فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۱۵، شمارهٔ ٤، صفحهٔ ۲۷۲-۲٦۵ (۱۳۸٦)

کلن کردن ژن *RGL2* از DNA ژنومی آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*)

حسین میرزایی‌ندوشن
مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران، صندوق پستی: ۱۱٦- ۱۳۱۸۵، E-mail: nodoushan2003@yahoo.com

چکیده

یکی از ژنهایی که در سنتز جیبرلین در گیاه شناخته شده و موقعیت آنها در ژنوم آرابیدپسیس مشخص شده است، *RGL2* می‌باشد که در این بررسی کلن گردید. با استخراج DNA از آرابیدوپسیس، اکوتیپ کلمبیا و استفاده از آغازگرهای اختصاصی که بر اساس توالی ژن مورد نظر ساخته شده بودند، این ژن تکثیر شد. پلاسمید PET-32a (+) و ژن تکثیر شده با استفاده از دو آنزیم برشی خاص به نامهای *Nco* I و *Sal* I برش داده شدند. پس از اتصال ژن مورد نظر به پلاسمید ناقل، پلاسمید حاوی ژن به باکتری *E. coli* سوش XL10-Gold منتقل گردید. با اجرای PCR بر روی نتایج حاصل از انتقال پلاسمید ناقل، کلن شدن این ژن مورد تأیید قرار گرفت.

واژه‌های کلیدی: آرابیدوپسیس، ژن *RGL2*، کلنینگ و جیبرلین.

مقدمه

بذر حامل یک گیاه کامل به صورت جنینی است که در مسیر توسعه متوقف گردیده است و منتظر شرایط مناسب محیطی است تا چرخه زندگی خود را از سر گیرد (Bewley, 1997). انتقال حالت خواب بذر به حالت جوانه‌زنی به وسیله عوامل بیرونی و محیطی نظیر کیفیت نور، رطوبت و نیز عوامل درونی نظیر جیبرلین و ابسسیک اسید صورت می‌گیرد. ابسسیک اسید موجب ایجاد خواب و ابقای آن می‌شود، ولی جیبرلین موجب شکستن خواب و القای جوانه‌زنی بذر می‌گردد (Steber *et al*,. 1998). اهمیت تعادل بین ابسسیک اسید و جیبرلین در جوانه‌زنی بذر به بهترین نحو با مطالعه موتانتهای مؤثر بر این دو ماده نشان داده شده است.

جیبرلینها از جمله هورمونهای گیاهی هستند که در طول دوره رشد گیاهان بسیار ضروری هستند. به عنوان نمونه، جوانه‌زدن بذر، رشد رویشی و توسعه گل و بذر از جمله مراحلی است که به این هورمونها نیاز دارد (Davies, 1995). اطلاعات زیادی مربوط به تنظیم فاز رشد رویشی گیاهان و تنظیم کننده‌های هورمونی آنها فراهم شده است (Berardini *et al*., 2001; Dill *et al*., 2001; Hunter *et al*., 2003; McGinnis *et al*., 2003; Meyerowitz & Somerville, 1994; Groot & Meicenheimer, 2000) ولی هنوز مکانیسم ملکولی که از طریق آن جیبرلین جنبه‌های مختلف رشد و رسیدن به مرحله بلوغ را تنظیم می‌کند، ناشناخته است (Gan *et al*., 2006). به همین دلیل محققان تلاش زیادی در بررسی چرخه تولید جیبرلین در گیاه نموده و موتانتهای

