

白色來亨雞端粒反轉錄酶基因的選殖與 DNA 序列分析⁽¹⁾

蕭振文⁽²⁾ 蔡麗卿⁽²⁾ 吳明娟⁽³⁾ 劉振發⁽²⁾ 劉瑞珍⁽²⁾
戴謙⁽⁴⁾ 陳立人^{(2) (5)}

收件日期：96年 9月 17日； 接受日期：96年 11月 20日

摘要

本研究的目的是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，期能發展延長家禽細胞體外培養的技術平台。試驗應用顯微抽取技術，自孵化16 hr的白色來亨雞蛋取得原腸期雞胚並萃取總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 (cDNA)，再設計特異引子進行 PCR以選殖雞的TERT。試驗結果顯示，經過PCR後獲得一長度 4.7 kb的產物，該產物經膠體回收並選殖入TOPO載體進行 T-A cloning，經過 DNA 序列分析與 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) 比對，結果與 NCBI 基因庫中編號 AY505015 序列具有最高之相似性 (99%)，確定為雞的TERT基因。此一 TERT 基因的構築物將可供基因轉殖與表現分析研究之用。

關鍵詞：白色來亨雞、端粒酶、基因選殖。

緒言

正常的體細胞在體外培養條件下，歷經數次至數十次分裂後即進入衰老期而不再分裂，主要原因在於染色體端粒的變短 (Faragher and Kipling, 1998)。端粒是位於染色體末端的短小重複 DNA 序列 (Blasco, 2002; McEachern *et al.*, 2000)，會隨著細胞的分裂次數增加而逐漸縮短；細胞每分裂一次端粒即減短20-200 bp (Harley *et al.*, 1990; Kozik *et al.*, 1998)，故端粒又被稱之為細胞的‘有絲分裂時鐘’ (mitotic clock) (Harley *et al.*, 1992; Holt *et al.*, 1996)。端粒對於保持染色體的穩定、細胞活性及基因組的完整具有重要功能，也可預防染色體的異常重組而利於 DNA的複製 (Blackburn,

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第1410號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所生理組。

(3) 嘉南藥理科技大學。

(4) 南台科技大學。

(5) 通訊作者，E-mail：lrchen@mail.tlri.gov.tw。

1991)。動物間的端粒組成變異極小，人類的端粒 DNA 序列為TTAGGG，而屬於單細胞生物的四膜蟲 (*Tetrahymena*) 其端粒DNA序列為TTGGGG。動物染色體端粒長度的維持與端粒反轉錄酶 (telomerase reverse transcriptase, TERT) 之活性有重要關係。

TERT是一種核糖核酸蛋白質 (ribonucleoprotein) 反轉錄酶，由重複序列 (tandem repeat, TR) 與 TERT 二個次單位所組成。TR 之 RNA 在動物細胞中普遍存在，但只有含 TERT 的細胞才具有端粒酶之活性 (Morin, 1989)。TERT 之作用藉由合成新的端粒 DNA 並添加到染色體末端而維持端粒長度。特別的是，TERT只表現在癌細胞 (Shay and Bacchetti, 1997)、生殖細胞 (Kozik *et al.*, 1998) 或再生組織 (Delany *et al.*, 2003; Swanberg and Delany, 2003, Forsyth *et al.*, 2002)，而不表現在一般的體細胞，故 TERT 與細胞壽命或癌化亦具密切相關 (Blasco, 2002)。

本研究的目的是選殖白色來亨雞的 TERT 基因並分析 DNA 序列，供構築表現載體，以期發展能有效延長家禽細胞壽命的技術平台與長期體外培養系統，提供細胞生長分化功能及後續基因轉殖研究之用。

