

METODE CEPAT UNTUK IDENTIFIKASI SIGOSITAS PADA IKAN TRANSGENIK

Rapid method for identification of transgenic fish zygosity

Alimuddin¹, G. Yoshizaki² and O. Carman¹

¹Departemen Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, IPB, Kampus Darmaga

²Department of Marine Bioscience, Tokyo University of Marine Science and Technology,
Minato, Tokyo 108-8477, Japan.

ABSTRACT

Identification of zygosity in transgenic fish is normally achieved by PCR analysis with genomic DNA template extracted from the tissue of progenies which are derived by mating the transgenic fish and wild-type counterpart. This method needs relatively large amounts of fish material and is time- and labor-intensive. New approaches addressing this problem could be of great help for fish biotechnologists. In this experiment, we applied a quantitative real-time PCR (qr-PCR) method to analyze zygosity in a stable line of transgenic zebrafish (*Danio rerio*) carrying masu salmon, *Oncorhynchus masou* $\Delta 6$ -desaturase-like gene. The qr-PCR was performed using iQ SYBR Green Supermix in the iCycler iQ Real-time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, USA). Data were analyzed using the comparative cycle threshold method. The results demonstrated a clear-cut identification of all transgenic fish ($n=20$) classified as a homozygous or heterozygous. Mating of those fish with wild-type had revealed transgene transmission to the offspring following expected Mendelian laws. Thus, we found that the qTR-PCR to be effective for a rapid and precise determination of zygosity in transgenic fish. This technique could be useful in the establishment of breeding programs for mass transgenic fish production and in experiments in which zygosity effect could have a functional impact.

Keywords: quantitative real-time PCR; zygosity; transgenic fish; mass production

ABSTRAK

Identifikasi sigositas ikan transgenik biasanya dilakukan menggunakan analisa PCR dengan cetakan DNA genomik yang diekstraksi dari jaringan ikan hasil persilangan antara ikan transgenik dan ikan normal. Metode ini memerlukan ikan dalam jumlah yang banyak, dan juga waktu serta tenaga. Pendekatan baru untuk mengatasi masalah tersebut akan memberikan manfaat besar kepada peneliti bioteknologi perikanan. Pada penelitian ini, kami menggunakan metode PCR real-time kuantitatif (krt-PCR) untuk menganalisa sigositas pada satu strain ikan zebra (*Danio rerio*) transgenik yang membawa gen $\Delta 6$ -desaturase-like dari ikan salmon masu, *Oncorhynchus masou*. krt-PCR dilakukan menggunakan *iQ SYBR Green Supermix* pada mesin *iCycler iQ Real-time PCR Detection system* (Bio-Rad Laboratories, USA). Data dianalisis menggunakan metode perbandingan nilai *cycle threshold*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa semua ikan transgenik ($n=20$) yang diidentifikasi dapat diklasifikasikan secara jelas sebagai ikan homosigot atau heterosigot. Persilangan antara ikan transgenik tersebut dengan ikan normal menunjukkan transmisi transgen ke keturunannya mengikuti hukum segregasi Mendel. Dengan demikian, metode krt-PCR adalah efektif untuk penentuan sigositas secara cepat dan tepat pada ikan transgenik. Teknik ini dapat berguna dalam program produksi ikan transgenik secara massal dan dalam percobaan dimana faktor sigositas memberikan pengaruh nyata.

Kata kunci: kuantitatif real-time PCR; sigositas, ikan transgenik; produksi massal

PENDAHULUAN

Penentuan apakah suatu ikan transgenik bersifat homosigot atau heterosigot pada suatu transgen adalah penting dalam rangka produksi massal ikan transgenik untuk

digunakan dalam suatu percobaan dimana tingkat ekspresi transgen mungkin mempengaruhi hasil penelitian. Pembuatan ikan transgenik homosigot juga akan memudahkan proses produksi ikan transgenik pada saat diaplikasikan dalam

akuakultur. Ikan transgenik homosigot dapat diperoleh dengan menyilangkan antar ikan transgenik. Jumlah ikan transgenik homosigot yang diperoleh dari persilangan antar ikan transgenik tersebut secara teoritis adalah sekitar 25% dari populasi.

