

文献综述

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.003045

RNA 甲基化修饰检测研究进展

蒲勤丽,陈维贤

(重庆医科大学附属第二医院检验科,重庆 400010)

【摘要】RNA 修饰是转录后调控基因表达的重要因素,在表观遗传学领域具有重要的研究意义。目前,许多已知的 RNA 修饰检测方法依赖抗体的特异性。最常用的是基于 RNA 甲基化免疫沉淀结合测序法(methylated RNA immunoprecipitation sequencing, MeRIP-seq),但这种方法也容易产生假阳性和假阴性结果。因此,近年来出现了一系列免抗体的测序方法,以及探索成本低廉、简单易操作的免抗体 RNA 修饰生物传感检测新方法。此外,特定位点的 RNA 修饰检测是探明甲基化对疾病具体调控机制的关键,单碱基分辨检测方法构建是必要的前提。本综述总结近年来 RNA 甲基化修饰特异性检测以及特定位点 RNA 修饰定量检测的新方法。主要从基于免疫途径、甲基化特异性酶途径、杂交方法、化学处理、标记技术以及 RNA 修饰原位检测技术进行总结归纳,分析不同检测方法的优点和不足。同时讨论了通用性检测方法及第三代测序用于直接检测 RNA 甲基化修饰的研究前景。

【关键词】RNA 修饰;定量检测;位点特异性分析;高通量测序

【中图分类号】R446.1

【文献标志码】A

【收稿日期】2021-09-02

Advances in the detection of RNA epigenetic modifications

Pu Qinli, Chen Weixian

(Department of Laboratory Medicine, The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】RNA modification is an important factor in the post-transcriptional regulation of gene expression and is of great research importance in all areas of epigenetics. Currently, many known methods for RNA modification detection rely in part on the specificity of antibodies. The most commonly used method is high-throughput sequencing based on antibody immunoprecipitation, but this method is also prone to false-positive and false-negative results. Therefore, a series of antibody-free sequencing methods have also emerged in recent years, as well as the exploration of new methods for cost-effective and simple antibody-free RNA modification biosensing assays. In addition, site-specific RNA modification detection is crucial for probing the specific regulatory mechanisms of methylation on diseases, and single-base resolution assay construction is a necessary prerequisite. This review summarizes new methods for the specific detection of RNA methylation modifications in recent years and for the quantitative detection of site-specific RNA modifications, and mainly summarize the advantages and shortcomings of different detection methods based on immune pathways, methylation-specific enzyme pathways, hybridization methods, chemical treatment, labeling techniques, and *in situ* detection of RNA modifications. We also discuss the research prospects of universal detection methods and third-generation sequencing for direct detection of RNA methylation modifications.

【Key words】RNA modification; quantitative detection; site-specific analysis; high-throughput sequencing

1 RNA 修饰研究背景

RNA 修饰在基因表达、蛋白翻译等生命进程中具有重要的调控作用。到目前为止,已经有 171 种 RNA 修饰被发

作者介绍:蒲勤丽,Email:1483650396@qq.com,

研究方向:临床检验诊断新技术。

通信作者:陈维贤,Email:chenweixian75@163.com。

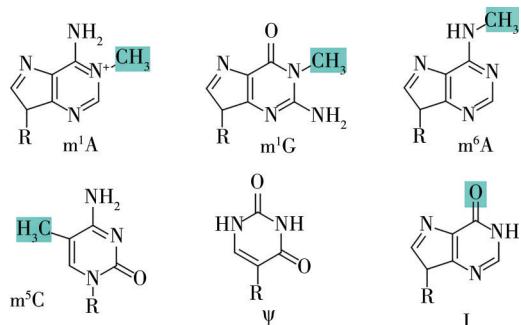
优先出版:<https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20220623.1445.004.html>

(2022-06-26)

现,其中有 72 种为甲基化修饰^[1]。RNA 修饰存在于不同类型的 RNA(如 tRNA、rRNA、mRNA、snRNA、lncRNA 和病毒 RNA)中。图 1 显示了最常见的几种 RNA 修饰的化学结构。根据修饰的核苷酸及 RNA 的类型不同,RNA 甲基化的生物学功能差异也很大。例如,一些细菌 rRNA 甲基化是导致大环内酯类抗生素耐药性的主要原因^[2];真核 mRNA 的甲基化在转录后调控中发挥重要作用等^[3]。然而,大多数 RNA 修饰的生物学作用还没有研究清楚。