材料與方法

I. 白色來亨雞TERT基因選殖

- (i) 原腸期胚之取得、RNA 萃取與第一股cDNA之增殖：
應用顯微操作自孵化16 hr的雞蛋抽取原腸期雞胚，使用總RNA純化套組 (Qiagen, GmbH, Germany) 並按照其操作步驟萃取、純化與定量 RNA，進行RT-PCR。RT-PCR反應體積為10 μ l，內含樣品 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)。混合後置 42°C 恆溫箱維持1 hr。
- (ii) 選殖 TERT 基因之引子設計：
參考 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 核酸庫的序列資料設計引子。供選殖全長TERT基因 (4.7 kb) 引子序列sense primer：5'-GCTGCGTGCGGGGATGGA-3'，antisense primer：5'-AACAGGAAATGCAAATATACCAAG-3'。試驗初期供為測試TERT基因片段的引子序列sense primer：5'-CCTGTTTACTTTCTTTCTTC-3'，antisense primer：5'-CAATTGTCATTTTCATGTTT-3'，預期產物為 508 bp。而做為陽性對照的*Gapdh*基因片段的引子序列sense primer：5'-CCGTTGACGTGCAGCAGGAA-3'、antisense primer：5'-ATGTTGCTGGGGTTCACGCTC-3'，預期產物為283 bp。
- (iii) 第二股cDNA之增殖及電泳：
PCR反應混合液中含有 cDNA 模板、10 μ M的sense 與antisense 引子各1 μ l、*Taq* DNA聚合酶 (Roche, Germany) 0.5 μ l (5 U/ μ l)、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°C 2 min，10次循環的 94°C 15 sec、60°C 30 sec、72°C 2 min，20次循環的 94°C 15 sec、60°C 30 sec、72°C 2 min，最後 72°C 5 min extension並維持於 4°C。PCR後取 10 μ l產物置入 2% 瓊脂糖膠片於 0.5 \times TAE液進行100 volt 30 min的電泳。電泳後膠片置入染液 [0.5 \times 的TAE內含 0.1 μ g/ml的溴化乙錠 (ethidium bromide)] 染色15 min，並於紫外燈箱上觀察紀錄結果。
- (iv) DNA片段回收與選殖：

將含有全長TERT之特異片段自瓊脂糖膠片切下，利用套組 (Qiagen, GmbH, Germany) 回收後，選殖入 TOPO XL PCR cloning kit (Invitrogen, CA) 之多選殖位置 (multiple cloning site, MCS)，再轉移入 *E. coli* 勝任細胞 (competent cell) 增殖。

(v) DNA 序列分析與比對：

選殖之TERT特異 PCR 產物，利用DNA序列分析儀 (ABI 3730) (Applied Biosystems Inc., CA) 並依其方法進行 DNA序列分析，以T7及 SP6序列做為分析引子。完成分析的 DNA 序列資料利用 Vector NTI (Infor Max Inc., USA) 連接NCBI進行 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)，以確認選殖基因之正確性。

結果與討論

雞的 TERT 活性可以在孵化前的胚葉細胞中測得，但到了原腸期雞胚時期的表現最為顯著 (Swanberg and Delany, 2003; Taylor and Delany, 2000)。故本研究採集孵化 16 hr 的白色來亨雞雞蛋為材料，應用顯微操作抽取原腸期雞胚供為總 RNA 的來源 (圖1)，經 RT-PCR 合成第一股 cDNA 做為模板，應用 TERT 之特異引子進行 PCR 增殖出第二股 cDNA，構築入 TOPO載體中。進行全長 TERT 基因選殖前，先應用 PCR 測定源自原腸期雞胚總 RNA 樣品所建構的 cDNA 庫中是否有標的基因的存在，結果在原腸期雞胚的 cDNA 庫分別順利擴增出長度 508 bp 的 TERT 與 283 bp 的陽性對照 *Gapdh* 正確基因片段產物；相較之下，源自家禽體細胞的 cDNA 庫只能擴增出 *Gapdh* 基因產物，並未測得增殖 TERT 基因的產物 (圖2)。試驗進一步擴增針對 TERT 基因前段、中段與後段的引子進行 PCR，結果分別擴增出 TERT 基因不同位置與長度的片段產物 (圖3)，證明合成的 cDNA 庫確實含有完整的TERT 基因。由於 TERT 長度長達 4.7 kb，經多次試驗並修正引子的序列與 PCR 之條件後，終於順利擴增一條長 4.7 kb 的特異 TERT 基因產物 (圖4)。擴增的全長 TERT 基因選殖入 TOPO vector system 載體進行 T-A cloning，分析完整的 DNA 序列 (圖 5)，經過網路 BLAST 比對，結果與 NCBI 基因庫中編號 AY505015 序列具有最高之相似性 (99%)，故確定為雞的 TERT 基因 (圖6)。

