



化学反应驱动的修饰核酸检测技术

方振天¹, 王雅芬^{2*}, 周翔^{1*}

1. 武汉大学化学与分子科学学院, 武汉 430072

2. 武汉大学公共卫生学院, 武汉 430071

*通讯作者, E-mail: yfwang@whu.edu.cn; xzhou@whu.edu.cn

收稿日期: 2025-02-04; 接受日期: 2025-03-17; 网络版发表日期: 2025-03-24

国家重点基础研究发展规划(编号: 2023YFC3402200)和国家自然科学基金(编号: 92153303, 22377096, 22407105)

摘要 修饰核酸在多种生命过程中发挥关键作用, 如调节基因表达、调控RNA稳定性和影响蛋白质翻译等. 深入理解修饰核酸的调控机制, 有助于提升人们对基因相关疾病的认知, 并促进新型诊疗策略的开发. 为了探究这些修饰核酸的功能, 研究者开发了各类结合高通量测序的检测技术. 基于化学工具对修饰核酸进行定位和定性分析具有显著的优势, 本文总结了近年来开发的化学反应驱动的修饰核酸检测技术, 展示了化学工具在生物领域中的重要作用.

关键词 核酸修饰, 修饰检测, 化学反应驱动, 高通量测序, 化学生物学

1 引言

遗传信息在生命体内以DNA中的经典脱氧核糖核苷酸(胞苷、鸟苷、腺苷和胸苷)以及RNA中的核糖核苷酸(胞苷、鸟苷、腺苷和尿苷)为基础存储^[1~3]. 然而, 近几十年的研究发现, DNA^[4]和RNA^[5]上分别存在40种和170多种不同的化学修饰(图1), 这些修饰核酸形成遗传的第二层信息, 通常被称为表观遗传学, 并参与调控转录和翻译等重要的生命过程^[3,6,7].

DNA修饰在人体的多种生物过程和疾病中起着重要作用, 包括发育、衰老和癌症等. 这些修饰不会改变或干扰经典的Watson-Crick碱基互补配对, 但会影响双螺旋大沟中的DNA-蛋白质相互作用^[3]. 在哺乳动物基因组中, 胞嘧啶碳5号位的甲基化(5-甲基胞嘧啶, 5mC)是最主要的DNA修饰, 也被称为“第五号碱基”.

5mC由DNA甲基转移酶(DNMT)催化, 主要存在于CpG二核苷酸区域, 在哺乳动物基因组中, 70%~80%的CpG被甲基化, 而在一些特定的区域如启动子中的CpG, 通常不被甲基化^[8,9]. 通过影响与DNA相互作用的蛋白质结合, DNA甲基化能够调控基因的表达活性, 进而影响原癌基因与抑癌基因的表达, 这对肿瘤的发生具有重要影响^[10,11]. 5mC可进一步被TET酶催化转化为5-羟甲基胞嘧啶(5hmC), TET酶介导的进一步连续氧化导致形成5-醛基胞嘧啶(5fC)和5-羧基胞嘧啶(5caC)^[12~16]. 这两种氧化产物通常被认为是活性DNA去甲基化途径的中间体, 它们被胸腺嘧啶DNA糖基化酶(TDG)切除, 并通过碱基切除修复(BER)途径恢复为未修饰的胞嘧啶^[17~19]. 有研究表明这些氧化产物本身在调控基因表达方面发挥作用, 如5fC在增强子中高度富集, 这提示5fC可能调控基因的转录和表达^[20].

引用格式: Fang Z, Wang Y, Zhou X. Chemical reaction-driven detection technologies for modified nucleic acids. *Sci Sin Chim*, 2025, 55: 949–961, doi: 10.1360/SSC-2025-0019

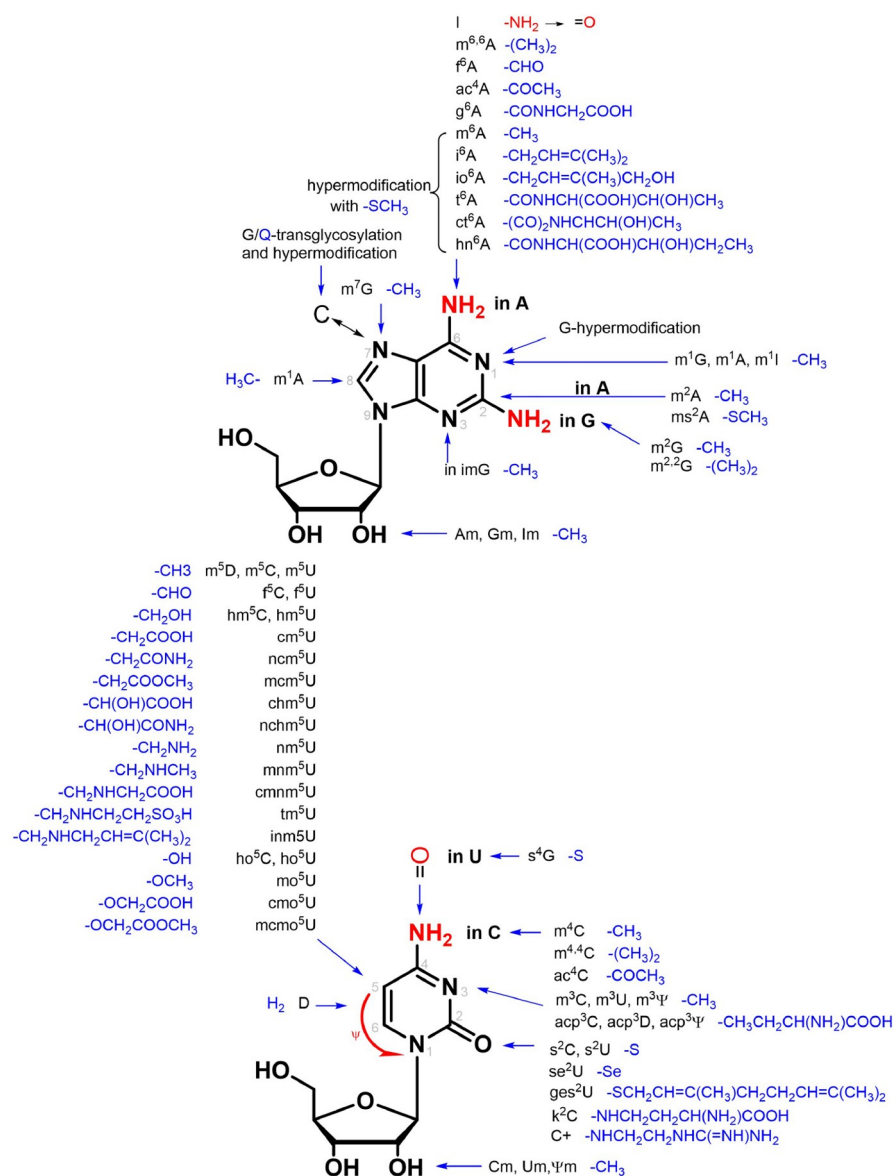


图 1 (网络版彩图)部分修饰核酸示意图
Figure 1 (Color online) Schematic diagram of partially modified nucleic acids.

