The Thai Journal of Veterinary Medicine

Volume 15
Issue 4 *December, 1985*

Article 8

12-1-1985

เซลล์เลี้ยงของปลาช่อน

สุมิตรา วัฒโนดร

วิวัฒน์ ชวนใช้

วัฒนา วัฒนวิจารณ์

Follow this and additional works at: https://digital.car.chula.ac.th/tjvm

Part of the Veterinary Medicine Commons

Recommended Citation

วัฒโนดร, สุมิตรา; ชวนใช้, วิวัฒน์; and วัฒนวิจารณ์, วัฒนา (1985) "เซลล์เลี้ยงของปลาช่อน," *The Thai Journal of Veterinary Medicine*: Vol. 15: Iss. 4, Article 8.
DOI: https://doi.org/10.56808/2985-1130.1425
Available at: https://digital.car.chula.ac.th/tjvm/vol15/iss4/8

This Article is brought to you for free and open access by the Chulalongkorn Journal Online (CUJO) at Chula Digital Collections. It has been accepted for inclusion in The Thai Journal of Veterinary Medicine by an authorized editor of Chula Digital Collections. For more information, please contact ChulaDC@car.chula.ac.th.

เซลล์เลี้ยงของปลาช่อน

*สุมิตรา วัฒโนดร วท.บ., Cert, in U.S. Med. Comp. Training.**
*วิวัฒน์ ขวนใช้ สพ.บ., M.Sc. Vet.**
*วัฒนา วัฒนวิจารณ์ สพ.บ., Ph.D.**

บทย่อ

ได้นำลูกปลาช่อนมาทำเป็นเซลล์เลี้ยง พบว่าเซลล์เจริญได้ดีที่ 26 - 28° C. มีลักษณะเป็น fibroblast มี microvilli ขนาดสั้นและยาวอยู่รอบเซลล์ ส่วนการศึกษาโครโมโซม พบว่าจำนวน diploid chromosome ของปลาช่อนเป็น 2n=44

บทนำ

ในการเตรียมเซลล์เลี้ยงโดยเฉพาะเซลล์สัตว์เลือดอุ่นมีกระดูกสันหลังได้มีการศึกษากันมานานแล้ว ซึ่งเซลล์เลี้ยงเหล่านี้สามารถเตรียมเป็น cell line ได้หลายชนิด ทำให้การศึกษาไวรัสในสัตว์เลือดอุ่นก้าวหน้าไปมาก แต่ในทางตรงข้ามเซลล์เลี้ยงของสัตว์เลือดเย็น โดยเฉพาะในปลา การศึกษาเกี่ยวกับเซลล์เลี้ยงเพิ่มเริ่มต้นมาได้ประมาณ 30 - 40 ปี เท่านั้น ซึ่งส่วนใหญ่จะศึกษากันมากในปลาของเขตหนาว และสามารถเตรียมเป็น cell line ได้หลายชนิด ส่วนปลาในเขตร้อน เช่น เมืองไทย ยังมีการศึกษาเกี่ยวกับเซลล์เลี้ยงกันน้อยมาก ทำให้การศึกษาไวรัสในปลาของเมืองไทยยังไม่ก้าวหน้าเหมือนเช่นในเขตหนาว

---

* คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนอังรีดูนังต์ กทม. 10500.

ในปัจจุบัน cell line มีลักษณะเฉพาะใช้กันอย่างกว้างขวางอยู่ 6 ชนิด ซึ่งให้ชื่อเป็น Certified cell line (CCL) เซลล์เหล่านี้เก็บไว้ใน American Type Culture Collection (ATCC) ซึ่งมี brown bullhead, BB (CCl 59); bluegill fry, BF-2 (CCL 91); goldfish CAR (CCL 71); fathead minnow, FHM (CCL 42); grunt fin, GF (CCL 58) และ rainbow trout gonad, RTG-2 (CCL 55) (Wolf and Mann, 1980) มี cell line หลายชนิดที่ทำมาจากเนื้องงอกเช่น EPC line ได้มาจากปลาคาร์พ (Cyprinus carpio) RTH และ RTN lines ได้มาจาก rainbow trout (Salmo gairdneri), WC-1 line ได้มาจาก walleye (Stizostedion vitreum) และ PS-12 ได้มาจาก northern pike (Esox lucius) (Wolf, and Mann, 1980)

