

Pembangunan kaedah pengekstrakan RNA berkualiti tinggi daripada isi buah mangga Harumanis

(Development of extraction method to extract high quality RNA from Harumanis fruit flesh)

Zulkifli Ahmad Seman, Sanimah Simoh dan Muhammad Fairuz Mohd Yusof

Pengenalan

Populariti buah mangga Harumanis menyebabkan para penyelidik mula membuat kajian di peringkat molekul bagi mengetahui khasiat sebenar yang terkandung dalam buah tersebut. Beberapa kajian molekul telah dilakukan pada era genomik tanaman berkayu, tetapi kajian transkriptomik yang merupakan kajian penting biologi molekul jarang dilakukan pada spesies tumbuhan ini. Oleh itu, pemencilan RNA berkualiti tinggi daripada isi buah mangga Harumanis amat penting untuk kajian transkriptomik selain untuk kajian yang lain seperti *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR), pengekspressan RNA dan juga analisis mikroatur. Walau bagaimanapun, buah-buahan daripada tumbuhan berkayu seperti Harumanis ini didapati mempunyai kandungan sebatian polisakarida, sebatian polifenolik dan protein yang tinggi di mana komponen ini akan dibebaskan bersama dengan genomik DNA semasa proses pemecahan sel untuk membebaskan RNA. Interaksi komponen-komponen tersebut dengan RNA akan membentuk kompleks tidak larut yang menjurus kepada degradasi RNA yang seterusnya memberikan hasil RNA yang rendah. Oleh itu, amat penting untuk menyingkirkan komponen-komponen ini secara berkesan kerana ia merupakan kunci untuk mengekstrak RNA berkualiti tinggi daripada buah tanaman berkayu.

Kesukaran mengekstrak RNA daripada tisu buah tanaman berkayu memerlukan pengubahsuaian kaedah yang sedia ada untuk membangunkan kaedah lain yang khusus untuk tisu tersebut. Terdapat banyak kaedah yang telah dibangunkan, tetapi tidak berjaya untuk mengekstrak RNA yang berkualiti tinggi daripada tisu buah Harumanis. Kaedah berasaskan cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) yang amat popular untuk pengekstrakan DNA/RNA telah dibangunkan untuk tisu yang mempunyai kandungan polisakarida dan sebatian fenolik yang tinggi. Malangnya, kaedah ini mengambil masa yang lama, melibatkan langkah yang panjang, sangat kompleks dan dalam beberapa kes kualiti RNA yang diperolehi didapati agak rendah. Di samping itu, kit komersial untuk pengekstrakan RNA yang ada di pasaran belum berupaya untuk mengekstrak RNA berkualiti tinggi daripada tisu tumbuhan yang mempunyai jumlah metabolit sekunder yang tinggi. Oleh itu, kaedah berasaskan CTAB bebas

fenol yang telah dimodifikasi sebelumnya oleh penyelidik Morante-Carriel et al. (2014) telah dimodifikasi sekali lagi supaya dapat disesuaikan untuk mengekstrak RNA daripada tisu buah mangga Harumanis yang mempunyai kandungan gula/air yang tinggi di samping kaya dengan polisakarida, polifenolik dan bahan-bahan metabolit yang lain.

Pembangunan kaedah melibatkan beberapa langkah dan penekanan diberikan untuk menyingkirkan metabolit sekunder, polisakarida dan polifenol dengan melibatkan langkah pembasuhan

Kaedah yang dibangunkan merupakan modifikasi daripada kaedah pengekstrakan RNA yang dibangunkan oleh kumpulan penyelidik Morante-Carriel et al. pada tahun 2014 berdasarkan kajian pengekstrakan RNA daripada pelbagai bahagian pada tumbuhan longan termasuk buah. Pengubahsuaian dilakukan berdasarkan kehendak yang diperlukan untuk mengekstrak RNA daripada isi buah mangga Harumanis. Sampel isi buah Harumanis pada peringkat 4 tahap kemasakan (*Gambar 1* dan *Jadual 1*) telah dihancurkan kepada bentuk serbuk menggunakan nitrogen cecair dan disimpan di dalam peti sejuk beku pada suhu -70°C sehingga sedia untuk digunakan.

