

## ISOLASI DAN KARAKTERISASI PROMOTER $\beta$ -ACTIN DARI IKAN KERAPU BEBEK (*Cromileptes altivelis*)

Alimuddin<sup>\*)</sup>, Wedaraningtyas Nugrahani<sup>\*)</sup>, Ratu Siti Aliah<sup>\*\*)</sup>, Komar Sumantadinata<sup>\*)</sup>, Irvan Faizal<sup>\*\*)</sup>, Odang Carman<sup>\*)</sup> dan Goro Yoshizaki<sup>\*\*\*)</sup>

### ABSTRAK

Promoter sebagai regulator ekspresi gen merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi keberhasilan transgenesis. Penelitian isolasi dan karakterisasi promotor  $\beta$ -actin (ktBA) dari ikan kerapu bebek (*Cromileptes altivelis*) dalam rangka pembuatan ikan kerapu autotransgenik telah dilakukan. Promoter  $\beta$ -actin memiliki aktivitas tinggi pada jaringan otot. Sekuens promotor ktBA diisolasi menggunakan metode *degenerate* PCR. Sekuensing dilakukan menggunakan mesin ABI PRISM 3100. Analisis sekuens menggunakan *software* BLAST, GENETYX versi 7 dan TFBind. Fragment DNA hasil amplifikasi PCR yang dipotong dari vektor kloning selanjutnya diligasi dengan pEGFP-N1 untuk membuat konstruksi pktBA-EGFP. Konstruksi pktBA-EGFP dimikroinjeksi ke embrio ikan zebra (*Danio rerio*) fase 1 sel untuk menguji aktivitas promotor ktBA. Ekspresi gen EGFP diamati menggunakan mikroskop fluoresens. Analisis sekuens menunjukkan bahwa panjang fragmen DNA hasil amplifikasi PCR sekitar 1,6 kb dan memiliki faktor transkripsi yang *conserved* pada promotor  $\beta$ -actin, yaitu CCAAT, CArG dan boks TATA. Selanjutnya, sekuens ktBA dalam konstruksi pktBA-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 promotor  $\beta$ -actin ikan kerapu bebek. Pembuatan ikan kerapu autotransgenik selanjutnya dapat dilakukan dengan mengganti gen EGFP pada pktBA-EGFP dengan gen-gen asal ikan kerapu yang mengkodekan karakter penting dalam budi daya ikan.

**ABSTRACT:** *Isolation and characterization of B-actin promoter from humpback grouper (Cromileptes altivelis). By: Alimuddin, Wedaraningtyas Nugrahani, Ratu Siti Aliah, Komar Sumantadinata, Irvan Faizal, Odang Carman, and Goro Yoshizaki*

*Promoter as gene expression regulator is one of the factors affecting the successful of transgenesis. Isolation and characterization of  $\beta$ -actin promoter (ktBA) from humpback grouper (Cromileptes altivelis) towards generation of autotransgenic grouper have been conducted.  $\beta$ -actin promoter has high activity in muscle. Sequence of ktBA promoter was isolated by using degenerate PCR method. Sequencing was performed using ABI PRISM 3100 machine. Analysis of sequences was conducted using BLAST, 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 pktBA-GFP construct. The construct was microinjected into one-cell stage of zebrafish (Danio rerio) embryos to test the ktBA 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 1.6 kb and*

<sup>\*)</sup> Laboratorium Reproduksi dan Genetik Ikan, Departemen Budidaya, IPB, Bogor.

<sup>\*\*)</sup> Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi, Jakarta.

<sup>\*\*\*)</sup> Department of Marine Biosciences, Tokyo University of Marine Science and Technology, Minato, Tokyo 108-8477, Japan.

containing the evolutionary conserved sequences of transcription factor for  $\beta$ -actin promoter including CCAAT, CARG and TATA boxes. Furthermore, *ktBA* sequence in *pktBA-EGFP* construct could drive GFP expression in muscle of zebrafish embryos injected with the construct. The results suggested that PCR amplification product is the regulator sequence of humpback grouper  $\beta$ -actin gene. Autotransgenic grouper can be then produced by changing GFP gene fragment of *pktBA-EGFP* construct with genes from grouper encoding important traits in aquaculture.

**KEYWORDS:** *cloning,  $\beta$ -actin promoter, autotransgenic, EGFP, *Cromileptes altivelis*, *Danio rerio**

## PENDAHULUAN

Rekayasa genetik dapat menjadi alat yang sangat berguna untuk pengembangan dan perbaikan kualitas ikan budi daya. Dalam rangka pencapaian tujuan tersebut, teknologi transgenesis telah diaplikasikan pada beberapa jenis ikan budi daya di manca negara, seperti pada ikan 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 untuk pembuatan ikan transgenik 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.

Hasil penelitian telah terbukti 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, dimungkinkan 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) dan ikan nila (Hwang *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 (*Green Fluorescent Protein*) 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 D6-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; Hwang *et al.*, 2003). Sementara itu, promoter  $\beta$ -actin dari ikan zebra dilaporkan aktif mengatur ekspresi gen GFP pada ikan zebra (Higashijima *et al.*, 1997).