与DNA类似, RNA也存在多种化学修饰, 这些修饰参与基因表达与RNA代谢等多个生命过程。不同的是, RNA不仅修饰种类远多于DNA, 且一些修饰碱基还会影响经典的Watson-Crick碱基互补配对及RNA-蛋白质相互作用^[5]。在转录组中, 腺嘌呤氮6号位甲基化(N⁶-甲基腺嘌呤, m⁶A)是最主要的RNA修饰之一, 其由RNA甲基转移酶(如METTL3、METTL14和WATP蛋白复合物)催化形成^[21]。m⁶A具有显著的规律性与保守

性, 主要集中在转录本的3'UTR区域和附近的终止密码子,分布的主要基序为DRACH (其中D = A, G或U; R = A或G; H = A, C或U)。m⁶A可以被去甲基化酶如FTO氧化脱去甲基, 因此m⁶A是动态变化的。许多环境因素(如紫外线照射)和生理因素(如生物钟的紊乱、炎症应激反应、神经行为或免疫反应)会影响m⁶A的稳态调节, 当m⁶A的稳态调节出现异常时, 可能导致蛋白翻译的错误, RNA相关的调节功能丧失, 从而引发癌

症等疾病的发生^[22]. 仅考虑一些常见修饰碱基, 如 m^6A 、次黄嘌呤(I)、 N^1 -甲基腺嘌呤(m^1A)、5-甲基胞嘧啶(m^5C)等, 已有超过175种疾病或病理生理状况与RNA修饰有关^[23]. 在稀有碱基修饰中, 如Dumelin等^[24]对2-香叶基尿苷的研究、Sakai等^[25]对5-羧酸甲酯尿苷的研究等都说明稀有修饰碱基在转录翻译过程中也起着重要的调控作用.

核酸修饰功能研究离不开新型检测技术的发展. 人们对DNA和RNA修饰功能及相关分子机制研究兴趣的持续增长, 进一步推动了用于检测基因组和转录组中的特异性修饰核酸的检测工具的开发. 鉴于部分修饰丰度低且化学性质多样, 准确检测和定位这些修饰面临着更大的挑战. 为了深入探究这些修饰的核苷的生物学作用, 亟需开发特异性标记、检测并富集修饰核酸的工具, 而化学探针分子具有明显的优势. 本综述介绍了化学反应驱动的修饰核酸的检测方法, 重点聚焦于近三年来化学反应驱动DNA和RNA修饰的检测策略, 阐述了其生物学发现, 并探讨了尚需解决的问题.

2 修饰核酸检测技术方向

随着修饰碱基检测方法的不断进步, 研究者获得了更多深入探索这些修饰核苷生物学功能的有力工具. 然而, 修饰碱基的低丰度显著增加了检测方法开发的难度. 例如, 在真核细胞内mRNA中, 丰度较高的 m^6A 仅占0.2%~0.6%^[22], 而其他低丰度或稀有修饰的占比甚至低于万分之一乃至十万分之一^[3,5], 这对检测的精度和灵敏度提出了极高要求.

超高效液相色谱-串联质谱(UHPLC-MS/MS)虽然可利用各种内参或衍生化进行精确的痕量定量分析, 但无法在基因组或转录组层面实现对修饰碱基的定位分析. 此外, 该方法需将核酸样品消化酶解为单个核苷, 这不仅导致核酸序列信息丢失, 还可能引入外源性污染. 在分离不同亚细胞器或不同种类RNA时, 分离方法造成的残留也可能产生严重的假阳性. 下一代测序技术(NGS)的发展, 使得修饰碱基的单碱基检测成为可能. NGS以高通量和高分辨率对数十亿个核酸分子进行大规模快速测序, 结合生物信息学分析和人工智能分析, 提供了核酸修饰的准确定位及定量信息, 为研究其生理功能提供了更坚实的数据支撑, 从而催

生了多种基于NGS的检测方法.

由于不同修饰碱基的化学性质各异, 研究者基于这些性质开发了不同的检测方法^[3]. 迄今为止, 已经成功绘制了几十种化学修饰图谱(表1), 包括DNA的5mC、5hmC、5fC、5caC、 N^6 -甲基脱氧腺苷(6mA), RNA的 m^6A 、 N^6 -2'-O-二甲基腺苷(m^6Am)、 m^5C 、5-羟甲基胞嘧啶(hm 5C)、5-醛基胞嘧啶(f 5C)、I、假尿嘧啶(Ψ)、 m^1A 、2'-O-甲基化(Nm)、 N^4 -乙酰胞苷(ac 4C)、 N^7 -甲基鸟苷(m^7G)、2-甲硫基- N^6 -异戊烯基腺苷(ms $^{2,6}A$)、二氢尿嘧啶(DHU)和糖基化RNA (GlycoRNAs)等. 这些检测方法大致分为两类: 一类是基于特异性蛋白质如抗体、酶类等的独特功能进行检测; 另一类则是基于特异性化学反应对单个修饰碱基进行特殊转化检测.

2.1 基于特异性蛋白质的修饰核酸检测策略

蛋白质作为生理活动的执行者, 其专一性和高效性在修饰碱基检测方法开发中发挥了重要作用. 修饰核酸的低丰度增大了其检测难度, 使得增强修饰核酸片段信号成为常见策略. 商业化抗体的发展使得基于抗体富集的策略成为有力的检测手段. 抗体富集测序方法的基本原理是利用对修饰核酸具有高特异性和亲和力的抗体进行免疫沉淀, 然后通过高通量测序比较和分析富集的片段与背景片段的差异, 从而获得修饰位点分布信息. 以典型的 m^6A 为例, 研究者采用 m^6A 特异性抗体联用免疫共沉淀技术的MeRIP-seq (m^6A -seq)^[26,27]富集含 m^6A 的RNA片段. 然而, 抗体富集方法通常分辨率低, 只能将修饰定位到大约100 nt片段. 为优化此策略的miCLIP-seq技术^[28]应运而生, 通过紫外线照射在交联位点诱导T到C的突变或截断, 实现单碱基分辨率的测定.

另一种策略是使用具有特异反应性的酶对修饰碱基进行酶催化反应. 如Garcia-Campos等^[29]开发的MAZTER-seq技术用RNA酶MazF特异性切割无甲基化修饰的ACA位点, 而不切割含 m^6A ACA位点, 通过高通量测序实现对 m^6A ACA位点修饰进行单碱基定量分析. 由于ACA含量只占DRACH的16%左右, 难以对 m^6A 进行无偏好检测. Yuan等^[2]利用脱氨酶eA3A-M5对C、5mC和5hmC表现出不同的脱氨能力, 开发了EDA-seq技术, C经历完全脱氨并读作T, 5mC部分脱氨读作T和C的混合, 而5hmC未脱氨读作C, 进而能够

表 1 部分修饰核酸的测序方法

Table 1 NGS methods for partially modified nucleic acids

	修饰核酸	特殊蛋白	化学驱动	
DNA	6mA	6mA-DIP	DR-6mA-seq	
		6mA-CLIP-exo DA-6 mA-seq		
	5mC	Me-DIP	BS-seq	
		hme-DIP		
		GLIB-Seq		
		CMS-DIP		
		JBPI-DIP		
	5hmC	hMeSeal-Seq	oxBS-Seq	
		SCL-exo		
		Aba-Seq		
Pvu-Seal-Seq RRHP TAB-Seq				
5fC	fCSeal-seq	5fC-DIP fC-CET redBS-Seq fCAB-Seq CLEVER-Seq		
	MAB-Seq			
	5caC		5caC-DIP	DIP-CAB-Seq
			MAB-Seq	
5hmU		5hmU-DIP		
5fU		Aldehyde-reactive probe		
Base J	BaseJ-DIP			
RNA	m ⁶ A	m ⁶ A-Seq	m ⁶ A-label-Seq m ⁶ A-SAC-Seq GLORI	
		MeRIP-Seq		
		PA-m ⁶ A-Seq		
		miCLIP		
		m ⁶ A-LAIC-Seq		
		m ⁶ A-SEAL-Seq MAZTER-seq m ⁶ A-REF-seq DART-Seq		
	m ¹ A-	m ¹ A-Seq	OH ⁻ Dimroth Mild Chemical Conditions	
		m ¹ A-ID-Seq		
		m ¹ A-MAP-Seq m ¹ A-Seq-TGIRT m ¹ A-quant-seq		
	m ⁵ C/h m ⁵ C	m ⁵ C-RIP-Seq miCLIP-Seq Aza-IP	modified BS-Seq	
ac ⁴ C	acrIP-Seq	ac ⁴ C-Seq		
ψ	PA-ψ-Seq	CeU-Seq Pseudo-Seq ψ-Seq PSI-Seq BID-Seq PRAISE		
m ⁷ G	m ⁷ G-MeRIP-Seq m ⁷ G-miCLIP-Seq	m ⁷ G-MaP-Seq m ⁷ G-quant-Seq		

