การแสดงออกของเอ็นทีทีจีนที่ถูกยับยั้งด้วยเมทธิลเลชัน โดยการใช้ 5-อะซาไซติดีน

นางสาวนุจรี สุวรรณมังกูล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2537

ISBN 974-584-124-2

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I18810343

EXPRESSION OF NEOMYCIN PHOSPHOTRANSFERASE GENE BEING REPRESSED BY METHYLATION VIA THE APPLICATION OF 5-AZACYTIDINE

MISS NUDJAREE SUWANAMUNGKOOL

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Programe of Biotechnology

Graduate School

Chulalongkorn University

1994

ISBN 974-584-124-2

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การแสดงออกของเอ็นพีทีจีนที่ถูกยับยั้งด้วยเมทธิลเลชัน โดยการใช้ 5-อะซาไซติดีน
โดย	นางสาวนุจรี สุวรรณมังกูล
หลักสูตร	เทคโนโลยีทางชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.วิชัย เชิดชีวศาสตร์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ศาสตราจารย์ ดร.ถาวร วัชราภัย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพินิตน์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ ดร.วิชัย เชิดชีวศาสตร์)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.วิทยา ยศยิ่งยวด)

..... กรรมการ

(อาจารย์ ดร.บุรชัย สนธยานนท์)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

นุจรี สุวรรณมังกูล : การแสดงออกของเอ็นพีทีจีนที่ถูกยับยั้งด้วยเมทธิลเลชัน โดยการใช้ 5-อะซาไซติดีน (EXPRESSION OF NEOMYCIN PHOSPHOTRANSFERASE GENE BEING REPRESSED BY METHYLATION VIA THE APPLICATION OF 5-AZACYTIDINE) อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร.วิชัย เชิดชีวศาสตร์, 127 หน้า. ISBN 974-584-124-2

การศึกษาการแสดงออกของยีน Neomycin Phosphotransferase (NPT) ในประชากรเมล็ดรุ่น F_3 ของต้นยาสูบ (Nicotiana plumbaginifolia) ที่เจริญมาจากโคลนเดียวกัน พบว่ามีความแตกต่างในระดับการแสดงออก โดยมีเพียง 15.4% ที่ยังมีการแสดงออกของยีน NPT ในระดับปกติ ทำการตรวจสอบว่าปรากฏการณ์ดังกล่าวเกิดจากการสูญเสียยีนออกจากจีโนมพืชหรือไม่ โดยทำ Southern blot แล้วตรวจสอบด้วยการติดฉลากดีเอ็นเอ ผลปรากฏว่ายีนดังกล่าวยังคงมีอยู่เป็นปกติในพืช และเมื่อตรวจสอบด้วย isoschizomeric enzymes MspI/HpaII พบว่าเกิดการเติมหมู่อนุมูลเมทธิลที่ยีนดังกล่าว เมื่อให้สาร 5-azacytidine แก่เมล็ดพืชที่เกิดจากประชากรพืชทดลองกลุ่มนี้ พบว่า มีการกลับมาแสดงออกของยีนได้ใหม่ แต่ผลดังกล่าวไม่สามารถคงอยู่ในประชากรรุ่นต่อไป

ภาควิชา - ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2536 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

C426380 : MAJOR : BIOTECHNOLOGY
KEY WORD: DNA METHYLATION/ GENEINACTIVATION/ 5-AZACYTIDINE
NUDJAREE SUWANAMUNGKOOL : EXPRESSION OF NEOMYCIN PHOSPHOTRANS FERASE GENE BEING REPRESSED BY METHYLATION VIA THE APPLICATION OF 5-AZACYTIDINE. THESIS ADVISOR : ASSO. PROF. WICHAI CHERDSHEWASART, Ph.D. 127 PP. ISBN 974-584-124-2

NPT gene expression in F_3 generation of transgenic Nicotiana plumbaginifolia showed variation in gene expression, of 15.4% retained its expression. Southern blot analysis confirmed the presence of NPT gene. Isoschizomeric enzymes MspI/HpaII analysis confirmed the phenomenon of methylation of that gene. 5-azacytidine treatment of inactivated seeds resulted in reactivation of the gene but that level of expression could not retain in the next population.

