

Deplezione dell'RNA ribosomiale per gli studi di metatrascrittomica

La soluzione RNA-analisi
Ribo-Zero™ Plus Microbiome
consente di ottenere
informazioni più approfondite
sull'attività microbica

- Ottimizzazione del sequenziamento dell'RNA di campioni microbici complessi, inclusi i campioni di feci
- Accesso a una soluzione software intuitiva per l'analisi metatrascrittomica
- Analisi di porzioni a elevato valore del trascrittoma per comprendere il ruolo del microbioma nella salute e nella malattia

illumina®

Introduzione

Il microbioma può influire su diversi aspetti della salute e della malattia. La ricerca tradizionale sul microbioma utilizza il sequenziamento del gene 16S per esaminare la diversità batterica complessiva o la metagenomica shotgun per determinare il potenziale funzionale dei microbi a livello di ceppo. In aggiunta a questi metodi basati sul DNA, il sequenziamento dell'RNA, o metatrascrittomica, fornisce informazioni dirette sull'espressione genica attiva per comprendere il profilo metabolico del microbioma. Tuttavia, il sequenziamento del metatrascrittoma è ostacolato dall'elevata abbondanza relativa di RNA ribosomiale (rRNA, ribosomal RNA) nelle cellule batteriche, comprendente $\geq 85\%$ delle molecole nell'RNA totale.¹ La rimozione degli rRNA prima del sequenziamento consente ai ricercatori di concentrarsi sull'analisi di porzioni di trascrittoma informative ad alto valore.

Illumina offre una soluzione RNA-analisi (Figura 1) per il sequenziamento del metatrascrittoma di campioni microbici complessi, come i campioni di feci. Il Ribo-Zero Plus Microbiome Depletion Kit consente un'analisi e una visione più approfondite dell'attività microbica riducendo le letture indesiderate e aumentando la copertura dell'RNA batterico espresso. Il Ribo-Zero Plus Microbiome Depletion Kit include pool di oligonucleotidi di deplezione che rimuovono l'rRNA dai batteri comuni nell'intestino umano di adulti e neonati, nonché l'RNA ospite da esseri umani, topi e ratti. Il kit include anche l'accesso all'app complementare BaseSpace™ Microbiome Metatranscriptomics, che esegue le pipeline per analizzare metatrascrittomi complessi con un'interfaccia grafica intuitiva.

Questa nota tecnica dimostra le prestazioni di deplezione dell'rRNA sui campioni fecali con Illumina Stranded Total RNA Prep, Ligation with Ribo-Zero Plus Microbiome Depletion Kit, inclusi alcuni output evidenziati dall'app BaseSpace Microbiome Metatranscriptomics.

Metodi

Preparazione dei campioni

I campioni fecali di adulti e neonati sani sono stati raccolti utilizzando l'OMNigene•GUT DNA and RNA Collection Tool (DNA Genotek, n. di catalogo OMR-205). L'RNA totale è stato estratto da 100 ng di campioni combinati di adulti e neonati utilizzando l'RNeasy PowerMicrobiome Kit (QIAGEN, n. di catalogo 26000-50) seguendo il protocollo del produttore. Questi campioni di RNA fecali sono indicati come campioni "G". I campioni fecali di controllo sono stati acquistati da ZymoBIOMICS Fecal Reference with TruMatrix Technology (ZymoBIOMICS, n. di catalogo D6323). L'RNA totale è stato estratto da un campione di controllo da 100 ng utilizzando il ZymoBIOMICS RNA Mini Kit (ZymoBIOMICS, n. di catalogo R2001). Questi campioni di RNA fecali sono indicati come campioni "Z".



Figura 1: Ribo-Zero Plus Microbiome Depletion Kit nei flussi di lavoro di sequenziamento dell'RNA (RNA-Seq) basato sul sequenziamento di nuova generazione (NGS, Next Generation Sequencing). Il Ribo-Zero Plus Microbiome Depletion Kit può essere integrato nei flussi di lavoro esistenti per RNA-Seq al fine di eliminare efficacemente l'rRNA indesiderato dai campioni di RNA totale in circa 40 minuti.

