

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2020 年 4 月 2 日 (02.04.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/062264 A1

(51) 国际专利分类号:
C12Q 1/68 (2018.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2018/109145

(22) 国际申请日: 2018 年 9 月 30 日 (30.09.2018)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人: 北京大学 (PEKING UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国北京市海淀区颐和园路 5 号, Beijing 100871 (CN)。

(72) 发明人: 贾桂芳 (JIA, Guifang); 中国北京市海淀区颐和园路 5 号, Beijing 100871 (CN)。 肖雨 (XIAO, Yu); 中国北京市海淀区颐和园路 5 号, Beijing 100871 (CN)。

(74) 代理人: 北京柏杉松知识产权代理事务所 (普通合伙) (PATENTSINO IP FIRM); 中国北京市西城区北三环中路 27 号商厦大厦 413 室, Beijing 100029 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(54) Title: SINGLE-GENE SINGLE-BASE RESOLUTION RATIO DETECTION METHOD FOR RNA CHEMICAL MODIFICATION

(54) 发明名称: 一种 RNA 化学修饰的单基因单碱基分辨率检测方法

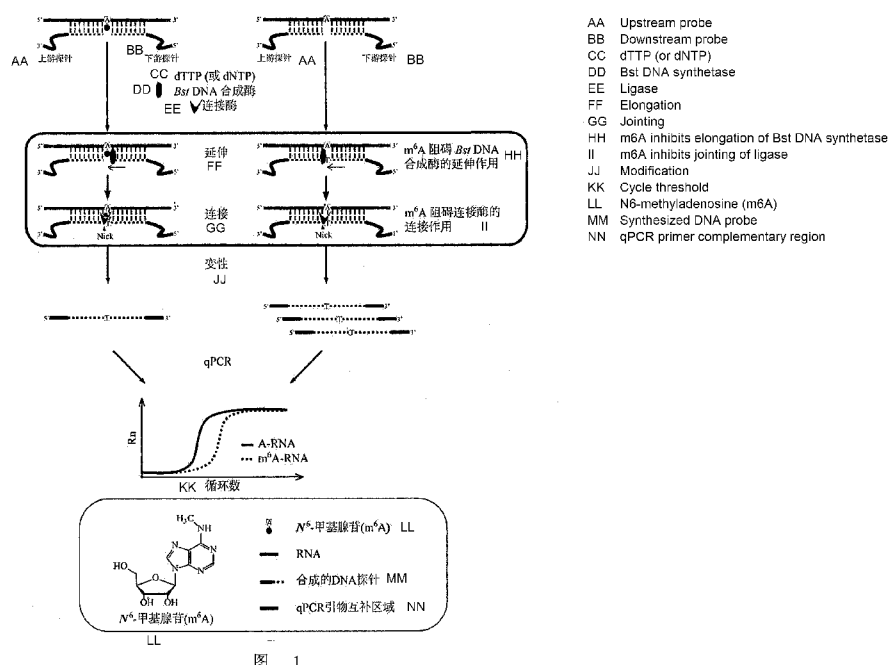


图 1

(57) Abstract: Provided is a method for detecting the chemical modification of a target RNA site X, comprising the steps as follows: (1)acquiring an RNA sample and selecting in the RNA sample a target RNA segment comprising the target RNA site X; (2)SELECT; (3)PCR amplification; (4)comparing the PCR cycle threshold value with a reference PCR cycle threshold value, or comparing the PCR amplification product quantity with a reference PCR amplification product quantity, so as to determine whether there is a target chemical modification in the target RNA site X. Further provided are a method for identifying a substrate target site of RNA modification enzyme

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告 (条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分 (细则5.2(a))。

or RNA demodification enzyme and a method for quantifying an RNA modification rate in a transcript.

(57) 摘要: 提供了一种检测RNA目标位点X的化学修饰的方法, 其包括: (1)获得RNA样品, 在RNA样品中选择包含RNA目标位点X的目标RNA区段; (2)SELECT步骤; (3)PCR扩增步骤; (4)将所述PCR阈值循环数与PCR阈值循环数参比值比较, 或者将所述PCR扩增产物量与PCR扩增产物量参比值比较, 以确定目标RNA位点X是否存在目标化学修饰。还提供了一种鉴定RNA修饰酶或RNA去修饰酶底物靶位点的方法和一种用于定量转录本中RNA修饰率的方法。

一种 RNA 化学修饰的单基因单碱基分辨率检测方法

技术领域

本公开涉及分子生物学领域，具体涉及一种 RNA 化学修饰的单基因单碱基分辨率检测方法。

背景技术

在生命的三个领域即细菌、古生菌、真核生物中发现了超过 100 种 RNA 的化学修饰。表观转录组标记 N^6 -甲基腺苷 (m^6A) 是真核 mRNA 和长非编码 RNA (lncRNA) 中最丰富的转录后 RNA 修饰。这些标记通常由 m^6A 修饰酶 (Writer) 形成，已经鉴定出人类 m^6A 修饰酶 (甲基转移酶复合物) 的几个亚单位：METTL3、METTL14、WTAP、KIAA1429 和 RBM15 (RNA 结合基序蛋白 15)，并且位于 MAT2A 发夹和剪接体 U6 snRNA 中的 m^6A 由 METTL16 引入。 m^6A 被称为去修饰酶的 AlkB 家族双加氧酶 (例如人的 FTO 和 ALKBH5) 去除。 m^6A 结合蛋白可以读取 m^6A 标记。已知 m^6A 标记会影响 RNA 加工和代谢，包括前体 mRNA 剪接、出核、mRNA 稳定性和翻译。因此， m^6A 标记在许多生物学过程如干细胞分化、昼夜节律、紫外线诱导的 DNA 损伤和疾病发病机制中发挥调节作用。

迄今为止转录组范围的 m^6A 的检测方法依赖于 m^6A -抗体免疫沉淀 (m^6A -IP)，这主要归因于 m^6A 的甲基的惰性反应性。第一个开发的方法 m^6A -测序 (或 MeRIP-seq) 结合了 m^6A -IP 和高通量测序来定位大约 200 个核苷酸的 RNA 区段内的 m^6A 位点。随后， m^6A 研究人员开发了 PA- m^6A -seq 和 miCLIP 方法，以更高的分辨率绘制 m^6A 标记。具体而言，PA- m^6A -seq 在体内掺入 4-硫尿苷 (4SU) 以在 UV (365nm) 暴露下将抗 m^6A 抗体与 RNA 交联，从而在约 23 个核苷酸分辨率下定位 m^6A 位点；miCLIP 在 UV (254nm) 暴露下使 RNA 与抗 m^6A 抗体交联，并且基于逆转录诱导的突变或截断，可以以单核苷酸分辨率鉴定 m^6A 残基。由于抗

-2-

m⁶A 抗体的特异性和低交联产率的问题, PA-m⁶A-seq 或 miCLIP 方法仅识别 m⁶A 位点有限的部分, 并且这两种方法在 m⁶A 研究中都没有像 m⁶A/MeRIP-seq 那样被广泛使用。

尽管 m⁶A 测序提供了转录组范围的信息, 但是对于研究 m⁶A 的生物学功能来说, 非常需要一种检测单个转录物的特定 m⁶A 修饰的方法。m⁶A-IP-qPCR 方法被广泛用于功能性 m⁶A 研究; 然而, 它不提供单碱基分辨率, 不能定量, 并且取决于 m⁶A 抗体的特异性。已经开发了几种方法来检测单核苷酸分辨率的 m⁶A 标记。迄今为止, 基于 RNase H 的 SCARLET 方法是唯一能够定量检测单个 mRNA 或 lncRNA 中 m⁶A 的方法, 但其非常耗时, 而且需要放射性标记, 这限制了其更广泛的应用。

发明内容

本公开的提供了一种检测 RNA 目标位点 X 的化学修饰的方法, 其包括:

(1) 获得 RNA 样品, 在 RNA 样品中选择包含 RNA 目标位点 X 的目标 RNA 区段;

(2) SELECT 步骤: 在目标 RNA 区段内、在 RNA 目标位点 X 的上游和下游分别设计上游探针 Px1 和下游探针 Px2, 利用所述下游探针 Px2 通过 DNA 聚合酶进行延伸, 并用连接酶连接上游探针 Px1 和延伸后的下游探针 Px2, 得到 SELECT 产物;

其中, 上游探针 Px1 与目标 RNA 位点 X 的上游互补配对, 且上游探针 Px1 5'末端的第一个核苷酸和位于目标 RNA 位点 X 上游与目标 RNA 位点 X 距离 1nt 的核苷酸互补配对;

下游探针 Px2 与目标 RNA 位点 X 的下游互补配对, 且下游探针 Px2 3'末端的第一个核苷酸和位于目标 RNA 位点 X 下游与目标 RNA 位点 X 距离 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10nt 的核苷酸互补配对;

优选地, 上游探针 Px1 与目标 RNA 位点 X 的上游互补配对的序列长度为 15-30nt; 下游探针 Px2 与目标 RNA 位点 X 的上游互补配对的序列

-3-

长度为 15-30nt;

(3) PCR 扩增步骤: 将步骤 (2) 获得的 SELECT 产物进行 PCR 扩增, 确定 PCR 阈值循环数或 PCR 扩增产物量, 优选通过 qPCR 荧光信号确定 PCR 阈值循环数, 或优选通过聚丙烯酰胺凝胶电泳确定 PCR 扩增产物量; 和

(4) 将所述 PCR 阈值循环数与 PCR 阈值循环数参比值比较, 或者将所述 PCR 扩增产物量与 PCR 扩增产物量参比值比较, 以确定目标 RNA 位点 X 是否存在目标化学修饰。

在本公开的一些实施方案中, 所述化学修饰选自 m^6A 修饰、 m^1A 修饰、假尿苷修饰和 2'-O-甲基化修饰。

在本公开的一些实施方案中, 所述 DNA 聚合酶选自 *Bst* 2.0 DNA 聚合酶或 *Tth* DNA 聚合酶, 优选 *Bst* 2.0 DNA 聚合酶; 所述连接酶选自 SplintR 连接酶、T3 DNA 连接酶、T4 RNA 连接酶 2、T4 DNA 连接酶, 优选 SplintR 连接酶或 T3 DNA 连接酶。

在本公开的一些实施方案中, 在步骤 (4) 中, 所述 PCR 阈值循环数参比值是 PCR 阈值循环数第一参比值或者 PCR 阈值循环数第二参比值, 其中:

所述 PCR 阈值循环数第一参比值为:

通过与所述目标 RNA 区段相同的方法确定的第一参比序列的 PCR 阈值循环数, 所述第一参比序列至少包含核苷酸序列 II, 所述核苷酸序列 II 具有与所述目标 RNA 区段中的核苷酸序列 I 相同的核苷酸序列, 其中: 核苷酸序列 I 为所述目标 RNA 区段上自与 X 位点的上游引物 3' 末端核苷酸互补配对的核苷酸起至与 X 位点的下游引物 5' 末端核苷酸互补配对的核苷酸止的核苷酸序列, 且所述第一参比序列中与所述目标 RNA 区段的所述 RNA 目标位点 X 相对应的 RNA 目标位点 X1 不存在目标修饰; 或者

其中, 所述 PCR 阈值循环数第二参比值为:

通过与所述目标 RNA 区段相同的方法确定的第二参比序列的 PCR 阈

值循环数，所述第二参比序列至少包含核苷酸序列 II，所述核苷酸序列 II 具有与所述目标 RNA 区段中的核苷酸序列 I 相同的核苷酸序列，其中：核苷酸序列 I 为所述目标 RNA 区段上自与 X 位点的上游引物 3' 末端核苷酸互补配对的核苷酸起至与 X 位点的下游引物 5' 末端核苷酸互补配对的核苷酸止的核苷酸序列，且所述第二参比序列中与所述目标 RNA 区段的所述 RNA 目标位点 X 相对应的 RNA 目标位点 X2 存在目标修饰。

需要说明的是，在本文中提出“具有相同核苷酸序列”时，不考虑核苷酸上的修饰。也就是说，具有相同核苷酸序列的两个 RNA 修饰状态或修饰种类可以相同或不同。

在本公开的一些实施方案中，当所述 PCR 阈值循环数大于 PCR 阈值循环数第一参比值时，则确定所述 RNA 目标位点 X 存在目标化学修饰；或者

当所述 PCR 阈值循环数等于 PCR 阈值循环数第二参比值时，则确定所述 RNA 目标位点 X 存在目标化学修饰。

在本公开的一些实施方案中，当所述 PCR 阈值循环数与 PCR 阈值循环数第一参比值多至少 0.4-10 个循环，优选至少 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10 个循环时，则确定所述 RNA 目标位点 X 存在目标化学修饰。

在本公开的一些实施方案中，当所述 PCR 阈值循环数与 PCR 阈值循环数第一参比值多至少 0.4-10 个循环，优选至少 0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9.0、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9、10 个循环时，则确定 RNA 目标位点存在目标化学修饰。

-5-

在本公开的一些实施方案中，在步骤（4）中，所述 PCR 扩增产物量参比值是 PCR 扩增产物量第一参比值或者 PCR 扩增产物量第二参比值，其中：

所述 PCR 扩增产物量第一参比值为：

通过与所述目标 RNA 区段相同的方法确定的第一参比序列的 PCR 扩增产物量，所述第一参比序列至少包含核苷酸序列 II，所述核苷酸序列 II 具有与所述目标 RNA 区段中的核苷酸序列 I 相同的核苷酸序列，其中：核苷酸序列 I 为所述目标 RNA 区段上自与 X 位点的上游探针 Px1 3' 末端核苷酸互补配对的核苷酸起至与 X 位点的下游探针 Px2 5' 末端核苷酸互补配对的核苷酸止的核苷酸序列，且所述第一参比序列中与所述目标 RNA 区段的所述 RNA 目标位点 X 相对应的 RNA 目标位点 X1 不存在目标修饰；或者

其中，所述 PCR 扩增产物量第二参比值为：

通过与所述目标 RNA 区段相同的方法确定的第二参比序列的 PCR 扩增产物量，所述第二参比序列至少包含核苷酸序列 II，所述核苷酸序列 II 具有与所述目标 RNA 区段中的核苷酸序列 I 相同的核苷酸序列，其中：核苷酸序列 I 为所述目标 RNA 区段上自与 X 位点的上游探针 Px1 3' 末端核苷酸互补配对的核苷酸起至与 X 位点的下游探针 Px2 5' 末端核苷酸互补配对的核苷酸止的核苷酸序列，且所述第二参比序列中与所述目标 RNA 区段的所述 RNA 目标位点 X 相对应的 RNA 目标位点 X2 存在目标修饰。

在本公开的一些实施方案中，当所述 PCR 扩增产物量小于 PCR 扩增产物量第一参比值时，则确定所述 RNA 目标位点 X 存在目标化学修饰；或者

当所述 PCR 扩增产物量等于 PCR 扩增产物量第二参比值时，则确定所述 RNA 目标位点 X 存在目标化学修饰。

在本公开的一些实施方案中，方法还包括以下步骤：

（c）控制初始 RNA 输入量：在所述目标 RNA 区段内，任选一个 RNA

-6-

非目标位点 N，优选地，所述 RNA 非目标位点 N 位于所述 RNA 目标位点 X 的上游 6nt 至下游 2nt 处；在所述 RNA 非目标位点 N 的上游和下游分别设计上游探针 Pn1 和下游探针 Pn2，利用所述下游探针 Pn2 通过 DNA 聚合酶进行延伸，并用连接酶连接上游探针 Pn1 和延伸后的下游探针 Pn2，得到 SELECT 产物；

将 SELECT 产物进行 PCR 扩增，确定 PCR 阈值循环数；

根据 PCR 阈值循环数控制初始 RNA 输入量，使目标 RNA 区段与第一参比序列或第二参比序列的初始 RNA 输入量相等；

其中，所述第一参比序列至少包含核苷酸序列 II，所述核苷酸序列 II 具有与所述目标 RNA 区段中的核苷酸序列 I 相同的核苷酸序列，其中：当 N 位点位于 X 位点上游时，核苷酸序列 I 为所述目标 RNA 区段上自与 N 位点的上游探针 Pn1 3'末端核苷酸互补配对的核苷酸起至与 X 位点的下游探针 Px2 5'末端核苷酸互补配对的核苷酸止的核苷酸序列；当 N 位点位于 X 位点下游时，核苷酸序列 I 为所述目标 RNA 区段上自与 X 位点的上游探针 Px1 3'末端核苷酸互补配对的核苷酸起至与 N 位点下游探针 Pn2 5'末端核苷酸互补配对的核苷酸止的核苷酸序列；且所述第一参比序列中与所述目标 RNA 区段的所述 RNA 目标位点 X 相对应的 RNA 目标位点 X1 不存在目标修饰；或者

所述第二参比序列至少包含核苷酸序列 II，所述核苷酸序列 II 具有与所述目标 RNA 区段中的核苷酸序列 I 相同的核苷酸序列，其中：当 N 位点位于 X 位点上游时，核苷酸序列 I 为所述目标 RNA 区段上自与 N 位点的上游探针 Pn1 3'末端核苷酸互补配对的核苷酸起至与 X 位点的下游探针 Px2 5'末端核苷酸互补配对的核苷酸止的核苷酸序列；当 N 位点位于 X 位点下游时，核苷酸序列 I 为所述目标 RNA 区段上自与 X 位点的上游探针 Px1 3'末端核苷酸互补配对的核苷酸起至与 N 位点下游探针 Pn2 5'末端核苷酸互补配对的核苷酸止的核苷酸序列；且所述第二参比序列中与所述目标 RNA 区段的所述 RNA 目标位点 X 相对应的 RNA 目标位点 X1 不存在目标修饰。

-7-

在本公开的一些实施方案中，所述 SELECT 步骤在包含以下的反应体系中进行：

RNA 样品，优选地所述 RNA 样品为细胞提取的总 RNA 或 mRNA；更优选地，所述总 RNA 或 mRNA 浓度为 10ng、1ng、0.2ng、0.02ng 或更低；或者更优选地，所述总 RNA 或 mRNA 浓度为 10ng、100ng、1μg、10μg 或更高；

dNTP，优选 dTTP，更优选 5-100μM 的 dTTP；

DNA 聚合酶，优选 *Bst* 2.0DNA 聚合酶、更优选 0.0005-0.05U 的 *Bst* 2.0DNA 聚合酶、最优选 0.01U 的 *Bst* 2.0DNA 聚合酶；

连接酶，优选 SplintR 连接酶、更优选 0.1-2U 的 SplintR 连接酶、最优选 0.5U 的 SplintR 连接酶。在本公开的一些实施方案中，所述 SELECT 步骤在 30-50℃、优选 37-42℃、更优选 40℃ 的反应温度下进行。

在本公开的一些实施方案中，在步骤（1）之前还包括以下步骤：

分别用 RNA 去修饰酶或 RNA 去修饰酶与 EDTA 的混合物处理所述 RNA 样品；其中，用 RNA 去修饰酶处理的 RNA 样品用作第一参比序列；

优选地，所述 RNA 去修饰酶是 FTO 或 ALKBH5。

在本公开的一些实施方案中，RNA 样品是细胞中提取的总 RNA、mRNA、rRNA 或 lncRNA。

本公开还提供了一种鉴定 RNA 修饰酶或 RNA 去修饰酶底物靶位点的方法，其包括：

（1）制备 RNA 修饰酶或 RNA 去修饰酶缺陷型细胞、或 RNA 修饰酶或 RNA 去修饰酶低表达细胞，培养后，提取 RNA；

（2）根据权利要求 1 的步骤（1）-（3）确定针对 RNA 目标位点 X 的 PCR 阈值循环数或 PCR 扩增产物量；

（3）将所述 PCR 阈值循环数与 PCR 阈值循环数参比值比较，或者将所述 PCR 扩增产物量与 PCR 扩增产物量参比值比较，以确定所述 RNA 修饰酶或 RNA 去修饰酶是否在所述 RNA 目标位点 X 进行化学修饰，

