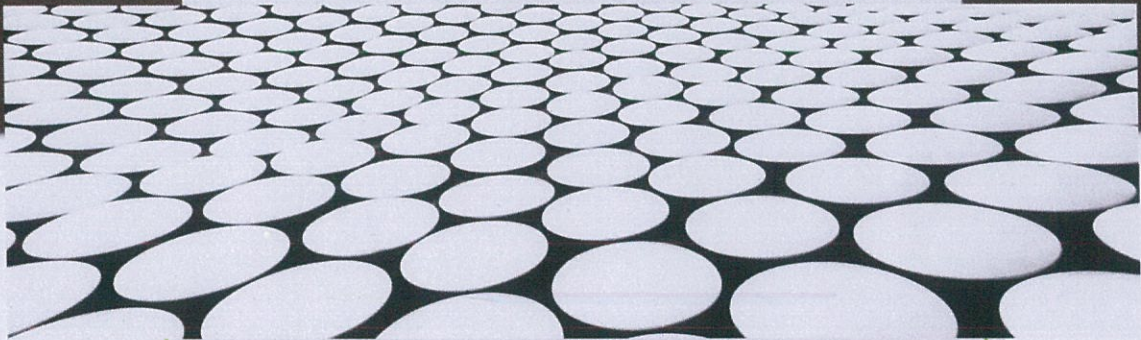


หลักฐานข้อต่อการกำเริบงา

Sit Dolor Amet





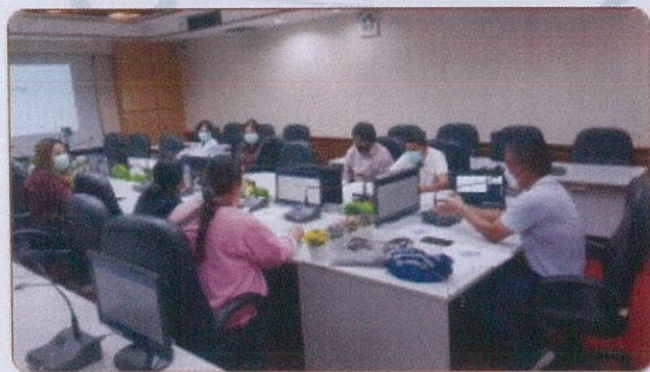
เป็นผู้นำในการผลิตวัคซีนระดับภูมิภาคอาเซียน
เพื่อส่งเสริมประเทศไทยอย่างยั่งยืน
Bureau of Veterinary Biologics



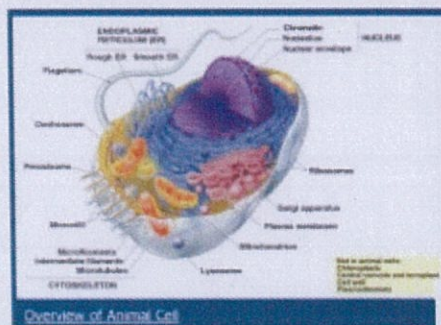
สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์

วันพฤหัสบดีที่ 2 มีนาคม 2566

นายสัตวแพทย์จาดรนต์ พลราช ผู้อำนวยการสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ มอบหมายให้ งานบริหาร ทรัพยากรบุคคล ฝ่ายบริหารทั่วไป จัดอบรมหลักสูตร “การเพาะเลี้ยงเซลล์ (In unit GMP Topic Cell culture)” โดยมี น.สพ.สมเกียรติ ศรีพิสุทธิ์ ฝ่ายผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย กลุ่มผลิตชีวภัณฑ์ มาเป็นวิทยากรในการบรรยายในครั้งนี้เพื่อเพิ่มพูนความรู้ให้กับบุคลากรของฝ่ายผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย เพื่อให้การทำงานเป็นไปอย่างถูกต้องเพื่อเตรียมความพร้อมเข้าสู่การขอรับรองระบบมาตรฐาน GMP ณ ห้องประชุมจักรพิชัย สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์




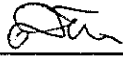
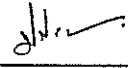
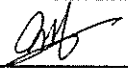

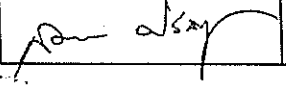
การเพาะเลี้ยงเซลล์
(In-unit GMP Topic Cell culture)



รายชื่อผู้เข้าอบรม หลักสูตร "การเพาะเลี้ยงเซลล์ (In unit GMP Training Topic Cell culture)"

ณ ห้องประชุม ๑ อาคารอาหารบริรักษ์

วันที่ ๒ มีนาคม ๒๕๖๖ (เวลา ๑๔.๐๐ - ๑๕.๐๐ น.)

ที่	รายชื่อ - สกุล	ตำแหน่ง	ลายเซ็น	หมายเหตุ
			๑๔.๐๐ - ๑๕.๐๐ น.	
๑	นาย จริญญา มุ่งพักกลาง	พนักงานควบคุมเครื่องมือวิทยาศาสตร์		
๒	นาง สาวิตรี มาตราขาว	พนักงานทั่วไป		
๓	นางสาว สรลลธร พะวอนรัมย์	พนักงานผลิตชีวภัณฑ์	สรลลธ	
๔	นายปริญญา แต่งจันทิก	พนักงานห้องปฏิบัติการ		
๕	นางนันทนา กลัดสูงเนิน	พนักงานผลิตชีวภัณฑ์		
๖	นางสาวปรารงค์ทอง ศรีศรี	พนักงานผลิตชีวภัณฑ์		
๗	นายกิตติ จันทรา	พนักงานผลิตชีวภัณฑ์	กิตติ	
๘	นางสาวศิริกร วันยั้ง วิทยากร	นักวิทยาศาสตร์	ศิริกร	
๙	นายสมเกียรติ ศรีพิสุทธิ์	นายสัตวแพทย์ชำนาญการ		

Cell culture หมายถึงการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์ชั้นในหลอดทดลอง โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่แตกต่างกันตามชนิดของเซลล์ ปัจจุบันนักวิจัยได้นำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์มาใช้ในการทดสอบสิ่งต่างๆ เช่น การทดสอบยาต้านเชื้อจุลินทรีย์ การทดสอบวัคซีน การผลิตโปรตีนที่จำเพาะในเซลล์ และการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ เป็นต้น แทนการทดสอบในสัตว์โดยตรง ซึ่งมีความยุ่งยากในการควบคุมปัจจัยต่างในการดำเนินชีวิตของสัตว์ มีค่าใช้จ่ายสูง และยังคงคำนึงถึงจริยธรรมการวิจัยในสัตว์ทดลอง ดังนั้นนักวิจัยจึงหันมาใช้แนวทางการทดสอบสิ่งต่างๆในเซลล์สัตว์ที่ทำการเพาะเลี้ยงชั้นในหลอดทดลองแทน ประโยชน์ของการเลี้ยงเซลล์ในหลอดทดลองคือสามารถควบคุมสภาวะแวดล้อมที่จะให้เซลล์อยู่ได้ เซลล์จะมีความเหมือนและมีลักษณะเฉพาะตัว ประหยัด และสามารถคาดเดาผลที่จะเกิดกับสัตว์ทดลองได้เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยสารต่างๆ

Cell culture หมายถึงการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์ชั้นในหลอดทดลอง โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่แตกต่างกันตามชนิดของเซลล์ ปัจจุบันนักวิจัยได้นำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์มาใช้ในการทดสอบสิ่งต่างๆ เช่น การทดสอบยาต้านเชื้อจุลินทรีย์ การทดสอบวัคซีน การผลิตโปรตีนที่จำเพาะในเซลล์ และการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ เป็นต้น แทนการทดสอบในสัตว์โดยตรง ซึ่งมีความยุ่งยากในการควบคุมปัจจัยต่างในการดำเนินชีวิตของสัตว์ มีค่าใช้จ่ายสูง และยังคงคำนึงถึงจริยธรรมการวิจัยในสัตว์ทดลอง ดังนั้นนักวิจัยจึงหันมาใช้แนวทางการทดสอบสิ่งต่างๆในเซลล์สัตว์ที่ทำการเพาะเลี้ยงชั้นในหลอดทดลองแทน ประโยชน์ของการเลี้ยงเซลล์ในหลอดทดลองคือสามารถควบคุมสภาวะแวดล้อมที่จะให้เซลล์อยู่ได้ เซลล์จะมีความเหมือนและมีลักษณะเฉพาะตัว ประหยัด และสามารถคาดเดาผลที่จะเกิดกับสัตว์ทดลองได้เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยสารต่างๆ

เมื่อตัดสินใจที่จะดำเนินการวิจัยโดยใช้วิธีเพาะเลี้ยงเซลล์ ห้องปฏิบัติการจำเป็นต้องมีความพร้อมในด้านอุปกรณ์เครื่องมือต่างๆ ดังนี้

๑. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow hood) เป็นตู้ที่ภายในจะปลอดเชื้อจุลินทรีย์ โดยใช้ลมเป่าไม่ให้เชื้อจุลินทรีย์ตกลงบริเวณปฏิบัติการ
๒. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) นำมาใช้ปั่นแยกเซลล์ออกจาก อาหารเลี้ยงเซลล์
๓. ปิเปต (pipette) เป็นอุปกรณ์ที่ใช้ดูดสารละลายปริมาณน้อยๆ ระดับไมโครลิตร และ serological pipette เป็นอุปกรณ์ที่ใช้ดูดสารในปริมาณในระดับมิลลิลิตร โดยมีปุ่มควบคุมการดูดและปล่อยสาร
๔. Hemocytometer เป็นอุปกรณ์ที่ใช้ในการนับจำนวนเซลล์
๕. กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ ใช้ในการดูเซลล์ใน flask และกล้องจุลทรรศน์แบบแสง ใช้ในการนับเซลล์
๖. ตู้บ่ม (incubator) เป็นตู้ที่ควบคุมอุณหภูมิ และปริมาณของ CO₂ ได้
๗. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้ความร้อน (autoclave) โดยตั้งอุณหภูมิไว้ที่ ๑๒๑ องศาเซลเซียส นาน ๑๕ นาที เพื่อกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อน
๘. ตู้เย็น ใช้เก็บอาหารเลี้ยงเซลล์
๙. Culture vessels เป็นภาชนะที่ใช้เลี้ยงเซลล์ จะมี ๒ ชนิด ได้แก่ plate และ flask
๑๐. Sterilization filter ช่วยกรองอาหารเลี้ยงเซลล์ให้ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์
๑๑. ๗๐% ethanol ใช้สำหรับฆ่าเชื้ออุปกรณ์ต่างๆ

การปฏิบัติงานด้านการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์ สิ่งที่สำคัญอย่างมากคือความสะอาด ทุกขั้นตอนต้องปฏิบัติโดยใช้ aseptic technique ตั้งแต่การนึ่งฆ่าเชื้ออุปกรณ์ทุกชิ้น หรือเลือกใช้วัสดุอุปกรณ์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยใช้รังสี การเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์ควรพยายามไม่ให้เกิดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ต่างๆ รวมถึงการเตรียมเซลล์สำหรับเพาะเลี้ยง และภายในตู้ปลอดเชื้อต้องเช็ดทำความสะอาดด้วย ๗๐% Ethanol ก่อนและหลังทำงานทุกครั้ง

การเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นวิธีการพื้นฐานที่นำไปศึกษาในงานวิจัยในด้านต่างๆ ยกตัวอย่างเช่น การทดสอบความมีชีวิตของเซลล์ โดยวิธี MTT colorimetric assay ซึ่งใช้ในงานด้านศึกษาความเป็นพิษของสารต่างๆต่อเซลล์มะเร็งเป้าหมาย วิธีการนี้สามารถใช้ทดแทนการทดลองที่ต้องใช้สัตว์ทดลอง ซึ่งมีความยุ่งยากในการดูแลสัตว์ และต้องปฏิบัติตามจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลองเพื่องานวิจัยทางวิทยาศาสตร์ การทดสอบสารกับเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการเป็นวิธีการที่ให้ผลรวดเร็ว ลดการใช้สัตว์ทดลอง และสามารถทดสอบกับเซลล์ของ คนหรือสัตว์ได้โดยตรง ดังนั้นเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์ จึงมีประโยชน์มากในการทดลองทางวิทยาศาสตร์ที่ต้องใช้คนหรือสัตว์เป็นสื่อทดลอง

Review article

Animal cell culture: History, basic and application in blood bank service

Sompong Boonhai*

Udom Tingtoy

Abstract

There are several benefits of cell culture either in researches or in clinical practices. For instance, cell culture is a mandatory process for some diagnostic tests, monoclonal antibody production and the procedures of *in vitro* fertilization. Indeed, several devices and techniques have been currently developed leading to less difficult processes including cell culture hoods with several antibiotics. However, the cell culture processes still rely on experienced and highly skilled researchers with relatively high cost. As such, several cell properties depend on the detail of cell condition and laboratory preparation. Hence, the fundamental knowledge of cell culture procedures is importance for the accuracy and the interpretation of cell culture experiments. The National Blood Center, Thai Red Cross Society, applies the basic knowledge of the animal cell culture to develop in the production of various blood type reagents leading to successful, begetting many benefits. In the future, cell culture will still be used to develop the production of rare blood types reagents.

Keywords: Animal cell culture, cell culture, animal cell.

*Correspondence to: Sompong Boonhai, Antiserum and Standard Cell Preparation Department
National Blood Centre, Thai Red Cross Society, Bangkok 10330, Thailand.

Received: January 16, 2019

Revised: January 31, 2019

Accepted: February 6, 2019

บทฟื้นฟูวิชาการ

การเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์: ประวัติความเป็นมา พื้นฐาน และการประยุกต์ใช้ในงานบริการโลหิต

สมพงศ์ บุญให้
อุดม ตั้งตอย

บทคัดย่อ

การเพาะเลี้ยงเซลล์ก่อให้เกิดประโยชน์อย่างมากมาย ทั้งในด้านงานวิจัย การวินิจฉัยโรค การรักษา พันธุวิศวกรรม การผลิตแอนติบอดี และการปฏิสนธิในหลอดทดลองแก่ผู้มีบุตรยาก เป็นต้น ซึ่งในปัจจุบันนั้นได้มีการพัฒนาอุปกรณ์ต่าง ๆ รวมทั้งอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มียาปฏิชีวนะ ซึ่งช่วยให้การเพาะเลี้ยงเซลล์สามารถทำได้ง่ายขึ้น อย่างไรก็ตามยังคงต้องอาศัยผู้ปฏิบัติงานที่มีประสบการณ์และความชำนาญสูงในการเพาะเลี้ยงเซลล์ อีกทั้งยังมีค่าใช้จ่ายสูง เนื่องจากคุณสมบัติของเซลล์สามารถเปลี่ยนแปลงได้ในช่วงเริ่มต้นของการเพาะเลี้ยงเซลล์ และสภาวะของเซลล์ยังขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมของการเลี้ยงที่แตกต่างกันได้ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ และออกแบบงานวิจัยให้เหมาะสม เพื่อได้ผลการทดลองที่น่าเชื่อถือ และทำให้มีโอกาสประสบความสำเร็จในงานวิจัยที่มีคุณค่าต่อไป ตัวอย่างเช่น ทางด้านธนาคารเลือด ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ได้นำความรู้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์มาพัฒนาและประยุกต์ใช้ในการผลิตน้ำยาตรวจหมู่โลหิตชนิดต่าง ๆ จนประสบความสำเร็จ ก่อให้เกิดประโยชน์อย่างมากมาย และในอนาคตยังคงใช้การเพาะเลี้ยงเซลล์ในการพัฒนาการผลิตน้ำยาตรวจหมู่โลหิตชนิดหายากต่อไป

คำสำคัญ: การเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์, การเพาะเลี้ยงเซลล์, เซลล์สัตว์.

