



การเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อกุ้งแชบ๊วย
Cultivation of Banana Shrimp cell culture

ณัฐกานต์ จาตุรนต์ลักษณ์

Nathakan Jaturonlak

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาชีววิทยาโมเลกุลและชีวสารสนเทศ
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of

Master of Science in Molecular Biology and Bioinformatics

Prince of Songkla University

2558

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อกระดูกไขว้
 ผู้เขียน นางสาวณัฐกานต์ จาตุรนต์ลักษณ์
 สาขาวิชา ชีววิทยาโมเลกุลและชีวสารสนเทศ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ
 (รองศาสตราจารย์ ดร.วิไลวรรณ โชติเกียรติ) (รองศาสตราจารย์ ดร.ทญ.อุรีพร เล็กกัต)

.....กรรมการ
 (รองศาสตราจารย์ ดร.วิไลวรรณ โชติเกียรติ)

.....กรรมการ
 (ดร.สุदारัตน์ กริ่งไกร)

.....กรรมการ
 (ดร.รภัทกร นวคณิตวรกุล)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้
 เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา
 โมเลกุลและชีวสารสนเทศ

.....
 (รองศาสตราจารย์ ดร.ธีระพล ศรีชนะ)
 คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณ
บุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ.....
(.....)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ.....
(.....)
นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน
และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....

(.....)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์	การเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อถุงแสบวัย
ผู้เขียน	นางสาวณัฐกานต์ จาตุรนต์ลักษณ์
สาขาวิชา	ชีววิทยาโมเลกุลและชีวสารสนเทศ
ปีการศึกษา	2558

บทคัดย่อ

การศึกษาเพาะเลี้ยงเซลล์จากเนื้อเยื่อถุงแสบวัย โดยแยกเซลล์รังไข่ เซลล์ต่อมน้ำเหลืองและเซลล์ตับ พบว่าการแยกเซลล์โดยการตัดเนื้อเยื่อเป็นชิ้นเล็กๆ และวางในอาหารเลี้ยงเซลล์ เป็นวิธีที่ง่าย สะดวกและยังช่วยให้เซลล์มีการรอดชีวิตสูงกว่าการแยกเซลล์โดยวิธีอื่น จากนั้นจึงทำการศึกษาผลของอาหารสังเคราะห์พื้นฐาน ที่มีผลช่วยในการเพิ่มจำนวนเซลล์ พบว่าที่เวลา 5 วัน เซลล์รังไข่และต่อมน้ำเหลืองมีอัตราการเพิ่มจำนวนในอาหารแต่ละสูตรได้ไม่แตกต่างกัน ส่วนเซลล์ตับพบว่าการเพิ่มจำนวนได้ดีในอาหารสูตร modified1 และเมื่อทำการศึกษาผลของ supplement เพื่อช่วยในการเพิ่มจำนวนของเซลล์พบว่า 3.3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ 0.1 ไมโครโมลาร์ RPS3a มีผลช่วยในการเพิ่มจำนวนเซลล์รังไข่ได้ดีที่สุด ส่วนเซลล์ต่อมน้ำเหลืองพบว่า supplement แต่ละชนิดไม่มีผลในการช่วยเพิ่มจำนวนเซลล์ และ 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ 1 ไมโครโมลาร์ RPL10a มีผลช่วยในการเพิ่มจำนวนของเซลล์ตับได้ดีที่สุด จากนั้นจึงทำการศึกษาผลของการเคลือบผิวหน้าภาชนะเพาะเลี้ยง ซึ่งพบว่าการเคลือบผิวด้วย 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร albumin และ 20%FBS เซลล์รังไข่สามารถเกาะผิวหน้าภาชนะเพาะเลี้ยงได้ดี ส่วนการเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อมน้ำเหลือง พบว่าการเคลือบผิวหน้าภาชนะไม่ได้มีผลในการเกาะของเซลล์ต่อมน้ำเหลือง ต่อมาจึงมีการนำเซลล์รังไข่กึ่งมาใช้ทดสอบการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว พบว่าเมื่อบ่มเซลล์รังไข่กึ่งกับไวรัสตัวแดงดวงขาวความเข้มข้น 10^5 และ 10^6 copies เซลล์รังไข่มีการติดเชื้อ ซึ่งสามารถทดสอบผลการติดเชื้อโดยพบการเพิ่มจำนวนยีน immediate early 1 (ie1) ด้วยวิธี RT-PCR ซึ่งเป็นยีนที่มีการแสดงออกทันทีเมื่อกึ่งมีการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว จึงสามารถนำเซลล์รังไข่กึ่งที่แยกได้มาใช้ในการศึกษาการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวได้

Thesis Title	Cultivation of Banana Shrimp cell culture
Author	Miss Nathakan Jaturonlak
Major Program	Molecular Biology and Bioinformatics
Academic Year	2015

ABSTRACT

The study of cultivation of banana shrimp cell culture was investigated. We found that direct explant was the best method for isolation of ovarian, lymphoid and hepatopancreas cells from banana shrimp. The advantages of this method were convenient, easy to preparation and cells can survive more than other method. Then the effect of selective media was studied. The result showed that ovarian and lymphoid cells in different medium had proliferated rate similarly at 5 days after culture. Whereas the proliferation rate of the hepatopancreas cells were increased in modified1 medium. The effects of supplement media on the growth of banana shrimp primary cell cultures revealed that the ovarian cells showed good proliferation in the 3.3 µg/ml or 0.1 µM of RPS3a protein supplement in medium. The lymphoid cells showed no difference of the cell proliferation with the different supplement media. While 30 µg/ml or 1 µM of RPL10a protein showed good cell proliferation in hepatopancreas cells. In addition, the effect of the coated surfaces culture plate was studied. We found that the coating on surface plate with 200 µg/ml albumin and 20% FBS helped ovarian cell attach to surface of vessels culture, but there was no difference on lymphoid cell. Moreover, ovarian cell were used to study WSSV infection. The result showed that after ovarian cells were incubated with WSSV at 10^5 and 10^6 copies, they were infected. The infected ovarian cells were confirmed by PCR technique using specific primers to WSSV immediate early 1 (ie1). The ie1 gene was expressed immediately after WSSV infection. The useful of shrimp ovarian cell can apply as a model for study of WSSV infection.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.วิไลวรรณ โชติเกียรติ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ผู้ซึ่งคอยให้คำแนะนำ ช่วยเหลือ ส่งสอนและคอยตักเตือนในด้านการค้นคว้าข้อมูล การทำวิจัย การเขียนวิทยานิพนธ์ อีกทั้งให้คำปรึกษาและข้อเสนอแนะต่างๆ ทั้งในด้านการเรียน การใช้ชีวิต แม้กระทั่งอาจารย์มีเวลารว่างน้อยแต่ก็ไม่เคยทอดทิ้งลูกศิษย์ เพราะไม่ว่าจะมีปัญหาอะไรเกิดขึ้นอาจารย์คอยเป็นผู้ให้คำปรึกษาที่ดีเสมอมาและคำสอนของอาจารย์มักสอดแทรกข้อคิด เพื่อให้ลูกศิษย์ที่จบออกไปเป็นคนดีในสังคม ขอบคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ทันตแพทย์หญิง อรุณีพร เล็กกัต ประธานกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ที่ให้ความช่วยเหลือในการสอบ รวมทั้งตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ ขอบคุณดร.สุदारัตน์ กริ่งไกร และ ดร.รภัทกร นวคณิตวรกุล กรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ที่สละเวลาตรวจทาน และแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอบคุณหลักสูตรชีววิทยาโมเลกุลและชีวสารสนเทศ สถาบันวิจัยจีโนมและชีวสารสนเทศ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่อนุเคราะห์วัสดุ อุปกรณ์และสถานที่ในการวิจัย รวมทั้งทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ พ.ศ.2555 ที่อนุเคราะห์เงินในการวิจัย บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ขอขอบคุณบิดา นายไตรวุฒิ จาตุรงค์ลักษณ์ มารดา นางสุนีย์ จาตุรงค์ลักษณ์ น้องชายทั้ง 2 คน ที่คอยดูแล เป็นที่ปรึกษา ให้กำลังใจทั้งในยามสุขหรือทุกข์ ขอบคุณสำหรับกำลังใจที่มีให้กันเสมอมาขอบคุณที่ทำให้มีวันนี้ ขอบคุณระยะเวลาที่ผ่านมา เรื่องราวต่างๆ ที่ทำให้รู้ว่าไม่ว่าจะเกิดอะไรขึ้นครอบครัวก็ยังคงอยู่ข้างๆ เสมอมาและที่ขาดไม่ได้ขอบคุณย่า นางเสี้ยน แซ่เตี้ย ในการดูแลหลานสาวคนนี้อย่างดีตั้งแต่เด็ก คอยอบรมสั่งสอนให้เป็นคนดีของสังคมและถึงแม้ว่าย่าจะไม่อยู่บนโลกใบนี้แล้วแต่ย่ายังคงอยู่ในใจของหลานสาวคนนี้ตลอดไป

สุดท้ายขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องในภาคภาควิชาชีววิทยาโมเลกุลและชีวสารสนเทศ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่คอยช่วยเหลือ ให้คำปรึกษาและเป็นกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ให้ลุล่วงไปด้วยดี

ณัฐกานต์ จาตุรงค์ลักษณ์

สารบัญ

หน้า	
สารบัญ	(8)
รายการตาราง	(9)
รายการภาพประกอบ	(10)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	(12)
บทที่	
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
บทตรวจเอกสาร	2
วัตถุประสงค์	25
2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ	26
วัสดุ	26
อุปกรณ์	28
วิธีการ	29
3. ผลการทดลอง	38
4. วิเคราะห์ผลการทดลอง	61
5. สรุปและข้อเสนอแนะ	66
เอกสารอ้างอิง	69
ภาคผนวก	76
ประวัติผู้เขียน	82

รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
1 สูตรอาหารเลี้ยงเซลล์สังเคราะห์พื้นฐาน	30
2 ส่วนประกอบของโพลีอะคริลาไมด์เจลอิลิกโตรโฟรีซิสแบบมีเอสดีเอส	33
3 ชนิดของ supplement ที่ใช้เติมในอาหารเลี้ยงเซลล์สังเคราะห์พื้นฐาน	34

รายการภาพประกอบ

รูปที่	หน้า
1 ลักษณะภายนอกของกิ้ง	2
2 วงจรชีวิตของกิ้ง	4
3 การพัฒนาของรังไข่กิ้ง	5
4 สายพันธุ์ของกิ้งที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์	8
5 เนื้อเยื่อของกิ้งที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์	9
6 ต่อมหน้าเหลืองกิ้งขาว	9
7 เซลล์ที่แยกได้จากต่อมหน้าเหลืองกิ้งคุรุมา	10
8 รังไข่กิ้ง	10
9 เซลล์ที่แยกได้จากรังไข่กิ้งคุรุมา	11
10 ตับกิ้งขาว	11
11 เซลล์ตับที่แยกได้จากกิ้งคุรุมา	12
12 สูตรอาหารสังเคราะห์พื้นฐานที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อกิ้ง	13
13 โครงสร้างทางเคมีของไบโอติน	16
14 โครงสร้างของ BrdU และ Thymidine	22
15 ลักษณะจุดขาวหรือดวงขาวบริเวณเปลือกกิ้ง	23
16 เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเซลล์รังไข่ ที่เวลา 24 และ 72 ชั่วโมง	38
17 เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของต่อมหน้าเหลือง ที่เวลา 24 และ 72 ชั่วโมง	39
18 เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเซลล์ตับ ที่เวลา 24 และ 72 ชั่วโมง	40
19 เปอร์เซ็นต์ดัชนีการเพิ่มจำนวนเซลล์รังไข่ ที่เวลา 24 72 และ 120 ชั่วโมง	41
20 เซลล์รังไข่กิ้งแซบวียในอาหารสูตร modified3 ระยะเวลา 1วัน (A) 7วัน (B) 14วัน (C) 21วัน (D) 28วัน (E) ที่กำลังขยาย 200 เท่า	42
21 เปอร์เซ็นต์ดัชนีการเพิ่มจำนวนเซลล์ต่อมหน้าเหลือง ที่เวลา 24 72 และ 120 ชั่วโมง	43
22 เซลล์ต่อมหน้าเหลืองกิ้งแซบวียในอาหารสูตร modified1 ระยะเวลา 3วัน (A) 10วัน (B) 17วัน (C) 24วัน (D) ที่กำลังขยาย 200 เท่า	44
23 เปอร์เซ็นต์ดัชนีการเพิ่มจำนวนเซลล์ตับ ที่เวลา 24 72 และ 120 ชั่วโมง	45
24 เซลล์ตับกิ้งแซบวียในอาหารสูตร modified1 ระยะเวลา 1วัน (A) 7วัน (B) 14วัน (C) 21วัน (D) 28วัน (E) ที่กำลังขยาย 200 เท่า	46
25 การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน His-RPS3a ในแบคทีเรีย <i>E.coli</i> สายพันธุ์ BL21 ด้วยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบมีเอสดีเอส (12%SDS-PAGE) ย้อมด้วยสี coomassie brilliant blue	47

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

รูปที่	หน้า
26 การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน His-RPL10a ในแบคทีเรีย <i>E.coli</i> สายพันธุ์ BL21 ด้วย วิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบมีเอสดีเอส (12%SDS-PAGE) ย้อมด้วยสี coomassie brilliant blue	48
27 เปอร์เซ็นต์ดัชนีการเพิ่มจำนวนเซลล์รังไข่ ที่เวลา 5 7 และ 10 วัน	49
28 ลักษณะรูปร่างเซลล์รังไข่กึ่งแซบวัยในอาหารเลี้ยงเซลล์สูตร modified3 มีการเติม supplement ชนิดต่างๆ เวลา 1 และ 10 วัน ที่กำลังขยาย 100 เท่า	51
29 เปอร์เซ็นต์ดัชนีการเพิ่มจำนวนเซลล์ต่อมน้ำเหลือง ที่เวลา 5 7 และ 10 วัน	52
30 ลักษณะรูปร่างเซลล์ต่อมน้ำเหลืองกึ่งแซบวัยในอาหารเลี้ยงเซลล์สูตร modified150 มีการเติม supplement ชนิดต่างๆ เวลา 1 และ 10 วัน ที่กำลังขยาย 100 เท่า	54
31 เปอร์เซ็นต์ดัชนีการเพิ่มจำนวนเซลล์ตับ ที่เวลา 5 7 และ 10 วัน	54
32 ลักษณะรูปร่างเซลล์ตับกึ่งแซบวัยในอาหารเลี้ยงเซลล์สูตร modified1 มีการเติม supplement ชนิดต่างๆ เวลา 1 และ 10 วัน ที่กำลังขยาย 100 เท่า	56
33 เปอร์เซ็นต์การเกาะภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์รังไข่ ที่เวลา 3 และ 5 วัน	57
34 เปอร์เซ็นต์การเกาะภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อมน้ำเหลือง ที่เวลา 3 และ 5 วัน	57
35 แสดงแถบดีเอ็นเอจากการทำ PCR ของเซลล์รังไข่กึ่ง โดยใช้ไพรเมอร์ GAPDH วิเคราะห์บน 1.5% agarose gel electrophoresis	58
36 แสดงแถบดีเอ็นเอจากการทำ PCR ของเซลล์รังไข่กึ่ง โดยใช้ไพรเมอร์ ie1 ที่วิเคราะห์บน 1.5% agarose gel electrophoresis	59

สัญลักษณ์คำย่อและตัวอักษร

APS	=	ammonium persulfate
β	=	Beta
bp	=	base pair
BSA	=	Bovine serum albumin
cDNA	=	complementary deoxyribonucleic acid
CTC	=	copper tartrate carbonate solution
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	=	copper sulphate penta-hydrate
dNTP	=	deoxy nucleotide triphosphate
<i>E.coli</i>	=	<i>Escherichia coli</i>
H_2SO_4	=	sulfuric acid
IPTG	=	isopropyl β -D-thiogalactopyranosid
KCl	=	potassium chloride
KH_2PO_4	=	potassium dihydrogen phosphate
LB broth	=	Luria Bertani broth
L15 medium	=	Leibovitz's L-15 Medium
mM	=	milli molar
NaCl	=	sodium chloride
$\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$	=	sodium tartrate
Na_2HPO_4	=	disodium hydrogen phosphate
NaH_2PO_4	=	sodium dihydrogen phosphate
NaOH	=	sodium Hydroxide
NaCO_3	=	sodium Carbonate
PBS	=	phosphate Buffer Saline
SDS	=	sodium dodecyl sulfate
TAE buffer	=	Tris Acetate buffer
TEMED	=	N,N,N',N'-tetramethyl ethylenediamine

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

กุ้งแชบ๊วยเป็นกุ้งทะเลที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทยเป็นอย่างมาก (วนิดา, 2549) เนื่องจากเป็นกุ้งที่มีขนาดใหญ่ รสชาติดี ราคาสูงจึงเป็นที่ต้องการของตลาดทั้งภายในและต่างประเทศ โดยเฉพาะตลาดต่างประเทศ เช่น สหรัฐอเมริกา ยุโรปและญี่ปุ่นซึ่งมีความต้องการกุ้งในปริมาณมาก (ชัยรัตน์และสุพจน์, 2545) แต่เกษตรกรไม่นิยมเลี้ยงเพราะเป็นกุ้งที่เลี้ยงยาก (สุพจน์และชัยรัตน์, 2549) และยังมีประสบปัญหาหลายด้าน เช่น ปัญหาการเลี้ยงกุ้งแชบ๊วยที่ให้ผลผลิตต่ำเพราะกุ้งทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำได้ต่ำ ซึ่งเป็นปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อผลผลิตของกุ้งโดยตรง (นิวุฒิและคณะ, 2547)

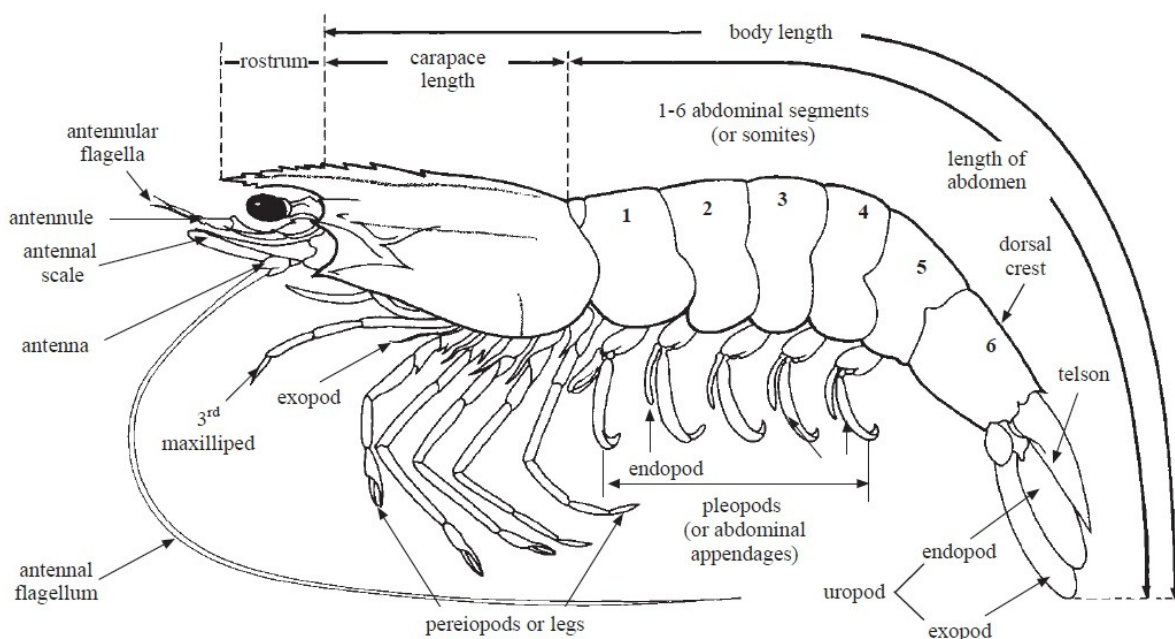
จึงมีการศึกษาและพัฒนาเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อกุ้งอย่างต่อเนื่อง โดยนาเซลล์ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อกุ้งมาใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับไวรัสในกุ้งสายพันธุ์ต่างๆ การทดลองของ Jayesh และคณะ (2012) สามารถพัฒนาให้เซลล์จากกุ้งกุลาดำมีการเจริญเติบโตดีขึ้นและยืดอายุได้ยาวนานขึ้นแต่ยังไม่ตรงตามเป้าหมายที่ต้องการเนื่องจากเซลล์ที่ได้ยังไม่จัดเป็น single cell line พบว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อกุ้งยังไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร เนื่องจากกุ้งทะเลเป็นสัตว์น้ำในกลุ่ม ครัสเตเชียน (Crustacean) ที่มีการพัฒนาของเซลล์ องค์กรประกอบภายในเลือดและระบบภูมิคุ้มกันที่แตกต่างออกไป เมื่อมีการเปรียบเทียบกับปลา ซึ่งประสบความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเซลล์มาแล้ว ประกอบกับการเพาะเลี้ยงเซลล์จำเป็นต้องอาศัยสภาพแวดล้อมที่มีความเหมาะสมและสูตรอาหารควรมีองค์ประกอบของสารอาหารจำเป็นอย่างครบถ้วนสำหรับการเจริญของเซลล์แต่ละชนิด (เรวัตร์, 2546) ดังนั้นงานวิจัยชิ้นนี้จึงได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์จากเนื้อเยื่อกุ้งแชบ๊วย โดยเริ่มแยกเซลล์จากรังไข่ ต่อม่าน้ำเหลือง และตับกุ้งแชบ๊วย มาศึกษาสูตรอาหารในการเพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อให้เซลล์แต่ละชนิดมีอายุนานที่สุด และนำมาใช้ประโยชน์ในการศึกษาโรคต่างๆในกุ้ง เช่น การกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ทดสอบประสิทธิภาพการติดเชื้อด้วยไวรัสตัวแดงดวงขาว (WSSV, White Spot Syndrome Virus) ซึ่งเป็นไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคในกุ้ง และเป็นโรคที่มีการระบาดอย่างรุนแรงส่งผลให้มีอัตราการตายสูง โดยมีการระบาดเป็นบริเวณกว้างในปี 2535 (จรีพร, 2546) ซึ่งโรคตัวแดงดวงขาว พบได้มากในแถบอินโดแปซิฟิกและเอเชียตะวันออก (Lightner and Redman, 1998) ส่งผลให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจที่สำคัญในอุตสาหกรรมกุ้งเป็นอย่างมาก พบว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อกุ้งที่มีลักษณะเป็นเซลล์ไลน์ (cell line) จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบการติดเชื้อและเพิ่มจำนวนไวรัส ซึ่งสามารถนำมาผลิตเป็นตัวยาลเพื่อป้องกันการติดเชื้อไวรัสชนิดต่างๆในกุ้งได้ จากปัญหาต่างๆเหล่านี้ทำให้ผู้วิจัยมีความสนใจในการศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์จากเนื้อเยื่อกุ้งแชบ๊วย เพื่อประยุกต์ใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับการติดเชื้อไวรัสกุ้ง

บทตรวจเอกสาร

1. กุ้งทะเล (Marine shrimp)

กุ้งทะเลเป็นสิ่งมีชีวิตไม่มีกระดูกสันหลัง (Invertebrates) มีเปลือกหุ้มภายนอกลำตัว (enveloping exoskeleton) ซึ่งประกอบไปด้วยไคตินและแคลเซียมเป็นส่วนใหญ่ ลำตัวของกุ้งมีลักษณะเป็นข้อปล้อง แบ่งเป็น 3 ส่วน คือ ส่วนหัว (head) ส่วนอก (thorax) และส่วนลำตัว (abdomen) พบว่าเปลือกแต่ละปล้องจะเชื่อมต่อกันด้วยเนื้อเยื่อบางๆ (articular membrane) และมีรยางค์ยื่นออกมาปล้องละ 1 คู่ โดยส่วนหัวและอกมีจำนวน 14 ปล้อง เรียกว่า เซบฟาโลทอแรก (cephalothorax) ส่วนลำตัวมี 6 ปล้อง รวมทั้ง 3 ส่วน มีทั้งหมด 20 ปล้อง พบว่าเปลือกกุ้งจะมีการลอกคราบอยู่เป็นระยะเพื่อช่วยในการเจริญเติบโต (จรีพร, 2546)

กุ้งสามารถแบ่งตามแหล่งที่อยู่อาศัยออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กุ้งโซนหนาว อาศัยอยู่ตามแหล่งน้ำที่มีกระแสน้ำเย็นไหลผ่าน ได้แก่ ประเทศในแถบมหาสมุทรแปซิฟิกตอนเหนือและแถบมหาสมุทรแอตแลนติก เป็นกุ้งที่มีลักษณะค่อนข้างเล็ก กุ้งโซนหนาวที่สำคัญ ได้แก่ กุ้งสกุล *Crangon* และ *Pandalus* เป็นต้น ส่วนกุ้งโซนร้อน อาศัยอยู่ตามแหล่งน้ำที่มีกระแสน้ำอุ่นไหลผ่าน ได้แก่ ประเทศในแถบอ่าวเม็กซิโก ทะเลแคริบเบียน แอฟริกาตะวันตก บริเวณฝั่งตะวันตกของอเมริกากลางกับอเมริกาใต้ และประเทศในแถบทวีปเอเชีย เป็นกุ้งที่มีลักษณะค่อนข้างใหญ่ โตเร็ว ทำให้กุ้งโซนร้อนเป็นกุ้งที่นิยมบริโภคมากกว่ากุ้งโซนหนาว กุ้งโซนร้อนที่สำคัญ ได้แก่ กุ้งสกุล *Penaeus* (รูปที่ 1) ได้แก่ กุ้งแชบ๊วย กุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) กุ้งลายเสือ และ *Metapenaeopsis* เป็นต้น



รูปที่ 1 ลักษณะภายนอกของกุ้ง (Carpenter and Niem, 1998)

1.1. อนุกรมวิธานของกุ้งแช่บ๊วย

Kingdom Animalia

Subkingdom Bilateria

Infrakingdom Protostomia

Superphylum Ecdysozoa

Phylum Arthropoda

Subphylum Crustacea

Class Malacostraca

Subclass Eumalacostraca

Superorder Eucarida

Order Decapoda

Suborder Dendrobranchiata

Superfamily Penaeoidea

Family Penaeidae

Genus Fenneropenaeus

Species Fenneropenaeus merguiensis (De Man, 1888)

1.2. ลักษณะของกุ้งแช่บ๊วย

กุ้งแช่บ๊วย มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Fenneropenaeus merguiensis* De Man, 1888 (Holthuis, 1980) มีชื่อสามัญว่า Banana prawn กุ้งแช่บ๊วย กุ้งหางแดงหรือกุ้งหางดอก และชื่อทางการค้าว่า White prawn (จันทน์ผา, 2544) กุ้งแช่บ๊วยมีลักษณะเด่น คือ เมื่อโตเต็มวัย โคนกริจะยกขึ้นเป็นรูปสามเหลี่ยมมีสีน้ำเงิน ปลายกริมีสีแดง กริมี่พินดำนบน 8-10 ซี่ และพินดำนล่าง 2-3 ซี่ ขาเดิน 3 คู่แรก ปลายขามีลักษณะเป็นก้ามมองเห็นได้ชัดเจน ซึ่งขาเดินคู่แรกมีขนาดสั้นที่สุด ส่วนขาเดินคู่ที่ 3 มีขนาดยาวที่สุด (พิศาลและสุรชัย, 2521) โดยปกติจะยาวไม่ถึงแปดนิ้ว พบว่าในเพศผู้รยางค์ส่วนนอก (maxilliped) คู่ที่ 3 จะยาวประมาณครึ่งหนึ่งของคู่ถัดไป ส่วนอวัยวะเพศเมียของกุ้งแช่บ๊วย (Thelycum) (ชัยรัตน์และสุพจน์, 2545) มีลักษณะเป็นแผ่นวงกลมตรงกลางมีติ่งเนื้อ (fleshy) เป็นสันนูนขึ้นมาสามารถมองเห็นได้ชัดเจน คล้ายครึ่งวงกลมสองชิ้นประกบติดกัน พบว่าติ่งเนื้อที่นูนออกมานั้นสามารถย่นลงไปในถุงเก็บน้ำเชื้อตัวของผู้ (seminal receptacle) ได้ ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับอวัยวะเพศของกุ้ง *Penaeus indicus* แต่ต่างกันตรงที่ไม่มีติ่งเนื้อนูนออกมอย่างชัดเจน (จันทน์ผา, 2544)

1.3. ชีววิทยาของกุ้งแชบ๊วย

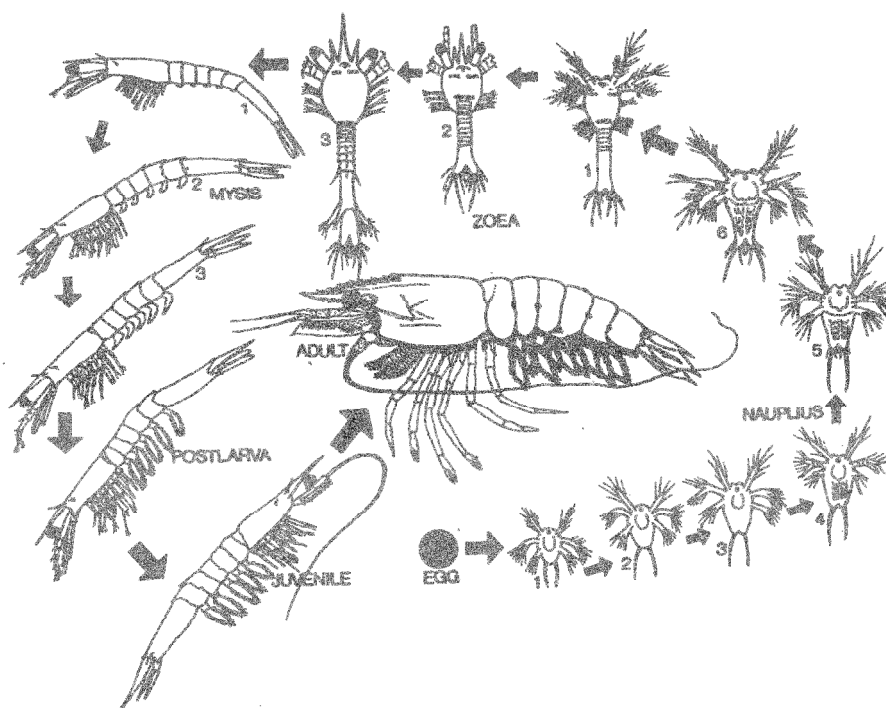
กุ้งอายุ 12-18 เดือน จะมีขนาดประมาณ 50-150 กรัม จึงมีการเริ่มวางไข่ในน้ำลึก 15-40 เมตร ใกล้กับพื้นดิน ไข่ที่มีการผสมแล้วจะฟักเป็นตัวภายในระยะเวลา 15 ชั่วโมง จากนั้นลูกกุ้งที่ได้จึงมีการพัฒนาเป็น 4 ระยะ (รูปที่ 2) ดังนี้

ระยะที่ 1 นอร์เพลียส (Nauplius) ลูกกุ้งมีขนาดเล็กมาก มองด้วยตาเปล่าไม่เห็น ใช้เวลาอยู่ในระยะนี้ประมาณ 38 ชั่วโมง มีการลอกคราบประมาณ 6 ครั้ง การดำรงชีวิตส่วนใหญ่จะอยู่บริเวณผิวหน้าของพื้นดินและกินอาหารที่มาจากถุงอาหาร (Yolk sac)

ระยะที่ 2 โซเอีย (Zoea) ลูกกุ้งเริ่มมีขนาดลำตัวยาวขึ้น เห็นส่วนหัวชัดเจน ใช้เวลาอยู่ในระยะนี้ประมาณ 4 วัน มีการลอกคราบประมาณ 3 ครั้ง การดำรงชีวิตส่วนใหญ่ มีการลอยตัวขึ้นสู่น้ำ เริ่มกินแพลงตอนพืชขนาดเล็ก ไตอะตอมและไข่หอยเป็นอาหาร

ระยะที่ 3 ไมซิส (Mysis) ลูกกุ้งเริ่มมีลักษณะของกุ้งชัดเจนมากยิ่งขึ้น โดยสามารถเคลื่อนที่ในน้ำได้อย่างรวดเร็ว กินอาหารจำพวกแพลงตอนสัตว์ โรติเฟอร์ (Rotifer) และไรน้ำเค็ม (Brine shrimp)

ระยะที่ 4 โปสลาวา (Post lava) ลูกกุ้งมีขนาดลำตัวยาวประมาณ 5.56 มิลลิเมตร มีเปลือกคลุมส่วนหัวยาวประมาณ 1.57 มิลลิเมตร ขาดิน 3 คู่แรกมีลักษณะเป็นก้ามชัดเจน พบว่าขาคู่แรกจะสั้นที่สุด ส่วนขาคู่ที่ 3 ยาวที่สุด ลูกกุ้งจะอยู่ในระยะนี้ประมาณ 30 วัน จึงมีการพัฒนาเข้าสู่ตัวเต็มวัย โดยอาศัยอยู่บริเวณป่าชายเลนหรือน้ำกร่อยประมาณ 3-4 เดือน และเมื่อมีอายุ 6 เดือนจึงว่ายน้ำออกสู่ทะเลเพื่อขยายพันธุ์ต่อไป (พิศาลและสุรัชย์, 2521)



รูปที่ 2 วงจรชีวิตของกุ้ง (Platona, 1978)

1.4. ฤดูกาลวางไข่ของกุ้งแชบ๊วย (Spawning season)

กุ้งแชบ๊วยมีการวางไข่ตลอดปี โดยเริ่มวางไข่ครั้งแรกเมื่อความยาวลำตัวประมาณ 14.08 เซนติเมตรขึ้นไป พบว่ามีอัตราการวางไข่สูงในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ และระหว่างเดือนกรกฎาคม กับเดือนสิงหาคม ซึ่งสามารถแยกระยะรังไข่ในกุ้งเพศเมียด้วยสายตาเปล่า (รูปที่ 3) แบ่งออกเป็น 4 ระยะ คือ

