

# Eliminación del ARN ribosómico para estudios de metatranscriptómica

La solución de ARN a análisis  
Ribo-Zero™ Plus Microbiome  
permite un conocimiento  
más profundo de la actividad  
microbiana

- Optimice la secuenciación de ARN de muestras microbianas complejas, incluidas las muestras de heces
- Acceda a una solución de software fácil de usar para el análisis metatranscriptómico
- Céntrese en las partes de alto valor del transcriptoma para comprender el papel del microbioma en la salud y la enfermedad

**illumina**®

## Introducción

El microbioma puede afectar a varios aspectos de la salud y la enfermedad. La investigación tradicional del microbioma utiliza la secuenciación del gen 16S para observar la diversidad bacteriana general o la metagenómica de escopeta para determinar el potencial funcional de los microbios a nivel de estirpe. Como complemento a estos métodos basados en ADN, la secuenciación de ARN o metatranscriptómica proporciona información directa sobre la expresión genética activa para comprender el perfil metabólico del microbioma. Sin embargo, la secuenciación del metatranscriptoma se ve obstaculizada por la elevada abundancia relativa de ARN ribosómico (ARNr) en las células bacterianas, que comprende más del 85 % de las moléculas en el ARN total.<sup>1</sup> La eliminación de ARNr antes de la secuenciación permite a los investigadores centrarse en analizar las partes informativas de alto valor del transcriptoma.

Illumina ofrece una solución de ARN a análisis (Figura 1) para la secuenciación de metatranscriptomas de muestras microbianas complejas, como muestras de heces. Ribo-Zero Plus Microbiome Depletion Kit permite un análisis y un conocimiento más profundos de la actividad microbiana al reducir las lecturas no deseadas y aumentar la cobertura del ARN bacteriano expresado. Ribo-Zero Plus Microbiome Depletion Kit incluye grupos de oligonucleótidos de eliminación que eliminan el ARNr de las bacterias comunes en el intestino humano de adultos y lactantes, así como el ARN del hospedador de humanos, ratones y ratas. El kit también incluye acceso a la aplicación BaseSpace™ Microbiome Metatranscriptomics, que ejecuta procesos para analizar metatranscriptomas complejos con una interfaz gráfica fácil de usar.

Esta nota técnica demuestra el rendimiento de eliminación de ARNr en las muestras de heces con Illumina Stranded Total RNA Prep, Ligation con Ribo-Zero Plus Microbiome Depletion Kit, que incluye algunos resultados destacados de la aplicación BaseSpace Microbiome Metatranscriptomics.

## Métodos

### Preparación de muestras

Las muestras de heces de adultos y lactantes sanos se recogieron con la herramienta de recogida de ADN y ARN OMNIgene•GUT (DNA Genotek, n.º de catálogo OMR-205). El ARN total se extrajo de 100 ng de las muestras combinadas de adultos y lactantes utilizando RNeasy PowerMicrobiome Kit (QIAGEN, n.º de catálogo 26000-50) siguiendo el protocolo del fabricante. Estas muestras de ARN en heces se denominan muestras «G». Las muestras de heces de control se adquirieron de ZymoBIOMICS Fecal Reference con TruMatrix Technology (ZymoBIOMICS, n.º de catálogo D6323). El ARN total se extrajo de una muestra de control de 100 ng con el minikit de ARN de ZymoBIOMICS (ZymoBIOMICS, n.º de catálogo R2001). Estas muestras de ARN en heces se denominan muestras «Z».



Figura 1: Ribo-Zero Plus Microbiome Depletion Kit en flujos de trabajo de secuenciación de ARN (RNA-Seq) basados en la NGS: Ribo-Zero Plus Microbiome Depletion Kit se puede incorporar a los flujos de trabajo existentes para RNA-Seq para eliminar eficazmente el ARNr no deseado de las muestras de ARN total en aproximadamente 40 minutos.

