



靶向宿主致病菌 sRNA 的发现及其靶标确定的实验技术进展

信英蓉^{1,2}, 杜昕颖², 杨明娟², 宋宏彬^{2*}, 王立贵^{2*}

1 郑州大学公共卫生学院, 河南 郑州 450001

2 解放军疾病预防控制中心, 北京 100071

信英蓉, 杜昕颖, 杨明娟, 宋宏彬, 王立贵. 靶向宿主致病菌 sRNA 的发现及其靶标确定的实验技术进展[J]. 微生物学报, 2024, 64(4): 1019-1030.

XIN Yingrong, DU Xinying, YANG Mingjuan, SONG Hongbin, WANG Ligui. Progress in experimental techniques for the discovery and target determination of pathogen sRNAs targeting hosts[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(4): 1019-1030.

摘要: 人类时常暴露于充满各种致病菌的环境中, 这些致病菌与人体细胞或组织之间存在多种相互作用。在相互作用的过程中, 细菌通过调节自身毒性、侵袭性等致病性, 以适应宿主环境并生存下来, 同样, 宿主细胞也会通过调动自身的免疫系统来抵抗致病菌的入侵。然而, 大多数研究者主要聚焦于致病菌 sRNA (small RNA, sRNA) 自身生理功能的研究, 致病菌与宿主相互作用的认识仍然处于起步阶段。因此, 如何使用高灵敏性、高分辨率的方法研究致病菌与宿主之间的相互作用成为当前研究面临的一大难题。本文综合国内外相关研究, 概述了目前研究致病菌与宿主相互作用常用的技术方法及实验流程, 提高对其机制原理的理解, 为致病菌 sRNA-宿主靶标的相关研究提供技术参考。

关键词: 致病菌 sRNA; 宿主靶标; 相互作用; 实验技术

资助项目: 国家重点研发计划(2022YFC2602304)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFC2602304).

*Corresponding authors. E-mail: SONG Hongbin, hongbinsong@263.com; WANG Ligui, wangligui1983@126.com

Received: 2023-11-01; Accepted: 2024-01-29; Published online: 2024-02-23

Progress in experimental techniques for the discovery and target determination of pathogen sRNAs targeting hosts

XIN Yingrong^{1,2}, DU Xinying², YANG Mingjuan², SONG Hongbin^{2*}, WANG Ligui^{2*}

1 College of Public Health, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, Henan, China

2 The Chinese PLA Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100071, China

Abstract: People are exposed to environments containing various pathogens, which have multiple interactions with human cells or tissues. Pathogens can survive in the host environment by regulating pathogenic conditions such as virulence and invasiveness. At the same time, host cells resist the invasion of pathogens by mobilizing their own immune system. However, researchers mainly focus on the physiological functions of sRNAs in pathogens and have gained limited knowledge about the interactions between pathogens and hosts. How to use highly sensitive and high-resolution methods to study the interactions between pathogens and hosts have become a major challenge in the current research. By reviewing relevant studies, we summarize the commonly used techniques and experimental processes for studying the interactions between pathogens and hosts, aiming to improve the understanding about the mechanisms and principles of these experimental techniques and provide technical references for the research on interactions between pathogen sRNAs and host targets.

Keywords: pathogen sRNA; host target; interaction; experimental technique

大多数致病菌小 RNA (small RNA, sRNA) 长度 40–500 nt, 主要位于基因间区, 目前的研究主要集中在致病菌 sRNA 本身的生理功能, 关于革兰氏阴性菌如大肠杆菌、肠道沙门氏菌及志贺氏菌的研究表明, sRNA 在调节适应过程中发挥着广泛作用^[1-3]。相比于革兰氏阴性菌, 革兰氏阳性菌的 sRNA 功能研究较少, 近些年来才陆续有研究者发现耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、单核细胞增生李斯特氏菌和产气荚膜梭菌的 sRNA 通过调节相关信使 RNA (messenger RNA, mRNA), 进而调控其毒力和代谢^[4-6]。总而言之, 目前已知的致病菌 sRNA 发挥调控作用主要方式是通过 RNA-RNA 碱基直接互补结合、sRNA-RNA 结合的强度和持续时间可能取决于互补碱基对的数

量; 有部分调控方式是通过 RNA-蛋白质相互作用, 这两种相互作用方式并不是相互独立的, 通过 RNA-RNA 相互作用发挥作用的 sRNA 也可以结合蛋白质发挥作用^[2]。然而, 目前研究者主要关注致病菌 sRNA 本身的功能研究, 或在宿主环境下对自身的调控作用, 近年来才逐渐有相关研究探索致病菌 sRNA-宿主靶标的作用机制^[7]。

本综述包括两个主要部分, 一部分阐述与宿主相互作用的致病菌 sRNA 发现的相关技术手段及其演变, 另一部分阐述验证 sRNA-宿主互作的关键实验, 系统地介绍 sRNA 与宿主相互作用研究的基本流程, 以期为 sRNA 相关研究者提供方法学参考, 为致病菌 sRNA 的发现与致病机制阐明提供参考。

1 与宿主相互作用致病菌 sRNA 的发现

1.1 致病菌 sRNA 发现的技术进展

致病菌 sRNA 的发现最早始于大肠杆菌, 大多数 sRNA 可调节细菌代谢, 因此又被称为调节 RNA。聚丙烯酰胺凝胶电泳分析和正磷酸标记总 RNA 技术是最先用于发现 sRNA 存在的证据, 4.5S 和 6S RNA 就是用该方法最先被鉴定的 sRNA^[8]。随后, 利用改进的二维凝胶电泳技术发现 Spot 42 RNA 和 10S RNA^[9], 对 10S RNA 条带进行表征, 发现其对应两个大小相似的不同 RNA (10Sa 和 10Sb), 也被称为 M2 和 M1^[10], 上述的 sRNAs 是在分析邻近蛋白编码基因的转录调控时偶然发现的, 随着生物信息学的发展, 通过计算机识别候选 sRNA 成为可能, 这是 sRNA 鉴定的一个重要转折点^[11]。多阵列芯片^[12]可以用于在各种条件下分离的总 RNA 探测, 但该方法只能发现在非常明确条件下表达的 sRNA。由于 sRNA 可以单独编码, 也可以在其他基因信息中编码, 因此阵列需要全基因组, 而不仅仅是开放阅读框(open reading frames, ORFs)或操纵子。总的来说, 上述各种方法非常适合于识别已知功能的单一 sRNA, 具有很强的偶然性, 需要大量的重复性实验进行 sRNA 的筛选, 因此, 传统发现 sRNA 的方法逐渐被取代。

