การศึกษาลักษณะโครโมโซมของเซลล์ BHK-21(C-13) ที่ใช้ผลิตไวรัส และวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย

Chromosomal Characterization of BHK-21(C-13) Cells Used for FMD Virus and Vaccine Production

ธนรัตน์ จานุกิจ[1] ลักขณา หิมะคุณ[2]
Thanarat Janukit[1] Lakana Himakoun[2]

บทคัดย่อ

ศึกษาลักษณะโครโมโซมของเซลล์ BHK-21(C-13) ที่ใช้ในการผลิตไวรัสและวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ โดยวิธีทางเซลล์พันธุศาสตร์ จากการย้อมโครโมโซมด้วยสี Giemsa เพื่อให้ทราบลักษณะโครโมโซมของเซลล์และเพื่อการตรวจสอบความผิดปกติของโครโมโซมของเซลล์ที่สามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรมได้ พบว่าส่วนใหญ่เซลล์ BHK-21 (C-13) ชนิด monolayer (73%) และชนิดแขวนลอย (suspension) (69%) มีจำนวนโครโมโซม 2n เป็น 44 โดยมี โครโมโซมร่างกาย 21 คู่ และโครโมโซมเพศ (X,Y) 1 คู่ นอกจากนี้การกระจายตัวของโครโมโซมของเซลล์ทั้งสองชนิดให้ผลสอดคล้องและไม่แตกต่างจากเซลล์มาตรฐานคือมีจำนวนโครโมโซม 41, 42, 43, 45 และ 46 การย้อมแถบสีของโครโมโซมของเซลล์ BHK-21(C-13) ชนิด monolayer โดยเทคนิค G-banding ให้ผลสอดคล้องกับแถบสีรูปแบบมาตรฐาน

คำสำคัญ: โครโมโซม เซลล์ BHK-21(C-13) เซลล์พันธุศาสตร์ เทคนิค G-banding
Keywords: Chromosome, BHK-21(C-13) cell, Cytogenetic, G-banding technique

[1] กลุ่มวิจัยและพัฒนา สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130
Veterinary Biologics Research and Development Sub-division, Bureau of Veterinary Biologics, Department of Livestock Development, Pakchong, Nakornratchasima, 30130
[2] ภาควิชาพยาธิชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล พญาไท กรุงเทพฯ 10400
Department of Pathobiology, Faculty of Science, Mahidol University, Phayathai, Bangkok, 10400

Abstract

BHK-21(C-13) cells used for FMD virus and vaccine production were characterized by cytogenetic techniques. The chromosomes of monolayer and suspension BHK-21(C-13) cells were observed using Geimsa staining. This study showed that the majority of both monolayer (73%) and suspension (69%) BHK-21(C-13) cells contained 44 chromosomes while the metaphase chromosomes of each cell were uniformly distributed into 21 pairs of autosomes and X , Y sex chromosomes similar to the reference cell. More than that the cells revealed the distribution of chromosome numbers of 41, 42, 43, 45 and 46 respectively. The chromosomes of monolayer BHK-21(C-13) cell tested by G-banding technique also corresponded to the chromosomes of the reference cell.

บทนำ

เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเซลล์ถูกนำมาใช้กันอย่างแพร่หลาย ทั้งด้านการแพทย์ อุตสาหกรรม งานวิจัยและนำไปประยุกต์ใช้ในสาขาอื่นๆ อีกมากมาย สำหรับเซลล์ BHK-21(C-13) เตรียมจากไตของ golden hamster หรือ syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) แรกเกิดอายุ 1 วัน คละเพศจำนวน 5 ตัว ในปีค.ศ. 1962 โดย Macpherson and Stoker แล้วศึกษา karyotype ของเซลล์นี้ พบว่าเป็นเซลล์ที่มาจากหนูเพศผู้เพียงเพศเดียว เมื่อ clone เซลล์แล้ว ได้มอบให้ American Type Culture Collection (ATCC) (Hay, 1994)

