

mRNA purification from *Musa* spp. leaves

Purificación de ARNm a partir de hojas de *Musa* spp.

C. Giménez and M. Colmenares

Laboratorio de Biotecnología Vegetal de LUZ BioVeLUZ. Departamento de Biología. Facultad Experimental de Ciencias. La Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela.

Abstract

Phenolic compounds of banana leaves cause much interference during the nucleic acids extraction and isolation. Therefore, improvement of RNA purification methods to achieve an adequate quality and quantity mRNA for expression analysis is required. A modified cetyl-trimethylammonium bromide (CTAB) and conventional Hot Phenol were tested for total RNA purification from leaves of *Musa* spp. Furthermore, the antioxidants; mercaptoethanol, dithiothreitol (DDT) and Polyvinylpyrrolidone (PVP) were evaluated. Mercaptoethanol (1%) in the extraction buffer was the best antioxidant. However, high concentrations of mercaptoethanol or DDT decreased total ARN recovery. All the protocols used showed DNA contamination, which was eliminated by DNase digestion. In conclusion, a modified CTAB protocol is suitable for RNA purification from *Musa* leaves, using mercaptoethanol, as antioxidant agent at 1% in the extraction buffer followed by rigorous DNase digestion.

Key words: *Musa* leaves, RNA, CTAB, Mercaptoethanol, Dithiothreitol, DNA contamination.

Resumen

Los compuestos fenólicos de las hojas de banana causan mucha interferencia durante la extracción y aislamiento de ácidos nucleicos, por lo que se requiere mejorar los métodos para la purificación de ARN, con el objeto de obtener cantidades adecuadas de ARN mensajero de calidad, para realizar estudios de expresión genética. En esta investigación, se probaron dos métodos

para la purificación de ARN total a partir de hojas de *Musa* spp., un método modificado basado en la sal de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) y el método convencional del fenol caliente. Adicionalmente se evaluó el efecto de diferentes antioxidantes como el mercaptoetanol, el dithiothreitol (DDT) y la Polivinilpirrolidona (PVP). El mercaptoetanol al 1% en el amortiguador de extracción, fue el mejor antioxidante. Sin embargo, concentraciones mayores al 1% de mercaptoetanol o DDT disminuyen la recuperación del ARN total. Todos los protocolos ensayados mostraron contaminación con ADN, el cual fue eliminado mediante una rigurosa digestión con ADNse. En conclusión el protocolo modificado basado en la sal de CTAB fue adecuado para la extracción de ARN total a partir de hojas de *Musa*, suplementado con 1% de mercaptoetanol en el amortiguador extracción seguido de una digestión rigurosa con ADNsa.

Palabras clave: Hojas de *Musa*, ARN, CTAB, mercaptoetanol, Ditiotreitól, contaminación por ADN.

Introduction

Isolation of pure RNA from banana leaves can be difficult due to high level of ribonucleases, polysaccharides, pectins, and polyphenols. The presence of these substances can affect the quality and/or quantity of purified RNA. The major problem for RNA purification from *Musa* fruit is the high concentration of polysaccharides (Mehtar *et al.*, 2000), but in leaves, the polyphenolic oxidation is the main problem which promotes the nucleic acid degradation or inhibition of downstream procedures such as cDNA synthesis, differential display reverse transcription, cDNA-AFLP (Koonjul *et al.*, 1999). In *Musa*, only one method for RNA isolation has been reported from banana pulp (Mehtar *et al.*, 2000). This is a modified CTAB/NaCl method, followed by one simple polysaccharide precipitation step.

Other method based on hot phenol, Sodium dodecyl sulphate (SDS) and NaCl for nucleic acid precipitation followed by LiCl

Introducción

El aislamiento de ARN puro a partir de hojas banana puede ser difícil debido al elevado nivel de ribonucleasas, polisacáridos, pectinas y polifenoles. La presencia de estas sustancias puede afectar la calidad y/o cantidad de ARN purificado. El problema principal para la purificación del ARN a partir de frutos de *Musa* es la elevada concentración de polisacáridos (Mehtar *et al.*, 2000), pero en las hojas, la oxidación polifenólica es el problema principal que promueve la degradación nucleica o inhibición de los procedimientos corriente abajo tales como la síntesis de ADNc, transcripción reversa de visualización diferencial, ADNc-AFLP (Koonjul *et al.*, 1999). En *Musa*, solamente un método para el aislamiento del ARN ha sido reportado para pulpa de banana (Mehtar *et al.*, 2000). Este es un método CTAB/NaCl modificado, seguido por un paso de precipitación simple de polisacárido.

Otro método basado en fenol caliente, dodecil sulfato de sodio (SDS)

precipitation of total RNA had been used in different plant tissues (De Vries *et al.*, 1988, Draper *et al.*, 1988, Salter and Conlon, 2007). However, these protocols leave traces of polyphenol that could inhibit PCR amplifications. Then, the main objective of this research was to develop a suitable protocol for total RNA isolation from *Musa* leaves for expression analysis.