目前, 靶向宿主的致病菌 sRNA 的发现通常使用 RNA 测序(RNA-seq)技术, 自从 RNA-seq 应用于感染生物学领域以来, 该技术出现了 3 个主要阶段。第一阶段是将宿主细胞和细菌物理分离, 并分别分析它们的转录组。第二阶段是双 RNA 测序(dual RNA-seq), 研究者认识到高分辨能力和单核苷酸分辨率对 RNA-seq 的重要性, 使用双 RNA 测序同时检测和定量来自相互作用的不同生物体的转录本^[13], 提示其在宿主-微生物相互作用中的重要作用^[14-15]。第三个阶段是越

来越多的研究者使用单细胞 RNA-seq (single-cell RNA-seq, scRNA-seq)来解决致病菌-宿主遇到的细胞异质性问题^[16-17], 目前, 这 3 种 RNA 测序技术均在应用, 如图 1 所示, 本综述对这 3 种 RNA 测序方法的工作流程进行简单介绍, 研究者根据不同需求可选择不同的测序方式, 在国内以 RNA-seq 应用最为广泛, 技术最为成熟, 可重复性好, 而双 RNA-seq 和致病菌 scRNA-seq 国内应用相对较少, 主要由于建库及数据分析复杂, 现有的方法难以跟上, 但是笔者认为, 在深入探索致病菌-宿主致病机制过程中, scRNA-seq 拥有更好的应用前景。

1.2 RNA-seq 技术在挖掘与宿主互作 sRNA 的应用

RNA-seq 是转录组学研究的重要工具, 能够动态检测生物基因组的表达, 多维度地反映差异变化。刚兴起的 RNA-seq 技术通常识别位于 ORFs、长度大于 100 bp 的 RNA 序列, 但是其无法检测出短的 ORF (长度<100 nt), 以及位于非翻译区(untranslated region, UTRs)或非编码 RNA 序列, 最早用于研究致病菌自身的代谢研究。作为转录组学研究的技术基础, RNA-seq 技术在不断地更新换代, 目前可用于研究占 RNA 绝大部分的非编码 RNA, 研究其结构以及在生命活动中的重要调控作用, 同时与蛋白组学相互补充, 更全面地呈现细胞水平的变化信息。差异 RNA-seq (dRNA-seq)的出现优化了原始的 RNA-seq 技术, 目前应用最为广泛, 其通过特异性地降解加工过的转录本来富集初始转录本, 通过总体定位转录起始、终止位点测序或末端富集 RNA-seq 等方式, 来确定转录终止位点^[18-19], 该方法可以区分初级转录本和经过加工的 RNA, 同时可以鉴定出短至 8-12 nt 的产物 RNA, 该项技术最早应用于革兰氏阴性菌, 如肠道沙门氏菌^[20], 随着研究进步其应用范围逐渐扩大至革兰氏阳性菌, 如肺炎链球菌^[21]。

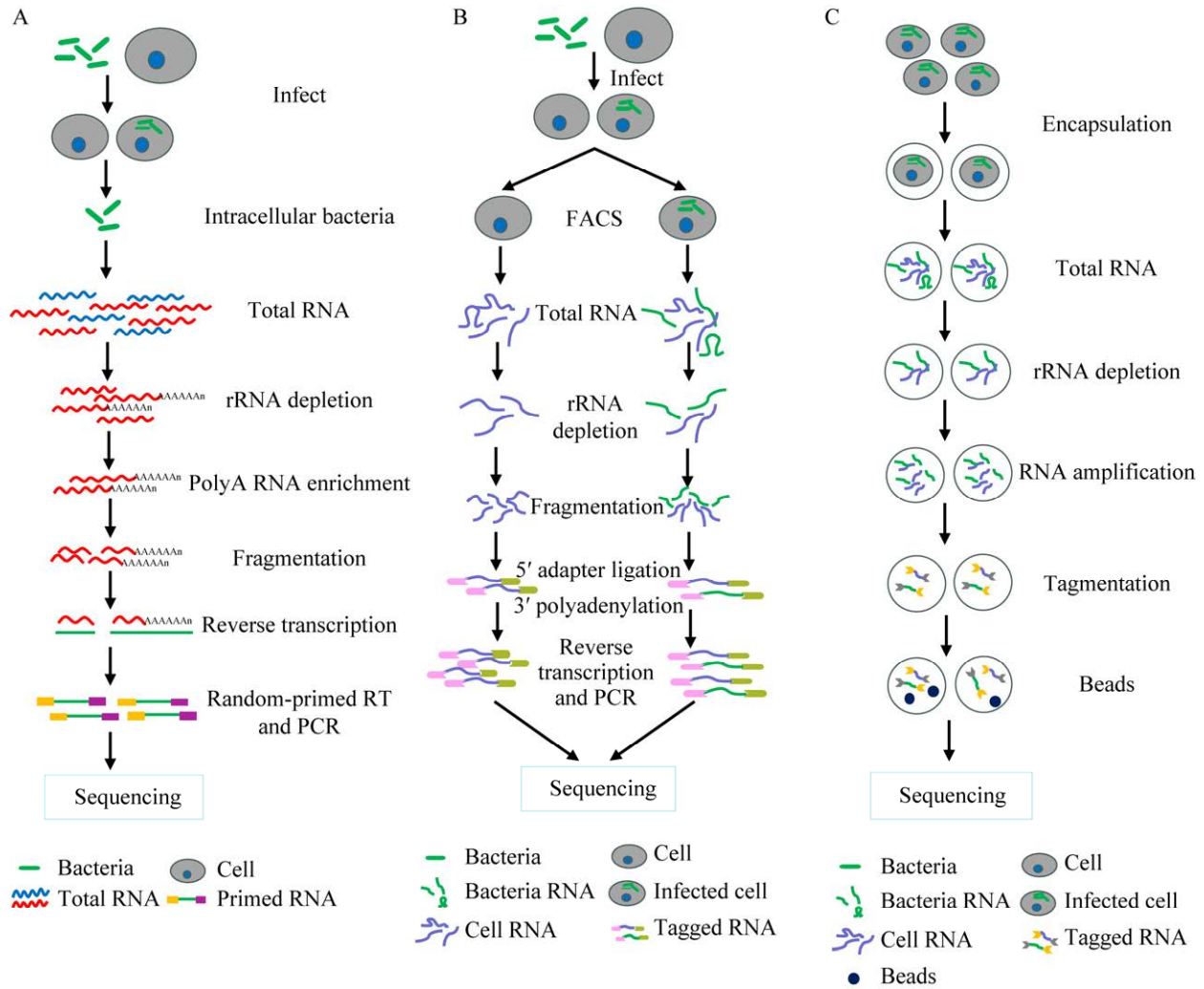


图 1 三种 RNA-seq 方法的实验工作流程 A: RNA 测序. B: 双 RNA 测序. C: 单细胞 RNA 测序

Figure 1 Experimental workflow for the three RNA-seq approach here described. A: RNA-seq. B: Dual RNA-seq. C: scRNA-seq.