特异性地同时定量C、5mC和5hmC, 但是针对其他稀有修饰的特异性酶的开发仍面临重重困难。

2.2 基于特异性化学反应驱动的修饰核酸检测策略

除了特异性蛋白具有高效性与专一性外, 部分化学反应同样展现出这一特性. 因此, 利用特异性化学条件或化学反应对修饰碱基进行检测, 已成为一种重要的检测手段. 最典型的方法是5mC检测的金标准BS-seq^[30]. 在BS-seq中, 胞嘧啶碳6号位在亚硫酸氢盐(BS)和酸性条件下易发生脱氨反应, 形成尿嘧啶; 而胞嘧啶C5号位的甲基化增加了嘧啶环中的电子密度, 使其不易与BS反应. 在高通量测序中, C读作T而5mC不变仍读作C, 从而实现特异性地在基因组水平上定量检测5mC. 5fC和5caC在BS条件下也可转化为尿嘧啶, 而5hmC虽被磺化但未脱氨. 因此, 常规的亚硫酸氢盐测序不足以区分5mC和5hmC. 不同的化学处理策略被提出以区分不同的胞嘧啶修饰, 如oxBS-Seq^[31]使用KRuO₄氧化5hmC至5fC, 再使用BS处理, 使用差减法区分5mC及5hmC达到检测5hmC的目的. 又如, fC-CET^[32]用于检测5fC, 使用小分子化合物对5fC进行特异性反应富集, 反应后的C读作T达到单碱基检测5fC的目的.

化学反应驱动的修饰碱基检测策略的一大优势在于, 修饰碱基的修饰基团具有独特的化学结构, 通过寻找与其特异性反应的化学条件即可实现高精度修饰碱基检测.

3 化学反应驱动的修饰核酸检测策略

在此, 根据是否引入富集手段, 将化学反应驱动的修饰核酸检测策略大致分为两类: 一类为基于包含富集效果的修饰检测; 另一类则为化学反应导致的碱基错配/缺失的修饰检测. 通过化学处理改变核苷酸碱基配对性质的检测策略已广泛应用于检测各种修饰核酸. 富集策略在提高低丰度核酸种类的核酸修饰检测及低化学计量修饰检测的检出限方面发挥着重要作用. 然而, 富集策略的引入会造成修饰碱基定量信息的丢失. 因此, 在开发新的化学反应驱动的检测方法时, 需要合理权衡是否引入富集策略.

在化学反应驱动的修饰核酸检测策略中, 还可以选择多种辅助联用技术. 例如, 代谢标记技术通过不

同的转移酶在基因组或转录组中引入不同的修饰碱基, 作为一种标记生物分子的方法, 通过使用具有底物兼容性的小分子类似物, 可将人为挑选的化学基团代谢至修饰位, 为缺乏特异性反应的修饰基团提供新的检测方向. 此外, 还可以利用酶催化反应引入新的化学特异性基团, 以实现后续特异性化学反应的目的.

3.1 基于化学反应富集的修饰核酸检测策略

通过化学特异性反应将修饰核酸加上click基团进行进一步生物素化或直接生物素化以富集检测低丰度修饰核酸是最主要的策略, 通过特殊处理以达成自富集效果也被应用于修饰核酸的检测(图2).

3.1.1 m^5C

m^5C 作为一种在基因表达调控中扮演关键角色且广泛存在的RNA修饰, 其位点鉴定仍面临显著挑战. 传统的BS-seq在处理过程中往往伴随着RNA的严重降解和序列复杂性降低, 因此开发更温和的检测手段显得尤为重要.

Li等^[33]创新性地开发了 m^5C -TAC-seq技术, 该技术首先利用TET酶将 m^5C 氧化成 f^5C , 随后用1,3-茛二酮的叠氮衍生物进行标记, 同时改变 m^5C 的氢键, 通过DBCO-S-S-Biotin与叠氮基团进行click反应, 将 m^5C 标记上Biotin基团, 进而利用Biotin-链霉亲和素(streptavidin, SA)相互作用实现含 m^5C 的RNA的富集, 并在逆转录时在 m^5C 处诱导C-to-T转变实现单碱基检测.

借助 m^5C -TAC-seq, 研究者进一步揭示了NSUN5 (一种已知的rRNA的 m^5C 甲基转移酶)在mRNA甲基化中发挥作用, 并发现NSUN2 (一种已知的tRNA和mRNA的 m^5C 甲基转移酶)也可以作用于rRNA、snoRNA和前体microRNA (pre-miRNA). 此外, 该技术还被用于评估细胞周期和细胞分裂相关的过程.

这种方法中的酶反应条件与化学反应条件对RNA表现出较高的温和性, 不会影响未修饰的C或造成其他副反应, 从而允许直接在低丰度和低序列复杂性RNA中进行 m^5C 的检测. 但由于TET酶介导的 m^5C -to- f^5C 氧化效率目前只有50%左右, 因此在选用小分子化合物时采用click基团的富集策略以提高灵敏度显得尤为重要, 但也因此, 该技术在单碱基水平并未实现绝对定量效果.

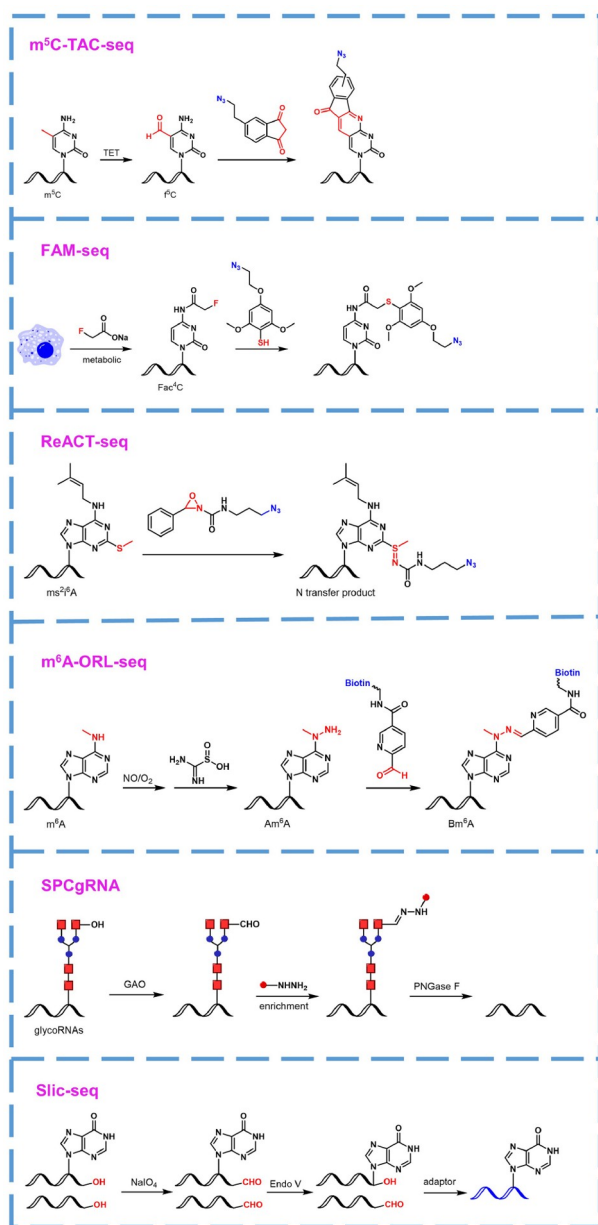


图2 (网络版彩图)基于化学反应富集的修饰核酸检测策略举例

Figure 2 (Color online) Examples of modified nucleic acid detection strategies based on chemical reaction enrichment.

