

貝類的基因轉殖研究

巫文隆、蔡奇立

中央研究院動物研究所

摘 要

1. pmiwZ質體DNA之鳥類嵌合性啟動子在牡蠣與文蛤基因表現上應屬於非專一性的啟動子。
2. 2~16細胞期之牡蠣與文蛤胚胎是較適合以電穿孔法來進行基因轉殖的時期。
3. 牡蠣與文蛤之藍色反應百分率各為 $5.36\% \pm 1.74\%$ 、 $19.12\% \pm 8.97\%$ 與 7.5% 。

故由上述幾點看來, pmiwZ質體DNA之鳥類嵌合性啟動子在這些生物體內表現確實為一很強而無專一性的啟動子, 其以電穿孔法進行牡蠣與文蛤之基因轉殖實驗是有可行性, 且其可成為軟體動物基因轉殖之模式動物。

一、前 言

本研究嘗試以牡蠣與文蛤為基因轉殖模式動物, 利用pmiwZ質體DNA為轉殖基因, 藉以探討外來基因在牡蠣與文蛤體內表現情形, 並進而了解其外來基因在子代遺傳的情形, 以期建立軟體動物基因轉殖的模式動物。

二、材料與方法

(一)、實驗材料

1. 生物材料

(1)基因轉殖動物

牡蠣 (*Crassostrea gigas* Thunberg) 取自鹿港海域的養殖場, 殼長為7~10公分。

文蛤 (*Meretrix lusoria* Roding) 取自台西海域的養殖場, 殼長為4~5公分。

(2)質體

pmiwZ : plasmid containing LacZ gene (From Dr. K. Ozato, Dept. of Biology, Fac. Lib. Arts Sci., Kyoto University, Kyoto, Japan)

(二)、實驗方法

1. 質體轉形 (Plasmid transformation) (Sambrook et al. 1989)

(1)勝任細胞 (Competent cell) 的製備

由大腸桿菌 (*E. coli*. JH101) 之菌體培養基中，挑單一菌落培養於 5ml SOB液體培養基中。經隔夜培養後，取 0.5ml 菌液倒入 50ml SOB液體培養基中，培養體積與容器體積比例為 1 : 10，於攝氏 37 度下培養 1.4 小時，當 OD_{500} 於 0.45 ~ 0.55 間，將菌液倒於 50ml 離心管並置於冰上，以 750xg 離心 10 分鐘，拋棄上清液，加入 1 / 3 體積 (13.4ml) 的 FSB，輕搖使菌液完全溶解，置於冰上 10 分鐘，用 750 x g 離心 10 分鐘並倒掉上清液，加入 1 / 12.5 體積的 FSB (3.2ml) 輕搖溶解，加入 DMSO 溶液 112 μ l，置於冰上 15 分鐘，然後以 200 μ l 分裝至 - 70 $^{\circ}$ C 備用。

(2)轉形 (Transformation)

將質體 DNA 10ng / 10 μ l，移入 15ml polypropylene 離心管中，加入 200 μ l 已製備之勝任細胞，混合均勻，置於冰上 1 小時，以 42 $^{\circ}$ C 熱刺激 90 秒，再放入冰上 5 分鐘，加入 800 μ l SOC 培養液，37 $^{\circ}$ C 下培養 2 小時，均勻塗抹在含 Ampicillin (60 μ g / ml) 的 LB plate 上，隔夜培養。

2. 小量質體 DNA 製備 (Mini-preparation of plasmid DNA) (Sambrook et al. 1989)

將經轉形後培養於 LB plate 上之菌株挑取數個單一菌落 (single colony)，接種在含有 60 μ g / ml Ampicillin 之 2ml LB 培養液中，37 $^{\circ}$ C 隔夜培養。各取 1.5ml 菌液至微量離心管中，以 15,000rpm 離心 30 秒後，去上清液，加入 100 μ l 冰冷的 Solution I，劇烈震盪使細菌完全溶解，再加 200 μ l 新配製的 Solution II，緩慢地上下倒轉微量離心管數次，不可劇烈震盪，混合後將離心管置於冰上數分鐘，加入 150 μ l 冰冷的 Solution III，緩慢混合後置於冰上 3 ~ 5 分鐘。以 15,000rpm 離心 5 分鐘，將上清液移至新管，加入等體積 phenol / chloroform 劇烈混合以萃取蛋白質。以 15,000rpm 離心 2 分鐘後，將上層含有 DNA 的冰溶液移至新管，加兩倍體積 100% 酒精混合後，置於 - 70 $^{\circ}$ C 下 30 分鐘，待回溫後，以 15,000rpm 在 10 $^{\circ}$ C 下離心 20 分鐘，得到 DNA 沉澱，以 70% 酒精清洗，再經真空乾燥 (Spin-vacuum)，加 50 μ l TE 溶解 DNA。