其中，所述 PCR 阈值循环数参比值为正常细胞通过与 RNA 修饰酶或

-8-

RNA 去修饰酶缺陷型细胞、或 RNA 修饰酶或 RNA 去修饰酶低表达细胞相同的方法获得的 PCR 阈值循环数，

所述 PCR 扩增产物量参比值为正常细胞通过与 RNA 修饰酶或 RNA 去修饰酶缺陷型细胞、或低表达细胞相同的方法获得的 PCR 扩增产物量；

其中，所述靶位点是单基因单位点；

优选地，当所述 PCR 阈值循环数小于 PCR 阈值循环数参比值时，则所述 RNA 修饰酶或去修饰酶在所述 RNA 目标位点进行化学修饰；

或者，优选地，当所述 PCR 扩增产物量大于 PCR 扩增产物量参比值时，所述 RNA 修饰酶或去修饰酶在所述 RNA 目标位点进行化学修饰。

在本公开的一些实施方案中，所述 RNA 化学修饰为选自 m⁶A 修饰、m¹A 修饰、假尿苷修饰和 2'-O-甲基化修饰，优选为 m⁶A 修饰；所述 RNA 化学修饰酶包括 m⁶A 修饰酶；优选地，所述 m⁶A 修饰酶为甲基转移酶复合物或 METTL16；所述甲基转移酶复合物选自以下的任意成员或其组合：METTL3、METTL14、WTAP、KIAA1429（又称 VIRMA 或 VIRILIZER）、HAKAI、ZC3H13、RBM15 和 RBM15B；所述 RNA 去修饰酶是 FTO 或 ALKBH5。

本公开还提供了一种用于定量转录本中 RNA 修饰率的方法，其包括：

（1）获得 RNA 样品，在 RNA 样品中选择包含 RNA 目标位点 X 的目标 RNA 区段；

（2）确定所述 RNA 样品中目标 RNA 区段的含量，其包括：

（2a）在所述目标 RNA 区段内，任选一个 RNA 非目标位点 N，优选地所述 RNA 非目标位点 N 位于所述 RNA 目标位点 X 的上游 6nt 至下游 2nt 处；在所述 RNA 非目标位点 N 的上游和下游分别设计上游探针 Pn1 和下游探针 Pn2，利用所述下游探针 Pn2 通过 DNA 聚合酶进行延伸，并用连接酶连接上游探针 Pn1 和延伸后的下游探针 Pn2，得到 SELECT 产物；将 SELECT 产物进行 PCR 扩增，获得 PCR 阈值循环数 N；

（2b）将参比序列梯度稀释成一系列浓度，分别采用步骤（1a）的方法获得与各浓度对应的 PCR 阈值循环数 N_n，根据浓度和 PCR 阈值循环

数 N_n 确定标准曲线 1; 优选地, 所述一系列浓度在 0.1fmol 至 3fmol 之间, 优选在 0.2fmol 至 2.8fmol 之间, 更优选在 0.2fmol 至 2.4fmol 之间;

其中, 参比序列是第一参比序列、第二参比序列、或两者以任意比例的混合物,

所述参比序列至少包含核苷酸序列 II, 所述核苷酸序列 II 具有与所述目标 RNA 区段中的核苷酸序列 I 相同的核苷酸序列, 其中: 当 N 位点位于 X 位点上游时, 核苷酸序列 I 为所述目标 RNA 区段上自与 N 位点的上游探针 Pn1 3' 末端核苷酸互补配对的核苷酸起至与 X 位点的下游探针 Px2 5' 末端核苷酸互补配对的核苷酸止的核苷酸序列; 当 N 位点位于 X 位点下游时, 核苷酸序列 I 为所述目标 RNA 区段上自与 X 位点的上游探针 Px1 3' 末端核苷酸互补配对的核苷酸起至与 N 位点下游探针 Pn2 5' 末端核苷酸互补配对的核苷酸止的核苷酸序列,

且所述第一参比序列中与所述目标 RNA 区段的所述 RNA 目标位点 X 相对应的 RNA 目标位点 X1 不存在目标修饰, 所述第二参比序列中与所述目标 RNA 区段的所述 RNA 目标位点 X 相对应的 RNA 目标位点 X1 不存在目标修饰;

优选地, 所述参比序列的长度为至少 40nt;

(2c) 将 PCR 阈值循环数 N 与标准曲线 1 比较, 确定所述 RNA 样品中目标 RNA 区段的含量;

(3) 将第一参比序列与第二参比序列按一系列摩尔浓度比混合得到一系列混合物, 对混合物应用权利要求 1 的 (2) SELECT 步骤和 (3) PCR 扩增步骤, 获得 PCR 阈值循环数 A1 或 PCR 扩增产物量 A2, 根据摩尔比和 PCR 阈值循环数 A1 或者根据摩尔比和 PCR 扩增产物量 A2 确定标准曲线 2; 优选地, 所述 RNA 样品与第一参比序列或与第二参比序列以 10:0、8:2、6:4、4:6、2:8 和 0:1 的摩尔浓度比混合; ;

(4) 对所述样品 RNA 应用权利要求 1 的 (2) SELECT 步骤和 (3) PCR 扩增步骤, 获得 PCR 阈值循环数 B1 或 PCR 扩增产物量 B2; 和

(5) 通过 PCR 阈值循环数 B1 或 PCR 扩增产物量 B2 与标准曲线 2

比较，计算出 RNA 样品中 RNA 目标位点 X 的修饰率。

在本公开的一些实施方案中，RNA 样品是细胞中提取的总 RNA、mRNA、rRNA 或 lncRNA。

本公开提供了一种基于单碱基延伸和连接的 PCR 扩增方法，用于单基因单碱基分辨率检测 RNA 中的化学修饰。原理是：RNA 中的化学修饰，例如 m⁶A 修饰，阻碍 (i) DNA 聚合酶的单碱基延伸活性和 (ii) 连接酶的切口连接效率，并采用基于 qPCR 的检测。该方法命名为 SELECT 法。在本公开的一个优选实施方案中，具有 PCR 接头的两个合成 DNA 寡核苷酸（称为上游探针和下游探针）与 RNA 互补退火但在 m⁶A 位点相对处留下核苷酸间隙。存在于 RNA 模板中的化学修饰，例如 m⁶A 修饰，选择性地阻碍 *Bst* DNA 聚合酶介导的 Up 探针的单碱基延伸。重要的是，尽管两个选择步骤中的第一步不是 100% 有效（仍然会在 RNA 模板中从给定的修饰位点形成少量延伸产物），但第二步的切口连接再次降低了所形成的产物量。也就是说，RNA 模板中的任何化学修饰，例如 m⁶A 修饰，用于选择性地阻止连接酶在上游探针和下游探针之间的切口连接活性。因此，化学修饰，例如 m⁶A 修饰，在经过两轮选择后，与由未修饰的 RNA 模板形成的产物相比，由含化学修饰例如 m⁶A 修饰的 RNA 模板形成的最终连接产物的量显著减少，因此能够对化学修饰例如 m⁶A 修饰的与未修饰的靶模板进行简单的基于 qPCR 的检测定量。图 1 示出了 SELECT 法检测 m⁶A 的示意图。

本公开的方法可以准确、高效地在许多类型的 RNA 例如 rRNA、lncRNA、mRNA 中以单碱基分辨率鉴定化学修饰位点例如 m⁶A 修饰位点；还可以精确定量转录本中 RNA 修饰率；并可用于验证各种化学修饰酶例如 m⁶A 修饰酶的特定靶位点；灵敏度高，可用于低丰度 RNA 或极低丰度 RNA 的检测；无需放射性标记，环境友好。

附图说明

为了更清楚地说明本公开实施例和现有技术的技术方案，下面对实施

例和现有技术中所需要使用的附图作简单地介绍，显而易见地，下面描述中的附图仅仅是本公开的一些实施例，对于本领域普通技术人员来讲，在不付出创造性劳动的前提下，还可以根据这些附图获得其他的附图。

图 1 示出了 SELECT 法检测 m^6A 的示意图。在单管反应中对 RNA 中 m^6A 进行两步选择：在第一步中， m^6A 通过阻碍 DNA 聚合酶延长靶序列的能力，从而阻碍在下游探针上与 m^6A 位点相对的位置上添加胸苷；在第二步中，RNA 模板中存在的 m^6A 标记选择性地阻止 DNA 连接酶催化上游探针和下游探针之间的切口连接；然后，使用 qPCR 定量最终的延伸和连接的产物。

图 2 示出了对 N 位点选择的评价。（a）qPCR 的阈值循环（ C_T ）柱形图，显示 SELECT 法检测 Oligo1- m^6A 与 Oligo1-A 中 X, X-1, X-2, X-4, X-6, X+1 和 X+2 位点的结果；（b）qPCR 的阈值循环（ C_T ）柱形图，显示 SELECT 法检测 Oligo2- m^6A 与 Oligo2-A 中 X, X-1, X-2, X-4, X-6 位点的结果；在该测定中使用 1fmol RNA；误差表示平均值 $\pm$ s.d；2 个生物重复 $\times$ 2 个技术重复。

图 3 示出了使用优化的 SELECT 法对寡核苷酸模型进行 m^6A 检测的结果。（a）qPCR 的阈值循环（ C_T ）的实时荧光扩增曲线和柱形图，显示 SELECT 法检测 Oligo1- m^6A v.s. Oligo1-A 的 X 位点和 N 位点（输入对照）的结果；（b）qPCR 的阈值循环（ C_T ）的实时荧光扩增曲线和柱形图，显示 SELECT 法检测 Oligo2- m^6A v.s. Oligo2-A 的 X 位点和 N 位点（输入对照）的结果；误差表示平均值 $\pm$ s.d；3 个生物重复 $\times$ 2 个技术重复；Rn 是与被动参比染料（ROX）的荧光标准化相关的良好原始荧光。

图 4 示出了 SELECT 法结合 PCR 和 TBE-PAGE 检测 Oligo1- m^6A v.s. Oligo1-A 寡核苷酸模型的结果。

图 5 示出了通过 Oligo1- m^6A 与 Oligo1-A 的不同比例混合验证 SELECT 法选择性的结果。（a）SELECT 法检测具有已知 m^6A 比例的 Oligo1- m^6A 与 Oligo1-A 的混合物，得到的实时荧光扩增曲线；（b）SELECT 法检测的相对产物（归一化为 2% 的 100% m^6A 的 $2C_T$ 值）与 m^6A 比例之

间的线性关系。

图 6 示出了 qPCR (左侧 y 轴) 的阈值循环 (C_T) 柱形图和不同 C_T (ΔC_T) (右侧 y 轴) 的线形图, 显示用于 SELECT 法的 7 种连接酶: SplintR 连接酶 (a)、T3 DNA 连接酶 (b)、T4 RNA 连接酶 2 (c)、T4 DNA 连接酶 (d)、T7 DNA 连接酶 (e)、9^oNTMDNA 连接酶 (f) 和 Taq DNA 连接酶 (g) 的性能测试结果。误差表示平均值 $\pm$ s.d; 2 个生物重复 $\times$ 2 个技术重复。

图 7 示出了 qPCR C_T (左侧 y 轴) 的柱形图和不同 C_T (ΔC_T) (右侧 y 轴) 的线形图, 显示用于检测 Oligo1-m⁶A 与 Oligo1-A 中 X 位点 SELECT 法下列反应条件的优化: 温度 (a)、dTTP 浓度 (b)、*Bst* 2.0 DNA 聚合酶剂量 (c) 和 SplintR 连接酶剂量 (d)。误差表示平均值 $\pm$ s.d; 2 个生物重复 $\times$ 2 个技术重复。

图 8 示出了 dTTP 和 dNTP 对 SELECT 法检测 Oligo1-m⁶A 与 Oligo1-A 中 X 位点和 N 位点的影响。误差表示平均值 $\pm$ s.d; 3 个生物重复 $\times$ 2 个技术重复。

图 9 示出了用于 SELECT 法的 qPCR 引物的扩增效率。SELECT 法检测 Oligo1 产生的 DNA 片段, TA 克隆 pGEM-T 载体中。(a) 通过 Sanger 测序确认的 Oligo1 qPCR 扩增子的序列; (b) C_T 与重组质粒浓度 lg 的线性图。从斜率-3.39 计算, 我们设计的 qPCR 引物的扩增效率为 97.2%。误差表示平均值 $\pm$ s.d; 2 个生物重复 $\times$ 3 个技术重复。

图 10 示出了更多下游探针用于 SELECT 法的结果, 其中下游探针 3' 末端的第一个核苷酸和位于目标 RNA 位点 X 下游与目标 RNA 位点 X 距离 2nt (a)、3nt (b)、4nt (c) 的核苷酸互补配对。

图 11 示出了 SELECT 法与 FTO 辅助的去甲基化步骤的组合总 RNA 或 polyA-RNA 中 m⁶A 位点的结果。(a) FTO 辅助的 SELECT 法检测 m⁶A; (b) 从大肠杆菌纯化的重组 FTO 蛋白的考马斯蓝染色; (c) UPLC-MS / MS 检测 RNA 中 m⁶A 含量, FTO 在从 HeLa 或 HEK293T 细胞分离的总 RNA 或 polyA-RNA 中的 m⁶A 去甲基化活性, EDTA 螯合辅因子 Fe²⁺并使

FTO 失活。

图 12 示出了 qPCR 的阈值循环(C_T)的实时荧光扩增曲线和柱形图, 显示 SELECT 法检测 HeLa 细胞 28S rRNA (30ng) 的 A2511 中的 m^6 A4190 和 A4194 位点 (输入对照) 的结果。

图 13 示出了 qPCR 的阈值循环(C_T)的实时荧光扩增曲线和柱形图, 显示 SELECT 法检测 HeLa 细胞 lncRNA *MALAT1* (10ng) 的 m^6 A2515、 m^6 A2577、 m^6 A2611 和 A2511、A2624 (输入对照) 的结果。

图 14 示出了 qPCR 的阈值循环(C_T)的实时荧光扩增曲线和柱形图, 显示 SELECT 法检测 HEK293 细胞 mRNA *HIF0* (1 μ g) 的 m^6 A1211 和 A1207 (输入对照) 的结果。

图 15 示出了 HEK293 细胞 mRNA *HIF0* 中的推定 m^6 A 位点在几个报告的 m^6 A 测序数据中作图。

图 16 示出了采用 FTO 辅助的 SELECT 法检测 28S rRNA 的 m^6 A4190 和 A4194 位点 (输入对照) 和 lncRNA *MALAT1* 中 m^6 A2577 和 A2614 (输入对照), 所得的延伸和连接产物的 PCR 扩增的 PAGE 凝胶电泳结果。对于 m^6 A4190, A4194, m^6 A2577 和 A2614 这四个位点, PCR 产物长度分别为 79bp、79bp、100bp 和 101bp, PCR 循环数分别为 22、21、29 和 25 个。。

图 17 示出了 FTO 辅助的 SELECT 结果的 C_T 柱形图, 使用不同量的 polyA-RNA 检测 lncRNA *MALAT1* 中的 m^6 A2577 位点 (a) 和 A2614 位点 (b); 误差表示平均值 $\pm$ s.d; 2 个生物重复 $\times$ 3 个技术重复。

图 18 示出了 SELECT 法定量转录本中的 m^6 A 修饰率的结果。

图 19 示出了 SELECT 法鉴定 m^6 A 修饰酶 METTL3 的生物靶位点的结果。(a) SELECT 法结合用于鉴定 m^6 A 修饰酶的生物学靶位点的遗传学方法; (b) Western 印迹显示 METTL3^{+/-} HeLa 杂合细胞中 METTL3 蛋白水平降低; (c) UPLC-MS / MS 显示对照细胞和 METTL3^{+/-} HeLa 杂合细胞中的总 m^6 A 水平; (d) qPCR 的阈值循环 (C_T) 的实时荧光扩增曲线和柱形图, 显示 SELECT 法检测对照与 METTL3 +/- 细胞中的 lncRNA

MALAT1 中的 m⁶A2515 和 A2511（输入对照）的结果，确定 *MALAT1* 的 2515 位点是 *METTL3* 的生物学靶位点。误差表示平均值±s.d；2 个生物重复×3 个技术重复。

图 20 示出了 SELECT 法鉴定 m⁶A 修饰酶 *METTL3* 的生物靶位点的结果。（a）*MALAT1* 的 qPCR 扩增 C_T 与逆转录混合物的相对浓度 lg 的线性图，从斜率-3.26 计算，我们设计的 *MALAT1* qPCR 引物的扩增效率为 102.7%；（b）在对照和 *METTL3*^{+/-} 样品中 *MALAT1* 区段的实时荧光扩增曲线，C_T 值显示在表中。通过 Qubit 测量总 RNA 的量，并通过 qPCR 定量来自对照和 *METTL3*^{+/-} 样品的总 RNA 中 *MALAT1* 的量。用 2^{-ΔC_T} 法计算，*METTL3*^{+/-} 中的 *MALAT1* 是对照中的 1.526 倍。在此，使用来自 *METTL3*^{+/-} 细胞的 2μg 总 RNA 和来自对照细胞的 3.05μg 总 RNA；误差表示平均值±s.d；2 个生物重复×3 个技术重复。

图 21 示出了 SELECT 法用于鉴定其他类型的 RNA 修饰的实时荧光扩增曲线和柱形图，显示了 SELECT 法检测 Oligo4-m¹A 与 Oligo4-A(a)，Oligo1-Am 与 Oligo1-A (b)、Oligo5-Ψ 与 Oligo5-U (c) 的 X 位点和 N 位点的结果。所用的 RNA 的浓度为 1fmol。误差表示平均值±s.d；2 个生物重复×3 个技术重复。

具体实施方式

为使本公开的目的、技术方案、及优点更加清楚明白，以下参照附图并举实施例，对本公开进一步详细说明。如无特殊说明，实施例中所用的试剂和实验材料均为常规市售试剂和实验材料，实施例中所用的方法为本领域技术人员所熟知的常规方法。

实验方法：

1、细胞培养和 RNA 提取

在 37℃、5%CO₂ 下，在含有 10%FBS（购自 Gibco）和 1%青霉素-链霉素（购自 Corning）的 DMEM 培养基（购自 Corning）中培养 HeLa 细胞、HEK293T 细胞以及由 CRISPR/cas9 产生的 *METTL3*^{+/-} 杂合 HeLa

细胞。根据制造商的说明书,用 TRIzol 试剂(购自 ThermoFisher Scientific)提取总 RNA。用 Dynabeads Oligo(dT)₂₅ (购自 ThermoFisher Scientific, 货号 61002) 按照制造商的说明书从总 RNA 中进行两轮 ployA 选择以分离 PolyA-RNA。

2、蛋白质印迹

通过蛋白质印迹检测对照细胞和 METTL3^{+/-} 杂合 HeLa 细胞中 METTL3 的蛋白质水平,其中 METTL3^{+/-} 杂合 HeLa 细胞由 CRISPR/Cas9 敲除获得,对照细胞是通过 CRISPR/Cas9 使用非靶向 sgRNA 获得的 HeLa 细胞,对照细胞中 METTL3 基因没有受到上述敲除。简言之,收集对照细胞和 METTL3^{+/-} 细胞,与 2×SDS 上样缓冲液(100mM Tris-HCl, pH 6.8, 1%SDS, 20%甘油, 25%β-巯基乙醇, 0.05%溴酚蓝)混合,然后在 95 °C 孵育 15 分钟。12000 转/分钟离心后,通过 SDS-PAGE 分离样品并从凝胶转移至 PVDF 膜。用 METTL3 抗体(购自 Cell Signaling Technology)和 ACTIN 抗体(购自 CWBIO)进行抗体染色。最后,在 Tanon 5500 化学发光成像系统对膜进行成像。

3、SELECT 法

将总 RNA、polyA-RNA 或合成的 RNA 寡核苷酸与 40nM 上游探针, 40nM 下游探针和 5μM dTTP(或 dNTP)在 17μl 1×CutSmart 缓冲液(50mM 醋酸钾, 20mM Tris-醋酸, 10mM 醋酸镁, 100μg/ml BSA, pH7.9, 于 25 °C)中混合。通过在以下温度梯度下孵育混合物以使探针与 RNA 退火: 90°C, 1 分钟; 80°C, 1 分钟; 70°C, 1 分钟; 60°C, 1 分钟; 50°C, 1 分钟, 然后 40°C, 6 分钟。随后,在混合物中加入含有 0.01U Bst 2.0 DNA 聚合酶、0.5U SplintR 连接酶和 10nmol ATP 的 3μl 混合物,得到 20μl 体积的最终反应混合物。将最终反应混合物在 40°C 下孵育 20 分钟,在 80 °C 下变性 20 分钟并在 4°C 下保持,得到 SELECT 产物。

