

RNA 上 N6-腺嘌呤甲基化 (m6A) 修饰的检测

Identification of N6-methyladenosine (m6A) in RNA

陈丽倩, 陈鸿萱, 骆观正*

有害生物控制与资源利用国家重点实验室, 基因功能与调控教育部重点实验室, 生命科学学院, 中山大学

*通讯作者邮箱: luogzh5@mail.sysu.edu.cn

引用格式: 陈丽倩, 陈鸿萱, 骆观正. (2021). RNA 上 N6-腺嘌呤甲基化 (m6A) 修饰的检测. Bio-101 e1010802. Doi: 10.21769/BioProtoc. 1010802.

How to cite: Chen, L. Q., Chen, H. X. and Luo, G. Z. (2021). Identification of N6-methyladenosine (m6A) in RNA. Bio-101 e1010802. Doi: 10.21769/BioProtoc. 1010802. (in Chinese)

摘要: RNA 是体现细胞生命活动的重要载体, 通过转录和转录后调控的方式对遗传信息进行解码和重编码, 并参与到细胞的生长代谢中 (Shi *et al.*, 2019)。RNA 上有超过 150 种修饰, N6-甲基化腺嘌呤 (m6A) 是真核生物 mRNA 上修饰含量最多的一种, 它在基因表达调控中发挥重要作用 (Yang *et al.*, 2018), 影响了胚胎发育、神经元调节和肿瘤发生等多个生物学过程 (Barber and Rastegar, 2010; Chen *et al.*, 2019)。而甲基化往往是一个动态的、可逆的过程, 受到多种其它生物化学过程的调节 (Fu *et al.*, 2014; Duan *et al.*, 2019)。准确全面解析 m6A 的定位和丰度信息对于了解 m6A 的分布规律和生物学功能有很大的研究和应用价值。然而, 由于方法学的限制, 我们目前对 m6A 在全转录组上的分布情况了解有限 (Hartstock and Rentmeister, 2019; Zhao *et al.*, 2020)。普通未修饰的 A 碱基与 m6A 碱基的化学结构差别不大, 并不影响碱基配对方式 (图 1), 所以通常很难通过常规的分子生物学方法进行区分。Dot-blot (斑点印记杂交法) 是一种基于抗体的修饰检测方法, 可以方便快捷地判断 RNA 样品中总体 m6A 修饰的含量 (Shu *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2020)。相对于质谱来说, 该方法价格成本更低, 操作和分析都更加简单。同时, 为了实现单个位点的 m6A 检测和定量, 本实验中我们使用了 T3 连接酶法和 MazF 核酸内切酶法 (Liu *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2019), 这两种方法具有操作简便, 成本低和灵敏度高的特点, 其中 MazF 核酸内切酶法还可以运用于高通量的转录组 m6A 位点的检测当中 (Zhang *et al.*, 2019)。

关键词: 哺乳动物细胞, 总 RNA 提取, HEK293T 细胞, m6A 修饰, Dot-blot, 抗体, T3 连接酶法, 单个位点, MazF 酶

材料与试剂

1. 无酶枪头 (QSP)
2. 1.5 ml 无酶 EP 管 (生工)
3. 50 ml 无酶离心管 (生工)
4. 抗体孵育盒 (生工)
5. 双面胶
6. 尼龙膜 (GE)
7. 无酶 PCR 管 (Axygen)
8. HEK293T 细胞系
9. m6A 抗体 (Synaptic Systems, catalog number: 202003)
10. 兔二抗 (CST)
11. TRIzol (TAKARA)
12. 氯仿 (广州牌)
13. 异丙醇 (生工)
14. 无水乙醇 (生工)
15. DEPC 处理水 (生工)
16. 无菌 1x PBS (生工)
17. Qubit RNA HS Assay Kit (Thermo Fisher)
18. BSA 粉末 (生工)
19. 1x TBS (生工)
20. Tween-20 (生工)
21. 100x 亚甲蓝染液 (生工)
22. RNA 寡聚核苷酸链(TAKARA)
m6A-UUGGUUUUUUUUUGG(m6A)CAUGUAUAUAGU-FAM
A-UUGGUUUUUUUUUGGACAUGUAUAUAGU-FAM
23. T3 DNA 连接酶 (NEB)

