



紫外交联免疫沉淀技术原理及其应用*

杜亚琼¹⁾ 王琬瑶¹⁾ 高帆¹⁾ 徐旻^{2)**} 时文涛^{1)**}

(¹⁾ 天津医科大学基础医学院遗传学系, 天津 300070; (²⁾ 南开大学医学院, 天津 300071)

摘要 紫外交联免疫沉淀 (UV cross-linking immunoprecipitation, CLIP) 技术最初建立于2003年。通过紫外交联、免疫沉淀、逆转录及后续的高通量测序等步骤, 可在全转录组范围鉴定特定RNA结合蛋白 (RNA-binding proteins, RBP) 的靶标RNA序列和结合位点。在近20年的应用过程中, 该技术被不断改进和完善, 可操作性、实验结果的准确性都有所提升, 技术的应用范围也有所拓展。本文对CLIP技术的基本原理、实验方法、实际应用进行介绍, 着重比较几种主流CLIP技术的异同, 并对如何选择具体的技术路线提出建议。

关键词 紫外交联免疫沉淀, 高通量测序, RNA结合蛋白

中图分类号 Q513, Q522

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0071

RNA在遗传中心法则中处于承上启下的位置, 不仅是蛋白质合成的模板, 其本身也在细胞的各种生命活动中发挥重要作用。RNA结合蛋白 (RBP) 在RNA分子转录与转录后加工的各个层面具有重要的调控作用, 如mRNA前体的加工 (剪接、加帽和加尾)、RNA分子的各种修饰、蛋白质的翻译、RNA在细胞中的定位、稳定性的维持及降解等过程, 都离不开RBP的调控^[1]。常见的RNA结合结构域 (RNA binding domain, RBD) 包括RNA识别基序 (RNA-recognition motif, RRM)、K同源结构域 (K-homology, KH)、双链RBD (double-chain RBD, dsRBD)、冷休克结构域 (cold shock domain, CSD)、精氨酸-甘氨酸-甘氨酸结构域 (arginine-glycine-glycine, RGG)、富酪氨酸结构域 (tyrosine-rich domain) 和锌指结构域 (zinc fingers, ZnF) 等^[2]。不同的RBD在数量和排列顺序上存在多样的组合, 与RNA上的特定基序或二级结构相结合, 实现了RBP功能的多样性^[1]。通过质谱分析, 研究人员已在人类细胞中鉴定出超过1 000种能与RNA结合的蛋白质, 其中包括一些RNA酶和缺乏典型RNA结合域的蛋白质^[3]。在整个转录组中鉴定某种RBP的靶标序列, 可以更全面系统地了解其功能。

最近的研究发现, 很多RBP内并没有上述经

典RBD。对这些非经典RBP的鉴定, 有赖于新技术的帮助^[4], 明确与RBP结合的RNA分子及其结合位点是开展新技术的关键步骤^[5]。为了确定RBP-RNA的相互作用, 必须要维持二者的结合状态, 同时确保仅纯化单个特定的RBP。为此, 人们开发了紫外交联免疫沉淀 (CLIP) 技术, 即直接在活细胞或组织中进行紫外交联, 形成稳定的化学共价键固定RNA与RBP间的相互作用, 免疫沉淀获得特定RBP-RNA复合物, 测序鉴定与特定RBP结合的RNA类别。与较为常见的RNA结合蛋白免疫沉淀 (RNA binding protein immunoprecipitation, RIP) 相比, CLIP能够更加全面、特异识别RBP在生理条件下的RNA底物, 反映RNA与蛋白质在体内的结合情况^[6]。为了实现不同的实验目的, 人们尝试了多种紫外交联条件和免疫共沉淀方法, 对CLIP技术进行改进和完善, 并建立了一系列相关技术 (表1)。这项技术的进展对系统认识RBP参与的重要生命活动及进一步阐明某些疾病发生的复杂分子机制具有重要意义^[7]。

* 国家自然科学基金 (32170649, 81802091) 资助项目。

** 通讯联系人。

时文涛 Tel: 022-83336567, E-mail: shiwentao@tmu.edu.cn

徐旻 Tel: 13920276603, E-mail: xuyang@nankai.edu.cn

收稿日期: 2023-03-03, 接受日期: 2023-04-25

Table 1 Classification of CLIP technologies

表1 紫外交联免疫沉淀技术分类

	简称	全称	参考文献
主流CLIP技术	HITS-CLIP	紫外交联免疫沉淀结合高通量测序技术	[7]
	PAR-CLIP	光活性增强的核糖核苷紫外交联免疫沉淀技术	[8]
	iCLIP	单核苷酸分辨率紫外交联免疫沉淀技术	[9]
	eCLIP	增强型紫外交联免疫沉淀技术	[10]
	irCLIP	红外成像紫外交联免疫沉淀技术	[11]
衍生CLIP技术	PAPERCLIP	PolyA结合蛋白介导的mRNA 3'端获取CLIP技术	[12]
	cTag-PAPERCLIP	条件性标记PAPERCLIP技术	[13]
	hiCLIP	RNA杂交和单核苷酸分辨率CLIP技术	[14]
	tiCLIP	多时间点iCLIP技术	[15]

