



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 119137289 A

(43) 申请公布日 2024.12.13

(21) 申请号 202380038225.3

(22) 申请日 2023.05.30

(30) 优先权数据

63/347,106 2022.05.31 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.11.04

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2023/064444 2023.05.30

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/232812 EN 2023.12.07

(71) 申请人 雀巢产品有限公司

地址 瑞士

(72) 发明人 L·特沙里 S·赫尔齐格

A·佐林格 潘元龙 P·谷特

P·施泰纳 L·卢卡扬科

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

专利代理师 魏子翔 于静

(51) Int.Cl.

C12Q 1/6876 (2006.01)

C12Q 1/6883 (2006.01)

权利要求书4页 说明书31页

序列表(电子公布) 附图7页

(54) 发明名称

使用生物学年龄改善狗的健康结果的方法

(57) 摘要

本发明用于为狗选择生活方式方案、膳食方案或治疗干预,方法包括:a)提供来自从该狗获得的样本的DNA甲基化图谱;b)使用该DNA甲基化图谱来确定该狗的生物学年龄;以及c)基于步骤b)中确定的该生物学年龄来为该狗选择合适的生活方式方案、膳食方案或治疗干预。

1. 用于为狗选择生活方式方案、膳食方案或治疗干预的方法,所述方法包括:
 - a) 提供来自从所述狗获得的样本的DNA甲基化图谱;
 - b) 使用所述DNA甲基化图谱来确定所述狗的生物学年龄;以及
 - c) 基于步骤b)中确定的所述生物学年龄来为所述狗选择合适的生活方式方案、膳食方案或治疗干预。
2. 用于确定生活方式方案、膳食方案或治疗干预对改善狗的生物学年龄的功效的方法,所述方法包括:
 - a) 将生活方式方案、膳食方案或治疗干预应用于所述狗,其中已经根据权利要求1所述的方法选择所述生活方式方案、膳食方案或治疗干预;
 - b) 在将所述生活方式方案、膳食方案或治疗干预应用于所述狗一段时间后;使用来自从所述狗获得的样本的DNA甲基化图谱来确定所述狗的生物学年龄;
 - c) 在遵循所述生活方式方案、膳食方案或治疗干预的所述时间段后,确定所述狗的所述生物学年龄是否存在变化。
3. 用于确定生活方式方案、膳食方案或治疗干预对改善狗的生物学年龄的功效的方法,所述方法包括:
 - a) 使用来自从所述狗获得的样本的DNA甲基化图谱来确定所述狗的生物学年龄;
 - b) 将基于步骤a)中确定的所述生物学年龄选择的生活方式方案、膳食方案或治疗干预应用于所述狗;
 - c) 在将所述生活方式方案、膳食方案或治疗干预应用于所述狗一段时间后;使用来自从所述狗获得的样本的DNA甲基化图谱来确定所述狗的生物学年龄;
 - d) 确定所述狗的所述生物学年龄在步骤a)和步骤c)之间是否存在变化。
4. 用于确定生活方式方案、膳食方案或治疗干预对改善狗的生物学年龄的功效的方法,所述方法包括:
 - a) 使用来自从所述狗获得的样本的DNA甲基化图谱来确定所述狗的第一生物学年龄;
 - b) 将生活方式方案、膳食方案或治疗干预应用于所述狗;
 - c) 在将所述生活方式方案、膳食方案或治疗干预应用于所述狗一段时间后;使用来自从所述狗获得的第二样本的DNA甲基化图谱来确定所述狗的第二生物学年龄;
 - d) 在遵循所述生活方式方案、膳食方案或治疗干预的所述时间段后,确定所述狗的所述第一生物学年龄和所述第二生物学年龄是否存在变化。
5. 用于开发抗衰老生活方式方案、膳食方案或治疗干预的方法;所述方法包括;
 - a) 使用来自从狗获得的样本的DNA甲基化图谱来确定所述狗的第一生物学年龄;
 - b) 将生活方式方案、膳食方案或治疗干预应用于所述狗;
 - c) 在将所述生活方式方案、膳食方案或治疗干预应用于所述狗一段时间后;使用来自从所述狗获得的第二样本的DNA甲基化图谱来确定所述狗的第二生物学年龄;
 - d) 在遵循所述生活方式方案、膳食方案或治疗干预的所述时间段后,确定所述狗的所述第一生物学年龄和所述第二生物学年龄是否存在变化;其中如果所述生活方式方案、膳食方案或治疗干预降低所述狗的所述生物学年龄和/或降低所述狗的所述生物学年龄的增加率,则确定其是抗衰老的。
6. 用于预防或降低狗发展疾病的风险的方法;所述方法包括:

a) 使用来自从所述狗获得的样本的DNA甲基化图谱来确定所述狗的生物年龄;其中对所述狗确定的所述生物年龄与发展所述疾病的增加的可能性相关联;以及

b) 基于步骤a)中确定的所述生物年龄来为所述狗选择生活方式方案、膳食方案或治疗干预;

其中所述生活方式方案、膳食方案或治疗干预预防或降低所述狗发展所述疾病的风险;优选地其中所述疾病是年龄相关疾病。

7. 用于选择适合接受抗衰老生活方式方案、膳食方案或治疗干预的狗的方法;所述方法包括:

a) 使用来自从所述狗获得的样本的DNA甲基化图谱来确定所述狗的生物年龄;

b) 如果与狗的实足年龄相比,所述狗具有增加的生物年龄,则将所述狗选择为适合接受抗衰老生活方式方案、膳食方案或治疗干预。

8. 用于确定狗的生物年龄的方法,所述方法包括:

a) 提供来自从所述狗获得的样本的DNA甲基化图谱;以及

b) 使用所述DNA甲基化图谱来确定生物年龄。

9. 根据权利要求1至3中任一项所述的方法,其中基于与所述狗的实足年龄相比所述狗具有增加的生物年龄的确定来选择所述生活方式方案、膳食方案或治疗干预。

10. 根据权利要求1至7或9中任一项所述的方法,其中所述生活方式方案、膳食方案或治疗干预是膳食干预。

11. 根据权利要求10所述的方法,其中所述膳食干预是热量限制饮食、老年饮食或低蛋白饮食。

12. 根据任一前述权利要求所述的方法,其中所述样本是血液样本。

13. 根据权利要求1或3至8中任一项所述的方法,其中步骤a)还包括确定来自从所述狗获得的样本的DNA甲基化图谱。

14. 根据任一前述权利要求所述的方法,其中所述DNA甲基化图谱包含至少一个如表1中所列的甲基化位点。

15. 根据权利要求14所述的方法,其中所述DNA甲基化图谱包含至少3个、至少5个、至少10个、至少20个、至少50个、至少100个、至少150个、至少200个或如表1中所列的甲基化位点中的每个甲基化位点。

16. 根据权利要求14所述的方法,其中所述DNA甲基化图谱包含如表2中所列的甲基化位点。

17. 根据权利要求14所述的方法,其中所述DNA甲基化图谱包含如表3中所列的甲基化位点。

18. 根据权利要求14所述的方法,其中所述DNA甲基化图谱包含如表4中所列的甲基化位点。

19. 根据权利要求14所述的方法,其中所述DNA甲基化图谱包含如表5中所列的甲基化位点。

20. 根据权利要求13至19中任一项所述的方法,其中使用包括以下步骤中的一者或多者的方法来确定DNA甲基化:(a) 用APOBEC处理样本DNA以使胞嘧啶脱氨基;(b) 基于捕获的富集;和/或(c) 高通量测序。

21. 根据任一前述权利要求所述的方法, 其中所述DNA甲基化图谱与以下项的增加的生物学年龄相关联: (i) 组织; (ii) 器官; 或 (iii) 生理系统, 诸如免疫系统、胃肠系统、泌尿系统、肌肉系统、心血管系统和/或神经系统。

22. 根据权利要求21所述的方法, 所述方法还包括对所述狗应用适用于改善已经确定生物学年龄增加的所述组织; 器官; 或生理系统的所述生物学年龄的生活方式方案、膳食方案或治疗干预。

23. 用于改善狗的生物学年龄的膳食干预或治疗方式, 其中将所述膳食干预施用于具有通过根据权利要求6至8或13至21中任一项所述的方法确定的生物学年龄的狗。

24. 膳食干预或治疗方式在改善狗的生物学年龄中的用途, 其中将所述膳食干预施用于具有通过根据权利要求6至8或13至21中任一项所述的方法确定的生物学年龄的狗。

25. 计算机可读介质, 所述计算机可读介质包括指令, 所述指令在被执行时使一个或多个处理器执行根据权利要求1或6至19中任一项所述的方法。

26. 用于为狗选择合适的生活方式方案、膳食方案或治疗干预的计算机系统, 所述计算机系统被编程为执行以下步骤中的一者或多者:

- a) 使用来自所述狗的DNA甲基化图谱来确定所述狗的生物学年龄; 以及
- b) 基于步骤a) 中确定的所述生物学年龄来为所述狗选择合适的生活方式方案、膳食方案或治疗干预。

27. 用于确定生活方式方案、膳食方案或治疗干预对改善狗的生物学年龄的功绩的计算机系统, 所述计算机系统被编程为执行以下步骤中的一者或多者:

- a) 使用来自在所述生活方式方案、膳食方案或治疗干预之前从所述狗获得的样本以及在所述生活方式方案、膳食方案或治疗干预之后从所述狗获得的样本的DNA甲基化图谱来确定所述狗的生物学年龄; 以及
- b) 在已经应用所述生活方式方案、膳食方案或治疗干预之前和之后确定所述狗的所述生物学年龄在从所述狗获得的所述样本之间是否存在变化。

28. 用于确定狗将受益于抗衰老生活方式方案、膳食方案或治疗干预的可能性的计算机系统; 所述计算机系统被编程为执行以下步骤中的一者或多者:

- a) 使用来自从所述狗获得的样本的DNA甲基化图谱来确定所述狗的生物学年龄;
- b) 如果与狗的实足年龄相比, 所述狗具有增加的生物学年龄, 则将所述狗标识为可能对抗衰老生活方式方案、膳食方案或治疗干预有反应。

29. 计算机程序产品, 所述计算机程序产品包括计算机可实施指令, 所述计算机可实施指令用于使可编程计算机使用来自狗的DNA甲基化图谱来确定所述狗的生物学年龄; 以及基于使用DNA甲基化图谱来确定的所述生物学年龄来为所述狗选择合适的生活方式方案、膳食方案或治疗干预。

30. 计算机程序产品, 所述计算机程序产品包括计算机可实施指令, 所述计算机可实施指令用于使可编程计算机: a) 使用来自在生活方式方案、膳食方案或治疗干预之前从狗获得的样本以及在所述生活方式方案、膳食方案或治疗干预之后从所述狗获得的样本的DNA甲基化图谱来确定所述狗的生物学年龄; 以及 b) 在已经应用所述生活方式方案、膳食方案或治疗干预之前和之后确定所述狗的所述生物学年龄在从所述狗获得的所述样本之间是否存在变化。

31. 计算机程序产品,所述计算机程序产品包括计算机可实施指令,所述计算机可实施指令用于使可编程计算机:a) 使用来自从狗获得的样本的DNA甲基化图谱来确定所述狗的生物学年龄;b) 如果与狗的实足年龄相比,所述狗具有增加的生物学年龄,则将所述狗标识为可能对抗衰老生活方式方案、膳食方案或治疗干预有反应。

32. 根据权利要求26至31中任一项所述的计算机系统或计算机程序产品;其中所述计算机系统或计算机程序准备并共享详述步骤(b)的结果的报告。

33. 用于确定狗的生物学年龄的试剂盒,所述试剂盒包括用于收集和任选地稳定来自受试者的样本的装置和试剂;以及用于收集和任选地稳定所述样本的说明书,并且其中所述样本用于邮寄以用于后续DNA提取,用于测量从所述样本提取的DNA中的DNA甲基化,从而获得DNA甲基化图谱。

34. 用于为狗选择合适的生活方式方案、膳食方案或治疗干预的方法;所述方法包括:(a) 提供来自所述狗的样本,任选地使用根据权利要求33所述的试剂盒;(b) 提供用于后续DNA提取的所述样本以用于测量从所述样本提取的DNA中的DNA甲基化,从而获得DNA甲基化图谱;(c) 使用根据权利要求26所述的计算机系统或根据权利要求29所述的计算机程序产品来为所述狗选择合适的生活方式方案、膳食方案或治疗干预;其中所述计算机系统准备并共享详述步骤(c)的结果的报告。

35. 用于确定生活方式方案、膳食方案或治疗干预对改善狗的生物学年龄的功效的方法,所述方法包括:(a) 提供在所述生活方式方案、膳食方案或治疗干预之前从所述狗获得的样本以及在所述生活方式方案、膳食方案或治疗干预之后从所述狗获得的样本,任选地使用根据权利要求33所述的试剂盒;(b) 提供用于后续DNA提取的所述样本以用于测量从所述样本提取的DNA中的DNA甲基化,从而获得DNA甲基化图谱;(c) 使用根据权利要求27所述的计算机系统或根据权利要求30所述的计算机程序产品在已经应用所述生活方式方案、膳食方案或治疗干预之前和之后确定所述狗的所述生物学年龄在从所述狗获得的所述样本之间是否存在变化;其中所述计算机系统准备并共享详述步骤(c)的结果的报告。

36. 用于确定狗将受益于抗衰老生活方式方案、膳食方案或治疗干预的可能性的方法,所述方法包括:(a) 提供从所述狗获得的样本;任选地使用根据权利要求33所述的试剂盒;(b) 提供用于后续DNA提取的所述样本以用于测量从所述样本提取的DNA中的DNA甲基化,从而获得DNA甲基化图谱;(c) 使用根据权利要求28所述的计算机系统或根据权利要求31所述的计算机程序产品,如果与狗的实足年龄相比,所述狗具有增加的生物学年龄,则将所述狗标识为可能对抗衰老生活方式、膳食方案或治疗干预有反应;其中所述计算机系统准备并共享详述步骤(c)的结果的报告。

使用生物学年龄改善狗的健康结果的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及用于使用DNA甲基化图谱来确定狗的生物学年龄的方法,特别地,本发明涉及基于从DNA甲基化图谱确定的生物学年龄来为狗选择生活方式方案、膳食方案或治疗干预,或确定生活方式方案、膳食方案或治疗干预的功效,或开发抗衰老生活方式或膳食方案的方法。

背景技术

[0002] 确定关于狗的健康的信息的能力是告知狗的总体健康和福祉所期望的。

[0003] 众所周知,实足年龄是总体健康状态的主要指标,其中实足年龄的增加与健康状况的降低相关联。然而,取决于遗传、营养和生活方式的不同,个体衰老的速度可能比实足年龄慢或快。因此,实足年龄可能并不总是反映个体的衰老速率或健康状况降低的风险。另一方面,某一个体的生物学年龄(基于例如临床生物化学和细胞生物学量度),与相同实足年龄的其他个体相比,可能会有所不同。用于确定生物学年龄的方法可能有助于比基于个体的实足年龄的预期更早地标识出处于年龄相关病症风险中的个体(参见例如W02019/046725)。

[0004] 然而,需要确定狗的生物学年龄并利用生物学年龄的测量来改善狗的健康结果的其他方法。

发明内容

[0005] 在第一方面,本发明提供了用于为狗选择生活方式方案、膳食方案或治疗干预的方法,所述方法包括:

[0006] a) 提供来自从所述狗获得的样本的DNA甲基化图谱;

[0007] b) 使用所述DNA甲基化图谱来确定所述狗的生物学年龄;以及

[0008] c) 基于步骤b)中确定的所述生物学年龄来为所述狗选择合适的生活方式方案、膳食方案或治疗干预。

[0009] 因此,本方法使得能够基于如从DNA甲基化图谱所确定的狗的生物学年龄来为狗选择合适的生活方式方案、膳食方案或治疗干预。例如,通常基于狗的实足年龄推荐高度可消化和高质量的蛋白饮食。例如,可能会推荐,让狗在7、8岁左右改用老年饮食。然而,在本发明的上下文中,与狗的实足年龄相比,确定狗的生物学年龄增加可允许确定让狗在更早的年龄改用老年饮食。相比之下,与狗的实足年龄相比,生物学年龄降低的狗可能能够更长时间地继续享用成年饮食。

[0010] 本方法可包括基于如从DNA甲基化图谱所确定的狗的生物学年龄来确定狗的寿命、健康跨度和/或长寿的概率;与例如相同实足年龄、性别和品种的同龄狗相比。

[0011] 如本文所用,“寿命”可以指受试者活的时间长度(例如数年)。“健康跨度”可以指没有疾病的生命的时间长度(例如数年)。“长寿”可以指受试者活了超过其预期寿命的时间长度(例如数年)。

[0012] 合适地,本方法可包括在确定狗的生物学年龄大于其实足年龄后,对狗选择和/或应用生活方式方案、膳食方案或治疗干预。

[0013] 如本文所用,“为狗选择合适的生活方式方案、膳食方案或治疗干预”还可涵盖“为狗推荐生活方式方案、膳食方案或治疗干预”或“为狗提供推荐的生活方式方案、膳食方案或治疗干预”。

[0014] 在另一方面,本发明提供了用于确定生活方式方案、膳食方案或治疗干预对改善狗的生物学年龄的功效的方法,所述方法包括:

[0015] a) 将生活方式方案、膳食方案或治疗干预应用于所述狗,其中已经根据本发明的第一方面选择所述生活方式方案、膳食方案或治疗干预;

[0016] b) 在将所述生活方式方案、膳食方案或治疗干预应用于所述狗一段时间后;使用来自从所述狗获得的样本的DNA甲基化图谱来确定所述狗的生物学年龄;

[0017] c) 在遵循所述生活方式方案、膳食方案或治疗干预的所述时间段后,确定所述狗的所述生物学年龄是否存在变化。

[0018] 在另一方面,本发明提供了用于确定生活方式方案、膳食方案或治疗干预对改善狗的生物学年龄的功效的方法,所述方法包括:

[0019] a) 使用来自从所述狗获得的样本的DNA甲基化图谱来确定所述狗的生物学年龄;

[0020] b) 将基于步骤a)中确定的所述生物学年龄选择的生活方式方案、膳食方案或治疗干预应用于所述狗;

[0021] c) 在将所述生活方式方案、膳食方案或治疗干预应用于所述狗一段时间后;使用来自从所述狗获得的样本的DNA甲基化图谱来确定所述狗的生物学年龄;

[0022] d) 确定所述狗的所述生物学年龄在步骤a)和步骤c)之间是否存在变化。

[0023] 在另一个方面,本发明涉及用于确定生活方式方案、膳食方案或治疗干预对改善狗的生物学年龄的功效的方法,所述方法包括:

[0024] a) 使用来自从所述狗获得的样本的DNA甲基化图谱来确定所述狗的生物学年龄;

[0025] b) 将生活方式方案、膳食方案或治疗干预应用于所述狗;

[0026] c) 在将所述生活方式方案、膳食方案或治疗干预应用于所述狗一段时间后;使用来自从所述狗获得的第二样本的DNA甲基化图谱来确定所述狗的第二生物学年龄;

[0027] d) 在遵循所述生活方式方案、膳食方案或治疗干预的所述时间段后,确定所述狗的所述第一生物学年龄和所述第二生物学年龄是否存在变化。

[0028] 合适地,改善狗的生物学年龄可以指狗的生物学年龄和实足年龄之间的差异的减少,其中狗的生物学年龄大于其实足年龄。此外,改善狗的生物学年龄可以指保持或进一步增加狗的生物学年龄和实足年龄之间的差异,其中狗的生物学年龄小于其实足年龄。另选地,狗的生物学年龄的恶化可以指狗的生物学年龄和实足年龄之间的差异的增加,其中狗的生物学年龄大于其实足年龄。狗的生物学年龄的恶化还可以指狗的生物学年龄和实足年龄之间的差异的减少,其中狗的生物学年龄小于其实足年龄。

[0029] 合适地,改善狗的生物学年龄可以指狗的生物学年龄和实足年龄之间的变化率的降低,其中狗的生物学年龄大于其实足年龄。例如,每增加1岁的实足年龄,狗的生物学年龄可能已经增加1.5岁。在生活方式和膳食方案干预后,变化率的降低使得每增加1岁的实足年龄狗的生物学年龄随后增加1.25岁,这可提供狗的生物学年龄的改善。

[0030] 改善生物学年龄还可以指保持或增加狗的生物学年龄和实足年龄之间的变化率,其中狗的生物学年龄小于其实足年龄。例如,每增加1岁的实足年龄,狗的生物学年龄可能已经增加小于1岁(例如0.9岁)。在生活方式、膳食方案或治疗干预后,变化率可改变,使得每增加1岁的实足年龄狗的生物学年龄随后增加例如0.8岁或更少,这可提供狗的生物学年龄的改善。