متعددی که در این مسیر مفید فایده هستند را کشف و بکار گرفته‌اند (Fleet & Sun, 2005). در همین راستا ژنهایی نظیر *GAI* و *RGA* شناسایی و معرفی شدند که منجر به بروز فنوتیپ کوتولگی که حاصل کاهش جیبرلین است می‌گردند (Peng *et al.*, 1997). موتانتهایی نظیر *spy* شناسایی شدند که تظاهری مشابه اکوتیپهای وحشی آرابیدوپسیس که با جیبرلین تیمار شده باشد از خود نشان می‌دهند (Lee *et al.*, 2002). چندین فاکتور مؤثر در رشد گیاه نیز شناسایی شدند که در مجموع GRAS نام گرفتند و در چندین جنبه از رشد گیاه از جمله، توسعه ریشه و ساقه‌های جانبی نیز نقش دارند (Nakajima *et al.*, 2001; Peng *et al.*, 1999; Silverstone *et al.*, 1998). در ادامه ژنهایی که در چرخه تولید جیبرلین مؤثر تشخیص داده شده‌اند و با توالی‌یابی ژنوم آرابیدوپسیس شناخته شدند ژنهایی هستند که *RGL1*، *RGL2*، و *RGL3* نام گرفته‌اند. احتمال می‌رود که *RGL2* نقش تعیین کننده‌ای در فرایند جوانه زدن، تولید بذر و گلدهی در گیاه داشته باشد (Dill *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2002). کلن کردن هریک از این ژنها که موقعیت آنها در ژنوم آرابیدپسیس مشخص شده و توالی آنها نیز تعیین گردیده است، می‌تواند در مطالعات جاری تعیین مکانیسمهای اثر جیبرلین بر رشد و توسعه گیاه بکار گرفته شود.

مواد و روشها

استخراج DNA

نظر به اینکه توالی ژن *RGL2* در اکوتیپ استاندارد کلمبیا تعیین گردیده است (جدول ۱) از این اکوتیپ جهت استخراج DNA استفاده گردید. از روش CTAB (Murray & Thompson, 1980) با تغییرات جزئی که در آن ایجاد شد، جهت استخراج DNA استفاده شد. در کنار این نمونه DNA که از اکوتیپ استاندارد کلمبیا استخراج گردید سه نمونه DNA از سایر اکوتیپهای موجود نیز در تکثیر ژن مورد نظر بکار گرفته شدند.

طراحی و ساخت آغازگرهای مورد نیاز

آغازگرهایی که ابتدا و انتهای ژن مورد نظر را هدف قرار دهند طراحی و ساخته شد (جدول ۱) که به‌ترتیب زیر می‌باشند. لازم به ذکر است که توالی چندگانه A در ابتدای هر آغازگر اضافه گردید تا قابلیت برش با آنزیمهای مورد نظر در محصول PCR ایجاد گردد.

RGL2 R 5'- : AAAAAAACATGGATGATGAGCTTCTTGCTGT -3'
RGL2 F 5'-: AAAAAAAAAAGACTCAGGCGAGTTTCCACGCCG -3'

