

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2022.09.11

Dual RNA-seq 技术及其在宿主-病原体相互作用中的研究进展

邹宏^{1,2}, 夏应菊², 徐璐², 赵俊杰², 李玲², 王震²,
刘业兵², 王琴², 宋振辉^{1*}, 张乾义^{2*}

(1. 西南大学动物医学院, 重庆荣昌 402460; 2. 中国兽药药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2022-04-07 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280(2022)09-0071-08 [中图分类号] S855

[摘要] 利用转录组测序技术(RNA-sequencing, RNA-seq)进行转录组分析是了解病原体入侵宿主分子变化的重要工具,在同时分析病原体与宿主转录组时, RNA-seq 技术需要分别构建病原体及宿主的 cDNA 文库,再将其各自映射到病原体及宿主参考基因组中,而互作转录组测序技术(Dual RNA-seq)无需分离两物种,只需构建一个转录组文库,便能同时对两个(或多个)研究对象进行测序和分析,可以直观地揭示病原体和宿主相互作用过程中转录组学动态变化,因此 Dual RNA-seq 技术被广泛应用到人类疾病和生物感染模型的相互作用研究中。为了解 Dual RNA-seq 技术及其在宿主-病原体相互作用研究中的前景,就 Dual RNA-seq 技术概述以及近年来该技术在原核生物、真核生物以及病毒研究中的应用现状及发展前景进行综述。Dual RNA-seq 技术可为病原体与宿主相互作用的研究提供新视角,有助于更好地识别和理解感染过程中病原体和宿主的转录组学变化,从而揭示潜在的新靶点或生物标记物。

[关键词] Dual RNA-seq; 转录组; 相互作用

Advance of Dual RNA-seq Technology in Host-pathogen Interaction

ZOU Hong^{1,2}, XIA Ying-ju², XU Lu², ZHAO Jun-jie², LI Ling², WANG Zhen²,
LIU Ye-bing², WANG Qin², SONG Zhen-hui^{1*}, ZHANG Qian-yi^{2*}

(1. College of Veterinary Medicine, Southwest University, Rongchang, Chongqing 402460, China;

2. China Institute of Veterinary Drugs Control, Beijing 100081, China)

Corresponding authors: SONG Zhen-hui, E-mail: szh7678@swu.edu.cn; ZHANG Qian-yi, E-mail: zhangqy114@126.com

基金项目: 国家自然科学基金项目(31872484); 中国兽药药品监察所“兽药行业公益性重点专项”(GY202011)

作者简介: 邹宏, 硕士研究生, 从事兽医微生物学及免疫学研究; 夏应菊, 副研究员, 从事猪瘟免疫致病机制及非洲猪瘟检测技术研究。二人为共同第一作者。

通讯作者: 宋振辉, E-mail: szh7678@swu.edu.cn; 张乾义, E-mail: zhangqy114@126.com

Abstract: Transcriptome analysis using RNA – sequencing (RNA – seq) is an important tool for understanding the molecular changes of pathogenic invasion of hosts. When analyzing the pathogen and host transcriptomes simultaneously, RNA – seq technology requires the construction of separate cDNA libraries for the pathogen and host, which are then mapped to the pathogen and host reference genomes, whereas interoperation Dual RNA – seq technology is widely used in the study of interactions between human diseases and biological infection models because it can sequence and analyze two (or more) subjects simultaneously by constructing a single transcriptome library without separating the two species, and can visually reveal the dynamic changes in transcriptomics during the interaction between pathogen and host. In order to understand Dual RNA – seq technology and its future in host – pathogen interaction studies, an overview of Dual RNA – seq technology and the current status and future of its application in prokaryotic, eukaryotic and viral studies in recent years are reviewed. Dual RNA – seq technology can provide a new perspective on pathogen – host interactions and help to better identify and understand the transcriptomic changes in pathogens and hosts during infection, thus revealing potential new targets or biomarkers.

