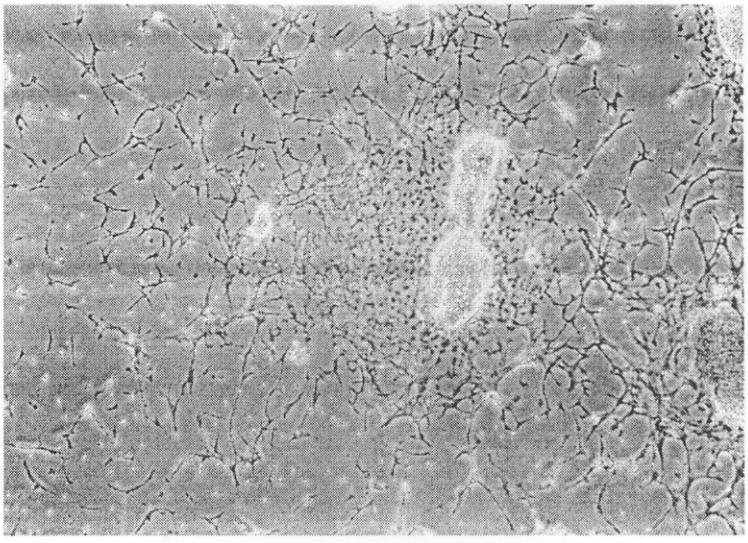
ผลการทดลอง

การเพาะเลี้ยงเซลปฐมภูมิ (primary cell culture)

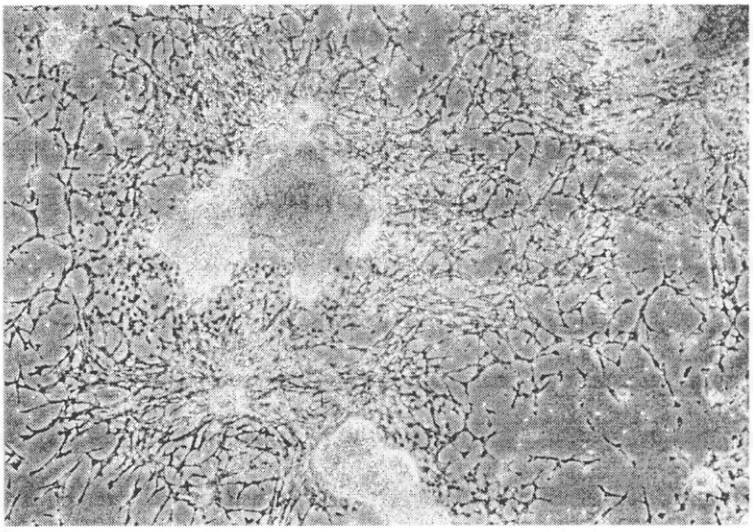
จากการทดลองเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดเข้มข้น 10^7 เซลล์/มล ในอาหารเลี้ยงเซลล์สังเคราะห์สูตรพื้นฐาน L-15 ความเข้มข้น 2 เท่าของสูตรอาหารปกติ ผสมรวมกับกลูโคส 1% เกลือแกง 0.5 FBS 20 % และยาปฏิชีวนะ พบว่าเซลล์เม็ดเลือดที่เลี้ยงมีชีวิตอยู่ได้แต่ไม่มีการเพิ่มจำนวนเซลล์ และ อาหารเลี้ยงเซลล์มีสภาพเป็นกรด (เปลี่ยนเป็นสีเหลือง) รอบๆ เซลล์เม็ดเลือดมีสารประกอบสีดำเกิดขึ้น และภายใน 4-5 วัน หลังการเพาะเลี้ยงครั้งแรกเซลล์เม็ดเลือดที่เกาะติดพื้นฟลาสเริ่มหลุดออกและแตกสลายในที่สุด (ตารางที่ 3)

