

**KARAKTERISASI PROMOTER  $\beta$ -ACTIN IKAN NILA (*Oreochromis niloticus*)****Characterization of  $\beta$ -Actin Promoter from Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*)**Alimuddin<sup>1</sup>, A. Octavera<sup>1</sup>, O. Z. Arifin<sup>2</sup> dan K. Sumantadinata<sup>1</sup><sup>1</sup>Laboratorium Reproduksi dan Genetik Ikan, Departemen Budidaya, IPB, Bogor  
Korepondensi: [alimuddin\\_alsani@yahoo.com](mailto:alimuddin_alsani@yahoo.com). Tel. 0251-622940. Fax. 0251-622941<sup>2</sup>Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar, Sempur, Bogor**ABSTRACT**

Promoter is one of the factors determining the successful of transgenesis. In this study we isolated and characterized  $\beta$ -actin promoter from Nile tilapia (tiBP) towards production of autotransgenic tilapia.  $\beta$ -actin promoter has high activity in muscle. Sequence of tiBP promoter was isolated by using PCR method. Sequencing was performed using ABI PRISM 3100 machine. Analysis of sequences was conducted using GENETYX version 7 and TFBind softwares. DNA fragment of PCR amplification product digested from the vector cloning was then ligated with pEGFP-N1 to generate ptiBP-EGFP construct. The construct was microinjected into one-cell stage of zebrafish (*Danio rerio*) embryos to test the tiBP promoter activity. EGFP gene expression was observed by fluorescence microscope. The result of sequence analysis showed that the length of DNA fragment obtained is about 1.5 kb and containing the evolutionary conserved sequences of transcription factor for  $\beta$ -actin promoter including CCAAT, CArG and TATA boxes. Furthermore, tiBP sequence in ptiBP-EGFP construct could regulated GFP expression in muscle of zebrafish embryos injected with the construct. The results suggested that PCR amplification product is the regulator sequence of tilapia  $\beta$ -actin gene. Autotransgenic tilapia can be then produced by changing GFP gene fragment of ptiBP-EGFP construct with genes from tilapia encoding important traits in aquaculture.

Keywords: cloning,  $\beta$ -actin promoter, autotransgenic, EGFP, *Oreochromis niloticus*, *Danio rerio*

**ABSTRAK**

Promoter merupakan salah satu faktor penentu keberhasilan transgenesis. Pada penelitian ini kami mengisolasi dan mengkarakterisasi promoter  $\beta$ -actin dari ikan nila (tiBP) dalam rangka pembuatan ikan nila autotransgenik. Promoter  $\beta$ -actin memiliki aktivitas tinggi pada jaringan otot. Sekuens promoter tiBP diisolasi menggunakan metode PCR. Sekuensing dilakukan menggunakan mesin ABI PRISM 3100. Analisa sekuens menggunakan software GENETYX versi 7 dan TFBind. Fragment DNA hasil amplifikasi PCR yang didigesti dari vektor kloning selanjutnya diligasi dengan pEGFP-N1 untuk membuat konstruksi ptiBP-EGFP. Konstruksi ptiBP-EGFP dimikroinjeksi ke embrio ikan zebra (*Danio rerio*) fase 1 sel untuk menguji aktivitas promoter tiBP. Ekspresi gen EGFP diamati menggunakan mikroskop fluoresens. Analisa sekuens menunjukkan bahwa panjang fragmen DNA hasil amplifikasi PCR sekitar 1,5 kb dan memiliki faktor transkripsi yang konserf untuk promoter  $\beta$ -actin, yaitu CCAAT, boks CArG dan TATA. Selanjutnya, sekuens tiBP dalam konstruksi ptiBP-EGFP mampu mengendalikan ekspresi gen EGFP pada jaringan otot embrio ikan zebra yang dimikroinjeksi dengan konstruksi tersebut. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa fragmen DNA hasil amplifikasi PCR tersebut merupakan sekuens promoter  $\beta$ -actin ikan nila. Pembuatan ikan nila autotransgenik selanjutnya dapat dilakukan dengan mengganti gen EGFP pada ptiBP-EGFP dengan gen-gen asal ikan nila yang mengkodekan karakter penting dalam budidaya ikan.

Kata kunci: kloning, promoter  $\beta$ -actin, autotransgenik, EGFP, *Oreochromis niloticus*, *Danio rerio*

## PENDAHULUAN

Rekayasa genetik dapat menjadi alat yang sangat berguna untuk pengembangan dan perbaikan kualitas ikan budidaya. Dalam rangka pencapaian tujuan tersebut, teknologi transgenesis telah diaplikasikan pada beberapa jenis ikan budidaya di manca negara, seperti lele “channel” *Ictalurus punctatus* (Dunham *et al.*, 1987), ikan nila *Oreochromis niloticus* (Brem *et al.*, 1988; Martinez *et al.*, 1996), ikan rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Guyomard *et al.*, 1989), ikan mas *Cyprinus carpio* (Zhang *et al.*, 1990; Hinitz dan Moav, 1999), salmon Atlantik *Salmo salar* (Shears *et al.*, 1991), salmon coho *Oncorhynchus kisutch* (Devlin *et al.*, 1994) dan lele Afrika *Clarias gariepinus* (Volckaert *et al.*, 1994). Meskipun transgenesis telah berhasil diterapkan pada beberapa jenis ikan seperti yang dicontohkan di atas, elemen regulator/promoter sebagai salah satu komponen dari konstruksi gen yang berfungsi mengontrol ekspresi gen asing (transgen) pada ikan transgenik masih menjadi masalah. Umumnya penggunaan promoter yang bukan berasal dari ikan menghasilkan ekspresi transgen yang rendah atau bahkan tidak ada ekspresi (Chourrout *et al.*, 1990; Penman *et al.*, 1991). Permasalahan ini dapat diatasi dengan menggunakan sekuens regulator dari ikan yang sama atau sekerabat dengan ikan yang akan dibuat menjadi transgenik. Telah dibuktikan bahwa sekuens promoter dari ikan umumnya memiliki aktivitas lebih tinggi dalam mengatur ekspresi transgen dibandingkan dengan yang berasal dari mamalia atau virus pada ikan transgenik (Alam *et al.*, 1996; Hanley *et al.*, 1998; Alimuddin, 2003). Selanjutnya, bila ikan transgenik dipasarkan, diduga bahwa penerimaan konsumen akan lebih baik pada ikan transgenik yang dibuat menggunakan konstruksi gen dengan promoter dan gen dari ikan, khususnya yang berasal dari spesies yang sama dibandingkan dengan yang berasal dari mamalia atau virus (Maclean dan Laight, 2000).