Materials and methods

Leaves of different banana wild species *Musa balbisiana* (BB), *Musa acuminata* (AA) Zebrina, and cultivars Pisang Mas (AA), FHIA-02 (AAAA), Williams (AAA) and Grand Nain (AAA) were employed for RNA isolation.

Total RNA extraction protocols

Hot-Phenol

Total RNA purification using hot-phenol was performed following De Vries *et al.*, (1988) protocol from 1.5 g of fresh fully expanded leaves, and carefully grounded it in a mortar with liquid nitrogen to obtain a fine powder.

CTAB method modified for banana leaves

This method was adapted from the original Doyle and Doyle (1990) protocol for DNA purification and Mehar *et al.*, (2000) CTAB protocol for total RNA purification from banana fruits.

Freeze leaves (1.5 g) were carefully ground in a mortar with liquid nitrogen to obtain a fine powder. Then, this powder was transferred to a centrifuge tube (50 mL) and 10 mL of pre-heated (65°C)

y NaCl para precipitación de ácido nucleico seguido por la precipitación LiCl de ARN total ha sido usado en diferentes tejidos de plantas (De Vries *et al.*, 1988, Draper *et al.*, 1988, Salter and Conlon, 2007). No obstante, estos protocolos dejan trazos de polifenol que podrían inhibir las amplificaciones de PCR. De aquí, el objetivo principal de esta investigación fue desarrollar un protocolo adecuado para el aislamiento del ARN total a partir de hojas *Musa* leaves para el análisis de expresión.

Materiales y métodos

Hojas de diferentes especies silvestres de banana *Musa balbisiana* (BB), *Musa acuminata* (AA) Zebrina, y cultivares Pisang Mas (AA), FHIA-02 (AAAA), Williams (AAA) y Grand Nain (AAA) fueron empleados para el aislamiento del ARN.

Protocolos de extracción total del ARN

Fenol caliente

La purificación del ARN total usando fenol caliente fue conducida siguiendo el protocolo de De Vries *et al.*, (1988) a partir de 1.5 g de hojas frescas totalmente expandidas y cuidadosamente molidas en un mortero con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino.

Método CTAB modificado para hojas de banana

Este método fue adaptado a partir del protocolo original de Doyle y Doyle (1990) para la purificación del DNA y Mehar *et al.*, (2000) el protocolo CTAB para la purificación total del ARN a partir de frutos de banana.

Hojas congeladas (1.5 g) fueron cuidadosamente molidas en un mor-

RNA extraction buffer (2% w/v CTAB, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 1% v/v mercaptoethanol) was added followed by incubation period at 65°C for 30 min and mixed by inversion every 5 min. Then 10 mL of chloroform:isoamyl alcohol (24:1) was added and mixed during 5 min until an emulsion was formed. After centrifugation at room temperature at 5,000 g for 10 min, the aqueous phase was transferred to a new tube, and the chloroform:isoamyl alcohol (24:1) extraction was repeated as mentioned before. RNA was precipitated adding 0.3 vol. of LiCl (10 M) and 0.005 vol. of mercaptoethanol either 2 hours or overnight at 4°C. The resulting precipitate was collected by centrifugation at 4°C for 30 min at 12.000 g. The RNA pellet was washed with 1 mL of ethanol 70% v/v, and dried. The pellet was dissolved in diethyl pyrocarbonate (DEPC) treated water to perform a DNase digestion.

DNase digestion

The DNase digestion of total or messenger RNA was done with Turbo DNase enzyme from AMBION[®] following the manufacturer instructions for samples with > 200 µg/mL of DNA contamination.

Direct mRNA isolation

Direct mRNA isolation was performed following Jakobsen *et al.*, (1990) protocol.

mRNA isolation from total RNA

The messenger RNAs were isolated from total RNA by magnetic separation PolyAtract 1000 system (Promega) following the manufacturer instructions.

tero con nitrógeno líquido para obtener un polvo fino. Luego, este polvo fue transferido a un tubo centrífugo (50 mL) y 10 mL de extracción precalentada (65°C) de ARN (2% w/v CTAB, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 1% v/v mercaptoetanol) fue añadido después de un período de incubación a 65°C durante 30 minutos y mezclado por inversión cada 5 min. Luego se añadieron 10 mL de alcohol cloroformo:isoamil (24:1) y se mezclaron durante 5 min hasta que se formó una emulsión. Después se centrifugó a temperatura ambiente a 5.000 g por 10 min, la fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo, y la extracción alcohol cloroformo:isoamyl (24:1) fue repetida como se describió con anterioridad. El ARN se precipitó añadiendo 0.3 volumen de LiCl (10 M) y 0.005 volumen de mercaptoetanol tanto a las 2 horas como durante toda la noche a 4°C. El resultado precipitado fue recolectado por centrifugación a 4°C durante 30 min a 12.000 g. El ARN pellet fue lavado con 1 mL de etanol al 70% v/v, y luego secado. El pellet fue disuelto in dietil pirocarbonato (DEPC) tratada con agua para conducir una digestión ADNse.

