نامه‌ی انجمن حشره‌شناسی ایران
۱۳۸۵ - ۲۶(۲): ۴۵-۶۳

کشت سلول‌های بافت جنینی کرم ابریشم، *Bombyx mori* (Lep.: Bombycidae)، در شرایط آزمایشگاهی

لیلا متین‌دوست[۱]، جلال جلالی سندی[۱]، حوریه سلیمان‌جاهی[۲]، کیوان اعتباری[۳] و فاطمه رهبری زاده[٤]

۱- گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده‌ی کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت صندوق پستی ۱۳۱٤-٤۱٦۳۵، ۲- گروه ویروس‌شناسی، دانشکده‌ی علوم‌پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ۳- گروه پژوهشی کرم ابریشم، دانشکده‌ی منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه‌سرا، ٤- گروه بیوشیمی و بیوتکنولوژی بالینی، دانشکده‌ی علوم‌پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران.

In vitro establishment of embryonic primary cultures of silkworm, *Bombyx mori* (Lep.: Bombycidae)

L. Matindoost[1], J. Jalali Sendi[1], H. Soleiman-Jahi[2], K. Etebari[3] and F. Rahbarizade[4]

1. Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Guilan, Rasht, P.O. Box 41635-1314, 2. Department of Virology, School of Medical Science, Tarbiat Modarres, Tehran, Iran, 3. Department of Sericulture, Faculty of Natural Resources, University of Guilan, Somehe Sara, Iran, 4. Department of Biochemistry and Biotechnology, School of Medical Science, Tarbiat Modarres, Tehran, Iran.

چکیده

از آنجاکه استفاده از رده‌های سلولی ناشی از حشرات برای تولید آفت‌کش‌های زیستی و پروتئین‌های نوترکیب رشد فزاینده‌ای دارد و تولید رده‌های سلولی جدید به هرچه غنی‌تر کردن این فن‌آوری کمک می‌کند، از بافت جنینی کرم ابریشم، *Bombyx mori* L.، تعدادی کشت اولیه به چهار روش متفاوت مکانیکی و آنزیمی در شرایط *in vitro* تهیه شد. این کشت‌ها در محیط TC-100 غنی شده با دو غلظت ۱۰ و ۲۰٪ سرم جنین گاوی (FBS) در دمای ۲۷ °C نگهداری شد. در بین روش‌های بکار گرفته شده، روش مکانیکی هموژنیزه کردن بافت جنینی بهترین کشت را ارائه داد و خیلی زود به صورت کشت تک لایه‌ی سلولی در آمد و غلظت ۲۰٪ FBS نسبت به ۱۰٪ باعث رسیدن سریع‌تر سلول‌ها به حالت اشباع شد. از نظر ریخت‌شناسی، شش نوع سلولی در کشت اولیه‌ی سلول‌های جنینی کرم ابریشم مشهود بود که عمدتاً شامل سلول‌های فیبروبلاست-مانند با سه زیرمجموعه‌ی A تا C، همچنین سلول‌های دوکی شکل، کروی و اپیتلیال-مانند بود. همچنین، تهیه‌ی کشت اولیه به روش آنزیمی برای سلول‌های *B. mori* به دلیل بازدهی کم پیشنهاد نمی‌شود.

واژگان کلیدی: کشت سلول، بافت جنینی، *Bombyx mori*، کرم ابریشم

Abstract

Since the use of insect cell lines for producing bio-pesticides and recombinant proteins is increasing, the establishment of new cell lines will help to enrich this industry. Therefore, several primary cultures were initiated from embryonic tissues of silkworm, *Bombyx mori* L. using both enzymatic and mechanical methods. The cultures were incubated in TC-100 medium supplemented with 10 and 20% concentrations of fetal bovine serum (FBS) at 27ºC. Among the methods used, homogenizing the embryonic tissue represented the best culture, which reached the confluence state sooner. Six different morphologies were distinguished in the embryonic primary cultures of silkworm including fibroblast-like cells with three sub-forms of A to C, spindle shaped cells, spherical cells and epithelial-like cells. Also, developing primary cultures from *B. mori* using enzymatic method is not recommended because of its low efficiency.

Key words: insect cell culture, embryonic tissue, *Bombyx mori*, silkworm

دریافت: ۱۳۸۴/۶/۱، پزیرش: ۱۳۸۵/۴/۱۳.

مقدمه

کشت سلول، شامل حفظ و پرورش سلول‌های یک جاندار در محیط *in vitro* به صورت زنده و فعال می‌باشد. اگر برخی از مواد مغذی و فاکتورهای رشد در محیط کشت در اختیار سلول‌های جانوری قرار داده شوند، سلول‌ها قادر خواهند بود به عنوان یک واحد منفرد بیولوژیک که قابلیت تکثیر، متابولیسم و پاسخ به محرک‌های محیطی را دارد به مدت بسیار زیادی زنده بمانند.

علیرغم تلاش‌هایی که برای کشت سلول حشرات در گذشته صورت گرفته بود، با گزارش اولین رده‌ی سلولی پیوسته‌ی حشرات توسط Grace (1962) در استرالیا از *Antheraea eucalypti* Scott (Lep.: Saturniidae) این علم وارد عرصه‌ی جدیدی شد. از آن زمان تا کنون بیش از ۵۰۰ رده‌ی سلولی پیوسته از بیش از صد گونه حشره ایجاد شده است (Lynn, 2001). بیشتر این رده‌های سلولی از راسته‌های بال‌پولک‌داران، دوبالان، جوربالان، بال‌غشائیان، راست‌بالان و سخت بال‌پوشان بوده است که در این بین بال‌پولک‌داران و دوبالان بیشترین تعداد رده‌های سلولی را به خود اختصاص داده‌اند (Granados & McKenna, 1995).

