



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118374548 A

(43) 申请公布日 2024. 07. 23

(21) 申请号 202410448498.1

C12N 5/10 (2006.01)

(22) 申请日 2024.04.12

A61K 48/00 (2006.01)

(66) 本国优先权数据

A61K 38/17 (2006.01)

202310401321.1 2023.04.14 CN

A61P 39/06 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

(71) 申请人 臻赫医药(杭州)有限公司

地址 310000 浙江省杭州市临平区经济开发
区临平大道502号1号楼309室

(72) 发明人 王刚 于寅 盛强龙 杨帆

(74) 专利代理机构 深圳国新南方知识产权代理
有限公司 44374

专利代理师 周纯

(51) Int. Cl.

C12N 15/867 (2006.01)

C12N 15/864 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

权利要求书1页 说明书17页

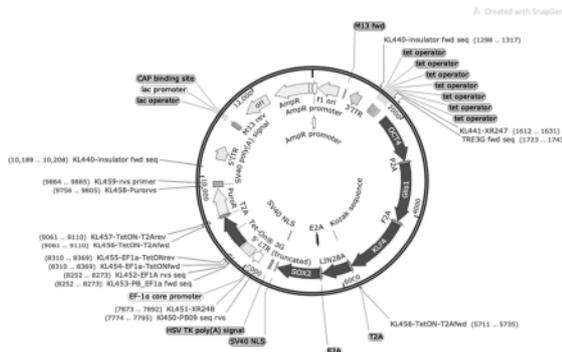
序列表(电子公布) 附图8页

(54) 发明名称

重编程因子抗衰老表达系统、生物材料及用途

(57) 摘要

本申请实施例提供的重编程因子抗衰老表达系统、生物材料及用途,包括编码Oct4转录因子的核酸分子、编码Sox2转录因子的核酸分子、编码Klf4转录因子的核酸分子、编码Glis1转录因子的核酸分子以及编码Lin28转录因子的核酸分子;通过上述方式,形成的OSKGL体系(Oct4、Sox2、Klf4、Glis1及Lin28)具有较好的表观遗传学重编程效果,能够推动皮肤、软骨、心脏、卵巢、睾丸及肾脏细胞启动表观遗传学重编程,逆转衰老,改善代谢,增强再生能力,逆转器官纤维化并且,不会产生细胞毒性。



1. 一种重编程因子抗衰老表达系统,其特征在于,所述表达系统包括编码Oct4转录因子的核酸分子、编码Sox2转录因子的核酸分子、编码Klf4转录因子的核酸分子、编码Glis1转录因子的核酸分子以及编码Lin28转录因子的核酸分子。

2. 根据权利要求1所述的重编程因子抗衰老表达系统,其特征在于,所述表达系统为具有嘌呤霉素抗性的重组载体。

3. 根据权利要求2所述的重编程因子抗衰老表达系统,其特征在于,所述重组载体包括依次连接的编码Oct4转录因子的核酸分子、编码P2A肽的核酸分子、编码Glis1转录因子的核酸分子、编码F2A肽的核酸分子、编码Klf4转录因子的核酸分子、编码T2A肽的核酸分子、编码Lin28转录因子的核酸分子、编码E2A肽的核酸分子以及编码Sox2转录因子的核酸分子。

4. 根据权利要求3所述的重编程因子抗衰老表达系统,其特征在于,所述重组载体包括piggybac转座子。

5. 根据权利要求3所述的重编程因子抗衰老表达系统,其特征在于,所述重组载体的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示。

6. 根据权利要求1所述的重编程因子抗衰老表达系统,其特征在于,所述表达系统为腺相关病毒表达载体或慢病毒表达载体。

7. 根据权利要求1所述的重编程因子抗衰老表达系统,其特征在于,所述表达系统包括含有表达盒,所述表达盒含有编码Oct4转录因子的核酸分子、编码Sox2转录因子的核酸分子、编码Klf4转录因子的核酸分子、编码Glis1转录因子的核酸分子以及编码Lin28转录因子的核酸分子。

8. 根据权利要求1所述的重编程因子抗衰老表达系统,其特征在于,所述表达系统包括编码Oct4转录因子的mRNA、编码Sox2转录因子的mRNA、编码Klf4转录因子的mRNA、编码Glis1转录因子的mRNA以及编码Lin28转录因子的mRNA。

9. 一种生物材料,其特征在于,所述生物材料为包括权利要求1~8任一项所述的重编程因子抗衰老表达系统的宿主细胞。

10. 如权利要求1~8中任一项所述的重编程因子抗衰老表达系统或如权利要求9所述的生物材料在制备细胞部分细胞重编程试剂中的用途、在制备改善代谢障碍制剂中的用途、在制备器官损伤后修复剂中的用途或在制备抗衰老药物中的用途。

重编程因子抗衰老表达系统、生物材料及用途

技术领域

[0001] 本申请涉及生物医药技术领域,尤其涉及一种重编程因子抗衰老表达系统、生物材料及用途。

背景技术

[0002] 表观遗传学的信息丢失是衰老发生、发展和转归的主要驱动力之一,研究证明细胞中的重编程因子可以通过表观遗传学重编程,恢复丢失的表观遗传信息,从而部分逆转皮肤、心脏、肾脏、大脑、骨质疏松、卵巢以及睾丸等器官衰老,提高器官损伤修复的能力,延长实验动物寿命,是生物学的重大概念突破。

[0003] 背景技术中,体内、体外瞬时表达维持多潜能转录因子可以通过表观遗传学部分重编程,恢复丢失的表观遗传信息,从而延长实验动物寿命。但是,背景技术中瞬时表达维持多潜能转录因子还存在细胞毒性问题以及无法推动心脏或软骨细胞启动表观遗传学重编程的问题。

发明内容

[0004] 鉴于以上问题,本申请实施例提供一种重编程因子抗衰老表达系统、生物材料及用途,以解决上述技术问题。

[0005] 第一方面,本申请实施例提供一种重编程因子抗衰老表达系统,所述表达系统包括编码Oct4转录因子的核酸分子、编码Sox2转录因子的核酸分子、编码Klf4转录因子的核酸分子、编码Glis1转录因子的核酸分子以及编码Lin28转录因子的核酸分子。

[0006] 可选地,所述表达系统为具有嘌呤霉素抗性的重组载体。

[0007] 可选地,所述重组载体包括依次连接的编码Oct4转录因子的核酸分子、编码P2A肽的核酸分子、编码Glis1转录因子的核酸分子、编码F2A肽的核酸分子、编码Klf4转录因子的核酸分子、编码T2A肽的核酸分子、编码Lin28转录因子的核酸分子、编码E2A肽的核酸分子以及编码Sox2转录因子的核酸分子。

[0008] 可选地,所述重组载体包括piggybac转座子。

[0009] 可选地,所述重组载体的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示。

[0010] 可选地,所述表达系统为腺相关病毒表达载体或慢病毒表达载体。

[0011] 可选地,所述表达系统包括含有表达盒,所述表达盒含有编码Oct4转录因子的核酸分子、编码Sox2转录因子的核酸分子、编码Klf4转录因子的核酸分子、编码Glis1转录因子的核酸分子以及编码Lin28转录因子的核酸分子。

[0012] 可选地,所述表达系统包括编码Oct4转录因子的mRNA、编码Sox2转录因子的mRNA、编码Klf4转录因子的mRNA、编码Glis1转录因子的mRNA以及编码Lin28转录因子的mRNA。

[0013] 第二方面,本申请实施例提供一种生物材料,所述生物材料为包括上述的重编程因子抗衰老表达系统的宿主细胞。

[0014] 第三方面,本申请实施例提供一种上述的重编程因子抗衰老表达系统或上述的生

物材料在制备细胞部分细胞重编程试剂中的用途、在制备改善代谢障碍制剂中的用途、在制备器官损伤后修复剂中的用途或在制备抗衰老药物中的用途。

[0015] 本申请实施例提供的重编程因子抗衰老表达系统、生物材料及用途,包括编码Oct4转录因子的核酸分子、编码Sox2转录因子的核酸分子、编码Klf4转录因子的核酸分子、编码Glis1转录因子的核酸分子以及编码Lin28转录因子的核酸分子;通过上述方式,形成的OSKGL体系(Oct4、Sox2、Klf4、Glis1及Lin28)具有较好的表观遗传学重编程效果,能够推动皮肤、软骨、心脏、卵巢、睾丸及肾脏,肝脏,肺等组织及细胞启动表观遗传学重编程,提高再生能力,提供其损失后修复能力,并且,不会完成完全细胞重编程而产生细胞毒性。

[0016] 本申请的这些方面或其他方面在以下实施例的描述中会更加简明易懂。

附图说明

[0017] 图1示出了本申请实施例提供的重编程因子抗衰老表达系统的结构示意图。

[0018] 图2示出了本申请应用例1中转染后的人成纤维细胞的光镜图。

[0019] 图3示出了本申请应用例2、对比例1和对比例2的结果对比图。

[0020] 图4示出了本申请应用例3、对比例9和对比例10的结果对比图;

[0021] 图5示出了本申请应用例4的结果对比图;

[0022] 图6示出了本申请应用例5的结果对比图;

[0023] 图7示出了本申请应用例6的结果对比图;

[0024] 图8示出了本申请应用例7的结果对比图;

[0025] 图9示出了本申请应用例8的结果对比图;

[0026] 图10示出了本申请实施例提供的重编程因子抗衰老表达系统中第一腺病毒表达载体的结构示意图;

[0027] 图11示出了本申请实施例提供的重编程因子抗衰老表达系统中第二腺病毒表达载体的结构示意图;

[0028] 图12示出了本申请实施例提供的重编程因子抗衰老表达系统中第三腺病毒表达载体的结构示意图。

具体实施方式

[0029] 下面将结合本申请实施例中的附图,对发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅是本申请的一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本申请中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本申请保护的范围。

[0030] 在本文中提及“实施例”意味着,结合实施例描述的特定特征、结构或特性可以包含在本申请的至少一个实施例中。在说明书中的各个位置出现该短语并不一定均是指相同的实施例,也不是与其它实施例互斥的独立的或备选的实施例。本领域技术人员显式地和隐式地理解的是,本文所描述的实施例可以与其它实施例相结合。

[0031] 下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。

[0032] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0033] 本申请一实施例提供了一种重编程因子抗衰老表达系统,该表达系统包括编码

Oct4转录因子的核酸分子、编码Sox2转录因子的核酸分子、编码Klf4转录因子的核酸分子、编码Glis1转录因子的核酸分子以及编码Lin28转录因子的核酸分子。

[0034] 在本实施例中,形成的OSKGL体系 (Oct4、Sox2、Klf4、Glis1及Lin28) 具有较好的表观遗传学重编程效果,能够推动皮肤、软骨、心脏、卵巢、睾丸及肾脏细胞启动表观遗传学重编程,逆转衰老,改善代谢,增强再生能力,逆转器官纤维化并且,不会产生细胞毒性。

[0035] 作为一种实施方式,上述的各核酸分子可以为DNA。该表达系统包括编码Oct4转录因子的DNA核酸分子、编码Sox2转录因子的DNA核酸分子、编码Klf4转录因子的DNA核酸分子、编码Glis1转录因子的DNA核酸分子以及编码Lin28转录因子的DNA核酸分子。

[0036] 作为一种实施方式,上述的各核酸分子可以为RNA。该表达系统包括编码Oct4转录因子的RNA核酸分子、编码Sox2转录因子的RNA核酸分子、编码Klf4转录因子的RNA核酸分子、编码Glis1转录因子的RNA核酸分子以及编码Lin28转录因子的RNA核酸分子。

[0037] 作为一种实施方式,表达系统可以为表达盒。在本实施方式中,该表达盒含有编码Oct4转录因子的核酸分子、编码Sox2转录因子的核酸分子、编码Klf4转录因子的核酸分子、编码Glis1转录因子的核酸分子以及编码Lin28转录因子的核酸分子。

