



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111154837 B

(45) 授权公告日 2021.05.18

(21) 申请号 201910822658.3

(22) 申请日 2019.09.02

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 111154837 A

(43) 申请公布日 2020.05.15

(73) 专利权人 浙江大学  
地址 310058 浙江省杭州市西湖区余杭塘路866号

(72) 发明人 刘建钊 冯新华 舒潇 曹婕

(74) 专利代理机构 杭州求是专利事务所有限公司 33200

代理人 万尾甜 韩介梅

(51) Int. Cl.

C12Q 1/6809 (2018.01)

C12Q 1/6869 (2018.01)

G01N 33/53 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 106047997 A, 2016.10.26

Xiao Shu等.N6-Allyladenine: A New Small Molecule for RNA Labeling Identified by Mutation Assay.《J. Am. Chem. Soc.》.2017,第139卷

Shanteri Singh等.Facile Chemoenzymatic Strategies for the Synthesis and Utilization of S-Adenosyl-1-Methionine Analogues.《Angew. Chem. Int. Ed.》.2014,第53卷

Xiao Shu等.A metabolic labeling method detects m6A transcriptome-wide at single base resolution.《Nature Chemical Biology》.2020,第16卷

审查员 冯晓亮

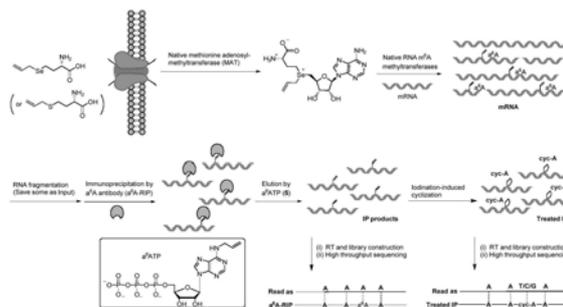
权利要求书2页 说明书17页 附图10页

(54) 发明名称

一种全转录组范围单碱基分辨率检测RNA N6-甲基腺嘌呤修饰的方法

(57) 摘要

本发明提供一种全转录组范围单碱基分辨率检测RNA N<sup>6</sup>-甲基腺嘌呤修饰的方法及试剂盒。该方法基于体内核糖核酸(RNA)腺嘌呤的N<sup>6</sup>-烯丙基标记并化学处理诱导其在逆转录成DNA过程中发生碱基突变,然后通过核酸测序手段识别突变位点,进而得到a<sup>6</sup>A位点,该位点即为细胞RNA中原本m<sup>6</sup>A修饰的位点。本发明方法首次实现了在细胞内进行N<sup>6</sup>-烯丙基腺嘌呤的特异性标记,该标记不但能够用于替换细胞内的N<sup>6</sup>-甲基腺嘌呤位点,并且能够借助突变测序的手段进行定位。本发明方法与现有应用于m<sup>6</sup>A检测的基因测序技术相比,由于突变位点可以精确到单碱基的分辨率,提升了目前普遍采用的基于m<sup>6</sup>A抗体免疫沉淀与大规模平行测序方法检测m<sup>6</sup>A位点的精度,是一个直接的高通量单碱基鉴定方法。



CN 111154837 B

1. 一种全转录组范围单碱基分辨率检测RNA N<sup>6</sup>-甲基腺嘌呤修饰的方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 烯丙基-L-硒代/硫代高半胱氨酸标记核酸腺嘌呤:用甲硫氨酸类似物烯丙基-L-硒代/硫代高半胱氨酸处理细胞,细胞通过天然代谢将烯丙基基团引入到细胞内RNA的特定腺嘌呤N<sup>6</sup>-甲基腺嘌呤位上,形成N<sup>6</sup>-烯丙基腺嘌呤a<sup>6</sup>A;

(2) 含有a<sup>6</sup>A修饰的RNA富集:提取细胞总RNA,再进一步提取细胞的mRNA,然后将所述细胞的全转录组RNA断裂为100~300nt的片段化RNA,利用抗体结合N<sup>6</sup>-烯丙基腺嘌呤核苷,借助免疫沉淀的方法,富集a<sup>6</sup>A修饰的RNA,并用洗脱剂从抗体上洗脱a<sup>6</sup>A修饰的RNA,并对洗脱所得的RNA进行纯化;

(3) RNA a<sup>6</sup>A上的N<sup>6</sup>-烯丙基腺嘌呤的碘加成与环化处理:RNA a<sup>6</sup>A上的N<sup>6</sup>-烯丙基腺嘌呤发生碘加成反应,然后在碱性条件下诱导RNA a<sup>6</sup>A上的N<sup>6</sup>-烯丙基腺嘌呤的N<sup>1</sup>,N<sup>6</sup>位形成环化结构,屏蔽碱基互补配对;

(4) 环化处理RNA的逆转录突变与测序识别:向步骤(3)获得的环化结构中加入HIV逆转录酶,RNA上的N<sup>1</sup>,N<sup>6</sup>环化腺嘌呤在HIV逆转录酶作用下逆转录成DNA的过程中,对位互补碱基引入发生错误,通过核酸测序手段识别突变位点,进而得到a<sup>6</sup>A位点,该位点即为细胞RNA中原本m<sup>6</sup>A修饰的位点;

所述方法不属于疾病的诊断和治疗方法。

2. 根据权利要求1所述的全转录组范围单碱基分辨率检测RNA N<sup>6</sup>-甲基腺嘌呤修饰的方法,其特征在于,步骤(1)中,烯丙基-L-硒代/硫代高半胱氨酸的制备方法为:在氮气保护下,以摩尔比为1:1的硒粉/硫粉和硼氢化钠为原料,乙醇为溶剂,80℃加热回流反应6~24小时;再加入摩尔量为硒粉/硫粉二分之一到三分之一的(S)-(+)-2-氨基-4-溴丁酸的氢溴酸盐继续在80℃加热回流6~24小时,加入酸终止反应,过滤除去不溶物,并用乙醚洗去副产物,再调节pH至中性;然后加入摩尔量为硒粉/硫粉1~2倍的硼氢化钠还原二硒/二硫键,再加入摩尔量为硒粉/硫粉0.5~2倍的碳酸氢钠/碳酸钠与摩尔量为硒粉/硫粉0.5~1.5倍的烯丙基溴室温反应6~24小时,通过高效液相色谱分析提纯,得到烯丙基-L-硒代/硫代高半胱氨酸。

3. 根据权利要求1所述的全转录组范围单碱基分辨率检测RNA N<sup>6</sup>-甲基腺嘌呤修饰的方法,其特征在于,步骤(1)中细胞处理的具体方法为,采用缺乏甲硫氨酸的培养基进行细胞培养,并加入0.1~2mM的半胱氨酸处理半个小时,之后再加入0.1~2mM的烯丙基-L-硒代/硫代高半胱氨酸,培养12~24小时。

4. 根据权利要求1所述的全转录组范围单碱基分辨率检测RNA N<sup>6</sup>-甲基腺嘌呤修饰的方法,其特征在于,步骤(2)中,所述的细胞全转录组RNA片段化通过Zn<sup>2+</sup>离子于70℃加热5~10分钟实现。

5. 根据权利要求1所述的全转录组范围单碱基分辨率检测RNA N<sup>6</sup>-甲基腺嘌呤修饰的方法,其特征在于,步骤(2)中,用于结合N<sup>6</sup>-烯丙基腺嘌呤核苷的抗体为N<sup>6</sup>-异戊烯基腺苷的抗体,10μg的抗体用于富集1~20μg的片段化RNA。

6. 根据权利要求1所述的全转录组范围单碱基分辨率检测RNA N<sup>6</sup>-甲基腺嘌呤修饰的方法,其特征在于,步骤(2)中,所述的洗脱剂为N<sup>6</sup>-烯丙基三磷酸腺苷,浓度为5~10mM。

7. 根据权利要求1所述的全转录组范围单碱基分辨率检测RNA N<sup>6</sup>-甲基腺嘌呤修饰的方

法,其特征在于,所述的步骤(3)具体为:将0.1~0.5M碘单质溶于0.2~1M碘化钾得到碘的碘化钾溶液,再使碘的碘化钾溶液与RNA a<sup>6</sup>A上的N<sup>6</sup>-烯丙基腺嘌呤的烯丙基反应,然后用0.1~0.5M硫代硫酸钠除去过量碘;再加入0.1~0.5M碳酸钠,调节pH=9~10,诱导RNA a<sup>6</sup>A上的N<sup>6</sup>-烯丙基腺嘌呤的N<sup>1</sup>,N<sup>6</sup>位形成环化结构,从而使腺嘌呤正常的氢键配对受到屏蔽。

8. 根据权利要求1所述的全转录组范围单碱基分辨率检测RNA N<sup>6</sup>-甲基腺嘌呤修饰的方法,其特征在于,所述步骤(4)具体为:i) 利用HIV逆转录酶逆转录上述碘加成环化的RNA; ii) 采用RNA文库制备技术结合高通量测序手段进行全转录组突变位点的识别从而得到全转录组单碱基分辨率的m<sup>6</sup>A位点分布,或者采用PCR与TA-cloning技术进行特定转录本上突变位点的识别与验证。

## 一种全转录组范围单碱基分辨率检测RNA N<sup>6</sup>-甲基腺嘌呤修饰的方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于基因测序领域,特别是一种全转录组范围单碱基分辨率检测RNA N<sup>6</sup>-甲基腺嘌呤修饰的方法及试剂盒。

### 背景技术

[0002] RNA不仅由胞嘧啶(C)、胸腺嘧啶(U)、鸟嘌呤(G)、腺嘌呤(A)四种碱基组合而成。N<sup>6</sup>-甲基腺嘌呤(m<sup>6</sup>A)是RNA上极其重要的修饰碱基,在生物学过程中起到多种的生物功能,如调控基因的表达等。其中,修饰的鉴定及测序方法是研究其生物学意义的前提条件。

[0003] 由于甲基修饰的腺嘌呤与普通腺嘌呤的物理化学性质接近,不能直接利用现有的一代或二代测序技术进行检测。目前,基于m<sup>6</sup>A抗体免疫沉淀测序技术(MeRIP-seq)可以使我们知道哪些转录本、基因组含有m<sup>6</sup>A修饰,但分辨率仅仅限制在100~200碱基区域范围内,不能区分哪个A被甲基化,也不能区分是单个A还是团簇的A被甲基化。为了提高分辨率,还采用了抗体/RNA光交联后免疫沉淀(CLIP)的方法,即抗体和RNA上m<sup>6</sup>A近邻的光活性尿嘧啶或硫代同源物交联,逆转录过程导致交联的尿嘧啶位点突变或在交联位置附近终止,进而通过分析突变或终止信息来间接认定尿嘧啶近邻的A为m<sup>6</sup>A位点。尽管该方法的分辨率得到了提升,但是位置鉴定是间接的,而且无法区分m<sup>6</sup>A团簇。

[0004] 根据以上分析可知,现有的RNA上m<sup>6</sup>A位点的高通量分析手段未获得重大突破的原因主要是目前的抗体免疫沉淀富集技术始终是基于抗体富集的m<sup>6</sup>A序列片段,或者抗体与m<sup>6</sup>A序列片段上光活性尿嘧啶或硫代同源物的交联作用,来间接识别m<sup>6</sup>A的位点,没有直接通过m<sup>6</sup>A位点突变的方式来识别其位点。

[0005] 我们希望利用可识别的修饰基团,通过将修饰基团接枝于氨基酸上,将带有修饰基团的氨基酸引入细胞代谢,替换m<sup>6</sup>A的甲基化修饰,然后再借助突变测序的方式,识别修饰基团所在位点,从而达到识别m<sup>6</sup>A位点的目的。但是在目前的培养条件下,带修饰基团的氨基酸与正常氨基酸在细胞代谢的竞争中处于劣势而无法引入细胞。

[0006] 因此,一种适合修饰氨基酸引入细胞的培养条件亟待开发。

### 发明内容

[0007] 针对现有技术中存在的缺点,本发明目的在于提供一种全转录组范围单碱基分辨率检测RNA N<sup>6</sup>-甲基腺嘌呤修饰的方法及试剂盒,不同于传统间接识别m<sup>6</sup>A位点的方法,通过突变测序的方式,用以单碱基分辨率下直接识别细胞全转录组RNA的m<sup>6</sup>A修饰位点。

[0008] 本发明采用以下技术方案:

[0009] 一种全转录组范围单碱基分辨率检测RNA N<sup>6</sup>-甲基腺嘌呤修饰的方法,包括以下步骤:

[0010] (1) 烯丙基-L-硒代/硫代高半胱氨酸参与细胞代谢,标记核酸腺嘌呤:用甲硫氨酸类似物烯丙基-L-硒代/硫代高半胱氨酸处理细胞,细胞通过天然代谢,在一系列酶的作用