کشت سلول حشرات دارای کاربردهای زیاد در زمینه‌های فیزیولوژی، بیوشیمیایی، ژنتیک، زیست‌شناسی تکاملی و آسیب شناسی می‌باشد. فیزیولوژیست‌ها از کشت بافت چربی و دیگر انواع سلولی، شامل کشت‌هایی با خواص عصبی، برای مطالعه‌ی مسیرهای سیگنال سلولی استفاده می‌کنند (Cha & Han, 1999; Iwabuchi, 2000). رده‌های سلولی که دارای خصوصیت عصبی هستند در مطالعات فیزیولوژی برای درک بهتر رشد و تمایز عصبی حشرات و همچنین در مطالعات سم‌شناسی برای ارزیابی حشره‌کش‌های زیستی کاربرد دارند (Shepppard & Lynn, 1996; Goodman *et al.*, 2002). زیست‌شناسان تکاملی از رده‌های سلولی ناشی از جوانه‌ی بلوغ[1] و میوبلاست‌ها برای مطالعه‌ی اشتقاق گونه‌ها بهره می‌گیرند (Inoue *et al.*, 1991). سم‌شناسان برای ارزیابی سمیت بعضی از مواد و آفت‌کش‌ها برای آزمایش‌های مقدماتی، از سلول‌های کشت شده‌ی حشرات استفاده می‌کنند که این هم زمان و هم هزینه‌ی بسیار کمتری را نسبت به پرورش خود حشره برای آنان در بردارد

۱- Imaginal disc

(Fornelli *et al.*, 2004). رفتارشناسان حشرات از کشت سلول‌های ناشی از اندام‌های فرمون‌زای بدن حشره به شناخت هر چه بهتر آنها دست می‌یابند (Lucas & Meillour, 1997). پرورش انبوه بعضی از حشرات که هنوز جیره‌ی غذایی مصنوعی در موردشان توسعه نیافته است، از طریق غنی‌سازی رژیم غذایی مصنوعی با سلول حشرات ممکن گردید (Ferkovich, *et al.*, 1999; Lynn & Ferkovich, 2004). علم کشت سلول حشرات به کمک بیماری‌شناسی گیاهی نیز آمده است و مکانیزم تکثیر بسیاری از ویروس‌های بیماری‌زای گیاهان با استفاده از این تکنیک امکان‌پذیر شده است (Hunter & Polston 2001; Hunter *et al*., 1995). همچنین امروزه مطالعات زیادی نیز روی ویروس‌های بیماری‌زای انسان و دام که به‌وسیله‌ی حشرات منتقل می‌شوند بر روی سلول حشرات انجام پذیرفته است (Bello *et al*., 1997; McHolland & Mecham, 1999). تولید آفت‌کش‌های زیستی، کاربرد کشت سلول حشرات را دوچندان نمود زیرا این امکان را به محققین و تولیدکنندگان تجاری داد که بتوانند به تولید میکروارگانیسم‌هایی همچون ویروس‌ها که ازدیاد آنها در خارج از محیط غیر زنده ممکن نیست بپردازند (Levin & Huang, 1999; Funk *et al*., 2001; Goodman *et al*., 2001). در عین حال استفاده از رده‌ی سلولی بخش میانی دستگاه گوارش بال‌پولک‌داران و آلوده‌سازی آن با باکتری باسیلوس[۱] بسیاری از ناشناخته‌ها را درباره‌ی چگونگی عملکرد این باکتری در سلول‌های میان معده آشکار کرد (Loeb & Hakim, 1996; Carpentier *et al*., 2002) و بالاخره توسعه‌ی سیستم بیان ژن باکلوویروس‌ها[۲] توانست صدها پروتئین مورد نظر در پزشکی و زیست شناسی را در سلول‌های حشرات به تولید انبوه برساند (Maeda *et al.*, 1988; Gong *et al*., 2000).

بنابراین، با توجه به اهمیت کشت سلول حشرات در مطالعات پایه و کاربردی و از آنجا که تا کنون این دانش فنی در ایران بکار گرفته نشده بود، ضرورت آن احساس گردید تا در این راستا به عنوان اولین گام به فناوری تهیه و تولید کشت سلول حشرات توجه گردد. از این رو ترجیح داده شد با توجه به پتانسیل کرم ابریشم در سیستم بیان ژن باکلوویروسی، از این حشره مفید جهت ایجاد کشت اولیه و متعاقباً رده‌ی سلولی استفاده شود و روش‌های گوناگون دسترسی به رده‌ی سلولی مورد بررسی قرار گیرد.

۱- *Bacillus thuringiensis*

۲- Baculovirus expression vector system

مواد و روش‌ها

تخم کرم ابریشم، *Bombyx mori* L.، از مرکز تحقیقات کرم ابریشم ایران، رشت تهیه شد. تخم‌هایی که در شهریور ۱۳۸۱ توسط پروانه گذاشته شده بودند، بعد از ۲٤ ساعت به سردخانه‌ای با دمای ٤ درجه‌ی سانتی‌گراد انتقال یافته و تا فروردین سال ۱۳۸۲ در همین شرایط نگهداری شدند تا دوره‌ی دیاپوز آنها سپری شود. سپس از سردخانه خارج و به مدت ٤۸ ساعت قبل از تهیه کشت اولیه[۱] در دمای ۲۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفتند. تعدادی نیز بعد از ۲٤ ساعت انکوبه شدن برای ایجاد کشت استفاده شدند. در این تحقیق از محیط کشت TC-100 که با ۱۰ و ۲۰٪ FBS غنی شده بود استفاده گردید.

تهیه‌ی کشت اولیه به روش مکانیکی جداسازی جنین از تخم

قبل از آغاز کار، تخم‌ها در الکل ۷٦٪ به مدت ۵ دقیقه غوطه‌ور و سپس دو بار با آب مقطر استریل شستشو داده شد. کوریون تخم‌های ضدعفونی شده در محیط کشت (TC-100 غنی شده با ۲۰٪ FBS) به طریق مکانیکی شکسته و باز گردید. سپس زرده از جنین به وسیله‌ی تیغ جراحی و پنس جدا گردید؛ هر جنین به ٤ تکه تقسیم و به یک قطره از محیط کشت حاوی ۵۰ µg/ml سولفات جنتامایسین در پلیت‌های با قطر ۳ سانتی‌متر (Nunc®, Denmark) انتقال داده شد. دور تا دور پلیت با پارافیلم مسدود شد و در یک ظرف پلاستیکی حاوی بشر کوچک آب قرار گرفت. برای هر پلیت ۲۰-۱۰ جنین استفاده شد. کل ظرف پلاستیکی در دمای ۲۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شده و ۲٤ساعت بعد، ۱ میلی‌لیتر محیط کشت به ظروف اضافه گردید. در هر هفته ۰/۵ میلی‌لیتر محیط کشت اضافه می‌شد تا زمانیکه کل ظرفیت پلیت به ۳ میلی‌لیتر برسد. در این زمان، همه‌ی محیط کشت به جزء ۰/۵ میلی‌لیتر، با ۰/۵ میلی‌لیتر محیط جدید تعویض می‌شد (Lynn, 1996). هر روز کشت‌ها برای بررسی رشد سلولی توسط میکروسکوپ اینورت مورد بازبینی قرار می‌گرفتند تا زمانی که به حالت بستر تک لایه برسند.