1958 年,RNA 被发现存在甲基化修饰^[4]。然而,缺乏灵

敏的检测方法限制了 RNA 修饰领域的研究进展。近年来,研究者发现 N⁶-甲基腺嘌呤(m⁶A)的甲基基团修饰是可逆的,并引起了广泛的科学关注。关于 m⁶A 是可逆修饰的假说声明,其动态水平受 Writers 和 Erasers 的共同调节^[5]。与此同时,关于 m⁶A 是可逆修饰的观点也备受争议,并研究出了一系列关于 RNA 修饰精确定位的检测方法。除 m⁶A 外,最近发现 tRNA 和 mRNA 中的 m¹A 也是可逆的^[6]。



注: m¹A, N¹-甲基腺嘌呤; m¹G: 1-甲基鸟苷; m⁶A: N⁶-甲基腺嘌呤; m⁵C: 5-甲基胞嘧啶; ψ: 假尿苷; I: 肌苷

图 1 常见的几种 RNA 修饰结构

2 RNA 修饰检测方法

RNA 修饰早期检测和定量的方法是基于其物理化学性质。通过薄层色谱法(thin layer chromatography, TLC)实现 RNA 单体的分离,或高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)结合紫外检测或(和)质谱联用结合质谱联用(liquid chromatograph-mass spectrometer, LC-MS)。同位素标记技术结合 LC-MS 提高了 RNA 修饰的检测性能^[7-9]。传统的 LC-MS 检测需要将核酸序列裂解成单个核苷酸,导致序列信息丢失。生物合成的短序列 RNA 中的 m⁶A、m⁵C、3-甲基尿苷(m³U)、5-甲基尿苷(m⁵U)位点可通过碰撞解离技术实现免标记的直接检测^[10]。

早期精确定位 RNA 修饰的方法依赖 RNA 酶剪切和指纹图谱结合纸上电泳和薄层色谱法来实现。例如,劳斯肉瘤病毒 RNA 中的 m⁶A 位点图谱已在 1985 年绘制出^[11]。甲基化位点检测的另一种方法是 RNA 逆转录(reverse transcription, RT)法。通过影响逆转录酶延伸,或 cDNA 对应的修饰位点诱导碱基错误修改实现位点检测^[12]。基于 RT 的检测可与高通量测序(next generation sequencing, NGS)结合,实现对全转录组分析^[13]。m⁶A 单碱基分辨有效的检测方法通过结合 RNase H 位点特异性剪切,特异性酶连接,以及 TLC 等,构建位点特异性切割和放射性标记结合连接辅助萃取及薄层色谱法(site-specific cleavage and radioactive-labeling followed by ligation-assisted extraction and thin-layer chromatography, SCARLET)检测技术。原则上,SCARLET 可以用来检测除 m⁶A 以外的其他 RNA 修饰,但该方法检测程序繁琐,而且耗时^[14]。

本综述主要总结 RNA 甲基化检测方法,探讨甲基化位点特异性检测方法的研究进展,以及各种方法的优缺点。根据不同的检测原理分为以下几种类型。

2.1 基于免疫学途径

部分 RNA 修饰的抗体已商品化,如 m⁶A、m¹A 和 m⁵C 等。通过交联免疫共沉淀结合测序实现对 m⁵C、m⁶A 和 m¹A 修饰的全基因组水平的多位点检测^[15-18]。但依赖抗体的检测方法仍存在不足。例如, m⁶A 特异的抗体无法区分 m⁶A 和 m⁶A_m^[19]。此外,核酸的二级结构产生的空间位阻可能会影响抗体与修饰位点的结合或导致脱靶^[20]。

甲基化特异性抗体的应用不仅限于结合 NGS 检测,也被用于免疫印迹试验^[21]和电化学免疫传感方法^[22]。另一种免疫化学方法是基于 RNA-DNA 双链的 bulge loop 免疫识别 m⁶A, m⁶A 被 bulge loop 上的抗体特异性识别,而不是与 RNA-DNA 杂交结合。应用该方法检测了 23S rRNA 中 2 030 位点的 m⁶A 含量。该方法无法检测完整的 RNA 样本。此外,高背景信号难以消除^[23]。

