



RNA修饰检测技术的研究进展

杨梅^{1,2,3,4}, 葛颜锐^{1,2,3,4}, 吴丁洁^{1,2,3,4}, 林金星^{1,2,3,4}, 李瑞丽^{1,2,3,4*}

1. 北京林业大学生物科学与技术学院, 林木遗传育种全国重点实验室, 北京 100083;
2. 北京林业大学生物科学与技术学院, 林木育种与生态修复国家工程研究中心, 北京 100083;
3. 北京林业大学生物科学与技术学院, 林木、花卉遗传育种教育部重点实验室, 北京 100083;
4. 北京林业大学生物科学与技术学院, 树木花卉育种生物工程国家林业和草原局重点实验室, 北京 100083

* 联系人, E-mail: liruli@bjfu.edu.cn

2024-02-21 收稿, 2024-06-11 修回, 2024-07-10 接受, 2024-08-29 网络版发表

科技创新2030-重大项目(2023ZD04069)、国家自然科学基金(32270368, 32030010, 31970182)、“5·5工程”科研创新团队项目(BLRC2023C06)、北京林业大学优秀研究生导师团队建设项目(YJSY-DSTD2022005)和大学生创新创业训练计划(S202310022067, X202310022120)资助

摘要 RNA修饰是在特定的位置上添加化学基团来改变RNA分子的结构和功能, 在转录后调控中发挥着重要作用. 研究表明, RNA中存在大量动态的、可逆的修饰, 能够参与基因表达调控、RNA翻译、细胞分化和疾病发生等生物学过程. 为了对RNA修饰的含量和位置信息进行检测, 研究人员开发了多种RNA修饰检测方法. 本综述主要从RNA修饰的定量检测技术、位点特异性检测技术和测序检测技术三个方面出发, 系统介绍了这些检测技术的原理、操作步骤和优缺点, 并对RNA修饰的检测技术最新研究进展进行了总结, 为深入研究RNA修饰的生物学功能和作用机制提供更好的思路和方法.

关键词 RNA修饰, 检测技术, 定量, 位点特异性, 测序

RNA修饰广泛存在于原核生物和真核生物中, 通过在特定的位置上添加化学修饰基团来改变RNA分子的化学结构和功能. 这些修饰可以影响RNA的稳定性、空间结构以及相互作用, 从而调控基因表达、RNA的翻译、细胞分化和疾病发生等生物学过程. RNA修饰广泛存在于各种RNA中, 如信使RNA(mRNA)、核糖体RNA(rRNA)、长链非编码RNA(lncRNA)、转移RNA(tRNA)、核小RNA(snRNA)和微RNA(miRNA)^[1]. 在生物学研究领域中, 已经鉴定出了超过160种不同的RNA修饰类型, 如N¹-甲基腺苷(m¹A)^[2,3]、N⁴-乙酰基胞苷(ac⁴C)^[4]、N⁶-甲基腺苷(m⁶A)^[3,5]、N⁷-甲基鸟苷(m⁷G)^[6]、2'-O-二甲基腺苷(m⁶Am)^[7]、2'-O-甲基化核苷(Nm)^[8]、5-甲基胞嘧啶(m⁵C)^[9,10]、5-羟甲基胞嘧啶(hm⁵C)^[11]、肌苷(I)^[9]、尿

苷化^[12]和假尿苷(Ψ)^[13]等. 这些修饰在不同的细胞或组织中呈现出差异的分布模式, 并且对RNA的功能产生着影响^[14].

近年来, 随着对RNA修饰重要性认识的增强, 研究者们对RNA修饰检测技术的关注也日益增加. 在过去几十年中, 研究人员开发了许多方法和技术, 用于检测和分析RNA修饰的类型和分布情况. 这些技术覆盖了广泛的应用领域, 从传统的生化方法到最新的高通量测序技术, 每种方法都具有独特的优势和适用范围^[15]. 但由于不同的化学修饰在RNA的代谢和功能调节中具有多样性, 因此, RNA修饰检测技术不仅可以全面了解转录组的修饰情况, 还为研究RNA修饰的功能奠定了基础. 本文主要介绍了RNA修饰的检测技术, 并探讨了

引用格式: 杨梅, 葛颜锐, 吴丁洁, 等. RNA修饰检测技术的研究进展. 科学通报, 2024, 69: 5129–5141

Yang M, Ge Y R, Wu D J, et al. Recent advances in detection techniques for RNA modifications (in Chinese). Chin Sci Bull, 2024, 69: 5129–5141, doi: 10.1360/TB-2024-0097

这些方法的原理、实验步骤、数据分析以及优缺点等,以便研究人员更好地了解和选择合适的RNA修饰检测技术,为深入理解RNA表观遗传修饰的功能提供理论基础。

1 RNA修饰的定量检测

RNA修饰的定量检测是指对RNA分子上的修饰进行定量分析和检测,对理解RNA修饰的功能、发现新的修饰类型和位点以及评估其在发育和分化中的调控机制具有重要意义。

1.1 二维薄层色谱

薄层色谱法(thin layer chromatography, TLC)是一种微量且快速的层析方法,可用于分析核苷酸、核苷和碱基^[16]。对于RNA修饰, TLC既可以通过比较样品及其相对应的迁移速率来进行定性,又可以通过测量斑点强度来进行定量。其中, Consden、Gordon和Martin在1944年发现, 二维薄层色谱(2D-TLC)可用于分离许多在单一维度TLC实验中无法分离的化合物, 能更好地分离样品^[17]。因此, 该技术是薄层色谱发展中极具特色的方法之一, 并已广泛用于分析RNA修饰中^[18]。

2D-TLC只需要少量的RNA(50~200 ng)即可进行, 主要是先将分离的RNA利用RNase A、T1或T2进行部分消化得到寡核苷酸, 再用T4聚核苷酸激酶(T4 PNK)通过³²P标记, 最后经核酸酶P1消化后得到5'-³²P-NMP, 用二维薄层色谱进行进一步的分离。通过比较这些核苷酸与标准核苷酸迁移因子(Rf)值, 便可以确定各个核苷酸的类型, 也可以通过测量TLC板中相应斑点的放射性活度, 来定量各个核苷酸^[1,19~21]。2D-TLC不需要昂贵的仪器, 成本较低, 但在对放射性试剂的要求、RNase酶切引起的偏置以及修饰后的核苷酸³²P标记效率差异上有些许缺陷^[22]。

1.2 斑点印迹

斑点印迹(dot blot)是一种利用特定抗体来检测和定量RNA修饰的分析方法, 可广泛应用于各种RNA类型的修饰检测中, 如hm⁵C修饰^[23]、m⁶A修饰^[22]等。该方法是将已经分离的RNA直接停留在聚偏氟乙烯或硝酸纤维膜上, 然后将目标修饰的特异性抗体与膜孵育, 再进行二抗杂交, 通过比较不同实验组的结果, 即可获得半定量的修饰水平信息。

通过斑点印迹方法不仅可以检测多种肠道沙门氏

菌^[24]和家禽腺病毒^[25], 还可应用于植物中, 如大豆菊苣枯萎病的鉴定^[26]、水稻疾病的检测^[27]等。此外, 斑点印迹具有较高的准确性和灵敏度, 操作简单、成本较低, 但高度依赖于抗体的特异性, 缺乏绝对定量和修饰位点信息^[22,28]。

1.3 高效液相色谱

高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)是常用的色谱分析方法, 可以根据核苷的不同极性来进行分离, 在生物化学、环境科学、化学、药学等领域具有广泛应用^[29]。

HPLC利用流动相在固定相上的作用, 使样品中的化合物在固定相和流动相之间发生分配和再分配, 从而达到分离和分析化合物的目的^[30]。在进行HPLC分析之前, RNA或寡核苷酸被核酸酶P1和碱性磷酸酶消化, 紫外检测器通过记录核苷的紫外吸光度和保留时间, 来识别和测量修饰后核苷的丰度。通过检测器可对样品的不同成分进行检测并生成色谱图谱, 便可确定样品中各成分的结构和含量。HPLC能够对样品中微量的成分进行高效分离和定量分析, 相对于传统的液相色谱, 具有更快的分离速度、更好的灵敏度和更高的分辨率, 因此广泛应用于生化分析、药物分析、环境监测、天然产物提取和分离等领域。

