บทที่ 2

การผลิตเซลล์ไลน์จากปลากะพงขาว

บทคัดย่อ

ทดลองเพาะเลี้ยงเซลล์จากเนื้อเยื่อส่วนครีบหางและไตของปลากะพงขาว โดยวิธีตัดชิ้นส่วนเนื้อเยื่อให้มีขนาดเล็ก (mincing method) ในอาหารสังเคราะห์ต่างกัน 3 ชนิด ซึ่งมีปริมาณความเข้มข้นของเกลือแกง (NaCl) แตกต่างกัน พบว่าเซลล์จากเนื้อเยื่อส่วนไตของปลากะพงขาว (seabass kidney : SK) สามารถเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเซลล์ Leibovitze-15 ที่มีความเข้มข้นของเกลือแกง 8,000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรผสมรวมกับซีรัม 10 เปอร์เซ็นต์ บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ลักษณะของเซลล์ที่ได้มีรูปร่างเป็นเซลล์เยื่อบุผิว (epithelial-like cells) ซึ่งสามารถถ่ายเลี้ยงเซลล์ได้ 75 ครั้ง (passages) ในระยะเวลา 24 เดือน มีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 42 ไม่พบการปนเปื้อนของแบคทีเรีย เชื้อรา และไมโคพลาสมาในเซลล์ที่เพาะเลี้ยงได้ สามารถเก็บรักษาเซลล์ดังกล่าวที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส และไนโตรเจนเหลวได้เป็นเวลานานกว่า 24 เดือน โดยมีอัตรารอด 83.20 และ 74.50 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ จากการทดสอบการยอมรับเชื้อไวรัส 9 ชนิด พบว่าเซลล์ที่ผลิตได้สามารถยอมรับเชื้อ sand goby virus (SGV), chub reovirus (Chub), snake-head rhabdovirus (SHRV), red seabream iridovirus (RSIV), seabass iridovirus (SIV) และ grouper iridovirus-2 (GIV-2)

CHAPTER II

Establishment of Cell Line from Seabass, *Lates calcarifer* (Bloch)

Abstract

Primary cell culture from caudal fin and kidney of seabass (*Lates calcarifer* Bloch) using mincing method were cultured in three different media with various salt concentrations. Seabass kidney (SK) cells grew well in Leibovitze-15 medium containing 8,000 mg/l NaCl supplemented with 10 % fetal bovine serum at an optimum temperature of 25 ^{O}C. Over a period of 24 months, SK cells were subcultured more than 75 passages and exhibited epithelial-like cells. The chromosome number of SK cells was 42. The cells were found free from bacterial, fungal and mycoplasma contamination. Seabass cells were preserved at –80 ^{O}C and/or in liquid nitrogen (-196 ^{O}C) for at least 24 months with a survival rate of 83.20 and 74.50 %, respectively. Nine viruses were tested for their infectivity and this cell line was susceptible to sand goby virus (SGV), chub reovirus (Chub), snake-head rhabdovirus (SHRV), red seabream iridovirus (RSIV), seabass iridovirus (SIV) and grouper iridovirus-2 (GIV-2).

บทนำ

การเพาะเลี้ยงเซลล์ปลาในอาหารสังเคราะห์เพื่อใช้ประโยชน์ในการแยกเชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรคปลา เริ่มต้นมาเมื่อประมาณ 30 ปีที่ผ่านมา นับตั้งแต่ Wolf และ Quimby (1962) ประสบความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเซลล์ Rainbow trout gonad (RTG-2) ซึ่งได้นำมาใช้ในการแยกเชื้อไวรัสได้หลายชนิด ในปัจจุบันถึงแม้ว่าจะมีการผลิตเซลล์ปลาขึ้นมาอีกหลายชนิดแต่ส่วนใหญ่จะเป็นปลาในเขตหนาว เช่น ปลาแซลมอน ปลาเทร้า และปลาน้ำจืดอีกหลายชนิด (Wolf and Mann, 1980) แต่เซลล์ปลาที่ผลิตจากปลาทะเลยังมีน้อยมากและการเพิ่มจำนวนของไวรัสแต่ละชนิดค่อนข้างจะมีความจำเพาะเจาะจงกับชนิดของปลานอง ประกอบกับมีปริมาณการเพาะเลี้ยงปลาทะเลเพิ่มมากขึ้นอย่างรวดเร็วทำให้ปลาที่เลี้ยงไว้มีโอกาสเกิดโรคขึ้นได้ ดังนั้นเพื่อช่วยให้การตรวจหาเชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรคปลาดังกล่าวมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น การพัฒนาการเพาะเลี้ยงเซลล์จากปลาทะเลจึงมีความจำเป็นเพื่อใช้ในการศึกษาโรคไวรัสที่จะเกิดขึ้นทั้งในปัจจุบันและอนาคต

การศึกษาครั้งนี้เป็นการทดลองเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อจากส่วนครีบหาง และส่วนไตของปลากะพงขาว โดยการตัดชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อให้มีขนาดเล็ก และนำมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ 3 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้นของเกลือแกงที่แตกต่างกัน เพื่อให้ทราบชนิดของอาหารและระดับความเข้มข้นของเกลือแกงที่เหมาะสม สำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์และใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อของปลาทะเลชนิดอื่นๆในอนาคต ตลอดจนการศึกษาลักษณะและคุณสมบัติของเซลล์เนื้อเยื่อที่ผลิตได้ ซึ่งเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการใช้ประโยชน์จากเซลล์เนื้อเยื่อปลาดังกล่าวต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์จากปลากะพงขาว
2. เพื่อศึกษาลักษณะและคุณสมบัติของเซลล์ที่ผลิตได้จากปลากะพงขาว

วิธีการวิจัย

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

1. การเพาะเลี้ยงเซลล์ชั้นต้น (primary cell culture)

