

嘉南藥理科技大學
生物科技系

碩士論文

雞端粒反轉錄酶基因的選殖與
體細胞核轉置牛羊之端粒長度分析

Cloning of telomerase reverse transcriptase gene from
chicken, and analysis of telomere length in cattle and
goats cloned by somatic cell nuclear transfer

指導教授：吳明娟 博士

蕭振文 博士

研 究 生：蔡麗卿

中華民國九十六年七月

嘉南藥理科技大學生物科技系
Department of Biotechnology
Chia-Nan University of Pharmacy & Science

碩士論文

Thesis for the Degree of Master

雞端粒反轉錄酶基因的選殖與

體細胞核轉置牛羊之端粒長度分析

Cloning of telomerase reverse transcriptase gene from chicken,
and analysis of telomere length in cattle and goats cloned by
somatic cell nuclear transfer

指導教授：吳明娟 博士 (Dr. Ming-Jiuan Wu)

蕭振文 博士 (Dr. Jen-Wen Shiau)

研 究 生：蔡麗卿 (Lih-ching Tsai)

中華民國九十六年七月二日

July 2, 2007

嘉南藥理科技大學

碩士學位考試委員會審定書

本校 嘉南藥理科技大學 碩士班 蔡麗卿 君

所提論文 雞端粒反轉錄酶基因的選殖與體細胞核轉

置牛羊之端粒長度分析

合於碩士資格水準，業經本委員會評審認可。

考試委員：陳立人 博士
行政院農業委員會畜產試驗所 副研究員兼組長

陳立人

顏瑞鴻 博士
慈濟大學人類遺傳研究所 副教授

顏瑞鴻

蕭振文 博士
行政院農業委員會畜產試驗所 副研究員

蕭振文

吳明娟 博士
嘉南藥理科技大學 生物科技系 教授

吳明娟

指導教授：吳明娟 博士
嘉南藥理科技大學 生物科技系 教授

吳明娟

蕭振文 博士
行政院農業委員會畜產試驗所 副研究員

蕭振文

系主任（所長）：張發凱

中華民國 96 年 7 月

中文摘要

本論文分為二部份，第一部份研究的目的是在選殖白色來亨雞之端粒反轉錄酶 (telomerase reverse transcriptase, TERT) 基因並進行 DNA 序列分析比對，期能供基因轉殖並發展延長家禽體細胞體外培養的技術平台。試驗應用顯微抽取技術自雞蛋取得原腸期雞胚供萃取 RNA 樣品，經過反轉錄 - 聚合酶連鎖反應 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 合成互補 DNA (complementary DNA, cDNA)，並設計特異引子進行 PCR 選殖雞的 TERT。結果 PCR 之後獲得一 4.7 kb 的產物，此產物經膠體回收並選殖入 TOPO 載體，經過 DNA 序列分析與 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) 比對，確定為雞的 TERT 基因。第二部份是分析行政院農業委員會畜產試驗所應用體細胞核轉置 (somatic cell nuclear transfer, SCNT) 技術生產的複製荷蘭種乳牛與阿爾拜因乳山羊及其後代動物的端粒 (telomere) 長度。將複製動物的端粒長度與同年齡的非複製動物進行比較，以了解複製與非複製動物及其後代的端粒長度變化。試驗自複製牛與羊採集全血，經離心分離白血球供萃取基因組 DNA，然後應用套組測定端粒限制片段長度 (Telomere Restriction Fragment, TRF)。結果顯示，年齡在 2 歲至 3 歲間的 4 頭複製乳牛之端粒長度與同年齡非複製牛之端粒長度相近。複製牛的

4 頭後代之端粒長度也與其同齡非複製乳牛相似；顯示複製牛及其後代之端粒長度與年齡相近之非複製乳牛之間並無差異顯著 ($p > 0.05$)。而 3 頭月齡不同的複製羊，其端粒長度則較同齡之非複製對照羊為短，並隨著月齡的增加，端粒長度顯著較非複製對照羊為短 ($p < 0.05$)。而複製羊的 5 頭後代之端粒長度則與同齡對照羊隻相近而無差異顯著 ($p > 0.05$)。本研究顯示，應用複製技術生產的乳牛，其端粒長度在經過 NT 操作後，胚在發育過程其基因組順利地經過再程式化，使端粒長度回復正常，並未因為應用成體供核體細胞進行複製而導致端粒短化。而應用 SCNT 複製羊其端粒長度較對照正常羊為短，且隨著月齡增加而與對照之正常羊隻為短，達到統計上的顯著差異結果，此結果顯示不同複製動物之端粒長度變化並不一致；而複製動物後代的端粒長度，則與正常動物相似。

關鍵字：雞、端粒反轉錄酶、基因選殖、端粒長度、體細胞核轉置

Abstract

This thesis consists of two parts. The objective of the first part was to clone and sequence the telomerase reverse transcriptase gene (TERT) from gastrula stage embryos of White Leghorn chicken. Total RNA were first extracted by using commercial kit and followed by RT-PCR with specific primers to obtain the full-length of putative TERT cDNA. The obtained PCR product was recovered by agarose gels electrophoresis and then subcloned into TOPO vectors for DNA sequencing. BLAST comparison of the cloned DNA sequences with NCBI Genomes database confirmed the identity of chicken TERT (chTERT). The results showed that the chTERT gene had been successfully cloned and could be subsequently used for gene transfer to establish long-term *in vitro* culture system for avian cells.

The objective of the second part was to compare the telomere length of somatic cell nuclear transfer (SCNT) cloned animals and their offspring with the non-cloned counterparts. Genomic DNA for terminal restriction fragment (TRF) analysis was purified from whole blood of cloned animals, their offspring and age-matched control animals. The results showed that there was no significant difference in the telomere

lengths between cloned cattles and their age-match cattles aged 2-3 and 3-4 ($p > 0.05$). Similarly, the average telomere lengths of the offspring of cloned cattles were not significantly different from their age-matched counterparts. However, the cloned dairy goats at different ages have shortened telomere lengths when compared with age-matched controls. Offspring derived from cloned goats had normal telomere lengths compared with their age-matched counterparts. Our results suggested that the telomere lengths of cloned animals were varied among species. The telomere lengths in cloned goats were not completely restored as those in the cloned cattle by SCNT from chicken.

Keywords : Chicken, Telomerase reverse transcriptase (TERT), Gene cloning, Telomere length, Somatic cell nuclear transfer (SCNT)

謝誌

本論文承蒙恩師 吳明娟博士與 蕭振文博士二年來對於試驗研究的辛苦指導和對論文提供諸多的討論與協助，復蒙口試委員 陳立人博士與 顏瑞鴻博士對本論文的細心審閱與斧正，使我獲益良多，也讓這本論文更加豐富完整，在此致上由衷的感激。

進修期間，系所老師與同學們對論文及試驗上提供的寶貴建議、討論與協助，使我在研究面臨挫折與困難時得以順利突破並向前邁進，也讓我兩年的研究所生涯更加充實且獲益良多，在此表達誠摯之謝意。謝謝 F402 實驗室的所有夥伴及桂容還有班上的同學，有你們一路的相互扶持並共同分享研究生涯的苦與樂，在此均一併致謝。

感謝畜產試驗所內長官們的支持、生理組同仁對於研究所需試驗材料之提供及實驗上的諸多協助，謹致萬分謝忱。

進修期間，感謝內子的鼓勵及支持還有對試驗及論文的諸多幫忙，感謝我的爸媽及公婆的支持和幫忙，若我有任何一絲成就，我都要將榮耀歸於你們，給你們幸福。還有我可愛的寶貝兒女旻勳、旻樺與旻旋，始終是我最重要的精神後盾。若不是他們長久以來的支持，陪我走過這忙碌且充實的二年，我不可能順利畢業，謝謝你們，我愛你們。

最後，僅將論文獻給每一個曾經在我的人生路上給我鼓勵的你們。謝謝你們。



目錄

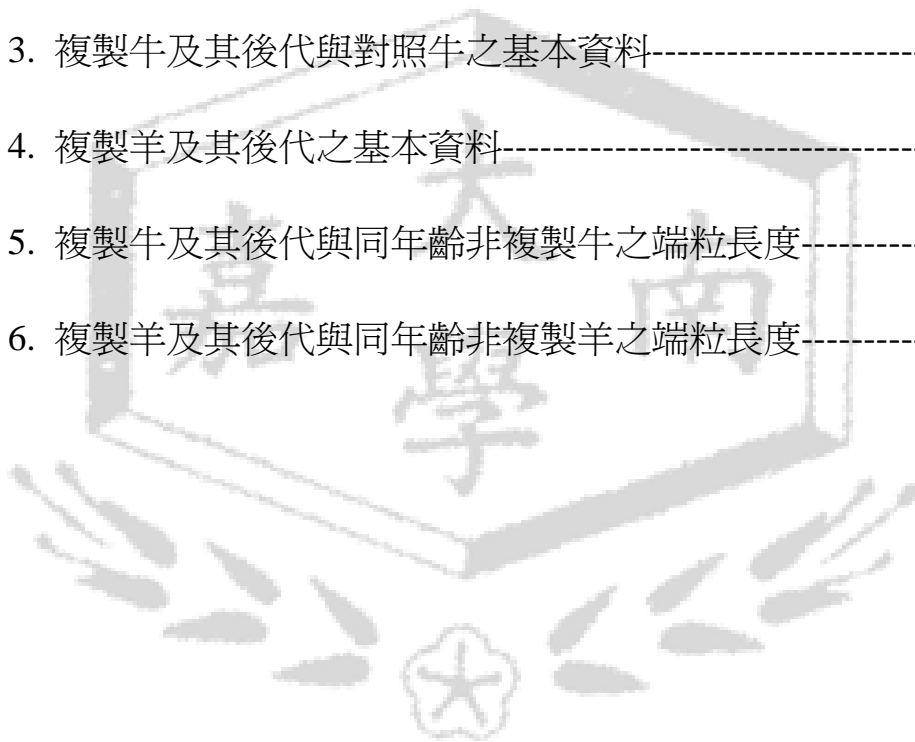
中文摘要	I
英文摘要	III
謝誌	V
目錄	VII
表目錄	IX
圖目錄	X
附錄目錄	XII
縮寫表	XIII
論文本文	1
第一章 緒論	1
一、 前言	1
二、 家禽的端粒酶基因與細胞壽命	2
三、 體細胞核轉置家畜的端粒	5
四、 複製動物的染色體端粒長度	7
第二章 材料與方法	13
第三章 結果	19
第四章 討論	24
第五章 結論	38

參考文獻	39
附表與附圖	48
附錄	83



表目錄

表 1. 白色來亨雞全長 TERT 之 DNA 序列進行 BLAST 比對後依序 列相似度排序的結果-----	48
表 2. 與白色來亨雞 TERT 蛋白質具有最高相似性的 10 種蛋白質序 列-----	49
表 3. 複製牛及其後代與對照牛之基本資料-----	50
表 4. 複製羊及其後代之基本資料-----	51
表 5. 複製牛及其後代與同年齡非複製牛之端粒長度-----	52
表 6. 複製羊及其後代與同年齡非複製羊之端粒長度-----	53



圖目錄

- 圖 1. 應用顯微抽取技術自白色來亨雞蛋取得原腸期雞胚樣品-----54
- 圖 2. 參考網路資料庫 AY626231 之序列進行 PCR 擴增自 5'至 3'的
部分基因片段產物-----55
- 圖 3. 自白色來亨雞胚 (E) 與始基生殖細胞 (PGC) 樣品中擴增家禽
端粒酶基因及陽性對照GAPDH的部分基因片段產物-----56
- 圖 4. 白色來亨雞之 TERT基因產物進行 DNA序列分析與 BLAST
比對之結果-----57
- 圖 5. 自白色來亨雞原腸期胚 cDNA 進行 PCR擴增的 TERT基因
前、中、後段基因-----58
- 圖 6. 白色來亨雞 TERT基因啓動子區與 3'端未轉錄區應用PCR選
殖後獲得之產物-----59
- 圖 7. 白色來亨雞 TERT全長基因之 PCR選殖產物-----60
- 圖 8. *XhoI/SacI*切割篩選 pchTERT TOPO質體。4,799 bp片段顯示完
整的TERT基因-----61
- 圖 9. 含有雞 TERT 基因的 pchTERT TOPO 序列分析載體圖譜-62
- 圖 10. 進行 BLAST比對後與白色來亨雞 TERT之DNA具有相似性
的序列及相似位置圖-----63
- 圖 11. 白色來亨雞 TERT 的 DNA 序列與相似程度最高的

NM_001031007.1 序列比對結果-----	70
圖 12. 轉譯之白色來亨雞 TERT 胺基酸序列-----	71
圖 13. 白色來亨雞 TERT 轉譯之胺基酸序列進行BLAST後呈現之 相關蛋白質與相似位置圖-----	72
圖 14. 白色來亨雞 TERT 的 胺基酸序列與相似程度最高的 NP_001026178.1 序列比對結果-----	75
圖 15. 複製牛 (2-3歲) 及其後代個體之端粒長度分析-----	76
圖 16. 複製牛對照 (2-3歲) 及其後代對照之同齡正常乳牛端粒長度 分析-----	77
圖 17. 複製牛3-4歲與同齡非複製牛之端粒長度-----	78
圖 18. 複製牛及其後代與同齡非複製牛之端粒長度-----	79
圖 19. 複製羊 1、2與 3號在 50、22與 6月齡 時及其後代之端粒長 度分析-----	80
圖 20. 複製羊對照及其後代對照同齡正常羊之端粒長度分析 -----	81
圖 21. 複製羊1、2與3號在不同月齡時與非複製羊對照羊的端粒長度 分析-----	82

附錄目錄

附錄 1. 不同脊椎動物 TERT 蛋白質區域之相似性-----	83
附錄 2. 各種複製哺乳動物已進行端粒長度分析的結果-----	84
附錄 3. 不同脊椎動物之 TERT 蛋白質比對分析-----	85
附錄 4. 雞與人 TERT 基因 5'端鄰近/啓動子區域上游的比較-----	87
附錄 5. 雞 TERT 5'端鄰近啓動子區域內的轉錄因子的結合序列 -----	88



縮寫表

INT	Interspecies nuclear transfer
NT	Nuclear transfer
SCNT	Somatic cell nuclear transfer
TERT	Telomerase reverse transcriptase
UTR	Untranslational region
CEF	Chick embryonic fibroblast
TR	Tandem repeat
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
TRF	Telomere restriction fragment
cDNA	Complementary DNA
PCR	Polymerase Chain Reaction
RT-PCR	Reverse transcription PCR
ALT	Alternative lengthening of telomeres
eGFP	Enhance green fluorescent protein
hEPO	Human erythropoietin
PGC	Primordial germ cells
MCS	Multiple cloning site
NCBI	National Center for Biotechnology Information

IVF *In vitro* fertilization

IVP *In vitro* production



第一章 緒論

一、前言

正常的體細胞有一定壽命，在歷經多次的細胞分裂後即進入衰老期而無法再分裂。引起細胞衰老的主要因素與染色體的端粒變短有關係⁽¹⁾。端粒位於染色體末端，由短且重複的 DNA 序列和蛋白質結構所組成^(2, 3)。至今，已有部分動物的染色體端粒被研究，發現物種間的端粒基因序列變異極小，甚至在演化上歧異度極大的物種亦然。例如屬於原生生物門纖毛蟲綱之單細胞生物四膜蟲 (*Tetrahymena*) 之端粒序列為 TTGGGG，而人類的端粒序列則為 TTAGGG。端粒的長度會隨著細胞分裂次數的增加而縮短，每次分裂約 20~200 bp⁽⁴⁾，故染色體的端粒被稱為細胞的「分子時鐘 (Mitotic clock)」⁽⁵⁾。端粒對保持染色體的穩定性、染色體的完整及預防異常重組以利 DNA 的正常複製具有重要功能。端粒變短將使染色體容易纏黏，並使細胞發生異常而步入死亡之途。端粒的短化起因於 DNA 聚合酶失去作用，因而無法再複製線型 DNA 的末端，短化之端粒將被端粒-結合蛋白質視為斷裂的雙股 DNA，故啟動訊號傳遞以活化腫瘤抑制因子 p53 與 p16/pRB，抑制衰老細胞之分裂而導致細胞生長停滯⁽⁶⁾。為了解救阻抑細胞的生長，可以應用致癌基因例如 SV40 large T 抗原，其作用可以使 p53 與 p16/pRB 失去活性，進而使細胞再度復原生長的能力⁽⁷⁾。然而此種作用仍有時間限制，仍會因為端粒持續變短而使細胞老化並走向不增殖階段

(non-proliferative stage)，此階段又稱之為端粒截斷 (telomere crisis)。此時，僅有極少數的細胞可以因端粒酶 (telomerase)的再活化而能避開端粒截斷期並存活下來⁽⁷⁾。

端粒酶 (telomerase) 是屬於核糖核酸蛋白質 (ribonucleoprotein) 反轉錄酶的一種，其組成是由重複序列 (tandem repeat, TR) 及具有端粒反轉錄酶 (telomerase reverse transcriptase, TERT) 活性的蛋白質所組成⁽⁸⁾。TR 的RNA於動物細胞中普遍存在，使端粒重複序列得以附加到染色體上，但唯有含TERT的細胞才具有端粒酶活性⁽⁸⁾。端粒酶可藉由合成新的端粒DNA而維持端粒長度。端粒酶的活性受到多重機制調控⁽²⁾。端粒長度的調節除了直接受端粒酶修飾外，例如 TRF1 與 TRF2 端粒結合蛋白質也會結合 TTAGGG 序列並協同其他調控端粒蛋白質而對端粒產生調控作用。端粒酶僅在永生細胞株、癌細胞、生殖細胞或再生組織表現⁽⁹⁻¹⁰⁾，而不表現在正常的體細胞。因此，端粒酶的表現被認為與細胞永生或癌化有著密切關係。缺乏端粒酶的作用將導致端粒短化及細胞老化。將外源的異種 TERT 轉殖入不同物種之體細胞，可誘發端粒酶之活性而維持端粒長度，克服細胞衰老與端粒截斷期並使細胞達到永生狀態。

二、家禽的端粒酶基因與細胞壽命

體外培養的家禽體細胞或源自雞胚的成纖維細胞(chick embryonic

fibroblast, CEF)，在經歷數次分裂後即因為端粒短化而進入增殖老化期 (replicative senescence)⁽¹¹⁾。細胞藉由老化或細胞凋亡 (apoptosis) 等機制可以防止老化細胞的無限制增殖。因此，端粒具有保護染色體末端免於斷裂融合，並利於染色體的複製等功能⁽¹²⁾。

雞與人的染色體差異最大之處在於其端粒 DNA 較人類多達 10 倍。家禽的端粒 DNA 依結構與長度之不同，可區分為長度介於 0.5~2 Mb 之間的 I、II 與 III 型⁽¹³⁾。第一型端粒 DNA 又稱為間隙 (interstitial) 端粒序列，位於染色體之內長約 0.5~10 kb，能抵抗限制酶 *Bal 31* 的切割為其特性。第二型端粒 DNA 長約 10~40 kb。第三型端粒長 40 kb ~20 Mb，是目前已知的脊椎動物中最長者，位於染色體末端並能被限制酶 *Bal 31* 迅速切割⁽¹³⁾。

端粒酶是一種核糖核酸蛋白，負責將 TTAGGG 序列添加到染色體的 3' 端⁽¹⁴⁾。重複序列在 3'-連接形成數百個核苷酸的突出 G 鏈，並受到端粒結合蛋白的保護。目前研究人類的 TERT，多數是應用小鼠模式進行，然因小鼠與人的差異甚大，應用小鼠模式研究做為人類 TERT 之作用以解開癌症或老化問題，存在實際的困難。雞則是完全不同的動物模式，與人的 TERT 在生物學上具有許多共同點，例如部分鳥類的壽命相當長，故可作為人類細胞老化與轉型的研究模式⁽¹⁵⁻¹⁷⁾。

包括雞與金鋼鸚鵡 (macaw) 等 35 種脊椎動物，TERT 的 RNA 序列及二級結構已有學者加以探討⁽¹⁸⁾，發現脊椎動物的 TERT 蛋白質的特異區域

內具有保留性，顯示保留區對於 TERT 結構及酶作用的重要性。

雞的 TERT 研究，已有學者自原腸期雞胚中選殖全長 4,497 bp TERT mRNA，自第一個轉錄起始點 ATG 起始可轉譯成長 1,346 個胺基酸產物⁽¹⁹⁾。雞的 TERT 與其他動物比較，最大之差異在於 N-端的彈性連接子相當長，比人類多了 144 個胺基酸，故雞的 TERT 蛋白質較大。雞的 TERT 胺基酸與人、非洲爪蟾蜍、小鼠、大鼠、倉鼠之相似性分別達 45%、38%、41%、40% 與 42%。而脊椎動物 TERT 的 N 端區域⁽²⁰⁾ 與保留性反轉錄酶區域⁽²¹⁾ 具有高度之結構相似性，顯示保留區域應具有重要理化功能⁽²²⁾。雞的 TERT 位於染色體 2q21 上接近空隙 (interstitial) 端粒的位置。雞與人 TERT 在 5' 端鄰近啓動子區含有各種轉錄因子之結合區，例如 E-box、Ik1、MAZ 與 Sp1 位置等。在網路基因庫中有關雞 TERT 之基因序列包括長 11,025 bp 的 5' 端鄰近啓動子序列與部份密碼子序列 (AY505015)、長 957 bp 的 3' 端未轉譯區及鄰近序列 (AY505016) 及長 4,497 bp 的 5' 端未轉錄區 (UTR) (AY502592)⁽¹⁹⁾。

體外培養的雞胚成纖維細胞，通常在增殖 25~35 代之後即進入增殖老化期⁽²³⁾。而雞胚成纖維細胞在達到成長高點 (plateau) 後，有超過 90% 的細胞可以被檢出細胞老化指標的 β -galactosidase 染色，顯示細胞已老化，細胞中並無殘存之細胞株成長出來，雞胚成纖維細胞無法自發成爲永生細胞。成纖維細胞老化後其端粒酶的活性會下降甚至喪失，TRF 1 與 RAD 51

基因的表現也隨之降低，RAD 52 基因的表現量則提升。細胞增殖數目加倍後其端粒約短少 60 bp⁽¹⁷⁾。而分離自體外培養CEFs之成纖維細胞，每一個世代端粒的短化約為 300bp。而體外培養的成纖維細胞老化時，端粒長度的變化有可能變長、變短或維持不變^(17, 24)，顯示鳥類細胞之端粒調控有其他的延長機制（alternative lengthening of telomeres, ALT），例如同源重組而調控端粒長度⁽²⁵⁾。

體外培養的人、綿羊、兔子、牛與鹿的體細胞，可藉由轉殖人類端粒酶基因而產生端粒酶活性，進而增加端粒長度而延長細胞壽命⁽²⁶⁻²⁹⁾。這些細胞與腫瘤細胞不同，不會異常生長或惡性轉移，顯示人類端粒酶基因在動物細胞中表現，除具有相容性外並能使細胞免於增值老化而獲得永生。例外的是，人的 TERT轉入雞的成纖維細胞卻無法產生端粒酶的作用而延長細胞壽命，與未轉染TERT的對照細胞均呈現老化現象⁽³⁰⁾。人的 TERT在雞的成纖維細胞未產生端粒酶活性的原因，有可能是 chaperone的功能不當而導致蛋白質組裝不正確所致。人的TR基因與兔、牛的 TR 具有高度的DNA相似性，但與雞的相似性則偏低⁽³¹⁾。而端粒酶之活性，需要正確的模板才得以發揮作用。雞 TERT 內的 N端及 7 個反轉錄區與人或其他脊椎動物具有高度相似性⁽¹⁹⁾。

三、體細胞核轉置家畜的端粒

細胞核轉置 (nuclear transfer, NT) 技術的概念始於 1938 年；首次將細胞核轉置成功地應用於體細胞複製動物的紀錄出現於 1952 年在兩棲類動物的研究，Briggs and King⁽³²⁾ 將胚葉細胞注入未受精的去核卵子而成功生產蝌蚪。之後到 20 世紀末葉，一直未再見到動物體細胞成功複製的例子。1997 年，英國羅斯林研究所 (Roslin Institute) 利用取自 6 歲母綿羊的乳腺上皮細胞做為供核源進行核轉置，在複製 276 個羊胚後，最終獲得一隻複製羊「桃莉」，首創哺乳動物體細胞核轉置 (somatic cell nuclear transfer, SCNT) 複製成功之例而震撼全球⁽³³⁾。桃莉的誕生被視為二十世紀末期生物科技成就的里程碑，也是 1997 年「科學」雜誌票選為年度科學的最大突破。迄今，應用取自胎體或成體動物之體細胞而成功複製的哺乳動物，包括綿羊、牛、小鼠、山羊、豬、大鼠、貓、兔子、騾、馬及狗等⁽³⁴⁾。複製技術應用在農業，可以擴大遺傳背景一致的高性能優良種畜的生產、復育與保種高度瀕臨絕種動物及基因轉置家畜的生產等用途。傳統上種公牛的選拔需歷經至少 6~8 年的長期後裔檢定始能完成，若能利用 SCNT 技術來複製優良種公牛，將具有重要的經濟價值並縮短後裔測定所需的時間⁽⁴⁹⁾。對於關鍵生物技術、基礎研究與組織再生的研究也具應用潛力^(35,36)。

複製的供核細胞置入受核體的細胞質，將經歷染色質的重組、DNA 甲基化、染色體銘印效應 (imprinting)、端粒 (telomere) 長度的回復、組蛋白 (histone) 的修飾作用、epigenetic 傳承及 X-染色體去活化等的複雜過程。目

前，學界對於複製動物的生產效率偏低、發育異常及出生後的高死亡率等⁽³⁷⁾，咸認為可能與供核體細胞的基因再程式化不全而導致發育過程中重要基因的表現異常⁽³⁸⁾，例如 DNA 甲基化異常、X-染色體去活化的異常、銘印基因的表現以及端粒長度的變異^(39,40)等現象。因此，近年來複製技術針對這些課題不斷研發改進，期能有效提升成功率與生產效率。

