

## EFEKTIVITAS PROMOTER hCMV, mEF1 $\alpha$ DAN mAct DALAM MENGATUR EKSPRESI GEN ASING PADA TRANSGENIK IKAN ZEBRA

### Effectiveness of hCMV, mEF1 $\alpha$ and mAct promoters on driving of foreign gene expression in transgenic zebrafish

Alimuddin\*<sup>1</sup>, G. Yoshizaki<sup>2</sup>, O. Carman<sup>1</sup>, dan T. Takeuchi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departemen Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, IPB.

<sup>2</sup>Department of Marine Bioscience, Tokyo University of Marine Science & Technology, Tokyo 108-8477, Japan.

#### ABSTRACT

Highly unsaturated fatty acids (HUFA), especially eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) have long been recognized for its beneficial effect for human health and development. The  $\Delta 6$  fatty acid desaturase is generally considered to be the rate-limiting factor in HUFA biosynthesis. Here, as the first step of study, we conducted experiment to select an appropriate construct that allows higher expression levels of masu salmon (*Oncorhynchus masou*)  $\Delta 6$ -desaturase gene in zebrafish (*Danio rerio*) in order to increase its activity for synthesizing EPA/DHA. Salmon  $\Delta 6$ -desaturase cDNA (sD6) was separately ligated with human cytomegalovirus (hCMV), medaka elongation factor 1 $\alpha$  (mEF1 $\alpha$ ) and medaka  $\beta$ -actin (mAct) promoters. The resulted construct was designated as hCMV-sD6, mEF1 $\alpha$ -sD6 and mAct-sD6, respectively. Each of the constructs in circular DNA form was microinjected into 1-cell stage embryos at a concentration of 30 $\mu$ g/ml. Transgenic individuals were identified by polymerase chain reaction (PCR) and their expression levels were analyzed by reverse transcription PCR. The first (F1) and second (F2) generation was produced by crossing the transgenic founder F0 and F1, respectively, with wild-type fish. The results showed that the highest transient gene expression level was obtained from the mAct-D6 construct, followed respectively by EF1 $\alpha$ -D6 and hCMV-D6 construct. The transmission rate of transgene into F1 generation was 4.2%–44.1%, and into F2 was followed the Mendelian segregation pattern. Expression of transgene in F2 generation was varied between strains regarding as the mosaics of F0 fish. Now, a transgenic system to study the modification of fatty acid biosynthesis pathways in fish was established. Further investigations are to produce fish containing higher levels of EPA and DHA.

Keywords: desaturase, nutraceutical fatty acid, transgenic, zebrafish, masu salmon

#### ABSTRAK

Promoter merupakan regulator yang menentukan tempat, waktu dan tingkat ekspresi gen. Pada penelitian ini, kami melakukan seleksi konstruksi plasmid yang tepat yang menghasilkan tingkat ekspresi yang tinggi dari gen  $\Delta 6$ -desaturase-like ikan masu salmon (*Oncorhynchus masou*) yang ditransfer ke ikan zebra (*Danio rerio*) untuk meningkatkan kemampuannya dalam mensintesa EPA/DHA. cDNA  $\Delta 6$ -desaturase-like (Om $\Delta 6$ FAD) dari ikan salmon masu diligasi secara terpisah dengan promoter dari cytomegalovirus manusia (hCMV), elongation factor 1 $\alpha$  (mEF1 $\alpha$ ) dan  $\beta$ -actin (m $\beta$ Act) dari ikan medaka, untuk membuat konstruksi plasmid yang berturut-turut disebut sebagai hCMV-Om $\Delta 6$ FAD, mEF1 $\alpha$ - Om $\Delta 6$ FAD dan m $\beta$ Act-Om $\Delta 6$ FAD. Konstruksi tersebut dengan konsentrasi 30 $\mu$ g/ml disuntikkan ke embrio pada saat fase satu sel. Individu transgenik diidentifikasi menggunakan PCR dan tingkat ekspresi transgen dianalisa dengan RT-PCR. Hasil menunjukkan bahwa tingkat ekspresi sementara yang tertinggi dari gen asing adalah diperoleh dari konstruksi m $\beta$ Act-Om $\Delta 6$ FAD, diikuti selanjutnya oleh EF1 $\alpha$ -Om $\Delta 6$ FAD dan hCMV- Om $\Delta 6$ FAD. Transgen telah ditransmisikan ke ikan generasi F2 dengan mengikuti pola segregasi Mendel. Tingkat ekspresi transgen yang tinggi pada jaringan ikan F2 yang diperiksa telah diperoleh. Dengan demikian, sebuah sistem transgenik untuk memodifikasi biosintesa asam lemak pada ikan telah dikembangkan.

Kata kunci: promoter, desaturase asam lemak, transgenik, ikan zebra, ikan salmon masu

## PENDAHULUAN

Asam lemak tidak jenuh yang berantai panjang (*highly unsaturated fatty acids*, HUFA), khususnya asam eikosapentanoat (*eicosapentaenoic acid*, EPA; C20:5n-3) dan asam dokosaheksanoat (*docosahexaenoic acid*, DHA; C22:6n-3), telah banyak dilaporkan memberikan efek positif untuk kesehatan dan pertumbuhan pada manusia (Simopolous, 1991; Kelley and Rudolf, 2000; Lauritzen *et al.*, 2001; Das, 2002). Kedua asam lemak tersebut juga dibutuhkan oleh ikan laut untuk pertumbuhan dan perkembangannya (Watanabe, 1993; Sargent *et al.*, 1995; 1999; Takeuchi, 2001). EPA and DHA adalah terutama diperoleh dari minyak ikan yang diekstrak dari ikan laut hasil tangkap. Namun demikian, akhir-akhir ini ketersediaan bahan mentah untuk memproduksi EPA dan DHA semakin lama semakin berkurang yang disebabkan oleh penurunan jumlah ikan di alam (Sargent and Tacon, 1999). Peningkatan produksi ikan dari kegiatan akuakultur memiliki potensi untuk menanggulangi pengaruh penurunan stok alam tersebut. Akan tetapi, kedua jenis asam lemak esensial itu juga dibutuhkan untuk memproduksi ikan melalui akuakultur, khususnya marikultur (Sargent *et al.*, 1995; Takeuchi, 2001). Oleh karena itu, diperlukan jalan alternatif, seperti aplikasi teknologi transfer gen, yang mungkin bisa digunakan untuk menyediakan sumber alternatif yang dapat menghasilkan EPA dan DHA dengan jumlah sama atau lebih tinggi daripada yang dikandung oleh ikan laut.