[0031] 用于确定生活方式方案、膳食方案或治疗干预对改善狗的生物学年龄的功效的本方法可有利地允许对生活方式方案、膳食方案或治疗干预对改善或保持狗的健康的有效性进行持续监测。这种方法的使用可有利地允许识别特别有效的生活方式方案、膳食方案或治疗干预。相比之下,如果基于狗的生物学年龄确定生活方式方案、膳食方案或治疗干预是无效的;则可实施替代的生活方式方案、膳食方案或治疗干预。

[0032] 在另一个方面,本发明提供了用于预防或降低狗发展疾病的风险的方法;所述方法包括:

[0033] a) 使用来自从所述狗获得的样本的DNA甲基化图谱来确定所述狗的生物学年龄;其中对所述狗确定的所述生物学年龄与发展所述疾病的增加的可能性相关联;以及

[0034] b) 基于步骤a)中确定的所述生物学年龄来为所述狗选择生活方式方案、膳食方案或治疗干预;

[0035] 其中所述生活方式方案、膳食方案或治疗干预预防或降低所述狗发展所述疾病的风险。

[0036] 合适地,所述疾病是年龄相关疾病。例如,年龄相关疾病可以是骨关节炎、痴呆、认知功能障碍、糖尿病前状况、糖尿病、癌症、心脏病、肥胖症、胃肠道病症、失禁、肾病、少肌症、视力丧失、听力丧失、骨质疏松、白内障、脑血管疾病和/或肝病。

[0037] 该方法还可任选地包括将生活方式方案、膳食方案或治疗干预施用于狗。合适地,生活方式方案可以是膳食干预或治疗方式。

[0038] 在另一方面,本发明涉及用于选择适合接受抗衰老生活方式方案、膳食方案或治疗干预的狗的方法;所述方法包括:a)使用来自从所述狗获得的样本的DNA甲基化图谱来确定所述狗的生物学年龄;b)如果与狗的实足年龄相比,所述狗具有增加的生物学年龄,则将所述狗选择为适合接受抗衰老生活方式方案、膳食方案或治疗干预。

[0039] 合适地,虽然抗衰老生活方式方案、膳食方案或治疗干预对于基于实足年龄的狗可能是有效的,但当应用于与其实足年龄相比具有增加的生物学年龄的狗时,其可能是特别有效的。因此,本方法可有利地使得能够选择对抗衰老生活方式方案、膳食方案或治疗干预具有增加的应答可能性或改善的应答量的狗。

[0040] 生活方式方案、膳食方案或治疗干预可基于与狗的实足年龄相比狗具有增加的生物学年龄的确定来选择。

[0041] 生活方式方案、膳食方案或治疗干预可以是膳食干预。膳食干预可以是热量限制饮食、老年饮食或低蛋白饮食。

[0042] DNA甲基化图谱可能与以下项的生物学年龄增加相关联:(i)组织;(ii)器官;或(iii)生理系统,诸如免疫系统、胃肠系统、泌尿系统、肌肉系统、心血管系统和/或神经系统。

[0043] 本发明还提供了用于改善狗的生物学年龄的膳食干预,其中将膳食干预施用于具

有通过本发明的方法确定的生物学年龄的狗。

[0044] 本发明进一步涉及膳食干预在改善狗的生物学年龄中的用途,其中将膳食干预施用于具有通过本发明的方法确定的生物学年龄的狗。

[0045] 本发明进一步提供了计算机可读介质,该计算机可读介质包括指令,这些指令在被执行时使一个或多个处理器执行本发明的方法。

[0046] 本发明还提供了用于为狗选择合适的生活方式方案、膳食方案或治疗干预的计算机系统,所述计算机系统被编程为执行以下步骤中的一者或多者:a)使用来自所述狗的DNA甲基化图谱来确定所述狗的生物学年龄;以及b)基于步骤a)中确定的所述生物学年龄来为所述狗选择合适的生活方式方案、膳食方案或治疗干预。

[0047] 在另一方面,本发明提供了用于确定生活方式方案、膳食方案或治疗干预对改善狗的生物学年龄的功效益的计算机系统,所述计算机系统被编程为执行以下步骤中的一者或多者:a)使用来自在所述生活方式方案、膳食方案或治疗干预之前从所述狗获得的样本以及在所述生活方式方案、膳食方案或治疗干预之后从所述狗获得的样本的DNA甲基化图谱来确定所述狗的生物学年龄;以及b)在已经应用所述生活方式方案、膳食方案或治疗干预之前和之后确定所述狗的所述生物学年龄在从所述狗获得的所述样本之间是否存在变化。

[0048] 在另一个方面,本发明提供了用于确定狗将受益于抗衰老生活方式方案、膳食方案或治疗干预的可能性的计算机系统;所述计算机系统被编程为执行以下步骤中的一者或多者:a)使用来自从所述狗获得的样本的DNA甲基化图谱来确定所述狗的生物学年龄;b)如果与狗的实足年龄相比,所述狗具有增加的生物学年龄,则将所述狗标识为可能对抗衰老生活方式方案、膳食方案或治疗干预有反应。

[0049] 在另一个方面,本发明提供了计算机程序产品,所述计算机程序产品包括计算机可实施指令,所述计算机可实施指令用于使可编程计算机使用来自狗的DNA甲基化图谱来确定所述狗的生物学年龄;以及基于使用DNA甲基化图谱来确定的所述生物学年龄来为所述狗选择合适的生活方式方案、膳食方案或治疗干预。

[0050] 在另一方面,本发明提供了计算机程序产品,所述计算机程序产品包括计算机可实施指令,所述计算机可实施指令用于使可编程计算机:a)使用来自在生活方式方案、膳食方案或治疗干预之前从狗获得的样本以及在所述生活方式方案、膳食方案或治疗干预之后从所述狗获得的样本的DNA甲基化图谱来确定所述狗的生物学年龄;以及b)在已经应用所述生活方式方案、膳食方案或治疗干预之前和之后确定所述狗的所述生物学年龄在从所述狗获得的所述样本之间是否存在变化。

[0051] 在另一个方面,本发明提供了计算机程序产品,所述计算机程序产品包括计算机可实施指令,所述计算机可实施指令用于使可编程计算机:a)使用来自从狗获得的样本的DNA甲基化图谱来确定所述狗的生物学年龄;b)如果与狗的实足年龄相比,所述狗具有增加的生物学年龄,则将所述狗标识为可能对抗衰老生活方式方案、膳食方案或治疗干预有反应。

[0052] 有利地,本发明可允许基于多个器官系统和功能的标志物来确定生物学年龄。因此,本方法可有利地涵盖了一系列潜在的器官功能障碍。

[0053] 评价狗的生物学年龄允许人们测试动物福祉的几个方面。首先,它可预测该动物是否更可能需要膳食或基于补充剂的干预。它还可用来测试膳食或基于补充剂的干预对衰

老的功效。

附图说明

[0054] 图1——使用本发明的例示性生物时钟预测的生物学年龄与实足年龄高度相关

[0055] 图2——在热量限制研究中验证本发明的例示性生物时钟。变化量对应于使用第一代时钟的实足年龄相对于预测的生物学年龄的回归模型的残差。与控制饮食的狗相比，热量限制的狗具有显著更低的生物学年龄(更低的变化量)。

[0056] 图3——包含来自完整生物时钟的前3个甲基化位点的例示性生物时钟与实足年龄相关

[0057] 图4——包含来自完整生物时钟的前5个甲基化位点的例示性生物时钟与实足年龄相关

[0058] 图5——包含来自完整生物时钟的前10个甲基化位点的例示性生物时钟与实足年龄相关

[0059] 图6——包含来自完整生物时钟的前20个甲基化位点的例示性生物时钟与实足年龄相关

[0060] 图7——包含来自完整生物时钟的前50个甲基化位点的例示性生物时钟与实足年龄相关

具体实施方式

[0061] 现将通过非限制性实施例来描述本发明的各优选特征和实施方案。技术人员将理解，在不脱离所公开的本发明范围的前提下，他们可以组合本文所公开的本发明的所有特征。

[0062] 必须指出的是，如本文和所附权利要求中所用的，单数形式“一个”、“一种”和“该”包括复数指代物，除非上下文另外明确规定。

[0063] 如本文所用，术语“包含(”和“由……构成”与“包括”或“含有”同义，并且包括端值在内或是开放式的，并且不排除附加的未列举的成员、要素或方法步骤。术语“包含”和“由……构成”也包括术语“由……组成”。

[0064] 数字范围包括限定该范围的数字。

[0065] 本文所讨论的出版物仅是对于其在本专利申请的提交日期之前的公开内容而提供的。本文中的任何内容均不应理解为承认此类出版物构成本文所附权利要求的现有技术。

[0066] 本文公开的方法和系统可由兽医、医护专业人员、实验室技术人员、宠物护理提供者等使用。

[0067] 受试者

[0068] 本方法针对犬受试者。因此，本发明的受试者是狗。

[0069] 在一个另选的方面，受试者可以是猫科动物受试者。因此，在本发明的另选方面，受试者是猫。除非另有说明，否则本文所有公开内容同样适用于猫。

[0070] 品种

[0071] 本方法可利用关于狗的品种的信息。例如，狗可分类为玩赏型、小型、中型、大型或

巨型品种。合适地,可基于狗的重量对狗品种进行分类。合适地,可基于给定品种的狗的平均重量对狗品种进行分类。

[0072] 合适地,狗可被分类为小型或中型品种。合适地,分类由该品种的成年狗的平均重量确定。合适地,平均重量低于10kg的品种被分类为小型品种和/或平均重量高于10kg的品种被分类为中型品种。

[0073] 在受试者是猫的另选方面,猫可以是家猫。合适地,猫可以是家养短毛猫。

[0074] 性别

[0075] 合适地,狗的性别可被分类为雄性或雌性。

[0076] 实足年龄

[0077] 实足年龄可定义为从受试者出生到给定日期所经过的时间量。实足年龄可用年、月、日等来表示。

[0078] 合适地,本方法可应用于任何实足年龄的狗。在某些实施方案中,狗可为至少约2岁大。合适地,狗可为至少约2岁大、至少约3岁大、至少约4岁大、至少约5岁大、至少约6岁大、至少约7岁大、至少约8岁大、至少约9岁大或至少约10岁大。

[0079] 合适地,狗可为至少约7岁大。

[0080] 样本

[0081] 本发明包括提供或确定来自从受试者获得的一个或多个样本的DNA甲基化图谱的步骤。

[0082] 合适地,样本是血液、毛囊、口腔拭子、唾液或组织样本。

[0083] 合适地,样本是毛囊、口腔拭子或唾液样本。如果例如在兽医环境之外提供样本——例如使用根据本发明的试剂盒,则此类样本类型是特别适用的。

[0084] 合适地,样本源自血液。样本可包含血液成分或可以是全血。样本优选包括全血。样本可包括外周血单核细胞(PBMC)或淋巴细胞样本。从受试者收集样本并从样本中提取DNA(例如基因组DNA)的技术是本领域熟知的。

[0085] 可对从受试者获得的一个或多个样本执行本方法。例如,可使用在给定时间点获得的第一样本和在获得第一样本后的时间间隔之后获得的第二样本来执行该方法。可对在一段时间内从同一只狗获得的样本执行该方法不止一次。例如,可每月一次、每年一次或每两年一次重复获得样本。合适地,样本可大约每年获得一次(例如,在年度兽医健康检查期间)。这可能有助于确定特定治疗或生活方式改变,诸如膳食干预或运动方案改变的效果。

[0086] 在一个实施方案中,该方法可应用于在生活方式改变(例如膳食产品干预或运动方案改变)之前从受试者获得的样本。在另一个实施方案中,该方法可应用于在例如膳食产品干预或运动方案改变之前和之后从受试者获得的样本。该方法还可应用于在例如整个膳食产品干预或运动方案改变的过程中的预定时间获得的样本。这些预定时间在例如整个膳食产品干预或运动方案改变的过程中可以是周期性的,例如每天或每三天,或者可取决于所测试的受试者。

[0087] DNA甲基化

[0088] DNA甲基化是将甲基基团(CH_3)共价添加到作为DNA分子一部分的胞嘧啶碱基上的过程。在体内,该过程由DNA甲基转移酶(Dnmt)家族催化,其通过从S-腺苷甲硫氨酸(SAM)转移甲基基团而产生修饰的胞嘧啶。胞嘧啶在第5个碳原子上被修饰,并且修饰的残基称为5-

甲基胞嘧啶 (5mC)。DNA甲基化也可包括5-羟甲基胞嘧啶 (5hmc)。

[0089] DNA甲基化是表观遗传机制的一个示例,即它能够在不修饰潜在DNA序列的情况下修饰基因表达。DNA甲基化可例如通过充当抑制因子的募集信号或通过直接阻断转录因子募集来抑制基因的表达。DNA甲基化主要发生在哺乳动物体细胞的基因组中形成二核苷酸 (CpG) 的相邻胞嘧啶和鸟嘌呤的位点处。虽然在胚胎发育中观察到非CpG甲基化,但在成人中这些修饰在大多数细胞类型中大大减少。CpG岛是具有高CpG密度但通常未甲基化的DNA片段。这些区域与启动子区域,特别是管家基因的启动子区域相关联,并且被认为保持在允许基因表达的允许状态。

[0090] 已经发现DNA甲基化在人类和其他动物中随年龄而变化。老化的哺乳动物组织显示总体DNA低甲基化,这被认为是由于DMNT1甲基转移酶活性的逐渐丧失或错误靶向,但CpG岛的局部超甲基化。局部超甲基化可导致某些基因的抑制,并且这可促成年龄相关疾病。DNA甲基化的表观遗传变化与年龄之间的联系允许使用“DNA甲基化时钟”来估计“生物学年龄”。通常使用监督机器学习方法针对实足年龄来训练这些时钟,并且“时钟年龄”与个体的实际实足年龄的偏差被认为是“生物学”年龄的指标。这与个体的实足年龄相关,但与相关性的偏差可指示个体中年龄相关疾病或疾患的潜在风险。

[0091] 特异性甲基化的DNA的检测可通过多种方法完成(参见例如Zuo等人,2009; Epigenomics.1(2):331-345)和Rauluseviciute等人;Clinical Epigenetics;2019;11(193))。许多方法可用于检测样本(诸如血液、尿液、粪便或唾液)中特定基因座处的差异甲基化的DNA。这些方法能够将5-甲基胞嘧啶或甲基化的DNA与未非甲基化的DNA区分开,并随后对特定基因组位点的甲基化和未甲基化的DNA的比例进行量化。

[0092] 本方法可包括使用任何合适的方法来确定狗的DNA甲基化图谱。合适的方法包括但不限于下文所述的那些。

[0093] 酶促甲基化测序法 (EM-seq)

[0094] 合适地,酶促方法用于检测5mC和5hmc。举例来说,可使用酶促甲基化测序法 (EM-seq)。

[0095] 通常在EM-seq中,在第一个酶促步骤中,通过Tet甲基胞嘧啶双加氧酶2 (TET2) 的活性将5mC氧化为5hmc,然后氧化为5fC,最后氧化为5caC。此外,T4-BGT酶的使用使预先存在的5hmc和由TET2活性产生的5hmc两者糖基化。在第二个酶促步骤中,在双链DNA变性后,使用酶载脂蛋白B mRNA编辑酶催化多肽样3A (APOBEC3A) 来使胞嘧啶脱氨基,但不能使5mC和5hmc的氧化或糖基化形式脱氨基。只有未甲基化的胞嘧啶被脱氨基形成尿嘧啶碱基。在第一个酶促步骤之前,DNA片段可由机械剪切和末端修复、A-加尾以及连接至测序衔接子来产生,这可使用例如**NEBNext**[®] DNA Ultra II试剂 (NEB) 来进行。在第二个酶促步骤后,可通过PCR反应,使用可扩增含有尿嘧啶的模板的聚合酶(诸如**NEBNext**[®] Q5U[™]) 来扩增脱氨基的单链DNA,并且可以与通过亚硫酸氢盐测序产生的DNA样本相同的方式对所得文库进行测序或分析。EM-seq的输出通常与全基因组亚硫酸氢盐测序相同,但使用较少的DNA损伤试剂,这因此减少样本损失,并且在胞嘧啶甲基化调用的覆盖率、灵敏度和准确度方面可优于亚硫酸氢盐转化制备的样本。例示性EM-seq方法由Vaisvila等人 (Genome Research; 2021;31:1-10) 所述。

[0096] 基于亚硫酸氢盐转化的方法

[0097] 当用亚硫酸氢钠处理时,亚硫酸氢盐转化利用未甲基化的胞嘧啶向尿嘧啶的选择性转化。变性的DNA用亚硫酸氢钠进行处理,亚硫酸氢钠将所有未修饰的胞嘧啶转化为尿嘧啶,并且随后的PCR扩增将这些残基转化为胸腺嘧啶。分析产生的DNA序列可经由许多不同的方法进行,该方法的示例包括但不限于:变性凝胶电泳、单链构象多态性、解链曲线、荧光实时PCR(MethyLight)、MALDI质谱、阵列杂交和测序(例如全基因组亚硫酸氢盐测序WGBS)。最近开发的技术(诸如SeqCap Epi)在测序之前富集所关注序列,这使得能够在更集中的区域进行更深入的覆盖。亚硫酸氢盐转化的样本中的序列丰度与未处理的对照的序列丰度的比较允许分析靶位点处的甲基化,其中转化的序列的比例指示靶位点处的甲基化水平。

[0098] 亚硫酸氢盐转化方法的其他变型是可用的,其能够将5mC与氧化形式5-羟甲基胞嘧啶(5hmC)区分开,后者在标准亚硫酸氢盐转化下表现与5mC相同,并且能够检测进一步的修饰5-甲酰基胞嘧啶(5fC)。这些方法,诸如oxBS-Seq和redBS-Seq,利用这些标志物的氧化和还原来改变每种物质对亚硫酸氢盐转化的敏感性,并且通过比较分析来量化靶基因座处的每种修饰的量。

[0099] 选择性限制性核酸内切酶消化方法

[0100] 存在的分析DNA甲基化模式的方法可涉及限制性酶的使用。这些方法包括例如限制性界标基因组扫描(RLGS)(Costello等人,2000;Nat Genet.;24(2):132-8)、甲基化敏感性代表性差异分析(MS-RDA)(Ushijima等人,Proc Natl Acad Sci U S A.1997年3月18日;94(6):2284-9)和差异甲基化杂交(DMH)(Huang等人,Cancer Res.1997年3月15日;57(6):1030-4)。限制性核酸内切酶的消化活性可以是甲基化依赖性的。这种特异性可用于区分甲基化的序列和未甲基化的序列。某些限制性酶(例如BstUI、HpaII和NotI)对甲基化的识别序列敏感。其他限制性酶(诸如McrBC)对甲基化的序列具有特异性。

[0101] 例如,差异甲基化杂交(DMH)(Huang等人,如上所述)需要用大量基因组限制性酶(诸如MseI)对基因组进行初始片段化,该酶将基因组片段化为小于200bp的长度。在该步骤后,使用甲基化敏感的限制性核酸内切酶(MRE)或在该技术的一些版本中使用MRE的混合物来对基因组片段进行消化以改善覆盖率。根据所使用的一种或多种酶的特异性,甲基化的序列或未甲基化的序列将被降解。消化的序列在随后的PCR步骤中不会被扩增。所得PCR产物适用于通过测序或微阵列杂交与荧光染料的组合进行进一步处理和分析。

[0102] 合适地,本方法利用通过包括使用一种或多种MRE的方法产生的DNA甲基化图谱。

[0103] 合适的比较物可用于研究条件之间的甲基化状态。可将来自健康受试者的DNA与老年或患病受试者进行比较以检测甲基化状态的变化(Huang等人,Hum Mol Genet.1999年3月;8(3):459-70)。另选地,甲基化不敏感形式的二级消化酶(诸如HpaII同裂酶MspI)可用于产生对照样本,使得可进行基因组内或基因组间DNA甲基化比较(Khulan等人,Genome Res.2006年8月;16(8):1046-55)。

[0104] 在一些实施方案中,用于检测甲基化的方法包括对基因组DNA进行随机剪切或随机片段化,用甲基化依赖性或甲基化敏感的限制性酶切割DNA,随后选择性鉴定和/或分析切割或未切割的DNA。选择性鉴定可包括例如分离切割和未切割的DNA(例如,通过大小)并对切割的或另选地未切割的所关注序列进行量化。另选地,该方法可涵盖在限制性酶消化后扩增完整的DNA,从而仅扩增在扩增区域中未被限制性酶切割的DNA。在一些实施方案中,可使用基因特异性的引物进行扩增。另选地,可将衔接子添加到随机片段化的DNA的末端,

