

## *Xenopus* 수정란에 미세주입된 $\lambda$ -DNA의 배발생에 미치는 영향 및 미세 구조에 관한 연구

송지환 · 손성향 · 최임순 · 정해문\*

### **Effect on Embryogenesis and Ultrastructural Behavior of lamda-DNA Following Microinjection into Fertilized Eggs of *Xenopus laevis***

Song, Ji Hwan, Seong Hyang Sohn, Rim Soon Choe and Hae Moon Chung\*

(Received July 10, 1992)

#### **ABSTRACT**

In an attempt to produce transgenic amphibia, bacteriophage  $\lambda$ -DNA was microinjected into fertilized eggs of *Xenopus laevis*, and the effect on early embryogenesis and the ultrastructural behavior of exogenous DNA were investigated. The effect of microinjected gene on embryonic development showed differences according to the concentration of injected DNA and the incubation temperature. Various concentrations of  $\lambda$ -DNA were tested. Among those, microinjection of 1-2 ng DNA dissolved in 20 nl TE buffer was not shown to disturb normal embryonic development and was recorded the highest survivability to the late tadpole stage (Stage 43); however, injection of increased concentrations of DNA than above provoked irregular cleavages or abnormal appearances, which resulted in reduced survivability. When the injected embryos were incubated at low temperatures (e.g., 12°C), 54.5% of the embryos developed to Stage 43, whereas 42.4% survived when incubated at room temperature. The survivability showed also differences according to the injection site. 58.0% of the embryos developed to Stage 43 when microinjected into the vegetal pole, whereas 44.9% survived when microinjected into the animal pole. To understand the structural fate or behavior of injected DNA a combined light and electron microscopical study was applied. The nucleus-like structure was observed in the  $\lambda$  DNA-injected embryos, which was quite a similar to the interphase nuclei of normal *Xenopus laevis*. The nucleus-like structure showed the typical double-layered nuclear membrane and nuclear complexes; however, it consisted of unusual structures such as furrows of

연세대학교 이과대학 생물학과

\*서울대학교 사범대학 생물교육과

Department of Biology, College of Science, Yonsei University, Seoul, Korea

\*Department of Biology Education, Seoul National University, Seoul, Korea

nuclear envelope into the nucleoplasm.

## 서 론

다세포생물의 발생은 난자와 정자가 합일된 수정란의 분열을 통하여 이루어지며, 발생과정중에는 세포의 급속한 분열과 더불어 모든 세포들은 일정한 방향으로 분화를 일으켜 독특한 형태와 기능을 보유하게 된다. 세포분화는 궁극적으로 유전자의 활동에 지배되며, 이와같은 유전자의 활동과 세포분화에 영향을 미치는 요인으로 크게 형태형성 요소와 같은 세포내적 요인과 호르몬, 성장요소 및 세포간의 상호 유도작용과 같은 세포외적인 요인을 들 수 있다(Davidson, 1986; Browder *et al.*, 1991; Gilbert, 1988). 따라서 발생학의 궁극적인 목표는 암, 수 배우자의 형성과 이들이 합친 수정란이 어떻게 성숙한 개체를 발생하는지 설명하는 일이며, 아울러 발생과 세포분화에 따른 유전자 발현의 조절 현상과 발현된 유전자와 발생과정 사이의 인과관계를 규명하는 일이라고 말할 수 있다(Armstrong and Malacinski, 1989; Grover and Hames, 1989).

현재에는 발생에 관계하는 다양한 유전자를 순수분리, 복제하여 초파리, 성게, 어류, 양서류 및 포유류 등의 수정란에 미세주입하는 실험을 통하여 초기발생 동안의 DNA의 복제와 유전자의 host 염색체내로의 삽입 여부 및 유전자 발현의 조절에 관련된 중요한 요인과 기작등을 규명하려는 노력이 활발히 이루어지고 있다(Malacinski, 1988; Westphal, 1989). 그 중 양서류는 연구 재료가 풍부하고, 체외수정을 하며, 큰 염색체를 가진 대형의 난자와 비교적 많은 돌연변이종이 존재할 뿐만 아니라, histone, DNA polymerase, ribosome 및 핵막 성분등이 다량 축적되어 있다. 또한 발생이 빠르게 진행되며, 하나하나의 조직들이 쉽게 분리될 수 있으므로 조직이식, 핵치환 및 외부 유전자의 미세주입에 의한 유전자 발현 조절 연구 재료로서 좋은 잇점을 가지고 있다는 유리한 점 때문에 오래전부터 사용되어 왔다(Gurdon and Melton, 1981; Etkin and Balcells, 1985; Krieg *et al.*, 1986; Dawid and Sargent, 1988; Malacinski, 1988; Armstrong and Malacinski, 1989).

