وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور- انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری

عنوان:

ردیابی، شناسایی و تکثیر سلول‌های زایای جنسی فیل ماهی از زمان لقاح تا لارو

مجری مسئول:
شیرین جمشیدی

شماره ثبت
٦٥٤٦٣

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور- انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری

عنوان طرح/پروژه: ردیابی، شناسایی و تکثیر سلول های زایای جنسی فیل ماهی از زمان لقاح تا لارو
کد مصوب: ۳-۳۲-۳۲۵۱-۰۱٤-۸۸۰۹۵۳
نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان: شیرین جمشیدی
نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه ها و طرحهای ملی و مشترک دارد) : شیرین جمشیدی
نام و نام خانوادگی مجری: طوبی میرزاپور
نام و نام خانوادگی همکار(ان): مریم فرزانه، مهوش هادوی،محمد حسن زاده صابر، تورج سهرابی لنگرودی، ایوب یوسفی جوردهی
نام و نام خانوادگی مشاور(ان): -
محل اجرا: استان گیلان
تاریخ شروع: ۱۳۹۸/۱۰/۰۱
مدت اجرا: ۲ سال و ۸ ماه
ناشر: موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور
تاریخ انتشار: سال ۱٤۰۳
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: ردیابی، شناسایی و تکثیر سلول های زایای جنسی فیل ماهی از زمان لقاح تا لارو

کد مصوب: ۳-۳۲-۳۲۵۱-۰۱٤-۸۸۰۹۵۳

شماره ثبت (فروست): ٦٥٤٦٣ تاریخ: ۱٤۰۳/۳/۱۸

با مسئولیت اجرایی سرکار خانم شیرین جمشیدی دارای مدرک تحصیلی دکتری در رشته شیلات است.

پروژه توسط داوران منتخب بخش زیست‌فناوری و فرآوری آبزیان در تاریخ ۱۴۰۳/۲/۳۰ مورد ارزیابی و با رتبه عالی تأیید گردید.

در زمان اجرای پروژه، مجری در :

ستاد ☐ پژوهشکده ☐ مرکز ■ ایستگاه ☐

با سمت عضو هیئت علمی در انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری مشغول بوده است.

عنوان	«فهرست مندرجات»	صفحه

چکیده ۱
۱-مقدمه ۳
۱-۱-بررسی بیوسیستماتیک ماهیان خاویاری ۳
۱-۲- فیزیولوژی ماهیان خاویاری ۳
۱-۳- تولید مثل در ماهیان خاویاری ۵
۱-۳-۱-کاربرد سلول های بنیادی جنسی در آبزی پروری با تاکید بر تولید ماهیان کایمر ۵
۱-۳-۲-دستگاه تولیدمثلی ماهیان خاویاری ۷
۱-۳-۲-۱- گنادهای ماده (تخمدان) ۷
۱-۳-۲-۲- گنادهای نر (بیضه ها) ۷
۱-۳-۳- زیست شناسی تولیدمثل ماهیان خاویاری ۸
۱-۳-۴- ساختمان تخمک در ماهیان خاویاری ۹
۱-۳-۴-۱-سیستم زرده سازی در ماهیان خاویاری ۹
۱-۴- سلول‌های زایای بدوی ۱۳
۱-۴-۱-تعریف سلول‌های زایای بدوی ۱۳
۱-۵-الگوهای تشکیل سلول‌های بنیادی زایا ۱۳
۱-۵-۱- اختصاصی شدن و تعیین سلول‌های زایا در دوزیستان و ماهی ها ۱٤
۱-۶-مهاجرت PGCها در موجودات مختلف ۱۵
۱-۶-۱- مهاجرت سلول‌های زایای بدوی در دوزیستان و ماهی ۱٦
۱-۶-۲- منشاء و مسیر مهاجرت سلول‌های زایای بدوی در دوزیستان بدون دم (زنوپوس) ۱۷
۱-۶-۳- منشاء و مسیر مهاجرت سلول‌های زایای بدوی در تاسماهیان ۱۷
۱-۷- روش های تشخیص و جداسازی سلول‌های زایا ۱۸
۱-۷-۱- تشخیص سلول‌های زایای جنسی با استفاده از ژن‌های نشانگر ۱۸
۱-۷-۱-۱-خانواده ژن *Nanos* ۱۹
۱-۷-۱-۲- خانواده ژن *Vasa* ۲۰
۱-۷-۱-۳- ژن *Dead end* ۲۱
۱-۷-۲- روش‌های غیر مولکولی ۲۲
۱-۷-۳- شناسایی سلول‌های زایای بدوی به روش های مختلف ۲۲

