

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

Halo-RPD: в поисках мишеней РНК-связывающих белков растений

А.О. Шамустакимова

Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, Россия
✉ nastja_sham@mail.ru

Аннотация. Изучение РНК-белковых взаимодействий и идентификация РНК-мишеней относятся к важнейшим аспектам понимания биологии РНК. К настоящему времени предложены различные методы изучения таких взаимодействий; одним из широко распространенных является иммунопреципитация РНК (RIP). Большинство работ по поиску РНК-мишеней было проведено с использованием антител непосредственно на эндогенный белок или же на GFP, слитый с целевым белком. Зависимость от уровня экспрессии целевого белка и подбор специфичных антител значительно затрудняют классическую иммунопреципитацию. Белок же, слитый с GFP, нередко может быть цитотоксичен, что в дальнейшем приведет к его неправильному узнаванию и/или деградации. В последние годы был разработан ряд мультифункциональных тагов, включая SNAP-tag и HaloTag. Такие таги способствуют изучению целевых белков с разных сторон. Для них созданы флуоресцентные красители, способные прочно связываться с определенным участком тага. Это позволяет как изучать наработку химерного белка, так и определять его локализацию непосредственно в клетке или во всем организме. Для таких тагов разработаны также высокоаффинные субстраты, ковалентно связывающие химерные белки, что значительно сокращает потери в ходе выделенения. В данной работе представлен метод, основанный на системе HaloTag, который мы назвали Halo-RPD (HaloTag RNA PullDown). В протоколе используются растения со стабильной экспрессией химерного белка и магнитные шарики Magne® HaloTag® Beads для захвата РНК-белковых комплексов непосредственно из цитоплазматического лизата трансгенных растений *Arabidopsis thaliana*. Приводится описание основных этапов: 1) подготовка магнитных шариков; 2) гомогенизация тканей и отбор контролей; 3) осаждение и отмывка РНК-белковых комплексов; 4) определение эффективности связывания белка; 5) выделение РНК; 6) анализ полученной РНК. Даны рекомендации для планирования эксперимента по высокопроизводительному секвенированию. Ключевые слова: *A. thaliana*; HaloTag; РНК-связывающие белки; соосаждение; РНК; РНК-белковые комплексы; белок с доменом холодного шока.

Для цитирования: Шамустакимова А.О. Halo-RPD: в поисках мишеней РНК-связывающих белков растений. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;28(1):74-79. DOI 10.18699/vjgb-24-09

Halo-RPD: searching for RNA-binding protein targets in plants

А.О. Shamustakimova

All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology, Moscow, Russia
✉ nastja_sham@mail.ru

Abstract. Study of RNA-protein interactions and identification of RNA targets are among the key aspects of understanding RNA biology. Currently, various methods are available to investigate these interactions with, RNA immunoprecipitation (RIP) being the most common. The search for RNA targets has largely been conducted using antibodies to an endogenous protein or to GFP-tag directly. Having to be dependent on the expression level of the target protein and having to spend time selecting highly specific antibodies make immunoprecipitation complicated. Expression of the GFP-fused protein can lead to cytotoxicity and, consequently, to improper recognition or degradation of the chimeric protein. Over the past few years, multifunctional tags have been developed. SNAP-tag and HaloTag allow the target protein to be studied from different perspectives. Labeling of the fusion protein with custom-made fluorescent dyes makes it possible to study protein expression and to localize it in the cell or the whole organism. A high-affinity substrate has been created to allow covalent binding by chimeric proteins, minimizing protein loss during protein isolation. In this paper, a HaloTag-based method, which we called Halo-RPD (HaloTag RNA PullDown), is presented. The proposed protocol uses plants with stable fusion protein expression and Magne® HaloTag® magnetic beads to capture RNA-protein complexes directly from the cytoplasmic lysate of transgenic *Arabidopsis thaliana* plants. The key stages described in the paper are as follows: (1) preparation of the magnetic beads; (2) tissue homogenization and collection of control samples; (3) precipitation and wash of RNA-protein complexes; (4) evaluation of protein binding efficiency; (5) RNA isolation; (6) analysis of the RNA obtained. Recommendations for better NGS assay designs are provided. Key words: *A. thaliana*; HaloTag; RNA-binding proteins; RNA pulldown assay; RNA-protein complexes; cold-shock domain protein.