۱- Primary culture

تهیه‌ی کشت اولیه به روش هموژنیزه کردن

تخم‌های ضدعفونی شده وارد محلول رینگر (Ephrussi & Beadle, 1935) استریل شد و توسط پاروی سلولی[1] شکسته شده و بافت هموژنیزه گردید. مخلوط حاصله پس از عبور از صافی در لوله‌های فالکون استریل ریخته شد. لوله‌ها با سرعت ۱۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ و رسوب حاصله ٦-۵ بار به همین طریق شستشو داده شد. در آخر، مایع رویی خارج و رسوب حاصل به فلاسک‌های ۲۵ سانتی‌متر مربع با ۵ میلی‌لیتر محیط کشت منتقل گردید. در این روش از محیط کشت TC-100 غنی شده با ۱۰ و ۲۰ درصد FBS جهت مقایسه‌ی کارآیی دو غلظت متفاوت استفاده شد. محیط کشت فلاسک‌ها به صورت هفتگی تعویض شده و رشد سلول‌ها روزانه توسط میکروسکوپ اینورت مورد بررسی قرار می‌گرفت.

تهیه‌ی کشت اولیه به روش آنزیمی

در این بررسی از ۲ آنزیم دیسپاز و تریپسین ساخت کمپانی گیبکوی آمریکا استفاده شد. تخم‌ها در محیط کشت گریس هموژنیزه شد و سپس به نسبت ۱ به ۱۰ با آنزیم دیسپاز (۰/۰۵ g/ml) جهت جداسازی باندهای بین سلولی بافت‌ها تیمار گردید (Mitsuhashi *et al.*, 2003). مخلوط حاصله در دمای ۲۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شد. سپس با اضافه کردن TC-100 غنی شده با ۱۰٪ FBS مخلوط دیسپاز و سلول رقیق گردید تا آنزیم غیر فعال گردد. سوسپانسیون حاصله در rpm ۱۵۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. رسوب بدست آمده دو بار با محیط کشت گریس به همین طریق شستشو و سرانجام با TC-100 غنی شده با ۱۰ و ۲۰٪ FBS به ظرف ٦ خانه انتقال داده شد. همچنین تعدادی کشت اولیه هم به همین طریق با استفاده از فلاسک ۲۵ سانتی‌متر مربع تهیه گردید. ظروف کشت به صورت هفتگی تعویض محیط می‌شد. در خصوص استفاده از آنزیم تریپسین، پس از هموژنیزه کردن تخم‌ها در گریس، با تریپسین ۰/۲۵ g/l تیمار شده و بقیه مراحل همچون روش فوق دنبال شد. تعدادی از سلول‌های کشت شده که خصوصیات مورفولوژیک و زیستی خود را حفظ کردند، روزانه از نظر سلامت و مورفولوژی توسط میکروسکوپ اینورت مورد بررسی قرار می‌گرفتند.

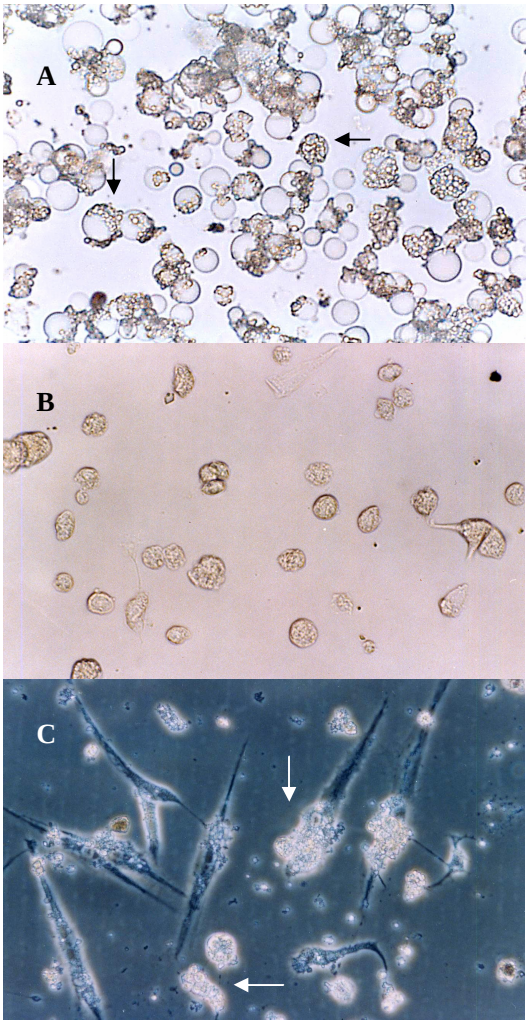
۱- Cell scraper

نتایج و بحث

بعد از گذشت یک هفته تعدادی از کشت‌ها به دلیل آلودگی از بین رفت و تعدادی نیز بدون تغییر خاصی باقی ماند. سلول‌ها بر اساس خصوصیات ریخت‌شناسی، زنده، مرده یا در حال مردن در نظر گرفته می‌شدند. سلول‌های زنده حاشیه‌ی صاف و phase-bright داشتند، در حالیکه سیتوپلاسم سلول‌های در حال مرگ واجد واکوئل‌های گرانوله بود که در زیر میکروسکوپ به صورت خشن دانه‌دار و تیره دیده می‌شد (شکل ۱). سلول‌های مرده از ته فلاسک کنده می‌شدند. بلافاصله بعد از ریختن کشت اولیه در ظرف، کشت‌ها شامل تکه‌های کوچک بافت، تجمعات سلولی و سلول‌های منفرد گرد می‌شد. علاوه بر سلول‌هایی که فعالانه تکثیر می‌شدند، سلول‌های باد کرده و گرانوله شده، توده‌های سلولی کوچک و بقایای سلول‌های مرده همیشه در کشت وجود داشتند.