与2D-TLC相比, 高效液相色谱分析更快速且不需要放射性标记, 但由于紫外检测仪器的限制, 该方法只能用于检测较为丰富的RNA种类中高丰度修饰的情况, 如rRNA、tRNA和mRNA, 且需要大量纯度大于1 μg的RNA。

1.4 质谱法

质谱分析(mass spectrometry, MS)是1962年McCloskey和Biemann在研究多种tRNA修饰时, 首次应用于核酸的分析方法^[31,32]。作为一种强大的分析技术, 质谱能够对复杂混合物中的分子进行检测和鉴定, 广泛应用于生物分子分析中, 如蛋白质组学、代谢组学、脂质组学等, 是生物样品的完整生物分子无标记检测中不可或缺的工具^[33]。长期以来, 质谱被认为是鉴定和定量蛋白质以及小分子(如代谢物)的金标准^[31]。大多数小分子的定量质谱都会涉及到分离步骤, 以降低混合物的复杂性, 如液体或气相色谱^[34]。

1.4.1 液相色谱-质谱联用

由于RNA的状态会发生变化, 因此修饰水平也会

随之变化,如植物中 m^6A 的总体修饰水平会在受到胁迫时增加,但在正常生长发育过程中会下降^[35,36];人的正常细胞和癌细胞之间的 m^6A 修饰水平也会存在差异^[37-39]。因此, RNA修饰的检测和定量可以更好地理解基因表达、免疫应答以及细胞调控等过程。由于受到紫外检测器的限制,高效液相色谱分析仅能运用于检测较为丰富的RNA种类中的修饰情况,如rRNA, tRNA和合成RNA。因此,为提高检测灵敏度和降低成本,高效液相色谱法与质谱联用应运而生—液相色谱-质谱联用仪(liquid chromatograph-mass spectrometer, LC-MS)。在LC-MS中,液相色谱(LC)用于样品的分离和纯化,而质谱则用于对分离出的化合物进行鉴定和结构分析。

LC-MS主要用于研究核苷酸水平的RNA修饰,能够通过RNA修饰的标准或数据库同时检测多个RNA修饰,具有良好的选择性和灵敏度^[40,41]。同时, LC-MS还可对mRNA和ncRNA中的低丰度修饰进行测定和定量,已成为RNA修饰检测和定量的基准^[42,43]。但LC-MS无法检测发生修饰的RNA位置,也不能区分是mRNA上的还是rRNA或snRNA污染物上的,因此,还需要对mRNA进行富集和纯化处理^[44]。

1.4.2 液相色谱-串联质谱联用

液相色谱串联质谱技术(liquid chromatograph-mass spectrometry/mass spectrometry, LC-MS/MS)是通过将液相色谱和质谱技术结合起来,可同时实现化合物的分离和鉴定^[43]。与LC-MS相比,在满足特定标准的情况下, LC-MS/MS可以识别任何数量的修饰^[31]。LC-MS/MS可以提供更高的选择性和灵敏度,减少干扰物质的影响,从而实现更准确的化合物检测和定量分析,但操作复杂,对技术要求高。Pan等人^[45]通过LC-MS/MS对外泌体小RNA表观遗传修饰进行系统分析,评估了外泌体内小RNA上几种具有代表性的修饰核苷。Guo等人^[46]通过LC-MS/MS发现, *Bt CryIAc*抗性小菜蛾中肠组织的 m^6A 修饰水平显著升高。

2 RNA修饰位点的检测技术

修饰位点的检测是指对基因组或转录组中的特定位置的修饰状态进行鉴定,通常是一个复杂而精细的过程,涉及到多个实验技术和数据分析方法。通过修饰位点的检测,可以深入了解RNA修饰类型的多样性和分布规律,探究RNA分子在基因调控、代谢、翻译和降解等方面的作用机制,进一步揭示RNA修饰在细胞

中的调控网络和生物学意义。

2.1 SCARLET技术

Liu等人^[47]开发了一种称为SCARLET(site-specific cleavage and radioactive-labeling followed by ligation-assisted extraction and thin-layer chromatography)的方法,该方法通过位点特异性切割、放射标记、连接辅助提取和薄层色谱来检测mRNA和lncRNA中的 m^6A 修饰^[44]。该方法适用于检测特定位点的低丰度 m^6A 修饰,且灵敏度高。

在SCARLET方法中, RNA混合物就可以作为起始材料, SCARLET既可以量化mRNA和lncRNA的修饰,也可以量化mRNA中 m^6A 和 Ψ 的修饰状态^[48]。此外,该方法还可以在单碱基分辨率下定量检测RNA修饰位点^[49]。SCARLET方法避免了反转录,因此可作为验证通过依赖反转录方法确定的修饰位点的正交方法。然而SCARLET涉及多种酶转化和分离步骤,程序复杂,操作难度大,所需试剂昂贵,且具有放射性危险^[44]。

2.2 SELECT技术

相较于SCARLET, SELECT(single-base elongation- and ligation-based qPCR amplification method)是一种基于单碱基延伸和连接的qPCR扩增方法,成本低且速度快^[50]。SELECT主要是通过DNA聚合酶和连接酶将两个互补的DNA引物连接到目标位点,在干扰上游引物的延伸的同时,阻碍下游引物的连接,从而大大减少最终产物的数量,再通过qRT-PCR分析靶位点的循环阈值(Ct)与对照组的差异,从而检测到靶位点的修饰及其修饰程度^[50,51]。

SELECT是一个基于qPCR的强有力工具,可通过 m^6A 阻碍DNA聚合酶和连接酶来快速地检测出特定位点的RNA m^6A 修饰及其修饰程度^[50,51]。此外, SELECT操作简单,步骤较少,但需要引入对照组,生成标准曲线^[52,53]。

2.3 ESI-MS技术

电喷雾离子化质谱(electrospray ionization-mass spectrometry, ESI-MS)是一种高灵敏度的质谱技术,能够对RNA分子进行准确的质量测定和结构分析^[54]。研究表明, ESI-MS技术不仅可以准确地测定RNA分子的质量,还可以检测到不同位置的修饰基团,从而对RNA修饰进行定量和定性分析^[54,55]。该方法主要是将RNA

样品进行离子化处理,然后通过电喷雾将离子化的RNA引入质谱仪进行分析,以分析出修饰位点^[56,57]。

与其他位点特异性方法相比,ESI-MS能够从开头检测 and 量化RNA修饰.因此,该方法被广泛应用于大量RNA的修饰检测,包括tRNA、rRNA和snRNA^[58].此外,该方法还可用于检测miRNA的修饰和mRNA中的cap修饰,对研究RNA修饰在生物学过程中的作用具有重要意义^[59,60].ESI-MS技术还可以应用于RNA修饰的定量分析和生物标志物的筛选,但该方法的局限是需要大量的起始物料以及高灵敏度的ESI-MS。

3 RNA修饰的测序技术

二维薄层色谱法(TLC)^[18]、斑点印迹^[22]和液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)^[61]是广泛用于测量RNA修饰水平的方法.然而,这些方法不能分析RNA修饰在转录组水平上的分布,也不能识别特定基因中的RNA m⁶A修饰位点^[53].近年来,随着测序技术的进步,基于抗体富集、酶辅助和化学处理的RNA修饰测序技术被开发出来(图1)。

3.1 基于抗体富集的检测技术

基于抗体的测序技术在RNA修饰的转录组图谱中已经受到广泛应用,如m¹A、m⁶A、m⁶Am、ac⁴C、hm⁵C和m⁷G^[11,62,63].在这种测序技术中,分离的RNA首先被片段化到100~200 nt,再由特定的抗体富集和分离出特定修饰的RNA片段,然后进行测序分析(图1).由于进行了富集,基于抗体的测序技术在检测mRNA和其他稀有RNA物种的低丰度修饰时将会显示出较强的灵敏性。