Terdapat tiga langkah yang terlibat untuk memperoleh RNA berkepekatan tinggi dan tulen. Langkah pertama melibatkan pembasuhan sampel hancur (yang telah dilumatkan menggunakan nitrogen cecair) di mana langkah ini amat kritikal untuk menyingkirkan metabolit sekunder, polisakarida, air dan gula yang boleh mengganggu proses pengekstrakan jika komponen-komponen tersebut tidak disingkirkan. Sebanyak 10 mL penimbal pembasuhan (100 mM Tris-HCL (pH8.0), 0.35 M sorbitol, 10% (w/v) PEG (polyethylene glycol) 400 dan 2% (v/v) β -mercaptoethanol) ditambah ke dalam setiap 1 g sampel sebelum diempar pada kelajuan 3500x g selama 15 minit pada



Gambar 1. Sampel buah mangga Harumanis pada indeks kemasakan 4 yang telah digunakan untuk pengekstrakan RNA

Jadual 1. Pencirian tahap kematangan dan kemasakan buah mangga Harumanis

Indeks	Umur	Pencirian
0	Minggu 0 – 7	Pramatang. Belum boleh dituai
1	Minggu 8 (Hari pertama)	Matang. Sedia untuk dituai
2	Minggu 8 (Hari kedua)	Matang. Sebaik sahaja dituai buah dicuci, rawatan air suam dan dikelaskan mengikut berat dan kebersihan kulit buah
3	Minggu 8 (Hari keenam)	Peringkat awal kemasakan. Pemasakan tiruan menggunakan <i>calcium carbide</i> . Kulit yang lembut dan sedikit gelap
4	Minggu 8 (Hari ketujuh)	Hampir masak. Isi Lembut, kulit sedikit lembut dan mempunyai sedikit bau manis
5	Minggu 9 (hari pertama)	Kemasakan optimum. Kulit licin, isi lembut dan mempunyai bau manis yang kuat

(Sumber: Zakaria et al. 2012)

suhu 4 °C. Supernatan yang mengandungi sisa-sisa ampaiian dibuang manakala pelet yang tinggal diampaiikan menggunakan penimbal pengekstrakan. Langkah pembasuhan ini boleh diulang bergantung kepada tahap kandungan metabolit sekunder dalam sampel yang digunakan.

Kaedah pengekstrakan RNA yang ditambah baik

Kebanyakan kaedah pengekstrakan RNA yang telah dibangunkan adalah berasaskan penggunaan CTAB yang melibatkan pemecahan sel oleh penimbal lisis yang berpiawai, pemisahan fenol-kloroform untuk membuang komponen sel dan seterusnya RNA dimendakkan oleh litium klorida bersama-sama dengan etanol. Walau bagaimanapun, kaedah ini memberikan hasil dan kualiti RNA yang rendah apabila digunakan untuk mengekstrak RNA daripada isi buah yang mempunyai kandungan polisakarida, protein dan metabolit sekunder yang tinggi. Ini adalah kerana langkah pemendakan RNA oleh fenol-kloroform tidak efisien untuk menyingkirkan polisakarida dan protein-protein di samping berlakunya kehilangan RNA yang diekstrak (20 – 25%) setiap kali proses pembuangan supernatan dilakukan. Oleh itu, kaedah yang dibangunkan ini adalah merupakan penambahbaikan kepada kaedah sedia ada yang melibatkan kombinasi antara penggunaan agen-agen optimum yang terlibat dalam kaedah pengekstrakan berasaskan CTAB dan beberapa langkah kritikal lain yang telah ditambah baik.