可用甲基化依赖性或甲基化敏感的限制性酶对DNA进行消化,可使用与衔接子序列杂交的引物来扩增完整的DNA。在这种情况下,可进行第二步以确定DNA扩增池中的特定基因的存在、不存在或量。在一些实施方案中,使用实时定量PCR来扩增DNA。

[0105] 合适地,通过探针或引物与未消化的核酸的选择性杂交来检测核酸的消化。另选地,探针选择性地与消化的核酸和未消化的核酸两者杂交,但例如通过电泳促进两种形式之间的区分。用于实现与杂交探针的选择性杂交的合适的检测方法包括例如Southern或其他核酸杂交。

[0106] 合适的杂交条件可基于包含探针的核酸双链体的解链温度(T_m)来确定。本领域技术人员将意识到,对于每种探针,最佳杂交反应条件应根据经验确定,但可应用一些一般性原则。优选地,以低至中等严格性进行采用短寡核苷酸探针的杂交。在富含GC的探针或引物或更长的探针或引物的情况下,高严格性杂交和/或洗涤是优选的。高严格性在本文中定义为在约 $0.1 \times$ SSC缓冲液和/或约0.1% (w/v) SDS或更低盐浓度中和/或在至少65°C的温度或等效条件处进行的杂交和/或洗涤。本文提及的特定严格性水平涵盖使用除本领域技术人员已知的SSC以外的洗涤/杂交溶液的等效条件。

[0107] 基于亲和力富集的方法

[0108] 通过使用含有甲基-CpG-结合结构域(MBD)的抗体(诸如抗5mC和/或甲基化的CpG结合蛋白)可实现甲基化的DNA与未甲基化的DNA的区分。MBD-结构域蛋白的抗体能够相对于未甲基化的DNA特异性分离甲基化的DNA。利用抗体的方法通常称为MeDIP,而利用甲基化的CpG结合蛋白的方法通常称为MBD或MIRA方法。

[0109] 这些方法需要基因组的初始片段化,这可通过用频繁切割的酶(诸如MseI)进行大量基因组消化,随后进行甲基化的片段的亲和纯化来进行。可通过微阵列杂交或测序将输入DNA与纯化的甲基化的DNA进行比较,以获得特定位点处的甲基化水平的比较分析。

[0110] 基于亲和力富集的方法的其他变型是可用的,诸如MethylCap-Seq或MBD-Seq。这些方法通过使用盐梯度以甲基-CpG-丰度依赖性方式洗脱甲基化的DNA片段,将CpG岛和其他高度甲基化的基因座与CpG密度较低的基因座分离来降低样本复杂性。然后可分别对这些部分进行测序,从而提高序列覆盖率。

[0111] 基于单分子测序的方法

[0112] 当代测序方法能够直接对单个分子进行测序。单分子实时(SMRT)DNA测序是可用的,例如来自Pacific Biosciences的Sequel系统,并且已经显示能够基于聚合酶动力学鉴定修饰的碱基(诸如甲基化的胞嘧啶)。能够对长链DNA进行单独测序的纳米孔测序装置(诸如来自Oxford Nanopore Technologies的MinION纳米孔测序仪)也能够检测碱基修饰,包括甲基化。

[0113] DNA甲基化位点

[0114] 合适地,DNA甲基化位点可以指在单个胞嘧啶,合适地单个CpG二核苷酸处存在或不存在5mC。

[0115] 合适地,DNA甲基化位点可以指跨DNA区域内的多个CpG位点的甲基化的存在或不存在(即5mC的数目或5mC的百分比)。合适地,DNA位点甲基化位点可以指跨DNA区域内的多个CpG位点的甲基化水平(即5mC的数目或5mC的百分比)。“DNA区域”可以指基因组DNA的特定部分。这些DNA区域可通过参考基因名称或一组染色体坐标来指定。基因名称和染色体坐

标两者是本领域技术人员熟知和理解的。

[0116] 合适地,基因名称和/或坐标可基于“Tasha”狗参考基因组(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000002285.5;Jagannathan等人;Genes (Bsacl); 2021;12(6);847)。

[0117] 例如,DNA区域可限定基因的启动子附近的DNA部分。已知启动子区域富含CpG。举例来说,DNA区域可以指启动子上游约3kb至下游约3kb;上游约2kb至下游约2kb;上游约2kb至下游约1kb;上游约2kb至下游约0.5kb;上游约1kb至下游约0.5kb;上游约0.5kb至下游约0.5kb。合适地,DNA区域可以指启动子上游约1kb至下游约0.5kb。

[0118] 合适地,DNA区域可包含相隔小于约5000个、小于约4000个、小于约3000个、小于约2000个、小于约1000个、小于约500个或小于约200个碱基的CpG位点或由其组成。

[0119] 合适地,DNA区域可包含相隔约200至约5000个、约200至约4000个、约200至约3000个、约200至约2000个或约200至约1000个碱基的CpG位点或由其组成。

[0120] 合适地,DNA区域可包含一个或多个CpG岛。合适地,DNA区域可由CpG岛组成。

[0121] “CpG岛”可以指包含至少200bp、GC百分比大于50%和观察到的与预期的CpG比率大于60%的DNA区域。

[0122] 合适地,DNA甲基化位点不包含X和/或Y染色体CpG。

[0123] 合适地,DNA甲基化位点不包含已知在CpG处包含SNP的CpG。

[0124] 对上文详述的每个基因/DNA区域的引用应理解为对这些分子的所有形式及其片段或变体的引用。如本领域技术人员所理解的,已知一些基因在个体之间表现出等位基因变异或单核苷酸多态性。变体包括来自共享至少90%、95%、98%、99%序列同一性的相同区域的核酸序列,即相对于本文所述的DNA区域具有一个或多个缺失、添加、取代、反向序列等。因此,本发明应被理解为延伸到此类变体,就本申请而言,尽管个体之间可能存在实际核酸序列之间的微小遗传变异,但这些变体仍能实现相同的结果。因此,本发明应被理解为延伸到由任何其他突变、多态性或等位基因变异产生的所有形式的DNA。

[0125] 就筛选这些基因区域的甲基化而言,应当理解,该测定可设计成筛选特定DNA。基于染色体坐标选择分析哪条链并靶向该链完全在本领域技术人员的技能范围内。在一些情况下,可建立测定来筛选两条链。

[0126] “甲基化状态”可理解是指是在DNA区域内的一个或多个特定核苷酸处甲基化的存在、不存在和/或量。特定DNA序列(例如如本文所述的DNA区域)的甲基化状态可指示序列中每个碱基的甲基化状态或者可指示序列内碱基对的子集的甲基化状态(例如胞嘧啶的甲基化状态或一种或多种特定限制性酶识别序列的甲基化状态),或者可指示关于序列内的区域性甲基化密度的信息而不提供序列中何处发生甲基化的确切信息。甲基化状态可任选地由“甲基化值”表示或指示。

[0127] 合适地,可使用EM-Seq策略来确定DNA甲基化。在这种方法中,可将甲基化水平确定为在酶和APOBEC3A转化处理后在靶CpG位点“i”处的“C”+“U”总碱基中的“C”碱基的分数。在其他实施方案中,可将甲基化水平确定为在酶和APOBEC3A转化处理以及随后的核苷酸扩增后在位点“i”处的“C”+“T”总碱基中的“C”碱基的分数。然后可评价每个位点处的平均甲基化水平以确定是否满足一个或多个阈值。

[0128] 在一些实施方案中,特别是当使用亚硫酸氢盐转化和测序方法时,可将甲基化水

平确定为在亚硫酸氢盐处理后在靶CpG位点“i”处的“C”+“U”总碱基中的“C”碱基的分数。在其他实施方案中,可将甲基化水平确定为在亚硫酸氢盐处理和随后的核苷酸扩增后在位点“i”处的“C”+“T”总碱基中的“C”碱基的分数。然后可评价每个位点处的平均甲基化水平以确定是否满足一个或多个阈值。

[0129] 另选地,可例如通过对在用甲基化依赖性限制性酶进行限制性消化后存在的完整DNA的量进行定量来产生甲基化值。在该示例中,如果使用定量PCR对DNA中的特定序列进行定量,则约等于模拟处理的对照的模板DNA的量表明该序列不是高度甲基化的,而基本上小于模拟处理的样本中出现的模板的量表明该序列处存在甲基化的DNA。因此,例如来自上述示例的值(即甲基化值)表示甲基化状态,因此可用作甲基化状态的定量指标。当需要将样本中序列的甲基化状态与阈值进行比较时,这是特别有用的。

[0130] 本发明不受被认为指示生物学年齡的甲基化残基的确切数目的限制,因为样本之间将发生一些变化。本发明也不必受甲基化残基(例如,特定甲基化位点)的定位限制。

[0131] 在一个实施方案中,可采用筛选方法,该方法特异性地针对评估一个或多个特定胞嘧啶残基或相对DNA链上位置n+1处的对应胞嘧啶的甲基化状态。

[0132] 富集和检测方法

[0133] 确定DNA甲基化图谱可包括富集DNA样本中所选DNA区域的步骤。例如,该方法可包括富集DNA样本中包含DNA甲基化位点的DNA区域的步骤,该DNA甲基化位点包含DNA甲基化图谱。

[0134] 合适的富集方法是本领域已知的并且包括例如基于扩增或杂交的方法。扩增富集通常是指例如使用针对待富集的DNA区域的引物的基于PCR的富集。可使用任何合适的扩增形式,例如聚合酶链反应(PCR)、滚环扩增(RCA)、反向聚合酶链反应(iPCR)、原位PCR、链置换扩增或循环探针技术。

[0135] 杂交富集或基于捕获的富集通常是指使用与待富集的DNA区域杂交的杂交探针(或捕获探针)。

[0136] 杂交探针可直接附接到固体载体,或者可包含一个部分,例如生物素,以允许与适用于捕获生物素部分的固体载体(例如包被有链霉亲和素的珠子)结合。在任何情况下,可捕获包含与探针互补的序列的DNA,从而允许将包含所关注DNA区域的DNA与不包含所关注DNA区域的DNA分开。因此,此类捕获步骤允许富集所关注DNA区域。例如,DNA区域可以是接近基因启动子的DNA区域。

[0137] 本文所用的阵列可根据探针组成和阵列的期望用途而变化。例如,在阵列中检测到的核酸(或CpG位点)可以是至少10个、100个、1,000个、10,000个、10万个、100万个、1000万个、1亿个或更多。另选地或另外地,检测到的核酸(或CpG位点)可选择为不超过1亿个、1000万个、100万个、10万个、10,000个、1,000个、100个或更少。使用核酸测序方法,诸如本领域已知的那些;例如下一代或大规模平行测序,可获得类似的范围。

[0138] 合适地,富集步骤可在分离或区别处理甲基化和未甲基化的DNA的步骤之前或之后进行。

[0139] 如本文所用,术语“富集”或者“DNA”或“DNA区域”的“富集”意指与起始材料中包含期望序列的DNA的量和/或比例相比,包含期望序列的DNA的(绝对)量和/或比例增加的过程。就这一点而言,通过扩增进行的富集增加了期望序列的量和比例。通过基于捕获的富集

进行的富集增加了包含期望序列的DNA的比例。

[0140] 在处理DNA以区分甲基化和未甲基化的位点后,本方法还可包括鉴定甲基化或未甲基化的位点(即在原始样本中)的步骤。

[0141] 鉴定步骤可包括本领域已知的任何合适的方法,例如阵列检测或测序(例如下一代测序)。

[0142] 测序鉴定步骤优选包括下一代测序(大规模平行或高通量测序)。下一代测序方法是本领域熟知的,并且原则上,任何方法都可考虑用于本发明。下一代测序技术可根据制造商的说明书(例如由Roche、Illumina或Applied Biosystems提供)进行。

[0143] 在一个优选的实施方案中,通过使用酶促反应转化DNA甲基化、进行全基因组文库制备以及由测序(EM-Seq)测量甲基化图谱来处理样本。

[0144] 在一个特别优选的实施方案中,通过使用酶促反应转化DNA甲基化、进行全基因组文库制备、将全基因组转化的文库制备物与捕获探针(优选能够捕获基因启动子附近的DNA区域的捕获探针)杂交;以及由测序(EM-Seq)测量甲基化图谱来处理样本。

[0145] DNA甲基化图谱

[0146] “DNA甲基化图谱”或“甲基化图谱”可以指在一个或多个DNA甲基化位点处5mC的存在、不存在、量或水平。优选地,“甲基化图谱”是指多个DNA甲基化位点处5mC的存在、不存在、量或水平。因此,可评估多个位点内每个单独的DNA甲基化位点处5mC的存在、不存在、量或水平,并且有助于确定狗的生物年龄。因此可通过组合来自多种DNA甲基化标志物的值来改善该方法的质量和/或功效。

[0147] 合适地,本发明的生物时钟包含来自多个甲基化位点的甲基化图谱。

[0148] 合适地,来自至少3个、至少5个、至少10个、至少20个、至少50个、至少100个、至少200个、至少500个、至少1000个、至少2000个、至少5000个、至少10000个、至少50000个、至少100000个或至少500000个DNA甲基化位点的5mC的存在或不存在可用于确定狗的生物年龄。

[0149] 合适地,甲基化图谱可以指来自至少100个、至少200个、至少500个、至少1000个或至少2000个DNA甲基化位点的5mC的存在或不存在。

[0150] 合适地,甲基化图谱可以指来自约100个、约200个、约500个、约1000个或约2000个DNA甲基化位点的5mC的存在或不存在。

[0151] 为了产生生物时钟,可处理或简化初始甲基化图谱以产生限制性甲基化图谱,然后将其用于产生生物时钟。

[0152] 举例来说,可通过例如使用DNA区域而不是单个胞嘧啶,通过选择与特定生理或生化途径相关联的甲基化位点的子集,进行相关性分析并保留每个簇的一个或多个代表性DNA甲基化位点,或进行差异分析以预先选择DNA甲基化位点或保留在年轻狗和年长狗之间变化更大的DNA甲基化位点来处理或简化初始甲基化图谱,

[0153] 例如,DNA区域可以是如本文所定义的任何DNA区域。

[0154] 合适地,甲基化图谱可以指与特定生理或生化途径相关联的基因的DNA甲基化位点。因此,甲基化图谱可以使得能够确定特定组织、器官或生理系统的生物年龄。确定特定组织、器官或生理系统的生物年龄可有利地允许以集中于该组织、器官或生理系统的病理和疾病的方式使用该方法。例如,如果已知特定品种的狗与肌肉或心血管疾病相关联,

则确定该生理系统的生物年龄可能是有利的。

[0155] 合适地,生理系统可以是免疫系统、胃肠系统、泌尿系统、肌肉系统、心血管系统和/或神经系统。

[0156] 特定组织、器官或生理系统的生物年龄可使用DNA甲基化图谱来确定,该DNA甲基化图谱包含来自该组织、器官或生理系统优先或特异性表达的基因的甲基化位点或由其组成。通过特定组织、器官或生理系统对基因的分类可在例如Gene Ontology (<http://geneontology.org/>)、KEGG途径数据库 (<https://www.genome.jp/kegg/>) 或MSigDB (<https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/index.jsp>) 处公开获得。

[0157] 在一些实施方案中,阈值选择对于表观遗传年龄预测因子具有最高排序的平均甲基化值的那些位点。例如,阈值可以是具有平均甲基化水平的那些位点,该平均甲基化水平是针对预测因子(例如生物时钟)测试的所有位点“i”的平均甲基化水平的前50%、前40%、前30%、前20%、前10%、前5%、前4%、前3%、前2%或前1%。

[0158] 另选地,阈值可以是平均甲基化水平处于大于或等于50、60、70、80、90、95、96、97、98或99的百分等级的那些位点。在其他实施方案中,阈值可基于平均甲基化水平的绝对值。例如,阈值可以是平均甲基化水平大于99%、大于98%、大于97%、大于96%、大于95%、大于90%、大于80%、大于70%、大于60%、大于50%、大于40%、大于30%、大于20%、大于10%、大于9%、大于8%、大于7%、大于6%、大于5%、大于4%、大于3%或大于2%的那些位点。相对阈值和绝对阈值可单独或组合应用于每个位点“i”处的平均甲基化水平。作为组合阈值应用的说明,可选择在通过平均甲基化水平测试的所有位点的前3%中并且还具有大于6%的绝对平均甲基化水平的位点的子集。该选择过程的结果是特定超甲基化位点(例如,CpG位点)的DNA甲基化图谱,其被认为对生物年龄确定最具信息性。

[0159] 合适地,DNA甲基化图谱可包含至少一个如表1中所列的甲基化位点。

[0160] 合适地,甲基化位点可定义为存在于SEQ ID NO:1-255中的任一者或多者中的甲基化标志物。SEQ ID NO:1-255显示了“Tasha”狗参考基因组中甲基化标志物的任一侧的序列(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000002285.5; Jagannathan等人; Genes (Bsacl); 2021; 12 (6); 847)。“CG”甲基化标志物是序列中的第26个和第27个核苷酸(即在甲基化标志物之前有25个核苷酸,在甲基化标志物之后有25个核苷酸)。

[0161] 合适地,甲基化位点可定义为表1中标记为“位点”的列中的插入位置。例如,对于位点chr1:32205238-32205240,甲基化标志物是chr1:32205239。合适地,DNA甲基化图谱可包含至少3个、至少5个、至少10个、至少20个、至少50个、至少100个、至少150个、至少200个或优选地如表1中所列的甲基化位点中的每个甲基化位点。

[0162] 合适地,DNA甲基化图谱可包含甲基化位点chr2.32494387.32494389; chr6.45773846.45773848;和chr16.8886545.8886547。这些位点在表2中示出。

[0163] 合适地,DNA甲基化图谱可包含甲基化位点chr2.32494387.32494389; chr6.45773846.45773848;chr16.8886545.8886547;chr5.61645225.61645227;和chr15.10856498.10856500。这些位点在表3中示出。

[0164] 合适地,DNA甲基化图谱可包含甲基化位点chr2.32494387.32494389; chr6.45773846.45773848;chr16.8886545.8886547;chr5.61645225.61645227; chr15.10856498.10856500;chr33.26512711.26512713;chr20.57347921.57347923;

chr12.12684190.12684192;chr24.30860619.30860621;和chr33.26512692.26512694。这些位点在表4中示出。

[0165] 合适地,DNA甲基化图谱可包含甲基化位点chr2.32494387.32494389;chr6.45773846.45773848;chr16.8886545.8886547;chr5.61645225.61645227;chr15.10856498.10856500;chr33.26512711.26512713;chr20.57347921.57347923;chr12.12684190.12684192;chr24.30860619.30860621;chr33.26512692.26512694;chr10.7411293.7411295;chr1.22213697.22213699;chr5.32711703.32711705;chr24.21051024.21051026;chr5.21480151.21480153;chr17.33851462.33851464;chr3.46843750.46843752;chr13.37474592.37474594;chr33.19810904.19810906;和chr20.44942213.44942215。这些位点在表5中示出。

[0166] 合适地,DNA甲基化图谱可包含甲基化位点chr2.32494387.32494389;chr6.45773846.45773848;chr16.8886545.8886547;chr5.61645225.61645227;chr15.10856498.10856500;chr33.26512711.26512713;chr20.57347921.57347923;chr12.12684190.12684192;chr24.30860619.30860621;chr33.26512692.26512694;chr10.7411293.7411295;chr1.22213697.22213699;chr5.32711703.32711705;chr24.21051024.21051026;chr5.21480151.21480153;chr17.33851462.33851464;chr3.46843750.46843752;chr13.37474592.37474594;chr33.19810904.19810906;chr20.44942213.44942215;chr20.54301453.54301455;chr35.23852932.23852934;chr6.60675998.60676000;chr22.46374563.46374565;chr24.12518910.12518912;chr16.8886356.8886358;chr21.43490796.43490798;chr11.53576970.53576972;chr4.36180013.36180015;chr4.43217432.43217434;chr9.35985983.35985985;chr32.40409729.40409731;chr23.37987526.37987528;chr18.44679236.44679238;chr21.16233628.16233630;chr10.18237423.18237425;chr30.8031060.8031062;chr1.121182146.121182148;chr9.50976682.50976684;chr14.58424689.58424691;chr20.49940551.49940553;chr2.31655107.31655109;chr18.46990963.46990965;chr20.46098568.46098570;chr10.68649436.68649438;chr9.25415871.25415873;chr14.39735273.39735275;chr11.33523800.33523802;chr5.32347978.32347980;和chr19.44679975.44679977。

