



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของหอยเป่าชื่อชนิดต่างๆ

โดย รองศาสตราจารย์ สพ.ญ. ดร.ดวงสมร สุวิทย์มน
และคณะ

กันยายน 2554

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของหอยเป่าฮือชนิดต่างๆ

คณะผู้วิจัย

1. รศ.สพ.ญ.ดร.ดวงสมร สุวิฑฒน
2. รศ.น.สพ.ดร.วีระพงศ์ โกยกุล

สังกัด

คณะสัตวแพทยศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
คณะสัตวแพทยศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดย สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

สารบัญ

บทนำ	1
บทสรุปสำหรับผู้บริหาร (Executive Summary)	2
บทคัดย่อ (Abstract ภาษาไทย)	4
Abstract (ภาษาอังกฤษ)	5
เนื้อหางานวิจัย	6
การเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อหอยเป่าฮื้อ	6
การศึกษาโครโมโซมหอยเป่าฮื้อ	15
บทสรุปงานวิจัย	26
ภาคผนวก	
บทความงานวิจัยที่ได้รับการเผยแพร่	48
ตารางเปรียบเทียบแผน กิจกรรม	
ผลที่คาดว่าจะได้รับและผลที่ได้รับตลอดโครงการ	52
รายงานการเงิน	53

บทนำ

โครงการวิจัยเรื่อง การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของหอยเป่าฮ้อชนิดต่างๆ รหัสโครงการ RDG 4820007 ได้รับการสนับสนุนเงินทุนวิจัยจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัย (สกว.) ระยะเวลา 2 ปี ตั้งแต่ 1 พฤศจิกายน 2547 ถึงวันที่ 31 ตุลาคม 2549 และได้รับอนุมัติให้ปรับแผนการวิจัยและขยายระยะเวลาการวิจัยต่อไปอีกถึงวันที่ 31 ธันวาคม 2552 ผลการดำเนินงานตามแผนกิจกรรมวิจัยเพื่อศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของหอยเป่าฮ้อชนิดต่างๆ โดยการเก็บเกี่ยวโครโมโซมจากเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงได้พบอุปสรรคและปัญหาในขั้นตอนต่างๆ ของการวิจัย ประกอบด้วย การเพาะเลี้ยงเซลล์หอยเป่าฮ้อจากเนื้อเยื่อ พบการเจริญแบ่งเซลล์มีการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียและปรสิตภายนอก ทำให้ได้จำนวนเซลล์ไม่มากพอสำหรับการเก็บเกี่ยวโครโมโซม การศึกษาโครโมโซมและการจัดทำคาริโอไทป์จึงต้องใช้เซลล์ที่ได้จากเนื้อเยื่อหอยโดยตรงที่ไม่ผ่านการเพาะเลี้ยง ซึ่งโครโมโซมที่ได้จากเซลล์เนื้อเยื่อโดยตรงมีคุณภาพไม่เหมาะสม ที่จะศึกษาลักษณะทางเซลล์พันธุศาสตร์ได้อย่างลึกซึ้ง ด้วยอุปสรรคดังกล่าว การศึกษาวิจัยเรื่องการเพาะเลี้ยงเซลล์และเรื่องเซลล์พันธุศาสตร์ จึงได้ดำเนินการเฉพาะในหอยเป่าฮ้อที่พบมากในประเทศไทยเพียงชนิดเดียว คือ *Haliotis asinina* ซึ่งผลงานเรื่องการเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อของ *H. Asinina* ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่ใน Suwattana D, Jirasupphachok J, Jarayabhand P, Koykul W. 2010. In vitro culture of gill and heart tissues of the abalone *Haliotis asinina*. Journal of Shellfish Research, 29(3): 651-653.

รองศาสตราจารย์ ส.พ.ญ.ดร.ดวงสมร สุวัฑฒน

หัวหน้าโครงการวิจัย

5 กันยายน 2554

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร (Executive Summary)

โครงการ "การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของหอยเป่าอีชนิดต่างๆ" มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของหอยเป่าอี (lissue culture) สำหรับการศึกษาลักษณะของโครโมโซม และคาร์ิโอไทป์ของหอยเป่าอีชนิด *Haliotis asinina* และชนิดอื่นๆ ที่พบในประเทศไทยและเลี้ยงในเชิงพาณิชย์ โดยศึกษาแบบแผนการติดสีของโครโมโซม และจัดทำไอดีโอแกรม (ideogram) ที่เป็นมาตรฐาน และเพื่อนำข้อมูลด้านเซลล์พันธุศาสตร์ของหอยเป่าอีไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาความเป็นไปได้ และผลกระทบของการผสมข้ามชนิดเพื่อให้เกิดลักษณะตามความต้องการทางเศรษฐกิจ

การเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อ (*in vitro* culture) ของหอยเป่าอีชนิด *H. asinina* พบอุปสรรคของการปนเปื้อน (contamination) ของเชื้อโปรโตซัว เชื้อรา และเชื้อแบคทีเรีย ที่ติดตัวหอยมาจากกระบวนการเลี้ยง และอุปสรรคเรื่องการกระตุ้นให้เซลล์ของหอยเป่าอีแบ่งตัว คณะผู้วิจัยได้ศึกษาผลกระทบต่างๆ ของการเพาะเลี้ยงเซลล์หอยเป่าอีและกำจัดอุปสรรคต่างๆ จนเกิดผลสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเซลล์ของ *H. asinina* จากชิ้นเนื้อเยื่อเหงือก และหัวใจ (gill and heart tissues – primary explants) โดยทำการลด และกำจัดการปนเปื้อนของจุลชีพด้วยการล้างทำความสะอาดอย่างสมบูรณ์ และเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Leibovitz – L15 medium และใช้สารกระตุ้นการแบ่งตัวและเพิ่มจำนวนเซลล์ประกอบด้วย insulin – like growth factor II (IGF-II) และ basic fibroblast growth factor (bFGF)

การศึกษาลักษณะของโครโมโซม และการจัดทำคาร์ิโอไทป์ ของ *H. asinina* ได้ดำเนินการโดยใช้เซลล์ที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (cultured cells) และโดยใช้เซลล์จากเนื้อเยื่อหอยโดยตรง (direct method) ผลการศึกษาได้คาร์ิโอไทป์ของ *H. asinina* ($2n = 32$) และได้จัดทำรูปแบบคาร์ิโอไทป์ตามหลักสากลนิยม สำหรับใช้เป็นโครงร่างในการจัดทำแผนที่ทางพันธุกรรมในระดับโมเลกุลต่อไป ส่วนการศึกษาลักษณะรูปแบบเฉพาะของโครโมโซมแต่ละตัว โดยการย้อมสีพิเศษชนิด GTG-banding พบว่า ยังให้ผลไม่ชัดเจนเท่าที่ควร ทั้งนี้คณะนักวิจัยคาดว่า การเพาะเลี้ยงเซลล์หอยเป่าอีจากเนื้อเยื่อเหงือกและหัวใจที่สามารถพัฒนาวิธีการได้สำเร็จจะช่วยทำให้สามารถเพาะเลี้ยงเซลล์ได้จำนวนมากตามความต้องการ และโครโมโซมมีคุณภาพดีเหมาะสมกับการศึกษาลักษณะรูปแบบเฉพาะของโครโมโซมแต่ละตัว จนสามารถจัดทำไอดีโอแกรมที่สมบูรณ์ของหอยเป่าอีได้ในที่สุด

การเพาะเลี้ยงเซลล์หอยเป่าฮื้อชนิด *H. asinina* ของการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ นับเป็นผลสำเร็จครั้งแรกของโลก โดยข้อมูลด้านเซลล์พันธุศาสตร์ของหอยเป่าฮื้อสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาความเป็นไปได้ และผลกระทบของการผสมข้ามชนิดเพื่อให้เกิดลักษณะที่ต้องการทางเศรษฐกิจ นอกจากนี้ เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อหอยเป่าฮื้อที่พัฒนาได้ในการวิจัยนี้ ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ เช่น microbiological and toxicological assays และ molecular biology and genetics.

บทคัดย่อ

การเพาะเลี้ยงเซลล์ จากเนื้อเยื่อเหงือกและหัวใจ และการศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์ของหอยเป่าฮือ (*Haliotis asinina*)

เนื้อเยื่อเหงือกและหัวใจชนิด *Haliotis asinina* ได้รับการเพาะเลี้ยงแบบ primary explants ใน Leibovitz-L15 medium ที่เสริมด้วยสารกระตุ้นการแบ่งเซลล์ 2 ชนิด คือ insulin-like growth factor II (IGF-II) และ basic fibroblast growth factor (bFGF) พบว่าสภาวะของการเลี้ยงเซลล์ที่ pH 7.8 – 8.0 อุณหภูมิ 27 – 28 °C และความเค็ม (salinity) ที่ 31-32 ‰ มีความเหมาะสมต่อการแบ่งตัวของเซลล์ เซลล์ที่เกิดขึ้นมี 2 ชนิด คือ เซลล์รูปร่างกลมไม่ยึดเกาะพื้นผิว และเซลล์คล้ายไฟโบรบลาสต์ที่ยึดเกาะพื้นผิวและเจริญแผ่ขยายเป็น monolayer เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์หอยเป่าฮือชนิด *H. asinina* ประสบผลสำเร็จเป็นครั้งแรกของโลก

การศึกษาโครโมโซมของหอยเป่าฮือ *H. asinina* โดยการเก็บเกี่ยวโครโมโซมโดยตรงจากเซลล์ในตัวหอย และการเก็บเกี่ยวโครโมโซมจากเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง (cultured cells) พบว่าคาริโอไทป์ของ *H. asinina* คือ $2n = 32$ การย้อมสีพิเศษชนิด GTG-banding ได้โครโมโซมที่สามารถนำมาจัดทำโครมโซมไอดีโอแกรมมาตรฐานได้

เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์หอยเป่าฮือที่พัฒนาขึ้น และเซลล์ที่เพาะเลี้ยงได้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการทดสอบทางจุลชีววิทยาและพิษวิทยา ข้อมูลด้านเซลล์พันธุศาสตร์ของ *H. asinina* สามารถนำไปประยุกต์ศึกษาความเป็นไปได้และผลกระทบของการผสมข้ามชนิดเพื่อให้เกิดลักษณะตามต้องการทางเศรษฐกิจ

ABSTRACT

In vitro culture of gill and heart tissues and cytogenetics studies on the abalone, *Haliotis asinina*.

Gill and heart tissues from the abalone, *Haliotis asinina*, were cultured *in vitro* using Leibovitz-L15 medium supplemented with insulin-like growth factor II (IGF-II) and basic fibroblast growth factor (b-FGF). Culture conditions at pH 7.8–8.0, 27–28 °C and 31–32‰ salinity yielded cell growth expansion from the explanted tissue. Dissociated, floating spherical cells were found along with spindle-shaped fibroblast-like cells, forming cell monolayer. This study provides basic knowledge in the development of *in vitro* culture technology of the abalone tissues and being the first report on *H. asinina* cell culture.

Studies on the chromosome of *H. asinina* were undertaken in two methods: chromosome harvest directly from abalone tissues (direct method) and from cultured cells. Both methods yielded chromosomes with $2n=32$. *H. asinina* karyotypes were made and a draft of ideogram was created.

Abalone tissue culture techniques and the yield of cultured cells could be applied in use of microbiological and toxicological assays. Cytogenetic data on *H. asinina* would be beneficial to studies on the probability and impact of inter-specific breedings to enhance the economic traits of the abalone.

เนื้อหางานวิจัย

การเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อหอยเป่าฮือ

ตัวอย่างหอยเป่าฮือ (*H. asinina*) ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ ได้รับมาจากสถาบันทรัพยากรทางน้ำ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในแต่ละครั้งห่างกันประมาณ 1-8 สัปดาห์ ขนาดหอยตั้งแต่เล็กมากจนไม่เห็น เป็นระยะที่ยังว่ายน้ำอยู่และยังไม่ได้ลงเกาะพื้นผิว จำนวน 1 ถัง ในแต่ละครั้งความจุประมาณ 500-700 ซีซี (ได้รับตัวอย่างหอย 3 ครั้ง) จนถึงหอยที่ลงเกาะพื้นขนาดต่างๆ ได้แก่ หอยขนาดเล็กกว่า 0.5 ซม. (ครั้งละประมาณ 20-30 ตัวขึ้นไป) หอยขนาด 2-5 ซม. (ครั้งละประมาณ 5-20 ตัว) โดยได้รับตัวอย่างหอยทั้งสิ้นประมาณ 10 ครั้ง

การเพาะเลี้ยงหอยเป่าฮือ มีขั้นตอนหลักๆ ได้แก่

1. ทดลองทำความสะอาดหอยเพื่อให้ปราศจากเชื้อทุกชนิด ด้วยวิธีการฆ่าเชื้อแบบต่างๆ กัน สังเกตผลโดยดูว่ามีการติดเชื้อหรือไม่ในระหว่างการเพาะเลี้ยงในช่วง 1-7 วันแรก
2. ทดลองเพาะเลี้ยงเซลล์จากหอยขนาดต่างๆ กัน เพื่อดูว่าเซลล์จากหอยในระยะใด และอวัยวะส่วนใดของหอยที่มีศักยภาพในการนำมาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการได้บ้าง
3. ทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ทำความสะอาดจนปลอดเชื้อแล้ว ใน plate เลี้ยงเซลล์ด้วยวิธีต่างๆ สังเกตความสามารถของเซลล์ที่จะลงเกาะพื้นผิวภาชนะเลี้ยง และหรือมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนขึ้น
4. ทดลองใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดต่างๆ และปรับสภาวะที่ใช้เลี้ยงแบบต่างๆ เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมให้เซลล์เจริญเติบโต

ในแต่ละขั้นตอนมีรายละเอียดสรุปได้ดังนี้

1. การเพาะเลี้ยงเซลล์หอยเป่าฮือจากตัวอ่อน (embryos)

จากการพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์หอยเป่าฮือ โดยใช้หอยอายุมากกว่า 1 วันนั้น พบว่ามีอุปสรรคในการปนเปื้อนของเชื้อโปรโตซัว เชื้อรา และเชื้อแบคทีเรีย ที่ติดมากับตัวหอย ซึ่งแม้ว่าจะใช้วิธีในการกำจัดการปนเปื้อนต่างๆ ก็ไม่เกิดผล และการปนเปื้อนเหล่านี้ทำให้เซลล์หอยที่แยกได้เพื่อการเพาะเลี้ยงเกิดความอ่อนแอ ไม่สามารถแบ่งเซลล์และเจริญเป็น cultured cells ในระบบเพาะเลี้ยงได้ คณะผู้วิจัย จึงมีดำริ ที่จะป้องกันการปนเปื้อนโดยใช้เซลล์ไข่ (eggs) และตัวอสุจิ (sperm) มาทำการปฏิสนธิ และใช้ตัวอ่อน (embryos) อายุ 6 - 12 ชั่วโมง มาทำการแยกเซลล์ และเพาะเลี้ยง ตามวิธีการ ดังนี้

1. การเหนี่ยวนำให้เกิดการปฏิสนธิที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้เซลล์ไข่ และตัวอสุจิผสมกัน
2. ตัวอ่อนหอยที่ได้จากการปฏิสนธิเจริญจากระยะ zygote (2 – 4 เซลล์) จนถึงระยะ morula (4 – 32 เซลล์) ซึ่งตัวอ่อนระยะ morula เริ่มเคลื่อนที่ได้
3. ทดลองกำจัดการปนเปื้อนเชื้อโปรโตซัวโดยใช้สารละลาย 1% chlorox แล ตัวอ่อนและ บัณเฑาะฟอก พบว่า สามารถกำจัดเชื้อโปรโตซัวได้ผลดีพอควร โดยพบเชื้อโปรโตซัวใน ปริมาณลดลงมาก เมื่อเทียบกับกลุ่มทดลองที่ไม่ใช้สารละลาย 1% chlorox
4. ทำการแยกเซลล์ของตัวอ่อนโดยใช้สารละลาย collagenase เพื่อให้ได้เซลล์เดี่ยว (individual cells) เพื่อทำการเพาะเลี้ยง
5. ล้างเซลล์ด้วยน้ำทะเลที่ผสมสารละลายยาปฏิชีวนะ และยาต้านเชื้อรา เพื่อป้องกันการปนเปื้อน
6. ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์โดยวิธี seeding ลงในระบบการเพาะเลี้ยง (plates และ ขวด เพาะเลี้ยง) เพื่อให้เซลล์เกาะพื้นผิวและเริ่มการแบ่งตัวเพื่อสร้าง monolayer
7. อบอุ่น (incubate) ระบบเพาะเลี้ยงที่ 28 °C, 5% CO₂

การใช้ตัวอ่อนหอยเป่าอื้อที่ได้จากการปฏิสนธิมาทำการเพาะเลี้ยง พบว่าการปฏิสนธิประสบความสำเร็จได้ตัวอ่อนหอยจำนวนหนึ่งที่มีการเจริญจากระยะ 2 เซลล์ จนถึง 32 เซลล์ โดยเซลล์จากตัวอ่อนเหล่านี้เมื่อได้รับการแยกและกำจัดการปนเปื้อนแล้ว พบว่ามีชีวิตอยู่ในระบบเพาะเลี้ยงได้ระยะหนึ่ง (72 ชั่วโมง) แต่ไม่สามารถเกาะพื้นผิวและแบ่งเซลล์ต่อไปเป็น monolayer ได้ นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้ยาปฏิชีวนะและยาต้านเชื้อรา ยังไม่ประสบผลสำเร็จโดยยังพบการปนเปื้อนของเชื้อทั้ง 2 ชนิด ส่วนเชื้อโปรโตซัวนั้นสามารถกำจัดได้โดยใช้สารละลาย 1% chlorox

2. การเลี้ยงหอยเป่าอื้อก่อนทำ tissue culture

ขั้นตอนการเลี้ยงหอยก่อนการนำไปใช้ทำ tissue culture โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อทำการเลี้ยงหอยในสภาพที่มีความสะอาดให้มากที่สุด โดยการเลี้ยงด้วยน้ำทะเลเตรียมพิเศษที่ปลอดเชื้อ และพยายามลด content ในลำไส้หอยให้เหลือน้อยที่สุด

- a. การเตรียมน้ำทะเลพิเศษซึ่งจะใช้ในการศึกษาทุกขั้นตอน โดยการกรองน้ำทะเลที่ได้มาจากฟาร์มด้วยกระดาษกรองและผ้ากรองขนาดไม่เกิน 80-100 ไมครอน แล้วนำไปผ่านขั้นตอนการฆ่าเชื้อโดยการอบที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส จากนั้นปล่อยให้เย็นตัวที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงทำการปรับความเค็มอยู่ที่ 30‰ ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ แล้วจึงเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องและบางส่วนเก็บไว้ในตู้เย็น สำหรับใช้ทำการปรับอุณหภูมิ น้ำทะเลให้ใกล้เคียงน้ำที่อยู่ในถังเลี้ยงหอย

- b. เลี้ยงหอยที่ได้รับจากฟาร์มในถังน้ำควบคุมอุณหภูมิ โดยปรับความเย็นของน้ำไว้ที่อุณหภูมิระหว่าง 27-30 องศาเซลเซียส ทำการเปลี่ยนน้ำที่ใช้เลี้ยงหอยและทำความสะอาดภาชนะเลี้ยงหอยทุกวัน
- c. การเลี้ยงหอยในห้องปฏิบัติการ ไม่ให้อาหารหอยเลยตลอดการเลี้ยง โดยใช้เวลาไม่น้อยกว่า 1 สัปดาห์หรือจนกว่าจะไม่พบมูลหอย ก่อนนำไปทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
- d. เดิมอากาศในน้ำเลี้ยงหอยตลอดเวลาด้วยเครื่องทำฟองอากาศ (air pump)
- e. สังเกตสุขภาพของหอย โดยพิจารณาจากความแข็งแรงในการเกาะพื้นภาชนะ

ผลการเลี้ยงหอยก่อนการนำไปใช้ทำ tissue culture ในแต่ละครั้งใช้เวลาเลี้ยงไม่แน่นอน ขึ้นกับความแข็งแรงของหอยที่ได้รับมาจากฟาร์ม ปริมาณหอยที่ได้รับในแต่ละครั้งประมาณ 20-30 ตัวในขนาดต่างๆ กัน ระยะเวลาเลี้ยงหอยตั้งแต่ 2 สัปดาห์ถึง 2 เดือน โดยจะทยอยเก็บหอยไปทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อครั้งละ 1-3 ตัว จนกว่าจะหมด

