

เอกสารอ้างอิง

- Adams, R.L.P. , and Bordon, R.H. 1985. Molecular biology of DNA methylation. New york: Springer-Verlag.
- . R.L.P., 1990. DNA methylation : The effect of minor on bases on DNA-protein interactions. Bioc J. 265 : 309-320.
- Amasino, R.M., Powell, A.L.T., Gordon, M.P. 1984. Changes in T-DNA methylation and expression are associated with phenotype variation and plant regeneration in a crown gall tumor line. Mol Gen Genet 197 : 437-446.
- Antequera , F. , and Bird , P.B. 1988. Unmethylation CpG islands associated with genes in higher plant DNA. EMBO J. 7 : 2295-2299.
- Arnholdt-Schmitt, B., Holzapfel, B., Schillinger, A., and Neumann, K-H. 1991. Variable methylation and differential replication of genomic DNA in cultured carrot root explants during growth induction as influenced by hormonal treatments. Theor. appl. Genet. 82 : 283-288.
- Bezdek, M., Koukalova, B., Brzohohaty, B., and Vyskot, B. 1991. 5- Azacytidine - induced hypomethylation of tobacco HRS 60

- tandam DNA repeats in tissue culture. Planta 184 : 487-490.
- Bezdek, M., Koukalova, B., Kuhrova, V., and Vyskot, B. 1992. Differential sensitivity of CG and CCG DNA sequences to ethionine - induced hypomethylation of the *Nicotiana tabacum* genome. FEBS 300 (3) : 268-270.
- Bianchi, M.W., and Viotti, A. 1988. DNA methylation and tissue specific transcription of storage protein genes in maize. Plant Mol. Biol. 11 : 203-214.
- Bird, A.P. 1986. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. Nature 321 : 209-213.
- . 1987. CpG islands as gene marker in vertebrate nucleus. Trends Genet. 3 : 324-347.
- Boehm, T., and Drahovsky, D. 1981. Evoluated transcriptional complexity and decrease in enzymatic DNA methylation in cell treated with L-ethionine. Cancer Res. 41 : 4101-4106.
- Brettel, R.I.S., and Dennis, E.S. 1991. Reactivation of a silent *Ac* following tissue culture is associated with heritable alterations in its methylation pattern. Mol Gen Genet 229 : 365-372.
- Brown, P.T.H. 1989. DNA methylation in plants and its role in tissue culture. Genome 31 : 717-729.
- Budar, F., Thai-Toong, L., Van Montagu, M., and Hernalsteen, J.P. 1986. *Agrobacterium* - mediated gene transfer results mainly in transgenic plants transmitting T-DNA as a single mendelian

- factor. Genetics. 114 : 303-310.
- Cedar, H. 1984. DNA methylation and gene expression. In : DNA methylation, Biochemistry and biological significance (Razin, A., Cedar, H., and Riggs, A.D. eds.) New York:Spinger-Verlag. 147-167.
- Cedar, H. 1988. DNA methylation and gene activity. Cell 53 : 3-4.
- Cedar, H., and Razin, A. 1990. DNA methylation and development. Biochemica et Biophysica Acta 1049 : 1-8
- Cherdshewasart, W. 1991a. Total DNA extraction-alternative protocols in : A Laboratory Guide for Cellular and Molecular Plant Biology (I. Negrutiu and G.B Ghart - Chhetri eds. Brikhauser Verlag, AG. Basel/Switzerland.). 4 : 161-166.
- . 1991b. Southern blot analysis of transgenic *Nicotiana* sp. in : A Laboratory Guide for Cellular and Molecular Plant Biology (I. Negrutiu and G.B Ghart - Chhetri eds. Brikhauser Verlag, AG. Basel/Switzerland .). 4 : 214-224.
- . 1991c . Assessing methylation of inserted DNA by restriction with isochizomeric enzymes and inducing demethylation with 5-azacytidine. in : A Laboratory Guide for Cellular and Molecular Plant Biology (I. Negrutiu and G.B Ghart - Chhetri eds. Brikhauser Verlag , AG. Basel/Switzerland.). 4 : 277-286.
- Cherdshewasart, W., Gharti-Chhetri, G.B., Saul, M.W., Jacobs, M., and Negrutiu, I. 1993. Expression instability and genetic

