

文章编号: 1674-5566(2010)03-0302-06

## 定量 PCR 检测不同温度下免疫后 剑尾鱼 IgM 的表达

张铃铃<sup>1,2</sup>, 任燕<sup>1</sup>, 王庆<sup>1</sup>, 石存斌<sup>1</sup>, 吴淑勤<sup>1</sup>

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广东 广州 510380;

2. 大连海洋大学生命科学与技术学院, 辽宁 大连 116023)

**摘要:** 利用两步法荧光定量 RT-PCR 法, 检测不同温度下剑尾鱼免疫后脾脏和头肾组织中免疫球蛋白 M (IgM)mRNA 水平, 发现其在不同温度下随着免疫时间呈现出不同的变化趋势。结果显示, 在 18℃ 水温下, 剑尾鱼的 IgM 在两种组织中转录水平上升得较慢, 随着水温的升高, 在 23℃、28℃ 水温下, 其 IgM 表达水平上升较快, 尤其是在 28℃ 水温下, IgM 表达水平迅速上升, 且达到一个最高值, 但在 33℃ 较高水温条件下, IgM 表达量并没有更高的上升幅度, 而是与 18℃ 水温下的 IgM 表达相比有所提高。本实验结果表明剑尾鱼注射免疫后在脾脏和头肾中都检测到了 IgM 表达的上调, 高于 33℃ 或低于 18℃, 都会影响剑尾鱼免疫效果。实验过程中发现在这种亚适温度下, 剑尾鱼摄食量减少, 反应比较迟钝, 头肾和脾脏中 IgM 相对表达量也较低。

**关键词:** 剑尾鱼; 免疫球蛋白 M; 荧光定量 PCR

**中图分类号:** S 917      **文献标识码:** A

## Detection of IgM mRNA of *Xiphophorus helleri* under different temperature with fluorescence quantitative RT-PCR method

ZHANG Ling-ling<sup>1,2</sup>, REN Yan<sup>1</sup>, WANG Qing<sup>1</sup>, SHI Cun-bin<sup>1</sup>, WU Shu-qin<sup>1</sup>

(1. Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fisheries Sciences, Guangzhou 510380, China;

2. College of Life Science and Technology, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China)

**Abstract:** To study the changes of the IgM mRNA in spleen and head kidney of immunized *Xiphophorus helleri* under different temperature, we used two-step methods of fluorescence quantitative RT-PCR method to detect the mRNA level of IgM. The results showed that, mRNA of IgM detected under different temperature displayed dissimilar tendency. After immunization, IgM mRNA detected from both spleen and kidney rose slowly at 18℃, whereas it faster rised at higher temperature such as 23℃, and at 28℃, the mRNA of IgM fastest rised up to highest level than other groups. Under higher temperature such as 33℃, mRNA of IgM couldn't reach higher level as expected and just showed a littler higher than that at 18℃. The present study suggested that the mRNA of IgM from spleen and kidney was up-regulated after immunization, but the

收稿日期: 2009-10-09

基金项目: 农业公益性行业科研专项 (200803013); 现代农业产业技术体系建设专项资金 (nycytx-49-14)

作者简介: 张铃铃 (1985-), 男, 硕士研究生, 专业方向为水生动物免疫学。E-mail: zhanglingling99@163.com

通讯作者: 吴淑勤, Tel: 020-81616813, E-mail: wushuqin001@21cn.com

immunity effect would be dissatisfactory under the temperature higher than 33 °C or lower than 18 °C. The study also revealed that under inappropriate temperature *Xiphophorus helleri* showed unusual signs including reduced feeding activity, lethargy and so on.