四、複製動物的染色體端粒長度

全球第一頭複製羊「桃莉」出生時，健康狀態即成為大眾關注之焦點。桃莉羊開啓體細胞複製動物的熱潮，也讓複製動物的老化及端粒長度成為研究的重點。至今，各種複製動物的端粒已有相當多的研究結果，分別有端粒變短、端粒正常或端粒變長等分歧的結果⁽⁴¹⁾。複製動物的端粒長度不一致且具有高度變異性，可能與供核細胞種類、端粒酶再程式化的效率、動物的個體差異、核轉置的操作步驟、分析時採集到的組織或細胞種類、動物種別間的不同等，導致複製後基因再程式化及發育潛力的差異⁽⁴¹⁾。

(一)、複製牛

複製牛的端粒長度與同年齡的對照牛隻比較，研究結果並不一致。利用取自老化的供核細胞產製的複製仔牛，端粒長度可以回復正常⁽⁴²⁾，或甚至比對照仔牛還要長⁽⁴²⁾。應用不同供核細胞生產的複製牛其端粒長度有顯

著的變異⁽⁴⁰⁾，例如應用胎體成纖維細胞生產的複製牛其 DNA 及組蛋白甲基化異常現象較使用顆粒細胞者為高，發育率也較低⁽⁴³⁾。不同供核細胞生產的複製動物，端粒的維持受到 epigenetic 機制及未知遺傳因子等調控，且端粒結合蛋白 TRF1、TRF2 與 TIN2 等也參與端粒的調節，藉由直接抑制或強化端粒酶與端粒的結合而改變端粒結構，有效的抑制或促進端粒酶的作用⁽⁴⁴⁾。不同組織或器官的端粒長度也不同，如複製公牛的皮膚端粒與對照動物相似，但睪丸的端粒長度則明顯較正常對照公牛為短，可能因端粒結合蛋白之再程式化異常所引起⁽⁴⁵⁾。

牛胚在早期發育的過程，均可見端粒酶的表現⁽⁴⁶⁾。應用成體或胎體成纖維供核細胞生產的複製牛胚，在著床前桑椹期與囊胚期的端粒與正常牛胚相似，均較牛卵母細胞或精子為短；而成體細胞者又較胎體成纖維體細胞為短。正常體內胚或體外生產（*in vitro production*）之桑椹胚的端粒長度相近且均較複製的桑椹期牛胚為長。而體外生產或複製囊胚之端粒，均較桑椹期為長⁽⁴⁷⁾，顯示牛胚的端粒延長約發生在囊胚期，此時端粒酶強烈表現並調節端粒長度⁽⁴⁶⁾。應用成體或胎體成纖維細胞產製的複製桑椹期-囊胚具有正常的端粒延長作用⁽⁴⁷⁾，顯示細胞核之再程式化或生殖細胞中端粒的結構重組與端粒酶活性，或許是促進複製動物端粒回復的主因⁽⁴⁸⁾。

(二)、複製羊

在 1999 年，參與桃莉羊研究的 PPL 公司曾檢測桃莉羊的染色體端粒長度，發現較同齡之正常綿羊短了 20%⁽⁵⁰⁾，推測桃莉羊可能因繼承 6 歲母羊的端粒，且在進行複製之前供核體細胞經體外培養了一段時間故使端粒進一步變短。Clark *et al.*⁽⁵¹⁾ 應用成纖維細胞生產做為供核細胞的複製綿羊中，僅部分具有正常的端粒長度；應用上皮細胞產製的複製綿羊，端粒長度比對照動物為短。應用 SCNT 複製的公山羊，睪丸之端粒酶活性與對照公羊並無顯著差異，雖然端粒較正常對照羊隻短，但 SCNT 複製羊的外表正常且身體健康，同時具有正常的生殖能力⁽⁴²⁾。

(三)、複製豬

複製豬與基因轉殖豬的生產，在關鍵性生物技術的發展上具有重大潛力⁽⁵²⁾。當人類的器官缺乏時，豬將是最有可能成為異種器官的供應動物。應用遺傳工程技術修飾供核細胞的基因，可生產與人類免疫系統相容的基因改造複製豬，是未來具有應用潛力之技術。然而複製豬的生產效率至今仍較其他家畜為低，複製豬胚轉殖後最終能順利產下且存活的比率約只有 1%⁽⁵³⁾；這可能與體細胞之基因再程式化不完全有關⁽³⁸⁾。

Jiang *et al.*⁽⁵⁴⁾ 曾研究複製豬的端粒長度，結果與自然繁殖生下的豬在不同年齡與組織中並無差異。不同年齡豬隻之不同組織端粒長度介於 9~23 kb 之間。取自豬胎之 6 個器官的端粒長度介於 20.7~21.7 kb 間，平均長

21.2 kb。到了發身之前與性成熟的豬其端粒長度明顯較短。因此，估算豬自胎期至發身前期之端粒約短少 4 kb，而由發身前期至性成熟期又將短少 1.5 kb。發身前期與成熟豬隻之不同器官，端粒長度具有顯著的差異。發身前期豬隻的皮膚與性腺細胞之端粒長度分別為 18.0 ± 0.4 kb與 18.20 ± 0.6 kb，比腎臟、肝臟與心臟細胞之端粒為長。而性成熟後豬隻皮膚與性腺細胞的端粒分別為 16.1 ± 0.8 kb與 16.6 ± 0.9 kb，較其他組織為長，肝臟細胞的端粒最短，僅 14.0 ± 1.0 kb。

轉殖綠色螢光蛋白基因 (eGFP) 的胎體成纖維細胞株與表現 eGFP 的成纖維細胞株，端粒分別長 18.5 kb與 19.1 kb。eGFP 基因轉殖複製豬，皮膚細胞之端粒為 20.1 kb。轉殖 eGFP的胎體成纖維細胞，端粒較對照胎兒細胞短約 2 kb，顯示細胞在培養過程會導致端粒變短。4月齡的複製豬其皮膚細胞之端粒與同齡對照豬並無差異。兩隻分娩後第 3與第 7天早夭的複製豬，其皮膚端粒分別長 24.7 kb 與 21.9 kb，與懷孕 70 天豬胎兒的 23.3 ± 2.0 kb 與 21.7 ± 0.6 kb 沒有明顯差異。

豬、人與小鼠出生後，不同組織的端粒已經不等長，器官間端粒長度有明顯差異。體細胞複製豬的端粒回復如同複製牛胚般有賴於端粒酶的作用⁽⁵⁵⁾。Miyashita *et al.* ⁽⁴⁸⁾使用不同供核細胞生產的複製牛，端粒之長度明顯不同。來自年老動物的供核細胞無法使全數的複製後代回復端粒長度；應用輸卵管及乳腺上皮細胞生產的複製仔牛，其端粒較對照仔牛為短。而

Jiang *et al.*⁽⁵⁴⁾ 的研究證明應用端粒較短的細胞所生產的複製豬，端粒可以回復到正常同齡豬隻的長度。Jeon *et al.*⁽⁵⁶⁾ 分析複製豬及複製牛的端粒，並與供核的胎體成纖維細胞及同齡正常豬隻比較，發現複製仔豬或基因轉殖複製仔豬的端粒正常，而複製牛的端粒並未比成體成纖維供核細胞長。

在供核細胞、源自成熟或剛出生豬與牛的正常組織，均可測得端粒酶的顯著活性，若以酶之活性強弱區分，豬的耳朵細胞又較牛的耳朵細胞或其他體細胞要強烈。複製仔牛、複製仔豬及供核體細胞具有相似的端粒酶活性。正常豬與基因轉殖複製豬的端粒酶活性沒有差異。複製豬囊胚與供核細胞或體外受精豬囊胚比較，其端粒酶活性增強，推測複製仔豬的端粒延長可能與囊胚期較強的端粒酶活性或其他調控機制有關⁽⁵⁷⁾。而應用培養的成纖維細胞產製的複製仔豬，其端粒可回復至自然配種所生同齡正常仔豬。

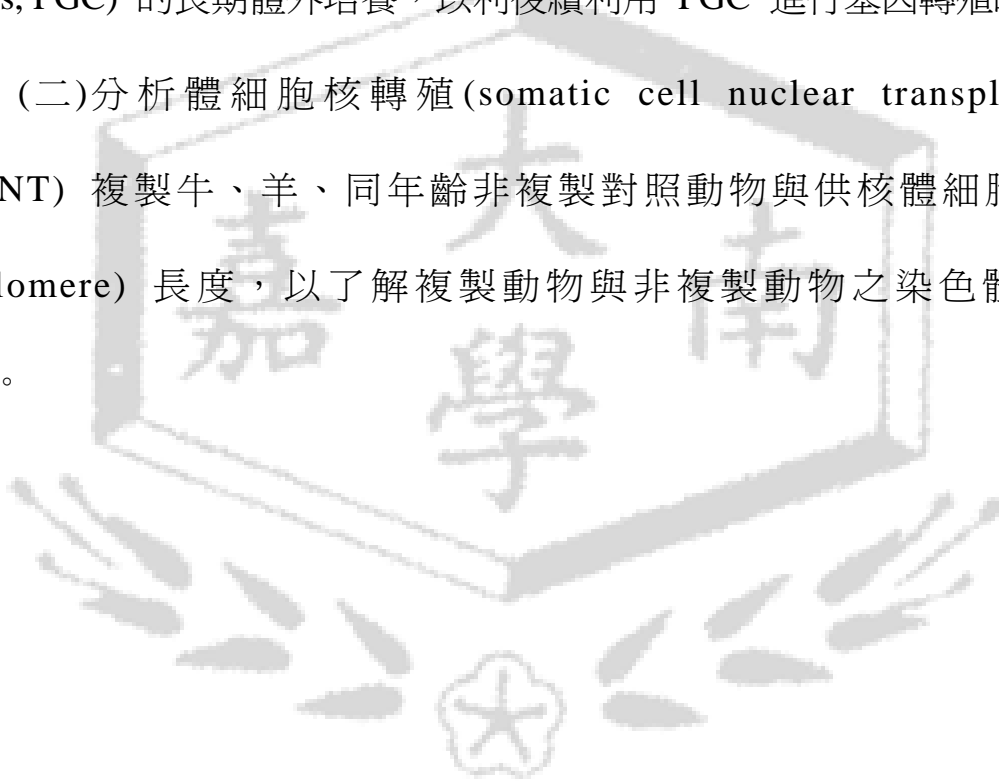
Jeon *et al.*⁽⁵⁶⁾ 應用轉基因雌性成纖維供核細胞進行 SCNT，產製了 15 頭複製豬中有 3 頭帶有 eGFP 或人類血球生成素 (human erythropoietin, hEPO)。非基轉與基轉複製豬之端粒分別為 25.2 ± 0.5 kb 與 24.8 ± 0.5 kb，兩者並無差異，但均比供核細胞的 22.8 ± 0.5 kb 為長。而供核細胞、複製仔豬與成豬皆具有顯著的端粒酶活性，豬的組織比牛者具有明顯的端粒酶活性。應用成體成纖維細胞、輸卵管細胞與卵丘細胞進行 SCNT，以胎體成纖維細胞產製的豬胚發育最佳，此或許因為胎體成纖維細胞較已分化細

胞在複製時更容易進行基因再程式化所致^(54, 56)。

本研究之目的

(一)選殖白色來亨雞的端粒酶基因並進行 DNA 序列分析,探討端粒酶基因中的調控區域,再次選殖與構築端粒酶之表現載體,發展有效延長家禽體細胞體外培養的技術平台,簡化家禽始基生殖細胞 (primordial germ cells, PGC) 的長期體外培養,以利後續利用 PGC 進行基因轉殖的研究。

(二)分析體細胞核轉殖 (somatic cell nuclear transplantation, SCNT) 複製牛、羊、同年齡非複製對照動物與供核體細胞的端粒 (telomere) 長度,以了解複製動物與非複製動物之染色體端粒長度。



第二章 材料與方法

一、實驗動物：白色來亨雞 (White Leghorn Chicken)

(一) 白色來亨雞端粒酶基因互補 DNA (complementary DNA, cDNA) 的選殖

1. 白色來亨雞原腸期胚之顯微抽取、RNA萃取與反轉錄-PCR (reverse transcriptase-PCR, RT-PCR)：白色來亨雞的雞蛋經過 18 h 孵化，此時雞胚發育至原腸期，再利用顯微操作取出雞胚 (圖 1)，萃取總 RNA (RNeasy Mini Kit, Qiagen) 供進行 RT-PCR。RT-PCR 的反應體積為 10 μ l，內含雞胚之總 RNA、RT 緩衝液、SuperScript II RNase H-Reverse Transcriptase (Invitrogen, CA)、Oligo (dT)₁₂₋₁₈ 引子 (Invitrogen, CA)、DTT及 RNAsin (Promega, USA)。反應條件為 42°C 1h。製備的 cDNA 即可供 PCR 選殖基因之用。

2. PCR及膠體電泳分析：以原腸期雞胚萃取的總 RNA 反轉錄的cDNA 做為模板。參考 NCBI 網路資料庫中家禽端粒酶基因全長 cDNA (access no. AY626231)，該段序列為雞 (*Gallus gallus gallus*) telomerase reverse transcriptase (TERT) 基因 cDNA。應用Vector NTI 軟體設計選殖雞端粒酶基因全長 cDNA之引子，sense primer：
GCTGCGTGCGGGGATGGA 、 antisense primer :

AACAGGAAATGCAAATATACCAAG。進行 PCR (iCycler, Bio-Rad, USA) 擴增出 4,799 bp 片段產物。PCR 反應液含有 10 μ M 的 sense 與 anti-sense 引子各 1 μ l、*Taq* DNA 聚合酶 0.5 μ l (5 U/ μ l) (Roche, Germany)、10 \times PCR buffer 3 μ l、2.5 mM dNTP 0.6 μ l 及 ddH₂O 22.9 μ l，PCR 反應總體積為 30 μ l。PCR 條件為 denaturation: 94 $^{\circ}$ C 2 min，之後進行 30 次循環 94 $^{\circ}$ C 15 s、68 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 2.5 min；72 $^{\circ}$ C 7 min，反應後保持在 4 $^{\circ}$ C。進行膠體電泳分析時，取 10 μ l PCR 產物，加入 2 μ l 的 6 \times Loading buffer，置入 2% 瓊脂糖 (agarose) 膠片內，於 0.5 \times 的 TAE (Tris-Acetate-EDTA) 液中進行電泳，條件為 100 Volt 30 min。電泳後將膠片置入染液 [0.5 \times 的 TAE 內含 0.1 μ g/ml 的溴化乙錠 (ethidium bromide)] 中染色，並於紫外燈箱上觀察並記錄結果。

3. DNA 片段回收與選殖、DNA 與轉譯胺基酸序列之分析與比對：選殖之 PCR 產物，應用序列分析儀 (ABI 3730) (Applied Biosystems Inc., CA) 進行 DNA 序列分析。完成 DNA 序列分析後，利用 Vector NTI 軟體或網路資料庫 NCBI 中的 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) 進行序列比對或轉譯為蛋白質之胺基酸序列，以了解選殖基因的正確性並比較網路資料庫中相似的基因或蛋

白質序列。

(二)白色來亨雞端粒酶基因啓動子區域之選殖

1. 白色來亨雞血樣品之採集與 DNA 萃取：自白色來亨雞之翼下採集血樣，置入已添加抗凝血劑 (EDTA) 之離心管，利用染色體 DNA 純化套組 (DNeasy Blood and Tissue kit, Qiagen, GmbH) 進行染色體 DNA 之萃取並加以定量 (Nano Drop, ND-1000 Spectrophotometer, USA)。
2. 選殖白色來亨雞端粒酶基因啓動子區域與 3' 未轉錄區域之引子設計：參考 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 網路資料庫有關家禽端粒酶基因 (access no. AH013710) 序列，該序列含有雞 (*Gallus gallus gallus*) TERT 基因啓動子區域 (access no. AY505015S1) 及 3' 未轉錄區域 (3'UTR) (access no. AY505015S2) 兩段序列。啓動子區域包括了部分表現子 1 (exon 1) 序列，應用 Vector NTI 軟體 (Infor Max Inc, USA) 剪貼端粒酶基因轉錄起始點 ATG 開始的 500 bp，設計雞端粒酶基因啓動子區引子爲 sense Primer : GGTGCCCATACTGCCAAT 、 antisense Primer : CAGCAAGGAGTATCCATACGC。進行聚合酶連鎖反應 (PCR) 擴

增出 1,307 bp 的片段產物 (1~901 為啓動子區域、902~1025 為 Exon 1 部分序列)。3' 未轉錄區域引子序列為 sense primer : CTGTGCCTAGCAAGATATGTGG 、 antisense primer : CAAAATTTATACCAACCTGCAAC。進行PCR 擴增出 609 bp 的片段產物 (序列 1~508 為 exon 末端、509~957 為 3-UTR區域)。

3. PCR 及膠體電泳分析：使用純化的白色來亨雞染色體 DNA 進行 PCR 進行 PCR 之儀器及條件同一、(一) 2，但 annealing 溫度調整為 60-65°C。
4. DNA 片段回收與選殖：將 PCR 產物切下，利用 Qiaquick Spin Gel Extraction columns 膠體回收套組 (Quiagen, GmbH) 回收純化 DNA 片段，利用 TOPO Vector system II (Invetrogen, USA) 進行 T-A 選殖入多選殖位置 (multiple cloning site, MCS)，再轉型入勝任細胞 (competent cells) *E. coli* 內，俾進行 DNA 序列分析。
5. DNA 序列分析與比對：同一、(一) 3 的方法進行 DNA 序列之 BLAST。

二、體細胞核轉殖 (somatic cell nuclear transplantation, SCNT) 生產的複製牛、羊與供核體細胞的端粒 (telomere) 長度分析

- (一) 試驗動物：應用 SCNT 技術生產的 4 頭「如意家族」複製牛及複製羊，分娩日期及年齡資料如表 3 及表 4 所示。做為 SCNT 牛羊同年齡的對照非複製牛羊亦採集血樣萃取染色體 DNA。
- (二) 血樣採集與染色體 DNA 萃取：自乳牛尾根採集全血，置入已添加抗凝血劑 (EDTA) 之離心管，經 1,000 rpm 離心分離白血球，再利用染色體 DNA 純化套組 (Qiagen, GmbH) 並依照操作步驟進行染色體 DNA 之萃取與定量。
- (三) 供核體細胞：取自牛與羊耳朵組織體外培養的成纖維細胞做為生產複製牛與羊的供核細胞。牛與羊的供核體細胞分別培養並繼代。體細胞之體外培養條件為 10 % 胎牛血清 (Fetal Bovine Serum, FBS) 之 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 培養基，當細胞數目達到約 2×10^7 時用 trypsin/EDTA (0.25 % trypsin/0.02 % EDTA ; GIBCO/BRL) 回收供萃取染色體 DNA 以分析端粒長度用。
- (四) 端粒長度分析：端粒長度分析乃應用 Telo TAGGG 端粒長度分析套組 (Roche Molecular Biochemicals, Canada) 並按依其方法測定端粒限制片段長度 (Telomere Restriction Fragment, TRF)。首先將萃取的牛羊染色體 DNA (1~2.5 μ g) 經過限制酶 *HinfI/RsaI* (4U/ μ g 染色體 DNA) 在 37 $^{\circ}$ C 作用 12~16 h 後，進行 0.8 % 瓊脂糖膠體電泳，電泳條件為 10V/cm

進行 24 h。電泳後膠體經過變性(denaturation)、中和 (neutralization) 及南方轉漬 (Southern blotting) 到帶正電之尼龍膜 (Roche Diagnostic, GmbH, Mannheim, Germany)，再與biotinylated Telomere Probe (Roche Molecular Biochemicals) 進行雜合反應 (hybridization)；最後在 X-光片上 (Kodak, USA) 自動放射顯影或應用化學螢光測定儀 Luminescent Image Analyser (LAS-3000, Fujifirm, Japan) 攫取影像後計算密度，再以電腦軟體計算平均端粒限制片段(Telomere restriction fragment TRF) 長度⁽⁶⁷⁾。計算公式為

Mean TRF length has been defined according to the following formula:

$$\overline{\text{TRF}} = \frac{\sum (\text{OD}_i)}{\sum (\text{OD}_i / L_i)} \quad (1)$$

where OD_i is the chemiluminescent signal and L_i is the length of the TRF fragment at position i (3). The calculation takes into account the higher signal intensity from larger TRF fragments because of multiple hybridization of the telomere-specific hybridization probe.

(五) 統計分析：複製牛羊及其後代的平均 TRF 測定後與對照正常動物比較，以統計軟體進行 student's t-test 分析，差異顯著水準為 $p < 0.05$ 。

第三章 結果

一、家禽 TERT 基因之選殖

雞的 TERT 活性雖然可以在孵化前的胚葉細胞中測得，但是在原腸期之雞胚中將會顯著表現。本研究採集已孵化 18 h 的白色來亨雞蛋為材料，應用顯微操作抽取原腸期雞胚做為總 RNA 的來源 (圖 1)，經過 RT-PCR 合成 cDNA 做為模板，設計 TERT 特異引子進行 PCR 以選殖標的 TERT 基因。擴增 TERT 的引子序列係參考網路資料庫編號 AY626231 的基因序列，先行針對 TERT 基因前、中與後段設計引子，進行 PCR 並獲得預期之片段產物 (圖 2)。而進行全長 TERT 基因選殖之前，也先行應用 PCR 測定源自原腸期雞胚或體細胞樣品所建構的 cDNA 庫中是否存在著標的基因，結果可自原腸期雞胚 cDNA 庫的模板中順利擴增出長度 508 bp 的 TERT 與 283 bp 的陽性對照 3-磷酸甘油醛脫氫酶 (GAPDH, 管家基因) 基因片段產物；而源自家禽體細胞的 cDNA 只能擴增出 GAPDH 基因產物而未見到 TERT 的表現 (圖 3)。自雞胚樣品所擴增之 508 bp TERT 產物經膠體回收、DNA 序列分析及 BLAST，顯示為正確之 TERT 部份序列 (圖 4)。故試驗進一步應用 PCR 擴增 TERT 基因前段、中段與後段產物並分別成功獲得不同長度的片段產物 (圖 5)。證明 cDNA 內確實含有完整的 TERT 基因。

本研究也擴增 TERT 基因的啓動子區域與 3' 端末轉錄區，結果亦自白色來亨雞之染色體 DNA 中分別擴增獲得 1,307 bp 及 609 bp 的片段長度 (圖 6)。由於 TERT 長度達 4.7 kb，經多次試驗並修正引子序列與 PCR 條件後，終於順利擴增一條長 4.7 kb 的特異性 TERT 基因產物 (圖 7)。將此全長 TERT 產物選殖入 TOPO Vector system 載體供進行 T-A cloning，再應用限制酶 *XhoI*/*SacI* 切割以確認插入片段，結果切割出長 4.7 kb 的片段 (圖 8)。此一完成選殖的序列分析質體命名為 pchTERT TOTP，長 8,418 bp (圖 9)。本試驗選殖的白色來亨雞全長 TERT 基因 DNA 序列經過 NCBI 的 BLAST 比對後，依照與 TERT 基因的序列相似度進行排序，其中相似度最高者為家雞 TERT 全長 mRNA 序列 (*Gallus gallus telomerase reverse transcriptase (TERT)*)，基因庫之編號分別為 NM_001031007.1 與 AY502592.1，相似度達到 99% (圖 10，圖 11，表 1)。故可以確定為雞的 TERT 基因。選殖的白色來亨雞 TERT 應用分析軟體進行核酸序列轉譯，結果為一含有 1,346 個胺基酸的蛋白質 (圖 12)。將雞的 TERT 蛋白質進行 BLAST 比對，結果與其相似程度最高的 10 種蛋白質序列如表 2 及圖 13 所示。其中相似度最高的序列即為編號 NP_001026178.1 的雞 TERT，兩種蛋白質的胺基酸序列進行 BLAST，相似程度達到 99% (圖 14)。本研究

已成功選殖白色來亨雞的全長 TERT 基因，該構築體將可供後續基因轉殖及家禽 PGCs 長期體外培養研究之用。

二、複製動物的染色體端粒長度

分析行政院農業委員會畜產試驗所應用 SCNT 生產的複製牛、羊及其後代，在不同年齡的端粒長度，並與同年齡非複製動物比較，以了解複製動物及其後代與對照非複製動物間的端粒長度是否有差異。試驗自複製牛、羊及同年齡對照非複製動物採集全血，並萃取染色體 DNA，然後應用套組測定端粒限制片段長度 (Telomere Restriction Fragment, TRF)。有關複製牛羊及對照動物的性別與年齡等基本資料如表 3 及表 4 所示。試驗結果顯示，年齡在 2 歲至 3 歲間的 4 頭複製牛端粒長度分別為 17.03 kb、17.92 kb、17.92 kb 及 17.19 kb，平均端粒長度為 17.52 ± 0.41 kb；而 4 頭同年齡同性別非複製牛之端粒長度分別為 17.79 kb、17.96 kb、17.86 kb 及 17.03 kb，平均端粒長度為 17.66 ± 0.32 kb (圖 15、16、表 5)。複製牛的 4 頭後代之端粒長度分別為 17.92 kb、17.80 kb、17.92 kb 及 17.03 kb，平均端粒長度為 17.67 ± 0.32 kb；而 5 頭後代對照非複製牛之端粒長度分別為 18.31 kb、19.4 kb、19.21 kb、18.2 kb 及 18.31 kb，平均端粒長度為 18.69 ± 0.50 kb，做為供核體細胞的端粒

長度則為 17.30 kb (圖 15、16、表 5)。複製牛在 3 至 4 歲時的端粒長度分別為 17.65、17.31、17.82 及 17.13 kb，平均端粒長度為 17.48 ± 0.31 kb；而 6 頭同年齡同性別非複製牛在之端粒長度分別為 18.76、15.04、19.47、17.59、17.31 及 18.62 kb，平均端粒長度為 17.80 ± 1.57 kb；供核體細胞之端粒長度為 17.07 kb (圖 17、18)。結果顯示，複製牛及其後代之端粒長度與非複製正常動物之間並無顯著差異存在 ($p > 0.05$)。本研究顯示應用複製技術生產的乳牛，其端粒長度在經過 NT 操作之後，胚在發育過程其染色體能順利地再程式化，使端粒長度回復正常，並未因為以成體供核體細胞進行複製而導致端粒短化。