۱-۷-۴- استخراج سلول‌های بنیادی از طریق روش هضم آنزیم ۲۳
۱-۷-۴-۱- کشت سلول‌های زایا در محیط کشت تحت شرایط *In Vitro* ۲۴
۱-۷-۴-۲- فرآیند پیوند سلول‌های زایا ۲۵
۱-۷-۴-۳- انجماد سلول‌های زایا ۲۵
۱-۸- انواع محیط کشت برای کشت سلول‌های گنادی ۲۶
۱-۹- تعیین جنسیت در ماهیان خاویاری ۲۶
۱-۱۰- اهمیت و ضرورت انجام مطالعه ۲۸
۱-۱۱- فرضیات ۲۸
۱-۱۲-اهداف مورد مطالعه ۲۸
۲-مواد و روش ها ۳۰
۲-۱- فهرست تجهیزات آزمایشگاهی ۳۰
۲-۲-فهرست مواد آزمایشگاهی ۳۵
۲-۳- مواد مصرفی و غیرمصرفی مورد نیاز در آزمایش ۳۷
۲-۴-انجام تحقیقات آزمایشگاهي (قسمت اول: تحقیقات سلولی) ۳۸
۲-۴-۱- گونه مورد آزمایش ۳۸
۲-۴-۲- شرایط نگهداري نمونه ها ۳۹
۲-۴-۳- محل و مدت انجام تحقیق ۳۹
۲-۵- نمونه برداري از لارو ۴۰
۲-۵-۱- استخراج سلول و هضم آنزیمی ۴۰
۲-۵-۲- انجماد سلول‌های زایا ۴۱
۲-۵-۳- مراحل انجام تکنیک ایمنوسیتوشیمی برای مشاهده کلونی های سلولهای بنیادی در زیر
میکروسکوپ فلورسنس ۴۲
۲-۵-۳-۱- بررسی فعالیت میتوزی سلولهای کشت شده با استفاده از Brdu ۴۳
۲-۵-۳-۲- تهیه بافرها و محلولهای لازم برای تکنیک ایمنوسیتوشیمی ۴۳
۲-۶- انجام تحقیقات آزمایشگاهي (قسمت دوم: تحقیقات مولکولي) ۴۴
۲-۶-۱- بررسي بیان ژن های هدف با استفاده از تکنیک Real-time PCR ۴۴
۲-۶-۲- استخراج RNA از بافت و سلول ۴۴
۲-۶-۳- اندازه گیری مقدار RNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ ۴۵