**Key words:** *Xiphophorus helleri*; immunoglobulin M; real-time quantitative RT-PCR

鱼类是变温动物,长期生活于水体中,其体温直接依赖于周围环境的温度。因此,鱼类的各种生理机能包括免疫机能,受水温的影响极大<sup>[1]</sup>。水温是最重要的外界因素之一,影响水生变温动物的所有代谢过程,涉及水产动物的整个生命过程。它不仅影响鱼类的摄食、饲料转化率、胚胎发育、标准代谢,而且可以影响鱼类的免疫功能、T细胞和B细胞的相互作用、抗体的合成和释放等。低温能够完全地和部分地抑制抗体生成,或者延迟抗体的合成;在一定范围内,温度升高,免疫应答加快,抗体滴度升高,达到峰值时间也减短<sup>[2-3]</sup>。

免疫球蛋白 M (IgM) 是鱼类特异性体液免疫应答中最主要的介质,剑尾鱼 IgM 以可溶型和膜结合型两种形式存在,其重链是由相同的基因编码,但 mRNA 前体的加工过程决定着哪种形式的重链被合成与表达。可溶型 Ig 由 B 细胞分泌,出现于血液和其他体液,作为免疫效应分子存在;膜结合型 Ig 分子则嵌入 B 细胞膜,作为抗原受体而存在,它和辅助分子结合成 B 细胞受体复合物<sup>[4-5]</sup>。作为体液免疫应答的重要部分, IgM 在研究鱼病防治和鱼类疫苗学方面均有十分重要意义<sup>[6]</sup>。

在实验过程中,为了保证实验的科学性、准确性和重复性,标准化实验动物受到越来越多科研工作者的青睐。中国水产科学院珠江水产研究所培育的剑尾鱼 RR-B 系广泛应用于水环境监测、水产药物安全性评价、化学品毒性检测、动物疾病模型等领域,已通过全国水产原良种审定委员会的审定确认为水生实验动物,目前剑尾鱼 RR-B 系已通过近亲繁殖达 28 代<sup>[7]</sup>。本试验通过分别对剑尾鱼在不同水温下免疫后,检测分析脾脏、头肾的 IgM 表达水平的变化,探讨水温与剑尾鱼特异性免疫力的关系,以期养殖中有效合理使用疫苗提供理论支持,同时,为利用标准化的水生实验动物剑尾鱼作为实验材料,建立免疫评价动物模型积累基础资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物及菌株

剑尾鱼 RR-B 系,体长为 5~7 cm,体重为 3.6~3.8 g 由中国水产科学研究院珠江水产研究所培育,暂养 2 周后实验。嗜水气单胞菌 GYK1 株,由珠江水产研究所鱼病室提供,经福尔马林灭活后,比浊法调整菌悬液浓度为  $10^9$  cfu/mL。

#### 1.1.2 主要试剂和仪器

SYBR Premix Ex Taq™; TaKaRa 日本;实时荧光定量 PCR 仪: LightCycler (Roche Diagnostics 公司), 瑞士;核酸蛋白测定仪: Bio-Photometer 美国;普通 PCR 仪 PTC-200; MJ Research 美国。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 引物设计及合成

根据韩进刚等<sup>[8]</sup>发表的剑尾鱼 IgM 重链基因的 cDNA 序列,确定以 CH4 恒定区为扩增靶序列。 $\beta$ -actin 引物根据 GenBank 已登陆的剑尾鱼  $\beta$ -actin 基因的 cDNA 序列 (登录号: DQ060278) 来设计。用 Primer express software v2.0 软件设计引物,并通过 NCBI 中 Blast 功能,检测引物的特异性。引物由上海生物工程技术公司合成。IgM 扩增片段长度为 182 bp 上游引物: 5'-TGGACTGGCTTGTTCGATGAT-3', 下游引物: 5'-CTTGACTTTGCCACTGACTCA-3'。 $\beta$ -actin 扩增片段长度为 114 bp 上游引物: 5'-TGCTATGTTGCACTGGACTTTGAG-3', 下游引物: 5'-CCTCTCGTTTCCGATGGTGATGAC-3'。

