

高通量 siRNA 文库筛选体系的建立及优化

High-Throughput siRNA Library Screening Assay Development and Optimization

韩帅*

化学生物学技术平台, 中国科学院分子细胞科学卓越创新中心, 上海

*通讯作者邮箱: shan@sibcb.ac.cn

引用格式: 韩帅. (2021). 高通量 siRNA 文库筛选体系的建立及优化. Bio-101 e1010863. Doi: 10.21769/BioProtoc. 1010863.

How to cite: Han, S. (2021). High-Throughput siRNA Library Screening Assay Development and Optimization. Bio-101 e1010863. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010863. (in Chinese)

摘要: 全基因组 siRNA 文库筛选是功能基因组筛选的重要手段之一, 被广泛用于发现及鉴定与特定表型或通路相关的基因。筛选体系的建立及优化是 siRNA 文库筛选的第一步, 也是最重要的环节, 直接决定了筛选数据的质量。本文介绍了 siRNA 文库筛选的整体流程, 并重点讨论在建立及优化筛选体系过程中需要考虑的关键因素。

关键词: siRNA 文库筛选, 筛选体系建立, 高通量筛选

研究背景

随着结构基因组学的不断成熟, 基因组学进入了功能基因组学时代。功能基因组学的主要目标是明确各基因及蛋白质的生物学功能及相互作用网络, 常用研究策略是在基因组范围内通过人为改变生物体或细胞内基因的序列或表达状态, 观察干预后的表型, 从而建立基因型与表型之间的关联并阐述基因的功能 (韩帅和陈铭, 2020)。

RNA干扰 (RNA interference, RNAi) 是在进化过程中高度保守的、由双链RNA介导的同源mRNA高效特异性降解的现象 (Rana, 2007)。双链RNA经胞内Dicer酶剪切后形成21-23个核苷酸长度的双链siRNA, 反义链进入RNA诱导沉默复合物 (RNA-induced silencing complex, RISC), 介导靶基因mRNA的降解或翻译沉默 (Fennell *et al.*, 2014)。

由于可以特异性敲减靶基因表达，RNAi已成为一种成熟的研究工具被广泛 用于探索基因功能。随着自动化液体工作站和高通量检测方法的不断成熟及商业化全基因组小干扰RNA (small interfering RNA, siRNA) 文库的出现，siRNA筛选已被广泛 应用到功能基因组研究的各个领域，例如鉴定参与信号转导、细胞活力、细胞或细胞器形态、蛋白定位、蛋白功能、抗药性机制及宿主细胞免疫反应等生物学过程的重要基因及基因相互作用网络，有力地推动了诸多领域的研究进展 (Bernards, 2006; Mohr *et al.*, 2010; Panda and Cherry, 2012; Mao *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2018; Ou *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2019; Tang *et al.*, 2020)。

本实验手册收集了siRNA筛选在不同领域的典型应用案例，作者们详细介绍了高通量siRNA筛选过程中各自所用细胞株的构建方法、最终确定的siRNA转染条件及检测流程等各个操作步骤的具体细节及注意事项。在开始正式筛选之前，每个项目都经过了筛选体系的建立及优化。本文将重点介绍siRNA筛选体系建立及优化过程中需要考虑的几个重要因素。

一、siRNA 文库筛选概述

一个完整的 siRNA 文库筛选流程包括了图 1 中的各个步骤。其中，筛选体系的建立及优化是筛选流程中的第一步，也是非常重要的一步，直接决定了筛选数据的质量，是本文的重点内容。

筛选体系和条件确定后，在开始大规模初筛之前，一般先开展小规模预筛选，以确保预实验确定的筛选条件合适整板操作，之后开始正式的第一轮高通量初筛。商业化的 siRNA 文库一般排布在 96 孔板或 384 孔板中，每个孔内有针对一个基因的有明确序列信息的 siRNA。由于 siRNA 的敲减效率和脱靶效应受序列影响，大多数商业化的 siRNA 文库会针对同一个基因设计多条 siRNA。大规模初筛时，为提高筛选速度并降低筛选成本，一般选用针对同一个基因所设计的多条 siRNA 混合在一个孔内的文库，例如 Dharmacon 公司的 SMARTPool 产品。由于 siRNA 技术本身具有的脱靶效应，进行第二轮复筛排除第一轮阳性基因列表中假阳性基因的必要性非常大。第二轮复筛的策略，一般使用针对同一个基因所设计的多条独立 siRNA 进行验证筛选，采用的检测手段可以跟第一轮初筛相同，也可以选择跟所关注表型相关的另外一种检测指标，后者更有利于排除初筛的假阳性结果。经过第二轮复筛及基因聚类分析后，将得到