Digestión de ADNsa

La digestión del ADNse del ARN total o mensajero fue hecha con una enzima Turbo ADNse de AMBION[®] siguiendo las instrucciones del fabricante para muestras con > 200 µg.mL⁻¹ de la contaminación del ADN.

Aislamiento directo del ARNm

El aislamiento del ARNm directo fue hecho siguiendo el protocolo de Jakobsen *et al.*, (1990).

Verification of RNA contamination

Previous the reverse transcription of RNA to cDNA, all the samples were verified by a conventional PCR amplification of 50 μ l reaction volume (100 ng RNA; 3 mM $MgCl_2$; 1.25 U, Taq DNA Polymerase; 1 μ M Primers; 200 μ M dNTPs; 1x Taq buffer) of Musa actin gene (Forward 5'-GAAGATTCTTACGGAGAGAGG-3' and Reverse 5'-GATGGCTGGAAGAGAACCTC-3') using RNA as a template, to verify the possible contamination with DNA. The thermal cycling profile was as follows: 5 min at 94°C for initial denaturation step, 40 cycles each: 94°C for 30 s, 56°C for 30 s and 72°C for 1 min, with a final extension at 72°C for 5 min. PCR products were verified by electrophoresis in 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide (0.1 mg.L⁻¹) and visualized with UV light (302 nm).

PCR differential displays amplification

First strand cDNA retrotranscription was done from 100 ng of mRNA following the SuperScript III (Invitrogen) manufacturer recommendations.

The PCR differential displays amplifications were carried out in a final volume of 25 μ l (3 mM $MgCl_2$; 1.25 U Taq DNA Polymerase; 200 μ M dNTPs; 1x Taq buffer) with 50 to 100 ng of retrotranscriptions as a template and using the oligos (1 μ M) dT₍₁₈₎VG and OPT-13 (AGGACTGCCA). Additionally, due to possible contamination with polyphenol traces,

Aislamiento del mRNA total a partir del ARN

El ARNs mensajero fue aislado a partir del ARN total mediante separación magnética PolyAtract 1000 sistema (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Verificación de la contaminación del ARN

Antes de la transcripción reversa del ARN a ADNc, todas las muestras fueron verificadas mediante amplificación PCR convencional de 50 μ l de volumen de reacción (100 ng ARN; 3 mM $MgCl_2$; 1.25 U, Taq ADN Polimerasa; 1 μ M cebadores; 200 μ M dNTPs; 1x Taq buffer) de genes de Musa actina (Forward 5'-GAAGATTCTTACGGAGAGAGG-3' y reverso 5'-GATGGCTGGAAGAGAACCTC-3') usando ARN como un templado, para verificar la posible contaminación con ADN. El perfil de ciclo térmico fue obtenido de la siguiente manera: 5 min a 94°C para el paso de desnaturación inicial, 40 ciclos cada uno: 94°C durante 30 s, 56°C durante 30 s y 72°C durante 1 min, con una extensión final a 72°C durante 5 min. Los productos PCR fueron verificados por electrofóresis en 1.5% de gel agarosa teñido con bromuro de etidio (0,1 mg.L⁻¹) y visualizado con luz UV (302 nm).

Amplificación de la pantalla diferencial del PCR

La primera retro transcripción de la cadena del ADNc fue hecha a partir de 100 ng de mRNA siguiendo las recomendaciones del fabricante SuperScript III (Invitrogen).

Las amplificaciones de visualización diferencial del PCR fueron con-

polyvinylpyrrolidone (PVP) (360 kDa, Sigma^{CS}) at different concentrations (0, 0.1 and 0.5% p/v) was added to improve cDNAs by PCR amplification.

The thermal cycling conditions were as follows: 5 min at 94°C for initial denaturation step, 40 cycles each: 94°C for 30 s, 45°C for 30 s and 72°C for 1 min, with a final extension at 72°C for 5 min. PCR products were verified by electrophoresis in 1.5% agarose gels and stained with ethidium bromide (0.1 mg.L⁻¹) and revealed with UV light (302 nm).

Results and discussion

For RNA purification from plant tissue, the protocols must have the fewest steps as possible to obtain the highest amount, purity and integrity of RNA, suitable for further application.

