

在 cDNA 文库构建中探究癌症病人血浆外泌体 miRNA 的特异性扩增

王娜¹, 何飞¹, 郁宏伟¹, 何栾樱¹, 熊国良², 卢建东², 喻长远¹, 王诗卉¹

1 北京化工大学 生命科学与技术学院, 北京 100029

2 深圳市中医院, 广东 深圳 518000

王娜, 何飞, 郁宏伟, 何栾樱, 熊国良, 卢建东, 喻长远, 王诗卉. 在 cDNA 文库构建中探究癌症病人血浆外泌体 miRNA 的特异性扩增. 生物工程学报, 2022, 38(6): 2213-2223.

WANG N, HE F, YU HW, HE LY, XIONG GL, LU JD, YU CY, WANG SH. Specific amplification of plasma exosome miRNA in cancer patients for construction of cDNA library. Chin J Biotech, 2022, 38(6): 2213-2223.

摘要: 血浆外泌体微小核糖核酸 (microRNAs, miRNAs) 与癌症的发生、诊断和治疗密切相关, 但其分子机制尚不明晰。本研究探讨了癌症病人血浆外泌体 miRNAs 在 cDNA 文库构建中非特异性扩增的解决方案。在酶切法中, 采用核酸外切酶 T (exonuclease T, EXOT) 和 phi29 DNA 聚合酶降解引物; 在磁珠法中, 利用 DNA 结合磁珠分离模板和引物。随后, 采取琼脂糖凝胶电泳和变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测磁珠分离情况, 运用 RT-qPCR 检测癌症病人血浆外泌体 miRNA 和不同连接物的含量变化。结果显示, 非特异性扩增来源于 miRNA 的连接物 USR5SR; 核酸外切酶 T (EXOT) 和 phi29 DNA 聚合酶虽可降解 USR5SR, 但模板链也会发生降解; 磁珠分离法中以 9% PEG 沉淀引物片段、15% PEG 沉淀模板链效果最佳。综上所述, 磁珠分离法能够高效解决 cDNA 文库构建中的非特异性扩增, 从而实现 293T 细胞和癌症病人血浆外泌体 miRNA cDNA 文库的成功构建。

关键词: microRNAs; cDNA 文库; 磁珠分离; 非特异性扩增

Received: September 30, 2021; **Accepted:** January 27, 2022; **Published online:** March 28, 2022

Supported by: National Mega-Project for Innovative Drugs, China (2019ZX09721001-007-002); Shenzhen Science and Technology Project, China (JCYJ20180507183842516); National Key Research and Development Program of China (218YFA0903000); National Natural Science Foundation of China (82174531, 21606013)

Corresponding authors: WANG Shihui. Tel: +86-64421335-203; E-mail: wangshihui@mail.buct.edu.cn
YU Changyuan. E-mail: yucy@mail.buct.edu.cn

基金项目: 国家十三五科技重大专项 (2019ZX09721001-007-002); 深圳科学技术项目 (JCYJ20180507183842516); 国家重点研发计划 (218YFA0903000); 国家自然科学基金 (82174531, 21606013)

Specific amplification of plasma exosome miRNA in cancer patients for construction of cDNA library

WANG Na¹, HE Fei¹, YU Hongwei¹, HE Luanying¹, XIONG Guoliang², LU Jiandong², YU Changyuan¹, WANG Shihui¹

¹ College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China

² Shenzhen Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shenzhen 518000, Guangdong, China

Abstract: Plasma exosome microRNAs (miRNAs) are closely related with the occurrence, diagnosis, and treatment of cancers. However, the underlying molecular mechanisms remain unclear. We herein investigated the solution for tackling the unspecific amplification of plasma exosome microRNAs from cancer patients during the construction of its cDNA library. For the restriction enzyme digesting method, the primers were degraded by exonuclease T (EXOT) and phi29 DNA polymerase. For the magnetic bead separation method, the templates and primers were separated through the DNA binding beads. The separation effects of magnetic beads were detected by agarose gel electrophoresis and modified polyacrylamide gel electrophoresis. The levels of plasma exosome miRNAs from cancer patients and various primers were assayed by RT-qPCR. The results indicated that the unspecific amplification stemmed from USR5SR. EXOT and phi29 DNA polymerase could degrade USR5SR, but the templates were also degraded simultaneously. Regarding the magnetic bead separation method, the best effect was achieved via precipitation of primer fragments by 9% PEG and precipitation of templates by 15% PEG. In conclusion, the magnetic bead separation method efficiently circumvented the unspecific amplification during the construction of cDNA library, and therefore led to the successful construction of cDNA library from plasma exosome miRNA of cancer patients and 293T cells.

Keywords: microRNAs; cDNA library; magnetic bead separation; non-specific amplification

近年来, 恶性肿瘤 (癌症) 已经成为威胁人类健康的重要因素, 根据 2021 年 1 月世界卫生组织国际癌症研究机构 (International Agency for Research on Cancer, IARC) 发布的最新一期全球癌症统计数据, 2020 年我国恶性肿瘤发病约为 457 万例, 死亡约为 300 万例, 平均每天超过 1 万人被确诊为癌症, 且肿瘤的发病率呈上升趋势。随着科技的发展, 癌症的治疗已有长足进步, 但研究癌症的发病机制仍然具有重要意义。

外泌体 (exosomes) 是一种能被机体内大

多数细胞分泌的直径约为 30–150 nm 的具有脂质双层膜的微小囊泡^[1]。它广泛存在并分布于各种体液中, 携带和传递重要的信号分子, 形成了一种全新的细胞间信息传递系统, 影响细胞的生理状态, 并与癌症等多种疾病的发生和进程密切相关, 是当前肿瘤标志物、癌症机理、药物开发等研究的热点^[2]。

微小核糖核酸 (microRNA, 简称 miRNA) 是一类内源性、非编码的单链小 RNA 分子, 长度约为 22 个核苷酸^[3]。miRNA 通过与 mRNA 的 3'端非翻译区完全或不完全互补结合