คัดเลือกลูกปลากะพงขาวที่มีสุขภาพดี ขนาดความยาวเฉลี่ย 2.0-3.0 เซนติเมตร จำนวน 3-5 ตัว นำมาทำความสะอาดบริเวณผิวลำตัวปลาด้วยสารละลายไอโอดีนความเข้มข้น 500 ส่วนในล้านส่วน (ppm) นาน 15 นาที ตัดส่วนครีบหาง (caudal fin) และไต (kidney) แช่ในสารละลาย PBS pH 7.4 ที่ผสมยาปฏิชีวนะเจนตามัยซิน 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 10 นาที ตัดออกเป็นชิ้นเล็กๆ ให้มีขนาดประมาณ 0.5-1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ลงไปเล็กน้อยและนำไปปลูกเลี้ยงในฟลาสต์ วางทิ้งไว้ 1-2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้เนื้อเยื่อเกาะติดกับพื้นฟลาสต์ จากนั้นจึงเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ลงไปฟลาสต์ละ 5 มิลลิลิตร สำหรับอาหารที่ใช้ในการทดสอบการเลี้ยงเซลล์ปลากะพงขาวมีด้วยกัน 3 ชนิดคือ MEM L-15 และ M-199 ซึ่งสูตรอาหารทั้ง 3 ชนิดจะถูกปรับให้มีระดับความเข้มข้นของเกลือแกงสุดท้ายเท่ากับ 8,000 9,000 และ 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากนั้นจึงผสมซีรัม 20 เปอร์เซ็นต์ และยาปฏิชีวนะเพนนิซิลลิน 200 IUต่อมิลลิลิตร สเตรพโตมัยซิน 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และแอมโฟเทอริซิน (amphotericin) 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ลงในอาหารทุกสูตรที่เตรียมไว้ บ่มเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 26-28 องศาเซลเซียส สังเกตดูการเจริญเติบโตของเซลล์ทุกๆ 2 วัน เมื่อเซลล์เจริญได้ประมาณ 60-70 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ผิวฟลาสต์ จึงทำการถ่ายเลี้ยงเซลล์ โดยการเติมสารละลายเอนไซม์ทริปซิน-อีดีทีเอ (trypsin-EDTA) ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงไปเพื่อย่อยเซลล์ให้หลุดออกจากกัน เซลล์ที่ย่อยได้เป็นเซลล์เดี่ยวๆ จะถูกแบ่งเป็น 2 ส่วน เพื่อนำไปเลี้ยงในฟลาสต์ใหม่ (อัตราการถ่ายเลี้ยงเซลล์เท่ากับ 1:2) เมื่อเซลล์เจริญเต็มพื้นฟลาสต์จะถ่ายเลี้ยงเซลล์ต่อไปจนถึงครั้งที่ 5 จึงลดปริมาณของซีรัมลงเหลือเพียง 10 เปอร์เซ็นต์

2. การศึกษาคุณสมบัติของเซลล์

2.1. อุณหภูมิที่เหมาะสมแก่การเจริญของเซลล์ (optimum temperature growth) ทำการศึกษาความสามารถในการเจริญของเซลล์ระหว่างการถ่ายเลี้ยงเซลล์ครั้งที่ 45 ที่ระดับอุณหภูมิต่างๆ กัน

คือ 15, 20, 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส ชุดละ 2 ซ้ำ โดยทำการตรวจนับปริมาณเซลล์ด้วยสไลด์นับเม็ดเลือด (hemacytometer) ทุกๆ วัน ตลอดระยะเวลาการทดลอง 7 วัน โดยกำหนดให้ปริมาณเซลล์เริ่มต้นของแต่ละฟลาสต์เท่ากับ 1.0×10^6 เซลล์ต่ออาหารเลี้ยงเซลล์ 5 มิลลิลิตร

2.2. จำนวนโครโมโซม (number of chromosome) ทำการเตรียมตัวอย่างเซลล์ เพื่อนับจำนวนโครโมโซม ในการเลี้ยงเซลล์ครั้งที่ 45 และ 75 ตามวิธีการของ Earley (1975) โดยการเติมสารโคลชิซิน (colchicine) ลงในฟลาสต์ที่เลี้ยงเซลล์ไว้แล้ว 22 ชั่วโมง ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25-26 องศาเซลเซียส ตรวจนับจำนวนโครโมโซมของเซลล์ปลากะพงขาวที่ผลิตได้ ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบเฟสคอนทรัสต์ (phase contrast microscope)

2.3. การยอมรับเชื้อไวรัสของเซลล์ปลากะพงขาว (viral susceptibility test) ทดสอบความสามารถในการยอมรับเชื้อไวรัสของเซลล์ปลากะพงขาว ในระหว่างการเลี้ยงเซลล์ครั้งที่ 75 โดยใช้เชื้อไวรัส ดังตารางที่ 8

โดยเลี้ยงเซลล์ปลากะพงขาวที่เพาะเลี้ยงได้และเซลล์ที่มีความเฉพาะเจาะจงกับไวรัสชนิดนั้นๆ อย่างละครึ่งในถาดหลุมขนาดเล็ก (96 well plate) บ่มเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 25-26 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แล้วจึงหยดสารละลายไวรัสซึ่งถูกเจือจางครั้งละ 10 เท่าในสารละลาย HBSS ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรต่อหลุม จำนวน 4 ซ้ำในแต่ละระดับความเข้มข้น บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25-26 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 14 วัน ตรวจเช็คและคำนวณค่าไตเตอร์จากระดับความเข้มข้นสุดท้ายที่เชื้อไวรัสสามารถเข้าทำลายเซลล์ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ต่อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ($TCID_{50}$/ml) (Rovozzo and Burke, 1973) ตามวิธีการของ Reed และ Muench (1938)

2.4. การทดสอบการปนเปื้อน (sterility test) ทดสอบการปนเปื้อนของเชื้อรา แบคทีเรีย ตามวิธีการของจิราพร เกษรจันทร์ และคณะ (2531) ในเซลล์ปลากะพงขาวระหว่างการถ่ายเลี้ยงเซลล์ครั้งที่ 45 โดยนำเซลล์ปลากะพงขาวซึ่งเลี้ยงในอาหารเลี้ยงที่ไม่ผสมยาปฏิชีวนะมาแล้วไม่น้อยกว่า 5 ครั้ง ลอกเซลล์ออกจากฟลาสต์ นำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทริปติกซอยอากา (tryptic soy agar) และอาหารเลี้ยงเชื้อราโพเทโตเดกโทรสอากา (potato dextrose agar) บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จึงทำการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อทั้งสองชนิด สำหรับการตรวจสอบการปนเปื้อนของไมโคพลาสมา (mycoplasma) ใช้เทคนิคการย้อมด้วยสารเรืองแสงบิสเบนซาไมล์ (bisbenzamide) ตามวิธีการของ Cheng (1975) และตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ (fluorescent microscope)

ตารางที่ 8 ไวรัสที่ใช้ในการทดสอบการยอมรับเชื้อไวรัสของเซลล์จากปลากะพงขาว

Viruses	Designation	Source
Rhabdovirus	SHRV	Kasornchandra และคณะ (1991)
snake-head rhabdovirus		
Birnavirus		
infectious pancreatic necrosis virus	IPNV	Wattanavijarn และคณะ (1988)
sand goby virus	SGV	Hedrick และคณะ (1986)
Herpesvirus		
channel catfish virus	CCV	Fijan และคณะ (1970)
Reovirus		
chub reovirus	Chub	Ahne และ Holbl (1988)
Iridovirus		
red sea bream iridovirus	RSIV	Nakajima และ Sorimachi (1994)
sea bass iridovirus	SIV	เรวัตร คงประดิษฐ์ และจิราพร เกษรจันทร์ (2539)
grouper iridovirus (black fin disease)	GIV-1	จิราพร เกษรจันทร์ และเรวัตร คงประดิษฐ์ (2539)
grouper iridovirus (blister disease)	GIV-2	เรวัตร คงประดิษฐ์ และคณะ (2540)

