DOI: 10.22092/vj.2017.115193.1354
شماره ۱۱۸ بهار ۱۳۹۷
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

تهیه کشت سلولی اولیه ماهی

• روزبه فلاحی
دانشیار موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
تاریخ دریافت: ۱۳۹۶-۰۶-۰۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶-۰۷-۱۰
Email: r.fallahi@rvsri.ac.ir

چکیده

ویروس‌ها از عوامل ایجادکننده خسارات هنگفت در پرورش آبزیان می‌باشند. انواع کشت‌های سلولی از جمله کشت‌های اولیه، روش‌های مناسبی برای تشخیص و جداسازی ویروس‌ها می‌باشند. از آنجاکه دسترسی به تیره‌های سلولی به ویژه در خصوص ماهیان براحتی سایر گونه‌ها نمی‌باشد و نیز برای تمام ماهیان هنوز تیره سلولی ایجاد نگردیده است، لذا در این تحقیق اقدام به تهیه و استاندارد نمودن کشت سلولی اولیه ماهی گردید. نمونه‌هایی از اندام‌های داخلی ماهی قرمز *(Carassius auratus)* شامل کلیه، کبد، عضلات و تخمدان و نیز از اندام‌های خارجی شامل باله‌ها، بافت همبند قسمت پوزه و آبشش‌ها، تهیه و بر طبق دستورالعمل‌های استاندارد آماده گردیدند. جهت تهیه کشت‌سلولی اولیه ماهی از روش‌های هضم آنزیمی کوتاه‌مدت، طولانی‌مدت، روش نشاکاری بافت‌های ریزشده و روش معمولی استفاده گردید. از محیط کشت EMEM غنی‌شده با سرم جنین‌گاو در درجه‌حرارت ۲۵ درجه سانتی‌گراد استفاده گردید. سلول‌های بدست آمده از روش‌های مختلف، رشد مناسبی داشته و به سطح پوششی کامل رسیدند و از آن‌ها چندین پاساژ متوالی تهیه گردید. بهترین نتیجه، از اندام‌های تخمدان و عضلات و روش هضم آنزیمی طولانی‌مدت با آنزیم تریپسین بدست آمد. با بکارگیری نتایج این تحقیق می‌توان در مواقع لزوم نسبت به تهیه کشت سلولی اولیه جهت جداسازی ویروس‌ها و تشخیص بیماری‌های ویروسی ماهیان در کشور اقدام نمود.

کلمات کلیدی: کشت، سلول، اولیه، ماهی

● Veterinary Researches & Biological Products No 118 pp: 162-170

Preparation of fish primary cell culture

By: Fallahi, R., Associate Professor of Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.
Email: r.fallahi@rvsri.ac.ir

Received: 2017-08-23 **Accepted: 2017-10-02**

The viruses cause heavy losses in fish farming. Types of cell cultures, including primary cultures are appropriate tools to diagnosis and isolation the viruses. In this study with regard to the appropriate cell lines, especially for fish is not possible, or there are no suitable cells for all fish species was provided, the preparation and standardization of fish primary cell culture were done. Some samples from goldfish (*Carassius auratus*) internal organs including the kidney, liver, muscles, ovary and external organs including fins, snout connective tissue and gills collected and prepared according to standard procedures. The methods were used include: Enzymatic disaggregated by short and long time trypsinization and without enzyme, by planting minced tissues and ordinary method. The EMEM enriched by FBS was used for growing cells in 25°C incubation. The cells had suitable growth and reached to complete confluency and several subcultures obtained from them. The best result obtained from long time trypsinization of ovaries and muscles. Using the instructions provided in this study can be taken to prepare the primary cell culture for virus isolation and diagnosis of fish viral diseases in the country.

Key words: Culture, Cellule, Primary, Fish

مقدمه

کشت‌های سلولی آبزیان چه بصورت اولیه (Primary) و یا لاین (Line)، کاربرد گسترده و فراوانی در جداسازی، شناسایی و طبقه‌بندی ویروس‌های آبزیان دارند. ویروس‌ها از مهم‌ترین عوامل بروز بیماری‌ها و ایجاد خسارات اقتصادی هنگفت در صنعت آبزی‌پروری محسوب می‌شوند. کشت‌های سلولی آبزیان همچنین برای تکثیر و ازدیاد ویروس‌های مورد نیاز در مطالعات مولکولی و تحقیقات بیوفیزیك که به منظور تهیه آنتی‌سرم‌ها و یا تولید واکسن‌های ویروسی زنده و یا کشته انجام می‌شوند کاربرد ویژه‌ای دارند (۷، ۱۳). کشت‌های سلولی، خصوصاً کشت اولیه، بعنوان مدل تجربی و آموزشی جهت تحقیقات پایه و مقایسه‌ای در فیزیولوژی سلولی، ژنتیك، سم‌شناسی، غدد درون‌ریز، مواد سرطان‌زا، واکنش‌های پاتوژن- میزبان و سایر موارد کاربرد دارد. کشت‌های سلولی اولیه، همچنین در تحقیقات کروموزومی (کاریوتایپ، مورفولوژی و حالات غیرطبیعی) استفاده گسترده‌ای دارند. مهم‌ترین کاربرد کشت‌های اولیه هنگامیست که امکان دسترسی به تیره‌های سلولی مورد نیاز فراهم نباشد (۴، ۷، ۱۳، ۱۵).

