

초기발생 동안 양서류 난에 미세주입된 β -galactosidase 유전자의 발현

차병직 · 정해문

서울대학교 사범대학 생물교육학과

Transgenic 양서류를 만들기 위한 연구의 일환으로 bacterial β -galactosidase 유전자를 cytoplasmic actin promoter에 연결시킨 plasmid를 *Xenopus* 수정란에 미세주입하여 외부 DNA의 발현을 조사하였다.

β -gal DNA를 20 나당 1 ng에서 2 ng의 농도로 미세주입하는 경우, 이 농도는 배발생에 크게 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 또한 유전자 산물인 β -galactosidase는 양서류의 모든 배엽성 세포에서 발현 가능하고, 정상적인 활성을 나타내므로 외부 DNA의 발현여부를 *in situ* 상태에서 판명할 수 있었다.

주입된 외부 DNA는 낭배기 시기에 최초로 발현되고, 적어도 올챙이 시기(stage 43)까지 유지 및 발현 가능하며, 초기 발생동안 extrachromosomal 상태에서 발현되는 것으로 나타났다. 그러나 발현의 정도는 주입된 개체는 물론 매 실험마다 차이를 보였고, 또한 기질인 X-Gal에 반응하는 부위가 전체 배에 분포하는 경우는 거의 없으며, 일정 부위에 한정되어 있음이 관찰되었다. 이는 세포막을 통해서 DNA가 다른 할구로 이동하지 못하는 사실에 비추어 미세주입된 DNA가 난할시 각 할구로 균등하게 분포되지 못하고 국부적으로 나뉘어 들어가기 때문인 것으로 사료된다.

KEY WORDS: Microinjection, Exogenous DNA, Gene expression, *Xenopus* egg

발생 및 세포 분화에 따른 유전자 발현의 조절 현상과 발현된 유전자와 발생과정사이의 인과관계는 발생유전학에 있어 매우 중요한 문제로 다루어지고 있으며, 현재 순수분리 복제된 유전자를 수정란에 미세주입하는 기술을 통해 이러한 관계를 밝히려는 노력이 경주되고 있다.

주입된 DNA가 염색체내로 삽입되어 transgenic 동물을 형성하는 경우 삽입된 유전자의 시간적, 조직특이적 발현조절에 대한 연구가 가능할 뿐만 아니라 삽입시 생길 수 있는 insertional mutation으로 인하여 고등 동물에서도 다양한 돌연변이를 생산, 응용할 수 있을 것으로 사료된다. 이와같이 유전자의 발현조절 기작의 연구에 좋은 기회를 제공하는 관계로 transgenic 동물을 생산하려는 시도가 초파리와 *C. elegans*를

비롯하여 성게와 어류는 물론, 포유류까지도 확대되어 많은 정보가 수집되고 있는 실정이다 (Palmiter *et al.*, 1982; reviewed by Malacinski, 1988).

그러나, 미세주입된 DNA가 초기 transformant의 모든 조직에서 발현되지 않고 한정된 부분에서만 발현되는 경우가 많았고 또 외부 DNA의 유지 및 발현연구에 있어서 대부분의 실험방법이 *in vitro* 분석방법을 사용하므로 배의 모든 세포가 외부 DNA를 소유하는지의 여부, 즉 DNA의 국부적 분포에 관해서는 정확하게 알 수 없었다. 이러한 점은 조직 특이성발현에 관한 실험의 경우 반드시 해결되어야 할 문제로, 그 이유는 조직 특이성발현의 확증은 모든 세포가 주입된 DNA를 갖고 있다는 사실하에서만 가능하기 때문이다.

한편, 양서류난에 미세주입된 외부 DNA는 세포질내에서 핵과 유사한 구조물을 유도, 형성한

본 연구는 1989년도 문교부와 과학재단의 학술연구 조성비의 지원하에 이루어진 것임.