۲-۶-۴-ارزیابی کیفیت RNA استخراج شده روی ژل آگارز یک درصد.....۴۵
۲-۶-۵- سنتز (cDNA) از RNA استخراج شده ۴۶
نمونه های cDNA ساخته شده سپس تا زمان انجام فرایند PCR در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. .۴۷
۲-۶-۶-ردیابی و طراحی آغازگر برای بررسی بیان ژن‌های *Nanos* و *Vasa* ۴۷
۲-۶-۶-۱- طراحی آغازگر ۴۷
۲-۶-۷-برنامه (RT- PCR) Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction ۴۷
۲-۶-۸- بررسی محصولات PCR روی ژل آگارز ۲ درصد ۴۸
۲-۶-۹- مراحل عملی انجام تکنیک qRT-PCR (Quantitive Real time PCR) یا SYBR green qRT-PCR..۴۸
۲-۶-۱۰- تعیین کارآیی برای هر جفت آغازگر ۴۹
۲-۶-۱۱- آنالیز کمی داده ها ۵۰
۲-۷-روش تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها ۵۰
۳-نتایج ۵۱
۳-۱-کشت سلول ها پس از هضم آنزیمی ۵۱
۳-۲- تغییرات تعداد سلول‌ها پس از کشت در گروه لاروهای قبل از جذب کیسه زرده ۵۳
۳-۳-تغییرات قطرکلونی ها پس از کشت در گروه لاروهای قبل از جذب کیسه زرده ۵۴
۳-۴-مقایسه نتایج تعداد و قطر کلونی ها در دو محیط کشت DMEM و L15 در گروه لاروهای قبل از
جذب کیسه زرده ۵۴
۳-۵- تغییرات تعداد کلونی‌ها پس از کشت در گروه لاروهای بعد از جذب کیسه زرده.....۵۵
۳-۶- تغییرات قطر کلونی‌ها پس از کشت در گروه لاروهای بعد از جذب کیسه زرده ۵۵
۳-۷- مقایسه نتایج تعداد و قطر سلول ها در دو محیط کشت DMEM و L15 در گروه لاروهای بعد از جذب
کیسه زرده ۵۵
۳-۸- مقایسه تعداد و قطر کلونی ها در دو مرحله قبل و بعد از جذب کیسه زرده ۵۶
۳-۹- نتایج انجماد سلول‌ها در دو محلول انجمادی دی متیل سولفوکسید و اتیلن گلیکول ۵۶
۳-۱۰-نتایج بررسی ایمنوسیتوشیمی برای بررسی کلونی های سلول های بنیادی ۵۸
۳-۱۱-نتایج تحقیقات مولکولی ۵۹
۳-۱۱- ۱- بررسی نتایج کمی و کیفی RNA استخراج شده ۵۹
۳-۱۱-۱-۱- نتایج کیفی RNA استخراج شده بر روی ژل آگارز ۵۹
۳-۱۱-۱-۲- نتایج کمی RNA استخراج شده توسط دستگاه نانودراپ ۶۰

۳-۱۲- نتایج حاصل از واکنش RT-PCR برای ژن‌های مورد مطالعه ۶۱
۳-۱۳- ارزیابی بیان ژن های *Nanos* و *Vasa* به روش Quantitive Real time PCR ۶۳
۱۳-۳- ۱- نتایج رسم منحني استاندارد براي پرايمر ها ۶۳
۳-۱۴-نتایج بررسی عملکرد اختصاصی آغازگرها از طریق منحنی ذوب (melt curve) آن‌ها ۶۴
۳-۱۵- تغییرات کمي بیان ژن *nanos* در مقایسه با بتا اکتین در لاروهای بعد از جذب کیسه زرده ۶۵
۳-۱۶- تغییرات کمی بیان ژن *Vasa* در مقایسه با کنترل داخلی بتا اکتین در لاروهای پس از جذب کیسه زرده ۶۶
۴-بحث و نتیجه‌گیری ۶۷
۵-نتیجه گیری کلی ۷۵
پیشنهادها ۷۶
منابع ۸۱
چکیده انگلیسی ۸۷