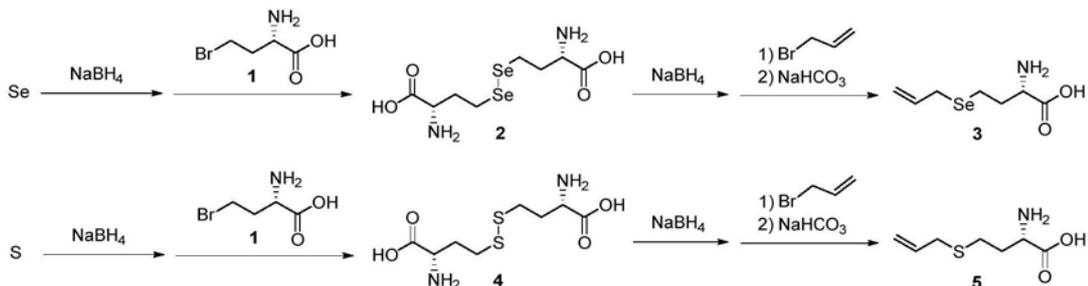
下可将烯丙基基团引入到细胞内的RNA的特定腺嘌呤 $N^6$ 位上,形成 $N^6$ -烯丙基腺嘌呤( $a^6A$ ),该位点原本应为天然甲基化修饰,即 $N^6$ -甲基腺嘌呤( $m^6A$ );

[0011] (2) 含有 $a^6A$ 修饰的RNA富集:提取细胞总RNA,再进一步提取细胞的mRNA,然后将所述细胞全转录组RNA断裂为100~300nt的片段化RNA,利用抗体结合 $N^6$ -烯丙基腺嘌呤核苷,借助免疫沉淀的方法,富集 $a^6A$ 修饰的RNA,并用洗脱剂从抗体上洗脱 $a^6A$ 修饰的RNA,并对洗脱所得的RNA进行纯化;

[0012] (3) RNA  $a^6A$ 上的 $N^6$ -烯丙基腺嘌呤的碘加成与环化处理:RNA  $a^6A$ 上的 $N^6$ -烯丙基腺嘌呤发生碘加成反应,然后在碱性条件下诱导RNA  $a^6A$ 上的 $N^1, N^6$ 位形成环化结构,屏蔽碱基互补配对;

[0013] (4) 环化处理RNA的逆转录突变与测序识别:向步骤(3)获得的环化结构中加入HIV逆转录酶,RNA上 $N^1, N^6$ 环化腺嘌呤在体外HIV逆转录酶作用下逆转录成DNA的过程中,对位互补碱基引入发生错误,通过核酸测序手段识别突变位点,进而得到 $a^6A$ 位点,该位点即为细胞RNA中原本 $m^6A$ 修饰的位点。

[0014] 上述技术方案中,进一步地,步骤(1)中,烯丙基-L-硒代/硫代高半胱氨酸的制备方法为:在氮气保护下,首先以摩尔比为1:1的硒粉Se和硼氢化钠 $NaBH_4$ 为原料,乙醇为溶剂,80℃加热回流反应6~24小时制得 $Na_2Se_2$ ,再将其与摩尔量为硒粉二分之一到三分之一的(S)-(+)-2-氨基-4-溴丁酸的氢溴酸盐(化合物1)在80℃加热回流反应6~24小时,用酸终止反应,过滤除去不溶物,并用乙醚洗去副产物,再调节pH至中性,得到硒代高胱氨酸(化合物2),之后,加入摩尔量为硒粉1~2倍的硼氢化钠还原二硒键,再在碱性条件下(摩尔量为硒粉0.5~2倍的碳酸氢钠/碳酸钠)与摩尔量为硒粉/硫粉0.5~1.5倍的烯丙基溴室温反应6~24,通过高效液相色谱(HPLC)分析提纯,可以得到烯丙基-L-硒代高半胱氨酸(化合物3);以硫S为原料,可制得硫代高胱氨酸(化合物4)以及烯丙基-L-硫代高半胱氨酸(化合物5)。



[0016] 所述的细胞可以为又不限于普通哺乳动物细胞、哺乳动物癌细胞、哺乳动物干细胞、细菌、病毒的宿主细胞以及来源于各种类型的组织与器官的细胞。

[0017] 进一步地,步骤(1)中细胞处理的具体方法为,将细胞培养体系的正常培养基更换为缺乏甲硫氨酸的培养基,再加入10%的胎牛血清(FBS),1%100x的青霉素-链霉素双抗的基础上,额外加入半胱氨酸(0.1~2mM)处理半个小时,之后再加入烯丙基-L-硒代/硫代高半胱氨酸(0.1~2mM),继续培养12-24小时后,即可将RNA上的 $N^6$ -甲基腺嘌呤修饰替换为 $N^6$ -烯丙基腺嘌呤修饰。缺乏甲硫氨酸的培养基可直接购买得到。

[0018] 进一步地,步骤(2)中,样本细胞全转录组RNA片段化处理通过 $Zn^{2+}$ 于70℃加热4-10分钟处理实现。

[0019] 进一步地,步骤(2)中,用于结合 $N^6$ -烯丙基腺嘌呤核苷的抗体为 $N^6$ -异戊烯基腺苷

的抗体,10 $\mu$ g的抗体用于富集1~20 $\mu$ g的片段化RNA,通过磁珠的ProteinA结合抗体,抗体结合上述样本细胞全转录组片段化RNA。

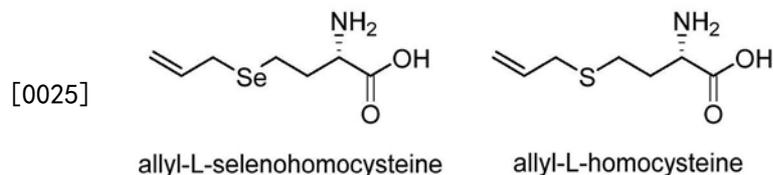
[0020] 进一步地,步骤(2)中,所述的洗脱剂为N<sup>6</sup>-烯丙基三磷酸腺苷(a<sup>6</sup>ATP),用5~10mM的N<sup>6</sup>-烯丙基三磷酸腺苷(a<sup>6</sup>ATP)从N<sup>6</sup>-异戊烯基腺苷的抗体上竞争洗脱上述细胞全转录组片段化RNA,所得RNA经由乙醇或者异丙醇沉淀纯化。

[0021] 进一步地,步骤(3)中,碘(0.1~0.5M碘单质溶于0.2~1M碘化钾)与N<sup>6</sup>-烯丙基腺嘌呤的烯丙基进行碘加成反应,除去过量碘后(0.1~0.5M硫代硫酸钠),在碱性条件下(0.1~0.5M碳酸钠,pH=9~10),其N<sup>1</sup>,N<sup>6</sup>位自发关环,从而使腺嘌呤正常的氢键配对受到屏蔽。

[0022] 进一步地,步骤(4)中,突变测序的方法包括步骤:i)利用HIV逆转录酶逆转录上述烯丙基-L-硒代/硫代高半胱氨酸细胞代谢标记后,抗体富集与碘加成环化的RNA;ii)采用RNA文库制备技术结合高通量测序手段进行全转录组突变位点的识别从而得到全转录组单碱基分辨率的m<sup>6</sup>A位点分布,或者采用PCR与TA-cloning技术进行特定转录本上突变位点的识别与验证。

[0023] 进一步地,本发明提供的一种全转录组范围单碱基分辨率检测RNA N<sup>6</sup>-甲基腺嘌呤修饰的方法,还可以具有这样的特征:所述细胞代谢与体外酶辅助的氨基酸包括但不限于烯丙基-L-硒代高半胱氨酸(allyl-L-selenohomocysteine)、烯丙基-L-硫代高半胱氨酸(allyl-L-homocysteine)及其衍生物、类似物;N<sup>6</sup>-烯丙基腺嘌呤核苷的抗体包括但不限于N<sup>6</sup>-异戊烯基腺苷(anti-cytokinin|N<sup>6</sup>-isopentenyladenosine)及其衍生物、类似物的抗体;逆转录突变的逆转录酶包括但不限于HIV逆转录酶(Recombinant HIV reverse transcriptase enzyme)。

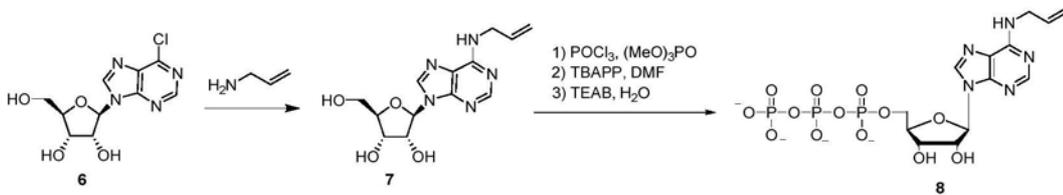
[0024] 上述步骤(1)中,培养细胞的方法为在缺乏甲硫氨酸的培养基中加入甲硫氨酸衍生物以及半胱氨酸,方法中甲硫氨酸衍生物包括但又不仅限于包括但不限于烯丙基-L-硒代高半胱氨酸(allyl-L-selenohomocysteine)、烯丙基-L-硫代高半胱氨酸(allyl-L-homocysteine)及其衍生物、类似物;方法中的半胱氨酸包括但又不仅限于甲硫氨酸在细胞代谢的下游代谢产物。烯丙基-L-硒代高半胱氨酸(allyl-L-selenohomocysteine)、烯丙基-L-硫代高半胱氨酸(allyl-L-homocysteine)化学结构式如下。



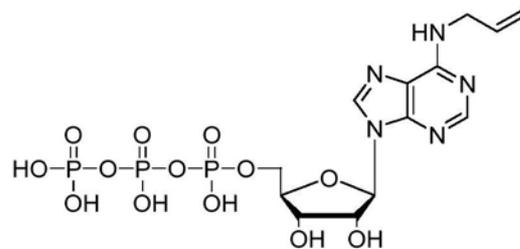
[0026] 上述步骤(1)中,提取RNA的方法包括常用的纯化方法或商业化的纯化试剂盒。方法中包括但不受限于:使用TRIzol<sup>TM</sup> Reagent,氯仿-苯酚萃取,Proteinase K消解,硅胶膜离心柱法,磁珠法,乙醇、异丙醇沉淀等技术中的一项或多项组合。纯化试剂盒包括但不受限于:GeneElute<sup>TM</sup> mRNA Miniprep Kit、RNeasy<sup>TM</sup> Mini Kit(Qiagen),RNA Clean&Concentrator (Zymo)。

[0027] 上述步骤(2)中,免疫沉淀方法中RNA的片段化包括但又不仅限于金属离子方法的RNA片段化、超声破碎的RNA片段化;免疫沉淀方法中的抗体富集包括但又不仅限于ProteinA/ProteinG beads的方法;免疫沉淀方法中的洗脱包括但又不仅限于N<sup>6</sup>-烯丙基单磷酸腺苷,N<sup>6</sup>-烯丙基三磷酸腺苷(N<sup>6</sup>-allyl adenosine-5'-triphosphate)的竞争洗脱、

TRIZol Reagent的萃取洗脱。 $N^6$ -烯丙基三磷酸腺苷( $N^6$ -allyl adenosine-5'-triphosphate)的化学结构式及其合成步骤如下:在氮气保护下,乙醇为溶剂,6-氯嘌呤核苷(化合物6)、烯丙基胺、三乙胺以摩尔量1:3:3在80°C下加热回流3~6小时,得到的产物经真空旋蒸后用乙醚沉淀,过滤除去不溶物,再经过甲醇重结晶,得到 $N^6$ -烯丙基腺苷(化合物7)。之后,氮气保护下,将 $N^6$ -烯丙基腺苷(0.2mmol)、三氯氧磷( $POCl_3$ ,0.26mmol)加入0.5mL无水磷酸三甲酯( $(MeO)_3PO$ ,0°C下反应1.5小时,再将溶于2mL无水N,N-二甲基甲酰胺(DMF)的三丁基焦磷酸铵(TBAPP,1mmol)加入上述反应体系,0°C下反应20分钟,并进一步在室温下反应5分钟,最后用2mL的三乙基碳酸氢铵(TEAB,1mol/L)终止反应,通过高效液相色谱(HPLC)分析提纯,得到 $N^6$ -烯丙基三磷酸腺苷( $a^6ATP$ ,化合物8)。所述各反应物的用量可按比例调整。

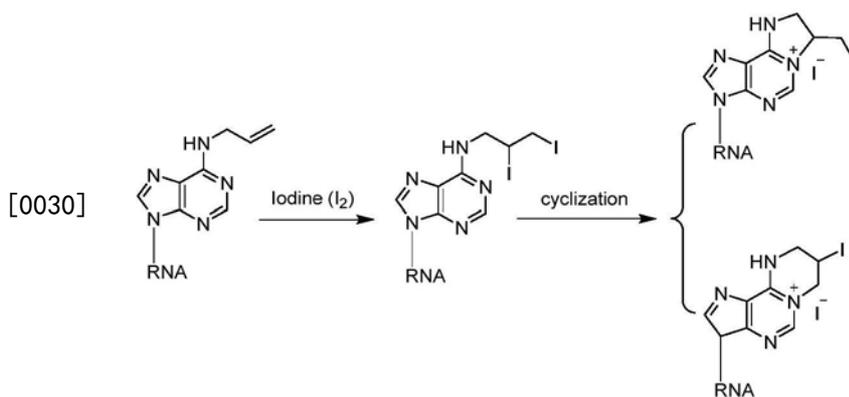


[0028]



