

• 综述 •

MicroRNA 靶基因的高通量鉴定方法

陈灵锋^{1) 2)}, 张均平^{1) 2)}, 王明席^{1) 2)}*

(华侨大学¹⁾ 分子药物研究院; ²⁾ 教育部分子药物工程研究中心, 福建 泉州 362021)

摘要 MicroRNAs(miRNAs) 是一类内源性非编码小 RNA, 可在转录后水平调节基因的表达, 在细胞生长、发育、疾病发生等过程中发挥着重要作用. 明确 miRNAs 所调控的靶基因对阐明 miRNAs 的功能及在各种生命过程和疾病发生机制的角色非常关键. 目前, 鉴定 miRNAs 的靶基因的方法主要计算机预测方法和生物学实验方法. 前者对 miRNA 靶基因的寻找作出巨大贡献, 但常存在很多假阳性, 必须通过生物学实验方法加以验证. 后者涉及单靶基因鉴定技术和高通量多靶基因鉴定技术, 高通量技术又包括基因芯片分析技术、蛋白质组学分析技术、RNA 连接酶介导的 cDNA 末端扩增技术和生物化学法等. 本文主要对这些高通量技术的应用、优劣进行归纳, 并对其改进方向予以讨论.

关键词 微小 RNA; 靶基因; 高通量鉴定方法

中图分类号 Q786

High-throughput Assays for MicroRNA Target Genes

CHEN Ling-Feng^{1) 2)}, ZHANG Jun-Ping^{1) 2)}, WANG Ming-Xi^{1) 2)}*

(¹⁾ Institute of Molecular Medicine; ²⁾ Engineering Research Center of Molecular Medicine, Ministry of Education, Huaqiao University, Quanzhou 362021, Fujian, China)

Abstract MicroRNAs(miRNAs) are a class of endogenous non-coding RNAs involved in the regulation of gene expression at the post-transcriptional level. miRNAs play pivotal roles in cell growth, development and disease pathogenesis. Therefore, to identify and validate miRNAs target genes regulated is essential to understand the functions of miRNAs in disease. miRNAs bind the complementary sequences of target mRNAs to mediate translational repression or target degradation and gene silencing, both computer-aided predication and biological experimental screening can be used for target identification. The former may produce a large number of miRNA target genes with higher false positive genes to be further excluded by the biological experiments. The latter approaches can be further greatly facilitated with high-throughput multiple target screening assays, such as microarray, proteome analysis, or RNA ligase mediated rapid amplification of cDNA ends. The applications involving these assays were summarized and compared, together with the discussion on the further development of related technologies.

Key words miRNAs; target genes; high-throughput assay

收稿日期: 2012-10-17; 接受日期: 2012-12-25

国家高技术研究发展计划 (863 计划, No. 2008AA02Z135), 国家自然科学基金 (No. 30900822) 资助

* 联系人 Tel/Fax: +86-595-22690952; E-mail: mxwang@hqu.edu.cn

Received: October 17, 2012; Accepted: December 25, 2012

Supported by National High Technology Research and Development Program of China (863 Program, No. 2008AA02Z135), National Natural Science Foundation of China (No. 30900822)

* Corresponding author Tel/Fax: +86-595-22690952; E-mail: mxwang@hqu.edu.cn

MicroRNAs(miRNAs) 是一类长度约为 21 个核苷酸(nt) 的内源性、单链、非编码小 RNA ,在进化过程中高度保守 ,能与靶基因进行特异性地碱基互补配对 ,促进其降解或抑制翻译从而抑制靶基因的表达^[1] . miRNAs 参与细胞增殖、死亡、分化、代谢、发育、肿瘤形成等多种生物学过程^[2] . 据估计 ,哺乳动物中一半以上的蛋白质编码基因由 miRNAs 调节 ,人类大多数 mRNA(messenger RNA) 中存在 miRNAs 的结合位点^[3] . 因此 ,明确 miRNAs 所调控的靶基因对阐明 miRNAs 功能和在各种生命过程以及疾病发生机制的作用至关重要 .