缩减的阳性基因列表，针对全部或部分基因开展更深入的功能性验证实验后，可以确定最终的阳性基因列表。

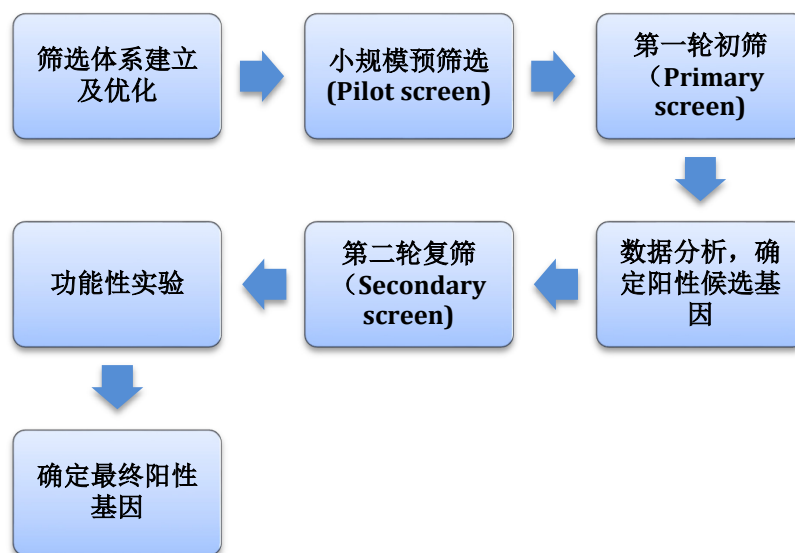


图 1. 高通量 siRNA 文库筛选流程

从具体操作步骤来讲，笔者单位开展正式高通量 siRNA 文库筛选的常规流程如图

2. 共有四个大的步骤：

1. siRNA 文库制备及分装。使用自动化液体工作站将 siRNA 文库从存储板分装至开展筛选所需的细胞培养板中，制备成可直接用于文库筛选的 siRNA 文库（文库制备的详细步骤及自动化液体工作站程序设置请参见本手册《siRNA 文库存储板的制备》）。
2. 高通量 siRNA 文库转染。siRNA 筛选时大多采取反式转染方法，利用自动分液仪在 siRNA 文库孔板内加入转染试剂及细胞悬液，在铺细胞的同时完成转染步骤。
3. 将细胞放至细胞培养箱培养特定时长。
4. 针对所关注的表型进行整板检测，常用的两类检测手段包括多功能酶标仪读值或高内涵成像分析仪获取图像并定量图像分析。