후(Forbes *et al.*, 1983) 복제하는 것으로 알려져 있으며, 이는 특정한 sequence를 요구하지 않는 것으로 나타났다(Mechali & Kearsley, 1984). 주입된 plasmid의 복제는 포배기에 최대의 복제 상태를 보이며 이후 점진적인 분해가 일어남이 알려져 있으나(Rusconi & Schaffner, 1981), 반면 포배기 시기까지 거의 복제하지 않은 상태로 남아 있다가 이후 소멸된다는 보고도 있다(Krieg & Melton, 1985). 이 외에도 포배기 이후, 주입된 DNA의 일부가 후기 배의 조직내에서 검출되거나 부분적으로 성체의 조직내에서 발견된 경우도 있다(Andres *et al.*, 1984; Etkin & Pearman, 1987).

이에 본 연구에서는 양서류에는 존재하지 않을 뿐 아니라 발현산물에 대한 조직화학적 검출이 용이한 β -galactosidase 유전자를 *Xenopus*의 수정란에 주입시켜 유전자의 발현 조절기작을 연구하고자 하였고 아울러 영구적인 transgenic animal을 형성하여 발생학의 제 분야에 이용하는데 최종 목적을 두었다. 위와 같은 목적하에 본 연구에서는 먼저 1) 미세주입된 외부 DNA의 toxicity 및 유전자 산물의 활성 여부와 2) 주입된 DNA의 행동 및 발현 양상을 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

미세주입에 사용된 외부 DNA

본 실험에 사용된 plasmid DNA는 bacterial β -galactosidase 유전자를 cytoplasmic actin promoter에 연결하여 retroviral vector에 삽입시켜 cloning한 것이다(미국 인디애나 대학의 Malacinski 박사의 제공). DNA는 pellet 상태로 -20°C 에서 보관하였으며, 미세주입시 TE 완충 용액(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) 또는 5% DeBoer 용액(pH 7.2)에 용해시켜 사용하였다.

Xenopus 난의 채취 및 DNA의 미세주입

본 연구에서는 β -galactosidase가 기질인

X-Gal과의 발색 반응을 보다 쉽게 판별하기 위하여 albino(a^b) *Xenopus* (Hoperskaya, 1975)난을 사용하였다. 수정란은 사용하기 12시간전에 human chorionic gonadotropin(Sigma Co.)을 암컷에는 350-600 IU를, 수컷에는 150-300 IU를 주사한 후 채취하거나 인공수정을 시켜 얻었다.

DNA 미세주입은 상처로 인한 세포질의 과다 유출을 방지하기 위해 5% ficoll을 포함한 5% DeBoer 용액에서 수행하였으며, 1 ng 내지 2 ng DNA를 포함한 용액 10 nl에서 20 nl정도를 동물반구 또는 식물반구에 주입하였다. 미세주입은 일반적으로 수정후 제 1분열이 일어나기 전까지 수행하거나, DNA 분포실험시에는 2세포기에서 8세포기 사이에 한 할구에만 DNA를 주입하였다. 미세주입된 난의 감염을 방지하기 위해, 모든 용액에는 penicillin, 50 units/ml; streptomycin, 50 μg /ml; gentamycin sulfate, 50 μg /ml의 농도로 항생제를 첨가하였다.

β -galactosidase의 조직화학적 효소 분석

주입된 β -galactosidase 유전자의 발현여부를 조사하기 위한 방법으로 β -galactosidase의 합성기질인 X-Gal(5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside; Sigma Co.)을 이용한 조직화학적 효소 분석 방법(Sanes *et al.*, 1986)을 사용하였다. 완전한 발현산물인 β -galactosidase를 갖는 세포들은 청색을 띠는 반응산물인 5-bromo-4-chloro-3-indolyl 침전물을 보이므로 유전자의 발현여부를 *in situ* 상태에서 쉽게 판명할 수 있다.

적당한 발생단계에 도달한 배를 PBS(pH 7.4)로 세척한 후 2% formaldehyde 및 0.2% glutaraldehyde를 포함하는 PBS에 넣고 4°C 에서 40분 내지 50분간 고정시켰다. 고정된 배를 PBS로 씻은 후 조직화학적 효소반응 용액(1 mg/ml X-Gal, 5 mM potassium ferricyanide, 5 mM potassium ferrocyanide, 2 mM MgCl_2 를 포함하는 PBS)에 넣고 30°C 에서 14시간 내지 18시간 동안 반응시켰다.