目前研究 miRNA 靶基因主要有两种途径 ,即计算机预测方法和生物学实验方法^[4] . 前者是利用生

物信息学等知识来推测 miRNA 靶基因 ,但由于 miRNA 长度很短且与靶基因并非完全互补 ,常产生大量预测结果 ,假阳性率较高^[5] ,必须通过实验方法加以验证 . 生物学实验方法主要有单靶基因鉴定技术和高通量多靶基因鉴定技术 ,前者是运用荧光素酶报告载体法等技术针对单个基因进行逐一验证 ,结果准确 ,但效率低 . 目前已知的 miRNA 靶基因数量在与日俱增 ,但仍有大量 miRNA 的功能不清楚 ,迫切需求一种准确高效的预测技术和高通量 miRNA 靶基因鉴定技术 . 本文只针对后者进行分析归纳 ,常用方法有基因芯片分析技术、蛋白质组学分析技术、RNA 连接酶介导的 cDNA(complementary DNA) 末端扩增技术和生物化学法等(Table 1) .

Table 1 High-throughput assay approaches for miRNA target genes

Methods	Advantages	Disadvantages
Microarray analysis	Simple	Not able to distinguish between direct miRNA target genes or identify all miRNA target genes
Proteome analysis	Able to identify functional miRNA target genes	Not able to discriminate the direct miRNA target genes
RLM-RACE	Able to identify miRNA target genes at the genome level , high sensitivity and reliability	Not able to discriminate between miRNA and siRNA cleavage products , tedious
RIP-Chip and HITS-CLIP	Genome-wide direct identification of miRNA target genes , able to determine the miRNA targeting sites within an mRNA	Technically challenging , tedious , expensive
Co-immunoprecipitation of tagged miRNA	Able to determine the direct target genes of a single miRNA , low ratio of the false positive	Technically challenging

1 基因芯片分析技术

此技术是基于检测过表达或沉默 miRNA 后 ,通过基因表达水平变化来筛选判断 miRNA 靶基因 . 目前 ,约有 30% 已知的 miRNA 靶基因是利用此技术鉴定的^[7] . 最近 Kojima 等^[8] 利用此技术发现 ,在前列腺癌 PC3 和 DU145 细胞系内 ,miR-1 和 miR-133a 的靶基因为嘌呤核苷磷酸酶(purine nucleoside phosphorylase ,PNP) ,通过荧光素酶报告载体法验证 ,并采用实时定量 PCR 技术(quantitative real-time PCR ,qRT-PCR) 、蛋白质印迹技术进一步验证了靶基因 PNP 的 mRNA 和蛋白质水平的变化 . 该技术优点是操作简单、可高通量数据分析 . Le Brigand 等^[9] 研发了一项基于生物信息学的软件工具 ,进一步精简了该技术产生的冗余数据(见 Fig. 1) . 但该技术无法区分由 miRNA 直接作用和间接作用的靶基因 ,也难以发现所有靶基因 . 后者因为 mRNAs 的表达存在组织特异性和瞬时性 ,以及某些 miRNAs

可在不改变转录水平的情况下就抑制蛋白质表达^[11] ,而蛋白质组学分析技术可以弥补后者的缺点 .

2 蛋白质组学分析技术

此技术是基于比较 miRNA 过表达后引起的蛋白质表达水平变化来分析 miRNA 靶基因 . 已知 miRNA 靶基因中约有 40% 通过该方法鉴定^[7] . Vinther 等^[10] 建立稳定同位素标记蛋白质谱法(stable isotope labeling by amino acids in cell culture- mass spectrometry ,SILAC-MS) ,当鉴定某种 miRNA 调控的靶基因时 ,先将化学合成的双链 miR-1 转染进宫颈癌 HeLa 细胞系 ,随后在含稳定同位素标记的氨基酸培养基中培养转染细胞 ,这样所有新合成蛋白质都含有同位素标记氨基酸 ,并使分子量恒定变大 ,从而在蛋白质谱上出现分子量大小恒定的偏移 ,当其与正常培养基孵育的内对照 HeLa 细胞按 1:1 比例混合 ,再将提取的蛋白质进行蛋白质谱分

