

HBD-3 基因的乳腺特异性表达载体的构建及真核表达

彭巍, 兰志刚, 马晶晶, 王保垒, 张涌

西北农林科技大学动物医学院生物工程研究所, 杨凌 712100

摘要: 为了制备高效表达人 β -防御素-3基因的转基因奶牛提供可靠的核移植供体细胞, 本试验采用 RT-PCR 从人胎盘组织获得人 β -防御素 3 cDNA, 通过双酶切法将目的基因片段 hBD 插入到质粒 pBCP 之间, 最后再通过双酶切法将目的片段 BCD 插入到真核表达载体 pEGFP-C1 中, 最终构建乳腺特异性表达载体 pEBCD。脂质体介导法转染奶牛胎儿成纤维细胞 G418, 抗性筛选 3~4 周后, 经 PCR、RT-PCR 扩增检测和报告基因 EGFP 表达检测, 得到稳定整合外源基因的转基因供体细胞; 同时检测稳定转染的奶牛乳腺上皮细胞系的上清液, 检测到重组人 β -防御素-3 蛋白可以在奶牛乳腺上皮细胞组织特异性表达。

关键词: 人 β -防御素 3, 奶牛 β -酪蛋白, EGFP 报告基因, 供体细胞, 核移植

Construction of HBD-3 gene mammary-specific expression vector and eukaryotic expression

Wei Peng, Zhigang Lan, Jingjing Ma, Baolei Wang, and Yong Zhang

Institute of Biotechnology, College of Animal Veterinary Medicine, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling 712100, China

Abstract: To establish human β -defensin-3 gene transgenic cell lines as competent donor cells for the production of transgenic animals using somatic cell nuclear transfer (SCNT). Firstly, we obtained human β -defensin-3 by RT-PCR from human placenta, and subsequently inserted the fragment hBD into the corresponding site of the plasmid pBCP. Then we moved the combined fragment BCD (including 5' and 3' regulating region of β -casein and hBD) into the corresponding site of the plasmid pEGFP-C1. Finally we successfully constructed mammary-specific expression vector pEBCD. We transected pEBCD into Holstein Fetal fibroblast cells by Lipofectamine TM-2000 and selected in medium with G418 for three to four weeks. We identified G418 resistant transfectants by PCR, RT-PCR and EGFP detection. Our results indicated that human β -defensin-3 gene stably was integrated into the open region of the chromatin in G418 resistant fibroblast cells. Meanwhile we identified the expression of human β -defensin-3 in the supernatant of stable transfected mammary epithelial cells by Western blotting. This study may provide competent transgenic donor cells for the production of transgenic animals by SCNT and improve the efficiency of transgenic cloning.

Keywords: human β -defensin-3, Holstein β -casein, EGFP reporter gene, donor cells, nuclear transfer

人 β -防御素-3(Human β -defensin-3, HBD-3)最早是在银屑病患者皮损组织提取物中发现的^[1], 并成功克隆了其 cDNA 序列^[2]。HBD-3 在皮肤、扁桃腺

有较强的表达, 此外, 呼吸道及生殖道上皮细胞^[1]、成年人心脏、口腔黏膜、气管和胎盘膜^[3]中也有不同的表达。HBD-3 具有强烈、广谱的革兰氏阳性/

Received: March 3, 2009; **Accepted:** April 27, 2009

Supported by: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2004AA213072).

Corresponding author: Yong Zhang. Tel: +86-29-87080085; E-mail: zhy1956@263.com

国家高技术研究发展计划(863 计划) (No. 2004AA213072)资助。

阴性细菌和真菌杀伤作用,且不受盐浓度影响^[4-6]。在微克浓度下,HBD-3对金黄色葡萄球菌、酿脓链球菌、铜绿假单胞菌(绿脓杆菌)和白色念珠菌均具有强烈的杀伤作用。在同样低浓度下,HBD-3也能杀伤多重耐药金黄色葡萄球菌和耐万古霉素粪肠球菌。同时,近年研究还发现HBD-3具有对HIV的杀伤作用^[7]和重要的免疫调节作用^[8];Maisetia等^[9]分析了HBD-3对临床上多重耐药菌株的抗菌活性,证明HBD-3对多重耐药的隔离菌群同样有很强的抗菌能力。有关其生物学活性、表达调控和基因工程研究是当前国内外普遍关注的热点,同时,研究者大多认为,HBD-3有望为解决日益严重的细菌耐药性问题提供有力的帮助。