Teknik yang umum digunakan untuk mengidentifikasi sigositas hewan transgenik adalah seperti *Southern-blot*, *dot-blot*, fluoresens hibridisasi *in situ*, dan uji progeni. Akan tetapi, metode-metode tersebut membutuhkan keterampilan dan waktu banyak. Baru-baru ini, ada dua metode kuantifikasi PCR yang telah digunakan untuk menganalisa perbedaan jumlah copy atau tingkat ekspresi gen tertentu, yaitu metode semi-kuantitatif (Alimuddin, 2003; Xu *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2004; Yamane *et al.*, 2005), dan kuantitatif real-time PCR (Raggi *et al.*, 1999; Svensson *et al.*, 2002; Boonanuntasarn *et al.*, 2003; Zheng *et al.*, 2004; Alimuddin *et al.*, 2005). Tingkat akurasi hasil analisa dengan metode PCR real-time kuantitatif (krt-PCR) adalah lebih tinggi daripada PCR semi-kuantitatif.

Dalam penelitian ini, kami menggunakan metode krt-PCR untuk menentukan sigositas ikan zebra transgenik yang membawa gen $\Delta 6$ -desaturase-like (*OmFAD6*) ikan salmon masu (Alimuddin *et al.*, 2004). Gen *OmFAD6* adalah sebuah gen yang bekerja dalam metabolisme asam lemak rantai panjang yang tidak jenuh (*highly unsaturated fatty acids*). Ekspresi gen desaturase ini dalam ikan zebra transgenik telah meningkatkan produksi asam lemak eikosapentanat dan dokosaheksanat (Alimuddin *et al.*, 2005).

BAHAN DAN METODE

Ikan transgenik dan ekstraksi DNA genomik

Ikan zebra transgenik yang digunakan merupakan keturunan keempat strain pActD6 15-2 yang membawa gen *Om Δ 6FAD* ikan salmon masu (Alimuddin *et al.*, 2004). Ikan transgenik homosigot diperoleh dengan menyilangkan antar ikan transgenik. Ekstraksi DNA genomik dilakukan dengan

menggunakan kit isolasi DNA Puregene (Gentra, Minneapolis, USA) sesuai petunjuk penggunaannya. Secara singkat, ekstraksi DNA genomik dilakukan dengan menambahkan larutan lisis sebanyak 150 μ l dan proteinase K (20 mg/ml) sebanyak 1 μ l ke dalam tabung mikro yang telah diisi dengan potongan sirip ekor. Tabung mikro tersebut dimasukkan ke dalam inkubator dengan temperatur 65°C selama 3 jam atau sampai semua sel mengalami lisis. Untuk mengeliminir kontaminasi RNA, 1 μ l RNase (4 mg/ml) ditambahkan ke dalam tabung mikro dan kemudian diinkubasi pada temperatur 37°C selama 30 menit. DNA genomik dipresipitasi menggunakan isopropanol 100%. Setelah dibilas dengan etanol 70% dan dikering-udarkan, DNA dilarutkan dalam air steril.

PCR real-time Kuantitatif

Amplifikasi DNA genomik dilakukan dengan menggunakan kit *iQ SYBR Green Supermix* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) pada mesin *iCycler Real-Time Detection System* (Bio-Rad Laboratories) menurut petunjuk pemakaiannya dengan kondisi seperti yang telah dijelaskan dalam Alimuddin *et al.* (2005). Primer yang digunakan untuk gen *Om Δ 6FAD* dan gen β -actin adalah sebagai berikut: forward “Fw-Omar-2” (5'-AGA-AAGGCATGACTG-ATGTTGTCA-3') dan reverse “des-Omar” (5'-ATCCAGGAAATGTCCTCTCTGTTC-GCA-3'); β -actin forward “actinZF-F2” (5'-CCTTCCACCATGAAGATCAAGATCAT-3'), β -actin reverse “actinZF-R2” (5'-TCG-TACTCCTGCTTGCTGATCCAC-3'). Gen β -actin berfungsi sebagai kontrol internal konsentrasi DNA genomik yang digunakan sebagai cetakan. Konsentrasi DNA genomik yang digunakan sebagai cetakan adalah sekitar 15 ng/ μ l. Data dianalisis menggunakan metode perbandingan nilai *cycle threshold*, CT (Pfaffl, 2001), dimana CT adalah jumlah siklus amplifikasi pada saat fluoresensi mencapai suatu nilai ambang tertentu. Nilai CT adalah berbanding terbalik dengan konsentrasi gen target dalam larutan DNA cetakan.

