Hayati, September 2002, hlm. 67-70
ISSN 0854-8587
Vol. 9, No. 3

Konstruksi Pustaka Genom Kedelai Kultivar Slamet

Construction of Genomic Library of Soybean Cultivar Slamet

SUHARSONO

Jurusan Biologi, FMIPA, Institut Pertanian Bogor, Jalan Raya Pajajaran, Bogor 16144
Pusat Penelitian Bioteknologi, Institut Pertanian Bogor, Kampus Darmaga, Bogor 16680, E-mail: sony-sh@indo.net.id

Diterima 14 November 2001/Disetujui 9 Juli 2002

Genomic library of soybean cv. Slamet had been constructed in λ phage vector. Partial digestion of total DNA was conducted using 0.014 units *Sau*3AI per µg DNA at 37^{0}C for 30 minutes. By using 0.5 µg insert DNA and the molarity ratio between insert DNA:vector = 2.9:1, the titer of 5 x 10^5 plaque forming unit was obtained. Among them, 85% or 4.25 x 10^5 pfu are recombinant. Since the length of insert DNA in λ recombinant phages is 15 kb in average, and the genome size of diploid soybean is 2.23 x 10^6 kb, therefore, the genomic library constructed was expected to contain all genome of soybean cv. Slamet.

PENDAHULUAN

Produktivitas kedelai dapat ditingkatkan melalui perbaikan genetika. Isolasi dan karakterisasi suatu gen merupakan salah satu faktor yang sangat penting di dalam perbaikan genetika. Usaha ekstensifikasi pertanaman kedelai telah dilakukan, tetapi banyak terbentur pada lahan marginal. Lahan marginal yang terbesar di Indonesia ialah lahan asam (Notohadiprawiro 1983) dengan kelarutan aluminium yang tinggi. Kelarutan aluminium ini sangat merugikan tanaman. Perbaikan genetika tanaman kedelai untuk dapat beradaptasi pada daerah marginal ini sangat penting dalam usaha peningkatan produksi nasional.

Pustaka genom mengandung semua gen yang dipunyai oleh suatu organisme, termasuk daerah bukan penyandi, sehingga sangat penting untuk menyimpan seluruh informasi genetika yang dipunyai oleh suatu organisme. Pustaka genom sangat bermanfaat dalam usaha isolasi dan karakterisasi suatu gen. Dengan menggunakan pelacak heterologus dari organisme lain, gen dari suatu organisme dapat diisolasi. Pemetaan gen secara fisik juga dapat dilakukan melalui konstruksi pustaka genom. Peta genetika ini sangat penting di dalam program pemuliaan tanaman secara konvensional. Dengan demikian pustaka genom merupakan bagian yang sangat penting dalam program perbaikan genetika tanaman, baik melalui teknologi DNA rekombinan maupun melalui pemuliaan konvensional.

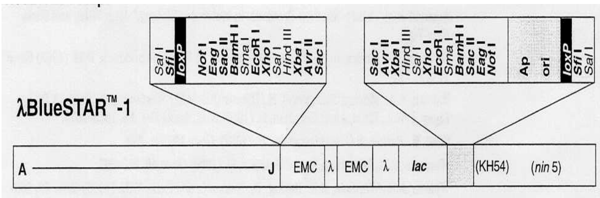
Penelitian ini bertujuan membuat pustaka genom tanaman kedelai kultivar Slamet.

BAHAN DAN METODE

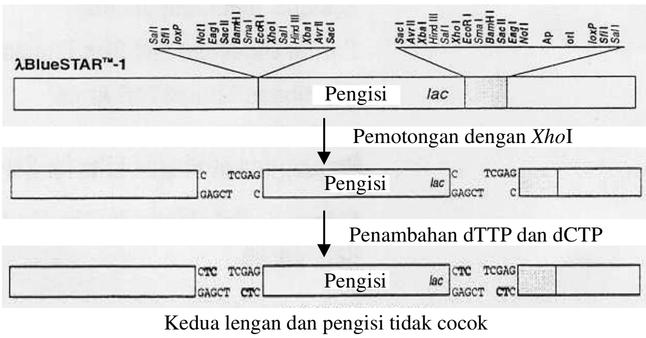
Bahan. Kedelai kultivar Slamet diploid yang toleran terhadap cekaman aluminium (Jusuf *et al*. 1999) digunakan sebagai bahan tanaman. Fage λ yang berupa λBluestar-1 dari Novagen (Gambar 1) digunakan sebagai vektor pengklonan.