## Preparación de librerías

Para la eliminación de ARNr, el ARN se hibrida con sondas de ADN complementarias al ARNr. Estas sondas permiten la digestión selectiva de moléculas de ARNr mediante ARNasa H. A continuación, las sondas de ADN se digieren con ADNasa I, seguida de una purificación con bolas del ARN intacto restante.<sup>2</sup> A continuación, las muestras de ARN con el ARN ribosomal eliminado se someten a la preparación de librerías. Illumina Stranded Total RNA Library Prep, Ligation con Ribo-Zero Plus Microbiome (Illumina, n.º de catálogo 20072063) incluye los juegos de sondas de eliminación tanto DP1 como DPM. DP1 es el juego de sondas de eliminación que se encuentra en Ribo-Zero Plus Depletion Kit (Illumina, n.º de catálogo 20037135), mientras que DPM es el juego de sondas de eliminación de ARNr de microbioma selectivo más reciente. El juego de sondas DPM se desarrolló como se describe en Tan et al.<sup>3</sup> Brevemente, las sondas se diseñaron para eliminar el ARNr que se encuentra en muestras de heces de seres humanos sanos, incluidos adultos y lactantes, y las 38 especies bacterianas en las muestras de la comunidad simulada de la American Type Culture Collection (ATCC) (MSA-2002, MSA-2005 y MSA-2006).

Las librerías se prepararon como se describe en Illumina Stranded Total RNA Prep, Ligation with Ribo-Zero Plus Microbiome Reference Guide<sup>4</sup> sin eliminación, con eliminación con Ribo-Zero Plus (solo DP1) o con eliminación con Ribo-Zero Plus Microbiome (DP1 + DPM). También se analizó un kit de eliminación de ARNr de un tercero en las mismas muestras utilizando el procedimiento estándar. Los ciclos de PCR aumentaron desde los 13 recomendados en el protocolo de preparación de librerías hasta 15.

## Secuenciación

Las librerías se agruparon y secuenciaron en NextSeq™ 2000 System con una longitud de lectura de 2 × 150 pb. La concentración de carga fue de 750 pM con adición de PhiX al 1 % en una celda de flujo NextSeq 1000/2000 P2 (Illumina, n.º de catálogo 20046813). Aunque las muestras variarán, se espera que más de 50 millones de lecturas/muestra sean suficientes para obtener la mayoría de los recuentos génicos expresados de forma única y capturar la diversidad de la función génica completa, incluidos los genes que rara vez se expresan.

## Análisis de datos

Todos los filtros de secuencias, la alineación y la cobertura de transcritos se realizaron en BaseSpace Sequence Hub con la aplicación BaseSpace Microbiome Metatranscriptomics (incluida con Illumina Stranded Total RNA Prep con Ribo-Zero Plus Microbiome Depletion Kit) con los ajustes predeterminados (Figura 2).

## Resultados

La aplicación BaseSpace Microbiome Metatranscriptomics proporciona los resultados y los valores necesarios para determinar qué bacterias están presentes en una muestra y las vías funcionales que esas bacterias están utilizando en su entorno. El flujo de trabajo de la aplicación BaseSpace Microbiome Metatranscriptomics incluye los procesos bioinformáticos BBduk, HUMAnN 3.0 y Kaiju (Figura 2).<sup>5-7</sup>