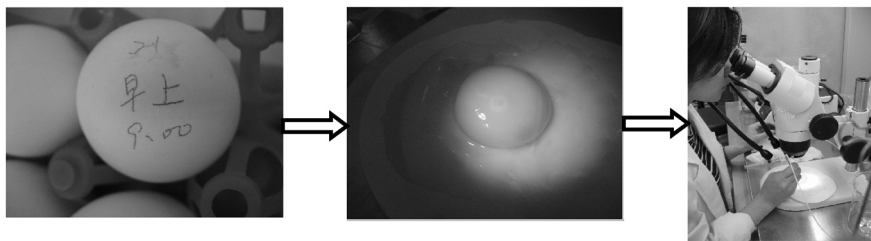


圖 1. 應用顯微操作法抽取孵化16 hr的原腸期雞胚。

Fig. 1. The gastrula stage chicken embryos were collected by micromanipulation from the White Leghorn chicken egg 16 h after incubation.

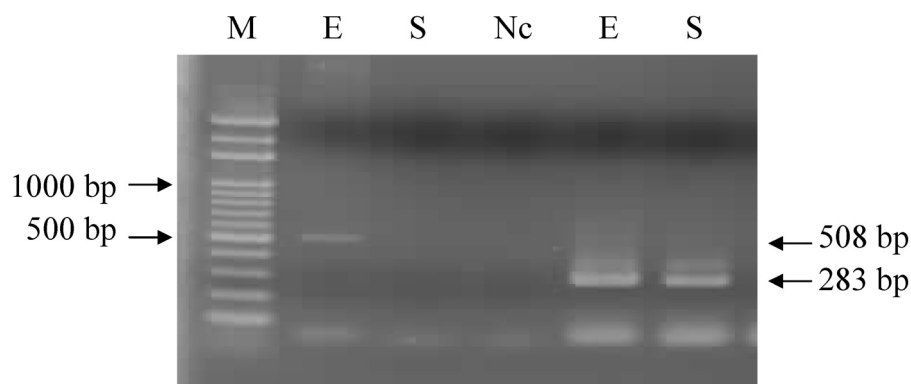


圖 2. 自原腸期雞胚 (E) 與體細胞 (S) cDNA 做為模板進行 PCR 擴增 TERT 及 *Gapdh* 基因片段的電泳分析。M 為 100 bp 標記，Nc 為陰性對照。

Fig. 2. Electrophoresis pattern of partial *Gapdh* and TERT PCR products amplified from gastrula stage embryos (E) and somatic cell (S) cDNA templates from the White Leghorn chicken. M: 100 bp ladder marker, Nc: negative control.

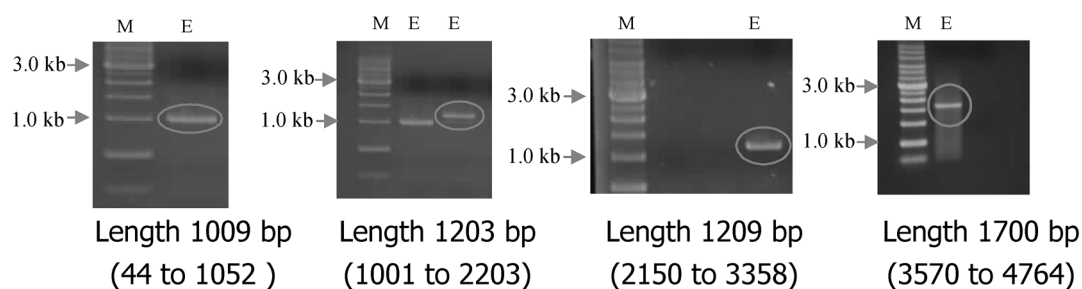


圖 3. 自白色來亨雞原腸期胚 (E) cDNA 進行 PCR 擴增的 TERT 基因前、中、後段基因產物之電泳圖。圖下方數字表示基因片段長度及自轉錄起始點開始的序列位置，M 為分子標記。

Fig. 3. Electrophoresis analysis of TERT PCR products amplified from gastrula stage embryos (E) in White Leghorn chicken. Numbers below figures indicated the fragment length and positions of gene fragments from the transcription start site. M: ladder marker.