发挥基因调节作用^[4], 参与调控细胞的生长、增殖和凋亡。miRNAs 具有癌基因或抑癌基因的作用, 在肿瘤的形成过程中具有重要意义^[5], miRNA 对消化系统癌症、血液系统癌症和生殖系统癌症具有一定的调节作用^[6-9]。

2007 年, Valadi 等^[10]首次发现了外泌体中存在 miRNA, 在细胞中起到调节作用。已有研究发现, 血浆外泌体 miR-21 与口腔鳞状细胞癌相关^[11]。miR-128a 与肝细胞癌的发生相关^[12]。miR-494 在肝癌组织的表达和细胞增殖中发挥作用^[13]。在非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 患者血浆样本中 miR-22、miR-24 和 miR-34a 的表达明显升高, 而 miR-22 的高表达与疾病进展和培美曲塞化疗抵抗具有相关性, 因此可作为疗效评价的一项指标。早期乳腺癌患者的血清 miR-155、miR-19a、miR-181b 和 miR-24 升高^[14], 在高危患者升高更明显。而在接受乳房手术切除后, 上述 miRNAs 含量显著降低。而血清 miR-10b、miR-34a 和 miR-155 的表达变化与乳腺癌的转移相关^[15]。

基于此, 当前科学界普遍认为血浆外泌体 miRNAs 与癌症的发生、诊断和治疗密切相关, 因此将癌症病人的血浆外泌体 miRNA 通过逆转录的方式构建全长 cDNA 文库^[16], cDNA 文库对某种特定细胞中的基因组的表达状态及表达基因的功能和鉴定方面发挥重要作用, 细胞的表达可包含细胞内 miRNA 的全部信息, 能够为癌症发病机制、早期诊断、治疗与预后的研究提供重要信息^[17]。全长 cDNA 文库构建的首选方法是 RNA 转录 5' 末端转换机制 (switching mechanism at 5' end of the RNA transcript, SMART)^[18-19]。但是, 在构建过程中, 由于 Mg^{2+} 浓度、退火温度、引物特异性、dNTP 浓度、退火时间、DMSO 和甜菜碱等因素的影响^[20],

PCR 扩增会出现非特异性扩增, 其中引物特异性引发的非特异性扩增是经常出现的现象^[21]。因此, 对引物非特异性扩增的研究是 cDNA 文库构建中的重要科学问题, 降低非特异性扩增有利于提高 PCR 反应扩增效率, 从而提高 cDNA 文库的建库效率、全长比例和代表性^[22-23]。

本文探究了如何以酶切法和磁珠分离法解决由引物产生的非特异性扩增问题, 为癌症病人血浆外泌体 miRNA cDNA 文库的构建提供相关理论指导和技术支撑。

1 材料与方法

1.1 试验动物

SPF 级 BALB/c 小鼠, 雌雄不限, 6-8 周龄, 18-20 g, 由河南省实验动物中心提供, 许可证号: SCXK (豫) 2005-0001。MSCs 由大鼠股骨中分离提取, 连续传 10 代以上。293T 细胞和大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 由郑州大学生物化学教研室惠赠。

1.2 主要试剂及设备

RNA 提取试剂盒、琼脂糖、磁珠、异丙醇、蛋白酶 K 购自 TaKaRa 公司; 高保真 DNA 聚合酶购自 Thermo Fisher Scientific 公司; 核酸外切酶 T、核酸外切酶 1、DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶 2、T4 DNA 连接酶 1、DNA Marker 购自 NEW ENGLAND BioLabs (NEB) 公司; DMEM 高糖 (含 L-谷氨酰胺、酚红、不含丙酮酸钠) 和 HEPES 培养基购自 Solarbio 公司; 引物合成由生工生物工程 (上海) 股份有限公司完成。96 梯度三槽 PCR 仪, iCycling 系列 GT9612, 北京百泰克生物技术有限公司; 荧光定量 PCR 仪, BTK-96, 购自北京百泰克生物技术有限公司; NanoDrop 超微量紫外-可见光分光光度计, ND-ONE-W, 购自赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司。

1.3 主要方法

1.3.1 血浆外泌体的提取

100 μ L 血浆中加入 400 μ L PBS 并离心, 在 100 kDa 超滤管中离心 1–2 min, 2 次水洗后将其转移至离心管中。

1.3.2 Trizol 法提取 miRNA

取 250 μ L 收集到的外泌体混悬液于 1.5 mL 离心管中, 使用 RNA 提取试剂盒提取血浆外泌体中的 miRNA, 放于 -80°C 冰箱保存。

1.3.3 双链 cDNA 的合成

以 1 μ g miRNA 为模板连接 USR3SR 和 USR5SR, 反转录合成第一链 cDNA; 以第一链为模板, 扩增合成双链 cDNA (扩增程序为: 95°C 10 min, 95°C 30 s, 65°C 1 min, 40 个循环); 在 1.5% 琼脂糖凝胶上对 PCR 产物进行分析。

1.3.4 引物非特异性扩增来源

按照表 1 所示体系进行实验, 对照组探究 miRNA 对非特异性扩增的影响, 实验组 1 探究 USRILL 对非特异性扩增影响, 实验组 2 探究常规 qPCR 体系的非特异性扩增, 实验组 3 探究 5'端引物 (表 2) 对非特异性扩增影响, 实验组 4 探究 LNARTP108 和 USR5SR 连接对非特异性扩增影响, 实验组 5 探究 LNARTP108 对非特异性扩增影响, 扩增程序为: 95°C 10 min; 95°C 30 s, 65°C 1 min, 40 个循环。

1.3.5 酶切法去除非特异性扩增

EXOT 和 phi29 两种酶分别用于去除非特异性扩增的实验。体系配制: 1 μ L 10 μ mol/L 引物, 1 μ L phi29 酶或 1 μ L EXOT, 1 μ L 对应 phi29 缓冲液或 NEB 缓冲液, 用无酶水加至 10 μ L, 在 1.5% 琼脂糖凝胶电泳上分析。