3.1.2 m^6A

m^6A 的非活泼甲基基团使得开发基于 m^6A 的化学检测方法拥有显著的挑战性. 前期开发的方法主要基于抗体或者酶促化学反应, Zhou等^[34]提出了纯化学检测 m^6A 的方法, 为 m^6A 的检测开辟了新的研究途径.

Zhou等^[34]开发了 m^6A -ORL-Seq技术通过三步氧

化还原化学反应巧妙地将 m^6A 位点带上Biotin基团: 首先利用NO/O₂体系将 m^6A 氧化为含NO基团的Nm⁶A; 随后, 采用甲脒亚磺酸将NO基团还原为氨基, 形成带胍基的Am⁶A; 最后, 通过带Biotin的醛基与胍基反应生成带Biotin的Bm⁶A. 由此, 含 m^6A 的RNA通过Biotin-SA相互作用实现高效富集, 并在 m^6A 位点形成逆转录终止(RT-stop)效应, 从而实现单碱基水平的精准检测. 尽管 m^6A -ORL-Seq为 m^6A 检测提供了新颖的化学视角, 但该方法中NO的低特异性反应导致非 m^6A 碱基错配率提高了5倍以上, 达2.4%~3.2%. 这一局限性影响了该方法的广泛应用.

而通过使用代谢标记的方式也可以为 m^6A 位点带上click基团从而富集检测不活泼的 m^6A . Rentmeister等^[35]开发的MePMe-seq使用炔丙基硒高半胱氨酸(PSH)进行代谢标记, 当对细胞进行缺甲硫氨酸的培养基进行饥饿培养后, 消耗掉细胞的内源甲硫氨酸, 然后通过PSH取代甲硫氨酸进行后续孵育, 使得炔丙基被代谢入SAM分子的甲基位, 进而被甲基转移酶代谢入 m^6A 位点. 接着通过使用含叠氮的Biotin为 m^6A 位点带上Biotin, 再使用含SA磁珠富集含 m^6A 的RNA片段. 这里, 并不将磁珠洗脱下来, 而是将RNA连接在磁珠上后直接进行建库测序, 此时大位阻的磁珠会在 m^6A 位点形成RT-stop效应从而实现 m^6A 的单碱基水平的精准检测.

基于代谢的无偏好性, MePMe-seq可一定程度上同时检测 m^6A 与 m^5C , 对许多方法都无法找到的位点也有很好的检测性, 并且可以通过对不同的甲基转移酶的敲除来分析不同位点的甲基化修饰与不同甲基转移酶之间的关联性, 这也进一步说明使用甲硫基转移酶进行开发的方式具有序列选择性. 而且, 不同甲基化修饰碱基的丰度差别很大, 这也使得低丰度甲基化修饰信息在MePMe-seq中易被高丰度甲基化修饰信息淹没, 在通过RT-stop进行聚类分析修饰位点时, 其关联性有待进一步提高.

3.1.3 ac^4C

ac^4C 作为NAT10介导的修饰碱基, 已被发现影响多种细胞中的生命活动. 然而, 由于其非活泼的乙酰基团特性, ac^4C 的检测仍面临诸多挑战. 前期开发的 ac^4C -seq^[36]化学方法采用高还原活性的氰基硼氢化钠(NaCNBH₃), 容易引发副反应, 进而影响测序结果, 因

此, 开发一种可靠且适用于全转录组范围 ac^4C 的检测方法十分必要.

氟原子具有独特的生物正交性、电子效应和空间位阻效应, 在生物分子修饰中展现出潜在价值. 鉴于氟原子与氢原子在范德华半径上的相似性以及C-F与C-H键长的一致性, 氟原子有时可替代生物分子中的氢原子而不影响其生物活性. Zhou等^[37]开发的FAM-seq通过使用氟乙酸钠作为代谢小分子, 在NAT10的介导下, 将 ac^4C 位点代谢标记为Fac⁴C. 随后通过氟硫置换反应, 使用含叠氮基团的苯硫酚小分子与Fac⁴C反应, 将 ac^4C 标记上叠氮基团, 进而利用DBCO-S-S-Biotin与叠氮基团进行click反应, 富集含有 ac^4C 的RNA片段.

FAM-seq作为一种代谢标记方法, 具有广泛的适用性, 对于任何 ac^4C 序列均无偏好性, 且不受细胞类型限制, 可用于不同生物体系中RNA的 ac^4C 检测. 然而, 该方法的局限性在于未能实现单碱基水平的检测, 目前仅能通过生物信息学分析统计可能的CCG基序.

3.1.4 I

A-to-I编辑是最丰富的RNA修饰之一. 它由ADAR蛋白家族的酶催化, 作用于dsRNA结构中的A, 使A编辑为I^[38]. 这一编辑事件与多种关键的生物过程密切相关, 包括氨基酸改变、RNA剪切、核内保留、RNA干扰和先天性细胞免疫等. 此外, 编辑活性的异常改变也与多种病理状态有关, 如神经系统疾病和癌症^[39]. 然而, 以往开发的检测方法普遍存在灵敏度有限或高假阳性率的问题, 因此, 开发高灵敏度和高准确性的A-to-I编辑检测方法仍面临显著挑战.

Zhou等^[40]开发了Slic-seq技术利用高碘酸钠(NaIO₄)对邻二醇的氧化特性, 首先将RNA 3'末端核苷上的2',3'-OH氧化形成二醛结构. 随后, 利用核酸内切酶V (Endo V)在I位点特异性切断RNA, 生成具有正常2',3'-OH的RNA 3'末端. 在这一处理过程中, 建库时的接头蛋白仅能连接含I的转录本并实现逆转录, 从而形成自富集效果. 最终, 通过测序富集含I的RNA, 在I位点形成截断效果, 实现单碱基水平的检测.

通过将Slic-seq应用于多种细胞系, 研究者评估了A-to-I编辑位点在3'UTR保守性. 这些高丰度的保守位点可能对RNA结合蛋白产生影响. 在小鼠神经模型中发现神经元活动相关基因的A-to-I编辑减少, 暗示A-to-I编辑与神经元活性存在潜在关联. Slic-seq集成了

富集、截断和自身的突变信号的多重优势, 显著提高了重复和非重复序列的检测范围和准确性. 该方法几乎不受单核苷酸多态性(SNP)的影响, 展现出在其他物种和进一步研究编辑功能方面的广泛应用潜力. 然而, 该方法的定量能力尚存在一定不足.

3.1.5 GlycoRNAs

GlycoRNAs, 这一新兴的RNA修饰形式, 直至2021年才被Flynn等^[41]证实确实存在于细胞膜表面的RNA上, 并参与免疫功能. 这一发现激发了研究者对GlycoRNAs的广泛兴趣, 包括哪些RNA底物被糖基化、RNA如何经历聚糖翻译后修饰、RNA糖基化的具体位置以及glycoRNA的改变如何影响细胞功能等. 因此, 开发针对GlycoRNAs的检测方法显得尤为迫切和必要.

Yang等^[42]开发了一种靶向糖基化RNA的固相化学酶方法(SPCgRNA). 该方法首先利用半乳糖氧化酶(GAO)将含半乳糖的聚糖特异性氧化为醛基, 随后通过含酰肼基团的树脂捕捉氧化的RNA进而纯化GlycoRNAs. 接着, 使用糖苷酶PNGase F切除糖基释放富集的GlycoRNAs, 进而进行small RNA建库测序得到GlycoRNAs的片段化信息.

使用SPCgRNA技术发现miRNA、snoRNA、snRNA、rRNA和Y-RNA均为GlycoRNAs底物. 进一步的研究表明, GlycoRNAs会影响细胞的增殖和迁移, 甚至调控细胞凋亡和细胞周期. 该方法反应条件温和, 适用于小片段RNA分析. 然而目前仍难以实现单碱基及定量分析.