ระยะที่ 1 อิมแมทัวร์ (Immature) เป็นระยะที่ไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า เนื่องจากรังไข่ที่อยู่บริเวณด้านหลังของลำตัวมีลักษณะใสไม่มีสี สีส ีเขียว จึงยากแก่การมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า

ระยะที่ 2 เออร์ลี่ แมทัวร์ริง (Early maturing) เป็นระยะที่เริ่มมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า เนื่องจากบริเวณด้านหลังของลำตัวมีสีเหลืองยาวตลอดลำตัว

ระยะที่ 3 เลท แมทัวร์ริง (Late maturing) เป็นระยะที่รังไข่เริ่มมองเห็นได้ชัดเจนขึ้น เนื่องจากรังไข่มีความหนามากยิ่งขึ้นและมีสีเขียวชัดเจนขึ้น จึงทำให้สามารถมองเห็นรังไข่ได้อย่างชัดเจน

ระยะที่ 4 แมทัวร์ (Mature) เป็นระยะที่รังไข่หนามากที่สุดและแผ่ยาวตั้งแต่ส่วนหัวลงมาตลอดด้านหลังของลำตัว ซึ่งส่วนบนของรังไข่สามารถมองเห็นชัดเจนที่สุดเนื่องจากรังไข่ส่วนนี้จะมีการแผ่อกมามากกว่าส่วนอื่นและมีสีเขียวคล้ำ ซึ่งเป็นระยะที่รังไข่กุ้งมีการพัฒนาพร้อมในการวางไข่



รูปที่ 3 การพัฒนาของรังไข่กุ้ง Uawisetwathana และคณะ (2011)

2. การเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อสัตว์ (animal tissue culture)

ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อสัตว์เป็นที่นิยมอย่างแพร่หลาย เนื่องจากสามารถประยุกต์ใช้ในการทดลองต่างๆได้ เช่น การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเพื่อนำมาใช้ศึกษาผลของยาต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็ง การเพาะเลี้ยงเซลล์ที่สามารถผลิตแอนติบอดีซึ่งสามารถนำมาใช้ในการวินิจฉัยโรค การเพาะเลี้ยงไวรัส เนื่องจากไวรัสไม่สามารถเพิ่มจำนวนด้วยตัวเองได้ จึงต้องอาศัยในสิ่งมีชีวิตอื่น(host) เพื่อเพิ่มจำนวน ดังนั้นการศึกษาโดยใช้เซลล์เนื้อเยื่อสัตว์มาทดลองแทน

การใช้สัตว์ทดลองจึงได้รับความสนใจ เนื่องจากสามารถเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีคุณสมบัติเหมือนกัน (Homogeneity of cell type) ภายใต้สภาวะที่ต้องการ

การเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อสัตว์ คือ การเพาะเลี้ยงเซลล์จากสิ่งมีชีวิตเฉพาะส่วน ซึ่งสามารถควบคุมสภาวะแวดล้อมได้ตามที่ต้องการ โดยแยกเซลล์ออกมาจากเนื้อเยื่อสัตว์ แล้วทำการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่เหมาะสม การเพาะเลี้ยงเซลล์จัดเป็นการศึกษาในระดับหลอดทดลอง (*in vitro test*) (บุษบา ศรีมี 2556) พบว่าเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์ได้พัฒนามาจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ของสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นต่ำของกบ เนื่องจากในการเพาะเลี้ยงไม่มีความซับซ้อนมาก จึงเป็นจุดเริ่มต้นในการทำการศึกษาคเพาะเลี้ยงเซลล์ ต่อมาได้มีการพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์ขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยทำการจำลองสภาวะให้เหมือนกับเซลล์ที่นำมาเพาะเลี้ยงเจริญอยู่ได้ภายในร่างกายของสิ่งมีชีวิตจริง ซึ่งมีการควบคุมอุณหภูมิ ความชื้น pH และปัจจัยอื่นๆ ภายใต้สภาวะแวดล้อมที่ใกล้เคียงกับในธรรมชาติมากที่สุด เพื่อทำการศึกษากลไก กระบวนการทำงานต่างๆ ภายในเซลล์ (David, 1994)

2.1. การแยกเซลล์จากเนื้อเยื่อสัตว์

การแยกเซลล์ออกจากอวัยวะหรือเนื้อเยื่อสิ่งมีชีวิตโดยตรง ถือเป็นกระบวนการสำคัญในการเพาะเลี้ยงเซลล์ เนื่องจากมีผลต่อการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนของเซลล์ ควรแยกเซลล์ภายใต้อุณหภูมิต่ำ ประมาณ 4 องศาเซลเซียส ระยะเวลาไม่เกิน 30 นาที ก่อนเซลล์จะอยู่ในอาหารเพาะเลี้ยง เพื่อคงคุณสมบัติให้มีลักษณะใกล้เคียงกับเซลล์ที่อยู่ในสิ่งมีชีวิตมากที่สุด โดยเซลล์แต่ละชนิดอาจมีกระบวนการแยกที่แตกต่างกัน

2.1.1. การตัดเนื้อเยื่อสัตว์เป็นชิ้นเล็ก (Explants method)

การแยกเซลล์โดยตัดเนื้อเยื่อเป็นชิ้นเล็กๆ หรือสับให้เนื้อเยื่อมีขนาดเล็กที่สุด (minced) เป็นการแยกเซลล์จากเนื้อเยื่อสัตว์แบบง่าย มีขั้นตอนไม่ยุ่งยาก เหมาะสำหรับเซลล์ที่มีคุณสมบัติเกาะภาชนะเพาะเลี้ยง เนื่องจากเซลล์เมื่อหลุด (spread) ออกจากเนื้อเยื่อสามารถเกาะภาชนะเพาะเลี้ยงได้โดยตรง มีรายงานของ Furukawa และคณะ (1996) ทำการแยกเซลล์โดยตัดเนื้อเยื่อเป็นชิ้นเล็กๆ เพื่อแยกเซลล์เยื่อบุผิว (Epithelial Cell) จากท่อตับอ่อน (Pancreatic Duct) ในมนุษย์ พบว่าการตัดเนื้อเยื่อเป็นชิ้นเล็กส่งผลให้เซลล์หลุดออกมาจากเนื้อเยื่อได้ดีกว่าการตัดเป็นชิ้นใหญ่ เนื่องจากการตัดเนื้อเยื่อให้มีขนาดเล็กช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวในการหลุดของเซลล์ออกมาได้มากกว่าเนื้อเยื่อที่มีขนาดใหญ่ แต่ในกระบวนการแยกเซลล์โดยการตัดเนื้อเยื่อเป็นชิ้นเล็ก มีข้อจำกัดเนื่องจากผนังเซลล์ของเนื้อเยื่อเป็นตัวขัดขวางการหลุดและแผ่ออกมาของเซลล์ (Jose, 2009) ซึ่งพบว่าบริเวณที่อยู่ใกล้เนื้อเยื่อ เซลล์จะมีการเกาะกันอย่างแน่นหนามากกว่าบริเวณที่ห่างจากเนื้อเยื่อ การแยกเซลล์โดยตัดเนื้อเยื่อเป็นชิ้นเล็กไม่เหมาะ

กับเซลล์ทุกชนิด จึงควรศึกษาชนิดของเซลล์และเนื้อเยื่อสัตว์ก่อนทำการแยกเซลล์เพื่อจะได้เซลล์ที่มีคุณสมบัติและประสิทธิภาพในการเพาะเลี้ยงมากยิ่งขึ้น

2.1.2. การย่อยเนื้อเยื่อสัตว์ด้วยเอนไซม์ (Enzymatic dissociation)

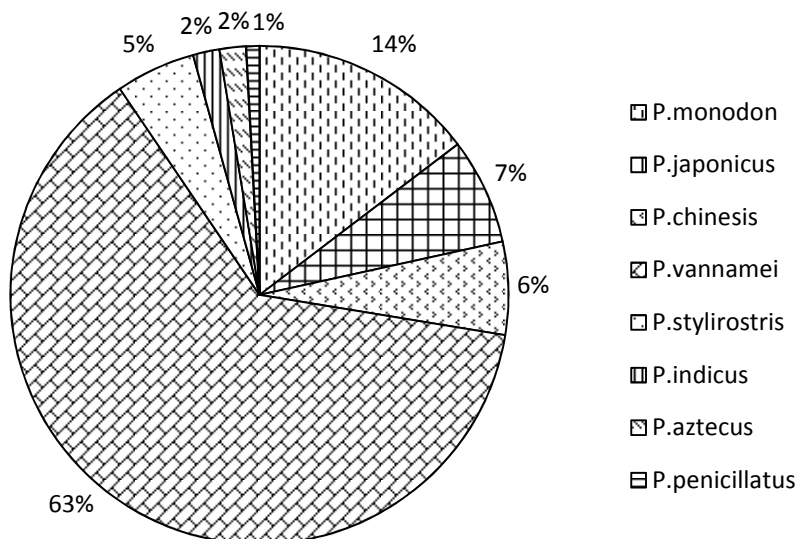
การแยกเซลล์โดยใช้เอนไซม์ย่อยเนื้อเยื่อเป็นวิธีที่นิยมอย่างแพร่หลาย เนื่องจากง่ายและค่อนข้างสะดวก เอนไซม์ที่นิยมใช้ ได้แก่ trypsin pronase collagenase และ dispase ซึ่งเอนไซม์แต่ละชนิดก็มีคุณสมบัติที่แตกต่างกัน เช่น trypsin มีหน้าที่ในการย่อยโปรตีนให้กลายเป็นกรดอะมิโน Masuda และคณะ (2008) และ pronase ซึ่งมีคุณสมบัติคล้ายกับ trypsin มีรายงานของ (Adamson, 1990) ใช้ pronase ย่อยเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือด (endothelial cell) ที่หลอดเลือดในท้องกบ (frog mesentery) ส่วนเอนไซม์ collagenase และ dispase มีคุณสมบัติในการย่อยเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) พบว่า collagenase จัดเป็นเอนไซม์ย่อยโปรตีน (protease) ชนิดหนึ่ง ซึ่งมีหน้าที่สลายพันธะเพปไทด์ (peptide bond) ในคอลลาเจน (collagen) โดย collagenase ที่มีขายตามท้องตลาด ได้มาจากการทำบริสุทธิ์ *Clostridium histolyticum* มีรายงานของ Jaffe และคณะ (1973) ทำการศึกษาโดยใช้ collagenase ในการแยกเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดจากหลอดเลือดดำอัมบิลิคัล (Umbilical Veins) พบว่าการแยกเซลล์โดยใช้เอนไซม์เหมาะกับเนื้อเยื่อที่มีลักษณะแข็ง (compact tissues) มากกว่าเนื้อเยื่อที่มีลักษณะอ่อนนุ่ม (loose tissues) เนื่องจากเอนไซม์จะไปมีผลต่อคุณสมบัติบางประการของเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) เช่น ย่อยโปรตีนบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้ความสามารถในการเกาะเกาะเพาะเลี้ยงลดลง จึงมีการเคลือบผิวภาชนะเพาะเลี้ยงด้วยคอลลาเจนหรือโพลีไลซีน (Poly-Lysine) เพื่อช่วยให้เซลล์เกาะเกาะได้ดียิ่งขึ้น (Touillec, 1999)

2.1.3. การย่อยเนื้อเยื่อสัตว์ด้วยสารที่ไม่ใช่เอนไซม์ (Non-enzymatic dissociation)

การย่อยเนื้อเยื่อสัตว์ด้วยสารที่ไม่ใช่เอนไซม์หรือเป็นการย่อยเนื้อเยื่อด้วยสารเคมีทั่วไป ยกตัวอย่างเช่น EDTA (Ethylene Diamine Tetraacetic Acid) เป็นสารที่ละลายน้ำได้ มีคุณสมบัติทำให้โปรตีนเสียสภาพ โดยไปจับกับไอออนของแคลเซียมระหว่างเซลล์ ทำให้เซลล์ที่เกาะเป็นกลุ่มหลุดออกจากกันและทำให้เซลล์หลุดออกจากภาชนะเพาะเลี้ยง EDTA มีความสามารถในการจับกับโลหะหนัก ทำให้เกิดการตกตะกอนของโลหะหนัก จึงนิยมนำมาใช้ประโยชน์ในทางเภสัชกรรม โดยมีรายงานของ Sequeira และคณะ (1996) ได้ทำการแยกเซลล์เม็ดเลือด (hemocytes) โดยใช้ EDTA เป็นส่วนประกอบ ที่ใช้ในการย่อย (dissociation) เซลล์ให้หลุดออกมา

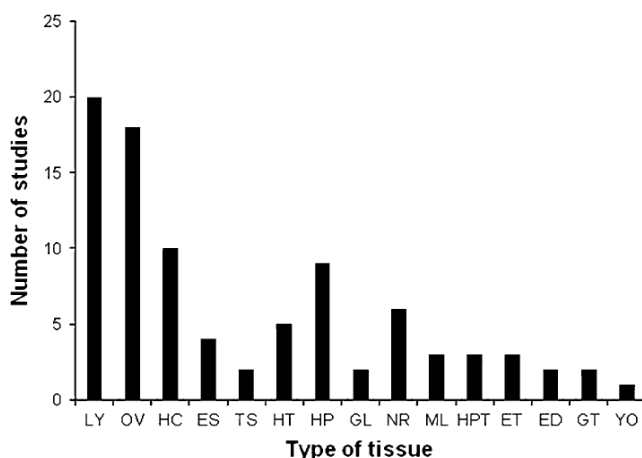
2.2. การเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อกุ้ง

การเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อกุ้งมีการศึกษามานานกว่า 25 ปี เนื่องจากการติดเชื้อและก่อให้เกิดโรคในสัตว์น้ำ จึงมีการศึกษาโดยนำความรู้ทางด้านอณูชีววิทยา (Molecular biology) และเทคโนโลยีในการถ่ายโอนยีน (Gene transfer technologies) มาประยุกต์ใช้ จนสามารถผลิตเซลล์ไลน์ (cell line) สายพันธุ์ต่างๆ ได้ เช่น เซลล์แมลงและเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม แต่ยังไม่สามารถผลิต single cell line ที่มาจากกุ้งได้ ทำได้เพียงพัฒนาให้เซลล์มีการเจริญได้ดีและยาวนานยิ่งขึ้น Jayesh และคณะ (2012) ในปัจจุบันมีการเพาะเลี้ยงกุ้งอย่างแพร่หลาย โดยวิธีการเพาะเลี้ยงมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรค ซึ่งส่งผลให้เกิดความเสียหายต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้ง จึงมีการศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อกุ้ง เพื่อนำมาใช้ศึกษาสาเหตุของการติดเชื้อ เพื่อหาวิธีป้องกันและวิธีรักษาเมื่อกุ้งมีการติดเชื้อ พบว่าการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวสามารถปรากฏได้อย่างชัดเจนในบริเวณต่อมน้ำเหลือง (lymphoid) ซึ่งสามารถนำไปพัฒนาเป็นเครื่องมือที่ใช้ในการตรวจสอบการติดเชื้อโรคในกุ้งได้ Maeda และคณะ (2003) พบว่ากุ้งขาว มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *P. vannamei* เป็นสายพันธุ์ที่นิยมนำมาใช้ในการศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์ (รูปที่ 4) เนื่องจากกุ้งขาวเป็นกุ้งที่นิยมเลี้ยงในฟาร์มอย่างแพร่หลายในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้



รูปที่ 4 สายพันธุ์ของกุ้งที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ Jayesh และคณะ (2012)

การศึกษานิตของเนื้อเยื่อกุ้งที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ พบว่าต่อมน้ำเหลือง รังไข่ เม็ดเลือดและตับ เป็นเนื้อเยื่อที่นิยมนำมาใช้ในการศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อกุ้งมากที่สุด (รูปที่ 5) Jayesh และคณะ (2012)



รูปที่ 5 เนื้อเยื่อของกึ่งที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์

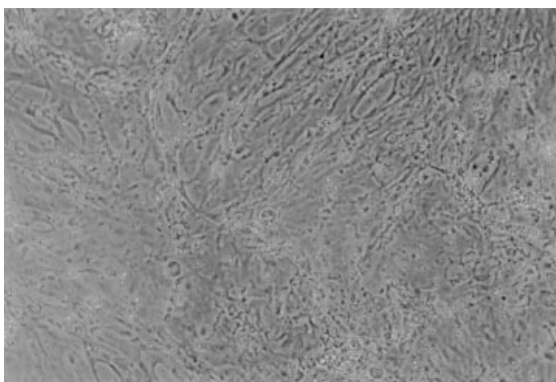
ที่มา : Jayesh และคณะ 2012

จากการศึกษาต่อมน้ำเหลืองหรือเรียกอีกอย่าง คือ Oka organ มีลักษณะเป็น 2 พู แยกกันอย่างชัดเจนเป็นพูซ้ายและพูขวา (รูปที่6) เชื่อมต่อกันด้วยเส้นเลือด อยู่บริเวณด้านหน้า ส่วนล่างของตับ (วัชระ, 2546)



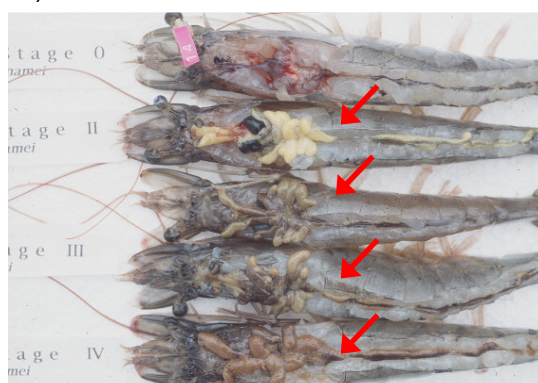
รูปที่ 6 ต่อมน้ำเหลืองกึ่งขาว (Lightner, 2011)

จากการศึกษาของ Itami และคณะ (1999) ได้ทำการแยกเซลล์จากต่อมน้ำเหลืองกึ่งครุมา ในอาหารสูตร M199 ที่มีการเติม 20% Fetal Bovine Serum (FBS) และ lactalbumin hydrolysate ความเข้มข้น 0.1 กรัมต่อลิตร นำมาบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่า เซลล์ที่แยกได้มีลักษณะ Fibroblast cells และ Epithelioid cells (รูปที่ 7) จากนั้นจึงนำเซลล์ที่แยกได้มาศึกษาการติดเชื้อ Penaeid Rod Shaped DNA Virus (PRDV) โดยใช้เทคนิค Cytopathic effects พบว่าเซลล์จากต่อมน้ำเหลืองกึ่งครุมา มีการแสดงออกถึงการติดเชื้อ PRDV ในเวลา 8 วัน



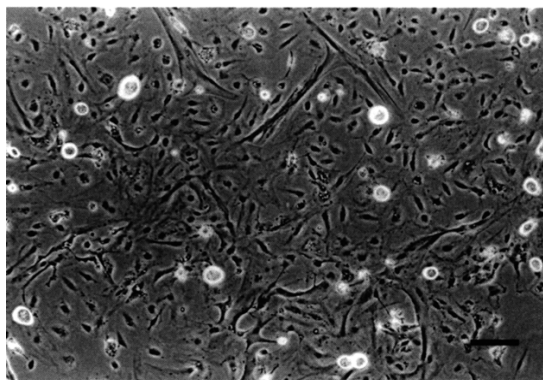
รูปที่ 7 เซลล์ที่แยกได้จากต่อมน้ำเหลืองกึ่งครุมา (Itami และคณะ 1999)

จากการศึกษารังไข่ (Ovarian) มีลักษณะเป็นเส้นคู่ยาวตั้งแต่ส่วนหัวไปถึงส่วนท้าย อยู่บริเวณส่วนหลังใกล้ตับกึ่ง (รูปที่8) พบว่ารังไข่มีการเปลี่ยนแปลงไปตามระยะในการพัฒนาของรังไข่ Felgenhauer, (1992)



รูปที่ 8 รังไข่กึ่ง (Dall และคณะ 1990)

จากการศึกษาของ Maeda และคณะ (2003) ได้ทำการแยกเซลล์จากรังไข่กึ่งครุมา ในอาหารสูตร 2X-Leibovitz's L-15 ที่มีการเติม 10% FBS glucose ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร proline ความเข้มข้น 0.1 กรัมต่อลิตร TC-Yeastolate ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร และ lactalbumin hydrolysate ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร นำมาบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่าเซลล์ที่แยกได้มีลักษณะ Fibroblast cells และ Epithelioid cells (รูปที่ 9) จากนั้นจึงศึกษาการเพิ่มจำนวนของเซลล์ด้วยเทคนิค 5-bromo-2'-deoxyuridine assay (BrdU assay)



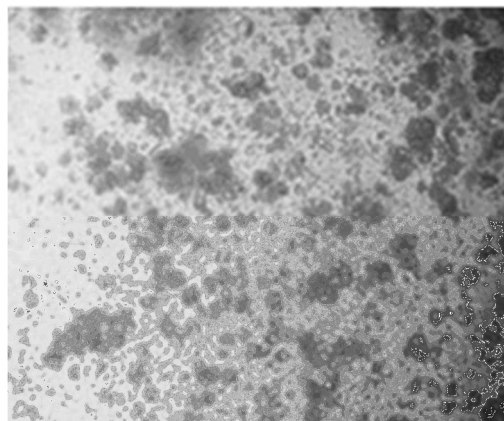
รูปที่ 9 เซลล์ที่แยกได้จากรังไข่กุ้งครุมา Maeda และคณะ (2003)

จากการศึกษาพบว่าตับกุ้งมีลักษณะเป็น 2 พู ขนาดใหญ่อยู่บริเวณส่วนหัวกุ้ง โดยมีลำไส้ผ่ากลางไปทะลุส่วนท้ายของตับ (รูปที่10) มีหน้าที่ในกระบวนการควบคุมการเผาผลาญอาหาร ช่วยในการหลั่งและสังเคราะห์เอนไซม์ในการย่อย ช่วยในการจัดเก็บและกำจัดสารพิษ ส่งผลให้ตับเป็นอวัยวะที่ได้รับผลกระทบต่างๆ เช่น สารพิษ ความเครียด ความไม่สมบูรณ์ของอาหารได้ง่าย จึงทำให้ตับเป็นอวัยวะที่ใช้งบออกสุขภาพของกุ้ง (Ceccaldi, 1989)



รูปที่ 10 ตับกุ้งขาว (Purivirojkul, 2012)

จากการศึกษาของ Uma และคณะ (2002) ได้ทำการแยกเซลล์จากตับกุ้งกุลาดำ ในอาหารสูตร Leibovitz's L-15 ที่มีการเติม 10% FBS นำมาบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส พบว่าเซลล์ที่แยกได้มีลักษณะ Round cells (รูปที่ 11) จากนั้นจึงนำเซลล์ที่ได้มาศึกษาการติดเชื้อ White Spot Syndrome Virus (WSSV) โดยใช้เทคนิค Cytopathic effects พบว่าที่เวลา 120 ชั่วโมง เซลล์มีลักษณะแตก หลุดลอยกระจ่ายเป็นเศษเซลล์ในอาหาร



รูปที่ 11 เซลล์ตับที่แยกได้จากกิ้งกือที่เวลา 2 วัน Wang และคณะ (2012)

3. อาหารเลี้ยงเซลล์ (culture medium)

การเพาะเลี้ยงเซลล์ในห้องปฏิบัติการจำเป็นต้องอาศัยอาหารเป็นส่วนสำคัญในการเจริญของเซลล์ ซึ่งพบว่าอาหารพื้นฐานที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์มีอยู่ด้วยกันมากมายหลายชนิด ขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์ที่เราสนใจศึกษา อุณหภูมิที่เหมาะสมแก่การเจริญของเซลล์แต่ละชนิด เช่น เซลล์จากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียส ส่วนเซลล์กิ้งหรือเซลล์แมลงอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 28 องศาเซลเซียส พบว่าสูตรอาหารพื้นฐานแต่ละชนิดก็มีความเหมาะสมจำเพาะต่ออุณหภูมิแตกต่างกัน ดังนั้นการเจริญของเซลล์ไม่ได้ขึ้นอยู่กับผลของปัจจัยจากสารอาหารที่เป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเซลล์เพียงอย่างเดียว pH ค่า osmolarity อุณหภูมิ ออกซิเจน ปริมาณคาร์บอนก็ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์เช่นเดียวกัน

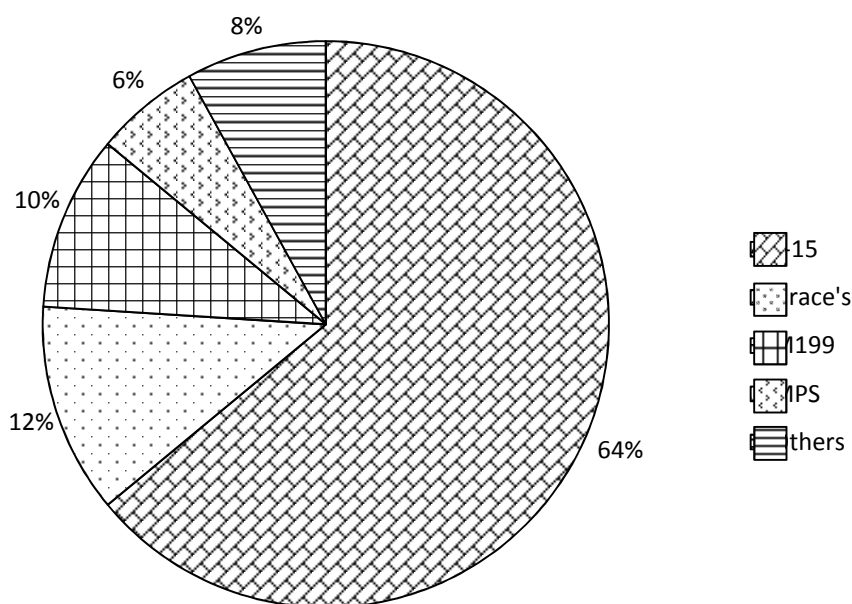
อาหารพื้นฐานที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ มีองค์ประกอบของสารอาหารหลักแต่ละชนิดในปริมาณแตกต่างกัน โดยองค์ประกอบพื้นฐานหลักที่ใช้ในการผลิตอาหารเลี้ยงเซลล์ได้มาจากการศึกษาองค์ประกอบของน้ำเลือด (plasma) เลือด (lymph) ซีรัม (serum) และเนื้อเยื่อของเซลล์ชนิดต่าง ๆ ว่ามีปริมาณสารอาหารแต่ละชนิดมาน้อยเพียงใด ซึ่งส่งผลต่อการเลือกสูตรอาหารพื้นฐานในการเลี้ยงเซลล์แต่ละชนิดได้แตกต่างกัน เซลล์แต่ละชนิดอาจเหมาะกับอาหารพื้นฐานสูตรเดียวกัน แต่อาจมีการเติมสารอาหารชนิดอื่นเพิ่มลงไปเพื่อช่วยให้เซลล์ชนิดนั้นโตได้ดียิ่งขึ้น (David, 1994)

3.1. อาหารสังเคราะห์พื้นฐานที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์กิ้ง

เนื่องจากการเพาะเลี้ยงเซลล์จากสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังที่อาศัยอยู่ในน้ำเค็ม (marine invertebrates) พบปัญหาหลัก 3 ประการ คือ แหล่งที่มาของเซลล์ กระบวนการในการรักษาสภาพเซลล์เมื่อผ่านการแช่แข็ง (cryopreservation) และการปนเปื้อนจากยูคาริโอตชนิดอื่น ซึ่ง

มีผลยับยั้งการเจริญของเซลล์ทำให้การพัฒนาเซลล์สายพันธุ์ของสัตว์ในคลาสครัสเตเชียนไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร เพราะความหลากหลายของชนิดเซลล์และสิ่งมีชีวิต จึงหาสูตรอาหารและสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงได้ยาก (Rinkevich, 2005) ส่งผลให้ Jayesh และคณะ (2012) ได้ทำการศึกษาสูตรอาหารที่นิยมนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์จากเนื้อเยื่อกุ้ง พบว่าอาหารสูตร Leibovitz's L-15 เป็นสูตรที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อกุ้งมากที่สุด (รูปที่ 12)

จากรายงานของ Nadala และคณะ (1993) ได้ทำการศึกษาแยกเซลล์ต่อมน้ำเหลืองระบบประสาท (nerve cord) ไส้ใน (gut) หัวใจ กล้ามเนื้อ รังไข่และเหงือก จากกุ้ง *P.stylirostris* และกุ้งขาว โดยตัดเนื้อเยื่อเป็นชิ้น ประมาณชิ้นละ 1 มิลลิเมตร วางในอาหารสูตร double strength L-15 (2X-L15), M199, RPMI1640, Grace's insect medium, MM insect medium, TC100 insect medium พบว่า อาหารสูตร 2X-L15 เซลล์มีการเจริญดีที่สุด



รูปที่ 12 สูตรอาหารสังเคราะห์พื้นฐานที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อกุ้ง Jayesh และคณะ (2012)

3.2. องค์ประกอบพื้นฐานในอาหารเลี้ยงเซลล์

3.2.1. โปรตีน (Protein)

โปรตีนเป็นส่วนประกอบสำคัญที่มีในอาหารเลี้ยงเซลล์ เนื่องจากเป็นตัวช่วยให้เซลล์มีอัตราการเจริญและการรอดชีวิตเพิ่มสูงขึ้น พบว่าปริมาณโปรตีนที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์มีการปรับให้มีปริมาณใกล้เคียงในเลือดของกุ้ง แต่ปริมาณโปรตีนในเลือดกุ้งก็ยังคงขึ้นกับชนิดของสาย

พันธุ์ ปริมาณและชนิดของอาหาร ระยะเวลาในการลอกคราบและอายุของกุ้งเป็นหลัก (Clayclon, 2009) โปรตีนนิยมเติมลงไปให้อาหารเลี้ยงเซลล์เพียงเล็กน้อย ซึ่งเป็นส่วนช่วยให้เซลล์มีการเจริญอย่างรวดเร็ว โปรตีนที่นิยมเติมเพิ่มลงไปให้อาหารเลี้ยงเซลล์ ได้แก่ fetuin α -globulin fibronectin albumin และ transferrin เป็นต้น (David, 1994) พบว่ากรดอะมิโน (Amino acid) เป็นหน่วยย่อยของโปรตีน โดยในการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์ส่วนใหญ่ต้องการกรดอะมิโนจำเป็น เนื่องจากไม่สามารถสังเคราะห์ขึ้นได้เอง (David, 1994) พบว่าในบางครั้งมีการเติมกรดอะมิโนไม่จำเป็นให้อาหารเลี้ยงเซลล์ ขึ้นอยู่กับความสามารถในการรับของเซลล์ จึงมีการเติมกรดอะมิโนเพิ่มลงในสูตรอาหารเลี้ยงเซลล์พื้นฐาน การเลือกชนิดของกรดอะมิโนขึ้นอยู่กับหน้าที่และปริมาณเซลล์ เนื่องจากกรดอะมิโนเป็นตัวช่วยในการปรับสมดุลในการเจริญและช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ กรดอะมิโนที่นิยมเติมลงในอาหาร เช่น โพรลีน (Proline) เป็นกรดอะมิโนไม่จำเป็นชนิดหนึ่งที่พบในเลือดกุ้ง ช่วยในการดูดซึมของเซลล์สิ่งมีชีวิตที่ไม่มีกระดูกสันหลัง และใช้เป็นแหล่งพลังงานในเซลล์กล้ามเนื้อของแมลง พบว่ากลูตามีน (Glutamine) ก็เป็นกรดอะมิโนที่นิยมเติมในอาหารเลี้ยงเซลล์ เนื่องจากช่วยให้เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตสูงขึ้น โดยกลูตามีนเป็นทั้งแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอน ช่วยในกระบวนการเผาผลาญอาหารโดยการ ออกซิเดชัน (oxidation) ของ กลูตาเมต (glutamate) แต่การเติมกลูตามีนในปริมาณมากเกินไปก็ส่งผลต่อเซลล์ เนื่องจากทำให้เกิดแอมโมเนียซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์ ทำให้เซลล์มีอัตราการเจริญจำกัด (Clayclon, 2009)

3.2.1.1. Fetal Bovine Serum (FBS)

ซีรัมเป็นของเหลวอยู่ในน้ำเลือด ซึ่งแยกส่วนที่ทำให้เลือดแข็งตัวออก ทำหน้าที่เป็นแหล่งโปรตีนในอาหารเลี้ยงเซลล์ ช่วยให้เซลล์มีการแบ่งตัวได้ดีขึ้น โดยช่วยในกระบวนการจำลอง (replication) ของเซลล์ พบว่า FBS เป็นซีรัมที่แยกจากเลือดในส่วนหัวใจ (cardiac puncture) ของลูกวัว มีส่วนประกอบของโปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต เอนไซม์ ฮอร์โมนและอิเล็กโทรไลต์ (electrolytes) เป็นสารที่ทำหน้าที่ปรับสมดุลประจุไฟฟ้าทั้งภายในและภายนอกเซลล์ (Stein, 2007) FBS ประกอบไปด้วยสารอาหารที่ช่วยในการเพิ่มจำนวนเซลล์ (proliferation) (วิชชุตาและคณะ, 2556) โดยกระตุ้นให้เซลล์มีการแบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวนในเซลล์บ้างชนิดและมีคุณสมบัติช่วยในการเกาะเกาะของเซลล์ ความเข้มข้นของ FBS ที่นิยมใช้อยู่ในช่วง 5-20% ขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์ มีรายงานของ Blight และคณะ (2003) เติม 10%FBS ในอาหารเลี้ยงเซลล์ Huh-7.5 ซึ่งเป็นเซลล์ที่แยกได้จากเซลล์ตับ (hepatocyte cell) ของมนุษย์ มาใช้ในการศึกษาผลการเพิ่มจำนวนของไวรัส Hepatitis C โดยมีการใช้ตั้งแต่เริ่มต้นในการเพาะเลี้ยงเซลล์ พบว่าไขมันชนิดที่มีใน FBS มีความจำเป็นในการเพาะเลี้ยงเซลล์ของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง เนื่องจากมี คอเลสเตอรอล (cholesterol) ในปริมาณต่ำ มีฮอร์โมนและสาร