但是,由于HBD-3在人体正常组织中的含量很少,分离纯化难度较大,通过提取所能获得的HBD-3的量是极其有限的。而化学合成成本太高,耗资巨大,因此通过基因工程技术来获得大量的抗菌肽HBD-3成为首选之路。虽然通过原核表达系统获得的重组HBD-3在抗菌活性、生化特征上与提取的天然HBD-3毫无差异,但以往进行的抗菌肽重组表达研究普遍存在表达量和活性偏低的现象。这可能是因为真核基因在原核细胞中表达时,密码子使用频率不同;也可能是因为在大肠杆菌中表达的产物常以包涵体形式存在,纯化后的蛋白还需要进一步的复性才具有活性。

因此,本研究采用奶牛乳腺上皮细胞真核表达系统,通过RT-PCR获得HBD-3 cDNA 45个成熟肽,将目的基因连接到以奶牛 β -酪蛋白为启动子的真核表达载体pEGFP-C1上,最终将构建成功的表达载体用于转染奶牛乳腺上皮细胞,进而使其能够整合到宿主细胞的基因组上,从而使目的基因能以 β -酪蛋白为启动子得以高效表达,利于蛋白的纯化,进而为通过利用动物乳腺生物反应器生产药用蛋白奠定基础。同时,将构建的乳腺特异性表达载体转染奶牛胎儿成纤维细胞,经过G418抗性筛选和EGFP的荧光检测,从而获得成功转染HBD-3基因的转基因成纤维细胞,提取转基因阳性细胞的基因组进行PCR扩增检测和细胞总RNA进行RT-PCR检测,进而进一步鉴定转基因细胞是否整合到细胞的基因组中,最终为通过乳腺生物反应器生产药用蛋白的转基因动物提供核移植供体细胞。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒

pMD19-T载体(购自大连TaKaRa公司),真核表达载体pEGFP-C1(Clontech公司),质粒pBCP(含奶牛 β -酪蛋白5'端2.8 kb的调控序列和3'端0.6 kb的调控区,原实验室保存)。

1.1.2 工具酶

各种限制酶均购自MBI公司;凝胶回收纯化试剂盒、质粒中、小量制备纯化试剂盒、T4 DNA连接酶、RNA提取试剂盒、RT-PCR试剂盒购自Promega公司;DEPC(AMRESCO);DMEM培养液、trypsin、geneticin(G418)和LipofectamineTM-2000(Invitrogen);催乳素(Prolactin)、胰岛素-转铁蛋白-硒钠(ITS)、氢化可的松、秋水仙素和表皮生长因子(Sigma);其他试剂未经标注均购自Sigma公司。

1.2 方法

1.2.1 HBD-3 cDNA 的 RT-PCR

HBD-3 cDNA的RT-PCR利用Trizol法从人胎盘组织(来源于杨凌示范区医院)提取总RNA,经过1.0%的甲醛琼脂糖凝胶电泳检测所提总RNA的完整性。利用Thermo ScriptTM RT-PCR System制备反转录体系,总体积为20 μ L,瞬时离心混匀。55 $^{\circ}$ C反应50 min,85 $^{\circ}$ C反应5 min,37 $^{\circ}$ C时加入1 μ L RNase H(2 U/ μ L)反应20 min,结束后取2 μ L进行PCR扩增。根据Harder^[1]在GenBank(No. AJ237673)提供的HBD-3 cDNA序列,利用引物设计软件Primer Premier 5.0辅助设计扩增引物(HS和HA)。扩增产物全长204 bp,为HBD-3 cDNA序列的32~237位。引物序列:上游引物HS 5'-TTGCTAGCATGAGGATCCATTATCTTCTG-3',下游引物HA 5'-TTGGCGCGCCTTATTTCTTTCTTCG GCAGC-3'。PCR反应程序为:94 $^{\circ}$ C 3 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,58 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,30个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR扩增产物经回收纯化后,连接到pMD19-T载体上。

1.2.2 载体的构建

Nhe I/*Asc* I双酶切质粒pMhD和pBCP,回收纯化后,通过T4 DNA连接酶将片段插入到质粒pBCP之间,得到重组质粒pBCD。然后通过*Sac* I/*Sac* II双酶切质粒pBCD和真核表达载体pEGFP-C1,片段回收纯化后,通过T4 DNA连接酶将片段插入到真

核表达载体 pEGFP-C1, 从而构建终极乳腺特异性表达载体 pEBCD。转化、挑取单克隆进行菌落 PCR 鉴定, 少量提取质粒后进行 *Sac* I/*Sac* II 双酶切鉴定, 阳性菌送交上海捷瑞生物工程公司测序。测序正确的重组质粒 pEBCD 使用 PureYield Plasmid Midiprep System (Promega) 纯化除去内毒素、RNA 和残存的蛋白质污染, 溶于灭菌 Nuclease-free 超纯水中, -20°C 中保存, 已备转染使用。

