

## 比較異種基因起動子在牡蠣幼生之效率

鄭達智<sup>1\*</sup>·盧詩堯<sup>2</sup>·吳純佩<sup>3</sup>·林明男<sup>4</sup>

<sup>1</sup>行政院農業委員會水產試驗所 水產養殖組；<sup>2</sup>國立台灣海洋大學 水產養殖研究所  
<sup>3</sup>國立台灣海洋大學 食品科學研究所；<sup>4</sup>行政院農業委員會水產試驗所 海水繁養殖研究中心

### 摘 要

研究外來基因在牡蠣之調控或表現重組蛋白質，首先須要合適的基因起動子。本研究應用精子媒介基因轉殖方式將含有 CMV、RSV 及 SV40 基因起動子及生物冷光基因載體分別轉入卵子，以評估起動子在幼生之強度，結果發現 RSV 基因起動子在受精 16 小時後即開始作用，而且效率顯著高於 CMV 及 SV40；但是在受精 24 ~ 32 小時後效率排序為 RSV = CMV > SV40；而在受精 40 小時後效率排序為 RSV > CMV = SV40。以維持起動子作用之時間及強度而言，RSV 基因起動子優於 CMV，而 CMV 優於 SV40。結果顯示，對牡蠣而言，RSV 及 CMV 起動子屬於高效率起動子，而 SV40 起動子則屬於低效率起動子。

關鍵詞：牡蠣、起動子、電穿孔、基因轉殖

### 前 言

適當的基因起動子是研究基因功能必要條件，當外來基因被轉入細胞內，進入細胞核時，基因表達程度受到多層的調控，包括基因轉錄 (transcription)、RNA 的處理 (RNA processing)、mRNA 的傳送 (mRNA transportation)、mRNA 的穩定性 (mRNA stability)、mRNA 轉譯 (mRNA translation) 及轉譯後蛋白質的修飾 (post translation modification) 等層面，但是其主要在轉錄層面受到起動子之控制 (Darnell 1982)。

研究基因轉殖所使用之起動子可分為來自同種生物之同源起動子 (homologous promoter) 及來自異種生物之異源起動子 (heterologous promoter)。雖然一般認為使用同源起動子比使用異源起動子較易受到宿主細胞之調控 (Du *et al.*, 1992; Devlin *et al.*, 1994; Takagi *et al.*, 1994)，但是當無法獲得同源起動子時，只能使用異源起動子。

過去研究牡蠣基因轉殖的種類，主要是具有高經濟價值之東方牡蠣 (*Crassostrea virginica*) 及巨牡蠣 (*C. gigas*)，而目前只有東方牡蠣  $\beta$ -actin 起動子被選殖出來 (Cadoret *et al.*, 1999)，但是未被應用於其它基因轉殖研究，因此目前研究牡蠣基因轉殖，皆使用來自哺乳類病毒之異源起動子，包括 cytomegalovirus early gene promoter (CMV) (Boshart *et al.*, 1985)，murine leukemia virus long terminal repeat promoter (MLVLTTR) (Gilboa *et al.*, 1982)，rous sarcoma virus long terminal repeat (RSV) (Norton and Coffin 1987)，simian virus 40 early promoter (SV40) (Benoist and Chambon 1981)，然而這些異源起動子之效率尚未在培養的牡蠣細胞或活體中作有系統的比較。

東方牡蠣基因轉殖之研究只注重在活體，例如 CMV 起動子曾被用在幼生 (Buchanan *et al.*, 2001) 及成體血球細胞 (Buchanan, Cheng *et al.*, 2001) 中表達螢光基因，而 SV40 起動子則被用於幼生表達抗生素篩選基因 (Buchanan *et al.*, 2001)，但是這二個起動子之效率則未曾作比較。而巨牡蠣之基因轉殖研究只注重在培養的牡蠣細胞，雖然分別比較了 CMV 與 SV40 起動子在心臟

\*通訊作者 / 基隆市和一路 199 號, TEL: (02) 2462-2101;  
FAX: (02) 2462-8138; E-mail: tccheng@mail.tfrin.gov.tw

細胞的效率 (Boulo *et al.*, 1996) 及 MLVLR 與 RSV 起動子在胚體細胞的效率 (Boulo *et al.*, 2000), 但是使用不同組織之細胞使得實驗結果之間不能比較。因此本研究採用最常用之哺乳類病毒起動子 CMV、RSV 與 SV40, 比較該三種起動子在巨牡蠣幼生的效率, 以做為將來基因轉殖及表現重組蛋白質時選擇起動子之依據。