Hot-Phenol and modified CTAB protocols gave good results regarding total RNA integrity (figure 1 and 2). However, the Hot-Phenol protocol was laborious (two workdays), complicated, and would be no suitable for expression studies because of low expressed or very susceptible mRNA to RNase degradation. Additionally, evaluation of total RNA quality from cultivar Williams (AAA), evaluated by 260/280 ratio (1.65) (table 1) indicated that protein or phenolic contamination were still present in the sample. This situation was the same for the rest of cultivars and wild species of *Musa* spp.

The modified CTAB protocol has few purification steps, which allows to perform mRNA purification and

ducidas a un volumen final de 25 µl (3 mM MgCl₂; 1.25 U Taq ADN Polimerasa; 200 µM dNTPs; 1x Taq buffer) con 50 a 100 ng de retro transcripciones como un templado y usando los oligos (1 µM) dT₍₁₈₎ VG y OPT-13 (AGGACTGCCA). Adicionalmente, debido a la posible contaminación con trazas de polifenol, polivinilpirrolidona (PVP) (360 kDa, Sigma^{CS}) en diferentes concentraciones (0, 0.1 y 0.5% p/v) fue añadido para mejorar ADNcs por amplificación del PCR.

Las condiciones térmicas del ciclo fueron como sigue: 5 min a 94°C para el paso de la denaturación inicial, 40 ciclos cada uno: 94°C para 30 s, 45°C para 30 s y 72°C para 1 min, con una extensión final a 72°C durante 5 min. Los productos PCR fueron verificados mediante electrofóresis en 1.5% de gel de agarosa y teñidos con bromuro de etidio (0,1 mg.L⁻¹) y luego revelados con luz UV (302 nm).

Resultados y discusión

Para la purificación del ARN a partir de tejido de planta, los protocolos deben seguir los menores pasos posibles para obtener la mayor cantidad, pureza e integridad del ARN, recomendado para una posterior aplicación.

Protocolos de fenol caliente y CTAB modificado rinden Buenos resultados considerando la integridad total del ARN (figura 1 y 2). Sin embargo, el protocolo del fenol caliente fue laborioso (dos días de trabajo), complicados y serían inapropiados para los estudios de expresión debido a la baja expresión o muy susceptible

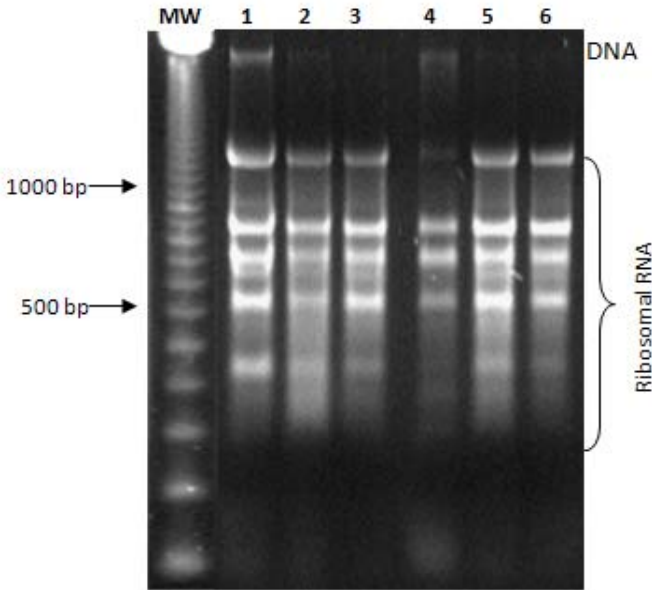


Figure 1. Purification of total RNA from 1.5 g of leaves using Hot-Phenol protocol. Lines: 1. *M. balbisiana*; 2. Williams; 3: Grand Nain; 4: FHIA-02; 5: Pisang Mas; 6: *M. acuminata* Zebrina; MW: 100 bp DNA Ladder *Invitrogen*.

Figura 1. Purificación del ARN total a partir de 1.5 g de las hojas usando el protocolo de fenol caliente. Líneas: 1. *M. balbisiana*; 2. Williams; 3: Grand Nain; 4: FHIA-02; 5: Pisang Mas; 6: *M. acuminata* Zebrina; MW: 100 bp ADN Ladder *Invitrogen*.

retrotranscription in the same workday. The efficiency for total RNA extraction using CTAB was higher than hot-phenol protocol (table 1). Two hours were enough to obtain good quantity of total RNA using LiCl, however high amounts of total RNA were recovered with overnight incubation (figure 2).

In *Musa* the CTAB method of Mehar *et al.*, (2000) had been used for RNA purification from pulp and more recently in leaves for RT-PCR analysis of resistance genes analogs (Xinwu *et al.*, 2007). However, no

ARNm a la degradación de la ARNs. Adicionalmente, la evaluación de la calidad del ARN total a partir del cultivar "Williams" (AAA), evaluado en un radio 260/280 (1.65) (cuadro 1) indicó que la proteína o la contaminación fenólica estuvieron presentes en la muestra. Esta situación fue la misma para el resto de los cultivares y especies silvestres de *Musa* spp.