[0038] 作为一种实施方式,表达系统可以为腺相关病毒表达载体或慢病毒表达载体。

[0039] 作为一种实施方式,Oct4转录因子的表达量大于Sox2转录因子的表达量的两倍,Oct4转录因子的表达量大于Klf4转录因子的表达量的两倍,Oct4转录因子的表达量大于Glis1转录因子的表达量的两倍,Oct4转录因子的表达量大于Lin28转录因子的表达量的两倍。在本实施方式中,将各目标转录因子的表达量控制在上述范围内,有利于进一步提高部分重编程效果。

[0040] 在一些实施方式中,该表达系统包括第一腺病毒表达载体和第二腺病毒表达载体。其中,第一腺病毒表达载体包括编码Oct4转录因子的DNA核酸分子、编码Sox2转录因子的DNA核酸分子以及编码Klf4转录因子的DNA核酸分子,第二腺病毒表达载体包括编码Oct4转录因子的DNA核酸分子、编码Glis1转录因子的DNA核酸分子以及编码Lin28转录因子的DNA核酸分子。

[0041] 在一些实施方式中,第一腺病毒表达载体可以为AAV9病毒DNA载体,第一腺病毒表达载体的结构参见图10所示,第一腺病毒表达载体可以为重组质粒,第一腺病毒表达载体的核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示。在如SEQ ID NO.2所示的核苷酸序列中,454至1533位为编码Oct4转录因子的核苷酸序列,1591至2541位为编码Sox2转录因子的核苷酸序列,2596至4008位为编码Klf4转录因子的核苷酸序列。

[0042] 在一些实施方式中,第二腺病毒表达载体可以为AAV9病毒DNA载体,第二腺病毒表达载体的结构参见图11所示,第一腺病毒表达载体可以为重组质粒,第二腺病毒表达载体的核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示。在如SEQ ID NO.3所示的核苷酸序列中,454至1533位为编码Oct4转录因子的核苷酸序列,1591至3450位为编码Glis1转录因子的核苷酸序列,3505至4134位为编码Lin28转录因子的核苷酸序列。

[0043] 在一些实施方式中,该表达系统除了第一腺病毒表达载体和第二腺病毒表达载体外,还包括第三腺病毒表达载体,第三腺病毒表达载体包括编码调控蛋白的DNA核酸分子,该调控蛋白用于调控上述各目标转录因子的表达并达到控制各目标转录因子表达配比的目的。示例性地,该调控蛋白可以为抗生素诱导型调控蛋白,具体地,该调控蛋白可以为

rtTA(reverse tetracycline-controlled transactivator)蛋白,rtTA蛋白在一般情况下是无法结合到tetO位点上的,当rtTA蛋白与四环素类抗生素或强力霉素结合后,rtTA蛋白的构象发生变化,使得其可以结合到tetO位点上,tetO位点与rtTA结合后形成的复合物可以激活附近的启动子区域,从而促进目标转录因子编码基因的转录。例如,该调控蛋白为Tet-On®3G,可以被强力霉素诱导。同时第一腺病毒载体和第二腺病毒载体分别表达OCT4转录因子,能够使得OCT4转录因子的表达量是其他目标转录因子的2倍以上,以进一步提高本申请的效果。

[0044] 在一些实施方式中,第三腺病毒表达载体可以为AAV9病毒DNA载体,第三腺病毒表达载体的结构参见图12所示,第三腺病毒表达载体可以为重组质粒,第三腺病毒表达载体的核苷酸序列如SEQ ID NO.4所示。在如SEQ ID NO.4所示的核苷酸序列中,739至1482位为编码调控蛋白(Tet-On®3G)的核苷酸序列。作为一种实施方式,表达系统可以为重组载体。

[0045] 在一些实施方式中,表达系统为具有嘌呤霉素抗性的重组载体。

[0046] 在一些实施方式中,该重组载体包括依次连接的编码OCT4转录因子的核酸分子、编码P2A肽的核酸分子、编码G1is1转录因子的核酸分子、编码F2A肽的核酸分子、编码K1f4转录因子的核酸分子、编码T2A肽的核酸分子、编码Lin28转录因子的核酸分子、编码E2A肽的核酸分子以及编码Sox2转录因子的核酸分子。其中,P2A肽,T2A肽,E2A肽和F2A肽分别为2A肽,具体地,2A肽是来源于病毒的短肽(一般18~25个氨基酸),它们通常被称为“自我剪切”肽,能使一条转录产物产生多种蛋白。2A肽并不是完全的“自我剪切”,而是通过使核糖体跳过2A元件C-末端的甘氨酸和脯氨酸肽键的合成而发挥作用,最终导致2A序列末端和下游产物分离。其中,上游蛋白的C端将会添加一些额外的2A残基,而下游蛋白的N端将会有额外的脯氨酸。P2A肽,T2A肽,E2A肽和F2A肽分别来源于四种不同的病毒。

[0047] 在一些实施方式中,该重组载体为强力霉素诱导转座子,例如,该重组载体可以为对piggybac转座子进行优化得到。

[0048] 在一些实施方式中,该重组载体的结构参见图1所示,该重组载体的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示,该重组载体可以为重组质粒。在如SEQ ID NO.1所示的核苷酸序列中,1772至2851位为编码OCT4转录因子的核苷酸序列,2909至4772位为编码G1is1转录因子的核苷酸序列,4839至6248位为编码K1f4转录因子的核苷酸序列,6303至6929位为编码Lin28转录因子的核苷酸序列,6990至7943位为编码Sox2转录因子的核苷酸序列。

[0049] 在本实施方式中,重组载体可以按Gibson方法进行构建,用Gibson酶进行连接形成图1所示目标载体序列,该目标载体序列的特点为本身带有嘌呤霉素抗性,在强力霉素的诱导下能够同时表达OCT4转录因子,Sox2转录因子,K1f4转录因子,G1is1转录因子和Lin28转录因子。

[0050] 作为一种实施方式,所述表达系统包括编码OCT4转录因子的mRNA、编码Sox2转录因子的mRNA、编码K1f4转录因子的mRNA、编码G1is1转录因子的mRNA以及编码Lin28转录因子的mRNA。

[0051] 在一些实施方式中,所述编码OCT4转录因子的mRNA、所述编码Sox2转录因子的mRNA、所述编码K1f4转录因子的mRNA、所述编码G1is1转录因子的mRNA以及所述编码Lin28转录因子的mRNA中部分或全部的核苷酸进行了能够提高所述mRNA在生物体内稳定性的化

学修饰。

[0052] 在一些实施方式中,所述编码Oct4转录因子的mRNA的摩尔量与所述编码Sox2转录因子的mRNA、所述编码Klf4转录因子的mRNA、所述编码Glis1转录因子的mRNA以及所述编码Lin28转录因子的mRNA的摩尔量之和的比例为1~8:1。

[0053] 在一些实施方式中,所述化学修饰包括利用N1-甲基假尿苷、假尿嘧啶或甲基尿嘧啶置换所述编码Oct4转录因子的mRNA、所述编码Sox2转录因子的mRNA、所述编码Klf4转录因子的mRNA、所述编码Glis1转录因子的mRNA以及所述编码Lin28转录因子的mRNA中的100%的尿嘧啶以及利用5-甲基胞嘧啶或5-羟甲基胞嘧啶置换所述编码Oct4转录因子的mRNA、所述编码Sox2转录因子的mRNA、所述编码Klf4转录因子的mRNA、所述编码Glis1转录因子的mRNA以及所述编码Lin28转录因子的mRNA中的100%的胞嘧啶。

[0054] 在一些实施方式中,本实施例的重编程因子抗衰老表达系统还包括:第三mRNA,第三mRNA编码RNA依赖性RNA聚合酶(RdRp),其中,所述第三mRNA的摩尔量为编码Oct4转录因子的mRNA、编码Sox2转录因子的mRNA、编码Klf4转录因子的mRNA、编码Glis1转录因子的mRNA以及编码Lin28转录因子的mRNA的摩尔量之和的1~8倍。

[0055] 在本实施方式中,可以通过第三mRNA编码的RNA依赖性RNA聚合酶实现上述各转录因子的复制。

[0056] 在一些实施方式中,第三mRNA编码的RNA依赖性RNA聚合酶为甲病毒属突变型复制酶,所述突变型复制酶产生nsP2区域的第259位的突变以及nsP2区域的第650位的突变。具体地,所述突变型复制酶包括依次连接的nsP1区域(537个氨基酸)、nsP2区域(799个氨基酸)、nsP3区域(482个氨基酸)以及nsP4区域(1254个氨基酸),所述突变型复制酶的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示,所述突变型复制酶的两个突变点分别产生在SEQ ID NO.2所示的796位点(丝氨酸S突变为脯氨酸P)以及在SEQ ID NO.2所示的1187位点(精氨酸R突变为天冬氨酸D)。

[0057] 在本实施方式中,通过对甲病毒属复制酶产生特异性的突变,降低甲病毒属复制酶的活性,可以通过第三mRNA编码的RNA依赖性RNA聚合酶实现各转录因子的有限自我复制,避免产生细胞毒性。

[0058] 本申请一实施例提供了一种生物材料,该生物材料为包括上述的重编程因子抗衰老表达系统的宿主细胞。

[0059] 作为一种实施方式,该宿主细胞可以为皮肤细胞、软骨细胞、心脏细胞、卵巢细胞、睾丸细胞或肾脏细胞中的一种,该表达系统可以实现部分逆转宿主细胞衰老。

[0060] 本申请一实施例提供了上述的重编程因子抗衰老表达系统或上述的生物材料在制备细胞重编辑试剂中的用途、在制备器官损伤后修复剂中的用途或在制备抗衰老药物中的用途。

[0061] 实施例1:目标质粒的制备

[0062] 在本实施例中,该重组载体为目标质粒,该目标质粒为强力霉素诱导转座子型质粒;制备出的目标质粒具有嘌呤霉素抗性,在强力霉素的诱导下能够同时表达转录因子Oct4转录因子,Sox2转录因子,Klf4转录因子,Glis1转录因子和Lin28转录因子。该目标质粒可以按照如下步骤制备:

[0063] S11,获得目标DNA片段:可以从质粒产物或其他来源中获取目标DNA片段序列,即

按照图1所示和具体序列分解为不同DNA序列,直接从商业公司订购(例如IDT公司)。

[0064] S12,设计引物:为目标DNA片段设计引物,引物的末端需要加入与目标质粒相匹配的序列,引物长度一般为30~40bp。

[0065] S13,PCR扩增:使用设计好的引物进行PCR扩增目标DNA片段,PCR条件根据目标DNA片段大小和引物设计进行调整。

[0066] S14,纯化PCR产物:使用商业PCR纯化试剂盒对PCR产物进行纯化,去除其他组分。

[0067] S15,测量DNA浓度:使用Nanodrop等工具测量PCR产物的DNA浓度。

[0068] S16,质粒线性化:将空目标质粒进行限制性酶切,使其线性化。

[0069] S17,加入Gibson同源重组酶:将包含线性的空目标质粒以及各目标DNA片段的混合物加入同源重组酶,同源重组酶可以自动将各目标DNA片段在体外重组成完整质粒。

[0070] S18,反应条件:Gibson组装反应酶反应温度为50°C,反应时间为1~2小时。

[0071] S19,转化态细胞:将Gibson组装的反应产物转化到适当的细胞中,如大肠杆菌等,进行培养。

[0072] S110,筛选阳性克隆:将转化后的菌落进行筛选,找出含有目标质粒的阳性克隆。

[0073] 在本实施方式中,该目标质粒即为图1所示重组载体,该目标质粒的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示。

[0074] 实施例2:目标腺病毒表达载体的制备

[0075] 制备编码Oct4转录因子、Sox2转录因子、Klf4转录因子、Glis1转录因子以及Lin28转录因子的AAV(adeno-associated virus,腺病毒相关)病毒载体,作为目标腺病毒表达载体。实施例3:目标mRNA表达系统的制备

