معرفی پروتئین‌های سرم خون، خالص سازی و تعیین وزن مولکولی ایمونوگلوبولین(IgM) ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان و آمور

احمد غرقی*[۱]، علیرضا رضوانی گیل‌کلایی[۲]

۱- موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی ، تهران ، ایران، صندوق پستی :۱۳۳-۱۵۷۴۵

۲- دانش آموخته دانشکده دامپزشکی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۷۹/۱/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۵/۶

چکیده

در این مقالعه پژوهشی مقادیر و خصوصیات پروتئینها و ایمنوگلوبولینهای ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان و آمور در شرایط فیزیولوژیک طبیعی آب و هوایی ایران مورد بررسی قرارگرفته است. مجموع مقادیر ایمونوگلوبولین ها (IG) در پستانداران، مانند موش و انسان، به طور معمول بین ۱۵-۲۰ میلی گرم در میلی لیتر و در حدود ۲۵ درصد کل پروتئین های سرم خون را تشکیل می دهند. در این پژوهش مشخص گردید. در حالیکه ماهیان استخوانی تنوع ایمنوگلوبین های پستانداران را ندارند ولی غلظت IgM در کل پروتئین های سرم خون ماهیان قزل آلای رنگین‌کمان و آمور پرورشی در کشور بالاتر از مقادیر ایمونوگلوبولین ها (IG) پستانداران است. همچنین مشخص گردید غلظت پروتئین تام سرم خون ماهیان آلای رنگین‌کمان و آمور پرورشی در کشورمان به طور کلی پایین تر از غلظت پروتئین تام در سرم خون پستانداران است. بررسی مطالعات و پژوهش های سایرین و همچنین اندازه گیری خود ما نشان می دهدکه هیچ پاسخ روشنی به این اختلاف وجود ندارد. جداسازی و خالص سازی ایمونوگلوبولین سرم (IG) ماهی با استفاده از روش تولید آنتی بادی سرم ماهی در خرگوش و تصفیه آنتی بادی با روش دیالیز و استفاده از تجزیه و تحلیل ایمنوالکتروفورزیس وکروماتوگرافی میل ترکیبی، مشخص شد. وزن مولکولی زنجیره سنگین ایمونوگلوبولین ماهی قزل آلا ۸۲ و زنجیره های سبک متمایز آن حدود ۲۱ کیلو دالتون و وزن مولکولی زنجیره سنگین و سبک IgM برای ماهی آمور به ترتیب ۷۰,۴ و ۲۵,۳ کیلو دالتون تعئین گردید.

کلمات کلیدی: پروتئین سرم، خالص سازی، وزن مولکولی ایمونوگلوبولین(IgM)، قزل‌آلای رنگین‌کمان و آمور.

* عهده‌دار مکاتبات (✉)، dr.ahmadghoroghi@gmail.com

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-05]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1397.12.3.1.9]

مقدمه

امروزه حدود ۲۱۷۰۰ گونه 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 استخوانی (ماهیان خاویاری و شبه خاویاری[6])، ماهیان دو دمی (شش‌دار)، سلوکانتها[7] و مارماهیان دهان گرد مانند میکسینیدها[8] یا پترومیزونیدها[9] (لامپری) می‌باشند (Avtalion, 1969).

بررسی خصوصیات پروتئینهای سرم خون ماهیان در تعداد محدودی از ماهییان مطالعه گردیده است. 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 (Dunier *et al.*, 1993; Dunier and Siwicki, 1993; Fange, 1993; Fontenot, 198). 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 (Avtalion, 1969).