Fage λ ini telah dipotong dengan *Xho*I dan telah mengalami penyisipan (*fill-in*) dengan nukleotida deoksisitidina trifosfat (dCTP) dan deoksitimidina trifosfat (dTTP) sehingga menghasilkan potongan DNA yang mempunyai ujung menggantung (*overhang*) TC pada situs penyisipan (Gambar 2). *Escherichia coli* galur ER1647 digunakan sebagai inang untuk mengamplifikasi fage λ rekombinan. *E. coli* galur BM25.8 digunakan sebagai inang untuk memroses eksisi dari fage menjadi plasmid dan *E. coli* galur XL1-Blue digunakan sebagai inang untuk mengamplifikasi plasmid rekombinan.

Isolasi DNA Total Tanaman. DNA total tanaman diisolasi dari daun kedelai berumur dua bulan dengan mengikuti prosedur Yasunory (1997). Daun digerus dengan bantuan nitrogen cair dan disuspensikan dalam bufer 1.5 x CTAB (CTAB 1.5%, Tris-HCl 75 mM, EDTA 15 mM, NaCl 1.05 M, pH 8.0). Suspensi diinkubasikan pada suhu 65^{0}C selama 30 menit, kemudian ditambahkan satu volume larutan kloroform:isoamil-alkohol (24:1). Setelah dicampur secara merata, suspensi disentrifugasi pada kecepatan 14 000 g (Tomy MRX150) selama lima menit. Cairan bagian atas diambil dan dicampur dengan CTAB 10% sebanyak 0.1 volume (CTAB 10%, NaCl 0.7 M). Campuran disentrifugasi pada 14 000 g, selama lima menit. Bagian atas diambil dan dicampur dengan isopropanol sebanyak 0.7 volume, campuran ini diinkubasikan di dalam es selama 30 menit, lalu disentrifugasi pada 14 000 g selama 10 menit, endapan DNAnya dibilas dengan etanol 70%. Setelah kering, DNA disuspensikan dalam TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0). Untuk menghilangkan RNA, suspensi DNA dicampur dengan RNAse dengan konsentrasi akhir 100 µg/ml dan diinkubasikan pada suhu 37^{0}C selama dua jam. Untuk mendapatkan DNA murni, suspensi DNA dicampur dengan satu volume fenol:kloroform, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 14 000 g pada suhu ruang selama lima menit. Cairan bagian atas dipresipitasi dengan menambahkan Na asetat 3 M sebanyak 0.1 volume dan etanol absolut sebanyak 2 x volume. Campuran disentrifugasi pada 18 500 g, suhu 4^{0}C selama 20 menit. Endapan dibilas dengan etanol 70%, lalu DNA disuspensikan di dalam TE, pH 8.0.



Gambar 1. λBluestar-1 yang digunakan sebagai vektor pengklonan.



Gambar 2. λBluestar-1 yang dipotong dengan *Xho*I dan mengalami penyisipan dengan nukleotida dCTP dan dTTP pada situs penyisipan.

Pemotongan Parsial DNA. DNA total tanaman dipotong dengan enzim *Sau*3AI (Takara) pada suhu 37^{0}C selama 30 menit dengan berbagai konsentrasi: 2.125, 1.063, 0.626, 0.531, 0.425, 0.354, 0.213, 0.106, 0.063, 0.053, 0.043, 0.035, 0.021, dan 0.014 unit untuk 1µg DNA.

