

體細胞核轉殖乳山羊的端粒長度分析⁽¹⁾

蕭振文⁽²⁾ 蔡麗卿⁽²⁾ 王君今⁽²⁾ 陳裕信⁽²⁾ 曲鳳翔⁽²⁾
劉振發⁽²⁾ 黃政齊⁽³⁾ 林正鏞⁽⁴⁾ 戴謙⁽⁵⁾ 陳立人⁽²⁾⁽⁶⁾

收件日期：98年3月23日；接受日期：98年8月13日

摘要

本研究主要目的在分析比較畜產試驗所應用體細胞核轉置 (somatic cell nuclear transfer, SCNT) 技術生產的 3 頭阿爾拜因複製山羊與同年齡同性別非複製乳山羊的端粒 (telomere) 長度，藉以了解 SCNT 對於阿爾拜因複製山羊之端粒長度的影響。試驗分別自 3 頭複製羊於不同月齡時採集全血經離心分離並收集白血球供萃取基因組 DNA，再應用套組完成端粒長度 (terminal restriction fragment, TRF) 分析。結果顯示，3 頭複製羊於不同月齡之端粒長度均顯著地 ($P < 0.05$) 比同月齡同性別之非複製對照山羊為短。

關鍵詞：體細胞核轉置、端粒長度、山羊。

緒言

細胞核轉置 (nuclear transplantation, NT) 技術的概念始於 1938 年，首次將細胞核轉置成功應用於細胞複製動物的紀錄是兩棲類的研究 (Briggs and King, 1952)。1997 年，利用取自 6 歲母綿羊的乳腺上皮細胞為供核源，進行核轉置而獲得「桃莉」羊，首創哺乳動物成體體細胞核轉置 (somatic cell nuclear transfer, SCNT) 的成功首例 (Wilmut *et al.*, 1997)。迄今，應用取自胎體或各種成體體細胞進行 SCNT 而成功複製的動物，包括綿羊 (Willadsen, 1986)、牛 (Prather *et al.*, 1987)、小鼠 (Tamada and Kikyo, 2004)、山羊 (Zou *et al.*, 2001)、豬 (Prather *et al.*, 1989)、野牛、大鼠 (Ausmess *et al.*, 2003)、貓 (Shin *et al.*, 2002)、兔子 (Stice and Robl, 1988)、驢 (Lee *et al.*, 2005)、馬 (Galli *et al.*, 2003)、狗 (Lee *et al.*, 2005)、狼 (Kim *et al.*, 2007) 與駱駝 (Khatir and Anouassi, 2008)。

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 1527 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所生理組。

(3) 行政院農業委員會畜產試驗所恆春分所。

(4) 行政院農業委員會畜產試驗所花蓮種畜繁殖場。

(5) 南台科技大學。

(6) 通訊作者，lrchen@mail.tlri.gov.tw。

複製技術之應用，可以擴大遺傳背景一致的高性能優良種畜、復育與保種高度瀕臨絕種動物及基因轉置家畜的生產；同時對於關鍵生物技術、基礎研究與組織再生的研究也具重要潛力（Campbell, 2002; Prather *et al.*, 1999）。

進行體細胞核轉置時供核細胞置入已去核之卵子，會經歷染色質重組、DNA 甲基化、基因組銘印效應（imprinting）、染色體端粒（telomere）長度回復、組蛋白（histone）修飾作用、上位遺傳的（epigenetic）傳承及 X- 染色體去活性等過程。正常之體細胞壽命有限，在歷經多次分裂後細胞即進入衰老期；引起細胞衰老的主要因素與染色體的端粒變短有關係（Faragher and Kipling, 1998）。端粒位於染色體末端，由短小的重複 DNA 序列組成（McEachern *et al.*, 2000; Blasco, 2002）。至今，許多動物的端粒已研究，資料顯示不同物種間的端粒變異極小，甚至演化上歧異度極大的物種亦然；例如單細胞生物四膜蟲（*Tetrahymena*）的端粒 DNA 序列為 TTGGGG，而人類之端粒 DNA 序列為 TTAGGG。端粒隨著細胞分裂次數增加而逐漸縮短，又被稱為細胞的「有絲分裂時鐘（mitotic clock）」（Harley *et al.*, 1990; Kozik *et al.*, 1998）。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，端粒變短將使染色體纏黏並使細胞發生異常死亡。第一隻 SCNT「桃莉」羊的出生成為大眾關注之焦點，除開啟 SCNT 複製動物的研究熱潮外，也讓 SCNT 動物的老化與端粒長度成為研究重點。迄今，SCNT 動物的端粒已有諸多研究，惟獲得之結果分歧，分別有端粒變短（Shiels *et al.*, 1999; Miyashita *et al.*, 2002; Clark *et al.*, 2003）、端粒變長（Lanza *et al.*, 2000; Miyashita *et al.*, 2002; Jeon *et al.*, 2005）或具有正常長度（Betts *et al.*, 2001; Jiang *et al.*, 2004）等結果。本研究在分析 SCNT 複製羊及同年齡同性別之非複製羊的端粒長度，探討 SCNT 操作對於複製羊端粒長度之影響，藉由了解這些乳山羊間的端粒長度變化。