For citation: Shamustakimova A.O. Halo-RPD: searching for RNA-binding protein targets in plants. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;28(1):74-79. DOI 10.18699/vjgb-24-09

Введение

РНК-связывающие белки играют важную роль в сложных клеточных процессах, таких как дифференцировка, развитие, ответ на биотический и абиотический стрессы и посттранскрипционный контроль. За последние годы спектр методов исследования РНК-белковых взаимодействий значительно расширился (Ramanathan et al., 2019). Одна из ранних и распространенных на данный момент технологий изучения такого взаимодействия была названа РНК-иммунопреципитацией (RIP) (Brooks, Rigby, 2000). В основе метода лежит картирование *in vivo* РНК-белковых взаимодействий в присутствии сшивающего агента, такого как УФ или формальдегид. Большинство работ по исследованию РНК-белковых комплексов растений выполнено при помощи RIP (Köster, Meyer, 2018; Frydrych Capelari et al., 2019; Seo, Chua, 2019; Steffen et al., 2019).

Несмотря на широкое применение, технология RIP имеет ряд недостатков: УФ-излучение создает необратимую ковалентную связь между белком и РНК; формальдегид связывает не только интересующий белок с РНК, но и его белковые партнеры; для успешного эксперимента необходимы высокоспецифичные антитела.

В настоящем протоколе в качестве альтернативы RIP представлен метод, основанный на использовании химерных белков, слитых с HaloTag (Los et al., 2008). Первоначально система HaloTag была разработана и успешно применена для осаждения белок-белковых и ДНК-белковых комплексов из лизата клеток бактерий и млекопитающих (Urh et al., 2008). В последние несколько лет методика была адаптирована (van Dijk et al., 2015; Banks et al., 2016; Li et al., 2020) и модифицирована (Gu et al., 2018) для идентификации РНК-белковых комплексов в клетках тканей животных и человека.

Существует всего две работы о поиске белковых партнеров в растениях с применением системы HaloTag (Santana, Thakur, 2017; Ren et al., 2020). В первой статье анализировали белки медиаторного комплекса в трансгенных растениях риса. Во второй – занимались поиском сайта связывания транскрипционного фактора *ZmNST3* в трансгенных растениях кукурузы.

Нашей целью была разработка протокола для выделения РНК-белковых комплексов из цитоплазмы растений *Arabidopsis thaliana* с использованием системы HaloTag. Ориентирами при подготовке протокола, названного нами HaloTag RNA-PullDown (Halo-RPD) служили статьи (Sorenson, Bailey-Serres, 2015; Banks et al., 2016).

Метод Halo-RPD

Растительный материал. В качестве объекта исследования использовали две трансгенные линии *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. экотипа Columbia со стабильной экспрессией: 1) HaloTag; 2) химерного белка *EsCSDP3*, слитого с HaloTag (Taranov et al., 2018).

Процедура выделения РНК-белковых комплексов методом HaloRPD включает: подготовку магнитных шариков, гомогенизацию тканей и отбор контролей, осаждение и отмывку РНК-белковых комплексов, определение эффективности связывания белка, выделение РНК, анализ

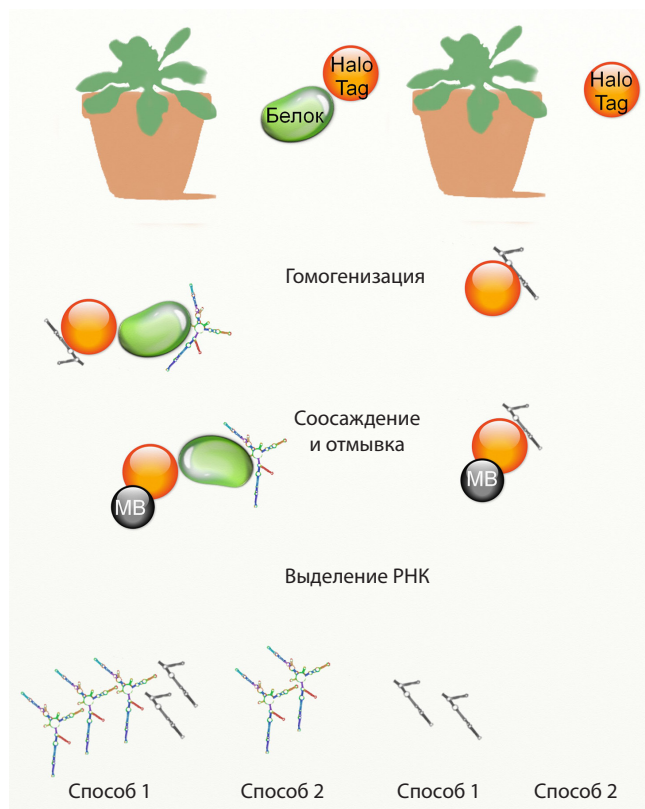


Рис. 1. Краткая схема эксперимента Halo-RPD: трансгенные растения, экспрессирующие РНК-связывающий белок, слитый с HaloTag (слева), и растения, экспрессирующие HaloTag (справа).