Secara umum hewan vertebrata, termasuk ikan air tawar, mampu mensintesa EPA dari konversi asam lemak linolenat ( $\alpha$ -*linolenic acid*, C18:3n-3) dengan bantuan enzim-enzim  $\Delta$ 6- dan  $\Delta$ 5-desaturase, dan elongase (Buzzy *et al.*, 1996; Tocher *et al.*, 1998; Sprecher, 2000). Selanjutnya, DHA disintesa dari EPA yang dilakukan secara terpisah oleh enzim-enzim elongase menjadi 22:5n-3 dan kemudian menjadi 24:5n-3, dilanjutkan oleh enzim  $\Delta$ 6-desaturase menjadi 24:6n-3, yang akhirnya diretrokonversi oleh peroksisoma  $\beta$ -oksidase

untuk menghasilkan DHA (Buzzy *et al.*, 1996; Sprecher, 2000). Sebuah jalur sintesa yang lebih pendek untuk memproduksi DHA yang secara langsung dikonversi dari 22:5n-3 oleh  $\Delta$ 4-desaturase juga telah ditemukan pada beberapa jenis mikroorganisme seperti *Thraustochytrium* sp. (Qiu *et al.*, 2001), *Euglena gracilis* (Meyer *et al.*, 2003) dan *Pavlova lutheri* (Tonon *et al.*, 2003).

Teknologi transfer gen baru-baru ini telah digunakan untuk memproduksi protein asing yang bermanfaat bagi kesehatan manusia pada hewan yang secara alami adalah tidak mampu disintesa oleh mereka (diulas oleh Houdebine, 2000). Teknologi ini telah diaplikasikan juga untuk akuakultur (Hackett, 1993; Hew and Fletcher, 2001; Yoshizaki, 2001). Ikan transgenik dapat diproduksi melalui beberapa cara, yaitu penyuntikan ke *germinal vesicle* telur (Ozato *et al.*, 1986) atau sitoplasma embrio pada fase satu sel (Chourrout *et al.*, 1986), elektroporasi pada embrio (Powers *et al.*, 1992) atau pada sperma (Kang *et al.*, 1999), infeksi dengan retroviral (Lin *et al.*, 1994a; Gaiano *et al.*, 1996), dan dengan partikel gun (Zelenin *et al.*, 1991). Meskipun semua metode tersebut telah berhasil memfasilitasi pemindahan gen pada jenis ikan, metode penyuntikan adalah lebih umum digunakan. Aplikasi teknologi transfer gen di bidang akuakultur telah dilakukan untuk memperbaiki laju pertumbuhan, daya tahan terhadap penyakit dan daya adaptasi terhadap kondisi lingkungan yang ekstrim (diulas oleh Melamed *et al.*, 2002).

Penelitian yang bertujuan untuk memodifikasi sistem metabolisme ikan dengan menggunakan teknologi transfer gen adalah masih sangat sedikit. Toyohara *et al.* (1996) telah mencoba untuk membuat agar ikan bisa mensintesa vitamin C dengan mengintroduksi gen L-gulono- $\gamma$ -lactone oxidase (rGLO) yang aktif sebagai katalisis pada reaksi pembentukan vit. C. Namun demikian, tidak ada produksi vit C yang diperoleh. Perbaikan metabolisme karbohidrat pada ikan rainbow trout dengan menyuntikan secara bersamaan konstruksi plasmid yang mengandung glucose transport proteins

(hGluT) dari manusia dan hexokinase II (rHKII) cDNAs tikus juga telah dicoba. Namun demikian, rHKII and hGluT1 tersebut tidak berfungsi (Pitkanen *et al.*, 1999a). Pada penelitian ini,  $\Delta 6$  desaturase gen yang diisolasi dari masu salmon (*Oncorhynchus masou*) dipindahkan ke ikan zebra dengan tujuan memodifikasi biosintesa asam lemak. Gen  $\Delta 6$  desaturase dipilih karena pada faktanya gen ini secara umum diduga sebagai faktor pembatas dalam biosintesa HUFA (Sprecher, 1981; Cho *et al.*, 1999). Ikan zebra *Danio rerio*, digunakan sebagai model dalam penelitian ini karena ikan ini cepat matang gonad, jumlah telur yang banyak dan mudah dipelihara (Westerfield, 1995).

Dalam pembuatan ikan transgenik, efisiensi transkripsi gen yang diintroduksi (transgen) merupakan salah satu faktor yang menentukan keberhasilan pembentukan fenotipe baru yang dikodekan oleh transgen (Hackett, 1993; Houdebine, 2000). Selanjutnya, tingkat ekspresi, waktu dan tempat ekspresi suatu gen sangat dipengaruhi oleh karakter promoternya. Oleh karena itu, sebagai tahap awal studi dalam rangka memodifikasi jalur metabolisme asam lemak pada ikan untuk meningkatkan produksi EPA/DHA, dilakukan penelitian dengan menggunakan tiga macam konstruksi gen yang dikontrol oleh promoter yang berbeda untuk menentukan konstruksi gen yang memberikan ekspresi  $\Delta 6$ -desaturase yang tertinggi. Promoter yang digunakan yaitu *cytomegalovirus* (CMV) dari virus manusia, *elongation factor 1 $\alpha$*  (EF1 $\alpha$ ) dan  $\beta$ -actin promoter dari ikan medaka (*Oryzias latipes*). Ketiga macam promoter tersebut telah dilaporkan memiliki aktivitas yang tinggi pada jenis ikan yang berbeda-beda oleh beberapa grup peneliti (Devlin *et al.*, 1994; Takagi *et al.*, 1994; Pitkanen *et al.*, 1999a,b; Kinoshita *et al.*, 2000; Yoshizaki, 2001). Medaka  $\beta$ -actin promoter adalah sangat aktif di bagian otot medaka (Takagi *et al.*, 1994) dan rainbow trout (Yoshizaki, 2001), sedangkan pada jenis jaringan lainnya adalah terdeteksi agak lemah. Kinoshita *et al.* (2000) melaporkan bahwa promoter EF1 $\alpha$  di

medaka adalah aktif disemua jaringan kecuali otot. Selanjutnya, promoter CMV adalah memiliki aktivitas yang tinggi di medaka (Winkler *et al.*, 1992), zebrafish (Westerfield *et al.*, 1992), seabream (Garcia-Pozo *et al.*, 1998), tilapia (Martinez *et al.*, 1996), dan Arctic charr (Pitkanen *et al.*, 1999b). Dalam paper ini kami melaporkan bahwa konstruksi plasmid yang dikontrol oleh promoter medaka  $\beta$ -actin memberikan ekspresi transgen yang paling kuat, diikuti selanjutnya oleh medaka EF1 $\alpha$  dan hCMV.