材料與方法

I. 試驗動物之血樣採集與基因組 DNA 萃取

SCNT 做為供核體細胞來源的母羊係採自本所台東種畜繁殖場耳號 09180 及 01244 兩頭高乳量阿爾拜因乳山羊的耳朵組織，採集耳朵組織時之月齡分別為 48 與 72 月齡。採集之耳朵組織經剪碎、應用無菌操作進行培養與繼代，供後續 SCNT 使用。3 頭複製阿爾拜因山羊的生日、年齡及採樣日期等資料如表 1 所示。羊隻血液採集日期分別為 2006 年 4 月 18 日及 2007 年 1 月 8 日共兩次。另採集對照之同齡同性別阿爾拜因山羊，每月齡 3 隻，共 9 隻。自供試山羊採集全血後置入已添加抗凝血劑（heparin）之離心管中，經 1,000×g 離心收集白血球；再利用基因組 DNA 純化套組（Qiagen, GmbH, Germany）並按照其操作步驟萃取、純化與定量基因組 DNA。

表 1. 複製羊的基本資料

Table 1. The background information of three SCNT cloned dairy goats

No. of SCNT dairy goats	Sex	Donor cell No.	Birth day
1	Female	09180	July 5, 2002
2	Female	09180	March 10, 2004
3	Female	01244	August 7, 2005

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) 並按其方法進行端粒限制片段長度 (TRF) 測定。首先將萃取的乳山羊基因組 DNA 約 1-2.5 μ g 經限制酶 *HinfI/RsaI* (4 U/ μ g 基因組 DNA) 在 37°C 作用 8 hr 後進行 0.7% 瓊脂糖膠體 (agarose gel) 電泳, 條件為 5 V/cm 4 hr; 之後膠體經過變性 (denaturation)、中和 (neutralization) 處理與南方轉漬 (southern blot) 將 DNA 轉漬到帶正電的尼龍膜 (Roche Diagnostic, GmbH, Mannheim, Germany)。尼龍膜在 40 ml DIG Easy Hyb (Roche) 中進行 42°C 2 hr 預雜交, 再與 biotinylated Telomere Probe (Roche Molecular Biochemicals, USA) 進行 42°C 3 hr 雜交反應。雜交後尼龍膜在 50 ml 0.5 \times 洗滌液 (SSC, 1 \times SSC: 0.15 M NaCl, 0.015 M sodium citrate) 室溫清洗 3 次, 每次 5 min。最後將尼龍膜取出以微波用膠膜包覆後, 放入卡匣內進行 X- 光片的顯影與沖片, 或直接将尼龍膜置入 LAS-3000 (Luminescent Image Analyzer, Fujifilm, Japan) 化學冷光影像系統中截取影像, 再利用內鍵之影像分析軟體, 按照端粒長度計算公式 $\Sigma (ODi \times Li) / \Sigma (ODi)$ 計算平均的端粒長度 (TRF); 公式中 ODi 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, 每一電泳條帶共劃分成 30 格, 計算長度範圍 3-50 kb 內的加總值。在進行電泳時, 膠片中均同時放入分析套組中所含有之 3.9 kb 的低分子量與 10.2 kb 高分子量對照樣品。

III. 統計分析

複製山羊及非複製正常對照山羊之端粒長度 TRF 測定後, 應用統計分析系統 (Statistical Analysis System; SAS, 2000) 套裝軟體進行統計分析, 使用一般線性模式程序 (General Linear Model Procedure; GLM) 進行變方分析, 以最小平方均值 (Least Squares Mean; LSM) 測定法, 比較同年齡複製羊與非複製羊間、同一個體不同月齡複製羊間之染色體端粒長度差異的顯著性。