เร่งการเจริญ (growth factor) ซึ่งช่วยกระตุ้นให้เซลล์มีการเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว (Clayclon, 2009)

3.2.1.2. Epidermal Growth Factor (EGF)

EGF เป็น growth factor ชนิดหนึ่ง จัดอยู่ในกลุ่มของโปรตีน มีหน้าที่ช่วยในการปฏิสัมพันธ์ (interaction) ระหว่างเซลล์ด้วยกัน ควบคุมการเจริญของเซลล์ ระบบภูมิคุ้มกันการตอบสนองต่างๆ และเร่งกระบวนการเมตาบอลิซึม (metabolism) ในเซลล์ (Clayclon, 2009) พบว่า EGF จัดเป็น growth factor ที่นิยมเติมในอาหารเลี้ยงเซลล์ เนื่องจากช่วยกระตุ้นในการสร้างอินเตอร์ลิวคิน (interleukins) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีฤทธิ์กระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์ (David, 1994) มีรายงานของ Reynolds และคณะ (1992) ทำการศึกษาโดยใช้ EGF กระตุ้นการแบ่งเซลล์ progenitor cells พบว่า EGF ช่วยในการแผ่ขยาย (migrated) และเพิ่มจำนวนเซลล์เพื่อพัฒนาไปเป็นเซลล์ประสาท (neurons) และเซลล์เกลียในระบบประสาท (astrocytes) แต่ EGF ไม่ได้มีผลกระตุ้นการเจริญของเซลล์ทุกชนิด ดังรายงานของ (Barnes, 1982) ได้ทำการศึกษาผลของ EGF ที่ความเข้มข้น 1-10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่ามีผลยับยั้งการเจริญของเซลล์ A431 ซึ่งเป็นเซลล์ที่แยกจากมะเร็งผิวหนังในมนุษย์ จากความรู้ดังกล่าว ส่งผลให้ปัจจุบันมีการผสม EGF ในครีมทาผิวเพื่อลดชะลอริ้วรอยและช่วยกระตุ้นการสร้างเซลล์ใหม่ของผิวหนัง ดังรายงานของ Baker และคณะ (1987) ได้ทำการศึกษาผลของยา Dexamethasone ควบคู่กับ EGF มีผลช่วยกระตุ้นให้เซลล์หนังหุ้มปลายอวัยวะเพศ (foreskin) ของมนุษย์มีการเพิ่มจำนวนขึ้น

3.2.2. คาร์โบไฮเดรต (Carbohydrate)

คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งพลังงานหลักที่ใช้ในกระบวนการเผาผลาญอาหารของเซลล์ แหล่งของคาร์โบไฮเดรตส่วนใหญ่ได้มาจากน้ำตาล เช่น มอลโทส (maltose) ซูโครส (sucrose) ฟรุคโทส (fructose) กาแลคโทส (galactose) แมนโนส (mannose) เป็นต้น ซึ่งพบว่าในอาหารเลี้ยงเซลล์ส่วนใหญ่นิยมใช้กลูโคส (glucose) เป็นแหล่งพลังงานหลัก (David, 1994)

3.2.2.1 กลูโคส (glucose)

กลูโคสมีสูตรโครงสร้างเป็น $C_6H_{12}O_6$ จัดเป็นเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวหรือโมโนแซคคาไรด์ (monosaccharide) ที่มีความสำคัญและพบมากในธรรมชาติ เนื่องจากเป็นองค์ประกอบพื้นฐานของคาร์โบไฮเดรตทุกชนิด ซึ่งพบว่าในอาหารเลี้ยงเซลล์ของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังนิยมเติมกลูโคสเพิ่มลงไป เนื่องจากกลูโคสเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการเผาผลาญอาหาร ช่วยในการเกาะกษณะเฉพาะเลี้ยงได้เร็วขึ้นและมีหน้าที่เป็นแหล่งพลังงานให้แก่เซลล์ (Clayclon, 2009) มีรายงานของ Maeda และคณะ (2003) ได้ทำการศึกษาเพาะเลี้ยงเซลล์รังไข่งูงูคัวร์มา ในอาหารสูตรต่างๆ พบว่าอาหารสูตรที่มีการเติม FBS 10% กลูโคส 1 กรัมต่อลิตร proline 0.1 กรัมต่อลิตร TC-Yeastolate 1 กรัมต่อลิตรและ lactalbumin hydrolysate 1 กรัมต่อลิตร เพิ่มในอาหารเลี้ยงเซลล์ ช่วยให้เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตและเพิ่มจำนวนได้ดีที่สุด

3.2.3. วิตามิน (Vitamin)

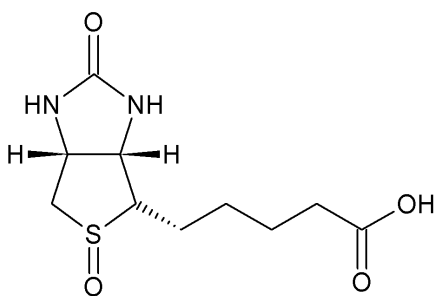
วิตามินเป็นแหล่งสำคัญในการเจริญและเพิ่มจำนวนเซลล์ เนื่องจากวิตามินเป็นตัวชักนำให้เกิดปัจจัยร่วมต่างๆ พบว่าในสูตรอาหารพื้นฐานส่วนใหญ่มีวิตามินเป็นส่วนประกอบ เช่น biotin choline folic acid nicotinic acid pantothenic acid pyridoxal riboflavin thiamin และ inositol เป็นต้น ซึ่งวิตามินที่เติมในอาหารเลี้ยงเซลล์จัดเป็นวิตามินที่ละลายน้ำ และพบว่าอาหารสูตรพื้นฐานบางชนิดมีการเติมวิตามินเอและวิตามินอีลงไปเช่นกัน (David, 1994)

3.2.3.1. MEM vitamin solution

MEM vitamin solution เป็นอาหารเสริมที่มีคุณสมบัติช่วยในการเจริญเติบโตของเซลล์ โดยช่วยให้เซลล์เจริญและมีอัตราการรอดชีวิตสูงขึ้น (HiMedia Laboratories, 2011) มีรายงานของ Brown และคณะ (1999) ใช้ MEM vitamin solution เป็นอาหารเสริมในการเพาะเลี้ยงเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือด (Vascular Smooth Muscle Cells) มนุษย์

3.2.3.2. ไบโอติน (Biotin)

ไบโอติน หรือวิตามินบี7 (Vitamin B7) มีสูตรทางเคมี $C_{10}H_{16}O_3N_2S$ (รูปที่13) จัดอยู่ในกลุ่มวิตามินบีรวม สามารถละลายน้ำได้ เป็นตัวช่วยสังเคราะห์ไขมันจากคาร์โบไฮเดรต และช่วยเร่งปฏิกิริยาทางเคมีโดยมีคุณสมบัติเป็นโคเอนไซม์ (Co-enzyme) Guesdon และคณะ (1979) ในกระบวนการสร้างสารไพริมิดีน (Pyrimidine) จัดเป็นสารตั้งต้นในการสร้างกรดนิวคลีอิก (Nucleic Acid) หรือกระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (DNA) และอาร์เอ็นเอ (RNA) ซึ่งส่งผลในการแบ่งและเพิ่มจำนวนเซลล์ Leary และคณะ (1983)



รูปที่ 13 โครงสร้างทางเคมีของไบโอติน

3.2.4. ไขมัน (Lipid)

เซลล์ของสัตว์แต่ละชนิดมีความต้องการไขมันในปริมาณที่แตกต่างกัน พบว่าไขมันเป็นส่วนประกอบสำคัญที่พบได้มากในตับกึ่งซึ่งอยู่ในรูปของฟอสโฟลิพิด (Phospholipids) โดยฟอสโฟลิพิดมีการสังเคราะห์ได้จากตับและมีปริมาณลดลงในเลือด ดังนั้นการเติมไขมันเพิ่มลงในอาหารเลี้ยงเซลล์จึงขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์เป็นหลัก โดยชนิดของไขมันที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง คือ คลอเรสเทอร์อล พบว่าที่ความเข้มข้น 0.01% มีผลช่วยในการจำลองตัวและเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ (Claydon, 2009)

3.2.5. ยาปฏิชีวนะ (Antibiotics)

ยาปฏิชีวนะนิยมใช้ในการทดลองที่มีการศึกษาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เนื่องจากป้องกันเชื้อจุลินทรีย์ซึ่งจะส่งผลต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่สนใจ โดยหลักการเลือกยาปฏิชีวนะที่ใช้ต้องไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ใช้ในปริมาณเล็กน้อย สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้ ยาปฏิชีวนะมีหลายชนิด เช่น เพนนิซิลิน (penicillin) สเตรปโตมัยซิน (streptomycin) เจนตามัยซิน (gentamycin) แอมโฟเทอริซินบี (amphotericin B) และนิสตาซิน (nystatin) เป็นต้น (David, 1994)

3.2.6. สารละลายที่ใช้ในการปรับสมดุลของอาหารเลี้ยงเซลล์

3.2.6.1. สารละลายเกลือ (Balance salt solutions, BSSs) จัดเป็นส่วนสำคัญในอาหารเลี้ยงเซลล์ เนื่องจากในองค์ประกอบของ BSSs ประกอบด้วยเกลือ (NaCl) เป็นตัวควบคุมค่าความดันออสโมติก (osmotic pressure) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ซึ่งส่งผลต่อประสิทธิภาพในการดูดซึมสารอาหารบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์เพื่อนำมาใช้ในกระบวนการเผาผลาญอาหาร (metabolism) ต่างๆ ภายในเซลล์ BSSs ส่วนใหญ่ไม่ได้มีองค์ประกอบของสารอาหารที่ใช้ในการเจริญเติบโตของเซลล์ แต่เป็นส่วนสำคัญในการรักษาและปรับความสมดุลของสารละลายเกลือที่มีในอาหารเลี้ยงเซลล์ (David, 1994)

3.2.6.2. สารละลายบัฟเฟอร์ (Buffer solution) ทำหน้าที่ในการรักษาสภาพ pH ของอาหารเลี้ยงเซลล์ เนื่องจากในกระบวนการเผาผลาญอาหารของเซลล์ มีการใช้กลูโคสเป็นแหล่งพลังงาน ซึ่งให้ผลิตภัณฑ์ออกมาเป็นกรดแลคติก (lactic acid) ทำให้ pH ของอาหารเลี้ยงเซลล์มีการเปลี่ยนแปลง ส่งผลให้เกิดสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเซลล์ สารละลายบัฟเฟอร์ที่นิยมใช้ คือ ไบคาร์บอเนต (Bicarbonate) และฮีเปส (Hepes) โดยเติมลงไปเล็กน้อย เพื่อไม่ให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) และช่วยให้อาหารมีค่า pH คงที่เหมาะสมแก่การเจริญของเซลล์ (David, 1994)

3.2.7. อาหารเสริมที่สกัดจากเนื้อเยื่อต่างๆ (Tissue extract)

3.2.7.1 Shrimp Meat Extract (SME)

SME นำมาประยุกต์ใช้เป็น growth factor โดยเติมลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ พบว่ามีผลช่วยในการเจริญของเซลล์กุ้ง จึงมีการศึกษา เติม 15% SME ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อมน้ำเหลืองและรังไข่ของกุ้งกุลาดำ ควบคู่กับการเติม 0.01% คคลอเรสเตอรอล (cholesterol) ซึ่งช่วยให้เซลล์มีการเจริญดีขึ้น Kasornchandra และคณะ (1999)

3.2.7.2 Shrimp Ovary Extract (SOE)

SOE มีผลช่วยในการรอดชีวิต (survival) ของเซลล์ จากรายงานของ (Chen and Wang, 1999) ได้ทำการทดลองโดยผสม SME และ SOE ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ พบว่า SME และ SOE มีผลในการรอดชีวิตของเซลล์หัวใจ (heart) และเซลล์เม็ดเลือด (peripheral

hemocytes) ได้แตกต่างกันกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่ช่วยในการรอดชีวิตและเพิ่มจำนวนของเซลล์ต่อม้ำเหลืองและรังไข่กึ่งสายพันธุ์ penaeid มากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ

3.2.8. ไโรโบโซมอลโปรตีน (Ribosomal Protein: RP)

Ribosomal Protein จัดเป็นองค์ประกอบของไโรโบโซม ซึ่งเป็นองค์ประกอบพื้นฐานที่มีความสำคัญในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต เนื่องจาก Ribosomal Protein ช่วยในการควบคุมการแสดงออกของยีนซึ่งมีผลช่วยในการเพิ่มจำนวนของเซลล์ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม (Yamashita, 2007)

3.2.8.1. Ribosomal protein L10a (RPL10a)

RPL10a เป็นองค์ประกอบของ 60S large subunit ในไโรโบโซม Liu และคณะ (2012) จากการทดลองของ Wonglapsuwan และคณะ (2011) RPL10A มีผลในการกระตุ้นการพัฒนารังไข่กึ่งแซบวัยและได้มีการศึกษาหน้าที่การทำงานของ RPL10A ในแมลงหวี่ (*Drosophila melanogaster*) พบว่ามีการแสดงออกในไซโตพลาสซึม (cytoplasm) ของ nurse และ follicle cells ในกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของเพศเมีย (oogenesis) ซึ่งมีการศึกษาเพิ่มเติมแสดงให้เห็นว่า ในกึ่งพบ RPL10a gene 1 ชนิด ส่วนในแมลงหวี่พบ RPL10a gene 2 ชนิด คือ RpL10Aa และ RpL10Ab โดย RpL10Ab มีความคล้ายคลึง (similarity) กับ RPL10a ที่พบในกึ่ง เนื่องจากลักษณะที่แสดงออก (phenotype) ของแมลงหวี่ แสดงให้เห็นว่า RpL10Ab มีส่วนเกี่ยวข้องกับวงจรในการส่งสัญญาณของอินซูลิน (insulin signaling pathway) อีกทั้งการเติม RpL10Ab ในปริมาณมากเกินไปมีผลทำให้เซลล์ตาย ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาปริมาณที่เหมาะสมในการใช้ RPL10a เพื่อกระตุ้นการพัฒนารังไข่ และได้มีการศึกษาของ McMahon และคณะ (2010) พบว่า RPL10a มีการแสดงออกสูงในเซลล์มะเร็ง

3.2.8.2. Ribosomal protein S3a (RPS3a)

RPS3a เป็นองค์ประกอบของ 40S subunit ในไโรโบโซม จากการทดลองของ Navakanitworakul และคณะ (2012) พบว่า RPS3a อาจจะมีผลช่วยกระตุ้นในการพัฒนาของรังไข่กึ่งแซบวัย และได้มีการศึกษาของ Slizhikova และคณะ (2005) ได้ทำการศึกษาเซลล์มะเร็งปอด (Carcinoma of Lung) ในมนุษย์โดยใช้ NOLA2 และ RPS3a genes เป็นตัวบ่งชี้ (marker) เซลล์มะเร็ง พบว่าเมื่อเปรียบเทียบระหว่างเซลล์ปกติและเซลล์มะเร็งของผู้ป่วย แสดงให้เห็นว่าผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งจะมีการแสดงออกของ NOLA2 และ RPS3a genes สูงกว่าเซลล์ของผู้ป่วยปกติถึง 70% เช่นเดียวกับในการรายงานของ Lim และคณะ (2011) พบว่า RPS3a มีการแสดงออกสูงในเซลล์มะเร็งตับที่ติดเชื้อไวรัสตับบี (Hepatitis B virus :HBV) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า RPS3a อาจเกี่ยวข้องกับความผิดปกติในการเพิ่มจำนวนเซลล์

4. การถ่ายเซลล์ไปยังภาชนะใหม่ (subculture)

การ subculture เป็นการย้ายเซลล์ไปยังภาชนะใหม่ ภายใต้อาหารชนิดเดิมหรืออาหารชนิดใหม่ ซึ่งเรียกการ subculture ในแต่ละครั้งว่า passage (จำนวนครั้งในการ subculture) ช่วยในการประมาณจำนวนในการแบ่งเซลล์และรุ่นหรืออายุของเซลล์ได้ สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาแนวโน้มหรืออัตราในการเจริญได้ โดยในการ subculture ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่น ปริมาตรหรือพื้นที่ของภาชนะ ซึ่งพื้นที่ที่กว้างส่งผลให้เซลล์สามารถเจริญเติบโตได้มากกว่าภาชนะแคบๆ แต่ขนาดของภาชนะที่กว้างไม่ได้ช่วยให้เซลล์เจริญได้มากเพียงปัจจัยเดียว จำนวนเซลล์ก็มีผลต่อการเจริญของเซลล์เช่นเดียวกัน เนื่องจากเซลล์เป็นสิ่งมีชีวิตจึงต้องมีการปฏิสัมพันธ์ (interaction) เพื่อช่วยในการเจริญ ส่วนการเพาะเลี้ยงเซลล์ให้อยู่รวมกันหนาแน่นจนเกินไปก็จะส่งผลต่อเสถียรของเซลล์ เนื่องจากเซลล์อาจมีการเกาะเป็นกลุ่ม (clump) หรือเจริญทับกันทำให้เซลล์ตายในที่สุด ปัจจัยของปริมาณสารอาหารก็ส่งผลต่อการ subculture เช่นกัน เนื่องจากการเพาะเลี้ยงเซลล์โดยไม่มีการเปลี่ยนอาหารเลย เซลล์อาจมีการใช้อาหารไม่เพียงพอ จนทำให้ไม่มีสารอาหารมาใช้ในการกระบวนการสลายสารอาหารเพื่อให้ได้พลังงาน (metabolism) ก็ส่งผลให้เซลล์ไม่มีการเจริญและตายในที่สุด ซึ่งประโยชน์ในการ subculture ช่วยให้เซลล์มีชีวิต อายุยาวนานขึ้น เนื่องจากกระหว่างการเพาะเลี้ยง เซลล์จะมีกระบวนการ metabolism ซึ่งอาจมีการปล่อยสารพิษออกมา อาจก่อให้เกิดผลเสถียรของเซลล์โดยถ้ามีสารพิษในปริมาณมากอาจส่งผลให้เซลล์ตาย อีกทั้งการ subculture ยังช่วยในการเจริญของเซลล์เนื่องจากเมื่อมีกระบวนการ metabolism เซลล์ต้องมีการใช้สารอาหาร ดังนั้นการ subculture จึงเป็นการช่วยเพิ่มปริมาณสารอาหารให้แก่เซลล์ ซึ่งช่วยให้เซลล์สามารถเจริญเติบโตได้ดีขึ้น โดยการ subculture เป็นการเพิ่มจำนวนเซลล์จากเซลล์ปริมาณน้อยให้มีการเพิ่มจำนวนมากยิ่งขึ้น อีกทั้งปริมาณเซลล์ที่มากเกินไปส่งผลให้เซลล์มีการใช้อาหารไม่เพียงพอต่อความต้องการในการเจริญต่อส่งผลให้เซลล์ตายในที่สุด ในการ subculture แต่ละครั้งจึงต้องมีการแบ่งเซลล์ในปริมาณที่เท่าๆกัน ซึ่งจะช่วยให้เซลล์ที่แบ่งออกมามีความสามารถเจริญได้สูงสุด อีกทั้งยังเป็นการเพิ่มจำนวนและปริมาตรของเซลล์ให้เพิ่มมากขึ้น ซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมได้

4.1. ชนิดของเซลล์ในการ subculture

4.1.1. เซลล์เกาะภาชนะเพาะเลี้ยง (adherent cells)

เซลล์เกาะภาชนะเพาะเลี้ยงเป็นเซลล์ที่มีคุณสมบัติในการเกาะบริเวณพื้นผิวของภาชนะ ซึ่งเซลล์ชนิดนี้ต้องมีการทำให้เซลล์หลุด (detached) ออกจากผิวหน้าภาชนะเพาะเลี้ยง ก่อน subculture โดยการดูความหนาแน่น (density) ของเซลล์ชนิดนี้ สามารถดูจากปริมาณในการเจริญซึ่งเกาะบริเวณผิวหน้าของภาชนะเพาะเลี้ยง ซึ่งความหนาแน่นของเซลล์มีผลต่อการ subculture เนื่องจากปริมาณที่น้อยเกินไปก็ส่งผลให้เซลล์เจริญช้า ปริมาณเซลล์ที่พอเหมาะในการ subculture ประมาณ 80%ของภาชนะเพาะเลี้ยง การ subculture เซลล์เกาะภาชนะ

เพาะเลี้ยง ต้อง detached ให้เซลล์หลุดออกมาโดยใช้ cell scaper ซึ่งขูดเซลล์ให้หลุดออกจากภาชนะเพาะเลี้ยง หรือการใช้สารเคมี เช่น trypsin เป็นตัวตัด (break down) พันธะของโปรตีนให้หลุดจากภาชนะ EDTA จับกับไอออนของโซเดียมบริเวณผิวเซลล์ซึ่งทำให้โปรตีนตัวที่เกาะกับผิวภาชนะเพาะเลี้ยงหลุดออก แต่การใช้สารเคมีก็อาจส่งผลในการ subculture เนื่องจากความเข้มข้นและเวลานานเกินไปส่งผลเป็นพิษต่อเซลล์ซึ่งอาจทำให้เซลล์ตายในที่สุด ดังนั้นจึงควรศึกษาความเข้มข้นและระยะเวลาที่ใช้ในการบ่มก่อนทำการทดลอง จากนั้นจึงทำการถ่ายเซลล์ไปยังภาชนะใหม่เพื่อให้เซลล์เกาะยังผิวหน้าภาชนะเพาะเลี้ยงตามเดิม

4.1.2. เซลล์ไม่เกาะภาชนะเพาะเลี้ยง (Non-adherent cells)

เซลล์ไม่เกาะภาชนะเพาะเลี้ยง เป็นเซลล์ชนิดที่ง่ายในการ subculture เนื่องจากไม่ต้อง detached ออกจากผิวหน้าภาชนะซึ่งอาจส่งผลต่อคุณสมบัติของเซลล์ โดยการ subculture เซลล์ไม่เกาะภาชนะเพาะเลี้ยง โดยการแบ่งเซลล์ออกมาเลี้ยงในภาชนะใหม่ในปริมาณที่เท่าๆกัน โดยเพิ่มปริมาณสารอาหารให้เหมาะสมต่อภาชนะเพาะเลี้ยง

4.2. การยึดเกาะของเซลล์ (cell adhesion)

cell adhesion เป็นการเชื่อมโยงระหว่างเซลล์ด้วยกัน หรือการยึดเกาะของเซลล์กับสารภายนอกเซลล์ (extracellular matrix เช่น collagen, fibronectin, และ laminin เป็นต้น) (ลัดดา, 2547) พบว่า cell adhesion มีหน้าที่สำคัญหลายประการ เช่น ช่วยในการเจริญของเซลล์ การเพิ่มจำนวนเซลล์ กระตุ้นให้เซลล์เกิดการเปลี่ยนรูปร่างไปทำหน้าที่เฉพาะอย่าง (differentiation) การเคลื่อนที่ของเซลล์ (cellular migration) และการเชื่อมโยงระหว่างเซลล์ด้วยกัน (cell-cell communication) เป็นต้น โดยการเคลือบผิวภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์ (coated surfaces) สามารถช่วยให้เกิดการยึดเกาะของเซลล์ได้ดีขึ้น Moreno และคณะ (2011) พบว่าการเคลือบผิวภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยซีรัมหรือสารที่มีประจุบวก ช่วยให้เซลล์มีการจับกับผิวหน้าภาชนะได้ดียิ่งขึ้น เนื่องจากบริเวณผิวเซลล์ส่วนใหญ่จะมีประจุลบสามารถจับกับประจุบวกของผิวภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์ จึงส่งผลช่วยในการแบ่งตัวของเซลล์บริเวณผิวหน้าภาชนะได้ดียิ่งขึ้น (รัชนีณี, 2550) ซึ่งมีรายงานของ Yamada และคณะ (2007) ได้มีการประยุกต์ใช้ MTT ในการวัดการยึดเกาะของเซลล์กับภาชนะเพาะเลี้ยง (Cell Adhesion Assay) ซึ่งจะกล่าวถึงในหัวข้อถัดไป

5. การศึกษาลักษณะของเซลล์ (characterization of culture cells)

5.1. การศึกษาความมีชีวิตของเซลล์ (cell viability)

การศึกษาค่าความมีชีวิตของเซลล์ สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาคุณสมบัติต่างๆ ของเซลล์ได้ เช่น ทดสอบความเป็นพิษของสารต่อเซลล์ วัดการเจริญเติบโตของเซลล์ ซึ่งมีหลายวิธี ดังนี้

5.1.1. Trypan blue assay

Trypan blue assay เป็นเทคนิคที่ใช้ในการศึกษาความมีชีวิตของเซลล์ได้ง่ายและรวดเร็ว ซึ่งสามารถแยกแยะระหว่างเซลล์ที่มีชีวิตและไม่มีชีวิตได้ โดยเซลล์ที่ไม่มีชีวิตจะมองเห็นเป็นสีน้ำเงิน เนื่องจาก Trypan blue สามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าไปจับกับโปรตีนซีรัม (serum proteins) ภายในเซลล์ได้ ส่วนเซลล์ที่มีชีวิต Trypan blue ไม่สามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าไปได้ จึงทำให้ย้อมไม่ติดสี (วิชชุตตาและคณะ, 2556) จากนั้นจึงทำการศึกษาความมีชีวิตของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ซึ่งสามารถนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและไม่มีชีวิตได้โดยใช้ Hemocytometer ซึ่งเป็นอุปกรณ์ที่ใช้นับจำนวนเซลล์ ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนที่เป็นสไลด์ (slide) และแผ่นปิดสไลด์ ภายในสไลด์จะมีช่องสำหรับใส่เซลล์ที่ต้องการนับ โดยมีลักษณะเป็นตาราง (grid) ซึ่งทำให้สามารถคำนวณจำนวนเซลล์ได้มีรายงานของ Graidist และคณะ (2006) ทำการศึกษาบทบาทของ fortilin ในการป้องกันการตายจากการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในเซลล์กุ้งกุลาดำ (*Penaeus mondon*) โดยใช้เทคนิค Trypan blue assay ในการศึกษาความมีชีวิตของเซลล์

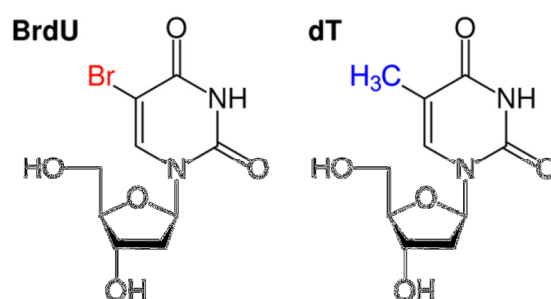
5.1.2. MTT assay

MTT assay (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay คือ เทคนิคที่ใช้ศึกษาความมีชีวิตของเซลล์ (cell viability) จากการวัดปริมาณเอนไซม์ succinate dehydrogenase ในไมโทคอนเดรีย (mitochondria) (David, 2011) โดยเอนไซม์ succinate dehydrogenase เป็นเอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการเผาผลาญอาหาร (metabolism) ซึ่งพบในไมโทคอนเดรียของเซลล์ที่มีชีวิต ส่วนเซลล์ตายไม่มีการสร้างเอนไซม์ succinate dehydrogenase จึงมีการประยุกต์ใช้โดยเติมสาร MTT ที่มีสีเหลือง ไปจับกับ tetrazolium ring ในเอนไซม์ succinate dehydrogenase เกิดเป็นผลิตภัณฑ์สีม่วงของ formazan ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ไม่ละลายน้ำ แต่สามารถละลายได้ใน isopropanol หรือตัวทำละลายบางชนิด เช่น dimethyl sulfoxide (DMSO) จากนั้นนำไปการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร (Frei, 2011) พบว่าเทคนิค MTT assay นิยมใช้ในการศึกษาความเข้มข้นของยาที่ส่งผลยับยั้งการเจริญของเซลล์ (cytotoxicity) โดยเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่มีการเติมตัวยาลงไป ใช้ดูการแบ่งเซลล์ (dividing cells) นิยมใช้กับเซลล์ไลน์ (cell lines) เนื่องจากสามารถรู้จำนวนเซลล์ที่แน่นอน หรือใช้ในการศึกษาสารบางชนิดที่ส่งผลต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (cell proliferation) โดยสามารถใช้ดูความมีชีวิตของเซลล์ได้โดยตรง พบว่าค่าการดูดกลืนแสงมีค่าแปรผันตรงกับความมีชีวิตของเซลล์ ในทางกลับกันค่าการดูดกลืนแสงน้อย แสดงให้เห็นว่าเซลล์มีชีวิตน้อยหรือเซลล์ตาย Meerloo และคณะ (2011)

5.2. การศึกษาการเพิ่มจำนวนเซลล์ (cell proliferation)

5.2.1. BrdU assay

การวิเคราะห์การเพิ่มจำนวนเซลล์โดยใช้เทคนิค 5-bromo-2'-deoxyuridine assay (BrdU assay) ตามวิธีการของ Cell Proliferation Elisa BrdU colorimetric (Roche, Germany) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้วัดปริมาณการเพิ่มจำนวนของเซลล์จากการวัดปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นภายในเซลล์ พบว่า BrdU เป็นสารที่มีโครงสร้างคล้ายกับ Thymidine หรือ เบส T ใน DNA (รูปที่ 14) จึงมีการเติม BrdU ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงลงไปในการเลี้ยงเซลล์ เพื่อให้ BrdU เข้าไปแทนที่เบส T ในการสังเคราะห์ DNA จากนั้นจึงทำการตรวจสอบการเพิ่มจำนวนของเซลล์โดยวัดการเรืองแสงด้วยเทคนิค Colorimetric immunoassay ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร



รูปที่ 14 โครงสร้างของ BrdU และ Thymidine

(http://openwetware.org/wiki/Bromodeoxyuridine_%28BrdU%29)

6. การติดเชื้อในเซลล์เนื้อเยื่อ

ในระบบการเพาะเลี้ยงกุ้งมักประสบปัญหาของโรคหลายชนิดเนื่องมาจากปัจจัยต่างๆ เช่น ปริมาณและคุณภาพของน้ำที่ใช้เลี้ยง การลำเลียงขนส่ง ทำให้กุ้งเกิดความเครียด อ่อนแอ จึงง่ายต่อการเกิดโรคติดเชื้อ พบว่าการเกิดโรคติดเชื้อในกุ้งเกิดจากเชื้อ 4 ชนิดหลัก คือ โปรโตซัว รา แบคทีเรียและไวรัส โดยโรคติดเชื้อไวรัสทำให้กุ้งมีการเจริญเติบโตช้าและเกิดอัตราการตายสูง ซึ่งส่งผลกระทบต่อระบบเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก (จรีพร, 2546)

6.1. โรคติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

โรคตัวแดงดวงขาว หรือ ไวรัสตัวแดงดวงขาว เกิดจากเชื้อ WSSV เป็นดีเอ็นเอไวรัส (DNA) รูปร่างของเชื้อเป็นชนิดแท่งโดยมีความยาว 270-290 นาโนเมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 110-120 นาโนเมตร เชื้อไวรัสสามารถทำลายเนื้อเยื่อผิวได้เปลือก เหงือก อวัยวะสร้างเม็ดเลือด ต่อม น้ำเหลืองและเม็ดเลือด โดยทำให้นิวเคลียสของเซลล์บวมโต

ลักษณะอาการ มีจุดขาวหรือดวงขาว (รูปที่ 15) มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.1-2 มิลลิเมตร กุ้งเป็นโรคตัวแดงดวงขาวจะไม่มีแรงติดตัว ว่าอยู่บริเวณผิวหนังหรือเกยขอบบ่อ กินอาหารลดลง

ลอกคราบไม่ออกหรือลอกคราบแล้วไม่แข็งตัว ตัวนุ่ม พบว่าในช่วงอากาศหนาวหรือฝนตกหนัก ติดต่อกันนานๆ จะมีการตายของกุ้งที่เป็นโรคตัวแดงดวงขาวมากกว่าช่วงอื่น



รูปที่ 15 ลักษณะจุดขาวหรือดวงขาวบริเวณเปลือกกุ้ง (Lightner, 2011)

6.2. การตรวจไวรัสตัวแดงดวงขาว

6.2.1. ย้อมเซลล์เหงือกและเซลล์เยื่อผิวหนังได้เปลือกด้วยสี Hematoxylin and eosin (H&E) เก็บตัวอย่างกุ้งที่ยังมีชีวิต โดยการตัดเหงือกหรือลอกเซลล์เยื่อผิวหนังได้เปลือก บริเวณเปลือกคลุมเหงือกไปดองในน้ำยา Davidson จากนั้นนำชิ้นเนื้อไปย้อมสี H&E แล้วนำเนื้อเยื่อเหงือกมาตัดเป็นชิ้นบางๆ แล้วนำไป permount บนสไลด์ ส่งภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กุ้งที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว จะพบ inclusion bodies ในนิวเคลียสติดสีแดงถึงสีน้ำเงิน ซึ่งถ้าติดเชื้อระยะท้าย จะพบนิวเคลียสขยายใหญ่ตัน chromatin ไปติดขอบเซลล์

6.2.2. ใช้เทคนิค PCR ในการตรวจไวรัสตัวแดงดวงขาว โดยนำตัวอย่างเหงือกหรือเนื้อเยื่อได้เปลือก บดด้วย Lysis solution (0.05N NaOH และ 0.025%SDS) โดยสารทั้ง 2 ตัวจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ นำไปต้มในน้ำเดือด แล้วแช่น้ำแข็ง ดูดสารละลายมาทำ PCR จากนั้นนำ PCR product มา run gel electrophoresis

