

# Déplétion de l'ARN ribosomique pour les études métatranscriptomiques

La solution de l'ARN à  
l'analyse Ribo-Zero<sup>MC</sup> Plus  
Microbiome offre une  
meilleure compréhension  
de l'activité microbienne

- Optimisez le séquençage de l'ARN des échantillons microbiens complexes, notamment les échantillons de selles
- Accédez à une solution logicielle facile à utiliser pour l'analyse métatranscriptomique
- Concentrez-vous sur les parties à valeur élevée du transcriptome pour comprendre le rôle du microbiome dans la santé et la maladie

**illumina**<sup>MD</sup>

## Introduction

Le microbiome peut affecter plusieurs aspects de la santé et de la maladie. La recherche traditionnelle sur le microbiome utilise le séquençage du gène 16S pour examiner la diversité bactérienne globale ou le séquençage métagénomique aléatoire afin de déterminer le potentiel fonctionnel des microbes au niveau de la souche. En complément de ces méthodes basées sur l'ADN, le séquençage de l'ARN ou la métatranscriptomique fournit des renseignements directs sur l'expression génique active pour comprendre le profil métabolique du microbiome. Cependant, le séquençage du métatranscriptome est entravé par la forte abondance relative d'ARN ribosomique (ARNr) dans les cellules bactériennes, comprenant  $\geq 85\%$  des molécules de l'ARN total<sup>1</sup>. L'élimination des ARNr avant le séquençage permet aux chercheurs de se concentrer sur l'analyse de parties informatives à valeur élevée du transcriptome.

Illumina propose une solution de l'ARN à l'analyse ([figure 1](#)) pour le séquençage du métatranscriptome d'échantillons microbiens complexes, tels que les échantillons de selles. Ribo-Zero Plus Microbiome Depletion Kit permet une analyse approfondie et un aperçu de l'activité microbienne en réduisant les lectures indésirables et en augmentant la couverture de l'ARN bactérien exprimé. Ribo-Zero Plus Microbiome Depletion Kit comprend des pools d'oligonucléotides de déplétion qui éliminent l'ARNr des bactéries courantes dans l'intestin humain de l'adulte et du nourrisson, ainsi que l'ARN hôte de l'homme, de la souris et du rat. La trousse comprend également l'accès à l'application complémentaire BaseSpace<sup>MC</sup> Microbiome Metatranscriptomics App qui exécute des pipelines pour analyser des métatranscriptomes complexes dans une interface graphique conviviale.

Cette note technique démontre les performances de déplétion de l'ARNr dans les échantillons de selles avec Illumina Stranded Total RNA Prep, Ligation with Ribo-Zero Plus Microbiome Depletion Kit, notamment certains résultats marquants provenant de BaseSpace Microbiome Metatranscriptomics App.

## Méthodes

### Préparation des échantillons

Des échantillons de selles provenant d'adultes et de nourrissons en bonne santé ont été recueillis à l'aide de l'outil de prélèvement OMNIgene•GUT DNA and RNA (DNA Genotek, référence n° OMR-205). L'ARN total a été extrait de 100 ng d'échantillons combinés d'adultes et de nourrissons à l'aide de RNeasy PowerMicrobiome Kit (QIAGEN, référence n° 26000-50) conformément au protocole du fabricant. Ces échantillons d'ARN dans les selles sont appelés échantillons « G ». Les échantillons de selles de contrôle ont été achetés auprès de ZymoBIOMICS Fecal Reference with TruMatrix Technology (ZymoBIOMICS, référence n° D6323). L'ARN total a été extrait d'un échantillon de contrôle de 100 ng à l'aide de ZymoBIOMICS RNA Mini Kit (ZymoBIOMICS, référence n° R2001). Ces échantillons d'ARN dans les selles sont appelés échantillons « Z ».



Figure 1 : Ribo-Zero Plus Microbiome Depletion Kit dans les flux de travail de séquençage de l'ARN (RNA-Seq) basé sur le séquençage de nouvelle génération (SNG) – Ribo-Zero Plus Microbiome Depletion Kit peut être intégrée aux flux de travail existants pour le RNA-Seq afin d'éliminer efficacement l'ARNr indésirable des échantillons d'ARN total en environ 40 minutes.