배에서 β -galactosidase 활성을 나타내는 부

위는 해부현미경하에서 판별하였으며, 반응한 조직을 떼어내어 ethanol:glycerol(2:1)에서 30 초 내지 1분 동안 재고정한 후 glycerol:PBS(9:1)에 mount하여 광학현미경으로 관찰하였다.

결 과

DNA의 주입량과 난의 발생률

주입된 외부 DNA가 배발생에 미치는 영향을 알아보기 위하여 다양한 농도(1 ng, 2 ng, 4 ng, 8 ng/20 nl)의 plasmid DNA를 미세주입하였으며 그 결과는 Table 1에 나타난 바와 같다. 20 nl 당 1 ng 내지 2 ng의 DNA를 미세주입하는 경우, 주입된 난의 39%에서 52%가 올챙이 시기(stage 43)까지 발생한 반면 4 ng에서 8 ng의 농도로 주입한 경우 1% 내지 5%만이 올챙이까지의 발생률을 보였으며 대부분이 이상난할을 일으키거나 배의 형태가 비정상적으로 나타났다. 그러나 1 ng 이하의 농도에서는 발생률은 증가되었으나 반대로 유전자의 발현 여부를 조

사하기가 어려웠다. 따라서 본 실험에서는 배 발생에 거의 무해한 정도로 보이는 1-2 ng/20 nl의 양으로 DNA를 미세주입하였다. 또한 주입된 유전자의 발현 산물인 β -galactosidase 역시 발생에 무해한 것으로 나타났다.

조직화학적 효소 분석에 의한 유전자의 발현 판별

X-Gal을 이용한 조직화학적 효소분석방법을 통하여 양서류의 세포에서 미세주입된 β -galactosidase(cytoplasmic actin promoter) 유전자가 발현되어 활성을 갖는지를 알아 보았다. 대조군으로서 DNA를 포함하지 않는 5% DeBoer 용액(또는 TE 완충용액)을 실험군과 동일한 과정으로 미세 주입하였다(sham control).

Table 2에서 보는 바와 같이 β -gal 유전자가 미세주입된 난의 약 85% 정도가 X-Gal에 대해 효소반응을 나타낸 반면, sham 대조군 및 미주입 대조군은 모두 X-Gal에 대해 반응하지 않았다. 이 결과를 통해 β -gal 유전자의 발현산물인 β -galactosidase는 양서류세포에서 정상적인 활

Table 1. Toxicity of the amount of injected DNA

| Amount of DNA (ng/20 nl) | Total No. of injected egg | Cleavage | Blastula | Development | | |
|-----------------------------|------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | | | | Gastrula | Neurula | Tadpole |
| 1 | 220 | 176 (80%) | 169 (77%) | 126 (57%) | 123 (56%) | 115 (52%) |
| 2 | 250 | 182 (73%) | 170 (68%) | 143 (57%) | 120 (48%) | 99 (39%) |
| 4 | 280 | 118 (42%) | 109 (39%) | 92 (33%) | 84 (30%) | 14 (5%) |
| 8 | 270 | 60 (22%) | 59 (21%) | 27 (10%) | 25 (9%) | 3 (1%) |

Table 2. Histochemical enzyme assay of injected embryos

| | No. of tested embryos | Histochemical assay at stage 26-36 | |
|-----------------------------------|--------------------------|------------------------------------|----------|
| | | positive | negative |
| DNA injected embryo | 83 | 71 | 12 |
| Sham control (buffer-injected) | 50 | 0 | 50 |
| Control (uninjected) | 78 | 0 | 78 |

성을 가지고 있음이 밝혀졌다.

미세주입된 β -gal 유전자의 발현시기

미세주입된 β -gal 유전자의 최초 발현시기 및 발현정도를 밝히기 위하여 주입된 난을 중기포배, 낭배, 신경배, stage 39, stage 41, stage 43 (feeding tadpole)(Nieuwkoop & Faber, 1967) 시기에 고정하여 조직화학적 효소반응을 수행하

였다.

실험의 결과 중기포배 전이시기(MBT: midblastula transition-Newport & Kirschner, 1982)에는 X-Gal에 대해 효소반응을 보이는 세포군이 검출되지 않았으며, 낭배중기에 이르러서 최초로 발현된 세포를 발견할 수 있었다(Fig. 1 (A)).