Penimbal pengekstrakan (300 mM Tris-HCl (pH 8.0), 25 mM EDTA (*Ethylenediaminetetraacetic acid*), 2 M NaCl, 2% (w/v) polyvinyl pyrrolidone (PVP K40) and 0.05% (w/v) spermidine trihydrochloride) diformulasi berdasarkan kaedah asal oleh Morante-Carriel et al. (2014) dengan pengubahsuaian terhadap beberapa komponen bahan kimia. PVPP (Polyvinylpolypyrrolidone) yang asalnya telah ditukar kepada PVP (Polyvinylpyrrolidone) disebabkan kesukaran

PVPP untuk larut semasa penyediaan larutan penimbal. Keduanya mempunyai fungsi sama yang mempunyai interaksi yang kuat (dengan pembentukan ikatan hidrogen) dengan polifenol untuk membentuk kompleks. Oleh itu, interaksi antara polifenol dengan RNA dapat dielak dan seterusnya dapat mengatasi masalah kehilangan RNA yang diekstrak. Sebanyak 10 mL penimbal pengekstrakan diperlukan untuk setiap 1 g sampel dengan penambahan 2% (v/v) β -mercaptoethanol yang berperanan sebagai agen penurunan yang kuat untuk menghalang pengoksidaan polifenol di samping dapat menyahkan RNase secara berkesan.

Campuran sampel dan larutan penimbal disebatikan (vorteks) dan dieram selama 10 minit pada suhu 65 °C dengan guncangan setiap 2 minit semasa tempoh eraman. RNA diekstrak daripada campuran tersebut dengan mencampurkan (pada kuantiti yang sama) kloroform Iso-amil alkohol (Chl/Iaa, 24:1) sebelum diempar pada kelajuan 5000x g selama 10 minit pada suhu 4 °C. Lapisan akuas dipindahkan ke tiub baharu dan diulang sekali lagi langkah yang sama. Lapisan akuas dipindahkan ke tiub baharu dan ditambah dengan 0.1 vol. 3 M larutan sodium asetat (NaOAc), pH 5.2 dan 0.6 vol. isopropanol. Campuran disebatikan sebelum disimpan di dalam peti sejuk beku pada suhu -80 °C selama 30 minit atau pada suhu -20 °C selama 1 jam. Selepas tempoh penyimpanan tersebut, pengemparan dilakukan (8,000x g selama 20 minit pada 4 °C) untuk memendakkan RNA/DNA dan sisa-sisa karbohidrat yang masih tertinggal (terbentuk sebagai pelet). Sebanyak 1 mL air steril digunakan untuk melarutkan pelet sebelum dipindahkan ke dalam tiub pengemparan mikro (1.5 mL) untuk proses penulenan RNA.

Penulenan RNA

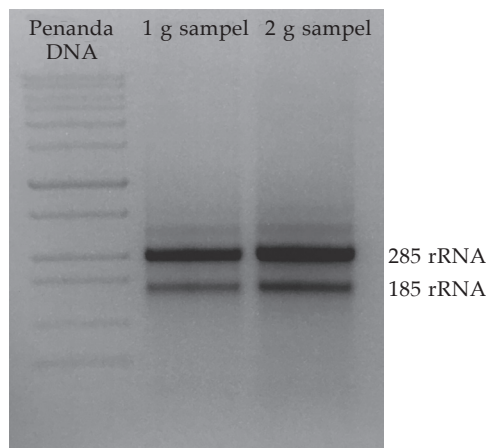
Bagi memastikan RNA yang diperoleh berkualiti tinggi, dua langkah pemisahan RNA menggunakan 10 M LiCl telah diperkenalkan untuk memisahkan RNA daripada polisakarida dan residu DNA. Sebanyak 10 M LiCl berfungsi sebagai agen dihidrat yang kuat untuk memastikan hanya pemendakan RNA sahaja yang berlaku. Pelet diampai sebat oleh 0.3 vol. 10 M LiCl dan diletakkan ke dalam ais selama 90 minit sebelum diempar pada 8,000x g selama 30 minit pada suhu 4 °C. Langkah yang sama diulang sekali lagi. Pelet RNA yang terhasil diampai menggunakan 0.1 mL air steril, 0.1 vol. 3 M NaOAc pH 5.2 dan 2 vol. etanol sejuk serta merta diempar pada 8,000x g selama 20 minit pada suhu 4 °C. Pelet dicuci menggunakan 70% (v/v) etanol sejuk, dibiarkan kering pada suhu bilik sebelum diampai dengan menambahkan 100 μ L air steril. Larutan RNA ini akan melalui proses pencucian seterusnya bagi memastikan RNA yang terhasil betul-betul tulen di samping untuk menyingkirkan residu DNA. Untuk langkah ini, kit komersial 'RNA isolation kit' (QIAGEN, USA) dan set 'RNase-Free DNase' (QIAGEN, USA) telah digunakan berpanduan kepada langkah-langkah di dalam manual yang dibekalkan oleh kit-kit tersebut.

