



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111044726 A

(43)申请公布日 2020.04.21

(21)申请号 201911259105.8

(22)申请日 2019.12.10

(71)申请人 昆明理工大学

地址 650500 云南省昆明市呈贡大学城景明南路727号昆明理工大学

(72)发明人 周若宇 谢晓丽 秦子一 李鑫波

(74)专利代理机构 北京汇信合知识产权代理有限公司 11335

代理人 张焕响

(51) Int. Cl.

G01N 33/58(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

C12Q 1/34(2006.01)

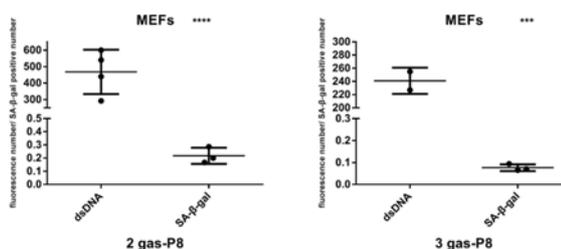
权利要求书1页 说明书6页 附图3页

(54)发明名称

一种检测和标记细胞衰老的方法及应用

(57)摘要

本发明公开了一种检测和标记细胞衰老水平的方法,包括以下步骤:采用免疫荧光方法检测细胞质中dsDNA的表达水平;将所检测细胞质中的dsDNA的表达水平与经典衰老染色方法检测β-半乳糖苷酶的检测结果进行比对;基于所述比对的结果来指示所述细胞的衰老水平。还公开检测成纤维细胞质中dsDNA的物质和表达水平在检测或辅助检测待测细胞衰老水平中的应用,以及在检测或辅助检测待测细胞衰老水平的产品的应用。本发明首次采用通过免疫荧光方法检测小鼠胚胎成纤维细胞质中dsDNA水平来评价细胞衰老水平,与经典衰老染色方法进行对比,证明该方法能够更准确、更精确地反应细胞衰老水平,为评价小鼠细胞衰老提供一种全新的检测指标。



1. 一种检测和标记细胞衰老水平的方法,其特征在于,包括以下步骤:
采用免疫荧光方法检测细胞质中双链脱氧核苷酸的表达水平;
将所检测细胞质中的双链脱氧核苷酸的表达水平与经典衰老染色方法检测 β -半乳糖苷酶的检测结果进行比对;
基于所述比对的结果来指示所述细胞的衰老水平。
2. 如权利要求1所述的检测和标记细胞衰老水平的方法,其特征在于,所述细胞来源于小鼠胚胎成纤维细胞或小鼠的其他来源的成纤维细胞。
3. 如权利要求1所述的检测和标记细胞衰老水平的方法,其特征在于,通过体外培养的细胞增殖减慢、延长的细胞周期及不可逆的细胞周期抑制、代谢改变、细胞形态改变指标指示所述细胞的衰老水平并进行定量。
4. 如权利要求1所述的检测和标记细胞衰老水平的方法,其特征在于,所述检测细胞中的双链脱氧核苷酸的表达水平是以标记细胞质里所含的双链脱氧核苷酸荧光信号的数量作为指标;
所述经典衰老染色法以 β -半乳糖苷酶检测后蓝色染色的细胞数量作为对照指标;
以三气培养条件下的p5代小鼠胚胎成纤维细胞为衰老的节点,将双链脱氧核苷酸标记后的荧光信号数量与对照指标进行比对以评价细胞衰老水平。
5. 如权利要求4所述的检测和标记细胞衰老水平的方法,其特征在于,标记细胞质里所含的双链脱氧核苷酸荧光信号的数量高于 β -半乳糖苷酶检测后蓝色染色的细胞数量,以指示细胞衰老水平。
6. 检测成纤维细胞中双链脱氧核苷酸的物质和表达水平在检测或辅助检测待测细胞衰老水平中的应用,其特征在于,根据权利要求1-5任一项所述的检测和标记细胞衰老水平的方法检测成纤维细胞中双链脱氧核苷酸的物质和表达水平。
7. 检测成纤维细胞细胞质中双链脱氧核苷酸的物质和表达水平在检测或辅助检测待测细胞衰老水平的产品的应用,其特征在于,根据权利要求1-5任一项所述的检测和标记细胞衰老水平的方法检测成纤维细胞质中双链脱氧核苷酸的物质和表达水平。
8. 如权利要求7所述的检测成纤维细胞细胞中双链脱氧核苷酸的物质和表达水平在检测或辅助检测待测细胞衰老水平的产品的应用,其特征在于,所述产品为检测或辅助检测待测细胞衰老水平的试剂盒。

