

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2020.11.12

基于 RNA-seq 对猪瘟病毒感染宿主的 转录组学研究进展

李元曦^{1,2}, 夏应菊¹, 徐璐¹, 赵启祖¹, 胡永浩², 王琴^{1*}, 张乾义^{1*}

(1. 中国兽医药品监察所, 北京 100081; 2. 甘肃农业大学动物医学院, 兰州 730000)

[收稿日期] 2020-04-07 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280(2020)11-0079-07 [中图分类号] S852.659.6

[摘要] 对转录组测序(RNA-seq)的技术特点及其发展进行概述,对该技术在猪瘟感染研究中的应用进行详细综述,并对其存在的问题及未来发展做了进一步展望,以期为猪瘟的相关研究提供参考。

[关键词] 转录组测序;猪瘟;研究进展

Research Progress of Transcriptome of Classical Swine Fever Virus after Infection

LI Yuan-xi^{1,2}, XIA Ying-ju¹, XU Lu¹, ZHAO Qi-zu¹, HU Yong-hao², WANG Qin^{1*}, ZHANG Qian-yi^{1*}

(1. OIE/National Reference Laboratory for Classical Swine Fever, China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China;

2. College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

Abstract: In this paper, the technical characteristics and development of RNA-seq were summarized, and the application of RNA-seq in the research of classical swine fever infection was reviewed in detail, and the existing problems and future development were further prospected, in order to provide reference for the related research of classical swine fever.

Key words: RNA-seq; classical swine fever virus; research progress

猪瘟病毒(Classical swine fever virus, CSFV)属于黄病毒科瘟病毒属,是一种有囊膜的单股正链RNA病毒^[1]。基因组包含约12300个碱基对,编码

4个结构蛋白(C, E^{ms}, E1, E2)及8个非结构蛋白(N^{pro}, P7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B)。其在自然条件下只感染猪,家猪和野猪是该病毒常

基金项目: 国家自然科学基金面上项目“利用 Dual RNA-seq 研究猪瘟病毒与宿主转录组相互作用的分子机制”(31872484);北京市科技计划课题“动物疫病公共检测服务平台建设”(D171100002117002)

作者简介: 李元曦,硕士研究生,从事动物传染病及病原分子生物学研究;夏应菊为共同第一作者。

通讯作者: 王琴。E-mail: wq551@vip.sina.com; 张乾义。E-mail: zhangqy114@126.com

见宿主。通常认为猪瘟(Classical swine fever, CSF)于 1810 年首次出现于美国^[2],后来传至世界各地,现美洲、亚洲、欧洲等地区都有流行,目前仅有少数国家如美国、加拿大、澳大利亚等得以根除 CSF 并宣布为无 CSF 区。我国 CSF 流行范围广泛,目前 CSF 多呈点状散发流行,流行规模较小,强度较轻,但这种散发流行见于全国各地^[3]。虽然我国进行了猪瘟的强制免疫,全国各地猪群免疫密度达到 95% 以上,使猪群具有了一定程度的免疫保护率,在很大程度上控制了 CSF 在全国范围内的流行,但近年来,我国很多地区的 C 株疫苗免疫猪场频繁出现免疫失败^[4]及持续性感染等问题,给 CSF 的防控和净化工作带来许多困难^[5]。CSFV 通过入侵宿主细胞并利用其物质和能量在宿主体内增殖。因此,对 CSFV 侵入宿主并在体内增殖过程进行研究是了解其致病机理从根本上控制疫病的途径之一,在病毒 RNA 水平上研究 CSFV 的感染及复制机制具有重要的科学价值。随着高通量测序技术的不断发展,新一代高通量测序已成为转录组学研究的重要手段,在生命科学研究中的应用日趋广泛。转录组广义上是指细胞在某一阶段内转录出的所有 RNA 的总和,有时也仅指信使 RNA(mRNA)的集合。其不仅仅是连接基因组遗传信息与功能蛋白质组的纽带,还反映了某一特定的发育或生理阶段特定的细胞或组织基因的表达情况。其不仅能够从整体水平研究基因功能以及基因结构,同时还可以揭示特定生物学过程以及疾病发生过程中的分子机理。所以对机体感染病原后转录组的解读,就是对该病原与宿主相互作用及其发展过程的解读。因此,利用 RNA-seq 技术对 CSFV 不同毒力毒株感染后宿主与病毒间的相互作用进行分析与研究,可以找到关键的差异表达基因和其在宿主与病毒互作中发挥的作用,揭示更多猪瘟病毒致病的分子机理。本文主要介绍了 RNA-seq 技术特点及其发展以及在猪瘟病毒感染中应用的研究进展,以期对相关研究提供参考。

