นิพนธ์ต้นฉบับ

การผลิตเซลล์ไลน์จากส่วนไตปลากะพงขาว

เรวัตร คงประดิษฐ์ [1] กิจการ ศุภมาตย์ [2] จิราพร เกษรจันทร์ [3] และ
วุฒิพร พรหมขุนทอง [4]

Abstract

Khongpradit, R.[1], Supamattaya, K.[2], Kasornchandra, J.[1], and Phromkunthong, W.[2]

Establishment of a cell line from kidney of seabass, *Lates calcarifer* (Bloch)

Songklanakarin J. Sci. Technol., 2003, 25(1) : 29-39

Primary cell culture from caudal fin and kidney of seabass (*Lates calcarifer* Bloch) using tissue explant method were cultured in three different medias with various salt concentrations. Only seabass kidney (SK) cells grew well in Leibovitze's-15 medium containing 8 g/l of NaCl supplemented with 10 % fetal bovine serum at an optimum temperature of 25 °C. Over a period of 24 months, SK cells were subcultured over than 75 passages and exhibited epithelial-like cells. The chromosome number of SK cells was 42. The cells were found to be free from bacterial, fungal and mycoplasma contamination. Seabass cells can be kept at -80 °C

---

[1]Coastal Aquatic Animal Health Research Institute, Department of Fisheries, Muang, Songkhla, 90100, [2]Aquatic Animal Health Research Center, Department of Aquatic Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112 Thailand.

---

[1]วท.ม. (วาริชศาสตร์) นักวิชาการประมง [3]Ph.D. (Microbiology) ผู้อำนวยการ สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา 90100 [2]Dr. rer. Nat. (Aquatic Animal Disease) รองศาสตราจารย์ [4]Dr. rer. Nat. (Aquatic Animal Nutrition) รองศาสตราจารย์ ศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112

Corresponding e-mail : skidchak@ratree.psu.ac.th

รับต้นฉบับ 1 มีนาคม 2545 รับลงพิมพ์ 28 มิถุนายน 2545

and/or in liquid nitrogen (-196 °C) for at least 24 months with a survival rate of 83.20 and 74.50 %, respectively. Nine fish viruses were tested for their infectivity and this SK cells were susceptible to sand goby virus (SGV), chub reovirus (CRV), snake-head rhabdovirus (SHRV), red seabream iridovirus (RSIV), seabass iridovirus (SIV) and grouper iridovirus-2 (GIV-2).

Key words : cell line, seabass, *Lates calcarifer* (Bloch)

บทคัดย่อ

เรวัตร คงประดิษฐ์ กิจการ ศุภมาตย์ จิราพร เกษรจันทร์ และ วุฒิพร พรหมขุนทอง

การผลิตเซลล์ไลน์จากส่วนไตปลากะพงขาว

ว. สงขลานครินทร์ วทท. 2546 25(1) : 29-39

ทดลองเพาะเลี้ยงเซลล์จากเนื้อเยื่อส่วนครีบหางและไตของปลากะพงขาว โดยวิธีตัดชิ้นส่วนเนื้อเยื่อให้มีขนาดเล็ก (tissue explant method) ในอาหารสังเคราะห์ต่างกัน 3 ชนิด ซึ่งมีปริมาณความเข้มข้นของเกลือแกง (NaCl) แตกต่างกัน พบว่าเซลล์จากเนื้อเยื่อส่วนไตของปลากะพงขาว (seabass kidney : SK) สามารถเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเซลล์ Leibovitze's-15 ที่มีความเข้มข้นของเกลือแกง 8 กรัม/ลิตร ผสมรวมกับซีรัม 10% บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 °C ลักษณะของเซลล์ที่ได้มีรูปร่างเป็นเซลล์เยื่อบุผิว (epithelial-like cells) ซึ่งสามารถถ่ายเลี้ยงเซลล์ได้ 75 ครั้ง (passages) ในระยะเวลา 24 เดือน มีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 42 ไม่พบการปนเปื้อนของแบคทีเรีย เชื้อรา และไมโคพลาสมาในเซลล์ที่เพาะเลี้ยงได้ สามารถเก็บรักษาเซลล์ดังกล่าวที่อุณหภูมิ -80 °C และไนโตรเจนเหลวได้เป็นเวลานานกว่า 24 เดือน โดยมีอัตรารอด 83.20 และ 74.50% ตามลำดับ จากการทดสอบการยอมรับเชื้อไวรัส 9 ชนิด พบว่าเซลล์ที่ผลิตได้สามารถยอมรับเชื้อ sand goby virus (SGV), chub reovirus (CRV), snake-head rhabdovirus (SHRV), red seabream iridovirus (RSIV), seabass iridovirus (SIV) และ grouper iridovirus-2 (GIV-2)

การเพาะเลี้ยงเซลล์ปลาในอาหารสังเคราะห์เพื่อใช้ประโยชน์ในการแยกเชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรคปลา เริ่มต้นมาเมื่อประมาณ 40 ปีที่ผ่านมา นับตั้งแต่ Wolf และ Quimby (1962) ประสบความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเซลล์ Rainbow trout gonad (RTG-2) ซึ่งได้นำมาใช้ในการแยกเชื้อไวรัสได้หลายชนิด ในปัจจุบันถึงแม้ว่าจะมีการผลิตเซลล์ปลาขึ้นมาอีกหลายชนิดแต่ส่วนใหญ่จะเป็นปลาในเขตหนาว เช่น ปลาแซลมอน ปลาเทร้า และ ปลาน้ำจืดอีกหลายชนิด (Wolf and Mann, 1980) แต่เซลล์ปลาที่ผลิตจากปลาทะเลในเขตร้อนยังมีน้อยมากและการเพิ่มจำนวนของไวรัสแต่ละชนิด ค่อนข้างจะมีความจำเพาะเจาะจงกับชนิดของปลาเอง ประกอบกับมีปริมาณการเพาะเลี้ยงปลาทะเลเพิ่มมากขึ้นอย่างรวดเร็วทำให้ปลาที่เลี้ยงไว้มีโอกาสเกิดโรคขึ้นได้ ดังนั้นเพื่อช่วยให้การตรวจหาเชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรคปลาดังกล่าวมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น การพัฒนาการเพาะเลี้ยงเซลล์จากปลาทะเลจึงมีความจำเป็นเพื่อใช้ในการศึกษาโรคไวรัสที่จะเกิดขึ้นทั้งในปัจจุบันและอนาคต