ส่วนผลการทดลองเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อจาก 2 แหล่งที่แตกต่างกันของกุ้งกุลาดำในอาหารชนิดเดียวกันพบว่าเซลล์เพาะเลี้ยงจากต่อมน้ำเหลืองของกุ้งกุลาดำที่มีขนาด > 100 กรัม สามารถเจริญเติบโตได้ดีกว่าเนื้อเยื่อชนิดเดียวกันจากกุ้งขนาด 20-25 กรัม และเจริญได้ดีกว่าเนื้อเยื่อหัวใจของกุ้งทั้งสองขนาด ลักษณะของเซลล์ต่อมน้ำเหลืองที่เจริญในอาหารเลี้ยงเซลล์สังเคราะห์มีรูปร่างเซลล์แบบเยื่อบุผิว (epithelial like cells) และเซลล์แบบรูปกระสวย (fibroblastic like cells) ปะปนกัน เซลล์ต่อมน้ำเหลืองของกุ้งทั้ง 2 ขนาดสามารถเลี้ยงต่อในอาหารสูตรอาหารดังกล่าวได้ 7-10 วัน แต่พบเซลล์ต่อมน้ำเหลืองของกุ้งขนาด > 100 กรัม มีความหนาแน่นกว่าเซลล์จากกุ้งขนาด 20-25 กรัม เมื่อเลี้ยงด้วยระยะเวลาเท่ากัน(รูปที่ 1-2; ตารางที่ 3)

ส่วนเซลล์เนื้อเยื่อหัวใจของกุ้งกุลาดำทั้งสองขนาด พบว่าเซลล์ที่เจริญส่วนใหญ่เป็นแบบเยื่อบุผิว และจากการสังเกตผลภายใต้กล้องพบว่าเซลล์ดังกล่าวแบ่งตัวได้ช้าและทยอยตายหลุดจากพื้นฟลาสก์ภายใน 4-5 วันหลังการเพาะเลี้ยง (ตารางที่ 3)



ภาพที่ 1 เซลล์เพาะเลี้ยงจากส่วนเนื้อเยื่อต่อมน้ำเหลืองกุ้งกุลาดำ ในอาหารสูตรพื้นฐาน (basal medium:2X 1-15, glucose 1%, NaCl 0.5% และ FBS 20%) ภายหลังการบ่มเลี้ยงที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง (280x)
(กุ้งขนาด 20-25 กรัม)



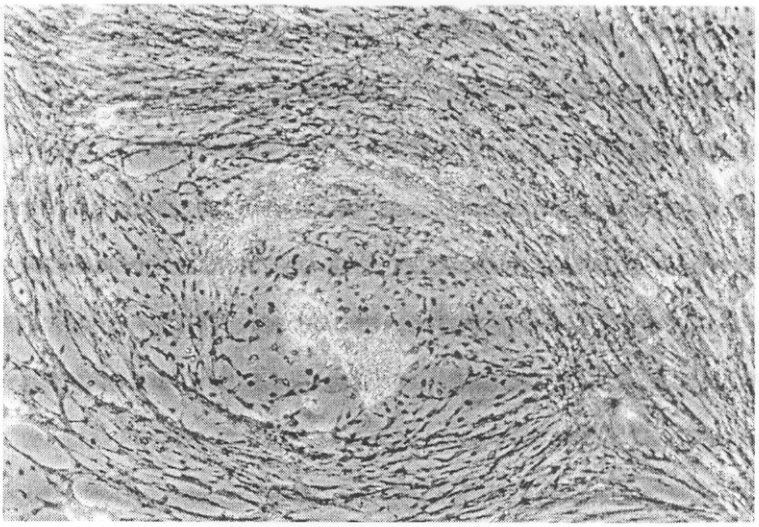
ภาพที่ 2 เซลล์เพาะเลี้ยงจากส่วนเนื้อเยื่อต่อมน้ำเหลืองกุ้งกุลาดำ ในอาหารสูตรพื้นฐาน (basal medium:2X 1-15, glucose 1%, NaCl 0.5% และ FBS 20%) ภายหลังการบ่มเลี้ยงที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง (280x)
(กุ้งขนาด 100 กรัม)

