

Kloning promotor β -actin ikan mas, *Cyprinus carpio* Lin. 1758 dan analisis fungsionalnya menggunakan gen target protein pendaran hijau (GFP)

[β -actin promoter cloning of common carp, *Cyprinus carpio* Lin. 1758 and its functional analysis using targeted Green Fluorescent Protein (GFP) gene]

Andi Aliah Hidayani^{1,✉}, Odang Carman², Alimuddin²

¹Jurusan Perikanan, FIKP Universitas Hasanuddin, Makassar

²Jurusan Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, IPB

✉ Jurusan Perikanan, FIKP Universitas Hasanuddin, Makassar

Kampus Tamalanrea, Jln. Perintis Kemerdekaan Km. 10, Makassar 90245

Surel: lhia_achsan@yahoo.com

Diterima: 28 September 2013; Disetujui: 3 Desember 2013

Abstrak

Promoter dalam vektor ekspresi berperan penting dalam mengatur ekspresi gen pada ikan transgenik. Dalam transgenesis ikan, peneliti yakin bahwa penggunaan vektor ekspresi semua ikan aman dan prospektif. Penelitian ini dilakukan untuk mengisolasi promotor β -aktin, promotor yang memiliki karakteristik *ubiquitous*, *constitutive*, *house keeping*, dari ikan mas sebagai langkah awal untuk mengkonstruksi vektor ekspresi semua ikan mas. Promotor β -aktin ikan mas (ccBA) diisolasi menggunakan metode PCR dengan primer FBP1, RBP1, dan RBP2. Sequensing dilakukan dengan menggunakan mesin ABI PRISM 3100, dan analisis sekuen dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak GENETYX versi 7. Hasil analisis sekuen menunjukkan bahwa panjang fragmen DNA yang diperoleh adalah sekitar 1,5 kb. Hasil homologi dengan sekuen promotor β -aktin dari pangkalan data bank gen (No. Akses: M24113) adalah sebesar 97,5%. Faktor transkripsi yang tetap secara evolusioner untuk promotor β -aktin termasuk CCAT, CArG, dan boks TATA ditemukan dalam sekuen. Ubiquitous dan ekspresi tertinggi protein pendaran hijau (GFP) dikendalikan oleh promotor ccBA dalam otot larva ikan mas yang dideteksi. Dengan demikian, kemungkinan besar bahwa sekuen yang terisolasi adalah promotor β -aktin ikan mas.

Kata penting: ekspresi, GFP, kloning, promotor β -aktin, transgenik ikan mas.

Abstract

Promoter in the expression vector plays an important role on regulating of gene expression in transgenic fish. In fish transgenesis, researcher convinced that the use of all-fish expression vector is safety and prospective. The study was performed to isolate β -actin promoter, the promoter which has ubiquitous, constitutive, housekeeping characteristics, of common carp as a first step to construct all-common carp expression vector. Common carp β -actin promoter (ccBA) was isolated using PCR method with FBP1, RBP1, and RBP2 primers. Sequencing was performed using ABI PRISM 3100 machine, and analysis of sequences was conducted using GENETYX version 7 software. The results of sequence analysis showed that the length of DNA fragment obtained was approximately 1.5 kb. Results of homology with β -actin promoter sequence of a gene bank database (Accession No.: M24113) was 97.5%. The evolutionary conserved of transcription factor for β -actin promoter including CCAT, CArG, and TATA boxes were found in the sequence. Ubiquitous and higher expression of green fluorescent protein driven by ccBA promoter in muscle of common carp larvae was detected. It is most likely that the isolated sequence is a common carp β -actin promoter.

Keywords: expression, GFP, cloning, β -actin promoter, common carp transgenic.

Pendahuluan

Tingkat ekspresi gen dalam transgenesis ditentukan oleh promotor, satu sekuen regulator yang diligasi pada posisi upstream dari gen target dalam suatu DNA konstruksi. Pada awal perkembangan transgenesis ikan, peneliti menggunakan konstruksi gen dengan promotor yang berasal dari mamalia dan virus untuk mengatur ekspresi transgen. Walaupun kedua konstruksi tersebut

menghasilkan tingkat ekspresi gen yang tinggi, namun permintaan untuk menghasilkan konstruksi gen dengan menggunakan sekuen regulator dari spesies yang sama semakin meningkat untuk menghasilkan autotransgenik yang lebih efisien dan lebih mudah diterima secara komersial (Biswal *et al.* 2012).