1.2.3 奶牛胎儿成纤维细胞培养体系的建立

1 头 3 月龄的西农荷斯坦奶牛胎儿取自杨凌科元生物工程有限公司, 将整个胎儿带回实验室, 用 70% 酒精和 PBS 清洗数次后, 取部分胎儿皮肤组织, 剪碎成 1 mm^3 左右的小块, 贴于 60 mm 培养皿中, 间距大约为 0.5 cm, 30 min 之后, 待组织块贴于皿壁后, 轻轻滴入少量细胞培养液, 放于 37°C , 饱和湿度的 CO_2 培养箱培养, 3~5 h 后再加入适量培养液, 继续培养。每 2~3 d 更换 1 次培养液。3~5 d 后, 待细胞生长汇合超过培养皿一半时, 用 0.5 mL TE (0.25% trypsin+0.02% EDTA) 消化传代至新的培养皿中。这样经过 2~3 次的传代培养, 可得到较纯的奶牛胎儿成纤维细胞。取一部分细胞用于转染试验, 另一部分细胞用细胞冷冻液(DMEM+10% FBS+10% DMSO) 重悬后放入液氮中冻存。

1.2.4 奶牛乳腺上皮细胞培养体系的建立

西农荷斯坦奶牛乳腺组织取自西安屠宰场, 将组织块带回实验室, 用 70% 酒精和 PBS 清洗数次后, 将腺泡剪碎成 1 mm^3 左右的小块, 37°C 粗消化乳腺组织, 然后沉淀组织块, 移除上清。用 PBS 冲洗组织块, 加入胶原酶, 37°C 振荡消化 2~3 h, 收集细胞及细胞团块。根据密度大小接种于 6 孔培养板, 置入 5% CO_2 饱和湿度的细胞培养箱中进行培养, 次日换液, 以后隔日换液 1 次。这样根据乳腺上皮细胞与成纤维细胞对于消化液的敏感程度不同, 去除成纤维细胞, 富集乳腺上皮细胞。经过 2~3 次的传代培养, 可得到较纯的奶牛乳腺上皮细胞。取一部分细胞用于转染试验, 另一部分细胞用细胞冷冻液(DMEM+10% FBS+10% DMSO) 重悬后放入液氮中冻存。

1.2.5 转染奶牛胎儿成纤维细胞和乳腺细胞及阳性细胞筛选

采用阳离子脂质体介导的方法, 用除去内毒素的质粒 pEBCD 转染奶牛胎儿成纤维细胞和乳腺上

皮细胞, 以商业化的 pEGFP-C1 质粒转染作为阳性对照, 以未转染的奶牛胎儿成纤维细胞作为阴性对照。转染试验在 24 孔板中进行, 质粒样品转染重复 4 次。转染 48 h 后使用荧光显微镜观察 EGFP 的表达情况, 以检测转染效率, 同时加入 $400\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的 G418 进行抗性细胞筛选, 每 2 d 更换 1 次培养液。G418 筛选约 3~4 周后, 阳性细胞即可长满 24 孔板, 用 TE 消化传代至 60 mm 培养皿中, 继续培养传代 2 次, 得到的 G418 抗性细胞。扩增的阳性转染细胞一部分用于冻存, 一部分用于进行 PCR 检测, RT-PCR 及荧光观察。

1.2.6 转染细胞基因组 PCR 及 RT-PCR 检测

利用 cDNA 的扩增引物(HS 和 HA), 从 G418 抗性细胞的基因组中扩增 HBD-3 cDNA, 以质粒 pEBCD 为模板作为阳性对照, 以转染质粒 pEGFP-C1 以及未转染的胎儿成纤维细胞基因组为模板作为阴性对照。PCR 产物用 2.0% 琼脂糖凝胶电泳分析。

RT-PCR 鉴定 Trizol Reagent 法提取转染细胞总 RNA, 对其进行 RT-PCR 鉴定。RT-PCR 检测引物: 上游引物与酪蛋白调控序列 3' 端互补, 5'-AGTATCCT ATGGGACCAC-3', 下游引物与 HBD-3 的 5' 端序列互补, 5'-TTATTTCTTTCTTCGGCAGC-3'。PCR 反应程序如下: 94°C 预变性 3 min; 94°C 变性 30 s, 59°C 退火 30 s, 72°C 延伸 1 min, 30 个循环; 72°C 延伸 10 min。