## 材料與方法

### 一、載體構築

除了 pSV40/GL3E (Promega Inc. USA) 外, 基因起動子以 PCR 擴大並轉接到含有生物冷光 (luciferase) 之報導基因載體 pGL3E (Promega Inc. USA)。應用 Primer Premier 5.0 (Biosoft International, USA) 電腦程式輔助分析在載體 pDsRed2-C1 上之 CMV promoter (Clontech Laboratories Inc. USA) 及 pRc/RSV (Invitrogen) 上之 RSV promoter 序列, 設計 5' 端帶有 Kpn I 限制酶切割序列 (劃底線) 之前進引子 (forward primer) 及帶有 Bgl II 限制酶切割序列 (劃底線) 之後退引子 (backward primer) (CMV: forward 5'-TTGGTACC TAG TTA TTA ATA GTA ATC AAT-3', reverse: 5'-TTAGATCT TCT GAC GGT TCA CTA AAC CAG C-3', RSV: forward 5'-TTGGTACC AAG CGG GGC TTC GGT TGT A-3', reverse: 5'-TTAGATCT AAT GTG GTG AAT GGT CAA A-3'), 應用 PCR 先以 1 次 95 °C、3 分鐘變性後, 再以 35 個循環的 95 °C、30 秒, 62 °C、1 分鐘及 72 °C、1 分鐘, 擴增出 589 鹼基對之 CMV 及 329 鹼基對之 RSV 起動子片段, 再以 Kpn I 或 Bgl II 限制酶切割後純化, 而帶有生物冷光報導基因之載體亦以相同之限制酶切割純化後, 再將兩者以濃度比為 1:3 混合, 加入連接酵素, 置於 25 °C 中 16 小時以上使兩者接合。接合後之產物以熱刺激方式 (heat shock) 轉入 DH5 $\alpha$  勝任細胞 (competent cell) 中, 塗於含有 30  $\mu$ g/ml ampicillin LB agar plate 上, 置於 37 °C 恆溫箱中培養 12~16 小時後, 再挑出 10 個單一菌落, 分別接種於 5 ml 含有 30  $\mu$ g/ml ampicillin LB broth 中, 置於 37 °C 恆溫箱中培養 12~16 小時後取出 3 ml 作小量質

體純化, 純化之質體先以 1% TAE agarose gel 電泳檢測質體大小, 再選取 3 個正確大小之質體菌落, 以 DNA 螢光自動定序儀 (ABI PRISM $\text{\textcircled{C}}$ 3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, USA) 定序後並應用 Vector NTI 8.0 (Invitrogen Corporation, USA) 電腦程式與原來序列作比對, 再將含有正確序列之菌株以 Qiagen plasmid maxi-perp kit (Qiagen Inc. USA) 大量製造載體, 分別命名為 pCMV/GL3E 及 pRSV/GL3E 並與 pSV40/GL3E 供起動子效率比較之用 (Fig. 1)。

### 二、基因轉殖

購自屏東之巨牡蠣以流水蓄養三天後使用, 精子由生殖腺直接刮取後, 以 4 °C 海水稀釋成為 1500 隻/ $\mu$ l, 再取 800  $\mu$ l 分別加到含有 200  $\mu$ g pCMV/GL3E、pRSV/GL3E 或 pSV40/GL3E, 載體之兩極距為 8 mm 之電穿孔槽中, 以經 121 °C、1.2 大氣壓滅菌後之天然海水為緩衝液進行電穿孔 (BTX 830), 參考 Tsai *et al.* (1997) 其條設定條件為: 400 V、1 ms、1 cycle。電穿孔後, 立即與卵以 100:1 之比例受精, 並在受精後 0、8、16、24、32 及 40 小時取樣活存之幼生, 供生物冷光酵素活性之測定。

### 三、生物冷光酵素活性測定

使用生物冷光酵素分析系統 (Luciferase Assay System, Promega Inc. USA) 測定生物冷光酵素之活性。首先將 reporter lysis buffer 400  $\mu$ l 加入含有牡蠣幼生之 1.5 ml 微量離心管中, 劇烈振盪, 使幼生充分與 lysis buffer 混合後, 迅速置入 -70 °C 冷凍庫中凍結, 再將樣本以低於 25 °C 之溫度解凍, 並充分混合後, 以 14000 g、20 °C、3 分鐘離心, 取 20  $\mu$ l 上層液加到含有 100  $\mu$ l 之 reporter assay buffer 之微量離心管中, 充分混合之後, 以 Luminometer TD 20/20 (Turner Biosystems, USA) 測量生物冷光酵素之活性。