複製羊的分析結果，年齡在 50、22 及 6 月齡的複製羊 1、2 及 3 號，端粒長度分別為 16.68 kb、17.05 kb 及 14.32 kb；而與 3 隻複製羊相近月齡非複製羊的端粒長度分別為 16.92 ± 0.73 、 17.04 ± 0.62 及 17.37 ± 0.32 (圖 19、20 與表 6)。複製羊的 5 頭後代之端粒長度，分別為 15.5、15.86、16.67、16.13 及 16.21 kb，平均端粒長度為 16.07 ± 0.32 kb；而 4 頭對照非複製羊的端粒長度分別為 16.37、15.77、16.58 及 17.01 kb，平均端粒長度為 16.43 ± 0.36 kb (圖 19、20 表 6)。複製羊 1、2 及 3 號在 62、34 及 18 月齡的端粒長度，分別為 12.26、13.50 及 10.39 kb；而與複製羊月齡相近的 3

組非複製羊，端粒長度分別為 16.08 ± 0.86 、 15.72 ± 0.61 及 16.32 ± 0.61 kb (圖 21)，而做為供核之體細胞株 GE1244P2 與 GE0918P8 之端粒長度分別為 14.86 kb 與 14.20 kb。顯示不同月齡之複製羊其端粒長度顯著較非複製羊為短 ($p < 0.05$)。本研究顯示，應用 SCNT 技術生產的複製羊，其端粒長度較正常非複製羊為短，且隨著月齡的增加，端粒長度的減損將顯著較非複製羊明顯。



第四章 討論

一、家禽端粒酶基因之選殖

本研究之目的在選殖白色來亨雞的 TERT 基因。TERT 的活性在原腸期之雞胚中顯著的表現^(58,59)。故本研究採集白色來亨雞孵化 18 h 的雞蛋做為材料，應用顯微操作抽取原腸期雞胚做為總 RNA 來源，經 RT-PCR 合成 cDNA 做為模板，配合選殖 TERT 的引子進行 PCR，已成功選殖白色來亨雞的全長 TERT 基因，將進一步次選殖入表現載體，供未來基因轉殖及家禽 PGCs 長期體外培養研究之用。

關於雞的 TERT 已有學者研究其 DNA 序列與胺氨酸的結構⁽¹⁹⁾。本研究參考選殖雞的 TERT 方法與 DNA 序列，設計特異之引子選殖白色來亨雞的 TERT 基因。由於雞的 TERT 基因長 4.7 kb 且含有 GC 核苷酸的比例甚高，研究進行之初經多次嚐試不同 PCR 條件及各種聚合酶均難以順利擴增全長的基因產物，經不斷嘗試並修正引子序列與 PCR 的各種條件，終於順利擴增全長的 TERT 產物。本研究選殖的 TERT 序列經 BLSAT 比對，與 NP_001026178.1 之序列相似性最高，達到 99%。雞 TERT 之 DNA 序列轉譯成胺氨酸後，為含有 1,346 個胺氨酸 (NP_001026178) 的蛋白質。雞 TERT 之胺氨酸序列雖與其他動物具有一定相似性，較

特別之處是雞的 TERT N-端含有一 298 個胺基酸之具彈性連接子 (linker)，而非洲爪蟾蜍、人、小鼠、大鼠、倉鼠則分別長 199 個、154 個、158 個、158 個與 161 個胺基酸 (附錄 3)，故雞的 TERT 蛋白質較大。雞的具彈性連接子與不同種別動物比較，胺基酸序列具有高度變異性，幾乎沒有甚至相似性極低⁽¹⁹⁾。而其他脊椎動物的 TERT 研究與蛋白質結構亦有學者探討^(18, 20, 60, 61)。

脊椎動物間的 TERT 在 C 端反轉錄酶區具有高度相似性，其中，又以 motif E 之保留性最強，胺基酸之相似度達 70%。雞的 TERT 胺基酸與人、非洲爪蟾蜍、小鼠、大鼠、倉鼠之相似性分別達 45%、38%、41%、40% 與 42%。而脊椎動物 TERT 的 N 端區域⁽²⁰⁾保留性反轉錄酶區域⁽²¹⁾ 具有高度結構相似性，推測這些保留區域應具有重要的理化功能⁽²²⁾。人的 TERT 在 5' 端鄰近啓動子區域內含有 E-box、Ik1、MAZ 與 Sp1 位置等各種轉錄因子結合區。在基因庫中雞的 TERT 基因序列，包括了 5' 端鄰近啓動子序列與部份密碼子序列 (AY505015)、3' 端未轉譯區及鄰近序列 (AY505016) 及 5' 端未轉錄區 (UTR) (AY502592) ⁽¹⁹⁾。

而依據人的 TERT，可將雞的 TERT 區域分爲：region v-I (1~196)、region v-II (495~531)、region v-III (554~588)、region v-IV (625~753)、motif T (756~803)、motif 1 (814~838)、motif 2 (839~870)、

motif A (915~950)、motif B' (1038~1072)、motif C (1078~1094)、motif D (1095~1120) 與 motif E (1139~1149) (附錄 1 與 3)。雞的 TERT 在 v-I 區域與 v-IV 區內，分別含有其他脊椎動物所缺乏的 15 與 27 個胺基酸序列。若依據相似度的變異做為參數，則區域 (region) 可再區分為 3 個次區域 (domains)，分別為 v-V (aa 1153~1175, 34%)、v-VI (aa 1180~1252, 65%) 與 v-VII (aa 1254~1346, 29%)，不同種別動物間在 3' 端末轉錄區內之變異甚大⁽²⁰⁾。

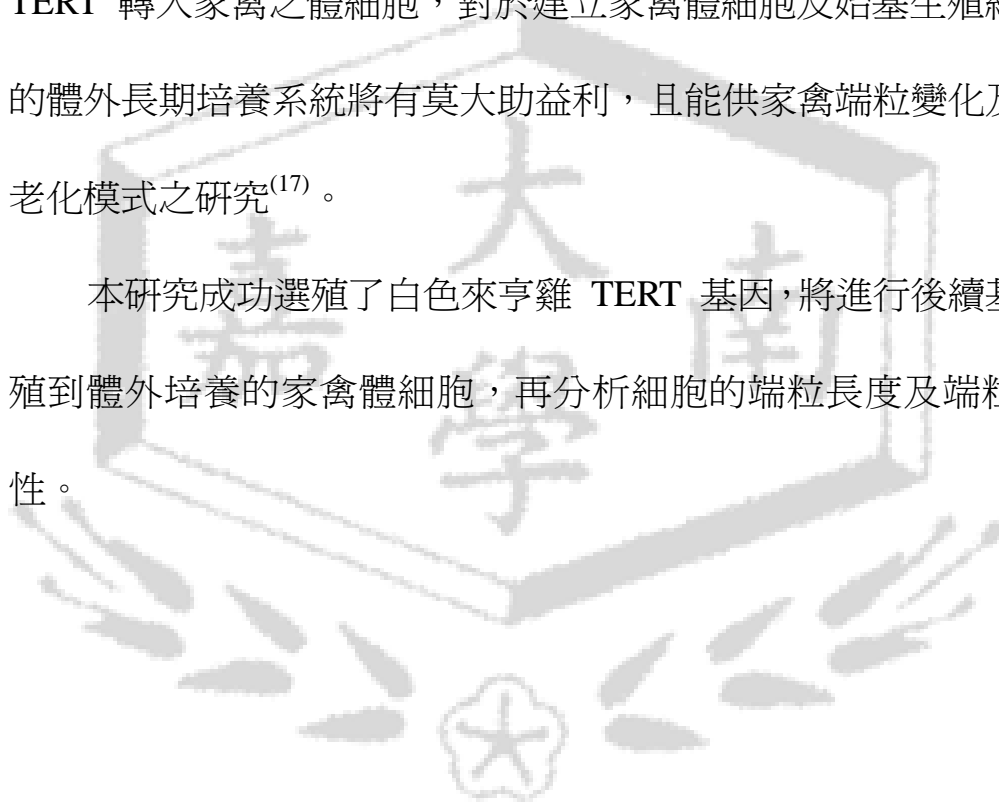
雞 TERT 之 5' 端鄰近啓動子區域，主要包括了一個位於 -259 開始一直延伸到 +727 bp 的 CpG 小島；自 5' 鄰近啓動子區域的 940 bp 到密碼子起始的 125 bp 內，存在 80 個以上的轉錄因子結合位置 (附錄 5)。5' 區域之 motifs 含有許多 CACC 及 CCAAT、Sp1、GR 及 c-Myb、各式 NF 與 AP 位置、E-box 等序列。在鄰近密碼區 340 bp 與 125 內的 Sp1、c-Myb、AP-1、AP-2、一個與 Sp1 重疊的 MAZ 等 motif 位置。此區域內也確定含有 NF-1、NF-1/L、NF-ATh、E-box (c-Myc/Mad 1/Max site)、CCAAT 及 CACCC 等位置。比較雞與人的 TERT 5' 端啓動子區 (500 bp)，發現雞的 TERT 內含有許多與人相似的轉錄因子結合區，例如 Sp1、MAZ/Sp-1、E-box、Ik1、NF-1 與 AP-1 等 (附錄 4)。雞的 TERT 序列中確定沒有 c-Ets-2 或 WT1 的位置。在人的 TERT 近

側啓動子及 5' 端末轉錄區內，含有許多雞所欠缺的 motif，包括 E-box 及二個 Sp1 位置。而雞在轉錄起始點區域內僅含一個 Sp1 位置、在 5' 端區域含有 4 個 c-myb 結合區是比較特別的。

端粒酶是核糖核酸蛋白質反轉錄酶的一種，由重複序列 (TR) 與具有端粒反轉錄酶 (TERT) 活性的蛋白質所組成⁽³⁷⁾。TR 的 RNA 普遍存於動物細胞中，但唯有含 TERT 的細胞才具有端粒酶活性。端粒酶的活性受到多重機制的調控，除了端粒酶直接作用之外，其他的作用因子也對端粒產生調控作用。將外源 TERT 轉殖入體細胞，可以產生端粒酶活性而預防端粒受侵蝕，克服細胞衰老與危機使細胞達到永生狀態。選殖家禽 TERT 基因的重要性，在於源自雞的體細胞經過體外培養分裂數次後即進入增殖老化期⁽²³⁾，與染色體末端的端粒結構短化有密切關係，因為端粒可以保護染色體末端免於斷裂與融合⁽¹²⁾。雞的染色體端粒 DNA 較人類多 10 倍。維持端粒長度有賴於端粒酶的作用，是負責將 TTAGGG 的序列加到染色體的 3' 端⁽⁶²⁾。缺乏端粒酶的作用，將導致端粒短化及細胞老化。體外培養的體細胞，可以應用異種間的 TERT 基因轉殖而恢復 TERT 活性，而維持端粒長度，例如將人類的 TERT 基因轉殖表現到人、綿羊、兔子、牛與鹿的體細胞，因為端粒酶的表現而增加端粒長度，維持染色體之穩定性而延長細胞壽命⁽²⁶⁻²⁹⁾。然而將人的 TERT 基因

轉殖到體外培養的家禽體細胞，卻不具有 TERT 的活性而維持端粒長度⁽⁶³⁾，顯見家禽的 TERT 仍存在著未知的作用機制。目前對於家禽與其他動物之 TERT 作用或穩定端粒的分子機制差異性尚未完全了解，但選殖雞的 TERT 基因轉殖入體外培養的家禽體細胞，可以順利表現 TERT 的活性。因此，若能應用基因轉殖技術將雞的 TERT 轉入家禽之體細胞，對於建立家禽體細胞及始基生殖細胞系的體外長期培養系統將有莫大助益利，且能供家禽端粒變化及細胞老化模式之研究⁽¹⁷⁾。

本研究成功選殖了白色來亨雞 TERT 基因，將進行後續基因轉殖到體外培養的家禽體細胞，再分析細胞的端粒長度及端粒酶活性。



二、複製動物的端粒長度

本研究分析畜產試驗所應用體細胞核轉置技術生產的複製牛、羊及其後代動物，在特定年齡的端粒長度，並與同年齡非複製動物比較，以了解複製動物及其後代與對照非複製動物間的端粒長度。試驗從複製牛、羊及同年齡同性別的非複製動物採集全血，經離心分離白血球供萃取染色體 DNA，然後應用套組測定端粒限制片段長度 (TRF)。試驗結果顯示，年齡在 2 歲至 3 歲間的 4 頭複製牛端粒長度分別為 17.03 kb、17.92 kb、17.92 kb 及 17.19 kb，平均端粒長度為 17.52 ± 0.41 kb；而 4 頭同年齡對照牛正常之端粒長度分別為 17.79 kb、17.96 kb、17.86 kb 及 17.03 kb，平均端粒長度為 17.66 ± 0.32 kb。複製牛的 4 頭後代之端粒長度分別為 17.92 kb、17.80 kb、17.92 kb 及 17.03 kb，平均端粒長度為 17.67 ± 0.32 kb；而 5 頭後代對照非複製牛之端粒長度分別為 18.31 kb、19.4 kb、19.21 kb、18.2 kb 及 18.31 kb，平均端粒長度為 18.69 ± 0.50 kb。做為供核體細胞的端粒長度則為 17.30 kb。複製牛在 3 至 4 歲時的端粒長度分別為 17.65 kb、17.31 kb、17.82 kb 及 17.13 kb，平均端粒長度為 17.48 ± 0.31 kb；而 6 頭同年齡同性別非複製牛在之端粒長度分別為 18.76 kb、15.04 kb、19.47 kb、17.59 kb、17.31 kb 及 18.62 kb，平均端粒長度為 17.80 ± 1.57 kb，供核體細胞其端粒長度

為 17.07 kb。複製牛與非複製牛之端粒長度無顯著差異。顯示應用成體供核體細胞進行 SCNT 生產的複製乳牛，其端粒長度與正常非複製牛相似，推測在核轉置後基因再程式化的過程順利，使端粒的長度得以回復正常，並未因為使用成體供核體細胞而導致端粒短化的現象。

複製羊的分析結果，應用 SCNT 生產的 3 頭複製羊 1、2 及 3 號於 50、22 及 6 月齡的端粒長度分別為 16.68 kb、17.05 kb 及 14.32 kb；而與 3 隻複製羊相近月齡非複製羊群的端粒長度分別為 16.92 ± 0.73 kb、 17.04 ± 0.62 kb 及 17.37 ± 0.32 kb (圖 19 與 20)。複製羊的 5 頭後代之端粒長度分別為 15.5、15.86、16.67、16.13 及 16.21 kb，平均端粒長度為 16.07 ± 0.32 kb；而 3 頭對照非複製羊的端粒長度分別為 16.37、15.77、16.58 及 17.01 kb，平均端粒長度為 16.43 ± 0.36 kb。複製羊 1、2 及 3 號在 62、34 及 18 月齡之端粒長度，分別為 12.26 kb、13.50 kb 及 10.39 kb；而與 3 隻複製羊相近月齡非複製羊群，端粒長度分別為 16.08 ± 0.86 kb、 15.72 ± 0.61 kb 及 16.32 ± 0.61 kb，複製羊之端粒長度顯著較非複製羊短 ($P < 0.05$)。

有關各種複製動物的端粒長度已有學者加以歸納⁽⁶⁴⁾ (附錄 2)。Kubota *et al.*⁽⁶⁵⁾ 曾連續複製日本和牛種公牛，生產的複製牛外表健康

且具正常端粒長度。而測定第一代與第二代複製牛的成纖維細胞與白血球之端粒長度卻明顯不同。供核細胞經過體外培養並繼代 15 次，端粒長度為 14.7 ± 0.4 kb 至 12.8 ± 0.4 kb，約減少 63 bp/細胞倍增。第一代與第二代複製牛的成纖維細胞，平均端粒分別為 15.4 ± 0.5 kb 至 16.1 ± 0.7 kb，與自然配種所生的同齡正常非複製仔牛相似，且均比原來供核公牛的端粒為長。供核細胞、第一代與第二代複製牛的白血球端粒分別為 13.8 ± 0.8 kb、 15.3 ± 0.8 kb 與 15.7 ± 0.8 kb。供核細胞的端粒較皮膚成纖維細胞為短。複製牛的端粒回復與牛胚發育至特定階段時端粒酶的高度活性有關係。

牛與人的精子均維持相當的端粒長度⁽⁶⁶⁾。生殖細胞系的端粒短化，可經由端粒酶的作用而修補。12 歲的日本種公和牛因遺傳性能優異而有產數以萬計的優良後代。應用 SCNT 生產的二頭日本種公用和牛，在體型、外表行為及採精量、精子濃度、冷凍耐受性、體外受精 (*in vitro fertilization, IVF*) 效率與精液性狀均在正常範圍，精液供人工授精也順利產下正常仔牛。正常公牛與 2 頭複製公牛精子的端粒分別為 22.42 kb、25.8 kb 與 20.9 kb。而來自老公牛的供核肌肉細胞及精子的端粒分別長 20.1 kb 與 22.2 kb，顯示正常的端粒長度。採自端粒較長複製公牛的精液進行人工授精，生下 9 頭外表健康的雌性仔牛，其出生體重、生長速率與行為均與正常仔牛無異，

顯示複製公牛供種畜應用的可行性。仔牛與正常對照仔牛的白血球端粒分別為 20.06 ± 0.45 kb 與 19.97 ± 0.41 kb⁽³⁶⁾。

Tian *et al.*⁽⁵⁵⁾應用 13 歲乳母牛的成纖維細胞與卵丘細胞做為供核源，產製 10 頭複製仔牛中，有 6 頭在分娩後夭折，僅 4 頭仔牛存活，這 4 頭複製仔牛之端粒長 15.38 ± 0.62 kb，與正常對照仔牛之 14.73 ± 0.49 kb 並無顯著差異，且均比較供核母牛的 12.43 ± 0.49 kb 為長。而分娩後早夭的 6 頭複製仔牛，端粒長 15.87 ± 0.40 kb，與存活的複製仔牛相似，顯示取自 13 歲乳牛的供核細胞雖然端粒較短，但經過複製後無論子代能否存活，均能使供核體細胞的端粒回復，而複製仔牛出生後高損失率似與端粒變短無關。母牛的成纖維體細胞在體外培養過程端粒會逐漸變短，短化速率平均為 155 bp/繼代 (或 > 100 bp/細胞倍增)，而人或綿羊之端粒短化速率約 50 bp⁽⁶⁷⁾與 172 bp⁽⁶⁸⁾/細胞倍增。複製與體外培養的 IVF 牛胚，在整個發育過程可測得端粒酶的活性，但在囊胚期時端粒酶的活性上升，如同 IVF 牛胚一般⁽⁴⁶⁾。而此結果與綿羊之分析結果有差異⁽⁵²⁾，顯示動物種別、動物的數量及分析時 DNA 的來源，將會影響測定的結果。例如白血球的數目會因為動物受感染而明顯增生。以胎體供核細胞產製的複製牛，端粒較同年齡對照牛隻為長⁽⁶⁹⁾。以年老成熟母牛供核細胞生產的複製仔牛，端粒長度均在正常

之範圍內⁽⁵⁵⁾。此種差異，應與供核細胞及培養條件不同有關。供核細胞僅短暫的體外培養或經長期培養至近乎老化期才進行複製的程度⁽²⁸⁾。應用老化的供核細胞，進行 SCNT 後或許因基因再程式化時之過度補償作用，而導致複製個體的端粒較應用胎體供核細胞者為長⁽⁵⁵⁾。

Lanza *et al.*⁽⁶⁹⁾分析雌性複製仔牛組織的端粒，結果與同年齡對照牛隻相似；取自胎體或老化之成纖維細胞，均可以重建端粒長度並延長了增殖壽命。應用老化的供核細胞，生產的複製仔牛，有端粒明顯加長或長度重建的結果，而到了 5~10 月齡，複製牛之白血球端粒較同齡對照牛或初生牛為長⁽⁴²⁾。Miyashita *et al.*⁽⁴⁸⁾應用取自不同組織的 4 種供核細胞生產之複製牛，端粒的長度明顯不同，應用上皮細胞者產製的複製牛，其端粒長度明顯比肌肉細胞或成纖維細胞者為短。而 7 歲母牛的端粒長 19.5 ± 0.5 kb，10 歲供核母牛的耳朵成纖維細胞端粒為 18.5 ± 0.5 kb，較 7 日齡新生仔牛的 20.5 ± 0.5 kb 為短⁽⁵⁶⁾。複製牛 1.5 歲的端粒平均為 18.0 ± 0.5 kb⁽⁵⁴⁾。

為了解釋複製牛胚及小鼠胚在發育過程的端粒延長作用，學者應用老化供核細胞生產複製動物，發現端粒可以回復正常⁽⁶⁷⁾。在體外胚的生產 (*in vitro* production, IVP) 條件下，端粒長度的調節除受端粒酶的活性影響外，也受到其他端粒結合蛋白質的調控⁽⁷⁰⁾。核轉

置或孤雌生殖牛囊胚，端粒酶的表現會增加，端粒之長度經由端粒酶-依存 (dependent) 的機制，決定桑椹期或囊胚期。而體內胚、IVP、複製牛胚或小鼠胚，桑椹期-囊胚之轉換是端粒延長的關鍵時期，顯示著床前的胚發育必然遵循一定之程式進行。此時細胞開始分化成爲內細胞群與滋養葉，緊實的桑椹胚發育成爲具有囊腔的囊胚，在外觀及胚的基因表現均呈現明顯變化的情況相符⁽⁷¹⁾。

在複製羊的部份，SCNT奈及利亞侏儒山羊的端粒長度與供核細胞有所差異，且其後代之端粒明顯比同齡非複製山羊爲短。應用成體顆粒細胞複製的山羊，皮膚細胞的端粒顯著較非複製動物爲短，而應用胎體成纖維細胞生產的複製公羊，端粒的長度雖有變異但皆在正常範圍內。複製公羊的皮膚細胞及白血球的端粒較同齡非複製羊爲短。複製羊的睪丸細胞端粒長 9.3 ± 0.52 kb，明顯較非複製羊之 16.3 ± 1.07 kb爲短；複製羊後代的睪丸細胞端粒長 12.8 kb，也明顯較非複製公羊爲短，而睪丸細胞的端粒酶活性則與非複製公羊沒有顯著差異。這些結果，顯示供核細胞種類及複製步驟，會影響後代之端粒長度。在活體內，端粒變短的速度平均約 0.78 ± 0.28 kb/每年。動物之血球端粒又較皮膚組織者短約 15%。正常的奈及利亞侏儒山羊在 90~135 日齡之端粒爲 14.96 ± 0.25 kb，較 775~895 日齡的老羊 12.71 ± 0.62 kb爲長。應用胎體成纖維細胞生產的複製公

羊在 71~350 日齡之端粒長 12.60 ± 0.51 kb，較 69~530 日齡的 5 頭非複製羊 14.03 ± 0.44 kb 為短。應用成體卵丘細胞生產的複製女羊，在 74~89 日齡之皮膚細胞端粒長 13.28 ± 0.41 kb，顯著較 90~135 日齡的非複製羊 14.96 ± 0.25 kb 為短。複製公羊與正常母羊配種所生的 9 頭羔羊，不論皮膚或血液之平均端粒均較同齡對照羊為短⁽⁴²⁾。Betts *et al.*⁽⁴⁵⁾ 的研究顯示 SCNT 公山羊外表正常、身體健康，且具有正常的生殖能力。

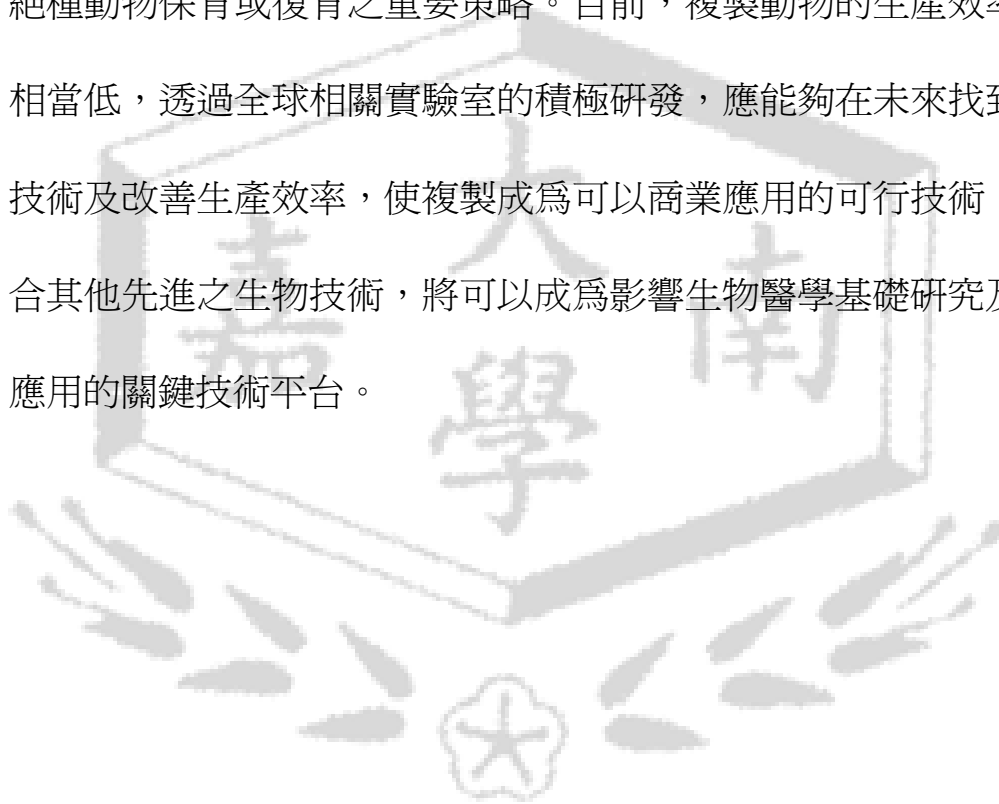
Clark *et al.*⁽⁵¹⁾ 的研究顯示，應用成纖維細胞生產的 SCNT 綿羊中，僅部分綿羊具有正常的端粒長度；而應用上皮細胞產製的 SCNT 綿羊其端粒長度較非複製動物為短。Alexander *et al.*⁽⁷²⁾ 分析 SCNT 複製綿羊及其性成熟後自然配種所生的 3 隻後代之端粒長度，同時採集 35 隻 1 至 36 月齡的非複製綿羊做為對照。結果顯示，應用體外培養的體細胞進行 SCNT 產製的綿羊，其端粒長度較相同年齡的對照羊為短。正常非複製綿羊之 TRFs 平均為 12 至 21 kb 之間。而做為 SCNT 之供核細胞，體外培養第一代 (P1) 時的 TRFs 為 17-19 kb，而源自 SCNT 之胎體成纖維細胞在體外培養到 P17 即達到老化階段。正常的對照細胞株則分別在 P25-P27 時達到老化階段。體外培養的體細胞在 P10 之前，端粒的磨損狀態並不明顯，但在 P10 之後，端粒將明顯磨損而直到進入老化階段。4 頭 28、