โรคระบาดปลาน้ำจืดของประเทศไทยได้เกิดขึ้นเมื่อปี พ.ศ. 2525 - 2528 และได้พบไวรัสอยู่ในปลาป่วยที่เป็นโรคระบาดนี้ (Wattanavijarn *et al.*, 1985) ดังนั้น หน่วยงานนี้จึงได้พยายามที่จะสร้างเซลล์เลี้ยงของปลาในประเทศไทยเพื่อเลี้ยงไวรัสที่พบจากปลาในขณะเกิดโรคระบาด ซึ่งเซลล์เลี้ยงนี้จะเป็นเซลล์ที่เหมาะสมที่สุดในการเลี้ยงไวรัสที่พบในปลาของประเทศไทยและเขตเมืองร้อน

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมเซลล์เลี้ยงจากปลาช่อน

นำลูกปลาช่อนขนาดความยาวประมาณ 3 - 4 เซนติเมตรมาล้างด้วยน้ำสะอาดหลาย ๆ ครั้ง แล้วใส่ใน 10% hypochlorite solution หลังจากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นอีกหลาย ๆ ครั้ง เพื่อกำจัด hypochlorite ออกให้หมดตัดส่วนหัวและลำไส้ของลูกปลาทิ้ง นำส่วนที่เหลือใส่ใน Hanks' balanced salt solution (HBSS) ตัดส่วนนี้ออกเป็นชิ้นเล็ก ๆ ให้มีขนาดประมาณ 1 - 2 มิลลิเมตร แล้วล้างด้วย HBSS อีก 2 - 3 ครั้ง นำชิ้นเนื้อเหล่านี้ใส่ในขวดแก้วแล้วเติม 0.25% trypsin ลงไปประมาณ 5 เท่าของชิ้นเนื้อ กวนทิ้งไว้นานประมาณ 15 - 30 นาที เทส่วนใสทิ้งแล้วเติม 0.25% trypsin ลงไปใหม่ในปริมาณเท่าเดิม ทิ้งไว้ประมาณ 15 - 30 นาทีอีกเช่นกัน นำส่วนใสซึ่งเป็นส่วนของเซลล์ที่ถูกย่อยออกมาเก็บไว้ที่ $4^{\circ}C$ ทำเช่นเดียวกันนี้จนเซลล์ถูกย่อยออกมากที่สุด แล้วนำไปกรองผ่านผ้ากรอง เก็บส่วนกรองไปปั่นที่ $4^{\circ}C$,200g, นาน 30 นาที เก็บส่วนที่เป็นเซลล์ซึ่งตกตะกอนที่ก้นหลอดมาล้างด้วย HBSS อีก 3 ครั้ง หลังจากนั้นนำมาผสมด้วย growth medium ซึ่งประกอบด้วย

10% fetal calf serum, Leibovitz Medium L - 15 และยาปฏิชีวนะ คือ penicillin (100 I.U./ml) และ streptomycin (100 µg/ml) หลังจากจ่ายเซลล์ไปยังขวดเลี้ยงแล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 26 - 28°C ประมาณ 48 - 72 ชั่วโมงหลังจากนี้เทอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าทิ้งและเติมอาหารใหม่ลงไปแทน เซลล์จะขึ้นเต็มพื้นแก้วภายในเวลา 7 วัน เมื่อเซลล์ขึ้นเต็มพื้นแก้วแล้วก็จะแบ่งเซลล์ต่อไปยังขวดเลี้ยงใหม่ได้ ในปัจจุบันสามารถเลี้ยงได้จนถึง 30 passages แล้วเซลล์มีลักษณะเป็นพวก fibroblast

Scanning electron microscopy

นำแผ่นแก้วที่เลี้ยงเซลล์ปลาย่อนไว้แช่ใน 2.5% glutaraldehyde นานประมาณ 2 ชั่วโมง แล้วระเหยน้ำออกด้วย ethanol ในระดับต่าง ๆ นำไปดำเนินการทาง critical point drying แพบด้วยทอง แล้วตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่แกน (JEOL Model JEM-35CF)