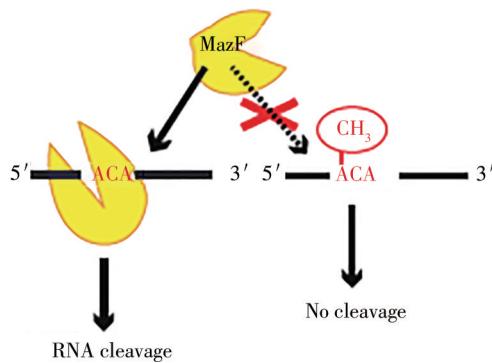
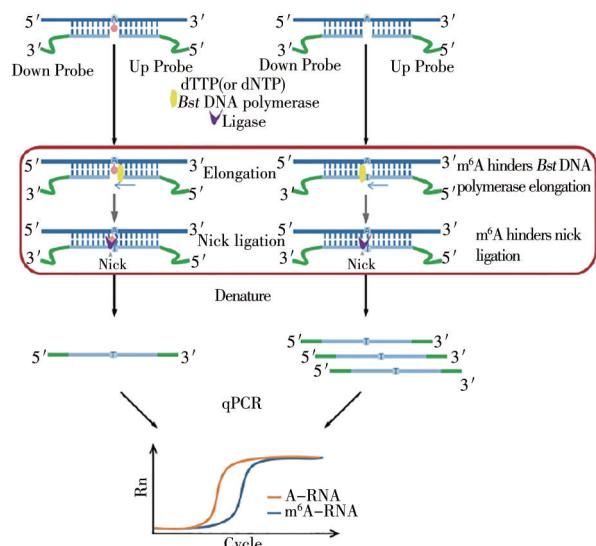
2.2 基于甲基化特异性酶法

部分甲基修饰基团位于 Watson-Crick 边缘(m¹A、m³U、m³C 和 m¹G)。核苷酸发生甲基化后 RT 会被阻断,碱基配对的稳定性也会受影响。因此,基于 RT 阻断构建了 RNA 修饰检测方法^[24]。不同的 RT 酶对 RNA 甲基化核酸的敏感性具有差异,通过改变酶和 RT 的反应条件,可影响修饰核酸的 RT 响应信号,例如缓冲液成分, dNTP 浓度^[25]。针对 m⁶A,嗜热病毒的聚合酶可对其修饰 RNA 的 RT 反应有选择性阻断作用。相比于修饰位点,这种聚合酶的阻断作用约为未修饰位点的 18 倍^[24]。

此外,通过对逆转录酶进行工程设计,可以改进基于 RT 阻断的 RNA 甲基化检测。Aschenbrenner J 等^[26-27]改进热稳定性 Klentaq 变异体研制出对 2'-O- 甲基和 m⁶A 敏感的聚合酶。在 2'-O- 甲基化的情况下,基因工程的酶阻断 RT,构建甲基化敏感的 qRT-PCR 反应,对来自不同细胞的 18S rRNA 中的 2'-O- 甲基进行定量分析。该方法检测的错误率为 14.3%,相比于 5' 末端的修饰或 m⁵U 的检测高 10%。因此,研究的工程酶对 m⁶A 以外的 RNA 修饰检测更敏感。

除 DNA 聚合酶以外,部分蛋白酶(如单链 RNA 结合蛋白 Pumilio^[28]、DNA 连接酶)对 RNA 修饰也具有敏感性。大肠杆菌 MazF 毒素最近被鉴定为第一个 m⁶A 敏感 RNA 剪切酶^[29]。MazF 在 5'-ACA-3' 序列内切割 RNA,但不切割 5'-(m⁶A) CA-3' 序列(图 2)。值得注意的是, MazF 对 m¹A 也敏感,因此,不适用于区分这 2 种甲基化。此外, MazF 不切割双链序列,会限制 RNA 二级结构中 m⁶A 的检测。

T4 DNA 连接酶是第一个发现的 m⁶A 特异性连接酶^[30]。但最近的研究报道,T3 DNA 连接酶对 A 和 m⁶A 的区分更具有选择性,在此基础上,构建了基于 PCR 的方法对 m⁶A 特异性检测(图 3)^[31]。这种方法用于定量检测 RNA 上的特定位点的 m⁶A,并在不同细胞提取 MALAT1 lncRNA 中得到验证。

图 2 MazF 选择性剪切非甲基化 RNA^[29]图 3 基于 T3 DNA 连接酶介导 PCR 对特定位点 m⁶A 修饰定量检测^[31]