3. 質體 DNA 鑑定 (Identification of plasmid DNA) (Sambrook

et al. 1989)

將上述小量製備之質體DNA，取適量（ $5\mu\text{l}$ ）DNA，以數種特定的限制酵素切割（Restriction enzyme digest）後，進行1% Agarose膠體電泳，用EtBr（ $0.5\mu\text{l}/\text{ml}$ ）染色，與已知DNA片段大小之marker比較，鑑定其經特定限制酵素切割後之DNA片段大小是否正確。而後將鑑定後正確之菌株接種在含Ampicillin之LB plate上，隔夜培養，保存在 4°C ，約每兩星期更換世代一次，或每 $850\mu\text{l}$ 菌液加入 $150\mu\text{l}$ 滅菌的甘油（Glycerol），在 -70°C 下永久保存。

4. 大量質體DNA製備(Large-scale preparation of plasmid DNA) (Sambrook et al. 1989)

經由小量質體DNA製備，以特定限制酵素鑑定後正確的菌落接種在含Ampicillin之LB plate上，隔夜培養，挑選單一菌落接種在30ml含Ampicillin（ $60\mu\text{l}/\text{ml}$ ）之LB Broth中，隔夜培養，將25ml菌液移至裝有500ml LB（含 $60\mu\text{l}/\text{ml}$ Ampicillin）培養液之2升錐形瓶(Flask)中，置於振盪培養箱中 37°C 下以3,000rpm的速度搖晃培養2.5小時後加2.5ml Chloramphenicol（34mg/ml），繼續培養12~16小時，將菌液移至500ml離心瓶中，用Hitachi RPR9-2 Rotor在 4°C 下以4,000rpm離心15分鐘，收集細菌細胞，倒棄LB，加100ml STE溶液，劇烈搖盪使其細菌細胞重新散開後，同上在 4°C 下以4,000rpm離心15分鐘，倒棄STE，加10ml冰冷的Solution I，劇烈搖盪使其細菌細胞均勻散開後，加1ml新鮮配製的Lysozyme solution與20ml剛配的Solution II，緩慢的上下倒轉離心瓶數次混合後，置於室溫下5至10分鐘，加15ml冰冷的Solution III輕搖離心瓶數次，將離心瓶置於冰上10分鐘，在 4°C 下以4,000rpm離心15分鐘，將懸浮液以浮游生物網過濾至250ml乾淨的血清瓶中，加0.6倍體積之Isopropanol，均勻混合並分裝至50ml離心管中，用Hitachi RPR20-2 Rotor室溫下以12,000rpm離心30分鐘得到DNA沉澱，倒棄上清液，加2ml 70%酒精清洗，將DNA沉澱真空乾燥，溶於TE溶液中。加TE溶液於DNA/TE溶液中至總體積為8毫升，加8g CsCl於DNA/TE溶液並估算其總體積，每10ml DNA/TE/CsCl溶液加0.8ml EtBr（10mg/ml），均勻混合後，移至50ml離心管中，在 20°C 以8,000rpm離心5分鐘，以針筒將澄清液抽出來，注入Hitachi Quick-Seal離心管中，以礦物油（mineral oil）將離心管補滿及與另一管平衡之並封孔，用Hitachi RP83T Rotor在 20°C 下以60,000rpm離心24小時。經超高速離心後，在UV照射下可見兩環狀區，上環為線形DNA或是缺幾個鹼基（Base）之不完整環狀DNA，下環則為完整的環狀質體