جدول ۱- توالی نوکلئوتیدی ژن *RGL2* و نواحی انتخاب شده جهت طراحی آغازگرهای مورد نیاز. اولین توالی زیر خطدار مربوط به آغازگر RGL2F و دومین توالی که زیر خطدار شده است مربوط به آغازگر RGL2R می‌باشد.

```
38761 ttataaactc tcttttgttc tttttttttc aacttcatca gtctcttaac tcaccatcac
38821 aagaacaaga aagatgaaga gaggatacgg agaaacatgg gatccgccac caaaaccact
38881 accagcttct cgttccggag aaggtccttc aatggcggat aagaagaagg ctgatgatga
38941 caacaacaac agcaacatgg atgatgagct tcttgctgtt cttggctaca aggttcgatc
39001 ttctgagatg gctgaagtag cacagaagct tgaacaactt gagatggtct tgtctaatga
39061 tgatgttggt tctactgtct taaacgactc tgttcattat aacccatctg atctctctaa
39121 ctgggtcgag agcatgcttt ctgagctgaa caacccggct tcttcggatc ttgacacgac
39181 ccgaagttgt gtggatagat ccgaatacga tctcagagca attccgggtc tttctgcgtt
39241 tccaaaggaa gaggaagtct ttgacgagga agctagcagc aagaggatcc gactcggatc
39301 gtggtgcgaa tcgtcggacg agtcaactcg gtccgtggtg ctcgttgact ctcaggagac
39361 cggagttaga cttgtccacg cactagtggc gtgcgctgag gcgattcacc aggagaatct
39421 caacttagct gacgcgctgg tgaaacgcgt gggaacactc gcgggttctc aagctggagc
39481 tatgggaaaa gtcgctacgt attttgctca agccttggct cgtcgtattt accgtgatta
39541 cacggcggag acggacgttt gcgcggcggt gaacccatct ttcgaagagg ttttggagat
39601 gcacttttac gagtcttgcc cttacctgaa gttcgctcat ttcacggcga accaagcgat
39661 tctagaagct gttacgacgg cgcgtagagt tcacgtcatt gatttagggc ttaatcaagg
39721 gatgcaatgg cctgctttaa tgcaagcttt agctctccga cccggtggac ctccgtcgtt
39781 tcgtctcacc ggaatcggac caccgcagac ggagaattca gattcgcttc aacagttagg
39841 ttggaaatta gctcaattcg ctcagaacat gggcgttgaa ttcgaattca aaggcttagc
39901 cgctgagagt ttatcggatc ttgaacccga aatgttcgaa acccgacccg aatctgaaac
39961 cttagtggtt aattcggtat ttgagctcca ccggttatta gcccgatccg gttcaatcga
40021 aaagcttctc aatacggtta aagctattaa accgagtatc gtaacggtgg ttgagcaaga
40081 agcgaaccac aacggaatcg tcttcctcga taggttcaac gaagcgcttc attactactc
40141 gagcttgttt gactcgctcg aagacagtta tagtttaccg agtcaagacc gagttatgtc
40201 agaagtgtac ttagggagac agatactcaa cgttgttgcg gcggaagggt ccgatcgggt
40261 cgagcggcac gagacggctg cacagtggag gattcggatg aaatccgctg ggtttgaccc
40321 gattcatctc ggatctagcg cgtttaaaca agcgagtatg cttttatcgc tttacgctac
40381 cggagatgga tacagagttg aagaaaatga cggatgttta atgatagggt ggcagacgcg
40441 accactcatc acaacctcgg cgtggaaact cgcctgagtc gcggcggtag agatgactcg
40501 cctgaaaccg ggaaaaacaa taaatgtttt aaaaaattag gaaaagagac cgtaacttta
```

اجرای PCR جهت تکثیر ژن *RGL2*

با توجه به نبود تجربه لازم در تکثیر این ژن، علاوه بر استفاده از چهار نمونه DNA، از سه دمای اتصال آغازگرها نیز استفاده گردید (جدول ۳). به این ترتیب، محیط واکنش مورد نیاز جهت ۱۲ واکنش ۵۰ میکرولیتری فراهم گردید. از این رو، ابتدا بر روی یخ مخلوط پایه ٦٤۸ میکرولیتری فراهم گردید (جدول ۲). پس از توزیع مخلوط واکنش در لوله واکنش، به هر لوله ۱ میکرولیتر از DNA های مورد نظر اضافه گردید. همه مراحل اضافه کردن مواد روی یخ انجام گرفت و در پایان هر لوله دارای ۵۰ میکرولیتر مخلوط واکنش گردید. سه بلوک از دستگاه PCR جهت اجرای چرخه‌های سه‌گانه تنظیم و راه‌اندازی گردید. جهت جلوگیری از تبخیر مخلوط واکنش از سیستم Top-Hot به جای قرار دادن یک لایه روغن معدنی در سطح مخلوط واکنش استفاده شد. پس از راه‌اندازی دستگاه به آن فرصت داده شد تا دمای درپوش را به ۹٦ درجه سانتیگراد برساند و پس از آن مخلوط‌های واکنش در دستگاه قرار داده شد. چنانکه از توالی نوکلئوتیدی این ژن (جدول ۱) استنباط می‌شود، پس از تکثیر آن با استفاده از DNA ژنومی اکوتیپ کلمبیا باید باندی به اندازه ۱/۵ کیلو جفت باز حاصل گردد.

