

## 核糖核酸-蛋白质复合物规模化富集与鉴定技术的研究进展

樊智雅, 秦伟捷\*

(军事科学院军事医学研究院生命组学研究所, 北京蛋白质组研究中心, 国家蛋白质科学中心(北京),  
蛋白质组学国家重点实验室, 北京 102206)

**摘要:**核糖核酸(RNA)在细胞中并非单独存在,从它们产生到被降解的过程中与大量蛋白质发生相互作用,RNA结合蛋白(RNA-binding proteins, RBPs)能与RNA结合形成RNA-蛋白质复合物(RP复合物),并以这种复合物的形式发挥生理功能。RNAs或RBPs任一组成分的异常与缺失都会影响RP复合物的正常生理功能,从而导致疾病的发生,如代谢异常、肌肉萎缩症、自身免疫性疾病和癌症。因此,定性定量分析RBPs及其在正常细胞和肿瘤细胞中与RNAs靶标之间的复杂相互作用网络有助于挖掘RP复合物在肿瘤发生发展中的作用,开发肿瘤生物标志物和新的治疗方式。要深入研究和理解RNAs与RBPs的相互作用网络,须依赖组学技术对RP复合物进行大规模鉴定。而作为在组学层面系统性解析RP复合物组成、含量和功能的第一步,大规模富集RP复合物极具挑战性。为了解决这一难题,研究者们发展了各种富集鉴定策略。该文针对RP复合物富集策略的最新进展进行了综述,包括紫外光交联和免疫沉淀(crosslinking and immunoprecipitation, CLIP)及其衍生技术、基于“点击化学”的富集策略和基于相分离的富集策略,比较分析了它们的技术原理、优缺点,以方便研究者们选择合适的策略来解决感兴趣的生物学问题。该文最后总结了当前的RP复合物富集方法仍然存在富集效率低和操作繁琐等亟需解决的技术挑战,为富集策略的发展提供了研究方向。

**关键词:**核糖核酸结合蛋白;紫外光交联和免疫沉淀;规模化富集;生物正交反应;相分离

中图分类号:O658

文献标识码:A

文章编号:1000-8713(2021)02-0105-07

## Advances in technologies for large-scale enrichment and identification of ribonucleic acid-protein complexes

FAN Zhiya, QIN Weijie\*

(Beijing Institute of Lifeomics, Beijing Proteome Research Center, National Center for Protein Sciences  
(Beijing), State Key Laboratory of Proteomics, Beijing 102206, China)

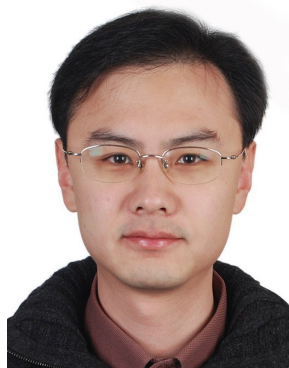
**Abstract:** Ribonucleic acid (RNA) rarely exists alone in the cell. RNAs interact with a variety of proteins and form RNA-protein complexes (RP-complexes) in every step of their life cycle, from transcription to degradation. These RP-complexes play key roles in regulating a variety of physiological processes. Defects in the composition and function of RP-complexes have been associated with many diseases, including metabolic disorders, muscular atrophy, autoimmune diseases, and cancer. It is hence evident that deciphering the highly complex interaction network of RNA-binding proteins (RBPs) and their RNA targets will provide a better understanding of disease development and lead to the discovery of new targets for cancer therapy. Large-scale identification of RP-complexes at the omics level is a prerequisite for obtaining insights into the complex RNA-protein interaction network. As the first step in omics-wide decoding of RP-complexes, enrichment and purification of RP-complexes is a highly challenging task. Recently, intensive efforts have been undertaken to better enrich and identify RP-complexes.

收稿日期:2020-07-19

\* 通讯联系人.Tel:(010)61777111,E-mail:aunp\_dna@126.com.

基金项目:国家重点研发计划(2016YFA0501403);国家自然科学基金(21675172).