結果與討論

本研究主要目的在分析畜產試驗所應用 SCNT 生產的 3 頭複製山羊與同年齡非複製山羊的端粒長度, 藉以了解體細胞複製羊與非複製正常羊隻的端粒長度。試驗分別自複製山羊採集全血, 萃取基因組 DNA, 再應用套組完成 TRF 分析。結果顯示, 3 號複製羊於 6 及 18 月齡的端粒長度分別為 9.93 ± 1.56 及 9.02 ± 1.68 kb, 而同齡非複製羊之端粒長度分別為 17.14 ± 0.83 與 14.43 ± 2.10 kb。2 號複製羊於 22 及 34 月齡的端粒長度分別為 12.2 ± 1.88 及 11.18 ± 1.42 kb, 而同齡非複製羊之端粒長度分別為 15.34 ± 1.27 及 14.91 ± 3.14 kb。1 號複製羊於 50 及 62 月齡的端粒長度分別為 10.96 ± 1.54 及 12.62 ± 3.16 kb, 而同齡非複製羊之端粒長度分別為 15.53 ± 1.19 及 18.53 ± 1.60 kb (圖 1 與表 2)。結果顯示不同個體的複製羊在不同月齡時的端粒長度均顯著較對照羊短 ($P < 0.05$)。本研究結果認為, 應用 SCNT 技術生產之複製羊, 其基因組 DNA 之再程式化可能受到影響, 造成其端粒長度顯著較非複製羊為短的現象。