Promoter  $\beta$ -actin telah diisolasi dari beberapa jenis ikan dan dilaporkan sebagai

regulator dengan aktivitas tinggi dalam mengatur ekspresi transgen pada ikan transgenik. Promoter  $\beta$ -actin telah diisolasi dari ikan mas *Cyprinus carpio* (Liu *et al.*, 1990), ikan medaka *Oryzias latipes* (Takagi *et al.*, 1994), ikan zebra *Danio rerio* (Higashijima *et al.*, 1997), ikan mud loach *Misgurnus mizolepis* (Noh *et al.*, 2003). Promoter  $\beta$ -actin dari ikan medaka mampu mengatur ekspresi gen penanda *LacZ* pada embrio ikan medaka (Takagi *et al.*, 1994). Ekspresi gen GFP yang kuat dengan menggunakan promoter  $\beta$ -actin medaka juga telah ditunjukkan pada ikan medaka (Hamada *et al.*, 1998) dan rainbow trout (Yoshizaki, 2001). Selanjutnya, promoter ini juga aktif mengatur ekspresi gen pengkode enzim  $\Delta 6$ -desaturase pada ikan zebra (Alimuddin *et al.*, 2005) dan gen pengkode hormon pertumbuhan pada ikan nila (Kobayashi *et al.*, 2007). Promoter  $\beta$ -actin ikan mas mampu mengatur ekspresi beberapa gen penanda pada beberapa jenis ikan (Liu *et al.*, 1990; Moav *et al.*, 1993). Sementara itu, promoter  $\beta$ -actin dari ikan zebra dilaporkan aktif mengatur ekspresi gen GFP pada ikan zebra (Higashijima *et al.*, 1997).

Pengujian aktivitas promoter umumnya dilakukan dengan cara menginjektikan konstruksi gen ke embrio dan kemudian mengamati ekspresi sementara (*transient*) dari gen penanda yang digunakan (Maclean *et al.*, 2002; Takagi *et al.*, 1994; Tsai *et al.*, 1995; Maclean *et al.*, 1996; Muller *et al.*, 1997; Hamada *et al.*, 1998; Alimuddin, 2003; Kato *et al.*, 2007) atau membuat ikan transgenik (Higashijima *et al.*, 1997). Metode lain yang juga bisa digunakan adalah menginjektikan langsung konstruksi gen ke otot daging (Hansen *et al.*, 1991; Rahman and Maclean, 1992) atau transfeksi ke sel kultur (Kato *et al.*, 2007). Metode injeksi langsung ke otot daging biasanya memerlukan tahap lanjutan seperti RT-PCR untuk melihat tingkat transkripsi RNA. Pengamatan ekspresi gen GFP pada daging ikan tempat injeksi relatif sulit dilakukan karena umumnya terhalang oleh pigmen kulit. Kelemahan metode transfeksi adalah berkaitan dengan tipe sel kultur yang digunakan, umumnya hanya satu jenis sel. Hal ini akan membatasi pengujian aktivitas

hanya untuk regulator yang sesuai dengan sel tersebut, atau hanya untuk promoter yang bersifat *ubiquitous* (aktif di semua tipe jaringan). Pada penelitian ini kami mengisolasi promoter  $\beta$ -actin dari ikan nila, membuat konstruksi gen ptiBP-EGFP, menginjeksikannya ke embrio ikan zebra dan selanjutnya ekspresi sementara diamati untuk mengetahui aktivitasnya. Ikan zebra digunakan sebagai model percobaan karena ikan ini memiliki telur yang transparan sehingga ekspresi gen berpendar GFP mudah diamati. Selain itu ikan ini mudah dipijahkan.

## BAHAN DAN METODE

### *Isolasi DNA genomik dan amplifikasi PCR*

DNA genomik diekstraksi dari jaringan sirip ikan nila menggunakan kit isolasi DNA (Puregene, Minneapolis, USA) dengan sedikit modifikasi dari prosedur dalam manualnya. Sekuens promoter  $\beta$ -actin ikan nila, disingkat menjadi tiBP, diisolasi menggunakan metode PCR dengan primer yang didesain berdasarkan database di Bank Gen. Database yang digunakan meliputi ikan mas (no. akses Bank Gen: M24113), ikan medaka (no. akses Bank Gen: S74868), ikan *Mylopharyngodon piceus* (no. akses Bank Gen: AY289135) dan ikan *Megalobrama amblycephala* (no. akses Bank Gen: AY170122). Pada PCR pertama menggunakan primer forward F-BP adalah 5'-GTGAGTGACCGCCGACCAATC-3' dan reverse R-BP1 (5'-TAGAAGGTGTGRTGCCAGATCTTC-3'), dan yang kedua menggunakan primer forward F-BP dan reverse R-BP2 (5'-TTGCACATRCCRG-AKCCGTTGTC-3').

Reaksi PCR dengan volume 10  $\mu$ L mengandung 1  $\mu$ L LA Buffer; 1  $\mu$ L dNTPs mix; 1  $\mu$ L MgCl<sub>2</sub>; 1  $\mu$ L masing-masing primer; 0,05  $\mu$ L LA *Taq* polymerase (TAKARA BIO); 1  $\mu$ L DNA genomik hasil pengenceran 10x dan sisanya adalah air steril hasil destilasi (SDW). Amplifikasi PCR dilakukan dengan program: 1 siklus pada suhu 94°C selama 3 menit; 5 siklus pada suhu 94°C selama 30 detik dan 62°C selama 3 menit; 30 siklus pada suhu 94°C selama 30 detik, 58°C selama 30 detik dan 72°C selama

3 menit; serta 1 siklus pada suhu 72°C selama 3 menit. Pengecekan hasil amplifikasi PCR dilakukan dengan elektroforesis menggunakan gel agarosa 0,7%. Fragmen DNA hasil amplifikasi PCR diisolasi dari gel menggunakan kit purifikasi DNA (MoBio Laboratories, CA, USA) sesuai instruksi dimanualnya.

### *Ligasi fragmen DNA, transformasi dan seleksi koloni bakteri*

Fragmen DNA hasil purifikasi dari gel diligasi dengan vektor kloning pGEM-T Easy (Promega, WI, USA) dengan komponen reaksi ligasi meliputi 5  $\mu$ L larutan DNA hasil purifikasi; 0,5  $\mu$ L pGEM-T Easy; 6,5  $\mu$ L 5x buffer ligasi, dan 1  $\mu$ L enzim T4 DNA ligase (Promega). Inkubasi dilakukan selama 2 jam pada suhu ruang dan dilanjutkan semalam di dalam refrigerator (suhu sekitar 4°C). Sebanyak 6,5  $\mu$ L hasil reaksi ligasi dicampur ke dalam tabung mikro berisi sel kompeten *E. coli* DH-5 $\alpha$ . Transformasi dilakukan menggunakan kejutan panas pada suhu 42°C selama 45 detik. Sekitar 2-3 menit setelah diinkubasi dalam es, ke dalam tabung mikro ditambahkan 900  $\mu$ L larutan SOC (1,2 g polypeptone; 0,3 g yeast extract; 0,035 g NaCl; 0,011 g KCl; 600  $\mu$ L MgCl<sub>2</sub> 1M; 600  $\mu$ L MgSO<sub>4</sub> 1M dan 60  $\mu$ L glucose 2M dalam 60 mL SDW). Selanjutnya inkubasi dilakukan menggunakan shaker pada suhu 37°C selama 1 jam. Bakteri disebar di atas cawan agarosa 2xYT (1,6% polypeptone, 1% yeast extract, 0,5% NaCl dan 1,5% agarosa dalam SDW) yang mengandung ampicilin, IPTG dan X-gal (disingkat menjadi 2xYT-A,I,X). Cawan agarosa berisi bakteri diinkubasi pada suhu 37°C selama sekitar 14 jam.