جدول ۲- شرایط واکنش در تکثیر ژن *RGL2*

Stock	۵۰ میکرولیتر	۵۰ × ۱۲× ۱۰٪ میکرولیتر
۱۰x expand buffer	۵	٦٦
۱۰ mM dNTP	۱/۲۵	۱٦/۵
۱۰۰ µM primer F	۰/۲	۲/٦٤
۱۰۰ µM primer R	۰/۲	۲/٦٤
ddH2O	٤۱/۷۵	۵۵۰
۵ U/µL *Taq* DNA pol.	۰/۵	٦/٦
۲ U/µL *Pfu* DNA pol.	۰/۵	٦/٦
DNA	۱	۱۲ *۱

جدول ۳- چرخه حرارتی مورد استفاده با سه تیمار حرارتی، در دمای اتصال تکثیر ژن *RGL2*

مرحله	دما (سانتیگراد)	زمان
۱	۹٤	۲ دقیقه
۲	۹٤	۱۵ ثانیه
۳	۵۱، ۵۳ و ۵۵	۲۰ ثانیه
٤	۷۲	۲ دقیقه
۵	۷۲	۵ دقیقه
٦	٤	تا زمان استفاده

مراحل دوم تا چهارم ۳۵ بار تکرار گردید

خالص کردن محصول PCR

پس از تکثیر قطعه مورد نظر، ابتدا بخشی از محصول PCR بر روی ژل آگارز رانده شد تا اندازه باند حاصل از تکثیر تعیین شود. با تطابق اندازه باند حاصل از اجرای محصول بر روی ژل با اندازه ژن مورد نظر، مابقی محصول PCR بر روی ژل آگارز با دمای ذوب پایین رانده شد تا از سایر ناخالصیها پاکسازی شود. پس از رسیدن باند مورد نظر به محدوده انتهایی ژل، این باند از ژل بریده شد و با استفاده از کیت تخلیص DNA از ژل ساخت شرکت QIAgen خالص سازی گردید.

هضم DNA ی تکثیری و پلاسمید ناقل با استفاده از دو آنزیم خاص

دو آنزیم برشی به نامهای *Nco* I و *Sal* I جهت برش نواحی انتهایی ژن مورد نظر انتخاب شده و به شرح زیر جهت هضم DNA حاصل، مورد استفاده قرار گرفتند. ده میکرولیتر بافر مخصوص دو آنزیم یاد شده با ۳۰ میکرولیتر DNA تکثیر شده (ژن مورد نظر) و ۸ میکرولیتر آب مقطر دایونایز شده مخلوط شد و مخلوط حاصل با یک میکرولیتر از هر آنزیم مخلوط گردید. این مخلوط در دمای ۳۷ درجه به مدت یک ساعت هضم

گردید. نمونه هضم شده بر روی ژل با دمای ذوب پایین اجرا شده و قطعه مورد نظر از ژل بریده شده و در فریزر نگهداری گردید.

پلاسمید PET-32a (+) نیز جهت انتقال ژن مورد نظر به باکتری انتخاب شده و مطابق روش گفته شده با دو آنزیم برشی *Nco* I و *Sal* I هضم گردید. انتخاب این پلاسمید به دلیل داشتن جایگاههای مناسب برای برش و تطابق آن با نقاط برش، در ژن مربوطه می‌باشد. به منظور اطمینان از انجام برش، نمونه‌ای از پلاسمید برش خورده در کنار نمونه‌ای از پلاسمید برش نخورده بر روی ژل آگارز رانده شد. پس از اطمینان از برش در نمونه‌های هضم شده این نمونه‌ها بر روی ژل با دمای ذوب پایین اجرا شده و قطعه مورد نظر از ژل بریده شده و در فریزر نگهداری گردید.

اتصال ژن مورد نظر و پلاسمید ناقل (Ligation)

مقادیر مختلفی از پلاسمید ناقل، فراورده PCR، بافر، آنزیم لیگاز و آب مقطر دایوناز شده به شرح جدول ٤ مخلوط شده و به مدت ١٦ ساعت در دمای ١٥ درجه سانتیگراد قرار داده شد و پس از آن به مدت ٢٠ دقیقه در دمای ٦٥ درجه سانتیگراد قرار داده شد و سپس جهت استفاده بعدی در دمای ٤ درجه نگهداری گردید.

