

Ribosomale RNA-Depletion für Metatranskriptomik- studien

Die RNA-zu-Analyse-Lösung
Ribo-Zero™ Plus Microbiome
ermöglicht tiefere Einblicke
in die mikrobielle Aktivität

- Optimierung der RNA-Sequenzierung komplexer mikrobieller Proben, einschließlich Stuhlproben
- Zugriff auf eine benutzerfreundliche Softwarelösung für die Metatranskriptomikanalyse
- Bestimmung der Rolle des Mikrobioms in Bezug auf Gesundheit und Erkrankung anhand der Konzentration auf wichtige Bereiche des Transkriptoms

illumina®

Einleitung

Das Mikrobiom kann sich in vielerlei Hinsicht auf Gesundheit und Erkrankung auswirken. Bei der herkömmlichen Mikrobiomforschung wird die allgemeine Bakterienvielfalt anhand von 16S-Gensequenzierung oder Shotgun-Metagenomik untersucht. Ziel ist hierbei die Bestimmung des funktionellen Potenzials von Mikroben auf Stammebene. Zusätzlich zu diesen Verfahren auf Basis von DNA liefert die RNA-Sequenzierung oder Metatranskriptomik unmittelbare Informationen zur aktiven Genexpression, womit sich das metabolische Profil des Mikrobioms bestimmen lässt. Jedoch beeinträchtigt die hohe relative Häufigkeit ribosomaler RNA (rRNA), die in Bakterienzellen über 85 % der Moleküle in der Gesamt-RNA ausmacht, die Metatranskriptomsequenzierung.¹ Die Entfernung von rRNA-Molekülen vor der Sequenzierung ermöglicht Forschern die Konzentration der Analyse auf hochwertige, informative Bereiche des Transkriptoms.

Illumina bietet eine RNA-zu-Analyse-Lösung ([Abbildung 1](#)) für die Metatranskriptomsequenzierung komplexer mikrobieller Proben wie Stuhlproben. Das Ribo-Zero Plus Microbiome Depletion Kit ermöglicht weiterreichende Analysen und Einblicke in die mikrobielle Aktivität, indem es unerwünschte Reads reduziert und die Coverage exprimierter bakterieller RNA erhöht. Das Ribo-Zero Plus Microbiome Depletion Kit enthält Depletion-Oligonukleotid-Pools zum Entfernen von rRNA aus Bakterien, die im Darm von Erwachsenen und Kleinkindern vorkommen, sowie von Wirts-RNA von Menschen, Mäusen und Ratten.

Außerdem umfasst das Kit Zugriff auf die ergänzende BaseSpace™ Microbiome Metatranscriptomics-App, mit der Pipelines zur Analyse komplexer Metatranskriptome über eine anwenderfreundliche grafische Oberfläche ausgeführt werden können.

Dieser technische Hinweis erläutert die Leistung der rRNA-Depletion bei Stuhlproben mit dem Illumina Stranded Total RNA Prep, Ligation with Ribo-Zero Plus Microbiome Depletion Kit, einschließlich einiger Beispiele für die Ausgabe der BaseSpace Microbiome Metatranscriptomics-App.

Methoden

Probenvorbereitung

Stuhlproben von gesunden Erwachsenen und Kleinkindern wurden mit dem Entnahmeanstrument OMNIgene•GUT DNA and RNA (DNA Genotek, Katalog-Nr. OMR-205) entnommen. Die Gesamt-RNA wurde mit dem RNeasy PowerMicrobiome Kit (QIAGEN, Katalog-Nr. 26000-50) aus 100 ng der kombinierten Erwachsenen- und Kleinkindproben gemäß dem Herstellerprotokoll extrahiert. Diese RNA-Stuhlproben werden als „G“-Proben bezeichnet. Zur Verwendung als Stuhlkontrollproben wurde ZymoBIOMICS Fecal Reference with TruMatrix Technology (ZymoBIOMICS, Katalog-Nr. D6323) erworben. Die Gesamt-RNA wurde mit dem ZymoBIOMICS RNA-Minikit (ZymoBIOMICS, Katalog-Nr. R2001) aus 100 ng der Kontrollprobe extrahiert. Diese RNA-Stuhlproben werden als „Z“-Proben bezeichnet.