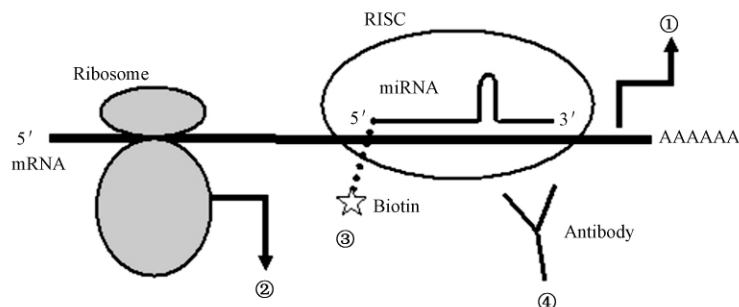


Fig. 1 Schematic description of high-throughput assay approaches of miRNA target genes Regulation of genes by miRNA is a multi-faceted process that allows several targeting sites for high-throughput identification of miRNA target genes. (1) Microarray analysis of degraded mRNAs as a consequence of over-expressed or silenced miRNA, RNA ligase mediated rapid amplification of cDNA ends followed by microarray analysis or sequencing. (2) Mass spectrometry analysis of protein production after labeling of proteins. (3) Affinity purification of labeled miRNAs followed by microarray analysis or sequencing. (4) Immuno-precipitation of RISC followed by microarray analysis or high-throughput sequencing

析,通过对比分析同一蛋白质的波峰偏移可以确定 miR-1 靶基因,结果与基因芯片分析法鉴定的靶基因一致。但该方法不适于鉴定低表达的蛋白质,为此 Baek 等^[11]改进了上述方法,建立同位素脉冲标记法(pulsed stable isotope labelling with amino acids in cell culture, pSILAC)。原理同前,只是将正常细胞与 miRNA 转染后的 HeLa 细胞在含轻/重型同位素标记的必需氨基酸培养基中进行短暂孵育,再分析标记前后同一蛋白质的质谱峰值变化,以实现低表达蛋白质的精确定量。蛋白质组分析比基因芯片法更适于检测功能性 miRNA 靶基因,但是两种方法均有类似的缺点,例如,不能鉴别出 miRNA 直接调控的靶基因。

3 RNA 连接酶介导的 cDNA 末端扩增技术

RNA 连接酶介导的 cDNA 末端快速扩增技术(RNA ligase mediated rapid amplification of cDNA ends, RLM-RACE),在基因组水平上直接鉴定 miRNA 靶点。Franco-Zorrilla 等^[12]利用此技术和基因芯片技术鉴定了 100 多个新的 miRNA 靶点,这些都是计算机预测技术和基因芯片技术所未发现的。

首先,用 T4 RNA 连接酶(T4 RNA ligase)将带有细菌噬菌体 T7 启动子的 RNA 接头连入带有多聚腺苷酸(polyA)的小 RNAs,再以寡聚胸腺嘧啶(oligo dT)作为引物逆转录合成第 1 条 cDNA 链,碱性水解消除模板 RNA,合成 cDNA 第 2 条链,利用 T7 RNA 聚合酶(T7 RNA polymerase)转录合成 RNA,用脱氧核糖核酸酶 I(DNase I)清除模板 cDNA,逆转录合成单链 cDNA,碱性水解消除模板 RNA,再用

