·基础研究·

大鼠肌细胞生成素基因的克隆

姜浩 徐建光 刘靖波 顾玉东 李继峰 胡韶楠

【摘要】 目的 设计特异引物克隆大鼠肌细胞生成素(myogenin)的 cDNA。方法 用逆转录聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction,RT-PCR)合成 myogenin cDNA,经提纯后,连接到克隆载体 pGEM-T,形成重组的克隆载体 pGEMT-myogenin。pGEMT-myogenin 转化大肠杆菌 Ecoli. DH5α 内扩增,提取、纯化的 pGEMT-myogenin,经酶切、PCR 鉴定及 DNA 测序,来判断所克隆 myogenin cDNA 的正确性。结果 RT-PCR 产物经凝胶电泳鉴定,含有大小正确的 DNA 片段,提取、纯化的 pGEMT-myogenin 质粒经限制性内切酶酶切、PCR 鉴定,含有大小正确的 DNA 片段,且该片段含有所设计的酶切位点。DNA 测序结果证实所克隆的 myogenin cDNA 序列正确。结论 该研究成功地克隆了 myogenin cDNA。

【关键词】 肌,骨骼; 去神经支配; 肌形成调节因子; 克隆细胞; 肌细胞生成素,基因

Molecular cloning of rat myogenin gene *JIANG Hao*, *XU Jian-guang*, *LU Jing-bo*, *et al*. *Department of Hand Surgery*, *Huashan Hospital*, *Fudan University*, *Shanghai* 200040, China

【Abstract】 Objective To clone rat myogenin cDNA by design of specific primers. **Methods** The myogenin cDNA was composed by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The purified products were ligated with the cloning vecter pGEM-T(Promega, USA). The recombinant cloning vector pGEMT-myogenin was formed. Then pGEMT-moygenin was transformed into Escherichia Coli DH5α for amplifying target gene. After plasmids pGEMT-myogenin were extracted and purified, the coding sequence of myogenin cDNA was verified by digestion with restriction endonuclease, PCR checkup and DNA sequencing. **Results** The RT-PCR products was checked by agarose gel electrophoresis analysis. The result confirmed the right length of inserted DNA fragment. The extracted and purified plasmids pGEMT-myogenin were digested by restriction endonuclease and checked up by PCR. The result confirmed the right length of inserted DNA fragment with designed digested site. The DNA sequencing result confirmed the cloned myogenin cDNA sequence was right. **Conclusion** The myogenin cDNA is cloned successfully.

【Key words】 Muscle, skeletal; Denervation; Myogenic regulatory factors; Clone cells; Myogenin, gene

肌细胞生成素(myogenin)是成肌调节因子(myogenic regulatory factors,MRFs)MyoD 家族中最重要的成员之一。它在骨骼肌的胚胎发育、骨骼肌的成熟、损伤后的修复以及骨骼肌失神经萎缩的病理过程中均起到了极为重要的作用。一些神经生长因子如 IGF 亦是通过该因子的中介作用而发挥其促进骨骼肌损伤的修复作用。1989 年,Wright 等[1]首先报道该基因,随后该基因及其产物的研究在国际上广泛发展,而目前国内对该基因的研究不多,对 myogenin 基因的克隆尚未见报道。

资料与方法

1. 材料:成年雄性 SD 大鼠,体重 250 ~ 300 g,由复旦大学上海医学院动物实验中心提供。Trizol 购自 GIBCO 公司。RT-PCR、PCR 系统(Promega 公司生产)。Hind Ⅲ和 Xho Ⅰ限制性内切酶购自英国 N. E. B. 公司。pGEM-T cloning system 购自美国 Promega 公司。大肠杆菌 Ecoli. DH5α 感受态由中科院上海植生所国家重点分子遗传实验室制备、冻存。DNA 回收试剂盒为上海华舜生物工程公司产品。特异寡聚核苷酸引物由上海 Sangon 公司合成。DNA 测序分别由上海 GeneCore 和上海 GeneTech 公司完成。

2. 失神经骨骼肌萎缩动物模型的建立:无菌条件下,切取 SD 大鼠长约 1.0 ~ 1.5 cm 的坐骨神经一段,神经近端反折缝合于坐骨神经外膜,造成坐骨神经所支配的远端骨骼肌失神经支配。