### 四、數據資料分析

各項實驗至少重覆三次, 每項實驗中之相同處理組有三重覆, 所收集之數據以 SPSS for

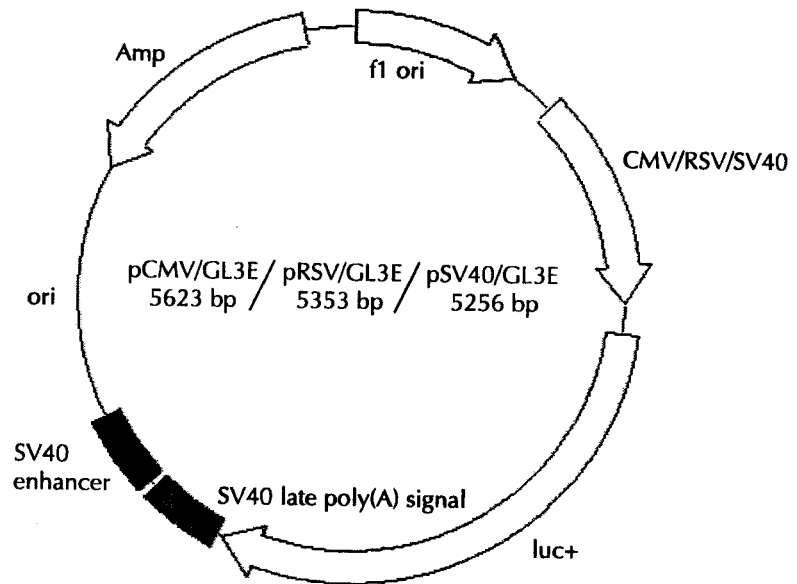


Fig. 1 Plasmids containing the CMV, RSV, and SV40 promoters used for comparison of efficiency in oyster larvae.

Window (SPSS Inc. USA) 電腦統計軟體做單因子分析，各組間若有顯著差異 ( $p < 0.05$ )，則再以 Tukey 進一步分析。

## 結 果

Figure 2 之結果顯示，當比較 3 個起動子在同一取樣時間點之效率時，發現牡蠣卵子受精後 0 及 8 小時之取樣中，並無顯著生物冷光酵素活性被測出，然而在受精後 16 小時之取樣中發現 RSV 起動子效率顯著高於 CMV 及 SV40 起動子，但是 CMV 及 SV40 起動子間之效率則無顯著差異。當受精後 24 小時取樣時發現 CMV 起動子效率已升高到與 RSV 起動子效率之間沒有顯著差異，而 SV40 起動子效率顯著低於上述兩者。在受精 32 小時各起動子之間的效率仍與受精後 24 小時各起動子之間的效率相同，但是在受精後 40 小時 CMV 起動子效率則遽降至與 SV40 起動子效率無顯著差異，而 RSV 起動子效率仍顯著高於 CMV 及 SV40 起動子。

當比較個別起動子在不同取樣時間點之效率時，發現雖然 3 個起動子在受精後 16 小時的取樣中皆可測得生物冷光酵素之活性，但是 SV40 起動

子之效率並沒有隨著時間而顯著增加，而 CMV 起動子之效率則在受精後 24 小時之取樣中顯著增加而且在受精後 32 小時仍顯著保有其效率，但在受精後 40 小時才遽降至與受精後 16 小時之取樣無顯著差異。RSV 起動子之效率則自受精後 16、24、32 到 40 小時之取樣中一直保持高效率沒有顯著之變化。

短暫性基因轉殖之研究，並不要求載體上之冷光報導基因插入細胞染色體。因此影響冷光報導基因表達強度之因子在於冷光報導基因濃度、起動子效率及冷光報導基因蛋白質濃度。而本實驗之冷光報導基因濃度固定，各實驗組之冷光報導基因蛋白質濃度則取決於起動子強度。但是冷光報導基因濃度會隨著時間而被細胞內酵素分解而逐漸地減少，而且冷光基因蛋白質並不會如螢光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 會長時間累積在細胞內，因此冷光報導基因表現到達高峰後會迅速下降，因此本實驗觀察到帶有三種起動子之冷光報導基因蛋白質其濃度皆在受精後期會迅速下降。Subramanian and Srienc (1996) 曾以流式細胞儀觀察 GFP 基因在 CHO 細胞中動態之表達強度，結果發現細胞平均 GFP 螢光強度隨著時間，在 24 小時先到達高峰後而下降，其推測可能