DNA，以18G針頭將下面環狀區質體DNA抽出，再加入TE/CsCl / EtBr溶液至Quick-Seal離心管中，平衡封孔，再上第二次超高速離心，用18G針頭將質體DNA抽出，用n-butanol等體積萃取數次，以除去EtBr，直至DNA Solution完全無色為止，將DNA溶液裝在透析袋（Dialysis bag）中，置於2升TE溶液進行透析以除去CsCl，於16小時內更換數次TE溶液，最後將DNA溶液自透析袋中吸出，酒精沉澱、真空乾燥，再溶於適量TE中，測波長260與280nm吸光值以確定所抽取的質體DNA的總量與純度。

5. 基因轉殖用質體DNA備製（Plasmid DNA preparation for gene transfer）

將大量純化備製之質體DNA，在DNA上只有一個特殊限制酵素切割位置，於37℃下作切割反應數小時後，取少量DNA作膠體電泳，檢視是否所有的DNA均已完全作用成爲線狀的質體DNA（Linear form），未經切割之超螺旋狀（Supercoil form）質體DNA在電泳膠片中跑的速度比線狀的質體DNA快，故可加以區別之。若仍有未切割完全者，則繼續作用，待已作用完全後，加等體積Phenol / Chloroform萃取三次，以去除限制酵素，100%酒精沉澱、真空乾燥，溶於少量TE中，取一部份溶液去測UV260 / 280nm吸光值，計算DNA濃度。

6. 牡蠣與文蛤之繁殖與飼育

(1) 牡蠣之繁殖與幼生飼育

由於具受精能力的牡蠣成熟卵係在第一極體排放之前（一般脊椎動物具受精能力的成熟卵則爲第一極體排放之後）故成熟具受精能力的牡蠣精子與卵子僅須解剖牡蠣精、卵巢即可獲得。將精子與卵子分置於含150 ml滅菌海水的250 ml燒杯中，並利用抽樣計數調整使其卵數每毫升約10,000~15,000顆，並予以受精。其胚胎分裂過程如表一，在桑椹期時，牡蠣胚胎開始具有移動能力，而在面盤幼蟲（Veliger）期時，牡蠣幼生開始具有攝食能力，此時便餵食黃色鞭毛藻、扁球藻與綠球藻混合物，持續飼養至幼生沉降（Settle down）與變態（Metamorphosis）（Bonar et al. 1990）。

(2) 文蛤之繁殖與幼生飼育

由於具受精能力的文蛤成熟卵係在第一極體排放之後，故成熟具受精能力的文蛤之精子與卵須利用溫度刺激來誘導排精與排卵。首先取成熟文蛤種貝（2~4齡，成熟期5~7月）陰乾20小時左右，放入流動海水中2~3小時，再放進0.15~0.25%的氨海水中浸泡30分鐘後，將經氨處理的文蛤分別置於含150 ml滅菌海水的250ml燒杯中，待其排精排卵，並予以受精與洗卵。其胚胎分裂過程與牡蠣類似，而文蛤幼生的飼育方式也與牡蠣飼育方式相同。

表一 The percentage of blue stain oyster (*Crassostrea gigas*) in different embryo stage by electroporation with an exponential decay wave.

Treatment	Blue stain oyster %									
	Unfert. (1 cell stage)		Fert. 5mins (1 cell stage)		Fert. 30mins (1 cell stage)		Fert. 2hr. (2~16 cell stage)		Fert. 4hr. (morula stage)	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Control + DNA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
100V 960 μ F	0.78%	0	0	0	4.17%	0	4.88%	6.94%	2.13%	0
	(1/129)				(4/96)		(4/82)	(5/72)	(2/94)	
200V 500 μ F	0	0	0	0	0	0	4.62%	4.62%	2.35%	0
300V 250 μ F	0	0	0	0	0	0	(3/65)	(6/130)	(2/85)	0
							8.43%	4.51%	0	0
400V 125 μ F	0	2.08%	0	0	0	0	(3/83)	(6/137)	0	0
		(1/48)					3.23%	4.89%	0	0
Mean \pm S.D.	1 cell stage: 0.29% \pm 0.94%									
	2~16 cell stage: 5.36% \pm 1.74%									
	morula stage: 0.64% \pm 1.10%									

7. 牡蠣與文蛤之基因轉殖

本實驗以電穿孔法進行基因轉殖，以pmiwZ(β -galactosidase gene)為轉殖基因(圖一)，質體DNA濃度為 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ ，並用KpnI限制酵素切成直線形狀，實驗條件如下：