ผลการเตรียมเนื้อเยื่อหอยก่อนการนำไปทำ tissue culture พบว่า

- a. หอยปล่อยเมือกในช่วงการเลาะเปลือกและขั้นตอนการฆ่าเชื้อเนื้อเยื่อหอยทั้งตัว ได้ทำการแก้ไขโดยการแช่หอยในน้ำเย็นจัดเป็นเวลานานก่อนการเตรียมเนื้อเยื่อและใช้น้ำที่เย็นจัดทุกขั้นตอนการล้างหอย พบว่า หอยลดการปล่อยเมือกลงได้บ้างแต่ผลยังไม่แน่นอนนัก ซึ่งเมือกรอบๆ ชิ้นเนื้อจะทำให้พื้นที่บริเวณรอบๆ ชิ้นเนื้อสกปรกและรบกวนการลงเกาะของเซลล์ใหม่
- b. การปนเปื้อนของเชื้อจนทำให้อาหารเลี้ยงเซลล์ ชื้นตั้งแต่เริ่มเพาะเลี้ยงชิ้นเนื้อพบน้อยมาก ส่วนใหญ่พบว่าแม้อาหารเลี้ยงเซลล์ จะใสตลอดการเลี้ยง แต่ยังสามารถตรวจพบแบคทีเรียขนาดเล็ก รูปร่างกลมขนาดไม่แน่นอนปะปนกับเซลล์ขนาดใหญ่ และมีจำนวนเพิ่มขึ้นตามอายุการเลี้ยงเซลล์อย่างช้าๆ
- c. ปริมาณเนื้อหอยบริเวณที่ไม่สัมผัสกับสิ่งแวดล้อมรอบตัวมีน้อยมาก จึงทำให้ขั้นตอนการฆ่าเชื้อโดยทำให้เซลล์หอยไม่ตายและเหลือเซลล์ที่จะแบ่งตัวต่อไปได้มากที่สุด เป็นขั้นตอนที่ยากมาก ซึ่งพบว่า ผลที่ได้ยังไม่ค่อยแน่นอน ขึ้นอยู่กับขนาดและความสะอาดของหอยที่ได้รับ
- d. การใช้หอยขนาดเล็กโดยมีความยาวเปลือก 0.5-1.5 ซม. มีข้อดีที่มีเซลล์หอยที่กำลังแบ่งตัวได้ดี แต่มีข้อเสียคือ ทำให้อาหารสะอาดและปลอดเชื้อโดยเหลือเซลล์หอยที่ไม่ตายและแบ่งตัวต่อไปจำนวนมากได้ยาก ส่วนการใช้หอยขนาดใหญ่จะพบปัญหาเซลล์แบ่งตัวได้ช้ามากจากการทดลองเลี้ยงเซลล์จากชิ้นเนื้อหอย สามารถตรวจพบเซลล์ใหม่ได้จากหอยขนาดเล็ก แต่ยังไม่สามารถทำได้ในหอยขนาดใหญ่

3. การทำความสะอาดหอยเป่าเชื้อก่อนการเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อ

ขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อหอยก่อนการนำไปทำ tissue culture เพื่อให้ชิ้นเนื้อที่จะทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ปลอดเชื้อโดยสิ้นเชิง

- นำหอยใส่น้ำทะเลเตรียมพิเศษที่ผสมสารละลายยาฆ่าเชื้อ (antibiotic antimycobial solution: ABAM) และ Kanamycin แช่ในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาไม่น้อยกว่า 15 นาทีถึงข้ามคืน (เพื่อลดการปล่อยเมือกขณะทำการเลาะเปลือก) สำหรับการแช่หอยในตู้เย็นข้ามคืนไว้ จะทำการตรวจสอบว่า หอยยังมีชีวิตอยู่หรือไม่ โดยดูจากการเคลื่อนไหวของ cilia ที่เนื้อเยื่อของเหงือก หากเซลล์หลุดและ cilia ไม่มีการเคลื่อนไหวแล้ว จะไม่นำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อ
- นำเนื้อเยื่อหอยทั้งตัวมาทำการฆ่าเชื้อโดยการแช่หรือฉีดพ่นด้วย 70% ethanol ครั้งละ 5-15 วินาทีสลับกับการล้างด้วยน้ำทะเลเย็นจัดผสมน้ำยาฆ่าเชื้อ (antibiotic antimycobial solution: ABAM) ทำซ้ำไม่น้อยกว่า 2-3 รอบ
- เลาะเปลือกหอย (ทดลองทำทั้งก่อนและหลังขั้นตอนการฆ่าเชื้อด้วย 70% ethanol) และทำการตัดกระพุ้งไล่หอยออก (ทดลองทำทั้งก่อนและหลังขั้นตอนการฆ่าเชื้อด้วย 70% ethanol)
- สุดท้ายทำการล้างด้วยน้ำทะเลและน้ำกลั่นเย็นจัดหลายๆ ครั้ง แล้วแช่ชิ้นเนื้อหอยในน้ำกลั่นหรือน้ำทะเล นำเข้าตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow)
- ตัดชิ้นเนื้อหอยเป็นชิ้นเล็กๆ คีบวางบนภาชนะเลี้ยงเซลล์ ปล่อยให้แห้ง
- เติมน้ำยาเลี้ยงเนื้อเยื่อ (medium) ที่ปรับ pH 7.8-8.0 ความเค็ม 30% และนำไปใส่ไว้ในถังน้ำปรับอุณหภูมิระหว่าง 27-30 องศาเซลเซียส
- วันรุ่งขึ้นตรวจสอบการปนเปื้อนโดยสังเกตจากความขุ่นของ medium ตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ไม่พบการปนเปื้อนด้วยเชื้อแบคทีเรียและ medium ยังใสดีอยู่ แสดงว่า ขั้นตอนการเตรียมชิ้นเนื้อปราศจากการปนเปื้อนได้ผลดี
- ทำการเลี้ยงเนื้อเยื่อต่อไป โดยตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ทุก 1-3 วัน เพื่อตรวจหาการเจริญเติบโตของเซลล์ใหม่ๆ
- ทำการเปลี่ยน medium อย่างน้อยสัปดาห์ละ 1-2 ครั้งตลอดการทดลอง จนกระทั่งการทดลองเมื่อมีการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียจำนวนมากจน medium ขุ่น หรือเมื่อทำการย้อมสีเซลล์เพื่อตรวจสอบว่า ชิ้นเนื้อและเซลล์ที่พบยังมีชีวิต

4. ขั้นตอนรายละเอียดการเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อหอยเป่าชื่อ

น้ำยาที่ต้องเตรียมก่อนการเพาะเลี้ยงเซลล์

1. เตรียมน้ำเกลือสำหรับใช้เลี้ยงหอยผสมยาปฏิชีวนะ แชนไวนด์ูเย็น
2. เตรียมน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์ (culture medium)
3. เตรียมคอลลาเจน 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 1 มิลลิลิตร ผสมน้ำเกลือ 14 มิลลิลิตร กรอง 0.22 ไมครอน แชนไวนด์ูเย็น
4. เตรียมสารละลาย IGF-II และ bFGF

วิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์

5. หอยขนาดเปลือก 1.0 ซม. ลักษณะหอย เปลือกเต็ม บริเวณโดยรอบหอยมีระยางค์ (ขาขนาดเล็ก)
6. นำมาแช่ในสารละลาย H_2O_2 เจือจาง ความเข้มข้นประมาณ 1 % เป็นเวลาสั้นๆ ครั้งละไม่เกิน 5 วินาที สลับกับการฉีดพ่นด้วย 70% ethanol
7. ทำข้อ 6 หลายๆ ครั้งจนแน่ใจว่า เปลือก เนื้อ และซอกต่างๆ รอบหอยสะอาดอย่างดี
8. ฉีดล้างด้วย 70% ethanol หลายๆ ครั้ง ย้ายเข้าตู้ปลอดเชื้อ วางในภาชนะ sterile ปล่อยให้หอยแห้งสนิทก่อนจึงดำเนินการต่อไป

ขั้นตอนต่อไปในตู้ปลอดเชื้อ วิธีการและขั้นตอนต่างๆ ระวังให้มีความปลอดภัยมากที่สุด

9. นำน้ำเกลือสำหรับเลี้ยงหอยผสมยาปฏิชีวนะ ที่เตรียมไว้แช่เย็นออกมาใช้ในตอนนี
10. เลาะเปลือกหอยออก ด้วยมีดผ่าตัดปลอดเชื้อ ระวังไม่ให้แตก
11. ใช้ที่คีบและกรรไกร ตัดเอาเนื้อเยื่อเหงือกทั้ง 2 ข้างออกมา พยายามให้ติดเนื้อเยื่อของหัวใจที่อยู่ถัดไปทางด้านที่ติดกับไส้หอยด้วย ระมัดระวังอย่าไปโดนบริเวณทางเดินอาหาร เนื้อเยื่อที่แยกได้ นำไปแช่ไว้ในน้ำเกลือ ที่กรองให้ปลอดเชื้อ 0.22 ไมครอน อีกครั้งก่อนใช้งาน
12. ตรวจสอบเซลล์เหงือกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ว่า เซลล์ยังมีชีวิตอยู่ โดยการสังเกตเห็นการเคลื่อนไหวของ villi ที่เนื้อเยื่อของเหงือกได้ชัดเจนด้วยกำลังขยาย 4 หรือ 10 เท่า
13. นำเนื้อเยื่อจากหอยแช่ในสารละลายคอลลาเจนที่เตรียมไว้ โดยทำการกรองอีกครั้ง ก่อนใช้งานและแช่ในภาชนะเลี้ยงเซลล์ที่ปลอดเชื้อ ใส่สารละลายคอลลาเจนปริมาณ 2-5 ซีซี ต่อเนื้อเยื่อหอย 1 ชิ้น
14. แช่เนื้อเยื่อในสารละลายคอลลาเจน ค้างไว้ 1 คืน ในตู้เย็น (4°C)

15. ตัดเนื้อเยื่อโดยรอบบริเวณ stump ที่เชื่อมต่อระหว่างเนื้อเยื่อเท้าและตัวหอยออก โดยรอบและนำไปแช่ในน้ำเกลือ ทำเช่นเดียวกับข้อ 6-12

16. ตรวจสอบเซลล์เท้า-ระยาง ว่ายังมีชีวิตอยู่ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ถ้ายังเห็นการ เคลื่อนไหวของเท้าจึงนำไปใช้เพาะเลี้ยงโดยทำเช่นเดียวกับข้อ 6-12

วันรุ่งขึ้น

17. นำน้ำยาเลี้ยงเซลล์ปลอดเชื้อ 2% L-15 ผสมกับน้ำเกลือสำหรับใช้เลี้ยงหอย สัดส่วน 1:4 กรอง 0.22 ไมครอนก่อนใช้เสมอ วัดความเค็มใหม่และปรับให้อยู่ระหว่าง 30-32% ; pH ประมาณ 7.9-8.0 โดยการปรับด้วยโซเดียมไบคาร์บอเนต

18. ดูดสารละลายคอลลาเจนส์ที่แช่เนื้อเยื่อไว้ออกทิ้งไปให้หมด ปล่อยให้เนื้อเยื่อแห้งติด ภาชนะสักครู่ จึงค่อยเติมน้ำยาเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมไว้ พอให้ท่วมเนื้อเยื่อสูงจากพื้น ภาชนะประมาณ 3-5 มม. กรอง medium ก่อนใช้เสมอ

19. เติมสารละลาย 5-10 ไมโครลิตรของ IGF-II ความเข้มข้น 0.05 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร ของ PBS และ 1-5 ไมโครลิตรของ bFGF ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร ของ PBS ลงบนก้อนเนื้อเยื่อโดยตรง

20. เลี้ยงในตู้ปรับอุณหภูมิ โดยกะให้น้ำยาเลี้ยงเซลล์มีอุณหภูมิอยู่ประมาณ 27-28 °C

21. สังเกตพบเซลล์หอยลงเกาะพื้นได้ในวันที่ 7

22. ทำการวัดความเค็ม pH และ อุณหภูมิของน้ำยาเลี้ยงเซลล์ทุกวัน โดยดูดแบ่งออกมา ตรวจสอบประมาณ 1 ซีซีในแต่ละครั้ง

23. การปรับความเค็มที่สูงเกินไป โดยดูดน้ำยาเลี้ยงเซลล์ออกครึ่งหนึ่ง แล้วทำการเติมน้ำเกลือทะเลปลอดเชื้อ ปริมาณเท่ากันลงไปแทน แล้วจึงตรวจสอบระดับความเค็มใหม่อีกครั้ง

24. ลักษณะเซลล์ที่เพิ่มจำนวนขึ้นเรื่อยๆ โดยจะสามารถเห็นเซลล์ใหม่ๆ ได้ชัดเจนที่ กำลังขยาย 10 เท่า

25. ข้อสังเกตในการเลี้ยงเซลล์ พบการปนเปื้อนในระดับต่ำด้วยจุลชีพเล็กๆ บ้าง แต่น้ำยาเลี้ยงเซลล์ยังคงใสปกติ

26. ต้องทำการตรวจสอบสภาวะน้ำยาที่ใช้เลี้ยงเซลล์ ทุกวัน และคอยปรับให้ความเค็มอยู่ที่ประมาณ 31-32% และความเป็นกรด-ด่างอยู่ระหว่าง 7.8-8.0 อุณหภูมิน้ำเลี้ยงอยู่ระหว่าง 25-28 °C

5. ผลการเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อหอยเป่าชื่อชนิด *H.asinina*

ผลของการเพาะเลี้ยงเซลล์หอยเป่าชื่อ *H.asinina* จากลูกหอยขนาดเปลือก 0.5-1.5 ซม. และเริ่มตรวจพบการเจริญเติบโตของเซลล์ใหม่ได้ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง พบเซลล์มีรูปร่างและลักษณะแตกต่างกัน ดังนี้

A. เซลล์เดี่ยวๆ ประเภทที่ cytoplasm มีลักษณะแผ่เกาะพื้นผิวสังเกตเห็นได้ชัดเจนที่กำลังขยาย 400 เท่า โดยเริ่มพบเซลล์เดี่ยวใกล้ๆ ขอบชิ้นเนื้อ แต่เซลล์มีจำนวนน้อยพบประมาณ 1-5 เซลล์ ลักษณะเซลล์มีขนาดใหญ่ cytoplasm มีลักษณะคล้าย pseudopod แผ่ยื่นออกไปเกาะพื้นผิวภาชนะไว้ 2-3 แห่ง ยังไม่มีลักษณะแผ่ติดภาชนะทั้งเซลล์เหมือน mammalian cells ทั่วไปในวันแรก เมื่อสังเกตอย่างต่อเนื่องเป็นเวลานานจึงพบว่า บางเซลล์มีลักษณะเหมือนเคลื่อนที่ได้โดย cytoplasm สามารถเคลื่อนตัวย้ายไปได้ แต่เป็นไปอย่างช้ามาก ในวันที่ 2 พบเซลล์มีลักษณะเกาะพื้นได้แน่นหนาและแผ่ออกไปมากขึ้น แต่ยังคงมีจำนวนเท่าเดิม การเพิ่มจำนวนช้ามาก เมื่อเซลล์มากขึ้นจะมีลักษณะเกาะเป็นกลุ่มคล้ายหุ่นลอยน้ำ ไม่พบการแผ่ออกเป็น monolayer

B. เซลล์เดี่ยวๆ ประเภทที่ไม่เกาะพื้น มีลักษณะคล้ายหุ่นลอยน้ำอยู่ เมื่อใช้แรงเขย่า medium เซลล์ไม่กระจัดกระจายไปไหน พบได้ตามขอบของชิ้นเนื้อและบริเวณที่ห่างไกล เซลล์มีรูปร่างและขนาดต่างๆ กัน พบบางเซลล์มี cilia คล้ายเซลล์ของเนื้อเยื่อเหงือก ในช่วงเซลล์อายุ 2-3 วันแรกพบบางเซลล์มีลักษณะเคลื่อนไหวอยู่ตลอดเวลา เซลล์ในกลุ่มนี้มีปริมาณเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ตามอายุการเลี้ยง การเปลี่ยน medium ใหม่ทำให้ปริมาณเซลล์หายไปบ้าง ลักษณะการอยู่รวมกันของกลุ่มเซลล์ คล้ายมีเมือกด้วยแต่มองไม่เห็น

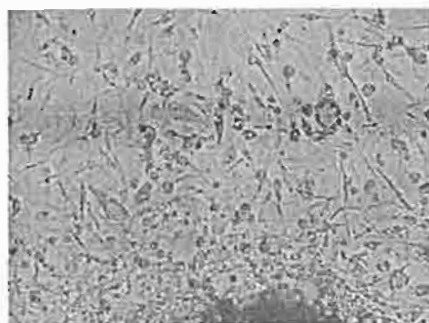
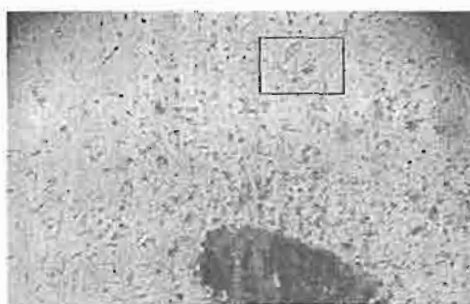
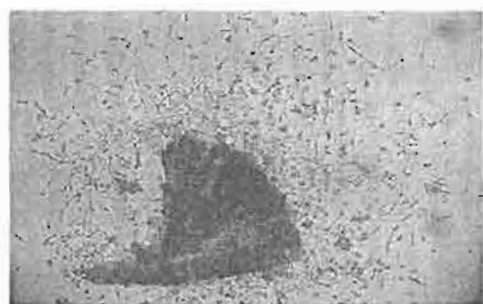
C. เซลล์ขนาดเล็กพวกแบคทีเรียกลมๆ มีลักษณะเคลื่อนไหวอยู่กับที่ พบไม่มากนัก แต่จะเพิ่มจำนวนขึ้นเรื่อยๆ ส่วนใหญ่พบปะปนอยู่กับกลุ่มเซลล์ที่ไม่เกาะพื้น จำนวนเซลล์ลดลงได้มากเมื่อทำการเปลี่ยน medium โดยดูดเอา medium เก่าออก แล้วเติม medium ใหม่

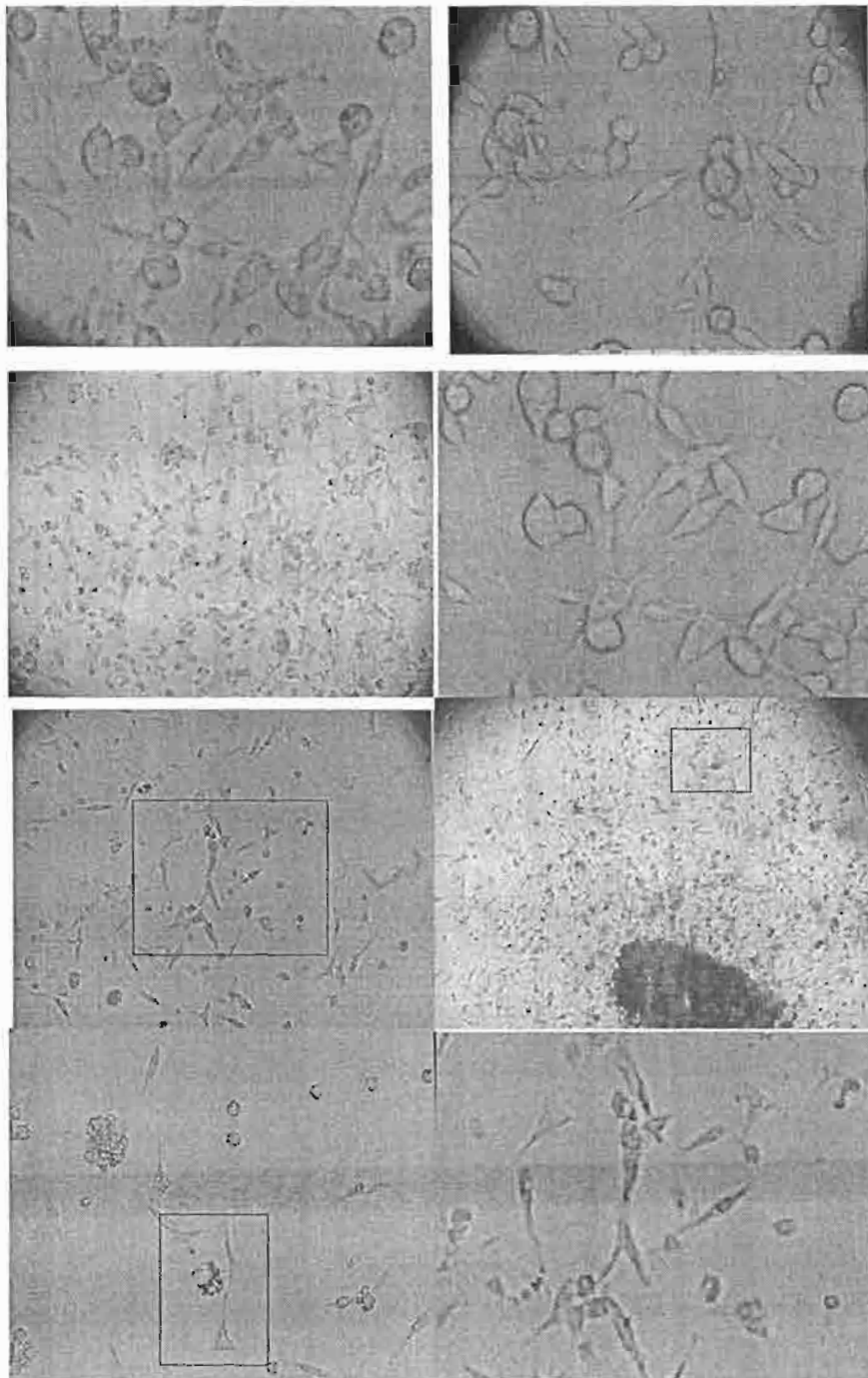
โดยจะสามารถตรวจพบเซลล์ทุกประเภทได้ในภาชนะเลี้ยงเซลล์เดียวกัน และหลังจากเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ประมาณ 14 วัน จะตรวจไม่พบเซลล์ที่ cytoplasm มีลักษณะแผ่เกาะพื้นภาชนะแล้ว และพบแต่เซลล์ไม่เกาะพื้นมีจำนวนเพิ่มมากขึ้น โดยมีการแบ่งเป็นแบคทีเรียเพิ่มจำนวนมากขึ้นเช่นกัน ทั้งๆ ที่ medium ยังคงใสอยู่ นอกจากนี้ได้ทดลองเก็บเกี่ยวเซลล์ตามขั้นตอนสำหรับการตรวจสอบโครโมโซม แต่ยังไม่สามารถทำให้เซลล์บวมและแตกออกจนเห็นโครโมโซมได้ อาจเป็นไปได้ว่า เซลล์เหล่านี้มีเมือกปกคลุมอยู่ ทำให้ขั้นตอนการทำให้เซลล์บวมไม่ได้ผล ซึ่งน่าจะได้ทำการย้อมพิเศษเพื่อตรวจสอบว่า เซลล์เหล่านี้มีเมือกปกคลุมอยู่หรือไม่