RNA-seq 通过物理方法获得感染样本中的致病菌, 对获得的胞内致病菌进行转录组测序, 即选择性地裂解被感染的真核细胞, 通过差离心法收集胞内细菌^[22]。然而, 即使对获得的胞内致病菌进行 RNA-seq, 由于差离心难以将致病菌与宿主完全分离, 使得收获的致病菌掺杂大量宿主细胞的基因信息, 因此采用技术手段减少宿主 RNA 背景的干扰势在必行。对于细菌转录本样本, 目前可以使用商业试剂盒来去除真核核

糖体 RNA (ribosomal RNA, rRNA)^[23], 这被用于小鼠模型^[24]中霍乱弧菌的体内表达研究, 以及小鼠结肠组织感染后恢复的体内表达研究^[25]。另外, 也可以使用“杂交选择”直接富集细菌转录本, “杂交选择”是将复杂的 cDNA 样本与特异性的生物素探针共同孵育, 在宿主的 cDNA 背景下, 捕获并富集感兴趣的致病菌 cDNA, 该方法最近应用于特异富集铜绿假单胞菌或结核分枝杆菌 mRNA 和 sRNA 以观察其细胞内表达谱^[26]。

细菌转录本的富集是 RNA 测序技术的关键一环, 需要开发新的、高效的方法从复杂、多物种样本中富集目标序列, 深入揭示病原菌与宿主间的相互作用。

1.3 双 RNA-seq 技术在挖掘与宿主互作 sRNA 的应用

双 RNA-seq 正被广泛应用于研究跨物种的相互作用, 首先是细菌病原体和哺乳动物宿主之间的相互作用^[27], 可以同时检测致病菌(细胞内或细胞外)和被感染宿主中的基因表达, 解决了致病菌和被感染细胞在感染过程中持续的信号交换问题。双 RNA-seq 将未进行物理分离的真核生物和细菌一起处理, 有望在致病菌-宿主相互作用中发现新的相互依赖关系, 全面分析细菌感染期间宿主和病原体基因的表达。Westermann 等^[28]率先利用双 RNA-seq 方法同时分析血清型鼠伤寒沙门氏菌感染期间病原体和宿主的 RNA 表达, 揭示了细菌核糖体调节因子的分子影响, 同时发现 *phop* 激活的 sRNA *PinT* 在细菌内化后短暂控制入侵相关效应因子和毒力基因的表达。随后, 双 RNA-seq 技术用于挖掘感染过程中病原体和宿主细胞的全局转录组学, 揭示了沙门氏菌中与感染相关的 RNA 结合蛋白 ProQ 结合的 sRNA STnc540 通过增加 ProQ 蛋白活性进一步激活宿主的裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路^[29], 并表明在巨噬细胞被感染过程中沙门氏菌处于代谢活性状态, 能够重新编程宿主细胞的基因表达^[30]。在树突状细胞(dendritic cells, DCs)^[31]同样发现不同类型的沙门氏菌病原体能重塑宿主细胞的基因表达, 同时 DCs 利用铁处理来防御入侵的沙门氏菌。双 RNA-seq 最先用于研究专性细胞内病原菌, 如结核分枝杆菌^[24,32]和恙虫病东方体^[33], 后来逐渐用于研究兼性细胞内病原菌, 如金黄色葡萄球菌^[34]、肺炎链球菌^[35]。

双 RNA-seq 除了用于细胞作为宿主的研究外, 在三维肠道组织模型^[36]通过模仿人类胃肠道的感染模型中, 可以观察到在急性鼠伤寒沙门氏菌感染期间的病原体细胞适应和宿主体的反应^[37]。但在组织或器官宿主中往往存在多种类型的细胞, 很难发现不同细胞间特异性的基因变化, 因此需要新的测序技术来解决这一问题, 深入探讨宿主应对致病菌的防御机制。同样, 双 RNA-seq 也面临着宿主背景基因含量高的难题, 除在测序后采用技术手段富集外, 在测序前还可以使用绿色荧光蛋白(green fluorescence protein, GFP)标记的沙门氏菌菌株, 分离出感染细胞和未被感染细胞, 对分选后的宿主细胞进行裂解, 随后收集宿主和细菌裂解物, 迅速提取总 RNA^[28,38]。该方法在测序前降低宿主的基因背景, 获得足够数量的细菌读数, 然而, 长时间的细胞分离和细胞分选不利于转录组的完整性, 同样带来了极大的技术挑战。

1.4 单细胞 RNA-seq 技术在挖掘与宿主互作 sRNA 的应用

单细胞 RNA-seq 技术是近年来刚兴起的测序技术, 开创了转录组学的新时代。随着人们对病原菌-宿主相互作用研究的深入, 发现细胞异质性在宿主-病原体相互作用中或许发挥重要作用, 细胞异质性的存在会导致治疗失败和慢性、反复感染^[39]。研究表明鼠伤寒沙门氏菌利用不同细胞类型的固有变异性来逃避宿主的免疫压力, 并对抗菌素治疗产生耐药性^[40], 因此, 迫切需要新的转录组学方法来挖掘细胞异质性如何影响致病菌-宿主细胞相互作用的结果。真核生物 scRNA-seq 的检测极限较低, 而细菌 scRNA-seq 必须考虑到致病菌 mRNA 含量远低于真核细胞, 同时, 细菌 mRNA 又不稳定, 需要迅速完成细胞裂解、分离和随后的 RNA 提取, 因此, scRNA-seq 在微生物领域一直未得到广泛应用。

随着最近改良的细菌 scRNA-seq^[41]的出现, 单细菌转录组学技术现在已经逐渐应用于致病菌的研究。致病菌在与宿主相互作用时存在不同的异质性, 在宿主内致病菌间也存在相互竞争, 从而一部分菌株在宿主内竞争存活下来, scRNA-seq 的出现使研究优势菌株的形成机制成为可能。microSPLiT 是一种最早用于革兰氏菌株的高通量 scRNA-seq 方法, 有研究者分析超过 25 000 个单一枯草芽孢杆菌细胞的基因表达状态, 发现在只有 0.1% 的个体出现异常状态^[42], 揭示了其在碳利用、胁迫反应、金属吸收和发育决策等调控机制的变化。另外有一项研究使用不依赖 *polyA* 的多轮退火和 dC 尾的定量 scRNA-seq (quantitative scRNA-seq, MATQ-seq), 对鼠伤寒沙门氏菌和铜绿假单胞菌分离后进行分析^[43], 可以可靠地捕获生长依赖的基因表达模式。BacDrop 是最新的一种高度可扩展的细菌单细胞 RNA 测序技术, 其特点是利用通用的核糖体 RNA 消耗和组合条形码, 实现大规模并行测序, 应用于肺炎克雷伯菌的临床分离株, 阐明其对