3. 特异寡聚核苷酸引物的设计:根据 GeneBank 上 myogenin cDNA 的碱基序列,设计了 myogenin cDNA 的特异寡聚核苷酸引物。考虑进一步要进行的基因治疗,特别在引物的 5'和 3'端分别设计了 Hind Ⅲ和 Xho Ⅰ两个限制性酶切位点:正向引物为 5'-ccc-AAGCTT atggagctgtatg 3',反向引物为 5'-ccg-CTCGAG tcagttaaattcccttgc 3';5'端-ccc-和-ccg-为保护碱基,AAGCTT为 Hind Ⅲ酶切位点,CTCGAG 为 Xho Ⅰ酶切位点。

基金项目:国家 973 创伤基础研究基金资助项目(G1999054206);复旦大学 Med-X 基金、创新基金资助项目(EXF000301)

作者单位:200040 上海,复旦大学华山医院手外科

万方数据

由上海 Sangon 公司合成。

4. myogenin cDNA 的 RT-PCR 克隆：分 4 步进行。

(1) 取材：无菌条件下，用组织剪（器械均先用 DEPC 预处理）取失神经支配的大鼠腓肠肌肌肉组织 20 ~ 30 g，立即投入 1.0 ml Trizol 中，用眼科剪剪碎，高速匀浆机匀浆至无明显肉眼可见的组织块为止。

(2) 抽提肌肉组织总 RNA：一步法抽提总 RNA（详细方法参见 GIBCO 操作手册）。

(3) 逆转录（reverse transcript for RT）：取上一步抽提的 RNA 5 μl 于 65℃ 温度下放置 10 min 后，置冰上迅速冷却。随后再加入逆转录反应体系（AMV RTase 0.5 μl，浓度为 10 mmol/L 的 dNTP 2.0 μl，Oligod（T）150.5 μl，加双蒸水补足体系至 30 μl，于 42℃反应 1 h 后，95℃灭活5 min，4℃冷却。

(4) PCR 扩增：总体系 50 μl：10 × buffer 5.0 μl，浓度为 25 mmol/L 的 $Mgcl_2$ 5.0 μl，浓度为 10 mmol/L 的 dNTP 1.5 μl，DNA 5.0 μl，myogenin-primer-forward 1.0 μl，myogenin-primer-reverse 1.0 μl，Taq DNA polymerase 0.5 μl，加双蒸水补足体系，于 94℃温度下置 50 s，55℃下置 50 s，72℃下置 50 s，共反应 30 个循环。用琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物的大小。

5. PCR 产物的回收和纯化：割取上一步电泳中目的片段所在的琼脂糖凝胶，用小量 DNA 回收试剂盒对目的片段进行纯化、回收（具体操作见试剂盒所附之操作指南）。

6. 重组克隆载体 pGEMT-myogenin 的构建：分 3 步进行。

(1) 连接反应：将纯化后的目的 DNA 片段与克隆载体 pGEM-T 在连接系统中进行连接反应。连接系统体系 10 μl：2 × buffer 5.0 μl，vector 1.0 μl，PCR product 3.0 μl，T4 DNA Ligase（3U/μl）1.0 μl。反应条件：4℃连接过夜。

(2) 转化反应：取连接产物 5.0 μl，热激转化法（方法参见 Promega 操作手册）转化至感受态大肠杆菌 Ecoli. DH5α 中进行扩增后；分别取 100 μl、200 μl 菌液均匀涂布于含氨苄青霉素和 X-gal、IPTG（X-gal/IPTG = 40 μl/4μl）的 LB 培养板，置于 37℃恒温箱中过夜。12 h 后，随机挑取 8 个白色的阳性克隆，于 LB 培养液中，37℃ 下以 260 r/min 转速摇菌过夜。

(3) pGEMT-myogenin 重组质粒的抽提：碱裂解法（方法参见《分子克隆实验指南》）。

7. pGEMT-myogenin 重组克隆载体的鉴定：提取之质粒分别用凝胶电泳法、限制性酶切法和 DNA 测序法，即用 3 种方法检验所克隆基因的正确性。

结　果

1. myogenin cDNA 的 RT-PCR 克隆：以大鼠骨骼肌肌细胞总 mRNA 为模板，用人工合成的 mygenin cDNA 之 5 和 3 端的特异寡聚核苷酸作引物进行 PCR 扩增，反应产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定显示，扩增出的一条带，位于 831 bp 和 947 bp 之间，其大小与预期的（myogenin cDNA）大小一致（图 1）。

2. pGEMT-myogenin 重组体的克隆筛选：连接产物转化大肠杆菌 Ecoli. DH5α 并在 LB 板培养 12 h，经过抗生素筛选和蓝白斑筛选后，可见两个 LB 培养板上各有数十个白色的阳性克隆，且克隆形状、大小较为均匀一致。