16、13 及 14 月齡 SCNT 綿羊的端粒長度分別為 11.3、14.45、13.85 及 11.75 kb；而同年齡對照綿羊的長度分別為 17.51 ± 0.65 、 17.45 ± 1.18 、 17.52 ± 0.37 及 17.52 ± 0.37 ，兩者比較除了 16 月齡 SCNT 綿羊及其對照羊沒有差異外，其餘均已達顯著差異的水準 ($p < 0.05$)。而 SCNT 複製綿羊達到性成熟後自然配種所生的後代，則具有與同齡非複製羊相似的端粒長度。體外培養超過 20 代的供核體細胞端粒長度顯著較短，且呈現高度染色體數目及結構的異常現象。

由於複製動物的生產效率偏低，可能的主要原因在於 SCNT 後基因再程式化的錯誤 (epigenetic reprogramming errors) 所致。各種複製動物之端粒已經有相當多的研究，雖然結果並不一致，經過複製後，端粒有變短、正常或甚至變長的結果。造成複製動物端粒長度變異的因素，可能與供核細胞的種類與體外培養條件、端粒酶再程式化效率、動物的個體差異、複製的操作步驟、分析的組織或細胞種類、動物種別間的差異等，因而導致複製之後基因再程式化能力與發育潛力的差異。

本研究應用複製技術生產的複製牛，其端粒長度顯示與非複製牛無差異，經過 NT 操作之後，複製胚在發育之過程染色體可能已順利地再程式化，並使端粒回復正常長度。近年來，國內的動物複製平台已成功建立，且相繼有牛、羊及豬順利產生。而複製技術建

立後，可繼續生產複製動物供做相關研究的材料之外，亦可提供做為保種或擴增優良種畜的重要方法。此外，複製動物胚發育調控機制的研究、利用核轉置生產具有高經濟價值基因的轉殖動物、了解粒線體 DNA 的命運等，對於改善複製生產效率、探討哺乳動物胚的早期發育機制及基因調控都將有重要影響，亦可做為稀有或瀕臨絕種動物保育或復育之重要策略。目前，複製動物的生產效率仍然相當低，透過全球相關實驗室的積極研發，應能夠在未來找到提升技術及改善生產效率，使複製成為可以商業應用的可行技術。若配合其他先進之生物技術，將可以成為影響生物醫學基礎研究及實際應用的關鍵技術平台。



第五章 結論

- 一、本研究已成功選殖到白色來亨雞之端粒反轉錄酶 (telomerase reverse transcriptase, TERT) 基因並進行 DNA 序列分析比對，期能供基因轉殖並發展延長家禽體細胞體外培養的技術平台。
- 二、本研究已完成畜產試驗所應用體細胞核轉置 (somatic cell nuclear transfer, SCNT) 技術生產的複製荷蘭種乳牛與阿爾拜因乳山羊及其後代動物在不同特定年齡的端粒 (telomere) 長度，發現複製牛與正常同齡動物並無顯著差異存在，本研究證明應用 SCNT 技術生產的複製牛，其調控端粒長度的相關基因可以順利的進行再程式化，使端粒維持一定的長度水準，並沒有因為使用成體之耳朵成纖維細胞做為供核細胞而導致端粒短化的老化現象。但複製羊則顯著 ($p < 0.05$) 較正常同齡對照羊為短。本研究顯示，應用 SCNT 技術生產的複製羊其端粒長度較正常對照為短，隨著月齡的增加，端粒的長度顯著較對照羊為短。應用複製技術生產的乳牛及乳羊，可能因為動物種別不同，其端粒長度在經過 NT 操作後，會因為胚在發育過程其染色體再程式化程度之不同，使端粒長度回復正常或較正常動物為短。

參考文獻

1. Faragher RG, Kipling D. How might replicative senescence contribute to human ageing? *Bioessays*. 1998; 20:985-991.
2. Blasco MA. Telomerase beyond telomeres. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2:627-633.
3. McEachern MJ, Krauskopf A, Blackburn EH. Telomeres and their control. *Annu Rev Genet*. 2000; 34:331-358.
4. Kozik A, Bradbury EM, Zalensky A. Increased telomere size in sperm cells of mammals with long terminal (TTAGGG)_n arrays. *Mol Reprod Dev*. 1998; 51:98-104.
5. Holt SE, Shay JW, Wright WE. Refining the telomere-telomerase hypothesis of aging and cancer. *Nat Biotechnol*. 1996; 14:836-839.
6. McEachern MJ, krauskopf A, Blackburn EH. Telomeres and their control. *Annu Rev Genet*. 2000; 34:331-358.
7. Maser RS, DePinho RA. Connecting chromosomes, crisis, and cancer. *Science*. 2002; 297:565-569.
8. Morin GB. The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell*. 1989; 59:521-529.
9. Forsyth NR, Wright WE, Shay JW. Telomerase and differentiation in multicellular organisms: turn it off, turn it on, and turn it off again. *Differentiation*. 2002; 69:188-197.

10. de Lange T. Protection of mammalian telomeres. *Oncogene*. 2002; 21:532-540.
11. Venkatesan RN, Price C. Telomerase expression in chickens: constitutive activity in somatic tissues and down-regulation in culture. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95:14763-14768.
12. Mathieu N, Pirzio L, Freulet-Marriere, Desmaze C, Sabatier L. Telomeres and chromosomal instability. *Cell Mol Life Sci*. 2004; 61:641-656.
13. Delany ME, Daniels LM, Swanberg SE, Taylor HA. Telomeres in the chicken: genome stability and chromosome ends. *Poult Sci*. 2003; 82:917-926.
14. Greider CW, Blackburn EH. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in tetrahymena extracts. *Cell*. 1985; 43:405-413.
15. Feng J, Funk WD, Wang SS *et al*. The RNA component of human telomerase. *Science*. 1995; 269:1236-1241.
16. Saretzki G, Petersen S, Petersen I, Kölbl K, von Zglinicki T. hTERT gene dosage correlates with telomerase activity in human lung cancer cell lines. *Cancer Lett*. 2002; 176:81-91.
17. Swanberg SE, Delany ME. Dynamics of telomere erosion in transformed and non-transformed avian cells in vitro. *Cytogenet Genome Res*. 2003; 102:318-325.

18. Chen JL, Blasco MA., Greider CW. Secondary structure of vertebrate telomerase RNA. *Cell*. 2000; 100:503-514.
19. Delany ME, Daniels LM. The chicken telomerase reverse transcriptase (chTERT): molecular and cytogenetic characterization with a comparative analysis. *Gene*. 2004; 339:61-69.
20. Kuramoto M, Ohsumi K, Kishimoto T, Ishikawa F. Identification and analyses of the *Xenopus* TERT gene that encodes the catalytic subunit of telomerase. *Gene*. 2001; 277:101-110.
21. Lingner J, Hughes TR, Shevchenko A, Mann M, Lundblad V, Cech TR. Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. *Science*. 1997; 276:561- 567.
22. Xia J, Peng Y, Mian IS, Lue NF. Identification of functionally important domains in the N-terminal region of telomerase reverse transcriptase. *Mol Cell Biol*. 2000; 20:5196- 5207.
23. Venkatesan RN, Price C. Telomerase expression in chickens: constitutive activity in somatic tissues and down-regulation in culture. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95:14763-14768.
24. Kim H, You S, Kim IJ *et al*. Alterations in p53 and E2F-1 function common to immortalized chicken embryo fibroblasts. *Oncogene*. 2001; 20:2671-2682.
25. Lundblad V. Telomere maintenance without telomerase. *Oncogene*. 2002; 21:522-531.

26. Cui W, Wylie D, Aslam S *et al.* Telomerase-immortalized sheep fibroblasts can be reprogrammed by nuclear transfer to undergo early development. *Biol Reprod.* 2003; 69:15-21.
27. Xiang H, Wang J, Mao YW, Li DW. hTERT can function with rabbit telomerase RNA: regulation of gene expression and attenuation of apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 278: 503-510.
28. Veitonmaki N, Fuxe J, Hultdin M, Roos G, Pettersson RF, Cao Y. Immortalization of bovine capillary endothelial cells by hTERT alone involves inactivation of endogenous p16INK4A/ pRb. *Faseb J.* 2003; 17:764-766.
29. Zou Y, Yi X, Wright WE, Shay JW. Human telomerase can immortalize Indian muntjac cells. *Exp Cell Res.* 2002; 281:63-76.
30. Wong SC, Ong LL, Er CP, Gao S, Yu H, So JB. Cloning of rat telomerase catalytic subunit functional domains, reconstitution of telomerase activity and enzymatic profile of pig and chicken tissues. *Life Sci.* 2003; 73:2749-2760.
31. Chen JL, Blasco MA., Greider CW. Secondary structure of vertebrate telomerase RNA. *Cell.* 2000; 100:503-514.
32. Briggs R, King TJ. Transplantation of Living Nuclei From Blastula Cells into Enucleated Frogs' Eggs. *Proc Nat Acad Sci USA.* 1952; 38(5): 455-463.
33. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable

- offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*. 1997; 385:810-813.
34. Meissner A, Jaenisch R. Mammalian Nuclear Transfer. *Dev Dyn*. 2006; 235:2460-2469.
35. Vajta G, Gjerris M. Science and technology of farm animal cloning: state of the art. *Anim Reprod Sci*. 2006; 92(3-4):211-230.
36. Campbell KH. A background to nuclear transfer and its applications in agriculture and human therapeutic medicine. *J Anat*. 2002; 200(Pt 3):267-275.
37. Rideout WM, Eggan K, Jaenisch R. Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of the genome. *Science*. 2001; 293:1093-1098.
38. Gurdon JB. Genetic reprogramming following nuclear transplantation in Amphibia. *Semin Cell Dev Biol*. 1999; 10:239-243.
39. Dean W, Santos F, Stojkovic M *et al*. Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98:13734-13738.
40. Miyashita N, Shiga K, Yonai M *et al*. Remarkable differences in telomere lengths among cloned cattle derived from different cell types. *Biol Reprod*. 2002; 66(6):1649-1655.
41. 蕭振文、蔡麗卿、劉瑞珍、劉振發、陳立人。體細胞核轉置家畜的端粒。 *科學農業*。2006; 54 (1,2,3): 14-22 頁。

42. Betts D, Bordignon V, Hill J *et al.* Reprogramming of telomerase activity and rebuilding of telomere length in cloned cattle. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98:1077-1082.
43. Santos F, Zakhartchenko V, Stojkovic M *et al.* Epigenetic marking correlates with developmental potential in cloned bovine preimplantation embryos. *Curr Biol*. 2003; 13:1116-1121.
44. Zhu L, Hathcock KS, Hande P, Lansdorp PM, Seldin MF, Hodes RJ. Telomere length regulation in mice is linked to a novel chromosome locus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95:8648-8653.
45. Betts D, Perrault SD, Petrik J *et al.* Telomere length analysis in goat clones and their offspring. *Mol Reprod Dev*. 2005; 72:461-470.
46. Xu J, Yang X. Telomerase activity in bovine embryos during early development. *Biol Reprod*. 2000; 63:1124-1128.
47. Schatzlein, Lucas-Hahn A, Lemme E *et al.* Telomere length is reset during early mammalian embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101:8034-8038.
48. Miyashita N, Shiga K, Fujita T *et al.* Normal telomere lengths of spermatozoa in somatic cell-cloned bulls. *Theriogenology*. 2003; 59(7):1557-1565.
49. Enright BP, Taneja M, Schreiber D *et al.* Reproductive characteristics of cloned heifers derived from adult somatic cells. *Biol Reprod*. 2002; 66:291-296.

50. Rhind SM, King TJ, Harkness LM *et al.* Cloned lambs –lessons from pathology. *Nat Biotechnol.* 2003; 21:744-745.
51. Clark AJ, Ferrier P, Aslam S *et al.* Proliferative lifespan is conserved after nuclear transfer. *Nat Cell Biol.* 2003; 5:535-538.
52. Prather RS, Tao T, Machaty Z. Development of the techniques for nuclear transfer in pigs. *Theriogenology.* 1999; 51:487-498.
53. Westhusin ME, Long CR, Shin T *et al.* Cloning to reproduce desired genotypes. *Theriogenology.* 2001; 55:35-49.
54. Jiang L, Carter DB, Xu J, Yang X, Prather RS, Tian XC. Telomere lengths in cloned transgenic pigs. *Biol Reprod.* 2004; 70:1589-1593.
55. Tian XC, Xu J, Yang X. Normal telomere lengths found in cloned cattle. *Nat Genet.* 2000; 26:272-273.
56. Jeon HY, Hyun SH, Lee GS *et al.* The analysis of telomere length and telomerase activity in cloned pigs and cows. *Mol Reprod Dev.* 2005; 71:315-320.
57. van Steensel B, Smogorzewska A, de Lange T. TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell.* 1998; 92:401-413.
58. Swanberg SE, Delany ME. Dynamics of telomere erosion in transformed and non-transformed avian cells in vitro. *Cytogenet Genome Res.* 2003; 102:318-325.
59. Taylor HA, Delany ME. Ontogeny of telomerase in chicken: impact of downregulation on pre-and postnatal telomere length in vivo. *Dev*

- Growth Differ.* 2000; 42:613-621.
60. Greenberg RA, Allsopp RC, Chin L, Morin GB, DePinho RA. Expression of mouse telomerase reverse transcriptase during development, differentiation and proliferation. *Oncogene.* 1998; 16:1723-1730.
61. Guo W, Okamoto M, Lee YM, Baluda MA, Park NH. Enhanced activity of cloned hamster TERT gene promoter in transformed cells. *Biochim Biophys Acta.* 2001; 1517:398-409.
62. Greider CW, Blackburn EH. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in tetrahymena extracts. *Cell.* 1985; 43:405-413.
63. Michailidis G, Saretzki G, Hall J. Endogenous and ectopic expression of telomere regulating genes in chicken embryonic fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 335:240-246.
64. Tamada H, Kikyo N. Nuclear reprogramming in mammalian somatic cell nuclear cloning. *Cytogenet Genome Res.* 2004; 105:285-291.
65. Kubota C, Tian XC, Yang X. Serial bull cloning by somatic cell nuclear transfer. *Nat Biotechnol.* 2004; 22:693-694.
66. Allsopp RC, Vaziri H, Patterson C *et al.* Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992; 89:10114-10118.
67. Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during aging

- of human fibroblast. *Nature* 1990; 345:458-460.
68. Shiels PG, Waddington D, Wilmut I *et al.* Analysis of telomere lengths in cloned sheep. *Nature*. 1999; 399:316-317.
69. Lanza RP, Cibelli JB, Blackwell C *et al.* Extension of cell life-span and telomere length in animals cloned from senescent somatic cells. *Science*. 2000; 288:665-669.
70. Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M *et al.* Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science*. 1998; 279:349-352.
71. Renard JP, Chastant S, Chesne P *et al.* Lymphoid hypoplasia and somatic cloning. *Lancet*. 1999; 353:1489-1491.
72. Alexander B, Coppola G, Perrault SD, Peura TT, Betts DH, King WA. Telomere length status of somatic cell sheep clones and their offspring. *Mol Reprod Dev*. 2007 ; PMID : 17455196 DOI : 10.1002/mrd.20735.

表 1. 白色來亨雞全長 TERT 之 DNA 序列進行 BLAST 比對後依序列相似度排序的結果

Table 1. Ranking of identity of White Leghorn chicken TERT related genes according to BLAST analysis.

Access no.	Description	Max score	Total score	Query coverage	Maximun identity
NM_001031007.1	<i>Gallus gallus</i> telomerase reverse transcriptase (TERT), mRNA >gb AY626231.1 <i>Gallus gallus</i> telomerase reverse transcriptase (TERT) mRNA, complete cds	8715	8715	100%	99%
AY502592.1	<i>Gallus gallus gallus</i> telomerase reverse transcriptase (TERT) mRNA, complete cds	8102	8102	93%	99%
DQ681294.1	<i>Coturnix japonica</i> telomerase reverse transcriptase (TERT) mRNA, complete cds, alternatively spliced	6806	6806	93%	94%
EF552224.1	<i>Gallus gallus</i> clone chTERTAC-GSC telomerase catalytic subunit mRNA, partial cds	3349	3349	38%	100%
DQ681293.1	<i>Anas platyrhynchos</i> telomerase reverse transcriptase (TERT) mRNA, partial cds, alternatively spliced	2143	2143	47%	84%
BX934708.1	<i>Gallus gallus</i> finished cDNA, clone ChEST116f8	2006	2006	23%	99%
BX934910.2	<i>Gallus gallus</i> finished cDNA, clone ChEST151a12	2002	2002	23%	99%
EF552225.1	<i>Gallus gallus</i> clone chTERTAC-MDCC-MSB1 nonfunctional telomerase catalytic subunit mRNA, partial sequence	1236	2843	32%	100%
DQ681312.1	<i>Gallus gallus</i> telomerase reverse transcriptase isoform K (TERT) mRNA, partial cds, alternatively spliced	968	1329	15%	100%
DQ681309.1	<i>Coturnix japonica</i> telomerase reverse transcriptase isoform qK3 (TERT) mRNA, partial cds, alternatively spliced	915	915	13%	93%
AY505016.1	<i>Gallus gallus gallus</i> telomerase reverse transcriptase (TERT) gene, 3' UTR	911	911	10%	99%
DQ681298.1	<i>Gallus gallus</i> telomerase reverse transcriptase isoform J (TERT) mRNA, partial cds, alternatively spliced	710	1241	14%	100%
DQ256207.1	<i>Gallus gallus</i> telomerase reverse transcriptase variant 1 (TERT) mRNA, exons 2 through 4 and partial cds, alternatively spliced	697	777	8%	100%
DQ681297.1	<i>Gallus gallus</i> telomerase reverse transcriptase isoform O (TERT) mRNA, partial cds, alternatively spliced	691	1174	13%	100%
DQ681313.1	<i>Gallus gallus</i> telomerase reverse transcriptase isoform E2 (TERT) mRNA, partial cds, alternatively spliced	682	842	9%	100%
DQ256206.1	<i>Gallus gallus</i> telomerase reverse transcriptase variant 1 (TERT) mRNA, exons 2 through 4 and partial cds, alternatively spliced	680	744	8%	100%
DQ256209.1	<i>Gallus gallus</i> telomerase reverse transcriptase variant 1 (TERT) mRNA, exons 3, 4 and partial cds, alternatively spliced	678	678	7%	100%

表 2. 與白色來亨雞 TERT 蛋白質具有最高相似性的 10 種蛋白質序列

Table 2. Top ten protein sequences which share the highest amino acid similarity with the White Leghorn chicken TERT.

Access no.	Description	Similarity
ref NP_001026178.1	telomerase reverse transcriptase [<i>Gallus gallus</i>]	1343/1346 (99%)
gb AAS75793.1	telomerase reverse transcriptase [<i>Gallus gallus gallus</i>]	1340/1346 (99%)
gb ABG75863.1	telomerase reverse transcriptase [<i>Coturnix japonica</i>]	1263/1347 (93%)
ref XP_001369432.1	PREDICTED: similar to telomerase reverse transcriptase [<i>Monodelphis domestica</i>]	672/1347 (49%)
gb ABQ15326.1	telomerase catalytic subunit [<i>Gallus gallus</i>]	604/604 (100%)
gb ABG75862.1	telomerase reverse transcriptase [<i>Anas platyrhynchos</i>]	485/613 (79%)
ref NP_001079102.1	telomerase reverse transcriptase [<i>Xenopus laevis</i>]	486/865 (56%)
ref NP_937983.2	telomerase reverse transcriptase isoform 1 [<i>Homo sapiens</i>]	456/860 (53%)
gb AAC40212.1	telomerase catalytic subunit [synthetic construct]	455/860 (52%)
gb AAC51724.1	telomerase catalytic subunit [<i>Homo sapiens</i>]	455/860 (52%)

表 3. 複製牛及其後代與對照牛之基本資料

Table 3. The background information of cloned cattle, offspring, and age-match control animals.

動物個體	性別	出生日期	採血進行端粒 分析時年齡*
SCNT 乳牛			(月齡)
如意 1 號	Female	2003.02.27	39
如意 2 號	Female	2003.12.11	28
如意 3 號	Female	2004.01.16	27
如意 4 號	Female	2004.01.22	27
SCNT 對照乳牛			
No. 216	Female	2003.01.16	39
No. 218	Female	2003.01.22	39
No. 314	Female	2004.02.17	24
No. 310	Female	2004.02.17	24
SCNT 乳牛後代			(月齡)
如意 1 號之子	Male	2006.03.03	1.5
如意 2 號之子	Male	2005.12.11	4.0
如意 3 號之子	Male	2006.04.15	NB
如意 4 號之女	Female	2006.02.06	2.5
SCNT 乳牛後代對照			(月齡)
No. 458	Female	2006.01.15	3.0
No. 468	Female	2006.01.30	3.0
No. 393	Male	2005.09.18	7.0
No. 444	Female	2005.10.08	6.0
No. 312	Female	2004.02.10	24.0

*採血日期為 2006 年 04 月 18 日

NB：採血時剛出生 (new born)

表 4. 複製羊及其後代之基本資料

Table 4. The background information of cloned dairy goats and their offspring.

動物個體	性別	出生日期	採血進行端粒 分析時年齡*
SCNT 乳羊			月齡
寶鈺	Female	2004.03.10	25
寶祥	Female	2005.04.25	50
HAS**基因轉殖複製羊	Female	2005.08.07	8
SCNT 乳羊後代			
寶貝	Male	2005.04.25	12
寶鈺之女 1 號	Female	2006.03.04	17
寶鈺之女 2 號	Female	2006.03.04	17
寶祥之子	Male	2005.02.27	14
寶祥之女	Female	2005.02.27	14

*採血日期為 2006 年 04 月 18 日

**人類血清白蛋白 (human serum albumin, HSA)

表 5. 複製牛及其後代與同年齡非複製牛之端粒長度

Table 5. Telomere length of cloned cattle, offspring, and age-match control animals.

動物別	數量 (N)	端粒長度 (kb) Mean \pm SD
複製牛*	4	17.52 \pm 0.41
複製牛同齡對照牛	4	17.66 \pm 0.32
複製牛後代	4	17.67 \pm 0.32
複製牛後代同齡對照牛	5	18.69 \pm 0.50
供核體細胞 (HE 921)	1	17.30
複製牛**	4	17.48 \pm 0.31
複製牛同齡對照牛	6	17.80 \pm 1.57
供核體細胞 (HE 921)	1	17.07

*採血日期為 2006 年 04 月 18 日

**採血日期為 2007 年 01 月 08 日

表 6. 複製羊及其後代與同年齡非複製羊之端粒長度

Table 6. Telomere lengths of cloned dairy goats, offspring, and age-matched control animals.

複製羊	月齡 (months)	端粒長度 (kb)	同月齡對照羊 端粒長度 (kb) (N=3)
1.(Bao Siang)	50	16.68	16.92±0.73
2.(Paoyu)	22	17.05	17.04±0.62
3.(HAS tg)	6	14.32 ^a	17.37±0.32 ^b
1.(Bao Siang)	62	12.26 ^a	16.08±0.86 ^b
2.(Paoyu)	34	13.50 ^a	15.72±0.61 ^b
3.(HAS tg)	18	10.39 ^a	16.32±0.61 ^b
複製羊後代 (N=5)	12-17	16.07 ± 0.32	16.43 ± 0.36
供核體細胞 (GE 1244, P2)		14.86	
供核體細胞 (GE 09181, P8)		14.20	

Letters a and b in same row indicate significantly different ($p < 0.05$)

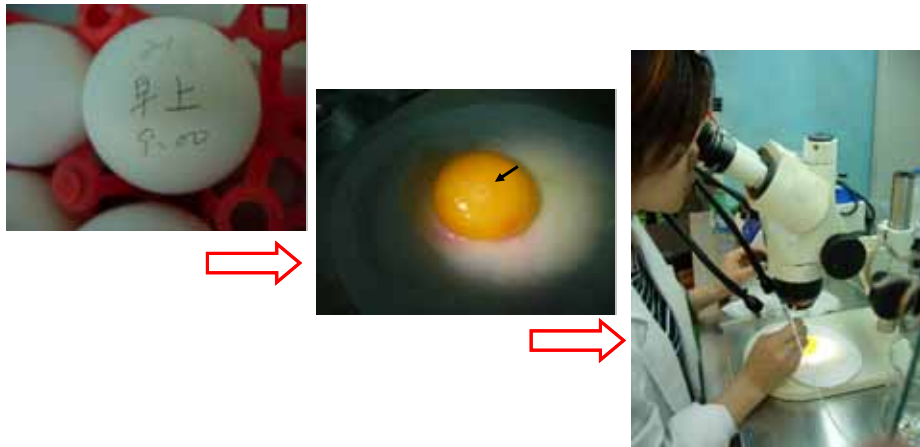
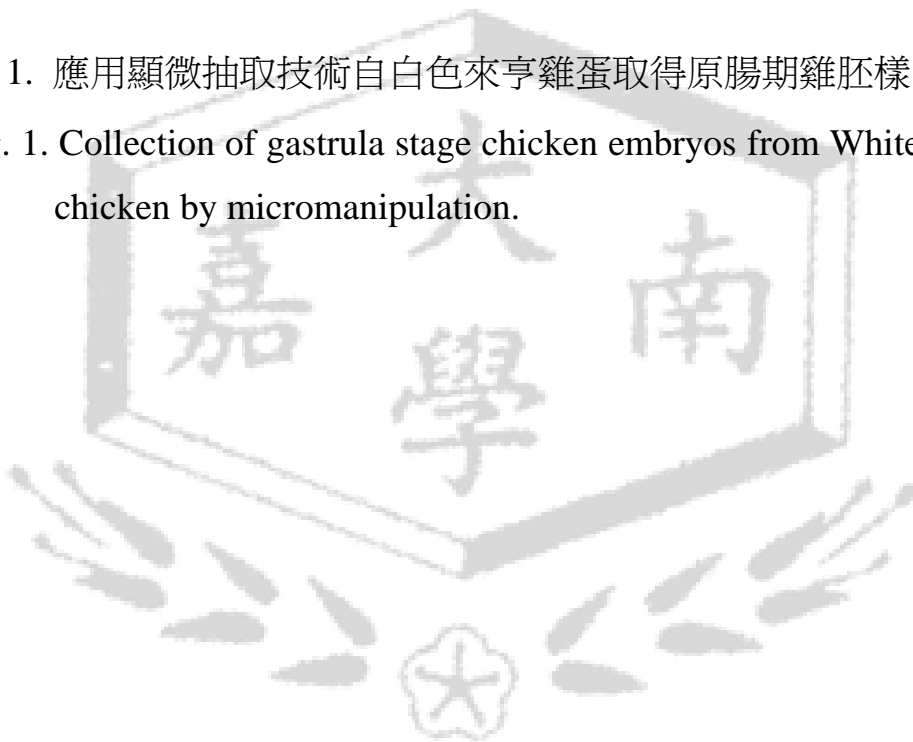


圖 1. 應用顯微抽取技術自白色來亨雞蛋取得原腸期雞胚樣品

Fig. 1. Collection of gastrula stage chicken embryos from White Leghorn chicken by micromanipulation.