3.1.1 交联免疫沉淀

交联免疫沉淀(cross-linking and immunoprecipitation, CLIP)是一种用于研究RNA与蛋白质相互作用的技术.这项技术可确定RNA分子与其相互作用的蛋白质及其在细胞中的位置^[64].Ule等人^[65]介绍了CLIP在基因工程中对小鼠特定细胞类型的研究应用.Blazie和Jin^[66]报道了秀丽隐杆线虫的细胞特异性seCLIP-seq方案.Darnell等人^[67]报道了哺乳动物组织培养细胞或整个组织的紫外线交联。

甲基化单核苷酸分辨率交联和免疫沉淀(methylation individual-nucleotide-resolution crosslinking and immunoprecipitation, miCLIP)是一种解决低分辨率限制的技术,基于经光交联的RNA与特异性抗体的结合,

先通过交联反应固定RNA与抗体的相互作用,然后进行酶切和RNA反转录等步骤,将RNA转化为cDNA,再引入特定的DNA条码以进行标记,最后通过测序技术对标记的cDNA进行测序,以获得高分辨率的修饰位点信息^[68,69].miCLIP能够提供单核苷酸级别修饰位点的定位,如m⁵C修饰^[70]、m⁶A修饰、m⁶Am修饰、m⁷G修饰^[6]、hm⁵C修饰以及Ψ修饰等,从而更准确地揭示RNA修饰的位置和丰度.但miCLIP也存在一定的不足,如程序复杂,需要对RNA进行多次操作和处理,容易出现误差和干扰;对交联反应的条件和时间等因素较为敏感,需要进行严格控制.Kan等人^[71]利用miCLIP表征了m⁶A“写入者”复合体,验证了YTH“阅读器”CG6422和YT521-B,并在五个m⁶A因子中生成了突变体.Horlacher等人^[72]提出可在单核苷酸分辨率下预测交联位点在RNA序列上的分布情况,从而预测蛋白质-RNA的相互作用。

3.1.2 甲基化RNA免疫共沉淀

甲基化RNA免疫共沉淀(MeRIP-Seq/m⁶A-seq)是一个简单而标准化的过程,可检测RNA上的m⁶A/m⁶Am修饰,广泛用于研究m⁶A修饰在调节生长和发育中的作用^[73,74]。

MeRIP-seq/m⁶A-seq是首个使用m⁶A抗体开发的测序技术,mRNA被片段化为100~200 nt,与m⁶A抗体孵育,将洗脱后的RNA用于文库的构建和测序^[3,75].MeRIP-seq/m⁶A-seq操作简单,分辨率约200 nt^[53].基于MeRIP-seq的多个m⁶A测序结果已在不同植物中报道,包括拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)^[76]、水稻(*Oryza sativa*)^[77]、玉米(*Zea mays*)^[78,79]、番茄(*Solanum lycopersicum*)^[73]、高粱(*Sorghum bicolor*)^[80]、大麦(*Hordeum vulgare*)^[81]、苹果(*Malus pumila*)^[82]、草莓(*Fragaria vesca*)^[83]、衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)^[84]以及毛果杨(*Populus trichocarpa*)^[85].但MeRIP-Seq/m⁶A-seq也有局限性,如需要两个库,使得成本增加;且m⁶A位点只能局限于100~200 nt的区域,无法确定“峰值”内m⁶A位点的精确数量^[44]。

3.2 基于酶的检测技术

3.2.1 MAZTER-seq

Garcia-Campos等人^[86]开发了一种通过核糖核酸内切酶MazF对m⁶A甲基化位点进行单核苷酸分辨率的定量分析(m⁶A-sensitive RNA digestion via mazf followed by RNA quantitation and sequencing, MAZTER-

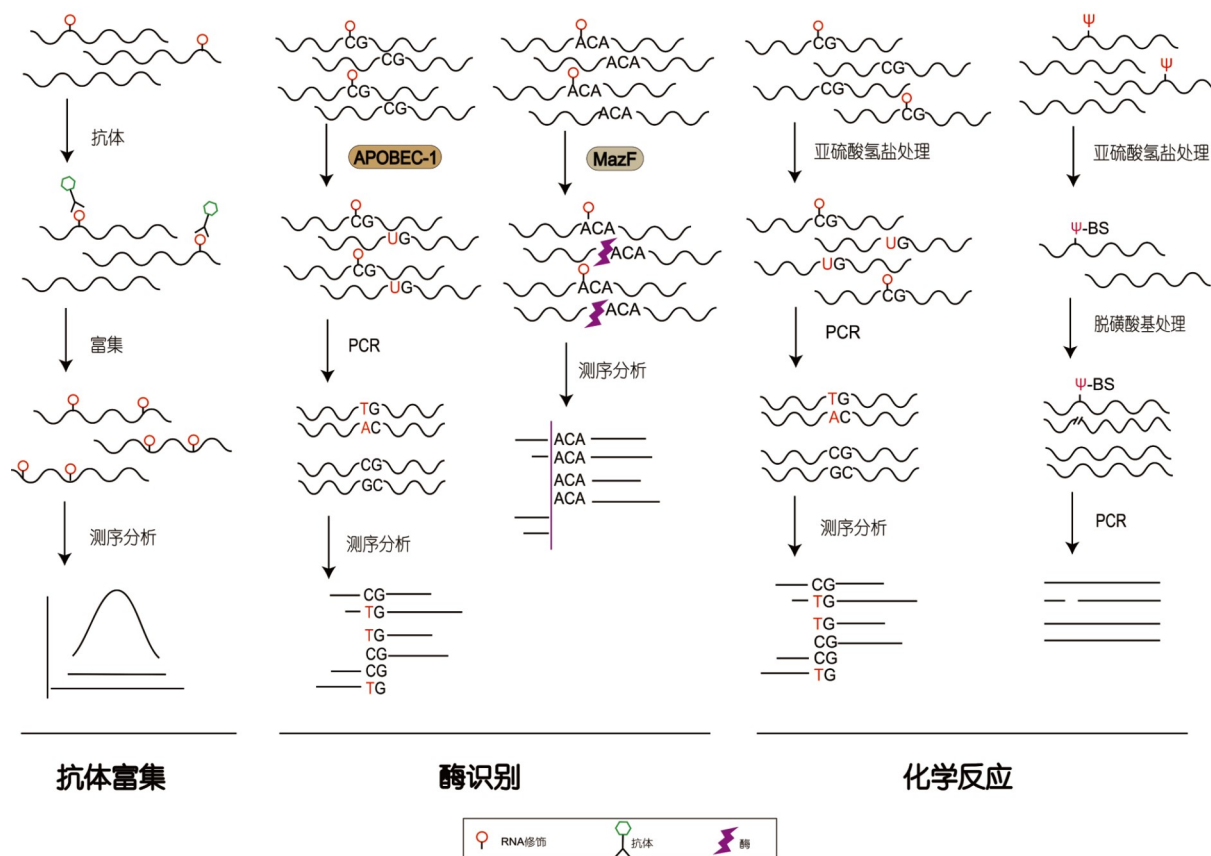


图1 (网络版彩色) RNA修饰检测技术示意图

Figure 1 (Color online) Diagram of the detection technologies for RNA modifications

seq). 因此, MAZTER-seq是利用MazF对RNA修饰位点进行选择性切割的原理, 将RNA修饰位点与序列信息相结合, 实现RNA修饰的检测^[87,88].

MAZTER-seq无需任何抗体或化学标记就可直接检测RNA修饰, 其灵敏度和精确度都达到较高水平, 并且还可以对不同修饰位点进行切割, 从而实现多种RNA修饰的同时检测^[88](图1). 由于该技术MazF进行修饰位点的选择性切割, 因此可以避免测序时出现噪音和假阳性, 提高了数据的可靠性和准确性, 能更好地了解RNA修饰的位置、类型和分布情况. Pandey和Pillai^[87]利用MAZTER-seq揭示了许多新位点, 并提出甲基化水平主要由甲基化位点的序列决定的观点.