**Foundation item:** National Key Research and Development Program of China (No. 2016YFA0501403); National Natural Science Foundation of China (No. 21675172).



**秦伟捷:** 军事医学研究院, 生命组学研究所, 国家蛋白质科学中心(北京), 研究员, 博士生导师。研究方向为基于富集新材料/新试剂和质谱新方法的低丰度/修饰蛋白质组分析技术, 以及蛋白质组技术在疾病标志物筛选中的应用研究。近年来发展了一系列特色性的低丰度/修饰蛋白质、外泌体富集材料、亲和抗体和化学标记富集方法, 显著提高了鉴定灵敏度和规模。特别是围绕着作为重要诊断标志物和药物靶点的糖基化蛋白质, 建立了多种高效富集、鉴定和数据解析新方法, 为糖蛋白质组研究提供了系统性工具。先后主持国家重大科学研究计划课题、国家重大科学仪器设备开发专项课题、国家重点研发专项(精准医学)课题以及国家自然科学基金面上项目等。在 *Mol Cell*, *Chem Sci*, *Anal Chem*, *Nucleic Acids Res* 等高水平杂志发表论文 50 余篇。中国质谱学会理事, 中国生物化学与分子生物学会蛋白质组学专业委员会委员、糖复合物专业委员会委员。

Generally, the enrichment strategies can be classified into two major categories: *in vitro* and *in vivo*. Although it has been successfully applied in many studies, the *in vitro* transcribed bait RNA lacks modifications or structural similarity compared with its natural counterpart. Further, since the proteins relocate and remodel after cell lysis, the use of cell lysates as a protein source may result in capturing false interacting proteins that bind non-physiologically with the bait RNA. Finally, weak interactions between the non-covalently bound proteins and RNA require mild washing to remove non-specific binding, which needs careful optimization. However, substantial sample loss is inevitable. To overcome the disadvantages of *in vitro* approaches, *in vivo* cross-linking strategies that “freeze” natural RNA-protein complexes in intact cells via covalent cross-linking have become increasingly popular. The *in vivo* methods allow RNA to interact with proteins in the intracellular environment. Therefore, the RP-complexes formed under physiological conditions are more biologically relevant than those obtained by *in vitro* methods. We herein summarize recent *in vivo* methodological advances in the large-scale enrichment and identification of RP-complexes, including cross-linking and immunoprecipitation (CLIP) and related methods, click chemistry-assisted methods, and organic phase separations. CLIP involves irradiating living cells with 254-nm ultraviolet (UV) light to establish covalent bonds between RNA and proteins. This enables CLIP to purify RNAs bound to a specific RBP under conditions that are stringent enough to prevent co-purification of nonspecifically bound proteins or free RNAs. Since the original study, multiple variant protocols have been derived to increase both efficiency and convenience. Photoactivatable ribonucleoside-enhanced-CLIP (PAR-CLIP) introduces a variation in the crosslinking strategy. Cells were preincubated with photoactivatable ribonucleosides 4-thiouridine (4SU) or 6-thioguanosine (6SG), which enables protein-RNA crosslinking with 365-nm UV-A irradiation. It increases the efficiency of cross-linking between RNA and RBPs and is particularly valuable for studying the interactions between RBPs and nascent RNA. Using a click chemistry-assisted strategy, an alkyne modified uridine analog, 5-ethynyluridine (EU), was incorporated into nascent RNAs via metabolic incorporation in living cells. Combined with UV irradiation-based cross-linking, the alkyne-functionalized RNA and the bound proteins were purified in a poly A-independent fashion by the highly selective bioorthogonal copper (I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition using azide-modified beads. Thus, full lists of both coding and non-coding RNAs with their interacting proteins can be purified, which is a major methodological advance. Organic phase separation

methods exploiting the physicochemical difference between cross-linked RP-complexes and free RNA and proteins do not require metabolic-based alkyne labeling or polyA-based RNA capture. Each method has unique strengths and drawbacks, which makes it important to select optimal approaches for the biological question being addressed. We hope that this review points out the current limitations and provides future directions to facilitate further development of methods for large-scale investigation of RP-complexes.