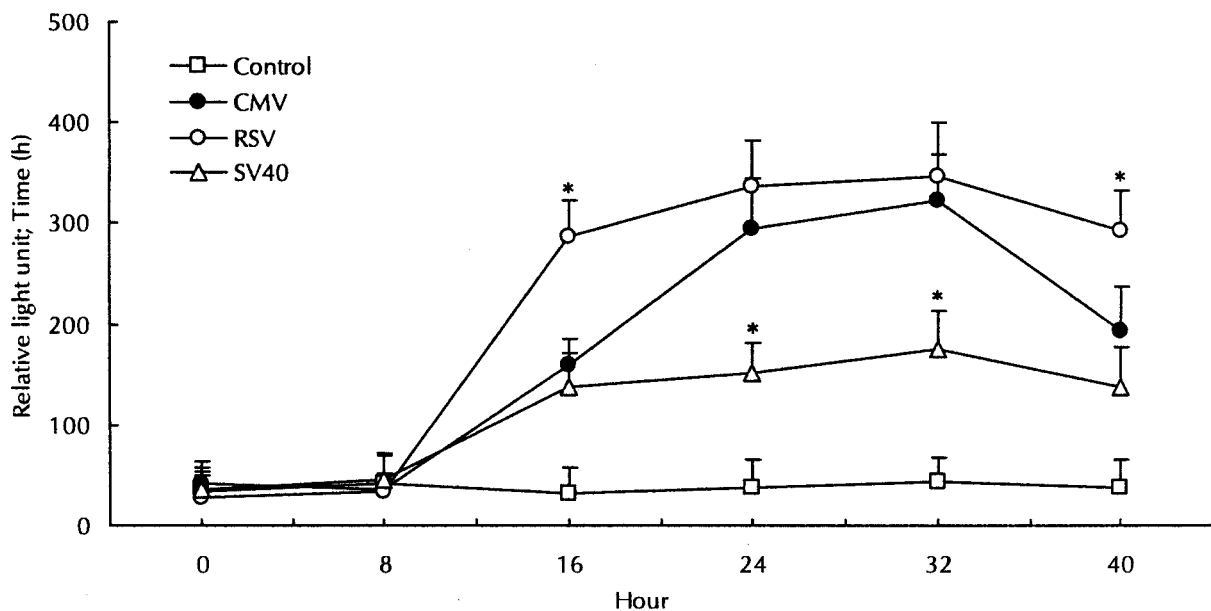


Fig. 2 Comparison of promoter efficiency in oyster larvae. The pGL3E vectors containing the CMV, RSV, or SV40 promoters were delivered into an oyster egg by sperm electroporation at 500 V/cm. Samples were collected at 0, 8, 16, 24, 32, and 40 h after fertilization for luciferase activity measurement. Samples with a star indicate a significant difference from the others at the same sampling times ( $p < 0.05$ ).

原因亦為 plasmid 在細胞內被分解，而 Floch *et al.* (1998) 亦發現轉殖  $\beta$ -galactosidase 報導基因到人類造血細胞株 K562 時，亦發現相似趨勢。

目前為止，有多篇論文探討牡蠣基因轉殖 (Table 1)，但並無同時比較 CMV、RSV、SV40 起動子在牡蠣幼生之效率的報導。本研究發現 RSV 起動子之效率最佳，CMV 起動子次之，SV40 起動子居末。Buchanan *et al.* (2001) 為了找尋最佳基因轉殖方法，就根據 CMV 起動子之效率在巨牡蠣心臟中顯著高於 SV40 起動子 (Boulo *et al.*, 1996) 之研究結果，直接使用 CMV 起動子在牡蠣幼生，結果發現轉殖基因表達之效率低於千分之一，因此建議須先比較起動子效率之後，再選用比 CMV 起動子更高效率之起動子來進行基因轉殖研究。Cadoret *et al.* (1997) 為了要評估以粒子槍基因轉殖牡蠣之效率，直接將 CMV 及果蠅熱刺激蛋白 70 起動子用在牡蠣幼生，因為 2 個起動子在不同之載體上所以實驗結果無法直接比較，可是間接發現 CMV 起動子效率僅比控制組增加 4 倍，而果蠅熱刺激蛋白 70 起動子之效率比控制組增加 55 倍。Boulo *et al.* (1996) 亦發現果蠅熱刺激蛋白 70 起動子效率在牡蠣心臟細胞中分別高於 CMV 起動子效率 5 倍及 SV40 起動子效率 8 倍。而