Preparazione delle librerie

Per la deplezione dell'rRNA, l'RNA viene ibridato con sonde di DNA complementari all'rRNA. Queste sonde consentono la digestione mirata delle molecole di rRNA da parte della RNasi H. Le sonde di DNA vengono quindi digerite con DNasi I, seguita da una purificazione con microsferi dell'RNA intatto rimanente.² I campioni di RNA soggetto a ribodeplezione vengono quindi sottoposti alla preparazione delle librerie. Illumina Stranded Total RNA Library Prep, Ligation with Ribo-Zero Plus Microbiome (Illumina, n. di catalogo 20072063) include i set di sonde di deplezione DP1 e DPM. DP1 è il set di sonde di deplezione che si trova nel Ribo-Zero Plus Depletion Kit (Illumina, n. di catalogo 20037135), mentre DPM è il set di sonde di deplezione per rRNA più recente per il microbioma. Il set di sonde DPM è stato sviluppato come descritto in Tan et al.³ In breve, le sonde sono state progettate per eseguire la deplezione dell'rRNA presente nei campioni fecali umani sani, che comprendono adulti e neonati, e tutte le 38 specie batteriche nei campioni della comunità simulata dell'American Type Culture Collection (ATCC) (MSA-2002, MSA-2005 e MSA-2006).

Le librerie sono state preparate come descritto nell'Illumina Stranded Total RNA Prep, Ligation with Ribo-Zero Plus, Ribo-Zero Plus Microbiome Reference Guide⁴ senza deplezione, con deplezione Ribo-Zero Plus (solo DP1) o con deplezione Ribo-Zero Plus Microbiome (DP1 + DPM). Un kit di deplezione dell'rRNA di terze parti è stato analizzato anche sugli stessi campioni utilizzando la procedura standard. I cicli PCR sono stati aumentati a 15 rispetto ai 13 raccomandati nel protocollo per la preparazione delle librerie.

Sequenziamento

Le librerie sono state raggruppate in pool e sequenziate sul NextSeq™ 2000 System utilizzando una lunghezza di lettura di 2 × 150 bp. La concentrazione di caricamento era di 750 pM con 1% di spike-in PhiX su una cella a flusso NextSeq 1000/2000 P2 (Illumina, n. di catalogo 20046813). Sebbene i campioni varino, si prevede che siano sufficienti più di 50.000.000 di letture/campioni per ottenere la maggior parte delle conte geniche espresse in modo univoco e catturare la diversità della funzione genica completa, inclusi i geni espressi raramente.

Analisi dei dati

Tutti i filtri delle sequenze, l'allineamento e la copertura dei trascritti sono stati eseguiti in BaseSpace Sequence Hub utilizzando l'app BaseSpace Microbiome Metatranscriptomics (inclusa con Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus Microbiome Depletion Kit) con le impostazioni predefinite (Figura 2).

Risultati

L'app BaseSpace Microbiome Metatranscriptomics fornisce gli output e le cifre necessari per determinare i batteri presenti in un campione e i percorsi funzionali che questi batteri utilizzano nel loro ambiente. Il flusso di lavoro dell'app BaseSpace Microbiome Metatranscriptomics include le pipeline di bioinformatica BBduk, HUMAnN 3.0 e Kaiju (Figura 2).⁵⁻⁷