#### 1.2.2 温度设置

试验剑尾鱼在 18 °C 条件下驯养,用自动温度控制器以 0.3 °C/min 速度缓慢升温,实验设置 4 个温度梯度 (18 °C, 23 °C, 28 °C, 33 °C), 当升温到设定温度时,恒温暂养。实验分成对照组和免疫组,对照组注射无菌生理盐水 (0.85% NaCl), 免疫组注射嗜水气单胞菌疫苗,注射剂量

每尾 0.1 mL 分别在 0、2、4、7、11、16、22 d 提取脾脏、头肾的总 RNA。每期取样 3 尾, 用荧光定量 RT-PCR 方法进行 IgM mRNA 表达水平分析。

### 1.2.3 总 RNA 提取和逆转录

参照试剂盒 RNA prep pure Tissue kit (TIANGEN) 说明书提取组织样品的总 RNA, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定所提取 RNA 的完整性。紫外分光光度法测定 RNA 样品的浓度和纯度。取 1  $\mu$ g 纯化的 RNA 在 20  $\mu$ L 的液体中用 M-MLV Reverse Transcriptase (Promega) 进行反转录得到相应的 cDNA。

### 1.2.4 PCR 实验

以对照组免疫前头肾的总 cDNA 为模板, 用 IgM、 $\beta$ -actin 基因引物和 Taq DNA polymerase 进行 PCR 反应。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测。PCR 反应条件为 94  $^{\circ}$ C 预变性 4 min, 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 56  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 40 s, 30 个循环后 72  $^{\circ}$ C 延伸 8 min。

### 1.2.5 标准曲线的制作

以 cDNA 为模板, 分别用两对引物进行 PCR 扩增。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳后, DNA 凝胶回收试剂盒对目的片段进行纯化, 纯化产物连接到 PMD-18T 载体 (TaKaRa) 中, 筛选阳性克隆 PCR 鉴定后, 送上海生物工程技术有限公司测序。构建的标准品质粒经核酸蛋白紫外分析仪检测, 其  $OD_{260} : OD_{280}$  达到了 1.90, 保证了标准品的纯度。以 10 倍梯度稀释的重组标准品质粒为模板进行定量 PCR 反应, 分别制作内参基因和目的基因的标准曲线。试验中各个标准均做 3 个重复, 另设无模板的阴性对照。

### 1.2.6 实时荧光定量 PCR 检测样品中 IgM 和 $\beta$ -actin 含量

取 2  $\mu$ L cDNA, 12.5  $\mu$ L SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup>, 各 0.5  $\mu$ L 浓度为 10  $\mu$ mol/L 上、下游引物, 10.5  $\mu$ L 去离子水, 在荧光 PCR 仪上进行扩增。反应条件为 95  $^{\circ}$ C 预变性 4 min, 95  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 56  $^{\circ}$ C 退火 20 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 35 个循环后 72  $^{\circ}$ C 延伸 5 min; 在 56~99  $^{\circ}$ C 做融解曲线。每个组织中 IgM 基因 mRNA 的精确拷贝数由荧光曲线的 Ct 值和标准曲线计算获得。IgM 基因 mRNA 表达水平为 IgM 总拷贝 /  $\beta$ -actin 总拷贝。

实验重复 3 次, 数据以  $\bar{X} \pm S$  表示, 用 SPSS 16.0 统计软件进行单因子变异数分析

(univariate), 以 LSD 方法进行多重比较。

## 2 结果

### 2.1 不同组织中 RNA 样品的 PCR 结果

不同组织中总 RNA 样品经 RT-PCR 后 (图 1), 单一亮带的位置与目的片段大小基本一致, 电泳检测带型单一, 说明没有引物二聚体也没有非特异扩增的现象, 因此所设计引物比较理想, 可以用于实时荧光定量检测。