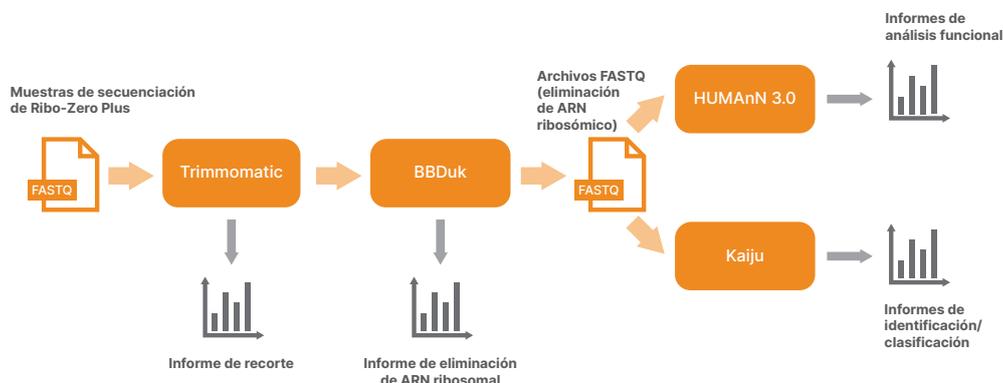


Figura 2: Flujo de trabajo de la aplicación BaseSpace Microbiome Metatranscriptomics. La aplicación BaseSpace Microbiome Metatranscriptomics se incluye con Ribo-Zero Plus Microbiome Depletion Kit para ofrecer las herramientas bioinformáticas necesarias para el análisis completo del metatranscriptoma.

El proceso BBDuk<sup>5</sup> informa del ARNr y el ARN del hospedador que se filtró por medios bioinformáticos (Figura 3 y Figura 4). Las lecturas retenidas son el ARN restante. El proceso HUMAnN 3.0<sup>6</sup> asigna la abundancia relativa según la función y las vías génicas (Figura 5). El proceso Kaiju<sup>7</sup> asigna la taxonomía, que se muestra en un gráfico interactivo de Krona (Figura 6).

Las librerías de secuenciación de ARN de dos muestras de heces mixtas, la muestra G y la muestra Z, se prepararon sin eliminación del ARNr o con uno de los tres kits de eliminación del ARNr: Ribo-Zero Plus

(diseñado para la eliminación de ARNr de una sola especie), Ribo-Zero Plus Microbiome Depletion Kit o un kit de un tercero. El proceso BBDuk proporcionó información detallada sobre qué genes de ARNr o de ARN del hospedador permanecen después de la eliminación (Figura 3). Como se esperaba, más del 98 % de las librerías sin eliminación del ARN ribosomal eran ARNr. Ribo-Zero Plus Microbiome Depletion Kit redujo de forma eficaz el ARNr no deseado y el ARN del hospedador y dio como resultado menos ARNr que Ribo-Zero Plus o el kit de eliminación de ARNr de un tercero (Figura 4).