이와 같이 연구하는데 적합한 재료임에도 불구하고, 최근 분자생물학과 *C. elegans*와 초파리등을 이용한 발

생학 분야에서 괄목할만한 발전을 이룩한 유전 정보 발현의 조절과 유전자 산물의 기능적 중요성에 대한 지식이 양서류에는 아직 적용되지 못하는 실정이다. 이에 대한 가장 큰 이유는 발생에 관계되는 돌연변이가 적게 일어나고, 외부의 유전자를 염색체내로 삽입시켜 유전자의 발현조절을 규명할 수 있는 transgenic 양서류의 형성에 성공하지 못하고 있기 때문인 것으로 지적되고 있다(Malacinski, 1988).

Transgenic animal이란 순수하게 분리한 유전자를 유전공학 기술을 통하여 대량 복제시킨 후 이를 수정란의 염색체에 삽입시켜 형질전환(transformation)을 일으키면서 발생한 동물을 의미한다. 이와같이 수정란에 미세주입된 유전자가 염색체내에 삽입되어 transgenic animal을 형성하는 경우, 삽입된 유전자의 시간과 공간에 따른 특이적인 발현 조절에 대한 연구가 가능하며(Palmiter and Brinster, 1986; Jaenisch, 1988; Westphal, 1989), 뿐만아니라 염색체내로의 삽입시에 유발될 수 있는 insertional mutation으로 인하여 고등동물에서도 다양한 돌연변이체를 생산할 수 있으며, 이를 통하여 유용한 세포의 보존과 대량복제 및 선천적 질병 치료의 치유수단으로 이용할 수 있다(Gridley *et al.*, 1987; Gordon, 1988; Friedmann, 1989).

따라서 본 연구는 이와같은 transgenic 양서류를 만들기 위한 노력의 일환으로 외부 유전자인 bacteriophage  $\lambda$ -DNA를 *Xenopus laevis*의 수정란에 미세주입하여 이의 배발생에 미치는 영향과 미세구조의 변화 양상을 밝히고자 하였다. 현재까지 유전자 미세주입 방법은 초기 발생동안의 DNA 복제, 유전자의 host 염색체내로의 삽입 및 유전자 발현의 조절에 관계하는 요인 및 기작을 조사하기 위한 효과적인 방법으로 정착되어져 왔다. 그러나 지금까지 많은 연구들이 미세주입된 외부 DNA의 유지, 복제 및 발현을 대상으로 이루어진 반면, 정착 주입된 DNA의 배발생에 미치는 영향과 행동과 분포에 관한 연구는 상대적으로 적게 이루어져 왔다. 따라서 본 연구에서는 다양한 농도의 유전자를 *Xenopus laevis*의 수정란에 미세주입하여 배발생단계에 따른 발생률을 조사하였고, 투과전자현미경 관찰을 통해 주입된 유전자의 행동에 관해 알아보려고 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. *Xenopus* 난의 채취

실험동물로서는 아프리카 원산의 무미 양서류인 *Xenopus laevis* 를 사용하였다. *Xenopus* 는 여과장치를 갖춘 수조에서 사육하며, 수정란은 사용하기 12시간 전에 human chorionic gonadotropin (Sigma Co.) 을 암컷에는 350-600 IU를, 수컷에는 150-300 IU 를 주사한 후 채취하거나 인공수정을 시켜 얻었으며, 발생단계는 Nieuwkoop 과 Faber 의 방식(1967)을 따랐다.

인공수정의 경우 미수정란을 petri dish 에 받은 후 100% DeBoer 용액으로 2번 정도 세척하고 정자 현탁액을 뿌려 수정시켰다. 수정된 지 약 20분 후 동물극이 중력의 반대방향으로 회전할 시기에 2% Cysteine-HCl (pH 7.3)으로 3분 내지 5분간 처리하여 한천층을 제거하였다.