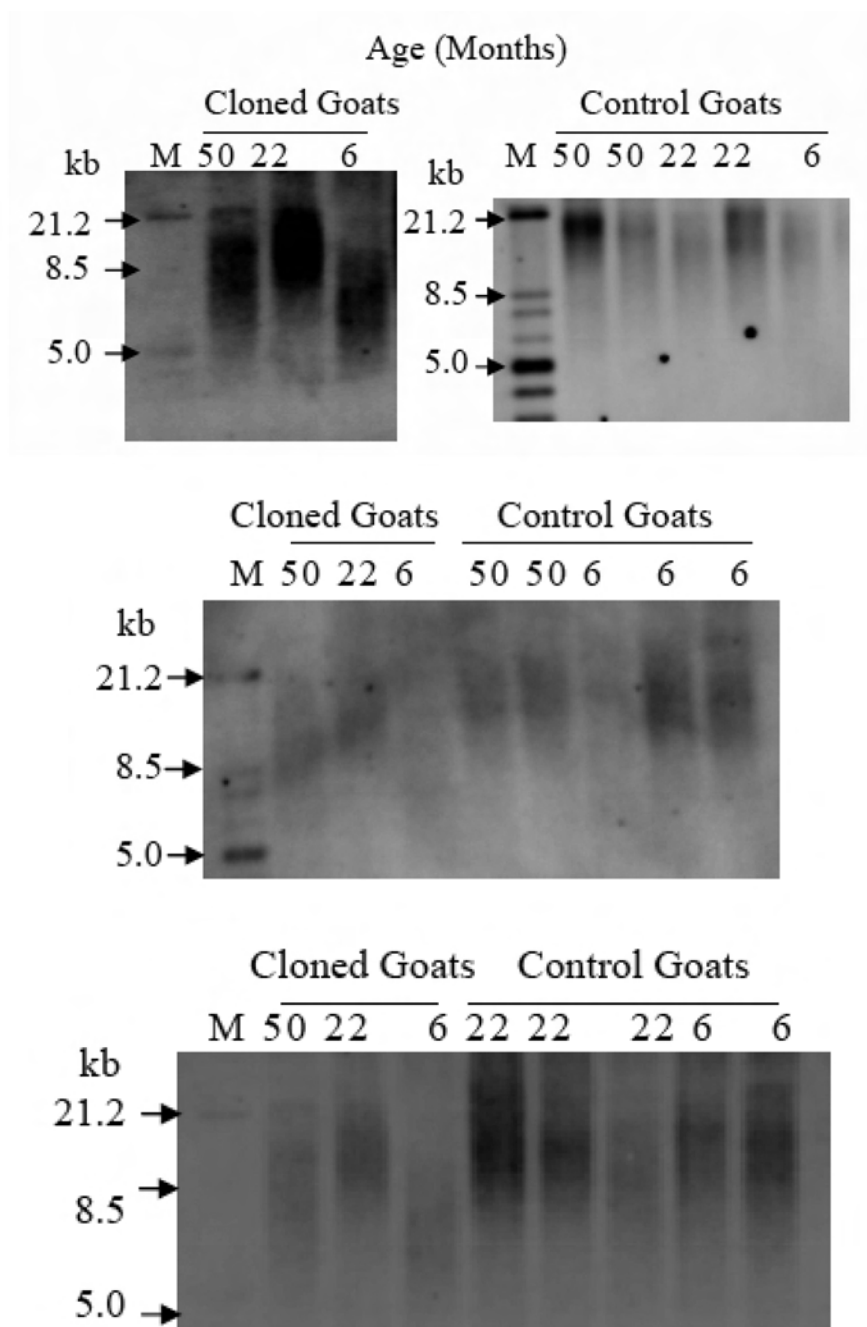


圖 1. 體細胞核轉殖複製羊1、2 與 3 號在50、22 與 6月齡時與對照之不同年齡非複製羊進行三次端粒長度分析之圖譜。M為分子量標記。

Fig. 1. Triplicate Analysis of telomere length in SCNT cloned goats No. 1, 2 and 3 at 50, 22 and 6 months old and part of their age-match controls. M: molecular weight markers.