1 RNA-seq 技术概述

1.1 RNA-seq 技术 生物体在其生长发育过程中,因外部环境的影响及内部调节的不同,转录组信息的变化也会呈多样性^[6]。目前,针对转录组的研究方法主要可分为以下三类:一是基于 cDNA 杂交荧光检测的高通量基因表达芯片(Gene Chip);二是基于测序技术的基因表达系列分析(Serial analysis of gene expression, SAGE)和表达序列标签(Ex-pressed sequence Tag, EST);三是基于新一代高通量测序技术的转录组测序(RNA-sequence, RNA-seq)^[7]。此外,还有生物信息学等诸多数据处理和分析的研究方法。

RNA-seq 是对各种类型的转录样本进行高通量测序的统称,该技术在近十多年间迅速发展起来^[8],成为分子生物学研究中重要的工具,深刻影响了人类对于基因组功能的理解^[9]。其主要以非编码小 RNA(Small non-messenger RNA, sRNA)、信使 RNA(messenger RNA, mRNA)、长链非编码 RNA(Long non-coding RNA, LncRNA)测序为主。通过高通量测序进行转录组分析,全面、快速地获得特定细胞或组织在某一状态下几乎所有转录本的序列及表达信息^[10],系统、准确地探究从 DNA 向 RNA 转录这一复杂而精细的调控层次,是揭示复杂生物过程和解析转录调控网络的重要方面。对于有参考基因组的测序分析,是将短序列映射到基因组相应的位置上去,对映射的结果进行基因水平、外显子水平、以及转录组水平的拼接,最后对结果进行数据处理和生物信息学分析,获得差异表达基因^[11]、新转录本预测、非翻译区的分析等^[12]。而对于无参考基因组的测序分析,则进行新基因组组装(de novo assembling)形成全基因组范围的转录谱,然后进行基因预测与 GO 分析及代谢通路分析等^[13]。目前 RNA-seq 平台主要是 Illumina 测序^[14],另外常见的还有 Pacific Biosciences(PacBio)和 Oxford Nanopore Technologies(ONT),其特点见表 1。

表 1 几种主要测序平台的特点

Tab 1 Features of several major sequencing platforms

平台	Illumina	PacBio/ONT	ONT
测序技术	短序列读取 cDNA	长序列读取 cDNA ^[15]	长序列读取 RNA
平均读长	100 kb	1 k ~ 50 kb	1 k ~ 50 kb
优点	<ol style="list-style-type: none"> 1. 运用最为广泛,性价比高^[33]; 2. 技术具有很高的吞吐量,每次运行的读取次数是长读取平台的 100 - 1000 倍^[16]; 3. 可用于降解 RNA; 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 样品制备的过程增加了误差; 2. 定量受到了限制; 3. 简化了转录组分析的计算方法; 4. 结果错误率较低 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 1 ~ 50 kb 内能捕获许多转录本的全长; 2. 简化了转录组分析的计算方法; 3. 样品制备不需要逆转录或 PCR,可减少偏差^[17]; 4. 结果错误率较低^[18]; 5. 可检测 RNA 碱基修饰,潜力巨大^[19]
缺点	<ol style="list-style-type: none"> 1. 读长短; 2. 反转录、PCR 等过程增加了误差 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 需大量模板进行 PCR^[20-21]; 2. 每次运行数据吞吐量较低,为 500000 ~ 1000000 次; 3. 降解 RNA 不能用于分析; 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 每次运行数据吞吐量较低,为 500000 ~ 1000000 次; 2. 降解 RNA 不能用于分析; 3. 样品制备和测序偏差尚不明确;
主要应用	DGE, WTA, 空间组学, 翻译组, 结构和 RNA - 蛋白质相互作用分析;	特别适用于新亚型发现、融合转录的发现以及 MHC、HLA 或其他复杂转录分析 ^[22] ;	适用于新亚型发现、融合转录的发现以及 MHC、HLA 或其他复杂转录分析,并能检测到核苷酸的修饰,应用前景更加广阔;