Abbildung 1: Ribo-Zero Plus Microbiome Depletion Kit in NGS-basierten Workflows zur RNA-Sequenzierung (RNA-Seq): Das Ribo-Zero Plus Microbiome Depletion Kit kann in vorhandene RNA-Seq-Workflows integriert werden, um unerwünschte rRNA in ca. 40 Minuten wirksam aus den Gesamt-RNA-Proben zu eliminieren.

Bibliotheksvorbereitung

Für die rRNA-Depletion wird RNA mit DNA-Sonden hybridisiert, die komplementär zu rRNA sind. Diese Sonden ermöglichen den gezielten Aufschluss von rRNA-Molekülen durch RNase H. Die DNA-Sonden werden dann mit DNase I aufgeschlossen, gefolgt von einer Bead-Reinigung der verbleibenden, intakten RNA.² Anschließend erfolgt die Vorbereitung von Bibliotheken mit den ribodepletierten RNA-Proben. Illumina Stranded Total RNA Library Prep, Ligation with Ribo-Zero Plus Microbiome (Illumina, Katalog-Nr. 20072063) enthält sowohl DP1- als auch DPM-Depletionssondensätze. Bei DP1 handelt es sich um einen Satz von Depletionssonden im Ribo-Zero Plus Depletion Kit (Illumina, Katalog-Nr. 20037135) und bei DPM um den neuesten Satz von rRNA-Depletionssonden für Mikrobiome. Der DPM-Sondensatz wurde wie von Tan et al beschrieben entwickelt.³ Kurz gesagt dienen die Sonden zur Depletion von rRNA, die in menschlichen Stuhlproben von gesunden Erwachsenen und Kleinkindern enthalten sind, sowie von allen 38 Bakterienspezies in den Mock-Community-Proben der American Type Culture Collection (ATCC) (MSA-2002, MSA-2005 und MSA-2006).

Bibliotheken wurden ohne Depletion, mit Ribo-Zero Plus-Depletion (nur DP1) oder mit Ribo-Zero Plus Microbiome-Depletion (DP1 + DPM) vorbereitet, wie im Referenzhandbuch zu Illumina Stranded Total RNA Prep, Ligation with Ribo-Zero Plus, Ribo-Zero Plus Microbiome⁴ erläutert. Zusätzlich wurde ein rRNA-Depletionskit eines Drittanbieters mit dem Standardverfahren an denselben Proben getestet. Die Anzahl der PCR-Zyklen wurde von den empfohlenen 13 im Protokoll für die Bibliotheksvorbereitung auf 15 erhöht.

Sequenzierung

Die Bibliotheken wurden zu einem Pool zusammengefasst und auf dem NextSeq™ 2000-System mit einer Read-Länge von 2 × 150 bp sequenziert. Die Ladekonzentration betrug 750 pM mit 1 % PhiX-Spike-in auf einer NextSeq 1000/2000 P2-Fließzelle (Illumina, Katalog-Nr. 20046813). Trotz der Varianz der Proben wird davon ausgegangen, dass über 50 Mio. Reads/Probe ausreichen, um die Anzahl der meisten eindeutig exprimierten Gene zu bestimmen und die Vielfalt der Genfunktionen vollständig zu erfassen, einschließlich selten exprimierter Gene.

Datenanalyse

Sequenzfilterung, Alignment und Transkript-Coverage erfolgten komplett in BaseSpace Sequence Hub. Hierzu wurde die BaseSpace Microbiome Metatranscriptomics-App (im Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus Microbiome Depletion Kit enthalten) mit den Standardeinstellungen verwendet (Abbildung 2).

Ergebnisse

Die BaseSpace Microbiome Metatranscriptomics-App liefert die zur Bestimmung der in einer Probe vorhandenen Bakterien sowie der funktionellen Signalwege, die diese Bakterien in ihrer Umgebung nutzen, erforderlichen Ergebnisse und Zahlen. Der Workflow der BaseSpace Microbiome Metatranscriptomics-App umfasst Bioinformatik-Pipelines für BBduk, HUMAnN 3.0 und Kaiju (Abbildung 2).⁵⁻⁷