[0076] 制备目标mRNA表达系统

[0077] 在本实施例中,目标mRNA表达系统包括编码Oct4转录因子的第一mRNA、编码Sox2转录因子的第二mRNA、编码Klf4转录因子的第二mRNA、编码Lin28转录因子的第二mRNA、编码Glis1转录因子的第二mRNA以及编码甲病毒属突变型复制酶的第三mRNA。

[0078] 其中,五种第二mRNA的摩尔量相同,第一mRNA的摩尔量与五种第二mRNA的摩尔量和之比为2~6。

[0079] 其中,第三mRNA的摩尔量为编码Oct4转录因子的mRNA、编码Sox2转录因子的mRNA、编码Klf4转录因子的mRNA、编码Glis1转录因子的mRNA以及编码Lin28转录因子的mRNA的摩尔量之和的1~8倍。

[0080] 第一mRNA按照5'→3'方向依次包括如下元件:5'UTR序列、信号肽序列、Oct4转录因子编码序列和3'UTR序列;各第二mRNA按照5'→3'方向依次包括如下元件:5'UTR序列、目标重编程因子编码序列和3'UTR序列,每个第二mRNA还包括信号肽序列。

[0081] 第三mRNA可以按照如下步骤进行制备:

[0082] i. 引物设计:DNA模板构建的第一步是设计引物。引物应该包含一个启动子、转录起始位点和T7RNA聚合酶结合序列。这些引物的设计需要考虑以下因素:启动子:启动子应位于DNA模板的5'端,并且能够被RNA聚合酶识别和结合。

[0083] ii. 转录起始位点:转录起始位点是RNA聚合酶开始转录的位置,它位于启动子的下游,通常是20-30个碱基的长度。

[0084] iii. T7聚合酶结合序列即5'或者3'非翻译区(UTR):T7 RNA聚合酶结合序列是RNA

聚合酶结合并开始转录的位置。这个序列通常位于转录起始位点的下游,长度为20-30个碱基。

[0085] iv. PCR扩增:使用设计好的引物进行PCR扩增。PCR反应中应包含所需的模板DNA、引物、聚合酶和核苷酸。PCR反应条件根据引物和模板DNA的特性进行优化。

[0086] v. PCR产物纯化:将PCR产物用于琼脂糖凝胶电泳或其他方法进行分离和纯化。此步骤可以去除PCR反应中的杂质和未扩增的DNA。

[0087] vi. 突变型mRNA复制酶mRNA体外合成:将线性扩增的DNA模板用于体外转录反应,使用T7 RNA聚合酶。

[0088] vii. 去除DNA:通过DNase等酶去除反应混合物中的DNA,以避免其干扰下游应用。

[0089] viii. 纯化mRNA:使用HPLC纯化方法纯化mRNA。

[0090] 实施例4:目标表达系统(AAV-OSKGL)的制备

[0091] 本实施例的目标表达系统包括第一腺病毒表达载体、第二腺病毒表达载体以及第三腺病毒表达载体。

[0092] 第一腺病毒表达载体(AAV-TET-OSK,以下简称为AAV1-OSK)为AAV9病毒DNA载体,该重组载体的结构参见图10所示,该重组载体可以为重组质粒,该重组载体的核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示。在如SEQ ID NO.2所示的核苷酸序列中,454至1533位为编码Oct4转录因子的核苷酸序列,1591至2541位为编码Sox2转录因子的核苷酸序列,2596至4008位为编码Klf4转录因子的核苷酸序列。

[0093] 第二腺病毒表达载体(AAV-TET-OGL,以下简称为AAV2-OGL)为AAV9病毒DNA载体,该重组载体的结构参见图11所示,该重组载体可以为重组质粒,该重组载体的核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示。在如SEQ ID NO.3所示的核苷酸序列中,454至1533位为编码Oct4转录因子的核苷酸序列,1591至3450位为编码Glis1转录因子的核苷酸序列,3505至4134位为编码lin28转录因子的核苷酸序列。

[0094] 第三腺病毒表达载体(pAAV-EF1a-rtTA,以下简称为AAV3-强力霉素诱导开关)为AAV9病毒DNA载体,该重组载体的结构参见图12所示,该重组载体可以为重组质粒,该重组载体的核苷酸序列如SEQ ID NO.4所示。在如SEQ ID NO.4所示的核苷酸序列中,739至1482位为编码调控蛋白(Tet-On®3G)的核苷酸序列。

[0095] 本实施例的目标表达系统在强力霉素的诱导下能够同时表达转录因子Oct4转录因子,Sox2转录因子,Klf4转录因子,Glis1转录因子和lin28转录因子。

[0096] 应用例1:实施例1的目标质粒转染人成纤维细胞实验

[0097] 第一阶段I:使用赛默飞Neon™转染系统完成上述目标质粒转染人成纤维细胞

[0098] 1. 细胞培养:选择需要转染的细胞系,并在合适的培养条件下培养,使其在转染前达到合适的生长状态。

[0099] 2. 质粒DNA准备:将需要转染的目标质粒用无菌PBS缓冲液溶解,并在室温下保存。

[0100] 3. 细胞收集:用适当的方式将细胞收集到离心管中。例如,使用消化酶将细胞从培养板中解离,收集后使用无菌PBS缓冲液洗涤一次,去除细胞中的酶。

[0101] 4. 细胞计数:使用显微镜和细胞计数板对细胞进行计数,以确定转染所需的细胞数量。

[0102] 5. 细胞沉淀:将细胞沉淀在离心管底部,去除PBS缓冲液,加入适量的无菌PBS缓冲

液使细胞悬浮。

[0103] 6. 转染参数设置:打开Neon™转染系统软件,在菜单中选择转染参数,按照细胞成纤维细胞类型和所需转染的DNA数量设置转染参数。

[0104] 7. 转染:将细胞和质粒DNA混合,按照转染参数在Neon™转染系统上进行电转染。将转染混合物转移至预先准备好的电转染管中,使用Neon™转染系统进行电转染。

[0105] 8. 细胞恢复:将电转染管放回到含有细胞培养基的培养皿中,并在37°C的CO₂培养箱中培养所需时间。细胞将在几小时到几天之间开始表达转染的基因。

[0106] 9. 细胞培养:稳定转染的细胞系在适宜的培养条件下培养至80%到90%的密度。

[0107] 10. 嘌呤霉素处理:将嘌呤霉素溶液加入培养基中,使其最终浓度达到适当的浓度,一般为0.5~5μg/ml。

[0108] 11. 细胞处理:将细胞移至含有嘌呤霉素的培养基中,使其与嘌呤霉素充分接触,以便未转染质粒的细胞被选择性地杀死。

[0109] 12. 细胞培养:将处理后的细胞放回培养箱中,继续在适宜的培养条件下培养。嘌呤霉素处理后的细胞将逐渐死亡,而转染了质粒的细胞则能够继续存活并生长。

[0110] 第二阶段II:强力霉素诱导完成细胞重编程:

[0111] 上述嘌呤霉素抵抗细胞形成后,取适量细胞置于丝裂霉素C处理小鼠胚胎纤维细胞(MEF)为饲养细胞的人多潜能干细胞培养液(15%KOSR+DMEF/F12+10ng/mlbFGF)中,培养7~21天,每天换液,直到出现典型人多潜能干细胞克隆。例如,可以培养7~10天、14~21天或7~21天。

[0112] 实验结果:实施例1制备的目标质粒在人成纤维细胞中形成Oct4转录因子,Sox2转录因子,Klf4转录因子,Glis1转录因子和lin28转录因子,强力霉素诱导7~21天,成功形成诱导性多潜能干细胞(iPS),如图2所示。

[0113] 应用例2:实施例1的目标质粒转染人软骨细胞实验

[0114] 第一阶段I:将上述目标质粒用电穿孔法转染致人软骨细胞(采用骨关节人软骨原代细胞,购自Promocell公司,货号C-12710),并用Puromycin 1mg/ml选择三天后,加入强力霉素7~10天后,提取细胞DNA,全基因组亚硫酸氢盐测序(Whole-Genome Bisulfite Sequencing,WGBS)。

[0115] 第二阶段II:WGBS将亚硫酸氢盐(bisulfite)化学处理DNA,之后通过PCR扩增和测序,可以获得甲基化和未甲基化的C的信息。以下是WGBS的详细步骤:

[0116] 1. 亚硫酸氢盐处理:将DNA加入含有亚硫酸氢盐的反应体系中,反应体系中的亚硫酸氢盐会将未甲基化的C转化为U,甲基化的C则不受影响。这个步骤会破坏DNA的完整性,需要在此后的步骤中对DNA进行修复和纯化。

[0117] 2. 端粘修复和A尾化:将DNA片段的5'端和3'端进行修复和A尾化,以便于在下一步骤中进行接头连接。

[0118] 3. 接头连接:将DNA片段连接到测序接头上,接头中包含序列标记和定向序列,用于后续的测序。

[0119] 4. PCR扩增:对接头连接后的DNA进行PCR扩增,扩增得到的片段即为待测DNA的亚硫酸氢盐处理后的DNA。

[0120] 5. 纯化和质检:对PCR扩增产物进行纯化和质检,确认扩增产物的大小和浓度。

[0121] 6.高通量测序:将PCR扩增产物进行高通量测序,使用Illumina高通量测序仪。测序得到的数据包含了基因组中所有的C位点,以及它们的甲基化状态。

[0122] 7.数据分析:使用生物信息学工具对测序得到的数据进行分析,包括去除接头序列、质量控制、比对到基因组、甲基化位点的识别和注释等步骤。最终可以获得基因组DNA中所有C位点的甲基化状态信息。

[0123] 对比例1

[0124] 制备OSK质粒:

[0125] OSK质粒与实施例1的目标质粒的区别在于:OSK质粒包括编码Oct4转录因子的核酸分子、编码Sox2转录因子的核酸分子以及编码Klf4转录因子的核酸分子,OSK质粒不包括编码Glis1转录因子的核酸分子以及编码Lin28转录因子的核酸分子,OSK质粒的其他部分与目标质粒相同,OSK质粒能够同时表达Oct4转录因子,Sox2转录因子,Klf4转录因子。

[0126] OSK质粒转染人软骨细胞:

[0127] 第一阶段I:将上述OSK质粒用电穿孔法转染致人软骨细胞(采用骨关节人软骨原代细胞,购自Promocell公司,货号C-12710),并用Puromycin 1mg/ml选择三天后,加入强力霉素7~10天后,提取细胞DNA,全基因组亚硫酸氢盐测序(Whole-Genome Bisulfite Sequencing,WGBS)。

[0128] 第二阶段II:WGBS将亚硫酸氢盐(bisulfite)化学处理DNA,之后通过PCR扩增和测序,可以获得甲基化和未甲基化的C的信息。第二阶段II具体参见应用例1所述,在此不进行一一赘述。

[0129] 对比例2

[0130] 制备空质粒:

[0131] 空质粒与实施例1的目标质粒的区别在于:空质粒不包括编码Oct4转录因子的核酸分子、编码Sox2转录因子的核酸分子、编码Klf4转录因子的核酸分子、编码Glis1转录因子的核酸分子以及编码Lin28转录因子的核酸分子,空质粒无法形成上述任何转录因子,空质粒的其他部分与目标质粒相同。

[0132] 空质粒转染人软骨细胞:

[0133] 第一阶段I:将上述空质粒用电穿孔法转染致人软骨细胞(采用骨关节人软骨原代细胞,购自Promocell公司,货号C-12710),并用Puromycin 1mg/ml选择三天后,加入强力霉素7~10天后,提取细胞DNA,全基因组亚硫酸氢盐测序(Whole-Genome Bisulfite Sequencing,WGBS)。

[0134] 第二阶段II:WGBS将亚硫酸氢盐(bisulfite)化学处理DNA,之后通过PCR扩增和测序,可以获得甲基化和未甲基化的C的信息。第二阶段II具体参见应用例1所述,在此不进行一一赘述。

[0135] 应用例1、对比例1及对比例2实验结果:

[0136] 请参阅图3所示,实施例1制备的目标质粒在人软骨细胞中形成Oct4转录因子,Sox2转录因子,Klf4转录因子,Glis1转录因子和Lin28转录因子,强力霉素诱导7~10天,明显增加软骨甲基化CpG位点数,降低软骨表观遗传学年龄,增强其损伤修复的能力,从而防治骨关节炎,相比之下对比例1中3个编码细胞多潜能Oct4转录因子,Sox2转录因子,Klf4转录因子对软骨表观遗传学年龄没有逆转;对比例2无法形成上述转录因子,对软骨表观遗传

学年龄亦没有逆转。

[0137] 对比例3:OSKM腺病毒表达载体的制备

[0138] 制备编码Oct4转录因子、Sox2转录因子、Klf4转录因子以及c-Myc转录因子的AAV (adeno-associated virus,腺病毒相关) 病毒载体,作为OSKM腺病毒表达载体。

[0139] 对比例4:OSK腺病毒表达载体的制备

[0140] 制备编码Oct4转录因子、Sox2转录因子以及Klf4转录因子的AAV (adeno-associated virus,腺病毒相关) 病毒载体,作为OSK腺病毒表达载体。

[0141] 对比例5:OSKML腺病毒表达载体的制备

[0142] 制备编码Oct4转录因子、Sox2转录因子、Klf4转录因子、c-Myc转录因子以及lin28转录因子的AAV (adeno-associated virus,腺病毒相关) 病毒载体,作为OSKML腺病毒表达载体。

[0143] 对比例6:OSKGML腺病毒表达载体的制备

[0144] 制备编码Oct4转录因子、Sox2转录因子、Klf4转录因子、Glis1转录因子、c-Myc转录因子以及lin28转录因子的AAV (adeno-associated virus,腺病毒相关) 病毒载体,作为OSKGML腺病毒表达载体。

[0145] 对比例7:OSKG腺病毒表达载体的制备

[0146] 制备编码Oct4转录因子、Sox2转录因子、Klf4转录因子以及Glis1转录因子的AAV (adeno-associated virus,腺病毒相关) 病毒载体,作为OSKG腺病毒表达载体。

[0147] 对比例8:OSKL腺病毒表达载体的制备

[0148] 制备编码Oct4转录因子、Sox2转录因子、Klf4转录因子以及lin28转录因子的AAV (adeno-associated virus,腺病毒相关) 病毒载体,作为OSKL腺病毒表达载体。

[0149] 毒理学实验

[0150] 将实施例2制备的目标腺病毒表达载体、对比例3制备的OSKM腺病毒表达载体以及对比例4制备的OSK腺病毒表达载体分别静脉注射至小鼠中,进行4周观察,结果如表1所示。

[0151] 表1毒理学实验结果表

转录因子组合	动物及数量	载体	给药路径	表达时间	结果
OSKM (对比例 3)	小鼠 4 只	AAV8	眼眶静脉注射	4 周	全部死亡
OSK (对比例 4)	小鼠 4 只	AAV8	眼眶静脉注射	4 周	全部存活
OSKGL (实施例 2)	小鼠 4 只	AAV8	眼眶静脉注射	4 周	全部存活
[0152] OSK+OGL (实施例 4)	小鼠 4 只	AAV8	眼眶静脉注射	4 周	全部存活
OSKML(对比例 5)	小鼠 4 只	AAV8	眼眶静脉注射	4 周	全部死亡
OSKGLM (对比例 6)	小鼠 4 只	AAV8	眼眶静脉注射	4 周	全部死亡
OSKG (对比例 7)	小鼠 4 只	AAV8	眼眶静脉注射	4 周	全部存活
OSKL (对比例 8)	小鼠 4 只	AAV8	眼眶静脉注射	4 周	全部存活

[0153] 如表1所示,cMyc同其他多潜能转录因子一起表达(对应对比例3、对比例5和对比例6)会引起明显毒性,造成小鼠死亡,OSKGL(对应实施例2和实施例4)、OSK(对应对比例4)、OSKG(对应对比例7)以及OSKL(对应对比例8)则无明显毒性。

[0154] 应用例3:实施例3的目标mRNA转染人卵巢颗粒细胞实验

[0155] 人卵巢颗粒细胞培养:选择Creatvie Bioarray公司货号CSC-I9239L人卵巢颗粒细胞,按说明进行培养。

[0156] mRNA转染:将纯化好的目标mRNA(包括突变复制酶mRNA,OSKGL),加入到细胞中,利用合适的转染试剂(如脂质体、聚合物等)将mRNA引入细胞,每1~2天转染1次,共计转染7~10次。

[0157] 随后进行转染后的人卵巢颗粒细胞部分重编程后甲基化分析和表观遗传学年龄计算。

[0158] 1,甲基化分析步骤:

[0159] a.样品准备:收集OSKMGLmRNA处理细胞。

[0160] b.DNA提取:使用商业化的DNA提取试剂盒提取样品中的DNA。

[0161] c.甲基化酶处理:使用商业化的甲基化酶试剂将DNA进行处理,以区分甲基化的Cytosine和未甲基化的Cytosine。

[0162] d.甲基化检测:采用上述WGBS测序方法,测序。

[0163] e.数据分析:将数据输入到生物信息学软件中R包中。数据分析包括质量控制,数据清洗,数据预处理,特征提取和统计分析。

[0164] 2,表观遗传学年龄计算

[0165] a.将上述甲基化数据输入线上表观遗传学年龄计算器<https://>

dnamage.genetics.ucla.edu/home。

[0166] b. 选择Horvath时钟和Hannum时钟。

[0167] c. 运行分析后,产生表观遗传学年龄。

[0168] 对比例9:OSK-mRNA表达系统

[0169] OSK-mRNA表达系统包括编码Oct4转录因子的第一mRNA、编码Sox2转录因子的第二mRNA、编码Klf4转录因子的第二mRNA以及编码甲病毒属突变型复制酶的第三mRNA。

[0170] 其中,两种第二mRNA的摩尔量相同,第一mRNA的摩尔量与两种第二mRNA的摩尔量和之比为2~6。

[0171] 其中,第三mRNA的摩尔量为编码Oct4转录因子的mRNA、编码Sox2转录因子的mRNA以及编码Klf4转录因子的mRNA的摩尔量之和的1~8倍。

[0172] 第一mRNA按照5'→3'方向依次包括如下元件:5' UTR序列、信号肽序列、Oct4转录因子编码序列和3' UTR序列;各第二mRNA按照5'→3'方向依次包括如下元件:5' UTR序列、目标重编程因子编码序列和3' UTR序列,每个第二mRNA还包括信号肽序列。

[0173] 人卵巢颗粒细胞培养:选择Creatvie Bioarray公司货号CSC-I9239L人卵巢颗粒细胞,按说明进行培养。

[0174] mRNA转染:将纯化好的OSK-mRNA(包括突变复制酶mRNA,OSK),加入到细胞中,利用合适的转染试剂(如脂质体、聚合物等)将mRNA引入细胞,每1~2天转染1次,共计转染7~10次。

[0175] 随后进行转染后的人卵巢颗粒细胞部分重编程后甲基化分析和表观遗传学年龄计算,具体参见应用例3。

[0176] 对比例10:空-mRNA表达系统

[0177] 空-mRNA表达系统包括编码甲病毒属突变型复制酶的第三mRNA。

[0178] 人卵巢颗粒细胞培养:选择Creatvie Bioarray公司货号CSC-I9239L人卵巢颗粒细胞,按说明进行培养。

[0179] mRNA转染:将纯化好的空-mRNA(包括突变复制酶mRNA),加入到细胞中,利用合适的转染试剂(如脂质体、聚合物等)将mRNA引入细胞,每1~2天转染1次,共计转染7~10次。

[0180] 随后进行转染后的人卵巢颗粒细胞部分重编程后甲基化分析和表观遗传学年龄计算,具体参见应用例3。

[0181] 应用例3、对比例9和对比例10实验结果

[0182] 请参阅图4所示,在人卵巢颗粒细胞中用目标mRNA表达系统编码细胞多潜能转录因子Oct4,Sox2,Klf4,Glis1和Lin28处理7~10天,明显降低卵巢表观遗传学年龄,增强其损伤修复的能力,从而防治卵巢早衰,相比之下对比例9中3个编码细胞多潜能转录因子Oct4,Sox2,Klf4对卵巢表观遗传学年龄没有逆转;对比例10中空-mRNA表达系统对卵巢表观遗传学年龄没有逆转。

[0183] 对比例11:AAV-OSK表达系统的制备

[0184] 本对比例的表达系统包括第一腺病毒表达载体以及第三腺病毒表达载体。

[0185] 第一腺病毒表达载体(AAV-TET-OSK,以下简称为AAV1-OSK)为AAV9病毒DNA载体,该重组载体的结构参见图10所示,该重组载体可以为重组质粒,该重组载体的核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示。在如SEQ ID NO.2所示的核苷酸序列中,454至1533位为编码Oct4转录

因子的核苷酸序列,1591至2541位为编码Sox2转录因子的核苷酸序列,2596至4008位为编码Klf4转录因子的核苷酸序列。

[0186] 第三腺病毒表达载体 (pAAV-EF1a-rtTA,以下简称为AAV3-强力霉素诱导开关) 为 AAV9病毒DNA载体,该重组载体的结构参见图12所示,该重组载体可以为重组质粒,该重组载体的核苷酸序列如SEQ ID NO.4所示。在如SEQ ID NO.4所示的核苷酸序列中,739至1482位为编码调控蛋白 (Tet-On®3G) 的核苷酸序列。

[0187] 本对比例例的表达系统在强力霉素的诱导下能够同时表达转录因子Oct4转录因子,Sox2转录因子和Klf4转录因子。

[0188] 对比例12:AAV-OGL表达系统的制备

[0189] 本对比例例的表达系统包括第二腺病毒表达载体以及第三腺病毒表达载体。

[0190] 第二腺病毒表达载体 (AAV-TET-OGL,以下简称为AAV2-OGL) 为AAV9病毒DNA载体,该重组载体的结构参见图11所示,该重组载体可以为重组质粒,该重组载体的核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示。在如SEQ ID NO.3所示的核苷酸序列中,454至1533位为编码Oct4转录因子的核苷酸序列,1591至3450位为编码Glis1转录因子的核苷酸序列,3505至4134位为编码lin28转录因子的核苷酸序列。

[0191] 第三腺病毒表达载体 (pAAV-EF1a-rtTA,以下简称为AAV3-强力霉素诱导开关) 为 AAV9病毒DNA载体,该重组载体的结构参见图12所示,该重组载体可以为重组质粒,该重组载体的核苷酸序列如SEQ ID NO.4所示。在如SEQ ID NO.4所示的核苷酸序列中,739至1482位为编码调控蛋白 (Tet-On®3G) 的核苷酸序列。

[0192] 本对比例例的表达系统在强力霉素的诱导下能够同时表达转录因子Oct4转录因子,Glis1转录因子和lin28转录因子。

[0193] 对比例13:AAV-报告基因表达系统的制备

[0194] 本对比例例的表达系统包括编码GFP蛋白的DNA核酸分子。

[0195] 本对比例例的表达系统为AAV9病毒DNA载体,能够表达GFP蛋白。

[0196] 应用例4:延长老年鼠剩余寿命实验研究

[0197] 将AAV9病毒DNA载体序列交付生物公司 (SignaGen) 合成AAV9病毒,分别得到第一腺病毒表达载体 (1.556E13 vg/mL,AAV1-OSK),第二腺病毒表达载体 (1.556E13 vg/mL,AAV2-OGL),第三腺病毒表达载体 (AAV3-强力霉素诱导开关) 和报告基因GFP病毒 (1.556E13 vg/mL,AAV-报告基因),所有AAV9病毒在强力霉素的诱导下表达。

[0198] 分别制备得到实施例4的表达系统 (AAV OSKGL)、对比例11的表达系统 (AAV OSK)、对比例12的表达系统 (AAV OGL) 和对比例13的表达系统 (AAV报告基因)。