24. 10x T3 连接缓冲液 (NEB)
25. 2x Taq Mix (Vazyme Biotech)
26. 0.5x TAE (生工)
27. 琼脂粉 (生工)
28. gel-red 核酸染料 (Genestar)
29. MazF 酶 (Takara Bio Inc., catalog number: 2415A)
30. 5x MazF buffer
31. 化学发光液 (BD)
32. 0.5x TBE (生工)
33. 尿素 (生工)
34. 5x TBE (生工)
35. 30%丙烯酰胺 (生工)
36. 过硫酸铵(APS)粉末 (生工)
37. 四甲基乙二胺(TEMED) (生工)
38. 1%亚甲蓝染液 (见溶液配方)
39. 75%乙醇 (见溶液配方)
40. 0.1%TBST (见溶液配方)
41. 3%BSA (见溶液配方)
42. 1%亚甲蓝染液 (见溶液配方)
43. 2.5%琼脂糖凝胶 (见溶液配方)
44. 10%尿素-聚丙烯酰胺胶 (见溶液配方)
45. 10% APS (见溶液配方)

仪器设备

1. 剪刀
2. 96 孔 PCR 管架
3. 镊子
4. 100 ml 小烧杯 (生工)
5. 低温高速离心机 (Eppendorf)

6. 低速离心机 (Eppendorf)
7. 移液枪 (Eppendorf)
8. 离心管架 (生工)
9. 通风橱
10. 水平电泳系统 (Bio-Rad)
11. NanoDrop 或 Qubit 2.0 (Thermo Fisher)
12. 紫外交联仪 (Agilent)
13. 化学发光仪 (Bio-Rad)
14. 干式恒温器 (杭州瑞诚)
15. 水平摇床 (Kylin-bell 其林贝尔)
16. PCR 仪 (Thermo Fisher)
17. 凝胶成像仪 (Bio-Rad)
18. 电子天平
19. 微波炉 (美的)
20. 垂直电泳系统 (Bio-Rad)
21. 恒温磁力搅拌器

软件

1. Agilent Bioanalyzer

实验步骤

注：以下实验涉及 **RNA** 操作，请做好实验台清洁和个人防护，所有实验用品按照 **RNA** 级别进行操作。

一、哺乳动物细胞总 RNA 提取

利用 **TRIzol** 抽提的方法抽取大量高纯度的哺乳动物细胞的总 **RNA**，该方法能较好地保持总 **RNA** 的完整性和纯度，能够避免 **DNA** 和蛋白质的污染，适用于后续的各种分子检测实验和高通量检测实验。

1. 显微镜下观察 6 cm 皿中 HEK293T 细胞系的细胞密度生长至~80-90%，从细胞房取出。预冷高速离心机至 4 °C。

2. 用移液枪小心吸去细胞培养液，并用 1x PBS 润洗细胞，用枪头吸去多余的液体，再加入 2 ml 1x PBS 吹打细胞（少于 2 ml 会导致细胞过于黏稠），将细胞吹均匀后吸取到 15 ml 离心管中，用 800 rpm 低速常温离心 6 min 收集细胞，去掉多余的 1x PBS。

注：由于 HEK293T 细胞系是半贴壁细胞，所以推荐吹打的方式进行细胞收集。如果是贴壁细胞，可以用胰酶进行消化或者细胞刮收集的方法。如果是悬浮细胞，直接离心收集即可。

3. 取一管细胞在通风橱中加入 500 μ l TRIzol 裂解 5 min，注意要吹匀细胞，不能留下细胞团块。每一百万个细胞可以获得 5-15 μ g 的 RNA。

注：提取细胞 RNA 最好是使用新鲜的细胞样品。如果细胞过多或需要保存，可以加入 TRIzol 将细胞吹散后放置在-80 $^{\circ}$ C 冰箱可保存一年；TRIzol 具有腐蚀性，其含有苯酚、异硫氰酸胍等物质，能迅速破碎细胞并抑制细胞释放出的核酸酶！

4. 在通风橱中向上步产物加入 100 μ l 氯仿进行振荡混匀，室温静置 5 min 后，放到预冷好的 4 $^{\circ}$ C 高速离心机中 13,200 rpm 离心 10 min。

注：注意离心机配平；氯仿有腐蚀性，使用前先分装到 50 ml 离心管中方便操作！

5. 离心结束后小心取出样品管，可见样品分为三层：上层透明的水层包含有 RNA、中间的白色层包含 DNA 蛋白质和一些杂质、下层粉红色的有机层包含蛋白质、脂类等物质。小心将上层的水层转移至新的 EP 管中，加入等体积异丙醇进行沉淀，振荡混匀，室温静置 5 min 后，放到 4 $^{\circ}$ C 高速离心机中 13,200 rpm 离心 10 min。