**Key words:** RNA-binding proteins; ultraviolet crosslinking and immunoprecipitation; large-scale enrichment; biorthogonal reaction; phase separation

核糖核酸(RNA)是细胞基因组转录的产物,根据结构和功能的不同可分为编码蛋白质的信使RNA(mRNA)和非编码RNA(ncRNA),RNA参与很多重要的生命活动,是细胞中必不可少的一类生物大分子。RNA在细胞中并非单独存在,从它们产生到被降解的过程中与大量蛋白质发生相互作用,在真核细胞中存在上千种RNA结合蛋白(RNA-binding proteins, RBPs)与RNAs结合形成种类纷繁复杂的RNA-蛋白复合物(RP复合物),并以这种复合物的形式发挥生理功能。以mRNAs为例,pre-mRNAs被转录合成后经过5'端加帽、剪接、多聚腺苷酸化到成熟,再经过出核、定位和翻译到最终被降解,mRNAs的整个生命周期都依赖于多种mRBPs与之结合才能发挥作用<sup>[1]</sup>。同时,非编码RNA也在RBPs的参与下介导组蛋白修饰和基因调控过程<sup>[2]</sup>。

这些功能实现的前提是RP复合物的正确组装,RNAs或RBPs任一组分的异常与缺失都会影响RNAs的正常功能,从而影响基因表达<sup>[3]</sup>,RBPs还有可能通过干扰癌细胞能量代谢使癌症恶化<sup>[4]</sup>。这些都会导致生理过程紊乱和疾病的发生,包括代谢异常、肌肉萎缩症、神经系统疾病、自身免疫性疾病和癌症<sup>[5-7]</sup>。例如,RBP HuR(human antigen R)的过表达能在转录后水平调节信号通路,使癌细胞适应恶劣的肿瘤微环境,促进癌细胞增殖。在体外使用siHuR或小分子抑制剂选择性拮抗HuR或HuR-RNA相互作用能显著抑制肿瘤的生长。因此,定性定量分析RBPs的表达谱及其在正常细胞和癌细胞中与RNAs靶标之间的复杂相互作用网络有助于挖掘RP复合物在肿瘤发生发展中的作用,并为开发肿瘤生物标志物和治疗方式提供了新的思路。

目前研究者们已经不再满足于研究单个RP复合物的功能,在组学层面上研究和理解RNAs与RBPs的相互作用是必然趋势。生物质谱具有灵敏

度高、动态范围宽、通量大的特点,是组学研究的必要分析手段。但由于RNAs与RBPs相互作用的动态性和网络复杂性,全面系统的阐述RP复合物的组成及动态变化并非易事。而作为系统性解析RP复合物组成、含量和功能的第一步,大规模富集RP复合物极具挑战性。为了解决这一难题,研究者们发展了各种富集鉴定策略,本文针对RP复合物富集策略的最新进展进行了综述,比较分析了它们的技术原理、优缺点及应用,并提出了需要解决的技术挑战,为富集策略的发展提供新的思路。

## 1 RP复合物富集策略

早期在富集RP复合物时通常利用RBPs与RNAs之间保持天然结合的特性在体外条件下实现富集,然而利用非内源性RNA和蛋白质,在非体内环境的结合会产生相当程度的假阳性结果,高洗涤强度也会导致RP复合物中结合力低的组分丢失。而体内条件下形成的RP复合物比通过体外方法获得的RP复合物更具有生物学相关性,能更真实地反映体内RNA-蛋白质相互作用的生理状态,近年最新发展的富集策略主要是在体内环境下实现RP复合物的富集。同样,为了克服因洗脱造成的部分RP复合物丢失的难题,需要增强核酸与蛋白质的相互作用。最简单有效的方法就是进行交联(cross-linking),主要分为化学交联和紫外光(UV)交联。化学交联通常采用甲醛试剂——一种双功能交联剂,可轻易渗透细胞并在0.2 nm以内的大分子之间形成可逆的共价键,因而会形成蛋白质-蛋白质复合物干扰RP复合物的鉴定。紫外光交联则是在RP复合物研究中应用更为广泛的“零距离”交联方式,UV可特异性地引发蛋白质与RNA之间形成不可逆的共价交联,从而排除在甲醛交联中不可避免的蛋白质-蛋白质交联,降低结果的假阳性。UV交联无疑成为体内研究RP复合物的基础,围绕UV交