Kualiti RNA yang diekstrak melepasi piawaian untuk kajian biologi molekul

Ketulen dan kepekatan RNA yang diekstrak telah diukur menggunakan spektrofotometer, Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, USA). Integriti RNA dinilai berdasarkan jalur RNA 28S dan 18S yang terhasil melalui elektroforesis 1.2% (w/v) gel agarose (90 V, 30 Min). RNA berkualiti tinggi berjaya diekstrak melalui penggunaan kaedah yang dibangunkan ini berdasarkan penghasilan jalur RNA ribosomal (28S dan 18S) tanpa ada sebarang degradasi RNA yang jelas (*Gambar 2*).

Kepekatan RNA yang diperolehi adalah tinggi iaitu sebanyak 2,016 ng/ μ L. Nisbah A260/A230 bagi sampel RNA yang melebihi 2.0 dikatakan berkualiti tinggi dan bebas daripada kontaminasi polifenolik dan kompaun polisakarida. Walau bagaimanapun, RNA daripada isi buah mangga Harumanis yang diekstrak menunjukkan nisbah A260/A230 yang rendah iaitu 0.34. RNA yang diekstrak ini masih dianggap tulen berdasarkan laporan analisis kawalan kualiti yang telah dijalankan. Di samping itu, nisbah A260/A280 ialah 1.99 yang menunjukkan bahawa sampel RNA yang diekstrak mengandungi kandungan protein yang sangat rendah atau sangat kurang kontaminasi protein (*Jadual 2*).