抗生素应激的异质性反应^[44]。从感染患者中分离出致病菌, 进行细菌 scRNA-seq 有助于研究其体内活性, 并提供关于它们何时、如何以及为什么重新激活相关功能的见解。现对上述介绍的 3 种 RNA 测序技术的优缺点进行简单比较 (表 1)。

2 与致病菌 sRNA 相互作用宿主靶标的确定

2.1 生物信息学方法预测 sRNA 靶标

当获得候选 sRNA 后, 对其靶标的预测显得至关重要。研究者通常采用生物信息学方法进行初步预测^[45], 可以选择的预测工具有多种, 如表 2 所示, 对常用的几种 sRNA 靶标预测工具的原理和目的进行介绍, 研究者可以使用 RNAfold WebServer^[46-47]对 sRNAs 的二级结构进行预测, 使用动态规划算法预测单个序列的最小自由能二级结构(minimum free energy principle, MFE), 利用质心结构评价 RNA 结构预测效果, 质心和 MFE 结构之间的高度相似性表明预测可靠。随

表 1 三种测序技术的应用及比较

Table 1 Application and comparison of three sequencing techniques

Type of sequencing techniques	Advantages	Disadvantages	References
RNA-seq	(1) Quantitative accuracy (2) Wide detection range (3) High accuracy (4) Good repeatability (5) Used to whole genome analysis	rRNA and mitochondrial RNA removal methods are limited and prone to introduce potential errors	[20-22,25-26]
Dual RNA-seq	(1) Detect gene expression of pathogenic bacteria and host cells or tissues simultaneously (2) Can be used for small clinical samples analysis	(1) When sequencing a large number of tissue samples, it is difficult to detect gene expression differences about specific cell type (2) Long term sample processing impairs the integrity of the sample transcriptome	[29-31,33,36]
scRNA-seq	Solved the problem of cellular heterogeneity in organizational samples	(1) There is a loss of spatial information regarding the infection niche during the process of organizational separation (2) High cost	[41-44]

表 2 常用的 sRNA 靶标预测工具

Table 2 Common sRNA target predictive tools

Predictive tools and links	Theory	Aim	References
RNAfold WebServer (http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi)	Dynamic programming-based algorithms, both the classical minimum free energy (MFE) methods and partition function methods	Predict RNA secondary structure	[46-47]
BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)	Base on seeding-and-extending method and Smith-waterman algorithm to generate high scoring segment pairs, finally evaluate the reliability of the comparison	Search similar sequences, structures, and infer the function of unknown sequences	[48-49]
miRanda microRNA target scan (https://www.targetscan.org/vert_72/)	Base on the principle of sequence complementarity, conservative seed match sequence was found that matched to the target 3'UTR, and the target of miRNA was further screened according to thermodynamic stability	Simulate microRNA to obtain potential host targets of sRNA	[50]
IntaRNA 2.0 (http://rna.informatik.uni-freiburg.de/IntaRNA)	Incorporate seed constraints and interaction site accessibility	Predict RNA-RNA hybrids	[51]

后可以使用 BLAST^[48-49]算法将 sRNA 的互补序列与 NCBI 人类参考序列进行比对, 以确定是否与人类 mRNA 完美匹配, 利用该方法 Koeppen 等^[46]在铜绿假单胞菌中发现 *sRNA52320* 与人类 mRNA 的潜在相互作用。由于细菌的 sRNAs 类似于真核生物的微小 RNA (microRNAs, miRNA), 同样可以与 mRNA 靶点不完全结合来抑制翻译, 因此, 利用 miRanda microRNA 靶标扫描^[50]可以预测 sRNA 可能靶向的宿主 mRNA。同时, IntaRNA 2.0^[51]也是强大的预测工具, 可以预测 microRNA 样的相互作用, 选取合适的截止点作为相互作用的最小自由能, 通常选为-8, 该方法认为 *polyA*+被预测为细菌 RNA 的靶标的次数越多, 成为真正靶标的概率越高。截至目前, 对物种间 RNA 通信的研究通常将 RNA 序列相似性

作为唯一的参数, 仅限于理论上存在相互作用的可能, 其预测的结果往往存在争议, 故而需要利用实验手段进行预测结果的验证。

2.2 验证 sRNA 靶标的实验方法

2.2.1 宿主 mRNA 靶标的确定

宿主靶标 mRNA 和宿主靶标蛋白往往是研究者关注的重点。靶标调控通常需要宿主 mRNA 水平上的变化, 通过多种方法进行检测, 如在单基因水平上的 Northern blotting 杂交、引物延伸和 RT-PCR^[52]。许多研究发现 sRNA 可能作用于多个靶点, 因此在 sRNA 表征的初始阶段使用微阵列、RNA-seq 或蛋白质组学等全局方法变得必要, 这些全局性方法可以将与核蛋白 Hfq 相关的 mRNA 作为潜在靶点进行分类^[53]。将受调控的 mRNA 确定为 sRNA 的直接靶点, 就必须证明

存在转录后调控的 sRNA-mRNA 碱基配对, *gfp* 翻译融合的双质粒系统^[54-55]就是方法之一, 该方法主要是检测转录后调控, 将两个兼容质粒的 sRNA 和潜在靶标 mRNA 在同一细胞内共表达, 随后被翻译融合到 *gfp*, 通过监测荧光来判断二者是否存在碱基配对结合; 该系统使用小质粒, 可以很容易在 sRNA 和靶标中引入点突变来影响调控, 该方法在大肠杆菌和沙门氏菌^[54,56]中不同靶点的调控中均有应用。还有一种相似的方法^[57-58]是将 5'cDNA 末端快速扩增 (rapid amplification of cDNA end, RACE) 介导的 5'UTRs 克隆到一个 *lacZ* 报告基因上, 然后对 *PBAD* 启动子下游的融合进行染色体整合, *lacZ* 和上述 *gfp* 报告基因可以使用荧光激活细胞分选仪 (fluorescence activated cell sorter, FACS) 分析, 快速筛选潜在的 sRNA 调控因子和编码辅助因子的基因。代偿性碱基对交换是相对新颖的技术, 通过将容易出现 PCR 错误的染色体 sRNA 基因进行点突变, 然后筛选 *lacZ* 融合对靶标基因的调控缺失^[59]。双荧光素酶测定实验目前备受研究者喜爱, 基本实验流程如图 2 所示, 构建 pmirGLO 双荧光素酶 miRNA 载体, 利用酶切位