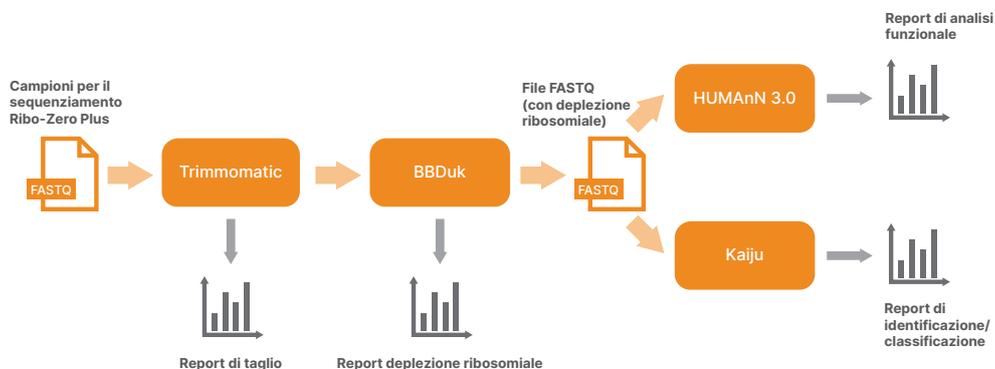


Figura 2: flusso di lavoro dell'app BaseSpace Microbiome Metatranscriptomics. L'app BaseSpace Microbiome Metatranscriptomics è inclusa nel Ribo-Zero Plus Microbiome Depletion Kit per offrire gli strumenti di bioinformatica necessari per l'analisi completa del metatrascrittoma.

La pipeline⁵ di BBDuk riporta l'rRNA e l'RNA ospite che sono stati filtrati bioinformaticamente (Figura 3 e Figura 4). Le letture conservate sono l'RNA rimanente. La pipeline⁶ di HUMAnN 3.0 assegna l'abbondanza relativa in base alla funzione genica e ai percorsi (Figura 5). La pipeline⁷ di Kaiju assegna la tassonomia, che viene visualizzata in un grafico Krona interattivo (Figura 6).

Le librerie di sequenziamento dell'RNA da due campioni fecali misti, il campione G e il campione Z, sono state preparate senza la deplezione dell'rRNA o con uno

dei tre kit di deplezione dell'rRNA: Ribo-Zero Plus (progettato per la deplezione di rRNA in una singola specie), Ribo-Zero Plus Microbiome Depletion Kit o un kit di terze parti. La pipeline BBDuk ha fornito informazioni dettagliate sui geni dell'rRNA o dell'RNA ospite rimanenti dopo la deplezione (Figura 3). Come previsto, più del 98% delle librerie senza deplezione era rRNA. Il Ribo-Zero Plus Microbiome Depletion Kit ha efficacemente eseguito la deplezione dell'rRNA indesiderato e dell'RNA ospite e ha prodotto meno rRNA rispetto a Ribo-Zero Plus o al kit di deplezione dell'rRNA di terze parti (Figura 4).

