

互作转录组测序技术在微生物研究中的应用进展*

许萌萌^{1,2,3}, 孙雨婷^{1,2,3}, 陈虹^{1,2,3}, 杨德琴^{1,2,3 Δ}

1. 重庆医科大学附属口腔医院(重庆 401147); 2. 口腔疾病与生物医学重庆市重点实验室(重庆 401147);
3. 重庆市高校市级口腔生物医学工程重点实验室(重庆 401147)

【摘要】 人体内定植着数量庞大、结构复杂的微生物群,微生物群之间、微生物群及宿主细胞间存在着复杂的相互作用。互作转录组测序技术(dual RNA sequencing, Dual RNA-seq)可同时分析两个(或多个)互作物种间基因表达的动态变化,并通过互作模型图获得物种间基因的调控关系,得到物种间的相互作用机制。本文就近年来Dual RNA-seq技术在肠道、呼吸道、皮肤及口腔微生物研究中的应用现状及发展前景作一综述。自Dual RNA-seq的概念被引入以来,该技术已被应用于一系列感染模型。在分子水平上直接研究物种间动态相互作用,有助于更好地理解感染过程中病原体和宿主的生理变化,从而揭示潜在的新靶点或生物标志物。但是, Dual RNA-seq目前仍然处于起步阶段,在实验技术方面存在一定的局限性,比如由于物种间的相互作用是动态变化的,最佳实验条件以及采样点的选择以及如何实现实时观测是亟需解决的难题;此外,由于Dual RNA-seq的生物信息学数据量大,如何快速灵活地处理互作信息仍然需要进一步的探索。

【关键词】 互作转录组测序 微生物 相互作用

Application Progress of Dual RNA Sequencing in Microbial Research XU Meng-meng^{1,2,3}, SUN Yu-ting^{1,2,3}, CHEN Hong^{1,2,3}, YANG De-qin^{1,2,3 Δ} . 1. Stomatological Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 401147, China; 2. Chongqing Municipal Key Laboratory of Oral Diseases and Biomedical Sciences, Chongqing 401147, China; 3. Chongqing Municipal Key Laboratory of Oral Biomedical Engineering of Higher Education Institutions, Chongqing 401147, China

Δ Corresponding author, E-mail: yangdeqin@hospital.cqmu.edu.cn

【Abstract】 The human body is colonized by densely-populated and structurally complex communities of microorganisms. The microbiota interact not only with their host cells, but also with other microbiota. Dual RNA sequencing (Dual RNA-seq) can be used to conduct simultaneous analysis of the dynamic changes of gene expression of two (or more) interactive species, and to obtain thus, through the interaction model diagram, the inter-species regulatory relationship of genes of different species, and hence the interaction mechanism between species. We herein reviewed the application status and development prospects of Dual RNA-seq in the research of intestinal, respiratory, skin and oral microbes. Since the concept of Dual RNA-seq was first introduced, the technology has been applied to a range of infection models. Direct investigation into the dynamic interactions between species at the molecular level will contribute to the better understanding of the physiological changes of pathogens and hosts during the course of infection, and thus help reveal potential new targets or biomarkers. However, the Dual RNA-seq technology is still in its early stage of development, and there are some limitations in the experimental technology. For example, due to the dynamic nature of the interaction between species, there are urgent problems awaiting solutions, such as the optimal experimental conditions, the selection of sampling sites and how to achieve real-time observation. In addition, due to the large amount of bioinformatics data of Dual RNA-seq, further research is needed to explore for ways to process the interaction information quickly and flexibly.

【Key words】 Dual RNA sequencing Microbiology Interaction

作为人体微生物群落的重要组成部分,皮肤、肠道、呼吸道和口腔等部位定植了大量的细菌、病毒、真菌等微生物,是微生物-宿主细胞、微生物-微生物相互作用的重要场所^[1]。感染性肺炎、炎症性肠病、龋病、牙周炎等是常见的慢性感染性疾病,其病因与多种致病微生物相互作用、微生物与宿主细胞相互作用密切相关^[2]。近年来,新一代测序技术已经广泛应用于各种病原菌转录组

水平的研究(即RNA sequencing, RNA-seq),用于分析微生物的生理学过程及其致病机制^[3]。在此基础上,互作转录组测序技术(Dual RNA sequencing, Dual RNA-seq)可以同时提取两个(或多个)物种的转录组信息进行测序和分析,从而揭示互作物种间基因表达的动态变化^[4]。然而目前, Dual RNA-seq应用于微生物的相关研究较少,本文就近年来Dual RNA-seq技术及其在肠道、呼吸道、皮肤和口腔微生物研究中的应用现状及发展前景作文献综述。