ภาควิชา -- ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2536 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความกรุณา และความช่วยเหลือ อย่างดียิ่งจากบุคคลหลายฝ่าย ผู้เขียนใคร่ขอกราบขอบพระคุณและขอบคุณทุกท่านผู้มีรายนามต่อไปนี้

รองศาสตราจารย์ ดร.วิชัย เชิดชีวศาสตร์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อาจารย์ที่ปรึกษา ที่ให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำและแนวทางในการศึกษาวิจัย ตลอดจนช่วยแก้ไขอุปสรรค และปัญหาต่างๆ ด้วยความเอาใจใส่เสมอมา ตลอดระยะเวลาที่ผู้เขียนทำวิทยานิพนธ์เรื่องนี้

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ เลขานุการหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประธานกรรมสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. วิทยา ยศยิ่งยวด หัวหน้าภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อาจารย์ ดร. บุรชัย สนธยานนท์ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ภาควิชาชีววิทยา ภาควิชาพฤษศาสตร์ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์ด้านสถานที่ อุปกรณ์ และเครื่องมือ ในการทำงานวิจัย

นิสิตปริญญาโท หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีวเคมี ภาควิชาพฤษศาสตร์ และภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือต่างๆ และเป็นกำลังใจให้ผู้เขียน

ท้ายสุดนี้ผู้เขียนขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย ที่ให้การอุดหนุนทุนวิจัยในการทำวิทยานิพนธ์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... ง

บทคัดย่อภาษาไทย..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ฌ

สารบัญรูป..... ฑ

คำย่อ..... ฒ

บทที่

1. บทนำ..... 1

วัตถุประสงค์..... 19

2. วัสดุอุปกรณ์สารเคมีและวิธีทดลอง

2.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี..... 20

2.1.1 เครื่องมือ..... 20

2.1.2 พืชทดลอง..... 21

2.1.3 วัสดุอุปกรณ์สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช..... 21

2.1.4 วัสดุอุปกรณ์สำหรับการปลูกเลี้ยงพืชทดลอง..... 22

2.1.5 วัสดุอุปกรณ์สำหรับการสกัดดีเอ็นเอ..... 22

2.1.6 วัสดุอุปกรณ์สำหรับการทำ Agarose Gel Electrophoresis..... 23

2.1.7 วัสดุอุปกรณ์สำหรับการทำ Southern Blot..... 23

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ หน้า

2.1.8 วัสดุอุปกรณ์สำหรับการทำ Prehybridization, Hybridization และ Autoradiograph..... 23
2.1.9 สารเคมีสำหรับการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช..... 24
2.1.10 สารเคมีสำหรับการฆ่าและกำจัดเชื้อ..... 24
2.1.11 สารเคมีสำหรับการลดระดับการเติมหมู่อนุมูลเมทธิลที่เบส cytosine..... 24
2.1.12 สารเคมีสำหรับการสกัดดีเอ็นเอ..... 25
2.1.13 สารเคมีสำหรับการทำ Agarose Gel Electrophoresis..... 25
2.1.14 สารเคมีสำหรับการทำ Southern Blot..... 25
2.1.15 สารเคมีสำหรับการทำ Prehybridization Hybridization และ Autoradiograph..... 26
2.1.16 สารเคมีสำหรับการตัดดีเอ็นเอ..... 26
2.1.17 ดีเอ็นเอมาตรฐาน..... 27
2.1.18 เครื่องแก้วและสารละลาย..... 27
2.2 ขั้นตอนการวิจัย..... 27
2.2.1 ศึกษาการจำแนกระดับของการเกิดการยับยั้งการแสดงออกของจีน NPT ในเมล็ดรุ่น R_3..... 27
2.2.2 ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ 5-azacytidine ในการกระตุ้นการแสดงออกของจีน NPT ที่ถูกยับยั้งการแสดงออก..... 29
2.2.3 ศึกษาการกระตุ้นการแสดงออกของจีน NPT ที่ถูกยับยั้งด้วย