수정란에 주입된 외부 DNA는 stage 43까지

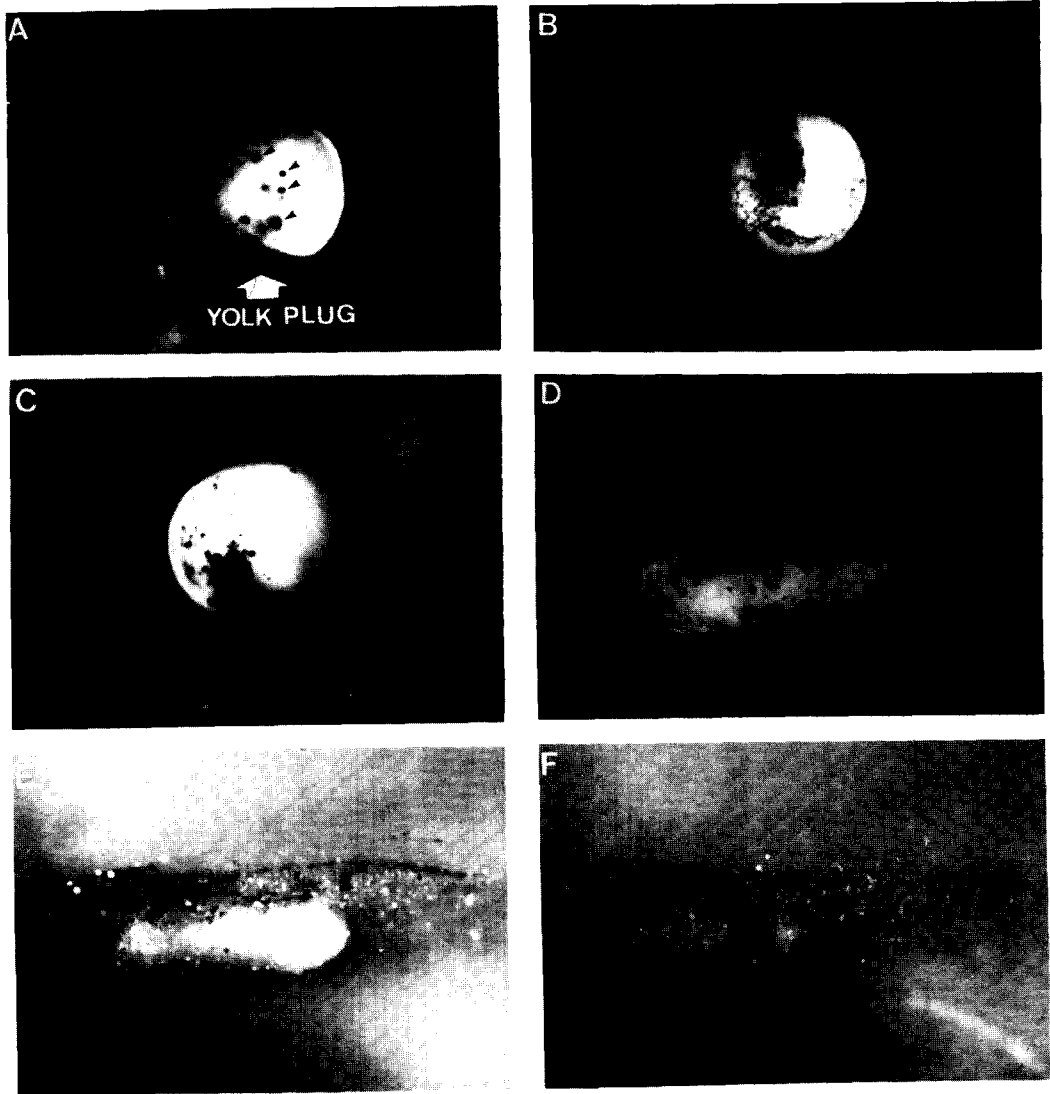


Fig. 1. Detection of enzyme activity of injected β -gal DNA. ($\times 30$). (A) Gastrula; (B), (C) Neurula; (D) Stage 35/36; (E) Stage 39; (F) Stage 41. Arrow heads indicate X-Gal positive cells.