Ross Harrison ประสบความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเซลล์ของสัตว์เป็นครั้งแรก ในปี พ.ศ. 2450 แต่ก็ไม่ได้เกิดการพัฒนาย่างต่อเนื่อง จนกระทั่งปลายปี พ.ศ. 2483 ถึงต้นปี พ.ศ. 2493 จึงได้มีการพัฒนาหลายด้านที่ทำให้การเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเครื่องมือสำคัญสำหรับนักวิทยาศาสตร์ ซึ่งสามารถสรุปเหตุการณ์สำคัญต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นตามประวัติความเป็นมาของการเพาะเลี้ยงเซลล์ (ตารางที่ 1) ⁽¹⁾ การเพาะเลี้ยงเซลล์นั้นเกิดขึ้นจากความต้องการศึกษาพฤติกรรมและกระบวนการต่าง ๆ ของเซลล์ภายในหลอดทดลอง (in vitro) ที่ไม่มีสิ่งรบกวนของปัจจัยต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นเมื่อเซลล์ทำงานอยู่ในสิ่งมีชีวิต (in vivo) ซึ่งการทดลองในหลอดทดลองนั้นมีข้อดีหลายประการ เช่น ก) สามารถควบคุมสภาวะแวดล้อมให้เหมาะสมกับการออกแบบการทดลองตามที่ต้องการได้ (direct control: medium, condition treatment) ข) ใช้สารเคมีในปริมาณน้อย ค) เซลล์ที่ใช้มีคุณสมบัติเหมือนกัน (homogeneity of cell type) ทำให้ผลการทดลองมีความสม่ำเสมอ และทำให้เกิดผลการทดลองใกล้เคียงกับผลการทดลองเดิมได้ง่ายจากการใช้ชุดของเซลล์ clonal ⁽²⁾ ง) อีกทั้งยังช่วยลดปริมาณการใช้สัตว์ทดลอง ตามพระราชบัญญัติสัตว์

เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ (พรบ.) คุ้มครองสัตว์ทดลอง ⁽³⁾ อย่างไรก็ตาม การทดลองในหลอดทดลองนั้นก็ยังมีข้อจำกัดบางประการ เช่น ผู้ปฏิบัติงานต้องมีความชำนาญอย่างมาก ค่าใช้จ่ายสูง คุณสมบัติของเซลล์สามารถเปลี่ยนแปลงได้ในช่วงเริ่มต้น เซลล์ยังสามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมของการเลี้ยงที่แตกต่างกันได้โดยการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ต่าง ๆ และสภาพแวดล้อมในร่างกายไม่เหมือนในสภาวะจำลองในหลอดทดลอง เป็นต้น

สิ่งจำเป็นสำหรับงานเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์

1. พื้นที่ทำงานปลอดเชื้อ (sterile work area) หากเป็นไปได้ควรจัดให้มีห้องแยกต่างหากสำหรับงานเพาะเลี้ยงเซลล์ที่สะอาด ห้องนี้ควรปลอดจากสภาวะที่แออัด และควรมีการติดตั้ง class II biohazard cabinets ซึ่งตู้เหล่านี้ถูกออกแบบมาเพื่อให้มีการปกป้องผู้ปฏิบัติงาน รวมถึงสภาพแวดล้อมที่ปลอดเชื้อ โดยอากาศพุ่งลงจากด้านบนของตู้ผ่านแผ่นกรองอากาศ (high efficiency particle air filter, HEPA) ไปยังฐาน การทำงานส่วนใหญ่ของการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้องดำเนินการภายในตู้ class II biohazard cabinets เสมอ

ตารางที่ 1. เหตุการณ์สำคัญที่เกิดขึ้นในการเพาะเลี้ยงเซลล์ ⁽¹⁾

2450	Ross Harrison ปลูกฝังเซลล์ประสาทของกบในก้อนน้ำเหลือง ด้วยวิธี 'hanging drop' และสังเกตการเติบโตของเส้นใยประสาทในหลอดทดลองเป็นเวลาหลายสัปดาห์ เขาได้รับขนานนามว่าเป็นบิดาแห่งการเพาะเลี้ยงเซลล์
2483	การใช้ยาปฏิชีวนะเพนิซิลลินและสเตอโรยด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อช่วยลดปัญหาการปนเปื้อนในเซลล์เพาะเลี้ยง
2495	Gey ได้ทำการเพาะเลี้ยง continuous cell line จากมะเร็งปากมดลูกของมนุษย์ที่รู้จักกันในชื่อเซลล์ HeLa (Helen Lane)
2507	Littlefield แนะนำการใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ (HAT medium) สำหรับการคัดเลือกเซลล์ลูกผสม
2508	Ham แนะนำอาหารปราศจากซีรัมตัวแรกซึ่งสามารถรองรับการเติบโตของเซลล์บางชนิด
2518	Kohler และ Milstein ผลิตเซลล์ลูกผสม ที่สามารถสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้
2525	อินซูลินที่ใช้ในมนุษย์กลายเป็นโปรตีนลูกผสมตัวแรกที่ได้รับอนุญาตให้ใช้ในการรักษา
2528	Growth hormones ที่ใช้ในมนุษย์ที่ผลิตจากแบคทีเรียลูกผสมได้รับการยอมรับสำหรับใช้ในทางการแพทย์
2533	ผลิตภัณฑ์โปรตีนลูกผสมถูกนำมาใช้ทางคลินิก (HBsAg, factor VIII, HIVgp120, CD4, GM-CSF, EGF, moAbs, IL-2)

2. **ตู้บ่มเซลล์เพาะเลี้ยง** (incubation facilities) ทำงานที่ 37°C และ $5\% \text{CO}_2$ เพื่อให้อาหารเลี้ยงเซลล์มีค่า pH ที่ถูกต้องโดยตู้เหล่านี้มีมาตรวัดอุณหภูมิ และตรวจสอบระดับก๊าซในตู้ มีสัญญาณเตือน เพื่อระบุว่ามีความผิดปกติ เบี่ยงเบนออกจากพารามิเตอร์ที่ตั้งไว้ ผู้ทำการวิจัยควรทำการเปิด-ปิดประตูให้เร็วที่สุดเท่าที่ทำได้

3. **ตู้เย็นและตู้แช่แข็ง** (refrigerators and freezers) ทั้งสองรายการนี้มีความสำคัญมาก สำหรับการเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ 4°C และสำหรับเอนไซม์ เช่น trypsin และ ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเซลล์บางอย่าง เช่น กลูตามีน และซีรัม นอกจากนี้ยังต้องใช้ตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิต่ำกว่า -20°C ในการเก็บส่วนที่เหลือจากการแบ่งของซีรัม สารอาหารและยาปฏิชีวนะ น้ำยาบางชนิดอาจถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C แต่หากต้องการเก็บรักษาเซลล์ไว้ อาจจำเป็นต้องจัดเก็บในไนโตรเจนเหลวหรือช่องแช่แข็งที่อุณหภูมิต่ำกว่า -70°C

4. **กล้องจุลทรรศน์** (microscopes) ชนิด inverted microscope เป็นสิ่งจำเป็นในงานเพาะเลี้ยงเซลล์ เพื่อใช้ในการตรวจสอบดูสภาพเซลล์ที่เพาะเลี้ยงใน flasks หรือ dishes เป็นสิ่งสำคัญที่สามารถรับรู้การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ (morphology) ในระหว่างการเพาะเลี้ยงเซลล์ เนื่องจากสิ่งเหล่านี้เป็นข้อบ่งชี้แรก ๆ ของการเสื่อมสภาพของการเพาะเลี้ยงเซลล์ กล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดาที่มีกำลังขยาย $100\times$ เพียงพอสำหรับการนับจำนวนเซลล์ ปกติใน haemocytometer อย่างไรก็ตามอาจต้องใช้กล้องจุลทรรศน์ที่มีคุณภาพดีกว่านี้สำหรับการศึกษา chromosome analysis หรือ autoradiography

5. **ภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์** (tissue culture ware) มีการผลิตพลาสติกเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่หลากหลาย ซึ่งเป็นโพลีไทรอินที่ได้รับการผลิตเป็นพิเศษ การใช้พลาสติกเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เหมาะสมมีผลต่อการเติบโตของเซลล์ และเป็นสิ่งสำคัญมากที่ต้องทดสอบการเติบโตของเซลล์เมื่อมีการเปลี่ยนภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์จากแหล่งผลิตอื่น ๆ จากที่เคยใช้อยู่ เพื่อให้แน่ใจว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงมีการเติบโตได้ดีก่อนการใช้อย่างจริงจัง

6. **อุปกรณ์เครื่องมือล้างและฆ่าเชื้อ** (washing up and sterilizing facilities) ความพร้อมใช้งานของ plastic tissue culture ที่ใช้ครั้งเดียวไม่มีความจำเป็นต้องทำการล้างแต่เครื่องแก้ว เช่น ปิเปต ควรนำไปแช่ในผงซักฟอกที่เหมาะสมจากนั้นผ่านขั้นตอนการล้างอย่างเข้มข้นแล้วนำไปแช่ในน้ำกลั่นก่อนการอบแห้งและการฆ่าเชื้อ ปิเปตควรเสียบด้วยสำลีที่ไม่ดูดซับก่อนใส่ลงในภาชนะสำหรับการฆ่าเชื้อเครื่องแก้ว เช่น ปิเปตแก้ว ขวดแก้ว บีกเกอร์ ควรห่อปกคลุมด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ก่อน แล้วจึงนำไปฆ่าเชื้อในเตาอบลมร้อน (hot air oven) ที่อุณหภูมิ 160°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง อุปกรณ์อื่น ๆ เช่น automatic pipette tips และขวด ให้ทำการปิดฝาแบบหลวม ๆ แล้วนำไปนึ่งที่ 121°C เป็นเวลา 20 นาที (autoclave) ตัวบ่งชี้การฆ่าเชื้อเช่นแถบทดสอบการฆ่าเชื้อเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับแต่ละชุดการฆ่าเชื้อ เพื่อให้แน่ใจว่าเครื่องสามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ

7. **ไนโตรเจนแช่แข็ง** (liquid nitrogen deep freezer) การเก็บรักษาเซลล์ด้วยการแช่แข็ง (cryopreservation and storage of cell lines)⁽⁴⁾ เพื่อลดความเสี่ยงของการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ ลดความเสี่ยงของการปนเปื้อนข้ามกับเซลล์อื่น ๆ ลดความเสี่ยงของการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม การเปลี่ยนแปลงทางรูปร่างของเซลล์ ทั้งยังเป็น การดำเนินการทดลองที่สอดคล้องกับการใช้เซลล์ตาม passage number หลักการพื้นฐานของการเก็บรักษาด้วยการแช่แข็งที่ประสบความสำเร็จ คือ การแช่แข็งอย่างช้า ๆ และละลายอย่างรวดเร็ว "a slow freeze and quick thaw" โดยการแช่แข็งเซลล์ค่อย ๆ ลดความเย็นที่อัตรา 1°C ถึง 3°C ต่อนาที, -20°C ข้ามคืน, -80°C 1 - 2 วัน หลังจากนั้นจึงค่อยย้ายไปแช่ในไนโตรเจนเหลว ซึ่งสามารถเก็บเซลล์ไว้ได้นานหลายสิบปี ส่วนในการละลายเซลล์ต้องทำอย่างรวดเร็ว โดยการแช่ในอ่างน้ำอุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3 - 5 นาที และเจือจางทันที หลังจากละลาย คุณสมบัติของ cell lines ที่ทำการ cryopreservation โดยเซลล์ต้องมีความสมบูรณ์ จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตมากกว่าร้อยละ 90 ไม่มีสัญญาณการปนเปื้อน

จุลินทรีย์ ต้องอยู่ในช่วง log phase of growth⁽⁵⁾ (รูปที่ 1) โดยก่อนที่เซลล์มาบรรจบกันและเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ 24 ชั่วโมงก่อนทำการแช่แข็ง โดยใช้ความเข้มข้นของซีรัมสูงกว่าร้อยละ 20 (ปกติใช้กันอยู่ที่ร้อยละ 90) ผสมกับ dimethyl sulphoxide (DMSO) ความเข้มข้นร้อยละ 10 ซึ่งช่วยปกป้องเซลล์จากการแตกเนื่องจากการก่อตัวของผลึกน้ำแข็ง โดยจำนวนเซลล์ที่เหมาะสมในการเก็บแช่แข็งอยู่ที่ประมาณ 10^6 ถึง 10^7 cells/ml.

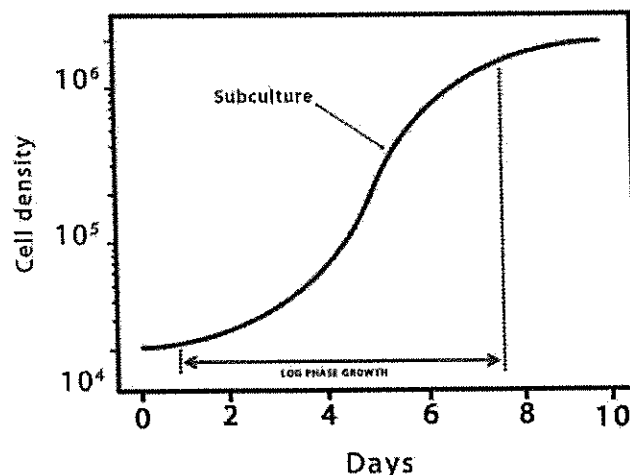
8. การเจ็ดน้ำกลั่น (double distilled or reverse osmosis) เป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ และการล้างเครื่องแก้วต่าง ๆ จึงจำเป็นต้องมีการตรวจสอบค่าความเป็นกรดต่างของน้ำกลั่นอย่างสม่ำเสมอเนื่องจากความผันแปรในคุณภาพของน้ำที่ใช้ อาจเป็นสาเหตุของการเปลี่ยนแปลงในผลลัพธ์บางอย่างในการเพาะเลี้ยงเซลล์ได้

9. การทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรอง (filter sterilization) อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่สามารถนิ่งฆ่าเชื้อได้ ต้องผ่านการกรองด้วยแผ่นกรองขนาดรูพรุน 0.22 ไมโครเมตร โดยหัวกรองขนาดต่าง ๆ สามารถหาได้ในการออกแบบที่หลากหลายของบริษัทต่าง ๆ เพื่อให้สามารถกรองในปริมาณที่แตกต่างกัน เช่น บริษัท Millipore, บริษัท Gelman

เป็นต้น ตัวอย่างของสารที่ไม่สามารถนิ่งฆ่าเชื้อได้ เช่น culture media, enzymes, hormones, cofactors และ bicarbonate buffers

10. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuges) เครื่องปั่นเหวี่ยงจำเป็นต้องมีตัวควบคุมความเย็น เซลล์ที่ปั่นเหวี่ยงจะต้องมีฝาที่ปิดผนึก ความแรง 100g นั้นมากพอที่ทำให้เซลล์ตกตะกอน ถ้าแรง g ที่สูงกว่านี้อาจเกิดการทำลายเซลล์ หากหลุดแตกในเครื่องปั่นแยกให้นำถ้วยปั่นทั้งหมดออกแล้วทำความสะอาดทันที

11. ระบบบัฟเฟอร์ (buffering systems) เซลล์ส่วนใหญ่ต้องการสภาวะความเป็นกรดเป็นด่างในช่วง pH 7.2 - 7.4 เซลล์ไฟโบรบลาสต์ (fibroblasts) ต้องการค่า pH ที่สูงขึ้น (7.4 - 7.7) ในขณะที่เซลล์ที่ถูกเปลี่ยนรูปแบบต่อนั้น ต้องการกรดมากกว่า (7.0 - 7.4) ระบบบัฟเฟอร์ที่ใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) สมดุลกับอาหารเลี้ยงเซลล์ ในรูปของกรดคาร์บอนิกและโปรตอน ($CO_2 + H_2O = H_2CO_3 = H^+ + HCO_3^-$) ปกติเราจะใช้ปริมาณ 5 - 10% CO_2 ในบรรยากาศภายในตู้ CO_2 incubator ซึ่งเป็นต้นทุนต่ำปลอดภัยและยังให้ประโยชน์ทางเคมีอื่น ๆ กับเซลล์ นอกจากนี้ยังมีการใช้ chemical buffering ได้แก่ HEPES โดยมีความสามารถในการรักษาสภาวะของ



รูปที่ 1. ระยะการเจริญเติบโตของเซลล์ logarithmic (Log) growth phase : เซลล์มีการเจริญเติบโตอย่างสมบูรณ์ และมีการเพิ่มขึ้นของความหนาแน่นของเซลล์แบบทวีคูณ จำนวนประชากรของเซลล์นั้นถือว่ามีความสำคัญมากที่สุดในระยะนี้ ดังนั้นจึงขอแนะนำให้ประเมินการทำงานของเซลล์และการเก็บรักษาเซลล์ในระยะนี้⁽⁵⁾

บัฟเฟอร์ที่เหนือกว่าในช่วงค่า pH 7.2 - 7.4 แต่ราคาค่อนข้างแพง ไม่ต้องการ CO₂ และอาจเป็นพิษต่อเซลล์ บางชนิดในการใช้ความเข้มข้นสูง ๆ ส่วนใหญ่ในอาหารเลี้ยงเซลล์สำเร็จรูป มีส่วนประกอบของ phenol red เพื่อใช้บ่งชี้สภาวะของความเป็นกรดเป็นด่าง โดยสีของอาหารเลี้ยงเซลล์ มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นสีเหลือง (acid) หรือสีม่วง (alkali)

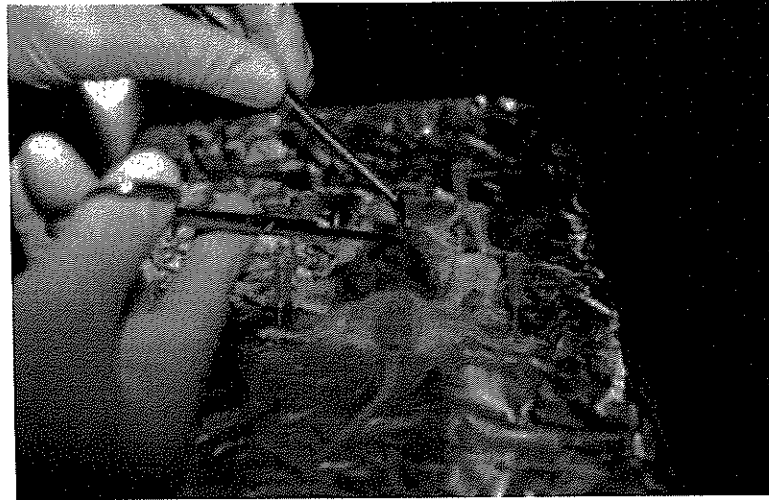
องค์ประกอบพื้นฐานของอาหารเลี้ยงเซลล์

1. เกลืออนินทรีย์ (inorganic salts) เพื่อรักษาสมดุลออสโมติกของเซลล์ ควบคุมเยื่อหุ้มเซลล์ด้วยการให้โซเดียม โพแทสเซียม และแคลเซียมไอออน นอกจากนี้ยังมีความจำเป็นในเซลล์เมทริกซ์ที่ใช้สำหรับ cell attachment และเป็นโคแฟกเตอร์เอนไซม์
2. ซีรัม (serum) หนึ่งในองค์ประกอบที่สำคัญที่สุดของอาหารเลี้ยงเซลล์ ประกอบไปด้วยโปรตีนอัลบูมิน (albumins) บั๊จจัยต่าง ๆ ที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์ ฮอร์โมน กรดอะมิโน กลูโคส สารยับยั้ง trypsin (trypsin inhibitors) และไขมัน ซีรัมที่ใช้อย่างน้อยที่สุด คือ fetal bovine serum (FBS) โดยคุณสมบัติของ fetal calf/bovine serum (FCS & FBS) ^(6, 7) ได้แก่ บั๊จจัยการเจริญเติบโตและฮอร์โมน ช่วยให้เซลล์ยึดเกาะได้ดี มีบั๊จจัยที่ช่วยจับและต่อต้านพิษ มีการใช้ FCS & FBS เพื่อเลี้ยงเซลล์มาเป็นเวลายาวนาน แต่ค่อนข้างมีราคาแพง โดยก่อนใช้จำเป็นต้องทำ heat inactivation (56°C นาน 30 นาที) หรือการฉายรังสีแกมมา เพื่อเป็นการทำลายคอมพลีเมนต์ อิมมูโนโกลบูลิน และไวรัสบางตัว ก่อนใช้เพื่อการเลี้ยงเซลล์
3. วิตามิน (vitamins) เป็นสารตั้งต้นสำหรับ co-factors จำพวกมาก ในกลุ่มของวิตามิน บี จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตและการเพิ่มจำนวนของเซลล์ โดยวิตามินที่พบในอาหารเลี้ยงเซลล์คือ riboflavin, thiamine และ biotin
4. ยาปฏิชีวนะและยาด้านเชื้อรา (antibiotics and antimycotics) ^(8, 9) ได้แก่ penicillin, streptomycin,

gentamicin, amphotericin B ช่วยลดความเสี่ยงของการปนเปื้อนจากแบคทีเรียและเชื้อรา แต่อาจทำให้เซลล์สามารถกลายเป็นเซลล์ที่ดื้อยาปฏิชีวนะ หรือการเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างของเซลล์ (phenotype) ได้ ควรหลีกเลี่ยงการใช้ยาต้านจุลชีพโดยเฉพาะอย่างยิ่งในการเพาะเลี้ยงเซลล์ในระยะยาว

ชนิดของเซลล์เพาะเลี้ยง (types of cell culture)

1. เซลล์เพาะเลี้ยงปฐมภูมิ (primary cell culture) ⁽¹¹⁾ เป็นเซลล์ที่ได้มาจากสัตว์โดยตรง ซึ่งมักมีเซลล์หลายชนิดปะปนกัน ส่วนใหญ่อายุไขสั้นในหลอดทดลอง มีการรักษาความแตกต่างของฟีโนไทป์ มีคุณสมบัติหยุดการเจริญเมื่อสัมผัสเซลล์ข้างเคียง (contact inhibition) และส่วนใหญ่เกาะติดกับพื้นผิวของภาชนะเพาะเลี้ยง (anchorage dependent) อาจถูกทำให้เป็นเซลล์ที่มีอายุยืนยาว (immortalized) ได้ ในบางสภาวะเซลล์ที่มีต้นกำเนิดจาก one primary culture ได้แก่ peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), photoelectrochemical cells (PEC) และ spleen cells (รูปที่ 2)
2. เซลล์เพาะเลี้ยงทุติยภูมิ (secondary cell culture) เป็นเซลล์ที่ได้มาจาก primary cell culture โดยได้ทำการคัดเลือกหรือโคลนนิ่งกลายเป็นประชากรเซลล์ที่เป็นชนิดเดียวกันมากขึ้น มีอายุการใช้งานที่แน่นอนในหลอดทดลอง มีการรักษาฟีโนไทป์ที่แตกต่างกัน มีคุณสมบัติ contact inhibition และส่วนใหญ่เป็น anchorage dependent
3. เซลล์ไลน์ (cell lines/established cell lines) ^(12, 13) เป็นเซลล์ที่ได้มาจาก primary or secondary cell culture ที่มีคุณสมบัติเป็นอมตะ (immortal) อันเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงบางอย่าง (transformations) โดยส่วนใหญ่ที่พบบ่อยจะเป็นเซลล์มะเร็งหรือเซลล์ที่มีการเปลี่ยนแปลงด้วยไวรัส เช่น Epstein-Barr virus หนึ่งในเซลล์ที่ใช้อย่างน้อยที่สุด คือ เซลล์รังไข่จีนหนูแฮมสเตอร์ (CHO) เซลล์ SH-SY-5Y เป็นเซลล์ที่ได้มาจากเซลล์ประสาทของมนุษย์



รูปที่ 2. การเพาะเลี้ยงเซลล์ปฐมภูมิ (primary cell culture) จากเซลล์ม้ามของหนู ซึ่งเป็นเซลล์ที่ได้มาจากการเก็บโดยตรงจากสัตว์ทดลอง⁽¹¹⁾

4. เซลล์ไลน์ต่อเนื่อง (continuous cell lines)^(14, 15) เป็นเซลล์ไลน์ที่มีอายุการเพาะเลี้ยงยาว สามารถ subculture ไปได้ไม่มีที่สิ้นสุดเจริญเติบโตง่ายแม้อยู่ในภาวะที่มีอาหารจำกัดโดยอาศัยการ transformed cells (tumor cells) ด้วยวิธีต่าง ๆ เช่น viral oncogenes และ chemical treatments เป็นต้น บางกรณีเกิดขึ้นเอง (spontaneous) เซลล์ที่ได้เป็นเซลล์ชนิดเดียวกัน มีช่วงชีวิตไม่สิ้นสุดในหลอดทดลอง ไม่เสถียรทางพันธุกรรม เซลล์เหล่านี้แสดงคุณสมบัติของ ploidy (aneuploidy หรือ heteroploidy) ไม่มี contact inhibition และ anchorage dependence มีอัตราการเติบโตรวดเร็วและสามารถเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่าได้ในเวลา 12-24 ชั่วโมง แหล่งที่มาของ continuous cell lines มี 2 แหล่ง คือ

4.1 กำเนิดมาจากเซลล์ปกติเกิดการกลายพันธุ์ระหว่างการเพาะเลี้ยงในระยะยาวหรือทำให้เป็นอมตะโดยไวรัส

4.2 จากเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่เป็นมะเร็ง เช่น HeLa, HT-29, HaCat เป็นต้น

5. เซลล์ไลน์อายุจำกัด (finite cell line) เป็นเซลล์ไลน์ที่มีอายุจำกัด สามารถ subculture ได้ประมาณ 30 - 80 ครั้งก็ตาย โดยเซลล์เหล่านี้มีคุณสมบัติของ contact inhibition, density limitation และ anchorage depen-

dence มีอัตราการเติบโตช้าและใช้เวลาในการเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่าประมาณ 24 - 96 ชั่วโมง

ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเซลล์

1. ระบบจำลอง (model systems)⁽¹⁶⁾ เพื่อการศึกษาพื้นฐานของเซลล์ชีววิทยา ปฏิกริยาระหว่างสารก่อโรคและเซลล์ ผลกระทบของยาหรือยาที่ผลิตได้ใหม่ต่อเซลล์ (toxicity testing) การประมวลผลและการกระตุ้นอายุของเซลล์ การศึกษาทางโภชนาการ ฯลฯ
2. การวิจัยโรคมะเร็ง (cancer research)⁽¹⁷⁻¹⁸⁾ สำหรับการศึกษากลไกของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติต่อเซลล์มะเร็ง หน้าที่ของสารเคมีต่าง ๆ ต่อเซลล์มะเร็ง ไวรัส หรือรังสี เพื่อเปลี่ยนแปลงเซลล์ที่เลี้ยงปกติไปเป็นเซลล์มะเร็ง ฯลฯ
3. ไวรัสวิทยา (virology) สำหรับศึกษาการเพาะเชื้อไวรัส เพื่อผลิตวัคซีนและใช้เพื่อศึกษาวงจรการติดเชื้อ
4. พันธุวิศวกรรม (genetic engineering)⁽¹⁹⁾ การผลิตโปรตีนหรือแอนติบอดีเชิงพาณิชย์ หรือการผลิตไวรัสจำนวนมากเพื่อใช้ในการผลิตวัคซีนตัวอย่างเช่น polio, rabies, chicken pox, hepatitis B และ measles
5. การบำบัดด้วยยีน (gene therapy)⁽²⁰⁾ หลักการของการรักษาด้วยยีน อาศัยการนำยีนเข้าสู่เซลล์เพื่อให้ทำหน้าที่ภายในร่างกาย โดยยีนดังกล่าวอาจเป็นยีนปกติ

ที่สามารถทำหน้าที่ทดแทนยีนที่ผิดปกติหรือยีนที่ทำให้เกิดโรค หรืออาจเป็นยีนอื่นที่มีการทำงานที่สามารถแก้ไขความผิดปกตินั้น ๆ และให้ผลทางการรักษาได้ การนำยีนดังกล่าวเข้าสู่เซลล์อาจทำได้หลายวิธี เช่น อาจฉีด DNA ที่มียีนที่ต้องการเข้าไปในเนื้อเยื่อที่ต้องการให้ยีนนั้นทำงานโดยตรง หรือ อาจตัดต่อยีนเข้าสู่จีโนมของไวรัสบางชนิดก่อน แล้วใช้ไวรัสที่ถูกดัดแปลงให้เป็นพาหะนั้น ทำหน้าที่นำยีนที่ต้องการเข้าสู่เซลล์ จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนก่อนนำไปรักษาผู้ป่วยต่อไป

6. การศึกษาวิจัยทางวิทยาศาสตร์ชีวภาพแขนงต่าง ๆ เช่น เซลล์ชีววิทยา และสรีรวิทยา

7. การทำปฏิสนธิในหลอดทดลอง คือ การปฏิสนธินอกร่างกาย หรือเด็กหลอดแก้ว (in vitro fertilization - IVF) ⁽²¹⁾ เป็นเทคนิคของการปฏิสนธิสังเคราะห์ โดยการนำเซลล์ไข่ ซึ่งถูกปฏิสนธิภายนอกของสตรี ซึ่งเป็นวิธีหลักในการแก้ไขปัญหาสตรีไม่สามารถมีบุตรได้ (infertility) โดยสรุปแล้ว กระบวนการนี้เกี่ยวข้องกับการควบคุมกระบวนการผลิตไข่ของสตรี ด้วยการนำไข่ออกมาจากร่างกายและปล่อยให้อสุจิปฏิสนธิกับไข่ภายในหลอดทดลอง หลังจากนั้นจึงถ่ายไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิแล้วหรือเอ็มบริโอไปยังมดลูกของสตรี เพื่อให้การตั้งครรภ์นั้นสมบูรณ์