2.5. การทดสอบการเก็บรักษาเซลล์ (storage test) ในระหว่างการถ่ายเลี้ยงเซลล์ครั้งที่ 75 ทำการเตรียมเซลล์อายุ 24 ชั่วโมง ย่อยเซลล์ให้หลุดออกจากกันด้วยสารละลายทริปซินความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปรับความเข้มข้นของเซลล์ประมาณ 2.5-4.0 x10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ด้วยอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ เติมสารไดเมธิลซัลโฟไซด์ (dimethylsulphoxide : DMSO) ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) แบ่งใส่หลอดพลาสติกความจุ 1 มิลลิลิตรจำนวน 26 หลอด นำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ –80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างเพื่อตรวจสอบอัตรารอดเฉลี่ยอีกครั้ง (2 ซ้ำ) ก่อนแยกเป็น 2 ชุด เพื่อแยกเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส (ในโตรเจนเหลว) นำเซลล์ที่เก็บรักษาไว้มาตรวจสอบอัตรารอดทุก 4 เดือน เป็นเวลา 24 เดือน

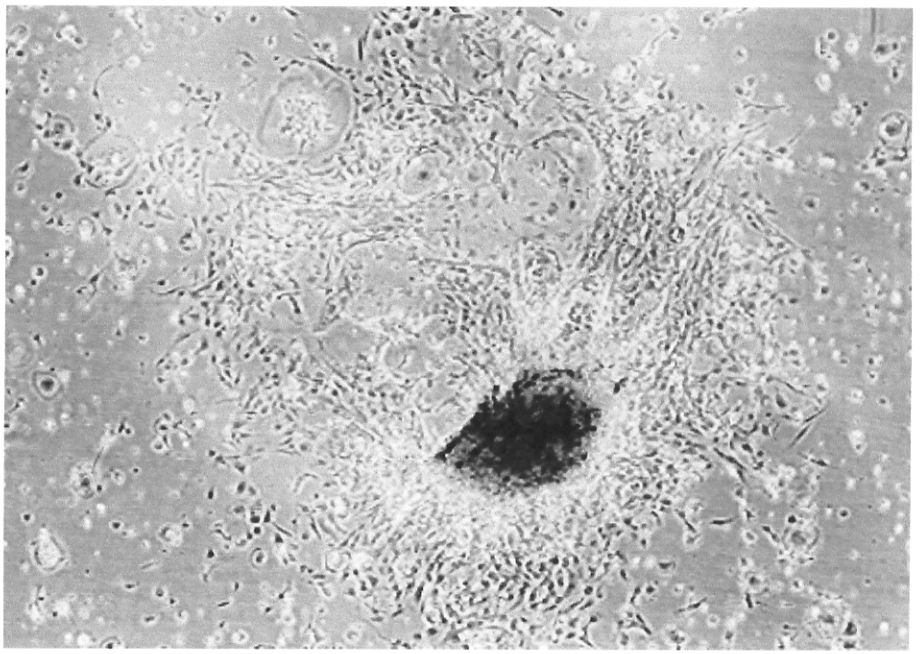
การตรวจสอบอัตรารอด นำเซลล์มาหลอมละลายในน้ำอุ่น (30-35 องศาเซลเซียส) เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ตกตะกอนที่ความเร็ว 400 x g เป็นเวลา 5 นาที ผสมตะกอนเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ 5 มิลลิลิตรเพื่อให้เซลล์กระจายอย่างทั่วถึง ก่อนนำไปเลี้ยงในฟลาสต์ โดยแบ่งสารละลาย 0.5 มิลลิลิตร ย้อมด้วยสารละลายทริพเพนบลู (trypen blue) ความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ อัตราส่วน 1:1 นาน 5 นาที นับด้วยสไลด์นับเม็ดเลือดเพื่อคำนวณอัตราการเจริญกลับคืนของเซลล์ (recovery rate)

ผลการวิจัย

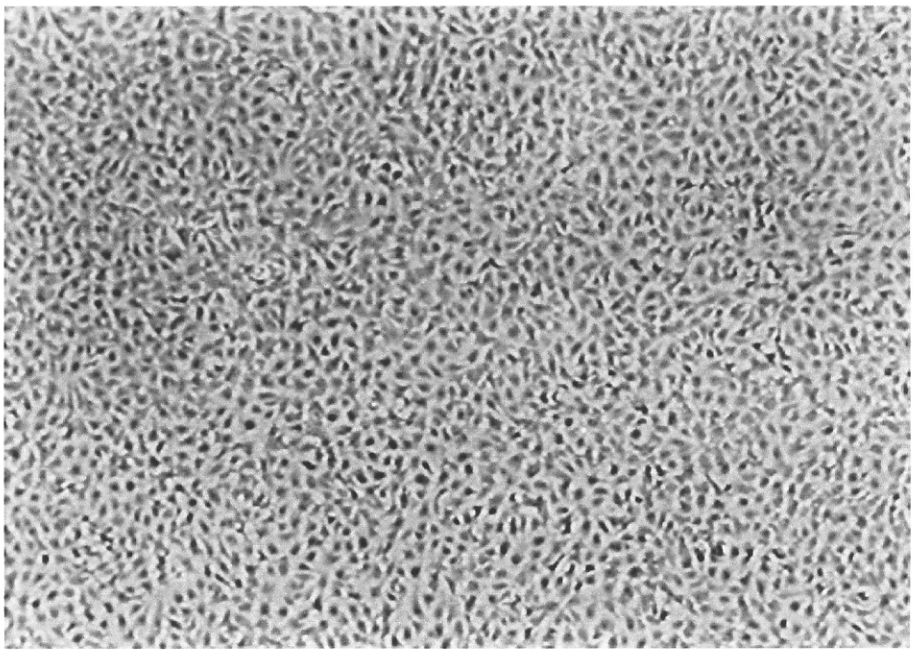
1. การผลิตเซลล์ชั้นต้น (primary cell culture)

จากการทดลองเพาะเลี้ยงเซลล์จากเนื้อเยื่อส่วนครีบหางและไต ของปลากะพงขาวในอาหารเลี้ยงเซลล์ 3 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้นของเกลือแกงแตกต่างกัน ปรากฏว่าเซลล์จากส่วนไตมีลักษณะเป็นเซลล์เยื่อบุผิว (epithelial-like cells) (รูปที่ 4) สามารถเจริญได้ดีที่สุดในอาหารเลี้ยงเซลล์ L-15 สามารถถ่ายเลี้ยงเซลล์ครั้งแรกได้ในสัปดาห์ที่ 2 และถ่ายเลี้ยงเซลล์ต่อเนื่องได้มากกว่า 75 ครั้งในระยะเวลา 24 เดือน (รูปที่ 5) ส่วนเซลล์ที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM และ M-199 สามารถเจริญได้เช่นเดียวกัน แต่ช้ากว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ L-15 และในการถ่ายเลี้ยงเซลล์ครั้งที่ 3 เซลล์ที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ M-199 เกิดการเปลี่ยนแปลงและตายไปในที่สุด ขณะที่เซลล์ซึ่งเลี้ยงด้วยอาหาร MEM จะเริ่มเปลี่ยนแปลงลักษณะและตายเช่นเดียวกัน ในการถ่ายเลี้ยงเซลล์ครั้งที่ 5