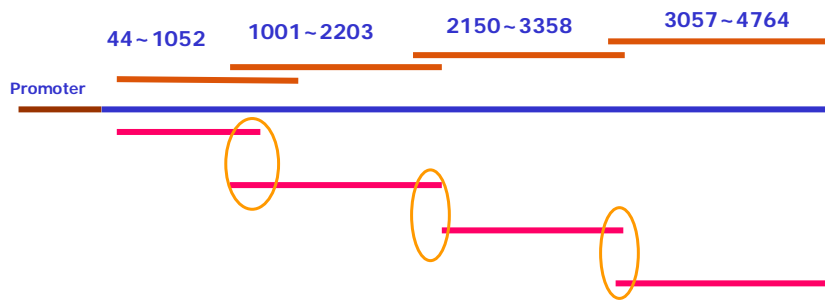
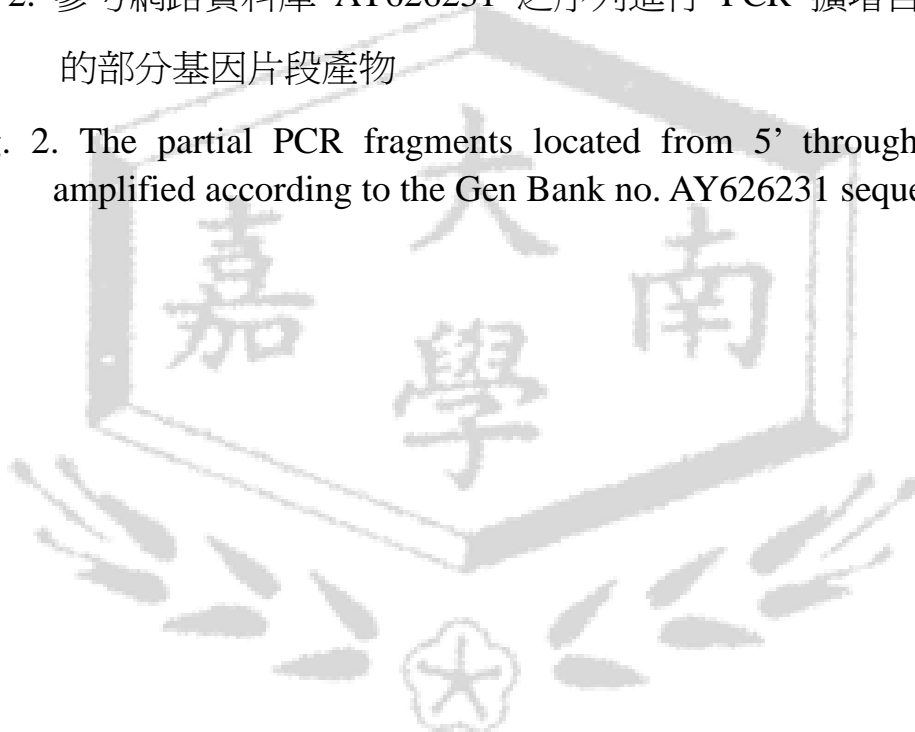


圖 2. 參考網路資料庫 AY626231 之序列進行 PCR 擴增自 5' 至 3' 的部分基因片段產物

Fig. 2. The partial PCR fragments located from 5' through 3' were amplified according to the Gen Bank no. AY626231 sequence.



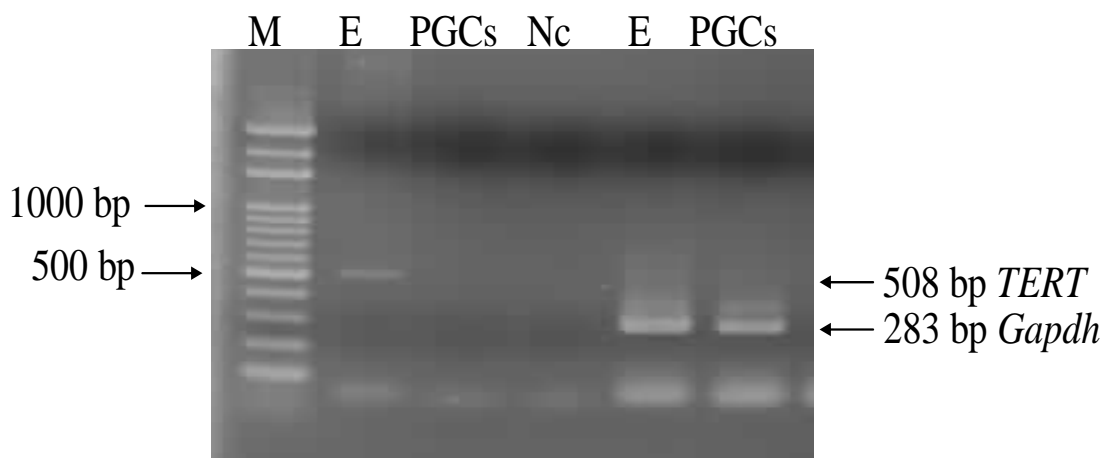


圖 3. 自白色來亨雞胚 (E) 與始基生殖細胞 (PGC) 樣品中擴增家禽端粒酶基因及陽性對照 GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) 的部分基因片段產物。M 為 100 bp 標記。Nc 為陰性對照組。

Fig. 3. Electrophoresis analysis of GAPDH and TERT PCR products amplified from gastrula stage embryos (E) in White Leghorn chicken. M: 100 bp ladder marker. Nc: negative control.

AY626231	(3051)	3051	TTCCACCCTGTTTACTTTCTTTCTTCAAATGTTA	3100
TERT-507	(1)		-----TCTTAATCCCTTG-GA	
Consensus	(3051)		C TAAT C T G	
AY626231	(3101)	3101	AGATTGGGCACAGGTA	3150
TERT-507	(17)		AGATTGGGCACAGGTA	
Consensus	(3101)		AGATTGGGCACAGGTA	
AY626231	(3151)	3151	ATTTTGTCAACCTTACTTTGCAGCTTATGCTACGGAGACATGGAAAACAA	3200
TERT-507	(67)		ATTTTGTCAACCTTACTTTGCAGCTTATGCTACGGAGACATGGAAAACAA	
Consensus	(3151)		ATTTTGTCAACCTTACTTTGCAGCTTATGCTACGGAGACATGGAAAACAA	
AY626231	(3201)	3201	ATTACTCTGTGGGATCCAGAAGGATGGAGTC	3250
TERT-507	(117)		ATTACTCTGTGGGATCCAGAAGGATGGAGTC	
Consensus	(3201)		ATTACTCTGTGGGATCCAGAAGGATGGAGTC	
AY626231	(3251)	3251	ACTTTTTGCTGGTTAC	3300
TERT-507	(167)		ACTTTTTGCTGGTTAC	
Consensus	(3251)		ACTTTTTGCTGGTTAC	
AY626231	(3301)	3301	ACTATAGCAGCAGGTTTCTGAGTATGGCTTTTTAATAAATGCCAAGAA	3350
TERT-507	(217)		ACTATAGCAGCAGGTTTCTGAGTATGGCTTTTTAATAAATGCCAAGAA	
Consensus	(3301)		ACTATAGCAGCAGGTTTCTGAGTATGGCTTTTTAATAAATGCCAAGAA	
AY626231	(3351)	3351	GACTGTGGTGAATTTTCTGTTGATGATATCCCGGGATGTTCCAAGTTCA	3400
TERT-507	(267)		GACGTGGTGAATTTTCTGTTGATGATATCCCGGGATGTTCCAAGTTCA	
Consensus	(3351)		GACGTGGTGAATTTTCTGTTGATGATATCCCGGGATGTTCCAAGTTCA	
AY626231	(3401)	3401	AACATCTGCCAGATTGTCGTTGATCTCATGGTGTGGTTTATTATTGGAT	3450
TERT-507	(317)		AACATCTGCCAGATTGTCGTTGATCTCATGGTGTGGTTTATTATTGGAT	
Consensus	(3401)		AACATCTGCCAGATTGTCGTTGATCTCATGGTGTGGTTTATTATTGGAT	
AY626231	(3451)	3451	GTGCAGACACTTGAGGTTTATTGTGATTACTCCAGTTATGCCTTTACTTC	3500
TERT-507	(367)		GTGCAGACACTTGAGGTTTATTGTGATTACTCCAGTTATGCCTTTACTTC	
Consensus	(3451)		GTGCAGACACTTGAGGTTTATTGTGATTACTCCAGTTATGCCTTTACTTC	
AY626231	(3501)	3501	TATCAGATCAAGTCTTTCCTTCAATTC AAGTAGAATAGCTGG	3550
TERT-507	(417)		TATCAGATCAAGTCTTTCCTTCAATTC AAGTAGAATAGCTGG	
Consensus	(3501)		TATCAGATCAAGTCTTTCCTTCAATTC AAGTAGAATAGCTGG	
AY626231	(3551)	3551	TGAAATGCAAATTGACTGCAGTCTCAA	3600
TERT-507	(467)		TGAAATGCAAATTGACTGCAGTCTCAA	
Consensus	(3551)		TGAAATGCAAATTGACTGCAGTCTCAA	

圖 4. 白色來亨雞之 TERT 基因產物進行 DNA 序列分析與 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) 比對之結果

Fig. 4. DNA sequences and BLAST analysis of TERT gene PCR-products amplified from gastrula stage embryos of White Leghorn chicken.

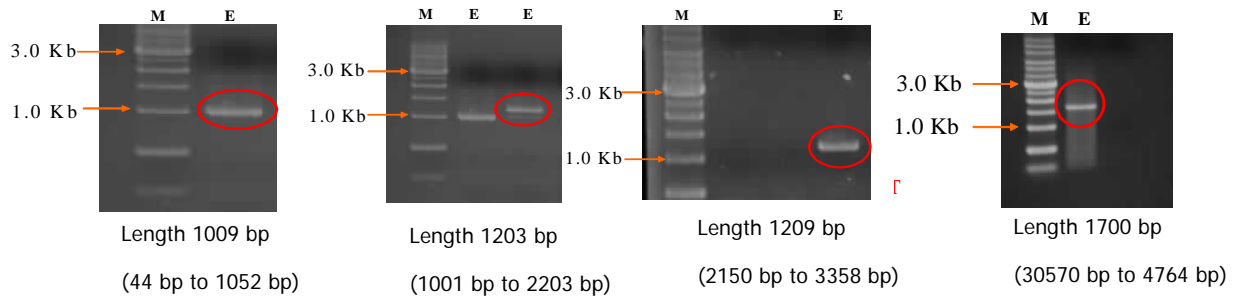
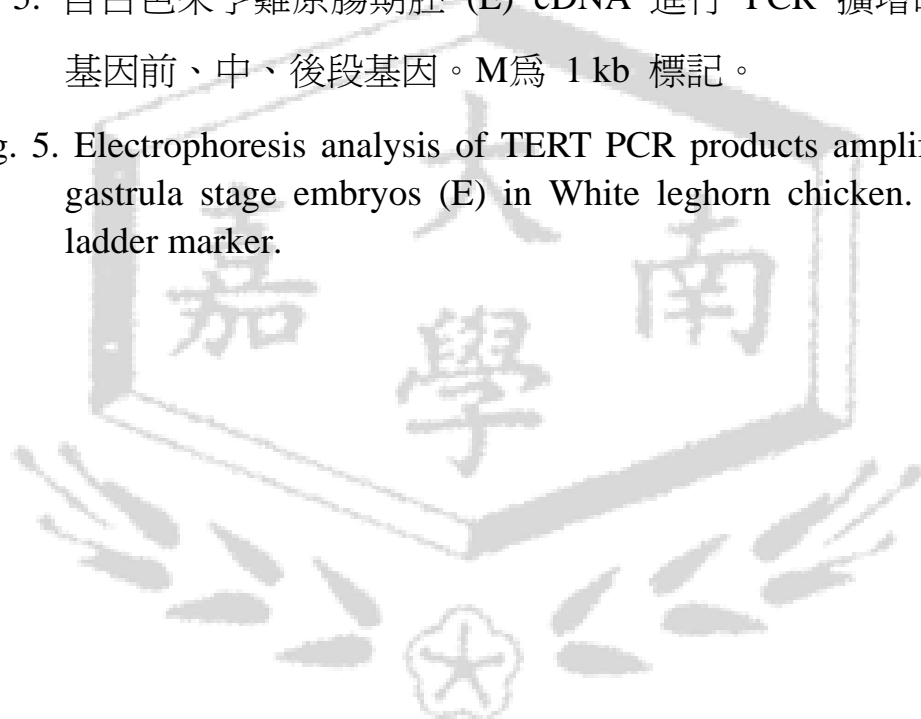


圖 5. 自白色來亨雞原腸期胚 (E) cDNA 進行 PCR 擴增的 TERT 基因前、中、後段基因。M 為 1 kb 標記。

Fig.5. Electrophoresis analysis of TERT PCR products amplified from gastrula stage embryos (E) in White leghorn chicken. M: 1 kp ladder marker.



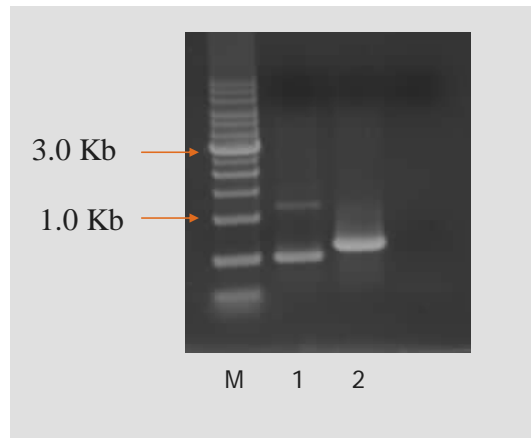


圖 6. 白色來亨雞 TERT 基因啓動子區 (1,307 bp) (1)與 3' 端未轉錄區 (609 bp) (2) 應用 PCR 選殖後獲得之產物。M為標記。

Fig. 6. Electrophoresis analysis of TERT promoter (1,307 bp) (1) and 3' UTR (609 bp) (2) PCR products were amplified from gastrula stage embryos (E) in White leghorn chicken. M: ladder marker.

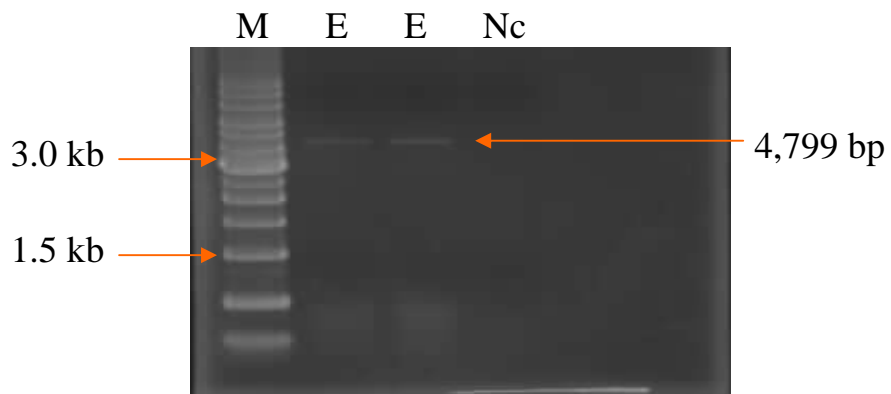


圖 7. 白色來亨雞 TERT全長基因之 PCR選殖產物 (4,799 bp)。M為分子標記。Nc 為陰性對照。

Fig. 7. Full length of TERT PCR products (4,799 bp) amplified from gastrula stage embryos (E) in White Leghorn chicken. M: ladder marker. Na: negative control.

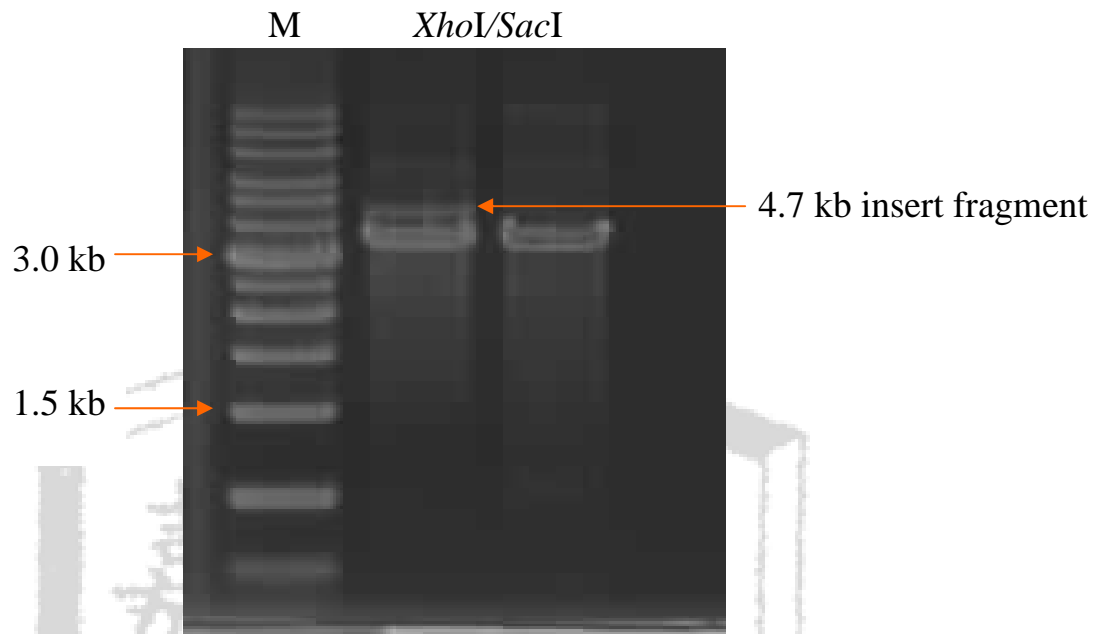


圖 8. *XhoI/SacI*切割篩選 pchTERT TOPO質體。4,799 bp片段顯示完整的TERT基因。M為分子標記。

Fig. 8. The *XhoI/SacI* digested putative pchTERT TOPO. The 4,799 bp fragment indicated full length of TERT gene. M: ladder marker.

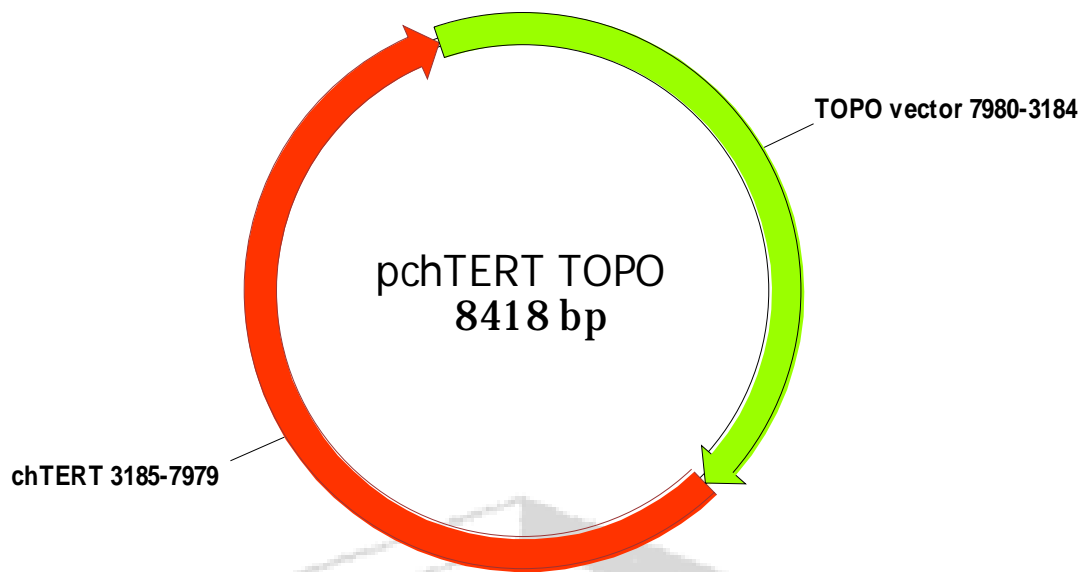


圖 9. 含有雞 TERT 基因的 pchTERT TOPO 序列分析載體圖譜
Fig. 9. The map of pchTERT TOPO.

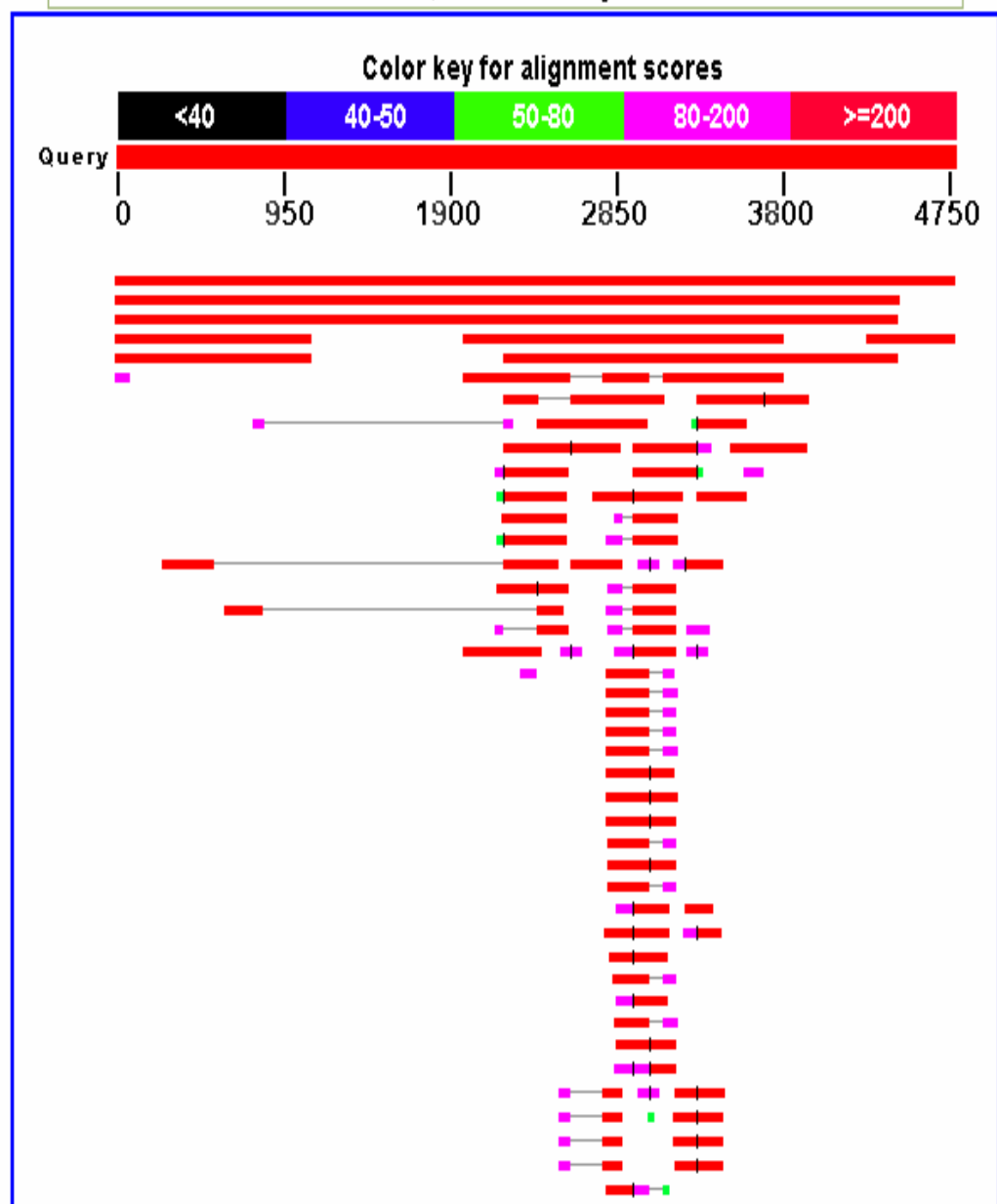


圖 10. 進行 BLAST 比對後與白色來亨雞 TERT 之 DNA 具有相似性的序列及相似位置圖

Fig. 10. The genes which share high similarity with the White Leghorn chicken TERT are indicated after BLAST alignment.

ref|NM_001031007.1| *Gallus gallus* telomerase reverse transcriptase (TERT), mRNA
Length=4764