7. เทคนิคที่ใช้ในการศึกษาการติดเชื้อไวรัสในเซลล์กุ้ง

7.1 Cytopathic effects

Cytopathic effects (CPE) คือ การเปลี่ยนแปลงรูปร่างและหน้าที่ของเซลล์ที่มีการติดเชื้อไวรัส โดยจะไปรบกวนการสร้างโมเลกุลขนาดใหญ่ (macromolecule) ของเซลล์เจ้าบ้าน (Host cell) ทำให้เกิดการแตกหักของโครโมโซม (chromosome) เกิดการรวมตัวกัน (inclusion body) เยื่อหุ้มเซลล์ (membrane) สูญเสียคุณสมบัติ เช่น เสียคุณสมบัติในการเกาะพื้นผิว ภาวะเพาะเลี้ยง (วคินและรุ่งทิพย์, 2555) หรือมีการรวมตัวกันของเซลล์ ทำให้กลายเป็นเซลล์ขนาดใหญ่มีหลายนิวเคลียส (syncytial cell) ส่งผลให้เกิดการตายของเซลล์ในที่สุด (apoptosis) พบว่าการเกิด CPE สามารถสังเกตได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (พรอำภาและวีระชัย, 2552)

7.2 Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

RT-PCR คือ เทคนิคการสร้างสายดีเอ็นเอคู่สม (complementary DNA; cDNA) จาก อาร์เอ็นเอ (RNA) โดยใช้เอนไซม์ Reverse Transcriptase (RT) จากนั้นจึงนำ cDNA ที่ได้ไป ทำปฏิกิริยา PCR ซึ่งเป็นเทคนิคการเพิ่มจำนวน DNA โดยใช้เอนไซม์ DNA polymerase ในการสังเคราะห์ DNA สายใหม่จาก DNA สายเดิม (DNA Replication) และตรวจสอบด้วยวิธี agarose gel electrophoresis (อาโนฮิระ, 2549)

พบว่าปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ

1. Denature เป็นขั้นตอนการแยกสาย DNA จาก double helix ให้แยกออกจากกัน เป็นสองสาย โดยทำลายพันธะระหว่าง nucleotides เพื่อให้ primer สามารถเข้ามาจับ DNA สายเดี่ยวได้ ที่อุณหภูมิประมาณ 94-95 องศาเซลเซียส

2. Annealing เป็นขั้นตอนการจับกันของ primer กับ DNA สายเดี่ยว โดยใช้อุณหภูมิ ประมาณ 45-72 องศาเซลเซียส ซึ่งขึ้นอยู่กับ Melting Temperature (Tm) ของ primer

3. Extension เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ DNA โดยใช้เอนไซม์ Taq polymerase ทำให้มีการนำ base มาต่อทางด้าน 3' ของ primer โดยต่อให้ complementary กับสาย DNA แม่แบบ ที่อุณหภูมิประมาณ 72 องศาเซลเซียส (อโณทัย, 2549)

8. ประโยชน์ที่ได้จากเซลล์จากเนื้อเยื่อกุ้ง

พบว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อกุ้งสามารถใช้เป็นรูปแบบในการศึกษาการเจริญของรังไข่ให้สามารถพัฒนาได้เร็วขึ้นในระยะเวลาน้อยลง (Touillec, 1999) พบว่าเซลล์จากต่อมน้ำเหลือง รังไข่ เม็ดเลือดและตับเป็นเซลล์ที่สามารถเลี้ยงได้ในระยะเวลานานและสามารถนำมาใช้ทดสอบ การติดเชื้อในกุ้งได้ ส่งผลให้การเพาะเลี้ยงเซลล์จากเนื้อเยื่อกุ้งเป็นที่นิยมศึกษาอย่างแพร่หลาย Jayesh และคณะ (2012) มีการทดลองเพาะเลี้ยงเซลล์รังไข่ เซลล์เม็ดเลือด เซลล์ต่อมน้ำเหลือง และเซลล์หัวใจจากกุ้ง *P. monodon* และ *P. penicillatus*. พบว่าเซลล์เม็ดเลือดและเซลล์หัวใจ สามารถเจริญได้ 4 วัน ส่วนเซลล์รังไข่และเซลล์ต่อมน้ำเหลืองสามารถ subculture ได้ถึง 3 ครั้ง และสามารถเจริญได้ 20 วัน (Chen and Wang, 1999) แสดงให้เห็นว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์ เนื้อเยื่อกุ้งจึงเป็นเครื่องมือสำคัญสำหรับการวิจัยพื้นฐานเกี่ยวกับไวรัสกุ้ง Maeda และคณะ (2003) โดยสามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นรูปแบบในการศึกษาโรคต่างๆในกุ้งได้

วัตถุประสงค์

1. หาสูตรอาหารที่เหมาะสมที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกุ้งแชบ๊วย
2. ศึกษาลักษณะและคุณสมบัติต่างๆของเซลล์เนื้อเยื่อกุ้งแชบ๊วย
3. ศึกษาการติดเชื้อของไวรัสตัวแดงดวงขาวต่อเซลล์เนื้อเยื่อกุ้งแชบ๊วย

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

1. วัสดุ

1.1. สารเคมี

1.1.1. สารเคมีชนิดเกรดวิเคราะห์ (Analytical grade)

สารเคมี	บริษัทที่ผลิต
Acetic acid	J.T.Baker
Ammonium Persulfate (APS)	USB
Antibiotic-Antimycotic	Invitrogen
β -Mercaptoethanol	BDH
Biotin	Sigma
Bovine Serum Albumin (BSA)	GE-Healthcare
Bromophenol blue	Fluka
Chloroform	LAB-SCAN
Comassie brilliant blue R	Sigma
Copper Sulphate penta-hydrate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	Merk
Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4)	Merk
Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA)	Merk
Fetal Bovine Serum (FBS)	Invitrogen
Gelatin	KSP
Glucose	Merk
Glycerol	Fisher Scientific
HEPES	Sigma
Hydrochloric (HCl)	Merk
Immidazole	Sigma
Kanamycin	BioBasic
Lactalbumin hydrolysate	Sigma
Leibovitz's L-15 Medium (L15 medium)	Invitrogen
MEM vitamin solution	Invitrogen
Methanol	LAB-SCAN
Potassium chloride (KCl)	RANKEM
Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	Merk

Sulfuric acid (H ₂ SO ₄)	LAB-SCAN
Sodium Carbonate (NaCO ₃)	BDH
Sodium Chloride (NaCl)	LAB-SCAN
Sodium dihydrogen phosphate (NaH ₂ PO ₄)	RCI Labscan
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Aps Ajex Finechem
Sodium Hydroxide (NaOH)	Loba Chemie
TC-yeastolate	Invitrogen
Tris-base	Fisher Scientific
Trypan blue	Invitrogen
Tryptone	Himedia
Yeast extract	RCI Labscan

1.1.2. สารเคมีชนิดเกรดอณูชีววิทยา (Molecular biology grade)

สารเคมี	บริษัทที่ผลิต
Acrylamide	Merk
Agarose	Promega
collagenase type V	Sigma
deoxynucleotide Triphosphate (dNTP)	Promega
Ethidium bromide	Sigma
isopropyl β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	GE-Healthcare
Lysosome	USB
MTT solution	Invitrogen
N,N,N',N'-tetramethyl ethylenediamine (TEMED)	USB
N'N-Methylenebisacrymide	Merk

1.2. แบคทีเรีย

Escherichia coli (*E.coli*) สายพันธุ์ BL21 มีลักษณะ Genotype : F-, *ompT*, *hsdS_B*-(r_B⁻, m_B⁻), *gal*, *dcm* บริษัท Invitrogen ประเทศเนเธอร์แลนด์

1.3. ดีเอ็นเอต้นแบบสายสั้น ๆ (Oligonucleotide primer) (Sigma)

ไพรเมอร์	ลำดับเบส	Tm (°C)
GAPDH-F	5' CAAGAAGGTCATCATCTCCGCT 3'	55
GAPDH-R	5' TCCACGGTCTTCTGTGTGGC 3'	55
ie1-F	5' GACTCTACAAATCTCTTTGCCA 3'	55
ie1-R	5' CTAGGAATTGGTGCAAAGGTAG 3'	55

2. อุปกรณ์

กระดาษกรองเบอร์3 (Whatman)

หลอดไมโครเซนติพิวจ์สำหรับทำ PCR ขนาด 0.2 มิลลิลิตร

หลอดไมโครเซนติพิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น 2200C SCS (บริษัท Precisa)

เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น AB 204 (บริษัท Mettler Toledo)

เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิได้ (บริษัท Labline)

เครื่องเขย่าผสมสาร Vortex-2 GENIE (บริษัท Scientific Industries)

เครื่องจ่ายกระแสไฟ Power Supply รุ่น 1000/500 (บริษัท Bio Rad)

เครื่อง Horizblot electrophoresis transfer รุ่น AE-6675&AE-6675L (บริษัท ATTO)

เครื่องตรวจสอบดีเอ็นเอโดยวิธีอีกาโรสเจลอิเล็กโตรฟอริซิส (บริษัท Bio Rad)

เครื่องบันทึกภาพเจลดีเอ็นเอ รุ่น Gel Doc (บริษัท Bio Rad)

เครื่องผลิตเสียงความถี่สูง (บริษัท Sonics)

เครื่องวัดการดูดกลืนแสง รุ่น Lamda 25 (บริษัท Perkin Elmer)

เครื่องวัดการดูดกลืนแสง UV รุ่น Ultraspec III (บริษัท Pramacia)

เครื่องวัด pH รุ่น Cyberscan 1000 (บริษัท Eutech Cybernectics)

เครื่องสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (PCR) รุ่น TouchDown (บริษัท HYBRID)

เครื่องหมุนแรงเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิได้ รุ่น RC 5B (บริษัท Sorvall)

เครื่องหมุนเหวี่ยงแบบตั้งโต๊ะ รุ่น Biofuge pico (บริษัท Sorvall)

ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส (บริษัท SANYO)

ตู้แช่แข็ง -70 องศาเซลเซียส (บริษัท SANYO)

ตู้ดูดควัน (บริษัท Major)

ตู้ปราศจากเชื้อ Laminar air flow (บริษัท Neurair)

หม้อนิ่งความดันไอน้ำ รุ่น HA-300 MII (บริษัท Hirayma)

อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (บริษัท Mammert)

วิธีการทดลอง

1. ศึกษาความมีชีวิตของเซลล์กึ่งแซบวัยโดยเทคนิค MTT assay (Invitrogen, USA)

นำกึ่งแซบวัย (น้ำหนักประมาณ 25-50 กรัม ความยาวประมาณ 15-20 เซนติเมตร) แช่ในน้ำแข็ง 10-15 นาที ล้างฆ่าเชื้อใน 70% ethanol แช่เย็น 10 นาที และ PBS (1X antibiotic-Antimycotic), pH7.4 แช่เย็น 15 นาที จากนั้นผ่าแยกเนื้อเยื่อ 3 ชนิด คือ รังไข่ ซึ่งอยู่ในระยะ undervelop ต่อมน้ำเหลืองและตับ มาล้างในอาหาร 2X-L15 medium 4 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ตัดเนื้อเยื่อรังไข่ ต่อมน้ำเหลืองและตับ เป็นชิ้นเล็กๆ โดยแบ่งเนื้อเยื่อแต่ละชนิด ออกเป็น 4 ส่วน

ส่วนที่ 1 นำเนื้อเยื่อรังไข่ ต่อมน้ำเหลืองและตับ มาวางใน 2X-L15 medium ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 2.30 ชั่วโมง

ส่วนที่ 2 นำเนื้อเยื่อรังไข่ ต่อมน้ำเหลืองและตับ มาย่อยด้วยสารละลาย SSS (สารที่มี EDTA เป็นส่วนประกอบ) ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 2.30 ชั่วโมง

ส่วนที่ 3 นำเนื้อเยื่อรังไข่ ต่อมน้ำเหลืองและตับ มาย่อยด้วย collagenase type V ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 2.30 ชั่วโมง

ส่วนที่ 4 นำเนื้อเยื่อรังไข่ ต่อมน้ำเหลืองและตับ มาย่อยด้วย collagenase type V ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2.30 ชั่วโมง

จากนั้นดูดเซลล์และเนื้อเยื่อแต่ละชนิด มากรองด้วย filter ขนาด 40 ไมโครเมตร นำส่วนใสที่กรองได้ไปปั่นความเร็ว 2,500 รอบต่อนาที 2 นาที ดูดสารละลายด้านบนออก เติม 2X-L15 medium นำเซลล์ไปปั่นที่ความเร็ว 2,500 รอบต่อนาที 2 นาที ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ เพาะเลี้ยงใน 96 well plate ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เวลา 24 และ 72 ชั่วโมง นำไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีชีวิต (% cell viability) ด้วยเทคนิค MTT assay (Stern and Potter, 2010) เติม 12mM MTT solution หลุมละ 10 ไมโครลิตรต่ออาหารเลี้ยงเซลล์ 2X-L15 medium 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เวลา 4 ชั่วโมง เติม 0.1M SDS-HCl solution หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เวลา 4 ชั่วโมง วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร คำนวณหาค่า % cell viability จากสมการ

$$\% \text{ cell viability} = \frac{\text{ค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่าง} \times 100}{\text{ค่าดูดกลืนแสงของตัวควบคุม}}$$

2. ศึกษาสูตรอาหารสังเคราะห์พื้นฐานในการเพาะเลี้ยงเซลล์กึ่งแซบิวโดยเทคนิค BrdU assay (Roche, Germany)

เพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อรังไข่ ต่อม้ำเหลืองและตับ ในอาหารเลี้ยงเซลล์สังเคราะห์พื้นฐานโดยปรับปรุงสูตรมาจาก Kasornchandra และคณะ (1999) แสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สูตรอาหารเลี้ยงเซลล์สังเคราะห์พื้นฐาน

สูตรอาหาร	Normal	Modified 1	Modified 2	Modified 3	Modified 4
medium L-15	2X	2X	2X	2X	2X
กลูโคส (glucose)	1%	1%	1%	1%	1%
เกลือแกง (NaCl)	-	-	0.5%	0.5%	0.5%
Lactalbumin hydrolysate	-	0.1%	-	0.1%	0.1%
TC-yeastolate	-	0.1%	-	0.1%	0.1%
L-proline	-	0.01%	-	0.01%	0.01%
ascorbic acid	-	-	-	-	0.001%
FBS	10%	10%	10%	10%	10%
Antibiotic- Antimycotic	1X	1X	1X	1X	1X

เพาะเลี้ยงเซลล์ทั้ง 3 ชนิด ใน 96 well plate บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เวลา 1 3 และ 5 วัน จากนั้นนำไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ดัชนีการเพิ่มจำนวนเซลล์ (%Proliferation index: PI) ด้วยเทคนิค BrdU assay เติม BrdU solution หลุมละ 10 ไมโครลิตรต่ออาหารเลี้ยงเซลล์ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นจึงดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก เติม FixDenat solution หลุมละ 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที ดูด FixDenat solution ออก เติม anti-BrdU-POD solution หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เวลา 90 นาที ดูด anti-BrdU-POD solution ออก เติม PBS หลุมละ 200 ไมโครลิตร 3 ครั้ง ดูด PBS ออก เติม Substrate solution หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที เติม 1M H₂SO₄ หลุมละ 25 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

$$\%Proliferation\ index = \frac{\text{ค่าดูดกลืนแสงของเซลล์ในอาหารสูตรต่างๆ} \times 100}{\text{ค่าดูดกลืนแสงของเซลล์ในอาหารสูตร normal}}$$

3. การเพาะเลี้ยงเซลล์กึ่งแขวนลอยในอาหารสังเคราะห์พื้นฐาน

เพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อรังไข่ ต่อมหน้าเหลืองและตับ ในอาหารเลี้ยงเซลล์สังเคราะห์สูตรดีที่สุด (การทดลองที่ 2) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใน 6 well plate ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุกๆ 3-4 วัน จากนั้นทำการ subculture โดยแบ่งเซลล์ออกเป็น 2 ชนิด ในการ subculture คือ เซลล์รังไข่และต่อมหน้าเหลือง โดยดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก เติมน้ำ PBS เพื่อล้างอาหารที่ติดบริเวณผิวเซลล์ออก ดูด PBS ออก เติมน้ำ 0.25% Trypsin-EDTA ปริมาตร 1-2 มิลลิลิตร หรือท่อมหน้าเหลืองเพาะเลี้ยง ปมที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เวลา 2 นาที หรือสังเกตลักษณะเซลล์มีการหลุดออกจากภาชนะเพาะเลี้ยง จากนั้นเติมน้ำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนผสมของ FBS ดูดเซลล์และอาหารเลี้ยงเซลล์ทั้งหมดลงในหลอดทดลองพลาสติกขนาด 15 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที เวลา 5-10 นาที ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก เติมน้ำอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ลงไป นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5-10 นาที ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก เติมน้ำอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ลงไป ดูดแบ่งอาหารเลี้ยงเซลล์เพื่อดูการมีชีวิตของเซลล์ โดยใช้ Hemocytometer ดูดเซลล์ 20 ไมโครลิตร ผสมกับ 0.2% Trypan blue จากนั้นดูส่วนผสมที่ได้ 10 ไมโครลิตร เติมน้ำในช่องว่างระหว่าง coverslip กับ hemocytometer แล้วนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ (inverted microscope) เพื่อดูการมีชีวิตของเซลล์ ซึ่งเซลล์ที่มีชีวิตจะมีลักษณะใส ส่วนเซลล์ตายจะย้อมติดสีน้ำเงินของ Trypan blue จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทั้งหมดลงในภาชนะเพาะเลี้ยง โดยแบ่งออกเป็น 2 ส่วนเท่าๆกัน จากนั้นนำไปปมที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ส่วนเซลล์ตับทำการ subculture โดยดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทั้งหมดลงในหลอดทดลองพลาสติกขนาด 15 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5-10 นาที ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก เติมน้ำอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ลงไป ดูดแบ่งอาหารเลี้ยงเซลล์เพื่อดูการมีชีวิตของเซลล์เช่นเดียวกับเซลล์รังไข่ และต่อมหน้าเหลือง จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทั้งหมดลงในภาชนะเพาะเลี้ยง โดยแบ่งออกเป็น 2 ส่วนเท่าๆกัน จากนั้นนำไปปมที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส

4. การเตรียมโปรตีนลูกผสม His-RPS3a จากดีเอ็นเอลูกผสม pET-RPS3a ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21

4.1 กระตุ้นการสร้างโปรตีนในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21

นำแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 มาเลี้ยงในอาหาร LB broth ที่มี Kanamycin ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 30 มิลลิลิตร นำไปปมเลี้ยงในเครื่องเขย่าที่ความเร็ว

180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงในอาหารชนิดเดียวกัน ปริมาตร 300 มิลลิลิตร นำไปบ่มเลี้ยงต่อในเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ประมาณ 3 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เมื่อแบคทีเรียมีการเจริญ จนมีค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 0.5-0.7 จึงกระตุ้นให้แบคทีเรียมีการผลิตโปรตีนด้วยสารละลาย 1mM IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) บ่มเลี้ยงที่ความเร็ว 80 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส ประมาณ 5 ชั่วโมง จากนั้นจึงปรับความเร็ว 110 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แยกเก็บเซลล์แบคทีเรีย โดยนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้ง เก็บตะกอนเซลล์แบคทีเรียบนน้ำแข็ง เติม binding buffer 7.5 มิลลิลิตร (ในอัตราส่วน 5 มิลลิลิตร binding buffer ต่อ 250 มิลลิลิตร ปริมาตรทั้งหมดของแบคทีเรีย) ทำให้เซลล์แตกโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (sonication) 200-300 วัตต์ โดยตั้งค่าเป็น เปิด 10 วินาที หยุด 30 วินาที รวมเวลาเปิดทั้งหมด 10 นาที โดยทำบนน้ำแข็งตลอดเวลา นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เก็บสารละลายส่วนใสที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส ทำการวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบมีเอสดีเอส

4.2 วิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบมีเอสดีเอส (SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis: SDS-PAGE)

นำสารละลายโปรตีนผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ (4x-SDS sample buffer) ในอัตราส่วน สารละลายบัฟเฟอร์ 1 ส่วน ต่อสารละลายโปรตีนตัวอย่าง 4 ส่วน ผสมให้เข้ากัน ต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที แล้ววางบนน้ำแข็งทันที เตรียม 12% โพลีอะคริลาไมด์เจล ซึ่งมีส่วนผสมแสดงในตารางที่ 2 โดยเทส่วนของชั้น separating gel แล้วใช้น้ำกลั่นหล่อผิวหน้าเจลเพื่อปรับให้ผิวหน้าเรียบ วางที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที เทน้ำกลั่นออกและซับให้แห้ง จากนั้นเทส่วนผสมของชั้น stacking gel ลงไป เสียบหัวในแผ่นกระจก ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ วางที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที ดึงหัว ประกอบเจลกับเครื่องเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้ running buffer สำหรับทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบมีเอสดีเอส ใช้กระแสไฟฟ้า 150 โวลต์ เวลา 1.30 ชั่วโมง แกะเจลออกจากเครื่องเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ย้อมด้วยสี Brilliant Coomassie Blue ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง ล้างสีออกด้วย destain I เวลา 1 ชั่วโมง และ destain II จนกระทั่งเห็นแถบโปรตีนชัดเจน

ตารางที่ 2 ส่วนประกอบของโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบมีเอสดีเอส

ส่วนประกอบ	12% separating gel (มิลลิลิตร)	4% stacking gel (มิลลิลิตร)
30%acrylamide-bis acrylamide	2.33	0.5
1.5M Tris-HCl, pH8.8	1.3	-
1.0M Tris-HCl, pH6.8	-	0.38
10%SDS	0.05	0.03
10%APS	0.05	0.03
TEMED	0.002	0.003
Distill water	1.37	2.1
ปริมาตรรวม	5.0	3.0

4.3 การทำให้โปรตีนบริสุทธิ์โดยใช้ His-Trap FF column (GE Healthcare, Thailand)

นำคอลัมน์ของ His-Trap FF column ขนาด 2 มิลลิลิตร ต่อเข้ากับเครื่อง AKTAprime จากนั้นล้างคอลัมน์ด้วย 20%ethanol และ Distill water ด้วยอัตราการไหล 5 มิลลิเมตรต่อนาที นำสารละลายโปรตีน นีตเข้าเครื่อง AKTAprime ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากนั้นนำโปรตีนที่ได้ในแต่ละ fraction มาตรวจสอบด้วย 12%SDS-PAGE

4.4 การหาปริมาณโปรตีนโดยใช้วิธี Lowry (Lowry และคณะ 1951)

เตรียมสารละลาย BSA เป็นโปรตีนมาตรฐานให้มีความเข้มข้น 0, 12.5, 25, 50, 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยทำการเจือจางโปรตีนมาตรฐานและโปรตีนตัวอย่างจากโปรตีนเริ่มต้น 1:100 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำมาทำปฏิกิริยากับสารละลาย A หลอดละ 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง เวลา 10 นาที เติมสารละลาย B หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง เวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบหาปริมาณโปรตีนตัวอย่างกับโปรตีนมาตรฐาน BSA

5. การเตรียมโปรตีนลูกผสม His-RPL10a จากดีเอ็นเอลูกผสม pET-RP L10a ในแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21

5.1 กระบวนการสร้างโปรตีนลูกผสม His-RPL10a ในแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21

นำแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21 มาเลี้ยงในอาหาร LB broth ที่มี Kanamycin ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 30 มิลลิลิตร นำไปบ่มเลี้ยงในเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงในอาหารชนิดเดียวกัน ปริมาตร 300 มิลลิลิตร นำไปบ่มเลี้ยงต่อในเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อ

นาที่ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ประมาณ 3 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เมื่อแบคทีเรียมีการเจริญ จนมีค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 0.5-0.6 จึงกระตุ้นให้แบคทีเรียมีการผลิตโปรตีนด้วยสารละลาย 1mM IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) บ่มเลี้ยงที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง แยกเก็บเซลล์แบคทีเรีย โดยนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้ง เก็บตะกอนเซลล์แบคทีเรียบนน้ำแข็ง เติม binding buffer 7.5 มิลลิลิตร (ในอัตราส่วน 5 มิลลิลิตร binding buffer ต่อ 250 มิลลิลิตร ปริมาตรทั้งหมดของแบคทีเรีย) เติม lysozyme ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร วางบนน้ำแข็ง 30 นาที ทำให้เซลล์แตกโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (sonication) 200-300 วัตต์ โดยตั้งค่าเป็น เปิด 10 วินาที หยุด 10 วินาที รวมเวลาเปิดทั้งหมด 5 นาที โดยทำบนน้ำแข็งตลอดเวลา นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เก็บสารละลายส่วนใสที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส ทำการวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบมีเอสดีเอส (SDS-PAGE) ตามวิธีในหัวข้อ 4.2-4.4

6. ศึกษาผลของอาหารเสริมในการเพาะเลี้ยงเซลล์จากกุ้งแชบ๊วยโดยเทคนิค BrdU assay

เพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อรังไข่ ต่อมหน้าเหลืองและตับ ในอาหารเลี้ยงเซลล์สังเคราะห์สูตรที่ดีที่สุด (การทดลองที่ 2) โดยเพาะเลี้ยงใน 96 well plate ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์สังเคราะห์สูตรที่ดีที่สุด (การทดลองที่ 2) และเติมอาหารเสริม (supplement) แสดงในตารางที่ 3 ตารางที่ 3 ชนิดของ supplement ที่ใช้เติมในอาหารเลี้ยงเซลล์สังเคราะห์พื้นฐาน

ชนิดของ supplement	ความเข้มข้น
อาหารเสริมชนิดโปรตีน (Protein supplement)	
- Fetal Bovine Serum (FBS)	20%
- Epidermal Growth Factor (EGF)	10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร
อาหารเสริมชนิดวิตามิน (Vitamin supplement)	
- MEM vitamin solution	2X
- Biotin	20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร
อาหารเสริมที่สกัดจากเนื้อเยื่อกุ้งแชบ๊วย (Tissue extract)	
- Shrimp Meat Extract (SME)	10%
- Shrimp Ovary Extract (SOE)	10%

อาหารเสริมที่มาจากไรโบโซมอลโปรตีน (Ribosomal Protein)	
- RPL10a	30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
- RPS3a	3.3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

โดยมีอาหารสูตรที่ไม่ได้เติมอาหารเสริมเป็นตัวควบคุม จากนั้นนำไปบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เวลา 5 7 และ 10 วัน วัดดัชนีการเพิ่มจำนวนเซลล์ ด้วยเทคนิค BrdU assay และถ่ายภาพลักษณะเซลล์รังไข่ ต่อม้นำเลี้ยงและดับในอาหารที่มีการเติม supplement แต่ละชนิด

7. ศึกษาผลของการเคลือบผิวหน้าภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์ (Cell Adhesion Assay)

เติม 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร albumin 20%FBS และ 0.2%gelatin เพื่อเคลือบผิวภาชนะเพาะเลี้ยง ลงใน 96 well plate หลุมละ 50 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง ดูดสารทุกชนิดออก เติม PBS, pH7.4 หลุมละ 100 ไมโครลิตรเพื่อล้างสารส่วนเกินออก โดยให้หลุมที่ไม่มีการเติมสารเคลือบผิวภาชนะเพาะเลี้ยงเป็นตัวควบคุม เติมอาหารเลี้ยงเซลล์สูตรที่ดีที่สุด (การทดลองที่ 6) หลุมละ 100 ไมโครลิตร วางเนื้อเยื่อรังไข่และ ต่อม นำเลี้ยงลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ นำไปบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เวลา 3 และ 5 วัน เมื่อครบเวลาที่กำหนด ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ลงไปหลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีชีวิตที่สามารถเกาะภาชนะเพาะเลี้ยง (%cell attachment) ด้วยเทคนิค MTT assay วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร คำนวณหาค่า %cell attachment จากสมการ

$$\%cell\ attachment = \frac{\text{ค่าดูดกลืนแสงของหลุมที่เติมสารเคลือบผิว} \times 100}{\text{ค่าดูดกลืนแสงของหลุมที่ไม่เติมสารเคลือบผิว}}$$

8. ทดสอบการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ด้วยเทคนิค RT-PCR

ทดสอบการติดเชื้อของไวรัส WSSV โดยเพาะเลี้ยงเซลล์รังไข่กุ้งแช่บ้วย ในอาหารเลี้ยงเซลล์สังเคราะห์ บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกแล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมเชื้อไวรัส WSSV ความเข้มข้น $10^5 - 10^6$ โดยใช้ WSSV บ่มที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เวลา 1 ชั่วโมง เป็นตัวควบคุม (internal control) นำไปบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง ปรับปรุงมาจาก Jose และคณะ (2012) เมื่อครบเวลาที่กำหนด ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมเชื้อไวรัส WSSV ออก จากนั้นล้างเซลล์ด้วย PBS, pH 7.4 ดูด PBS ออกแล้วจึงเติม trizol reagent (invitrogen, United States)

จากนั้นเติม คลอโรฟอร์ม (chloroform) 0.2 มิลลิลิตร ต่อ trizol reagent 1 มิลลิลิตร จากนั้นจึงปั่นที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที แล้วนำไปหมุนเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที ที่ 8 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที ดูดสารละลายส่วนใสชั้นบนสุดออกมาใส่หลอดไมโครเซนติพีพิจ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ใหม่ จากนั้นเติม ไอโซโพรพานอล (isopropanol) 1 มิลลิลิตรต่อ trizol reagent 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส เวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำไปหมุนเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เวลา 10 นาที ดูดสารละลายส่วนใสออก เติม 75% ethanol 1 มิลลิลิตรต่อ trizol reagent 1 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที ที่ 8 องศาเซลเซียส เวลา 5 นาที ดูดสารละลาย 75% ethanol ออก วางที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้ตะกอนแห้ง จากนั้นเติมน้ำกลั่น (RNase-free water) 20–50 ไมโครลิตร เพื่อละลายตะกอน RNA

นำ RNA ไปวิเคราะห์ปริมาณ RNA ด้วยวิธีสเปกโตรโฟโตเมตริก (spectrophotometry) โดยวัดค่าดูดกลืนแสง (Absorbance) ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) และทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ RNA คือ ที่ความยาวคลื่น A260:A280 จากนั้นจึงตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ RNA ด้วยวิธีอากาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยละลาย 1.2% agarose ใน 0.5X TAE buffer ที่ microwave จน agarose ละลายหมด ตั้งทิ้งไว้ให้อุณหภูมิเย็นลงประมาณ 60 องศาเซลเซียส จึงเทลงในภาชนะที่มีหัวเสียบไว้เรียบร้อยแล้ว หลังจากนั้นปล่อยให้เจลแข็งตัวที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที เมื่อเจลแข็งตัวดีแล้วจึงถอดหัวออก นำแผ่นเจลที่ได้ไปวางลงในแชมเบอร์ (chamber) แล้วเติม 0.5X TAE buffer ลงใน chamber จากนั้นผสม RNA กับ loading dye ในอัตราส่วน 5:2 แล้ว load ลงในช่องเจล จ่ายกระแสไฟที่ความต่างศักย์คงที่ 100 โวลต์ (volt) เป็นเวลา 15 นาที นำแผ่นเจลไปย้อมด้วย ethidium bromide ประมาณ 1.30 นาทีและล้างด้วยน้ำกลั่น 15 นาที ดูผลภายใต้แสง UV

จากนั้นจึงทำการเปลี่ยน RNA ไปเป็น cDNA (reverse transcription) ด้วยเทคนิค RT-PCR

ด้วยเครื่อง PCR โดยผสม

2 µg Total RNA	4	ไมโครลิตร
100 ng/µl Random primer	1	ไมโครลิตร
10 mM dNTP	0.75	ไมโครลิตร
5X-RT buffer	2.5	ไมโครลิตร
AMV reverse transcriptase	0.5	ไมโครลิตร
RNase-free water	3.75	ไมโครลิตร
รวม	7.5	ไมโครลิตร

หลังจากนั้นนำส่วนผสมที่ได้เข้าเครื่อง PCR โดยตั้งอุณหภูมิสำหรับ reverse transcription ที่อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

จากนั้นจึงการเพิ่มจำนวน cDNA โดยปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรส โดยนำ cDNA ที่ได้จากการทำ RT-PCR มาเพิ่มจำนวนด้วย PCR โดยใช้ specific primers (GAPDH-primer เป็น internal control และ primer ที่มีความจำเพาะต่อไวรัส WSSV ได้แก่ ie1-primer) โดยมีปฏิกิริยาดังต่อไปนี้

2X-Toptaq mastermix	6.25	ไมโครลิตร
Forward primer	0.5	ไมโครลิตร
Reverse primer	0.5	ไมโครลิตร
cDNA	1	ไมโครลิตร
RNase-free water	4.25	ไมโครลิตร
รวม	12.5	ไมโครลิตร

หลังจากนั้นนำส่วนผสมที่เตรียมแล้ว (GAPDH-primer) เข้าเครื่อง PCR โดยตั้งอุณหภูมิดังต่อไปนี้

denaturation	94 องศาเซลเซียส	เวลา 3 นาที	} 30 cycle
denaturation	94 องศาเซลเซียส	เวลา 30 วินาที	
annealing	55 องศาเซลเซียส	เวลา 30 วินาที	
extension	72 องศาเซลเซียส	เวลา 30 วินาที	
extension	72 องศาเซลเซียส	เวลา 10 นาที	
และอุ่นที่	4 องศาเซลเซียส	ไม่จำกัดเวลา	

และ ie1-primer เข้าเครื่อง PCR โดยตั้งอุณหภูมิดังต่อไปนี้

denaturation	95 องศาเซลเซียส	เวลา 5 นาที	} 40 cycle
denaturation	94 องศาเซลเซียส	เวลา 30 วินาที	
annealing	55 องศาเซลเซียส	เวลา 30 วินาที	
extension	72 องศาเซลเซียส	เวลา 30 วินาที	
extension	72 องศาเซลเซียส	เวลา 10 นาที	
และอุ่นที่	4 องศาเซลเซียส	ไม่จำกัดเวลา	

จึงตรวจสอบหา PCR product ด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis โดยแยกดีเอ็นเอของ PCR product เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงดูผลภายใต้แสง UV