دستیابی به کشت اولیه با روش مکانیکی جداسازی جنین از تخم

در این روش، بیشتر قطعات جدا شده به ظرف کشت نچسبید و تعداد کمی از آنها زنده ماند. تکه‌های بافت که زنده بودند به ته ظرف چسبیده و بعد از حدود یک هفته مهاجرت سلولی از آنها مشاهده گردید که البته این مهاجرت بسیار کند بود. بیشتر زوائد سیتوپلاسمی سلول‌های فیبروبلاستی که در حال گسترش بودند دیده شد. ذرات بسیار ریز که گاهاً حالت تجمعی پیدا می‌کردند در این نوع کشت زیاد دیده می‌شد. این ذرات ممکن است توسط سلول‌ها تولید شده و یا همان ذرات ناشی از بافت‌های مرده باشند. در مطالعات قبلی نیز به این نکته اشاره شده و به نظر می‌رسد که این یکی از خصوصیات خاص کشت سلول‌های جنینی کرم ابریشم می‌باشد (Inoue & Mitsuhashi, 1988). کلاً در این روش کشت رسیدن به حالت بستر تک لایه سلولی بسیار دیر اتفاق می‌افتد و مستلزم گذشتن زمان طولانی‌است. در ضمن به دلیل وقت زیادی که تهیه این کشت می‌گیرد، تعداد کشت‌هایی که دچار آلودگی می‌شوند در این روش نسبت به بقیه روش‌ها بیشتر است. هر چند که گوناگونی سلولی در این روش بسیار بیشتر از روش‌های آنزیمی است، در اصل با از بین نبردن پیوندهای بین سلولی تعداد کمتری



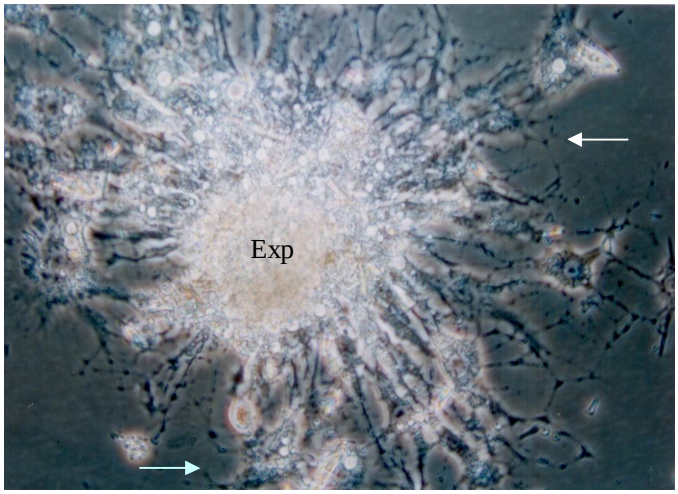
شکل ۱. سلول‌های غیر زنده و همچنین گرانوله شده‌ی در حال مرگ جدا شده از بافت جنینی کرم ابریشم: A– سلول‌های کروی گرانوله شده، B– سلول‌های کروی و دوکی شکل مرده، C– سلول‌های فیبروبلاست گرانوله شده در اولین مراحل رشد.

Fig. 1. Dead and granulated cells that have been separated from silkworm embryonic tissue: A. granulated spherical cells, B. fusiform and spherical dead cells, C. fibroblastic cells granulated in the primary stages of growth.

از انواع سلول‌ها دچار پدیده‌ی «انتخاب طبیعی» می‌شوند و این کشت معرف واقعی‌تری از سلول‌های موجود در بافت جنینی است. Lynn (1996) نیز این روش را بهترین روش برای ایجاد کشت توصیف کرد. هر چند که در تحقیق حاضر رده‌ی سلولی به این روش تولید نشد ولی محققین دیگر موفق به تولید شش رده‌ی سلولی از کرم قوزه‌ی پنبه با استفاده از این روش شدند (Lynn & Shapiro, 1998). همچنین، این روش در تهیه‌ی رده‌ی سلولی از پروانه‌ی *Ephestia kuehniella* Zeller پاسخگوی نیاز محققین بوده است (Lynn & Ferkovich, 2004).

دستیابی به کشت اولیه با روش هموژنیزه کردن

در این روش تعداد زیادی از قطعات بسیار ریز شده‌ی بافت به ته ظرف کشت چسبید و حدود ٤٨ ساعت بعد سلول‌ها شروع به مهاجرت از این قطعات کردند (شکل۲). میتوز در سلول‌های فیبروبلاستی اتفاق افتاده و شبکه‌هایی از سلول‌های فیبروبلاست–مانند شکل گرفت. در این روش تکثیر و مهاجرت سلولی خیلی زود اتفاق افتاد به طوری که در طول یک ماه پس از شروع کار، کشت به صورت بستر تک لایه‌ی سلول در آمد.

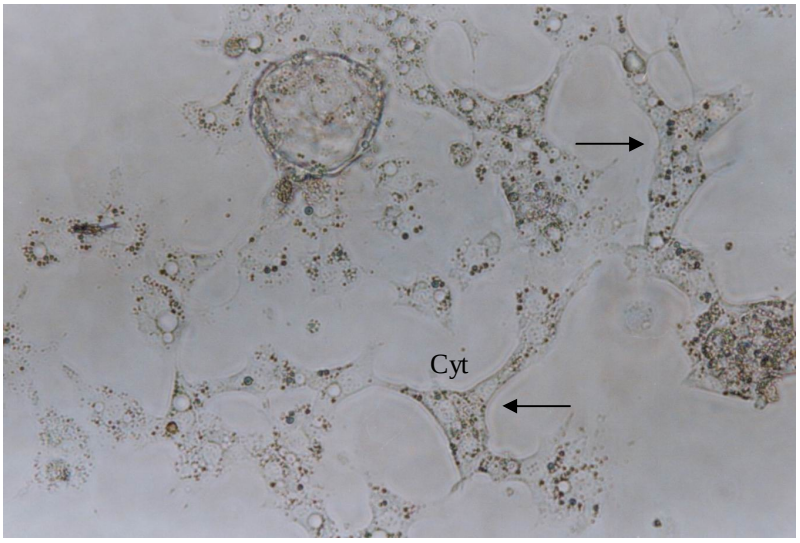


شکل ۲. سلول‌های در حال مهاجرت از بافت جنینی کرم ابریشم (Exp). بزرگنمایی ۴۰۰ برابر.
Fig. 2. Migrating cells from explants of silkworm embryonic tissue (Exp). 400 ×.