Uji Progeni

Uji progeni dilakukan untuk mengetahui ketepatan hasil identifikasi sigositas dengan metode krt-PCR. Setiap individu ikan transgenik homosisot dan heterosisot hasil identifikasi dengan krt-PCR dikawinkan dengan ikan non-transgenik secara berpasangan. Larva umur satu hari hasil persilangan tersebut diambil secara acak dari populasi sebanyak 20 ekor, dimasukkan ke dalam tabung mikro satu ekor larva per tabung, DNA genomik diisolasi dan kemudian dilakukan analisa PCR. Analisa PCR dilakukan dengan volume akhir reaksi 20 μ l yang terdiri atas 2 μ l *Ex Taq* Buffer 10x, 2 μ l dNTPs 200 μ M, 0,05 μ l *Ex Taq* polymerase (Takara Bio, Shiga, Japan), 2 μ l DNA sebagai cetakan dan 2 pmol untuk setiap primer. Proses denaturasi dilakukan pada temperatur 94°C selama 30 detik, pelekatan (*annealing*) pada 62°C selama 30 detik, dan pemanjangan (*extension*) pada 72°C selama 30 detik. Primer yang digunakan adalah seperti yang telah dijelaskan di atas. Jumlah siklus amplifikasi PCR adalah 35 siklus.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari 84 ekor ikan hasil persilangan antar ikan zebra transgenik pActD6 strain 15-2 keturunan keempat, ada 53 ekor ikan atau sekitar 63% adalah membawa transgen. Karena segregasi transgen pada ikan transgenik *stable line* adalah mengikuti hukum Mendel, maka secara teoritis ada sekitar 13% dari populasi ikan transgenik tersebut merupakan ikan transgenik homosisot. Untuk menentukan sigositas ikan transgenik tersebut, analisa kRT-PCR dilakukan pada 20 ekor ikan yang diambil secara acak dari populasi. Hasil amplifikasi real-time PCR memperlihatkan adanya dua kelompok nilai jumlah copy gen desaturase/ β -actin. Satu kelompok ikan sebanyak 15 ekor mempunyai nilai 41,0-59,8 dan kelompok ikan lainnya sebanyak 5 ekor dengan nilai 95,1-99,6 (Gambar 1). Perbandingan nilai rata-rata kedua grup ikan tersebut adalah 1 : 1,8. Nilai perbandingan ini mendekati angka teoritis perbandingan

antara individu heterosisot dan homosisot, yaitu 1 : 2, dengan asumsi hanya ada satu integran dalam genom. Oleh karena itu, kemungkinan grup ikan dengan kelompok nilai 41,0-59,8 dapat digolongkan menjadi heterosisot, dan grup ikan dengan nilai 95,1-99,6 sebagai ikan transgenik homosisot.

Untuk membuktikan hasil identifikasi sigositas dengan metode krt-PCR, dilakukan uji progeni. Hasil analisa menunjukkan bahwa keturunan ikan yang memiliki nilai antara 41,0-59,8 adalah tidak semua membawa transgen. Sedangkan keturunan ikan dengan nilai 95,1-99,6 adalah semuanya membawa transgen. Transmisi transgen yang diperoleh dari ikan-ikan tersebut adalah mengikuti hukum segregasi Mendel. Salah satu contoh hasil uji progeni yang diperiksa dengan PCR ditunjukkan pada Gambar 2. Dari hasil uji progeni ini dapat disimpulkan bahwa ikan transgenik dengan nilai antara 41,0-59,8 adalah individu heterosisot, sedangkan ikan dengan nilai 95,1-99,6 adalah homosisot. Dengan demikian penentuan sigositas dengan metode PCR real-time kuantitatif adalah tepat.