Растения гомогенизируют для получения цитоплазматического лизата и инкубируют с магнитными шариками, способными ковалентно связывать HaloTag. Шарика с осажденными на них комплексами целевых белков отмывают и выделяют РНК двумя различными способами: способ 1 – выделение РНК непосредственно с магнитных шариков путем инкубации в реагенте ExtractRNA; способ 2 – элюция в TEV буфере с последующей экстракцией с помощью ExtractRNA.

полученной РНК. Краткая схема эксперимента приведена на рис. 1.

Подготовка магнитных шариков

По 100 мкл суспензии шариков MagneBeads (Promega) помещали в две пробирки: для экспериментального образца (*EsCSDP3*-HaloTag) и для контроля (HaloTag). Пробирки инкубировали на магнитном штативе до прозрачности раствора. Аккуратно, не затрагивая шарика, удаляли жидкость. Добавляли к шарикам 400 мкл буфера следующего состава: 50 мМ Трис-НСl (рН 7.4), 137 мМ NaCl, 2.7 мМ KCl, 0.05 % Igepal Ca-630 (Promega). Плавно перемешивали суспензию несколько раз вручную. Переносили пробирки на магнитный штатив, инкубировали до прозрачности раствора и отбирали пипеткой всю жидкость. Повторяли промывку еще два раза. После третьей промывки супернатант не сливали. Хранили пробирки при +4 °С.

Для осаждения химерного белка из лизата производитель предлагает два вида субстрата: смолу HaloLink (Promega) и магнитные шарика MagneBeads (Promega), которые появились позже. Преимущество магнитных шариков заключается в высокой связывающей способности слитых с HaloTag белков и низком уровне неспецифического свя-

звания. Так, 1 мл MagneBeads способен связать чуть больше 20 мг белка, тогда как такое же количество смолы – только 7 мг. Предварительные эксперименты в нашем исследовании были проведены с использованием смолы, что значительно удлиняло эксперимент из-за необходимости многостадийного центрифугирования. Такой подход предполагал также наличие LowBind пробирок или самостоятельного силиконирования для минимизации потери смолы.

Гомогенизация ткани и отбор контролей

Для лучшей сохранности растительной ткани листовые пластинки оборачивали в фольгу и помещали в жидкий азот.

Гомогенизацию проводили в предварительно охлажденных ступках с помощью пестиков. Ткань помещали в ступку, наливали небольшое количество жидкого азота и гомогенизировали до образования порошкообразной массы. Затем массу быстро переносили в пробирку, содержащую 300 мкл лизирующего буфера следующего состава: 50 мМ Трис-НСl (рН 7.5), 150 мМ NaCl, 1 % Triton X-100, 0.1 мМ бензамидина HCl, 55 мкМ пенантролина, 10 мкМ бестатина, 20 мкМ леупептина, 5 мкМ пепстатина А, 1 мМ PMSF, 1 мМ ДТТ и 3 мкл RiboLock™ (Thermo Fisher Scientific). Пробирки закрывали и перемешивали на вортексе. Для оттаивания пробирки оставляли на льду. Гомогенат центрифугировали на предварительно охлажденной до +4 °С центрифуге в течение 7 мин при максимальной скорости. Супернатант переносили аккуратно, не задевая осадок, в чистые охлажденные пробирки. Полученный лизат содержал достаточно высокую концентрацию детергента, что могло привести к диссоциации РНК-белковых комплексов и ослабить последующее связывание белка с субстратом. Во избежание этого к лизату сразу добавляли 700 мкл буфера следующего состава: 50 мМ Трис-НСl (рН 7.4), 137 мМ NaCl, 2.7 мМ KCl. На этом этапе брали две пробы для контроля эксперимента: 1) по 100 мкл лизата отливали в отдельные пробирки для последующего анализа «input» фракции РНК; 2) по 10 мкл лизата переносили в 0.6 мкл пробирки для определения эффективности связывания целевого белка с субстратом. Обе пробирки хранили при +4 °С.

Осаждение и отмывка РНК-белковых комплексов

Предварительно подготовленные пробирки с магнитными шариками помещали в магнитный штатив, удаляли лишнюю жидкость. Извлекали пробирки из штатива и приливали к шарикам полученный разбавленный лизат. Пробирки помещали на орбитальный шейкер, инкубировали при постоянном вращении в течение 2 ч при +4 °С, после чего переносили их на магнитный штатив. Отбирали по 10 мкл лизата для контроля связывания белка с субстратом, оставшуюся жидкость аккуратно сливали.

