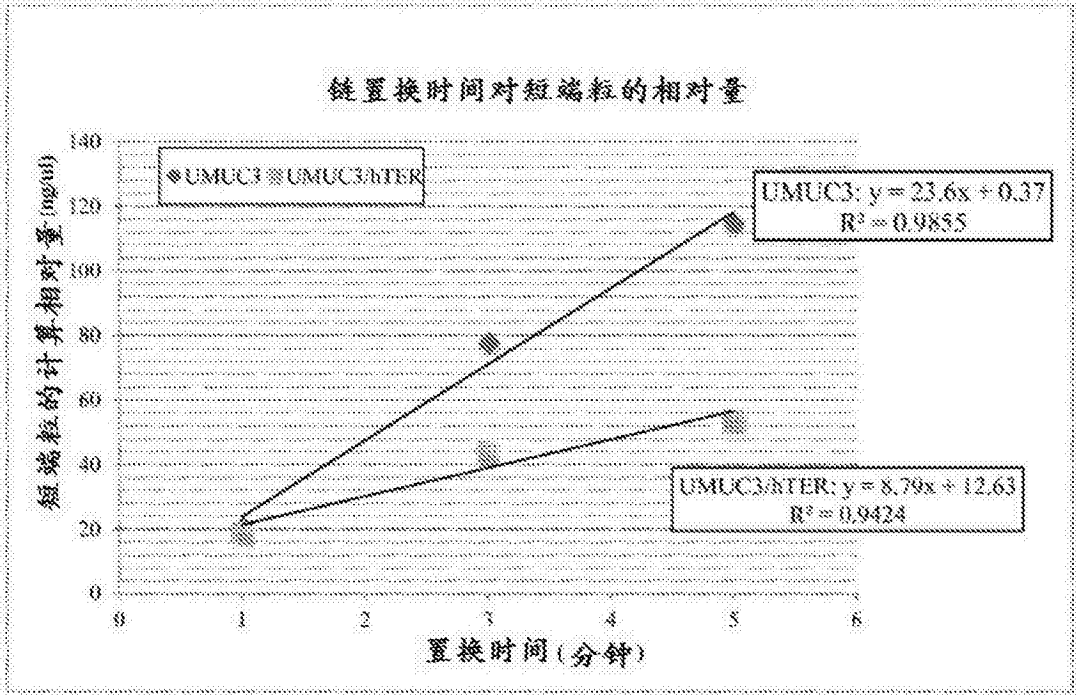


图 4

短端粒的百分比	UMUC3	UMUC3/hTER
DNA印迹 (0.2-5Kb)	75%	26%
短端粒测定	100%	33%

图 5

步骤	描述	自动化或手动
退火	1.1. 用移液管吸取 gDNA 并与 TeloPrimer 和水混合	自动
	1.2. 在 65 °C 下孵育 10 分钟, 缓慢冷却	
链置换	2.1. 用移液管吸取具有测序酶 2.0/SSB/ 缓冲剂的主体混合物(master mix)	自动
	2.2. 用移液管吸取 gDNA 并混合	自动
	2.3. 密封平板	手动
	2.4. 在 37 °C 下孵育 3 分钟	手动
	2.5. 将平板转移至 80 °C 下, 保持 20 分钟	手动
利用 SUS 和 TELOANCHOR 进行 PCR	3.1. 用低 EDTA Tris 稀释来自步骤 2.5 的样本	自动
	3.2. 用移液管将 PCR 主体混合物吸取到新的 96 孔板中	自动
	3.3. 用移液管将来自步骤 3.1 的稀释 DNA 吸取到来自步骤 3.2 的 96 孔板中	自动
	3.4. 密封两个板	手动
	3.5. 将 PCR 板转移至热循环仪中	手动
	3.6. PCR	
TELOTEST	4.1. 用低 EDTA Tris 稀释来自步骤 3.6 的 PCR 产物	自动
	4.2. 利用来自 4.1 的稀释样本进行 TeloTest® 的 T- 运行	自动