1.2.7 奶牛乳腺上皮细胞诱导表达产物的 Western blotting 检测

1) 细胞诱导表达及样品处理: 选择 PCR 阳性单克隆细胞, 大量繁殖后, 加入胰岛素($10\text{ }\mu\text{g/mL}$)、催乳素($1\text{ }\mu\text{g/mL}$)、氢化可的松($20\text{ }\mu\text{g/mL}$) 在专用培养基中进行诱导培养, 每隔 5 h 取 1 次培养基上清, 经 1000 r/min 离心 10 min 后, 将上清加到透析袋中进行浓缩, -20°C 保存。

2) Western blotting 检测: 将浓缩处理的蛋白样品 SDS-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE) 凝胶电泳分离, 凝胶用蒸馏水漂洗 1 遍, 再用转移缓冲液漂洗 1 遍。剪取 1 张与凝胶大小相同的 PVDF 滤膜, 在其左下角作一标记, 先将滤膜用甲醇浸泡 2~3 s, 再用去离子水浸泡滤膜 1~2 min 以洗去甲醇, 最后用转移缓冲液浸泡滤膜 10 min, 按凝胶面积 0.65 mA/cm^2 电流转移 90 min, 转移结束后, 将 PVDF 膜浸入

20 mL 封闭液中, 室温轻轻摇动, 封闭 1 h。用 PBS 洗膜 3 次, 每次 10 min。将 PVDF 膜浸入 10 mL 用封闭液稀释的羊抗人 β -防御素-3 单克隆抗体 (Abcam) 溶液中, 室温轻轻摇动温育 1.5 h。用 PBS 洗膜 3 次, 每次 10 min, 将 PVDF 膜浸入 10 mL 用封闭液稀释的鼠抗人抗体 (武汉博士德) 溶液中, 室温轻轻摇动温育 1.5 h。用 PBS 洗膜 3 次, 每次

10 min。将 PVDF 膜浸入 5 mL 碱性磷酸酶生色底物溶液中, 轻轻摇动, 观察反应过程, 当蛋白条带显现时, 终止反应。室温干燥 PVDF 膜, 拍照。