3.2.2 DART-Seq技术

美国杜克大学医学院的Meyer课题组开发了一种对RNA m⁶A修饰进行检测的方法——DART-Seq, 即RNA修饰靶点附近的脱氨^[89]. APOBEC1是一种胞苷脱氨酶, 最初发现其具有编辑*ApoB* mRNA的能力, 被用于CRISPR/cas9为基础的基因组编辑方法中, 在靶向单链

DNA位点诱导C到U的转换^[90,91](图1). RNA-Seq技术可以检测到APOBEC1与m⁶A结合的结构域融合, 在表达时会导致m⁶A残基相邻位点上发生C到U的脱氨作用, 即可鉴定出是否发生了甲基化修饰. DART-Seq可以从10 ng的总RNA中识别出成千上万个细胞中的m⁶A位点^[89]. 这种方法可以分析单个转录本的RNA m⁶A分布情况, 提高了RNA m⁶A修饰检测的时间和成本.

3.2.3 eTAM-seq技术

Xiao等人^[92]报道了一种酶辅助测序技术, 即TadA辅助N6-甲基腺苷测序(eTAM-seq), 通过使用转移RNA腺苷脱氨酶(TadA)变体, 使得腺苷到肌苷的转化率高达99%, 并且可通过直观的方法来进行m⁶A特定位点的检测和定量, 以较高的分辨率来检测m⁶A的分布. Xiao和Zhu^[90]利用eTAM-seq, 定量了HeLa细胞和小鼠胚胎干细胞(mESCs)全转录组中的m⁶A, 发现不同甲基化水平的m⁶A位点分布几乎是均匀的. 此外, eTAM-seq不仅具有可靠性和可重复性, 还可进行位点特异性的m⁶A定量, 在有限的RNA下进行m⁶A的检测和定量^[93].

但eTAM-seq对低甲基化水平的位点不太敏感,且不适用于高度结构化的RNA。此外,相较于其他方法,eTAM-seq采用酶解脱氨机制,能够保持RNA的完整性^[94]。eTAM-seq的优势还在于只需少量细胞就可以进行RNA m⁶A的检测和定量,且未来有望于延伸到单细胞水平的检测^[90]。

3.3 基于化学方法的检测技术

3.3.1 UBS-seq技术

5-甲基胞嘧啶(5-methylcytosine, m⁵C)是一种重要的RNA转录后修饰,参与多种细胞过程,对维持细胞和生物体的正常生理功能至关重要。Dai等人^[95]提出了一种超快亚硫酸氢盐测序技术(UBS-seq)来检测DNA/RNA中的5-甲基胞嘧啶修饰,该技术利用高浓度亚硫酸氢盐试剂和较高的反应温度使得亚硫酸氢盐反应加速了约13倍,从而减少DNA损伤和降低背景噪声。

在以往的研究中,亚硫酸氢盐测序(BS-seq)是检测5-甲基胞嘧啶(5mC)的金标准,不但有着成本低、无危险性的优点,而且具有高灵敏度,且无需复杂的操作步骤,但也具有一定的局限性,如反应时间长、DNA损伤严重、出现假阳性等^[96]。这些缺点影响了m⁵C在RNA和DNA中的准确定位。Dai等人^[95]优化BS-seq为UBS-seq,利用更高的亚硫酸氢盐浓度和反应温度加速了反应。但UBS-seq也存在一定的不足,如样本需求量大、成本高、技术复杂和基因组比对问题等。此外,Dai等人^[95]还发现了UBS-2在98℃下3 min内即可介导C到U的定量转化,可以适用于RNA m⁵C的检测。此外,优化后的UBS-seq在RNA中能有效地减少假阳性,且仅需10~20 ng mRNA,即可在HeLa和HEK293T的mRNA中检测到数千个可靠的m⁵C位点。不仅如此,Dai等人^[95]还通过UBS-seq揭示了mRNA中m⁵C位点的序列基序,确定了NSUN2为主要的m⁵C甲基转移酶,促进了RNA m⁵C的功能研究。

3.3.2 f⁵C-seq技术

5-甲酰胞嘧啶核苷(5-formylcytosine, f⁵C)是一种转录后RNA修饰,对线粒体蛋白质合成至关重要^[97]。Lyu等人^[98]描述了一种用于定位RNA中f⁵C修饰的定量测序方法,即f⁵C-seq。基于化学原理,RNA中的f⁵C可以在较高温度下通过吡啶硼烷被还原为二氢尿嘧啶(DHU),在反转录时产生C-T的高突变率,从而实现RNA中f⁵C的检测和定量。

Lyu等人^[98]发现在HeLa细胞和小鼠胚胎干细胞

(mESCs)的caRNA上有多个位点存在f⁵C修饰,且检测到了几个高度修饰的f⁵C位点。f⁵C-seq作为一种检测和定量f⁵C修饰的测序方法,不仅简单、高效,还具有较高的准确性和定量可靠性。但同时也存在一定的缺点,如成本较高,样本需求量较大等。

3.3.3 m⁶A-SAC-seq技术

Ge等人^[99]开发了一种用于定量RNA m⁶A的测序方法—m⁶A选择性烯丙基化学标记测序(m⁶A-selective allyl chemical labeling and sequencing, m⁶A-SAC-seq),以检测RNA m⁶A的修饰。m⁶A-SAC-seq通过在反应过程中添加放线菌素D,抑制RNA反转录成cDNA,提高了比对率。由于添加了二甲基亚砜(DMSO)和六次氨合钴(III)氯化物(Co(NH₃)₆Cl₃),使单链DNA的连接效率得到显著提高。此外,使用磁珠进行纯化更有利于重复。但是该方法对测序深度要求较高,且数据处理较为复杂,具有一定的技术挑战性。

m⁶A-SAC-seq作为一种先进的位点特异性测序方法,具有可重复性和单碱基分辨率高的优势,对样本要求低且识别的m⁶A位点多,具有广泛的应用潜力^[98,100]。当使用有限的样本RNA时,可以通过增加测序深度来提高数据质量。此外,该方法不需要对细胞进行代谢标记或转染,也可以对新鲜、固定或冷冻组织样本的RNA进行分析。

3.3.4 BID-seq技术

假尿嘧啶(Ψ)作为一种丰富的RNA修饰,不仅存在于rRNA、tRNA和snRNA中,还存在于哺乳动物mRNA中。Zhang等人^[101]利用亚硫酸氢盐在Ψ上的化学性质,开发了一种定量方法—亚硫酸氢盐诱导缺失测序(BID-seq),能在全转录组水平上以单碱基分辨率绘制RNA Ψ的分布^[102,103](图1)。

BID-seq可揭示假尿苷化的序列基序,将假尿苷合成酶分配到单个位点^[104]。此外,BID-seq背景噪音较低,但对样本处理的需求较高,且应用范围具有一定的局限性。Zhang等人^[101]通过BID-seq在HeLa细胞、3种人类细胞和12种小鼠组织中均检测到了多个Ψ位点,揭示TRUB1在HeLa细胞中调控mRNA稳定性。此外,通过BID-seq还证明了哺乳动物mRNA终止密码子内存在Ψ修饰,为未来研究Ψ在mRNA和其他RNA中的生物学功能提供了理论基础。

与传统方法不同的是,BID-seq只需要10~20 ng的RNA即可进行,且无需基于抗体的下拉富集,成本相对较低。此外,BID-seq不仅可以检测短RNA和结构化

RNA中的 Ψ ,还可以在低丰度的RNA中绘制 Ψ 分布,且在定量时还可以监测 Ψ 修饰位点的变化,为研究不同生物过程中 Ψ 的动态奠定了基础。

3.3.5 GLORI技术

Shen等人^[105]开发了GLORI(glyoxal and nitrite-mediated deamination of unmethylated adenosine),一种单碱基分辨率的全转录组定量RNA m^6A 方法。该方法是在乙二醛和亚硝酸盐的化学反应基础上,选择性地将来甲基化的腺苷脱氨,同时保持 m^6A 的完整性,确保RNA m^6A 在单碱基分辨率下的定量^[106]。