การประยุกต์ใช้ทางด้านงานบริการโลหิต

การค้นพบหมู่โลหิตเริ่มต้นตั้งแต่ทศวรรษที่ 20 โดย Landsteiner ได้ค้นพบหมู่โลหิต A, B และ O ต่อมาอีก 2 ปีได้ค้นพบหมู่โลหิต AB หลังจากนั้นนักวิทยาศาสตร์ได้มีการศึกษาทางด้านหมู่โลหิตพบหมู่โลหิตจำนวนมาก ครั้งล่าสุดมีการรายงานในที่ประชุม ครั้งที่ 34 International Society of Blood Trans-fusion เมื่อปี พ.ศ. 2559 ที่ Dubai, United Arab Emirates ⁽²²⁾ สามารถจัดแบ่งหมู่โลหิตได้ 36 ระบบ ซึ่งพบว่าบนเม็ดเลือดแดงมีแอนติเจน 3-46 ชนิด และแอนติเจนที่อยู่บนเกล็ดเลือดมี 33 ชนิด ในจำนวนนี้หมู่โลหิต ABO เป็นระบบที่สำคัญที่สุดรองลงมา คือ หมู่โลหิตระบบ Rh นอกจากระบบ ABO และ Rh แล้วยังมีหมู่โลหิตอีกกลุ่มที่มีแอนติบอดีเกิดขึ้น

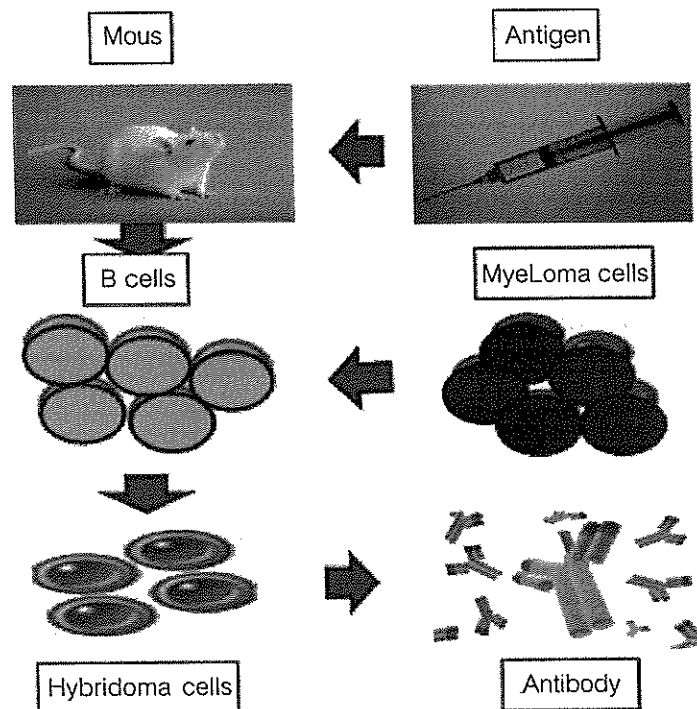
เองตามธรรมชาติ อาจทำให้เกิดปัญหาจากการที่เม็ดเลือดแดงมีอายุสั้นกว่าปกติ (short survival) หมู่โลหิตเหล่านี้ได้แก่ หมู่โลหิตระบบ Lewis, P1PK และ MNS ในปี พ.ศ. 2518 Kohler และ Milstein ได้ค้นพบวิธีการผลิตเซลล์สายพันธุ์ที่ผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะและสามารถเลี้ยงได้ในหลอดทดลองให้มีชีวิตยืนยาว โดยอาศัยหลักการ hybridization หรือผสมรวมกันของเซลล์ ซึ่งเป็นพื้นฐานของการผลิตเซลล์สายพันธุ์ของงานโมโนโคลนัลในปัจจุบัน ส่วนการผลิตแอนติบอดีต่อหมู่โลหิตด้วยวิธีโมโนโคลนัล เริ่มขึ้นในปี พ.ศ. 2523 โดย Voak D. และคณะ ผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดีต่อหมู่โลหิตเอรวมทั้งในปี พ.ศ. 2530 Sacks S. และคณะ สามารถผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดีต่อหมู่โลหิตบีได้สำเร็จ ต่อมาได้มีการผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดีต่อหมู่โลหิตในระบบ ABO, ระบบ Rh และในระบบอื่น ๆ อีกมากมาย ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทยจึงได้นำความรู้เรื่องการเพาะเลี้ยงเซลล์ และเทคโนโลยีเซลล์ลูกผสม (hybridoma technology) ⁽²³⁾ นี้มาใช้ในการผลิตน้ำยาตรวจหมู่โลหิตชนิดต่าง ๆ ในปี พ.ศ. 2530 โดยแพทย์หญิง สร้อยสองศักดิ์ พิกุลสด ^(24 - 25) เริ่มศึกษาค้นคว้าการผลิตน้ำยาตรวจหมู่โลหิตในระบบ ABO จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธีเทคโนโลยีเซลล์ลูกผสม จนประสบความสำเร็จได้ moAB anti-B ชนิดแรก ในปี พ.ศ. 2534 และเจ้าหน้าที่ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย รุ่นต่อมา ได้แก่ นางสาวทัศนีย์ สกุลดำรงคพานิช นางรัชณี แก้วมงคล นายอุดม ตึงต้อย ⁽²⁶⁾ นางสาวริกา เมฆฉาย นางสาวกาญจนา เขียมอัมพร นายสมพงศ์ บุญให้ ⁽²⁷⁾ นางสาวกัลยา เกิดแก้วงาม นางสาวศิริพร พลเสน เป็นต้น ได้วิจัยพัฒนา moAB anti-A, moAB anti-AB, moAB anti-D, moAB anti-A1, moAB anti-C3d, moAB anti-H, moAB anti-M, moAB anti-N, moAB anti-P1 จนประสบความสำเร็จตามลำดับ ทำให้เกิดประโยชน์ด้านงานธนาคารเลือดเป็นอย่างมาก ช่วยลดการนำเข้าน้ำยาตรวจหมู่โลหิตจากต่างประเทศปีละมากกว่าสิบล้านบาท และยังช่วยเพิ่มรายได้ให้กับสภากาชาดไทย ไม่ต่ำกว่าปีละสิบล้านบาทอีกด้วย ในอนาคต ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

ยังใช้หลักการเทคโนโลยีเซลล์ลูกผสม เพื่อค้นหาเซลล์สายพันธุ์ที่สร้างแอนติบอดีต่อหมู่โลหิตชนิดหายากที่ยังขาดแคลน และเป็นที่ต้องการของผู้ปฏิบัติงานทางด้านงานธนาคารเลือดต่อไป เช่น moAB anti-IgG, moAB anti-Le^a, moAB anti-Le^b เป็นต้น

เทคโนโลยีเซลล์ลูกผสม เป็นเทคนิคการสร้างเซลล์ผสมระหว่าง B-lymphocytes และ myeloma cells หรือเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว เพื่อผลิตให้ได้เป็น monoclonal antibody (moAB) ชนิดต่าง ๆ กัน การผลิต monoclonal antibody ที่เริ่มจากการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูด้วยแอนติเจน จากนั้นทำการสกัด B-lymphocytes ที่ทำหน้าที่สร้างแอนติบอดีออกมา B-lymphocytes นี้ไม่สามารถเลี้ยงต่อได้จึงต้องนำไปเชื่อมรวมกับ tumor cells ของ B-lymphocytes ที่มีความสามารถในการเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเซลล์ได้ไม่จำกัด (immortal) เพื่อสร้างเป็น hybridomas ที่มีความสามารถในการหลั่ง monoclonal antibody ที่ต้องการ (รูปที่ 3)

สรุป

นับตั้งแต่มีการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์ที่ประสบความสำเร็จของ Ross Harrison เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเซลล์ได้พัฒนาขึ้นอย่างก้าวกระโดด เนื่องด้วยการพัฒนาส่วนประกอบต่าง ๆ เช่น อาหารเลี้ยงเซลล์ และอุปกรณ์การเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีจำหน่ายในเชิงพาณิชย์ ทำให้เป็นเรื่องง่ายสำหรับนักวิจัยที่ทำงานวิจัยเกี่ยวกับเซลล์เพาะเลี้ยง อย่างไรก็ตามยังคงต้องอาศัยผู้ปฏิบัติงานที่มีประสบการณ์และความชำนาญสูงในการเพาะเลี้ยงเซลล์ การศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ และออกแบบงานวิจัยให้เหมาะสม จึงช่วยให้มีโอกาสประสบความสำเร็จในงานวิจัยมากยิ่งขึ้น เช่นเดียวกับศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ที่ได้นำความรู้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์นี้มาพัฒนาและประยุกต์ใช้ในงานบริการโลหิต จนประสบความสำเร็จและก่อให้เกิดประโยชน์อย่างมาก



รูปที่ 3. เทคโนโลยีเซลล์ลูกผสม (hybridoma technology) เพื่อผลิตโปรตีนเชิงพาณิชย์หรือการผลิตแอนติบอดี⁽²⁷⁾

เอกสารอ้างอิง

1. Carlos OR, Saúl ET, Carlos OS, Flor YR, Abraham LM, Francisco JA, et al. Cell culture: history, development and prospects. *Int J Curr Res Acad Rev* 2014;2:188-200.
2. Brunner D, Frank J, Appl H, Schoffl H, Pfaller W, Gstraunthaler G. Serum-free cell culture: the serum-free media interactive online database. *ALTEX* 2010;27:53-62.
3. พระราชบัญญัติสัตว์เพื่อนงานทางวิทยาศาสตร์. ราชกิจจานุเบกษา 13 มีนาคม 2558. เล่ม 132 ตอนที่ 18 ก. หน้า 1-16.
4. Grout B, Morris J, McLellan M. Cryopreservation and the maintenance of cell lines. *Trends Biotechnol* 1990;8:293-7.
5. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 1977;36:59-74.
6. Parshad R, Sanford KK. Effect of horse serum, fetal calf serum, calf serum, bovine serum, and fetulin on neoplastic conversion and chromosomes of mouse embryo cells in vitro. *J Natl Cancer Inst* 1968;41:767-79.
7. Contu F, Elsener B, Böhni H. A study of the potentials achieved during mechanical abrasion and the repassivation rate of titanium and Ti6Al4V in inorganic buffer solutions and bovine serum. *Electrochimica Acta* 2004;50:33-41.
8. Perlman D. Use of antibiotics in cell culture media. *Methods Enzymol* 1979;58:110-6.
9. Ryu AH, Eckalbar WL, Kreimer A, Yosef N, Ahituv N. Use antibiotics in cell culture with caution: genome-wide identification of antibiotic-induced changes in gene expression and regulation. *Sci Rep* 2017;7:7533.
10. Eagle H. Buffer combinations for mammalian cell culture. *Science* 1971;174:500-3.
11. Park CH, Bergsagel DE, McCulloch EA. Mouse myeloma tumor stem cells: a primary cell culture assay. *J Natl Cancer Inst* 1971;46:411-22.
12. Cooper GM, Hausman RE. Cell walls, the extracellular matrix, and cell interactions. In: Cooper GM, Hausman RE, editors. *The cell: a molecular approach*. 4th ed. Washington D.C: ASM Press; 2006. p. 569-95.
13. Singh J, Goswami A. Applications of cell lines as bioreactors and in vitro models. *Int J Appl Biol Pharmaceut Tech* 2012;4:178-98.
14. Rothlein R, Czajkowski M, O'Neill MM, Marlin SD, Mainolfi E, Merluzzi VJ. Induction of intercellular adhesion molecule 1 on primary and continuous cell lines by pro-inflammatory cytokines. Regulation by pharmacologic agents and neutralizing antibodies. *J Immunol* 1988;141:1665-9.
15. Stampfer MR, Bartley JC. Induction of transformation and continuous cell lines from normal human mammary epithelial cells after exposure to benzo[a]pyrene. *Proc Natl Acad Sci US A* 1985;82:2394-8.
16. Eppig JT, Blake JA, Bult CJ, Kadin JA, Richardson JE. The mouse genome database (MGD): new features facilitating a model system. *Nucleic Acids Res* 2007;35:D630-7.
17. Krupke D, Naf D, Vincent M, Allio T, Mikaelian I, Sundberg J, et al. The Mouse Tumor Biology Database: integrated access to mouse cancer

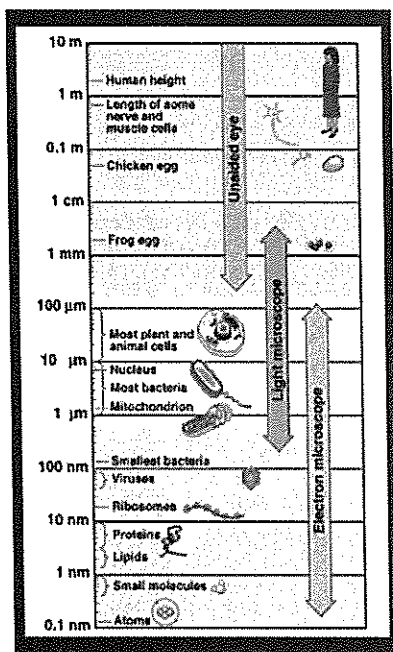
- biology data. *Exp Lung Res* 2005;31:259-70.
18. Thoma CR, Zimmermann M, Agarkova I, Kelm JM, Krek W. 3D cell culture systems modeling tumor growth determinants in cancer target discovery. *Adv Drug Deliv Rev* 2014;69-70: 29-41.
19. Khademhosseini A, Langer R, Borenstein J, Vacanti JP. Microscale technologies for tissue engineering and biology. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:2480-7.
20. Kiatpongsan S, Pruksananonda K, Tannirandorn Y. Cell therapy: hype or hope. *J Med Assoc Thai* 2006;89:550-7.
21. Pedersen HS, Liu Y, Foldager L, Callesen H, Larsen K, Sorensen MT. Calibration of sperm concentration for in vitro fertilization in a mouse reprotoxicity model. *Toxicol In Vitro* 2019;55: 58-61.
22. Storry JR, Castilho L, Chen Q, Daniels G, Denomme G, Flegel WA, et al. International society of blood transfusion working party on red cell immunogenetics and terminology: report of the Seoul and London meetings. *ISBT Science Series* 2016;11:118-22
23. Voak D, Sacks S, Alderson T, Takei F, Lennox E, Jarvis J, et al. Monoclonal anti-A from a hybrid-myeloma: evaluating as a blood grouping reagent. *Vox Sang* 1980;39:134-40.
24. สร้อยสองงค์ พิภูลสด, รัชณี พลเทียร, ประภาศรี แก้วกิติโรจน์, กัญญ์ชลา อุทิศ, อุดม ดิ่งต้อย, จินตนา ทับรอด. การผลิตน้ำยาตรวจหมู่โลหิต โมโนโคลนัลแอนติ-เอ โดยใช้เทคนิคไฮบริโดมา ของศูนย์บริการโลหิตฯ. *วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต* 2535;2:373-81.
25. สร้อยสองงค์ พิภูลสด, รัชณี พลเทียร, กัญญ์ชลา อุทิศ, ประภาศรี แก้วกิติโรจน์, อุดม ดิ่งต้อย, จินตนา ทับรอด. การผลิตน้ำยาตรวจหมู่โลหิตของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย โดยการใช้ไฮบริโดมาเทคนิค: II การศึกษาประสิทธิภาพของน้ำยาตรวจหมู่โลหิตแอนติ-บีชนิดโมโนโคลนัลแอนติบอดีเปรียบเทียบกับน้ำยาโมโนโคลนัลของต่างประเทศและน้ำยาชนิดโพลีโคลนัลของศูนย์ฯ. *วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต* 2535;2:295-302.
26. อุดม ดิ่งต้อย, สุวิทย์ โพธิ์นิมิตร, อัจฉรา ศิริพงษ์ชานุสิทธิ์, สารีกา เมฆฉาย, ทศนีย์ สกุลดำรงค์พานิช. การพัฒนาการผลิตน้ำยาตรวจหมู่โลหิต โมโนโคลนัล แอนติ-เอ ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย. *วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต* 2551;18:11-8.
27. Boonhai S, Aiemumpron K, Tingtoy U. Production of a new anti-M monoclonal reagent using human hybridoma technology. *Chula Med J* 2016;60:101-13.