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบการเจริญของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อต่อมน้ำเหลืองและหัวใจของ กุ้งกุลาดำขนาด 20-25 และ >100 กรัม ในอาหารเลี้ยงเซลล์สูตรพื้นฐาน (L-15 ผสมกลูโคส 1% เกลือแกง 0.5% FBS 20% และยาปฏิชีวนะ)

ขนาดกุ้ง (กรัม)	เซลล์และเนื้อเยื่อ	ระดับการเจริญเติบโต	ระยะเวลาที่มีชีวิตอยู่ได้ (วัน)
>100	เม็ดเลือด	+	4-5
	ต่อมน้ำเหลือง	++++	7-10
	หัวใจ	++	4-5
20-25	เม็ดเลือด	+	4-5
	ต่อมน้ำเหลือง	+++	7-10
	หัวใจ	++	4-5

ผลการทดสอบหาปัจจัยที่เหมาะสมกับการเจริญของเซลล์เนื้อเยื่อ

จากการนำเนื้อเยื่อต่อมน้ำเหลืองของกุ้งกุลาดำขนาด >100 กรัม ซึ่งพบว่าเจริญเติบโตดีที่สุดจากผลการทดลองข้างต้นมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตรพื้นฐานที่เติมปัจจัยต่อการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน พบว่าเนื้อเยื่อต่อมน้ำเหลืองที่เลี้ยงในอาหารพื้นฐานผสมปัจจัยส่งเสริม 3 ชนิด คือ hemolymph extracted 10% , MEM vitamin solution 2%, และ lactalbulmin hydrolysate 5% (สูตร 4) เป็นองค์ประกอบเจริญได้ดีที่สุด (ภาพที่ 3) ในอาหารสูตรที่มี hemolymp extracted 10% และ MEM vitamin solution 2% (สูตร 2) เซลล์สามารถเจริญเติบโตได้ดีใกล้เคียงกับสูตรอาหารที่มี hemolymp extracted 10% และ lactalbulmin hydrolysate 5% เป็นองค์ประกอบ (สูตร 3) และการทดลองพบการเติม hemolymp extract 10% เพียงอย่างเดียว (สูตร 1) เซลล์เจริญเติบโตได้ดีกว่าการเติม MEM vitamin solution 2% (สูตร 6) หรือ lactalbumin hydrolysate 5% (สูตร 7) หรือเติมสารทั้ง 2 ชนิดรวมกัน (สูตร 6) เมื่อทดลองดูระยะเวลาการเจริญของเซลล์โดยไม่ทำการเปลี่ยนถ่ายอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ พบว่าเซลล์ต่อมน้ำเหลืองที่เลี้ยงในอาหารสูตรที่เสริมองค์ประกอบเพิ่มเติมทั้ง 3 ชนิด (สูตร 4) เจริญเติบโต และมีชีวิตอยู่ได้นานที่สุด 14-15 วัน ขณะที่การเลี้ยงในสูตรอื่นๆ มีระยะเวลาการมีชีวิตอยู่ได้น้อยกว่า (ตารางที่ 4)