Penyisipan Nukleotida pada Ujung Fragmen DNA. Setelah dipotong secara parsial, kedua ujung fragmen DNA disisipi dua nukleotida untuk menghindari terjadinya penyambungan kedua ujung dan antarfragmen sesuai dengan prosedur Novagen (1997). Sebanyak 20 µg fragmen DNA dicampur dalam bufer yang mengandung Tris-HCl 50 mM, pH 7.3, $MgCl_2$ 10 mM, 50 µg/ml bovin serum albumin (BSA), deoksiadenosina trifosfat (dATP) 1 mM, dan deoksiguanosina trifosfat (dGTP) 1 mM (Novagen), 4 µl ditiotreitol (DTT) 100 mM, dan 20 unit Klenow DNA polimerase (Takara) dalam volume total 400 µl. Campuran diinkubasikan pada suhu 30^{0}C selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan pemanasan pada suhu 70^{0}C selama 10 menit. Fragmen yang berukuran 7-20 kb diisolasi dengan menggunakan kolom (Chroma Spin 1000, Clontech) (Clontech 1995).

Penyisipan Fragmen DNA ke dalam Vektor. Sebanyak 0.5 µg fragmen DNA yang ujungnya telah disisipi nukleotida dicampur dengan 0.5 µg λBluestar-1 (Novagen), 4.5 unit T4 DNA ligase (Takara), dan bufer ligasi (Tris-HCl 30 mM, $MgCl_2$ 10 mM, DTT 10 mM, ATP 1 mM, polietilena glikol 8000 5%, pH 7.8) dalam volume total 10 µl. Campuran diinkubasikan pada suhu 4^{0}C selama 24 jam.

Pengemasan DNA Fage ke dalam Protein Mantel dan Transveksi. Setelah ligasi, DNA λ rekombinan dikemas di dalam protein mantel. Sebanyak 10 µl DNA hasil ligasi dicampur dengan 50 µl protein ekstrak pengemas (Gigapack III, Stratagene) sesuai dengan prosedur dari Stratagene (1999). Campuran diinkubasikan pada suhu 22^{0}C selama dua jam. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 440 µl bufer SM (komposisi per liter: 5.8 g NaCl, 2 g $MgSO_4{\cdot}7H_2O$, Tris-HCl 50 mM, 0.1 g gelatin, pH 7.5). Jumlah titer ditentukan dengan melakukan transveksi λ ke *E. coli* galur ER1647.

Transveksi dilakukan dengan mencampur 100 µl *E. coli* galur ER1647 (OD_{600}=1) dengan 100 µl fage λ. Agar tidak sulit menghitung jumlah fage, fage λ hasil pengemasan diencerkan 100 kali. Campuran diinkubasikan di dalam balok pemanas pada suhu 37^{0}C selama 30 menit, setelah itu ditambahkan 4 ml agarosa cair permukaan (*molten top agarose*) (komposisi per liter: 10 g tripton, 5 g NaCl, 6 g agarosa) yang bersuhu 47^{0}C dan telah ditambah X-gal dengan konsentrasi akhir 500 ppm (untuk menseleksi λ rekombinan). Campuran disebar di dalam cawan Petri yang mengandung media H (komposisi per liter: 10 g tripton, 8 g NaCl, 15 g agar-agar) sesuai prosedur Novagen (1997). Setelah agarosa yang di permukaan media H membeku, cawan diinkubasikan pada suhu 37^{0}C selama semalam. Plak (*plaque*) yang berwarna biru adalah plak bukan rekombinan dan plak yang tidak berwarna (transparan) adalah plak rekombinan.

Eksisi Plasmid dari Fage λ. Eksisi plasmid dilakukan dengan mencampur 100 µl *E. coli* galur BM25.8 (OD_{600}=1) dengan 100 µl fage λ. Campuran diinkubasikan di dalam balok pemanas suhu 37^{0}C selama 30 menit dan disebar di atas media luria bertani (LB) padat (komposisi per liter: 10 g tripton, 5 g ekstrak khamir, 10 g NaCl, 15 g agar-agar, pH 7.5) yang mengandung ampisilin 100 ppm.