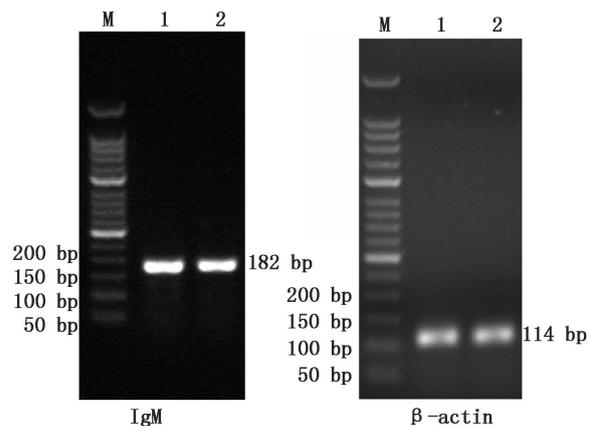


图 1 脾脏、头肾组织中 IgM、 $\beta$ -actin 的扩增结果

Fig 1 Partial products of IgM and  $\beta$ -actin from two organs

1 头肾; 2 脾脏; M: DNA 分子标记

### 2.2 定量标准曲线的建立

重组标准品质粒以 10 倍梯度进行稀释, 以系列稀释的质粒为模板进行实时定量 PCR 反应, 反应结束后系统自动生成起始模板浓度扩增反应的动力学曲线。并用这个结果作标准曲线, 用模板初始量 (或未知量样品的稀释倍数) 的 log 值对每个稀释样品的 Ct 值作图, 得出一条呈线性关系的标准曲线 (图 2)。IgM 的扩增效率为 2.025, Error 值为 0.056 1;  $\beta$ -actin 的扩增效率为 1.970, Error 值为 0.049 1。

### 2.3 IgM mRNA 在脾脏和头肾中的表达

在相对定量检测中, 为了比较不同样本 mRNA 表达量水平, 必须是不同样品之间起始细胞数目相同、RNA 提取效率相同, 且目的基因的扩增效率相同, 实际上这些条件不可能同时得到满足, 因而需要一个内参基因进行定量 PCR 对目的基因的定量结果误差进行校正, 选用  $\beta$ -actin 基因作为校正基因, 即将 IgM 的拷贝数与  $\beta$ -actin 的

拷贝数相比,得到的比值作为相对表达量<sup>[9]</sup>。根据 IgM 在脾脏和头肾中的相对表达量作柱形图,可以清楚地看出,注射灭活嗜水气单胞菌疫苗后,免疫组中脾脏和头肾中 IgM 相对表达量呈现

先上升后下降的趋势,最高能达到 12.41;而对照组的 IgM 相对表达量都低于 2.0(图 3、4),实验结果表明剑尾鱼在注射疫苗后,免疫组 IgM 相对表达量显著高于对照组 ( $P < 0.05$ )。