1.2 新兴 RNA - seq 技术的发展及应用 近年来,随着 RNA - seq 技术的不断应用和得益于技术的进步,该技术已经逐渐向单细胞转录组测序 (Single cell RNA - seq, scRNA - seq) 和互作转录组测序 (Dual RNA - seq) 发展。传统 RNA - seq 的研究主要是在器官或者组织水平上,往往忽略了单个细胞在遗传方面的特殊性。ScRNA - seq 是在单个细胞水平对 mRNA 进行高通量测序的一项新技术,可将分离的单个细胞的微量全转录组 RNA 扩增后进行高通量测序^[23]。2009 年, Tang 等首次报道深度 scRNA - seq 分析,并于 2010 年再次发表相关研究工作^[24-25]。Qi 等^[26]利用 ScRNA - seq 研究分析了包括 13 种人类组织共 119 种细胞类型的单细胞基因表达图谱,并分析了 51 种 RNA 病毒受体和 400 种其他膜蛋白的单细胞共表达谱。结果证实了 SARS - CoV - 2 感染人体细胞的宿主受体血管紧张素转换酶 2 (ACE2) 主要在肺 AT2、肝胆管细胞、结肠结肠细胞、食管角质形成细胞、回肠 ECs、直肠 ECs、胃上皮细胞和肾脏近端小管中表

达。并且发现了 3 个候选的共受体 ANPEP、DPP4 和 ENPEP。其中, ANPEP 和 DPP4 是已知的人类 cov 受体,提示 ENPEP 是人类 cov 的另一个潜在受体。在另一项研究中, Wang 等^[27]利用 ScRNA - seq 研究了 ACE2 在成人睾丸中的表达模式。结果表明, ACE2 主要富集于精原细胞、间质细胞和支持细胞。基因集富集分析 (GSEA) 表明,与病毒繁殖和传播相关的基因在 ACE2 阳性精原细胞中出现上调,而与雄配子生成相关的基因表达则出现下调,这提示人类睾丸是 SARS - CoV - 2 感染的潜在靶点,对理解这种快速传播疾病的病理生理学有重要影响。

2012 年, Westermann 等提出了术语“dual RNA - seq”,指的是对病原体及其感染的宿主同时 RNA - seq 分析^[28],即同时捕获病原体和宿主中的所有类别的编码和非编码转录物。不同于先前的转录组学研究通常需要分离相互作用的宿主和病原体, dual RNA - seq 不需要设计特异性探针的优势,在不了解物种基因信息的情况下,也可对其转录组进

行检测分析,并发现新的转录本,检测到未知基因,因此,一经面世,该技术很快被广泛应用于生命科学研究。Dual RNA-seq 不仅可以更好地了解病原体 and 宿主在感染过程中的生理变化,还揭示了在以往检测中不可见的与毒力相关的小非编码 RNA 的隐藏分子表型^[29],而这得益于高通量 RNA 测序灵敏度的增加。Thänert R 等用金黄色葡萄球菌感染两种不同的小鼠品系并使用 dual RNA-seq 分析感染过程中不同品种的小鼠作为宿主及其体内病原的相关基因表达情况,发现宿主本身固有的变异性会影响细菌毒力因子的表达^[30]。在另一项研究中,对检出高呼吸道病毒感染和仅携带病毒的两组儿童的呼吸道细胞进行 dual RNA-seq 分析后,发现不发病的呼吸道病毒感染并非无害,其感染可诱导免疫细胞在呼吸道的浸润、纤毛细胞基因表达的下调及致哮喘基因的表达,这些影响最终会改变呼吸道的功能^[31]。

