ชุดโครงการ 75 โครงการวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

โครงการ 213 โครงการวิจัยและพัฒนาการควบคุมศัตรูพืชทางการเกษตรโดยชีววิธี

กิจกรรม 2. การผลิตและการใช้เชื้อจุลินทรีย์และไส้เดือนฝอยควบคุมแมลงศัตรูพืช

กิจกรรมย่อย 2.1 การผลิตและการใช้ไวรัส NPV ควบคุมแมลงศัตรูพืช

พัฒนารูปแบบการเก็บรักษาเซลล์แมลงเพาะเลี้ยงต้นแบบ

Development of Maintenance Insect Cell Line Stock

สุชลวัจน์ ว่องไวลิขิต เสาวนิตย์ โพธิ์พูนศักดิ์ สาทิพย์ มาลี

กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

พัฒนารูปแบบการเก็บรักษาเซลล์แมลงเพาะเลี้ยงต้นแบบ ณ ห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ระหว่าง เดือนตุลาคม 2553 ถึง เดือนกันยายน 2554 เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิต่างๆ สภาพแวดล้อมกัน เซลล์เพาะเลี้ยงทั้ง 4 ชนิด สามารถเจริญเติบโตแบ่งเซลล์ได้ดี ที่อุณหภูมิห้อง 25-28 °C (12 ชั่วโมง/วัน) ซึ่งยังคงสภาพได้เป็นเซลล์เพาะเลี้ยง (cell line) ได้ และ ผลการตรวจวิเคราะห์ทางชีวโมเลกุลยังแสดงผลไปในทิศทางเดียวกัน

คำหลัก : เซลล์แมลงเพาะเลี้ยง การผลิต Insect cell culture, producing, biopesticide

---

รหัสการทดลอง 03-04-54-01-02-01-02-54

คำนำ

เซลล์แมลงเพาะเลี้ยง สามารถนำไปใช้ประโยชน์ ทดแทนตัวหนอนทดลองในการผลิตไวรัสโรคแมลง เพื่อช่วยลดการปนเปื้อนจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่ทำให้ผลิตภัณฑ์ไวรัสมีกลิ่นเหม็น ทำให้คุณภาพสม่ำเสมอและมีมาตรฐานความปลอดภัย เป็นเทคโนโลยีการผลิตที่เหมาะสมอีกวิธีการหนึ่ง ที่สามารถพัฒนาไปใช้ในการผลิตไวรัสโรคแมลงชนิดอื่นๆ ได้ในทำนองเดียวกัน จึงต้องมีการพัฒนาการเก็บรักษาเซลล์แมลงเพาะเลี้ยงต้นแบบเพื่อให้มีไว้ใช้งานได้อย่างต่อเนื่อง และเก็บรักษาเซลล์เพาะเลี้ยงได้อย่างเป็นระบบ การนำเซลล์เพาะเลี้ยง (cell line) นอกจากนำไปใช้ประโยชน์ในการผลิตไวรัส NPV เพื่อใช้เป็นสารชีวินทรีย์ควบคุมแมลงศัตรูพืชแล้ว (Entwisetle, 1998; สุดาวรรณ, 2542; สุชลวัจน์และคณะ, 2551) ยังสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในงานวิจัยอื่นๆได้อีกมาก เช่น การทดสอบสารพิษของรา (Vey *et al*., 1993) การทำสูตรอาหารเทียมเพาะเลี้ยงแตนเบียน *Trichogramma sp.* (Notarte and Merritt, 2001) การทดลองการเกิดโรคไวรัสในเซลล์ (สุชลวัจน์และคณะ, 2551) เป็นต้น และมีการเก็บรักษาและเพาะเลี้ยงเซลล์ได้อย่างประสิทธิภาพ (Lynn, 2001)