一种检测和标记细胞衰老的方法及应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种检测和标记细胞衰老的方法和应用。

背景技术

[0002] 随着生活水平和医疗科技的发展以及人口平均寿命的延长,我国已经进入老龄化社会。因此,对衰老的预防研究和机制研究成为研究的焦点。衰老机制的研究是研究衰老相关疾病,如肿瘤、器官退行性变的关键。在组织和细胞水平上,衰老表现为干细胞库容衰减,细胞间通讯异常,线粒体功能异常,染色体不稳定性增加,表观遗传学修饰改变,蛋白稳态降低,端粒酶活性降低,端粒功能异常:包括端粒缩短,端粒DNA损伤,端粒结构异常改变等等。

[0003] 在对衰老机制的研究中,需要对细胞是否衰老做检测。衰老的成纤维细胞会分泌 β -半乳糖苷酶,称之为衰老相关 β -半乳糖苷酶(senescence-associated β -galactosidase;SA- β -Gal)。利用 β -半乳糖苷酶可以催化底物X-Gal生产蓝色产物这一特性,从而标记出衰老细胞。但是,由于这个指标会受细胞培养条件、处理条件(主要是pH值)等因素的影响,而导致检测结果可能存在较大偏差,因此开发出一个敏感且不受处理条件限制的检测标记方法非常重要,经过我们的试验发现,双链脱氧核苷酸(double strand desoxyribonucleic acid,dsDNA)抗体可以检测和标记衰老细胞,不仅可以较准确地指示衰老,而且检测灵敏度非常高。无论是对科研还是未来的临床市场,都是一种新型的灵敏的细胞衰老检测标记方法。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种检测和标记细胞衰老水平的方法,以解决上述现有技术存在的问题,首次通过免疫荧光方法检测小鼠胚胎成纤维细胞质中双链脱氧核苷酸水平评价细胞衰老水平,相比经典染色方法测定结果能够更准确、更精确低反应细胞的衰老水平。

[0005] 本发明还有一个目的是提供检测成纤维细胞质中双链脱氧核苷酸的物质和表达水平在检测或辅助检测待测细胞衰老水平中的应用。

[0006] 本发明还有一个目的是提供检测成纤维细胞细胞质中双链脱氧核苷酸的物质和表达水平在检测或辅助检测待测细胞衰老水平的产品的应用。

[0007] 为实现上述目的,本发明提供了如下方案:

[0008] 本发明提供一种检测和标记细胞衰老水平的方法,包括以下步骤:

[0009] 采用免疫荧光方法检测细胞质中双链脱氧核苷酸的表达水平;

[0010] 将所检测细胞质中的双链脱氧核苷酸的表达水平与经典衰老染色方法检测 β -半乳糖苷酶的检测结果进行比对;

[0011] 基于所述比对的结果来指示所述细胞的衰老水平。

[0012] 优选的是,所述细胞来源于小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblast,MEF)或小鼠的其他来源的成纤维细胞。

[0013] 优选的是,通过体外培养的细胞增殖减慢、延长延长的细胞周期及不可逆的细胞周期抑制、代谢改变、细胞形态改变指标指示所述细胞的衰老水平并进行定量。

[0014] 优选的是,所述检测细胞中的双链脱氧核苷酸的表达水平是以标记细胞质里所含的双链脱氧核苷酸荧光信号的数量作为指标;

[0015] 所述经典衰老染色法以 β -半乳糖苷酶检测后蓝色染色的细胞数量作为对照指标;

[0016] 以三气培养条件下的p5代小鼠胚胎成纤维细胞为衰老的节点,将双链脱氧核苷酸标记后的荧光信号数量与对照指标进行比对以评价细胞衰老水平。因为正常三气培养条件下,MEF细胞培养到p5代时,即出现衰老情况,因此,选择p5代培养细胞作为评价衰老水平的节点更为准确。

[0017] 优选的是,标记细胞质里所含的双链脱氧核苷酸荧光信号的数量高于 β -半乳糖苷酶检测后蓝色染色的细胞数量,以指示细胞衰老水平。以三气培养的p5代小鼠成纤维细胞为衰老节点,在这一细胞中,dsDNA标记后的最低荧光数为2116.667%,而使用SA- β -Gal方法检测后的最高阳性染色细胞数仅为2.4%。