1 Dual RNA-seq技术

物种之间存在广泛且复杂的相互作用,针对特定物

* 国家自然科学基金面上项目(No. 31970783)、重庆市医学重点学科建设项目(2011年55号)和重庆市博士后研究项目特别资助(渝人社办[2020]379号)资助

Δ 通信作者, E-mail: yangdeqin@hospital.cqmu.edu.cn

种的研究,其结论通常较为片面。而Dual RNA-seq则可以实现从多个物种分析,更系统全面地解析多物种之间互作的分子功能和调控机制。Dual RNA-seq无需分离物种,应用范围广泛,可从大量的数据中筛选出差异表达基因,从而进行后续深入实验分析与应用^[5]。

进行Dual RNA-seq测序时,首先要在体外建立共培养模型,收集样本之后提取总RNA。随后,根据样本类型选择不同的方式获得mRNA——如果样本中只有真核生物,其mRNA都具有polyA尾结构,可使用polyA捕获的方式,获得物种的全部mRNA;若样本中存在原核生物,由于原核生物mRNA缺少polyA尾,因此只能采取剔除rRNA的方式获得mRNA^[6]。获取mRNA之后,构建测序文库并进行高通量测序,然后对测序数据进行统计和质控以获得高质量的数据信息。对比混合基因组测序的覆盖度、深度、分布统计,再从饱和度、覆盖度等方面对转录组整体质量进行评估。接着可从序列、表达量、高级分析等进行数据分析,最终获得物种间的互作信息^[7]。

在计划和实施Dual RNA-seq时应注意:①收集样本需避免不必要的转录组变化,细胞应低温保存直至裂解。②如果要进行不同时间点的比较,在收获后立即对物种进行分选较为困难,可以通过固定防止转录组变化,使用含有酒精或硫酸铵的防腐剂去除水分使细胞蛋白质变性,从而使核糖核酸酶和核糖核酸聚合酶失活^[8]。③进行Dual RNA-seq时,除了保持细胞物理性完整以进行细胞分选之外,还要防止荧光信号淬灭以及保证高质量RNA分离。④提取总RNA时,对于细胞壁比较厚的革兰阳性菌还应通过物理方法进行破壁^[9]。⑤多数Dual RNA-seq都涉及时间过程,通过两两比较来分析差异表达,但这忽略了样本之间的时间关系;重复实验在时间上进行交错,而不是简单重复相同的采样时间点,可更有利于分析差异表达^[10]。

2 Dual RNA-seq在微生物研究中的应用

2.1 肠道微生物

人类肠道微生物群落复杂多样,由多种不同的细菌组成,这些微生物群落在正常状态下对维持肠道微生物稳态有着重要作用^[11]。然而病原体的肠道定植会打破这种平衡,并且与宿主细胞发生相互作用,从而导致疾病的发生。胃肠炎通常是由微生物感染引起,其中沙门氏菌、假结核耶尔森菌(*Yersinia pseudotuberculosis*, *Y. pseudotuberculosis*)以及金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*)是其常见病原菌,关注病原微生物与宿主之间的相互作用,有助于更好地理解致病过程,寻找疾

病控制的有效靶点。

鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*, *S. typhimurium*)是一种重要的人畜共患病原菌,其感染发病率居沙门菌感染的首位^[12]。*S. typhimurium*主要通过饮食侵入人体从而导致急性胃肠炎。WESTERMANN等^[13]用*S. typhimurium*感染人永生上皮细胞(HeLa细胞)进行Dual RNA-seq,发现在宿主和病原菌中存在广泛的基因表达变化,同时在*S. typhimurium*中发现一个高度上调的sRNA——毒力因子PinT。BARRILA等^[14]观察航天飞行对人肠道上皮细胞(HT-29)与*S. typhimurium*相互作用的影响,Dual RNA-seq结果显示*S. typhimurium*感染诱导核心的促炎反应,航天飞行会导致HT-29中与I型干扰素(IFN- γ)信号相关的基因上调,并降低多种生物能量途径的表达。

*Y. pseudotuberculosis*是一种食源性致病菌,可穿透肠道上皮,引起胃肠炎^[15]。NUSS等^[16]应用Dual RNA-seq研究*Y. pseudotuberculosis*感染小鼠肠道相关淋巴滤泡,测序结果与已知的宿主-病原体相互作用一致,揭示了宿主在感染过程中涉及的趋化因子和信号分子,并发现了*Y. pseudotuberculosis*编码毒力因子相关的非编码RNA,为深入了解复杂的宿主-病原体相互作用网络和疾病的发展提供了依据。