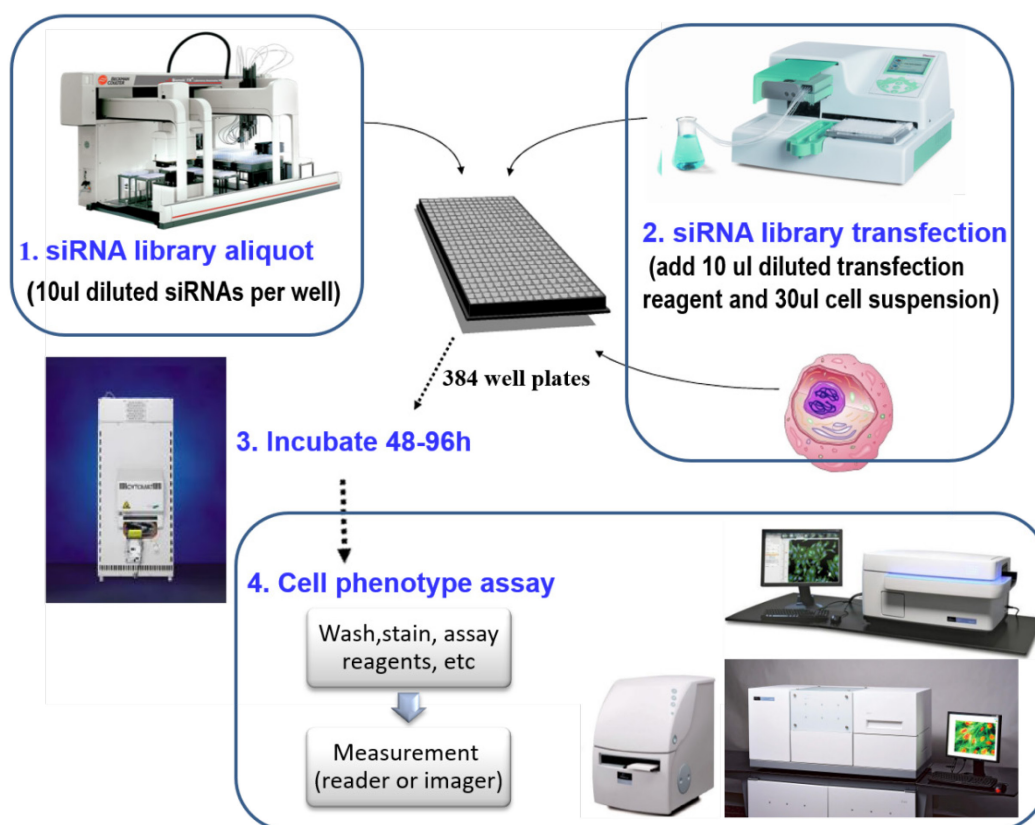


图 2. siRNA 文库筛选操作步骤

对于筛选者而言，预实验阶段需要摸索的条件主要是 siRNA 文库转染条件的优化以及筛选表型检测两大部分。其中，siRNA 文库转染条件的优化可参见本实验手册《siRNA 筛选文库转染条件优化方法》，该文详细地介绍了实验设计及流程。本文将重点介绍建立及优化表型检测体系的重点考虑因素。

二、建立 siRNA 筛选检测体系需要考虑的重点因素

1. siRNA 筛选体系建立的目标及指导原则

所有高通量筛选项目在体系建立及优化阶段基本都围绕共同的目标，即筛选体系的特异性、灵敏性及稳定性。为实现这个目标，我们在建立筛选体系时需要首先明确自己所关注的科学问题及筛选目标，并基于此选择合适的检测手段；其次，在保证准确性的前提下，尽量简化操作步骤，简洁的操作流程有助于获得高稳定性的数据。

2. 检测方法的选择

目前检测体系多种多样，不同体系所反映的指标不同，也有各自的优缺点，选择一个合适的检测体系对筛选项目非常关键。

选择合适的检测体系,首先要明确所关注的生物学问题及筛选的目标,其次要了解各种检测方法的原理及优缺点。例如,CellTiter-Glo 发光法检测试剂被广泛应用于细胞活力调控基因的筛选,该检测方法由于快速及准确成为细胞活力检测的金标准。该试剂的检测原理是通过检测 ATP 进行定量测定来反应培养物中活细胞数目。但是,影响孔内最终活细胞数目的有可能是细胞增殖发生了改变,也有可能是细胞死亡所引起的改变,单从 CellTiter-Glo 检测数值的变化无法分辨孔内细胞的增殖和死亡情况。另外,由于 ATP 是活细胞新陈代谢的一个指标,细胞代谢水平的改变同样会引起 CellTiter-Glo 检测值的改变。因此,筛选者需要首先明确自己的筛选目标,例如,如果要筛选细胞存活/死亡的调控基因,可以在 CellTiter-Glo 作为终点法检测的同时,整合活/死细胞染色的检测,通过成像统计孔内活细胞和死细胞的比例(可参考本实验手册《胃癌细胞中铁死亡调控因子筛选---PI/ Hoechst 染色法》)。如果目标是筛选与细胞增殖相关的调控基因,在筛选基因数不是太多的情况下可以整合 CellTiter-Glo 检测及活细胞动态监测即绘制细胞增殖曲线(可参考本实验手册《细胞活力调控因子筛选---CellTiter-Glo 法》)。如果关注特定类型的死亡通路,可对特定死亡通路的标志性事件进行检测,例如凋亡通路 Annexin V 染色等。筛选细胞周期调控因子时,如果要寻找的是调控周期中某个特定时相的基因,需要选定该时相的特定标志性事件,例如本实验手册中《细胞周期调控因子筛选---FUCCI 活细胞标记法》案例中所使用的 FUCCI 筛选体系鉴定到的是调控细胞从 G1 期进入 S/G2/M 期的基因 (Sakaue-Sawano *et al.*, 2008)。