วันที่ 7 หลังการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่ามีเซลล์เริ่มเกาะพื้นขยายออกจากก้อนเนื้อเยื่อ



วันที่ 9-10 หลังการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่ามีเซลล์เกาะขยายออกจากก้อนเนื้อเยื่อเพิ่มขึ้น





การเจริญของเซลล์หอยเปาชื่อ *H.asinina* จากเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยง (primary explants) พบเซลล์ 2 ชนิด รูปร่างกลมไม่เกาะกัน และเซลล์คล้ายไฟโบรบลาสต์ยึดเกาะกันสร้าง monolayer

การศึกษาโครโมโซมหอยเป่าฮือ

1. การดำเนินงานและผลการศึกษา

ขั้นตอนการเหนี่ยวนำให้ได้เซลล์ในระยะเมตาเฟส โดยวิธี direct method

ปัญหา ในการศึกษาโครโมโซมด้วยวิธี direct method เซลล์ของหอยที่กำลังแบ่งตัวอยู่ในระยะเมตาเฟส มีจำนวนน้อยเกินไปที่จะใช้ศึกษาต่อไป จึงจำเป็นต้องทำการเหนี่ยวนำให้เซลล์ที่กำลังแบ่งตัวหยุดอยู่ที่ระยะเมตาเฟสมากขึ้น

การดำเนินงาน

จากการทดลองใช้หอยที่มีขนาดเปลือกต่างๆ พบว่าหอยขนาดเปลือกประมาณ 2-3 ซม. เหมาะสมที่จะใช้ในการเหนี่ยวนำให้เซลล์ที่กำลังมีการแบ่งตัวหยุดแบ่งตัวในระยะเมตาเฟสได้จำนวนมากพอที่จะใช้ในการนำไปจัดทำคาริโอไทป์ ถ้าใช้หอยขนาดเล็กหรือใหญ่เกินไป พบว่าจะเก็บเกี่ยวเซลล์ระยะเมตาเฟสได้ไม่มากนัก

การเก็บเนื้อเยื่อเซลล์ที่ต้องการ ทำการทดลองเก็บเซลล์จากอวัยวะต่างๆ แยกกัน ได้แก่ ส่วนเหงือก ส่วน hepatopancreas ส่วนหัวและส่วนเท้า พบว่า ส่วนเหงือกจะพบเซลล์ระยะเมตาเฟสได้มากที่สุด และหลังจากเลาะเปลือกหอยออก สามารถเลาะส่วนเหงือกออกมาได้โดยง่าย จึงเลือกเก็บเฉพาะเนื้อเยื่อหอยส่วนเหงือกมาทำการศึกษาต่อไป

ในขั้นตอนการทำให้เซลล์บวม จะทำในขณะที่หอยยังมีชีวิตอยู่หรือหอยเพิ่งจะมีอาการเท้าหลุดและไม่สามารถเกาะพื้นได้อีกแล้วใหม่ๆ เนื่องจากหลังการตายเนื้อเยื่อหอยจะเน่าเหม็นและเซลล์ที่ตายแล้วเสื่อมสภาพอย่างรวดเร็ว

ทำการศึกษาและปรับสภาวะในการเลี้ยงทั่วไป พบว่าทำการเลี้ยงหอยในน้ำทะเลที่มีความเค็มประมาณ 32‰ ในห้องที่ปรับอุณหภูมิไว้ที่ประมาณ 25 องศาเซลเซียสตลอดเวลา จะช่วยทำให้หอยแข็งแรง สามารถเกาะพื้นผิวภาชนะเลี้ยงได้นาน 2-5 วันขึ้นไปโดยไม่ต้องให้อาหาร

ผลการศึกษา ทราบสภาวะที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำหอยทั้งตัวให้ได้เซลล์ระยะเมตาเฟสมากพอ สำหรับใช้ศึกษาในครั้งนี้ โดยพบว่าระยะเวลาที่ให้หอยแช่อยู่ในน้ำทะเลที่เค็มสลายยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ไม่น้อยกว่า 18 ชั่วโมงขึ้นไป โดยใช้สารละลาย colchicines ที่ความเข้มข้นไม่น้อยกว่า 10^{-3} M ขึ้นไป

ปัญหา เนื่องจากเนื้อเยื่อ (เหงือก) จะมีเซลล์ที่เกาะกันเป็นผืนใหญ่อย่างต่อเนื่อง ซึ่งจะมีผลทำให้ การกระจายตัวของโครโมโซมไม่ดี โครโมโซมมีการซ้อนทับกันหรือบิดงอ และทำให้รูปร่าง

ของโครโมโซมไม่ชัดเจน ต้องเพิ่มขั้นตอนที่ทำให้เซลล์หลุดจากการเกาะกันและอยู่เป็นเซลล์เดี่ยวๆ ก่อนขั้นตอนการหยดไลด์

การดำเนินงาน

ก่อนขั้นตอนการทำให้เซลล์บวม หรือภายหลังเซลล์ผ่านขั้นตอนการตรึงเซลล์ด้วยสารละลาย fixative แล้ว จะทำการตัดเนื้อเยื่อเหียงออกเป็นชิ้นละเอียดที่สุดด้วยการกรีดขนาดเล็กที่ใช้ในงานศัลยกรรม พบว่า จะช่วยทำให้เซลล์ลดการเกาะกันและได้เซลล์ในระยะเมตาเฟสที่อยู่เดี่ยวๆ เพิ่มมากขึ้น หรือ ทำการตัดเนื้อเยื่อเหียงออกอย่างหยาบๆ ก่อนขั้นตอนการทำให้เซลล์บวม และตรึงเซลล์ แล้วจึงทำการตัดละเอียดอีกครั้งหนึ่ง จะได้เซลล์เดี่ยวๆ มากเช่นกัน นอกจากนี้ยังได้เซลล์ที่บวมได้ดีมากขึ้นด้วย

ผลการศึกษา ได้ปรับปรุงวิธีการที่ช่วยทำให้ได้เซลล์ในระยะเมตาเฟสที่เป็นเซลล์เดี่ยวๆ เพิ่มขึ้น

ปัญหา ขั้นตอนการทำให้เซลล์บวมโดยวิธีทั่วไปที่ใช้ได้ดีในสัตว์บก ไม่ค่อยได้ผลดีในหอยเป่าฮือ จำเป็นต้องหาวิธีปรับปรุงให้เซลล์ของหอยบวมด้วยวิธีอื่น และพบว่าหอยปล่อยเมือกจำนวนมากขณะทำการเหนี่ยวนำให้เซลล์บวม ทำให้การบวมของเซลล์ให้ผลที่ไม่แน่นอน

การดำเนินงาน

การแก้หอยปล่อยเมือกโดยการนำหอยแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4-10 องศาเซลเซียสประมาณ 30 นาทีขึ้นไปก่อนทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ นอกจากนี้สารละลายต่างๆ ที่ใช้จะทำการควบคุมให้มีอุณหภูมิไม่เกิน 10 องศาเซลเซียส จะช่วยควบคุมไม่ให้หอยปล่อยเมือกหรือปล่อยเมือกน้อยที่สุด เนื่องจากถ้าหอยมีการปล่อยเมือกมากในระหว่างขั้นตอนการเก็บเกี่ยวเซลล์ จะประสบปัญหาในขั้นตอนการทำให้เซลล์บวม โดยพบว่าเซลล์ไม่บวมหรือบวมได้น้อยมาก ทำให้ไม่พบโครโมโซม

จากการทดลองปรับสภาวะต่างๆ เพื่อเหนี่ยวนำให้เซลล์บวม พบว่า การใช้น้ำทะเล เจือจาง 50-55% ที่มีอุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 5-10 นาทีหรือใช้น้ำกลั่นที่มีอุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1-2 นาที จะทำให้ได้เซลล์ที่บวม และพบเมตาเฟสจำนวนมากพอสมควร อย่างไรก็ตามวิธีดังกล่าว จะทำให้การบวมของเซลล์ไม่แน่นอน โดยสังเกตจากลักษณะของเมตาเฟส กล่าวคือ บางเซลล์มีโครโมโซมไม่ครบชุด บางเมตาเฟสมีโครโมโซมกระจายตัวไม่ดี ทับกันเป็นกระจุก ในขณะที่มีเมตาเฟสที่โครโมโซมกระจายตัวดี ครบจำนวนด้วยเช่นกัน นอกจากนี้ยังพบว่า โครโมโซมมีขนาดสั้นถึงสั้นมาก และมีซากางมากเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งจะทำให้ได้ผลไม่ดีเมื่อทำการย้อมสีพิเศษ G-banding

นอกจากนี้อาจใช้วิธีการแช่เนื้อเยื่อเหียงในสารละลายที่เป็นส่วนผสมของซีรัมกับเอ็นไซม์ไฮyaluronidase ในสัดส่วนที่เหมาะสม ซึ่งพบว่าได้ผลดีมาก โดยจะช่วยให้เซลล์บวมดี ได้

เซลล์เดี่ยวๆ มากขึ้นและสังเกตได้ชัดเจนว่าโครโมโซมภายในเซลล์มีการกระจายตัวดีมาก แต่ยังไม่พบว่ามีสัญญาณที่แสดงว่าเซลล์ยังไม่แตกในช่วงการหยุดเซลล์

ผลการศึกษา ทราบสภาวะที่สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์บวมและโครโมโซมกระจายตัวดี โดยใช้ ส่วนผสมของซีรัมกับเอ็นไซม์ไฮยาลูโรนเนส เพื่อให้ได้เซลล์ที่บวมมากขึ้น และไม่แตกก่อนเวลาที่ต้องการ

ขั้นตอนการจัดทำคาริโอไทป์หลังจากการย้อมสีแบบต่างๆ

การดำเนินงาน

1. ทำการย้อมสีธรรมชาติ ได้โครโมโซมที่เหมาะสมในการจัดทำโครงร่างไอดีโอแกรม

การย้อมสีด้วยสารละลาย giemsa มีวัตถุประสงค์เพื่อ ศึกษาและวัดขนาดของโครโมโซมแต่ละตัว และตรวจสอบรูปร่างของโครโมโซมแต่ละตัว เพื่อใช้เป็นข้อมูลสำหรับจัดทำแบบโครงร่างของไอดีโอแกรม ได้ผลเป็นที่น่าพอใจ ได้จัดทำคาริโอไทป์ และแบบโครงร่างของไอดีโอแกรม



การย้อมสี G-banding มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบแบบแผนการติดสีของโครโมโซมแต่ละตัว เพื่อจัดทำคาริโอไทป์ และใช้เป็นข้อมูลสำหรับจัดทำไอดีโอแกรม

จากผลการศึกษาที่ผ่านมา พบว่าการเก็บเกี่ยวเซลล์หอยโดยวิธี direct method (การเก็บเกี่ยวเซลล์ที่กำลังแบ่งตัวอยู่ในระยะเมตาเฟสจากอวัยวะส่วนหนึ่งของหอยที่มีชีวิตโดยตรง) เพื่อใช้ศึกษาโครโมโซม จะได้โครโมโซมส่วนใหญ่ที่มีขนาดสั้นเกินไป ทำให้โครโมโซมมีขนาดเล็ก นอกจากนี้ยังพบว่าโครโมโซมบางมาก ไม่เหมาะในการนำไปใช้ศึกษาเชิงลึก เช่นการย้อมสีพิเศษ G-banding สำหรับจำแนกโครโมโซมแต่ละตัว

ดังนั้น เป้าหมายในการทดลองช่วงนี้ คือ การปรับปัจจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้อง เพื่อให้ได้โครโมโซมขนาดยาวขึ้น และชัดกันมากขึ้น เพื่อให้โครโมโซมมีความเหมาะสมสำหรับใช้ในการย้อมสีพิเศษ G-banding โดยแบ่งออกเป็น 2 วิธีใหญ่ๆ คือ การปรับสภาวะต่างๆ ในระหว่างการเก็บเกี่ยวเซลล์หอย และวิธีเหนี่ยวนำด้วยสารเคมีเฉพาะให้เซลล์มีการแบ่งตัวพร้อมๆ กันและยืดขนาดโครโมโซมให้ยาวขึ้น

วิธีที่ 1. ทำการทดลองปรับสภาวะต่างๆ ในการเหนี่ยวนำให้เซลล์หอยหยุดแบ่งตัวในระยะเมตาเฟส ก่อนทำการเก็บเกี่ยวโครโมโซม

จากการเลี้ยงหอยเป่าฮัจซินิก *Hasinina* ความยาวเปลือกอยู่ระหว่าง 2.0 – 3.0 ซม. ในน้ำทะเลที่มีอุณหภูมิประมาณ 25-26 °C ทำการทดลองปรับปัจจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับคุณภาพของโครโมโซมที่จะเก็บเกี่ยวได้ดังนี้

1. ทดลองปรับระยะเวลาและความเข้มข้นสารละลาย Colchicine ที่ใส่น้ำทะเลในระหว่างการเลี้ยงหอยในระดับต่างๆ กัน เนื่องจากการใช้สารละลาย Colchicine ที่มีความเข้มข้นอยู่ในระดับที่สูงและระยะเวลานานมาก จะทำให้ได้โครโมโซมที่หดสั้นมาก

1.1 ทดลองใช้สารละลาย Colchicine ที่มีช่วงความเข้มข้นต่างๆ เปรียบเทียบกันได้แก่ ความเข้มข้นสูง = 0.01-0.05%, ปานกลาง = 0.001-0.005% และความเข้มข้นต่ำ = 0.0001-0.0005%

1.2 ทดลองเปรียบเทียบระยะเวลาที่แช่ในสารละลาย Colchicine ที่เวลาต่างๆ ได้แก่ 16-48 ชม.

2. นำภาชนะใส่หอยแช่ไว้ในตู้เย็นที่มีอุณหภูมิประมาณ 8 °C โดยทำการทดลองปรับระยะเวลาที่หอยอยู่ในตู้เย็นระหว่าง 10 - 120 นาที เพื่อสังเกตปัญหาการปล่อยเมือกของหอยเมื่อทำการเลาะเปลือกออก

3. ทำการเลาะเปลือกหอยออก ใช้หอยทั้งตัว (กรณีเป็นหอยตัวเล็ก) หรือแยกเอาเฉพาะอวัยวะส่วนเหงือก แช่ในสารละลาย hypotonic solution

4. ทำการทดลองปรับสารละลาย hypotonic solution ถ้าใช้เป็นส่วนผสมของน้ำทะเลเจือจางระหว่าง 25 - 75% ในขั้นตอนการเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดการบวมน้ำ

5. ทำการทดลองปรับระยะเวลาที่เซลล์แช่อยู่ในสารละลาย hypotonic solution

ที่เวลาต่างๆ กัน ตั้งแต่ 1 -120 นาที

6.ทำการทดลองปรับระยะเวลาที่เนื้อเยื่อแช่อยู่ในสารละลาย hypotonic solution ถ้าใช้เป็น 0.02% Hyaluronidase solution ระหว่าง 5 – 15 นาที

7.หลังจากนั้น ทำการตรึงเซลล์ด้วยสารละลาย fixative ที่เป็นส่วนผสมของ acetic acid จำนวน 1 ส่วนและ methanol จำนวน 3 ส่วน จึงนำเฉพาะส่วนเนื้อเยื่อเหงือกมาตัดละเอียดด้วย fixative หลายๆ ครั้งแล้วจึงนำไปหยดบนสไลด์และทำการย้อมสีด้วยวิธีต่างๆ ต่อไป

วิธีที่ 2. การเหนี่ยวนำให้โครโมโซมยาวขึ้น โดยการเติมสารละลาย

Methotrexate ความเข้มข้น 10^{-7} M เป็นระยะเวลา 14 – 40 ชั่วโมง ก่อนการเก็บเกี่ยวโครโมโซม ล้างหอยด้วยน้ำทะเลสะอาด แล้วจึงเติมสารละลาย Thymidine 10^{-5} M หรือ 0.05% BrdU ร่วมกับการเติมสารละลาย Colchicine ทำการแช่หอยเป็นเวลา 5 – 48 ชั่วโมง ก่อนทำการเก็บเกี่ยวโครโมโซม โดยใช้สารละลายน้ำเกลือเจือจาง 50 - 55% เป็นเวลา 5 นาที ในขั้นตอนการทำให้เซลล์บวมน้ำ แล้วจึงทำการตรึงเซลล์ด้วยสารละลาย Fixative

ผลการทดลองใช้สารละลาย Colchicine ที่มีระยะเวลาและช่วงความเข้มข้นต่างๆ เปรียบเทียบกัน ได้แก่ ความเข้มข้นสูง (0.01-0.05%) และปานกลาง (0.001-0.005%) ส่วนใหญ่พบโครโมโซมมีจำนวนตั้งแต่ +1 ถึง +4 ส่วนความเข้มข้นต่ำ (0.0001-0.0005%) พบโครโมโซมน้อยมากหรือไม่พบเลย (ระดับ+1 หมายถึง การตรวจหาชุดโครโมโซมพบจำนวน 1 - 3 เมตาเฟสต่อสไลด์ 1 แผ่น ส่วนระดับ +4 หมายถึง การตรวจพบชุดโครโมโซมมากกว่า 15 เมตาเฟสต่อสไลด์ 1 แผ่น ในระดับ +3 และ +2 มีสัดส่วนเมตาเฟสมาก - น้อยตามลำดับ)

2. สรุปการศึกษาโครโมโซมหอยเป่าฮือ

ทำการทดลองเก็บเกี่ยวโครโมโซมหอยเป่าฮือโดยตรง

การทดลองที่ 1 เพื่อประเมินผลของแต่ละขั้นตอนในการเก็บเกี่ยวโครโมโซมของหอย

โดยการเติมสารละลาย 0.0001% colchicine ลงในน้ำเกลือที่เลี้ยงหอยขนาดเปลือก 1 ซม. เป็นเวลา 7 ชั่วโมง จากนั้นแช่หอยใน 50% น้ำเกลือเจือจาง ตรึงเซลล์ด้วยสารละลาย fixative (acetic acid : methanol = 1 : 3) อย่างน้อย 3 ครั้ง ทำการตัดเนื้อเยื่อหอยให้ละเอียด และผ่านขั้นตอนการตรึงเซลล์ด้วยสารละลาย fixative อีก 2-3 ครั้ง หยดสไลด์ เพื่อดูว่ามี metaphase cells หรือไม่

จากผลการเก็บเกี่ยวเซลล์ พบจะสรุปปัญหาต่างๆ ได้ดังนี้

1. มีปัญหาเซลล์เดี่ยวๆ น้อย ส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นกลุ่มเซลล์ขนาดต่างๆ ต้องทำการแก้ปัญหาต่อไป เพื่อให้ได้เซลล์เดี่ยวๆ จำนวนมากซึ่งจะเป็นผลดีต่อการกระจายตัวของโครโมโซมเมื่อนั่งเซลล์แตกออก

2. เซลล์มีการพองตัวไม่ดี ต้องทำการทดลองปรับสภาวะในขั้นตอน hypotonic treatment ให้ดีขึ้น ทั้งความเข้มข้นของสารและเวลาที่เหมาะสม

3. ไม่พบลักษณะเซลล์ที่ต้องการ ต้องทำการปรับให้สารเคมียับยั้งเซลล์ที่กำลังอยู่ในระยะแบ่งตัวให้ได้ หรือใช้สารเคมีกระตุ้นให้เซลล์เกิดการแบ่งตัวมากขึ้น แล้วจึงเก็บเกี่ยวเซลล์ที่ต้องการ

การทดลองที่ 2 ใส่สารกระตุ้นให้เซลล์แบ่งตัวเพิ่มขึ้นและปรับความเข้มข้นของสารละลาย colchicine

โดยการเติมสารพวก mitogen เช่น concanavalin A, phytohaemagglutinin และ pokeweed เป็นต้น ปรับความเข้มข้นที่ระดับต่างๆ

จากผลการศึกษาพบว่า หอยจะไวต่อสารกระตุ้นการแบ่งเซลล์มาก และมักตายก่อนที่จะได้เวลาเก็บเกี่ยวเซลล์ ส่วนความเข้มข้นของสารละลาย 0.0001% colchicines สามารถเพิ่มได้กว่า 10 เท่า โดยที่หอยไม่ตาย แต่ยังไม่พบ metaphase cells ที่ต้องการ

การทดลองที่ 3 ปรับชนิดและเวลาของสารละลาย hypotonic treatment

หอยที่ศึกษาถ้าเป็นตัวเล็กจะใช้ทั้งตัว ถ้าเป็นตัวใหญ่แยกอวัยวะออกเป็นส่วนๆ และตรวจหาโครโมโซมตามอวัยวะต่างๆ แยกกัน โดยเฉพาะเหงือกและ hepatopancreas นำมาแช่ในสารละลาย 0.001-0.05% colchicines ในน้ำเกลือ เป็นเวลาต่างๆ กัน โดยแช่หอยไว้ให้นานที่สุดจนหอยไม่เกาะพื้นแล้ว จึงเก็บเกี่ยวเซลล์ และทำการปรับชนิดและความเข้มข้นของสารละลายที่ทำให้เซลล์บวมขึ้น เช่น น้ำเกลือเจือจาง สารละลาย KCl และน้ำกลั่น ตั้งแต่ 25-75%