Isolasi DNA Plasmid. Satu koloni bakteri *E. coli* galur BM25.8 dan XL1-Blue ditumbuhkan di dalam 2 ml media LB yang mengandung ampisilin 100 ppm pada inkubator bergoyang (250 rpm) dengan suhu 37^{0}C selama semalam. Bakteri diendapkan dengan sentrifugasi pada 18 500 g (Tomy MRX-150) pada suhu 4^{0}C selama 10 menit. Endapan bakteri dilisis mengikuti prosedur dari Promega (1996). Selanjutnya, sebanyak 300 µl bufer netralisasi (natrium asetat 1.32 M, pH 4.8) ditambahkan ke dalam campuran bakteri yang sudah mengalami lisis. Campuran disentrifugasi pada kecepatan 18 500 g pada suhu 4^{0}C selama 20 menit. Cairan yang mengandung DNA plasmid diekstraksi dengan fenol:kloroform:isoamil alkohol (25:24:1), kemudian diperlakukan dengan RNase pada suhu 37^{0}C selama semalam, untuk menghilangkan RNA. Untuk menghilangkan protein RNase dilakukan ekstraksi dengan fenol:kloroform:isoamil alkohol. Cairan kemudian dipresipitasikan dengan penambahan natrium asetat 3 M, pH 5.2 sebanyak 0.1 volume dan etanol absolut 2 volume dan diinkubasikan pada suhu -5^{0}C selama dua jam. DNA plasmid diendapkan dengan sentrifugasi pada kecepatan 18 500 g pada suhu 4^{0}C selama 20 menit. DNA plasmid dibilas dengan etanol 70% dan dikeringvakumkan. DNA disuspensikan di dalam H_2O.

Transformasi Bakteri. Bakteri kompeten dibuat dengan mengikuti prosedur Nakayama dan Nishikata (1995). Satu koloni bakteri *E. coli* galur XL1-Blue dikulturkan dalam 2 ml media LB cair semalam pada inkubator bergoyang (kecepatan 250 rpm) pada suhu 37^{0}C, kemudian disubkultur dalam 100 ml media SOB (komposisi per liter: tripton 20 g, ekstrak khamir 5 g, NaCl 0.5 g, KCl 25 mM, $MgSO_4{\cdot}7H_2O$ 10 mM, $MgCl_2{\cdot}6H_2O$ 10 mM, pH 7.0) dengan kondisi yang sama hingga OD_{600} = 0.6. Bakteri diendapkan dengan disentrifugasikan pada kecepatan 4 000 g (Avanti, Beckman) pada suhu 4^0C selama lima menit. Endapan bakteri disuspensikan dalam 33.3 ml bufer transformasi FTB (kalium asetat 10 mM, $MnCl_2{\cdot}4H_2O$ 45 mM, $CaCl_2{\cdot}2H_2O$ 10 mM, $[Co(NH_3)_6]Cl_3$ 10 mM, KCl 100 mM, gliserol 10%, pH 7.5) dan diinkubasikan selama 10 menit di dalam es. Setelah itu suspensi disentrifugasi, endapan bakteri disuspensikan dalam 8 ml FTB dan ditambah 0.6 ml dimetilsulfoksida, lalu diinkubasikan di dalam es selama 10 menit. Sebanyak 50 µl bakteri kompeten ini dicampur dengan 10 µl (50-100 ng) DNA plasmid dan diinkubasikan di dalam es selama 25 menit. Campuran ini kemudian diinkubasikan pada suhu 42^0C selama 45 detik, dimasukkan kembali ke dalam es dan dibiarkan di dalamnya selama lima menit, ditambah 100 µl media 2 x YT (komposisi per liter: 16 g tripton, 10 g ekstrak khamir, 5 g NaCl, pH 7.0) dan diinkubasikan pada suhu 37^0C selama 20 menit. Bakteri disebar pada media LB padat yang mengandung ampisilin 100 ppm dan diinkubasikan pada suhu 37^0C semalam.