(1) 牡蠣基因轉殖條件

電脈波型：指數式遞減波

電擊條件：Voltage, 100~400V; Capacity, 125~960 μF ; Sample volume, 800 μl (with 8,000 embryos) ; 極距為0.4cm

電擊溶液：滅菌海水

胚胎時期：不同卵裂時期(1 cell stage, 2~16 cell stage, morula stage)

(2) 文蛤基因轉殖條件

電脈波型：方形波

電擊條件：Voltage, 4~10kV; Pulse time, 160 μs ; Number of Pulse, 1024; Cycle, 5~20; Burst time, 0.8s; Dial, 220; Sample volume, 100 μl (with 500 embryos)。

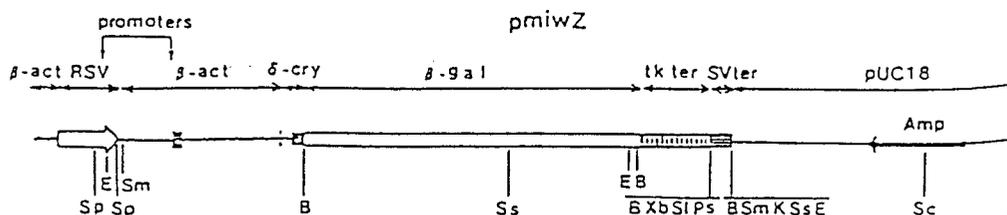
電擊溶液：滅菌海水

胚胎時期：2~16 cell stage

牡蠣與文蛤之胚胎經電脈衝擊後，以滅菌海水清洗數次，將牡蠣或文蛤胚胎置於含5ml滅菌海水的培養皿中，以低速旋轉培養，經24~36小時後，胚胎便發育至面盤幼蟲期。

8. β -galactosidase活性測定 (Inoue et al. 1991)

將胚胎時期經電穿孔擊處理之牡蠣或文蛤的面盤幼蟲置於2ml微量離心管中，加入2ml 2.6% NaOCl在 4°C 下對標本體表進行滅菌15~30分鐘，此可降低因細菌沾染生物體表所造成背景顏色的干擾(暈開藍色反應)，用PBS清洗數次以去除NaOCl，加入2ml固定溶液(Fix solution)在 4°C 下固定1小時，除去固定溶液



圖一 Structure of pmiwZ (After Suemori, 1990).

，以PBS清洗數次，並加入 1 ml 染色溶液(Stain solution)在37°C 下染色。經12~16小時後，去除染色溶液，將標本置於含5ml 1mM EDTA/PBS的培養皿中，以倒立顯微鏡觀察 β -galactosidase在生物體內表現的情形。