Key words: Dual RNA – seq; transcriptome; interaction

转录组是指特定组织或细胞在某一功能状态下转录出来的所有 RNA 的总和,包括 mRNA (2% ~ 4%)、tRNA (5% ~ 15%)、rRNA (80% ~ 90%)和 ncRNA (1%)等^[1]。RNA – seq 是 21 世纪初进行转录组分析的新一代测序技术,利用 RNA – seq 可以全面快速的获得组织和细胞在某一状态下几乎所有的转录本序列和表达信息,进而研究不同发育阶段或组织之间的基因差异表达模式,同时还可发现新的基因和转录本,为未知蛋白的功能研究提供基因序列参考信息^[2]。随着 RNA – seq 数据的累积,科学家们建立了广泛的转录组数据库^[3]。伴随高通量测序深度不断提高,2012 年 Westermann 等^[4]在 RNA – seq 的基础上提出并探讨了 Dual RNA – seq 技术的可行性,Dual RNA – seq 得以实现并应用到生命科学领域的研究中^[5]。与 RNA – seq 相比,Dual RNA – seq 可以同时监测宿主和病原体的所有编码和非编码转录本^[6],无需分离病原体和宿主、避免分离样本造成的干扰和数据浪费,揭示两个转录本之间基因表达的动态变化,同时通过相互作用模型图预测基因的调控关系和两物种间的相互作用机制,为进一步研究病原体致病机制提供重要依据。

1 Dual RNA – seq 概述

Dual RNA – seq 技术的发展和与应用与基因测序

技术的发展密切相关。基因测序技术的发展按照时间段可分为第一代毛细管测序、第二代高通量测序和第三代单分子测序技术。第一代毛细管测序以 1977 年 Sanger 建立的“DNA 双脱氧链末端终止测序法”为基础,但 Sanger 测序法的通量很低,不能实现大批量测序,而转录组中有成千上万个序列,因此 Sanger 法难以应用在转录组测序的研究中^[7]。高通量测序技术,即二代测序 (Next generation sequencing, NGS) 技术,其测序平台主要为 454 测序、Solexa 及 SOLID 测序等^[1]。与一代相比,二代测序的主要特点是以高密度基因芯片的荧光成像为基础,测序通量大幅度提升,测序时间和成本显著下降^[8],可以一次对几十万到几百万条 DNA 分子序列测定,使物种全转录组和基因组的整体分析成为可能^[9],实现了测序的自动化和高通量,促进了转录组学研究的快速发展。三代测序技术,又叫单分子测序技术^[10] (Single Molecule Real – Time sequencing, SMRT),通过检测标记荧光获得序列信息的 HeliScope 遗传分析系统和 SMRT 技术,实现了对每一条 DNA 分子单独测序,其读数较二代更长 (最长可高达 60 kb),具有无 GC 偏好性,无聚合酶链式反应偏向性扩增等特点。

Dual RNA – seq 是在 NGS 技术的基础上发展起来的,其核心除了高通量荧光成像系统,此外还

包括高密度生物芯片、高通量图像传感器及高功率半导体激光器。Dual RNA-seq 测序深度决定了技术的准确性和可行性^[13]。转录组测序会受到研究样本遗传材料的复杂性和大小的限制,如真核生物感染宿主时往往涉及两种完全不同的互作生物体转录组,通常转录组测序技术更加侧重于分析参与蛋白翻译的 mRNA,忽略了大量非编码区 RNA^[14],而非编码 RNA 广泛参与生命过程的各个环节,如生长、发育、分化、免疫,甚至在肿瘤的形成中也具有重要的调节功能,蛋白质和 DNA 发挥正常的生理学功能离不开非编码区 RNA^[15]。随着高通量 (High-Throughput sequencing, HT) 测序技术深度

的不断提升,宿主转录组和病原体转录组同时测序技术得以实现,Dual RNA-seq 技术的应用更加广泛^[15],进一步加强了对病原体感染宿主期间发生的分子相互作用(包括非模式宿主物种)的分析。Dual RNA-seq 技术改进了文库构建和测序技术,可以深入研究信号通路相关的非编码 RNA,及研究感染相关的 sRNA、线粒体 RNA 等^[14],使其可以同时捕捉病原体和宿主中所有类别的编码和非编码 RNA,使我们更好地了解感染过程中病原体和宿主的生理变化,揭示了在 RNA-seq 中不可见的毒力相关小非编码 RNA 隐藏的分子表型。

表 1 基因测序技术发展特征比较

Tab 1 Comparison of the development characteristics of gene sequencing technology