1 主流CLIP技术

1.1 HITS-CLIP

最早被人们建立的技术称为紫外交联免疫沉淀结合高通量测序技术 (high-throughput sequencing with crosslinking-immunoprecipitation, HITS-CLIP), 又称为 CLIP-seq, 在全转录组水平揭示 RNA 与 RBP 相互作用, 依赖于紫外线 (UV) 交联诱导的碱基突变来定位蛋白质-RNA 结合位点。其实验部分主要包括蛋白质-RNA 交联共沉淀样品制备和高通量测序两部分。在 HITS-CLIP 技术建立之前, 人们主要应用 RIP 技术开展对 RBP 的研究, 但 RIP 存在特异性低和分辨率欠佳的问题, 不能准确重现体内生理条件下 RBP 与 RNA 的结合状态 [6]。与 RIP 技术相比, HITS-CLIP 技术增加了紫外交联和 RNA 酶消化步骤, 目标蛋白和 RNA 之间的结合更加紧密, 并能获得 RBP 在 RNA 上的结合位点信息。

HITS-CLIP 的基本步骤如图 1 所示, 包括:

a. UV-C (254 nm) 对单层细胞以 150 mJ/cm² 的能量照射约 40 s, 维持 RNA 与 RBP 共价结合的状态;

b. 在细胞裂解液用 RNase I 消化未与 RBP 结合的游离 RNA, RBP 覆盖区两侧的单链 RNA 也被 RNase I 消化, 并在其 5'端和 3'端分别留下羟基和磷酸基;

c. 应用与 RBP 特异结合的抗体免疫沉淀 RBP-RNA 复合物, 以 ³²P-γ-ATP 为底物, 用 T4 多聚核苷酸激酶 (PNK) 将 ³²P 转移至 RNA 的 5'羟基末端;

d. 使用 RNA 连接酶向 RNA 的 5'端添加接头 (adaptor);

e. 碱性磷酸酶催化 RNA 3'端磷酸基转变为羟基;

f. 通过电泳、转膜、放射自显影等步

骤, 对 RBP-RNA 复合物进行分离纯化; g. 蛋白酶 K 消化 RBP, 释放 RNA; h. 应用 RNA 连接酶在 RNA 3'端添加接头; i. 应用 urea-TBE gel 纯化 RNA, 去除多余的接头; j. 应用与接头序列互补的引物, RT-PCR 构建测序文库; k. 高通量测序鉴定与 RBP 特异结合的所有 RNA 分子。

HITS-CLIP 技术实现了全转录组层面上 RBP 结合位点信息的获取, 对 RBP 的研究起到了巨大的推动作用。2003 年 Ule 等 [16] 首次揭示了 NOVA 蛋白在小鼠大脑神经元细胞中参与 pre-mRNA 的剪接, 并鉴定了受 NOVA 蛋白调控的 RNA 种类。2008 年 Licatalosi 等 [17] 应用 HITS-CLIP 进一步揭示了 NOVA 蛋白参与 RNA 3'端加工的分子机制。2021 年 O'Connor 等 [18] 通过该技术阐明了白色和棕色脂肪细胞中 Argonaute (AGO) 蛋白参与调控 miRNA 与 mRNA 相互作用的分子机制。另外, 该技术还帮助人们发现, 雌激素受体 (ERα) 不仅能与 DNA 结合参与转录调控, 它还是一种 RBP, 通过参与 RNA 的代谢维持乳腺癌细胞的生存能力及其抗药性 [19]。

HITS-CLIP 技术需要的原始样本量较大, 实验步骤比较繁琐且需用到放射性同位素, 对实验室条件要求较高。此外, 若目的蛋白可与多种 RNA 结合, HITS-CLIP 不能分辨各种 RNA 分子的比例和精确的结合位点 [20]。

1.2 PAR-CLIP

为解决 HITS-CLIP 交联效率低的问题, Hafner 等 [21] 开发了光活性增强的核糖核苷 CLIP (photoactivatable-ribonucleoside-enhanced CLIP, PAR-CLIP) 技术。该技术核心在于利用具有光敏