## BAHAN DAN METODE

### Cara pemeliharaan dan pemijahan ikan zebra

Ikan zebra dipelihara dan dipijahkan sesuai dengan metode Westerfield (1995), dengan berbagai modifikasi. Induk ikan dipelihara di akuarium volume 40-L yang dilengkapi dengan pengatur waktu lampu menyala (14 jam terang; 10 jam gelap). Temperatur air akuarium pemeliharaan dipertahankan pada  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  dengan menggunakan pemanas (*heater*). Ikan diberi makan 3 kali sehari; dua kali dengan pakan komersial “otohime” (Nisshin Co., Tokyo, Japan) dan satu kali dengan pakan alami nauplii *Artemia*. Sebanyak 3 ekor induk betina dan 2 ekor induk jantan dicampur ke dalam wadah pemijahan (vol. 3 liter) sekitar 15 menit sebelum lampu menyala. Telur-telur diambil dan dikumpulkan dengan bantuan siphon yang dilakukan sekitar 5 menit setelah pemijahan.

### Isolasi RNA dan sintesa cDNA $\Delta 6$ -desaturase

Total RNA diekstraksi dari hati ikan masu salmon dengan menggunakan ISOGEN (Nippon Gene, Tokyo, Japan) sesuai dengan petunjuk pemakaiannya. Sisa-sisa DNA yang ada didegradasi dengan RQ1 RNase-free DNase (Promega, Madison, USA) 2 U/ $\mu\text{g}$  RNA selama 30 menit pada suhu  $37^\circ\text{C}$ . Setelah diekstraksi dengan fenol-klorofom dan diendapkan dengan etanol, pellet RNA

dilarutkan dalam air berisi diethylpyrocarbonate. DNA untai tunggal disintesa dari 2-3 µg total RNA dengan menggunakan Ready-to-Go You-Prime First-Strand Beads (Amersham Pharmacia Biotech, NJ, USA) sesuai dengan petunjuk pemakaiannya. Dalam reaksi digunakan 1 µg primer dT3`RACE-VECT (5'-GTAATACGAATAACTATAGGGCACGC GTGGTCGACGGCCCGGGCTGG(T)<sub>17</sub>-3').

cDNA Δ6-desaturase diamplifikasi menggunakan PCR dengan dua set primer yang dibuat berdasarkan data sikwens yang ada di GenBank (kode akses: AB070444). Forward primer yang digunakan untuk mengamplifikasi desaturase ikan salmon adalah (5'-TACTCCATGGTTCAGCAA-ATGAATTGAACA-3') dan reverse adalah (5'-TCGTCCATGGCCATTCAGTCTGCA-CAAGGA-3') yang keduanya memiliki daerah pemotongan enzim *NcoI* (garis bawah) untuk membantu proses kloning ke dalam vektor ekspresi. Hasil amplifikasi dengan panjang 1680 bp diligasi ke vektor pGEM-T Easy (Promega, Madison, USA).

### Konstruksi plasmid

**Konstruksi hCMV-sD6.** cDNA desaturase yang telah disubklon dalam vektor pGEM-T Easy diisolasi dengan memotongnya menggunakan enzim pemotong *EcoRI*. Kemudian fragmen desaturase tersebut diligasi ke vektor pEGFP-N1 (Clontech, Palo Alto, USA) yang sudah tidak mempunyai gen GFP (*green fluorescence protein*). Konstruksi gen yang diperoleh diberi nama hCMV-sD6.

**Konstruksi mEF1α-sD6.** Fragmen cDNA Δ6 desaturase ikan zebra yang ada dalam vektor pGEM-T Easy diisolasi dengan memotong vektor menggunakan enzim *NcoI* dan selanjutnya diligasi ke dalam vektor pEF-L-SAH-N yang sudah dipotong dengan *NcoI*. Vektor pEF-L-SAH-N ini mengandung promoter *elongation factor 1α* (EF1α) (Kinoshita *et al.*, 2000). Vektor ekspresi yang dihasilkan diberi nama mEF1α-sD6.

**Konstruksi mβAct-sD6.** Fragment promoter β-Actin dari ikan medaka yang

panjangnya 3.7 kb diisolasi dari plasmid pOBA-109 (Takagi *et al.*, 1994), selanjutnya diligasi ke pBluescript SK (+/-) yang mempunyai poliadenilasi dari hormon pertumbuhan sapi (*bovine growth hormone polyadenylation signal*). Poliadenilasi ini diperoleh dari pRc/RSV (Invitrogen) dengan memotongnya menggunakan *XhoI*. cDNA Δ6 desaturase ikan salmon diamplifikasi dengan PCR menggunakan forward primer "SalI-desF3" (5'-TTGTCGACGGTGTG-AGTGGAGCAGAGAGAA-3') daerah *SalI* digarisbawahi, dan reverse primer "des-OmaR" (5'-ATCCAGGAAATGTCCTCT-CTGTTCGCA-3'). Hasil amplifikasi kemudian disubklon ke vektor pGEM-T Easy. Fragment desaturase diambil dari pGEM-T Easy dengan memotongnya menggunakan *SalI*. Kemudian, fragmen tersebut diligasi ke daerah *SalI* antara promoter dan poliadenilasi untuk menghasilkan pmβAct-sD6.

### Produksi ikan transgenik

DNA yang berbentuk sirkuler dilarutkan ke dalam 0.1 M KCl dan 0.125% tetramethyl-rhodamine dextran dengan konsentrasi 30 µg/ml. Suspensi DNA ini dimasukkan ke dalam tube yang memiliki saringan (Ultrafree-MC Centrifuge Filter Devices 0.22 µm; MILLIPORE, Bedford, USA) dan disentrifus 5,000 rpm, 4°C selama 5 menit untuk membuang partikel kontaminan yang ada. Tiga sampai empat mikroliter DNA dimasukkan ke dalam jarum suntik yang dibuat dari gelas kapileri dengan bantuan Narishige Micropipette Puller (Model PC-10, Japan; Fig. 2A). Diameter bukaan jarum suntik adalah sekitar 5-8µm.

Telur-telur ikan diatur di atas cawan agar (3% agarose) yang memiliki 12 lubang berbentuk "V". Lubang-lubang tersebut berfungsi sebagai penahan telur pada saat penyuntikan. Posisi blastodisk diatur sedemikian rupa ke arah jarum suntik dengan bantuan tusuk gigi. Suspensi DNA disuntikkan ke dalam sitoplasma dan kemudian diinkubasi di ruangan dengan suhu 28±1°C. Telur-telur yang tidak dibuahi dan

yang tidak berkembang dibuang 5-6 jam setelah pemijahan.