注：吸取水层时注意不要吸到细胞杂质，宁缺毋滥；注意离心机配平；异丙醇使用前先分装到 50 ml 离心管中方便操作！

6. 离心结束后小心取出样品管，可见样品管底部出现一块白色沉淀，小心去掉上清，加入 1 ml 75% 乙醇进行漂洗。放到 4 $^{\circ}$ C 高速离心机中 13,200 rpm 离心 2 min。

7. 小心去掉上清，加入 1 ml 75% 乙醇进行再次漂洗，再次放到 4 $^{\circ}$ C 高速离心机中 13,200 rpm 离心 2 min，用枪头吸去多余的液体。在通风橱中静置晾干，等到白色沉淀变透明之前加入 50-100 μ l DEPC 处理水进行溶解。

注：去掉上清时，可以将样品管放在厨房纸上倒扣一下快速吸干管口残余液体。

8. 5 min 后，白色沉淀完全溶解，用 NanoDrop 或者琼脂糖凝胶电泳法对提取的 RNA

进行纯度鉴定，用 **NanoDrop** 或者 **Qubit** 进行浓度测定。

二、Dot-blot 检测 RNA 样品中的 m6A 修饰

Dot-blot 检测的原理是基于抗原抗体结合放大信号的检测方法，常用于检测 **DNA** 和 **RNA** 上的生物信号，相比于 **Western blot** 和 **Northern blot** 更加简便，不需要转膜和设计特异性的探针，只需要将定好量的核酸直接点到尼龙膜上经过交联即可加抗体孵育进行检测，原理如图 1 所示。具体操作如下：

1. 制备高纯度的 **RNA** 样品，进行浓度测定后，取 500 ng 用 **DEPC** 处理水定容到 5 μ l 进行点样，5 μ l 样品液滴点样均质性比较稳定。
2. 点样前，需提前预热 干式恒温器至 70 °C，把干式恒温器的金属加热模块倒置，提供受热均匀的底板进行热交联。
3. 预热完毕后，裁剪大小合适的尼龙膜用透明胶带固定在 96 孔 PCR 管架上，膜面向下倒扣在金属板面上，在对应的孔中点入对应样品。
4. 一次性吸取 5 μ l 样品进行准确点样，点样完毕后在金属板面上静置热交联 15 min。

注：操作过程中不要移动点膜装置。

5. 待样品干透后去掉透明胶，用镊子把膜放到紫外交联仪中进行交联，按照总能量 2000 KJ 为单位进行交联，自动释放完能量即可，无需记时，再重复一次同样的，并尽量把膜靠近光源，可以用枪头盒架高。
6. 交联完成后，小心将膜的正面（点样的一面）转移到抗体孵育盒中，加入 3% BSA (bovine serum albumin) 放置在水平摇床中室温封闭 1 h 或者 4 °C 封闭过夜。
7. 封闭完成之后，将膜放到含有 1:2,000 的 3% BSA 溶液稀释的 m6A 抗体的抗体孵育盒中，室温进行一抗孵育 2 h。
8. 用 0.1% TBST 洗膜 3 次，每次 5 min。再用 3% BSA 溶液按照 1:5,000 的比例稀释兔抗进行二抗孵育，室温孵育 1 h。
9. 用 0.1% TBST 洗膜 5 次，每次 5 min。
10. 沥干水后，按照 1:1 混匀化学显影液组分 A 和 B，均匀滴在膜上孵育 1 min，进行显影检测。
11. 检测后，用 0.1% TBST 洗膜 3 次，每次 5 min。