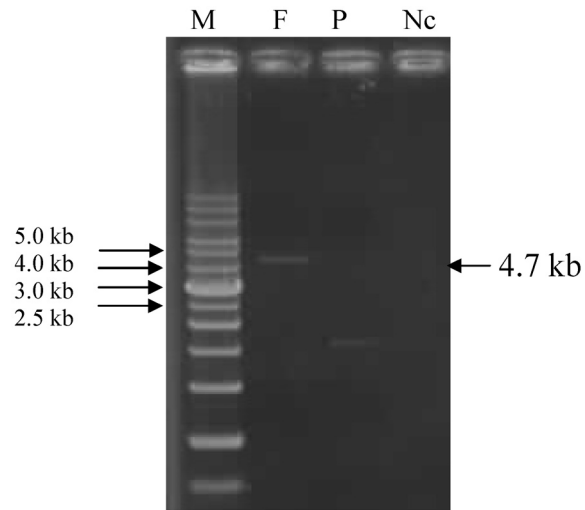


圖 4. 自白色來亨雞雞胚 cDNA 模板進行 PCR 所擴增之全長 TERT (F) 基因產物的電泳圖。

P 為對照用部份 TERT 片段產物，Nc 為負對照，M：分子標記。

Fig. 4. Full length (F) and partial (P) TERT gene products amplified from the cDNA template of gastrula stage embryos of the White Leghorn chicken. Lane Nc: negative control. Lane M: ladder marker.

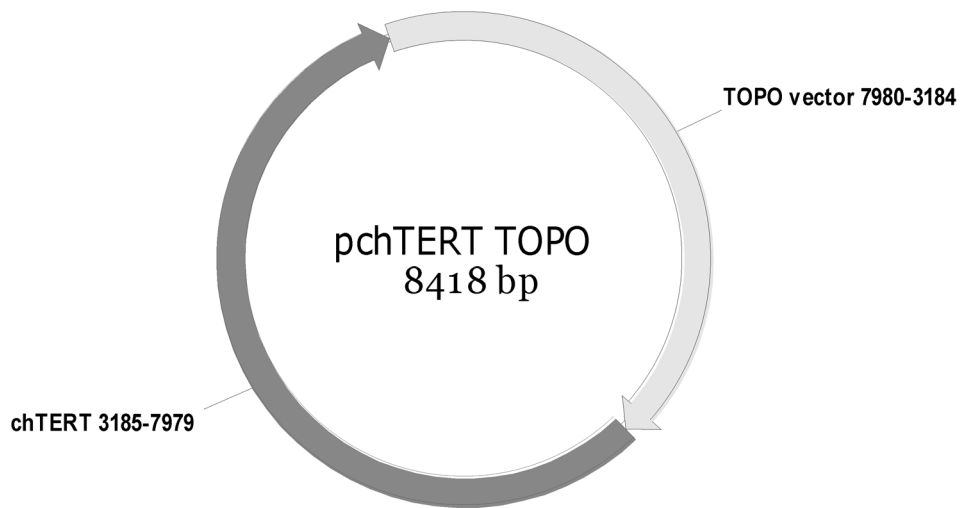


圖 5. 選殖在 TOPO 載體 (Invitrogen) 中之雞 TERT 基因圖譜

Fig. 5. The map of pchTERT cloned into the TOPO vector (Invitrogen).