HASIL

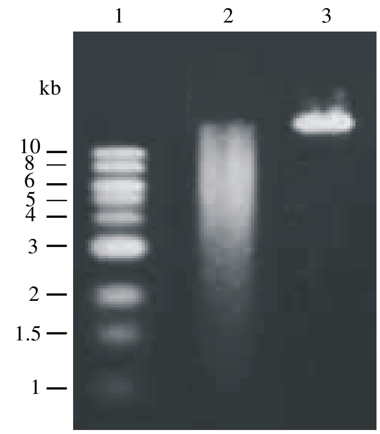
Pemotongan Parsial dan Penyisipan Nukleotida pada Ujung Fragmen DNA. Ukuran 7-20 kb DNA kedelai kultivar Slamet didapat dari 1 µg DNA yang dipotong dengan 0.014 unit *Sau*3AI (Takara) pada 37^0C selama 30 menit. Dari sekitar 20 µg DNA total kedelai didapatkan sekitar 4 µg fragmen DNA yang berukuran besar (Gambar 3) dan fragmen DNA tersebut dapat disisipkan ke dalam vektor.

Konstruksi Fage Rekombinan. Dengan menggunakan 0.5 µg DNA sisipan dan perbandingan molaritas DNA sisip-an:vektor = 2.9:1 didapatkan titer sebesar 5×10^5 pfu. Sebanyak 85% pfu adalah rekombinan (Gambar 4) pustaka yang berhasil dikontruksi mengandung 4.25×10^5 pfu rekombinan.

Ukuran DNA Sisipan. Untuk memastikan seleksi biru-putih, plak yang berwarna putih diambil dengan menggunakan ujung pipet yang telah dipotong sehingga berukuran sedikit lebih besar dari ukuran plak. Gel yang mengandung plak kemudian dielusi di dalam 500 µl bufer SM selama semalam. Berkat adanya *loxP* (Gambar 1), sisipan di dalam fage dapat keluar untuk membentuk plasmid karena terjadinya eksisi yang dilakukan oleh rekombinase cre pada situs rekombinasi yang spesifik. Proses eksisi terjadi di *E. coli* galur BM25.8. Untuk mendapatkan eksisi yang bagus, suspensi fage hasil elusi diencerkan 100 kali dan kemudian dilakukan transveksi pada *E. coli* galur BM25.8. Plasmid yang berada di dalam *E. coli* galur BM25.8 tidak efisien dalam melakukan replikasi sehingga setelah diisolasi, plasmid tersebut diintroduksikan ke dalam *E. coli* galur XL1-Blue. Keberadaan plasmid di dalam XL1-Blue diseleksi dengan menggunakan ampisilin. Dengan menggunakan XL1-Blue pada media 2 x YT diperoleh rendemen rata-rata 1 µg DNA plasmid tiap mililiter biakan bakteri dengan lama inkubasi semalam.

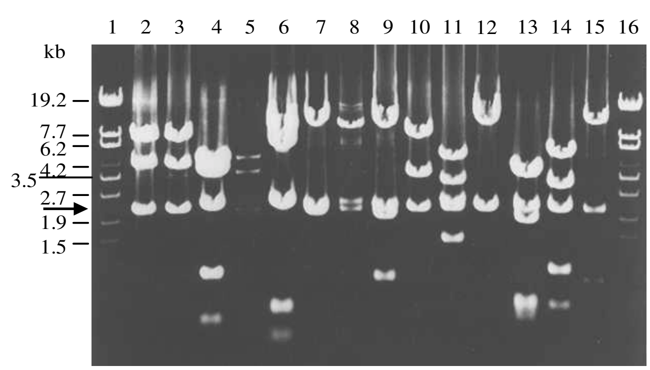
Semua plak berwarna putih yang mengalami eksisi, menghasilkan plasmid berukuran lebih besar daripada vektornya (2.139 kb). Jadi semua plak tersebut membawa sisipan.

Untuk mengetahui ukuran DNA sisipan, plasmid dipotong dengan enzim *Bam*HI. Dari contoh fage yang diambil secara acak, ukuran sisipan berkisar antara 15-20 kb (Gambar 5).