3.1.6 ms^2i^6A

ms^2i^6A 作为一种高度修饰的稀有碱基, 已报道参与调控蛋白质翻译过程, 调控翻译过程中的密码子配对准确性, 提高翻译的保真度. 在真核细胞的线粒体中, ms^2i^6A 影响能量传递, 其甲硫转移酶及甲硫修饰的缺失与多种肌体病变密切相关^[43]. 然而, 针对 ms^2i^6A 化学的检测方法仍然缺失.

Zhou等^[44]开发的ReACT-seq通过使用与甲硫基特异性反应的含氧杂吡丙啶基团的小分子, 在甲硫基的孤对电子对氧杂吡丙啶基团进行亲核反应条件下, 通过控制溶剂极性, 得到氮转移产物, 从而在 ms^2i^6A 位点引入叠氮基团. 随后, 利用DBCO-S-S-Biotin与叠氮基团进行click反应用于富集含有 ms^2i^6A 的RNA片段, 由

于标记上的基团较大, 会在 ms^2i^6A 的位点产生RT-stop效果, 从而达到单碱基检测的目的.

通过此方法, 在*E. coli*样本中证实 ms^2i^6A 是一种高度保守的修饰碱基, 可能只存在于tRNA中而不存在于其他类型RNA中. ReACT-seq的化学反应条件温和和高效, 也具备良好的拓展性, 可用于其他物种中含甲硫基腺苷的修饰碱基, 该技术的缺点在于采用了富集的策略使其无法实现绝对定量检测.

3.2 化学反应致碱基突变/缺失的修饰核酸检测策略

当特异性化学反应发生于修饰核酸的碱基互补配对区域时, 原本的修饰核酸的碱基互补配对规则发生改变, 通过比对这种错配率, 可以实现对修饰核酸单碱基定量检测(图3).

3.2.1 5mC

正如前文介绍的, BS-seq是5mC检测的金标准, 然而其仍然存在反应时间长、DNA降解严重等问题. 为克服这些局限, He等^[45]开发了UBS-seq, 通过提高BS试剂浓度和反应温度, 将反应速度提升了约13倍, 同时显著减少了DNA降解和背景噪音. 与传统的BS-seq相比, UBS-seq的假阳性更低, 基因组覆盖率更高, 定量结果更准确, 并且能够处理低至单细胞样本量的建库.

结合化学处理手段和单细胞RNA测序技术, 研究人员进一步开发了针对单细胞样本的5mC检测技术. Wu等^[46]提出的Joint-snhmC-seq利用优化的BS处理结合A3A脱氨酶, 实现了5mC和5hmC在单细胞水平上的单碱基检测. 该方法通过两步反应策略, 首先利用BS处理打断DNA链并诱导C-to-T突变, 而5mC保持不变, 5hmC转变为CMS-5hmC (测序仍读作C); 随后, A3A脱氨酶将5mC转变为T, 而CMS-5hmC保持不变. 通过差减, 实现了对5mC和5hmC的精确检测.

Yi等^[47]开发的SIMPLE-seq通过使用不含BS的化学标记反应组合达到对5mC和5hmC同时单细胞单碱基检测. 首先通过Tn5转座酶给单细胞DNA加上不同的标记接头, 然后使用 K_2RuO_4 将5hmC氧化为5fC, 通过与茚二酮反应, 在5hmC位点特异性产生C-to-T信号, 通过包含5caC的引物进行延伸标记, 使用TET酶将5mC氧化为5fC和5caC, 然后使用吡啶硼烷将5fC和5caC以及引物中的5caC加氢还原为DHU, 在5mC位点

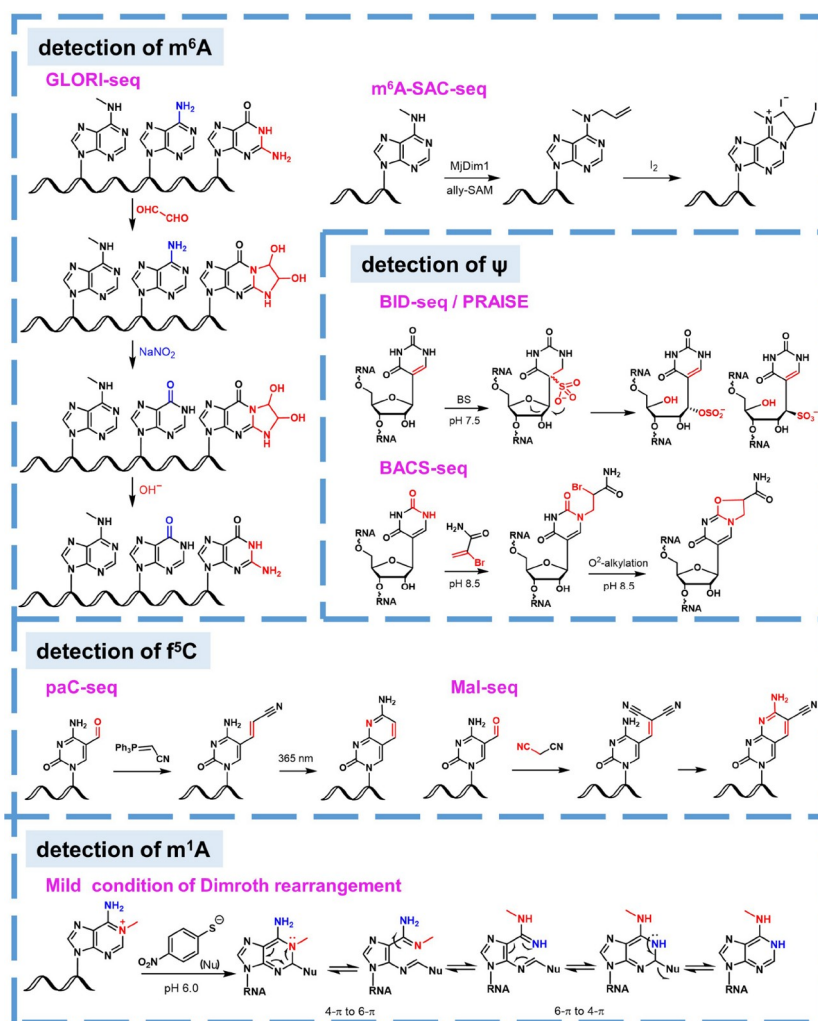


图 3 (网络版彩图)基于化学标记导致碱基突变/缺失的修饰核酸检测策略举例

Figure 3 (Color online) Examples of modified nucleic acid detection strategies based on chemical labeling-induced base mutations/deletions.

和引物5caC位点特异性产生C-to-T信号。最终, 通过新的接头引物进行延伸扩增和建库测序, 实现了5hmC和5mC的单碱基分辨率同步检测。

通过与单细胞测序技术的联合使用, Joint-snhmC-seq和SIMPLE-seq可以准确绘制5hmC和5mC的细胞类型特异性表观基因组图谱, 为进一步揭示基因中5hmC和5mC对细胞类型特异性基因表达的不同基因调控作用提供了有力工具。

3.2.2 5hmC

传统的5hmC化学氧化测序技术虽已有报道, 但其基于K₂Cr₂O₇/K₂Cr₂O₄的氧化活性受限于阴离子盐与负电性dsDNA的排斥, 仅适用于ssDNA, 导致在dsDNA碱

性预变性处理时易造成DNA损伤。因此, 开发更温和和高效的化学处理方式是必要的。

Song等^[48]开发的CAPS+技术使用4-乙酰胺-2,2,6,6-四甲基哌啶-1-氧代四氟硼酸铵(ACT⁺BF₄⁻)将5hmC转化为5fC并进一步使用亚氯酸钠(NaClO₂)和2-甲基-2-丁烯通过Pinnick氧化将5fC转化为5caC。两种反应对dsDNA均表现出温和且高效的特点。结合硼烷还原反应, 将5caC脱氢还原为DHU, 在5hmC处产生C-to-T的碱基突变, 从而实现了5hmC的高灵敏度单碱基定量检测。

3.2.3 5caC

传统的5caC基于吡啶硼烷的化学还原测序技术已

有报道,也广泛应用于如前文提到的SIMPLE-seq以及CAPS+等测序技术中.这也让人们对于这种低丰度修饰越来越感兴趣,已经有报道5caC修饰会瞬时抑制RNA Pol II的转录,但人们对于其在基因组中的作用仍然了解有限.而吡啶硼烷会同时还原5fC和5caC到DHU,这种非特异性也令研究者想要寻找更温和专一的化学反应.