点扩增潜在靶标 mRNA 的 UTR 区域, 并将其克隆到 *luc2* 基因附近, 随后将 sRNA 引入克隆到 pmirGLO 系统中, 通过检测荧光素酶活性来判断 sRNA 与靶标 mRNA 是否结合; 在嗜肺军团菌^[50]研究中, 利用该方法发现 sRNA *RsmY* 与 mRNA *ddx58* 的 UTR 和 mRNA *cRel* 结合、*tRNA-Phe* 与 mRNA *ddx58* 和 mRNA *irak1* 结合的证据。

2.2.2 宿主蛋白靶标的确定

无论靶标蛋白是被激活还是被抑制, 通过聚丙烯酰胺凝胶电泳或 Western blotting 方法可用于研究 sRNA 在蛋白水平上的调控, 但该方法需要已知蛋白的特异性抗体; 如果没有特异性抗体, 染色体表位标记方法^[60]可以检测调控蛋白, 该方法使用血凝素 (hemagglutinin, HA) 标记的反向自转运体入侵蛋白 (invAHA) 作为鼠伤寒沙门氏菌三型分泌系统 1 (T1) 表达的转录报告基因, 使用基于 GFP 和 InvAHA 的双报告方法用于 T1 基因表达分析, 发现 SPI-1 启动子 *PprgH* 和 *PsicA* 分别对 GFP 和 InvAHA 的驱动作用。蛋白质与 mRNA 的共纯化联合质谱分析也是一个可行的方法, 目前已知的与细菌 sRNA 相互作用的蛋白

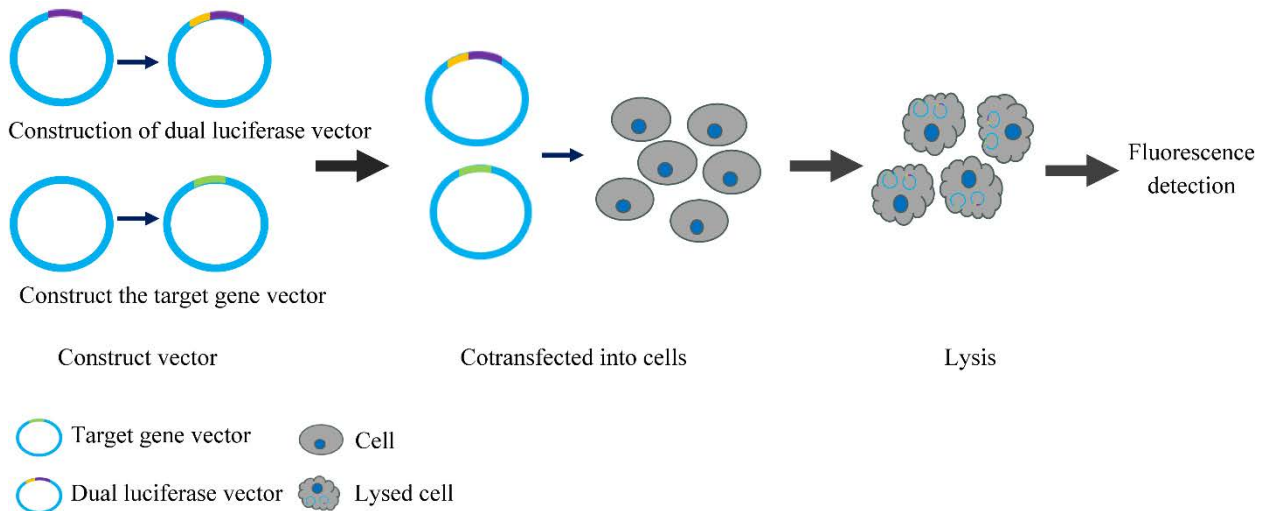


图 2 双荧光素酶报告基因实验的基本实验流程

Figure 2 The basic procedure of double luciferase reporter gene assay.

除了 Hfq 以外, 还可能与 sRNA 引导 mRNA 降解复合物中的 RNase E^[61]相互作用, 有项研究发现色氨酸酶是 ColE1 质粒编码的 Rcd RNA 的靶点, 利用 Rcd 与琼脂糖交联, 与大肠杆菌裂解液孵育, 将总蛋白进行质谱鉴定。通过 sTarPicker 方法和蛋白质组学分析, 发现热休克蛋白(DnaK)可能是福氏志贺菌 sRNA *Ssr1* 的直接靶点, 调控其在酸性环境的耐受性^[58], 还有在体外用链霉素载体标记大肠杆菌 RNA, 并通过亲和层析发现几种相互作用的蛋白, 包括聚合酶亚基、Hfq 和 S1^[62]。上述各种方法提供了有价值的参考, 以寻找与 sRNA 相关或靶向的蛋白质。

sRNA 的靶标蛋白发现主要集中在致病菌自身蛋白, 尚无关于 sRNA 直接靶向宿主蛋白的研究, 但是方法学都是通用的, 可以借鉴上述方法进行相关研究, 这也反映了对 mRNA 靶点研究的偏向性和缺乏生物计算算法来全局预测蛋白质靶点, 笔者认为, 将 RNA-seq 技术与蛋白质组学结果联合分析, 再附加以上实验方法进行验证, 或许可以用于致病菌 sRNA 与宿主靶标蛋白相互作用研究。

3 展望

目前, 致病菌 sRNA-宿主靶标相关研究方法处于起步阶段, 这些方法仍然有待发展完善, 比如双 RNA-seq 难以区分致病菌是处于宿主细胞质、细胞核还是细胞膜, scRNA-seq 的出现解决了具有相同基因组的宿主细胞异质性的问题, 但其花费较大且所需要的样本量也较大, 对致病菌的应用也刚刚兴起还未成熟, 以上各种技术方法并非独立的, 还可以联合使用, 比如单细胞双 RNA-seq 在未来或许有很好的应用前景。同时, 研究者们也在寻找新的发现和功能表征的技术方法及实验策略, 不断优化测序深度, 以期发现不稳定存在以及短的 sRNA, 未来 sRNA 和基因