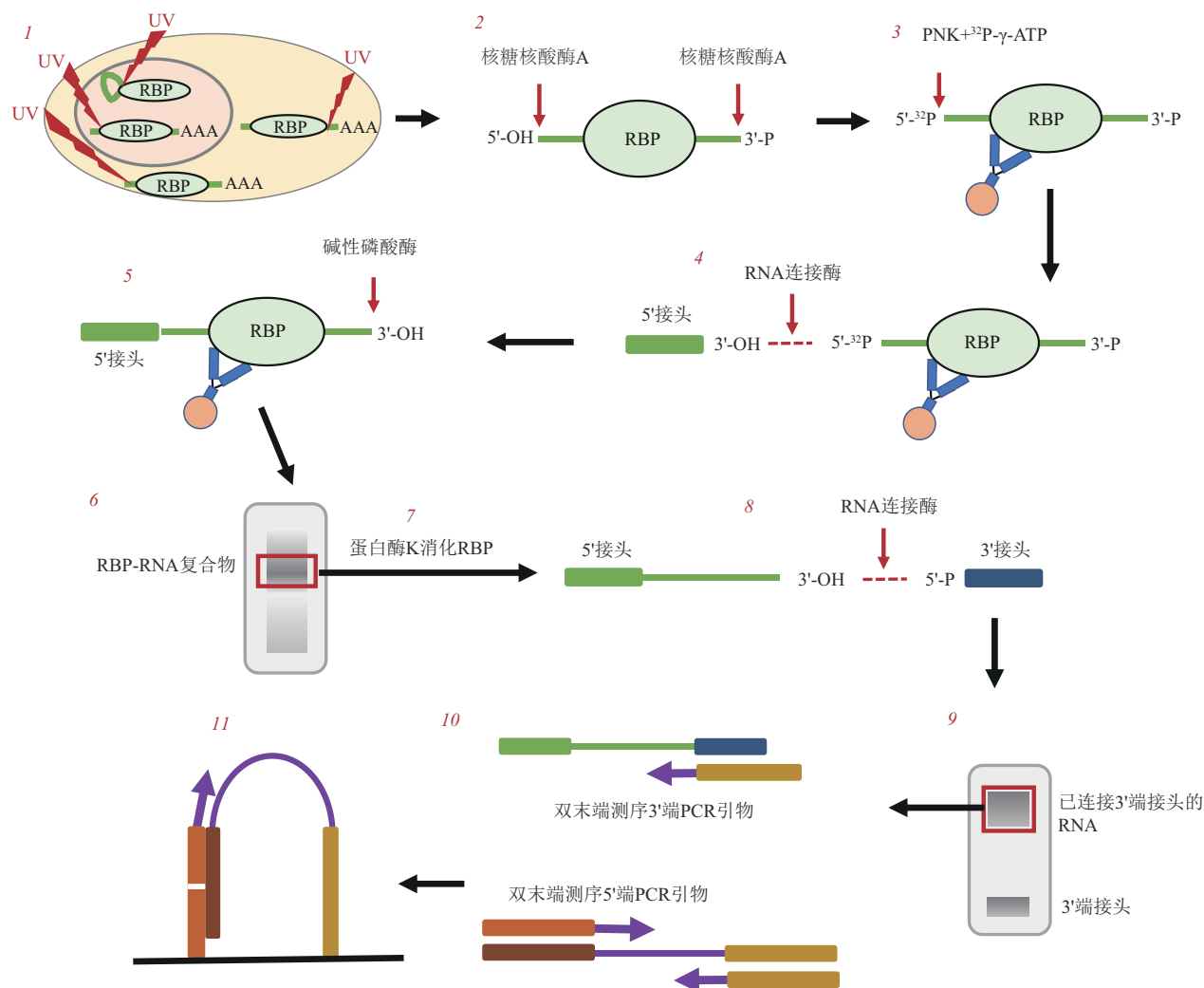


Fig. 1 Basic experimental process of HITS-CLIP

图1 紫外交联免疫沉淀结合高通量测序技术 (HITS-CLIP) 基本实验流程

活性的核苷类似物代替体内正常核苷掺入到新生成的转录本中, 如将4-硫代尿苷(4-SU)或6-硫代鸟苷(6-SG)掺入RNA链中代替原本的U或G, 每40个尿苷核苷中大约有1个发生4-SU替代, 在交联位点上还可能引起U到C的转换。另一方面, 由于交联位点对光敏核苷的偏好性, UV-A (365 nm) 照射使RBP与掺入了4-SU或6-SG的靶标序列结合更紧密, 提高了对特异性结合位点的识别和检测能力, 并通过降低背景噪音获得了更高的分辨率^[8]。Hafner等^[21]应用该技术鉴定出了多种可与RBP结合的特异RNA序列, 并发现RBP更倾向于与RNA中的蛋白质编码序列结合。脆性X染色体综合征致病基因*FMRI*编码的蛋白质是一种

RNA结合蛋白, Ascano等^[22]用PAR-CLIP技术鉴定了其参与调控的mRNA种类, 进一步阐明了该基因变异致病的分子机制。

PAR-CLIP仅适合应用于体外培养细胞^[23], 核苷类似物的掺入会产生细胞毒性, 难以大规模应用在动物实验, 且由于PCR带来的扩增偏好性仍然存在, 分辨率的提高比较有限^[24]。

1.3 iCLIP

为进一步提高CLIP技术的分辨率, 单核苷酸分辨率CLIP (individual nucleotide resolution CLIP, iCLIP) 技术应运而生^[9]。iCLIP前半部分实验步骤与HITS-CLIP基本相同, 后半部分则进行了改进(图2)。SDS-PAGE及转膜后, 用蛋白酶K消化保

留在醋酸纤维素膜上的 RBP-RNA 复合物, 从而将一段与 RNA 紧密结合的短肽链保留在了后续提取到的 RNA 样本上^[25]。在下一步的逆转录过程中, 所应用的引物不仅可以与 RNA 的 3' 端接头互补, 在引物 5' 端还携带了一段随机标签序列 (barcode), 且引物序列中存在一个 *Bam*HI 核酸内切酶位点^[26]。逆转录出的 cDNA 在延伸过程中, 一旦遇到与 RNA 紧密结合的短肽, 延伸即终止在了与 RBP 交联位点的前一个核苷酸。用单链 DNA 环化连接酶将逆转录出的 cDNA 进行环化, *Bam*HI 核酸内切酶在逆转录引物序列中间将环化 DNA 切断, 重新得到线性 DNA 单链^[25]。环化及酶切的步骤巧妙地将逆转录延伸得到的 cDNA 末端转移到了单链 DNA 的中间位置, 从而在后续的高通量测序结果中得到交联位点的序列信息, 即在单核苷酸水平上精准定

位了蛋白质和 RNA 的结合位点^[27]。2020 年, Buchbender 等^[28]对 iCLIP 进行改进, 建立了 iCLIP2 技术, 他们将单端接头连接改为双端接头连接, 用磁珠代替凝胶电泳对 cDNA 产物进行筛选与纯化, 进一步优化了 iCLIP 技术。

iCLIP 技术使 RNA 与蛋白质结合位点的分辨率得到了极大的提高, 并且随机标签序列的加入, 可以在测序结果分析步骤消除 PCR 扩增所带来的偏倚, 但其不足之处在于实验步骤比较繁琐, 环化过程效率较低, 进而导致建库成功率低, 且仍需应用放射性同位素^[24]。因此需要一种新的技术能够在提高分辨率和简化实验流程中取得一个平衡, 由此催生了增强型紫外交联免疫沉淀技术 (enhanced CLIP, eCLIP) 技术^[10]。

