Archive of SID

نشریه دامپزشکی
در
پژوهش و سازندگی شماره ۱۱۰ بهار ۱۳۹۵
DOI: 10.22034/vj.2016.105751

تهیه کشت سلولی اولیه زنبور عسل (*Apis mellifera* L.) به روش های هضم آنزیمی و نشاکاری بافت‌های ریز شده

• **روزبه فلاحی (نویسنده مسئول)**
عضو هیات علمی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی
• **محمدرضا قلعه نویی**
عضو هیات علمی سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی
تاریخ دریافت: خرداد ۹۴ تاریخ پذیرش: مهر ۹۴
Email: r.fallahi@rvsri.ac.ir

چکیده

در این تحقیق به منظور تهیه کشت سلولی اولیه زنبور عسل، نمونه‌هایی از مرحله لاروی و شفیرگی زنبور عسل تهیه و بر طبق دستورالعمل‌های استاندارد آماده گردیدند. جهت تهیه کشت اولیه از روش‌های هضم آنزیمی کوتاه مدت (سه مرحله ۱۰ دقیقه‌ای)، هضم آنزیمی طولانی مدت (۱۸ ساعته) و روش نشاکاری بافت‌های ریز شده استفاده گردید. جهت رشد سلول‌های بدست آمده در روش‌های مختلف، از محیط کشت Grac'e غنی شده با سرم جنین گاو (FBS) به مقدار ۱۵٪ در درجه حرارت ۲۸ ^{o}C استفاده گردید. سلول‌های بدست آمده در روش‌های مختلف، از نظر تعداد و میزان رشد سلول‌های زنده وضعیت مناسبی داشته و بعد از ۵-۲ هفته به سطح پوششی کامل رسیدند و از آن‌ها چندین پاساژ متوالی تهیه گردید. در روش هضم آنزیمی بهترین نتیجه، از روش تریپسینه کردن طولانی مدت مرحله شفیرگی بدست آمد. نتایج روش نشاکاری بافت‌های ریز شده در هر دو مرحله لاروی و شفیرگی مشابه و آن‌ها نیز از نظر تعداد و میزان رشد سلول‌های زنده وضعیت مناسبی داشتند.

کلمات کلیدی: کشت سلولی اولیه، زنبور عسل، هضم آنزیمی، نشاکاری بافت‌های ریز شده

www.SID.ir

Archive of SID

Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 110 pp: 101-109

Preparation of honey bee (*Apis mellifera* L.) primary cell culture by enzymatic disaggregation and planting minced tissues methods

By: Fallahi, R., (Corresponding Author) Member of Scientific Board; Razi Vaccine and Serum Research Institute, Alborz, Iran. Ghalenoee, MR., Member of Scientific Board; Agricultual Research Education & Extention Organization.
Email: r.fallahi@rvsri.ac.ir

Received: July 2015 **Accepted: September 2015**

In this study, in order to preparation of primary cell culture of honey bees, some samples were collected from larval and pupal honey bee and were prepared according to standard guidelines. For preparing of primary culture, the short-time enzymatic disaggregation (three-phase, 10 min), long-time (18 h) and planting minced tissues methods were used. For growth of obtained cells in various methods, the Grac'e medium enriched with fetal bovine serum (FBS) to a value of 15% was used in the temperature 28°C. Cells obtained in various methods, had good status in number and rate of growth of living cells and have reached in full confluency after 2-5 weeks and several successive subcultures were prepared. In enzymatic disaggregation method the best result was obtained from long-time trypsinization of pupa stage. The result of planting minced tissues method in the larval and pupal stages were similar and both were great.

Key words: Primary Cell Culture, Honey bee, Enzymatic disaggregation, Planting minced tissues

