

# 白色來亨雞染色體第二型端粒分析<sup>(1)</sup>

蕭振文<sup>(2)</sup> 王佩華<sup>(3)</sup> 蔡麗卿<sup>(2)</sup> 王君今<sup>(2)</sup> 劉振發<sup>(2)</sup>  
劉瑞珍<sup>(2)</sup> 林義福<sup>(4)</sup> 戴謙<sup>(5)</sup> 陳立人<sup>(2)(6)</sup>

收件日期：98年2月 22日；接受日期：98年5月14日

## 摘要

本研究之旨在建立家禽染色體端粒 (telomere) 分析技術，同時進行不同性別白色來亨雞之第二型端粒長度分析，藉以了解禽類之端粒長度變化。試驗分別自不同月齡與性別之 5 隻白色來亨雞之翼下採集血樣，放入含抗凝血劑之微量離心管供萃取基因組 DNA。DNA 經純化後定量取 1-2  $\mu$ g，應用限制酶 *Hin* f1/*Rsa* I 進行切割作用後，進行膠體電泳與南方吸漬，再與 biotinylated Telomere Probe 探針進行雜交反應，最後應用化學冷光儀截取影像資料並計算出白色來亨雞之染色體端粒長度 (terminal restriction fragment, TRF)。分析結果顯示，3、6、12、24、30 及 44 月齡雌性白色來亨雞第二型端粒長度分別為  $18.58 \pm 0.66$ 、 $19.57 \pm 1.47$ 、 $19.08 \pm 0.97$ 、 $18.48 \pm 0.50$ 、 $19.15 \pm 0.68$  及  $18.92 \pm 1.05$  kb。相似月齡之雄性白色來亨雞第二型端粒長度則分別為  $19.52 \pm 0.63$ 、 $19.46 \pm 0.35$ 、 $19.18 \pm 1.01$ 、 $19.09 \pm 0.50$ 、 $19.05 \pm 0.41$  及  $19.27 \pm 0.91$  kb，結果顯示不同月齡及性別之白色來亨雞之染色體第二型端粒間並無顯著差異。本試驗建立的雞隻端粒技術可供其他家禽分析之重要參考。

關鍵詞：白色來亨雞、端粒長度、末端限制片段。

## 緒言

正常的體細胞在體外培養條件下，歷經數次至數十次細胞分裂後，即進入衰老期而不再分裂，原因在於染色體端粒 (telomere) 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

---

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 1513 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所生理組。

(3) 國立台灣大學動物科技系。

(4) 行政院農業委員會畜產試驗所產業組。

(5) 南台科技大學。

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

被稱為細胞的‘有絲分裂時鐘’ (mitotic clock) (Harley *et al.*, 1992; Holt *et al.*, 1996)。端粒具有保持不同動物細胞之染色體穩定、細胞活性及基因組完整性等重要功能。端粒長度與細胞壽命成反比，端粒變短將造成染色體容易纏黏、細胞異常並步入死亡。端粒不僅能保護 DNA 免於為外切酶所分解、維持染色體末端的穩定，也可預防 DNA 重組時之異常 (Blackburn, 1991)。端粒的短化，源自 DNA 聚合酶失去活性而無法進行線型 DNA 末端之複製。不同動物之間，端粒組成的變異極小；例如人類的端粒 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。

端粒-結合蛋白質可辨識短化的端粒並認定為斷裂之雙股 DNA，經由訊號傳遞而啟動腫瘤抑制因子 p53 與 p16/pRB，抑制衰老細胞之分裂能力而使細胞生長停滯 (McEachern *et al.*, 2000)。細胞若要避免生長受到抑制，可應用例如 SV40 病毒之 large T 抗原處理而使 p53 與 p16/pRB 失去作用，進而回復細胞的生長；惟此種生長回復仍然無法避免細胞因持續老化而使端粒變短，故細胞最終將步入第二次無法增殖階段 (non-proliferative stage)，此又稱為“端粒截斷” (telomere crisis)。此時細胞的生長難以突破端粒截斷的影響，除非細胞的端粒反轉錄酶能夠再度活化並產生功能。

目前，有關家禽端粒長度及端粒反轉錄酶的研究文獻不甚豐富。因此，本研究將建立雞的染色體端粒長度分析技術，並應用在不同月齡與性別白色來亨雞的分析，藉以建立基本資料並了解端粒長度的變化。

## 材料與方法

### I. 白色來亨雞血液樣品之收集與基因組 DNA 純化萃取

分別自 3、6、12、24、30 及 44 月齡不同性別的白色來亨雞採集 5 個血樣，置入已添加抗凝血劑 (EDTA) 之離心管，再利用套組 (Qiagen, GmbH, Germany) 並依照其操作步驟進行基因組 DNA 之萃取純化與定量。