[0018] 本发明还提供检测成纤维细胞中双链脱氧核苷酸的物质和表达水平在检测或辅助检测待测细胞衰老水平中的应用,其特征在于,根据所述的检测和标记细胞衰老水平的方法检测成纤维细胞中双链脱氧核苷酸的物质和表达水平。

[0019] 本发明还提供检测成纤维细胞细胞质中双链脱氧核苷酸的物质和表达水平在检测或辅助检测待测细胞衰老水平的产品的应用,其特征在于,根据所述的检测和标记细胞衰老水平的方法检测成纤维细胞质中双链脱氧核苷酸的物质和表达水平。

[0020] 优选的是,所述产品为检测或辅助检测待测细胞衰老水平的试剂盒。

[0021] 本发明公开了以下技术效果:

[0022] 本发明首次通过免疫荧光方法检测小鼠胚胎成纤维细胞质中双链脱氧核苷酸水平来评价细胞的衰老水平,并与经典染色法中以SA- β -Gal为检测指标进行差异比较,结果证明:对于相同条件下培养的小鼠胚胎成纤维细胞p5代和p8代时,dsDNA检测结果显示二气(氧气含量为21%)培养条件下,细胞的衰老情况明显高于三气(氧气含量为3%)培养条件下的细胞衰老情况,这是因为在二气培养条件下,细胞受到氧化应激而引发衰老,因此二气培养条件下的细胞比三气培养条件下的细胞呈现出更加衰老的状态。而以SA- β -Gal为检测指标的结果显示两种情况下没有明显区别。进一步通过dsDNA和SA- β -Gal在不同培养条件和代数细胞中的表达情况来进行比较,显示两种方法标记细胞衰老趋势相同但是灵敏度差异明显,并且用dsDNA标记显示的红色荧光信号在衰老细胞中明显高于SA- β -Gal的蓝色染色信号。上述结果都能证明,采用dsDNA标记检测细胞衰老水平相比经典染色法标记检测细胞衰老水平,是非常准确的,而且具有更高的灵敏度。因此可以更准确、更精确的反应细胞的衰老水平。本发明提供的检测和标记细胞衰老的方法可以为评价小鼠细胞衰老提供一种全新的检测指标,可更广泛的应用到生物检测产品或试剂盒中检测细胞衰老的方法当中,具有较强的实用性。

附图说明

[0023] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅是本发明的一些实施

例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0024] 图1为本发明p5代—p8代细胞分别于二气培养箱(氧气含量为21%)和三气培养箱(氧气含量为3%)培养之后,使用dsDNA标记后的荧光结果图;

[0025] 图2为本发明p5代—p8代细胞分别于二气培养箱(氧气含量为21%)和三气培养箱(氧气含量为3%)培养之后,使用SA- β -Gal标记后的显微镜下结果图;

[0026] 图3为本发明不同气体培养条件下p5代细胞中dsDNA(荧光数量)和SA- β -gal(阳性细胞数量)的定量图;

[0027] 图4为本发明不同气体培养条件下p8代细胞中dsDNA(荧光数量)和SA- β -gal(阳性细胞数量)的定量图;

[0028] 图5为本发明不同气体培养条件下p5代—p8代dsDNA(荧光数量)和SA- β -gal(阳性细胞数量)的定量总图。

具体实施方式

[0029] 现详细说明本发明的多种示例性实施方式,该详细说明不应认为是对本发明的限制,而应理解为是对本发明的某些方面、特性和实施方案的更详细的描述。

[0030] 应理解本发明中所述的术语仅仅是为描述特别的实施方式,并非用于限制本发明。另外,对于本发明中的数值范围,应理解为还具体公开了该范围的上限和下限之间的每个中间值。在任何陈述值或陈述范围内的中间值以及任何其他陈述值或在所述范围内的中间值之间的每个较小的范围也包括在本发明内。这些较小范围的上限和下限可独立地包括或排除在范围内。

[0031] 除非另有说明,否则本文使用的所有技术和科学术语具有本发明所述领域的常规技术人员通常理解的含义。虽然本发明仅描述了优选的方法和材料,但是在本发明的实施或测试中也可以使用与本文所述相似或等同的任何方法和材料。本说明书中提到的所有文献通过引用并入,用以公开和描述与本发明相关的方法和/或材料。在与任何并入的文献冲突时,以本说明书的内容为准。