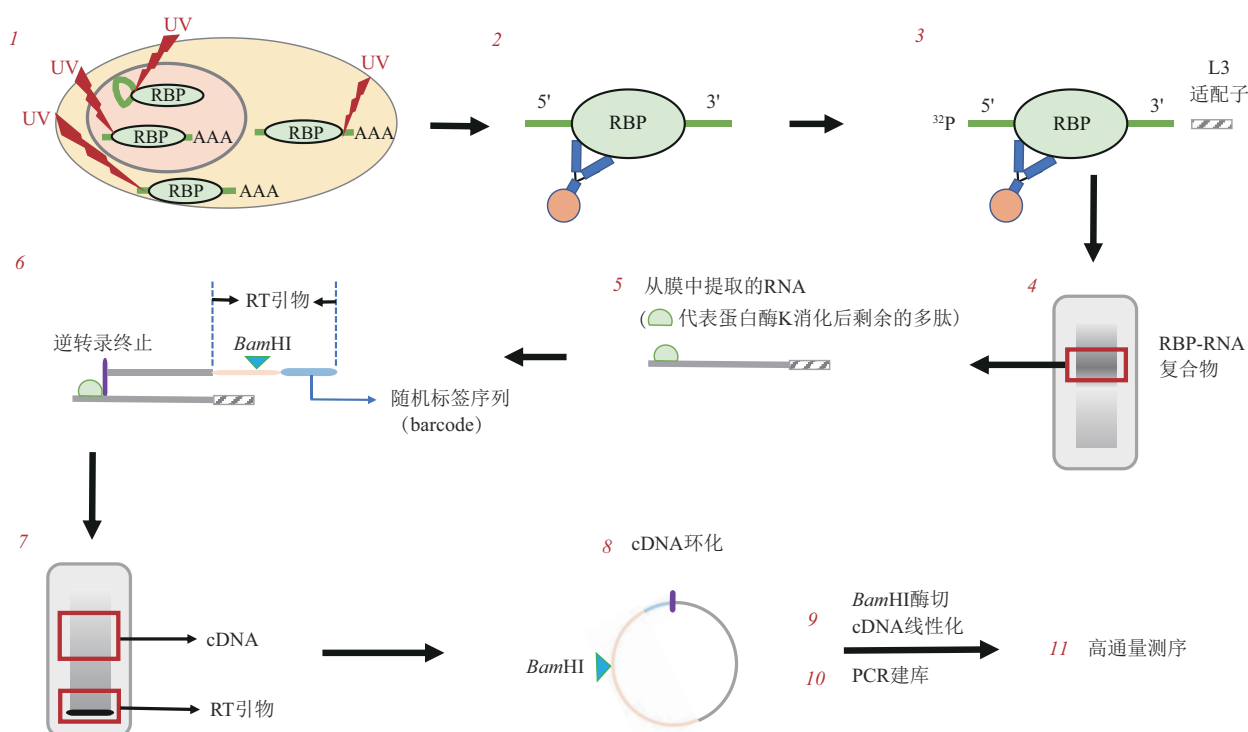


Fig. 2 Basic experimental process of iCLIP

图2 单核苷酸分辨率紫外交联免疫沉淀技术 (iCLIP) 基本实验流程

1.4 eCLIP

为解决 iCLIP 技术 cDNA 环化效率低的缺点, eCLIP 技术将接头添加变为两个独立的步骤: a. 将 RNA 接头连接到交联的 RNA 片段 3' 端; b. 逆转录

完成后, 将 ssDNA 接头连接到 cDNA 的 3' 端^[10]。如上文所述, 逆转录可终止于 RBP 的结合位点, 因此 ssDNA 接头与其 3' 端的 cDNA 片段的连接位点同样为 RBP 结合位点上游的一个核苷酸, 与 iCLIP

一样具有单核苷酸水平的RBP结合位点分辨率^[29]。此外, ssDNA接头中包含两种随机标签序列(长度分别为5 nt和10 nt),从而可以区分测序后得到的两个相同序列的读长(reads)是来源于不同的cDNA还是来源于同一个cDNA分子的PCR扩增产物^[10]。另外,在接头连接过程中,Shishkin等^[30]提高了T4 RNA连接酶的浓度,并添加高浓度聚乙二醇(PEG8000)和二甲基亚砜(DMSO),使连接效率分别超过90%和70%,减少了因连接失败而导致的RNA片段损失。eCLIP技术还省略了RNA放射性标记和放射自显影步骤,这些改进将实际操作时间缩短至4 d^[10]。