表 1 探究非特异性扩增来源的体系设计

Table 1 Design for exploring the sources of non-specific amplification

Reagent name	Control group (μ L)	Experimental group 1 (μ L)	Experimental group 2 (μ L)	Experimental group 3 (μ L)	Reagent name	Experimental group 4 (μ L)	Experimental group 5 (μ L)
Control products	2.00	0.00	0.00	0.00	Control products	0.00	0.00
RT products	2.00	2.00	2.00	2.00	LNARTP 108	1.92	1.92
2 \times boost mix	5.00	5.00	5.00	5.00	2 \times boost mix	5.00	5.00
10 μ mol/L URP28	0.20	0.20	0.20	0.20	10 μ mol/L URP28	0.20	0.20
USR5SR primer	0.00	0.00	0.00	0.20	USR5SR	1.68	0.00
10 μ mol/L USRILL	0.20	0.00	0.20	0.00	10 mmol/L USRILL	0.20	0.20
LNAFAM	0.10	0.10	0.10	0.10	LNAFAM	0.10	0.10
ROX	0.10	0.10	0.10	0.10	ROX	0.10	0.10
Enzyme free water	2.40	2.60	2.40	2.40	Enzyme free water	0.80	2.48
Total	10.00	10.00	10.00	10.00	Total	10.00	10.00

表 2 引物序列

Table 2 Sequences of the primers

Primer names	Primer sequences (5'→3')	Size (bp)
USR3SR	AAAAAACCATCAATCGTGTGTCTAC	25
USR5SR	rGrUrUrCrArGrArGrUrUrCrUrArCrArGrUrCrCrGrArCrGrArUrCrNrNrNrN	60
USRRTP	GCCTCTGACTCCAGGATCTGTAGACCACACGATTGATGGTAGACACACGATTGATGG	57
USRILL	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGTTTCAGAGTTCTACAGTCCG*A	50
Cal01-P	rGrUrCrCrArCrUrCrCrGrUrArGrArUrCrUrGrUrUrC	44

1.3.6 磁珠分离实验去除非特异性扩增

配制 DNA binding bead mix, 加 $1 \times$ TE 至体积为 50 mL 备用。在 1.5 mL 离心管中加入 10 μ L 待分离产物、4 μ L 磁珠和 4.182 μ L DNA binding bead mix, 吹打 6–8 次, 孵育 5 min; 随后置于磁力架上反应至澄清, 吸取上清至 1.5 mL 离心管, 加入 10 μ L 无酶水, 孵育 2 min; 重复上述步骤后, 吸上清进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳。在 1.5 mL 离心管中加入 7.25 μ L 无酶水、5 μ L 上清和 27.75 μ L DNA binding bead mix, 吹打 6–8 次, 孵育 5 min, 磁力架上至澄清, 吸上清并转移至新 PCR 管, 在 1.5% 琼脂糖凝胶电泳上分析。

1.3.7 293T 细胞培养

37 $^{\circ}$ C 水浴锅中解冻 293T 细胞, 1 mL 细胞加入 2 mL DMEM 培养基, 离心 3–5 min, 弃上清, 1 mL 培养基打散细胞沉淀, 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养。

1.3.8 去除非特异性扩增验证实验

用 Trizol 法提取 293T 细胞总 RNA 和癌症病人血浆外泌体 miRNA, 进行磁珠分离优化后的 RT-qPCR 实验, 扩增程序为: 95 $^{\circ}$ C 10 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 65 $^{\circ}$ C 1 min, 40 个循环。通过扩增曲线进行非特异性扩增及扩增效率分析。

2 结果与分析

2.1 293T 细胞总 RNA 提取

Trizol 法提取总 RNA, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 质量, 293T 细胞培养至第 4 天, 细胞长到皿底约 80% (图 1B), 可以进行传代、冻存和上清液外泌体分离实验。提取的总 RNA 在 28S RNA 和 18S RNA 条带清晰 (图 1C), 表明 RNA 完整性较好, 通过 NanoDrop 仪器测定, 浓度约为 1–2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, RNA 内无 DNA、蛋白质和污染物, 可以进行后续实验。

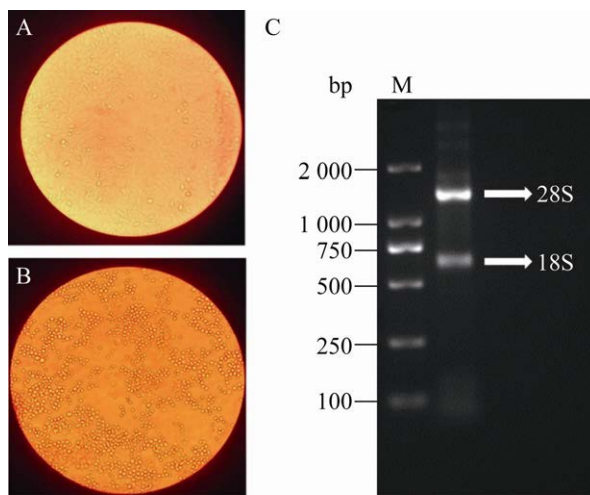


图 1 293T 细胞培养及 RNA 提取分析

Figure 1 293T cell cultivation and RNA extraction analysis. (A) 293T cell culture for one day. (B) 293T cells cultured for four days. (C) Total RNA of 293T cell. M-band is DNA marker.