[0032] 在不背离本发明的范围或精神的情况下,可对本发明说明书的具体实施方式做多种改进和变化,这对本领域技术人员而言是显而易见的。由本发明的说明书得到的其他实施方式对技术人员而言是显而易见的。本申请说明书和实施例仅是示例性的。

[0033] 关于本文中所使用的“包含”、“包括”、“具有”、“含有”等等,均为开放性的用语,即意指包含但不限于。

[0034] 下面将以小鼠胚胎成纤维细胞培养为例,通过双链脱氧核苷酸(dsDNA)和衰老相关 β -半乳糖苷酶(SA- β -Gal)分别进行标记,检测其细胞的衰老水平,并进行具体的比对。

[0035] 1、实验材料

[0036] 小鼠MEF细胞的制作:将怀孕13.5天的母鼠断颈处死,70%乙醇消毒,剖腹取出母体胚胎放入平皿,去除母体组织、外膜和心脏,用剪刀将胚胎剪碎,用0.25%胰酶进行消化处理10min。之后用DMEM培养基吹打组织数次,加入新鲜培养基补足至10mL,置于三气培养箱(5%CO₂,3%O₂)中培养待用。

[0037] 2、实验方法

- [0038] 2.1小鼠MEF细胞的传代和培养
- [0039] 1) 用真空泵将旧的培养基吸净。
- [0040] 2) 加2mL的1×PBS清洗细胞,吸净。
- [0041] 3) 加1mL的0.1%的胰酶(EDTA浓度为0.02%)溶液使贴壁细胞悬浮起来,37℃,约1min,柔和拍打培养皿侧面,帮助细胞离壁。
- [0042] 4) 待细胞完全悬浮,加DMEM培养基约2mL终止胰酶的消化作用。用移液管吹打细胞,使细胞均匀分散。
- [0043] 5) 根据细胞密度分至不同数量的新的培养皿中,补加培养基至10mL。37℃,5%CO₂,3%O₂培养箱(三气培养箱)中培养。
- [0044] 6) 从第三代(p3)开始,细胞分别在37℃、5%CO₂、3%O₂培养箱(三气培养箱)和37℃、5%CO₂、3%O₂培养箱(二气培养箱)培养。
- [0045] 7) 以每孔种细胞 1.0×10^5 个的细胞密度,接种p5、p8代的细胞到六孔培养板中,分别进行传统的SA-β-Gal染色和dsDNA免疫荧光染色。
- [0046] 2.2 SA-β-Gal染色
- [0047] 2.2.1试剂
- [0048] 试剂盒购于碧云天,细胞衰老β-半乳糖苷酶染色试剂盒,货号C0602。
- [0049] 2.2.2染色方法
- [0050] 1) 吸除细胞培养液,用PBS或HBSS洗涤1次,加入1mLβ-半乳糖苷酶染色固定液,室温固定15min。
- [0051] 2) 吸除细胞固定液,用PBS或HBSS洗涤细胞3次,每次3min。
- [0052] 3) 吸除PBS或HBSS,每孔加入1mL染色工作液。
- [0053] 染色工作液的配制方法:
- | | |
|--------------|--------|
| β-半乳糖苷酶染色液 A | 10μL; |
| β-半乳糖苷酶染色液 B | 10μL; |
| β-半乳糖苷酶染色液 C | 930μL; |
| X-Gal 溶液 | 50μL。 |
- [0054]
- [0055] 4) 37℃孵育过夜,可以用parafilm或保鲜膜封住6孔板防止蒸发。注意:37℃孵育不能在二氧化碳培养箱中进行。
- [0056] 5) 普通光学显微镜下观察。如不能及时观察计数,可以去除染色工作液,加入2mL PBS,4℃可以保存数天;或者加上封片液封片后,4℃可以保存较长时间。
- [0057] 2.3免疫荧光染色
- [0058] 1) 吸掉培养液后,加约2mL/孔1×PBS洗一到两遍,注意加1×PBS时要轻缓,并且避免直接冲击盖玻片上的细胞,以免造成细胞脱落。
- [0059] 2) 固定液固定10min,每孔加1mL。(固定液配方:母液:5%多聚甲醛(paraformaldehyde);20%蔗糖(sucrose),工作液浓度:3%多聚甲醛和2%蔗糖,用1×PBS稀释配制)。
- [0060] 3) 吸掉固定液,用1×PBS洗三次,每次放置5min,清洗时要轻缓,并且避免直接冲击盖玻片上的细胞,以免造成细胞脱落。