WL-TERT	(51)	CCGCCAGTGTGATGGATATCTGCAGAAATTCGCCCTTGCTGCGTGCGGGGA
AY505015	(1)	-----GCCCGCTGCA—CGGCAGCGCTGCGTGCGGGGA
Consensus	(51)	C G C G A C G C GCTGCGTGCGGGGA
WL-TERT	(101)	TGGAGCGCGGGGCTCAGCCGGGAGTCGGCGTGCGGCGGCTCCGCAATGTA
AY505015	(32)	TGGAGCGCGGGGCTCAGCCGGGAGTCGGCGTGCGGCGGCTCCGCAATGTA
Consensus	(101)	TGGAGCGCGGGGCTCAGCCGGGAGTCGGCGTGCGGCGGCTCCGCAATGTA
WL-TERT	(151)	GCGCGGGAGGAGCCCTTCGCCGCGGTCTGGGCGCGCTGCGGGGCTGCTA
AY505015	(82)	GCGCGGGAGGAGCCCTTCGCCGCGGTCTGGGCGCGCTGCGGGGCTGCTA
Consensus	(151)	GCGCGGGAGGAGCCCTTCGCCGCGGTCTGGGCGCGCTGCGGGGCTGCTA
WL-TERT	(201)	CGCCGAGGCCACGCCGCTGGAGGCCTTCGTCCGGCGGGCTGCAGGAGGGTG
AY505015	(132)	CGCCGAGGCCACGCCGCTGGAGGCCTTCGTCCGGCGGGCTGCAGGAGGGTG
Consensus	(201)	CGCCGAGGCCACGCCGCTGGAGGCCTTCGTCCGGCGGGCTGCAGGAGGGTG
WL-TERT	(251)	GCACCGGGGAGGTCGAGGTGCTGCGAGGCGACGACGCTCAGTGCTACCGG
AY505015	(182)	GCACCGGGGAGGTCGAGGTGCTGCGAGGCGACGACGCTCAGTGCTACCGG
Consensus	(251)	GCACCGGGGAGGTCGAGGTGCTGCGAGGCGACGACGCTCAGTGCTACCGG
WL-TERT	(301)	ACCTTCGTGTCGCAGTGCGTGGTGTGCGTCCCCCGCGGGGCTCGCGCCAT
AY505015	(232)	ACCTTCGTGTCGCAGTGCGTGGTGTGCGTCCCCCGCGGTGCTCGCGCCAT
Consensus	(301)	ACCTTCGTGTCGCAGTGCGTGGTGTGCGTCCCCCGCGG GCTCGCGCCAT
WL-TERT	(743)	TTATTTTGTAGTAAGCTTCAACCCAATCCCACCCAACCTTGGCAGTGTCTT
AY505015	(4497)	TTATTTTGTAGTAAGCTTCAACCCAATCCCACCCAACCTTGGCATTGTCTT
Consensus	(4501)	TTATTTTGTAGTAAGCTTCAACCCAATCCCACCCAACCTTGGCA TGTC TT
WL-TERT	(793)	GAAATGCACTTATTGGTACAGGGAAAAGTGCATTTTCATGGCTGCGCCTAGC
AY505015	(4547)	GAAATGCACTTATTGGTACAGGGAAAAGTGCATTTTCATGGCTGCGCCTAGC
Consensus	(4551)	GAAATGCACTTATTGGTACAGGGAAAAGTGCATTTTCATGGCTGCGCCTAGC
WL-TERT	(843)	AAGATATGTGGGGTAAAGATTCTTTCACTTTGGAGAACACAGTCAAAAATT
AY505015	(4597)	AAGATATGTGGGGTAAAGATTCTTTCACTTTGGAGAACACAGTCAAAAATT
Consensus	(4601)	AAGATATGTGGGGTAAAGATTCTTTCACTTTGGAGAACACAGTCAAAAATT
WL-TERT	(893)	TGTATGCCAAATCTGGGTATGTTCAACATGTTTAATATATTCTGAGAGTT
AY505015	(4647)	TGTATGCCAAATCTGGGTATGTTCAACATGTTTAATATATTCTGAGAGTT
Consensus	(4651)	TGTATGCCAAATCTGGGTATGTTCAACATGTTTAATATATTCTGAGAGTT
WL-TERT	(943)	TACAGAGATGTACAGAACAATGGTGATGTATTTATAACTACAAAAACAAG
AY505015	(4697)	TACAGAGATGTACAGAACAATGGTGATGTATTTATAACTACAAAAACAAG
Consensus	(4701)	TACAGAGATGTACAGAACAATGGTGATGTATTTATAACTACAAAAACAAG
WL-TERT	(993)	GGGAACCAGAGTTATTGATTAGATAATAGAAAAGTAATCTGCTTGGTATA
AY505015	(4747)	GGGAACCAGAGTTATTGATTAGATAATAGAAAAGTAATCTGCTTGGTATA
Consensus	(4751)	GGGAACCAGAGTTATTGATTAGATAATAGAAAAGTAATCTGCTTGGTATA
WL-TERT	(1043)	TTTGCATTTCTGTTAAGGGCGAATTCAGGCCTGAATTCAGCACACTGG
AY505015	(4797)	TTTGCATTTCTGTTCCTT-----ATTAGGCT-----
Consensus	(4801)	TTTGCATTTCTGTT ATT AGGC