2.2 模板链的合成

以 1 μg miRNA 为模板连接 USR3SR 和 USR5SR, 或连接 USR3SR 和 PolyA, 构建的模板链在 18% 尿素变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, miRNA 连接 USR5SR 和 USR3SR 的模板链、引物条带和 RNA 条带清晰, 在预期位置连接成功 (图 2A)。miRNA 连接 USR3SR 和 PolyA 的模板链构建条带清晰, 表明连接成功, miRNA 条带和 PolyA 模糊, 表明连接反应较为充分、PolyA 较为充分 (图 2B)。

2.3 引物非特异性扩增来源分析

按照连接两段引物构建的 miRNA cDNA 文库模板方案进行 RT-qPCR 实验, 对照组出现非特异性扩增曲线 (图 3B), 实验组 1、4 和 5 未出现非特异性扩增曲线 (图 3C, 3F, 3G), 实验组 2 和 3 中出现非特异性扩增曲线 (图 3D, 3E)。结果表明, miRNA、USRILL 和 LNARTP 不是非特异性扩增来源, USR5SR 产生非特异性扩增。

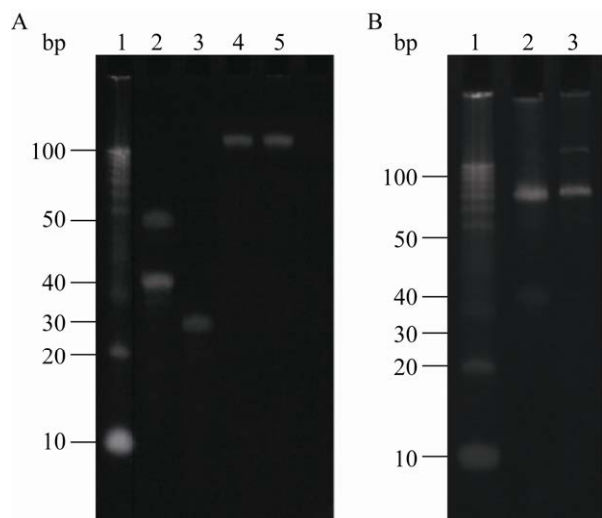


图 2 MIRNA 的 CDNA 文库模板链构建结果分析
Figure 2 Analysis of the constructed miRNA cDNA library template chain. (A) USR5SR+miRNA+USR3SR template chain; 1: 100 base pairs dsRNA ladder, NEB; 2: miRNA+USR5SR fragment; 3: USR3SR fragment; 4 and 5: USR5SR+miRNA+USR3SR fragment. (B) Poly+miRNA+USR3SR template strand; 1: 100 base pairs dsRNA ladder; 2: Poly+miRNA plus tail fragment; 3: Poly+miRNA+USR3SR fragment.

2.4 引物非特异性扩增的去除

酶切法去除非特异性扩增结果表明, phi29 DNA 聚合酶可以充分降解 USR5SR, 但对模板链会产生部分降解 (图 4A), 核酸外切酶 T 可以降解 USR5SR 和模板链 (图 4B)。表明酶切法不适合用于引物非特异性扩增的去除。

磁珠特异性地与靶序列结合, 使之具有顺磁性, 随后利用外加电场将其滞留, 从而与其他成分分离, 达到纯化和提高序列质量的目的^[24-25]。磁珠分离法去除非特异性扩增结果表明, 7%、9%和 10% PEG 均可沉淀引物二聚体和非目标大分子产物, 其中 9% PEG 沉淀分子范围更大、沉淀小片段更少, 并且沉淀上清液中引物小片

段更多 (图 4C)。随着 PEG 浓度提高, 磁珠吸附范围逐渐变宽, 10% PEG 沉淀大片段范围窄, 12% PEG 和 15% PEG 沉淀大片段范围基本一致, 15% PEG 沉淀小片段更少 (图 4D), 表明用 9% PEG 沉淀引物二聚体、用 15% PEG 沉淀模板链效果最优。

2.5 非特异性扩增去除验证

用上述优化的磁珠分离法 (9% PEG 沉淀引物二聚体, 15% PEG 沉淀模板链) 去除非特异性扩增, 将合成 RNA、293T 细胞总 RNA 和癌症病人血浆外泌体 miRNA 分别进行验证实验。结果表明, 合成 RNA 实验组中出现唯一扩增曲线 (图 5A), 对照组中未出现扩增曲线 (图 5B); 293T 细胞总 RNA 实验组扩增对应曲线, 对照组中未出现扩增曲线 (图 5C); 癌症病人血浆外泌体实验组扩增对应曲线, 对照组中未出现扩增曲线, 表明未出现非特异性扩增 (图 5D)。以上结果说明, 优化的磁珠分离法可以有效解决模板中引物引起的非特异性扩增问题, 并成功构建了 293T 细胞总 RNA 和癌症病人血浆外泌体 miRNA cDNA 文库模板。

2.6 RT-qPCR 扩增效率计算

将癌症病人血浆外泌体 miRNA 利用优化的磁珠分离法 (9% PEG 沉淀引物二聚体, 15% PEG 沉淀模板链) 去除非特异性扩增后, 进行 RT-qPCR 扩增实验验证其扩增效率。结果表明, 浓度是 10 倍梯度的前提下, C_t 值相差约为 3.3 (图 6A), 符合标准曲线绘制要求。将样品浓度和 C_t 值绘制标准曲线 (图 6B), 扩增效率为 98%, 相关系数为 0.998。以上结果说明利用去除非特异性扩增后的引物进行 RT-qPCR 扩增的扩增效率为 98%, 验证了 RT-qPCR 扩增数据的有效性。