1.5 irCLIP

eCLIP技术省略了放射自显影步骤,操作更为简便,但研究者在实验初期无法评估免疫沉淀的效率。Zarnegar等^[11]在2016年建立了红外成像紫外交联免疫沉淀技术(infrared-CLIP, irCLIP),对此进行了改进。irCLIP技术所应用的RNA 3'端接头,通过叠氮化物分子与二苯并环辛炔(DBCO)的点击化学反应(click-chemistry),偶联了红外染料(IR 800)(图3)。将RBP-RNA-适配子复合物进行SDS-PAGE电泳后,在LI-COR Odyssey红外成像仪上即可成像,并分选出目的范围的条带。蛋白酶K消化RBP后,还可以很便捷地在硝酸纤维素膜上通过斑点杂交及红外成像对纯化的RNA进行定量分析^[31]。另外,irCLIP对一些技术细节进行了改进:a.不将RNA酶直接加入到紫外交联后的细胞裂解液中,而是先进行免疫沉淀,将RBP-RNA复合物保留在磁珠上进行RNA酶消化,这样可以显著提高RNA的产量;b.选用了效率更高的逆转录酶,如TGIRT-III,得到的cDNA量比SuperScript III逆转录酶提高了4~8倍;c.蛋白酶K消化过程中,用SDS替代尿素,有效提高了RNA的回收率^[11]。上述优化,让实验所需的初始细胞量大幅度降低,例如应用iCLIP技术,从初始的50万个细胞中,最终能通过高通量测序获得约 20×10^6 个读长,而应用irCLIP技术获得同样数量的读长仅需2万个初始细胞^[31]。Kaczynski等^[32]在2019年对irCLIP的实验流程进一步优化,建立了用时更短的Quick-irCLIP技术。

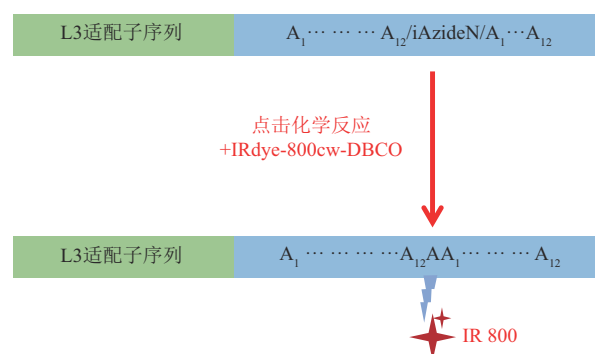


Fig. 3 Preparation of 3' adaptor for irCLIP

图3 红外成像紫外交联免疫沉淀技术(irCLIP) 3'端接头的制备

2 衍生的CLIP技术

2.1 PAPERCLIP

同一个基因转录出的pre-mRNA分子,在不同类型的组织细胞中,3'端加尾的位置存在差异,从而导致3'非翻译区(UTR)中保留下来的顺式作用元件存在差异,这种现象称为选择性多聚腺苷酸化(alternative polyadenylation, APA)。APA可以影响mRNA的稳定性和翻译效率,是不同类型细胞调控基因表达的一种转录后加工方式。polyA位点的多样性不仅可以影响正常的细胞增殖、分化,还与某些疾病的发生发展相关。RNA-seq在精确定位polyA位点方面的能力有限,因此依赖于现有的polyA位点来识别潜在的APA变化和基于oligo(dT)引物的APA定位方法存在一定局限性。

为解决上述问题,Hwang等^[12]开发了polyA结合蛋白介导的mRNA 3'端获取CLIP技术(polyA binding protein-mediated mRNA 3' end retrieval by CLIP, PAPERCLIP)。polyA结合蛋白(polyA binding protein, PABP)能识别成熟mRNA的polyA尾并与之结合。紫外交联后,应用PABP抗体进行免疫沉淀,并进行后续的逆转录及高通量测序。该技术可以在转录组水平鉴定相应细胞内表达的mRNA,特别是能准确获得polyA上游的3'UTR序列,从而可用于研究不同细胞APA的变化,并探索特定细胞中3'UTR中发挥作用的顺式作用元件,如某种miRNA的结合位点等^[12]。

在 PAPERCLIP 的基础上, 该课题组又建立了条件性标记 PAPERCLIP 技术 (“conditionally” tagged PAPERCLIP, cTag-PAPERCLIP)^[13]。通过构建转基因小鼠, 在选定的小鼠组织细胞类型中条件性敲入 PABP-GFP 融合基因, 应用 GFP 抗体进行免疫沉淀, 从而不必进行细胞分选就可以分析某种组织中特定类型细胞的 APA 状态。如针对小鼠大脑中兴奋性神经元、抑制性神经元、星形细胞、小胶质细胞分别构建条件性敲入小鼠, 通过 cTag-PAPERCLIP 技术即可比较这 4 种细胞中相同基因的 APA 状态差异^[13], 从而更深入地理解 3'UTR 区参与转录后调控过程的分子机制。

2.2 hiCLIP

RNA 分子转录后所形成的二级结构, 同样是影响转录后调控的重要因素^[33]。最常见的二级结构是 RNA 双链 (RNA duplexes), 包括分子内序列配对形成的双链如茎环结构, 以及两个分子间形成的双链, 如 miRNA-mRNA、lncRNA-mRNA、mRNA-mRNA 之间均有可能发生互补配对^[14]。Sugimoto 等^[34]建立了 RNA 杂交和单核苷酸分辨率 CLIP 技术 (RNA hybrid and individual-nucleotide resolution CLIP, hiCLIP), 用于鉴定与 RBP 结合的 RNA 双链。hiCLIP 特有的步骤是, 免疫沉淀后, 将未与 RBP 直接结合的部分 RNA 单链消化, 再用特定的接头序列将两段与 RBP 直接结合的 RNA 连接在一起形成一条单链。经过后续纯化、逆转录及高通量测序后, 将测序结果与参考转录组比对, 从而明确与该 RBP 相结合的所有双链 RNA 由哪些基因编码, 形成双链的两条单链来源于同一个基因还是不同的基因。