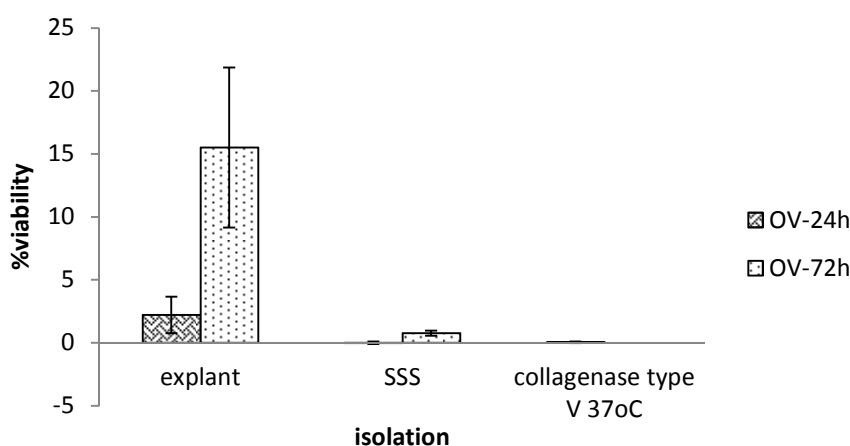
บทที่ 3

ผลการทดลอง

1. การศึกษาความมีชีวิตของเซลล์จากเนื้อเยื่อรังไข่

1.1. การศึกษาความมีชีวิตของเซลล์รังไข่

การทดลองศึกษากรรมวิธีในการแยกเซลล์จากรังไข่รังไข่ โดยศึกษาความมีชีวิตของเซลล์ด้วยเทคนิค MTT assay จากการแยกเซลล์ด้วยการตัดเนื้อเยื่อเป็นชิ้นเล็ก (explant) แล้ววางในอาหารเลี้ยงเซลล์ การใช้สารละลาย SSS ซึ่งมี EDTA เป็นส่วนประกอบ และการใช้เอนไซม์ collagenase type V ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยใช้การแยกเซลล์ด้วยเอนไซม์ collagenase type V ที่อุณหภูมิห้อง เป็นตัวควบคุม ในการแยกเซลล์จากรังไข่รังไข่ โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่แยกได้ในอาหารสูตร L-15 ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เวลา 24 และ 72 ชั่วโมง พบว่าการแยกเซลล์โดยการตัดเนื้อเยื่อเป็นชิ้นเล็ก ที่เวลา 72 ชั่วโมง เซลล์รังไข่มีการเจริญและรอดชีวิตมากกว่าการแยกเซลล์ด้วยวิธีอื่น อย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95% รูปที่ 16 ดังนั้นจึงใช้การตัดเนื้อเยื่อเป็นชิ้นเล็กแล้ววางในอาหารเลี้ยงเซลล์ ในการแยกเซลล์รังไข่รังไข่ในการทดลองต่อไป

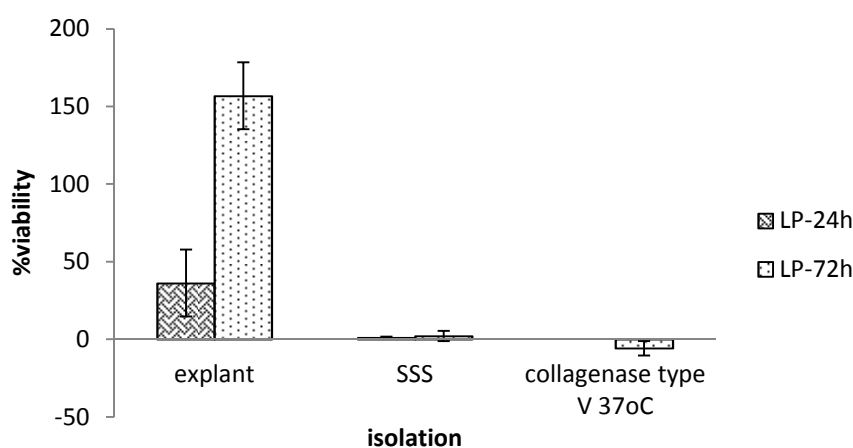


รูปที่ 16 เปอร์เซนต์ความมีชีวิตของเซลล์รังไข่ ที่เวลา 24 และ 72 ชั่วโมง
(ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ที่จำนวน 4 ซ้ำ)

Figure 16 Percentage of viability of ovarian cells at 24 and 72 hours. (mean±S.D. and n=4)

1.2. การศึกษาความมีชีวิตของเซลล์ต่อมน้ำเหลือง

การทดลองศึกษากรรมวิธีในการแยกเซลล์จากต่อมน้ำเหลืองกึ่งแซบวัย โดยเฉพาะเลี้ยงเซลล์ที่แยกได้ในอาหารสูตร L-15 อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ที่เวลา 24 และ 72 ชั่วโมง พบว่าการแยกเซลล์โดยการตัดเนื้อเยื่อต่อมน้ำเหลืองเป็นชิ้นเล็กแล้ววางในอาหารเลี้ยงเซลล์ ที่เวลา 72 ชั่วโมง เซลล์ต่อมน้ำเหลืองมีการเจริญและรอดชีวิตมากกว่าการแยกเซลล์ด้วยวิธีอื่น อย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95% ดังนั้นจึงใช้การตัดเนื้อเยื่อเป็นชิ้นเล็ก ในการแยกเซลล์ต่อมน้ำเหลืองกึ่งแซบวัยในการทดลองต่อไป ดังแสดงในรูปที่ 17

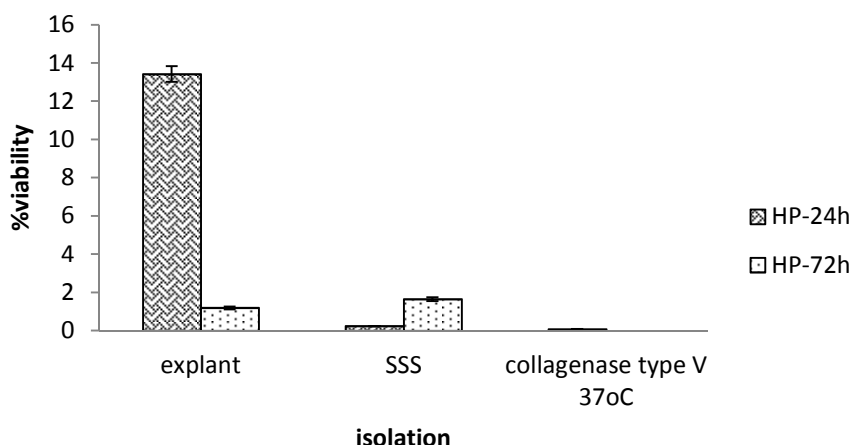


รูปที่ 17 เปอร์เซนต์ความมีชีวิตของต่อมน้ำเหลือง ที่เวลา 24 และ 72 ชั่วโมง (ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ที่จำนวน 4 ซ้ำ)

Figure 17 Percentage of viability of lymphoid cells at 24 and 72 hours. (mean±S.D. and n=4)

1.3. การศึกษาความมีชีวิตของเซลล์ตับ

การทดลองศึกษากรรมวิธีในการแยกเซลล์จากตับกึ่งแซบวัย โดยเฉพาะเลี้ยงเซลล์ที่แยกได้ในอาหารสูตร L-15 อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ที่เวลา 24 และ 72 ชั่วโมง พบว่าการแยกเซลล์โดยการตัดเนื้อเยื่อตับเป็นชิ้นเล็กแล้ววางในอาหารเลี้ยงเซลล์ ที่เวลา 24 ชั่วโมง เซลล์ตับมีการเจริญและรอดชีวิตมากกว่าการแยกเซลล์ด้วยวิธีอื่น อย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95% แสดงในรูปที่ 18 ดังนั้นจึงใช้การตัดเนื้อเยื่อเป็นชิ้นเล็กแล้ววางในอาหารเลี้ยงเซลล์ เพื่อแยกเซลล์ตับกึ่งแซบวัยในการทดลองต่อไป



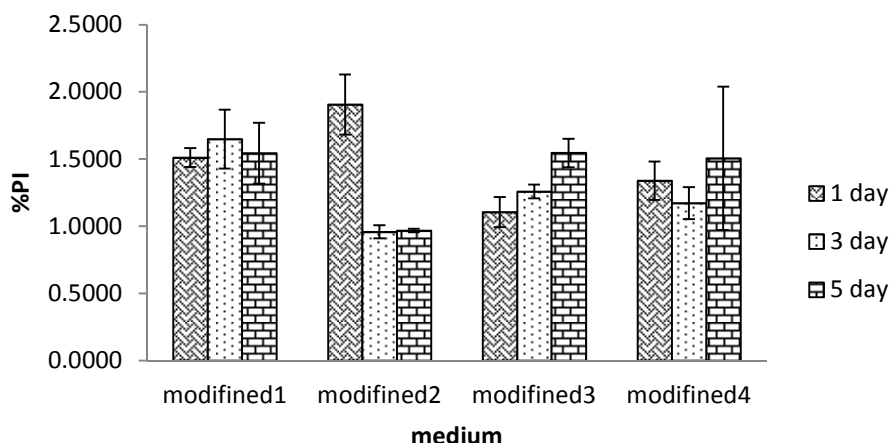
รูปที่ 18 เปอร์เซนต์ความมีชีวิตของเซลล์ตับ ที่เวลา 24 และ 72 ชั่วโมง
(ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ที่จำนวน 4 ซ้ำ)

Figure 18 Percentage of viability of hepatopancreas cells at 24 and 72 hours.
(mean±S.D. and n=4)

2. การศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเซลล์สังเคราะห์พื้นฐานในการเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อกุ้ง แช่บ๊วย

2.1. ศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเซลล์สังเคราะห์พื้นฐานในการเพาะเลี้ยงเซลล์รังไข่

การทดลองศึกษาสูตรอาหารพื้นฐานในการเพาะเลี้ยงเซลล์รังไข่กุ้งแช่บ๊วย โดยศึกษา
ดัชนีการเพิ่มจำนวนเซลล์ด้วยเทคนิค BrdU assay จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหาร 5 สูตร คือ
สูตรnormal สูตรmodified1 สูตรmodified2 สูตรmodified3 และสูตรmodified4 ซึ่งมีองค์ประกอบที่
แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยใช้อาหารสูตรnormal เป็นสูตรควบคุม ทำการเพาะเลี้ยงที่
อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 3 และ 5 วัน พบว่าที่ระยะเวลา 5 วัน เซลล์รังไข่มีการ
เพิ่มจำนวนเซลล์ในอาหารทั้ง 4 สูตรไม่แตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95% รูปที่
19 แต่เมื่อทำการเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงเซลล์รังไข่ที่เวลา 1 3 และ 5 วัน ในอาหารแต่ละ
สูตร พบว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์รังไข่ในอาหารสูตรmodified3 เซลล์มีการเพิ่มจำนวนขึ้นในทุกๆ
เวลา ดังนั้นจึงเลือกใช้ใช้อาหารสูตรmodified3 ในการศึกษาผลของ supplement ในการทดลอง
ต่อไป

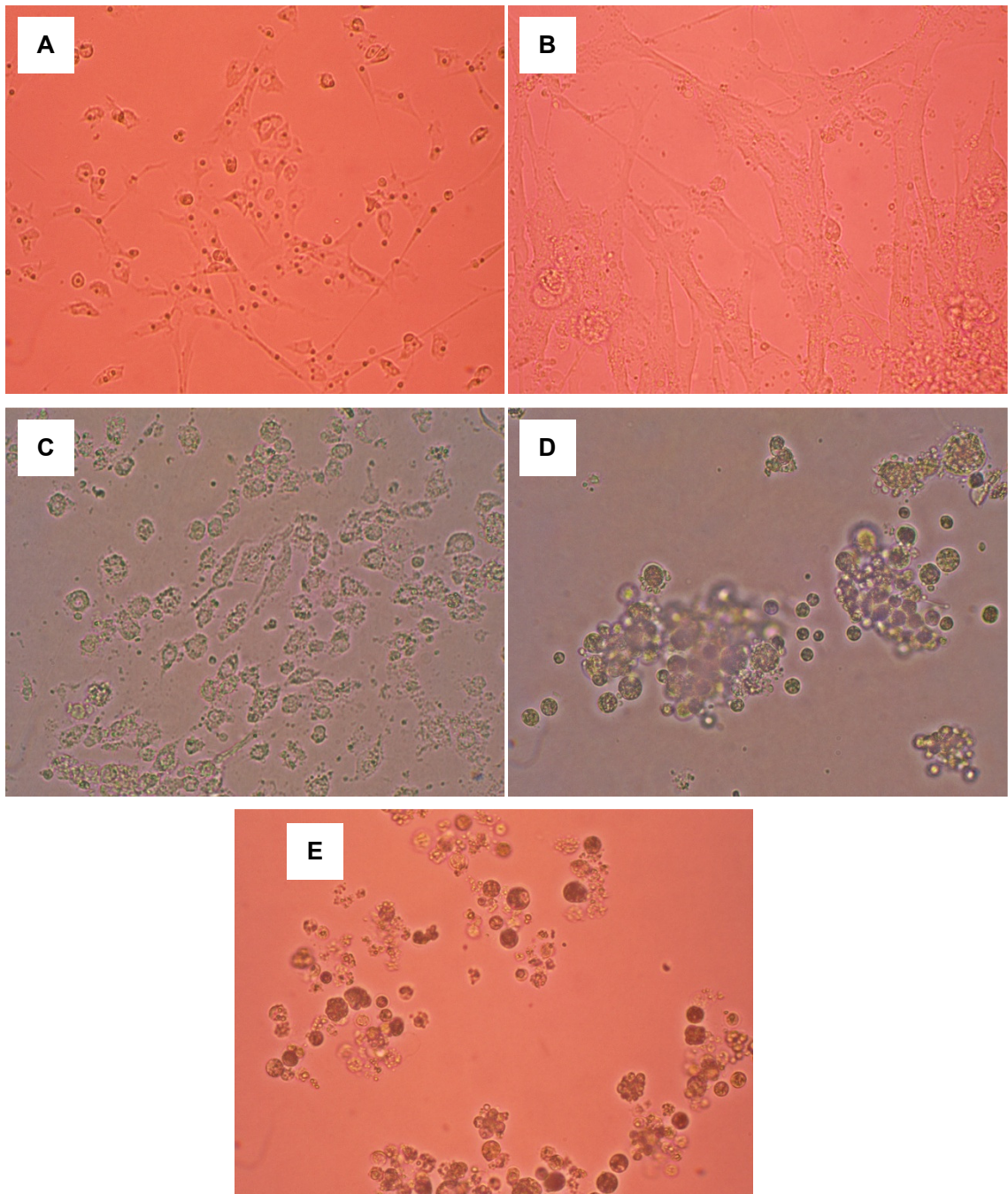


รูปที่ 19 เปอร์เซนต์ดัชนีการเพิ่มจำนวนเซลล์รังไข่ ที่เวลา 1 3 และ 5 วัน
(ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ที่จำนวน 3 ซ้ำ)

Figure 19 Percentage of proliferation index of ovarian cells at 1, 3 and 5 day.
(mean±S.D. and n=3)

2.2. การเพาะเลี้ยงเซลล์รังไข่ในอาหารสังเคราะห์พื้นฐาน

การเพาะเลี้ยงเซลล์รังไข่กึ่งแซบวัยในอาหารสูตร mofied3 ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส พบว่าสามารถ subculture ได้สูงสุด 3 ครั้ง ที่เวลา 7 14 และ 21 วัน ในรูปที่ 22 โดยหลังแยกเซลล์รังไข่มาเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 วัน เซลล์เริ่มมีแผ่ขยายไปเกาะภาชนะเพาะเลี้ยงรูปที่ 20A และเมื่อผ่านการ subculture ด้วย 0.25% Trypsin-EDTA ไป 2 ครั้ง คือ วันที่ 7 รูปที่ 20B และวันที่ 14 รูปที่ 20C เซลล์รังไข่มีความสามารถเกาะภาชนะเพาะเลี้ยงได้ลดน้อยลง ส่งผลให้เซลล์ที่สามารถเพาะเลี้ยงและ subculture ต่อไปได้ คือ เซลล์ที่มีลักษณะกลมและลอยในอาหารเลี้ยงเลี้ยงเซลล์ และเมื่อผ่านการ subculture ครั้งที่ 3 รูปที่ 20D แล้วทำการเพาะเลี้ยงต่อไป พบว่าเซลล์ที่ได้มีลักษณะดำคล้ำ รูปที่ 20E และเมื่อนำไปย้อมด้วย 0.2% Trypan blue พบว่าเซลล์ตายในที่สุด ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเซลล์รังไข่สามารถเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร mofied3 ได้นานสูงสุด 21 วัน หลังผ่านการ subculture 2 ครั้ง (passage2)

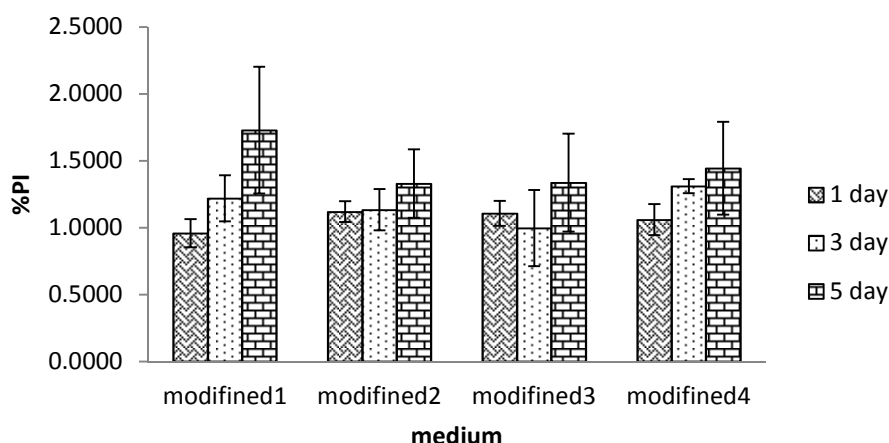


รูปที่ 20 เซลล์รังไข่กึ่งแซบิวรี่ในอาหารสูตร mofied3 ระยะเวลา 1วัน (A) 7วัน (B) 14วัน (C) 21วัน (D) 28วัน (E) ที่กำลังขยาย 200 เท่า

Figure 20 Effect of Ovarian cells grow in mofied3 medium on day 1(A), 7(B), 14(C), 21(D), 28(E) at 200X magnification

2.3. ศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเซลล์สังเคราะห์พื้นฐานในการเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อมน้ำเหลือง

การทดลองศึกษาสูตรอาหารพื้นฐานในการเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อมน้ำเหลือง พบว่าที่ระยะเวลา 5 วัน เซลล์ต่อมน้ำเหลืองมีการเพิ่มจำนวนในอาหารทั้ง 4 สูตรไม่แตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95% และเมื่อทำการเปรียบเทียบเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อมน้ำเหลือง ที่เวลา 1 3 และ 5 วัน ในอาหารแต่ละสูตร พบว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อมน้ำเหลือง ในอาหารสูตร modified1 modified2 และ modified4 เซลล์มีการเพิ่มจำนวนขึ้นในทุกๆ ช่วงเวลา รูปที่ 21 แต่เมื่อทำการเปรียบเทียบดูการเพิ่มจำนวนเซลล์ต่อมน้ำเหลืองในอาหารทั้ง 3 สูตร พบว่าอาหารสูตร modified1 เซลล์ต่อมน้ำเหลืองมีอัตราการเพิ่มจำนวนดีที่สุด ดังนั้นจึงเลือกใช้อาหารสูตร modified1 ในการศึกษาผลของ supplement ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อมน้ำเหลืองต่อไป



รูปที่ 21 เปอร์เซนต์ดัชนีการเพิ่มจำนวนเซลล์ต่อมน้ำเหลือง ที่เวลา 1 3 และ 5 วัน
(ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ที่จำนวน 3 ซ้ำ)

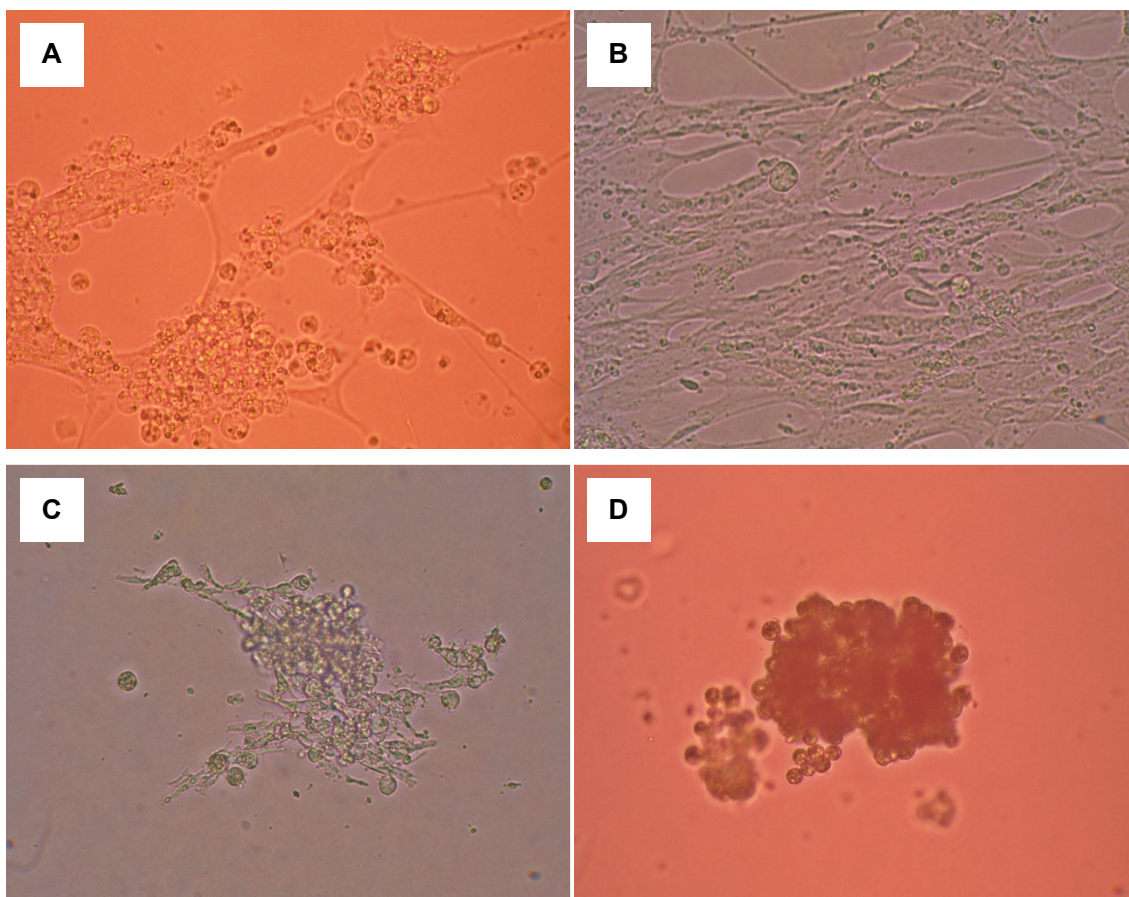
Figure 21 Percentage of proliferation index of lymphoid cells at 1, 3 and 5 day.

(mean±S.D. and n=3)

2.4. การเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อมน้ำเหลืองในอาหารสังเคราะห์พื้นฐาน

การเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อมน้ำเหลืองกึ่งแขวนลอยสามารถ subculture ได้สูงสุด 3 ครั้ง ในอาหารสูตร modified1 ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ซึ่งพบว่าหลังการ subculture ครั้งที่ 3 เซลล์ที่ได้มีลักษณะดำเกาะกันเป็นกลุ่ม รูปที่ 22E ไม่สามารถเกาะภาชนะเพาะเลี้ยงได้ และเมื่อนำไปย้อมด้วย 0.2% Trypan blue พบว่าเป็นเซลล์ตาย ส่วนหลังการ subculture ในครั้งที่ 1 และ 2 พบว่าเซลล์ต่อมน้ำเหลืองสามารถเกาะภาชนะเพาะเลี้ยงได้ รูปที่ 22B และ 22C ตามลำดับ แต่หลังการ subculture ครั้งที่ 2 พบว่าเซลล์ต่อมน้ำเหลืองสามารถเกาะภาชนะได้ลดลงมาก ซึ่ง

ส่งผลให้การ subculture ในครั้งที่ 3 เซลล์ต่อมน้ำเหลืองไม่สามารถเกาะภาชนะเพาะเลี้ยงได้และตายในที่สุด ส่วนในรูปที่ 22A เป็นเซลล์ต่อมน้ำเหลืองที่มีอายุ 3 วันก่อนทำการ subculture ซึ่งสรุปได้ว่าเซลล์ต่อมน้ำเหลืองสามารถเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร mofied1 ได้นานสูงสุด 17 วัน หลังผ่านการ subculture 2 ครั้ง (passage2)



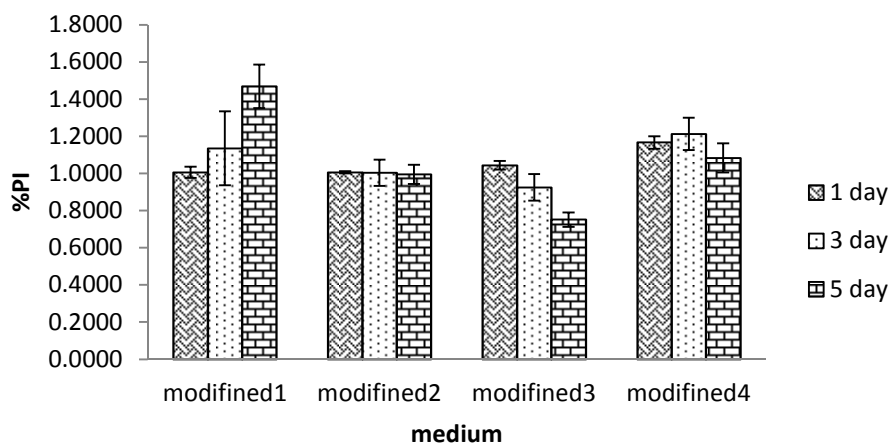
รูปที่ 22 เซลล์ต่อมน้ำเหลืองกึ่งแซบวัยในอาหารสูตร mofied1 ระยะเวลา 3วัน (A) 10วัน (B) 17 วัน (C) 24วัน (D) ที่กำลังขยาย 200 เท่า

Figure 22 Effect of lymphoid cells grow in mofied1 medium on day 3(A), 10(B), 17(C), 24(D) at 200X magnification.

2.5. การศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเซลล์สังเคราะห์พื้นฐานในการเพาะเลี้ยงเซลล์ตับ

การทดลองศึกษาสูตรอาหารพื้นฐานโดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ตับ ในอาหาร 5 สูตร พบว่าอาหารสูตร mofied1 ที่ระยะเวลา 5 วัน เซลล์ตับมีการเพิ่มจำนวนดีที่สุดใน อย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95% และเมื่อทำการเปรียบเทียบเพาะเลี้ยงเซลล์ตับที่เวลา 1 3 และ 5 วัน ในอาหารแต่ละสูตร พบว่าในอาหารสูตร mofied1 เซลล์ตับมีอัตราการเพิ่มจำนวนดีที่สุดใน รูปที่ 23

ดังนั้นจึงเลือกใช้อาหารสูตรmodified1 ในการศึกษาผลของ supplement ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ ตับต่อไป

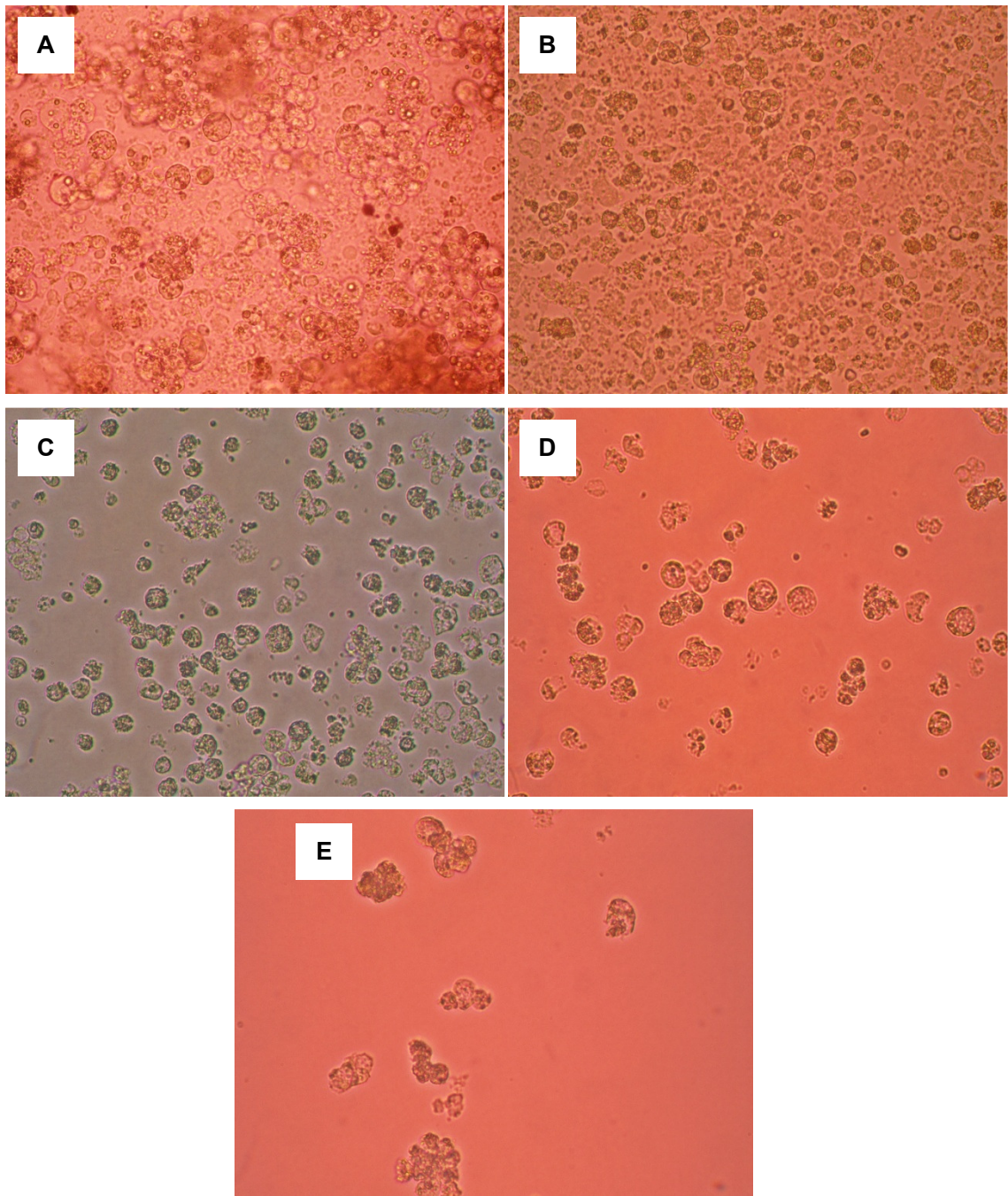


รูปที่ 23 เปอร์เซนต์ดัชนีการเพิ่มจำนวนเซลล์ตับ ที่เวลา 1 3 และ 5 วัน
(ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ที่จำนวน 3 ซ้ำ)

Figure 23 Percentage of proliferation index of hepatopancreas cells at 1, 3 and 5 day.
(mean±S.D. and n=3)

2.6. การเพาะเลี้ยงเซลล์ตับในอาหารสังเคราะห์พื้นฐาน

จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ตับกึ่งแซบวัยในอาหารสูตร modified1 ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส พบว่าหลังการเพาะเลี้ยง 1 วัน เซลล์ตับที่แยกได้มีลักษณะกลม เกาะเป็นกลุ่มบางส่วนและลอยในอาหาร รูปที่ 24A ซึ่งเมื่อ subculture ในครั้งที่ 1 และ 2 พบว่าเซลล์ที่เกาะเป็นกลุ่มมีการหลุดแยกออกเป็นเซลล์เดี่ยว รูปที่ 24C และ 24D ตามลำดับ และเมื่อทำการ subculture ในครั้งที่ 3 พบว่าเซลล์ตับมีลักษณะดำและเกาะกันเป็นกลุ่ม รูป 24E เมื่อนำไปย้อมด้วย 0.2% Trypan blue พบว่าเซลล์ตาย ส่วนในรูป 24B คือเซลล์ตับก่อนการ subculture ในครั้งที่ 1 ซึ่งเซลล์มีการเจริญอย่างหนาแน่น ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าเซลล์ตับสามารถเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร modified1 ได้นานสูงสุด 21 วัน หลังผ่านการ subculture 2 ครั้ง (passage2)

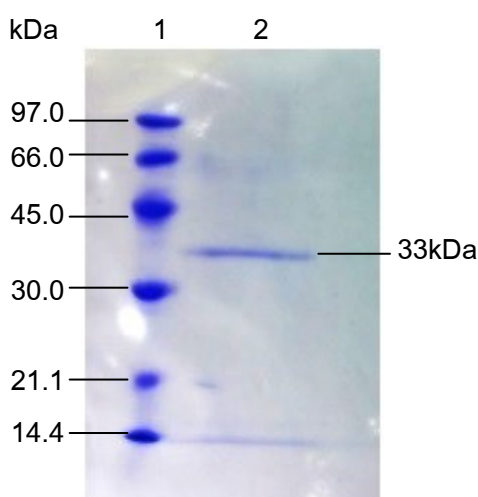


รูปที่ 24 เซลล์ตับกุ้งแชบ๊วยในอาหารสูตร mofied1 ระยะเวลา 1วัน (A) 7วัน (B) 14วัน (C) 21วัน (D) 28วัน (E) ที่กำลังขยาย 200 เท่า

Figure 24 Effect of hepatopancreas cells grow in mofied1 medium on day 1(A), 7(B), 14(C), 21(D), 28(E) at 200X magnification.

