อุปกรณ์และวิธีการ

สัตว์ทดลอง

กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ขนาดน้ำหนักตัวละประมาณ 20-25 กรัม ซื้อจากบ่อเลี้ยงกุ้งที่ไม่มีประวัติการระบาดของโรคไวรัส และพ่อ-แม่พันธุ์กุ้งกุลาดำขนาด >100 กรัม ซื้อจากแหล่งจับจากธรรมชาติ จังหวัดสตูล นำมาเลี้ยงในถังไฟเบอร์ขนาด 3 ตัน ที่ความเค็มของน้ำ 30 ส่วนในพัน ให้อาหารเม็ดและสลับด้วยปลาหมึกสดวันละ 3 มื้อ ดูดตะกอนและเปลี่ยนถ่ายน้ำทุกวัน ควบคุมอุณหภูมิของน้ำให้คงที่ 30 องศาเซลเซียส โดยใช้เครื่องให้ความร้อน

อาหารเลี้ยงเซลล์

เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์จากอาหารพื้นฐาน คือ L-15 โดยละลาย L-15 ด้วยน้ำกรองขจัดไอออน (Deionized water) ปรับความเข้มข้นของเกลือ และเติมกลูโคสในอาหารให้ใกล้เคียงกับน้ำเลือดกุ้งกุลาดำ กรองผ่านเมมเบรนที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรู 0.22 μm และเติมสารอื่นๆที่จำเป็นตามรายละเอียดแสดงในตารางที่ 1แล้วนำไปวัดค่าออสโมลาลิตี้โดยใช้ Osmometer (Osmomat-400)

ตารางที่1 องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเซลล์พื้นฐานที่ใช้ในการทดลอง

องค์ประกอบ	ความเข้มข้นสุดท้าย
L-15	2 x
NaCl	1%
Glucose	1%
Streptomycin (μg/ml)	100
Penicillin (IU/ml)	100
Fetal bovine serum (FBS)	20%

การเตรียมซีรัมกุ้ง (hemolymph extract)

เก็บตัวอย่างเลือดกุ้งจากโคนขาเดินคู่ที่ 3 โดยไม่ใช้สารป้องกันเลือดแข็งตัว นำมาทิ้งให้แข็งตัวที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้วปั่นแยกเอาเฉพาะส่วนของเหลวด้วยเครื่องเซ็นตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที ส่วนใสนำมากรองผ่านเมมเบรนที่มีขนาดรู 0.22 ไมครอน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนใช้

การเก็บตัวอย่างเลือด

เก็บตัวอย่างเลือดกุ้งจากโคนขาเดินคู่ที่ 3 โดยใช้ L-cysteine ผสมใน K-199 pH 7.6 (Itami *et al.*, 1992) เข้มข้น 5% เป็นสารป้องกันเลือดแข็งตัว ตัวอย่างที่ได้นำมาหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,600xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที นำตะกอนเม็ดเลือดมาล้างด้วย K-199 ที่ผสม L-cysteine 0.5% เซลล์เม็ดเลือดที่ได้นำมานับจำนวนโดยใช้สารละลาย trypan blue 0.5% ในน้ำเกลือ 2.5%

การเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือด (primary culture of hemocyte)

นำเม็ดเลือดที่ล้างด้วย K-199 มาปรับปริมาณเซลล์ให้ได้ 1×10^7 เซลล์/มล ในอาหารเลี้ยงสูตรพื้นฐานตาม ตารางที่ 1 แล้วนำมาเลี้ยงใน T-flask ขนาด 25 ลบ.ซม. โดยบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25-26 องศาเซลเซียส สังเกตการเจริญเติบโตภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ (inverted microscope)

การเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อ (primary cell culture of tissue)

นำกุ้งกุลาดำทั้ง 2 ขนาดมาทำความสะอาดภายนอกโดยใช้ในสารละลายไอโอดีนเข้มข้น 500 ppm แยกอวัยวะภายใน คือ ต่อมน้ำเหลือง และ หัวใจ แต่ละส่วนมาแช่ใน L-15 ที่มีส่วนผสมของยาปฏิชีวนะ (penicillin 250 IU/ml, streptomycin 250 μg/ml) นาน 10 นาที นำมาตัดเป็นชิ้นขนาด 0.5-1 มม. เติมใน T-flask ขนาด 25 ลบ.ซม. ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมตามตารางที่ 1 แล้วบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25-26 องศาเซลเซียส สังเกตการเจริญเติบโตของเซลล์ทุกวันภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ

การศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการเจริญของเซลล์

ทำการเตรียมเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำที่พบว่าให้ผลการเจริญเติบโตดีที่สุดหลังจากทดลองเลี้ยงในอาหารสูตรพื้นฐานตามรายละเอียดในตารางที่ 1 มาเลี้ยงในอาหารสูตรปรับปรุงจากสูตรอาหารพื้นฐานที่มีความแตกต่างกัน 7 สูตร ดังรายละเอียดในตารางที่ 2 สังเกตการเจริญเติบโตของเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารสูตรต่าง ๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของสารอาหารที่ทำให้เซลล์มีการเจริญเติบโตที่ดีที่สุด