4、qPCR

将步骤 3 中获得的 SELECT 产物在 Applied Biosystems ViiA™7 实时 PCR 系统(Applied Biosystems, USA)中进行实时定量 PCR (qPCR)反

应。20 μ l qPCR 反应体系由 2 $\times$ Hieff qPCR SYBR Green Master Mix（购自 Yeasen）、200nM qPCR 上游引物（qPCR_F）、200nM qPCR 下游引物（qPCR_R）、2 μ l 上述 SELECT 产物和余量 ddH₂O 组成。qPCR 在以下条件下运行：95 $^{\circ}$ C，5 分钟；（95 $^{\circ}$ C，10s；60 $^{\circ}$ C，35s） $\times$ 40 个循环；95 $^{\circ}$ C，15s；60 $^{\circ}$ C，1 分钟；95 $^{\circ}$ C，15s（以 0.05 $^{\circ}$ C/s 的升温速率收集荧光）；4 $^{\circ}$ C，保持。通过 QuantStudioTM Real-Time PCR 软件 v1.3 分析数据。

5、TBE-PAGE 电泳分析 PCR 产物

在进行 qPCR 前，取 2 μ l 的 SELECT 产物与 2 $\times$ Taq Plus Master Mix（购自 Vazyme）和 400nM qPCR 上游引物、400nM qPCR 下游引物混合，得到总体积 25 μ l 的混合物，进行 X 位点（29 个循环）和 N 位点的 PCR（26 个循环）。使 10 μ l PCR 产物在冰水浴中用 0.5%TBE 缓冲液，在 12%非变性 TBE-PAGE 凝胶上进行电泳。用 YeaRed 核酸胶染色剂（购自 Yeasen）染色 TBE-PAGE 凝胶，并用 Tanon 1600 凝胶成像系统（Tanon）拍照。

6、基于不同连接酶的连接及 qPCR

将 80 fmol 合成的 RNA 寡核苷酸与 40 nM T 上游引物（SEQ ID NO. 6），40 nM 下游引物（SEQ ID NO. 7）在 18 μ l 1 $\times$ 反应缓冲液中混合。需要说明的是，与 SELECT 中所用的引物相比，T 上游引物在 3'末端多加了一个碱基 T。这是由于该方法中没有采用 DNA 聚合酶进行逆转录以合成 m⁶A 或 A 对位的 T，因此需要在 3'末端人为引入碱基 T。使用 1 $\times$ CutSmart 缓冲液（50mM 醋酸钾，20 mM Tris-醋酸，10 mM 醋酸镁，100 μ g/ml BSA，pH7.9，于 25 $^{\circ}$ C 下）检测 SplintR 连接酶、T4 DNA 连接酶和 T4 RNA 连接酶 2（dsRNA 连接酶）。

使用 1 $\times$ T3 DNA 连接酶反应缓冲液（66 mM Tris-HCl，10 mM MgCl₂，1 mM ATP，1 mM DTT，7.5% PEG 6000，pH7.6，于 25 $^{\circ}$ C 下）检测 T3 DNA 连接酶和 T7 DNA 连接酶。

使用 1 $\times$ 9 $^{\circ}$ N DNA 连接酶反应缓冲液（10 mM Tris-HCl，600 μ M ATP，2.5 mM MgCl₂，2.5 mM DTT，0.1%Triton X-100，pH 7.5，于 25 $^{\circ}$ C 下）

检测 9°N DNA 连接酶。

1×Taq DNA 连接酶反应缓冲液 (20mM Tris-HCl, 25mM 醋酸钾, 10mM 醋酸镁, 10mM DTT, 1mM NAD, 0.1% Triton X-100, pH 7.6, 于 25°C 下) 检测 Taq DNA 连接酶。

通过在以下温度梯度下孵育混合物以使探针与 RNA 退火: 90°C, 1 分钟; 80°C, 1 分钟; 70°C, 1 分钟; 60°C, 1 分钟; 50°C, 1 分钟; 然后 40°C, 6 分钟。在上述经退火的混合物中加入包含具有指定浓度的连接酶和 10nmol ATP (仅在 SplintR 连接酶、T4 DNA 连接酶和 T4 RNA 连接酶 2 的检测中加入) 的 2μl 混合物。最终的反应混合物在 37°C 反应 20 分钟, 然后在 95°C 变性 5 分钟, 并在 4°C 保持。随后, 按照与步骤 3 相同的方法进行 qPCR。

7、重组 FTO 蛋白的克隆、表达和纯化

将截短的人 FTO cDNA (ΔN31) 亚克隆到 pET28a 载体中。将质粒转化到 BL21-Gold (DE3) 大肠杆菌感受态细胞中。FTO 蛋白的表达和纯化按照本领域技术人员熟知的程序(例如参见 G. Jia, et al., Nat. Chem. Biol. 2011, 7, 第 885-887 页)进行。用 12% SDS-PAGE 电泳鉴定纯化的 FTO 蛋白。

8、FTO 介导的 m^6A 去甲基化反应

按照本领域技术人员熟知的方法(例如参见例如参见 G. Jia, et al., Nat. Chem. Biol. 2011, 7, 第 885-887 页), 用 FTO 蛋白处理总 RNA 或 polyA-RNA。对于实验组: 将 40μg 总 RNA 或 2μg polyA-RNA 与 FTO、50mM HEPES (pH 7.0)、2mM L-抗坏血酸、300μM α -酮戊二酸 (α -KG)、283μM $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 和 0.2U/μl RiboLock RNase 抑制剂 (购自 ThermoFisher Scientific) 混合, 在 37°C 下反应 30 分钟。通过加入 20mM EDTA 淬灭反应。对于对照组: 应在去甲基化反应之前加入 20mM EDTA。通过苯酚-氯仿提取和乙醇沉淀回收 RNA, 随后用 SELECT 法检测。

9、通过 UPLC-MS/MS 进行 m^6A 定量

将 200ng RNA 用 1U 核酸酶 P1 (购自 Wako) 在 10mM 醋酸铵缓冲

液中于 42℃消化 2 小时，然后在 100mM MES (pH6.5) 中与 1U rSAP (购自 NEB) 于 37℃孵育 4 小时。将消化的样品以 15,000rpm 离心 30 分钟，并将 5μl 溶液注入 UPLC-MS/MS 中。在 UPLC (SHIMADZU) 中通过 ZORBAX SB-Aq 柱 (Agilent) 分离核苷酸，并通过 Triple Quad™ 5500 (AB SCIEX) 检测。基于母离子和子离子 m/z 转变定量核苷酸：对于 A， m/z 为 268.0 至 136.0，对于 m^6A ， m/z 为 282.0 至 150.1。用市售的核苷酸作出标准曲线，并根据标准曲线精确计算 m^6A/A 的比率。

在本文中，术语“循环阈值 (C_T)”，又称阈值循环数，是指 qPCR 扩增过程中，扩增产物的荧光信号达到设定的荧光阈值时的所对应的扩增循环数。

在本文中，术语“上游”是指 DNA 序列或信使核糖核酸(mRNA)中远离转录或翻译起始位点的位置和/或方向，即靠近 5'端的位置或朝向 5'方向。术语“下游”是指 DNA 序列或信使核糖核酸(mRNA)中远离转录或翻译起始位点的位置和/或方向，即靠近 3'端的位置或朝向 3'方向。

在本文中，术语“目标 RNA 位点 X 上游与目标 RNA 位点 X 距离 1nt 的核苷酸”是指目标 RNA 位点 X 上游与目标 RNA 位点 X 相邻位置的核苷酸。例如，将目标 RNA 位点 X 定义为第 0 位，则目标 RNA 位点 X 上游与目标 RNA 位点 X 距离 1nt 的核苷酸为第-1 位，目标 RNA 位点 X 下游与目标 RNA 位点 X 距离 1nt 的核苷酸为第+1 位。

在本文中，RNA 修饰酶是指，能够对 RNA 中核苷酸进行化学修饰的酶。例如： m^6A 修饰酶能够将 A 转化为 m^6A ， m^6A 修饰酶包括例如 (1) 甲基转移酶复合物和 (2) METTL16。甲基转移酶复合物选自以下的任意成员或其组合：METTL3、METTL14、WTAP、KIAA1429 (又称 VIRMA 或 VIRILIZER)、HAKAI、ZC3H13、RBM15 和 RBM15B。在 RNA 中形成 m^1A 修饰、假尿苷修饰和 2'-O-甲基化修饰的酶也属于 RNA 修饰酶。

在本文中，RNA 去修饰酶是指，去除 RNA 中核苷酸上化学修饰的酶，将修饰的核苷酸转化为普通的 A、U、C 或 G。FTO 和 ALKBH5 是 m^6A 的去修饰酶。 m^6A 修饰和 m^1A 修饰在去修饰酶作用下转化为 A。假尿苷

修饰在去修饰酶作用下转化为 U。

表1. 本公开使用的RNA寡核苷酸模型

名称	序列 (5' -> 3')	特征
Oligo1	rArUrGrGrGrCrCrGrUrUrCrArUrCrUrGrCrUrArA rArAr <u>GrGrXrCrU</u> rGrCrUrUrUrUrGrGrGrGrCrUr UrGrU	X表示A或m ⁶ A 或Am, 其中Am 表示2'-O-甲基 腺苷
Oligo2	rArUrGrGrGrCrCrGrUrUrCrArUrCrUrGrCrUrArA rArAr <u>GrArXrCrU</u> rGrCrUrUrUrUrGrGrGrGrCrUr UrGrU	X表示A或m ⁶ A
Oligo3	rArGrUrArGrCrUrUrArGrUrUrUrGrArArArArA rUrGrUrGrArAr <u>GrGrXrCrU</u> rUrUrCrGrUrArArC rGrGrArArGrUrArArUrUrC	X表示A或m ⁶ A
Oligo4	rUrGrGrGrGrUrCrUrCrCrCrGrCrGrCrArGrGrU rUrCrGr <u>XrArUrCrCrUrGrCrCrGrArCrUrArCrGrU</u> rCrA	X表示A或m ¹ A (N1-甲基腺 苷)
Oligo5	rGrGrGrGrArArGrArGrCrArArCrArArArGrCrArA rGrCrArArGrArCrGrArCrArArGrGrArArGrCrArA rArArCrArArCrArCrGrCrCrArCrArCrArCrGrGrG rArArGrArGr <u>XrCrArGrArCrGrArCrCrArCrArCrG</u> rArArGrArArCrCrArCrArCrArGrArGrCrArArGrG rArArArCrArCrCrArArCrArCrCrArCrCrArCrCrG rCrArGrArGrArGrArGrArArArGrCrGrArCrArGrG rGrArCrArCrCrArArGrCrArGrGrCrArCrArGrArA rCrArArG	X表示U或Ψ

注: 1. 碱基A、U、C、G左侧的小写字母r表示该核苷酸为核糖核苷酸;

2. 划线部分表示m⁶A经典保守基序。

表2. 实验方法步骤6中qPCR所用的引物

名称	序列 (5' -> 3')
Oligo1-X-T-上游引物	tagccagtaccgtagtgcgtgAGCCCCAAAAGCAGT (SEQ ID NO. 6)
Oligo1-X-下游引物	5phos/CCTTTTAGCAGATGAACGGCcagaggctgagtcgctgcat (SEQ ID NO. 7)

注: 5phos表示5'磷酸化。

表3. 本公开SELECT法中使用的探针

名称	序列 (5' -> 3')
----	---------------

Oligo1-X-下游探针/ Oligo2-X-下游探针	tagccagtaccgtagtgcgtgAGCCCCAAAAGCAG (SEQ ID NO. 8)
Oligo1-X-上游探针	5phos/CCTTTTAGCAGATGAACGGCcacagag gctgagtcgctgcat (SEQ ID NO. 9)
Oligo2-X-上游探针	5phos/TCTTTTAGCAGATGAACGGCcacagag gctgagtcgctgcat (SEQ ID NO. 10)
Oligo1-X-1-下游探针	tagccagtaccgtagtgcgtgAGCCCCAAAAGCAG T (SEQ ID NO. 11)
Oligo2-X-1-下游探针	tagccagtaccgtagtgcgtgAGCCCCAAAAGCAG T (SEQ ID NO. 12)
Oligo1-X-1-上游探针/ Oligo2-X-1-上游探针	5phos/CTTTTAGCAGATGAACGGCcacaggc tgagtcgctgcat (SEQ ID NO. 13)
Oligo1-X-2-下游探针	tagccagtaccgtagtgcgtgAGCCCCAAAAGCAG TC (SEQ ID NO. 14)
Oligo2-X-2-下游探针	tagccagtaccgtagtgcgtgAGCCCCAAAAGCAG TT (SEQ ID NO. 15)
Oligo1-X-2-上游探针/ Oligo2-X-2-上游探针	5phos/TTT TAGCAGATGAACGGCcacaggctg agtcgctgcat (SEQ ID NO. 16)
Oligo1-X-4-下游探针	tagccagtaccgtagtgcgtgAGCCCCAAAAGCAG TCCT (SEQ ID NO. 17)
Oligo2-X-4-下游探针	tagccagtaccgtagtgcgtgAGCCCCAAAAGCAG TTCT (SEQ ID NO. 18)
Oligo1-X-4-上游探针/ Oligo2-X-4-上游探针	5phos/TTAGCAGATGAACGGCcacaggctgagt cgctgcat (SEQ ID NO. 19)
Oligo1-X-6-下游探针	tagccagtaccgtagtgcgtgAGCCCCAAAAGCAG TCCTTT (SEQ ID NO. 20)
Oligo2-X-6-下游探针	tagccagtaccgtagtgcgtgAGCCCCAAAAGCAG TTCTTT (SEQ ID NO. 21)
Oligo1-X-6-上游探针/ Oligo2-X-6-上游探针	5phos/AGCAGATGAACGGCcacaggctgagtcg ctgcat (SEQ ID NO. 22)
Oligo1-X+1-下游探针	tagccagtaccgtagtgcgtgAGCCCCAAAAGCA (SEQ ID NO. 23)
Oligo1-X+1-上游探针	5phos/TCCTTTTAGCAGATGAACGGCcacaga ggctgagtcgctgcat (SEQ ID NO. 24)
Oligo1-X+2-下游探针	tagccagtaccgtagtgcgtgACAAGCCCCAAAAG C (SEQ ID NO. 25)
Oligo1-X+2-下游探针	5phos/GTCCTTTTAGCAGATGAACGGCcac

	aggctgagtcgctgcat (SEQ ID NO. 26)
Oligo4-X-下游探针	tagccagtaccgtagtgcgtgTGACGTAGTCGGCAGGAT (SEQ ID NO. 27)
Oligo4-X-上游探针	5phos/CGAACCTGCGCGGGGcagaggctgagtcgctgcat (SEQ ID NO. 28)
Oligo4-X-7-下游探针	tagccagtaccgtagtgcgtgGTCGGCAGGATTCGAACC (SEQ ID NO. 29)
Oligo4-X-7-上游探针	5phos/GCGCGGGGAGACCCcagaggctgagtcgctgcat (SEQ ID NO. 30)
Oligo5-X-下游探针	tagccagtaccgtagtgcgtgCTTCGTGTGGTCGTCGTG (SEQ ID NO. 31)
Oligo5-X-上游探针	5phos/CTCTTCCCGTGTGTGGcagaggctgagtcgctgcat (SEQ ID NO. 32)
Oligo4-X+4-下游探针	tagccagtaccgtagtgcgtgTGGTTCTTCGTGTGGTCG (SEQ ID NO. 33)
Oligo4-X+4-上游探针	5phos/CTGACTCTTCCCGTGTGcagaggctgagtcgctgcat (SEQ ID NO. 34)
28S_m6A4190_下游探针	tagccagtaccgtagtgcgtgCGCCTTAGGACACCTGCG (SEQ ID NO. 35)
28S_m6A4190_上游探针	5phos/TACCGTTTGACAGGTGTAcagaggctgagtcgctgcat (SEQ ID NO. 36)
28S_A4194-下游探针	tagccagtaccgtagtgcgtgAGCTCGCCTTAGGACACC (SEQ ID NO. 37)
28S_A4194-上游探针	5phos/GCGTTACCGTTTGACAGGTcagaggctgagtcgctgcat (SEQ ID NO. 38)
MALAT1_m ⁶ A2515_下游探针	tagccagtaccgtagtgcgtgAATTACTTCCGTTACGAAAG (SEQ ID NO. 39)
MALAT1_m ⁶ A2515_上游探针	5phos/CCTTCACATTTTCAAACCTAAGCTACTcagaggctgagtcgctgcat (SEQ ID NO. 40)
MALAT1_m ⁶ A2577_下游探针	tagccagtaccgtagtgcgtgGGATTAAAAAATAATCTTAACCTCAAAG (SEQ ID NO. 41)
MALAT1_m ⁶ A2577_上游探针	5phos/CCAATGCAAAAACATTAAGTcagaggctgagtcgctgcat (SEQ ID NO. 42)
MALAT1_A2511_下游探针	tagccagtaccgtagtgcgtgAATTACTTCCGTTACGAAAGTCCT (SEQ ID NO. 43)
MALAT1_A2511_上游探针	5phos/CACATTTTCAAACCTAAGCTACTcagaggctgagtcgctgcat (SEQ ID NO. 44)

MALAT1_m ⁶ A2611_下游探针	tagccagtaccgtagtgcgtgGTCAGCTGTCAATTAATGC (SEQ ID NO. 45)
MALAT1_m ⁶ A 2611-上游探针	5phos/AGTCCTCAGGATTTAAAAAATAATCTTAACcagaggctgagtcgctgcat (SEQ ID NO. 46)
H1F0-m6A1211-下游探针	tagccagtaccgtagtgcgtgCATTAGATTGGTTGTGCTG (SEQ ID NO. 47)
H1F0-m6A1211-上游探针	5phos/CCTTGCACAACCTGGTTAAcagaggctgagtcgctgcat (SEQ ID NO. 48)
H1F0-A1207-下游探针	tagccagtaccgtagtgcgtgTGGTTGTTGCTGTCC T (SEQ ID NO. 49)
H1F0-A1207-上游探针	5phos/GCACAACCTGGTTAAGGAAAcagaggctgagtcgctgcat (SEQ ID NO. 50)

表4. 用于SELECT产物的qPCR的引物

名称	序列 (5' -> 3')
qPCRF	ATGCAGCGACTCAGCCTCTG (SEQ ID NO. 51)
qPCRR	TAGCCAGTACCGTAGTGC GTG (SEQ ID NO. 52)
MALAT1_qPCRF	GACGGAGGTTGAGATGAAGCT (SEQ ID NO. 53)
MALAT1_qPCRR	ATTCGGGGCTCTGTAGTCCT (SEQ ID NO. 54)

实施例 1 SELECT 法结合 qPCR 检测 m⁶A RNA 寡核苷酸模型中的 m⁶A 修饰

对具有内部 X 位点(X = m⁶A 或 A)的 2 种寡核苷酸模型 42-mer RNA Oligo1 (SEQ ID NO. 1) 和 Oligo2 (SEQ ID NO. 2) 执行 SELECT 法。按照 X 位点是否存在甲基化修饰, 将寡核苷酸模型分成 4 类: Oligo1-m⁶A、Oligo1-A、Oligo2-m⁶A、Oligo2-A。

(1) 初始 RNA 输入量的控制

由于初始 RNA 输入量直接影响 qPCR 扩增循环, 发明人同时检测了寡核苷酸模型中的非 m⁶A 修饰位点 (又称 N 位点) 以控制初始 RNA 输入量 (图 2a)。理论上, 用 SELECT 法检测 Oligo1-m⁶A 和 Oligo1-A 中的 N 位点时, 将得到相同数目的 qPCR 循环阈值 (C_T), 这也表明初始 RNA 输入量相等; 同理, 对于用 SELECT 法检测 Oligo2-m⁶A 和 Oligo2-A