ส่วนใหญ่การผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยในระดับอุตสาหกรรมใช้การเพาะเลี้ยงเซลล์ BHK-21(C-13) ชนิดแขวนลอย (suspension) (Capstic et al., 1962; Amadori et al., 1997) สำหรับศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อยเริ่มใช้เซลล์ชนิดนี้ในการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยในปี พ.ศ. 2521 (Makarasen et al., 1982) การผลิตเซลล์ที่มีคุณภาพเป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งที่จะนำไปสู่การผลิตไวรัสและวัคซีนที่มีคุณภาพและได้มาตรฐาน ในการผลิตเซลล์ให้ได้ปริมาณและคุณภาพที่ดีมีปัจจัยหลายประการ เช่น เซลล์ที่นำมาใช้ควรมีการตรวจสอบลักษณะของเซลล์เพื่อให้ได้เซลล์ที่มีคุณภาพดีและได้มาตรฐาน วิธีการศึกษาลักษณะเฉพาะของเซลล์มีหลายวิธี เช่น chromosome analysis, isoenzyme analysis, cell surface antigen, cytoskeleton และ DNA fingerprint (Freshney, 2000) วิธีการตรวจวิเคราะห์โครโมโซม (chromosome analysis) เป็นขั้นตอนแรกสำหรับตรวจแยกสายพันธุ์สัตว์ สามารถทำได้ง่ายโดยอาศัยเครื่องมือที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการทั่วไป ในปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้ DNA probe เพื่อให้ได้ผลรวดเร็วยิ่งขึ้น อย่างไรก็ตามการผลิต probe ยังจำกัดอยู่เพียงบางสายพันธุ์เท่านั้น ยิ่งไปกว่านั้นยังเสียค่าใช้จ่ายสูง และการตรวจสอบต้องใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิดฟลูออเรสเซนต์ ซึ่งมีอยู่เฉพาะบางห้องปฏิบัติการเท่านั้น

ในการตรวจสอบลักษณะดั้งเดิมของสายพันธุ์ (specie of origin) ของเซลล์ว่ายังคงเดิมหรือมีการเปลี่ยนแปลงเมื่อ passage เซลล์ไปหลายๆ ครั้งจึงได้นำวิธีทางเซลล์พันธุศาสตร์ (cytogenetic) มาศึกษาถึงลักษณะของเซลล์ เนื่องจากยีนส์ซึ่งควบคุมลักษณะต่างๆ ทางพันธุกรรมอยู่บนโครโมโซม การเปลี่ยนแปลงของโครโมโซมโดยจำนวนหรือโครงสร้างลักษณะย่อมมีผลกระทบถึงการเปลี่ยนแปลงลักษณะของเซลล์ ดังนั้นการศึกษาโครโมโซมในระยะเมตาเฟสซึ่งเป็นระยะการแบ่งตัวที่เห็นโครโมโซมชัดเจนมากที่สุด เมื่อนำโครโมโซมที่เป็นคู่กัน (homologous chromosomes) มาจัดเรียงตัวตามสัดส่วนของความยาวแขนและตำแหน่ง centromere ตามหลักการของ Lehman et al. (1963) จะสามารถวิเคราะห์ถึงรูปร่างและโครงสร้างลักษณะโครโมโซมของเซลล์ได้

จุดประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้ เพื่อตรวจสอบลักษณะโครโมโซมของเซลล์ให้ทราบถึงรูปแบบและเพื่อตรวจสอบความผิดปกติของโครโมโซมของเซลล์ที่สามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรมได้ รวมทั้งเพื่อประเมินคุณภาพเซลล์ที่ใช้ผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยในปัจจุบัน

วัสดุอุปกรณ์ และวิธีการ

เซลล์เพาะเลี้ยง

เซลล์ BHK-21(C-13) ชนิดแขวนลอย lot no. S_{14} ปีค.ศ. 1989 ใช้ผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย โค-กระบือ และเซลล์ BHK-21(C-13) ชนิด monolayer lot no. F 15120 P_{12} เพาะเลี้ยงนาน 8-24 ชม. (Li et al., 1982) ปริมาตร 5 มล.