Karyotype analysis

ได้เลือกเซลล์ปลาย่อนที่มีอายุประมาณ 12 - 48 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงที่เซลล์มีการแบ่งตัวมากมาหยดด้วย colchicine นำมาอบที่อุณหภูมิ 26 - 28°C นานประมาณ 2 ชั่วโมง แล้วเก็บเซลล์ที่อยู่ในระยะ metaphase หลังจากปั่นที่ 80g นาน 10 นาที แล้วนำส่วนเซลล์นี้ไปผสมกับ 0.55% KCL นาน 10 นาที ที่ 26 - 28°C นำเซลล์ที่ได้มาผสมกับ 1:3 glacial acetic acid และ absolute ettanol นานประมาณ 45 นาที หลังจากนั้นนำเซลล์มาหยดบนสไลด์ ย้อมด้วยสี giemsa ศึกษาโครโมโซมจากกล้องจุลทรรศน์ ถ่ายภาพ และทำ karyotype

ผล

หน่วยงานนี้ได้พยายามที่จะสร้างเซลล์เลี้ยงปลาย่อนขึ้นมาให้ได้ เพื่อใช้เลี้ยงไวรัสชนิดต่าง ๆ ที่พบในโรคระบาดปลาน้ำจืดที่เกิดขึ้นในประเทศไทย แต่ความพยายามก็ได้ประสบความล้มเหลวหลายครั้ง เนื่องจากลูกปลาที่นำมาหลังจากเกิดโรคระบาดแล้วนี้พบว่ามีอินคลูซันบอดีและไวรัสอยู่ในตัวปลาแล้ว ซึ่งบ่อยครั้งพบว่าเซลล์ที่เลี้ยงไว้จะตายหมด หน่วยงานนี้ได้พยายามเก็บลูกปลาย่อนมาจากแหล่งต่าง ๆ ที่คาดว่ายังไม่ได้รับเชื้อไวรัสมาเลี้ยงใหม่อยู่เรื่อย ๆ ในที่สุดก็พบว่าสามารถเลี้ยงเซลล์ปลาย่อนได้เป็นผลสำเร็จ เซลล์เลี้ยงของปลาย่อนมีลักษณะของ fibroblast (รูปที่ 1) และพบว่าอุณหภูมิที่ 26 - 28°C เซลล์เลี้ยงนี้เจริญได้ดีที่สุด ส่วนอุณหภูมิที่ 37°C ทำให้เซลล์เลี้ยงนี้ตายหมด

เมื่อนำเซลล์เลี้ยงนี้ไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่แกนก็พบเซลล์มีลักษณะเป็นรูปกระส่วย พร้อมกับมี microvilli ขนาดสั้นและยาวอยู่รอบ ๆ ตัวเซลล์ (รูปที่ 2)

ส่วน karyotype ของเซลล์เลี้ยงปลาช่อนนั้นพบว่ามี จำนวนโครโมโซมประกอบด้วย metacentric 2 คู่ submetacentric 1 คู่ และ acrocentric chromosome อีก 19 คู่ (รูปที่ 3)

วิจารณ์

โดยทั่วไปการเตรียมเซลล์เลี้ยงของปลาส่ามารถใช้อวัยะวะต่าง ๆ ได้จากปลาหลายชนิด เช่น ครีบ เหงือก ตับ ไต หัวใจ ถุงลม และอวัยวะสืบพันธุ์ อายุของปลาที่นำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงใช้ได้ตั้งแต่ปลายังไม่เจริญเต็มที่จนถึงปลาที่เจริญเต็มที่แล้ว ส่วนอาหารเลี้ยงเซลล์ซึ่งมีความสำคัญต่อการเจริญของเซลล์โดยทั่วไปส่ามารถใช้ได้หลายชนิด เช่น Eagle's minimal essential medium, Medium 199, Leibovitz Medium L-15 โดยมี pH อยู่ในช่วง 7.2 - 7.4 อุณหภูมิที่ใช้เลี้ยงเซลล์ก็มีความสำคัญมากเช่นกัน ปกติเซลล์ปลาเจริญได้ในอุณหภูมิระหว่าง 15 - 30°C สำหรับการทดลองเลี้ยงเซลล์ปลาช่อนพบว่าเซลล์เลี้ยงนี้เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 26 - 28°C และเจริญใน Leibovitz Medium L - 15 ซึ่งมี 10% fetal calf serum อยู่ด้วย ได้ดีกว่าอาหารชนิดอื่น เซลล์ปลาช่อนจะเจริญเต็มพื้นแก้วในเวลาประมาณ 7 วัน และส่ามารถแบ่งเซลล์เพื่อถ่ายทอดต่อไปได้

