وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور – پژوهشکده اکولوژی دریای خزر

عنوان :

معرفی پروتئین‌های سرم خون ماهی قزل‌آلا *(Oncorhynchus mykiss)* و آمور *(Ctenopharyngodon idella)* و تعیین ایمنوگلوبولینهای آنها به طریق ایمنوالکتروفورز

مجری :
احمد غرقی

شماره ثبت
٤٢٧١٣

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور- پژوهشکده اکولوژی دریای خزر

عنوان پروژه : معرفی پروتئین‌های سرم خون ماهی قزل‌آلا *(Oncorhynchus mykiss)* و آمور *(Ctenopharyngodon idella)* و تعیین ایمنوگلوبولینهای آنها به طریق ایمنوالکتروفورز

شماره مصوب پروژه : ۰۵-۰۷۱۰۴۴۲۰۰۰-۷۲

نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان : احمد غرقی

نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه ها و طرحهای ملی و مشترک دارد) : -

نام و نام خانوادگی مجری / مجریان : احمد غرقی

نام و نام خانوادگی همکار(ان) : حسین لطیفی نژاد

نام و نام خانوادگی مشاور(ان) : -

نام و نام خانوادگی ناظر(ان) : -

محل اجرا : استان مازندران

تاریخ شروع : ۷۲/۲/۱

مدت اجرا : ۱ سال ۳ ماه

ناشر : موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور
تاریخ انتشار : سال ۱۳۹۲

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 »

پروژه : معرفی پروتئین‌های سرم خون ماهی قزل‌آلا *(Oncorhynchus mykiss)* و آمور *Ctenopharyngodon idella*)و تعیین ایمنوگلوبولینهای آنها به طریق ایمنوالکتروفورز

کد مصوب : ۰۵-۰۷۱۰۴۴۲۰۰۰-۷۲

شماره ثبت (فروست) : ۴۲۷۱۳ تاریخ : ۱۳۹۱/۱۲/۲۰

با مسئولیت اجرایی جناب آقای احمد غرقی دارای مدرک تحصیلی دکتری در رشته دامپزشکی می‌باشد.

پروژه توسط داوران منتخب بخش زیست فناوری و فرآوری آبزیان مورد ارزیابی و با نمره ۱۹ و رتبه عالی تأیید گردید.

در زمان اجرای پروژه، مجری در :

ستاد ☐ پژوهشکده ■ مرکز ☐ ایستگاه ☐

با سمت رئیس بخش بیماریهای آبزیان در پژوهشکده اکولوژی دریای خزرمشغول بوده است.

به نام خدا

عنوان	« فهرست مندرجات »	صفحه

چکیده ۱

۱- مقدمه ۳

۱-۱- بررسی مطالعات سایر محققین ۵

۱-۲- مشخصات ماهی آمور ۱۱

۱-۳- مشخصات ماهی قزل‌آلا ۱۳

۲- مواد و روشها ۱۵

۲-۱ - خالص‌سازی ایمنوگلوبولین ماهیان ۲۰

۳- نتایج ۲۲

۴- بحث و نتیجه‌گیری ۲۸

پیشنهادها ۳۹

منابع ۴۳

چکیده انگلیسی ۴۵

چکیده

اندازه‌گیری پروتئین‌های سرم ماهیان جهت بررسی شرایط فیزیولوژیک و هنگام آلودگی آنها با اجرام بیماریزای احتمالی اهمیت بسیار زیادی دارد.

در این پروژه پروتئینها و ایمنوگلوبولینهای ماهیان قزل‌آلا و آمور در شرایط آب و هوایی ایران مورد بررسی قرار گرفته است.

برای جداسازی پروتئینهای سرم و اندازه‌گیری مقادیر آنها از روش الکتروفورزیس با استفاده از ژل آکاروز کیت هیدر اژل پروتئین ساخت شرکت سبیا فرانسه و برای تعیین مقدار پروتئین تام سرم از دستگاه اتو آنالایزر هیتاچی ۷۰۴ استفاده گردید. تعداد ۲۲۰ قطعه ماهی قزل‌آلا از دو ناحیه متفاوت پرورش ماهیان سرد آبی در سنین بین ۱۶-۷ ماهگی و تعداد ۱۱۰ قطعه ماهی آمور نیز از دو ناحیه متفاوت در استان مازندران در سنین بین۱۲-۸ ماهگی نمونه‌برداری شدند. خونگیری از ورید دمی نزدیک باله مخرجی انجام شد و پس از تهیه سرم خون نسبت به انجام آزمایشها اقدام گردید در این آزمایشها مقادیر پروتئین‌های سرم خون مانند آلبومین و گلوبولینها اندازه‌گیری شدند. در این پروژه با تزریق سرم ماهی به همراه اوجوانت کامل و ناقص فروندز و بر اساس برنامه خاص آنتی سرم پلی والان ضد سرم ماهی تهیه گردید که در بررسی‌های ایمنوالکتروفورتیک سرم ماهیان مورد استفاده قرار گرفت.

همچنین به علت عدم دسترسی به آنتی ایمنوگلوبولین ماهیان یاد شده جهت تعیین محل الکتروفورتیک آنها سعی گردید تا با استفاده از روش رسوب ایمنوگلوبولین با نمک (سولفات آمونیم) ایمنوگلوبولین ماهیان مذکور تقریباً تخلیص و محل الکتروفورتیک آنها از طریق الکتروفرزیس و ایمنوالکتروفرزیس تعیین گردد.

میزان طبیعی پروتئین تام پلاسما در آبزیان ۵۰-۳۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و مقدار ایمنوگلوبولین طبیعی آنها بین ۷-۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر گزارش شده است (۱۸). نتایج حاصل از آزمایش‌های سرولوژیک و الکتروفورز سرم ماهیان قزل‌آلا و آمور در سنین مختلف رشد مطابق نمای شماره یک می‌باشد.

جدول شماره ۱ : میانگین مقادیر پروتئینها و ایمنوگلوبین سرم خون ماهیان قزل‌آلا و آمور

مقدار پروتئین	قزل‌آلا		آمور	
پروتئین تام	۳۸/۵	mg/ml	۱۹	mg/ml
آلبومین	۱۲	mg/ml	۵	mg/ml
α_1	۱۷/۳	mg/ml	۶/۵	mg/ml
α_2	۴/۴	mg/ml	۴	mg/ml
ایمنوگلوبین	۴/۹۱	mg/ml	۳/۴۶	mg/ml

۱- مقدمه

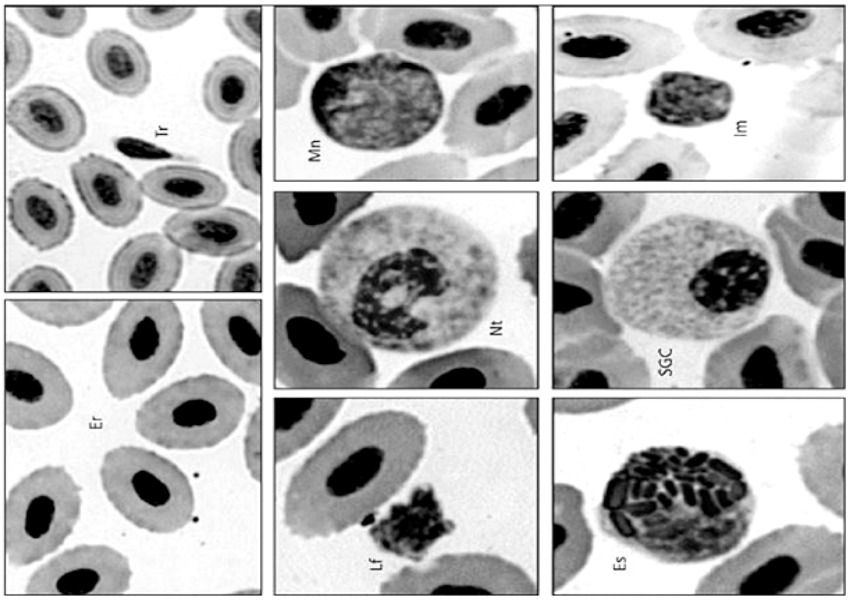
امروزه حدود ۲۱۷۰۰ کوسه ماهی زنده وجود دارد. این تعداد برابر نیمی از گونه مهره‌داران شناخته شده می‌باشد. از این تعداد ماهی تقریباً ۲۱۰۰۰ گونه ماهی استخوانی و ۷۰۰ گونه ماهی الاسموبرانش[1] (کوسه‌ها و سفره ماهیان) می‌باشد و از گروه اخیر (۱۲۰ گونه) هلولوسفالها[2]، ماهی شمروئید[3]، برایکوپتریگینها[4]، هلوستینها[5]، ماهیان غضروفی ـ استخوانی (ماهیان خاویاری و شبه خاویاری[6])، ماهیان دو دمی (شش‌دار)، سلوکانتها[7] و آبزیانی به نام مارماهیان دهان گرد مانند میکسینیدها[8] یا پترومیزونیدها[9] (لامپری) می‌باشند (۸). ماهی‌ها مانند کلیه انواع مهره‌داران، از مهره‌داران شبه ماهی که در دوران دوونیئن[10] (دوره ماهی‌ها) ۴۰۰-۳۵۰ میلیون سال قبل وجود داشته‌اند می‌باشد و این اجداد شبه ماهی به نوبه خود ممکن است از نیاکان ناشناخته ۵۵۰ میلیون سال پیش منشاء گرفته باشند (۸).

بررسی خصوصیات پروتئینهای سرم خون ماهیان تنها و تعداد محدودی از ۲۱۷۰۰ گونه ماهی شناخته شده مطالعه گردیده است. بررسی‌های کتابخانه‌ای و جستجوی کامپیوتری فایل ASEA جهت یافتن سابقه و پیشینه مطالعاتی بررسی‌هی پروتئینهای سرم خون ماهیان، حاکی است که مطالعات جامعی بر روی تمام پروتئینهای سرم خون ماهیان انجام نشده است و تاکنون مقدار و مشخصات پروتئینهای سرم و نوع اسید آمینه‌های آنان معرفی نشده است.

1. Elasmobranches
2. Holocephalans
3. Chimaeroid
4. Brachiopterygians (bichirs)
5. Holosteans (bowfin, gars)
6. Paddle fish
7. Coelacanths (Latimeria)
8. Myxinids (hag fishes)
9. Petromyzonids (lampreys)
10. Devonian

پروتئینهای سرم خون ماهیان با سایر مهره‌داران متفاوت می‌باشد. به عنوان مثال ماهیان فاقد بعضی از گلوبولینها به خصوص آنهائی که به عنوان ایمنوگلوبولینهای مهره‌داران عالی به شمار می‌روند هستند. مطالعات محققین نشان می‌دهد که ایمنوگلوبولینها در ماهیان همگی جزء ماکروگلوبولینها هستند و مشابه IgM انسان می‌باشد (۱۶، ۱۳، ۱۲، ۱۱، ۱۰).

ایمنوگلوبولینها (پادتنها) اساساً توسط پلاسموسیتما تولید میتوند که از سلولهای B مشتق شده‌اند، ماهیان استخوانی فرایندهای ایمنی بسیار پیشرفته‌ای را نشان می‌دهند همین امر نیز در الاسموبرانش‌ها (کوسه‌ها، سفره ماهیان) دیده می‌شود (۸).



سیستم ایمنی در ماهیان دهان گرد (لامپری، مارماهی انگلی) بسیار کم توسعه یافته است.

پلاسموسیتها که سلولهای ترشح کننده ایمنوگلوبولین در ماهیان می‌باشند از B لنفوسیتها مشتق می‌شوند و با روشهای میکروسکوپ الکترونی در بافتهای لنفومیلوئید همه گروههای اصلی مهره‌داران حتی در ماهیان دهان

گرد مشخص شده‌اند با این وجود پادتنهای احتمالی به طور همه جانبه توسط پلاسموسیتها تولید نمی‌شوند بلکه سایر انواع گلبولهای سفید ماهیان نیز آنها را می‌سازند (۸).

بررسی‌های ایمنوتوکسیکولوژی نشان می‌دهد که سیستم ایمنی ماهیان تحت تاثیر سموم محیطی تخریب می‌شوند و مطالعات خانم دکتر دونیر و دکتر سوویچی نیز حاکی از همین مسئله می‌باشد (۱۹، ۷، ۶).

بافت لنفومیلوئیدی اصلی پستانداران مغز استخوان، تیموس، طحال، گره‌های لنفاوی بافتهای لنفواپیتیال و بافت پیوندی می‌باشند.

بررسی مشخصات و اندازه‌گیری پروتئینها و ایمنوگلوبولین سرم خون ماهیان قزل‌آلا و آمور که از مهمترین ماهیان پرورشی در کارگاههای سرد آبی و گرم آبی کشورمان می‌باشد، اطلاعات بسیار مهمی را در رابطه با وضعیت کیفی و کمی جیره غذایی آنان، روش غذادهی و همچنین بررسی وضعیت سیستم ایمنی آنان در شرایط فیزیولوژیکی و طبیعی می‌دهد. ارزیابی پروتئینهای سرم خون این ماهیان و تعیین مقادیر ایمنوگلوبولین آنان در شرایط آب و هوای ایران از مهمترین اهداف این پروژه می‌باشد و همچنین این مطالعه مقدمه‌ای جهت تحقیقات آینده برای اجرای واکسیناسیون ماهیان پرورشی در ایران محسوب می‌گردد.