圖 6. 白色來亨雞TERT基因DNA序列經BLAST 比對後與 AY505015 序列具最高相似性 (99%)。

Fig. 6. BLAST analysis and alignment comparison of DNA sequence of the TERT gene cloned from the DNA sequences and BLAST analysis of TERT gene cloned from the White Leghorn chicken and AY505015 sequences (99%).

雞的 TERT 基因之 DNA 序列與胺基酸結構曾有學者加以研究 (Delany and Daniels, 2004)。本研究參考其選殖 TERT 方法與 DNA 序列，設計特異引子進行白色來亨雞的 TERT 基因選殖。由於雞的 TERT 基因長度達 4.7 kb，研究初期進行的PCR均難以順利擴增出全長的白色來亨雞基因產物，經不斷修正引子對的序列長度與影響 PCR 的各種重要反應條件，終於順利擴增選殖到全長的

TERT 基因產物。本研究選殖的 TERT 序列，經過 BLSAT 比對與 AY505015 序列除了部分單一核苷酸差異外，序列相似性達到 99%。雞 TERT 的 DNA 序列轉譯成為胺基酸序列後含 1,346 個胺基酸序列 (NP_001026178)。雞的 TERT 胺基酸序列雖與其他動物具有一定相似性，然而特別的是雞的基因 N-端含有一 298 胺基酸具有彈性連接子 (linker)，比人類長了 144 個胺基酸。而雞 TERT 的胺基酸序列與人類者比對相似性達 45% (Delany and Daniels, 2004; Delany *et al.*, 2003; Delany and Daniels, 2003)。有關其他脊椎動物 TERT 的研究與蛋白質結構亦有諸多學者探討 (Guo *et al.*, 2001; Kuramoto *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2000; Greenberg *et al.*, 1998; Nakamura *et al.*, 1997)。

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後分裂數次即進入增殖老化期 (Venkatesan and Price, 1998)；此與染色體末端的端粒結構短化及失去功能有密切關係，因為端粒可以保護染色體末端免於斷裂與融合 (Mathieu *et al.*, 2004)。雞的染色體端粒 DNA 較人類多 10 倍，端粒長度之維持有賴於端粒酶的作用，端粒酶負責將 TTAGGG 的序列添加到染色體的 3'-端 (Greider and Blackburn, 1985)。缺乏端粒酶的作用，將導致端粒短化及細胞老化 (Campisi, 2000)。其他動物的體細胞在體外培養條件下，可以應用異種間基因轉殖使恢復 TERT 活性而維持端粒長度；例如藉由人類的 TERT 基因轉殖與表現而活化端粒酶活性，使人、綿羊、兔子、牛與鹿等動物體細胞增加端粒長度並提升染色體穩定性，延長細胞壽命使成為不死細胞 (Cui *et al.*, 2003; Veitonmaki *et al.*, 2003; Zou *et al.*, 2002; Xiang *et al.*, 2000; Bodnar *et al.*, 1998)。然而，將人類的 TERT 基因轉殖到體外培養的家禽體細胞，卻未產生 TERT 的活性與作用而維持家禽體細胞的端粒長度 (Michailidis *et al.*, 2005)，顯見人類與家禽的 TERT 仍存在著未知的作用機制。目前雖然對家禽與其他動物間 TERT 作用或穩定端粒的分子機制差異性尚不完全了解，但選殖雞的 TERT 基因，應用於轉殖家禽之體外培養體細胞，或將可使其順利表現 TERT 的作用活性而獲得與轉殖人類 TERT 基因完全不同的結果。若能應用雞的 TERT 基因轉殖技術建立家禽體細胞及始基生殖細胞系的體外長期培養系統，將有利於家禽的端粒變化及細胞老化研究，提供可資參考的重要模式 (Swanberg and Delany, 2003)。