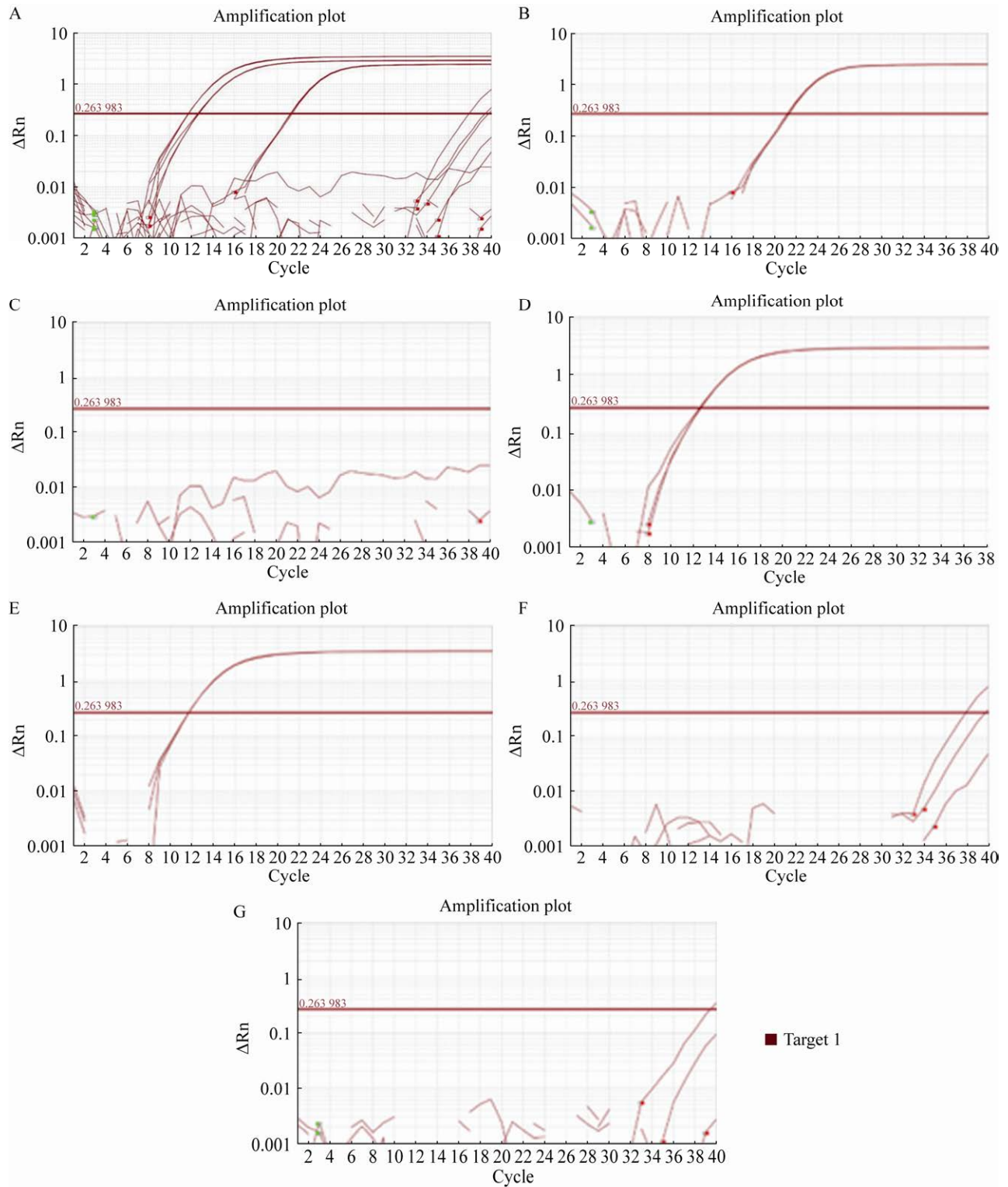


图3 引物非特异性扩增分析

Figure 3 Analysis of non-specific amplification of primers by RT-qPCR. (A) Experimental design of non-specific amplification sources. (B) Control group. (C) Experimental group 1. (D) Experimental group 2. (E) Experimental group 3. (F) Experimental group 4. (G) Experiment Group 5.

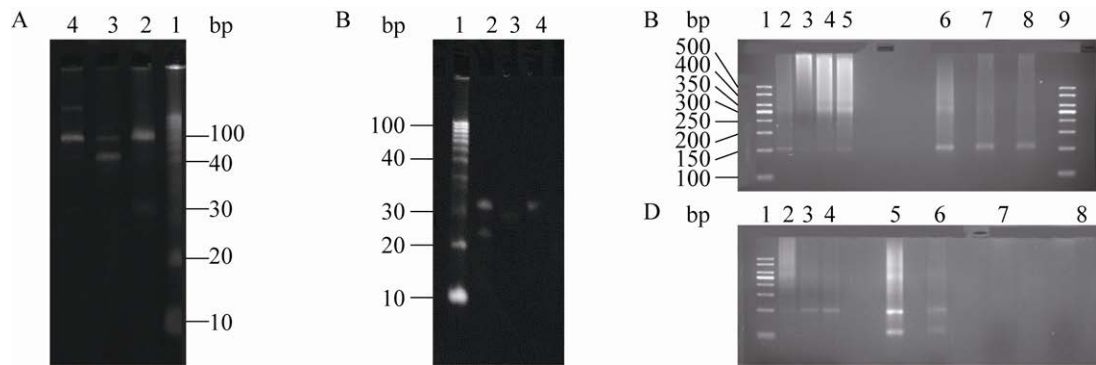


图 4 非特异性扩增去除分析

Figure 4 Analysis of removal of non-specific amplification. (A) Excision of USR5SR by phi29 DNA polymerase; 1: 100 base pairs dsRNA ladder; 2: USR5SR+LNARTP108 mixed; 3: product after digestion; 4: template chain control group. (B) Excision of USR5SR by exonuclease T; 1: 100 base pairs dsRNA ladder, 2: USR5SR+miRNA, 3: digested miRNA, 4: miRNA. (C) 1 and 9: Quick-load 500 kb extend DNA ladder, NEB; 2-4: 7%, 9% and 10% PEG precipitated primer dimer, 5: unseparated mixture; 6-8: 7%, 9% and 10% PEG precipitated supernatant. (D) 1: Quick-load 500 kb extend DNA ladder; 2-4: 9%, 12% and 15% PEG precipitated target fragments; 5: unseparated mixture; 6-8: 9%, 12% and 15% PEG separated product supernatant.