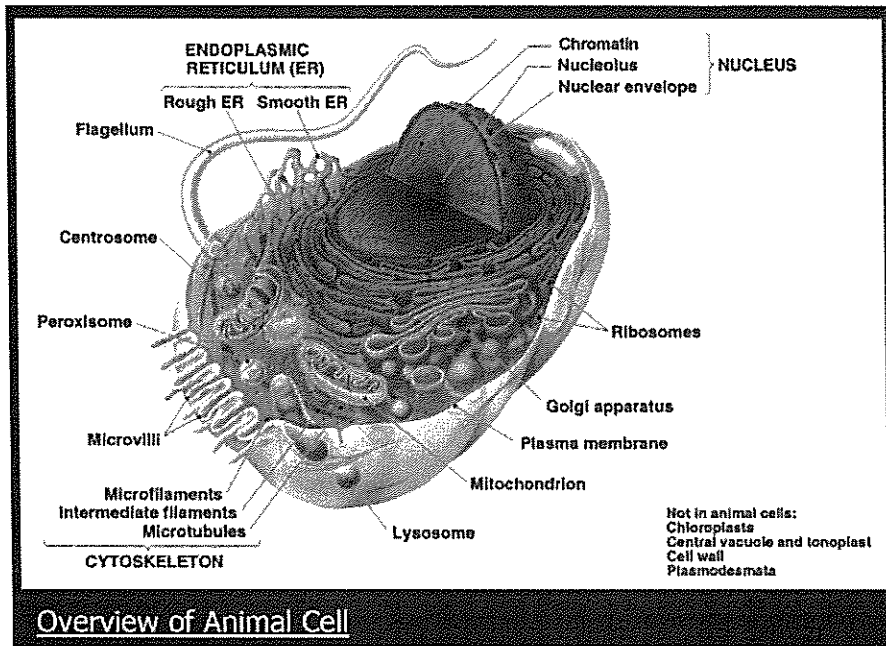
อบรมในหน่วย In unit GMP training

เซลล์

สมเกียรติ ศรีวิสุทธิ
หัวหน้าหน่วยเซลล์ 2
ฝ่ายผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย

2 มีนาคม 2566



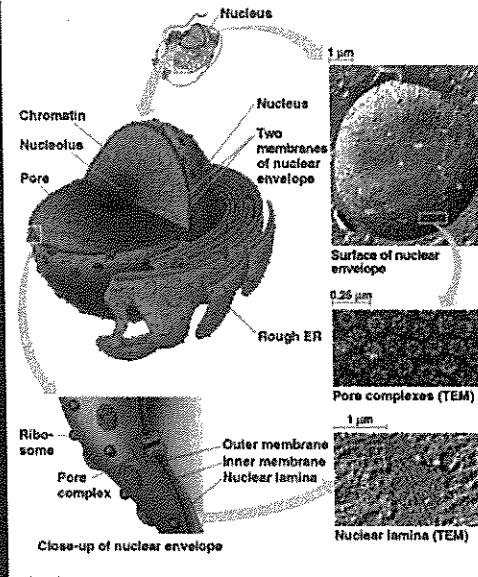


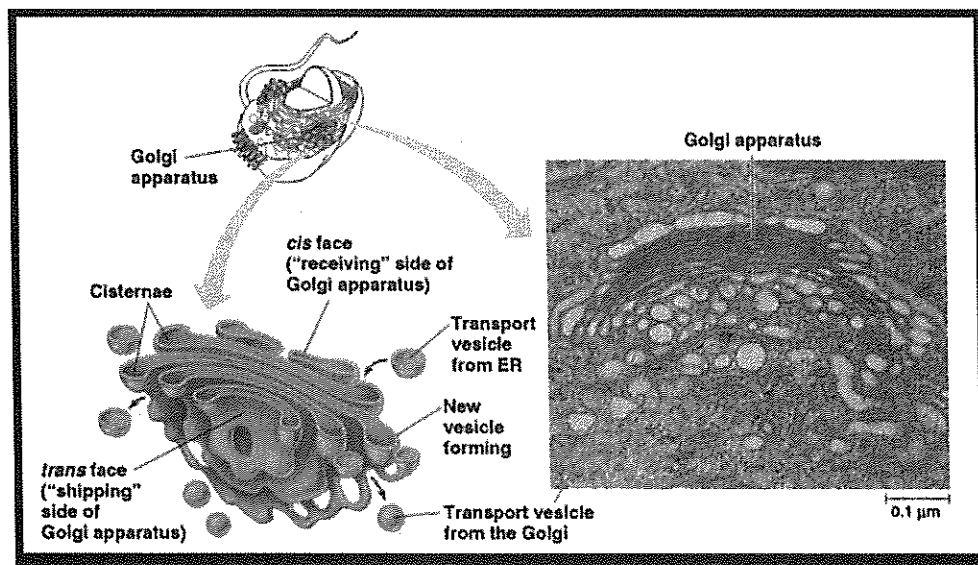
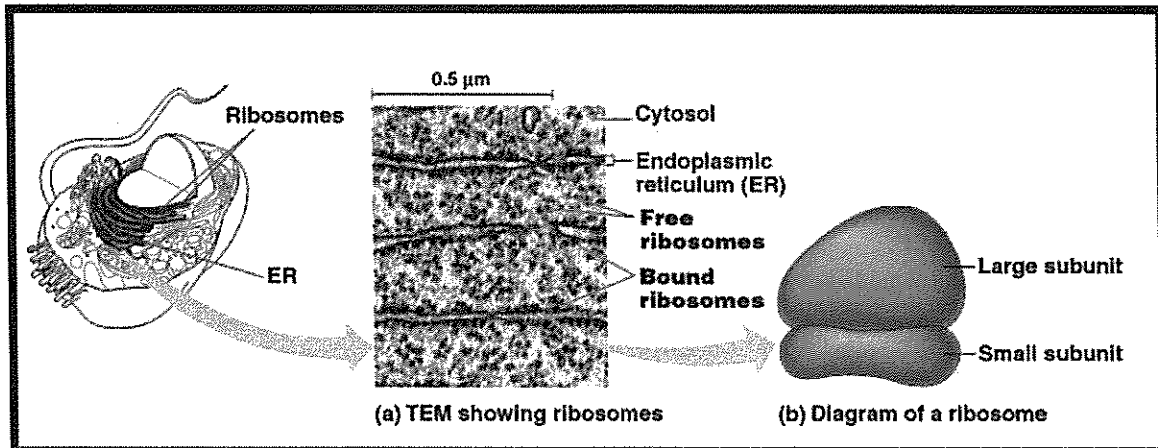
The Nucleus and Its Envelope

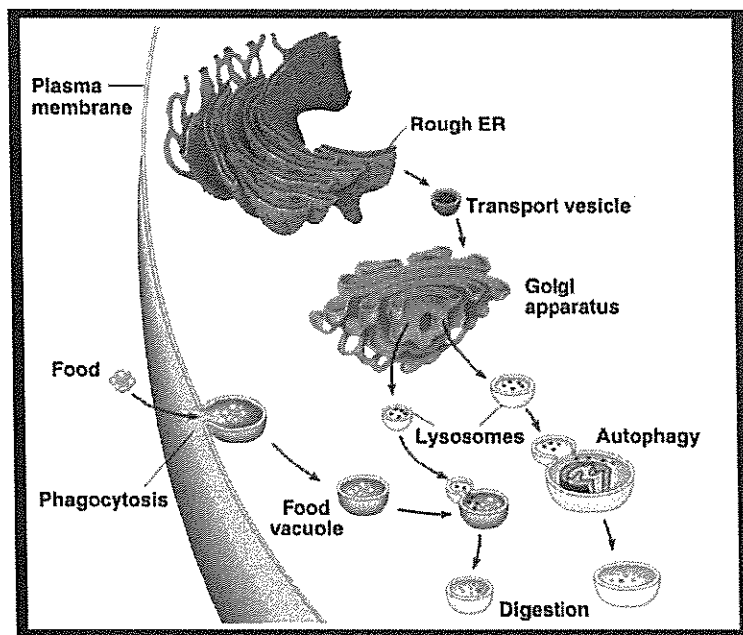
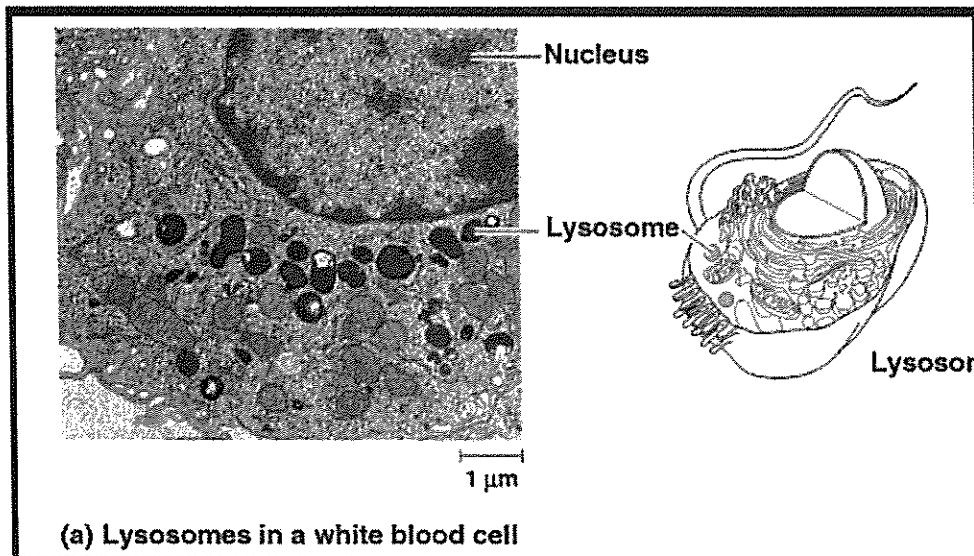
-The nucleus contains most of the genes in a eukaryotic cell.

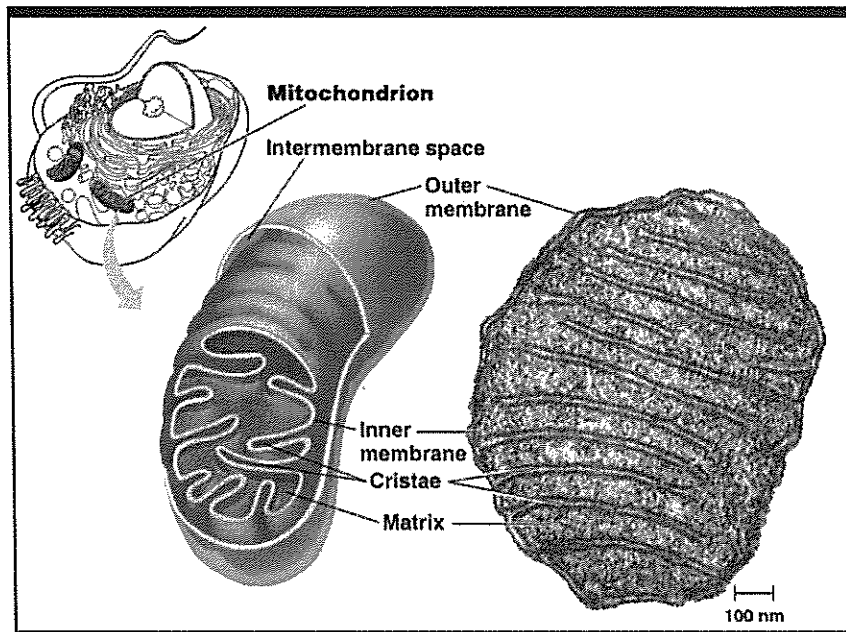
Some genes are located in mitochondria and chloroplast

-The nucleus averages about 5 microns in diameter.









- **Centrioles** - Centrioles are self-replicating organelles made up of nine bundles of microtubules and are found only in animal cells. They appear to help in organizing cell division, but aren't essential to the process.
- **Cilia and Flagella** - For single-celled eukaryotes, cilia and flagella are essential for the locomotion of individual organisms. In multicellular organisms, cilia function to move fluid or materials past an immobile cell as well as moving a cell or group of cells.
- **Endoplasmic Reticulum** - The endoplasmic reticulum is a network of sacs that manufactures, processes, and transports chemical compounds for use inside and outside of the cell. It is connected to the double-layered nuclear envelope, providing a pipeline between the nucleus and the cytoplasm.
- **Endosomes and Endocytosis** - Endosomes are membrane-bound vesicles, formed via a complex family of processes collectively known as endocytosis, and found in the cytoplasm of virtually every animal cell. The basic mechanism of endocytosis is the reverse of what occurs during exocytosis or cellular secretion. It involves the invagination (folding inward) of a cell's plasma membrane to surround macromolecules or other matter diffusing through the extracellular fluid.
- **Golgi Apparatus** - The Golgi apparatus is the distribution and shipping department for the cell's chemical products. It modifies proteins and fats built in the endoplasmic reticulum and prepares them for export to the outside of the cell.
- **Intermediate Filaments** - Intermediate filaments are a very broad class of fibrous proteins that play an important role as both structural and functional elements of the cytoskeleton. Ranging in size from 8 to 12 nanometers, intermediate filaments function as tension-bearing elements to help maintain cell shape and rigidity.
- **Lysosomes** - The main function of these microbodies is digestion. Lysosomes break down cellular waste products and debris from outside the cell into simple compounds, which are transferred to the cytoplasm as new cell-building materials.
- **Microfilaments** - Microfilaments are solid rods made of globular proteins called actin. These filaments are primarily structural in function and are an important component of the cytoskeleton.
- **Microtubules** - These straight, hollow cylinders are found throughout the cytoplasm of all eukaryotic cells (prokaryotes don't have them) and carry out a variety of functions, ranging from transport to structural support.
- **Mitochondria** - Mitochondria are oblong shaped organelles that are found in the cytoplasm of every eukaryotic cell. In the animal cell, they are the main power generators, converting oxygen and nutrients into energy.
- **Nucleus** - The nucleus is a highly specialized organelle that serves as the information processing and administrative center of the cell. This organelle has two major functions: it stores the cell's hereditary material, or DNA, and it coordinates the cell's activities, which include growth, intermediary metabolism, protein synthesis, and reproduction (cell division).
- **Peroxisomes** - Microbodies are a diverse group of organelles that are found in the cytoplasm, roughly spherical and bound by a single membrane. There are several types of microbodies but peroxisomes are the most common.
- **Plasma Membrane** - All living cells have a plasma membrane that encloses their contents. In prokaryotes, the membrane is the inner layer of protection surrounded by a rigid cell wall. Eukaryotic animal cells have only the membrane to contain and protect their contents. These membranes also regulate the passage of molecules in and out of the cells.
- **Ribosomes** - All living cells contain ribosomes, tiny organelles composed of approximately 60 percent RNA and 40 percent protein. In eukaryotes, ribosomes are made of four strands of RNA. In prokaryotes, they consist of three strands of RNA.