จากการทดลองเลี้ยงเซลล์เนื้องอกของตับซึ่งชักนำให้เกิดโดย aflatoxin ของปลาเทราท์ พบว่าเซลล์เป็น heteroploid มีจำนวนโครโมโซม 54 และ 60 (Fryer, 1981) ส่วนเซลล์เลี้ยงของปลาช่อนนี้พบว่าเซลล์เป็น diploid มีจำนวนโครโมโซม 2n=44.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอขอบพระคุณต่อกรมประมง กระทรวงเกษตรและส่หกรณ์ที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัย ดร. กมลพร ทองอุไทย แห่งส่ถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ รศ. น.ส่พ. ระบิล รัตนพานิ คณบดีคณะสัตวแพทย์ศาส่ตร์ และ รศ. ดร. วิรุฬห์ มังคละวิรัช ผู้อำนวยการศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาส่ตร์และเทคโนโลยีที่ให้ความส่นับส่นุนงานวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

Wolf, K.E. and Mann, J.A. 1980. Poikilotherm vertebrate cell lines and viruses: A current listing for fishes. In Vitro. 16 (2): 168-179.

Wattanavijarn, W., Ruttanaphani, R., Tesprateep, T., Tangtrongpiros, J., and Thirapatsakun, T. 1985. Detection of virus in the sick snakehead fish during a disease epizootic by light and electron microscopy. Accepted for publication in National History Bulletin of the Siam Society. 1985. 33(2):2.

Fryer, J.L., McCain, B.B., and Leong J.E. 1981. A cell line derived from rainbow trout (Salmo gairdneri) hepatoma. Fish Pathology. 15:193-200.

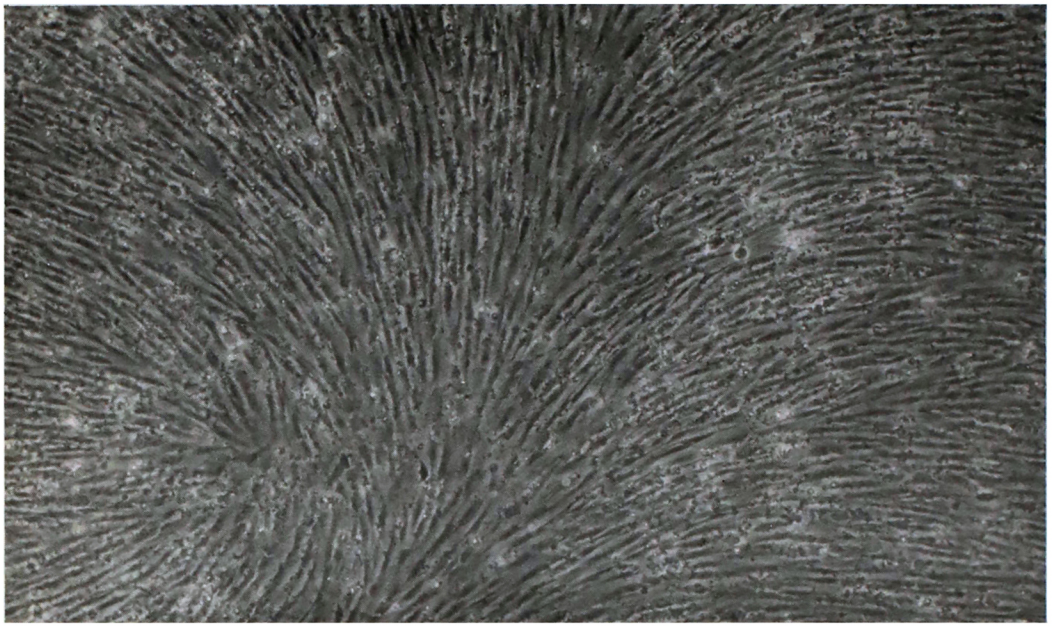


Figure 1. Photomicrograph of snakehead fish cells at passage 28 showing characteristic fibroblastic morphology. Magnification 200X.