联诞生了许多经典的研究策略,下面将详细阐述。

### 1.1 UV 交联和免疫沉淀及衍生技术

2003 年 Darnell 等<sup>[8]</sup>提出了一种用于 RP 复合物富集的 UV 交联和免疫沉淀 (crosslinking and immunoprecipitation, CLIP) 策略,其目的是捕获并检测与特定蛋白质结合的 RNA 片段,他们使用 CLIP 策略联合 Sanger 测序鉴定到了 340 个与小鼠脑中剪接因子 Nova1、Nova2 相互作用的 RNA 序列。随后, Darnell 团队又对细节进行了优化<sup>[9]</sup>, CLIP 的技术路线是:首先通过 UV (254 nm) 照射使 RBP 与 RNA 共价交联,然后使用 RNA 酶 (RNase) 温和酶切,与 RBP 结合的 RNA 会因 RBP 的保护而留下一定长度的片段,再将 RNA 片段的 3'-磷酸基团进行去磷酸化,防止 RNA 片段的环化自连接,而 RNA 片段的 5'末端将进行放射性同位素标记 (<sup>32</sup>P 标记),接着用修饰有目标蛋白质抗体的微球/磁珠将目标 RBP 蛋白及 RNA 片段富集下来,再使用蛋白酶 K 将蛋白质降解,得到的 RNA 片段将采用逆转录-聚合酶链式反应技术 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 扩增,最后进行测序分析就可以得到目标 RBP 结合 RNA 的种类以及结合的位点信息,具体流程如图 1。

CLIP 技术一经提出就获得了高度关注,但是该方法也面临着通量低、UV 存在偏好性、穿透力弱、交联效率低 (大约仅为 1%~5%) 等问题。尽管可以通过对组织样品低温研磨和不断混合使 UV 更高效地穿透细胞促进样品的均匀交联,但高能量 UV 长时间照射可能会导致 RNA 的降解<sup>[10]</sup>。在此基础上,越来越多的研究者投入研究并不断改进,产生了许多各具特色的衍生 CLIP 技术。

为了提高交联效率, Hafner 等<sup>[11]</sup>发展了一种光活化核苷增强的 CLIP 策略 (photoactivatable-ribonucleoside-enhanced crosslinking and immu-

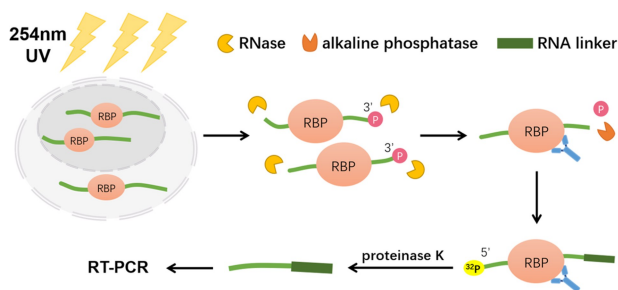


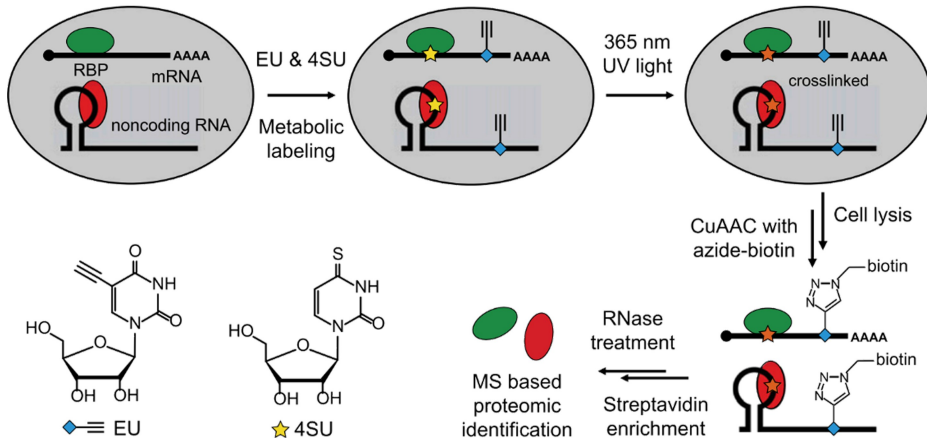
图 1 CLIP 技术鉴定 RNAs 蛋白结合位点示意图  
Fig. 1 A schematic representation of CLIP for identification of protein binding sites on RNAs