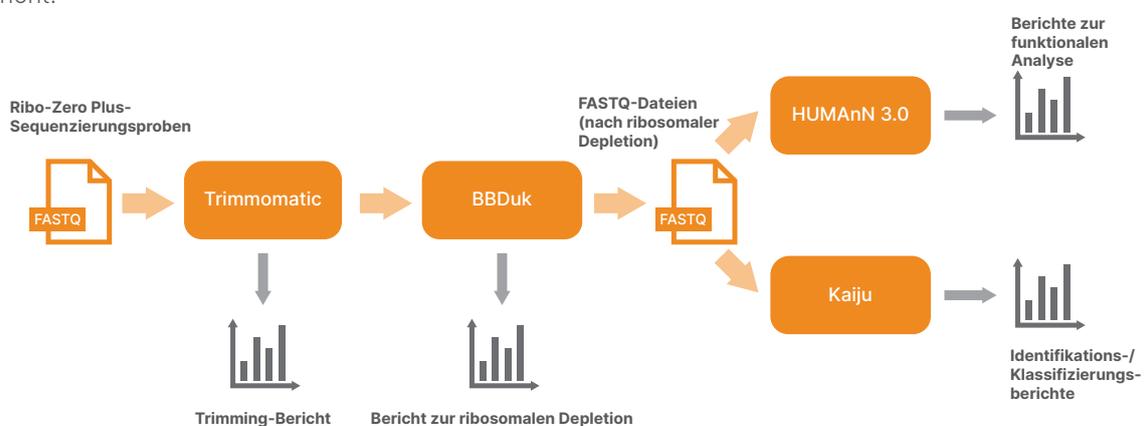


Abbildung 2: Workflow der BaseSpace Microbiome Metatranscriptomics-App: Die BaseSpace Microbiome Metatranscriptomics-App ist im Ribo-Zero Plus Microbiome Depletion Kit enthalten und bietet die für eine umfassende Metatranskriptomanalyse erforderlichen Bioinformatik-Tools.

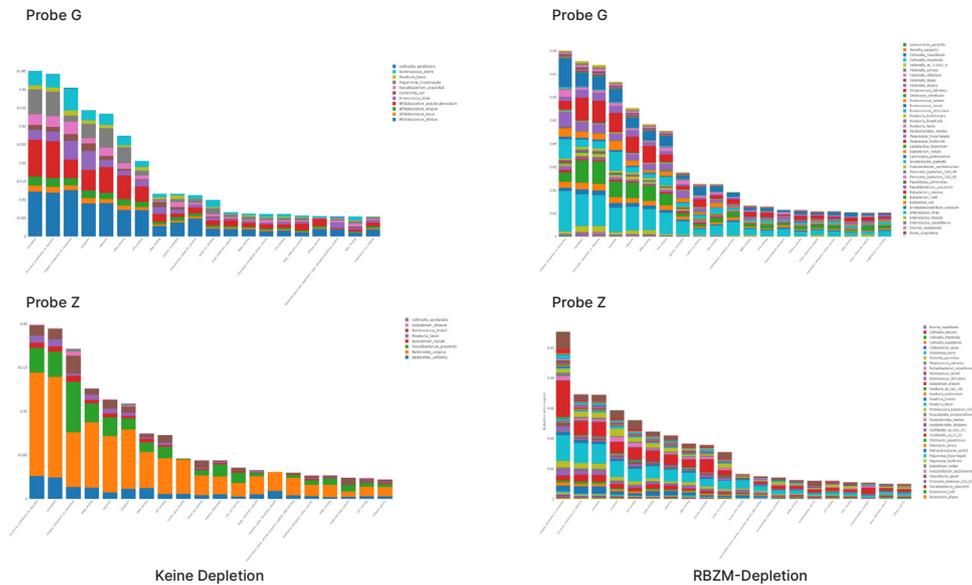


Abbildung 5: Bei der rRNA-Depletion können mehr Genfamilien mit höherer Auflösung sequenziert werden: Ergebnisse aus der HUMAnN 3.0-Pipeline, grafisch dargestellt nach Genfamilien für die 20 wichtigsten Gen-Ontologie (GO)-Bezeichnungen mit prognostizierten Bakterienbeteiligungen. Jede Farbe in den Balkendiagrammen stellt eine einzelne im Metatranskriptom enthaltene mikrobielle Spezies dar. Die Proben G und Z, die mit Ribo-Zero Plus Microbiome (rechter Bereich) verarbeitet wurden, weisen für jedes Gen eine höhere Auflösung der individuellen mikrobiellen Beteiligung auf als die Proben ohne Depletion.