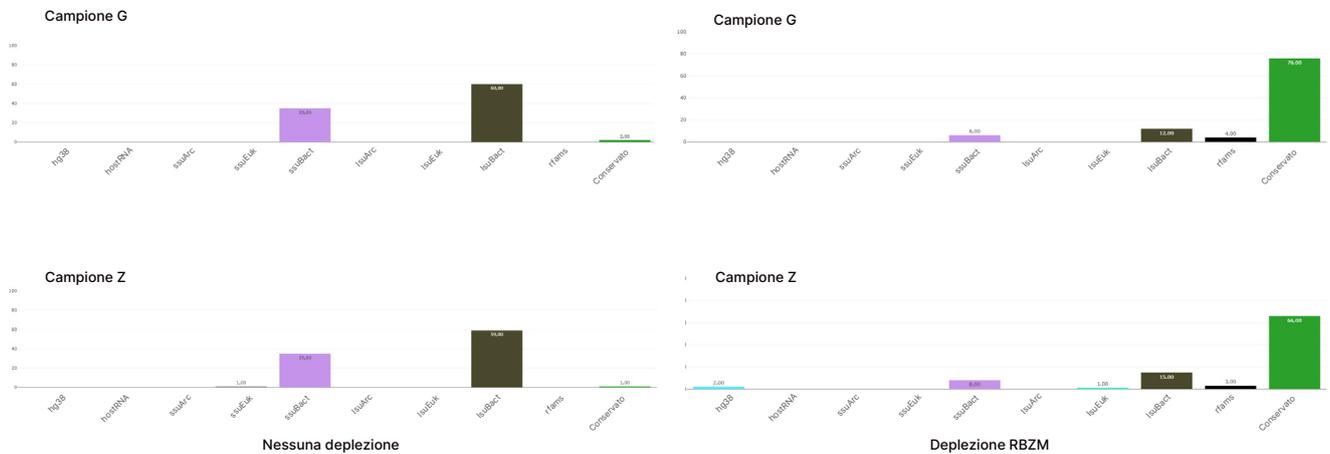


Figura 3: output BBDuk per la percentuale di rRNA rimanente dopo la deplezione. Output BBDuk rappresentativo utilizzando l'app BaseSpace Microbiome Metatranscriptomics per il campione G e il campione Z, entrambi elaborati con il Ribo-Zero Plus Microbiome Depletion Kit. La barra verde rappresenta l'RNA di interesse per la comunità della ricerca microbica. Le altre categorie sono indesiderate e/o RNA ospite che viene filtrato. RBZM, Ribo-Zero Plus Microbiome Depletion Kit.

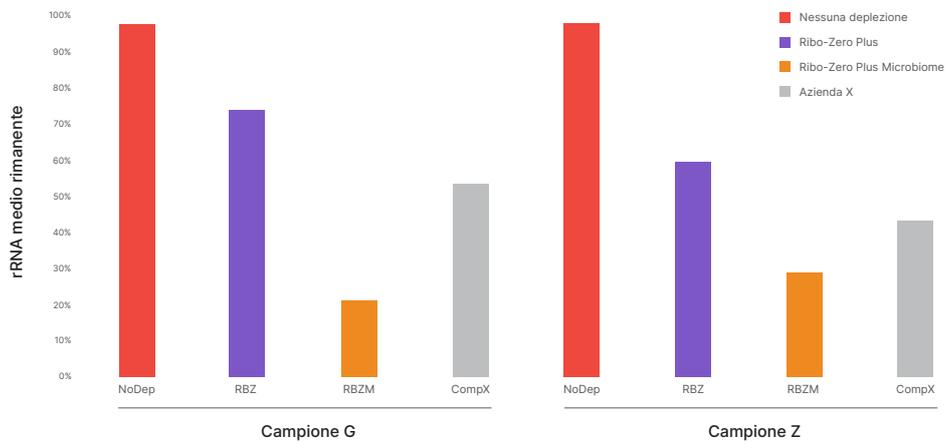


Figura 4: percentuale di rRNA rimanente dopo la deplezione. Ribodeplezione efficace con il Ribo-Zero Plus Microbiome Depletion Kit (barre arancioni). È auspicabile una minore quantità di rRNA. I risultati sono confrontati con il Ribo-Zero Plus rRNA Depletion Kit (barre viola) e un kit di ribodeplezione di terze parti disponibile in commercio (barre grigie). NoDep = nessuna deplezione; RBZ = solo deplezione Ribo-Zero Plus; RBZM = deplezione Ribo-Zero Plus Microbiome; CompX = kit di deplezione di terze parti.