另外,为了使筛选数据更特异性地反应筛选者所关注的表型,一般会加入内参或归一化 (normalization) 指标用来消除由细胞数或非特异性调控等因素所带来的假阳性结果。在开展 siRNA 筛选时,很多基因被敲减后会影响到孔内细胞数,所以预实验阶段一定要考虑孔内细胞数改变对所关注表型所造成的影响。以筛选特定基因的转录调控因子为例,我们一般使用报告基因体系,将该基因的转录调控区克隆至报告基因载体上,通过报告基因的表达水平指征所关注基因的转录情况。常使用的报告基因有荧光素酶 (luciferase) 体系及荧光蛋白体系。在选用荧光素酶作为报告基因筛选体系时,推荐选用双荧光素酶体系。同时也可参考本手册《生物钟调控基因的高通量 siRNA 筛选》案例 (Ou *et al.*, 2019) 在使用 Firefly 单荧光素酶报告基因的筛选体系中,整合了 PrestoBlue 作为细胞数的检测手段用以校准细胞数改

变对孔内信号值的影响。在选用荧光蛋白作为报告基因的筛选体系中，建议外加另一个组成型表达的荧光蛋白作为内参，用来指征细胞内非特异性调控的基因转录水平，例如本手册中《特定蛋白表达调控因子筛选---GFP 融合蛋白法》及《全基因组 siRNA 法筛选长非编码 RNA NEAT1 的转录调控因子》(Wang *et al.*, 2018)。

最后，基于读值的检测体系和基于成像的检测体系各有优劣。基于读值的筛选速度快、通量高，但得到的信息相对较少；基于成像的高内涵筛选体系速度慢、对图像分析和存储要求高，但是得到的信息量大，目前已经越来越多地运用在功能基因组筛选中。建立高内涵筛选体系时需要考虑的重要因素可参考本手册中《高内涵检测体系优化方法》一文及《高内涵成像及定量分析实验手册》。

3. 检测流程中关键时间点的确定

考虑到 siRNA 在细胞内的寿命及有效时长，整个筛选实验的流程一般控制在 48-96 h 内，以 72 h 居多。在某些实验体系中，所关注的表型受细胞密度调控比较明显，例如本手册《胃癌细胞中 Hippo 通路负调控因子筛选-YAP 出入核检测》的案例 (Tang *et al.*, 2020) 中，Hippo 通路中 YAP 的核质转位会受细胞密度影响，筛选者最终选用 48 h 作为筛选流程总时长，以尽量减少时间过长情况下不同基因被敲减后导致孔间细胞数不一致而引起的表型差异。

另外，筛选实验的流程中可能会涉及中途加入特定刺激或药物等步骤，在确定外加刺激的时间点时，需要牢记的一点是从 siRNA 转染进入细胞，到下调靶基因 mRNA 水平，到下调靶基因蛋白水平，再到最终该基因所调控的表型出现改变，整个过程是需要特定时间长度的。由于不同蛋白半衰期不同，siRNA 在胞内下调靶基因蛋白水平的有效时长也不尽相同，对于文库筛选，我们一般统一选取 48 h 作为 siRNA 下调靶基因的时长。如果筛选者希望检测靶基因被下调后细胞对外加刺激物的响应是否改变，一般建议在 siRNA 文库转染 48 h 后加入刺激物。例如，在本手册《胃癌细胞中铁死亡调控因子筛选---PI/ Hoechst 染色法》的案例中，转染 48 h 后，再加入铁死亡的诱导剂，以筛选到参与铁死亡通路的基因。另外，在本手册《全基因组 siRNA 法筛选环形 RNA 的反式调控因子》案例 (Li *et al.*, 2017) 中，作者构建了环形 RNA 的可诱导表达体系，在 siRNA 转染入细胞 48 h 后，才诱导环形 RNA 开始合成，以观察靶基因被敲减后特定事件的发生情况，从而增大表型检测的变化窗口。