کشت‌های سلولی اولیه همچنین مقدمه‌ای برای تولید تیره‌های سلولی می‌باشند. اولین گزارش در مورد نگه‌داری سلول‌های ماهیان، در مورد سلول‌های جنینی ماهی قزل‌آلا در سال ۱۹۱۴ می‌باشد که تنها بمدت ۲۴ ساعت در محیطی از محلول رینگر (Ringer) حاوی لنف قورباغه نگه‌داری شد. پیشرفت‌های مهم در این زمینه از سال ۱۹۴۹ همزمان با استفاده از آنتی‌بیوتیك‌ها در محیط‌های کشت، حاصل گردید. در سال ۱۹۵۸ با اضافه‌کردن تریپسین (Trypsinization) به بافت‌های ماهی، روشی معرفی گردید که برای اولین بار منجر به تهیه کشت یك لایه از سلولهای ماهیان گردید (۱۱، ۱۶). ولف و کویمبی در سال ۱۹۷۶ اولین گزارش جامع در مورد کشت‌های سلولی و بافت‌های آبزیان را منتشر نمودند (۱۶). مهم‌ترین منبع جامع برای تمام کشت‌های بافتی، کتابی تحت عنوان "روش‌های کشت بافت و کاربردهای آن" است که توسط کراس و پترسون در سال ۱۹۷۳ منتشر گردید. این کتاب حاوی توضیح مختصری از روش اضافه‌کردن تریپسین به بافت‌های ماهیان دریایی است که بوسیله سیگل و بیزلی در سال ۱۹۷۳ انجام گرفت (۱۶). تهیه کشت سلولی اولیه ماهی قرمز نیز توسط مکنزی و استفنسون در سال ۱۹۷۳ انجام گرفته است (۱۶). در مورد محیط‌های کشت سلولی و نیز محلول سرم فیزیولوژی مورد نیاز ماهیان، توضیحات مختصری توسط ولف و کویمبی در سال ۱۹۷۶ منتشر گردیده است (۱۶). برای تهیه کشت سلولی اولیه ماهیان، استفاده از ماهیان سالم بدون هیچگونه عارضه در سطح خارجی آنها توصیه شده است. انتخاب ماهیان از کارگاه‌هایی که از نظر سلامت و تاریخچه ژنتیکی وضعیت مناسبی داشته باشند ضروری می‌باشد. انتقال ماهی زنده به آزمایشگاه، ایده‌آل بوده ولی می‌توان در صورت نیاز، ماهی از آب گرفته را در کنار یخ سریعاً به آزمایشگاه

منتقل کرد. برای احتیاط بیشتر، ماهیانی که برای تهیه کشت سلولی، انتخاب می‌گردند بمدت یك یا چند روز از غذا گرفته شوند تا در هنگام کالبدگشایی، احتمال خروج غذا و مدفوع و ایجاد آلودگی به حداقل میزان کاهش پیدا کند (۳، ۱۲). تنوع بافت‌های گوناگون برای تهیه کشت اولیه، زیاد بوده ولی بافت‌های جنینی و گنادها بیشترین تعداد سلول‌های فعال با قابلیت تقسیم مناسب را داشته و نتایج موفقیت‌آمیزی در کشت‌های تک لایه و رسیدن به سطح پوششی مناسب در کمترین زمان را دارا می‌باشند. تخمدان‌ها در تمام مراحل تکاملی به استثنای مرحله بلافاصله پس از تخم‌ریزی، توصیه می‌گردند. از آنجا که تخم‌ها رشدشان متوقف نمی‌شود، بر این اساس قبل از کشت بایستی آنها را از تخمدان‌های رسیده و یا کامل، جدا نمود (۱۸). با اینحال کلیه، قلب، کبد، پوزه (Snout) و کیسه شنا نیز برای این کار مناسب می‌باشند. باله‌ها، عضلات، طحال و هیپوفیز نیز بطور موفقیت‌آمیزی استفاده می‌شوند. علاوه بر این، کشت اولیه تک‌لایه از سلول‌های لکوسیت ماهیان تهیه شده است. سلول‌های بدست‌آمده از باله‌ها و طحال، از نظر شکل، فیبروبلاستیك بوده، دوکی و کشیده هستند و سلول‌های حاصل از پوزه و کلیه به شکل اپی‌تلوئیدی یا چند وجهی می‌باشند. سلول‌های عضلات، چند وجهی و کشیده می‌باشند. رشد سلول‌های باله و پوزه بهتر و راحت‌تر از سلول‌های کلیه، طحال و قلب می‌باشد. بطور کلی استفاده از اندام‌های خارجی، توصیه می‌گردد ولی احتمال آلودگی آنها بالاست. بجز چند مورد استثناء، در مراحل ابتدایی و تکثیر سلول‌ها، کشت‌های سلولی ماهیان اختلاف چندانی با مهره‌داران عالی ندارند (۳، ۵، ۹، ۱۲، ۱۴، ۱۷). روش‌های اختصاصی متعددی برای تهیه کشت‌های سلولی اولیه تک لایه ماهیان وجود دارد که عبارتند از:

- روش هضم آنزیمی (Enzymatic disaggregation) بافت‌های ریزشده (Minced tissues) (تریپسینه کردن بافت)
- روش نشاکاری (Planting) بافت‌های ریز شده بدون استفاده از آنزیم
- روش معمولی بافت‌های ریز شده بدون استفاده از آنزیم (۱۶)

از آنجا که دسترسی به تیره‌های سلولی به ویژه در خصوص ماهیان براحتی سایر گونه‌ها نمی‌باشد و نیز برای تمام ماهیان هنوز تیره سلولی ایجاد نگردیده است، لذا با استفاده از روش های ارائه شده در این تحقیق، می‌توان در مواقع لزوم نسبت به تهیه کشت سلولی اولیه هر گونه ماهی جهت جداسازی ویروس‌ها و تشخیص بیماری‌های ویروسی ماهیان اقدام نمود.

مواد و روش‌ها

ماهی و انتخاب نمونه

سه قطعه ماهی قرمز سالم در محدوده وزنی ۳۵-۲۵ گرم که هیچگونه ضایعه‌ای در سطح بدن نداشته و در مرحله سنی قبل از بلوغ قرار داشتند انتخاب و در آکواریوم با اکسیژن‌دهی مناسب در آب ۲۵-۲۳ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. غذادهی به آن‌ها از دو الی سه روز قبل از شروع کار قطع گردید. در آزمایش لام مرطوب که از سطح پوست و آبشش‌های آن‌ها تهیه گردید، هیچ نوع انگل خارجی مشاهده نشد. ماهیان را با غوطه‌ور کردن در آب حاوی دز کشنده (۵۰۰ ppm) بیهوش کننده گل گیاه میخک به روش انسانی کشته و سپس جهت نمونه‌برداری از اندام‌های داخلی، سطح بدن آن‌ها را از طریق غوطه‌ور نمودن در محلول خنك هیپوکلریدسدیم با غلظت ۵۰۰ ppm بمدت سه الی پنج دقیقه انداخته و بعد از چند بار آبکشی با آب استریل، آنها را در اتانول ۷۰ درصد غوطه‌ور نموده و پس از کالبدگشایی اندام‌های داخلی (کلیه، کبد، عضلات و تخمدان)، بطور جداگانه در ظروف کشت (Petri dishes) استریل قرار داده شدند. برای نمونه‌برداری از اندام‌های خارجی (باله‌ها و پوزه) بدون ضدعفونی کردن سطح بدن ماهی، آن‌ها را بریده و سپس در محلول آنتی‌بیوتیکی (حاوی ۲۰۰ µg/mL جنتامایسین، ۵۰۰ µg/mL پلی‌میکسین B، ۵۰۰ µg/mL نئومایسین و ۱۰۰ IU/mL باسیتراسین) بمدت یك ساعت غوطه‌ور شدند. جهت ضدعفونی کردن آبشش‌ها، ابتدا آنها را دو مرتبه با محلول نمکی عاری از کلسیم و منیزیم آبکشی کرده و بعد بمدت۲۴ساعت در محلول حاوی ۴۰۰ IU/mL پنی سیلین، ۴۰۰ µg/mL استرپتومایسین و ۱۰ µg/mL آمفوتریسین B بر روی همزن مغناطیسی غوطه‌ور گردیدند. سپس بافت‌های فوق‌الذکر در اندازه‌های یک الی دو میلی‌متر، ریز شدند (۱، ۶، ۸، ۱۵).

روش هضم آنزیمی

در روش تریپسینه کردن کوتاه‌مدت، قطعات بافتی به میزان ۱:۱۰ (یک گرم بافت و ۱۰ میلی لیتر محلول) در سه نوبت ۱۵-۱۰ دقیقه‌ای به محلول تریپسین ۰/۲۵ درصد (Fluka, Biochemika) تهیه شده در محلول فسفات بافر سالین (PBS) اضافه گردیده و بر روی همزن مغناطیسی با سرعت کند قرار داده و سپس سوسپانسیون سلولی برداشت شده بمدت ۱۰ دقیقه در ۲۰۰ g سانتریفوژ گردید. رسوب سلولی بدست آمده به فلاسك کشت سلول منتقل و محیط EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium, GIPCO) در pH= ۷/۲-۷/۴ حاوی ۱۵ درصد FBS (Fetal Bovine Serum, GIPCO) به آن اضافه گردید. جهت بررسی وضعیت و تعداد سلول‌های جمع‌آوری شده، سوسپانسیون سلولی را با رنگ تریپان‌بلو ۰/۵درصد رنگ‌آمیزی و توسط لام هموسایتومتر شمارش و در صورت مناسب بودن تعداد، فلاسك‌های کشت سلولی به انکوباتور معمولی ۲۵ درجه سانتی‌گراد منتقل و هنگامی‌که سلول‌ها به سطح پوششی کامل رسیدند، از آن‌ها پاساژ مجدد تهیه گردید. در تریپسینه کردن طولانی‌مدت، قطعات بافتی به میزان ۱:۵۰ (یک گرم بافت و ۵۰ میلی لیتر محلول) در محلول تریپسین ۰/۲۵ درصد و بر روی همزن مغناطیسی در درجه حرارت ۴ درجه سانتی‌گراد و با سرعت کند بمدت ۱۸ساعت قرار گرفته و همانند روش قبل سلول‌ها برداشت گردید.