GLORI可实现98.0%~99.0%的A-G转换,且 m^6A 不会发生脱氨反应,可检测到序列中所有的 m^6A 位点,具有可靠性和高灵敏度^[105]。GLORI需要100~200 ng RNA的起始材料,可以是不同组织或细胞的RNA样品。相比于其他方法,GLORI可以提供更准确、更全面的RNA m^6A 修饰图谱。Liu等人^[107]利用GLORI定量了小鼠和人

类细胞的 m^6A 修饰,通过检测应激情况下 m^6A 修饰的动态变化,探究了 m^6A 修饰对基因表达水平的调控机制。GLORI是一种无偏、便捷且易操作的 m^6A 定量方法,具有准确性和可重复性。但缺点是与基于富集的方法相比,测序成本相对较高。

3.3.6 PRAISE技术

Zhang等人^[108]开发了一种以单碱基分辨率定量检测假尿嘧啶 Ψ 的方法,通过亚硫酸盐对 Ψ 的选择性化学标记来诱导反转录过程中的核苷酸缺失,命名为“PRAISE”(图1)。与基于CMC的方法相比,PRAISE可以更准确地检测 Ψ 。此外,PRAISE可对 Ψ 位点进行位点特异性和定量分析,避免了复杂的化学合成步骤,方便快捷。但PRAISE也存在一定的局限性,需要较高的测序深度才能对 Ψ 位点进行全转录组定量分析。此外,关于RT中删除信号生成的详细机制也尚不清楚,可能受到RT酶的类型和RT条件的影响。总之,PRAISE作为一

表 1 RNA修饰的主要检测技术及其特点

Table 1 Detection technologies and characteristics of RNA modifications

分类	检测技术	修饰类型	优点	缺点	文献
定量检测	2D-TLC	$m^6A/m^5C/s^2U$	操作简便,适用性广,成本低	灵敏度低,样品处理困难	[19]
	Dot blot	$m^6A/m^7G/m^5C$	灵敏度高,选择性强	可重复性和准确性有限	[22]
	HPLC	$m^6A/m^7G/m^5C$	可结合不同的检测方法	不能直接确定修饰类型和位置	[30]
	LC-MS	$m^6A/m^2G/m^5U$	高灵敏度,高选择性	步骤复杂	[41]
	LC-MS/MS	$m^6A/m^2G/m^5U$	可同时检测和定量多种修饰	数据复杂,操作要求高	[43]
位点检测	SCARLET	$m^6A/m^5C/\Psi$	高灵敏度和分辨率,可直接检测	实验操作复杂,适用性限制,数据分析复杂	[47]
	SELECT	m^6A	操作简单,步骤少	需要对照组	[50]
	ESI-MS	$m^6A/m^5C/\Psi$	高灵敏度,可定量	成本高,对RNA结构敏感	[54]
抗体	CLIP	$m^6A/m^7G/m^2G/m^5U$	可标记修饰位点,高分辨率	程序复杂,易出现误差和干扰	[64]
	MeRIP-Seq	$m^6A/m^6Am/m^1G/m^2G/m^5U$	高灵敏度,高特异性	抗体特异性影响较大,数据量大且复杂,分辨率低	[75]
	MAZTER-seq	$m^6A/m^5C/\Psi/m^2G$	快速高效,可靠性	花费高,数据处理复杂	[86]
酶	DART-Seq	m^6A/m^1A	高灵敏度,适用性广	操作复杂,分析难度大	[89]
	eTAM-seq	m^6A	高分辨率,可重复性	对低甲基化水平位点不敏感,不适用于高度结构化的RNA	[92]
	UBS-seq	m^5C	缩短反应时间,减少假阳性	成本高,样本需求量大	[95]
	f^5C -seq	f^5C	快速高效,准确性高	数据处理复杂,成本较高,样本需求量大	[98]
测序检测	m^6A -SAC-seq	m^6A	样本要求低,单碱基分辨率,具有可重复性	测序深度要求高	[99]
	BID-seq	Ψ	RNA起始量少,成本低	样本要求高	[101]
	GLORI	m^6A	单碱基分辨率,高灵敏度	成本较高	[105]
	PRAISE	Ψ	准确性,方便快捷	需要较高的测序深度	[108]

种灵敏且方便的方法来检测和定量转录组中的 Ψ , 可以应用于揭示转录本中 Ψ 的修饰水平, 为阐明mRNA假尿苷化的功能和机制提供了巨大贡献. 表1总结了RNA修饰的主要检测技术及其特点.

4 总结与展望

RNA修饰检测技术的开发和应用对RNA修饰研究领域的发展具有重要意义. 本综述系统介绍了目前常见的RNA修饰检测技术, 并总结了其优缺点及最新研究进展, 为深入探究RNA修饰的生物学功能奠定了基础. 然而, RNA修饰检测技术还存在一些问题和挑战: (1) 目前二代测序技术仍依赖反转录和PCR扩增等步骤, 可能引起错误率增加, 还受到测序长度较短的限制; (2) 基于化学试剂处理的测序方法虽然具有简单、易于操作和成本低等优点, 但是它也存在一定的局限性, 如反应条件不够温和, 可能对RNA造成损伤; (3) 目前的RNA检测技术无法直接在单细胞水平实现, 无法同时确定单个RNA分子上不同种类的修饰.

对未来的RNA修饰检测技术而言, 开发更加高效、高通量、高分辨率的检测方法至关重要, 在以下几个方面有待深入研究.

(1) 纳米孔直接RNA测序技术(nanopore direct RNA sequencing-based detection technology)具有单分子测序、无需PCR扩增、读取长度增加及无系统偏差等特点, 可以提供全长转录本修饰图谱. 近年来, 已经开发了许多基于纳米孔测序数据来预测RNA修饰的软件工具, 例如EpiNano、Nanom⁶A、NanoRMS和DENA等, 推动了RNA修饰相关研究的发展. 此外, 针对海量的RNA修饰数据, 需要建立更加精确和高效的算法和数据分析方法, 以探究RNA修饰的生物学功能.

(2) 由于RNA不同修饰之间的丰度差异很大, 因此, 检测技术的灵敏度、准确性和高效性至关重要, 开发快速且可同时识别多个RNA修饰的高通量技术尤为重要.

(3) 目前在单细胞水平上对RNA修饰进行检测方法较少, 且需要依赖于抗体或酶, 因此, 开发可直接在单细胞水平上检测单个RNA分子上不同种类修饰的检测技术具有重要意义, 为揭示RNA修饰在细胞发育和分化过程中的作用机制提供重要参考.

总的来说, RNA修饰检测技术的不断更新和发展将有助于研究RNA修饰的功能和作用机制, 从而揭示RNA修饰的生物学意义, 为进一步探究RNA修饰在表观遗传中的作用提供了理论基础.