Отмывку шариков проводили путем добавления 400 мкл буфера следующего состава: 50 мМ Трис-НСl (рН 7.4), 137 мМ NaCl, 2.7 мМ KCl, 0.05 % Igepal Ca-630 (Promega). Пробирки плавно, вручную, покачивали 3 раза и помещали на магнитный штатив. Важно отметить, что количество отмывок для каждого РНК-белкового комплекса подбирается индивидуально. В нашем эксперименте применяли 5 отмывок. Во время последней пробирки инкубировались на орбитальном шейкере в течение 5 мин при +4 °С.

После стадии отмывки пробирки помещали в лед.

Определение эффективности связывания белка с магнитными шариками

На этом этапе отслеживали уровень целевого белка, его сохранность, а также эффективность осаждения. Для этого использовали пробирки с заранее отобранными фракциями лизатов, описанными в разделах «Гомогенизация ткани и отбор контролей» и «Осаждение и отмывка РНК-белковых комплексов». В каждую из пробирок добавляли по 1 мкл HaloTag® TMR Ligand (Promega) в концентрации 50 мкМ. Перемешивали пипетированием. Помещали пробирки в темноту на 15 мин. Добавляли по 10 мкл 4× SDS загрузочного буфера и нагревали 2 мин при температуре +90 °С. Готовили 8 % ПААГ для электрофореза по методу Лэммли (Laemmli, 1970). В лунки геля загружали по 5 мкл продукта. Анализировали гель с помощью сканера-денситометра на определенной длине волны (экстинция = 532 нМ, эмиссия = 580 нМ).

В процентном соотношении большая часть белка оказалась в связанном состоянии (рис. 2), за счет чего не детектируется в супернатанте после 2-часовой инкубации.

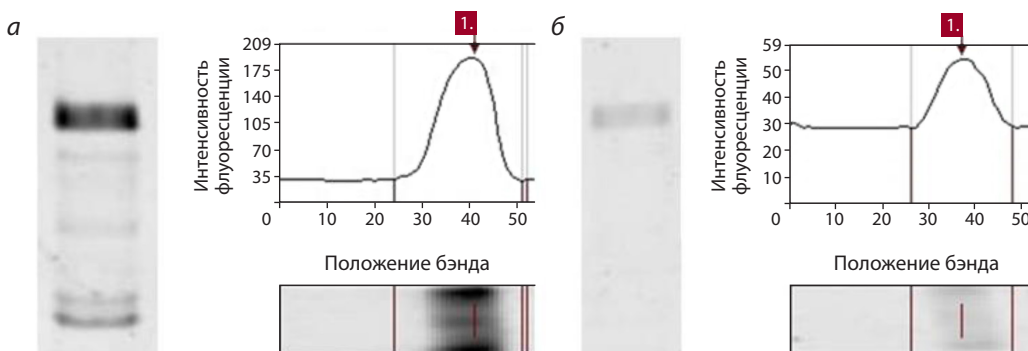


Рис. 2. Оценка эффективности связывания белка *EsCSDP3* на магнитных шариках с помощью флуоресцентного красителя TMRligand.

а – образец лизата до связывания и уровень флуоресценции связанного красителя; *б* – образец лизата через 2 ч после инкубации при +4 °С и соответствующий уровень флуоресценции связанного красителя. Количество несвязавшейся фракции белка составляет около 25 %.