- disorders in transgenic *Nicotiana plumbaginifolia* L. plants. Transgenic Research 2 : 307-320.
- Cox, R. 1980. DNA methylase inhibition *in vitro* by N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine. Cancer Res. 40 : 61-63.
- Creusot, F., Aes. G., and Christman, J.K. 1982. Inhibition of DNA methyltransferase and induction of Friend erythroleukemia cell differentiation by 5-azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine. J. Biol. Chem. 257 : 2041-2074.
- David, E., Garfin-Howard, M.G. 1974. Nucleotide sequence at the cleavage of two restriction endonuclease from *Hemophilus parainfluenzae*. Biochemical and Biophysical Research Communication 59 (1): 108-116.
- De Block, M., Hersera - Esterella, L., Van Montagu, M., Schell, J., and Zambryski, P. 1984. Expression of foreign genes in regenerated plants and progeny. EMBO J. 3 : 1681-1689.
- Delsny, M., Loroche, M., Penon, P. 1984. Methylation pattern of radish (*Raphanus sativus*) nuclear ribosomal RNA genes. Plant Physiol 76 : 627-632.
- Doerfler, W., Toth, M., Kochanek, S., Achten, S., Freisen-Rabien, U., Behn-Krappa, A., and Orend, G. 1990. Eukarotic DNA methylation : facts and problems. FEBS 268 (2) : 329-333.
- Durante, M., Geri, G., and Ciomei, M. 1982. DNA methylation in differentiating plant pith tissue. Experientia 38 : 451-452.

- Ehrlich, M., Zhang, X-Y., and Wang, R.Y.H. 1985. in Biochemistry and Biology of DNA methylation (Cantoni, G.L., and Razin, A., eds.) 255-269. Alan R, Liss, New York.
- Flavell, R.B. 1986. The structure and control of gene expression of ribosomal RNA genes. Oxford Surv. Plant mol. Cell Biol. 3 : 251-274.
- Gharti-Chhetri, G.B., Cherdshewasart, W., Dewulf, J., Paszkowski, J., Jacobs, M., and Negrutiu, I. 1990. Hybrid genes in to analysis of transfoemation condition.3. Temporal/spatial fate of NPTII gene integration, its inheritance and factors affecting these process in *Nicotiana plumbaginifolia* . Plant Mol Biol. 14 : 687-690.
- Gharti-Chhetri, G.B., Cherdshewasart, W., Dewulf, J., Jacobs, M., and Negrutiu, I. 1992. Polyethylene glycol-mediated direct gene transfer in *Nicotiana* spp. Physiologia Plantarum 85 : 345-351.
- Giert, A., Lutticke, S., and Saedler, H. 1988. *Tnp A* product encoded by the transposable element En-1 of *Zea mays* is a DNA binding protein. EMBO J. 7 : 4045-4053.
- Gruenbaum, Y., Naven-Many, T., Cedar, H., and Razin, A.1981. Sequence specific of methylation in higher plant DNA. Nature 292 : 860-862.
- Hare, J.T., and Taylor, J.H. 1985. One role of DNA methylation in vetebrate cells in strand discremination in mismatch repair.

- Proc. Natl. Acad. USA 82 : 7350-7354.
- Hart, C.M., Fischer, B., Neuhaus, J.M., and Meins, Jr, F. 1992. Regulated inactivation of homologous gene expression in transgenic *Nicotiana sylvestris* plants containing a defence-related tobacco chitinase gene. Mol Gen Genet 235 : 179-188.
- Hepburn, A.G., Clarke, L.E., Pearson, L., and White, J. 1983. The role of cytosine methylation in the control of nopaline synthase gene expression in a plant tumor. Mol Apply Genet 2 : 315-329.
- Hepburn, A.G., Belanger, F.C., Matteis, J.R. 1987. DNA methylation in plants. Dev Genet 8 : 475-493.
- Herskovitz, M., Gruenbaum, Y., Zakai, N., and Loyter, A. 1989. Gene transfer in plant protoplast ; inhibition of gene activity by cytosine methylation and expression of single-strand DNA constructs. FEBS 253 (1,2) : 167-172.
- Holliday, R. 1987. The inheritance of epigenetics defects. Science. 238 : 163-170.
- . R. 1989. A different kind of inheritance. Scientific American 260 (6) : 40-48.
- Hooykass-Van Slogteren, G.M.S., Hooykass, P.J.J., and Schilperoort, R.A. 1984. Expression of Ti plasmid genes in monocotyledenous plants infected plants with *Agrobacterium tumefaciens* . Nature 311 : 763-764.
- Horsch, R.B., Fry, J.E., Hoffmann, N.L., Eichholtz, D., Rogers,

