

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

عنوان:

**تأثیر ترکیب القاءکننده نوپال بر استرس‌های زیست‌محیطی شوری،
دما، سم دیازینون و آلودگی‌های نفتی بنزوآلفاپایرن با
تعیین میزان بیان ژن HSP و شاخص‌های ایمنی در
بچه‌ماهیان ازون‌برون**

مجری مسؤل:

تورج سهرابی لنگرودی

شماره ثبت

۶۴۸۲۴

وزارت جهاد کشاورزی

سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی

موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور - انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری - پژوهشکده حوضه آبی دریای خزر (دانشگاه گیلان)

عنوان طرح/پروژه: تاثیر ترکیب القاءکننده نوپال بر استرس های زیست محیطی شوری، دما، سم دیازینون و آلودگی های نفتی بنزوآلفاپایرن با تعیین میزان بیان ژن HSP و شاخص های ایمنی در بچه ماهیان ازون برون
کد مصوب: ۳-۳۲-۱۲۵۱-۲-۹۷۰۴۵۶

نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان: تورج سهرابی لنگرودی

نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه ها و طرح های ملی و مشترک دارد): تورج سهرابی لنگرودی

نام و نام خانوادگی مجری: بهروز حیدری

نام و نام خانوادگی همکار(ان): ذبیح اله پزند، محمود محسنی، حمیدرضا علیزاده ثابت، علیرضا شناورماسوله، محمد پوردهقانی پیشکناری، هوشنگ یگانه راسته کناری، جلیل جلیل پور رودکلی، علی حسین پورزنتی، حامد یوسف پورپیربازاری، سجاد قاسمیان، سودا زارعی، لیلا وحدتی راد

نام و نام خانوادگی مشاور(ان): -

نام و نام خانوادگی ناظر(ان): -

محل اجرا: استان گیلان

تاریخ شروع: ۱۳۹۹/۵/۱

مدت اجرا: ۲ سال و ۶ ماه

ناشر: موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور

تاریخ انتشار: سال ۱۴۰۲

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: تاثیر ترکیب القاءکننده نوپال بر استرس‌های زیست‌محیطی شوری، دما، سم دیازینون و آلودگی‌های نفتی بنزوآلفاپایرن با تعیین میزان بیان ژن HSP و شاخص‌های ایمنی در بچه ماهیان ازون‌برون

کد مصوب: ۳-۳۲-۱۲۵۱-۲-۹۷۰۴۵۶

شماره ثبت (فروست): ۶۴۸۲۴ تاریخ: ۱۴۰۲/۱۱/۱۶

با مسئولیت اجرایی جناب آقای تورج سهرابی لنگرودی دارای مدرک تحصیلی دکتری در رشته زیست‌شناسی آبریان است.

پروژه توسط داوران منتخب بخش زیست‌فناوری و فرآوری آبریان در

تاریخ ۱۴۰۲/۱۱/۱ مورد ارزیابی و بارتبه عالی تأیید گردید.

در زمان اجرای پروژه، مجری در:

ستاد پژوهشکده مرکز ایستگاه

با سمت عضو هیئت علمی در انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان

خاویاری مشغول بوده است.

عنوان	«فهرست مندرجات»	صفحه
چکیده.....		۱
۱- مقدمه.....		۲
۱-۱- القا پروتئین های شوک حرارتی		۳
۱-۲- ترکیبات القاکننده و کمک القاگرها.....		۴
۱-۳- پاسخ HSP در ماهیان علیه استرس آلودگی.....		۵
۱-۴- آلاینده های زیست محیطی و سیستم ایمنی در ماهیان.....		۵
۱-۵- فاکتورهای غیر زیستی و استرس در ماهیان.....		۶
۱-۶- پاسخ به استرس دمایی و شوری در ماهیان		۶
۱-۷- اثرات آلاینده های زیست محیطی برآبزیان.....		۷
۱-۸- ماهی اوزون برون.....		۱۰
۱-۹- مروری بر مطالعات گذشته.....		۱۰
۱-۱۰- هدف از اجرا.....		۱۳
۱-۱۱- اهداف پژوهش.....		۱۵
۱-۱۱-۱- اهداف کاربردی.....		۱۵
۱-۱۱-۲- اهداف فرعی.....		۱۵
۱-۱۲- فرضیات پژوهش.....		۱۵
۲- مواد و روش ها.....		۱۷
۲-۱- وسایل و تجهیزات مورد نیاز.....		۱۷
۲-۲- محلول ها و بافرهای مورد نیاز.....		۱۷
۲-۲-۱- بافرنمکی فسفات PBS.....		۱۷
۲-۲-۲- بافر TBE (TBE-10X).....		۱۷
۲-۲-۳- بافر TAE (TAE-5X).....		۱۷
۲-۲-۴- آماده سازی ژل آگارز ۲ %.....		۱۸
۲-۳- بچه ماهیان مورد آزمون.....		۱۸
۲-۴- مرحله پیش تیمار.....		۱۹
۲-۵- مرحله اول استرس شوری.....		۲۱