$N^6$ -allyl adenosine-5'-triphosphate

[0029] 上述步骤(3)中,碘加成的方法包括但又不仅限于碘的碘化钾溶液(0.125M  $I_2$ , 0.25MKI),过量碘的去除方法包括但又不仅限于硫代硫酸钠处理(0.2M  $Na_2S_2O_3$ ),碱性条件下诱导环化的方法包括但又不仅限于碳酸钠、碳酸氢钠溶液(0.1M  $Na_2CO_3$ , pH=9.5)处理,反应式如下。在碱性条件下, $N^1, N^6$ 位自发关环,屏蔽碱基互补配对。



[0031] 上述步骤(4)中,逆转录的方法包括但又不仅限于HIV逆转录酶(Recombinant HIV reverse transcriptase enzyme)处理的方法。

[0032] 上述步骤(4)中,逆转录后测序的方法包括但又不仅限于构建文库的高通量测序、基于TA-cloning的低通量测序。其中,TA-cloning方法中PCR的酶包括但又不仅限于KOD-FX DNA聚合酶,TA-cloning方法中质粒载体的连接包括但又不仅限于T载体;建库方法包括但不

仅限于illumina stranded建库,NEB small RNA建库,eCLIP及改进的建库方法等。

[0033] 上述步骤(1)-(4)中,各反应后的核酸纯化步骤,可以使用常用的纯化方法或商业化的纯化试剂盒。方法中包括但不限于:硅胶膜离心柱法,磁珠法,乙醇、异丙醇沉淀等技术中的一项或多项组合。纯化试剂盒包括但不限于:AmpureXP beads, QIAquick® PCR purification Kit (Qiagen), RNA Clean&Concentrator (Zymo), DNA Clean&Concentrator (Zymo)。

[0034] 本发明还提供一种全转录组范围单碱基分辨率检测RNA N<sup>6</sup>-甲基腺嘌呤修饰的试剂盒,包括烯丙基-L-硒代/硫代高半胱氨酸,半胱氨酸,N<sup>6</sup>-烯丙基三磷酸腺苷,含二价锌离子的RNA片段化溶液,N<sup>6</sup>-异戊烯基腺苷抗体,碘的碘化钾溶液,硫代硫酸钠溶液,碳酸钠溶液,HIV逆转录酶,HIV逆转录反应液,Tris-HCl,RNase inhibitor,测序接头,测序引物。

[0035] 在本发明中:

[0036] (1) 碘诱导的双键加成在加成到双键上后,碘具有一定的离去性,其紧邻的碳原子可以亲电进攻电子云密度较高的原子,对于腺嘌呤而言,其嘌呤环上的氮原子就具有电子云密度较高的特性,特别是1号位的氮原子。因此我们设计了N<sup>6</sup>-烯丙基腺嘌呤核苷这样一个分子,发现其在碘加成与碱性条件下,N6位置的烯丙基碘可以诱导碘原子离去后碳原子亲电进攻相邻位置的N1,形成N1、N6关环反应,屏蔽原本这两个位置用于碱基互补配对的氢键,从而在逆转录的过程中引发突变,借助测序的手段,达到识别N<sup>6</sup>-烯丙基腺嘌呤位点的目的;

[0037] (2) 为了将上述突变测序的方法应用于m<sup>6</sup>A位点的识别,我们设计了细胞代谢的方法,利用细胞内RNA甲基化修饰的甲基代谢途径,将甲基替换为烯丙基,从而可以将m<sup>6</sup>A替换为N<sup>6</sup>-烯丙基腺嘌呤,通过突变测序识别N<sup>6</sup>-烯丙基腺嘌呤的位点,来达到单碱基分辨率检测m<sup>6</sup>A位点的目的。细胞内RNA甲基化修饰的代谢途径为甲硫氨酸、S-腺苷甲硫氨酸、N<sup>6</sup>-甲基腺嘌呤,我们去除了细胞内本身存在的甲硫氨酸,然后在培养条件中用烯丙基-L-硒代/硫代高半胱氨酸(硒代的氨基酸相较于硫代被证明更容易发生基团的转移)替代甲硫氨酸,成功地将烯丙基修饰到细胞全转录组的RNA上。由于通过定量质谱鉴定出N<sup>6</sup>-烯丙基腺嘌呤核苷的修饰效率较低,我们找到了能够特异性富集N<sup>6</sup>-烯丙基腺嘌呤核苷的抗体,借助抗体免疫沉淀的技术来富集N<sup>6</sup>-烯丙基腺嘌呤核苷修饰的全转录组RNA,再按照上述碘加成与环化的方法,利用突变测序,利用高通量和低通量两种途径鉴定了全转录组范围内大多数的单碱基m<sup>6</sup>A位点,极大地促进了m<sup>6</sup>A修饰的生物学功能研究。

[0038] 本发明的有益效果在于:

[0039] 本发明的一种全转录组范围单碱基分辨率检测RNA N<sup>6</sup>-甲基腺嘌呤修饰的方法及试剂盒是基于体内核酸腺嘌呤的化学标记与诱导突变,与现有应用于m<sup>6</sup>A检测的基因测序技术相比,由于突变位点可以精确到单碱基的分辨率,提升了目前普遍采用的基于m<sup>6</sup>A抗体免疫沉淀与大规模平行测序方法检测m<sup>6</sup>A位点的精度,是一个直接的高通量单碱基鉴定方法。

[0040] 本发明首次实现在细胞内核糖核酸(RNA)腺嘌呤的N<sup>6</sup>-烯丙基标记,为后续通过m<sup>6</sup>A位点突变的方式来识别其位点提供了可能性。

[0041] 由于N<sup>6</sup>-烯丙基腺嘌呤核苷的修饰效率较低,故本发明采用N<sup>6</sup>-异戊烯基腺苷的抗体来特异性富集N<sup>6</sup>-烯丙基腺嘌呤核苷的抗体。因为目前暂无N<sup>6</sup>-烯丙基腺嘌呤核苷特异性

的抗体,经过分析以及对一些商业化抗体进行筛选,我们发现, $N^6$ -异戊烯基腺苷的抗体对 $N^6$ -烯丙基腺嘌呤核苷具有一定的特异性,该抗体与 $N^6$ -烯丙基腺嘌呤核苷具有较好的结合能力,并且,商业化的抗体更加容易获得,极大地提升了本方法的实用性。

[0042] 本发明采用 $N^6$ -烯丙基三磷酸腺苷( $a^6$ ATP)作为洗脱剂,由于 $a^6$ ATP与RNA上的 $a^6$ A修饰主要结构一样,并且三磷酸增加了其水溶性,与抗体结合能力更强,使得其与 $a^6$ A修饰的RNA在结合抗体的过程中处于竞争优势,因此可以通过竞争结合抗体将 $a^6$ A修饰的RNA洗脱。因此,与常见的RNA萃取法洗脱RNA相比,该方法使 $a^6$ A修饰的RNA与抗体近乎完全分离,极大地提高了洗脱RNA的产率。

[0043] 本发明采用HIV逆转录酶对碘加成与诱导环化的RNA进行逆转录处理,因为在我们的研究中发现,HIV逆转录酶对于腺嘌呤用于碱基互补配对的氢键被屏蔽的环化结构具有更强的识别能力,我们选取了众多商业化的逆转录酶,包括HIV逆转录酶(Reverse Transcriptase Recombinant HIV,Worthington Biochemical Corporation),M-MLV逆转录酶(PROMEGA,M170A),AMV逆转录酶(PROMEGA,M510F),RevertAid逆转录酶(ThermoFisher,EP0441),SuperScript II逆转录酶(Invitrogen,100004925),SuperScript III逆转录酶(Invitrogen,55549)等,最终发现了HIV逆转录酶在 $a^6$ A碘加成环化RNA的逆转录过程中对应位点会发生突变。

[0044] 本发明在突变测序的基础上,可将其应用于多种基于基因测序的分析方法,如各种类型核酸上 $m^6$ A修饰位点的检测,以及基于 $N^6$ -烯丙基腺苷的细胞RNA动态测序等。

## 附图说明

[0045] 图1是一种全转录组范围单碱基分辨率检测RNA  $N^6$ -甲基腺嘌呤修饰的方法示意图;

[0046] 图2是烯丙基-L-硒代/硫代高半胱氨酸引入HeLa细胞代谢后得到mRNA中 $N^6$ -烯丙基腺嘌呤核苷的含量,对照为甲硫氨酸引入HeLa细胞代谢后得到mRNA中 $N^6$ -甲基腺嘌呤核苷的含量以及正常培养HeLa细胞后得到mRNA中 $N^6$ -甲基腺嘌呤核苷的含量;

[0047] 图3是样本细胞mRNA经过二价锌离子片段化处理得到的RNA条带;

[0048] 图4是 $N^6$ -异戊烯基腺苷的抗体与正常A、 $m^6$ A修饰RNA、 $a^6$ A修饰RNA的斑点杂交图,其显示对应RNA与抗体的结合能力,亚甲基蓝显示RNA上样量;

[0049] 图5是HeLa(人类癌细胞)、H2.35(小鼠普通细胞)两种细胞经过抗体免疫沉淀方法富集mRNA前后 $N^6$ -烯丙基腺嘌呤核苷的含量;

[0050] 图6是HeLa细胞中 $a^6$ A修饰的RNA,在碘加成诱导环化前后进行基因测序的结果;

[0051] 图7是HeLa细胞和H2.35细胞高通量测序得到的转录组上 $m^6$ A位点的保守序列;

[0052] 图8是HeLa细胞高通量测序得到的转录组上 $m^6$ A位点,以三种mRNA基因序列为例;

[0053] 图9是H2.35细胞高通量测序得到的转录组上 $m^6$ A位点,以四种mRNA基因序列为例;

[0054] 图10是HeLa细胞低通量测序得到的转录组上 $m^6$ A位点,以三种mRNA基因序列为例;

[0055] 图11是烯丙基-L-硒代高半胱氨酸的高分辨质谱;

[0056] 图12是烯丙基-L-硒代高半胱氨酸的 $^1H$ 核磁共振波谱;

[0057] 图13是烯丙基-L-硒代高半胱氨酸的 $^{13}C$ 核磁共振波谱;

[0058] 图14是烯丙基-L-硫代高半胱氨酸的高分辨质谱;

[0059] 图15是N<sup>6</sup>-烯丙基三磷酸腺苷的高分辨质谱。

### 具体实施方式

[0060] 下面结合附图和具体实施例对本发明进行详细的说明,但是不能把它们理解为对本发明保护范围的限定。

[0061] 如图1为本发明的一种全转录组范围单碱基分辨率检测RNA N<sup>6</sup>-甲基腺嘌呤修饰的方法示意图。该方法包括以下步骤:

[0062] (1) 烯丙基-L-硒代/硫代高半胱氨酸参与细胞代谢,标记核酸腺嘌呤:细胞会摄取甲硫氨酸类似物烯丙基-L-硒代高半胱氨酸,通过细胞天然代谢,在一系列酶的作用下可将烯丙基基团引入到细胞内的RNA的特定腺嘌呤N<sup>6</sup>位上,形成N<sup>6</sup>-烯丙基腺嘌呤(a<sup>6</sup>A),该位点原本应为天然甲基化修饰,即N<sup>6</sup>甲基腺嘌呤(m<sup>6</sup>A);

[0063] (2) 含有a<sup>6</sup>A修饰的RNA富集:提取细胞总RNA,再进一步提取细胞的mRNA,然后将所述样本细胞全转录组RNA断裂为100~300nt的片段化RNA,利用N<sup>6</sup>-烯丙基腺嘌呤核苷的抗体,借助免疫沉淀的方法,富集a<sup>6</sup>A修饰的RNA,并用N<sup>6</sup>-烯丙基三磷酸腺苷(a<sup>6</sup>ATP)从抗体上洗脱a<sup>6</sup>A修饰的RNA,并对洗脱所得的RNA进行纯化;

[0064] (3) 碘加成RNA a<sup>6</sup>A上的N<sup>6</sup>-烯丙基诱导发生N<sup>1</sup>,N<sup>6</sup>位环化:RNA a<sup>6</sup>A上的N<sup>6</sup>-烯丙基腺嘌呤发生碘加成反应,然后在碱性条件下诱导RNA a<sup>6</sup>A上的N<sup>6</sup>-烯丙基腺嘌呤的N<sup>1</sup>,N<sup>6</sup>位形成环化结构,屏蔽碱基互补配对;

[0065] (4) 环化处理RNA的逆转录突变与测序识别:RNA上N<sup>1</sup>,N<sup>6</sup>环化腺嘌呤在体外HIV逆转录酶作用下逆转录成DNA的过程中,对位互补碱基引入发生错误,可通过核酸测序手段识别突变位点,进而得到a<sup>6</sup>A位点,该位点即为细胞RNA中原本m<sup>6</sup>A修饰的位点。

[0066] 在本发明中,样本细胞在正常培养至百分之八十左右融合度后,需在无甲硫氨酸的细胞培养基中加入1mM半胱氨酸预处理30分钟,除去细胞内残留的甲硫氨酸,再在培养基中加入1mM烯丙基-L-硒代/硫代高半胱氨酸,培养12~24小时后,先提取样本细胞总RNA,再进一步提取样本细胞全转录组RNA。本发明对可应用的样本细胞种类没有特殊限定,细胞可以为又不限于普通哺乳动物细胞、哺乳动物癌细胞、哺乳动物干细胞、病毒的宿主细胞、细菌以及来源于各种类型的组织与器官的细胞。在本发明中,细胞与组织的收集、裂解、提取总RNA与全转录组RNA的方法采用本领域常规的RNA提取方法即可,无其他特殊要求,例如本发明具体实施过程中采用TRIzol Reagent提取总RNA,GenElute™ mRNA Miniprep Kit提取mRNA。