[0167] 指示生物学年龄的DNA甲基化位点/DNA甲基化图谱的确定

[0168] 本发明包括利用DNA甲基化图谱来确定狗的生物学年龄。因此,本发明包括利用DNA甲基化图谱来产生生物时钟。本发明的生物时钟也可称为“表观遗传时钟”。

[0169] 例如,可通过训练数据集和机器学习方法来实现指示生物学年龄的DNA甲基化位点或DNA甲基化图谱的提供。合适地,机器学习方法可以是监督机器学习方法。

[0170] 举例来说,DNA甲基化位点或DNA甲基化图谱可针对包括具有已知实足年龄的狗的数据集进行训练。合适地,DNA甲基化位点或DNA甲基化图谱可针对包括具有已知实足年龄与已知品种和/或性别的组合的狗的数据集进行训练。

[0171] 例如,可通过使用机器学习框架针对具有已知实足年龄的狗的训练数据集来训练多个DNA甲基化位点处的甲基化状态数据集,并且针对保留的队列进行测试以验证模型的准确性,来提供指示生物学年龄的DNA甲基化位点或DNA甲基化图谱的模型。

[0172] 机器学习框架可包括例如使用glmnet R包将惩罚回归拟合到具有已知实足年龄(以及任选的品种和/或性别)的狗的训练数据集。

[0173] 机器学习框架可包括例如使用glmnet R包将弹性网络回归拟合到具有已知实足年龄(以及任选的品种和/或性别)的狗的训练数据集。

[0174] 合适地,机器学习框架可包括拟合由DNA甲基化图谱(以及任选的品种、年龄和/或性别)解释的实足年龄的惩罚回归,诸如弹性网络回归。

[0175] 合适地,机器学习框架可包括拟合由DNA甲基化图谱、品种、年龄和性别解释的实足年龄的惩罚回归,诸如弹性网络回归。

[0176] 合适地,机器学习框架可用于确定包括指示生物学年齡的一组DNA甲基化位点或DNA甲基化图谱的模型。

[0177] 模型可包括多个DNA甲基化位点处的甲基化状态;其中在模型中通过乘以系数值来考虑每个位点处的甲基化状态。

[0178] 每个参数的系数值通常取决于模型中的所有变量的测量单位。如技术人员将理解,每个系数值的值因此将取决于例如模型中使用的不同参数的数量和性质以及所提供的训练数据的性质。因此,可将常规统计方法应用于训练数据集,以便得到系数值。

[0179] 合适地,性别可被编码为数值,其中0代表雌性,而1代表雄性。

[0180] 合适地,品种可被编码为数值,其中0代表小型品种,而1代表中型品种。

[0181] 合适地,机器学习平台可包括一个或多个深度神经网络。神经网络是在非循环图中连接的神经元(也称为单元)的集合。神经网络模型通常被组织成不同的神经元层。对于大多数神经网络,最常见的层类型是全连接层,其中两个相邻层之间的神经元完全成对连接,但单层内的神经元不共享连接。深度神经网络的主要特征之一是神经元由非线性激活函数控制。这种非线性与深度架构组合,使得输入特征的更复杂组合成为可能,最终导致对它们之间关系的更广泛理解,并因此导致更可靠的最终输出。深度神经网络已经应用于范围介于结构数据到化学描述符或转录组学数据的许多类型的数据。

[0182] 合适地,机器学习平台包括一个或多个生成式对抗网络。合适地,机器学习平台包括对抗自动编码器架构。合适地,机器学习平台包括特征重要性分析以用于通过DNA甲基化位点在生物学年齡确定中的重要性来对它们进行排序。

[0183] 狗的生物学年齡可用年、月、日等来表示。

[0184] 与参考或对照进行比较

[0185] 本方法还可包括将测试样本中一个或多个位点处的DNA甲基化差异与一个或多个参考或对照进行比较的步骤。参考或对照中一个或多个位点处的DNA甲基化的存在或不存在可能与预先定义的生物学年齡相关联。在一些实施方案中,参考值是之前针对具有已知生物学年齡的受试者或受试者群组获得的值。参考值可基于来自具有已知实足年龄、品种和/或性别的受试者群组的一个或多个位点处的已知DNA甲基化状态,例如平均或中值水平。

[0186] 将生物标志物水平与另外的量度和/或特性相组合

[0187] 合适地,本方法还包括通过DNA甲基化图谱与狗的品种和/或性别中的一者或多者的组合来解释实足年龄。

[0188] 受试者分类

[0189] 还可将通过本发明的方法确定的生物年龄与一个或多个预定的阈值(即与实足年龄的差异)进行比较。使用这种阈值,可将受试者分层到指示确定的风险(例如,低、中或高确定风险)的各个类别中。与阈值的发散程度可用于确定哪些个体将最受益于某些干预。这样,可优化膳食干预和生活方式改变。

[0190] 用于选择/监测受试者的生活方式方案、膳食方案或治疗干预的方法

[0191] 在另一个方面,本发明提供了用于为受试者选择生活方式方案、膳食方案或治疗干预的方法。生活方式的改变可以是本文所述的任何改变,例如膳食干预和/或运动方案的改变。生活方式的改变可以是治疗方式的施用。

[0192] 可在任何合适的时间段内将生活方式方案、膳食方案或治疗干预应用于狗。在所述一段时间后,可使用本方法再次确定狗的生物年龄,以便确定生活方式方案、膳食方案或治疗干预对改善狗的生物年龄的功效。举例来说,可应用生活方式方案、膳食方案或治疗干预至少2周、至少4周、至少8周、至少16周、至少32周或至少64周。可应用生活方式方案、膳食方案或治疗干预至少3个月、至少6个月、至少12个月、至少24个月、至少36个月、至少48个月或至少60个月。

[0193] 生活方式方案、膳食方案或治疗干预可称为抗衰老生活方式方案、膳食方案或治疗干预。

[0194] 优选地,该改变是如本文所述的膳食干预。术语“膳食干预”是指应用于受试者并引起受试者的饮食变化的外部因素。更优选地,膳食干预包括至少一种膳食产品或膳食方案或营养补充剂的施用。

[0195] 膳食方案可以是膳食、膳食方案、补充剂或补充剂方案或膳食和补充剂的组合,或膳食和多种补充剂的组合。

[0196] 本文所述的膳食干预或膳食产品可以是任何合适的膳食方案,例如热量限制饮食、老年饮食、低蛋白饮食、磷饮食、低蛋白饮食、钾补充剂饮食、多不饱和脂肪酸(PUFA)补充剂饮食、抗氧化剂补充剂饮食、维生素B补充剂饮食、液体饮食、硒补充剂饮食、 ω 3-6比例饮食、或补充有肉碱的饮食、支链氨基酸或衍生物、核苷酸、烟酰胺前体(诸如烟酰胺单核苷酸(MNM)或烟酰胺核苷(NR))或上述的任何组合。

[0197] 合适地,膳食干预或膳食产品可以是热量限制饮食、老年饮食或低蛋白饮食。合适地,膳食干预或膳食产品可以是热量限制饮食。合适地,膳食干预或膳食产品可以是低蛋白饮食。

[0198] 可基于狗的基线维持能量需求(MER)来确定膳食干预。合适地,MER可以是稳定狗体重(三周内变化小于5%)的食物量。

[0199] 举例来说,通常认为年轻的正在成长的狗受益于高能量/高蛋白饮食;然而,年长狗可能具有较低的能量需求,因此饮食可以适当调整。特别是,许多制造商生产“老年”系列狗粮,这种狗粮热量较低,纤维含量较高,但蛋白质和脂肪水平适合于年长狗。

[0200] 合适地,热量限制饮食可占狗MER的约50%、约55%、约60%、约65%、约75%、约80%、约85%或约90%。合适地,热量限制饮食可占狗MER的约60%或约75%。

[0201] 合适地,低蛋白饮食可包含少于20%的蛋白质(干物质%)。例如,低蛋白饮食可包含少于19%(干物质%)。

[0202] 这些饮食通常是基于狗的实足年龄而推荐的。例如,可能会推荐,让狗在7、8岁左

右改用老年饮食。然而,在本发明的上下文中,相比于在给定实足年龄的情况下所预期而确定狗的死亡风险增加可允许确定让狗在更早的年龄改用老年饮食。相比之下,与狗的实足年龄相比,死亡风险降低的狗可能能够更长时间地继续享用成年饮食。

[0203] 膳食干预可包括食物、补充物和/或饮料,其包含模拟热量限制(CR)的益处而不限制每日热量摄入的营养物和/或生物活性剂。例如,食品、补充剂和/或饮料可包含具有类似CR的益处的功能性成分。合适地,食物、补充物和/或饮料可包含自噬诱导剂。合适地,食物、补充剂和/或饮料可包含水果和/或坚果(或它们的提取物)。合适的示例包括但不限于石榴、草莓、黑莓、卡姆果、核桃、栗子、开心果、碧根果。合适地,食品、补充剂和/或饮料可包含益生菌,含或不含水果提取物或坚果提取物。

[0204] 改变受试者的生活方式还包括指示受试者需要改变生活方式,例如规定更多的运动。类似于膳食干预,相比于在给定实足年龄的情况下所预期而确定狗的死亡风险增加可允许确定让狗改用适当的运动方案。

[0205] 改变受试者的生活方式还包括推荐治疗方式或方案。治疗方式或方案可以是用于治疗 and/或预防例如关节炎、牙科疾病、内分泌病症、心脏病、糖尿病、肝病、肾病、前列腺病症、癌症以及行为或认知障碍的方式。合适地,预防性治疗可施用于由于生物学年龄增加而鉴定为处于此类病症的风险中的狗。在其他实施方案中,可更规律地监测由于生物学年龄增加而被确定为处于某些病状的风险中的狗,以便可尽可能早地开始诊断和治疗。

[0206] 本发明还涉及监测和/或确定抗衰老疗法的功效或开发抗衰老疗法。抗衰老疗法可包括例如“复壮”干预。复壮干预旨在引起受试者的表观遗传或生物学年龄的降低。合适地,复壮干预可将表观遗传年龄重新编程为非常年轻的狗的表观遗传年龄。此类复壮干预的示例包括但不限于合适地将表观遗传年龄重新编程为非常年轻的狗的表观遗传年龄的基因疗法。监测和/或确定生活方式方案、膳食方案或治疗干预的功效或开发生活方式方案、膳食方案或治疗干预以减少生物学年龄的本方法特别适用于该方面。

[0207] 因此,本发明可有利地实现对预期对给定干预(例如生活方式方案、膳食方案或治疗干预)反应特别好的狗的标识。因此,干预可以更有针对性的方式应用于预期有反应的狗。

[0208] 在一个方面,本发明提供了用于确定生活方式方案、膳食方案或治疗干预对改善狗的生物学年龄的功效的方法,所述方法包括:

[0209] a) 将生活方式方案、膳食方案或治疗干预应用于所述狗,其中已经根据本发明的第一方面选择所述生活方式方案、膳食方案或治疗干预;

[0210] b) 在将所述生活方式方案、膳食方案或治疗干预应用于所述狗一段时间后;使用来自从所述狗获得的样本的DNA甲基化图谱来确定所述狗的生物学年龄;

[0211] c) 在遵循所述生活方式方案、膳食方案或治疗干预的所述时间段后,确定所述狗的所述生物学年龄是否存在变化。

[0212] 在另一方面,本发明涉及用于确定生活方式方案、膳食方案或治疗干预对改善狗的生物学年龄的功效的方法,所述方法包括:

[0213] a) 使用来自从所述狗获得的样本的DNA甲基化图谱来确定所述狗的生物学年龄;

[0214] b) 将基于步骤a)中确定的所述生物学年龄选择的生活方式方案、膳食方案或治疗干预应用于所述狗;

[0215] c) 在将所述生活方式方案、膳食方案或治疗干预应用于所述狗一段时间后;使用来自从所述狗获得的样本的DNA甲基化图谱来确定所述狗的生物学年龄;

[0216] d) 确定所述狗的所述生物学年龄在步骤a) 和步骤c) 之间是否存在变化。

[0217] 在另一个方面,本发明涉及用于确定生活方式方案、膳食方案或治疗干预对改善狗的生物学年龄的功效的方法,所述方法包括:

[0218] a) 使用来自从所述狗获得的样本的DNA甲基化图谱来确定所述狗的第一生物学年龄;

[0219] b) 将生活方式方案、膳食方案或治疗干预应用于所述狗;

[0220] c) 在将所述生活方式方案、膳食方案或治疗干预应用于所述狗一段时间后;使用来自从所述狗获得的第二样本的DNA甲基化图谱来确定所述狗的第二生物学年龄;

[0221] d) 在遵循所述生活方式方案、膳食方案或治疗干预的所述时间段后,确定所述狗的所述第一生物学年龄和所述第二生物学年龄是否存在变化。

[0222] 合适地,在确定第一生物学年龄之前,可能已将生活方式方案、膳食方案或治疗干预应用于狗一段时间;然而,仍然可通过在生活方式方案、膳食方案或治疗干预的应用期间的两个或更多个时间确定生物学年龄来监测生活方式方案、膳食方案或治疗干预对改善狗的生物学年龄(例如减少生物学年龄、减少生物学年龄的增加或增加率)的有效性。

[0223] 合适地,本方法可包括“生态系统”;特别是数字生态系统。合适地,本方法可包括提供从狗获得的样本,任选地使用根据本发明的试剂盒;以及(b) 提供用于后续DNA提取的样本(例如通过邮寄)以用于测量从样本提取的DNA中的DNA甲基化,从而获得DNA甲基化图谱。

[0224] 然后可根据本方法中的任一种方法使用DNA甲基化图谱;优选地使用根据本发明的计算机系统或计算机程序产品。

[0225] 然后,计算机系统或计算机程序可以例如为狗选择或推荐合适的生活方式方案、膳食方案或治疗干预的形式准备并共享详述分析/方法的结果或本方法的任何其他结果的报告。

[0226] 合适地,样本可以是可由狗主人在家获得的样本(例如不需要兽医或医护专业人员)。合适地,样本可以是毛囊、口腔拭子或唾液样本。

[0227] 膳食干预的用途

[0228] 在一个方面,本发明提供了用于改善狗的生物学年龄的膳食干预,其中将膳食干预施用于具有通过本方法确定的生物学年龄的狗。

[0229] 在另一方面,本发明提供了膳食干预在改善狗的生物学年龄中的用途,其中将膳食干预施用于具有通过本方法确定的生物学年龄的狗。

[0230] 如本文所述,膳食干预可以是膳食产品或膳食方案或营养补充剂。

[0231] 计算机程序产品

[0232] 本方法可使用计算机来执行。因此,本方法可在计算机上执行。

[0233] 合适地,计算机可准备并共享详述本方法的结果的报告。

[0234] 本文所述的方法可实施为在通用硬件诸如一个或多个计算机处理器上运行的计算机程序。在一些实施方案中,本文所述的功能可通过诸如智能手机、平板终端或个人计算机的装置实施。

[0235] 在一个方面,本发明提供了计算机程序产品,该计算机程序产品包括计算机可实施指令,这些计算机可实施指令用于使可编程计算机如本文所述地确定狗的生物年龄。

[0236] 在另一方面,本发明提供了计算机程序产品,该计算机程序产品包括计算机可实施指令,这些计算机可实施指令用于使装置使用来自狗的DNA甲基化图谱来确定狗的生物年龄;以及任选地基于使用DNA甲基化图谱来确定的生物年龄来为狗选择合适的生活方式方案、膳食方案或治疗干预。还可将狗的附加参数或特性提供给计算机程序产品。如本文所述,附加参数或特性可包括实足年龄、品种和性别。

[0237] 在一个实施方案中,使用者向装置输入如本文定义的DNA甲基化标志物中的一种或多种DNA甲基化标志物的水平,任选地连同实足年龄、品种和性别一起输入。装置然后处理该信息并提供狗的生物年龄的确定。另选地,装置然后处理该信息并基于生物年龄为狗提供合适的生活方式方案、膳食方案或治疗干预的确定。

[0238] 该装置通常可以为网络上的服务器。然而,可使用任何装置,只要其可使用处理器、中央处理单元(CPU)等处理生物标志物数据和/或附加参数或特性即可。例如,装置可以是智能电话、平板终端或个人计算机,并且输出指示所确定的狗的生物年龄或基于生物年龄的狗的合适的生活方式方案、膳食方案或治疗干预的确定的信息。

[0239] 本领域的技术人员将理解,在不脱离本文所公开的本发明范围的前提下,他们可以自由地组合本文所述的本发明的所有特征。

[0240] 实施例

[0241] 现将通过实施例进一步描述本发明,这些实施例意在帮助本领域的技术人员实施本发明,而不以任何方式限制本发明的范围。

[0242] 实施例1-用于产生表观遗传生物时钟的例示性方法

[0243] DNA甲基化位点的鉴定

[0244] 通过进行DNA提取、通过使用酶促反应转化DNA甲基化、进行全基因组文库制备、将全基因组转化的文库制备物与针对基因启动子的捕获探针杂交以及由测序(EM-Seq)测量甲基化图谱来分析来自犬科动物队列的全血样本。

[0245] 捕获探针针对约40,000个靶标(启动子区域——启动子上游约1kb至下游0.5kb)。这些靶区域包含潜在的所关注的甲基化位点(可被甲基化的单个胞嘧啶残基)。

[0246] 在测序之后和进一步分析之前进行以下生物信息学步骤:

[0247] 使用fastQC进行fastq质量检查——<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>

[0248] 使用trimGalore进行衔接子修剪——https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/

[0249] 使用bwa-meth(<https://github.com/brentp/bwa-meth>) (或Bismark) 与狗基因组进行比对——<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/bismark/>

[0250] 使用Picard标记重复项——<https://gatk.broadinstitute.org/hc/en-us/articles/360037052812-MarkDuplicates-Picard->

[0251] 使用Methyldackel调用甲基化——<https://github.com/dpryan79/Methyldackel>

[0252] 用于过滤位点以产生用于训练生物时钟的限制性DNA甲基化图谱的方法

[0253] 在确定每个样本中的甲基化位点的甲基化状态后,可过滤/处理初始甲基化图谱以便产生包含较少离散甲基化位点的限制性甲基化图谱。这种过滤的目的是提供包含例如50000至500000个可用于训练生物时钟的甲基化位点的限制性甲基化图谱。

[0254] 用于过滤初始甲基化图谱的方法包括:

[0255] 1) 除去所有样本中(未)甲基化的位点

[0256] 2) 除去在至少90%的样本中不具有至少5个计数的位点

[0257] 3) 除去染色体X和/或Y位点

[0258] 减少离散甲基化位点数目的其他潜在过滤步骤包括:

[0259] 1) 将甲基化位点定义为DNA区域(CpG岛,相隔小于例如1000bp的位点被认为是相同的)

[0260] 2) 将靶标限制到例如炎症位点,例如与来自GO/KEGG途径的炎症相关联的基因,并选择这些基因上的位点

[0261] 3) 相关分析和每个簇的代表物的保留(例如,加权相关网络分析(WGCNA)(Langfelder&Horvath;BMC Bioinformatics;9(559);2008或EBModules(Zollinger等人;Biostatistics,19(2),153-168;(2018))。

[0262] 4) 差异甲基化分析以预先选择DNA甲基化位点(例如使用逻辑回归)或鉴定在年轻狗和年长狗之间变化更大的位点(例如使用方差分析)。如果进行差异甲基化分析(使用R中的函数preprocessQuantile),则在过滤步骤之前进行归一化(quantile)。

[0263] 产生生物时钟

[0264] 包括关于狗队列的实足年龄、品种和性别的信息的数据集被分成训练集和测试集(例如,2/3的数据用于训练,1/3的数据用于测试,从而确保关于元数据的良好划分;例如在训练集和测试集中每个品种/每个性别的类似比例)。

[0265] 在实足年龄和限制性DNA甲基化图谱、性别和品种之间拟合惩罚回归,以便鉴定与生物学年龄相关的DNA甲基化位点(即产生DNA甲基化生物时钟)。

[0266] 选择惩罚参数以提供合理数目的DNA甲基化位点(例如最多1000个),其具有对于生物学年龄的良好模型拟合。

[0267] 然后在测试集上评估基于DNA甲基化位点的生物学年龄模型。

[0268] 在本实施例中,进行以下步骤:

[0269] 1) 将具有少于15个计数覆盖的所有甲基化位点设定为“缺失”;

[0270] 2) 使用“Boostme”算法进行插补(Zou等人;BMC Genomics 19,390(2018))并且将训练集、测试集和验证集大小设定为200,000个随机选择的位点;

[0271] 3) 除去ChrX位点;

[0272] 4) 使用EBmodule进行位点过滤(Zollinger等人;Biostatistics,19(2),153-168;(2018));通过对每个靶标(TSS周围1500bp)和每个染色体的位点进行分组,将数据集分成约5000个位点的块。然后计算应用所述的EB模块的相关矩阵——如Zollinger等人所述。然后由medoid位点表示每个模块。一些位点不属于任何模块并且称为分散位点(如Zollinger等人所述那样定义);

[0273] 5) 除去存在于哺乳动物CpG阵列上的位点(Arneson等人;Nature Communications;13;783;2022);