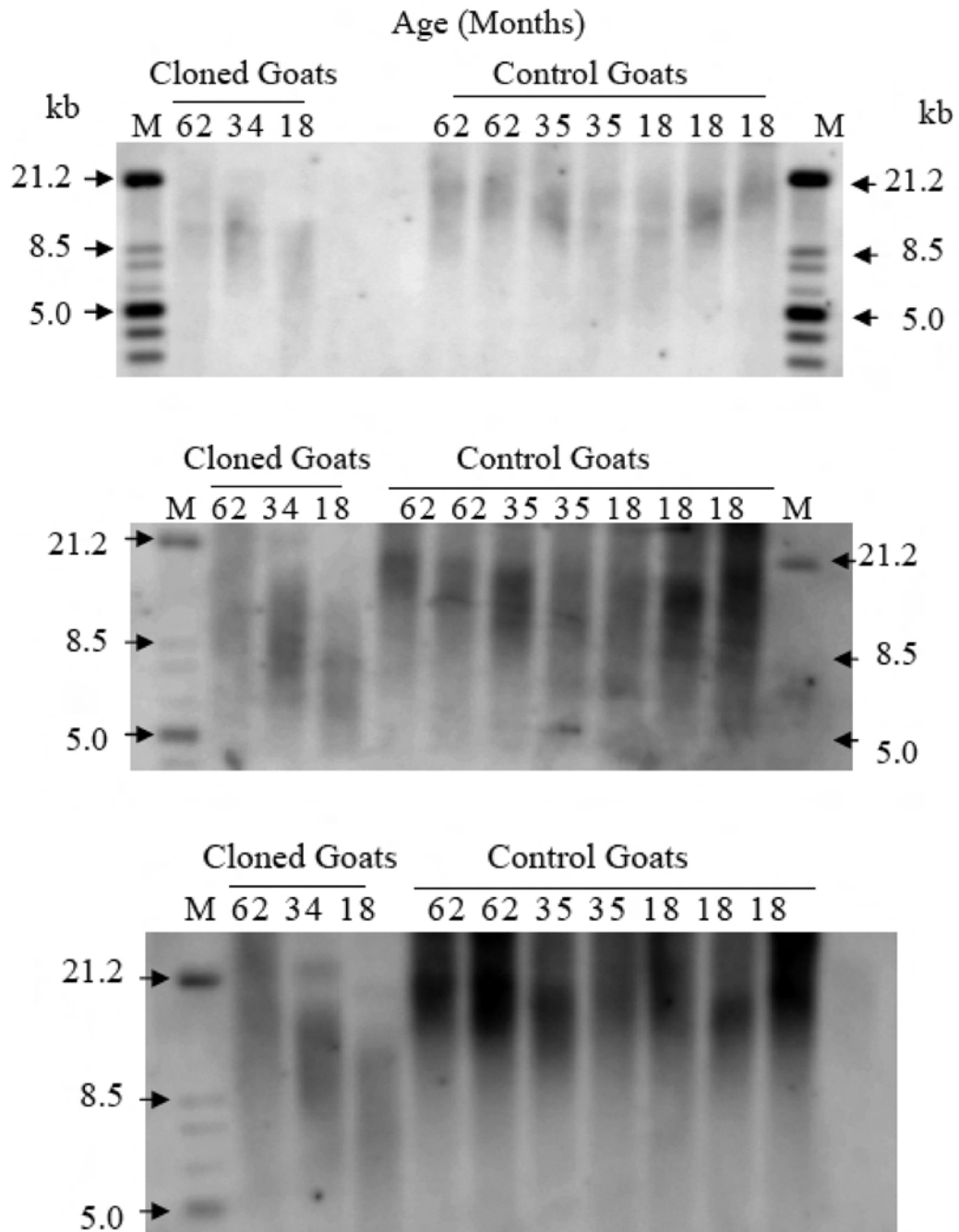


圖 2. 體細胞核轉殖複製羊1、2 與 3 號在62、34 及18月齡時與對照之不同年齡非複製羊進行三次端粒長度分析之圖譜。M為分子量標記。

Fig. 2. Triplicate analysis of telomere length in SCNT 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.

表 2. 複製山羊及同齡對照山羊的端粒長度

Table 2. Telomere length of cloned goats and their age-match counterparts

No. of SCNT dairy goats	Age (months)	Telomere length of SCNT dairy goats (kb)	Mean telomere length of controls goats (N=3) (kb)	P	
				SCNT vs. Control	SCNT, age
3	6	9.93 ± 1.56	17.14 ± 0.83	<0.01	NS
	18	9.02 ± 1.68	14.43 ± 2.10	<0.01	
2	22	12.2 ± 1.88	15.34 ± 1.27	<0.05	NS
	34	11.18 ± 1.42	14.91 ± 3.14	<0.05	
1	50	10.96 ± 1.54	15.53 ± 1.19	<0.01	NS
	62	12.62 ± 3.16	18.53 ± 1.60	<0.01	

NS : No significant difference at 5% level on the same individual SCNT dairy goat in different months of age.

自 1997 年 SCNT 複製綿羊成功生產之後，應用不同供核細胞進行各種複製動物的生產不斷有成功的例子出現（蕭等, 2006）。關於 SCNT 動物與正常對照動物之端粒長度比較已有學者研究，獲得之結果並不一致（Tamada and Kikyo, 2004），分別有複製動物的端粒變短（Shiels *et al.*, 2003; Miyashita *et al.*, 2002; Clark *et al.*, 2003）、變長（Lanza *et al.*, 2000; Miyashita *et al.*, 2002; Jeon *et al.*, 2005）或長度正常（Betts *et al.*, 2001; Jiang *et al.*, 2004）等結果。而造成 SCNT 動物端粒長度變異的因素，可能與供核細胞的種類（Morin, 1989）、胚發育時端粒酶再程式化之效率、動物種別與個體之差異（Betts *et al.*, 2001; Jeon *et al.*, 2005; Lanza *et al.*, 2000; Shiels *et al.*, 1999）、核轉置之操作方法（Lanza *et al.*, 2000; Tian *et al.*, 2000）、分析的組織或細胞種類不同（Lanza *et al.*, 2000; Betts *et al.*, 2001）所致，導致 SCNT 後基因再程式化能力與發育潛力的差異（蕭等, 2006）。

1999年，參與桃莉羊研究的英國 PPL 公司曾檢測桃莉羊的染色體端粒，結果發現較同齡之非複製綿羊約短了 20%（Rhind *et al.*, 2003; Shiels *et al.*, 1999），因而推測桃莉羊可能因繼承了 6 歲供核母羊的端粒長度，而且在進行 SCNT 之前，供核體細胞已經在體外培養了一段時間，致使端粒進一步變短老化。Clark *et al.*（2003）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 綿羊其端粒長度較對照動物為短。Betts *et al.*（2005）的研究顯示 SCNT 公山羊的外表正常、身體健康，且具有正常的生殖能力。Alexander *et al.*（2007）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 頭 1 至 36 月齡的正常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非複製綿羊為短。正常對照綿羊之 TRF 平均在 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 TRF 為 17-19 kb，源自 SCNT 之胎體成纖維細胞在體外培養到 P17 即到達老化階段；正常的對照細胞株則分別在 P25-P27 時到達老化階段。體外培養的體細胞在 P10 之前，端粒的短損並不明顯，但在 P10 之後，端粒將明顯短損並進入老化階段。SCNT 複製綿羊達到性成熟後經自然配種所生的後代，則具有與正常同齡對