روش نشاکاری بافت‌های ریز شده بدون استفاده از آنزیم

در این روش قطعات بافتی تهیه شده را در داخل فلاسك کشت سلول ریخته و بوسیله پیپت پاستور نوك خمیده ای، در فواصل تقریبی ۱/۵-۱سانتی‌متر از یکدیگر قرار داده و به منظور ایجاد چسبندگی، بمدت یك ساعت در انکوباتور ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده و سپس حجم مناسبی از محیط به آنها اضافه گردید. از آنجا که قطعات بافتی برای چسبندگی کامل و شروع رشد از لبه‌ها حدوداً به دو الی سه روز

زمان نیاز دارند، طی این مدت از هرگونه جابجایی ممانعت نموده و هنگامی‌که سلول‌های رشد یافته از لبه قطعات بافتی، تمام سطح فلاسك را پر نمودند، اقدام به کندن قطعات بافتی (با ایجاد ضربه مکانیکی و یا نوك پیپت) کرده و سپس محیط کشت جدید به آنها اضافه نموده و پس از پر شدن کامل سطح فلاسك که حدوداً ۱۲- ۱۰ روز طول می کشید، مجدداً پاساژ داده شدند (۱۶).

روش معمولی

در روش معمولی قطعات بافتی را در داخل فلاسك ریخته و بلافاصله حجم مناسبی از محیط کشت EMEM به آنها اضافه گردید. بقیه مراحل شبیه روش نشاکاری بافتی بود (۱۶).

نتایج

نتایج حاصل از روش هضم آنزیمی

در هر دو روش تریپسینه کردن کوتاه‌مدت و طولانی‌مدت، بر اساس مشاهدات میکروسکوپی، سلول‌های رشدیافته و درحال‌تقسیم و زنده در فلاسک کشت‌سلول که به سطح چسبیده بوده و متحرک نمی‌باشند و مشاهده تعداد بسیار اندک سلول‌های مرده که بر روی محیط کشت شناور می‌باشند، نتایج کشت به ویژه در روش تریپسینه کردن طولانی‌مدت عالی بود. سلول‌های رشد یافته در هر دو روش پس از ۱۲-۱۰ روز به سطح پوششی کامل رسیدند و از آن‌ها پاساژ مجدد تهیه گردید. هم‌چنین در مشاهدات میکروسکوپی، نتایج بدست آمده از اندام‌های تخمدان و عضلات، بهتر از دیگر اندام‌ها بود (شکل‌های ۳-۱). تعداد سلول‌های زنده در هر میلی لیتر سوسپانسیون سلولی، مدت زمان رسیدن به سطح پوششی کامل و تعداد کل پاساژهای بعمل آمده در روش‌های هضم آنزیمی کوتاه‌مدت و طولانی‌مدت در جدول ۱- آمده است.

نتایج حاصل از نشاکاری بافت‌های ریزشده و روش معمولی: در هر دو روش، سلول‌های رشد یافته از لبه قطعات بافتی وضعیت خوبی داشتند، ولی مقدار رشد و وضعیت سلول‌های رشد یافته و در حال تقسیم، میزان سلول‌های شناور مرده و زمان کامل شدن سطح پوششی در فلاسک کشت سلول در روش نشاکاری بافتی، بهتر از روش معمولی بود (شکل‌های ۶-۴).