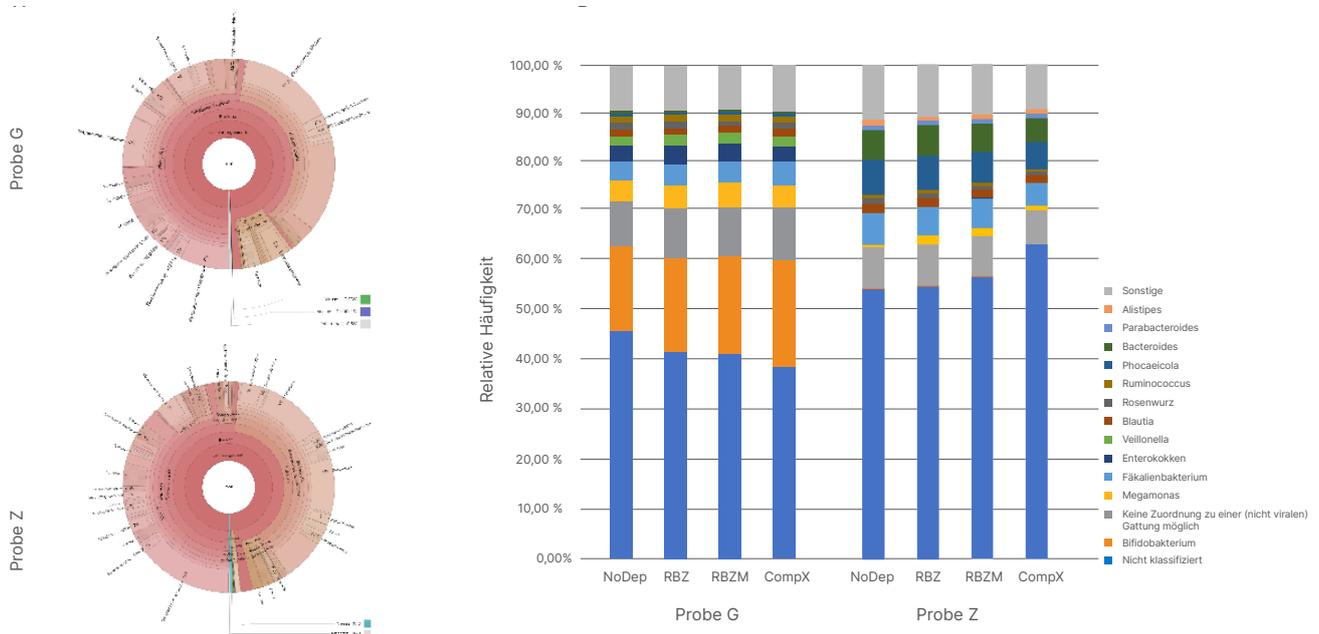


Abbildung 6: Taxonomische Profile in einem Format, das leicht zu visualisieren und herunterzuladen ist: Ergebnisse der Kaiju-Pipeline aus der BaseSpace Microbiome Metatranscriptomics-App. (A) Krona-Plots aus zwei verschiedenen Proben, die mit Ribo-Zero Plus Microbiome-Depletion verarbeitet wurden. Das Krona-Diagramm der Microbiome Metatranscriptomics BaseSpace-App ist dynamisch und ermöglicht eine weitere Untersuchung der mikrobiellen Vielfalt in den Proben, einschließlich Viren und nichtbakterieller Taxa. (B) Die Ausgaben umfassen eine TSV-Datei, die in Excel grafisch dargestellt werden kann. Die Taxonomie ist über die unterschiedlichen Methoden hinweg konsistent. Beachten Sie, dass ähnliche Taxa homologe RNA enthalten können. Das Verfahren ist daher nur so genau wie die Datenbanken.