۱-۱- بررسی مطالعات سایر محققین

عوامل مختلفی می‌تواند مقدار پروتئین‌های سرم ماهیان را تحت تاثیر قرار بدهد. از مهمترین این عوامل بیماریهای عفونی، واکسیناسیون و کمیت و کیفیت جیره غذائی ماهیان و درجه حرارت آب استخرهای پرورش می‌باشد. غذای طبیعی اکثر ماهیان غنی از پروتئین می‌باشد، بنابراین باید در هنگام پرورش ماهیان به این نکته توجه دقیقی مبذول نمود. حداقل میزان پروتئین خالص مورد نیاز ماهیان به میزان اسید آمینه‌هایی که از هر منبع پروتئین به

دست می‌آید بستگی دارد، این میزان اغلب به عنوان کیفیت پروتئین بیان می‌گردد. مقدار پروتئین خالص مورد نیاز ماهیان بین حداقل ۲۵ درصد برای گربه ماهی بالغ تا ۵۶ درصد برای آزاد ماهی نابالغ (چینوک) تعیین شده است.

جدول شماره ۲:میزان پروتئین مورد نیاز هفت گونه ماهی بر حسب درصد در جیره غذایی آنان (۱۵)

نام ماهی	بچه ماهی	دوران رشد	ماهی بالغ
گربه ماهی	۳۵-۴۰	۲۵-۳۶	۲۵-۳۲
قزل‌آلا رنگین کمان	۳۸-۴۰	۳۶-۳۸	۳۴-۳۶
چینوک سالمون	۴۷-۵۶	۴۳-۴۷	۴۰-۴۲
کپور	۴۳-۴۷	۳۷-۴۲	۲۸-۳۲
مارماهی	۵۰-۵۶	۴۵-۵۰	۰۰-۰۰
ماهی آیو (Ayu)	۴۴-۵۱	۴۵-۴۸	۰۰-۰۰
ماهی سیم (دریای سرخ)	۴۵-۵۴	۴۳-۴۸	۰۰-۰۰
ماهی خاردار دهان کوچک	۰۰-۴۵	۰۰-۰۰	۰۰-۰۰
ماهی خاردار دهان بزرگ	۴۰-۴۱	۰۰-۰۰	۰۰-۰۰

با این وجود کیفیت پروتیئن، قابلیت هضم آنها و در دسترس بودن اسید آمینه‌های موجود در پروتئین جیره باید مورد توجه قرار گیرد تا اطمینان یابیم مقدار پروتئین برای نیازمندیهای گوشتی ماهیانی که مورد پرورش قرار می‌گیرند مناسب و کافی است.

بیشترین کوششها برای دانستن نیازمندیهای غذایی ماهیان بر روی ماهیان قزل‌آلا و آزاد انجام شده است و اخیراً نیز مطالعاتی جهت دانستن نیازمندیهای ماهیان همه چیزخوار و گیاهخوار مانند کپور ماهیان و تیلاپیا انجام شده است (۱۵) اسیدهای آمینه واحد ساختمانی پروتئینها می‌باشند و علاوه بر شرکت در ساختمان پروتئینها نقش مهمی را در متابولیسم بافتهای بدن ایفاء می‌کنند، در ماهیان اسید آمینه‌هایی که در ساختمان پروتئینها شرکت دارند مشخص شده‌اند و آنها را به دو دسته ضروری و غیرضروری تقسیم کرده‌اند، مقادیر اسید آمینه‌های

ضروری که می‌بایستی در جیره روزانه شش گونه ماهی به قرار زیر موجود باشد در جدول شماره ۳ آمده است (۱۵):

جدول شماره ۳:نیازمندیهای شش گونه ماهی به اسید آمینه‌های ضروری: (بر حسب درصد)

	قزل‌آلا رنگین کمان	چنوک سالمون	مارماهی (جوان)	کپور (چینی)	کوهو سالمون	گربه ماهی
آرژنین	۲/۵	۲/۴	۱/۷	۱/۷	۲/۴	۲/۶
ایزولوسین	۰/۹	۰/۹	۱/۵	۱	–	۲/۴
لوسین	۱/۶	۱/۶	۱/۷	۱/۵	–	۳/۲
لیزین	۲	۲	۲	۳/۵	۱/۵	۱/۲
ترونین	۰/۹	۰/۹	۱/۵	۲/۴	–	۱/۸
والین	۱/۳	۱/۳	۱/۵	۲/۳	–	۳/۳
متیونین	۱/۵(a)	۱/۵(a)	۲/۱(a)	۱/۲(c)	۱/۵(a)	۲/۱(a)
فنل آلانین	۲/۱ (b)	۲/۱ (b)	۲ (b)	۴ (b)	–	۴/۶
تریپتوفان	۰/۲	۰/۲	۰/۴	۱	۰/۲	۰/۵
هیستیدین	۰/۷	۰/۷	۰/۸	۱/۳	۰/۷	۱/۴

A: بیش از دو سوم متیونین ممکن است از سیستین تهیه گردد.

B: بیش از یک پنجم فنیل آلانین ممکن است از تیروزین تهیه گردد.

C: متیونین + سیستین

در صورتی‌که جیره غذایی ماهیان فاقد اسید آمینه‌های فوق باشند اختلالات رشد در ماهیان به وجود خواهد آمد. برای مثال کمبود تریپتوفان باعث بیماری اسکولیوزیس[1] و لردوزیس[2] در ماهی آزاد و قزل‌آلا می‌گردد (۱۷، ۱۵، ۱۵، ۹) و افزایش مقدار آرژنین در جیره غذایی قزل‌آلا می‌تواند باعث افزایش چشمگیر رشد آنان شود (۹).

1. Scoliosis
2. Lordosis

بعضی از آزمایش‌ها جهت تعیین نیازمندیهای پروتئین در مورد ماهی آزاد، ارتباط مستقیمی را بین مقادیر مورد نیاز پروتئین و تغییرات درجه حرارت آب نشان دادند، به عنوان مثال قزل‌آلا *Oncorhynchus ishawytsha* در آب ۷ درجه سانتی‌گراد تقریبا به ۴۰ درصد پروتئین با ترکیبی از اسید آمینه های مشابه تخم ماهی نیاز دارند تا حداکثر رشد را بنماید همین ماهی در آب ۱۵ درجه به ۵۰ درصد پروتئین نیاز دارد. برعکس ماهی قزل‌آلای رنگین کمان *Oncorhynchus mykiss* که تحت رژیم غذای تجربی قرار گرفته بود با پروتئین‌های ۳۵، ۴۰ و ۴۵ درصد در حرارت‌های ۹، ۱۲، ۱۵ و ۱۸ درجه سانتی‌گراد هیچ تفاوتی را از لحاظ وزنی نشان نداد. همچنین در آزمایش دیگری با حرارتهای ۹، ۱۵ و ۱۸ درجه که تصور می‌شد این فاصله مشخص بین حرارت موثر باشد، همین نتیجه گرفته شد (۹). لذا به نظر می‌رسد که نیاز بیشتر ماهی قزل‌آلا به پروتئین در حرارت بالاتر با افزایش مصرف جیره‌های غذایی که حاوی پروتئین کمتری هستند نسبت مستقیم دارد. ماهی آزاد و قزل‌آلا کفشک ماهیان پروتئین بیشتری نسبت به آنچه که برای حداکثر رشد لازم دارند مصرف می‌کنند این امر به دلیل نقض در دفع مستقیم مواد نیتروژنی به شکل ترکیبات محلول آمونیاکی از طریق بافت آبشش به محیط آب می‌باشد (۹) این سیستم برای دفع نیتروژن نسبت به سیستمی که پرندگان و پستانداران برای دفع نیتروژن به کار می‌برند، ناقص‌تر است.

پروتئین‌ها در بدن می‌توانند در موارد زیادی به شرح ذیل عمل کنند:

* نقش اصلی را به عنوان ترمیم کننده بافتهای بدن دارند.

* در ایجاد انرژی نقش دارند و در مواقع نبودن چربی، قند و پروتئین در جیره غذایی تا حدودی به مصرف می‌رسند.

* در مواقع گرسنگی و کمبود مواد قندی و یا چربی پروتئین‌ها قابل تبدیل به این دو دسته از ترکیبات می‌باشد.

* در عمل انتقال مواد به ویژه مواد معدنی و نمکها در خون شرکت دارند.

* پروتئینهای درون سلولی و برون سلولی به ویژه آلبومین در ایجاد و تنظیم فشار اسمزی شرکت دارند.

* به علت داشتن خواص آمفوتری عمل تامپون (بافری) را به عهده دارند.

* به عنوان آنزیم یا هورمون در فعل و انفعالات بدن شرکت می‌کنند.

* با جذب مواد معدنی خاصی عمل انتقال تحریکات عصبی را عهده دارند.

پروتئینهای پلاسما شامل آلبومین، گلوبولینها و فیبرینوژن هستند، در حالیکه سرم حاوی فیبریوژن نمی‌باشد. در اندازه‌گیری‌های شیمیایی آلبومین و گلوبولینها به طور تام تعیین می‌شوند، در حالی که در اثر الکتروفورز گلوبولینها به اجزاء کوچکتری تقسیم می‌شوند که شامل آلفا یک، آلفا دو، بتا یک و بتا دو و گاماگلوبولین می‌باشد.

ایمنوگلبولین ماهیان یک ماکروگلبولین می‌باشد و شباهت بسیار زیادی به IgM اساسی دارد. در بررسیهای انجام شده بر روی سرم ماهی کاد (کادوس مورا) ایمنوگلوبولین ماهی را توسط آمونیم سولفیت رسوب دادند و وزن مولکولی آن را توسط روش کروماتوگرافی اندازه‌گیری نمودند، نتایج حاصل از الکتروفورز سرم ماهی کاد و غربال نمودن آن توسط کروماتوگرافی نشان داد که وزن کامل ملکول IgM در این ماهی ۸۵۱ کیلو دالتون و زنجیره سبک و سنگین آن به ترتیب ۸۱ و ۲۷/۵ کیلو دالتون می‌باشد لذا حدس می‌زنند که IgM در ماهیان دارای ساختمانی تترامریک بوده و از نظر ترکیبات اسید آمینه مشابه ایمنوگلوبولینهای سایر گونه‌های ماهیان، و از نظر وزن ملکولی مانند IgM پستانداران می‌باشد (۱۶). همچنین در مطالعه دیگری، ماهیان قزل‌آلا را به طور تجربی با ویروس عفونت‌زای نکروز پانکراس تماس داده و آنها را آلوده ساختند و آنتی‌بادی ضد ویروس را در سرم و سایر ترشحات مختلف ماهی پیدا کردند و توسط سرم ضد IgM ماهی قزل‌آلا در خرگوش آن را شناسایی

نمودند و آنتی بادی ضد ویروس را به مقدار زیاد بر روی جلد، موکوس روده و به مقدار کمتر در مایع سمینال یافتند (۵) همچنین خصوصیات بیوشیمیایی IgM جدا شده از روی موکوس پوست ماهی ایو Ayu (*Plecoglossus altivelis*) با آنتی‌بادی سرم همان ماهی مقایسه شد و اختلاف خاصی در آنها مشاهده نکردند (۱۲).

در شرایط طبیعی زندگی و در مراحل مختلف رشد مقدار غلظت ایمنوگلوبولین در سرم خون ماهیان بستگی مستقیم به سن آنان دارد. مقدار غلظت IgM بچه ماهیان مازوسالمون در مراحل اولیه رشد آنان توسط روش رادیال ایمنودیفوژیون مورد مطالعه قرار گرفت. مقدار غلظت ایمنوگلوبولین آنان در ۸۸ روزکی ۴۶/۵ mg/ml و در سن ۲۳۵ روزکی به بیش از ۱۰۰mg/ml افزایش یافت. مقدار غلظت IgM در این ماهی به طور کاملاً مشخصی در سنین بین ۴۲۹-۲۵۱ روزکی افزایش یافت و به ۶۹۱+۳۷ mg/ml رسید (۱۱).

ضرورت مطالعات ایمنولوژیکی ماهیان پرورشی در کارگاههای تکثیر و پرورش بسیار مهم می‌باشد و این مطالعات تاکنون در ایران انجام نشده است به عنوان مثال واکنشهای اتو ایمنی که بر علیه اسپرم ماهیان در هنگام تخمکشی و لقاح در ماهیان به وجود می‌آید می‌تواند باعث از بین رفتن اسپرمهای مولد نر گردد. محققین نشان داده‌اند که عمل آگلوتیناسیون اسپرم (SAF) در سرم ماهیان مولد ماده وجود دارد (۱۴) که می‌تواند عامل بسیار مهمی در وقفه برنامه‌های تکثیر و پرورش ماهیان محسوب گردد.

عامل (SAF) توسط محققین خالص‌سازی گردید و آشکارا مشخص شد که یک IgM با ملکول تترامریک با وزن ملکولی ۷۶۰ کیلو دالتون است که قادر به واکنش با اسپرم سایر گونه‌های ماهیان استخوانی نیز می‌باشد (۱۴).