Seleksi koloni bakteri yang membawa plasmid hasil ligasi dilakukan dengan metode "cracking". Koloni bakteri berwarna putih yang tumbuh dalam cawan agarosa diambil menggunakan tusuk gigi steril dan dioleskan ke dasar tabung mikro volume 1,5 mL untuk "cracking", dan dilanjutkan dengan menggoreskan tusuk gigi tersebut ke dalam cawan agarosa 2xYT-A,I,X untuk membuat "master plate". Master plate merupakan cawan agarosa yang mengandung setiap koloni bakteri yang dianalisa dengan

cracking, yang merupakan sumber koloni bakteri untuk tahap penelitian berikutnya. Master plate diinkubasi pada suhu 37°C sekitar 8 jam. Ke dalam tabung mikro yang berisi bakteri ditambahkan 10 µL buffer cracking (0,2 g saccharosa, 40 µL NaOH 5M, 50 µL SDS 10% dan sisanya SDW sehingga volume larutan menjadi 1 mL), 10 µL larutan EDTA 10mM dan sekitar 2 µL 6x buffer loading DNA berisi KCl 4M dengan perbandingan volume 1:1. Setelah diinkubasi sekitar 5 menit, dilakukan sentrifus pada kecepatan 13.000 rpm selama 15 menit. Sebanyak 10 µL supernatan yang terbentuk digunakan untuk elektroforesis menggunakan gel agarosa 0,7%. Untuk mengetahui koloni bakteri yang membawa DNA insersi dalam plasmid digunakan koloni bakteri biru sebagai kontrol. Ukuran DNA plasmid koloni bakteri yang membawa insersi akan lebih besar daripada yang dari kontrol. Koloni bakteri yang membawa DNA insersi diambil dari master plate menggunakan tusuk gigi steril dan disentuhkan ke media cair 2xYT yang mengandung ampisilin dalam tabung kultur berbentuk "L" untuk diperbanyak. Inkubasi bakteri menggunakan shaker dilakukan pada suhu 37°C selama sekitar 14 jam.

### ***Isolasi plasmid***

Isolasi plasmid dilakukan menggunakan kit FlexiPrep (Amersham Biosciences, NJ, USA) dengan prosedur sesuai manual. Plasmid DNA hasil isolasi dilarutkan menggunakan SDW sebanyak 50 µL. Setelah divorteks, tabung mikro berisi plasmid tersebut dibiarkan selama 5 menit di suhu ruang. Kemudian dilakukan sentrifus pada suhu ruang dengan kecepatan 13.000 rpm selama 1-2 menit. Supernatan yang terbentuk yang berisi plasmid DNA dipindahkan ke tabung mikro yang baru. Sebanyak 1 µL hasil isolasi plasmid digunakan untuk elektroforesis menggunakan gel agarosa 0,7%.

### ***Sekuensing dan analisa sekuens promoter $\beta$ -actin***

Volume reaksi amplifikasi PCR untuk sekuensing adalah sebanyak 20 µL dengan

komposisi 2 µL Ready Reaction Mix; 3 µL BigDye buffer; 6,4 µL primer "T7-BS" (5'-TTGTAATACGACTCACTATAGGGCGA A-3') atau DyeT-R (5'-GGAATTGTGAG-CGGATAACA-3') dengan konsentrasi 10 pmol; 300 ng DNA dan sisanya adalah SDW. Program PCR yang digunakan yaitu 1 siklus pada suhu 96°C selama 2 menit, dan 30 siklus dengan suhu 96°C selama 10 detik, 55°C selama 5 detik dan 60°C selama 3 menit. Sekuensing DNA dilakukan menggunakan mesin ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer. Analisa sekuens menggunakan program GENETYX versi 7 dan TFBind.

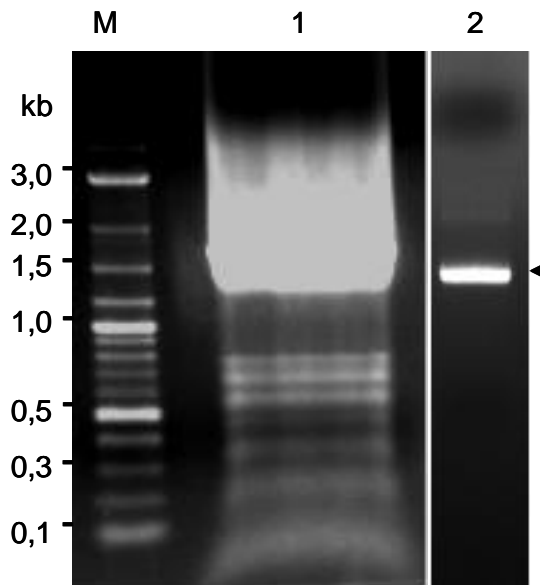
### ***Pembuatan konstruksi gen dan uji aktivitas promoter***

Plasmid pEGFP-N1 (BD Biosciences Clontech, USA), yang mengandung gen pengkode protein berpendar hijau hasil mutasi yang dikenal dengan nama EGFP (*enhanced green fluorescent protein*), dipotong/didigesti menggunakan enzim restriksi *KpnI* dan *ApaI*. Fragmen promoter tiBP untuk pembuatan konstruksi gen diamplifikasi dengan PCR menggunakan primer forward "F-Pro-BA" (5'-TTGGTACCGTGAGTGACGCCGGACCA-ATC-3') dan reverse "R-Pro-tiBA" (5'-TTGGGCCCTAGCACTCAAGCCTGCGG CCA-3'). Hasil amplifikasi diligasi dengan pGEM-T Easy dan kemudian fragmen tiBP tersebut diisolasi kembali dengan cara memotong plasmid menggunakan enzim restriksi *KpnI* dan *ApaI*. Selanjutnya, fragmen tiBP hasil restriksi tersebut diligasi dengan fragmen EGFP-N1 yang telah didigesti untuk membuat konstruksi gen ptiBP-EGFP. Konstruksi gen ptiBP-EGFP dimikroinjeksi ke embrio ikan zebra fase satu sel untuk menguji aktivitasnya. Metode mikroinjeksi mengikuti teknik Alimuddin *et al.* (2005). Aktivitas promoter  $\beta$ -actin ikan nila diketahui dengan cara mengamati ekspresi gen EGFP menggunakan mikroskop fluoresens saat sekitar 30 jam setelah mikroinjeksi.