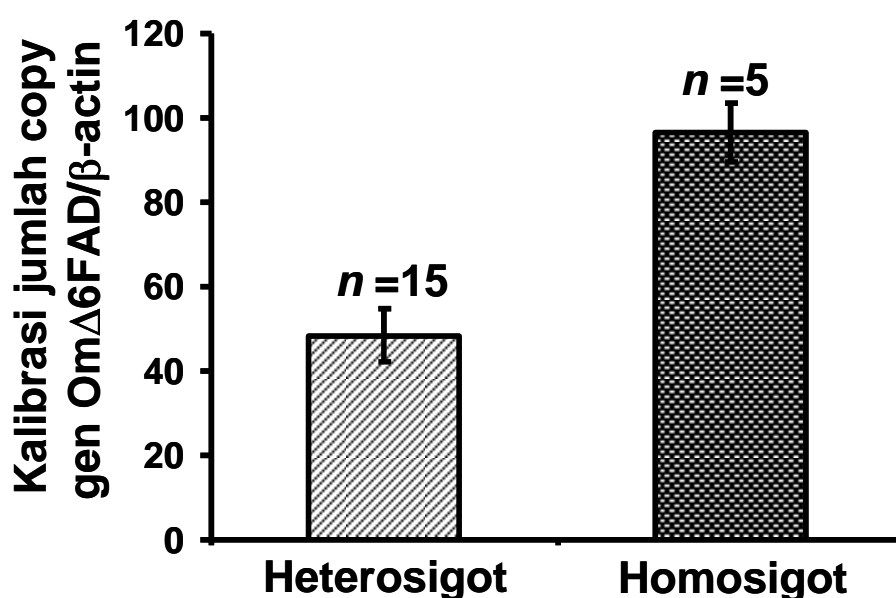
Meskipun cara uji progeni kelihatannya memberikan hasil yang lebih pasti dibandingkan dengan metode krt-PCR dalam penentuan sigositas ikan transgenik, uji progeni membutuhkan banyak waktu dan tenaga. Pada ikan zebra, bila dalam sehari kita bisa memijahkan ikan sebanyak 10 ekor, maka dibutuhkan waktu dua hari untuk memijahkan 20 ekor ikan transgenik. Selanjutnya, bila kita membutuhkan waktu 4 hari untuk memeriksa larva sebanyak 400 ekor (20 ekor sampel per induk ikan transgenik), maka total waktu yang dibutuhkan untuk mengetahui sigositas ikan transgenik tersebut adalah 6 hari. Sebaliknya, identifikasi sigositas ikan transgenik dengan metode kRT-PCR bisa dilakukan lebih cepat. Bila kita menggunakan mesin real-time PCR yang memiliki 96 lubang untuk tabung, dengan 3 kali ulangan per sampel induk ikan transgenik, maka jumlah ikan yang dapat diperiksa dalam sekali proses PCR adalah 32 ekor ikan. Dengan demikian, identifikasi sigositas pada 20 ekor ikan transgenik di atas bisa dilakukan dalam waktu satu hari saja.

Selanjutnya, bila jumlah ikan relatif banyak, maka wadah pemeliharaan yang diperlukan selama dilakukan seleksi menjadi lebih banyak pula untuk metode uji progeni. Uji progeni juga hanya bisa dilakukan setelah ikan matang gonad; berumur sekitar 1,5 bulan untuk ikan zebra jantan dan 2 bulan untuk ikan betina, sedangkan analisa krt-PCR bisa dilakukan lebih awal; sebelum ikan matang gonad. Karena seleksi dapat dilakukan lebih awal, maka biaya untuk pakan mungkin berkurang secara signifikan, terutama untuk ikan yang berukuran besar.