3. pGEMT-myogenin 重组体的鉴定：3 种方法鉴定的结果如下述。

(1) 凝胶电泳鉴定结果（图 2）：随机挑选 8 个从阳性克隆所提取的质粒进行琼脂糖凝胶电泳，以 Lambda DNA/ Hind III + EcoR I 为 marker，pGEM-T 空载体为对照。电泳结果显示，8 个质粒大小均为 4.0 kb 左右，而 pGEM-T 空载体大小为 3.0 kb。这说明重组体中插入了约 900 bp 多的片段，该插入片段大小与预期 myogenin cDNA 的大小一致

(2) 酶切鉴定的结果（图 3）：酶切 pGEMT-myogenin 重组体的电泳图显示，同时用限制性内切酶 Hind Ⅲ和 Xho Ⅰ酶切 pGEMT-myogenin，可以见到 2 个片段，分别约为3.0kb和0.9kb。3.0kb的片段与pGEM-T空

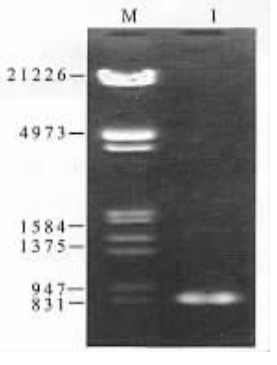


图 1　M：marker Lambda DNA/Hind Ⅲ + EcoR 1
1：RT-PCR Product

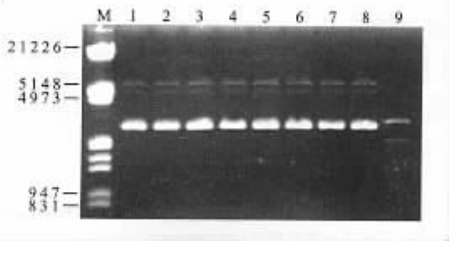


图 2　M：marker Lambda DNA/Hind Ⅲ + EcoR 1
1 ~ 8：pGEMT-myogenin vector；　9：pGEM-T vector

万方数据

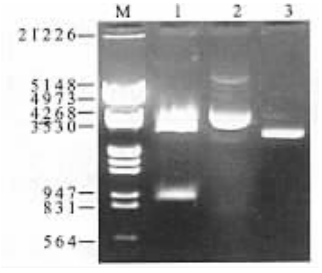


图 3 M：marker Lambda DNA/Hind Ⅲ + EcoR 1；1：pGEMT-myogenin/Hind Ⅲ + Xho 1 2：pGEMT-myogenin 3：pGEM-T vector

载体的大小一致，0.9 kb 的片段与 myogenin cDNA 的大小一致。这说明，pGEM-T 克隆载体中插入了 0.9 kb 的片段，且插入片段中包含了预先设计的 Hind Ⅲ 和 Xho Ⅰ 酶切位点。

(2) DNA 测序的结果：用 M13 通用引物，分别在 2 家公司进行双向测序。结果显示，本实验所克隆的 myogenin cDNA 之碱基序列与 1989 年 Wright 等[1]报道的序列完全一致。

讨 论

myogenin 是成肌调节因子 MyoD 家族的成员之一[1]。成肌调节因子 MyoD 家族由 MyoD、MRF4、myogenin 和 myf5 组成[2]，前两者在骨骼肌的胚胎发育中与成肌先驱细胞(myogenic precursor cell)分化方向的决定和细胞的增殖相关；后两者与成肌细胞的分化、肌管形成、肌纤维的成熟等相关[3]。该家族的 4 个因子之间存在遗传冗余现象，即它们之间在一定程度上具有相似性，可以相互替代；但是，唯独 myogenin 是无法取代的。因为，单独敲除 myogenin 基因后，出生的小鼠会由于严重的骨骼肌发育缺陷而死亡[4]；单独敲除其它 3 个基因都可以出现正常、成熟的骨骼肌[5]。这说明在骨骼肌的胚胎发育中，myogenin 所具有的地位极其重要。myogenin 基因的体外转染实验说明该因子可使成纤维细胞、成软骨细胞等转化成为具有成肌细胞特性的细胞，并能够稳定传代；这些具有成肌特性的细胞可以分裂、增殖，而且可以融合成肌管、发育成为横纹肌[6]。此外，myogenin 可以与许多骨骼肌的特异性基因上游的启动子和增强子的 CANNTG 序列(E 盒子)结合，产生反式激活作用，从而促进骨骼肌发育及肌特异性基因，如肌肉肌酸激酶(muscle creatine kinase，MCK)、烟碱样乙酰胆碱受体(nicotinic acetylcholine receptor，nAChR)等基因的表达[7,8]。