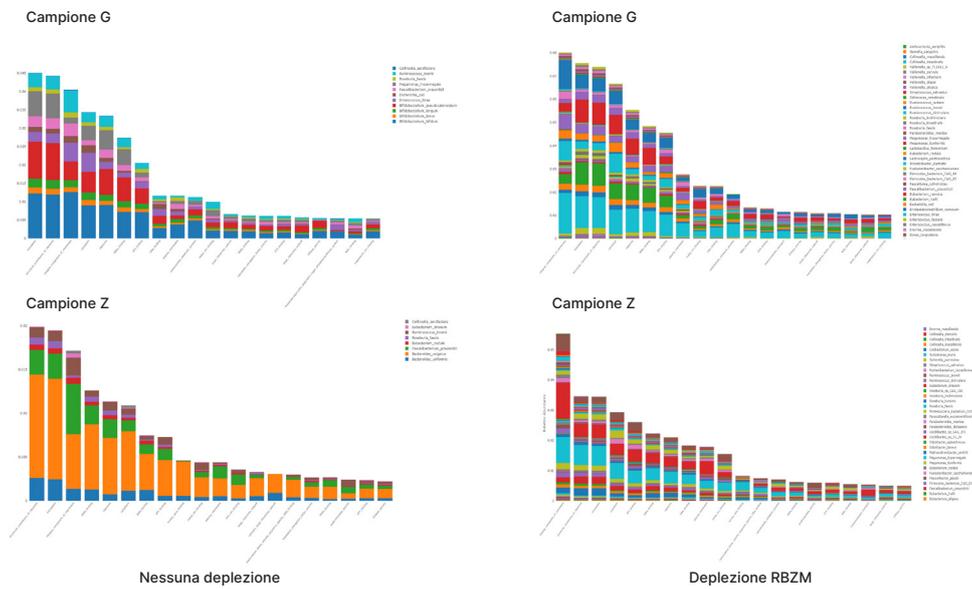


Figura 5: con la deplezione dell'rRNA, è possibile eseguire il sequenziamento di un numero maggiore di famiglie geniche a una risoluzione più precisa. I risultati della pipeline HUMAnN 3.0 rappresentati graficamente in base alle famiglie geniche per i primi 20 termini di ontologia genica (GO, Gene Ontology) con contributi batterici previsti. Ogni colore nei grafici a barre rappresenta le singole specie microbiche che contribuiscono al metatrascrittoma. Il campione G e il campione Z processati con Ribo-Zero Plus Microbiome (pannelli a destra) mostrano una risoluzione più elevata del contributo microbico individuale per ciascun gene rispetto ai campioni senza deplezione.