### II. 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)，並按其步驟進行端粒限制片段長度 (Telomere Restriction Fragment, TRF) 測定。首先，將萃取的 1-2  $\mu$ g 基因組 DNA 經限制酶 *HinfI/RsaI* (4 U/ $\mu$ g 基因組 DNA) 在 37°C 作用 5-12 hr 後進行 0.7% 瓊脂糖膠體 (agarose gel) 傳統式電泳，條件為 5-7 V/cm，電泳時間為 5-8hr；而在本試驗之預備試驗中亦測試 Pulsed Field Gel Electrophoresis System (CHEF-DRII, Bio-Rad)，電泳條件 14 °C 進行 6 V/cm，電泳時間約 5 hr，而其 initial switch 時間設定為 7.5 sec；final switch 時間為 7.5sec。電泳後，膠體經變性 (denaturation)、中和 (neutralization) 處理、南方轉漬 (Southern blotting) 到帶正電荷之尼龍膜 (Roche Diagnostic, GmbH, Mannheim, Germany)。尼龍膜在 40 ml DIG Easy Hyb (Roche) 中進行 42°C、2 hr 的預雜交，再與 biotinylated Telomere Probe (Roche Molecular Biochemicals, USA) 進行 42°C、16 hr 的雜交反應。雜交後，尼龍膜在 50 ml 0.5× 洗滌液 (SSC, 1×SSC: 0.15 M NaCl, 0.015 M sodium citrate) 室溫清洗 3 次，每次 15 min。最後將尼龍膜取出以微波用膠膜包覆，放入卡匣內進行 X- 光片顯影，或直接將尼龍膜置入 LAS-3000 (Luminescent Image Analyzer, Fujifilm, Japan) 化學冷光影像系統截取影像，再按照端粒長度計算公式  $\Sigma (OD_i \times Li) / \Sigma (OD_i)$  計算平均的端粒長度 (TRF)；公式中  $OD_i$  代表訊號強度， $Li$  則代表每一電泳條帶中每一分析點內的端粒長度；計算長度範圍 3-50 kb 內的加總值。

### III. 統計分析

不同月齡白色來亨雞端粒長度 TRF 之分析，係應用 SAS 統計分析軟體（SAS Institute, 1999）進行統計分析，以 Tukey's honest significant difference 測定不同性別與月齡間 TRF 的差異顯著性，差異顯著水準為  $P < 0.05$ 。

## 結果與討論

本研究之主要目的在建立雞的第二型端粒分析技術，同時分析白色來亨雞之第二型端粒長度，藉以了解不同性別與月齡雞隻間之第二型端粒長度變化。試驗分別採集不同月齡與性別白色來亨雞之血樣，以套組萃取基因組 DNA 後再進行端粒長度測定。

為了建立較適之分析條件，在預備試驗中已先行測定影響端粒分析之重要因子，包括萃取之基因組 DNA 品質、限制酶作用時間、電泳條件及方式（pulse field 電泳儀與一般電泳儀）等。萃取之雞隻基因組 DNA 經限制酶  $37^{\circ}\text{C}$ ，16 小時切割，再以 pulse field 電泳系統進行分析，可能因限制酶作用時間過長而造成 DNA 過度切割現象，結果經南方吸漬與雜交反應後，呈現階梯般片段而造成端粒長度計算分析上的困難（圖 1）。經適度修正相關條件，包括限制酶作用時間調整為  $37^{\circ}\text{C}$  作用 5 hr、電泳條件調整為 75V 進行 5 hr 南方吸漬與探針濃度等條件，產生較佳的結果。但因為雜交後清洗嚴苛度不足，致使尼龍膜上仍殘留雜交後之非特異斑點（圖 2）。經進一步調整雜交後尼龍膜之清洗強度後，有效改善非特異之雜交訊號，得到較佳的端粒分析結果（圖 3）。

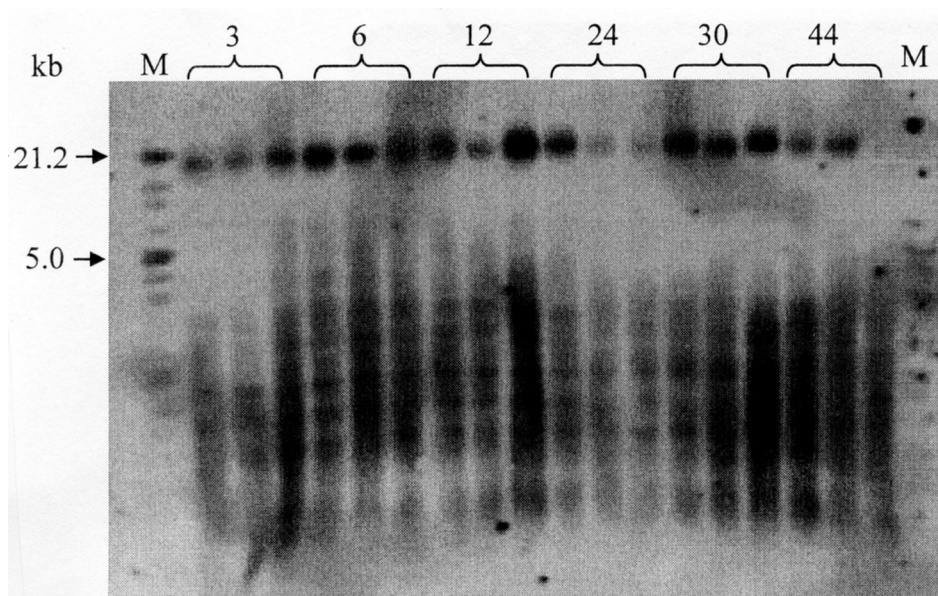


圖 1. 白色來亨雞雄性個體之第二型端粒長度分析。基因組 DNA 於  $37^{\circ}\text{C}$  經限制酶切割 16 小時後進行 pulse field 電泳分析，再進行南方吸漬及雜交反應。M 為分子量標記。

Fig. 1. Telomere length analysis of male White Leghorn chicken with different months of age. Genomic DNA from chicken was digested with restriction enzyme at  $37^{\circ}\text{C}$  for 16 hours and run on the pulse field electrophoresis before Southern blotting and hybridized with a probe. M: molecular weight markers.



