وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور – پژوهشکده آبزی‌پروری آبهای داخلی

عنوان:

امکان‌سنجی تهیه کشت سلولی اولیه از بافت‌های باله و کلیه بچه ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus kutum*)

مجری :
محدث قاسمی

شماره ثبت
۵۸۲۲۷

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور- پژوهشکده آبزی‌پروری آبهای داخلی

عنوان طرح/پروژه: امکان‌سنجی تهیه کشت سلولی اولیه از بافت‌های باله و کلیه بچه ماهی سفید دریای خزر(*Rutilus kutum*)
کد مصوب: ۹۶۱۳۱۶-۰۶۰-۱۲-۷۳ - ۲٤
نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان: محدث قاسمی
نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه ها و طرحهای ملی و مشترک دارد) : -
نام و نام خانوادگی مجری: محدث قاسمی
نام و نام خانوادگی همکار(ان): سمیه حقیقی کارسیدانی، بابک رمضانی عاقله، صادق امیدوار، سوسن شاهرخی، نوشین طهماسبی، شکوفه نصیری، ناهید پورعباس تحویلداری، علیرضا رضوانی گیل کلائی، سید ابراهیم صفوی، عباس توکل
نام و نام خانوادگی مشاور(ان): سیدمحمدابراهیم جلیل ذریه زهرا
نام و نام خانوادگی ناظر(ان): -
محل اجرا: استان گیلان
تاریخ شروع: ۱۳۹٦/٤/۱
مدت اجرا: ۱ سال و ۲ ماه
ناشر: موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور
تاریخ انتشار: سال ۱۳۹۹
حق چاپ برای مؤلف محفوظ است . نقل مطالب ، تصاویر ، جداول ، منحنی ها و نمودارها با ذکر مأخذ بلامانع است .

«سوابق طرح یا پروژه و مجری مسئول / مجری»

طرح/پروژه : امکان سنجی تهیه کشت سلولی اولیه از بافتهای باله و کلیه بچه ماهی سفید دریای خزر(*Rutilus kutum*)

کد مصوب : ۹۶۱۳۱۶-۰۶۰-۱۲-۷۳ - ۲۴

شماره ثبت (فروست) : ۵۸۲۲۷ تاریخ : ۱۳۹۹/۶/۲۸

با مسئولیت اجرایی جناب آقای محدث قاسمی دارای مدرک تحصیلی دکتری در رشته بهداشت و بیماری‌های آبزیان می‌باشد.

پروژه توسط داوران منتخب بخش بهداشت و بیماری‌های آبزیان در تاریخ ۱۳۹۹/۶/۱۶ مورد ارزیابی و با رتبه عالی تأیید گردید.

در زمان اجرای پروژه، مجری در :

ستاد □ پژوهشکده ■ مرکز □ ایستگاه □

با سمت عضو هیئت علمی در پژوهشکده آبزی‌پروری آبهای داخلی مشغول بوده است.