การเตรียมโครโมโซม

นำเซลล์ทั้งสองชนิดเติมสารละลาย colchicine (ความเข้มข้น 2.5 มก./มล.) อบในตู้ 37°C นาน 2 ชั่วโมง 30 นาที เพื่อให้ได้เซลล์ในระยะเมตาเฟส ย่อยเซลล์ชนิด monolayer ด้วยสารละลาย 0.1% versene trypsin นำเซลล์ทั้งสองชนิดมาปั่นด้วยความเร็ว 1,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที ดูดน้ำส่วนบนทิ้ง เติมสารละลาย hypotonic (KCl 0.075 M) ปริมาตร 5 มล. ผสมให้เข้ากัน ปั่นซ้ำด้วยความเร็วเดิมดูดน้ำส่วนบนทิ้ง เติมสารละลาย fixative (Methanol : Acetic acid = 3 : 1 โดยปริมาตร) ปริมาตร 5 มล. ผสมให้เข้ากัน ทำซ้ำอีก 2 ครั้ง เก็บเข้าตู้เย็น 4°C นาน 1 ชั่วโมง นำมาหยดลงบนสไลด์ 1 หยดทิ้งไว้สักครู่พอหมาด ตามด้วยสารละลาย fixative 1 หยด ทิ้งไว้จนสไลด์แห้ง

การย้อมสีสไลด์

ย้อมสไลด์ด้วยสี 10% Giemsa ใน Weise buffer นาน 15 นาที ล้างด้วยน้ำประปา ทิ้งไว้ให้สไลด์แห้ง เพื่อนับจำนวนและตรวจดูลักษณะโครโมโซมในแต่ละเมตาเฟสเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 เท่า และถ่ายภาพ เพื่อจัดเรียงโครโมโซมคู่เหมือนตามหลักการจัด karyotype ของ Lehman et al. (1963)

การย้อมแถบสีโครโมโซมโดยเทคนิค G-banding

นำสไลด์ที่หยดโครโมโซมแล้วเข้าตู้อบ 60-70°C นาน 3-4 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็น จุ่มสไลด์ลงในสารละลาย 0.1% trypsin ใน normal saline อุณหภูมิ 37°C นาน 1-2 นาที ล้างสไลด์ด้วยน้ำกลั่น ย้อมสไลด์ด้วยสี 10% Giemsa ใน Weise buffer นาน 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น ทิ้งไว้ให้สไลด์แห้ง ดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 เท่า และถ่ายภาพ เพื่อจัดเรียงโครโมโซมที่มีคู่เหมือนตามลักษณะของแถบสีที่ปรากฏตรงกันโดยเทียบกับแถบมาตรฐาน (standard pattern) ของ Pavia et al. (1997) Popescu and DiPaolo (1972) และ Li et al. (1982)

การวิเคราะห์ผล

เปรียบเทียบลักษณะโครโมโซมของเซลล์ทั้งสองชนิดที่ใช้ในสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์กับข้อมูลของเซลล์ BHK-21(C-13) ของ ATCC โดยการนับเซลล์จำนวน 100 เมตาเฟสเซลล์ ดูการกระจายตัวของจำนวนโครโมโซม (41-46 แท่ง) โดยวิธีไคสแควร์ (นิภา, 2527; ทัสสนี และเดิมศรี, 2541)

ผลการทดลอง

เซลล์ BHK-21(C-13) ชนิด monolayer และ ชนิดแขวนลอย พบว่ามีจำนวนโครโมโซมส่วนใหญ่ 2n = 44 แท่ง เป็นร้อยละ 73 และ 69 ตามลำดับ การกระจายตัวของโครโมโซมของเซลล์ทั้งสองชนิดไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) แสดงใน Table 1 และ figure 1 ตัวอย่างเมตาเฟสโครโมโซมของเซลล์แต่ละชนิดแสดงใน figure 2 และ 4 การจัดเรียง karyotype ของเซลล์แต่ละชนิดตามขนาดและสัดส่วนความยาวแขนแสดงใน figure 3 และ 5 จำนวนโครโมโซม 44 แท่ง แบ่งเป็นโครโมโซมเพศ X,Y (sex chromosome) 1 คู่ และ โครโมโซมร่างกาย (autosome) 21 คู่ ซึ่งประกอบด้วย โครโมโซมชนิด metacentrics (MM) จำนวน 4 คู่ (คู่ที่ 5, 10, 14 และ 20) โครโมโซมชนิด submetacentrics (SMM) จำนวน 9 คู่ (คู่ที่ 1, 2, 3, 4, 8, 9, 12, 13 และ 15) โครโมโซมชนิด subtelocentrics (ST) จำนวน 3 คู่ (คู่ที่ 6, 7 และ 11) โครโมโซมชนิด acrocentrics (A) ขนาดใหญ่ จำนวน 4 คู่ (คู่ที่ 16-19) และโครโมโซมชนิด acrocentric (A) ขนาดเล็ก จำนวน 1 คู่ (คู่ที่ 21)