可见光介导的光氧化还原化学适用于温和条件下快速高选择性催化反应,其生物体系兼容性也让研究者注意到它. Balasubramanian等^[49]报道了首个适用于5caC检测的光催化方法.他们使用巯基作为辅因子, $[\text{Ir}(\text{dF}(\text{CF}_3)\text{ppy})_2(\text{dtbbpy})]\text{Cl}$ 作为催化剂,在蓝光下, Ir催化剂形成三重态激发态时转化为单电子还原剂,催化5caC形成碳6号位自由基中间体,在pH 4.5 (氮3号位 $\text{p}K_a$ 值)时氮3号位质子化促进巯基氢向自由基中间体转移,电子转移到氧化态Ir催化剂并形成羧基自由基中间体,完成催化循环.羧基自由基中间体经历自由基脱羧过程形成DHU碳5号位自由基中间体,经过巯基氢转移后形成终产物DHU. DHU在测序中造成C-to-T的碱基突变,从而实现了5caC的单碱基检测.

该反应在5mC、5hmC、5fC和5caC中高效专一地还原5caC,展示了这一光催化方法在未来研究5caC相关功能中的强大应用潜力.

3.2.4 $f^5\text{C}$

核磁共振(NMR)和生物物理表征的结果表明,吸电子甲酰取代基显著限制了反密码子碱基区域的构象动力学,从而产生了与AUG的G和AUA的A(后者A)配对的非典型Watson-Crick碱基互补配对情况^[50,51].然而,这一修饰的生理功能在很大程度上仍属未知领域,因此开发更准确的检测方法是必要的.

Meier等^[52]提出了质子化增强还原化学法,在偏酸性环境中利用 NaCNBH_3 还原含吸电子基团的胞苷,生成还原脱氢产物DHU,从而实现单碱基定量检测.然而,该方法在本质上无法区分 $f^5\text{C}$ 和 ac^4C ,其应用范围受到一定限制,需进一步优化以提升特异性.

针对这一问题, Kleiner等^[53]开发了Mal-Seq技术.该技术首先利用具有活性亚甲基的丙二腈与醛基进行Knoevenagel反应,随后 N^4 -氨基的孤对电子对氨基碳正中心进行亲核进攻,促进氨基-腈环化反应,生成稳定的加合物.该加合物导致C-to-T的碱基错配,从而实

现 $f^5\text{C}$ 的单碱基定量检测.

此外, Cheng等^[54]开发的paC-Seq技术通过半稳定酰化物氰亚甲基三苯基磷烷与醛基进行Wittig烯炔化反应,当使用365 nm光照后,热力学上更稳定的 $E\text{-}pn^5\text{C}$ 完全转换为 $Z\text{-}pn^5\text{C}$,接着 N^4 -氨基孤对电子对氨基碳正中心进行亲核进攻促进氨基-腈环化反应,得到的加合物paC同样在测序中形成C-to-T的碱基错配进而可以单碱基定量检测 $f^5\text{C}$.

3.2.5 $m^1\text{A}$

$m^1\text{A}$ 通过由 N^1 -甲基及其携带的正电荷引起的空间位阻,显著干扰了典型的Watson-Crick碱基配对,同时在重塑生物分子结构和相互作用中起着重要作用^[55].传统的去甲基化酶消除法存在序列选择性问题,而强碱性下的Dimroth重排会引起严重的RNA降解.因此,开发新的更温和、高效的检测手段显得尤为迫切.

在这一背景下, Dickinson等^[56]开发的 $m^1\text{A}$ -to- $m^6\text{A}$ 温和转化策略结合 $m^1\text{A}$ -quant-seq^[57],通过使用对硝基苯磺酸在偏酸性条件下对腺苷碳2号位进行亲核进攻形成 $4\pi\text{-to-}6\pi$ 电子开环体系,通过碳5-碳6键旋转和互变异构化,形成 $6\pi\text{-to-}4\pi$ 电子关环体系并消除亲核基团,进而将 $m^1\text{A}$ 转变为 $m^6\text{A}$,使得 $m^1\text{A}$ 处RT-stop效果被消除以达到单碱基检测,当加入不同 $m^1\text{A}$ 含量的内参链后,可达到对 $m^1\text{A}$ 位点的定量检测效果.

3.2.6 $m^6\text{A}$

$m^6\text{A}$ 作为哺乳动物细胞中最丰富的RNA修饰之一,是研究最深入的RNA修饰.尽管已有多种工具用于 $m^6\text{A}$ 的检测,但仍然缺乏一种能够对 $m^6\text{A}$ 进行绝对定量的全转录组单碱基检测方法.

为了填补这一技术空白, He等^[58]开发了 $m^6\text{A}$ -SAC-seq.通过使用二甲基转移酶MjDim1,以烯丙基SAM作为辅因子来标记 $m^6\text{A}$ 形成 $\text{a}^6\text{m}^6\text{A}$.随后通过使用 I_2 进行烯基的氧化加成反应,生成的碘鎓离子会在腺苷 N^1 号位的亲核进攻下形成环化产物,在测序过程中形成A-to-N的随机碱基错配.通过加入不同修饰比例的 $m^6\text{A}$ 内参链,以达到对 $m^6\text{A}$ 的单碱基定量检测.此外, $m^6\text{A}$ -SAC-seq的另一显著优势在于其低起始量样本(30 ng mRNA)建库能力使其可广泛应用于细胞分化、早期发育、神经元信号传导及临床样本中 $m^6\text{A}$ 动态变化的定量绘制.然而,其定量准确性依赖于内参标

准曲线校正, 不可避免地引入了校正误差。

为进一步提升 m^6A 定量检测的绝对定量精度, Wang等^[59]开发的GLORI-seq技术通过使用三步化学处理实现了 m^6A 的绝对定量检测: 首先使用丙二醛与G反应形成可逆环加成产物保护G上的氨基基团, 然后使用亚硝酸钠($NaNO_2$)介导的脱氨反应形成A-to-I的高效转化, 最后通过碱性条件下加热脱除G上的保护剂, 进而进行 m^6A 的检测。在这三步反应后, 样本中会形成A-to-G, 而 m^6A 保持不变, 通过对比 m^6A 位点A-to-G转化率, 可对 m^6A 进行绝对定量。利用此方法, 他们发现部分基因的特定区域中出现了一些聚集分布的 m^6A 位点, 这些基因会显著降低基因的转录水平和翻译效率, 发挥负调控基因的表达的作用。此外, 通过热休克和缺氧条件处理, 证实约4.8%~11%的 m^6A 位点具有动态变化特性, 且具有相反的动态变化区域, 表明 m^6A 在不同环境下对基因表达具有特异性的调控作用。

3.2.7 Ψ

Ψ 作为一种普遍存在的RNA修饰, 已被广泛报道参与mRNA的加工、代谢及翻译等关键生物学过程^[60]。然而, 由于缺乏针对 Ψ 的单碱基定量检测方法, 其作用机制的研究一直受到限制。

He等^[61]开发的BID-seq与Yi等^[62]开发的PRAISE, 基于相同原理, 成功解决了 Ψ 单碱基定量检测的难题。在酸性环境(pH约5.1)下, 胞嘧啶中 N^3 位质子化是BS介导脱氨反应的关键。通过将pH调节至中性, 有效抑制了BS对C-to-U的转化, 同时促进了 Ψ 与BS的反应, 生成 Ψ -BS糖环开环加成产物。在逆转录过程中, Ψ -BS位点被跳过, 形成碱基缺失。通过引入含不同修饰比例的 Ψ 内参链, 校正 Ψ 位点的碱基缺失率, 实现了对 Ψ 的单碱基定量检测。