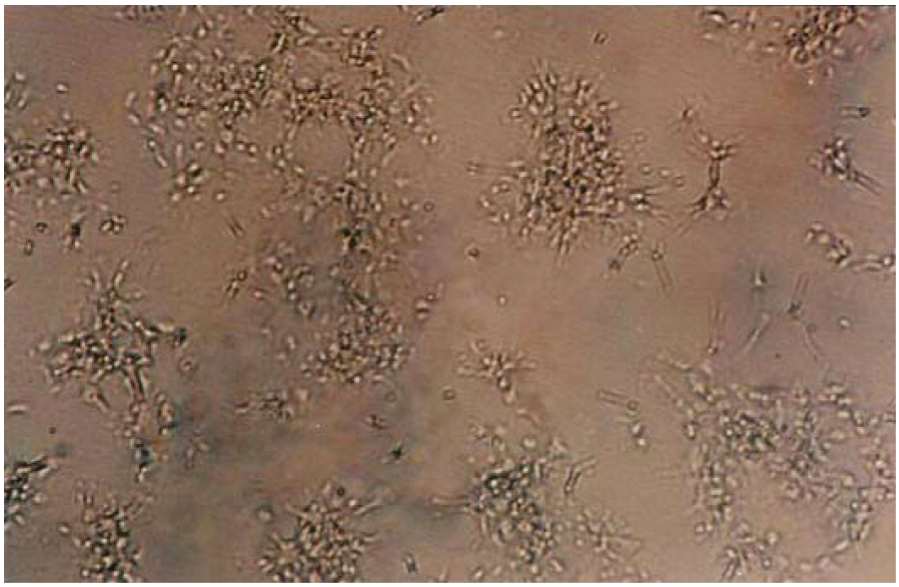
بحث و نتیجه‌گیری

کشت‌های سلولی بویژه کشت‌های اولیه استفاده گسترده‌ای در تحقیقات بیولوژی به ویژه ویروس شناسی و نیز تشخیص بیماری‌های ویروسی دارند. در تکنیك‌های سرولوژی مورد استفاده در شناسایی و ردیابی ویروس‌های ماهیان، مانند آزمایش خنثی‌سازی سرم (Serum Neutralization) و روش ایمونوفلورسانس (Immunofluorescence)، از کشت‌های سلولی استفاده می‌گردد (۲، ۱۰، ۱۱، ۱۸). کشت‌های سلولی آبزیان برای تکثیر و ازدیاد ویروس‌های مورد نیاز جهت مطالعات مولکولی و بیوفیزیك و تهیه آنتی‌سرم‌های مورد نیاز در واکسن‌های ویروسی کشته و زنده ماهیان کاربرد فراوانی دارند. استفاده از کشت‌های سلولی ماهیان در مطالعات سم‌شناسی نیز در حال گسترش می‌باشد (۱۶).

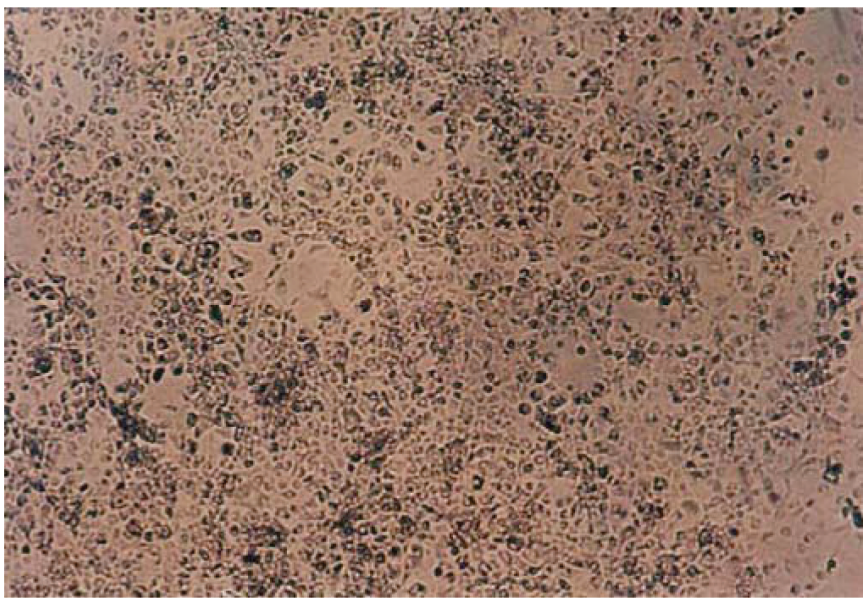
کشت‌های اولیه سلول‌های ماهیان استفاده گسترده‌ای در مطالعات کروموزومی از لحاظ تعداد و مورفولوژی آن‌ها دارد. در اکثر کشت‌های سلولی و بافتی ماهیان از محیط کشت EMEM، EBM (Eagle's Basal Medium)، محیط ۱۹۹ و نیز محیط Leibovitz L-15 استفاده می‌گردد، ولی محیطی که مکرراً از آن استفاده می‌گردد EMEM می‌باشد. pH محیط به اجزاء بافرهای محیط وابسته بوده و براساس کاربردهای گوناگون محیط، تنظیم می‌گردد. برای pH اولیه محیط، محدوده ۷/۴-۷/۲ مناسب می‌باشد. بهترین درجه حرارت برای رشد سلول‌های ماهی قرمز ۲۵ درجه سانتی‌گراد و محدوده حرارتی آن ۲۸-۲۲ درجه سانتی‌گراد می‌باشد. جهت غنی‌سازی محیط کشت، معمولاً از سرم گاو به میزان ۲۰-۱۰ درصد استفاده می‌گردد. برای کشت سلولی اولیه ماهیان، سرم جنین گاو (FBS) به میزان ۱۵ درصد توصیه می‌شود. در این تحقیق محیط EMEM با pH=۷/۴-۷/۲ که با FBS (۱۵ درصد) غنی شده بود استفاده گردید. درجه حرارت انکوباسیون نیز ۲۵ درجه سانتی‌گراد بود. جهت تهیه کشت‌های سلولی اولیه ماهیان روش‌های مختلفی نظیر روش هضم آنزیمی، بدون هضم آنزیم و از طریق نشاکاری بافت‌های ریز شده و نیز روش معمولی توصیه شده است. از مزایای روش هضم آنزیمی می‌توان به بدست آمدن تعداد بیشتری از سلول‌ها اشاره کرد ولی اثرات تخریبی آنزیم تریپسین بر روی سلول‌های بدست آمده از معایب این روش می‌باشد. در روش نشاکاری بافت‌های ریزشده