项目	应用	优势	不足
第一代 Sanger 测序 ^[7]	PCR 产物测序、重测序、分型分析、临床应用等低通量的快速研究项目	准确率高于二、三代测序;序列读长长;数据分析简单迅速	成本高; 通量低; 耗时长; 不能实现大批量测序
高通量测序技术 ^[11]	基因组测序、转录组测序、群体测序、扩增子测序、宏基因组测序、重测序等	测序通量大幅度提升 敏感性高;测序时间和成本显著下降	测序读长较短; 序列拼接繁琐; 建库中使用 PCR 富集序列,含量较少序列无法大量扩增,造成信息丢失
单分子测序技术 ^[12]	基因组组装、临床应用(实时获取和分析 DNA/RNA 序列)、甲基化分析	读数较二代更长; 无 GC 偏好性; 无聚合酶链式反应偏向性扩增; 成本与测序时间进一步下降	错误率较二代测序高; 测序信号易丢失; 技术相对不成熟

Dual RNA-seq 的过程与 RNA-seq 相同,包括转录组 RNA 的提取、cDNA 文库的构建、高通量测序及数据预处理、比对混合基因组和转录组整体的质量评估等。其区别在于,在同时分析病原体与宿主转录组时,RNA-seq 技术需要分别构建病原体及宿主的 cDNA 文库,再将其各自映射到病原体及宿主参考的基因组中,而 Dual RNA-seq 技术无需分离两物种,只构建一个 cDNA 文库,然后将测序得到的原始数据经过质量控制和修剪,各自映射到宿主及病原体参考基因组,确定每个基因的读段数,再利用相关分子生物学技术对数据进行分析^[16]。如 Dual RNA-seq 可以通过构建数字基因表达谱(Digital Gene Expression Profiling, DGE)确定

基因差异表达情况。利用 GO(Gene Ontology, GO)和 KEGG 富集(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)进行层次聚类分析^[17],一般这些相同分组的基因具有相似功能并聚于一簇,属于同一调控途径。采用 Cytoscape 软件对差异蛋白的 mRNA 建立节点及网络形式的生物分子相互作用网络^[18],挖掘互作网络中的核心模块及关键节点,从分子调控网络的角度出发探究其分子致病机制和发现新药靶点。

2 利用 Dual RNA-seq 研究病原体与宿主相互作用的进展

2.1 Dual RNA-seq 技术在原核生物研究中的应用

病原体入侵宿主时是一个主动、动态的过程,在病

原体感染宿主细胞的过程中,病原体 and 宿主分别通过入侵策略和自身防御影响另一个生物体,在这种互相影响下的基因表达会发生差异并出现一系列级联变化反应^[4]。利用 Dual RNA-seq 研究杜克雷嗜血杆菌(*Hemophilus ducreyi*)感染病例^[19]时发现,杜克雷嗜血杆菌通过利用抗坏血酸作为一种替代碳源在脓肿中生存,还通过上调参与无机离子、厌氧代谢和营养运输的基因来适应脓肿,该研究第一次描述了细菌和人类宿主在感染部位的相互作用网络,揭开了这一系列级联反应的面纱。

2017 年 Robert 等^[20]首次将 Dual RNA-seq 应用到体内感染研究中,已有文章证实 A/J 小鼠对金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)非常敏感,在 C57BL/6 具有较强的抵抗性的前提下,研究人员使用金黄色葡萄球菌感染 A/J 和 C57BL/6。利用 Dual RNA-seq 技术对两组小鼠转录组的高通量测序数据分析,结果表明两组小鼠感染反应中,大量的宿主基因表达上调,特别是编码炎症细胞因子的基因,如白细胞介素-6(IL-6)基因、白细胞介素-1 α (IL-1 α)基因、白细胞介素-1 β (IL-1 β)基因和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)基因以及参与单核细胞/巨噬细胞螯合作用的趋化因子,如趋化因子(CXC 基序)配体 1(Cxcl1)、趋化因子(CXC 基序)配体 2(Cxcl2)和趋化因子(CXC 基序)配体 3(Cxcl3),发现 A/J 小鼠和 C57BL/6 小鼠之间的感染组织的微环境是高度不同的,这可能会极大的影响金黄色葡萄球菌的毒力决定因素的表达。另外还发现编码急性期蛋白的宿主基因,如血清淀粉样蛋白 A1(SAA1)、血清淀粉样蛋白 A2(SAA2)、结合珠蛋白、S100 钙结合蛋白 A8(S100A8)和 S100 钙结合蛋白 A9(S100A9)在感染的 A/J 和 C57BL/6 小鼠中被高度诱导。虽然转录组整体水平分析结果显示炎症相关基因在两组小鼠对金黄色葡萄球菌感染的反应中都高表达,但 A/J 明显高于 C57BL/6 小鼠。此外,编码精氨酸酶 1(Arg1)和精氨酸酶 2(Arg2)的基因在感染 A/J 小鼠中的表达程度要高于感染 C57BL/6 小鼠。精氨酸酶可以通过消耗细胞外的 L-精氨酸和一氧化氮(NO)的生