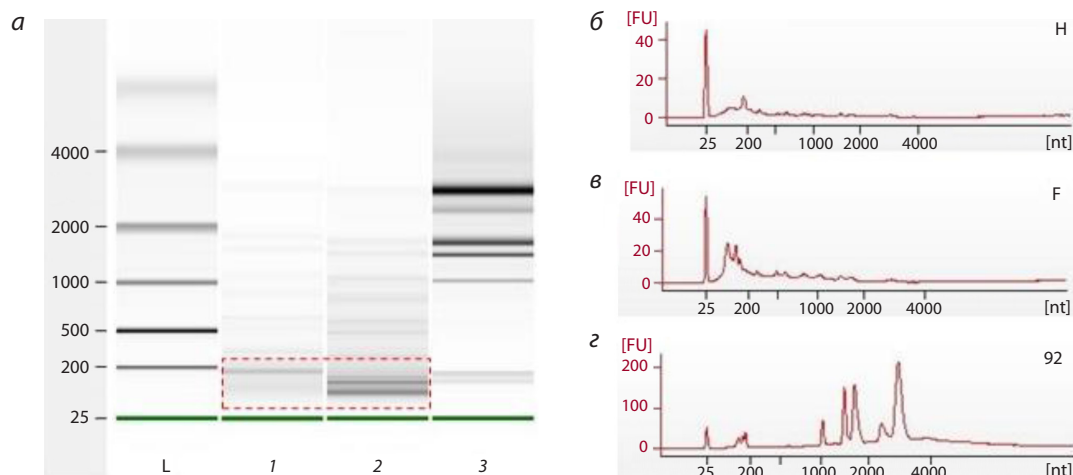


Рис. 3. РНК-профиль, полученный на приборе Agilent 2100 Bioanalyzer с использованием набора RNA 6000 Nano kit. *a*–*в* – РНК, выделенная способом 1, где *a1* и *б* – образец HaloTag, *a2* и *в* – образец *EsCSDP3*; *a3* и *г* – образец тотальной РНК для сравнения. Штриховой рамкой отмечена зона малых РНК. По оси абсцисс отложен размер РНК относительно маркера-стандарта, по оси ординат – интенсивность флуоресценции интеркалирующего красителя.

Если наблюдается иная картина, то в первую очередь необходимо увеличить время инкубации. Большое количество магнитных шариков приведет к повышению неспецифического связывания.

Выделение РНК

На данном этапе есть два варианта выделения РНК из белкового комплекса. Стоит опираться на предварительные знания об исследуемом белке и последующей системе анализа полученной РНК.

Способ 1 подразумевает выделение РНК непосредственно с магнитных шариков путем инкубации в реагенте ExtractRNA («Евроген»). Элюат, полученный таким образом, будет содержать не только искомые РНК (непосредственно с белка), но и ряд неспецифичных – с субстрата и HaloTag®. Данный способ будет оптимален при последующей RT-PCR или Real-time PCR с праймерами на известные РНК-мишени.

В случае высокопроизводительного секвенирования для установления природы неизвестных РНК-мишеней рекомендуется прибегнуть к элюции РНК из комплекса в TEV буфере с последующей экстракцией с помощью ExtractRNA («Евроген») – **способ 2**. Обработка TEV протеазой РНК-белкового комплекса способствует его высвобождению в раствор, оставляя при этом неспецифично-связавшиеся молекулы РНК на дне пробирки.

Для выделения РНК из элюата к промытым шарикам, содержащим целевой РНК-белковый комплекс, приливали 100 мкл буфера следующего состава: 50 мМ Трис-НСl (рН 8.0), 0.5 мМ ЭДТА, 0.005 мМ ДТТ, 40 ед. RiboLock™ (Thermo Fisher Scientific) и 5 ед. HaloTEV протеазы (Promega). Пробирки инкубировали в орбитальном шейкере в течение ночи при +4 °С. На следующий день помещали пробирки в магнитный штатив, отбирали 90 мкл элюата и переливали в чистые 1.5 мл пробирки. К полученному элюату приливали 1 мл реагента ExtractRNA («Евроген»). На этом этапе выделение РНК из элюата или с шариков ничем не различалось. В пробирки с магнит-

ными шариками после отмытки в буфере также заливали по 1 мл реагента ExtractRNA («Евроген»). Инкубировали пробирки в штативе при комнатной температуре в течение 5 мин. Периодически плавно перемешивали. Добавляли 200 мкл хлороформа и перемешивали на вортексе 30 с. Центрифугировали пробирки в охлажденной до +4 °С центрифуге на скорости 10000g в течение 10 мин. Осторожно отбирали 500 мкл водной фазы и переносили в новую пробирку. Добавляли по 25 мкг гликогена, перемешивали пипетированием и инкубировали 10 мин при комнатной температуре. Центрифугировали пробирки 10 мин на скорости 18000g при комнатной температуре. Аккуратно сливали супернатант, оставляя на дне немного изопропанола, так как велик риск потерять прозрачный осадок, приливали по 1 мл 75 % этанола. Инкубировали пробирки при –20 °С на протяжении ночи. Центрифугировали пробирки на максимальной скорости при комнатной температуре 5 мин. Осторожно сливали супернатант и просушивали осадок в течение 10 мин при комнатной температуре. Элюировали в 20 мкл свободной от РНКаз воды.

Анализ полученной РНК

Для измерения концентрации выделенной РНК использовали прибор Quantus Fluorometer (Promega). РНК-профиль анализировали на приборе 2100 Bioanalyzer с помощью набора RNA 6000 Nano и Pico kit (Agilent). Для анализа на таком высокочувствительном приборе необходим всего 1 мкл образца, что позволяет сохранить достаточное количество элюата для дальнейших экспериментов.

