

M：标准；1：RT-PCR 产物

图3 转染细胞中 β_3-AR mRNA 表达的 RT-PCR 检测

2.4 HEK293 细胞间接免疫荧光细胞化学结果

在 pcDNA3.1(+)-β_3-AR 质粒转染细胞的细胞膜上有绿色荧光，提示 β_3-AR 在 HEK293 细胞中表达（图4），转染空 pcDNA3.1(+)载体的细胞膜上未见荧光。

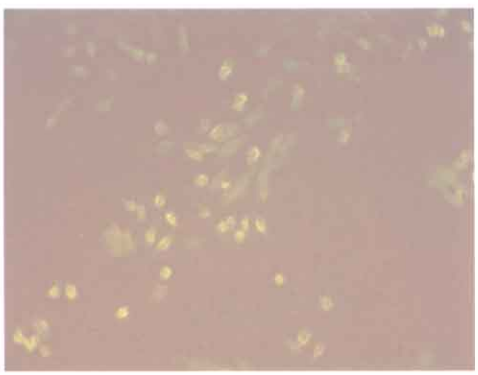


图4 转染 pcDNA3.1(+)-β3-AR 质粒的 HEK293 细胞（荧光显微镜×100）

3 讨论

目的基因在转染的真核细胞内的稳定表达，最关键的因素是真核表达载体的构建及所构建载体的结构和功能。本实验采用的真核表达载体 pcDNA3.1(+)具有很强的复制能力，完全可以满足随宿主细胞增殖分裂时随细胞质遗传给新生的子细胞，这是保证目的基因稳定表达的重要因素之一；此外，该载体含有高效增强子 SV40，且在目的基因前（多克隆酶切位点前）装有功能强大的基因启动结构 T7 PCMV，使目的基因的表达得以保证，有可能随宿主细胞分裂，随细胞遗传给子代细胞，因而可在一定程度上保证目的基因稳定传给新增殖的细胞。已有很多实验证明 pcDNA3.1(+)是一种具有高表达功能的载体[5,6]。

本实验利用 PCR 法从 pENTR_ADRB3-Stop 质粒中获得长约 1.2 kb 的片段，其序列与 GenBank 中 β_3-AR mRNA 全编码序列完全一致。经 *Kpn* Ⅰ和 *Xba* Ⅰ双酶切，将目的基因片段定向插入真核表达质粒 pcDNA3.1(+)中，成功构建了真核表达质粒 pcDNA3.1(+)-β_3-AR。将此真核表达质粒转染 HEK293 细胞，通过 RT-PCR 检测到 β_3-AR mRNA 的表达，通过免疫荧光检测到 β_3-AR 在 HEK293 细胞膜上成功表达，为后续建立 β_3-AR 基因的稳定表达细胞株，用于筛选高效、高选择性 β_3-AR 激动剂奠定了基础。

参考文献：

1 White C L, Ishihara Y, Dotson T L, *et al*. Effect of a beta-3 agonist on food intake in two strains of rats that differ in susceptibility to obesity [J]. Physiol Behav, 2004, 82(2-3): 489-496.

2 Kim H, Pennisi P A, Gavrilova O, *et al*. Effect of adipocyte beta3-adrenergic receptor activation on the type 2 diabetic MKR mice[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2006, 290(6): E1227-E1236.

3 曾凡新，董 志，傅洁民，等. 减肥药的作用新靶点及相关新药研发近况[J]. 药学进展，2006，23(1)：23-29.

4 Pietri-Rouxel F, Strosberg A D. Pharmacological characteristics and species-related variations of beta 3-adrenergic receptors[J]. Fundam Clin Pharmacol, 1995, 9(3): 211-218.

5 Lin M P, Marti G P, Dieb R, *et al*. Delivery of plasmid DNA expression vector for keratinocyte growth factor-1 using electroporation to improve cutaneous wound healing in a septic rat model[J]. Wound Repair Regen, 2006, 14(5): 618-624.

6 Qin J, Liu Z X. FAK-related nonkinase attenuates hypertrophy induced by angiotensin-Ⅱ in cultured neonatal rat cardiac myocytes[J]. Acta Pharmacol Sin, 2006, 27(9): 1159-1164.

（编辑 薛国文）

文献标识码的标识方法

为了便于文献的统计和期刊评价，确定文献的检索范围，提高检索结果的适用性，每篇文章或资料应标识1个文献标识码。一般设置以下5种标准：

A：理论与应用研究学术论文（包括综述报告）

B：实用性技术成果报告（科技）、理论学习与社会实践总结（社科）

C：业务指导与技术管理性文章（包括领导讲话、特约评论等）

D：一般动态性信息（通讯、报道、会议活动、专访等）

E：文件、资料（包括历史资料、统计资料、机构、人物、书刊、知识介绍等）

不属于上述各类的文章以及文摘、零讯、补白、广告、启事等不加文献标识码。

本刊编辑部