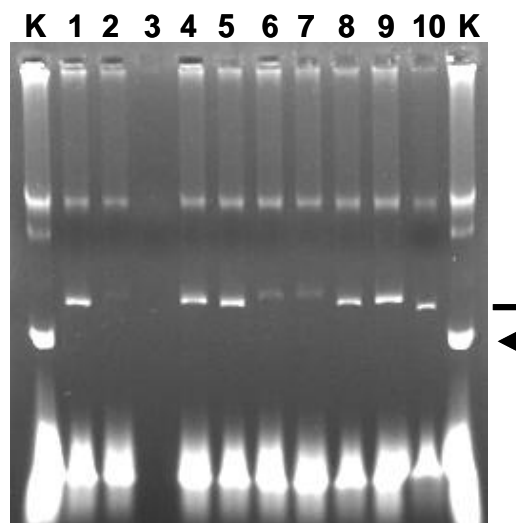
## HASIL DAN BAHASAN

Panjang fragmen DNA hasil amplifikasi PCR menggunakan primer F-BP1 dan R-BP2 dengan cetakan DNA genomik ikan nila sekitar 1,5 kb (Gambar 1). Fragmen DNA hasil amplifikasi PCR tersebut diligasi dengan vektor kloning, ditransformasi ke sel kompeten *E. coli*, dan

kemudian bakteri dikultur. Dengan melakukan elektroforesis terhadap hasil cracking untuk bakteri dengan koloni berwarna putih, diketahui bahwa semua koloni bakteri tersebut membawa DNA insersi yang ditandai dengan ukuran pita DNA hasil elektroforesis lebih besar dibandingkan dengan kontrol koloni biru (Gambar 2).



Gambar 1. Elektroforesis DNA hasil PCR kedua untuk purifikasi DNA (1) dan hasil purifikasinya dari gel agarosa (2). M adalah marker DNA 1 kb (BioLabs Inc., New England). Angka di sebelah kiri gambar adalah ukuran fragmen marker DNA. Tanda kepala panah (◄) di sebelah kanan gambar menunjukkan DNA target dari hasil PCR dan purifikasinya.



Gambar 2. Elektroforesis hasil cracking bakteri koloni berwarna biru (K) dan yang putih (no. 1-10). Tanda kepala panah (◄) di sebelah kanan gambar menunjukkan ukuran plasmid DNA dari bakteri biru, sedangkan tanda minus (—) untuk bakteri dengan plasmid yang mengandung DNA insersi.

Hasil sekuensing dari arah forward/sense atau dari kiri ditunjukkan pada Gambar 3, dan dari arah reverse/antisense (dari kanan) pada Gambar 4. Berdasarkan hasil analisa dengan software TFBind diketahui bahwa sekuens DNA hasil isolasi memiliki semua elemen faktor transkripsi (TF) yang konserf (*conserved*) untuk promoter  $\beta$ -actin dari ikan. Dengan demikian diduga hasil kloning merupakan sekuens promoter  $\beta$ -actin ikan nila. Sekuens TF yang dilaporkan berperan penting dalam aktivitas promoter  $\beta$ -actin adalah CCAAT, CC(A/T)<sub>6</sub>GG atau motif CARG, dan boks TATA. Elemen CCAAT yang terletak pada nt. 16 – 20 dihitung dari ujung terminal 5, CC(A/T)<sub>6</sub>GG atau disebut motif CARG pada nt. 46 - 55 dihitung dari ujung terminal 5 dan nt. 225 – 234 dihitung dari ujung terminal 3, dan boks TATA pada nt. 79 – 83 (Gambar 5 dan 6). Hubungan tingkat aktivitas promoter  $\beta$ -actin dengan sekuens CCAAT telah diteliti oleh Quitschke *et al.* (1989). Kegunaan

motif CARG, sebagai elemen responsif terhadap serum (*serum-response element*), yang terletak antara CCAAT dan boks TATA, telah dijelaskan oleh Liu *et al.* (1991). Boks TATA merupakan elemen yang umum dijumpai pada sekuens promoter, sebagai tempat RNA polimerase melekat (*bind*) pada saat transkripsi RNA akan berlangsung (Glick dan Pasternak, 2003). Selanjutnya, promoter  $\beta$ -actin ikan kerapu bebek juga memiliki elemen CARG kedua pada intron 1 seperti yang terdapat pada promoter  $\beta$ -actin dari ikan lainnya (Noh *et al.*, 2003), manusia, tikus dan ayam (Orita *et al.*, 1989; Sands *et al.*, 1993). Elemen CARG kedua juga berpengaruh positif terhadap aktivitas promoter (Liu *et al.*, 1990). Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa sekuens regulator  $\beta$ -actin ikan nila adalah konserf secara evolusi (*evolutionary conserved*). Selanjutnya, diduga bahwa promoter tersebut dapat aktif mengatur ekspresi gen asing.

```

5'- GTG AGT GAC GCC GGA CCA ATC AGG AGG CGC AAT TCC GAA AGT TTA      45
CCT TTT ATG GCT AGA GCC AGG CAA CCG GCT GAG TAT AAA AAA CAA GCG      93
CCC ACA GCT AAC GGA TTC ACT CTG AGC GCC GTC ACA CTC ACA GCT TGT     131
GCG GGA TAT CAT TTG CCT GAA ACC GTT TCC CTT AAA GCG AAA AGC CCC     179
CCA CCC AAA GGT AAG GAG ACG GAG AAA TCC TTA TTT ATA GAT TCT TAT     227
TTT AGG ATG TTT ATT AAG TAA ACA ACG AGC TGA TTT GTT TAT TTT ATG     275
TAA ACA TGG ATG AAT TTA TTC ACT TTA ATG CAA ACT GTC GTC GGG GAC     323
CAC GCG GTT CTT TGT CTT CGC AAG AAT TGT ATT GAT TGT TAA ACA GCA     471
GTA TCT GTA TCT TGT GCT TGG CTT TTT TAA AAC GAG GAA CGG TTA TGA     519
CTG CAG ACA AGT TCA TTA GCG CTG CTG CTG CGA TTC ACA GGT GCT TTT     567
GGA TGG AGC CGG CTT CTA GTA AAT GGC GTC CTA TGA GTT AAT GGT TGC     615
GCT AAA ACC GGT GTT TGT CAC CGT GTA GTC GTG CAC GGT TTT TTT TGT     663
TTT TTT TTT TTT GTA GGA TTG TGG TGA CAC TTG GGA TTT GAT CCC AGG     711
CAG GAT ACT TTG AAG CGG GTT TCC GAG TTG AGG CTG TCT GGA TCC CGG     759
CTG CTC CCT TTG TGC GCC CGA TGC GGC GGG GTG TGA CCT ACT TTA GCA     807
TAT TAG CCT AGC CAC ATC ATG CTA GCA CGC CCT TTT AGA TTT GCA GCA     855
GTT GCA GTT TTA AGT CTC TCT CGG TTT ATC CTG GAT ACT CCC ACA CAC     903
GGC TTT TAA AGG ATG AAT TAC TTT TCT TTT TAT TTT AAC CTT AAT CTG     951
GGG GTC AGG TTT ATA AGG CCT TGC AGT TAA AAA GGA TAG AAA GGG ACT    1009
AGG CTT TTT TCT TTT TCC TTA AAG GTG GAT AAA CTG GAT TTA ATA GGC    1057
TTC AAG GTG GAA TGG AAT GGT TCC TGG ATC CTG GTT CAG GTC TTT TTC    1105
TTT ATA TGG TGG ACC AAA GGA AAT TGA GGG AAA TTG GGC AAT CAT CCG    1153
TCC TGG ATT CGG TCC CAC TCT CGG AGA AAG GGC GGT GGC TTT TCA GGA    1201
AAT GGA TTC ACC TAG TTC AGG CCC CTT GGG GGA CCG TTC ATG GAG TTC    1249
GGC ATA GGT TCA ATT ATG GCC AAC TTT CCT TTC TCA ATA AAA CCT AGC    1297
TTT CCA TAA TTT AGG TAA TCC CGC AGA GAA CTT TCA T-3'                    1334