مقدمه

کشت‌های سلولی چه بصورت اولیه[1] و یا لاین[2]، کاربرد گسترده و فراوانی در جداسازی، شناسایی و طبقه‌بندی ویروس‌ها دارند. ویروس‌ها از مهم‌ترین عوامل بروز بیماری‌ها و ایجاد خسارات اقتصادی هنگفت محسوب می‌شوند. کشت‌های سلولی همچنین برای تکثیر و ازدیاد ویروس‌های مورد نیاز در مطالعات مولکولی و تحقیقات بیوفیزیک که به منظور تهیه آنتی سرم‌ها و یا تولید واکسن‌های ویروسی زنده و یا کشته انجام می‌شوند کاربرد ویژه‌ای دارند (۱۲، ۱۳). کشت‌های سلولی، خصوصاً کشت اولیه، بعنوان مدل تجربی و آموزشی جهت تحقیقات پایه و مقایسه‌ای در فیزیولوژی سلولی، ژنتیک، سم‌شناسی، غدد درون‌ریز، مواد سرطان زا، واکنش‌های پاتوژن- میزبان و ... کاربرد دارند. کشت‌های سلولی اولیه، همچنین در تحقیقات کروموزومی (کاریوتایپ، مورفولوژی و حالات غیر طبیعی) و اخیراً در مورد اثرات شیمیایی بیان[3] ژن‌ها و پروتئین‌ها در سلول‌ها با استفاده از تکنولوژی‌های نوین نظیر ژنومیکس[4] یا ترانس کریپتومیکس[5] استفاده گسترده‌ای دارند. مهم‌ترین کاربرد کشت‌های اولیه هنگامی است که امکان دسترسی به تیره‌های سلولی مورد نیاز فراهم نباشد. کشت‌های سلولی اولیه همچنین مقدمه‌ای برای تولید تیره‌های سلولی می‌باشند. در آغاز قرن بیستم میلادی، موضوع جدیدی در تحقیقات بیولوژی شکل گرفت و آنهم کشت‌ها و پیوندهای بافتی بود. متعاقب آن، کشت سلول‌های پرایمری و بدنبال آن کشت‌های لاین دائمی و فناناپذیر، بیولوژی سلول را وارد عرصه جدیدی کرد. کارهای اولیه بر روی بی مهره‌گان و حشرات بالدار[6] صورت گرفت. در ابتدا بافت عضلانی حشرات فوق بیرون آورده شده و کشت داده می‌شدند. پیشرفت‌های مهم در این زمینه از سال ۱۹۴۹ همزمان با استفاده از آنتی بیوتیک‌ها در محیط‌های کشت، حاصل گردید (۴، ۱۲، ۱۳). در سال ۱۹۵۸ با استفاده از تریپسینه کردن[7] بافت، تکنیکی معرفی گردید که برای اولین بار منجر به تهیه کشت یک لایه از سلول‌های ماهیان گردید. Wolf و Quimby در سال ۱۹۶۹ اولین گزارش جامع در مورد کشت‌های سلولی و بافت‌های آبزیان را منتشر نمودند. مهم‌ترین منبع جامع برای تمام کشت‌های بافتی، متنی است تحت عنوان "روش های کشت بافت و کاربردهای آن" که توسط Kruse و Patterson در سال ۱۹۷۳ منتشر گردید. این کتاب حاوی توضیح مختصری از تریپسینه کردن بافت‌ها است که بوسیله Sigel و Beasley در سال ۱۹۷۳ انجام گرفت. تحقیقات در این زمینه ادامه یافت تا جائی‌که سلول‌های لاین بی‌مهره‌گان و مهره‌داران جهت رشد دائمی بوجود آمدند و بسیاری از آن‌ها بصورت تجارتی امروزه قابل دسترسی می‌باشند (۴).

بطور کلی تنوع بافت‌های گوناگون برای تهیه کشت اولیه، زیاد بوده ولی بافت‌های جنینی و گنادها بیشترین تعداد سلول‌های فعال یا قابلیت تقسیم مناسب را داشته و نتایج موفقیت آمیزی در کشت‌های یک لایه و رسیدن به سطح پوششی مناسب در کمترین زمان را دارا می‌باشند (۱۲، ۱۳). روش‌های اختصاصی متعددی برای تهیه کشت‌های سلولی اولیه وجود دارد که عبارتند از: (۱۲، ۱۳)

- روش هضم آنزیمی[8] بافت‌های ریز شده[9](تریپسینه کردن بافت)
- روش نشاکاری[10] بافت‌های ریز شده بدون استفاده از آنزیم

در مورد حشرات، کشت سلولی اولیه کاربرد فراوانی در تحقیقات و تشخیص بیماری‌های ویروسی دارد، خصوصاً در مورد گونه‌هایی از جانداران نظیر زنبور عسل که تاکنون تیره سلولی از آن‌ها تهیه نشده است اما

www.SID.ir

Archive of SID

تلاش‌هایی در زمینه تهیه کشت پرایمری و نیز تیره‌های سلولی غیردائم زنبور عسل آن‌هم فقط برای تعداد کمی پاساژ[11] انجام گرفته و در این زمینه موفقیت‌هایی نیز حاصل شده است (Lynn، ۲۰۰۱: Bergem و همکاران، ۲۰۰۸: Chan و همکاران، ۲۰۱۰: Hunter، ۲۰۱۰ و Poppinga و همکاران، ۲۰۱۲). Kitagishi و همکاران (۲۰۱۱) تلاش‌هایی برای تولید سلول‌های جنینی زنبور عسل که دائمی باشند را از طریق انتقال ژن به سلول‌های سرطانی C-myc Proto انسان انجام دادند. گرچه ممکن است به اولین تیره سلولی دائمی زنبور عسل منجر شود اما ماهیت آنها ناشی از بیان ژن در سلول‌های انسانی خواهد بود. از این رو تلاش جهت تهیه سلول‌های دائمی از خود زنبور عسل همچنان ادامه دارد (۴، ۸، ۱۵). در زمینه کشت سلولی زنبور عسل تحقیقات در اغلب کشورها بسیار محدود می‌باشد ولی محققان زیادی در زمینه کشت سلولی سایر حشرات فعالیت نموده و به نتایج خوبی دست پیدا کرده اند. در زمینه کشت بافت و سلول‌های حشرات بالدار، پیشرفت‌هایی توسط Giauffret (۱۹۷۱)، Kaatz و همکاران (۱۹۸۵)، Greny (۱۹۸۶)، Ferkovich و همکاران (۱۹۹۴) و Rocher و همکاران (۲۰۰۴) گزارشاتی وجود دارد. Kolokol'tsova و همکاران (۱۹۹۵) موفق به تهیه کشت اولیه پروانه از راسته پولک بالان[12] شدند (۶). Eide (۲۰۰۳) از سلول‌های جنینی مگس خانگی، تیره سلولی تهیه نمود (۲). Tolbert و Oland (۱۹۹۰) از سلول‌های عصبی حشره بید (*Mandura sexata*) کشت سلولی اولیه تهیه نمودند (۴، ۱۱).