عنوان	«فهرست مندرجات»	صفحه

چکیده ۱
۱-مقدمه ۲
۱-۱- ماهی سفید دریای خزر ۲
۱-۲- کشت سلول ۴
۱ـ۲ـ۱ـ کشت اولیه ۴
۱-۲-۱- تیره سلولی ۵
۱-۳- روش های کشت سلول ۷
۱-۳-۱- کاشتن ۷
۱-۳-۱- مکانیکی ۸
۱-۳-۱- استخراج سلول از بافت توسط آنزیم ۸
۱-۴-استفاده از سرم ماهی در کشت سلول ۹
۱-۵- استفاده از آنتی بیوتیک در کشت سلول ۱۰
۱-۶- محیط کشت های رایج در کشت سلول های ماهی ۱۰
۱-۷- مزایای کشت سلولی ماهیان ۱۲
۱-۸-کاربردهای تیره های سلولی ماهی ۱۲
۲-پیشینه تحقیق ۱۴
۲-۱- سابقه اولین مطالعات کشت سلول ۱۴
۲-۲-کشت سلول به روش کاشتن ۱۵
۲-۳- استخراج سلول از بافت توسط آنزیم ۱۵
۲-۴- استفاده از سرم درکشت سلول ماهی ۱۶
۲-۵-استفاده از آنتی بیوتیک درکشت سلول ماهی ۱۷
۲-۶- محیط کشت های رایج در کشت سلول ماهی ۱۷
۲-۷- اولین کشت سلول از ماهیان الاسموبرانش ۱۷
۲-۸-کشت اولیه ماهی در جهان ۱۸
۲-۹- تیره سلولی ماهی ۱۸
۲-۱۰- تیره های سلولی تولید شده از ماهیان آب شیرین به تفکیک گونه ماهی ۱۹
۲-۱۱-تیره های سلولی تولید شده از ماهیان آب شور ۲۳
۲-۱۲-تیره های سلولی تولید شده از ماهیان آب لب شور ۲۶

۱۳-۲- مطالعات انجام شده در خصوص کشت سلول آبزیان در کشور ۲۷
۳- مواد و روش‌ها ۲۹
۱-۳- مواد مصرفی ۲۹
۲-۳- مواد غیر مصرفی ۳۱
۳-۳- روش کار ۳۵
۱-۳-۳- محل انجام کار ۳۵
۲ـ۳ـ۳ـ تهیه و نگهداری بچه ماهیان ۳۵
۳-۳-۳- نمایش مراحل کار بصورت خلاصه ۳۷
۴-۳-۳-کشت اولیه ۳۹
۵-۳-۳-نگهداری و پاساژ کشت های اولیه ۴۵
۴-۳- بررسی مهاجرت سلول ۴۶
۵-۳- شمارش سلول ها و تعیین درصد بقا ۴۶
۶-۳- بررسی کارایی ایجاد کلونی ۴۸
۷-۳-روش ها و ابزار تجزیه و تحلیل داده ها ۴۸
۴-نتایج ۴۹
۱-۴-کشت اولیه باله ۴۹
۱-۱-۴- روش کاشت ۴۹
۵-۱-۴- مقایسه چسبندگی و مهاجرت سلول از قطعات کاشته شده(درصد کارایی کاشت بافت) بدون تیمار و با تیمار با آنزیم تریپسین ۵۵
۶-۱-۴- تراکم سلول ها در ظرف کشت ۲۵ سانتی متر مربع از روز اول تا زمان کشت مجدد ۵۶
۷-۱-۴- نتایج کاشت سلول ها با دو مرحله شستشوی بافت (گروه A و B) ۵۷
۸-۱-۴- تأثیر دماهای مختلف بر روی سلول در روش کاشت ۵۷
۲ـ۴ـ روش آنزیمی ۵۸
۱-۲-۴- بررسی چسبیدن و تکثیر سلول به صورت روزانه از بافت باله ماهی سفید دریای خزر(*Rutilus kutum*) پس از دو روز چسبندگی سلول ها به کف فلاسک و تکثیر آنها قابل مشاهده بود(تصویر۴ـ۱۴) ۵۸
۲ـ۲ـ۴ـ درصد زنده مانی سلول های باله تریپسینه بدون استفاده و با استفاده از همزن مغناطیسی در زمان های مختلف ۵۹