物利用率,导致内皮的一氧化氮合成酶失调,从而产生高水平的有害活性氧(ROS),从而促进内皮细胞功能障碍。以上研究表明,A/J 小鼠和 C57BL/6 小鼠之间的感染组织的微环境是高度不同的,这可能会极大的影响金黄色葡萄球菌的毒力决定因素的表达。

利用 Dual RNA-seq 研究肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)感染人体转录组学^[15,21]发现,人类肺上皮细胞中谷胱甘肽依赖的活性氧解毒途径是由肺炎链球菌产生的活性氧引起的,感染期间添加抗氧化剂白藜芦醇可抑制这种反应。在肺炎球菌与肺上皮细胞体外感染模型中,肺炎球菌通过对上皮细胞的粘附激活自身糖转运蛋白,同时抑制宿主趋化因子 IL-8 的表达和抗菌肽的产生,避免其激活宿主炎症反应,保护自身不被抗菌肽清除。利用 Dual RNA-seq 实现了在同一实验中对宿主和病原体同时监测,从而对肺炎球菌与肺上皮细胞相互作用关系有更清晰的认知。

以上研究证明,通过运用 Dual RNA-seq 技术使我们能够系统性的研究病原体感染宿主后如何通过调节差异基因的表达得以探究病原体如何在宿主体内进行吸附、侵入、脱壳、生物合成、组装和释放等病毒的复制过程^[22],从而能够研究同一病原体在入侵不同宿主或同一宿主的的不同部位时宿主与病原体转录组水平的应答特征,了解导致病毒嗜性变化和致病性差异的机制,鉴别致病力相关的关键基因,为深入了解复杂的宿主-病原体相互作用网络和疾病的发生发展提供了有力的支持。

2.2 利用 Dual RNA-seq 在真核生物中的研究应用

相较于原核生物,病原体与真核生物相互作用的过程中,病原体感染宿主存在着广泛的特殊相互作用,如共生、寄生、竞争和拮抗等^[23]。根结线虫(*Meloidogyne*)是危害亚洲和拉丁美洲水稻主要的病原之一,寄生感染过程中通过分泌蛋白因子来抑制水稻防御和紊乱代谢^[24]。在没有参考基因组的情况下利用 Dual RNA-seq 技术,Petitot 等^[20]获得了 66396 个根结线虫和水稻相互作用的转录本,进一步研究分析共发现 15 个可能的关键效应

基因,其中包括两个特征明显的线虫效应基因 *CLE* 和 *VAP1*, 以及一个水稻效应基因金属硫蛋白 (*Metallothionein*) 基因,为根结线虫感染水稻时的生物学特性的研究提供了重要依据。

利用 Dual RNA - seq 研究核果链核盘菌 (*Ascomycetes*) 感染不同发育阶段的油桃互作转录本^[25]时发现,宿主防御机制及病原体的感染策略与果实发育阶段有密切关系,核果链核盘菌只对成熟果实造成病变,在未成熟的果实中,病原体数量,宿主反应及病原体的转录活动在感染后 14 ~ 24 h 逐渐增强,此后核果链核盘菌不能利用碳水化合物活性酶 (CAZymes) 进行渗透,而宿主能够通过调节激素反应和氧化爆发来对抗核果链核盘菌的增殖。但在成熟果实中,核果链核盘菌更加依赖蛋白质水解效应,更利于感染早期核果链核盘菌丝状体的生长。对感染核果链核盘菌的成熟果实激素分析表明,虽然茉莉酸活性可能有利于防御,但成熟果实释放的高乙烯活性可能通过诱导成熟过程促进核果链核盘菌易感性。最后通过进一步验证,确定了在不同生长发育阶段感染中显著上调的核果链核盘菌基因,这些基因可能成为控制褐腐病的靶点。

此外,Musungu 等^[26]用黄曲霉 (*Aspergillus flavus*) 感染玉米 3 d 后,利用 Dual RNA - seq 构建了基因共表达网络 (Gene Co - expression Network Analysis, GEN),分析发现 GEN 证明了茉莉酸,活性氧和乙烯等许多已知途径具有高度连通性,确定了泡囊与产生黄曲霉毒素之间的互作网络,发现了一个重要的黄曲霉毒素簇调节因子 AfIS 与互作网络中的多个参与生存活性氧的基因共同调控,表明 AfIS 可以监视宿主活性氧水平。此研究发现玉米和黄曲霉的整个基因共表达网络及种间相关子集,该技术可作为发现黄曲霉侵染玉米的早期诊断工具。