noprecipitation, PAR-CLIP)。他们将光活性更强的核苷代谢进入 RNA,可以使 RNA 和蛋白质在更长波长的 UV (如 365 nm) 照射下交联。具有代表性的核苷有 4-硫代尿苷 (4-thiouridine, 4SU) 和 6-硫代鸟苷 (6-thioguanosine, 6SG), 4SU 比 6SG 的交联效率更高。与常规的 254 nm UV 交联相比, PAR-CLIP 可将交联效率提高 100 到 1 000 倍。此外, PAR-CLIP 的另一项优势是, 4SU 与蛋白质发生交联后, 该位点在逆转录时受到非交联寡核糖核苷酸背景的影响, 多达 70% 的 RNA 序列中的尿嘧啶 (uracil, U) 被识别为胞嘧啶 (cytosine, C), 于是会得到相对应的 cDNA 序列中的胸腺嘧啶 (thymine, T) 到 C 的突变, 由此可推测该位点是 RBP 的结合位点。但是 PAR-CLIP 技术也有一定局限性: 由于需要在细胞培养时将 4SU 或 6SG 代谢进入 RNA, 此方法仅限于细胞水平, 不适用于组织样品; 细胞倾向于不使用非天然核苷酸类似物, 这限制了 4SU 或 6SG 代谢进入细胞的效率; 长时间的摄入 4SU 或 6SG 可能会引起细胞毒性<sup>[12]</sup>。因此, 仍然需要新的方法来提高交联效率并且实现对 RP 复合物的更深覆盖。

CLIP 及其衍生技术被广泛应用于酵母、真菌、哺乳动物的 RNA-蛋白质相互作用研究中。值得一提的是, Castello 等<sup>[13,14]</sup>利用 UV 交联结合 oligo (dT) 富集与质谱鉴定 poly(A) RBP, 发展了 RIC (RNA-interactome capture) 策略, 可以大规模富集 RBP。结合生物质谱技术, 该策略在人宫颈癌细胞 HeLa 中鉴定到 860 个高置信的 RBPs, 极大地补充了人们对 RBPs 的认知。然而, 这种方法基于 RNA 的 poly(A) 尾巴 (主要是 mRNA), 而 mRNA 仅占细胞中 RNA 总质量的 3%~5%<sup>[3]</sup>。并且不是所有 mRNA 都带有 poly(A) 尾巴<sup>[15]</sup>, poly(A) 的长度也不尽相同<sup>[16]</sup>, 导致部分 mRNA 也很难被 oligo (dT) 捕获。因此, RIC 策略遗漏了大量 RP 复合物, 无法鉴定 ncRNA-蛋白质复合物乃至全类型 RNA-蛋白质复合物。

### 1.2 基于“点击化学”的富集策略

鉴于 RIC 策略的局限性, 最近一种基于代谢标记结合“点击化学”反应的 RNA 捕获策略能够不依赖 RNA 的 poly(A) 尾巴, 更广泛的富集鉴定 RP 复合物。Huang 等<sup>[17]</sup>开发的 CARIC (click chemistry-assisted RNA-interactome capture) 策略能富集全类型 RP 复合物, 见图 2。其主要思路是: 首先将