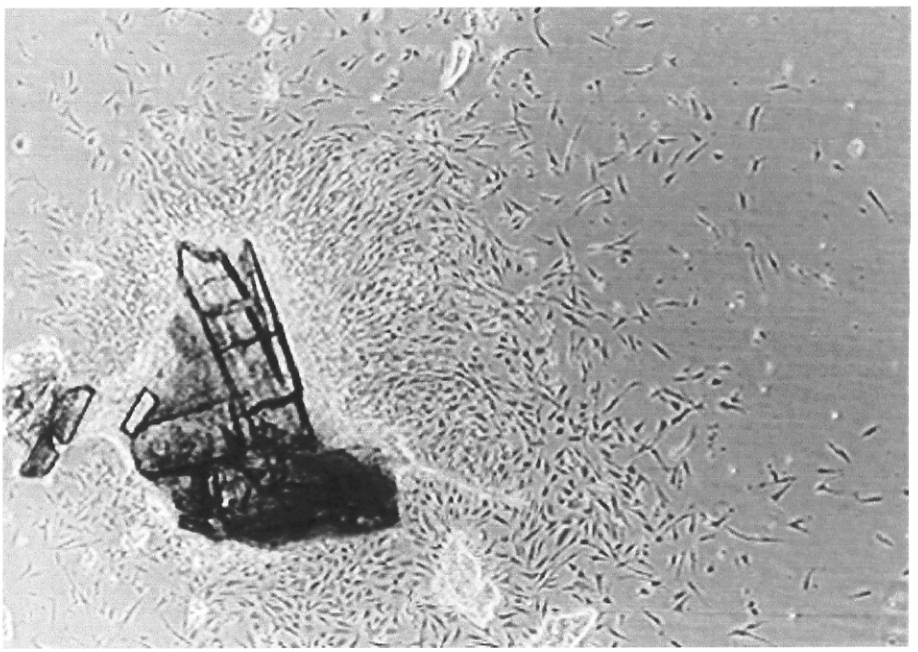
สำหรับเซลล์จากเนื้อเยื่อส่วนครีบหางมีลักษณะเป็นเซลล์รูปกระสวย (fibroblastic-like cells) (รูปที่ 6) สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเซลล์ทั้ง 3 ชนิด แต่เจริญได้ช้ากว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์จากเนื้อเยื่อส่วนไต โดยในการถ่ายเลี้ยงเซลล์ครั้งที่ 12 เซลล์ที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ L-15 เริ่มชะงักการเจริญเติบโตและตายในที่สุด ส่วนเซลล์ที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM และ M-199 อ่อนแอและตายระหว่างการถ่ายเลี้ยงในครั้งที่ 3 และ 1 ตามลำดับ ซึ่งได้ทำการเปรียบเทียบการเจริญของเซลล์ดังกล่าว ดังแสดงใน ตารางที่ 9 เมื่อเปรียบเทียบผลของความเข้มข้นเกลือแกง พบว่าไม่มีความแตกต่างกันในระดับความเข้มข้นของเกลือแกงทั้ง 3 ระดับ แสดงให้เห็นว่าอาหารเลี้ยงเซลล์โดยทั่วไป ซึ่งมีส่วนผสมของเกลือแกง 8,000 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถใช้เลี้ยงเซลล์ปลากะพงขาวได้ โดยไม่มีความจำเป็นต้องเสริมเกลือแกงในอาหารเลี้ยงเซลล์อีก



รูปที่ 4 ลักษณะของเซลล์เยื่อบุผิวที่เจริญออกมาจากเนื้อเยื่อส่วนไตของปลากะพงขาว ภายหลังการบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25-26 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง (250X)



รูปที่ 5 ลักษณะของเซลล์เยื่อบุผิวที่เจริญจากเนื้อเยื่อส่วนไตของปลากะพงขาว ภายหลังการถ่ายเลี้ยงเซลล์ครั้งที่ 75 (420X)



รูปที่ 6 ลักษณะของเซลล์รูปกระสวยที่เจริญจากเนื้อเยื่อส่วนครีบหางของปลากะพงขาว ภายหลังการบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25-26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง (250X)

ตารางที่ 9 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเซลล์ชั้นต้นจากส่วนของครีบหางและส่วนไตของปลากะพงขาวในอาหารสังเคราะห์ 3 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้นของเกลือแกงต่างกัน

Medium	NaCl concentration (mg/L)	Organs	
		Caudal fin	Kidney
L-15	8,000	++[b]	+++[c]
	9,000	++	+++
	10,000	++	+++
MEM	8,000	+[a]	++
	9,000	+	++
	10,000	+	++
M-199	8,000	+	+
	9,000	+	+
	10,000	+	+