جدول ۱- تعداد سلول های زنده، مدت زمان رسیدن به سطح پوششی کامل و تعداد کل پاساژهای بعمل آمده در روش های هضم آنزیمی کوتاه مدت و طولانی مدت

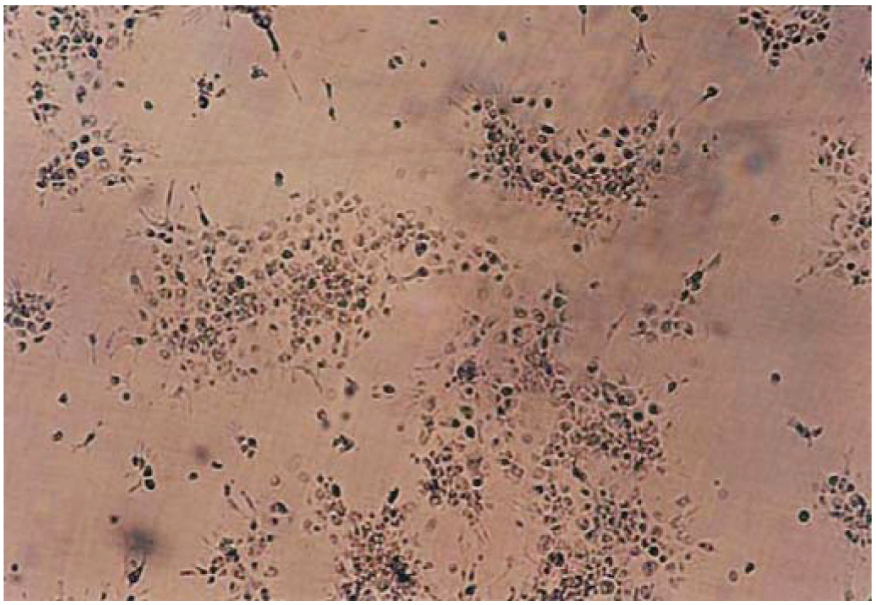
نوع روش هضم آنزیمی	کوتاه مدت	طولانی مدت
تعداد سلول‌های زنده در هر میلی لیتر سوسپانسیون سلولی	۴۰۰۰۰۰ عدد	**۵۰۰۰۰۰ عدد**
مدت زمان رسیدن به سطح پوششی کامل	۱۲ روز	**۱۰ روز**
تعداد کل پاساژهای بعمل آمده	چهار مرتبه	**پنج مرتبه**



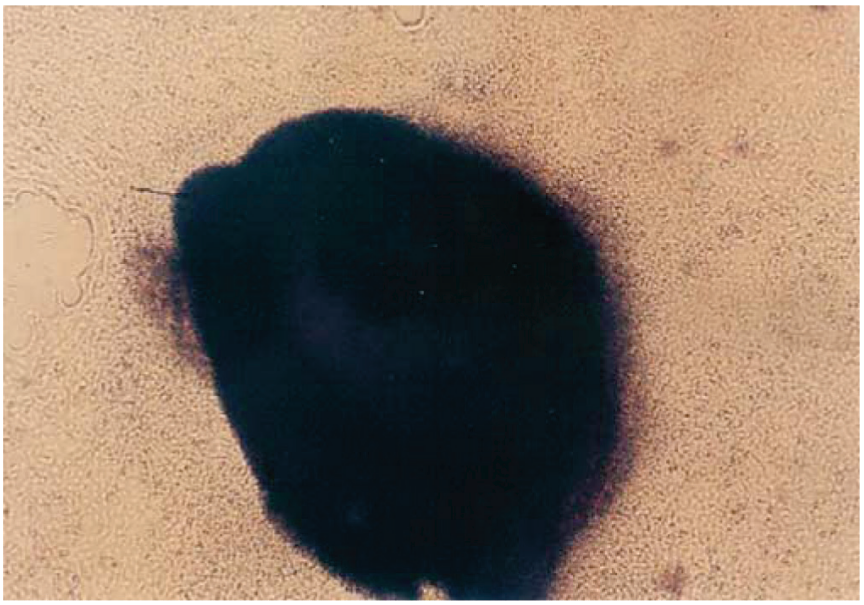
شکل ۱- سلول‌های بدست آمده از بافت عضلات در روش تریپسینه کردن طولانی‌مدت بعد از ۴۸ ساعت از کشت اولیه (بزرگنمایی= ۲۵ ×)