```

Gambar 3. Sekuens promoter  $\beta$ -actin ikan nila hasil sekuensing dari arah forward

```

5' - ACC ACA GGG TGG CTT TTA GAA ATA AGG AAG CCG GAC TTT TCT AAT 45
TAA AAA ATG GGC GTC CTA ATG AAG TTA ATG GGT GGC GCC TAA AAC CGG 93
GGT TTT TTG TCA ACC GGG GTT ATG TTC CGT GCA CAG TTT TTT TTT TAG 131
TTT TTT TTT TTT TTT GTA AGG AAT TTG TGG GTG ACC ACC TTG GGA TTT 179
GAA TCC CAA GGC AGG ATA ACT TGG AAG CGG GTT TCC GAG TTG AAG CTG 227
TTC TGG ATC CCG ACT GCT CCC TTT TGT GCG CCC CGA TTG CGG ACG GGG 275
TGT GAC CCT ACT TTA AGC ATA ATT AAG CCT AGG CCA CAT TCA AGG CTA 323
AGC ACG CCC TTT AGA TTT GCA GCA GTT GCA GTT TTA AAG TCT CTC TCG 471
TTT ATC CTG GAT ACT CCC ACA CAC GCT TTT AAA AGA TGA ATT ACT TTC 519
TTT TAT TTA ACC TAA TCT GGT GTC AGT TTA TAA AGG CTT GCA GTA AAA 567
AAG ATA GAA GGA CTA GCT TTT CTT TTC TTA AAG GTG ATA AAC TGA TTA 615
ATA GCT CAA GTG AAT GAA TGT CCT GAT CTG TTT AGT CTT TTC TTA TAT 663
GTG ACA AAG AAA TGA GGA AAT TGC AAA TCA ATC GCC TGA TCG TCC ACT 711
CCG AGA AAA GGC GTG GCT TTC AGG AAA TGG ATC ACC AGT CAA GCG CTT 759
GTG ACC GTT CAT GAG TCG GCA TAA GTT CAT TAT GCA ACT TCC CTT CTC 807
ATA AAC TAG CTT CAA TAT TAA GTA ATC GCA GAC TTC ATC TTT TTT AAA 855
CGT CTC GTG GTG TGC AAT GAA TGA GTG TGC TGC TGC ATG ACG CAG TGA 903
TAT TCG CTC AAA GGA CTT GGA AGG TTC ATA AAA GCG AGC GTG ATT AAG 951
CAA GCT TGG GAG GGC GCT GGT TGT GAC GAT AGT AAA ACG AAG GGA GTG 1009
GTC TGT CGG CTA GTC TGT AAT GTG GAC TGT TCC TTT TTT TTC TCG CCG 1057
TGC GTT GCC GCT CTG GCG TCG CGC CAC GCG CCG GTA GCC GCA AAG CTG 1105
CTC AAA ACC GAA CCA TGT CCT TAT ATG GTA ATA ACA GAA CGC AGC GCC 1153
ACT TCC TTT TGT CTG GCT TAC TCG GAA TGT GCG GCA CGA GCT CCT CCT 1201
AGC GGC CGA GCT CGT GAA CTT CCG CTA GTT AAC AGG AAG TAG AAG CGG 1249
AAT GGC CGC AGG CTT GAG TGC TAA TCT TTT TTT TCT TTA TCT TTA ACA 1297
GTT CAG CCA TGG AAG ATG AAA TCG CCG CAC TGG TTG TTG ACA ACG GCT 1345
CCG GCA TGT GCA-3' 1357

```

Gambar 4. Sekuens promotor  $\beta$ -actin ikan nila hasil sekuensing dari arah reverse

Primer forward: GTGTGTGACGCTGGACCAATCAGAGGCGCAGAGCTCCGAAAAGTTTACCTTTTATGGCTAGA

Motif CArG: TCCGAAAAGTTTACCTTTTATGGCTAGA

Boks TATA: CATCTGCCGTCATATAAAAGAGCGCGCCCGCCTTCAGCCCTCACTTTGAGCC

CCAAT motif: CCAATCAGCGGACTATAAAATCCACGTCGCCAGGGCTAGCAATTCACCTGTGAGCC

Alignment details (F-nila as reference):

- Mas: 1-60 (Primer forward), 61-117 (Boks TATA), 118-175 (CCAAT motif)
- Medaka: 1-60 (Primer forward), 61-120 (Boks TATA), 121-177 (CCAAT motif)
- Megalobrama: 1-60 (Primer forward), 61-118 (Boks TATA), 119-176 (CCAAT motif)
- Myopharyngodon: 1-60 (Primer forward), 61-118 (Boks TATA), 119-176 (CCAAT motif)
- F-nila: 1-60 (Primer forward), 61-120 (Boks TATA), 121-180 (CCAAT motif)
- Mas: 176-231 (CCAAT motif)
- Medaka: 178-233 (CCAAT motif)
- Megalobrama: 177-234 (CCAAT motif)
- Myopharyngodon: 177-234 (CCAAT motif)
- F-nila: 181-238 (CCAAT motif)
- Mas: 232-290 (CCAAT motif)
- Medaka: 234-291 (CCAAT motif)
- Megalobrama: 235-293 (CCAAT motif)
- Myopharyngodon: 235-293 (CCAAT motif)
- F-nila: 239-298 (CCAAT motif)

Gambar 5. Alignment sekuens parsial promotor  $\beta$ -actin ikan nila (hasil sekuensing dari arah forward, F-nila), ikan mas (no. Akses Bank Gen: [M24113](#)), ikan medaka (no. Akses Bank Gen: [S74868](#)), ikan megalobrama (no. Akses Bank Gen: [AY170122](#)) dan ikan mylopharyngodon (no. Akses Bank Gen: [AY289135](#)). Posisi primer forward, motif CArG pertama, dan boks TATA ditunjukkan di atas sekuens. Posisi motif CCAAT yang ada alam sekuens primer F, CArG pertama dan boks TATA untuk ikan nila sama dengan ikan lainnya dilihat dari ujung terminal 5 (dilihat dari sebelah kiri).