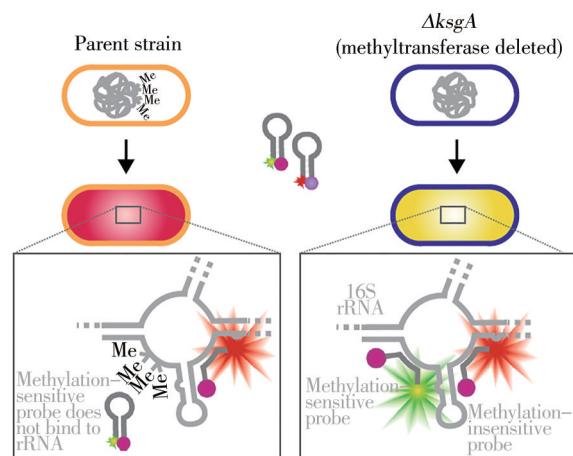
2.3 基于杂交的途径

m^6A 修饰位于 Watson-Crick 边缘, 对碱基互补影响较小, 发生修饰后仍可形成 m^6A -U 配对, m^6A 修饰 RNA 杂交双链热稳定性微小变化可能是由空间位阻导致^[32]。但由于碱基堆积作用, m^6A 可增强单链 RNA 区域的稳定性^[33]。因此, 基于 RNA-DNA 溶解曲线的差异构建了 m^6A 特定位点检测方法^[34]。设计的 2 条 DNA 探针(分别修饰荧光基团和猝灭基团)与修饰区域互补结合。通过分析解链时荧光信号的变化, 实现不同 RNA 的 m^6A 位点检测。这种方法的最大优点就是简单易操作, 不足在于检测需要较大浓度的 RNA 样本($>0.4 \text{ mmol/L}$)。

设计 RNA 甲基化敏感的 DNA 杂交探针, 构建甲基化 RNA

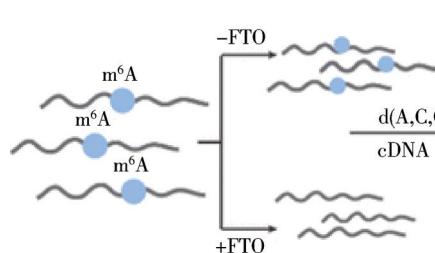
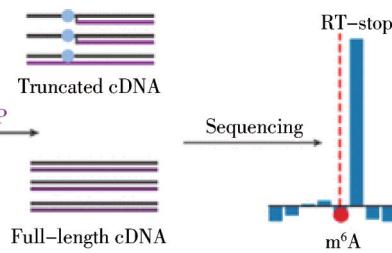
荧光原位杂交法(methylation-sensitive RNA fluorescence *in situ* hybridization, MR-FISH), 实现对细胞内 RNA 甲基化修饰的原位检测(图 4)^[35]。设计细胞中 rRNA 序列互补的甲基化敏感的杂交探针。另一个分子信标探针与同一 RNA 链上的远端非甲基化序列互补用于内部校准。结果表明, 该方法对相邻的 2 个 m^6A 、 m^1G 和 m^3U 都能有效检测。同时, 该方法验证了 m^6A 也在一定程度上破坏了双链结构的稳定性。

采用三磷酸脱氧胸苷类似物 4SeTTP(4 位置的氧原子用硒原子取代)替换逆转录的 dTTP 原料, 未修饰的 A 碱基与 4SeT 杂交与普通的 A-T 碱基配对无明显区别。但由于氢键和碱基堆积的扰动, 4SeT 与 m^6A 杂交明显受阻(图 5)。通过空间位阻效应阻断逆转录的延伸, 结合去甲基酶(fat mass and obesity associated, FTO)和 NGS 实现对 m^6A 位点的单碱基分辨的检测。这种方法不仅可以对已知的甲基化位点的修饰进行检测, 也可以检测 RNA 修饰的未知位点。但目前为止, 该策略尚未应用于实际样本中的 m^6A 鉴定^[36]。

图 4 基于 DNA 荧光探针的杂交法对 RNA 修饰的定量检测^[35]

2.4 细胞内 RNA 修饰原位检测的途径

大部分 RNA 甲基化位点是从细胞或组织中提取的 RNA 生物样本开始的, 只有部分策略第一步需要在细胞内原位操作。基于 5-氮杂胞苷(5-aza-C)抑制作用对甲基转移的破坏, 构建细胞内 RNA 胞嘧啶甲基转移酶(MTases)的直接检测方法。HeLa 细胞表达一个表位标记的 m^5C -RNA 甲基转移酶(DNMT2)是在 5-aza-C 存在下生长的, 5-aza-C 整合到

图 5 基于 4SeTTP 与 FTO 辅助的单核苷酸分辨率检测 m^6A 修饰位点^[36]