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 (Avtalion, 1969). 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 (وثوقی و مستجیر، ۱۳۷۱؛ Jiang *et al.*, 1991). 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 قزل‌آلای رنگین‌کمان و آمور که از مهمترین ماهیان پرورشی 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 بدست داد. ارزیابی پروتئینهای سرم خون این ماهیان و تعیین مقادیر ایمنوگلوبولین آنان در شرایط آب و هوای ایران از مهمترین اهداف این مطالعه و مقدمه‌ای جهت تحقیقات آینده برای اجرای واکسیناسیون ماهیان پرورشی در

[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)

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-05]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1397.12.3.1.9]

ایران محسوب می‌گردد. 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. بیشترین کوششها برای دانستن نیازمندیهای غذایی ماهیان بر روی ماهیان قزل‌آلا و آزاد انجام شده است. مقادیر اسید آمینه‌های ضروری که می‌بایستی در جیره روزانه شش گونه ماهی به قرار زیر موجود باشد در جدول ۱ آمده است (Fuda *et al.*, 1991).

جدول ۱: نیازمندیهای شش گونه ماهی به اسید آمینه‌های ضروری (درصد)

اسید آمینه ضروری	قزل‌آلای رنگین‌کمان	چینوک 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)	½ (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. به عنوان مثال کمبود تریپتوفان باعث بیماری اسکولیوزیس[1] و لردوزیس[2] در ماهی آزاد و قزل‌آلا می‌گردد (Fuda *et al.*, 1991; Dorson *et al.*, 1989) و افزایش مقدار آرژنین در جیره غذایی قزل‌آلا می‌تواند باعث افزایش چشمگیر رشد آنان شود (Dorson *et al.*, 1989).

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 انسانی دارد. مطالعات ایمنولوژیکی ماهیان پرورشی در کارگاههای تکثیر و پرورش ضرورت 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 (Fuda *et al.*, 1992) که می‌تواند عامل بسیار مهمی در وقفه برنامه‌های تکثیر

[1]. Scoliosis
[2]. Lordosis

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-05]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1397.12.3.1.9]

و پرورش ماهیان محسوب گردد.عامل (SAF) یک IgM با ملکول تترامریک با وزن ملکولی ۷۶۰ کیلو دالتون است که قادر به واکنش با اسپرم سایر گونه‌های ماهیان استخوانی نیز می‌باشد (Fuda *et al.*, 1992).

مواد و روشها

تعداد ۲۲۰ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان از دو ناحیه متفاوت پرورش ماهیان سردآبی یکی در فیروزکوه و دیگری در کلاردشت در سنین بین ۱۶-۷ ماهگی نمونه‌برداری شدند (جدول ۲). هم زمان تعداد ۲۱۰ قطعه ماهی آمور از دو کارگاه تکثیر و پرورش ماهیان گرم‌آبی 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 ۳). 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 و ماهی را درون حوله مرطوب بصورت طاقباز درآورده بطوریکه شکم کمی خمیده (محدب) شده و از ورید دمی مقدار ۵ تا ۱۰ میلی لیتر خونگیری شده و سرم آنها جداسازی گردید. ماهیان با این روش خونگیری کاملا سالم و زنده دراستخر آب رها گردیدند و هیچگونه تلفاتی دیده نگردید.

جدول ۲: زمان، سن و تعداد ماهیان قزل‌آلا نمونه‌برداری شده

زمان	مهر	آبان	آذر	دی	بهمن	اسفند	اردیبهشت		خرداد	
سن (ماه)	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴	۱۵	۱۶
تعداد	۱۰	۱۵	۲۸	۲۹	۲۹	۲۹	--	۳۹	--	۴۳

جدول ۳: زمان، سن و تعداد ماهیان آمور نمونه‌برداری شده

زمان	اسفند	فروردین	اردیبهشت	خرداد	تیر
سن (ماه)	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲
تعداد	۳۶	۳۶	۴۴	۴۵	۴۹

زمان شروع نمونه‌برداری برای ماهی آمور را در سن دو ماهگی پیش‌بینی گردیده بود، 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 افتاد. 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 فرانسه و برای تعیین مقدار پروتئین تام سرم از دستگاه اتوآنالایزر هیتاچی مدل ۷۰۴ استفاده 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.