DNase I 酶切成 50~200 bp 片段,最后在 cDNA 片段的 3'端标记生物素进行微阵列杂交。该技术的关键步骤是利用 RLM-RACE 技术分离小 RNAs。利用此方法可直接找到 miRNA 靶位点,避免冗余的计算分析,且能一次分析多个重复样品,减少基因组分析内在的变异性,提高了可信度。通过比较分析实验组与对照组的差异,极大地降低了假阳性。但步骤较繁琐、无法区分 miRNA 与 siRNA(small interfering RNA)作用的靶位点是其不足之处。与上述工作相似,German 等^[13]利用改进的 5'cDNA 末端快速扩增技术,对 mRNA 3'端的分裂产物进行测序,高通量地鉴定 mRNA 靶位点。不同的是,它的 5'端 RNA 接头含有 Mme I 限制性内切酶识别位点,Mme I 酶能在识别位点 3'端的第 20 个碱基处断裂 DNA 链,该技术也称作 RNA 末端的平行分析技术(parallel analysis of RNA ends, PARE)。该技术紧密地结合高通量测序技术与生物信息学,已成功用于拟南芥^[14]和水稻^[15]等植物的 miRNA 靶基因筛选。

在植物体内,绝大多数 miRNA 是利用剪切作用调控靶基因的表达,且剪切常发生在 miRNA 与 mRNA 互补区域的第 10 位核苷酸处。靶基因经剪切产生 2 个片段,5'剪切片段和 3'剪切片段。其中 3'剪切片段包含自由的 5'单磷酸和 3'polyA 尾,可被 RNA 连接酶连接,连接产物可用于下游高通量测序;而含有 5'帽结构的基因缺少 5'单磷酸基团,无法被 RNA 连接酶连接,因而无法进入下游的测序过程。对测序数据进行深入地比对分析,可以直观地发现在 mRNA 序列的某个位点会出现一个波峰,而该处正是 miRNA 候选剪切位点。但该技术主要应

用于植物中,最近,Folkes 等^[16]利用该技术的测序数据研发了新的软件 PAREsnip,能够高通量寻找所有小 RNA 组的靶基因。

4 生物化学法

生物化学法的种类较多,其优点是可以鉴定 miRNA 直接作用的靶基因,目前最常见有 2 种。

4.1 RISC 免疫共沉淀技术

RNA 诱导沉默复合物(RNA-induced silencing complex,RISC)的 AGO(Argonaute)蛋白同时结合 miRNAs 和 mRNAs,将 RISC 免疫共沉淀就可以分离得到 miRNA-mRNA。X 衍射 AGO-miRNA-mRNA 复合物的晶体结构显示^[17],AGO 能同时充分有效地结合 miRNA 和附近的 mRNA 位点。分离得到的 mRNA 可以用于基因芯片分析或测序,这 2 种方法可分别称为 RIP-Chip 技术(RNA-binding protein immunoprecipitation for microarray)和 HITS-CLIP 技术(high-throughput sequencing of RNA isolated by crosslinking immunoprecipitation)。

RIP-Chip 技术,是将 miRNA 结合的蛋白复合体 RISC 免疫共沉淀下来,分离出 RNA 后进行芯片分析。Tan 等^[18]使用该技术鉴定了霍杰金淋巴瘤细胞(Hodgkin lymphoma,HL)的 miRNA 靶基因。Zhang 等^[19]通过免疫共沉淀秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)的 GW182 家族蛋白 AIN-1 和 AIN-2,鉴定了 miRNA 的靶基因。最近,Nelson 等^[20]使用该技术,鉴定了 miR-103、miR-107、miR-16 和 miR-195 的靶基因,他们也发现在蛋白质编码区(coding sequence,CDS)存在 miRNA 结合的靶位点,miR-107 的种子序列更倾向在 CDS 富集。突变 miR-107 的 3'端发现,其靶点主要富集在 3'端非翻译区(untranslated regions,UTR)中,而突变 miR-107 的 5'端(种子区)其靶点却仍在 CDS 富集,说明突变种子区 miRNA 仍然能够变换种子区形成一个新的种子序列靶向 CDS 区,由此推测,miRNA 3'端区域在靶向 mRNA 的 CDS 区至关重要。