۲-۱- مشخصات ماهی آمور[1]

کپور علفخوار (ماهی آمور) :

اسم علمی آن *Ctenopharyngodon idella*است . نام لاتین آن Grass Carpمی‌باشد .

این ماهی اولین بار در ایران در سال ۱۳۴۶ از شوروی خریداری شد . و هدف از خرید آن کنترل رشد گیاهان تالاب انزلی بود .

بعدا مولدین آن توسط شرکت دامپروی سفیدرود از کشور رومانی به ایران وارد شد و از آن به بعد تکثیر و پرورش دردامپروی سفیدرود و دیگر مراکز شیلاتی و سپس در مزارع تکثیر بخش خصوصی اقدام شد.این ماهی به نام ماهی آمور سفید نیز معروف می‌باشد و مشخصات آن عبارت است از بدن کشیده (دراز) ولی عریض و پهن نمی‌باشد. باله پشتی به موازات باله‌های شکمی قرار دارد و دارای سه شعاع غیرمنشعب، هفت شعاع منشعب و باله مخرجی دارای سه شعاع غیر منشعب، هشت شعاع منشعب می‌باشد. دهان نیمه هلالی است و دندان‌های حلقی دو ردیفی (۲/۵ تا ۴/۲ یا ۲/۴ تا ۴/۲) و دندانه‌دار می‌باشد. در خط جانبی ۴۰ تا ۴۷ عدد فلس وجود دارد. قوس عنبیه چشم به رنگ طلایی، باله پشتی و دمی تیره رنگ، بقیه باله‌ها روشن‌تر و ناحیه شکم به رنگ طلایی روشن است. طول بدن ماهی آمور تا ۱۲۰ و به طور متوسط ۶۵ سانتی‌متر و وزن آن ۳۰ و به طور متوسط به ۴/۵ کیلوگرم می‌رسد.

1. *Ctenopharyngodon idella* Valenciennes (1844)

۱-۲-۱- زیست‌شناسی ماهی آمور

ماهی علفخوار در رودخانه‌های با جریان سریع زندگی می‌کند. این ماهی در زادگاه اصلی خود (چین) در رودخانه‌های سیلابی با آب گل‌آلود و بستر پوشیده از سنگریزه به صورت دسته جمعی تخم‌ریزی می‌کنند. تخم‌ریزی در دمای ۲۱-۲۳ درجه سانتی‌گراد صورت می‌گیرد. شرایط مناسب برای لاروها، غوطه‌وری تخم‌ها می‌باشد که در رودخانه‌ها و در فصل سیلابی چنین شرایطی تامین می‌گردد. لاروها در ابتدا از مواد غذایی موجود در کیسه زرده خود تغذیه می‌کنند و هنگامی‌که به طول ۷-۶ میلی‌متر رسیدند تغذیه فعال خود را آغاز می‌کنند. بچه ماهیان ابتدا از جلبکها و سپس از گیاهان آبزی و همچنین از لاروهای شیرونومیده، بی‌مهرگان و سخت‌پوستان تغذیه می‌کنند (۲) امروزه از این ماهی برای جلوگیری از رویش شدید گیاهی در آب‌بندانهای طبیعی استفاده می‌شود.

تعداد این ماهی در رودخانه‌های حوزه آبریز دریای خزر فعلاً زیاد نیست. ولی طبق آمارگیری که از حوزه آبریز رودخانه ولگا به عمل آمده تعداد ۱۰ تا ۱۵ هزار عدد آمور ۶ سال به بالا زندگی می‌کند. ماهیان آمور در استخرهای پرورش به صورت پلی کالچرو در مدت دو سال به وزن ۱۳۰۰-۱۶۰۰ گرم و پس از ۳ سال به وزن

۲۵۰۰ تا ۲۸۰۰ گرم نیز می‌رسند. در قسمت جنوبی دریای خزر (سواحل ایران) نیز طی ۱۰ سال اخیر هر ساله تعداد قابل توجهی ماهی آمور به مرداب بندر انزلی، سد ارس، مرداب‌ها و خلیج‌ها و تعدادی از آبگیرهای دیگر منتقل که در بعضی مواقع ماهیان ۱۸ کیلویی و بیشتر از مرداب صید شده است.

۳-۱- مشخصات ماهی قزل‌آلای رنگین کمان[1]

قزل‌آلای رنگین کمان : این ماهی در آبهای سرد و غنی از اکسیژن زندگی می‌کند این ماهی بومی سواحل اقیانوس آرام و آمریکای شمالی است و در سال ۱۸۸۰ به اروپا آورده شد و به تدریج به نقاط مستعد در سراسر دنیا معرفی شد. بدن این ماهی پوشیده از خال سیاه ستاره‌ای شکل است وماهیان دارای دو نوار به صورت رنگین‌کمان در دو طرف سطح بدن می‌باشند . نام علمی آن*Onchorhynchus mykiss* و از خانواده Salmonidae می‌باشد. زمان تخم‌ریزی این ماهی از ماه دی تا اردیبهشت ماه است وزن ماهی قزل‌آلا در شرایط طبیعی در بعضی دریاچه‌ها به ۹ کیلوگرم می‌رسد . به نظر می‌رسد که بهترین شرایط رشد در شرایط طبیعی در دریاچه‌های کم عمق با سنگ‌های آهکی و PHکم قلیایی دارد.

این ماهی از خانواده آزاد ماهیان محسوب می‌گردد. این خانواده دارای شش جنس به نام‌های جنس سالمو[2]، جنس هوکو[3]، جنس اونکورینکوس[4]، جنس سالموتیموس[5]، جنس سالولینوس[6] جنس استئنودوس[7] می‌باشد.

این ماهی دارای یک نوار پهن به صورت رنگین کمان در هر طرف بدن می‌باشد. بر روی سر، بدن، پشت، باله چربی و باله دمی این ماهی لکه‌های تیره رنگ دیده می‌شود. حداکثر طول آنها به ۷۰ سانتی‌متر و وزن بدن به ۷

1. *Oncorhynchus mykiss*
2. Salmo
3. Hucho
4. Oncorhynchus
5. Salmotemus
6. Salvelinus
7. Stenodus

کیلوگرم می‌رسد. از سال ۱۸۸۰ دو نوع از این ماهیان از آمریکای شمالی به سایر نقاط دنیا انتقال یافتند. (۲) باله پشتی دارای چهار تیغه سخت و ده تیغه نرم است. در خط جانبی ۱۳۰-۱۳۵ فلس وجود دارند. خارهای برانشی ۱۷-۱۶ عدد و تیغ‌های برانشی[1] ۱۲-۱۱ عدد می‌باشد. دارای نقاط بسیار زیاد تیره در بالای خط جانبی هستند در منطقه ساقه دمی نیز این نقاط بر سطح فوقانی و تحتانی خط جانبی دیده می‌شوند.

در حال حاضر ماهی قزل‌آلای رنگین کمان به صورت ماهی شماره یک کارگاههای تکثیر و پرورش ماهیان سرد آبی در بیشتر نقاط جهان از جمله ایران درآمده است. از خصوصیاتی که این ماهی را مورد توجه قرار داده، سازش خوب آن با شرایط پرورش متراکم است. از طرف دیگر این ماهی در انتخاب غذا زیاد سختگیر نیست و از سرعت رشد خوبی نیز برخوردار می‌باشد. قزل‌آلای رنگین کمان جهت ماهی‌دار کردن آبهای داخلی که واجد شرایط لازم بوم شناختی آن هستند بسیار مناسب می‌باشد. با توجه به این مطالب ماهی قزل‌آلای رنگین کمان دارای ارزش اقتصادی فراوان است.

1. Gill rakers

۲- مواد و روشها

جداسازی و اندازه‌گیری و تعیین مقادیر پروتئینهای سرم ماهیان مورد آزمایش از روش الکتروفورزیس سرم ماهی بر روی ژل آکاروز با استفاده از کیت هیدر اژل پروتئین ساخت شرکت سبیا پرفرانس[1] فرانسه و برای تعیین مقدار پروتئین تام سرم از دستگاه اتوآنالایزر هیتاچی مدل ۷۰۴ استفاده گردید و سپس با استفاده از روش رسوب با نمک (سولفات آمونیوم) ایمنوگلوبولینهای ماهیان تقریباً خالص‌سازی شدند و با به کارگیری روش الکتروفورزیس و ایمونو الکتروفورزیس محل دقیق الکتروفورتیکی آنان شناسایی گردید. وسایل و موادی که در انجام این پروژه مورد استفاده واقع شدند عبارتند از:

* وسایل و تجهیزات:

- سیستم کامل الکتروفورز سبیا پرفرانس مانند منبع تغذیه مدل GD 61 D، تانک الکتروفورز مدل K20، میکرو پیپت، دستگاه تولید هوای گرم، دستگاه دانسیتومتر با فیلتر زرد ۵۸۰ نانومتر، لام میکروسکپی ۲۵mm x ۷۵ mm جهت ایمونو الکتروفورزیس مخلوط کننده مغناطیسی و سانتریفیوژ با حداقل ۳۰۰۰ دور در دقیقه.

- دستگاه اتو آنالایزر هیتاچی مدل ۷۰۴، پروتئین تام سرم ماهیان توسط این دستگاه اندازه‌گیری گردید.

* مواد شیمیایی استفاده شده در مراحل مختلف آزمایشها به ترتیب عبارتند از:

برای مراحله الکتروفورز:

بافر باربیتال سدیم PH = 8.6 جهت الکتروفورزیس

تریس: /2 گرم در لیتر آب مقطر

باربیتال: گرم در لیتر آب مقطر

1. Sebia preference

سدیم باربیتال: گرم در لیتر آب مقطر

سدیم آزاید: گرم در لیتر آب مقطر

بافر تریس باربیتال PH: 8.6 جهت ایمونو الکتروفورزیس

تریس: ۲۲

اسید باربیتال: ۴۴

لاکتاک کلسیم: ۰/۵۸۵

سدیم آزاید: ۰/۶۲۵

آکاروز خالص تایپ L

سرم فیزیولوژی ۱ سالین (۸/۵ گرم سدیم کلرید در یک لیتر آب مقطر)

- محلول رنگ‌آمیزی: - محلول رنگ‌بر:

آمیدوبلک: ۱ گرم اسید استیک غلیظ: 5ml

اسید استیک غلیظ: 5ml آب مقطر: ۹۵ml

آب مقطر: ۹۵ml

- محلول نمکی جهت رسوب ایمونوگلوبولینها:

سولفات آمونیوم ۷۴ گرم + آب مقطر ۱۰۰ میلی‌لیتر

- محلول فیکساسیون پروتئین‌های الکتروفورز شده:

اتانول ۶۰۰ میلی‌لیتر

اسید استیک ۱۰۰ میلی‌لیتر

آب مقطر ۳۰۰ میلی‌لیتر

- آنتی سرم پلی والان ضد سرم ماهی

- سرم خون ماهیان آمور و قزل‌آلا:

ماهی قزل‌آلا:

تعداد ۲۲۰ قطعه ماهی قزل‌آلا از دو ناحیه متفاوت پرورش ماهیان سرد آبی یکی در فیروزکوه و دیگری در کلاردشت در سنین بین ۱۶-۷ ماهگی نمونه‌برداری شدند.

طرز تهیه سرم ماهیان

ماهیان نمونه‌برداری شده تماما سالم بودند و سابقه یا علائم بیماری در آن‌ها دیده نمی‌شد. ابتدا آن‌ها بیومتری کرده و با دقت یک گرم توزین نموده. سپس همکارم سطح بدن ماهیان را با حوله تمیزی خشک نموده و ماهی را در میان حوله طوری نگه می‌داشت که سطح شکم ماهی به طرف بالا قرار می‌گرفت و ماهی بی‌حرکت می‌ماند. در این حالت با دست چپ قسمتی از باله دمی را به طرف پائین می‌کشیدم تا خط عرضی بین آنان و باله دمی کمی به طرف بالا انحنا پیدا کند. سپس سوزن را از بین فلس‌های ماهی به آرامی تا استخوان مهره دمی فرو برده و در لحظه برخوردسوزن به استخوان ستون فقرات با کشیدن پیستون سرنگ خونگیری انجام می‌گرفت. بعد از تهیه ۳ تا ۴ میلی لیتر خون ماهیان کمی بی‌حال می‌شدند اما بعد از مدّتی سرحال می‌آمدند و به آرامی به شنا می‌پرداختند و تقریبا در این روش خون‌گیری تلفاتی به وجود نیامد.

نحوه خونگیری از سیاهرگ دمی قزل آلا

جدول شماره ٤: زمان، سن و تعداد ماهیان قزل‌آلا نمونه‌برداری شده:

زمان	سال ۱۳۷۲						سال ۱۳۷۳				
	مهر	آبان	آذر	دی	بهمن	اسفند	اردیبهشت		خرداد		
سن	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴	۱۵	۱۶	ماهگی
تعداد	۱۰	۱۵	۲۸	۲۹	۲۹	۲۹	--	۳۹	--	۴۳	جمع: ۲۲۲

- ماهی آمور:

تعداد ۱۰ قطعه ماهی آمور از دو کارگاه تکثیر و پرورش ماهیان گرم آبی در حومه ساری (سمسکنده) به نام کارگاه نصر و دیگری در حومه بهشهر (امیر آباد) به نام کارگاه آقای حاج مبارکی در سنین بین ۱۲-۸ ماهگی نمونه‌برداری شدند.