Panjang sekuens dan elemen yang ada pada promoter sangat menentukan tingkat aktivitasnya. Walaupun promoter  $\beta$ -actin dari suatu spesies mampu mengatur ekspresi gen asing pada beberapa spesies lain, hingga saat ini belum diketahui promoter  $\beta$ -actin dari jenis ikan mana yang lebih baik karena panjang sekuens dan elemen yang digunakan oleh setiap peneliti berbeda-beda. Hwang *et al.* (2003) telah mencoba untuk membandingkan aktivitas promoter  $\beta$ -actin dari ikan nila dan

ikan mas. Panjang sekuens promoter (1,5 kb untuk ikan mas dan 1,6 kb pada ikan nila) dan elemen yang digunakan relatif sama, keduanya memiliki elemen CCAAT, CC(A/T)<sub>6</sub>GG atau disebut motif CAR<sub>G</sub>, dan boks TATA. Uji aktivitas promoter dengan gen penanda *LacZ* menunjukkan bahwa promoter  $\beta$ -actin ikan nila (famili Cichlidae) lebih baik daripada ikan mas (famili Cyprinidae) bila digunakan pada ikan nila, tetapi hasil sebaliknya diperoleh bila digunakan pada ikan zebra (famili Cyprinidae). Hasil penelitian Hwang *et al.* (2003) juga memperkuat dugaan bahwa penggunaan promoter dari spesies yang sama atau sekerabat adalah lebih baik.

Pengujian aktivitas promoter umumnya dilakukan dengan cara menginjeksikan konstruksi gen ke embrio dan dilakukan pengamatan 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 pembuatan ikan transgenik (Higashijima *et al.*, 1997). Metode lain yang dapat digunakan adalah menginjeksi langsung konstruksi gen ke otot daging (Hansen *et al.*, 1991; Rahman and Maclean, 1992) atau transfeksi ke sel kultur (Hwang *et al.*, 2003; 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).

Hasil isolasi dan karakterisasi promoter  $\beta$ -actin dari ikan kerapu bebek (*Cromileptes altivelis*) dalam rangka pembuatan ikan kerapu autotransgenik yaitu, ikan transgenik yang dibuat menggunakan konstruksi gen dengan komponen semua dari ikan kerapu ("all-kerapu gene construct") telah diperoleh. Pembuatan ikan kerapu bebek transgenik belum pernah dilakukan. Ikan kerapu bebek dipilih mengingat ikan ini termasuk target spesies dalam revitalisasi perikanan budi daya dan juga memiliki harga yang relatif mahal sebagai komoditas ekspor.

## BAHAN DAN METODE

### Isolasi Genom DNA Genomik dan Amplifikasi PCR

Pada penelitian ini konstruksi gen diinjeksikan ke embrio ikan zebra dan selanjutnya ekspresi sementara diamati untuk mengetahui aktivitas promoter  $\beta$ -actin ikan kerapu bebek. 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.

Genom DNA diekstraksi dari jaringan hati ikan kerapu bebek menggunakan kit isolasi DNA (Puregene, Minneapolis, USA) dengan beberapa modifikasi. Hasil ekstraksi DNA diencerkan 10x untuk digunakan sebagai cetakan (*template*) dalam proses amplifikasi PCR. Sekuens promoter  $\beta$ -actin (ktBA) ikan kerapu bebek, diisolasi menggunakan metode *degenerate* PCR dengan primer yang didesain berdasarkan database di Bank Gen. Database yang digunakan meliputi ikan mas (no. akses Bank Gen: M24113), ikan nila (no. akses Bank Gen: AY116536), ikan medaka (no. akses Bank Gen: S74868), ikan *Mylopharyngodon piceus* (no. akses Bank Gen: AY289135) dan ikan *Megalobrama amblycephala* (no. akses Bank Gen: AY170122). Primer yang digunakan adalah forward "F-BP1" (5'-GTGWTGACGCGYGGACCAATC-3') dan reverse R-BP1 (5'-TAGAAGGTGTGRTGCCAGAT-CTTC-3'). Reaksi PCR dengan volume 10  $\mu$ L mengandung 1  $\mu$ L LA Buffer; 1  $\mu$ L dNTPs mix (2,5 mM); 1  $\mu$ L MgCl<sub>2</sub> (25 mM); 1  $\mu$ L masing-masing primer (10 pmol); 0,05  $\mu$ L LA *Taq* polymerase (TAKARA); 1  $\mu$ L genom DNA hasil pengenceran dan sisanya adalah air steril hasil destilasi (SDW). Amplifikasi PCR dilakukan dengan 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 prosedur yang ada.

### **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 µL larutan DNA hasil purifikasi; 0,5 µL pGEM-T Easy; 6,5 µL 5x buffer ligasi, dan 1 µL enzim T4 DNA ligase (Promega). Inkubasi dilakukan selama 2 jam pada suhu ruang dan dilanjutkan semalam di dalam refrigerator (suhu sekitar 4°C). Plasmid DNA hasil ligasi disebut sebagai pT-ktBA. Sebanyak 6,5 µL hasil reaksi ligasi dicampur ke dalam tabung mikro berisi sel kompeten *E. coli* DH-5α (100 µL). 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 µL larutan SOC (1,2 g polypeptone; 0,3 g yeast extract; 0,035 g NaCl; 0,011 g KCl; 600 µL MgCl<sub>2</sub> 1M; 600 µL MgSO<sub>4</sub> 1M dan 60 µL 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 ampisilin, IPTG dan X-gal (2xYT-A,I,X). Cawan agarosa berisi bakteri diinkubasi pada suhu 37°C selama sekitar 14 jam.