ชื่อ - นามสกุล

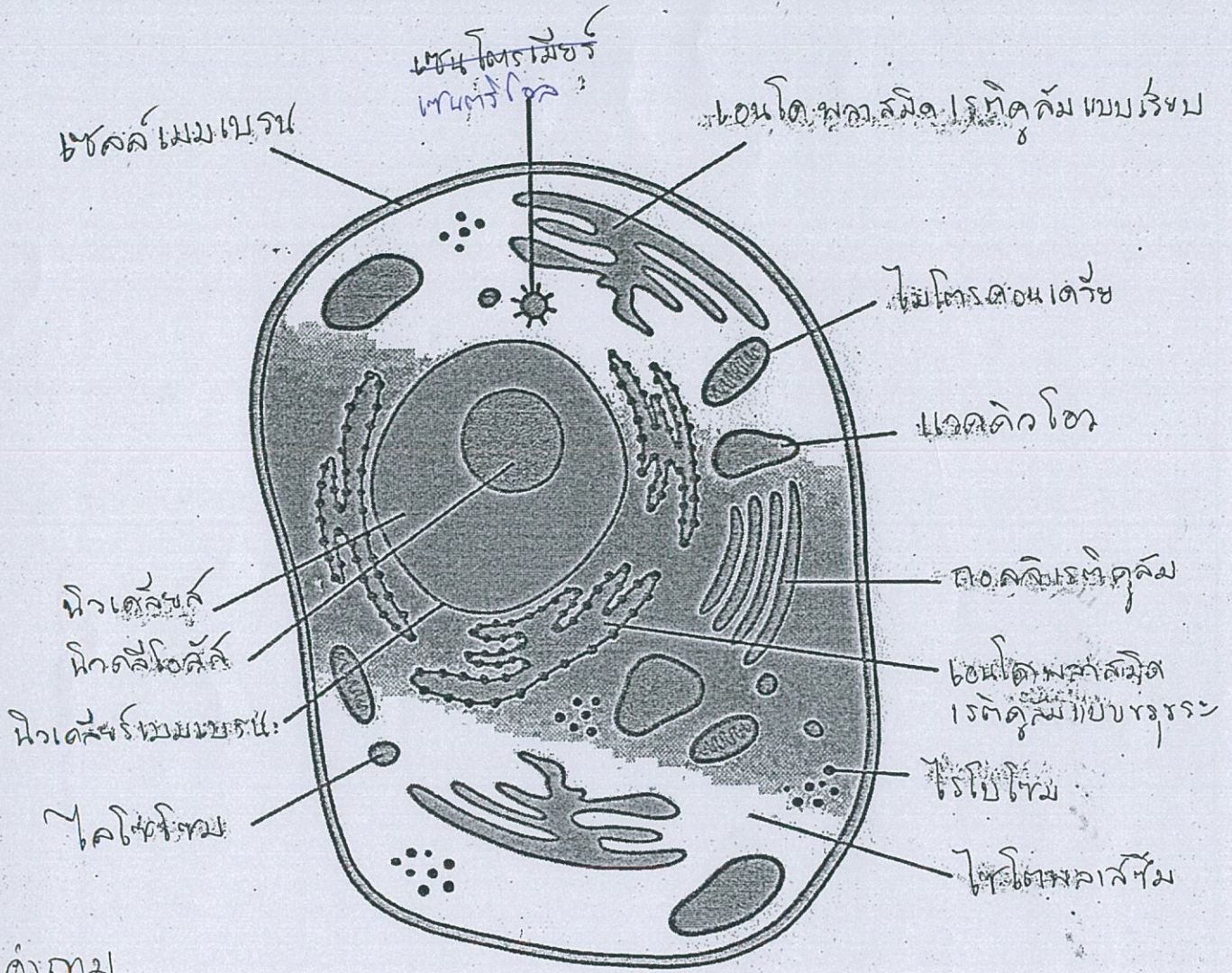
วิชา/สาขา กัลป์จุริ่งเหซ

ตำแหน่ง

พหุกิจงานผลิตใช้วัสดุ

หน่วย

ผลิตเซลล์ 2



คำถาม

1. ชื่อของออร์แกเนลล์ที่พบในเซลล์สัตว์และพืช

2. ออร์แกเนลล์

3. ชื่อ

1.

2.

3.

4.

5.

6.