*S. aureus*可以导致严重的侵袭性感染,针对*S. aureus*毒力因子的“抗毒力”靶向策略是有效的抗感染措施^[17]。THÄNERT等^[18]在两个不同的小鼠品系感染*S. aureus*的过程中对宿主和病原体进行Dual RNA-seq,发现宿主本身耐药的多态性或变异影响细菌毒力因子的转录组表达。

基于肠道疾病的预防与治疗越来越注重生态化原则,益生菌制剂是常见的疾病预防手段。嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*, *L. acidophilus*)是一种常用于乳制品和膳食补充剂的益生菌菌株。GOH等^[19]利用无菌小鼠定植模型,通过Dual RNA-seq提供了*L. acidophilus*在哺乳动物肠道环境中与生存、营养获取、压力适应和宿主相互作用相关的基因表达模式,以宿主回肠转录反应揭示了*L. acidophilus*在促进抗炎反应、维持肠上皮细胞动态平衡和调节宿主体内昼夜代谢轴方面的机制作用。

综上,Dual RNA-seq应用于肠道感染模型,有助于理解宿主和肠道微生物之间的相互作用,并揭示了与毒力相关的非编码RNA的隐藏分子表型。感染过程中的细微变化,可能导致整个有机体的不同疾病结果,但常规的分析中未能关注这些隐藏的基因功能,因此Dual RNA-seq可能成为未来研究非编码RNA调控基因网络的理想选择。

2.2 呼吸道微生物

下呼吸道感染是世界上死亡率最高的传染性疾病,肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*, *S. pneumoniae*)、结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, *M. tuberculosis*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, *P. aeruginosa*)以及不可分型流感嗜血杆菌(*Nontypeable Haemophilus influenzae*, NTHi)作为常见的呼吸道相关病原体,得到广泛研究。

*S. pneumoniae*是细菌性肺炎最常见的原因,也是全球范围内死亡的重要原因。这种微生物最初在鼻咽部定居,并由此侵入身体的其他部位^[20]。APRIANTO等^[21]建立了*S. pneumoniae*对II型肺泡上皮细胞(A549)感染模型,并进行Dual RNA-seq。结果显示*S. pneumoniae*激活了上皮细胞的活性氧解毒途径,黏附状态下的*S. pneumoniae*抑制了上皮细胞的固有免疫;*S. pneumoniae*中糖转运蛋白相关的基因表达被激活。SHENOY等^[22]使用Dual RNA-seq技术,捕获了*S. pneumoniae*在受感染心脏和血液中的基因表达谱,以确定心脏内的*S. pneumoniae*相关毒力因子。结果发现*S. pneumoniae*生物膜通过增强溶血素的释放,杀死巨噬细胞,实现在心脏内“定居”。RITCHIE等^[23]利用小鼠*S. pneumoniae*感染48 h分离出的支气管肺泡和胸膜液样本行Dual RNA-seq,确定了对胸膜腔侵入的主要宿主和细菌反应,发现胸膜和肺样本中参与中性粒细胞外渗调节的基因上调,但介导杀菌作用的基因下调,*S. pneumoniae*与细菌素、肺炎球菌表面黏附素和糖肽抗性相关的基因上调,编码蛋白酶的基因在感染中下调。MINHAS等^[24]通过使用Dual RNA-seq发现单核苷酸多态性可以影响*S. pneumoniae*编码多种糖转运体的细菌基因的表达,并精细调节碳水化合物代谢,以及宿主对感染的转录反应的广泛重组,特别是调节细胞因子和趋化因子配体和受体的编码基因的表达。

M. tuberculosis、*P. aeruginosa*以及NTHi等与呼吸道疾病相关的病原菌也受到关注。PISU等^[25]利用Dual RNA-seq先定义了小鼠肺巨噬细胞中*M. tuberculosis*感染导致的特异性上调基因,然后揭示了巨噬细胞之间的不同转录反应,肺泡巨噬细胞通过增加对铁和脂肪酸的接触来维持*M. tuberculosis*的生长,间质巨噬细胞通过铁螯合和更高水平的一氧化氮来限制*M. tuberculosis*的生长。DAMRON等^[26]使用Dual RNA-seq同时观测*P. aeruginosa*感染小鼠的基因表达和呼吸道反应。参与代谢和编码毒力的细菌基因在感染过程中差异表达,血红素获得、铁-肠杆菌素转运和pyoverdine生物合成基因显著上调。BADDAL等^[27]利用Dual RNA-seq同时监测了NTHi和感染

黏膜上皮长达72 h的转录变化,发现上皮细胞通过细胞骨架网络和细胞因子库的实质性改变对NTHi做出反应。

综上,Dual RNA-seq以更系统的方法研究微生物发病机制,并广泛适用于各个系统,从而促进新疗法的开发。然而,大多数肠道和呼吸系统的研究都是在体外或者动物感染系统中进行的,因此为了揭示体内感染过程中宿主和病原体基因的表达变化,需要新的技术手段来解决宿主组织和宿主相关微环境的异质性带来的复杂挑战。