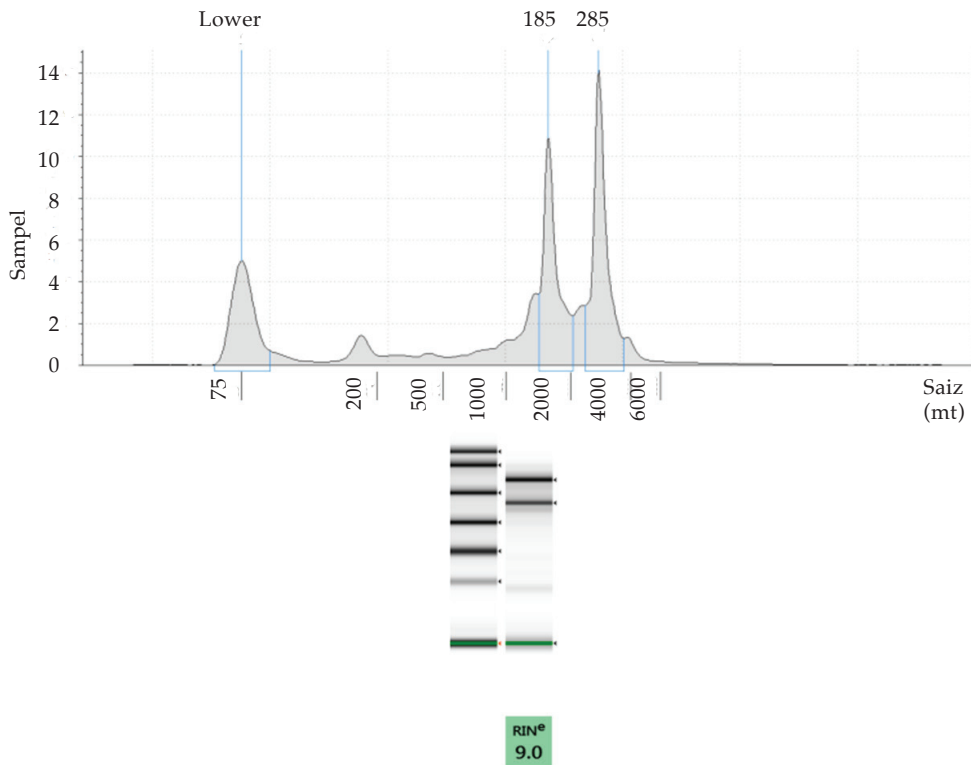
Nilai RIN (RNA integrity number) merupakan sejenis penilaian terhadap integriti sesuatu RNA yang telah diekstrak. Penggunaan RIN ini membolehkan integriti sampel RNA tidak hanya ditentukan berdasarkan nisbah antara jalur ribosomal (28S dan 18S) sahaja, tetapi juga ditentukan melalui gel elektroforesis secara digital menggunakan sistem Agilent 2100 Analyzer untuk mengesan dan mengenal pasti kehadiran/ketidakhadiran RNA yang terdegradasi (*Gambar 3*). Nilai RIN berskala 1 – 10 di mana 10



Gambar 2. Jumlah RNA yang diekstrak daripada isi buah mangga Harumanis masak yang mempunyai berat berbeza (1 g dan 2 g). Lorong 1: Penanda DNA; Lorong 2: berat sampel 1 g; Lorong 3: berat sampel 2 g

Jadual 2. Analisis kepekatan dan kualiti RNA yang diekstrak daripada isi buah mangga Harumanis yang masak menggunakan kaedah spektrofotometrik

Tumbuhan	Tisu yang dianalisis	Jenis sampel	Kepekatan/ amaun	Nisbah penyerapan		Nilai RIN/ Rank
				OD 260/280	OD 260/230	
<i>Mangifera indica</i> linn (Harumanis)	1 g berat isi buah mangga Harumanis yang masak (Indeks 4 tahap kemasakan)	RNA	201.6 ng/ μ L 2.02 ug/10 μ L	1.99	0.34	9/ A



Rajah 1. Analisis RNA menggunakan Agilent TapeStation dan Nanodrop

adalah bagi RNA yang terbaik tanpa berlaku degradasi manakala nilai 1 dikategorikan sebagai RNA terdegradasi sepenuhnya. Oleh itu, nilai RIN 9 yang diperoleh dalam *Jadual 2* menunjukkan bahawa RNA yang diekstrak menggunakan kaedah ini mempunyai RNA terdegradasi yang sangat rendah. Kontaminasi DNA mungkin muncul sebagai jalur berat molekul (*molecular weight*) yang tinggi. Namun begitu, jalur DNA tersebut tidak dapat dikesan di dalam gel agarose yang menunjukkan bahawa sampel RNA yang diekstrak adalah bebas daripada kontaminasi DNA (*Rajah 1*).

Kesimpulan

Secara keseluruhan, kualiti (ketulen dan integriti) dan kuantiti RNA yang diekstrak daripada isi buah Harumanis yang masak menggunakan kaedah ini adalah sangat tinggi dan amat sesuai diguna pakai untuk kajian molekular seterusnya. Pengubahsuaian kaedah ini memberi penekanan untuk menyingkirkan polisakarida secara efisien yang mana sukar bagi kaedah konvensional untuk melakukannya. Keputusan yang diperoleh adalah setanding apabila dibandingkan dengan kaedah-kaedah berasaskan CTAB, fenol dan LiCl sebelum ini yang ditambah baik dari segi pengekstrakan RNA berkualiti tinggi (A260/A280 dan A260/A230). Kaedah ini membolehkan RNA berkualiti tinggi dan signifikan diekstrak