3. การเตรียมโปรตีนลูกผสม His-RPS3a จากดีเอ็นเอลูกผสม pET-RPS3a ในแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21

การเตรียมโปรตีนลูกผสม His-RPS3a จากดีเอ็นเอลูกผสม pET-RPS3a ในแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21 โดยเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21 ให้เจริญในอาหาร LB broth ที่มี Kanamycin ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และกระตุ้นให้แบคทีเรียมีการผลิตโปรตีนด้วยสารละลาย 1mM IPTG นำแบคทีเรียที่ผ่านการกระตุ้นให้ผลิตโปรตีน มาทำให้เซลล์แตกโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง ปั่นแยกตะกอนเซลล์และสารละลายโปรตีนออกจากกัน นำโปรตีนที่แยกได้มาทำให้โปรตีนบริสุทธิ์โดยใช้ His-Trap FF column จากนั้นนำไปตรวจสอบด้วย 12%SDS-PAGE พบว่าโปรตีนที่ได้มีขนาด 33 กิโลดาลตัน ดังแสดงในรูปที่ 25



รูปที่ 25 การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน His-RPS3a ในแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21 ด้วย

วิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบมีเอสดีเอส (12%SDS-PAGE) ย้อมด้วยสี coomassie brilliant blue

แถวที่ 1 : โปรตีนมาตรฐาน

แถวที่ 2 : โปรตีน His-RPS3a ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว (33 กิโลดาลตัน)

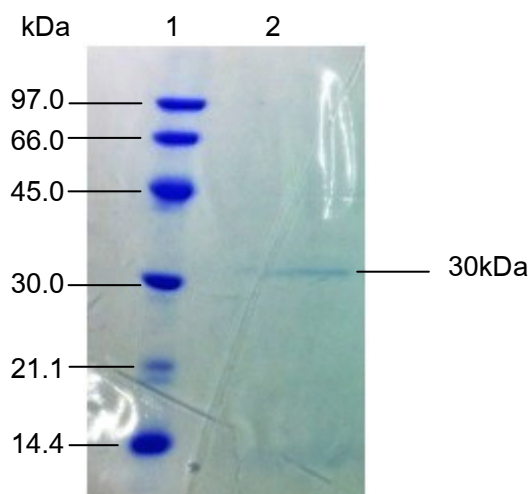
Figure 25 12% Coomassie brilliant blue stained SDS-PAGE gel of His-RPS3a protein expression in *E.coli* BL21.

Lane 1 : Low molecular weight standard marker

Lane 2 : His-RPS3a purified protein (33 kDa)

4. การเตรียมโปรตีนลูกผสม His-RPL10a จากดีเอ็นเอลูกผสม pET-RP L10a ในแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21

การเตรียมโปรตีนลูกผสม His-RPL10a จากดีเอ็นเอลูกผสม pET-RP L10a ในแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21 โดยเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21 ให้เจริญในอาหาร LB broth ที่มี Kanamycin ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และกระตุ้นให้แบคทีเรียมีการผลิตโปรตีนด้วยสารละลาย 1mM IPTG นำแบคทีเรียที่ผ่านการกระตุ้นให้ผลิตโปรตีน มาทำให้เซลล์แตกโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง ปั่นแยกตะกอนเซลล์และสารละลายโปรตีนออกจากกัน นำโปรตีนที่แยกได้มาทำให้โปรตีนบริสุทธิ์โดยใช้ His-Trap FF column จากนั้นนำไปตรวจสอบด้วย 12%SDS-PAGE พบว่าโปรตีนที่ได้มีขนาด 30 กิโลดาลตัน ดังแสดงในรูปที่ 26



รูปที่ 26 การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน His-RPL10a ในแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21 ด้วย

วิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบมีเอสดีเอส (12%SDS-PAGE) ย้อมด้วยสี coomassie brilliant blue

แถวที่ 1 : โปรตีนมาตรฐาน

แถวที่ 2 : โปรตีน His-RPL10a ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้ว (30 กิโลดาลตัน)

Figure 26 12% Coomassie brilliant blue stained SDS-PAGE gel of His-RPL10a protein expression in *E.coli* BL21.

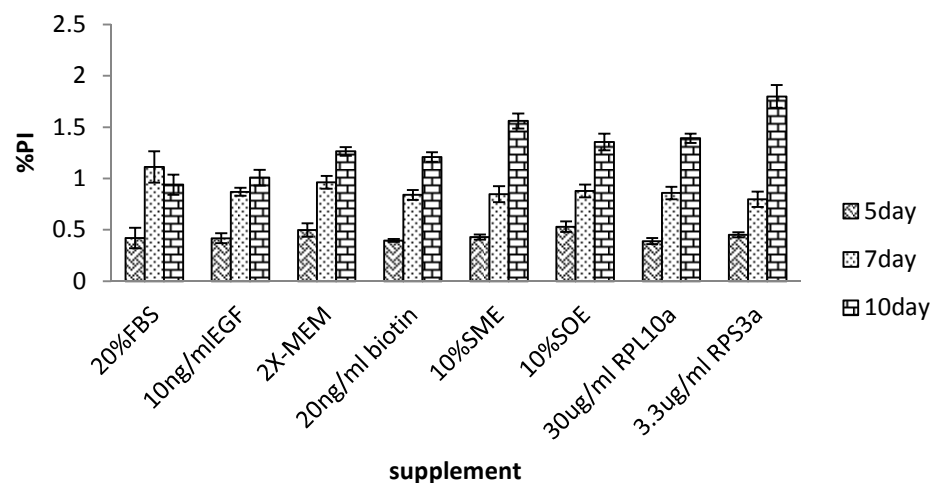
Lane 1 : Low molecular weight standard marker

Lane 2 : His-RPL10a purified protein (30 kDa)

5. การศึกษาผลของ supplement ในการเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อรังไข่

5.1 การศึกษาผลของ supplement ในการเพาะเลี้ยงเซลล์รังไข่

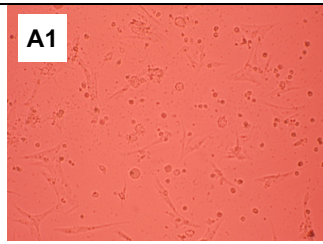
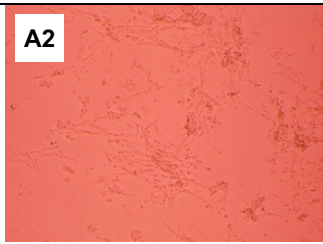
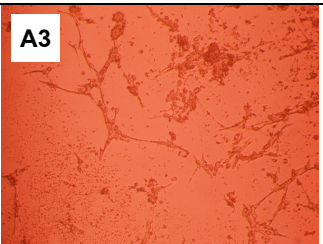
การศึกษาผลของ supplement ในการเพาะเลี้ยงเซลล์รังไข่เนื้อเยื่อรังไข่ โดยศึกษาดัชนีการเพิ่มจำนวนเซลล์ด้วยเทคนิค BrdU assay ในอาหารสูตร mofied 3 มีการเติม supplement 8 ชนิด ที่แตกต่างกัน คือ 20% FBS 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร EGF 2X-MEM vitamin solution 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร Biotin 10% SME 10% SOE 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร RPL10a และ 3.3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร RPS3a โดยใช้ในอาหารสูตรmofied3 ที่ไม่มีการเติม supplement เป็นสูตรควบคุม ทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 7 และ 10 วัน รูปที่28 แสดงลักษณะของเซลล์รังไข่ในอาหารที่มีการเติม supplement ชนิดต่าง ๆ พบว่าที่เวลา 10 วัน ในอาหารสูตร mofied3ที่มีการเติม RPS3a เซลล์รังไข่มีการเพิ่มจำนวนดี ที่สุดอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95% รูปที่ 27

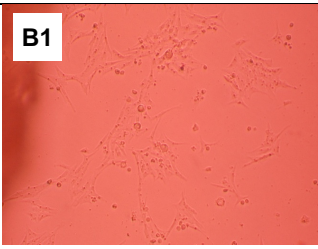
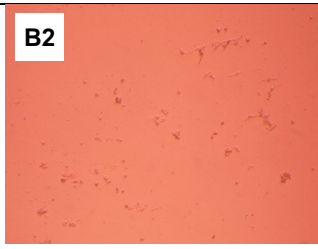
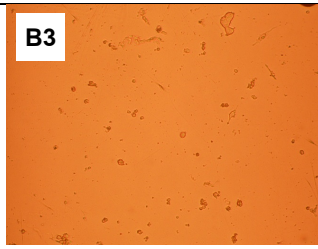
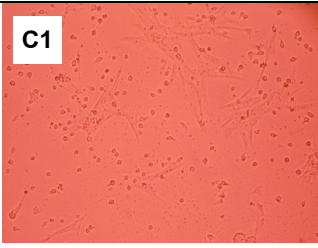
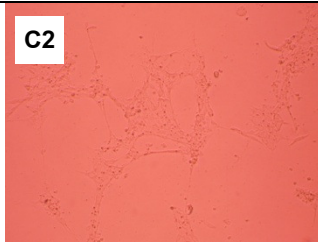
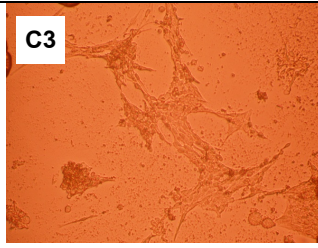
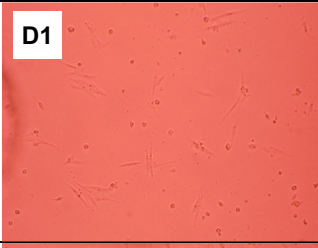
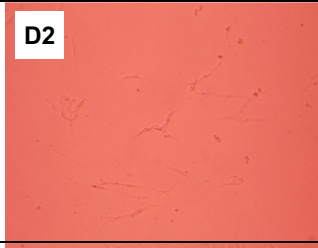
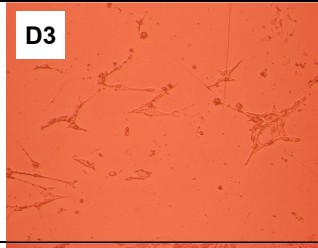
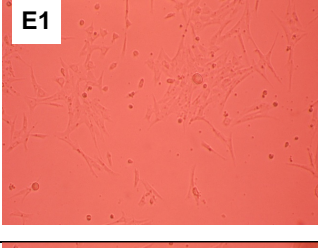

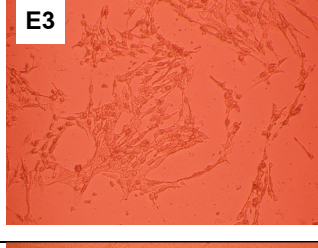
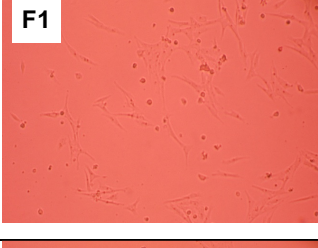
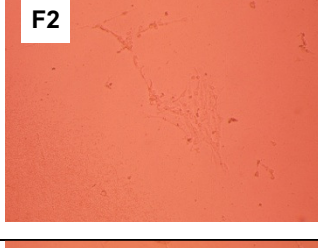
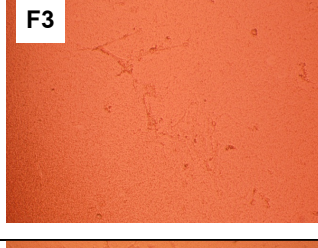
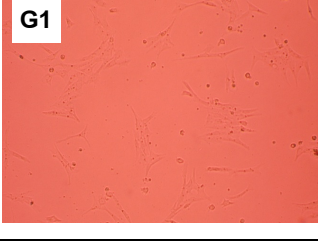
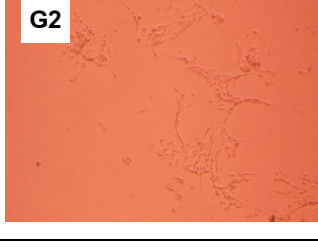
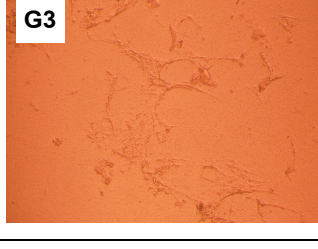


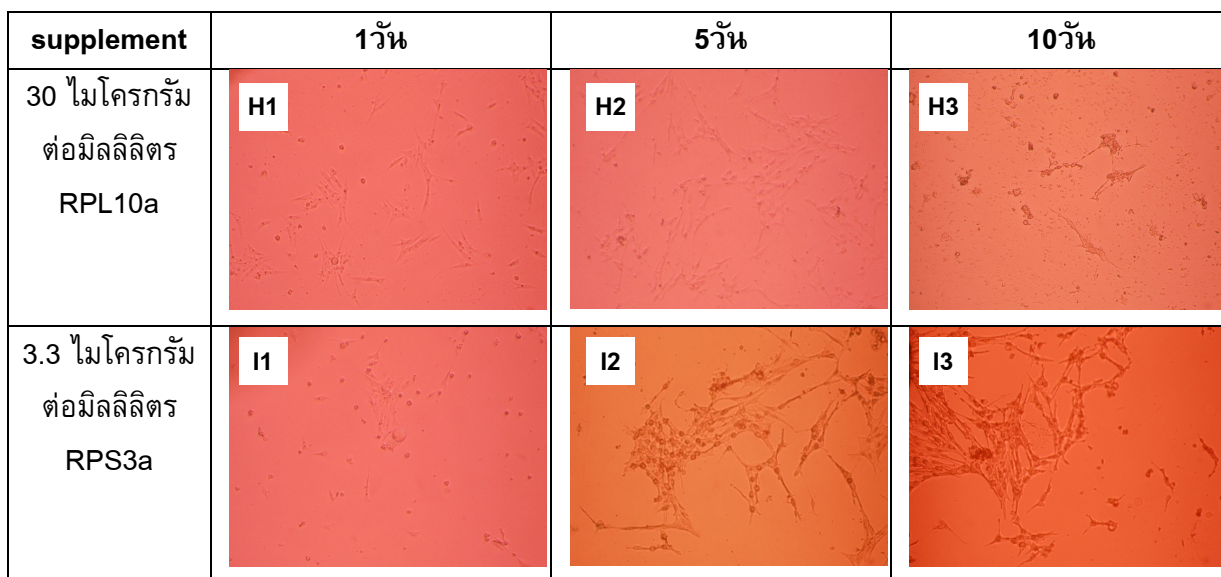
รูปที่ 27 เปอร์เซนต์ดัชนีการเพิ่มจำนวนเซลล์รังไข่ ที่เวลา 5 7 และ 10 วัน
(ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ที่จำนวน 4 ซ้ำ)

Figure 27 Percentage of proliferation index of ovarian cells at 5, 7 and 10 days.

(mean±S.D. and n=4)

supplement	1วัน	5วัน	10วัน
ไม่เติม supplement			

supplement	1วัน	5วัน	10วัน
20% FBS	 B1	 B2	 B3
10 นาโนกรัม ต่อมิลลิลิตร EGF	 C1	 C2	 C3
2X-MEM vitamin solution	 D1	 D2	 D3
20 นาโนกรัม ต่อมิลลิลิตร Biotin solution	 E1	 E2	 E3
10% SME	 F1	 F2	 F3
10% SOE	 G1	 G2	 G3

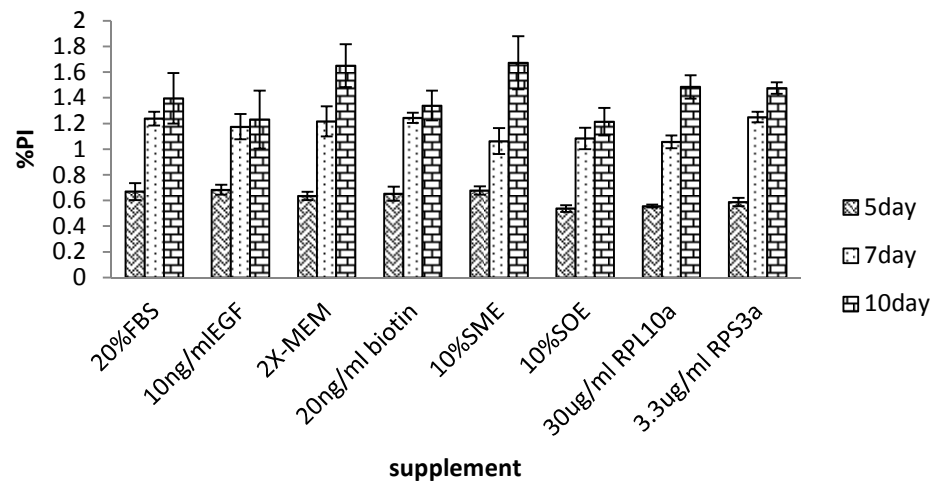


รูปที่ 28 ลักษณะรูปร่างเซลล์รังไข่กึ่งแซบวัยในอาหารเลี้ยงเซลล์สูตร mofied3 มีการเติม supplement ชนิดต่างๆ เวลา 1 และ 10 วัน ที่กำลังขยาย 100 เท่า

Figure 28 The effect of supplement on the morphology of ovarian cells cultured in mofied3 medium for 1 and 10 day at 100X magnification.

5.2 การศึกษาผลของ supplement ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อมน้ำเหลือง

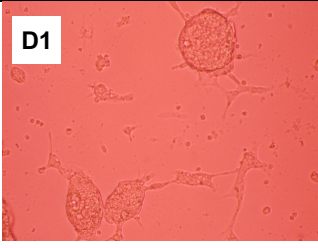
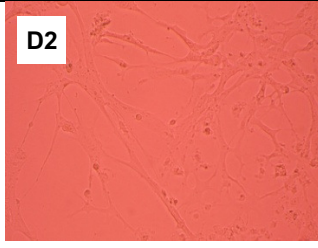
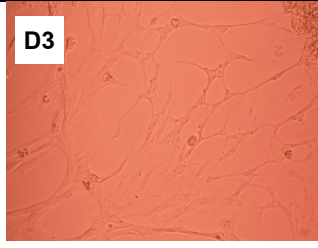
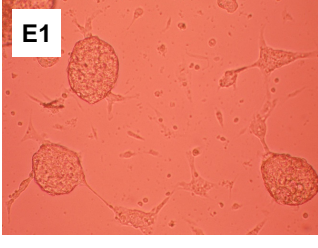
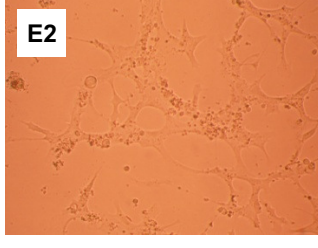

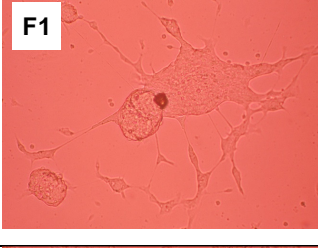
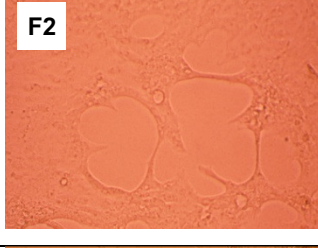
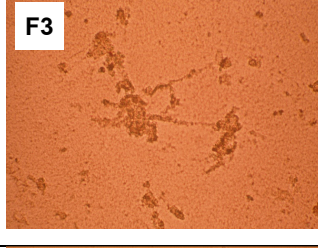
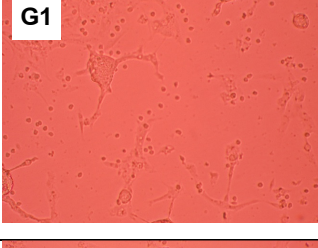
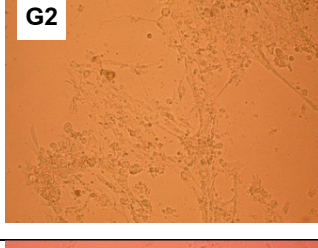
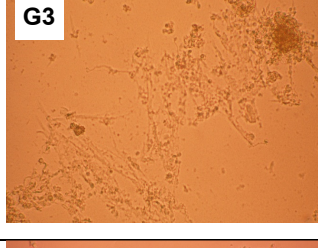
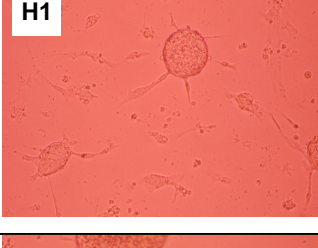

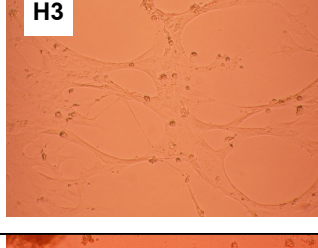
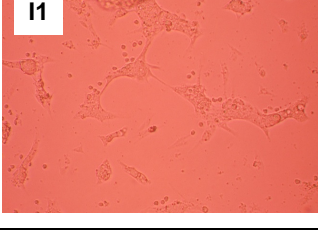
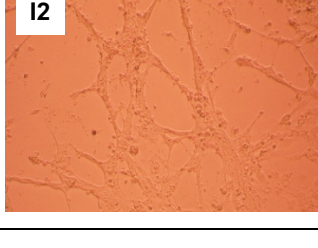
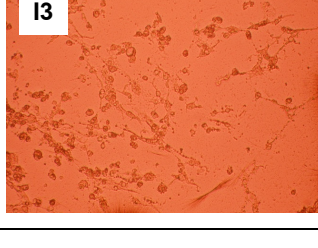
การศึกษาผลของ supplement ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อมน้ำเหลืองกึ่งแซบวัย ในอาหารสูตร mofied 1 ซึ่งมีการเติม supplement 8 ชนิด ที่แตกต่างกัน โดยใช้ในอาหารสูตร mofied 1 ที่ไม่มีการเติม supplement เป็นสูตรควบคุม และทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ลักษณะรูปร่างเซลล์รังไข่กึ่งแซบวัยในอาหารเลี้ยงเซลล์สูตร mofied3 มีการเติม supplement ชนิดต่างๆ เวลา 1 และ 10 วัน ที่กำลังขยาย 100 เท่า เวลา 5 7 และ 10 วัน รูปที่ 30 แสดงลักษณะของเซลล์ต่อมน้ำเหลืองในอาหารที่มีการเติม supplement ชนิดต่างๆ พบว่าที่เวลา 10 วัน เซลล์ต่อมน้ำเหลืองมีการเพิ่มจำนวนเซลล์ในแต่ละสูตรไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95% แสดงในรูปที่ 29



รูปที่ 29 เปอร์เซนต์ดัชนีการเพิ่มจำนวนเซลล์ต่อม้ามน้ำเหลือง ที่เวลา 5 7 และ 10 วัน
(ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ที่จำนวน 4 ซ้ำ)

Figure 29 Percentage of proliferation index of lymphoid cells at 5, 7 and 10 days.
(mean±S.D. and n=4)

supplement	1วัน	5วัน	10วัน
ไม่เติม supplement	A1	A2	A3
20% FBS	B1	B2	B3
10 นาโนกรัม ต่อมิลลิลิตร EGF	C1	C2	C3

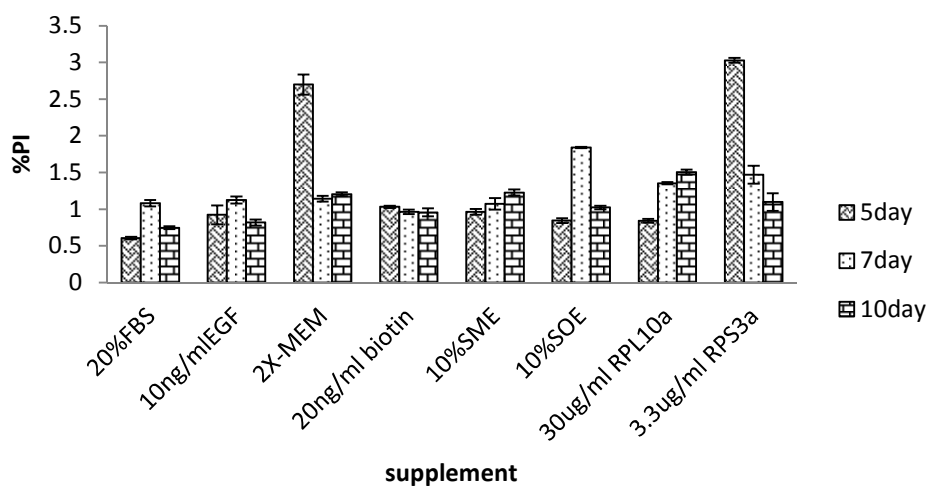
supplement	1วัน	5วัน	10วัน
2X-MEM vitamin solution	 D1	 D2	 D3
20 นาโนกรัม ต่อมิลลิลิตร Biotin solution	 E1	 E2	 E3
10% SME	 F1	 F2	 F3
10% SOE	 G1	 G2	 G3
30 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร RPL10a	 H1	 H2	 H3
3.3 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร RPS3a	 I1	 I2	 I3

รูปที่ 30 ลักษณะรูปร่างเซลล์ต่อมน้ำเหลืองกึ่งแซบวัยในอาหารเลี้ยงเซลล์สูตร mofied1 มีการเติม supplement ชนิดต่างๆ เวลา 1 และ 10 วัน ที่กำลังขยาย 100 เท่า

Figure 30 The effect of supplement on the morphology of lymphoid cells cultured in mofied1 medium for 1 and 10 day at 100X magnification.

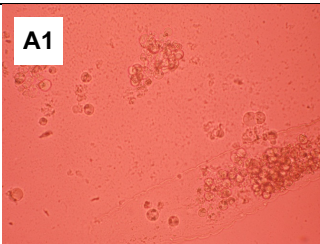
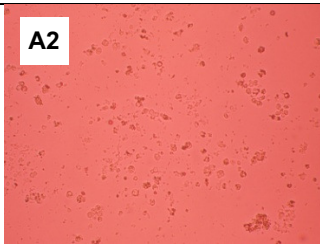
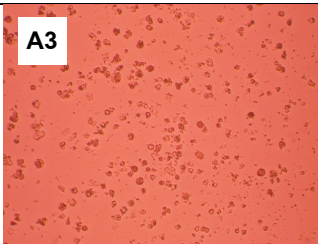
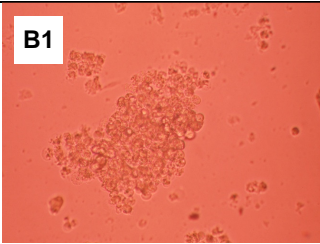
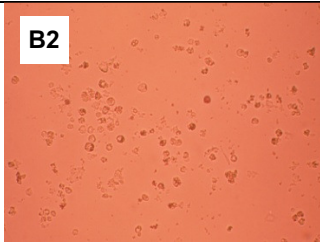
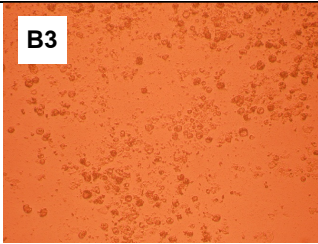
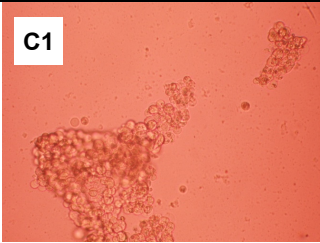
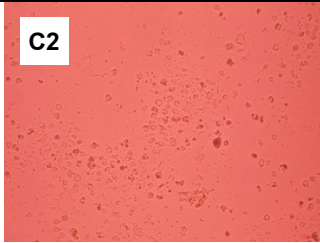
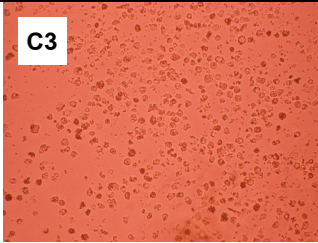
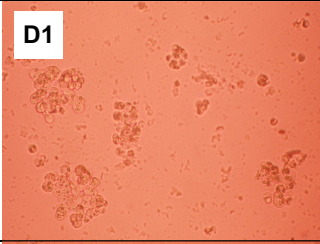
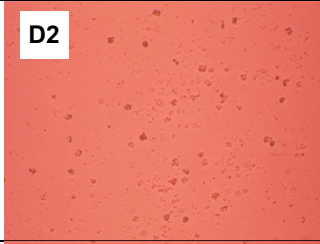
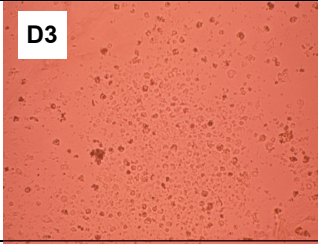
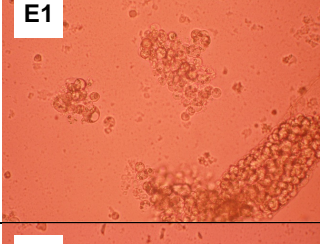
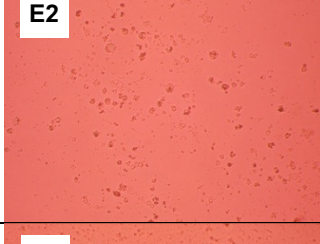
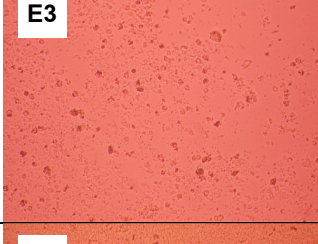
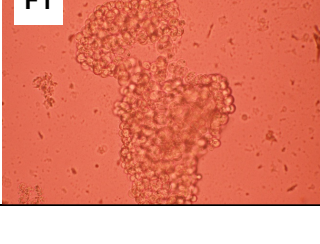
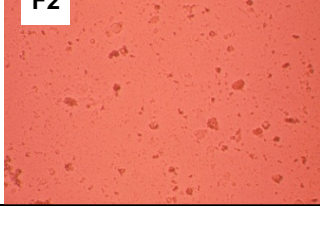
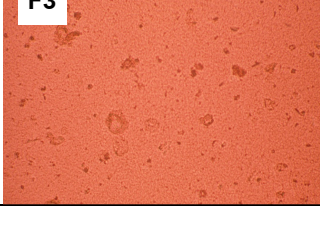
5.3 การศึกษาผลของ supplement ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ตับ

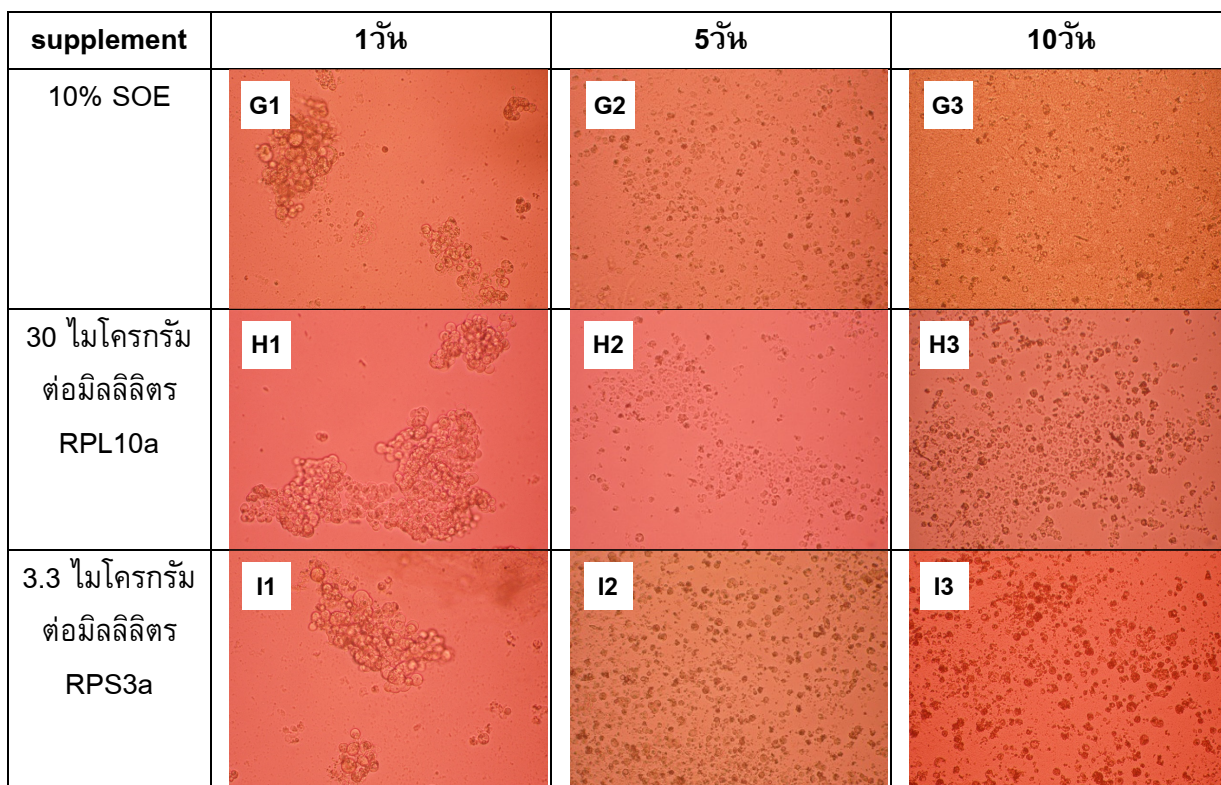
การศึกษาค่าผลของ supplement จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ตับกึ่งแซบวัย ในอาหารสูตร mofied1 ซึ่งมีการเติม supplement 8 ชนิด ที่แตกต่างกัน โดยใช้ในอาหารสูตร mofied1 ที่ไม่มีการเติม supplement เป็นสูตรควบคุม เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เวลา 5 7 และ 10 วัน รูปที่ 32 แสดงลักษณะของเซลล์ตับในอาหารที่มีการเติม supplement ชนิดต่างๆ พบว่าเมื่อเปรียบเทียบทั้ง 3 เวลา อาหารที่มีการเติม SME และ RPL10a เซลล์ตับมีการเพิ่มจำนวนในทุกๆ ช่วงเวลา และที่เวลา 10 วัน เซลล์ตับมีการเพิ่มจำนวนดีสุด ในอาหารสูตร mofied1 ที่มีการเติม RPL10a ที่ความเข้มข้น 95% รูปที่ 31



รูปที่ 31 เปอร์เซนต์ดัชนีการเพิ่มจำนวนเซลล์ตับ ที่เวลา 5 7 และ 10 วัน (ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ที่จำนวน 4 ซ้ำ)

Figure 31 Percentage of proliferation index of hepatopancreas cells at 5, 7 and 10 days. (mean±S.D. and n=4)

supplement	1วัน	5วัน	10วัน
ไม่เติม supplement			
20% FBS			
10 นาโนกรัม ต่อมิลลิลิตร EGF			
2X-MEM vitamin solution			
20 นาโนกรัม ต่อมิลลิลิตร Biotin solution			
10% SME			



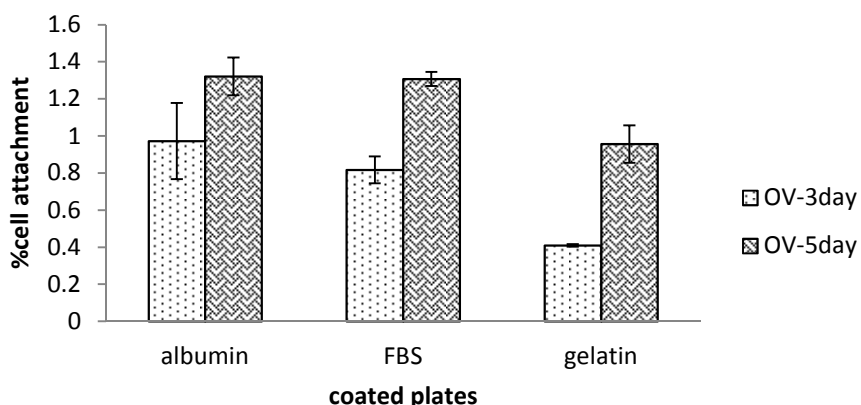
รูปที่ 32 ลักษณะรูปร่างเซลล์ตับกุ้งแชบ๊วยในอาหารเลี้ยงเซลล์สูตร modified1 มีการเติม supplement ชนิดต่างๆ เวลา 1 และ 10 วัน ที่กำลังขยาย 100 เท่า

Figure 30 The effect of supplement on the morphology of hepatopancreas cells cultured in modified1 medium for 1 and 10 day at 100X magnification.