2.3 利用 Dual RNA - seq 在病毒中的研究应用

目前在病毒转录组学的研究中还是主要以 RNA - seq 技术为主^[27],如利用 RNA - seq 技术对高致病性禽流感 H5N1 病毒转录组高通量测序分析中发现,H5N1 通过下调 *IFNAR1* 基因和 *IFNAR2* 基因来

减弱干扰素诱导信号,从而实现逃避宿主先天免疫的目的^[28]。猪繁殖和呼吸障碍综合症病毒 (Porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRSV) 感染猪的研究过程中发现,PRRSV 会导致宿主体内的 *IRF7* 以及其他一些诱导抗病毒的信号因子基因 (Interferon stimulated gene, ISG) 下调,通过构建基因表达谱分析发现,PRRSV 病毒非结构蛋白 *nsp7* 基因上调是导致这些抗病毒细胞因子下调的主要原因^[29]。在猪瘟疫病毒 (Classical Swine Fever Virus, CSFV) 强毒株感染猪的动物模型^[30]上,发现猪体内细胞凋亡相关基因、免疫应答相关基因以及新陈代谢相关基因均有不同程度的差异表达,揭示 CSFV 可能通过抑制或改变这些基因的表达来实现潜伏、复制和传播。以上研究结果均是在 RNA - seq 的基础上针对动物病毒或其宿主进行的单方面转录组学分析,缺乏另一方面的研究数据及辩证关系的分析佐证。然而随着高通量测序的快速发展,Dual RNA - seq 技术的出现使得在宿主转录组中同时分析病毒 RNA 基因组和发现病毒感染生物标志物成为可能,随之被逐渐应用到病毒与宿主相互作用的研究中^[31]。该技术可以对宿主和病原体的 RNA 进行同时捕获和分析,能够筛选基因差异表达谱的几乎所有差异表达的基因,为宿主与病原体的相互作用机制的研究提供强有力的依据,该技术在病毒转录组学研究中引起人们极大的兴趣。Giulia 等用 H3N2 流行毒株 Brisbane/10/07 和 Perth/16/09 以及早期毒株 Udom/307/72 分别感染人的支气管上皮细胞 BEAS - 2B^[33],利用 Dual RNA - seq 对病原体和宿主转录组数据进行分析时发现,以上三个毒株分别有 81、372 和 1614 个基因发生差异表达,这三个毒株可引起 22 个相同宿主基因表达上调,包括具有抗病毒作用的 ISG 宿主基因^[32] (如 *MX1*、*RO*、*RSAD2* 和 *left1 - 3*)、诱导 IFN 表达基因 (*DDX58* 和 *DDX60*)、抑制 IFN 表达的基因 (泛素类 *ISG15* 和 *E3* 连接酶 *IMTR69*)、或减弱 IFN 信号传导基因 (*USP18* 和 *GBP4*, 后者抑制 *IRF7*),而在三株不同的 H3N2 毒株感染宿主后 *IFNAR1* 基因均发生了下调^[34],且差异表达基因

(Differentially Expressed Genes, DEGs) 分析发现下调程度并没有明显差异,但通过 Dual RNA-seq 技术却发现三株不同病毒株在宿主感染过程中引起了一系列相同的级联反应,具体的反应途径还需进行下一步研究。文章揭示了 H3N2 与人上皮细胞相互作用的新要素,并强调了 Dual RNA-seq 在确定基因组水平的分子变化方面的重要性。