- ۲-۶- استرس سم ارگانوفسفره دیازینون ۲۳
- ۲-۷- مرحله سوم آزمون شامل بررسی اثرآلاینده آلی بنزوآلفا پایرن ۲۷
- ۲-۷-۱- در آزمایشی برای محاسبه میزان LC50 96h آلاینده آلی بنزوآلفاپایرن ۲۷
- ۲-۸- اندازه گیری پارامترهای ایمنی ۲۹
- ۲-۹- تعیین میزان پارامتر لیزوزیم ۳۰
- ۲-۱۰- تعیین میزان پروتئین C3 از طریق روش ELISA ۳۱
- ۲-۱۱- تعیین میزان IgM از طریق روش ELISA ۳۱
- ۲-۱۲- تعیین میزان آنزیم کورتیزول ۳۲
- ۲-۱۲-۱- مواد مورد نیاز جهت سنجش کورتیزول ۳۳
- ۲-۱۲-۲- نحوه انجام آزمایش ۳۳
- ۲-۱۳- اندازه گیری میزان فعالیت آنزیم کاتالاز ۳۴
- ۲-۱۳-۱- آماده سازی معرف ها ۳۴
- ۲-۱۴- اندازه گیری میزان فعالیت آنزیم SOD ۳۵
- ۲-۱۴-۱- دقت سنجش ۳۵
- ۲-۱۴-۲- آماده سازی نمونه ها ۳۶
- ۲-۱۴-۳- آماده سازی معرف ها ۳۶
- ۲-۱۴-۴- محدوده سنجش ۳۶
- ۲-۱۵- تعیین میزان توتال آنتی اکسیدان ۳۷
- ۲-۱۵-۱- آماده سازی بافت ۳۷
- ۲-۱۵-۲- آماده سازی معرف ها ۳۷
- ۲-۱۶- بررسی میزان پروتئین کل ۳۷
- ۲-۱۶-۱- اندازه گیری پروتئین تام ۳۸
- ۲-۱۷- اندازه گیری فعالیت آنزیم سیتوکروم p450 ۳۹
- ۲-۱۸- سنجش فعالیت آنزیم استیل کولین استراز ۳۹
- ۲-۱۸-۱- تهیه نمونه آنزیمی ۴۰
- ۲-۱۸-۲- معرف ها در این آزمون ۴۰
- ۲-۱۸-۳- سنجش فعالیت استیل کولین استراز ۴۰

۴۱	۱۹-۲- استخراج RNA
۴۱	۱-۱۹-۲- ارزیابی RNA استخراج شده به کمک ژل آگارز ۱ %
۴۲	۲-۱۹-۲- تیمار DNase
۴۳	۲-۲۰- سنتز cDNA و اندازه گیری بیان ژن HSP
۴۴	۲-۲۱- واکنش زنجیره ای پلی مرز PCR
۴۵	۲-۲۱-۱- پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر ژن HSP70
۴۵	۲-۲۱-۲- الکتروفورز محصول PCR روی ژل آگارز
۴۵	۲-۲۲- واکنش Real Time PCR
۴۷	۳- نتایج
۴۷	۱-۳- بیان ژن Hsp70 در کبد و آبشش بچه ماهیان تحت تاثیر دیازینون
۴۷	۳-۱-۱- کبد
۴۷	۳-۱-۲- آبشش
۴۹	۳-۲- فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی کبد تحت تاثیر دیازینون
۵۲	۳-۳- پارامترهای ایمنی تحت تاثیر دیازینون
۵۵	۳-۴- سطح کورتیزول تحت تاثیر دیازینون
۵۶	۳-۵- فعالیت استیل کولین استراز تحت تاثیر دیازینون
۵۷	۳-۶- بیان ژن Hsp70 تحت استرس شوری
۵۷	۳-۶-۱- کبد
۵۸	۳-۶-۲- آبشش
۶۰	۳-۷- فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی تحت استرس شوری
۶۳	۳-۸- پارامترهای ایمنی تحت استرس شوری
۶۶	۳-۹- سطح کورتیزول تحت استرس شوری
۶۷	۳-۱۰- محاسبه میزان LC ₅₀ 96h آلاینده آلی بنزوآلفاپایرن
۶۸	۳-۱۱- بیان ژن Hsp70 در کبد و آبشش ماهیان تحت تاثیر بنزوآلفاپایرن
۶۸	۳-۱۱-۱- کبد
۶۸	۳-۱۱-۲- آبشش
۷۰	۳-۱۲- فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی تحت تاثیر بنزوآلفاپایرن