可以看出,较之前的基因芯片技术和基于二代测序的转录组分析技术而言,这两种技术具有着灵敏度高、信号数字化、易于分析和不需要设计特异性探针的优势,对于分析宿主与感染病原间的生物过程具有独特优势。因此,使用新一代的 RNA-seq 技术对 CSFV 入侵宿主后及宿主对 CSFV 的防御与抵抗中的基因差异表达的情况进行研究和进一步分析,将有助于进一步揭示 CSFV 的致病机制。

2 RNA-seq 对 CSFV 感染宿主相互作用的研究进展

CSFV 感染宿主细胞后利用宿主细胞的物质和能量在宿主体内增殖并逃避了宿主的免疫系统。但宿主对病毒的清除和防御反应一刻也没有停止。宿主的天然免疫系统与获得性免疫应答在 CSFV 感染及其复制过程中均发挥着重要作用^[1]。尤其是免疫 C 株后机体能迅速建立起有效的免疫保护,在免疫后 5 d 攻毒即可达到完全保护^[32]。因此,CSFV 与宿主的免疫应答是一个互相博弈的复杂过程^[33]。而 CSFV 与宿主相互作用的过程可在宿主细胞内转录组及蛋白组的表达变化有所体现。所以在转录组的水平上对 CSFV 入侵宿主及宿主对

CSFV 的防御抵抗进行研究,即在病毒 RNA 水平上研究其感染及复制机制,对揭示 CSFV 入侵并在宿主体内复制和宿主免疫系统防御抵抗 CSFV 的分子机制很有意义。

目前已有科研人员利用 RNA-seq 对 CSFV 感染后宿主基因表达的变化情况进行了研究。侯玉臻等^[34]基于 RNA-seq 技术对感染 CSFV C 株后不同时间的家兔脾脏组织进行测序发现,感染后 30 h 内的前 10 个差异基因只有少数与炎症反应、免疫应答、细胞凋亡等相关;感染后第 36 小时开始,机体与免疫相关的基因出现差异表达,且第 36 小时和第 48 小时的前 10 个差异基因完全相同,其中 $\beta 2$ 微球蛋白 ($\beta 2$ microglobulin, B2M)、II 型跨膜糖蛋白 CD74 (MHC class II invariant chain, Ii)、人类白细胞抗原-DR- α (human leukocyte antigens-DR- α , HLA-DR- α) 和免疫球蛋白 J 链 (immunoglobulin J, IGJ) 等参与机体抗病毒免疫的基因均显著下调。GO 功能注释结果和 KEGG 通路富集分析发现,感染后各时间点的差异基因都和宿主的免疫与代谢调控紧密相关,其中和免疫应答相关的最多,这说明病毒的感染激发了家兔持续恒定的免疫反应。宁蓬勃使用 CSFV 石门株及 CSFV C 株感染猪静脉血管内皮细胞 (SUVEC) 及巨嗜细胞后对宿主细胞基因表达的差异进行了研究^[35],通过对感染后宿主细胞转录组水平的基因调控应答特征的分析,发现 CSFV 石门株早期感染中 PDIA3 和 AXL 基因发生上调, NAMPT 与 PDGF 基因发生下调。DGE 检测数据库、GO 和 KEGG 富集显著性分析 CSFV 石门株与 C 株感染 SUVEC 后 72 h 转录组的应答差别,发现 CSFV 石门株感染猪静脉血管内皮细胞后 SRPX2、TYMS、HMGB1、SOD2 基因转录受到抑制,这些基因在诱导血管上皮细胞迁移、血管网络的生成和维持血管结构和功能中具有重要作用。VEGFC 和 CAV1 基因则在 CSFV 石门株感染后出现了表达的上调,且 VEGFC 基因是 CSFV 石门株感染后特异上调表达的基因。CAV1 活性或表达升高时,对 PDGF 等多种关键生长因子的活性有抑制作用, VEGF 则与血管通透性密切相关,其对血管通透