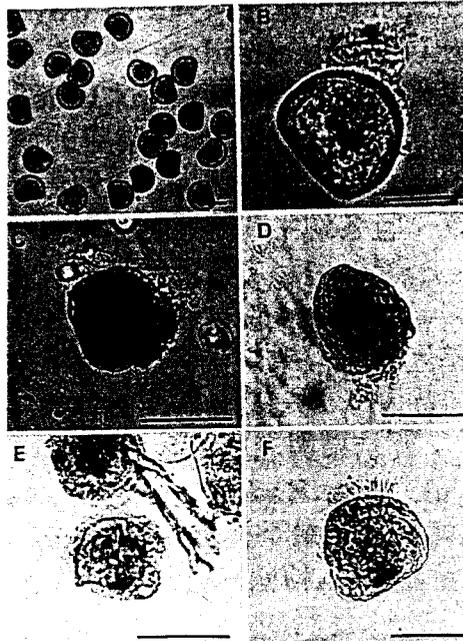
三、結果與討論

pmiwZ為含有lacZ (Bacterial β -galactosidase gene) 與鳥類嵌合性啓動子 (Avian chimeric promoter: miw) 的質體DNA，此鳥類嵌合性啓動子是由Rous sarcoma virus (RSV) long terminal repeat (LTR) 與chicken β -actin promoter所組成，故其為一表現能力極強的質體DNA。若將pmiwZ轉殖入胚胎之內時，此質體DNA便會表現出neutral β -galactosidase，然而一般真核生物體細胞之溶小體 (Lysosome) 內主要為acidic β -galactosidase的型式 (在內質網與粒線體內仍有少量neutral β -galactosidase) (Chuang 1990)，此acidic β -galactosidase的活性可藉由pH值與一些重金屬離子 (如 Mg^{2+} 與 Zn^{2+}) 所抑制 (Chuang et al. 1991)，若此時將經基因轉殖之胚體固定，並置於含重金屬離子之染色溶液(pH7.5)時，其生物體內之內生性acidic β -galactosidase的活性會被抑制，若此時生物體內某一特定細胞攜帶有pmiwZ質體DNA，並表現出neutral β -galactosidase時，其neutral β -galactosidase 會將滲入胚體中之X-gal分解，經氧化而在特定細胞內呈藍色反應，由此簡易的測試方法便可測試其生物體是否有攜帶外來基因。本實驗的方法便是以此簡易的測試方法來探討外來基因在牡蠣與文蛤體內表現的情形。

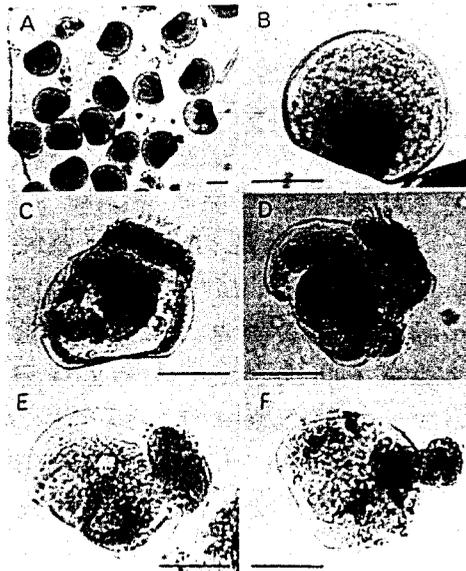
由圖版一所示，取經電擊處理之牡蠣面盤幼蟲進行 β -galactosidase活性測定，其結果發現，在控制組 (Control) 中僅在消化道 (Digestive duct) 中有藍色反應 (圖版一A, B)；而在基因轉殖組中，其牡蠣面盤幼蟲可見全身性藍色反應 (圖版一C, D) 或鑲嵌狀 (Mosaic) 分布的藍色反應 (圖版一E, F)。就藍色反應百分率而言，由表一所示，取不同卵裂時期之牡蠣胚胎進行基因轉殖，其結果發現，以2~16細胞期之牡蠣胚胎進行基因轉殖時，可得較高藍色反應百分率 ($5.36\% \pm 1.74\%$)，故以下實驗便針對多細胞期進行基因轉殖。

在文蛤2~16細胞期之基因轉殖實驗，其結果與牡蠣基因轉殖結果類似，在控制組中其也僅在消化道中有藍色反應 (圖版二A, B)；而在基因轉殖組中，其文蛤面盤幼蟲的全身也出現藍色反應 (圖版二C, D) 或鑲嵌狀分布的藍色反應 (圖版二E, F)，其藍色反應百分率為 $19.12\% \pm 8.97\%$ (表二)。