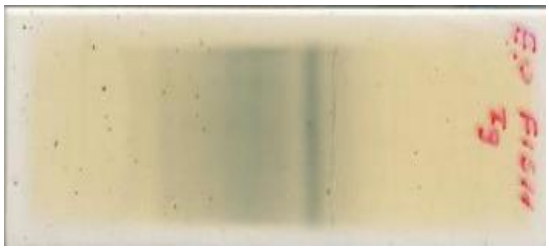
[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-05]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1397.12.3.1.9]

تهیه آنتی سرم پلی والان ضد سرم ماهی

برای تهیه آنتی سرم پلی والان ضد سرم ماهی از تزریق متوالی به دو خرگوش سفید آزمایشگاهی در انسیتو پاستور تهران استفاده گردید. هر خرگوش به میزان ۱/۵ و ۰/۵ میلی لیتر سرم خون ماهیان آمور و قزل‌آلا بطور جداگانه بصورت فاصله هفتگی داخل وریدی آنتی ژن (سرم ماهی) دریافت نمودند. در دوره استراحت برای چند هفته تزریق انجام نگردید. پس از تزریقات متوالی و دوره استراحت خونگیری جهت شناسایی آنتی بادی ها صورت گرفت. واکنش ایمونودیفوژن ژل با آنتی بادی (خرگوش) و آنتی ژن (سرم ماهی) روی لام موجب ایجاد رسوبات اختصاصی گردید که تولید آنتی بادی پلی والان ضد سرم ماهی تائید گردید.

خالص‌سازی ایمنوگلوبولین ماهیان

برای خالص نمودن ایمنوگلوبولین ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان و آمور از سولفات آمونیوم ۵۰ درصد استفاده گردید. 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 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 گردید و محل دقیق الکتروفورتیکی Ig ماهیان مورد آزمایش را مشخص نمودیم.



شکل ۱: باند پررنگ IgM خالص شده

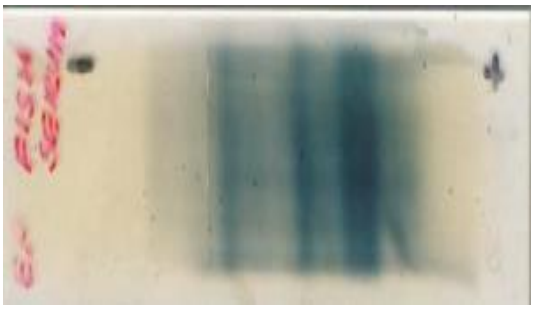
تعیین وزن مولکولی توسط فیلتراسیون ژل کروماتوگرافی:خالص سازی و وزن مولکولی ایمنوگلوبین ماهیان آمور و قزل آلا با استفاده از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون (ساخت کارخانه فارماسیای سوئد) با ستون حاوی ۳۰۰ -Sephacryl S در ابعاد ۱/۶ × ۵۷ سانتی متر تخت با حجم (V) ۱۱۴/۶ میلی لیتر شسته و تعیین شد.

نتایج

در این بررسی با روش الکتروفورز پروتئین‌های موجود در سرم خون ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان 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 شد. سپس با رنگ‌آمیزی

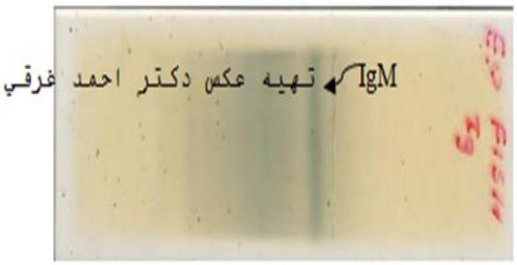
[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-05]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1397.12.3.1.9]

باندهای حاصل از مهاجرت پروتئین‌ها و پس از ترسیم منحنی‌های مربوط به هر یک از باندها توسط دستگاه دانسیتومتر با فیلتر زرد ۵۸۰ نانومتر، مقادیر کمی هر یک از اجزاء پروتئین‌های سرم ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان و آمور تعیین گردید.