از نظر ریخت‌شناسی، حداقل شش نوع سلول در محیط کشت مشاهده شد. سلول‌های فیبروبلاستی که براساس اندازه‌ی هسته و پهنای زوائد سلولی به سه زیر مجموعه قابل تقسیم بودند: نوع A، سلول‌های با هسته‌ی بزرگ و زوائد سیتوپلاسمی بسیار پهن، و دارای تعداد زیادی گرانول در سیتوپلاسم (شکل۳)؛ نوع B، سلول‌های با هسته‌ی کوچک و زوائد پهن ولی نه به پهنای سلول‌های نوع A (شکل٤)؛ نوع C، سلول‌های با هسته‌ی کوچک و انشعاباتی باریک (شکل٥). سلول‌های دوکی شکل نیز از دیگر انواع سلول در ظرف کشت بودند (شکل٦). در فلاسکی که چهار شکل سلولی فوق دیده می‌شد، به ندرت سلول‌های هموسیت–مانند کروی شکل که البته بسیار بزرگ و دارای سیتوپلاسم توری شکل بودند مشاهده گردید. شبکه‌های سلول‌های فیبروبلاست–مانند در بسیاری از جاها تشکیل شد و خوشه‌های سلولی که بیشتر تجمع سلول‌های در حال رشد بودند، در بین این اجتماعات بعد از یک تا دو ماه پدیدار شد. تعداد زیادی سلول‌های دوکی از این خوشه‌های سلولی مهاجرت کردند و در نهایت کل مساحت فلاسک پر شد. سلول‌های فیبروبلاست–مانند شبکه‌ها، و گاهی در اثر تجمع، زنجیره‌هایی را تشکیل دادند که حرکت نبض مانندی را نشان می‌داد. این حرکت معمولاً ۱۰ روز بعد از شروع کشت شروع و دو تا سه ماه بعد هم ادامه داشت. مهاجرت سلول‌های کوچک انکساری بعد از دو هفته قرار دادن کشت‌ها مشاهده شده ولی اغلب بعد از مدتی متوقف می‌گشت. در پلیت‌هایی که سلول‌های کروی شکل (شکل۷) غالب بود، معمولاً شکل سلولی دیگری به‌جز سلول‌های اپیتلیال–مانند دیده نمی‌شد (شکل۸). سلول‌های هموسیت–مانند معمولاً به فلاسک نمی‌چسبیدند و به حالت معلق در محیط کشت قرار داشتند. این شکل‌های سلولی، در مطالعات دیگر نیز برای سلول‌های جنینی کرم ابریشم ذکر شده است (Inoue & Mitsuhashi, 1984; Imanishi *et al*., 1999) ولی آنچه در این مطالعات جالب توجه بوده این است که در کشت از نوع معلق سلولی، نهایتاً سلول‌های کروی شکل رشد کرده و حالت غالب پیدا می‌کنند (Inoue & Mitsuhashi, 1984; Imanishi & Ohtsuki, 1988; Imanishi & Tomita, 1992; Imanishi *et al*., 1999)، در حالیکه در تحقیق حاضر، فقط در یک فلاسک سلول‌های کروی حالت غالب داشتند که در این فلاسک نیز تکثیر آنها بسیار کند بود و به حالت اشباع

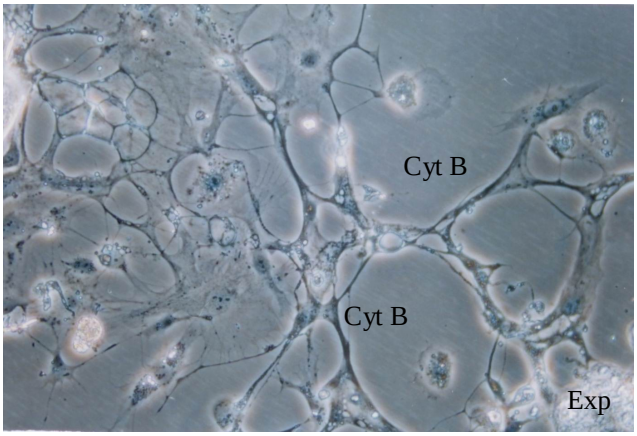
نرسید. در بقیه، حتی بعد از گذشت شش ماه، تکثیر سلولی اتفاق نیفتاد و نهایتاً تنها ظروف کشتی که به حالت اشباع رسیدند، آنهایی بودند که پنج شکل سلولی دیگر را شامل می‌شدند.

همچنین گزارش شده است که سلول‌های موجود در محیط کشت MM باعث تیره شدن محیط کشت می‌شوند و پلیت سلولی ناشی از آنها نیز تیره است (Inoue & Mitsuhashi, 1988)؛ این در حالیست که سلول‌های رشد یافته در محیط TC-100 رنگ محیط کشت را تغییر نداده و دارای پلیت سلولی سفید بودند. تعداد آلودگی که توسط این روش ایجاد می‌شود نسبت به روش قبلی کمتر است و شانس بدست آوردن یک کشت موفق به دلیل بالا بودن تعداد قطعات و کوچک بودن آنها بیشتر است. بسیاری از محققان از این روش برای کشت اولیه‌ی سلول استفاده می‌کنند (Li, 1998; Li *et al.*, 1999; Goodman *et al.*, 2001).



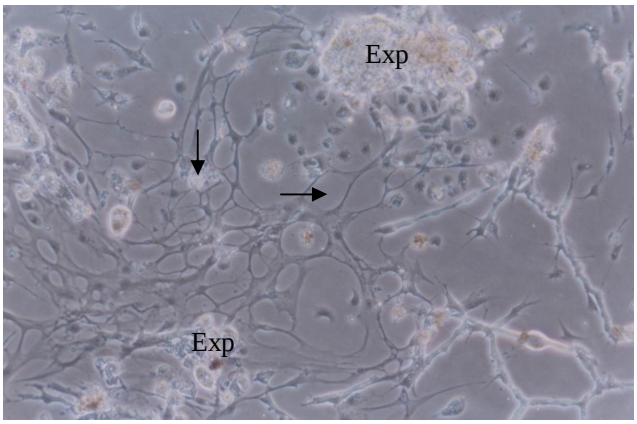
شکل ۳. سلول‌های فیبروبلاستی نوع A بافت جنینی کرم ابریشم با سیتوپلاسم (Cyt) بسیار پهن. بزرگنمایی ۲۰۰ برابر.

Fig. 3. Silkworm embryonic tissue showing fibroblastoid cells, type A, with thick cytoplasm (Cyt). 200 ×.



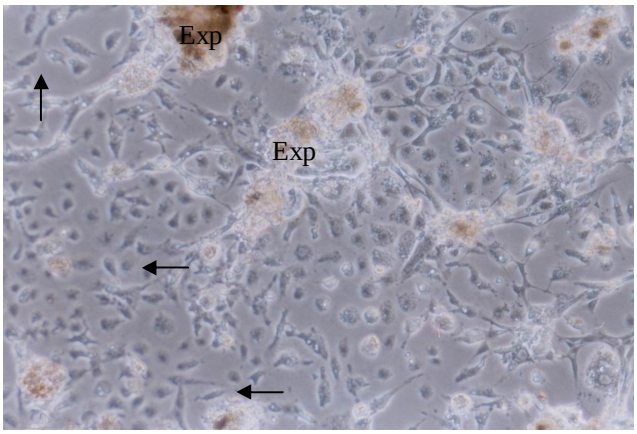
شکل ٤. سلول‌های فیبروبلاستی نوع B بافت جنینی کرم ابریشم با سیتوپلاسم (Cyt) نازک. بزرگنمایی ۴۰۰ برابر.