参考文献

- Zhang Y, Lu L, Li X. Detection technologies for RNA modifications. *Exp Mol Med*, 2022, 54: 1601–1616
- Li X, Xiong X, Wang K, et al. Transcriptome-wide mapping reveals reversible and dynamic N¹-methyladenosine methylome. *Nat Chem Biol*, 2016, 12: 311–316
- Meyer K D, Saletore Y, Zumbo P, et al. Comprehensive analysis of mRNA methylation reveals enrichment in 3' UTRs and near stop codons. *Cell*, 2012, 149: 1635–1646
- Arango D, Sturgill D, Alhusaini N, et al. Acetylation of cytidine in mRNA promotes translation efficiency. *Cell*, 2018, 175: 1872–1886.e24
- Luo G Z, MacQueen A, Zheng G, et al. Unique features of the m⁶A methylome in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Commun*, 2014, 5: 5630
- Malbec L, Zhang T, Chen Y S, et al. Dynamic methylome of internal mRNA N⁷-methylguanosine and its regulatory role in translation. *Cell Res*, 2019, 29: 927–941
- Sugita A, Kuruma S, Yanagisawa N, et al. The cap-specific m⁶A methyltransferase, PCIF1/CAPAM, is dynamically recruited to the gene promoter in a transcription-dependent manner. *J Biochem*, 2021, 170: 203–213
- Dai Q, Moshitch-Moshkovitz S, Han D, et al. Nm-seq maps 2'-O-methylation sites in human mRNA with base precision. *Nat Methods*, 2017, 14: 695–698
- Levanon E Y, Eisenberg E, Yelin R, et al. Systematic identification of abundant A-to-I editing sites in the human transcriptome. *Nat Biotechnol*, 2004, 22: 1001–1005
- Squires J E, Patel H R, Nousch M, et al. Widespread occurrence of 5-methylcytosine in human coding and non-coding RNA. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40: 5023–5033
- Delatte B, Wang F, Ngoc L V, et al. Transcriptome-wide distribution and function of RNA hydroxymethylcytosine. *Science*, 2016, 351: 282–285
- Chang H, Lim J, Ha M, et al. TAIL-seq: Genome-wide determination of poly(A) tail length and 3' end modifications. *Mol Cell*, 2014, 53: 1044–1052
- Carlile T M, Rojas-Duran M F, Zinshteyn B, et al. Pseudouridine profiling reveals regulated mRNA pseudouridylation in yeast and human cells. *Nature*, 2014, 515: 143–146

- 14 Huang M H, Wang J T, Zhang J H, et al. Mitochondrial RNA m³C methyltransferase METTL8 relies on an isoform-specific N-terminal extension and modifies multiple heterogenous tRNAs. *Sci Bull*, 2023, 68: 2094–2105
- 15 Zhao X, Zhang Y, Hang D, et al. Detecting RNA modification using direct RNA sequencing: A systematic review. *Comput Struct Biotechnol J*, 2022, 20: 5740–5749
- 16 Zhong S, Li H, Bodi Z, et al. MTA is an *Arabidopsis* messenger RNA adenosine methylase and interacts with a homolog of a sex-specific splicing factor. *Plant Cell*, 2008, 20: 1278–1288
- 17 Gocan S. Two-dimensional thin-layer chromatography. *J Liquid Chromatogr Relat Technol*, 2004, 27: 1105–1113
- 18 Bodi Z, Fray R G. Detection and quantification of N⁶-methyladenosine in messenger RNA by TLC. *Methods Mol Biol*, 2017, 1562: 79–87
- 19 Keith G. Mobilities of modified ribonucleotides on two-dimensional cellulose thin-layer chromatography. *Biochimie*, 1995, 77: 142–144
- 20 Zhao X, Yu Y T. Detection and quantitation of RNA base modifications. *RNA*, 2004, 10: 996–1002
- 21 Grosjean H, Droogmans L, Roovers M, et al. Detection of enzymatic activity of transfer RNA modification enzymes using radiolabeled tRNA substrates. *Method Enzymol*, 2007, 425: 55–101
- 22 Nagarajan A, Janostiak R, Wajapeyee N. Dot blot analysis for measuring global N⁶-methyladenosine modification of RNA. *Methods Mol Biol*, 2019, 1870: 263–271
- 23 Miao Z, Xin N, Wei B, et al. 5-hydroxymethylcytosine is detected in RNA from mouse brain tissues. *Brain Res*, 2016, 1642: 546–552
- 24 Cho J, Song H, Yoon H C, et al. Rapid dot-blot immunoassay for detecting multiple *Salmonella enterica* serotypes. *J Microbiol Biotechnol*, 2024, 34: 340–348
- 25 Hou L, Su Q, Zhang Y, et al. Development of a PCR-based dot blot assay for the detection of fowl adenovirus. *Poultry Sci*, 2022, 101: 101540
- 26 Mattio M C, Peretti Canale M V, Lurá M C, et al. Validación de una técnica de Dot blot para la detección de *Cercospora kikuchii* en plantas de soja. *Revista Argentina de Microbiol*, 2018, 50: 211–215
- 27 Henry Sum M S, Yee S F, Eng L, et al. Development of an indirect ELISA and dot-blot assay for serological detection of rice tungro disease. *Biomed Res Int*, 2017, 2017: 1–7
- 28 Jia G, Fu Y, Zhao X, et al. N⁶-methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO. *Nat Chem Biol*, 2011, 7: 885–887
- 29 Kašpar M, Bajer T, Bajerová P, et al. Comparison of phenolic profile of balsamic vinegars determined using liquid and gas chromatography coupled with mass spectrometry. *Molecules*, 2022, 27: 1356
- 30 Schieppati D, Patience N A, Campisi S, et al. Experimental methods in chemical engineering: High performance liquid chromatography—HPLC. *Can J Chem Eng*, 2021, 99: 1663–1682
- 31 Lauman R, Garcia B A. Unraveling the RNA modification code with mass spectrometry. *Mol Omics*, 2020, 16: 305–315
- 32 Li S, Su K, Zhuang Z, et al. A simple, rapid, and practical method for single-cell proteomics based on mass-adaptive coating of synthetic peptides. *Sci Bull*, 2022, 67: 581–584
- 33 Xu G, Li J. Recent advances in mass spectrometry imaging for multiomics application in neurology. *J Comp Neurol*, 2018, 527: 2158–2169
- 34 Unsihuay D, Mesa Sanchez D, Laskin J. Quantitative mass spectrometry imaging of biological systems. *Annu Rev Phys Chem*, 2021, 72: 307–329
- 35 Li Z, Shi J, Yu L, et al. N⁶-methyl-adenosine level in *Nicotiana tabacum* is associated with tobacco mosaic virus. *Virol J*, 2018, 15: 87
- 36 Martínez-Pérez M, Aparicio F, López-Gresa M P, et al. *Arabidopsis* m⁶A demethylase activity modulates viral infection of a plant virus and the m⁶A abundance in its genomic RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114: 10755–10760
- 37 Lin S, Choe J, Du P, et al. The m⁶A methyltransferase METTL3 promotes translation in human cancer cells. *Mol Cell*, 2016, 62: 335–345
- 38 Schibler U, Kelley D E, Perry R P. Comparison of methylated sequences in messenger RNA and heterogeneous nuclear RNA from mouse L cells. *J Mol Biol*, 1977, 115: 695–714
- 39 Paris J, Morgan M, Campos J, et al. Targeting the RNA m⁶A reader YTHDF2 selectively compromises cancer stem cells in acute myeloid leukemia. *Cell Stem Cell*, 2019, 25: 137–148.e6
- 40 Tang Y, Xiong J, Jiang H P, et al. Determination of oxidation products of 5-methylcytosine in plants by chemical derivatization coupled with liquid chromatography/tandem mass spectrometry analysis. *Anal Chem*, 2014, 86: 7764–7772
- 41 Thüring K, Schmid K, Keller P, et al. LC-MS analysis of methylated RNA. *Methods Mol Biol*, 2017, 1562: 3–18
- 42 Yoluç Y, Ammann G, Barraud P, et al. Instrumental analysis of RNA modifications. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2021, 56: 178–204
- 43 Thüring K, Schmid K, Keller P, et al. Analysis of RNA modifications by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Methods*, 2016, 107: 48–56
- 44 Zheng H, Zhang X, Sui N. Advances in the profiling of N⁶-methyladenosine (m⁶A) modifications. *Biotechnol Adv*, 2020, 45: 107656
- 45 Pan H Y, Yu Y, Cao T, et al. Systematic profiling of exosomal small RNA epigenetic modifications by high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. *Anal Chem*, 2021, 93: 14907–14911
- 46 Guo Z, Bai Y, Zhang X, et al. RNA m⁶A methylation suppresses insect juvenile hormone degradation to minimize fitness costs in response to a