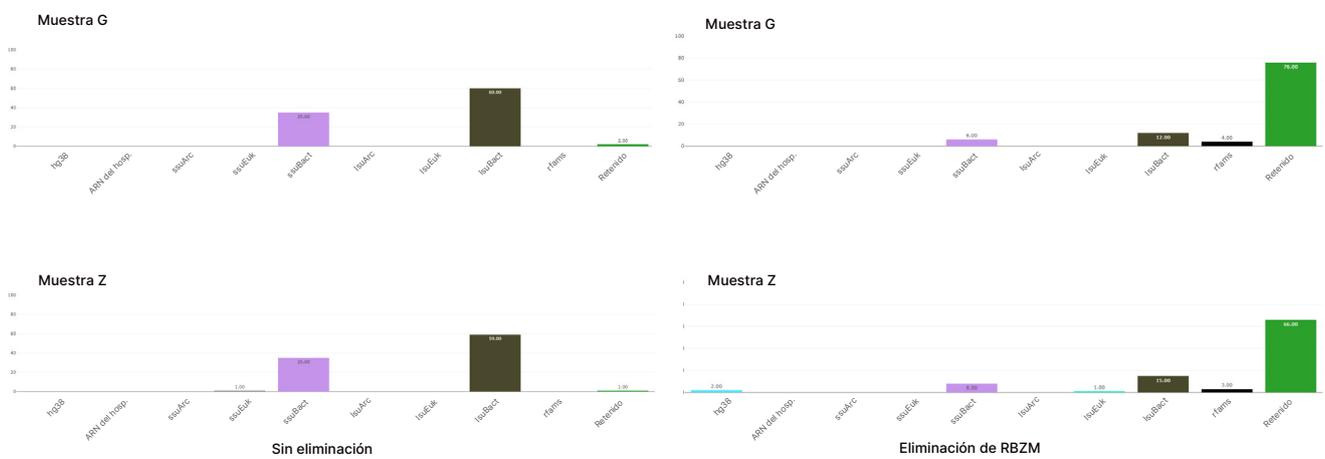


Figura 3: Resultado de BBDuk para el porcentaje de ARNr restante después de la eliminación. Resultado de BBDuk representativo utilizando la aplicación BaseSpace Microbiome Metatranscriptomics para la muestra G y la muestra Z, ambas procesadas con Ribo-Zero Plus Microbiome Depletion Kit. La barra verde representa el ARN de interés para la comunidad de investigación microbiana. Las otras categorías son ARN no deseado o del hospedador que se ha filtrado. RBZM, Ribo-Zero Plus Microbiome Depletion Kit.

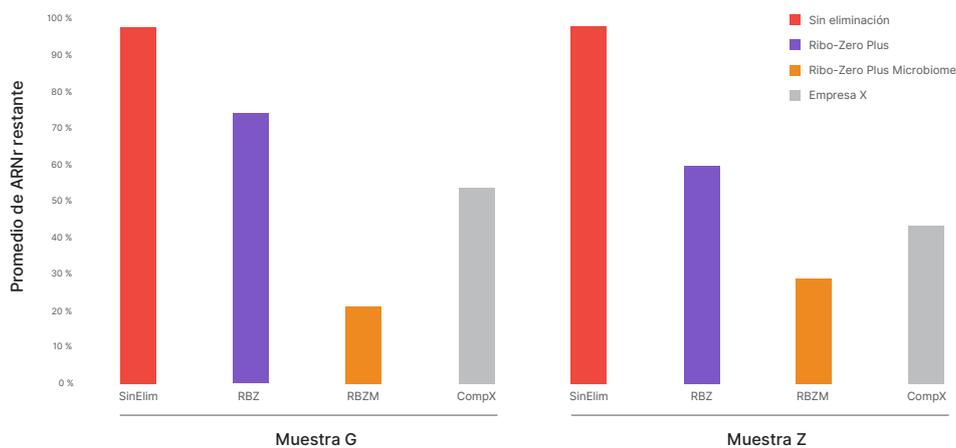


Figura 4: Porcentaje de ARNr restante después de la eliminación. Eliminación sólida de ARN ribosomal con Ribo-Zero Plus Microbiome Depletion Kit (barras de color naranja). Resulta deseable menos ARNr. Los resultados se comparan con Ribo-Zero Plus rRNA Depletion Kit (barras de color morado) y con un kit de eliminación de ARN ribosomal comercial de un tercero (barras grises). SinElim, sin eliminación; RBZ, solo eliminación con Ribo-Zero Plus; RBZM, eliminación con Ribo-Zero Plus Microbiome; CompX, kit de eliminación de un tercero.