Song等^[63]利用 Ψ 的 N^1 位对Michael加成受体的高度反应性, 开发了BACS-seq技术, 解决了序列偏好性的问题。BACS-seq通过2-溴丙烯酰胺与 Ψ 在碱性条件下进行Michael加成反应, 随后 α -卤素基团将通过分子内O诱导串联环化烷基化反应形成 $nce^{1,2}\Psi$ 环化产物。在测序过程中产生U-to-C的突变, 达到对 Ψ 的单碱基

定量检测的目的。

与BACS-seq相比, BID-seq支持更低起始量(10 ng)的RNA样本测序分析, 适用于分析从珍贵样品中分离的RNA, 并且其中性反应条件对RNA降解影响更小。

BACS-seq则在多方面展现了独特的优势: 可以同时检测A-to-I编辑与 m^1A 位点, 实现对多种修饰进行单碱基检测; 精确测定位于一个或多个尿苷附近的 Ψ 位点, 增强了对密集修饰 Ψ 位点的检测能力, 提高了准确度和灵敏度。

4 总结与展望

随着核酸修饰碱基的发现及其检测技术的突破性进展, 我们对基因表达调控与生理活动动态变化的认识得到了显著深化, 为表观遗传学研究提供了前所未有的精准评估工具。特别是近年来, 单碱基分辨率检测技术和定量化分析方法的快速发展, 不仅推动了核酸修饰研究领域向更高精度、更深层次迈进, 更为疾病机制研究、创新药物开发和精准医学实践注入了强劲动力。这些技术突破为阐明疾病发生发展的分子机制、开发靶向治疗策略以及实现个体化精准诊疗提供了重要的理论依据和技术支撑。

然而, 由于核酸修饰的丰度低、动态性高和化学性质多样等特点, 特异性检测以及实际应用仍面临诸多挑战, 如信号失真、定位困难、缺乏通用方法、序列偏好性、假阳性及样本降解等。目前, 所有检测方法均有其优缺点, 因此在选择或开发新方法时, 需综合考虑修饰核酸的丰度、目标类型、起始样本量等因素。

本综述主要展示了近年来基于化学反应驱动的修饰核酸检测方法的进展, 介绍了其基于化学反应性的基本原理。在学科交叉的背景下, 如何通过化学手段解决生物学问题需要更有创造力的思考来设计更精准的化学探针。未来, 针对不同修饰碱基的独特化学性质, 开发新的修饰核酸检测方法, 或将其与单细胞测序或医学诊疗等方向相结合, 将具有更广阔的应用前景。

参考文献

- 1 Heiss M, Kellner S. *RNA Biol*, 2016, 14: 1166–1174

- 2 Xie NB, Wang M, Ji TT, Guo X, Gang FY, Hao Y, Zeng L, Wang YF, Feng YQ, Yuan BF. *Chem Sci*, 2024, 15: 10073–10083
- 3 Luo R, Chen H, Kong J, Zhang Z, Ayoub N, Luo G. *Israel J Chem*, 2024, 64: e202400024
- 4 Sood AJ, Viner C, Hoffman MM. *J Cheminform*, 2019, 11: 30
- 5 Cappannini A, Ray A, Purta E, Mukherjee S, Boccaletto P, Moafinejad SN, Lechner A, Barchet C, Klaholz BP, Stefaniak F, Bujnicki JM. *Nucl Acids Res*, 2024, 52: D239–D244
- 6 Baralle FE, Giudice J. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2017, 18: 437–451
- 7 Barbieri I, Kouzarides T. *Nat Rev Cancer*, 2020, 20: 303–322
- 8 Law JA, Jacobsen SE. *Nat Rev Genet*, 2010, 11: 204–220
- 9 Suzuki MM, Bird A. *Nat Rev Genet*, 2008, 9: 465–476
- 10 Bird A. *Genes Dev*, 2002, 16: 6–21
- 11 Geissler F, Nesic K, Kondrashova O, Dobrovic A, Swisher EM, Scott CL, J. Wakefield M. *Ther Adv Med Oncol*, 2024, 16: doi: 10.1177/17588359231220511
- 12 Kriaucionis S, Heintz N. *Science*, 2009, 324: 929–930
- 13 Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, Agarwal S, Iyer LM, Liu DR, Aravind L, Rao A. *Science*, 2009, 324: 930–935
- 14 Ito S, D'Alessio AC, Taranova OV, Hong K, Sowers LC, Zhang Y. *Nature*, 2010, 466: 1129–1133
- 15 He YF, Li BZ, Li Z, Liu P, Wang Y, Tang Q, Ding J, Jia Y, Chen Z, Li L, Sun Y, Li X, Dai Q, Song CX, Zhang K, He C, Xu GL. *Science*, 2011, 333: 1303–1307
- 16 Ito S, Shen L, Dai Q, Wu SC, Collins LB, Swenberg JA, He C, Zhang Y. *Science*, 2011, 333: 1300–1303
- 17 Yoon JH, Iwai S, O'Connor TR, Pfeifer GP. *Nucl Acids Res*, 2003, 31: 5399–5404
- 18 Sjolund AB, Senejani AG, Sweasy JB. *Mutat Res Fundamental Mol Mech Mutagenesis*, 2013, 743-744: 12–25
- 19 Silveira AB, Houy A, Ganier O, Özemek B, Vanhuele S, Vincent-Salomon A, Cassoux N, Mariani P, Pierron G, Leyvraz S, Rieke D, Picca A, Bielle F, Yaspo ML, Rodrigues M, Stern MH. *Nat Commun*, 2024, 15: 9864
- 20 Kumar D, Hyder I, Kues WA. *Sig Transduct Target Ther*, 2024, 9: 295
- 21 Wu B, Li L, Huang Y, Ma J, Min J. *Curr Opin Struct Biol*, 2017, 47: 67–76
- 22 Boulias K, Greer EL. *Nat Rev Genet*, 2023, 24: 143–160
- 23 Boccaletto P, Stefaniak F, Ray A, Cappannini A, Mukherjee S, Purta E, Kurkowska M, Shirvanizadeh N, Destefanis E, Groza P, Avşar G, Romitelli A, Pir P, Dassi E, Conticello SG, Aguilo F, Bujnicki JM. *Nucl Acids Res*, 2022, 50: D231–D235
- 24 Dumelin CE, Chen Y, Leconte AM, Chen YG, Liu DR. *Nat Chem Biol*, 2012, 8: 913–919
- 25 Sakai Y, Miyauchi K, Kimura S, Suzuki T. *Nucl Acids Res*, 2016, 44: 509–523
- 26 Dominissini D, Moshitch-Moshkovitz S, Schwartz S, Salmon-Divon M, Ungar L, Osenberg S, Cesarkas K, Jacob-Hirsch J, Amariglio N, Kupiec M, Sorek R, Rechavi G. *Nature*, 2012, 485: 201–206
- 27 Meyer KD, Saletore Y, Zumbo P, Elemento O, Mason CE, Jaffrey SR. *Cell*, 2012, 149: 1635–1646
- 28 Linder B, Grozhik AV, Olarerin-George AO, Meydan C, Mason CE, Jaffrey SR. *Nat Methods*, 2015, 12: 767–772
- 29 Garcia-Campos MA, Edelheit S, Toth U, Safra M, Shachar R, Viukov S, Winkler R, Nir R, Lasman L, Brandis A, Hanna JH, Rossmannith W, Schwartz S. *Cell*, 2019, 178: 731–747.e16
- 30 Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, Molloy PL, Paul CL. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 1827–1831
- 31 Booth MJ, Branco MR, Ficiz G, Oxley D, Krueger F, Reik W, Balasubramanian S. *Science*, 2012, 336: 934–937
- 32 Zeng H, He B, Xia B, Bai D, Lu X, Cai J, Chen L, Zhou A, Zhu C, Meng H, Gao Y, Guo H, He C, Dai Q, Yi C. *J Am Chem Soc*, 2018, 140: 13190–13194
- 33 Lu L, Zhang X, Zhou Y, Shi Z, Xie X, Zhang X, Gao L, Fu A, Liu C, He B, Xiong X, Yin Y, Wang Q, Yi C, Li X. *Mol Cell*, 2024, 84: 2984–3000.e8
- 34 Xie Y, Han S, Li Q, Fang Z, Yang W, Wei Q, Wang Y, Zhou Y, Weng X, Zhou X. *Chem Sci*, 2022, 13: 12149–12157
- 35 Hartstock K, Kueck NA, Spacek P, Ovcharenko A, Hüwel S, Cornelissen NV, Bollu A, Dieterich C, Rentmeister A. *Nat Commun*, 2023, 14: 7154
- 36 Thalalla Gamage S, Sas-Chen A, Schwartz S, Meier JL. *Nat Protoc*, 2021, 16: 2286–2307
- 37 Yan S, Lu Z, Yang W, Xu J, Wang Y, Xiong W, Zhu R, Ren L, Chen Z, Wei Q, Liu S, Feng T, Yuan B, Weng X, Du Y, Zhou X. *J Am Chem Soc*,