Seleksi koloni bakteri yang membawa plasmid pT-ktBA 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 kedalam cawan agarosa 2xYT-A,I,X untuk membuat *master plate*. Master plate merupakan cawan agarosa yang mengandung setiap koloni bakteri yang dianalisis dengan *cracking*, yang merupakan sumber koloni bakteri untuk tahap penelitian berikutnya. Master plate diinkubasi pada suhu 37°C sekitar 8 jam. Kedalam 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 dimasukkan ke media cair 2xYT yang mengandung ampisilin dalam tabung kultur berbentuk "L" untuk dikembangkan. 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) sesuai prosedur. 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 Analisis Sekuens Promoter β-actin**

Volume reaksi amplifikasi PCR untuk sekuensing sebanyak 20 µL dengan komposisi 2 µL Ready Reaction Mix; 3 µL BigDye buffer; 6,4 µL primer "T7-BS" (5'-TTGTAATACGACTACTATAGGGCGAA-3') atau DyeT-R (5'-GGAATTGTGAGCGGATAACA-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. Analisis sekuens menggunakan software BLAST, 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 dan dikenal dengan EGFP (*enhanced green*

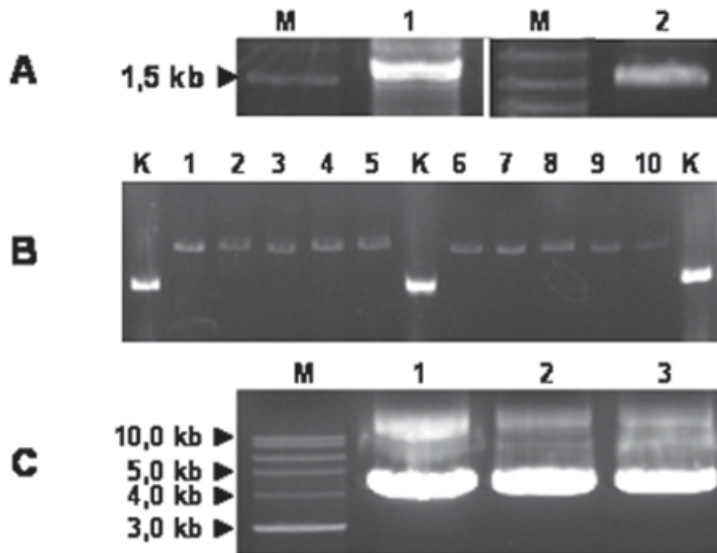
*fluorescent protein*), selanjutnya dipotong menggunakan enzim restriksi *Kpn*I dan *Apa*I. Untuk pengujian aktivitas promoter  $\beta$ -actin ikan kerapu, panjang sekuens yang digunakan sekitar 1,3 kb; mencakup sekuens promoter proksimal (sekuens sebelum ekson-1), ekson 1 dan intron 1. Fragmen DNA tersebut diamplifikasi dengan PCR menggunakan primer forward "F-Pro-BA" (5'-TTGG-TACCGTGAGTGACGCCG-GACCAATC-3') dan reverse "R-Pro-BA" (5'-TTGGGCCCTTT-CTGAGCAGGAGGAAGGATG-3).

Hasil amplifikasi diligasi dengan pGEM-T Easy dan kemudian fragmen ktBA tersebut diisolasi kembali dengan cara memotong plasmid menggunakan enzim restriksi *Kpn*I dan *Apa*I. Selanjutnya, fragmen ktBA hasil restriksi tersebut diligasi dengan fragmen EGFP-N1 yang telah dipotong untuk membuat konstruksi gen pktBA-EGFP. Konstruksi gen

pktBA-EGFP dimikroinjeksi ke embrio ikan zebra fase satu sel untuk menguji aktivitas promoter ktBA ikan kerapu bebek hasil isolasi. Metode mikroinjeksi mengikuti teknik Alimuddin *et al.* (2005). Aktivitas promoter  $\beta$ -actin ikan kerapu bebek 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-BP1 dengan cetakan genom DNA ikan kerapu bebek adalah antara 1,5 kb dan 2,0 kb (Gambar 1-A). 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



Gambar 1. (A) Elektroforesis hasil amplifikasi PCR (1) & fragmen DNA hasil isolasi dari gel (2). (B) Elektroforesis hasil *cracking* koloni bakteri, 1-10: koloni bakteri putih. K: koloni bakteri biru sebagai kontrol yang tidak membawa insersi. (C) Elektroforesis hasil isolasi plasmid DNA dari 3 koloni bakteri yang membawa insersi dengan panjang fragment DNA, 1,5 kb; 3,0 kb dan 5,0 kb. M: adalah marker DNA 1 kb (BioLabs Inc., New England)

Figure 1. (A) Electrophoresis of PCR amplification product (1) and the isolated DNA fragment from gel (2) (B) Electrophoresis of the cracking product of bacterial colony. Line 1 to 10 is number of each white bacterial colony. K is of the blue colony without DNA insertion as control. (C) Electrophoresis of DNA plasmid isolation product from 3 white bacterial colony with fragment DNA length of 1.5 kb, 3 kb, and 5 kb. M is 1 kb DNA marker (BioLabs Inc., New England)

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 1-B). Sejalan dengan hasil elektroforesis pada Gambar 1-B, ukuran pita DNA plasmid hasil isolasi dari bakteri koloni putih (lebih besar dari 4 kb) lebih besar dibandingkan dengan panjang sekuens pGEM-T Easy; 3015 bp (Gambar 1-C). Hal ini menunjukkan bahwa plasmid DNA bakteri tersebut membawa DNA insersi hasil amplifikasi PCR. Hasil sekuensing terhadap DNA insersi tersebut ditunjukkan pada Gambar 2. Panjang sekuens hasil sekuensing adalah 1630 bp.