性具有强烈的增强作用^[36],是组胺的数百倍,且其与机体出现弥漫性出血、血管病变、组织脏器损害为特征性疾病的发病机制也密切相关。这些结果显示,CSFV 石门株的感染将会对宿主机体血管功能、生长代谢、氧化应激、炎性出血等产生影响和损伤,以达到逃避炎性清除、破坏血管结构等一系列作用,而 CSFV C 株的感染则完全不会产生出血病变。初步揭示了 CSFV 石门株引起血管通透性增加而导致广泛性出血的引发急性 CSF 的分子机制。龚小程基于 CSFV 石门株侵染猪肺泡巨噬细胞和猪血管内皮细胞差异表达的转录组学数据,深度挖掘这两种宿主细胞被 CSFV 感染后均出现显著表达的关键基因^[37],发现真核生物起始因子 4A3、蛋白酶体 β 亚基 3 型等关键基因在感染后 48 h 均出现下调,而它们的异常表达可能影响宿主细胞的凋亡、周期调控等生理进程。此外还发现 CSFV 的侵染造成了 NF- κ B 等相关调控的改变,并且 DNA 复制等信号通路出现显著性应答,这提示 NF- κ B 调控及其相关通路与 CSFV 侵染有着的密切联系。王竞晗使用 CSFV 石门株及 CSFV C 株对 8 周龄的 SPF 猪进行了攻毒并进一步分离感染猪只的外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)进行转录组测序,以筛选差异转录的宿主分子^[38]。结果显示:在病毒感染后 3 d,发现转录水平发生明显上调的基因有 3205 个,而下调的基因有 377 个;在病毒感染后 5 d,明显上调的基因有 83 个,而下调的基因有 7373 个。在显著富集的前 30 个信号通路中,与免疫和病毒感染相关的信号通路包括 NF- κ B、RIG-I 样受体、Toll 样受体和 JAK-STAT 信号通路。结合生物信息学分析发现 IL-10、VLDLR 和 USP18 的下调能够显著抑制 CSFV 石门株的复制,而 HES4(Hairy and enhancer of split 4)、Stefin A1、CYSLTR2、LGASL1、IFIT1、ISG15、CASP1、MOV10、USP25、Trim5、DDX58 和 ISG20 下调后能够明显促进 CSFV 的复制,且 HES4 可以与 CSFV IRES 相互作用并抑制其活性以拮抗 CSFV 的复制。

这些研究说明 CSFV 能有效的逃避宿主免疫

监控,其感染会直接或者间接影响宿主体内细胞因子的表达,引起宿主的免疫细胞凋亡及出血性炎症反应。这些研究虽然揭示了部分 CSFV 与宿主相互作用的复杂分子机制,并为更好地开展 CSFV 与宿主的互作机制研究提供了有价值的信息,但是,这些研究有些是基于体外模型,不能完全反映动物感染的真实情况,甚至感染病毒后,相同的基因在不同的细胞中的表达情况相反。例如,Bensaude 等在感染了 CSFV 的血管内皮细胞中检测到 NF- κ B 的表达升高^[39],而石子学则在感染了 CSFV 猪的外周血白细胞中检测到 NF- κ B 抑制剂 α (Nuclear Factor- α , NFKBIA)的表达升高,抑制了该细胞中 NF- κ B 的表达^[25]。有些研究虽然开展了动物实验,但仅是经典强毒株的感染,不能反映目前流行毒株感染后的情况。此外,同种宿主的不同品系感染同一毒株后也会产生不同反应,如 Ning 等用 RNA-seq 分析了 CSFV 弱毒疫苗免疫后的猪外周血单核细胞的转录组,发现疫苗免疫的地方猪和杂交品种猪分别有 5222 和 6037 种基因的转录出现了显著变化,两种品系的猪有 677 个基因的表达不同^[40]。因此,要想进一步阐明 CSFV 的致病机理,还需要更多更全面地针对 CSFV 感染后宿主细胞调控的关键性基因进行深入系统的研究。