การศึกษาครั้งนี้เป็นการทดลองเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อจากส่วนครีบหาง และส่วนไตของปลากะพงขาว โดยการตัดชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อให้มีขนาดเล็ก และนำมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ 3 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้นของเกลือแกงที่แตกต่างกัน เพื่อให้ทราบชนิดของอาหารและระดับความเข้มข้นของเกลือแกงที่เหมาะสม สำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์และใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อของปลาทะเลชนิดอื่นๆ ในอนาคต ตลอดจนการศึกษาลักษณะและคุณสมบัติของเซลล์เนื้อเยื่อที่ผลิตได้ ซึ่งเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการใช้ประโยชน์จากเซลล์เนื้อเยื่อปลาดังกล่าวต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการศึกษา

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

1. การเพาะเลี้ยงเซลล์ชั้นต้น (primary cell culture)

คัดเลือกลูกปลากะพงขาวที่มีสุขภาพดี ขนาดความยาวเฉลี่ย 2.0-3.0 ซม. จำนวน 3-5 ตัว นำมาทำความสะอาดบริเวณผิวลำตัวปลาด้วยสารละลายไอโอดีนความเข้มข้น 500 ส่วนในล้านส่วน (ppm) นาน 15 นาที ตัดส่วนครีบหาง (caudal fin) และไต (kidney) แช่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ (phosphate buffer saline ; PBS) pH 7.4 ที่ผสมยาปฏิชีวนะเจนตามัยซิน (gentamycin) 250 ไมโครกรัม/มล. นาน 10 นาที ตัดออกเป็นชิ้นเล็กๆ ให้มีขนาดประมาณ 0.5-1 ลบ.มล เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ลงไปเล็กน้อยและนำไปปลูกเลี้ยงในฟลาสค์ (tissue culture flask) ขนาด 25 ตร.ซม. วางทิ้งไว้ 1-2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้เนื้อเยื่อเกาะติดกับพื้นฟลาสต์ จากนั้นจึงเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ลงไปฟลาสค์ละ 5 มล. สำหรับอาหารที่ใช้ในการทดสอบการเลี้ยงเซลล์ปลากะพงขาวมีด้วยกัน 3 ชนิดคือ MEM (minimum essential medium, Gibco) L-15 (Leibovitze's-15, Gibco) และ M-199 (medium-199, Gibco) ซึ่งสูตรอาหารทั้ง 3 ชนิดจะถูกปรับให้มีระดับความเข้มข้นของเกลือแกงสุดท้ายเท่ากับ 8, 9 และ 10 กรัม/ลิตร ตามลำดับ จากนั้นจึงผสมซีรัม (fetal bovine serum ; FBS) 20 % และยาปฏิชีวนะเพนนิซิลลิน (penicillin) 200 IU/มล. สเตรพโตมัยซิน (streptomycin) 200 ไมโครกรัม/มล. และแอมโฟเทอริซิน (amphotericin) 2.5 มก/มล. ลงในอาหารทุกสูตรที่เตรียมไว้ บ่มเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 26-28 °C สังเกตดูการเจริญเติบโตของเซลล์ทุกๆ 2 วัน เมื่อเซลล์เจริญได้ประมาณ 60-70 % ของพื้นที่ผิวฟลาสค์จึงทำการถ่ายเลี้ยงเซลล์โดยการเติมสารละลายเอนไซม์ทริปซิน-อีดีทีเอ (trypsin-EDTA) ความเข้มข้น 0.1 % ปริมาตร 2 มล. ลงไปเพื่อย่อยเซลล์ให้หลุดออกจากกัน เซลล์ที่ย่อยได้เป็นเซลล์เดี่ยวๆ จะถูกแบ่งเป็น 2 ส่วน เพื่อนำไปเลี้ยงในฟลาสค์ใหม่ (อัตราการถ่ายเลี้ยงเซลล์เท่ากับ 1:2) เมื่อเซลล์เจริญเต็มพื้นฟลาสค์จะถ่ายเลี้ยงเซลล์ต่อไปจนถึงครั้งที่ 5 จึงลดปริมาณของซีรัมลงเหลือเพียง 10 %

2. การศึกษาคุณสมบัติของเซลล์

2.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมแก่การเจริญของเซลล์ (optimum temperature growth) ทำการศึกษาความสามารถในการเจริญของเซลล์ระหว่างการถ่ายเลี้ยงเซลล์ครั้งที่ 45 ที่ระดับอุณหภูมิต่างๆ กัน คือ 15, 20, 25, 30 และ 35 °C ชุดละ 2 ซ้ำ โดยทำการตรวจนับปริมาณเซลล์ด้วยสไลด์นับเม็ดเลือด (hemocytometer) ทุกๆ วัน ตลอดระยะเวลาการทดลอง 7 วัน โดยกำหนดให้ปริมาณเซลล์เริ่มต้นของแต่ละฟลาสค์เท่ากับ 1.0×10^6 เซลล์/อาหารเลี้ยงเซลล์ 5 มล.