Gambar 3. Fragmen DNA tanaman kedelai berukuran besar hasil dari pemotongan parsial dengan enzim *Sau*3AI dan telah mengalami penyisipan nukleotida pada kedua ujungnya. Lajur 1 = 1 kb *ladder*; lajur 2 = fragmen DNA kedelai; lajur 3 = DNA λ utuh.

Gambar 4. Seleksi biru-putih terhadap plak. 1 = plak rekombinan (tidak berwarna), 2 = plak bukan rekombinan (berwarna biru).



Gambar 5. Plasmid diturunkan dari λBluestar-1 yang dipotong dengan *Bam*HI. Lajur 1 dan 16 = λ/*Eco*T14; lajur 2-15 = vektor rekombinan/*Bam*HI. Tanda panah (→) menunjukkan ukuran vektor (2.139 kb).

PEMBAHASAN

Jumlah enzim yang dibutuhkan untuk mendapatkan ukuran fragmen tertentu sangat ditentukan oleh kualitas DNA, spesies asal DNA, jenis enzim restriksi, suhu inkubasi, dan lama inkubasi. Enzim *Sau*3AI 0.014 unit dapat memotong secara parsial 1 μg DNA kedelai cv. Slamet pada suhu 37^0C selama 30 menit sehingga menghasilkan potongan yang berukuran 7-20 kb. Pemberian enzim *Sau*3AI lebih dari 0.014 unit menyebabkan DNA total terpotong-potong menjadi fragmen yang berukuran lebih kecil dari 20 kb. Ukuran fragmen DNA yang besar sangat penting dalam mengonstruksi pustaka genom.

Pemotongan DNA tanaman kedelai menggunakan enzim *Sau*3AI menghasilkan ujung menggantung GATC. Untuk menghindari terjadinya penyambungan antarpotongan DNA tanaman kedelai, ujung-ujungnya telah diperlakukan dengan penambahan nukleotida dGTP dan dATP sehingga ujung menggantungnya menjadi GA. Ujung GA dari satu fragmen DNA tanaman kedelai tidak dapat menyambung dengan ujung GA dari fragmen DNA tanaman kedelai lainnya. Penambahan nukleotida dCTP dan dTTP pada ujung situs sisipan (TCGA) dari vektor fage λ menghasilkan ujung menggantung TC sehingga tidak akan terjadi penyambungan antarvektor. Ujung menggantung GA dari fragmen DNA tanaman kedelai hanya cocok dengan ujung menggantung TC dari vektor sehingga proses penyambungan akan terjadi antara DNA tanaman kedelai dan vektor. Spesifikasi kecocokan ujung DNA tanaman kedelai dan vektor fage λ menyebabkan efisiensi perakitan vektor rekombinan menjadi tinggi. Sebanyak 85% fage λ adalah rekombinan.

Dari analisis terhadap plasmid rekombinan yang merupakan turunan dari fage rekombinan menunjukkan bahwa ukuran fragmen DNA tanaman kedelai yang tersisip di dalam vektor ialah 15-20 kb. Ukuran yang besar ini sangat menguntungkan dalam konstruksi pustaka genom karena jumlah vektor rekombinan yang relatif sedikit. Semakin besar ukuran fragmen DNA yang menyisip ke dalam vektor, maka semakin sedikit jumlah vektor rekombinan yang dibutuhkan untuk membawa genom organisme di dalam pustaka genom. Keuntungan lain dari ukuran sisipan yang besar ialah pustaka genom dapat digunakan untuk mengisolasi gen secara utuh dan pemetaan gen secara fisik. Fragmen DNA yang berukuran besar dapat mengandung lebih dari satu gen sehingga dapat digunakan untuk melakukan pemetaan fisik dari suatu gen.

Genom haploid kedelai besarnya 1.115 x 10^6 kb (Arumuganathan & Earle 1991) sehingga genom kedelai kultivar Slamet diploid ialah 2.23 x 10^6 kb. Karena ukuran fragmen DNA kedelai yang menyisip di dalam vektor rata-rata 15 kb, maka untuk mendapatkan pustaka genom kedelai yang lengkap diperlukan sekitar 1.5 x 10^5 pfu rekombinan. Dalam penelitian ini, jumlah fage rekombinan yang terbentuk dalam pustaka genom (4.25 x 10^5 pfu) ialah lebih besar daripada jumlah fage rekombinan yang dibutuhkan agar seluruh genomnya tersisip ke dalam fage (1.5 x 10^5 pfu) sehingga pustaka genom yang terbentuk mengandung seluruh bahan genetika yang dipunyai oleh kedelai kultivar Slamet.