2.3 皮肤微生物

皮肤是人体最大的器官,在机体与外界的接触过程中主要起屏障保护作用,皮肤上栖息着数以万计的微生物,正常情况下对人体无害,但也存在一些条件致病菌和病原微生物,它们在人体免疫力低下时致病^[28-29]。

红色毛癣菌(*Trichophyton rubrum*, *T. rubrum*)是皮肤、头发和指甲的主要真菌病原体;*T. rubrum*在感染过程中使用角质化底物作为主要营养物质,研究人员通常用人角质形成细胞(HaCat细胞)建立感染模型。PETRUCCELLI等^[30]体外共培养*T. rubrum*和HaCat细胞24 h后行Dual RNA-seq,发现*T. rubrum*中编码羧酸转运蛋白和角质分解蛋白酶的基因被诱导,HaCat细胞抗菌基因被诱导、而参与上皮屏障完整性的基因被抑制。这些基因可能成为治疗皮肤真菌病的潜在抗真菌靶点。

杜克雷嗜血杆菌(*Haemophilus ducreyi*, *H. ducreyi*)导致成人生殖器溃疡疾病软下疳,是热带地区儿童皮肤溃疡的主要原因。GRIESENAUER等^[31]在志愿者上臂接种*H. ducreyi*,直至长出脓疱。通过Dual RNA-seq确定脓疱中*H. ducreyi*和宿主的转录组学变化,表明*H. ducreyi*和人类宿主之间存在相互作用,*H. ducreyi*充分利用宿主免疫反应所创造的代谢生境(metabolic niche)。

化脓性链球菌(*Streptococcus pyogenes*, *S. pyogenes*)引起的坏死性肌炎有很高的发病率和死亡率,并且治愈率较低^[32]。KACHROO等^[33]利用Dual RNA-seq分析*S. pyogenes*及其感染非人灵长类动物的转录组信息,发现相关基因在坏死性感染中影响病原体-宿主的相互作用,*S. pyogenes*毒力因子在体内表达水平与病原体对宿主的适应性之间存在显著的相关性。

麻风分枝杆菌(*Mycobacterium leprae*, *M. leprae*)是麻风病的特异致病菌,无法在体外培养。MONTROYA等^[34]利用Dual RNA-seq对麻风患者的皮损进行分析,发现反应细菌负荷的转录产物与具有抑制抗菌作用的宿主I型IFN通路有关,反应细菌生存能力的细菌mRNA:rRNA比率将细菌热休克蛋白与BAFFBCMA宿主抗体反应途径相关联。

综上,皮肤微生物相关研究在进行Dual RNA-seq时,将灵长类动物以及患者皮损作为实验对象,更接近临床研究的方向,打破了基础研究结果难以应用于临床的壁垒。

2.4 口腔微生物

作为人体微生物群落的重要组成部分之一,口腔定植了约700种细菌、病毒、真菌等微生物,目前Dual RNA-seq在口腔中的应用主要集中于牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*, *P. gingivalis*)和链球菌属。

2.4.1 *P. gingivalis*与齿垢密螺旋体(*Treponema denticola*, *T. denticola*)、鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*, *A. baumannii*)、白色念珠菌(*Candida albicans*, *C. albicans*)之间的相互作用 *P. gingivalis*在龈沟液中检出率极高,目前是公认的牙周主要致病菌^[35]。KIN等^[36]利用Dual RNA-seq揭示*P. gingivalis*和*T. denticola*之间相互作用的分子机制和可能的代谢协同作用,*P. gingivalis*提高游离甘氨酸的产量,*T. denticola*则可利用甘氨酸作为碳源,使*P. gingivalis*绕过脂肪酸合成的初始代谢,减少对血红素的需求,且两种细菌相互作用后毒力相关基因表达显著上调。

*A. baumannii*是一种机会致病菌,其龈下定植与慢性侵袭性牙周炎以及难治性牙周病有关^[37]。MILLER等^[38]对*P. gingivalis*与*A. baumannii*体外共培养后,Dual RNA-seq显示差异基因主要富集在两种细菌的多种重要毒力因子,包括黏附、生物膜形成和蛋白质分泌等。

*C. albicans*是口腔内最常见的真菌,与龋病、牙周炎、口腔扁平苔藓等口腔常见病的发生发展密切相关。慢性牙周炎患者中*C. albicans*和*P. gingivalis*的检出率增加。*P. gingivalis*可以促进*C. albicans*的菌丝形成,而*C. albicans*可以增强*P. gingivalis*对牙龈上皮细胞的侵袭。SZTUKOWSKA等^[39]对浮游状态下共培养的*C. albicans*和*P. gingivalis*进行Dual RNA-seq,发现*P. gingivalis*中与生长和分裂相关的57个基因仅在*C. albicans*存在的情况下表现上调;同时,*C. albicans*还诱导了*P. gingivalis*的IX型分泌系统相关基因表达上调。