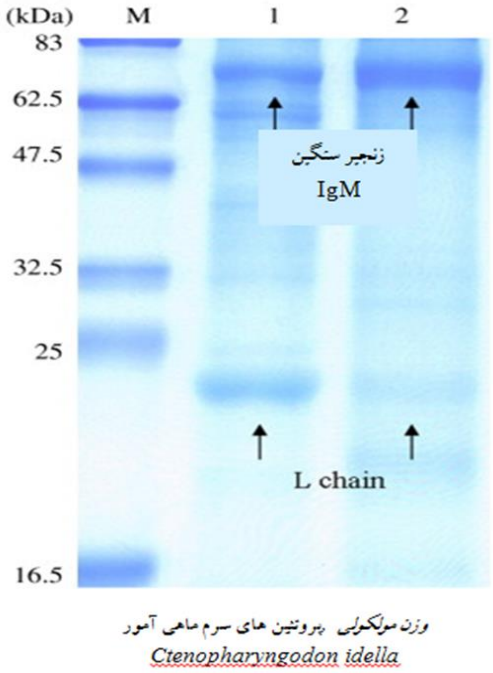
شکل ۲: پروتئین های سرم خون ماهی قزل آلای رنگین کمان

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 گردید و سپس ایمنوگلوبولین خالص شده را دوباره الکتروفورز گردید 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.

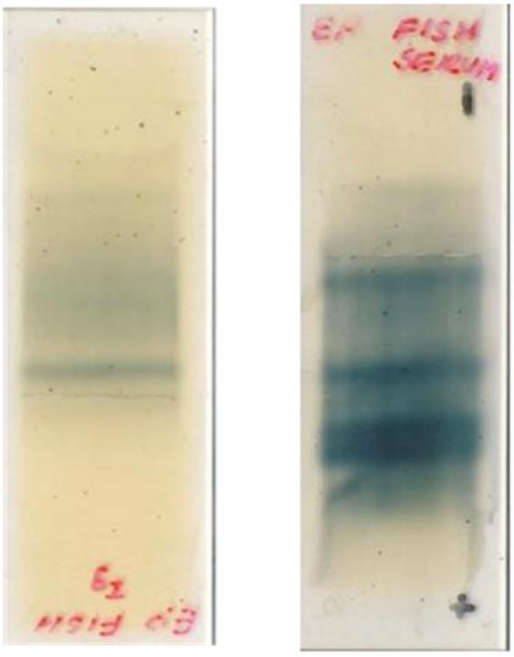


شکل ۳: IgM خالص شده ماهی قزل آلای رنگین‌کمان

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



شکل ۴: پروتئین های سرم ماهی آمور و IgM خالص شده



شکل ۵: پروتئین های سرم ماهی قزل آلای رنگین‌کمان و IgM خالص شده

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-05]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1397.12.3.1.9]

میـانگین گلبـولین آلفـا یـک در قـزل‌آلا ۱۷/۳ میلی‌گرم و در ماهی آمور ۶/۵ میلی‌گـرم در میلی‌لیتـر و میانگین گلبولین آلفا دو در سرم قزل‌آلا ۴/۴ میلی‌گرم و در ماهی آمور ۰/۴ گرم در میلی‌لیتر و میـانگین IgM در قـزل‌آلا ۴/۹۴ میلی‌گـرم و در آمـور ۳/۴۶ میلی‌گـرم در میلی‌لیتر محاسبه گردید (جداول ۴ و ۵). شکل ۶ مقادیر پروتئین‌های دو نمونه سرم خون ماهیان قـزل‌آلا و آمـور که مورد آزمایش الکتروفورزیس قرار گرفتنـد را نشـان می‌دهد.