- S.G., and Fraley, R.T. 1985. A simple and general method for transferring gene into plants. Science 227 : 1229-1231.
- Hsiao, W.-L.W., Gattioni-Celli, S., and Weinstein, I.B. 1985. Effect of 5-azacytidine on the progressive nature of cell transformation. Mol. Cell Biol. 5 : 1800-1803.
- John, M.C., and Amasino, R.M. 1989. Extensive change in DNA methylation patterns accompany activation of a silent T-DNA *ipt* gene in *Agrobacterium tumefaciens* - transformed plants cells. Molecular and Cellular Biology : 4298-4303.
- Jones, P.A. 1985. Altering gene expression with 5-Azacytidine. Cell 40: 485-486.
- Jones, P.A., and Buckley, J.D. 1990. The role of DNA methylation in cancer. Adv. Cancer Res. 54 : 1-23.
- Kasten, M., Gowmans, B., and Lieberman, M. 1983. Methylation of deoxycytosine incorporated by excision-repair synthesis of DNA. Cell 30 : 509-516.
- Keshet, I., Lieman-Hurwitz, J., and Cedar, H. 1986. DNA methylation affects the formation of active chromatin. Cell 44 : 535-543.
- Klaas, M., John, M.C., Crowell, D.N., and Amasino, R.M. 1989. Rapid induction of genomic demethylation and T-DNA gene expression in plants cell by 5-azacytidine derivatives. Plant Molecular Biology 12 : 413-423.
- Linn. F., Heidmann, I., Saedler, H., and Meyer, P. 1990. Epigenetic

- changes in the expression of maize *A1* gene in *Petunia hybrida* : Role of numbers of integrated gene copies and state of methylation. Mol Gen Genet 222 : 329-336.
- Lo Schiavo, F., Pitto, L., Giuliano, G., Torti, G., Nuti-Ronchi, V., Marazziti, D., Vergara, R., Orselli, S., and Terzi, M. 1989. DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs. Theor. appl. Genet. 77 : 325-331.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J. 1982. Molecular Cloning : A Laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Matzke, M.A., Primig, M., Trnovsky, J., and Matzke, A.J.M. 1989. Reversible methylation and inactivation of marker genes in sequentially transformed tobacco plants. EMBO J. 8 (3) : 643-649.
- McClelland, M., and Nelson, M. 1988. The effect of site-specific DNA methylation on restriction endonuclease and DNA modification methyltransferase - a review. Genet. 74 : 291-304.
- Meyer, P., Linn, F., Heidmann, I., Meyer Z.A., H., Niednhof, I., and Saedler, H. 1992. Endogenous and environmental factors influence 35S promoter methylation of a maize *A1* gene construct in transgenic petunia and its colour phenotype. Mol Gen Genet 233 : 53-64.



- Mittelsten Scheid, O., Paszkowski, J., and Potrykus, I. 1991. Reversible inactivation of a transgene in *Arabidopsis thaliana*. Mol Gen Genet 228 : 104-112.
- Mohandas, T., Sparkes, R.S., and Shapiro, L.J. 1981. Reactivation of an inactive human X chromosome : evidence for X inactivation by DNA methylation. Science . 211 : 393-396.
- Monk. M. 1988. Genomic imprinting. Genes Dev. 2 : 921-925.
- Murashige, T., and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant J. 15: 473-497.
- Negrutiu, I., Shillito, R., Potrykus, I., Biasini, G., and Sala, f. 1987. Hybrid genes in the analysis of transformation condition I. Setting up a simple method for direct gene transfer in plant protoplast. Plant Mol Biol. 8 : 363-373.
- Nelsen-Salz, B., and Doring, H-P. 1990. Rare de novo methylation within the transposable element *Activator(Ac)* in transgenic tobacco plants. Mol Gen Genet 223 : 87-96.
- Ngernprasirtsiri, J., Macherel, D., Kobayashi, H., and Akazawa, T. 1988a. Expression of amyloplast and chloroplast DNA in suspension cultured cells of sycamore ( *Acer pseudoplatanus* L.). Plant Physio. 86 : 137-142.
- Ngernprasirtsiri, J., Harinasut, P., Macherel, D., Strzalka, K., Takabe, T., Akazawa, T., and Kojima, K. 1988b. Isolation and characterilization of the amyloplast envelope-membrane from