新生 RNA 中^[37]。随后,该方法被用于鉴定和表征一种新的哺乳动物 m⁵C tRNA 甲基转移酶(NSUN6)^[38]。

RNA 的 MTases 需要 S-腺苷蛋氨酸(S-adenosylmethionine, SAM)作为甲基供体^[39]。最近,有研究者建立了一种从蛋氨酸类似物代谢标记 MTases 作用位点的方法^[40]。HeLa 细胞采用合成的丙炔基-L-硒同型半胱氨酸来培养,由细胞蛋氨酸腺苷转移酶转化为含有丙炔基而不是甲基的 SAM 类似物(图 6)^[41],细胞 MTases 使用这种底物会导致丙炔基转移到正常甲基化的位点。真核生物 5'-帽的 MTases 作用,在体外实验也显示出与 SAM 类似物作用具有高效的代谢标记^[42]。Shu X 等^[43]研究表明,碘化的烯丙基形成 N¹,N⁶-环化腺苷,在 METTL3-METTL14 和烯丙基-SAM 存在的情况下对分离出的总 RNA 进行标记,实现在转录组范围内对 A 和 m⁶A 进行鉴别。

2.5 NGS 在 RNA 修饰中的检测应用

基于 NGS 的方法检测 RNA 修饰常依赖抗体识别或特定的化学处理^[13]。由于 RNA 修饰的性能多样性,一个通用的方法同时检测位点特异性的多种 RNA 修饰将推动该领域快速发展。最近的研究旨在系统探索商用逆转录酶对不同 RNA 修饰 RT 性能的影响。因此,研究者对 RT 酶的浓度、类型和序列上下文的信息对 RT 的作用^[44],例如 M-MuLV、AMV 和 ProtoScript II 对 m⁶A、m⁵C、m⁵U 等在 RT 保真度方面的影响。另一项研究通过假设不同的 RNA 修饰在深度测序数据(突变、截断、插入和缺失的模式)中产生不同的影响,绘制了 RNA 修饰的指纹图谱^[45]。部分 RNA 修饰检测结果与未修饰的核酸检测结果无统计学差异(m⁵C、m⁵U 和 m⁶A),而其他的

一些 RNA 修饰(N⁶-双甲基腺苷、m¹A、I、m¹G、O⁶-甲基鸟苷)分别获得了不同于未修饰的图谱。然而,聚合酶的反应会随序列上下文的不同而不同。此外,该研究观察到的修饰依赖模式可能与未经测试的 RNA 修饰模式重叠。这项研究为同时检测多种 RNA 修饰提供了重要依据。未来,对修饰特异性 RT 标记或蛋白质工程的进一步研究可能会发现一种具有更特异且高效的 RT 酶。

2.6 第三代测序技术在 RNA 修饰中的检测应用

第三代测序又称单分子测序,是目前正在开发的一类多样化的高通量测序技术,其工作原理不同于二代测序。与后者相比,三代测序无须将核苷酸链断裂成小片段,也不需要 PCR 扩增。早期的实验研究显示了第三代技术具有检测 RNA 甲基化的潜力。

纳米孔测序是将单个 DNA 或 RNA 分子捕获并通过纳米孔实现的。一个恒定的电场被施加到系统上,当核苷酸通过小孔时,观察电流的改变,这使得测序成为可能。利用大肠杆菌 16S rRNA 进行直接纳米孔测序,是首次尝试对甲基化 RNA 进行检测^[46]。测序数据中存在的一个碱基读出错误与 7-甲基鸟苷的位置相对应。鸟苷甲基化改变了离子电流,从而使纳米孔检测 RNA 甲基化成为可能。另一项研究也表明,合成 RNA 的 m⁶A 和 m⁵C 修饰链在纳米孔内有电流的扰动^[47]。平均电流水平在修饰碱基的位置有改变,但未在生物 RNA 甲基化样本中进行检测验证。

另一种新兴的 NGS 技术是单分子实时逆转录监测 (single molecule real-time, SMRT)。它最初是为 DNA 开发的,也适用于 RNA 测序。荧光团附着在 dNTPs 的末端磷酸