[0199] 在老年小鼠模型 (124周雄性C57BL/6J小鼠,购自Jaxson Lab),通过眼球后静脉途径注射4组处理组:A组:注射实施例4的表达系统 (AAV OSKGL)、B组:注射对比例11的表达系统 (AAV OSK)、C组:注射对比例12的表达系统 (AAV OGL),D组:注射对比例13的表达系统 (AAV报告基因)。

[0200] 其中,A组、B组和C组中每只小鼠注射1.5E12 vg (150μL体积),D组中每只小鼠则注射150μL。

[0201] 注射后,A组、B组、C组和D组诱导使用强力霉素是在研究期间一周通过强力霉素诱导目标转录因子基因的表达和一周关闭目标转录因子基因表达,再一周通过强力霉素诱导

目标转录因子基因的表达和一周关闭目标转录因子基因表达,如此循环,其中,通过提供2mg/mL浓度的强力霉素混合饮用水实现强力霉素诱导。

[0202] 检测所有小鼠剩余寿命。具体地,衰老标记物检测及老年小鼠剩余寿命计算方式如下:

[0203] A组、B组、C组和D组分别处理8周后,收集小鼠肝脏并按试剂盒**Monarch®**基因组DNA提取和纯化试剂盒(New England Labs,NEB#T3050)及说明书,提取和纯化肝脏基因组DNA,用Illumina RRBS芯片扫描基因组甲基化位点谱,按参考文献PMID24138928及对应的计算方法生物年龄时钟(<https://dnamage.genetics.ucla.edu/home>)计算A组、B组、C组和D组中每只小鼠的衰老生物标记物(表观遗传年龄)。

[0204] 请参阅图5所示,A组(实施例4)处理124周老年鼠表现出降低老年鼠表观遗传生物年龄和延长老年鼠剩余寿命。其中,图5中A显示A组(实施例4)显著降低老年鼠表观遗传生物年龄,而B组(对比例11),C组(对比例12)作用不明显。图5中B显示A组(实施例4)显著提高老年鼠剩余寿命,而B组(对比例11),C组(对比例12)作用不明显。*** $P < 0.001$ 。

[0205] 实验结果提示经过体内AAV1+AAV2+AAV3(A组,实施例4的OSKGL)处理8周后,相当于对照组(B组、C组和D组)小鼠的表观遗传年龄显著下降,剩余寿命明显延长。

[0206] 应用例5:降低高脂肪饮食鼠表观遗传生物年龄实验研究

[0207] 将AAV9病毒DNA载体序列交付生物公司(SignaGen)合成AAV9病毒,分别得到第一腺病毒表达载体(1.556E13 vg/mL,AAV1-OSK),第二腺病毒表达载体(1.556E13 vg/mL,AAV2-UGL),第三腺病毒表达载体(AAV3-强力霉素诱导开关)和报告基因GFP病毒(1.556E13 vg/mL,AAV-报告基因),所有AAV9病毒在强力霉素的诱导下表达。

[0208] 分别制备得到实施例4的表达系统(AAV OSKGL)、对比例11的表达系统(AAV OSK)、对比例12的表达系统(AAV UGL)和对比例13的表达系统(AAV报告基因)。

[0209] 高脂肪饮食小鼠模型的建立:雄性C57BL/6J野生型(WT,购自Jaxson Lab)小鼠,每笼三至四只,可自由进食水。小鼠首先被转换到第一实验饲料(LabDiet5053,购自Labdiet公司),持续4个月;随后,小鼠进行高脂肪饲养(小鼠被转换到高脂肪AIN-93G饮食,即通过添加氢化椰子油,使其提供60%的热量来自脂肪,以建立高脂肪饮食小鼠模型);高脂肪饲养5个月后,得到高脂肪饮食小鼠模型。收集高脂肪饮食小鼠模型的肝脏,进行衰老生物标记物(表观遗传年龄)检测。

[0210] 在高脂肪饮食小鼠模型上,通过眼球后静脉途径注射4组处理组:A组:注射实施例4的表达系统(AAV OSKGL)、B组:注射对比例11的表达系统(AAV OSK)、C组:注射对比例12的表达系统(AAV UGL),D组:注射对比例13的表达系统(AAV报告基因)。

[0211] 其中,A组、B组和C组中每只小鼠注射1.5E12 vg(150 μ L体积),D组中每只小鼠则注射150 μ L。

[0212] 注射后,A组、B组、C组和D组诱导使用强力霉素是在研究期间一周通过强力霉素诱导目标转录因子基因的表达和一周关闭目标转录因子基因表达,再一周通过强力霉素诱导目标转录因子基因的表达和一周关闭目标转录因子基因表达,如此循环,其中,通过提供2mg/mL浓度的强力霉素混合饮用水实现强力霉素诱导。

[0213] 检测所有小鼠剩余寿命。具体地,衰老标记物检测及老年小鼠剩余寿命计算方式如下:

[0214] A组、B组、C组和D组分别处理8周后,收集小鼠肝脏并按试剂盒**Monarch®**基因组DNA提取和纯化试剂盒(New England Labs,NEB#T3050)及说明书,提取和纯化肝脏基因组DNA,用Illumina RRBS芯片扫描基因组甲基化位点谱,按参考文献PMID24138928及对应的计算方法生物年龄时钟(<https://dnamage.genetics.ucla.edu/home>)计算A组、B组、C组和D组中每只小鼠的衰老生物标记物(表观遗传年龄)。

[0215] 请参阅图6所示,A组(实施例4)降低高脂肪饮食后肝脏表观遗传学生物年龄。A组(实施例4)显著降低高脂肪饮食后肝脏表观遗传学生物年龄,而B组(对比例11),C组(对比例12)作用不明显。*** $P < 0.001$ 。

[0216] 应用例6:降低肝纤维化鼠表观遗传生物学年龄并逆转小鼠肝纤维化实验研究

[0217] 将AAV9病毒DNA载体序列交付生物公司(SignaGen)合成AAV9病毒,分别得到第一腺病毒表达载体(1.556E13 vg/mL,AAV1-OSK),第二腺病毒表达载体(1.556E13 vg/mL,AAV2-OGL),第三腺病毒表达载体(AAV3-强力霉素诱导开关)和报告基因GFP病毒(1.556E13 vg/mL,AAV-报告基因),所有AAV9病毒在强力霉素的诱导下表达。

[0218] 分别制备得到实施例4的表达系统(AAV OSKGL)、对比例11的表达系统(AAV OSK)、对比例12的表达系统(AAV OGL)和对比例13的表达系统(AAV报告基因)。

[0219] 肝脏纤维化小鼠模型的构建:6-8周C57BL/6小鼠每周两次腹腔注射 1ml kg^{-1} 四氯化碳(CCl_4),连续注射12次,诱导肝纤维化。

[0220] 在肝脏纤维化小鼠模型上,通过眼球后静脉途径注射4组处理组:A组:注射实施例4的表达系统(AAV OSKGL)、B组:注射对比例11的表达系统(AAV OSK)、C组:注射对比例12的表达系统(AAV OGL),D组:注射对比例13的表达系统(AAV报告基因)。

[0221] 其中,A组、B组和C组中每只小鼠注射 $1.5\text{E}12$ vg($150\mu\text{L}$ 体积),D组中每只小鼠则注射 $150\mu\text{L}$ 。

[0222] 注射后,A组、B组、C组和D组诱导使用强力霉素是在研究期间一周通过强力霉素诱导目标转录因子基因的表达和一周关闭目标转录因子基因表达,再一周通过强力霉素诱导目标转录因子基因的表达和一周关闭目标转录因子基因表达,如此循环,其中,通过提供 2mg/mL 浓度的强力霉素混合饮用水实现强力霉素诱导。同时,在上述实验期间,每周两次腹腔注射 1ml kg^{-1} 四氯化碳(CCl_4)。

[0223] 各表达系统处理8周后,最后一次 CCl_4 注射后,48-72h处置收集小鼠肝脏,A组、B组、C组和D组中,均由部分小鼠收集肝脏,进行衰老生物标记物(表观遗传年龄)检测(见上步骤),部分小鼠进行肝脏SA- β -gal染色。肝脏SA- β -gal染色过程如下:SA- β -gal染色按照先前的描述进行(PMID:30573629),pH 5.5的条件下新鲜冰冻组织切片,用含有0.5%戊二醛的磷酸盐缓冲盐水(PBS)固定15min,用含有 1mM MgCl_2 的PBS洗涤,并在含有 1mM MgCl_2 、 1mg ml^{-1} X- β -gal、 5mM 钾亚铁氰化钾和 5mM 钾铁氰化钾的PBS中染色5-8h。组织切片进行了伊红染色。每个孔或切片的五个高倍视野进行计数并求平均以量化SA- β -gal阳性细胞的百分比。一组小鼠肝脏组织标本在10%福尔马林中固定过夜,然后嵌入石蜡并切成 $5\mu\text{m}$ 厚的切片,切片进行了苏木精-伊红(H&E)染色,以及用于检测纤维化的Sirius Red染色,为了对纤维化进行定量分析,每只小鼠至少有三个完整切片进行扫描,然后利用NIH ImageJ软件对图像进行量化分析。纤维化组织的数量相对于总分析的肝脏面积进行计算。

[0224] 请参阅图7所示,图7中A显示A组(实施例4)显著降低鼠纤维化肝脏SA- β -gal阳性

细胞百分比,而B组(对比例11),C组(对比例12)作用不明显。图7中B显示A组(实施例4)显著降低鼠纤维化肝脏Sirus红染色阳性细胞百分比,而B组(对比例11),C组(对比例12)作用不明显。*** $P < 0.001$ 。

[0225] 实验结果提示经过体内AAV OSKGL处理8周后,小鼠的肝脏纤维化明显改善。

[0226] 应用例7:降低雌性鼠表观遗传生物年龄及阻止卵巢衰老实验研究

[0227] 将AAV9病毒DNA载体序列交付生物公司(SignaGen)合成AAV9病毒,分别得到第一腺病毒表达载体(1.556E13 vg/mL,AAV1-OSK),第二腺病毒表达载体(1.556E13 vg/mL,AAV2-OGL),第三腺病毒表达载体(AAV3-强力霉素诱导开关)和报告基因GFP病毒(1.556E13 vg/mL,AAV-报告基因),所有AAV9病毒在强力霉素的诱导下表达。

[0228] 分别制备得到实施例4的表达系统(AAV OSKGL)、对比例11的表达系统(AAV OSK)、对比例12的表达系统(AAV OGL)和对比例13的表达系统(AAV报告基因)。

[0229] 27周龄的雌性C57BL/6小鼠(购自Jaxson Lab),并自由喂养一周以适应环境,通过眼球后静脉途径注射4组处理组:A组:注射实施例4的表达系统(AAV OSKGL)、B组:注射对比例11的表达系统(AAV OSK)、C组:注射对比例12的表达系统(AAV OGL),D组:注射对比例13的表达系统(AAV报告基因)。

[0230] 其中,A组、B组和C组中每只小鼠注射1.5E12 vg(150 μ L体积),D组中每只小鼠则注射150 μ L。

[0231] 注射后,A组、B组、C组和D组诱导使用强力霉素是在研究期间一周通过强力霉素诱导目标转录因子基因的表达和一周关闭目标转录因子基因表达,再一周通过强力霉素诱导目标转录因子基因的表达和一周关闭目标转录因子基因表达,如此循环,其中,通过提供2mg/mL浓度的强力霉素混合饮用水实现强力霉素诱导。

[0232] 在实验期间,分别在3个月和6个月喂养后的连续14天中,每天上午约9点采集阴道涂片,以评估发情周期状况。用生理盐水采集阴道分泌物,然后将其涂抹在载玻片上,等干燥后进行HE染色。然后,我们通过显微镜下的细胞学确定发情周期的阶段,并计算正常发情周期的小鼠比例。

[0233] 请参阅图8所示,图8中A显示A组(实施例4)显著降低卵巢表观遗传生物年龄,而B组(对比例11),C组(对比例12)作用不明显。图8中B显示A组(实施例4)处理6个月后明显提高雌性小鼠正常发情周期比例,推迟绝经期,而B组(对比例11),C组(对比例12)作用不明显。*** $P < 0.001$ 。