Die Analyse der Daten aus der HUMAnN 3.0-Pipeline hat die Bedeutung der rRNA-Depletion für die Reduzierung unerwünschter Reads gezeigt sowie für die Optimierung der Sequenzierung in Hinblick auf exprimierte Gene. Daten aus Bibliotheken, die mit dem Ribo-Zero Plus Microbiome Depletion Kit vorbereitet wurden, zeigten im Vergleich zu nicht depletierten Bibliotheken eine größere Vielfalt von Genfamilien bei höherer Auflösung. Dadurch wurde deutlich, welche Spezies zur Genexpression beitrugen (Abbildung 5). Die BaseSpace Microbiome Metatranscriptomics-App hilft bei weiteren Metatranskriptomanalysen wie die Taxonomie in interaktiven Krona-Diagrammen und Excel-kompatiblen Dateiformaten (Abbildung 6).

Zusammenfassung

Beim Ribo-Zero Plus Microbiome Depletion Kit handelt es sich um eine Lösung mit einem RNA-zu-Analyse-Workflow für die Metatranskriptomikforschung. Die Ribo-Zero Plus Microbiome-Depletionssondensätze reduzieren bei der Analyse von Stuhlproben unerwünschte rRNA-Reads und erhöhen die Anzahl relevanter RNA-Reads. Darüber macht die kostenlose Analysesoftware diese Methode sowohl für erfahrene als auch für neue Mikrobiomanwender zugänglich. Die Konzentration auf die Analyse wichtiger Bereiche des Transkriptoms ermöglicht einen tieferen Einblick in die aktive Genfunktion im Mikrobiom. Informationen darüber, wie das Mikrobiom auf Behandlungen, Ernährungsweisen oder Krankheitszustände anspricht, lassen sich in der biomedizinischen Forschung zur Entwicklung besserer und gezielterer Behandlungen einsetzen.

Weitere Informationen

Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus Microbiome Depletion Kit, [illumina.com/products/by-type/sequencing-kits/library-prep-kits/stranded-total-rna-prep](https://www.illumina.com/products/by-type/sequencing-kits/library-prep-kits/stranded-total-rna-prep)

Quellen

1. Karpinets TV, Greenwood DJ, Sams CE, Ammons JT. [RNA:protein ratio of the unicellular organism as a characteristic of phosphorous and nitrogen stoichiometry and of the cellular requirement of ribosomes for protein synthesis. BMC Biol. 2006;4:30. doi:10.1186/1741-7007-4-30](https://doi.org/10.1186/1741-7007-4-30)
2. Illumina. Microbial RNA sequencing enabled with the Illumina Ribo-Zero Plus rRNA Depletion Kit. [illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/technotes/ribo-zero-plus-data-concordance-tech-note-1270-2020-003.pdf](https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/technotes/ribo-zero-plus-data-concordance-tech-note-1270-2020-003.pdf). Veröffentlicht 2020. Aufgerufen am 24. Mai 2022.
3. Tan A, Murugapiran S, Mikalauska A, et al. Rational probe design for efficient rRNA depletion and improved metatranscriptomic analysis of human microbiomes. *Microbiome* (in Prüfung)
4. Illumina. Ribo-Zero rRNA Removal Kit Reference Guide. https://jp.support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/ribosomal-depletion/ribo-zero/ribo-zero-reference-guide-15066012-02.pdf. Aktualisiert 2016. Aufgerufen am 24. Mai 2022.
5. Joint Genome Institute (JGI). BBDuk Guide. <https://jgi.doe.gov/data-and-tools/software-tools/bbtools/bb-tools-user-guide/bbduk-guide/>. Aufgerufen am 24. Mai 2022.
6. Menzel P, Ng KL, Krogh A. [Fast and sensitive taxonomic classification for metagenomics with Kaiju. Nat Commun. 2016;7:11257. doi:10.1038/ncomms11257](https://doi.org/10.1038/ncomms11257)
7. Beghini F, McIver LJ, Blanco-Míguez A, et al. [Integrating taxonomic, functional, and strain-level profiling of diverse microbial communities with bioBakery 3. Elife. 2021;10:e65088. doi:10.7554/eLife.65088](https://doi.org/10.7554/eLife.65088)

illumina®

1 800 8094566 (USA, gebührenfrei) | +1 858 2024566 (Tel. außerhalb der USA)
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2022 Illumina, Inc. Alle Rechte vorbehalten. Alle Marken sind Eigentum von Illumina, Inc. bzw. der jeweiligen Inhaber. Spezifische Informationen zu Marken finden Sie unter www.illumina.com/company/legal.html.
M-GL-00692 DEU v1.0