

## พัฒนารูปแบบการเก็บรักษาเซลล์แมลงเพาะเลี้ยงต้นแบบ Development of Maintenance Insect Cell Line Stock

สุชลวัจน์ 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 และ ผลการตรวจวิเคราะห์ทางชีวโมเลกุลยังแสดงผลไปในทิศทางเดียวกัน

**คำหลัก :** เซลล์แมลงเพาะเลี้ยง การผลิต Insect cell culture, producing, biopesticide

### คำนำ

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

รหัสการทดลอง 03-04-54-01-02-01-02-54

เซลล์แมลงเพาะเลี้ยง สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการผลิตไวรัสซึ่งเป็นชีวินทรีย์ที่มีประโยชน์ ในการควบคุมแมลงศัตรูพืช การตั้งต้นเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นแบบจะต้องใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงจนกว่า จะได้เป็นเซลล์เพาะเลี้ยงที่ต่อเนื่อง ที่มีทั้งคุณภาพและประสิทธิภาพ นานเป็นปี และต้องใช้เวลาในการ เพาะเลี้ยงให้อาหารทุกสัปดาห์ ดังนั้นจึงต้องมีการพัฒนารูปแบบการเก็บรักษาเพื่อประหยัดเวลา ค่าใช้จ่ายในการเพาะเลี้ยง และเก็บรักษาเซลล์ต้นแบบเพื่อให้มีไว้ใช้อย่างต่อเนื่อง โดยที่ไม่ต้องตั้งต้น เพาะเลี้ยงเซลล์ต้นแบบทุกครั้ง สามารถยืดระยะเวลาช่วงชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยงได้นานขึ้น และมีความหลากหลายในชนิดของเซลล์แมลงเพาะเลี้ยงต้นแบบ นอกจากนี้ ในต่างประเทศมีการผลิตเซลล์ ขยายเพื่อการค้าในรูปแบบแช่แข็งซึ่งมีราคาสูงมาก ดังนั้น จึงควรมีการทดลองวิจัยหารูปแบบการเก็บรักษา เซลล์เพาะเลี้ยง เพื่อประหยัดค่าใช้จ่ายในการดำเนินงานวิจัยภายในประเทศ และมีแนวทางที่ผลิต เซลล์เพื่อการค้าได้อีกด้วย

### วิธีดำเนินการ

#### อุปกรณ์

1. วัสดุอุปกรณ์ในการเก็บตัวอย่างแมลงและการเลี้ยงแมลงในห้องปฏิบัติการ เช่น กล่อง พลาสติก ปากคีบ น้ำหวาน อาหารเทียมเลี้ยงแมลง เป็นต้น
2. วัสดุอุปกรณ์การเพาะเลี้ยงเซลล์แมลง เช่น อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ ขวดใส่สารละลาย สารเคมี ผสมสูตรสำเร็จ กระจกกรอง ชุดกรองสารละลาย จานพลาสติกเพาะเลี้ยงเซลล์แมลง หลอดดูด สารละลาย 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 ตู้ควบคุม อุณหภูมิ เครื่องเพาะเลี้ยงเซลล์ cell spin เป็นต้น
4. วัสดุอุปกรณ์เก็บตัวอย่าง Cell line เช่น หลอด Cryotube ใส่สารละลาย ไนโตรเจนเหลว เป็นต้น

#### วิธีการ

1. เตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลง และเซลล์เพาะเลี้ยง
2. พัฒนารูปแบบการทดสอบการเก็บรักษาเซลล์เพาะเลี้ยง แบบระยะสั้น โดยการเก็บรักษาใน ภาชนะเลี้ยงที่อุณหภูมิต่ำกว่า 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 ตรวจวิเคราะห์คุณภาพของเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล เปรียบเทียบกับเซลล์นอนแมลงปกติ โดย สกัดตัวอย่างนอนและเซลล์เพาะเลี้ยง ด้วยโกร่งเย็น เติม PBS 1,000  $\mu$ l เพื่อรักษาสภาพเซลล์ ปั่นเหวี่ยง 2,000 - 5,000 rpm 5 นาที เติม extraction buffer 500  $\mu$ l บ่มที่อุณหภูมิ  $65^{\circ}\text{C}$  นาน 10 นาที เติม cool 5M potassium acetate 120  $\mu$ l และ proteinase K 10  $\mu$ l แช่เย็น 30 นาที เติม phenol/chloroform 1:1 500  $\mu$ l 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  $\mu$ l ปั่นเหวี่ยง 12,000 rpm นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้งเหลือแต่ตะกอนทิ้งให้ ethanol ระเหยที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที จากนั้นเติม TE buffer 30  $\mu$ l ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที หลังจากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้ไปทำการวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสสำหรับวิเคราะห์แถบของดีเอ็นเอ

5. บันทึกผลทุกขั้นตอน พร้อมสรุปผล

#### เวลาและสถานที่

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

#### ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

นำเซลล์เพาะเลี้ยงที่เจริญในภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 35 มม. อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงศัตรูพืช มีค่าออสโมซิส 350 – 360 mOsmols/kg. ค่า pH 6.2- 6.3 เพาะเลี้ยงในสภาวะค่าออสโมซิส 350 – 360 mOsmols/kg. ค่า pH 6.2- 6.3 ที่อุณหภูมิ  $27^{\circ}\text{C}$  ระยะเวลา 24 ชั่วโมง/วัน เปรียบเทียบที่อุณหภูมิ  $25-28^{\circ}\text{C}$  ระยะเวลา 12 ชั่วโมง/วัน ตรวจหาค่าร้อยละการเจริญของเซลล์ที่สามารถเจริญต่อไปได้ (cells viability) และตรวจดูความต่อเนื่องของการเจริญของเซลล์พบว่า เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิต่างๆสภาพแวดล้อมกัน เซลล์เพาะเลี้ยงทั้ง 4 ชนิด สามารถเจริญเติบโตแบ่งเซลล์ได้ดี ที่อุณหภูมิห้อง  $25-28^{\circ}\text{C}$  (12 ชั่วโมง/วัน) ซึ่งยังคงสภาพได้เป็นเซลล์เพาะเลี้ยง (cell line) ได้ ส่วนที่ควบคุมอุณหภูมิ  $5^{\circ}\text{C}$  ระยะเวลา 24 ชั่วโมง/วัน เพาะเลี้ยงในตู้ควบคุมอุณหภูมิ  $5^{\circ}\text{C}$  ยังไม่ได้เซลล์ต้นแบบที่มีอัตราการเจริญที่ดีกว่าวิธีการเดิมที่เพาะเลี้ยงในตู้ควบคุมอุณหภูมิ  $27^{\circ}\text{C}$  และ การตรวจสอบคุณภาพเซลล์ตามระยะการเก็บรักษาเซลล์เพาะเลี้ยง เปรียบเทียบกับเซลล์นอนแมลงด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล พบว่า แถบของดีเอ็นเอเซลล์เพาะเลี้ยง เปรียบเทียบกับเซลล์นอนแมลงอยู่ที่ตำแหน่งตรงกัน ซึ่งควรได้มีการวิจัยเพิ่มเติม โดยใช้

Degenerate primers หรือ Restriction enzyme หรือ ลำดับเบสของดีเอ็นเอ เพื่อยืนยันผลความเหมือนกัน และ ควรเพิ่มระยะเวลาการเก็บรักษาซึ่งจะยืนยันผลได้ดียิ่งขึ้น

### สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

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

### เอกสารอ้างอิง

- สุชลวัจน์ 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.
- 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.