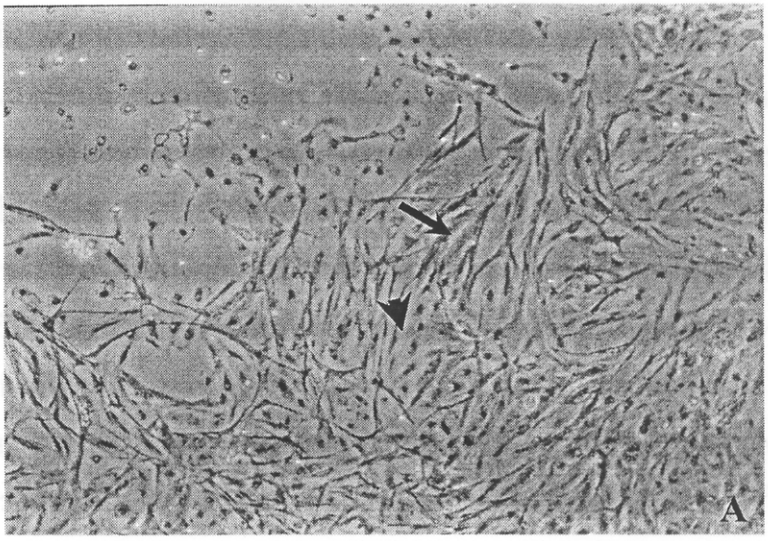
ภาพที่ 3 เซลล์เพาะเลี้ยงจากส่วนเนื้อเยื่อต่อมน้ำเหลืองกุ้งกุลาดำ ในอาหารสูตรพื้นฐาน ผสมรวมกับ haemolymph extracted 10% MEMV 2% และ lactalbumin hydrolysate 5% ภายหลังการบ่มเลี้ยง 6 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส (280x)
(กุ้งขนาด 100 กรัม)

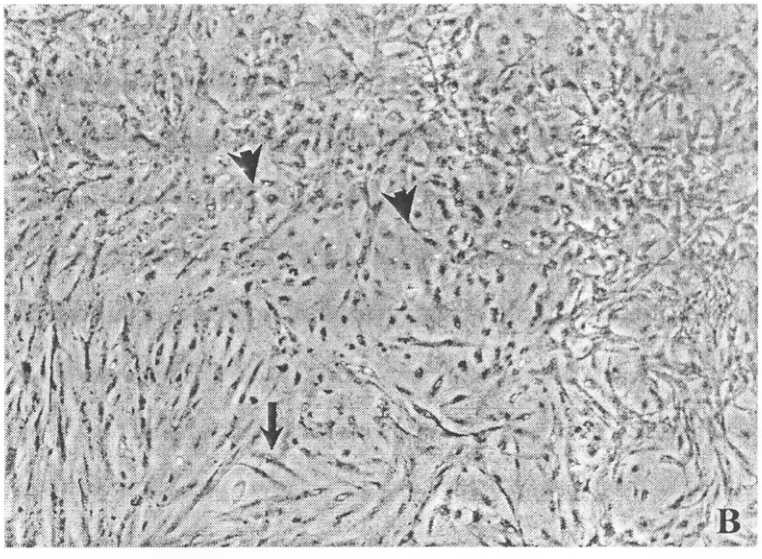
ตารางที่ 4 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตและระยะเวลาการมีชีวิตของเซลล์ต่อมน้ำเหลืองกุ้งกุลาดำในอาหารเลี้ยงเซลล์สูตรพื้นฐาน (2xL-15 ผสมกลูโคส 1% เกลือแกง 0.5% FBS 20%) ที่มีการเติมปัจจัยเสริมการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน 7 สูตร

สูตรที่	ระดับการเจริญของเซลล์	ระยะเวลาที่มีชีวิตอยู่ได้ (วัน)
1	++	7-10
2	+++	7-10
3	+++	7-10
4	++++	14-15
5	+	4-5
6	+	4-5
7	+	4-5

การผสมอาหารสูตรพื้นฐานกับน้ำเลือดกุ้ง (hemolymph extracted)10% MEM vitamin solution 2% และ lactalbumin hydrolysate 5% พบว่าทำให้อาหารเลี้ยงเซลล์มีค่าออสโมลาลิตี้ประมาณ 740 mOsmole/kg และเมื่อทดลองถ่ายเลี้ยงเซลล์เริ่มต้นในวันที่ 10 หลังการปลูกเลี้ยงครั้ง