- cultured white-wild cells of sycamore (*Acer pseudoplatanus* L.). Plant Physiol. 87 : 371-378.
- Ngernprasirtsiri, J., Kobayashi, H., and Akazawa, T. 1988c. DNA-methylation occurred around lowly expressed gene of plastid DNA during tomato fruit development. Plant Physiol. 88 : 16-20.
- . 1988d. DNA - methylation as a mechanism of transcriptional regulation in nonphotosynthetic plastids in plant cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 : 4750-4754.
- . 1989. Transcriptional regulation and DNA methylation of nuclear genes for photosynthesis in nongreen plant cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 : 7919-7923.
- Nick, H., Bowen, B., Ferl, R.J., and Gilbert, W. 1986. Detection of cytosine methylation in maize alcohol dehydrogenase gene by genomic sequencing. Nature 319 : 234-246.
- Olmedilla, A., Delcasso, D., and Delseny, M. 1984. Methylation pattern of nuclear ribosomal RNA genes from rice (*Oryza sativa*). Plant Sci. Lett. 37 : 132-127.
- Otten, L., De Greve, H., Hernaslteens, J.-P., Van Montagu, M., Schieder, O., Stanb, J., and Schell, J. 1981. Mendelian transmission of gene introduced into plants by the Ti-plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. Mol. Gen. Genet 183 : 209-213.
- Palmgren, G., Mattsson, O., and Okkels, T. 1991. Specific levels of

- DNA methylation in various tissues, cell lines, and cell types of *Daucus carota*. Plant Physiol. 95 : 174-178.
- Pietrzak, M., Shillito, R.D., Hohn, T., and Potrykus, I. 1986. Expression in plants of two bacterial antibiotic resistance genes after protoplast transformation with a new plant expression vector. Nucl. Acid Res. 14 : 5857-5868.
- Potrykus, I., Paskowski, J., Petruska, J., Saul, M.W., and Shillito, R.D. 1985. Molecular and general genetics of a hybrid foreign gene introduced into tobacco by direct gene transfer. Mol Gen Genet 199 : 169-177.
- Quemada, H., Roth, E.J., and Lark, K.G. 1987. Changes in methylation of tissue cultured soybean cells detected by digestion with restriction enzyme HpaII and MspI . Plant Cell Reports 6 : 63-66.
- Razin, A., and Cedar, H. 1991. DNA methylation and gene expression. Microbiological Reviews. 55(3) : 451-458.
- Renken, S., De Greve, H., Van Montagu, M., and Hernalsteens, J-P. 1992. *Petunia* plants escape from negative selection against a transgene by silencing the foreign DNA via methylation. Mol Gen Genet 233 : 53-64.
- Sanger, R., Sano, H., Grabowy, C.T. 1984. Control of material inheritance by DNA methylation in *Chlamydomonas*. In: Trautner TA (eds.) Methylation of DNA. Springer-Verlag : New york 157-172.

- Sano, H., Lamada, I., Youssefian, S., and Wabiko, H. 1989. Correlation between DNA undermethylation and dwarfism in maize. Biochem Biophys Acta 1009 : 35-38.
- Sano, H., Kamada, I., Youssefian, S., Katsumi, M., and Wabiko, H. 1990. A single treatment of rice seedling with 5-azacytidine induce heritable dwarfism and undermethylation of genomic DNA. Mol Gen Genet 220 : 441-447.
- Sano, H., and Youssefian, S. 1991. A novel *ras* related *rpg1* gene encoding a GTP-binding protein has reduced expression in 5-azacytidine-induced dwarf rice. Mol Gen Genet 228 : 227-232.
- Santi, D.V., Garrett, C.E., and Barr, P.J. 1983. On the mechanism of inhibition of DNA - cytosine methyltransferase by cytosine analog. Cell 33 : 9-10.
- Sardana, R., O'Dell, M., and Flavell, R. 1993. Correlation between the size of the intergenic regulatory region, the status of cytosine methylation of rRNA genes and nucleolar expression in wheat. Mol Gen Genet 236 : 155-162.
- Steele-Scott, N., Kavanagh, T.A., Trimmis, J.N. 1984. Methylation of rRNA genes in some higher plants. Plant Sci. Lett. 35 : 213-217.
- Stein, R., Sciaky-Gallili, N., Razin, A., and Cedar, H. 1983. Pattern of methylation of two genes coding for housekeeping functions. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80 : 2422-2426.
- Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequence among DNA

- fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98: 503-518.
- Vergara, R., Verde, F., Pitto, L., Lo Schiavo, F., and Terzi, M. 1990. Reversible variations in the methylation pattern of carrot DNA during somatic embryogenesis. Plant Cell Rep. 8 : 697-700.
- Voet, D., and Voet, J.D. 1990. DNA methylation : In Biochemistry. ( Stiefel, J. eds. Wiley and Son ) New York : 982-983.
- Vyskot, B., Gazdova, B., and Siroky, J. 1993. Methylation pattern of two repetitive DNA sequences in tobacco tissue cultures and their regenerants. Biological Plantarum 35(3): in press.
- Waalwijk, C., and Flavell, R.A. 1987. MspI, an Isochizomer of HpaII which cleaves both unmethylated and methylated HpaII sites. Nucleic Acids Research 5 (9) : 3231-3236.
- Wang, Y-C., Klein, T.M., Fromm, H., Cao, J., Sanford, J.C., and Wu, R. 1988. Transient expression of foreign gene in rice, wheat and soybean cells following particle bombardment. Plant Mol Biol. 11 : 433-439.
- Watson, J.C., Kaufman, L.S., and Thompson, W.R. 1987. Developmental regulation of cytosine methylation in nuclear ribosomal RNA genes of *Pisum sativum*. J. Mol. Biol. 193 : 15-26.
- Weber, H., Graessmann, A. 1989. Biological activity of hemimethylated and single-strand DNA after direct gene transfer into tobacco protoplasts. FEBS 253 : 163-166.

- Weber, H., Ziechmann, C., and Graessmann, A. 1990. *In vitro* DNA methylation inhibits gene expression in transgenic tobacco. EMBO J. 9 : 4409-4415.
- Weissbach, A., Ward, C., and Bolden, A. 1990. Eukaryotic DNA methylation and gene expression. Curr. Top. Cell Regul. 30 : 1-21.
- Wilson, V., and Jones, P.A. 1983. Inhibition of DNA methylation by chemical carcinogens *In vitro*. Cell 32 : 239-246.
- Youssoufian, H., Kazazian, H.H.Jr., Philips, D.G., Aronis, S., Tsiftis, G., Brown, V.A., and Antonarakis, S.E. 1986. Recurrent mutations in haemophilia A give evidence for CpG mutation hotspots. Nature 324 : 380-382.
- Zambryski, P., Tempe, J., and Schell, J. 1989. Transfer and function of T-DNA genes from *Agrobacterium* Ti and Ri plasmids in plants. Cell 56 : 193-201.

ภาคผนวก

**สารเคมีและวิธีการเตรียม**

1) 5 M NaCl

NaCl	292.2	g
น้ำกลั่น	800	ml
ปรับปริมาตรให้เป็น	1000	ml

นำไปทำให้ปราศจากนิวคลีเอสด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121° ซ ,  
เป็นเวลา 15 นาที

2) 0.5 M Na<sub>2</sub>EDTA pH 8.0

Na <sub>2</sub> EDTA	186.1	g
น้ำกลั่น	800	ml

ปรับ pH เป็น 8.0 ด้วย NaOH ประมาณ 20 g  
นำไปทำให้ปราศจากนิวคลีเอสด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121° ซ ,  
เป็นเวลา 15 นาที

3) 1 M Tris-HCL pH 8.0

Tris-base	121.1	g
น้ำกลั่น	800	ml

ปรับ pH ตามที่ต้องการด้วย Conc HCl

pH 7.5 เติม Conc HCl ประมาณ 65 ml

pH 8.0 เติม Conc HCl ประมาณ 42 ml

ปรับปริมาตรให้เป็น 1000 ml

นำไปทำให้ปราศจากนิวคลีเอสด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121° ซ ,  
เป็นเวลา 15 นาที

4) 4.4 M Ammonium acetate pH 5.2

deionized water 105 ml

glacial acetic acid 50 ml

ammonium hydroxide 45 ml

5) Phenol

หลอม phenol ที่อุณหภูมิ 68° ซ เติม 8-hydroxyquinoline ให้มีความเข้มข้น  
สุดท้ายเป็น 0.1% สกัดด้วย 1 M Tris-HCl pH 8.0 เท่าปริมาตร คูดขึ้นบนทั้ง สกัดซ้ำด้วย  
0.1 M Tris-HCl pH 8.0 เท่าปริมาตร คูดขึ้นบนทั้ง เติม 0.2 %  $\beta$ -mercaptoethanol  
เติม TE เก็บในขวดสีชา เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4° ซ