### 2. DNA 미세주입

전통적으로 사용하는 미량 주입 장치(micromanipulator)를 사용하였으며, 미세주입시 상처로 인한 세포질의 과다유출을 방지하기 위하여 5% Ficoll 을 포함한 5% DeBoer 용액에서 실험을 수행하였다. 실험에 이용된 DNA 는 Sigma 사(USA)에서 구입한 bacteriophage  $\lambda$ -DNA (43 kb)로 pellet 상태로  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였으며, 미세주입시 TE 완충용액(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)에 용해시켜 사용하였다.

DNA 미세주입은 1 ng에서 8 ng까지 다양한 양의 DNA 를 포함한 용액 10 nl에서 20 nl 정도를 동물반구 또는 식물반구에 주입하였으며, 주입시키는 미분열 수정란 또는 제1분열이 완료되기 전까지 수행하였다. 미세주입된 난의 감염을 방지하기 위하여 모든 용액에서 항생제를 첨가하였다(penicillin, 50 units/ml; streptomycin, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; gentamycin sulfate, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).

### 3. 주입된 bacteriophage $\lambda$ -DNA 의 행동에 대한 광학현미경과 투과전자현미경 관찰

bacteriophage  $\lambda$ -DNA 를 미세주입한 후, 주입후 2시간이 경과된 미분열난과 상실배 및 포배를 각각 3% glutaraldehyde 가 용해된 0.1 M phosphate 완충액

(pH 7.3)으로 전기정한 후 동일 용액으로 세척하여 다시 1.33% osium tetra oxide 로 2시간 동안 후고정하였다. 후고정한 배를 동일 완충액으로 세척한 후 ethyl alcohol 농도 상승순으로(50~100%) 탈수하여, propylene oxide 로 15분 동안 치환한 다음 Epon 812 혼합액에 포매하였다. 포매한 배를  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 6시간,  $60^{\circ}\text{C}$ 에서 48시간 동안 방치하여 중합시킨 후에 0.5  $\mu\text{m}$ 의 두께로 절편을 만들어 toluidine blue 로 염색한 후 광학현미경 관찰을 하였다. 세포질내에서 유사핵 구조를 발견하면 trimming 한 뒤 다시 50 nm의 두께로 초박 절편을 만들어 uranyl acetate 와 lead citrate 로 이중전자 염색하여 투과전자현미경(Hitachi, H-500)으로 관찰하였다.

## 결 과

### 1. DNA의 주입량과 난의 발생율

주입된 외부 DNA가 배발생에 미치는 영향을 알아보기 위하여 다양한 농도(1 ng, 2 ng, 4 ng, 8 ng/20 nl)의 bacteriophage  $\lambda$ -DNA를 미세주입하였으며, 그 결과는 Table 1에 나타난 바와 같다. 20 nl당 1 ng 내지 2 ng의 DNA 를 미세주입하는 경우, 주입된 난의 39.6%에서 52.3%가 올챙이 시기(stage 43)까지 발생한 반면 4 ng에서 8 ng의 농도로 주입한 경우 1.1% 내지 5.0%만이 올챙이 시기까지의 발생율을 나타내었으며, 대부분이 이상난황을 일으키거나 배의 형태가 비정상적으로 나타났다(Fig. 1). Sham 대조군으로 5%의 DeBoer 용액을 주입한 경우 78.0%의 발생율을 나타내었다.

### 2. 미세주입 후 저온처리에 의한 회복 효과

미세주입된 DNA 에 의한 발생율의 저하가 미세주입 후 낭배이전 시기까지의 저온( $12^{\circ}\text{C}$ ) 처리에 의하여 회복될 수 있는지의 여부를 살펴 보았으며, 그 결과는 Table 2에 나타난 바와 같다. 즉, 미세주입 후 저온에서 배양한 경우에는 54.5%가 tailbud 에 도달한 반면, 상온에서 배양한 경우는 42.4%를 나타내어 저온 처리가 발생율의 증진에 기여하는 것으로 판명되었다.