جدول شماره ٥: زمان، سن و تعداد ماهیان آمور نمونه‌برداری شده:

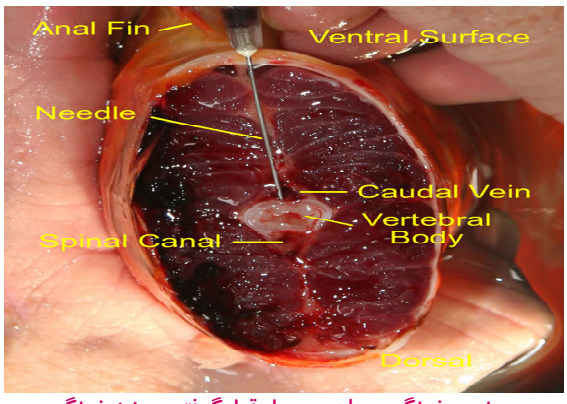
زمان	سال ۱۳۷۲	سال ۱۳۷۳				
	اسفند	فروردین	اردیبهشت	خرداد	تیر	
سن	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	ماهگی
تعداد	۲۶	۶	۱۴	۴۵	۱۹	جمع: ۱۱۰

زمان شروع نمونه‌برداری برای ماهی آمور را در سن دو ماهگی پیش‌بینی کرده بودیم، اما به واسطه رشد کم و پائین بودن وزن بدن آنها خونگیری و تهیه سرم به اندازه کافی مقدور نبود به ناچار زمان نمونه‌برداری را تا سن ۸ ماهگی که به وزن و رشد مناسبی جهت خونگیری و تهیه سرم رسیده بودند به تعویق انداختیم.

طرز تهیه سرم ماهیان:

ماهیان نمونه‌برداری شده تماما سالم بودند و سابقه یا علائم بیماری در آنها دیده نمی‌شد. ابتدا آنها را بیومتری کرده و با دقت یک گرم توزین نمودیم. سپس همکارم سطح بدن ماهیان را با حوله تمیزی خشک نموده و ماهی را در میان حوله طوری نگه می‌داشت که سطح شکم ماهی به طرف بالا قرار می‌گرفت و ماهی بی‌حرکت باقی می‌ماند، در این حالت با دست چپ قسمتی از باله دمی را به طرف پائین می‌کشیدم تا خط فرضی بین آنال و باله دمی کمی به طرف بالا انحنا پیدا کند، سپس سوزن را از بین فلسهای ماهی به آرامی تا استخوان مهره دمی فرو برده و در لحظه برخورد سوزن به استخوان ستون فقرات با کشیدن پیستون سرنگ خونگیری انجام می‌گرفت. بعد از تهیه ۴-۲ میلی‌لیتر خون ماهیان کمی بی‌حال می‌شدند اما بعد از مدتی سرحال می‌آمدند و به آرامی به شنا می‌پرداختند و تقریباً در این روش خون‌گیری تلفاتی به وجود نیامد.

نحوه خونگیری ماهی و محل قرارگرفتن سوزن



نحوه خونگیری ماهی و محل قرارگرفتن سوزن خونگیری

نحوه خونگیری ماهی آمور تابستان ۱۳۷۲

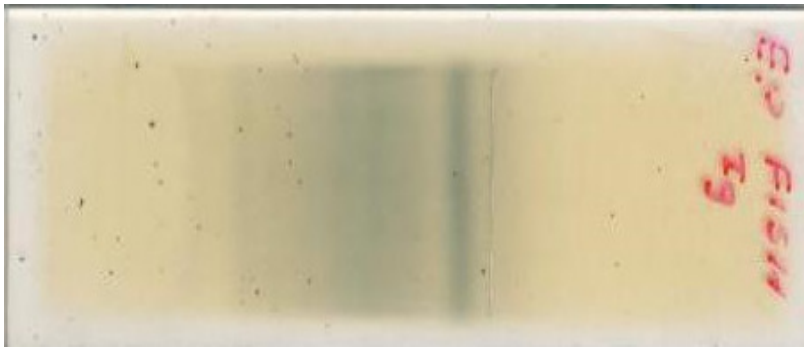
نحوه خونگیری ماهی آمور تابستان ۱۳۷۲

خون درون سرنگ بدون وقفه و به آرامی به درون لوله‌های کوچک آزمایش ریخته می‌شد و لوله‌ها به صورت مورب در جای ساکنی قرار می‌گرفتند تا حداکثر سرم تهیه گردد سپس لوله‌ها در ۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شده و سرم هر ماهی جداگانه مورد الکتروفورز و آزمایش تعیین پروتئین قرار گرفتند.

۱-۲- خالص‌سازی ایمنوگلوبولین ماهیان

برای خالص نمودن ایمنوگلوبولین ماهیان قزل‌آلا و آمور از سولفات آمونیوم ۵۰ درصد استفاده نمودیم. بدین طریق که به هم حجم سرم ماهی در حالی که در یک ظرف یخ قرار داشت، قطره قطره از محلول سولفات آمونیم اشباع شده و سرد $4^{\circ}C$ اضافه نموده مرتب هم زده و مجموعه را در ۱۰/۰۰۰ دور به مدت ۳۰ دقیقه در سانتریفوژ یخچال‌دار سانتریفوژ کرده، سپس مایع رویی رسوب را دور ریخته و رسوب حاصل را در بافر فسفات به حجم اولیه سرم حل نموده و مجدداً مطابق روش قبل با هم حجم آن سولفات آمونیم اشباع شده اضافه نمودیم تا رسوب شستشو گردد پس از سانتریفوژ دوباره مایع رویی را دور ریخته و رسوب را در بافر فسفات حل کردیم و برای خارج نمودن سولفات آمونیم، مجموعه را در کیسه‌های دیالیز به مدت ۴۸ ساعت با استفاده از بافر فسفات دیالیز کرده و در این مدت چند بار بافر را تعویض نمودیم محلول نهایی در داخل کیسه دیالیز که اکثراً شامل گاماگلوبولین ماهیان می‌باشد عاری از سولفات آمونیم خواهد بود. در این روش آلبومین، آلفا و بتا گلوبولین‌ها با

سولفات آمونیم ۵۰٪ رسوب نخواهند کرد و در روی رسوب باقی می‌مانند که دور ریخته خواهند شد. برای تائید تشخیص ایمنوگلوبولین ماهی، محلول نهایی داخل کیسه دیالیز را روی ژل آکاروز الکتروفورز نمودیم و محل دقیق الکتروفورتیکی Ig ماهیان مورد آزمایش را مشخص نمودیم.

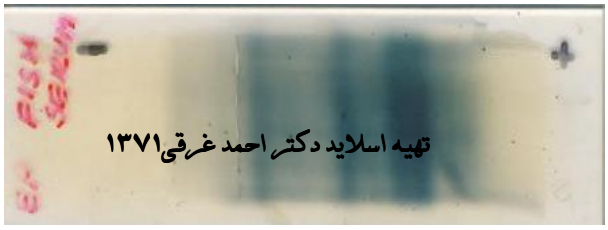


IgM **خالص شده ماهی (تهیه عکس دکتر احمد غرقی ۱۳۷۱)**

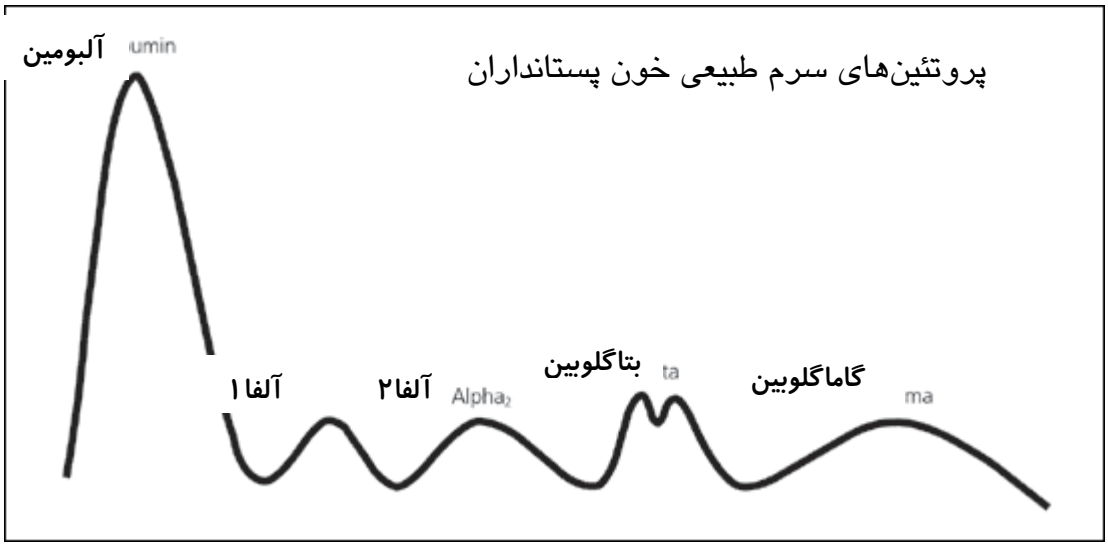
۳- نتایج

انجام این پروژه به واسطه تازگی موضوع و نبودن مطالعات و تجربیات قبلی در ایران کاملاً تحقیقاتی و توصیفی می‌باشد و جداسازی و اندازه‌گیری و تعیین مقادیر پروتئین‌ها و ایمنوگلوبولین‌های ماهیان قزل‌آلا و آمور در شرایط آب و هوایی ایران از مهمترین اهداف این پروژه می‌باشد.

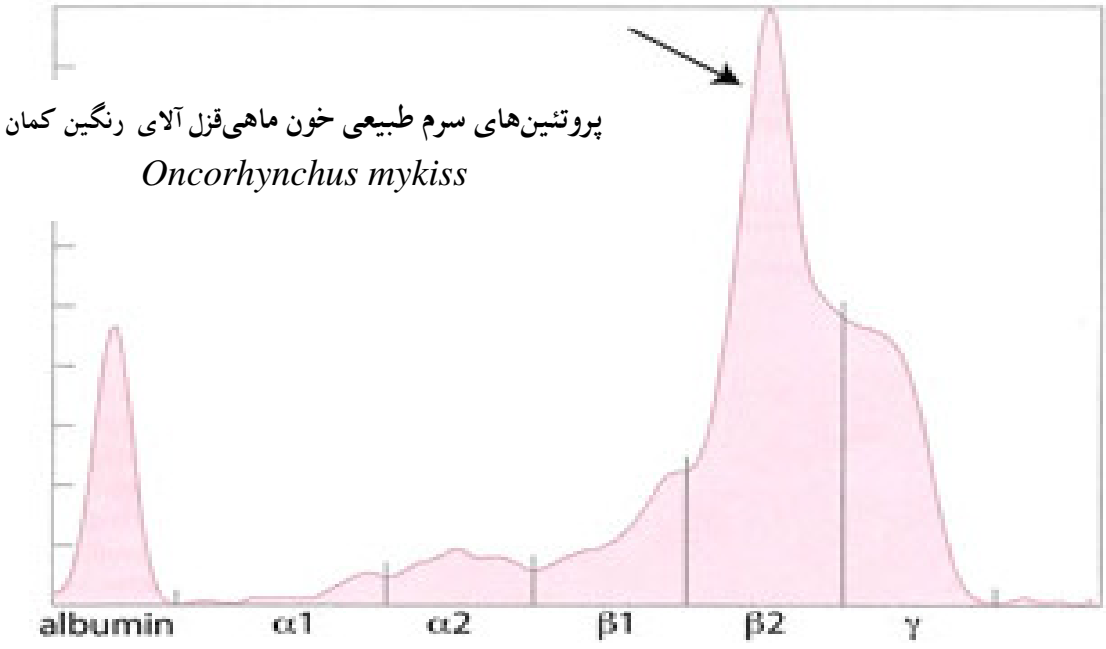
در این بررسی با روش الکتروفورز و استفاده از جریان الکتریکی پروتئین‌های موجود در سرم خون ماهیان قزل‌آلا و آمور را بر اساس شارژ الکتریکی آنها از یکدیگر جدا نموده و مقادیر آنها را با استفاده از دستگاه دانسیتومتر با فیلتر ۵۸۰ نانومتر اندازه‌گیری نمودیم. هنگامی که مجموع پروتئین‌ها را در میدان الکتریکی قرار دادیم با توجه به بار الکتریکی هر کدام از پروتئین‌های سرم ماهیان به یکی از دو قطب مثبت (آند) و یا منفی (کاتد) مهاجرت نمودند، سپس با رنگ‌آمیزی باندهای حاصل از مهاجرت پروتئین‌ها و پس از ترسیم منحنی‌های مربوط به هر یک از باندها توسط دستگاه دانسیتومتر با فیلتر زرد ۵۸۰ نانومتر، توانستیم علاوه بر بررسی‌های کیفی، سنجش‌های کمی را نیز بر روی هر یک از اجزاء پروتئین‌های سرم ماهیان قزل‌آلا و آمور به عمل آوریم. پروتئین سرم خون این ماهیان به وسیله الکتروفورز از همدیگر مجزا شده و دارای شش باند مشخص می‌باشد که در شکل صفحه ۱۵ نشان داده شده است.