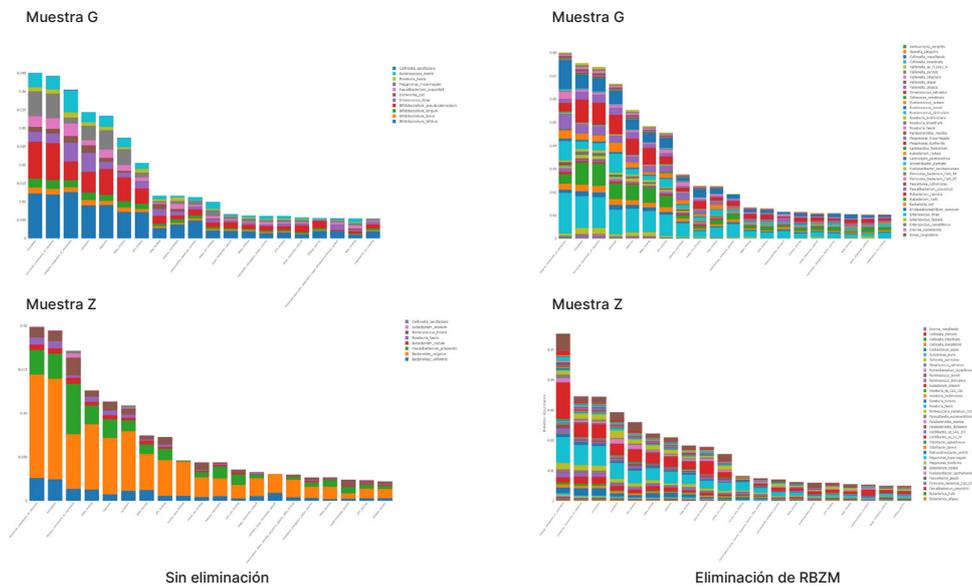


Figura 5: Con la eliminación de ARNr, se pueden secuenciar más familias génicas con una resolución más precisa. Los resultados del proceso HUMAnN 3.0 se representan gráficamente según las familias génicas para los 20 términos principales de ontología génica (GO, Gene Ontology) con las contribuciones bacterianas previstas. Cada color de los diagramas de barras representa especies microbianas individuales que contribuyen al metatranscriptoma. La muestra G y la muestra Z procesadas con Ribo-Zero Plus Microbiome (paneles derechos) muestran una mayor resolución de la contribución microbiana individual para cada gen que las muestras sin eliminación.