HITS-CLIP 技术与高通量测序技术联合,能在基因组水平鉴定 miRNA-mRNA 的相互作用。该技术首先用于鉴定小鼠脑细胞^[21]AGO-miRNA-mRNA 的复合物。其简要步骤为:先用紫外线照射细胞使 RNA 与直接接触的蛋白质复合物共价结合,用核糖核酸酶 A(ribo nuclease A,RNase A)消化 AGO 表面的 RNA,经去磷酸化后接上 3'RNA 接头,再经磷酸化,十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium

dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis,SDS-PAGE)分离 RNA,PCR 扩增并测序。该课题组利用此项技术最终获得 1463 个 AGO 结合位点。生物信息学分析结果显示,miRNA 基本上与靶基因 mRNA 的 3'UTR 结合(60%),但也有大量的 miRNA 与 CDS 结合(25%)。此外,预测的 miR-124 靶位点中有 86% 在实验中得到确认,且该技术可鉴定 miRNA 调节的功能性靶位点。但此技术受限于紫外光交联 RNA 与 AGO 的效率。

为此,Hafner 等^[22]对其进行了改进,建立了光激活的免疫共沉淀技术(photoactivatable-ribonucleoside-enhanced crosslinking and immunoprecipitation,PAR-CLIP)。他们通过引入一种光激活的核苷酸 4-硫脲苷(4SU)来提高核苷酸交联效率。利用 miRNA 反义抑制剂处理细胞,此项技术是鉴定某个 miRNA 的靶基因非常高效的办法。最近,Leung 等^[23]应用该技术,研究比较敲除核酸酶 Dicer 的鼠胚胎干细胞与正常细胞的 miRNA 靶基因组发现,敲除 Dicer 的细胞 AGO 也能够结合 miRNA 靶基因,提示 AGO 结合 mRNA 并不依赖 miRNA。

尽管 RISC 免疫共沉淀技术被认为是非常巧妙的方法,能直接将细胞内带有 miRNA 的 RISC 进行分离,并确定其是与 miRNA 直接作用的 mRNA,但操作较难、价格昂贵,无法鉴定已降解的 mRNA,存在假阳性。后者是由于,位于不同细胞区间的 RNA 和 RNA 结合蛋白在细胞裂解后可发生非生理条件下的结合^[24]。

4.2 miRNA 标记后 RISC 免疫共沉淀技术

Orom 和 Lund^[25]利用生物素标记双链 miRNA,再用链霉亲和素(streptavidin)磁珠捕获 miRNA 与 mRNA 结合的复合物。该技术成功地分别鉴定了果蝇属、哺乳动物细胞系的 miRNA bantam 和 miR-124a 的靶基因。Orom 等^[26]也利用生物素标记小鼠胚胎干细胞的 miR-10a,免疫共沉淀 RISC 后基因芯片分析显示,miRNA 在 mRNA 的 CDS 富集。进一步研究发现,miR-10a 也能够特异靶向 5'UTR 并提高翻译效率。该技术的优点是能特异地将某种 miRNA 的靶基因免疫共沉淀。

Hsu 等^[27]用地高辛标记双链 miRNA,再利用抗地高辛抗体免疫共沉淀 miRNA 与 mRNA 结合的复合物,接着将其反转录成 cDNA 并测序,或者用 qRT-PCR 扩增法研究已知 miRNA 预测的靶基因。应用该技术,研究人员找到了斑马鱼 miR-1 的靶基因 Hand2,并且通过原位杂交技术和荧光素酶报告

载体法进一步确证。Nonne 等^[28]将生物素标记 miRNA 技术和 FLAG 标记 AGO 蛋白技术联合使用,免疫共沉淀 RISC 复合体,并通过链霉素亲和素磁珠捕获标记的 RNA,经 2 次纯化的方法极大地降低了假阳性,但也存在操作较难等缺点。