ปรับเวลาแช่หอยตั้งแต่ 5-60 นาที เมื่อผ่านขั้นตอนการทำให้เซลล์บวม ทำการตรึงเซลล์ด้วยสารละลาย fixative ตามปกติ

ผลการศึกษาพบว่า ความเข้มข้นของสารละลาย colchicines ในน้ำเกลือสามารถเพิ่มได้ถึง 0.01% โดยที่หอยสามารถอยู่ได้ 1-2 วันขึ้นอยู่กับความแข็งแรงของหอยที่ได้รับในวันแรก สารละลายที่เหมาะสมในการทำให้เซลล์บวม ปัจจุบันพบว่าน้ำทะเลที่ใช้เลี้ยงหอยที่มีความเจือจางประมาณ 50% สามารถพบโครโมโซมหอยได้ โดยใช้เวลาแช่ในสารละลายประมาณ 5-10 นาที แต่ผลยังไม่ค่อยแน่นอน พบว่าบางครั้งหอยปล่อยเมือกออกมาจำนวนมากเมื่อแช่อยู่ในน้ำทะเลเจือจาง คาดว่าน่าจะทำให้เวลาในการทำให้เซลล์บวมคลาดเคลื่อนไป ต้องทำการทดลองลดการปล่อยเมือกของหอยขณะทำให้เซลล์บวมน้ำ และปรับความเข้มข้นและเวลาที่ทำได้ โครโมโซมที่ยาวขึ้นและกระจายตัวได้ดีกว่านี้

นอกจากนี้พบว่า จะต้องทำให้เซลล์แยกจากกันเป็นเซลล์เดี่ยวๆ ให้มากขึ้น ก่อนการหยดสไลด์เพื่อดูโครโมโซม เนื่องจากเซลล์ที่ทำการเกาะกันเป็นกลุ่มจะรบกวนทำให้การแตกของผนังเซลล์ในเวลาอันสมควร หรือผนังเซลล์ไม่แตกได้ ส่งผลให้การกระจายตัวของโครโมโซมไม่ดีไปด้วย โดยพยายามแก้ปัญหาข้อนี้โดยที่ไม่มีผลกระทบทำให้ผนังเซลล์ในระยะ metaphase แตกก่อนเวลาที่เหมาะสมด้วย

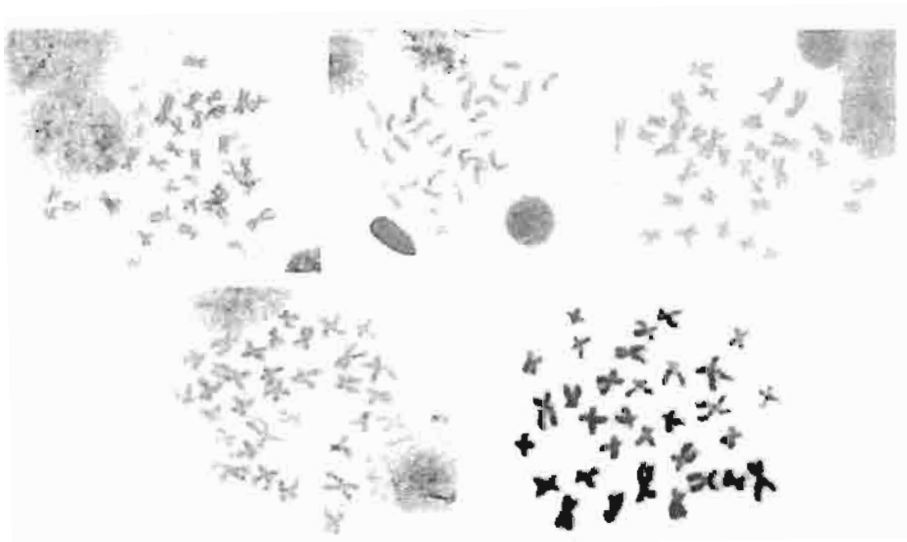
ประการสำคัญคือ ลักษณะโครโมโซมที่ได้ยังมีคุณภาพไม่เหมาะในการทำ banding เพราะสั้น และโครโมโซมยังกระจายตัวไม่มาก metaphase cells ยังมีจำนวนไม่มากนัก คาดว่าเมื่อทำการปรับปรุงคุณภาพของโครโมโซมได้แล้ว การย้อม G-banding และการตรวจสอบรูปแบบของโครโมโซมแต่ละตัว จะสามารถทำได้เร็วขึ้น

ส่วนการย้อม RBA-banding เพื่อตรวจสอบยืนยันรูปแบบของโครโมโซมจากการย้อม G-banding นั้น ขึ้นอยู่กับการพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ในหลอดทดลองให้ได้ผล หรือการปรับคุณภาพโครโมโซมจากการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยตรงจากตัวหอยที่ได้ผลดี

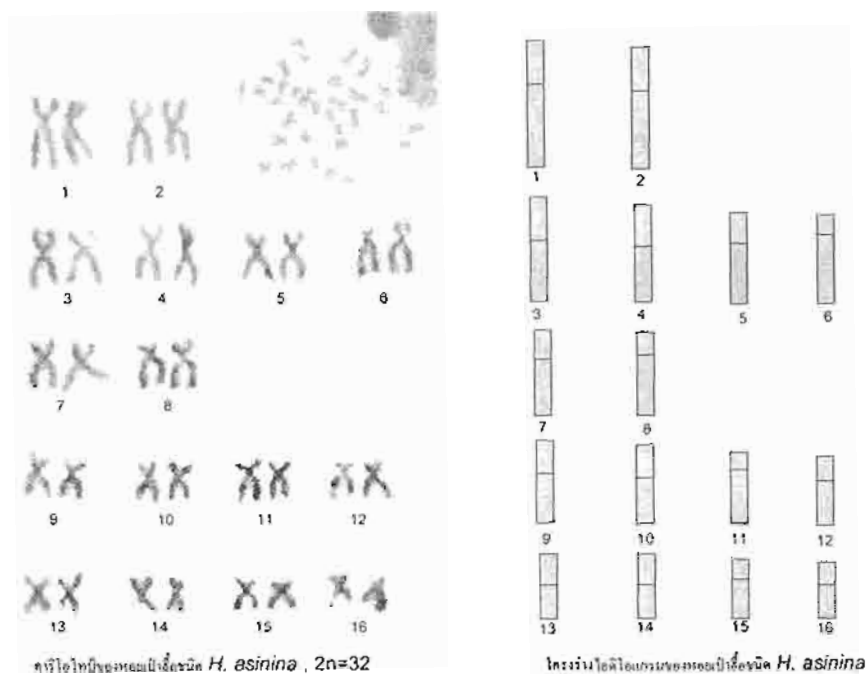
3. ผลการจัดทำคาริโอไทป์และไอดิโอแกรมของ *H.asinina*

ทำการย้อมสีจีเอ็มซ่า เลือกเมตาเฟสจำนวนหนึ่งที่โครโมโซมมีการกระจายตัวดี ตัวยาว ไม่ซ้อนทับกันมากนัก (รูปที่1) เพื่อศึกษาจำนวนและรูปร่างของโครโมโซม จัดทำคาริโอไทป์ แบบโครงร่างของไอดิโอแกรมและจัดลำดับโครโมโซมทั้งหมด (รูปที่2) พร้อมระบุลักษณะเฉพาะตัวโดยแบ่งเป็น 4 กลุ่มตามขนาดของโครโมโซมใหญ่-เล็ก มีรายละเอียด ดังนี้

กลุ่มที่ 1 โครโมโซมคู่ที่ 1 และโครโมโซมคู่ที่ 2 มีรูปร่างเป็น submetacentric ขนาดกลาง ทั้งสองตัวมีขนาดใกล้เคียงกันและมีขนาดตัวใหญ่กว่าโครโมโซมตัวอื่นๆ ชัดเจน เมื่อเปรียบเทียบกับพบว่า ส่วนแขนมีขนาดเท่ากัน แต่ส่วนขาของโครโมโซมคู่ที่ 1 จะยาวกว่าส่วนขาของโครโมโซมคู่ที่ 2 เล็กน้อย



รูปที่ 1 แสดงตัวอย่างชุดโครโมโซมของหอยเป่าอีชนิด *H. asinina* ที่มีคุณภาพดี สำหรับจัดทำโครงร่างไอดิโอแกรม



รูปที่ 2 แสดงคาริโอไทป์ (ซ้าย) และโครโมโซมโอโตแกรม (ขวา)

ของหอยเป่าอีชนิด *H. asinina*

กลุ่มที่ 2 โครโมโซมคู่ที่ 3-8 มีรูปร่างเป็น submetacentric ขนาดกลางและมีขนาดใกล้เคียงกัน แต่พอจะมีจุดสังเกตที่เปรียบเทียบความต่างกันได้ ดังนี้ โครโมโซมคู่ที่ 3 และโครโมโซมคู่ที่ 4 มีขนาดใหญ่กว่าตัวอื่นๆ ในกลุ่ม แต่ไม่สามารถแยกคู่ได้ชัดเจน น่าจะต้องพิจารณาจากผลการย้อมสีพิเศษ เช่น G-banding โครโมโซมคู่ที่ 5 และโครโมโซมคู่ที่ 7 มีขนาดตัวเล็กกว่าโครโมโซมคู่ที่ 3 และ 4 เล็กน้อย แต่ไม่สามารถแยกคู่ได้ชัดเจนเช่นกัน ส่วน โครโมโซมคู่ที่ 6 และโครโมโซมคู่ที่ 8 สังเกตได้จากส่วนแขนที่สั้นมากสังเกตได้ง่าย และเมื่อเปรียบเทียบกันจะพบว่าโครโมโซมคู่ที่ 6 มีขนาดใหญ่กว่าโครโมโซมคู่ที่ 8 เล็กน้อย

กลุ่มที่ 3 โครโมโซมคู่ที่ 9-12 มีรูปร่างเป็น submetacentric ขนาดเล็กและมีขนาดใกล้เคียงกันมาก ไม่สามารถแยกคู่กันได้ชัดเจน น่าจะต้องพิจารณาจากการย้อมสีพิเศษ เช่น G-banding อย่างไรก็ตามอาจพิจารณาคร่าวๆ ได้จากขนาดตัวและส่วนแขนที่ต่างกัน แต่ไม่เด่นชัดมากนัก

กลุ่มที่ 4 โครโมโซมคู่ที่ 13-14 มีรูปร่างเป็น metacentric ขนาดเล็ก มีลักษณะเหมือนกันมาก จึงจับคู่ได้ยาก ส่วนโครโมโซมคู่ที่ 15-16 มีรูปร่างเป็น submetacentric และมีขนาดเล็กกว่าโครโมโซมคู่ที่ 13 และ 14 เล็กน้อย มีลักษณะเหมือนกันมาก จึงจับคู่ได้ยากเช่นกัน จำเป็นต้องพิจารณาจากการย้อมสีพิเศษ เช่น G-banding

ทำการย้อมสีพิเศษด้วยวิธี G-banding (รูปที่ 3) พบว่า

โครโมโซมคู่ที่ 1 และคู่ที่ 2 ลักษณะแถบแบนยังเห็นไม่ค่อยชัดเจนนัก ไม่สามารถใช้เป็นเกณฑ์ในการพิจารณาจับคู่ที่ถูกต้องได้ แต่สามารถใช้เปรียบเทียบจากความยาวของส่วนของโครโมโซมทั้งสอง ตามเกณฑ์พิจารณาจากการย้อมสีจีมีซ่า ได้เช่นกัน

จากการย้อม G-banding พบว่า โครโมโซมคู่ที่ 3 และคู่ที่ 4 สามารถเห็นตำแหน่งของ centromere ได้ดีและใช้เป็นเกณฑ์ในการจับคู่ที่ถูกต้องได้ชัดเจนขึ้น โดยโครโมโซมคู่ที่ 3 มีส่วนแขนสั้นกว่าคู่ที่ 4 ดังนั้นโครโมโซมคู่ที่ 3 จึงมีรูปร่างเป็น submetacentric ส่วนโครโมโซมคู่ที่ 4 แสดงรูปร่างเป็น metacentric อย่างไรก็ตาม ลักษณะแถบแบนบนโครโมโซมยังไม่ชัดเจน จึงยังไม่สามารถใช้เป็นเกณฑ์ในการพิจารณาจับคู่ที่ถูกต้องได้

โครโมโซมคู่ที่ 5, 6 และ 7 มีขนาดใกล้เคียงกัน ลักษณะแถบแบนบนโครโมโซมไม่ชัดเจน แต่สามารถพิจารณาจับคู่ที่เหมาะสมได้จากความยาวส่วนแขนของโครโมโซมเหล่านี้ โดยพบว่า โครโมโซมคู่ที่ 6 มีส่วนแขนสั้นที่สุด และโครโมโซมคู่ที่ 7 เมื่อพิจารณาโดยรอบคอบ จะพบว่ามีส่วนแขนยาวกว่าคู่ที่ 5

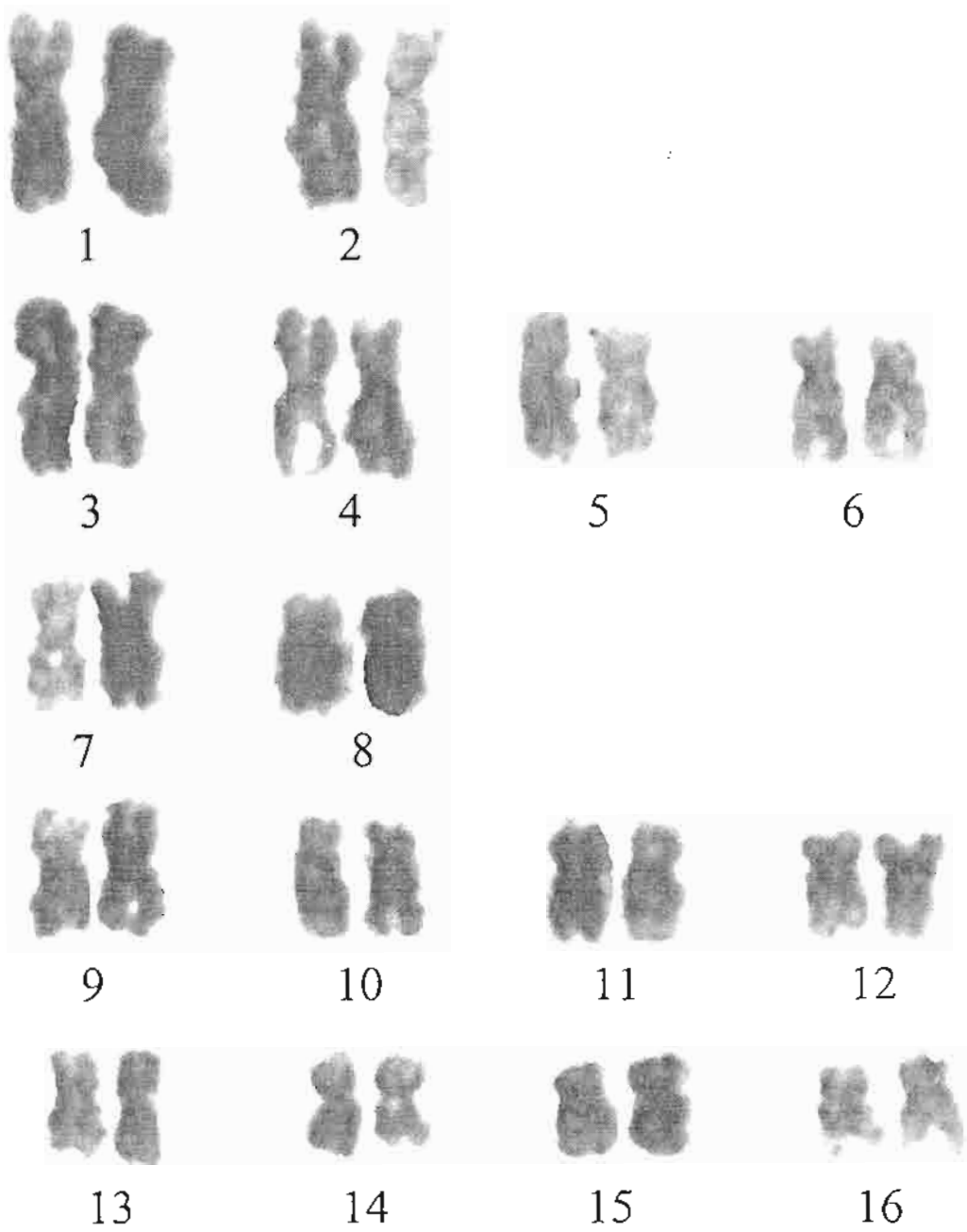
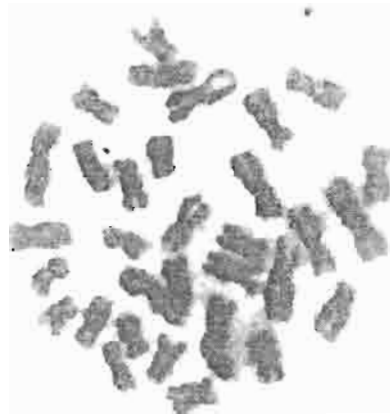
จากการย้อมพิเศษพบว่า โครโมโซมคู่ที่ 6 และคู่ที่ 8 มีความคล้ายคลึงกันมาก อย่างไรก็ตาม สามารถใช้ขนาดและลักษณะแถบแบนบนโครโมโซมเป็นเกณฑ์พิจารณาในการจับคู่ที่เหมาะสมได้ไม่ยากนัก โดยเรียงตามขนาดโครโมโซมใหญ่ไปเล็ก ตามลำดับ

โครโมโซมคู่ที่ 9 และคู่ที่ 12 มีขนาดใกล้เคียงกันมาก แต่จากการย้อมสีพิเศษ พบแถบแบนบนโครโมโซมที่พอจะนำมาใช้พิจารณาพร้อมกับขนาดของโครโมโซม เพื่อจับคู่โครโมโซมที่เหมาะสมได้ นอกจากนี้พบข้อสังเกตเพิ่มเติม เพื่อให้ง่ายต่อการจับคู่มากขึ้น คือ โครโมโซมคู่ที่ 9 มีรูปร่างเป็น metacentric ในขณะที่โครโมโซมคู่ที่ 10-12 เป็น submetacentric ซึ่งจะพบว่า โครโมโซมคู่ที่ 10 และ 12 มีส่วนแขนสั้นมาก และจะสามารถแยกกันได้อย่างชัดเจนโดยพิจารณาจากขนาดของโครโมโซมประกอบ

โครโมโซมคู่ที่ 13 และคู่ที่ 14 มีรูปร่างแบบ metacentric ทั้งคู่ สามารถจับคู่ได้ถูกต้องโดยใช้ขนาดโครโมโซมประกอบการพิจารณาด้วย

โครโมโซมคู่ที่ 15 และคู่ที่ 16 มีรูปร่างแบบ submetacentric ทั้งคู่ สามารถจับคู่ได้ถูกต้องโดยพิจารณาจากขนาดและแถบแบนบนโครโมโซมประกอบ

โดยสรุป การย้อมสีจีมีซ่า ร่วมกับการย้อมพิเศษ G-banding ในการศึกษาครั้งนี้ เมื่อนำข้อมูลที่ได้ มาพิจารณาร่วมกัน สามารถใช้จัดทำคาริโอไทป์ของหอยเป่าชื่อชนิด *H. asinina* และจัดเรียงคู่โครโมโซมได้ทั้งคู่ อย่างไรก็ตาม การย้อมสีพิเศษ G-banding ในการศึกษาครั้งนี้ ยังไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร น่าจะได้มีการพัฒนาเทคนิควิธีการในรายละเอียดต่อไป เพื่อให้ได้ข้อมูลแถบแบนบนโครโมโซมที่ชัดเจนกว่านี้



รูปที่ 3 แสดงคาริโอไทป์ของหอยเป่าฮือ ชนิด *H. asinina*, $2n=32$; ด้วยวิธี GTG banding

บทสรุปการวิจัย

แนวทางการเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อของหอยเป่าฮือ

วิธีการเตรียมหอยให้สะอาดเพื่อรอการเพาะเลี้ยงเซลล์

การเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อหอย

วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเหงือกและหัวใจของหอยเป่าฮือ

ข้อสังเกตต่างๆ เกี่ยวกับสภาพน้ำเลี้ยงเซลล์ที่พบได้

วิธีการตรวจสอบโครโมโซมของหอยเป่าฮือ (โดยตรง)

การเตรียมน้ำทะเลปลอดเชื้อ

การเตรียมสารละลายอาหารเลี้ยงเซลล์หอย (Culture medium)

การเตรียมสารละลายคอลลาจีเนส

ส่วนผสมของสารละลายอาหารเลี้ยงเซลล์หอย 2%L-15 สำหรับการเริ่มเลี้ยง

ส่วนผสมของสารละลายอาหารเลี้ยงเซลล์หอย 2%L-15 สำหรับเปลี่ยนน้ำเลี้ยง

การเตรียมสารละลาย Insulin-like Growth Factor-II (IGF-II)

การเตรียมสารละลาย Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF)

ภาพแสดงคาริโอไทป์ของหอยเป่าฮือไทย (*Haliotis asinina*; 2n=32)

บทสรุปการวิจัย

แนวทางการเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อของหอยเป่าฮือ

วิธีการเตรียมหอยให้สะอาดเพื่อรอการเพาะเลี้ยงเซลล์

การเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อหอย

วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเหงือกและหัวใจของหอยเป่าฮือ

ข้อสังเกตต่างๆ เกี่ยวกับสภาพน้ำเลี้ยงเซลล์ที่พบได้

วิธีการตรวจสอบโครโมโซมของหอยเป่าฮือ (โดยตรง)