2 结果

2.1 乳腺特异性表达载体 pEBCD 构建示意图 详见图 1。

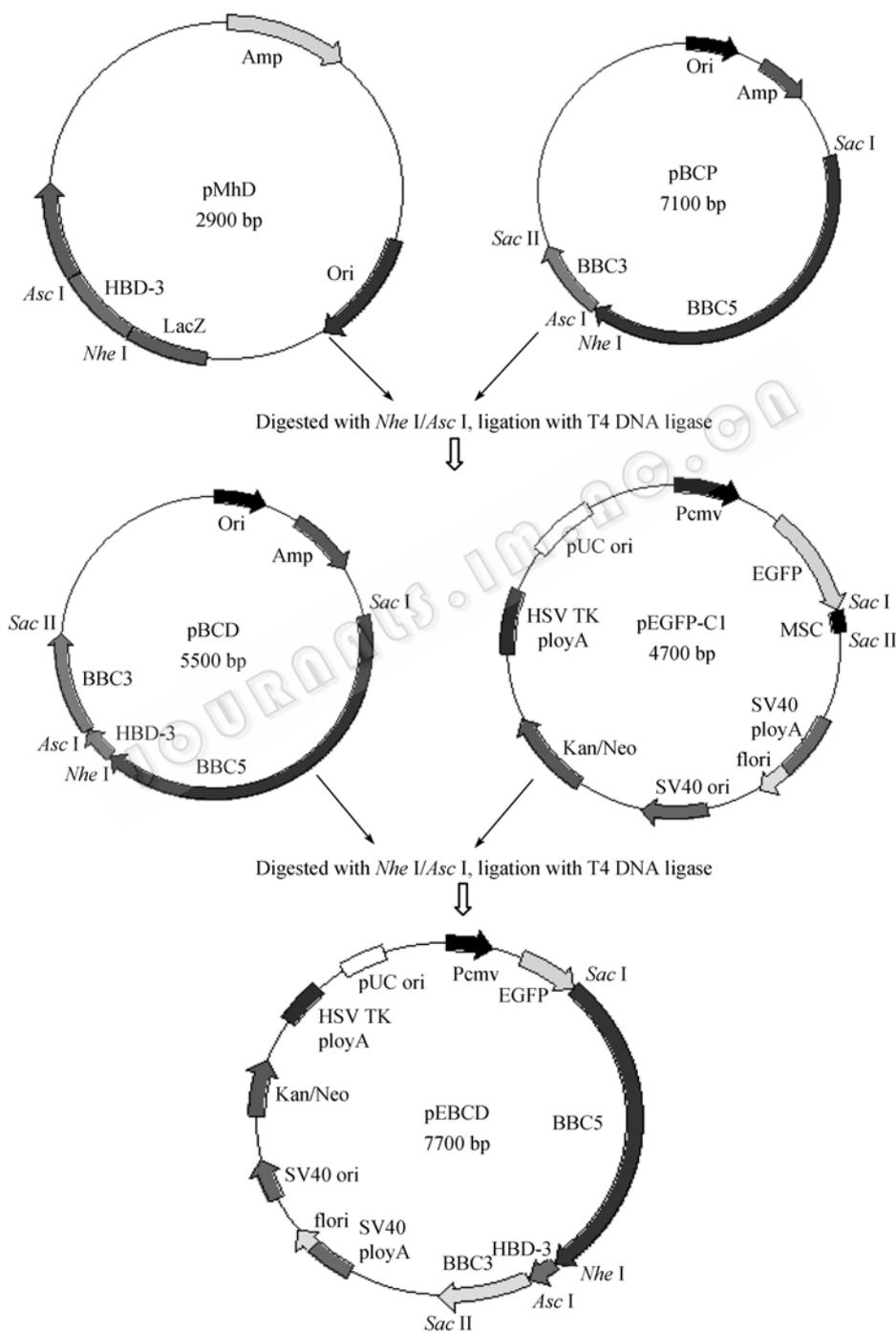


图 1 质粒 pEBCD 的构建示意图
Fig. 1 Map of plasmid pEBCD

2.2 重组质粒 pEBCD 的双酶切鉴定

如图 2 所示, 质粒 pEBCD 用 *Sac* I/*Sac* II 双酶切后, 切出 4.7 kb +3.0 kb 片段。质粒 pEBCD 中长约 3.0 kb 的插入片段由上海捷瑞生物工程公司测定, 测序结果反映出插入序列的大小及方向均正确。

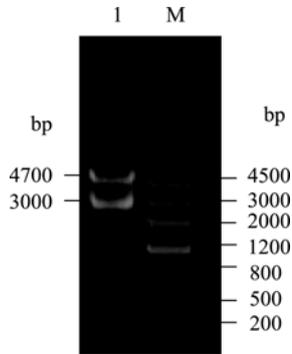


图 2 重组质粒 pEBCD 酶切鉴定

Fig. 2 Restriction endonuclease digestion of recombinant plasmid pEBCD. 1: restriction endonuclease digestion of recombinant plasmid by *Sac* I/*Sac* II; M: DNA marker.

2.3 细胞转染后报告基因 EGFP 的荧光观察

乳腺特异性表达载体 pEBCD 和真核表达载体 pEGFP-C1 转染奶牛乳腺上皮细胞 48 h 后荧光观察, 实验组 pEBCD(图 3A)和对照组腺特异性表达载体 pEBCD 作为实验组和真核表达载体 pEGFP-C1 作为对照组转染奶牛胎儿成纤维细胞 48 h 后观察荧光, 实验组 pEBCD(图 3D)和对照组 pEGFP-C1(图 3F)转染细胞均有荧光表达, 并且转染后对照组 pEGFP-C1 荧光表达强度均稍高于实验组 pEBCD。可能是因为重组质粒 pEBCD 插入的一些元件可能会导致 EGFP 的表达效率降低, 故实验组转染细胞在转染后的 48 h 荧光较弱。

经过 3~4 周稳定筛选后, 扩大培养, 得到的 G418 抗性奶牛胎儿成纤维细胞系(图 3G), 阳性细胞 EGFP 表达仍很明显(图 3H), 结果初步表明, 携带有以 EGFP 为报告基因且整合外援 HBD-3 的基因已经稳定整合到阳性细胞的染色体基因组上。