中的 N 位点时，也将得到相同数目的 qPCR 循环阈值。

发明人在 X 位点上游 6nt 至下游 2nt (X-6 到 X+2) 处使用 SELECT 法以确定 N 位点。结果显示，除 m⁶A 上下游各 1bp 处的位点 (m⁶A±1) 之外的任何非 m⁶A 修饰位点均可以用作 N 位点以控制初始 RNA 输入量 (参见图 2b 和 2c)。在本实施例中，各个寡核苷酸模型中均选用 X-6 位点 (即 X 位点上游 6nt 处的位点) 作为 N 位点控制初始 RNA 输入量。

(2) SELECT 法结合 qPCR 检测 m⁶A RNA 寡核苷酸模型中的 m⁶A 修饰

根据上述实验方法步骤 3 的 SELECT 法，通过 Bst 2.0 DNA 聚合酶和 SplintR 连接酶与 Oligo1-m⁶A、Oligo1-A、Oligo2-m⁶A、Oligo2-A 分别反应，分别得到 Oligo1-m⁶A、Oligo1-A、Oligo2-m⁶A、Oligo2-A 的 SELECT 产物。

将 SELECT 产物在 Applied Biosystems ViiA™7 实时 PCR 系统 (Applied Biosystems, USA) 中进行 qPCR 反应。通过 QuantStudio™ Real-Time PCR 软件 v1.3 分析数据。图 3a 和 3b 分别显示了 SELECT 法检测 Oligo1-m⁶A、Oligo1-A、Oligo2-m⁶A、Oligo2-A 的 X 位点 (图 3a 左图、图 3b 左图) 和 N 位点 (图 3a 右图、图 3b 右图) 的结果，其中 N 位点结果用作输入对照。

可以看出，当控制 RNA 输入量相同时 (即 Oligo1-m⁶A 与 Oligo1-A 的 N 位点扩增的 C_T 相同；对于 Oligo2-m⁶A 与 Oligo2-A 的 N 位点扩增的 C_T 相同)，对于含有 GGXCU 序列的 Oligo1，Oligo1-m⁶A 与 A-oligo 的 X 位点扩增的循环阈值差异 (ΔC_T) 高达 7.6 个循环；对含有 GAXCU 序列的 Oligo2，ΔC_T 高达 4 个循环 (图 3a 和 3b)，证明本公开的 SELECT 法可以有效地区分 m⁶A 修饰的位点和未修饰的位点。

实施例 2 SELECT 法结合 PCR 和 TBE-PAGE 检测 m⁶A RNA 寡核苷酸模型中的 m⁶A 修饰

将实施例 1 中获得的 Oligo1-m⁶A 和 Oligo1-A 的 SELECT 产物采用实

验方法3先进行PCR再进行TBE-PAGE电泳分析。图1c显示了TBE-PAGE凝胶电泳检测结果。可以看出，与Oligo1-m⁶A和Oligo1-A的N位点、Oligo1-A的X位点相比，对于Oligo1-m⁶A的X位点，几乎观察不到PCR产物条带。可见，相对于未经甲基化修饰的腺苷（A），本公开的SELECT法对m⁶A具有显著的选择性（图4）。

实施例3 SELECT法的选择性的验证

为了精确评估本公开的SELECT法的性能，将Oligo1-m⁶A与Oligo1-A分别以0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1的比例混合，并用SELECT法结合qPCR进行检测。结果示于图5a，qPCR的相对产物量（用100% m⁶A的2^{C_T}值归一化的2^{C_T}值）与样品中的m⁶A比例成线性比例。进行3次实验重复。误差线，平均值±s.d。Rn(Normalized reporter)是荧光报告基团的荧光发射强度与参比染料的荧光发射强度的比值。

本公开的SELECT法具有非常高的灵敏度，如图5b所示，SELECT法可以在0.25 fmol至100 fmol的目标模板浓度下区分A和m⁶A位点。对于1fmol RNA Oligo1样品，观察到测试X位点的最大ΔC_T为7.62个循环，表明SELECT法对RNA中m⁶A的选择性相对于A高达196.7倍(2^{7.62})。

实施例4 SELECT法结合qPCR检测m⁶A RNA寡核苷酸模型中的m⁶A修饰

根据实验方法的步骤6的方法，利用实施例1的寡核苷酸模型Oligo1（SEQ ID NO. 1）作为模板，分别测试了7种连接酶的性能：SplintR连接酶、T3 DNA连接酶、T4 RNA连接酶2、T4 DNA连接酶、T7 DNA连接酶、9°N DNA连接酶、Taq DNA连接酶。结果示于图6，可以看出，SplintR连接酶、T3 DNA连接酶、T4 RNA连接酶2和T4 DNA连接酶对m⁶A有选择性，其中SplintR连接酶、T3 DNA连接酶的选择性良好，SplintR连接酶的连接效率较高，适用于低微量样品的检测。

实施例 5 SELECT 法反应条件测试-1

根据实施例 1 的方法,本公开扩展了延伸和连接步骤的反应条件,确定了简单的单管反应系统。具体地,本实施例测试了以下反应条件:三个反应温度:37℃、40℃、42℃(图 7a);dTTP 的六个浓度:0、5μM、10μM、20μM、40μM、100μM(图 7b);*Bst* 2.0DNA 聚合酶五个用量:0、0.0005U、0.002U、0.01U、0.05U(图 7c);SplintR 连接酶五个用量:0、0.1U、0.5U、1U、2U(图 7d)。

由图 7a-d 可以看出,SELECT 法在 37-42℃下、在 5-100μM 的 dTTP、0.0005-0.05U 的 *Bst* 2.0DNA 聚合酶、0.1-2U 的 SplintR 连接酶下均表现出对 m⁶A 的良好选择性。最优的反应条件是:反应温度 40℃,dTTP 用量 5μM, *Bst* 2.0DNA 聚合酶用量 0.01U, SplintR 连接酶用量 0.5U。

根据实施例 1 的方法,将 dTTP 替换为 dNTP,发现 dNTP 可用于延伸步骤(参见图 8)。

通过 SELECT 法检测 Oligo1 产生的 DNA 片段在 pGEM-T 载体中进行 TA 克隆。通过 Sanger 测序确认的 Oligo1 qPCR 扩增子的序列(参见图 9a)。用于 SELECT 的探针包括两部分:qPCR 衔接子和 RNA 模板的互补链(熔解温度应超过 50℃)。将 SEQ ID NO. 8 和 SEQ ID NO. 9 针对 SEQ ID NO. 1 进行 SELECT 检测所得到的 PCR 扩增子克隆到 pGEM-T 载体中,用 Nanodrop 进行定量,逐级稀释(10 倍稀释一级)为标准样品进行荧光定量 PCR 检测,绘制曲线,计算衔接子扩增效率。我们测试了针对 m⁶A 状态的靶向 X 位点的引物的扩增特异性和效率,根据斜率-3.39 计算,我们设计的 qPCR 引物的扩增效率为 97.2%,证实我们的 qPCR 衔接子设计足以进行 qPCR 扩增(参见图 9b)。

实施例 6 SELECT 法反应条件测试-2

根据实施例 1 的方法,本公开设计了更多下游探针:3'末端的第一个核苷酸和位于目标 RNA 位点 X 下游与目标 RNA 位点 X 距离 2nt、3nt、4nt 的核苷酸互补配对。结果如图 10 所示,这些下游探针均能够实现良好

的检测效果。

实施例 7 FTO 去甲基化活性验证

FTO 是 m^6A 去甲基化酶；它是 Fe^{2+} 和 α -KG 依赖性的，当在反应体系中加入 EDTA 以螯合游离的 Fe^{2+} 时， m^6A 位点不能通过 FTO 去甲基化。图 11a 显示了 FTO 辅助的 SELECT 法检测 m^6A 的过程。图 11b 显示了从大肠杆菌纯化的重组 FTO 蛋白的考马斯蓝染色的 SDS-PAGE 图。

根据实验方法的步骤 1 的方法分别提取 HeLa 细胞的总 RNA 和 HEK293T 细胞的总 RNA，HeLa 细胞的 polyA-RNA。实验组采用 FTO+EDTA 处理，对照组采用 FTO 处理。具体步骤如下：对于实验组：将 40 μ g 总 RNA 或 2 μ g polyA-RNA 与 FTO、50mM HEPES (pH 7.0)、2mM L-抗坏血酸、300 μ M α -酮戊二酸 (α -KG)、283 μ M $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$ 和 0.2U/ μ l RiboLock RNase 抑制剂（购自 Thermo Fisher Scientific）混合，在 37°C 下反应 30 分钟。通过加入 20mM EDTA 淬灭反应。对于对照组：在去甲基化反应之前加入 20mM EDTA。通过苯酚-氯仿提取和乙醇沉淀回收 RNA。FTO+EDTA 或 FTO 处理后的样品用实验方法的步骤 3 所述的 SELECT 法检测。进行 3 次重复实验，误差棒表示平均值 $\pm$ s.d。

图 11c 显示了 FTO 在从 HeLa 或 HEK293T 细胞分离的总 RNA 或 polyA-RNA 中的 m^6A 去甲基化活性。可以看出，经 FTO 处理的 HeLa 细胞总 RNA、HeLa 细胞 polyA-RNA 和 HEK293T 细胞总 RNA 中 m^6A 水平显著降低：FTO 能够去除 HeLa RNA 样品和 HEK293T RNA 样品中大约 90% 的 m^6A 位点，而 FTO+EDTA 不能去除 m^6A 位点。

实施例 8 FTO 辅助的 SELECT 法检测 rRNA、lncRNA 和 mRNA 中的 m^6A 修饰

需要说明的是，28S rRNA 用 HeLa 细胞总 RNA 进行检测，lncRNA *MALAT1* 用 polyA-RNA 进行检测，mRNA H1F0 用 HEK293T 细胞总 RNA 进行检测。

实验组采用 FTO+EDTA 处理,对照组采用 FTO 处理。具体步骤如下:实验组将 40 μ g 总 RNA 或 2 μ g polyA-RNA 与 FTO、50mM HEPES(pH 7.0)、2mM L- 抗坏血酸、300 μ M α - 酮戊二酸 (α -KG) 、283 μ M (NH₄)₂Fe(SO₄)₂•6H₂O 和 0.2U/ μ l RiboLock RNase 抑制剂(购自 Thermo Fisher Scientific)混合,在 37°C 下反应 30 分钟。通过加入 20mM EDTA 淬灭反应。对于对照组:在去甲基化反应之前加入 20mM EDTA。通过苯酚-氯仿提取和乙醇沉淀回收 RNA。FTO+EDTA 或 FTO 处理后的样品用实验方法的步骤 3 所述的 SELECT 法检测。在 SELECT 法中,各种 RNA 的用量分别为: HeLa 细胞 28S rRNA, 30ng; HeLa 细胞 lncRNA *MALAT1*, 10ng; HEK293T 细胞 mRNA *H1FO*, 1 μ g。在 HeLa 细胞 28S rRNA 中检测 m⁶A4190 位点和 A4194 位点(输入对照);在 HeLa 细胞 lncRNA *MALAT1* 中检测 m⁶A2515 位点和 A2511 位点(输入对照)、以及 m⁶A2577 位点、m⁶A2611 位点和 A2614 位点(输入对照),在 HEK293T 细胞 mRNA *H1FO* 中检测 m⁶A1211 位点和 A1207 (输入对照)。进行 3 次重复实验,误差表示平均值 $\pm$ s.d。

结果显示,SELECT 法与 FTO 去甲基化步骤的组合能够清楚地鉴定 HeLa 细胞中 28S rRNA 上存在的已知 m⁶A4190 位点(图 12, 左),并且针对相同 rRNA 上的已知非 m⁶A 位点(A4194, N 位点)进行同时分析,作为输入对照的 N 位点显示 FTO 与 FTO-EDTA 处理的样品之间没有差异(图 12, 右)。

SELECT 法与 FTO 去甲基化步骤的组合能够清楚地鉴定来自 HeLa 细胞的 lncRNA *MALAT1* 转录物上的三个已知 m⁶A 位点 m⁶A2515、m⁶A2577 和 m⁶A2611;用于控制初始 RNA 输入量的 *MALAT1* 转录物上两个非 m⁶A 位点 A2511 和 A2614 在 FTO 与 FTO+EDTA 处理的样品之间没有差异(图 13)。

除了对上述已知 m⁶A 位点的再次确认之外,我们用本公开的 SELECT 法与 FTO 去甲基化步骤的组合,对已报道的来自 HEK293T 和 HeLa 细胞的 m⁶A 测序数据推定的 mRNA 转录物上的 m⁶A 位点(*H1FO* 的 3'UTR 中

的 1211 位点, 参见图 15) 进行了检测。结果证实了在 HEK293T 细胞的 mRNA 中 1211 位点被 m^6A 修饰 (图 14)。由此可见, 本公开的 SELECT 法是一种简单而高效的方法, 能够准确高效地鉴定来自生物样品的 rRNA、lncRNA 和 mRNA 分子上的 m^6A 位点。

FTO 辅助的 SELECT 方法还可以使用 PAGE 电泳分析鉴定细胞 m^6A 位点 (参见图 16)。

另外, 采用本实施例的方法, 还确定了输入量的检测限可降至 0.2 ng polyA-RNA (约 200~1400 个细胞) (参见图 17)。

实施例 9 SELECT 法定量转录本中的 m^6A 修饰率

还利用本公开的 SELECT 法确定了 HeLa 细胞中 MALAT1 lncRNA 在已知的 m^6A 2515 位点的 m^6A 修饰率。根据来自 HeLa 细胞 MALAT1 的包含 m^6A 2515 的第 2488-2536 位的序列, 合成由 49 个核苷酸组成的 RNA Oligo3 (SEQ ID NO. 3) 作为标准 RNA, 其中内部包含 X 位点, $X = m^6A$ 或 A。首先, 使用不同量的具有 A 的标准 RNA 或具有 m^6A 的标准 RNA 的, 或两种标准 RNA 的混合物在 A2511 位点进行实验方法步骤 3 的 SELECT 法, 并产生线性图以定量细胞 MALAT1 转录本的量。结果发现, 3 μ g HeLa 总 RNA 含有 0.936 ± 0.048 fmol 的 MALAT1 转录物 (图 18a)。通过将 Oligo3- m^6A 与 Oligo3-A 和 3 μ g HeLa 总 RNA 混合, 得到一系列具有已知的 m^6A 修饰率的 0.936 fmol 的标准 RNA 混合物, 然后进行 SELECT 法分析 MALAT1 m^6A 2515 位点的修饰率。使用具有不同 m^6A 修饰率的 0.936 fmol 标准 RNA 混合物在 m^6A 2515 位点进行实验方法步骤 3 的 SELECT 法, 并产生线性图以定量生物样品中 MALAT1 m^6A 2515 位点的绝对 m^6A 修饰率。结果显示, 在 HeLa 中 MALAT1 m^6A 2515 位点的 m^6A 修饰率为 0.636 ± 0.027 (图 18b)。SCARLET 等人已报道测量的 MALAT1 m^6A 2515 位点的 m^6A 修饰率为 0.61 ± 0.03 。因此, SELECT 可以准确方便地确定总 RNA 中的 m^6A 修饰率。

图 18 用于测定 HeLa 中 MALAT1 的 m^6A 2515 位点的 m^6A 修饰率的

SELECT。a) 在 3 μ g HeLa 总 RNA 中定量 MALAT1 转录物。在 MALAT1 A2511 位点进行 SELECT 分析, 进行标准 RNA (Oligo3) 和 3 μ g HeLa 总 RNA 的一系列量梯度。实时荧光扩增曲线显示在左图中。通过标准曲线 (右图) 计算的 MALAT1 转录物的量在 3 μ g HeLa 总 RNA 中为 0.936 ± 0.048 fmol。b) 在 HeLa 中 MALAT1 的 m⁶A2515 位点处的 m⁶A 修饰率的定量。通过将 Oligo3-m⁶A 与 Oligo3-A 和 3 μ g HeLa 总 RNA 混合, 得到一系列具有已知的 m⁶A 修饰率的 0.936 fmol 的标准 RNA 混合物, 然后进行 SELECT 法分析 MALAT1 m⁶A2515 位点的修饰率。左图示出了实时荧光扩增曲线, 右图示出了标准曲线, 通过标准曲线计算的 HeLa 细胞中 MALAT1 2515 位点处的 m⁶A 修饰率为 0.636 ± 0.027 。误差棒表示平均值 $\pm$ 标准差。2 个生物重复 $\times$ 2 个技术重复。

实施例 10 SELECT 法鉴定 m⁶A 修饰酶 METTL3 的生物靶位点

SELECT 法也是 m⁶A 代谢功能研究的有力工具, 它也可以与遗传学方法结合使用, 以验证特定的 m⁶A 修饰酶是否能够修饰特定的 m⁶A 位点。使用 MALAT1 lncRNA 的 m⁶A2515 位点作为验证实验系统。已有报道称, 含有催化亚基 METTL3 的两个 m⁶A 修饰酶-METTL16 可以结合 MALAT1 转录物, 但是负责 2515 位点的 m⁶A 修饰的酶尚未得到证实。本公开使用 CRISPR/Cas9 系统来产生 METTL3^{+/-}HeLa 杂合细胞; 值得注意的是纯合的 METTL3^{-/-}细胞是致死的。图 19a 显示出, 与对照相比, METTL3^{+/-}HeLa 杂合细胞中 m⁶A 显著减少。

使用抗 METTL3 抗体的蛋白质印迹实验, 证实了杂合细胞的 METTL3 水平降低 (图 19b)。根据实验方法的步骤 9 中的 UPLC-MS/MS 进行 m⁶A 定量, UPLC-MS/MS 分析显示 METTL3^{+/-}细胞中 polyA-RNA 的总 m⁶A 水平显著低于对照细胞 (图 19c)。随后, 利用实验方法的步骤 3 的 SELECT 法检测, 与对照相比, METTL3^{+/-}细胞中 2515 位点的 m⁶A 修饰程度显著降低 (图 19d)。与 METTL3 在甲基化 2515 位点中的特定作用一致, 在用于控制初始 RNA 输入量的非 m⁶A 2511 位点的扩增中未观察到显著差

异。因此，确定 MALAT1 的 2515 位点是 METTL3 的生物学靶位点。

注意 m^6A 介导 mRNA 降解，为了确保 SELECT 法中来自对照组的总 RNA 和 METTL3^{+/+}细胞含有等量的 MALAT1 转录物，发明人还进行了 qPCR 分析以调整输入总 RNA 的量（参见图 20）。

实施例 11 SELECT 法用于鉴定其他类型的 RNA 修饰

发明人通过实施例 1 的 SELECT 法结合 qPCR 检测，利用表 1 列出的寡核苷酸模型 Oligo3 (SEQ ID NO. 3)、Oligo4 (SEQ ID NO. 4)、Oligo5 (SEQ ID NO. 5) 和表 3 中列出的上游探针和下游探针，还有效地鉴定出了其他类型的 RNA 修饰：N1-甲基腺苷 (m^1A) 和 2'-O-甲基腺苷 (Am)，但不能区分假尿苷 (Ψ)（参见图 21）。

以上所描述的实施例仅仅是本公开一部分、而不是全部的实施例。基于本公开中的实施例，本领域普通技术人员在没有作出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例，都属于本公开保护的范围。

权 利 要 求

1、一种检测 RNA 目标位点 X 的化学修饰的方法，其包括：

(1) 获得 RNA 样品，在 RNA 样品中选择包含 RNA 目标位点 X 的目标 RNA 区段；

(2) SELECT 步骤：在目标 RNA 区段内、在 RNA 目标位点 X 的上游和下游分别设计上游探针 Px1 和下游探针 Px2，利用所述下游探针 Px2 通过 DNA 聚合酶进行延伸，并用连接酶连接上游探针 Px1 和延伸后的下游探针 Px2，得到 SELECT 产物；