پروتئین های سرم خون ماهی قزل آلای رنگین کمان

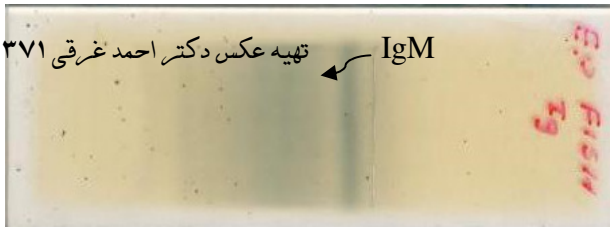


تصویر یک: منحنی الکتروفورتیکی پروتئین‌های سرم طبیعی خون ماهیقزل آلای رنگین کمان



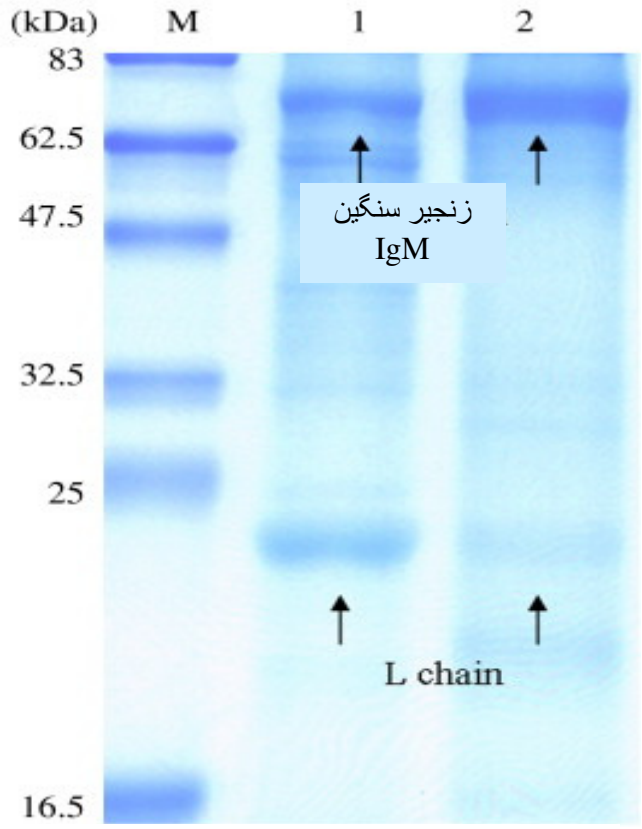
در این بررسی جهت تعیین مقادیر Ig ماهیان و تعیین محل دقیق الکتروفورتیکی آن ابتدا Ig ماهیان را با استفاده از آمونیوم سولفات تا حدودی خالص نمودیم و سپس ایمنوگلوبولین نسبتا خالص شده را دوباره الکتروفورز

کردیم و با الکتروفورز سرم کامل ماهیان مقایسه به عمل آوردیم و مشخص گردید که Ig ماهیان بررسی شده در منطقه گاما و بتا قرار دارد لذا مجموع مقادیر مناطق بتا و گاما به عنوان مقدار Ig سرم ماهیان محاسبه و منظور گردید.

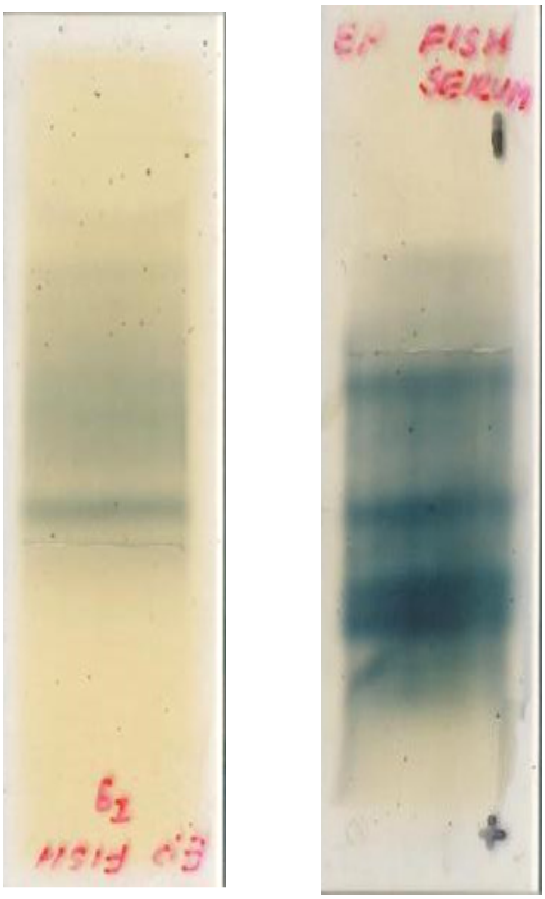


IgMخالص شده ماهی قزل آلای رنگین کمان

آزمایش‌های ایمنوفورتیک با استفاده از آنتی بادی پلی‌والان ضد سرم ماهی در خرگوش انجام گردید و نتایج حاصل از مطالعات الکتروفورتیکی نیز تائید گردید.

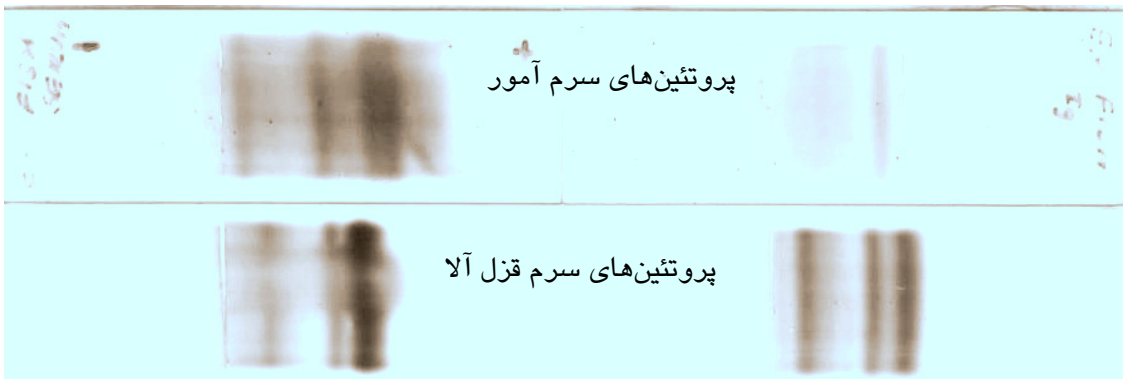


پروتئین های سرم ماهی آمور
Ctenopharyngodon idella



پروتئین های سرم ماهی قزل‌آلا و IgM خالص شده

به طوریکه در جداول ۶ و ۷ ملاحظه می گردد، میانگین گلبولین آلفا یک در قزل‌آلا ۱۷/۳ میلی گرم و در ماهی آمور ۶/۵ میلی گرم در میلی‌لیتر و میانگین گلبولین آلفا دو در سرم قزل‌آلا ۴/۴ میلی گرم و در ماهی آمور ۰/۴ گرم در میلی‌لیتر و میانگین IgM در قزل‌آلا ۴/۹۴ میلی گرم و در آمور ۳/۴۶ میلی گرم در میلی‌لیتر محاسبه گردید.



در شکل بالا مقادیر پروتئین‌های دو نمونه سرم خون ماهیان قزل‌آلا و آمور که مورد آزمایش الکتروفورزیس قرار گرفتند را نشان می‌دهد، سطح هر یک از منحنی‌ها متناسب با غلظت پروتئین‌های مربوط در سرم خون ماهیان و جداول شماره ۶ و ۷ نیز میانگین مقادیر پروتئین‌های سرم خون ماهی قزل‌آلا و آمور را در سنین مختلف نشان می‌دهد.

جدول شماره ٦ : میانگین مقادیر پروتئین‌های سرم خون ماهی قزل‌آلا در سنین مختلف رشد

جمع: ۲۲۲	۴۳	۲۹	۲۹	۲۹	۲۹	۲۸	۱۵	۱۰	تعداد ماهی
میانگین	خرداد	اردیبهشت	اسفند	بهمن	دی	آذر	آبان	مهر	زمان
کل	۱۶	۱۴	۱۲	۱۱	۱۰	۹	۸	۷	سن (ماه)
mg/ml	mg/ml	mg/ml	mg/ml	mg/ml	mg/ml	mg/ml	mg/ml	mg/ml	پروتئین
۳۸/۵	۳۷/۴	۳۷	۳۸/۲	۳۵/۳	۳۷/۲	۵۱	۳۲/۳	۳۹	TP mg/ml
۱۲	۱۱/۲	۱۰/۳	۱۰/۶	۱۰/۸	۱۱/۶	۱۶/۵	۱۱/۵	۱۲/۸	ALB mg/ml
۱۷/۳	۱۶/۵	۱۷/۳	۱۸/۷	۱۶/۵	۱۸/۶	۲۴/۱	۸/۱	۱۸/۲	A1 mg/ml
۴/۴	۴/۱	۳/۷	۴/۵	۳/۷	۲/۷	۴/۴	۷/۵	۴/۳	A2 mg/ml
۴/۹۴	۶	۶	۴/۶	۴/۲	۵/۲	۵/۳	۵/۲	۳/۳	IgM mg/ml

جدول شماره ۷ : میانگین مقادیر پروتئین‌های سرم خون ماهی آمور در سنین مختلف رشد

جمع: ۱۱۰	۱۹	۴۵	۱۴	۶	۲۶	تعداد ماهی
میانگین کل	تیر	خرداد	اردیبهشت	فروردین	اسفند	زمان
	۱۲	۱۱	۱۰	۹	۸	سن (ماه)
mg/ml	mg/ml	mg/ml	mg/ml	mg/ml	mg/ml	پروتئین
۱۹	۱۰/۲	۱۷/۶	۲۱/۶	۱۳/۷	۳۱/۶	TP mg/ml
۵	۲/۹	۲/۴	۶/۳	۵/۱	۷/۸	ALB mg/ml
۶/۵	۲/۸	۷/۷	۷/۱	¼	۱۰/۶	A1 mg/ml
۴	۲/۷	۲/۷	۴/۱	۲/۳	۱۰/۶	A2 mg/ml
۳/۴۶	۱/۸	۴/۷	۴/۳	۱/۱	۵/۴	IgM mg/ml

تمام ماهیان قزل‌آلا و آمور در شرایط پرورش در کارگاههای پرورشی نمونه‌برداری شدند و سرم خون آنان به روشی که شرح داده شد، تهیه گردید.

TP: پروتئین تام سرم

ALB: آلبومین سرم

γ1: آلفا یک گلوبولین سرم

γ2: آلفا دو گلوبولین سرم

IgM: ایمنوگلوبولین سرم

٤- بحث و نتیجه‌گیری

سیستم گردش خونی که مملو از سلولهای قرمز و سفید (اریتروسیت‌ها و لکوسیت‌ها) می‌باشد، از ویژگی‌های مشترک مهره‌داران به شمار می‌رود و احتمالا از مهره‌داران اولیه پرکامبرین به ارث رسیده است (۸). خون و لنف نقش مهمی در ثابت نگه داشتن محیط داخلی بدن دارند. حجم خون در ماهیان بین ۸-۲ درصد متغیر است.

ترکیبات مواد غیرآلی پلاسمای ماهیان با آب دریا بسیار شباهت دارد اما غلظت یونی یک سوم تا یک چهارم غلظت مواد غیرآلی اقیانوس‌ها می‌باشد.

مارماهیان (میکین) در این موضوع استثنا می‌باشد چرا که خون آنها هم غلظت با آب دریا است. اوره نقش مهمی در تنظیم اسمزی مایعات بدن در الاسموبراشها (کوسه و سفره ماهیان دارد. پروتئین‌های اصلی پلاسمای خون ماهیان گلبولینها هستند که قسمت اعظم آنتی‌بادی (ایمنوگلبولینها) را تشکیل می‌دهد. سلولهای قرمز به طور طبیعی ۹۸ تا ۹۹ درصد سلولهای خونی را شامل می‌شوند. مقدار حجم خون در ماهیان استخوانی نسبت به سایر مهره‌داران کم می‌باشند و حدود ۵٪ وزن بدن را تشکیل می‌دهد.

مقدار غلظت پروتئین پلاسما در ماهیان کمتر از مقدار پروتئین پلاسمای انسانی و حدود ۷ گرم در لیتر می‌باشد و این فاکتور در گونه‌های مختلف ماهیان بین ۱/۶۸ تا ۶/۱۹ گرم در لیتر متغیر می‌باشد (۱۷).

همچنین مقدار غلظت پروتئین در پلاسمای قزل‌آلای رنگین کمان سالم بین ۵۰-۳۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر گزارش شده است (et al, 1993) مقدار پروتئین در سرم ماهیان نیز ۳۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر گزارش شده است (۱۸).