照羊相似的端粒長度。體外培養超過 20 代的供核體細胞，其端粒長度則顯著較短，且呈現染色體數目及結構的高度異常。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，而同年齡非複製綿羊的長度分別為 17.51 ± 0.65 、 17.45 ± 1.18 、 17.52 ± 0.37 及 17.52 ± 0.37 kb；兩者比較，除了 16 月齡 SCNT 綿羊與非複製綿羊沒有差異外，其餘之月齡均已達顯著差異的水準（ $P < 0.05$ ）。

Betts *et al.* (2005) SCNT 生產之奈及利亞侏儒山羊，其端粒長度與供核細胞有所差異，且其後代山羊之端粒亦明顯比同年齡對照山羊為短；應用成體顆粒細胞進行 SCNT 之複製山羊，其皮膚細胞之端粒長度顯著較對照山羊為短。而應用胎體成纖維細胞生產的 SCNT 公羊之端粒長度雖有變異，但皆在正常範圍之內。SCNT 山羊的睪丸細胞端粒長度為 9.3 ± 0.52 kb，明顯較同齡對照的 16.3 ± 1.07 kb 為短；而 SCNT 山羊後代之睪丸細胞的端粒長 12.8 kb，明顯較同齡對照公羊為短，但睪丸細胞中端粒酶之活性則無顯著差異。這些結果顯示，供核細胞的種類及 SCNT 步驟，會影響後代之端粒長度。90-135 日齡的正常奈及利亞侏儒山羊，端粒平均長 14.96 ± 0.25 kb，較 775-895 日齡之老山羊的 12.71 ± 0.62 kb 為長。應用胎體成纖維細胞生產的雄性 SCNT 山羊在 71-350 日齡的平均端粒長 12.60 ± 0.51 kb，較 69-530 日齡的 5 頭同齡非複製山羊的 14.03 ± 0.44 kb 為短。應用成體卵丘細胞生產的 74 - 89 日齡 SCNT 女山羊，皮膚細胞的端粒長 13.28 ± 0.41 kb，顯著較 90-135 日齡的同齡非複製山羊的 14.96 ± 0.25 kb 為短。SCNT 公山羊與正常母羊配種所生的 9 頭羔羊，皮膚與血液細胞之平均端粒均較同齡對照山羊為短 (Betts *et al.*, 2005)。

畜產試驗所生產的複製羊「寶吉」與「寶祥」自 2002 年 7 月分娩後，在發育過程之外觀及血液生理值性狀均與正常非複製羊隻相似而在正常範圍內（未發表資料）。在畜試所研究人員之飼養照顧下，該 2 隻複製羊於 2003 年之繁殖季節與種公羊進行自然配種順利產下後代，兩頭複製羊之泌乳量可達每天 2.5 kg，乳成份包括：比重、乳脂率、乳蛋白質率、乳糖率、乳固形物與體細胞數等，均與一般正常乳山羊無異（未發表資料）。複製羊經自然配種後生產的仔羊之健康狀況良好，其生長、增重和性能表現均與正常自然配種所生之乳山羊無異。複製羊能夠順利孕育下一代，代表體細胞複製動物具有正常的生理功能與生殖能力。體細胞複製技術在應用上可用來大量擴增優良家畜族群；也可應用在瀕臨絕種動物的復育。而結合基因轉殖技術，亦可用以產製基因轉殖家畜，供生產高價值醫用蛋白的生物工廠用途，提高畜牧生產之效益；此外，也可供胚幹細胞相關研究之用，做為基因治療或器官移植用之細胞來源。