4. 筛选所用细胞模型及多孔板的选择

确定筛选要用的细胞株，首先要考虑研究表型的需要。某些特定表型或信号转导通路只在某些特定的细胞类型中存在。在满足这个条件的前提下，贴壁牢的细胞相对而言更易操作；如果是基于成像的筛选体系，细胞铺展较开且非成团生长的细胞所获得的图像相对更易分析。由于转染实验对细胞状态要求较高，建议筛选前进行支原体检测，并尽量保证整个筛选过程中所用细胞代数跨度不要太大。

关于筛选所用多孔板的选择，一般基于信号检测的方式及对细胞数的要求来决定。**siRNA** 筛选大多在 **384** 孔板开展。基于荧光信号的检测体系多使用黑色多孔板，以尽量降低背景噪音信号值；基于化学发光的检测体系多使用白色多孔板，以提高信号收集效率；若检测过程涉及成像，需使用底部透明的多孔板。

确定多孔板类型还需考虑板型与自动化设备的兼容性。例如，基于高内涵成像的筛选体系，如果要用到高倍物镜或数值孔径较高的物镜进行拍摄，需用薄底板，且为了能够拍摄到靠近多孔板边缘的孔，对多孔板的裙边高度也有要求（具体请参考本实验手册《高内涵检测体系优化方法》）。另外，不同材质的多孔板在封膜机上封膜的温度条件也需提前测试。

5. 细胞接种数目的确定

细胞接种数的确定需要同时考虑 **siRNA** 转染及检测体系两方面的要求。从 **siRNA** 转染的角度，细胞接种数目过低往往导致转染毒性较强。从检测体系角度，不同筛选指标对细胞密度要求不同，例如，观测细胞增殖情况，需要在整个筛选实验进程中尽量保证细胞处于对数生长期，而不是提前达到接触抑制；通过划痕实验反应细胞迁移能力的筛选体系中，需要划痕时细胞融合度达到 **100%**，以减少细胞增殖对细胞迁移结果的影响(利用划痕实验筛选调控细胞迁移能力的实验体系可参考 (Wang *et al.*, 2019))；某些蛋白在高细胞密度条件下定位会发生改变，当我们要筛选该蛋白定位的调控因子而不希望受到细胞密度干扰时，需要保证细胞在整个培养过程中处于低密度状态（可参见本实验手册《胃癌细胞中 **Hippo** 通路负调控因子筛选-YAP 出入核检测》(Tang *et al.*, 2020))。另外，基于成像的筛选体系，密度过高不利于成像分析，在满足表型对细胞密度的要求前提下，我们一般尽量控制最终细胞密度在 **70%-80%**以内。

6. 阴阳性对照的选择

siRNA 筛选中使用的阴性对照指一段随机序列的 siRNA，不靶向基因组中任何表达基因，推荐使用与 siRNA 筛选文库配套的阴性对照 siRNA。在预实验阶段，我们会将阴性对照孔的数据与不进行转染的实验孔 (non-transfected wells, NT 组) 和只加转染试剂但无任何 siRNA 的实验孔 (mock transfection wells) 进行比较，理想的阴性对照应该跟 NT 组和 mock 组相差不大。

siRNA 筛选体系的阳性对照分为两类，一类是文库特异性的阳性对照，该类对照已明确验证会下调其靶基因，通用于绝大多数筛选体系，用来指征筛选过程中整个文库的转染及细胞内 RNA 干扰的过程没有异常。例如我们在优化转染条件时用来指征转染效率的 siRNA TOX——当 TOX 转染进入细胞后细胞发生死亡，明场下便可对转染效果进行评判 (参考本手册《siRNA 文库转染条件优化方法》)。另一类阳性对照是筛选体系特异性的，即针对已知的可调控特定筛选表型或通路的基因所设计的 siRNA，这类阳性 siRNA 仅用于特定筛选体系，用来表征转染及检测体系均无异常。例如，为筛选新的肿瘤细胞迁移能力调控基因，可使用已报道的通过调控上皮细胞间质转型 (epithelial-mesenchymal transitions, EMT) 从而影响肿瘤细胞迁移能力的 *SNAIL1* 的 siRNA 作为阳性对照 (Wang *et al.*, 2019)。我们推荐同时使用强阳性和中等强度表型变化的 siRNA 作为阳性对照。