其中，上游探针 Px1 与目标 RNA 位点 X 的上游互补配对，且上游探针 Px1 5'末端的第一个核苷酸和位于目标 RNA 位点 X 上游与目标 RNA 位点 X 距离 1nt 的核苷酸互补配对；

下游探针 Px2 与目标 RNA 位点 X 的下游互补配对，且下游探针 Px2 3'末端的第一个核苷酸和位于目标 RNA 位点 X 下游与目标 RNA 位点 X 距离 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10nt 的核苷酸互补配对；

优选地，上游探针 Px1 与目标 RNA 位点 X 的上游互补配对的序列长度为 15-30nt；下游探针 Px2 与目标 RNA 位点 X 的上游互补配对的序列长度为 15-30nt；

(3) PCR 扩增步骤：将步骤 (2) 获得的 SELECT 产物进行 PCR 扩增，确定 PCR 阈值循环数或 PCR 扩增产物量，优选通过 qPCR 荧光信号确定 PCR 阈值循环数，或优选通过聚丙烯酰胺凝胶电泳确定 PCR 扩增产物量；和

(4) 将所述 PCR 阈值循环数与 PCR 阈值循环数参比值比较，或者将所述 PCR 扩增产物量与 PCR 扩增产物量参比值比较，以确定目标 RNA 位点 X 是否存在目标化学修饰。

2、根据权利要求 1 所述的方法，其中，所述化学修饰选自 m⁶A 修饰、m¹A 修饰、假尿苷修饰和 2'-O-甲基化修饰。

3、根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中，所述 DNA 聚合酶选自 *Bst* 2.0 DNA 聚合酶或 *Tth* DNA 聚合酶，优选 *Bst* 2.0 DNA 聚合酶；

所述连接酶选自 SplintR 连接酶、T3 DNA 连接酶、T4 RNA 连接酶 2、T4 DNA 连接酶，优选 SplintR 连接酶或 T3 DNA 连接酶。

4、根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中，在步骤（4）中，所述 PCR 阈值循环数参比值是 PCR 阈值循环数第一参比值或者 PCR 阈值循环数第二参比值，其中：

所述 PCR 阈值循环数第一参比值为：

通过与所述目标 RNA 区段相同的方法确定的第一参比序列的 PCR 阈值循环数，所述第一参比序列至少包含核苷酸序列 II，所述核苷酸序列 II 具有与所述目标 RNA 区段中的核苷酸序列 I 相同的核苷酸序列，其中：核苷酸序列 I 为所述目标 RNA 区段上自与 X 位点的上游引物 3' 末端核苷酸互补配对的核苷酸起至与 X 位点的下游引物 5' 末端核苷酸互补配对的核苷酸止的核苷酸序列，且所述第一参比序列中与所述目标 RNA 区段的所述 RNA 目标位点 X 相对应的 RNA 目标位点 X1 不存在目标修饰；或者

其中，所述 PCR 阈值循环数第二参比值为：

通过与所述目标 RNA 区段相同的方法确定的第二参比序列的 PCR 阈值循环数，所述第二参比序列至少包含核苷酸序列 II，所述核苷酸序列 II 具有与所述目标 RNA 区段中的核苷酸序列 I 相同的核苷酸序列，其中：核苷酸序列 I 为所述目标 RNA 区段上自与 X 位点的上游引物 3' 末端核苷酸互补配对的核苷酸起至与 X 位点的下游引物 5' 末端核苷酸互补配对的核苷酸止的核苷酸序列，且所述第二参比序列中与所述目标 RNA 区段的所述 RNA 目标位点 X 相对应的 RNA 目标位点 X2 存在目标修饰。

5、根据权利要求 4 所述的方法，其中：

当所述 PCR 阈值循环数大于 PCR 阈值循环数第一参比值时，则确定所述 RNA 目标位点 X 存在目标化学修饰；或者

当所述 PCR 阈值循环数等于 PCR 阈值循环数第二参比值时，则确定所述 RNA 目标位点 X 存在目标化学修饰。

6、根据权利要求 5 所述的方法，其中，当所述 PCR 阈值循环数与

PCR 阈值循环数第一参比值多至少 0.4-10 个循环, 优选至少 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10 个循环时, 则确定所述 RNA 目标位点 X 存在目标化学修饰。

7、根据权利要求 1-3 中任一项所述的方法, 其中, 在步骤 (4) 中, 所述 PCR 扩增产物量参比值是 PCR 扩增产物量第一参比值或者 PCR 扩增产物量第二参比值, 其中:

所述 PCR 扩增产物量第一参比值为:

通过与所述目标 RNA 区段相同的方法确定的第一参比序列的 PCR 扩增产物量, 所述第一参比序列至少包含核苷酸序列 II, 所述核苷酸序列 II 具有与所述目标 RNA 区段中的核苷酸序列 I 相同的核苷酸序列, 其中: 核苷酸序列 I 为所述目标 RNA 区段上自与 X 位点的上游探针 Px1 3' 末端核苷酸互补配对的核苷酸起至与 X 位点的下游探针 Px2 5' 末端核苷酸互补配对的核苷酸止的核苷酸序列, 且所述第一参比序列中与所述目标 RNA 区段的所述 RNA 目标位点 X 相对应的 RNA 目标位点 X1 不存在目标修饰; 或者

其中, 所述 PCR 扩增产物量第二参比值为:

通过与所述目标 RNA 区段相同的方法确定的第二参比序列的 PCR 扩增产物量, 所述第二参比序列至少包含核苷酸序列 II, 所述核苷酸序列 II 具有与所述目标 RNA 区段中的核苷酸序列 I 相同的核苷酸序列, 其中: 核苷酸序列 I 为所述目标 RNA 区段上自与 X 位点的上游探针 Px1 3' 末端核苷酸互补配对的核苷酸起至与 X 位点的下游探针 Px2 5' 末端核苷酸互补配对的核苷酸止的核苷酸序列, 且所述第二参比序列中与所述目标 RNA 区段的所述 RNA 目标位点 X 相对应的 RNA 目标位点 X2 存在目标修饰。

8、根据权利要求 7 所述的方法, 其中:

当所述 PCR 扩增产物量小于 PCR 扩增产物量第一参比值时, 则确定所述 RNA 目标位点 X 存在目标化学修饰; 或者

当所述 PCR 扩增产物量等于 PCR 扩增产物量第二参比值时, 则确定

所述 RNA 目标位点 X 存在目标化学修饰。

9、根据前述权利要求中任一项所述的方法，其还包括以下步骤：

(c)控制初始 RNA 输入量：在所述目标 RNA 区段内，任选一个 RNA 非目标位点 N，优选地，所述 RNA 非目标位点 N 位于所述 RNA 目标位点 X 的上游 6nt 至下游 2nt 处；在所述 RNA 非目标位点 N 的上游和下游分别设计上游探针 Pn1 和下游探针 Pn2，利用所述下游探针 Pn2 通过 DNA 聚合酶进行延伸，并用连接酶连接上游探针 Pn1 和延伸后的下游探针 Pn2，得到 SELECT 产物；

将 SELECT 产物进行 PCR 扩增，确定 PCR 阈值循环数；

根据 PCR 阈值循环数控制初始 RNA 输入量，使目标 RNA 区段与第一参比序列或第二参比序列的初始 RNA 输入量相等；

其中，所述第一参比序列至少包含核苷酸序列 II，所述核苷酸序列 II 具有与所述目标 RNA 区段中的核苷酸序列 I 相同的核苷酸序列，其中：当 N 位点位于 X 位点上游时，核苷酸序列 I 为所述目标 RNA 区段上自与 N 位点的上游探针 Pn1 3'末端核苷酸互补配对的核苷酸起至与 X 位点的下游探针 Px2 5'末端核苷酸互补配对的核苷酸止的核苷酸序列；当 N 位点位于 X 位点下游时，核苷酸序列 I 为所述目标 RNA 区段上自与 X 位点的上游探针 Px1 3'末端核苷酸互补配对的核苷酸起至与 N 位点下游探针 Pn2 5'末端核苷酸互补配对的核苷酸止的核苷酸序列；且所述第一参比序列中与所述目标 RNA 区段的所述 RNA 目标位点 X 相对应的 RNA 目标位点 X1 不存在目标修饰；或者

所述第二参比序列至少包含核苷酸序列 II，所述核苷酸序列 II 具有与所述目标 RNA 区段中的核苷酸序列 I 相同的核苷酸序列，其中：当 N 位点位于 X 位点上游时，核苷酸序列 I 为所述目标 RNA 区段上自与 N 位点的上游探针 Pn1 3'末端核苷酸互补配对的核苷酸起至与 X 位点的下游探针 Px2 5'末端核苷酸互补配对的核苷酸止的核苷酸序列；当 N 位点位于 X 位点下游时，核苷酸序列 I 为所述目标 RNA 区段上自与 X 位点的上游探针 Px1 3'末端核苷酸互补配对的核苷酸起至与 N 位点下游探针 Pn2 5'末端

核苷酸互补配对的核苷酸止的核苷酸序列；且所述第二参比序列中与所述目标 RNA 区段的所述 RNA 目标位点 X 相对应的 RNA 目标位点 X1 不存在目标修饰。

10、根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中，所述 SELECT 步骤在包含以下的反应体系中进行：

RNA 样品，优选地所述 RNA 样品为细胞提取的总 RNA 或 mRNA；更优选地，所述总 RNA 或 mRNA 浓度为 10ng、1ng、0.2ng、0.02ng 或更低；或者更优选地，所述总 RNA 或 mRNA 浓度为 10ng、100ng、1μg、10μg 或更高；

dNTP，优选 dTTP，更优选 5-100μM 的 dTTP；

DNA 聚合酶，优选 *Bst* 2.0DNA 聚合酶、更优选 0.0005-0.05U 的 *Bst* 2.0DNA 聚合酶、最优选 0.01U 的 *Bst* 2.0DNA 聚合酶；

连接酶，优选 SplintR 连接酶、更优选 0.1-2U 的 SplintR 连接酶、最优选 0.5U 的 SplintR 连接酶。

11、根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中，所述 SELECT 步骤在 30-50℃、优选 37-42℃、更优选 40℃ 的反应温度下进行。

12、根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中，在步骤（1）之前还包括以下步骤：

分别用 RNA 去修饰酶或 RNA 去修饰酶与 EDTA 的混合物处理所述 RNA 样品；其中，用 RNA 去修饰酶处理的 RNA 样品用作第一参比序列；

优选地，所述 RNA 去修饰酶是 FTO 或 ALKBH5。

13、根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中，所述 RNA 样品是细胞中提取的总 RNA、mRNA、rRNA 或 lncRNA。

14、一种鉴定 RNA 修饰酶或 RNA 去修饰酶底物靶位点的方法，其包括：

（1）制备 RNA 修饰酶或 RNA 去修饰酶缺陷型细胞、或 RNA 修饰酶或 RNA 去修饰酶低表达细胞，培养后，提取 RNA；

（2）根据权利要求 1 的步骤（1）-（3）确定针对 RNA 目标位点 X

的 PCR 阈值循环数或 PCR 扩增产物量；

(3) 将所述 PCR 阈值循环数与 PCR 阈值循环数参比值比较，或者将所述 PCR 扩增产物量与 PCR 扩增产物量参比值比较，以确定所述 RNA 修饰酶或 RNA 去修饰酶是否在所述 RNA 目标位点 X 进行化学修饰，

其中，所述 PCR 阈值循环数参比值为正常细胞通过与 RNA 修饰酶或 RNA 去修饰酶缺陷型细胞、或 RNA 修饰酶或 RNA 去修饰酶低表达细胞相同的方法获得的 PCR 阈值循环数，

所述 PCR 扩增产物量参比值为正常细胞通过与 RNA 修饰酶或 RNA 去修饰酶缺陷型细胞、或低表达细胞相同的方法获得的 PCR 扩增产物量；

其中，所述靶位点是单基因单位点；

优选地，当所述 PCR 阈值循环数小于 PCR 阈值循环数参比值时，则所述 RNA 修饰酶或去修饰酶在所述 RNA 目标位点进行化学修饰；

或者，优选地，当所述 PCR 扩增产物量大于 PCR 扩增产物量参比值时，所述 RNA 修饰酶或去修饰酶在所述 RNA 目标位点进行化学修饰。

15、根据权利要求 14 所述的方法，所述 RNA 化学修饰为选自 m^6A 修饰、 m^1A 修饰、假尿苷修饰和 2'-O-甲基化修饰，优选为 m^6A 修饰；所述 RNA 化学修饰酶包括 m^6A 修饰酶；优选地，所述 m^6A 修饰酶为甲基转移酶复合物或 METTL16；所述甲基转移酶复合物选自以下的任意成员或其组合：METTL3、METTL14、WTAP、KIAA1429、HAKAI、ZC3H13、RBM15 和 RBM15B。

16、一种用于定量转录本中 RNA 修饰率的方法，其包括：

(1) 获得 RNA 样品，在 RNA 样品中选择包含 RNA 目标位点 X 的目标 RNA 区段；

(2) 确定所述 RNA 样品中目标 RNA 区段的含量，其包括：

(2a) 在所述目标 RNA 区段内，任选一个 RNA 非目标位点 N，优选地所述 RNA 非目标位点 N 位于所述 RNA 目标位点 X 的上游 6nt 至下游 2nt 处；在所述 RNA 非目标位点 N 的上游和下游分别设计上游探针 Pn1 和下游探针 Pn2，利用所述下游探针 Pn2 通过 DNA 聚合酶进行延伸，并

用连接酶连接上游探针 Pn1 和延伸后的下游探针 Pn2, 得到 SELECT 产物; 将 SELECT 产物进行 PCR 扩增, 获得 PCR 阈值循环数 N;

(2b) 将参比序列梯度稀释成一系列浓度, 分别采用步骤 (1a) 的方法获得与各浓度对应的 PCR 阈值循环数 Nn, 根据浓度和 PCR 阈值循环数 Nn 确定标准曲线 1; 优选地, 所述一系列浓度在 0.1fmol 至 3fmol 之间, 优选在 0.2fmol 至 2.8fmol 之间, 更优选在 0.2fmol 至 2.4fmol 之间;

其中, 参比序列是第一参比序列、第二参比序列、或两者以任意比例的混合物,

所述参比序列至少包含核苷酸序列 II, 所述核苷酸序列 II 具有与所述目标 RNA 区段中的核苷酸序列 I 相同的核苷酸序列, 其中: 当 N 位点位于 X 位点上游时, 核苷酸序列 I 为所述目标 RNA 区段上自与 N 位点的上游探针 Pn1 3' 末端核苷酸互补配对的核苷酸起至与 X 位点的下游探针 Px2 5' 末端核苷酸互补配对的核苷酸止的核苷酸序列; 当 N 位点位于 X 位点下游时, 核苷酸序列 I 为所述目标 RNA 区段上自与 X 位点的上游探针 Px1 3' 末端核苷酸互补配对的核苷酸起至与 N 位点下游探针 Pn2 5' 末端核苷酸互补配对的核苷酸止的核苷酸序列,

且所述第一参比序列中与所述目标 RNA 区段的所述 RNA 目标位点 X 相对应的 RNA 目标位点 X1 不存在目标修饰, 所述第二参比序列中与所述目标 RNA 区段的所述 RNA 目标位点 X 相对应的 RNA 目标位点 X1 不存在目标修饰;

优选地, 所述参比序列的长度为至少 40nt;

(2c) 将 PCR 阈值循环数 N 与标准曲线 1 比较, 确定所述 RNA 样品中目标 RNA 区段的含量;

(3) 将第一参比序列与第二参比序列按一系列摩尔浓度比混合得到一系列混合物, 对混合物应用权利要求 1 的 (2) SELECT 步骤和 (3) PCR 扩增步骤, 获得 PCR 阈值循环数 A1 或 PCR 扩增产物量 A2, 根据摩尔比和 PCR 阈值循环数 A1 或者根据摩尔比和 PCR 扩增产物量 A2 确定标准曲线 2; 优选地, 所述 RNA 样品与第一参比序列或与第二参比序列以 10:0、

-38-

8:2、6:4、4:6、2:8 和 0:1 的摩尔浓度比混合；；

(4) 对所述样品 RNA 应用权利要求 1 的 (2) SELECT 步骤和 (3) PCR 扩增步骤，获得 PCR 阈值循环数 B1 或 PCR 扩增产物量 B2；和