لذا مقدار طبیعی پروتئین سرم در ماهیان قزل‌آلا بین ۷۰-۳۰ میلی‌گرم در میلی لیتر مورد توافق محققین می‌باشد.

مقدار ایمنوگلوبولین ماهیان در منابع معتبر بسیار متغیر گزارش شده است به عنوان مثال دکتر رونالد روبرنز در کتاب آسیب‌شناسی ماهیان (۱۹۸۹) مقدار ایمنوگلوبولین را در سرم ماهیان ۷-۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بیان می‌دارد در حالی که دکتر سویچی از آزمایشگاه آسیب‌شناسی و ایمنولوژی انسیتو شیلات لهستان و دکتر داگلاس اندرسون از آزمایشگاه تحقیقات بهداشت آبزیان در آمریکا، مقدار ایمنوگلوبولین در پلاسما قزل‌آلای طبیعی و سالم را بین ۲۰-۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر گزارش نموده‌اند (۱۸).

نمای شماره ۸:

مقدار طبیعی پروتئین تام و ایمنوگلوبولین در سرم و پلاسمای ماهیان

مقدار پروتئین	پلاسما	۵۰-۳۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر	(۱۸)
	سرم	۳۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر	(۱۵)
مقدار IgM	پلاسما	۲۰-۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر	(۱۸)
	سرم	۷-۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر	(۱۷)
	صفرا	۰/۰۰۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر	(۱۷)

مقدار پروتئین تام سرم ماهیان آزمایش شده:

در بررسی‌های آزمایشگاهی و الکتروفورتیکی ما نیز میانگین مقدار پروتئین سرم برای ماهی قزل‌آلا ۳۸/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و برای ماهی آمور ۱۹ میلی‌گرم در میلی‌لیتر محاسبه گردید. این مقدار پروتئین در سرم خون برای ماهی قزل‌آلای سالم در حداقل میزان طبیعی می‌باشد و در ماهی آمور بسیار پائین‌تر از میزان طبیعی است، هیپوپروتئینی ماهیان آمور بررسی شده علامت درمانگاهی بارز سوء تغذیه شدید آنها می‌باشد و احتمال بروز مرگ و میر ناشی از عوامل بیماریزا در آنها بسیار زیاد می‌باشد.

نگارنده این نوع سوء تغذیه را ناشی از کمبود مقدار پروتئین جیره و نامنظم دادن غذا و احتمال درگیر بودن آنها با بیماری‌های انگلی مزمن می‌داند.

میانگین مقدار پروتئین تام سرم ماهیان قزل‌آلا و آمور آزمایش شده

مقدار پروتئین تام سرم	قزل‌آلا	۳۸/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر
	آمور	۱۹ میلی‌گرم در میلی‌لیتر

مقدار آلبومین سرم ماهیان آزمایش شده:

یکی از پروتئین‌هایی که حرکت سریعی داشته و به طرف قطب مثبت مهاجرت نمود، آلبومین سرم بود. مقدار این پروتئین نسبت به گلوبولینهای سرم بسیار کم می‌باشد و این نسبت در دو گونه ماهیان سرد آبی و گرم آبی مورد آزمایش کاملاً مشهود می‌باشد و آزمایشهای سرولوژیک ما نشان می‌دهد این وضعیت عکس نسبت آلبومین به گلوبولین در پستانداران (انسان) می‌باشد. این پروتئین در کبد ماهیان ساخته می‌شود و دو عمل مهم را انجام می‌دهد:

-۱- فشار اسمزی محیط داخلی بدن ماهیان را حفظ و ثابت نگه می‌دارد.

۲- ملکولهای حیاتی مثل آنتی‌بیوتیکها، داروها، بیلی‌روبین، چربیها و هورمونها را در جریان خون حمل می‌نماید، به طور کلی آلبومین یک حامل مواد در بدن ماهیان می‌باشد.

میانگین مقدار آلبومین سرم ماهیان قزل‌آلا و آمور آزمایش شده

مقدار آلبومین سرم	قزل‌آلا	۱۲میلی‌گرم در میلی‌لیتر
	آمور	۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر

داده‌های به دست آمده از دستگاه دانسیتومتر سبیا پرفرنس حاکی از آن است که مقدار متوسط آلبومین در ماهی قزل‌آلا حدود ۳۰ درصد و در ماهی آمور حدود ۲۶ درصد پروتئین تام سرم می‌باشد و مابقی پروتئین آنان را گلوبولینها تشکیل می‌دهند، این نسبت در مقایسه با انسان برعکس می‌باشد، در انسان مقدار آلبومین ۸۰-۷۰ درصد و گلوبولینها ۳۰-۲۰ درصد پروتئین تام سرم می‌باشد.

نمای شماره ۹:

مقایسه مقدار آلبومین و گلوبولینهای ماهی و انسان

	درصد آلبومین	درصد گلوبولین‌ها	نسبت آلبومین به گلوبولین‌ها
آمور	۳۶	۷۴	۰/۳۵
قزل‌آلا	۳۰	۷۰	۰/۴۳
انسان	۷۰	۳۰	۲/۳

کاهش مقدار آلبومین نسبت به گلوبولین در ماهیان علت ژنتیکی داشته و همانطوری که در مقدمه توضیح داده شده است این موضوع به علت نقص در سیستم دفع مواد نیتروژنی به شکل ترکیبات محلول آمونیاکی از طریق بافت آبشش به محیط آب می‌باشد که باعث کاهش آلبومین در سرم خون می‌گردد. (به نمای شماره ۸ مراجعه گردد)

این وضعیت جدا از خروج مواد نیتروژنی متابولیزه شده توسط کلیه (ادرار) و یا باقی‌مانده غذای هضم شده در لوله گوارش می‌باشد (۹). لذا پرورش‌دهندگان ماهی و میگو با دانستن وضعیت پروتئین سرم در شرایط مختلف رشد می‌توانند کمیت و کیفیت پروتئین جیره غذایی را تعیین و برنامه غذادهی را به طریقه علمی تنظیم نماید و در صورت افزایش مقدار آمونیاک نسبت به تصفیه به موقع آب و یا افزایش جریان آب ورودی و یا خروجی استخرها اقدام نمایند.

این موضوع ضرورت میزان پروتئین بیشتر در جیره غذایی ماهیان پرورشی، تنظیم برنامه غذادهی و تصفیه به موقع آب استخرها را توجیه و تاکید می‌نماید.

همانطور که در منحنی الکتروفرزیس سرم ماهیان صفحه ۱۵ مشاهده می‌گردد آلبومین سرم بسیار کمتر از مقدار آلفا یک می‌باشد. مقدار آلبومین سرم خون برای ماهی قزل‌آلا ۱۲ میلی‌گرم و برای ماهی آمور ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر محاسبه گردید.

مقدار گلوبولینهای سرم ماهیان آزمایش شده:

گلوبولینها از ۴ جزء تشکیل شده‌اند. انواع گلبولینهای سرم ماهیان نیز بر مبنای الکتروفورزیس سرم انسان نامگذاری و تقسیم‌بندی شده و به نامهای آلفا یک، آلفا دو، بتا و گاما مشخص گردیده‌اند.

مقدار گلوبولین آلفا یک در تمام نمونه‌های ماهی قزل‌آلا از ماهیان آمور آزمایش شده بیشتر می‌باشد و مطابق نمای شماره ۶ و ۷ می‌باشد.

در انسان گلوبولینهای آلفا یک، آلفا دو و بتاگلوبولین در کبد و گاماگلوبولین در سیستم رتیکولو آندونتیال ساخته می‌شود.

بتا گلوبولین ناقل فلزات در خون می‌باشد و به نام ترانسفرین نامیده می‌شود.

فیبرینوژن نیز از پروتئین‌هی محلول در پلاسما می‌باشد که هنگام تهیه سرم به صورت فیبرین از سرم جدا می‌گردد. و در الکتروفورز سرم دیده نمی‌شود.

بخش مهمی از گلوبولینها، ایمنوگلوبولینها می‌باشند که خاصیت ایمن‌سازی دارند. ایمنوگلوبولین ماهیان مشابه IgM انسان می‌باشد و فاقد گروههای ایمنوگلوبولینهای پستانداران می‌باشند (۱۶، ۱۲، ۱۱، ۱۰ و ۵)

ماهیان فاقد مغز استخوان و گره‌های لنفاوی هستند اما سایر اشکال بافت لنفومیلوئیدی را به خوبی دارا می‌باشند، نیموس یک مکان مهم تولید لنفوسیت در ماهیان جوان به شمار می‌آید که در هنگام بلوغ جنسی تحلیل رفته و یا ناپدید می‌شود. طحال ماهیان به عنوان صافی خون عمل می‌کند این عضو غنی از بافت لنفوئیدی است امّا مراکز زاینده ندارد (۸). سلولهای تولیدکننده ایمنوگلوبولین (پلاسموسیتها) ممکن است در اغلب بافتهای لندومیلوئید یافت شوند و احتمالاً در همه ماهیان لنفوسیتها از دیواره روده تراوش می‌شوند (۷).

هنگام بررسی‌های انگل‌شناسی ماهیان خاویاری توسط نگارنده توده‌های حجیم بافت لنفوئیدی در دریچه‌های مارپیچی روده قره‌برون و فیل‌ماهی دیده شد که بررسی دقیق‌تر بافت‌شناسی در این رابطه در حال انجام است. سایر بافتهای لنفومیلوئید اصلی در ماهیان استخوانی قسمت جلویی کلیه (راس کلیه، پرونفرس) می‌باشد.

ایمنوگلوبولین ماهیان یک ماکروگلبولین می‌باشد و شباهت بسیار زیادی به IgM انسانی دارد و مقدار آن در سرم خون ماهیان استخوانی ۷-۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و غلظت آن در صفرا ۰/۰۰۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و نیمه عمر IgM در خون ماهیان ۱۶-۱۲ روز گزارش شده است. (۱۷).

دکتر رونالد. ج. روبرتی در کتاب آسیب‌شناسی ماهی محل استقرار الکترونورتیکی IgM ماهیان استخوانی را در باندهای آلفا و بتا مشخص نموده‌اند، اما نتایجی را که ما از آزمایش خالص‌سازی IgM و الکتروفورز دوباره آن گرفتیم حاکی از این است که IgM ماهیان قزل‌آلای مورد آزمایش در شرایط آب و هوایی ایران در منطقه بتا و گاما قرار دارد.

میانگین مقدار ایمنوگلوبولین سرم ماهیان قزل‌آلا و آمور آزمایش شده:

	مقدار IgM سرم	قزل‌آلا	۴/۹۴ میلی گرم در میلی‌لیتر	
		آمور	۳/۴۶ میلی گرم در میلی‌لیتر	

آزمایش‌های ایمنوالکتروفورز انجام شده حاکیست که مقدار IgM ماهیان در طی دوران رشد افزایش نشان می‌دهند به طوریکه حداکثر تولید IgM را در سن ۱۶-۱۴ ماهگی نشان می‌دهد. کاهش تدریجی مقدار ایمنوگلوبولین در سنین بین ۱۱-۱۲ ماهگی مربوط به کاهش دمای آب در ماههای بهمن و اسفند می‌باشند چون ماهیانی که در آبهای سرد و کمتر از $7^{\circ}C$ زندگی می‌کنند، ایمنوگلوبولین را تولید نمی کنند (۳ و ۱۵ و ۱۷) و مقدار ایمنوگلوبولین سرم خون آنها کاهش می‌یابد ولی با گرم شدن آب و هوا و با شروع تغذیه مناسب مقدار آن به تدریج رو به افزایش می‌گذارد به طوریکه در اواخر ماههای فروردین و اردیبهشت مقدار تولید ایمنوگلوبولین نسبت به ماههای سرد سال افزایش چشمگیری را نشان می‌دهد و مقدار آن در اردیبهشت و اواخر خرداد به ۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر افزایش یافته است، ولی این وضعیت در خصوص ماهیان آمور مورد آزمایش کاملاً صدق نمی‌نماید و نوسانات مقدار IgM آنان، احتمالاً به واسطه سوء تغذیه در هنگام پرورش و نمونه‌برداری می‌باشد.

کاهش مقدار IgM در سرم ماهیان آمور کاملاً ارزش درمانگاهی داشته و نشان می‌دهد که هر قدر مقدار پروتئین جیره کاهش یابد مقدار پروتئین کل سرم کاهش یافته و بالطبع مقدار IgM نیز کاهش نشان می‌دهد.