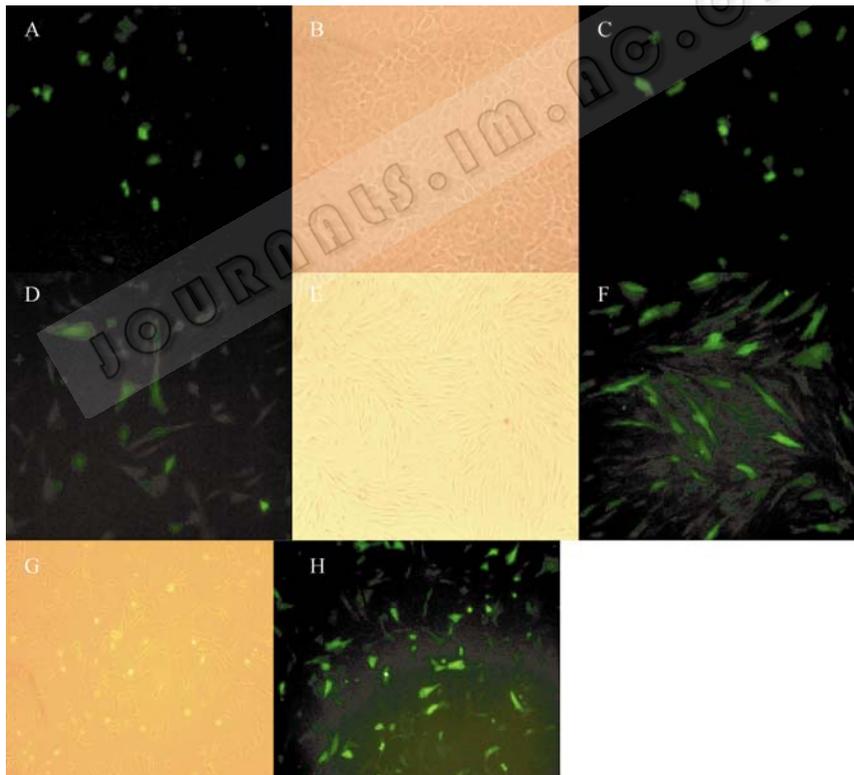


图 3 转染细胞的 EGFP 的荧光观察及阳性细胞

Fig. 3 Fluorescence microscope image of transgenic cell and positive cell clone. (A) EGFP detections of transfected Holstein mammary epithelial resitant cells with plasmid pEBCD. (B) Untransfected of Holstein mammary epithelial cells. (C) EGFP detections of transfected Holstein mammary epithelial cells with plasmid pEGFP-C1. (D) EGFP detections of transfected of Holstein fetal fibroblast cells with plasmid pEBCD. (E) Untransfected of Holstein fetal fibroblast cells. (F) EGFP detections of transfected Holstein fetal fibroblast cells with plasmid pEGFP-C1. (G) EGFP detections positive clone of the transfected Holstein fetal fibroblast cells by G418. (H) Positive clone of the transfected Holstein fetal fibroblast cells by G418.

2.4 稳定转染细胞系的 PCR 检测

经过 3~4 周 G418 筛选后得到的稳定整合的转基因奶牛胎儿成纤维细胞, 提取基因组进行 HBD-3 cDNA 的 PCR 扩增(图 4)。PCR 扩增结果显示 HBD-3 cDNA 已经稳定整合到转基因供体细胞基因组上。结合 EGFP 基因的荧光观察, 上述结果表明得到的 G418 阳性细胞稳定整合有外源基因 HBD-3, 且整合位点位于染色质的开放区。

RT-PCR 检测: PCR 扩增引物位于酪蛋白启动子的 3'端与基因 HBD-3 cDNA 的 5'端。阴性对照在加入无 DNase 的 RNase 时没有得到阳性条带, 因此排除了内源基因的影响; 没有加入 RNase 时, 扩增完毕后得到 420 bp 条带, 图 5 表明目的基因已进入细胞核且稳定地整合到染色体中。

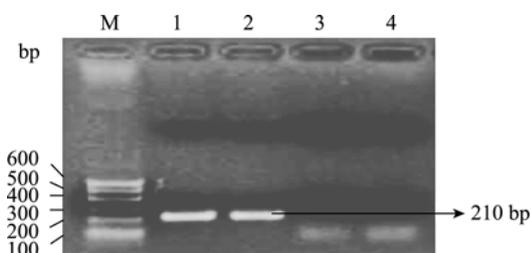


图 4 阳性细胞的 PCR 鉴定

Fig. 4 PCR analysis of positive clones. M: molecular weight marker; 1,2: Transfection group of pEBCD; 3: transfection group of pEGFP/C1; 4: untransfection group.

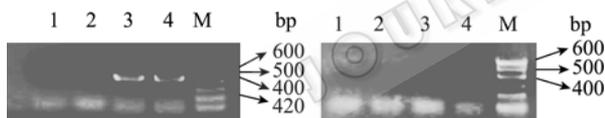


图 5 阳性细胞的 RT-PCR 鉴定

Fig. 5 Identification of positive clones by RT-PCR. HBD-3 gene transcription in positive clones analyzed by RT-PCR, Samples were treated with RNase (light) or not (left); 1: transfection group of pEGFP-C1; 2: untransfection group; 3,4: transfection group of pEBCD.