[0234] 实验结果显示,AAV OSKGL降低表观遗传生物年龄和阻止;卵巢功能衰老减弱。

[0235] 应用例8:降低鼠肺表观遗传生物年龄及减轻肺纤维化实验研究

[0236] 将AAV9病毒DNA载体序列交付生物公司(SignaGen)合成AAV9病毒,分别得到第一腺病毒表达载体(1.556E13 vg/mL,AAV1-OSK),第二腺病毒表达载体(1.556E13 vg/mL,AAV2-OGL),第三腺病毒表达载体(AAV3-强力霉素诱导开关)和报告基因GFP病毒(1.556E13 vg/mL,AAV-报告基因),所有AAV9病毒在强力霉素的诱导下表达。

[0237] 分别制备得到实施例4的表达系统(AAV OSKGL)、对比例11的表达系统(AAV OSK)、对比例12的表达系统(AAV OGL)和对比例13的表达系统(AAV报告基因)。

[0238] 肺纤维化小鼠模型的构建:6-8周C57BL/6小鼠,并通过气管导管直接滴注博来霉素盐酸盐BAXTER(1mg/kg)在50 μ L生理盐水(0.9%)中,或载体[50 μ L生理盐水(0.9%)]在第

0天和第4天2次使用,诱导肺纤维化,得到肺纤维化小鼠模型。

[0239] 在肺纤维化小鼠模型上,通过眼球后静脉途径注射4组处理组:A组:注射实施例4的表达系统(AAV OSKGL)、B组:注射对比例11的表达系统(AAV OSK)、C组:注射对比例12的表达系统(AAV OGL),D组:注射对比例13的表达系统(AAV报告基因)。

[0240] 其中,A组、B组和C组中每只小鼠注射 $1.5E12$ vg (150 μ L体积),D组中每只小鼠则注射150 μ L。

[0241] 注射后,A组、B组、C组和D组诱导使用强力霉素是在研究期间一周通过强力霉素诱导目标转录因子基因的表达和一周关闭目标转录因子基因表达,再一周通过强力霉素诱导目标转录因子基因的表达和一周关闭目标转录因子基因表达,如此循环,其中,通过提供2mg/mL浓度的强力霉素混合饮用水实现强力霉素诱导。

[0242] 各表达系统处理后,A组、B组、C组和D组中,均由部分小鼠收集肺脏,进行衰老生物标记物(表观遗传年龄)检测(见上步骤),部分小鼠进行羟脯氨酸的生化定量。羟脯氨酸的生化定量过程如下:使用Sigma-Aldrich公司的商业试剂盒,根据制造商的方案确定右肺中羟脯氨酸的含量。简要地说,右肺叶在PBS中匀浆,并取一部分在6N HCl中在100 $^{\circ}$ C下水解24小时。然后,通过氧化羟脯氨酸与4-(二甲氨基)苯甲醛(DMAB)的反应来测定羟脯氨酸浓度,产生的比色产物(560nm)与羟脯氨酸的含量成正比。右肺叶的羟脯氨酸总量根据其560nm比色计算得出。

[0243] 请参阅图9所示,AAV OSKGL降低肺表观遗传学生物年龄和减轻肺纤维化。图9中A显示A组(实施例4)显著降低肺表观遗传学生物年龄,而B组(对比例11),C组(对比例12)作用不明显。图9中B显示A组(实施例4)处理6个月后明显降低肺纤维化,降低纤维化肺脯氨酸含量,而B组(对比例11),C组(对比例12)作用不明显。*** $P < 0.001$ 。

[0244] 实验结果提示经过体内AAV OSKGL处理8周后,小鼠的肺羟脯氨酸明显下降,纤维化明显改善。

[0245] 以上所述的仅是本申请的实施方式,在此应当指出,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本申请创造构思的前提下,还可以做出改进,但这些均属于本申请的保护范围。