เซลล์แมลงเพาะเลี้ยง สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการผลิตไวรัสซึ่งเป็นชีวินทรีย์ที่มีประโยชน์ในการควบคุมแมลงศัตรูพืช การตั้งต้นเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นแบบจะต้องใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงจนกว่าจะได้เป็นเซลล์เพาะเลี้ยงที่ต่อเนื่อง ที่มีทั้งคุณภาพและประสิทธิภาพ นานเป็นปี และต้องใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงให้อาหารทุกสัปดาห์ ดังนั้นจึงต้องมีการพัฒนารูปแบบการเก็บรักษาเพื่อประหยัดเวลาค่าใช้จ่ายในการเพาะเลี้ยง และเก็บรักษาเซลล์ต้นแบบเพื่อให้มีไว้ใช้อย่างต่อเนื่อง โดยที่ไม่ต้องตั้งต้นเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นแบบทุกครั้ง สามารถยืดระยะเวลาช่วงชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยงได้นานขึ้น และมีความหลากหลายในชนิดของเซลล์แมลงเพาะเลี้ยงต้นแบบ นอกจากนี้ ในต่างประเทศมีการผลิตเซลล์ขายเพื่อการค้าในรูปแช่แข็งซึ่งมีราคาสูงมาก ดังนั้น จึงควรมีการทดลองวิจัยหารูปแบบการเก็บรักษาเซลล์เพาะเลี้ยง เพื่อประหยัดค่าใช้จ่ายในการดำเนินงานวิจัยภายในประเทศ และมีแนวทางที่ผลิตเซลล์เพื่อการค้าได้อีกด้วย

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. วัสดุอุปกรณ์ในการเก็บตัวอย่างแมลงและการเลี้ยงแมลงในห้องปฏิบัติการ เช่น กล่องพลาสติก ปากคีบ น้ำหวาน อาหารเทียมเลี้ยงแมลง เป็นต้น

2.วัสดุอุปกรณ์การเพาะเลี้ยงเซลล์แมลง เช่น อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ ขวดใส่สารละลาย สารเคมีผสมสูตรสำเร็จ กระดาษกรอง ชุดกรองสารละลาย จานพลาสติกเพาะเลี้ยงเซลล์แมลง หลอดดูดสารละลาย หลอดปั่นแยกสาร T-flask และภาชนะเพาะเลี้ยง Cells lines ขนาดต่างๆ อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ สารเคมีที่จำเป็น เช่น Sodium phosphate, Serum, Glucose, Yeastolate, Tryptose,

Primatone, Cystine, Methionine, Inosine, Pluronic, Sodium bicarbonate, Potassium chloride, Magnesium sulfate เป็นต้น

3. เครื่องมือวิทยาศาสตร์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเซลล์แมลง เช่น เครื่องกรองอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลง เครื่องวัดค่าออสโมซีส กล้องจุลทรรศน์ ถังไนโตรเจนเหลวเก็บสต๊อคเซลล์ ตู้ควบคุมอุณหภูมิ เครื่องเพาะเลี้ยงเซลล์ cell spin เป็นต้น

4. วัสดุอุปกรณ์เก็บตัวอย่าง Cell line เช่น หลอด Cryotube ใส่สารละลาย ไนโตรเจนเหลว เป็นต้น

วิธีการ

1. เตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลง และเซลล์เพาะเลี้ยง

2 พัฒนาวิธีการทดสอบการเก็บรักษาเซลล์เพาะเลี้ยง แบบระยะสั้น โดยการเก็บรักษาในภาชนะเลี้ยงที่อุณหภูมิต่ำกว่า 25-28 °C เช่น 5, 10, 15, 20, 25 °C เก็บข้อมูลทุก 3, 5, 7, 10, 15 วัน

3. พัฒนาวิธีการการเก็บรักษาเซลล์เพาะเลี้ยง แบบระยะยาว โดยการเก็บรักษาในภาชนะทนอุณหภูมิต่ำมาก เช่น -20, - 80 และ -196 °C เก็บข้อมูลทุก 6 เดือน