[a] สามารถถ่ายเลี้ยงเซลล์ได้ 1-3 ครั้ง

[b] สามารถถ่ายเลี้ยงเซลล์ได้ 4-12 ครั้ง

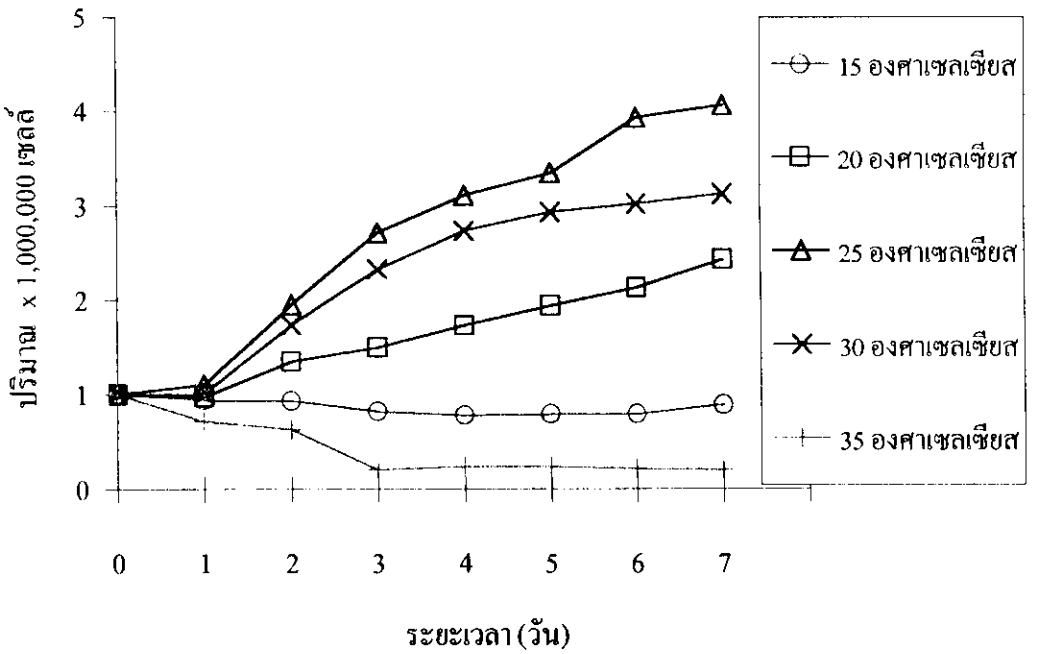
[c] สามารถถ่ายเลี้ยงเซลล์ได้ >12 ครั้ง

2. การศึกษาคุณสมบัติของเซลล์

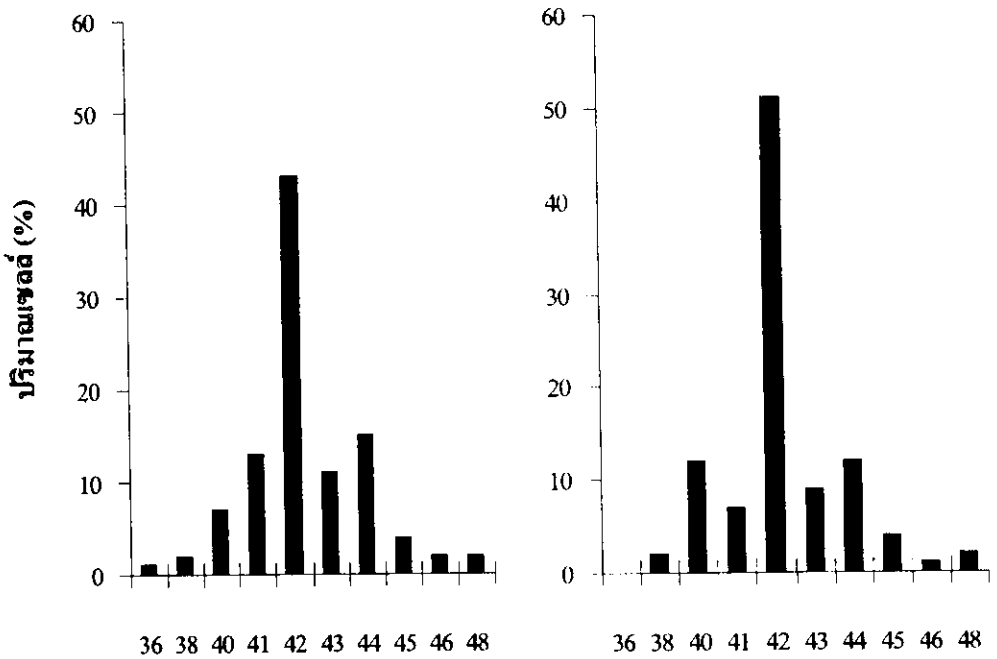
เซลล์จากส่วนไตปลากะพงขาว สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส แต่จะสามารถเจริญได้ดีที่สุดที่ระดับอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (รูปที่ 7) และเมื่อทำการตรวจนับจำนวนโครโมโซม พบว่าในการถ่ายเลี้ยงเซลล์ครั้งที่ 45 จำนวนของโครโมโซมมีการกระจายตัวอยู่ในช่วง 36-48 แต่เซลล์ส่วนใหญ่ประมาณ 43 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนโครโมโซม = 42 เช่นเดียวกันกับในการถ่ายเลี้ยงเซลล์ครั้งที่ 75 ซึ่งเซลล์ส่วนใหญ่ประมาณ 51 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนโครโมโซม = 42 (รูปที่ 8)

จากการทดสอบการยอมรับเชื้อไวรัส 9 ชนิด พบว่าเซลล์จากไตปลากะพงขาว ภายหลังการถ่ายเลี้ยงเซลล์ในครั้งที่ 75 สามารถยอมรับเชื้อ SHRV, SGV, Chub, RSIV, GIV-2 และเชื้อ SIV ได้เป็นอย่างดี ดังตารางที่ 10 โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อ SIV ซึ่งแยกได้จากลูกปลากะพงขาวโดยใช้เซลล์ที่ผลิตได้ในครั้งนี้เป็นครั้งแรก สามารถสังเกตพบการเปลี่ยนแปลงของเซลล์หลังการติดเชื้อ (cytopathic effect : CPE) ใน 3 วัน หลังการบ่มเลี้ยง (รูปที่ 9) และเมื่อนำเซลล์ดังกล่าวมาทำการศึกษาเพิ่มเติมด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน พบอนุภาคไวรัสซึ่งมีรูปทรงแบบหลายเหลี่ยม (icosahedral) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของนิวคลีโอแคปซิด (nucleocapsid) ประมาณ 140-160 นาโนเมตร กระจายอยู่ภายในเซลล์เป็นจำนวนมาก (รูปที่ 10) แสดงให้เห็นว่าเซลล์ดังกล่าวสามารถใช้ในการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสซึ่งแยกได้จากลูกปลากะพงขาวที่เป็นโรคได้เป็นอย่างดี และจากการตรวจสอบเซลล์ไตปลากะพงขาว ไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา และเชื้อไมโคพลาสมา (รูปที่ 11) ในเซลล์เนื้อเยื่อปลากะพงขาวที่ผลิตได้

สำหรับการทดสอบการเก็บรักษาเซลล์เนื้อเยื่อจากส่วนไตของปลากะพงขาวภายหลังการถ่ายเลี้ยงเซลล์ครั้งที่ 75 ในระดับอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส โดยทำการตรวจสอบอัตรารอด ทุก 4 เดือน เป็นเวลานาน 24 เดือน พบว่าเซลล์ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ –196 องศาเซลเซียส มีอัตรารอดสูงกว่าในช่วง 12 เดือนแรก และลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงเดือนที่ 16-24 ในขณะที่เซลล์ซึ่งเก็บรักษาที่อุณหภูมิ –80 องศาเซลเซียส มีอัตรารอดลดลงอย่างสม่ำเสมอ แต่มีอัตรารอดสูงกว่าเมื่อเก็บรักษาเป็นเวลาครบ 24 เดือน อย่างไรก็ตามทั้ง 2 ระดับอุณหภูมิมีความเหมาะสมและสามารถใช้ในการเก็บรักษาเซลล์ได้เป็นอย่างดี ซึ่งจากการตรวจสอบภายหลังการเก็บรักษาที่ระดับอุณหภูมิต่ำ -80 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 เดือน พบว่าเซลล์มีอัตรารอดครั้งสุดท้ายเท่ากับ 83.20 และ 74.50 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (รูปที่ 12)



รูปที่ 7 การเจริญเติบโตของเซลล์จากส่วนไตของปลากะพงขาว ที่อุณหภูมิต่างกัน 5 ระดับ คือ 15, 20, 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส

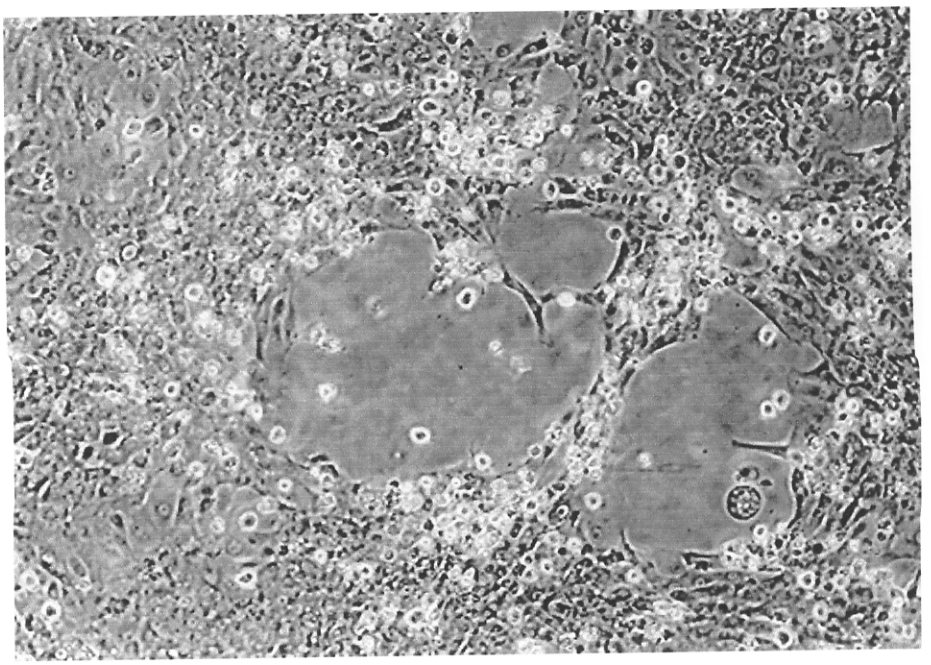


(ก) การถ่ายเลี้ยงเซลล์ครั้งที่ 45 (ข) การถ่ายเลี้ยงเซลล์ครั้งที่ 75

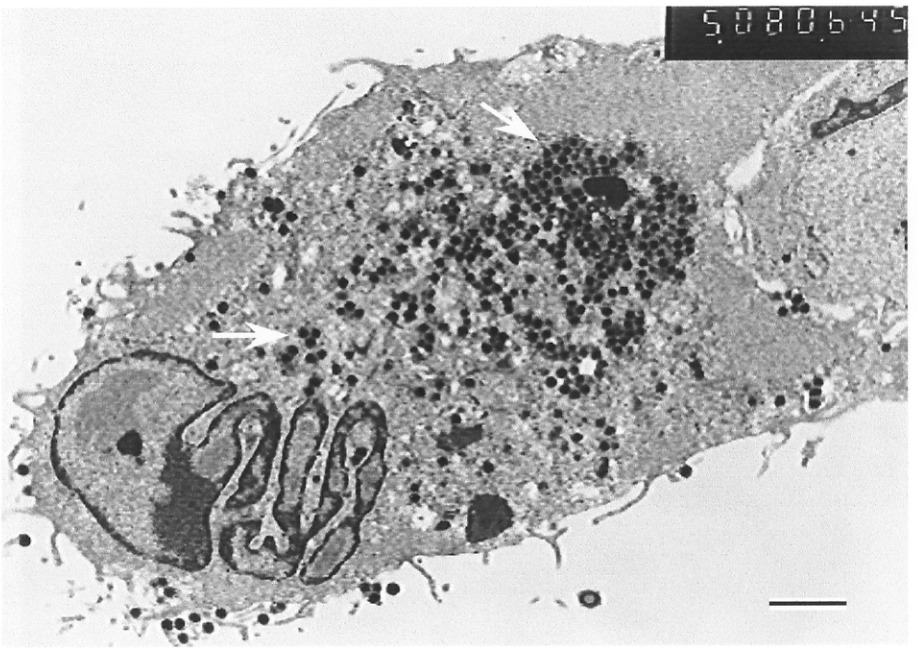
รูปที่ 8 จำนวนโครโมโซมของเซลล์จากส่วนไตของปลากะพงขาว

ตารางที่ 10 ผลการทดสอบการยอมรับเชื้อไวรัส 9 ชนิด ของเซลล์จากส่วนไตของปลากะพงขาว ในการถ่ายเลี้ยงเซลล์ครั้งที่ 75 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน

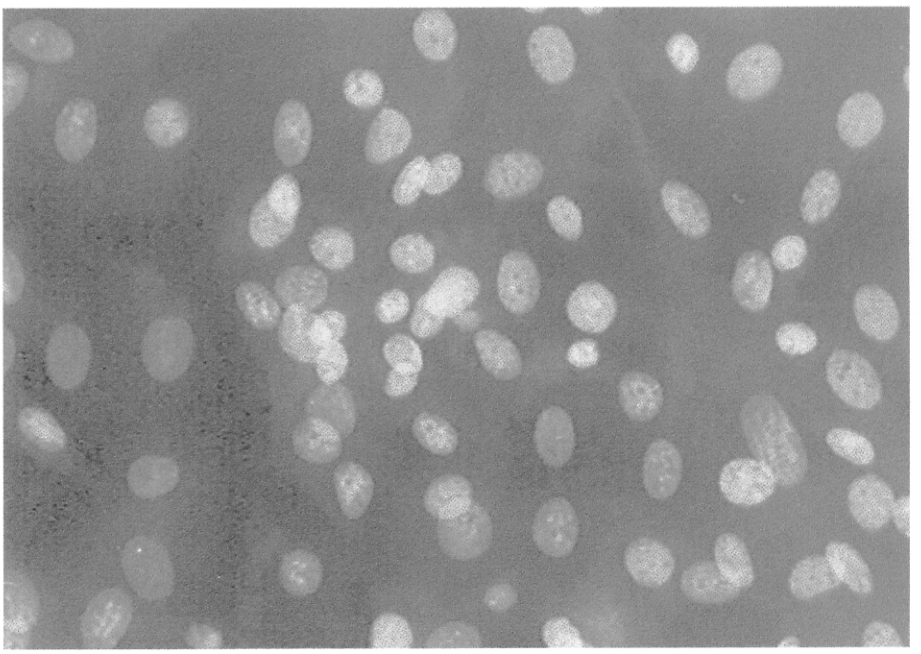
Viruses	Permissible cell line and log $TCID_{50}$/ml of virus		Susceptibility of SK and log $TCID_{50}$/ml of virus
SHRV	EPC	5.33	3.66
IPNV	BF-2	6.33	< 2
SGV	BF-2	5.66	2.66
CCV	CCO	5.33	< 2
Chub	BF-2	5.66	3.33
RSIV	BF-2	3.33	7.50
SIV	SK	5.33	5.33
GIV-1	GF	4.33	< 2
GIV-2	GF	7.33	3.50