### 3. 미세주입 위치에 의한 회복 효과

수정란의 동물극에 미세주입한 경우와 식물극에 주입한 경우의 발생율을 비교한 결과는 Table 3과 같다. 즉,

식물극에 미세주입한 경우에는 58.0%가 tailbud에 도달한 반면, 동물극에 주입한 경우에는 44.9%만이 tailbud에 도달하여 식물극에 주입한 경우 DNA 미세주입에 의한 세포독성이 어느 정도 회복되는 것으로 밝혀졌다.

**4. 미세주입된 bacteriophage  $\lambda$ -DNA의 행동과 분포 양상**

양서류 수정란에 미세주입된 외부 유전자의 운명을 조사하기 위하여  $\lambda$ -DNA를 주입한 후 광학현미경과 전자현미경 관찰을 수행하였다. 주입된 난을 0.5  $\mu$ m의 두께

로 절단한 후 toluidine blue로 염색한 결과, 세포질내에 독특한 염색 부위가 관찰되었다(Fig. 2). 염색 부위의 미세구조를 알아보기 위하여 50 nm의 두께로 초박절편을 만들어 uranyl acetate와 lead citrate로 염색한 후 투과전자 현미경 관찰을 수행한 결과, 세포 주기중간기(interphase)의 정상핵의 구조(Fig. 3)와 유사한 핵구조물이 유도되고 형성되어진 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 4, 5). 이와같은 유사핵 구조물은 핵공을 갖고 이중막에 의하여 둘러 싸여져 있다는 점에서 정상핵과 유사하나(Fig. 5), 정상핵과는 상이한 비정상적인 핵막의 함입과 비교적 균질적인 핵질의 분포 양상등을 나타내었다(Fig. 4).

**Table 1.** Toxicity according to the amount of injected DNA

Amount of DNA (ng/20 nl)	Total No. of injected eggs	No. of survived eggs				
		Cleavage	Blastula	Gastrula	Neurula	Tadpole
1	220	176 (80.0%)	169 (76.8%)	126 (57.3%)	123 (55.9%)	115 (52.3%)
2	250	182 (72.8%)	170 (68.0%)	143 (57.2%)	120 (48.0%)	99 (39.6%)
4	280	118 (42.1%)	109 (38.9%)	92 (32.9%)	84 (30.0%)	14 (5.0%)
8	270	60 (22.2%)	59 (21.9%)	27 (10.0%)	25 (9.3%)	3 (1.1%)
Sham control (5% DeBoer)	150	142 (94.7%)	139 (92.7%)	136 (90.7%)	129 (86.0%)	117 (78.0%)

**Table 2.** Influence of low temperature on embryonic development following microinjection

Incubation Temperature	Total No. of injected eggs	No. of survived eggs			
		Blastula	Gastrula	Tailbud	Tadpole
Control (Room temp.)	137	105 (76.6%)	68 (49.6%)	64 (46.7%)	58 (42.4%)
Low temp. (12 $^{\circ}$ ...)	149	139 (91.7%)	90 (62.1%)	83 (57.2%)	79 (54.5%)

**Table 3.** Influence of injection site on embryonic development

Injection Site	Total No. of injected eggs	No. of survived eggs			
		Blastula	Gastrula	Tailbud	Tadpole
Animal pole	107	82 (76.6%)	55 (51.4%)	52 (48.6%)	48 (44.9%)
Vegetal pole	112	104 (92.9%)	74 (66.1%)	69 (61.6%)	65 (58.0%)

## 고 찰

Transgenic 양서류를 생산하기 위한 연구의 일환으로 bacteriophage  $\lambda$ -DNA 를 양서류의 수정란에 미세주입한 결과, 양서류의 초기 발생동안 외부 유전자의 배발생에 미치는 영향과 행동에 관한 몇가지 사실을 알 수 있었다.

DNA 의 주입량과 난의 발생률의 상관관계에 있어서는, 미세주입된 DNA 가 배발생에 어떠한 기작을 통하여 독성을 나타내는지에 대하여는 아직 명확하게 밝혀지지 않았지만 (Rusconi and Schaffner, 1981), 본 실험에서는 20 nl의 용액당 4 ng 이상의 농도로 외부 DNA 를 주입한 경우 비정상 발생 양상을 나타내었다. 이러한 현상은 외부 DNA 를 갖는 할구들은 대조군의 할구보다 상대적으로 크며 (Fig. 1), 이 할구들의 존재가 정상 낭배운동을 방해하였기 때문인 것으로 생각된다. 즉, 고농도의 DNA 가 주입된 경우에는, 미세주입된 DNA 가 세포질내에서 자유롭게 확산되지 못하고 국부적으로 편재하여 비정상 난할을 유발하여 발생률을 저하시킨 것으로 생각해 볼 수 있다. 이와같은 실험 결과를 토대로 20 nl 당 1 ng 내지 2 ng 의 농도로 미세주입하는 경우에 배발생에 크게 지장을 주지 않는 것을 간접적으로 확인할 수 있었고, 따라서 차후의 실험을 이 농도에 근거하여 수행하였다.