[0274] 6) 使用实足年龄 (DNA收集时的年龄) 作为响应变量在500K位点上调整弹性网络回归, 这选择255个位点作为形成生物时钟的位点 (参见表1)。

[0275] 使用生物时钟预测的生物学年龄与实足年龄高度相关 (参见图1)。

[0276] 还使用热量限制研究验证了生物时钟 (参见图2)。变化量对应于使用生物时钟的实足年龄相对于预测的生物学年龄的回归模型的残差。与控制饮食的狗相比, 热量限制的狗被确定具有显著更低的生物学年龄 (更低的变化量) (图2)。

[0277] 进行单变量分析以确定255个位点中的每个位点单独在与生物学年龄相关方面是否具有统计学意义 (参见表1)。

[0278] 仅使用表1中示出的完整位点列表中的前3个、前5个、前10个、前20个和前50个位点还产生了进一步的生物时钟, 并且每个位点显示与生物学年龄相关 (参见图3-图7)。这些时钟是通过基于全时钟的系数的绝对值 (按降序, 首先取大系数) 选择前n个位点而产生的。使用前n个位点作为预测因子拟合分别解释实足年龄的线性模型。前3个、前5个、前10个和前20个时钟的细节在表2-表5中示出。

[0279] 在上述说明书中提到的所有出版物均以引用方式并入本文。在不脱离本发明的范围和实质的情况下, 本发明所公开的方法、组合物和用途的各种修改和变型对技术人员将是显而易见的。虽然已结合具体优选的实施方案对本发明进行了公开, 但是应当理解, 受权利要求书保护的本发明不应不当地受限于此类具体实施方案。实际上, 对技术人员显而易见的对用于实践本发明所公开的模式的各种修改旨在落在以下权利要求书的范围内。

[0280]

表 1

位点	系数	单变量分析 (p 值)	序列 (5mC 位点上游和下游的 25 个碱基)	SEQ ID NO.
截距	11.62197421	NA	NA	
chr1:32205238-32205240	-1 < x < 0	1.47E-36	GTTTCACTTCTTGTTCAGACAGCGCCTGTTTTCCGGATCATATTGTTCTC	1
chr1:22213697-22213699	>1	1.44E-81	TGACCCGAGGGAGCCGACCCCGGCCCGCGACGTTCACTCCGGGGGCGC	2
chr1:109309639-109309641	-1 < x < 0	3.25E-08	GCGTCCACCAAGAGCTGGGTGCTCCGACCTGGCCCAAGTATGTGGC	3
chr1:108982935-108982937	-1 < x < 0	2.70E-66	CTGAAGTCACTCCAGGCTAGAGGGGGGGGCAATCCCCCTCCCTGCAATCC	4
chr1:116329650-116329652	-1 < x < 0	1.39E-16	GATTGTCGGGAGGCCCTCGAGAGTCGGCCAGGCTTCGGGGTGCCCTGTGGGC	5
chr1:121182146-121182148	0 < x < 1	2.96E-18	CTGGCCCGGAAGGCGCAGGGCATCTCGATGTCTCTCCCTCCCGGACTGTCA	6
chr1:118453583-118453585	0 < x < 1	2.72E-17	AAGCCACAGGATTGGCACAAAGGTCGGGTGAGTGGGGTGGGATGCTCAGG	7
chr1:58324050-58324052	0 < x < 1	5.00E-49	CTGCCGAGGGCCGGGGAAGGCCCTCCCGGACTCTCGAAAAGCATCTCGCACCG	8
chr1:65058896-65058898	-1 < x < 0	4.23E-35	CCCTCCGGCGGGCACCGTCCCTGGCGGGTCTGCGACAGCTGGACCCCTCGGA	9
chr1:94142224-94142226	0 < x < 1	0.004658423	GGCCAAAGACCCGACGTCCTCCAGGACCGGGTGGAGTGAACGGGCGCAGCAGG	10
chr1:98084469-98084471	-1 < x < 0	6.90E-49	ACTTGTGTTTTTGTCAACATCTTTCGATGATATGCACCTTCTTAGAATCAC	11
chr1:100289525-100289527	0 < x < 1	2.93E-62	TTCACAGACCGCACACTGAGGCTCGCGGGTCTGCGACCTACTCAGGCCTTCC	12
chr1:107216628-107216630	-1 < x < 0	4.37E-30	AACCTGATGATGAGGCCAGACGCGCGGGAAGAACGGCAGAAAATAATGCAGG	13
chr10:801511-801513	-1 < x < 0	3.10E-56	GGCGCGCCAGGACGATGGAGTTGCCGGAGAGAGAGGGGAGCGCGCCTCTC	14
chr10:7411293-7411295	>1	1.15E-77	CAGCACCGGGCATCTGGACAGCAACCGGAGAGCGAGGCGTGTTCCTCTGGT	15
chr10:16799192-16799194	-1 < x < 0	3.16E-11	CTGGACACGGTGGGAGCGTCAACAGACGCCACAGACACTGCGGAGAGGACGG	16
chr10:18237423-18237425	0 < x < 1	4.87E-15	CCGGGGCGGTGCGGAACCAAGCCTCCGACAGAGCCCTCCAGGCCCTACACGCG	17
chr10:19851621-19851623	-1 < x < 0	2.05E-13	AGTGGGAGGCGCTGGAGACTGCGCAGCGCTTGGTCTCAGGGGGCCATGCCCT	18
chr10:20655689-20655691	0 < x < 1	5.86E-10	TCCTCTCCCTCTCCCCAGCCCCCCCCCGCGAGGACTAAGGGGCAAGCTAGAA	19
chr10:44524663-44524665	-1 < x < 0	3.78E-24	AGCAAAAGCAGGCACAAATCCAAAGAGCGAGACGATCCCATTCAGCGCTTCTGG	20
chr10:44524681-44524683	-1 < x < 0	1.33E-19	CCAAGAGCGAGACGATCCCATTCAGCGCTTCTGGGTACTGTGTCTTGAGGAT	21
chr10:44846025-44846027	0 < x < 1	2.79E-19	CAC'TCAATAAATAAAACATTATACGTCGTGTTTGC'CGGAGGATGCTAAAAATA	22
chr10:40787376-40787378	-1 < x < 0	1.55E-61	CATCTTGTGACCAGACTGACCCCTCGGAGCCTAAACCCCGAGCGGGGCC	23
chr10:62719946-62719948	0 < x < 1	3.34E-78	CTACGAGGGTCTTTACCCATTCCACGCTGAGAAAGAGGCCATGACGATCCA	24
chr10:68649436-68649438	-1 < x < 0	0.156992847	GCGGCGGGGGTGTGTCGCGGCGTCCCGTCCGCTTGCAGGCTGGGCGGGAGGC	25
chr11:1992634-1992636	-1 < x < 0	1.20E-14	ATTACCCACAAAAGGAATGAAGTACGGACATACACAAAGGACGCAAGTAAAC	26
chr11:33523800-33523802	0 < x < 1	1.28E-50	TGTAAGAGGGCTTCGGAGTGGTCTCGGCCAAGCGCTACAGCACCCGCAAAA	27
chr11:24476652-24476654	-1 < x < 0	3.10E-09	ACTGTTCCAGGGTGTACAAATCCACGCCAACATCCAAAAATAATGGCAATA	28
chr11:49947821-49947823	-1 < x < 0	7.57E-06	GTGGATTCAAGGATTATACCCCTACCCGACCCCAAGACTGTGAGTGC'GGGAGA	29

[0281]

chr11:50260436-50260438	-1 < x < 0	2.89E-06	GCCCCACCTCTTGTGTTGCCCAAGCGACACCCCAATCCTTGTGCTCTTCCA	30
chr11:51974516-51974518	0 < x < 1	1.68E-19	CACGTTCAATTGACAAACGGCGGGGGCGAAGGCTAGTGGAGCGGGTGGGG	31
chr11:53576970-53576972	0 < x < 1	5.55E-76	GTCCGGCAGCAGCGCGCACCGGGCCCGGCCCGCGCTCCGGGACGCGAGCGG	32
chr11:62839836-62839838	0 < x < 1	3.61E-11	CACACGGGGGGGGGGCGGGTCCCGGGGCTGCCAGCGCGCGGCTCACTCA	33
chr12:1207870-1207872	-1 < x < 0	6.31E-45	CCCCGCCCGCTCAGCTCAGCGCGGGGCGCACCACTACCGGGCTCTCTCCC	34
chr12:3769194-3769196	0 < x < 1	1.44E-26	GTCCCCCTGCAGGCTCCAGGCTCCCGGACACACTCGGGGTTCAGTCAAGA	35
chr12:10418644-10418646	-1 < x < 0	1.59E-42	CCCCAAATATCTCTCTCTGGGTCCGGGAAATCCCTCCCAACCTCTCCGAG	36
chr12:12684190-12684192	>1	2.80E-21	CTCAGCCGCTTGGCGGGGTATCCACCGGCCCGGGGGTAGTCGGGCCCTGCG	37
chr12:14294419-14294421	-1 < x < 0	1.31E-119	GTGAGCCAGCTTGTTCAGGGGGCGGGAGCCAAAGGACCGTGGCTCCCTCA	38
chr12:46491407-46491409	-1 < x < 0	1.86E-60	CCTCTAAACGTGGGCCCTGTGTTCGGGAGCCCTGGAATGTTTCAGCATG	39
chr13:3737760-3737762	-1 < x < 0	5.17E-41	CGCACTGACCCCCGTGCCCCACTGCGAAATTTCTCCAAAGCTTCCATCCCA	40
chr13:10113845-10113847	-1 < x < 0	2.88E-55	CGGGCACTCCCTGGACACACAGGACGCGTGGCCCCAACGTTAGGGCAAT	41
chr13:37195182-37195184	0 < x < 1	2.76E-05	CCGACACTGCAACACAGGCACCTGCGGGGGGGAGGGGTGTCGGCTGGCG	42
chr13:37332032-37332034	-1 < x < 0	3.16E-13	AGTCCAGGGAACAGGGCCAAAGTACAGCAGAAAGGTCACTGTATCAAAACG	43
chr13:37474592-37474594	-1 < x < 0	2.27E-44	TTCCCGGCTCCCAACCAAGGTGGCCGAGCCAGGCTCTGCTCCGGGGTCTC	44
chr13:37665667-37665669	-1 < x < 0	1.49E-32	CCCTGTGGGGGCTTAGGCAAAACGGGTAGCCGCAAGCAGGACGACGACG	45
chr13:37877759-37877761	0 < x < 1	6.31E-36	TGCAGCGGGGCTCTTGGGGCAGGGAGCTGCGACCTGTGGCTCCCGCG	46
chr13:37906098-37906100	0 < x < 1	3.77E-59	TGACGCTCCCGGGCGGGCTCCCCCGCCGAGCCACGGGCTCCGCGCCCA	47
chr13:38339807-38339809	0 < x < 1	7.26E-80	CTCGCTGCGTCTCACTTGGCGGCTGCGCGGTACGGCAGATGCTCGG	48
chr14:345761-345763	-1 < x < 0	1.22E-06	GGGGCAGCCCTGGACTGTGGTGGCTCTGTGTGAGGTGGCTGTGGGT	49
chr14:6144664-6144666	0 < x < 1	6.62E-07	TATCTAGCCATTATAGCGCTAACGGCTCACATACCCTAAAGGCTCCCT	50
chr14:5949450-5949452	0 < x < 1	9.32E-81	CCGGCGGTGCCAGCATGTCCGCCCGCTGGGTGCTGCTGGACTTCTGCCGC	51
chr14:7586529-7586531	-1 < x < 0	6.72E-09	GAGCTTACCTCCACCACTCCCTCCGCATGTCTGGGCTGTGGCCATTACC	52
chr14:39735273-39735275	-1 < x < 0	3.33E-07	TGGTAGCTGGGGCCCCCGCTGGGCCCGCTCTCCGCCCGCGGCGCTGT	53
chr14:58424689-58424691	-1 < x < 0	1.56E-75	TTTCTAGGACTACGTCTGTGCACCTCGTGTGGCAATAAAACTATGCTAACA	54
chr15:2611795-2611797	0 < x < 1	6.88E-35	CCTTAGACCCCAACCTTCGAGTGGTCTCAGGTCCGCTCAGGTCTCAGTCTCG	55
chr15:7297280-7297282	0 < x < 1	6.12E-77	AATAACTGTCAGTCCCTGGGCTCCGAGGCAGCTGCTCCCAACCAAGCCC	56
chr15:10856498-10856500		7.42E-18	CCCCAGCCGGCGCGCTCGGGTTTCCAGCGAGGGCGCGGGTGCAGCGGCTC	57
chr15:10856612-10856614	0 < x < 1	1.44E-59	GGCAGCCGGGCAAGCGGAGGCGTGGCGAGCGCGGCGAGGAGGACCGCGC	58
chr15:18190829-18190831	0 < x < 1	0.032879523	CACCGCTGAGCTTCCCGCGCTCCGCGAGCGCAGCCCTCTCGCCGCTATA	59
chr15:20380665-20380667	-1 < x < 0	1.86E-07	AGTTCTTTTGGGAAGATGAACCCGACGGAGGCAGCTGCGCGGGGTGTGT	60
chr15:51319029-51319031	-1 < x < 0	1.03E-36	GAGTTCTGTGCACGAGGTATCTTCGGTCAAGTATTATTTCCACCCGTCTC	61
chr16:8886356-8886358	>1	2.94E-15	CCGGCCGGCCCGCCACGGAACCTCCGAGGCCCCGGGCCCCCGGGGTGTC	62
chr16:8886545-8886547	>1	2.03E-101	GGCGGCTCCCGGTGCGCGCACGGCCGCGGCGGACCTCTCCGCGCGGGTCC	63
chr16:15250294-15250296	-1 < x < 0	5.04E-14	CATAACTGATGCCCCACAGGGGTCTGACGTTCTGAGTTAACCTGCATTATAACT	64

[0282]

chr17:15014527-15014529	0 < x < 1	2.86E-29	ACGGGCATAGCGGGCTCCGGCTCCGGCAGGGGTCGGTCTCGTCAAGGTCGG	65
chr17:19405682-19405684	0 < x < 1	1.09E-17	TGGATAGAGAGGGGTCCCTTAAAGCGTGCTTGAGTTCAGGCTTTGAAAAA	66
chr17:33544113-33544115	0 < x < 1	3.12E-75	CTGGGGGTACGAGCGAGAAATCCCTCGACGCTCTGAGAAACTGACACCAGA	67
chr17:33851462-33851464	>1	2.82E-131	ACAGAGGATGAAGCCGAAAGCTCCGAGTCCGCTCGTCAAGAAAGTACTCGTT	68
chr17:34115428-34115430	-1 < x < 0	3.35E-49	TCCTGGGCCCGCGGCTGGCCCCCTCGGCCCTCGGCTCGTCAAGCCCTTGTTC	69
chr17:48274513-48274515	0 < x < 1	1.03E-43	ATGCTACTGCAGGACATGGCTGCTTCGGGCTGGCTCTGTGCGGTAGTGTCTC	70
chr17:49222883-49222885	0 < x < 1	7.66E-32	GAAGCAGGAGCCGCTCCGAGGCGGTCCTCCGGGAGCAAGGGGCCCTCGG	71
chr17:55836014-55836016	0 < x < 1	1.59E-15	CGGTGTCTGTGTATCTGTGTGCTGTTCCTTAACTCCCTCCCAAGCT	72
chr17:60022289-60022291	-1 < x < 0	5.73E-66	ACAATCCTTTAAGCAACGTGTCTCCGCCCTCTTAACCATATAAGTCAAC	73
chr18:5425112-5425114	0 < x < 1	7.01E-67	CAGACGAGCGAGGCGGTGAGGCGGGGTGGCTGCGTTGAGCGGACGGG	74
chr18:31999739-31999741	0 < x < 1	1.47E-20	GGTGCGTGGCGAAGCGGGCCAGCCGTTGGAGCTGCGCCCGCAGCCGCCG	75
chr18:46670535-46670537	0 < x < 1	3.67E-30	GTGGCTGGCAGTACGCGGAGCCCGCGGCTACGAGCACCTCGGCGGGGCC	76
chr18:4690963-4690965	0 < x < 1	7.61E-44	GGCGGATGCGGGCGCGCGGCGGCTACGAGCACCTCGGCGGGGCC	77
chr18:44679236-44679238	-1 < x < 0	1.20E-31	TCCCGAAGTCTGTCTCACTAGCCCCGTGGCGGCTGTCACCCGTG	78
chr18:44686394-44686396	-1 < x < 0	2.56E-78	GTGCCACCATCCCCGGTTGAAGGACGGGTCCGAGTGAGCCAGGAACCA	79
chr18:48681702-48681704	-1 < x < 0	1.01E-08	GGATCCGTCAATTGACCTTGGAGAACGGAAGATTCTGGGGCTCAAGGAGT	80
chr18:50259206-50259208	-1 < x < 0	5.46E-54	CCAACATGACGCTCATCGGAGAGACGGCCACGACACGACACGCTCACGG	81
chr18:51915009-51915011	-1 < x < 0	0.06485116	TTAAGCCACGCTAATTCCATAGGCGAGTTAGATGTGGCTAAATTGCTT	82
chr18:51374197-51374199	0 < x < 1	7.00E-102	CCACAGCCCCTCGCTCCCGAGCGCGCACGCCCGCAGCGGTGCAACTG	83
chr18:53063592-53063594	-1 < x < 0	6.71E-33	AGAAAGATCTGGAACGTGTAGGAGACGTGCAGCTTCTCAGGGTCCGCTCA	84
chr19:44679975-44679977	0 < x < 1	1.44E-18	GCCCATCGCTCGGGCTCGGTCTCCGGGAGAGGGAAGTAACCTCCGAGC	85
chr2:32494387-32494389	>1	0.178817525	TTGGAAGCTCGGGGGCGGAGATCCCGCGCCGCCCGCGGCTCGGGCGG	86
chr2:31655107-31655109	-1 < x < 0	1.12E-44	CTGCACAGCCCTGCTCCGCCCTGCGGGCCCTGCACGTGCTGCTCGGTGCT	87
chr2:32780982-32780984	0 < x < 1	2.44E-08	TTGAGTGACGGCTAGCGGCCCCCGGGCGGTGACGTCAATCCCGGTGTGCT	88
chr2:64665545-64665547	-1 < x < 0	2.99E-09	CTTACAGTAAGCTTAAAGAGTAGGCGTTATCTCCGTTTATGGTGAAC	89
chr2:65566948-65566950	-1 < x < 0	3.68E-14	CGCCAGCTGCAGCAGGTCCATGACGGAACGTTGGGCCCGCAGTTGCTG	90
chr20:3395529-3395531	-1 < x < 0	1.27E-18	AAAAGCCAGGGGAGAGGAGGCGCGGCTCCACAGGCCACTGTAAAGTCCC	91
chr20:3833805-3833807	-1 < x < 0	4.84E-49	AGTAAGGAGTGTCTCATGACTGTGCTGTTGCTAAGTGGCCCTTTTC	92
chr20:3832009-3832011	-1 < x < 0	8.18E-17	CCGCGGCCCACTCGGTACGCCCCACGGGCACTTACGAGCTCCAGGGA	93
chr20:18594283-18594285	0 < x < 1	2.07E-50	CCCGCGCTGCGCGGCCCTGTCGGCCAGGAGCTCAACACGTCCTGC	94
chr20:36046282-36046284	0 < x < 1	8.06E-63	CTTCATTGCATCGCTTCCCGACCGCGGTGCCAACAAAGCAACCAAAAT	95
chr20:40374930-40374932	0 < x < 1	4.41E-91	CCAGGATTCACATGTCAGGAGAACGCTCTCTGCACATCATGACACCA	96
chr20:44689213-44689215	0 < x < 1	3.92E-125	TTCTCCCGCTCAGCACCTCCAGCGGACAGCTCTCGCTGTGCGCTCCAC	97
chr20:44942213-44942215	>1	1.98E-31	GGCAGGGCCGCCAGGCGCGGCCCGCGGTGAAGAAGTCTCGGCGTGC	98
chr20:45091614-45091616	0 < x < 1	5.38E-50	TTGCGTAGGAGGTAGGAGGCGAGGCGGTGGGGCTGGGAACCCGAACTGGGCT	99