ตารางที่ 2 องค์ประกอบเพิ่มเติมในอาหารพื้นฐานเพื่อทดสอบการเจริญเติบโตของเซลล์เนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำ

สูตรที่	องค์ประกอบเพิ่มเติม
1	Hemolymph extracted 10 %
2	Hemolymph extracted10% + MEMV 2%
3	Hemolymph extracted 10 % + Lactalbulmin 5%
4	Hemolymph extracted10% + MEMV 2%+ Lactalbulmin 5%
5	MEMV 2%+ Lactalbulmin 5%
6	MEMV 2%
7	Lactalbulmin 5%

เมื่อได้อาหารสูตรที่ดีที่สุดสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ทำการทดลองเพาะเลี้ยงเซลล์เริ่มต้นและถ่ายเซลล์เพาะเลี้ยงโดยย่อยเซลล์ที่เจริญเติบโตเต็มพื้นฟลาสก์ด้วยสารละลาย trypsin EDTA ให้เป็นเซลล์เดี่ยวๆ และถ่ายเซลล์ส่วนหนึ่งใส่ในฟลาสก์ใหม่ เติมอาหารเลี้ยงใหม่ 1 ส่วน และอาหารเลี้ยงเซลล์เก่า 1 ส่วน สังเกตการเจริญเติบโตของเซลล์ที่ทำการถ่ายเลี้ยงภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ

การทดสอบการยอมรับเชื้อไวรัส (virus susceptibility test)

การเตรียมเชื้อไวรัส

เนื้อเยื่อกุ้งติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง (yellow head virus; YHV) และเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (white spot syndrome virus: WSSV) ได้จาก stock ของศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา นำกุ้งที่ติดเชื้อแต่ละชนิดมาแยกเหงือก หัวใจ และต่อมน้ำเหลือง บดให้ละเอียดในอาหารเลี้ยงเซลล์ K-199 pH 7.6 (Itami *et al*., 1992) ในอัตราเนื้อเยื่อ 1 ส่วน และK-199 10 ส่วน นำไปเหวี่ยงแยกเครื่องเซ็นตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 8000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แยกส่วนใสกรองผ่านเมมเบรนที่มีรูขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 ไมโครเมตร แบ่งสารละลายใส่หลอดไครโอ (Cryo tube) หลอดละ 0.5 มิลลิลิตรและจัดเก็บในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส

การเตรียมเซลล์และการทดสอบการยอมรับเชื้อ

เตรียม monolayer ของเซลล์เนื้อเยื่อโดยทำการย่อยเซลล์เริ่มต้นและถ่ายเลี้ยงใหม่ครั้งที่ 2 ในอาหารสูตรปรับปรุงที่ให้ผลการเจริญเติบโตดีที่สุดจากการเพาะเลี้ยงในหัวข้อที่ผ่านมาในฟลาสก์ขนาด 25 ลบ.ซม. 6 ฟลาสก์ บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25-26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ให้เซลล์ขยายตัว 80-90% ของพื้นที่ ถ่ายอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมออกทั้งหมดเก็บใส่ภาชนะฆ่าเชื้อไว้ เติมเชื้อไวรัสหัวเหลือง และตัวแดงดวงขาว ที่เจือจางลง 10 เท่าจาก $TCID_{50}$/มล ของสารเริ่มต้นที่เตรียมไว้ 0.5 มล ลงในฟลาสก์ๆ ละ1 เชื้อ (เชื้อละ 2 ซ้ำ) วางให้เชื้อเข้าสู่เซลล์ ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง และล้างเชื้อส่วนเกินทิ้งด้วย HBSS 1 ครั้ง และเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ 1 ส่วน (2.5 มล) และอาหารเลี้ยงเซลล์เดิม 1 ส่วน (2.5 มล) สำหรับเซลล์ทดลองชุดควบคุมเติมสารละลาย HBSS 0.5 มล แทนสารละลายเชื้อไวรัส บ่มเซลล์ทั้ง 3 ชุดที่อุณหภูมิ 25-26 องศาเซลเซียส สังเกตการเข้าทำลายเซลล์ของเชื้อทั้ง 2 ชนิด ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับทุกวัน

การทดสอบหาค่าไตเตอร์ของเชื้อไวรัส

เตรียม monolayer ของเซลล์เนื้อเยื่อในอาหารสูตรปรับปรุงที่ให้ผลการเจริญเติบโตดีที่สุดจากการเพาะเลี้ยงในหัวข้อที่ผ่านมาในถาดหลุม (96 well plate) โดยใส่ปริมาตรหลุมละ 0.1 มล หลังจากบ่มเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง และพบว่าเซลล์มีการเจริญเติบโต เป็น แบบ monolayer ประมาณ 80-90% จากการตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ หยดเชื้อไวรัสที่เจือจางไว้ครั้งละ (10 fold dilution) 50 ไมโครลิตร/หลุม ความเจือจางละ 4 ซ้ำ และนำมาบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลง (cytopathic effect; CPE)

ของ monolayer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน คำนวณหาค่า $TCID_{50}$ / มล (Rovozzo and Buke; 1973; Reed and Muench; 1938)