เมตาเฟสโครโมโซมของเซลล์ BHK-21(C-13) ชนิด monolayer ซึ่งย้อมด้วยเทคนิค G-banding แสดงใน figure 6 และการจัดเรียง karyotype โครโมโซมคู่เหมือนตามลักษณะของแถบสีที่ปรากฏตรงกันโดยเทียบกับแถบมาตรฐานแสดงใน figure 7

Table 1 Distribution of monolayer and suspension BHK-21(C-13) cells with different Chromosome numbers.

Chromosome numbers (2n)	Percentage of cells with different chromosome numbers	
	Monolayer BHK-21(C-13) cell	Suspension BHK-21(C-13) cell
41	3	1
42	5	4
43	8	10
44	73	69
45	8	12
46	3	4

วิจารณ์ และสรุป

ลักษณะโครโมโซมของเซลล์ BHK-21(C-13) ชนิด monolayer และชนิดแขวนลอย เมื่อย้อมด้วยสี Giemsa มีการกระจายตัวของโครโมโซมของเซลล์ทั้งสองชนิดสอดคล้องกับข้อมูลจาก ATCC ซึ่งรายงาน การกระจายตัวของโครโมโซม จำนวน 50 เมตาเฟสเซลล์ มีจำนวนโครโมโซม 41, 42, 43, 44, 45 และ 46 แท่ง เป็น 2, 1, 1, 37, 7 และ 2 เซลล์ ตามลำดับ (Hay, 1994)

การย้อมแถบสีโครโมโซมด้วยเทคนิค G-banding เป็นการย่อยโปรตีนบนโครโมโซมด้วยเอ็นไซม์แล้วย้อมสีโครโมโซมจะติดเป็นแถบสีไม่เท่ากัน การจัดเรียงโครโมโซมของเซลล์ซึ่งย้อมด้วยเทคนิค G-banding โครโมโซมแต่ละคู่จะปรากฏแถบสีที่ตรงกันซึ่งให้ผลชัดเจนและแน่นอนกว่า พบว่าการติดสีของโครโมโซมเพศจะติดสีเข้มกว่าโครโมโซมร่างกาย แขนสั้น (p) ของโครโมโซมเพศเห็นแถบได้ชัดเจนกว่าแขนยาว (q) และแขนยาวของโครโมโซมเพศมักจะติดสีเข้มทึบ ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับรายงานของ Popescu and DiPaolo (1972) สไลด์ที่จะนำมาย้อมด้วยเทคนิค G-banding ควรมีอายุไม่เกิน 1 สัปดาห์ การตรวจวินิจฉัยควรทำอย่างรวดเร็วและต้องรีบถ่ายรูปไว้เป็นหลักฐานเพราะทิ้งไว้นานสไลด์จะมีสีซีดลงทำให้ยากต่อการตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์