Fig. 4. Silkworm embryonic tissue showing fibroblastoid cells, type B, with thin cytoplasm (Cyt). 400 ×.

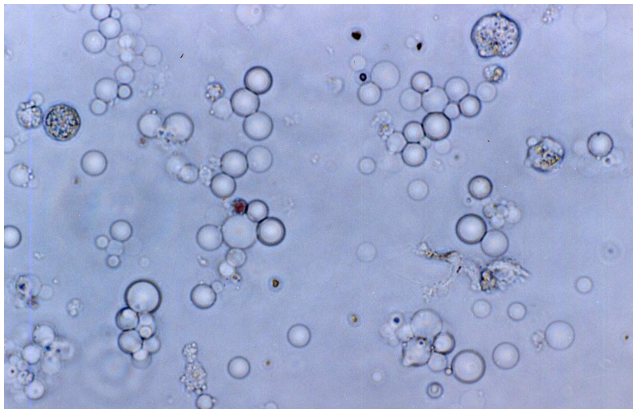


شکل۵. سلول‌های فیبروبلاستی نوع C بافت جنینی کرم ابریشم با انشعابات بسیار باریک سیتوپلاسمی. بزرگنمایی ۲۰۰ برابر.

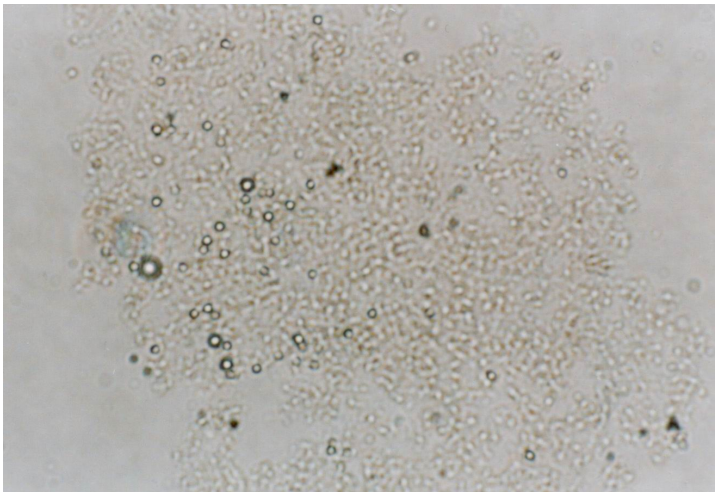
Fig. 5. Silkworm embryonic tissue showing fibroblastoid cells, type C, with very thin cytoplasmic branches. 200 ×.



شکل ٦. سلول‌های دوکی شکل جدا شده از بافت جنینی کرم ابریشم. بزرگنمایی ۲۰۰ برابر.
Fig. 6. Fusiform cells separated from silkworm embryonic tissue. 200 ×.



شکل۷. سلول‌های کروی شکل جدا شده از بافت جنینی کرم ابریشم. بزرگنمایی ۴۰۰ برابر.
Fig. 7. Spheroid cells separated from silkworm embryonic tissue. 400 ×.



شکل ۸. سلول‌های اپیتلیال–مانند جدا شده از بافت جنینی کرم ابریشم. بزرگنمایی ۲۰۰ برابر.
Fig. 8. Epithelioid cells separated from silkworm embryonic tissue. 200 ×.

شکل‌های سلولی که در این کشت‌های اولیه مشاهده شد با آنچه در کشت سلول سایر بافت‌ها یا جنین سایر حشرات گزارش شده، قابل مقایسه است. در تحقیقات Lee & Hou (1992)، سلول‌های کشت شده‌ی پروانه‌ی *Plutella xylostella* L. شکل‌های متفاوت داشتند که شکل کروی غالب بود و بهترین رشد سلولی در ۱۰٪ FBS صورت گرفت. در سه شکل سلولی متفاوت بدست آمده از کشت تخمدان شفیره‌ی سفیده‌ی کوچک کلم، عمدتاً سلول‌های گردی گزارش شده که یا بسیار محکم به سطح چسبیده و یا چسبندگی کمتری داشتند ولی نهایتاً همه میل به تجمع از خود نشان دادند و حالت خوشه‌ای به‌خود گرفته و به همین حالت نیز تکثیر شدند (Mitsuhashi *et al.*, 2003). در کشت اولیه‌ی هموسیت‌های شب‌پره‌ی کلم، شش شکل سلولی گزارش شده است که هر یک بیانگر یکی از انواع سلولی موجود در همولنف حشرات می‌باشد. پلاسموسیت‌ها که به ظرف چسبیده و سیتوپلاسم‌های نازک خود را گسترش می‌دهند، هموسیت‌های گرانوله که به ظرف اتصال پیدا می‌کنند، سلول‌های گویچه‌ای، ائنوسیتوئیدها و پروهموسیت‌ها که در محیط کشت به حالت معلق مشاهده می‌شوند (Mitsuhashi & Shozawa, 1985).

دستیابی به کشت اولیه با روش آنزیمی

همانگونه که قبلاً ذکر گردید، در این روش از دو آنزیم استفاده شد: (۱) تریپسین که آنزیمی است پروتئولیتیک و در کشت سلول پستانداران بسیار پر استفاده است ولی تعدادی از رده‌های سلولی حشره‌ای به آن حساس هستند؛ این آنزیم به هیدرولیز پروتئین‌ها می‌پردازد و با شکستن پیوند بین دو سلول یا سلول و سطح، باعث جداسازی سلول‌ها از یکدیگر و یا از سطح می‌شود، و (۲) دیسپاز که یک پروتئاز است و توسط باکتری *Bacillus polymixa* تولید می‌شود.

با استفاده از آنزیم دیسپاز، تعداد زیادی از سلول‌ها بلافاصله بعد از تهیه سوسپانسیون سلولی مردند، به طوری که بعد از حدود یک هفته از تهیه‌ی کشت، حدود ۱۰٪ سلول‌ها زنده بودند و به‌نظر می‌رسید تقریباً هیچ تکثیر سلولی در کشت‌ها انجام نمی‌شود. لذا، آنزیم دیسپاز برای کشت سلول کرم ابریشم نامناسب تلقی می‌شود. با وجود این، Kishimoto *et al*. (1999) از آنزیم دیسپاز برای کشت بافت چربی کرم ابریشم استفاده کرده و تکثیر سلولی را مشاهده نمودند. همچنین، در مورد پروانه‌ی *Trichoplusia ni* (Hübner)، از طریق قرار دادن بافت معده‌ی میانی در برابر آنزیم دیسپاز، یک رده‌ی سلولی ایجاد شد (Granados & McKenna, 1995).