ماهیان قزل‌آلا به واسطه اینکه در حوضچه‌های سیمانی کم عمق و آبهای شفاف و تمیز پرورش می‌یابند، در هنگام نمونه‌برداری با مشکلی مواجه نبودیم اما ماهیان آمور در استخرهای خاکی وسیع چندین هکتاری به صورت پلی کالچر پرورش می‌یابند و درصد آنها در استخرهای پرورشی نسبت به سایر ماهیان دیگر مانند کپور

معمولی و نقره‌ای و سرگنده کم می‌باشد (بین ۸-۵ درصد) لذا عملاً صید و نمونه‌برداری از آنها در استخرهای پرورشی ممکن نبود، به همین سبب حدود یک سوم از کل بچه آمور ماهیانی که مورد بررسی قرار دادیم از کارگاههای تکثیر و پرورش کپور ماهیان در حوالی ساری (کارگاه نصر) و در هنگام تفکیک و فروش بچه ماهیان به متقاضیان پرورش ماهی می‌باشد، و دو سوم دیگر ماهیان آمور از کارگاه پرورش ماهی حوالی بهشهر نمونه‌برداری شدند. در این کارگاه انواع بچه ماهیان در حداقل آب ممکنه و تقریباً بدون این که تغذیه دستی گردند در یکی از استخرها جهت فروش به متقاضیان نگهداری می‌شدند به همین دلیل مقدار میانگین پروتئین تام سرم آنان و همین‌طور مقدار ایمنوگلوبین آنان هر قدر زمان می‌گذرد کاهش نشان می‌دهد.

مقدار کمیت و کیفیت جیره غذایی ماهیان قزل‌آلای مورد آزمایش تقریباً متناسب با حداقل نیازمندی‌های آنان بود و در شرایط مدیریتی بهتری قرار داشتند، چون مقدار میانگین پروتئین تام سرم آنان طبق نتایج آزمایشگاهی ما ۳۸/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر برآورد گردیده است که با حداقل مقدار طبیعی این فاکتور که سایر محققین گزارش نموده‌اند برابر می‌باشد. اما میانگین پروتئین تام سرم ماهیان آمور مورد آزمایش پائین‌تر از حداقل مقدار طبیعی و برابر ۱۹ میلی‌گرم در میلی‌لیتر می‌باشد.

مطابق نتایج آزمایش‌های سرولوژیک به دست آمده مقدار پروتئین تام سرم ماهیان هشت ماهه آمور که از کیفیت خوبی نسبت به سایر سنین ماهی آمور برخوردار بوده‌اند ۳۱/۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر (شکل ۶ و ۷) و مقدار آلبومین و گلبولینهای آن بیشتر از سایر سنین می‌باشد مربوط به کارگاه اول می‌باشد چون بچه ماهیان تغذیه دستی می‌شدند و در شرایط پرورشی مناسبی برای فروش قرار داشتند، ولی نتایج آزمایشگاهی به دست آمده از سرم ماهیان کارگاه دوم کاهش شدید پروتئین و سایر فراکسیونها مخصوصاً IgM را نشان می‌دهند و در آنها علائم درمانگاهی مانند پراکندگی و کاهش وزن دیده می‌شود. این نتایج به خوبی نشان می‌دهد که هر قدر

وضعیت کمی و کیفی جیره غذایی ماهیان بالاتر باشد واکنش‌های بدن آنها نسبت به تغییرات محیط، عوامل انگلی و پاتوژن بهتر و مناسب‌تر می‌گردد و به عبارتی سلامتی ماهیان بهتر تأمین می‌گردد.

تغییرات پروتئین‌های سرم از علائم مهم درمانگاهی می‌باشد کاهش آن می‌تواند نشانگر بیماری‌های عفونی مزمن و یا کاهش پروتئین جیره غذایی باشد و افزایش آن حاکی از بیماریهای عفونی حاد و یا نشانه ایمنی فعال در مرحله بعد از واکسیناسیون در آبزیان می‌باشد (۱۸).

کمبود پروتئین و اسیدهای آمینه در رژیم غذایی ماهیان بر روی بیوسنتز بسیاری از ترکیبات نیتروژن‌دار مانند آنزیمها و هورمون‌هایی مثل تیروکسین، آدرنالین، رنگدانه‌های ملانین، کراتین و سایر فاکتورها و بسیاری از مواد حیاتی دیگر موثر است.

اسید آمینه‌های خاصی که از پروتئین‌های رژیم غذایی مشتق می‌گردد برای اکسیداسیون و استفاده چربیها و هیدروکربناتها ضروی هستند و به عنوان منابع گروه متیل در تشکیل استیل کولین، نیکوتین آمید و پورینها و پریمدین‌ها و سایر ترکیبات محسوب می‌گردد. تشخیص سوء تغذیه ناشی از کمبود پروتئین و یا اسیدهای آمینه فوق‌العاده مشکل است. این امر به دلیل تغییرات کلی در بدن می‌باشد.

بسیاری از علائم کمبود پروتئین و اسیدهای آمینه غیراختصاصی هستند. یافته‌های درمانگاهی ممکن است نمایانگر کم خونی (گلبولهای قرمز کمتر از ۷۵۰۰۰۰ در میلی‌متر مکعب، هموگلوبین کمتر از ۷/۵ گرم در دسی‌لیتر، هماتوکریت کمتر از ۳۷ و گلبولهای قرمز غیرطبیعی در گسترشهای خونی رنگ‌آمیزی شده مشاهده شوند) و پروتئین تام سرم کمتر از ۳۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر باشد.

نمای شماره ۱۰:

میانگین پروتئین تام و فراکسیونهای آن در سرم خون ماهیان قزل‌آلا و آمور

	پروتئین سرم mg/ml	آلبومین سرم mg/ml	گلوبولین سرم mg/ml	نسبت آلبومین به گلوبولین
قزل‌آلا	۳۸/۵	۱۲	۲۶/۵	۴/۵
آمور	۱۹/۵	۵	۱۴	۳/۶

جدول شماره ۱۱: تابلو درمانگاهی طبیعی ماهیانی که با جیره نرمال تغذیه می‌گردند (۱۵)

واکنش‌های درمانگاهی	میزان طبیعی
ضریب تبدیل غذا به گوشت	۲ کیلوگرم به ازاء هر کیلو
مقدار پروتئین به ازاء هر کیلو رشد بدن	۶۵۰-۴۷۵ گرم
مقدار انرژی به ازاء هر کیلو رشد بدن	۵۵۳۰ K Cal تا ۳۶۰۰
درصد رشد	۳۰۰ تا ۵ درصد در هر ماه (بستگی به سن ماهی دارد)
درصد مرگ و میر	حدود ۰/۱ درصد در ماه
مقدار هماتوکریت	حدود ۴۲
مقدار هموگلوبین	حدود ۱۰ گرم در هر دسی‌لیتر
مقدار گلبولهای قرمز	یک میلیون در هر CC خون
مقدار قند خون	۱۲۰-۷۰ میلی‌گرم در هر دسی‌لیتر
پروتئین تام سرم	حدود ۳۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر سرم

سایر نتایج آزمایشگاهی به دست آمده از الکتروفورز سرم خون ۲۲۰ قطعه قزل‌آلا و ۱۱۰ قطعه ماهی آمور نشانگر آن است که بیشترین پروتئین‌های سرم خون این ماهیان را گلوبولینها تشکیل می‌دهند و نسبت آلبومین به گلوبولین در ماهی قزل‌آلا ۴/۵ و برای ماهی آمور ۳/۶ می‌باشد.

پیشنهادها

به علت اهمیت حیاتی که پروتئین‌ها در بدن آبزیان دارند، امروزه از مهمترین ترکیبات بیولوژیک هستند که مطالعات تجربی و تحقیقاتی زیادی بر روی آنها صورت می‌گیرد. با پیشرفت سریع روشها و تکنیکهای آزمایشگاهی و تحقیقاتی، به خصوص در این چند سال اخیر تعداد زیادی از بیماریهای عفونی و متابولیسمی آبزیان تشخیص داده شده است. مطالعات سرولوژیک و ایمنولوژیک بر روی آبزیان در ایران تازگی دارد و استاد ارجمندم آقای دکتر کیوان تحقیقات موثر و مفیدی را در انجام آزمایش‌های سرولوژیک بر روی ماهیان خاویاری دارند که نه تنها ارزش کلینیکی و بیولوژیک خاصی دارند بلکه این نتایج ارزش قضایی بین‌المللی در اثبات تقلب و اختلاط خاویار گونه‌های مختلف ماهیان خاویاری دارد. ما نیز در این بررسی هیپوپروتئینمی و هیپوگاماگلوبولیمی را در ماهی آمور مشخص نمودیم لذا استفاده از روش‌های سرولوژیک و ایمنولوژیک در بیماریهای آبزیان ارزش تشخیص مهمی دارد. لذا پیشنهاد می‌شود:

۱- استفاده از روشهای سرولوژیک در تشخیص بیماری‌های آبزیان به صورت روشهای جاری در کارگاههای تکثیر و پرورش مورد استفاده قرار می‌گیرند.

۲- اندازه‌گیری پروتئین‌های و سایر مواد بیولوژیک در سرم و پلاسمای ماهیان پرورشی می‌تواند باعث کاهش اتلاف غذا، بهبود و تنظیم برنامه غذادهی و بالا بردن ضریب تبدیل غذا به گوشت گردد و کمک زیادی در تصمیم‌گیری به موقع و مناسب جهت تنظیم آب ورودی و خروجی استخرها و تصفیه و هوادهی آب درون استخرها نماید و به عبارتی بدین طریق می‌توان مدیریت پرورش آبزیان را بهبود بخشید.

۳- اطلاعات به دست آمده از نتایج این پروژه به مدیران و مسئولان کارگاههای تکثیر و پرورش آگاهیهای دقیق و لازم را جهت ایمن‌سازی و پیشگیری از بیماریها می‌دهد.

۴- تا چندی قبل نقش پاسخ‌های ایمنی سلولی و خونی در سیستم دفاعی بدن ماهیان ناشناخته بود ولی اکنون به عنوان واکنش اصلی ایمنی در مقابل عوامل بیماریزای محسوب می‌گردد.

۵- در بدن انسان و سایر حیوانات کاهش و یا افزایش پروتئین‌های سرم خون در ارتباط با بیماریها شناخته شده است و دارای ارزشهای تشخیصی مهمی می‌باشد. در آبزیان پرورشی نیز می‌توان مقادیر طبیعی و نرمال پروتئین‌های سرم آنها را با این روش اندازه‌گیری نمود و در هر مرحله‌ای که نیاز به ترمیم جیره غذایی و یا پیشگیری از بیماریها باشد تصمیم‌گیری موثری انجام داد.

۶- اندازه‌گیری ایمنوگلوبولینها در کارگاههای تکثیر و پرورش ارزش درمانگاهی ویژه‌ای دارد و در حال حاضر که عوامل بیماریزای عفونی در ایران کاملاً مشخص نشده است و از طرفی امکانات آزمایشگاهی جهت تشخیص بیماریهای آبزیان به قدر کافی موجود نیست (مثل ویروس‌شناسی آبزیان) انجام این آزمایشهای سرولوژیک و ایمنولوژیک در کارگاههای تکثیر و پرورش ماهی و میگو در صورتی که جیره غذایی متعادل و متناسب باشد می‌تواند حداقل این سوال را پاسخ دهد که آیا این آبزیان درگیر بیماریهای عفونی هستند یا خیر. بالا رفتن مقدار پروتئین در سرم خون ماهیان (بیش از ۵ گرم در دسی‌لیتر) حاکی از واکنش ایمنی بعد از واکسیناسیون و یا علامت شروع واکنش بدن بر علیه بیماریهای عفونی می‌باشد لذا ضرورت اندازه‌گیری این فاکتورها در کارگاههای تکثیر و پرورش ارزش درمانگاهی خاصی دارد.

۷- با توجه به این که ایمنوگلوبولینها در آبزیان می‌توانند از طریق مولدین به تخم و از تخم به لارو و بچه ماهیان منتقل گردد (۴) لذا هر گونه کوشش جهت بالا بردن تیتر ایمنی در بدن مولدین می‌تواند سبب محافظت و ایمنی بیشتر لارو و بچه ماهیان در مراحل اولیه زندگی گردد. در این ارتباط نگارنده در حال اجرای پروژه

تحقیقاتی "ایمن بخشی کیتوزان و گلوکزامن هیدروکلراید جهت بالا بردن دفاع سلولی و خونی در ماهی قزل‌آلا" می‌باشد و امیدوار است که بتواند در مولدین تیتر ایمنی بالایی به وجود آورد.

۸- با اندازه‌گیری مقدار تیتر ایمنی در آبزیان می‌توان قبل و پس از واکسیناسیون به موثر بودن واکسیناسیون پی برد.

۹- ضرورت مطالعات ایمنولوژیک ماهیان پرورشی در هنگام تخمکشی و لقاح در کارگاههای تکثیر و پرورش بسیار مهم است به عنوان مثال تزریق هیپوفیزیک ماهی به بدن ماهی مولد دیگر می‌تواند واکنشهای اتوامینی بر علیه اسپرم ماهی مولد تولید نماید و باعث از بین رفتن اسپرمهای مولد نر گردد. محققین نشان داده‌اند که عامل آگلوتنین کننده اسپرم (SAF) در سرم ماهیان مولد ماده وجود دارد و یک IgM می‌باشد این فاکتور می‌تواند عامل بسیار مهمی در وقفه برنامه‌های تکثیر و پرورش ماهیان محسوب گردد. (۱۴)

۱۰- اندازه‌گیری پروتئین‌ها در سرم و پلاسمای ماهیان پرورشی می‌تواند در بهبود و تنظیم برنامه غذادهی و بالا بردن ضریب تبدیل غذا به گوشت و تصمیم‌گیری به موقع و مناسب جهت تنظیم آب ورودی و خروجی استخرها و تصفیه و هوادهی آب درون استخرها مفید واقع گردد.