[0061] 4) 1% NP-40处理5min, 每孔加800 μ L, 此步是为了提高细胞膜的通透性, 利于抗体的进入。

[0062] 5) 重复步骤3。

[0063] 6) 5% BSA封闭2h, 每孔800 μ L, 此步是为了提高抗体的特异性结合。

[0064] 7) 重复步骤3。

[0065] 8) 标dsDNA一抗(购于abcam, 货号ab27156), 稀释倍数为1:1000, 孵育过夜。

[0066] 9) 重复步骤3。

[0067] 10) 标荧光二抗, 1h(购于Invitrogen), 操作要迅速, 加完后用锡箔纸遮光处理, 防止淬灭。

[0068] 11) 重复步骤3。

[0069] 12) 标DAPI或PI(染核), 20min, 操作同步骤8, 操作要迅速, 加完后用锡箔纸遮光处理,

[0070] 13) 重复步骤3。

[0071] 14) 用小镊子小心夹取盖玻片, 将有细胞的面朝下, 盖到预先滴加防萃灭剂的载玻片上, 盖玻片从一侧向另一侧缓缓放下, 避免产生气泡, 并立即放于暗盒中, 防止荧光淬灭, 4 $^{\circ}$ C可长期保存。

[0072] 15) 荧光显微镜下观察拍照。

[0073] 3、结果

[0074] 1) 如图1所示: dsDNA红色荧光图(激光共聚焦显微镜拍摄), 可以看出细胞处于同代数时, 二气培养的细胞胞质dsDNA信号(dsDNA在细胞质中的分布和亮度, 黄圈内的dsDNA信号)明显比三气培养细胞的胞质dsDNA信号强。在二气培养条件下, 细胞受到氧化应激而引发衰老, 因此, 细胞衰老情况与dsDNA信号强度成正比; 说明dsDNA标记和检测细胞的衰老水平的灵敏度更高。

[0075] 2) 如图2所示: SA- β -Gal的染色图(普通光学显微镜拍摄), 可以看出在不同培养条件下的p5代细胞, 镜下观察到的染色差异没有明显区别; 但是当细胞为p8代时, 二气培养条件下的蓝色染色细胞(箭头已指出)数量明显多于同代数三气培养的蓝色染色细胞数量。

[0076] 3) 如图3所示, dsDNA荧光(激光共聚焦显微镜拍摄)信号和SA- β -Gal(普通光学显微镜拍摄图)的定量统计图, 在细胞处于p5代时, 从dsDNA的指标来看, 二气培养的细胞质中dsDNA的水平高于三气培养细胞的细胞质中dsDNA的水平。从SA- β -Gal检测指标中, 不同培养条件下的细胞, 两者之间的衰老染色没有明显区别。经统计, dsDNA组与SA- β -Gal组之间存在显著性差异。

[0077] 4) 如图4所示: dsDNA荧光(激光共聚焦显微镜拍摄)信号和SA- β -Gal(普通光学显微镜拍摄图)的定量统计图, 在细胞处于p8代时, 从dsDNA的指标来看, 二气培养的细胞质中dsDNA的水平明显高于三气培养细胞的细胞质中dsDNA的水平。从SA- β -Gal检测指标中, 不同培养条件下的细胞, 两者之间的衰老染色有区别, 但是两组间阳性细胞数量相差较小, 若有实验条件的影响, 如pH的改变, 则会造成组间差异过大等不精确的结果出现。经统计, dsDNA组与SA- β -Gal组之间存在显著性差异。

[0078] 5) 如图5所示: dsDNA荧光(激光共聚焦显微镜拍摄)信号和SA- β -Gal(普通光学显微镜拍摄图)的总定量统计图。dsDNA和SA- β -gal在不同培养条件和代数的细胞中, 标记的

趋势相同,但是灵敏度相差非常大,说明dsDNA标记在检测细胞衰老水平中的灵敏度更高。

[0079] 以上所述的实施例仅是对本发明的优选方式进行描述,并非对本发明的范围进行限定,在不脱离本发明设计精神的前提下,本领域普通技术人员对本发明的技术方案做出的各种变形和改进,均应落入本发明权利要求书确定的保护范围内。