Профиль РНК, детектируемый на приборе Agilent 2100 Bioanalyzer, представлен на рис. 3. На рис. 3, *a* показана РНК, полученная путем элюции из TEV буфера и последующего выделения с использованием реагента ExtractRNA (способ 2). При сравнении обоих РНК-профилей можно видеть, что в комплексе с белком (дорожка 1) элюируется гораздо более разнообразный спектр различных РНК с большей концентрацией, нежели с HaloTag (дорожка 2). При более детальном рассмотрении можно заметить, что

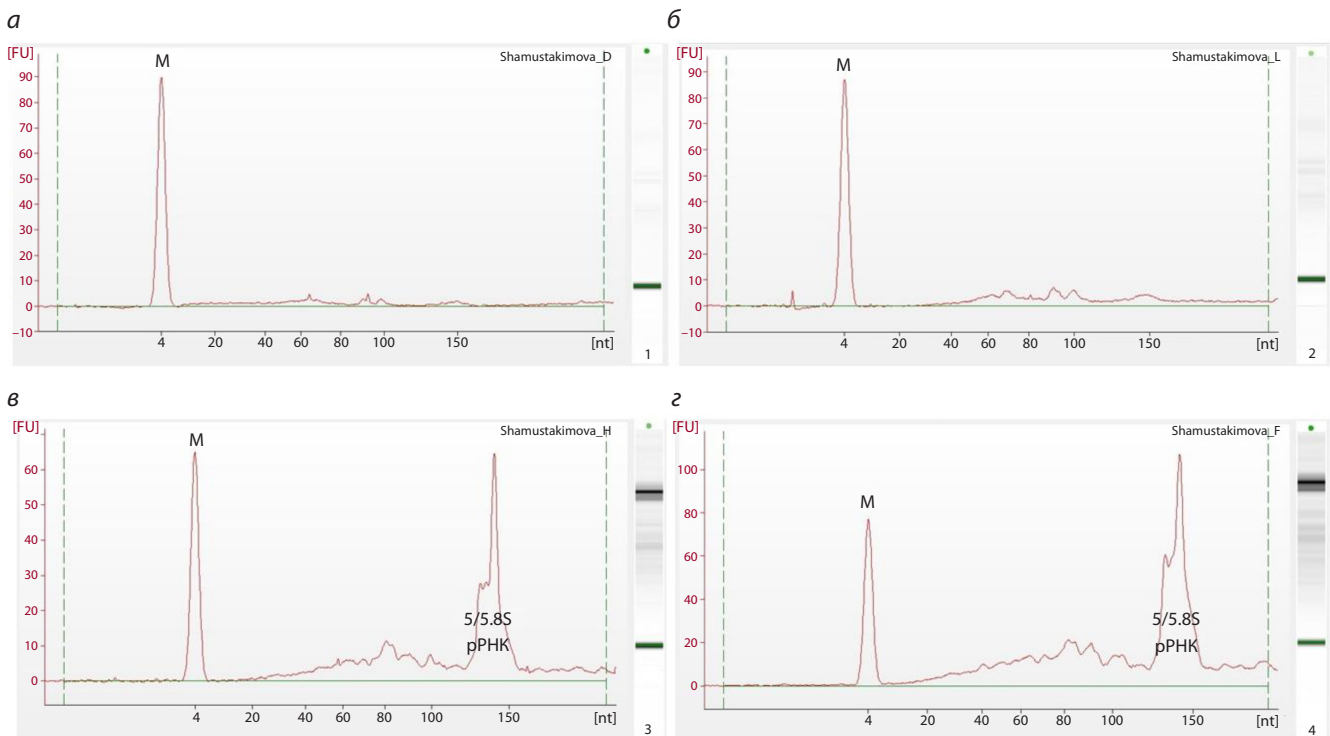


Рис. 4. РНК-профиль, полученный на приборе Agilent 2100 Bioanalyzer с использованием набора Small RNA kit для анализа малых РНК.

а, б – образцы HaloTag и EsCSDP3 из эксперимента, представленного на рис. 3, *а* (отмечено штриховой рамкой); *в, г* – РНК, выделенная из образцов HaloTag и EsCSDP3 способом 2. По оси ординат – интенсивность флуоресценции интеркалирующего красителя, по оси абсцисс – размер РНК в количестве нуклеотидов. Буквой «М» обозначен нижний маркер молекулярного веса.

оба образца имеют часть общих РНК, что надо учитывать при дальнейшем анализе и сравнении.

На рис. 4 показана зона малых РНК в образцах, представленных на рис. 3, *а* (отмечена штриховой рамкой). Эта зона представляла особый интерес вследствие обнаружения больших различий между образцами. Анализ зоны малых РНК позволяет также предсказать природу РНК-мишеней. Так, зону малых РНК можно поделить на участки: в диапазоне до ~40 нуклеотидов расположен участок микроРНК; от ~40 до ~80 находятся транспортные РНК; от ~80 до ~150 – малые ядрышковые, ядерные и рибосомальные РНК.