การเตรียมน้ำทะเลปลอดเชื้อ

การเตรียมสารละลายอาหารเลี้ยงเซลล์หอย (Culture medium)

การเตรียมสารละลายคอลลาจีเนส

ส่วนผสมของสารละลายอาหารเลี้ยงเซลล์หอย 2%L-15 สำหรับการเริ่มเลี้ยง

ส่วนผสมของสารละลายอาหารเลี้ยงเซลล์หอย 2%L-15 สำหรับเปลี่ยนน้ำเลี้ยง

การเตรียมสารละลาย Insulin-like Growth Factor-II (IGF-II)

การเตรียมสารละลาย Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF)

ภาพแสดงคาริโอไทป์ของหอยเป่าฮือไทย (*Haliotis asinina*; 2n=32)

วิธีการเตรียมหอยให้สะอาดเพื่อรอการเพาะเลี้ยงเซลล์

หอยเป่าอื้อที่มีชีวิต ในขนาดที่เหมาะสมสำหรับนำมาใช้ในการศึกษาวิจัย ควรมีความยาวเปลือกหอยประมาณ 1 นิ้ว เพราะจะช่วยให้การเตรียมเนื้อเยื่อปลอดเชื้อทำได้ง่ายขึ้น และเนื้อเยื่ออวัยวะที่ต้องการมีปริมาณมากพอ หากให้หอยตัวเล็กเกินไปจะเลาะเอาเนื้อเยื่อที่ต้องการออกมาได้ยากและเนื้อเยื่อมีปริมาณน้อยยากแก่การทำให้ปลอดเชื้อและเซลล์ไม่ตายเสียก่อนการเพาะเลี้ยงได้ และทำให้ง่ายต่อการปนเปื้อนในขณะเพาะเลี้ยง ส่วนหอยขนาดใหญ่ที่มีขนาดเปลือกยาว 2 นิ้วขึ้นไป ได้เนื้อเยื่อที่เหมาะสมปริมาณมาก ทำการเลาะแยกเนื้อเยื่อจากอวัยวะส่วนต่างๆ ได้ง่าย แต่วิธีทำให้ปราศจากเชื้ออย่างแท้จริง ในการเพาะเลี้ยง ทำได้ค่อนข้างยาก เนื่องจากพบว่า เซลล์เนื้อเยื่อภายในอวัยวะต่างๆ มักจะติดเชื้อโรคฝังอยู่ภายในเซลล์ไปเรียบร้อยแล้ว ทำให้การทำความสะอาด และฆ่าเชื้อทำได้เพียงภายนอก ไม่สามารถป้องกันเชื้อที่อยู่ในเนื้อเยื่อเซลล์หอยได้

หอยที่ได้รับมาจากสถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี ที่นำมาใช้งานในครั้งนี้ ปกติระหว่างขนส่ง บรรจุมาในถุงพลาสติกอัดอากาศใบใหญ่ หากสังเกตพบว่า เมื่อรับมาหอยส่วนใหญ่ไม่เกาะถุง ให้นำถุงที่รับมาตั้งไว้ในห้อง (ห้องควรมีอุณหภูมิประมาณ 25-28 องศาเซลเซียส) โดยยังไม่ต้องแกะถุง รอจนกระทั่งสังเกตเห็นว่า หอยเริ่มเกาะถุงพลาสติกได้ดีทั้งหมดแล้ว (อาจใช้เวลาานกว่า ชั่วโมง ขึ้นอยู่กับความแข็งแรงของหอยและผลกระทบจากการบรรจุและระหว่างการขนส่ง) หากการขนส่งหอยจากแหล่งเพาะพันธุ์หอยมายังห้องปฏิบัติการ (ใช้เวลาเดินทางอย่างน้อย 10 ชั่วโมง) บรรจุไม่ดี จะทำให้หอยอ่อนแอมากและตายหมดก่อนการใช้งาน

เมื่อได้รับหอยมาจากแหล่งเพาะเลี้ยงแล้ว ได้นำมาพักไว้ในน้ำทะเลปลอดเชื้อ ที่ทำการปรับอุณหภูมิไว้ประมาณ 25-28 องศาเซลเซียส จัดระดับน้ำให้ท่วมตัวหอยสูงจากพื้นประมาณ 2 นิ้วถึง 2 นิ้วครึ่ง เพื่อให้ระดับออกซิเจนในน้ำเหมาะสม และไม่ควรใส่หอยจำนวนมากไว้ในภาชนะเดียวกัน เพราะหอยจะอ่อนแอและตายเร็วกว่าปกติ จะพบว่า หอยชอบเกาะตามขอบภาชนะและพื้นภาชนะเลี้ยง ส่วนใหญ่จะเกาะอยู่ตามพื้น พบการเคลื่อนไหวและการเคลื่อนไหวของหนวด (กรณีตัวใหญ่) เพื่อค้นหาอาหารตามปกติ แสดงว่า หอยมีความแข็งแรง

ทำการเปลี่ยนน้ำพร้อมทำความสะอาดภาชนะเลี้ยงหอยทุกวัน และทำความสะอาดตัวหอยด้วยการดูด-ล้าง คราบบนตัวหอยด้วยแรงน้ำจากหลอดฉีดยาขนาดใหญ่ทุกวัน อย่างน้อยวันละ 1 ครั้ง ปรับอุณหภูมิของ ตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ใส่ภาชนะเลี้ยงหอยไว้ที่ประมาณ 22-25 องศาเซลเซียส (หากตู้เป็นระบบแช่เย็นควบคุม อุณหภูมิได้ไม่ละเอียดนัก) การตั้งอุณหภูมิตู้แช่ไว้ต่ำกว่าระดับที่เหมาะสมในการเลี้ยงหอย จะช่วยทำให้ อุณหภูมิของน้ำที่สัมผัสตัวหอยได้ระดับความเย็นใกล้เคียงตามที่ต้องการมากขึ้น เนื่องจากสภาพอากาศทั่วไป ตลอดทั้งวัน ส่วนใหญ่จะค่อนข้างร้อน การปรับอุณหภูมิน้ำที่สัมผัสกับตัวหอยไว้ที่ประมาณ 25 องศาเซลเซียส สังเกตว่า จะทำให้หอยแข็งแรง และเลี้ยงพักไว้ก่อนการใช้งานได้นานขึ้น (รูปที่1)

หอยที่เลี้ยงโดยไม่เปลี่ยนน้ำทุกวันอย่างสม่ำเสมอ จะมีลักษณะอ่อนแอและตายลงอย่างรวดเร็ว หากพบ มีหอยหงายท้อง ไม่เกาะพื้นภาชนะเลี้ยง ควรรีบเลาะเปลือก ตรวจจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังต่ำ หากพบว่า cilia ที่บริเวณเหงือกยังเคลื่อนไหวดีอยู่ จึงสามารถนำมาทำการเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ก่อนที่หอยจะตายได้ โดยทั่วไป จะพบว่า หอยที่แสดงอาการหงายท้องเหล่านี้ จะมีการขับเมือกออกมากและพบ โปรโตซัวหลายชนิด จำนวนมากด้วย จึงจัดเป็นตัวอย่างที่ไม่ดีนักในการให้เตรียมเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ



รูปที่ 1 หอยเป่าฮื้อในภาชนะเพาะเลี้ยง ส่วนใหญ่เกาะอยู่ตามพื้นภาชนะ

การเตรียมน้ำทะเลปลอดเชื้อ

น้ำทะเลที่นำมาจากธรรมชาติ นำมากรองผ่านกระดาษกรองจำนวน 2-3 ครั้ง แล้วนำไปกรองด้วยชุดกรองสารละลายขนาด 0.22 ไมครอน จากนั้นนำไปผ่านการฆ่าเชื้อน้ำทะเลจากธรรมชาติที่ผ่านการฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้ว ควรวางไว้ที่อุณหภูมิห้องจนเย็นเท่าอุณหภูมิห้องก่อน (เนื่องจากการนำเข้าสู่ตู้เย็นขณะที่น้ำทะเลยังร้อนอยู่ อาจจะทำให้เกิดเกล็ดเกลือเล็กๆ จำนวนมากได้) จากนั้นจึงแบ่งเก็บที่อุณหภูมิห้องและในตู้เย็นธรรมดา เมื่อเวลาจะใช้เลี้ยงหอยให้นำมาผสมกันเพื่อปรับอุณหภูมิให้ได้ประมาณ 28 องศาเซลเซียส ตรวจสอบความเค็มให้อยู่ที่ 30 ก่อนทุกครั้ง)

ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จำเป็นต้องการความสะอาด 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นขั้นตอนที่ยากมาก เนื่องจากหอยมีขนาดเล็กเกินกว่าจะสามารถทำการฆ่าเชื้อโรคทั้งหมดได้ด้วยการผ่านความร้อนจากเปลวไฟตามวิธีมาตรฐานทั่วไป สำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์จากเนื้อเยื่อต่างๆ อีกทั้งลักษณะเนื้อเยื่อของหอยค่อนข้างลึกลงได้ง่ายเมื่อผ่านความร้อน ดังนั้นเซลล์จะตายหมดก่อนเริ่มการเพาะเลี้ยงเซลล์หากใช้วิธีฆ่าเชื้อตามปกติ

การเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อหอย

(สารละลายทั้งหมดก่อนใช้ทุกครั้ง กรองผ่านเครื่องกรองลำเร็วรูปขนาดเล็กประมาณ 2-3 ซม. ขนาดรูกรอง 0.22 ไมครอน - และทำทุกขั้นตอนด้วยวิธีการปลอดเชื้ออย่างเฝ้าระวัง)

การเตรียมสารละลายอาหารเลี้ยงเซลล์หอย (Culture medium)

1.การเตรียม 2X L-15 โดยใช้ L-15 (Gibco) 1 ของ ละลายในน้ำกลั่น 500 มล ผสมให้เข้ากัน อย่างดี กรองด้วยชุดกรองสารละลายขนาด 0.22 ไมครอน เก็บในภาชนะและเก็บเข้าสู่ตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส

2.การเตรียม ASW (artificial sea water) โดยทำการผสม NaCl 102.8 กรัม, KCl 1.8 กรัม, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 5.1 กรัม, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 11.8 กรัม และ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 16.7 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1,000 ซีซี กรองด้วยชุดกรองสารละลายขนาด 0.22 ไมครอน อบฆ่าเชื้อและเก็บในภาชนะ นำเข้าเก็บในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส

3.การเตรียม 0.048M KCl โดยทำการละลาย KCl 0.36 กรัมในน้ำกลั่น 100 มล. กรองด้วยชุดกรองสารละลาย ขนาด 0.22 ไมครอน เก็บในภาชนะ นำเข้าเก็บในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส

ส่วนผสมของสารละลายอาหารเลี้ยงเซลล์หอย 2%L-15 สำหรับการเริ่มเลี้ยง

การเตรียมสารละลายอาหารเลี้ยงเซลล์หอย 2%L-15 โดยทำการเตรียมส่วนผสม ดังนี้ 2X L-15 จำนวน 70 มล., FBS (fetal bovine serum) 2 มล., ASW 6 มล. และ 0.048M KCl 20 มล. ปรับpHให้ได้ 7.8 ด้วย 1N HCl หรือ 1N NaOH (ปกติเติม 200 mM NaOH จำนวน 400 ไมโครลิตรจะได้ pH ตามต้องการ) และปรับความเค็มที่ 30% กรองอีกครั้งด้วยชุดกรองสารละลายขนาด 0.22 ไมครอน เก็บในภาชนะ นำเข้าเก็บในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส เวลานำไปใช้เลี้ยงเซลล์หอยให้ผสมกับน้ำทะเลปลอดเชื้ออีกครั้งหนึ่ง ให้ได้น้ำยาเจือจางประมาณ 10 เท่า

ส่วนผสมของสารละลายอาหารเลี้ยงเซลล์หอย 2%L-15 สำหรับเปลี่ยนน้ำเลี้ยง

การเตรียมสารละลายอาหารเลี้ยงเซลล์หอย 2%L-15 จากส่วนผสมเริ่มเลี้ยง จำนวน 0.5-1.0 มล., ASW 9 มล. และ 0.048M KCl 0.5 มล. ปรับpHให้ได้ 7.8 ด้วย 1N HCl หรือ 1N NaOH; อุณหภูมิน้ำเลี้ยงอยู่ที่ 20°C และมีความเค็มอยู่ที่ 30% มีลักษณะสีชมพูส้มอ่อนๆ หรือชมพูจาง เติมสารละลาย growth factor ทั้งสองชนิด จำนวน 50-100 ไมโครลิตร ก่อนกรองอีกครั้งด้วยชุดกรองสารละลายขนาด 0.22 ไมครอน ใช้เปลี่ยนแทนน้ำเลี้ยงที่มีสีชมพูเข้มแล้ว

การเตรียมสารละลาย Insulin-like Growth Factor-II (IGF-II)

สาร Insulin-like Growth Factor-II (IGF-II; Sigma) 50 ug ละลายด้วยสารละลาย PBS (with 0.1%BSA) จำนวน 1000 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันดี แล้วแบ่งใส่หลอดขนาดเล็กหลอดละ 100 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การเตรียมสารละลาย Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF)

สารละลาย Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF; Cell Signaling) 100 ug/ml จำนวน 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย PBS (with 0.1%BSA) จำนวน 900 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันดี แล้วแบ่งใส่หลอดขนาดเล็กหลอดละ 50 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การเตรียมสารละลายคอลลาจีน

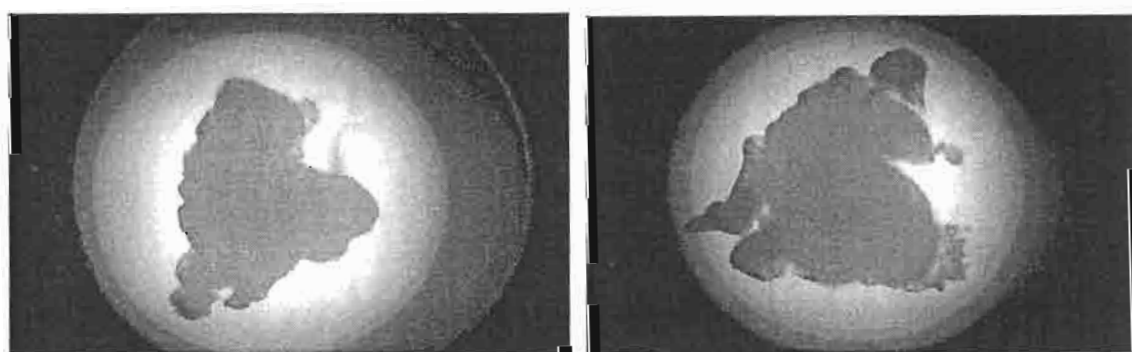
สารละลายคอลลาจีน (5mg/ml; Sigma) จำนวน 1 มล. ผสมกับน้ำทะเลปลอดเชื้อ 14 ซีซี และ ABAM (antibiotic-antimycotic solution; Gibco) จำนวน 1 มล. นำไปกรองด้วยเครื่องกรองสารละลายขนาด 0.22 ไมครอน เก็บเข้าตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส

วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเหงือกและหัวใจของหอยเป่าอี

ในการเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อหอยวันแรก จากหอยเป่าอีตัวเล็ก ขนาดเปลือกไม่เกิน 1 ซม. (ระยะที่เห็นระยางยาวๆ หลายเส้นรอบตัวภายใต้เปลือกหอย) หรือใช้หอยขนาดใหญ่มีความยาวเปลือกประมาณ 1 นิ้ว เพื่อลดการปนเปื้อนเชื้อโรคและปรสิตภายนอกต่างๆ ที่ยังคงพบได้ในน้ำทะเลที่ใช้เลี้ยงและภายในตัวหอย ควรทำความสะอาดหอยที่จะใช้งานอีกครั้งหนึ่ง ก่อนเริ่มการเลี้ยงเซลล์ โดยการนำหอยจุ่มใน 1% H₂O₂ อย่างเร็ว (เวลา 3 - 5 วินาที) แล้วรีบนำไปวางบนเครื่องดูดกรองสารละลายที่ต่อกับ air pump และเปิดเครื่องเตรียมไว้แล้ว

ทำการฉีดล้างด้วย 70% alcohol อย่างเร็ว สลับกับการล้างด้วยน้ำทะเลปลอดเชื้อ โดยเทราดลงไปบนตัวหอย โดยตรงจำนวนมากๆ ทำซ้ำขั้นตอนล้างด้วย alcohol สลับกับน้ำทะเลหลายๆ ครั้ง สุดท้ายฉีดล้างด้วย 70% alcohol นำเข้าตู้ปลอดเชื้อ ปล่องให้แห้งสนิท ก่อนทำขั้นตอนต่อไป ระวังอย่าทำให้หอยเกิดความระคายเคืองมากเกินไป ด้วยการฉีดน้ำล้างใส่ตัวหอยแรงๆ บ่อยๆ หรือทำให้หอยสัมผัสกับ alcohol นานเกินไปโดยไม่รีบล้างออกด้วยน้ำทะเลปลอดเชื้อ หลังจากนั้นใช้ปลายมีดผ่าตัด (ชนิดปลอดเชื้อ) เลาะเปลือกหอยออก โดยค่อยๆ เลาะเบาๆ ด้วยการกรีดปลายมีดไปได้ขอบเปลือกหอยที่ติดกับเนื้อเยื่อโดยรอบขอบเปลือก แล้วเลื่อนปลายมีดเข้าไปแตะเนื้อเยื่อที่เกาะติดอยู่กับเปลือกหอยตรงบริเวณกลางเปลือก เลาะให้แยกออกจากกัน ทำอย่างเบามือ ระวังอย่าให้อวัยวะภายในโดยเฉพาะลำไส้ของหอยแตก และอย่าให้มีเศษเนื้อเยื่อเหลือติดฝาหอย เนื่องจากส่วนใหญ่จะเป็นเนื้อเยื่อเหงือกทั้งสิ้น เมื่อยกฝาหอยออก จะเห็นอวัยวะภายใน ที่อยู่ใต้เปลือกหอย วางตัวอยู่เป็นระเบียบ

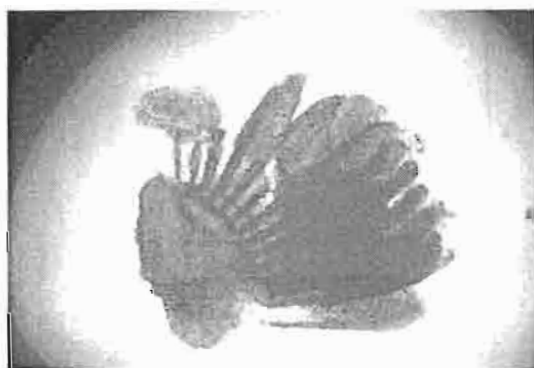
การเจาะเนื้อเยื่อทำได้โดยใช้ปากคีบและกรรไกรขนาดเล็กที่อบฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้ว ตัดเลาะเนื้อเยื่อเหงือกและเนื้อเยื่อหัวใจซึ่งอยู่บริเวณใกล้เคียงกันแยกออกจากตัวหอย จะพบว่า หัวใจอยู่ระหว่างเนื้อเยื่อเหงือกกับส่วนของลำไส้ มีลักษณะเป็นกระเปาะถุงเล็กๆ สีขาวใส ภายในกลวงและผนังมีลักษณะบางใสมาก จะเห็นได้ชัดเจนหากให้หอยตัวใหญ่ (ดูจากลักษณะการเคลื่อนไหว ขยับตัวของเนื้อเยื่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์) หลังจากเลาะออกมาแล้ว จะเห็นการหดและคลายตัวเป็นจังหวะช้าๆ ที่คล้ายกับการเต้นของหัวใจ ทำการแยกเนื้อเยื่อที่เลาะได้ ไปไว้ในน้ำทะเลปลอดเชื้อ ระวังไม่ให้อุปกรณ์ใดชนหรือสัมผัสลำไส้หอย เพราะจะทำให้เนื้อเยื่อผนังลำไส้ซึ่งบางและแห้งอยู่ ติดกับอุปกรณ์และทำให้เกิดฉีกขาด เกิดการปนเปื้อน content ในไส้และเกิด contamination ตามมาได้ (รูปที่2)



รูปที่2 เนื้อเยื่อหอยเป่าอื้อที่เจาะแยกออกจากเปลือกแล้ว

ทำการล้างเนื้อเยื่อที่เลาะออกมาได้ ด้วยน้ำทะเลปลอดเชื้อหลายๆ ครั้ง โดยการจุ่มผ่านน้ำทะเลปลอดเชื้อที่อยู่ในภาชนะที่เตรียมไว้แล้วทีละอัน ทำหลายๆ ครั้ง โดยไม่จุ่มล้างซ้ำในภาชนะเดิม จากนั้นนำไปตรวจสอบการเคลื่อนไหวและความสะอาดของเนื้อเยื่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังต่ำอีกครั้งหนึ่ง จะเห็นลักษณะการเคลื่อนไหวของเนื้อเยื่อเหงือกบริเวณ cilia การพริ้วของ cilia เป็นลูกคลื่นสั้นๆ ต่อเนื่องกันอยู่ตลอดเวลา ส่วนกลุ่มเซลล์ที่เกาะอยู่ด้วยกันเป็นกลุ่มหนาแน่น พบมีการขยับตัวเป็นจังหวะช้าๆ ไม่บ่อยนัก ซึ่งลักษณะเหล่านี้แสดงให้เห็นว่า เซลล์ยังมีชีวิตอยู่ หากพบมีเศษกลุ่มเซลล์เมือกตามขอบเนื้อเยื่อเหงือกจำนวนมาก ให้ใช้ปิเปตดูดทิ้งไป ให้สะอาดที่สุด ควรทำอย่างเบามือ ไม่ควรดูดล้างด้วยการใช้ปิเปตดูดเนื้อเยื่ออื่นๆ ลงๆ เพราะจะไปกระตุ้นให้เซลล์เหงือกปล่อยเมือกออกมาเพิ่มขึ้น และเป็นอุปสรรคต่อการลงเกาะพื้นผิวภาชนะของเซลล์ที่ต้องการ นำเนื้อเยื่อทั้งหมดที่แยกได้ แช่ในสารละลายคอลลาเจนที่ทำเตรียมไว้ แล้วนำเข้าเก็บในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียสทิ้งไว้ 1 คืน