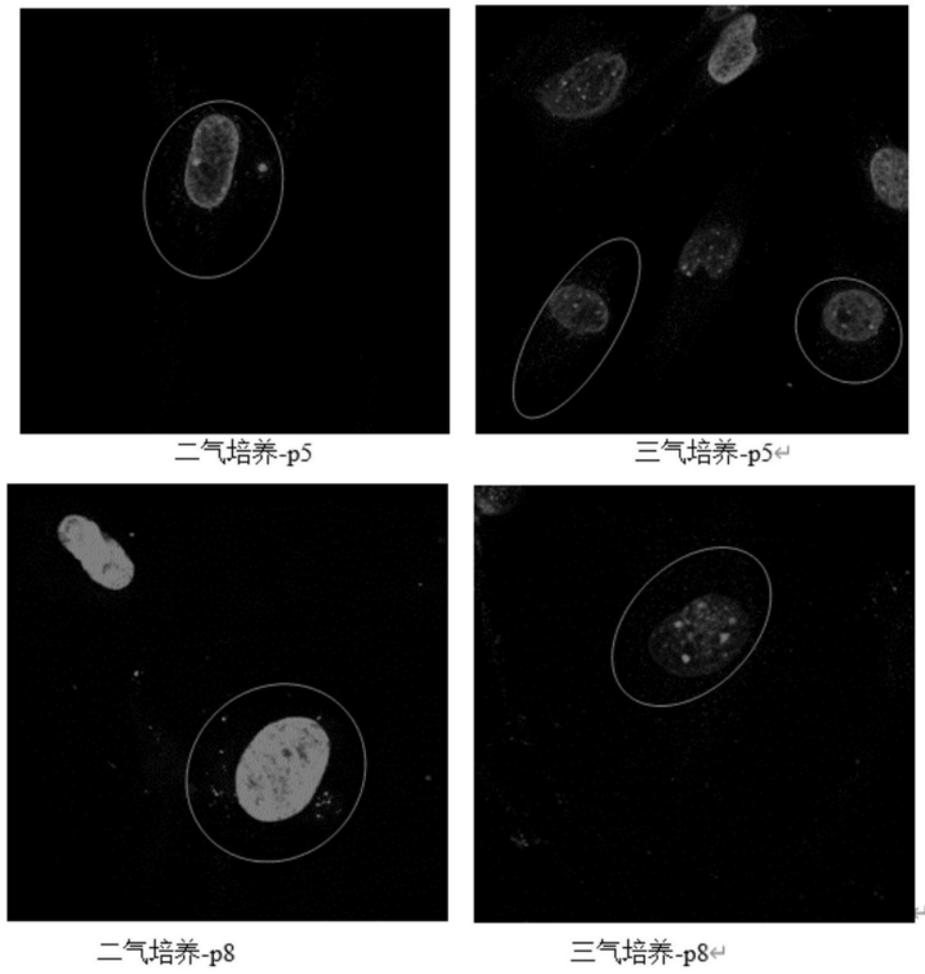


图1

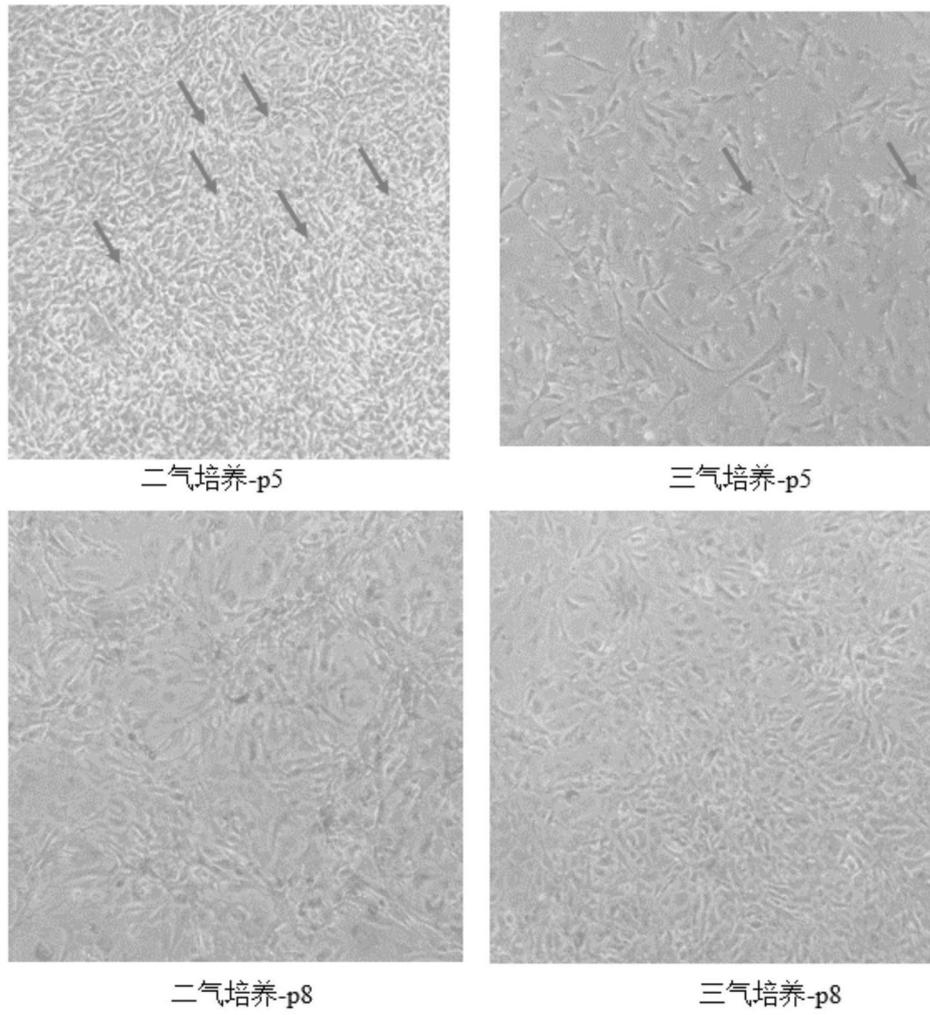


图2

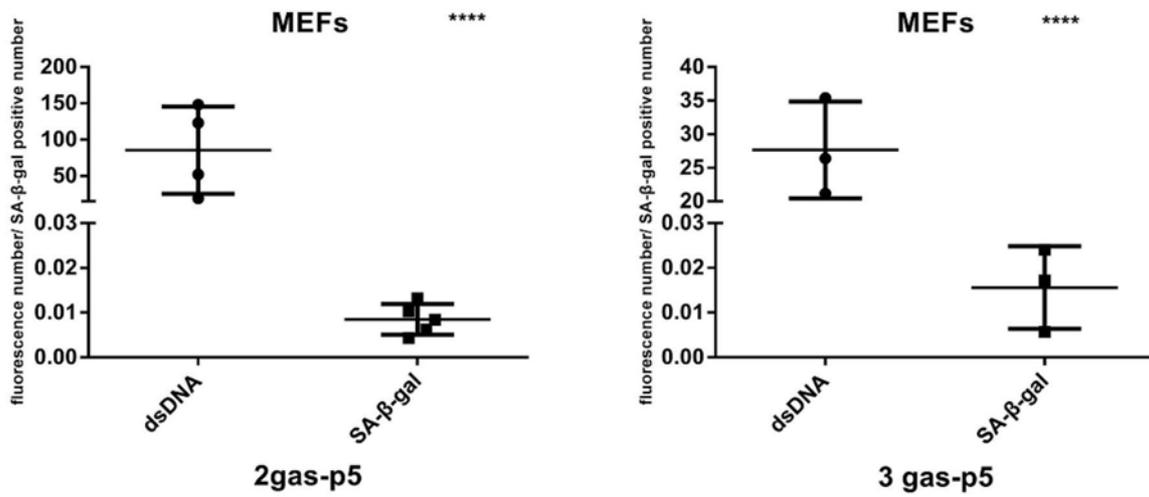


图3

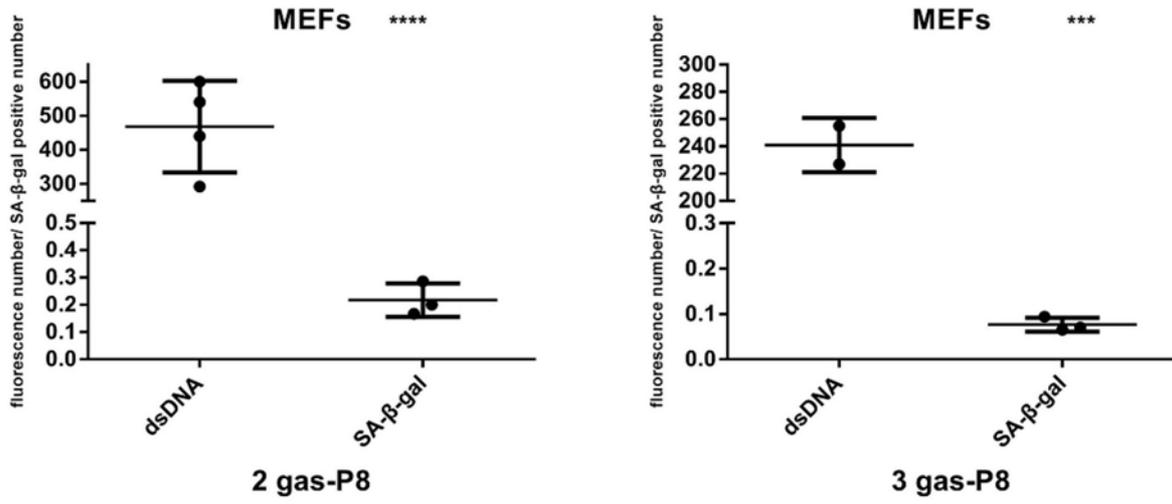


图4

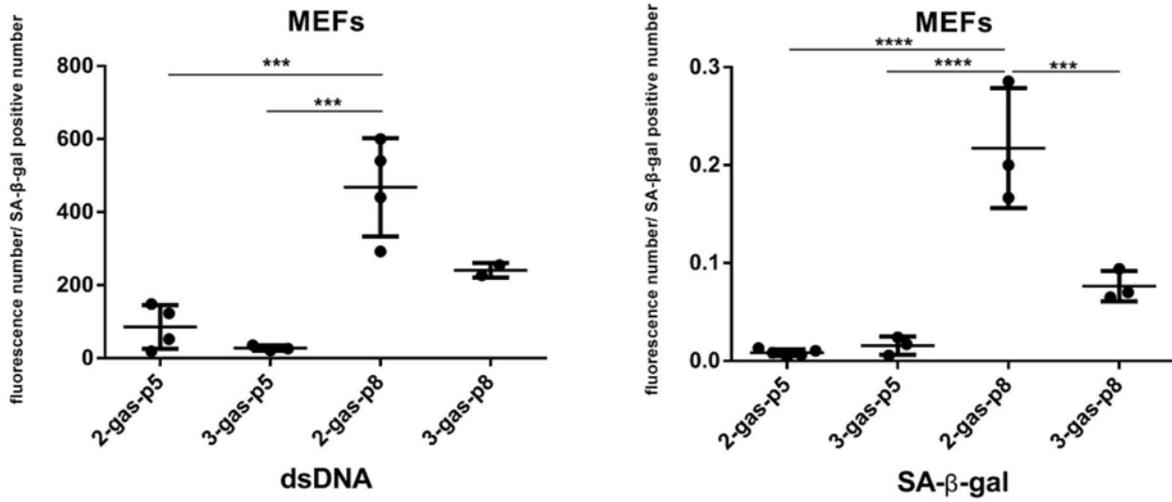


图5

专利名称(译)	一种检测和标记细胞衰老的方法及应用		
公开(公告)号	CN111044726A	公开(公告)日	2020-04-21