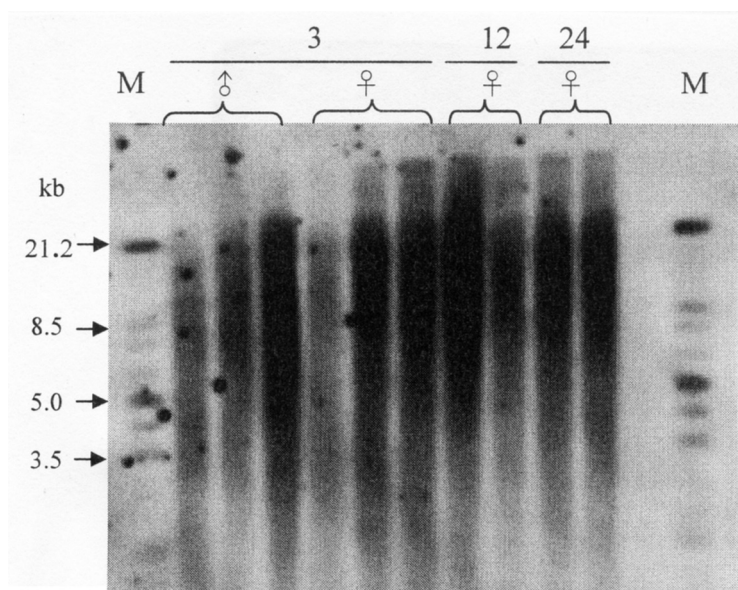


圖 2. 3月齡雄性與 3、12 與 24 月齡雌性白色來亨雞之第二型端粒長度分析圖譜。基因組 DNA 於 37°C 經限制酶切割 5 hr 後進行 75V 的電泳分析 5 hr、南方吸漬及雜交反應。圖上之數字代表雞隻月齡。M 為分子量標記。

Fig. 2. Telomere length analysis of male White Leghorn chicken at 3 months of age, female Leghorn chicken at 3, 12 and 24 months of age. Genomic DNA was digested with restriction enzyme at 37°C for 5 hr and run on electrophoresis at 75 V for 5 hr before Southern blotting and hybridized with a probe. M: molecular weight markers. Numbers above this figure were represented months of age of chickens.

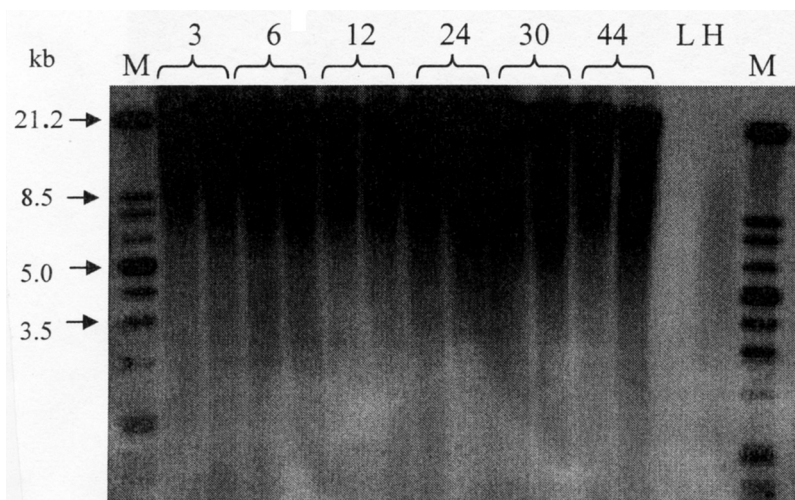


圖 3. 不同月齡雌性白色來亨雞之第二型端粒長度分析。基因組 DNA 於 37°C 經限制酶切割 5 hr 後進行 75V 的電泳分析 5 hr、南方吸漬及雜交反應。圖上之數字代表雞隻月齡。L 與 H 分別為 3.9 kb 與 10.2 kb 的低與高分子量對照。M 為分子量標記。

Fig. 3. Detection of telomere length in female White Leghorn chicken with different months of age. Genomic DNA was digested with restriction enzyme at 37°C for 5 hr and run on electrophoresis at 75 V for 5 hr, Southern blotting and hybridized with a probe. Numbers above this figure were represented months of age of chickens. L and H are represent 3.9 kb and 10.2 kb molecular weight control, respectively. M: molecular weight markers.