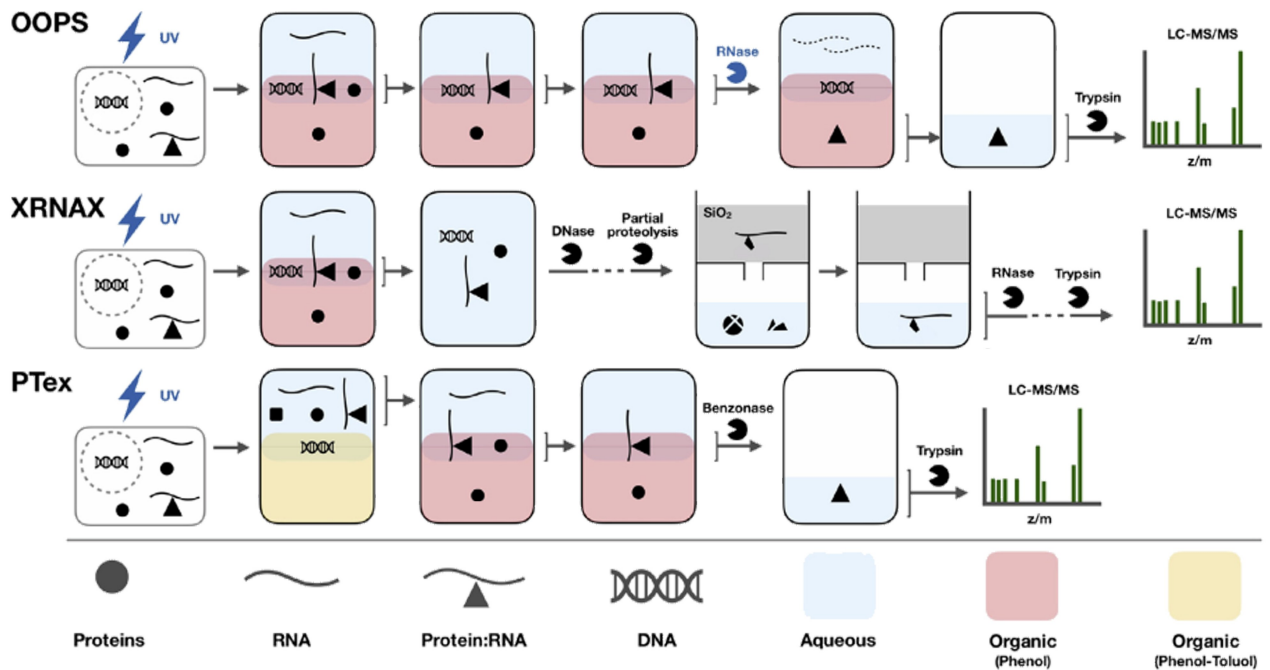
图 2 CARIC 策略工作流程示意图<sup>[17]</sup>Fig. 2 Schematic of the workflow of click chemistry-assisted RNA-interactome capture (CARIC)<sup>[17]</sup>

5-炔基尿苷 (5-ethynyluridine, 5-EU, 简称 EU) 与 4SU 代谢进同一条 RNA 中, EU 提供了进行点击化学反应的炔基, 然后在 UV 365 nm 照射下使 RNA 与 RBP 交联, 接着利用叠氮与炔基的生物正交“点击化学”反应在 EU 的位置上引入生物素基团, 最后利用生物素与链霉亲和素之间的强相互作用实现细胞中所有 RP 复合物的富集与捕获, 其中一部分使用蛋白酶 K 处理进行 RNA-seq 分析, 另一部分使用 RNase A 处理进行蛋白质组学分析。与之类似的, Bao 等<sup>[18]</sup>开发的 RICK (RNA interactome using click chemistry) 策略也利用代谢标记结合“点击化学”反应将生物素标记在 RNA 上用于富集鉴定, 不同之处是他们只将 EU 代谢进 RNA, 在 254 nm UV 条件下交联。利用这种基于“点击化学”的方法可以鉴定到除 mRNA 之外的各种类型的 ncRNA, 包括长非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA)、微小 RNA (microRNA, miRNA) 和核小 RNA (small nuclear, snRNA), 是方法学上的重大突破。然而, 由于需要将非天然核苷代谢进 RNA, 这种策略面临和 PAR-CLIP 类似的局限性, 例如仅限于细胞水平研究和存在一定的细胞毒性, 并且分析的灵敏性很大程度上取决于 EU 的代谢标记效率。