5 其它方法

Gäken 等^[29]利用 3'UTR 文库的功能性分析阳性/阴性选择策略,建立了一项新方法。他们利用 miR-130a 的已知靶基因 *MAFB* 验证了新策略的可行性,鉴定出 miR-130a 的靶基因 *MAFB* 和额外 5 个靶基因,并且通过 Western 印迹分析证实。简要步骤如下:先将脑细胞 cDNA 文库构建到 p3'TKzeo 质粒中,转染乳腺癌 MCF7 细胞系后,利用博来霉素 (zeocin) 筛选出稳定表达 miR-130a 质粒的细胞,再利用更昔洛韦 (ganciclovir) 筛选出表达胸苷激酶 (thymidine kinase, TK) 的细胞,提取总基因组、PCR 扩增并测序。该策略联合高通量测序技术,能在短时间内,系统高通量地鉴定某种特定 miRNA 的靶基因,但所选用的细胞内不能含有高表达待验证的 miRNA。该策略的缺陷是受限于 cDNA 文库,不能鉴定未列入文库的基因。为了克服这一缺陷, Sigma 公司构建了 1 种全新的人 cDNA 文库,该文库包含 10 种人类细胞系,含有大约 77% 人类基因。

6 问题和展望

大量资料表明, miRNAs 参与多种生物学过程,明确其确切的靶基因对阐明其参与生物学过程的机制具有直接的提示作用。由于 miRNA 及其靶基因数目可能非常庞大,与其靶基因之间存在“一对多”和“多对一”的关系,并且与细胞的复杂环境密切相关。目前,基因芯片分析技术等几种高通量生物学方法很难单独实现真实还原 miRNA-mRNA 间的作用。其发展趋势是,需要建立新的计算机预测原则、或优化现有算法、并结合高通量测序技术、构建生物学上更精确的模型等,方可快速、高通量预测并检验大量未知 miRNA 直接作用的靶基因和直接作用位点,尤其是和疾病相关的 miRNAs,进而能够催生新的疾病治疗策略。

参考文献 (References)

[1] Guo H, Ingolia N T, Weissman J S, et al. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels [J]. *Nature* 2010 **466**(7308): 835-840

[2] 俞秀冲,宋皓军,郭俊明. MiRNA 影响胃癌转移的机制. *中国生物化学与分子生物学报* (Yu Xiu-Chong, Song Hao-Jun, Guo Jun-Ming. MicroRNAs Involved in Metastasis of Gastric Cancer [J]. *Chin J Biochem Mol Biol*) 2011 **27**(10): 907-913

[3] Friedman R C, Farh K K, Burge C B, et al. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs [J]. *Genome Res*, 2009 **19**(1): 92-105

[4] Sun W, Julie Li Y S, Huang H D, et al. microRNA: a master regulator of cellular processes for bioengineering systems [J]. *Annu Rev Biomed Eng* 2010 **12**: 1-27

[5] Sethupathy P, Megraw M, Hatzigeorgiou A G. A guide through present computational approaches for the identification of mammalian microRNA targets [J]. *Nat Methods* 2006 **3**(11): 881-886

[6] Thomas M, Lieberman J, Lal A. Desperately seeking microRNA targets [J]. *Nat Struct Mol Biol* 2010 **17**(10): 1169-1174

[7] Witkos T M, Koscianska E, Krzyzosiak W J. Practical Aspects of microRNA Target Prediction [J]. *Curr Mol Med* 2011 **11**(2): 93-109

[8] Kojima S, Chiyomaru T, Kawakami K. Tumour suppressors miR-1 and miR-133a target the oncogenic function of purine nucleoside phosphorylase (PNP) in prostate cancer [J]. *Br J Cancer* 2012 **106**(2): 405-413

[9] Le Brigand K, Robbe-Sermesant K, Mari B, et al. MiRonTop: mining microRNAs targets across large scale gene expression studies [J]. *Bioinformatics* 2010 **26**(24): 3131-3132

[10] Vinther J, Hedegaard M M, Gardner P P, et al. Identification of miRNA targets with stable isotope labeling by amino acids in cell culture [J]. *Nucleic Acids Res* 2006 **34**(16): e107

[11] Baek D, Villen J, Shin C, et al. The impact of microRNAs on protein output [J]. *Nature* 2008 **455**(7209): 64-71