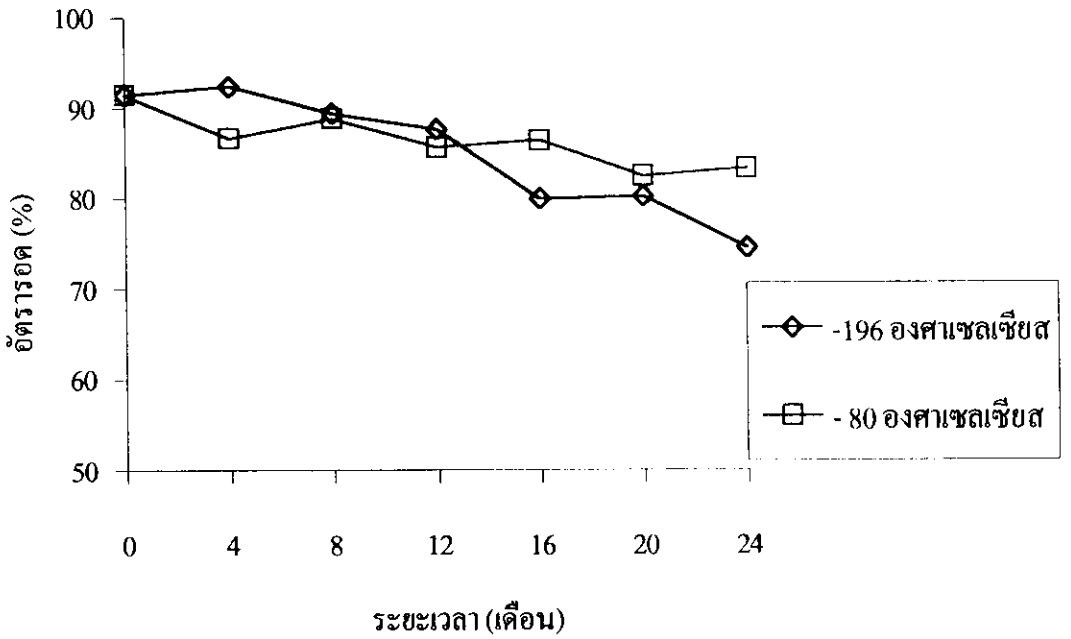
รูปที่ 9 ลักษณะของเซลล์จากส่วนไตปลากะพงขาวที่ถูกเชื้อไวรัส SIV เข้าทำลาย (CPE) ทำให้เซลล์มีลักษณะบวมและหลุดออกจากพื้นฟลาสต์ ภายหลังการบ่มเลี้ยง 3 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (630X)



รูปที่ 10 ลักษณะของเชื้อไวรัส SIV (ลูกศรชี้) ซึ่งเพิ่มจำนวนในเซลล์จากไตปลากะพงขาว เมื่อตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาคประมาณ 140-160 นาโนเมตร (Uranyl acetate & Lead citrate ; Bar = 1.5 ไมโครเมตร)



รูปที่ 11 ลักษณะของเซลล์ปลากะพงขาวที่ปราศจากการปนเปื้อนของไมโคพลาสมา ซึ่งไม่พบการเรืองแสงของไมโคพลาสมาบริเวณไซโตพลาสซึมของเซลล์ เมื่อย้อมด้วยสารเรืองแสงบิสเบนซาไมล์และตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ (1,680X)



รูปที่ 12 อัตรารอดของเซลล์ไตปลากะพงขาวหลังการถ่ายเลี้ยงเซลล์ครั้งที่ 75 ภายหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ –80 องศาเซลเซียสและไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ –196 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 เดือน

วิจารณ์และสรุป

นับได้ว่าการทดลองเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อปลากะพงขาวในครั้งนี้ประสบความสำเร็จเป็นอย่างยิ่ง โดยสามารถผลิตเซลล์ไลน์จากเนื้อเยื่อส่วนไตปลากะพงขาว ซึ่งมีรูปร่างคล้ายเซลล์เยื่อบุผิว สามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหารสังเคราะห์ L-15 ซึ่งมีส่วนผสมของซีรัม 10 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับอุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส และสามารถถ่ายเลี้ยงเซลล์ในอาหารสังเคราะห์ได้มากกว่า 75 ครั้ง ในระยะเวลา 24 เดือน ซึ่งสามารถยอมรับได้ว่าเป็นเซลล์ไลน์ (Bowser and Plumb, 1980 ; Noga and Hartmann, 1981) และให้ชื่อเซลล์ที่ทำการเพาะเลี้ยงได้ในครั้งนี้ว่า "seabass kidney" โดยมีชื่อย่อว่า SK

จากการทดลองเพาะเลี้ยงเซลล์ปลากะพงขาวจากอวัยวะ 2 ส่วน คือส่วนไต และส่วนครีบหาง พบว่าเซลล์จากส่วนไต มีรูปร่างคล้ายเซลล์เยื่อบุผิว สามารถเจริญเติบโตได้รวดเร็วกว่าเซลล์ครีบหาง ซึ่งมีรูปร่างแบบเซลล์รูปกระสวย และสามารถถ่ายเลี้ยงเซลล์ได้เพียง 12 ครั้ง ก่อนชะงักการเจริญเติบโตและตายในที่สุด เช่นเดียวกับ กิจการ ศุภมาตย์ และคณะ (2530) ซึ่งได้ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์จากส่วนครีบหางปลากะพงขาว และพบว่าสามารถถ่ายเลี้ยงเซลล์ดังกล่าวได้เพียง 16 ครั้งก่อนที่เซลล์จะตาย โดยไม่พบการปนเปื้อนจากเชื้อราและแบคทีเรีย

สำหรับการทดลองเปรียบเทียบอาหารเลี้ยงเซลล์สังเคราะห์ทั้ง 3 ชนิด ต่อการเจริญของเซลล์เนื้อเยื่อของปลากะพงขาวนั้น พบว่าอาหารเลี้ยงเซลล์ L-15 ให้ผลดีที่สุด เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบองค์ประกอบของสารอาหารที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์สังเคราะห์ L-15 กับ MEM และ M-199 พบว่ามีความแตกต่างของชนิดน้ำตาล กล่าวคืออาหารเลี้ยงเซลล์ L-15 มีน้ำตาล D-galactose เป็นองค์ประกอบ ส่วนในอาหาร MEM และ M-199 เป็นน้ำตาล D-glucose ส่วนอีกปัจจัยหนึ่งซึ่งส่งผลให้เซลล์มีการเจริญแตกต่างกันก็คือ ความสามารถในการช่วยคงสภาพ pH ซึ่งอาหารเลี้ยงเซลล์ L-15 สามารถช่วยคงสภาพความเป็นกรดเป็นด่างได้ดีกว่าในสภาพบรรยากาศปกติ (กิจการ ศุภมาตย์ และคณะ, 2530) ถึงแม้ว่าอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM จะได้รับความนิยมในการเลี้ยงเซลล์ปลาหลายชนิด (Lannan *et al.*, 1984 ; Nicholson *et al.*, 1987) แต่ผลจากการทดลองเลี้ยงเซลล์ปลากะพงขาวในครั้งนี้ พบว่าอาหารเลี้ยงเซลล์ L-15 จะให้ผลในการเจริญของเซลล์ดีกว่า ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Chen และ Kou (1987) ; จิราพร เกษรจันทร์ และเรวัตร คงประดิษฐ์ (2537) ซึ่งพบว่าเซลล์ปลาในเขตร้อนจะเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเซลล์ L-15 ถึงแม้ปลากะพงขาวจะเป็นปลาที่เลี้ยงได้ทั้งในน้ำจืดและน้ำเค็ม แต่การเพาะเลี้ยงเซลล์ก็ไม่มีความจำเป็นที่จะต้องเพิ่มปริมาณเกลือแกงลงไปอีก