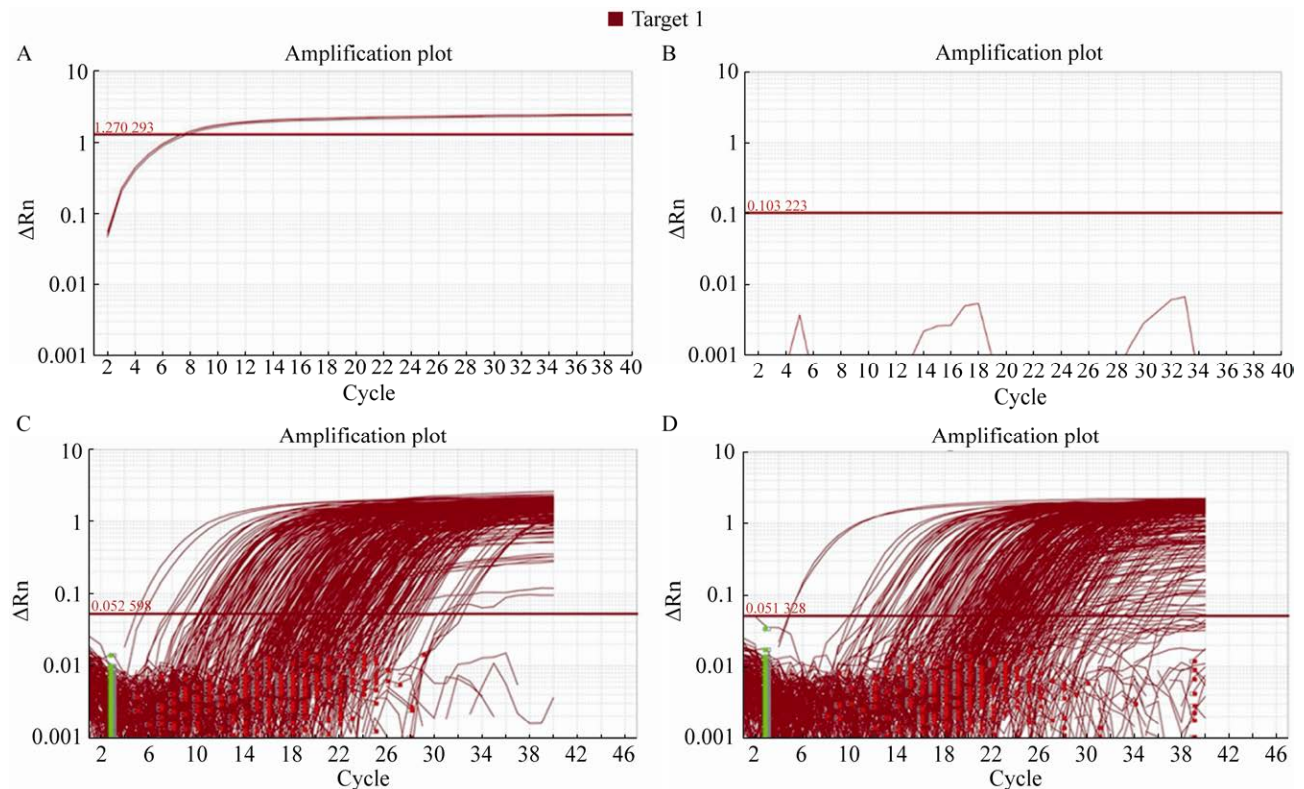


图 5 模板构建方案优化后的 RT-qPCR 分析

Figure 5 RT-qPCR analysis of optimized templates of miRNA. (A) Optimized templates of miRNA. (B) Control. (C) Total RNA of 293T cell. (D) Plasma exosome miRNA from cancer patients'.

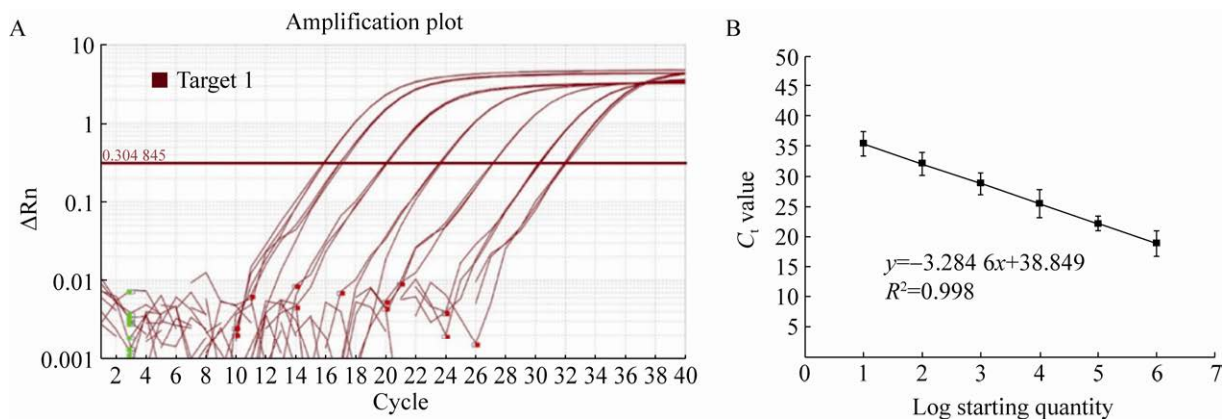


图 6 RT-qPCR 扩增效率分析

Figure 6 Amplification efficiency analysis of RT-qPCR. (A) Absolute quantitative standard curve results. (B) Standard curve of RT-qPCR for optimization of plasma exosome miRNA in tumor patients.