جدول ٤- اجزاء مورد استفاده در اتصال ژن مورد نظر با مقادیر مختلف DNA ی هدف

ردیف	مقدار وکتور (میکرولیتر)	مقدار DNA (میکرولیتر)	بافر 10X (میکرولیتر)	آب مقطر (میکرولیتر)	آنزیم لیگاز (میکرولیتر)	تعداد کلنی تشکیل شده
۱	۲	۰	۲	۱۵	۱	۰
۲	۲	۰/۵	۲	۱٤/۵	۱	۱
۳	۲	۱	۲	۱٤	۱	۳
٤	۲	۲	۲	۱۳	۱	۲
۵	۲	٤	۲	۱۱	۱	۷

انتقال پلاسمید ناقل به باکتری *E. coli* (Transformation)

بیست میکرولیتر از هریک از واکنشهای فوق با ۲۰۰ میکرولیتر نژادی از باکتری *E. coli* به نام XL10-Gold از شرکت Stratagene مخلوط شده و به مدت ۲۰ دقیقه روی یخ نگهداری گردید. در ادامه، مخلوطهای حاصل به مدت ٦۰ ثانیه در دمای ٤۲ درجه قرار داده شده و مجدد به روی یخ منتقل گردیدند. پس از دو دقیقه یک میلی‌لیتر محیط کشت مناسب رشد باکتری به هریک از مخلوطهای فوق اضافه شده و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه نگهداری گردیدند. در ادامه، ۲۰۰ میکرولیتر از هر یک از مخلوطهای فوق در سطح محیط کشت باکتری حامل آنتی بیوتیک کربنیسیلین (Carbenicillin) پخش شده و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری شد. ظروف حاوی نمونه‌ها به مدت ١٦ ساعت در این دما نگهداری گردیدند. پس از سپری شدن این دوره، کلنیهای حاصل شمارش گردیده و مورد استفاده قرار گرفتند.

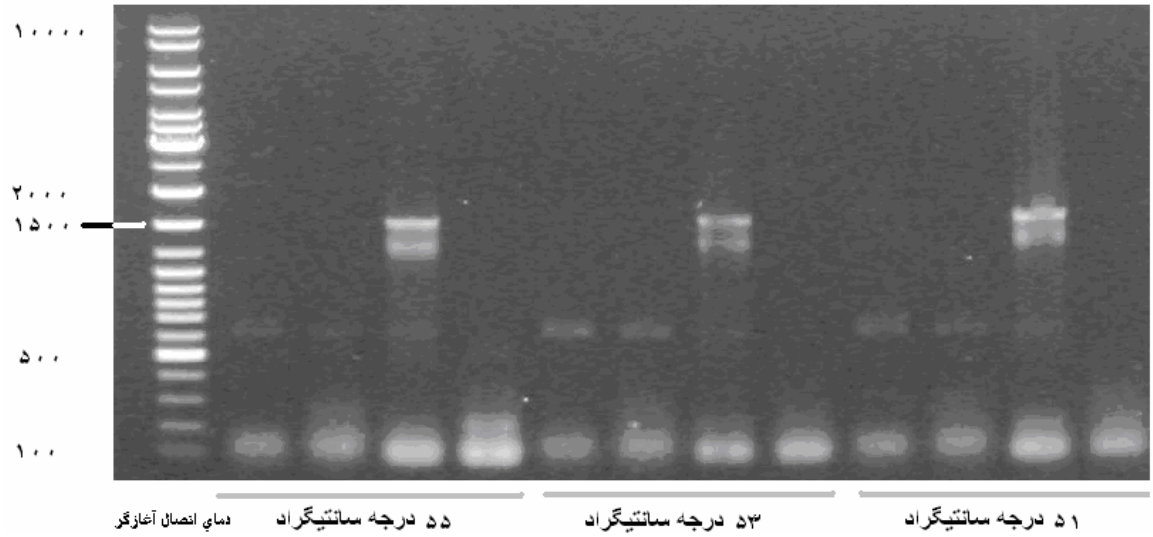
تأیید انتقال ژن به باکتری، با استفاده از PCR

با استفاده از شرایط واکنش مورد استفاده در تکثیر ژن *RGL2* یک کلنی از هر یک از محیط‌های فوق در PCR تکثیر شده و حاصل کار روی ژل اجرا گردید تا اندازه نمونه تکثیر شده بدست آید. با تطابق این اندازه با اندازه ژن مورد نظر عملیات موفقیت‌آمیز تلقی گردید.