### 1.3 基于相分离的富集策略

早期研究 RNA 提取时常采用基于酸性苯酚的相分离法<sup>[19]</sup>。首先破碎细胞, 将核酸蛋白复合物中的蛋白质变性并释放出核酸, 接着采用苯酚抽提, 苯酚的诱导极化作用会使蛋白质内外翻转, 疏水性侧链暴露在外, 极性残基翻转到内部, 从而将水相中

的蛋白质萃取出来。同时, 由于 DNA 和 RNA 在特定 pH 值下的溶解度不同, 低 pH 条件下 (pH < 5) 的苯酚使 RNA 进入水相, 而 DNA 维持不溶解的状态。最终在酸性苯酚萃取下 RNA 进入上层水相, 而大多数 DNA 和蛋白质则保留在中间层或者下层有机相中。最近发展了一系列基于 UV 交联和相分离原理的富集策略, 交联后的 RP 复合物会集中在水相与有机相之间的界面, 再经过进一步纯化可以实现 RP 复合物的分离富集, 见图 3<sup>[20]</sup>。正交有机相分离 (orthogonal organic phase separation, OOPS) 策略<sup>[21]</sup>正是基于这种思路, 使用酸性异硫氰酸胍-苯酚-氯仿 (acidic guanidinium-thiocyanate-phenol-chloroform, AGPC) 作为有机相, 通过连续多次 AGPC 萃取后得到 RP 复合物, 然后通过 RNase 消化 RNAs 获得分配到有机相的 RBPs, 最后通过质谱鉴定在 HEK293、U2OS 和 MCF10A 3 种人类细胞系中共鉴定到了 1 838 个 RBPs, 包括 926 个推定的 RBPs, 其中约 80% 的 RBPs 与先前报道的不依赖 poly(A) 的策略 (CARIC 和 RICK) 结果一致, 这说明 OOPS 具有更全面的分离富集 RP 复合体的能力, 此外 OOPS 还可以进行 RNA-蛋白质相互作用的动态分析。另一种基于相分离的策略是苯酚-甲苯萃取 (phenol-toluol extraction, PTex) 策略<sup>[10]</sup>, 不同之处是有机相为 pH 7.0 的苯酚-甲苯 (50:50, v/v) 混合溶液。在这种体系下, RNAs、蛋白质和 RP 复合物分配在上层水相中, DNA 和脂质在中间层, 回收水相后与酸性苯酚混合进行多次萃取得到 RP 复合物。通过这种分离策略从 HEK293 细胞中鉴定出共 3 037 个 RBPs, 回收率约为 30% ~ 50%。

图 3 基于相分离的 RP 复合物富集方法<sup>[20]</sup>Fig. 3 Phase separation-based approaches to enrich RP-complexes<sup>[20]</sup>

为了进一步提高 RP 复合物的富集选择性,一种新的策略 XRNAX (protein-crosslinked RNA extraction) 联合 TRIzol (total RNA isolation) 试剂相分离与二氧化硅实现 RP 复合物的富集<sup>[22]</sup>。TRIzol 常用于总 RNA 分离纯化,能保持 RNA 的完整性,主要成分是苯酚。XRNAX 的主要思路是:首先利用 TRIzol 将 DNA、蛋白质和 RP 复合物分布在中间层,回收中间层后通过 DNase 消化 DNA。由于硅胶柱在标准条件下可以保留 RNA,但不保留与蛋白质交联的 RNA,通过蛋白酶部分酶解得到 RNA-肽段复合物使其可以保留在硅胶柱中,从而有效富集了 RNA-肽段复合物。除去非交联的肽段后,对 RBPs 的富集选择性从 69% 增加到 89%。结合在 3 种细胞系 (MCF7、HeLa 和 HEK293) 中的应用结果,共鉴定到 1 753 个 RBPs,其中有 858 个 RBPs 是 3 种细胞系共有的。