เซลล์ที่นำมาเตรียมโครโมโซมจะต้องเป็นเซลล์ที่อยู่ในระยะแบ่งตัว จะมีลักษณะกลม เรืองแสงแวววาว เมื่อดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ การแบ่งตัวแบบไมโตซีสเป็นการเพิ่มจำนวนเซลล์โดยที่จำนวนโครโมโซมยังคงเท่ากับเซลล์เริ่มต้น (วิสุทธิ์, 2533) โดยปกติเซลล์ BHK-21(C-13) มีการเพิ่มจำนวนเซลล์เป็นสองเท่าของเซลล์ปกติ (doubling time) ในเวลา 12 ชั่วโมง (Macpherson, 1963; Bird and Forrester, 1981) ดังนั้นก่อนเตรียมโครโมโซมจึงต้องเพาะเลี้ยงนานกว่า 12 ชั่วโมง ถ้าเซลล์แก่เกินไปหรือเซลล์ที่เกิด contraction confluent แล้วจะไม่มีการแบ่งตัวทำให้ได้เมตาเฟสน้อย นอกจากนี้การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก็มีผลต่อการลดลงของการแบ่งเซลล์ และการเตรียมโครโมโซมเช่นกัน

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณภาควิชาพยาธิชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้การสนับสนุนงานวิจัยครั้งนี้ ดร.แสงชัย เอกประทุมชัย คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยพระจอมเกล้าธนบุรี ที่ช่วยค้นเอกสารและข้อมูลจากห้องสมุดต่างประเทศ และขอขอบคุณ ศ.น.สพ. ศุภกิจ อังศุภกร, ผชช.น.สพ.แอบ คงทน และ น.สพ.ดร.วิวัฒน์ ชัยชนะศิริวิทยา ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำและแก้ไขที่มีคุณค่าอย่างยิ่ง

เอกสารอ้างอิง

ทัสสนี นุชประยูร และ เติมศรี ชำนิสารกิจ. 2541. สถิติการวิจัยทางการแพทย์. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ. หน้า 146-165.

นิภา ศรีไพโรจน์. 2527. หลักการวิจัยเบื้องต้น. บริษัทศึกษาพรจำกัด. กรุงเทพฯ. หน้า 232-251.

วิสุทธิ์ ใบไม้. 2533. พันธุศาสตร์ ฉบับปรับปรุงใหม่. เจ้าพระยาระบบการพิมพ์. กรุงเทพฯ. หน้า 29-31.

Amadori, M., Volpe, G., Defilippi, P. and Berneri, C. 1997. Phenotypic features of BHK-21cells used for production of Foot and Mouth disease vaccine. Biologicals. 25: 65-73.

Bird, B.R. and Forrester, F.T. 1981. Basic Laboratory Techniques in Cell Culture. U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta. p. 9.

Capstic, P. B., Telling, R. C., Chapman, W. G. and Stewart, D.L. 1962. Growth of a cloned strain of hamster kidney cells in suspended cultures and their susceptibility to the virus of foot and mouth disease. Nature (Lond). 195: 1163-1164.

Freshney, R. I. 2000. Culture of animal cells. A manual of Basic technique, 4th ed. Wiley-Liss, Inc. New York. p. 229-257.

Hay, R. 1994. American Type Culture Collection (ATCC) Catalogue of Cell Lines & Hybridomas Rockville. : ATCC. CCL-10.

Lehman, J. M., Macpherson, I. and Moorhead, P.S. 1963. Karyotype of the syrian hamster. J. Nat. Cancer Inst. 31: 639-650.

Li, S., Pathak, S. and Hsu, T.C. 1982. High resolution G-banding patterns of syrian hamster chromosomes. Cytogenet. Cell Genet . 33: 295-302.

Macpherson, I. 1963. Characteristics of a hamster cell clone transformed by polyoma virus. J. Nat. Cancer Inst. 30(4): 795-815.

Macpherson, I. and Stoker, M. 1962 . Polyoma transformation of hamster cell clones-an investigation of genetic factor affecting cell competence. Virology. 16: 147-151.

Makarasen, P., Sinsuwongwat, P., Chinsawadpun, W., Tokui, T. and Motohashi, T. 1982. Large scale production of FMD vaccine using BHK cell in Thailand. 16th Conferences of Foot and Mouth Disease Commission. Paris. p. 175

Pavia, R.A., Smith, I.W. and Goldenberg, D.M. 1977. An analysis of the G-banded chromosomes of the golden hamster. Int. J. Cancer. 20: 460-465.

Popescu, N.C. and DiPaolo, J.A. 1972. Identification of Syrian hamster chromosomes by acetic-saline-Giemsa (ASG) and trypsin techniques. Cytogenetics. 11: 500-507.