6) TE buffer pH 8.0

1 M Tris-HCl pH 8.0 10 ml

0.5 M Na<sub>2</sub>EDTA pH 8.0 2 ml

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปลอดนิวคลีเอสเป็น 1000 ml



7) 5 M NaOH

NaOH	40	g
------	----	---

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปลอดนิวคลีเอสเป็น 200 ml

8) Ethidium bromide ( 10 mg/ml )

Ethidium bromide	0.10	g
------------------	------	---

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น	10	ml
-----------------------------	----	----

9) Tris-borate buffer ( 10 X )

Tris-base	108	g
-----------	-----	---

boric acid	55	g
------------	----	---

0.5 M Na <sub>2</sub> EDTA pH 8.0	40	ml
-----------------------------------	----	----

เติมน้ำกลั่น	800	ml
--------------	-----	----

ปรับ pH เป็น 8.3

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น	1000	ml
-----------------------------	------	----

10) 20 X SSC

NaCl	175.3	g
------	-------	---

Sodium citrate	88.2	g
----------------	------	---

เติมน้ำกลั่น	800	ml
--------------	-----	----

ปรับ pH เป็น 7.0

ปรับปริมาตรเป็น	1000	ml
-----------------	------	----

นำไปทำให้ปราศจากนิวคลีเอส ด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121° ซ,

เป็นเวลา 15 นาที

11) Denaturation solution

NaCl	87.66	g
NaOH	20	g
ปรับปริมาตรเป็น	1000	ml

นำไปทำให้ปราศจากนิวคลีเอส ด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121° ซ,  
เป็นเวลา 15 นาที

12) Neutralization solution

NaCl	87.66	g
Tris-HCl	60.55	g
ปรับ pH เป็น 7.2 ด้วย Conc HCl		
ปรับปริมาตรเป็น	1000	ml

นำไปทำให้ปราศจากนิวคลีเอส ด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121° ซ,  
เป็นเวลา 15 นาที

13) Depurination solution

Conc HCl (37 %)	20.72	ml
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปลอดนิวคลีเอสเป็น	1000	ml

14) 10 % SDS pH 7.2

Sodium dodecyl sulfate	100	g
น้ำกลั่น	800	ml
ปรับ pH เป็น 7.2 ด้วย HCl		
ปรับปริมาตรเป็น	1000	ml

15) 2 X SSC

20 X SSC	100	ml
----------	-----	----

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปลอดนิวคลีเอสเป็น 1000 ml

16) 2 X SSC+0.5 % SDS

10 % SDS	50	ml
----------	----	----

20 X SSC	100	ml
----------	-----	----

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปลอดนิวคลีเอสเป็น 1000 ml

17) 0.2 X SSC+0.5 % SDS

10 % SDS	50	ml
----------	----	----

2 X SSC	10	ml
---------	----	----

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปลอดนิวคลีเอสเป็น 1000 ml

18) 0.3 % Orange-G in 0.5 M Na<sub>2</sub>EDTA pH 8.0

Orange-G	0.3	g
----------	-----	---

0.5 M Na <sub>2</sub> EDTA pH 8.0	100	ml
-----------------------------------	-----	----

19) T<sub>10</sub>E<sub>1</sub>NaCl<sub>50</sub> buffer

1 M Tris-HCl pH 8.0	10	ml
---------------------	----	----

0.5 M Na <sub>2</sub> EDTA pH 8.0	2	ml
-----------------------------------	---	----

5 M NaCl	10	ml
----------	----	----

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปลอดนิวคลีเอสเป็น 1000 ml

20) Prehybridization solution

sheared salmon sperm DNA (20 mg/ml)	1.25	ml
5 M NaCl	3.5	ml
1 M Tris-HCl pH 7.5	1	ml
0.5 M Na <sub>2</sub> EDTA pH 8.0	2	ml
10 % SDS	5	ml
skimmed milk	0.25	g
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปลอดนิวคลีเอสเป็น 50 ml		

21) 20 mg/ml Salmon Sperm DNA (type II; Sigma)