Score = 8715 bits (4719), Expect = 0.0
Identities = 4749/4764 (99%), Gaps = 0/4764 (0%)
Strand=Plus/Plus

```
Query 1 ATGGAGCGCGGGGCTCAGCCGGGAGTCGGCGTGCGGCGGCTCCGCAATGTAGCGCGGGAG 60
      |||
Sbjct 1 ATGGAGCGCGGGGCTCAGCCGGGAGTCGGCGTGCGGCGGCTCCGCAATGTAGCGCGGGAG 60

Query 61 GAGCCCTTCGCCGCGGTCTGGGCGCGCTGCGGGGCTGCTACGCCGAGGCCACGCCGCTG 120
      |||
Sbjct 61 GAGCCCTTCGCCGCGGTCTGGGCGCGCTGCGGGGCTGCTACGCCGAGGCCACGCCGCTG 120

Query 121 GAGGCCCTTCGTCCGGCGGCTGCAGGAGGGTGGCACCGGGGAGGTCGAGGTGCTGCGAGGC 180
      |||
Sbjct 121 GAGGCCCTTCGTCCGGCGGCTGCAGGAGGGTGGCACCGGGGAGGTCGAGGTGCTGCGAGGC 180

Query 181 GACGACGCTCAGTGCTACCGGACCTTCGTGTCGCGAGTGCCTGGTGTGCGTCCCCGCGGG 240
      |||
Sbjct 181 GACGACGCTCAGTGCTACCGGACCTTCGTGTCGCGAGTGCCTGGTGTGCGTCCCCGCGGT 240

Query 241 GCTCGCGCCATCCCCGGCCCATCTGCTTCCAGCAGTTATCCAGTCAGGGCGAAGTCATC 300
      |||
Sbjct 241 GCTCGCGCCATCCCCGGCCCATCTGCTTCCAGCAGTTATCCAGTCAGAGCGAAGTCATC 300

Query 301 ACGAGAATCGTTCAGAGGCTGTGTGAAAAGAAAAGAAGAACATCCTTGCGTATGGATAC 360
      |||
Sbjct 301 ACAAGAATCGTTCAGAGGCTGTGTGAAAAGAAAAGAAGAACATCCTTGCGTATGGATAC 360

Query 361 TCCTTGCTGGATGAGAACAGTTGTCACCTCAGAGTTTTGCCATCTTCGTGTATATACAGC 420
      |||
Sbjct 361 TCCTTGCTGGATGAGAACAGTTGTCACCTCAGAGTTTTGCCATCTTCGTGTATATACAGC 420

Query 421 TATCTGTCCAATACTGTAACAGAAACGATTGCGCATCAGTGGCCTCTGGGAGATACTGCTG 480
      |||
Sbjct 421 TATCTGTCCAATACTGTAACAGAAACGATTGCGCATCAGTGGCCTCTGGGAGATACTGCTG 480

Query 481 AGTAGGATAGGGGACGACGTGATGATGTACCTGCTGGAGCACTGTGCGCTCTTCATGCTG 540
      |||
Sbjct 481 AGTAGGATAGGGGACGACGTGATGATGTACCTGCTGGAGCACTGTGCGCTCTTCATGCTG 540

Query 541 GTTCCCCAAGTAACTGTTACCAGGTCTGCGGGCAACCAATTTATGAACTTATTTGCGGT 600
      |||
Sbjct 541 GTTCCCCAAGTAACTGTTACCAGGTCTGCGGGCAACCAATTTATGAACTTATTTGCGGT 600

Query 601 AACATAGGGCCATCCCCAGGGTTTGTAGACGACGGTACTCAAGGTTTAAACATAATAGC 660
      |||
Sbjct 601 AACATAGGGCCATCCCCAGGGTTTGTAGACGACGGTACTCAAGGTTTAAACATAATAGC 660
```

Sbjct 601 AACGTAGGGCCATCCCCAGGGTTTGTAGACGACGGTACTCAAGGTTTAAACATAATAGC 660
 Query 661 TTGCTTGACTATGTGCGAAAAAGGCTTGTGTTTCACAGGCACTATCTTTCCAAGTCGCAA 720
 |||
 Sbjct 661 TTGCTTGACTATGTGCGAAAAAGGCTTGTGTTTCACAGGCACTATCTTTCCAAGTCACAG 720
 Query 721 TGGTGAAGTGCAGGCCGAGACGTCGAGGTCGCGTCTCCAGCAGGAGAAAAAGAAGGAGC 780
 |||
 Sbjct 721 TGGTGAAGTGCAGGCCGAGACGTCGAGGTCGCGTCTCCAGCAGGAGAAAAAGAAGGAGC 780
 Query 781 CATAGGATACAAAGCCTAAGGTCTGGTTATCAGCCTTCTGCAAAAGTGAACCTTCAAGCA 840
 |||
 Sbjct 781 CATAGGATACAAAGCCTAAGGTCTGGTTATCAGCCTTCTGCAAAAGTGAACCTTCAAGCA 840
 Query 841 GGTAGGCAGATCAGCACTGTTACTGCACGTCTGGAAAAACAGAGCTGCTCCAGTTTATGT 900
 |||
 Sbjct 841 GGTAGGCAGATCAGCACTGTTACTGCACGTCTGGAAAAACAGAGCTGCTCCAGTTTATGT 900
 Query 901 TTGCCAGCTAGAGCACCATCTTTAAAAAGGAAGCGTGATGGAGAACAGGTTGAAATCACA 960
 |||
 Sbjct 901 TTGCCAGCTAGAGCACCATCTTTAAAAAGGAAGCGTGATGGAGAACAGGTTGAAATCACA 960
 Query 961 GCTAAGAGAGTGAAAGTAATGGAGAAAGAGATAGAGGAACAGGCTTGTAGTATCGTTCCT 1020
 |||
 Sbjct 961 GCTAAGAGAGTGAAAGTAATGGAGAAAGAGATAGAGGAACAGGCTTGTAGTATCGTTCCT 1020
 Query 1021 GATGTAAACCAAAGTAGCTCCCAGAGGCATGGAACCTCCTGGCATGTAGCACCACGTGCT 1080
 |||
 Sbjct 1021 GATGTAAACCAAAGTAGCTCCCAGAGGCATGGAACCTCCTGGCATGTAGCACCACGTGCT 1080
 Query 1081 GTAGGTCTTATTAAGAACATTACATTTCTGAAAGAAGTAACAGTGAGATGTCTGGTCT 1140
 |||
 Sbjct 1081 GTAGGTCTTATTAAGAACATTACATTTCTGAAAGAAGTAACAGTGAGATGTCTGGTCT 1140
 Query 1141 TCTGTAGTTCGCAGATCTCACCTGGGAAGAGGCCTGTGGCAGACAAAAGCTCTTTTCCA 1200
 |||
 Sbjct 1141 TCTGTAGTTCGCAGATCTCACCTGGGAAGAGGCCTGTGGCAGACAAAAGCTCTTTTCCA 1200
 Query 1201 CAAGGAGTTCAGGGTAACAAACGCATAAAGACCGGTGCAGAAAAACGAGCAGAATCCAAT 1260
 |||
 Sbjct 1201 CAAGGAGTTCAGGGTAACAAACGCATAAAGACCGGTGCAGAAAAACGAGCAGAATCCAAT 1260
 Query 1261 AGAAGGGGCATAGAGATGTATATAAACCCAATCCATAAACCCAATAGAAGGGGCATAGAG 1320
 |||
 Sbjct 1261 AGAAGGGGCATAGAGATGTATATAAACCCAATCCATAAACCCAATAGAAGGGGCATAGAG 1320
 Query 1321 AGGCGTATAAATCCAACCCACAAACCTGAGTTGAATTCTGTACAACTGAACCAATGGAA 1380
 |||
 Sbjct 1321 AGGCGTATAAATCCAACCCACAAACCTGAGTTGAATTCTGTACAACTGAACCAATGGAA 1380
 Query 1381 GGTGCTTCTTCAGGGGACAGAAAGCAGGAAAATCCCCAGCTCATTTGGCAAAGCAGTTA 1440
 |||
 Sbjct 1381 GGTGCTTCTTCAGGGGACAGAAAGCAGGAAAATCCCCAGCTCATTTGGCAAAGCAGTTA 1440

Query 1441 CCAAATACATTGTCGCGCTCTACAGTGTACTTTGAGAAGAAATTTCTTCTGTATTCCCGC 1500
 |||
 Sbjct 1441 CCAAATACATTGTCGCGCTCTACAGTGTACTTTGAGAAGAAATTTCTTCTGTATTCCCGC 1500

Query 1501 AGTTACCAAGAATATTTTCCTAAATCGTTCATACTGAGCCGCCTGCAGGGTTGCAGGCA 1560
 |||
 Sbjct 1501 AGTTACCAAGAATATTTTCCTAAATCGTTCATACTGAGCCGCCTGCAGGGTTGCAGGCA 1560

Query 1561 GGTGGAAGGCGGCTTATAGAACTATATTCTTAAGCCAAAACCCATTAAGGAACAGCAG 1620
 |||
 Sbjct 1561 GGTGGAAGGCGGCTTATAGAACTATATTCTTAAGCCAAAACCCATTAAGGAACAGCAG 1620

Query 1621 AACCAAAGCCTACCACAGCAAAAGTGGCGAAAGAAGAGGTTGCCAAACGCTACTGGCAA 1680
 |||
 Sbjct 1621 AACCAAAGCCTACCACAGCAAAAGTGGCGAAAGAAGAGGTTGCCAAACGCTACTGGCAA 1680

Query 1681 ATGAGAGAGATATTTTCAGAAGCTGGTAAAGAACCATGAGAAGTGCCCTTATTTAGTTTTC 1740
 |||
 Sbjct 1681 ATGAGAGAGATATTTTCAGAAGCTGGTAAAGAACCATGAGAAGTGCCCTTATTTAGTTTTC 1740

Query 1741 TTGAGGAAAAATTGCCCTGTTTTGCTTTCTGAAGCATGTTTGAAAAAGACGGAGCTGACC 1800
 |||
 Sbjct 1741 TTGAGGAAAAATTGCCCTGTTTTGCTTTCTGAAGCATGTTTGAAAAAGACGGAGCTGACC 1800

Query 1801 TTGCAGGCGGCTCTGCCTGGGAAGCAAAGGTTACAAGCACACAGAACATGGGAAAGAG 1860
 |||
 Sbjct 1801 TTGCAGGCGGCTCTGCCTGGGAAGCAAAGGTTACAAGCACACAGAACATGGGAAAGAG 1860

Query 1861 TCCACTGAGGGTACTGCACCGAACAGCTTCCTCGCTCCTCCCTCAGTGCTAGCGTGTGGG 1920
 |||
 Sbjct 1861 TCCACTGAGGGTACTGCACCGAACAGCTTCCTCGCTCCTCCCTCAGTGCTAGCGTGTGGG 1920

Query 1921 CAGCCAGAGAGAGGGGAACAGCACCCCTGCAGAGGGGAGTGATCCGCTCCTCAGGGAGCTG 1980
 |||
 Sbjct 1921 CAGCCAGAGAGAGGGGAACAGCACCCCTGCAGAGGGGAGTGATCCGCTCCTCAGGGAGCTG 1980

Query 1981 CTCAGGCAGCACAGCAGCCACTGGCAGGTGTATGGCTTTGTGAGGGAGTGCTGGAGCGG 2040
 |||
 Sbjct 1981 CTCAGGCAGCACAGCAGCCACTGGCAGGTGTATGGCTTTGTGAGGGAGTGCTGGAGCGG 2040

Query 2041 GTGATCCCTGCTGAGCTGTGGGGTTCAAGCCATAACAAATGCCGGTCTTTAAAAACGTG 2100
 |||
 Sbjct 2041 GTGATCCCTGCTGAGCTGTGGGGTTCAAGCCATAACAAATGCCGGTCTTTAAAAACGTG 2100

Query 2101 AAAGCATTCAATTTCCATGGGAAGTATGCTAAGCTTTTCATTGCAGCAGCTGATGTGGAAG 2160
 |||
 Sbjct 2101 AAAGCATTCAATTTCCATGGGAAGTATGCTAAGCTTTTCATTGCAGCAGCTGATGTGGAAG 2160

Query 2161 ATGAGAGTGAATGACTGCGTATGGCTTCGCTGGCCAAAGGTAATCACTCTGTTCTGCC 2220
 |||
 Sbjct 2161 ATGAGAGTGAATGACTGCGTATGGCTTCGCTGGCCAAAGGTAATCACTCTGTTCTGCC 2220

Query 2221 TATGAACATTGTTACCGTGAAGAAATTCTGGCAAATTCCTATACTGGCTGATGGATTCC 2280
 |||
 Sbjct 2221 TATGAACATTGTTACCGTGAAGAAATTCTGGCAAATTCCTATACTGGCTGATGGATTCC 2280

Query 2281 TATGTTATCGAGTTGCTCAAATCATTTTTCTATATCACCGAGACCATGTTCCAGAAAAAC 2340
 |||
 Sbjct 2281 TATGTTATCGAGTTGCTCAAATCATTTTTCTATATCACCGAGACCATGTTCCAGAAAAAC 2340

Query 2341 ATGCTTTTCTACTACCGAAAGTTTATCTGGGCAAGTTACAGAACATTGGAATTAGAGAC 2400
 |||
 Sbjct 2341 ATGCTTTTCTACTACCGAAAGTTTATCTGGGCAAGTTACAGAACATTGGAATTAGAGAC 2400

Query 2401 CATTTTGCCAAAGTACATCTACGTGCCTTGCTTCAGAGGAGATGGAAGTGATCCGTCaa 2460
 |||
 Sbjct 2401 CATTTTGCCAAAGTACATCTACGTGCCTTGCTTCAGAGGAGATGGAAGTGATCCGTCaa 2460

Query 2461 aaaaaGTATTTTCTATTGCATCAAGGCTCCGGTTCATTCTAAAATGAATGGTTAAGA 2520
 |||
 Sbjct 2461 AAAAAGTATTTTCTATTGCATCAAGGCTCCGGTTCATTCTAAAATGAATGGTTAAGA 2520

Query 2521 CCCGTAGTAAGACTAAGCCGTGTTGTTGAAGGACAGAACTCAGCAAGGAAAGCAGAGAA 2580
 |||
 Sbjct 2521 CCCGTAGTAAGACTAAGCCGTGTTGTTGAAGGACAGAACTCAGCAAGGAAAGCAGAGAA 2580

Query 2581 AAGAAGATACAGCGCTATAACACTCAGCTAAAAAATCTATTTAGTGTTTTAACTATGAA 2640
 |||
 Sbjct 2581 AAGAAGATACAGCGCTATAACACTCAGCTAAAAAATCTATTTAGTGTTTTAACTATGAA 2640

Query 2641 CGAACTGTAAACACCAGTATCATTGGCTCTTCAGTATTCGGGAGAGATGATATCTACAGG 2700
 |||
 Sbjct 2641 CGAACTGTAAACACCAGTATCATTGGCTCTTCAGTATTCGGGAGAGATGATATCTACAGG 2700

Query 2701 AAGTGAAGGAGTTTGTACAAAGTTTTTGAATCAGGTGGTGAATGCCTCATTTCTAC 2760
 |||
 Sbjct 2701 AAGTGAAGGAGTTTGTACAAAGTTTTTGAATCAGGTGGTGAATGCCTCATTTCTAC 2760

Query 2761 TTTGTAAAGGGTGATGTATCCAGAGCTTTTGATACCATTCTCACAAGAACTTGTTGAA 2820
 |||
 Sbjct 2761 TTTGTAAAGGGTGATGTATCCAGAGCTTTTGATACCATTCTCACAAGAACTTGTTGAA 2820

Query 2821 GTGATATCACAGGTCTTGAAACCTGAGAGCCAAACTGTCTATGGAATAAGGTGGTATGCA 2880
 |||
 Sbjct 2821 GTGATATCACAGGTCTTGAAACCTGAGAGCCAAACTGTCTATGGAATAAGGTGGTATGCA 2880

Query 2881 GTGATTATGATTACCCCAACTGGAAAAGCCAGGAAACTCTATAAGAGACATGTTTCTACT 2940
 |||
 Sbjct 2881 GTGATTATGATTACCCCAACTGGAAAAGCCAGGAAACTCTATAAGAGACATGTTTCTACT 2940

Query 2941 TTCGAGGATTTTATTCCAGACATGAAGCAGTTTGTGTCCAAGCTTCAAGAGAGAACTTCA 3000
 |||
 Sbjct 2941 TTCGAGGATTTTATTCCAGACATGAAGCAGTTTGTGTCCAAGCTTCAAGAGAGAACTTCA 3000

Query 3001 TTACGAAATGCAATAGTAGTTGAACAGTGCTTAACTTTTAATGAGAACAGTTCACCCTG 3060

Sbjct	3001	 TTACGAAATGCAATAGTAGTTGAACAGTGCTTAACCTTTAATGAGAACAGTTCACACCTG	3060
Query	3061	TTTACTTTCTTTCTTCAAATGTTACATAATAACATCCTGGAGATTGGGCACAGGTACTAT	3120
Sbjct	3061	 TTTACTTTCTTTCTTCAAATGTTACATAATAACATCCTGGAGATTGGGCACAGGTACTAT	3120
Query	3121	ATACAGTGCTCTGGAATCCCACAGGGCTCCATTTTGTCAACCTTACTTTGCAGCTTATGC	3180
Sbjct	3121	 ATACAGTGCTCTGGAATCCCACAGGGCTCCATTTTGTCAACCTTACTTTGCAGCTTATGC	3180
Query	3181	TACGGAGACATGAAAAACAAATTACTCTGTGGGATCCAGAAGGATGGAGTCTAATACGT	3240
Sbjct	3181	 TACGGAGACATGAAAAACAAATTACTCTGTGGGATCCAGAAGGATGGAGTCTAATACGT	3240
Query	3241	CTTATTGATGACTTTTTGCTGGTTACGCCACATTTAATGCAGGCAAGAACTTTTCTAAGG	3300
Sbjct	3241	 CTTATTGATGACTTTTTGCTGGTTACGCCACATTTAATGCAGGCAAGAACTTTTCTAAGG	3300
Query	3301	ACTATAGCAGCAGGTATTCCTGAGTATGGCTTTTTAATAAATGCCAAGAAGACTGTGGTG	3360
Sbjct	3301	 ACTATAGCAGCAGGTATTCCTGAGTATGGCTTTTTAATAAATGCCAAGAAGACTGTGGTG	3360
Query	3361	AATTTTCCTGTTGATGATATCCCGGGATGTTCCAAGTTCAAACATCTGCCAGATTGTCGT	3420
Sbjct	3361	 AATTTTCCTGTTGATGATATCCCGGGATGTTCCAAGTTCAAACATCTGCCAGATTGTCGT	3420
Query	3421	TTGATCTCATGGTGTGGTTTATTATTGGATGTGCAGACACTTGAGGTTTATTGTGATTAC	3480
Sbjct	3421	 TTGATCTCATGGTGTGGTTTATTATTGGATGTGCAGACACTTGAGGTTTATTGTGATTAC	3480
Query	3481	TCCAGTTATGCCTTTACTTCTATCAGATCAAGTCTTTCCTCAATTCAAGTAGAATAGCT	3540
Sbjct	3481	 TCCAGTTATGCCTTTACTTCTATCAGATCAAGTCTTTCCTCAATTCAAGTAGAATAGCT	3540
Query	3541	GGAAAAACATGAAATGCAAATTGACTGCAGTCCCTCAAAGTAAATGCCATCCTTACTT	3600
Sbjct	3541	 GGAAAAACATGAAATGCAAATTGACTGCAGTCCCTCAAAGTAAATGCCATCCTTACTT	3600
Query	3601	CTTGACTTAAAGATCAACAGCCTTCAGACAGTTCTAATTAACATCTACAAGATATTTTAA	3660
Sbjct	3601	 CTTGACTTAAAGATCAACAGCCTTCAGACAGTTCTAATTAACATCTACAAGATATTTTAA	3660
Query	3661	CTTCAGGCTTACAGGTTCCATGCCTGTGTTCTTCAGCTTCCATTCAACCAGAAAGTTAGG	3720
Sbjct	3661	 CTTCAGGCTTACAGGTTCCATGCCTGTGTTCTTCAGCTTCCATTCAACCAGAAAGTTAGG	3720
Query	3721	AATAATCCTGATTTCTTCTAAGGATCATCTCTGATACTGCTTCATGCTGCTATTTTATC	3780
Sbjct	3721	 AATAATCCTGATTTCTTCTAAGGATCATCTCTGATACTGCTTCATGCTGCTATTTTATC	3780
Query	3781	CTGAAAGCTAAAAATCCAGGAGTTTCTTTAGGTAGCAAGGATGCATCTGGCATGTTCCCT	3840

Sbjct 3781 CTGAAAGCTAAAAATCCAGGAGTTTCTTTAGGTAGCAAAGATGCATCTGGCATGTTCCCT 3840
 Query 3841 TTTGAGGCAGCAGAATGGCTGTGCTACCATGCCTTCATTGTCAAAGTGTCCAACCACAAA 3900
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct 3841 TTTGAGGCAGCAGAATGGCTGTGCTACCATGCCTTCATTGTCAAAGTGTCCAACCACAAA 3900
 Query 3901 GTTATTTACAAATGCTTACTTAAGCCCCTTAAAGTCTATAAGATGCGTCTGTTTGGGAAG 3960
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct 3901 GTTATTTACAAATGCTTACTTAAGCCCCTTAAAGTCTATAAGATGCGTCTGTTTGGGAAG 3960
 Query 3961 ATCCCAAGGGATACTATGGAAGTCTGAAGACGGTGACGGAACCATCGCTTTGTCAAGAT 4020
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct 3961 ATCCCAAGGGATACTATGGAAGTCTGAAGACGGTGACGGAACCATCGCTTTGTCAAGAT 4020
 Query 4021 TTCAAAACATACTGGACTAAGGGATGAAGGTCTATTTTCATAATCCTTCCAGGCTTAAAA 4080
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct 4021 TTCAAAACATACTGGACTAAGGGATGAAGGTCTATTTTCATAATCCTTCCAGGCTTAAAA 4080
 Query 4081 ATAAATCTTAAATTTTTAGATTAATTTTCTCTGTAGATAATTTTGGTAGACTGAACTGAA 4140
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct 4081 ATAAATCTTAAATTTTTAGATTAATTTTCTCTGTAGATAATTTTGGTAGACTGAACTGAA 4140
 Query 4141 AGCATCTCTACTTGAAAGTTTTCTTTTTTTTTATGGGTACCACACAATGACCTTTAAA 4200
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct 4141 AGCATCTCTACTTGAAAGTTTTCTTTTTTTTTATGGGTACCACCAATGACCTTTAAA 4200
 Query 4201 AGAGTAGGCTGTTTTGTTAACATCTTCATGTTTGTGTTTTCTGTAAGTTCGAAGGCTGT 4260
 |||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct 4201 AGAGTAGACTGTTTTGTTAACATCTTCATGTTTGTGTTTTCTGTAAGTTCGAAGGCTGT 4260
 Query 4261 TTGAAGTACAACCTGTGAACCTGACTTGATTTCTTCAGTAATTCCTTTCTTCTGGTGA 4320
 |||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct 4261 TTGAAGTACAACCTGTGAACCTGACTCGATTTCTTCAGTAATTCCTTTCTTCTGGTGA 4320
 Query 4321 AGACATATTTAACCTATCTGTATAAACAGATCAATATTTTTGCCAGTATTGTTTCTGAAG 4380
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct 4321 AGACATATTTAACCTATCTGTATAAACAGATCAATATTTTTGCCAGTATTGTTTCTGAAG 4380
 Query 4381 AACTGTTCTTTGATTTTTCTATTGCAGACAATTTTACAATAAATTGTCTACATAGTTGCA 4440
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct 4381 AACTGTTCTTTGATTTTTCTATTGCAGACAATTTTACAATAAATTGTCTACATAGTTGCA 4440
 Query 4441 ATAATGCATACTTGCCTCCAATACCTTTATTTTGTAGTAAGCTTCAACCAATCCCACCC 4500
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct 4441 ATAATGCATACTTGCCTCCAATACCTTTATTTTGTAGTAAGCTTCAACCAATCCCACCC 4500
 Query 4501 AACTTGGCAGTGTCTTCAAATGCACTTATTGGTACAGGAAAGTGCATTTTCATGGCTGCG 4560
 |||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct 4501 AACTTGGCATTGTCTTCAAATGCACTTATTGGTACAGGAAAGTGCATTTTCATGGCTGCG 4560
 Query 4561 CCTAGCAAGATATGTGGGGTAAAGATTCTTTCACCTTGGAGAACACAGTCAAATTTGTA 4620
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct 4561 CCTAGCAAGATATGTGGGGTAAAGATTCTTTCACCTTGGAGAACACAGTCAAATTTGTA 4620

```

Query 4621 TGCCAAATCTGGGTATGTTCAACATGTTTAATATATTCTGAGAGTTTACAGAGATGTACA 4680
          |||
Sbjct 4621 TGCCAAATCTGGGTATGTTCAACATGTTTAATATATTCTGAGAGTTTACAGAGATGTACA 4680

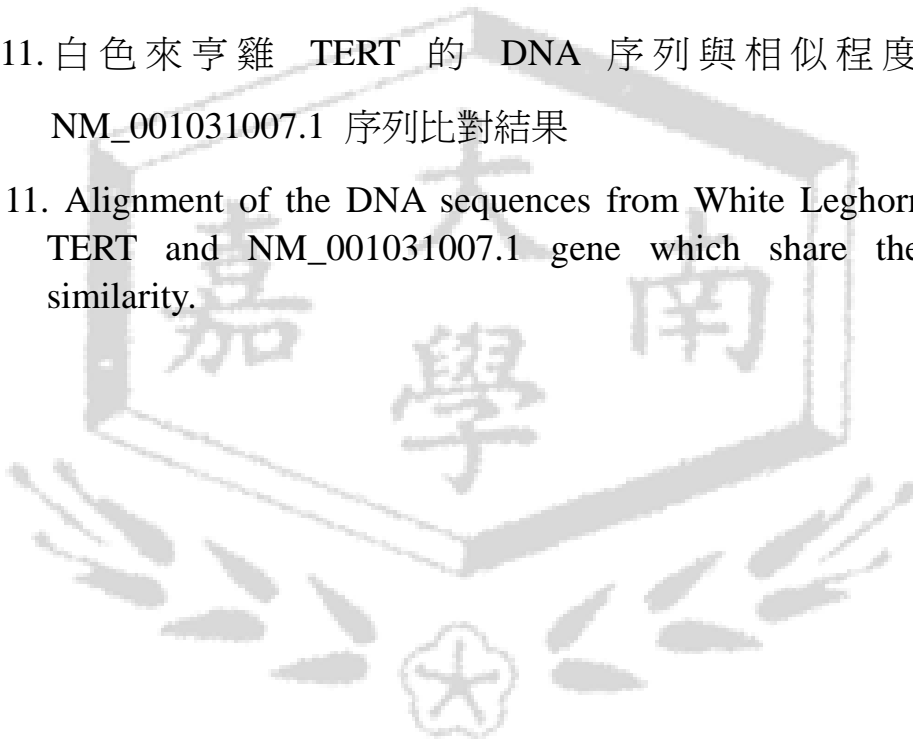
Query 4681 GAACAATGGTGATGTATTTATAACTACAAAAACAAGGGGAACCAGAGTTATTGATTAGAT 4740
          |||
Sbjct 4681 GAACAATGGTGATGTATTTATAACTACAAAAACAAGGGGAACCAGAGTTATTGATTAGAT 4740

Query 4741 AATAGAAAAGTAATCTGCTTGGTA 4764
          |||
Sbjct 4741 AATAGAAAAGTAATCTGCTTGGTA 4764

```

圖 11. 白色來亨雞 TERT 的 DNA 序列與相似程度最高的 NM_001031007.1 序列比對結果

Fig. 11. Alignment of the DNA sequences from White Leghorn chicken TERT and NM_001031007.1 gene which share the highest similarity.