El protocolo CTAB modificado tiene pocos pasos de purificación, los cuales permiten realizar la purificación y retro transcripción del mRNA en el mismo día de trabajo. La eficiencia

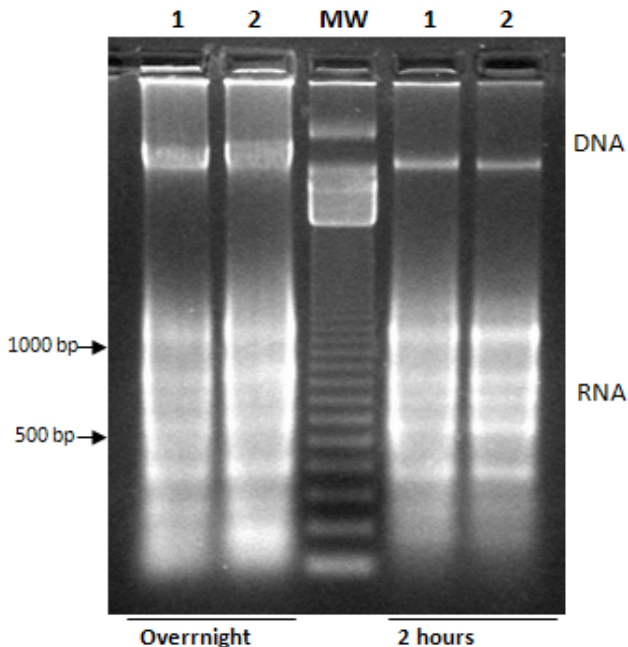


Figure 2. Total RNA isolation from banana leaves using a modified CTAB method. Lines: 1. Williams; 2. Grand Nain; MW: 100 bp DNA Ladder *Invitrogen*. Precipitation time (2 hours and overnight) with LiCl, at 4°C: 1 (Williams) and 2 (Grand Nain).

Figura 2. Aislamiento del ARN total a partir de hojas de banana usando un método de CTAB modificado. Lines: 1. Williams; 2. Grand Nain; MW: 100 bp ADN Ladder *Invitrogen*. El tiempo de precipitación (2 horas y durante toda la noche) con LiCl, a 4°C: 1 (Williams) y 2 (Grand Nain).

detailed discussion or comparison of different protocols had been published.

DNase digestion

DNA contamination was present in both protocols but CTAB protocol showed higher contamination (figure 1 and 2). Conventional treatment with DNase I digestion of mRNA purified with biotin coated magnetic particles or total RNA, did not removed this DNA contamination. To improve the DNase I digestion, the samples must be diluted, which cau-

de extracción del ARN total usando CTAB fue mayor que el protocolo del fenol caliente (cuadro 1). Dos horas fueron suficientes para obtener buena calidad de ARN total usando LiCl, no obstante, altas cantidades de ARN total fueron recuperadas con incubación nocturna (figura 2).

En *Musa* el método CTAB de Mehar *et al.*, (2000) ha sido usado para la purificación del ARN a partir de pulpa y más recientemente in hojas para en análisis de resistencia RT-PCR de genes análogos (Xinwu *et al.*,

Table 1. Purification efficiency and quality of total RNA from leaves of *Musa* (AAA) cv. Williams.**Tabla 1. Eficiencia de la purificación y cualidad total de ARN a partir de hojas de *Musa* (AAA) cv. "Williams".**

Method	Fresh weight (g)	RNA ratio ABS $\lambda_{260}/\lambda_{280}$	Total RNA (μg)	Efficiency ($\mu\text{g RNA/g tissue}$)
Hot-Phenol	1.50	1.65	243	162
Modified CTAB	1.50	1.96	382	255

se RNA losses due to the necessity of reprecipitation to concentrate the sample after DNase digestion and Phenol: Chloroform extraction. PCR amplification using mRNA as a template and actin specific primers showed similar amplification that control reactions with genomic DNA as a template.

Naderi *et al.*, (2004), reported that specimens purified by the LiCl method had high levels of genomic DNA. This contamination was detected by agarose gel and Agilent Bioanalyzer both revealed that even the column method had genomic DNA carry over. Then, the application of DNase I (2 Units/1 μg of total RNA) to diluted samples followed by phenol extraction was the most effective method for removal of this genomic DNA contamination. Dilution leads to easier access of DNase to genomic DNA and probably allows more efficient phenol extraction due to lower viscosity of the sample.

Our results demonstrate that conventional DNase I digestions do not remove completely the DNA contamination. However, Turbo DNase from AMBION® which has 10 fold more activity than the

2007). Sin embargo, la discusión no detallada discusión o comparación de diferente protocolos han sido publicados.