daripada isi buah Harumanis yang masak dan boleh dijadikan kaedah eksklusif untuk mengekstrak RNA daripada buah-buahan nadir Malaysia yang lain. Oleh itu, kekuatan yang ada pada kaedah ini adalah untuk mengekstrak RNA daripada buah yang berair, masam dan tinggi kandungan metabolit sekunder yang mana ciri-ciri ini adalah umum pada buah-buahan nadir Malaysia. Di samping itu, tidak terhad untuk mengekstrak RNA daripada buah-buahan yang mempunyai kandungan kompaun fenolik yang rendah. RNA berkualiti tinggi yang berpotensi digunakan untuk analisis penjujukan transkriptom bagi kajian tapakjalan yang terlibat dalam penghasilan metabolit berguna di dalam isi buah Harumanis.

Penghargaan

Penulis ingin mengucapkan jutaan terima kasih kepada projek penjujukan transkriptom Harumanis bawah peruntukan NKEA EPP14 - Pembangunan industri benih yang memerlukan kaedah pengekstrakan RNA berkualiti tinggi daripada isi buah tersebut dibangunkan. Penulis juga ingin mengucapkan terima kasih kepada Pegawai Penyelidik kontrak Pn. Husmaruzaini Syaza Husin dan Penolong Pegawai Penyelidik Pn. Jameah Baharom kerana terlibat secara lansung dalam menjayakan kajian ini.

Bibliografi

- Baker, S.S., Rugh, C.L. dan Kamalay, J.C. (1990). RNA dan DNA isolation from recalcitrant plant tissues. *Biotechniques* 9: 268 – 272
- Birtic, S. dan Kranner, I. (2006). Isolation of high-quality RNA from polyphenol-, polysaccharides-, and lipid-rich seeds. *Phytochem. Anal.* 17: 144 – 148
- Chang, S., Puryear, J. dan Cainey, J. (1993). Simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol. Biol. Rep.* 11: 113 – 116
- Chen, F.S., Brown, S.K. dan Weeden, N.F. (1997). A DNA extraction protocol from various tissues in woody species. *HortScience* 32: 921 – 922
- Hu, C.G., Honda, C., Kita, M., Zhang, Z., Tsuda, T. dan Moriguchi, T. (2002). A simple protocol for RNA isolation from fruit trees containing high levels of polysaccharides and polyphenol compounds. *Plant Mol. Biol. Rep.* 20: 69a – 69g
- Kiefer, E., Heller, W. dan Ernst, D. (2000). A simple and efficient protocol for isolation of functional RNA from plant tissues rich in secondary metabolites. *Plant Mol. Biol. Rep.* 18: 33 – 39
- Morante-Carriel, J., Sellés-Marchart, S., Martínez-Márquez, A., Martínez-Esteso, M. J., Luque, I. dan Bru-Martínez, R. (2014). RNA isolation from loquat and other recalcitrant woody plants with high quality and yield. *Analytical Biochemistry* 452: 46 – 53
- Schneiderbauer, A., Sandermann Jr, H. dan Ernst, D. (1991). Isolation of functional RNA from plant tissues rich in phenolic compounds. *Anal. Biochem.* 197: 91 – 95

- Shellie, K.C., Meyer, R.D. dan Mirkov, T.E. (1997). Extraction of total RNA from melon mesocarp tissue. *HortScience*, 32: 134
- Shi, H.Z. dan Bressan, R. (2006). RNA extraction. *Methods Mol. Biol.* 323: 345 – 348
- Zakaria, A., Md Shakaff, A.Y., Masnan, M.J., Ahmad Saad, F.S., Mohd Noor Ahmad, A.H.A., Jaafar, M.N., Abdullah, A.H. dan Kamarudin, L.M. (2012). Improved maturity and Ripeness classifications of *Mangifera Indica* cv. Harumanis mangoes through sensor fusion of an electronic nose and acoustic sensor. *Sensors* 12: 6023 – 6048