(5) 通过 PCR 阈值循环数 B1 或 PCR 扩增产物量 B2 与标准曲线 2 比较，计算出 RNA 样品中 RNA 目标位点 X 的修饰率。

17、根据权利要求 16 所述的方法，所述 RNA 样品是细胞中提取的总 RNA、mRNA、rRNA 或 lncRNA。

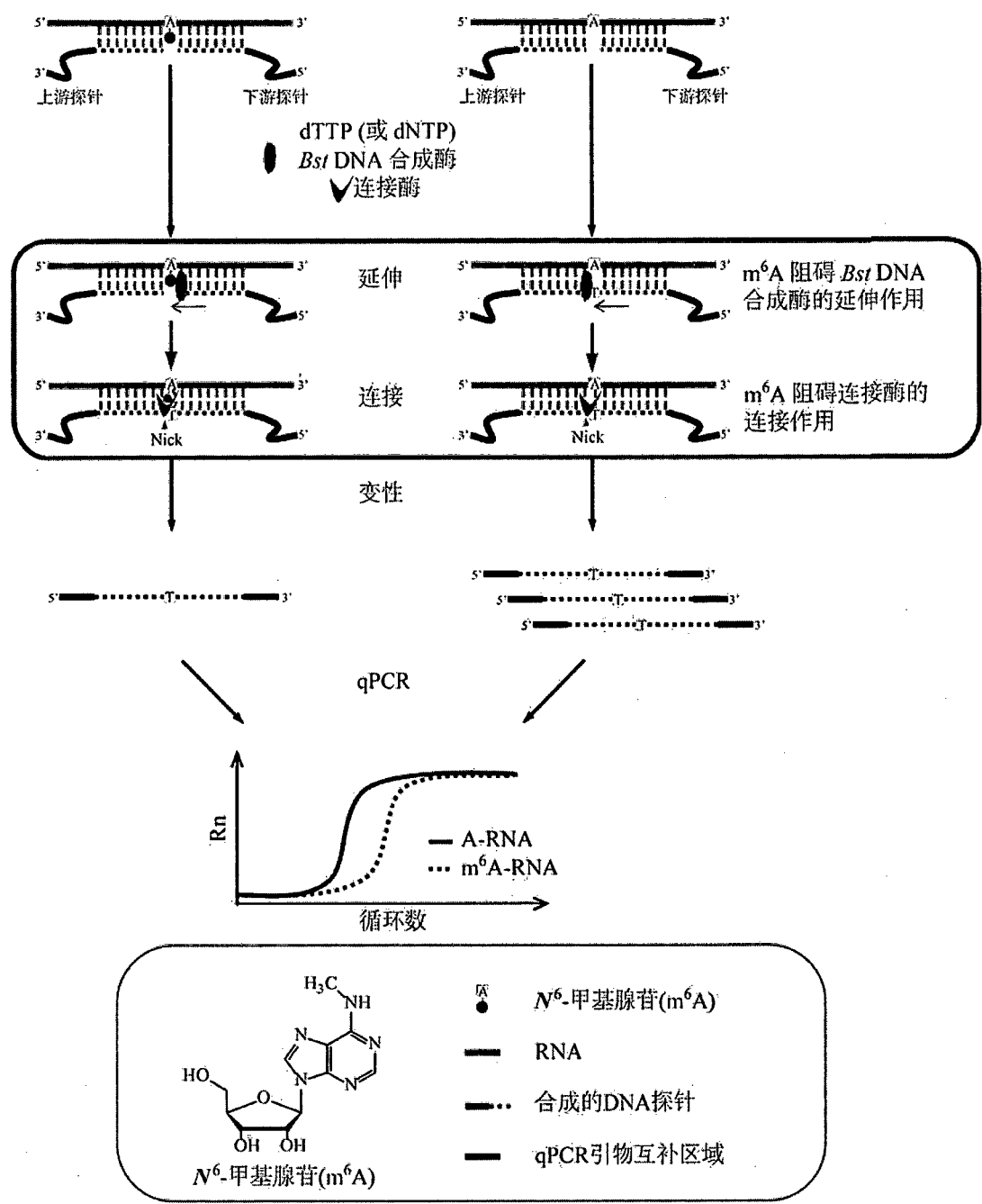


图 1

-2/16-

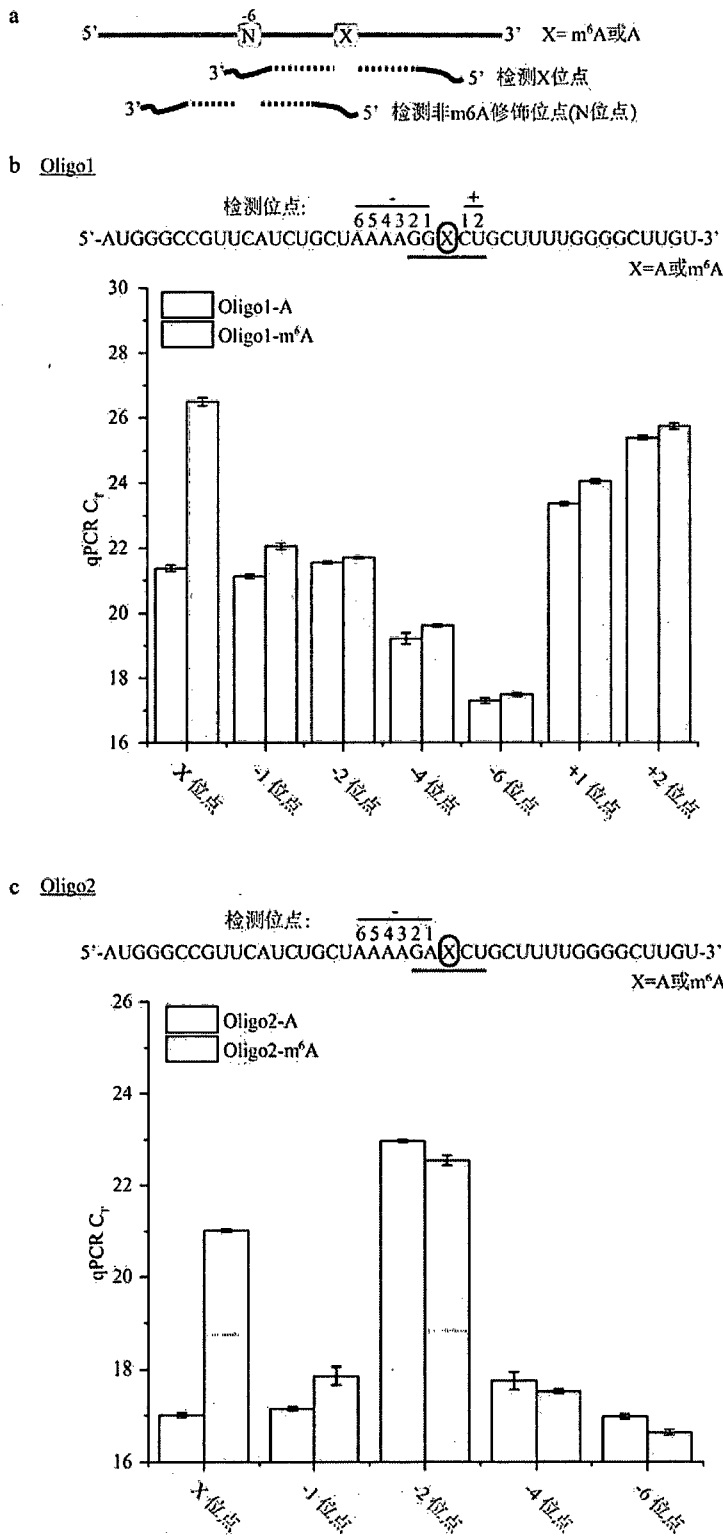


图 2

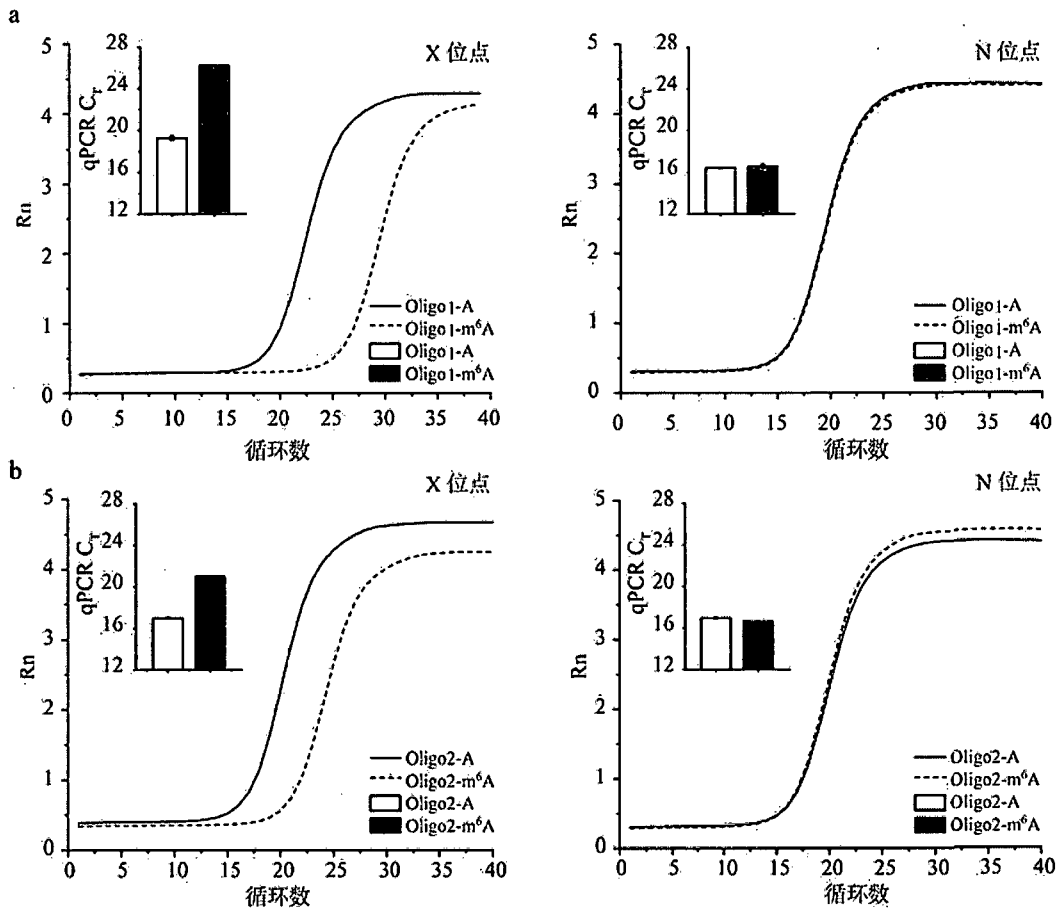


图 3

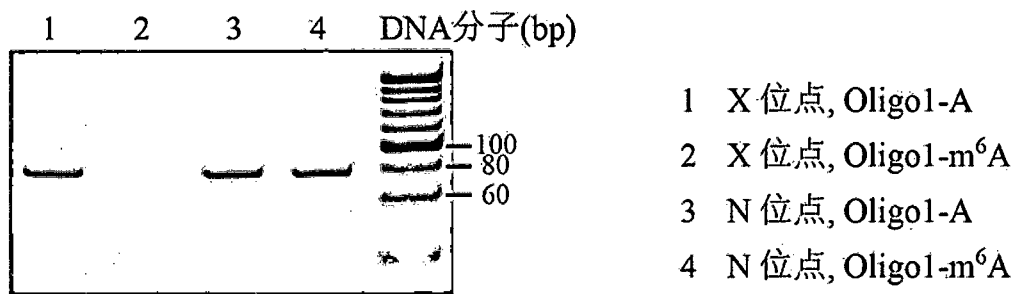


图 4

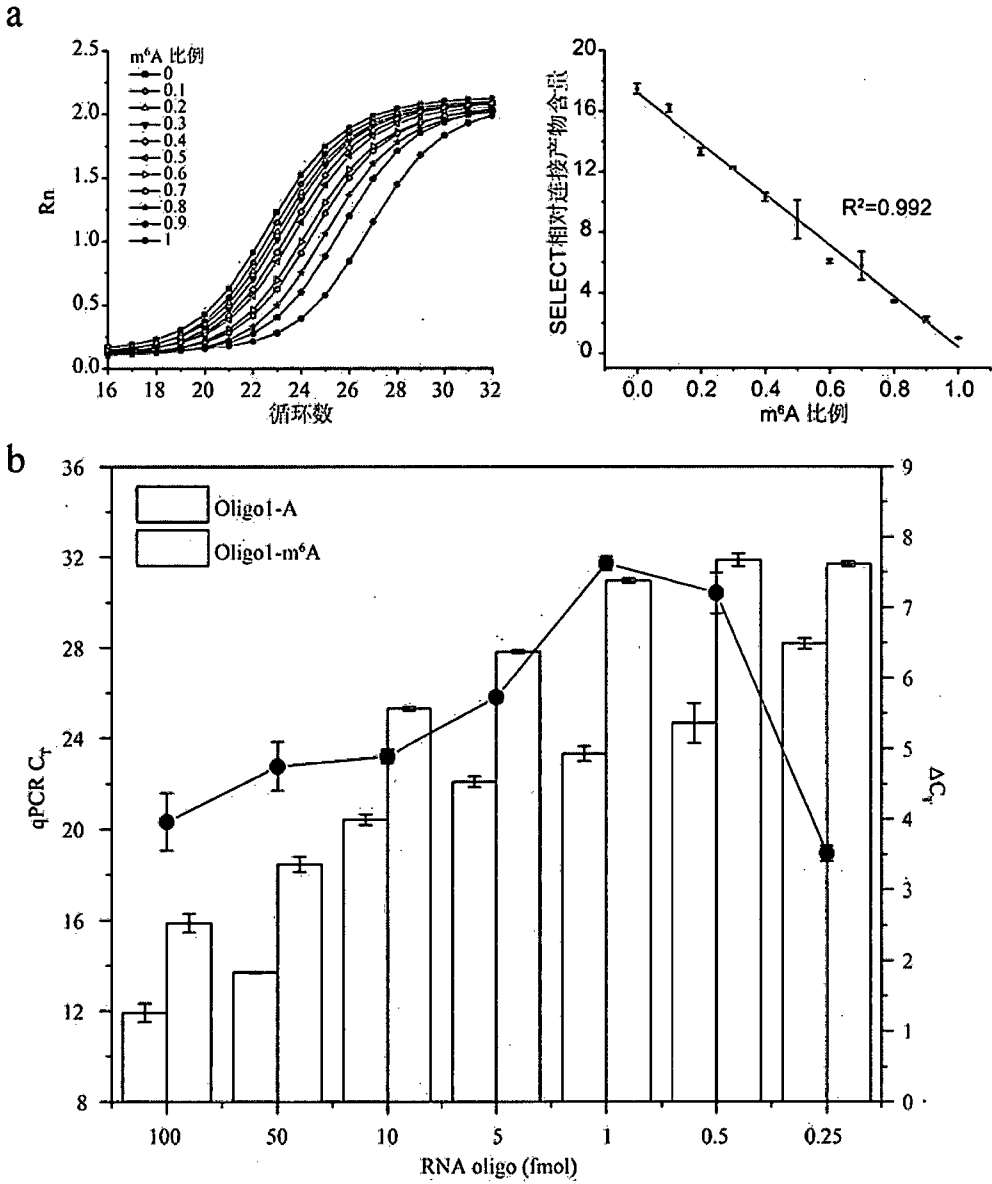


图 5

-5/16-

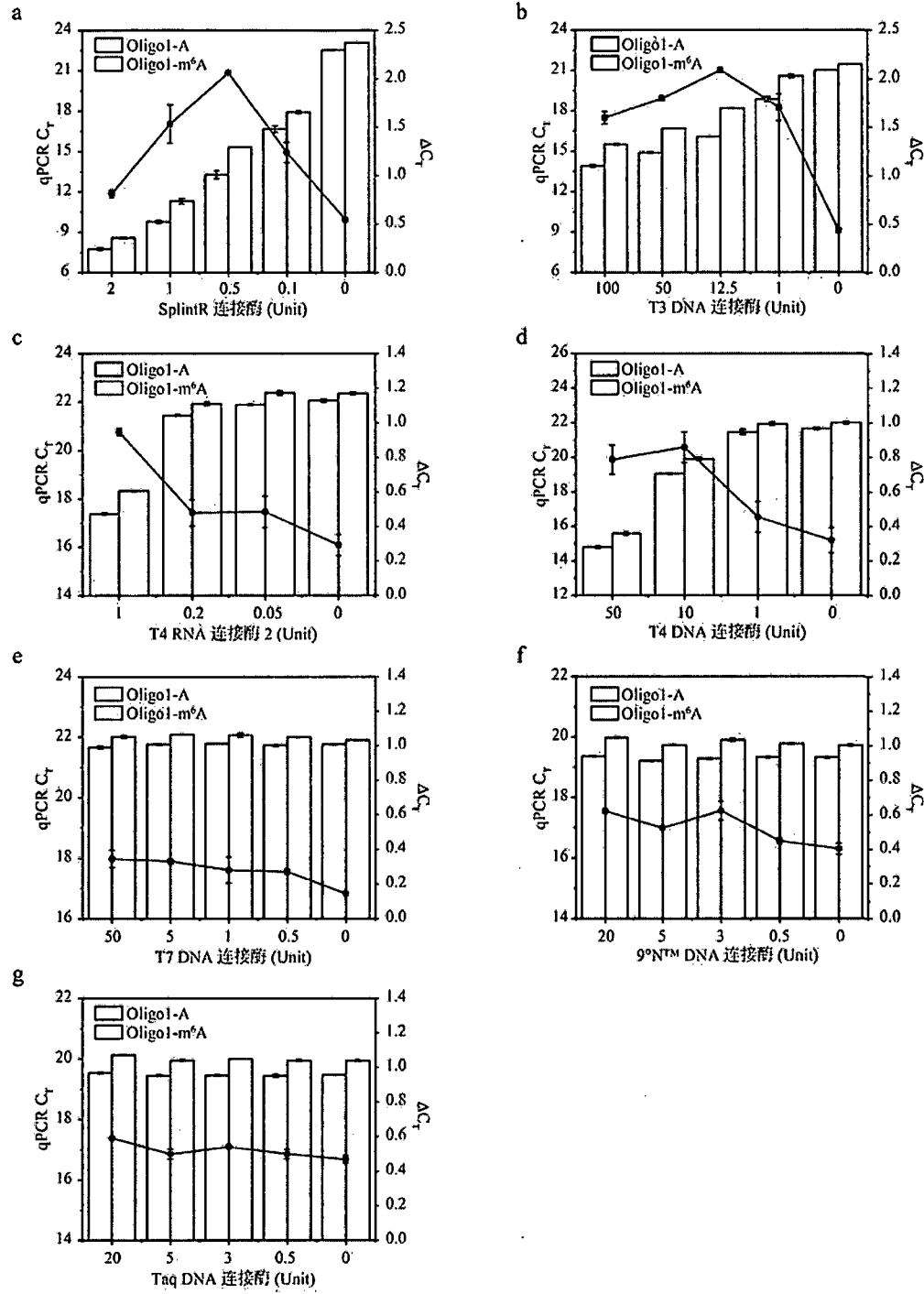


图 6

-6/16-

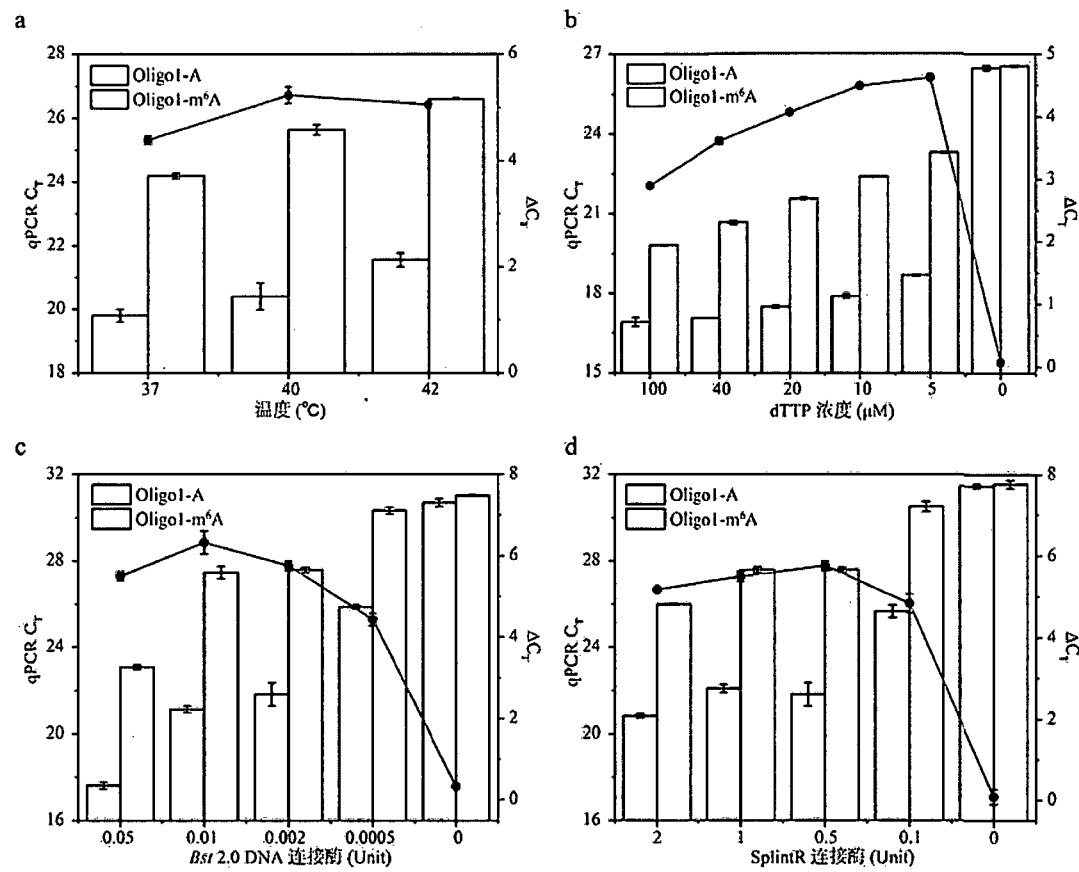


图 7

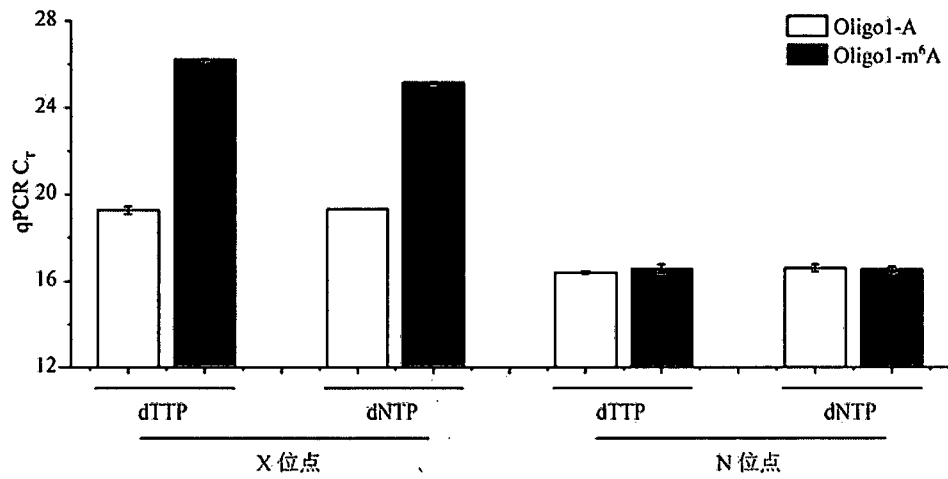


图 8

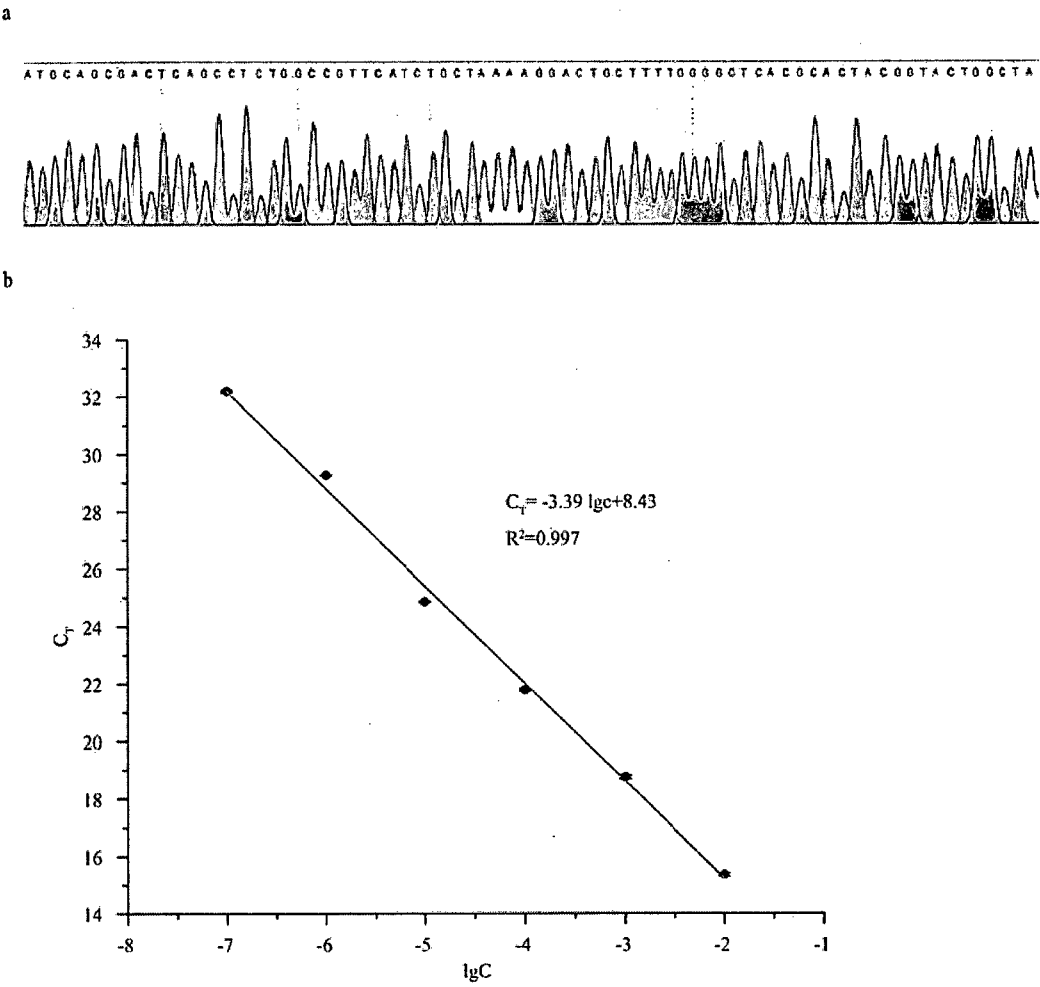


图 9

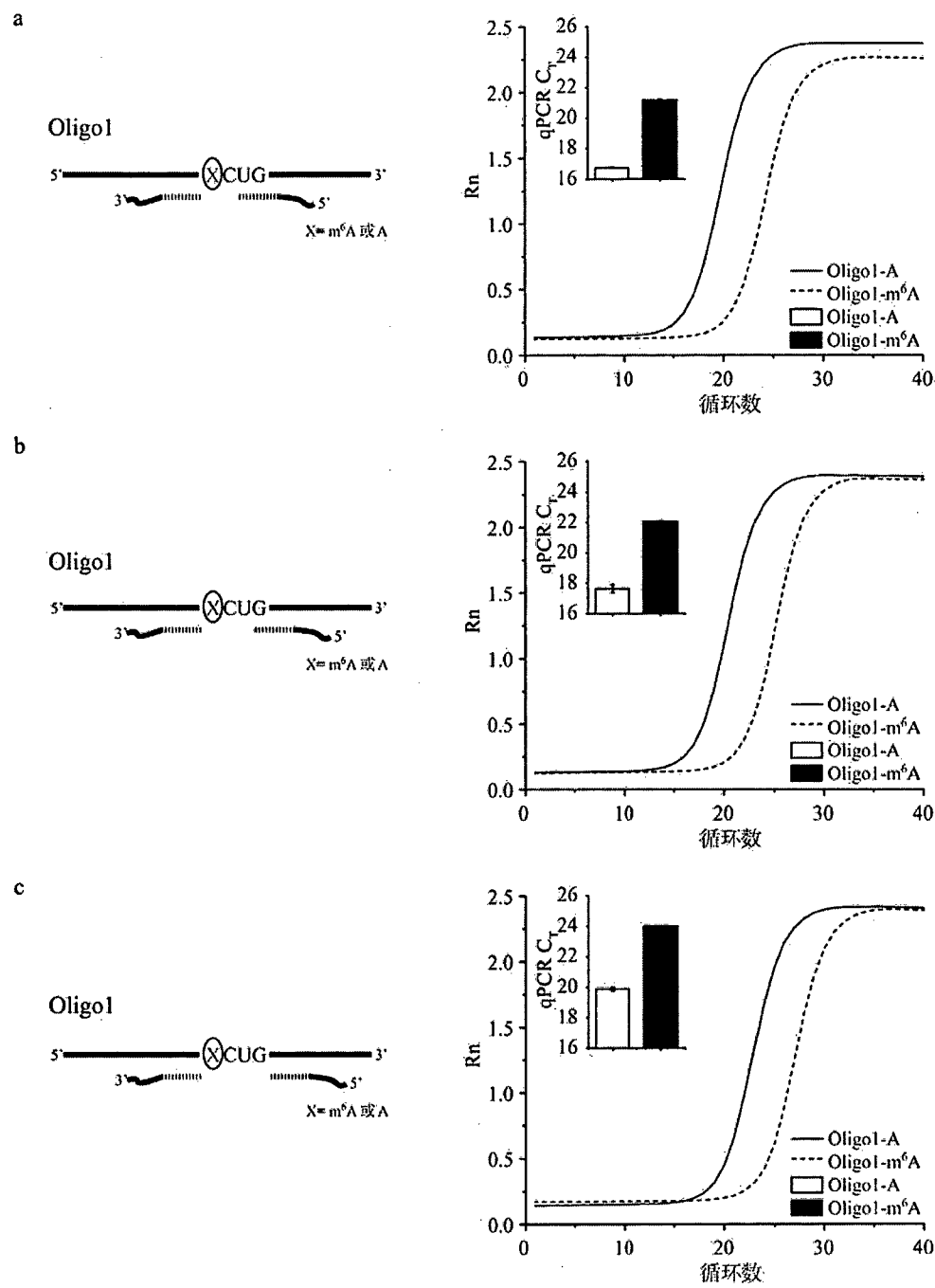


图 10

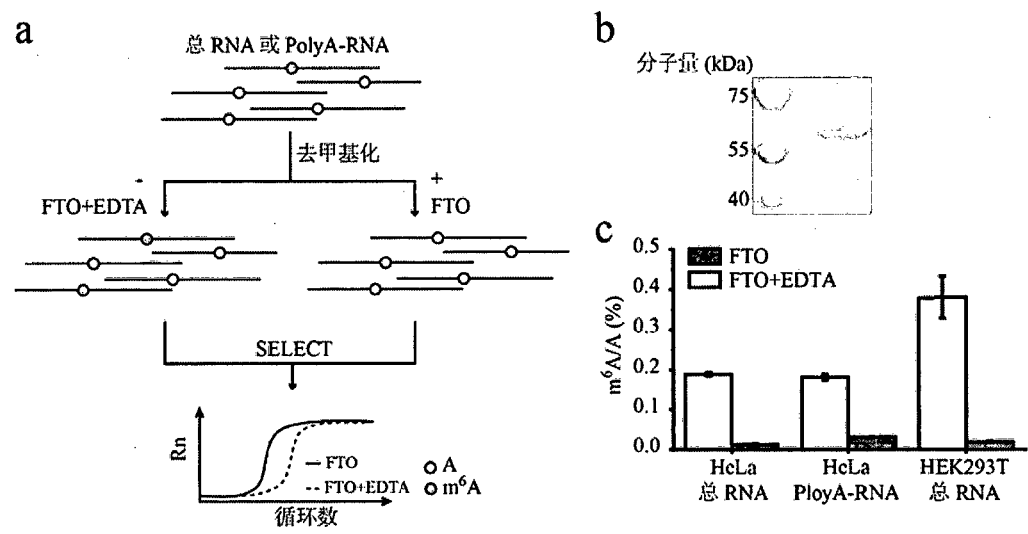


图 11

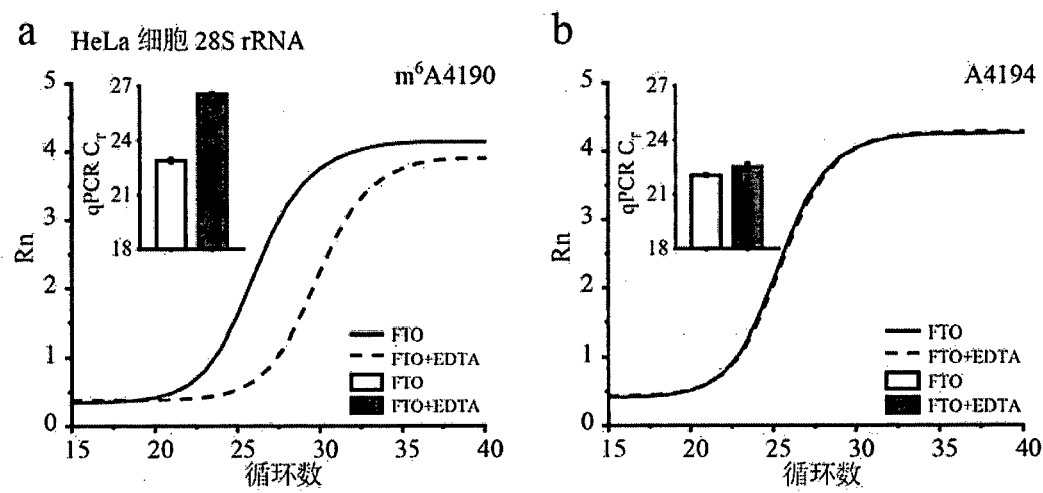


图 12

-10/16-

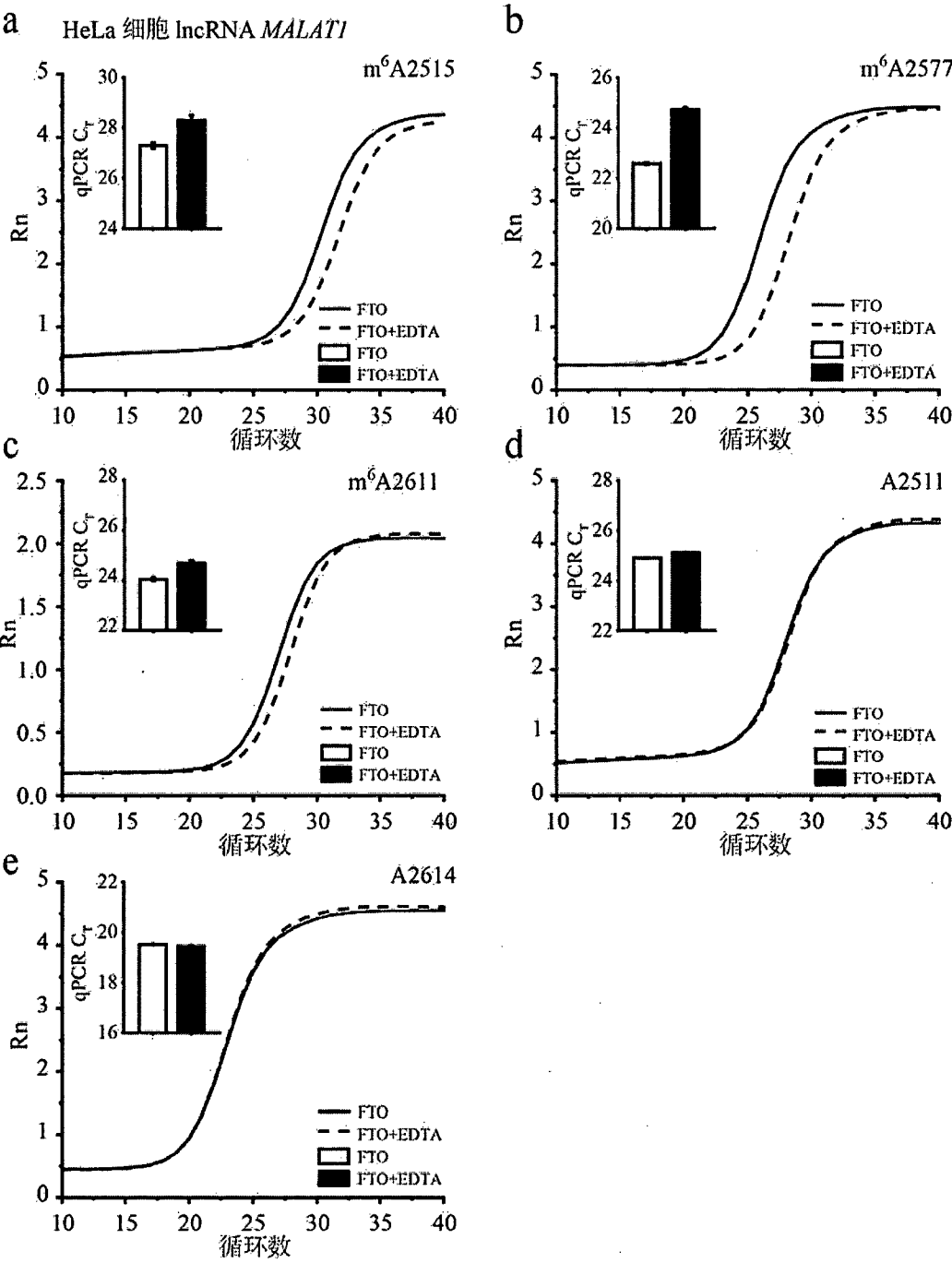


图 13

-11/16-

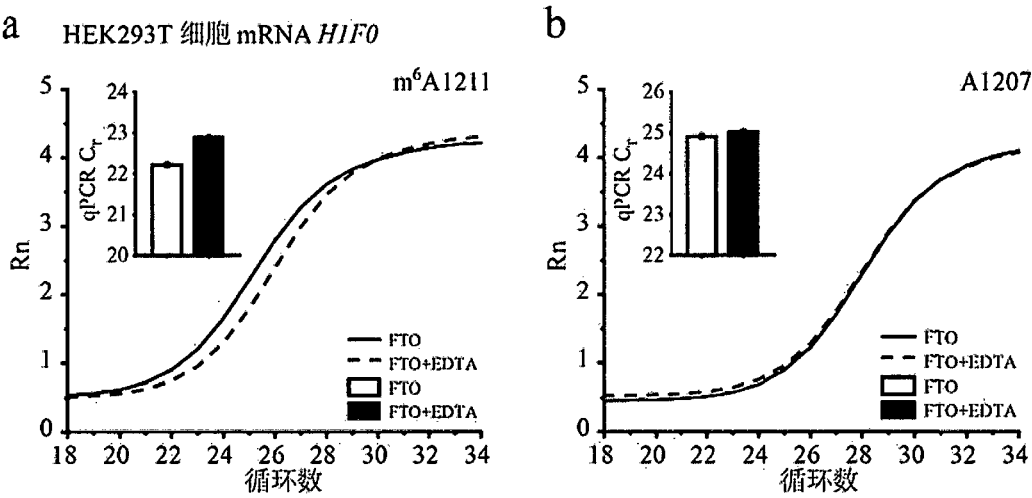


图 14

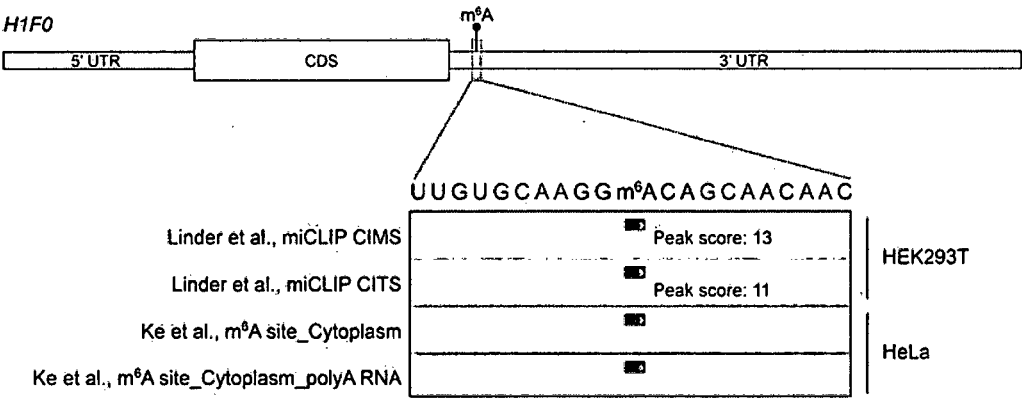


图 15

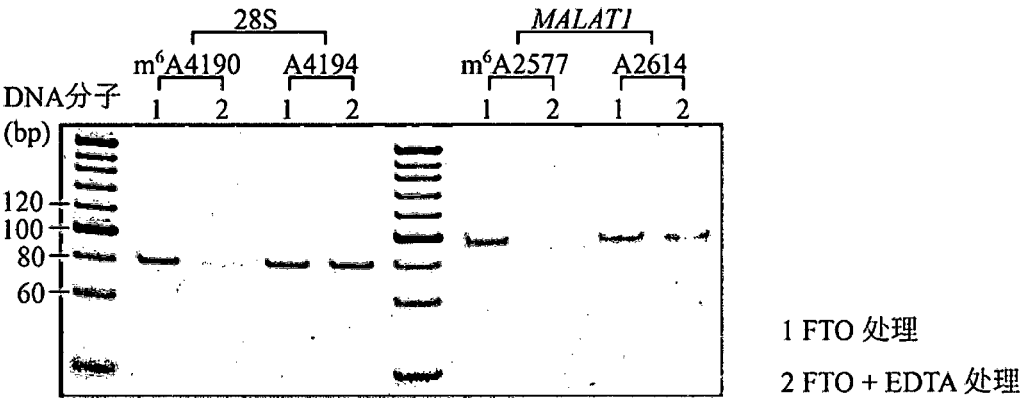


图 16

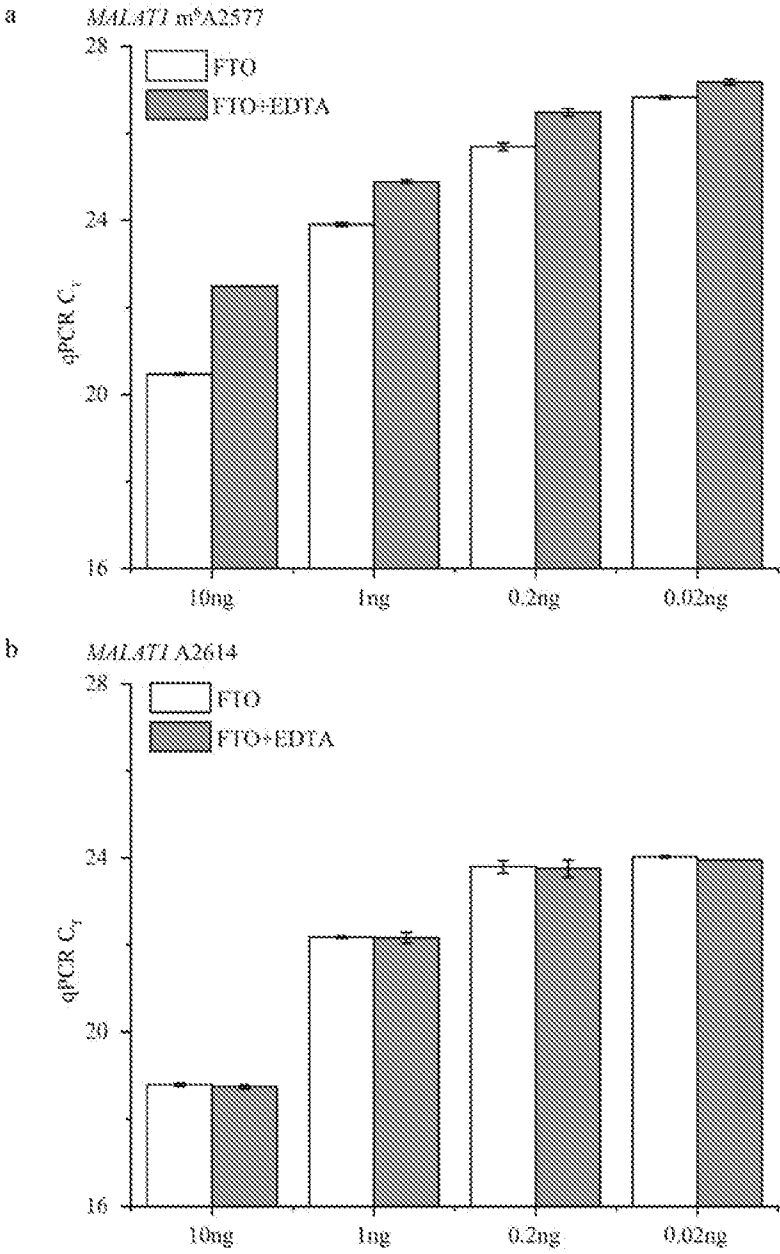


图 17

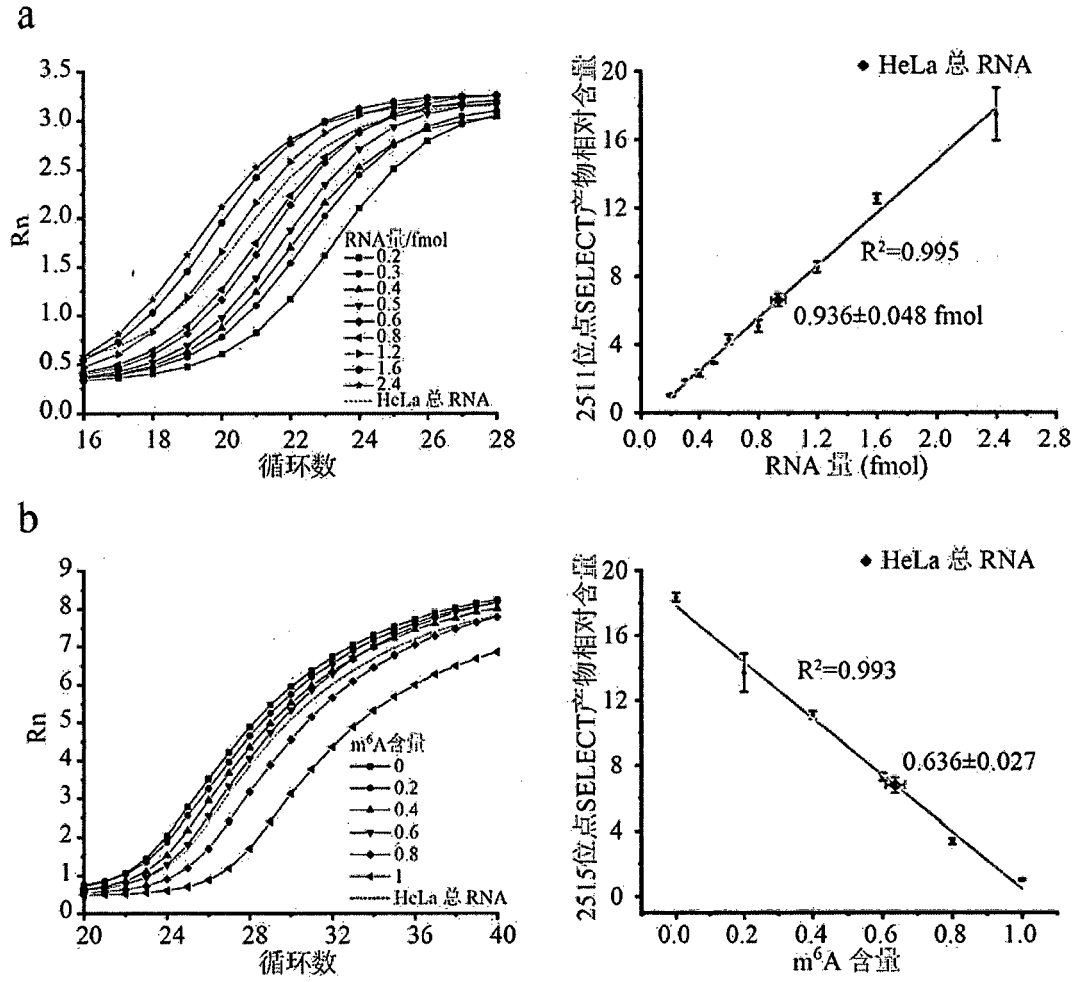


图 18

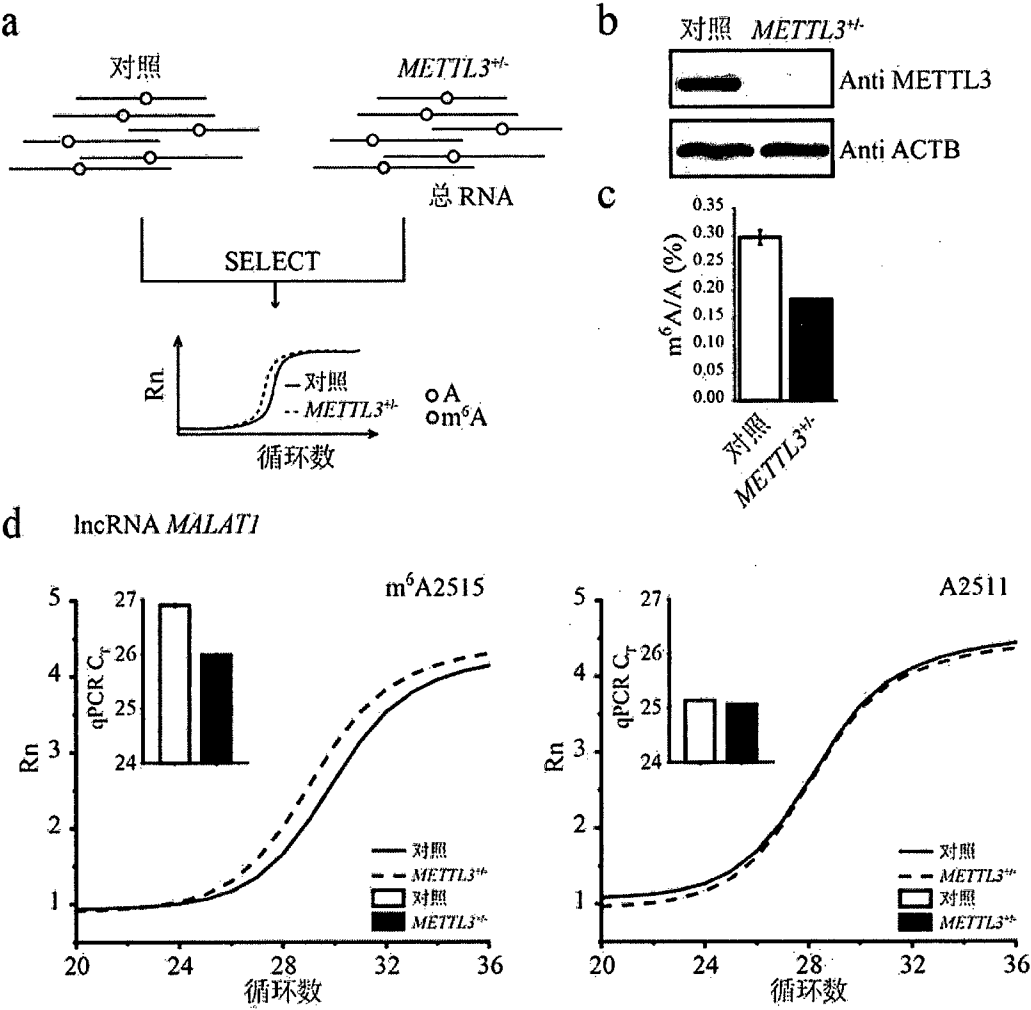


图 19

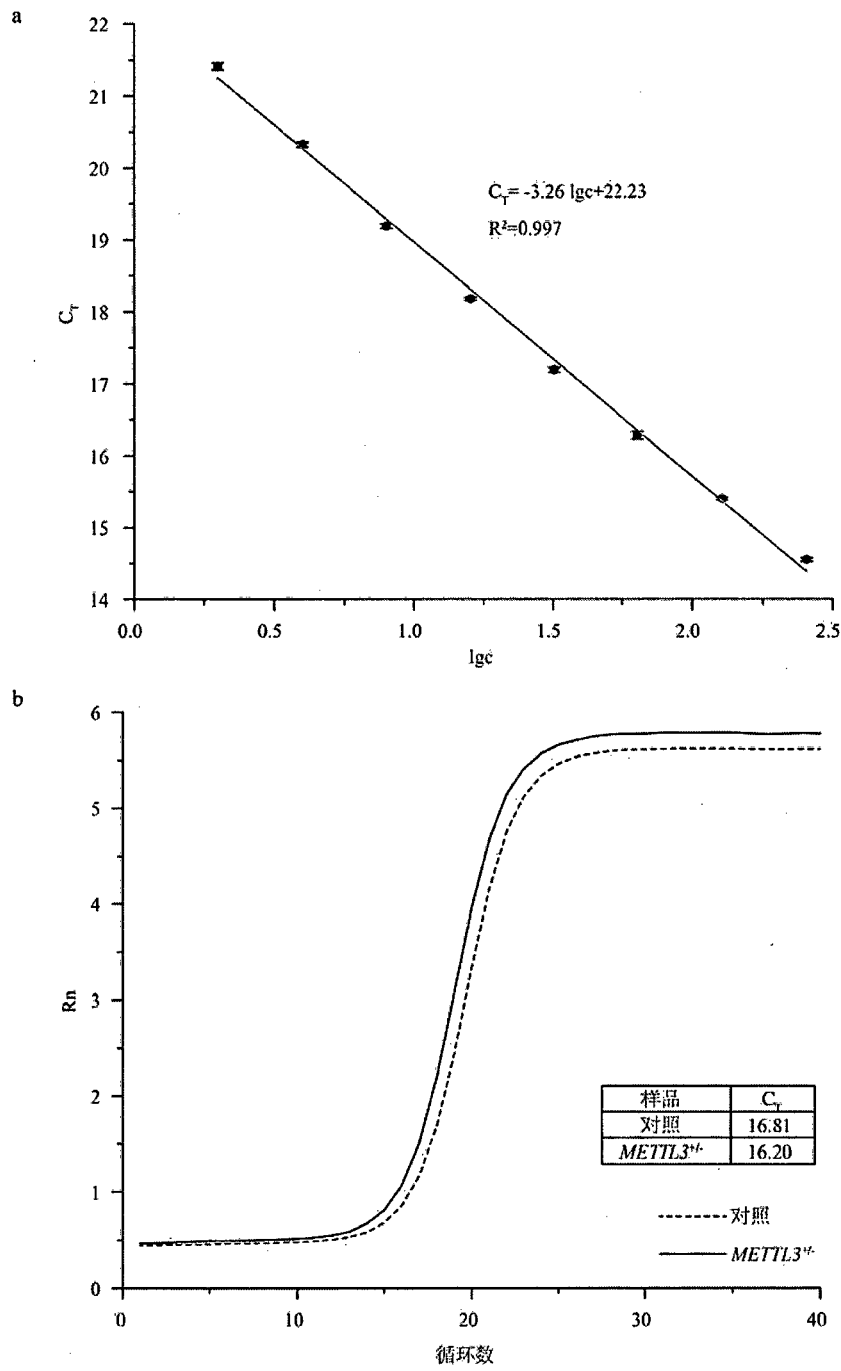


图 20

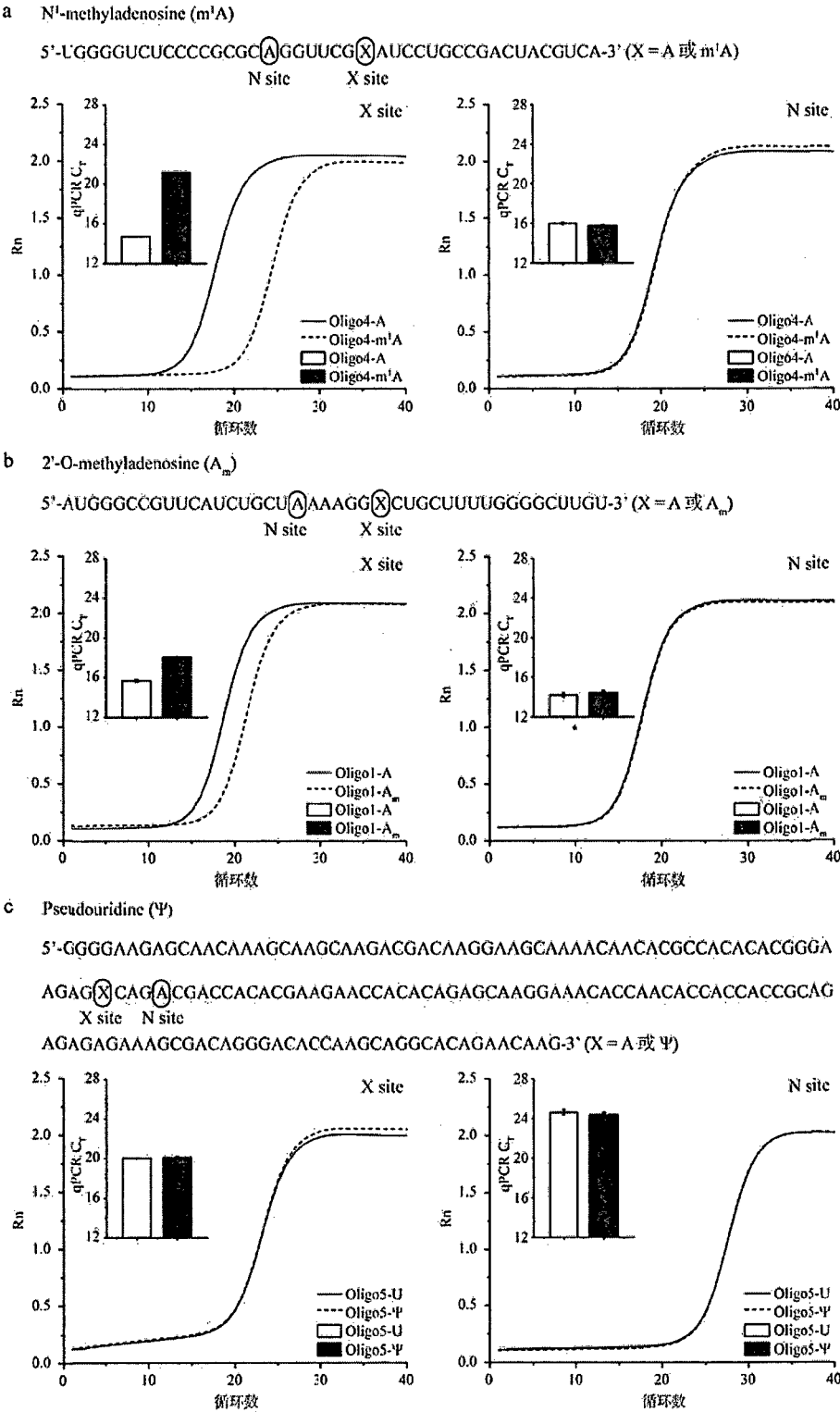


图 21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/109145

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/68(2018.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

DWPI, SIPOABS, CNABS, CNKI, ISI Web of knowledge, NCBI, Google Scholar, GenBank: 核酸, 修饰, 甲基化, 检测, 识别, 探针, 引物, 荧光, 扩增, 阈, Nucleic acid, modify, Methylation, detect, identify, probe, primer, fluorescence, amplify, threshold, RNA, PCR

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 103525907 A (QILU HOSPITAL OF SHANDONG UNIVERSITY) 22 January 2014 (2014-01-22) entire document	1-17