Untuk keperluan mengisolasi suatu gen melalui penapisan terhadap pustaka genom diperlukan minimum satu kopi untuk tiap gen. Pada tanaman kedelai, lebih dari 90% dari ruas DNA yang tidak berulang terdapat lebih dari dua kopi (Shoemaker *et al*. 1996) sehingga jumlah fage rekombinan dengan DNA sisipan sebesar 15 kb yang diperlukan untuk mencakup seluruh gen yang dipunyai oleh kedelai (dalam keadaan haploid) ialah kira-kira sebanyak (0.10 + 0.45) x (0.75 x 10^5) = 0.4125 x 10^5 fage. Dengan demikian pustaka genom yang berhasil dikonstruksi mengandung lebih dari lima kali dari seluruh gen yang dipunyai oleh kedelai kultivar Slamet.

Peta fisik gen sangat berguna dalam perakitan kultivar atau galur yang diinginkan melalui persilangan konvensional. Isolasi gen sangat penting untuk merakit kultivar baru melalui teknologi DNA rekombinan. Oleh sebab itu, pustaka genom kedelai kultivar Slamet dengan ukuran sisipan yang besar sangat penting untuk perbaikan genetika, baik dengan teknologi DNA rekombinan maupun teknologi konvensional.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh Proyek RUT VIII dengan berjudul: Isolasi dan Karakterisasi Gen-Gen pada Tanaman Kedelai yang Mendapat Cekaman Aluminium. Terima kasih disampaikan kepada Muhammad Jusuf atas saran; Ko Shimamoto, *Laboratory of Plant Molecular Genetic, Nara Institut of Science and Technology*, Jepang atas fasilitas laboratorium, dan Utut Widyastuti atas bantuan teknis dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

Arumuganathan H, Earle ED. 1991. Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol Biol Rep* 9:208-218.

Clontech. 1995. Chroma Spin Columns. [produk protokol]. California: Clontech. hlm 1-21.

Jusuf M, Suharsono, Sopandie D. 1999. Molecular biology of soybean tolerance to aluminium stress. Report of Graduate Team Research Grant, Urge Project, Batch II. Jakarta: Directorate General of Higher Education.

Nakayama H, Nishikata T. 1995. [Preparation of *E. coli* Competence cell for transformation][dalam bahasa Jepang]. Di dalam: Nakayama H, Nishikata T (ed). *Bio Jiken Illustrator*. Bagian ke-2. Tokyo: Shujunsha Co. hlm 83-86.

Notohadiprawiro T. 1983. Persoalan tanah masam dalam pembangunan pertanian Indonesia. *Bul Faperta UGM* 18:44-47.

Novagen. 1997. λBlueStar Vector System. Madison: Novagen. hlm 1-14.

Promega. 1996. Technical Bulletin. Madison: Promega Co. hlm 1-19.

Shoemaker RC, Polzin K, Labate J, Specht J, Brummer EC, Olson T, Young N, Concibido V, Wilcox J, Tamulonis JP, Kochert G, Boerma HR. 1996. Genome duplication in soybean (*Glycine* subgenus *soja*). *Genetics* 144: 329-338.

Stratagene. 1999. Gigapack III Gold Packaging Extract, Gigapack III Plus Packaging Extract, and Gigapack III XL Packaging Extract. Instruction Manual. California: Stratagene Cloning System. hlm 1-14.

Yasunory B. 1997. [Isolation of DNA and RNA fom rice][dalam bahasa Jepang]. Di dalam: Shimamoto K, Sasaki T (ed). *Syokubutsu No Jiken Protokol*. Tokyo: Shujunsha Co. hlm 34-40.