Gambar 6. *Alignment* sekuens parsial promoter  $\beta$ -actin ikan nila (hasil sekuensing dari arah reverse, R-nila), ikan mas (no. Akses Bank Gen: [M24113](#)), ikan medaka (no. Akses Bank Gen: [S74868](#)), ikan megalobrama (no. Akses Bank Gen: [AY170122](#)) dan ikan mylopharyngodon (no. Akses Bank Gen: [AY289135](#)). Motif CARg (CC(A/T)<sub>6</sub>GG), kodon awal (ATG) dan posisi primer reverse ditunjukkan di atas sekuens. Posisi motif CARg kedua untuk ikan nila sedikit berbeda dengan ikan lainnya bila dilihat dari ujung terminal 3 (dari sebelah kanan)

Dengan menggunakan software GENETYX, *alignment* sekuens parsial promoter  $\beta$ -actin ikan nila dengan ikan mas (no. Akses Bank Gen: [M24113](#)), ikan medaka (no. Akses Bank Gen: [S74868](#)), ikan megalobrama (no. Akses Bank Gen: [AY170122](#)) dan ikan mylopharyngodon (no. Akses Bank Gen: [AY289135](#)) ditunjukkan

pada Gambar 4 dan 5. Dari hasil *alignment* diketahui bahwa posisi dari elemen-elemen penting tersebut adalah konserf seperti dengan sekuensnya. Hal ini memperkuat dugaan bahwa hasil kloning merupakan promoter  $\beta$ -actin ikan nila.

Karena sekuens DNA hasil isolasi relatif panjang, meskipun kemampuan mesin



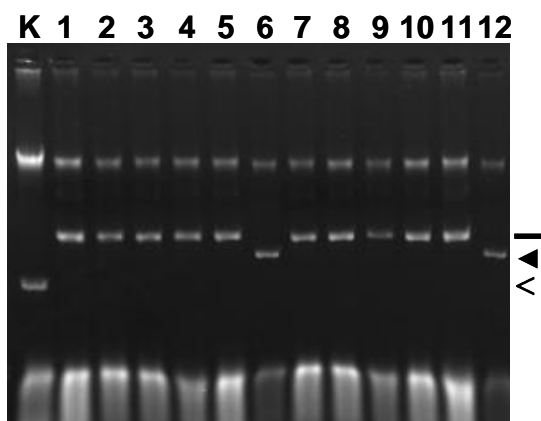
sekuensing bisa membaca sekuens sampai sekitar 1,3 kb, tidak semua sekuens nukleotida (nt.) hasil sekuensing pada ujung terminal 3 pada Gambar 3 dan ujung terminal 5 pada Gambar 4 adalah tepat. Sekuens yang diperlihatkan dalam laporan ini adalah hasil pembacaan dari masing-masing primer. Untuk memperoleh semua sekuens nt. promoter  $\beta$ -actin ikan nila dengan tepat, perlu dilakukan sub-kloning dengan minimal 2 klon yang panjangnya masing-masing sekitar 500 bp.

Untuk verifikasi apakah sekuens promoter  $\beta$ -actin ikan nila hasil kloning dapat aktif, maka dibuat konstruksi gen ekspresi dengan gen penanda EGFP. Pengecekan hasil cracking bakteri transforman ditunjukkan pada Gambar 7. Ukuran DNA untuk bakteri hasil transformasi dengan plasmid *ptiBA-EGFP* lebih besar dibandingkan dengan plasmid *pEGFP-N1* dan plasmid dari kontrol berupa bakteri biru. Hal ini menunjukkan bahwa konstruksi gen *ptiBA-EGFP* berhasil dibuat dan bakteri yang membawa plasmid ini berhasil diidentifikasi (no. 1-5 dan 7-11 pada Gambar 7).

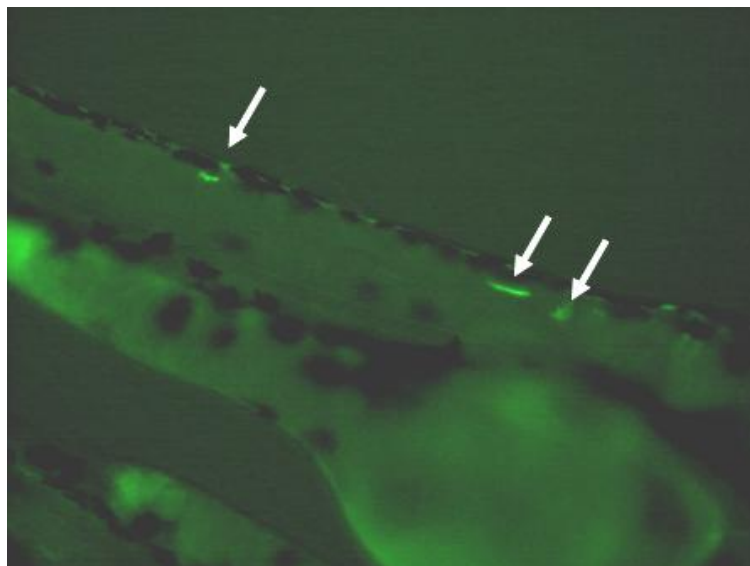
Uji aktivitas promoter dilakukan untuk membuktikan secara *in vivo* bahwa sekuens DNA hasil isolasi mampu mengatur ekspresi gen asing. Pada penelitian ini digunakan gen penanda EGFP, suatu gen pengkode protein berpendar hijau bila diberi sinar ultraviolet, untuk memudahkan pengujian. Seperti

ditunjukkan pada Gambar 8, ekspresi gen GFP terlihat pada jaringan otot larva ikan zebra. Dari 10 embrio ikan zebra yang dimikroinjeksi dengan konstruksi gen *ptiBA-EGFP*, 3 diantaranya mengekspresikan gen EGFP. Salah satu contoh larva yang mengekspresi gen EGFP pada jaringan otot ditunjukkan pada Gambar (ditandai dengan tanda panah). Hal ini menunjukkan bahwa sekuens promoter *tiBA* ikan nila hasil isolasi dapat aktif, minimal pada ikan zebra.