발현되는 것으로 보인다. 그러나 발현의 정도가 발생이 진행될수록 점진적으로 감소하며 (Fig. 1의 (B)에서 (F)까지), stage 43시기는 초기배에 비해 극히 적은 세포군들만이 β -galactosidase 활성을 나타냈다.

외부 DNA의 국부적 분포 및 발현

주입된 DNA의 유지 및 발현 정도는 미세주입된 개체마다 그리고 배 실험마다 차이를 보였다. 즉, Fig. 2에서 볼 수 있듯이 X-Gal에 반응한 지역이 배 전체에 고르게 분포 양상을 보이는 경우는 거의 없고, 일정 부위에 국부적으로 나타났다. 이와같은 유전자의 발현 양상이 특정 배엽에서만 조직 특이적으로 일어났는지를 알아보기 위해 외배엽, 중배엽, 내배엽의 조직을 분리하여 관찰한 결과, 3배엽에서 골리 효소 활성을 갖는 세포가 발견되었으며 활성도가 높은 특정한 배엽이 나타나지 않는 것으로 보아 이는 조직 특이성이 없는 것으로 밝혀졌다 (Fig. 3).

2세포기의 DNA 주입

Fig. 2에 나타난 분포양상은 주로 1세포기에 외부 DNA를 주입한 실험의 결과이다. 이러한 부분적 분포현상이 주입된 DNA의 국부적 분포 배분일지를 알아보기 위하여 2세포기에 한쪽 할구에만 β -gal 유전자를 주입하였다.

좌우측의 구분이 명확해지는 시기인 신경배시기에 배를 고정한 후 조직화학적 반응을 지킨 결과 Fig. 4에 나타난 바와 같이 주입된 할구에서 유래한 부위에서만 β -galactosidase 활성을

갖는 세포군을 발견할 수 있었다.

따라서 1세포기에 주입된 난에서 발생한 배가 좌우중 한쪽에서만 X-Gal에 반응하는 부위를 보이는 것은 제 1분열시 주입된 DNA가 양쪽 할구로 나뉘어 들어가지 못하고 주입된 할구에만 포함된 결과로 사료된다.

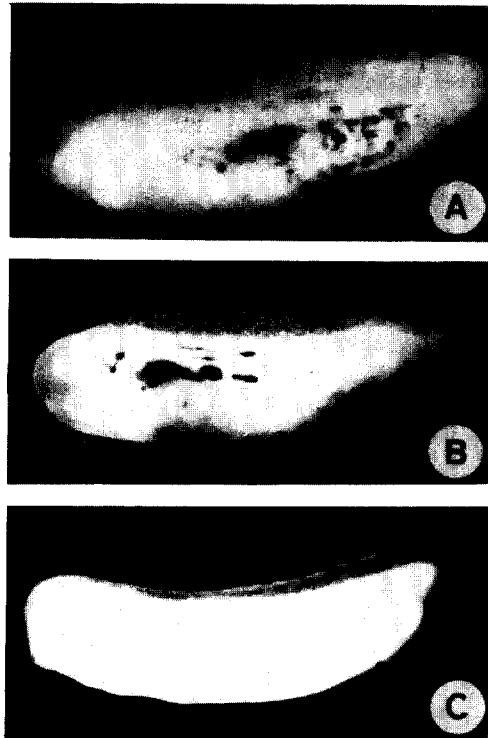


Fig. 2. Localized expression of injected exogenous DNA. Figures, (A)-(B), show the various pattern of expression and distribution of exogenous DNA. (C); control (uninjected) embryo. ($\times 20$)



Fig. 3. Histochemical detection of β -galactosidase activity in the 3 germ layers. DNA was injected into vegetal hemisphere at 1 cell stage and tissues were isolated from neurula or tailbud stage. (A) epidermis (B) somite (mesoderm) (C) endoderm ($\times 150$)(Arrows indicate X-Gal positive cell clones and asterisks show large regions of cells having β -galactosidase activity.)