Individu ikan yang membawa gen asing diidentifikasi dengan menggunakan PCR dengan cetakan (*template*) DNA yang telah diekstraksi dari jaringan sirip ekor. Isolasi DNA genom dilakukan dengan menggunakan DNA Isolation Kit (Puregene, Minneapolis, USA) sesuai dengan petunjuk pemakaiannya. Primer yang digunakan adalah “*Sall*-desF3” dan “des-OmaR”. Analisis PCR dilakukan dengan total vol. 20  $\mu$ l yang berisi 10x *Ex Taq* Buffer, 200 $\mu$ M of dNTPs, 0,125U of *Ex Taq* polimerase (Takara Bio, Shiga, Japan), 2  $\mu$ l of DNA cetakan and 1 pmol dari masing-masing primer di atas. Jumlah siklus PCR yang digunakan adalah 30 siklus amplifikasi.

Ikan F0 yang positif membawa DNA asing di perlihara sampai dewasa. Ikan yang telah matang gonad dikawinkan dengan ikan kontrol (bukan ikan transgenik). Sekitar 20 ekor larva yang dihasilkan yang berumur 2 hari diambil dan disatukan untuk menyeleksi induk ikan yang membawa gen asing di gonadnya (disebut sebagai *germline transmitter*). Ikan F0 *germline transmitter* tersebut digunakan untuk memproduksi ikan transgenik generasi pertama (F1) and kedua (F2). Metode produksi dan skrening F1 dan F2 adalah sama dengan metode yang digunakan untuk F0.

### Semi-kuantitatif RT-PCR

Semi-kuantitatif *reverse transcription* PCR (RT-PCR) dilakukan untuk mengetahui tingkat transkripsi gen desaturase. Cara isolasi RNA, sintesa cDNA dan reaksi PCR dilakukan seperti yang telah dijelaskan di atas, dengan jumlah siklus PCR untuk mendapatkan gambaran jumlah mRNA awal adalah 21, 24, and 27 siklus. Ekspresi gen  $\beta$ -actin digunakan sebagai kontrol internal dari jumlah RNA yang digunakan dalam sintesa cDNA. Forward primer untuk gen  $\beta$ -actin adalah (5`-ACTACCTCATGAAGATCCTG-3`) dengan reverse primer (5`-TTGCTGATCCACATCTGCTG-3`). Dua  $\mu$ l dari hasil reaksi PCR dielektroforesis dalam 0.7% gel agaros, distaining dengan ethidium

bromide, kemudian difoto di bawah cahaya ultraviolet. Intensitas cahaya dari setiap band dikuantifikasi dengan Densitograph (Atto Co. Ltd., Tokyo, Japan). Ekspresi gen desaturase pada keturunan F1 dan F2 juga dianalisa dengan menggunakan metode yang sama dengan yang dipakai pada F0.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

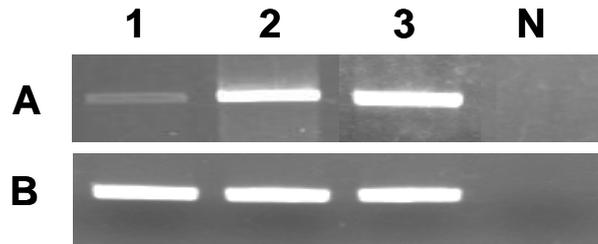
### Hasil

#### Tingkat ekspresi transgen sementara (*transient gene expression level*)

Metode semi-kuantitatif RT-PCR dilakukan untuk mengetahui tingkat ekspresi transgen yang sementara (*transient gene expression*) dari setiap konstruksi plasmid yang diuji. Hasil analisa RT-PCR menunjukkan bahwa konstruksi plasmid yang dikontrol oleh promoter m $\beta$ -actin memberikan nilai yang tertinggi, diikuti berturut-turut oleh promoter mEF1 $\alpha$  dan hCMV (Gambar 1). Kedua konstruksi plasmid dengan promoter dari ikan tersebut, m $\beta$ Act-sD6 and mEF1 $\alpha$ -sD6, adalah selanjutnya digunakan untuk membuat strain ikan transgenik yang stabil (*stable transgenic strain*).

#### Integrasi dan transmisi transgen

Juvenil F0 diseleksi dengan cara PCR dengan DNA templet yang telah diekstraksi dari sirip ekor untuk menentukan individu-individu ikan transgenik. Gambar 2 merupakan salah satu contoh hasil elektroforesis untuk memilih individu ikan transgenik dari populasi ikan yang hidup. Sebanyak 20 dari 110 ekor ikan yang hidup adalah membawa mEF1 $\alpha$ -sD6. Delapan belas ekor dari mereka adalah mencapai matang gonad dan dipijahkan dengan ikan normal (*wild-type*). Dari hasil persilangan, sekitar 20 ekor anaknya diambil dan DNA genom diekstraksi dan kemudian PCR dilakukan untuk menentukan ikan yang membawa gen asing di gonadnya. Hasil



Gambar 1. Ekspresi transgene yang dianalisa menggunakan RT-PCR dengan cetakan cDNA (A). Total RNA diekstraksi dari 20 embrio setelah delapan jam dari waktu penyuntikan dengan konstruksi plasmid yang berbeda. Baris no.1, 2 dan 3, amplifikasi cDNA yang disintesa dari RNA diekstraksi dari embrio yang masing-masing telah diinjeksi dengan hCMV-sD6, mEF1 $\alpha$ -sD6 dan m $\beta$ Act-sD6. N adalah sampel hasil PCR tanpa cetakan DNA. Panjang fragmen desaturase yang diamplifikasi adalah sekitar 1.5 kb. RT-PCR dengan cDNA  $\beta$ -actin menunjukkan persamaan konsentrasi RNA yang digunakan dalam sintesa cDNA (B).