3 讨论

3.1 癌症病人血浆外泌体 miRNA 和 293T 细胞总 RNA 提取

cDNA 文库的完整性和代表性是评价 cDNA 文库质量的重要指标。总 RNA、miRNA 和模板的完整性和高纯度是构建高质量 cDNA 文库的前提，并直接决定文库的好坏。利用实验探究如何去除 RNA 扩增中的非特异性，为构建高质量 cDNA 文库提供前提^[26]。

外泌体是细胞分泌并进入体液或细胞外环境的小囊泡，对细胞的通讯具有重要作用，外泌体中含有的组分包括 DNA、miRNA、脂质和蛋白质。外泌体 miRNA 是癌症诊断的标志物之一，对外泌体 miRNA 的分析和提取是研究癌症发生的重要因素之一^[27]。目前，miRNA 的提取方法主要有两种^[28-30]，一种是沉淀法，首先用裂解液使细胞释放 RNA，再用乙醇、异丙醇、乙酸钠、氯化锂等试剂沉淀 RNA。另一种是柱吸附法，用裂解液使细胞释放 RNA 后用吸附柱纯化 mRNA。癌症病人血浆外泌体 miRNA 的提取首先用 Trizol 试剂裂解细胞释放 RNA，然后通过离心、孵育、洗脱

和干燥获得 miRNA，提取出的 miRNA 条带清晰且集中，不含有蛋白质等杂质。

3.2 非特异性扩增来源及去除分析

核酸检测方法主要有普通定性 PCR、实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)、多重复合 PCR、数字 PCR、重组聚合酶扩增、环介导等温扩增技术 PCR 方法等^[31-33]，其中以 RT-qPCR 应用较为广泛，且相对准确灵敏。

RT-qPCR 通过荧光信号累积进行实时监测 PCR 产物的变化^[34]，并生成扩增曲线，通过扩增曲线对模板连接反应和 qPCR 反应进行分析。结果表明：通过连接 USR5SR 和 USR3SR 与连接 USR5SR 和 polyA 构建模板链的两种方法均可以成功构建模板，模板的 RT-qPCR 结果显示，对照组和实验组中均出现非特异性扩增曲线 (图 3)。

本研究在 SMART 法基础上用磁珠分离法纯化连接模板^[35]，避免了由引物产生的非特异性扩增。非特异性扩增可能来源于 Mg^{2+} 浓度、退火温度、引物特异性、dNTP 浓度等因素，其中引物非特异性是模板构建中非特异性扩增的主要来源。通过探究模板链和引物的扩增，表明非特异性扩增来源于模板连接中未充分连接

的 5'端引物。利用酶切法和磁珠分离法解决 5'端引物非特异性扩增, 结果说明酶切法可以去除未连接的引物, 但同时也对模板链产生了降解。而优化后的磁珠分离法, 即利用 9% PEG 沉淀大片段、15% PEG 沉淀模板链, 可达到良好的引物非特异性去除效果。RT-qPCR 验证显示, 对照组和实验组中均未出现非特异性扩增, 表明扩增特异性高。综上所述, 磁珠分离法能够高效去除引物引起的非特异性扩增, 迅速获取模板链。

REFERENCES

- [1] Harjai KJ, Shenoy C, Orshaw P, et al. Clinical outcomes in patients with the concomitant use of clopidogrel and proton pump inhibitors after percutaneous coronary intervention. *Circ Cardiovasc Interv*, 2011, 4(2): 162-170.
- [2] Van Hoof A, Frischmeyer PA, Dietz HC, et al. Exosome-mediated recognition and degradation of mRNAs lacking a termination codon. *Science*, 2002, 295(5563): 2262-2264.
- [3] 马筱秋, 蔡建春. microRNAs 在肿瘤表观遗传调控的研究进展. *中国肿瘤临床*, 2012, 39(4): 237-240.
Ma XQ, Cai JC. Advances in the research on the microRNAs related to tumorous epigenetic modifications. *Chin J Clin Oncol*, 2012, 39(4): 237-240 (in Chinese).
- [4] Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6(11): 857-866.
- [5] 李金花, 谢海龙. MicroRNA 与肿瘤. *国际病理科学与临床杂志*, 2007, 27(1): 11-14.
Li JH, Xie HL. MicroRNA and cancer. *Int J Pathol Clin Med*, 2007, 27(1): 11-14 (in Chinese).
- [6] 张磊, 陈明. MicroRNA 与肾细胞癌转移的研究进展. *东南大学学报(医学版)*, 2012, 31(3): 334-337.
Zhang L, Chen M. Research progress of microRNA and metastasis of renal cell carcinoma. *J Southeast Univ (Med Sci Ed)*, 2012, 31(3): 334-337 (in Chinese).
- [7] Schubert M, Junker K, Heinzelmann J. Prognostic and predictive miRNA biomarkers in bladder, kidney and prostate cancer: where do we stand in biomarker development? *J Cancer Res Clin Oncol*, 2016, 142(8): 1673-1695.
- [8] Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *PNAS*, 2008, 105(30): 10513-10518.
- [9] Mesri M, Wall NR, Li J, et al. Cancer gene therapy using a survivin mutant adenovirus. *J Clin Invest*, 2001, 108(7): 981-990.
- [10] Valadi H, Ekström K, Bossios A, et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*, 2007, 9(6): 654-659.
- [11] Liu T, Chen G, Sun D, et al. Exosomes containing miR-21 transfer the characteristic of cisplatin resistance by targeting PTEN and PDCD4 in oral squamous cell carcinoma. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2017, 49(9): 808-816.
- [12] 牛连杰, 张雅敏. 外泌体 microRNA 在肝癌中的研究进展. *中华普通外科杂志*, 2018, 33(11): 982-983.
Niu LJ, Zhang YM. Research progress of secreted microRNA in hepatocellular carcinoma. *Chin J Gen Surg*, 2018, 33(11): 982-983 (in Chinese).
- [13] 熊先会, 敖鸿舜, 冯盈庭, 等. miRNA 在胃癌和肝癌中的研究进展. *中国医药导报*, 2018, 15(35): 30-33.
Xiong XH, Ao HS, Feng YT, et al. Research progress of miRNAs in gastric and liver cancer. *China Med Her*, 2018, 15(35): 30-33 (in Chinese).
- [14] Harquail J, Benzina S, Robichaud GA. MicroRNAs and breast cancer malignancy: an overview of miRNA-regulated cancer processes leading to metastasis. *Cancer Biomarkers*, 2012, 11(6): 269-280.
- [15] Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *PNAS*, 2001, 98(19): 10869-10874.
- [16] Bao J, Zhang S, Meng Q, et al. SNHG16 silencing inhibits neuroblastoma progression by downregulating HOXA7 via sponging miR-128-3p. *Neurochem Res*, 2020, 45(4): 825-836.
- [17] Tian L, Sun S, Li W, et al. Down-regulated microRNA-141 facilitates osteoblast activity and inhibits osteoclast activity to ameliorate osteonecrosis of the femoral head via up-regulating TGF- β 2. *Cell Cycle*, 2020, 19(7): 772-786.
- [18] Zhu YY, Machleder EM, Chenchik A, et al. Reverse transcriptase template switching: a SMARTTM approach for full-length cDNA library construction. *BioTechniques*, 2001, 30(4): 892-897.
- [19] 罗彦忠, 王磊. RNA 干扰(RNAi)文库研究进展. *微生物学通报*, 2010, 37(10): 1512-1518.