لیستی از سلول‌های هترولوگ که برای پاتوژن‌های زنبور عسل می‌توانند مورد استفاده قرار گیرند توسط Gisder و همکاران (۲۰۱۱) منتشر شده است. بعنوان مثال تیره سلولی IPL-LD۶۵Y یک لاین سلولی دائمی از پولک بالان می‌باشد که از پروانه کرم ابریشم (*Lymantria dispar*) تهیه شده که به عفونت‌های میکروسپوریدیایی بیماری‌زای زنبور عسل شامل *Nosema apis* و *Nosema ceranae* حساس می باشد و می‌تواند کامل کننده چرخه زندگی گونه‌های نوزما در کشت سلول باشد. تیره‌های سلولی MB-L۲، MB-۳ و MB-L۱۱ از حشره بید کلم (*Mamestra brassicae*)، تیره سلولی Schneider-۲ از مگس سرکه (*Drosophila melanogaster*)، تیره‌های سلولی sf-۹، sf-۲۱، و sf-۱۵۸ از *Spodoptera frugiperda*، تیره سلولی SPC-BM-۲۶ از *Bombyx mori* و تیره سلولی Tn-۳۶۸ از *Trichoplusia ni* تهیه شده است. در زمینه کشت سلولی زنبور عسل چند گزارش در مورد کشت نرون‌های مغزی شفیره[13] زنبور عسل وجود دارد (۳، ۷، ۱۰). Jirasripongpun و همکاران (۲۰۰۳) تحقیقی در مورد تهیه کشت اولیه لارو زنبور عسل انجام دادند. هدف اصلی در آن‌ها تکمیل مطالعات سیستم بویایی حشرات با استفاده از اطلاعات حاصل از کشت‌های سلولی در شرایط آزمایشگاهی بود (۴، ۵). اخیراً انواع متعددی از سلول‌های بدست آمده از شفیره و مغز زنبورهای بالغ و نیز سلول‌های دستگاه گوارش برای این منظور توسط Mockel و همکاران (۲۰۰۹)، Poppinga و همکاران (۲۰۱۲) تهیه گردید. گرچه سلول‌های پرایمری در بسیاری از موضوعات مفید می‌باشند ولی محدودیت‌هایی نیز در آنها وجود دارد. اکثر سلول‌های پرایمری برای دوره زمانی محدودی باقی مانده و وقتی از آنها کشت مجدد۱۴ تهیه می‌شود، بعنوان سلول‌های غیردائم عمل کرده و بعد از چند نوبت از بین می‌روند. در طی این پاساژها، اکثر سلول‌ها جهت عادت پیدا کردن به شرایط محیطی مصنوعی، تغییرات ماهیتی پیدا کرده و مشکلاتی را در تکثیر و ادامه رشد آن‌ها ایجاد می‌گردد (۴). Bergem و همکاران (۲۰۰۶) موفق به نگه‌داری طولانی مدت سلول‌های جنینی زنبور عسل گردیدند (۱).

با توجه به رشد چشمگیر پرورش زنبور عسل در ایران، ارائه روش‌هایی که در جهت تشخیص بیماری‌های عفونی، بخصوص عوامل ویروسی که خسارات قابل توجهی ببار می‌آورند بیش از پیش احساس می‌گردد (۹). با تهیه کشت اولیه که اهمیت زیادی در تحقیقات و تشخیص بیماری‌های ویروسی دارد، امکان تهیه تیره سلولی از این حشره نیز فراهم می‌گردد. این تحقیق اولین مطالعه در زمینه کشت سلولی زنبور عسل در ایران می‌باشد. از آنجائی‌که گزارشاتی از تشخیص بیماری‌های ویروسی مهم زنبور عسل در ایران وجود دارد، با توجه به تفاوت‌های کشت سلولی زنبور عسل با حیوانات خونگرم، با نتایج بدست آمده از این تحقیق، امکان تهیه کشت سلولی زنبور در مواقع لزوم فراهم گردیده و امکان جداسازی ویروس‌های مورد نظر و زمینه مناسب برای تهیه سلول‌های لاین این حشره سودمند در کشور فراهم شده است.

مواد و روش کار

انتخاب نمونه

در این تحقیق که در بهار ۱۳۹۳ صورت گرفت از مرحله لاروی زنبور عسل در سنین ۷-۵ روزگی و نیز از مرحله شفیرگی در سنین ۱۵-۱۲ روزگی بر طبق دستورالعمل Human و همکاران (۲۰۱۳) چندین نمونه از یک کلنی زنبور در استان البرز تهیه گردید (شکل -۱) (۴). از نظر ظاهری لاروها و شفیره‌ها کاملاً سالم بوده و با مشاهده در زیر لوپ هیچ نوع انگل خارجی در سطح بدن آنها مشاهده نشد. بعد از کشتن زنبورها توسط کلروفرم، جهت ضدعفونی کردن سطح بدن، ابتدا آنها را بمدت ۵-۳ دقیقه در اتانول ۷۰٪ قرار داده و پس از سه مرتبه آبکشی با آب استریل، لاروها را بطور کامل ولی شفیره‌ها را پس از خارج نمودن دستگاه

شکل۱- لارو(سمت راست) و شفیره (سمت چپ) زنبور عسل مورد استفاده در تهیه کشت سلولی پرایمری

www.SID.ir

Archive of SID

گوارش، با قیچی استریل، در اندازه‌های ۲-۱ میلی متر، ریز ریز نموده، بعد از سه مرتبه شستشو با محلول PBS۱۵ سرد، بمدت یک ساعت در محلول آنتی بیوتیکی (حاوی ۲۰۰ gµ/ml جنتامایسین، ۵۰۰ gµ/ml پلی میکسین- B، ۵۰۰ gµ/ml نئومایسین و ۱۰۰ IU/ml پاسیتراسین) غوطه‌ور شدند. سپس اقدام به تهیه کشت سلولی اولیه به روش‌های هضم آنزیمی (با دو روش تریپسینه کردن کوتاه مدت و طولانی مدت) و روش نشاکاری بافت‌های ریز شده[16] گردید (۴).