Created with SnapGene®

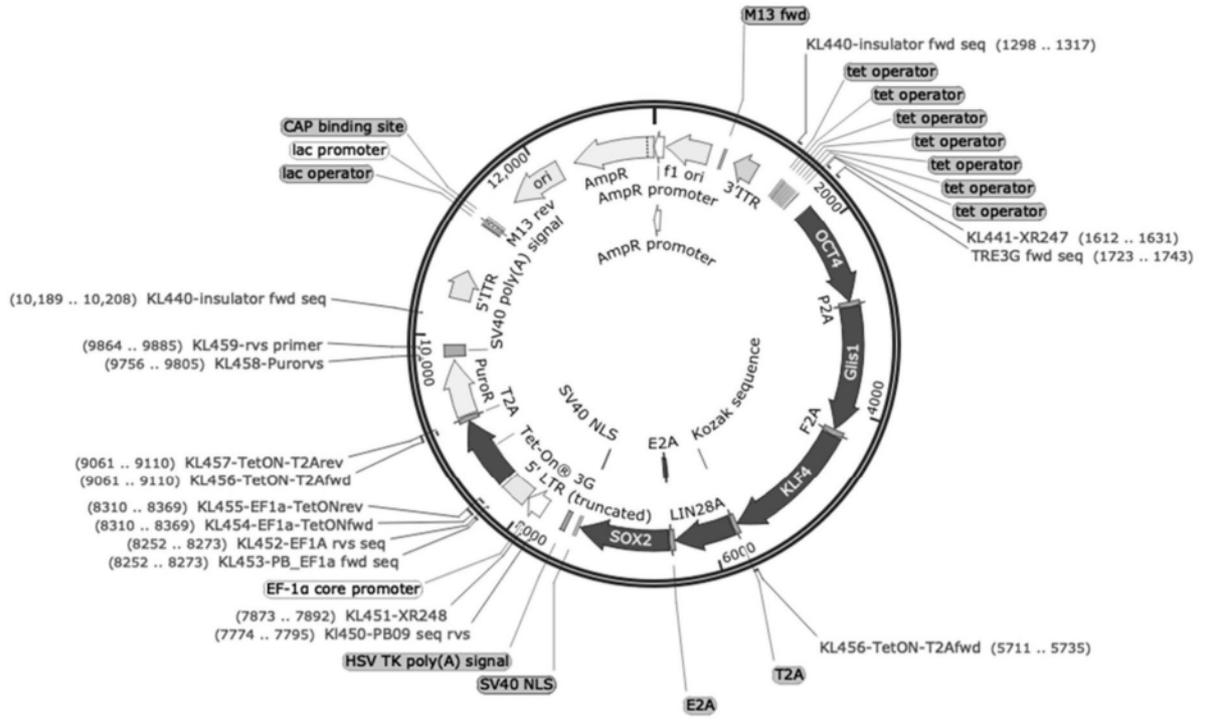


图1

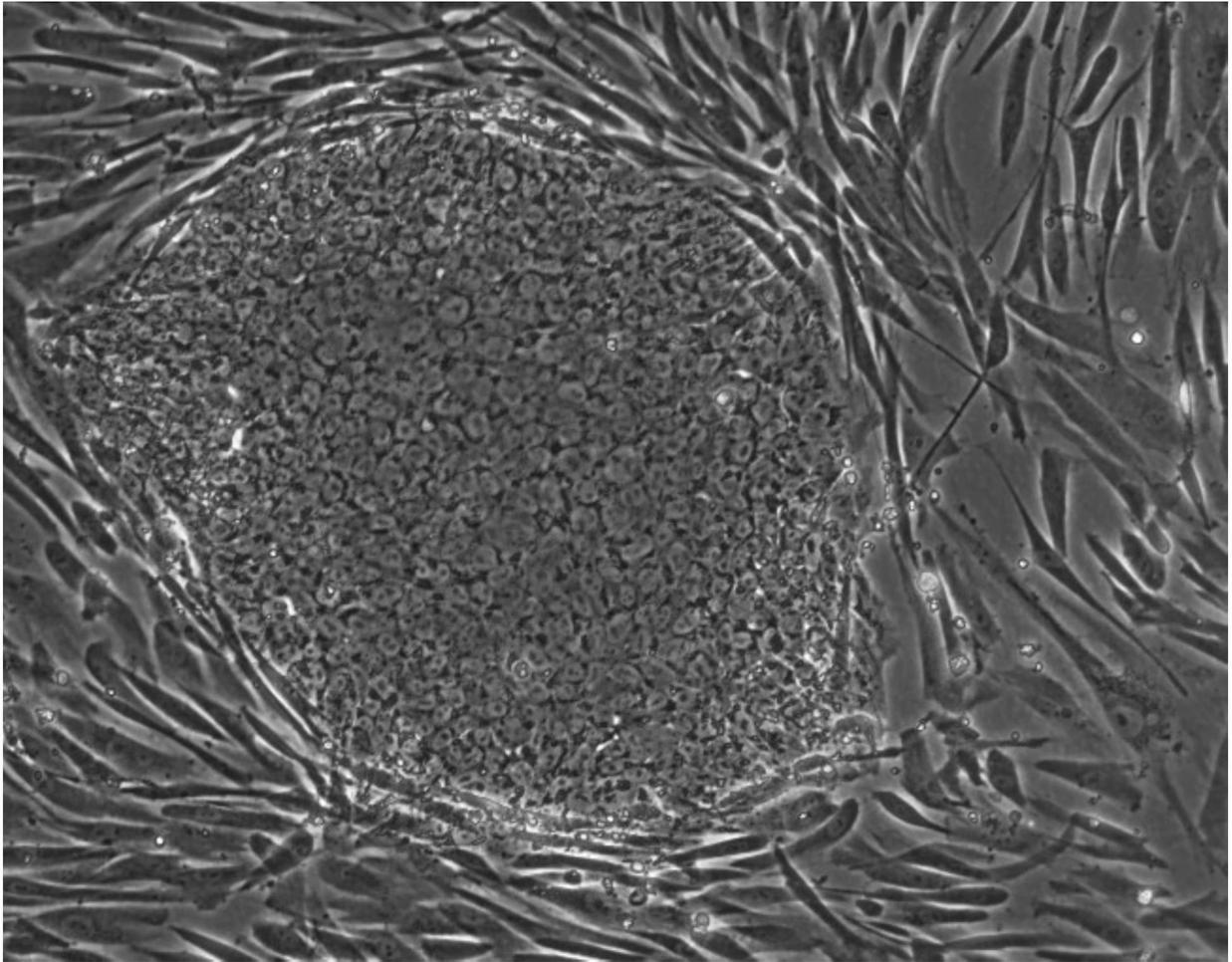


图2

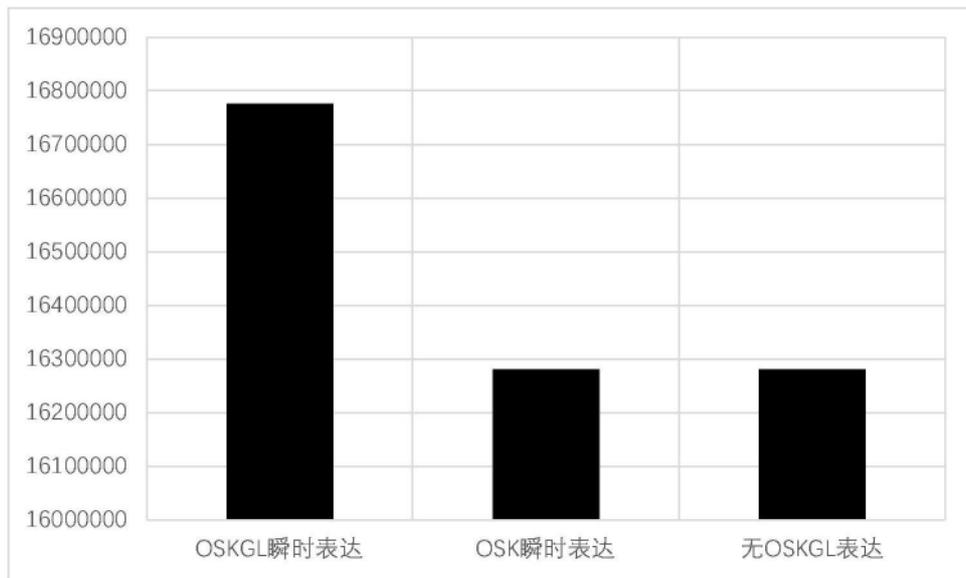


图3

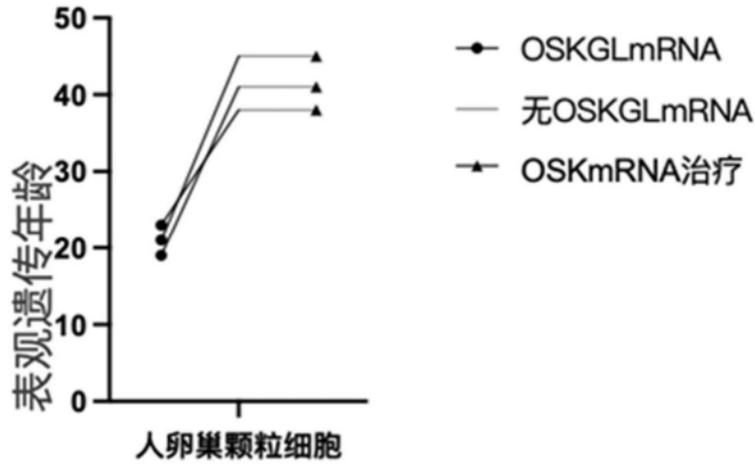


图4

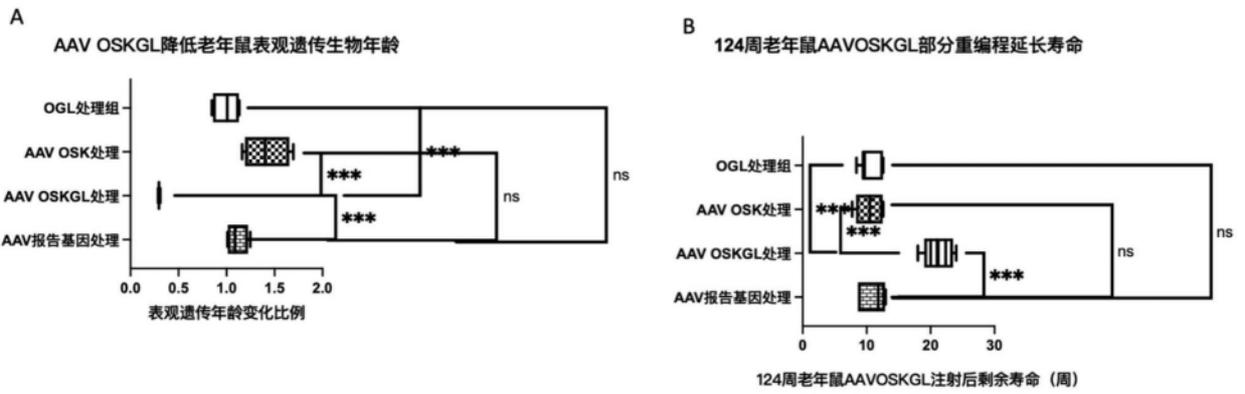


图5

高脂肪饮食后表观遗传生物年龄AAV OSKGL处理

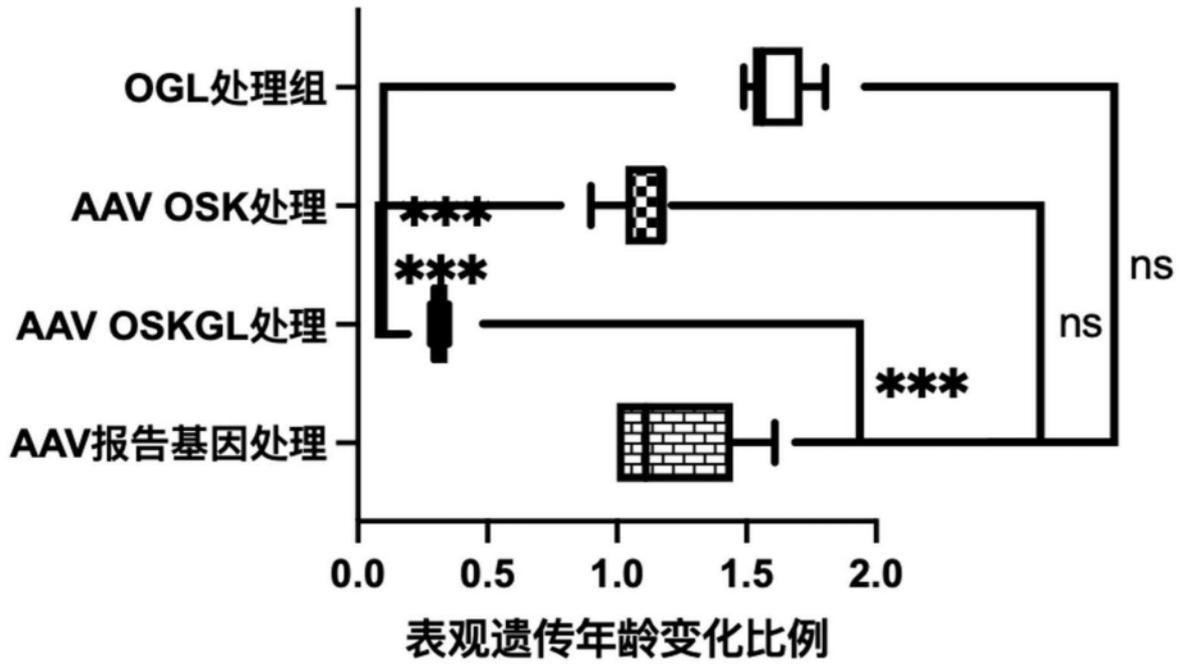