Untuk mengetahui apakah sekuens yang diperoleh mirip dengan suatu gen atau genom yang ada di Bank Gen, dilakukan analisis BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). Hasil analisis menunjukkan bahwa sekuens tersebut sangat mirip dengan gen  $\beta$ -actin dari berbagai jenis ikan seperti ikan nila, ikan mas dan ikan kerapu totol oranye *Epinephelus coioides* (hasil tidak ditampilkan). Bagian yang sangat mirip adalah sekuens yang mengkodekan (*coding sequence*) asam amino. Dengan demikian diduga bahwa sekuens DNA hasil isolasi merupakan gen  $\beta$ -actin.

Dengan menggunakan *software* GENETYX, persentase homologi sekuens genomik  $\beta$ -actin ikan kerapu bebek hasil kloning dengan ikan

gtgagtqacgccggaccaatcagcggggcgcggtgcggaaagtctccttttatggagag  
gggctgcagcgcgagctctgataaaaccctgcaatttatggcgctccattgcagtc  
ttcagacactaaaccctaccggagtgtagcgtcagtcacagccttcccaacgccgaca  
accctccctctaacaggttaagacaactcgggtgcgaagatgagagttctgtcacattt  
caaatacttctgttttaacacaagtggtgtatatacacagctggcgccggttaagtt  
acgtagggggtctctgtgtgactccaagttgcagcaatcgttacaactgtaactg  
aaattcccgtagcctctcatttcattacatgtctttgaatgggaccggttaaagtt  
gggatgctgccgtaacatttaacgcctcaaagtgggctgtttgtcggcatgctgtcg  
tttgtttaaagcgtgggtgtgaaataaccggctgctccgtgctgaccgcttcac  
actgaaacaaatcagacggcgttaaaaaagcctgaccttctcgcttacataaagcat  
ctgctttggcacggctcggcgggtCTGCTGTCTCCGATTTACACACGGCAGATGATGG  
CAGATTAGACGGTAAACTAAACGACTTCATTTAGATTGCgtggagagatagga  
tgcccggtgacattgcagccacaatgtcatttgggtatcaagttaacgttacgtcttg  
caaatgtcagaagttgctatttatcatataacctttagggatgaaataatggtcacga  
caaaactgtgcatctgatggctgacatgatagtgaaatggaagtttatgcacgtcagaac  
tgctgtatgaaatgtgcaagagggtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt  
atggtgatcccggaagggagtggtcggctgctcgggtgcatttggaggttaactaac  
acggggcggcttcgctggcggcggctgcccggctctcaagctgctcactttgacctt  
atatggccatggccagaccgaggagaaactgcctttgtttctcagcgtggatttggg  
ctgggacctgcccactgagacatccagcgtccagctccataatgacaaggctttcat  
ccagctgatgatgtccagatgtaactgtcacagagcatcagttgtaaccaccccttcctc  
ttttttcatccttctcctgctcagAAAATGGATGATGAAATCGCCGCCCTCGTTGTT  
GACAACGGATCCGGTATGTGCAAGCTGGCTTTGCAGGAGATGATGCTCCACGTGCTGT  
GTTCCCTCCATTGTTGGACGTCCAGACATCAGgtacagttgtgcagaagatcatat  
caaacatcgatacctaacttgttctacatttgccttgatttaacctctgtcttctt  
ccctagGGTGTGATGGTTGGTATGGGCCAGAAGGACAGCTATGCTCGGTGATGAGGCACA  
GAGCAAAGGGGCATCCTGACCCTGAAGTACCCATTGAGCACGGTATTGTACCAACT  
GGGACGACATGGAGAAGATCTGGCATCACACCTTCTA

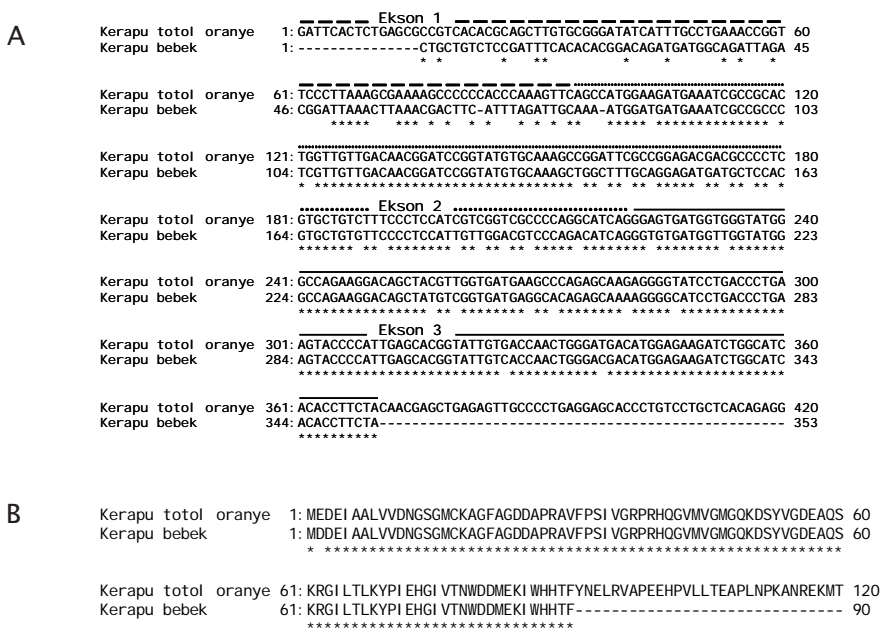
Gambar 2. Sekuens genomik  $\beta$ -actin ikan kerapu bebek hasil amplifikasi PCR. (Huruf kecil intron, huruf besar yang digaris bawah: ekson. Huruf kecil digaris bawah: sekuens elemen CARg dan TATA, huruf ditulis miring dan digaris bawah dua: sekuens primer. Huruf yang dikotak segi empat: primer reverse yang digunakan dalam pembuatan konstruksi gen)