Beberapa jenis promotor telah diisolasi dan diuji pada beberapa spesies ikan oleh para

peneliti, yaitu promotor *cytomegalovirus* (CMV) dari virus manusia, *elongation factor-1 α* (EF-1 α) dari ikan medaka, β -aktin dari ikan medaka, dan *myosin light chain-2* (Mylz-2) dari ikan zebra (Alimuddin 2003). Selanjutnya, Berdasarkan penelitian Alimuddin (2003) pada ikan zebra, promotor β -aktin dan Mylz-2 menunjukkan aktivitas paling kuat dibandingkan EF-1 α , sedangkan CMV menunjukkan aktivitas paling rendah. Hal ini dikarenakan tidak semua elemen *cisacting* pro-moter CMV dikenali oleh faktor *transacting* ikan zebra, sedangkan promotor lainnya yang berasal dari ikan menunjukkan aktivitas yang tinggi.

β -aktin merupakan promotor yang bersifat *house keeping*; selalu aktif sepanjang hidup organisme. Selain itu, promotor β -aktin juga mempunyai sifat *ubiquitous* (Hackett 1993), yaitu promotor ini akan aktif di mana-mana, dan *constitutive* (Volckaert *et al.* 1994) yang berarti bahwa promotor ini dapat aktif tanpa diberikan rangsangan dari luar seperti suhu dan hormon. Promotor ini sering digunakan dalam penelitian transgenesis seperti pada ikan zebra (Higashijima *et al.* 1997), ikan medaka (Hamada *et al.* 1998), ikan *mud loach* (Nam *et al.* 2001), ikan nila (Hwang *et al.* 2003), ikan kakap merah (Kato *et al.* 2007) dan *Oryzias javanicus* (Lee *et al.* 2012)

Berdasarkan hasil penelitian, dikemukakan bahwa promotor heterolog (promotor yang berasal dari ikan yang berbeda dengan ikan uji) memiliki efektivitas yang berbeda dengan promotor homolog (promotor yang berasal dari ikan yang sama dengan ikan uji). Lebih lanjut, konstruksi gen *all-fish*, konstruksi transgen dengan sekuen yang berasal dari ikan terutama dengan spesies yang sama (homolog), lebih mudah diterima oleh konsumen jika ikan transgenik dipasarkan (Ge *et al.* 2012). Oleh karena itu dalam penelitian ini dilakukan isolasi promotor β -aktin yang

berasal dari ikan mas untuk menghasilkan transgenik ikan mas dengan menggunakan konstruksi gen yang semuanya berasal dari ikan mas. Dalam studi ini, isolasi dan karakterisasi promotor β -aktin pada ikan mas dilaporkan. Mikroinjeksi DNA yang mengandung promotor β -aktin yang telah menyatu dengan gen protein pendaran hijau *green fluorescent protein* (GFP) ke dalam embrio ikan mas. Analisis fungsional promotor β -aktin dilakukan dengan mengamati ekspresi gen GFP yang dikendalikan oleh sekuen promotor β -aktin hasil isolasi pada larva ikan mas. Tujuan penelitian ini adalah mengisolasi promotor β -aktin dari ikan mas, dan menguji efektivitas promotor β -aktin homolog pada ikan mas (*Cyprinus carpio*) dengan menggunakan gen target protein pendaran hijau /*green fluorescent protein* (GFP).

Bahan dan metode

Kloning promotor β -aktin ikan mas

Promotor β -aktin ikan mas diisolasi menggunakan metode PCR dengan cetakan berupa DNA genom hasil ekstraksi dari jaringan hati ikan mas. Ekstraksi DNA dilakukan dengan menggunakan kit isolasi DNA (Gentra). Sekuen promotor β -aktin ikan mas (ccBA) yang diisolasi menggunakan PCR dengan primer yang didesain berdasarkan pangkalan data (*database*) ikan mas yang ada dalam bank gen (No. akses: M24113). Proses amplifikasi PCR pertama dilakukan menggunakan primer *forward* "F-BP1" adalah 5'-GTGWGTGACGCGYGGACCAATC-3' (W = A + T, Y = T + C) dan *reverse* "R-P1" adalah 5' TAGAAGGTGTGRTGCCAGA TCTTC-3' (R = A + G). Seratus kali pengenceran produk PCR pertama kemudian digunakan dalam *nested* PCR menggunakan "F-BP1" dan "R-BP2" yaitu 5'-TTGCACATRCCRGAKCCGTTG TC-3' (K= G + T). Hasil amplifikasi PCR dipisahkan dengan elektroforesis menggunakan gel agarosa 0,7%. Se-