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ หน้า

5-azacytidine..... 29

2.2.4 ศึกษาการแสดงออกของจีน NPT ในประชากรรุ่นต่อไป (R_4) ที่ถูกยับยั้งด้วย 5-azacytidine..... 29

2.2.5 ศึกษาดีเอ็นเอเปรียบเทียบก่อนและหลังการกระตุ้นด้วย 5-azacytidine..... 30

2.3 วิธีทดลอง..... 31

2.3.1 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสำหรับการเพาะเลี้ยงเมล็ดยาสูบในสภาพปลอดเชื้อ..... 31

2.3.2 การเพาะเลี้ยงเมล็ดยาสูบในสภาพปลอดเชื้อ..... 32

2.3.3 การศึกษาลักษณะต้นอ่อนในสารอาหารคัดเลือกกึ่งแข็งสูตร MS ผสมคานาไมซิน..... 32

2.3.4 การปลูกเลี้ยงพืชทดลองในเรือนต้นไม้..... 33

2.3.5 การศึกษา rooting test..... 33

2.3.6 การสกัดดีเอ็นเอ..... 33

2.3.7 การตรวจวัดปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอ..... 34

2.3.8 การทำ Agaroes Gel Electrophoresis..... 35

2.3.9 การตรวจสอบจีน NPT ในจีโนมิคดีเอ็นเอของพืชทดลอง โดยการตัดด้วย restriction enzyme; EcoRI..... 35

2.3.10 การจำแนกความแตกต่างของจีโนมิคดีเอ็นเอ โดยการตัดด้วย isoschizomeric enzymes; MspI,HpaII..... 36

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ หน้า

2.3.11 การทำ Southern Blot..... 37

2.3.12 การติดฉลากดีเอ็นเอโพรบด้วย α-^{32}P..... 38

2.3.13 การทำ Hybridization..... 38

2.3.14 การทำ Rehybridization..... 40

2.3.15 การทำ Serial dilution ของพลาสมิด pGP6 ตัดด้วย isoshizomeric enzymes; MspI,HpaII..... 41

3.ผลการทดลอง

3.1 การศึกษาเพื่อจำแนกระดับของการเกิด การยับยั้งการแสดงออกของจีน NPT ในเมล็ดรุ่น R_3..... 42

3.2 การศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ 5-azacytidine ในการกระตุ้นการแสดงออกของจีน NPT..... 50

3.3 ผลข้างเคียงของ 5-Azacytidine..... 53

3.4 การศึกษาการกระตุ้นการแสดงออกของจีน NPT ที่ถูกยับยั้งด้วย 5-azacytidine..... 57

3.5 การศึกษาการแสดงออกของจีน NPT ในประชากรรุ่นต่อไป (R_4) ภายหลังได้รับการกระตุ้นด้วย 5-azacytidine..... 66

3.6 การศึกษาดีเอ็นเอเปรียบเทียบ ก่อนและหลังการกระตุ้นด้วย 5-azacytidine..... 71

3.6.1 Serial dilution ของพลาสมิด pGP6 ตัดด้วย isoschizomeric enzymes; MspI,HpaII..... 71

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ หน้า

3.6.2 การตรวจสอบจีน NPT ในจีโนมิคดีเอ็นเอของพืชทดลองรุ่น R_2..... 74

3.6.3 การตรวจสอบจีน NPT ในจีโนมิคดีเอ็นเอของพืชทดลองรุ่น R_3..... 78

3.6.4 การตรวจสอบระดับความแตกต่างของจีน NPT ในจีโนมิคดีเอ็นเอของพืชทดลองรุ่น R_2เมื่อตัดด้วย isoschizomeric enzymes; MspI, HpaII..... 81