จากที่มีอยู่เดิม ซึ่งโดยทั่วไปอาหารสังเคราะห์จะมีปริมาณของเกลือแกงผสมอยู่ 8,000 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ก็มีปริมาณเพียงพอสำหรับการเจริญเติบโตของเซลล์เนื้อเยื่อปลาทะเล ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ กิจการ ศุภมาตย์ และคณะ (2530) ; Nicholson และคณะ (1987) ; Meguro และคณะ (1991) ; Fernandez และคณะ (1993) ; จิราพร เกษรจันทร์ และเรวัตร คงประดิษฐ์ (2537) ; เรวัตร คงประดิษฐ์ และคณะ (2538) ซึ่งรายงานไว้เช่นเดียวกัน

การศึกษาคุณสมบัติของเซลล์นับเป็นสิ่งสำคัญในการนำเซลล์ไลน์ที่ผลิตได้มาประยุกต์ใช้ได้อย่างถูกต้องเหมาะสมและเกิดประโยชน์สูงสุด ซึ่งเซลล์ SK ที่ผลิตได้ในครั้งนี้สามารถเจริญและเพิ่มจำนวนได้ที่ช่วงอุณหภูมิ 20-30 องศาเซลเซียส จึงเหมาะอย่างยิ่งสำหรับการศึกษาเชื้อไวรัส โดยเฉพาะอย่างยิ่งพื้นที่เขตร้อน ซึ่งผลการทดสอบประสิทธิภาพในการยอมรับเชื้อไวรัส พบว่าเซลล์ SK สามารถยอมรับเชื้อไวรัสได้ถึง 6 ชนิด ได้แก่ SHRV, SGV, Chub, RSIV, SIV และ GIV-2 จากจำนวนเชื้อไวรัสที่ทำการทดสอบ 9 ชนิด และเป็นเชื้อที่พบการระบาดในปลาเขตร้อนทั้งพื้นที่น้ำจืดและน้ำเค็ม ประการสำคัญเซลล์ SK สามารถแยกเชื้อไวรัส SIV ซึ่งเป็นสาเหตุการตายของลูกปลากะพงขาวในโรงเพาะฟัก (เรวัตร คงประดิษฐ์ และคณะ, 2539) เชื้อไวรัสดังกล่าวสร้างความเสียหายต่อธุรกิจการผลิตลูกพันธุ์ปลากะพงขาวเพื่อการส่งออก และธุรกิจการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งของไทยอย่างต่อเนื่อง (นิเวศน์ เรืองพานิชย์ และเจนจิต คงกำเนิด, 2535)

ส่วนคุณสมบัติอื่นๆ ของเซลล์ที่ผลิตได้ เช่น จำนวนโครโมโซม ซึ่งพบว่าเซลล์ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของจำนวนชุดของโครโมโซม แม้จะถูกถ่ายเลี้ยงด้วยอาหารสังเคราะห์ถึง 75 ครั้ง แสดงให้เห็นว่าเซลล์ที่ผลิตได้มีคุณสมบัติคงเดิมและเหมาะสมอย่างยิ่งในการใช้เป็นตัวแทนของปลากะพงขาวในการศึกษาทดลองต่อไป นอกจากนี้จำนวนโครโมโซมยังสามารถใช้ในการจำแนกชนิด เพื่อป้องกันการปนเปื้อนระหว่างเซลล์แต่ละชนิดในห้องปฏิบัติการได้อีกทางหนึ่ง เช่นเดียวกับการทดสอบการปนเปื้อนซึ่งการทดลองก็แสดงให้เห็นว่าเซลล์ที่ผลิตได้ไม่มีการปนเปื้อนของแบคทีเรีย เชื้อรา และไมโคพลาสมาแอบแฝงอยู่ ซึ่งเชื้อดังกล่าวอาจทำให้คุณสมบัติของเซลล์เปลี่ยนแปลงไปและส่งผลกระทบต่อการใช้ประโยชน์จากเซลล์ที่ผลิตได้ในอนาคต

สำหรับการศึกษาเปรียบเทียบเทคนิคการเก็บรักษาเซลล์เนื้อเยื่อโดยวิธีการเติมสารไดเมธิลซัลโฟไซด์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับอุณหภูมิต่างกัน คือ การแช่แข็งที่อุณหภูมิ –80 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ –196 องศาเซลเซียส ภายหลังการเก็บรักษานานถึง 2 ปี พบว่ามีอัตรารอด 83.20 และ 74.50 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ –80 องศาเซลเซียสมีอัตรารอดสูงกว่าเมื่อเก็บรักษาเป็นเวลานาน ประกอบกับการดูแลจัดการทำได้ง่ายและสะดวกกว่า เนื่องจากการเก็บที่อุณหภูมิ –196 องศาเซลเซียสจะต้องหมั่นตรวจสอบปริมาณและเติม

สารในโตรเจนเหลวอยู่เสมอ อย่างไรก็ตามทั้งสองวิธีดังกล่าวสามารถใช้ในการเก็บรักษาเซลล์เนื้อเยื่อได้เป็นอย่างดี ซึ่งจะเกิดประโยชน์ต่อการดูแลและการบริหารจัดการคลังเซลล์สัตว์น้ำในอนาคต เช่น ป้องกันการปนเปื้อน การเก็บสำรองเซลล์ ตลอดจนเป็นการลดต้นทุนการดูแลจัดการเมื่อไม่มีความจำเป็นในการใช้ประโยชน์จากเซลล์เนื้อเยื่อดังกล่าว เป็นต้น

ผลของการศึกษาในครั้งนี้มีความสำเร็จในการผลิตเซลล์ไลน์จากปลากะพงขาว สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้ยังสามารถใช้ในการแยกเชื้อและการศึกษาคุณลักษณะของเชื้อไวรัสซึ่งเป็นสาเหตุของโรคในสัตว์น้ำ รวมถึงการนำไปใช้ประโยชน์อื่นๆในอนาคต เช่น การผลิตแอนติซีรัม สำหรับการตรวจวินิจฉัยโรค (Ahne, 1981 อ้างโดย จิราพร เกษรจันทร์ และคณะ, 2531) การผลิตวัคซีนป้องกันโรคและการศึกษาความเป็นพิษของสารต่อสิ่งมีชีวิต (toxicity) เป็นต้น ซึ่งจะได้กล่าวถึงการนำเซลล์เนื้อเยื่อของปลากะพงขาวที่เพาะเลี้ยงได้มาประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์แก่การศึกษาโรคไวรัสต่อไป