骨骼肌损伤或失神经支配后，myogenin 在 mRNA 及蛋白水平的表达上升几十或几百倍[9]，但在失神经的后期，其表达水平却大大下降。本实验结果证明 myogenin mRNA 在人体骨骼肌失神经支配后的早期迅速上升，晚期却降至较低水平；并由此推测，骨骼肌在失神经晚期纤维化严重及神经再支配后骨骼肌功能恢复较差，可能与此相关[10,11]。

本实验室克隆了该基因的编码序列。大鼠 myogenin cDNA 全长 1 447 bp，其中编码序列全长 864 bp，共编码 287 个氨基酸。本实验中，在设计引物时，加入 Hind Ⅲ 和 Xho Ⅰ 2 个酶切位点及两侧各 3 个保护碱基，故目的片段全长共 914 bp。本实验用凝胶电泳、双酶切及 DNA 测序 3 种方法鉴定，结果证实了所克隆的 myogenin cDNA 编码序列大小及序列的正确性。另外，由于在所克隆的 myogenin cDNA 的编码框两端各加了 1 个酶切位点，为进一步构建用于基因治疗的真核表达载体创造了良好的条件。

总之，本实验室采用分子生物学方法，构建了 pGEMT-myogenin 克隆载体，成功地克隆了 myogenin cDNA。为进一步研究其在失神经骨骼肌萎缩，骨骼肌损伤及横纹肌肉瘤等方面的作用奠定了基础；也为进一步的基因治疗提供了可能性。另外，本实验室正在构建 myogenin 基因的真核表达载体，希望在分子水平上，为失神经骨骼肌萎缩的防治探索出一条新的道路。

参 考 文 献

1 Wright WE, Sassoon DA, Lin VK. Myogenin, a factor regulating myogenesis, has a domain homologous to MyoD. Cell, 1989, 56: 203-209.

2 Rudnicki MA, Jaenisch R. The MyoD family of transcription factors and skeletal myogenesis. Bioessays, 1995, 17: 203-209.

3 Megeney LA, Rudnicki MA. Determination versus differentiation and the MyoD family of transcription factors. Biochem Cell Biol, 1995, 73: 723-732.

4 Hasty P, Bradley A, Morris JH, et al. Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene. Nature, 1993, 364: 501-506.

5 Weintraub H, Davis R, Tapscott S, et al. The MyoD gene family: nodal point during specification of the muscle cell lineage. Science, 1991, 251: 761-766.

6 Weintraub H, Tapscott SJ, Davis RL, et al. Activation of muscle-specific genes in pigment, nerve, fat, liver, and fibroblast cell lines by forced expression of MyoD. Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86: 5434-5438.

7 Eftimie R, Brenner HR, Buonanno A. Myogenin and MyoD join a family of skeletal muscle genes regulated by electrical activity. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88: 1349-1353.

8 Piette J, Bessereau JL, Huchet M, et al. Two adjacent MyoD1-binding sites regulate expression of the acetylcholine receptor alpha-subunit gene. Nature, 1990, 345: 353-355.

9 Murry CE, Kay MA, Bartosek T, et al. Muscle differentiation during repair of myocardial necrosis in rats via gene transfer with MyoD. J Clin Invest, 1996, 98: 2209-2217.

10 黄汉伟，徐建光，顾玉东，等. 肌细胞生成素在人体失神经骨骼肌中的表达. 中华手外科杂志，2001，17(增刊)：62-64.

万方数据

11　Adams L, Carlson BM, Henderson L. Adaptation of nicotinic acetylcholine receptor, myogenin, and MRF4 gene expression to long-term muscle denervation. J Cell Biol, 1995, 131: 1341-1349.

（收稿日期：2002-08-26）
（本文编辑：郑忆柳）

·临床经验·

指尖离断血运重建的方式

潘希贵　田万成　卢全中　管同勋

1990 年 1 月～2001 年 12 月，我们以不同的血运重建方式对 352 例 401 指施行了指尖离断再植术，成功率达 95%。选择指尖离断的血运重建方式主要是根据指尖离断时的受伤机制和血管受损的程度。