2.2 จำนวนโครโมโซม (number of chromosome) ทำการเตรียมตัวอย่างเซลล์ เพื่อนับจำนวนโครโมโซม ในการเลี้ยงเซลล์ครั้งที่ 45 และ 75 ตามวิธีการของ Earley (1975) โดยการเติมสารโคลชิซิน (colchicine) ลงในฟลาสค์ที่เลี้ยงเซลล์ไว้แล้ว 22 ชั่วโมง ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.1 ไมโครกรัม/มล. บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25-26 °C ตรวจนับจำนวนโครโมโซมของเซลล์ปลากะพงขาวที่ผลิตได้ ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบเฟสคอนทรัสท์ (phase contrast microscope)

2.3 การยอมรับเชื้อไวรัสของเซลล์ปลากะพงขาว (viral susceptibility test) ทดสอบความสามารถในการยอมรับเชื้อไวรัสของเซลล์ปลากะพงขาวในระหว่างการเลี้ยงเซลล์ครั้งที่ 75 โดยใช้เชื้อไวรัสจำนวน 9 ชนิด (Table 1)

โดยเลี้ยงเซลล์ปลากะพงขาวที่เพาะเลี้ยงได้และเซลล์ที่มีความเฉพาะเจาะจงกับไวรัสชนิดนั้นๆ อย่างละครึ่งในถาดหลุมขนาดเล็ก (96 well plate) บ่มเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 25-26 °C นาน 24 ชั่วโมง แล้วจึงหยดสารละลายไวรัสซึ่งถูกเจือจางครั้งละ 10 เท่าในสารละลาย HBSS (Hank's balance salt solution) ปริมาตร 0.1 มล./หลุม จำนวน 4 ซ้ำ ในแต่ละระดับความเข้มข้น บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25-26 °C เป็นเวลา 14 วัน ตรวจเช็คและคำนวณค่าไตเตอร์จากระดับความเข้มข้นสุดท้ายที่เชื้อไวรัสสามารถเข้าทำลายเซลล์ได้ 50%/ปริมาตร 1 มล. ($TCID_{50}$/ml) (Rovozzo and Burke, 1973) ตามวิธีการของ Reed และ Muench (1938)

2.4 การทดสอบการปนเปื้อน (sterility test) ทดสอบการปนเปื้อนของเชื้อรา แบคทีเรีย ตามวิธีการของ

Table 1. Nine fish viruses were tested for the susceptibility of seabass kidney (SK) cells.

Fish viruses	Designation	Source
Rhabdovirus		
snake-head rhabdovirus	SHRV	Kasornchandra และคณะ (1991)
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	CRV	Ahne และ Holbl (1988)
Iridovirus		
red sea bream iridovirus	RSIV	Nakajima และ Sorimachi (1994)
sea bass iridovirus	SIV	เรวัตร และจิราพร (2539)
grouper iridovirus (black fin disease)	GIV-1	จิราพร และเรวัตร (2539)
grouper iridovirus (blister disease)	GIV-2	เรวัตร และคณะ (2540)

จิราพร และคณะ (2531) ในเซลล์ปลากะพงขาวระหว่างการถ่ายเลี้ยงเซลล์ครั้งที่ 45 โดยนำเซลล์ปลากะพงขาวซึ่งเลี้ยงในอาหารเลี้ยงที่ไม่ผสมยาปฏิชีวนะมาแล้วไม่น้อยกว่า 5 ครั้ง ลอกเซลล์ออกจากฟลาสค์ นำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทริปติกซอยอากา (tryptic soy agar) และอาหารเลี้ยงเชื้อราโพเทโตเดกโทรสอากา (potato dextrose agar) บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 7 วัน จึงทำการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อทั้งสองชนิด สำหรับการตรวจสอบการปนเปื้อนของไมโคพลาสมา (mycoplasma) ใช้เทคนิคการย้อมด้วยสารเรืองแสงบิสเบนซาไมล์ (bisbenzamide) ตามวิธีการของ Cheng (1975) และตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ (fluorescent microscope)

2.5 การทดสอบการเก็บรักษาเซลล์ (storage test) ในระหว่างการถ่ายเลี้ยงเซลล์ครั้งที่ 75 ทำการเตรียมเซลล์อายุ 24 ชั่วโมง ย่อยเซลล์ให้หลุดออกจากกันด้วยสารละลายทริปซินความเข้มข้น 0.1 % ปรับความเข้มข้นของเซลล์ประมาณ 2.5-4.0 $\times 10^6$ เซลล์/มล. ด้วยอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ เติมสารไดเมธิลซัลโฟไซด์ (dimethylsulphoxide : DMSO) ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10 % (ปริมาตร/ปริมาตร) แบ่งใส่หลอดพลาสติกความจุ 1 มล. จำนวน 26 หลอด นำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างเพื่อตรวจสอบอัตรารอดเฉลี่ยอีกครั้ง (2 ซ้ำ) ก่อนแยกเป็น 2 ชุด เพื่อแยกเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 °C และอุณหภูมิ -196 °C (ไนโตรเจนเหลว) นำเซลล์ที่เก็บรักษาไว้มาตรวจสอบอัตรารอด ทุก 4 เดือน เป็นเวลา 24 เดือน

การตรวจสอบอัตรารอด นำเซลล์มาหลอมละลายในน้ำอุ่น (30-35 °C) เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 5 มล. ตกตะกอนที่ความเร็ว 400 $\times$ g เป็นเวลา 5 นาที ผสมตะกอนเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ 5 มล. เพื่อให้เซลล์กระจายอย่างทั่วถึงก่อนนำไปเลี้ยงในฟลาสค์ โดยแบ่งสารละลาย 0.5 มล. ย้อมด้วยสารละลายทริพเพนบลู (trypen blue) ความเข้มข้น 0.4 % อัตราส่วน 1:1 นาน 5 นาที นับด้วยสไลด์นับเม็ดเลือด เพื่อคำนวณอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ (viable rate)

ผลการทดลอง

1. การผลิตเซลล์ชั้นต้น (primary cell culture)

จากการทดลองเพาะเลี้ยงเซลล์จากเนื้อเยื่อส่วนครีบหางและไต ของปลากะพงขาวในอาหารเลี้ยงเซลล์ 3

ชนิด ที่ระดับความเข้มข้นของเกลือแกงแตกต่างกัน ปรากฏว่าเซลล์จากส่วนไต มีลักษณะเป็นเซลล์เยื่อบุผิว (epithelial-like cells) (Figure 1) สามารถเจริญได้ดีที่สุดในอาหารเลี้ยงเซลล์ L-15 สามารถถ่ายเลี้ยงเซลล์ครั้งแรกได้ในสัปดาห์ที่ 2 และถ่ายเลี้ยงเซลล์ต่อเนื่องได้มากกว่า 75 ครั้งในระยะเวลา 24 เดือน (Figure 2) ส่วนเซลล์ที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM และ M-199 สามารถเจริญได้เช่นเดียวกัน แต่ช้ากว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ L-15 และในการถ่ายเลี้ยงเซลล์ครั้งที่ 3 เซลล์ที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ M-199 เกิดการเปลี่ยนแปลงและตายไปในที่สุด ขณะที่เซลล์ซึ่งเลี้ยงด้วยอาหาร MEM จะเริ่มเปลี่ยนแปลงลักษณะและตายเช่นเดียวกัน ในการถ่ายเลี้ยงเซลล์ครั้งที่ 5