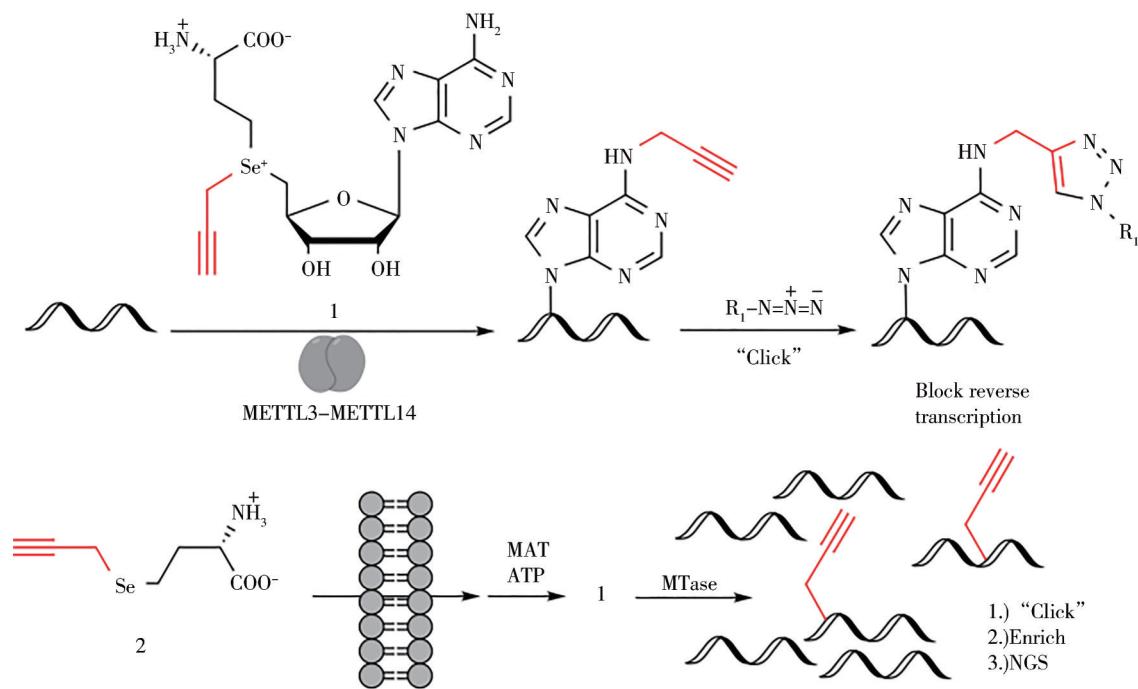


图 6 蛋氨酸类似物代谢标记 MTases 的作用位点检测 m⁶A^[41]

基团上,实现 RT 的可视化,可以实时监测 cDNA 合成。当 m⁶A 存在时,mRNA 中已知位点的磷脂核苷酸结合受影响^[48]。

3 小 结

综上所述, RNA 修饰定量检测及特定位点的检测方法近年来受到研究者的广泛关注,也取得了飞速的进展。前期 RNA 修饰检测除 HPLC 和 LC-MS 外,主要依赖 MeRIP-seq 实现。但基于抗体的方法容易出现假阴性及假阳性结果,且操作复杂、成本昂贵。随着对 RNA 表观遗传深入研究的需求,研究者整合细胞代谢标记技术等开发一系列新方法不仅可以在转录组范围内检测未知修饰位点,并实现了 RNA 修饰核酸富集。并且能快速、灵敏地监测特定位点上甲基化碱基存在。近年来 RNA 修饰的检测方法主要集中在 m⁶A 的检测上,这可能与 m⁶A 的重要生物学作用有关。未来,将目前的甲基化特异性标记技术结合第三代测序技术将推动 RNA 修饰的研究新进展。结合新一代生物传感技术和 PCR 技术构建简单易操作的方法,更易实现临床转化和常规实验室的推广使用。

尽管 RNA 甲基化修饰检测方法在不断改进,但基于不同 RNA 修饰结构比较复杂,目前仍没有一种皆具特异、灵敏、通用、操作简单、成本低廉的检测方法。HPLC 对总 RNA 修饰定量检测仍占据不可取代的优势。高通量测序依然是全转录组 RNA 位点检测不可缺少的技术支持。但操作复杂、成本昂贵的缺点也不容忽视。新型的传感策略需要在测序和质谱对位点和甲基化率信息充分探索的基础上进行。只有将这些技术巧妙地联合应用,才更有利于推动 RNA 表观遗传在生命科学中不断探索,以及在临床检测中转化应用。