- Luo YZ, Wang L. Progress in construction of RNAi library for generation of siRNAs. *Microbiol China*, 2010, 37(10): 1512-1518 (in Chinese).
- [20] 胡兴文. 实时荧光 PCR 影响因素分析. *实用医技杂志*, 2005, 12(18): 2551-2552.
Hu XW. Analyzed fluorescence quantitative polymerase chain reaction effect complication. *J Pract Med Tech*, 2005, 12(18): 2551-2552 (in Chinese).
- [21] 李金春, 李家鹏, 周彤, 等. 引物 3'端不同碱基错配情况下实时荧光定量 PCR 非特异性扩增的发生规律. *食品科学*, 2017, 38(10): 277-283.
Li JC, Li JP, Zhou T, et al. Pattern of occurrence of nonspecific amplification in real-time fluorescent PCR with different base pair mismatches at the primer 3' end. *Food Sci*, 2017, 38(10): 277-283 (in Chinese).
- [22] 姜翠翠. (木奈)均一化全长 cDNA 文库的构建及果实褐变相关基因的分离与表达分析[D]. 福州: 福建农林大学, 2012.
Jiang CC. Construction of normalized full-length cDNA library from Nai and cloning and expression profile analysis of related genes from Nai browning fruit[D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2012 (in Chinese).
- [23] 郁宏伟. 基于 cDNA 文库研究癌症病人血浆外泌体 miRNA 扩增效率[D]. 北京: 北京化工大学, 2020.
Yu HW. Study on the amplification efficiency of plasma exosome mirna in cancer patients based on cDNA library[D]. Beijing: Beijing University of Chemical Technology, 2020 (in Chinese).
- [24] Nishi H, Nishimura S, Higashiura M, et al. A new method for histamine release from purified peripheral blood basophils using monoclonal antibody-coated magnetic beads. *J Immunol Methods*, 2000, 240(1/2): 39-46.
- [25] 徐波, 汪桂玲, 李家乐. 磁珠富集法与 5'锚定 PCR 法开发背瘤丽蚌微卫星标记的比较. *生态学杂志*, 2012, 31(4): 923-930.
Xu B, Wang GL, Li JL. Development of microsatellite markers from *Lamprotula leai*: a comparison of magnetic beads hybridization and 5' anchored PCR methods. *Chin J Ecol*, 2012, 31(4): 923-930 (in Chinese).
- [26] 张小海, 罗飞, 王广, 等. 珠子参实时荧光定量 PCR 体系的建立与优化. *武汉轻工大学学报*, 2019, 38(1): 27-32.
Zhang XH, Luo F, Wang G, et al. Establishment and optimization of real-time fluorescence quantitative PCR system for *Panax japonicus* var. *major*. *J Wuhan Polytech Univ*, 2019, 38(1): 27-32 (in Chinese).
- [27] Corbett AH, Leung SW, Sterrett MC, et al. The RNA exosome and genetic disease. *FASEB J*, 2020, 34(S1): 1.
- [28] 李冉冉, 王兵, 胡胜, 等. 不同 RNA 提取方法的效能比较. *刑事技术*, 2018, 43(6): 431-435.
Li RR, Wang B, Hu S, et al. Comparative evaluation on different RNA extraction methods. *Forensic Sci Technol*, 2018, 43(6): 431-435 (in Chinese).
- [29] Doleshal M, Magotra AA, Choudhury B, et al. Evaluation and validation of total RNA extraction methods for microRNA expression analyses in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J Mol Diagn*, 2008, 10(3): 203-211.
- [30] 陈昌国, 陈秋圆, 郭建巍, 等. 三种方法提取血清 miRNA 效果的比较. *检验医学与临床*, 2015, 12(20): 2976-2978.
Chen CG, Chen QY, Guo JW, et al. Comparing the serum miRNA extraction effect of three methods. *Lab Med Clin*, 2015, 12(20): 2976-2978 (in Chinese).
- [31] 钟泽澄, 王进, 张师音. 多重 PCR 技术研究进展. *生物工程学报*, 2020, 36(2): 171-179.
Zhong ZC, Wang J, Zhang SY. Advances in multiple PCR technology studies. *Chin J Biotech*, 2020, 36(2): 171-179 (in Chinese).
- [32] 林佳琪, 苏国成, 苏文金, 等. 数字 PCR 技术及应用研究进展. *生物工程学报*, 2017, 33(2): 170-177
Lin JQ, Su GC, Su WJ, et al. Progress in digital PCR technology and application. *Chin J Biotech*, 2017, 33(2): 170-177 (in Chinese).
- [33] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-delta delta C(T)) method. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [34] Thiery R, Pannetier C, Rziha HJ, et al. A fluorescence-based quantitative PCR method for investigation of pseudorabies virus latency. *J Virol Methods*, 1996, 61(1/2): 79-87.
- [35] 陈倩. 调节乳腺癌干细胞的 miRNA 靶基因及信号通路的研究进展. *中国妇幼保健*, 2016, 31(20): 4324-4326.
Chen Q. Research progress of miRNA target genes and signaling pathways regulating breast cancer stem cells. *Matern Child Heal Care China*, 2016, 31(20): 4324-4326 (in Chinese).

(本文责编 郝丽芳)