สำหรับเซลล์จากเนื้อเยื่อส่วนครีบหางมีลักษณะเป็นเซลล์รูปกระสวย (fibroblastic-like cells) (Figure 3) สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเซลล์ทั้ง 3 ชนิด แต่เจริญได้ช้ากว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์จากเนื้อเยื่อส่วนไต โดยในการถ่ายเลี้ยงเซลล์ครั้งที่ 12 เซลล์ที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ L-15 เริ่มชะงักการเจริญเติบโตและตายในที่สุด ส่วนเซลล์ที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM และ M-199 อ่อนแอและตายระหว่างการถ่ายเลี้ยงในครั้งที่ 3 และ 1 ตามลำดับ ซึ่งได้ทำการเปรียบเทียบการเจริญของเซลล์ดังกล่าว ดังแสดงใน Table 2 เมื่อเปรียบเทียบผลของความเข้มข้นเกลือแกง พบว่าไม่มีความแตกต่างกันในระดับความเข้มข้นของเกลือแกงทั้ง 3 ระดับ แสดงให้เห็นว่าอาหารเลี้ยงเซลล์โดยทั่วไป ซึ่งมีส่วนผสมของเกลือแกง 8 กรัม/ลิตร สามารถใช้เลี้ยงเซลล์ปลากะพงขาวได้ โดยไม่มีความจำเป็นต้องเสริมเกลือแกงในอาหารเลี้ยงเซลล์อีก

2. การศึกษาคุณสมบัติของเซลล์

เซลล์จากส่วนไตปลากะพงขาว สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 25-30 ^{o}C แต่จะสามารถเจริญได้ดีที่สุดที่ระดับอุณหภูมิ 25 ^{o}C (Figure 4) และเมื่อทำการตรวจนับจำนวนโครโมโซม พบว่าในการถ่ายเลี้ยงเซลล์ครั้งที่ 45 จำนวนของโครโมโซมมีการกระจายตัวอยู่ในช่วง 36-48 แต่เซลล์ส่วนใหญ่ประมาณ 43 % มีจำนวนโครโมโซม = 42 เช่นเดียวกันกับในการถ่ายเลี้ยงเซลล์ครั้งที่ 75 ซึ่งเซลล์ส่วนใหญ่ประมาณ 51 % มีจำนวนโครโมโซม = 42 (Figure 5)

จากการทดสอบการยอมรับเชื้อไวรัส 9 ชนิด พบว่าเซลล์จากไตปลากะพงขาว ภายหลังการถ่ายเลี้ยงเซลล์ในครั้งที่ 75 สามารถยอมรับเชื้อ SHRV, SGV, CRV, RSIV, SIV และ GIV-2 ได้เป็นอย่างดี และมีค่าไตเตอร์เท่ากับ $10^{3.66}$, $10^{2.66}$, $10^{3.33}$, $10^{7.5}$, $10^{5.33}$ และ $10^{3.5}$ $TCID_{50}$/ml ตามลำดับ (Table 3) โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อไวรัส SIV ซึ่งแยกได้จากลูกปลากะพงขาวที่เป็นโรคด้วยเซลล์ที่ผลิตได้ในครั้งนี้เป็นครั้งแรก สามารถสังเกตพบการเปลี่ยนแปลงของเซลล์หลังการรับเชื้อ (cytopathic effect: CPE) เป็นเวลา 3 วัน (Figure 6) เช่นเดียวกับเชื้อไวรัส RSIV แต่เร็วกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อไวรัสชนิดอื่นๆ ซึ่งพบการเกิด CPE ในวันที่ 6 หรือ 7 หลังการรับเชื้อ เมื่อนำเซลล์ซึ่งติดเชื้อไวรัส SIV ดังกล่าวมาทำการศึกษาเพิ่มเติมด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน พบอนุภาคไวรัสซึ่งมีรูปทรงแบบหลายเหลี่ยม (icosahedral) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของนิวคลีโอแคปซิด (nucleocapsid) ประมาณ 140-160 นาโนเมตร กระจายอยู่ภายในเซลล์เป็นจำนวนมาก (Figure 7) แสดงให้เห็นว่าเซลล์ดังกล่าวสามารถใช้ในการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสซึ่งแยกได้จากลูกปลากะพงขาวที่เป็นโรคได้เป็นอย่างดี และจากการตรวจสอบเซลล์ไตปลากะพงขาวไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา และเชื้อไมโคพลาสมา ในเซลล์ที่ผลิตได้ในครั้งนี้

สำหรับการทดสอบการเก็บรักษาเซลล์เนื้อเยื่อจากส่วนไตของปลากะพงขาวภายหลังการถ่ายเลี้ยงเซลล์ครั้งที่ 75 ในระดับอุณหภูมิ -80 ^{o}C และอุณหภูมิ -196 ^{o}C โดยทำการตรวจสอบอัตรารอด ทุก 4 เดือน เป็นเวลานาน 24 เดือน พบว่าเซลล์ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -196 ^{o}C มีอัตรารอดสูงกว่าในช่วง 12 เดือนแรก และลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงเดือนที่ 16-24 ในขณะที่เซลล์ซึ่งเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 ^{o}C มีอัตรารอดลดลงอย่างสม่ำเสมอ แต่มีอัตรารอดสูงกว่าเมื่อเก็บรักษาเป็นเวลาครบ 24 เดือน อย่างไรก็ตามทั้ง 2 ระดับอุณหภูมิมีความเหมาะสมและสามารถใช้ในการเก็บรักษาเซลล์ได้เป็นอย่างดี ซึ่งจากการตรวจสอบภายหลังการเก็บรักษาที่ระดับอุณหภูมิต่ำ -80 ^{o}C และอุณหภูมิ -196 ^{o}C เป็นเวลา 24 เดือน พบว่าเซลล์มีอัตรารอดครั้งสุดท้ายเท่ากับ 83.20 และ 74.50 % ตามลำดับ (Figure 8)