- pathogenic attack. *Adv Sci*, 2023, 11: e2307650
- 47 Liu N, Parisien M, Dai Q, et al. Probing N⁶-methyladenosine RNA modification status at single nucleotide resolution in mRNA and long noncoding RNA. *RNA*, 2013, 19: 1848–1856
- 48 Wang Y, Zhang Z, Sepich-Poore C, et al. LEAD-m⁶A-seq for locus-specific detection of N⁶-methyladenosine and quantification of differential methylation. *Angew Chem Int Ed*, 2021, 60: 873–880
- 49 Li X, Zhu P, Ma S, et al. Chemical pulldown reveals dynamic pseudouridylation of the mammalian transcriptome. *Nat Chem Biol*, 2015, 11: 592–597
- 50 Xiao Y, Wang Y, Tang Q, et al. An elongation- and ligation-based qPCR amplification method for the radiolabeling-free detection of locus-specific N⁶-methyladenosine modification. *Angew Chem Int Ed*, 2018, 57: 15995–16000
- 51 Castellanos-Rubio A, Santin I, Olazagoitia-Garmendia A, et al. A novel RT-QPCR-based assay for the relative quantification of residue specific m⁶A RNA methylation. *Sci Rep*, 2019, 9: 4220
- 52 Wang S, Wang J, Zhang X, et al. N⁶-methyladenine hinders RNA- and DNA-directed DNA synthesis: Application in human rRNA methylation analysis of clinical specimens. *Chem Sci*, 2016, 7: 1440–1446
- 53 Tang J, Chen S, Jia G. Detection, regulation, and functions of RNA N⁶-methyladenosine modification in plants. *Plant Commun*, 2023, 4: 100546
- 54 Jora M, Lobue P A, Ross R L, et al. Detection of ribonucleoside modifications by liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Gene Regulatory Mech*, 2019, 1862: 280–290
- 55 Yuan B F. Liquid chromatography-mass spectrometry for analysis of rna adenosine methylation. *Methods Mol Biol*, 2017, 1562: 33–42
- 56 Suzuki T, Ikeuchi Y, Noma A, et al. Mass spectrometric identification and characterization of RNA-modifying enzymes. *Methods Enzymol*, 2007, 425: 211–229
- 57 Schürch S. Characterization of nucleic acids by tandem mass spectrometry-The second decade (2004–2013): From DNA to RNA and modified sequences. *Mass Spectrometry Rev*, 2016, 35: 483–523
- 58 Akichika S, Suzuki T, Suzuki T. Mass spectrometric analysis of mRNA 5' terminal modifications. *Methods Enzymol*, 2021, 658: 407–418
- 59 Akichika S, Hirano S, Shichino Y, et al. Cap-specific terminal N⁶-methylation of RNA by an RNA polymerase II-associated methyltransferase. *Science*, 2019, 363: 6423
- 60 Pandolfini L, Barbieri I, Bannister A J, et al. METTL1 promotes let-7 microRNA processing via m⁷G methylation. *Mol Cell*, 2019, 74: 1278–1290.e9
- 61 Wu Z, Wang Y, Jia G. Detection methods of epitranscriptomic mark N⁶-methyladenosine. *Essays Biochem*, 2020, 64: 967–979
- 62 Dominissini D, Nachtergaele S, Moshitch-Moshkovitz S, et al. The dynamic N¹-methyladenosine methylome in eukaryotic messenger RNA. *Nature*, 2016, 530: 441–446
- 63 Zhang L S, Liu C, Ma H, et al. Transcriptome-wide mapping of internal N⁷-methylguanosine methylome in mammalian mRNA. *Mol Cell*, 2019, 74: 1304–1316.e8
- 64 Hoffman E A, Frey B L, Smith L M, et al. Formaldehyde crosslinking: A tool for the study of chromatin complexes. *J Biol Chem*, 2015, 290: 26404–26411
- 65 Ule J, Hwang H W, Darnell R B. The future of cross-linking and immunoprecipitation (CLIP). *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2018, 10: a032243
- 66 Blazie S M, Jin Y. Executing cell-specific cross-linking immunoprecipitation and sequencing (seCLIP) in *C. elegans*. *STAR Protocols*, 2023, 4: 101959
- 67 Darnell J C, Mele A, Hung K Y S, et al. Ultraviolet (UV) cross-linking of live cells, lysate preparation, and rnase titration for cross-linking immunoprecipitation (CLIP). *Cold Spring Harb Protoc*, 2018, 12: pdb.prot097949
- 68 Ke S, Alemu E A, Mertens C, et al. A majority of m⁶A residues are in the last exons, allowing the potential for 3' UTR regulation. *Genes Dev*, 2015, 29: 2037–2053
- 69 Linder B, Grozhik A V, Olarerin-George A O, et al. Single-nucleotide-resolution mapping of m⁶A and m⁶Am throughout the transcriptome. *Nat Methods*, 2015, 12: 767–772
- 70 Hussain S, Sajini A A, Blanco S, et al. NSun2-mediated cytosine-5 methylation of vault noncoding RNA determines its processing into regulatory small RNAs. *Cell Rep*, 2013, 4: 255–261
- 71 Kan L, Grozhik A V, Vedanayagam J, et al. The m⁶A pathway facilitates sex determination in *Drosophila*. *Nat Commun*, 2017, 8: 15737
- 72 Horlacher M, Wagner N, Moyon L, et al. Towards *in silico* CLIP-seq: Predicting protein-RNA interaction via sequence-to-signal learning. *Genome Biol*, 2023, 24: 180
- 73 Zhou L, Tian S, Qin G. RNA methylomes reveal the m⁶A-mediated regulation of DNA demethylase gene SIDML2 in tomato fruit ripening. *Genome Biol*, 2019, 20: 156
- 74 Anderson S J, Kramer M C, Gosai S J, et al. N⁶-methyladenosine inhibits local ribonucleolytic cleavage to stabilize mRNAs in *Arabidopsis*. *Cell*