Сравнение профилей РНК от двух разных способов выделения показало ожидаемо более высокий сигнал флуоресценции в образцах, полученных при выделении непосредственно с магнитных шариков. При этом в таких образцах преобладали 5/5.8S рибосомальные РНК. Если сравнивать общий сигнал флуоресценции в образцах HaloTag и EsCSDP3, то можно увидеть, что он почти в два раза выше у опытного образца (110 FU) по сравнению с контрольным (65 FU).

Подготовка кДНК библиотек и секвенирование

В данном протоколе подробно не освещены процедуры подготовки кДНК библиотек и последующее секвенирование. Указаны лишь моменты, на которые надо обратить внимание при планировании и подготовке эксперимента.

Набор по пробоподготовке библиотек должен подбираться исходя из получаемого количества РНК. Несмотря

на небольшой геном, количество генов у *A. thaliana* сопоставимо с *H. sapiens*: 27000 против 25000. Принимая во внимание данный факт, рекомендуется использовать ячейки на 15–30 млн непарных прочтений (ридов) с длиной 50 п. о. (Xing et al., 2015; Petri, Jakobsson, 2018). Такой длины ридов будет достаточно для последующего картирования на геном, а заданное количество прочтений должно позволить статистически достоверно выявить специфические мишени путем количественного измерения их представленности в пробе.

В случае анализа РНК, полученной непосредственно с магнитных шариков, рекомендуется воспользоваться набором для избавления от рибосомальной РНК, так как на них будет приходиться большое число ридов из-за высокой представленности.

Заключение

Полученные результаты показали, что разработанный нами метод позволяет выделить из листьев *A. thaliana* химерный белок в комплексе с РНК-мишенями.

Метод Halo-RPD обладает рядом преимуществ по сравнению с протоколами, основанными на иммунопреципитации:

- благодаря стабильной экспрессии белка минимизируется как количество растительного материала на старте эксперимента, так и расход реактивов;
- применение реагента на стадии выделения РНК из элюата/субстрата способствует получению малых и микроРНК;

- за счет отсутствия ковалентных сшивок и исключения этапа ультразвуковой фрагментации настоящий протокол дает возможность анализировать нативный РНК-профиль, на основе которого можно делать предварительные выводы о природе РНК-мишеней;
- применение флуоресцентных красителей, связывающихся ковалентно с HaloTag, помогает отслеживать правильность выполнения этапов гомогенизации и выделения белка.