Cheng *et al.* (2001) 及 Lacoste *et al.* (2001) 亦發現來自蝸牛之熱刺激蛋白 70 起動子亦可在牡蠣心臟及血球細胞以熱刺激方式在特定時間誘導其作用。因此在牡蠣幼生基因轉殖研究，除了 RSV、CMV 及 SV40 起動子之外，熱刺激蛋白 70 起動子與其它起動子之相對效率亦是值得探討。

RSV、CMV 及 SV40 起動子亦常被用在魚類基因轉殖研究，SV40 起動子在早期之研究被直接使用在活體基因轉殖，包括虹鱒 (*Salmo gairdneri*) (Chourrout *et al.*, 1986) 及斑馬魚 (Stuart *et al.*, 1988) 等，但多數無法作用而其所帶動的基因亦無法測得，後來之研究大多數利用 RSV 及 CMV 起動子。在細胞株基因轉殖研究中曾經在鯉魚的 EPC、鮭魚的 CHSE 及吳郭魚的 TO2 等細胞株中比較 RSV 及 CMV 起動子的效率，發現兩者效率並沒有顯著差異而且能有效表達所驅動之基因 (Bearzotti *et al.*, 1992; Betancourt *et al.*, 1993)，而 Paul *et al.* (2001) 亦在斑馬魚 ZF-4 及藍鰂魚 BF-2 細胞株比較 RSV 及 CMV 起動子效率時發現在 ZF-4 細胞株中 RSV 起動子效率是 CMV 的 6.6 倍，在 BF-2 細胞株中 RSV 起動子效率是 CMV 起動子的 5.7 倍。在活體基因轉殖研究中亦已成功地應用 RSV 起動子表達生長荷爾蒙基因 (Dunham;

**Table 1** Promoters used in transgenic oyster studies

| Cell type                           | Method                      | Promoter efficiency*       | Reference                     |
|-------------------------------------|-----------------------------|----------------------------|-------------------------------|
| Heart Cells ( <i>C. virginica</i> ) | Lipofection                 | SHSP70                     | Cheng <i>et al.</i> , 2001    |
| Hemocytes ( <i>C. virginica</i> )   | Lipofection                 | CMV                        | Buchanan <i>et al.</i> , 2001 |
| Larvae ( <i>C. virginica</i> )      | Electroporation lipofection | CMV/SV40 (No comparison)   | Buchanan <i>et al.</i> , 2001 |
| Heart Cells ( <i>C. gigas</i> )     | Lipofection                 | DHSP70 >CMV>SV40           | Boulo <i>et al.</i> , 1996    |
| Heart Cells ( <i>C. gigas</i> )     | Lipofection                 | Beta-Actin (No comparison) | Cadoret <i>et al.</i> , 1999  |
| Embryo Cells ( <i>C. gigas</i> )    | Retrovirus                  | MLVLR>RSV>DHSP70           | Boulo <i>et al.</i> , 2000    |
| Larvae ( <i>C. gigas</i> )          | Biolistic                   | DHSP70/CMV (No comparison) | Cadoret <i>et al.</i> , 1997  |
| Hemocyte ( <i>C. gigas</i> )        | Lipofection                 | SHSP70                     | Lactose <i>et al.</i> , 2001  |

\*CMV: cytomegalovirus early gene promoter; DHSP70: drosophila heat shock protein 70; MLVLR: murine leukemia virus long terminal repeat; SHSP70: snail heat shock protein 70; RSV: rous sarcoma virus long terminal repeat; SV: simian virus early promoter 40.

Chatakonli *et al.*, 2002)、CMV 起動子表達抗菌蛋白基因 (Sarmakik *et al.*, 2002; Dunham *et al.*, 2002)、生長荷爾蒙基因 (Martinez *et al.*, 2000) 及碳水化合物代謝酵素基因 (Pitkanen *et al.*, 1999)。這些結果間接顯示 RSV 及 CMV 起動子效率優於 SV40 起動子效率。