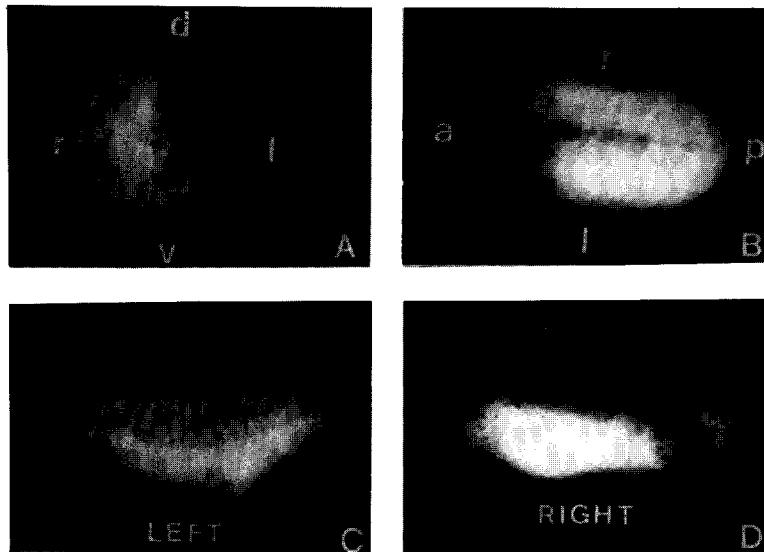


Fig. 4. Histochemical examination of β -gal activity in embryo developed from the egg into which one blastomere was injected at 2 cell stage. ($\times 30$). (A) Neurula embryo (frontal view) showing X-Gal positive area only at the injected site (left side). (B) Upper view of same embryo as (A). (C), (D) Tailbud embryo developed from the egg that DNA was injected into the vegetal site of one blastomere at 2 cell stage; Only right side shows X-Gal signal. Abbreviations: d-dorsal, v-ventral; r-right half, l-left half; a-anterior, p-posterior.

고 찰

Transgenic 양서류를 생산하는 방법중 하나인 외부 DNA의 미세주입 기술을 사용하여 양서류 초기 발생 동안 주입된 DNA의 발현에 관한 몇 가지 사실을 밝혀냈다. 본 연구 결과 주입된 β -gal 유전자는 양서류 세포에서 발현 가능하며, 조직화학적으로 쉽게 검출 가능하여 외부 DNA의 유지 정도 및 국부적 분포 현상을 *in situ* 상태에서 알 수 있었다.

미세주입된 DNA가 배발생에 어떤 기작을 통하여 toxicity를 갖는지는 명확하지 않으나 (Rusconi & Schaffner, 1981) 본 실험에서는 20 nl의 용액당 4 ng 이상의 농도로 외부 DNA를 주입한 경우 비정상 발생 양상을 나타냈다. 이러한 현상은 외부 DNA를 갖는 알구들은 태조군의 알구보다 상대적으로 크며 (Shiokawa *et al.*, 1986) 이 알구들의 존재가 정상 낭배 운동을 방

해하였기 때문인 것으로 생각된다. 반면 20 nl의 용액당 1 ng이하의 양으로 주입한 경우 발생율은 증가하였으나 후기 배에서의 발현 분포가 감소하는 경향을 나타냈다.

한편, β -gal DNA의 산물인 β -galactosidase는 양서류에는 존재하지 않음에도 불구하고 초기 배에서 정상적인 활성을 보이고 있다. 따라서, 본 실험에 사용된 조직화학적 효소분석방법은 유전자의 발현여부를 판정하는 기준을 제공할 수 있다고 여겨진다 (Table 2).

수정란에 미세 주입된 외부 DNA는 일정 시기까지 발현 가능하며 수정란과 stage 33/34 배에서 X-Gal에 반응한 부위가 넓은 반면, 발생이 진행됨에 따라 반응 부위가 점차 감소되어 stage 43 시기에는 극히 작은 세포군만이 β -galactosidase를 소유하는 것으로 나타났다 (Fig. 1). 양서류의 경우, 대부분 미세 주입된 DNA는 포배기까지 최대 복제상태를 보인 후 집진적인 분해가 일어나 올챙이 시기까지 외부 DNA의 95%가 분

해됨이 보고된 바 있으며(Etkin & Pearman, 1987; Krieg & Melton, 1985), 본 연구 Fig. 1의 결과는 이와 비슷한 양상을 보이고 있다.