[0283]

chr20:45360920-45360922	-1<x<0	1.11E-19	CAAGTCAACCCAGCTCATCTGTGTGAGCGTTCACTGTCTCTAAGCCCTTTATGAC	100
chr20:46098568-46098570	0 < x < 1	4.57E-68	TCGGTGCCCGCCGCTCGGGCTCTGCGCGCGGCGACGCTGCGGGTGACAGA	101
chr20:49844561-49844563	-1<x<0	2.37E-33	TGAAATTTTCGAGTCTCGGAGACGGCTGGATGCTGGGGTCTTGAAAGCCT	102
chr20:49940551-49940553	-1<x<0	4.34E-59	ACCTGCCCCAGGGGATAATAATAACGTTAATGAAACCCCTTGCAGAGTACTC	103
chr20:54301453-54301455	>1	3.30E-119	ACCACGCCCGGGGGCGGAGCTCGCGGGGTGCGGACGCCGAGAGCTGCCG	104
chr20:53921003-53921005	-1<x<0	9.56E-10	CCCTCAGGAATCTCTCCAGGTCCAGCTCCCGCTGCTTCTCGGGCTCTGGCGC	105
chr20:57347921-57347923	-1<x<0	1.16E-62	ACCAGCCGCCAGCGGTGACCTTTCCGGGCTGTTCTCTCGGGCTCTGGCGC	106
chr20:57318012-57318014	0 < x < 1	1.45E-14	GCGGAGCTCGGGAAGTCAACCCCGCGGACATCTGACAGGCGAGGCCGCG	107
chr20:57621119-57621121	-1<x<0	2.51E-16	AGCGAGGACACCCCTGCACGTGCGGCGCGGGGCTGCCAAGTCTCTGG	108
chr21:16233628-16233630	0 < x < 1	1.28E-11	CGCGGGCGCTGCTGGGGGCGGACGAGGCGGGGACGTGCGGAGGCCAC	109
chr21:41864188-41864190	-1<x<0	1.42E-10	AGAATAAGTCCGTCTTCACTCTGGGCGGACGCGGGGAACCGGCAGAGTCT	110
chr21:43490796-43490798	>1	3.27E-88	ACGGCTGGCCCGCTGCCCGCGCTCGGGAGAGCATCCCTGCCCTGC	111
chr22:46374563-46374565	>1	1.65E-07	TTGGACGCGGAGGCGCTCCGGGCGCGAGCAACGAGCAGCAGCAGCGGTGG	112
chr23:11942623-11942625	-1<x<0	1.81E-08	ATCCAGAGGGGCTCTTGGGGCTGCTGCGGAGCAGCAGCAGCAGCAATAC	113
chr23:29966538-29966540	-1<x<0	2.56E-38	AGGGGAGGTGACATGGGAATTAACGCCCTTTCCCTCAGCCAGTGCCAAAT	114
chr23:37987526-37987528	-1<x<0	0.15833084	CGGGCGGGAATCCGCCCGCGCTCGCCCCCGCGCTAGACCCGGGCGC	115
chr23:50123623-50123625	0 < x < 1	8.61E-122	CCAGAACTACGGCAACTCGCGCGGGTGGCGCTGGAAGGGGAGTCCG	116
chr24:12518910-12518912	>1	3.37E-125	CTCTCTCGGAGATCCATGCTGCCCTGACGCGAAGGAGCCAGATGTCT	117
chr24:17354043-17354045	-1<x<0	9.00E-50	TGGTAGGTGAGAGCAGGCGAGGGCGGCAAGTTCGGGTGCCCCAGACTGCT	118
chr24:21051024-21051026	>1	1.02E-124	ACGTTGCTCTCTGTCTCTGCCCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTTCC	119
chr24:30860619-30860621	>1	0.176671196	CAGAACCCGCTTCCCCGAAACTCGCGGGCGGTGGGATCGCAAGTCACCCC	120
chr24:24968751-24968753	-1<x<0	3.88E-104	GTCTCTGGGAGGGAAGTTACAGACGCCAAGCCAGAGTCTGGGTGCCCA	121
chr24:43790837-43790839	0 < x < 1	9.16E-44	CGCCGGCCCCAGGAGCGCGCTACGACCCGCGCTCGCTGCGCTAGCGCTCCG	122
chr25:15332071-15332073	-1<x<0	2.20E-31	ACCACCGACAAAGATAATGTTGCCGAATAAGTTACGTGCATCTTAACATG	123
chr25:15332101-15332103	-1<x<0	1.11E-28	AAGTTACGTGCATCTAACATGTACAGGGATCTGTTCTGTGTCTTGTG	124
chr25:16764068-16764070	-1<x<0	1.40E-42	CGCTGAGCATCTACTACTGCGGGAATTAATCCACATTTCTCTGCAT	125
chr25:18016409-18016411	0 < x < 1	3.89E-62	AGAGCCAGGCGGCGCGCGAGGCGGGGTGACGTGCACACGAGGGGCGCC	126
chr25:35778245-35778247	-1<x<0	1.05E-28	CTTGAAGCTTGAAGATGGCCCTCGCTCCACGACAGGGGTGGGGCTCCTG	127
chr25:47511184-47511186	0 < x < 1	1.37E-79	CCGGACCCGGAACGACGAGCGCGCGGACCCCTCAGTCCCGGGCGCGTGCAT	128
chr26:5490242-5490244	-1<x<0	3.09E-113	TCCCAGGCTTACGTCTCTGAGTGTGGGTGGAAGCCCGCCAGGGTTACCAT	129
chr26:9207175-9207177	-1<x<0	1.73E-06	CCCGCAGTACTGGCTCTTCGCCCGCAGCAGCCCGCACCACGCGCCGCTGCG	130
chr26:10691576-10691578	-1<x<0	5.16E-17	TGATTAACCTCCATAAATGTATATACGGGATAGAAGGACCTGCCCTGTCTCC	131
chr26:22918623-22918625	-1<x<0	3.10E-26	TAATTCATTCTGGTTGTAGAATTCGTCTGCAGGCTATTGTGGATAGGATA	132
chr27:9490065-9490067	-1<x<0	7.50E-09	CCCTGAGCAGTGCCACCCCTCTTCCCGGAAAAGGAGGGAAGCCATCCTTTTC	133
chr27:29307097-29307099	-1<x<0	2.59E-25	CAACATGCAACTCGGGGTGTCTGCGGATGTGTTTAAGGCCAATGTAATTC	134

[0284]

chr27:45037864-45037866	0 < x < 1	4.82E-106	CCAGCGGCGCCAGCCCTGCGCCGCGCGACACAAGAGTGTGGGGGATTC	135
chr28:8994532-8994534	0 < x < 1	4.42E-57	GAGCCGCCAAGTTAGAAAGACTGTGCTGGGGCCACACGGCTGTTCGGG	136
chr28:21744238-21744240	-1 < x < 0	1.81E-57	TAGTAGTCGATAGAGGACTGTGAACACGGCACTTCAGATAAAGAAATGCTCCAG	137
chr29:9541477-9541479	-1 < x < 0	4.37E-13	ACTAGATTTTGAATCTATGATGACCGGCACTACTACTTCTACCTTTC	138
chr29:19479611-19479613	0 < x < 1	6.53E-89	TGGGAGGTGGGGAAATCGGTACCAACCGTGGCAGCTTGTGTACCAAGGCAG	139
chr29:32189910-32189912	-1 < x < 0	2.95E-66	GCAGGTGTGGGACAGCCATTGGGCCGTGTAGAACCGAGGTTCACGCTTG	140
chr29:35629292-35629294	-1 < x < 0	3.46E-55	TCCCGATGATGGTGAATGATCATACGAGGACGGTAATAAGATTGTACCCG	141
chr3:17063027-17063029	0 < x < 1	7.60E-31	CCGCCCGCACTCCCGGCCCGCCGCGGAGGACAGTGTGGGGTGGGGCTCC	142
chr3:30303462-30303464	0 < x < 1	1.61E-47	TGGAGCGGTGCGCGATGCTGTCTACGCCCACTCTCTGGACGCCAGGCTAGG	143
chr3:30303526-30303528	0 < x < 1	2.78E-23	TCTCGCCCGGCAACAGGAGAAAGCCGGGCGAGGAAATGTCAATTGTTC	144
chr3:31677748-31677750	0 < x < 1	2.45E-111	GCTGAGCCCGAGCTGCGGGCGGACGCCGCTCGACGCCCGCGGGGGCTGG	145
chr3:46852141-46852143	0 < x < 1	3.72E-16	CTATGGGCGATATTGCAAGCAAGACACCCGAGGCACGCCAAATCCACT	146
chr3:46843750-46843752	> 1	1.98E-135	CCAGGGCCACAGACCTTGAAGTGCCTGGGAGCCCGGCGACCTCTCTCAAG	147
chr3:70831746-70831748	0 < x < 1	3.57E-19	CTACCTGTGCGGGGAGGCGGAGCACCGGGCGCCCGCAGCTGCGCGCGGG	148
chr3:72353348-72353350	-1 < x < 0	9.65E-58	GGACACCTACTCTGGGCCCCGACCGGCCGAGACAGACAGGTGCCTGCAAA	149
chr30:8031058-8031060	0 < x < 1	1.27E-55	GGCGTCGGGCGGGGCGGCTACCGCGGCGCGCTGGAGGGCGCGCGCCG	150
chr30:8031060-8031062	0 < x < 1	1.06E-40	CCGTGCGGCGGGGCGGCTACCGCGGCGCGCTGGAGGGCGCGCGCCG	151
chr30:37920883-37920885	0 < x < 1	3.52E-27	TTCCAAGGCGCGGGCGGCTCCCGCGTGGAGCTCCACTGTTGGGGTAA	152
chr31:35123688-35123690	0 < x < 1	2.86E-15	CACCTCCGGACACCCAGGGAGCACGGACAGGTCTTCCACGACCGCAGGC	153
chr32:10044870-10044872	-1 < x < 0	1.29E-11	GTGAGACGGAATGTGTAGTATGTACGTACAGGTTTAAAGAAATTGTGTAC	154
chr32:40409729-40409731	0 < x < 1	2.89E-62	GAGCTCTTCAAGGCTTCGTCAACGCGGTGCGCGGTCGCCAGGACCCCG	155
chr32:40409736-40409738	0 < x < 1	1.49E-50	TCAAGGGCTTCGTCAACGCGGTGCGCGGTCGCCAGGACCCCGACGCGAC	156
chr32:40571018-40571020	-1 < x < 0	3.33E-83	TTTGGGTCTTAGCCAAAGTACACATCGGCGTTTGTGTTTGTGATCTA	157
chr33:23247947-23247949	-1 < x < 0	1.70E-32	GACAAGGATATGGAATACCTACAACGGTGATTCTGTGATTCTTCAAGGTTG	158
chr33:23473772-23473774	0 < x < 1	1.07E-05	ACAGGCAACATCGTGGGCTTCTACCGGGCACTTCTTCTCTGCCCCGA	159
chr33:23473856-23473858	0 < x < 1	7.19E-11	GCCAGAGGATATCCACAGCCAGCTGCTGTGTCTACACACAGCGTCTCA	160
chr33:26512692-26512694	> 1	3.39E-65	CGGCTGCCGCGCGCGAGTCGTGCGCGCGCGCTCTGCCAGGCCGACCTGG	161
chr33:26512711-26512713	> 1	3.97E-30	CGTCGCCGCGCGCTCTGCCAGGCCGACCTGGAGCGGAAGCTGAAGCCGAA	162
chr33:19810904-19810906	> 1	1.38E-70	GCCTCTCTGCCGCTCTGGTGGCGGAGAACAAAACCCCGGGCTGGCC	163
chr33:28241609-28241611	-1 < x < 0	4.28E-75	GGAGGGCAGCTGGGAGTACTTCCACGCCCAATGAGCCTTTGTGTGAAAAT	164
chr33:28241833-28241835	-1 < x < 0	1.22E-83	AATTACTTTCACTTTGTGTGAGGTGCTGCTGCTCTGTGTACCCCAAG	165
chr33:29201592-29201594	-1 < x < 0	2.23E-80	CTGGTGCCCGACGGAATAGGAGGCCGGCAGCCTGCCAGAGTGGGACAGTCC	166
chr33:29201578-29201580	-1 < x < 0	4.79E-64	GTGGCCCTGTTACCTTGGTCCCGACGGAATAGGAGGCCGCGAGCTGCCA	167
chr34:21237427-21237429	0 < x < 1	1.02E-35	GGGGGTGCTGCTGGCTTGGTGGCCCGAAGAGGAGTTGGTGTCTCTGCAGGC	168
chr35:7689584-7689586	0 < x < 1	5.64E-14	GGGCGGGGCTCCCGGGCTGGAGTGGGTACCTGAGCGAGACGCGCACCCAGA	169

[0285]

chr35:23852932-23852934	>1	1.76E-44	ACACGCCGCTGCGCTCTTGGACGACGACACGGCCTGGACGATCAGCTCCGA	170
chr35:23853763-23853765	0 < x < 1	2.09E-70	GCTACGCCGCTCTTACCGCGGGGGGCGACGTGTGGAACACGACGCGCA	171
chr36:18662589-18662591	-1 < x < 0	2.78E-36	CCCGTGGTCTCCAACACAGCCAGGCGTCGGTTTGTGCGGATGTTGCAG	172
chr37:2007181-2007183	-1 < x < 0	7.34E-48	TTCATCATTTGGATGATAGTTTTCACGACCTTGAGAGTCTCTTGTAAACT	173
chr37:26735403-26735405	-1 < x < 0	3.70E-30	CCCTTTTACACATGAACAAAACGGCTACAGAGAGGAATAACCTCCCCAG	174
chr38:14762928-14762930	0 < x < 1	1.11E-57	GCCACGCGCGCGCCAGCCACGCCACGACAGGACAGCAGGTCCGACAGCA	175
chr38:21317970-21317972	-1 < x < 0	1.16E-21	GGATCTAGGATGGCAGTGTACTCCGAGAAAGGTAGGACAGCGGGAGAGG	176
chr4:19870655-19870657	-1 < x < 0	2.31E-06	CCTAAATAAACTTTAGGAATTCGCCGGTTCCTTCTCCCTGTCCCACTGCA	177
chr4:23880514-23880516	-1 < x < 0	0.018537335	CGCCGACCCCGGAACCCCGGTGGGTCACTGCTGGCTCCGCGGAGCA	178
chr4:25509815-25509817	-1 < x < 0	1.33E-39	ATGGCTCTGTCTATCTCTGGGACCCGTCTCCACCCCATCAGACCAATGA	179
chr4:34981731-34981733	0 < x < 1	4.21E-25	TGCGCCCGGGGTCTGGCTGCTCCGCGGGGCGACGGCCCATGGTCGGCGG	180
chr4:36661557-36661559	-1 < x < 0	5.86E-25	TATTACAGTGTCTGAGTCAACCGGCTTTTACATCAATGGAATTCCTCT	181
chr4:36180013-36180015	0 < x < 1	1.08E-119	GCGGCTGGGGCCCGAGGGCGCGCTCGCACCCGCGGACGCTGCAGTTC	182
chr4:40697330-40697332	0 < x < 1	3.06E-42	GGAGGGCGGCTGCTCGGTCACTCGGGGGCAGCATCGCGGGCGGTGG	183
chr4:43217432-43217434	0 < x < 1	3.97E-81	GTGTGTGACAGTTAGCGTGGCCGACGGGTGTGGGCCCTGGGGCCGCAAGC	184
chr5:19192793-19192795	0 < x < 1	6.11E-87	TAGCAGGGCTCTGGGAGTCCCTAGCCGTGCAAGTTAGAAAGACATCAC	185
chr5:21480151-21480153	>1	4.09E-32	TTGAGTGCCTGGAGCAGCAGCCGTGGCCACCTAGCAGAGTGTCTCGCA	186
chr5:32347978-32347980	-1 < x < 0	0.890183588	ACACGATAGCCCTGGCCCGTCCCGGGCCACCCCGCCAGCAGCCCGATGC	187
chr5:32612576-32612578	-1 < x < 0	1.82E-15	ACTTCTTGGTCAGAACACCGCTTCGCCCTGAGAACTAATTGTACCTCGA	188
chr5:32711703-32711705	>1	0.068664987	GGTATCCCTCCCTCGGCTCGGCTCGGCTCGGCTCGGCGGGCCCCG	189
chr5:32884319-32884321	-1 < x < 0	2.18E-34	CCAGCTTGTGTGGTCTCCACACCCCTGTGTATGAATGGGACTAAATT	190
chr5:40054086-40054088	0 < x < 1	7.25E-31	CGTACAGCGCTCTGCGCTCCAGCGGCATGCGGGGCGGACCCGCCCCGG	191
chr5:33220460-33220462	0 < x < 1	2.71E-47	ACGTAAAGTGAGAAAGCGCGAGCGCCGCGGACCCGTCCGTTGGATGAGGGG	192
chr5:46881938-46881940	0 < x < 1	6.21E-74	TCCTCGGCGTCAGCACCGTCTGGCCGACATGTCGTGGCGTGCCTCCGCGC	193
chr5:55848493-55848495	-1 < x < 0	1.84E-13	GACCTGTGCCCCAGCTGGCTCACGTGCATGGAATGGTGTGTGCCCCGT	194
chr5:56981423-56981425	-1 < x < 0	9.11E-71	CTGCCGGCTGGCCGGGGCGCTTCGTGGTCTGCACTTACCCACGTGCCA	195
chr5:61645225-61645227	>1	1.61E-64	TAAAGGGCGATGCCCGACCCAGCGCTGGCGTGGGTCCACCGGCTGCGC	196
chr5:64909470-64909472	-1 < x < 0	2.94E-20	AGAGTGTAGAGCTGCTGGGGGTGCCGTGCCCCCTGCTGGCTGTGTGTA	197
chr5:76278186-76278188	-1 < x < 0	3.25E-40	TTCACTCTGTTCTTGTCAATCCCCCGCAGGAATGTGTCTTCAGACACAG	198
chr5:76278307-76278309	-1 < x < 0	2.57E-05	GTGAATTCCTGCAAGTCGTGTGGGGGTGCCGTGCCCCCTGCTGGCTGTG	199
chr6:8231142-8231144	-1 < x < 0	6.01E-28	GAGAGGGGGCCCCCTGGCTTTTGGGCGCAGACCTCCAGGGCCCGCATCAAGT	200
chr6:8915114-8915116	-1 < x < 0	3.25E-61	TCCAGACCTTAGCAGTTGGAGGATCCGAGTTGCAATCTGTCTTTGCCATT	201
chr6:29756505-29756507	0 < x < 1	1.70E-24	TGCACGACCAACCGACGCTCCCAACCGTGGTCTTGGCCCCCTGGCTCCCT	202
chr6:31453418-31453420	0 < x < 1	4.35E-06	GCGGCAGAAAGTCCGGCGTGGGCGCCCGGTTCGGGGGCGCTCCGAGACCCC	203
chr6:40418271-40418273	0 < x < 1	3.39E-53	GGCCCCGATTGTGCCGCTGTGTGTGCTGACTCTTGCCCCGATTGCCGCGC	204