申请号	CN201911259105.8	申请日	2019-12-10
[标]申请(专利权)人(译)	昆明理工大学		
申请(专利权)人(译)	昆明理工大学		
当前申请(专利权)人(译)	昆明理工大学		
[标]发明人	周若宇 谢晓丽 李鑫波		
发明人	周若宇 谢晓丽 秦子一 李鑫波		
IPC分类号	G01N33/58 G01N33/53 C12Q1/34		
CPC分类号	C12Q1/34 G01N33/5308 G01N33/582 G01N2333/938 G01N2800/7042		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测和标记细胞衰老水平的方法，包括以下步骤：采用免疫荧光方法检测细胞质中dsDNA的表达水平；将所检测细胞质中的dsDNA的表达水平与经典衰老染色方法检测β-半乳糖苷酶的检测结果进行比对；基于所述比对的结果来指示所述细胞的衰老水平。还公开检测成纤维细胞质中dsDNA的物质和表达水平在检测或辅助检测待测细胞衰老水平中的应用，以及在检测或辅助检测待测细胞衰老水平的产品的应用。本发明首次采用通过免疫荧光方法检测小鼠胚胎成纤维细胞质中dsDNA水平来评价细胞衰老水平，与经典衰老染色方法进行对比，证明该方法能够更准确、更精确地反应细胞衰老水平，为评价小鼠细胞衰老提供一种全新的检测指标。