آنزیم تریپسین به خوبی باعث جداسازی سلول‌ها شد ولی متأسفانه در انتهای کشت بیشتر سلول‌ها از بین رفتند. در تحقیق حاضر، تهیه‌ی کشت اولیه با این روش نیز موفقیت‌آمیز نبود. Goodman *et al*. (2001) از ۱۰ گونه‌ی پروانه برای تهیه‌ی رده‌ی سلولی به روش‌های مختلف استفاده کردند که در بیشتر موارد، کشت‌های موفق آنهایی بودند که از آنزیم جهت انهدام بافت استفاده نشده بود بلکه بافت‌ها یا خرد شده و یا به آرامی در محیط کشت هموژنیزه شده بودند. این در حالی است که محققینی هم به عنوان اولین قدم در ایجاد یک رده‌ی سلولی از بافت جنینی سوسری آمریکایی، *Periplaneta American* (L.)، روند آماده سازی کشت اولیه را با جداسازی سلول‌ها توسط محلول تریپسین انجام دادند. نتایج نشان داد که این محلول در غلظت ۰/۱٪ برای جداسازی سلول‌های جنینی در آخرین مرحله‌ی امبریوژنز بسیار مؤثر بود (Han *et al*., 1997).

با بررسی برآیند یافته‌ها در این تحقیق، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که روش مکانیکی هموژنیزه کردن، نسبت به سایر روش‌ها، برای داشتن یک کشت سلولی موفق از سلول‌های جنینی کرم ابریشم کارآیی بیشتری دارد. هرچند که کشت سلول به روش مکانیکی جداسازی نیز پاسخگو می‌باشد ولی به دلیل وقت‌گیر بودن و مشکل بودن در اولویت دوم قرار می‌گیرد. در مورد کشت سلول‌های کرم ابریشم، خصوصاً بافت جنینی، بهتر است که از تیمار آنزیمی استفاده نشود زیرا سلول‌های این بافت نسبت به این آنزیم حساسیت نشان می‌دهند. در کشت‌های اولیه، بین تخم‌هایی که ۲٤ و ٤۸ ساعت بعد انکوبه شده بودند، تفاوتی در رشد سلول‌ها مشاهده نشد، لذا هریک از این دو مدت زمان برای تهیه کشت مناسب می‌باشد. با توجه به اینکه FBS با غلظت ۲۰٪ رشد سلولی را خیلی بهتر از غلظت ۱۰٪ تسهیل کرد، پیشنهاد می‌شود که برای تهیه‌ی کشت اولیه از این غلظت استفاده شود زیرا سلول‌ها در کشت اولیه هنوز به شرایط آزمایشگاهی ایجاد شده برایشان عادت نکرده و بسیار حساس هستند. بدیهی است که در این حالت تهیه‌ی محیط هر چه غنی‌تر به رشد آنها کمک خواهد کرد. البته بعد از رسیدن به بستر سلولی تک لایه‌ای مناسب، بهتر است سلول‌ها را به مقدار کم سرم عادت داد تا کاربرد آن در آزمایشگاه به‌صرفه باشد؛ و مهمتر اینکه کشت ویروس در محیط دارای سرم کم بیشتر عملی می‌شود و عیار ویروس تولید شده بیشتر خواهد بود.

از آنجایی که کشت و تکثیر سلول حشرات در آزمایشگاه از کارهای بسیار حساس محسوب می‌شود، مقدار، زمان و نحوه‌ی تعویض محیط کشت - با توجه به ترشحات سلولی که سیگنال‌های بین سلولی را کنترل می‌کنند - امری است که در حین سادگی از اهمیت بالایی برخوردار است. با توجه به تفاوت‌های بسیار زیاد سلول‌های حشرات با سلول‌های انسانی، دستیابی به فناوری کشت حشرات با توجه به کاربردهای گسترده‌ی آن در علوم مختلف می‌تواند از موقعیت‌های علمی برای کشور به حساب آید. پیشنها می‌شود که در مطالعات بعدی، با استخراج DNA سلول‌های فوق به بررسی خصوصیات مولکولی و ژنتیکی آنها پرداخته شود تا بتوان به اطلاعات مفیدی در مورد آنها دست یافت.

سپاسگزاری

این تحقیق در قالب پایان نامه‌ی کارشناسی ارشد نگارنده‌ی اول و با حمایت مالی گروه پژوهشی کرم ابریشم دانشگاه گیلان انجام یافته است. همچنین از مرکز تحقیقات ابریشم ایران به خاطر در اختیار گذاشتن نمونه‌ها سپاسگزاری می‌گردد.

منابع

Bello, F. J., Brochero, H., Boshell, J., Olano, V. & Rey, G. (1997) Establishment and characterization of a cell line from the mosquito *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae). *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 92, 123-128**.**

Carpentier, G., Tian, L., Cossette, J., Lery, X. & Belloncik, S. (2002) Characterization of cell lines developed from the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera: Chrysomelidae). *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal* 38, 73-78.

Cha, S. J. & Han, S. S. (1999) Establishment of a novel cell line from *Plutella xylostella* fat bodies. *Korean Journal of Entomology* 29, 121-126.

Ephrussi, B. & Beadle, G. W. (1935) La transplantation des ovaires chez la *Drosophila*. *Bulletin Biologique France et Belgique* 69, 492-505.

Ferkovich, S. M., Morales-Ramos, J. A., Rojas, M. G., Oberlander, H., Carpenter, J. E. & Greany, P. (1999) Rearing of ectoparasitoid *Diapetimorpha introita* (Hymenoptera: Ichneumonidae) on an artificial diet supplemented with insect cell line-derived factors. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal* 35, 352-358.

Fornelli, F., Minervini, F. & Logrieco, A. (2004) Cytotoxicity of fungal metabolites to lepidopteran (*Spodoptera frugiperda*) cell line (SF-9). *Journal of Invertebrate Pathology* 85, 74-79.

Funk, C. J., Hunter, W. B. & Achor, D. S. (2001) Replication of insect iridescent virus 6 in a whitefly cell line. *Journal of Invertebrate Pathology* 77, 144-146.

Gong, C. L., Kobayasi, J., Jin, W. & Wu, X. F. (2000) Expression of *Bombyx mori* prothoracicotropic hormone gene using recombinant *Hyphantria cunea* nuclear polyhedrosis virus. *Acta Sericologica Sinica* 26, 150-154.