2.5 HBD-3 cDNA 在奶牛乳腺上皮细胞中的表达

稳定转染乳腺特异性表达载体 pEBCD 的奶牛乳腺上皮细胞在诱导培养基作用下, 开始在上清中分泌 HBD-3 蛋白。表达产物的 Western blotting 分析结果见图 6。重组的人 HBD-3 蛋白分子量约 5.0 kD, 稍小于标准品 HBD-3 蛋白的分子量, 这可能是由于重组蛋白在乳腺上皮细胞中加工修饰的方式不同造成的; 并且对照组转染奶牛胎牛成纤维细胞和未转染组的奶牛乳腺上皮细胞培养上清液均无目的蛋白

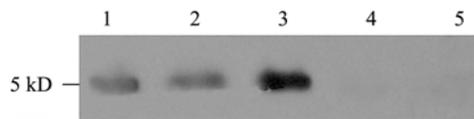


图 6 细胞诱导表达 HBD-3 蛋白的 Western blotting 检测

Fig. 6 Western blotting analysis of recombinant HBD-3 protein. 1,2: products from HBD-3 cDNA transgenic Holstein mammary epithelial cells; 3: standard HBD-3 protein; 4: products from HBD-3 cDNA transgenic Holstein fetal fibroblast cells; 5: products from HBD-3 cDNA nontransgenic Holstein mammary epithelial cells.

表达。试验结果进一步表明以奶牛酪蛋白启动子能够指导整合于奶牛基因组上的外源 HBD-3 基因在奶牛乳腺上皮细胞中表达。

3 讨论

制作乳腺生物反应器的关键是选择有效的调控元件。奶牛的 β -酪蛋白启动子已被广泛地用于调控外源基因在转基因动物乳腺中的特异性表达。研究表明, 1.7 kb 的 β -酪蛋白启动子足以调控外源基因在体外培养的细胞中进行表达^[10,11]。Rosen 等证实小鼠的组织特异性表达的位点位于 β -酪蛋白基因的 -511~+487 区间内。并且, β -酪蛋白基因启动子中转录因子反应元件或结合位点位于 RNA 起始位点 5'端 2.3 kb 区间内^[12]。鉴于以上原因, 本实验将基因 HBD-3 作为候选基因, 以奶牛 β -酪蛋白(β -casein, CSN2)启动子作为调控序列试验构建了靶基因的乳腺特异性表达载体。其仅仅相当于以 HBD-3 基因的 cDNA 代替 CSN2 的结构基因部分, 基本符合内源性 CSN2 表达调控模式。如果表达载体在靶细胞中整合的位点合适, 便能够指导靶基因在乳腺上皮细胞细胞或乳腺组织中进行有效表达^[13]。

EGFP 作为报告基因, 可以用于筛选以及检测整合有外源基因的细胞。在制备转基因克隆动物时, EGFP 的表达可用来检测供体细胞外源基因的整合以及表达, 在胚胎移植前可以进一步筛选转基因克隆胚胎, 从而提高转基因克隆的效率^[14,15]。使用 EGFP 作为报告基因, 通过体细胞核移植的方法已经获得了转基因山羊^[16]、转基因牛^[14]以及转基因猪^[17,18], 提示通过 EGFP 的表达来筛选转基因供体细胞制备转基因克隆动物的可行性。本试验在构建乳腺特异性表达载体时, 利用 pEGFP-C1 上的 EGFP 基因以及 CMV 强启动子, 指导 EGFP 的非特异性表达,

旨在用来筛选转基因核移植供体细胞以及后期筛选转基因克隆胚胎,从而尽可能地提高核移植法制备乳腺生物反应器的效率。

综上所述,通过 G418 抗性筛选及 EGFP 检测分析,成功获得了转基因奶牛成纤维细胞和乳腺上皮细胞,进而通过 PCR、RT-PCR 检测分析,获得了稳定整合外源 HBD-3 基因的奶牛成纤维细胞,并且整合位点处于染色质开放区,从而为制备乳腺生物反应器生产药用蛋白的转基因牛成功提供核移植的供体细胞。同时利用奶牛乳腺上皮细胞系的体外诱导表达系统,证明了 HBD-3 cDNA 表达的组织特异性,进一步验证通过乳腺生物反应器生产药用蛋白的可行性。然而,转基因随着细胞传代次数的增多,可能会影响供体细胞的遗传学以及表观遗传学状态,进而影响细胞核重编程以及以后在转基因动物个体水平上的表达,这些都有待于进一步研究。