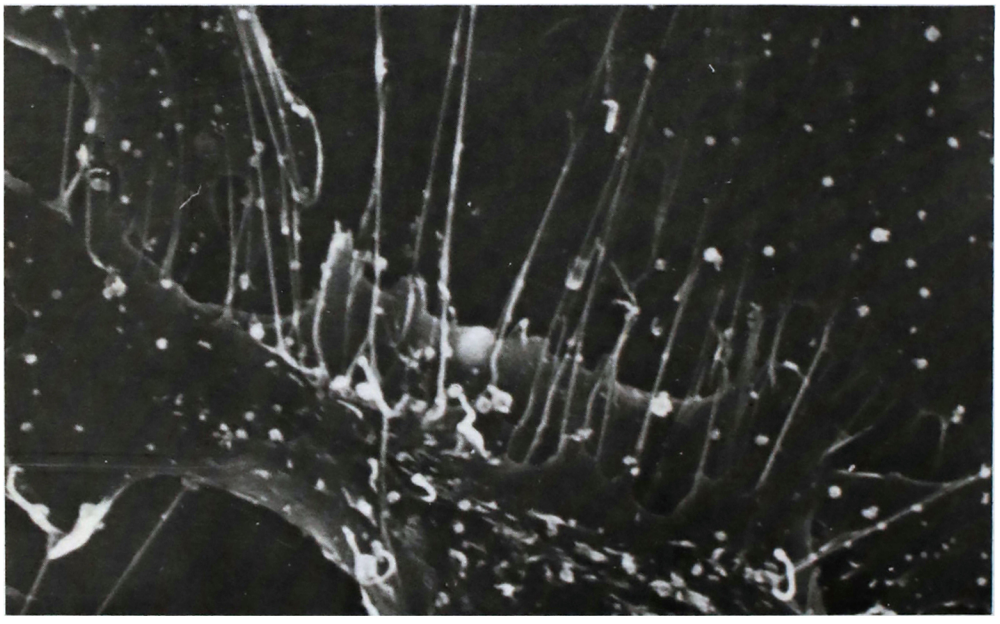
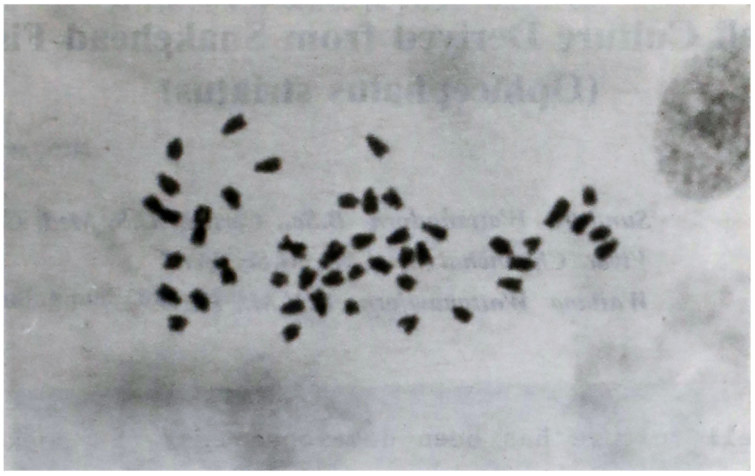
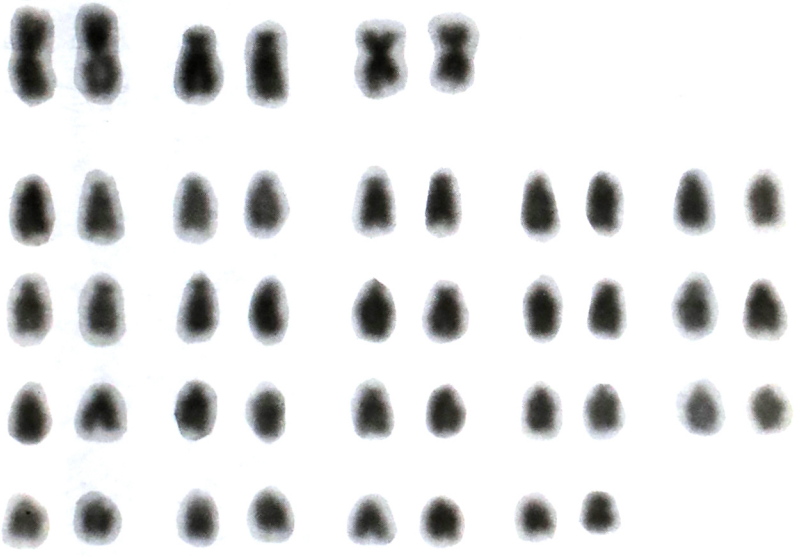