6. การศึกษาผลของการเคลือบผิวหน้าภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อกุ้งแชบ๊วย

6.1. การศึกษาผลของการเคลือบผิวหน้าภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์รังไข่

การศึกษาผลของการเคลือบผิวหน้าภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์รังไข่กุ้งแชบ๊วย โดยศึกษาความสามารถในการเกาะภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์ ด้วยเทคนิค MTT assay ในอาหารสูตร modified3 ที่มีการเติม 3.3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร RPS3a ซึ่งผ่านการเคลือบผิวหน้าภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วย 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร albumin 20% FBS และ 0.2% gelatin โดยให้หุ้มนที่ไม่มีมีการเติมสารเคลือบผิวภาชนะเป็นตัวควบคุม ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์รังไข่ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 และ 5 วัน พบว่าที่เวลา 5 วัน เซลล์รังไข่กุ้งสามารถเกาะผิวหน้าภาชนะเพาะเลี้ยงที่มีการเคลือบด้วย albumin และ FBS ได้ดีกว่า การเคลือบผิวหน้าด้วย gelatin อย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95% ดังรูปที่ 33

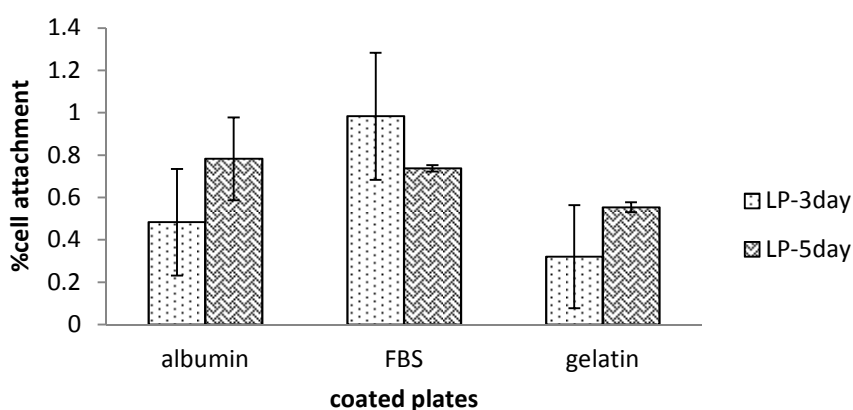


รูปที่ 33 เปอร์เซ็นต์การเกาะภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์รังไข่ ที่เวลา 3 และ 5 วัน
(ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ที่จำนวน 3 ซ้ำ)

Figure 33 Percentage of cell attachment of ovarian cells at 3 and 5 days. (mean±S.D. and n=3)

6.2. การศึกษาผลของการเคลือบผิวหน้าภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อน้ำเหลือง

การศึกษาความสามารถในการเกาะภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์ โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อมน้ำเหลืองกึ่งซบวัยในอาหารสูตร modified1 ซึ่งผ่านการเคลือบผิวหน้าภาชนะเพาะเลี้ยง โดยให้หลุมที่ไม่มีสารเคลือบผิวภาชนะเป็นตัวควบคุม บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 และ 5 วัน พบว่าที่เวลา 5 วัน เซลล์ต่อมน้ำเหลืองสามารถเกาะผิวหน้าภาชนะเพาะเลี้ยงที่ผ่านการเคลือบผิวทั้ง 3 ชนิด ได้ไม่แตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95% ดังแสดงในรูปที่ 34



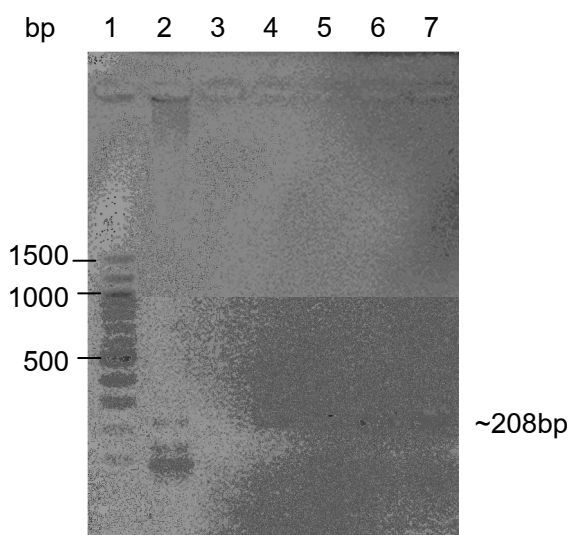
รูปที่ 34 เปอร์เซ็นต์การเกาะภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อมน้ำเหลือง ที่เวลา 3 และ 5 วัน
(ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ที่จำนวน 3 ซ้ำ)

Figure 34 Percentage of cell attachment of lymphoid cells at 3 and 5 days. (mean±S.D. and n=3)

7. ทดสอบการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในเซลล์รังไข่กุ้งแช่บ๊วย ด้วยเทคนิค RT-PCR

เพาะเลี้ยงเซลล์รังไข่กุ้งแช่บ๊วย ในอาหารสูตร modified3 ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เวลา 72 ชั่วโมง เติมน้ำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมเชื้อไวรัส WSSV ความเข้มข้น $10^3 - 10^6$ โดยใช้ WSSV ป่มที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เวลา 1 ชั่วโมง เป็นตัวควบคุม (internal control) นำไปบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก ล้างเซลล์ด้วย PBS จากนั้นทำการสกัด RNA โดยใช้ trizol reagent วิเคราะห์ปริมาณ RNA ด้วยวิธีสเปคโตรโฟโตเมตริก

จากนั้นจึงทำการเปลี่ยน RNA ไปเป็น cDNA ด้วยเทคนิค RT-PCR จากนั้นจึงการเพิ่มจำนวน cDNA ด้วย PCR โดยใช้ไพรเมอร์ GAPDH ดังแสดงในรูปที่ 35 พบว่า มีแถบดีเอ็นเอประมาณ 208bp ซึ่งเป็นขนาดของยีน GAPDH ขึ้นในทุกตัวอย่างยกเว้น น้ำกลั่น (negative control)



รูปที่ 35 แสดงแถบดีเอ็นเอจากการทำ PCR ของเซลล์รังไข่กุ้ง โดยใช้ไพรเมอร์ GAPDH

วิเคราะห์หีบ่น 1.5% agarose gel electrophoresis

แถวที่ 1 : 100bp DNA ladder

แถวที่ 2 : แถบดีเอ็นเอของเนื้อเยื่อกุ้งปกติ

แถวที่ 3 : แถบดีเอ็นเอของน้ำกลั่น

แถวที่ 4 : แถบดีเอ็นเอของเซลล์รังไข่ปกติ

แถวที่ 5 : แถบดีเอ็นเอของเซลล์รังไข่บ่ม WSSV ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส

แถวที่ 6 : แถบดีเอ็นเอของเซลล์รังไข่บ่ม WSSV⁶

แถวที่ 7 : แถบดีเอ็นเอของเซลล์รังไข่บ่ม WSSV⁵

Figure 35 PCR product of ovarian cells using GAPDH primer on 1.5% agarose gel electrophoresis

Lane 1 : 100bp DNA ladder

Lane 2 : PCR product of positive control

Lane 3 : PCR product of negative control

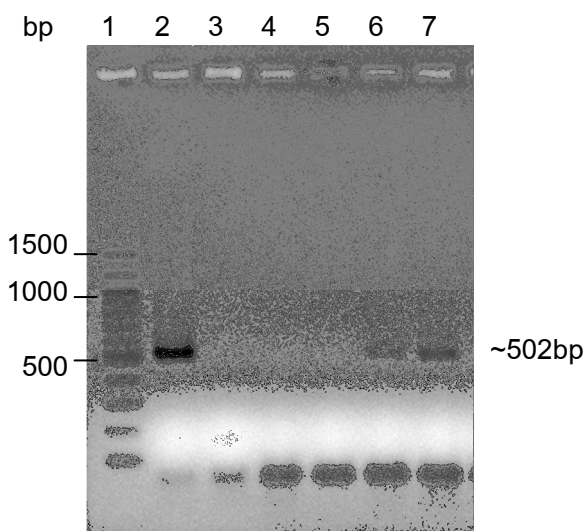
Lane 4 : PCR product of normal ovarian cells

Lane 5 : PCR product of ovarian cells incubation with WSSV incubate at 56°C

Lane 6 : PCR product of ovarian cells incubation with WSSV10⁶

Lane 7 : PCR product of ovarian cells incubation with WSSV10⁵

และไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อ WSSV ได้แก่ ไพรเมอร์ ie1 รูปที่ 36 พบว่า ยีน ie1 สามารถจับกับตัวอย่างเซลล์รังไข่กุ้งแช่บ้วยที่บ่มด้วย WSSV ความเข้มข้น 10⁶ และ 10⁵ coppies ซึ่งมีแถบดีเอ็นเอประมาณ 208bp เท่านั้น และไม่สามารถจับกับเซลล์รังไข่กุ้งแช่บ้วยปกติและเซลล์รังไข่กุ้งแช่บ้วยที่บ่ม WSSV ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียสได้



รูปที่ 36 แสดงแถบดีเอ็นเอจากการทำ PCR ของเซลล์รังไข่กุ้ง โดยใช้ไพรเมอร์ ie1 วิเคราะห์บน 1.5% agarose gel electrophoresis

แถวลำดับที่ 1 : 100bp DNA ladder

แถวลำดับที่ 2 : แถบดีเอ็นเอของเนื้อเยื่อติดเชื้อ WSSV

แถวลำดับที่ 3 : แถบดีเอ็นเอของน้ำกลั่น

แถวลำดับที่ 4 : แถบดีเอ็นเอของเซลล์รังไข่ปกติ

แถวลำดับที่ 5 : แถบดีเอ็นเอของเซลล์รังไข่บ่ม WSSV ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส

แถวลำดับที่ 6 : แถบดีเอ็นเอของเซลล์รังไข่บ่ม WSSV10⁶

แถวลำดับที่ 7 : แถบดีเอ็นเอของเซลล์รังไข่บ่ม WSSV10⁵

Figure 36 PCR product of ovarian cells using ie1 primer on 1.5% agarose gel electrophoresis

Lane 1 : 100bp DNA ladder

Lane 2 : PCR product of positive control

Lane 3 : PCR product of negative control

Lane 4 : PCR product of normal ovarian cells

Lane 5 : PCR product of ovarian cells incubation with WSSV incubate at 56°C

Lane 6 : PCR product of ovarian cells incubation with WSSV10⁶

Lane 7 : PCR product of ovarian cells incubation with WSSV10⁵

บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

1 การศึกษาความมีชีวิตของเซลล์เนื้อเยื่อถุงแซบวัย

จากการศึกษาของ Jayesh และคณะ (2012) พบว่าต่อมน้ำเหลือง ริงไข่ เม็ดเลือด (hemocytes) และตับเป็นเนื้อเยื่อที่นำมาใช้ในการศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์มากที่สุด เรียงลำดับจากมากไปน้อย พบว่าต่อมน้ำเหลืองเป็นเนื้อเยื่อที่มีการศึกษามากที่สุด เนื่องจากต่อมน้ำเหลืองเป็นเนื้อเยื่อที่นิยมในการใช้ศึกษาการติดเชื้อในกุ้ง ซึ่งมีรายงานการศึกษาของ Itami และคณะ (1999) ได้ทำการแยกเซลล์จากต่อมน้ำเหลืองกุ้งครุมา (*Penaeus japonicus*) เพื่อใช้ในการศึกษาการติดเชื้อ PRDV ส่วนริงไข่เป็นอวัยวะเกี่ยวกับเพศจึงมีการนำมาใช้ในการศึกษาพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ (King, 1948) ซึ่ง Tsukimura และ Kamemoto (1991) ได้ใช้เนื้อเยื่อริงไข่ในการศึกษาผลของสารสเตียรอยด์ (steroids) ในการกระตุ้น โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของ (oocytes) ในกุ้งขาว และได้มีรายงาน Krol และคณะ (1991) นำเซลล์ตับกุ้งขาวมาใช้ในการศึกษาการติดเชื้อแบคทีเรีย Rickettsial และ mollicute ดังนั้นในการทดลองเพาะเลี้ยงเซลล์จากเนื้อเยื่อถุง จึงสนใจศึกษาเนื้อเยื่อริงไข่ ต่อมน้ำเหลืองและตับกุ้งแซบวัย ต่อมาได้มีรายงานของ Tanfermin และ Pudadera (1989) ทำการศึกษาระยะการพัฒนารังไข่กุ้งกุลาดำ โดยใช้เทคนิคการศึกษาลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยา (histology) แบ่งระยะการพัฒนารังไข่ออกเป็น 4 ระยะ คือ previtellogenic stage (P) เป็นระยะแรกที่ริงไข่เริ่มมีการพัฒนา โดยมีการเปลี่ยนแปลงภายใน oogonia และ primary oocytes เพื่อเตรียมสู่การพัฒนาในขั้นต่อไป คือ vitellogenic stage (V) เป็นระยะที่เริ่มมีการสะสมอาหารซึ่งปรากฏในส่วนของ yolky oocytes ต่อมาเป็นระยะ cortical rod stage (C) ซึ่งปรากฏ cortical rod มีลักษณะเป็นท่อนทรงรี (spherical or rod-like bodies) เชื่อมอยู่กับไซโทพลาสซึมและในระยะ spent stage (S) เป็นระยะที่ follicle cells มีขนาดหนาและสีเข้มขึ้น จากรายงานของ Fraser และ Hall (1999) กล่าวถึงริงไข่ในระยะไม่พัฒนา (immature ovaries) เป็นระยะที่มีการนำมาใช้ในการศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์มากที่สุด ในการทดลองนี้จึงเลือกรังไข่ในระยะไม่พัฒนามาใช้ในการศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์ริงไข่กุ้งแซบวัย ต่อมา มีรายงานของ Hsu และคณะ (1995) ได้ทำการศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อมน้ำเหลือง ของกุ้งกุลาดำ พบว่าการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 3 วัน เซลล์มีการเจริญประมาณ 80%ของภาชนะ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองศึกษาความมีชีวิตของเซลล์ต่อมน้ำเหลือง พบว่าที่ระยะเวลา 3 วันเซลล์มีชีวิตเพิ่มขึ้นมากกว่าที่ 1 วัน

จากศึกษาการแยกเซลล์โดยตัดเนื้อเยื่อเป็นชิ้นเล็กแล้ววางในอาหารเหมาะสำหรับเซลล์ที่มีการเกาะภาชนะเพาะเลี้ยง โดยอาจมีการเติมสารช่วยให้เซลล์เกาะภาชนะได้ดีขึ้น เช่น คอลลาเจน โพลีไลซีน (poly-lysine) เป็นต้น (Toullec, 1999) แต่ไม่จำเพาะเฉพาะเซลล์ที่คุณสมบัติในการเกาะภาชนะเพาะเลี้ยงเท่านั้น ดังในรายงานของ Rosenthal และ Diamant

(1990) พบว่าการใช้เทคนิคการตัดเนื้อเยื่อตับและรังไข่เป็นชิ้นเล็กวางในอาหารเลี้ยงเซลล์ M199 ภายในเวลา 24 ชั่วโมง เซลล์ทั้ง 2 ชนิดสามารถแผ่ออกมาได้ดีที่สุด และ Wangl และคณะ (2000) ใช้เทคนิคการตัดเนื้อเยื่อต่อมน้ำเหลืองแล้ววางในอาหารสูตร L-15 เวลา 1 วัน ในการแยกเซลล์ต่อมน้ำเหลืองเพื่อใช้ในการศึกษาการติดเชื้อ WSSV ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองพบว่าการตัดเนื้อเยื่อรังไข่ ต่อมน้ำเหลืองและตับเป็นชิ้นเล็กๆ แล้ววางในอาหารเลี้ยงเซลล์ ส่งผลให้เซลล์รอดชีวิตมากกว่าการย่อยด้วยเอนไซม์ collagenase type V และสารที่มี EDTA เป็นส่วนประกอบ ซึ่งอาจเป็นผลจากความเข้มข้นและระยะเวลาที่นานเกินไป ทำให้เซลล์ตาย แต่จากการทดลองพบว่ามีข้อจำกัดหลายประการในการศึกษา ซึ่งส่งผลกระทบต่อ การทดลอง โดยเริ่มตั้งแต่ข้อจำกัดในการเพาะเลี้ยงเซลล์จำนวนเริ่มต้น เนื่องจากไม่สามารถทำการ นับจำนวนเซลล์ที่แน่นอนได้ จึงส่งผลให้จำนวนเซลล์เริ่มต้นในการทดลองไม่เท่ากัน แต่ทาง ผู้วิจัยได้พยายามทำการแก้ไขโดยตัดเนื้อเยื่อก้อนในแต่ละการทดลองให้มีขนาดใกล้เคียงกันมากที่สุด คือ ชิ้นละ 1 มิลลิเมตร x 1 มิลลิเมตร เพื่อเป็นการลดผลซึ่งกระทบต่อจำนวนเซลล์เริ่มต้น

2 การศึกษาสูตรอาหารสังเคราะห์พื้นฐานในการเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อกุ้งแชบ๊วย

การเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อสัตว์เป็นการเพาะเลี้ยงเซลล์จากสิ่งมีชีวิตเฉพาะส่วนภายใต้ สภาวะที่เหมาะสม ใกล้เคียงกับสภาวะแวดล้อมมากที่สุด จากรายงานของ Shimizu และคณะ (2001) ได้ทำการศึกษาองค์ประกอบในเลือดกุ้ง *P. stylirostris* พบว่าใกล้เคียงกับอาหารเลี้ยง เซลล์ 2 สูตร คือ อาหารสูตร L-15 และ M199 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Jayesh และคณะ (2012) พบว่าอาหารสูตร L-15 เป็นสูตรที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อกุ้งมากที่สุด ใน การทดลองนี้จึงนำอาหารเลี้ยงเซลล์สูตร L-15 มาเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์พื้นฐานที่ใช้ในการ เพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อกุ้งแชบ๊วย และ Shimizu และคณะ (2001) ได้มีการศึกษาองค์ประกอบ ของเลือดกุ้งเปรียบเทียบกับอาหารสูตร L-15 พบว่า ในอาหารสูตร L-15 มีปริมาณ proline ต่ำ กว่าในเลือดกุ้ง ซึ่ง Proline มีคุณสมบัติช่วยในการดูดซึมสารอาหารในเซลล์สัตว์ไม่มีกระดูกสัน หลังและเป็นแหล่งพลังงานในเซลล์กล้ามเนื้อของแมลง Jayesh และคณะ (2012) สอดคล้องกับ รายงานของ Maeda และคณะ (2004) ได้มีการเติม Proline ความเข้มข้น 0.1 กรัมต่อลิตร TC-Yeastolate และ lactalbumin hydrolysate ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเซลล์รัง ไข่ของกุ้งครุมา และ Lang และคณะ (2002) ได้ทำการศึกษาโดยเติม NaCl ความเข้มข้น 11 กรัมต่อลิตร เพิ่มลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ พบว่าการเติม NaCl เพื่อช่วยในการปรับค่าออสโมลาริตี (osmolarity) ให้มีความเหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเซลล์ตัวอ่อน (embryonic cells) ของกุ้ง *P. chinensis* Fan และ Wang (2002) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Castille และ Lawrence (1981) ได้ทำการศึกษาโดยวัดค่าออสโมลาริตีในเลือดกุ้งซึ่งใกล้เคียง (isosmotic) กับน้ำทะเล โดยกุ้งแต่ละชนิดมีค่าออสโมลาริตีไม่เท่ากัน เช่น *P. aztecus* มีค่า 745 mOs/kg, *P. duorarum* มีค่า 768 mOs/kg, *P. setiferus* มีค่า 680 mOs/kg, *P. stylirostris* มีค่า 699 mOs/kg และกุ้ง

ขามีค่า 718 mOs/kg จากข้อมูลดังกล่าวจึงนำมาประยุกต์ใช้ในอาหารเลี้ยงเซลล์สูตร Modified 3 ซึ่งพบว่าอาหารสูตร Modified 3 มีผลเพิ่มจำนวนเซลล์รังไข่ที่ 1 3 และ 5 วัน โดยเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์รังไข่กึ่งแซบิวย เซลล์ส่วนใหญ่จะประกอบไปด้วย fibroblast cells และ epithelial cells ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Maeda และคณะ (2003) ได้มีรายงานว่าเซลล์รังไข่กึ่ง *Marsupenae japonicas* เริ่มเกาะภาชนะเพาะเลี้ยงที่เวลา 1 วัน และเริ่มมีการเพิ่มจำนวนเซลล์ ที่ระยะเวลา 2 วัน โดยเซลล์ที่แยกได้มีลักษณะเป็น epithelial cells และ fusiform cells ส่วนในการเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อมน้ำเหลือง ไม่พบความแตกต่างในการเพิ่มจำนวนเซลล์ในแต่ละสูตรอาหาร แสดงให้เห็นว่าผลของสารอาหารที่เติมเพิ่มลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ ไม่ได้มีผลในการเพิ่มจำนวนเซลล์ต่อมน้ำเหลือง สอดคล้องกับรายงานของ Chen และ Wang (1999) ได้ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อมน้ำเหลือง จากกึ่งสายพันธุ์ penaeid ในอาหาร L-15 ที่มีการเติม 20% Fetal Calf Serum (FCS) ซึ่งสามารถเลี้ยงเซลล์ต่อมน้ำเหลืองได้นานมากกว่า 20 วัน และเมื่อทำการทดลองเพาะเลี้ยงเซลล์ที่แยกได้จากต่อมน้ำเหลืองกึ่งแซบิวย พบว่าเซลล์ที่แยกได้ส่วนใหญ่เป็นเซลล์เกาะ มีลักษณะคล้าย fibroblast และ epithelial cells ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Kasornchandra และคณะ (1999) ได้มีรายงานว่าเซลล์ที่แยกได้จากต่อมน้ำเหลืองกุลาดำในอาหารสูตร 2X-L15 ที่มีการเติม 15% FBS 1% glucose 5 กรัมต่อลิตร NaCl 15% SME ที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส พบว่าเซลล์ที่ได้มีลักษณะเป็น fibroblast cells และ epithelial cells และจากการศึกษาเพาะเลี้ยงเซลล์ตับในอาหารสูตร Modified 1 พบว่ามีการเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ดีที่สุดที่ 5 วันและมีแนวโน้มในการเพิ่มจำนวนเซลล์ที่ 1 3 และ 5 วัน เมื่อทำการทดลองเพาะเลี้ยงเซลล์ที่แยกได้จากตับกึ่งแซบิวย พบว่าเซลล์ส่วนใหญ่เป็นเซลล์แขวนลอยในอาหาร มีลักษณะคล้าย round cells ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Uma และคณะ (2002) ได้มีรายงานว่าเซลล์ที่แยกได้จากตับกึ่งกุลาดำ โดยตัดเนื้อเยื่อเป็นชิ้นเล็กๆ แล้ววางในอาหารสูตร L-15 ที่มีการเติม 10% FBS พบว่าเซลล์ที่ได้มีลักษณะรูปร่างเป็นทรงกลม (spherical shape) สามารถเจริญได้ 12 สัปดาห์และมีการ subculture ไปไปถึง 7 ครั้ง จึงมีการเลือกอาหารสูตร Modified 1 มาใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ตับในการทดลองต่อไป

3 การศึกษาผลของอาหารเสริมในการเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อกึ่งแซบิวย

จากการศึกษาของ Naora และคณะ (1998) พบว่าเซลล์ที่มีการตาย (apoptosis) จะไม่มีการแสดงออก (expression) ของ RPS3a ซึ่งตรงข้ามกับเซลล์มะเร็ง คือ RPS3a จะมีการแสดงออกสูง มากกว่าในเซลล์ปกติ จึงทำการทดลองพบว่า RPS3a มีผลเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ NIH3T3 และก่อให้เกิดเนื้องอกในหนูที่ไม่มีภูมิคุ้มกัน (nude mice) แต่จากการทดลองยังไม่สามารถระบุได้อย่างชัดเจน เนื่องจากการแสดงออกของ RPS3a ในปริมาณสูง (over expression) ส่งผลชักนำให้เกิดการตายของเซลล์แทนที่จะช่วยยับยั้งการตายของเซลล์ จากความรู้ดังกล่าวจึงส่งผลให้ Navakanitworakul และคณะ (2012) ได้ทำการศึกษา

ผลของ RPS3a ต่อการพัฒนาของรังไข่ของกึ่งแซบวัย พบว่า RPS3a ความเข้มข้น 0.1 ไมโครโมลาร์ มีผลในการพัฒนารังไข่ของกึ่งแซบวัย จากระยะที่รังไข่ยังไม่พัฒนา (undeveloped) ไปสู่ระยะที่รังไข่มีการพัฒนาเข้าสู่ระยะแรก (stage 1) ที่ความเชื่อมั่น ($P < 0.05$) ส่งผลให้ในการทดลองจึงนำ RPS3a ความเข้มข้น 0.1 ไมโครโมลาร์ หรือ 3.3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาใช้เป็น supplement โดยเติมในอาหารสูตร modified 3 พบว่า มีผลในการเพิ่มจำนวนเซลล์รังไข่ดีที่สุดที่ระยะเวลา 10 วัน

ต่อมา Wang และคณะ (2009) ได้มีรายงานผลการแสดงออกของ ribosomal proteins (S3a, L10, L16) พบว่ามีผลต่อการเกิดมะเร็ง ทำการศึกษาเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก (malignant prostate cancer cell lines) มีการแสดงออกสูงใน RPS2 (Ribosomal Protein ชนิดหนึ่ง ขนาด 33 กิโลดาลตัน) ซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ใช้ศึกษาผลของยาในการป้องกันการเกิดโรคมะเร็งได้ จากรายงานของ Wang และคณะ (2009) สอดคล้องกับผลการทดลองเพาะเลี้ยงเซลล์ตับในอาหารสูตร Modified1 ที่มีการเติม RPL10a ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ 1 ไมโครโมลาร์ พบว่า ที่เวลา 10 วัน มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์ตับดีที่สุด สอดคล้องกับการศึกษาของ Wonglapsuan และคณะ (2010) พบว่า เมื่อบ่มเนื้อเยื่อรังไข่กึ่งแซบวัยกับอาหาร 199 ที่มีการเติม RPL10a ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ ภายในระยะเวลา 4 ชั่วโมง พบมีการพัฒนาของรังไข่ ซึ่งแสดงออก Translationally Controlled Tumor Protein (TCTP), Heat Shock Protein 70 (HSP70) และ Shrimp Ovarian Peritrophin (SOP) genes ได้สูง ซึ่งทั้ง 3 ยีน เป็นยีนที่ใช้ในการศึกษาการพัฒนาของรังไข่ และจากการศึกษาของ Suzuki และคณะ (2009) ทำการศึกษาผลของมะเร็งตับ (hepatocellular carcinogenesis) ในหนูและมนุษย์ พบว่า RPL10a มีการเพิ่มขึ้นเมื่อเซลล์มะเร็งมีการเพิ่มจำนวนมากขึ้น ดังนั้นจากรายงานและผลการทดลองดังกล่าว จึงแสดงให้เห็นว่า RPS3a และ RPL10a มีผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์รังไข่และเซลล์ตับ

4. การศึกษาผลของการเคลือบผิวหน้าภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อกึ่งแซบวัย

จากการรายงานของ Tashiro (1989) ได้ทำการศึกษาผลของ laminin ซึ่งจัดเป็น glycoprotein ชนิดหนึ่ง พบได้บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ โดยทำการเคลือบผิวหน้าภาชนะเพาะเลี้ยงด้วย laminin เพื่อศึกษาผลของการเกาะภาชนะเพาะเลี้ยง การเคลื่อนที่และการเจริญของเซลล์เส้นใยประสาท (Neurite) พบว่าหลังจากเคลือบผิวภาชนะเพาะเลี้ยงด้วย laminin ส่งผลให้เซลล์เส้นใยประสาทมีการเกาะและเคลื่อนที่ได้ดียิ่งขึ้นและจากในรายงานยังได้มีการกล่าวถึงสาเหตุที่อาจส่งผลให้เซลล์มีการยึดเกาะหรือเคลื่อนที่ได้ยาก เนื่องจากผลของพันธะเปปไทด์บริเวณผิวเซลล์ไม่สามารถยึดตัวได้ดีเท่าที่ควร จึงมีการเติม albumin มีผลช่วยในการเคลื่อนที่และยึดเกาะของเซลล์ได้ดียิ่งขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลอง พบว่าการเคลือบผิวภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วย albumin และ FBS ส่งผลให้เซลล์รังไข่กึ่งแซบวัยสามารถยึดเกาะผิวภาชนะ

ได้ดียิ่งขึ้น และได้มีรายงานของ Blom (1995) ทำการศึกษา เคลือบผิวภาชนะเพาะเลี้ยงด้วย FBS พบว่ามีผลช่วยในการเกาะภาชนะของเซลล์ fibroblast และเซลล์ mesothelial ได้ดียิ่งขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ James และคณะ (1999) ได้ทำการศึกษาผลของ nicotine และ cotinine ต่อการเกาะของเซลล์ fibroblast ที่แยกจากเยื่อฟันของมนุษย์ (human periodontal ligament) ซึ่งพบว่า nicotine และ cotinine มีผลทำให้เซลล์มีความสามารถในการเกาะภาชนะ ได้ลดลง ส่งผลให้เซลล์มีอัตราการเจริญลดต่ำลง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการยึดเกาะของเซลล์มีส่วนช่วยในการเจริญและการเพิ่มจำนวนเซลล์ได้

5. ทดสอบการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในรังไข่กุ้งแชบ๊วย

จากการศึกษาของ Jiang และคณะ (2006) ได้ทำการแยกเซลล์เม็ดเลือดจากหัวใจกุ้ง *Penaeus chinensis* พบว่าสามารถเจริญได้ 20 วัน ในอาหารสูตร 2X L-15 ที่มีการเติม 20% FBS และ 2% กลูโคส โดยปรับ pH 7.2–7.4 มาเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยบ่มเซลล์กับไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ความเข้มข้นต่าง ๆ จากนั้นจึงทำการทดสอบผลการติดเชื้อด้วยเทคนิค immunocytochemical โดยใช้ monoclonal antibodies เป็นตัวตรวจสอบการติดเชื้อไวรัส พบว่าเซลล์เม็ดเลือดสามารถติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวได้ โดยไวรัสสามารถเพิ่มจำนวนใน nuclei ของเซลล์เม็ดเลือดที่มีการติดเชื้อ ต่อมา Jiravanichpaisal และคณะ (2006) ได้ทดสอบการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวจากเซลล์เม็ดเลือดที่แยกจากเนื้อเยื่อที่สร้างเม็ดเลือด (haematopoietic tissue) จากกุ้ง *Pacifastacus leniusculus* หลังจากบ่มกับไวรัสเป็นเวลา 36 ชั่วโมง จึงทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดที่อุณหภูมิ 4 ถึง 25 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงทำการตรวจสอบการติดเชื้อตัวแดงดวงขาวด้วยเทคนิค *in situ* hybridization และ RT-PCR โดยศึกษาการแสดงออกของ VP28 พบว่าเซลล์เม็ดเลือดสามารถติดเชื้อได้ดีที่อุณหภูมิสูงมากกว่าอุณหภูมิต่ำและไม่พบการติดเชื้อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองโดยทำการศึกษาการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว โดยทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส และทำการตรวจสอบผลการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวด้วยเทคนิค RT-PCR โดยศึกษาการแสดงออกของยีน ie1 ซึ่งสอดคล้องกับรายงาน ของ He และคณะ (2008) พบว่า ie1 มีการแสดงออกทันทีที่เซลล์มีการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเซลล์ที่แยกได้จากรังไข่กุ้งแชบ๊วยสามารถนำมาใช้ในการทดสอบการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว โดยใช้เทคนิค RT-PCR ในการศึกษาการแสดงออกของยีน ie1 ได้