buah fragmen DNA target dengan panjang sekitar 1500 bp dipurifikasi dari gel agarosa menggunakan kit gel/PCR DNA *Gene Mate Purification* (ISC BioExpress) dan selanjutnya diligasi ke vektor pGEM-T Easy, dan digunakan untuk sekuensing DNA. Sekuensing DNA dilakukan dengan menggunakan mesin ABI PRISM 3100 *Avant Genetic Analyzer* mengikuti protokol produsen. Sekuen nukleotida dibandingkan dengan sekuen DNA promoter β -aktin pangkalan data Bank Gen menggunakan software GENETYX versi 7.

Analisis fungsional promoter β -aktin ikan mas

Sekuen DNA promoter β -aktin ikan mas diligasi ke gen GFP (*green fluorescent protein*) dengan menggunakan vektor pEGFP-N1 (BD Biosciences Clontech) untuk mendesain plasmid pCcBA-EGFP. Plasmid pCcBA-EGFP pada konsentrasi $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ dalam $0,1 \text{ M KCl}$ dimikroinjeksikan ke dalam blastodisk embrio-embrio ikan mas tahap 1 sel. Mikroinjeksi dilakukan sesuai dengan penelitian sebelumnya (Alimuddin *et al.* 2005). Ekspresi gen GFP diamati dengan menggunakan mikroskop fluorescent (Olympus SZX 16).

Hasil

Kloning promoter β -aktin ikan mas

Produk amplifikasi PCR promoter β -aktin ikan mas (Gambar 1) memiliki ukuran 1528 bp (Gambar 2). Isolasi sekuen DNA homolog 97,5% dengan sekuen promoter β -aktin dari pangkalan data bank gen (No. akses: M24113) (Gambar 2). Analisis sekuen juga menunjukkan bahwa tiga faktor transkripsi untuk promoter β -aktin seperti CCAAT, CARG [CC(A/T)₆GG], dan boks TATA ditemukan dalam sekuen isolat (Gambar 3).

Hasil isolasi promoter β -aktin ikan mas (CcBA) kemudian diligasi ke gen GFP untuk

membuat vektor ekspresi pCcBA-EGFP. Ukuran plasmid hasil ligasi sekitar 6,2 kb (Gambar 4, jalur 1-5), lebih besar daripada pEGFP-N1 (4,7 kb); tulang punggung plasmid pCcBA-GFP.

Analisis fungsional promoter β -aktin ikan mas

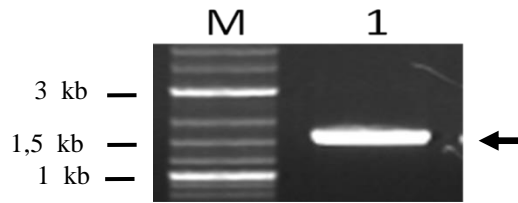
Pengujian efektivitas promoter dilakukan untuk membuktikan secara *in vivo* bahwa sekuen DNA hasil isolasi mampu mengatur ekspresi gen asing. Dalam penelitian ini gen penanda EGFP, satu gen yang mengkode protein pendaran hijau digunakan. Ekspresi gen GFP yang kuat dapat diamati pada bagian kepala (Gambar 5A), kuning telur dan otot (Gambar 5B) yang dimikroinjeksikan pada larva ikan mas.