ทำการตรวจสอบเนื้อเยื่อทุกวันด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังต่ำ เพื่อคอยเฝ้าระวังการปนเปื้อนของแบคทีเรียและปรสิตภายนอกขนาดเล็กๆ พร้อมทั้งวัดความเป็นกรด-ด่างและความเค็มของสารละลายอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อให้เหมาะสมอยู่เสมอ (รูปที่3)



รูปที่3 เนื้อเยื่อหอยเป่าฮื้อในสารละลายอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ

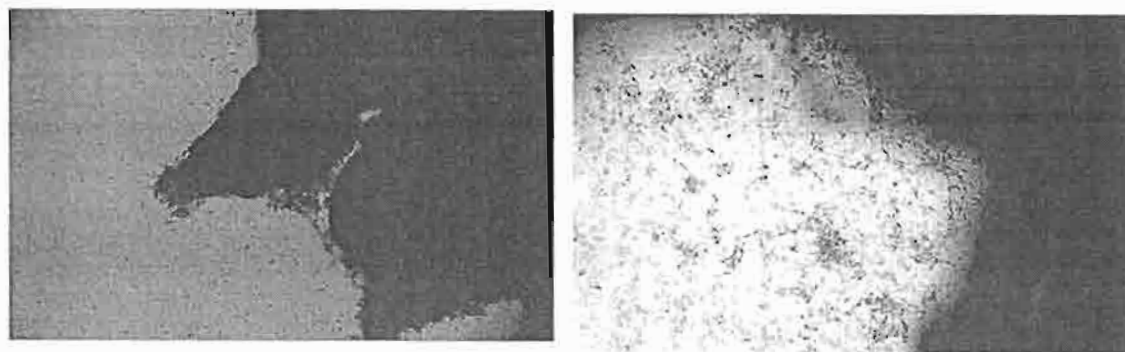
ทำการตรวจสอบเซลล์หอยว่ายังมีชีวิตหรือไม่ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังต่ำ บ่อยๆ เพื่อให้แน่ใจว่าเซลล์ยังพร้อมจะแบ่งตัว เพิ่มจำนวนได้คือดู สำหรับเนื้อเยื่อเหงือกสามารถดูได้จากการเคลื่อนไหวของ cilia ที่เซลล์เยื้องขึ้นนอกสุด เนื้อเยื่อประเภทนี้มีความทนทานพอสมควร สามารถแช่ไว้ในน้ำทะเลปลอดเชื้อ และนำไปเก็บไว้ในตู้เย็นธรรมดาข้ามวันได้โดยที่เซลล์ไม่ตาย ส่วนเนื้อเยื่อหัวใจมีปริมาณน้อย แต่เซลล์มีศักยภาพในการลงเกาะพื้นผิวภาชนะเลี้ยงได้ดี สามารถมองเห็นการขยับตัวพร้อมๆ กันอย่างช้าๆ ของเนื้อเยื่อทั้งกลุ่มได้ โดยมีรูปแบบคล้ายจังหวะการเต้นของหัวใจ (รูปที่4)



รูปที่4 ลักษณะการแผ่ขยายของเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงบนพื้นภาชนะเพาะเลี้ยง

ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหอยวันที่ 2 นำเนื้อเยื่อจากอวัยวะของหอยที่แช่สารละลายคอลลาจีเนสไว้ 1 คืน ออกมาดูดสารละลายคอลลาจีเนสทิ้งไป เติมน้ำทะเลปลอดเชื้อเข้าไปแทน ให้มีปริมาณสูงกว่าเนื้อเยื่อที่เลี้ยงเล็กน้อย แล้วเติมน้ำยาเลี้ยงเซลล์หอย 2%L-15 ประมาณ 0.5-1.0 มล. เตรียมสารละลาย IGF-II และ bFGF (ใส่หรือไม่ใส่ ไม่พบความแตกต่างแต่อย่างใด) อย่างละประมาณ 5-10 ไมโครลิตรต่อชิ้นเนื้อ โดยหยดลงไปบนชิ้นเนื้อเยื่อหอยแต่ละชิ้นโดยตรง นำภาชนะเลี้ยงเก็บไว้ในตู้ปรับความเย็นระหว่าง 26-28 องศาเซลเซียส เปิดฝาตู้แง้มไว้ ตรวจสอบการลงเกาะพื้นของเซลล์ใหม่ๆ ทุกๆ 1-2 วัน

หลังจากทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ในวันที่ 2-3 เริ่มตรวจเห็นมีเซลล์เดี่ยวๆ ลงเกาะพื้นภาชนะเลี้ยงโดยรอบก้อนเนื้อเยื่อ (รูปที่5)



รูปที่5 การเกาะของเนื้อเยื่อบนพื้นผิวภาชนะเพาะเลี้ยงและการเจริญแบ่งตัวของเซลล์ออกไปรอบเนื้อเยื่อ

ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหอยวันที่ 7 ตรวจสอบการเจริญเติบโตของเซลล์เนื้อเยื่อหอย โดยการส่องกล้องจุลทรรศน์กำลังต่ำ พบว่า ก้อนเนื้อเยื่อเริ่มมีเซลล์หอยลงเกาะพื้นภาชนะเลี้ยงแล้ว และพบว่า ก้อนเนื้อเยื่อยังสามารถสังเกตเห็นการขับ เคลื่อนไหวได้อยู่ ทำการเลี้ยงต่อไป (รูปที่6)



รูปที่6 ลักษณะการเกาะพื้นผิวภาชนะเพาะเลี้ยงของเนื้อเยื่อหอย และเซลล์ที่แขวนลอยในสารละลายอาหารเลี้ยงเซลล์

เมื่อพบมีการลงเกาะพื้นภาชนะของเซลล์เดี่ยวๆ ที่มีจำนวนพอสมควรแล้ว จึงย้ายก้อนเนื้อเยื่อไปเลี้ยงต่อในภาชนะอันใหม่ เพื่อให้เซลล์จากก้อนเนื้อหอยลงเกาะพื้นผิวภาชนะใหม่อีก และยังไม่ควรปรับเปลี่ยนน้ำยาเลี้ยงเซลล์ของภาชนะเดิม เนื่องจากเซลล์หอยที่ลงเกาะพื้นผิวได้ แสดงว่า เซลล์กำลังอยู่ในสภาวะการเจริญเติบโตที่เหมาะสม ควรรอสังเกตการแบ่งตัว เพิ่มจำนวนเซลล์อีกสักกระยะหนึ่งก่อนเปลี่ยนน้ำยาใหม่

หมายเหตุ: -เนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยง โดยไม่ผ่านการแช่แข็งด้วยสารละลายคอลลาจีเนส ไม่พบเซลล์เดี่ยวๆ ลงเกาะพื้นในช่วงสัปดาห์แรกของการเพาะเลี้ยง

การเปลี่ยนสารละลายอาหารเลี้ยงเซลล์หอยในภาชนะที่เซลล์หอยสามารถลงเกาะพื้นภาชนะได้แล้ว โดยดูดน้ำเลี้ยงเดิมทิ้งไป ให้เหลือค้างอยู่ประมาณ 0.5 มล. แล้วเติมน้ำทะเลปลอดเชื้อ ปรับอุณหภูมิแล้ว ผสมลงไปเลี้ยงต่อในตู้ปรับความเย็นให้น้ำเลี้ยงเซลล์ที่สัมผัสกับเซลล์หอยมีอุณหภูมิประมาณ 25-26 องศาเซลเซียส เปิดฝาตู้แง้มไว้ เพื่อช่วยระบายอากาศไม่ให้อบ (มีข้อสังเกตว่า อากาศในช่วงที่มีฝนตกหนัก กลางคืนอากาศไม่ร้อน กลางวันห้องเปิดแอร์ น่าจะมีส่วนช่วยให้เซลล์หอยไม่อยู่ในสภาวะที่ร้อนเกินไปในเวลากลางคืน) (รูปที่7)

สำหรับก้อนเนื้อเยื่อที่ย้ายไปเพาะเลี้ยงในภาชนะใหม่ (หลังจากพบเซลล์หอยลงเกาะพื้นครั้งแรกไปแล้ว) ยังสังเกตเห็นที่บริเวณขอบก้อนเนื้อเคลื่อนไหวได้ชัดเจน เติมสารละลาย growth factor ทั้งสองชนิดประมาณ 10 ไมโครลิตรลงไปบนชิ้นเนื้อโดยตรง ภายในเวลา 2-3 นาที เริ่มสังเกตเห็นว่า เซลล์ขอบๆ เริ่มยื่นขาออกมาช้าๆ เริ่มสังเกตพบเซลล์เกาะพื้นภาชนะใหม่อีกครั้งได้ภายใน 1-5 วัน มีจำนวนเซลล์เกาะพื้นเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ นอกจากนี้ยังพบมีเซลล์หอยเกาะกันเป็นแพ (monolayer) ลอยอยู่ผิวน้ำ 2-3 กลุ่มด้วย



รูปที่7 การตรวจสอบสภาวะการเพาะเลี้ยงเซลล์หอยเป่าฮือในภาชนะเพาะเลี้ยง

จากการสังเกตพบว่ามีจุลชีพขนาดเล็กๆ สีเข้มๆ ขยับไป-มาได้ มีจำนวนพอสมควร เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ พร้อมกับเซลล์หอยที่ลงเกาะพื้นภาชนะ เข้าใจว่า น่าจะเป็นโปรโตซัวที่ฝังอยู่ในเนื้อหอย น้ำเลี้ยงเซลล์ยังใสปกติ ทำการแก้ปัญหาการปนเปื้อน โดยการดูดเอาน้ำที่เลี้ยงอยู่ออก และใส่น้ำเลี้ยงใหม่ แม้จะยังคงทำการเลี้ยงต่อไป แต่พบว่า เซลล์ปนเปื้อนเกาะพื้นและเพิ่มจำนวนอย่างช้าๆ ออกไปโดยรอบบริเวณที่พบ และยังพบที่ใหม่ เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ แต่เป็นไปอย่างช้าๆ ส่วนเซลล์หอยยังคงเพิ่มจำนวนอย่างช้าๆ ได้เช่นกัน น้ำเลี้ยงเซลล์ยังคงใส

ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหอยวันที่ 10 ตรวจพบการเติบโตของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำเพิ่มมากขึ้น พบเซลล์เดี่ยวๆ เติบโตแผ่ออกมาจากก้อนเนื้อเยื่อเหงือกขนาดเล็ก (มีขนาดเท่าปลายหัวเข็มหมุด เมื่อขยายใต้กล้องจุลทรรศน์จะพบเป็นก้อนเนื้อเยื่อขนาดใหญ่พอสมควร แต่ยังมองเห็นได้ทั้งก้อนเมื่อใช้กำลังขยายเลนส์ 10 เท่า) ขนาดของเซลล์เดี่ยวๆ ที่ลงเกาะพื้นรอบๆ ก้อนเนื้อ มีขนาดใหญ่และสามารถเห็นได้ชัดเจน ลักษณะการเกาะพื้นดูแข็งแรงแน่นหนา และแผ่ออกไปโดยรอบอย่างดี พบเซลล์เกาะพื้นที่บริเวณอื่นๆ ทั่วไปได้ประปรายด้วยเช่นกัน (รูปที่8)



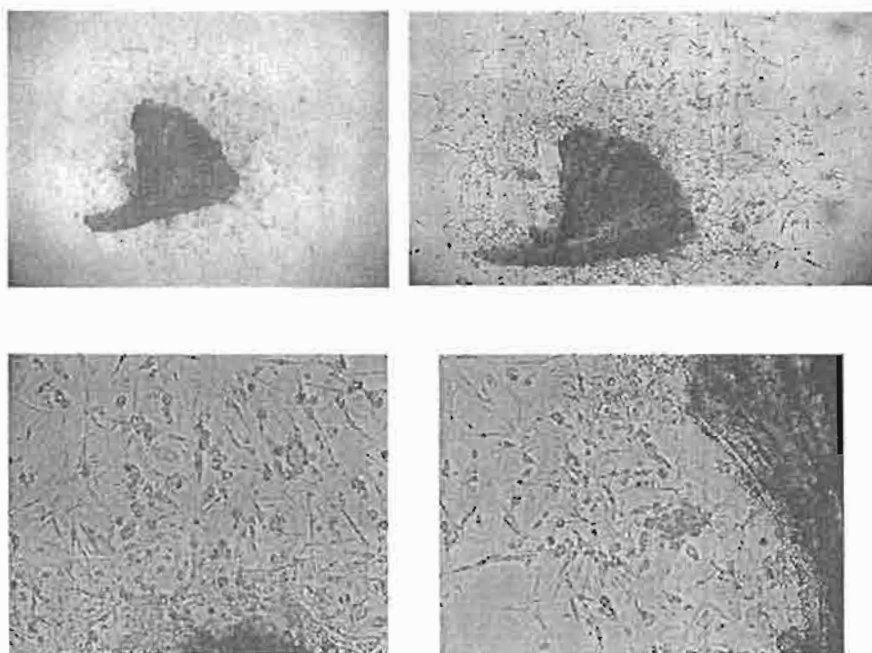
รูปที่8 เซลล์ที่แบ่งตัวแผ่ขยายออกโดยรอบเนื้อเยื่อ

การเพาะเลี้ยงเซลล์หอยวันที่ 11 ตรวจวัดสภาพทั่วไปของน้ำเลี้ยงเซลล์ พบว่า มี pH 7.8 ; อุณหภูมิ น้ำเลี้ยงอยู่ที่ 25.8°C และมีความเค็มอยู่ที่ 32-33%

การเพาะเลี้ยงเซลล์หอยวันที่ 12 ในช่วงเช้า อากาศอบอ้าว ครึ้มฝน ไม่มีแดด อุณหภูมิตู้เลี้ยงเซลล์ ประมาณ 28.5 องศาเซลเซียส ห้องปฏิบัติการไม่ได้เปิดแอร์ แต่พบว่า เซลล์ที่ลงเกาะพื้นเพิ่มจำนวนขึ้นรอบก้อนเนื้อเยื่ออย่างชัดเจน มีจำนวนมาก

การเพาะเลี้ยงเซลล์หอยในวันที่ 14 ตรวจวัดสภาพทั่วไปของสารละลายอาหารเลี้ยงเซลล์ พบว่ามี pH 7.9 ; อุณหภูมิ น้ำเลี้ยงอยู่ที่ 30.7°C และมีความเค็มอยู่ที่ 31% ; ลักษณะน้ำเลี้ยงเซลล์มีสี medium light ถึง pale purple-pink สีของน้ำเลี้ยงเซลล์ในระหว่างใช้งาน สามารถใช้เป็นตัวเฝ้าระวังสภาพของน้ำเลี้ยงที่เหมาะสมได้ดี โดยสีน้ำเลี้ยงควรจะมีสีชมพู-ส้มอ่อนๆ หากน้ำเลี้ยงเซลล์เปลี่ยนเป็นสีชมพูเข้ม ควรรีบตรวจสอบสภาพน้ำว่าวัดความเป็นกรด-ด่างและความเค็มของน้ำ และเปลี่ยนน้ำเลี้ยงเซลล์โดยเร็ว

เมื่อเซลล์เจริญเติบโตโดยรอบก้อนเนื้อเยื่อมากพอ อย่าปล่อยให้ก้อนเนื้อคาไว้ในภาชนะเดิม ควรนำออกไปใส่ภาชนะใหม่ เติมน้ำเลี้ยงเซลล์ใหม่และเลี้ยงต่อไป ส่วนกลุ่มเซลล์ที่โตเกาะพื้นผิวภาชนะเดิม สังเกตว่ายังคงเจริญเติบโต แบ่งตัวขยายออกโดยรอบเป็นบริเวณกว้างขึ้นเรื่อยๆ หมั่นตรวจสอบสภาพน้ำเลี้ยงทุกวันและเปลี่ยนใหม่เมื่อระดับความเป็นกรด-ด่างและความเค็มไม่เหมาะสมแล้ว

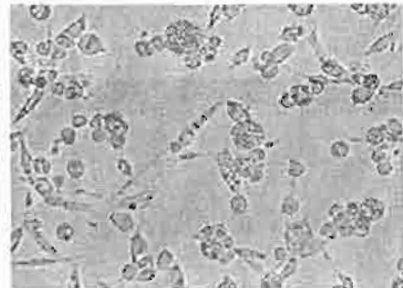
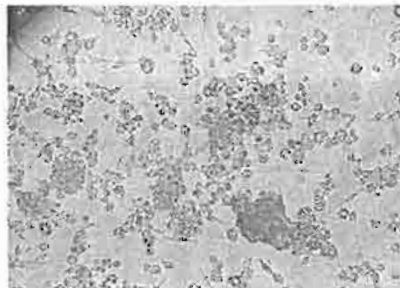


รูปที่ 11 การเจริญแบ่งตัวของเซลล์รอบก้อนเนื้อเยื่อ เซลล์ส่วนมากมีลักษณะคล้ายไฟโบรบลาสต์ (fibroblast-like cells)

ข้อสังเกตต่างๆ เกี่ยวกับสภาพน้ำเลี้ยงเซลล์ที่พบได้

ก่อนเนื้อเยื่อหอยที่เลี้ยงไว้เป็นเวลานาน โดยไม่มีการเปลี่ยนน้ำเลี้ยง เนื่องจากยังไม่พบเซลล์เดี่ยวๆ ลงเกาะพื้นภาชนะเลย เป็นสิ่งที่ไม่ควรกระทำ ควรหมั่นตรวจสอบสภาพน้ำเลี้ยงและเปลี่ยนน้ำเลี้ยงอย่างสม่ำเสมอ แม้ว่ายังไม่พบเซลล์ลงเกาะพื้นภาชนะ เนื่องจาก น้ำเลี้ยงเซลล์จะมีสภาพความเค็ม เปลี่ยนแปลงได้ตามสภาพอากาศประจำวัน อาจวัดได้ถึง 40% ซึ่งเป็นระดับที่สูงมาก ไม่เป็นสภาวะที่เอื้อต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่า เซลล์หอยมีความทนทานต่อสภาพน้ำเค็มและความเป็นกรด-ด่างได้ค่อนข้างสูงบางครั้งวัดความเค็มได้เกือบ 40% เซลล์ยังคงสภาพอยู่ได้ข้ามวัน เมื่อทำการเปลี่ยนน้ำก็มีสภาพดีขึ้นได้เหมือนเดิม ดังนั้นจึงควรทำการตรวจวัดสภาพทั่วไปของน้ำเลี้ยงทุกวัน และรีบเปลี่ยนน้ำเลี้ยงทันทีเมื่ออยู่ในระดับที่ไม่เหมาะสมแล้ว

การตรวจสอบเซลล์เพาะเลี้ยงที่ลงเกาะพื้นภาชนะแล้วและเพิ่มจำนวนขึ้นเรื่อยๆ มีอายุประมาณ 4 สัปดาห์ วัดสภาพทั่วไปของน้ำเลี้ยง พบว่ามี pH 7.8 ; อุณหภูมิน้ำเลี้ยงอยู่ที่ 25°C และมีความเค็มอยู่ที่ 32% เมื่อทำการเปลี่ยนน้ำเลี้ยงใหม่ เพื่อปรับความเค็มของน้ำเลี้ยงให้ลดลง ตรวจพบว่า สภาพทั่วไปของน้ำเลี้ยงเป็น : pH 7.89 ; อุณหภูมิน้ำเลี้ยงอยู่ที่ 25.3°C และมีความเค็มอยู่ที่ 30% จัดเป็นสภาวะที่เหมาะสม สังเกตว่า เซลล์หอยเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนได้เรื่อยๆ



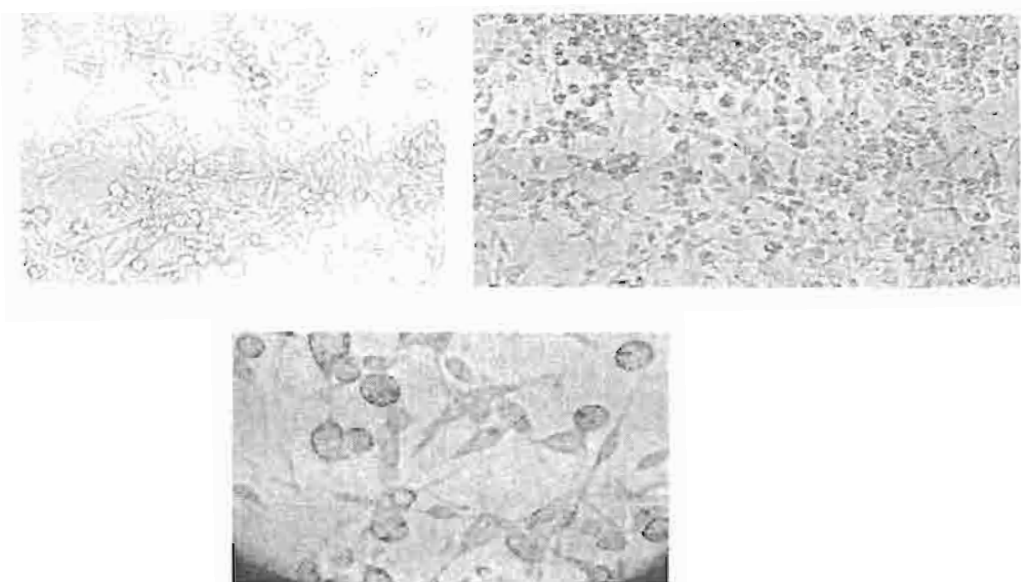
รูปที่12 เซลล์ที่เกิดขึ้นจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบเซลล์กลม (spherical) และเซลล์รูปกระสวย (spindle-shaped) ไม่เกาะพื้นผิวภาชนะ