[0067] 本发明在获得上述样本细胞全转录组RNA后,将所述样本细胞全转录组RNA片段化处理为100~300nt的RNA。本发明中所述的片段化处理优选的采用二价锌离子来实现,二价锌离子可以使RNA上的磷酸二酯键断裂而不破坏相连碱基。本发明中优选的片段化缓冲液为(1μL 1M ZnCl<sub>2</sub>,1μL Tris-HCl pH=7.0,8μL RNase-free water),400~700ng/μL的上述样本细胞全转录组RNA与片段化缓冲液按照体积比9:1的比例,在70℃下加热4-10分钟。本发明在获得片段化的RNA后,优选的还包括对断裂后的RNA进行纯化的步骤,本发明中采用的纯化方法为领域内常规的RNA异丙醇沉淀法,即RNA样品、3M醋酸钠溶液、异丙醇、糖原glycogen体积比为100:10:110:1,沉淀过夜后,15000rpm转速下4℃离心45分钟,80%乙醇洗涤后,溶解得到上述样本细胞全转录组的片段化RNA溶液。

[0068] 本发明在得到上述样本细胞全转录组的片段化RNA后,用抗体免疫沉淀的方法富集RNA。本发明采用的抗体免疫沉淀方法(Immunoprecipitation, IP)为领域内常规的ProteinA磁珠法,所用的抗体优选为商业化的N<sup>6</sup>-异戊烯基腺苷的抗体。每1~20μg的上述片段化RNA,更优为3~10μg,与1~20μg的抗体,更优为5~10μg,一起孵育结合2~6小时,更优为3~4小时,温度更优为4℃。片段化RNA与抗体结合后,用ProteinA磁珠结合抗体,借助磁性分离出ProteinA磁珠、N<sup>6</sup>-异戊烯基腺苷抗体、N<sup>6</sup>-烯丙基腺嘌呤核苷修饰的RNA三者结合产物后,用N<sup>6</sup>-烯丙基三磷酸腺苷洗脱液洗脱RNA。N<sup>6</sup>-烯丙基三磷酸腺苷洗脱液浓度为5~10mM,更优为6.67mM。本发明在富集RNA后,优选的还包括对RNA进行纯化的步骤,得到的N<sup>6</sup>-烯丙基腺嘌呤核苷修饰的RNA按照上述异丙醇沉淀法进行纯化。

[0069] 如图4所示,通过体外转录的手段得到三种RNA,分别为正常的RNA(A-RNA),将A替换为m<sup>6</sup>A的RNA(m<sup>6</sup>A-RNA),以及将A替换为a<sup>6</sup>A的RNA(a<sup>6</sup>A-RNA),三种RNA与N<sup>6</sup>-异戊烯基腺苷抗体的免疫斑点杂交dot-blot图显示,只有a<sup>6</sup>A-RNA(相较于A-RNA与m<sup>6</sup>A-RNA)与抗体有相对特异性的结合能力,能够从细胞mRNA的正常A序列与m<sup>6</sup>A修饰序列中将a<sup>6</sup>A修饰的mRNA鉴别出来,从而提供富集功能,作为对照,亚甲基蓝Methylene blue显示的是对应RNA的上样量,证明相同量的RNA下a<sup>6</sup>A-RNA与抗体的特异性结合能力。

[0070] 本发明在得到上述样本细胞全转录组N<sup>6</sup>-烯丙基腺嘌呤核苷修饰的RNA后,进一步进行碘加成与碱性条件下环化处理。在本发明中,26μL的上述RNA与4μL的0.125M碘溶液(溶于0.25M碘化钾),在4~50℃下处理15~60分钟,更优为37℃下处理30分钟。之后,加入2~4μL的0.2M硫代硫酸钠至溶液无色,再加入6μL的0.1M碳酸钠(pH=9~10,更优为9.5),在4~50℃下处理15~60分钟,更优为37℃下处理30分钟。本发明在RNA碘加成与环化处理后,优选的还包括对RNA进行纯化的步骤,得到的RNA产物按照上述异丙醇沉淀法进行纯化。

[0071] 本发明在得到免疫沉淀的环化和未环化的产物后,片段化的RNA经过HIV逆转录后接上测序接头并用测序引物进行PCR扩增构建高通量测序文库。在本发明中,片段化的RNA经过HIV逆转录后接上测序接头并用测序引物进行PCR扩增构建高通量文库优选为illumina Truseq stranded mRNA LT kit,具体建库方法参照说明书进行。

[0072] 本发明在完成测序文库构建后,对所述测序文库进行测序获得测序数据。本发明中,所述测序优选为二代测序,更优选为Illumina双端测序,所述测序的读长优选为150bp。

[0073] 本发明在获得测序数据后,分析环化和未环化样品在腺苷酸位点的突变率,若环化样品突变率相对于未环化样品倍数变化大于三,且在a<sup>6</sup>A抗体富集区域则认为该位点为m<sup>6</sup>A位点。所述分析包括对所述测序数据进行质量控制、将所述数据去除接头序列、去除低质量碱基、将所述去除低质量和接头的的数据比对到基因组序列并进行富集统计、将所述去除低质量和接头的的数据比对到转录组序列并进行突变统计。在本发明的具体实施过程中,所述分析包括以下步骤:通过fastqc默认参数对所述原始测序数据进行质量控制,通过fastp软件去除接头序列和低于25个碱基的序列(fastp-f 10-F 10-x--detect\_adapter\_for\_pe-l 25-iRaw-R1.fq-I Raw-R2.fq-o Clean-R1.fq-0 Clean-R2.fq),得到的序列再次用fastqc软件默认参数进行质量控制,之后用hisat2默认参数比对到转录组序列,用samtools将比对得到的SAM文件转化为BAM文件并用samtools rmdup去除重复序列,最后用samtools mpileup统计BAM文件中的突变信息,比较环化和未环化样品在同一个位点的突变率,倍数变化大于三即认为此处为m<sup>6</sup>A位点。

[0074] 本发明在得到免疫沉淀的环化和未环化的产物后,还可用PCR与TA-cloning技术进行某段转录组的低通量测序识别突变位点。在本发明中,PCR的DNA聚合酶优选为KOD-FX DNA聚合酶,连接PCR产物的质粒载体优选为T载体。如图6所示,为某段经过 $a^6A$ 标记的RNA通过PCR与TA-cloning技术低通量测序得到的结果,其中 $X=a^6A$ 表示该位点确定有 $a^6A$ 修饰, $X=cyc-A$ 表示该 $a^6A$ 修饰位点经过碘加成与诱导环化处理,结果显示,HIV逆转录酶在 $X=cyc-A$ 位点发生了突变,而在 $X=a^6A$ 位点未发生突变,证明了碘加成与诱导环化的必要性以及HIV逆转录酶的必要性。比较环化和未环化样品在同一个位点的突变率,发现倍数变化大于三,证实采用此本发明方法可精确检测到 $m^6A$ 位点。

[0075] 本发明还提供了一种全转录组范围单碱基分辨率检测RNA  $N^6$ -甲基腺嘌呤修饰的试剂盒,包括烯丙基-L-硒代/硫代高半胱氨酸,半胱氨酸, $N^6$ -烯丙基三磷酸腺苷,含二价锌离子的RNA片段化溶液, $N^6$ -异戊烯基腺苷抗体,0.125M碘的碘化钾溶液,0.2M硫代硫酸钠溶液,0.1M碳酸钠溶液(pH=9.5),HIV逆转录酶,HIV逆转录反应液,Tris-HCl,RNase inhibitor,测序接头,测序引物。

[0076] 本发明中的烯丙基-L-硒代/硫代高半胱氨酸的合成步骤如下:在氮气保护下,首先以硒粉Se(4mmol)和硼氢化钠 $NaBH_4$ (4mmol)为原料,乙醇为溶剂,在80°C加热回流反应6~24小时制得 $Na_2Se_2$ ,再将其与(S)-(+)-2-氨基-4-溴丁酸的氢溴酸盐(2mmol)在80°C加热回流反应6~24小时,用酸终止反应,过滤除去不溶物,并用乙醚洗去副产物,再调节pH至中性,得到硒代高半胱氨酸(1mmol);加入硼氢化钠(6mmol)还原二硒键,再在碱性条件下(碳酸氢钠,3mmol)与烯丙基溴(3.8mmol)反应6~24,通过高效液相色谱分析提纯,可以得到烯丙基-L-硒代高半胱氨酸;同理,以硫S为原料,制得烯丙基-L-硫代高半胱氨酸。

[0077] 如图11为本发明制备的烯丙基-L-硒代高半胱氨酸的高分辨质谱( $m/z$ 为224.0183,  $[M+H]^+$ 理论计算为224.0184);图12为其 $^1H$ 核磁共振波谱, $^1H$  NMR(500MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  5.84(ddt,  $J=17.6, 9.9, 7.7$ Hz, 1H), 5.10-4.90(m, 2H), 3.72(dd,  $J=6.7, 5.7$ Hz, 1H), 3.29-3.06(m, 2H), 2.62-2.41(m, 2H), 2.24-1.93(m, 2H);图13为其 $^{13}C$ 核磁共振波谱, $^{13}C$  NMR(126MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  174.02(s), 134.73(s), 116.75(s), 54.78(s), 31.19(s), 25.33(s), 17.17(s);结合图11-13可知本发明成功制备了烯丙基-L-硒代高半胱氨酸。同理,结合图14( $C_7H_{13}NO_2S$ ,  $m/z$ 为176.0729,  $[M+H]^+$ 理论计算为176.0740),可知按照该方法成功制备了烯丙基-L-硫代高半胱氨酸。

[0078]  $N^6$ -烯丙基三磷酸腺苷的合成步骤如下:在氮气保护下,乙醇为溶剂,6-氯嘌呤核苷、烯丙基胺、三乙胺以摩尔量1:3:3在80°C下加热回流3~6小时,得到的产物经真空旋蒸后用乙醚沉淀,过滤除去不溶物,再经过甲醇重结晶,得到 $N^6$ -烯丙基腺苷。之后,氮气保护下,将 $N^6$ -烯丙基腺苷(0.2mmol)、三氯氧磷( $POCl_3$ , 0.26mmol)加入0.5mL无水磷酸三甲酯( $(MeO)_3PO$ , 0°C下反应1.5小时,再将溶于2mL无水N,N-二甲基甲酰胺(DMF)的三丁基焦磷酸铵(TBAPP, 1mmol)加入上述反应体系,0°C下反应20分钟,并进一步在室温下反应5分钟,最后用2mL的三乙基碳酸氢铵(TEAB, 1mol/L)终止反应,通过高效液相色谱(HPLC)分析提纯,得到 $N^6$ -烯丙基三磷酸腺苷( $a^6ATP$ )。

[0079] 如图15为本发明制备的 $N^6$ -烯丙基三磷酸腺苷( $a^6ATP$ )的相关表征数据(高分辨质谱,  $C_{13}H_{20}N_5O_{13}P_3$ ,  $m/z$ 为546.0192,  $[M-H]$ 理论计算546.0198),可知成功制备了 $a^6ATP$ 。

[0080] 实施例1 HeLa细胞中转录组mRNA上 $m^6A$ 修饰位点的检测

[0081] 1、HeLa细胞的培养、烯丙基标记与mRNA提取

[0082] (1) HeLa细胞在正常培养条件下培养至满度为百分之八十后,吸去培养基,用磷酸缓冲盐溶液(PBS)洗去残留培养基;

[0083] (2) 在不含有甲硫氨酸的培养基中加入10%的胎牛血清(FBS),1%100x的青霉素-链霉素双抗,以及1mM的半胱氨酸,将上述HeLa细胞在此培养基中培养30分钟,去除细胞内残存的甲硫氨酸;

[0084] (3) 去除甲硫氨酸后,在培养上述HeLa细胞的培养基中加入1mM烯丙基-L-硒代/硫代高半胱氨酸,继续培养16小时;

[0085] (4) 细胞培养完毕,吸去培养基,用PBS洗去残留培养基,然后在培养皿中加入TRIzol™ Reagent至覆盖培养皿底部,将贴壁的HeLa细胞全部洗脱至溶液中,转移至离心管中室温裂解5分钟;

[0086] (5) 每1mL TRIzol™ Reagent,在上述离心管中加入0.2mL的氯仿,剧烈摇晃离心管15秒,室温萃取3分钟,在4℃、RCF 12000g下离心15分钟,溶液分层,上层清液为RNA,中间白色沉淀为DNA,下层红色液体为蛋白质;

[0087] (6) 将上层水相转移至新的离心管,加入等体积的异丙醇(isopropanol),冰上孵育10分钟,4℃下RCF 15000g离心15分钟,得到total RNA白色沉淀;

[0088] (7) 移去上清液,留下total RNA白色颗粒,用1mL 75%乙醇(ethanol)/1mL TRIzol洗涤沉淀,4℃下RCF 15000g离心15分钟,再次移去上清液,风干3分钟,用250μL的RNase-free water溶解total RNA,70℃加热10分钟使total RNA充分溶解,用Bio Drop测定RNA浓度为1000ng/μL;