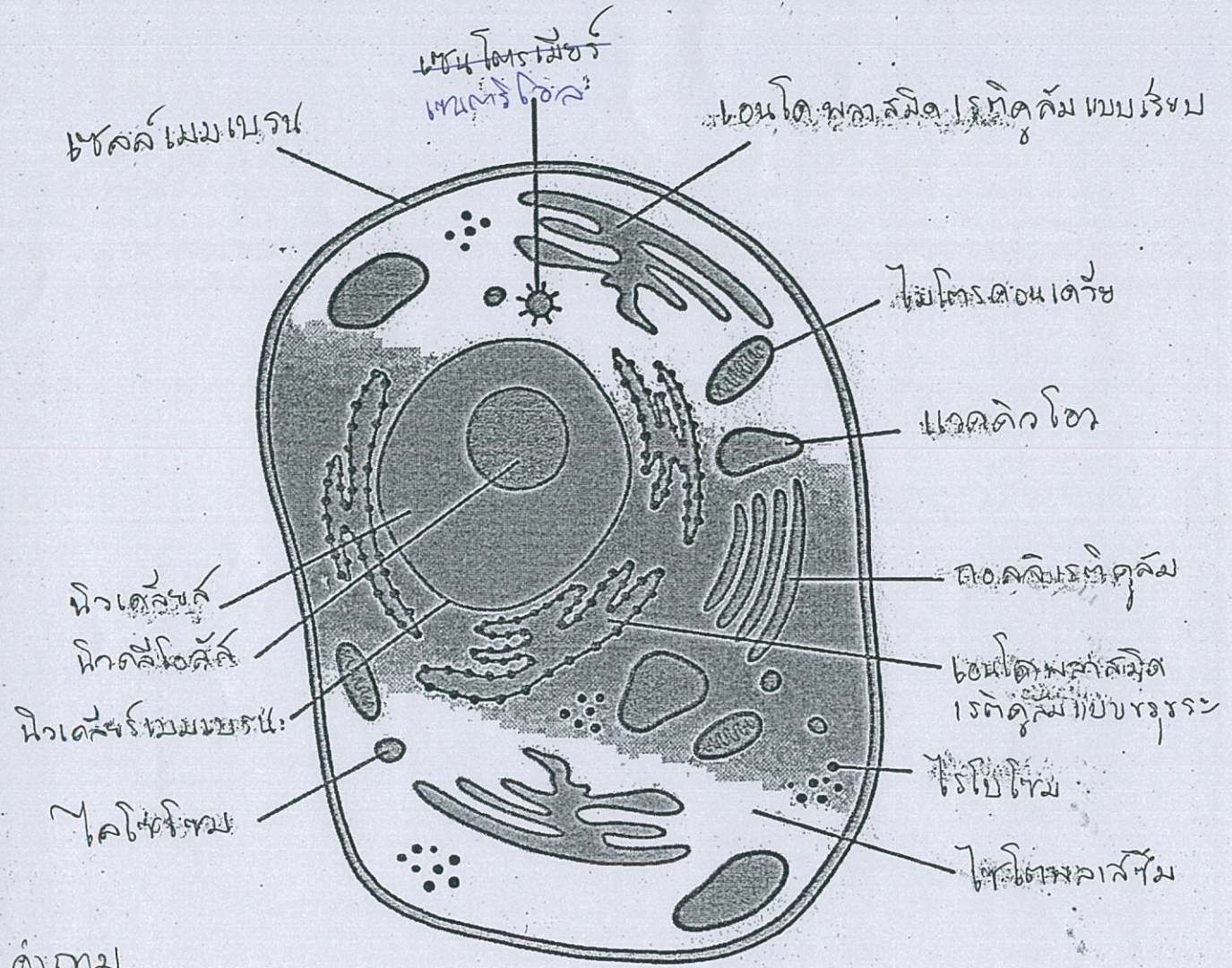
0/6

ชื่อ - นามสกุล

นางสาวปราณีพร อธิกุล

จำนวน ๑ จากวิชาพฤกษศาสตร์

หน่วย ๒ เซลล์ ๒



คำถาม

1) ลีดออก และขบถอนหน้าที่ยขบถองด์ประกอบเซลล์จากภาพข้างต้น อ่างงหน่วย

๒ อดด์ประกอบ

%

คำตอบ

1. _____
2. _____
3. _____
4. _____
5. _____
6. _____

ชื่อ-นามสกุล

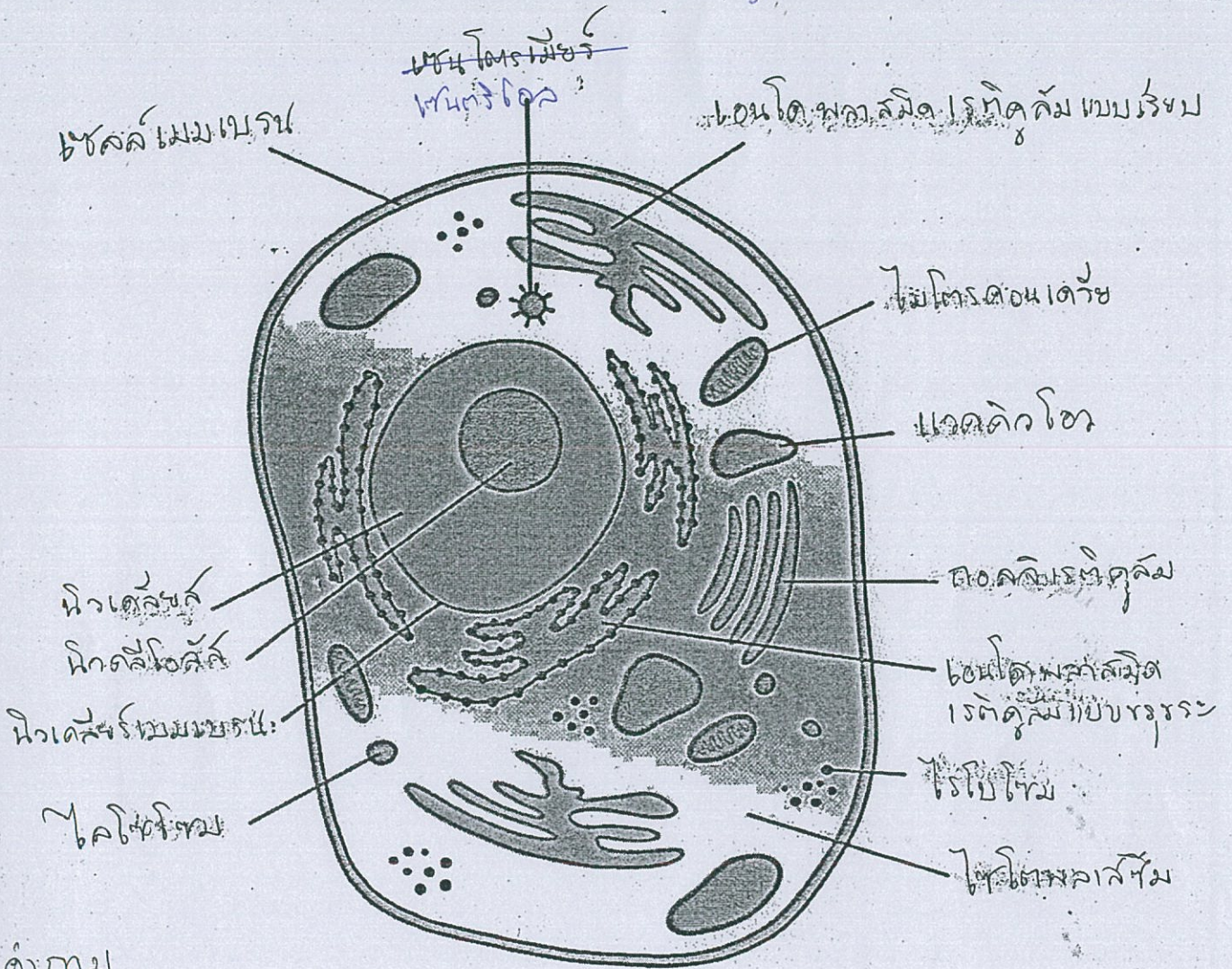
ศิวิน อุษงหิงกา

ตำแหน่ง

นักศึกษา ภาควิชาชีววิทยา

หน่วย

พฤกษศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏวชิรเวศน์



คำถาม

จงเลือกและบอกหน้าที่ของออร์แกเนลล์จากภาพข้างต้น ๖ ออร์แกเนลล์

๖ ออร์แกเนลล์

0/6

ตอบ

1. _____
2. _____
3. _____
4. _____
5. _____
6. _____

ชื่อ-นามสกุล

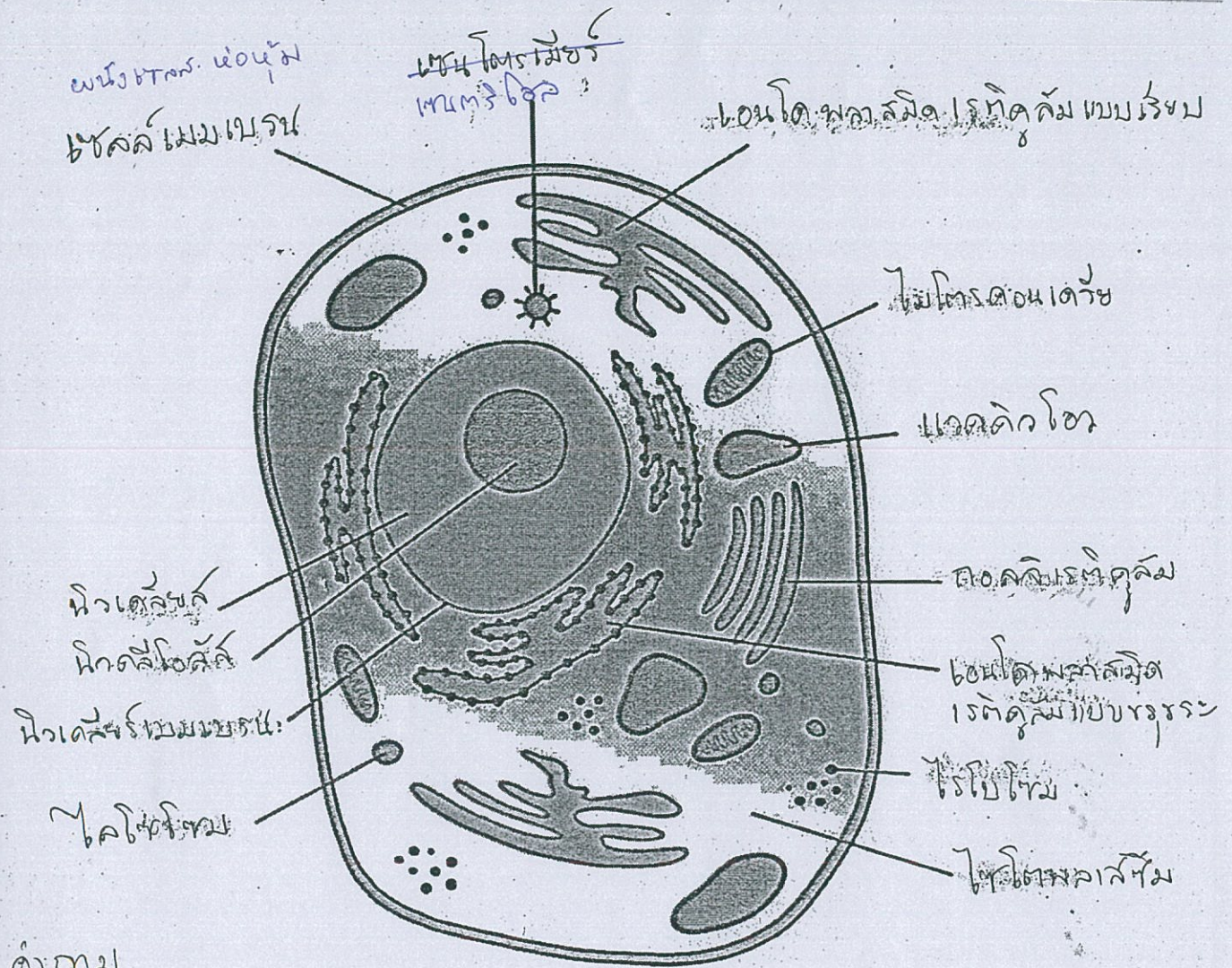
นางสาว นริศนุช ๒๒๗จันทัก

ตำแหน่ง

พนักงานห้องปฏิบัติการ

หน่วย

ผลิตเซลล์ 2



คำถาม

จงเลือกและบอกหน้าที่ของออร์แกเนลล์จากภาพข้างบน

๖ ออร์แกเนลล์

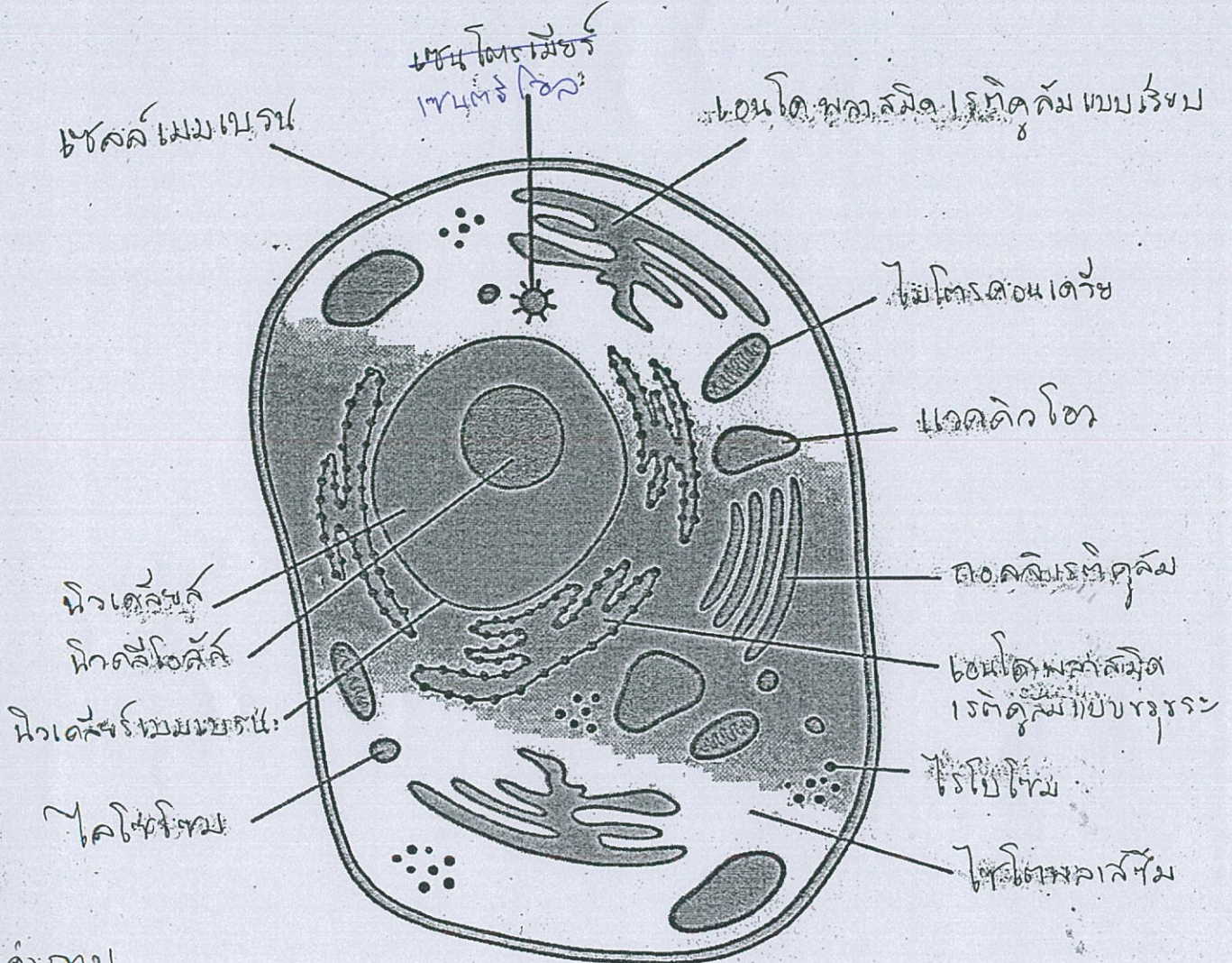
1/6

คำตอบ

1. เซลล์เมมเบรน มีหน้าที่ ห่อหุ้ม เซลล์ทั้งหมด.
- 2.
- 3.
- 4.
- 5.
- 6.

ชื่อ - นามสกุล
ตำแหน่ง
หน่วย

นางสาวรัชฎา จาตนา
พนักงานทั่วไป
ผลิตเซลล์ 1



คำถาม

1) เลือก และบอกหน้าที่ของอวัยวะประกอบเซลล์จากภาพข้างต้น อย่างน้อย 6 อวัยวะประกอบ

คำตอบ

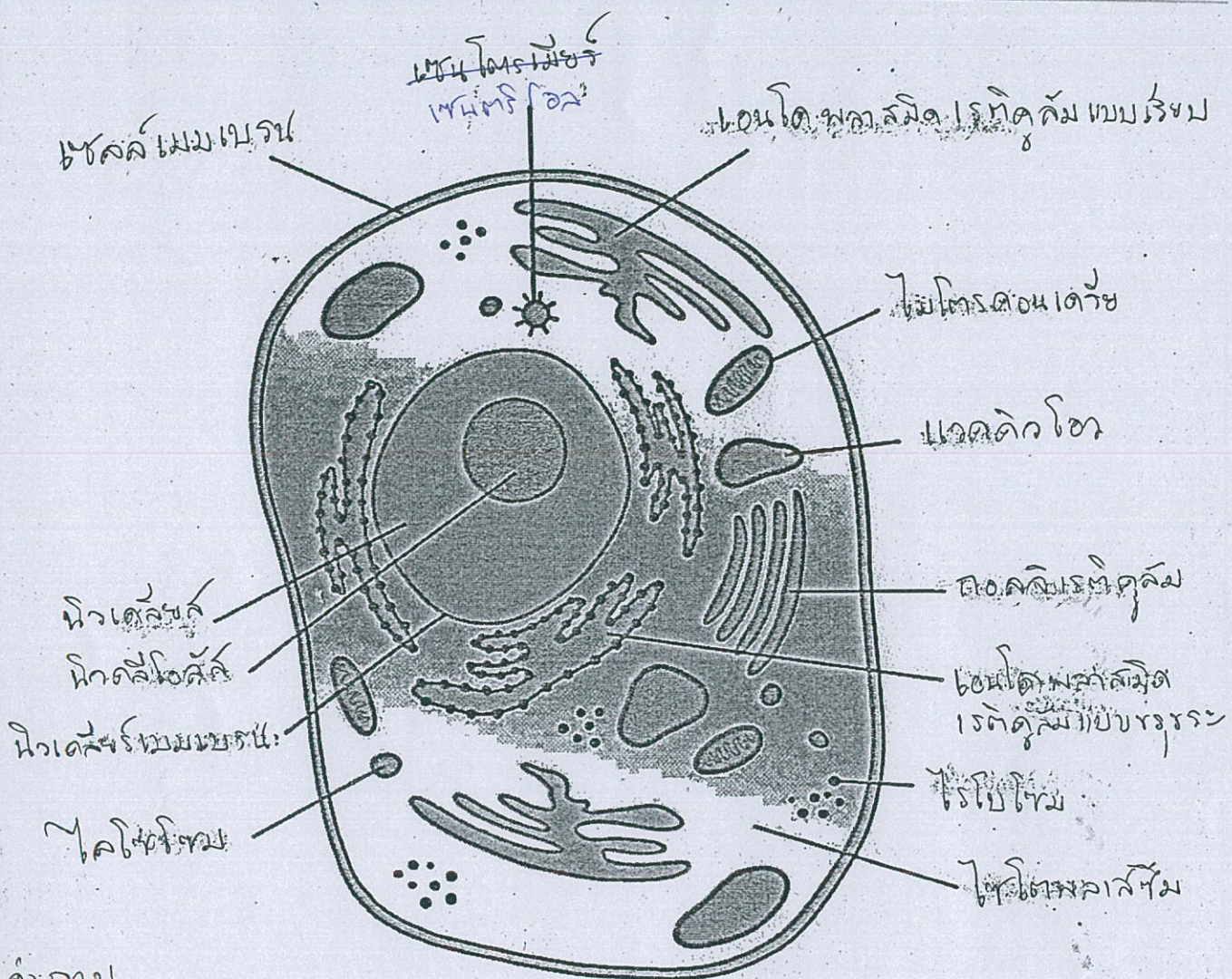
- 1. เซลล์ เมมเบรน : เยื่อหุ้มเซลล์ รักษาสมดุลภายใน cell ✓
- 2. ไมโทคอนเดรีย : ผลิตพลังงาน , เกิดกระบวนการ ✓
- 3. นิวเคลียส : ควบคุมกิจกรรมภายในเซลล์ ✗
- 4. นิวเคลียสเมมเบรน : ควบคุมให้ไปกับนิวเคลียส ✓
- 5. ไซโทพลาสซึม : ของเหลวภายในเซลล์ ✓
- 6. ไรโบโซม : สังเคราะห์โปรตีน ✓

5/6

ชื่อ - นามสกุล รัฐพร พงษ์อนันต์

ตำแหน่ง พนักงานฝึกสอนวิชา

หน่วย สัตวศาสตร์ 1



คำถาม

1. เลือกและบอกหน้าที่ของออร์แกเนลประกอบเซลล์จากภาพข้างต้น อย่างน้อย

6 ออร์แกเนล

5 1/2 / 6

ตอบ

1. เซลล์ เมมเบรน = ไซโทพลาสซึม, ไรโบโซม, ไรโบโซม, ไรโบโซมใน Cell ✓
2. ไมโทคอนเดรีย = ผลิตพลังงาน, กำจัดของเสีย ✓ 1/2
3. นิวเคลียส = ออร์แกเนลในเซลล์ ✗
4. นิวเคลียส เมมเบรน = ไซโทพลาสซึม, ไรโบโซม, ไรโบโซม, ไรโบโซมใน Cell ✓
5. ไซโทพลาสซึม = ออร์แกเนลในเซลล์ ✓
6. ไรโบโซม = ไรโบโซม, โปรตีน ✓