۳-۲-۴- تراکم سلول در ظرف کشت ۲۵ سانتی متر مربع با استفاده و بدون استفاده از همزن مغناطیسی..... ۶۰
۳-۴- مقایسه سه روش استفاده شده جهت تهیه کشت سلول اولیه(Primery cell)..... ۶۱
۴-۴- پاساژ کشت های سلولی..... ۶۱
۱-۴-۴- پاساژ کشت های سلولی در روش کاشت(Explant)..... ۶۱
۲-۴-۴- تأثیر دماهای مختلف بر روی کشت سلول در زمان پاساژ..... ۶۵
۳-۴-۴- تأثیرpH بر رشد سلول ها در زمان پاساژ..... ۶۷
۴-۴-۴- درصد کارایی کلونی در تیمار های مختلف(بدون و با استفاده از همزن)..... ۶۷
۵-۴-کشت اولیه کلیه..... ۶۸
۱-۵-۴- روش کاشت..... ۶۸
۲-۵-۴- بررسی چسبندگی و مهاجرت سلول از قطعات کاشته شده کلیه(درصد کارایی کاشت بافت)..... ۷۱
۳-۵-۴-تراکم سلول ها در ظرف کشت ۲۵ سانتی متر مربع از روز اول تا زمان کشت مجدد ۷۱
۶-۴- روش آنزیمی..... ۷۲
۱-۶-۴- بررسی چسبیدن و تکثیر سلول های کلیه ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus kutum*) در روش آنزیمی بدون استفاده از همزن مغناطیسی..... ۷۲
۲-۶-۴- بررسی چسبیدن و تکثیر سلول های کلیه سفید دریای خزر(*Rutilus kutum*)بصورت روزانه در روش آنزیمی با استفاده از همزن مغناطیسی..... ۷۴
۳-۶-۴- درصد زنده مانی سلول های کلیه تریپسینه(روش آنزیمی) بدون استفاده و با استفاده از همزن مغناطیسی..... ۷۷
۴-۶-۴- تراکم سلول در ظرف کشت ۲۵ سانتی متر مربع با استفاده و بدون استفاده از همزن مغناطیسی..... ۷۸
۷-۴- مقایسه سه روش استفاده شده جهت تولید سلول پرایمری(کشت اولیه)..... ۷۹
۸-۴- پاساژ کشت های سلولی کلیه..... ۸۰
۱-۸-۴- پاساژ کشت های سلولی در روش کاشت(Explant)..... ۸۰
۲-۸-۴- درصد کارایی کلونی در تیمارهای مختلف بدون و با استفاده از همزن مغناطیسی..... ۸۲
۹-۴- تأثیر دماهای مختلف بر کشت سلول..... ۸۲
۱۰-۴- تأثیر pH بر رشد سلول ها..... ۸۳
۱۱-۴-تأثیر استیرر کردن..... ۸۳

۵- بحث ۸۴
۵-۱- بیهوش کردن و ضدعفونی کردن ماهی برای کشت سلول ۸۴
۵-۲- روش کاشت در کشت سلول اولیه باله ۸۵
۵-۲-۱- مقایسه کاشت بافت باله ماهی سفید دریای خزر(*Rutilus kutum*) بدون تیمار و با تیمار با آنزیم تریپسین ۸۵
۵-۳- روش آنزیمی در کشت سلول اولیه باله ۸۶
۵-۳-۱- درصد زنده مانی سلول های باله تریپسینه بدون و با استفاده از همزن مغناطیسی ۸۶
۵-۳-۲- تراکم سلول در ظروف کشت با استفاده و بدون استفاده از همزن مغناطیسی ۸۶
۵-۴- پاساژ کشت های سلولی اولیه باله ۸۶
۵-۴-۱- درصد کارایی کلونی بدون و با استفاده از همزن مغناطیسی در کشت سلول اولیه باله ۸۶
۵-۵- مقایسه سلول های حاصل از روش کاشت بافت با روش آنزیمی در کشت سلول اولیه باله ۸۷
۵-۶- تأثیر محیط کشت بر کشت سلول اولیه باله ۸۸
۵-۷- تأثیر سرم بر روی سلول ها در کشت سلول اولیه باله ۸۹
۵-۸- کاهش آلودگی هنگام کشت سلولی بر کشت سلول اولیه باله ۹۰
۵-۹- تأثیر دما بر کشت سلول اولیه باله ۹۱
۵-۱۰-آنزیم به کار برده شده در کشت سلول اولیه باله ۹۱
۵-۱۱- روش‌های مختلف کشت سلول جهت تهیه کشت سلول اولیه کبد ۹۲
۵-۱۲- تأثیر محیط کشت بر کشت سلول اولیه کبد ۹۳
۵-۱۳- تأثیر دما بر کشت سلول اولیه کبد ۹۴
۵-۱۴- ایجاد تک لایه سلولی در کشت اولیه کبد ۹۴
۵-۱۵- تأثیر سرم بر کشت سلول اولیه کبد ۹۵
۵-۱۶-تأثیر pH بر کشت سلول اولیه کبد ۹۶
۵-۱۷- پاساژ یا کشت مجدد کشت سلول اولیه کبد ۹۶
۵-۱۸- تراکم سلول ها در کشت سلول اولیه کبد ۹۷
۶- نتیجه گیری ۹۸
پیشنهادها ۹۹
منابع ۱۰۱
چکیده انگلیسی ۱۱۰