- 2023, 145: 22232–22242
- 38 Bass BL. *Annu Rev Biochem*, 2002, 71: 817–846
- 39 Nishikura K. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2016, 17: 83–96
- 40 Wei Q, Han S, Yuan K, He Z, Chen Y, Xi X, Han J, Yan S, Chen Y, Yuan B, Weng X, Zhou X. *Nucl Acids Res*, 2023, 51: e87
- 41 Flynn RA, Pedram K, Malaker SA, Batista PJ, Smith BAH, Johnson AG, George BM, Majzoub K, Villalta PW, Carette JE, Bertozzi CR. *Cell*, 2021, 184: 3109–3124.e22
- 42 Li J, Yue S, Gao Z, Hu W, Liu Z, Xu G, Wu Z, Zhang X, Zhang G, Qian F, Jiang J, Yang S. *Anal Chem*, 2023, 95: 11969–11977
- 43 Wei FY, Zhou B, Suzuki T, Miyata K, Ujihara Y, Horiguchi H, Takahashi N, Xie P, Michiue H, Fujimura A, Kaitsuka T, Matsui H, Koga Y, Mohri S, Suzuki T, Oike Y, Tomizawa K. *Cell Metab*, 2015, 21: 428–442
- 44 Fang Z, Lu Z, Han S, Zhou Y, Yang W, Zhang X, Zhou X. *J Am Chem Soc*, 2023, 145: 5467–5473
- 45 Dai Q, Ye C, Irklyenko I, Wang Y, Sun HL, Gao Y, Liu Y, Beadell A, Perea J, Goel A, He C. *Nat Biotechnol*, 2024, 42: 1559–1570
- 46 Fabyanic EB, Hu P, Qiu Q, Berríos KN, Connolly DR, Wang T, Flournoy J, Zhou Z, Kohli RM, Wu H. *Nat Biotechnol*, 2023, 42: 960–974
- 47 Bai D, Zhang X, Xiang H, Guo Z, Zhu C, Yi C. *Nat Biotechnol*, 2025, 43: 85–96
- 48 Xu H, Chen J, Cheng J, Kong L, Chen X, Inoue M, Liu Y, Kriaucionis S, Zhao M, Song CX. *J Am Chem Soc*, 2023, 145: 7095–7100
- 49 Mortishire-Smith BJ, Becker SM, Simeone A, Melidis L, Balasubramanian S. *J Am Chem Soc*, 2023, 145: 10505–10511
- 50 Bilbille Y, Gustilo EM, Harris KA, Jones CN, Lusic H, Kaiser RJ, Delaney MO, Spremulli LL, Deiters A, Agris PF. *J Mol Biol*, 2011, 406: 257–274
- 51 Cantara WA, Murphy IV FV, Demirci H, Agris PF. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 10964–10969
- 52 Link CN, Thalalla Gamage S, Gallimore D, Kopajtich R, Evans C, Nance S, Fox SD, Andresson T, Chari R, Ivanic J, Prokisch H, Meier JL. *Biochemistry*, 2022, 61: 535–544
- 53 Li A, Sun X, Arguello AE, Kleiner RE. *ACS Chem Biol*, 2022, 17: 503–508
- 54 Jin X, Huang Z, Xie L, Liu L, Han D, Cheng L. *Angew Chem Int Ed*, 2022, 61: e202210652
- 55 Helm M, Giegé R, Florentz C. *Biochemistry*, 1999, 38: 13338–13346
- 56 Liu H, Zeng T, He C, Rawal VH, Zhou H, Dickinson BC. *ACS Chem Biol*, 2022, 17: 1334–1342
- 57 Zhou H, Rauch S, Dai Q, Cui X, Zhang Z, Nachtergaele S, Sepich C, He C, Dickinson BC. *Nat Methods*, 2019, 16: 1281–1288
- 58 Hu L, Liu S, Peng Y, Ge R, Su R, Senevirathne C, Harada BT, Dai Q, Wei J, Zhang L, Hao Z, Luo L, Wang H, Wang Y, Luo M, Chen M, Chen J, He C. *Nat Biotechnol*, 2022, 40: 1210–1219
- 59 Liu C, Sun H, Yi Y, Shen W, Li K, Xiao Y, Li F, Li Y, Hou Y, Lu B, Liu W, Meng H, Peng J, Yi C, Wang J. *Nat Biotechnol*, 2023, 41: 355–366
- 60 Borchardt EK, Martinez NM, Gilbert WV. *Annu Rev Genet*, 2020, 54: 309–336
- 61 Dai Q, Zhang LS, Sun HL, Pajdzik K, Yang L, Ye C, Ju CW, Liu S, Wang Y, Zheng Z, Zhang L, Harada BT, Dou X, Irklyenko I, Feng X, Zhang W, Pan T, He C. *Nat Biotechnol*, 2023, 41: 344–354
- 62 Zhang M, Jiang Z, Ma Y, Liu W, Zhuang Y, Lu B, Li K, Peng J, Yi C. *Nat Chem Biol*, 2023, 19: 1185–1195
- 63 Xu H, Kong L, Cheng J, Al Moussawi K, Chen X, Iqbal A, Wing PAC, Harris JM, Tsukuda S, Embarc-Buh A, Wei G, Castello A, Kriaucionis S, McKeating JA, Lu X, Song CX. *Nat Methods*, 2024, 21: 2024–2033

Chemical reaction-driven detection technologies for modified nucleic acids

Zhentian Fang¹, Yafen Wang^{2*}, Xiang Zhou^{1*}

¹ College of Chemistry and Molecular Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China

² School of Public Health, Wuhan University, Wuhan 430071, China

*Corresponding authors (email: yfwang@whu.edu.cn; xzhou@whu.edu.cn)

Abstract: Modified nucleic acids play a crucial role in various biological processes, such as regulating gene expression, controlling RNA stability, and influencing protein translation. A deeper understanding of the regulatory mechanisms of modified nucleic acids can enhance our knowledge of gene-related diseases and facilitate the development of novel diagnostic and therapeutic strategies. To explore the functions of these modified nucleic acids, researchers have developed various detection technologies integrated with high-throughput sequencing. The use of chemical tools for the localization and qualitative analysis of modified nucleic acids offers significant advantages. This review summarizes the chemical reaction-driven detection technologies for modified nucleic acids developed in recent years, highlighting the important role of chemical tools in the biological field.

Keywords: nucleic acid modifications, detection of modifications, chemical reaction-driven, high-throughput sequencing, chemical biology

doi: [10.1360/SSC-2025-0019](https://doi.org/10.1360/SSC-2025-0019)