Ekspresi gen EGFP pada ketiga larva tersebut di atas terlihat seperti tambalan (*patchy*) dan beberapa sel dengan ekspresi tinggi, sementara yang lainnya lemah atau tidak mengekspresikan transgen. Kondisi seperti ini disebut mosaik, dan hal ini umum ditemukan pada embrio ikan hasil mikroinjeksi (Maclean *et al.*, 1996). Tingkat ekspresi gen biasanya berhubungan erat dengan jumlah copy transgen yang terdapat pada setiap sel (Rahman *et al.*, 2000). Dengan demikian variasi tingkat ekspresi gen EGFP antar sel dan larva diduga merupakan akibat dari perbedaan jumlah copy transgen. Dengan menggunakan sekuens regulator yang bersifat *ubiquitous* seperti  $\beta$ -actin, variasi tempat ekspresi sementara dari transgen juga telah dilaporkan pada ikan medaka (Tsai *et al.*, 1995). Ekspresi transgen akan terlihat pada semua jaringan otot ikan transgenik pada generasi pertama dan seterusnya.



Gambar 7. Elektroforesis hasil cracking bakteri koloni berwarna biru (K) dan yang putih (no. 1-12). No. 1-5 dan 7-11: bakteri yang membawa konstruksi gen *ptiBA-EGFP*, no. 6 dan 12: bakteri yang membawa plasmid *pEGFP-N1*. Tanda minus (—) di sebelah kanan gambar menunjukkan ukuran DNA plasmid yang mengandung DNA insersi atau *ptiBA-EGFP*, tanda kepala panah tertutup (◄) untuk plasmid DNA *pEGFP-N1*, sedangkan tanda kepala panah terbuka (<) untuk plasmid dari bakteri koloni biru



Gambar 8. Ekspresi gen GFP yang dikendalikan oleh promotor tiBA ikan nila pada larva ikan zebra. Jaringan otot yang mengekspresikan gen GFP ditunjukkan dengan tanda panah.

Hasil pengamatan ekspresi gen EGFP menunjukkan bahwa promotor  $\beta$ -actin ikan nila (Famili Cichlidae) dapat aktif pada ikan zebra (Famili Cyprinidae) yang tidak sekerabat. Karena pada penelitian ini belum dilakukan pengujian aktivitas promotor  $\beta$ -actin ikan nila pada ikan yang sekerabat dengannya, perbedaan aktivitasnya pada ikan zebra yang tidak sekerabat ini belum diketahui. Namun demikian, promotor  $\beta$ -actin ikan nila diduga akan memiliki aktivitas yang lebih baik bila digunakan pada ikan yang sekerabat.

Dalam rangka pembuatan ikan nila autotransgenik untuk memacu pertumbuhannya, sekuens promotor dalam konstruksi gen (pmBP-tiGH) yang mengandung gen GH ikan nila telah dibuat sebelumnya sudah dapat diganti dengan promotor tiBP. Selanjutnya, berbagai jenis ikan transgenik, khususnya untuk kelompok ikan cychlidae, mungkin dapat diproduksi dengan adanya konstruksi gen “all-nila” ini.

### KESIMPULAN

Promoter  $\beta$ -actin dari ikan nial telah berhasil diisolasi dengan panjang sekitar 1,5 kb. Elemen-elemen yang biasa terdapat pada promotor  $\beta$ -actin, yaitu CCAAT, CArG dan

boks TATA, juga ditemukan pada sekuens promotor  $\beta$ -actin ikan nila hasil isolasi. Promoter ikan nila hasil isolasi mampu mengontrol ekspresi gen penanda EGFP pada jaringan otot ikan zebra.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Kami menyampaikan banyak terima kasih kepada Sdri. Shoko Ihara yang mengambil foto embrio ikan zebra yang mengekspresikan gen GFP di Laboratorium Fisiologi Ikan, Department of Marine Biosciences, Tokyo University of Marine Sciences and Technology. Penelitian ini dibiayai oleh Kementerian Negara Riset dan Teknologi pada Program Riset Insentif Terapan 2007.

### DAFTAR PUSTAKA

Alam MS, Lavender FL, Iyengar A, Rahman MA, Ayad HH, Lathe R, Morley SD and Maclean N. 1996. Comparison of the activity of carp and rat  $\beta$ -actin gene regulatory sequences in tilapia and rainbow trout embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, 45: 117-122.

- Alimuddin, Yoshizaki G, Kiron V, Satoh S and Takeuchi T. 2005. Enhancement of EPA and DHA biosynthesis by over-expression of masu salmon  $\Delta 6$ -desaturase-like gene in zebrafish. *Transgenic Res.*, 14: 159-165.
- Alimuddin. 2003. Introduction and expression of foreign  $\Delta 6$ -desaturase-like gene in a teleostean fish. Thesis. Tokyo University of Fisheries, Japan.
- Brem G, Brenig B, Horstgen-Schwark G and Winnacker E-L. 1988. Gene transfer in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 68: 209-219.
- Chourrout DR, Guyomard R and Houdebine LM. 1990. Techniques for the development of transgenic fish: a review. In: Church RB (Ed.). *Transgenic Models in Medicine and Agriculture*. Wiley-Liss, New York. p. 89-99.
- Devlin RH, Yesaki TY, Biagy CA, Donaldson EM, Swanson P and Chan WK. 1994. Extraordinary salmon growth salmon growth. *Nature*, 371: 209-210.
- Dunham RA, Eash J, Askins J and Townes TM. 1987. Transfer of metallothionein-human growth hormone fusion gene into channel catfish. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 116: 87-91.
- Glick BR and Pasternak JJ. 2003. *Molecular Biotechnology: Principles and Application of Recombinant DNA*. 3<sup>rd</sup> ed. ASM Press, Washington, DC.
- Guyomard R, Chourrout D, Leroux C, Houdebine LM and Pourrain F. 1989. Integration and germ line transmission of foreign genes microinjected into fertilised trout eggs. *Biochimie*, 71: 857-883.
- Hamada K, Tamaki K, Sasado T, Watai Y, Kani S, Wakamatsu Y, Ozato K, Kinoshita M, Kohno R, Takagi S and Kimura M. 1998. Usefulness of the medaka  $\beta$ -actin promoter investigated using a mutant GFP reporter gene in transgenic medaka (*Oryzias latipes*). *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 7: 173-180.
- Hanley S, Smith TJ, Muller F, Maclean N, Uzbekova S, Prunet P and Brenton B. 1998. Isolation and functional analysis of the histone H3 promoter from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 7: 165-172.
- Hansen E, Fernandes K, Goldspink G, Butterworth P, Umeda PK and Chang K-C. 1991. Strong expression of foreign genes following direct injection into fish muscle. *FEBS Lett.*, 290: 73-76.
- Higashijima S, Okamoto H, Ueno N, Hotta Y and Eguchi G. 1997. High frequency generation of transgenic zebrafish which reliably express GFP in whole muscles or the whole body by using promoters of zebrafish origin. *Dev. Biol.*, 192: 289-299.
- Hinits Y and Moav B. 1999. Growth performance studies in transgenic *Cyprinus carpio*. *Aquaculture*, 173: 285-296.
- Kato K, Takagi M, Tamaru Y, Akiyama S-I, Konishi T, Murata O and Kumai H. 2007. Construction of an expression vector containing a  $\beta$ -actin promoter region for gene transfer by microinjection in red sea bream *Pagrus major*. *Fisheries Science*, 73: 440-445.
- Kobayashi S-I, Alimuddin, Morita T, Miwa M, Lu J, Endo M, Takeuchi T and Yoshizaki G. 2007. Transgenic Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) over-expressing growth hormone show reduced ammonia excretion. *Aquaculture*, 270: 427-435.
- Liu Z, Moav B, Faras AJ, Guise KS, Kapuscinski AR and Hackett PB.