- Rep, 2018, 25: 1146–1157.e3
- 75 Dominissini D, Moshitch-Moshkovitz S, Schwartz S, et al. Topology of the human and mouse m⁶A RNA methylomes revealed by m⁶A-seq. *Nature*, 2012, 485: 201–206
 - 76 Wan Y, Tang K, Zhang D, et al. Transcriptome-wide high-throughput deep m⁶A-seq reveals unique differential m⁶A methylation patterns between three organs in *Arabidopsis thaliana*. *Genome Biol*, 2015, 16: 272
 - 77 Li Y, Wang X, Li C, et al. Transcriptome-wide N⁶-methyladenosine profiling of rice callus and leaf reveals the presence of tissue-specific competitors involved in selective mRNA modification. *RNA Biol*, 2014, 11: 1180–1188
 - 78 Luo J H, Wang Y, Wang M, et al. Natural variation in RNA m⁶A methylation and its relationship with translational status. *Plant Physiol*, 2020, 182: 332–344
 - 79 Miao Z, Zhang T, Qi Y, et al. Evolution of the RNA N⁶-methyladenosine methylome mediated by genomic duplication. *Plant Physiol*, 2020, 182: 345–360
 - 80 Zheng H, Sun X, Li J, et al. Analysis of N⁶-methyladenosine reveals a new important mechanism regulating the salt tolerance of sweet sorghum. *Plant Sci*, 2021, 304: 110801
 - 81 Su T, Fu L, Kuang L, et al. Transcriptome-wide m⁶A methylation profile reveals regulatory networks in roots of barley under cadmium stress. *J Hazard Mater*, 2022, 423: 127140
 - 82 Hou N, Li C, He J, et al. MdMTA-mediated m⁶A modification enhances drought tolerance by promoting mRNA stability and translation efficiency of genes involved in lignin deposition and oxidative stress. *New Phytol*, 2022, 234: 1294–1314
 - 83 Zhou L, Tang R, Li X, et al. N⁶-methyladenosine RNA modification regulates strawberry fruit ripening in an ABA-dependent manner. *Genome Biol*, 2021, 22: 168
 - 84 Lv Y, Han F, Liu M, et al. Characteristics of N⁶-methyladenosine modification during sexual reproduction of *Chlamydomonas Reinhardtii*. *Genomics Proteomics BioInf*, 2022, 21: 756–768
 - 85 Gao Y, Liu X, Wu B, et al. Quantitative profiling of N⁶-methyladenosine at single-base resolution in stem-differentiating xylem of *Populus trichocarpa* using Nanopore direct RNA sequencing. *Genome Biol*, 2021, 22: 22
 - 86 Garcia-Campos M A, Edelheit S, Toth U, et al. Deciphering the “m⁶A code” via antibody-independent quantitative profiling. *Cell*, 2019, 178: 731–747.e16
 - 87 Pandey R R, Pillai R S. Counting the cuts: MAZTER-seq quantifies m⁶A levels using a methylation-sensitive ribonuclease. *Cell*, 2019, 178: 515–517
 - 88 Zhang Z, Chen L Q, Zhao Y L, et al. Single-base mapping of m⁶A by an antibody-independent method. *Sci Adv*, 2019, 5: eaax0250
 - 89 Meyer K D. DART-seq: An antibody-free method for global m⁶A detection. *Nat Methods*, 2019, 16: 1275–1280
 - 90 Tegowski M, Zhu H, Meyer K D. Detecting m⁶A with *In vitro* DART-Seq. *Methods Mol Biol*, 2022, 2404: 363–374
 - 91 Komor A C, Kim Y B, Packer M S, et al. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*, 2016, 533: 420–424
 - 92 Xiao Y L, Liu S, Ge R, et al. Transcriptome-wide profiling and quantification of N⁶-methyladenosine by enzyme-assisted adenosine deamination. *Nat Biotechnol*, 2023, 41: 993–1003
 - 93 Gale D, Lawson A R J, Howarth K, et al. Development of a highly sensitive liquid biopsy platform to detect clinically-relevant cancer mutations at low allele fractions in cell-free DNA. *PLoS ONE*, 2018, 13: e0194630
 - 94 Schaefer M, Pollex T, Hanna K, et al. RNA cytosine methylation analysis by bisulfite sequencing. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37: e12
 - 95 Dai Q, Ye C, Irklyenko I, et al. Ultrafast bisulfite sequencing detection of 5-methylcytosine in DNA and RNA. *Nat Biotechnol*, 2024, doi: 10.1038/s41587-023-02034-wdoi: 10.1038/s41587-023-02034-w
 - 96 Frommer M, McDonald L E, Millar D S, et al. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 1827–1831
 - 97 Wang Y, Chen Z, Zhang X, et al. Single-base resolution mapping reveals distinct 5-formylcytidine in *Saccharomyces cerevisiae* mRNAs. *ACS Chem Biol*, 2022, 17: 77–84
 - 98 Lyu R, Pajdzik K, Sun H L, et al. A quantitative sequencing method for 5-formylcytosine in RNA. *Israel J Chem*, 2024, 64: e202300111
 - 99 Ge R, Ye C, Peng Y, et al. m⁶A-SAC-seq for quantitative whole transcriptome m⁶A profiling. *Nat Protoc*, 2023, 18: 626–657
 - 100 Hu L, Liu S, Peng Y, et al. m⁶A RNA modifications are measured at single-base resolution across the mammalian transcriptome. *Nat Biotechnol*, 2022, 40: 1210–1219
 - 101 Zhang L S, Ye C, Ju C W, et al. BID-seq for transcriptome-wide quantitative sequencing of mRNA pseudouridine at base resolution. *Nat Protoc*, 2024, 19: 517–538
 - 102 Khoddami V, Yerra A, Mosbrugger T L, et al. Transcriptome-wide profiling of multiple RNA modifications simultaneously at single-base resolution. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116: 6784–6789

- 103 Fleming A M, Xiao S, Burrows C J. Pseudouridine and N¹-methylpseudouridine display pH-independent reaction rates with bisulfite yielding ribose adducts. [Org Lett](#), 2022, 24: 6182–6185
- 104 Dai Q, Zhang L S, Sun H L, et al. Quantitative sequencing using BID-seq uncovers abundant pseudouridines in mammalian mRNA at base resolution. [Nat Biotechnol](#), 2023, 41: 344–354
- 105 Shen W, Sun H, Liu C, et al. GLORI for absolute quantification of transcriptome-wide m⁶A at single-base resolution. [Nat Protoc](#), 2024, 19: 1252–1287
- 106 Shen W, Wang J. Deamination- or N-nitrosation-based methods for m⁶A Profiling. [Israel J Chem](#), 2024, 64: e202300180
- 107 Liu C, Sun H, Yi Y, et al. Absolute quantification of single-base m⁶A methylation in the mammalian transcriptome using GLORI. [Nat Biotechnol](#), 2023, 41: 355–366
- 108 Zhang M, Jiang Z, Ma Y, et al. Quantitative profiling of pseudouridylation landscape in the human transcriptome. [Nat Chem Biol](#), 2023, 19: 1185–1195

Summary for “RNA修饰检测技术的研究进展”

Recent advances in detection techniques for RNA modifications

Mei Yang^{1,2,3,4}, Yanrui Ge^{1,2,3,4}, Dingjie Wu^{1,2,3,4}, Jinxing Lin^{1,2,3,4} & Ruili Li^{1,2,3,4*}

¹ State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, College of Biological Sciences and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China;

² National Engineering Laboratory for Tree Breeding, College of Biological Sciences and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China;

³ Key Laboratory of Genetics and Breeding in Forest Trees and Ornamental Plants, Ministry of Education, College of Biological Sciences and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China;

⁴ The Tree and Ornamental Plant Breeding and Biotechnology Laboratory of National Forestry and Grassland Administration, College of Biological Sciences and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

* Corresponding author, E-mail: liruli@bjfu.edu.cn

RNA is a single-stranded macromolecule that consists of adenosine (A), guanosine (G), uridine (U), and cytidine (C) nucleotides. It has been demonstrated that RNA can participate in the flow of genetic information and regulate gene expression. RNA modifications, referring to the addition of chemical groups at specific positions, can increase the complexity and modify the function of RNA molecules. These modifications are widely found in various types of RNA, including messenger RNA (mRNA), long non-coding RNA (lncRNA), transfer RNA (tRNA), ribosomal RNA (rRNA), and micro RNA (miRNA) in both prokaryotes and eukaryotes. Previous studies have shown that RNA undergoes extensive dynamic and reversible modifications that participate in biological processes, including gene expression regulation, RNA translation, cell differentiation, and disease development. Over 160 different types of RNA modifications have been identified through biological research, including N¹-methyladenosine (m¹A), N⁴-acetylcytidine (ac⁴C), N⁶-methyladenosine (m⁶A), N⁷-methylguanosine (m⁷G), 2'-O-dimethyladenosine (m⁶Am), 2'-O-methylated nucleosides (Nm), 5-methylcytosine (m⁵C), 5-hydroxymethylcytosine (hm⁵C), inosine (I), and pseudouridine (Ψ). Additionally, research on the functions of RNA modifications has been promoted by the development of detection techniques. Therefore, techniques that detect RNA modifications can provide evidence for a comprehensive understanding of the epigenetics and offer powerful tools for functional studies.

Over the past several decades, researchers have developed unique methods to detect the various forms and distribution of RNA modifications. Existing detection techniques for RNA modifications can be grouped into three categories based on different detection principles, including quantification methods, site-specific detection methods, and sequencing methods. Due to the diversity of chemical modifications in RNA metabolism and functional regulation, detection techniques for RNA modification provide comprehensive insights into the modification status of the transcriptome and further lay the foundation for studying the functions of RNA modifications. In this review, we systematically introduce the principles, procedures, benefits, and drawbacks of different detection techniques for RNA modifications. Moreover, we summarize the latest research progress in RNA modification detection techniques, providing better insights and approaches to further study the biological functions and mechanisms of RNA modifications. Taken together, the continuous growth of detection techniques will improve the study of the functions and mechanisms of RNA modifications, providing a theoretical basis for further exploring the roles of RNA modifications in epigenetics. Therefore, it is crucial to develop more efficient, high-throughput, and high-resolution detection methods for detection techniques of RNA modifications in the future.

RNA modifications, detection techniques, quantitative, site-specific, sequencing

doi: [10.1360/TB-2024-0097](https://doi.org/10.1360/TB-2024-0097)