Salmon sperm DNA (Sigma type II)	0.30	g
เติม 1 N NaOH	5	ml

ต้มในน้ำเดือด 10 นาที เพื่อ denature DNA แล้วทำการ shear DNA

โดยการตัดผ่านเข็มฉีดยาขนาด 25-G (จนมีขนาดประมาณ 300 nucleotides)

เติม 2 M Tris-HCl	10	ml
-------------------	----	----

22) Urea extraction buffer (ปริมาตรสุทธิ 400 ml)

Urea	168	g
5 M NaCl	25	ml
1 M Tris-HCl pH 8.0	20	ml
0.5 M Na <sub>2</sub> EDTA pH 8.0	16	ml
20 % Sarkosyl	20	ml
น้ำกลั่นปลอดนิวคลีเอส	100	ml

23) 0.4 M NaOH

5 M NaOH	80	ml
----------	----	----

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปลอดนิวคลีเอสเป็น 1000 ml

24) 0.1 X SSC

20 X SSC	5	ml
----------	---	----

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปลอดนิวคลีเอสเป็น 1000 ml

25) 0.1 % SDS

10 % SDS	10	ml
----------	----	----

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปลอดนิวคลีเอสเป็น 1000 ml

26) 0.2 M Tris-HCl pH 7.5

2 M Tris-HCl pH 7.5	100	ml
---------------------	-----	----

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปลอดนิวคลีเอสเป็น 1000 ml

27) 2 M Tris-HCl pH 7.5

Tris- base	242.2	g
------------	-------	---

น้ำกลั่น	100	ml
----------	-----	----

ปรับ pH เป็น 7.5 ด้วย Conc HCl

ปรับปริมาตรเป็น	1000	ml
-----------------	------	----

นำไปทำให้ปราศจากนิวคลีเอส ด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121° C,

เป็นเวลา 15 นาที

28) 20 % Sarkosyl

N-Lauryl sarkosyl	20	g
น้ำกลั่น	50	ml
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปลอดนิวคลีเอสเป็น 100 ml		

29) Loading buffer

Glycerol	50	%
Bromphenol blue	0.1	%
Xylene cyanol	0.1	%

อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

30) สูตร MS (Murashige and skoog, 1962)

มีองค์ประกอบดังนี้

$\text{KNO}_3$	1900	mg/l
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1650	"
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	"
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	"
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	170	"
$\text{Na}_2\text{EDTA}$	37.23	"
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.95	"
$\text{MnSO}_4 \cdot 1\text{H}_2\text{O}$	22.30	"
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.60	"
$\text{H}_3\text{BO}_3$	6.20	"
KI	0.83	"
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25	"
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025	"
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025	"
Agar	8	g/l
Sucrose	30	g/l
pH 5.6		

โดยเตรียมจาก stock ดังนี้

- MS stock I (50 X)

$\text{NH}_4\text{NO}_3$	82.5	g/l
$\text{KNO}_3$	95.0	"

- MS stock II (100 X)

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	44.0	"
---	------	---

- MS stock III (50 X)

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	18.5	"
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	8.5	"

- Minor MS (100 X)

KI	83.0	mg/l
$\text{H}_3\text{BO}_3$	620.0	"
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2230.0	"
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	860.0	"
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	25.0	"
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	2.5	"
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2.5	"

- FeEDTA (100 X)

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.78	g/l
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3.73	"



- Vitamin MS (100 X)

Nicotinic acid	25.0	mg/l
Pyridoxine HCl	25.0	"
Thiamine HCl	5.0	"
Glycine	100.0	"

ให้ stock แต่ละตัวตามปริมาณดังนี้

MS stock I	20	ml/l
MS stock II	10	"
MS stock III	20	"
Minor MS	10	"
FeEDTA	10	"
Vitamin MS	10	"
เติมน้ำตาล	30	g/l
Agar	8	"

pH 5.6

นำไปทำให้ปราศจากเชื้อ ด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121° ซ,

เป็นเวลา 15 นาที

## ประวัติผู้เขียน

นางสาว นุจรี สุวรรณมังกุล เกิดวันที่ 9 กุมภาพันธ์ พ.ศ.2513 เขตพญาไท จังหวัด  
กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี  
มหาวิทยาลัยขอนแก่น เมื่อปี พ.ศ.2534 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร  
มหาบัณฑิต หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ ที่จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปี พ.ศ.2534