相分离策略不依赖于 RNA 特定序列,完全根据 RP 复合物的理化性质实现分离富集,然而由于利用了 UV 交联,相分离策略也面临着 UV 偏好性、穿透力弱、交联效率低等问题,而且糖蛋白具有与 RP 复合物类似的理化性质,可能会污染富集产物。

## 2 总结与展望

RP 复合物富集策略的创新使方法学取得

了重大进步,从而大大提高了 RBP 在不同物种中的覆盖深度,为基因表达和转录后调控的研究提供了重要的参考依据。本文对不同方法的优缺点进行了比较和讨论,以方便研究者们选择合适的策略来解决感兴趣的生物学问题。由于当前的 RP 复合物富集方法仍然存在效率低和操作繁琐等问题,因此迫切需要高效、易于实施并适用于不同类型样品的新方法。目前亟待解决的问题包括:1) 基于 UV 或甲醛的交联策略仍存在选择性和交联效率有限等局限,因此需要开发新的交联剂或交联策略。2) 目前已经成功鉴定出数千个 RBPs,而与 RNAs 的结合 RBP 位点鉴定数量却较少(仅报道了几百个)。因此,需要更为特异的 RNA-蛋白质交联策略和高灵敏度质谱分析方法。3) 目前用于验证新发现的 RBPs 的方法通量较低,难以满足大规模验证 RNA-蛋白质相互作用的重大需求。

## 参考文献:

- [1] Muller-Mcnicoll M, Neugebauer K M. *Nat Rev Genet*, 2013, 14(4): 275
- [2] Chu C, Zhang Q C, Da Rocha S T, et al. *Cell*, 2015, 161(2): 404
- [3] Jankowsky E, Harris M E. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2015, 16(9): 533
- [4] Pereira B, Billaud M, Almeida R. *Trends Cancer*, 2017, 3(7): 506

- [ 5 ] Brinegar A E, Cooper T A. *Brain Res*, 2016, 1647: 1
- [ 6 ] Anderson D M, Cannavino J, Li H, et al. *Proc Natl Acad Sci*, 2016, 113(31): E4494
- [ 7 ] Wolozin B, Ivanov P. *Nat Rev Neurosci*, 2019, 20(11): 649
- [ 8 ] Ule J, Jensen K B, Ruggiu M, et al. *Science*, 2003, 302(5648): 1212
- [ 9 ] Ule J, Jensen K B, Mele A, et al. *Methods*, 2005, 37(4): 376
- [ 10 ] Urdaneta E C, Vieira Vieira C H, Hick T, et al. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 990
- [ 11 ] Hafner M, Landthaler M, Burger L, et al. *Cell*, 2010, 141(1): 129
- [ 12 ] Burger K, Muhl B, Kellner M, et al. *RNA Biol*, 2013, 10(10): 1623
- [ 13 ] Castello A, Fischer B, Eichelbaum K, et al. *Cell*, 2012, 149(6): 1393
- [ 14 ] Castello A, Horos R, Strein C, et al. *Nat Protoc*, 2013, 8(3): 491
- [ 15 ] Yang L, Duff M O, Graveley B R, et al. *Genome Biol*, 2011, 12(2): 1
- [ 16 ] Chang H, Lim J, Ha M, et al. *Mol Cell*, 2014, 53(6): 1044
- [ 17 ] Huang R, Han M, Meng L, et al. *Proc Natl Acad Sci*, 2018, 115(17): E3879
- [ 18 ] Bao X, Guo X, Yin M, et al. *Nat Methods*, 2018, 15(3): 213
- [ 19 ] Chomczynski P, Sacchi N. *Nat Protoc*, 2006, 1(2): 581
- [ 20 ] Smith T, Villanueva E, Queiroz R M L, et al. *Curr Opin Chem Biol*, 2020, 54: 70
- [ 21 ] Queiroz R M L, Smith T, Villanueva E, et al. *Nat Biotechnol*, 2019, 37(2): 169
- [ 22 ] Trendel J, Schwarzl T, Horos R, et al. *Cell*, 2019, 176(1/2): 391