由預備試驗建立之限制酶作用時間及電泳條件等較適端粒條件後，分別自 3、6、12、24、30 及 44 月齡之 5 隻不同性別白色來亨雞採集血液樣品，供萃取基因組 DNA，再應用套組分析其端粒長度。分析結果顯示，3、6、12、24、30 及 44 月齡雌性白色來亨雞第二型端粒長度分別為  $18.58 \pm 0.66$ 、 $19.57 \pm 1.47$ 、 $19.08 \pm 0.97$ 、 $18.48 \pm 0.50$ 、 $19.15 \pm 0.68$  及  $18.92 \pm 1.05$  kb。3、6、12、24、30 及 44 月齡雄性白色來亨雞第二型端粒長度則分別為  $19.52 \pm 0.63$ 、 $19.46 \pm 0.35$ 、 $19.18 \pm 1.01$ 、 $19.09 \pm 0.50$ 、 $19.05 \pm 0.41$  及  $19.27 \pm 0.91$  kb（表 1）。結果顯示不同月齡及不同性別白色來亨雞間之染色體第二型端粒並無顯著差異。

表 1. 不同月齡與性別之白色來亨雞的第二型端粒長度分析

Table 1. Telomere length analysis of White Leghorn chicken with different months of age and sex

Sex	Age (months)	Number of chickens	Telomere length (kb)
Female	3	5	$18.58 \pm 0.66$
	6	5	$19.57 \pm 1.47$
	12	5	$19.08 \pm 0.97$
	24	5	$18.48 \pm 0.50$
	30	5	$19.15 \pm 0.68$
	44	5	$18.92 \pm 1.05$
Male	3	5	$19.52 \pm 0.63$
	6	5	$19.46 \pm 0.35$
	12	5	$19.18 \pm 1.01$
	24	5	$19.09 \pm 0.50$
	30	5	$19.05 \pm 0.41$
	44	5	$19.27 \pm 0.91$

No significantly different were observed between sex and ages at 5% level.

在 1978 年，Blackburn 與 Gall 突破性發表單細胞生物 *Tetrahymena* 的端粒 DNA 序列（Blackburn and Gall, 1978），此一結果顯示端粒是由複雜的核蛋白結構所組成，其特性是由演化過程所保留下來的連續性重複 DNA 序列（tandem repeat）（哺乳動物之序列為 5'-TTAGGG-3'/3'-AATCCC-5'），再結合許多端粒結合蛋白所構成（Fang and Cech, 1995; Henderson, 1995; Stavenhagen and Zakian, 1998）。

端粒長度之測定，可應用端粒限制片段長度（Telomere Restriction Fragment, TRF）分析，應用限制酶儘可能的對端粒進行切割。不同染色體間或染色體內的端粒排列，會伴隨著細胞間的變異而產生差異，大小重疊的端粒在南方轉漬時呈現 Smear 的型態。端粒長度之表示是以平均大小或範圍來說明。不同生物間的端粒長度不同，例如酵母菌（*Saccharomyces cerevisiae*）端粒長度約 300-400 bp（Zakian, 1995）、實驗小鼠（*Mus musculus*）約 50-200 kb（Kipling and Cooke, 1990）、人類（*Homo sapiens*）約 25-55 kb（Harley *et al.*, 1990）、牛（*Bos taurus*）約 15 kb 而豬（*Sus scrofa*）約短於 18 kb（Kozik *et al.*, 1998）。

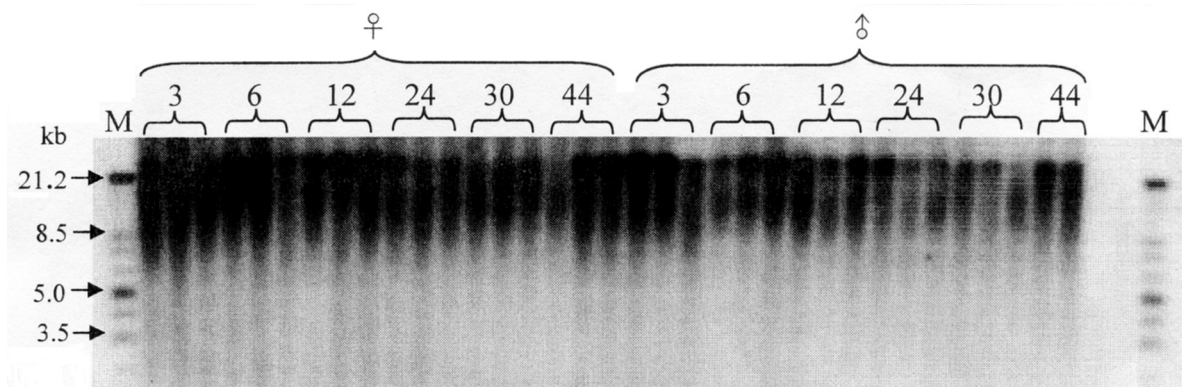


圖 4. 不同月齡與性別白色來亨雞之第二型端粒長度圖譜。圖上方數字為雞之月齡。基因組 DNA 於 37°C 經限制酶切割 5 hrs 後進行切割後進行 75V 的電泳分析 5 hrs、南方吸漬及雜合反應。圖上之數字代表雞隻月齡。M 為分子量標記。

Fig. 4. Telomere length of White Leghorn chicken with different months of age and sex. The number above the figure are months of age of chicken. Genomic DNA was digested with restriction enzyme at 37°C for 5 hr and run on electrophoresis at 75 V for 5 hr, Southern blotting and hybridized with a probe. M: molecular weight markers.