Pembahasan

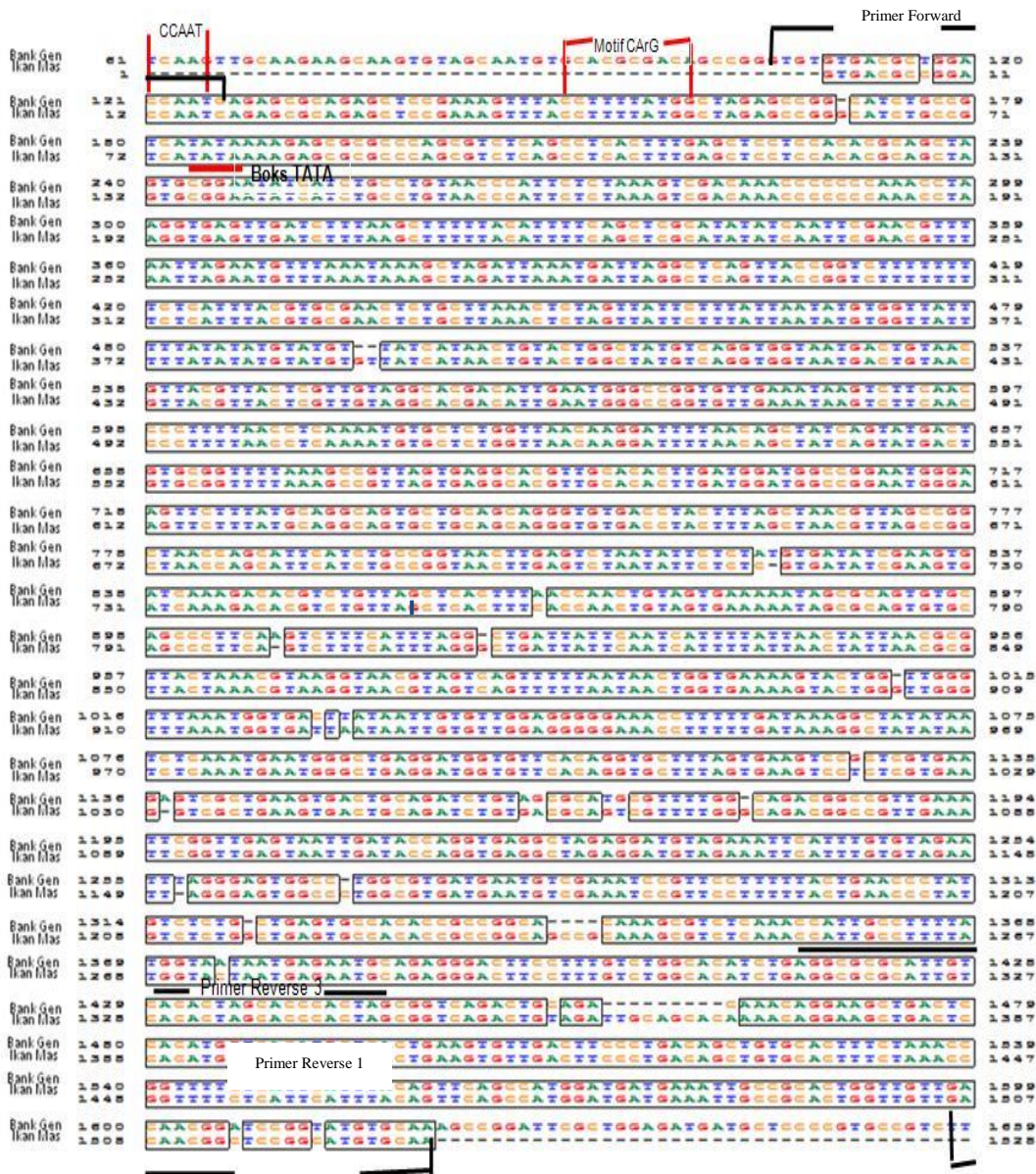
Panjang sekuen hasil sekuensing adalah 1528 bp (Gambar 1). Berdasarkan analisis sekuen diperoleh faktor transkripsi yang merupakan elemen-elemen yang memengaruhi aktivitas promoter. Ketiga faktor transkripsi tersebut memiliki fungsi yang berbeda. Sekuen CARG berfungsi sebagai elemen responsif terhadap serum (Liu *et al.* 1990), dan terletak antara CCAAT dan boks TATA. Boks TATA merupakan elemen umum dari sekuen promoter, sebagai target untuk polimerase RNA dalam proses transkripsi (Glick & Pasternak 2003). Kerja sama antara ketiga elemen tersebut menyebabkan promoter dapat aktif dan mengendalikan ekspresi transgen pada waktu dan tempat yang sama.