3 展望

虽然目前在转录组水平对 CSFV 的感染机理的研究取得了一定的进展,但 CSFV 感染后与宿主间的相互作用并不完全清楚,仍存在以下问题:(1)之前的研究工作主要针对 CSFV 的部分基因对某种宿主细胞的致病作用;(2)其大多是用 CSFV 在体外感染宿主细胞,对其免疫、细胞凋亡等相关的基因进行表达差异的分析,而且宿主的遗传背景也各不相同;(3)动物实验研究目前仅限于对经典强毒株感染的研究,对流行毒株感染后情况的参考价值有限;(4)这些研究虽然揭示了一部分 CSFV 的致病机理,但是由于 CSFV 不同致病力毒株感染对宿主转录组的影响各不相同,且不同遗传背景的宿主对 CSFV 感染产生的相关反应也会有所不同,所以缺乏全面系统的转录组水平表达差异的研究,无

法确定 CSFV 感染宿主后致病或者产生免疫应答的关键所在。随着测序技术的不断更新和进步,新一代的 RNA-seq 技术:如 scRNA-seq 和 Dual RNA-seq 能够在感染期间同时测定宿主和病原体的基因表达情况,这对于深入研究 CSFV 的致病机制,发现关键的致病基因与作用蛋白提供了有力工具。因此,针对 CSFV 不同毒力毒株感染来源清晰、相同遗传背景的宿主,使用新一代 RNA-seq 技术对 CSFV 与其宿主间的相互作用进行分析研究,不仅能详细、直观的揭示 CSFV 的致病机理及其分子机制,也将有助于解释 C 株的免疫保护机制,为 CSF 的防治及新型 CSF 疫苗的研制提供新的方向,并为从根本上控制和净化 CSF 提供更多科学数据的支持。

参考文献:

- [1] 王琴,涂长春. CSF[M]. 北京:中国农业出版社,2015:15.
Wang Q, Tu C C. Classical Swine Fever [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2015:15.
- [2] Hanson R P. 1957. Origin of hog cholera[J]. J. Am. Vet. Med. Assoc., 131:211-218.
- [3] 姚文生,范学政,王琴,等. 我国猪瘟流行现状与防控措施建议[J]. 中国兽药杂志,2011,45(9):44-55.
Yao W S, Fan X Z, Wang Q, et al. Epidemic Status and Proposals for Prevention and Control of Classical Swine Fever in China [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug., 2011, 45(9):44-55.
- [4] Luo Y, Li S, Sun Y, et al. Classical swine fever in China: a minireview[J]. Veterinary Microbiology, 2014, 172(1/2):1-6.
- [5] Liu J, Fan X Z, Wan Q, et al. Dynamic distribution and tissue tropism of classical swine fever virus in experimentally infected pigs [J]. Virol J, 2011, 8(201).
- [6] 赵敏蝶,吴尽,赵宇卓,等. ScRNA-seq 技术及其在动物研究中的应用与进展[J]. 野生动物学报,2020,41(1):220-225.
Zhao M D, Wu J, Zhao Y Z, et al. scRNA-Seq Technology and its Application and Progress in Animal Research [J]. Hinese Journal of Wildlife. 2020, 41(1):220-225.
- [7] 崔凯,吴伟伟,刁其玉,等. 转录组测序技术的研究和应用进展[J]. 生物技术通报,2019,35(7):1-9.
Cui K, Wu W W, Diao Q Y, et al. Application and Research Progress on Transcriptomics [J]. Biotechnology Bulletin, 2019, 35(7):1-9.
- [8] Emrich S J, Barbazuk W B, Li L. et al. Gene discovery and annotation using LCM-454 transcriptome sequencing [J]. Genome Res, 2007, 17:69-73.
- [9] Lister R, Ronan C O, Julian T F. et al. Highly integrated single-base resolution maps of the epigenome in Arabidopsis [J]. Cell, 2008, 133:523-536.
- [10] Wang Z, Gerstein M, Gerstein M. et al. RNA-seq: a revolutionary tool for transcriptomics [J]. Nat Rev Genet, 2009. 10(1):57-63.
- [11] Jiang Z, Zhou X, Li R, et al. Whole transcriptome analysis with sequencing: methods, challenges and potential solution [J]. Cell Mol Life Sci, 2015, 72(18):3425-3439.
- [12] Hitzemannr, Bottomlyd, Darakjianp, et al. Genes, behavior and next-generation RNA sequencing [J]. Genes Brainbehav, 2012, 12(1):1-12.
- [13] Pootakhamw, Shearman J R, Ruangareeratep P, et al. Large-scale SNP discovery through RNA sequencing and snpgenotyping by targeted enrichment sequencing in cassava (manihotescu-lentacrantz) [J]. Plosone, 2014, 9(12):ell6028-ell6028.
- [14] Sharon D, Tilgner H, Grubert F. et al. A single-molecule long-read survey of the human transcriptome [J]. Nat. Biotechnol, 2013, 31:1009-1014.
- [15] Thomas S, Underwood J. G, Tseng E, et al. Long-read sequencing of chicken transcripts and identification of new transcript isoforms [J]. PLOS ONE, 2014, 9:e94650.
- [16] Su Z, Labajn P P, Li S, et al. A comprehensive assessment of RNA-seq accuracy, reproducibility and information content by the Sequencing Quality Control Consortium [J]. Nat. Biotechnol., 2014, 32:903-914.
- [17] Jain M, Olsen H E, Paten B, et al. The Oxford Nanopore MinION: delivery of nanopore sequencing to the genomics community [J]. Genome Biol, 2016, 17:239.
- [18] Jain M, Koren S, Miga K H. et al. Nanopore sequencing and assembly of a human genome with ultra-long reads [J]. Nat. Biotechnol, 2018, 36:338-345.
- [19] Workman R E, Tang A D, Tang P S. et al. Nanopore native RNA sequencing of a human poly(A) transcriptome [J]. Preprint at bioRxiv, 2019, 16(12):1297-1305.
- [20] Matz M, Shagin D, Bogdanova E, et al. Amplification of cDNA ends based on template-switching effect and step-out PCR [J]. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 1999, 27(6):1558-1560.
- [21] Ramsk? Id D, Luo S J, Wang Y C, et al. Full-length mRNA-Seq from single-cell levels of RNA and individual circulating tumor cells [J]. Nat. Biotechnol, 2012, 30(8):777-782.