Venkatesan and Price (1998) 分析雞的組織與細胞之端粒酶活性，同時應用南方吸漬雜交法，以 (T<sub>2</sub>AG<sub>3</sub>)<sub>4</sub> 探針分析源自雞胚之成纖維細胞的端粒長度，結果發現存在著一連串抗 -Bal 31 限制酶的條帶而使特異性的 smear 端粒限制片段解析度受到影響，此結果顯示抗 -Bal 31 限制酶片段序列可能源自雞隻部份染色體可以見到之豐富間隙 (interstitial) 端粒。雞的基因組 DNA 應用不同限制酶切割會造成條帶態樣之些微差異，但仍無法改善受影響之 smear 端粒限制片段的解析度。應用 pulsed field 膠體電泳進行分析，配合限制酶 *Hin* *fl* + *Alu* *I* 進行切割，產生 < 50 kb 的較大大片段，然大部分的片段均低於 25 kb。若應用非變性膠體並配合末端標定之 (C<sub>3</sub>TA<sub>2</sub>)<sub>4</sub> 探針進行分析，可避免探針與間隙端粒進行雜交反應，確認了由雞的紅血球萃取之基因組 DNA 的端粒長度介於 8-20 kb 之間。而隨著細胞繼代次數之增加，會使其端粒長度減少約 60 bp/ 每次細胞數目加倍 (Venkatesan and Price, 1998)。

雞是屬於較高等之脊椎動物，具有較緊密的基因組結構、無數的微染色體及較高之重組率 (Delany *et al.*, 2003)。Delany *et al.* (2000) 進行一系列的研究以解析雞端粒調控之分子機制，包括長度、排列方式及位置等，認為雞的端粒長度在 0.5 到 2 Mb 間。TTAGGG 序列的總百分比相當高，約佔雙套雞基因組的 3 到 4%，而人類之總百分比僅佔 0.3%，顯著較雞為低。雞的雙套基因組的大小約為人類基因組的 1/3 (2.5 pg vs. 6.5 pg)，含有顯著較多的端粒 DNA 序列。雞的基因組似缺乏 degenerate telomeric sequence (Delany *et al.*, 2000)。然而在人類，最接近末端的端粒排列是由具變異性之 degenerate 重複序列組成 (Allshire *et al.*, 1989)。依據端粒大小、在染色體上的位置、南方吸漬後態樣及年齡相關的穩定性，雞具有 3 種不同型式的端粒 (Delany *et al.*, 2000)。雞與人的染色體最大差異在於雞之端粒 DNA 較人類的基因組多達 10 倍。雞的基因組端粒 DNA 依結構與長度不同可區分為 I、II 與 III 型，長度介於 0.5~2 Mb 之間。第一型端粒 DNA 又稱為間隙端粒序列，位於染色體內而非位於染色體末端，長約 0.5~10 kb，此型端粒之特性是不



會被限制酶 *Bal* 31 所切割，在南方吸漬雜交後之態樣呈現不連續的環帶型式，此型端粒與老化之端粒短化沒有關係。第二型端粒 DNA 長約 10~35/40 kb，在南方吸漬雜交後態樣是呈現獨特的模糊型式，顯現端粒按大小而重疊排列，而證據顯示此型端粒之短化與細胞及年齡老化具有相關性 (Delany *et al.*, 2000; Taylor and Delany, 2000)。第三型端粒長 40 kb ~< 2 Mb，位於染色體末端並能被限制酶 *Bal* 31 迅速切割，其南方吸漬雜交後之態樣呈現不連續的環帶型式，具有高度的變異多態性 (Delany *et al.*, 2003)。

調控雞隻端粒長度的端粒酶活性在早期胚胎期較高，爾後在孵化後期或孵化後之大多數體組織會下降，而具有更新能力的組織例如性腺及免疫器官則仍具高水準的端粒酶活性，甚至到了 4-5 歲成熟期亦然。在體外培養條件下，細胞除非經歷轉型作用而保留端粒酶活性，否則雞細胞中端粒酶的表現量會降低。了解雞的端粒長度及其調控作用等生物學知識，將有助於應用雞隻進行體外或體內細胞培養及老化的研究之用。雞之第二型端粒經評估約每經過一次細胞分裂即短少約 160 bp (Delany *et al.*, 2000)。而源自雞胚或成體器官的細胞則可能短少 600 bp/年 (Taylor and Delany, 2000)。因此，推估雞若達到可能之最大壽命 20 歲，其端粒應會顯著變短。與雞隻比較，許多鳥類相當長壽，可達到 60-70 歲。如果依據雞隻端粒的短化速率，60 歲的鳥類若持續進行細胞分裂且欠缺端粒酶的活性，其端粒可能會減短掉 36 kb。Haussman and Vleck (2002) 研究斑胸草雀 (zebrafinches) 的端粒發現每年約短化 500 bp。

雞的基因組約含有 3-4% 的大量端粒 DNA。約較人類者多 10 倍，但卻不含 degenerate telomeric DNA (Delany *et al.*, 2000)。在活體內，雞體組織中端粒的短化與老化有關 (Taylor and Delany, 2000)。了解家禽端粒組成及端粒酶之功能，對於目前及未來應用包括構築人工染色體，供活體內或活體外之應用 (重新生成端粒、端粒植入或截斷)，轉染外源端粒酶基因，或經由修飾端粒結合蛋白以研究活體內細胞老化的修飾與致癌作用、活體外細胞老化或永生。具永生之非轉型雞細胞株可以克服端粒短化所造成的不穩定，較初代培養細胞有較長壽命，此類細胞相當具有價值。