شکل ۶: مقادیر پروتئین‌های سرم خون قزل‌آلای رنگین-کمان و آمور

جدول ۴: میانگین مقادیر پروتئین‌های سرم خون ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان 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	α 1 mg/ml
۴/۴	۴/۱	۳/۷	۴/۵	۳/۷	۲/۷	۴/۴	۷/۵	¾	α 2 mg/ml
۴/۹۴	۶	۶	۴/۶	۴/۲	۵/۲	۵/۳	۵/۲	۳/۳	IgM mg/ml

پروتئین تام سرمTP - آلبومینALB - آلفا یک آلفا دو ، گلوبولین α 1 ، α 2 -گاماگلوبولینIgM

شکل ۵: میانگین مقادیر پروتئین‌های سرم خون ماهی آمور در سنین مختلف رشد

جمع: ۲۱۰	۴۹	۴۵	۴۴	۳۶	۳۶	تعداد ماهی
میانگین	تیر	خرداد	اردیبهشت	فروردین	اسفند	زمان
کل	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	α1 mg/ml
۴	۲/۷	۲/۷	۴/۱	۲/۳	۱۰/۶	α 2 mg/ml
۳/۴۶	۱/۸	۴/۷	۴/۳	۱/۱	۵/۴	IgM mg/ml

پروتئین تام سرمTP - آلبومینALB - آلفا یک آلفا دو ، گلوبولین α 1 ، α 2 -گاماگلوبولینIgM

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-05]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1397.12.3.1.9]

بحث

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 (Avtalion, 1969). 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 (Ghoroghi, 2009).

همچنین مقدار غلظت پروتئین در پلاسمای قزل‌آلای رنگین کمان سالم بین ۵۰-۳۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر گزارش شده است مقدار پروتئین در سرم ماهیان نیز ۳۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر گزارش شده است (Itami *et al*., 1988).

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 مقدار ایمنوگلوبولین را در سرم ماهیان ۷-۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بیان می‌دارد در حالی که دکتر سویچی از آزمایشگاه آسیب‌شناسی و ایمنولوژی انستیتو 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 (Itami *et al*., 1988).

جدول ۶: مقدار طبیعی پروتئین تام و ایمنوگلوبولین در سرم و پلاسمای ماهیان

مقدار پروتئین	پلاسما	۵۰-۳۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر	(۱۳)
	سرم	۳۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر	(۱۱)
مقدار IgM	پلاسما	۲۰-۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر	(۱۳)
	سرم	۷-۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر	(۱۲)
	صفرا	۰/۰۰۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر	(۱۲)

مقدار پروتئین تام سرم ماهیان آزمایش شده

در بررسی‌های آزمایشگاهی و الکتروفورتیکی این تحقیق 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

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-05]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1397.12.3.1.9]

حداقل میـزان طبیعـی می‌باشـد و در مـاهی آمـور بسـیار پائین‌تر از میزان طبیعی است، هیپوپروتئینی ماهیان آمـور بررسی شده علامت درمانگاهی بارز سـوء تغذیـه شـدید آنها می‌باشد و احتمال بروز مرگ و میر ناشی از عوامـل بیماریزا در آنهـا بسـیار زیـاد می‌باشـد.نگارنده ایـن نـوع سوء تغذیـه را ناشـی از کمبـود مقـدار پـروتئین جیـره و نـامنظم دادن غـذا و احتمـال درگیـر بـودن آنهـا بـا بیماری‌های انگلی مزمن می‌داند.

مقدار آلبومین سرم ماهیان آزمایش شده

یکی از پروتئین‌هایی که بواسطه وزن مولکولی کم حرکت سریعی داشته و به طرف قطـب مثبـت مهـاجرت نمود، آلبومین سرم بـود. مقـدار ایـن پـروتئین نسـبت بـه گلوبولینهای سرم بسیار کم می‌باشد و ایـن نسـبت در دو گونه ماهیان سرد آبی و گرم آبی مورد آزمـایش کـاملاً مشـهود می‌باشـد و آزمایشـهای سـرولوژیک مـا نشـان می‌دهد این وضعیت عکس نسبت آلبومین بـه گلوبـولین در پستانداران (انسان) می‌باشد.

داده‌های به دست آمده از دسـتگاه دانسـیتومتر سـبیا پرفرنس حاکی از آن است که مقـدار متوسـط آلبـومین در مـاهی قـزل‌آلا حـدود ۳۰ درصـد و در مـاهی آمـور حـدود ۲۶ درصـد پـروتئین تـام سـرم می‌باشـد و مـابقی پروتئین آنان را گلوبولینها تشکیل می‌دهنـد، ایـن نسـبت در مقایسه با انسـان بـرعکس می‌باشـد، در انسـان مقـدار آلبـومین ۸۰-۷۰ درصـد و گلوبولینهـا ۳۰-۲۰ درصـد پروتئین تام سرم می‌باشد.