应用 hiCLIP 技术, Sugimoto 等^[34]发现 STAU1 作为 RBP 可与近 3 000 种 mRNA 中的双链结构结合, 这些双链结构有 75% 位于 mRNA 的 3'UTR, 20% 位于编码序列。进一步分析发现, 在蛋白质编码区存在双链结构的 mRNA, 其翻译为蛋白质的效率较低。而仅在 3'UTR 存在双链结构的 mRNA 则翻译效率较高。这些结果提示, 当核糖体与 mRNA 的编码区结合时, STAU1 与双链结构解离, 从而让双链解离为单链, 完成 mRNA 到蛋白质的翻译。

2.3 tiCLIP

前文所述方法都聚焦于某一个特定时间点 RNA-RBP 的稳定结合状态, 无法观察 RBP 和 RNA 结合的动态变化。为了捕获二者结合的动态过程, 尤其是转录早期阶段的 RNA-RBP 结合谱,

Cordiner 等^[15]在 2023 年发表了多时间点 iCLIP 技术 (temporal-iCLIP, tiCLIP)。首先用转录抑制剂 5,6-二氯-1- β -D-呋喃核糖基苯并咪唑 (DRB) 处理细胞, 记为时间 0 点, 并在此时进行紫外交联, 收集样品。去除 DRB, 用正常培养液恢复细胞的转录过程, 并在 5、10、15、20、40 及 60 min 时间点进行紫外交联并收集样品。ALYREF、RBM7、CBP20、CBP80 均与 RNA 聚合酶 II (RNAPII) 参与的转录过程密切相关, 应用针对上述 4 种 RBP 的抗体对各个时间点的样品进行免疫沉淀, 并分析与它们结合的 RNA 序列特征, 从而鉴定这几种 RBP 在不同时间点所参与的转录相关步骤。结果发现, 这 4 种 RBP 均与新转录的 RNA 存在相互作用, 但它们参与转录过程的时间点还存在细微差别, 如 ALYREF 和 RBM7 都会与 RNA 剪接中间体结合, 但分别参与了剪接过程中的第一次和第二次酯交换步骤。另外, RBM7 还参与了小核仁 RNA (snoRNA) 3'端的加工过程。

3 总结与展望

总的来说, HITS-CLIP 技术首次将高通量测序与 CLIP 技术相结合, 254 nm 紫外交联和 RNA 酶消化步骤使该技术得以捕捉细胞内 RNA 和蛋白质的瞬时相互作用, 但在紫外交联的穿透性、效率等方面有一定局限性, 分辨率较低^[17]。PAR-CLIP 使用具有光敏活性的核糖核酸衍生物标记并用 365 nm 紫外线交联, 提高了交联效率和分辨率, 交联介导的单碱基突变提供了比较准确的结合位点信息, 减少了背景序列的干扰, 但长期替代核苷酸掺入会产生细胞毒性, 可能让实验结果产生偏差^[21]。iCLIP 通过环化 cDNA 及后续的再次线性化步骤, 提升了分辨率, 在单核苷酸水平上确定 RBP-RNA 交联位点, 但其反应步骤较多, 环化效率不高^[9]。eCLIP 通过两个步骤分别独立添加接头, 降低了 RNA 损失, 极大提高了建库成功率, 减少了 PCR 扩增带来的误差, 靶标识别率显著提高^[10]。在此基础上 2017 年又出现了 seCLIP, 是 eCLIP 的简化改良版, 支持单端测序, 降低了成本^[35]。irCLIP 技术用红外染料代替了放射性同位素, 实验需要的初始细胞数量也大幅度降低, 但操作过程中需要用到红外成像扫描仪^[11]。此外, 人们还开发了如 PAPERCLIP、hiCLIP、tiCLIP 等衍生技术, 用于解决更为具体的科学问题。表 2 展示了几种主流 CLIP 技术的优势及不足。

Table 2 Comparison of 5 mainstream CLIP technologies
表2 5种主流紫外交联免疫沉淀技术比较

	HITS-CLIP	PAR-CLIP	iCLIP	eCLIP	irCLIP
是否使用核苷类似物	否	使用4-SU或6-SG	否	否	否
紫外光波长	254 nm	365 nm	254 nm	254 nm	254 nm
接头序列	两端添加	两端添加	分子内环化	两端添加	两端添加
特异位点识别	无	U到C或G到A	cDNA截断处	无	无
优势	可广泛应用于细胞、组织	UV交联效率较高; 鉴定结合位点有较高信噪比	鉴定结合位点时有较高信噪比	去掉了放射性步骤, 缩短了实验时间, 设立对照组	RNA产量、RNA回收率和得到的cDNA量显著提高
劣势	结合位点的突变率较低	核苷酸类似物对细胞有潜在毒性	技术更复杂, 操作难度大	结果一致性略低	技术复杂, 时间较长

综上所述, 几种主流的 CLIP 技术在实际操作中均有其优势和不足, 在选择技术路线时, 应综合考虑自己的实验目的和实验条件: 如是否需要明确与 RBP 结合的精确 RNA 位点; 是否有操作放射性同位素的实验条件或进行红外成像的条件; 初始样本量的多寡等。另外, CLIP 技术的步骤相对比较多, 且可划分为几个连续的实验模块, 可以尝试综合几种主流技术的模块来满足自己的实验要求, 对其不断改进和完善, 根据研究内容建立更为有针对性的衍生 CLIP 技术。RBP 与不同种类、不同结构及不同修饰状态的 RNA 分子协同发挥作用, 对细胞生命活动的重要性不言而喻, CLIP 技术将有助于逐步探索其中涉及的重要分子机制及其生物学意义。