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

นับได้ว่าการทดลองเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อปลากะพงขาวในครั้งนี้ประสบความสำเร็จเป็นอย่างยิ่ง โดยสามารถผลิตเซลล์ไลน์จากเนื้อเยื่อส่วนไตปลากะพงขาว ซึ่งมีรูปร่างคล้ายเซลล์เยื่อบุผิว สามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหารสังเคราะห์ L-15 ซึ่งมีส่วนผสมของซีรัม 10 % ที่ระดับอุณหภูมิ 25-30 °C 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 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 สามารถช่วยคงสภาพ pH หรือมีคุณสมบัติการเป็นบัฟเฟอร์ได้ดีกว่าในสภาพบรรยากาศปกติ (กิจการ และคณะ, 5) ถึงแม้ว่าอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM จะได้รับความนิยมในการเลี้ยงเซลล์ปลาหลายชนิด (Lannan *et al*., 1984 ; Nicholson *et al*., 1987) แต่ผลจากการทดลองเลี้ยงเซลล์ปลากะพงขาวในครั้งนี้ พบว่าอาหารเลี้ยงเซลล์ L-15 จะให้ผลในการเจริญของเซลล์ดีกว่าซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Chen และ Kou (1987) ; จิราพร และเรวัตร (2537) ซึ่งพบว่าเซลล์ปลาในเขตร้อนจะเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเซลล์ L-15 ถึงแม้ปลากะพงขาวจะเป็นปลาที่เลี้ยงได้ทั้งในน้ำจืดและน้ำเค็ม แต่การเพาะเลี้ยงเซลล์ก็ไม่มีความจำเป็นที่จะต้องเพิ่มปริมาณเกลือแกงลงไปอีกจากที่มีอยู่เดิม ซึ่งโดยทั่วไปอาหารสังเคราะห์จะมีปริมาณของเกลือแกงผสมอยู่ 8 กรัม/ลิตร แต่ก็มีปริมาณเพียงพอสำหรับการเจริญเติบโตของเซลล์เนื้อเยื่อปลาทะเล ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ กิจการ และคณะ (2530) ; Nicholson และคณะ (1987) ; Meguro และคณะ (1991) ; Fernandez และคณะ (1993) ; จิราพร และเรวัตร (2537) ; เรวัตร และคณะ (2538) ซึ่งรายงานไว้เช่นเดียวกัน

การศึกษาคุณสมบัติของเซลล์นับเป็นสิ่งสำคัญในการนำเซลล์ไลน์ที่ผลิตได้ มาประยุกต์ใช้ได้อย่างถูกต้องเหมาะสม และเกิดประโยชน์สูงสุด ซึ่งเซลล์ SK ที่ผลิตได้ในครั้งนี้สามารถเจริญและเพิ่มจำนวนได้ที่ช่วงอุณหภูมิ 20-30 °C จึงเหมาะอย่างยิ่งสำหรับการศึกษาเชื้อไวรัสโดยเฉพาะอย่างยิ่งพื้นที่เขตร้อน ซึ่งผลการทดสอบประสิทธิภาพในการยอมรับเชื้อไวรัส พบว่าเซลล์ SK สามารถยอมรับเชื้อไวรัสได้ถึง 6 ชนิด ได้แก่ SHRV, SGV, CRV, RSIV, SIV และ GIV-2 จากการทดสอบเชื้อไวรัส 9 ชนิด ซึ่งส่วนใหญ่เป็นเชื้อที่พบการระบาดในปลาเขตร้อนทั้งพื้นที่น้ำจืดและน้ำเค็มโดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้ประโยชน์จากเซลล์ SK ในการแยกเชื้อไวรัส SIV ซึ่งเป็นสาเหตุการตายของลูกปลากะพงขาวในโรงเพาะฟัก (เรวัตร และจิราพร, 2539) และได้สร้างความเสียหายต่อธุรกิจการผลิตลูกพันธุ์ปลากะพงขาวเพื่อการส่งออกและธุรกิจการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งของไทยอย่างต่อเนื่อง (นิเวศน์ และเจนจิต, 2535)

ส่วนคุณสมบัติอื่นๆ ของเซลล์ที่ผลิตได้ เช่น จำนวนโครโมโซม ซึ่งพบว่าเซลล์ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของจำนวนชุดของโครโมโซม แม้จะถูกถ่ายเลี้ยงด้วยอาหารสังเคราะห์ถึง 75 ครั้ง แสดงให้เห็นว่าเซลล์ที่ผลิตได้มีคุณสมบัติคงเดิมและเหมาะสมอย่างยิ่งในการใช้เป็นตัวแทนของปลากะพงขาวในการศึกษาทดลองต่อไป นอกจากนี้จำนวนโครโมโซม

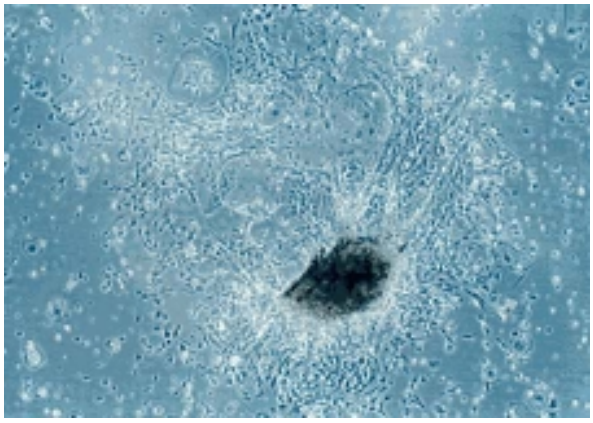

Figure 1. The primary cells from seabass kidney exhibited epithelial cells-like morphology after 48 hrs incubation period at 25-26 °C. (250X)

Figure 3. The primary cells from seabass fin exhibited firoblastic cells-like after 72 hrs incubation period at 25-26 °C (250X)