1 MERGAQPGVG VRRLRNVARE EPFAAVLGAL RGCYAEATPL EAFVRLQEG
 51 GTGEVEVLRG DDAQCYRTFV SQCVVCVPRG ARAIPRPICF QQLSSQGEVI
 101 TRIVQRLCEK KKKNILAYGY SLLDENSCHF RVLPSSCIYS YLSNPTVTETI
 151 RISGLWEILL SRIGDDVMMY LLEHCALFML VPPSNCYQVC GQPIYELISR
 201 NIGPSPGFVR RRYSRFKHNS LLDYVRKRLV FHRHYLSKSQ WWKCRPRRRG
 251 RVSSRRKRRS HRIQSLRSGY QPSAKVNFQA GRQISTVTAR LEKQSCSSLC
 301 LPARAPSLKR KRDGEQVEIT AKRVKMEKE IEEQACSIVP DVNQSSSQRH
 351 GTSWHVAPRA VGLIKEHYIS ERSNSEMSGP SVVRRSHPGK RPVADKSSFP
 401 QGVQGNKRIK TGAEKRAESN RRGIEMYINP IHKPNRRGIE RRINPTHKPE
 451 LNSVQTEPME GASSGDRKQE NPPAHLAKQL PNTLSRSTVY FEKKFLLYSR
 501 SYQEYFPKSF ILSRLQGCQA GRRRLIETIF LSQNPLKEQQ NQSLPQQKWR
 551 KKRLPKRYWQ MREIFQKLVK NHEKCPYLVF LRKNCPVLLS EACLKKTTELT
 601 LQAALPGEAK VHKHTEHGKE STEGTAPNSF LAPPSVLACG QPERGEQHPA
 651 EGSDDLREL LRQHSSHWQV YGFVRECLER VIPAELWGSS HNKCRFFKNV
 701 KAFISMCKYA KLSLQQLMWK MRVNDCVWLR LAKGNHSVPA YEHCYREEIL
 751 AKFLYWLMDS YVIELLKSFF YITETMFQKN MLFYRKFIV GKLQNGIRD
 801 HFAKVHLRAL SSEEMEVIRQ KKYFPIASRL RFIPKMNGLR PVVRLSRVVE
 851 GQKLSKESRE KKIORYNTQL KNLFSVLNVE RTVNTSIIGS SVFGRDDIYR
 901 KWKEFVTKVF ESGGEMPHFY FVKGDVSRF DTIPHKKLVV VISQVLKPEV
 951 QTVYGIRWYA VIMITPTGKA RKLYKRHVST FEDFIPDMKQ FVSKLQERTS
 1001 LRNAIVVEQC LTFNENSSTL FTFFLQMLHN NILEIGHRYI IQCSGIPQGS
 1051 ILSTLLCSLC YGDMENKLLC GIQKDGVLIR LIDDFLLVTP HLMQARTFLR
 1101 TIAAGIPEYG FLINAKKTVV NFPVDDIPGC SKFKHLPDCR LISWCGLLLD
 1151 VQTLEVYCDY SSYAFTSIRS SLSFNSSRIA GKNMKCKLTA VLKLCCHPLL
 1201 LDLKINSLQT VLINIYKIFL LQAYRFHACV LQLPFNQKVR NNPDFFLRII
 1251 SDTASCCYFI LKAKNPGVSL GSKDASGMFP FEAAEWLCYH AFIVKLSNHK
 1301 VIYKLLKPL KVYKMRLFVK IPRDTMELLK TVTEPSLCQD FKTILD

圖 12. 轉譯之白色來亨雞 TERT 胺基酸序列

Fig. 12. The translated amino acid sequences of White Leghorn chicken TERT.

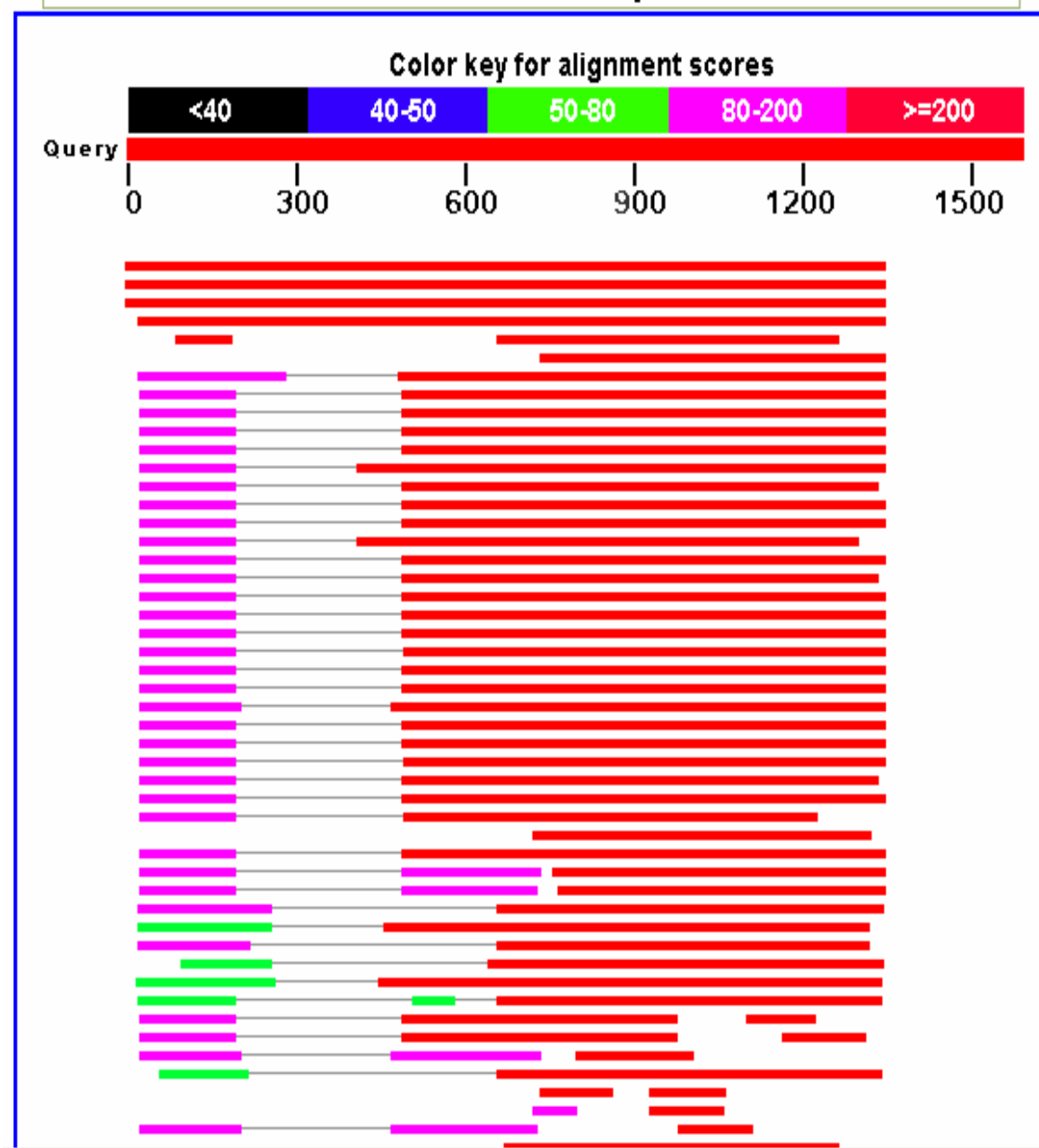


圖 13. 白色來亨雞 TERT 轉譯之胺基酸序列進行 BLAST 後呈現之相關蛋白質與相似位置圖

Fig. 13. The proteins share amino acid similarity with the White Leghorn chicken TERT are indicated after BLAST alignment.

ref|NP_001026178.1| telomerase reverse transcriptase [*Gallus gallus*]
 gb|AAV35463.1| telomerase reverse transcriptase [*Gallus gallus*]
 Length=1346

Score = 2737 bits (7096), Expect = 0.0, Method: Composition-based stats.
 Identities = 1343/1346 (99%), Positives = 1344/1346 (99%), Gaps =
 0/1346 (0%)

Query	1	MERGAQPGVGVRRRLRNVAREEPFAAVLGALRGCYAEATPLEAFVRRRLQEGGTGEVEVLRG	60
		MERGAQPGVGVRRRLRNVAREEPFAAVLGALRGCYAEATPLEAFVRRRLQEGGTGEVEVLRG	
Sbjct	1	MERGAQPGVGVRRRLRNVAREEPFAAVLGALRGCYAEATPLEAFVRRRLQEGGTGEVEVLRG	60
Query	61	DDAQCYRTFVSQCVCVPRGARAIPRPICFQQLSSQGEVITRIVQRLCEKKNKKNILAYGY	120
		DDAQCYRTFVSQCVCVPRGARAIPRPICFQQLSSQ EVITRIVQRLCEKKNKKNILAYGY	
Sbjct	61	DDAQCYRTFVSQCVCVPRGARAIPRPICFQQLSSQSEVITRIVQRLCEKKNKKNILAYGY	120
Query	121	SLLDENSCHFRVLPSSCIYSYLSNTVTETIRISGLWEILLSRIGDDVMMYLLEHCALFML	180
		SLLDENSCHFRVLPSSCIYSYLSNTVTETIRISGLWEILLSRIGDDVMMYLLEHCALFML	
Sbjct	121	SLLDENSCHFRVLPSSCIYSYLSNTVTETIRISGLWEILLSRIGDDVMMYLLEHCALFML	180
Query	181	VPPSNCYQVCGQPIYELISRNIGPSPGFVRRRYSRFKHNSLLDYVRKRLVFHRHYLSKSQ	240
		VPPSNCYQVCGQPIYELISRN+GPSPGFVRRRYSRFKHNSLLDYVRKRLVFHRHYLSKSQ	
Sbjct	181	VPPSNCYQVCGQPIYELISRNIGPSPGFVRRRYSRFKHNSLLDYVRKRLVFHRHYLSKSQ	240
Query	241	WWKCRPRRRGRVSSRRKRRSHRISQLRSGYQPSAKVNFQAGRQISTVTARLEKQSCSSLC	300
		WWKCRPRRRGRVSSRRKRRSHRISQLRSGYQPSAKVNFQAGRQISTVTARLEKQSCSSLC	
Sbjct	241	WWKCRPRRRGRVSSRRKRRSHRISQLRSGYQPSAKVNFQAGRQISTVTARLEKQSCSSLC	300
Query	301	LPARAPSLKRKRDEQVEITAKRVKMEKEIEEQACSVDPVQSSSRHGTSWVHAPRA	360
		LPARAPSLKRKRDEQVEITAKRVKMEKEIEEQACSVDPVQSSSRHGTSWVHAPRA	
Sbjct	301	LPARAPSLKRKRDEQVEITAKRVKMEKEIEEQACSVDPVQSSSRHGTSWVHAPRA	360
Query	361	VGLIKEHYISERSNSEMSGPSVRRSHPGKRPVADKSSFPQGVQGNKRKTGAEKRAESN	420
		VGLIKEHYISERSNSEMSGPSVRRSHPGKRPVADKSSFPQGVQGNKRKTGAEKRAESN	
Sbjct	361	VGLIKEHYISERSNSEMSGPSVRRSHPGKRPVADKSSFPQGVQGNKRKTGAEKRAESN	420
Query	421	RRGIEMYINPIHKPNRRGIERRINPTHKPELNSVQTEPMEGASSGDRKQENPPAHLAKQL	480

RRG I E M Y I N P I H K P N R R G I E R R I N P T H K P E L N S V Q T E P M E G A S S G D R K Q E N P P A H L A K Q L

Sbjct 421 RRG I E M Y I N P I H K P N R R G I E R R I N P T H K P E L N S V Q T E P M E G A S S G D R K Q E N P P A H L A K Q L 480

Query 481 P N T L S R S T V Y F E K K F L L Y S R S Y Q E Y F P K S F I L S R L Q G C Q A G G R R L I E T I F L S Q N P L K E Q Q 540
P N T L S R S T V Y F E K K F L L Y S R S Y Q E Y F P K S F I L S R L Q G C Q A G G R R L I E T I F L S Q N P L K E Q Q

Sbjct 481 P N T L S R S T V Y F E K K F L L Y S R S Y Q E Y F P K S F I L S R L Q G C Q A G G R R L I E T I F L S Q N P L K E Q Q 540

Query 541 N Q S L P Q Q K W R K K R L P K R Y W Q M R E I F Q K L V K N H E K C P Y L V F L R K N C P V L L S E A C L K K T E L T 600
N Q S L P Q Q K W R K K R L P K R Y W Q M R E I F Q K L V K N H E K C P Y L V F L R K N C P V L L S E A C L K K T E L T

Sbjct 541 N Q S L P Q Q K W R K K R L P K R Y W Q M R E I F Q K L V K N H E K C P Y L V F L R K N C P V L L S E A C L K K T E L T 600

Query 601 L Q A A L P G E A K V H K H T E H G K E S T E G T A P N S F L A P P S V L A C G Q P E R G E Q H P A E G S D P L L R E L 660
L Q A A L P G E A K V H K H T E H G K E S T E G T A P N S F L A P P S V L A C G Q P E R G E Q H P A E G S D P L L R E L

Sbjct 601 L Q A A L P G E A K V H K H T E H G K E S T E G T A P N S F L A P P S V L A C G Q P E R G E Q H P A E G S D P L L R E L 660

Query 661 L R Q H S S H W Q V Y G F V R E C L E R V I P A E L W G S S H N K R F F K N V K A F I S M G K Y A K L S L Q Q L M W K 720
L R Q H S S H W Q V Y G F V R E C L E R V I P A E L W G S S H N K R F F K N V K A F I S M G K Y A K L S L Q Q L M W K

Sbjct 661 L R Q H S S H W Q V Y G F V R E C L E R V I P A E L W G S S H N K R F F K N V K A F I S M G K Y A K L S L Q Q L M W K 720

Query 721 M R V N D C V W L R L A K G N H S V P A Y E H C Y R E E I L A K F L Y W L M D S Y V I E L L K S F F Y I T E T M F Q K N 780
M R V N D C V W L R L A K G N H S V P A Y E H C Y R E E I L A K F L Y W L M D S Y V I E L L K S F F Y I T E T M F Q K N

Sbjct 721 M R V N D C V W L R L A K G N H S V P A Y E H C Y R E E I L A K F L Y W L M D S Y V I E L L K S F F Y I T E T M F Q K N 780

Query 781 M L F Y Y R K F I W G K L Q N I G I R D H F A K V H L R A L S S E E M E V I R Q K K Y F P I A S R L R F I P K M N G L R 840
M L F Y Y R K F I W G K L Q N I G I R D H F A K V H L R A L S S E E M E V I R Q K K Y F P I A S R L R F I P K M N G L R

Sbjct 781 M L F Y Y R K F I W G K L Q N I G I R D H F A K V H L R A L S S E E M E V I R Q K K Y F P I A S R L R F I P K M N G L R 840

Query 841 P V V R L S R V V E G Q K L S K E S R E K K I Q R Y N T Q L K N L F S V L N Y E R T V N T S I I G S S V F G R D D I Y R 900
P V V R L S R V V E G Q K L S K E S R E K K I Q R Y N T Q L K N L F S V L N Y E R T V N T S I I G S S V F G R D D I Y R

Sbjct 841 P V V R L S R V V E G Q K L S K E S R E K K I Q R Y N T Q L K N L F S V L N Y E R T V N T S I I G S S V F G R D D I Y R 900

Query 901 K W K E F V T K V F E S G G E M P H F Y F V K G D V S R A F D T I P H K K L V E V I S Q V L K P E S Q T V Y G I R W Y A 960
K W K E F V T K V F E S G G E M P H F Y F V K G D V S R A F D T I P H K K L V E V I S Q V L K P E S Q T V Y G I R W Y A

Sbjct 901 K W K E F V T K V F E S G G E M P H F Y F V K G D V S R A F D T I P H K K L V E V I S Q V L K P E S Q T V Y G I R W Y A 960

Query 961 V I M I T P T G K A R K L Y K R H V S T F E D F I P D M K Q F V S K L Q E R T S L R N A I V V E Q C L T F N E N S S T L 1020
V I M I T P T G K A R K L Y K R H V S T F E D F I P D M K Q F V S K L Q E R T S L R N A I V V E Q C L T F N E N S S T L

Sbjct 961 V I M I T P T G K A R K L Y K R H V S T F E D F I P D M K Q F V S K L Q E R T S L R N A I V V E Q C L T F N E N S S T L 1020

Query	1021	FTFFLQMLHNNILEIGHRYYIQCSGIPQGSILSTLLCSLCYGD MENKLLCGIQKDGVLIR	1080
		FTFFLQMLHNNILEIGHRYYIQCSGIPQGSILSTLLCSLCYGD MENKLLCGIQKDGVLIR	
Sbjct	1021	FTFFLQMLHNNILEIGHRYYIQCSGIPQGSILSTLLCSLCYGD MENKLLCGIQKDGVLIR	1080
Query	1081	LIDDFLLVTPHLMQARTFLRTIAAGIPEYGF L INAKKTVVNFVDDIPGCSKFKHLPCR	1140
		LIDDFLLVTPHLMQARTFLRTIAAGIPEYGF L INAKKTVVNFVDDIPGCSKFKHLPCR	
Sbjct	1081	LIDDFLLVTPHLMQARTFLRTIAAGIPEYGF L INAKKTVVNFVDDIPGCSKFKHLPCR	1140
Query	1141	LISWGCLLLDVQTLEVYCDYSSYAFTSIRSSLSFNSSRIAGKNMKCKLTAVLKLKCHPLL	1200
		LISWGCLLLDVQTLEVYCDYSSYAFTSIRSSLSFNSSRIAGKNMKCKLTAVLKLKCHPLL	
Sbjct	1141	LISWGCLLLDVQTLEVYCDYSSYAFTSIRSSLSFNSSRIAGKNMKCKLTAVLKLKCHPLL	1200
Query	1201	LDLKINSLQTVLINIYKIFLLQAYRFHACVLQLPFNQVRNNDFFLR IISDTASCCYFI	1260
		LDLKINSLQTVLINIYKIFLLQAYRFHACVLQLPFNQVRNNDFFLR IISDTASCCYFI	
Sbjct	1201	LDLKINSLQTVLINIYKIFLLQAYRFHACVLQLPFNQVRNNDFFLR IISDTASCCYFI	1260
Query	1261	LKAKNPGVSLGSKDASGMFPFEAAEWLCYHAFIVKLSNHKVIYKCLLKPLKVYKMRLFGK	1320
		LKAKNPGVSLGSKDASGMFPFEAAEWLCYHAFIVKLSNHKVIYKCLLKPLKVYKM LFGK	
Sbjct	1261	LKAKNPGVSLGSKDASGMFPFEAAEWLCYHAFIVKLSNHKVIYKCLLKPLKVYKMHLFGK	1320
Query	1321	IPRDTMELLKTVTEPSLCQDFKTI LD	1346
		IPRDTMELLKTVTEPSLCQDFKTI LD	
Sbjct	1321	IPRDTMELLKTVTEPSLCQDFKTI LD	1346

圖 14. 白色來亨雞 TERT 的胺基酸序列與相似程度最高的 NP_001026178.1 序列比對結果

Fig. 14. Alignment of the amino acid sequences from White Leghorn chicken TERT and NP_001026178.1 gene which share the highest similarity.

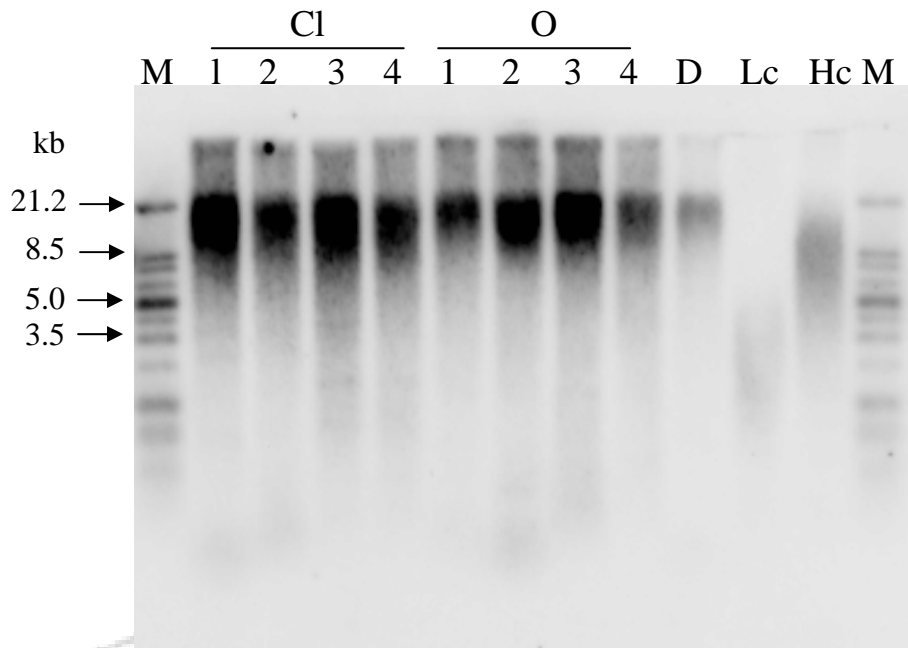


圖 15. 複製牛 2-3 歲 (Cl) 及其後代 (O) 個體之端粒長度分析。D 為供核體細胞。Lc 與 Hc 分別為低分子量及高分子量對照。M 為長度分子標記。

Fig. 15. Detection of telomere length in cloned cattle (Cl) and their offspring (O). D: donor cell. Lc and Hc is low and high molecular control, respectively. M : molecular marker.

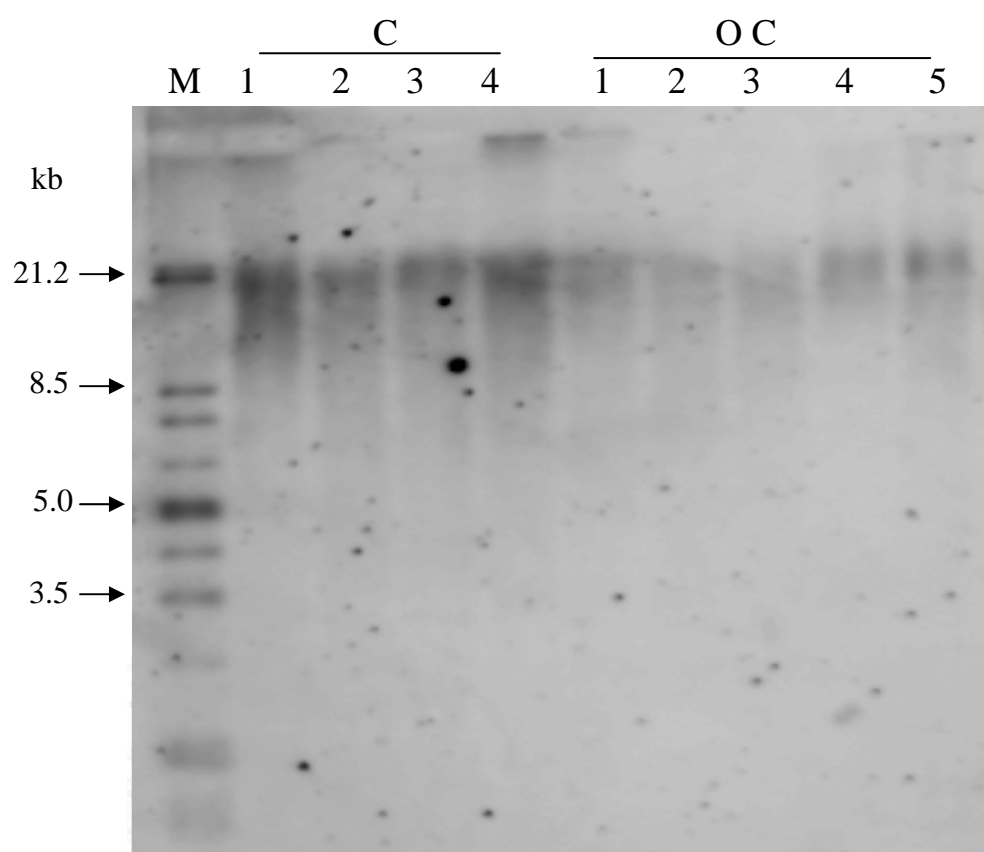


圖 16. 複製牛對照(2-3 歲) (C)及其後代對照 (O C) 之同齡正常乳牛端粒長度分析。M 為長度分子標記。

Fig. 16. Detection of telomere length in SCNT control cattle (C) and their offspring control animals (O C). M: molecular marker.