جدول ۷: مقایسه مقدار آلبومین و گلوبولینهای ماهی و انسان

	درصد آلبومین	درصد گلوبولین‌ها	نسبت آلبومین به گلوبولین‌ها
آمور	۳۶	۷۴	۰/۴۹
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 مقدمـه توضـیح داده شده است این موضـوع بـه علـت نقـص در سیسـتم دفع مواد نیتروژنی به شکل ترکیبات محلـول آمونیـاکی از طریق بافت آبشش به محیط آب می‌باشـد کـه باعـث کاهش آلبومین در سرم خون می‌گردد.

این وضعیت جدا از خروج مواد نیتروژنی متـابولیزه شده توسط کلیه (ادرار) و یا باقی‌مانده غذای هضم شده در لوله گوارش می‌باشـد (Dorson *et al*., 1989). لـذا پرورش‌دهندگان ماهی با دانستن وضعیت پـروتئین سـرم در شـرایط مختلـف رشـد می‌تواننـد کمیـت و کیفیـت پروتئین جیـره غـذایی را تعیـین و برنامـه غـذادهی را بـه طریقه علمی تنظـیم کننـد و در صـورت افـزایش مقـدار آمونیاک نسـبت بـه تصـفیه بـه موقع آب و یـا افـزایش جریان آب ورودی و یا خروجی اسـتخرها اقـدام کننـد. ایـن موضـوع ضـرورت میـزان پـروتئین بیشـتر در جیـره غذایی ماهیان پرورشی، تنظیم برنامـه غـذادهی و تصـفیه به موقع آب استخرها را توجیه و تاکید می‌کند.

همانطور که در منحنی الکتروفـرزیس سـرم ماهیـان مشاهده می‌گردد آلبومین سرم بسیار کمتر از مقدار آلفـا یک می‌باشـد. مقـدار آلبـومین سـرم خـون بـرای مـاهی قزل‌آلا ۱۲ میلی‌گرم و برای ماهی آمـور ۵ میلی‌گـرم در میلی‌لیتر محاسبه گردید.

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-05]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1397.12.3.1.9]

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 جداول ۴ و ۵ 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 پروتئین‌های 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 (غرقی، ۱۳۷۵; Dunier *et al*., 1993; Dunier and Siwicki, 1993; Fange, 1993)

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 (Avtalion, 1969). سلولهای تولیدکننده ایمنوگلوبولین (پلاسموسیتها) ممکن است در اغلب بافتهای لندومیلوئید یافت شوند و احتمالاً در همه ماهیان لنفوسیتها از دیواره روده تراوش می‌شوند.

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 (Ghoroghi, 2009).

Roberts در در سال ۱۹۸۹ 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.

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 (غرقی، ۱۳۸۱؛ Fuda *et al*., 1991; Ghoroghi, 2009) 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

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-05]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1397.12.3.1.9]

اواخر خرداد به ۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر افزایش یافته است، ماهیان قزل آلا بواسطه 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 موضعیت در خصوص ماهیان آمور مورد آزمایش کاملاً صدق نمی‌شکلد 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 بور از کارگاه پرورش ماهی حوالی بهشهر نمونه‌برداری شدند. در این کارگاه انواع بچه ماهیان در حداقل آب ممکنه و تقریباً بدون این که تغذیه 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 (جدول ۴ و ۵) 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.

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-05]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1397.12.3.1.9]

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 (Itami *et al*., 1988).