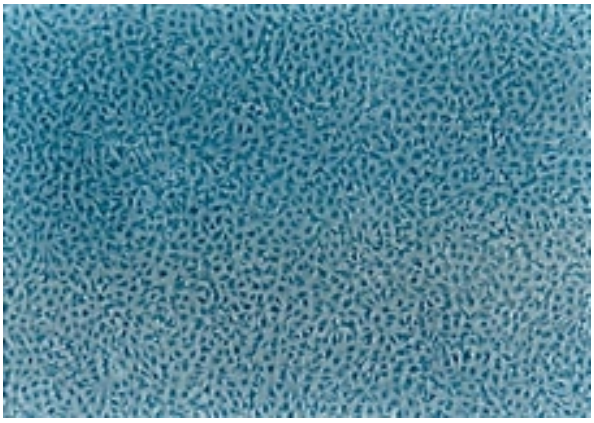

Figure 2. Seabass kidney cell line at 75 th passage. (420X)

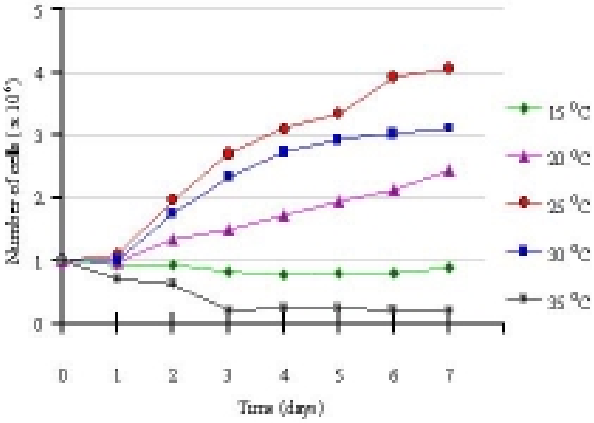

Figure 4. Growth of the seabass kidney cells at temperatures of 15, 20, 25, 30 and 35 °C.

ยังสามารถใช้ในการจำแนกชนิดและป้องกันการปนเปื้อนระหว่างเซลล์แต่ละชนิดในห้องปฏิบัติการได้อีกทางหนึ่ง เช่นเดียวกับการทดสอบการปนเปื้อนซึ่งการทดลองก็แสดงให้เห็นว่าเซลล์ที่ผลิตได้ไม่มีการปนเปื้อนของแบคทีเรีย เชื้อรา และไมโคพลาสมาแอบแฝงอยู่ ซึ่งเชื้อดังกล่าวอาจทำให้คุณสมบัติของเซลล์เปลี่ยนแปลงไปและส่งผลกระทบต่อการใช้ประโยชน์จากเซลล์ที่ผลิตได้ในอนาคต

สำหรับการศึกษาเปรียบเทียบเทคนิคการเก็บรักษาเซลล์เนื้อเยื่อ โดยวิธีการเติมสารไดเมธิลซัลโฟไซด์ ความเข้มข้น 10 % ที่ระดับอุณหภูมิต่างกัน คือ การแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 °C และอุณหภูมิ -196 °C ภายหลังการเก็บรักษานานถึง 2 ปี พบว่ามีอัตรารอด 83.20 และ 74.50 % ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 °C มีอัตรารอดสูงกว่าเมื่อเก็บรักษาเป็นเวลานาน ประกอบกับการดูแลจัดการทำได้ง่ายและสะดวกกว่า เนื่องจากการเก็บที่อุณหภูมิ -196 °C จะต้องหมั่นตรวจสอบปริมาณและ

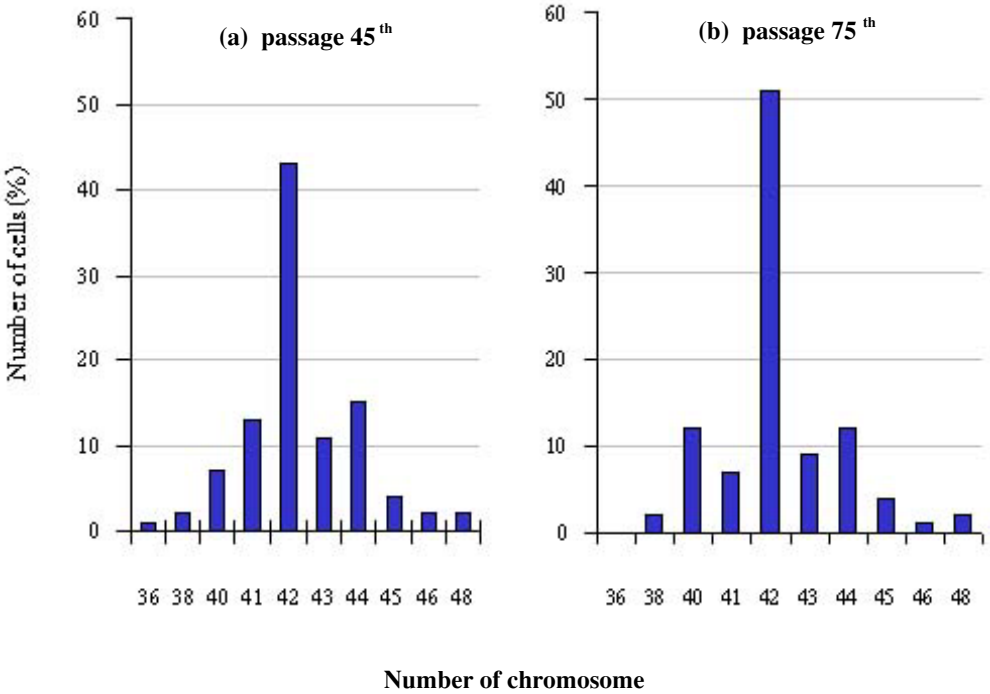

Figure 5. Chromosome number of seabass kidney cells at 45 th and 75 th passasges

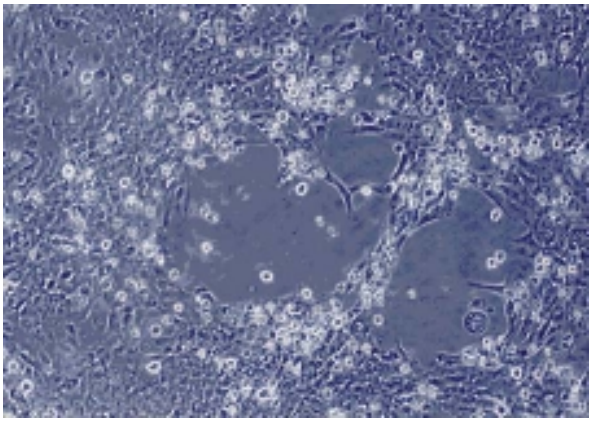

Figure 6. Cytopathic effect (CPE) in SK cells caused by seabass iridovirus (SIV) after 3 days post inoculation at 25 °C (630X)