在牡蠣與文蛤基因轉殖實驗中，其控制組之面盤幼蟲僅在消化道中有藍色反應 (圖版一、二A, B)，推測其原因可能是牡蠣或文蛤幼生本身之



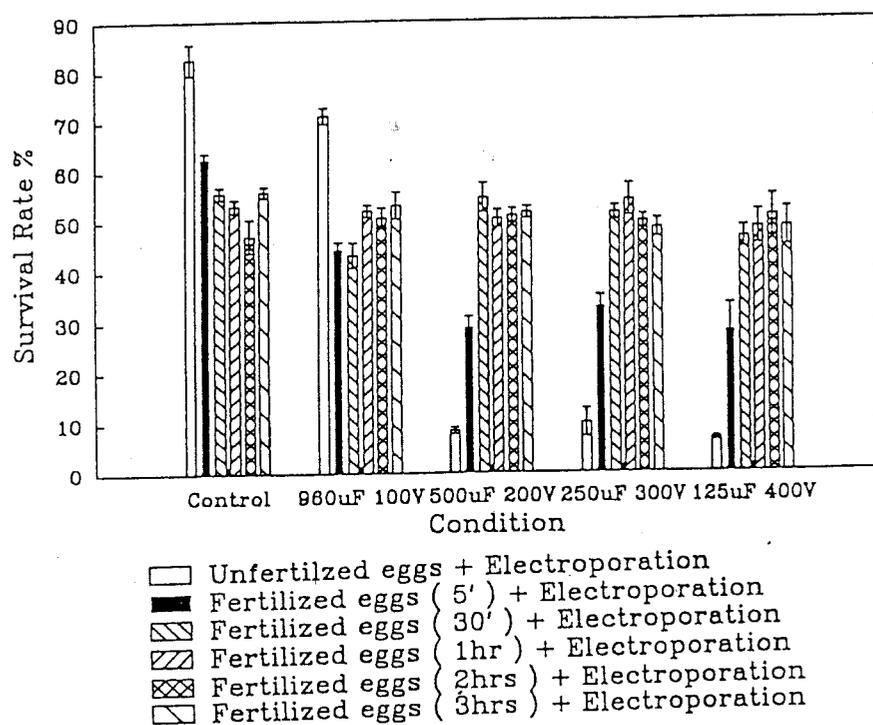
圖版一 Expression of *pmiwZ* in veliger larvae of oyster (*Crassostrea gigas*). Bar:50 μm .
 A,B. Controlled oyster show the β -galactosidase activity in digestive duct.
 C,D. Transgenic oyster show the β -galactosidase activity ubiquitous in whole body.
 E,F. Transgenic oyster show the β -galactosidase activity mosaic in whole body.



圖版二 Expression of *pmiwZ* in veliger larvae of hard clam (*Meretix lusoria*). Bar:50 μm .
 A,B. Controlled hard clam show the β -galactosidase activity in digestive duct.
 C,D. Transgenic hard clam show the β -galactosidase activity ubiquitous in whole body.
 E,F. Transgenic hard clam show the β -galactosidase activity mosaic in whole body.

內生性neutral β -galactosidase或是其共生菌 (Symbiotic bacteria) 在消化道所分泌的neutral β -galactosidase, 將滲入胚體之X-gal分解而呈藍色反應, 此現象在其他報告也有相同結果 (Inoue et al. 1991, Gong 1992)。然值得一提的是, 在控制組面盤幼蟲的消化道並非在每次進行neutral β -galactosidase活性測試時皆會出現藍色反應, 其多在有攝食行為之後才會有藍色反應, 且各幼生間的藍色反應強度也不一, 若此為內生性neutral β -galactosidase所引起之藍色反應, 其各幼生間的藍色反應強度應該是一致, 故本實驗之藍色反應可能是由共生在面盤幼蟲消化道之共生菌所引起的。而在基因轉殖組中, 其在牡蠣與文蛤之面盤幼蟲的全身可見藍色反應 (圖一、二C, D), 一部分的面盤幼蟲呈鑲嵌狀分布的藍色反應 (圖一、二E, F), 此結果與老鼠胚胎進行pmiwZ質體DNA轉殖的結果類似 (Suemori et al. 1990, Kadokawa et al. 1990), 但與魚類胚胎進行pmiwZ質體DNA轉殖的結果不盡相同 (Inoue et al. 1991; Gong 1992), 如經pmiwZ質體DNA轉殖的虹鱒仔魚其僅在卵黃囊中出現藍色反應, 故由此看來, pmiwZ質體DNA之鳥類嵌合性啟動子在牡蠣與文蛤基因表現上應屬於非專一性的啟動子。