แรก โดยย่อยเซลล์ด้วย trypsin EDTA และเคาะให้หลุดจากพื้นฟลาสก์ แล้วแบ่งออกเป็น 2 ส่วน (split ratio1:2) เติมอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมซึ่งกรองผ่านเมมเบรนที่มีขนาดรูเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 ไมครอน 1 ส่วนและ อาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ 1 ส่วน แล้วทำการเปลี่ยนอาหารใหม่ทุกๆ 5 วัน โดยใช้อัตราส่วนของอาหารที่มีอยู่เดิมในฟลาสก์ (condition medium) ต่ออาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ 1:1 เมื่อครบ 2 ครั้งทำการย่อยและถ่ายเลี้ยงเซลล์ใหม่ พบว่าเซลล์เนื้อเยื่อต่อมน้ำเหลืองที่ทำการถ่ายเลี้ยงครั้งที่ 2 มีอัตราการเจริญเติบโตดีที่สุด โดยเซลล์ที่ถ่ายเลี้ยงนานขึ้นจะมีเซลล์ลักษณะแบบเยื่อบุผิว (epithelial like cells) มากกว่าเซลล์แบบกระสวย (fibroblastic like cells) (ภาพที่ 4) และการเจริญเติบโตลดลงหลังการถ่ายเลี้ยงครั้งที่ 3 และ 4 โดยการถ่ายเลี้ยงครั้งที่ 4 พบเซลล์หยุดการเจริญเติบโต หลุดออกจากพื้นฟลาสก์ภายใน 5-7 วัน โดยไม่สามารถเลี้ยงต่อไปได้