نتایج

با اجرای مکرر PCR روی نمونه‌های DNA و تکرار با چند دمای اتصال، ژن مورد نظر تکثیر گردید که نتیجه حاصل از اجرای آن بر روی ژل آگارز در شکل ۱ ارائه شده است. پس از هضم DNAی تکثیر شده به همراه پلاسمید ناقل و راندن نتایج هضم پلاسمید ناقل بر روی ژل، نتایج مورد تأیید قرار گرفت.

با اتصال ژن مورد نظر به پلاسمید ناقل و انتقال آن به باکتری و کشت باکتری بر روی محیط کشت، تشکیل کلنی باکتری بر روی محیط کشت در حضور آنتی بیوتیک، جهت گزینش باکتری تراریخته، حاکی از حضور باکتری مورد نظر که پلاسمید نیز به آن انتقال یافته قلمداد گردید. با این حال، اجرای PCR بر روی نمونه‌ها و حصول باند مطلوب نیز کلن شدن ژن را تأیید نمود. به عبارت دیگر، با تکثیر ژن *RGL2* با اندازه ۱۵۰۰ کیلو جفت باز بر روی نمونه‌های گرفته شده از کلنی باکتریهای مورد اشاره و در حضور آغازگرهای اولیه این امر تأیید گردید.



شکل ۱- نتیجه حاصل از PCR جهت تکثیر ژن *RGL2* از ژنوم آرابیدوپسیس

بحث

در خصوص تکثیر ژن مورد نظر لازم به یادآوری است که تنها نمونه DNA استخراج شده از اکوتیپ کلمبیای آرابیدوپسیس به این شرایط واکنش مثبت نشان داد و تکرار اجرای PCR و حصول نتیجه یکسان این نتیجه را قابل اعتماد نمود. ضمن اینکه سه دمای اتصال آغازگرهای بکار گرفته شده نیز نتیجه مشابهی نشان دادند. اگرچه تراکم باندهای حاصل که به دلیل تفاوت نسبی شدت عمل آغازگرهای بکار رفته در دماهای مذکور بود، اما تفاوت جزئی از خود نشان دادند، ولی حصول باند یکسان

در این دماهای اتصال نیز مزید بر اطمینان گردید. اندازه ۱۵۰۰ کیلوجفت باز با استفاده از مارکر نردبانی از GeneRuler مورد تأیید قرار گرفت. استفاده از دو روش خالص سازی DNA به صورت همزمان این اطمینان را حاصل نمود که باند مورد نظر به میزان قابل توجهی به خلوص رسیده است. نتیجه حاصل از PCR به خوبی بر روی ژل با دمای پایین اجرا شده و خالص سازی گردید. لازم به توضیح است که تکرار هریک از این مراحل و حصول نتایج قطعی و اطمینان بخش، جهت افزایش ضریب اطمینان در دستور کار قرار گرفت.

منابع مورد استفاده

Berardini, T.Z., Bollman, K., Sun, H., and Poethig, R.S., 2001. Regulation of vegetative phase change in *Arabidopsis thaliana* by cyclophilin 40. Science, 291: 2405–2407.

Bewley, J.D., 1997. Seed germination and dormancy. Plant Cell, 9**:** 1055-1066.

Davies, P.J., 1995. Plant Hormones: Physiology, Biochemistry, and Molecular Biology. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands.

Dill, A., Jung, H.S., and Sun, T.P., 2001. The DELLA motif is essential for gibberellin-induced degradation of RGA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98: 14162–14167.