A	CN 107326078 A (NINGBO UNIVERSITY) 07 November 2017 (2017-11-07) entire document	1-17
A	CN 105008551 A (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION KUMAMOTO UNIVERSITY) 28 October 2015 (2015-10-28) entire document	1-17
A	马士清 等 (MA, Shiqing et al.). "RNA修饰检测技术 (The Detection Methods of RNA Modifications)" <i>生命科学 (Chinese Bulletin of Life Sciences)</i> , Vol. 30, No. 4, 30 April 2018 (2018-04-30), entire document	1-17
A	CHAVEZ, L. et al. "Simultaneous sequencing of oxidized methylcytosines produced by TET/JBP dioxygenases in <i>Coprinopsis cinerea</i> " <i>PNAS</i> , Vol. 118, No. (48), 18 November 2014 (2014-11-18), entire document	1-17



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

02 November 2018

Date of mailing of the international search report

15 January 2019

Name and mailing address of the ISA/CN

State Intellectual Property Office of the P. R. China (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing
100088
China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/109145

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2018/109145

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	103525907	A	22 January 2014	None			
CN	107326078	A	07 November 2017	None			
CN	105008551	A	28 October 2015	US	2016060698	A1	03 March 2016
				WO	2014136870	A1	12 September 2014
				EP	2966178	A1	13 January 2016
				EP	2966178	A4	05 April 2017
				JP	WO2014136870	A1	16 February 2017

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2018/109145