บทที่ 5

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อกุ้งแชบ๊วย คือ เซลล์รังไข่ เซลล์ต่อมน้ำเหลืองและเซลล์ตับโดยแยกเซลล์จากเนื้อเยื่อแต่ละชนิดด้วยวิธีแตกต่างกันแล้วศึกษาความมีชีวิตของเซลล์จากนั้นนำเซลล์ที่แยกได้มาใช้ศึกษาสูตรอาหารสังเคราะห์พื้นฐานในการเพาะเลี้ยงเซลล์แต่ละชนิดและศึกษาผลของการเติม supplement ในการมีชีวิตรอดและเพิ่มจำนวนเซลล์เนื้อเยื่อกุ้งแชบ๊วย ซึ่งสามารถสรุปผลการทดลองได้ดังนี้

1. สามารถแยกเซลล์รังไข่ ต่อมน้ำเหลืองและตับจากเนื้อเยื่อกุ้งแชบ๊วยโดยใช้วิธีตัดเนื้อเยื่อเป็นชิ้นเล็ก แล้ววางในอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส พบว่าที่เวลา 3 วัน เซลล์รังไข่และต่อมน้ำเหลืองมีการเจริญและรอดชีวิตสูงกว่าการแยกเซลล์ด้วยวิธีอื่น และที่เวลา 1 วัน เซลล์ตับมีการเจริญและรอดชีวิตสูงกว่าการแยกเซลล์ด้วยวิธีอื่นเช่นกัน

2. การศึกษาสูตรอาหารพื้นฐานในการเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อกุ้งแชบ๊วย พบว่าที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 5 วัน เซลล์รังไข่และต่อมน้ำเหลืองมีอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ในอาหารพื้นฐานแต่ละสูตรได้ไม่แตกต่างกัน ส่วนเซลล์ตับพบว่าการเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ดีที่สุดในอาหารสูตร mofied1

3. ศึกษาผลของ supplement ในการเพาะเลี้ยงเซลล์รังไข่ ต่อมน้ำเหลืองและตับจากเนื้อเยื่อกุ้งแชบ๊วย ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 10 วัน พบว่าในอาหารสูตร mofied3 ที่มีการเติม RPS3a ความเข้มข้น 3.3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ 0.1 ไมโครโมลาร์ เซลล์รังไข่มีการเพิ่มจำนวนดีที่สุด การเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อมน้ำเหลืองในอาหารที่มีการเติม supplement แต่ละชนิด พบว่าไม่มีผลช่วยในการเพิ่มจำนวนเซลล์ที่แตกต่างกันและในการเพาะเลี้ยงเซลล์ตับ พบว่าอาหารสูตร mofied1 ที่มีการเติม RPL10a ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ 1 ไมโครโมลาร์ ที่ระยะเวลา 10 วัน เซลล์ตับมีการเพิ่มจำนวนได้ดีที่สุด

4. การศึกษาผลของการเคลือบผิวหน้าภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 5 วัน พบว่า การเคลือบผิวหน้าภาชนะด้วย 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร albumin และ 20%FBS เซลล์รังไข่กุ้งสามารถเกาะผิวหน้าภาชนะเพาะเลี้ยงได้ดีกว่าในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีการเคลือบผิว ส่วนในการเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อมน้ำเหลืองพบว่าการเคลือบผิวภาชนะไม่ได้ช่วยให้เซลล์เกาะภาชนะเพาะเลี้ยงได้ดีขึ้น

5. จากการทดสอบการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในเซลล์รังไข่กุ้งแชบ๊วยพบว่า เมื่อบ่มเซลล์รังไข่กุ้งที่ด้วย WSSV ความเข้มข้น 10^5 และ 10^6 coppies เซลล์รังไข่มีการติดเชื้อ WSSV ได้ โดยแสดงผลโดยการจับกับไพรเมอร์ ie1 ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อ WSSV ดังนั้นจึงสามารถนำเซลล์รังไข่กุ้งที่แยกได้มาใช้ในการศึกษาการติดเชื้อไวรัสได้

ข้อเสนอแนะ

1. การศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับการแยกเซลล์จากเนื้อเยื่อกระดูกไขว้ จึงเลือกเนื้อเยื่อซี่โครง ต่อมน้ำเหลืองและตับซึ่งเป็นเนื้อเยื่อที่มีการนิยมศึกษาในกึ่งชนิดอื่นมาใช้ในการทดลอง ซึ่งในอนาคตน่าจะมีการศึกษาเนื้อเยื่อชนิดอื่น เช่น หัวใจ กล้ามเนื้อ เม็ดเลือด เส้นประสาท เหนือกระดูก เป็นต้น ในกึ่งไขว้เพิ่มขึ้น เพื่อสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวางเพิ่มมากยิ่งขึ้น

2. ในการทดลองที่ไม่สามารถนับจำนวนเซลล์ได้แน่นอน จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ โดยสามารถแบ่งเป็น 2 เซลล์ (doubling time) ในเซลล์แต่ละชนิดซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นกราฟมาตรฐาน (standard curve) ในการนับจำนวนเซลล์แต่ละชนิดได้จากผลการทดลองพบว่า สามารถบอกได้โดยประมาณถึง doubling time ของเซลล์ซี่โครงกระดูกไขว้ที่อยู่ประมาณ 48 ชั่วโมง ซึ่งมีผลในการแบ่งเซลล์เพิ่มขึ้นจาก 1 เป็น 2 เซลล์

3. จากการศึกษาผลของการ subculture พบว่าสามารถ subculture ได้เพียง 2 ครั้งก็ส่งผลให้เซลล์ตายอีกทั้งเซลล์ที่เพาะเลี้ยงได้ก็มีลักษณะคล้ายกับเซลล์ที่ใกล้จะตาย ซึ่งอาจมีวิธีการแก้ไขโดยหลังจากทำการ subculture ด้วย 0.25% trypsin EDTA อาจมีการย้ายมาเพาะเลี้ยงในภาชนะที่ทำการเพาะเลี้ยงด้วย Feeder layer (เซลล์ที่ได้จากหนูซึ่งผ่านการฉายรังสีทำให้ไม่สามารถแบ่งเซลล์ได้อีก) ซึ่ง Feeder layer ช่วยเหนี่ยวนำให้เซลล์ที่ต้องการเพาะเลี้ยง สามารถแบ่งตัวได้ดียิ่งขึ้น อีกทั้งในการ subculture ควรเพาะเลี้ยงให้เซลล์มีความหนาแน่นมากพอสมควรก่อนที่จะมีการ subculture เนื่องจากเซลล์จะไม่สามารถมีปฏิสัมพันธ์ (interaction) กันได้ ซึ่งอาจแก้ไขโดยการเปลี่ยนภาชนะเพาะเลี้ยงให้มีขนาดเล็กลงเพื่อช่วยให้เซลล์มีการเจริญได้ดียิ่งขึ้น

4. จากการทดลองพบว่าผลของ RPS3a และ RPL10a มีผลช่วยในการเพิ่มจำนวนของเซลล์ซี่โครงและเซลล์ตับกระดูกไขว้ ซึ่งในการทดลองได้มีการเลือกใช้เพียงความเข้มข้นเดียวในการทดสอบ ดังนั้นในอนาคตน่าจะมีการศึกษาผลความเข้มข้น RPS3a และ RPL10a โดยปรับใช้ความเข้มข้นที่สูงและต่ำกว่าที่ใช้ในทดลอง ซึ่งอาจจะมีผลช่วยในการเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ดีกว่าความเข้มข้นเดิม และจากผลของ RPS3a และ RPL10a ซึ่งจัดเป็น ribosomal protein ที่มีผลช่วยในการเพิ่มจำนวนเซลล์ จึงน่าจะมีการศึกษาผลของ ribosomal protein ชนิดอื่นซึ่งอาจช่วยในการเพิ่มจำนวนเซลล์ได้มากกว่า RPS3a และ RPL10a

5. จากการทดลองเคลือบผิวภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วย albumin FBS และ gelatin น่าจะมีการศึกษาผลของสารชนิดอื่นเพิ่มเติมซึ่งอาจช่วยให้เซลล์เกาะภาชนะเพาะเลี้ยงได้ดียิ่งขึ้น และหลังจากทราบองค์ประกอบของอาหารและผลจากการเคลือบผิวภาชนะเพาะเลี้ยงแล้ว น่าจะมีการศึกษาผลการเพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อศึกษาเปรียบเทียบระหว่างการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารสังเคราะห์ทั่วไปกับอาหารที่มีการเติม supplement เพิ่ม

6. การทดลองศึกษาแยกเซลล์จากเนื้อเยื่อกุ้งแชบ๊วยเพื่อนำมาใช้ในการทดสอบการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวเพียงชนิดเดียว ดังนั้นจึงน่าจะมีการนำเซลล์ที่แยกได้มาใช้ในการทดสอบการติดเชื้อชนิดอื่นในกุ้ง เช่น Yellow Head Virus: YHV *V.harveyi* และ Taura Syndrome Virus: TSV เป็นต้น เพื่อเพิ่มความหลากหลายในการศึกษาและมีประโยชน์ได้กว้างมากยิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

- จรีพร เรืองศรี. 2546. การตอบสนองแบบกึ่งจำเพาะของภูมิคุ้มกันกึ่งกุลาดำ (*Penaeus monodon Fabricius*) ต่อเชื้อไวรัสหัวเหลืองและเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต, คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา.
- จันทร์ผา ตันธนา. 2544. การใช้ดีเอ็นเอไพรเมอร์แบบจำเพาะสำหรับแยกชนิดของกุ้งแชบ๊วย. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา.
- ชัยรัตน์ พุ่มช่วย และสุพจน์ จิงแย้มปิ่น. 2545. การศึกษาอาหาร 4 ชนิดที่มีผลต่อการวางไข่ของแม่กุ้งแชบ๊วย (*Penaeus merquiensis* De Man). เอกสารวิชาการ. 2: 3-5.
- บุษบา ศรีมี. 2556. เซลล์เพาะเลี้ยง (Cell Culture). การวิจัยและพัฒนาองค์การเภสัชกรรม. 20, 1(มกราคม-มีนาคม): 19.
- พิศาล มโนลีหกุล และสุรัชย์ ณ ป้อมเพชณ. 2521. กุ้ง. เอกสารวิชาการ1, 4: 15-62.
- รักษิณีย์ คำมานิตย์. 2550. ผลของการลดซีรัม การเลี้ยงเซลล์ให้เจริญเต็มพื้นที่และสารเคมี ต่อวงจรชีวิตเซลล์ของเซลล์ไฟโบรบลาสผิวหนังสุนัข. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (กายวิภาคศาสตร์ทางสัตวแพทย์) คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.
- ลัดดา เอกสมทราเมษฐ์. 2547. ชีววิทยาของเซลล์ (Cell Biology). โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ.
- วัชระ วงศ์เกิดสุข. 2546. การศึกษาลักษณะทั่วไปและลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของอวัยวะน้ำเหลืองในกึ่งกุลาดำ (*Penaeus monodon*). วิทยานิพนธ์ สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ.
- วิชชุดา จริยะพันธุ์, สุภาพร ภูมิอมร, กนิษฐา ภูวนาถนรานูบาล. 2556. แนวทางการควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์เซลล์ต้นกำเนิดสำเร็จรูปทางห้องปฏิบัติการ. FULL FORSE จำกัด: กรุงเทพฯ.
- Adamson, R.H. 1989. Permeability of frog mesenteric capillaries after partial pronase digestion of the endothelial glycocalyx. *Physiology*. 428: 1-13.
- Baker, J.B., Barsh, G.S., Carney, D.H., Cunningham, D.D. 1978. Dexamethasone modulates binding and action of epidermal growth factor in serum-free cell culture. *Cell Biology*. 75: 1882-1886.
- Barnes, D.W. 1982. Epidermal Growth Factor Inhibits Growth of A431 Human Epidermoid Carcinoma in Serum-free Cell Culture. *CELL BIOLOGY*. 93: 1-4.

- Blight, K. J., McKeating, J.A., Marcotrigiano, J., Rice C.M. 2003. Efficient Replication of Hepatitis C Virus Genotype 1a RNAs in Cell Culture. *Virology*. 77: 3181–3190.
- Blom, A., Pertoft, H., Fries, E. 1995. Inter- α -inhibitor Is Required for the Formation of the Hyaluronan-containing Coat on Fibroblast and Mesothelial Cells. *Biological Chemistry*. 270: 9698-9701.
- Brown, M.R., Miller, F.J., Li, J.W., Ellingson, A.N., Mozena, J.D., Chatterjee, P., Engelhardt, J.F., Zwacka, R.M., Oberley, L.W., Arthur X.F., Neal A.S., Weintraub, L. 1999. Overexpression of Human Catalase Inhibits Proliferation and Promotes Apoptosis in Vascular Smooth Muscle Cells. *Circulation Research*. 85:524-533.
- Carpenter, K.E. and Niem, V.H. 1998. The living marine resources of the western central pacific. Food and Agriculture Organization of the United Nations: Rome, Vol2, pp852.
- Castille, F.L., Lawrence, A.L. 1981. The effect of salinity on the osmotic, sodium and chloride concentrations in the hemolymph of euryhaline shrimp of the genus *Penaeus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*. 68: 75–80.
- Ceccaldi, H.J. 1989. Anatomy and physiology of digestive tract of Crustaceans Decapods reared in aquaculture. *Aquaculture*. 9: 243-259.
- Chen, S. N., Wang, C. S. 1999. Establishment of cell culture systems from penaeid shrimp and their susceptibility to white spot disease and yellow head viruses. *Cell Science*. 21: 199–206.
- Clayclon, K. 2009. Advances in Crustacean Cell Culture. Ph.D. Thesis, James Cook University, Queensland, Australia.
- David, J.M. 2011. Animal Cell Culture Essential Method. Hertfordshire University Press: Hertfordshire, UK.
- Fan, T.J. Wang, X.F. 2002. In vitro culture of embryonic cells from the shrimp, *Penaeus chinensis*. *Experimental Marine Biology and Ecology*. 267: 175– 184.
- Frei, M. 2011. Cell Viability and Proliferation. *Biofiles*. *Biofiles Online*. 6: 17-19.

- Furukawa, T., Duguid, W.P., Rosenberg, L., Viallet, J., Galloway, D.A., Tsao, M.S. 1996. Long-Term Culture and Immortalization of Epithelial Cells from Normal Adult Human Pancreatic Ducts Transfected by the E6E7 Gene of Human Papilloma Virus 16. *American Journal of Pathology*. 148: 1763-1770.
- Graidist, P., Fujise, K., Wanna, W., Sritunyalucksana, K., Phongdara, A. 2006. Establishing a role for shrimp fortilin in preventing cell death. *Aquaculture*. 255: 157–164.
- Guesdon, J.L., Ternynck, T., Avrameas, S. 1979. The Use of Avidin-Biotin Interaction in Immunoenzymatic Techniques. *Histochemistry and cytochemistry*. 27: 1131-1139.
- He, F., Ho, Y., Yu, L., Kwang, J. 2008. WSSV ie1 promoter is more efficient than CMV promoter to express H5 hemagglutinin from influenza virus in baculovirus as a chicken vaccine. *BMC Microbiology*. 8: 1-10.
- Holthuis, L. B. *Fenneropenaeus merguensis* (De Man, 1888). 1980. http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=551580 (accessed 23/12/13).
- HiMedia Laboratories. 2011. MEM Vitamin Solution 100X. <http://himedialabs.com/TD/VA002.pdf> (accessed 31/12/14).
- Hsu, Y.L., Yang, Y.H., Chen, Y.C., Tung, M.C., Wu, J.L., Engelking, M.H., Leong, J.C. 1995. Development of an in vitro subculture system for the oka organ (Lymphoid tissue) of *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 136: 43-55.
- Jaffe, E.A., Nachman, R.L., Becker, C.G., Miinick, C.R. 1973. Culture of Human Endothelial Cells Derived from Umbilical Veins. *Clinical Investigation*. 52: 2745-2756.
- Jame, J.A., Sayers, N.M., Drucker, D.B., Hull, P.S. 1999. Effect of Tobacco Products on the Attachment and Growth of Periodontal Ligament Fibroblast. *Periodontol*. 70: 518-525.
- Jayesh, P., Seena, J., Bright Singh, I.S. 2012. Establishment of Shrimp Cell Lines: Perception and Orientation. *Indian Virological*. 23(2): 244–251.
- Jiang, Y.S., Zhan, W.B., Wang, S.B., Xing, J. 2006. Development of primary shrimp hemocyte cultures of *Penaeus chinensis* to study white spot syndrome virus (WSSV) infection. *Aquaculture* 253: 114– 119.

- Jiravanichpaisal, P., Soderhall, K., Soderhall, I. 2006. Characterization of white spot syndrome virus replication in in vitro-cultured haematopoietic stem cells of freshwater crayfish, *Pacifastacus leniusculus*. *General Virology*. 87: 847–854.
- Jose, S. 2009. Cell Culture Systems from *Penaeus monodon*: Development and Application. Ph.D. Thesis, National Center for Aquatic Animal Health, Cochin University of Science and Technology, Kerala, India.
- Kasornchandra, J., Khongpradit, R., Ekpanithanpong, U., Boonyaratpalin, S. 1999. Progress in the development of shrimp cell cultures in Thailand. *Cell Science*. 21: 231–235.
- King, J.E. 1948. A STUDY OF THE REPRODUCTIVE ORGANS OF THE COMMON MARINE SHRIMP, *PENAEUS SETIFERUS* (LINNAEUS). *Biol Bull*. 94: 244-262.
- Krol, R.M., Hawkins, W. E., Overstreet R.M. 1991. Rickettsial and mollicute infections in hepatopancreatic cells of cultured Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Invertebrate Pathology*. 57: 362–370.
- Lang, G.H. Nomura, N. Matsumura, M. 2002. Growth by cell division in shrimp (*Penaeus japonicus*) cell culture. *Aquaculture*. 213: 73–83.
- Leary, J.J., Brigati, D.J., WARD, D.C. 1983. Rapid and sensitive colorimetric method for visualizing biotinlabeled DNA probes hybridized to DNA or RNA immobilized on nitrocellulose: Bio-blots. *Genetics*. 80: 4045-4049.
- Lim, K.H., Kim, K.H., Choi, S. I., Park, E.S., Park, S.H., Yong, K. R., Park, K., Kwon, S.Y., Yang, S.I., Lee, H.C., Sung, I.K., Seong, B.L. 2011. RPS3a Over-Expressed in HBV-Associated Hepatocellular Carcinoma Enhances the HBx-Induced NF- κ B Signaling via Its Novel Chaperoning Function. *PLoS ONE*. 6: 1-17.
- Lightner, D.V. 2011. Virus diseases of farmed shrimp in the Western Hemisphere (the Americas): A review. *Invertebrate Pathology*. 106: 110–130.
- Liu, Z.M., L.Hou, Y., Ding, X., Hou, W.R., Yang, J., Peng, Z.S. 2012. CDNA AND GENOMIC SEQUENCE CLONGING AND ANA LYSIS OF RIBOSOMAL PROTEIN LI OA GENE (RPLI0A) FROM GAIN T PANDA. International Conference on Computer Science and Information Processing. China West Normal University. August 24-26, 2012. pp.545-548.
- Maeda, M., Mizuki, E., Itami, T., Ohba, M. 2003. Ovarian Primary Tissue Culture of the Kuruma Shrimp *Marsupenaeus Japonicus*. *Animal*. 39:208-212.

- Maeda, M., Saitoh, H., Mizuki, E., Itami, T., Ohba, M. 2004. Replication of white spot syndrome virus in ovarian primary cultures from the kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*. *Virological Methods*. 116: 89–94.
- Masuda, T., Tomita, M., Ishihama, Y. 2008. Phase Transfer Surfactant-Aided Trypsin Digestion for Membrane Proteome Analysis. *Proteome Research*. 7: 731–740.
- Meerlo, J.V., Kaspers, G.J.L., Cloos, J. 2011. Cell Sensitivity Assay: The MTT Assay. *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols*. Cree, I.A., Ed. Springer eBooks., Vol.731, pp237-238.
- Moreno, A.Z., Taubert, I., Hellwig, I., Hoang, V., Pietsch, L., Lakshmanan, V.K., Wagner, W., Ho A.D. 2011. Innovative method for quantification of cell-cell adhesion in 96-well plates. *Cell Adhesion & Migration*. 3: 215-219.
- Nadala, E.C., Lu, Y., Loh, P.C. 1993. PRIMARY CULTURE OF LYMPHOID, NERVR, AND OVARY CELLS FROM *PENAEUS STYLIROSTRIS* AND *PENAEUS VANNAMEI*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*. 29: 620-622.
- Naora, H., Takai, I., Adachi, M., Naora, H. 1998. Altered Cellular Responses by Varying Expression of a Ribosomal Protein Gene: Sequential Coordination of Enhancement and Suppression of Ribosomal Protein S3a Gene Expression Induces Apoptosis. *Cell Biology*. 141: 741–753.
- Navakanitworakul, R., Deachamag, P., Wonglapsuwan, M., Chotigeat, W. 2012. The roles of ribosomal protein S3a in ovarian development of *Fenneropenaeus merguensis* (De Man). *Aquaculture*. 208–215.
- Platon, R.R. 1978. *Aquaculture Extension Manual No. 1*. Aquaculture Department. <http://aquaticcommons.org/3980/2/AEM01.htm>. (accessed 28/12/13).
- Purivirojkul, W. 2012. Histological Change of Aquatic Animals by Parasitic Infection. In: *Phylum microspora. Histopathology*. 9: 153-176.
- Reynolds, B.A., Tetzlaff, W., Weiss, S. 1992. A Multipotent EGF-Responsive Striatal Embryonic Progenitor Cell Produces Neurons and Astrocytes. *Neuroscience*. 12: 4565-4574.
- Rinkevich, B. 2005. Marine Invertebrate Cell Cultures: New Millennium Trends. *Marine Biotechnology*. 7: 429–439.

- Rosenthal, L., Diamant, A. 1990. IN VITRO PRIMARY CELL CULTURES FROM *PENAEUS SEMISULCATUS*. In Pathology in Marine Science. Perkins, F.O., Cheng, T.C. Academic Press. UK., 7-13.
- Sequeira, T., Tavares, D., Chaves, M.A. 1996. Evidence for circulating hemocyte proliferation in the shrimp *Penaeus japonicas*. Developmental & Comparative Immunology. 20: 97–104.
- Shimizu, C., Shike, H., Klimpel, K.R., Burns, J.C. 2001. HEMOLYMPH ANALYSIS AND EVALUATION OF NEWLY FORMULATED MEDIA FOR CULTURE OF SHRIMP CELLS (*PENAEUS STYLIROSTRIS*). Animal. 37:322-329.
- Slizhikova, D. K., Vinogradova, T. V., Sverdlov, E. D. 2005. The *NOLA2* and *RPS3A* Genes As Highly Informative Markers of Human Squamous Cell Carcinoma of Lung. Bioorganic Chemistry. 31: 178–182.
- Stein, A. 2007. Decreasing variability in your cell culture. BioTechniques. 42: 382-384.
- Suzuki, S., Takeshita, K., Asamoto, M., Takahashi, S., Kandori, H., Tsujimura, K., Saito, F., Masuko, K., Shirai T. 2009. High mobility group box associated with cell proliferation appears to play an important role in hepatocellular carcinogenesis in rats and humans. Toxicology. 255: 160–170.
- Tanfermin, J.D., Pudadera R. A. 1989. Ovarian maturation stages of the wild giant tiger prawn, *Penaeus monodon* Fabricius. Aquaculture. 77: 229–242.
- Tashiro, K., Sephel, G.C., Weeks, B., Sasakig, M., Martinn, G.R., Kleinman, H.K., Yamada, Y. 1989. A Synthetic Peptide Containing the IKVAV Sequence from the A Chain of Laminin Mediates Cell Attachment, Migration, and Neurite Outgrowth. BIOLOGICAL CHEMISTRY. 264: 16174-16182.
- Tinikul, Y., Poljaroen, J., Nurai, P., Anuracpreeda, P., Chotwiwatthanakun, C., Phoungpetchara, I., Kornthong, N., Poomtong T. 2011. Existence and distribution of gonadotropin-releasing hormone-like peptides in the central nervous system and ovary of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Cell and Tissue Research. 3: 579- 593.
- Toullec, J.Y. 1999. Crustacean primary cell culture: A technical approach. Cell Science. 21: 193–198.
- Tsukimura, B., Kamemoto, F.I. 1991. In vitro stimulation of oocytes by presumptive mandibular organ secretions in the shrimp, *Penaeus vannamei*. Aquaculture. 92, 1991: 59–66.

- Uawisetwathana, U., Leelatanawit,R., Klanchui, A., Prommoon, J., Klinbunga, S., Karoonuthaisiri, N.2011. Insights into Eyestalk Ablation Mechanism to Induce Ovarian Maturation in the Black Tiger Shrimp. *Plos One*. 6: 1-14.
- Uma, A., Prabhakar, T.G., Koteeswaran, A., Ravikumar, G. 2002. Establishment of Primary Cell Culture from Hepatopancreas of *Penaeus monodon* for the Study of White spot Syndrome Virus (WSSV). *Asian Fisheries Science* 15: 365-370.
- Wang, C.H., Yang, H.N., Tang, C.Y., Lul, C.H., Kou, G.H., Lo, C.F. 2000. Ultrastructure of white spot syndrome virus development in primary lymphoid organ cell cultures. *DISEASES OF AQUATIC ORGANISMS*. 41: 91-104.
- Wang, H., Cai, D., Li, K., Xu, H., Yang, L., Zhu, N. 2012. Effects of Different Calcium, Magnesium, and Zinc Concentrations Supplemented on Hepatopancreatic Cell Proliferation of Kuruma Prawn, *Penaeus japonicas*. *Biol Trace Elem Res*. 148:198–202.
- Wang, M., Hu, Y., Stearns, M.E. 2009. RPS2: a novel therapeutic target in prostate cancer. *Experimental & Clinical Cancer Research*. 28: 1-12.
- Wonglapsuwan, M., Miyazaki, T., Loongyai, W., Chotigeat, W. 2010. Characterization and Biological Activity of the Ribosomal Protein L10a of the White Shrimp: *Fenneropenaeus merguensis* De Man During Vitellogenesis. *Mar Biotechnol*. 12:230–240.
- Yamada, T., Minoura, K., Tanaka, R., Numata, A. 2007. Cell-adhesion Inhibitors Produced by a Sea Hare-derived *Periconia* sp. *Antibiot*. 60: 370–375.

ภาคผนวก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ สารละลายและบัฟเฟอร์

1. การเตรียมสารละลาย PBS, pH7.4 ปริมาตร 1 ลิตร

Na ₂ HPO ₄	1.44	กรัม
KH ₂ PO ₄	0.2	กรัม
NaCl	8.0	กรัม
KCl	0.2	กรัม

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 7.4 จากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที วางให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เก็บที่อุณหภูมิห้อง

2. การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ 2X-L15 medium, pH7.4 ปริมาตร 1 ลิตร

Leibovitz's L-15 Medium power	27.4	กรัม
1%D+glucose	10	กรัม
10%FBS	100	มิลลิลิตร
1X-antibiotic-antimycotic	10	มิลลิลิตร

ละลาย Leibovitz's L-15 Medium power และ D+glucose ในน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 7.4 เติม FBS จากนั้นนำไปกรองด้วยเมมเบรน 0.22 ไมโครเมตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. การเตรียมสารละลาย SS ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

450mM NaCl	2.63	กรัม
10mM KCl	0.075	กรัม
10mM EDTA	0.72	กรัม
10mM HEPES	0.26	กรัม

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร นำไปกรองด้วยเมมเบรน 0.22 ไมโครเมตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4. การเตรียมสารละลาย 1mg/ml collagenase typeV ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

ละลาย collagenase typeV 0.01 กรัม ในน้ำกลั่น เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

5. การเตรียมสารละลาย 12mM MTT solution ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ละลาย MTT powder 0.5 กรัม ใน PBS 10 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

6. การเตรียมสารละลาย 0.01M HCl ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

เติม hydrochloric 37% ปริมาตร 370 ไมโครลิตร ในน้ำกลั่น 9.63 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง

7. การเตรียมสารละลาย 0.1M SDS-HCl solution ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ละลาย SDS 1 กรัม ใน 0.01M HCl 10 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง

8. การเตรียมสารละลาย 1M H₂SO₄ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

เติม H₂SO₄ 95% ปริมาตร 1.03 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 8.93 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง

9. การเตรียมสารละลาย LB broth ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

Yeast extract 10 กรัม

Tryptone 10 กรัม

NaCl 5 กรัม

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที วางให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

10. การเตรียมสารละลาย 20mg/ml Kanamycin ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

ละลาย Kanamycin 0.02 กรัม ในน้ำที่ถูกล้างไอน์ออก (น้ำ Milli-Q) 1 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

11. การเตรียมสารละลาย 1M IPTG ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ละลาย IPTG 2.38 กรัม ในน้ำ Milli-Q 10 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

12. การเตรียมสารละลายสำหรับ SDS-PAGE**12.1. การเตรียม 4x-SDS sample buffer ปริมาตร 10 มิลลิลิตร**

100% glycerol 4 มิลลิลิตร

1M Tris-HCl, pH 6.8 2.4 มิลลิลิตร

SDS 0.8 กรัม

Bromophenol blue 0.004 กรัม

β-Mercaptoethanol 0.5 มิลลิลิตร

ละลาย Bromophenol blue ในน้ำกลั่น 3.1 มิลลิลิตร เติมสารที่เหลือทั้งหมด โดยผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

12.2. การเตรียม running buffer ปริมาตร 1 ลิตร

Tris-base 3.03 กรัม

Glycine 14.42 กรัม

SDS 0.1 กรัม

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร (ใช้ทันที)

12.3. การเตรียม Brilliant Coomassie Blue ปริมาตร 1 ลิตร

Coomassie brilliant blue R	2	กรัม
Methanol	525	มิลลิลิตร
Acetic acid	75	มิลลิลิตร

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง

12.4. การเตรียม 30%acrylamide-bis acrylamide

Acrylamide	29	กรัม
N'-N-Methylenebisacrymide	1	กรัม

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่น (ทำในตู้ดูดควัน) โดยให้ความร้อนอ่อนๆ จนสารละลายหมด ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง

12.5. การเตรียม 1.5M Tris-HCl, pH8.8 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ละลาย Tris-base 18.17 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับ pH ด้วย HCl เป็น 8.8 ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร นำไปนั่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที วางให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เก็บที่อุณหภูมิห้อง

12.6. การเตรียม 1.0M Tris-HCl, pH6.8 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ละลาย Tris-base 12.11 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับ pH ด้วย HCl เป็น 6.8 ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร นำไปนั่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที วางให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เก็บที่อุณหภูมิห้อง

12.7. การเตรียม 10%SDS ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ละลาย SDS 10 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง

12.8. การเตรียม 10%APS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

APS	1	กรัม
Distill water	10	มิลลิลิตร
ปริมาตรรวม	10	มิลลิลิตร

ละลาย APS 1 กรัม ในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

13. การเตรียมสารละลายสำหรับทำบริสุทธิ์ His-RPL10a

13.1 การเตรียม Binding buffer, pH8.0 ปริมาตร 1 ลิตร

300mM NaCl	17.54	กรัม
50mM NaH ₂ PO ₄	7.8	กรัม
20mM Immidazol	1.36	กรัม

ละลายสารทั้งหมดในน้ำ Milli-Q ปรับ pH เป็น 8.0 ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร นำไปกรองด้วยเมมเบรน 0.22 ไมโครเมตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที วางให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เก็บที่อุณหภูมิห้อง

13.2 การเตรียม Elution buffer, pH8.0 ปริมาตร 1 ลิตร

300mM NaCl	17.54	กรัม
50mM NaH ₂ PO ₄	7.8	กรัม
500mM Immidazol	34.04	กรัม

ละลายสารทั้งหมดในน้ำ Milli-Q ปรับ pH เป็น 8.0 ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร นำไปกรองด้วยเมมเบรน 0.22 ไมโครเมตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที วางให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เก็บที่อุณหภูมิห้อง

13.3 การเตรียม Dialysis buffer I, pH8.0 ปริมาตร 1 ลิตร

350mM NaCl	20.5	กรัม
50mM NaH ₂ PO ₄	7.8	กรัม
10% glycerol	7.9	มิลลิลิตร

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 8.0 ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที วางให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

13.4 การเตรียม Dialysis buffer II, pH8.0 ปริมาตร 1 ลิตร

350mM NaCl	20.5	กรัม
50mM NaH ₂ PO ₄	7.8	กรัม

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 8.0 ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที วางให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

14. การเตรียม Dialysis buffer, pH8.0 ปริมาตร 1 ลิตร สำหรับทำบริสุทธิ์ His-RPS3a

Tris-base	6.06	กรัม
NaCl	8.76	กรัม

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 8.0 ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที วางให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

15. การเตรียมสารละลายสำหรับ Lowery

15.1 การเตรียม CTC ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.1	กรัม
NaCO_3	2	กรัม
$\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$	1	กรัม

ละลายสารทั้งหมด ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

15.2 การเตรียม 5%SDS ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ละลาย SDS 5 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง

15.3 การเตรียม 0.8M NaOH ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ละลาย NaOH 3.2 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง

16. การเตรียมสารละลาย 0.2% Trypan blue ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ละลาย 0.4% Trypan blue 5 มิลลิลิตร ใน PBS 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เก็บที่อุณหภูมิห้อง

17. การเตรียมสารละลาย 20%ethanol ปริมาตร 1 ลิตร

เติม 100%ethanol 200 มิลลิลิตร ในน้ำ Milli-Q ปริมาตร 800 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง

18. การเตรียมสารละลาย 75% ethanol

เติม 95%ethanol 750 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น ปริมาตร 250 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

19. การเตรียมสารละลาย 0.5X-TAE buffer ปริมาตร 1 ลิตร

Tris-base	4.84	กรัม
0.5M EDTA	2.0	มิลลิลิตร
Acetic acid	1.142	มิลลิลิตร

ละลายสารทั้งหมด ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที วางให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เก็บที่อุณหภูมิห้อง

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล	นางสาวณัฐกานต์ จาตุรนต์ลักษณ์	
รหัสประจำตัวนักศึกษา	5510220172	
วุฒิการศึกษา		
วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2553