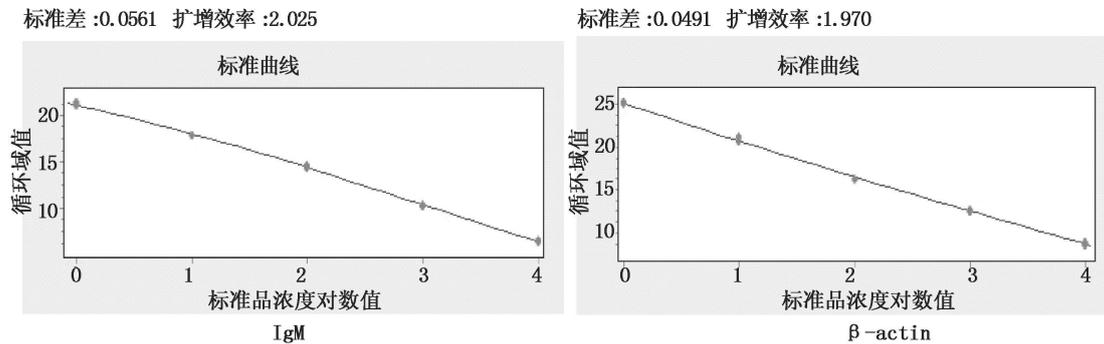


图 2 IgM 和  $\beta$ -actin 定量 PCR 标准曲线

Fig 2 Standard curve of IgM and  $\beta$ -actin quantitative PCR

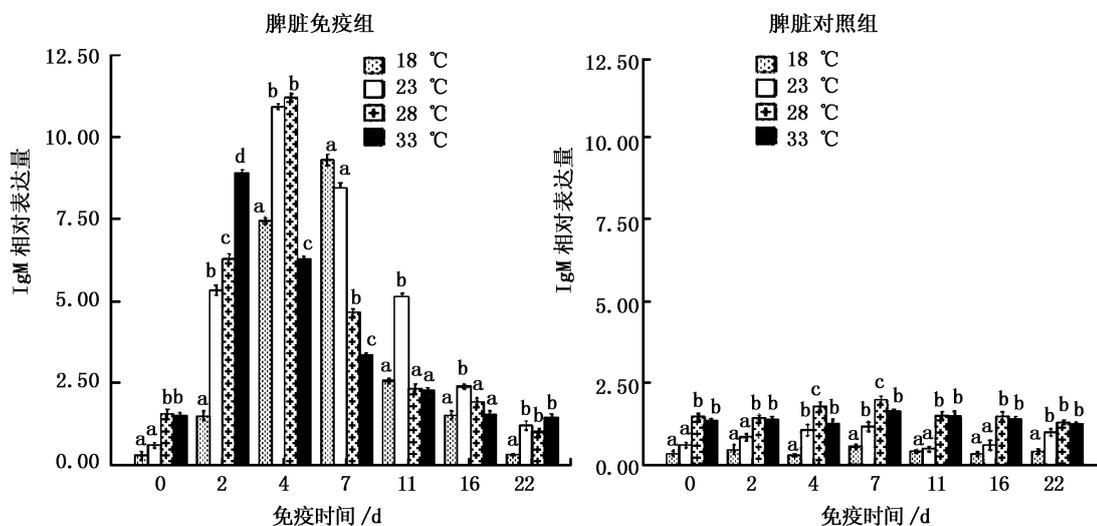


图 3 不同温度下剑尾鱼脾脏中 IgM 的相对表达量

Fig 3 The relative expression level of IgM of *Xiphophorus helleri* spleen at different temperature

注:标注的不同字母表示 IgM 的相对表达量显著不同 ( $P < 0.05$ ),而相同的字母表示 IgM 的相对表达量变化不显著。

在 23°C、28°C 水温下,剑尾鱼脾脏中 IgM 相对表达量均在第 4 天达到最高峰,在 18°C 水温下, IgM 相对表达量在第 7 天达到最高峰,而在 33°C 水温下,脾脏中 IgM 相对表达量的最高点出现在加强免疫后的第 2 天,其中在 28°C 水温下 IgM 相对表达量能达到一个至高点(与 18°C、23°C、33°C 下相比,分别上升了 1.2 倍、1.0 倍、1.3 倍)。在这之后都呈现下降趋势,在 33°C 水温下, IgM 相对表达量下降趋势尤其明显,到第 11 天, IgM 的转录已经降到了极低水平,与免疫前相

比基本持平(图 3)。

剑尾鱼头肾中 IgM 表达量在 23°C、28°C、33°C 水温下,与脾脏显示相似的动态变化, IgM 表达量均在第 4 天达到最高峰,而在 18°C 水温下,头肾中 IgM 相对表达量的最高点出现在加强免疫后的第 7 天,其中在 28°C 水温下 IgM 相对表达量能达到一个至高点(与 18°C、23°C、33°C 下相比,分别上升了 1.3 倍、1.1 倍、1.2 倍),之后呈现下降趋势。头肾的 IgM 表达量直到第 16 天仍保持较高的表达水平,与免疫前相比,分别上升