Untuk mengetahui promoter β -aktin ikan mas hasil isolasi dapat aktif atau tidak, maka promoter β -aktin diligasi dengan gen GFP untuk menghasilkan konstruksi gen pCcBA-GFP. Keberhasilan ligasi dianalisis menggunakan metode "cracking" (Octavera 2008) seperti yang ditunjukkan pada Gambar 4. Ukuran ccBA-GFP lebih besar dibandingkan dengan plasmid pEGFP-N1

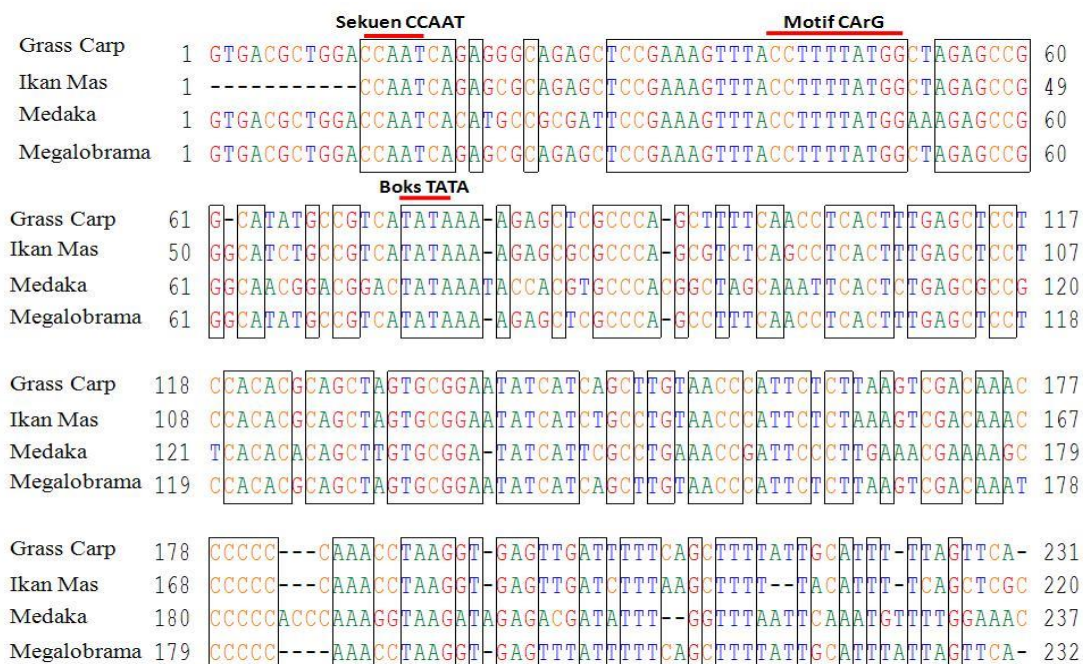
Kloning promoter β -aktin ikan mas



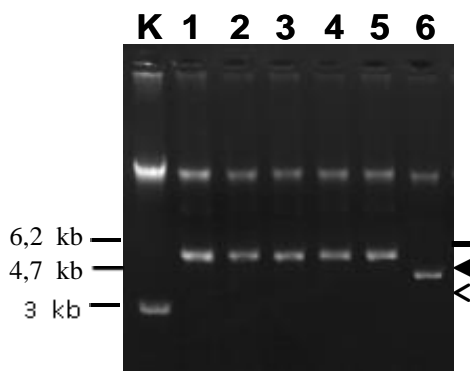
Gambar 1. Elektroforesis hasil amplifikasi PCR (1) dan (M) marker ukuran fragmen DNA 2-log ladder (Biolabs, New England). Fragmen DNA target ditunjukkan dengan tanda panah