未來，應用雞的體細胞進行複製目的的研究，應整合活體內或活體外有關雞端粒短化的知識。因為端粒短化的恢復作用，在不同動物種別間具有差異，例如體細胞複製綿羊觀察到的端粒短化，在牛則有完全不同的結果 (Shiels *et al.*, 1999; Lanza *et al.*, 2000)。動物的端粒排列特性及調控訊息，對於目前或未來雞及其細胞在生物科技上的應用皆具有相關性。

Nanda and Schmid (1994) 及 Solovei *et al.* (1994) 應用螢光原位雜交 (Fluorescence *in situ* hybridization, FISH) 技術分析減數分裂及有絲分裂時的雞隻染色體，發現雞的 78 條染色體中含有末端及間隙端粒序列。在巨大染色體 (macrochromosome) 之末端 (Ladjali-Mohammed *et al.*, 1999)、間隙區域與接近著絲點 (centromere-proximal) 的位置均含有 TTAGGG 的重複序列。應用端粒 -FISH 分析，可觀察到部份微染色體整個呈現螢光訊號 (Nanda and Schmid, 1994)。而雞的染色體端粒長度分析亦呈現不同的結果。Bloom *et al.* (1993) 曾報導雞的端粒介於 250 kb 至 2.2 Mb; Lejnine *et al.* (1995) 的研究顯示雞的端粒介於 3 至 100 kb。Venkatesan and Price (1998) 指出雞的端粒介於 8 至 20 kb。而在端粒之末端，單鏈的 3' 端會存在不同長度的突出 (Griffith *et al.*, 1999)。而本研究發現，不同年齡雄性白色來亨雞的端粒長度介於 18.48 至 19.57 kb 之間，而不同年齡雌性白色來亨雞的端粒長度介於 19.05 至 19.52 kb 之間，經統計分析後並未呈現顯著差異。目前哺乳動物的端粒結構是由雙股端粒 DNA 形成一個大的雙股環 (t-loop)，如同單股 3' 由富含 G 序列形成置換的 D-loop (Griffith *et al.*, 1999)。而 TTAGGG 端粒重複序列會結合 TRF1、TRF2 因子與其他蛋白質而調控端粒 DNA (Bilaudi *et al.*, 1997; Broccoli *et al.*, 1997; van Steensel and de Lange, 1997)。端粒除了提供染色體末端之擴增外，也可經由其特殊構型而保護染色體末端使免於遭分解或融合 (Griffith *et al.*, 1999)。在脊椎動物，除了位於染色體末端的端粒序列外，

染色體也存在著次端粒序列 (subtelomeric) 與間隙端粒序列 (Meyne *et al.*, 1990; De La Sena *et al.*, 1995)。

由於端粒的結構與功能對於調控基因組的穩定性、細胞之老化與癌化等均有值得研究之處。在不同動物的細胞中對於保持染色體的穩定性、細胞活性及基因組的完整具有重要功能。端粒 DNA 的短化，源自 DNA 聚合酶失去作用而無法複製線型 DNA 的末端。細胞克服末端增殖問題之機制，因發現端粒酶而獲解決 (Greider and Blackburn, 1985)。端粒酶藉由添加重複端粒序列 (6 到 26 個核苷酸而延長 DNA 鏈的 3' 末端 (Greider and Blackburn, 1989; Yu *et al.*, 1990)。端粒酶是一種核糖核蛋白質 (ribonucleoprotein) 反轉錄酶，由重複序列 (tandem repeat, TR) 與具有 TERT 活性的蛋白質二個次單位所組成。TR 的 RNA 普遍存在動物細胞中，但僅含有 TERT 的細胞才具有端粒酶活性 (Morin, 1989)。端粒酶藉由合成新的端粒 DNA 而維持受損短化的端粒。端粒酶只表現在永生的細胞株、癌細胞 (Shay and Bacchetti, 1997)、生殖細胞 (Kozik *et al.*, 1998) 或再生的組織中 (Forsyth *et al.*, 2002)，而不表現在皮膚、腸道或血中幹細胞以外的正常體細胞。因此端粒酶的表現與細胞的永生或癌化有密切關聯。此外，端粒酶的活性受到多重機制的調控。端粒的調節除了端粒酶直接作用外，端粒結合蛋白質也扮演重要角色，例如 TRF1 與 TRF2 會結合 TTAGGG 重複序列，並協同其他調控端粒 DNA 的蛋白質，對端粒產生調控作用 (de Lange, 2002)。

Chen *et al.* (2000) 比較 35 種 TR (包括雞長 465 bp 之 TR 基因)。發現所有脊椎動物發展出一種包括 4 個構造保留區的一致性二級結構。包括人、小鼠、酵母菌、纖毛蟲及阿拉伯芥 (*Arabidopsis*) 之 TERT 已經被選殖 (Meyerson *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2000)。人的 TERT 基因約 35 kb，由 16 個小 exons 組成與反轉錄酶區具許多高度之相似性 (Xiang *et al.*, 2000)。由於端粒長度與細胞老化有密切關係，很多研究藉由比較體細胞核轉殖法所生產的複製動物與正常動物的端粒長度，了解這些動物間的端粒差異，同時了解供核體細胞能否有效進行端粒回復作用 (Betts *et al.*, 2001; Miyashita *et al.*, 2002; Tamada and Kikyo, 2004)。