Figure 2. Sequence of PCR amplification product of humpback grouper  $\beta$ -actin genomic. Lowercase letters is intron, while the underlined and uppercase letters is exon. The underlined and lowercase letters is the sequence of CARg and TATA elements. Double underlined and italics letters is the primer sequences. Boxed letters is the sequence of reverse primer used in the designing of gene construct

mas adalah sebesar 55,23%; sedangkan dengan *Mylopharyngodon* sebesar 54,52%; sementara dengan ikan *Megalobrama* sebesar 52,96%, kerapu bebek dengan ikan nila sebesar 49,55%, dan kerapu bebek dengan ikan medaka hanya 46,66%. Selanjutnya, sekuens DNA hasil kloning memiliki 3 ekson. Posisi ekson-intron dalam sekuens mengikuti aturan GT-AG. Ekson 1 diduga terletak pada nukleotida (nt.) 614-691, ekson 2 pada nt. 1266-1391 dan parsial (sebagian) sekuens ekson 3 pada nt. 1482-1630 yang dihitung dari ujung sekuens terminal 5 (Gambar 3-A). Ekson 1 merupakan sekuens tidak mengkodekan asam amino atau disebut *untranslated region*. Posisi dan sekuensnya masih bersifat dugaan dan perlu dibuktikan dengan cara mengisolasi mRNA  $\beta$ -actin. Pada penelitian ini tidak

mencakup pembuktian tersebut. Selanjutnya, ekson 2 dan 3 merupakan sekuens yang mengkodekan asam amino. Kodon awal (ATG) terdapat pada ekson 2, pada nt. 1269 dihitung dari ujung sekuens terminal 5. Sekuens asam amino residu gen  $\beta$ -actin ikan kerapu bebek (Gambar 3-B) hampir sama semua dengan yang dimiliki oleh ikan kerapu totol oranye (no. akses Bank Gen: AY510710). Hal ini memperkuat dugaan sebelumnya bahwa sekuens DNA hasil isolasi merupakan sekuens  $\beta$ -actin.

Analisis sekuens lebih lanjut dilakukan menggunakan software TFBind untuk mengetahui sekuens faktor transkripsi (*transcription factor*, TF) yaitu; elemen-elemen yang sangat menentukan aktivitas promoter. Sekuens TF yang telah diketahui berperan



Gambar 3. (A) *Alignment* sekuens ekson gen  $\beta$ -actin ikan kerapu bebek dengan gen  $\beta$ -actin ikan kerapu totol oranye (no. akses Bank Gen: AY510710). Posisi setiap ekson diberi label di atas sekuens. (B) *Alignment* sekuens asam amino residu gen  $\beta$ -actin ikan kerapu bebek dengan gen  $\beta$ -actin ikan kerapu totol oranye. Tanda asterisk di bawah sekuens masing-masing menunjukkan kesamaan nukleotida dan asam amino residu

Figure 3. (A) *Alignment of the exon of humpback grouper and orange-spotted grouper  $\beta$ -actin genes (GenBank accession no.: AY510710). Site of each exon is marked above their sequences. (B) Alignment of amino acid residues of humpback and orange-spotted grouper  $\beta$ -actin genes. Asterisk under the sequences is showing same of nucleotide and amino acid residues, respectively*

penting dalam aktivitas promoter  $\beta$ -actin adalah CCAAT, CC(A/T)<sub>6</sub>GG atau motif CAR<sub>G</sub>, dan boks TATA. Hubungan tingkat aktivitas promoter  $\beta$ -actin dengan sekuens CCAAT telah diteliti oleh Quitschke *et al.* (1989). Kegunaan motif CAR<sub>G</sub>, 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).

Hasil analisis menunjukkan bahwa ketiga sekuens TF tersebut telah dilaporkan dijumpai pada promoter  $\beta$ -actin dari berbagai jenis ikan juga terdapat pada sekuens hasil kloning dari ikan kerapu bebek. Sekuens CCAAT terletak pada nt. 16-20, motif CAR<sub>G</sub> terletak pada nt. 46-55 pada sekuens promoter proksimal dan nt. 1059-1068 pada intron 1, serta boks TATA terletak pada nt. 582-586. Posisi elemen CCAAT dan CAR<sub>G</sub> promoter  $\beta$ -actin ikan kerapu bebek adalah relatif sama dengan ikan-ikan yang telah dilaporkan sebelumnya, tetapi letak boks TATA berbeda. Boks TATA pada promoter  $\beta$ -actin ikan-ikan lain terletak di dekat sekuens CAR<sub>G</sub> yang pertama di promoter proksimal.