روش هضم آنزیمی

در تریپسینه کردن کوتاه مدت، قطعات بافتی به میزان ۱:۱۰ (یک گرم بافت و ۱۰ میلی لیتر محلول تریپسین) در سه نوبت ۱۰ دقیقه‌ای در محلول تریپسین ۰/۲۵٪ (Fluka, Biochemika) و بر روی همزن مغناطیسی با سرعت کند قرار گرفته و در هر نوبت، سوسپانسیون سلولی برداشت شده و جهت خنثی شدن فعالیت تریپسین باقیمانده، به میزان ۱۰٪ به آن FBS[17] (GIPCO) اضافه گردید (۴، ۵، ۱۲، ۱۳). سپس بمدت ۱۰ دقیقه در ۲۰۰g سانتریفوژ شد. رسوب سلولی بدست آمده به فلاسک کشت سلول منتقل و محیط مخصوص حشرات (Grac'e Insect Medium, GIPCO) غنی شده با FBS (به میزان ۱۵٪) به آن اضافه گردید. جهت بررسی وضعیت و تعداد سلول‌های جمع آوری شده، سوسپانسیون سلولی را با رنگ تریپان بلو[18] ۰/۵٪ به نسبت ۵۰:۵۰ مخلوط کرده و توسط لام هموسایتومتر شمارش، که در صورت مناسب بودن تعداد، فلاسک‌های کشت سلولی به انکوباتور ۲۸ °C منتقل گردیدند. برای خارج کردن سلول‌های مرده هر هفته نیمی از محیط کشت داخل فلاسک را با محیط جدید تعویض نموده و هنگامی که سلول‌ها به سطح پوششی کامل رسیدند از آن‌ها پاساژ مجدد تهیه گردید و این کار با دادن پاساژهای مکرر ادامه یافت (۴، ۵، ۱۲، ۱۳).

در تریپسینه کردن طولانی مدت، قطعات بافتی به میزان ۱:۵۰ (یک گرم بافت و ۵۰ میلی لیتر محلول تریپسین) در محلول تریپسین ۰/۲۵٪ و بر روی همزن مغناطیسی در درجه حرارت ۴ °C و با سرعت کند بمدت ۱۸ ساعت قرار گرفته و همانند روش قبل سلول‌ها برداشت گردید (۴، ۵، ۱۲، ۱۳).

روش نشاکاری بافت‌های ریز شده

در روش نشاکاری بافت‌های ریز شده، قطعات بافتی در اندازه‌های تقریبی ۱ mm^3 را در داخل فلاسک کشت سلول ریخته و بوسیله پیپت پاستور نوک خمیده‌ای، در فواصل تقریبی ۱/۵-۱ سانتی‌متر از یکدیگر قرار داده و به منظور ایجاد چسبندگی، بمدت یک ساعت در انکوباتور ۲۸ °C قرار داده و سپس حجم مناسبی (برای فلاسک کشت سلول ۲۵ cm^2 مقدار ۱۰ ml) از محیط Grac'e غنی شده با FBS (به میزان ۱۵٪) به آن اضافه گردید. از آنجا که قطعات بافتی برای چسبندگی کامل و شروع رشد از لبه‌ها، حدوداً به ۳-۲ روز زمان نیاز دارند، طی این مدت از هر گونه جابجایی ممانعت نموده و هنگامی‌که سلول‌های رشد یافته از لبه قطعات بافتی، تمام سطح فلاسک را پر نمودند، پس از تخلیه کامل محیط کشت، اقدام به کندن قطعات بافتی (با ایجاد ضربه مکانیکی و یا نوک پیپت) کرده و سپس محیط کشت جدید به آن‌ها اضافه نموده و پس از پر شدن سطح بافت برداشته شده از سلول‌های رشد یافته و کامل شدن سطح پوششی کف فلاسک کشت سلول، اقدام به پاساژ سلولی گردید (۴، ۵، ۱۲، ۱۳).

نتایج

روش هضم آنزیمی

تعداد سلول‌های زنده در هر میلی لیتر سوسپانسیون سلولی، مدت زمان رسیدن به سطح پوششی کامل و تعداد کل پاساژهای بعمل آمده مراحل لاروی و شفیرگی در روش‌های هضم آنزیمی کوتاه مدت و طولانی مدت در جدول ۱ آمده است.

سلول‌های در حال رشد بدست آمده از مرحله لاروی و شفیرگی در روش‌های تریپسینه کردن کوتاه مدت و طولانی مدت در شکل‌های ۲ الی ۴ نشان داده شده است.