了 4.1 倍、2.3 倍、2.0 倍、6.2 倍。

上述结果表明,在 18℃ 水温下,剑尾鱼脾脏、头肾中的 IgM 转录上升地较慢,随着水温的升高,在 23℃、28℃ 下,其 IgM 表达量上升较快,

尤其是在 28℃ 水温下,不仅 IgM 表达量迅速上升,且达到一个最高值,但在 33℃ 更高水温条件下, IgM 表达量并没有更高的上升幅度,但与 18℃ 水温下的 IgM 表达相比,还是有所提高(图 4)。

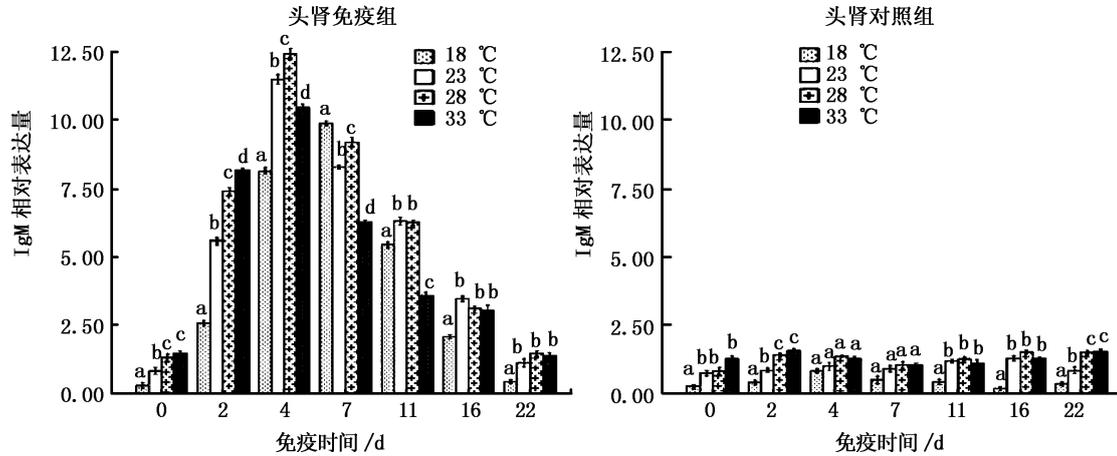


图 4 不同温度下剑尾鱼头肾中 IgM 的相对表达量

Fig 4 The relative expression level of IgM of *Xiphophorus helleri* head kidney at different temperature

注:标注的不同字母表示 IgM 的相对表达量显著不同 ( $P < 0.05$ ),而相同的字母表示 IgM 的相对表达量变化不显著。

### 3 讨论

由于技术的限制,以往对基因表达分析只能进行粗略的半定量分析,或者是 Northern blot 杂交,但因其分析误差大、样本需要量大、操作复杂等缺点,难以满足科研工作者的实验需求,随着科学技术的发展,定量 PCR 技术实现了对微量组织进行基因表达的定量分析<sup>[10]</sup>。本实验选择剑尾鱼 IgM 基因为目的基因,  $\beta$ -actin 为内参基因,应用 SYBR GREEN I 的定量 PCR 技术,对免疫后剑尾鱼 IgM 基因在不同水温下的表达水平进行测定。在实验过程中,制备了标准品,得到效率很高的标准曲线。其效率分别为 2.025 (IgM) 和 1.970 ( $\beta$ -actin),都接近于理想化效率 2.0,而且两者之间扩增效率差异小于 0.1,无需进行 PCR 扩增效率校正,就可以进行相似相对定量计算。

温度变化对鱼类免疫系统的影响是极其复杂的。很早就有研究表明:在低温条件下,鱼类的免疫应答功能低下,随着温度的升高,免疫反应可以比较正常或加速进行<sup>[11-13]</sup>。近些年,国内外学者对温度这个环境因子进行了更深入、更系统的研究,并对此提出新的观点。Marc 等<sup>[14]</sup>认为特异性免疫对低温十分敏感,这种敏感性是