2.4.2 链球菌属与其他口腔微生物的相互作用 变异链球菌(*Streptococcus mutans*, *S. mutans*)和戈登链球菌(*Streptococcus gordonii*, *S. gordonii*)均属于链球菌属,主要在牙菌斑形成的初始阶段发挥作用,并且参与龋病的发生发展过程。

牙菌斑生物膜的形成过程涉及多种微生物的相互作用,有研究发现^[40],牙菌斑中存在*S. mutans*和伴放线放线杆菌(*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *A. actinomycetemcomitans*)的致密聚集体。SZAFRANSKI等^[41]在体外培养*S. mutans*-*A. actinomycetemcomitans*共生

生物膜,并进行Dual RNA-seq分析,发现共生生物膜中*A. actinomycetemcomitans*可以诱导调控*S. mutans*的群体密度感应系统相关基因表达上调,而与氧化应激相关的基因则表达下调;*A. actinomycetemcomitans*中与毒力因子、铁摄取、应激以及DNA代谢等相关基因表达上调,但是与逃避宿主免疫相关的基因下调。

具核梭杆菌(*Fusobacterium nucleatum*, *F. nucleatum*) 在牙菌斑形成过程中起桥梁作用,*F. nucleatum*与*S. mutans*的相互作用对于牙菌斑的形成至关重要。杨蕊琦等^[42]体外共培养*S. mutans*和*F. nucleatum*,Dual RNA-seq发现*S. mutans*中与精氨酸合成的相关基因表达上调,由于精氨酸具有抗氧化性,这导致牙菌斑中H₂O₂产量降低;碳水化合物代谢相关基因表达下调,产酸减少有利于*F. nucleatum*的存活。在*F. nucleatum*中毒力因子和代谢相关基因表达上调。

*C. albicans*和*S. mutans*两者相互作用是最常见的真菌-细菌跨界交互作用。ELLEPOLA等^[43]基于*C. albicans*-*S. mutans*共生生物膜的Dual RNA-seq结果得出结论,在共生生物膜中*C. albicans*真菌致病性增强,并提出了*C. albicans*和*S. mutans*之间的致病协同作用。这些结果为*C. albicans*-*S. mutans*共生生物膜致病力增强提供了依据。

微小韦洛氏菌(*Veillonellaparvula*, *V. parvula*)是牙菌斑形成过程的另一个先驱菌,与*S. gordonii*的相互作用影响牙菌斑形成的初始过程。MUTHA等^[44]共培养*S. gordonii*和*V. parvula* 30 min行Dual RNA-seq,显示与单菌种相比,*V. parvula*中参与抗氧化性应激的相关基因下调,*S. gordonii*中差异表达基因集中于磷酸转移酶系统转运蛋白和碳水化合物代谢。该课题组^[45]在体外共培养*F. nucleatum*和*S. gordonii*,Dual RNA-seq表明共培养后*F. nucleatum*中编码唾液酸摄取和分解代谢的基因上调;*S. gordonii*中编码磷酸转移酶系统介导的乳糖和半乳糖摄取功能的基因下调。

*S. gordonii*是少数可以与*C. albicans*共聚集的口腔链球菌之一,*S. gordonii*与细菌的共聚集对*C. albicans*参与口腔生物膜形成及多菌群落的发展至关重要。DUTTON等^[46]应用Dual RNA-seq揭示*C. albicans*和*S. gordonii*的相互作用,结果显示*C. albicans*中75个基因上调,这些基因参与体内平衡、蛋白质修饰和细胞周期、菌丝形成等相关生理过程;36个参与转运和翻译的基因下调。而*S. gordonii*中仅有8个基因显著上调。提示来自*S. gordonii*的信号促进*C. albicans*菌丝形成,而*S. gordonii*受*C. albicans*的转录影响较小。

综上,牙周病和龋病作为常见的口腔疾病,其形成与

牙菌斑的形成密切相关, 并涉及多种微生物的共同感染, 利用Dual RNA-seq观察到的微生物间相互作用, 可能在口腔微生物失调中起着重要作用, 提供了控制牙菌斑形成的潜在目标。