7. 多孔板边缘效应对表型的影响

由于液体蒸发等因素，往往导致位于多孔板外周的实验孔的数据出现不同程度的偏差。为了尽量减少边缘效应对筛选结果的影响，我们一般在实验孔周边一圈的孔内加入不少于实验孔体积的液体量。在预实验阶段，需要测试边缘效应对检测指标的影响，并在文库排板时尽量避免边缘效应明显的区域作为实验孔。我们日常使用的 siRNA 文库中针对不同基因的 siRNA 分布在 B3-O22 区域内 (图 3，黄色区域)，第 2 列和第 23 列用于设置各类对照孔，四周一圈的孔 (图 3，灰色区域) 加入与实验孔等体积的 PBS 或培养基等液体。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A																								
B																								
C																								
D																								
E		NC																					PC	
F																								
G																								
H																								
I																								
J																								
K		PC																						
L																							NC	
M																								
N																								
O		TOX																					TOX	
P																								

图 3. siRNA 筛选的 384 孔板排布图

三、实现 siRNA 筛选流程的自动化及质量控制方法

筛选体系建立后，下一步是将所有操作步骤使用自动化仪器实现。由于不同单位配备的硬件设备不同，本文不展开叙述，本实验手册的每个具体案例中都描述了正式筛选过程中各自所用到的设备及详细参数的设置情况，供读者参考。如果筛选流程中涉及到整板细胞换液的操作，例如干细胞诱导分化，可参考本实验手册《无菌条件下贴壁细胞换液的 Bravo 仪器参数设置》。

siRNA 筛选体系所有条件确定后，我们将使用阴性对照及阳性对照 siRNA 开展正式筛选前的流程模拟（每种 siRNA 开展至少 32 个孔的重复）。为衡量所建立的 siRNA 筛选体系是否合适开展正式筛选，我们一般使用 Z'-factor 作为重要的评判指标之一。Z'-factor 的计算公式如下 (Oldenburg, 1999):

$$Z' = 1 - \frac{(3\sigma_{c+} + 3\sigma_{c-})}{|\mu_{c+} - \mu_{c-}|}$$

Z'-factor 反应的是阴阳性对照变化的窗口 (assay window) 及重复孔之间的变异 (variation) 大小。Z'-factor 的数值小于或等于 1。当 Z'-factor 为负值时，说明筛选体系不适合开展高通量筛选，有可能是检测体系的窗口太小，或复孔间稳定性不好，或二者兼有，需要继续优化；当 $0 < Z'-factor < 0.5$ 时，我们认为筛选体系是可以接受的；当 $Z'-factor > 0.5$ 时，筛选体系是比较理想的。

四、展望—siRNA 筛选与 CRISPR 筛选

高通量 siRNA 筛选已经成为一种非常成熟的功能基因组筛选手段，被广泛应用于生命科学的诸多研究领域。近些年随着 CRISPR 技术的快速发展，全基因组 CRISPR 筛选技术也开始被研究者越来越多地使用。siRNA 筛选和 CRISPR 筛选两类技术各有优势。

siRNA 筛选属于点阵式文库筛选，即一个孔对应一个明确的基因。全基因组 CRISPR 筛选根据开展形式的不同分为混合式 CRISPR 筛选及点阵式 CRISPR 筛选两大类。混合式筛选目前大多利用基于病毒载体的 sgRNA 文库，且所有感兴趣基因的 sgRNA 混合在一起，同时包装病毒感染靶细胞。这种筛选体系需经过表型的富集（例如根据细胞活/死或荧光强弱进行正向富集或反向富集），最后通过对富集的细胞群体进行高通量测序鉴定候选基因。混合式 CRISPR 筛选的优势在于筛选通量高，速度快；劣势是对于无法进行富集的表型不具备筛选可行性。针对混合式 CRISPR 筛选所得到的阳性基因，继续开展 siRNA 筛选作为第二轮的验证筛选，已成为很多筛选者的选择。

点阵式 CRISPR 筛选也开始起步，筛选模式类似 siRNA 筛选。但由于 CRISPR 编辑效率的限制，一个孔内只有部分细胞真正发生基因编辑，如果筛选所选择的检测指标是以孔内全部细胞作为一个整体进行检测和分析，有可能会造成假阴性的结果。另外，CRISPR 筛选一般需要在筛选细胞株中稳定表达 Cas 蛋白，该蛋白的稳定表达对筛选者所关注的表型是否有影响也需要关注。