4. ตรวจสอบคุณภาพเซลล์ตามระยะการเก็บรักษา ด้วยค่าร้อยละการเจริญของเซลล (cells viability) และ เทคนิคชีวโมเลกุล ตรวจวิเคราะห์คุณภาพของเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยเทคนิคชีวโมเลกุลเปรียบเทียบกับเซลล์หนอนแมลงปกติ โดย สกัดตัวอย่างหนอนและเซลล์เพาะเลี้ยง ด้วยโกร่งเย็น เติม PBS 1,000 µl เพื่อรักษาสภาพเซลล์ ปั่นเหวี่ยง 2,000 - 5,000 rpm 5 นาที เติม extraction buffer 500 µl บ่มที่อุณหภูมิ 65°C นาน 10 นาที เติม cool 5M potassium acetate 120 µl และ proteinase K 10 µl แช่เย็น 30 นาที เติม phenol/chloroform 1:1 500 µl ปั่นเหวี่ยง 10,000 rpm นาน 5 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ เติม 95% Cool ethanol ปริมาตรเป็น 2 เท่าของส่วนใส ปั่นเหวี่ยง 12,000 rpm นาน 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม 70% ethanol 200 µl ปั่นเหวี่ยง 12,000 rpm นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้งเหลือแต่ตะกอนทิ้งให้ ethanol ระเหยที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที จากนั้นเติม TE buffer 30 µl ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที หลังจากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้ไปทำการวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอีเล็กโตรโฟรีซีสสำหรับวิเคราะห์แถบของดีเอ็นเอ

5. บันทึกผลทุกขั้นตอน พร้อมสรุปผล

เวลาและสถานที่ทำการทดลอง

ดำเนินการทดลองวิจัย ตั้งแต่ เดือนตุลาคม 2553 สิ้นสุด เดือนกันยายน 2555 ณ ห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กรุงเทพฯ

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

นำเซลล์เพาะเลี้ยงที่เจริญในภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 35 มม. อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงศัตรูพืช มีค่าออสโมซีส 350 – 360 mOsmols/kg. ค่า pH 6.2- 6.3 เพาะเลี้ยงในสภาวะค่าออสโมซีส 350 – 360 mOsmols/kg. ค่า pH 6.2- 6.3 ที่อุณหภูมิ 27 °C ระยะเวลา 24 ชั่วโมง/วัน เปรียบเทียบที่อุณหภูมิ 25-28 °C ระยะเวลา 12 ชั่วโมง/วัน ตรวจหาค่าร้อยละการเจริญของเซลล์ที่สามารถเจริญต่อไปได้ (cells viability) และตรวจดูความต่อเนื่องของการเจริญของเซลล์ พบว่า เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิต่างๆสภาพแวดล้อมกัน เซลล์เพาะเลี้ยงทั้ง 4 ชนิด สามารถเจริญเติบโตแบ่งเซลล์ได้ดี ที่อุณหภูมิห้อง 25-28 °C (12 ชั่วโมง/วัน) ซึ่งยังคงสภาพได้เป็นเซลล์เพาะเลี้ยง (cell line) ได้ ส่วนที่ควบคุมอุณหภูมิ 5 °C ระยะเวลา 24 ชั่วโมง/วัน เพาะเลี้ยงในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 5 °C ยังไม่ได้เซลล์ต้นแบบที่มีอัตราการเจริญที่ดีกว่าวิธีการเดิมที่เพาะเลี้ยงในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 27 °C และ การตรวจสอบคุณภาพเซลล์ตามระยะการเก็บรักษาเซลล์เพาะเลี้ยงเปรียบเทียบกับเซลล์หนอนแมลงด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล พบว่า แถบของดีเอ็นเอเซลล์เพาะเลี้ยงเปรียบเทียบกับเซลล์หนอนแมลงอยู่ที่ตำแหน่งตรงกัน ซึ่งควรได้มีการวิจัยเพิ่มเติม โดยใช้ Degenerate primers หรือ Restriction enzyme หรือ ลำดับเบสของดีเอ็นเอ เพื่อยืนยันผลความเหมือนกัน และ ควรเพิ่มระยะเวลาการเก็บรักษาซึ่งจะยืนยันผลได้ดียิ่งขึ้น