หลังจากเปลี่ยนน้ำเลี้ยงใหม่ได้ 2 วัน ทำการตรวจสอบสภาพทั่วไปของน้ำเลี้ยงอีกครั้ง พบว่ามี : pH 8.3 ; อุณหภูมิน้ำเลี้ยงอยู่ที่ 27.5°C และมีความเค็มอยู่ที่ 30% ลักษณะสีของน้ำเลี้ยงเปลี่ยนเป็นสีชมพูม่วงเข้ม ลักษณะเซลล์ที่เกาะพื้นไม่แผ่กว้าง และการย้ายภาชนะเลี้ยงเซลล์ไปมาบ่อยๆ เพื่อการตรวจสอบสภาพเซลล์ที่เจริญเติบโตอยู่ มีผลให้เซลล์ที่เกาะพื้นผิวอยู่หลุดง่ายและหลุดมากขึ้น เห็นเซลล์กลมๆ มากขึ้น (รูปที่12) แสดงให้เห็นว่า เซลล์มีลักษณะที่ไม่แข็งแรง หลุดจากการเกาะพื้นผิวภาชนะ ทั้งนี้จะเกิดจาก ระดับความเป็นกรด-ด่างไม่เหมาะสม อย่างไรก็ตามเซลล์ยังคงมีชีวิตอยู่ได้ ควรรีบทำการปรับเปลี่ยนระดับความเป็นกรด-ด่างของน้ำเลี้ยงโดยเร็ว และทำการตรวจสอบสภาพน้ำเลี้ยงทุกวัน พร้อมทั้งสังเกตสีของน้ำเลี้ยงอย่างใกล้ชิด

ข้อสังเกตสภาพของน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ไม่เหมาะสม จะพบว่า เซลล์ที่เดิมมีสภาพเกาะพื้นอยู่ในสภาพแข็งแรง วันรุ่งขึ้น ตรวจพบลักษณะขาที่ยื่นยาวออกไปเกาะพื้นผิวภาชนะ หดหายไปหมด ไม่มีเกาะพื้นเหลือให้เห็น จากการศึกษาครั้งนี้ สังเกตพบว่า สภาพน้ำเลี้ยงที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างมากกว่า 8 ขึ้นไป และความเค็มไม่อยู่ที่ 28-30% น้ำเลี้ยงจะมีสีม่วงเข้ม และพบว่า เซลล์ที่ลงเกาะพื้นภาชนะหยาบเล็กๆ ไม่เห็นการแผ่เกาะพื้นแล้ว แต่ยังสามารถในกลุ่มเซลล์ที่มีจำนวนเซลล์มาก การเกาะไม่ดี เซลล์ส่วนใหญ่หลุดเกือบหมด จากที่เคยเห็นว่า มีเซลล์เกาะอยู่มาก ทำการปรับความเป็นกรด-ด่างของน้ำเลี้ยงเซลล์ใหม่ให้ได้ pH 7.8 โดยการเติมสารละลาย โซเดียมไบคาร์บอเนตและ/หรือกรดไฮโดรคลอริก และเมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 1 ชม. จะพบว่า เซลล์เริ่มแผ่กว้างขึ้นอีกครั้ง มีขาที่ยื่นยาวออกไปเกาะพื้นได้ สีน้ำเลี้ยงเซลล์เปลี่ยนเป็นสีชมพูอ่อน วัดสภาพน้ำได้ pH 7.8; อุณหภูมิน้ำเลี้ยงอยู่ที่ 25°C; และมีความเค็มอยู่ที่ 30%

วิธีการปรับสภาพน้ำเลี้ยงเซลล์หอยที่มี pH สูงไป โดยไม่เปลี่ยนน้ำเลี้ยง

สภาพน้ำเลี้ยงเซลล์ที่มีสีชมพูเข้ม แสดงถึงลักษณะสภาวะที่ไม่เหมาะสมของความเป็นกรด-ด่าง ทำการปรับแก้ไขได้โดยการเติมกรดไฮโดรคลอริกเจือจางเพียงเล็กน้อยลงในน้ำเลี้ยงเซลล์ แต่ถ้าเดิมแล้วทำให้น้ำเลี้ยงมีสภาพเป็นกรดมากเกินไป แก้ด้วยการเติมสารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนต สุดท้ายควรวัดน้ำเลี้ยงได้ pH 7.8-8.0 จึงจะเห็นการเปลี่ยนแปลงของเซลล์หอย จากที่เปลี่ยนสภาพเป็นเซลล์กลมๆ ไม่เกาะพื้นผิว จะเห็นว่า เซลล์เพิ่มความสามารถในการเกาะยึดพื้นผิวภาชนะได้มากขึ้นภายในเวลา 1-1 ชม.ครึ่ง (รูปที่13)



รูปที่13 เซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมีคุณภาพดีเกาะพื้นที่ผิวภาชนะแผ่กระจายสม่ำเสมอ

หลังจากเลี้ยงเซลล์ที่กำลังเจริญเติบโต เพิ่มจำนวนและขยายบริเวณการเกาะพื้นผิวภาชนะออกไปเรื่อยๆ ได้ประมาณเดือนกว่า เซลล์ยังมีปริมาณน้อยเกินกว่าจะเก็บเกี่ยวไป เพื่อศึกษาโครโมโซม ในขณะเดียวกัน ปริมาณของจุลชีพขนาดเล็กๆ ปนเปื้อนเซลล์ที่เพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้นเช่นกัน น้ำเลี้ยงยังคงความใสปกติ วัดสภาพทั่วไปของน้ำเลี้ยงได้ pH 8.18, อุณหภูมิ น้ำเลี้ยงอยู่ที่ 29°C และมีความเค็มอยู่ที่ 28-29% ลองใช้ scraper ขนาดเล็กขูดเซลล์ปนเปื้อนออก ไม่ได้ผล ต่อจากนั้น ในวันรุ่งขึ้น วัดความเค็มของน้ำเลี้ยงได้ 30% มีการปนเปื้อนเซลล์รุนแรง และพบว่า เซลล์ส่วนใหญ่เริ่มสลายไปอย่างรวดเร็ว และเซลล์แตกหมดภายในเวลาไม่นาน

วิธีการตรวจสอบโครโมโซมหอยเป่าฮือ (โดยตรง)

ขั้นตอนหยุดการแบ่งเซลล์ของหอย (การเพิ่มจำนวนเซลล์ระยะเมตาเฟส)

หอยที่เหมาะสมในการใช้งาน ควรมีขนาดเปลือกยาวประมาณ 2-3 ซม. มีสภาพแข็งแรงดีมาก มิฉะนั้นจะตายก่อนตั้งแต่ขั้นตอนแรก แช่หอยในน้ำทะเลปริมาตร 250-300 มล. แล้วเติมสารละลาย colchicine ความเข้มข้น 1% จำนวน 500-1,000 ไมโครลิตร (ได้ความเข้มข้นประมาณ 0.001-0.003%) เก็บในตู้ปรับอากาศที่ 24-25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 19-20 ชั่วโมง (จะต้องแช่หอยไว้ข้ามคืน จึงควรเริ่มทำตอนบ่ายหรือเย็น) รุ่งเช้าเติมสารละลาย colchicine ความเข้มข้น 1.0% จำนวน 1-2 มล. (ได้ความเข้มข้นประมาณ 0.01%) เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง และย้ายหอยเข้าตู้เย็นที่ 4 องศาเซลเซียส เติมสารละลาย 0.5% BrdU (5-bromo-2-deoxyuridine) จำนวน 100 ไมโครลิตร ก่อนเริ่มขั้นตอนการเก็บเกี่ยวเซลล์ประมาณ 6-8 ชั่วโมง (ในช่วงบ่าย) กระยะเวลาให้พอดี เพื่อให้การเก็บเกี่ยวเซลล์มีเวลารวมทั้งสิ้นที่หอยถูกแช่อยู่ในสารละลาย colchicine ประมาณ 20-21 ชั่วโมง แต่ถ้าไม่เติมสารละลาย BrdU ควรนำหอยเข้าตู้เย็นที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-40 นาทีก่อนการเก็บเกี่ยวเซลล์ เพื่อช่วยลดการปล่อยเนื้อของหอยหลังจากผ่านขั้นตอนการแช่เย็นแล้ว ควรจะพบว่า เท้าหอยจะบวมขึ้น เห็นได้ชัดเจน

สภาวะที่เหนี่ยวนำให้เซลล์หอยบวมขึ้น (แบบที่ 1)

การเตรียม สารละลาย Hyaluronidase เพื่อทำให้เซลล์เหงือกแยกตัวออกเป็นเซลล์เดี่ยวๆ และบวมขึ้น ทำโดยใช้สารผง Hyaluronidase ขนาด 451 units/mg จำนวน 0.01 กรัม ผสมกับน้ำกลั่น 5 มล. เวลาใช้งาน นำสารละลาย Hyaluronidase จำนวน 1 มล. ผสมกับ serum 10 มล. และน้ำกลั่น 2 มล. ผสมให้เข้ากันดี แล้วจึงนำไปใช้

เมื่อครบเวลาที่แช่หอยในน้ำยา ทำการเลาะเปลือกหอยออก จะพบว่า หอยปล่อยเนื้อจำนวนมาก ควรทำการดูดเอาเมือกบริเวณเนื้อเยื่อเหงือกออกให้สะอาดก่อนตัดเลาะเฉพาะเนื้อเยื่อเหงือกทั้งชิ้นในน้ำทะเลล้างให้สะอาด

นำเหงือกทั้งชิ้นแช่ในสารละลาย Hyaluronidase จำนวน 13 มล. และนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5-15 นาที (โดยเฉลี่ย 8 นาที และไม่ควรอุ่นเซลล์นานเกินไป เพราะจะทำให้ไม่พบเซลล์ที่ต้องการเลย เนื่องจากเซลล์ที่ต้องการอาจจะแตกหมด) ใช้ปิเปตดูดขึ้น-ลงเบาๆ ทำจนเห็นว่าเนื้อเยื่อเหงือกฟูดีแล้ว ขั้นตอนนี้ยังไม่ควรตัดเหงือกเป็นชิ้นเล็กๆ (ระวังอย่าทำแรง เพราะจะทำให้เซลล์ปล่อยเมือกออกมาเยอะ และหากไม่ได้ล้างเมือกออกให้สะอาด จะมีผลทำให้ขั้นตอนการเหนี่ยวนำให้เซลล์บวมไม่ได้ผล)

นำเนื้อเยื่อที่ได้ไปแช่ใน fixative เขย่าแรงๆ จนเซลล์สะอาด มีสีขาวขุ่น และเนื้อเยื่อแข็ง ลักษณะคล้ายเนื้อสุก หยดส่วนผสมลงบนสไลด์ จะพบเซลล์เดี่ยวๆ จำนวนมาก และพบเซลล์ในระยะเมตาเฟสเหมือนกัน จากนั้นใช้กรรไกรยาว ตัดชิ้นเหงือกให้ละเอียดมากที่สุดเท่าที่จะทำได้ แล้วนำไปปั่นล้างที่ 1,200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที และดูดสารละลายใส่ทิ้งไป ทำขั้นตอน fixative ซ้ำหลายๆ ครั้ง จนเซลล์สะอาด จึงหยดสไลด์

สภาวะที่เหนี่ยวนำให้เซลล์หอยบวมน้ำ (แบบที่ 2)

เติมน้ำทะเล"เย็น" ที่มีระดับเกลือจากลดลง (ระมัดระวังไม่ควรเขย่าหรืออย่าทำให้กระเทือนมาก หากพบว่าหอยมีการขับเมือก ต้องใช้ปิเปตดูดเมือกออกให้มากที่สุด) แช่หอยเป็นเวลานาน 5-10 นาทีในแต่ละความเข้มข้นของน้ำทะเล ที่เย็นจัดตามลำดับ ดังนี้ น้ำทะเลเกลือจาก 75%, 50%, 37.5%, 25% และขั้นสุดท้ายใช้น้ำเย็นธรรมดา แช่นานประมาณ 1-5 นาที จากนั้นปั่นล้างที่ 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายส่วนใส่ทิ้งไป

เติม fixative ปั่นล้าง 1 ครั้งและแช่ทิ้งไว้ในตู้เย็นที่ 4 องศาเซลเซียสข้ามคืน รุ่งขึ้นทำขั้นตอน fixative 2-3 ครั้ง แล้วจึงดูดส่วนใส หยดลงบนสไลด์ ต้องหยดแรงมากๆ เพื่อช่วยให้เซลล์แตก ส่วนที่เหลือเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส หลังจากผ่านขั้นตอนการเก็บเกี่ยวเซลล์แล้ว เติมน้ำทะเลให้มีความหนาแน่นปานกลาง โดยการตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 10x พบการกระจายตัวของเซลล์เดี่ยวๆ ทั้งหมดและอย่างหลวมๆ มีช่องว่างห่างกันพอควรโดยทั่วไป ตรวจจอบโดยกำลังขยาย 20x เพื่อหาตำแหน่งของเมตาเฟส ปรับกำลังขยายเป็น 100x เพื่อหาดูรายละเอียดของจำนวนและรูปร่างโครโมโซม

ตรวจให้ทั่วทั้งแผ่นสไลด์ (ดังภาพ) และให้ระดับผลการเพาะเลี้ยง



เกณฑ์ที่ใช้ในการพิจารณาผลการเพิ่มจำนวนเมตาเฟส

การตรวจสอบจำนวนเมตาเฟสต่อสไลด์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10-20 เท่า เพื่อประเมินผลสำเร็จของวิธีการกระตุ้นให้มีเซลล์แบ่งตัวอยู่ในระยะเมตาเฟส โดยการนับจำนวนเมตาเฟสที่พบได้ภายใต้กล้องในแต่ละฟิลด์ แต่ละสไลด์หดยดส่วนผลสมประมาณ 20 ไมโครลิตร ที่ความหนาแน่นของเซลล์ปานกลาง ดำรวจทั้งแผ่นสไลด์ ตามรูปข้างบน

ตรวจพบโครโมโซม 1-2 เมตาเฟสต่อสไลด์	ระดับ +1
------------------------------------	----------

ตรวจพบโครโมโซมตั้งแต่ 3 แต่ไม่เกิน 10 เมตาเฟส ต่อสไลด์	ระดับ +2
--	----------

ตรวจพบโครโมโซม 10 เมตาเฟสต่อสไลด์ขึ้นไป	ระดับ +3
---	----------

ตรวจพบโครโมโซมอย่างน้อย 1-2 เมตาเฟสในทุกๆ ฟิลด์	ระดับ +4
---	----------

เกณฑ์ที่ใช้ในการพิจารณาคุณภาพของโครโมโซม

โครโมโซมกระจายตัวได้ดีมาก ไม่มีการซ้อนทับกัน โครโมโซมแต่ละตัวอยู่ห่างกันเพียงเล็กน้อย แขนขาของแท่งโครโมโซมไม่กางออก แขนขาทั้งสองข้างมีลักษณะยาว ตัวที่มีขนาดเล็กที่สุดสามารถเห็นรูปร่างได้ชัดเจน

สรุปผลการเพาะเลี้ยงเซลล์หอยเป่าฮื้อในห้องปฏิบัติการ

คณะผู้วิจัยได้ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์หอย เป่าฮื้อหลายครั้ง โดยแต่ละครั้งสามารถทำความสะอาดเนื้อเยื่อหอยให้ปลอดเชื้อก่อนการเพาะเลี้ยงได้ผลดีเป็นส่วนใหญ่ หากสภาพหอยที่ได้รับมีความสะอาดระดับหนึ่ง ไม่พบการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราในระหว่างการเลี้ยงเซลล์ และไม่พบลักษณะคล้ายโปรโตซัวขนาดเล็กๆ (มองเห็นได้ชัดเจนแม้จะส่องดูด้วยกำลังขยายต่ำๆ น้ำเลี้ยงเซลล์ยังคงใส) ในช่วง 2 สัปดาห์แรกของการเลี้ยงเซลล์ ดังนั้น จากการศึกษาครั้งนี้ ทำให้ได้ขั้นตอนที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมหอย เพื่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ปลอดเชื้อได้

คณะผู้วิจัยทำการศึกษาน้ำยาชนิดต่างๆ และสภาวะที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำให้เซลล์หอยเพิ่มจำนวนในห้องปฏิบัติการได้อย่างต่อเนื่อง หากสามารถแก้ปัญหาการปนเปื้อนของเชื้อที่ไม่ทราบชนิดนี้ได้ คาดว่า ส่วนผสมของน้ำยาดังกล่าวจะสามารถนำไปใช้พัฒนาวิธีการเลี้ยงเซลล์หอยในห้องปฏิบัติการได้เป็นเวลานาน ทำให้สามารถนำเซลล์เหล่านี้ไปประยุกต์ใช้ประโยชน์อื่นๆ ได้อย่างกว้างขวางต่อไป เช่น ใช้เป็นเซลล์ทดสอบ ความรุนแรงของเชื้อโรคของหอยเป่าอื้อ แผนการทดสอบ ทดลองกับตัวหอยโดยตรง เป็นต้น

จากการศึกษาทดลองเลี้ยงเนื้อเยื่อจากอวัยวะต่างๆ ของหอยเป่าอื้อ ผู้วิจัยสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์ เต็มๆ จากเนื้อเยื่อเหงือกและหัวใจของหอยลงเกาะพื้นภาชนะได้เป็นอย่างดี ตรวจพบว่าเซลล์หอยสามารถลง เกาะพื้นผิวภาชนะได้อย่างเร็วที่สุด ในวันรุ่งขึ้นของการเพาะเลี้ยงเซลล์จากเนื้อเยื่อหัวใจ แต่ในบางครั้งจะต้อง ทำการเลี้ยงไปถึง 7 วัน จึงจะมีเซลล์หอยลงเกาะพื้น ซึ่งส่วนใหญ่ได้ผลดีจากเนื้อเยื่อเหงือกหอย

นอกจากนี้ จากการศึกษาดูการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อหอยเป่าอื้อมาเป็นเวลานานพอสมควร ผู้วิจัยสังเกตว่า เซลล์ของหอยเป่าอื้อจากอวัยวะหลายแห่ง มีลักษณะค่อนข้างพิเศษที่ไม่พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมทั่วไป (เซลล์ ปกติ เมื่ออยู่รวมกันเป็นอวัยวะทำหน้าที่เฉพาะเจาะจง จะไม่แสดงการเคลื่อนไหวจนสังเกตเห็นได้ชัดเจนเมื่อ เซลล์ถูกแยกมาอยู่เดี่ยวๆ) แต่ในกรณีของเซลล์หอยเป่าอื้อ โดยเฉพาะจากเนื้อเยื่อเหงือก พบว่า เมื่อเฝ้าสังเกต อย่างใกล้ชิด ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง จะเห็นเซลล์บางบริเวณมีศักยภาพของความเป็นเซลล์เดี่ยวๆ สูงมาก โดยพบว่า สามารถเห็นเซลล์จากบางกลุ่มเซลล์ เคลื่อนขยับตัวได้อย่างอิสระจากเซลล์รอบข้าง โดย แสดงลักษณะยื่นขาเทียมออกไป คล้ายการเคลื่อนและขยับตัว สามารถพบเห็นได้เมื่อเอาใจใส่เพ่งมองอย่าง ต่อเนื่องเป็นเวลานาน อย่างไรก็ตาม เซลล์เช่นนี้มีเป็นส่วนน้อยและในบางจังหวะเท่านั้น จึงจะสังเกตเห็น พฤติกรรมเช่นนี้ และเมื่อพบเซลล์ลงเกาะพื้นผิวภาชนะแล้ว พฤติกรรมเหล่านี้จะตรวจไม่พบอีกต่อไป

ปัญหาการปนเปื้อนในเวลาต่อมาของเซลล์หอยเป่าอื้อที่กำลังเจริญเติบโตและแบ่งตัว เกิดขึ้นเสมอหลังจากเซลล์เหล่านี้มีอายุได้ 3-4 สัปดาห์ไปแล้ว เซลล์ไม่สามารถเจริญเติบโต เพิ่มจำนวนได้ตามปกติและพบสภาพเซลล์แตกพร้อมๆ กันเป็นส่วนใหญ่ และเซลล์แตกทั้งหมดในที่สุด ทั้งนี้ผู้วิจัยคิดว่า น่าจะเป็นปัญหาจากปรสิตที่ปนเปื้อนอยู่ภายในผนังเซลล์ของเซลล์หอยเอง ซึ่งจะเพิ่มจำนวนขึ้นภายหลัง และจากการค้นคว้าข้อมูลพบว่า การปนเปื้อนในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสัตว์จำพวกหอย (molluscan tissue culture) มีผู้รายงานถึง เชื้อ *Thraustochytrid* spp. ที่เป็นปัญหาใหญ่ สามารถพบได้หลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์ไปได้ 3 สัปดาห์ไปแล้ว (Moss et al., 2001) โดยลักษณะเชื้อที่แสดงในรายงาน มีความคล้ายคลึงกับเชื้อที่เป็นปัญหาในการศึกษาครั้งนี้ จึงเป็นที่น่าสนใจว่า จะมีผู้ทำการศึกษาต่อยอดเพื่อหาความชัดเจนและหาวิธีจัดการปัญหาการปนเปื้อนนี้ได้ในที่สุด