1990. Functional analysis of elements affecting expression of the  $\beta$ -actin gene of carp. *Mol. Cell. Biol.*, 10: 3432-3440.
- Liu Z, Moav B, Faras AJ, Guise KS, Kapuscinski AR and Hackett P. 1991. Importance of the CArG box in regulation of  $\beta$ -actin-encoding genes. *Gene*, 108: 211-217.
- Maclean N and Laight RJ. 2000. Transgenic fish: an evaluation of benefits and risks. *Fish Fish.*, 1: 146-172.
- Maclean N, Hwang G-L and Farahmand T. 2002. Exploiting transgenic tilapia and the tilapia genome. In: Shimizu N, Aoki T, Hirono I and F. Takashima (Eds.). *Aquatic Genomics*. Springer-Verlag, Tokyo.
- Maclean N, Alam MS, Iyengar A and Popplewell A. 1996. Transient expression of reporter genes in fish as a measure of promoter efficiency. In: Ennion SJ and Goldspink G (Eds.). *Gene Expression and Manipulation in Aquatic Organisms*. Society for Experimental Biology Seminar Series, vol. 58, Cambridge Univ. Press, Cambridge. p. 165-174.
- Martinez R, Estrada MP, Berlanga J, Guillen I, Hernandez O, Cabrera E, Pimentel R, Morales R, Herrera F, Morales A, Pina JC, Abad Z, Sanchez V, Melamed P, Leonart R and de la Fuente J. 1996. Growth enhancement in transgenic tilapia by ectopic expression of tilapia growth hormone. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 5: 62-70.
- Moav B, Liu Z, Caldovic LD, Gross ML, Faras AJ and Hackett PB. 1993. Regulation of expression of transgenes in developing fish. *Transgenic Res.*, 2: 153-161.
- Muller F, Williams DW, Kobolak J, Gauvry L, Goldspink G, Orban L and Maclean N. 1997. Activator effect of coinjected enhancers on the muscle-specific expression of promoters in zebrafish embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, 47: 404-412.
- Muller F, Gauvry L, Williams DW, Kobolak J, Maclean N, Orban L and Goldspink G. 1996. The use of transient *LacZ* expression in fish embryos for comparative analysis of cloned regulatory elements. In: Ennion SJ and Goldspink G (Eds.). *Gene Expression and Manipulation in Aquatic Organisms*. Society for Experimental Biology Seminar Series, vol. 58, Cambridge Univ. Press, Cambridge. p. 175-179.
- Noh JK, Cho KN, Han EH, Kim A, Lee JS, Kim DS and Kim CG. 2003. Genomic cloning of mud loach *Misgurnus mizolepis* (Cypriniformes, Cobitidae) beta-actin gene and usefulness of its promoter region for fish transgenesis. *Mar. Biotechnol.*, 5(3): 244-252.
- Orita S, Makino K, Kawamoto T, Niwa H, Sugiyama H and Kakunaga T. 1989. Identification of a site that mediates transcriptional response of the human  $\beta$ -actin gene to serum factors. *Gene*, 30: 13-19.
- Penman DJ, Iyengar A, Beeching AJ, Rahman A, Sulaiman Z and Maclean N. 1991. Patterns of transgene inheritance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Mol. Reprod. Dev.*, 30: 201-206.
- Quitschke WW, Lin Z-Y, DePoti-Zilli L and Paterson BM. 1989. The  $\beta$ -actin promoter. *J. Biol. Chem.*, 264: 9539-9546.
- Rahman MA and Maclean N. 1992. Fish transgene expression by direct injection into fish muscle. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 1: 286-289.
- Rahman MA, Hwang G-L, Razak SA, Sohm F and Maclean N. 2000. Copy number

- related transgene expression and mosaic somatic expression in hemizygous and homozygous transgenic tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Transgenic Res.*, 9: 417-427.
- Sands AT, Hansen TN, Demayo FJ, Stanley LA, Xin L and Schwartz RJ. 1993. Cytoplasmic  $\beta$ -actin promoter produces germ cell and preimplantation embryonic transgene expression. *Mol. Reprod. Dev.*, 34: 117-126.
- Shears MA, Fletcher GL, Hew CL, Gauthier S and Davies PL. 1991. Transfer, expression, and stable inheritance of antifreeze protein genes in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 1: 58-63.
- Takagi S, Sasado T, Tamiya G, Ozato K, Wakamatsu Y, Takeshita A and Kimura M. 1994. An efficient expression vector for transgenic medaka construction. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 3: 192-199.
- Tsai H-J, Wang S-H, Inoue K, Takagi S, Kimura M, Wakamatsu Y and Ozato K. 1995. Initiation of the transgenic *LacZ* gene expression in medaka (*Oryzias latipes*) embryos. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 4: 1-9.
- Volckaert FA, Hellemans BA, Galbusera P, Ollevier F, Sekkali B and Belayew A. 1994. Replication, expression, and fate of foreign DNA during embryonic and larval development of the African catfish (*Clarias gariepinus*). *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 3: 57-69.
- Williams DW, Muller F, Lavender FL, Orban L and Maclean N. 1996. High transgene activity in the yolk syncytial layer affects quantitative transient expression assays in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Transgenic Res.*, 5: 433-442.
- Yoshizaki G. 2001. Gene transfer in salmonidae: applications to aquaculture. *Suisanzoshoku*, 49:137-142.
- Zhang P, Hayat M, Joyce C, Gonzalez-Villasenor LI, Lin RA, Dunham RA, Chen TT and Powers DA. 1990. Gene transfer, expression and inheritance of pRCV-rainbow trout-GHcDNA in the common carp *Cyprinus carpio*. *Mol. Reprod. Dev.*, 25: 13-25.