نشاکاری بافت‌های ریز شده

در نمونه‌های تهیه شده از مرحله لاروی و شفیرگی، تداوم تکثیر و زیاد شدن سلول‌های رشد یافته از لبه قطعات بافتی مشاهده گردید. پس از کندن قطعات بافتی، که حدوداً ۷-۵ روز پس از نشاکاری آن‌ها صورت می‌گرفت، جای خالی قطعات کنده شده بعد از حدوداً یک هفته، بطور کامل با سلول‌های جدید پر شدند (شکل‌های ۵ الی ۷).

بحث

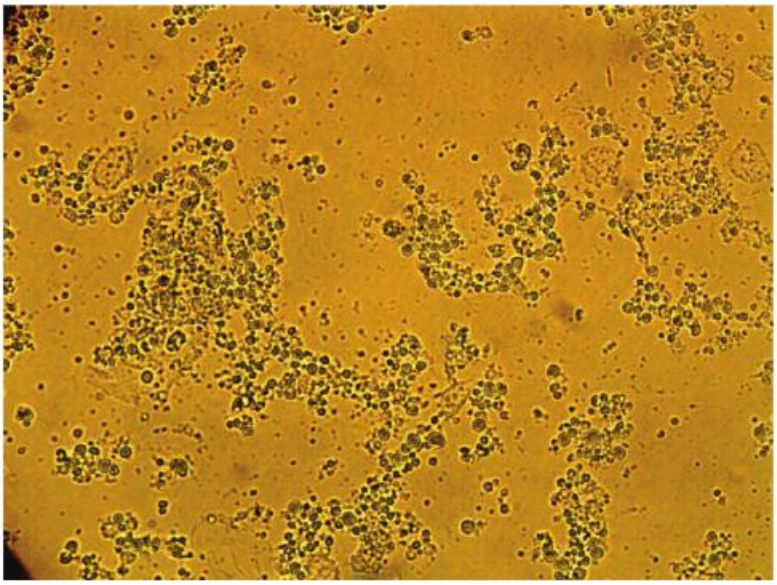
استفاده عمده کشت‌های سلولی بویژه کشت‌های اولیه در ویروس شناسی می‌باشد. همچنین کشت‌های سلولی استفاده گسترده‌ای در تحقیقات و تشخیص بیماری‌های ویروسی دارند. در تکنیک‌های سرولوژی

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

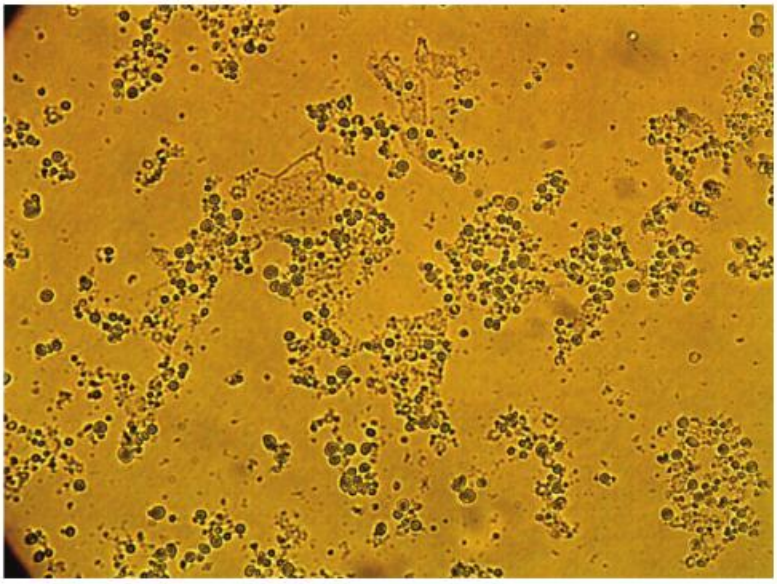
نوع روش هضم آنزیمی	مرحله لاروی		مرحله شفیرگی	
	کوتاه مدت	طولانی مدت	کوتاه مدت	طولانی مدت
تعداد سلول های زنده در هر میلی لیتر سوسپانسیون سلولی	۴۰۰۰۰۰	۵۰۰۰۰۰	۶۵۰۰۰۰	۸۰۰۰۰۰
مدت زمان رسیدن به سطح پوششی کامل	۵-۴ هفته	۴-۳ هفته	۴-۳ هفته	۴-۲ هفته
تعداد کل پاساژهای بعمل آمده	۳	۴	۴	۵

www.SID.ir

Archive of SID



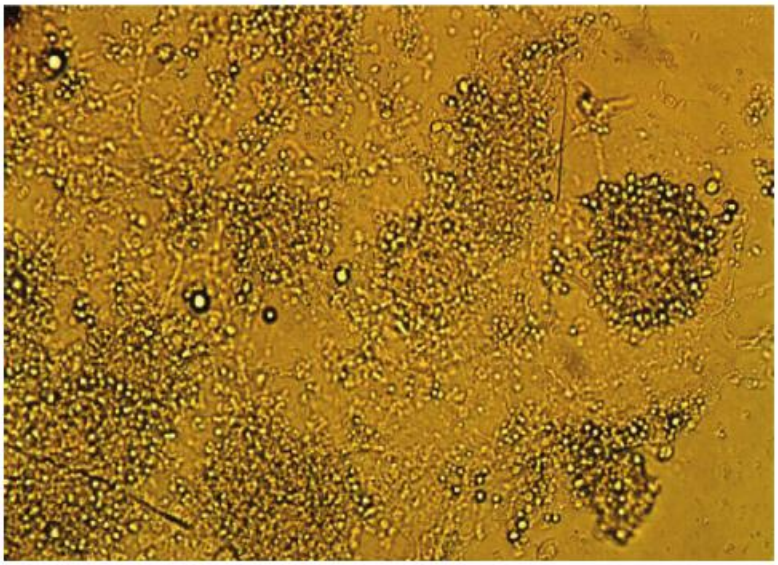
شکل۲- سلول‌های در حال رشد بدست آمده از مرحله لاروی در روش تریپسینه کردن کوتاه مدت بعد از گذشت ۲۷ ساعت (بزرگنمایی:x ۴۰).