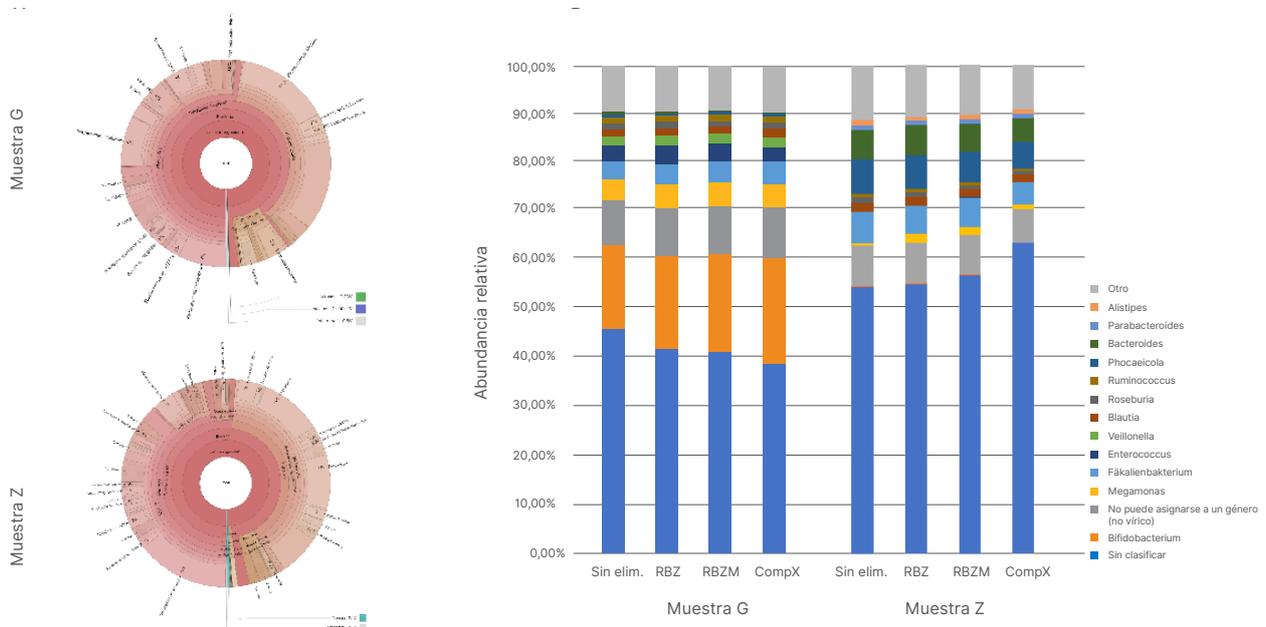


Figura 6: Perfiles taxonómicos en un formato fácil de visualizar y descargar. Resultados del proceso Kaiju de la aplicación BaseSpace Microbiome Metatranscriptomics. (A) Gráficos de Krona de dos muestras diferentes procesadas con Ribo-Zero Plus Microbiome Depletion. El gráfico de Krona de la aplicación BaseSpace Microbiome Metatranscriptomics es dinámico y permite una mayor exploración de la diversidad microbiana en las muestras, incluidos virus y taxones no bacterianos. (B) En los resultados, hay un archivo TSV que puede representarse gráficamente en Excel. La taxonomía es coherente entre los distintos métodos. Téngase en cuenta que taxones similares pueden tener ARN homólogo y, por lo tanto, este método es preciso en la medida en que la base de datos lo sea.

El análisis de datos del proceso HUMAnN 3.0 mostró que la eliminación de ARNr es fundamental para reducir las lecturas no deseadas y optimizar la secuenciación de los genes expresados. Los datos de las librerías preparadas con Ribo-Zero Plus Microbiome Depletion Kit revelaron una mayor diversidad de familias génicas con una resolución más precisa, identificando qué especies estaban contribuyendo a la expresión genética, en comparación con las librerías sin eliminación (Figura 5). La aplicación BaseSpace Microbiome Metatranscriptomics ayuda con el análisis metatranscriptómico adicional, como la taxonomía, presentado en gráficos interactivos de Krona y formatos de archivo compatibles con Excel (Figura 6).

## Resumen

Ribo-Zero Plus Microbiome Depletion Kit ofrece una solución de flujo de trabajo de ARN a análisis para la investigación metatranscriptómica. Los juegos de sondas de Ribo-Zero Plus Microbiome Depletion reducen las lecturas de ARNr no deseado de las muestras de heces y aumentan las lecturas de ARN de interés. Además, el software de análisis gratuito facilita este método tanto para los usuarios experimentados como para los nuevos usuarios de microbioma. El enfoque en el análisis de porciones de alto valor del transcriptoma permite un conocimiento más profundo de la función génica activa en el microbioma. Comprender cómo responde el microbioma a los tratamientos, las dietas o las enfermedades puede servir de base para la investigación biomédica y, potencialmente, dar lugar a tratamientos mejores y más selectivos.



1 800 809 4566 (llamada gratuita, EE. UU.) | tel.: +1 858 202 4566  
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2022 Illumina, Inc. Todos los derechos reservados. Todas las marcas comerciales pertenecen a Illumina, Inc. o a sus respectivos propietarios. Si desea consultar información específica sobre las marcas comerciales, consulte [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).  
M-GL-00692 ESP v1.0

## Información adicional

Illumina Stranded Total RNA Prep con 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)

## Bibliografía

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. 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). Año de publicación: 2020. Fecha de consulta: 24 de mayo de 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* (En revisión).
4. Illumina. Ribo-Zero rRNA Removal Kit Reference Guide. (Guía de referencia de Ribo-Zero rRNA Removal Kit) [https://jp.support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry\\_documentation/ribosomal-depletion/ribo-zero/ribo-zero-reference-guide-15066012-02.pdf](https://jp.support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/ribosomal-depletion/ribo-zero/ribo-zero-reference-guide-15066012-02.pdf). Año de actualización: 2016. Fecha de consulta: 24 de mayo de 2022.
5. Joint Genome Institute (JGI). BBDuk Guide (Guía de BBDuk). <https://jgi.doe.gov/data-and-tools/software-tools/bbtools/bb-tools-user-guide/bbduk-guide/>. Fecha de consulta: 24 de mayo de 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