۷۳	۳-۱۳- پارامترهای ایمنی تحت تاثیر بنزوآلفاپایرن.....
۷۶	۳-۱۴- سطح کورتیزول تحت تاثیر بنزوآلفاپایرن.....
۷۷	۳-۱۵- فعالیت استیل کولین استراز AChE تحت تاثیر بنزوآلفاپایرن.....
۷۸	۳-۱۶- میزان آنزیم سیتوکروم P450 تحت تاثیر بنزوآلفاپایرن.....
۷۹	۴- بحث.....
۷۹	۴-۱- پاسخ Hspi تحت تاثیر استرس.....
۸۱	۴-۲- استرس اکسیداتیو.....
۸۴	۴-۳- پاسخ ایمنی به استرس.....
۸۸	۴-۴- کورتیزول.....
۹۰	۴-۵- فعالیت استیل کولین استراز در مغز ماهیان خاویاری.....
۹۲	۴-۶- سیتوکرم p450 در کبد.....
۹۴	۵- نتیجه گیری نهایی.....
۹۵	پیشنهادها.....
۹۶	منابع.....
۱۰۴	چکیده انگلیسی.....

چکیده

جمعیت ماهیان خاویاری به دلیل عوامل گوناگونی چون افزایش صید، کاهش تکثیر طبیعی ماهیان به دلیل مسدود شدن مسیرهای مهاجرتی، از بین رفتن محل‌های طبیعی تخم‌ریزی، افزایش آلودگی و ورود گونه‌های غیر بومی، بخصوص در سه دهه اخیر دستخوش کاهش شدید شده است. فاکتورهای زیست محیطی و آلودگی‌ها از عوامل مهم ایجاد استرس و کاهش عملکرد سیستم ایمنی در ماهیان هستند. یکی از بهترین مکانیسم‌های شناخته شده که از سلول‌ها در برابر استرس‌های گوناگون حفاظت می‌کند پاسخ به شوک حرارتی است که منجر به القاء سنتز پروتئین‌های شوک حرارتی یا HSP می‌شود. تحریک تولید HSP پیش از قرار گرفتن در معرض عوامل استرس‌زای کشنده‌ای چون عفونت، استرس حمل‌ونقل، استرس‌های گرما یا شوری و آلاینده‌ها باعث افزایش تحمل به عوامل استرس‌زا می‌شوند. هدف از این تحقیق بررسی ترکیب تحریک‌کننده چپرونی® Tex-OE است و اینکه آیا می‌تواند بر بیان HSP70 در بچه تاس ماهیان اثر گذاشته و آنها را بر علیه عوامل استرس‌زای غیر زیستی چون شوری، سم دیازینون و هیدروکربن نفتی حفاظت کند و اینکه آیا کاندید مناسب برای ماده ضد استرس‌زا در طی پروسه آبرزی پروری است. در این تحقیق از بچه ماهیان اوزون برون (*Acipenser stellatus*)، و برای بررسی اثرات القایی از ماده نوپال اندورانس که عصاره کاکتوس گللابی خاردار است بر بیان ژن HSP70 استفاده شد. بچه ماهیان قبل از قرارگیری تحت استرس‌های شوری، سم ارگانوفسفره دیازینون و آلاینده نفتی بنزوآلفاپایرن تحت تأثیر ترکیب القاءکننده نوپال اندورانس در غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر به مدت ۴ ساعت قرار گرفتند و سپس بررسی بیان ژن HSP70، بررسی پارامترهای ایمنی لیزوزیم، IgM، C3، اندازه‌گیری میزان کورتیزول، اندازه‌گیری شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز، کاتالاز، توتال آنتی‌اکسیدان و توتال پروتئین همچنین اندازه‌گیری فعالیت آنزیم استیل کولین استراز و سیتوکروم P450 انجام پذیرفت. یافته‌ها نشان داد فاکتورهای ایمونولوژیک و بیان HSP70 در *Acipenser stellatus* با پیش‌تیمار به طور قابل توجهی بهبود یافت. غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر از پیش‌تیمار به طور قابل توجهی محافظت از استرس را در بچه ماهیان در معرض استرس افزایش داد، تجزیه و تحلیل آنتی‌اکسیدانی *Acipenser stellatus* نشان داد که استفاده از ترکیب القاءکننده باعث رساندن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مورد مطالعه به سطح مطلوب می‌شود و سطوح استیل کولین استراز در اثر استرس دیازینون و بنزوآلفاپایرن طور قابل توجهی کاهش یافت. بنابراین، استفاده از یک القاءکننده HSP مانند Tex-OE® می‌تواند به طور قابل توجهی بقای ماهیان خاویاری ارزشمند را افزایش دهد و استرس‌های محیطی مانند دیازینون و بنزوآلفاپایرن را به چالش بکشد.

کلمات کلیدی: پروتئین شوک حرارتی، دما، شوری، دیازینون، هیدروکربن نفتی، ماهیان خاویاری