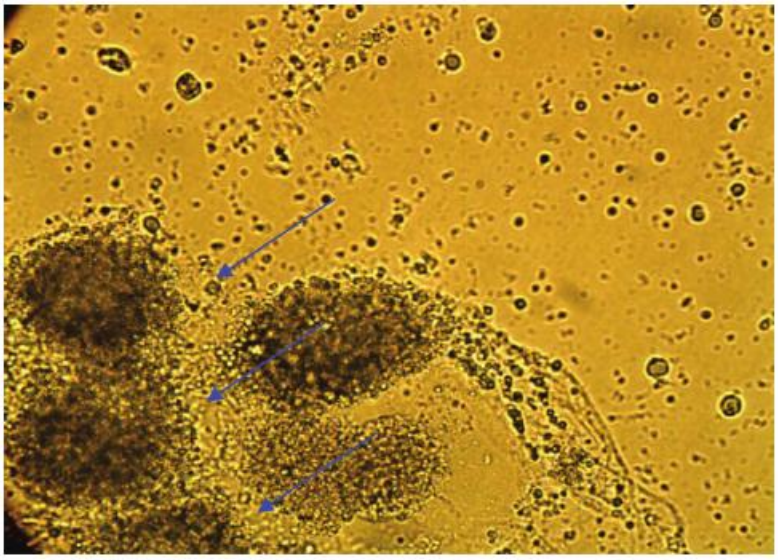
شکل۳- سلول‌های در حال رشد بدست آمده از مرحله لاروی در روش تریپسینه کردن طولانی مدت بعد از گذشت ۲۷ ساعت (بزرگنمایی:x ۴۰).

www.SID.ir

Archive of SID



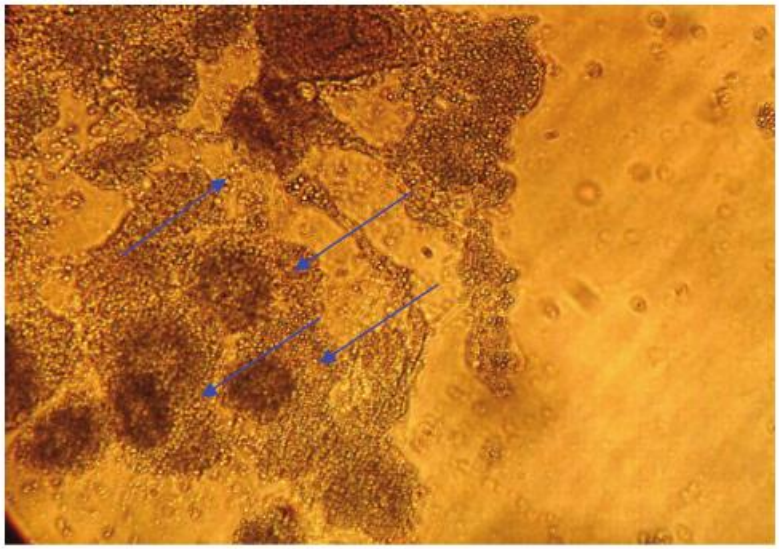
شکل۴- سلول‌های رشد یافته، بدست آمده از مرحله شفیرگی در روش تریپسینه کردن طولانی مدت بعد از گذشت ۲۰ روز که به سطح پوششی تقریباً کامل رسیده اند (بزرگنمایی:x ۱۰۰).



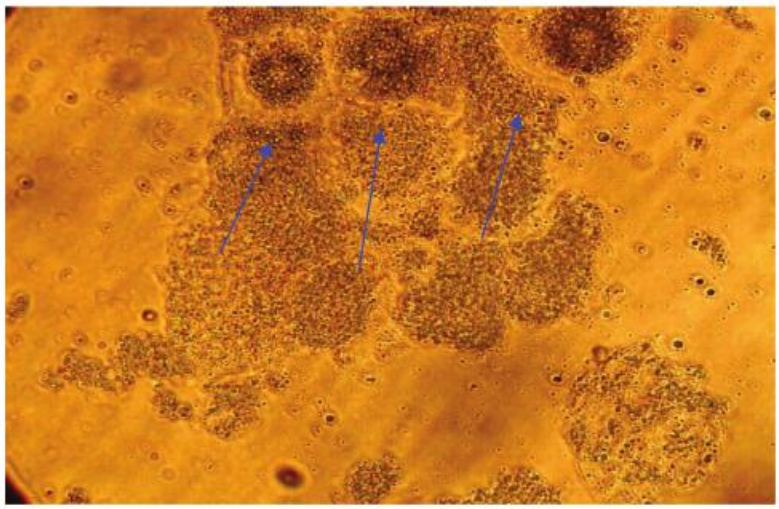
شکل۵- سلول های رشد یافته از لبه قطعات بافتی (با فلش مشخص شده اند) در روش نشاکاری بافت های ریز شده، بعد از گذشت ۲۷ ساعت (بزرگنمایی:x ۴۰).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۶- سلول‌های رشد یافته از لبه قطعات بافتی (با فلش مشخص شده اند) کاشته شده در روش نشاکاری بافت های ریز شده، بعد از گذشت ۲۷ ساعت (بزرگنمایی:x ۴۰).