由于低温抑制或延迟了抗体的释放,而不是抗体的产生; Raida<sup>[15]</sup>通过浸泡免疫虹鳟,检测细胞因子、趋化因子等一系列免疫相关的基因,认为免疫基因的表达,免疫球蛋白的浓度等都依赖于周围的浓度; Stewart 等<sup>[16]</sup>认为鲑鱼的免疫机制在 8℃ 饲养下主要依赖于非特异性免疫,而在 12℃ 下,特异性免疫则起着关键的作用。也有研究者发现尽管低温延迟了抗体应答,但应答的强弱没有被改变。升高温度能加速抗体的合成,但是当孵化温度超过其自然环境温度时,抗体产生细胞的溶血斑点数明显减少,似乎表明在低温时鱼类能较好地产生抗体<sup>[17]</sup>,而且 McGann 等<sup>[18]</sup>也认为温度的变化确实影响着白细胞介素,干扰素等细胞因子的表达,但对免疫球蛋白的影响不大。本实验选择剑尾鱼在 4 种不同温度 (18℃、23℃、28℃、33℃) 下饲养后,用灭活嗜水气单胞菌免疫剑尾鱼,测定其脾脏和头肾中 IgM 表达量变化,来反映其免疫功能变化。实验结果说明在适宜温度范围内,剑尾鱼头肾中 IgM 水平的变化是温度依赖型的,即高温 (28℃) 能加强 IgM 的合成或分泌,而低温 (23℃) 能抑制 IgM 的合成或分泌。剑尾鱼的最适生长温度为 20~30℃,但对于鱼类免疫学研究,最适生活温度的确定是必要的,本实验结果表明,高于 33℃,或低于 18

℃,都会影响剑尾鱼免疫效果。实验过程中我们发现在这种亚适温度下,剑尾鱼摄食量减少,反应比较迟钝,头肾和脾脏中 IgM 相对表达量也较低,这与江育林<sup>[19]</sup>、侯亚义等<sup>[20]</sup>在其他鱼类中的研究结果是一致的。

目前,检测血清中抗体效价的高低已成为反映水生动物免疫水平较为理想和可靠的指标,但剑尾鱼体型小,采血量少,不利于作血液抗体效价的检测。据研究证明,IgM 表达与血清抗体效价的变化规律具有一定的相似性<sup>[21]</sup>,而且国内外学者都曾利用实时荧光定量 PCR 技术检测鱼免疫后的 IgM 表达量变化<sup>[22-23]</sup>。因此,希望建立一种实时荧光定量 PCR 方法,检测不同温度下剑尾鱼 IgM 的表达变化,可有效地替代先前采血分析免疫指标的方法。本实验在国内首次利用实时荧光定量 PCR 方法对免疫后剑尾鱼 IgM 在不同水温下的表达变化规律进行了监测,该方法克服了传统免疫学手段灵敏度低的缺点,为认识温度对剑尾鱼免疫的影响提供了资料,更为进一步寻求新的免疫评价指标奠定了基础,其研究成果将对建立免疫评价动物模型起着重要的促进作用。