综上所述，siRNA 筛选技术和 CRISPR 技术将互相补充，相辅相成，成为功能基因组筛选领域并行的两大利器。

致谢

感谢所有筛选者在项目开展过程中的讨论和建议，感谢中国科学院分子细胞科学卓越创新中心化学生物学技术平台全体成员的建议和帮助。本工作得到中科院关键技术人才项目 (Y907S21A11) 的资助。

参考文献

1. 韩帅, 陈铭. (2020). [功能基因组学研究的技术方法](#). *生命的化学* 40(3): 11-20.
2. Bernards, R., Brummelkamp, T. R. and Beijersbergen, R. L. (2006). [shRNA libraries and their use in cancer genetics](#). *Nat Methods* 3(9): 701-706.

3. Fennell, M., Xiang, Q., Hwang, A., Chen, C., Huang, C. H., Chen, C. C., Pelossof, R. and Garippa, R. J. (2014). [Impact of RNA-guided technologies for target identification and deconvolution](#). *J Biomol Screen* 19(10): 1327-1337.
4. Li, X., Liu, C. X., Xue, W., Zhang, Y., Jiang, S., Yin, Q. F., Wei, J., Yao, R. W., Yang, L. and Chen, L. L. (2017). [Coordinated circRNA biogenesis and function with NF90/NF110 in viral infection](#). *Mol Cell* 67(2): 214-227 e217.
5. Mao, L., Liu, C., Wang, Z., Niu, X., Xue, L., Zhou, Z., Cai, Z., Yu, M., Li, Y., Wu, D. and Li, L. (2016). [A genome-wide loss-of-function screening method for minimizing false-negatives caused by functional redundancy](#). *Cell Res* 26(9): 1067-1070.
6. Mohr, S., Bakal, C. and Perrimon, N. (2010). [Genomic screening with RNAi: results and challenges](#). *Annu Rev Biochem* 79: 37-64.
7. Ou, J., Li, H., Qiu, P., Li, Q., Chang, H. C. and Tang, Y. C. (2019). [CDK9 modulates circadian clock by attenuating REV-ERBalpha activity](#). *Biochem Biophys Res Commun* 513(4): 967-973.
8. Panda, D. and Cherry, S. (2012). [Cell-based genomic screening: elucidating virus-host interactions](#). *Curr Opin Virol* 2(6): 784-792.
9. Rana, T. M. (2007). [Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs](#). *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(1): 23-36.
10. Sakaue-Sawano, A., Kurokawa, H., Morimura, T., Hanyu, A., Hama, H., Osawa, H., Kashiwagi, S., Fukami, K., Miyata, T., Miyoshi, H., Imamura, T., Ogawa, M., Masai, H. and Miyawaki, A. (2008). [Visualizing spatiotemporal dynamics of multicellular cell-cycle progression](#). *Cell* 132(3): 487-498.
11. Tang, Y., Fang, G., Guo, F., Zhang, H., Chen, X., An, L., Chen, M., Zhou, L., Wang, W., Ye, T., Nie, P., Yu, H., Lin, M., Zhao, Y., Lin, X., Yuan, Z., Jiao, S. and Zhou, Z. (2020). [Selective inhibition of STRN3-containing PP2A phosphatase restores hippo tumor-suppressor activity in gastric cancer](#). *Cancer Cell* 38(1): 115-128 e119.
12. Wang, X., Liu, R., Zhu, W., Chu, H., Yu, H., Wei, P., Wu, X., Zhu, H., Gao, H., Liang, J., Li, G. and Yang, W. (2019). [UDP-glucose accelerates SNAI1 mRNA decay and impairs lung cancer metastasis](#). *Nature* 571(7763): 127-131.
13. Wang, Y., Hu, S. B., Wang, M. R., Yao, R. W., Wu, D., Yang, L. and Chen, L. L. (2018). [Genome-wide screening of NEAT1 regulators reveals cross-regulation between paraspeckles and mitochondria](#). *Nat Cell Biol* 20(10): 1145-1158.

14. Zhang, J. H., Chung, T. D. and Oldenburg, K. R. (1999). [A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays](#). *J Biomol Screen* 4(2): 67-73.