۱۱- از آنجائی که عوامل بیماریزای عفونی آبزیان در ایران کاملاً مشخص شده است و از طرفی امکانات آزمایشگاهی جهت تشخیص بیماریهای آبزیان به قدر کافی موجود نیست (مثل ویروس‌شناسی آبزیان) انجام این آزمایشهای سرولوژیک و الکتروفورتیک در کارگاههای تکثیر و پرورش ماهی در صورتی که جیره غذایی آبزیان پرورشی متعادل و متناسب باشد می‌تواند حداقل این سوال را پاسخ دهد که آیا آبزیان درگیر بیماری‌های عفونی هستند یا خیر.

تشکر و قدردانی

ستایش خداوندی را که به ما راه و رسم زیستن آموخت، سپاس بیکران بر ذات مقدس او که بر من منت نهاد تا بتوانم این پروژه را با تمام سستی‌ها و کاستی‌ها به پایان برم.
موقعیت را غنیمت شمرده سپاس و امتنان خود را از برادر ارجمند آقای دکتر سهراب رضوانی ریاست سابق مرکز تحقیقات شیلاتی استان مازندران و برادر دکتر رضاپور غلام رئیس فعلی مرکز که همواره مشوق کارشناسان و محققین هستند و همچنین از استاد ارجمندم جناب آقای دکتر امین کیوان که انجام این پروژه را تائید فرمودند اعلام دارم.
استاد عزیزم جناب آقای دکتر سید محمد حسین حسینی عضو هیئت علمی انسیتو پاستور مشاور این پروژه بودند، ایشان علی‌رغم مشغله‌های زیاد تحقیقاتی و آموزشی با تواضع و فروتنی راهنمائیهای علمی ارزشمند و کارسازی ارائه نمودند و باعث اعتلای علمی این گزارش شدند که به نوبه خود از ایشان سپاسگزارم.
آقای دکتر فرشاد نقشوار رئیس بخش پاتوبیولوژی دانشگاه مازندران و دکتر احمدیان مسئول آزمایشگاه بیمارستان بوعلی مساعدت زیادی در انجام آزمایشها مبذول داشتند همچنین آقای علیرضا فلاحت مسئول آزمایشگاه بیمارستان بوعلی سینای ساری و آقای ابراهیم بهساز کارشناس آزمایشگاه رفرانس ساری، همکاری بسیار ارزشمندی در طول اجرای پروژه مبذول داشتند که بدین‌وسیله از آنان تشکر می‌نمایم.
آقای دکتر محمدرضا مهرابی ریاست محترم بخش بیماریهای آبزیان موسسه در هنگام اجرای پروژه و در تصحیح گزارش راهنمائیهای علمی ارزشمندی ارائه نمودند که از ایشان سپاسگزارم.
همکاران گرانمایه‌ام خواهر شکوفه شمسی کارشناس بخش بیماریها و برادر عزیزم آقای حسین لطفی‌نژاد در اجرای این پروژه کمکهای ارزنده‌ای به عمل آوردند که بدین‌وسیله از ایشان ممنون و سپاسگزارم. همچنین از آقای سید نورالدین نوش‌آبادی مسئول کامپیوتر مرکز که اوقات مناسب کاری در اختیارم نهادند و از خواهر عذرا رزقی پرسنل بخش بیماریهای ماهی مرکز جهت تایپ گزارش تشکر و قدردانی می‌نمایم و آرزوی سلامتی و موفقیت همه همکارانم را از خداوند متعال خواستارم.

منابع

۱- غرقی، احمد ۱۳۷۲. مطالعه مقدماتی معرفی پروتئین‌های سرم خون ماهیان قزل‌آلا و آمور و تعیین مقدار ایمنوگلوبولینهای آنها به طریقه الکتروفورز. مرکز تحقیقات شیلاتی استان مازندران .

۲- غرقی، احمد ۱۳۷۵شناسایی و بررسی پروتئین‌های سرم خون ماهی اوزون‌برون *Acipenser stellatus pallas* اولین کنگره جانورشناسی ایران

۳ - غرقی، احمد (۱۳۷۸) فراکسیون‌های سرولوژیک و ایمونوالکتروفورتیک سرم خون ماهیان قزل‌آلا و آمور در شرایط فیزیولوژیک طبیعی. مجموعه مقالات چهاردهمین کنگره فیزیولوژی و فارماکولوژی ایران

۴ - غرقی، احمد (۱۳۸۱) - خالص سازی و تعیین نسبی وزن مولکولی پروتئین های سرم خون ماهی آمور *Ctenopharyngodon idella* مجموعه مقالات سومین گردهمائی دامپزشکان علوم بالینی ایران

۵ - غرقی، احمد (۱۳۸۸) بررسی و مقایسه شاخص‌های ایمنولوژیک ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان *Onchorhynchus mykiss* در شرایط فیزیولوژیک طبیعی کشور . مجموعه مقالات نخستین همایش ملی بیماری‌های اقتصادی صنعت پرورش قزل آلای رنگین کمان شهرکرد

۶- وثوقی، دکتر غلامحسین، مستجیر، مهندس بهزاد (۱۳۷۱) ماهیان آب شیرین انتشارات دانشگاه تهران.

7- Avtalion, R.R (1969) Temperature effect on antibody Production and immunological memory in carp (Cyprinus carpio).

8- Avtalion, R.R – Mor, -A. nonnumeric IgM is transferred from mother to Egg in tilapias. Aquaculture, 1992.Vol. 44, no.3, pp.93-98.

9- Dorson, M- Perrier, H-Perrier, C – Torchy, C. Antibodies in mucus and other secretions in fish. Ichtyophysiol. 1989. no. 13 pp. 31-42.

10- Dunier. M & Siwichi, 'A.K (1993). Study of the effects of pollutant on fish defenses mechanisms. Present at the international work shop and trlning course in Poland. Aug 23- sep 3, 1993.

11- Dunier 'Siwichi, A.K' Scholtens.y Dal Molin. S (1993) Influence of linden on nonspecific defense mechanisms and B – lymphocyte functions of Rainbow trout (oncorhynchus mykiss) presented at the international work shop and training course in Poland. Aug 23-sep 3, 1993.

12 - GHOROGHI. Ahmad (2009)Serological comparison of Onchorhynchus mykiss in various growth stage in Iran fish farming. Journal of Comparative pathology, Number 4,2009

13 - GHOROGHI. Ahmad (1995) Characterization and measurement of serum proteins and Immunoglobulin's of Ctenopharyngodon idella and Oncorhynchus mykiss in Iran climate

14- Fange, Ragnar (1993) Blood cells, Hemopoiesis and Lymphomyeloeid tissues. The Nordic Symposium on Fish Immunology. LYSEKIL 19-22 may.

15- Fontenot, joseph (1981) Nutrient Requirements of Coldwater Fish. National Academy Press, Washington, D.C.

16- Fuda, H-Hara,A – Yamasaki, F-kobayashi, k.A peculiar immunoglobin M (IgM) ldentified in egg of chum salmon (onchorhynchus keta). Journal article, Immunol. 1992. Vol. 16, no. 5 , pp. 415-423.
17- Fuda, H-Soyano, k – Yamasaki, F-Hara, A. Serum immunoglobulin M (IgM) during early development of masu salmon. Journal article, Biochem physiol A. 1991.Vol. 99A no4, pp. 637-643.
18- Itami, T-Takahashi, Y-Okamoto, T – Kubono, K. Purification and characterization of immunoglobulin in skin. Bull. Jap. Soc – Sci – Fish. 1988, vol.54 , no.9 , pp. 1611-1617.
19- Jiang, Yalin – Li, Yan – Yu , ping. A preliminary study of immunorespnse of grass carp. Journal Article, HYDROBIOL. 1991. Vol. 2, no.4 , pp. 321-326.
20 - Lou, Ya – Hara, A- Takahashi, H. Induction of autoantibodies against spermatozoa by injection of allogeneic sperm in the Nile Tilapia. Journal ortiole. Biochem – physiol – B 1989 Vol 94 B no4 pp. 829-836.
21- Post, Gorge. (1987). fish health. T.F.H. publication, Inc.
22- Pillstroem, L-petersson, A. Isolation and partial characterization of IgM from cod (Gadus morhua L.) Journal article – Immunol. 1991 , Vol. 15 , no33, pp. 143-152.
23 - Roberts, Ronald j. (1989). fish pathology. Baillieve tindall.
24 - siwichi, A.K, Anderson D.P (1993) Diagnostic hematology and serology for fish health programs, presented at the international work shop and trining course in Poland. Aug 23-Sep 3, 1993.
25- studnicka. M, siwichi A.K, Dunier. M (1993) Immunosuppessive effect of the organophosphorus insecticide trichlorphon on the neutrophils ctivity in carp presented international work shop and trining course in poland Aug 23-Sep 3, 1993

ABSTRACT:

The concentration of serum immunoglobulin in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and(*Ctenopharyngodon idella*)was measured by Immunoelectrophoresis. Serum total protein, also called plasma total protein or total protein, is a biochemical test for measuring the total amount of protein in blood plasma or serum.
Protein in the plasma is made up of albumin and globulin. The globulin in turn is made up of α1, α2, β, and γ globulins. These fractions can be quantities using protein electrophoresis, but the total protein test is a faster and cheaper test that estimates the total of all fractions together. The traditional method for measuring total protein uses the biuret reagent, but other chemical methods such as Kjeldahl method, dye-binding and Refractometer are now available. The measurement is usually performed on automated analyzer salong with other laboratory tests.
The normal IgM concentration was 3.3 mg ml in a group of free-living trout. While the IgM concentration was low in sera from fish living under aquarium conations. In visual variations were very pronounced. The purity of reference preparations and the specificity of anti sera used were examined by crossed Immunoelectrophoresis.

Fish respond to antigenic stimulation by the production of immunoglobulin. So far only one immunoglobulin class is known to occur in teleosts, the characteristics of the class being rather similar to those of mammalian IgM.
The molecule is a tetramers consisting of a basic structure of 8 light chains and 8 heavy chains (same molecular weight as the p-chains of mammals) (Acton et al. 1971, Etuis 1982). The molecular weight of the whole molecule is about 700 000 Daltons (13 to 16 S).
Most studies concerning the humoral immune response in teleosts have dealt with aracteristics of the immune response elicited by known antigens.
Only in a few cases has the concentration of total immunoglobulin been measured.
Estimates of total immunoglobulin have been made in serum from (*Oncorhynchus mykiss*) and (*Ctenopharyngodon idella*) carp and goldfish (Vilain et al. 1984), carp (Richter et al. 1973), brown trout (Ingram & Alexander 1979) and certain salt-water fish (Fidler et al. 1969, Acton et al. 1971, Legler et al. 1971).
Estimates of total IgM in serum from rainbow trout Salmo gairdnen have not, to our knowledge, been published so far.Serum. Blood samples were obtained by puncture of the caudal vein of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and(*Ctenopharyngodon idella*)After clotting overnight at 4 "C the blood was centrifuged at 1000 g for 15 min to obtain serum. The sera were stored at -20 "C until examined.
Total serum protein. Protein concentration in (*Oncorhynchus mykiss*) and(*Ctenopharyngodon idella*) sera was estimated by means of the Biuret method(Richtenich 1971).
Antiserum to IgM :
The monospecificity of the rabbit antiserum to rainbow trout IgM was indicated by the appearance of only one precipitation Line when the antiserum was reacted against normal trout serum in crossed Immunoelectrophoresis (Fig. 1).
The purity of the IgM preparation which was used as reference IgM in connection with IgM quantification is illustrated in Fig. 2a. It appears that only one precipitation line developed when the preparation was reacted against antiserum to trout serum in crossed Immunoelectrophoresis. Fig. 2b illustrates the multi specificity of the rabbit antiserum to trout serum used.

Key word: *Oncorhynchus mykiss, Ctenopharyngodon idella,* immunoglobulin, Serum total protein

Ministry of Jihad – e – Agriculture
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
IRANIAN FISHERIES RESEARCH ORGANIZATION – Caspian Sea Ecology Research Center

---

Project Title : Introduction of serum proteins and immunoglobulin's in *Oncorhynchus mykiss* and *Ctenopharyngodon idella*
Apprpved Number: 72-0710442000-0
Author: Ahmad GHOROGHI
Project Researcher : Ahmad GHOROGHI
Collaborator(s) *:* H.Latifinezhad
Advisor(s): -
Supervisor: -
Location of execution : Mazandaran province
Date of Beginning : 1993
Period of execution : 1 Year & 3 Months
Publisher : ***Iranian Fisheries Research Organization***
Date of publishing : ***2013***

All Right Reserved . No Part of this Publication May be Reproduced or Transmitted without indicating the Original Reference

MINISTRY OF JIHAD - E - AGRICULTURE
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
IRANIAN FISHERIES RESEARCH ORGANIZATION - Caspian Sea Ecology Research Center

Project Title :

Introduction of serum proteins and immunoglobulin's in *Oncorhynchus mykiss* and *Ctenopharyngodon idella*

Project Researcher :
Ahmad GHOROGHI

Register NO.
42713