Meskipun perlu pembuktian lebih lanjut, bila posisi boks TATA secara evolusi adalah konserf (*conserve*) pada ikan, maka kandidat boks TATA lainnya untuk ikan kerapu bebek adalah terletak pada nt. 92-99. Selanjutnya, promoter  $\beta$ -actin ikan kerapu bebek juga memiliki elemen CAR<sub>G</sub> 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 CAR<sub>G</sub> kedua juga berpengaruh positif terhadap aktivitas promoter (Liu *et al.*, 1990). Hal ini mengindikasikan bahwa sekuens regulator  $\beta$ -actin ikan kerapu bebek adalah konserf secara evolusi (*evolutionary conserved*).

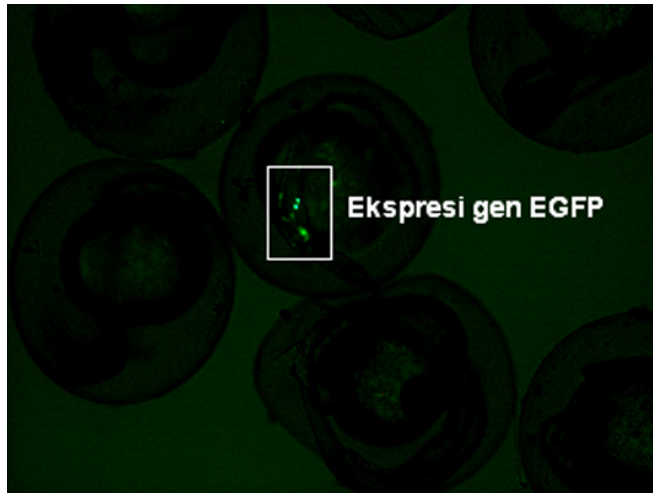
Uji aktivitas promoter dilakukan untuk membuktikan secara *in vivo* bahwa sekuens DNA hasil isolasi mampu mengatur ekspresi gen. Pada penelitian ini digunakan gen penanda EGFP, suatu gen pengkode protein berpendar hijau bila diberi sinar ultraviolet. Panjang sekuens DNA hasil isolasi yang digunakan dalam pembuatan konstruksi gen adalah sekitar 1,3 kb yang mencakup sekuens promoter proksimal, ekson 1 dan intron 1.

Intron 1 dimasukkan dalam konstruksi gen karena bagian ini biasanya mengandung elemen "enhanser"; elemen yang bisa meningkatkan ekspresi gen. Elemen yang diduga sebagai enhanser tersebut adalah CCATGGCC yang terletak pada nt. 1069-1076. Sekuens ini hanya berbeda 1 nt. dengan sekuens putatif *enhanser* ikan nila (CCATGTCC, no. akses Bank gen: AY116536), berbeda 2 nt. dengan yang dimiliki ikan mas (CCATGCCT, no. akses Bank gen: M24113), tetapi hanya beberapa nukleotida yang sama untuk beberapa jenis ikan lainnya pada kondisi antikodon dan dibaca dari arah kiri (CCATAAAGG). Ikan-ikan yang memiliki elemen enhanser dengan nt. banyak berbeda dengan ikan kerapu bebek terlihat pada ikan *Heteropneustes fossilis* (no. akses Bank gen: AY531754), ikan *Megalobrama amblycephala* (no. akses Bank gen: AY170122) dan ikan *Ctenopharyngodon idella* (no. akses Bank gen: M25013), dengan sekuens *enhanser* 5'-CCTTTTATGG-3'.

Pengujian aktivitas promoter dilakukan dengan menginjeksikan plasmid pktBA-EGFP dan mengamati ekspresi sementara (*transient expression*) gen EGFP pada embrio ikan zebra. Metode ini umum dilakukan untuk menguji aktivitas promoter (Maclean *et al.*, 2002; Takagi *et al.*, 1994; Tsai *et al.*, 1995; Maclean *et al.*, 1996; Muller *et al.*, 1996; Hamada *et al.*, 1998; Alimuddin, 2003; Kato *et al.*, 2007). Dari 12 embrio ikan zebra yang dimikroinjeksi dengan konstruksi gen pktBA-EGFP, 3 diantaranya mengekspresikan gen EGFP. Embrio yang mengekspresi gen EGFP pada jaringan otot ditunjukkan pada Gambar 4 (ditandai dengan kotak segi empat). Hal ini menunjukkan bahwa elemen TF yang ada dalam sekuens 1,3 kb berperan aktif dalam mengontrol ekspresi transgen pada jaringan otot.

Ekspresi gen EGFP pada ketiga embrio tersebut di atas terlihat seperti tambalan (*patchy*) dan beberapa sel dengan ekspresi tinggi, sementara yang lainnya lemah atau tidak mengekspresikan transgen. Kondisi mosaik tersebut 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 embrio diduga merupakan akibat dari perbedaan jumlah copy transgen. Dengan menggunakan sekuens regulator yang bersifat *ubiquitous* seperti  $\beta$ -actin, variasi





Gambar 4. Ekspresi gen EGFP dalam jaringan otot daging (diberi tanda kotak) embrio ikan zebra yang telah dimikroinjeksi dengan konstruksi gen pktBA-EGFP

Figure 4. EGFP gene expression in muscle (marked by box) of zebrafish embryo that had been microinjected by pktBA-EGFP gene construct

tempat ekspresi sementara dari transgen juga telah dilaporkan pada ikan medaka dan nila (Tsai *et al.*, 1995; Hwang *et al.*, 2003). Ekspresi transgen akan terlihat pada semua jaringan otot ikan transgenik pada generasi pertama dan seterusnya.