جدول ۸: میانگین پروتئین تام و فراکسیونهای آن در سرم خون ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان و آمور

	پروتئین سرم mg/ml	آلبومین سرم mg/ml	گلوبولین سرم mg/ml	نسبت آلبومین به گلوبولین
قزل‌آلا	۳۸/۵	۱۲	۲۶/۵	۰/۴۵
آمور	۱۹/۵	۵	۱۴	۰/۳۶
انسان	۷۰	۳۰	۲/۳	۱۳/۱

سایر نتایج آزمایشگاهی به دست آمده از الکتروفورز سرم خون ۲۲۰ قطعه قزل‌آلا و ۲۱۰ 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.

سپاسگزاری

سپاس و امتنان از آقای دکتر سهراب رضوانی مشاور محترم رئیس موسسه تحقیقات علوم شیلاتی، آقای دکتر سید محمد حسین حسینی عضو هیئت علمی انسیتو پاستور، آقای دکتر فرشاد نقشوار رئیس بخش پاتوبیولوژی دانشگاه مازندران و دکتر احمدیان مسئول آزمایشگاه بیمارستان بوعلی سینای ساری مساعدت زیادی در انجام آزمایشها مبذول داشتند. همچنین آقای علیرضا فلاحت کارشناس 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 می‌کنیم.

منابع

۱. غرقی، ا.، ۱۳۷۵. شناسایی و بررسی پروتئین‌های سرم خون ماهی اوزون‌برون *Acipenser stellatus*. اولین کنگره جانورشناسی ایران.

۲. غرقی، ا.، ۱۳۸۱. خالص سازی و تعیین نسبی وزن مولکولی پروتئین های سرم خون ماهی آمور *Ctenopharyngodon idella* مجموعه مقالات سومین گردهمائی دامپزشکان علوم بالینی ایران.

۳. وثوقی، غ.ح.، مستجیر، ب.، ۱۳۷۱. ماهیان آب شیرین. انتشارات دانشگاه تهران. ۳۱۷ صفحه.

4. Avtalion, R.R., 1969. Temperature effect on antibody Production and immunological memory in carp (*Cyprinus carpio*) immunized against bovine serum albumin (BSA). Immunology. 17(6):927-31.
5. Dorson, M., Perrier, H., Perrier, C, Torchy, C., 1989. Antibodies in mucus and other secretions in fish. Ichtyophysiology. 13, 31-42.
6. Dunier, M., Siwicki, 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.
7. Dunier, M., Siwicki, A.K., 1993. Study of the effects of pollutant on fish defenses

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-05]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1397.12.3.1.9]

mechanisms. Present at the international work shop and training course in Poland. Aug 23- Sep 3, 1993.
8. Fange, R., 1993. Blood cells, Hemopoiesis and Lymphomyeloeid tissues. The Nordic Symposium on Fish Immunology. Lysekil. 19-22 may.
9. Fontenot, J., 1981. Nutrient Requirements of Coldwater Fish. National Academy Press, Washington, D.C.
10. Fuda, H. Soyano, K., Yamasaki, F., Hara, A. 1991. Serum immunoglobulin M (IgM) during early development of masu salmon. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Molecular & Integrative Physiology. 99(4)637-643.
11. Fuda, H., Hara, A., Yamasaki, F., Kobayashi, K.A., 1992. A Peculiar immunoglobin M (IgM) identified in egg of chum salmon (*Onchorhynchus keta*).

Development and Comparative Immunology. 16(5) 415-423.
12. Ghoroghi, A., 2009. Serological comparison of *Onchorhynchus mykiss* in various growth stage in Iran fish farming. Journal of Comparative Pathology, 141(4), 287-287.
13. Itami, T., Takahashi, Y., Okamoto, T., Kubono, K., 1988. Purification and characterization of immunoglobulin in skin mucus and serum of ayu (*Plecoglossus altivelis*). Bulletin of Japanese Society for the Sciences of Fish. 54(9), 1611-1617.
14. Jiang, Y., Li, Y., Yu, P., 1991. A preliminary study of immunorespnse of grass carp. Hydrobiology. 2(4), 321-326.
15. Roberts, R.J., 1989. Fish pathology. 4th Edition. Wiley-Blackwell. 590 p.

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-05]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1397.12.3.1.9]