12. 加入 1% 亚甲蓝染液进行本底核酸染色，染色 5 min 后，用 0.1% TBST 漂洗至信噪比降低，用白光进行检测。

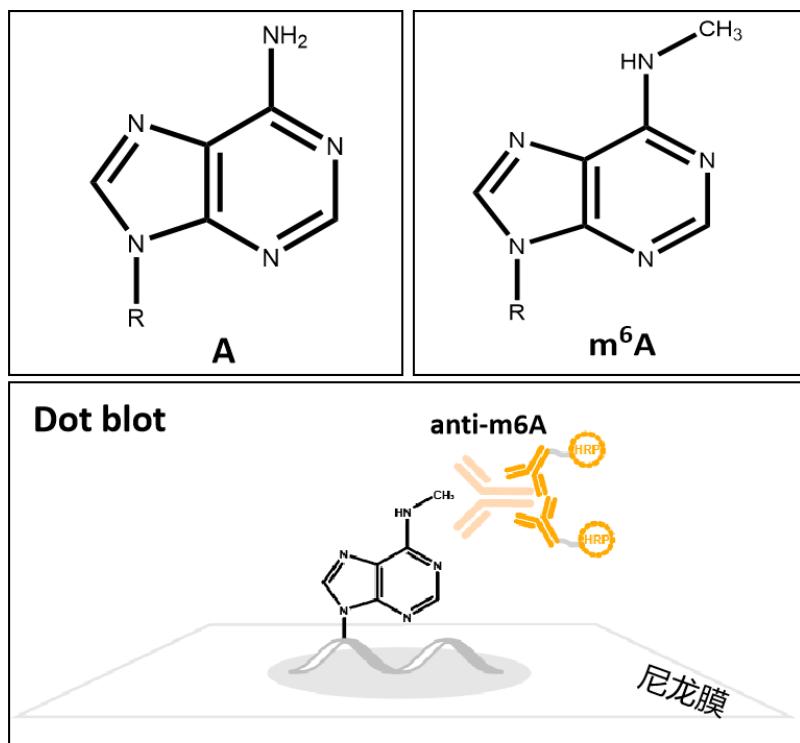


图 1. A 与 m6A 的化学式与 dot-blot 的检测原理

三、T3 连接酶法检测 RNA 寡聚核苷酸链的 m6A 修饰

刘等人最先报道了一种基于 RNaseH 裂解特定单个 m6A 位点的定量方法，该方法需要位点特异性裂解和放射性标记，再进行连接辅助提取和薄层色谱分离 (SCARLET) (Liu *et al.*, 2013)。虽然这个方法可以对 m6A 位点进行准确定量，但是多个酶的处理步骤和分离导致实验流程异常繁琐，需要一定的实验经验，况且该实验需要用到昂贵的试剂并且需要进行放射标记，使得该方法运用受到限制。最近，E. T. Kool 等人鉴定了甲基敏感性的聚合酶 Tth 在进行延伸反应过程中可以区分 A 和 m6A，影响了 T 碱基的掺入从而导致延伸阻碍 (Harcourt *et al.*, 2013)。周等人也报道了 Bst DNA 聚合酶可以阻碍 RNA 引导的 DNA 合成 (Wang *et al.*, 2016)。通过在 DNA 聚合酶中的探究，基于探针延伸来研究单个特定位点的 m6A 方法已经基本得到了建立。但是这些方法都需要放射标记或者荧光标记，而且这些方法的检测灵敏度还有所欠缺，由于缺少扩增的步骤使得低丰度的样品检测非常困难。这些方法对于 A 和 m6A 的区分度仅仅相差了十几倍，不

足以检测各种复杂的样品。在此，我们介绍一种具有更高灵敏度的 T3 连接酶法来检测 RNA 的 m6A 修饰。具体操作如下：

1. 按照序列设计靶点左右两边的检测探针和 PCR 引物，如图 2 所示。

注：探针 L 的 5' 端需要加磷酸修饰，探针 R 的 3' 末端两个脱氧核糖改为核糖 (Liu et al., 2018)。

2. 配置连接反应混合物 A，进行探针退火。反应混合物 A 包括 1 μ l 探针 L (20 nM), 1 μ l 探针 R (20 nM), 1 μ l 10x T3 连接缓冲液，以及 1 μ l RNA 模板 (100-300 ng)，最后加 DEPC 处理水定容到 9 μ l，放进 PCR 仪中进行 85 °C 加热 3 min。反应结束后，在冰上静置。

注：RNA 需要先在 85 °C 加热 3 min 进行变性。

3. 配置连接反应混合物 B，进行连接反应。经过条件测试，加入 1 μ l 适量稀释的 T3 DNA 连接酶 (稀释 10-50 倍)，在 35 °C 孵育 10 min 后，放到 PCR 仪中 65 °C 反应 10 min 失活连接酶。