그러나, Fig. 2에 나타난 바와 같이 외부 DNA의 발현의 정도에 있어서 실험개체마다 차이를 보였으며, β -galactosidase 활성을 갖는 부위가 전체 배에 분포하지 못하고 국부적으로 나타나 있다. 이와같은 국부적 분포현상은 초기 난할시 주입된 DNA가 각 할구로 균등하게 나뉘어 들어가지 못하고 지역적으로 편중 분포한 결과임이 2할구기 주입실험에서 부분적으로 밝혀졌다(Fig. 4). 즉, *Xenopus*에서 최초의 난할면이 좌, 우 대칭축을 결정하여 배의 좌, 우측이 구분된다는 사실(Chung & Malacinski, 1980)을 바탕으로 2세포기의 한쪽 할구에 유전자를 주입한 경우 배의 한면에서만 유전자의 활성이 나타났다(Fig. 4(A)). 따라서 주입된 유전자가 세포막을 통과하지 못하는 것으로 보인다. 또한 수정란에 비해 2세포기의 한쪽 할구가 크기 면에서 작용에도 불구하고 한정된 부위(Fig. 4(B))만이 효소 활성을 보이는 것은 주입된 DNA가 세포질 내에서 자유롭게 확산되지 못했기 때문인 것으로 여겨진다. 이러한 사실에 대하여 2가지 가능성을 제시할 수 있다. 첫째, λ -DNA나 pBR322 DNA를 *Xenopus*난에 미세주입한 경우 핵과 유사한 구조물(nucleoid body)을 형성하고, 이 구조물이 초기 난할시 "nuclear fission"이라는 비정상적인 분배과정을 통해 각 할구로 나뉘어 들어감이 보고된 바 있다(Shiokawa *et al.*, 1986). 따라서 제 1분열시 주입된 DNA가 세포막을 통과하지 못하여 양쪽 할구로 나뉘어지지 않으면 한쪽 할구에서 유래한 세포들만이 외부 DNA를 소유하게 되어, 이러한 국부적 분포현상이 초래되는 것으로 사료된다. 둘째, 후기배에서 효소활성을 보이지 않는 세포들은 β -gal 유전자들이 소실하였거나, 이밖에도 DNA rearrangement, 또는 transcription 혹은 posttranscription 단계에서의 발현 억제에 의해 효소활성이 나타나지 않았을 가능성도 배제할 수 없다. 발생단계에 따른 외부 DNA의 유지 및 소실의 여부는 Southern blotting과 같은 방법을 통하여 확인할

수 있으므로 현재 이를 위한 노력이 진행되고 있다.

한편, β -gal 유전자의 발현 산물인 β -galactosidase는 낭배기에 최초로 검출되었으며(Fig. 1(A)), 3 배엽에서 모두 활성을 갖는 것으로 보아(Fig. 3) β -gal 유전자가 cytoplasmic actin promoter하에서 비세포 특이적으로 전사되는 것으로 보인다. 이와같은 사실은 *Xenopus* 발생에서 cytoplasmic actin 유전자의 발현이 낭배 중기 이후에 새롭게 시작되며, 조직 특이성을 보이지 않는다는 사실(Mohun *et al.*, 1986)에 비추어 낭배 중기이후 전사가 일어났을 가능성이 크다고 하겠다. 그러나, 이러한 결과는 MBT 시기에 대부분의 DNA가 전사된다는 이전의 보고(Etkin & Balcells, 1985; Rusconi & Schaffner, 1981)와 차이를 보인다. 만약 MBT 시기에 전사가 일어났을 경우 posttranscription 수준에서의 조절이 MBT 시기에 존재함을 의미하므로 이는 유전자 발현의 조절 mechanism상 매우 흥미로운 사실이 될 것이며, 이를 밝히기 위해서는 Northern blotting과 같은 방법이 요구된다.