[0286]

chr6:40624669-40624671	-1<x<0	7.26E-43	CCTGGTGCCGAGAGCGGGATGTACGGCTTGTATCGATCAGCGTTGAACC	205
chr6:41485415-41485417	-1<x<0	3.69E-05	GGCCGTCCATGGCAGTGCCTGGCCCAACGAGGACGGGGCAGATAAGGGGGCCG	206
chr6:41661247-41661249	-1<x<0	3.49E-53	TCTCTGGCGCAATAAAGAGACCCCGTGAGGAAGCCCCCAGCACTATA	207
chr6:45773846-45773848	>1	5.94E-243	GAGAAGGACGTCCCTGTCTCGGAAGCCGTTTCGACGGCGGGCCCTGGGGCG	208
chr6:60675998-60676000	>1	1.02E-37	GATAGTTCTCTGGCTCGGTGGGGGGGCTGCTGAGCGGCGGAGCGGCGCG	209
chr7:388496-388498	0<x<1	3.63E-26	GAGGACCTTGCCCCGTGGGGTGGCGGTGACGTTTGGGGGGCGCATCTCGG	210
chr7:38420583-38420585	0<x<1	6.52E-09	CAGGACCTCGGCCCTCCCTCCACGCGGCGGACACAGATCCGGGTGCCT	211
chr7:38136719-38136721	-1<x<0	1.74E-12	CGTCCCCGAGGTGTTACCGACCCGCGCACACACACCCCGTACGTGCCA	212
chr7:41785316-41785318	-1<x<0	3.46E-24	AGGGTGGGAAGATTGGCAGCCCTCGGAGTTTATGCGTGAAGGGAGTCCAT	213
chr7:41785327-41785329	-1<x<0	1.25E-17	GATTGGCAGCCCTCGGAGTTTATGCGTGAAGGGAGTCCATCTACCCCTCC	214
chr7:41980137-41980139	-1<x<0	1.31E-49	CCACAGCATCAGCCACGAGGAGAGGACGGTTTATTGACAGGTTACACCCAGG	215
chr7:42504060-42504062	0<x<1	2.99E-18	CCACAGGGAACCATCACTGGCAGGCTACTCTTACGGACAATGCTGGG	216
chr7:78016807-78016809	0<x<1	3.99E-20	AAATGTACAGCCAGCGATTGGCATCGTACAGCGGAGGTTAAGGGCCAC	217
chr8:14013084-14013086	0<x<1	1.77E-07	ACGAGAAACCACTTATCTGAGGACGGTTCGAAAATTAGATCCTACTTCCC	218
chr8:14259939-14259941	-1<x<0	1.79E-36	ATTTAGATGCCAATCTTTGAAGGCGTTGGATGTAAACACCCCTCATTTCC	219
chr8:4291048-4291050	-1<x<0	2.83E-89	GGCGGCAAGTGAAGGGCCGATCCCGGCTTTACATCCCATCTTTCC	220
chr8:15508656-15508658	-1<x<0	3.75E-08	ACCTTGCCCTCTTGGCAGGCCAGCGCTCCGGGAGGCCCTAAAGAACGGAC	221
chr8:26390136-26390138	-1<x<0	2.00E-20	GTGTTACCTGGAGACTAATCATACGGTAGTTATTGGCTTTAATCCAGG	222
chr8:26943273-26943275	0<x<1	1.51E-17	GTGGCAGCCTATTAGTTCACATCGTTCAGCCTAGATGCCCCCACCACCT	223
chr8:37559917-37559919	0<x<1	2.38E-18	TCTGTAGAGTGTTCCTTCGACACGGTGTATTCTGGAAGTTTCTTCT	224
chr8:33509086-33509088	0<x<1	2.95E-94	GGGCCAGTAGTGGCGCTGCGCGCGGGAGGGCGGGCGGGCGGGCGGGC	225
chr8:42969805-42969807	0<x<1	2.55E-45	TCGCCGTGCTGGAGCAGGCGGAGTCGGACGCGCTGGACATCAGACCAAG	226
chr8:52253090-52253092	-1<x<0	1.16E-47	GAGGTACGATGCGCTCCACTCCCCGCGAGTGGACTTGAGCGGCTCAGCA	227
chr8:67527837-67527839	0<x<1	9.12E-123	GCGTGGCGCCGAAGCGCTGCCACTCGCGCGCCAGCTTGCGCCCTTCTGCC	228
chr8:67627712-67627714	-1<x<0	1.67E-99	ATTTCTGAGTGCCACTCTGTGCCCCACATGGGTACACACAGTCCCCCAGG	229
chr8:7045928-7045930	-1<x<0	6.25E-120	GAGCCAGGCCGCGCTGCCAGCCACGTACCCGACACATACACACACACGC	230
chr9:933885-933887	-1<x<0	2.32E-24	CACCTGTGTAGTCCAGCTGATGGCGCAGGTGCAGCCCAACTCAGGGGG	231
chr9:1046331-1046333	-1<x<0	4.39E-23	AGGAAGGGGGGCGAGGCGATGCTTCGAGTTTGGATCCGAGGTCTTCAGGGG	232
chr9:2360284-2360286	0<x<1	3.93E-08	CGGAGCCACAGCACCCCGGGAAACCGATGTTAAGATGAAGTATTTCATT	233
chr9:5481047-5481049	-1<x<0	0.413612259	GCCTTCCCACTCAGCGCCGCGGCCGCTTCCCGCCCCACGGCCCCGCCA	234
chr9:5697426-5697428	-1<x<0	1.47E-13	GGCGTGGACGGGCAATCCGGGGGGCGGGGAGCCAGCCGACCCCAAGCAC	235
chr9:12758035-12758037	-1<x<0	2.63E-12	TTGCTGATCTTGCCCCGTGGAGCCCGCCCCCGGAGGTTCCCAAGTTACACTC	236
chr9:17910388-17910390	0<x<1	1.44E-17	CCGGGTACCGGGTGGGGGGGCGAGCGGCCCATCAGCACGGCCACCTACAC	237
chr9:12642800-12642802	0<x<1	1.49E-36	GCGAGGCTGCGAGGCTGCGAGGCTGCGAGGCGGCGGCGGCCCTGTGTGTCAC	238
chr9:18277673-18277675	0<x<1	1.06E-41	GCCTCGCAGCCCTGGCGCGCGCTCGCAGATGGAGCGGCACGGCGGGATGG	239

[0287]

chr9:18277684-18277686	0 < x < 1	6.23E-49	CTGGCGCGCGCTCGCAGATGGAGCGGCACGGCGGGATGGCCTGCTCCAGC	240
chr9:19703027-19703029	-1 < x < 0	3.63E-24	AAGCCCTCCCCAAGCCAAGGACCCGGTCAACCCATCCCTCCACCTCCCTA	241
chr9:20527917-20527919	0 < x < 1	4.14E-12	CGAGTCCCCCTCGCACCCCGCCCGGCCAGTCCCGCTCCGGAGCCCTCTG	242
chr9:25415871-25415873	0 < x < 1	5.08E-66	GTGAGGATGCTGCTGAGCTTGCATCGAAGGAGCCACTCATCTGGCGAGCG	243
chr9:24331651-24331653	-1 < x < 0	5.37E-15	GATCGCCCGGCCACATGACCGGCGCGGCCAATCGCTGGATTCAACCACTCA	244
chr9:35985983-35985985	0 < x < 1	1.12E-10	GAGGACCGGAGCCGCTGATTGTCTGCAAGGCCGCGGTGACGTGCGCGGGCG	245
chr9:36717168-36717170	0 < x < 1	2.42E-35	GGCTCCGGGGCTTTTCCACCCCGCCGCGAGTCCACTTTTAGTCTGTAGAGAAG	246
chr9:47196375-47196377	0 < x < 1	3.67E-33	CCATAGCGGCTGCCAGCTCGTCCCCGAAGCGGACCATGGTTCCTCCGGCGCC	247
chr9:47612619-47612621	-1 < x < 0	1.62E-34	GGACCGGGACCTGCAGGTGGTCCACGATGGGTGGACGTGCTCCAGCCCTG	248
chr9:47612682-47612684	-1 < x < 0	1.95E-33	GCTCTGGGCTGGGGACTCAGCAGACGCCCTCCCCACCCGCTAGCAGGACCCT	249
chr9:47957838-47957840	-1 < x < 0	0.000380125	GGAACAAGCTGGCCTGGCCTCTGCAGCGCCCAAGGAGCTGGCCCGGCTGACGCC	250
chr9:48225579-48225581	0 < x < 1	4.32E-06	CCGCCATCCCTGGGGTCAAGTGCCCCGGCCTGTCTCTGGAGGCTCGCCACG	251
chr9:50976682-50976684	0 < x < 1	2.19E-57	CCGGAGTGATGACGCTGATTGGCTCCGGCCGATTTTGGGGGTGATGTCACGG	252
chr9:49248845-49248847	-1 < x < 0	4.75E-26	GGTCACGTAGCTCTGGTTTTCATCAGCGAGGGAACCTTACTCAGCTCGAGGGA	253
chr9:54993941-54993943	-1 < x < 0	4.44E-32	CTGCCCTGTCCCCACAAGCTACCTCCCGAGTGAAATACCCATGCGCTGAGCCC	254
chr9:57421027-57421029	0 < x < 1	1.10E-47	CGTGTACCTTTTGTGGCTCCTTCGCAGTCACTTTCAGGTCCTTCTACC	255

表 2——“前 3 个”生物时钟

位点	时钟系数	p 值 (Pr(> t))	序列	SEQ ID NO:
(截距)	-1.488083921	7.40E-19		
chr2:32494387-32494389	25.49884175	0.000801242	TTGGAAAGCTCGGGGGGGGAGATCCCCGCGCCCGCCCGGCCCTCGGGGCGG	86
chr6:45773846-45773848	18.31906431	2.49E-165	GAGAAGGACGTCCCTGTCTGCGAAGCCGTTTCGCAGCGCGCGGCCCTGGGGCGG	208
chr16:8886545-8886547	15.43246339	1.49E-22	GGCGGGCTCCCCGTGCGCGCACGGCCGCGGCCGACCTCTCCGCGCGGGCTCC	63

[0288]

表 3——“前 5 个”生物时钟

位点	时钟系数	p 值 (Pr(> t))	序列	SEQ ID NO:
(截距)	-1.626008306	2.92E-23		
chr2.32494387.32494389	25.40472484	0.000515096	TTGGAAGCTCGGGGGGCGGAGATCCCGCGCCGCCCGCGGCTCGGGGCGG	86
chr6.45773846.45773848	16.83100695	3.51E-140	GAGAAAGGACGTCCCTGTGCGAAGCCGTTGCGAGCGCGGCGCCCTGGGGCGG	208
chr16.8886545.8886547	14.1755269	2.09E-20	GGCGGGCTCCCCGTGCGCGCACGGCCGCGGCCGACCTCTCCGCGCGGGCTCC	63
chr5.61645225.61645227	9.685390237	1.46E-06	TAAAGGGGCGATGCCGCGACCCAGGCGCTGGCGTGGGTCCACCGGCGTCGC	196
chr15.10856498.10856500	20.454796	4.36E-10	CCCCAGCCGGGCGGCTCGGGTTTCCGACGGAGGGCCGGGCTGCGCGGCGTC	57

表 4——“前 10 个”生物时钟

位点	时钟系数	p 值 (Pr(> t))	序列	SEQ ID NO:
(截距)	2.636785028	1.68E-11		
chr2.32494387.32494389	31.48707725	3.15E-06	TTGGAAGCTCGGGGGGCGGAGATCCCGCGCCCGCGGCGCCCTCGGGGCGG	86
chr6.45773846.45773848	14.11743561	1.46E-118	GAGAAAGGACGTCCCTGTGCGAAGCCGTTGCGAGCGCGGCGCCCTGGGGCGG	208
chr16.8886545.8886547	11.15446753	3.81E-16	GGCGGGCTCCCCGTGCGCGCACGGCCGCGGCGCGACCTCTCCGCGCGGGCTCC	63
chr5.61645225.61645227	7.635417929	1.71E-05	TAAAGGGGCGATGCCGCGACCCAGCGCTGGCGTGGGTCCACCGGCGTCGC	196
chr15.10856498.10856500	15.04348128	2.25E-07	CCCCAGCCGGGCGGCTCGGGTTTCCGACGGAGGGCCGGGCTGCGCGGCGTC	57
chr33.26512711.26512713	9.624991584	2.86E-05	CGTCGCCGCCGCGCTCC TGCCAGGCCGACCTGGAGCGGAAGCTGAAGCCGAA	162
chr20.57347921.57347923	-8.924503605	7.22E-31	ACCAAGCCGCCAGCCGTGACCTTTCCGGGCCCTGTTCC TGCGGCTCTGGGGCGC	106
chr12.12684190.12684192	10.01399267	0.004659424	CTCAGCCCGCTTGGGCGGGTATCCACCGGCCCGGGGGTAGTCGGCCCTGCG	37
chr24.30860619.30860621	-6.97439064	0.178939513	CAGAACCGCGCTTCCCCGAAACTCGCGGGGCGGTGGGATCGCAAGTCACCC	120
chr33.26512692.26512694	5.841178421	3.34E-06	CGGCTGCCGCGGCCCGCAGTCGTCGCCGCCCGCGCTCC TGCCAGGCCGACCTGG	161

[0289]

表 5——“前 20 个”生物时钟

位点	时钟系数	p 值 (Pr(> t))	序列	SEQ ID NO.
(截距)	1.426173487	0.000738149		
chr2.32494387.32494389	29.97454506	1.89E-07	TTGGAAGCTCGGGGGCGGAGATCCCGCGCCGCCCGCGGCGGCTCGGGGCGG	86
chr6.45773846.45773848	8.47941593	1.94E-47	GAGAAAGGACGTCCCTGTGCGGAAGCCGTTCGACGCGCGGCGGCTCGGGGCGG	208
chr16.8886545.8886547	5.880759211	1.03E-06	GGCGGGCTCCCGGTGCGGCGACGGCCGCGGCGGACCTCTCCGCGCGGGCTCC	63
chr5.61645225.61645227	4.434791641	0.003872156	TAAAGGGGCGATGCCGCGACCCAGGCGCTGGGTGGGTCCACCGGGCTCGC	196
chr15.10856498.10856500	10.82275414	1.28E-05	CCCCAGCCGGCGCGGCTCGGGTTTCCGACGAGGCGCGGCTGCGCGGCGTTC	57
chr33.26512711.26512713	6.576079765	0.000762612	CGTCGCCGCCGCGCTCCTGCCAGGCCGACCTGGAGCGGAAGCTGAAGCCGAA	162
chr20.57347921.57347923	-7.357261642	9.37E-28	ACCAAGCCGCCAGCCGTGACCTTTCCGGGCTGTTCCTGCGGCTCTGGGCGC	106
chr12.12684190.12684192	6.041563837	0.045272957	CTCAGCCGCTTGGGCGGGTATCCACCGGCCCGGGGGTAGTCGGGCCCCTGCG	37
chr24.30860619.30860621	-4.447714718	0.314850718	CAGAACCGCGCTTCCCCGAAACTCGCGGGCGGTGGGATCGCAAGTCACCCCC	120
chr33.26512692.26512694	2.226277287	0.041402225	CGGCTGCCGCGCCCGCAGTCGTGCGCGCCGCGCTCCTGCCAGGCCGACCTGG	161
chr10.7411293.7411295	3.014021236	2.67E-08	CAGACCCGGGCATCTGGACAGCAACCGGAGAGCGAGGCGTGTTCCTCCTGGT	15
chr1.22213697.22213699	4.119609069	0.001713821	TGACCCCGAGGAGCCGCACCCCGGCGCGGACGTTACCTCCGGGGGCGC	2
chr5.32711703.32711705	10.34618246	0.000750409	GGTATCCCGTCCCTCGGCTCGGCTCGGCTCGGCTCGGCTCGGCGGGCCCCCG	189
chr24.21051024.21051026	1.754900433	0.014548112	ACGTTGCTCTTCGTGCTCCTGCCCCGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTTCC	119
chr5.21480151.21480153	5.475715773	0.001332943	TTGAGCTGCTTGAGCAGCAGCCGTCGGCCACCTAGCAGGAGTGTCTCTCGCA	186
chr17.33851462.33851464	5.28692709	3.41E-07	ACAGCAGGATGAAGCCGAAAGCCTCCGAGTGCCGGTCGAAAGTACTCGTT	68
chr3.46843750.46843752	4.070393226	1.33E-10	CCAGGGCCACAGACCTGGAAGTCGCCGGGAGCCCGGACACTCCTCTCAAG	147
chr13.37474592.37474594	-4.646099678	2.64E-11	TTCCCGGCTCCCGAACCAAGGTGGCCGAGCCAGGCCCTCTGCCCTCCGGGGTTC	44
chr33.19810904.19810906	2.651938013	0.001641489	GCGCTCCTCGCGCTCTCGGTGGCCCGGAGAACAAAGCCCCGGGCGCTGGCC	163
chr20.44942213.44942215	4.772633102	7.94E-06	GGCAGGGCCGCCAGGCGCGGCCCCCGGTGAAGATCCTCGGCGCTGCGCT	98