Hasil pengamatan ekspresi gen EGFP menunjukkan bahwa promoter  $\beta$ -actin ikan kerapu bebek (Famili Serranidae) dapat aktif pada ikan zebra (Famili Cyprinidae) yang tidak sekerabat. Pengujian aktivitas promoter  $\beta$ -actin ikan kerapu bebek pada ikan yang sekerabat dengannya, perbedaan aktivitasnya pada ikan zebra yang tidak sekerabat juga belum diketahui. Namun demikian, promoter  $\beta$ -actin ikan kerapu bebek diduga akan memiliki aktivitas yang lebih baik bila digunakan pada ikan yang sekerabat seperti yang telah dilaporkan oleh Hwang *et al.* (2003). Promoter ikan mas (Famili Cyprinidae) lebih aktif pada ikan zebra dibandingkan dengan aktivitasnya pada ikan nila (Famili Cichlidae). Sebaliknya, promoter ikan nila lebih aktif pada ikan *blue gill* yang sekerabat dengannya.

Dalam rangka pembuatan ikan laut transgenik, promoter  $\beta$ -actin ikan kerapu bebek merupakan salah satu dari 2 promoter  $\beta$ -actin yang telah diisolasi dari ikan laut dan diuji aktivitasnya. Baru-baru ini isolasi dan uji aktivitas promoter  $\beta$ -actin dari ikan kakap merah, *Pagrus major* juga telah dilakukan (Kato

*et al.*, 2007). Namun demikian, sampai saat ini keturunan ikan kakap merah transgenik belum dilaporkan berhasil diproduksi. Dengan diperolehnya promotor  $\beta$ -actin, pembuatan ikan kerapu transgenik untuk peningkatan produksi budi daya dapat dilakukan serta tidak terprotek oleh isu GMO.

#### KESIMPULAN

1. Promoter  $\beta$ -actin dari ikan kerapu bebek telah berhasil diisolasi.
2. Elemen-elemen yang terekspresi terdapat pada promoter  $\beta$ -actin, yaitu CCAAT, CaTG dan boks TATA (pada sekuens promoter  $\beta$ -actin ikan kerapu hasil isolasi).
3. Sekuens promoter dengan panjang sekitar 1,3 kb mampu mengontrol ekspresi gen penanda EGFP pada jaringan otot ikan zebra.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Kami menyampaikan banyak terima kasih kepada Sdri. Shoko Ihara (Department of Marine Biosciences, Tokyo University of Marine Sciences and Technology) dalam pengambilan foto embrio ikan zebra yang mengekspresikan gen GFP. Penelitian ini sebagian dibiayai oleh RUSNAS ikan kerapu Tahun Anggaran 2007.

## DAFTAR PUSTAKA

- Alam M.S., F.L. Lavender, A. Iyengar, M.A. Rahman, H.H. Ayad, R. Lathe, S.D. Morley, and N. Maclean. 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, G. Yoshizaki, V. Kiron, S. Satoh, and T. Takeuchi. 2005. Enhancement of EPA and DHA biosynthesis by over-expression of masu salmon 6-desaturase-like gene in zebrafish. *Transgenic Res.* 14: 159-165.
- Alimuddin. 2003. *Introduction and expression of foreign D6-desaturase-like gene in a teleostean fish*. Thesis. Tokyo University of Fisheries, Japan. 41 pp.
- Brem G., B. Brenig, G. Horstgen-Schwark, and E-L. Winnacker. 1988. Gene transfer in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture.* 68: 209-219.
- Chourrout D.R., R. Guyomard, and L.M. Houdebine. 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 R.H., T.Y. Yesaki, C.A. Biagy, E.M. Donaldson, P. Swanson, and W.K. Chan. 1994. Extraordinary salmon growth salmon growth. *Nature.* 371: 209-210.
- Dunham R.A., J. Eash, J. Askins, and T.M. Townes. 1987. Transfer of metallothionein-human growth hormone fusion gene into channel catfish. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 116: 87-91.
- Glick B.R. and J.J. Pasternak. 2003. *Molecular Biotechnology: Principles and Application of Recombinant DNA*. 3<sup>rd</sup> ed. ASM Press, Washington, DC. 760 pp.
- Guyomard R., D. Chourrout, C. Leroux, L.M. Houdebine, and F. Pourrain. 1989. Integration and germ line transmission of foreign genes microinjected into fertilised trout eggs. *Biochimie.* 71: 857-883.
- Hamada K., K. Tamaki, T. Sasado, Y. Watai, S. Kani, Y. Wakamatsu, K. Ozato, M. Kinoshita, R. Kohno, S. Takagi, and M. Kimura. 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., T.J. Smith, F. Muller, N. Maclean, S. Uzbekova, P. Prunet, and B. Brenton. 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., K. Fernandes, G. Goldspink, P. Butterworth, P.K. Umeda, and K-C Chang. 1991. Strong expression of foreign genes following direct injection into fish muscle. *FEBS Lett.* 290: 73-76.
- Higashijima S., H. Okamoto, N. Ueno, Y. Hotta, and G. Eguchi. 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.
- Hinitz Y. and B. Moav. 1999. Growth performance studies in transgenic *Cyprinus carpio*. *Aquaculture.* 173: 285-296.
- Hwang G-L, M.A. Rahman, S.A. Razak, F. Sohm, H. Farahmand, A. Smith, C. Brooks, and N. Maclean. 2003. Isolation and characterisation of tilapia  $\beta$ -actin promoter and comparison of its activity with carp  $\beta$ -actin promoter. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1625: 11 -18.
- Kato K., M. Takagi, Y. Tamaru, S-I. Akiyama, T. Konishi, O. Murata, and H. Kumai. 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, T. Morita, M. Miwa, J. Lu, M. Endo, T. Takeuchi, and G. Yoshizaki. 2007. Transgenic Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) over-expressing growth hormone show reduced ammonia excretion. *Aquaculture.* 270: 427-435.
- Liu Z., B. Moav, A.J. Faras, K.S. Guise, A.R. Kapuscinski, and P.B. Hackett. 1990. Functional analysis of elements affecting expression of the  $\beta$ -actin gene of carp. *Mol. Cell. Biol.* 10: 3432-3440.
- Liu Z., B. Moav, A.J. Faras, K.S. Guise, A.R. Kapuscinski, and P. Hackett. 1991. Importance of the CARG box in regulation of  $\beta$ -actin-encoding genes. *Gene.* 108: 211-217.
- Maclean N., M.S. Alam, A. Iyengar, and A. Popplewell. 1996. Transient expression of reporter genes in fish as a measure of promoter efficiency. In: Ennion S.J. and G. Goldspink (Eds.). *Gene Expression and Manipulation in Aquatic Organisms*. Society