A. 主题的分类 C12Q 1/68(2018.01) i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) C12Q 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) DWPI、SIPOABS、CNABS、CNKI、ISI Web of knowledge、NCBI、Google Scholar、GenBank: 核酸、修饰、甲基化、检测、识别、探针、引物、荧光、扩增、阈、Nucleic acid、modify、Methylation、detect、identify、probe、primer、fluorescence、amplify、threshold、RNA、PCR		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 103525907 A (山东大学齐鲁医院) 2014年 1月 22日 (2014 - 01 - 22) 全文	1-17
A	CN 107326078 A (宁波大学) 2017年 11月 7日 (2017 - 11 - 07) 全文	1-17
A	CN 105008551 A (国立大学法人熊本大学) 2015年 10月 28日 (2015 - 10 - 28) 全文	1-17
A	马士清 等. "RNA修饰检测技术" 生命科学, 第30卷, 第4期, 2018年 4月 30日 (2018 - 04 - 30), 全文	1-17
A	Lukas Chavez 等. "Simultaneous sequencing of oxidized methylcytosines produced by TET/JBP dioxygenases in Coprinopsis cinerea" PNAS, 第118卷, 第48期, 2014年 11月 18日 (2014 - 11 - 18), 全文	1-17
☐ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 "T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 "X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 "&" 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期 2018年 11月 2日		国际检索报告邮寄日期 2019年 1月 15日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		受权官员 张起 电话号码 62411036

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列表进行的:

a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的:

☒ 附件C/ST. 25文本文件形式

☐ 纸件或图形文件形式

b. ☐ 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:

☐ 附件C/ST. 25文本文件形式(细则13之三. 1(a))

☐ 纸件或图形文件形式(细则13之三. 1(b)和行政规程第713段)

2. ☐ 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。

3. 补充意见:

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2018/109145

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	103525907	A	2014年 1月 22日	无			
CN	107326078	A	2017年 11月 7日	无			
CN	105008551	A	2015年 10月 28日	US	2016060698	A1	2016年 3月 3日
				WO	2014136870	A1	2014年 9月 12日
				EP	2966178	A1	2016年 1月 13日
				EP	2966178	A4	2017年 4月 5日
				JP	W02014136870	A1	2017年 2月 16日