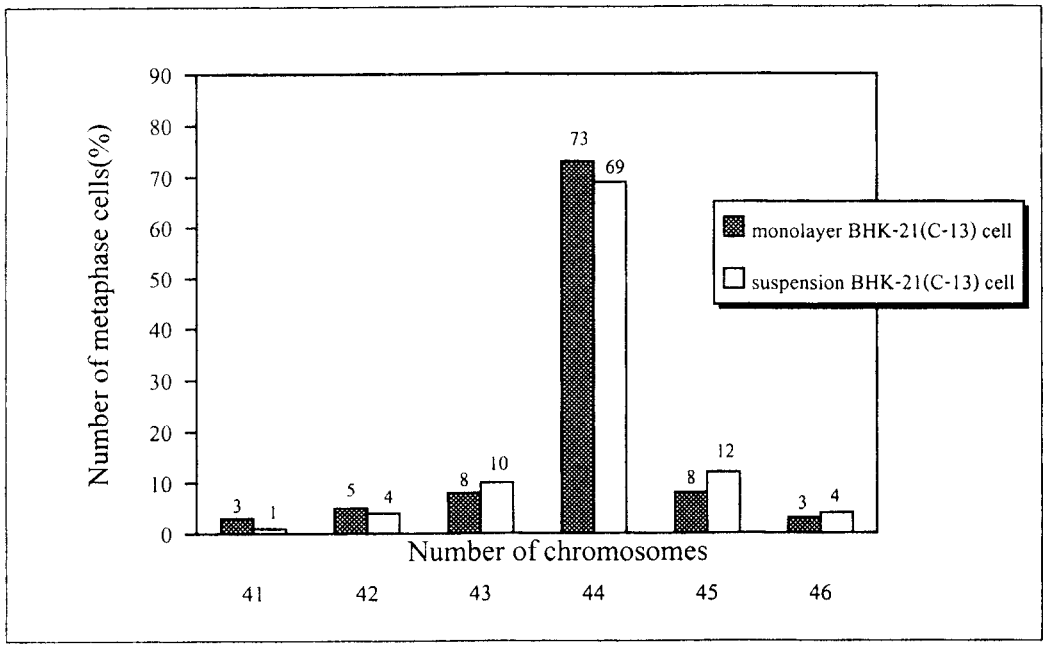

Figure 1 Chromosome numbers of monolayer and suspension BHK-21(C-13) cells

Figure 2 The metaphase chromosomes of monolayer BHK-21(C-13) cell stained with 10% Giemsa, x100