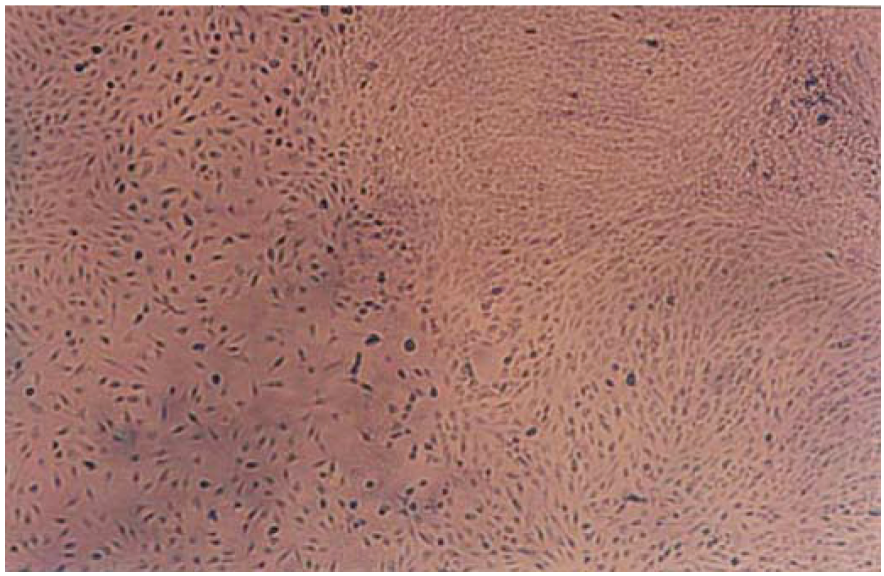
شکل ۲- سلول‌های بدست آمده از بافت کبد در روش تریپسینه کردن طولانی‌مدت بعد از هفت روز از کشت اولیه که به سطح پوششی کامل رسیده‌اند. (بزرگنمایی= ۲۵ ×)



شکل ۳- سلول‌های به دست آمده از بافت کبد در روش تریپسینه کردن کوتاه‌مدت بعد از پنج روز از کشت اولیه (بزرگنمایی= ۲۵ ×)



شکل۴- سلول‌های رشد یافته از لبه قطعه بافت باله (توده سیاه رنگ) در روش نشاکاری بافت‌های ریزشده بعد از ۷۲ ساعت (بزرگنمایی= ۲۵ ×)



شکل ۵- سلول‌های بافت همبند ناحیه پوزه در روش نشاکاری بافت‌های ریزشده که بعد از کندن قطعات بافتی رشد یافته و به سطح پوششی کامل رسیده‌اند. (بزرگنمایی= ۲۵ ×)

شکل۶- سلول‌های بافت همبند ناحیه پوزه در روش معمولی بعد از ۲۴ ساعت (بزرگنمایی= ۲۵ ×)

به آنزیم هضم‌کننده نیازی نداشته و اثرات تخریبی بر روی سلول‌ها در کمترین میزان می‌باشد ولی انجام این روش براحتی سایر روش‌ها نمی‌باشد و به زمان بیشتری برای رسیدن به سطح پوششی کامل نیاز است. انجام روش معمولی، در مقایسه با روش نشاکاری، ساده تر بوده ولی بدلیل عدم اختصاص زمان مناسب جهت چسبندگی بافت به سطح فلاسک و شناور ماندن در محیط کشت، نتایج ایده‌آلی حاصل نمی‌گردد (۱۶). از مزایای روش نشاکاری بافت‌های ریز شده می‌توان به ساده بودن و به زمان کمتر نیاز داشتن آن، اشاره کرد. جزئیات کامل‌تر در دستورالعملی که توسط ولف و کویمبی (۱۹۷۶) منتشر گردیده وجود دارد (۱۶). آن و بچمن (۱۹۷۴) دستورالعمل استانداردی را برای تهیه کشت‌های اولیه از بافت‌های تریپسینه شده ماهی کپور و قزل‌آلای رنگین‌کمان ارائه نمودند (۱۶). جهت هضم بیشتر، معمولاً از آنزیم تریپسین استفاده می‌گردد. غلظت نهایی آن ۰/۲۵ درصد توصیه شده است. از آنزیم‌های پروتئولیتیك (Proteolytic) دیگر که منشاء لوزالمعده‌ای دارند و نیز از آنزیم کولاژناز (Collagenase) یا آنزیم پروناز (Pronase) با منشا باکتری نیز می‌توان استفاده کرد. پروناز در غلظت ۰/۱ درصد توصیه شده ولی بسیار گران‌تر از تریپسین می‌باشد و از این جهت بطور گسترده استفاده نمی‌گردد. هضم می‌تواند در شرایط سکون با مقداری جابجایی بصورت همزدن دستی صورت گیرد ولی همزدن دائمی با دستگاه مغناطیسی به شرط اینکه ایجاد کف نکند ترجیح داده می‌شود. تراکم مطلوب سلول‌ها (براساس تعداد سلول در هر میلی‌لیتر) در کشت‌های اولیه ماهی در محدوده $10^5 \times$ (۱۰-۴) می‌باشد (۱۶). در این تحقیق تعداد سلول‌های زنده در روش هضم آنزیمی پس از شمارش، در این محدوده قرار داشت. با استفاده از نتایج این تحقیق که برای اولین بار در کشور صورت گرفته است، مشخص گردید که روش هضم آنزیمی طولانی‌مدت با آنزیم تریپسین و استفاده از اندام‌های تخمدان و عضلات جهت تهیه کشت سلولی اولیه از ماهی مناسب‌تر می‌باشد. از آنجاکه ماهی قرمز در محدوده درجه حرارت مابین ماهیان گرم آبی و سرد آبی زیست می‌کند، از کشت سلولی آن می‌توان برای سایر ماهی‌ها نیز استفاده نمود (۴). جهت ذخیره و نگه‌داری طولانی مدت سلول های تهیه شده، می‌توان در پاساژهای اولیه با استفاده از دستورالعمل‌های استاندارد نسبت به انجماد و نگه‌داری در تانک ازت مایع اقدام و در مواقع لزوم آن‌ها را به سلول‌های آماده رشد تبدیل نمود. با استفاده از روش‌های ارائه شده در این تحقیق می‌توان در مواقع لزوم نسبت به تهیه کشت سلولی اولیه هر گونه ماهی جهت جداسازی ویروس‌ها و تشخیص بیماری‌های ویروسی ماهیان در کشور اقدام نمود.