参 考 文 献

- [1] Boccaletto P, Machnicka MA, Purta E, et al. MODOMICS: a database of RNA modification pathways. 2017 update[J]. Nucleic Acids Res, 2018, 46(D1):D303–D307.
- [2] Maravić G. Macrolide resistance based on the Erm-mediated rRNA methylation[J]. Curr Drug Targets Infect Disord, 2004, 4 (3) : 193–202.
- [3] Wang X, He C. Dynamic RNA modifications in posttranscriptional regulation[J]. Mol Cell, 2014, 56(1):5–12.
- [4] Adler M, Weissmann B, Gutman AB. Occurrence of methylated purine bases in yeast ribonucleic acid[J]. J Biol Chem, 1958, 230 (2) : 717–723.
- [5] Jia GF, Fu Y, Zhao X, et al. N6-methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO[J]. Nat Chem Biol, 2011, 7(12):885–887.
- [6] Mauer J, Jaffrey SR. FTO, m⁶Am, and the hypothesis of reversible epitranscriptomic mRNA modifications[J]. FEBS Lett, 2018, 592 (12) : 2012–2022.
- [7] Paulines MJ, Limbach PA. Stable isotope labeling for improved comparative analysis of RNA digests by mass spectrometry[J]. J Am Soc Mass Spectrom, 2017, 28(3):551–561.
- [8] Kellner S, Ochel A, Thüring K, et al. Absolute and relative quantification of RNA modifications via biosynthetic isotopomers[J]. Nucleic Acids Res, 2014, 42(18):e142.
- [9] Popova AM, Williamson JR. Quantitative analysis of rRNA modifications using stable isotope labeling and mass spectrometry[J]. J Am Chem Soc, 2014, 136(5):2058–2069.
- [10] Glasner H, Riml C, Micura R, et al. Label-free, direct localization and relative quantitation of the RNA nucleobase methylations m⁶A, m⁵C, m³U, and m⁵U by top-down mass spectrometry[J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45(13):8014–8025.
- [11] Kane SE, Beemon K. Precise localization of m⁶A in Rous sarcoma virus RNA reveals clustering of methylation sites: implications for RNA processing[J]. Mol Cell Biol, 1985, 5(9):2298–2306.
- [12] Motorin Y, Muller S, Behm-Ansmant I, et al. Identification of modified residues in RNAs by reverse transcription-based methods[J]. Methods Enzymol, 2007, 425:21–53.
- [13] Schwartz S, Motorin Y. Next-generation sequencing technologies for detection of modified nucleotides in RNAs[J]. RNA Biol, 2017, 14(9):1124–1137.
- [14] Liu N, Parisien M, Dai Q, et al. Probing N⁶-methyladenosine RNA modification status at single nucleotide resolution in mRNA and long noncoding RNA[J]. RNA, 2013, 19(12):1848–1856.
- [15] Dominissini D, Moshitch-Moshkovitz S, Schwartz S, et al. Topology of the human and mouse m⁶A RNA methylomes revealed by m⁶A-seq[J]. Nature, 2012, 485(7397):201–206.
- [16] Meyer KD, Saleto Y, Zumbo P, et al. Comprehensive analysis of mRNA methylation reveals enrichment in 3' UTRs and near stop codons [J]. Cell, 2012, 149(7):1635–1646.
- [17] Edelheit S, Schwartz S, Mumbach MR, et al. Transcriptome-wide mapping of 5-methylcytidine RNA modifications in bacteria, Archaea, and yeast reveals m⁵C within archaeal mRNAs[J]. PLoS Genet, 2013, 9(6):e1003602.
- [18] Li XY, Xiong XS, Wang K, et al. Transcriptome-wide mapping reveals reversible and dynamic N¹-methyladenosine methylome[J]. Nat Chem Biol, 2016, 12(5):311–316.
- [19] Linder B, Grozhik AV, Olarerin-George AO, et al. Single-nucleotide-resolution mapping of m⁶A and m⁶Am throughout the transcriptome[J]. Nat Methods, 2015, 12(8):767–772.
- [20] Feederle R, Schepers A. Antibodies specific for nucleic acid modifications[J]. RNA Biol, 2017, 14(9):1089–1098.
- [21] Mishima E, Jinno D, Akiyama Y, et al. Immuno-northern blotting: detection of RNA modifications by using antibodies against modified nucleosides[J]. PLoS One, 2015, 10(11):e0143756.
- [22] Wang HY, Yin HS, Huang H, et al. Dual-signal amplified photo-