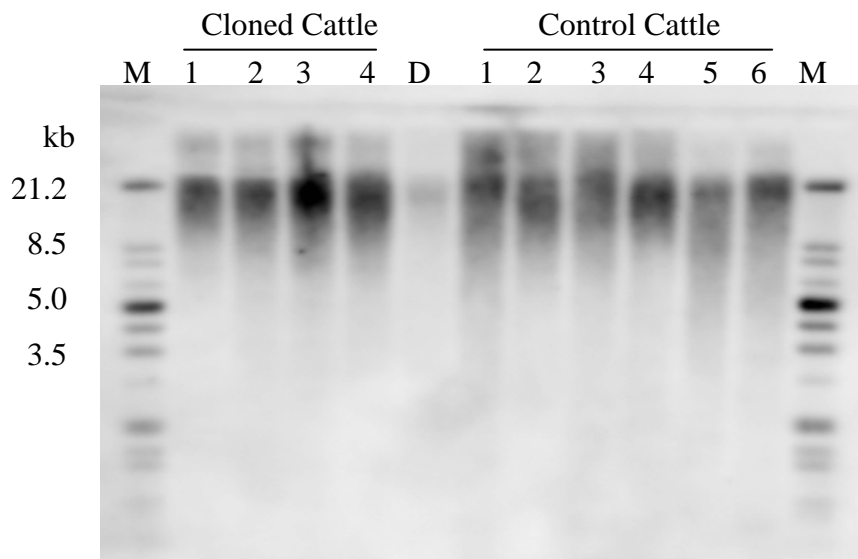


圖 17. 複製牛 3-4 歲 (Cl) 與同齡非複製牛 (C) 之端粒長度 (Mean \pm SD)。D 為供核體細胞。

Fig. 17. Telomere length (Mean \pm SD) of cloned cattle (3-4 year-old) (Cl) their age-match counterparts (C). The telomere length of cloned cattle 3-4 year-old, respectively. Cl: cloned cattle. C: normal control. D: donor cells.

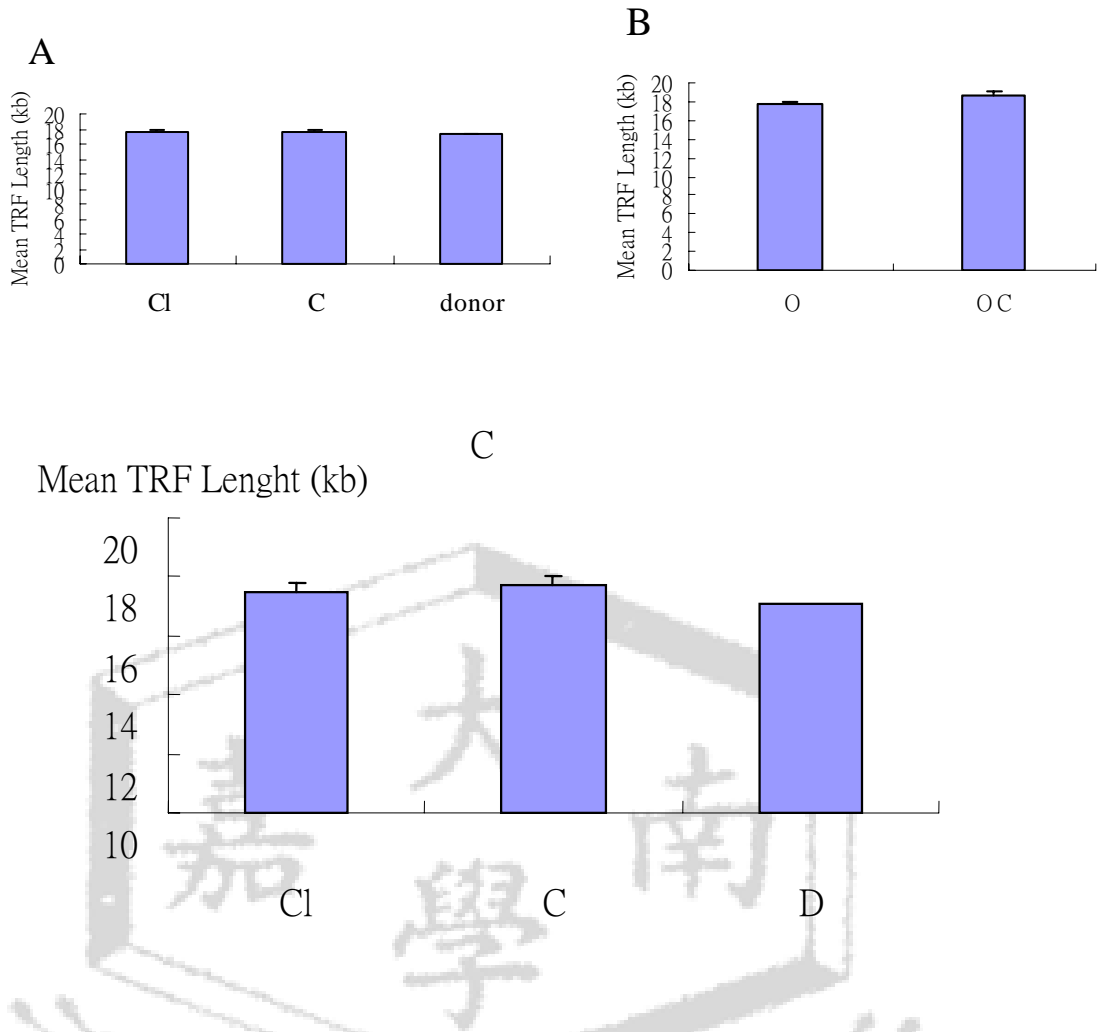


圖 18. 複製牛及其後代與同齡非複製牛之端粒長度 (Mean \pm SD)。
 A：複製牛 (2-3 歲) (Cl)、複製牛對照 (C)及供核體細胞 (D) 的端粒長度。
 B：複製牛後代 (O) 及同齡對照牛 (O C)的端粒長度。
 C：複製牛 (3-4 歲) (Cl) 與同齡對照牛 (C) 之端粒長度。

Fig. 18. Telomere length (Mean \pm SD) of cloned cattle (2-3 year-old), their offspring and age-match counterparts. A: cloned cattle (2-3 year-old) (Cl), normal control (C) and donor cell (D). B: offspring of cloned cattle (O) and their age-match normal control (O C). C: cloned cattle (3-4 year-old) (Cl) and normal control (C).

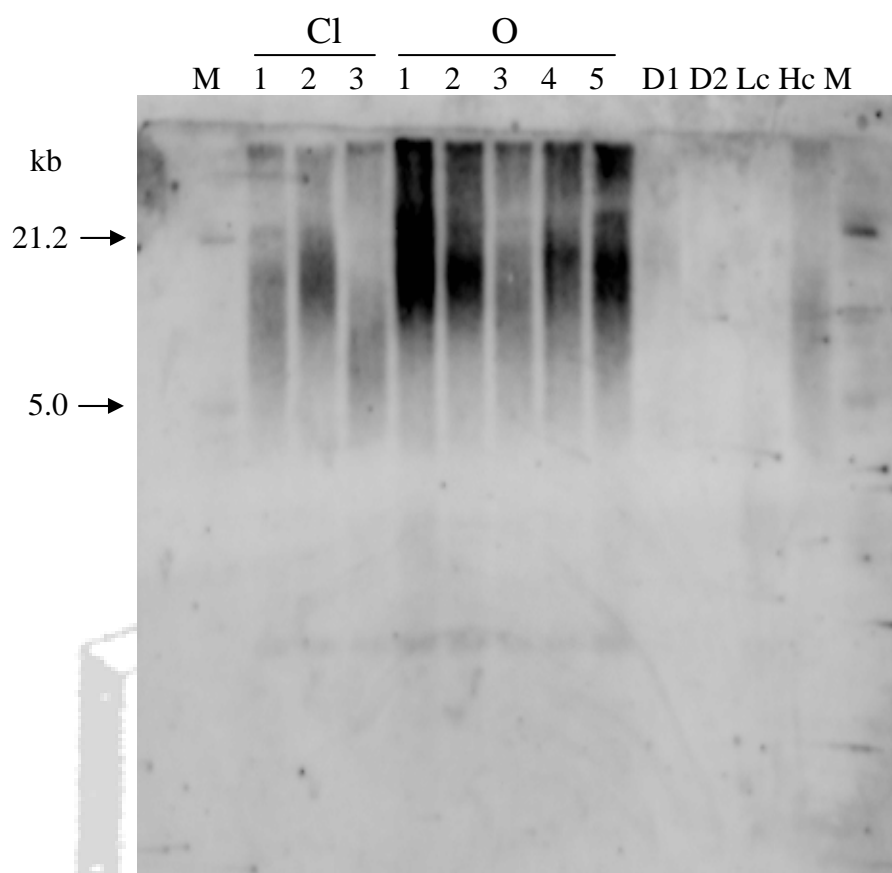


圖 19. 複製羊 1、2 與 3 號在 50、22 與 6 月齡 (Cl) 時及其後代 (O) 之端粒長度分析。D 為供核體細胞。Lc 與 Hc 分別為低分子量及高分子量對照。M 為長度分子標記。

Fig. 19. Telomere length in cloned dairy goat (Cloned) No. 1, 2 and 3 at 50, 22 and 6 months old and their offspring (Offspring). D: donor cell. Lc and Hc is low and high molecular control, respectively. M : molecular marker.

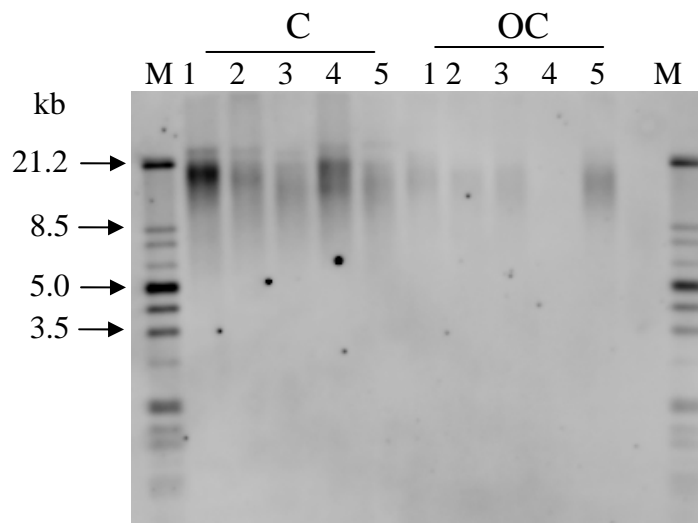


圖 20. 複製羊對照 (C) 及其後代對照 (OC) 同齡正常羊之端粒長度分析。M 為長度分子標記。

Fig. 20. Detection of telomere length in control dairy goat (C) and counterparts of cloned goat's offspring (OC). M: molecular marker.

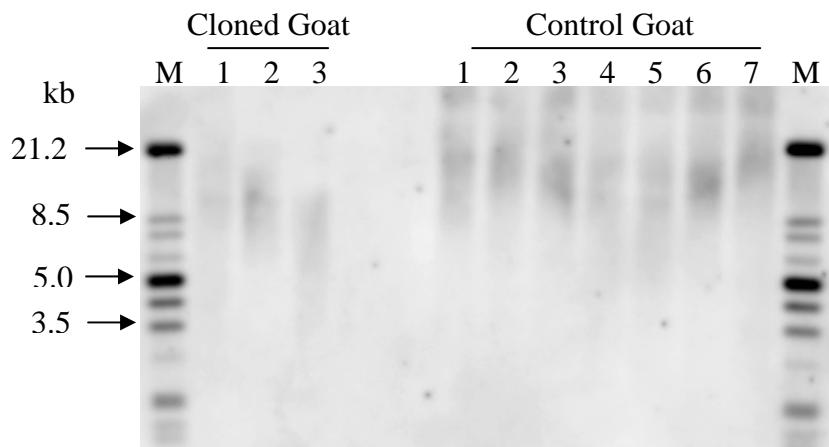


圖 21. 複製羊 1、2 與 3 號在不同月齡時與非複製對照羊的端粒長度分析。複製羊 1、2 與 3 號在 62、34 及 18 月齡時及相似月齡對照正常羊的端粒長度。M 為分子量標記。

Fig. 21. Analysis of telomere length in cloned goats and their age-match controls. The telomere length of cloned goats No. 1, 2 and 3 at 62, 34 and 18 months old and part of their age-match controls. M: molecular weight markers.

附錄 1. 不同脊椎動物 TERT 蛋白質區域之相似性

Appendix 1. Homology among vertebrate TERT protein regions

Homology among vertebrate TERT protein regions		
	% Identity ^a	% Equivalency ^b
Full-length TERT	25	52
Region v-I	22	62
Region v-II	29	66
Region v-III	35	71
Region v-IV	34	56
Motif T	55	89
Motif 1	38	54
Motif 2	13	52
Motif A	34	66
Motif B'	65	88
Motif C	75	88
Motif D	42	85
Motif E	70	90
Region v-V	34	82
Region v-VI	65	87
Region v-VII	29	73

^a Percentage of amino acid residues which were identical within a Clustal W column for all species (chicken, *Xenopus*, human, mouse, rat, hamster). Note that individual pairwise comparison between full-length chicken TERT and each vertebrate TERT indicated 38–45% identity.

^b Amino acid residues which were identical and/or share similarity across physico-chemical groups (>0.7) within a column for all species.

資料來源：Delany and Daniels⁽¹⁹⁾

附錄 2. 各種複製哺乳動物已進行端粒長度分析的結果

Appendix 2. Review of telomere length analysis in various cloned mammalian species.

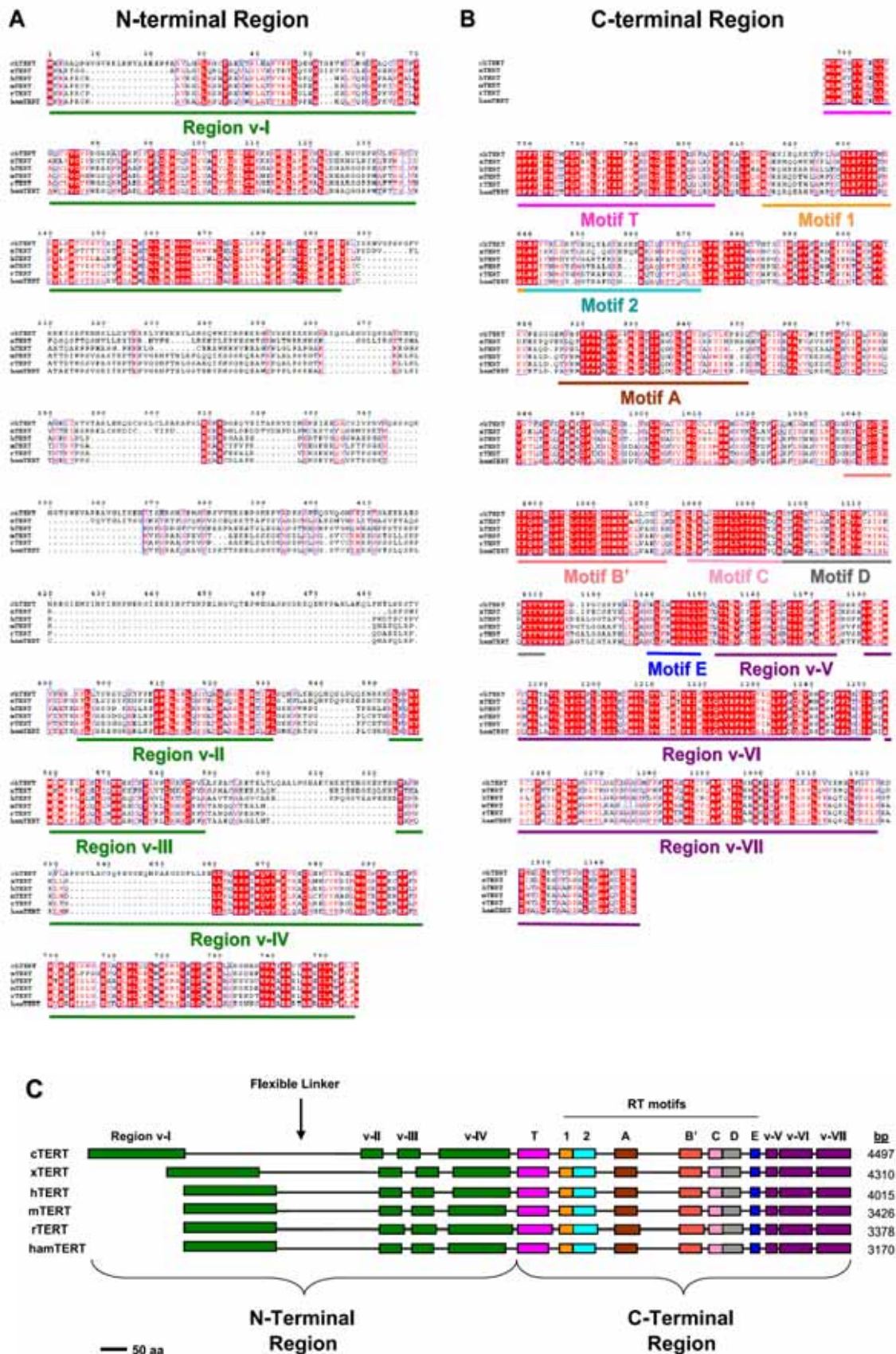
動物別	供核細胞別	複製動物數目	複製動物的端粒長度	複製動物的端粒活性
綿羊	乳腺上皮細胞	3	$D=C>A$	未測定
綿羊	胎體之成纖維細胞	2	$D<C<A$	未測定
小鼠	卵丘細胞	35	$D<C$	未測定
牛	成熟母牛之成纖維細胞與卵丘細胞	10	$D>C=A$	
牛	成熟牛之耳朵細胞	3	耳朵細胞: $D<C$ 白血球: $D>C=A$	
牛	老化的成纖維細胞	6	$D<C>A$	測定
牛	成熟牛之成纖維細胞	共21頭	$D<C=A$	測定
	胎體之成纖維細胞			
	顆粒細胞			
牛	輸卵管上皮細胞	9	$D>C<A$	未測定
	乳腺上皮細胞	1	$D>C<A$	未測定
	肌肉細胞	2	$D=C<A$	未測定
	皮膚成纖維細胞	2	$D=C<A$	未測定
	細胞			
	胚葉細胞	6	$C>A$	未測定

A:同齡的受精對照動物、C:複製動物、D:供核動物。

資料來源: Tamada and Kikyo⁽⁶⁴⁾

附錄 3. 不同脊椎動物之 TERT 蛋白質比對分析

Appendix 3. Alignments of vertebrate TERT proteins.

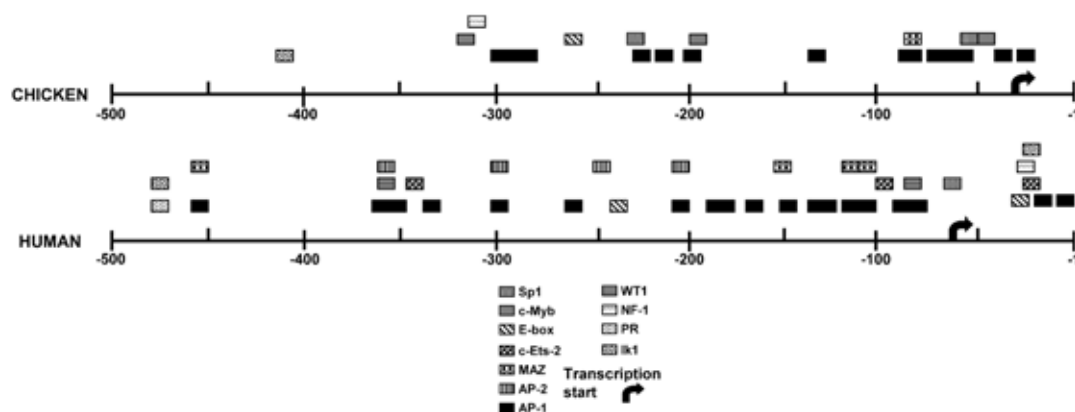


Clustal W alignment of the N-terminal and C-terminal regions of cloned vertebrate TERT messages translated into protein (*Xenopus laevis* AF212299; Homo sapiens AF015950; *Mus musculus* NM-009354; *Rattus norvegicus* AF247818; *Mesocricetus auratus* AF149012; *G. gallus* AY502592). Homologous regions were defined and colored for percent equivalency (>0.7) using ESPript 2.1. Each column is scored; columns with exact identity are shaded in red with white lettering, residues within a column which are homologous based on their physico-chemical grouping are represented by red lettering, and columns/regions boxed in blue share similarity across physico-chemical groups. (A) N-terminal region. Conserved vertebrate regions (v-I to v-IV) are noted by name and green lines (Kuramoto et al., 2001). (B) C-terminal region of vertebrates. Conserved motifs in the C-terminal region are noted by name and corresponding colored lines (Lingner et al., 1997). Regions showing conservation across vertebrate TERTs in the C-terminal region after the last conserved reverse transcriptase (RT) motif are termed regions v-V, v-VI, and v-VII, and are underlined purple lines. These regions were called according to percent identity, region v-V having 34%, region v-VI 65%, and region v-VII 29%, although percent equivalencies were higher at 82%, 87%, and 73%, respectively. (C) Schematic of relative locations and sizes of vertebrate TERT protein motifs. The vertebrate domains and RT motifs are color coded and correspond to panels A and B. Note the flexible linker of chicken is much longer than that of the mammalian species and *Xenopus*. Also, chicken N-terminal motifs v-I and v-IV are longer in comparison to the other species. Predicted protein molecular weights and pI's were calculated using ProtParam (<http://us.expasy.org/tools/protparam.html>).⁽¹⁹⁾

資料來源：Delany and Daniels⁽¹⁹⁾

附錄 4. 雞與人 TERT 基因 5' 端鄰近/啓動子區域上游的比較

Appendix 4. Comparison of the 5' flanking/promoter region upstream of the human (AH007699) and chicken (AY505015) TERT genes.

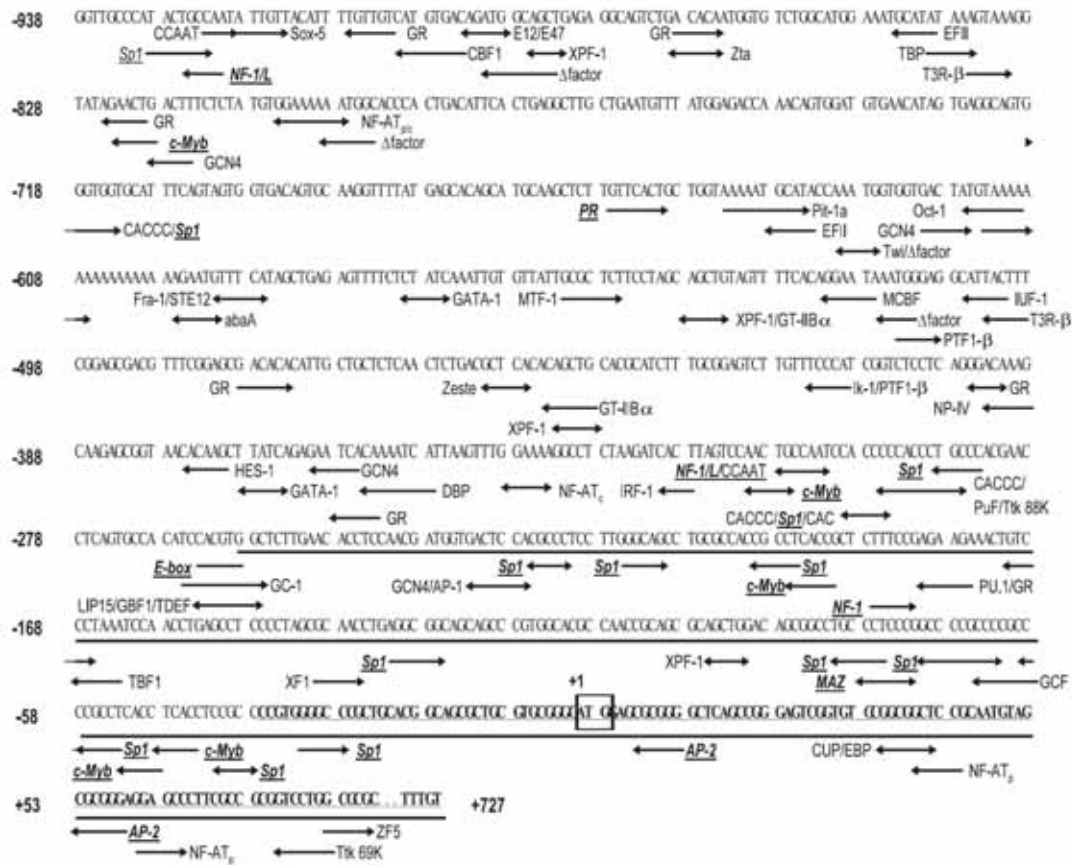


Transcription factors are indicated above the respective chicken and human sequence lines, indicated in 100 bp increments. The transcriptional start site is indicated on each sequence by the arrow; the ATG translation start codon begins following position -1 . See key for motif name. Only those sites known to be involved in hTERT regulation are indicated (see Poole et al., 2001). The larger Sp1 boxes contained overlapping individual sites. Chicken TERT has four c-Myb sites absent in the human sequence; sites present in human but lacking in the chicken sequence include: c-Ets2, AP-2 (although two AP-2 sites are located within the first 50 bp of the chTERT coding sequence), WT-1, and PR. Both species have one E-box (c-Myc/Mad 1/Max binding site) at about -250 bp; hTERT also contains an additional E-box downstream of the transcriptional start along with Sp1, c-Ets2, and Ik1 motifs.

資料來源：Delany and Daniels⁽¹⁹⁾

附錄 5. 雞 TERT 5'端鄰近啓動子區域內的轉錄因子的結合序列

Appendix 5. Sequence and transcription factor binding sites for the 5' flanking/promoter region of the chTERT gene.



All factor binding sites were called by TESS. The direction (forward and/or reverse direction indicated) of site recognition is indicated and all factors are written below the corresponding sequence. Factors known to be involved in hTERT regulation are bolded and underlined (Cong et al., 1999; Mergny et al., 2002; Poole et al., 2001). The chTERT transcript (beginning at -37) is shown in bold type with the ATG translational start codon indicated by a box (+1). A CpG island is indicated by the black line (beginning at -259) and extends into the gene (to +727). Over 80 transcription factor binding sites were identified in the 5' flanking/promoter region of chTERT and the initial transcript. Within the adjacent 300 bp, an abundance of Sp1 and c-Myb sites were identified along with a single E-box motif.

資料來源：Delany and Daniels⁽¹⁹⁾