Digestión de la ADNsa

La contaminación del ADN estuvo presente en ambos protocolos pero los protocolos CTAB mostraron la contaminación más alta (figura 1 y 2). El tratamiento convencional con digestión de la ADNsa I del mRNA purificado con biotina cubierta con partículas magnéticas o ARN total, no removió esta contaminación del ADN. Para mejorar la digestión del ADNsa I, las muestras deben ser diluidas, lo cual causa pérdidas del ARN debido a la necesidad de reprecipitación para concentrar la muestra después de la digestión de la ADNsa y el fenol: Extracción del cloroformo. La amplificación del PCR usando mRNA como templado e iniciadores específicos de la actina mostraron similar amplificación que las reacciones de control con ADN genómico como templado.

Naderi *et al.*, (2004), reportaron que los especímenes purificados mediante método LiCl tuvieron altos niveles de ADN genómico. Esta contaminación fue detectada por gel de agarosa y bioanalizador Agilent, am-

conventional DNase I, eliminate this contamination without any sample dilution. Samples with DNA contamination >200 µg of nucleic acid per ml were treated with 4 Units of Turbo DNase enzyme, adding only half of the TURBO DNase to the initial reaction and incubated for 30 min, after that the remainder enzyme was added and incubating for another 30 min to completed eliminate the contaminant DNA. Special resin, DNase inactivation reagent (0.2 volumes) AMBION®, was used to remove the turbo DNase following the cDNA transcription without any lost due to the purification process (Ambion, 2004).

Turbo DNase digestion must be performed to remove the contaminant DNA from total RNA following mRNA purification with biotin coated magnetic particles, which could remove the DNase enzyme without any Phenol:chlorophorm extractions. Alternatively total RNA could be used as a template for expression analysis using the conventional Turbo DNase protocol with the inactivation reagent. After that, it is recommended to perform as soon as possible the cDNA synthesis to prevent the mRNA degradation, especially when the experiments imply the analysis of labile and low abundant mRNAs.

Antioxidant Effects

The concentration effect of mercaptoethanol and DTT on total RNA purification was evaluated using the CTAB protocol. For total nucleic acid recovery, the mercaptoethanol at 2% showed the best yield, while of DDT higher than 1% decrease the nucleic acid recovery (figure 3).

bos revelaron que incluso el método de la columna tuvo ADN genómico aplazado. Entonces, la aplicación de la ADNsa I (2 unidades/1 µg de ARN total) para muestras diluidas seguidas por la extracción del fenol fue el método más efectivo para remover esta contaminación del ADN genómico. La dilución conduce a un acceso más fácil de la ADNsa al ADN genómico y probablemente permite una extracción más eficiente del fenol debido a la viscosidad más baja de la muestra.

Nuestros resultados demuestran que las digestiones de la ADNsa I convencionales no remueven completamente la contaminación del ADN. Sin embargo, Turbo ADNsa a partir de AMBION® el cual tuvo 10 variaciones más de mayor actividad que la ADNsa I convencional, elimina esta contaminación sin ninguna dilución de la muestra. Las muestras con contaminación de ADN >200 µg de ácido nucleico por ml fueron tratadas con 4 unidades de enzima Turbo ADNsa, añadiendo sólo la mitad de TURBO ADNsa para la reacción inicial e incubados durante 30 min, después que la enzima restante fue añadida e incubada durante otros 30 min para la eliminación completa del ADN contaminante. La resina especial, el reactivo de la inactivación de ADNsa (0.2 volúmenes) AMBION®, fue usado para remover la ADNsa turbo siguiendo la trascipción del ADNc sin ninguna pérdida debido al proceso de purificación (Ambion, 2004).

La digestión ADNsa turbo debe ser realizada para remover el ADN contaminante a partir del ARN total siguiendo la purificación del ARNm

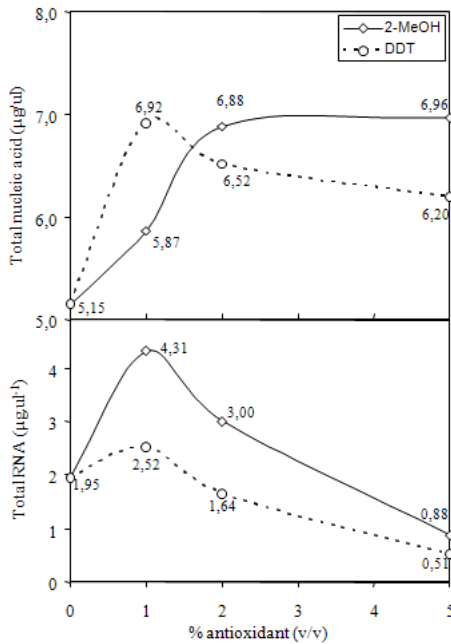


Figure 3. Antioxidant effects on the isolation of total nucleic acids (upper panel) and subsequent recovering of total RNA (lower panel) using CTAB protocol from leaves (1.5 g) of the cultivar Williams. Concentrations were calculated using absorbance measures at 260 nm. Dithiothreitol (DDT), 2-Mercaptoethanol (2-MeOH).