參考文獻

- Blackburn, E. H. 1991. Telomeres. *Trends Biochem. Sci.* 16:378-381.
- Blasco, M. A. 2002. Telomerase beyond telomeres. *Nat. Rev. Cancer* 2:627-633.
- Bodnar, A. G., M. Ouellette, M. Frolkis, S. E. Holt, C. P. Chiu, G. B. Morin, C. B. Harley, J. W. Shay, S. Lichtsteiner and W. E. Wright. 1998. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 279:349-352.
- Campisi, J. 2000. Cancer, aging and cellular senescence. *In Vivo* 14:183-188.
- Chen, J. L., M. A. Blasco and C. W. Greider. 2000. Secondary structure of vertebrate telomerase RNA. *Cell* 100:503-514.
- Cui, W., D. Wylie, S. Aslam, A. Dinnyes, T. King, I. Wilmut and A. J. Clark. 2003. Telomerase-immortalized sheep fibroblasts can be reprogrammed by nuclear transfer to undergo early development. *Biol. Reprod.* 69:15-21.
- Delany, M. E. and L. M. Daniels. 2003. The chicken telomerase RNA gene: conservation of sequence, regulatory elements and syntenicity among viral, avian and mammalian genomes. *Cytogenet. Genome Res.* 102:309-317.
- Delany, M. E., L. M. Daniels, S. E. Swanberg and H. A. Taylor. 2003. Telomeres in the chicken: chromosome ends and genome stability. *Poultry Sci.* 82:917-926.
- Delany, M. E. and L. M. Daniels. 2004. The chicken telomerase reverse transcriptase (chTERT): molecular and cytogenetic characterization with a comparative analysis. *Gene* 339:61-69.
- Faragher, R. G. and D. Kipling. 1998. How might replicative senescence contribute to human ageing? *Bioessays* 20:985-991.
- Forsyth, N. R., W. E. Wright and J. W. Shay. 2002. Telomerase and differentiation in multicellular organisms: turn it off, turn it on, and turn it off again. *Differentiation* 69:188-197.
- Greenberg, R. A., R. C. Allsopp, L. Chin, G. B. Morin and R. A. DePinho. 1998. Expression of mouse telomerase reverse transcriptase during development, differentiation and proliferation. *Oncogene* 16:1723-1730.
- Greider, C. W. and E. H. Blackburn. 1985. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in tetrahymena extracts. *Cell* 43:405-413.
- Guo, W., M. Okamoto, Y. M. Lee, M. A. Baluda and N. H. Park. 2001. Enhanced activity of cloned hamster TERT gene promoter in transformed cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1517:398-409.
- Harley, C. B., A. B. Futcher and C. W. Greider. 1990. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345:458-460.
- Harley, C. B., H. Vaziri, C. M. Counter and R. C. Allsopp. 1992. The telomere hypothesis of cellular aging. *Exp. Gerontol.* 127:375-382.
- Holt, S. E., S. E. Holt, J. W. Shay and W. E. Wright. 1996. Refining the telomere-telomerase hypothesis of aging and cancer. *Nat. Biotechnol.* 14:836-839.
- Kozik, A., E. M. Bradbury and A. Zalsensky. 1998. Increased telomere size in sperm cells of mammals with long terminal (TTAGGG)_n arrays. *Mol. Reprod. Dev.* 51:98-104.
- Mathieu, N., L. Pirzio, M. A. Freulet-Marriere, C. Desmaze and L. Sabatier. 2004. Telomeres and chromosomal instability. *Cell Mol. Life Sci.* 61:641-656.