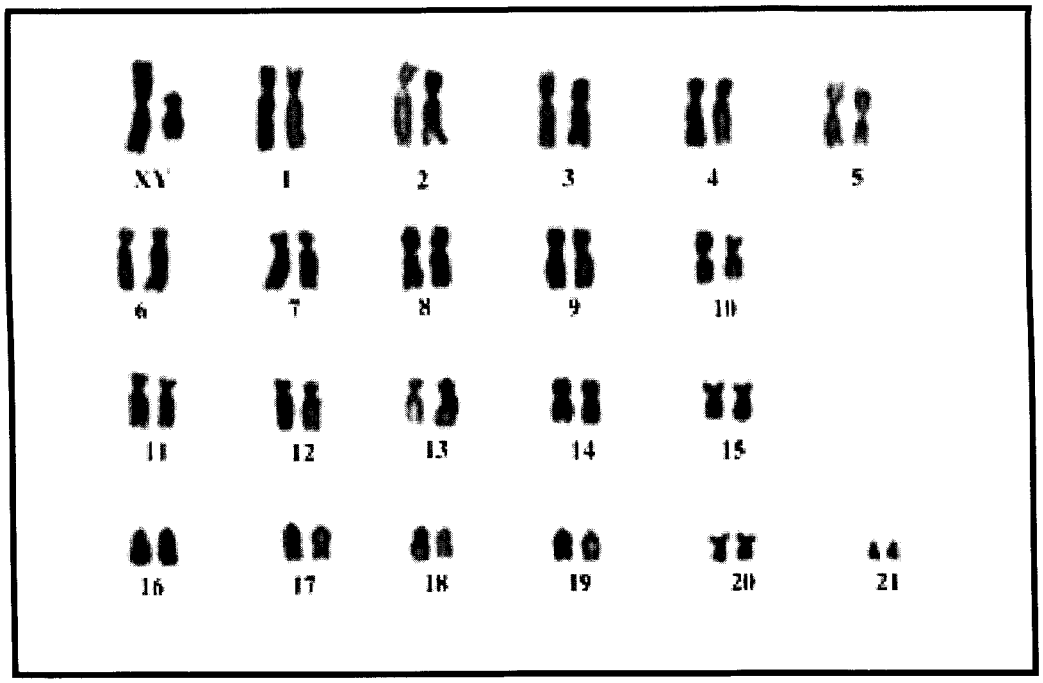

Figure 3 Karyotype of monolayer BHK-21(C-13) cell stained with 10% Giemsa, x100

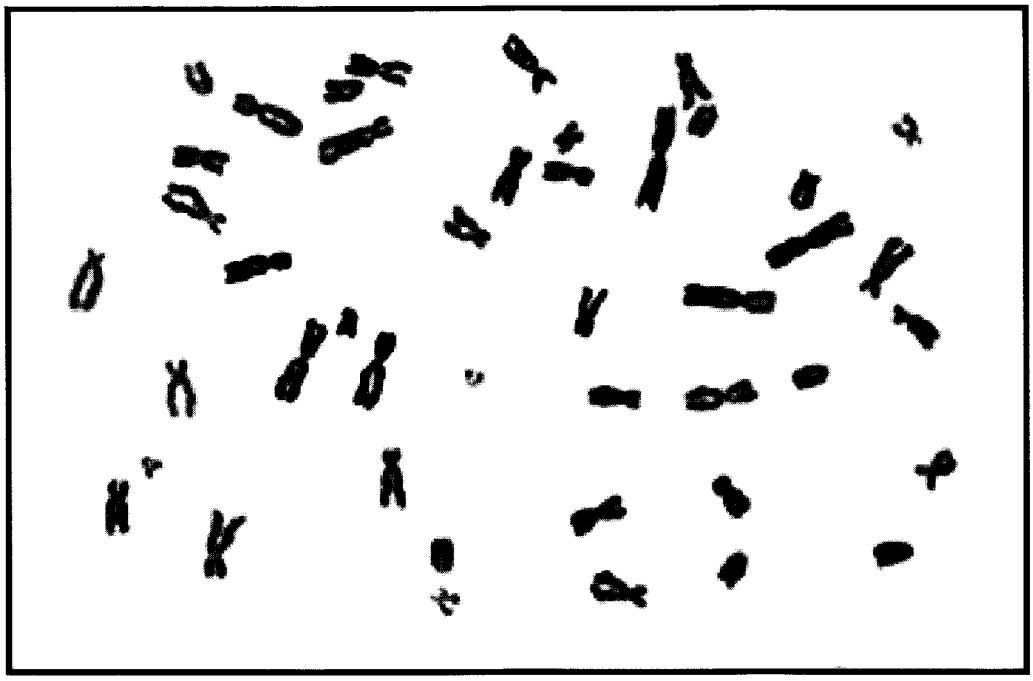

Figure 4 The metaphase chromosomes of suspension BHK-21(C-13) cell stained with 10% Giemsa, x100