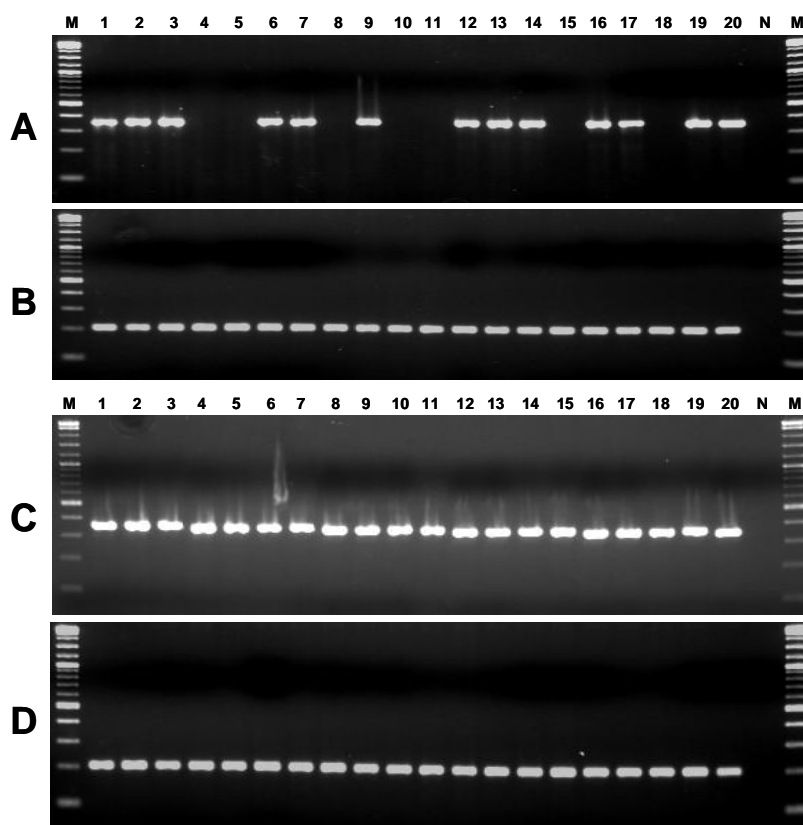
Perbandingan jumlah copy gen antara individu transgenik heterosigot dan homosigot yang diperoleh dalam penelitian ini adalah sekitar 1:2. German *et al.* (2003) juga telah melaporkan bahwa real-time PCR mampu mendeteksi rasio kandungan DNA antara tanaman transgenik T1 heterosigot vs. homosigot dengan nilai 1 : 2,2. Akan tetapi, hanya ada satu individu heterosigot dan satu homosigot yang ditampilkan, sehingga susah menilai tingkat kepercayaan metode ini. Dalam penelitian ini, kami menggunakan

lebih banyak individu ikan transgenik dan diperoleh hasil yang menunjukkan perbedaan yang jelas antara individu heterosigot dan homosigot. Juga tidak ditemukan nilai yang tumpang tindih sehingga tingkat kepercayaan hasil analisa yang diperoleh adalah besar.

Selain metode krt-PCR, metode PCR semi-kuantifikasi mungkin juga bisa digunakan dalam identifikasi sigositas ikan transgenik secara cepat. Prinsip metode PCR semi-kuantitatif ini adalah terletak pada jumlah siklus yang digunakan untuk amplifikasi fragmen DNA. Jumlah siklus yang digunakan harus lebih kecil dari jumlah siklus PCR yang menghasilkan fase *plateu*. Jumlah siklus tersebut adalah biasanya sekitar 20-28 siklus, tergantung pada konsentrasi DNA genomik yang digunakan sebagai cetakan. Meskipun tingkat ketelitiannya tidak setinggi metode krt-PCR, metode semi-kuantitatif PCR juga bisa dipakai bila kita tidak memiliki fasilitas yang cukup. Kami sudah membuktikan ketepatan metode ini dalam penentuan sigositas ikan zebra transgenik (data tidak dipublikasi).



Gambar 1. Identifikasi sigositas ikan transgenik menggunakan metode PCR real-time kuantitatif. Jumlah copy gen *OmFAD6* hasil amplifikasi PCR dikalibrasi dengan jumlah copy gen β -actin. Data ditampilkan sebagai rata-rata \pm S.D.