DNA 가 미세주입된 배의 발생률을 증진시키기 위한 방안으로 저온 처리와 미세주입 위치를 변경한 결과 효과적임을 알 수 있었다. 실온보다 낮은 저온(12°C)에서 배양할 경우 발생 속도가 지연되고 조직이식 등으로 인한 세포 손상이 치유될 가능성이 높으므로 (Hamburger, 1960), 미세주입시 유발되는 세포 손상의 치유와 발생 속도의 저하를 목적으로 낭배이전 시기까지 저온처리를 시도하였다. 미세주입후 저온에서 배양한 경우에는 54.5%가 tailbud 에 도달한 반면, 상온에서 배양한 경우는 42.4%로 저온처리가 미세주입한 배의 발생률의 증진에 기여하는 것으로 판명되었다 (Table 2). 이와같은 결과는 저온처리를 통해 배발생이 지연됨으로써 외부 DNA 가 특정 할구에만 편재되지 않고 보다 넓게 확산됨으로써 DNA 의 미세주입에 의한 독성이 감소되는 것으로 사료된다. 이러한 회복효과는 외부 DNA 를 식물극에 주입한 실험에서도 나타났다 (Table 3). 즉, 식물

극에 미세주입한 경우에는 58.0%가 tailbud 에 도달한 반면, 동물극에 주입한 경우에는 44.9%만이 tailbud 에 도달하였다. 이는 식물극 세포가 동물극 세포에 비해 세포 크기가 크고, 이동 속도가 빠르기 때문에 (Slack, 1991) 주입된 DNA 가 보다 넓게 퍼져 독성을 감소시키는 것으로 생각된다. 하지만 일반적으로 미세주입은 동물극을 대상으로 이루어지는데, 이는 식물극으로 주입하는 경우 인위적으로 난의 방향을 뒤집어야 하므로 보다 많은 시간과 노력이 요구되어 많은 개체를 실험할 수 없기 때문이다.

양서류 수정란에 미세주입된 외부 유전자의 행동과 분포양상을 조사하기 위하여  $\lambda$ -DNA 를 주입한 후 광학현미경과 전자현미경 관찰을 하였다 (Shiokawa *et al.*, 1986; Trendelenburg *et al.*, 1986; Shiokawa *et al.*, 1987). 0.5  $\mu$ m의 두께로 절단한 후 toluidine blue 로 염색한 결과 세포질내에 독특한 염색 부위가 관찰되었는데 (Fig. 2), 이와같은 독특한 부위가 주입된 DNA 에 의하여 유도되었다는 사실은  $^3$ H-labeled  $\lambda$  DNA 를 주입한 후 autoradiography 를 수행한 실험결과를 통하여 간접적으로 확인될 수 있었다 (Shiokawa *et al.*, 1987). 이 염색 부위의 미세구조를 알아보기 위하여 투과전자현미경 관찰을 수행한 결과 세포 주기중간기 (interphase) 의 정상핵의 구조 (Fig. 3)와 유사한 핵구조물이 유도되고 형성된 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 4, 5). 이와같은 유사핵 구조물 (Nucleus-like structure)은 핵공을 갖고 이중막에 의해 둘러싸여져 있으며, 핵막 주위로 lipid droplet 과 mitochondria 및 yolk platelet 등을 갖는다는 점에서 *Xenopus* 수정란의 정상핵과 유사하나 (Fig. 5), 비정상적으로 핵막이 함입되었고, 비교적 균질적인 핵질의 분포 양상등을 나타내어 핵질 전체에 걸쳐 이질 염색사 (heterochromatin) 를 갖는 정상핵과는 상이한 구조를 나타내었다 (Fig. 4).