Fleet, C.M. and Sun, T.P., 2005. A DELLAcate balance: the role of gibberellin in plant morphogenesis. Curr. Opin. Plant Biol., 8: 77–85.

Gan, Y., Kumimoto, R., Liu, C., Ratcliffe, O., Yu H. and Broun, P., 2006. Glabrous inflorescence stems modulates the regulation by gibberellins of epidermal differentiation and shoot maturation in *Arabidopsis*. The Plant Cell, 18: 1383-1395.

Groot, E.P. and Meicenheimer, R.D., 2000. Comparison of leaf plastochron index and allometric analyses of tooth development in *Arabidopsis thaliana*. J. Plant Growth Regul., 19: 77–89.

Hunter, C., Sun, H. and Poethig, R.S., 2003. The *Arabidopsis* heterochronic gene ZIPPY is an ARGONAUTE family member. Curr. Biol., 13: 1734–1739.

Lee, S., Cheng, H., King, K. E., Wang, W., He, Y., Hussain, A., Lo, J., Harberd, N. P. and Peng, J., 2002. Gibberellin regulates *Arabidopsis* seed germination via *RGL2*, a *GAI/RGA*-like gene whose expression is up-regulated following imbibitions Genes and Development, 16: 646-658,

McGinnis, K.M., Thomas, S.G., Soule, J.D., Strader, L.C., Zale, J.M., Sun, T.P. and Steber, C.M., 2003. The *Arabidopsis SLEEPY1* gene encodes a putative F-box subunit of an SCF E3 ubiquitin ligase. Plant Cell, 15: 1120–1130

Meyerowitz, E.M. and Somerville, C.R., 1994. *Arabidopsis*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.

Murray, M.G. and Thompson, M.F., 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucl. Acid Res. 8: 4321-4325.

Nakajima, K., Sena, G., Nawy, T. and Benfey, P.N., 2001. Intercellular movement of the putative transcription factor SHR in root patterning. Nature, 413**:** 307-311.

Peng, J.R., Carol, P., Richards, D.E., King, K.E., Cowling, R.J., Murphy, G.P. and Harberd, N.P., 1997. The *Arabidopsis GAI* gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses. Genes and Development. 11**:** 3194-3205.

Peng, J.R., Richards, D.E., Hartley, N.M., Murphy, G.P., Devos, K.M., Flintham, J.E., Beales, J., Fish, L.J., Worland, A.J. and Pelica, F., 1999. "Green Revolution" genes encode mutant gibberellin response modulators. Nature 400: 256-261.

Silverstone, A.L., Ciampaglio, C.N. and Sun, T.P., 1998. The *Arabidopsis RGA* gene encodes a transcriptional regulator repressing the gibberellin signal transduction pathway. Plant Cell 10: 155-169.

Steber, C.M, Cooney, S.E., and McCourt, P., 1998. Isolation of the GA-response mutant sly1 as a suppressor of ABI1-1 in *Arabidopsis thaliana.* Genetics 149: 509-521.

Cloning the *RGL2* gene from *Arabidopsis thaliana* genomic DNA

H. Mirzaie-Nodoushan

Research Institute of Forests and Rangelands, P.O. Box: 13185-116, Tehran, Iran. E-mail: nodoushan2003@yahoo.com

Abstract

There are vast endeavors by scientists to investigate gibberellin synthesis cycle in plant kingdom. One of the known genes that are supposed to be effective in gibberellin synthesis is *RGL2* which was cloned in this study. Using extracted DNA from Colombia ecotype of *Arabidopsis thaliana*, the gene was amplified using specific primers designed based on the *RGL2* gene sequence. The PET-32a(+) plasmid was selected for the gene cloning. The plasmid was digested by two specific restriction enzymes, *Nco* I and *Sal* I along with the DNA sample. Ligating the gene to the vector, an *E. coli* strain, XAL-Gold was used for the gene transformation. PCR conducted on the transformed bacteria confirmed the accuracy of the cloning.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*, *RGL2*, cloning and gibberellin.