[12] Franco-Zorrilla J M, Del Toro F J, Godoy M, et al. Genome-wide identification of small RNA targets based on target enrichment and microarray hybridizations [J]. *Plant J* 2009 **59**(5): 840-850

[13] German M A, Luo S, Schroth G, et al. Construction of parallel analysis of RNA ends (PARE) libraries for the study of cleaved miRNA targets and the RNA degradome [J]. *Nat Protoc* 2009 **4**(3): 356-362

[14] Addo-Quaye C, Eshoo T W, Bartel D P, et al. Endogenous siRNA and miRNA targets identified by sequencing of the Arabidopsis degradome [J]. *Curr Biol* 2008 **18**(10): 758-762

[15] Zhou M, Gu L, Li P, et al. Degradome sequencing reveals endogenous small RNA targets in rice (*Oryza sativa* L. ssp. indica) [J]. *Front Biol (中国高等学校学术文摘·生物学)*, 2010 **5**(1): 67-90

[16] Folkes L, Moxon S, Woolfenden H C, et al. PAREsnip: a tool for rapid genome-wide discovery of small RNA/target interactions evidenced through degradome sequencing [J]. *Nucleic Acids Res* 2012 **40**(13): e103

[17] Wang Y, Juranek S, Li H, et al. Structure of an argonaute silencing complex with a seed-containing guide DNA and target RNA duplex [J]. *Nature* 2008 **456**(7224): 921-926

- [18] Tan L P , Seinen E , Duns G , *et al.* A High-throughput experimental approach to identify miRNA targets in human cells [J]. *Nucleic Acids Res* 2009 **37**(20) : e137
- [19] Zhang L , Ding L , Cheung T H , *et al.* Systematic identification of *C. elegans* miRISC proteins , miRNAs , and mRNA targets by their interactions with GW182 proteins AIN-1 and AIN-2 [J]. *Mol Cell* 2007 **28**(4) : 598-613
- [20] Nelson P T , Wang W X , Mao G , *et al.* Specific sequence determinants of miR-15/107 microRNA gene group targets [J]. *Nucleic Acids Res* 2011 **39**(18) : 8163-8172
- [21] Chi S W , Zang J B , Mele A , *et al.* Argonaute HITS-CLIP decodes microRNA-mRNA interaction maps [J]. *Nature* 2009 , **460**(7254) : 479-486
- [22] Hafner M , Landthaler M , Burger L , *et al.* Transcriptome-wide identification of RNA-binding protein and microRNA target sites by PAR-CLIP [J]. *Cell* 2010 **141**(1) : 129-141
- [23] Leung A K , Young A G , Bhutkar A , *et al.* Genome-wide identification of Ago2 binding sites from mouse embryonic stem cells with and without mature microRNAs [J]. *Nat Struct Mol Biol* 2011 **18**(2) : 237-244
- [24] Mili S , Steitz J A. Evidence for reassociation of RNA-binding proteins after cell lysis: implications for the interpretation of immunoprecipitation analyses [J]. *RNA* , 2004 **10**(11) : 1692-1694
- [25] Orom U A , Lund A H. Isolation of microRNA targets using biotinylated synthetic microRNAs [J]. *Methods* , 2007 **43**(2) : 162-165
- [26] Orom U A , Nielsen F C , Lund A H. MicroRNA-40a binds the 5' UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation [J]. *Mol Cell* 2008 **30**(4) : 460-471
- [27] Hsu R J , Yang H J , Tsai H J. Labeled microRNA pull-down assay system: an experimental approach for high-throughput identification of microRNA-target mRNAs [J]. *Nucleic Acids Res* 2009 **37**(10) : e77
- [28] Nonne N , Ameyar-Zazoua M , Souidi M , *et al.* Tandem affinity purification of miRNA target mRNAs (TAP-Tar) [J]. *Nucleic Acids Res* 2010 **38**(4) : e20
- [29] Gaken J , Mohamedali A M , Jiang J , *et al.* A functional assay for microRNA target identification and validation [J]. *Nucleic Acids Res* 2012 **40**(10) : e75