Ringkasan

Tisu tumbuhan yang mengandungi sejumlah besar polisakarida dan sebatian polifenol didapati agak sukar untuk mengekstrak RNAny. Kit pengekstrakan RNA komersial yang berada di pasaran kini telah dibangunkan untuk pengekstrakan RNA berkualiti tinggi. Walau bagaimanapun, ia tidak spesifik kepada bahagian tertentu tisu tumbuhan terutamanya tisu buah. Selain itu, sebilangan besar kaedah manual yang telah dibangunkan mengandungi langkah-langkah yang rumit di samping RNA yang dihasilkan mempunyai kualiti yang rendah apabila digunakan untuk mengekstrak RNA daripada tisu tumbuhan berkayu (daun, batang buah). Dalam kajian ini, kaedah pengekstrakan RNA yang efisien telah dibangunkan untuk mengekstrak RNA berkualiti tinggi daripada tisu buah mangga Harumanis. Kaedah ini telah ditambah baik daripada kaedah yang telah dibangunkan untuk mengekstrak RNA daripada isi buah longan di mana kaedah ini berasaskan kepada langkah pemendapan RNA oleh cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) dan 10 M lithium chloride. RNA berketulenan dan berintegriti tinggi (nisbah A260/A280 antara 1.8 – 2.0 dan nisbah A260/A230 0.34) telah berjaya diekstrak menggunakan kaedah yang telah ditambah baik ini dan keseluruhan kuantiti RNA yang berjaya diekstrak bagi setiap gram tisu adalah melebihi 2.0 µg. Tujuan utama pembangunan protokol pemencilan RNA daripada buah Harumanis pada indeks kemasakan 4 adalah supaya RNA berkualiti tinggi dapat diperolehi bagi memenuhi kriteria minimum penjujukan transkriptom di mana transkriptom memberi gambaran keseluruhan dalam pencirian, pengekspresan dan fungsian gen-gen yang terkandung dalam buah Harumanis.

Summary

Plant tissues containing large quantity polysaccharides and polyphenol have been found difficult in isolating RNA. Although commercial kits in the market to date have been developed for isolation of high-quality RNA, but they are not specific to isolating good quality RNA from fruit tissue enriched with those characteristics. Moreover, most published protocols are tedious and give poor yield of RNA when applied to recalcitrant plant tissues. Here an efficient RNA isolation protocol has been developed to extract high-quality RNA from Harumanis fruit tissue. This protocol has been modified from RNA isolation protocol that was developed specifically to extract RNA from loquat fruit. The protocol is based on cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) with precipitation steps using 10 M lithium chloride (LiCl). RNAs with high purity and integrity (A260/A280 ratios between 1.8 – 2.0 and 0.34 for A260/A230) were successfully isolated by this improved protocol and total yield of RNA per gram tissue was above 2.0 μ g. Sample used in this study was at fruit maturity index of 4. The main reason of developing this protocol was to obtain high quality RNA that fulfil the criteria of minimum RNA quality for transcriptome sequencing, of which enables us to gain insights into the characterisation, expression and function of genes found in Harumanis fruit.

Pengarang

Zulkifli Ahmad Seman (Dr.)

Pusat Penyelidikan Bioteknologi dan Nanoteknologi

Ibu Pejabat MARDI, Persiaran MARDI-UPM

43400 Serdang, Selangor

E-mel: szula@mardi.gov.my

Sanimah Simon

Pusat Perancangan Strategik dan Inovasi

Ibu Pejabat MARDI, Persiaran MARDI-UPM

43400 Serdang, Selangor

Muhammad Fairuz Mohd Yusof

Pusat Penyelidikan Bioteknologi dan Nanoteknologi

Ibu Pejabat MARDI, Persiaran MARDI-UPM

43400 Serdang, Selangor