在其它脊椎動物基因轉殖研究中，無論在淋巴細胞株包括 CEM、Jurkat、ST-F10、REH、SMS-SB 及 C3P (Zarrin *et al.*, 1999; Sutherland and Williams 1997) 或非淋巴細胞株包括 CV-1, CHO, HeLa, NH/3T3 (Cornelia *et al.*, 1982) 及 K-562 (Keating *et al.*, 1990)，都顯示出 RSV 起動子效率顯著高於 CMV 起動子及與 CMV 起動子無顯著差異，而且 RSV 及 CMV 起動子效率皆顯著高於 SV40 起動子效率。在陸上動物活體基因轉殖，RSV 及 CMV 起動子已被廣泛應用 (Wheeler *et al.*, 2003)。

造成不同起動子在相同細胞內效率差異之主要原因在於起動子上之 DNA 序列 (transcription element) 及細胞內之轉錄因子 (transcription factor)，起動子上會影響轉錄效率之 DNA 序列可分為轉錄增進子 (enhancer) 及轉錄抑制子 (repressor)，而其是否能增進或抑制起動子轉錄效率取決於細胞內之是否有相對應及適當量之轉錄因子與之結合。基於此原理，控制起動子效率研究可由兩方面著手：第一，同時混合多種起動子

序列，組成人工起動子以期能在多種之細胞內作用，而仍保有或增進其效率，例如海鹿貝 (*Aplysia kurodai*) 神經細胞基因轉殖研究中發現，RSV、CMV 及 SV40 起動子幾乎無法作用，然而為了研究外來基因功能，而以在一般細胞中效率較高之 RSV 起動子為核心再加上轉錄增進子 (enhancer)，結果發現含有四、八及十二個 AP-1 轉錄增進子之序列皆能明顯增進起動子效率。其中含有八個 AP-1 轉錄增進子其效率比不含 AP-1 轉錄增進子之 RSV 起動子高 192 倍 (Kanng 1996)。在哺乳類研究亦發現 SV40、human beta-actin 及 ubiquitin C 起動子之序列所合成之起動子無論在 HiB5 與 ARPE-19 細胞株中，其效率可增加達 10 倍 (Tornoe *et al.*, 2002)。第二，調節細胞內轉錄因子，即根據使用之起動子所需之轉錄因子，使細胞增加或減少表達該轉錄因子以控制起動子效率例如 Yaghmai and Cutting (2002) 將 VP16 或 P65 正轉錄因子與鋅指形蛋白質結合並增加此重組蛋白基因在 Hela 細胞株及 CRL8805 細胞株的表達，而使 RSV, CMV 及 SV40 起動子在上述細胞株之效率增加 5 倍以上。

## 結 論

在牡蠣幼生中 RSV 及 CMV 起動子屬於高效

率起動子，而 SV40 起動子則屬於低效率起動子，在魚類及其它脊椎動物基因轉殖研究中亦發現相同之趨勢，本研究結果提供基因轉殖之前可依效率排序來選擇適合實驗目的之起動子，即可作為基因轉殖及表現重組蛋白質時選擇起動子之參考依據。