## Préparation des bibliothèques

Pour la déplétion de l'ARNr, l'ARN est hybridé avec des sondes d'ADN complémentaires à l'ARNr. Ces sondes permettent une digestion ciblée des molécules d'ARNr par la ribonucléase H. Les sondes d'ADN sont ensuite digérées avec la DNase I, suivie d'une purification des billes de l'ARN intact restant<sup>2</sup>. Les échantillons d'ARN ayant subi une déplétion des ARNr sont ensuite soumis à l'étape de préparation des bibliothèques. Illumina Stranded Total RNA Library Prep, Ligation with Ribo-Zero Plus Microbiome (Illumina, référence n° 20072063) comprend les ensembles de sondes de déplétion DP1 et DPM. DP1 est l'ensemble de sondes de déplétion inclus dans Ribo-Zero Plus Depletion Kit (Illumina, référence n° 20037135), tandis que DPM est le tout dernier ensemble de sondes de déplétion d'ARNr ciblant le microbiome. L'ensemble de sondes DPM a été développé comme décrit dans Tan et al<sup>3</sup>. En résumé, les sondes ont été conçues pour réduire l'ARNr trouvé dans les échantillons de selles humaines saines, notamment les adultes et les nourrissons, et les 38 espèces bactériennes dans les échantillons communautaires simulés de l'American Type Culture Collection (ATCC) (MSA-2002, MSA-2005 et MSA-2006).

Les bibliothèques ont été préparées comme décrit dans le Guide de référence d'Illumina Stranded Total RNA Prep, Ligation with Ribo-Zero Plus, Ribo-Zero Plus Microbiome<sup>4</sup> sans déplétion, avec déplétion Ribo-Zero Plus (DP1 uniquement) ou déplétion Ribo-Zero Plus Microbiome (DP1 + DPM). Une trousse de déplétion d'ARNr tierce a également été testée sur les mêmes échantillons en suivant la procédure standard. Les cycles PCR sont passés à 15 cycles par rapport aux 13 cycles recommandés dans le protocole de préparation des bibliothèques.

## Séquençage

Les bibliothèques ont été regroupées et séquencées sur le NextSeq<sup>MC</sup> 2000 System en utilisant une longueur de lecture de 2 × 150 pb. La concentration de chargement était de 750 pM avec un ajout de 1 % de substance de contrôle PhiX sur une Flow Cell P2 pour NextSeq 1000/2000 (Illumina, référence n° 20046813). Bien que les échantillons varient, plus de 50 millions de lectures/échantillon devraient suffire pour obtenir la plupart des gènes exprimés de manière unique et capturer la diversité complète des fonctions géniques, notamment les gènes rarement exprimés.

## Analyse des données

Tous les filtrages de séquence, l'alignement et la couverture des transcrits ont été effectués dans BaseSpace Sequence Hub à l'aide de l'application BaseSpace Microbiome Metatranscriptomics App (incluse avec Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus Microbiome Depletion Kit) avec les paramètres par défaut (figure 2).

## Résultats

BaseSpace Microbiome Metatranscriptomics App fournit les résultats et les chiffres nécessaires pour déterminer quelles bactéries sont présentes dans un échantillon et les voies fonctionnelles que ces bactéries utilisent dans leur environnement. Le flux de travail de BaseSpace Microbiome Metatranscriptomics App comprend les pipelines bioinformatiques BBduk, HUMAnN 3.0 et Kaiju (figure 2)<sup>5-7</sup>.

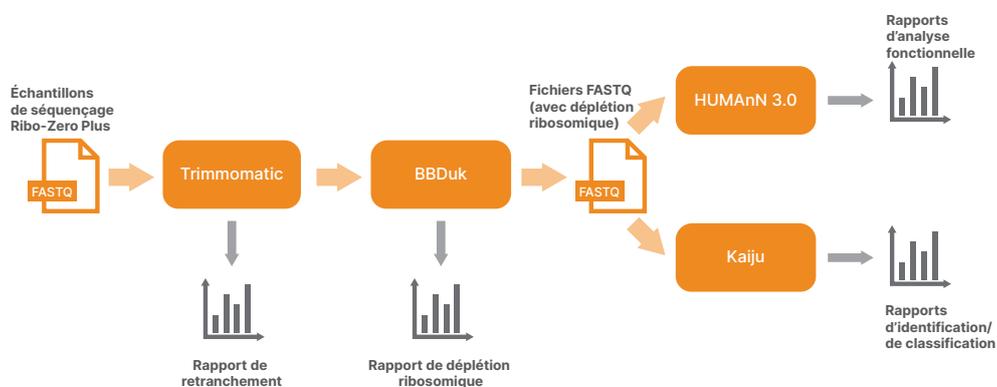


Figure 2 : Flux de travail de BaseSpace Microbiome Metatranscriptomics App – L'application BaseSpace Microbiome Metatranscriptomics App est incluse dans Ribo-Zero Plus Microbiome Depletion Kit pour offrir les outils de bioinformatique nécessaires à l'analyse complète du métatranscriptome.