注：配置连接酶体系操作需要在冰上操作。

4. 取 1 μ l 的连接产物，配置 PCR 体系。加入 2x Taq mix、通用引物和连接产物，用 DEPC 水定容至 20 μ l，放到 PCR 仪中扩增 24 个循环。
5. 往 5 μ l PCR 样品中加入 1 μ l 6x DNA 上样缓冲液混匀后上样到 2.5% 琼脂糖凝胶中，在 0.5x TAE 缓冲液中恒压 120 V 电泳 40 min，检测信号。

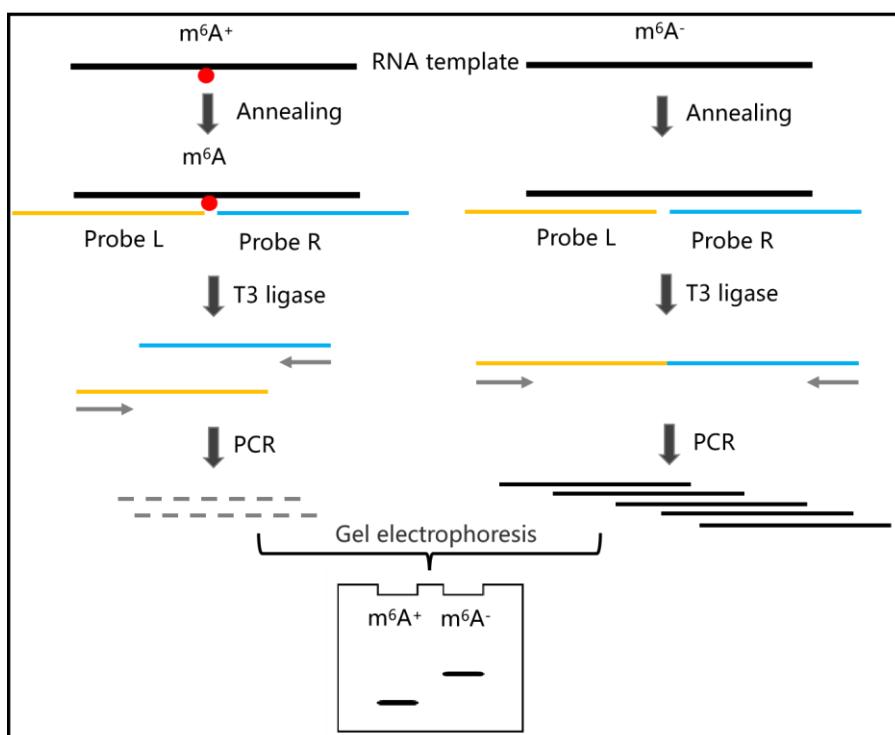


图 2. T3 连接酶法检测 m6A 修饰示意图

四、MazF 核酸内切酶法检测 RNA 寡聚核苷酸链的 m6A 修饰

最近有报道称,一种来源于大肠杆菌毒素家族的 RNA 核糖核酸内切酶 MazF 对 RNA 中的 ACA 基序有甲基敏感性,能特异地裂解未甲基化的 ACA 基序,而保持甲基化 (m6A) CA 基序不被裂解 (图 3),因此可以用来鉴定 m6A 修饰的位点 (Imanishi *et al.*, 2017)。具体操作如下:

1. 取 10 pmol RNA oligo 与 2.5 U MazF 酶和 5x MazF buffer 用 DEPC 处理水配置成 20 μ l 反应体系, 放入 PCR 仪中 37 °C 孵育 30 min, 反应后再 65 °C 反应 10 min 进行失活。

注: RNA 样品反应前需要先在 85 °C 加热 3 min 进行预变性。

2. 反应完后, 取 5 μ l 样品加入 1 μ l 6x DNA loading buffer 混匀后上样到 10% 尿素-聚丙烯酰胺胶中, 在 0.5x TBE 电泳缓冲液中恒压 150 V 电泳 30 min, 进行分离鉴定。