本研究建立雞染色體端粒分析技術，同時進行不同性別與年齡白色來亨雞之第二型端粒長度分析，藉以了解禽類之端粒長度變化。結果發現不同性別與月齡雞隻之端粒長度並沒有差異。此結果與部份文獻所示的端粒長度變化範圍近似，卻與部份文獻所示之第二型端粒會因細胞老化而短化的結果稍有差異，究其可能的因素在於分析方法的限制或造血系統之血液細胞具有自我更新能力，所以雖採自較年老雞隻的血液，其端粒並不一定較年青雞隻的血液細胞要老化，此在文獻中亦曾提及並比較 (Delany *et al.*, 2003)。本研究結果及建立之分析技術將可做為家禽或其他動物端粒長度分析之重要參考。

## 誌謝

感謝生理組與產業組三股之同仁協助進行雞隻樣品採集，特致謝忱。

## 參考文獻

- Allshire, R. C., M. Dempster and N. D. Hastie. 1989. Human telomeres contain at least three types of G-rich repeat distributed non-randomly. *Nucl. Acids Res.* 17:4611-4627.
- Betts, D., V. Bordignon, J. Hill, Q. Winger, M. Westhusin, L. Smith and W. King. 2001. Reprogramming of telomerase activity and rebuilding of telomere length in cloned cattle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*



98:1077-1082.

- Bilaudi, T., C. Brun, K. Ancelin, C. E. Koering, T. Laroche and E. Gilson. 1997. Telomeric localization of TRF2, a novel human telobox protein. *Nat. Genet.* 237:236-239.
- Blackburn, E. and J. Gall. 1978. A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*. *J. Mol. Biol.* 20:33-53.
- Blackburn, E. H. 1991. Telomeres. *Trends Biochem. Sci.* 16:378-381.
- Blasco, M. A. 2002. Telomerase beyond telomeres. *Nat. Rev. Cancer* 2:627-633.
- Bloom, S. E., M. E. Delany and D. M. Muscarella. 1993. Constant and variable features of avian chromosomes. *Manipulation of the Avian Genome*. R. J. Etches and A. M. Verrinder Gibbins, ed. CRC Press Inc., pp 39-59.
- Broccoli, D., A. Smogorzewska, L. Chong and T. de Lange. 1997. Human telomeres contain two distinct Myb-related proteins, TRF1 and TRF2. *Nat. Genet.* 17:231-235.
- Chen, J. L., M. A. Blasco and C. W. Greider. 2000. Secondary structure of vertebrate telomerase RNA. *Cell* 100:503-514.
- Delany, M. E., A. B. Krupkin and M. M. Miller, 2000. Organization of telomere sequences in birds: evidence for arrays of extreme length and for *in vivo* shortening. *Cytogenet. Cell Genet.* 90:139-145.
- 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.
- de Lange, T. 2002. Protection of mammalian telomeres. *Oncogene* 21:532-540.
- De La Sena, C., B. P. Chowdhary and I. Gustavsson. 1995. Localization of the telomeric (TTAGGG)<sub>n</sub> sequences in chromosomes of some domestic animals by fluorescence *in situ* hybridization. *Hereditas* 123:269-274.
- Fang, G. and T. R. Cech. 1995. Telomere proteins in Telomeres. E. H. Blackburn and C. W. Greider, ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. Pp. 69-105
- 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.
- Greider, C. W. and E. H. Blackburn. 1985. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell* 43:405-413.
- Greider, C. W. and E. H. Blackburn. 1989. A telomeric sequence in the RNA of *Tetrahymena* telomerase is required for telomere repeat synthesis. *Nature* 337:331-337.
- Griffith, J. D., L. Comeau, S. Rosenfield, R. M. Stansel, A. Bianchi, H. Moss and T. de Lange. 1999. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* 97:503-514.
- 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.