此外, Dual RNA-seq 技术也可以作为一种诊断方法, Wesolowska 等采集了 92 例哮喘儿童及 69 例健康儿童临床样本,使用 qPCR 对六种常见的呼吸道病毒进行筛查。结果显示 21 例病毒阳性的患者中有 19 例为哮喘患者, 2 例为健康儿童。将这两例筛选结果为阴性的哮喘儿童样本进一步研究,使用 *CCL8* 和 *CXCL11* (这两种被确定为急性呼吸道疾病上调最明显的病毒生物标志物基因) 进行 qPCR 检测,发现这两例患者的样本中这两种生物标志物显著表达。进一步对这些样本进行 Dual RNA Seq 分析发现在这 21 个 qPCR 阳性样本中有 18 个样本检测到呼吸道病毒,有 15 个样本通过 Dual RNA Seq 检测到的呼吸道病毒与 qPCR 鉴定的病毒相符,有 3 个被 qPCR 阳性的样本测序发现实际为人类肠道病毒及人类冠状病毒。该文章证实利用 Dual RNA-seq 在诊断上比 qPCR 更准确更敏感,为采取正确措施控制疾病发展发挥更精准的作用,体现了宿主和病原体的 Dual RNA Seq 是一种可以检测病原体及揭示其对宿主转录组影响的开创性方法。与常规的 qPCR 检测及传统方法(免疫层析、直接荧光抗体等技术等)相比, Dual RNA Seq 是基于比 qPCR 结果更全的病毒基因组序列检测,具有更高的特异性、不受引物交叉反应的限制还可以根据少量的读数对病毒进行分型,而 qPCR 方法却难以实现^[35-36]。Dual RNA Seq 可以从样本中检测病毒并确定其对宿主细胞转录组的影响,对于了解由病毒感染及后遗症引发的复杂疾病至关重要,在临床疾病诊断中意义重大。

3 总结和展望

本文就 Dual RNA-seq 技术本身及在病原体与宿主相互作用的研究中的应用进行论述,同时也

介绍了它在生命科学领域研究中的优势,但是 Dual RNA-seq 技术也有一定的局限性,例如要求有较高 RNA 浓度,由于细菌和真菌的细胞壁厚,破坏时要比哺乳动物细胞处理更困难,处理过程会导致哺乳动物细胞 RNA 浓度低,影响后期数据的分析^[37]。此外,不同物种间每个细胞的 RNA 含量相差很大,哺乳动物细胞含有大约 20 ~ 25 pg RNA,而真菌细胞和细菌分别为 0.5 ~ 1 pg 和 0.05 ~ 0.1 pg^[38],因此真菌和细菌 RNA 浓度高低通常是影响转录组分析的一个重要因素。此外读数覆盖率也是一个重要因素, Dual RNA-seq 的有效读取数一般在 50 ~ 100 bp,一般读取数越长,在基因组中的定位越准确。冗余读数也会存在影响,主要表现在 rRNA 感染细胞时高达 98%,是冗余读数的重要来源^[39],可以通过剔除 rRNA 或者在 mRNA 尾部添加 poly(A) 过滤掉 rRNA,残余的 rRNA,读取数可以使用 SortMeRNA 工具在计算机上进行删除^[40]。

相信随着测序技术不断发展,高通量测序的深度必定会进一步提高, Dual RNA-seq 技术也会越来越成熟的应用于更多领域研究。比如对于新发传染病的病原体而言,通过 NGS 技术测的序列往往比较新,与已知参考序列差异较大,通过传统的检测手段很难对其做出准确的判断^[5],而基于 NGS 技术的 Dual RNA-seq 不仅可以及时对其做出判断,同时还能了解和追踪病原体和宿主在感染过程中发生的生理及病理变化,为诊治新发传染病提供一定的依据; Dual RNA-seq 也可不依赖病毒培养,对于那些临床难以培养的病毒的研究显得尤其关键;此外, RNA 病毒的基因组由核糖核苷酸组成, Dual RNA-seq 技术可以在核苷酸水平平行比较病毒感染后组织与细胞中差异表达的基因,从而更直观,准确的揭示病毒的嗜性和改变病程,从而理解病毒与宿主之间的相互作用^[41-42]。因此利用 Dual RNA-seq 技术开展病毒与宿主转录组间基因表达的研究,分析病毒感染后病毒与宿主转录组水平的基因调控应答特征,鉴定与致病性相关的关键基因,进一步在生物学角度阐明病毒的分子致病机制

提供科学的证据,也可以作为一种诊断方法,对未知疾病进行诊断。本文针对 Dual RNA-seq 在各宿主-病原体相互作用进行综述,相信 Dual RNA-seq 技术优势将会在转录组学研究中有广阔的应用基础和前景,并为宿主-病原体相互作用机制的研究提供有力的技术支撑。

参考文献:

- [1] Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-seq: a revolutionary tool for transcriptomics[J]. Nature Reviews Genetics, 2009, 10(1): 57-63.
- [2] Withanage M H, Liang H, Zeng E. RNA-seq experiment and data analysis[J]. Methods in Molecular Biology, 2022, 2418: 405-424.
- [3] Hrdlickova R, Toloue M, Tian B. RNA-Seq methods for transcriptome analysis[J]. Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA, 2017, 8(1): e1364.
- [4] Westermann A J, Gorski S A, Vogel J. Dual RNA-seq of pathogen and host[J]. Nature Reviews Microbiology, 2012, 10(9): 618.
- [5] Mika-Gospodorz B, Giengkam S, Westermann A J. Dual RNA-seq of *Orientia tsutsugamushi* informs on host-pathogen interactions for this neglected intracellular human pathogen[J]. Nature Communications, 2020, 11(1): 3363.
- [6] Westermann A J, Lars B, Jörg V, et al. Resolving host-pathogen interactions by dual RNA-seq[J]. PLoS Pathogens, 2017, 13(2): e1006033.
- [7] Sultan M, Schulz M H, Richard H, et al. A global view of gene activity and alternative splicing by deep sequencing of the human transcriptome[J]. Science, 2008, 321(5891): 956-960.
- [8] Eid J, Fehr A, Gray J, et al. Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules[J]. Science, 2009, 323(5910): 133-138.
- [9] Schuster S C. Next-generation sequencing transforms today's biology[J]. Nature Methods, 2008, 5(1): 16-18.
- [10] Ardui S, Ameer A, Vermeesch J R, Hestand M S. Single molecule real-time (SMRT) sequencing comes of age: applications and utilities for medical diagnostics[J]. Nucleic Acids Res, 2018, 46(5): 2159-2168.
- [11] Parola C, Neumeier D, Reddy S T. Integrating high-throughput screening and sequencing for monoclonal antibody discovery and engineering[J]. Immunology, 2018, 153(1): 31-41.
- [12] Erwin L, van D, Yan J, Delphine N, et al. The third revolution in sequencing technology[J]. Trends in Genetics, 2018, 34(9): 666-681.
- [13] Werley C A, Chien M P, Cohen A E. Ultrawidefield microscope for high-speed fluorescence imaging and targeted optogenetic stimulation[J]. Biomedical Optics Express, 2017, 8(12): 5794-5813.
- [14] Westermann A J, Förstner K U, Amman F, et al. Dual RNA-seq unveils noncoding RNA functions in host-pathogen interactions[J]. Nature, 2016, 529(7587): 496-501.
- [15] Mehta S L, Chokkalla A K, Vemuganti R. Noncoding RNA crosstalk in brain health and diseases[J]. Neurochemistry International, 2021, 149:105139.
- [16] Bolger A M, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for illumina sequence data[J]. Bioinformatics, 2014, 30(15): 2114-2120.
- [17] Van Dam S, Vösa U, Van Der Graaf A, et al. Gene co-expression analysis for functional classification and gene-disease predictions[J]. Briefings in Bioinformatics, 2018, 19(4): 575-592.
- [18] Ning P, Zhou Y, Liang W, et al. Different RNA splicing mechanisms contribute to diverse infective outcome of classical swine fever viruses of differing virulence: insights from the deep sequencing data in swine umbilical vein endothelial cells[J]. PeerJ, 2016, 4: e2113.
- [19] Griesenauer B, Tran T M, Fortney K R, et al. Determination of an interaction network between an extracellular bacterial pathogen and the human host[J]. mBio, 2019, 10(3): e01193-19.
- [20] Petitot A, Dereeper A, Agbessi M, et al. Dual RNA-seq reveals *Meloidogyne graminiicola* transcriptome and candidate effectors during the interaction with rice plants[J]. Molecular Plant Pathology, 2016, 17(6): 860-874.
- [21] Prina E, Ranzani O T, Torres A. Community-acquired pneumonia[J]. Lancet, 2015, 386(9998): 1097-1108.
- [22] Saliba A E, Santos S, Vogel J. New RNA-seq approaches for the study of bacterial pathogens[J]. Current Opinion in Microbiology, 2017, 35: 78-87.
- [23] Pisu D, Huang L, Grenier J K, et al. Dual RNA-seq of *mtb*-infected macrophages *in vivo* reveals ontologically distinct host-pathogen interactions[J]. Cell Reports, 2020, 30(2): 335-350.
- [24] Dash M, Somvanshi V S, Budhwar R, et al. A rice root-knot nematode *Meloidogyne graminiicola*-resistant mutant rice line shows early expression of plant-defence genes[J]. Planta, 2021, 253(5):108.