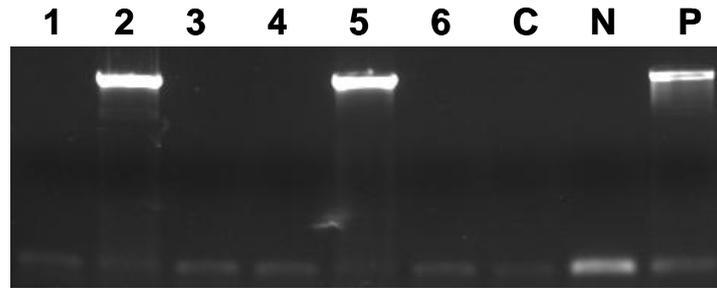
analisa menunjukkan bahwa 6 ekor dari 18 ekor ikan tersebut adalah positif membawa transgen di gonadnya (5,5% dari total ikan yang hidup hingga dewasa). Ikan-ikan tersebut kemudian digunakan untuk membuat keturunan pertama. Persentase transmisi transgen pada ikan keturunan F1, yaitu sebanyak 11,4% sampai 23,2%. Untuk konstruksi plasmid m $\beta$ Act-sD6, dari 109 ekor ikan yang hidup terdapat 16 ekor yang membawa transgen, 4 ekor (3,7%) diantaranya adalah membawa transgen di dalam gonadnya. Ikan-ikan tersebut kemudian digunakan untuk memproduksi generasi F1 and F2. Tingkat transmisi gen asing pada generasi pertama adalah antara 4,2% and 44,1%. Variasi persentase ikan F1 transgenik yang diperoleh menunjukkan bahwa induk F0 tersebut bersifat mosaik (tidak semua sel tubuh ikan mempunyai transgen). Bila induk-induk ikan F1 dikawinkan dengan ikan normal, sekitar 50% keturunan F2 adalah membawa transgen, pola segregasi gen mengikuti Hukum Mendel. Hasil ini menunjukkan bahwa semua sel diploid dari setiap F1 transgenik membawa transgen.

### **Ekspresi transgen pada generasi F1 dan F2**

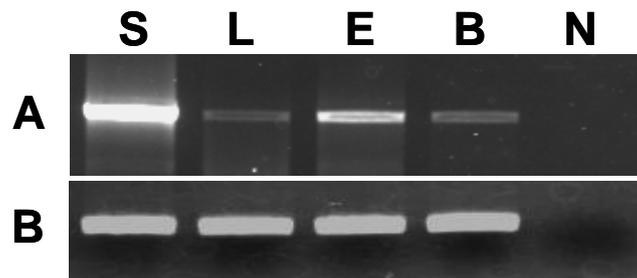
Untuk konstruksi plasmid mEF1 $\alpha$ -sD6, keturunan F1 strain no. 12 digunakan untuk

memeriksa tingkat ekspresi transgen dengan metode semi-kuantitatif RT-PCR. Sample RNA diambil dari otot, hati, mata dan otak. Hasil dari RT-PCR tersebut ditunjukkan pada Gambar 3. Sebuah band dengan panjang fragmen sekitar 1,5 kb terdeteksi pada semua jaringan yang diperiksa. Pada Gambar 3 terlihat bahwa tingkat ekspresi transgen bervariasi bergantung pada tipe jaringan. Tingkat ekspresi tertinggi didapatkan pada jaringan otot, level sedang pada mata, dan terendah di jaringan hati dan otak (Gambar 3-A). Ekspresi dari transgen juga diperiksa pada keturunan F2 dengan RNA yang diekstraksi dari 20 ekor larva berumur 2 hari yang diperoleh dari strain ikan yang berbeda (Gambar 4). Akan tetapi, seperti ditunjukkan pada Gambar 4-A, sebagian besar ikan F2 tidak memiliki ekspresi transgen. Ekspresi gen juga diperiksa di jaringan otot dan hati dari beberapa ekor ikan dewasa F2 (data tidak ditunjukkan). Hasil yang sama juga diperoleh, tingkat ekspresi gen adalah rendah atau tidak ada ekspresi sama sekali.

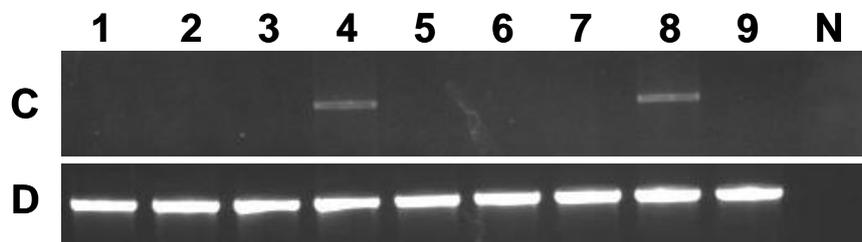
Sementara itu, meskipun terdapat perbedaan tingkat ekspresi dari transgen pada jaringan yang berbeda, ikan-ikan yang diperoleh dari penyuntikan dengan m $\beta$ Act-sD6 memiliki ekspresi gen pada semua jaringan yang diperiksa (Gambar 5).



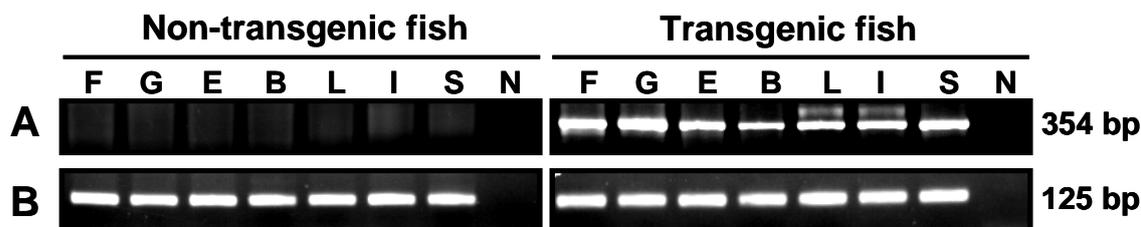
Gambar 2. Contoh hasil seleksi ikan transgenik F0 menggunakan PCR dengan cetakan DNA diekstraksi dari sirip ekor. Baris 1 sampai dengan 6, hasil amplifikasi PCR dengan DNA sampel dari individu ikan transgenik F0; baris C, adalah dari ikan normal bukan transgenik; baris N, sampel hasil PCR tanpa cetakan DNA; baris P, hasil amplifikasi dengan cetakan DNA plasmid mEF1 $\alpha$ -sD6 (0,6 pg).



Gambar 3. Deteksi ekspresi transgen pada jaringan yang berbeda dari ikan generasi F1 dengan RT-PCR (A). Total RNA adalah diekstraksi dari jaringan sebagai berikut: S, otot; L, hati; E, mata; dan B, otak. N adalah sampel hasil PCR tanpa cetakan DNA. RT-PCR dengan cDNA  $\beta$ -actin menunjukkan kesamaan konsentrasi RNA yang digunakan dalam sintesa cDNA (B).



Gambar 4. Contoh hasil analisa ekspresi transgen dari beberapa strain ikan F2 menggunakan RT-PCR dengan cDNA (A). Total RNA adalah diekstraksi dari 20 ekor larva umur 2 hari. Baris 1 sampai 5, amplifikasi cDNA dengan RNA diekstraksi dari strain ikan berbeda yang diperoleh dari induk F0 yang sama; Baris N, sampel hasil PCR tanpa cetakan DNA. RT-PCR dengan cDNA  $\beta$ -actin menunjukkan kesamaan konsentrasi RNA yang digunakan untuk sintesa cDNA (B).