شکل ۷- سلول‌های رشد یافته از لبه قطعات بافتی کاشته شده (با فلش مشخص شده اند) در روش نشاکاری بافت های ریز شده، بعد از گذشت ۵ روز (بزرگنمایی:x ۴۰).

www.SID.ir

Archive of SID

مورد استفاده در شناسایی و ردیابی ویروس‌ها، مانند آزمایش خنثی‌سازی سرم[19] و تکنیک ایمنوفلورسانس[20]، از کشت‌های سلولی استفاده می‌گردد (۴، ۵، ۱۲، ۱۳).

کشت‌های سلولی برای تکثیر و ازدیاد ویروس‌های مورد نیاز جهت مطالعات مولکولی و بیوفیزیک و تهیه آنتی‌سرم‌های مورد نیاز در واکسن‌های ویروسی کشته و زنده کاربرد فراوانی دارند. استفاده از کشت‌های سلولی در مطالعات سم‌شناسی نیز در حال گسترش می‌باشد. کشت‌های اولیه استفاده گسترده‌ای در مطالعات کروموزومی از لحاظ تعداد و مورفولوژی آن‌ها دارد. در اکثر کشت‌های سلولی و بافتی حیوانات از محیط کشت EMEM[21]، EBM[22]، محیط ۱۹۹ و نیز محیط Leibovitz L-15 استفاده می‌گردد، ولی محیطی که برای کشت سلول‌های حشرات استفاده می‌گردد، محیط Grac'e می‌باشد. pH محیط به اجزاء بافرهای محیط وابسته بوده و بر اساس کاربردهای گوناگون محیط، تنظیم می‌گردد. برای pH اولیه محیط، محدوده ۷/۴-۷/۲ مناسب می‌باشد. بهترین درجه حرارت برای رشد سلول‌های حشره‌ای مانند زنبور عسل ۲۸ °C و محدوده حرارتی آن ۳۰-۲۵ °C می‌باشد. جهت غنی‌سازی محیط کشت، معمولاً از سرم به میزان ۲۰-۱۰٪ استفاده می‌گردد. برای کشت‌های سلولی اولیه، سرم جنین گاو به میزان ۱۵٪ توصیه می‌شود. در مراحل مختلف چرخه زندگی زنبور عسل از تخم تا مرحله بلوغ و از بافت‌های مختلف می‌توان کشت سلولی پرایمری تهیه کرد. از مغز زنبور عسل، Goldberg و همکاران (۱۹۹۹)، از آنتن‌ها (شاخک‌ها)، Barbarn و همکاران (۲۰۰۸)، از جنین، Chan و همکاران (۲۰۱۰)، از همولنف، VanSteenkiste (۱۹۸۸)، Sorescu و همکاران (۲۰۰۳)، از سلول‌های چربی، Kaatz و همکاران (۱۹۸۵) و Hunter (۲۰۱۰)، از لارو ۹-۴ روزه، Sorescu و همکاران (۲۰۰۳)، Rocher و همکاران (۲۰۰۴) و Hunter (۲۰۱۰) گزارشات موفقیت آمیزی وجود دارد (۴).