- [22] Stark R, Grzelak M, Hadfield J, *et al.* RNA sequencing: the teenage years. [J]. *Nature reviews. Genetics*, 2019, 20(11): 631–656.
- [23] 李丽娟, 师书玥, 张村宇, 等. 单细胞转录组测序技术原理及其应用[J]. *中国畜牧杂志*, 2019, 55(2): 15–21.
LI L J, Shu S Y, Zhang C Y, *et al.* Principle and Application of Single Cell Transcriptome Sequencing [J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2019, 55(2): 15–21.
- [24] Treutle B, Brownfield D G, Wu A R, *et al.* Reconstructing lineage hierarchies of the distal lung epithelium using single-cell RNA-Seq. [J]. *Nature*, 2014, 509(7500): 371–375.
- [25] Treutle B, Barbacioru C, Nordman E, *et al.* RNA-Seq analysis to capture the transcriptome landscape of a single cell. [J]. *Nature Protocols*, 2010, 5(3): 516–535.
- [26] Qi F R, Qian S, Zhang S, *et al.* Single cell RNA sequencing of 13 human tissues identify cell types and receptors of human coronaviruses. [J]. *Biochemical and biophysical research communications*, 2020, 526(1).
- [27] Wang Z P, Xu X J. scRNA-seq Profiling of Human Testes Reveals the Presence of the ACE2 Receptor, A Target for SARS-CoV-2 Infection in Spermatogonia, Leydig and Sertoli Cells. [J]. *Cells*, 2020, 9(4).
- [28] Westermann A J, Gorski S A, Vogel J, *et al.* Dual RNA-seq of pathogen and host [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2012, 10(9): 618–630.
- [29] Westermann A J, Barquist L, Vogel J, *et al.* Resolving host-pathogen interactions by dual RNA-seq [J]. *PLoS Pathog*, 2017, 13(2).
- [30] Tharnt R, Goldmann O, Beineke A, *et al.* Host-inherent variability influences the transcriptional response of *Staphylococcus aureus* during in vivo infection [J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 14268.
- [31] Wesolowska A, Everman J L, Davidson R, *et al.* Dual RNA-seq reveals viral infections in asthmatic children without respiratory illness which are associated with changes in the airway transcriptome [J]. *Genome Biol*, 2017, 18: 1474–7596.
- [32] Graham S P, Everett H E, Haines F J, *et al.* Challenge of pigs with classical swine fever viruses after C-strain vaccination reveals remarkably rapid protection and insights into early immunity [J]. *PLoS One*, 2012; 7: e29310.
- [33] 蔡彬祥, 於子鼎, 曾显成, 等. 猪瘟病毒与宿主天然免疫系统的相互作用 [J]. *微生物学通报*, 2017, 44(12): 2997–3006.
CAI B X, Yu Z D, Zen X C, *et al.* Interaction between classical swine fever virus and host innate immune system [J]. *Microbiology China*, 2017, 44(12): 2997–3006.
- [34] 侯玉臻, 赵丹彤, 张文广, 等. 基于高通量测序技术分析家兔感染猪瘟兔化弱毒株后脾脏的转录组学变化 [J]. *病毒学报*, 2016, 32(3): 316–323.
HOU Y Z, Zhao D T, Zhang W G. *et al.* Analysis of transcriptome changes in spleen of rabbits infected with classical swine fever attenuated strain based on high throughput sequencing [J]. *Chinese Journal of Virology*, 2016, 32(3): 316–323.
- [35] 宁蓬勃. CSFV 石门株与 C 株感染宿主细胞差异表达基因及其在病毒致病中的作用 [D]. 西北农林科技大学, 2013.
NING B P, Understanding differential gene expression in swine umbilical vein endothelial cell and macrophage in response to classical swine fever virus Shimen strain and C strain infections [D]. North West Agriculture and Forestry University, 2013.
- [36] Senger D R, Galli S J, Dvorak A M, *et al.* 1983. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid [J]. *Science*, 2019, (4587): 983–985.
- [37] 龚小程, 胡傲雪, 宁蓬勃, 等. CSFV Shimen 株感染猪肺泡巨噬细胞与猪血管内皮细胞的转录组共表达基因分析 [J]. *动物医学进展*, 2018, 39(12): 1–5.
GONG X C, Hu A X, Ning B P, *et al.* Transcriptome Co-expression Gene Analysis of Porcine Alveolar Macrophages and Swine Umbilical Vein Endothelial Cells after Infection with Classical Swine Fever Virus Shimen Strain [J]. *Progress in Veterinary Medicine*. 2018, 39(12): 1–5.
- [38] 王竞晗. 猪瘟病毒强弱毒感染猪 PBMCs 转录组分析及 HES4 抗病毒分子机制研究 [D]. 中国农业科学院, 2018.
WANG J H. Transcriptome analysis of porcine PBMCs of differentially virulent classical swine fever virus strains and dissection of antiviral mechanisms of HES4 [D]. Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2018.
- [39] Bensaude E, Turner J L, Wakeley P R, *et al.* Classical swine fever virus induces proinflammatory cytokines and tissue factor expression and inhibits apoptosis and interferon synthesis during the establishment of long-term infection of porcine vascular endothelial cells [J]. *J Gen Virol*, 2004, 85: 1029–1037.
- [40] NING P, Zhou Y, Liang W, *et al.* Different RNA splicing mechanisms contribute to diverse infective outcome of classical swine fever virus of differing virulence: insights from the deep sequencing data in swine umbilical vein endothelial cells [J]. *PeerJ*, 2016, 4: e2113.