Gambar 5. Deteksi ekspresi dari gen desaturase pada jaringan yang berbeda dengan RT-PCR. (A) RT-PCR dengan cDNA dari ikan normal-bukan transgenic dan ikan transgenik keturunan F2 yang membawa pm $\beta$ Act-sD6 (strain 10-2). Total RNA diekstraksi dari jaringan sebagai berikut: F, sirip; G, insang; E, mata; B, otak; L, hati; I, usus and S, otot. N adalah sample hasil PCR tanpa cetakan DNA. RT-PCR dengan cDNA  $\beta$ -actin menunjukkan kesamaan konsentrasi RNA yang digunakan untuk sintesa cDNA (B).

### Pembahasan

Pada penelitian ini, gen  $\Delta 6$  desaturase dari ikan salmon masu telah ditransfer ke ikan zebra dalam rangka modifikasi sistem metabolisme asam lemak untuk meningkatkan produksi EPA dan DHA pada ikan. Karena efisiensi transkripsi gen asing pada host merupakan salah satu faktor penting dalam introduksi fenotipe baru yang dikodekan oleh gen asing, maka identifikasi konstruksi gen yang tepat yang menghasilkan tingkat ekspresi gen  $\Delta 6$  desaturase yang tinggi adalah dilakukan sebagai tahap awal dalam penelitian ini. cDNA  $\Delta 6$  desaturase adalah diligasi dengan sebuah promoter yang kuat dari virus (CMV) dan dari ikan medaka (EF1 $\alpha$  dan  $\beta$ -actin). Promoter-promoter ini telah berhasil digunakan oleh beberapa grup peneliti pada beberapa jenis ikan yang berbeda. CMV promoter menunjukkan aktivitas yang tinggi pada ikan medaka (Winkler *et al.*, 1992), zebrafish (Westerfield *et al.*, 1992), seabream (Garcia-Pozo *et al.*, 1998), tilapia (Martinez *et al.*, 1996), dan Arctic charr (Pitkanen *et al.*, 1999b). Medaka  $\beta$ -actin promoter mempunyai aktivitas tinggi di medaka (Takagi *et al.*, 1994) dan rainbow trout (Yoshizaki, 2001). Aktivitas yang tinggi dari promoter EF1 $\alpha$  telah ditunjukkan dengan menggunakan ikan yang sama, medaka (Kinoshita *et al.*, 2000). Tetapi, belum ada laporan yang membandingkan aktivitas promoter-promoter

tersebut dengan menggunakan ikan yang sejenis. Dengan menggunakan metode semi-quantitative RT-PCR, telah ditunjukkan bahwa tingkat ekspresi sementara dari gen  $\Delta 6$  desaturase adalah bervariasi, bergantung pada promoter yang digunakan. Promoter yang paling kuat adalah  $\beta$ -actin, diikuti oleh EF1 $\alpha$  promoter dan CMV. Karena CMV promoter adalah berasal dari virus manusia, elemen *cis*-acting yang dimiliki mungkin tidak sepenuhnya dapat dikenali oleh faktor *trans*-acting ikan zebra. Sebaliknya, promoter lainnya yang berasal dari ikan memiliki aktivitas yang tinggi. Kinoshita *et al.* (1999) telah melaporkan bahwa aktivitas medaka EF1 $\alpha$  promoter pada ikan transgenik medaka adalah 4 kali lebih kuat dari pada CMV promoter. Selanjutnya,  $\beta$ -actin adalah gen *housekeeping* yang mana dibutuhkan oleh semua jenis sel di semua tahap perkembangan. Oleh karena itu, promoter dari gen tersebut telah aktif diawal perkembangan.

Organ-organ yang berperan utama dalam metabolisme asam lemak adalah hati dan otak. Tingkat ekspresi gen  $\Delta 6$  desaturase yang tinggi di kedua organ tersebut telah dilaporkan oleh Seiliez *et al.*, 2001. Hal ini yang menyebabkan mengapa kami memiliki konstruksi gen yang dikontrol oleh medaka EF1 $\alpha$  promoter yang telah dilaporkan memiliki aktivitas yang tinggi pada hati dan otak (Kinoshita *et al.*, 2000). Sedangkan

promoter beta-actin dipilih karena memiliki aktivitas yang tinggi di otot, dimana bagian ini merupakan bagian yang dikonsumsi, sehingga diharapkan otot mengandung banyak asam lemak EPA/DHA dengan tujuan konsumsi.

Gen asing  $\Delta 6$  desaturase yang dikontrol oleh promoter EF1 $\alpha$  dan beta-actin telah dapat ditransmisikan ke generasi pertama melalui *germline*. Pada persilangan ikan transgenik dengan yang bukan transgenik, transgen telah diturunkan ke generasi F2 yang proporsinya mengikuti hukum Mendel. Hal ini menunjukkan bahwa transgen telah terintegrasi ke dalam genom ikan. Tingkat transmisi transgen pada F1 dan F2 adalah relatif sama dengan apa telah dilaporkan sebelumnya pada ikan zebra dengan konstruksi gen yang berbeda (Higashijima *et al.*, 1997; Gong *et al.*, 2002).

Ekspresi gen  $\Delta 6$  desaturase pada keturunan F1 ikan mEF1 $\alpha$ -sD6 adalah terlihat di semua jaringan yang diperiksa. Sebagai tambahan, ekspresi tertinggi diperoleh di otot. Sebaliknya, Kinoshita *et al.* (2000) telah melaporkan bahwa tidak ada ekspresi gen asing di otot dengan menggunakan promoter ini pada ikan medaka. Perbedaan ini mungkin berhubungan dengan posisi dimana transgen terintegrasi dalam kromosom yang mengaktifkan gen tersebut di otot. Perbedaan jenis ikan yang digunakan juga mungkin ikut mempengaruhi perbedaan hasil ini.

Lebih lanjut, meskipun pada penelitian ini telah ditunjukkan kapabilitas promoter EF1 $\alpha$  dalam mengontrol ekspresi gen asing di F1, sebagian besar keturunan kedua, baik pada fase larva maupun dewasa tidak menunjukkan ekspresi gen desaturase. Hal ini mungkin karena gen asing telah terintegrasi pada daerah di kromosom yang menyebabkan gen asing tidak diekspresikan sebagai akibat dari pengaruh posisi integrasi (*positional effect*). Juga, variasi ini mungkin disebabkan oleh dua atau lebih integrasi dalam satu individu F1 yang selanjutnya disegregasi ke generasi kedua. Variasi ekspresi transgen antar individu yang

diperoleh dari satu strain ikan transgenik juga telah dilaporkan pada tikus transgenik (Dobie *et al.*, 1996). Transgen akan diekspresikan secara lemah atau bahkan tidak sama sekali bila terintegrasi di sentromer atau di telomer dimana DNA tidak aktif mengalami transkripsi dan diposisikan di heterokromatin (Houdebine, 2000). Fenomena ini mungkin juga telah terjadi pada penelitian ini. Sementara itu, untuk ikan m $\beta$ Act-sD6, karena integrasi gen terjadi secara acak dalam kromosom, maka dimungkinkan terjadi perbedaan tingkat ekspresi gen di jaringan yang berbeda (Lin *et al.*, 1994b).