Figura 3. Efectos antioxidantes en el aislamiento de los ácidos nucleicos totales (panel superior) y la subsiguiente recuperación del ARN total (panel inferior) usando el protocolo CTAB a partir de hojas (1.5 g) del cultivar "Williams". Las concentraciones fueron calculadas usando medidas de absorción en 260 nm. Ditiotretitol (DDT), 2-Mercaptoetanol (2-MeOH).

Regarding total RNA purification, 1% of mercaptoethanol yield 2 fold the DDT efficiency (figure 3). Higher concentrations of both antioxidants decreased the efficiency of RNA purification (figure 3).

Thea and Lawrence (1996) reported the ability of phenolics to crosslink to RNA under oxidation condition, and the capacity of

con biotina cubierta por partículas magnéticas la cual podría remover la enzima ADNsa sin ninguna extracción fenol:cloroformo. Alternativamente, el ARN total puede ser usado como un templado para el análisis de la expresión usando el protocolo convencional ADNsa Turbo con el reactivo de inactivación. Después de esto, se recomienda realizar lo más

mercaptoethanol and DDT to change the chemical conditions for RNA purification to prevent this undesirable interaction. Also, mercaptoethanol is reported as the best antioxidant for DNA purification of *Dactylis glomerata* (Costa *et al.*, 2002),

mRNA isolation

Direct isolation of mRNA from banana leaves following Jakobsen *et al.*, (1990) protocol did not work. The appropriate way to obtain messenger RNA was starting from total RNA. On the other hand, direct cDNA synthesis from total RNA is possible if a rigorous DNase digestion is performed. However, cDNA starting from total RNA purified with Hot-Phenol protocol showed phenolic compounds contamination that interferes with PCR amplification. This contamination is eliminated adding PVP (360 kDa, Sigma) (0.5% p/v) to the reaction buffer. PVP binds to the polyphenolic compounds and eliminate their inhibitory effect on PCR reaction (figure 4) (Costa *et al.*, 2002).

Conclusions

A modified CTAB protocol is suitable for RNA purification from *Musa* leaves, using β -mercaptoethanol, as antioxidant agent at 1% in the extraction buffer.

Concentrations higher than 1% of Mercaptoethanol and DTT reduce the efficiency of total RNA recovery.

A rigorous DNase digestion of total or mRNA was necessary for the purification protocols tested in *Musa* leaves.

pronto posible la síntesis del ADNc para prevenir la degradación del ARNm, especialmente cuando los experimentos implican los análisis de inestabilidad y bajos ARNm abundantes.

Efectos antioxidantes

El efecto de concentración del mercaptoetanol y DTT en la purificación del ARN total fue evaluado usando el protocolo CTAB. Para la recuperación del ácido nucleico total, el mercaptoetanol al 2% mostró el mayor rendimiento, mientras que el DDT mayor al 1% disminuye la recuperación del ácido nucleico (figura 3). Con respecto a la purificación del ARN total, 1% de mercaptoetanol rinde 2 variaciones más que la eficiencia del DDT (figura 3). Las concentraciones más altas de ambos antioxidantes disminuyó la eficiencia de la purificación del ARN (figura 3).

Thea and Lawrence (1996) reportaron la habilidad de los fenólicos para "crosslink" el ARN bajo condiciones de oxidación y la capacidad de mercaptoetanol y DDT para cambiar las condiciones químicas de la purificación del ARN o para prevenir la interacción no deseada. También, el mercaptoetanol es reportado como el mejor antioxidante para la purificación del ADN de *Dactylis glomerata* (Costa *et al.*, 2002).

Aislamiento del ARNm

El aislamiento directo del ARNm a partir de hojas de banana siguiendo el protocolo de Jakobsen *et al.*, (1990) no funcionó. La manera apropiada de obtener un ARN mensajero fue comenzar a partir del ARN total. Por otra parte, la síntesis del ADNc a partir del ARN total es posi-