- [25] Balsells L M, Silva C J, Usall J, *et al.* Depicting the battle between nectarine and *Monilinia laxa*; the fruit developmental stage dictates the effectiveness of the host defenses and the pathogen's infection strategies [J]. *Horticulture Research*, 2020, 7: 167.
- [26] Musungu B M, Bhatnagar D, Brown R L, *et al.* A network approach of gene co-expression in the *Zea mays/Aspergillus flavus* pathosystem to map host/pathogen interaction pathways [J]. *Frontiers in Genetics*, 2016, 7: 206.
- [27] Liu C, Liu Y, Liang L, *et al.* RNA-Seq based transcriptome analysis during bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection [J]. *BMC Genomics*, 2019, 20(1): 774.
- [28] Vijayakumar P, Mishra A, Ranaware P B, *et al.* Analysis of the crow lung transcriptome in response to infection with highly pathogenic H5N1 avian influenza virus [J]. *Gene*, 2015, 559(1): 77-85.
- [29] Liu K, Ma G, Liu X, *et al.* Porcine reproductive and respiratory syndrome virus counteracts type I interferon-induced early antiviral state by interfering IRF7 activity [J]. *Veterinary Microbiology*, 2019, 229: 28-38.
- [30] Li J, Yu Y J, Feng L, *et al.* Global transcriptional profiles in peripheral blood mononuclear cell during classical swine fever virus infection [J]. *Virus Research*, 2010, 148(1/2): 60-70.
- [31] Pittman K J, Aliota M T, Knoll L J. Dual transcriptional profiling of mice and *Toxoplasma gondii* during acute and chronic infection [J]. *BMC Genomics*, 2014, 15: 806.
- [32] François N V, Magno D F, Payelle B B, *et al.* USP18-based negative feedback control is induced by type I and type III interferons and specifically inactivates interferon α response [J]. *PloS One*, 2011, 6(7): e22200.
- [33] Hu Y, Wang J, Yang B, *et al.* Guanylate binding protein 4 negatively regulates virus-induced type I IFN and antiviral response by targeting IFN regulatory factor 7 [J]. *Journal of Immunology*, 2011, 187(12): 6456-6462.
- [34] Fabozzi G, Oler A J, Liu P, *et al.* Strand-specific dual RNA sequencing of bronchial epithelial cells infected with influenza A/H3N2 viruses reveals splicing of gene segment 6 and novel host-virus interactions [J]. *Journal of Virology*, 2018, 92(17): e00518-18.
- [35] Ellis C, Misir A, Hui C, *et al.* Detection of respiratory viruses and bacteria in children using a twenty-two target reverse-transcription real-time PCR (RT-qPCR) panel [J]. *World Journal of Pediatrics*, 2016, 12(2): 183-189.
- [36] Advani S, Sengupta A, Forman M, *et al.* Detecting respiratory viruses in asymptomatic children [J]. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 2012, 31(12): 1221-1226.
- [37] Rienksma R A, Suarez D M, Mollenkopf H J, *et al.* Comprehensive insights into transcriptional adaptation of intracellular mycobacteria by microbe-enriched dual RNA sequencing [J]. *BMC Genomics*, 2015, 16: 34.
- [38] Baddal B, Muzzi A, Censini S, *et al.* Dual RNA-seq of nontypeable *Haemophilus influenzae* and host cell transcriptomes reveals novel insights into host-pathogen cross talk [J]. *mBio*, 2015, 6(6): e01765-01715.
- [39] Zhao W, He X, Hoadley K A, *et al.* Comparison of RNA-Seq by poly(A) capture, ribosomal RNA depletion, and DNA microarray for expression profiling [J]. *BMC Genomics*, 2014, 15: 419.
- [40] Kopylova E, Noé L, Touzet H. SortMeRNA: fast and accurate filtering of ribosomal RNAs in metatranscriptomic data [J]. *Bioinformatics*, 2012, 28(24): 3211-3217.
- [41] Westermann A J, Vogel J. Host-pathogen transcriptomics by dual RNA-seq [J]. *Methods in Molecular Biology*, 2018, 1737: 59-75.
- [42] Luo G, Sun Y, Huang L, *et al.* Time-resolved dual RNA-seq of tissue uncovers *Pseudomonas plecoglossicida* key virulence genes in host-pathogen interaction with *Epinephelus coioides* [J]. *Environ Microbiol*, 2020, 22(2): 677-693.

(编辑:李文平)