Sebagai kesimpulan, sebuah model ikan transgenik untuk penelitian modifikasi sistem metabolisme asam lemak telah berhasil dibuat. Ikan transgenik m $\beta$ Act-sD6 mungkin akan membantu untuk berfungsinya gen  $\Delta 6$  desaturase dalam rangka produksi ikan yang bisa menghasilkan EPA and DHA yang banyak untuk konsumsi manusia. Aktivitas gen asing ini dapat diuji dengan memberikan pakan yang mengandung substrat dari enzim  $\Delta 6$ -desaturase.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih banyak kami ucapkan kepada Dr. M. Kinoshita, Universitas Kyoto Jepang, yang telah memberikan plasmid pOBA-109 dan pEF-L-SAH-N.

## DAFTAR PUSTAKA

- Bell, J.G., and Sargent, J.R. 2002. Arachidonic acid in aquaculture feeds: current status and future opportunities. *Aquaculture* (In Press).
- Buzzy, M., Henderson, R.J., and Sargent, J.R. 1996. The desaturation and elongation of linolenic acid and eicosapentaenoic acid by hepatocytes and liver microsomes from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing fish oil or olive oil.

- Biochim. Biophys. Acta, 1299: 235-244.
- Buzzy, M., Henderson, R.J., and Sargent, J.R., 1997. Biosynthesis of docosahexaenoic acid in trout hepatocytes proceeds via 24-carbon intermediates. *Comp. Biochem. Physiol.*, 116B:263-267.
- Cho, H.P., Nakamura, M.T., and Clarke, S.D. 1999. Cloning, expression, and nutritional regulation of the mammalian  $\Delta 6$  desaturase. *J. Biol. Chem.*, 274:471-477.
- Chourrout, D., Guyomard, R., and Houdebine, L.M. 1986. High efficiency gene transfer in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Rich.) by microinjection into egg cytoplasm. *Aquaculture*, 51:143-150.
- Das, U.N. 2002. Estrogen, statins, and polyunsaturated fatty acids: similarities in their actions and benefits - is there a common link? *Nutrition*, 18:178-188.
- Devlin, R.H., Yesaki, T.Y., Biagi, C.A., Donaldson, E.M., Swanson, P., and Chan, W.K. 1994. Extraordinary salmon growth. *Nature*, 371:209-210.
- Devlin, R.H., Yesaki, T.Y., Donaldson, E.M., and Hew, C.L. 1995. Transmission and phenotype effects of an antifreeze/GH gene construct in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquaculture*, 137:161-169.
- Dobie, K.W., Lee, M., Fantes, J.A., Graham, E., Clark A.J., Springbett, A., Lathe, R., and McClenaghan, M. 1996. Variegated transgene expression in mouse mammary gland is determined by the transgene integration locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 93:6659-6664.
- Gaiano, N., Allende, M., Amsterdam, A., Kawakami, K., and Hopkins, N. 1996. Highly efficient germ-line transmission of proviral insertions in zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 93:7777-7782.
- Garcio-Poso, S., Bejar, J., Shaw, M., and Alvarez, M.C. 1998. Effect of exogenous DNA microinjection on early development response of the seabream (*Sparus auratus*). *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 7:248-258.
- Gong, Z. 1999. Zebrafish expressed sequence tags and their applications. *Methods Cell Biol.*, 60: 213-233.
- Gong, Z., Ju, B., Wang, X., He, J., Wan, H., Sudha, P.M., and Yan, T. 2002. Green fluorescent protein in germ-line transmitted transgenic zebrafish under a stratified epithelial promoter from *Keratin8*. *Dev. Dyn.*, 223:204-215.
- Hackett, P.B. 1993. The molecular biology of transgenic fish. In: *Biochemistry and molecular biology of fishes*, vol. 2. (P.W. Hochachka and T.P. Mommsen, Eds.). Amsterdam, Netherlands: Elsevier Science Publisher, pp: 207-240.
- Hew, C.L., and Fletcher, G.L. 2001. The role of aquatic biotechnology in aquaculture. *Aquaculture*, 197:191-204.
- 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.
- Houdebine, L.M. 2000. Transgenic animal bioreactors. *Transgenic Res.*, 9: 305-320.
- Infante, J.P., and Huszagh, V.A. 1998. Analysis of the putative role of 24-