Список литературы / References

- Banks C.A.S., Boanca G., Lee Z.T., Eubanks C.G., Hattem G.L., Peak A., Weems L.E., Conkright J.J., Florens L., Washburn M.P. TNIP2 is a hub protein in the NF- κ B network with both protein and RNA mediated interactions. *Mol. Cell. Proteomics*. 2016;15(11):3435-3449. DOI 10.1074/mcp.M116.060509
- Brooks S.A., Rigby W.F.C. Characterization of the mRNA ligands bound by the RNA binding protein hnRNP A2 utilizing a novel *in vivo* technique. *Nucleic Acids Res.* 2000;28(10):e49. DOI 10.1093/nar/28.10.e49
- Frydrych Capelari É., da Fonseca G.C., Guzman F., Margis R. Circular and micro RNAs from *Arabidopsis thaliana* flowers are simultaneously isolated from AGO-IP libraries. *Plants*. 2019;8(9):302. DOI 10.3390/plants8090302
- Gu J., Wang M., Yang Y., Qiu D., Zhang Y., Ma J., Zhou Y., Hanon G.J., Yu Y. GoldCLIP: gel-omitted ligation-dependent CLIP. *Genom. Proteom. Bioinform.* 2018;16(2):136-143. DOI 10.1016/j.gpb.2018.04.003
- Köster T., Meyer K. Plant ribonomics: proteins in search of RNA partners. *Trends Plant Sci.* 2018;23(4):352-365. DOI 10.1016/j.tplants.2018.01.004
- Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-685. DOI 10.1038/227680a0
- Li X., Pritykin Y., Concepcion C.P., Lu Y., La Rocca G., Zhang M., King B., Cook P.J., Au Y.W., Popow O., Paulo J.A., Otis H.J., Mastroleo C., Ogradowski P., Schreiner R., Haigis K.M., Betel D., Leslie C.S., Ventura A. High-resolution *in vivo* identification of miRNA targets by Halo-enhanced Ago2 pull-down. *Mol. Cell*. 2020;79(1):167-179. DOI 10.1016/j.molcel.2020.05.009
- Los G.V., Encell L.P., McDougall M.G., Hartzell D.D., Karassina N., Zimprich C., Wood M.G., Learish R., Ohana R.F., Urh M., Simpson D., Mendez J., Zimmerman K., Otto P., Vidugiris G., Zhu J., Darzins A., Klaubert D.H., Bulleit R.F., Wood K.V. HaloTag: a novel protein labeling technology for cell imaging and protein analysis. *ACS Chem. Biol.* 2008;3(6):373-382. DOI 10.1021/cb800025k
- Petri R., Jakobsson J. Identifying miRNA targets using AGO-RIPseq. In: Lamandé S. (Ed.) *mRNA Decay. Methods in Molecular Biology*. Vol. 1720. New York: Humana Press, 2018;131-140. DOI 10.1007/978-1-4939-7540-2_9
- Ramanathan M., Porter D.F., Khavari P.A. Methods to study RNA-protein interactions. *Nat. Methods*. 2019;16(3):225-234. DOI 10.1038/s41592-019-0330-1
- Ren Z., Zhang D., Cao L., Zhang W., Zheng H., Liu Z., Han S., Dong Y., Zhu F., Liu H., Su H., Chen Y., Wu L., Zhu Y., Ku L. Functions and regulatory framework of ZmNST3 in maize under lodging and drought stress. *Plant Cell Environ.* 2020;43(9):2272-2286. DOI 10.1111/pce.13829
- Samanta S., Thakur J.K. Characterization of mediator complex and its associated proteins from rice. In: Kaufmann K., Mueller-Roeber B. (Eds.) *Plant Gene Regulatory Networks. Methods in Molecular Biology*. Vol. 1629. New York: Humana Press, 2017;123-140. DOI 10.1007/978-1-4939-7125-1_9
- Seo J.S., Chua N.H. Analysis of interaction between long noncoding RNAs and protein by RNA immunoprecipitation in *Arabidopsis*. In: Chekanova J.A., Wang H.-L.V. (Eds.) *Plant Long Non-Coding RNAs. Methods in Molecular Biology*. Vol. 1933. New York: Humana Press, 2019;289-295. DOI 10.1007/978-1-4939-9045-0_18
- Sorenson R., Bailey-Serres J. Rapid immunopurification of ribonucleoprotein complexes of plants. In: Alonso J., Stepanova A. (Eds.) *Plant Functional Genomics. Methods in Molecular Biology*. Vol. 1284. New York: Humana Press, 2015;209-219. DOI 10.1007/978-1-4939-2444-8_10
- Steffen A., Elgner M., Staiger D. Regulation of flowering time by the RNA-binding proteins *AtGRP7* and *AtGRP8*. *Plant Cell Physiol.* 2019;60(9):2040-2050. DOI 10.1093/pcp/pcz124
- Taranov V.V., Zlobin N.E., Evlakov K.I., Shamustakimova A.O., Babakov A.V. Contribution of *Eutrema salsugineum* cold shock domain structure to the interaction with RNA. *Biochemistry (Moscow)*. 2018;83(11):1369-1379. DOI 10.1134/S000629791811007X
- Urh M., Hartzell D., Mendez J., Klaubert D.H., Wood K. Methods for detection of protein-protein and protein-DNA interactions using HaloTagTM. In: Zachariou M. (Ed.) *Affinity Chromatography. Methods in Molecular Biology*. Vol. 421. New York: Humana Press, 2008;191-210. DOI 10.1007/978-1-59745-582-4_13
- van Dijk M., Visser A., Buabeng K.M., Poutsma A., van der Schors R.C., Oudejans C.B. Mutations within the *LINC-HELLP* non-coding RNA differentially bind ribosomal and RNA splicing complexes and negatively affect trophoblast differentiation. *Hum. Mol. Genet.* 2015;24(19):5475-5485. DOI 10.1093/hmg/ddv274
- Xing D., Wang Y., Hamilton M., Ben-Hur A., Reddy A.S. Transcriptome-wide identification of RNA targets of Arabidopsis SERINE/ARGININE-RICH45 uncovers the unexpected roles of this RNA binding protein in RNA processing. *Plant Cell*. 2015;27(12):3294-3308. DOI 10.1105/tpc.15.00641

ORCID

A.O. Shamustakimova orcid.org/0000-0003-3535-3108

Благодарности. Автор благодарит Чарльза Бэнкса из Института медицинских исследований им. Стоуерса (США) за консультативную помощь в разработке протокола. Работа поддержана грантами Российского фонда фундаментальных исследований (№ 05-04-89005-NWO, № 14-04-00816). Выполнена с использованием научного оборудования Центра коллективного использования «Биотехнология» в ФГБНУ ВНИИСБ (соглашение № RFMEFI62114X0003).

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 28.03.2023. После доработки 21.08.2023. Принята к публикации 24.08.2023.