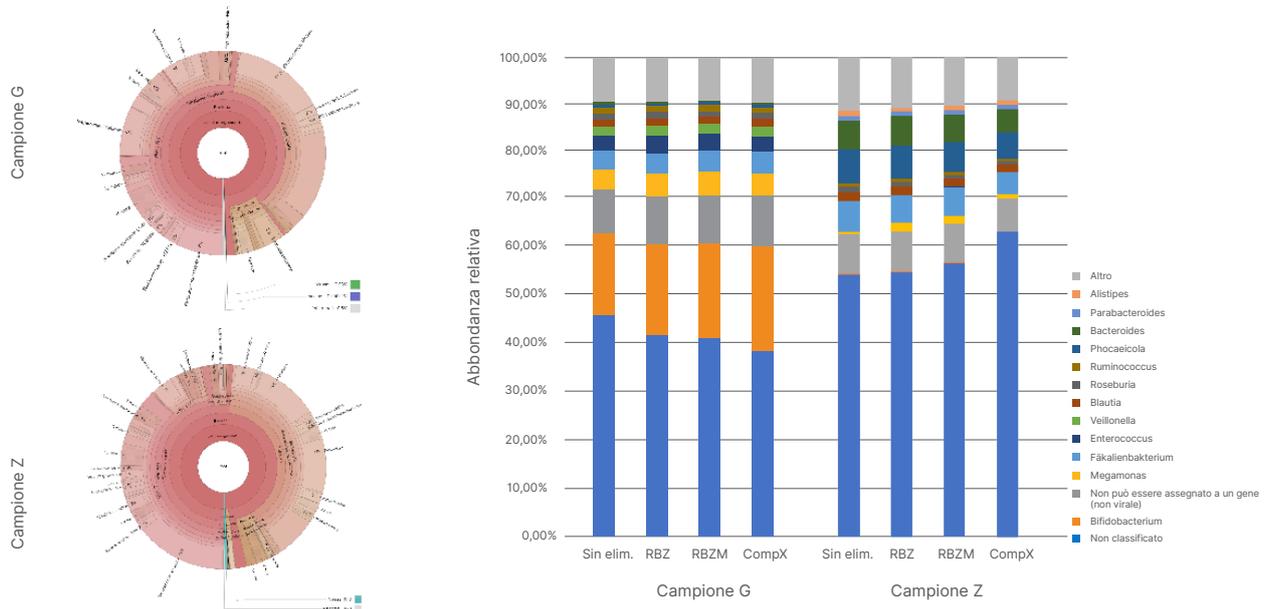


Figura 6: profili tassonomici in un formato facile da visualizzare e scaricare. I risultati della pipeline Kaiju ottenuti dall'app BaseSpace Microbiome Metatrascriptomics. (A) Grafici Krona di due campioni diversi elaborati con deplezione di Ribo-Zero Plus Microbiome. Il grafico Krona dell'app BaseSpace Microbiome Metatrascriptomics è dinamico e consente un'ulteriore esplorazione della diversità microbica nei campioni, inclusi virus e taxa non batterici. (B) Un file TSV che può essere rappresentato graficamente in Excel è disponibile negli output. La tassonomia è coerente tra i vari metodi. Nota: taxa simili possono avere RNA omologo e, pertanto, questo metodo è accurato solo quanto i database.

L'analisi dei dati derivati dalla pipeline HUMAnN 3.0 ha mostrato come la deplezione dell'rRNA sia fondamentale per ridurre le letture indesiderate e ottimizzare il sequenziamento per i geni espressi. I dati ottenuti dalle librerie preparate con il Ribo-Zero Plus Microbiome Depletion Kit hanno rivelato una maggiore diversità di famiglie geniche a una risoluzione più precisa, identificando quali specie stavano contribuendo all'espressione genica rispetto alle librerie senza deplezione (Figura 5). L'app BaseSpace Microbiome Metatranscriptomics supporta l'analisi metatrascrittomica aggiuntiva, come la tassonomia, presentata nei grafici Krona interattivi e in formati di file compatibili con Excel (Figura 6).

Riepilogo

Il Ribo-Zero Plus Microbiome Depletion Kit offre una soluzione per il flusso di lavoro RNA-analisi per la ricerca metatrascrittomica. I set di sonde per la deplezione Ribo-Zero Plus Microbiome riducono le letture indesiderate dell'rRNA dai campioni fecali e aumentano le letture di RNA di interesse. Inoltre, il software di analisi complementare rende fruibile questo metodo da utenti esperti e neofiti di microbiomi. L'attenzione all'analisi di porzioni di trascrittoma ad alto valore consente una visione più approfondita della funzione genica attiva nel microbioma. La comprensione delle modalità di risposta del microbioma ai trattamenti, alle diete o agli stati patologici può fornire informazioni alla ricerca biomedica e favorire potenzialmente l'impiego di trattamenti avanzati e più mirati.

illumina®

Numero verde 1.800.809.4566 (U.S.A.) | Tel. +1.858.202.4566
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2022 Illumina, Inc. Tutti i diritti riservati. Tutti i marchi di fabbrica sono di proprietà di Illumina, Inc. o dei rispettivi proprietari. Per informazioni specifiche sui marchi di fabbrica, visitare la pagina web www.illumina.com/company/legal.html.
M-GL-00692 ITA v1.0

Maggiori informazioni

Per Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus Microbiome Depletion Kit, visitare la pagina illumina.com/products/by-type/sequencing-kits/library-prep-kits/stranded-total-rna-prep.

Bibliografia

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](#)
2. Illumina. Sequenziamento RNA microbico abilitato con l'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. Pubblicato nel 2020. Consultato il 24 maggio 2022.
3. Tan A, Murugapiran S, Mikalauskas A, et al. Rational probe design for efficient rRNA depletion and improved metatranscriptomic analysis of human microbiomes. *Microbiome* (in revisione).
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. Aggiornato nel 2016. Consultato il 24 maggio 2022.
5. Joint Genome Institute (JGI). BBDuk Guide. <https://jgi.doe.gov/data-and-tools/software-tools/bbtools/bb-tools-user-guide/bbduk-guide/>. Consultato il 24 maggio 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](#).
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](#).