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การพัฒนาวิธีการทดสอบการเก็บรักษาเซลล์เพาะเลี้ยง แบบระยะสั้น โดยการเก็บรักษาในภาชนะเลี้ยงที่อุณหภูมิต่างๆจะช่วยให้ลดค่าใช้จ่ายได้ ซึ่งถ้าได้ดำเนินการต่อเนื่อง และมีการตรวจสอบคุณภาพเซลล์ตามระยะการเก็บรักษา ด้วย เทคนิคชีวโมเลกุล หรือ วิธี isozyme analysis เพื่อยืนยันคุณภาพของเซลล์ได้ดียิ่งขึ้น

การนำผลงานไปใช้ประโยชน์

ผลงานวิจัยนี้เมื่อเสร็จสมบูรณ์ จะสามารถเผยแพร่เทคนิคการผลิตขยายไวรัสจากเพาะเลี้ยงเซลล์ และ การควบคุมคุณภาพไวรัสที่ผลิตจากเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล ให้กับผู้สนใจได้ กลุ่มเป้าหมายคือ นักวิจัย นักวิชาการ ด้านการป้องกันกำจัดโดยชีววิธี และด้านอารักขาพืชที่เกี่ยวข้อง รวมถึงผู้สนใจทั้งภาครัฐและเอกชน

เอกสารอ้างอิง

สุชลวัจน์ ว่องไวลิขิต วัชรี สมสุข สาทิพย์ มาลี และ เสาวนิตย์ โพธิ์พูนศักดิ์. 2551. วิจัยรูปแบบการผลิตไวรัส *Spodoptera exigua* Multiple-nucleocapsids Nucleopolyhedrosisvirus (SeMNPV) จากเซลล์เพาะเลี้ยง (in vitro) *ใน* เอกสารการประชุม ผลงานวิจัยดีเด่น ประจำปี 2550 การประชุมวิชาการ ประจำปี 2551 กรมวิชาการเกษตร. 16-18 มิถุนายน, โรงแรมมิราเคิล แกรนด์ คอนเวนชั่น กรุงเทพฯ.

สุดาวรรณ เชยชมศรี. 2542 เทคโนโลยีการผลิตไวรัสกำจัดแมลงศัตรูพืชด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ หน้า 72-82 ใน เอกสารการประชุมสัมมนาทางวิชาการ สารชีวินทรีย์กำจัดศัตรูพืช *ใน* ศตวรรษที่ 21 จัดโดย สมาคม กีฏและสัตววิทยาแห่งประเทศไทย กรมวิชาการเกษตร กรมส่งเสริมการเกษตร สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 15-16 กรกฎาคม, โรงแรมมิราเคิล แกรนด์ คอนเวนชั่น กรุงเทพฯ

Lynn, D.E. 2001. Novel techniques to establish new insect cell lines. In Vitro Cell. 37:319-321.

Entwisetle, P.F. 1998. A world survey of virus control of insect pests, p.186-201 *In* Insect viruses and pest management edits : Frances R. Hunter-Fujita, Philip F. Entewistle, Hugh F. Evans and Norman E. Crook.

Notarte, A. and D.J. Merritt 2001. Successful in vitro rearing of *Trichogramma australicum* (Hymenoptera : Trichogrammatidae) on artificial diet containing cultured insect cells, Bulletin of Entomological Research 91 (3) : 227-231

Vey,A., J. N. Quiot , I. Mazet and C.W. McCoy. 1993. Toxicity and Pathology of Crude Broth Filtrate Produced by *Hirsutella thompsonii* var. thompsonii in shake culture. J. Inverteb. Pathol. 61 : 131-137.