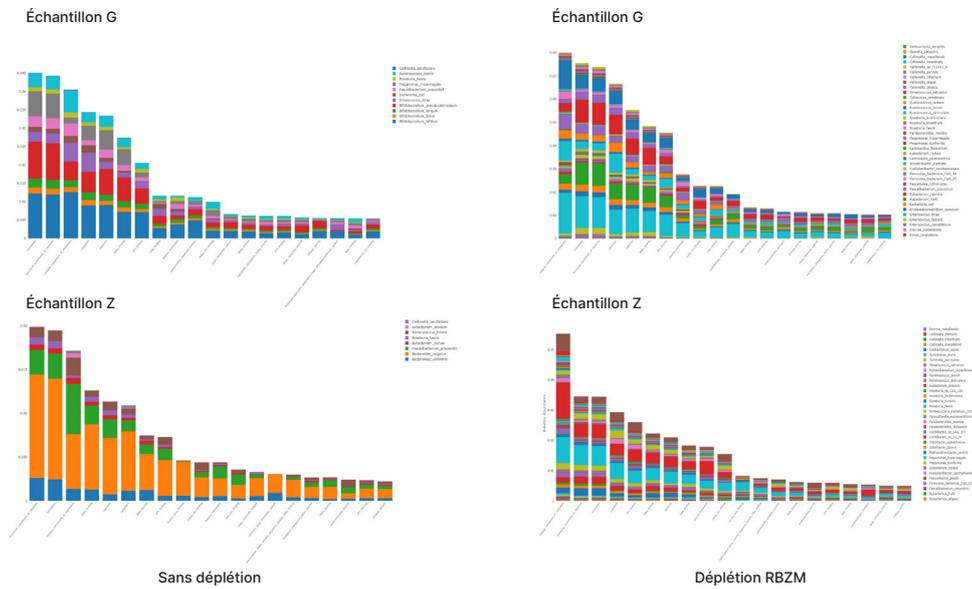


Figure 5 : Grâce à la déplétion de l'ARNr, davantage de familles de gènes peuvent être séquencées à une résolution plus élevée – Les résultats du pipeline HUMAnN 3.0 sont présentés sous forme de graphique en fonction des familles de gènes pour les 20 principaux termes Gene Ontology (GO) avec les contributions bactériennes prévues. Chaque couleur dans les graphiques à barres représente les espèces microbiennes individuelles contribuant au métatranscriptome. L'échantillon G et l'échantillon Z traités avec Ribo-Zero Plus Microbiome (côté droit) affichent une résolution plus élevée de la contribution microbienne individuelle pour chaque gène que les échantillons sans déplétion.