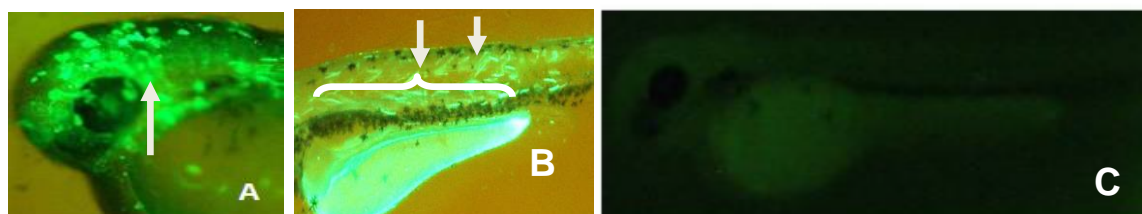
Gambar 2. *Alignment* sekuen promoter β -aktin ikan mas hasil sekuensing dengan data base yang ada di Bank Gen (No. Akses Bank Gen: M24113). Elemen penting promoter β -aktin yaitu CCAAT yang terletak pada nt. 12-16, CArG (CC(A/T)₆GG) pada nt. 42-51, dan boks TATA pada nt. 75-80. Garis hitam pada baris 1 dan 2 merupakan sekuen primer *forward* yang digunakan untuk isolasi promoter maupun pembuatan konstruksi gen. Baris 22 dan 23 merupakan sekuen primer *reverse* yang digunakan untuk pembuatan konstruksi gen, baris 26 dan 27 merupakan sekuen primer *reverse* yang digunakan untuk isolasi promoter.



Gambar 3. *Alignment* sekuen parsial promoter β -aktin ikan mas (hasil sekuensing), ikan koan (no. Akses Bank Gen: M25013), ikan medaka Jepang (no. Akses Bank Gen: S74868) dan ikan megalobrama (no. Akses Bank Gen: AY170122). Posisi sekuen CCAAT, motif CArG dan boks TATA di-tunjukkan di atas sekuensekuen nukleotida.



Gambar 4. Verifikasi hasil ligasi antara promoter β -aktin ikan mas dengan vektor pEGFP-N1 menggunakan metode *cracking* perubahan koloni bakteri (jalur 1-5). Metode *cracking* sebagaimana digambarkan sebelumnya oleh Octavera (2008). K: Hasil *cracking* dari *Escherichia coli* DH5 α yang membawa plasmid pGEM-T Easy. Jalur 6: hasil *cracking* bakteri yang membawa plasmid pEGFP-N1. (←): ukuran DNA plasmid yang mengandung pccBA-EGFP (6,2 kb), (◄): ukuran DNA dari plasmid pEGFP-N1 (4,7 kb), sedangkan (<): ukuran plasmid pGEM-T Easy (3 kb).



Gambar 5. Ekspresi gene GFP sementara (panah) yang dikendalikan oleh promoter β -aktin promoter ikan mas pada kepala (A), kuning telur (panah) dan otot (panah garis putus) (B), dan kontrol (C)

dan plasmid dari kontrol berupa bakteri biru. Hal ini menunjukkan bahwa konstruksi gen pccBA-EGFP berhasil dibuat dan koloni bakteri yang membawa plasmid ini berhasil diidentifikasi (No. 1-6 pada Gambar 4).

Berdasarkan pengujian efektivitas promoter, ekspresi gen GFP terlihat pada beberapa jaringan ikan mas. Pola ekspresi gen pCcBA-GFP secara ubiquitous ditemukan pada larva. Posisi ekspresi gen GFP pada larva terdapat pada kepala, kuning telur, dan otot. Ekspresi gen tersebut nampak tidak spesifik pada suatu organ. Peristiwa yang sama juga terjadi pada ikan *Oryzias javanicus* dengan menggunakan promoter β -aktin dan gen RFP, di mana signal gen RFP terdeteksi pada beberapa bagian organ termasuk kuning telur dan badan embrio (Lee *et al.* 2012). Hal ini berkenaan dengan sifat *ubiquitous* (terdapat di mana-mana) dari promoter β -aktin yang artinya promoter ini dapat aktif pada semua jaringan otot. Menurut Iyengar *et al.* (1996), distribusi yang tidak sama dari cetakan gen asing dalam jaringan seperti sel-sel otot atau sel-sel dalam lapisan telur syncytial (YSL) dapat menjelaskan variabilitas tinggi ekspresi gen asing dalam jaringan. Selanjutnya, tingkat ekspresi gen asing yang berbeda kemungkinan juga berhubungan dengan posisi integrasi dalam kromosom.

Tingkat ekspresi gen GFP pada larva ikan mas tergolong kuat. Ini kemungkinan disebabkan oleh meningkatnya laju replikasi DNA karena pertumbuhan yang cepat saat ini (Winkler *et al.* 1991). GFP khususnya diekspresikan dalam sel-sel jaringan karena promoter β -aktin diisolasi dari otot. Quitschke *et al.* (1989) mengklarifikasi bahwa promoter ini diekspresikan secara aktif dalam latar belakang sel kebanyakan vertebrata pada semua tahap perkembangan dan hanya ditekankan dalam jaringan otot. Namun, ekspresi ini akan menghilang pada waktu tertentu. Pola

umum ekspresi sementara nampaknya berlaku dalam semua spesies yang telah dipelajari sejauh ini (Iyengar *et al.* 1996).