Figure 2. Scanning electron micrograph showing short and long microvilli around the cell. Magnification 7,000X.





KARYOTYPE $2n = 44$

Common name **Snakehead fish**

Scientific name **Ophicephalus striatus**

Figure 3. Karyotype of the snakehead fish cell.

Summary
Cell Culture Derived from Snakehead Fish (Ophicephalus striatus)

*Sumittra Wattanodorn B.Sc., Cert. in U.S. Med. Comp. Training.**
*Vivat Chuanchai D.V.M., M.Sc. Vet.**
*Wattana Wattanavijarn D.V.M., Ph.D.**

Cell culture has been developed from the snakehead fish. Cells are routinely cultured at 26 - 28°C and show fibroblastic morphology with short and long microvilli. Chromosome analysis indicated that a cell is diploid with chromosome number of 44.

---

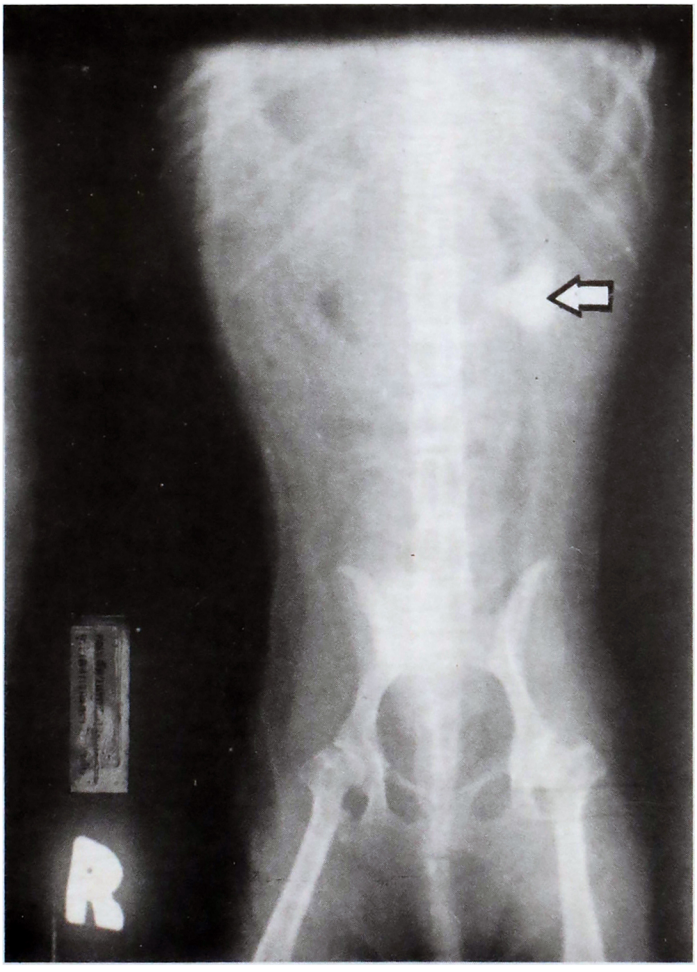
*Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Henri Dunant Street, Bangkok 10500.

Answer for what is your diagnosis

Radiographic diagnosis

Renal calculi.

Radiographic finding and comments



A large radio-opaque calculi about 2x2 cm. in diameter can be visualized at the left renal pelvis (arrow). Renal uroliths are common in dogs and are composed of triple phosphates. They vary in number, size, density and location. Most of them located within the renal pelvis called staghorn calculi. Two radiographic positions are strongly recommended to locate the calculus. Intravenous urography is more advantageous in evaluating not only the location of the renal urolith but also renal obstruction.