Gambar 2. Produk PCR untuk ikan transgenik heterosigot (A), dan ikan homosigot (C), dengan primer spesifik untuk gen OmFAD6 ikan masu salmon. Panjang fragmen hasil amplifikasi adalah 354-bp. (B, D) Produk PCR dari ikan heterosigot dan homosigot menggunakan primer gen β -actin dengan panjang fragmen sekitar 200-bp. Gen β -actin digunakan sebagai kontrol internal *loading* DNA genomik dari masing-masing grup ikan. Baris 1-20, produk PCR dengan cetakan DNA dari larva ikan transgenik; dan N, sampel hasil PCR tanpa cetakan DNA. M adalah marker DNA 2-log ladder (BioLabs, Inc., New England, USA).

KESIMPULAN

Metode PCR real-time kuantitatif dapat menentukan sigositas ikan transgenik secara akurat dan cepat. Metode ini dapat berguna dalam program produksi ikan transgenik secara massal dan dalam percobaan dimana faktor sigositas memberikan pengaruh nyata.

DAFTAR PUSTAKA

Alimuddin. 2003. Introduction and expression of foreign Δ 6-desaturase-like gene in a teleostean fish. Master Thesis. Tokyo University of Fisheries. 41p.

Alimuddin, G. Yoshizaki, V. Kiron, S. Satoh and T. Takeuchi. 2004. Modification of fatty acids composition in zebrafish by expression of masu salmon Δ 6-desaturase-like gene. The 11th International Symposium on Nutrition and Feeding in Fish, 2-7 May 2004, Phuket, Thailand. (In abstract).

Alimuddin, G. Yoshizaki, V. Kiron, S. Satoh and T. Takeuchi. 2005. Enhancement of EPA and DHA biosynthesis by over-expression of masu salmon Δ 6-desaturase-like gene in zebrafish. *Transgenic Res.* 14,159-165.

- Boonanuntasarn, B., G. Yoshizaki, and T. Takeuchi. 2003. Specific gene silencing using small interfering RNAs in fish embryos. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 310: 1089–1095.
- German, M.A., M. Kandel-Kfir, D. Swarzberg, T. Matsevitz, and D. Granot. 2003. A rapid method for the analysis of zigosity in transgenic plants. *Plant Sci.*, 164:183-187.
- Pfaffl, M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29: 2002-2007.
- Raggi, C.C., M.L. Bagnoni, G.P. Tonini, M. Maggi, G. Vona, P. Pinzani, K. Mazzocco, B. De Bernardi, M. Pazzaghi, and C. Orlando. 1999. Real-time quantitative PCR for the measurement of MYCN amplification in human neuroblastoma with the TaqMan detection system. *Clin. Chem.*, 45:1918-1924.
- Svensson, A.S., F.I. Johnsson, I.M. Moller, and A.G. Rasmusson. 2002. Cold stress decreases the capacity for respiratory NADH oxidation in potato leaves. *FEBS Lett.*, 517:79-82.
- Xu, E., Lai, M., Lv, B., Xing, X., Huang, Q., and X. Xia. 2004. A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-2 promoter is associated with colorectal cancer. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 324:999-1003.
- Yamane, S., N. Iwasaki, T. Majima, T. Funakoshi, T. Masuko, K. Harada, A. Minami, K. Monde, and S-I. Nishimura. 2005. Feasibility of chitosan-based hyaluronic acid hybrid biomaterial for a novel scaffold in cartilage tissue engineering. *Biomaterial*, 26:611-619.
- Zhang, X-J, G-G. Zheng, X-T. Ma, Y-H. Yang, G. Li, Q. Rao, K. Nie, and K-F. Wu. 2004. expression of P2X7 in human hematopoietic cell lines and leukemia patients. *Leukimia Res.*, 28:1313-1322.
- Zheng, X., D.R. Tocher, C.A. Dickson, J.G. Bell, A.J. Teale. 2004. Effects of diets containing vegetable oil on expression of genes involved in highly unsaturated fatty acid biosynthesis in liver of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 236:467–483.