表达的分析方式依然会发生重大转变。

本文关注的宿主靶点侧重于 mRNA 和蛋白质, 因为这一主题自致病菌-宿主相互作用研究起始未曾有过改变, 众多 mRNA 介导的 sRNA 活性调控的相关研究也印证该观点。目前宿主 mRNA 作为致病菌 sRNA 靶标是研究者的重心, 因为相关的全局测序、预测、实验手段都相对完善, 笔者认为, 由于缺乏可靠的蛋白靶点全局预测方法, sRNA 对蛋白质活性的调节目前仍然被低估了。此外, 关于 CRISPR 介导的免疫调节, DNA 作为调节 RNA 活性的靶点尚未得到完全解决, 这也提示我们宿主 DNA 或许也可能是致病菌 sRNA 潜在调节靶标。在感染沙门氏菌的人类宿主细胞中, 长链非编码 RNA (long noncoding RNA, lncRNA) 表达谱的改变较 mRNA 更快, 而在致病菌中, sRNA 通常作为重要调控因子, 反映致病菌所处何种宿主环境^[28], 这提示 lncRNA 未来或许能成为致病菌-宿主相互作用研究的重点。

参考文献

- [1] YANG G, LI BA, JIA LL, QIU HY, YANG MJ, ZHU BH, XIE J, QIU SF, LI P, MA H, SONG HB, WANG LG. A novel sRNA in *Shigella flexneri* that regulates tolerance and virulence under hyperosmotic pressure[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2020, 10: 483.
- [2] GONG H, VU GP, BAI Y, CHAN E, WU RB, YANG E, LIU FY, LU SW. A *Salmonella* small non-coding RNA facilitates bacterial invasion and intracellular replication by modulating the expression of virulence factors[J]. *PLoS Pathogens*, 2011, 7(9): e1002120.
- [3] STORZ G, VOGEL J, WASSARMAN KM. Regulation by small RNAs in bacteria: expanding frontiers[J]. *Molecular Cell*, 2011, 43(6): 880-891.
- [4] NIELSEN JS, LEI LK, EBERSBACH T, OLSEN AS, KLITGAARD JK, VALENTIN-HANSEN P, KALLIPOLITIS BH. Defining a role for Hfq in Gram-positive bacteria: evidence for Hfq-dependent antisense regulation in *Listeria monocytogenes*[J]. *Nucleic Acids Research*, 2010, 38(3): 907-919.

- [5] OBANA N, SHIRAHAMA Y, ABE K, NAKAMURA K. Stabilization of *Clostridium perfringens* collagenase mRNA by VR-RNA-dependent cleavage in 5' leader sequence[J]. *Molecular Microbiology*, 2010, 77(6): 1416-1428.
- [6] McKELLAR SW, IVANOVA I, AREDE P, ZAPF RL, MERCIER N, CHU LC, MEDIATI DG, PICKERING AC, BRIAUD P, FOSTER RG, KUDLA G, FITZGERALD JR, CALDELARI I, CARROLL RK, TREE JJ, GRANNEMAN S. RNase III CLASH in MRSA uncovers sRNA regulatory networks coupling metabolism to toxin expression[J]. *Nature Communications*, 2022, 13(1): 3560.
- [7] 李泽, 祝丙华, 叶中杨, 王立贵, 宋宏彬. 致病菌与宿主相互作用中 sRNA 的调控作用[J]. *生命科学*, 2018, 30(3): 327-332.
- LI Z, ZHU BH, YE ZY, WANG LG, SONG HB. sRNA roles in pathogenic bacteria-host interactions[J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2018, 30(3): 327-332 (in Chinese).
- [8] GRIFFIN BE. Separation of ³²P-labelled ribonucleic acid components. The use of polyethylenimine-cellulose (TLC) as a second dimension in separating oligoribonucleotides of '4.5S' and 5S from *E. coli*[J]. *FEBS Letters*, 1971, 15(3): 165-168.
- [9] IKEMURA T, DAHLBERG JE. Small ribonucleic acids of *Escherichia coli*. I. Characterization by polyacrylamide gel electrophoresis and fingerprint analysis[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1973, 248(14): 5024-5032.
- [10] JAIN SK, GUREVITZ M, APIRION D. A small RNA that complements mutants in the RNA processing enzyme ribonuclease P[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1982, 162(3): 515-533.
- [11] ARGAMAN L, HERSHBERG R, VOGEL J, BEJERANO G, WAGNER EGH, MARGALIT H, ALTUVIA S. Novel small RNA-encoding genes in the intergenic regions of *Escherichia coli*[J]. *Current Biology*, 2001, 11(12): 941-950.
- [12] MONTZKA WASSARMAN K, ZHANG AX, STORZ G. Small RNAs in *Escherichia coli*[J]. *Trends in Microbiology*, 1999, 7(1): 37-45.
- [13] FROST LR, STARK R, ANONYE BO, MacCREATH TO, FERREIRA LRP, UNNIKRISHNAN M. Dual RNA-seq identifies genes and pathways modulated during *Clostridioides difficile* colonization[J]. *mSystems*, 2023, 8(5): e0055523.
- [14] AGLIANO F, RATHINAM VA, MEDVEDEV AE, VANAJA SK, VELLA AT. Long noncoding RNAs in host-pathogen interactions[J]. *Trends in Immunology*, 2019, 40(6): 492-510.
- [15] WESTERMANN AJ. Regulatory RNAs in virulence and host-microbe interactions[J]. *Microbiology Spectrum*, 2018, 6(4): 492-510.
- [16] PENARANDA C, HUNG DT. Single-cell RNA sequencing to understand host-pathogen interactions[J]. *ACS Infectious Diseases*, 2019, 5(3): 336-344.
- [17] ZHENG WS, ZHAO SJ, YIN YH, ZHANG HD, NEEDHAM DM, EVANS ED, DAI CL, LU PJ, ALM EJ, WEITZ DA. High-throughput, single-microbe genomics with strain resolution, applied to a human gut microbiome[J]. *Science*, 2022, 376(6597): eabm1483.
- [18] DAR D, SHAMIR M, MELLIN JR, KOUTERO M, STERN-GINOSSAR N, COSSART P, SOREK R. Term-seq reveals abundant ribo-regulation of antibiotics resistance in bacteria[J]. *Science*, 2016, 352(6282): aad9822.
- [19] LALANNE JB, TAGGART JC, GUO MS, HERZEL L, SCHIELER A, LI GW. Evolutionary convergence of pathway-specific enzyme expression stoichiometry[J]. *Cell*, 2018, 173(3): 749-761.e38.
- [20] KRÖGER C, DILLON SC, CAMERON ADS, PAPPENFORTH K, SIVASANKARAN SK, HOKAMP K, CHAO YJ, SITTKA A, HÉBRARD M, HÄNDLER K, COLGAN A, LEEKITCHAROENPHON P, LANGRIDGE GC, LOHAN AJ, LOFTUS B, LUCCHINI S, USSERY DW, DORMAN CJ, THOMSON NR, VOGEL J, et al. The transcriptional landscape and small RNAs of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(20): E1277-E1286.
- [21] SLAGER J, APRIANTO R, VEENING JW. Deep genome annotation of the opportunistic human pathogen *Streptococcus pneumoniae* D39[J]. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46(19): 9971-9989.
- [22] RAYNAUD S, le PABIC H, FELDEN B. Selective recovery of RNAs from bacterial pathogens after their internalization by human host cells[J]. *Methods*, 2018, 143: 4-11.
- [23] WESTERMANN AJ, VOGEL J. Cross-species RNA-seq for deciphering host-microbe interactions[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2021, 22: 361-378.
- [24] MANDLIK A, LIVNY J, ROBINS WP, RITCHIE JM, MEKALANOS JJ, WALDOR MK. RNA-seq-based monitoring of infection-linked changes in *Vibrio cholerae* gene expression[J]. *Cell Host & Microbe*, 2011, 10(2): 165-174.
- [25] CONNOLLY JPR, SLATER SL, O'BOYLE N, GOLDSTONE RJ, CREPIN VF, RUANO-GALLEGO D, HERZYK P, SMITH DGE, DOUCE GR, FRANKEL G, ROE AJ. Host-associated niche metabolism controls