2.5 微生物感染和宿主响应

中性粒细胞是人体内最主要的固有免疫细胞之一, 对于防御微生物入侵至关重要。真菌感染过程中, 中性粒细胞可通过吞噬杀伤和分泌抗菌物质发挥其免疫作用。NIEMIEC等^[47]用Dual RNA-seq研究中性粒细胞与*C. albicans*早期相互作用。结果显示中性粒细胞接触*C. albicans*时, 通过炎性小体的诱导和大量细胞因子的释放, 在复杂的免疫反应中起重要的调节作用; *C. albicans*则利用转录因子Hap43p作为关键调节因子逃避中性粒细胞的“捕杀”。识别并抑制Hap43p有助于对*C. albicans*进行特异性靶点定位, 调节*C. albicans*诱导的炎症反应。

3 总结与展望

Dual RNA-seq的不断发展, 推进了各个领域物种间相互作用的研究进展。人体存在丰富种类的微生物, 他们之间复杂的相互作用, 被精密复杂的基因网络调控, 虽然目前已有大量微生态的研究, 但大部分机制网络仍不清晰, 进一步研究多物种互作转录信息尤为重要。互作转录组测序技术的发展, 为微生态研究提供了新的研究方法手段。微生态的互作转录组测序技术应用, 将有助于对多物种间基因表达变化及基因调控关系研究, 涉及调控网络、病原菌感染宿主致病机制、寻找微生物之间联系的介质, 为确定疾病预防和治疗的潜在靶点提供基础和依据。

未来Dual RNA-seq技术的进步, 也存在一些局限和挑战。例如, 在进行Dual RNA-seq时, 可能会存在批次效应, 引起高通量测序的误差; 此外, 在样本中存在原核生物时, 需要通过rRNA剔除的方法获得mRNA。目前商业化的rRNA剔除试剂盒, 仅覆盖十余个动物、植物物种以及数十种微生物, 因此, 没有rRNA剔除试剂盒的互作物种, 则无法进行Dual RNA-seq研究。对于多个物种互作, 如多种病原体侵染同一宿主, 则面临更多问题: 一方面可能如上所述缺乏rRNA剔除试剂盒; 另一方面, 即便存在相应的rRNA剔除试剂盒, 实验过程中也需要对不同物种的rRNA依次顺序剔除, 造成很大的材料损失并影响最终建库。

* * *

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] The Integrative HMP (iHMP) Research Network Consortium. The integrative human microbiome project. *Nature*, 2019, 569(7758): 641–648.
- [2] HARKINS C, KONG H, SEGRE J. Manipulating the human microbiome to manage disease. *JAMA*, 2020, 323(4): 303–304.
- [3] GOODWIN S, MCPHERSON J, MCCOMBIE W. Coming of age: Ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet*, 2016, 17(6): 333–351.
- [4] WESTERMANN A, GORSKI S, VOGEL J. Dual RNA-seq of pathogen and host. *Nat Rev Microbiol*, 2012, 10(9): 618–630.
- [5] SALIBA A E, SANTOS C S, VOGEL J. New RNA-seq approaches for the study of bacterial pathogens. *Curr Opin Microbiol*, 2017, 35: 78–87[2021-08-04]. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.01.001>.
- [6] 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. *BMC Genomics*, 2014, 15(1): 419[2021-08-04]. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-419>.
- [7] WOLF T, KÄMMER P, BRUNKE S, et al. Two's company: Studying interspecies relationships with dual RNA-seq. *Curr Opin Microbiol*, 2018, 42: 7–12[2021-08-04]. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.09.001>.
- [8] COX M L, SCHRAY C L, LUSTER C N, et al. Assessment of fixatives, fixation, and tissue processing on morphology and RNA integrity. *Exp Mol Pathol*, 2006, 80(2): 183–191.
- [9] RIENKSMA R A, SUAREZ-DIEZ M, MOLLENKOPF H J, et al. Comprehensive insights into transcriptional adaptation of intracellular mycobacteria by microbe-enriched dual RNA sequencing. *BMC Genomics*, 2015, 16(1): 34[2021-08-04]. <https://doi.org/10.1186/s12864-014-1197-2>.
- [10] WESTERMANN A J, BARQUIST L, VOGEL J. Resolving host-pathogen interactions by dual RNA-seq. *PLoS Pathog*, 2017, 13(2): e1006033 [2021-08-04]. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006033>.
- [11] HOOPER L V, MACPHERSON A J. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nat Rev Immunol*, 2010, 10(3): 159–169.
- [12] SHEN C, ISLAM M T, MASUDA Y, et al. Transcriptional changes involved in inhibition of biofilm formation by epsilon-polylysine in *Salmonella Typhimurium*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2020, 104(12): 5427–5436.
- [13] WESTERMANN A J, FORSTNER K U, AMMAN F, et al. Dual RNA-seq unveils noncoding RNA functions in host-pathogen interactions. *Nature*, 2016, 529(7587): 496–501.
- [14] BARRILA J, SARKER S F, HANSMEIER N, et al. Evaluating the effect of spaceflight on the host-pathogen interaction between human intestinal epithelial cells and *Salmonella Typhimurium*. *NPJ Microgravity*, 2021, 7(1): 9[2021-08-04]. <https://doi.org/10.1038/s41526-021-00136-w>.
- [15] SHARMA C M, NUSS A M, HEROVEN A K, et al. Transcriptomic