3.6.5 การตรวจสอบระดับความแตกต่างของจีน NPT ในจีโนมิคดีเอ็นเอของพืชทดลองรุ่น R_3เมื่อตัดด้วย isoschizomeric enzymes; MspI, HpaII..... 86

4. วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง..... 91

เอกสารอ้างอิง.....102

ภาคผนวก.....116

สารละลายและวิธีการเตรียม.....116

อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.....124

ประวัติผู้เขียน.....127

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1 เปอร์เซ็นต์การเกิดดีเอ็นเอเมทธิลเลชันใน wheat-germ DNA ที่ลำดับเบส ต่างๆ.....4

2 อัตราส่วนจำนวนเมล็ดที่ต้านคานาไมซิน/ไม่ต้านคานาไมซิน ในสารอาหาร คัดเลือกกึ่งแข็ง MS ที่มีคานาไมซิน 100 mg/l และผลการจำแนกระดับ การเกิดการยับยั้งการแสดงออกของจีนในเมล็ดที่ได้จากการทำ selfing ของพืชทดลองในระยะ R_2 ที่กำเนิดมาจากโคลนเดียวกัน.....43

3 ผลการทดสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมของ 5-azacytidine ในการกระตุ้น การแสดงออกของจีน NPT ที่ถูกยับยั้งทั้งหมด.....51

4 เปรียบเทียบอัตราส่วนระหว่างจำนวนต้นที่ต้านคานาไมซิน/ไม่ต้านคานาไมซิน ในสารอาหารคัดเลือกกึ่งแข็ง MS ที่มีคานาไมซิน 50 mg/ml คานาไมซิน , 50 mg/ml คานาไมซิน + 100 μM 5- azacytidine , 100 mg/ml คานาไมซิน , 100 mg/ml คานาไมซิน + 100 μM 5-azacytidine ในพืชทดลองกลุ่มที่จีน NPT ถูกยับยั้งบางส่วน , จีน NPT ถูกยับยั้งทั้งหมด จีน NPT แสดงออกปกติ.....58

5 อัตราส่วนจำนวนเมล็ดที่ต้านคานาไมซิน/ไม่ต้านคานาไมซิน ของประชากรรุ่น R_4 ภายหลังการได้รับ 100 μM 5-Azacytidine ในกลุ่มของพืชทดลองที่ ผ่านการคัดเลือกในสารอาหารคัดเลือกที่มี 50 mg/l คานาไมซิน ร่วมกับ 100 μM 5-azacytidine.....67

6 อัตราส่วนจำนวนเมล็ดที่ต้านคานาไมซิน/ไม่ต้านคานาไมซิน ของประชากรรุ่น R_4 ภายหลังการได้รับ 100 μM 5-azacytidinecytidine ในกลุ่มของ

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

พืชทดลองที่ผ่านการคัดเลือกในสารอาหาร คัดเลือกที่มี 100 mg/l คานาไมซิน ร่วมกับ 100 μM 5-azacytidine.....68

7 ผลการศึกษาเปรียบเทียบ rooting test.....69

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

1 โครงสร้างของ 5-azacytosine..... 9

2 แสดง restriction map ของพลาสมิด pGP6..... 28

3 แสดง Southern blot transfer..... 39

4 การกระจายลักษณะ ที่ต้านคานาไมซิน/ไม่ต้านคานาไมซิน ของประชากรเมล็ดรุ่น R_3 ในสัดส่วนที่แตกต่างกัน..... 46

5 แสดงการกระจายลักษณะของจำนวนต้นที่ต้านคานาไมซิน / ไม่ต้านคานาไมซิน ในอัตราส่วน 1:0..... 47