- enteric infection through fine-tuning the regulation of type 3 secretion[J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 4187.
- [26] BETIN V, PENARANDA C, BANDYOPADHYAY N, YANG R, ABITUA A, BHATTACHARYYA RP, FAN A, AVRAHAM R, LIVNY J, SHORESH N, HUNG DT. Hybridization-based capture of pathogen mRNA enables paired host-pathogen transcriptional analysis[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 19244.
- [27] WESTERMANN AJ, BARQUIST L, VOGEL J. Resolving host-pathogen interactions by dual RNA-seq[J]. *PLoS Pathogens*, 2017, 13(2): e1006033.
- [28] WESTERMANN AJ, FÖRSTNER KU, AMMAN F, BARQUIST L, CHAO YJ, SCHULTE LN, MÜLLER L, REINHARDT R, STADLER PF, VOGEL J. Dual RNA-seq unveils noncoding RNA functions in host-pathogen interactions[J]. *Nature*, 2016, 529: 496-501.
- [29] WESTERMANN AJ, VENTURINI E, SELLIN ME, FÖRSTNER KU, HARDT WD, VOGEL J. The major RNA-binding protein ProQ impacts virulence gene expression in *Salmonella enterica* serovar typhimurium[J]. *mBio*, 2019, 10(1): e02504-e02518.
- [30] STAPELS DAC, HILL PWS, WESTERMANN AJ, FISHER RA, THURSTON TL, SALIBA AE, BLOMMESTEIN I, VOGEL J, HELAINE S. *Salmonella* persists undermine host immune defenses during antibiotic treatment[J]. *Science*, 2018, 362(6419): 1156-1160.
- [31] AULICINO A, ANTANAVICIUTE A, FROST J, SOUSA GEROS A, MELLADO E, ATTAR M, JAGIELOWICZ M, HUBLITZ P, SINZ J, PRECIADO-LLANES L, NAPOLITANI G, BOWDEN R, KOOHY H, DRAKESMITH H, SIMMONS A. Dual RNA sequencing reveals dendritic cell reprogramming in response to typhoidal *Salmonella* invasion[J]. *Communications Biology*, 2022, 5: 111.
- [32] DONALDSON GP, CHOU WC, MANSON AL, ROGOV P, ABEEL T, BOCHICCHIO J, CIULLA D, MELNIKOV A, ERNST PB, CHU H, GIANNOUKOS G, EARL AM, MAZMANIAN SK. Spatially distinct physiology of *Bacteroides fragilis* within the proximal colon of gnotobiotic mice[J]. *Nature Microbiology*, 2020, 5(5): 746-756.
- [33] MIKA-GOSPODORZ B, GIENGKAM S, WESTERMANN AJ, WONGSANTICHON J, KION-CROSBY W, CHUENKLIN S, WANG LC, SUNYAKUMTHORN P, SOBOTA RM, SUBBIAN S, VOGEL J, BARQUIST L, SALJE 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.
- [34] GRØNNEMOSE RB, GARDE C, WASSMANN CS, KLITGAARD JK, NIELSEN R, MANDRUP S, MATTSSON AH, ANDERSEN TE. Bacteria-host transcriptional response during endothelial invasion by *Staphylococcus aureus*[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11: 6037.
- [35] APRIANTO R, SLAGER J, HOLSAPPEL S, VEENING JW. Time-resolved dual RNA-seq reveals extensive rewiring of lung epithelial and pneumococcal transcriptomes during early infection[J]. *Genome Biology*, 2016, 17(1): 198.
- [36] PUSCHHOF J, PLEGUEZUELOS-MANZANO C, MARTINEZ-SILGADO A, AKKERMAN N, SAFTIEN A, BOOT C, de WAAL A, BEUMER J, DUTTA D, HEO I, CLEVERS H. Intestinal organoid cocultures with microbes[J]. *Nature Protocols*, 2021, 16: 4633-4649.
- [37] SCHULTE LN, SCHWEINLIN M, WESTERMANN AJ, JANGA H, SANTOS SC, APPENZELLER S, WALLEES H, VOGEL J, METZGER M. An advanced human intestinal coculture model reveals compartmentalized host and pathogen strategies during *Salmonella* infection[J]. *mBio*, 2020, 11(1): e03348-e03319.
- [38] WESTERMANN AJ, VOGEL J. Host-pathogen transcriptomics by dual RNA-seq[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2018, 1737: 59-75.
- [39] BUMANN D. Heterogeneous host-pathogen encounters: act locally, think globally[J]. *Cell Host & Microbe*, 2015, 17(1): 13-19.
- [40] TSAI CN, COOMBES BK. The role of the host in driving phenotypic heterogeneity in *Salmonella*[J]. *Trends in Microbiology*, 2019, 27(6): 508-523.
- [41] BLATTMAN SB, JIANG WY, OIKONOMOU P, TAVAZOIE S. Prokaryotic single-cell RNA sequencing by *in situ* combinatorial indexing[J]. *Nature Microbiology*, 2020, 5: 1192-1201.
- [42] KUCHINA A, BRETTNER LM, PALEOLOGU L, ROCO CM, ROSENBERG AB, CARIGNANO A, KIBLER R, HIRANO M, DePAOLO RW, SEELIG G. Microbial single-cell RNA sequencing by split-pool barcoding[J]. *Science*, 2021, 371(6531): eaba5257.
- [43] IMDAHL F, VAFADARNEJAD E, HOMBERGER C, SALIBA AE, VOGEL J. Single-cell RNA-sequencing reports growth-condition-specific global transcriptomes of individual bacteria[J]. *Nature Microbiology*, 2020, 5: 1202-1206.
- [44] MA PJ, AMEMIYA HM, HE LL, GANDHI SJ, NICOL R, BHATTACHARYYA RP, SMILLIE CS, HUNG DT.