## 參考文獻

- Benoist, C. and P. Chambon (1981) In vivo sequence requirements of the SV40 early promoter region. *Nature*, 290: 304-310.
- Bearzotti, M., E. Perrot., C. Michard-Vanhee., G. Jolivet, J. Attal, M. C. Theron, C. Puissant, M. Dreano, J. J. Kopchick and R. Powell (1992) Gene expression following transfection of fish cells. *J Biotechnol.*, 6: 315-325.
- Betancourt, O. H., J. Attal, M. C. Theron, C. Puissant and L. M. Houdebine (1993) Efficiency of introns from various origins in fish cells. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 2: 181-188.
- Boshart, M., F. Weber, G. Jahn, K. Dorsch-Hasler, B. Fleckenstein and W. Schaffner (1985) A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. *Cell*, 41: 521-530.
- Boulo, V., J. P. Cadoret, M. F. Le, G. Dorange and E. Mialhe (1996) Transient expression of luciferase reporter gene after lipofection in oyster (*Crassostrea gigas*) primary cell cultures. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 5: 167-174.
- Boulo, V., J. P. Cadoret, H. Shike, C. Shimizu, A. Miyahara and J. C. Burns (2000) Infection of cultured embryo cells of the pacific oyster, (*Crassostrea gigas*), by pantropic retroviral vectors. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.*, 36: 395-399.
- Buchanan, J. T., A. D. Nickens, R. K. Cooper and T. R. Tiersch (2001) Transfection of eastern oyster (*Crassostrea gigas*) embryos. *Mar. Biotechnol. (NY)*, 3: 322-335.
- Buchanan, J. T., T. C. Cheng, J. F. La-Peyre, R. K. Cooper and T. R. Tiersch (2001) In Vivo Transfection of Adult Eastern Oysters *Crassostrea virginica*. *J. World Aquacult. Soc.*, 32: 286-299.
- Cadoret, J. P., V. Boulo, S. Gendreau and E. Mialhe (1997) Promoters from *Drosophila* heat shock protein and cytomegalovirus drive transient expression of luciferase introduced by particle bombardment into embryos of the oyster *Crassostrea gigas*. *J. Biotechnol.*, 56: 183-189.
- Cadoret, J. P., R. Debon, L. Cornudella, V. Lardans, A. Morvan, P. Roch and V. Boulo (1999) Transient expression assays with the proximal promoter of a newly characterized actin gene from the oyster (*Crassostrea gigas*). *FEBS Letters*, 460: 81-85.
- Cheng, T. C., J. F. La-Peyre, T. R. Tiersch and R. K. Cooper (2001) Evaluation of the function of snail heat shock protein 70 promoter in oyster ventricle cells. Presented at International Marine Biotechnology Symposium.
- Chourrout, D., B. Chevassus, F. Krieg, A. Happe, G. Burger and P. Renard (1986) Production of second generation triploid and tetraploid rainbow trout by mating tetraploid males and diploid females. Potential of tetraploid fish. *Theor. Appl. Genet*, 72: 193-206.
- Darnell, J. E. Jr (1982) Variety in the level of gene control in eukaryotic cells. *Nature*, 297: 365-371.
- Devlin, R. H., T. Y. Yesaki, C. A. Biagi, E. M. Donaldson, P. Swanson and W. K. Chan (1994) Extraordinary salmon growth. *Nature*, 371: 209-210.
- Du, S. J., Z. Y. Gong, G. L. Fletcher, M. A. Shears, M. J. King, D. R. Idler and C. L. Hew (1992) Growth enhancement in transgenic Atlantic salmon by the use of an "all fish" chimeric growth hormone gene construct. *Biotechnology (N Y)*, 10: 176-181.
- Dunham, R. A., N. Chatakondi, A. Nichols, T. T. Chen, D. A. Powers and H. Kucuktas (2002) Survival of F2 transgenic common carp (*Cyprinus carpio*) containing pRSVrtGH1 complementary DNA when subjected to low dissolved oxygen. *Mar. Biotechnol. (NY)*, 4: 323-327.
- Dunham, R. A., G. W. Warr, A. Nichols, P. L. Duncan, B. Argue, D. Middleton and H. Kucuktas (2002) Enhanced bacterial disease resistance of transgenic channel catfish *Ictalurus punctatus* possessing cecropin genes. *Mar. Biotechnol. (NY)*, 4: 338-344.
- Floch, V., M. P. Audrezet, C. Guillaume, E. Gobin, G. L. Bolch, J. C. Clement, J. J. Yaouanc, H. D. Abbayes, B. Mercier, J. P. Leroy, J. F. Abgrall and C. Ferec (1998) Transgene expression kinetics after transfection with cationic phosphonolipids in hematopoietic non adherent cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 1371: 53-70.
- Gilboa, E., M. Kolbe, K. Noonan and R. Kucherlapati