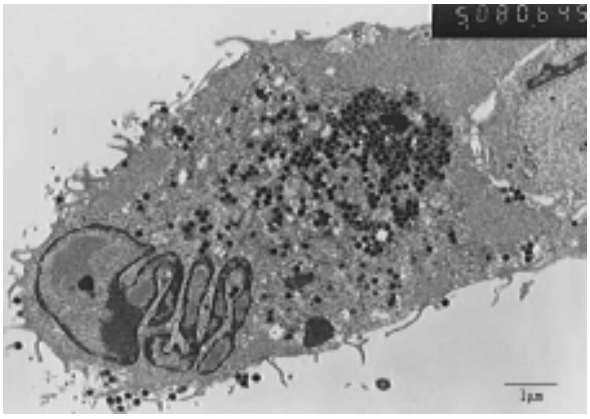

Figure 7. Electron microscopy revealed the seabass iridovirus (SIV) particles (arrows) in SK cell. (Uranyl acetate & lead citrate)

เติมสารไนโตรเจนเหลวอยู่เสมอ อย่างไรก็ตามทั้งสองวิธีดังกล่าวสามารถใช้ในการเก็บรักษาเซลล์เนื้อเยื่อได้เป็นอย่างดี ซึ่งจะเกิดประโยชน์ต่อการดูแลและการบริหารจัดการคลังเซลล์สัตว์น้ำในอนาคต เช่น ป้องกันการปนเปื้อนการเก็บสำรองเซลล์ ตลอดจนเป็นการลดต้นทุนการดูแลจัดการเมื่อไม่มีความจำเป็นในการใช้ประโยชน์จากเซลล์

เนื้อเยื่อดังกล่าว เป็นต้น

อย่างไรก็ตามการประสบความสำเร็จในการผลิตเซลล์ไลน์จากปลากะพงขาวในครั้งนี้ สามารถใช้ประโยชน์ในการตรวจวินิจฉัยโรค โดยเฉพาะโรคไวรัสได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้ยังสามารถใช้ในการแยกเชื้อและการศึกษาคุณลักษณะของเชื้อซึ่งเป็นสาเหตุของโรคไวรัสได้ รวมถึงการนำไปใช้ประโยชน์อื่นๆในอนาคต เช่น การผลิตแอนติซีรัม สำหรับการตรวจวินิจฉัยโรค (Ahne, 1981) การผลิตวัคซีนป้องกันโรคและการศึกษาความเป็นพิษของสารต่อสิ่งมีชีวิต (toxicity) เป็นต้น ซึ่งจะได้กล่าวถึงการนำเซลล์เนื้อเยื่อของปลากะพงขาวที่เพาะเลี้ยงได้มาประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์แก่การศึกษาโรคไวรัสต่อไป

Table 2. Comparison of the primary cells initiated from caudal fin and kidney of seabass in 3 different media with various salt concentrations.

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

[a] Subcultured 1-3 passages [b] Subcultured 4-12 passages [c] Subcultured >12 passages

เอกสารอ้างอิง

กิจการ ศุภมาตย์, สถาพร ดิเรกบุษราคม และ เยาวนิตย์ ดนยดล. 2530. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของปลากะพงขาว (*Lates calcarifer* Bloch) และปลากะพงแดง (*Lutianus argentimaculatus* Forskal). ว.สงขลานครินทร์. 9(2) : 203-208.

จิราพร เกษรจันทร์ และ เรวัตร คงประดิษฐ์. 2537. การเพาะเลี้ยงเซลล์เบื้องต้นจากเนื้อเยื่อส่วนหางของปลาเก๋า. เอกสารวิชาการฉบับที่ 1/2537. สงขลา : สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

จิราพร เกษรจันทร์ และ เรวัตร คงประดิษฐ์. 2539. การแยกเชื้อไวรัสและคุณสมบัติบางประการของ Iridovirus-like agent สาเหตุของโรคครีบดำในลูกปลาเก๋า. เอกสารวิชาการฉบับที่ 5/2539. สงขลา : สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

Table 3. Virus susceptibility of the seabass kidney (SK) cells at passage 75th compare to permissible cells.

Fish 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

EPC (*Epithelioma papulosum* of cyprini), BF-2 (blue gill, *Lepomis macrochirus* fry), CCO (chanel catfish, *Ictalurus punctatus* ovary), GF (grouper, *Epinephelus malabaricus* fin)

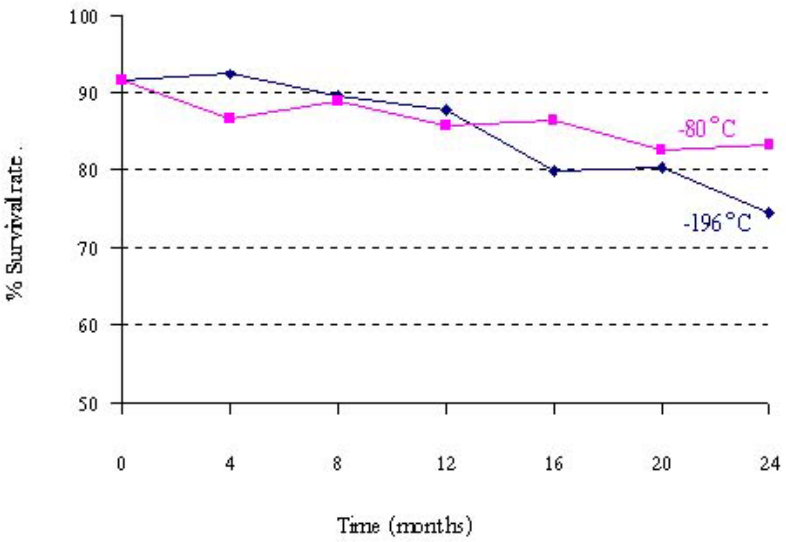

Figure 8. Viability of SK cells at 75 th passage after 24 months incubation at -80 °C and -196 °C.