در این تحقیق محیط Grac'e با pH=۷/۲-۷/۴ که با FBS (۱۵٪) غنی شده بود استفاده گردید. درجه حرارت انکوباسیون نیز ۲۸ °C بود. جهت تهیه کشت‌های سلولی اولیه روش‌های مختلفی نظیر روش هضم آنزیمی، بدون هضم آنزیم و از طریق نشاکاری بافت‌های ریز شده توصیه شده است (۴، ۵، ۱۲، ۱۳). از مزایای روش نشاکاری بافت‌های ریز شده می‌توان به ساده بودن و به زمان کمتری نیاز داشتن آن اشاره کرد. جزئیات کامل‌تر در دستورالعملی که توسط Wolf و Quimby (۱۹۷۶) منتشر گردیده وجود دارد (۱۴). Ahne و Bachmann (۱۹۷۴) دستورالعمل استانداردی را برای تهیه کشت‌های اولیه از بافت‌های تریپسینه شده ماهیان ارائه نمودند (۱۴). جهت هضم بیشتر، معمولاً از آنزیم تریپسین استفاده می‌گردد. غلظت نهایی آن ۰/۲۵٪ توصیه می‌گردد. از آنزیم های پروتئولیتیک[23] دیگر که منشاء پانکراسی دارند و نیز از آنزیم کولاژناز[24] یا آنزیم با منشاء باکتری پروناز[25] نیز می‌توان استفاده کرد. پروناز در غلظت ۰/۱٪ توصیه شده ولی بسیار گران‌تر از تریپسین می‌باشد و از این جهت بطور گسترده استفاده نمی‌گردد. Human و همکاران (۲۰۱۳) از آنزیم کولاژناز به میزان ۱ mg/ml تهیه شده در محلول رینگر عاری از کلسیم جهت هضم آنزیمی استفاده کرد. Poppinga و همکاران (۲۰۱۲) از مخلوط آنزیم‌های تریپسین ۰/۰۵٪ و کولاژناز ۰/۵٪ جهت هضم آنزیمی استفاده نمودند (۴). هضم، می‌تواند در شرایط سکون یا مقداری جابجایی بصورت همزدن دستی صورت گیرد ولی همزدن دائمی یا دستگاه مغناطیسی به شرط اینکه ایجاد کف نکند ترجیح داده می‌شود. دانسیته (تراکم) مطلوب سلول‌ها (بر اساس تعداد سلول در هر میلی لیتر) در کشت‌های اولیه در محدوده ۱۰۰۰۰۰۰-۴۰۰۰۰۰ می‌باشد (۱۲، ۱۳، ۱۴). در این تحقیق تعداد سلول‌های زنده پس از شمارش، در این محدوده قرار داشت. تعداد سلول‌های زنده و مدت زمان رسیدن به سطح پوششی کامل و تعداد پاساژ متوالی در این تحقیق مطلوب و با گزارشات سایر محققین خصوصاً با نتایج Genersch و همکاران (۲۰۱۳) مطابقت دارد. این تحقیق اولین مطالعه در زمینه کشت سلولی زنبور عسل در ایران می‌باشد. از آنجائی‌که گزارشاتی از بیماری‌های ویروسی مهم زنبور عسل در ایران وجود دارد، با توجه به تفاوت‌های کشت سلولی زنبور عسل با حیوانات خونگرم، با نتایج بدست آمده از این تحقیق، امکان تهیه کشت سلولی زنبور در مواقع لزوم فراهم گردیده و امکان جداسازی ویروس‌های مورد نظر در کشور فراهم شده است.

پاورقی‌ها

1-Primary
2-Line
3- Expression
4- Genomics
5- Transcriptomics
6- Hymenoptera
7-Trypsinization
8- Enzymatic disaggregation
9- Minced tissues
10- Planting
11-Passage
12- Lepidoptera
13- Pupa
14- Subculture
15-Phosphate Buffer Saline
16- Planting Minced Tissues
17-Fetal Bovine Serum
18- Trypan blue
19-Serum Neutralization
20-Immunofluorescence
21-Eagle's Minimum Essential Medium
22- Eagle's Basal Medium
23-Proteolytic
24-Collagenase
25-Pronase

منابع مورد استفاده

1- Bergem, M., Norberg, K. and Aamodt, R. M. (2006) Long-term maintenance of in vitro cultured honeybee (*Apis mellifera*) embryonic cells, BMC Developmental Biology,6:17.

www.SID.ir

Archive of SID

2- Eide , P.E. (1975) Establishment of a cell line from long-term primary embryonic house fly cell cultures, Journal of Insect Physiology, 21, 8: 1431-1435.

3- Gascuel, J., Masson, C. and Beadle, D. J.(1991) The morphology and ultrastructure of antennal lobe cells from pupal honeybees (*Apis mellifera*) growing in culture, Tissue and Cell, Volume 23, Issue 4, 547-559.

4- Genersch, E., Gisder, S., Hedtke, K., Hunter, W.B., Mockel, N. and Muller, U.(2013) Standard methods for cell cultures in *Apis mellifera* research, Journal of Apicultural Research, 52 (1): DOI 10.3896/IBRA.1.52.1.02.

5- Jirasripongpun, K., Parnichnavin, W. and Pamepreeda, U. (2003) Study on primary cell culture preparation from bee larva, Department of Biotechnology, Faculty of Engineering and Industrial Technology, Silpakorn University, Nakornpathom 73170.

6- Kolokol'tsova, T.D, and Tsareva, A.A. (1995) Morphological and karyologic analysis of primary and continuous lepidopteran cells, Vopr Virusol , 40(2) :91-95.

7- Kreissl, S. and Bicker, G. (1992) Dissociated neurons of the pupal honeybee brain in cell culture, Journal of Neurocytology, 21, 8: 545-556.

8- Lynn, D.E. (2002) Method for Maintaining Insect Cell Culture, Journal of insect Science, 1-7.

9- Moharrami, M., Modirrousta, H. (2013) Molecular detection of acute bee paralysis virus in Iran, Archives of Razi Institute, Vol. 68, No. 2, 101-104.

10- Murata, Y., Ozaki, M. and Nakamura, T. (2006) Primary Culture of Gustatory Receptor Neurons from the Blowfly, Phormia regina, Chemical Senses, 31(6):497-504.

11- Tolbert, L. P. and Oland, L.A. (1990) Glial cells form boundaries for developing insect olfactory glomeruli, Experimental Neurology, Volume 109, Issue 1, 19-28.

12- Wolf, K. and Ahne, W. (1982) Advances in Cell Culture, Academic Press, 2: 305-328.

13- Wolf, K. and Ahne, W. (1978) TCA Manual, 2 (4) 741-744.

14- Wolf, K. and Quimby, M. C. (1978) Systematic Management of Animal Cell Lines, TCA Manual, Vol 2, No 1.

15- Yue, C., Schröder, M., Gisder, S. and Genersch, E. (2007) Vertical-transmission routes for deformed wing virus of honeybees (*Apis mellifera*), Journal of General Virology 88, 2329-2336.

www.SID.ir