เนื่องจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการศึกษาโครโมโซมของหอยเป่าอื้ออยู่ในระหว่างพัฒนาวิธีการเลี้ยงเซลล์หอยในครั้งนี้ คาดว่าจะใช้เวลานาน ผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาโครโมโซมของหอยด้วยวิธีเก็บเซลล์โดยตรงจากตัวหอย ควบคู่ไปด้วยเช่นกัน (ผลการศึกษาดังภาพคาร์ิโอไทป์แนบท้าย) และได้พัฒนาวิธีการเพื่อให้ได้โครโมโซมจำนวนมากและมีคุณภาพในการใช้วิเคราะห์โครโมโซมหอยได้ดีพอสมควร จากการใช้วิธีกระตุ้นให้มีเมตาเฟสโดยตรงจากตัวหอยเอง และในการศึกษาดังนี้ ทำให้ทราบขั้นตอนต่างๆ ที่ทำให้ได้โครโมโซมจำนวนมากขึ้น อย่างไรก็ตาม พบว่า คุณภาพของโครโมโซมที่ได้ยังมีจำนวนน้อย ที่เพียงพอต่อการย้อมพิเศษ เพื่อการวิเคราะห์โครโมโซมโดยละเอียด

จากการศึกษาดังนี้ พบว่า มีหลายครั้งที่สามารถเหนี่ยวนำทำให้พบเมตาเฟสจำนวนมากถึงระดับ +4 ได้ แต่คุณภาพโครโมโซมส่วนใหญ่ยังไม่ค่อยดีนัก กล่าวคือ มีขนาดสั้น ขากาง หรือกระจายตัวมากเกินไป ทำให้จำนวนโครโมโซมบางตัวหายไป ได้สุดของโครโมโซมที่ไม่สมบูรณ์ หรือโครโมโซมอยู่รวมกันเป็นกลุ่มก้อน มีการกระจายตัวไม่ดี ทำให้มีโครโมโซมซ้อนทับกันหลายตัว ไม่สามารถทำการวิเคราะห์รูปร่างและจำนวนได้สะดวก ความไม่แน่นอนของผลในการทำให้เซลล์หอยบวมน้ำในการศึกษาดังนี้ ผู้วิจัยมีข้อสังเกตว่าส่วนหนึ่งเนื่องมาจาก เซลล์เหงือกของหอยปล่อยเมือกออกมา แม้จะมาก-น้อยไม่แน่นอน แต่จะมีผลต่อการใช้สารละลายเพื่อทำให้เซลล์หอยบวมน้ำ ทำให้เซลล์หอยได้สัมผัสกับสารละลายที่ใช้ไม่ทั่วถึง ไม่สม่ำเสมอ การกระจายตัวของโครโมโซมจึงไม่แน่นอนตามไปด้วย อย่างไรก็ตาม ผู้วิจัยยังสามารถพบเมตาเฟสที่สามารถนำมาวิเคราะห์และจัดทำคาร์ิโอไทป์ได้

In Vitro* Culture of Gill and Heart Tissues of the Abalone *Haliotis asinina

Author(s): Duangsmorn Suwattana, Jutarat Jirasupphachok, Padermsak Jarayabhand and Weerapong Koykul

Source: Journal of Shellfish Research, 29(3):651-653, 2010.

Published By: National Shellfisheries Association

DOI: 10.2983/035.029.0314

URL: <http://www.bioone.org/doi/full/10.2983/035.029.0314>

BioOne (www.bioone.org) is an electronic aggregator of bioscience research content, and the online home to over 160 journals and books published by not-for-profit societies, associations, museums, institutions, and presses.

Your use of this PDF, the BioOne Web site, and all posted and associated content indicates your acceptance of BioOne's Terms of Use, available at www.bioone.org/page/terms_of_use.

Usage of BioOne content is strictly limited to personal, educational, and non-commercial use. Commercial inquiries or rights and permissions requests should be directed to the individual publisher as copyright holder.

IN VITRO CULTURE OF GILL AND HEART TISSUES OF THE ABALONE *HALIOTIS ASININA*

DUANGSMORN SUWATTANA,^{1,*} JUTARAT JIRASUPPHACHOK,¹
PADERMSAK JARAYABHAND² AND WEERAPONG KOYKUL¹

¹Faculty of Veterinary Science, ²Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

ABSTRACT Gill and heart tissues from the abalone *Haliotis asinina* were cultured *in vitro* using Leibovitz L15 medium supplemented with insulinlike growth factor and basic fibroblast growth factor. Culture conditions at a pH of 7.8–8.0, a temperature of 27–28°C, and 31–32‰ salinity yielded cell growth expansion from the explanted tissue. Dissociated, floating spherical cells were found along with spindle-shaped fibroblastlike cells, forming a cell monolayer. This study provides basic knowledge in the development of *in vitro* culture technology of abalone tissues and is the first report on *H. asinina* cell culture.

KEY WORDS: *Haliotis asinina*, abalone, cell culture

INTRODUCTION

Abalone are marine gastropod molluscs found in temperate and tropical waters around the world. There are almost 100 different species, all belonging to the genus *Haliotis*. However, only about 10–20 species are currently used in commercial production. There are 3 species of tropical abalone found in Thailand: *H. asinina*, *H. ovina*, and *H. varia*. Of all these, *H. asinina* is the most economically promising species being cultured, because of the high ratio of abalone meat and growth rate (Jarayabhand & Paphavasit 1996).

Cultured cells of marine invertebrates are useful and offer several advantages for fundamental research in the fields of biotechnology, toxicology, and genetics (Mulcahy 2001). However, attempts to grow and maintain molluscan cells *in vitro*, which began during the early 20th century, have been far from a complete success. There have been reports on short-term cultures, but few, if any, secondary cultures, and the production of a cell line has rarely been achieved (Odintsova et al. 1992, Birmelin et al. 1999, Bulgakov et al. 2002, Poncet & Lebel 2003).

There are two great obstacles in cultures of marine invertebrate cells: contamination and the lack of cell growth stimulation. Primary explant cultures from *Haliotis* spp. were found contaminated by microbes including fungi, bacteria, and protozoa (Sud et al. 2001, Suja & Dharmaraj 2005). In addition to contamination, a low cellular proliferative level prevents the establishment of long-term cultures (Bulgakov et al. 2002). Low to moderate achievements have been reported on cultures of *Haliotis* spp. tissues with supplementation of growth-promoting factors and other agents, including epidermal growth factor and concanavalin A (Lebel et al. 1996), insulin and insulinlike growth factor I (IGF-I) (Poncet et al. 2000, Poncet et al. 2002), and lactalbumin hydrolysate (Suja & Dharmaraj 2005). More recently, supplementation of tissue extracts from mantle and whole body of abalone in the culture medium was found to enhance the cell yield and facilitate cell adherence (Suja et al. 2007).

The current study focuses on the development of a cell culture from the primary explants of *H. asinina* tissues. The objectives were to determine the factors influencing the growth of abalone cells including the effects of contamination and the promotion of cell proliferation using growth factors.

MATERIALS AND METHODS

Abalone

H. asinina were transported live from Chulalongkorn University Marine Research Station at Koh Sichang, Chonburi. At the laboratory, *H. asinina* with shell lengths of 1.0–1.5 cm were then soaked in 1.0% hydrogen peroxide for 5 sec prior to being sprayed with 70% ethanol. This washing and cleaning protocol was repeated twice before the abalone were again washed in 70% ethanol four times, placed in a sterile Petri dish, and allowed to air-dry in a sterile cabinet.

Abalone Cell Culture

The shell of *H. asinina* was removed using a scalpel blade; care was taken not to tear the gut. Gill and heart tissues were removed and the tissues were cut into 1.0 × 1.0 × 1.0-mm pieces and submerged in sterile saline. Explanted tissues were transferred to three replicates of culture plates and examined under the microscope to detect viability of cells by observing the motility of their villi. The tissues were then soaked in 5 mg/mL collagenase solution overnight (12 h) at 4°C.

Shell muscle (a short stalk joining the foot and the shell) was cut, removed, and treated, as were gill and heart tissues. Tissue viability was detected by observing the motility of foot tentacles.

The next day, the collagenase solution was drained, and the tissues were allowed to air-dry for 3–5 min before being flooded with 100 µL 2.0% Leibovitz-L15 medium supplemented with 10% fetal calf serum and 0.05% antibiotic-antimycotic (penicillin G sodium, streptomycin sulfate, and amphotericin B) (Gibco). Ten microliters of 0.05 µg/µL IGF-2 and 5 µL 0.1 µg/µL basic fibroblast growth factor solutions were directly added onto the tissues.

Tissue cultures were maintained in the incubator at a temperature range of 27–28°C, a pH of 7.8–8.0, and at 31–32‰ salinity of the culture medium. These conditions were checked and adjusted every day. Cell growth expansion from the tissues was examined under an inverted microscope and photographed.

RESULTS

Cell Types and Survival

On days 1–7 of tissue culture, motility of explanted gill cells and growth of cells from the periphery of the explants were

*Corresponding author. E-mail: Duangsmorn.S@chula.ac.th

observed. There were 2 types of growing cells: spherical and spindle shaped. The spherical cells were found floating in the culture medium whereas the spindle-shaped fibroblastlike cells adhered to the surface of culture plates (Fig. 1). An initial monolayer was formed from day 17 onward, and cell growth continued until day 28. Heart tissues yielded the same cell types as the gill tissue, however the culture of shell muscle was not successful.

Occurrence of Contamination

During the course of the study, almost all tissues of *H. asinina* were contaminated by microbes. Fungal contamination was noted along with the presence of bacteria and protozoa. Microbial contaminations occurred on days 3–5 and severely contaminated the cultures without the appearance of viability of the explant and cell growth. Washing and cleaning abalone tissue before explanting, using hydrogen peroxide and 70% ethanol, along with antibiotic and antifungal supplementations in the culture medium, appeared to keep the contamination under control, which in turn allowed cell proliferation and growth.

DISCUSSION

Development of cultured cells from the primary tissue explants and establishment of a cell line from abalone were our main objectives in this study. Attempts were made to culture *H. asinina* tissues to get a cell monolayer that would later be used in cytogenetic and molecular genetic studies, and in other fields such as toxicological and microbiological assays. It is well known that primary cell cultures from marine invertebrates have a low proliferative level that prevents the establishment of long-term cultures (Bulgakov et al. 2002). Failures in cultures of abalone cells were largely the result of the absence of specific growth stimulators in the culture system (Odintsova et al. 1992, Poncet & Lebel 2003) and the problem of contamination from a variety of microbes, including bacteria, fungi, and protozoa (Mulcahy 2001, Suja & Dharmaraj 2005).

In the current study, failure of cell culture establishment was initially the result of severe contamination. Inherent microorganisms that came along with the abalone used to obtain the tissue explants, presumably the protozoa (Rinkevich 1999), appeared and increased in number during the first 2 days of incubation. Later, on days 3–8, fungal and bacterial contaminations usually occurred, and cell growth was completely prevented. We found that thorough washing and cleaning of the specimen with hydrogen peroxide and 70% ethanol before setting up the explant culture was an important step to lessen and/or prevent contamination. Supplementation of fungicides and antibiotics later controlled microbial growth in the culture system, which is in agreement with other investigators who added a variety of antimicrobial agents to the culture media (Sud et al. 2001, Suja & Dharmaraj 2005).

Stimulation of cell proliferation and growth is an important part in the success of abalone cell culture. Unlike mammalian cells, primary cultures of marine invertebrate cells naturally have a very low proliferative level (Bulgakov et al. 2002). Growth-promoting factors have been widely used in the culture of molluscan cells with various degrees of achievement (Poncet et al. 2000, Poncet et al. 2002). In this study, we used IGF-2 and basic fibroblast growth factor, and found that these factors stimulated cell proliferation from the primary explants.

In addition to supplementation with growth-promoting factors, the culture medium and physical properties of the culture environment are the key to success in cell growth promotion. We used Leibovitz L15 medium, which does not require atmospheric CO₂ for buffering (Birmelia et al. 1999). Unlike warm-blooded animals, cells and tissues of abalone in nature survive and grow in seawater with fluctuating temperatures. Thus, the temperature of the culture has been adjusted to imitate the natural environment according to tropical or temperate waters. The cells of *H. tuberculata* of the Atlantic Ocean were found to grow at 15°C (Poncet et al. 2000, Poncet et al. 2002), whereas the culture of *H. varia* tissues had an optimal

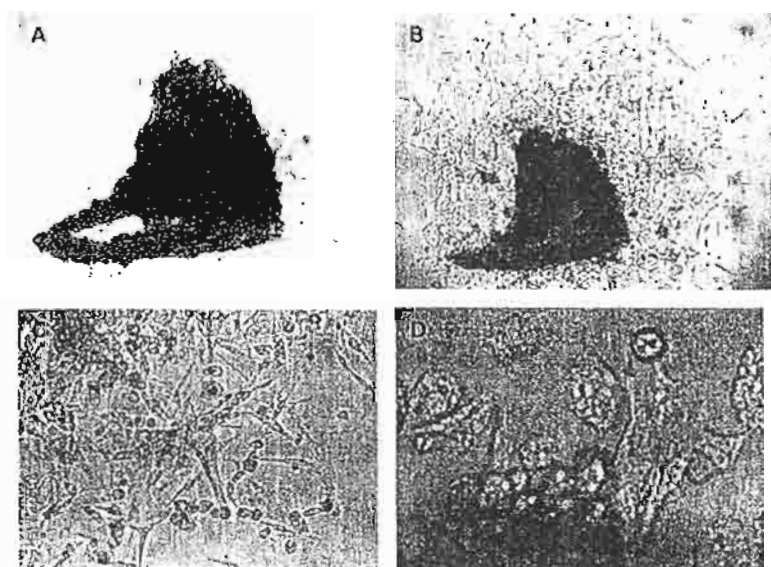


Figure 1. (A–D). *H. asinina* cell culture from the primary explants of gill tissues. Migration and growth of cells occurred from the periphery of the explants on day 7 (A) and on day 14 (B). (C, D) Note the spherical cells and spindle-shaped fibroblastlike cells forming a monolayer.

temperature of 28°C (Suja & Dharmaraj 2005). Similar to *H. varia*, *H. asinina* in tropical waters was found to yield cell growth at 27–28°C in this study. In addition to culture temperature, we found that a pH of 7.8–8.0 and 31–32‰ salinity were optimal for cell growth.

Primary explants of *H. asinina* in the current study gave rise to 2 types of cells: spherical and spindle-shaped cells. Spherical cells were floating cells that could be free individual cells, not attaching and forming an adherent monolayer. These spherical cells may have resulted from the proliferation of hemocytes and granulocytes (Suja & Dharmaraj 2005). However, it was reported that round, floating hemocytes could transform to adherent fibroblastlike cells with the presence of concanavalin A in the culture medium (Lebel et al. 1996). In the current study, fibroblastlike cells were found to grow and expand from the periphery of the primary tissue explants. A monolayer was initially formed and the culture could be maintained until day 28 of incubation. This is the first report of success in the primary cell culture of *H. asinina*.

CONCLUSION

Primary explant cultures of gill and heart tissues from the abalone *Haliotis asinina* were undertaken using Leibovitz-L15 medium supplemented with IGF-2 and basic fibroblast growth factor. Prevention of contamination and culture conditions at a pH of 7.8–8.0, a temperature of 27–28°C, and at 31–32‰ salinity were crucial to success in *H. asinina* cell culture, which yielded cell growth from the explanted tissues. Dissociated, floating spherical cells were found along with spindle-shaped fibroblastlike cells, forming a cell monolayer. This report provides basic knowledge of the development of *in vitro* culture technology of abalone tissues.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by the Thailand Research Funds (project no. RDG4820007). We gratefully acknowledge Chulalongkorn University Marine Research Station at Koh Sichang, Chonburi, for the supply of *H. asinina* used in the experiment.

LITERATURE CITED

- Birmelin, C., R. K. Pipe, P. S. Goldfarb & D. R. Livingstone. 1999. Primary cell-culture of the digestive gland of the marine mussel *Mytilus edulis*: a time-course study of antioxidant and biotransformation enzyme activity and ultrastructural changes. *Mar. Biol.* 135:65–75.
- Bulgakov, V. P., N. A. Odintsova, S. V. Plotnikov, K. V. Kiselev, E. V. Zacharov & Y. N. Zhuravlev. 2002. Gal4-gene-dependent alterations of embryo development and cell growth in primary culture of sea urchins. *Mar. Biotechnol.* 4:480–486.
- Jarayabhand, P. & N. Paphavasit. 1996. A review of the culture of tropical abalone with special reference to Thailand. *Aquaculture* 140: 159–168.
- Lebel, J. M., W. Giard, P. Fayrel & E. Boucaud-Camou. 1996. Effects of different vertebrate growth factors on primary cultures of hemocytes from the gastropod mollusc, *Haliotis tuberculata*. *Biol. Cell* 86:67–72.
- Mulcahy, M. F. 2001. Culture of molluscan cells. In: C. Mothersill & B. Austin, editors. *Aquatic invertebrate cell culture*. London: Springer Praxis, 165–176.
- Odintsova, N. A., A. M. Nesterov & D. A. Korchagina. 1992. Growth from the tissues of the marine mollusk *Mytilus edulis*. *Tsitologia* 34:90–96.
- Poncet, J. M. & J. M. Lebel. 2003. Influence of cryoprotective agent and cooling rate on frozen and thawed hemocytes from the mollusk *Haliotis tuberculata*. *Cryobiology* 47:184–189.
- Poncet, J. M., A. Serpentin, E. Boucaud-Camou & J. M. Lebel. 2002. Cryopreservation of mantle dissociated cells from *Haliotis tuberculata* (Gastropoda) and postthawed primary cell cultures. *Cryobiology* 44: 38–45.
- Poncet, J. M., A. Serpentin, B. Thiebot, V. Villers, J. Bocquet, E. Boucaud-Camou & J. M. Lebel. 2000. *In vitro* synthesis of proteoglycans and collagen in primary cultures of mantle cells from the nacreous mollusk, *Haliotis tuberculata*: a new model study of molluscan extracellular matrix. *Mar. Biotechnol.* 2:387–398.
- Rinkevich, B. 1999. Cell cultures from marine invertebrates: obstacles, new approaches and recent improvements. *J. Biotechnol.* 70:133–153.
- Sud, D., D. Doumenc, E. Lopez & C. Milet. 2001. Role of water-soluble matrix fraction, extracted from the nacre of *Pinctada maxima*, in the regulation of cell activity in abalone mantle cell culture (*Haliotis tuberculata*). *Tissue Cell* 33:154–160.
- Suja, C. P. & S. Dharmaraj. 2005. *In vitro* culture of mantle tissue of the abalone *Haliotis varia* Linnaeus. *Tissue Cell* 37:1–10.
- Suja, C. P., N. Sukumaran & S. Dharmaraj. 2007. Effect of culture media and tissue extracts in the mantle explant culture of abalone, *Haliotis varia* Linnaeus. *Aquaculture* 271:516–522.

ตารางเปรียบเทียบแผนกิจกรรม ผลที่คาดว่าจะได้รับ และผลที่ได้รับ		
แผนกิจกรรม	ผลที่คาดว่าจะได้รับ	ผลที่ได้รับ
1 การพัฒนาวิธีการเตรียมเซลล์ที่ปราศจากเชื้อ ก่อนการเพาะเลี้ยง	เทคนิควิธีการเตรียมเซลล์ที่เหมาะสม	ทราบเทคนิควิธีการเตรียมเซลล์เนื้อเยื่อหอยเป่าเชื้อให้ปราศจากเชื้อ ก่อนการเพาะเลี้ยง
2 การพัฒนาเทคนิควิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ เพื่อให้ ได้เซลล์หอยเป่าเชื้อที่แบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้	ได้เซลล์เกิดใหม่ที่สามารถแบ่งตัวและเพิ่ม จำนวนได้	สามารถผลิตเซลล์หอยเป่าเชื้อที่แบ่งตัวเพิ่มจำนวนจากเนื้อเยื่อ เพาะเลี้ยง
3 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำให้เซลล์ของ หอยเป่าเชื้อแบ่งตัว เพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว และทำการตรวจสอบยืนยันเซลล์หอยที่ให้เกิดใหม่	ทราบสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงหอย	สามารถกำหนดสภาวะที่เหมาะสมและคุณสมบัติของอาหารเลี้ยง เซลล์ เพื่อผลิตเซลล์หอยเป่าเชื้อที่เกิดการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนจาก เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง
4 การจัดทำโครโมโซมของหอยเป่าเชื้อทั้งแบบ conventional และ banded chromosomes	โครโมโซมของหอยเป่าเชื้อ (H.asiatica)	ได้เซลล์ไม่มากพอจะดำเนินการต่อไป ประสบปัญหา ไม่สามารถ เพาะเลี้ยงเซลล์ได้นานกว่า 3-4 สัปดาห์ เพราะเซลล์ที่เพาะเลี้ยงมี ลักษณะการติดเชื้อ ไม่สามารถแก้ไขปัญหาดังกล่าวได้และตายหมด ก่อนที่ จะมีจำนวนมากพอทำการศึกษาคืบต่อไป
		จัดทำโครโมโซมโครโมโซมโดยตรงจากตัวหอยเป่าเชื้อ (ดังภาพที่แนบในรายละเอียด) แต่ผู้วิจัยยังไม่สามารถตรวจสอบ โครโมโซมจากเซลล์หอยที่ทำการเพาะเลี้ยง (cultured cells) ใน ห้องปฏิบัติการได้