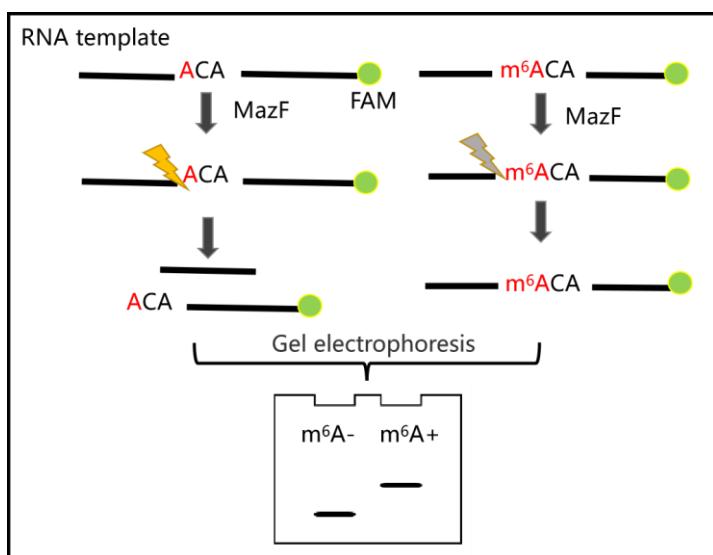


图 3. MazF 酶切 RNA 片段的原理图

结果与分析

一、哺乳动物细胞总 RNA 提取

1. 纯度分析

a. 用 NanoDrop 对提取的 RNA 进行纯度鉴定

RNA 质检参数有 OD_{260}/OD_{280} 、 OD_{260}/OD_{230} ，它们的分别代表了不同的成分： 260 、 280 、 230 nm 下的吸光度分别代表了核酸、蛋白质、盐浓度和有机溶剂的值。 A_{230} : 测定其它碳源物质，如酚，糖类等； A_{260} : 核酸的吸收峰，用于检测 RNA、DNA、引物等浓度； A_{280} : 蛋白质的吸收峰。一般来说， OD_{260}/OD_{280} (Ratio, R) 在 1.8 - 2.1 范围内时，我们认为 RNA 中蛋白的污染是可以容忍的，但是，用三羟甲基氨基甲烷 (Tris) 作为缓冲液检测吸光度时，R 值可能会大于 2 (一般应该是 < 2.2 的)。当 $R < 1.8$ 时，溶液中蛋白的污染比较明显，可以根据自己的需要决定是否使用该 RNA 样品。当 $R > 2.2$ 时，说明 RNA 已经水解成单核酸了。纯 RNA 的 OD_{260}/OD_{280} 的比值为 2.0 。

b. 用 1% 琼脂糖凝胶电泳法对提取的 RNA 进行纯度和完整性鉴定

真核生物的 RNA 在凝胶电泳时会呈现 3 条核糖体 RNA 的主带： $28s$ 、 $18s$ 、 $5.8s$ (图 4)。纯度高的 RNA 无多余的降解条带或者拖带现象， $28s$ 比 $18s$ 一般为 $2:1$ ， $5.8s$ 比较弱，发生降解的 RNA 的 $5.8s$ 条带会出现明显聚集。如果出现比 $28s$ 高的条带一般判断为基因组污染。如果出现了基因组污染，可以加入 DNaseI

进行消化处理；如果出现高位置拖带或者堵孔现象，原因可能是蛋白质或者盐离子污染，可以再次纯化去除杂质。

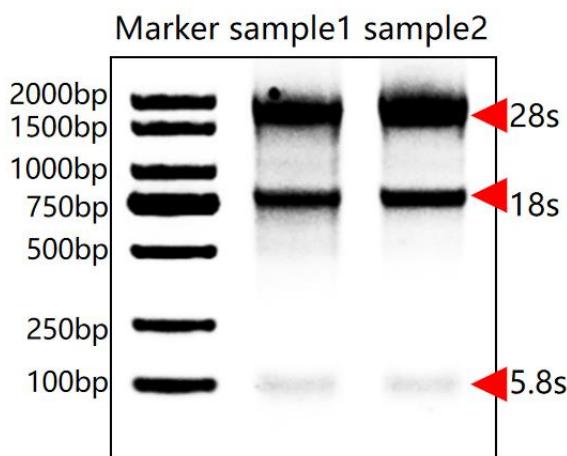


图 4. HEK293T 细胞的 RNA 凝胶电泳图

2. 浓度分析

- 用 NanoDrop 对提取的 RNA 进行浓度鉴定。
- 用 Qubit 对提取的 RNA 进行浓度鉴定

3. 完整性分析

以 Agilent Bioanalyzer 进行毛细管电泳 (capillary electrophoresis)，并以软件的 RIN(RNA Integrity Number) 分数评估，10 为 RNA 完整性最好，0 为最差。

二、Dot-blot 检测 m6A 修饰

实验结果如图 5 所示，阴性对照组无信号，m6A 修饰组信号明显，在亚甲蓝染色中显示两组点样量一致。如果抗体显色不明显，注意检查抗体的批次质量；如果背景过强，可以增加封闭的时间和洗膜的时间。如果亚甲蓝显色不明显，可以适当增加染色时间。