- electrochemical biosensor for detection of N⁶-methyladenosine based on BiVO₄-110-TiO₂ heterojunction, Ag⁺-mediated cytosine pairs[J]. *Biosens Bioelectron*, 2018, 108: 89–96.
- [23] Yoshioka K, Kurita R. N⁶-methylation assessment in *Escherichia coli* 23S rRNA utilizing a bulge loop in an RNA–DNA hybrid[J]. *Anal Chem*, 2018, 90(12): 7578–7582.
- [24] Hauenschild R, Tserovski L, Schmid K, et al. The reverse transcription signature of N-1-methyladenosine in RNA-Seq is sequence dependent[J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(20): 9950–9964.
- [25] Dong ZW, Shao P, Diao LT, et al. RTL-P: a sensitive approach for detecting sites of 2'-O-methylation in RNA molecules[J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(20): e157.
- [26] Aschenbrenner J, Marx A. Direct and site-specific quantification of RNA 2'-O-methylation by PCR with an engineered DNA polymerase [J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(8): 3495–3502.
- [27] Aschenbrenner J, Werner S, Marchand V, et al. Engineering of a DNA polymerase for direct m⁶A sequencing[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2018, 57(2): 417–421.
- [28] Vaidyanathan PP, AlSadhan I, Merriman DK, et al. Pseudouridine and N⁶-methyladenosine modifications weaken PUF protein/RNA interactions[J]. *RNA*, 2017, 23(5): 611–618.
- [29] Imanishi M, Tsuji S, Suda A, et al. Detection of N⁶-methyladenosine based on the methyl-sensitivity of MazF RNA endonuclease [J]. *Chem Commun (Camb)*, 2017, 53(96): 12930–12933.
- [30] Dai Q, Fong R, Saikia M, et al. Identification of recognition residues for ligation-based detection and quantitation of pseudouridine and N⁶-methyladenosine[J]. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35(18): 6322–6329.
- [31] Liu WL, Yan JL, Zhang ZH, et al. Identification of a selective DNA ligase for accurate recognition and ultrasensitive quantification of N⁶-methyladenosine in RNA at one-nucleotide resolution[J]. *Chem Sci*, 2018, 9(13): 3354–3359.
- [32] Kierzek E, Kierzek R. The thermodynamic stability of RNA duplexes and hairpins containing N⁶-alkyladenosines and 2-methylthio-N⁶-alkyladenosines[J]. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(15): 4472–4480.
- [33] Roost C, Lynch SR, Batista PJ, et al. Structure and thermodynamics of N⁶-methyladenosine in RNA: a spring-loaded base modification [J]. *J Am Chem Soc*, 2015, 137(5): 2107–2115.
- [34] Golovina AY, Dzama MM, Petriukov KS, et al. Method for site-specific detection of m⁶A nucleoside presence in RNA based on high-resolution melting (HRM) analysis[J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(4): e27.
- [35] Ranasinghe RT, Challand MR, Ganzinger KA, et al. Detecting RNA base methylations in single cells by *in situ* hybridization[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 655.
- [36] Hong TT, Yuan YS, Chen ZG, et al. Precise antibody-independent m⁶A identification via 4SedTPP-involved and FTO-assisted strategy at single-nucleotide resolution[J]. *J Am Chem Soc*, 2018, 140(18): 5886–5889.
- [37] Khoddami V, Cairns BR. Identification of direct targets and modified bases of RNA cytosine methyltransferases[J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(5): 458–464.
- [38] Haag S, Warda AS, Kretschmer J, et al. NSUN6 is a human RNA methyltransferase that catalyzes formation of m⁵C72 in specific tRNAs [J]. *RNA*, 2015, 21(9): 1532–1543.
- [39] Hamdane D, Grosjean H, Fontecave M. Flavin-dependent methylation of RNAs: complex chemistry for a simple modification[J]. *J Mol Biol*, 2016, 428(24 Pt B): 4867–4881.
- [40] Hartstock K, Nilges BS, Ovcharenko A, et al. Enzymatic or *in vivo* installation of propargyl groups in combination with click chemistry for the enrichment and detection of methyltransferase target sites in RNA [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2018, 57(21): 6342–6346.
- [41] Muttach F, Rentmeister A. A biocatalytic cascade for versatile one-pot modification of mRNA starting from methionine analogues[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2016, 55(5): 1917–1920.
- [42] Holstein JM, Muttach F, Schiefelbein SHH, et al. Dual 5' cap labeling based on regioselective RNA methyltransferases and bioorthogonal reactions[J]. *Chemistry*, 2017, 23(25): 6165–6173.
- [43] Shu X, Dai Q, Wu T, et al. N⁶-allyladenosine: a new small molecule for RNA labeling identified by mutation assay[J]. *J Am Chem Soc*, 2017, 139(48): 17213–17216.
- [44] Potapov V, Fu XQ, Dai N, et al. Base modifications affecting RNA polymerase and reverse transcriptase fidelity[J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(11): 5753–5763.
- [45] Kietrys AM, Velema WA, Kool ET. Fingerprints of modified RNA bases from deep sequencing profiles[J]. *J Am Chem Soc*, 2017, 139(47): 17074–17081.
- [46] Smith AM, Jain M, Mulroney L, et al. Reading canonical and modified nucleobases in 16S ribosomal RNA using nanopore native RNA sequencing[J]. *PLoS One*, 2019, 14(5): e0216709.
- [47] Garalde DR, Snell EA, Jachimowicz D, et al. Highly parallel direct RNA sequencing on an array of nanopores[J]. *Nat Methods*, 2018, 15(3): 201–206.
- [48] Vilfan ID, Tsai YC, Clark TA, et al. Analysis of RNA base modification and structural rearrangement by single-molecule real-time detection of reverse transcription[J]. *J Nanobiotechnology*, 2013, 11: 8.

(责任编辑:周一青)