Figure 5 Karyotype of suspension BHK-21(C-13) cell stained with 10% Giemsa, x100

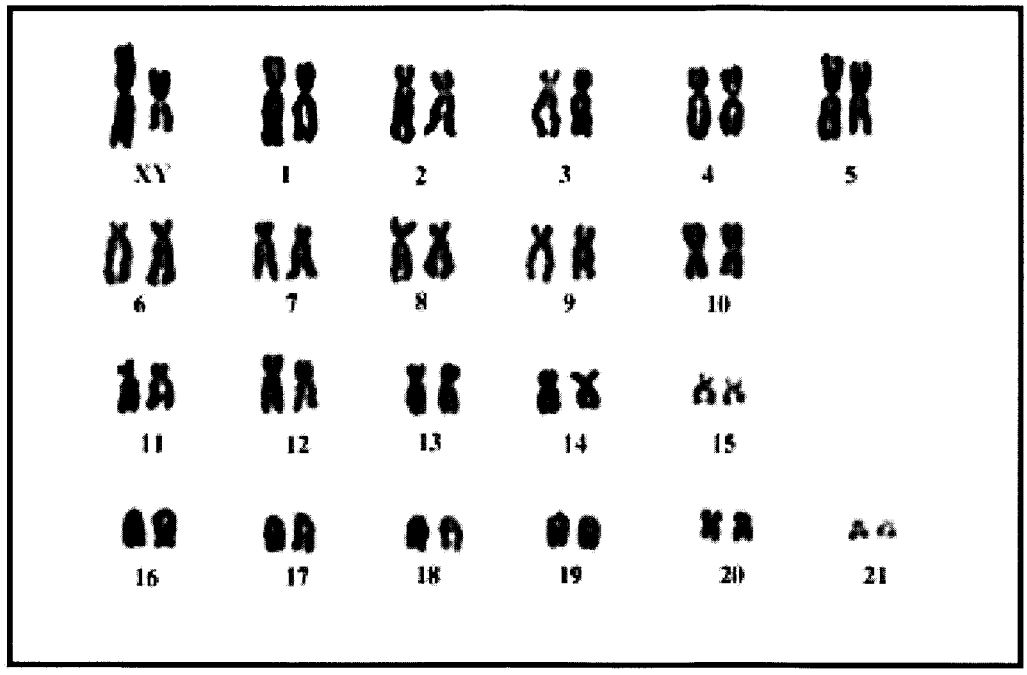

Figure 6 The metaphase of G-banding chromosome of monolayer BHK-21(C-13) cell, x100

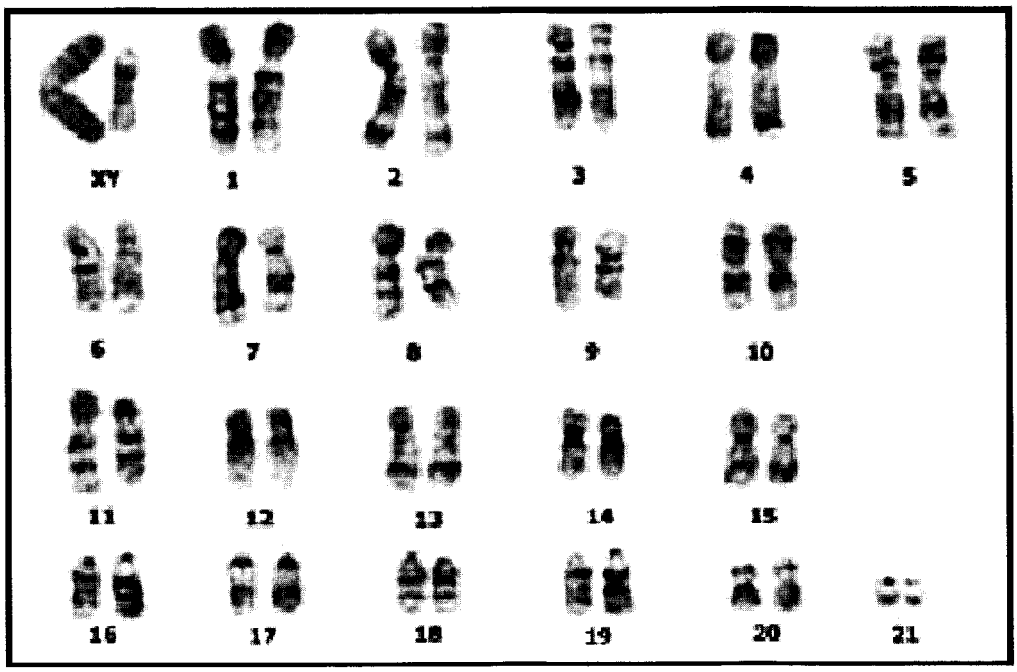

Figure 7 Karyotype of G-banding chromosome of monolayer BHK-21(C-13) cell, x100