Tingkat ekspresi gen dalam setiap jaringan berbeda. Menurut Chou *et al.* (2001), sangat umum mosaik, ekspresi sementara, dan ekspresi beragam gen asing ditemukan pada ikan transgenik. Hal ini disebabkan distribusi yang tidak merata dari gen asing yang diinjeksikan dalam embrio ikan. Ekspresi dalam setiap embrio merata dan tidak terlalu *ubiquitous*, dengan beberapa jaringan yang terekspresi secara kuat sementara beberapa tidak terekspresi. Sebagian besar tingkat ekspresi diduga secara kuat berhubungan dengan jumlah cetakan gen asing dalam setiap sel (Hwang *et al.* 2003). Alimuddin *et al.* (2007) menjelaskan bahwa ekspresi gen yang lemah atau bahkan belum ada ketika terintegrasi pada DNA sentromer atau telomer di mana proses transkripsi tidak aktif. Selain itu, kemungkinan integrasi gen terjadi secara acak dalam kromosom sehingga perbedaan tingkat ekspresi gen dalam jaringan berbeda.

Gen GFP dalam plasmid pCcBA-EGFP dapat diganti dengan gen yang berfungsi penting dalam sifat budi daya, seperti hormon pertumbuhan (Nam *et al.* 2001 dan Kobayashi *et al.* 2007). Gen cDNA hormon pertumbuhan (GH) gen cDNA ikan mas telah dikloning oleh kelompok lain (Guan *et al.* 2008). Dengan menggunakan metode RT-PCR, cDNA GH ikan mas yang berasal dari Indonesia dapat juga diisolasi, dan kemudian diligasi dengan sekuen promoter β -aktin, untuk menghasilkan vektor ekspresi ikan mas.

Simpulan

Promoter β -aktin ikan mas telah diklon dan dianalisis fungsional. Ukuran sekuen promoter sekitar 1,5 kb (1528 bp) dan memiliki homo-

logi sekitar 97,5% dengan sekuen promotor β -aktin dari pangkalan data bank gen (No. akses: M24113) sesama ikan mas (*Cyprinus carpio*) dari luar Indonesia. Sekuen ini memiliki tiga faktor transkripsi spesifik untuk promotor β -aktin, yaitu CCAAT, CARG, dan boks TATA. Tingkat ekspresi gen GFP dikendalikan oleh promotor β -aktin ikan mas sebagaimana ditunjukkan dalam otot larva.

Persantunan

Kami mengucapkan terima kasih kepada Prof. Goro Yoshizaki untuk sekuensing dan Balai Besar Pengembangan Budi Daya Air Tawar (BBPBAT) Sukabumi untuk penyediaan embrio ikan mas dan fasilitas pengambilan foto ekspresi gen GFP.