這些研究結果，顯示畜產試驗所應用體細胞複製技術已成功生產包括複製牛與羊，在人工生殖科技的發展上已邁入一個新的里程。為了解這些複製牛、羊的染色體端粒長度是否與同年齡非複製動物有差異，已分別採集複製牛、羊與同年齡非複製對照動物的血液樣品，萃取基因組 DNA 後分析端粒限制片段長度。本研究結果顯示，複製山羊的端粒長度顯著較非複製山羊短。此結果與畜試所生產的複製牛有所差異。因為經過分析，應用 SCNT 生產的複製牛其端粒長度與同年齡非複製牛之平均端粒長度並無顯著差異（蕭等，2007），顯示應用複製技術生產的乳牛，其端粒長度在經過 SCNT 操作後，供核體細胞的基因程式能再度啟動而回復端粒應有的正常長度，並未因為應用成體供核體細胞進行複製而導致端粒短化。畜試所複製動物研發團隊利用相同之 SCNT 操作方法所生產的複製山羊其端粒長度顯著較對照非複製山羊為短。此結果顯示不同複製動物之端粒長度變化並不一致。複製動物的端粒長度不一致且具有高度變異性，可能與進行複製時的供核細胞種類、端粒酶基因的再程式化效率、動物的個體差異、複製的操作步驟、分析時採集到的組織或細胞種類、及動物種別的不同等因素，導致複製動物的端粒長度的差異、基因再程式化及發育潛力的差異。

誌謝

感謝畜產試驗所恆春分所同仁協助試驗羊隻試驗樣品之採集，特致謝忱。

參考文獻

- 蕭振文、蔡麗卿、劉瑞珍、劉振發、陳立人。2006。體細胞核轉置家畜的端粒。科學農業 54:14-22。
- 蕭振文、蔡麗卿、王君今、陳裕信、曲鳳翔、劉振發、李善男、陳立人。2007。體細胞核轉置複製荷蘭牛的端粒長度分析。畜產研究 40:141-149。
- Alexander, B., G. Coppola, S. D. Perrault, T. T. Peura, D. H. Betts and W. A. King. 2007. Telomere length status of somatic cell sheep clones and their offspring. *Mol. Reprod. Dev.* 74:1525-1537.
- Ausmess, N., J. R. Kuhn and C. Jacobes-Wanger. 2003. The bacterial cytoskeleton: an intermediate filament-like function in cell shape. *Cell* 115:705-715.
- 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.
- Betts, D., S. D. Perrault, J. Petrik, L. Lin, L. A. Favetta, C. L. Keefer and W. A. King. 2005. Telomere length analysis in goat clones and their offspring. *Mol. Reprod. Dev.* 72:461-470.
- Blasco, M. A. 2002. Telomerase beyond telomeres. *Nat. Rev. Cancer* 2:627-633.
- Briggs, R. and T. J. King. 1952. Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs' eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 38:455-463.
- Campbell, K. H. 2002. A background to nuclear transfer and its applications in agriculture and human therapeutic medicine. *J. Anat.* 200:267-275.
- Clark, A. J., P. Ferrier, S. Aslam, S. Burl, C. Denning, D. Wylie, A. Ross, P. de Sousa, I. Wilmut and W. Cui. 2003. Proliferative lifespan is conserved after nuclear transfer. *Nat. Cell Biol.* 5:535-538.
- Faragher, R. G. and D. Kipling. 1998. How might replicative senescence contribute to human ageing? *Bioessays* 20:985-991.
- Galli, C., I. Lagutina, G. Crotti, S. Coleoni, P. Turini, N. Ponderato, R. Duchi and G. Lazzari. 2003. Pregnancy: a cloned horse born to its dam twin. *Nature* 424:635.
- Harley, C. B., A. B. Futcher and C. W. Greider. 1990. Telomeres shorten during aging of human fibroblast. *Nature* 345:458-460.
- Jeon, H. Y., S. H. Hyun, G. S. Lee, K. S. Kim, S. Kim, Y. W. Jeong, S. K. Kang, B. C. Lee, J. Y. Han, C. Ahn and W. S. Hwang. 2005. The analysis of telomere length and telomerase activity in cloned pigs and cows. *Mol. Reprod. Dev.* 71:315-320.
- Jiang, L., D. B. Carter, J. Xu, X. Yang, R. S. Prather and X. C. Tian. 2004. Telomere lengths in cloned transgenic pigs. *Biol. Reprod.* 70:1589-1593.
- Khatir, H. and A. Anouassi. 2008. Preliminary assessment of somatic cell nuclear transfer in the dromedary (*Camelus dromedarius*). *Theriogenology* 70:1471-1477.
- Kim, M. K., G. Jang, H. J. Oh, F. Yuda, J. J. Kim, W. S. Hwang, M. S. Hossein, J. J. Kim, N. S. Shin, S. K. Kang and B. C. Lee. 2007. Endangered wolves cloned from adult somatic cells. *Cloning Stem Cells* 9:130-137.