چکیده

سلول‌های زایا(جنسی) اولیه[1] پیش سازهای جنینی گامت‌ها هستند که از نیمکره گیاهی سلول تخم منشاء گرفته و به ستیغ‌های تناسلی در حال نمو مهاجرت می‌کنند. در ماهیان خاویاری PGCها بعد از مرحله‌ی ۲۲ سلولی روی توده زرده و در امتداد محور گناد به ستیغ‌های تناسلی مهاجرت می‌کنند و به سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در جنس نر و اووگونی در جنس ماده تبدیل می‌شوند. در این مطالعه تخم‌های بارور شده فیل ماهی در مرحله ۴-۱ سلولی جداسازی شده و تزریق Fluorescein isothiocyanate-Dextran با وزن مولکولی ۵۰۰ به قطب گیاهی جنین‌ها برای ردیابی سلول‌های زایا انجام گرفت. مکان‌های دارای بیشترین تجمع سلول‌های زایا در آن با میکروسکپ فلوئورسنت مشخص گردید. سپس سلول‌های زایای اولیه به روش هضم آنزیمی از لارو ماهیان خاویاری گونه فیل ماهی(قبل و بعد از جذب کیسه زرده) با استفاده از آنزیم‌های تریپسین (۰/۵ درصد) و کلاژناز (۱ mg/ml) جدا سازی شد و در داخل محیط کشت DMEM[2] و یا L-15[3] برای سه هفته کشت داده شدند. برای اثبات حضور PGC ها، mRNA از سلول‌های کشت داده شده جدا و بیان ژن‌های *Nanos* و *Vasa* با استفاده از تکنیک Real-Time طی گذشت سه هفته از کشت مورد بررسی قرار گرفت. کشت سلول‌های بنیادی استخراج شده از لاروهای هر دو گروه نشان داد تعداد و قطر کلونی‌ها در گروه بعد از جذب کیسه زرده در هر دو محیط L15 و DMEM افزایش می‌یابد. بنابراین گروه لاروهای بعد از جذب کیسه زرده بعد از استخراج و کشت، سلول‌های زایای بیشتری به شکل کلونی تولید می‌کنند. نتایج ایمنوسیتوشیمی نشان دهنده بیان مثبت *vasa* در سیتوپلاسم سلولهای زایا به عنوان یک نشانگر تشخیصی بود. این امر حضور و تکثیر سلول های بنیادی زایای لارو فیل ماهی در محیط L15 در شرایط *in vitro* را تایید می کند. از طرفی در این مطالعه بیان مثبت Brdu در DNA سلولهای زایا نیز مشاهده شد. آنتی بادی Brdu به طور انتخابی به DNA سلولها در فاز S چرخه سلولی متصل می شوند. این امر نشان می دهد که سلولهای بنیادی زایا در مقایسه با سلولهای حمایت کننده، قدرت تکثیر بیشتری داشته و زاده هایشان دائما در فاز s چرخه سلولی و در حال رونوشت برداری از DNA هستند. نتایج بیان mRAN ژن های *vasa* و *nanos* در سلول‌های زایا استخراج شده از لارو فیل ماهی نشان داد بیان هر دو ژن در دو محیط کشت DMEM و L-15 با گذشت زمان روند صعودی داشت. از نظر آماری اختلاف معنی داری در بیان این دو ژن در روزهای انتهایی کشت بین دو محیط مشاهده نشد ($P > 0/05$). برای نگهداری طولانی مدت سلول‌های زایا، انجماد با استفاده از دو محافظ سرمایی دی‌متیل

[1] Primordial Germ Cell
[2] Dulbecco's Modified Eagle Medium
[3] Leibovitz's

سولفوکسید و اتیلن گلیکول انجام گرفت. نتایج نشان داد در حضور DMSO زنده مانی سلول‌ها پس از ذوب نسبت به اتیلن گلیکول افزایش قابل ملاحظه‌ای می‌یابد. با در نظر گرفتن چرخه تولیدمثلی طولانی این جانداران، می‌توان با کشت و تکثیر موفق این سلول‌ها از آن‌ها برای پیوند به داخل گناد گونه‌های دارای دوره تولیدمثلی کوتاه استفاده کرد.

کلمات کلیدی: سلول‌های بنیادی زایا، لارو فیل ماهی، شناسایی و تکثیر