تشکر و قدردانی

نویسنده این مقاله مراتب قدردانی خود را از پرسنل بخش تحقیقات بیماریهای ویروسی دام، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی بخاطر همکاری صمیمانه در انجام این تحقیق اعلام می‌دارد.

منابع مورد استفاده

1. Akhlaghi, M. and Brojerdi, M. 1999. Anesthetic effect of clove tree and LC50 determination in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Faculty of Veterinary Medicine, Univerity of Tehran* 54, 49-52.

2. Chen, H., Yi, Y., Chen, M. and Yang, X. 2010. Studies on the developmental potentiality of cultured cell nuclei of fish, *International Journal of Biological Sciences* 6: 192–198.

3. Goff, P.L., Weil, C., Valotaire, Y., Gonnard, J.F. and Prunet, P. 1992. Effect of somatostatin on prolactin in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) pituitary cells in primary culture, *Journal of Molecular Endocrinology* 9 (2): 137-146.

4. Hong, N., Li, Z. and Hong, Y. 2011. Fish Stem Cell Cultures, *International Journal of Biological Sciences* 7(4): 392–402.

5. Klaunig, J.E., Rich, R. J. and Goldblatt, P.J. 1985. Trout hepatocyteculture: Isolation and primary culture, *In Vitro Cellular and Developmental Biology* 21 (4): 221-228.

6. Kvellestad, A., Aune, L.G. and Dannevig, B. H. 2002. Washing and disinfecting fish gills: Preventing contamination by normal surface microflora of cell cultures inoculated with tissue for isolating intracellular pathogens, *Journal of Aquatic Animal Health* 14 (1): 45-49.

7. Lannan, C. N., Winton, J. R. and Fryer, J. L. 1984. Fish cell lines: establishment and characterization of nine cell lines from salmonids, *In Vitro* 20 (9): 671-676.

8. Lee , L.E., Dayeh, V.R., Schirmer , K. and Bols, N.C. 2009. Applications and potential uses of fish gill cell lines: examples with RTgill-W1, *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Animal* 45 (3-4): 127-134.

9. Marques, C.L., Rafael, M.S., Cancela, M.L. and Laize, V. 2007. Establishment of primary cell cultures from fish calcified tissues, *Cytotechnology* 55 (1): 9–13.

10. Nakamura, S., Kobayashi, K., Nishimura, T., Higashijima, S. and Tanaka, M. 2010. Identification of germline stem cells in the ovary of the teleost medaka, *Science* 328: 1561–1563.

11. Nolan, D.T., Nabben, I., Li, J. and Wendelaar Bonga S. E. 2002. Characterization of primary culture of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) skin explants: Growth, cell composition, proliferation and apoptosis, *Society for In Vitro Biology Journal* 38: 14-24.

12. Ostrander, G.K., Blair, J.B., Stark, B.A., Marley, G.M., Bales, W.D., Veltri, R., Hinton, D.E., Okihiro, M., Ortego, L.S. and Hawkins, W.E. 1995. Long-term primary culture of epithelial cells from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver, In Vitro Cellular and Developmental Biology – Animal 31(5): 367- 378.

13. Salvo, L. M., Malucelli, M. I. C., Richartz, R. R. T. and Bacila, M. 2000. Primary culture of hepatic cells from *Metynnis roosevelti* (Pisces, Teleostei, Characidae), *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* 37(5): 1-11.

14. Scholz, S., Braunbeck, T. and Segner, H. 1998. Viability and differential function of rainbow trout liver cells in primary culture: Coculture with two permanent fish cells, *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Animal* 34: 762-771.
15. Stott, L.C., Schnell, S., Hogstrand, C., Owen, S.F. and Bury, N.R. 2015. A primary fish gill cell culture model to assess pharmaceutical uptake and efflux: Evidence for passive and facilitated transport, *Aquatic Toxicology* 159: 127–137.
16. Wolf, K. and Quimby, M. C. 1976. Primary Monolayer Culture of Fish Cells Initiated from Tripsinized Tissues, TCA Manual Vol 2, No 4.
17. Wood, C.M., Eletti, B. and Part, P. 2002. New methods for the primary culture of gill epithelia from freshwater rainbow trout, *Fish Physiology and Biochemistry* 26 (4): 329-344.
18. Yi, M., Hong, N. and Hong, Y. 2010. Derivation and characterization of haploid embryonic stem cell cultures in medaka fish, *Nature Protocols* 5:1418–1430.