- for *Experimental Biology Seminar Series*, Cambridge Univ. Press, Cambridge. 58: 165-174.
- Maclean N., G-L. Hwang, and T. Farahmand. 2002. Exploiting transgenic tilapia and the tilapia genome. In: Shimizu N., T. Aoki, I. Hirono, and F. Takashima (Eds.). *Aquatic Genomics*. Springer-Verlag, Tokyo. 432 pp.
- Maclean N. and R.J. Laight. 2000. Transgenic fish: an evaluation of benefits and risks. *Fish Fish*. 1: 146-172.
- Martinez R., M.P. Estrada, J. Berlanga, I. Guillen, O. Hernandez, E. Cabrera, R. Pimentel, R. Morales, F. Herrera, A. Morales, J.C. Pina, Z. Abad, V. Sanchez, P. Melamed, R. Leonart, and J. de la Fuente. 1996. Growth enhancement in transgenic tilapia by ectopic expression of tilapia growth hormone. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 5: 62-70.
- Moav B., Z. Liu, L.D. Caldovic, M.L. Gross, A.J. Faras, and P.B. Hackett. 1993. Regulation of expression of transgenes in developing fish. *Transgenic Res.* 2: 153-161.
- Muller F., D.W. Williams, J. Kobolak, L. Gauvry, G. Goldspink, L. Orban, and N. Maclean. 1997. Activator effect of coinjected enhancers on the muscle-specific expression of promoters in zebrafish embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 47: 404-412.
- Muller F., L. Gauvry, D.W. Williams, J. Kobolak, N. Maclean, L. Orban, and G. Goldspink. 1996. The use of transient *LacZ* expression in fish embryos for comparative analysis of cloned regulatory elements. In: Ennion S.J. and G. Goldspink (Eds.). *Gene Expression and Manipulation in Aquatic Organisms. Society for Experimental Biology Seminar Series*. Cambridge Univ. Press, Cambridge. 58: 175-179.
- Noh J.K., K.N. Cho, E.H. Han, A Kim, J.S. Lee, D.S. Kim, and C.G. Kim. 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., K. Makino, T. Kawamoto, H. Niwa, H. Sugiyama, and T. Kakunaga. 1989. Identification of a site that mediates transcriptional response of the human  $\beta$ -actin gene to serum factors. *Gene*. 30: 13-19.
- Penman D.J., A. Iyengar, A.J. Beeching, A. Rahman, Z. Sulaiman, and N. Maclean. 1991. Patterns of transgene inheritance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Mol. Reprod. Dev.* 30: 201-206.
- Quitschke W.W., Z-Y. Lin, L. DePoti-Zilli, and B.M. Paterson. 1989. The  $\beta$ -actin promoter. *J. Biol. Chem.* 264: 9539-9546.
- Rahman M.A. and N. Maclean. 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 A.T., T.N. Hansen, F.J. Demayo, L.A. Stanley, L. Xin, and R.J. Schwartz. 1993. Cytoplasmic  $\beta$ -actin promoter produces germ cell and preimplantation embryonic transgene expression. *Mol. Reprod. Dev.* 34: 117-126.
- Shears M.A., G.L. Fletcher, C.L. Hew, S. Gauthier, and P.L. Davies. 1991. Transfer, expression, and stable inheritance of antifreeze protein genes in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 1: 58-63.
- Takagi S., T. Sasado, G. Tamiya, K. Ozato, Y. Wakamatsu, A. Takeshita, and M. Kimura. 1994. An efficient expression vector for transgenic medaka construction. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 3: 192-199.
- Tsai H-J., S-H. Wang, K. Inoue, S. Takagi, M. Kimura, Y. Wakamatsu, and K. Ozato. 1995. Initiation of the transgenic *LacZ* gene expression in medaka (*Oryzias latipes*) embryos. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 4: 1-9.
- Volckaert F.A., B.A. Hellemans, P. Galbusera, F. Ollevier, B. Sekkali, and A. Belayew. 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 D.W., F. Muller, F.L. Lavender, L. Orban, and N. Maclean. 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., M. Hayat, C. Joyce, L.I. Gonzalez-Villasenor, R.A. Lin, R.A. Dunham, T.T. Chen, and D.A. Powers. 1990. Gene transfer, expression and inheritance of pRCV-rainbow trout-GHcDNA in the common carp *Cyprinus carpio*. *Mol. Reprod. Dev.* 25: 13-25.