주입된 bacteriophage  $\lambda$ -DNA 의 행동 양상에 대한 모형이 *in vitro* 에서 protein-free DNA 의 nuclear reconstitution 실험을 통하여 제시되어졌는데 (Newport, 1987), 주입된 bacteriophage  $\lambda$ -DNA 가 복제되기 위하여는 nucleus-like structure 를 형성하여야 한다는 사실을 입증했다. 하지만 다른 종류의 DNA 를 대상으로 한 연구는 아직까지 부족한 형편이다. 따라서 앞으로의 연구 방향은 양서류 수정란에 미세주입된 외부 유전자의 다양한 복제 양상을 DNA 의 크기

와 topology 차원등에서의 연구(Etkin *et al.*, 1987; Endean and Smithies, 1989)로부터 좀더 발전시켜서 미세구조상의 행동양상과의 상관관계를 통한 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다(Newport, 1987; Blow and Laskey, 1988; Hutchison, 1988; Blow and Sleeman, 1990). 따라서 *Xenopus laevis* 수정란에 미세주입된 다양한 특성과 크기를 갖는 DNA 를 Southern blotting 을 통한 복제 양상과, 전자현미경 관찰을 통한 주입된 DNA 의 분포 및 nucleus-like structure 의 형성 유무와의 상관 관계를 비교 연구하여야 할 것이며, 이를 통해 eukaryotic DNA 의 복제 기작을 또다른 측면에서 이해할 수 있을 것으로 기대된다.

## 결 론

Transgenic 양서류를 만들고자 하는 연구의 일환으로 bacteriophage  $\lambda$ -DNA 를 *Xenopus* 수정란에 미세주입하여 양서류의 초기 발생동안 외부 유전자의 배발생에 미치는 영향과 행동에 관하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 20 nl당 1 ng에서 2 ng의 농도로 미세주입한 경우 배발생에 크게 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

2. 주입된 DNA 에 의한 생존율의 저하는 저온 처리와 주입 위치를 변경함으로써 어느 정도 회복이 가능하였다.

3. 미세주입된 외부 유전자의 운명과 행동 양상을 조사하기 위하여 광학현미경과 투과전자현미경 관찰을 수행한 결과, 세포 주기중 간기의 정상핵의 구조와 유사한 핵구조물이 유도되고 형성된 것을 관찰할 수 있었다.

## REFERENCES

- Amstrong, J.B. and G.M. Malacinski. 1989. Developmental Biology of the Axolotl. Oxford University Press.
- Blow, J.J. and A.M. Sleeman. 1990. Replication of purified DNA in *Xenopus* egg extract is dependent on nuclear assembly. *J. Cell Sci.* 95, 383-391.
- Blow, J.J. and R.A. Laskey. 1988. A role for the nuclear envelope in controlling DNA replication within the cell cycle. *Nature* 332, 546-548.
- Brow, J.J. and R.A. Laskey. 1986. Initiation of DNA replication in nuclei and purified DNA by a cell-free extract of *Xenopus* eggs. *Cell* 47, 577-587.
- Browder, L.W., C.A. Erickson and W.R. Jeffery. Developmental Biology. 3rd ed. Saunders College Publishing.
- Davidson, E. 1986. Gene activity in early development. 2nd ed. Academic Press.
- Dawid, I.B. and T.D. Sargent. 1988. *Xenopus laevis* in developmental biology and molecular biology. *Science* 240, 1443-1447.
- Endean, D.J. and O. Smithies. 1989. Replication of plasmid DNA in fertilized *Xenopus* eggs is sensitive to both the topology and size of the injected template. *Chromosoma* 97, 307-314.
- 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., B. Pearman and R. Ansah-Yiadom. 1987. Replication of injected DNA templates in *Xenopus* embryos. *Exp. Cell Res.* 169, 468-477.
- Friedmann, T. 1989. Progress toward human gene therapy. *Science* 244, 1275-1281.
- Gilbert, S.F. 1991. Developmental Biology. 3rd ed. Sinauer.
- Gordon, J.W. 1988. Transgenic mice. In: Developmental Genetics of Higher Organisms (G.M. Malacinski, eds). pp.477-498. Macmillan.
- Gridley, T., P. Soriano and K. Jaenish. 1987. Insertional mutagenesis in mice. *Trends Genet.* 3, 162-166.
- Grover, D.M. and B.D. Hames. 1989. Genes and Embryos. IRL Press.
- Gurdon, J.B. and D.A. Melton. 1981. Gene transfer in amphibian eggs and oocytes. *Ann. Rev. Genet.* 15, 189-218.
- Hamburger, V. 1960. A manual of experimental embryology. University of Chicago Press.
- Hutchison, C.J., R. Cox and C.C. Ford. 1988. The control of DNA replication in a cell-free extract