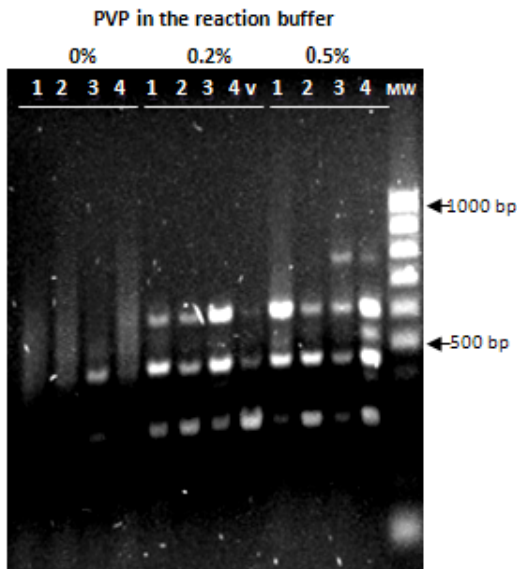


Figure 4. Differential display amplification of cDNA from total RNA purified according to Hot Phenol protocol. Lines: 1-2: Grand Nain; 3-4: Williams; MW: 100 bp DNA Ladder *Invitrogen*. PCR was performed using the primers Oligo dT₍₁₈₎VG and OPT-13 (AGGACTGCCA).

Figura 4. Amplificación de la muestra diferencial del ADNc a partir del ARN purificado de acuerdo al protocolo de fenol caliente. Líneas: 1-2: Grand Nain; 3-4: Williams; MW: 100 bp ADN Ladder *Invitrogen*. El PCR fue desarrollado usando los cebadores Oligo dT₍₁₈₎VG y OPT-13 (AGGACTGCCA).

Acknowledgements

Universidad del Zulia Council of Science CONDES-LUZ CC-318 and CC-451-06 sponsored this research.

Literature cited

Ambion. 2004. The world's best DNase improved TURBO DNA-free™. Technotes 11: 4.

Costa, R., G. Pereira and M. Tavares-de-Sousa. 2002. Estabelecimento do Protocolo de Extração de DNA e Caracterização Molecular de Uma

ble si se realiza una digestión rigurosa de ADNsa. No obstante, el ADNc iniciador a partir del ARN purificado con el protocolo del fenol caliente mostró contaminación de los componentes fenólicos que interfiere con la amplificación del PCR. Esta contaminación es eliminada añadiendo PVP (360 kDa, Sigma) (0.5% p/v) al buffer de reacción. El PVP liga a los componentes fenólicos y elimina su efecto inhibitorio en la reacción del PCR (figura 4) (Costa *et al.*, 2002).

Coleção de *Dactylis glomerata*.
Melhoramento 38: 46-53.

De Vries, S., H. Hoge and T. Biseeing. 1988. Isolation of total and polysomal RNA from plant tissues. *Plant Molecular Biology Manual* 6: 64-71.

Doyle, J. and J. L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.

Draper, J., Scott, R. J., Armitage, P., and Walden, R. (1988). *Plant Genetic Transformation and Gene Expression. A Laboratory Manual* Blackwell Scientific, Oxford, pp. 226-23.

Jakobsen, K., E. Brevold and E. Hornes. 1990. Purification of mRNA directly from crude plant tissues in 15 minutes using magnetic oligo dT microspheres. *Nucleic Acids Research* 18(12): 3669.

Koonjul, P., W. Barndt, J. Farrant and G. Lindsey. 1999. Inclusion of polyvinylpyrrolidone in the polimerasa chain reaction reverse the inhibitory effect of polyphenolic contamination of RNA. *Nucleic Acids Research* 27: 915-916.

Mehar, H., D. Puneet and N. Pravendra. 2000. A simple procedure for the isolation of high quality RNA from ripening banana fruit. *Plant Molecular Biology Reporter* 18: 109-115.

Naderi, A., A. Ahmed, N. Barbosa-Morais, S. Aparicio, J. Brenton and C. Caldas. 2004. Expression microarray reproducibility is improved by optimizing purification steps in RNA amplification and labeling. *BMC Genomics* 5:9.

Salter, M. and H. Conlon. 2007. Extraction of plant RNA. *Methods Mol Biol* 362:309-14

Conclusiones

Un protocolo CTAB modificado es apropiado para la purificación del ARN a partir de hojas *Musa*, usando β -mercaptoetanol, como agente antioxidante al 1% en la extracción del buffer.

Las concentraciones más altas que el 1% de Mercaptoetanol y DTT reduce la eficiencia de la recuperación del ARN total.

Una rigurosa digestión ADNse del total o del ARNm fue necesaria para los protocolos de purificación evaluados en hojas de *Musa*.

Agradecimiento

El Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de La Universidad del Zulia (CONDES-LUZ) CC-318 y CC-451-06 financio esta investigación.

Fin de la versión español

Thea, W. and S. Lawrence. 1996. Isolation of RNA from plant tissues. In: *A laboratory guide to RNA isolation, analysis and synthesis*. Ed. Paul Krieg, Wiley-IEEE, p 21.

Xinwu, P., L. Shengjun, J. Ying, Z. Yongqiang, W. Zhixing and J. Shirong. 2007. Isolation, characterization and phylogenetic analysis of the resistance gene analogues (RGAs) in banana (*Musa* spp.) *Plant Science* 172: 1166-1174.