- McEachern, M. J., A. Krauskopf and E. H. Blackburn. 2000. Telomeres and their control. *Annu. Rev. Genet.* 34:331-358.
- Michailidis, G., G. Saretzki and J. Hall. 2005. Endogenous and ectopic expression of telomere regulating genes in chicken embryonic fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 335:240-246.
- Morin, G. B. 1989. The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell* 59:521-529.
- Nakamura, T. M., G. B. Morin, K. B. Chapman, S. Weinrich, W. H. Andrews, J. Lingner, C. B. Harley and T. R. Cech. 1997. Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science* 277:955-959.
- Shay, J. W. and S. Bacchetti. 1997. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur. J. Cancer* 33:787-791.
- Swanberg, S. E. and M. E. Delany. 2003. Dynamics of telomere erosion in transformed and non-transformed avian cells in vitro. *Cytogenet. Genome Res.* 102:318-325.
- Taylor, H. A. and M. E. Delany. 2000. Ontogeny of telomerase in chicken: impact of downregulation on pre- and postnatal telomere length in vivo. *Dev. Growth Differ.* 42:613-621
- Veitonmaki, N., J. Fuxe, M. Hultdin, G. Roos, R. F. Pettersson and Y. Cao. 2003. immortalization of bovine capillary endothelial cells by hTERT alone involves inactivation of endogenous p16INK4A/ pRb. *Faseb J.* 17:764-766.
- Venkatesan, R.N. and C. Price. 1998. Telomerase expression in chickens: constitutive activity in somatic tissues and down-regulation in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:14763-14768.
- Xiang, H., J. Wang, Y.W. Mao and D.W. Li. 2000. hTERT can function with rabbit telomerase RNA: regulation of gene expression and attenuation of apoptosis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 278:503-510.
- Zou, Y., X. Yi, W. E. Wright and J. W. Shay. 2002. Human telomerase can immortalize Indian muntjac cells. *Exp. Cell Res.* 281:63-76.

Cloning and sequencing of telomerase reverse transcriptase (TERT) gene from White Leghorn chicken ⁽¹⁾

Jen-Wen Shiau⁽²⁾ Lih-Ching Tsai⁽²⁾ Ming-Jiuan Wu⁽³⁾
Jenn-Fa Liou⁽²⁾ Jui-Jane Tailiu⁽²⁾ Chein Tai⁽⁴⁾ and Lih-Ren Chen^{(2) (5)}

Received : Sept. 7, 2007 ; Accepted : Nov. 20, 2007

Abstract

The objective of this study was to clone and sequence the telomerase reverse transcriptase (chTERT) gene from the White Leghorn chicken. Gastrula stage embryos from the White Leghorn chicken were collected by micromanipulation and RNA was extracted using commercial kit and followed by RT-PCR. The primers specific for chTERT were designed and PCR performed to obtain full length chTERT cDNA. The PCR products were verified by agarose gels electrophoresis, and the correct fragments of 4.7 kb in length were extracted from the gel and TA-cloned into TOPO vectors. DNA sequencing and BLAST comparison were performed to identify chTERT sequences. The chTERT cloned in this study had the highest similarity (99%) to AY505015 sequence in NCBI GenBank. The TERT gene we cloned from the White Leghorn chicken could be used for somatic cells gene transfer in future studies.

Key words : White Leghorn chicken, Telomerase (TERT), Gene cloning.

(1) Contribution No. 1410 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Physiology Division, COA-LRI, Hsinhua, Tainan 712, Taiwan, R.O.C.

(3) Department of Biotechnology, Chia-Nan University of Pharmacy & Science, Tainan 71710, Taiwan, R.O.C.

(4) Southern Taiwan University, Tainan 71005, Taiwan, R.O.C.

(5) Corresponding author, E-mail: lrchen@mail.tlri.gov.tw