REFERENCES

- [1] Harder J, Bartels J, Christophers E, *et al.* Isolation and characterization of human beta-defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem*, 2001, **276**(8): 5707–5713.
- [2] Jia HP, Schutte BC, Schudy A, *et al.* Discovery of new human beta-defensins using a genomics-based approach. *Gene*, 2001, **263**(1-2): 211–218.
- [3] Garafa JR, Jaumann F, Schulz S, *et al.* Identification of a novel, multifunctional beta-defensin(human beta-defensin3) with specific antimicrobial activity: Its interaction with plasma membranes of xenopus oocytes and the induction of macrophage chemoattraction. *Cell Tissue Res*, 2001, **306**(2): 257–264.
- [4] Joly S, Maze C, McCray PB Jr, *et al.* Human beta-defensins 2 and 3 demonstrate strain-selective activity against oral microorganisms. *J Clin Microbiol*, 2004, **42**(3): 1024–1029.
- [5] Maisetta G, Batoni G, Esin S, *et al.* Activity of human beta-defensin 3 alone or combined with other antimicrobial agents against oral bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003, **47**(10): 3349–3351.
- [6] Sahly H, Schubert S, Harder J, *et al.* Burkholdria is highly resistant to human beta-defensin-3. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003, **47**(5): 1739–1741.
- [7] Feng Z, Dubyak Gr, Lederman MM, *et al.* Cutting edge: Human beta-defensin-3 a novel antagonist of the HIV-1 coreceptor CX-CR4. *J Immunol*, 2006, **177** (2): 782–786.
- [8] Dhople V, Krukemeyer A, Ramamoorthy A. The human beta-defensin-3, an antibacterial peptide with multiple biological functions. *Biochim Biophys Acta*, 2006, **1758** (9): 1499–1512.
- [9] Maisetta G, Batoni G, Esin S, *et al.* *In vitro* bactericidal activity of human beta-defensin 3 against multidrug-resistant nosocomial strains. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006, **50**(2): 806–809.
- [10] Cerdan MG, Young JI, Zino E, *et al.* Accurate spatial and temporal transgene expression driven by a 3.8-kilobase promoter of the bovine beta-casein gene in the lactating mouse mammary gland. *Mol Reprod Dev*, 1998, **49**(3): 236–245.
- [11] Naruse K, Yoo SK, Kim SM, *et al.* Analysis of tissue-specific expression of human type II collagen cDNA driven by different sizes of the upstream region of the beta-casein promoter. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2006, **70** (1): 93–98.
- [12] Doppler W, Groner B, Ball RK. Prolactin and glucocorticoid hormones synergistically induce expression of transfected rat beta-casein gene promoter constructs in a mammary cell line. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, **86**: 104–108.
- [13] Liu JL, Zheng YM, Zhang Y. Molecular cloning and sequence analysis of bovine beta-casein gene 5',3'control region. *J Northwest Sci-tech Univ Agr For* (Natural Science Edition), 2003, **32** (2): 99–103.
刘金龙, 郑月茂, 张涌. 奶牛 β -酪蛋白基因 5'和 3'调控区的克隆及序列分析. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2003, **32** (2): 99–103.
- [14] Bordignon V, Keyston R, Lazaris A, *et al.* Transgene expression of green fluorescent protein and germ line transmission in cloned calves derived from *in vitro*-transfected somatic cells. *Biol Reprod*, 2003, **68**: 2013–2023.
- [15] Haermann FA, Wuensch A, Sinowatz F, *et al.* Reporter genes for embryogenesis research in livestock species. *Theriogenology*, 2007, **68S**: S116–S124.
- [16] Keefer CL, Baldassarre H, Keyston R, *et al.* Generation of dwarf goat (*Capra hircus*) clones following nuclear transfer with transfected and nontransfected fetal fibroblasts and *in vitro* matured oocytes. *Biol Reprod*, 2001, **64**: 849–856.
- [17] Hyun S, Lee G, Kim D, *et al.* Production of nuclear transfer-derived piglets using porcine fetal fibroblasts transfected with the enhanced green fluorescent protein. *Biol Reprod*, 2003, **69**: 1060–1068.
- [18] Lee G, Kim H, Hyun S, *et al.* Production of transgenic cloned piglets from genetically transformed fetal fibroblasts selected by green fluorescentprotein. *Theriogenology*, 2005, **63**: 973–991.