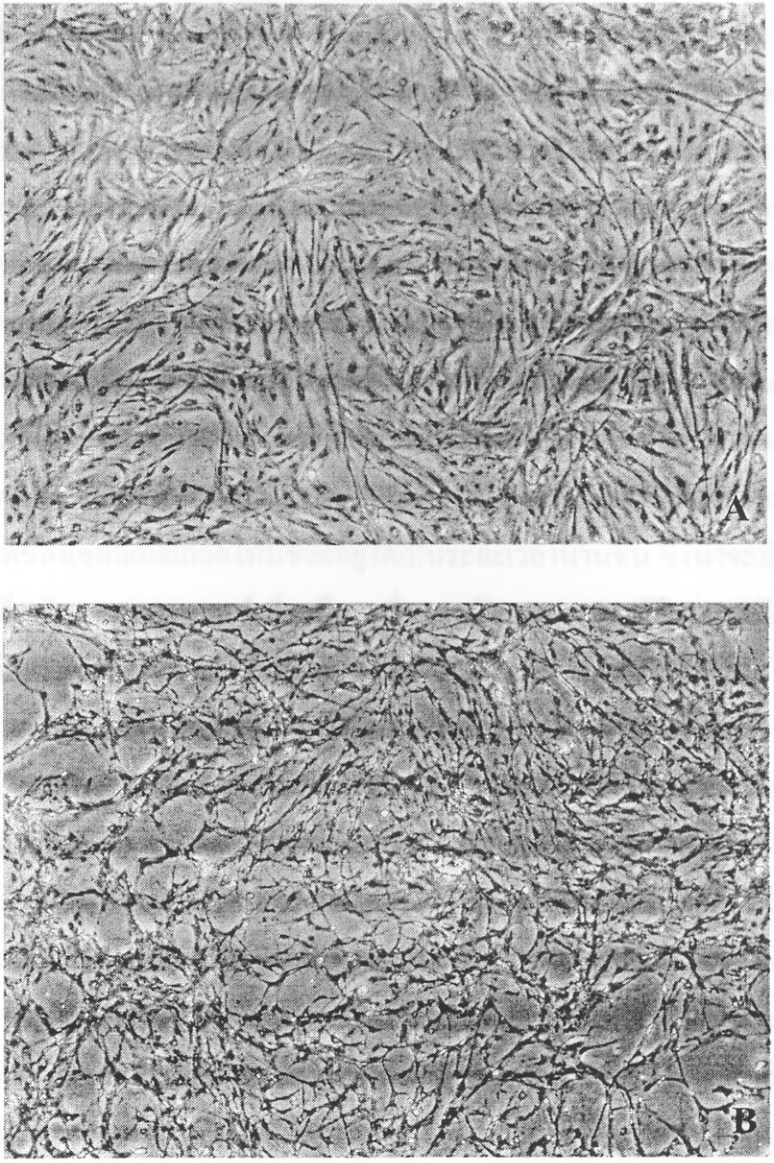


ภาพที่ 4 เซลล์เพาะเลี้ยงจากส่วนเนื้อเยื่อต่อมน้ำเหลืองกุ้งกุลาดำ ในอาหารสูตรพื้นฐาน ผสมรวมกับ haemolymph extracted 10% MEMV 2% และ lactalbumin hydrolysate 5%, พบเซลล์ต่อมน้ำเหลืองที่เจริญมีทั้งเซลล์ลักษณะส่วนใหญ่แบบ (fibroblastic like cells) (หัวลูกศร),แบบเซลล์เยื่อบุผิว (epithelial like cells) (ศรชี้) A = หลังการถ่ายเลี้ยงครั้งที่ 2 ที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน B = หลังการถ่ายเลี้ยงครั้งที่ 2 ที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน (280x)
(กุ้งขนาด 100 กรัม)

การยอมรับเชื้อไวรัส (Susceptibility test)

เมื่อนำเซลล์ที่เพาะเลี้ยงไว้ในอาหารที่เตรียมโดยใช้จากสภาวะดังกล่าว มาทำการทดสอบการยอมรับเชื้อไวรัส 2 ชนิดพบว่าเซลล์ที่ผลิตได้สามารถยอมรับเชื้อยอมรับหัวเหลือง (YHV) ได้อย่างดี โดยสามารถพบการเข้าทำลายเซลล์ของเชื้อ ซึ่งทำให้เซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลง (CPE) มีลักษณะหดตัวและหลุดจากพื้นฟลาสก์ ภายในวันที่ 3 หลังการเติมเชื้อ (ภาพที่ 5) และเซลล์ถูกทำลายหมดภายในระยะเวลา 5 วัน สำหรับผลการทดสอบการยอมรับเชื้อไวรัส WSSV ของเซลล์ที่ทำการเพาะเลี้ยงครั้งนี้ ไม่พบเซลล์ที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสดังกล่าวในระยะเวลาการบ่มเชื้อนาน 7 วัน ส่วนเซลล์เริ่มต้นในชุดควบคุมไม่พบการเปลี่ยนแปลงในลักษณะที่เกิดการหดตัวและหลุดจากพื้นฟลาสก์

เมื่อทดสอบหาค่าไตเตอร์ของเชื้อ YHV ในเซลล์ดังกล่าวที่เตรียมในถาดหลุมพบว่าเชื้อ YHV จากทำการสกัดจากเนื้อเยื่อเหงือกและหัวใจกุ้งกุลาดำมีค่าไตเตอร์เท่ากับ $10^{6.5}$ $TCID_{50}$/มล



ภาพที่ 5 การทดสอบการยอมรับเชื้อไวรัส YHV ของเซลล์ต่อมน้ำเหลืองกุ้งกุลาดำ, A= เซลล์ชุดควบคุมภายหลังการถ่ายเลี้ยงครั้งที่ 2 นาน 3 วัน, B = ลักษณะ CPE ที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อ YHV ในเซลล์ที่ถ่ายเลี้ยงครั้งที่ 2 นาน 4 วันพบเซลล์เริ่มหดตัวและหลุดจากพื้นฟลาสก์ (280x)