Goodman, C. L., El Sayed, G. N., McIntosh, A. H., Grasela, J. J. & Stiles, B. (2001) Establishment and characterization of insect cell lines from 10 lepidopteran species. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal* 37, 367-373.

Goodman, C. L., McIntosh, A. H., El Sayed, G. N., Grasela, J. J. & Stiles, B. (2001) Production of selected baculoviruses in newly established lepidopteran cell lines. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal* 37, 374-379.

Goodman, C. L., Wagner, R. M., Nabli, H., Davis, D., Crimmins, S. & Okuda, T. (2002) Synthetic activity of cultured corpora cardiaca/corpora allata complexes from the two-spotted stinkbug, *Perillus bioculatus. In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal* 38, 128-132.

Grace, T. D. C. (1962) Establishment of four strains of cells from insect tissue grown in vitro. *Nature* 195, 788-789.

Granados, R. R. & McKenna, K. A. (1995) Insect cell culture methods and their use in virus research. pp. 13-39 in Shuler, M. L., Wood, H. A., Granados, R. R. & Hammer, D. A. (Eds) *Baculovirus expression system and biopesticides*. 259 pp. Wiley-Liss.

Han, S. S., Seo, Y. R., Park S. C., Lee, J. J. & Ryui, J. C. (1997) Establishment of optimal condition for primary cell culture of cockroach embryos. *Korean Journal of Entomology* 27, 341-344.

Hunter, W. B., Hsu, H. T., Parker, B. L., Skinner, M. & Lewis, T. (1995) Establishing thrips cell cultures to study tospoviruses. *Thrips biology and management*: *Proceedings of the 1993 International Conference on Thysanoptera*, 163-166.

Hunter, W. B. & Polston, J. E. (2001) Development of a continuous whitefly cell line [Homoptera: Aleyrodidae: *Bemisia tabaci* (Gennadius)] for the study of begomovirus. *Journal of Invertebrate Pathology* 77, 33-36.

Imanishi, S., Cho, E. S. & Tomita, A. (1999) Novel *Bombyx mori* cell lines. *Applied Entomology and Zoology* 34, 259-266.

Imanishi, S. & Ohtsuki, Y. (1988) Characterization of cell lines established from embryonic tissues of several races of the silkworm, *Bombyx mori*, cultured *in vitro. Journal of Sericultural Sciences of Japan* 57, 184-188.

Imanishi, S. & Tomita, S. (1992) Suspension-type cloned cell lines from embryo tissues of *Bombyx mori. Japan Agricultural Research Quarterly* 26, 196-202.

Inoue, H., Kobayashi, J., Kawakita, H., Miazaki, J. I. & Hirabayashi, T. (1991) Insect muscle cell line forms contractile tissue networks in vitro. *In Vitro Cellular and Developmental Biology* 27, 837-840.

Inoue, H. & Mitsuhashi, J. (1984) A *Bombyx mori* cell line susceptible to a nuclear polyhedrosis virus. *Journal of Sericultural Sciences of Japan* 53, 108-113.

Inoue, H. & Mitsuhashi, J. (1988) Characterization of a new continuous cell line from silkworm (*Bombyx mori*) embryos. *Applied Entomology and Zoology* 23, 8-14.

Iwabuchi, K. (2000) A continuous cell line derived from larval fat bodies of *Thysanoplusia intermixa* (Lepidoptera: Noctuidae). *Applied Entomology and Zoology* 35, 245-249.

Kishimoto, A., Nakato, H. & Izumi, S. (1999) Biosynthesis of major plasma proteins in the primary culture of fat body cells from the silkworm, *Bombyx mori*. *Cell Tissue Research* 297, 329-335.

Lee, S. H. & Hou, R. F. (1992) Establishment of a cell line derived from embryos of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). *Journal of Invertebrate Pathology* 59, 174-177.

Levin, D. B. & Huang, J. (1999) *Spodoptera littoralis* type B nucleopolyhedrovirus infection of a grasshopper cell line. *Journal of Invertebrate Pathology* 74, 184-192.

Li, G. (1998) New cell line from embryos of *Mythimna separata* (Lepidoptera: Noctuidae). *Entomologica Sinica* 5, 89-94.

Li, G., Song, J., Song, J., Yue, S., Wang, Z. & Zhang, G. (1999) New cell line establishment of a cell line from embryos of *Dendrolimus superans*. *Journal of Forestry Research* 10, 99-102.

Loeb, M. J. & Hakim, R. S. (1996) Insect midgut epithelium in vitro: an insect stem cell system. *Journal of Insect Physiology* 42, 1103-1111.

Lucas, P. & Meillour, P. N. (1997) Primary culture of antennal cells of *Mamestra brassicae*: morphology of cell types and evidence for biosynthesis of pheromone-binding proteins in vitro. *Cell and Tissue Research* 289, 375-382.

Lynn, D. E. (1996) Development and characterization of insect cell line. *Cytotechnology* 20, 3-11.

Lynn, D. E. (2001) Novel techniques to establish new insect cell lines. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal* 37, 319-321.

Lynn, D. E & Ferkovich, S. M. (2004) New cell lines from *Ephestia kuehniella*: characterization and susceptibility to baculoviruses. *Journal of Insect Science* 4(9), 1-5.

Lynn, D. E. & Shapiro, M. (1998) New cell lines from *Heliothis virescens*: characterization and susceptibility to baculoviruses. *Journal of Invertebrate Pathology* 72, 276-280.

Maeda, S., Obinata, T., Fujiwara, M., Horiuchi, H., Saeki, T., Sato, Y. & Furusawa, M. (1989) Production of human α-interferon in silkworm using a baculovirus vector. *Nature* 315, 592-594.

McHolland, L. E. & Mecham, J. O. (1999) *Culicoides variipennis* (Diptera: Ceratopogonidae) embryo cell lines developed from field populations: susceptibility to bluetongue viruses. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal* 35.

Mitsuhashi, J., Hayasaka, S., & Imanishi, S. (2003) Continuous cell lines from the common white, *Pieris rapae crusivora* Boisduval. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal* 39, 114-116.

Mitsuhashi, J. & Shozawa, A. (1985) Continuous cell line from larval hemocytes of the cabbage armyworm, *Mamestra brassicae*. *Development Growth Different* 27, 599-606.

Shepppard C. A. & Lynn, D. E. (1996) Immunoreactivities for calcium signaling components and neural-like properties of Colorado potato beetle cell line. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 33, 197-20**.**