- carbon polyunsaturated fatty acids in the biosynthesis of docosapentaenoic (22:5 $n$ -6) and docosahexaenoic (22:6 $n$ -3) acids. *FEBS Letters*, 431:1-6.
- Kang, J.H., Yoshizaki, G., Homma, O., Strunsmann, C.A., and Takashima, F. 1999. Effect of an osmotic differentiation on the efficiency of gene transfer by electroporation of fish spermatozoa. *Aquaculture*, 173:297-307.
- Kelley, D.S., and Rudolph, I.L. 2000. Effect of individual fatty acids of  $\omega$ -6 and  $\omega$ -3 type on human immune status and role of eicosanoids. *Nutrition*, 16:143-145.
- Kinoshita, M., Kani, S., Ozato, K. and Wakamatsu, Y. 2000. Activity of the medaka translation elongation factor 1 $\alpha$ -A promoter examined using the GFP gene as a reporter. *Develop. Growth Differ.*, 42:469-478.
- Kinoshita, M., Nakata, T., Yabe, T., Adachi, K., Yokohama, Y., Hirata, T., Takayama, E., Mikawa, S., Kioka, N., Takahashi, M., Toyohara, H., and Sakaguchi, M. 1999. Structure and transcription of the gene coding for polypeptide chain elongation factor 1 $\alpha$  of medaka *Oryzias latipes*. *Fisheries Sci.*, 65:765-771.
- Lauritzen, L., Hansen, H.S., Jorgensen, M.H., and Michaelsen, K.F. 2001. The essentiality of long chain  $n$ -3 fatty acids in relation to development and function of the brain and retina. *Prog. Lipid Res*, 40:1-94.
- Lin, S., Gaiano, N., Culp, P., Burns, J.C., Friedmann, T., Yee, J.K., and Hopkins, N. 1994a. Integration and germ-line transmission of a pseudotyped retroviral vector in zebrafish. *Science*, 265:666-668.
- Lin, S., Yang, S., and Hopkins, N. 1994b. *LacZ* expression in germline transgenic zebrafish can be detected in living embryos. *Dev. Biol.*, 161:73-83.
- Martinez, R., Estrada, M.P., Berlanga, J., Guillen, I., Hernandez, O., Cabrera, E., Pimentel, R., Morales, R., Herrera, F., Morales, A., Pina, J.C., 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.
- Melamed, P., Z. Gong, G. Fletcher, and C.L. Hew. 2002. The potential impact of modern biotechnology on fish aquaculture. *Aquaculture*, 204:255-269.
- Ozato, K., Kondoh, H., Inohara, H., Iwamatsu, T., Wakamatsu, Y., and Okada, T. 1986. Production of transgenic fish: introduction and expression of chicken  $\delta$ -crystallin gene in medaka embryos. *Cell Differen.*, 19:237-244.
- Pitkanen, T.I., Krasnov, A., Reinisalo, M., and Molsa, H. 1999a. Transfer and expression of glucose transporter and hexokinase genes in salmonid fish. *Aquaculture*, 173:319-332.
- Pitkanen, T.I., Krasnov, A., Teerijoki, H., and Molsa, H. 1999b. Transfer of growth hormone (GH) transgenes into Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). I. Growth response to various GH constructs. *Genet. Anal. Biomol Eng.*, 15:99-105.
- Powers, D.A., Hereford, L., Cole, T., Chen, T.T., Lin, C.M., Night, K., Creech, K., and Dunham, R. 1992. Electroporation: a method for transferring genes into the gametes of

- zebrafish (*Brachidonio rerio*), channel catfish (*Ictalurus punctatus*), and common carp (*Cyprinus carpio*). *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 1:301-308.
- Qiu, X., Hong, H., and MacKenzie, S.L. 2001. Identification of a  $\Delta 4$  fatty acid desaturase from *Thraustochytrium* sp. involved in the biosynthesis of docosahexanoic acid by heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae* and *Brassica juncea*. *J. Bio. Chem.*, 276:31561–31566.
- Sargent, J.R., and Tacon, A. 1999. Development of farmed fish: a nutritionally necessary alternative to meat. *Proc. Nutr. Soc.*, 58:377-383.
- Sargent, J.R., Bell, J.G., Bell, M.V., Henderson, R.J., and Tocher, D.R. 1995. Requirement criteria for essential fatty acids. *J. Appl. Ichthyol.*, 11:183-198.
- Sargent, J.R., McEvoy, L.A., Estevez, A., Bell, J.G., Bell, M.V., Henderson, R.J., and Tocher, D.R. 1999. Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions. *Aquaculture*, 179:217-229.
- Seilliez, I., Panserat, S., Kaushik, S., and Bergot, P. 2001. Cloning, tissue distribution and nutritional regulation of a  $\Delta 6$  desaturase-like enzyme in rainbow trout. *Comp. Biochem. Physiol.*, 130B:83-93.
- Simopolous, A.P. 1991. Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *Am. J. Clin. Nutr.*, 54:438-463.
- Sprecher, H. 2000. Metabolism of highly unsaturated n-3 and n-6 fatty acids. *Biochim. Biophys. Acta*, 1486:219-231.
- Sprecher, H. 1981. Biochemistry of essential fatty acids. *Prog. Lipid Res.*, 20:13-22.
- Takagi, S., Sasado, G., 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.
- Takeuchi, T. 2001. A review of feed development for early life stages of marine finfish in Japan. *Aquaculture*, 200:203-222.
- Tocher, D.R., Leaver, M.J., and Hodgson, P.A. 1998. Recent advances in the biochemistry and molecular biology of fatty acyl desaturases. *Prog. Lipid Res.*, 37:73-117.
- Toyohara, H., Nakata, T., Touhata, K., Hashimoto, H., Kinoshita, K., Sakaguchi, M., Nishikima, M., Yagi, K., Wakamatsu, Y., and Ozato, K. 1996. Transgenic expression of L-guluno- $\gamma$ -lactone oxidase in medaka (*Oryzias latipes*), a teleost fish that lacks this enzyme necessary for L-ascorbic acid biosynthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 223:650-653.
- Uauy, R. and Valenzuela, A. 2000. Marine oils: the health benefits of n-3 fatty acids. *Nutrition*, 16:680-684.
- Wan, H., He, J., Ju, B., Yan, T., Lam, T.J. and Gong, Z. 2002. Generation of two-color transgenic zebrafish using the green and red fluorescent protein reporter genes *gfp* and *rfp*. *Mar. Biotechnol.*, 4:146-154.
- Watanabe, T. 1993. Importance of docosahexaenoic acid in marine larval fish. *J. World Aquacult. Soc.*, 24:152-161.

- Westerfield, M. 1995. The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*). Univ. of Oregon Press, Eugene, OR. 93pp.
- Westerfield, M., Wegner, J., Jegalian, B.G., DeRobertis, E.M., and Puschel, A.W. 1992. Specific activation of mammalian *Hox* promoters in mosaic transgenic zebrafish. *Genes. Dev.*, 6:591-598.
- Winkler, C., Hong, Y., Wittbrodt, J., and Schartl, K. 1992. Analysis of heterologous and homologous promoters and enhancers *in vitro* and *in vivo* by gene transfer into Japanese medaka (*Oryzias latipes*) and *Xiphophorus*. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 1:326-337.
- Xu, Y., He, J., Tian, H.L., Chan, C.H., Liao, J., Yan, T., Lam, T.J., and Gong, Z. 1999. Fast skeletal muscle-specific expression of a zebrafish myosin light chain 2 gene and characterization of its promoter by direct injection into skeletal muscle. *DNA and Cell Biology*, 18:85-95.
- Yoshizaki, G. 1998. Gene transfer in fish: applications to aquaculture. In: *Research for the Future Program Genetic Engineering of Animal Protein Resources* (A. Iritani, Ed.). pp: 69-80.
- Yoshizaki, G. 2001. Gene transfer in salmonidae: applications to aquaculture. *Suisanzoshoku*, 49:137-142.
- Zelenin, A.V., Alimov, A.A., Barmintzev, V.A., Beniumov, A.O., Zelenina, I.A., Krasnov, A.M., and Kolesnikov, V.A. 1991. The delivery of foreign gene into fertilized fish eggs using high-velocity microprojectiles. *FEBS Letters*, 287:118-120.