- 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.
- 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* 288:665-669.
- Lee, B. C., M. K. Kim, G. Jang, H. J. Oh, F. Yuda, H. J. Kim, M. S. Hossein, J. J. Kim, S. K. Kang, G. Schatten and W. S. Hwang. 2005. Dogs cloned from adult somatic cells. *Nature* 436:641.
- McEachern, M. J., A. Kauskopf and E. H. Blackburn. 2000. Telomeres and their control. *Annu. Rev. Genet.* 34:331-358.
- 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.
- Prather, R. S., F. L. Barnes, M. M. Sims, J. M. Robe, W. H. Eyestone and N. L. First. 1987. Nuclear transplantation in the bovine embryo: assessment of donor nuclei and recipient oocyte. *Biol. Reprod.* 37:859-866.
- Prather, R. S., M. M. Sims and N. L. First. 1989. Nuclear transplantation in early pig embryos. *Biol. Reprod.* 41:414-418.
- Prather, R. S., T. Tao and Z. Machaty. 1999. Development of the techniques for nuclear transfer in pigs. *Theriogenology* 51:487-498.
- Rhind, S. M., T. J. King, L. M. Harkness, C. Bellamy, W. Wallace, P. DeSousa and I. Wilmut. 2003. Cloned lambs—lessons from pathology. *Nat. Biotechnol.* 21:744-745.
- SAS. 2000. SAS User's Guide. Statistical Institute, Inc., Cary. N.C.
- Shiels, P. G., D. 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.
- Shiels, P. G. and A. G. Jardine. 2003. Dolly, no longer the exception: telomeres and implications for transplantation. *Cloning Stem Cells* 5:157-160.
- Shin, T., D. Kraemer, J. Pryor, L. Liu, J. Rugila, R. Howe, S. Buck, K. Murphy, L. Lyons and M. Westhusin. 2002. A cat cloned by nuclear transplantation. *Nature* 415:859
- Stice, S. L. and J. M. Robl. 1988. Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol. Reprod.* 39:657-664.
- Tamada, H. and N. Kikyo. 2004. Nuclear reprogramming in mammalian somatic cell nuclear cloning. *Cytogenet. Genome Res.* 105:285-291.
- Tian, X. C., J. Xu and X. Yang. 2000. Normal telomere lengths found in cloned cattle. *Nat. Genet.* 26:272-273.
- Willadsen, S. M. 1986. Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature* 320:63-65.
- Wilmut, I., A. E. Schnieke, J. McWhir, A. J. Kind and K. H. Campbell. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385:810-813.
- Zou, X., Y. Chen, Y. Wang, J. Luo, Q. Zhang, X. Zhang, Y. Yang, H. Ju, Y. Shen, W. Lao, S. Xu and M. Du. 2001. Production of cloned goats from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei or fused with cumulus cells. *Cloning* 3:31-37.

Telomere length analysis of cloned dairy goat produced by somatic cell nuclear transfer ⁽¹⁾

Jen-Wen Shiau⁽²⁾ Lee-Ching Tsai⁽²⁾ Chun-Chin Wang⁽²⁾
Yu-Hsin Chen⁽²⁾ Feng-Hsiang Chu⁽²⁾ Jenn-Fa Liou⁽²⁾
Jan-Chi Huang⁽³⁾ Cheng- Yong Lin⁽⁴⁾ Chein Tai⁽⁵⁾
and Lih-Ren Chen⁽²⁾⁽⁶⁾

Received : Mar. 23, 2009 ; Accepted : Aug. 13, 2009

Abstract

The purpose of this study was to determine the telomere length of somatic cell nuclear transfer (SCNT) cloned dairy goat and their age-match control counterparts. Genomic DNA samples were purified from whole blood of cloned and control animals and telomere length were assessed by terminal restriction fragment (TRF) analysis. The results showed that the telomere length were significantly ($P < 0.05$) shorter in three SCNT dairy goats cloned from cultured adult somatic cells as compared to age-matched control goats.

Key words : Somatic cell nuclear transfer (SCNT), Telomere length, Goat.

(1) Contribution No. 1527 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

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

(3) Hengchun Branch, COA-LRI, Hengchun 946, Pingtung, Taiwan, R.O.C.

(4) Hualien Animal Propagation Station, COA-LRI, Hualien, Taiwan, R.O.C.

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

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