图6

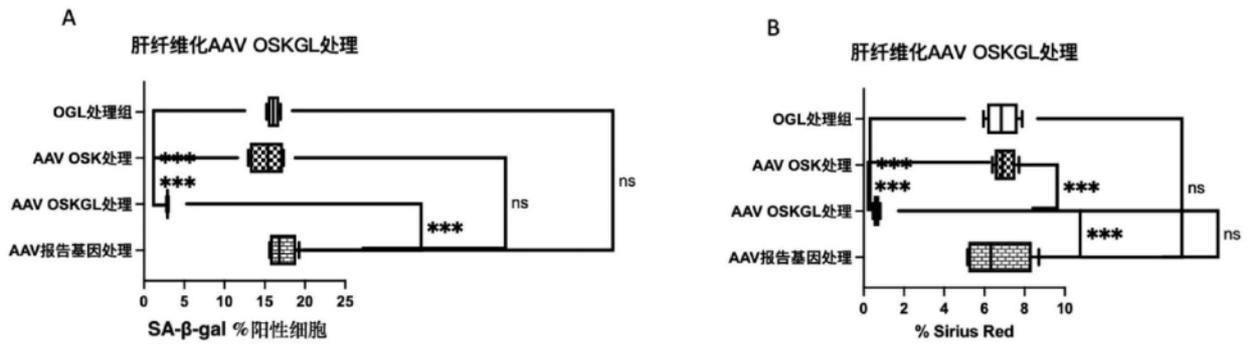


图7

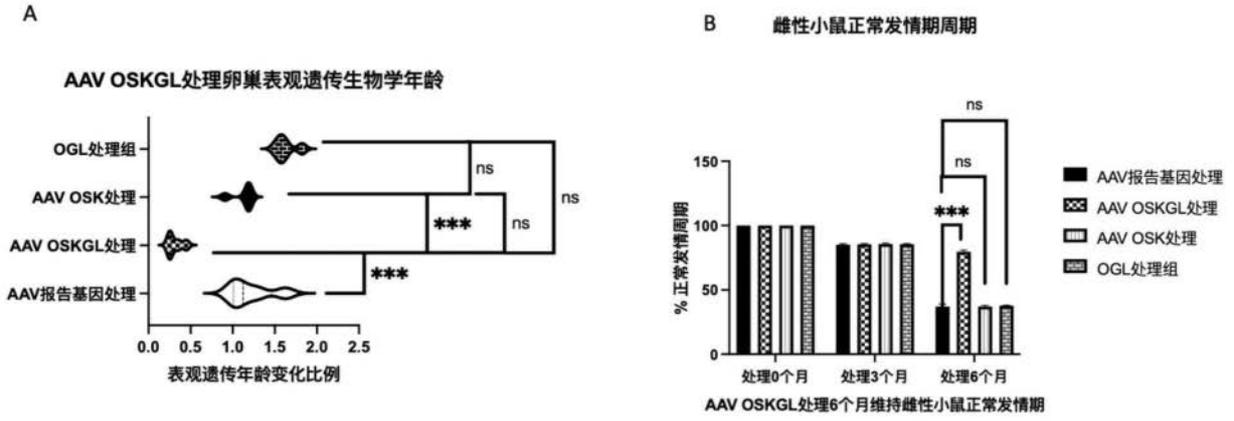


图8

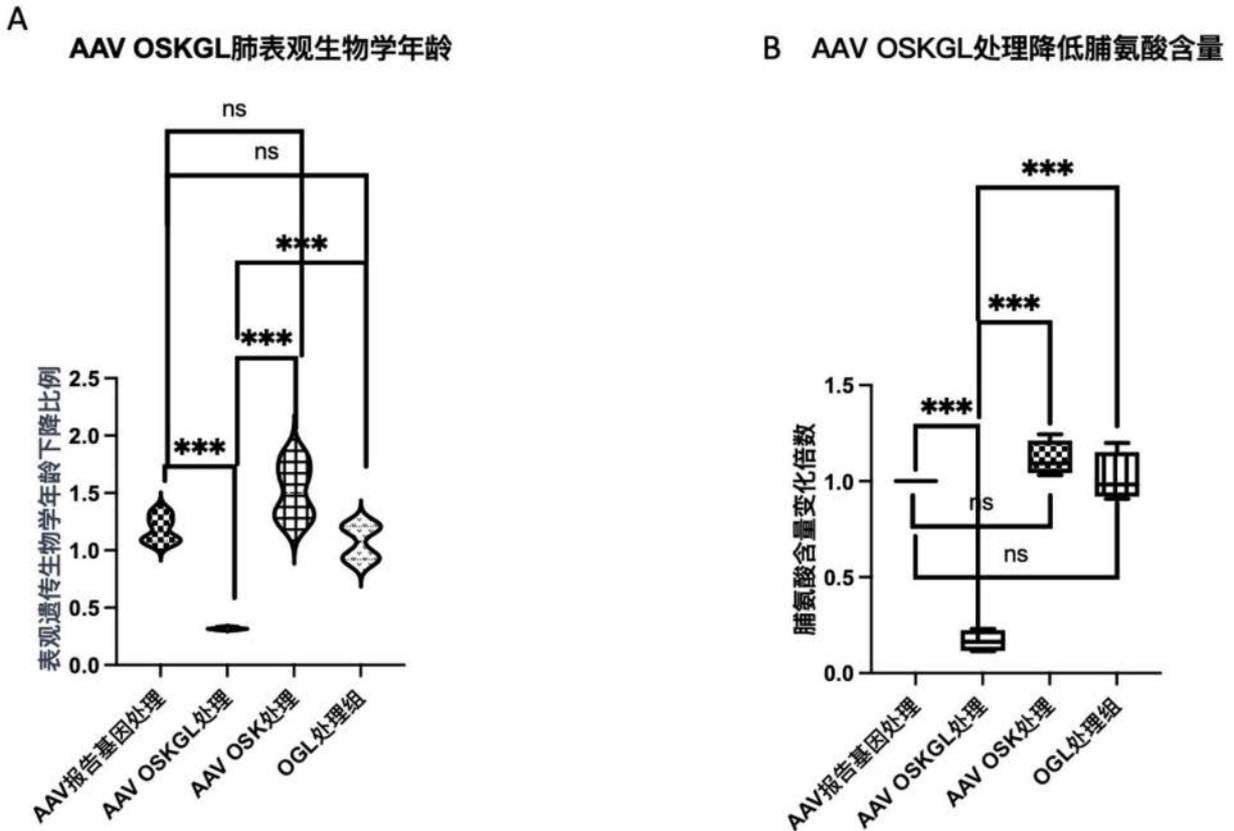


图9

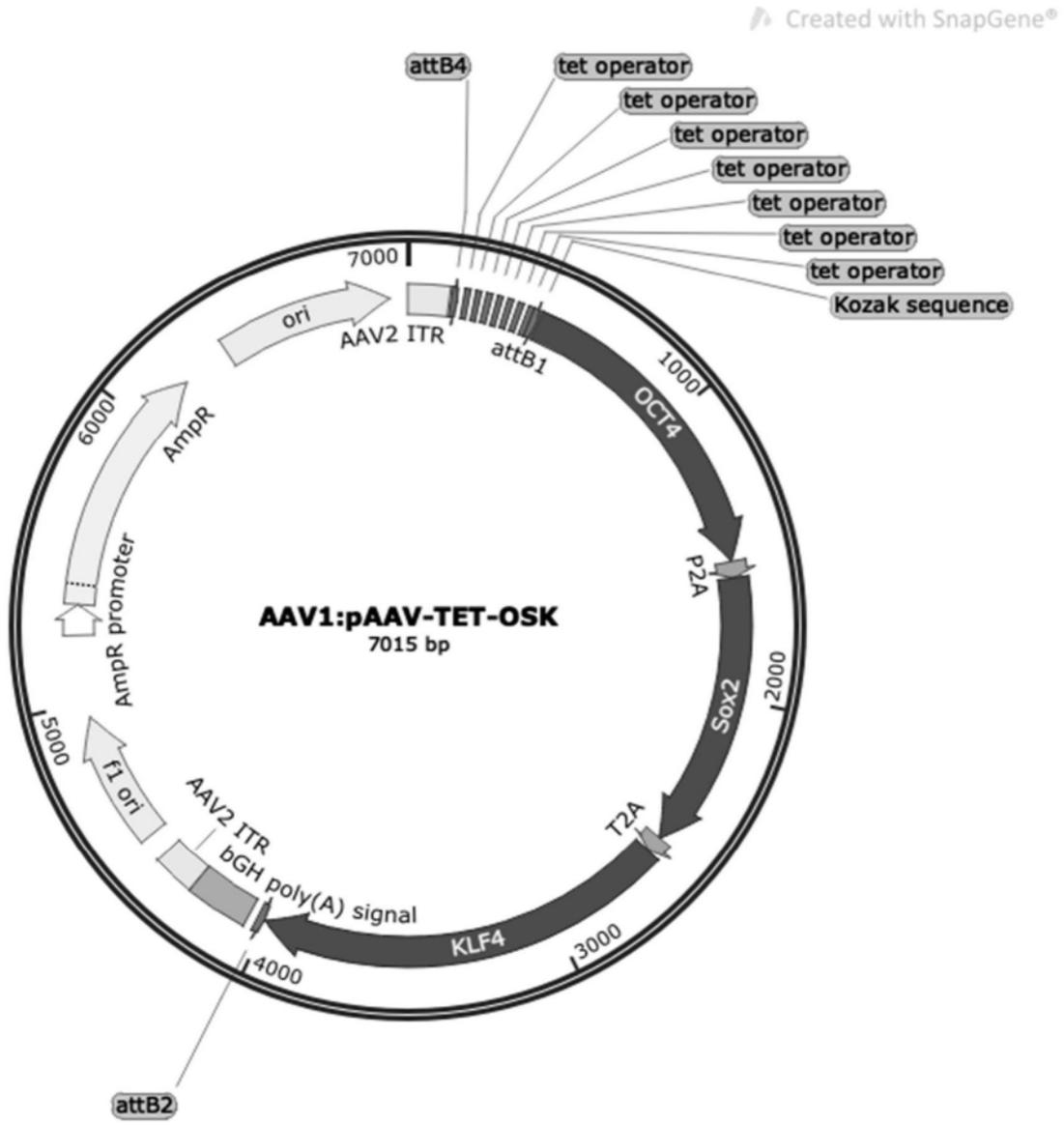


图10

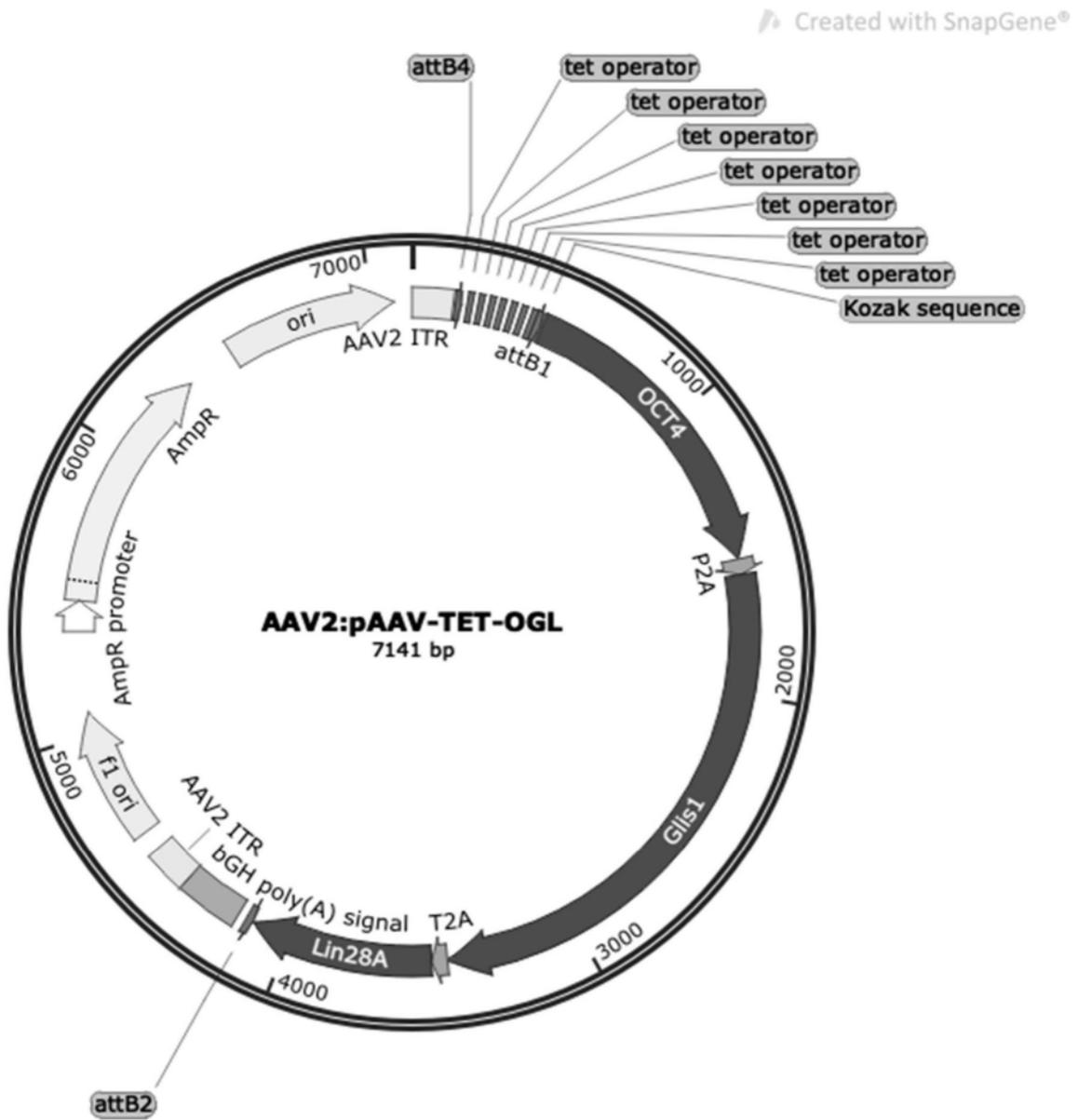


图11

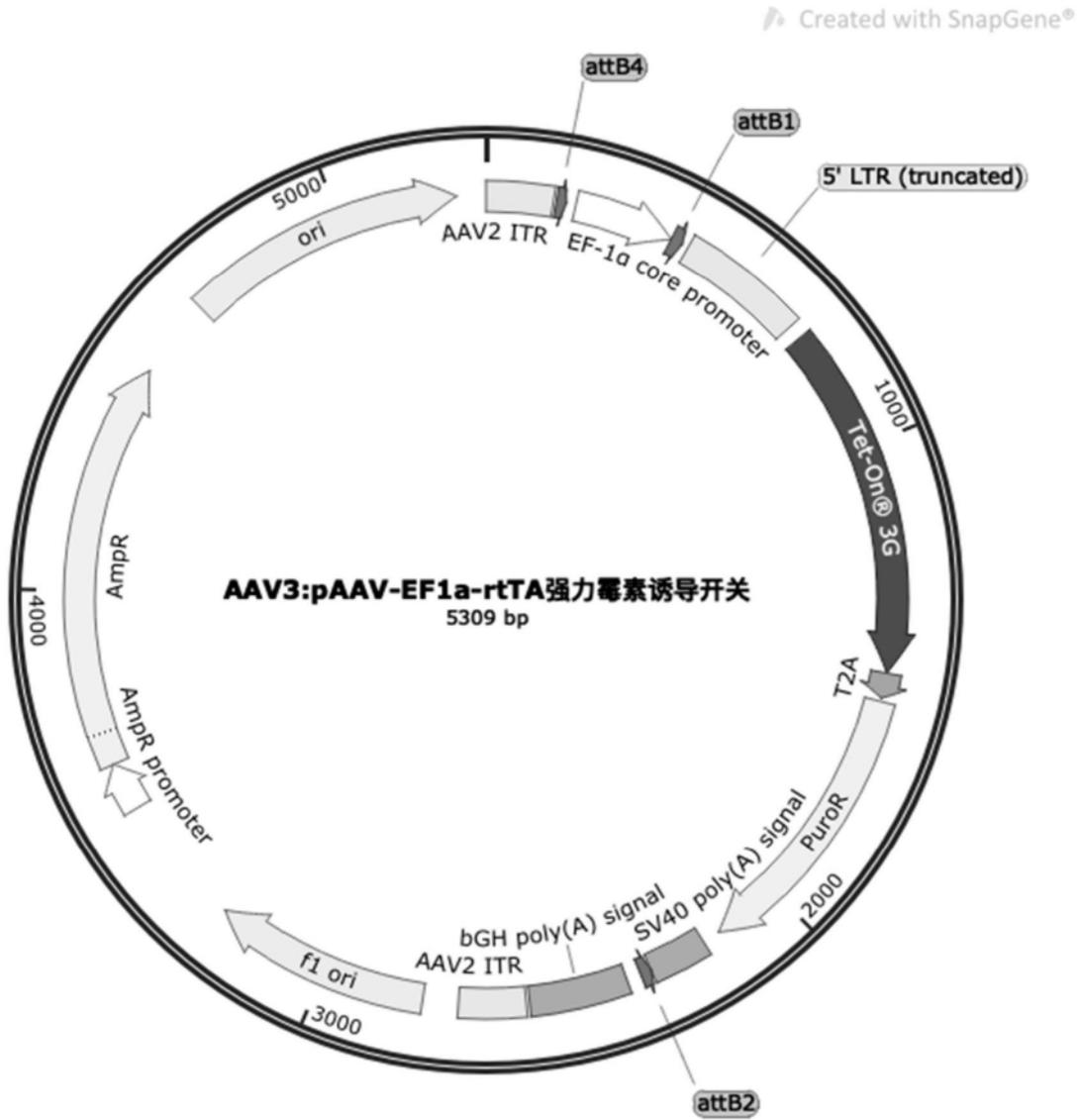


图12