- that recapitulates a basic cell in vitro. Development. 103, 553-566.
- Jaenisch, R. 1988. Transgenic animals. Science 240, 1468-1474.
- Krieg, P.A., M.R. Rebagliati, D.L. Weeks and D.A. Melton. 1986. Gene activation during *Xenopus* embryogenesis. In: Gametogenesis and the Early Embryo. Alan R. Liss, Inc.
- Malacinski, G.M. 1988. Amphibian developmental genetics. In: Developmental Genetics of Higher Organisms (G.M. Malacinski eds.). Macmillan.
- Malacinski, G.M. (eds.) 1988. Developmental Genetics of Higher Organisms: A Primer in Developmental Biology. MacMillan.
- Newport, J. 1987. Nuclear reconstitution in vitro: Stages of assembly around protein-free DNA. Cell 48, 205-217.
- Nieuwkoop, P.D. and J. Faber. 1967. Normal table of *Xenopus laevis* (daudin). North Holland Publ. Co., Amsterdam.
- Palmiter, R.D. and R.L. Brinster. 1986. Germ-line transformation of mice. Ann. Rev. Genet. 20, 463-499.
- Rusconi, S. and W. Schaffner. 1981. Transformation of frog embryos with a rabbit  $\beta$ -globin gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 5051-5055.
- Shiokawa, K., M. Shameshima, K. Tashiro, T. Miura, N. Nakamura and K. Yamana. 1986. Formation of nucleus-like structure in the cytoplasm of  $\lambda$ -DNA injected fertilized eggs and its partition into blastomeres during early embryogenesis in *Xenopus laevis*. Dev. Biol. 116, 539-542.
- Shiokawa, K., K. Tashiro, K. Yamana and M. Same-shima. 1987. Electron microscopic studies of giant nucleus-like structure formed by DNA introduced into *Xenopus laevis* fertilized eggs and embryos. Cell Diff. 20, 253-261.
- Slack, J.M.W. 1991. From Egg to Embryo. 2nd ed. Cambridge University Press.
- Trendelenburg, M.F.P. Outdet, H. Spring and M. Montag. 1986. DNA injections into *Xenopus* embryos: fate of injected DNA in relation to formation of embryonic nuclei. J. Embryol. Exp. Morph. 97 Suppl, 243-255.
- Westphal, H. 1989. Molecular genetics of development studied in the transgenic mouse. Ann. Rev. Cell Biol. 5, 181-196.

## FIGURE LEGENDS

- Fig. 1.** Blastula of *Xenopus laevis* which shows the irregular cleavage caused by injection of DNA (4 ng/20 nl) Arrow indicates the injection site.  $\times 40$
- Fig. 2.** Light micrograph of the "Nucleus-like structure" formed around the injection site. Arrow indicates the nucleus-like structure.  $\times 200$
- Fig. 3.** Electron micrograph showing a normal nucleus in animal side cells of control morula in *Xenopus laevis*. Arrow indicates nuclear envelope. Nucleoplasm at this stage still does not contain definitive nucleoli. Y, yolk platelet; L, lipid droplet; M, mitochondria; N, nucleus.  $\times 12,500$
- Fig. 4.** Electron micrograph of the nucleus-like structure formed in the blastula of *Xenopus laevis*. Arrow head indicates the double-layered nuclear envelope. Arrow shows the furrowing of nuclear envelope into the nucleoplasm. Y, yolk platelet; L, lipid droplet; M, mitochondria.  $\times 10,000$
- Fig. 5.** Electron micrograph showing the part of the nucleus-like structure formed in the blastula of *Xenopus laevis*, which shows the doublelayered nuclear membrane (arrows) and nuclear pore complex (arrow head). L, lipid droplet; M, mitochondria; N, nucleus-like structure.  $\times 42,500$