6 แสดงการกระจายลักษณะของจำนวนต้นที่ต้านคานาไมซิน / ไม่ต้านคานาไมซิน ในอัตราส่วนที่ต่ำกว่า 3:1..... 48

7 แสดงการกระจายลักษณะของจำนวนต้นที่ต้านคานาไมซิน / ไม่ต้านคานาไมซิน ในอัตราส่วน 0:1..... 49

8 แสดงลักษณะการเกิดการยับยั้งการแสดงออกของจีน NPT อย่างสมบูรณ์ เปรียบเทียบกับตัวอย่างต้นอ่อนที่มีการแสดงออกของจีน NPT เป็นปกติ..... 52

9 แสดงลักษณะใบของตัวอย่างพืชที่ผิดปกติภายหลังได้รับสาร 5-azacytidine เทียบกับใบพืชตัวอย่างที่ปกติ..... 54

10 แสดงลักษณะลำต้นที่ผิดปกติภายหลังการได้รับสาร 5-azacytidine เทียบกับต้นปกติ..... 55

11 แสดงลักษณะดอกที่ผิดปกติภายหลังการได้รับสาร 5-azacytidine..... 56

12 ผลการกระตุ้นการแสดงออกของจีน NPT ด้วย 100 μM 5-azacytidine ในพืชทดลองหมายเลข 1 ซึ่งมีระดับการยับยั้งการแสดงออกของจีน NPT

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

บางส่วน..... 60

13 ผลการกระตุ้นการแสดงออกของจีน NPT ด้วย 100 μM 5-azacytidine ในพืชทดลองหมายเลข 1 ซึ่งมีระดับการยับยั้งการแสดงออกของจีน NPT บางส่วน..... 61

14 ผลการกระตุ้นการแสดงออกของจีน NPT ด้วย 100 μM 5-azacytidine ในพืชทดลองหมายเลข 25 ซึ่งมีระดับการยับยั้งการแสดงออกของจีน NPT ทั้งหมด..... 62

15 ผลการกระตุ้นการแสดงออกของจีน NPT ด้วย 100 μM 5-azacytidine ในพืชทดลองหมายเลข 25 ซึ่งมีระดับการยับยั้งการแสดงออกของจีน NPT ทั้งหมด..... 63

16 ผลการกระตุ้นการแสดงออกของจีน NPT ด้วย 100 μM 5-azacytidine ในพืชทดลองหมายเลข 24 ซึ่งมีระดับการแสดงออกของจีน NPT เป็นปกติ..... 64

17 ผลการกระตุ้นการแสดงออกของจีน NPT ด้วย 100 μM 5-azacytidine ในพืชทดลองหมายเลข 24 ซึ่งมีระดับการแสดงออกของจีน NPT เป็นปกติ..... 65

18 ผลการศึกษา rooting test เปรียบเทียบระหว่างต้นที่เป็น positive test และ negative test..... 70

19 ผลการทำ Serial dilution ของพลาสมิด pGP6 ตัดด้วย isoschizomeric

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

enzymes; MspI,HpaII วิเคราะห์ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis ใน 0.8 % agarose gel , ความต่างศักย์ 35 โวลต์ , เวลา 16 ชั่วโมง..... 72

20 แสดง Southern blot analysis ของพลาสมิด pGP6 ตัดด้วย isoschizomeric enzymes; MspI,HpaII โพรบด้วย 1.6 kb EcoRI fragment ของพลาสมิด pGP6..... 73

21 แสดงผลการตัดจีโนมิคดีเอ็นเอของพืชทดลองรุ่น R_2 ด้วยเอนไซม์ EcoRI วิเคราะห์โดยวิธี agarose gel electrophoresis ใน 0.8 % agarose gel ความต่างศักย์ 35 โวลต์, เวลา 16 ชั่วโมง..... 75

