

พัฒนารูปแบบการเก็บรักษาเซลล์แมลงเพาะเลี้ยงต้นแบบ
Development of Maintenance Insect Cell Line Stock
สุขลวจัน ว่องไวลิขิต เสาวนิตย์ โพธิ์พูนศักดิ์ สาทิพย์ มาลี
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

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

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 เพื่อใช้เป็นสารชีวภัณฑ์ควบคุมแมลงศัตรูพืชแล้ว (Entwisetle, 1998; สุदारรณ, 2542; สุขลวัจน์และคณะ, 2551) ยังสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในงานวิจัยอื่นๆ ได้อีกมาก เช่น การทดสอบสารพิษของรา (Vey *et al.*, 1993) การทำสูตรอาหารเทียมเพาะเลี้ยงแตนเบียน *Trichogramma sp.* (Notarte and Merritt, 2001) การทดลองการเกิดโรคไวรัสในเซลล์ (สุขลวัจน์และคณะ, 2551) เป็นต้น และมีการเก็บรักษาและเพาะเลี้ยงเซลล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Lynn, 2001)

เซลล์แมลงเพาะเลี้ยง สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการผลิตไวรัสซึ่งเป็นชีวภัณฑ์ที่มีประโยชน์ในการควบคุมแมลงศัตรูพืช การตั้งต้นเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นแบบจะต้องใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงจนกว่าจะได้เป็นเซลล์เพาะเลี้ยงที่ต่อเนื่อง ที่มีทั้งคุณภาพและประสิทธิภาพ นานเป็นปี และต้องใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงให้อาหารทุกสัปดาห์ ดังนั้นจึงต้องมีการพัฒนารูปแบบการเก็บรักษาเพื่อประหยัดเวลาค่าใช้จ่ายในการเพาะเลี้ยง และเก็บรักษาเซลล์ต้นแบบเพื่อให้มีไว้ใช้อย่างต่อเนื่อง โดยที่ไม่ต้องตั้งต้นเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นแบบทุกครั้ง สามารถยืดระยะเวลาช่วงชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยงได้นานขึ้น และมีความหลากหลายในชนิดของเซลล์แมลงเพาะเลี้ยงต้นแบบ นอกจากนี้ ในต่างประเทศมีการผลิตเซลล์ขายเพื่อการค้าในรูปแบบแช่แข็งซึ่งมีราคาสูงมาก ดังนั้น จึงควรมีการทดลองวิจัยหารูปแบบการเก็บรักษาเซลล์เพาะเลี้ยง เพื่อประหยัดค่าใช้จ่ายในการดำเนินงานวิจัยภายในประเทศ และมีแนวทางที่ผลิตเซลล์เพื่อการค้าได้อีกด้วย

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. วัสดุอุปกรณ์ในการเก็บตัวอย่างแมลงและการเลี้ยงแมลงในห้องปฏิบัติการ เช่น กล่องพลาสติก ปากคีบ น้ำหวาน อาหารเทียมเลี้ยงแมลง เป็นต้น
2. วัสดุอุปกรณ์การเพาะเลี้ยงเซลล์แมลง เช่น อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ ขวดใส่สารละลาย สารเคมีผสมสูตรสำเร็จ กระจกกรอง ชุดกรองสารละลาย จานพลาสติกเพาะเลี้ยงเซลล์แมลง หลอดดูดสารละลาย หลอดปั่นแยกสาร T-flask และภาชนะเพาะเลี้ยง Cells lines ขนาดต่างๆ อาหารเพาะเลี้ยง

เซลล์ สารเคมีที่จำเป็น เช่น Sodium phosphate, Serum, Glucose, Yeastolate, Tryptose, Primatone, Cystine, Methionine, Inosine, Pluronic, Sodium bicarbonate, Potassium chloride, Magnesium sulfate เป็นต้น

3. เครื่องมือวิทยาศาสตร์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเซลล์แมลง เช่น เครื่องกรองอาหาร เพาะเลี้ยงเซลล์แมลง เครื่องวัดค่าออสโมซิส กล้องจุลทรรศน์ ถังไนโตรเจนเหลวเก็บสต็อกเซลล์ 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 ด้วยค่าร้อยละการเจริญของเซลล์ (cells viability) และ เทคนิคชีวโมเลกุล หรือ วิธี isozyme analysis
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 เพาะเลี้ยงในสถานะค่าออสโมซีส 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 ตรวจสอบค่าร้อยละการเจริญของเซลล์ที่สามารถเจริญต่อไปได้ (cells viability) และตรวจสอบความต่อเนื่องของการเจริญของเซลล์พบว่า เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิต่างๆสภาพแวดล้อมกัน เซลล์เพาะเลี้ยงทั้ง 4 ชนิด สามารถเจริญเติบโตแบ่งเซลล์ได้ดี ที่อุณหภูมิห้อง 25-28 °C (12 ชั่วโมง/วัน) ซึ่งยังคงสภาพได้เป็นเซลล์เพาะเลี้ยง (cell line) ได้ ส่วนที่ควบคุมอุณหภูมิ 5 °C ระยะเวลา 24 ชั่วโมง/วัน และ การตรวจสอบคุณภาพเซลล์ตามระยะการเก็บรักษา ด้วย เทคนิคชีวโมเลกุล หรือ วิธี isozyme analysis จะดำเนินการทดลองวิจัยต่อไป

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

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

เอกสารอ้างอิง

- สุขลวจันน์ ว่องไวลิขิต วัชรีย์ 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 เขยชมศรี. 2542 เทคโนโลยีการผลิตไวรัสกำจัดแมลงศัตรูพืชด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ หน้า 72-82 ใน เอกสารการประชุมสัมมนาทางวิชาการ สารชีววินทรีย์กำจัดศัตรูพืช 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.
- Entwistle, 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. Entwistle, 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.