چکیده

کشت سلول این امکان را فراهم می‌آورد تا تغییرات و آثار آسیب سلولی در محیط کنترل شده مورد بررسی قرار گیرند. در این مطالعه که در سال ۱۳۹۶ انجام شد امکان تهیه کشت سلول اولیه از باله و کلیه ماهی سفید دریای خزر(*Rutilus kutum*) به دو روش کاشتن(Explant) با دو تیمار (تیمار با آنزیم و بدون آنزیم تریپسین) و جداسازی آنزیمی با دو تیمار(استفاده و بدون استفاده از همزن مغناطیسی) مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور پس از طی مراحل شستشو و ضدعفونی، سلول ها در محیط کشت L-15 حاوی ۲۰ درصد سرم جنین گوساله و آنتی بیوتیک در فلاسک های کشت سلول cm^2 ۲۵ کاشته شدند. در روش آنزیمی با استفاده از همزن قطعات بافت با ظرفی حاوی تریپسین بر روی استیرر قرار گرفته ولی در روش بدون همزن قطعات بافت بر روی استیرر قرار نمیگرد، در انتها در هر دو روش بافت ها سانتریفیوژ شده و در فلاسک های کشت سلول کاشته می‌شوند. سپس بعد از گذشت ۷ الی ۱۰ روز زمانی که سلول ها ۷۰ درصد کف فلاسک را پوشاندند در هر دو روش اقدام به پاساژ سلول ها گردید، سلول ها توسط ۳ سی سی آنزیم تریپسین از کف فلاسک جدا شدند و پلیت سلولی حاصل به فلاسک کشت جدید منتقل شد. در مقایسه کلی بین روش های تولید کشت اولیه، روش جداسازی آنزیمی توسط آنزیم تریپسین با استفاده از همزن مغناطیسی موفق تر بود و نتایج نشان داد شرایط بهینه برای کشت اولیه سلولهای باله و کلیه ماهی سفید محیط کشت L-15 به همراه ۲۰ درصد سرم جنین گوساله، pH ، ۷/۲ و دمای ۲۴ درجه‌ی سانتی گراد می باشد. تا کنون ۱۲پاساژ از سلول های باله ماهی سفید انجام شده و سلول ها از رشد خوبی نیز برخوردار هستند. با توجه به تکثیر و پاساژ مناسب سلول های بدست آمده می‌توان از این کشت سلولی برای تحقیقات ویروس شناسی، سم شناسی و ایمنی شناسی استفاده کرد، اما سلول های کلیه علی رغم مهاجرت سلول ۸۸/۳۷ درصد، تا ۵ پاساژ تکثیر شدند و پس از آن تکثیر مناسبی صورت نگرفت.

واژگان کلیدی: کشت سلول اولیه، باله، کلیه، ماهی سفید دریای خزر