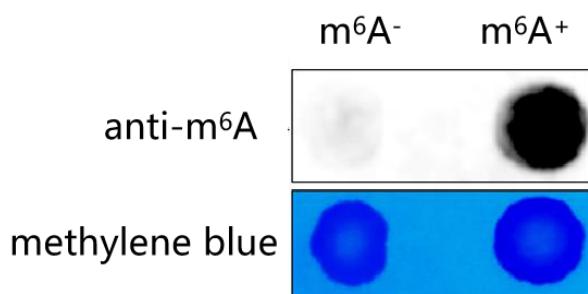


图 5. Dot-blot 检测 m6A 修饰的效果

三、T3 连接酶法检测 m6A 修饰

经过核酸凝胶电泳检测的结果如图 6 所示，胶上面可见有三条主带，包括连接产物带，游离的探针和 PCR 引物带。在 m6A 修饰 RNA oligo 组中，无明显产物带，只有游离的探针和 PCR 引物带；在无 m6A 修饰 RNA oligo 组中，有明显的产物带，剩余少量的游离的探针和 PCR 引物。本实验针对每个位点的作用条件都不同，要根据使用模板、具体位点的序列来调整酶的反应浓度和反应时间等。

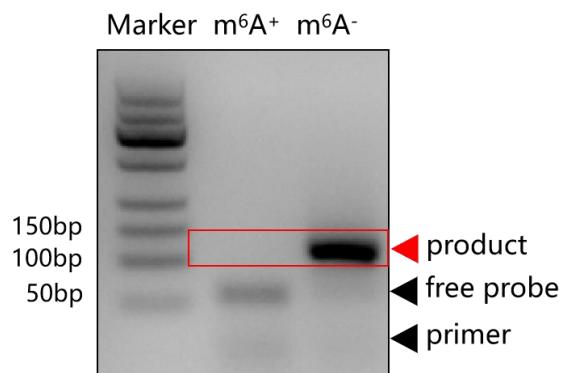


图 6. T3 连接酶法检测 m6A RNA oligo 的结果

四、MazF 核酸内切酶法检测 m6A 修饰

MazF 酶切反应结果如图 7 所示，含有 m6A 修饰的 RNA 片段不能被 MazF 切开，而不含有 m6A 修饰的 RNA 片段能被 MazF 切开。由于 RNA 片段 3'端带有 FAM 荧光基团修饰，所以在胶上显示出切下的剩余 13 nt 的条带。注意该实验要避免 RNA 酶的污染，如果是自己纯化的 MazF 蛋白，可以在体系中适当加入 RNA 酶抑制剂进行反应。

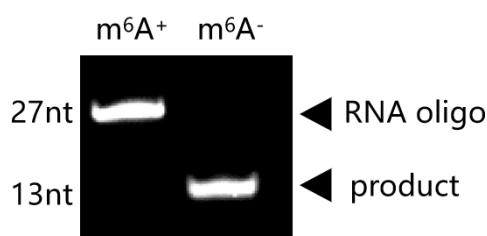


图 7. MazF 酶切 RNA 片段的结果

溶液配方

1. 75%乙醇

750 μ l 无水乙醇、250 μ l DEPC 处理水，两者混匀，现配现用。

2. 0.1%TBST:

在 500 ml 1x TBS 中加入 500 μ l Tween-20，进行充分混匀后静置，等泡泡消失后使用。

3. 3%BSA

在 100 ml 0.1% TBST 中加入 3 g BSA 粉末，手动混匀后需要放在摇床上继续混匀 30 min，确保 BSA 中的细小颗粒充分溶解。

4. 1%亚甲蓝染液

吸取 1 ml 100x 亚甲蓝染色加入 99 ml DEPC 处理水中进行混匀，静置后使用。

5. 2.5%琼脂糖凝胶

称取 1.25 g 琼脂粉加入 50 ml 的 0.5x TAE 中，放入微波炉中进行融化，完全融化后，等温度降到 70 °C 左右加入按照 1:10000 稀释的 gel-red 核酸染料，再倒入制胶槽中。

6. 10%尿素-聚丙烯酰胺胶

在小烧杯中称取 7.2 g 尿素，加入 7 ml DEPC 处理水，放到磁力搅拌器上搅拌溶解。再分别加入 3.8 ml 5x TBE，4 ml 30%丙烯酰胺，120 μ l 10% APS，16 μ l TEMED，混匀后灌入制胶模具中。