[0089] (8) 用GenElute mRNA MiniprepKit进一步提取mRNA。取250μL的total RNA(1000ng/μL)于1.5mL离心管,加入250μL的2x Binding Solution,轻轻晃动离心管使溶液混合;

[0090] (9) 加入分散均匀的20μL oligo(dT) beads震荡使体系充分混匀,70℃下加热3分钟使RNA变性,再在室温下孵育10分钟使oligo(dT)与RNA充分结合,混合体系在RCF 15000g下离心2分钟,得到结合有mRNA的oligo(dT) beads,小心移去上清液,留下50μL左右溶液防止beads损失;

[0091] (10) 在离心管中加入500μL的Wash Solution吹打使oligo(dT)充分悬浮,转移至GenElute离心过滤柱/收集管,RCF 15000g离心2分钟,弃去收集管中的液体;

[0092] (11) 再次在过滤柱中加入500μL的Wash Solution,RCF 15000g离心2分钟,弃去收集管中的液体;

[0093] (12) 最后,将过滤柱转移至新的收集管,吸取50μL于70℃预热的Elution Solution加入到离心过滤柱滤膜的正中心,与柱孔中的mRNA复合物充分接触,70℃下孵育5分钟,RCF 15000g离心1分钟,收集管中得到mRNA溶液,用Bio Drop测定mRNA浓度为200ng/μL。此外,还可以再吸取50μL 70℃的Elution Solution重复上述洗脱过程,使得过滤柱柱孔中的mRNA充分溶解,将得到的mRNA置于-80℃保存。

[0094] 2、含有腺嘌呤N<sup>6</sup>位烯丙基修饰的RNA富集

[0095] (1) 将200μL上述RNA样品(200ng/μL)、20μL 3M醋酸钠溶液、220μL异丙醇、2μL糖原glycogen混合后吹打混匀,沉淀过夜后,15000rpm转速下4℃离心45分钟,用440μL的80%乙

醇洗涤沉淀,15000rpm转速下4℃离心15分钟,再次移去上清液,风干3分钟,用70μL的RNase-free water溶解RNA至浓度为550ng/μL;

[0096] (2) 将45μL上述RNA样品(550ng/μL)与5μL的Zn<sup>2+</sup>片段化缓冲液(10x Fragment buffer)混合后吹打混匀,70℃加热7分钟,之后加入10μL 0.5M EDTA溶液终止片段化,Zn<sup>2+</sup>片段化缓冲液(10x Fragment buffer)成分见表1;

[0097] 表1 Zn<sup>2+</sup>片段化缓冲液(10x Fragment buffer)

[0098]	1M ZnCl <sub>2</sub>	1 μL
	1M Tris-HCl pH=7.0	1 μL
	RNase-free water	8 μL
	Total volume	10 μL

[0099] (3) 将上述60μL溶液与6μL 3M醋酸钠溶液、66μL异丙醇、1μL糖原glycogen混合后吹打混匀,沉淀过夜后,15000rpm转速下4℃离心45分钟,用132μL的80%乙醇洗涤沉淀,15000rpm转速下4℃离心15分钟,再次移去上清液,风干3分钟,用200μL的RNase-free water溶解RNA至浓度为100ng/μL,得到的RNA片段(fragments)如图3所示,片段长度为100~300nt;

[0100] (4) 将50μL上述片段化RNA(100ng/μL)与80μL 5x IP缓冲液(5x IP buffer)、2μL RNA酶抑制剂(RNase inhibitor)、1μL N<sup>6</sup>-异戊烯基腺苷的抗体、267μL RNase-free water混合后吹打混匀,4℃下旋转震荡4小时,使N<sup>6</sup>-烯丙基腺嘌呤核苷修饰的RNA与N<sup>6</sup>-异戊烯基腺苷的抗体充分结合,5x IP缓冲液成分见表2;

[0101] 表2 5x IP缓冲液(5x IP buffer)

[0102]	1M Tris-HCl pH = 7.4	0.5 mL
	1.5 mL 5 M NaCl	1.5 mL
	0.5 mL 10% vol/vol Igepal CA-630	0.5 mL
	RNase-free water	7.5 mL
	Total volume	10 mL

[0103] (5) 与此同时,将40μL ProteinA磁珠(ProteinAbeads)在磁力架上分离磁珠,用200μL 1x IP缓冲液(1x IP buffer)清洗三次,吸去剩余清液,再与80μL 5x IP缓冲液(5x IP buffer)、10μL 20mg/μL牛血清白蛋白(BSA)、310μL RNase-free water混合后吹打混匀,4℃下旋转震荡2小时,防止之后磁珠在与抗体结合时的非特异性吸附,1x IP缓冲液(1x IP buffer)成分见表3;

[0104] 表3 1x IP缓冲液(1x IP buffer)

	5x IP buffer	2 mL
[0105]	RNase-free water	8 mL
	Total volume	10 mL

[0106] (6) RNA与抗体结合充分后,将上述ProteinA磁珠与BSA的混合液在磁力架上分离磁珠,用200 $\mu$ L 1x IP缓冲液(1x IP buffer)清洗三次,吸去剩余清液,再将ProteinA磁珠与RNA-抗体的混合液混合后吹打混匀,4 $^{\circ}$ C下旋转混匀孵育2小时,使结合RNA的抗体与磁珠上的ProteinA结合;

[0107] (7) 将上述混合液放在磁力架上分离磁珠,用200 $\mu$ L 1x IP缓冲液(1x IP buffer)清洗三次,吸去剩余清液,用100 $\mu$ L N<sup>6</sup>-烯丙基三磷酸腺苷洗脱液(Elution buffer)与ProteinA磁珠混合后吹打混匀,4 $^{\circ}$ C下旋转震荡3小时,将N<sup>6</sup>-烯丙基腺嘌呤核苷修饰的RNA从结合ProteinA磁珠的抗体上洗脱至溶液中,N<sup>6</sup>-烯丙基三磷酸腺苷洗脱液成分见表4;

[0108] 表4 N<sup>6</sup>-烯丙基三磷酸腺苷洗脱液(Elution buffer)

	5x IP buffer	90 $\mu$ L
	75 mM N <sup>6</sup> -allyl adenosine-5' -triphosphate	40 $\mu$ L
[0109]	RNase inhibitor	3 $\mu$ L
	RNase-free water	317 $\mu$ L
	Total volume	450 $\mu$ L

[0110] (8) 将4个50 $\mu$ L片段化RNA(100ng/ $\mu$ L)抗体免疫沉淀后的洗脱产物混合,得到400 $\mu$ L溶液,与40 $\mu$ L 3M醋酸钠溶液、440 $\mu$ L异丙醇、2 $\mu$ L糖原glycogen混合后吹打混匀,沉淀过夜后,15000rpm转速下4 $^{\circ}$ C离心45分钟,用880 $\mu$ L的80%乙醇洗涤沉淀,15000rpm转速下4 $^{\circ}$ C离心15分钟,再次移去上清液,风干3分钟,用20 $\mu$ L的RNase-free water溶解RNA得到浓度为15ng/ $\mu$ L。将得到的RNA酶解为单个核苷之后,经过液相质谱定量,得到IP前后a<sup>6</sup>A在RNA中的含量如图5所示,HeLa Input为IP前HeLa细胞mRNA中a<sup>6</sup>A含量,HeLa IP为IP后a<sup>6</sup>A含量,H2.35 Input为IP前小鼠H2.35细胞mRNA中a<sup>6</sup>A含量,H2.35 IP为IP后a<sup>6</sup>A含量,结果显示,IP的确对a<sup>6</sup>A修饰的mRNA进行了富集。

[0111] 3、RNA的N<sup>6</sup>-烯丙基腺嘌呤的碘加成反应与环化处理

[0112] (1) 将20 $\mu$ L上述抗体富集处理的RNA(15ng/ $\mu$ L)转移至PCR管中,用RNase-free water稀释至26 $\mu$ L,加入4 $\mu$ L的0.125M碘溶液(溶于0.25M碘化钾),溶液变为棕色,在37 $^{\circ}$ C下处理30分钟;

[0113] (2) 将上述棕色溶液转移至新的PCR管,加入4 $\mu$ L的0.2M硫代硫酸钠至溶液无色,再加入6 $\mu$ L的0.1M碳酸钠(pH=9.5),在37 $^{\circ}$ C下处理30分钟;

[0114] (3) 将上述40 $\mu$ L溶液,与40 $\mu$ L异丙醇、1 $\mu$ L糖原glycogen混合后吹打混匀,沉淀过夜后,15000rpm转速下4 $^{\circ}$ C离心45分钟,用880 $\mu$ L的80%乙醇洗涤沉淀,15000rpm转速下4 $^{\circ}$ C离心15分钟,再次移去上清液,风干3分钟,用15 $\mu$ L的RNase-free water溶解RNA得到浓度为10ng/ $\mu$ L。

[0115] 4、将未经免疫沉淀及免疫沉淀(包括环化处理与未环化处理)所得RNA片段利用 illumina mRNA建库试剂盒构建文库;

[0116] (1) 按表5反应体系配置逆转录体系;

[0117] 表5 mRNA建库逆转录反应体系

	Fragmented RNA	3 $\mu$ L
	5x RT buffer (Thermofisher)	5 $\mu$ L
[0118]	Fragment, Prime, Finish Mix	9 $\mu$ L
	HIV + Act D mix (1: 9)	8 $\mu$ L
	Total volume	25 $\mu$ L

[0119] (2) 混匀后在PCR仪中运行程序见表6;

[0120] 表6 mRNA建库逆转录反应PCR运行程序

	25 $^{\circ}$ C	10 分钟
	37 $^{\circ}$ C	1 小时
[0121]	75 $^{\circ}$ C	15 分钟
	4 $^{\circ}$ C	保温

[0122] (3) 向上述体系中加入5 $\mu$ L resuspension buffer, 20 $\mu$ L Second Strand Marking Master Mix, 混匀后在16 $^{\circ}$ C孵育1h;

[0123] (4) 纯化上述所得双链DNA片段: 向反应体系中加入100 $\mu$ L提前恢复至室温的 AMPure XP beads, 吹打混匀6-10次后室温孵育15分钟, 用磁力架分离并丢弃上清, 用80%乙醇洗beads两次, 每次30秒, 静置5-10分钟挥发乙醇, 用17.5 $\mu$ L resuspension buffer洗脱双链DNA片段, 室温孵育2分钟后经磁力架分离, 取15 $\mu$ L上清用于下步反应;

[0124] (5) 上述所得双链DNA按下表7反应体系配置添加腺苷酸尾巴;

[0125] 表7 mRNA建库添加腺苷酸尾巴反应体系

	双链 DNA 片段	15 $\mu$ L
	Resuspension buffer	2.5 $\mu$ L
[0126]	A-Tailing Mix	12.5 $\mu$ L
	Total volume	30 $\mu$ L

[0127] (6) 上述体系吹打混匀后在PCR仪中运行程序见表8;

[0128] 表8 mRNA建库添加腺苷酸尾巴PCR运行程序

	37℃	30 分钟
[0129]	70℃	5 分钟
	4℃	保温
[0130]	(7) 按下列表9反应体系配置添加接头；	
[0131]	表9 mRNA建库配置添加接头反应体系	
	上述 6) 所得反应物	30 $\mu$ L
	Resuspension buffer	2.5 $\mu$ L
[0132]	RNA Adapter	2.5 $\mu$ L
	Ligation Mix	2.5 $\mu$ L
	Total volume	37.5 $\mu$ L
[0133]	(8) 上述反应体系在30℃孵育10分钟；	
[0134]	(9) 向上述反应中加入5 $\mu$ L连接终止混合物,吹打混匀；	
[0135]	(10) 纯化连上接头序列的DNA片段:向反应体系中加入42.5 $\mu$ L提前恢复至室温的AMPure XP beads,吹打混匀6-10次后室温孵育15分钟,用磁力架分离并丢弃上清,用80%乙醇洗beads两次,每次30秒,静置5-10分钟挥发乙醇,用52.5 $\mu$ L resuspension buffer洗脱双链DNA片段,室温孵育2分钟后经磁力架分离,取50 $\mu$ L上清,加入50 $\mu$ L AMPure XP beads,重复纯化步骤,用22.5 $\mu$ L resuspension buffer洗脱,取20 $\mu$ L上清用于下步PCR文库扩增；	
[0136]	(11) 按下表10反应体系配置文库扩增体系；	
[0137]	表10 mRNA建库文库扩增反应体系	
	DNA 片段	20 $\mu$ L
	PCR Primer Cocktail	5 $\mu$ L
[0138]	PCR Master Mix	25 $\mu$ L
	Total volume	50 $\mu$ L
[0139]	(12) 上述体系吹打混匀后在PCR仪中运行程序见表11；	
[0140]	(13) 纯化上述经扩增的文库:向反应体系中加入55 $\mu$ L提前恢复至室温的AMPure XP beads,吹打混匀6-10次后室温孵育15分钟,用磁力架分离并丢弃上清,用80%乙醇洗beads两次,每次30秒,静置5-10分钟挥发乙醇,用22.5 $\mu$ L resuspension buffer洗脱双链DNA片段,室温孵育2分钟后经磁力架分离,取20 $\mu$ L上清,其中1 $\mu$ L用于Qubit测定浓度；	
[0141]	表11 mRNA建库文库扩增PCR运行程序	
[0142]	98℃	30 秒