- (1982) Construction of a mammalian transducing vector from the genome of Moloney murine leukemia virus. *J. Virol.*, 44: 845-851.
- Gorman C. M., G. T. Gorman, M. C. Merlino, I. P. Willingham and H. H. Bruce (1982) The Rous sarcoma virus long terminal is a strong promoter when introduced into a variety of eukaryotic cells by DNA-mediated transfection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79: 6777-6781.
- Kanng, B. K. (1996) Neuronal expression of report genes in the intact nervous system of *Aplysia*. *Mol. Cell*, 6: 285-295.
- Keating, A., W. Horsfall, R. G. Hawley and F. Toneguzzo (1990) Effect of different promoters on expression of genes introduced into hematopoietic and marrow stromal cells by electroporation. *Exp. Hematol.*, 18: 99-102.
- Lacoste, A., De. M. Cian, A. Cuffe and S. A. Poulet (2001) Noradrenaline and  $\alpha$ -adrenergic signaling induce the hsp70 gene in mollusc immune cells. *J. Cell Sci.*, 114: 3557-3564.
- Martinez, R., J. Juncal, C. Zaldivar, A. Arenal, I. Guillen, V. Morera, O. Carrillo, M. Estrada, A. Morales and M. P. Estrada (2000) Growth efficiency in transgenic tilapia (*Oreochromis* sp.) carrying a single copy of an homologous cDNA growth hormone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 267: 466-472.
- Norton, P. A. and J. M. Coffin (1987) Characterization of Rous sarcoma virus sequences essential for viral gene expression. *J. Virol.*, 61: 1171-1179.
- Pitkanen, T. I., A. Krasnov, H. Molsa and M. Reinisalo (1999) Transfer and expression of glucose transporter and hexokinase gene in salmonid fish. *Aquaculture*, 173: 319-332.
- Sarmasik, A., G. Warr and T. T. Chen (2002) Production of transgenic medaka with increased resistance to bacterial pathogens. *Mar. Biotechnol.* (NY), 4: 310-322.
- Stuart, G. W., J. V. McMurray and M. Westerfield (1988) Replication, integration and stable germ-line transmission of foreign sequences injected into early zebrafish embryos. *Development*, 103: 403-412.
- Subramanian, S and F. Srienc (1996) Quantitative analysis of transient gene expression in mammalian cells using the green fluorescent protein. *J. Biotech.*, 49: 137-151.
- Sutherland, L. C. and G. T. Williams (1997) Viral promoter expression in CEM-C7 and Jurkat human T-lymphoid cell lines. *J. Immunol. Methods*, 207: 179-83.
- 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., C. H. Lai and H. S. Yang (1997) Sperm as a carrier to introduce an exogenous DNA fragment into the oocyte of Japanese abalone (*Haliotis divorsicolor supertexta*). *Transgenic Res.*, 6: 85-95.
- Wheeler, M. B., E. M. Walters and S. G. Clark (2003) Transgenic animals in biomedicine and agriculture: outlook for the future. *Anim. Reprod. Sci.*, 79: 265-289.
- Yaghmai, R. and G. R. Cutting (2002) Optimized regulation of gene expression using artificial transcription factors. *Mol. Ther.*, 5: 685-694.
- Zarrin, A. A., L. Malkin, I. Fong, K. D. Luk, A. Ghose and N. L. Berinstein (1999) Comparison of CMV, RSV, SV40 viral and  $\lambda$ 1 cellular promoters in B and T lymphoid and non-lymphoid cell lines. *Biochim. Biophys. Acta.*, 7: 135-139.

## Comparison of Heterologous Promoter Efficiency in Oyster (*Crassostrea gigas*) Larvae

Ta-Chih Cheng<sup>1\*</sup>, Shih-Yao Lu<sup>2</sup>, Chun-Pei Wu<sup>3</sup> and Min-Nan Lin<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Aquaculture Division, and <sup>4</sup> Mariculture Research Center, Fisheries Research Institute

<sup>2</sup> Department of Aquaculture, and <sup>3</sup> Department of Food Sciences, National Taiwan Ocean University

### ABSTRACT

High-efficiency promoters are necessary for the study of functions of foreign genes *in vivo* and *in vitro*. A sperm-mediated gene transfer technique was used to deliver a luciferase vector containing a cytomegalovirus (CMV), rous sarcoma virus (RSV), or simian virus 40 (SV40) promoters into oyster (*Crassostrea gigas*) eggs for comparison of promoter efficiency in larvae. We found that the RSV promoter began to function 16 h after fertilization, which was significantly earlier than the CMV and SV40 promoters. No significant difference in promoter efficiency was found between the RSV and CMV promoters, while the efficiency of the SV40 promoter was significantly lower than those of the RSV and CMV promoters at 24 and 32 h after fertilization. Based on the timing and strength of the promoters, the RSV promoter is better than the CMV promoter, and the CMV promoter is better than the SV40 promoter. This is the first report regarding comparisons of the efficiencies of the CMV, RSV, and SV40 promoters in oyster larvae. The results of this study may become important guidelines for the selection of a promoter for transgenic studies such as recombinant protein expression in the oyster. Further studies to obtain high-efficiency promoters for oyster larvae can use a synthesis of artificial promoters or cloning of homologous promoters. However, a comparison of the promoters' efficiency must be conducted before transgenic studies are carried out.

**Key words:** oyster, *Crassostrea gigas*, promoter, transgenic, electroporation

---

\*Correspondence: Aquaculture Division, Fisheries Research Institute, 199 Hou-lh Road, 202 Keelung, Taiwan. TEL: (02) 2462-2101; FAX: (02) 2462-8138; E-mail: tccheng@mail.tfrin.gov.tw