22 แสดง Southern blot analysis ของจีโนมิคดีเอ็นเอของพืชทดลองรุ่น R_2 ตัดด้วยเอนไซม์ EcoRI โพรบด้วย 1.6 kb EcoRI fragment ของพลาสมิด pGP6..... 77

23 แสดงผลการตัดจีโนมิคดีเอ็นเอของพืชทดลองรุ่น R_3 ด้วยเอนไซม์ EcoRI วิเคราะห์โดยวิธี agarose gel electrophoresis ใน 0.8 % agarose gel ความต่างศักย์ 35 โวลต์, เวลา 16 ชั่วโมง..... 79

24 แสดง Southern blot analysis ของจีโนมิคดีเอ็นเอของพืชทดลองรุ่น R_3 ตัดด้วยเอนไซม์ EcoRI โพรบด้วย 1.6 kb EcoRI fragment ของพลาสมิด pGP6..... 80

25 แสดงผลการตัดจีโนมิคดีเอ็นเอของพืชทดลองรุ่น R_2 ตัดด้วย isoschizomeric enzymes; MspI,HpaII วิเคราะห์โดยวิธี agarose gel electrophoresis

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

ใน 0.8 % agarose gel , ความต่างศักย์ 35 โวลต์ ,
เวลา 16 ชั่วโมง..... 82

26 แสดง Southern blot analysis ของจีโนมิคดีเอ็นเอของพืชทดลองรุ่น R_2
ตัดด้วย isoschizomeric enzymes ; MspI,HpaII โพรบด้วย 1.6 kb
EcoRI fragment ของพลาสมิด pGP6 84

27 แสดงผลการตัดจีโนมิคดีเอ็นเอของพืชทดลองรุ่น R_3 ตัดด้วย isoschizomeric
enzymes; MspI,HpaII วิเคราะห์โดยวิธี agarose gel electrophoresis
ใน 0.8 % agarose gel , ความต่างศักย์ 35 โวลต์ ,
เวลา 16 ชั่วโมง..... 87

28 แสดง Southern blot analysis ของจีโนมิคดีเอ็นเอของพืชทดลองรุ่น
R_3 ตัดด้วย isoschizomeric enzymes; MspI,HpaII โพรบด้วย 1.6 kb
EcoRI fragment ของพลาสมิด pGP6..... 89

คำย่อ

5-azaC	=	5-azacytidine
A	=	adenine
APH	=	aminoglycoside phosphotransferase
bp	=	base pair
C	=	cytosine
CH_3	=	methyl group
dATP	=	deoxyadenosine 5′-triphosphate
dCTP	=	deoxycytidine 5′-triphosphate
dGTP	=	deoxyguanosine 5′-triphosphate
dTTP	=	deoxythymidine 5′-triphosphate
DNA	=	deoxyrinucleoic acid
EDTA	=	ethylene diamine tetra-acetic acid
g	=	gram
G	=	guanine
Km	=	kanamycin
Km^R	=	kanamycin resistance
Km^S	=	kanamycin sensitive
kb	=	kilo base
l	=	litre
M	=	molar
5-mc	=	5-methyl cytosine
μg	=	microgram

µl	=	microlitre
µm	=	micromitre
µM	=	micromolar
mg	=	miligram
ml	=	mililitre
mM	=	millimolar
NaCl	=	sodium chloride
NaOH	=	sodium hydroxide
ng	=	nanogram
NPT	=	neomycin phosphotransferase
O.D	=	optical density
^{32}P	=	radioactive phosphorus 32
PEG	=	Polyethylene glycol
pg	=	picogram
r-RNA	=	ribosomal deoxyribonucleoic acid
RNA	=	ribonucleic acid
RNase	=	ribonuclease
SDS	=	sodium dodecyl sulphate
SSC	=	saline sodium citrate
T	=	thymine
T-DNA	=	transfer-DNA
Ti	=	tumor inducing
Tris	=	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane
U	=	unit

UV	=	ultra violet
α	=	alpha
β	=	beta