#### 参考文献:

- [1] 李亚南,王翼平,邵健忠,等. 鱼类免疫应答中温度效应研究 [J]. 浙江大学学报, 1999, 26(3): 82-85.
- [2] Bly JE. Temperature mediated Processes in Teleost Immunity: in Vivo Low Temperature in Channel Catfish [J]. Vet Immunol Immunopathol 1991, 28(3): 356-377.
- [3] Ahne W. The Influence of Environmental Temperature and Infection Route on the Immune Response of Carp to Spring Viremia of Carp Virus (SVCV) [J]. Immunopathol 1991, (12): 383-386.
- [4] 王荻,刘红柏. 5种鲟鱼免疫球蛋白重链恒定区序列研究 [J]. 遗传, 2006, 28(10): 1247-1253.
- [5] 刘红柏,王荻. 史氏鲟免疫球蛋白重链可变区系列及多样性 [J]. 动物学报, 2006, 52(3): 557-563.
- [6] Ross D A, Wilson M R, Miller N W, et al Evolutionary variation of immunoglobulin mu heavy chain RNA processing pathways: origins effects and implications [J]. Immunol Rev 1998, 166: 143-151.
- [7] 吴淑勤,黄志斌,石存斌,等. 水生实验动物—剑尾鱼 [M]. 北京:中国农业出版社, 2005: 3-5.
- [8] 韩进刚,付小哲. 剑尾鱼 IgM 基因的克隆及免疫对其组织表达的影响 [J]. 广东海洋大学学报, 2007, 27(6): 1-6.
- [9] Zhang X Z, Lily D, Andrew J S. Selection of reference genes for gene expression studies in human neutrophils by real-time PCR [J]. BMC Mol Biol 2005, 6(1): 4-10.
- [10] 冯晨,唐锐勤. 荧光定量 RT-PCR 检测神经母细胞瘤细胞 MYCN 基因 mRNA 的表达 [J]. 中国当代儿科杂志, 2007, 9(1): 34-39.
- [11] Stolen J S, Gahn T, Nagle J J. The humoral antibody formation to erythrocyte antigens in three species of flatfish [J]. Dev Comp Immunol suppl 1982, (2): 101-106.
- [12] Hnibec T C, Robertson J L, Smith S A, et al The effect of temperature and water quality on antibody response *Aeromonas salmonicida* in sunshine bass [J]. Vet Immunol Immunopathol 1996, 50(1-2): 157-166.
- [13] Suzuki Y, Orito M, Iigo M, et al Seasonal changes in blood IgM levels in goldfish with special reference to water temperature and gonadal maturation [J]. Fish Sci 1996, 62: 754-759.
- [14] Mare Y, Engelsma Sander Hougee et al Multiple acute temperature stress affects leucocyte populations and antibody responses in common carp *Cyprinus carpio* L [J]. Fish & Shellfish immunology 2003, (15): 397-410.
- [15] Raida M K, Buchmann K. Bath vaccination of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) against *Yersinia nuckeri*. Effects of temperature on protection and gene expression [J]. Vaccine 2008, (26): 1050-1062.
- [16] Stewart W, Alcom Anthony L Murray, et al Effects of rearing temperature on immune functions in sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) [J]. Fish & Shellfish 2002, (12): 303-334.
- [17] Battersby B J, Moyes C D. Influence of acclimation temperature on mitochondrial DNA, RNA, and enzymes in skeletal muscle [J]. Am J Physiol 1998, 275: 905-912.
- [18] McGann P, Ivanek R, Wiedmann M, et al Temperature-Dependent Expression of *Listeria monocytogenes* Intestinal and Intestinal-Like Genes Suggests Functional Diversity of These Proteins among the *Listeriae* [J]. Environmental Microbiology 2007, 14(5): 2806-2814.
- [19] 江育林. 草鱼免疫应答的初步研究 [J]. 水生生物学报, 1991, 15(4): 321-326.
- [20] 侯亚义,韩晓冬. 温度和类固醇激素对虹鳟免疫球蛋白 M 的影响 [J]. 南京大学学报:自然科学版, 2001, 37(5): 563-568.
- [21] Mas V R, Mahif D G, Archer K J, et al Study of mRNA growth factors in urinary cells of kidney transplant recipients as predictors of chronic allograft nephropathy [J]. Transplantation 2005, 80(12): 1686-1690.
- [22] Raida M K, Buchmann K. Bath vaccination of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) against *Yersinia nuckeri*. Effects of temperature on protection and gene expression [J]. Vaccine 2008, (26): 1050-1062.
- [23] 刘雨果,潘厚军,陈偿,等. 实时荧光定量 PCR 检测鳊 IgM mRNA 标准品质粒的构建 [J]. 广东海洋大学学报, 2008, 28(6): 1-4.