[0143]	98℃	10 秒	} 15 个循环
	60℃	30 秒	
	72℃	30 秒	
	72℃	5 分钟	
	4℃	保温	

[0144] (14) 将得到的mRNA建库,利用illumina X-10平台进行双端150测序,得到的数据经低质量过滤、接头过滤后与所测细胞来源物种的转录组进行比对,通过分析突变位点前后所在的序列特征,得到HeLa细胞和小鼠H2.35细胞转录组上m<sup>6</sup>A位点的保守序列,其与常见的m<sup>6</sup>A抗体免疫沉淀与测序技术得到的保守序列大致相同,说明本方法所识别的位点为m<sup>6</sup>A位点(如图7)。

[0145] (15) 高通量测序结果如图8所示,根据突变测序结果显示,LATS1 (NM\_001350339) 在2970、2991两个位点有m<sup>6</sup>A修饰,ZNF445 (NM\_181489) 在3451、3462两个位点有m<sup>6</sup>A修饰,OTUD1 (NM\_001145373) 在1479位点有m<sup>6</sup>A修饰。

[0146] 5、将碘加成与环化处理的RNA片段用TA克隆技术进行低通量测序,验证HeLa细胞mRNA上具体位点的突变,进一步鉴定m<sup>6</sup>A位点

[0147] (1) 取1μL上述碘加成与环化处理的RNA (10ng/μL) 至PCR管,与1μL 10μM反向引物(R-primer)、12μL RNase-free water混合后吹打混匀,65℃下加热变性5分钟,反向引物(R-primer)序列见表12;

[0148] 表12正向引物(F-primer)与反向引物(R-primer)序列

LATS1	F-primer	TGAATGGGTAGTTCGTCTATATTATTCATTCCAAG
	R-primer	GGCTCATCATATCACCCCCAGGAA
[0149] ZNF445	F-primer	CCTGGCTCGGCATATGAAAAACCA
	R-primer	TCTCTAGCAGGGGACTGAGAACCC
OTUD1	F-primer	CTGAGGCCTAGTATTTGGCTCAGTTG
	R-primer	CGTACTCTGGGTTAGGATAGGAGTGAT

[0150] (2) 在冰上冷却后,加入4μL 5x逆转录反应缓冲液(5x RT Reaction Buffer, Thermofisher, EP0441)、1μL 10mM dNTP、1μL 10U/μL HIV逆转录酶(Reverse Transcriptase Recombinant HIV, Worthington Biochemical Corporation),37℃反应1小时,之后70℃加热10分钟使逆转录酶失活;

[0151] (3) 取11μL上述逆转录反应液至新的PCR管,用KOD-FX (TOYOBO, KFX-101) 酶进行PCR扩增,加入10μL 2mM dNTP,1.5μL 10μM正向引物(F-primer)与反向引物(R-primer),25μL 2x KOD-FX反应缓冲液,以及1μL KOD-FX酶,混合后吹打混匀,正向引物(F-primer)与反向引物(R-primer)序列见表5,PCR反应程序如表13所示;

[0152] 表13逆转录后PCR扩增反应程序

	94℃	2 分钟	
[0153]	98℃	10 秒	} 35 个循环
	55℃	30 秒	
	68℃	15 秒	
	4℃	保温	

[0154] (4) PCR反应完毕后,产物DNA用1.8倍体积的AMPure XP beads (BECKMAN COULTER, A63881) 纯化,用15 $\mu$ L RNase-free water溶解DNA得到浓度为50ng/ $\mu$ L;

[0155] (5) 使用pUCm-T Vector (Sangon Biotech, B522213) 对1 $\mu$ L上述DNA (50ng/ $\mu$ L) 产物进行T载体连接,16℃下反应6小时,pUCm-T Vector载体连接体系见表14;

[0156] 表14 pUCm-T Vector载体连接体系

	插入的目的片段	1 $\mu$ L
	pUCm-T Vector	1 $\mu$ L
[0157]	10x Ligation Buffer	1 $\mu$ L
	50% PEG 4000	1 $\mu$ L
	T4 DNA Ligase	1 $\mu$ L
	Sterilized ddH <sub>2</sub> O	5 $\mu$ L

[0158] (6) 将100 $\mu$ L DH5 $\alpha$ 感受态细胞置于冰上解冻5分钟,至细胞均匀悬浮,加入5 $\mu$ L上述连接液,轻轻敲打混匀,冰上放置25分钟;

[0159] (7) 42℃水浴热激45秒,再在冰上放置2分钟,加入700 $\mu$ L SOC培养基,37℃220rpm震荡培养1小时;

[0160] (8) 5000rpm离心1分钟,用枪头吸掉600 $\mu$ L上清液,用剩余的培养基将细胞悬浮;

[0161] (9) 配置50mL含有50 $\mu$ L IPTG (100mM)、100 $\mu$ L X-gal (20mg/mL)、50 $\mu$ L 1000x氨苄青霉素的LB平板,每块平板15mL,将上述细菌悬液均匀涂布到LB平板上;

[0162] (10) 先将平板于37℃培养1小时,然后倒置培养16小时,筛选蓝白斑中的白色单菌落提取质粒进行Sanger测序,得到低通量测序结果;

[0163] (11) 低通量测序结果与高通量测序结果相同。如图10所示,根据突变结果显示,LATS1 (NM\_001350339) 在2970、2991两个位点有m<sup>6</sup>A修饰,ZNF445 (NM\_181489) 在3451、3462两个位点有m<sup>6</sup>A修饰,OTUD1 (NM\_001145373) 在1479位点有m<sup>6</sup>A修饰。

[0164] 实施例2小鼠H2.35细胞中转录组mRNA上m<sup>6</sup>A修饰位点的检测

[0165] 1、小鼠H2.35细胞的培养、烯丙基标记与mRNA提取

[0166] (1) 小鼠H2.35细胞在正常培养条件下(需额外加入200nM DEX,dexamethasone),培养至满度为百分之六十后,吸去培养基,用磷酸缓冲盐溶液(PBS)洗去残留培养基;

[0167] (2) 在不含有甲硫氨酸的培养基中加入10%的胎牛血清(FBS),1%100x的青霉素-链霉素双抗,200nM DEX(dexamethasone),以及1mM的半胱氨酸,将上述小鼠H2.35细胞在此

培养基中培养30分钟,去除细胞内残存的甲硫氨酸;

[0168] (3) 去除甲硫氨酸后,在培养上述小鼠H2.35细胞的培养基中加入1mM烯丙基-L-硒代/硫代高半胱氨酸,继续培养16小时;

[0169] (4) - (12) 同实施例1中HeLa细胞的培养、烯丙基标记与mRNA提取。

[0170] 2、同实施例1中含有腺嘌呤N<sup>6</sup>位烯丙基修饰的RNA富集。

[0171] 3、同实施例1中RNA的N<sup>6</sup>-烯丙基腺嘌呤的碘加成反应与环化处理。

[0172] 4、同实施例1中将未经免疫沉淀及免疫沉淀(包括环化处理与未环化处理)所得RNA片段利用illumina mRNA建库试剂盒构建文库。

[0173] 5、高通量测序结果如图9所示,根据突变测序结果显示,Xist (NR\_001463) 在11956、11964两个位点有m<sup>6</sup>A修饰,Usp42 (NM\_029749) 在2973位点有m<sup>6</sup>A修饰,Ice1 (NM\_144837) 在3777位点有m<sup>6</sup>A修饰,Eppk1 (NM\_144848) 在2899、2924两个位点有m<sup>6</sup>A修饰。

[0174] 6、也可同实施例1中将碘加成与环化处理的RNA片段用TA克隆技术进行低通量测序,验证HeLa细胞mRNA上具体位点的突变,进一步鉴定m<sup>6</sup>A位点。

[0175] 实施例3正常细胞培养条件下培养HeLa细胞与小鼠H2.35细胞

[0176] 1. HeLa细胞的培养

[0177] 在正常的细胞培养基中加入10%的胎牛血清(FBS),1%100x的青霉素-链霉素双抗,将HeLa细胞在此培养基中培养16-24小时后,即可提取HeLa细胞的mRNA,其m<sup>6</sup>A含量如图2中Ctrl所示。

[0178] 与此同时,按照上述烯丙基标记方法的处理条件培养HeLa细胞,加入1mM烯丙基-L-硒代、烯丙基-L-硫代高半胱氨酸、或甲硫氨酸(甲基-L-硫代高半胱氨酸),培养16小时,得到mRNA的m<sup>6</sup>A含量如图2中Se-allyl-L-selenohomocysteine、S-allyl-L-homocysteine、L-Methionine所示。图2中Se-allyl-L-selenohomocysteine/S-allyl-L-homocysteine为烯丙基-L-硒代/硫代高半胱氨酸引入HeLa细胞代谢后得到mRNA中N<sup>6</sup>-烯丙基腺嘌呤核苷的含量,L-Methionine为甲硫氨酸引入HeLa细胞代谢后得到mRNA中N<sup>6</sup>-甲基腺嘌呤核苷的含量,Ctrl为正常培养HeLa细胞后得到mRNA中N<sup>6</sup>-甲基腺嘌呤核苷的含量,可知烯丙基-L-硒代高半胱氨酸的标记效率比硫代更高,其标记水平远低于正常培养细胞中的m<sup>6</sup>A水平,而在经过半小时的去除细胞内甲硫氨酸处理后,再次加入甲硫氨酸,细胞的m<sup>6</sup>A水平近乎正常,说明短时间内去除甲硫氨酸的处理对细胞状态无过大影响。

[0179] 2. 小鼠H2.35细胞的培养

[0180] 在正常的细胞培养基中加入10%的胎牛血清(FBS),1%100x的青霉素-链霉素双抗,200nM DEX(dexamethasone),将小鼠H2.35细胞在此培养基中培养16-24小时后,即可提取小鼠H2.35细胞的mRNA。

[0181] 同样按照上述烯丙基标记方法的处理条件培养HeLa细胞,加入1mM烯丙基-L-硒代、烯丙基-L-硫代高半胱氨酸、或甲硫氨酸(甲基-L-硫代高半胱氨酸),培养16小时,得到各组mRNA的m<sup>6</sup>A。其结果与上述HeLa细胞相似,烯丙基-L-硒代高半胱氨酸的标记效率比硫代更高,其标记水平远低于正常培养细胞中的m<sup>6</sup>A水平,而在经过半小时的去除细胞内甲硫氨酸处理后,再次加入甲硫氨酸,细胞的m<sup>6</sup>A水平近乎正常,说明短时间内去除甲硫氨酸的处理对细胞状态无过大影响。