Daftar pustaka

- Alimuddin. 2003. Introduction and expression of foreign $\Delta 6$ desaturase-like gene in a teleostean fish. *Thesis*. Graduate School of Fisheries Science. Tokyo University of Fisheries.
- Alimuddin, Yoshizaki G, Kiron V, Satoh S, Takeuchi T. 2005. Enhancement of EPA and DHA biosynthesis by overexpression of masu salmon $\Delta 6$ desaturase-like gene in zebrafish. *Transgenic Research*, 14(2):159-165.
- Alimuddin, Yoshizaki G, Carman O, Takeuchi T. 2007. Efektivitas promotor hCMV, mEF1 α dan mAct dalam mengatur ekspresi gen asing pada transgenik ikan zebra. *Akuakultur Indonesia*, 6(1):65-77.
- Biswal MR, Singh SD, Srivastava PP, Umesha D. 2012. Molecular cloning and characterization of Asia seabass (*Lates calcarifer*) beta-actin gene promoter. *The National Academy of Sciences*, 35(3):163-168
- Chou CY, Horng LS, Tsai HJ. 2001. Uniform GFP-expression in transgenic medaka *Oryzias latipes* at the F0 generation. *Transgenic Research*, 10(4):303-315.
- Ge J, Dong Z, Li J, Xu Z, Song W, Bao J, Liang D, Li J, Li K, Jia W, Zhao M, Chai Y, Yang J, Pan J, Zhao Q. 2012. Isolation of yellow catfish β -actin promoter and generation of transgenic yellow catfish expressing enhanced yellow fluorescent protein. *Transgenic Research*, 21(5):995-1004.
- Glick BR, Pasternak JJ. 2003. *Molecular biotechnology: Principles and applications of recombinant DNA*. 3rd. ASM Press, Washington DC. 760 p.
- Guan B, Hu W, Zhang T, Wang Y, Zhu Z. 2008. Metabolism traits of "all fish" growth hormone transgenic common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquaculture*, 284(1-4):217-223.
- Hackett PB. 1993. The molecular biology of transgenic fish. In: Hochachka PW, Mommsen TP (Eds.). *Biochemistry and molecular biology of fish, Volume 2: Molecular biology frontiers*. Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam. pp. 207-240.
- Hamada K, Tamaki K, Sasado T, Watai Y, Kani S, Wakamatsu Y, Ozato K, Kinoshita M, Kohno R, Takagi S, Kimura M. 1998. Usefulness of the medaka β -actin promoter investigated using a mutant GFP reporter gene in transgenic medaka *Oryzias latipes*. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 7(3):173-180.
- Higashijima S, Okamoto H, Ueno N, Hotta Y, Eguchi G. 1997. High frequency generation of transgenic zebrafish which reliably express GFP in whole muscles or the whole body by using promoter of zebrafish origin. *Developmental Biology*, 192(2):289-299.
- Hwang GL, Rahman MA, Razak SA, Sohm F, Farahmand H, Smith A, Brooks C, Maclean N. 2003. Isolation and characterization of tilapia β -actin promoter and comparison of its activity with carp β -actin promoter. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1625(1): 11-18.
- Iyengar A, Muller F, Maclean N. 1996. Regulation and expression of transgenes in fish a review. *Transgenic Research*, 5(3):147-166.
- Kato K, Takagi M, Tamaru Y, Akiyama S-I, Konishi T, Murata O, Kumai H. 2007. Construction of an expression vector containing β -actin promoter region for gene transfer by microinjection in red sea bream *Pagrus major*. *Fisheries Science*, 73(2): 440-445.
- Kobayashi S-I, Alimuddin, Morita T, Miwa M, Lu J, Endo M, Takeuchi T, Yoshizaki G. 2007. Transgenic Nile-tilapia (*Oreochromis niloticus*) overexpressing growth hormone show reduced ammonia excretion. *Aquaculture*, 270(1-4):427-435.

- Lee SY, Kim DS, Nam YK. 2012. Molecular characterization of cytoskeletal beta-actin and its promoter in the Javanese ricefish *Oryzias javanicus*. *Fisheries and Aquatic Science*, 15(4):317-324.
- Liu Z, Moav B, Faras AJ, Guise KS, Kapucinski AR, Hackett PB. 1990. Functional analysis of elements affecting of the β -actin gene of carp. *Molecular and Cellular Biology*, 10(7):3432-3440.
- Nam YK, Noh JK, Cho YS, Cho HJ, Cho KN, Kim CG and Kim DS. 2001. Dramatically accelerated growth and extraordinary gigantism of transgenic mud loach *Misgurnus mizolepis*. *Transgenic Research*, 10(4): 353-362.
- Octavera A. 2008. Isolasi promoter β -actin ikan nila *Oreochromis niloticus* dengan metode *degenerate* PCR. *Skripsi*. Departemen Budi daya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor.
- Quitschke WW, Lin Z-Y, De Poti-Zilli L, and Paterson BM. 1989. The β -actin promoter. *The Journal of Biological Chemistry*, 264(16):9539-9546.
- Winkler C, Vielkind JR, Scharf M. 1991. Transient expression of foreign DNA during embryonic and larval development of the medaka fish *Oryzias latipes*. *Molecular General Genetics*, 226(1-2):129-140.
- Volckaert FA, Hellemans BA, Galbusera P, Olivier F. 1994. Replication, expression and fate of foreign DNA during embryonic and larval development of the African catfish *Clarias gariepinus*. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3(2):57- 69.