인용문헌

- Andres, A.-C., D. B. Muelloner, and G. U. Ryfferl, 1984. Persistence, methylation and expression of vitellogenin gene derivatives after injection into fertilized eggs of *Xenopus laevis*. *Nucleic Acid Res.* **12**:2283-2302.
- Bendig, M. M. and J. G. Williams, 1983. Replication and expression of *Xenopus laevis* globin genes injected into fertilized *Xenopus* eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**:6179-6201.
- Chung, H.-M. and G. M. Malacinski, 1980. Establishment of the dorsal-ventral polarity of the amphibian embryo-use of ultraviolet irradiation and egg rotation as probes. *Dev. Biol.* **80**:120-133.
- Etkin, L. D. and S. Balcells, 1985. Transformed *Xenopus* embryo as a transient expression system to analyze gene expression at the midblastula transition. *Dev. Biol.* **108**:173-178.
- Etkin, L. D. and B. Pearman, 1987. Distribution, expression and germ line transmission of exogenous DNA sequences following microinjection into *Xeno-*

- pus laevis* eggs. *Development* **99**:14-23.
- Forbes, D. J., M. W. Kirschner, and J. W. Newport, 1983. Spontaneous formation of nucleus-like structures around bacteriophage DNA microinjected into *Xenopus* egg. *Cell* **34**:13-23.
- Hoperskaya, O. A., 1975. The development of animals homozygous for a mutation causing periodic albinism (a^p) in *Xenopus laevis*. *J. embryol. Exp. Morph.* **34**:253-264.
- Krieg, P. A. and D. A. Melton, 1985. Developmental regulation of a gastrula-specific gene injected into fertilized *Xenopus* egg. *EMBO J.* **4**:3463-3471.
- Malacinski, G. M., 1988. *Developmental Genetics of Higher Organisms; A Primer in Developmental Biology*, Macmillan Publ. Co. New York.
- Mechali, M. and S. Kearsy, 1984. Lack of specific sequence requirement for DNA replication in *Xenopus* eggs compared with high sequence specificity in yeast. *Cell* **38**:55-64.
- Mohun, T. J., N. Garrett, and J. B. Gurdon, 1986. Upstream sequence required for tissue-specific activation of the cardiac actin gene in *Xenopus laevis* embryos. *EMBO J.* **5**:3185-3193.
- Newport, J. and M. Kirschner, 1982. A major developmental transition in early *Xenopus* embryos: II. Control of the onset of transcription. *Cell* **30**:687-696.
- Nieuwkoop, P. D. and J. Faber, 1967. *Normal Table of Xenopus laevis (Daudin)*, North Holland Publ. Co., Amsterdam.
- Palmiter, R. D., H. Y. Chen, and R. L. Brinster, 1982. Differential regulation of metallothionein-thymidine kinase fusion genes in transgenic mice and their offspring. *Cell* **29**:701-710.
- Rusconi, S. and W. Schaffner, 1981. Transformation of frog embryos with a rabbit β -globin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**:5051-5055.
- Sanes, J. R., J. L. R. Rubenstein, and J-F. Nicolas, 1986. Use of a recombinant retrovirus to study post-implantation cell lineage in mouse embryos. *EMBO J.* **5**:3133-3142.
- Shiokawa, K., M. Shameshima, K. Tashiro, T. Miura, N. Nakamura, and K. Yamana, 1986. Formation of nucleus-like structure in the cytoplasm of λ -DNA injected fertilized eggs and its partition into blastomeres during early embryogenesis in *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* **116**:539-542.

(Accepted May 4, 1990)

Expression of β -Galactosidase Gene Microinjected into *Xenopus* Egg During Early Development

Byeong-Jik Cha and Hae-Moon Chung (Department of Biology Education, College of Education, Seoul National University)

For the effort to produce transgenic amphibians, a plasmid DNA sequence (cytoplasmic actin promoter-linked bacterial β -galactosidase gene) was microinjected into fertilized *Xenopus* eggs.

It appeared that the injection of 20 nl solution containing 1-2 ng of DNA was not toxic, but over 4 ng was toxic to embryonic development. The translational product of β -gal gene (β -galactosidase) had enzyme activity in all three germ layers of the embryo.

Expression of the injected β -gal genes was first detected at mid-gastrula stage, and the activity persisted up to stage 43 (feeding tadpole) with decreased level of retention. However, the level of the expression was various among the injected individuals as well as each experiment. That is, β -galactosidase activities did not appear in all cells, instead a localized distribution pattern. Although other possibilities could not be omitted, this mosaic distribution of gene expression seemed to arise from unequal partition of the injected DNA into each blastomere during early cleavage.