จิราพร เกษรจันทร์ สิทธิ บุณยรัตผลิน และ อุมาลัย สะดวกดี. 2531. การเพาะเลี้ยงเซลล์จากปลาช่อน. เอกสารวิชาการฉบับที่ 90. กรุงเทพฯ : สถาบันวิจัยประมงน้ำจืดแห่งชาติ กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

นิเวศน์ เรืองพานิช และ เจนจิต คงกำเนิด. 2535. ศึกษาปัจจัยบางประการที่เหมาะสมเพื่อป้องกันและลดการตายของลูกปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) อายุ 12-30 วัน. ในรายงานการสัมมนาวิชาการประจำปี 2535, หน้า 206-211. กรุงเทพฯ : กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

เรวัตร คงประดิษฐ์ และจิราพร เกษรจันทร์. 2539. Iridovirus สาเหตุการตายของลูกปลากะพงขาวในโรงเพาะฟัก. เอกสารวิชาการฉบับที่ 13/2539. สงขลา : สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

เรวัตร คงประดิษฐ์ จิราพร เกษรจันทร์ และ สิทธิ บุณยรัตผลิน. 2538. การเพาะเลี้ยงเซลล์เบื้องต้นจากเนื้อเยื่อส่วนหางปลากระบอกดำ. เอกสารวิชาการฉบับที่ 8/2538. สงขลา : สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

เรวัตร คงประดิษฐ์, จิราพร เกษรจันทร์, วินัย กระจายวงค์ และสิทธิ บุณยรัตผลิน. 2540. โรคแผลพุพองในปลากะรัง : การแยกเชื้อและคุณสมบัติบางประการของเชื้อที่เป็นสาเหตุ. เอกสารวิชาการฉบับที่ 9/2540. สงขลา : สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

Ahne, W. 1981. Serological techniques currently used in fish virology. **In** International symposium on fish biology sera diagnostics and vaccines, pp. 3-27.

Ahne, W. and Holbl, O. 1988. Some properties of reovirus isolated from tench (*Tinca tinca*) and chub (*Leuciscus cephalus*). **In** Viruses of Lower Vertebrates, pp. 250-256. Ahne, W. and Kurstak, E., eds. Berlin : Springer-Verlag.

Bowser, P.R. and Plumb, J.A. 1980. Fish cell line : Establishment of a line from ovaries of channel catfish. *In vitro*. 16(5) : 365-368.

Cheng, T.R. 1975. Microsopic demonstration of mycoplasma contamination in cell culture and cell culture media. TCA Manual. 1 : 229-232.

Chen, S.N. and Kou, G.W. 1987. Establishment, characterization and application of 14 cell lines from warm-water fish. **In** Invertebrate and Fish Tissue Culture, pp. 218-227. Kuroda, Y., Kuroda, E. and Maramorosch, K., eds. Tokyo : Jap. Sci. Soc. Press.

Earley, E.M. 1975. Chromosome preparations from monolayer cell culture. TCA Manual. 1 : 31-35.

Fernandez, R.D., Yoshimizu, M., Kimuro, T., Ezura, Y., Inouye, K. and Takami, I. 1993. Characterization of three continuous cell line from marine

fish. J. Aquat. Anim Health. 5 : 137-147.

Fijan, N., Wellborn, T.L.Jr. and Naftel, J.P. 1970. An acute viral disease of channel catfish. Technical paper No.43. U.S. Fish Wildl. Serv., USA.

Hedrick, R.P., Eaton, W.D., Fryer, J.L., Groberg, W.G.Jr. and Boonyaratpalin, S. 1986. Characteristics of a birnavirus isolated from cultured sand goby, *Oxyeleotris marmoratus*. Dis. Aquat. Org. 1 : 219-225.

Kasornchandra, J., Lannan, C.N., Rohovec, J.S. and Fryer, J.L. 1991. Characterization of rhabdovirus isolated from the snakehead fish (*Ophicephalus striatus*). **In** Proceeding of the Second International Symposium on Viruses of Lower Vertebrates Corvallis, pp. 175-782. Oregon : USA.

Lannan, C.N., Winton, J.R. and Fryer, J.L. 1984. Fish cell lines : establishment and characterization of nine cell lines from salmonids. *In vitro*. 20 : 671-676.

Meguro, Y., Mokai, T., Murogo, K. and Sorimachi, M. 1991. A cell line derived from the fin of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. Gyobyo Kenkyu. 26 : 61-75.

Nakajima, K. and Sorimachi, M. 1994. Biological and physico-chemical properties of the iridovirus isolated from cultured red sea bream, *Pagrus major*. Fish Pathol. 29(1) : 29-33.

Nicholson, B.L., Danner, D.J. and Wu, J.L. 1987. Three new continuous cell lines from marine fishes of Asia. *In vitro* Cell. Dev. Biol. 23 : 199-204.

Noga, E.T. and Hartmann, J.X. 1981. Establishment of walking catfish (*Clarieas batrachus*) cell line and development of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) virus vaccine. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 38 : 925-930.

Reed, L.J. and Muench, H. 1938. A simple method of estimating fifty percent end points. Amer. J. Hygiene. 27 : 493-497.

Rovozzo, G.C. and Burke, C.N. 1973. A manual of Basic Virological Technique. New Jersy : Prentice-Hall, Englewood Cliffs.

Wattanavijarn, W., Torchy, T., Tangtrongpiros, J. and Kinkelin, P. 1988. Isolation of a birnavirus belonging to Sp serotype from southeast Asia fishes. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 8(5) : 106-108.

Wolf, K. and Quimby, M.C. 1962. Established eurythermic line of fish cells. *In vitro*. Science. 135 : 1065-1066.

Wolf, K. and Mann, J. A. 1980. Poikilotherm vertebrate cell lines and viruses : a current listing for fishes. *In vitro*. 16 : 168-179.