ชื่อ - นามสกุล

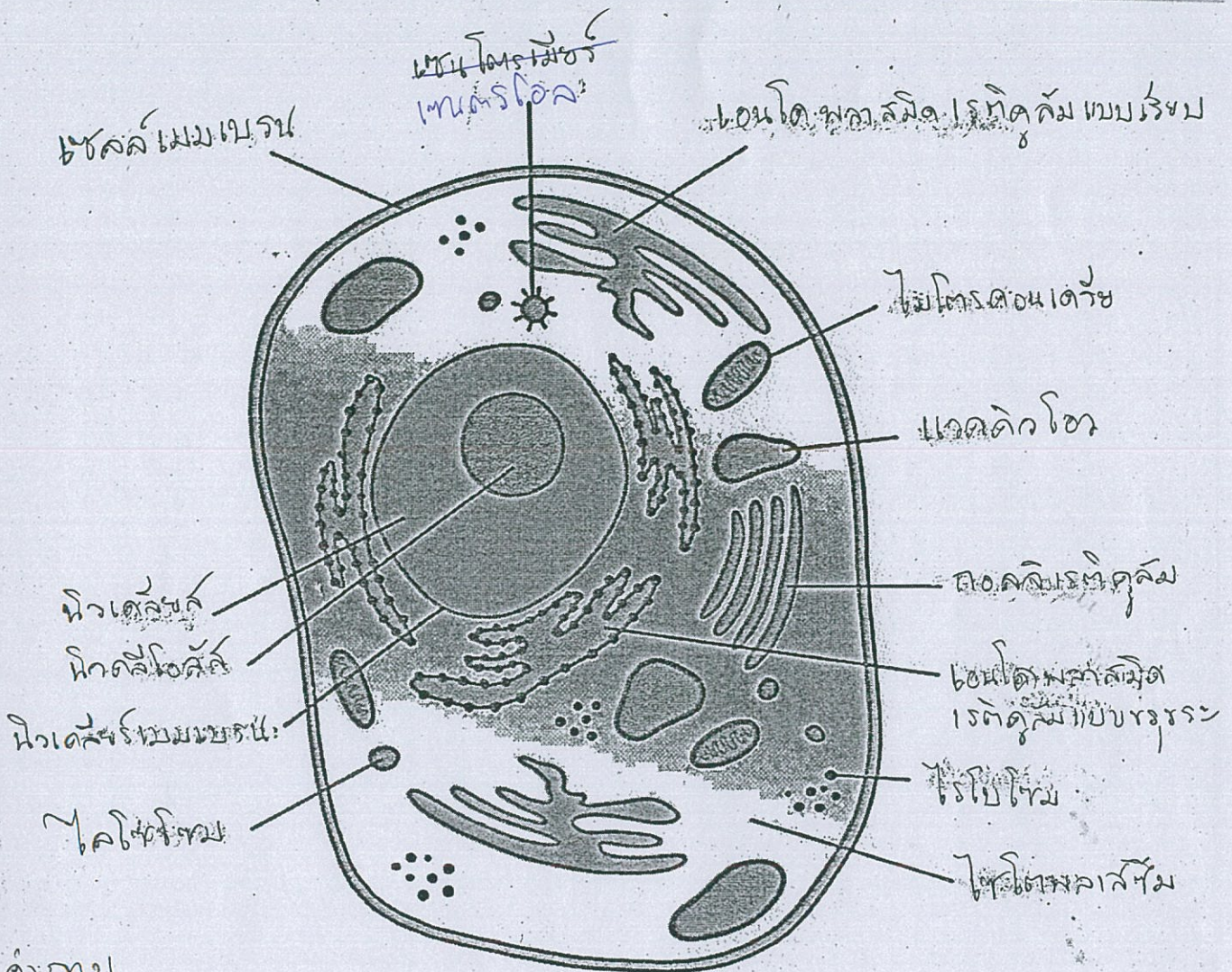
จางส์กิตษ์ ภาสพาน

ตำแหน่ง

พนักงานทั่วไป

หน่วย

ผลิตเซลล์ 1



คำถาม

ดูใบ้อก และบอกหน้าที่ของอวัยวะประกอบเซลล์จากภาพข้างต้น อย่างน้อย

6 อวัยวะประกอบ

ตอบ

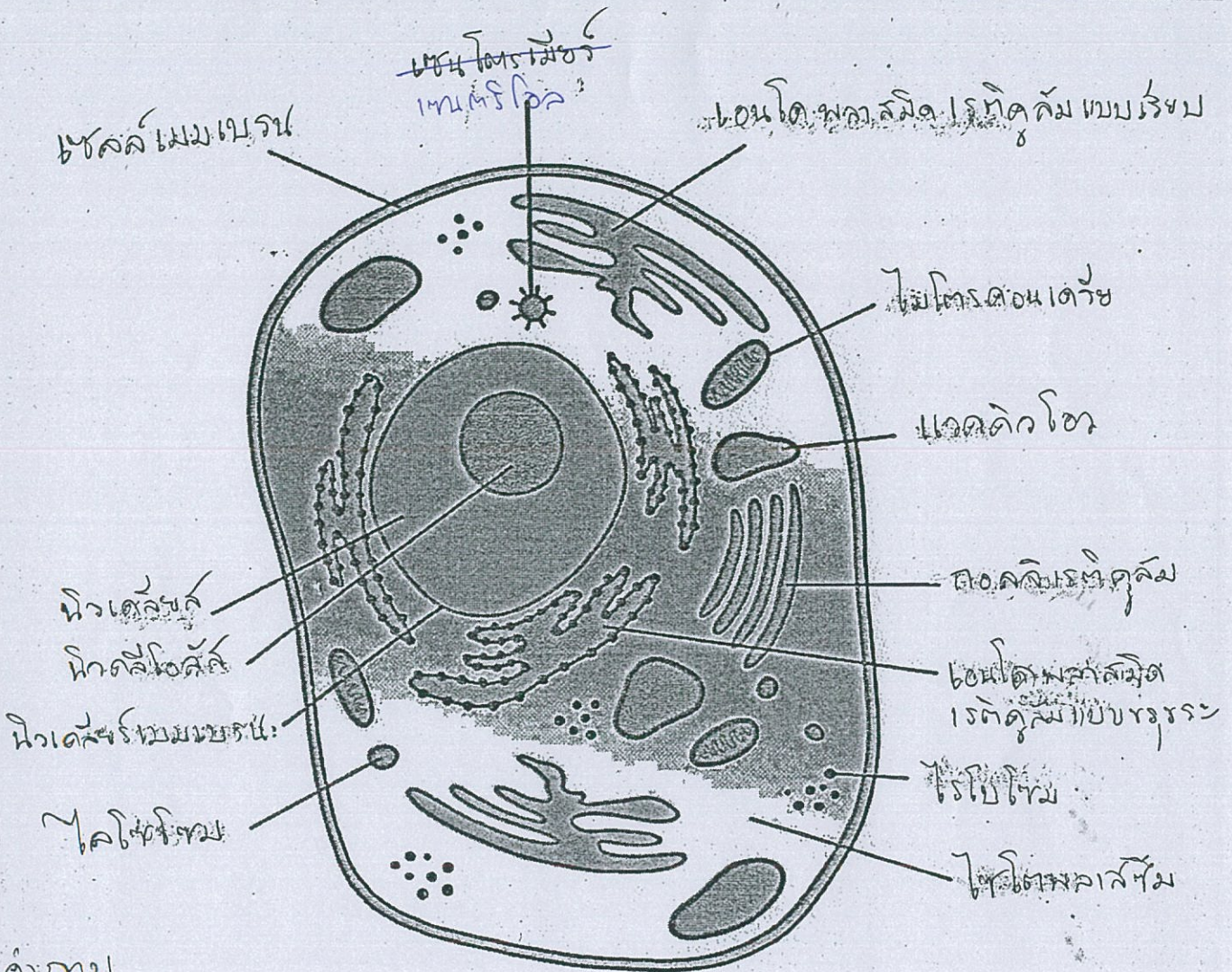
3/6

1. ไซโทพลาสซึม : ส่วนหน้าที่กักเก็บสารพันธุกรรม ✓
2. ไบโอมคลอโรพลาสต์ : ส่วนหน้าที่แปลงสารพันธุกรรมให้เป็นโปรตีน ✓
3. ไมโทคอนเดรีย : ส่วนหน้าที่ผลิตและให้พลังงานกับเซลล์ ✓
4. _____
5. _____
6. _____

ชื่อ - นามสกุล สังวรส พงษ์พานิช

ตำแหน่ง พนักงานบริษัทส่วนตัว

หน่วย นิเทศศิลป์ 1



คำถาม

1. เยื่อพลาสมา คือ ขอบหน้าที่ของเซลล์ ประกอบด้วย เยื่อพลาสมา ชั้นนอก ชั้นใน

2. ไลโซโซม

ตอบ

1. นิวเคลียส = กำเนิดสารพันธุกรรม ✓
2. lysosome = ผลิตสารอาหารเพื่อของเซลล์ รับส่งไปยัง ER และ Golgi body ✓
3. ribosomes = แปลรหัส DNA ✓
4. Golgi & Mitochondrion = ผลิตพลังงาน, ATP ✓
5. Golgi apparatus = ผลิตและส่งโปรตีนต่าง ๆ ทั่วเซลล์ ✓
6. Cytoplasm = ^{ของ} ~~ส่วน~~ ภายในเซลล์ ✓

3/6

ชื่อ - นามสกุล

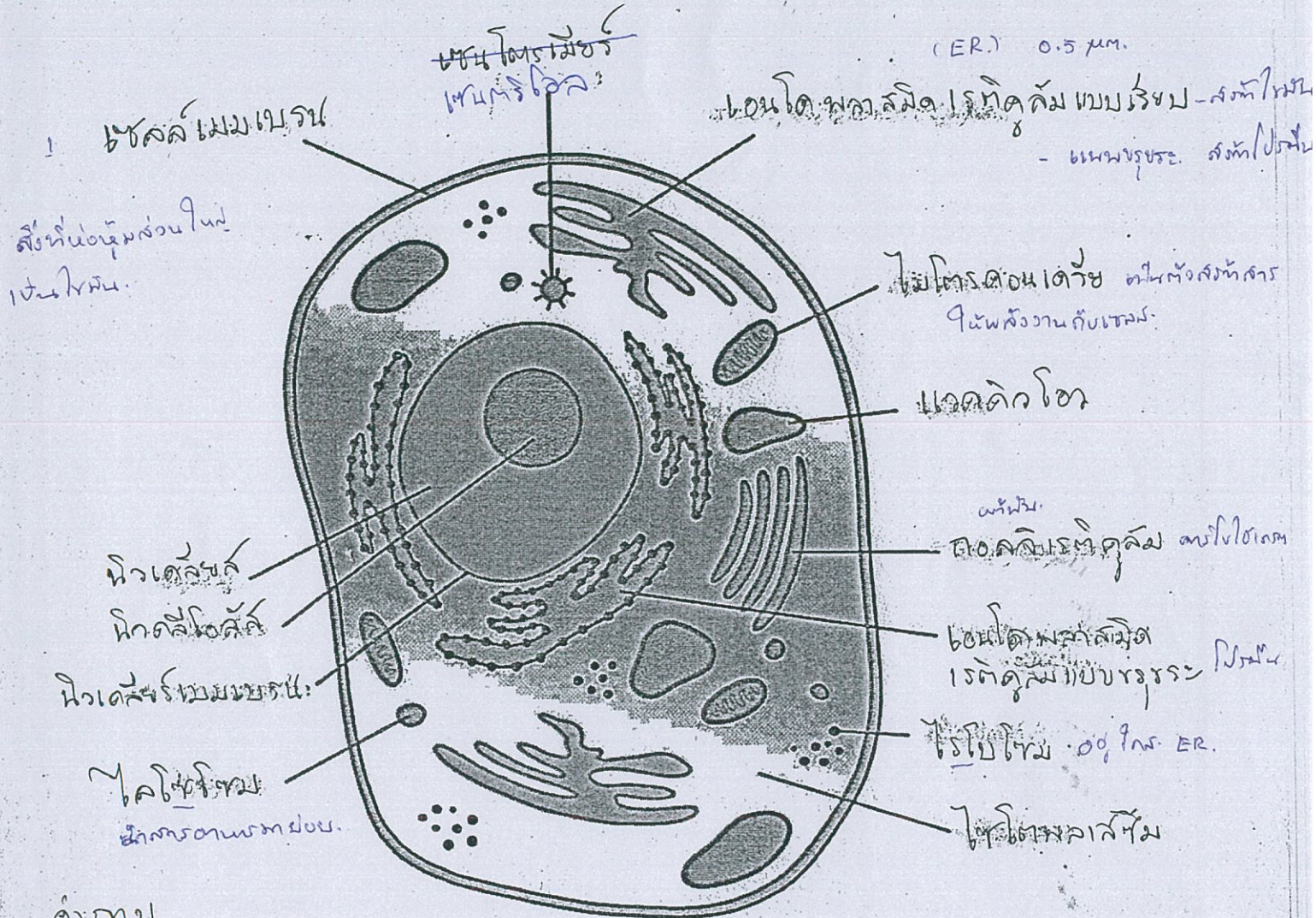
ตาม ปริณุกต์ บัณฑิต

ตำแหน่ง

พนักงานห้องปฏิบัติการ

หน่วย

ผลิตภัณฑ์ 2



คำถาม

จงเลือกและบอกหน้าที่ของออร์แกเนลล์จากภาพข้างบน

6 ออร์แกเนลล์

6/6

คำตอบ

1. เซลล์เมมเบรน หน้าที่ หน้าที่กั้นเซลล์กับสิ่งแวดล้อม กำหนดรูปร่างของเซลล์ ✓
2. ไมโทคอนเดรีย หน้าที่ เป็นตัวสร้างสารให้พลังงานกับเซลล์ ✓
3. ไลโซโซม หน้าที่ ทำหน้าที่สลายของเสีย ✓
4. กอลจิบอดี หน้าที่ ทำหน้าที่สร้างโปรตีน ✓
5. นิวเคลียส หน้าที่ กักเก็บสารพันธุกรรม หรือ DNA. ✓
6. ไรโบโซม หน้าที่ สร้างโปรตีน ✓

ชื่อ-นามสกุล

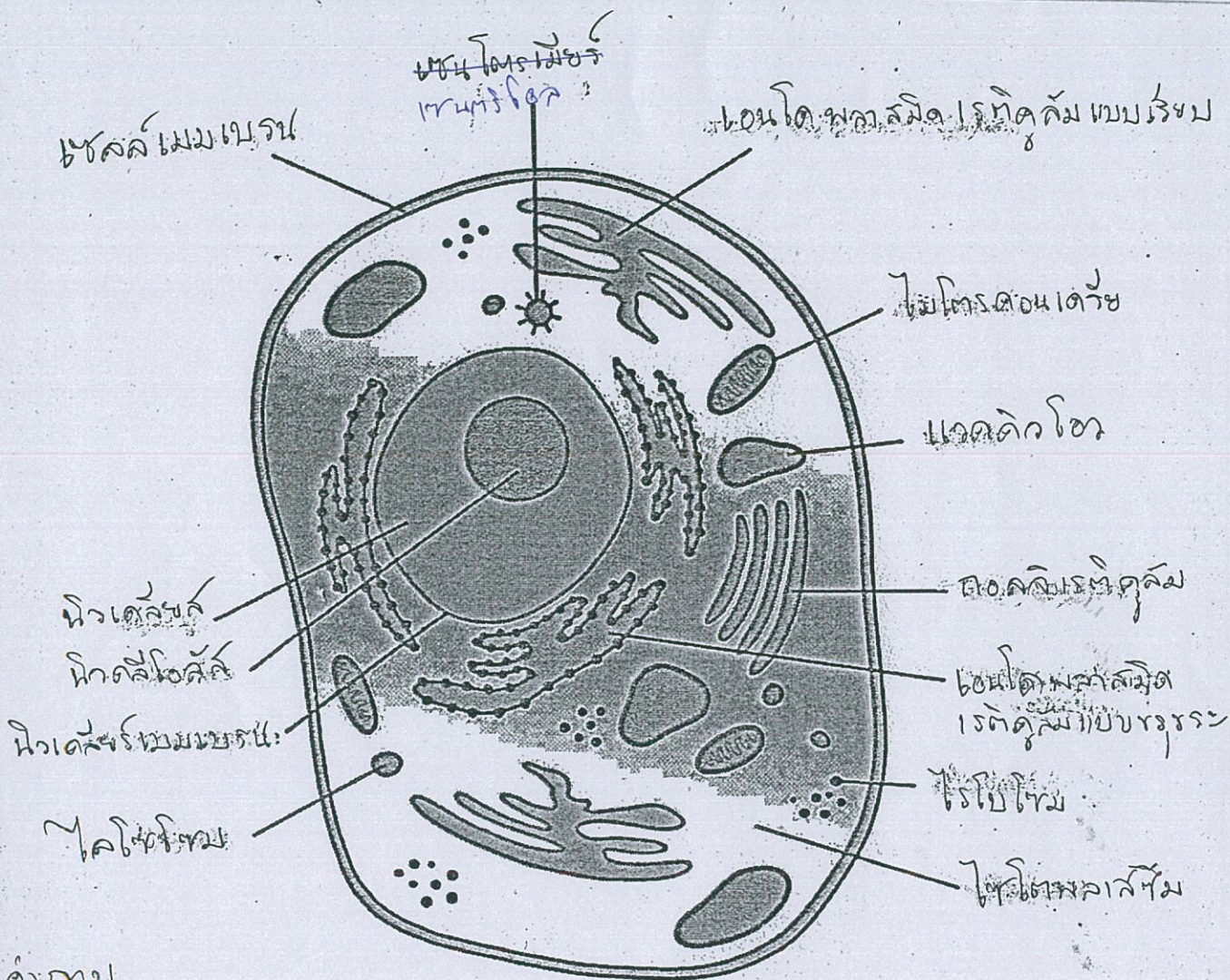
ลวัญ มุ่งพิงกา

ตำแหน่ง

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

หน่วย

เซลล์ 1



คำถาม

1) เลือกและบอกหน้าที่ของออร์แกเนลล์จากภาพข้างบน

6 ออร์แกเนลล์

3/6

คำตอบ

1. เซลล์เมมเบรน หน้าที่กั้นเซลล์ ✓
2. นิวเคลียส หน้าที่เก็บสารพันธุกรรม ✓
3. ไรโบโซม สังเคราะห์โปรตีน ✓
4. _____
5. _____
6. _____