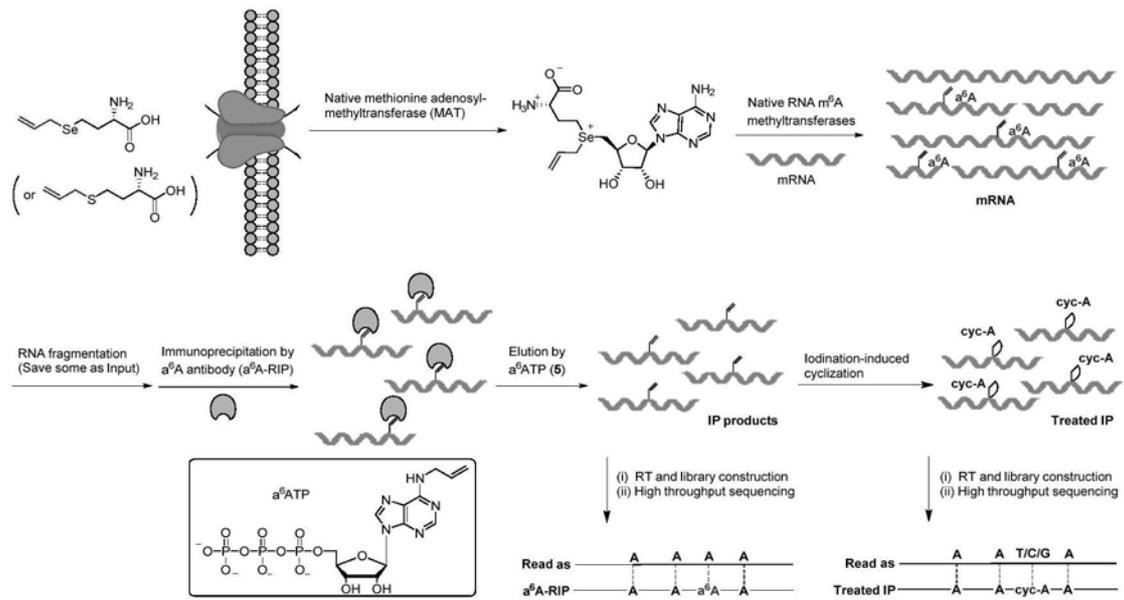


图1

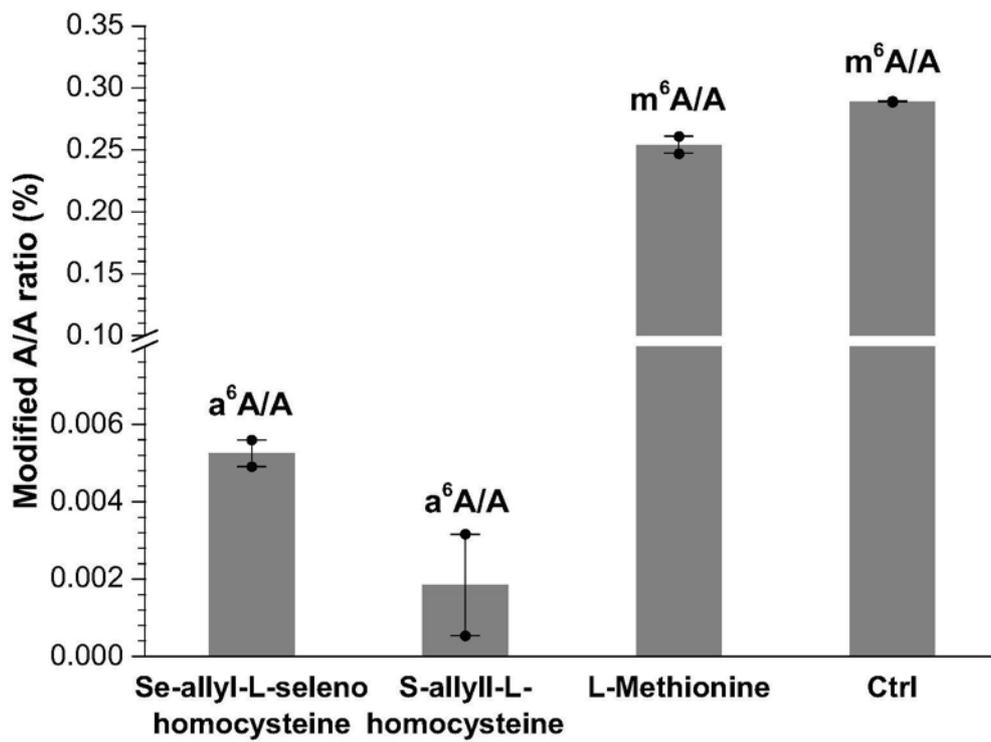


图2

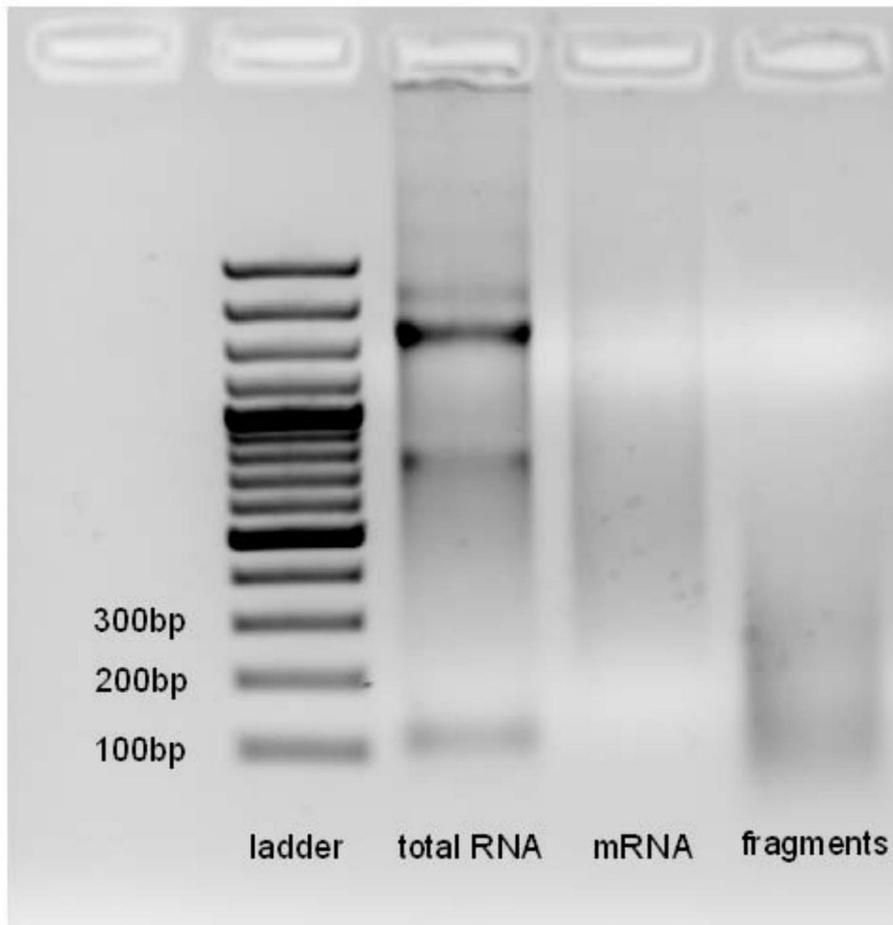


图3

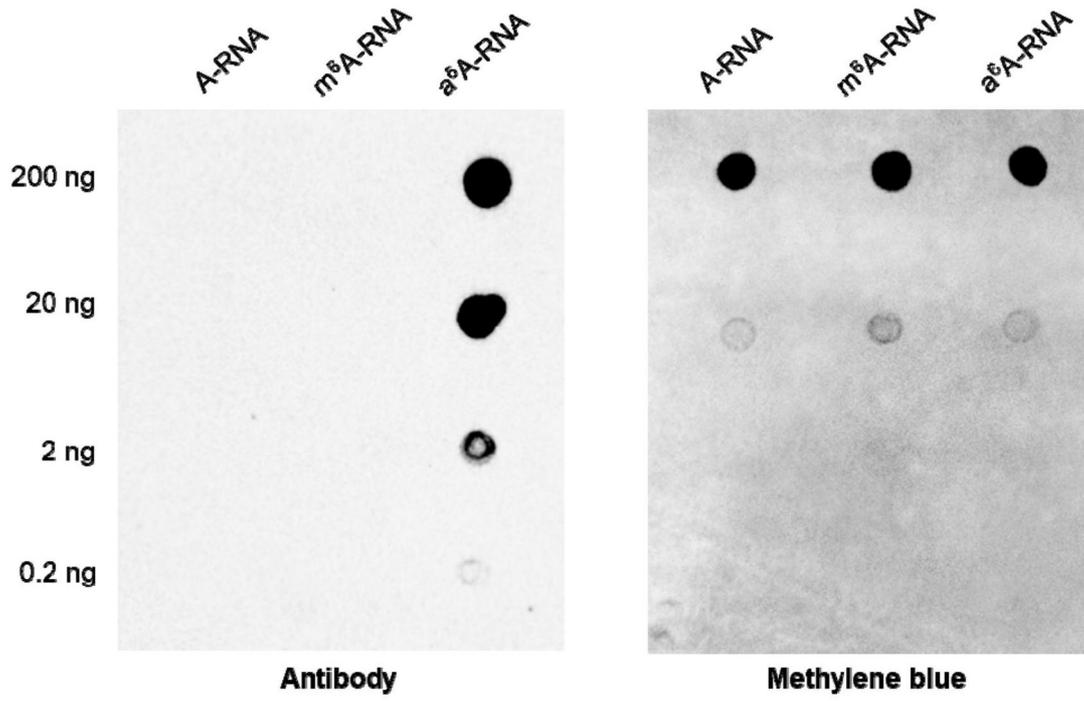


图4

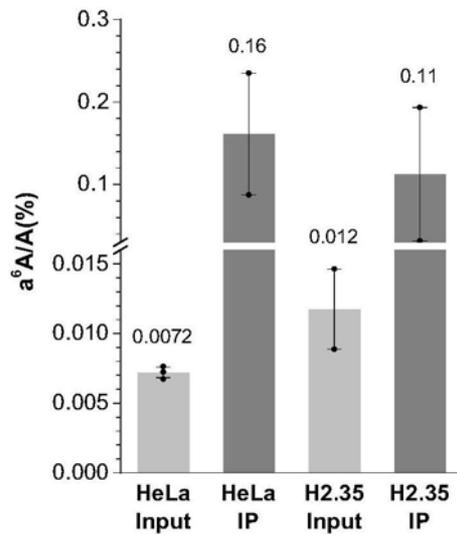


图5

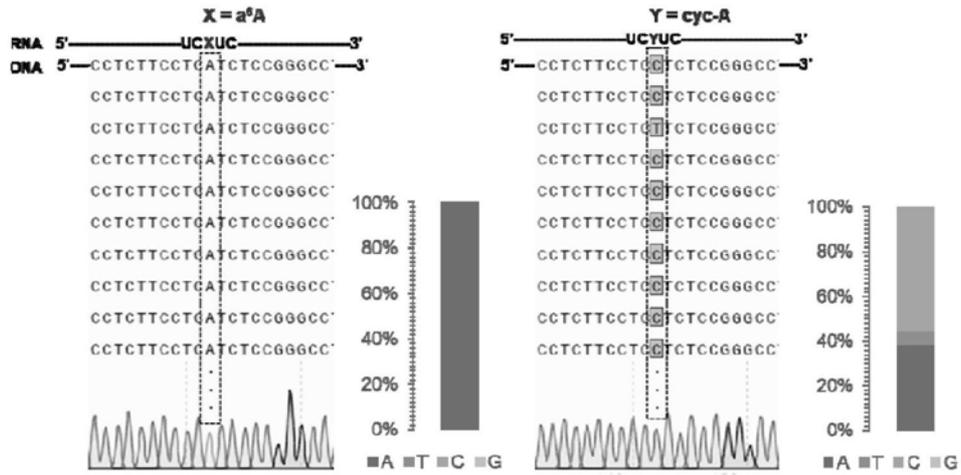


图6

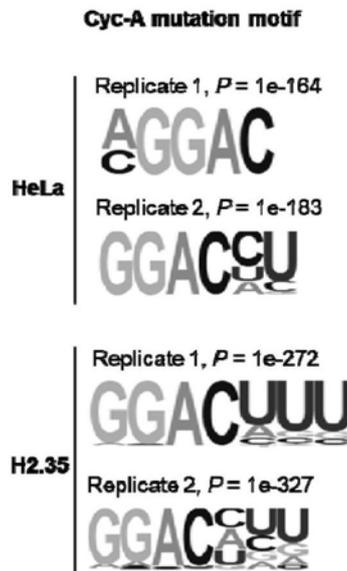


图7

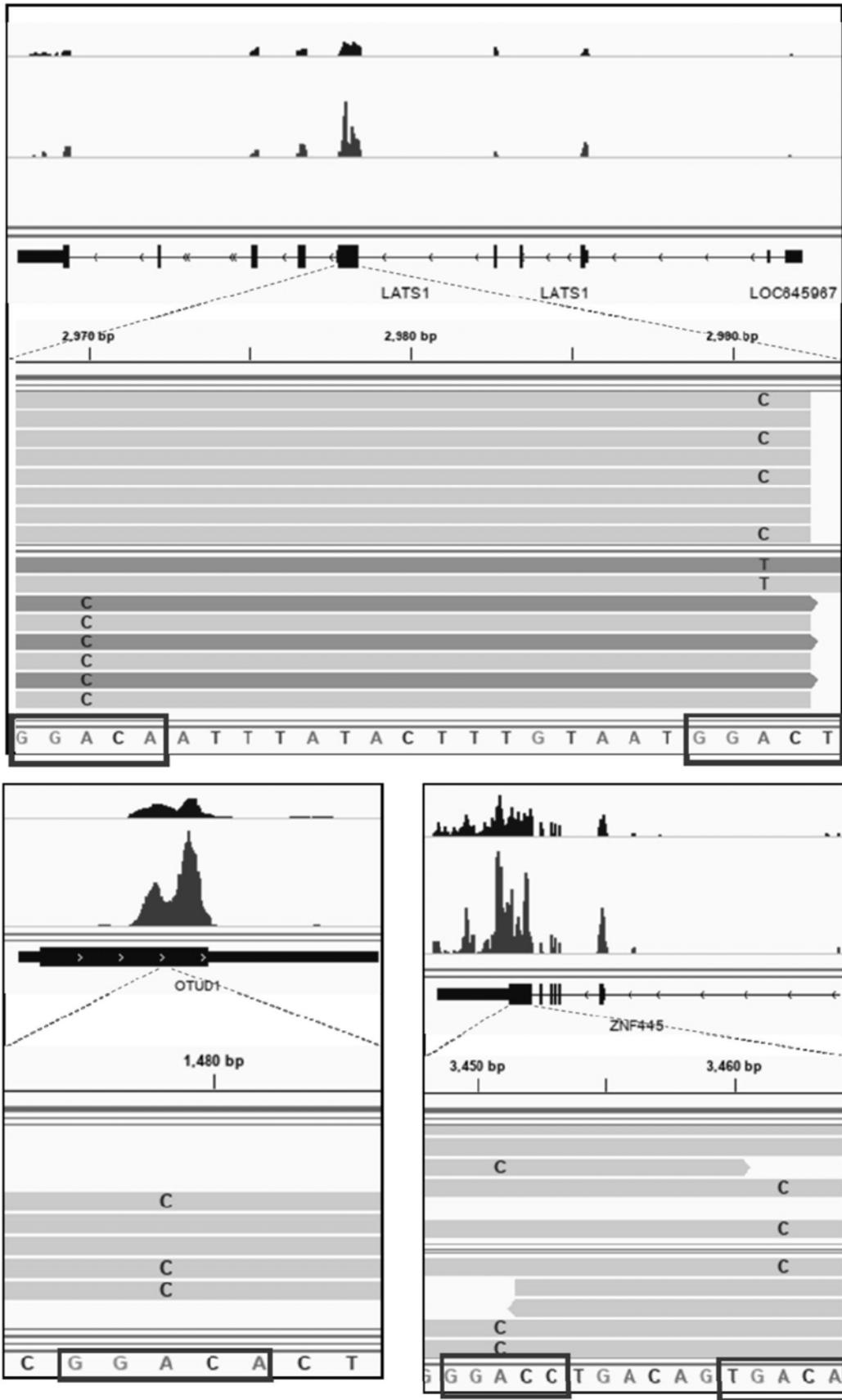


图8