- profiling of *Yersinia pseudotuberculosis* reveals reprogramming of the Crp regulon by temperature and uncovers Crp as a master regulator of small RNAs. *PLoS Genetics*, 2015, 11(3): e1005087[2021-08-04]. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005087>.
- [16] NUSS A M, BECKSTETTE M, PIMENOVA M, *et al.* Tissue dual RNA-seq allows fast discovery of infection-specific functions and riboregulators shaping host-pathogen transcriptomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114(5): e791–e800[2021-08-04]. <https://doi.org/10.1073/pnas.1613405114>.
- [17] RASKO D, SPERANDIO V. Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. *Nat Rev Drug Discov*, 2010, 9(2): 117–128.
- [18] THÄNERT R, GOLDMANN O, BEINEKE A, *et al.* Host-inherent variability influences the transcriptional response of *Staphylococcus aureus* during *in vivo* infection. *Nat Commun*, 2017, 8: 14268[2021-08-04]. <https://doi.org/10.1038/ncomms14268.00>.
- [19] GOH Y J, BARRANGOU R, KLAENHAMMER T R. *In vivo* transcriptome of *Lactobacillus acidophilus* and colonization impact on murine host intestinal gene expression. *mBio*, 2021, 12(1): e03399–20[2021-08-04]. <https://doi.org/10.1128/mBio.03399-20>.
- [20] PRINA E, RANZANI O T, TORRES A. Community-acquired pneumonia. *Lancet*, 2015, 386(9998): 1097–1108.
- [21] APRIANTO R, SLAGER J, HOLSAPPEL S, *et al.* Time-resolved dual RNA-seq reveals extensive rewiring of lung epithelial and pneumococcal transcriptomes during early infection. *Genome Biol*, 2016, 17(1): 198[2021-08-04]. <https://doi.org/10.1038/ncomms14268>.
- [22] SHENOY A T, BRISSAC T, GILLEY R P, *et al.* *Streptococcus pneumoniae* in the heart subvert the host response through biofilm-mediated resident macrophage killing. *PLoS Pathog*, 2017, 13(8): e1006582[2021-08-04]. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006582>.
- [23] RITCHIE N D, EVANS T J. Dual RNA-seq in *Streptococcus pneumoniae* infection reveals compartmentalized neutrophil responses in lung and pleural space. *mSystems*, 2019, 4(4): e00216–19[2021-08-04]. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00216-19>.
- [24] MINHAS V, APRIANTO R, MCALLISTER L J, *et al.* *In vivo* dual RNA-seq reveals that neutrophil recruitment underlies differential tissue tropism of *Streptococcus pneumoniae*. *Commun Biol*, 2020, 3(1): 293[2021-08-04]. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-1018-x>.
- [25] PISU D, HUANG L, GRENIER J K, *et al.* Dual RNA-Seq of Mtb-infected macrophages *in vivo* reveals ontologically distinct host-pathogen interactions. *Cell Rep*, 2020, 30(2): 335–350.e4[2021-08-04]. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.12.033>.
- [26] DAMRON F H, OGLESBY-SHERROUSE A G, WILKS A, *et al.* Dual-seq transcriptomics reveals the battle for iron during *Pseudomonas aeruginosa* acute murine pneumonia. *Sci Rep*, 2016, 6: 39172[2021-08-04]. <https://doi.org/10.1038/srep39172>.
- [27] 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. *mBio*, 2015, 6(6): e01765–15[2021-08-04]. <https://doi.org/10.1128/mBio.01765-15>.
- [28] BLUM H E. The human microbiome. *Adv Med Sci*, 2017, 62(2): 414–420.
- [29] MUSTHAQ S, MAZUY A, JAKUS J. The microbiome in dermatology. *Clin Dermatol*, 2018, 36(3): 390–398.
- [30] PETRUCELLI M F, PERONNI K, SANCHES P R, *et al.* Dual RNA-Seq analysis of *Trichophyton rubrum* and HaCat keratinocyte co-culture highlights important genes for fungal-host interaction. *Genes (Basel)*, 2018, 9(7): 362[2021-08-04]. <https://doi.org/10.3390/genes9070362>.
- [31] GRIESENAUER B, TRAN T M, FORTNEY K R, *et al.* Determination of an interaction network between an extracellular bacterial pathogen and the human host. *mBio*, 2019, 10(3): e01193–19[2021-08-04]. <https://doi.org/10.1128/mBio.01193-19>.
- [32] CARAPETIS J R, STEER A C, MULHOLLAND E K, *et al.* The global burden of group A streptococcal diseases. *Lancet Infect Dis*, 2005, 5(11): 685–694.
- [33] KACHROO P, ERASO J M, OLSEN R J, *et al.* New pathogenesis mechanisms and translational leads identified by multidimensional analysis of necrotizing myositis in primates. *mBio*, 2020, 11(1): e03363–19[2021-08-04]. <https://doi.org/10.1128/mBio.03363-19>.
- [34] MONTOYA D J, ANDRADE P, SILVA B J A, *et al.* Dual RNA-Seq of human leprosy lesions identifies bacterial determinants linked to host immune response. *Cell Rep*, 2019, 26(13): 3574–3585.e3[2021-08-04]. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.02.109>.
- [35] DARVEAU R P. Periodontitis: A polymicrobial disruption of host homeostasis. *Nat Rev Microbiol*, 2010, 8(7): 481–490.
- [36] KIN L X, BUTLER C A, SLAKESKI N, *et al.* Metabolic cooperativity between *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola*. *J Oral Microbiol*, 2020, 12(1): 1808750[2021-08-04]. <https://doi.org/10.1080/20002297.2020.1808750>.
- [37] RICHARDS A M, ABU KWAIK Y, LAMONT R J. Code blue: *Acinetobacter baumannii*, a nosocomial pathogen with a role in the oral cavity. *Mol Oral Microbiol*, 2015, 30(1): 2–15.
- [38] MILLER D P, WANG Q, WEINBERG A, *et al.* Transcriptome analysis of *Porphyromonas gingivalis* and *Acinetobacter baumannii* in polymicrobial communities. *Mol Oral Microbiol*, 2018, 33(5): 364–377.
- [39] SZTUKOWSKA M N, DUTTON L C, DELANEY C, *et al.* Community development between *Porphyromonas gingivalis* and *Candida albicans* mediated by InI and Als3. *mBio*, 2018, 9(2): e00202–18[2021-08-04]. <https://doi.org/10.1128/mBio.00202-18>.
- [40] MARK WELCH J L, ROSSETTI B J, RIEKEN C W, *et al.* Biogeography of a human oral microbiome at the micron scale. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(6): e791–e800[2021-08-04]. <https://doi.org/10.1073/pnas.1522149113>.
- [41] SZAFRANSKI S P, DENG Z L, TOMASCH J, *et al.* Quorum sensing of *Streptococcus mutans* is activated by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and by the periodontal microbiome. *BMC Genomics*, 2017, 18(1):