一、资料与方法

1. 一般资料：本组共 352 例 401 指，男 261 指，女 140 指；年龄 4～54 岁，平均 24 岁。刀砍伤 78 指，电锯伤 89 指，挤切伤 124 指，机器绞伤 105 指，人或动物咬伤 5 指。全组均为完全性指尖离断，其中拇指 105 指，示指 133 指，中指 62 指，环指 71 指，小指 30 指。按田万成指尖离断Ⅵ型分类：Ⅰ型 153 指，Ⅱ型 67 指，Ⅲ型 90 指，Ⅳ型 26 指，Ⅴ型 59 指，Ⅵ型 6 指。

2. 指尖离断血运重建的方式以下述 4 种方式进行。

(1) 吻合指动脉与静脉，维持生理性血循环：根据指动脉的损伤情况有三种吻合方式：① 远端存在指动脉及指动脉弓或指动脉弓向远端发出的分支者，可直接修复指动脉。② 相对侧的指动脉作交叉吻合。③ 指动脉缺损不能直接吻合者，取腕部掌侧浅静脉移植。本组共 247 指，存活 242 指，存活率为 97.98%。

(2) 动-静脉转流断指再植：用于远断端无可供吻合的浅静脉，但有 2 条指固有动脉分支者。先吻合 1 条指动脉，将另 1 条指动脉与近端的掌侧浅静脉吻合，主要解决静脉回流的问题。本组再植 81 指，存活 77 指，存活率为 95.06%。

(3) 只吻合指动脉的断指再植：用于Ⅱ型断指、断端未找到静脉者应用。本组再植 62 指，其中 30 指为切割性断指，断面较整齐，指体损伤轻，再植术后顺利存活 28 指，存活率达93.33%。指尖有挫伤者（有瘀斑及针尖样出血点）32 指，再植术后均出现不同程度的静脉危象，经保守及手术探查等方法处理后，只有 10 指顺利存活，16 指表皮坏死或部分坏死。16 指于术后 6～10 周结痂的组织才逐渐脱落，结果 6 指全部存活，4 指部分坏死，6 指完全坏死。指尖挫伤 32 指的存活率为81.25%。

(4) 静脉动脉化的再植方式：适用于指腹撕脱性离断或指腹单纯切割性离断，离断的指体内无动脉或动脉干已撕脱，只存在掌侧浅静脉者。修复方式有二：① 远端一侧的浅静脉与近端指动脉吻合，另一侧浅静脉与近端浅静脉吻合，建立一种非生理性血液循环途径。共再植 6 指，存活 5 指。② 远端只找到 1 条掌侧浅静脉，将此浅静脉与近端的指动脉吻合。共再植 5 指，存活 3 指。

3. 结果：本组 401 指，存活 381 指，存活率 95%。再植后随访 6～24 个月，手指外形和长度与健指相似，二点分辨觉在 2 至 6 mm 范围内，指甲生长良好。病人均恢复原工作，对治疗效果满意。

二、讨论

指尖离断后，虽对手指的主要功能影响不大，但对手指的外形、感觉及触摸有一定的影响，会给患者造成心理创伤。指尖再植的成功率较低，故基层医院对指尖再植重视不够，常放弃再植。我们根据指尖离断时受伤机制，和在手术显微镜下清创后离断指体动静脉的损伤情况，采用上述 4 种血运重建方式，成功率达 95%。分别吻合指动脉与静脉是常规的断指再植方法，但动静脉损伤时受限制。其它 3 种方式是建立了一种非生理性血液循环途径，如操作熟练仍有较高的存活率，这主要与下列因素有关：(1) 指尖细小，需血量少，对缺血缺氧耐受性强，易成活。(2) 指尖部血管丰富，动脉-动脉、静脉-静脉、动脉-静脉之间存在广泛的网状交通支交织成球状，而且指尖部小静脉无瓣膜，血液无论从动脉或从静脉均能到达指尖远端血管网。(3) 指尖断指的端面与离断指体积比例大，断面渗血多，弥补了静脉回流不足，同时由于断端接触面积大，有利于静脉侧枝的建立，重新建立静脉回流。

血运重建的注意事项：(1) 吻合指动脉之前应放松止血带，在指动脉近端呈喷射样出血时，才能确保吻合口的通畅。如出血不足经采取保温、解痉等处理后出血仍不活跃时，应向近端游离直至指动脉出现喷射样出血时，才能进行指动脉吻合。(2) 血管吻合时，应先吻合优势侧的指动脉和指静脉。指动脉或静脉有缺损需桥接血管时，应首选手腕掌侧部浅静脉，因该浅静脉具有分支少、血管外径与指端血管外径相仿、切取容易等优点。

（收稿日期：2002-10-29）
（本文编辑：张丽银）

作者单位：264002 山东，烟台解放军第一〇七医院手外科

万方数据