7. 10% APS

称取 1 g APS 粉末加入 10 ml DEPC 处理水中混匀，可分装成小管进行储存使用，要放在 4 °C 中进行保存。

参考文献

1. Shi, H., Wei, J. and He, C. (2019). [Where, when, and how: context-dependent functions of RNA methylation writers, readers, and erasers](#). *Mol Cell* 74: 640-650.
2. Yang, Y., Hsu, P. J., Chen, Y. S. and Yang, Y. G. (2018). [Dynamic transcriptomic m6A decoration: Writers, erasers, readers and functions in RNA metabolism](#). *Cell Res* 28: 616-624.
3. Barber, B. A. and Rastegar, M. (2010). [Epigenetic control of Hox genes during neurogenesis, development, and disease](#). *Ann Anat - Anat Anzeiger* 192: 261-274.
4. Chen, X. Y., Zhang, J. and Zhu, J. S. (2019). [The role of m6A RNA methylation in human cancer](#). *Mol Cancer* 18: 103.
5. Fu, Y., Dominissini, D., Rechavi, G. and He, C. (2014). [Gene expression regulation mediated through reversible m 6 A RNA methylation](#). *Nat Rev Genet* 15: 293-306.
6. Duan, H. C., Wang, Y. and Jia, G. (2019). [Dynamic and reversible RNA N 6 -methyladenosine methylation](#). *Wiley Interdiscip Rev RNA* 1: e1507.
7. Hartstock, K. and Rentmeister, A. (2019). [Mapping N 6 -Methyladenosine \(m 6 A\) in RNA: established methods, remaining challenges, and emerging approaches](#). *Chem Eur J*
8. Zhao, L. Y., Song, J., Liu, Y., Song, C. X. and Yi, C. (2020). [Mapping the epigenetic modifications of DNA and RNA](#). *Protein Cell* 11(11): 792-808.
9. Shu, X., Cao, J., Cheng, M., Xiang, S., Gao, M., Li, T., Ying, X., Wang, F., Yue, Y., Lu, Z., Dai, Q., Cui, X., Ma, L., Wang, Y., He, C., Feng, X. and Liu, J. (2020). [A metabolic labeling method detects m6A transcriptome-wide at single base resolution](#). *Nat Chem Biol* 16: 887-895.
10. Wang, Y., Xiao, Y., Dong, S., Yu, Q. and Jia, G. (2020). [Antibody-free enzyme-assisted chemical approach for detection of N 6-methyladenosine](#). *Nat Chem Biol* 16: 896-903.
11. Liu, W., Yan, J., Zhang, Z., Pian, H., Liu, C and Li, Z. (2018). [Identification of a selective DNA ligase for accurate recognition and ultrasensitive quantification of: N 6-methyladenosine in RNA at one-nucleotide resolution](#). *Chem Sci* 9: 3354-3359.
12. Zhang, Z., Chen, L. Q., Zhao, Y. L., Yang, C. G., Roundtree, I. A., Zhang, Z. J., Ren, J., Xie, W., He, C. and Luo, G. Z. (2019). [Single-base mapping of m 6 A by](#)

an antibody-independent method. *Sci Adv* 5: eaax0250.

13. Liu, N., Parisien, M., Dai, Q., Zheng, G., He, C. and Pan, T. (2013). Probing N6-methyladenosine RNA modification status at single nucleotide resolution in mRNA and long noncoding RNA. *RNA* 19: 1848-1856.
14. Harcourt, E. M., Ehrenschwender, T., Batista, P. J., Chang, H. Y. and Kool, E. T. (2013). Identification of a selective polymerase enables detection of N6-methyladenosine in RNA. *J Am Chem Soc* 135: 19079-19082.
15. Wang, S., Wang, J., Zhang, X., Fu, B., Song, Y., Ma, P., Gu, K., Zhou, X., Zhang, X., Tian, T. and Zhou, X. (2016). N6-Methyladenine hinders RNA- and DNA-directed DNA synthesis: application in human rRNA methylation analysis of clinical specimens. *Chem Sci* 7: 1440-1446.
16. Imanishi, M., Tsuji, S., Suda, A. and Futaki, S. (2017). Detection of: N 6-methyladenosine based on the methyl-sensitivity of MazF RNA endonuclease. *Chem Commun* 53: 12930-12933.