- 238[2021-08-04]. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3618-5>.
- [42] 杨蕊琦, 刘亭君, 周佳妮, 等. 具核梭杆菌与变异链球菌共聚集的环境适应性及转录组学研究. 中华口腔医学会口腔医学生物专业委员会, 2020年中华口腔医学会口腔生物医学专业委员会第十次全国口腔生物医学学术年会暨第六次全国口腔杰青优青论坛. 上海: 2020: 218–219.
- [43] ELLEPOLA K, TRUONG T, LIU Y, *et al.* Multi-omics analyses reveal synergistic carbohydrate metabolism in *Streptococcus mutans-Candida albicans* mixed-species biofilms. *Infect Immun*, 2019, 87(10): e00339-19[2021-08-04]. <https://doi.org/10.1128/IAI.00339-19>.
- [44] MUTHA N V R, MOHAMMED W K, KRASNOGOR N, *et al.* Transcriptional profiling of coaggregation interactions between *Streptococcus gordonii* and *Veillonella parvula* by Dual RNA-Seq. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 7664[2021-08-04]. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43979-w>.
- [45] MUTHA N V R, MOHAMMED W K, KRASNOGOR N, *et al.* Transcriptional responses of *Streptococcus gordonii* and *Fusobacterium nucleatum* to coaggregation. *Mol Oral Microbiol*, 2018, 33(6): 450–464.
- [46] DUTTON L C, PASZKIEWICZ K H, SILVERMAN R J, *et al.* Transcriptional landscape of trans-kingdom communication between *Candida albicans* and *Streptococcus gordonii*. *Mol Oral Microbiol*, 2016, 31(2): 136–161.
- [47] NIEMIEC M J, GRUMAZ C, ERMERT D, *et al.* Dual transcriptome of the immediate neutrophil and *Candida albicans* interplay. *BMC Genomics*, 2017, 18(1): 696[2021-08-04]. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-4097-4>.

(2021 – 08 – 27收稿, 2021 – 12 – 15修回)

编辑 吕 熙