- Hausmann, M. F. and C. M. Vleck. 2002. Telomere length provides a new technique for aging animals. *Oecologia* 130:325-328.
- Henderson, E. 1995. Telomere DNA structure. *Telomeres*. E. H. Blackburn and C. W. Greider, ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. Pp 11-34.
- 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.
- Kipling, D. and H. J. Cooke. 1990. Hypervariable ultra-long telomeres in mice. *Nature* 347:400-402.
- Kozik, A., E. M. Bradbury and A. Zalensky. 1998. Increased telomere size in sperm cells of mammals with long terminal (TTAGGG)<sub>n</sub> arrays. *Mol. Reprod. Dev.* 51:98-104.
- Ladjali-Mohammed, K., J. J. Bitgood, M. Tixier-Boichard and F. A. Ponce de Leon. 1999. International System for Standardized Avian Karyotypes (ISSAK): Standardized banded karyotypes of the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Cytogenet. Cell Genet.* 86:271-276.
- Lanza, R. P., J. B. Cibelli, C. Blackwell, V. J. Cristofalo, M. K. Francis, G. M. Baerlocher, J. Mak, M. Schertzer, E. A. Chavez, N. Sawyer, P. M. Lansdorp and M. D. West. 2000. Extension of cell life-span and telomere length in animals cloned from senescent somatic cells. *Science* 288:665-660.
- Lejnine, S., L. Vladimir and J. P. Langmore. 1995. Conserved nucleoprotein structure at the ends of vertebrate and invertebrate chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:2393-2397.
- McEachern, M. J., A. Krauskopf and E. H. Blackburn. 2000. Telomeres and their control. *Annu. Rev. Genet.* 34:331-358.
- Meyne, J., R. J. Baker, H. H. Hobart, T. C. Hsu, O. A. Ryder, O. G. Ward, J. E. Wiley, D. H. Wurster-Hill, T. L. Yates and R. K. Moyzis. 1990. Distribution of non-telomeric sites of the (TTAGGG)<sub>n</sub> telomeric sequence in vertebrate chromosomes. *Chromosoma* 99:3-10.
- Miyashita, N., K. Shiga, M. Yonai, K. Kaneyama, S. Kobayashi, T. Kojima, Y. Goto, M. Kishi, H. Aso, T. Suzuki, M. Sakaguchi and T. Nagai. 2002. Remarkable differences in telomere lengths among cloned cattle derived from different cell types. *Biol. Reprod.* 66:1649-1655.
- Morin, G. B. 1989. The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell* 59:521-529.
- Nanda, I. and M. Schmid. 1994. Localization of the telomeric (TTAGGG)<sub>n</sub> sequence in chicken (*Gallus domesticus*) chromosomes. *Cytogenet. Cell Genet.* 65:190-193.
- 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.
- Shay, J. W. and S. Bacchetti. 1997. A survey of telomerase activity in human cancer.
- Shiels, P. G., A. J. Kind, K. H. Campbell, D. Waddington, I. Wilmut, A. Colman and A. E. Schnieke. 1999. Analysis of telomere lengths in cloned sheep. *Nature* 399:316-317.
- Solovei, I., E. R. Gaginikaya and H. C. Macgregor. 1994. The arrangement and transcription of telomere DNA sequences at the ends of lampbrush chromosomes of birds. *Chromosome Res.* 2:460-470.
- Stavenhagen, J. B. and V. A. Zakian. 1998. Yeast telomeres exert a position effect on recombination between internal tracts of yeast telomeric DNA. *Genes Dev.* 12:3044-3058.
- Tamada, H. and N. Kikyo. 2004. Nuclear reprogramming in mammalian somatic cell nuclear cloning. *Cytogenet. Genome Res.* 105:285-291.
- 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.

- van Steensel, B. and T. de Lange. 1997. Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1. *Nature* 385:740-743.
- 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.
- Yu, G. L., J. D. Bradley, L. D. Attardi and E. H. Blackburn. 1990. In vivo alteration of telomere sequences and senescence caused by mutated *Tetrahymena* telomerase RNAs. *Nature* 344:126-132.
- Zakian, V. A. 1995. *Saccharomyces* Telomeres: function, structure, and replication. in *Telomeres*. E. H. Blackburn and C. W. Greider, ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. Pp. 107-137.



## Type II telomere length analysis for White Leghorn chicken <sup>(1)</sup>

Jen-Wen Shiau<sup>(2)</sup> Pei-Hwa Wang<sup>(3)</sup> Lee-Ching Tsai<sup>(2)</sup>

Chun-Chin Wang<sup>(2)</sup> Jenn-Fa Liu<sup>(2)</sup> Jui-Jane Liu<sup>(2)</sup>

Yih-Fwu Lin<sup>(4)</sup> Chein Tai<sup>(5)</sup> and Lih-Ren Chen<sup>(2)(6)</sup>

Received : Feb. 22, 2009 ; Accepted : May 14, 2009

### Abstract

The purpose of this study was to establish the telomere analysis technique and to determine the telomere length of White Leghorn chickens at different age so as to better understand the variance and regulation of telomere in chicken. Blood samples from both sexes of chicken at different ages were collected and purified by commercial kits. After purification, the genomic DNA was quantified, digested with restriction enzyme *HinfI/RsaI*, subjected to southern blotting and hybridized with the biotinylated telomere probe. The results showed that the telomere length of female White Leghorn chicken at 3, 6, 12, 24, 30 and 44 months of age were  $18.58 \pm 0.66$ ,  $19.57 \pm 1.47$ ,  $19.08 \pm 0.97$ ,  $18.48 \pm 0.50$ ,  $19.15 \pm 0.68$  and  $18.92 \pm 1.05$  kb, respectively. The telomere length of male White Leghorn chicken at 3, 6, 12, 24, 30 and 44 months of age were  $19.52 \pm 0.63$ ,  $19.46 \pm 0.35$ ,  $19.18 \pm 1.01$ ,  $19.09 \pm 0.50$ ,  $19.05 \pm 0.41$  and  $19.27 \pm 0.91$  kb, respectively. The results showed that there was no significant difference in TRF between male and female White Leghorn chickens at different ages.

Key words : White Leghorn chicken, Telomere length, Terminal restriction fragment (TRF).

---

(1) Contribution No.1513 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

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

(3) Department of Animal Science and Technology, National Taiwan University, Taipei 106, Taiwan, R.O.C.

(4) Animal Industry Division, COA-LRI, Hsinhua, Tainan 712, Taiwan, R.O.C.

(5) Southern Taiwan University, Tainan 712, Taiwan, R.O.C.

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