就藍色反應百分率而言 (表一), 其結果發現, 以2~16細胞期之牡蠣胚胎進行基因轉殖時, 可得較高基因轉殖效率 ($5.36\% \pm 1.74\%$), 而在文蛤2~16細胞期進行基因轉殖時, 其基因轉殖效率更是高達 $19.12\% \pm 8.97\%$ (表二), 其他報告也有類似的結果 (Buono and Linsner 1992, Gong 1992)。由此結果看來, 是否意謂著以電穿孔法進行基因轉殖時, 不應如微量注射法只侷限於1~2細胞期進行基因轉殖, 而應投入在2~16細胞時期進行基因轉殖呢? 在前一部份的實驗的結果也發現隨著胚胎的分裂, 其對電脈衝擊的耐受性有逐漸增加的趨勢 (圖二), 換言之, 以多細胞胚胎進行基因轉殖時, 可得較高之存活率。綜合上述實驗結果, 以電穿孔法進行2~16細胞胚胎基因轉殖時, 可得較佳基因轉殖效率, 其可能原因為: 以電穿孔法進行基因轉殖時, 外來基因是以擴散 (Diffuse) 方式進入細胞之中, 此不若以微量注射法直接將外來基因注射入細胞核之中, 若此時欲基因轉殖之胚胎只停留在剛受精而未進行卵裂時, 外來基因需經細胞質, 而後才擴散入細胞核中, 在此漫長擴散過程中, 外來基因是很容易受到細胞內酵素所分解; 若此時欲基因轉殖之胚胎為2~16細胞期時, 其細胞分裂時, 細胞核內之染色體會因核膜消失而散佈在細胞質之中, 故此時外來基因僅須擴散入細胞質中, 便可與細胞內染色體接觸; 相對而言, 外來基因與細胞內染色體結合機率就遠較在以單細胞胚胎基因轉殖時外來基因須擴散入細胞核內之機率為大, 因此由本研究結果可以初步獲知, 2~16細胞期的文蛤與牡蠣胚胎是較適合以電穿孔法進行基因轉殖。



圖二 The effect of electric impulse on the survival rate of different oyster embryo stages by using Bio-Rad Gene Pulser.

表二 The percentage of blue stain hard clam (*Meretrix lusoria*) in 2~16 cell stage at different voltage and cycles by electroporation with a square wave.

Treatment	Blue stain hard clam %
Control	0 (0/30)
Control + DNA	0 (0/42)
4kV 5	6.25% (2/32)
10	10% (5/50)
20	20% (5/25)
6kV 5	7.14% (2/28)
10	16.67% (6/36)
20	20% (9/45)
8kV 5	21.05% (12/57)
10	23.08% (6/26)
20	18.18% (4/22)
10kV 5	38.46% (20/52)
10	28.57% (16/56)
20	20% (3/15)
Mean ± S.D.	19.12% ± 8.97%

Other condition: $160\mu\text{s}$, 2^{11} , 0.8s, 220, $100\mu\text{l}$.

謝 辭

本研究承中央研究院動物研究所軟體動物研究室相關同仁的合作協助，經費來源係由行政院農委會“生物技術在水產養殖上的應用研究”專案計劃的補助，特此致謝。

參考文獻

- Bonar DB, SL Coon, M Walch, RM Weiner, W Fitt. 1990. Control of oyster settlement and metamorphosis by endogenous and exogenous chemical cues. *Bull. Mar. Sci.*, 46(2) : 484-498.
- Buono RJ, PJ Linser. 1992. Transient expression of RSV-CAT in transgenic zebrafish made by electroporation. *Investigative Ophthalmology Visual Science*, 33: 1006-1006.
- Chuang NN. 1990. A neutral beta-galactosidase from the hepatopancreas of the shrimp *Penaeus japonicus* (Crustacea: Decapoda): Dimeric and sialylated. *Comp. Biochem. Physiol.*, [B], 96(4) : 747-751.
- Chuang NN, BC Yang, CC Yeh. 1991. Purification and characterization of an acidic β -galactosidase from the hepatopancreas of the shrimp *Penaeus japonicus* (Crustacea: Decapoda). *J. Exp. Zool.*, 259: 26-31.
- Inoue K, S Yamashita, N Akita, T Mitsuboshi, E Nagahisa, T Shiba, T Fujita. 1991. Histochemical detection of foreign gene expression in rainbow trout. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57(8): 1511-1517.
- Kadokawa Y, H Suemori, N Nakatsuji. 1990. Cell lineage analyses of epithelia and blood vessels in chimeric mouse embryos by use of an embryonic stem cell line expressing the β -galactosidase gene. *Cell Differ. Dev.*, 29: 187-194.
- Gong Hong-Yi. 1990. Gene transfer of Zebra-Cichlid (*Cichlasoma nigrofasciatum*) and black sea bream (*Acanthopagrus schlegeli*). National Taiwan University thesis, 81pp.
- Sambrook J, EF Fritsch, T Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Suemori H, Y Kadodawa, K Goto, I Araki, H Kondoh, N Nakatsuji. 1990. A mouse embryonic stem cell line showing pluripotency of differentiation in early embryos and ubiquitous β -galactosidase expression. *Cell Differ. Dev.*, 29: 181-186.