参 考 文 献

[1]

Corley M, Burns M C, Yeo G W. How RNA-binding proteins interact with RNA: molecules and mechanisms. *Mol Cell*, 2020, **78**(1): 9-29

[2]

Pereira B, Billaud M, Almeida R. RNA-binding proteins in cancer: old players and new actors. *Trends Cancer*, 2017, **3**(7): 506-528

[3]

Baltz A G, Munschauer M, Schwanhusser B, *et al.* The mRNA-Bound proteome and its global occupancy profile on protein-coding transcripts. *Mol Cell*, 2012, **46**(5): 674-690

[4]

Shawky A E M, Dondeti M, Mourelatos Z, *et al.* Solid-support directional (SSD) RNA-Seq as a companion method to CLIP-Seq. *Methods Mol Biol*, 2022, **2509**: 251-268

[5]

樊智雅, 秦伟捷. 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. *色谱*, 2021, **39**(2): 105-111
Fan Z Y, Qin W J. *Chinese Journal of Chromatography*, 2021, **39**(2): 105-111

[6]

Miriam G, R M M. RIP: RNA immunoprecipitation. *Methods Mol Biol*, 2016, **1480**: 73-86

[7]

Ule J, Jensen K, Mele A, *et al.* CLIP: a method for identifying protein-RNA interaction sites in living cells. *Methods*, 2005, **37**(4): 376-386

[8]

Danan C, Manickavel S, Hafner M. PAR-CLIP: a method for transcriptome-wide identification of RNA binding protein interaction sites. *Methods Mol Biol*, 2016, **1358**: 153-173

[9]

König J, Zarnack K, Rot G, *et al.* ICLIP reveals the function of hnRNP particles in splicing at individual nucleotide resolution. *Nat Struct Mol Biol*, 2010, **17**(7): 909-915

[10]

Nostrand E L V, Pratt G A, Shishkin A A, *et al.* Robust transcriptome-wide discovery of RNA-binding protein binding sites with enhanced CLIP (eCLIP). *Nat Methods*, 2016, **13**(6): 508-514

[11]

Zarnegar B J, Flynn R A, Shen Y, *et al.* IrCLIP platform for efficient characterization of protein-RNA interactions. *Nat Methods*, 2016, **13**(6): 489-492

[12]

Hwang H W, Park C Y, Goodarzi H, *et al.* PAPERCLIP identifies microRNA targets and a role of cstf64/64tau in promoting non-canonical poly(A) site usage. *Cell Rep*, 2016, **15**(2): 423-435

[13]

Hwang, Hun-Way, Saito, *et al.* CTag-PAPERCLIP reveals alternative polyadenylation promotes cell-type specific protein diversity and shifts araf isoforms with microglia activation. *Neuron*, 2017, **95**(6): 1334-1349

[14]

Yoichiro, Sugimoto, Alessandra, *et al.* HiCLIP reveals the *in vivo* atlas of mRNA secondary structures recognized by staufen 1. *Nature*, 2015, **519**(7544): 491-494

[15]

Cordiner R A, Dou Y, Thomsen R, *et al.* Temporal-iCLIP captures co-transcriptional RNA-protein interactions. *Nat Commun*, 2023, **14**(1): 696

[16]

Ule J, Jensen K B, Ruggiu M, *et al.* CLIP identifies Nova-regulated RNA networks in the brain. *Science*, 2003, **302**(5648): 1212-1215

[17]

Licalosi D D, Mele A, Fak J J, *et al.* HITS-CLIP yields genome-wide insights into brain alternative RNA processing. *Nature*, 2008, **456**(7221): 464-469

[18]

O'connor S, Murphy E A, Szwed S K, *et al.* AGO HITS-CLIP reveals distinct miRNA regulation of white and brown adipose tissue identity. *Genes Dev*, 2021, **35**(9-10): 771-781

[19]

Yichen X, Peiwei H, Ying W, *et al.* ERα is an RNA-binding protein sustaining tumor cell survival and drug resistance. *Cell*, 2022, **184**(20): 5215-5229.e17