图 6

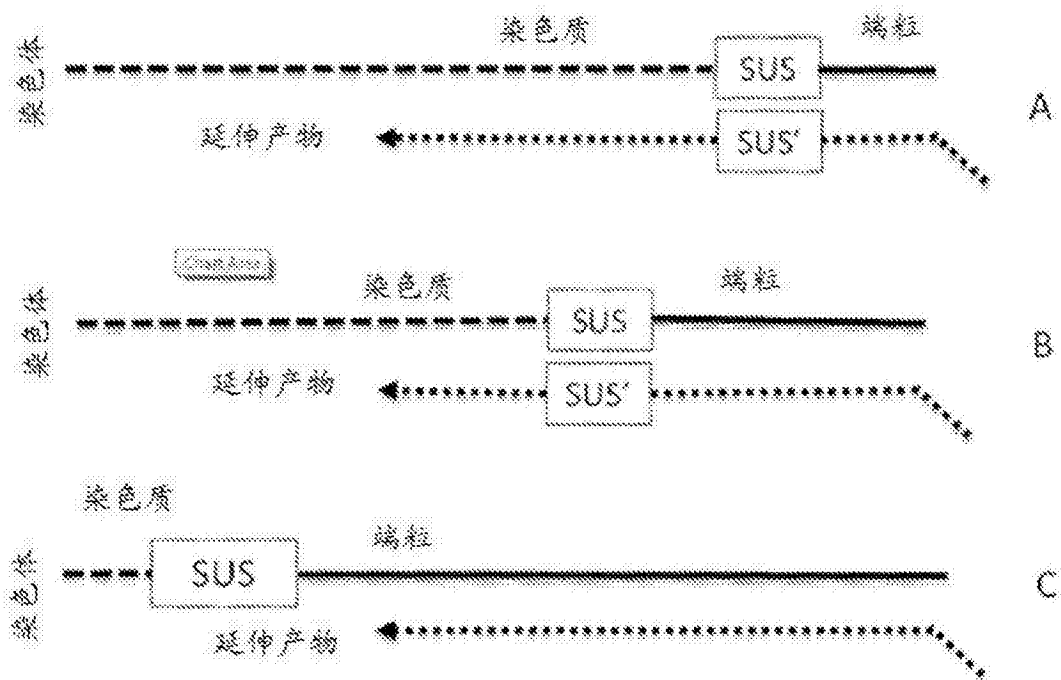


图 7A

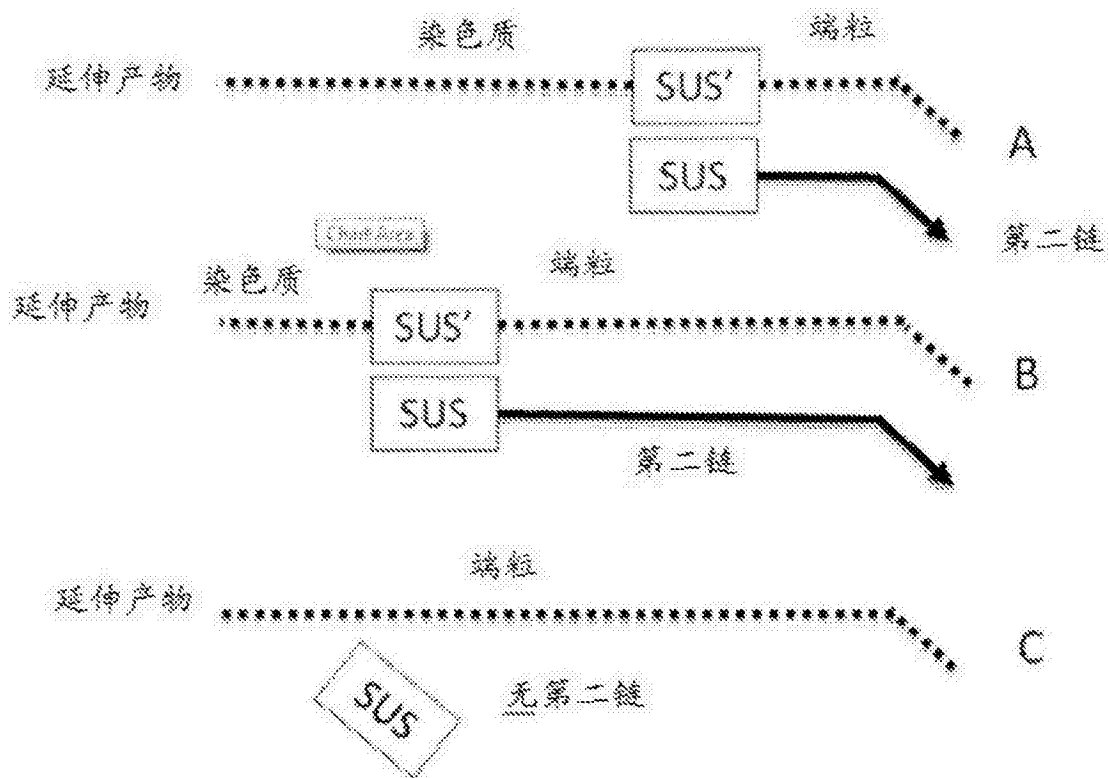


图 7B