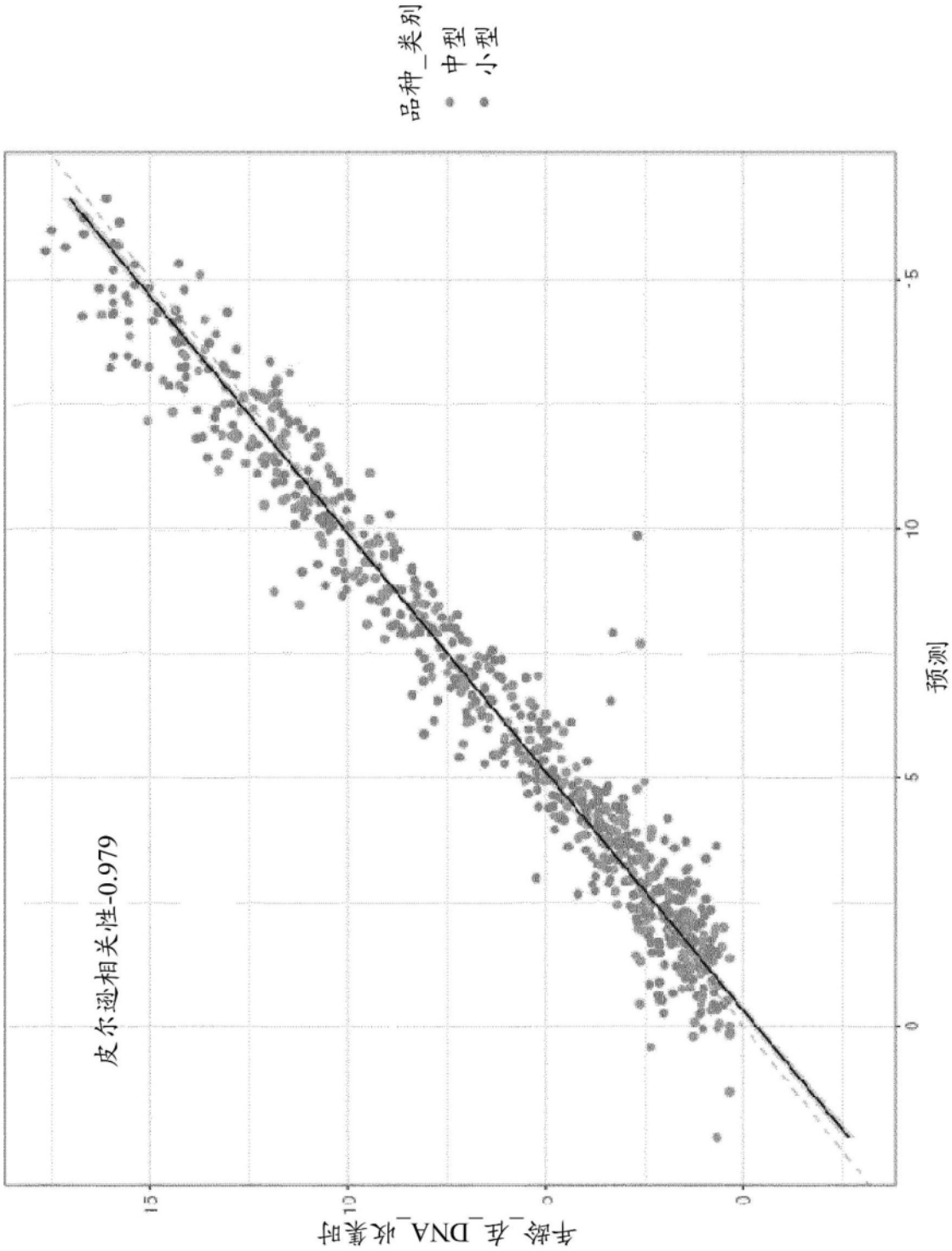


图1

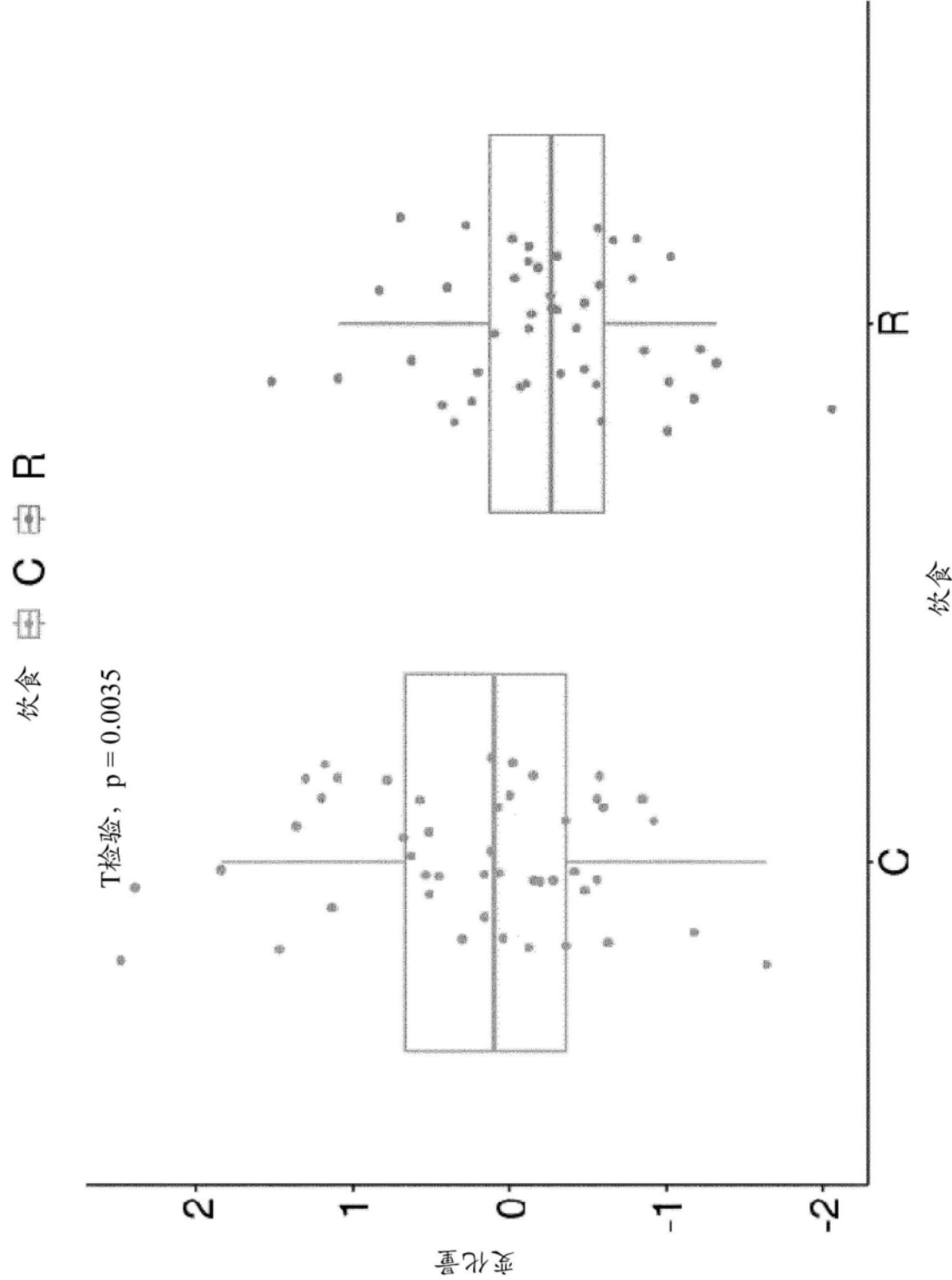


图2

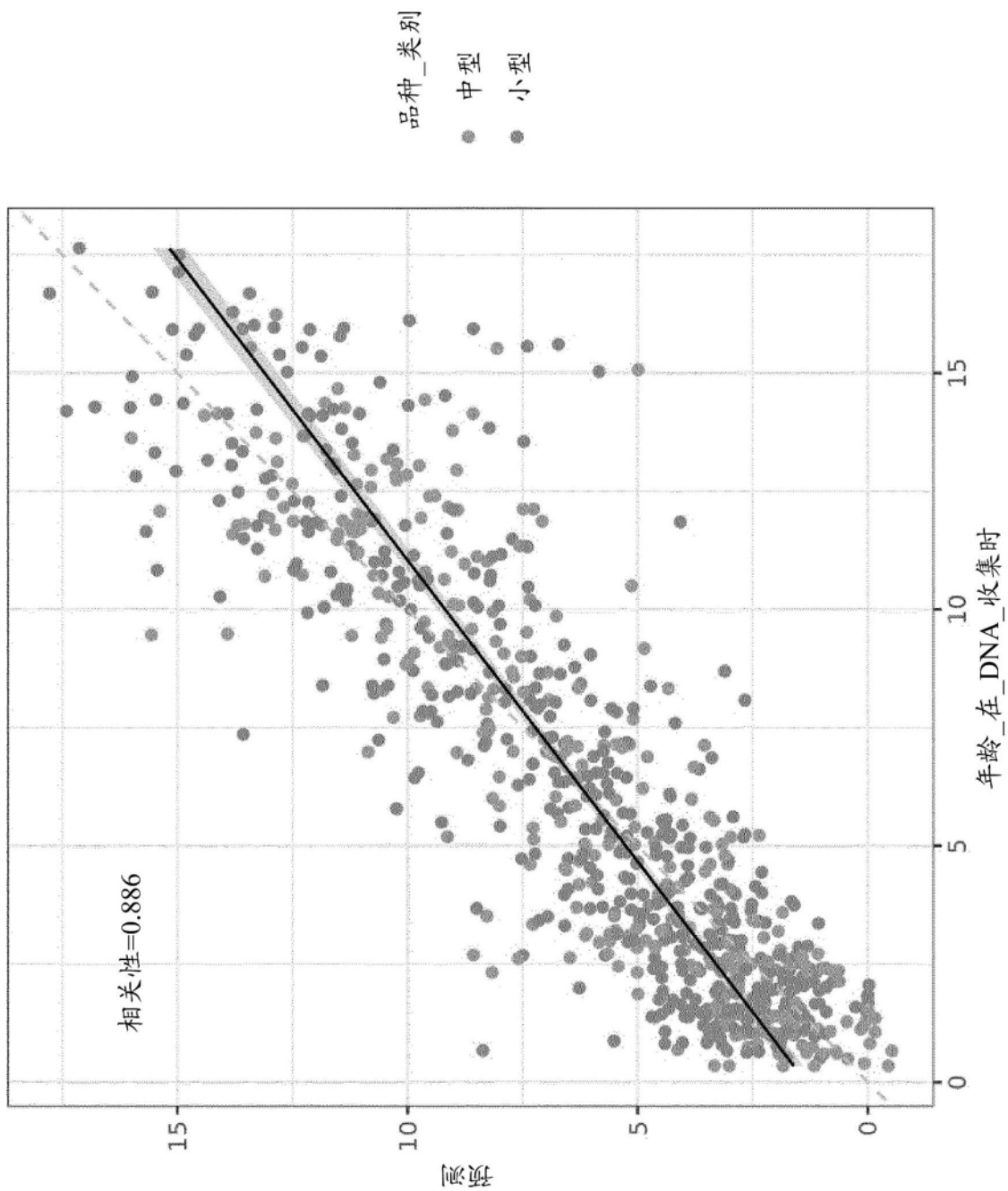


图3

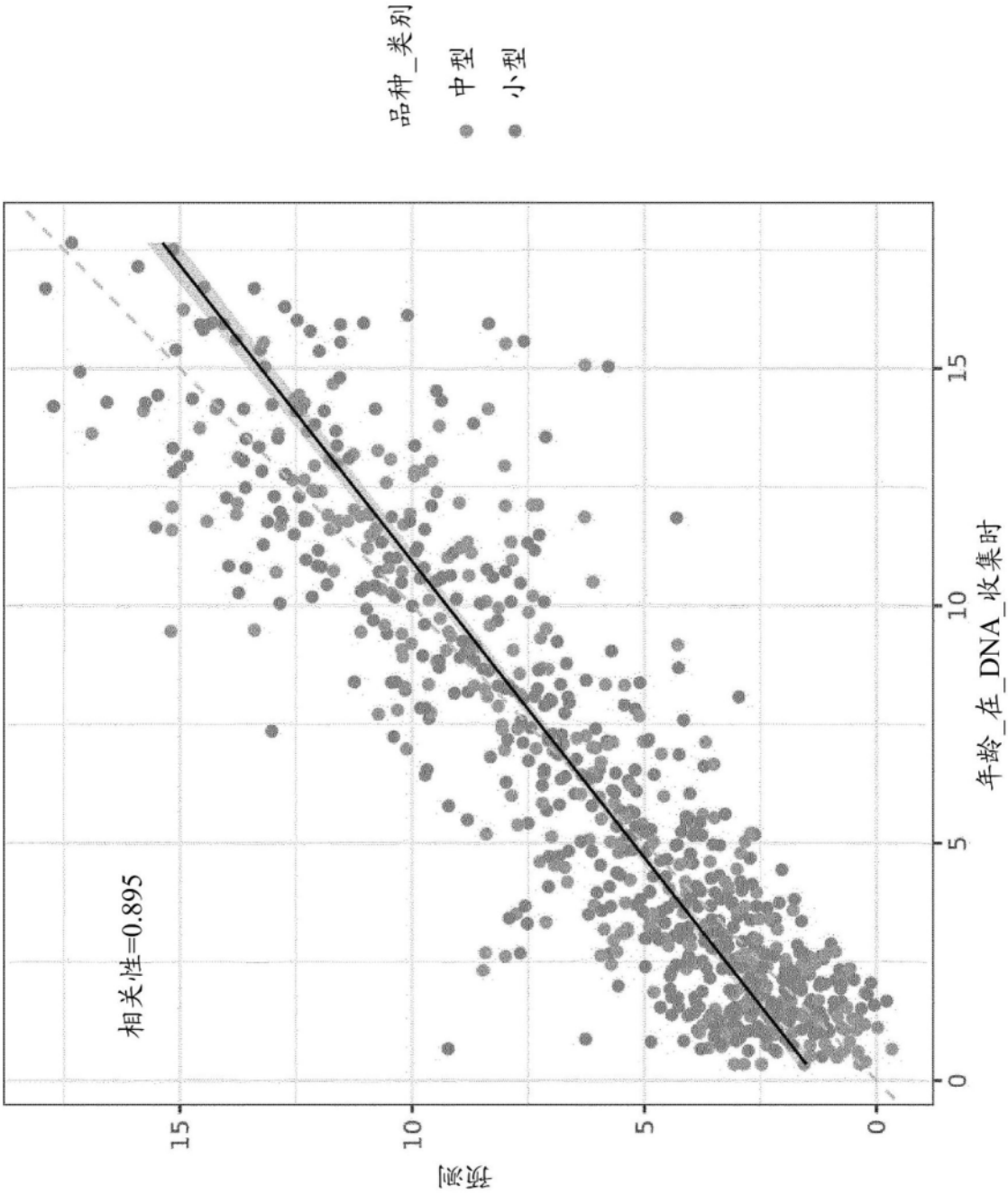


图4

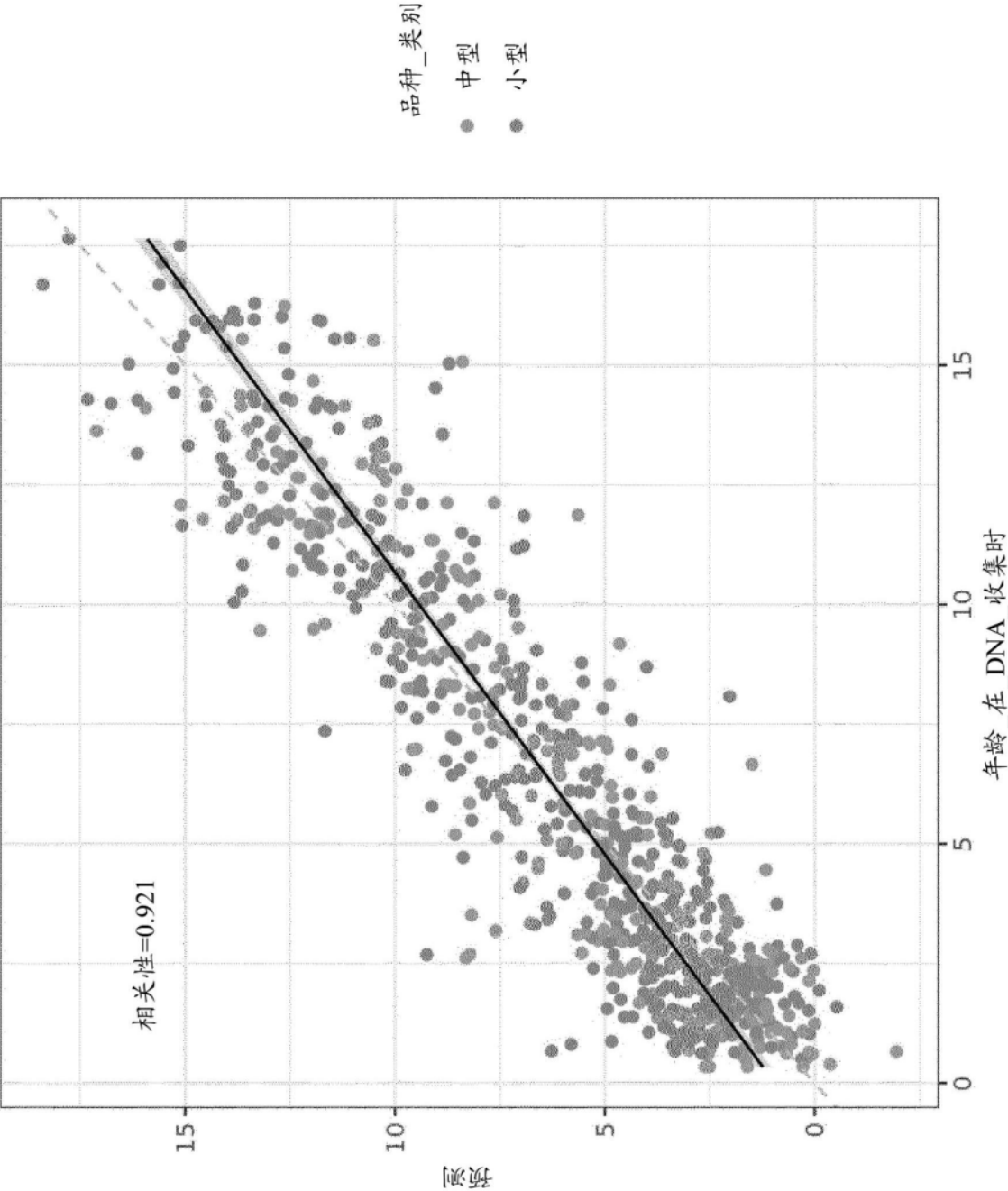


图5

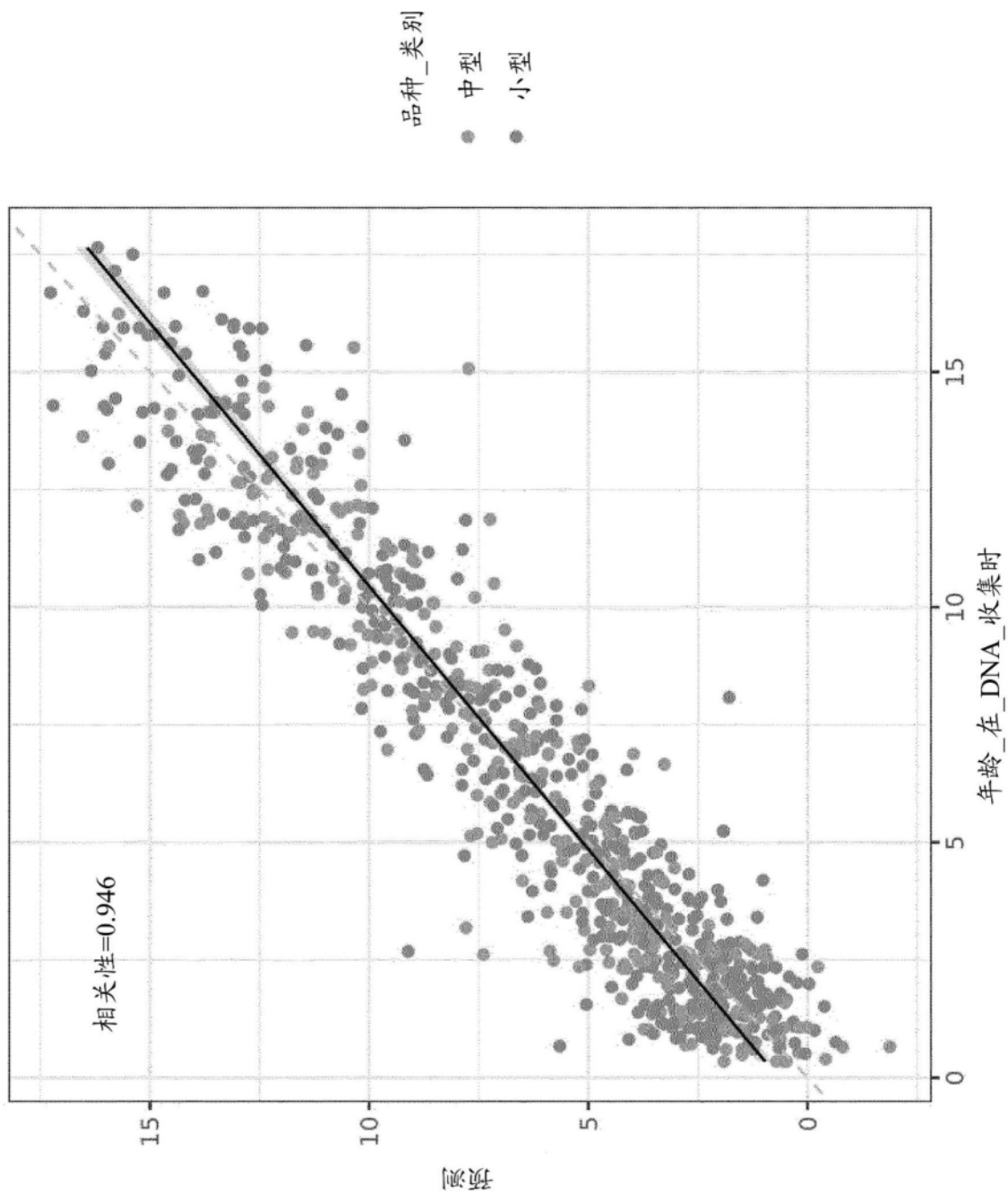


图6

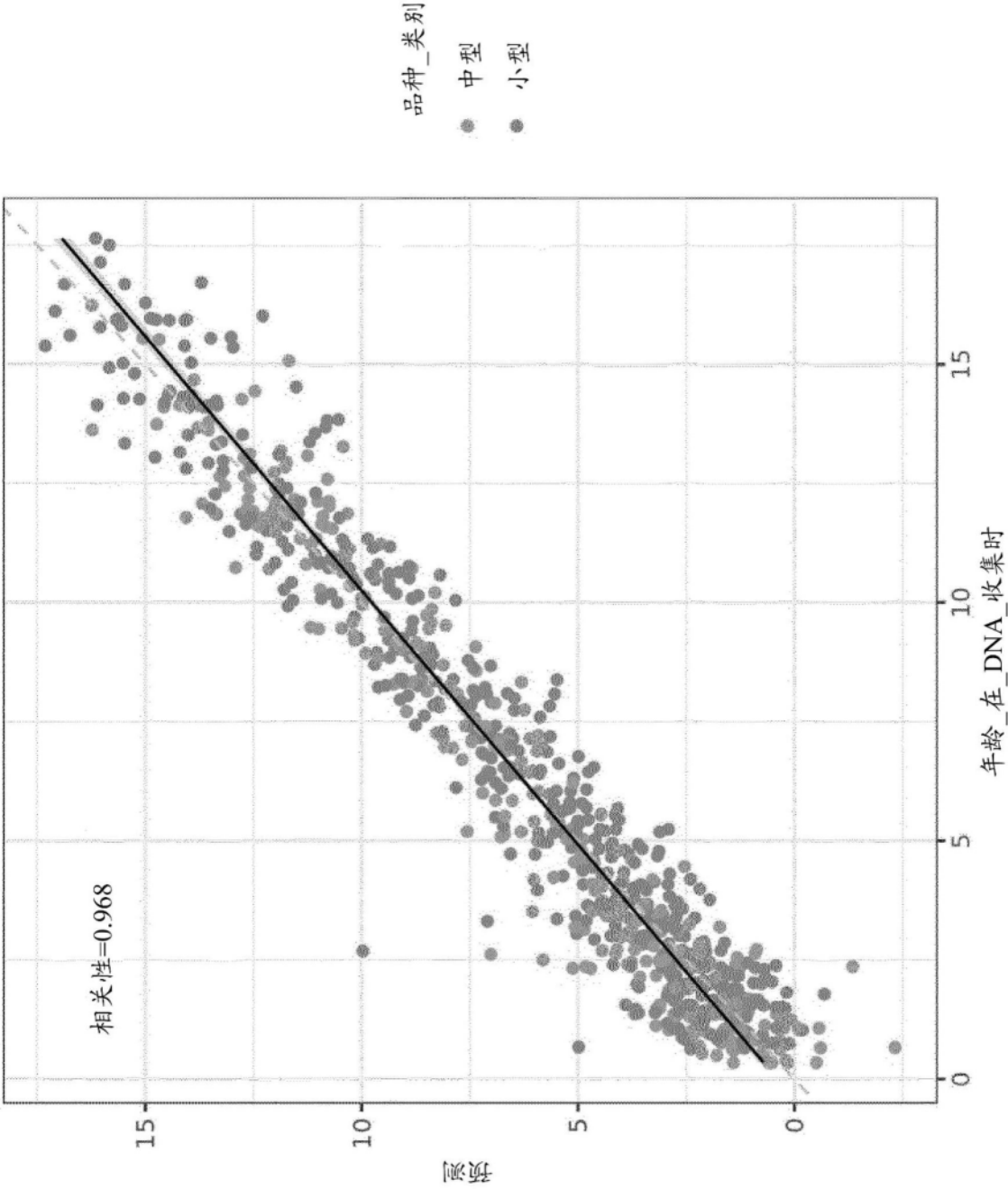


图7