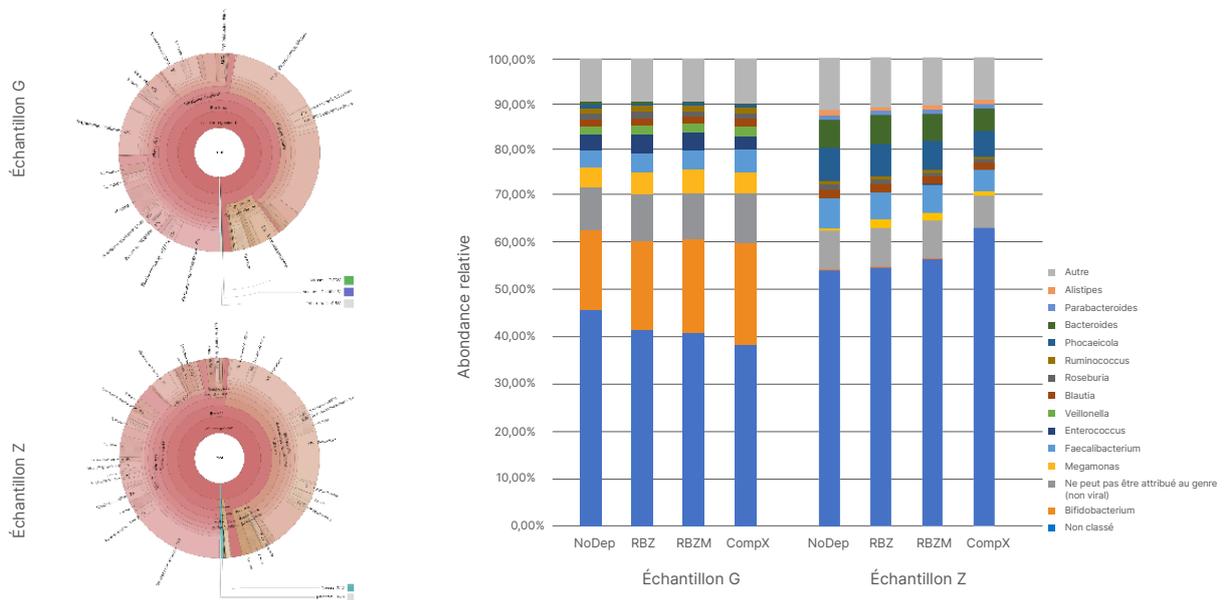


Figure 6 : Profils taxonomiques dans un format facile à lire et à télécharger – Les résultats du pipeline Kaiju proviennent de Microbiome Metatranscriptomics BaseSpace App. (A) Représentations Krona de deux échantillons différents traités avec la déplétion Ribo-Zero Plus Microbiome. Le graphique Krona de Microbiome Metatranscriptomics BaseSpace App est dynamique et permet d'explorer plus en détail la diversité microbienne dans les échantillons, notamment les virus et les taxons non bactériens. (B) Un fichier TSV qui peut être présenté sous forme de graphique dans Excel est disponible avec les résultats. La taxonomie est cohérente entre les différentes méthodes. Notez que des taxons similaires peuvent avoir un ARN homologue et que cette méthode est donc aussi précise que les bases de données.

L'analyse des données du pipeline HUMAnN 3.0 a montré à quel point la déplétion de l'ARNr est essentielle pour réduire les lectures indésirables et optimiser le séquençage des gènes exprimés. Les données des bibliothèques préparées avec Ribo-Zero Plus Microbiome Depletion Kit ont révélé une plus grande diversité de familles de gènes à une résolution plus élevée, identifiant ainsi les espèces qui contribuaient à l'expression génique, par rapport aux bibliothèques sans déplétion (figure 5). BaseSpace Microbiome Metatranscriptomics App facilite l'analyse métatranscriptomique supplémentaire, telle que la taxonomie, présentée dans des graphiques Krona interactifs et des formats de fichiers compatibles avec Excel (figure 6).

## Résumé

Ribo-Zero Plus Microbiome Depletion Kit offre une solution de flux de travail de l'ARN à l'analyse pour la recherche métatranscriptomique. Les ensembles de sondes de déplétion Ribo-Zero Plus Microbiome réduisent les lectures d'ARNr indésirables provenant d'échantillons de selles et augmentent les lectures d'ARN d'intérêt. En outre, le logiciel d'analyse gratuit démocratise cette méthode pour les utilisateurs expérimentés, mais aussi pour les nouveaux utilisateurs en microbiomique. L'accent mis sur l'analyse de parties à valeur élevée du transcriptome permet de mieux comprendre la fonction génique active dans le microbiome. Comprendre comment le microbiome réagit aux traitements, aux régimes alimentaires ou aux états pathologiques peut éclairer la recherche biomédicale et potentiellement conduire à des traitements meilleurs et plus ciblés.

## En savoir plus

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)

## Références

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). Publié en 2020. Consulté le 24 mai 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 Review).
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](https://jp.support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/ribosomal-depletion/ribo-zero/ribo-zero-reference-guide-15066012-02.pdf). Mis à jour en 2016. Consulté le 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/>. Consulté le 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**<sup>MD</sup>

Numéro sans frais aux États-Unis : + (1) 800 809-4566 | Téléphone : + (1) 858 202-4566  
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2022 Illumina, Inc. Tous droits réservés. Toutes les marques de commerce sont la propriété d'Illumina, Inc. ou de leurs détenteurs respectifs. Pour obtenir des renseignements sur les marques de commerce, consultez la page [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).  
M-GL-00692 FRA v1.0