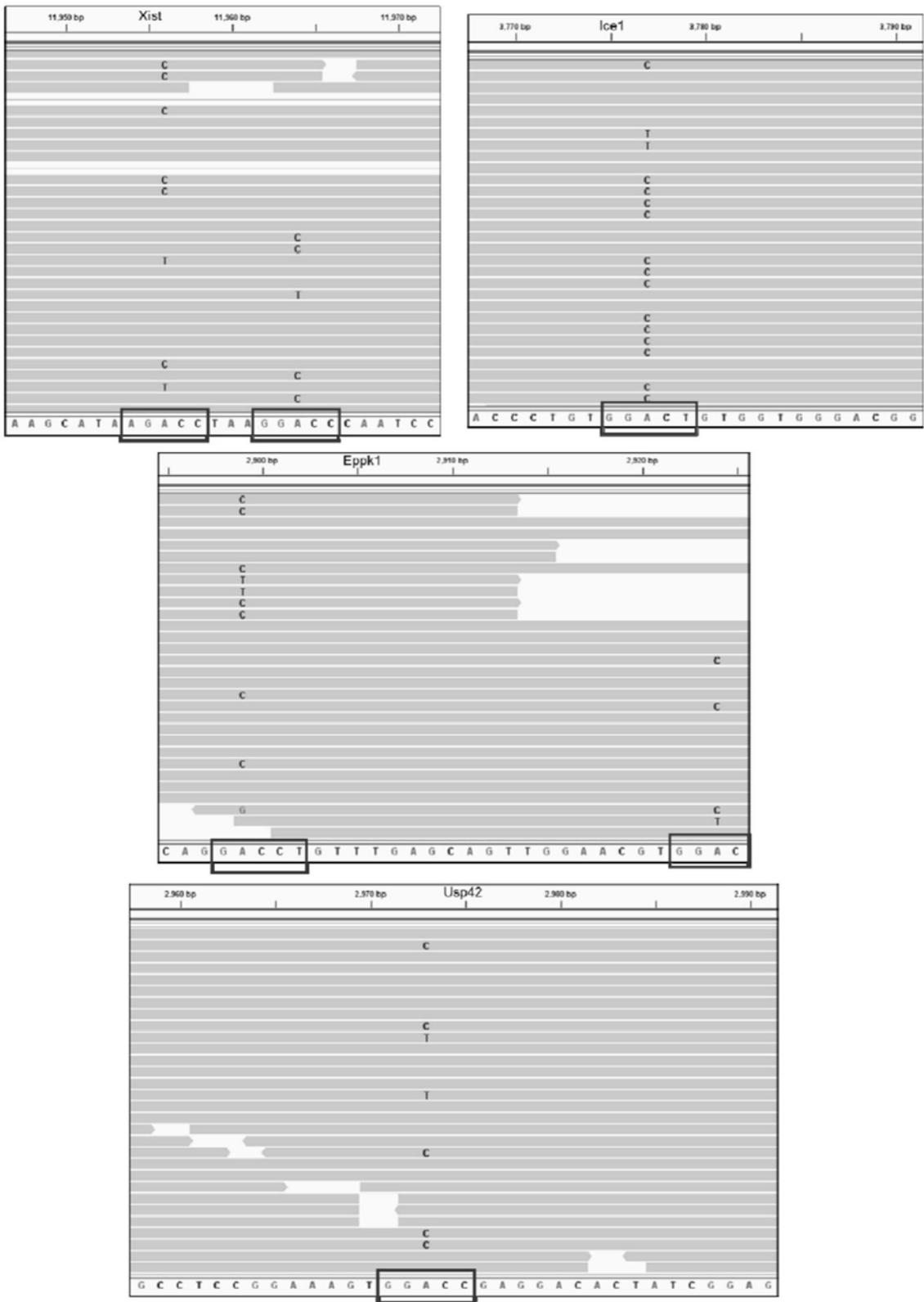


图9



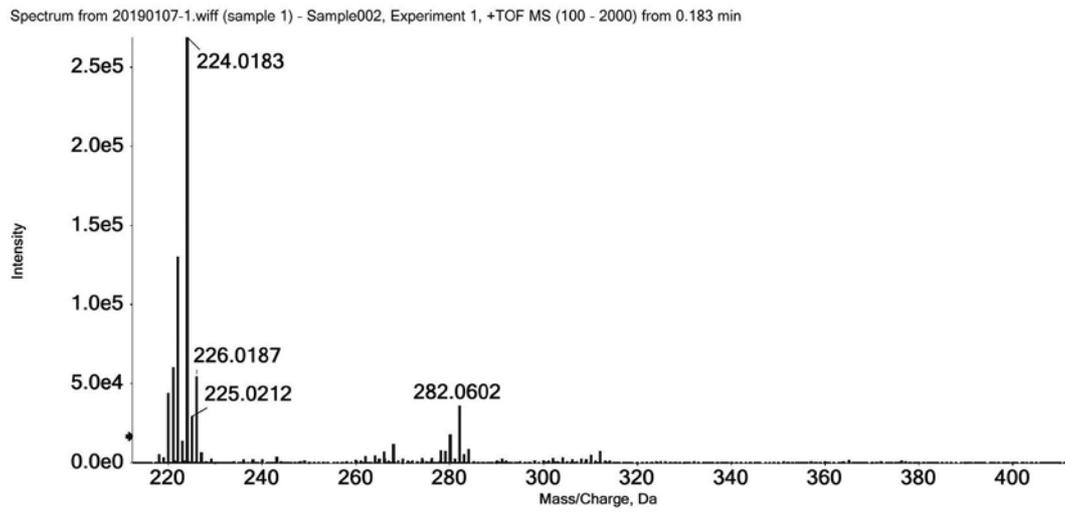


图11

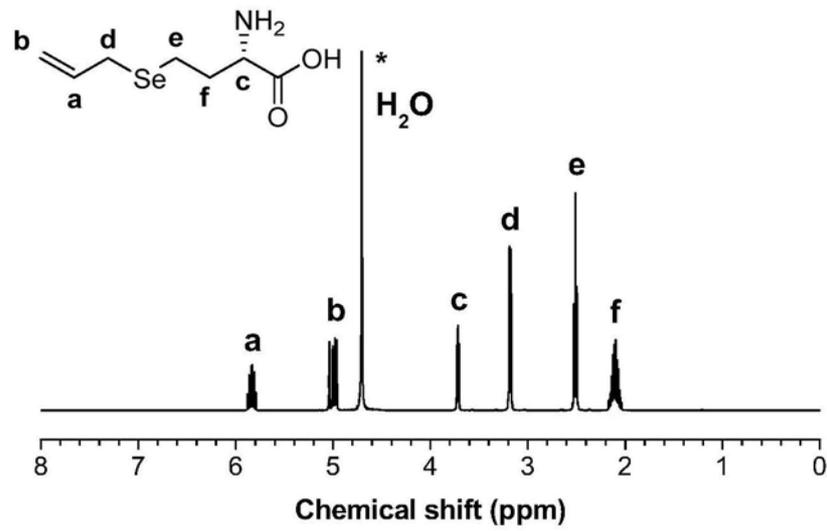


图12

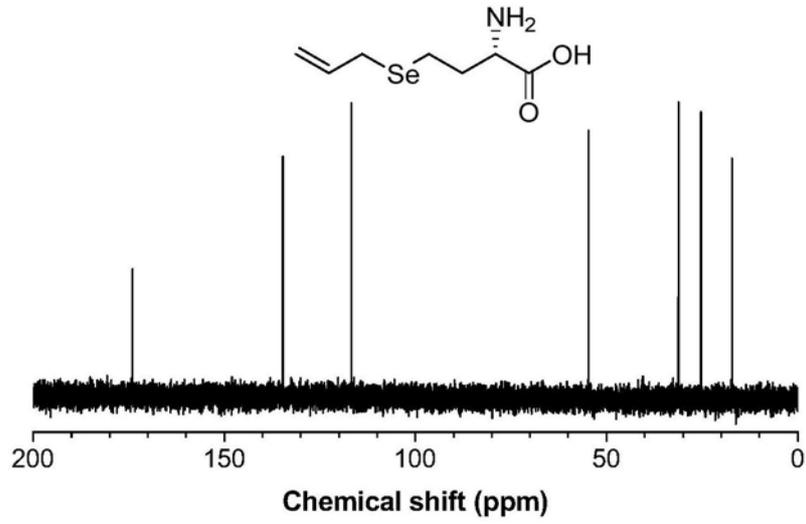


图13

Spectrum from SA-0403-SX-POS.wiff (sample 1) - Sample001, Experiment 1, +TOF MS (100 - 2000) from 0.981 min

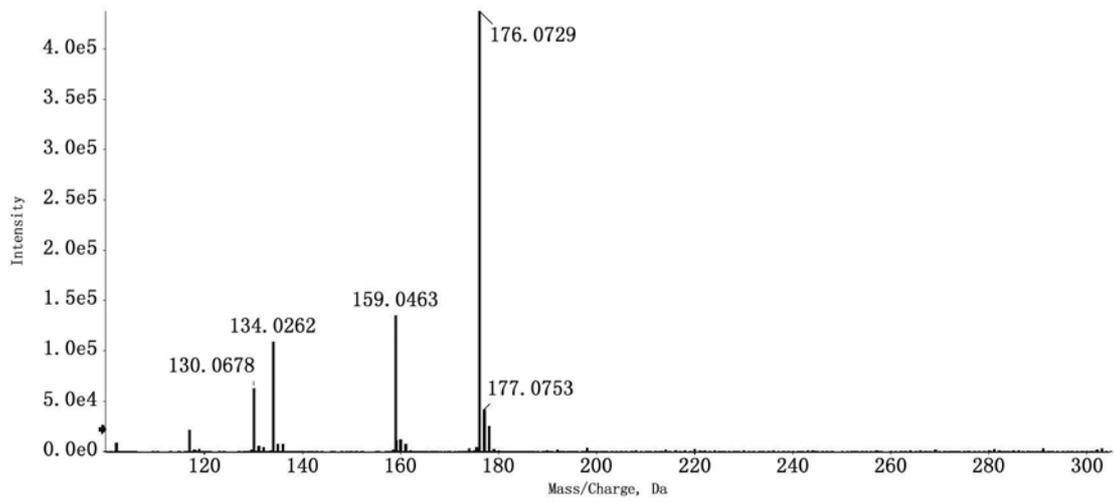


图14

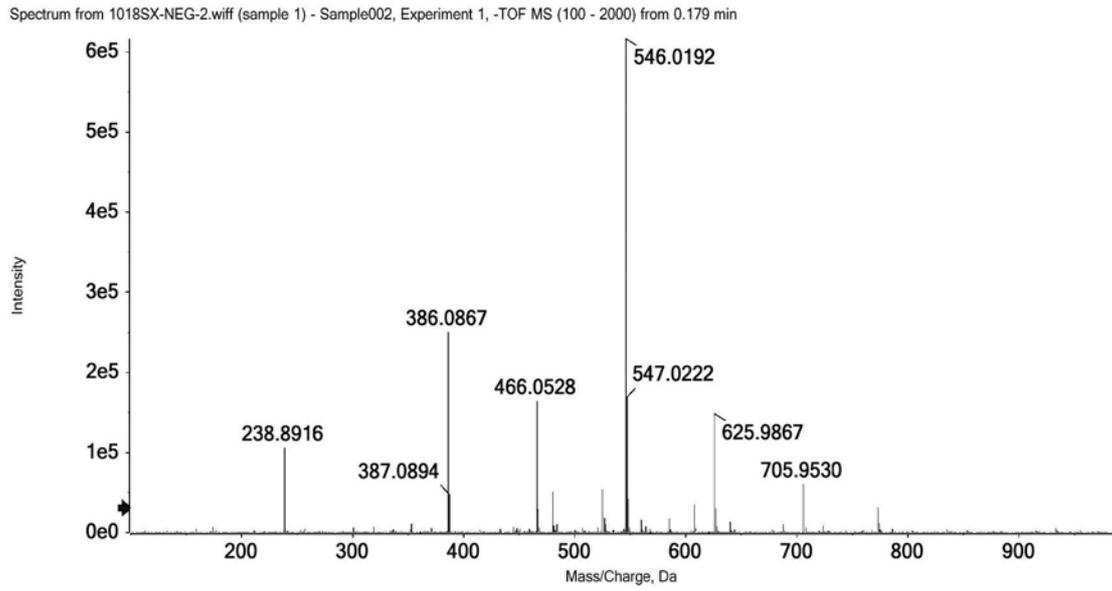


图15