- [20] Ivana C, Marek B, Tomas S, *et al.* HITS-CLIP analysis of human ALKBH8 reveals interactions with fully processed substrate tRNAs and with specific noncoding RNAs. *RNA*, 2022, **28**(12): 1568-1581
- [21] Hafner M, Landthaler M, Burger L, *et al.* Transcriptome-wide identification of RNA-binding protein and microRNA target sites by PAR-CLIP. *Cell*, 2010, **141**(1): 129-141
- [22] Ascano M, Mukherjee N, Bandaru P, *et al.* FMRP targets distinct mRNA sequence elements to regulate protein expression. *Nature*, 2012, **492**(7429): 382-386
- [23] König J, Zarnack K, Luscombe N M, *et al.* Protein-RNA interactions: new genomic technologies and perspectives. *Nat Rev Genet*, 2012, **13**(3):77-83
- [24] Sugimoto Y, König J, Hussain S, *et al.* Analysis of CLIP and iCLIP methods for nucleotide-resolution studies of protein-RNA interactions. *Genome Biol*, 2012, **13**(8):R67
- [25] König J, Zarnack K, Rot G, *et al.* ICLIP-transcriptome-wide mapping of protein-RNA interactions with individual nucleotide resolution. *J Vis Exp*, 2011, **50**: e2638
- [26] Ina Huppertz, Jan Attig, Andrea D'Ambrogio, *et al.* ICLIP: protein-RNA interactions at nucleotide resolution. *Methods*, 2014, **65**(3): 274-287
- [27] Haberman N, Huppertz I, Attig J, *et al.* Insights into the design and interpretation of iCLIP experiments. *Genome Biol*, 2017, **18**(1): 7
- [28] Buchbender A, Mutter H, Sutandy R F, *et al.* Improved library preparation with the new ICLIP2 protocol. *Methods*, 2019, **178**: 33-48
- [30] Shishkin A A, Georgia G, Alper K, *et al.* Simultaneous generation of many RNA-seq libraries in a single reaction. *Nat Methods*, 2015, **12**(4): 323-325
- [31] Masuda A, Kawachi T, Ohno K. Rapidly growing protein-centric technologies to extensively identify protein-RNA interactions: application to the analysis of co-transcriptional RNA processing. *Int J Mol Sci*, 2021, **22**(10): 5312
- [32] Kaczynski T, Hussain A, Farkas M. Quick-irCLIP: interrogating protein-RNA interactions using a rapid and simple cross-linking and immunoprecipitation technique. *MethodsX*, 2019, **6**: 1292-1304
- [33] Qi Y, Zhang Y, Zheng G, *et al.* *In vivo* and *in vitro* genome-wide profiling of RNA secondary structures reveals key regulatory features in plasmodium falciparum. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021, **11**: 404
- [34] Sugimoto Y, Chakrabarti A M, Luscombe N M, *et al.* Using hiCLIP to identify RNA duplexes that interact with a specific RNA-binding protein. *Nat Protoc*, 2017, **12**(3): 611
- [35] Nostrand E L V, Nguyen T B, Gelboinburkhart C, *et al.* Robust, cost-effective profiling of RNA binding protein targets with single-end enhanced crosslinking and immunoprecipitation (seCLIP). *Methods Mol Biol*, 2017, **1648**: 177-200

Principle and Application of Ultraviolet Crosslinking Immunoprecipitation Technology*

DU Ya-Qiong¹⁾, WANG Wan-Yao¹⁾, GAO Fan¹⁾, XU Yang^{2)**}, SHI Wen-Tao^{1)**}

¹⁾Department of Genetics, School of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China;

²⁾School of Medicine, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract The UV cross-linking immunoprecipitation (CLIP) technique was first established in 2003. Sequences of target RNAs and binding sites of specific RNA-binding proteins (RBPs) were identified within the entire transcriptome by UV cross-linking, immunoprecipitation, reverse transcription, and subsequent high-throughput sequencing. Over the last 20 years, CLIP has been continuously modified and improved. Advanced operability and accuracy have extended its application category. Currently, the widely used CLIP technologies include high-throughput sequencing with crosslinking-immunoprecipitation (HITS-CLIP), photoactivatable-ribonucleoside-enhanced CLIP (PAR-CLIP), individual nucleotide resolution CLIP (iCLIP), enhanced CLIP (eCLIP), infrared-CLIP (irCLIP), *etc.* HITS-CLIP combines high-throughput sequencing with UV cross-linking immunoprecipitation. The 254 nm UV cross-linking and RNAase digestion steps allow the technology to capture transient intracellular RBP-RNA interactions. However, there are limitations in the efficiency of UV cross-linking, with low resolution and high intrinsic background noise. For PAR-CLIP, photoactivatable ribonucleoside was incorporated into RNA molecules, and RBP cross-linked with RNA by 365 nm UV light to improve cross-linking efficiency and resolution. Cross-linking mediated single-base mutations provide more accurate binding site information and reduce interference from background sequences. Long-term alternative nucleotide incorporation, on the other hand, can be cytotoxic and may skew experimental results. iCLIP can identify RBP-RNA cross-linking sites at the single nucleotide level through cDNA circularization and subsequent re-linearization steps, but it has more experimental procedures, and partial cDNAs lost in the circularization step are inevitable. eCLIP discards the radioisotope labeling procedure and reduces RNA loss by ligating adaptors in two separate steps, greatly improving the library-building efficiency, and reducing bias associated with PCR amplification; however, the efficiency of immunoprecipitation cannot be visually assessed at the early stage of the experiment. The irCLIP technique replaces radioisotopes with infrared dyes and greatly reduces the initial number of cells required for the experiment; however, an infrared imaging scanner is essential for the irCLIP application. To address more particular scientific issues, derivative CLIP-related techniques such as PAPERCLIP, cTag-PAPERCLIP, hiCLIP, and tiCLIP have also been developed in recent years. In practice, the aforementioned CLIP approaches have their advantages and disadvantages. When deciding on a technical strategy, we should take into account our experimental objectives and conditions, such as whether we need to precisely define the RNA site for binding to RBP; whether we have the necessary experimental conditions for working with radioisotopes or performing infrared imaging; the amount of initial sample size, and so on. In addition, the CLIP technique has a relatively large number of procedures and can be divided into several successive experimental modules. We can try to combine modules from different mainstream CLIP technologies to meet our experimental requirements, which also gives us more opportunities to improve and refine them and to build more targeted derivative CLIP technologies according to our research objectives.

Key words UV cross-linking immunoprecipitation, high-throughput sequencing, RNA-binding protein

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0071

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (32170649, 81802091).

** Corresponding author.

SHI Wen-Tao. Tel: 86-22-83336567, E-mail: shiwentao@tmu.edu.cn

XU Yang. Tel: 86-13920905507, E-mail: xuyang@nankai.edu.cn

Received: March 3, 2023 Accepted: April 25, 2023