- Bacterial droplet-based single-cell RNA-seq reveals antibiotic-associated heterogeneous cellular states[J]. *Cell*, 2023, 186(4): 877-891.e14.
- [45] 王立贵, 赵雅琳, 李伍举. 细菌 sRNA 基因及其靶标预测研究进展[J]. *微生物学报*, 2009, 49(1): 1-5.
WANG LG, ZHAO YL, LI WJ. Research progress of prediction of bacterial sRNA genes and their targets-a review[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2009, 49(1): 1-5 (in Chinese).
- [46] KOEPPEN K, HAMPTON TH, JAREK M, SCHARFE M, GERBER SA, MIELCARZ DW, DEMERS EG, DOLBEN EL, HAMMOND JH, HOGAN DA, STANTON BA. A novel mechanism of host-pathogen interaction through sRNA in bacterial outer membrane vesicles[J]. *PLoS Pathogens*, 2016, 12(6): e1005672.
- [47] ZHANG H, ZHANG L, LIU KB, LI SZ, MATHEWS DH, HUANG L. Linear-time algorithms for RNA structure prediction[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2023, 2586: 15-34.
- [48] LOTT SC, SCHÄFER RA, MANN M, BACKOFEN R, HESS WR, VOß B, GEORG J. GLASSgo-automated and reliable detection of sRNA homologs from a single input sequence[J]. *Frontiers in Genetics*, 2018, 9: 124.
- [49] HENG S, SUTHEEWORAPONG S, CHAMPREDA V, UKE A, KOSUGI A, PASON P, WAEONUKUL R, CEBALLOS RM, RATANAKHANOKCHAI K, TACHAAPAUKOON C. Genomics and cellulolytic, hemicellulolytic, and amylolytic potential of *Iocasia fonsfrigidiae* strain SP3-1 for polysaccharide degradation[J]. *PeerJ*, 2022, 10: e14211.
- [50] SAHR T, ESCOLL P, RUSNIOK C, BUI S, PEHAU-ARNAUDET G, LAVIEU G, BUCHRIESER C. Translocated *Legionella pneumophila* small RNAs mimic eukaryotic microRNAs targeting the host immune response[J]. *Nature Communications*, 2022, 13: 762.
- [51] MANN M, WRIGHT PR, BACKOFEN R. IntaRNA 2.0: enhanced and customizable prediction of RNA-RNA interactions[J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(W1): W435-W439.
- [52] 杨光, 郝荣章, 邱少富, 王勇, 薛文仲, 宋宏彬, 王立贵. 细菌小 RNA 识别研究方法进展[J]. *生物物理学报*, 2012, 28(1): 23-28.
YANG G, HAO RZ, QIU SF, WANG Y, XUE WZ, SONG HB, WANG LG. A review on methodology of identifying small RNA in bacteria[J]. *Acta Biophysica Sinica*, 2012, 28(1): 23-28 (in Chinese).
- [53] SITTKA A, LUCCHINI S, PAPPENFORT K, SHARMA CM, ROLLE K, BINNEWIES TT, HINTON JCD, VOGEL J. Deep sequencing analysis of small noncoding RNA and mRNA targets of the global post-transcriptional regulator, Hfq[J]. *PLoS Genetics*, 2008, 4(8): e1000163.
- [54] URBAN JH, VOGEL J. A green fluorescent protein (GFP)-based plasmid system to study post-transcriptional control of gene expression *in vivo*[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2009, 540: 301-319.
- [55] WANG YF, KE YH, XU J, WANG LG, WANG TK, LIANG H, ZHANG W, GONG CL, YUAN JY, ZHUANG YB, AN C, LEI SS, DU XY, WANG ZJ, LI WN, YUAN XT, HUANG LY, YANG XL, CHEN ZL. Identification of a novel small non-coding RNA modulating the intracellular survival of *Brucella melitensis*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 164.
- [56] PFEIFFER V, PAPPENFORT K, LUCCHINI S, HINTON JCD, VOGEL J. Coding sequence targeting by MicC RNA reveals bacterial mRNA silencing downstream of translational initiation[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2009, 16: 840-846.
- [57] MANDIN P, GOTTESMAN S. A genetic approach for finding small RNAs regulators of genes of interest identifies RybC as regulating the DpiA/DpiB two-component system[J]. *Molecular Microbiology*, 2009, 72(3): 551-565.
- [58] WANG LG, YANG G, QI LH, LI X, JIA LL, XIE J, QIU SF, LI P, HAO RZ, WU ZH, DU XY, LI WJ, SONG HB. A novel small RNA regulates tolerance and virulence in *Shigella flexneri* by responding to acidic environmental changes[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2016, 6: 24.
- [59] BOSSI L, FIGUEROA-BOSSI N. A small RNA downregulates LamB maltoporin in *Salmonella*[J]. *Molecular Microbiology*, 2007, 65(3): 799-810.
- [60] CURKIĆ I, SCHÜTZ M, OBERHETTINGER P, DIARD M, CLAASSEN M, LINKE D, HARDT WD. Epitope-tagged autotransporters as single-cell reporters for gene expression by a *Salmonella typhimurium wbaP* mutant[J]. *PLoS One*, 2016, 11(5): e0154828.
- [61] SHEEHAN LM, BUDNICK JA, FYFFE-BLAIR J, KING KA, SETTLAGE RE, CASWELL CC. The endoribonuclease RNase E coordinates expression of mRNAs and small regulatory RNAs and is critical for the virulence of *Brucella abortus*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2020, 202(20): e00240-20.
- [62] WINDBICHLER N, von PELCHRZIM F, MAYER O, CSASZAR E, SCHROEDER R. Isolation of small RNA-binding proteins from *E. coli*: evidence for frequent interaction of RNAs with RNA polymerase[J]. *RNA Biology*, 2008, 5(1): 30-40.