บทคัดย่อ

177227

แบคคิวโลไวรัสเป็นสารชีวภาพชนิดหนึ่งที่ใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืช ในการผลิตแบคคิวโลไวรัสสามารถใช้เซลล์แมลง (insect cell line) ในรูปแบบ cell culture เป็นเซลล์เจ้าบ้าน (host) ในการเพิ่มปริมาณไวรัส แต่เนื่องจากการ infection ของไวรัสในเซลล์แมลงอย่างต่อเนื่อง (serial passage) มีผลทำให้ผลผลิตไวรัสลดต่ำลง ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการ infection ของแบคคิวโลไวรัส *Helicoverpa armigera* NPV (HaNPV) เพื่อให้ได้ผลผลิตไวรัสที่สูงและมีศักยภาพในการผลิตระดับการค้าได้ โดยการศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเซลล์แมลง และการ infection ของไวรัส ได้แก่ การเตรียมสูตรอาหารที่เหมาะสม การหาสภาวะในการ infection ที่เหมาะสม และการใช้สารเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการ infection ของไวรัส

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการ infection พบว่าความหนาแน่นเซลล์ $5x10^5$ cells/ml หรือ MOI (Multiplicity of infection) เท่ากับ 0.5 เป็นปริมาณไวรัสที่เหมาะสมในการ infect เซลล์ในช่วง early exponential phase และทำให้เกิดการสร้างผลึกสะสมจากการ infection มากกว่า 1 รอบ เนื่องจากมีเซลล์บางส่วนรอดจากการ infection ของไวรัสในรอบแรกและสามารถเพิ่มจำนวนและถูก infect จากไวรัสในรอบต่อไปได้อีก นอกจากนี้ยังพบว่าช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเก็บอนุภาค Extracellular Virus (ECV) เพื่อใช้เป็น virus inoculum คือ 96 หรือ 144 ชั่วโมงหลังการ infection โดยควรหลีกเลี่ยงไม่ใช้ไวรัสที่ได้หลังจาก passage ที่ 5 เนื่องจากเริ่มมีการสะสมของไวรัสที่มีการกลายพันธุ์แบบ FP mutant (few polyhedra mutant) ซึ่งจะทำให้ความสามารถในการสร้างผลึกลดลง ส่วนช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเก็บผลึกไวรัส (ODV) ให้ได้ปริมาณมากที่สุด คือ วันที่ 8 หลังการ infection เนื่องจากเซลล์ทุกเซลล์ถูก infect และมีการสร้างผลึกไวรัสสูงสุด ในการศึกษาเพื่อใช้สารต่างๆเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการ infection นั้น พบว่าการใช้ Bovine Serum Albumin เติมลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ความเข้มข้นสูงกว่า 10 g/l สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการ infection ของไวรัส HaNPV เข้าสู่เซลล์ มีผลทำให้ได้ผลผลิตผลึกไวรัสสูงขึ้น นอกจากนี้ การใช้สารซีลีเนียม ในรูปแบบ Sodium Selenite หรือ Sodium Selenate มีผลในการช่วยการเจริญของเซลล์แต่ควรใช้ในปริมาณที่เหมาะสม โดย Sodium Selenite ที่ความเข้มข้น 0.4 ng/ml และ Sodium Selenate ที่ความเข้มข้น 0.2 ng/ml ช่วยเสริมการเจริญของเซลล์แมลง และเพิ่มผลผลิตไวรัส ทั้งนี้น่าจะเนื่องจากสาร Selenium มีส่วนช่วยลด oxidative stress ที่เกิดกับเซลล์ได้ และจากการศึกษาเพื่อคัดเลือกสูตรอาหารเลี้ยงเซลล์ราคาถูกที่เหมาะสม พบว่า อาหารชนิด IPL-41 ที่ผสม Soy protein (5 g/l) lipid mix (100X) 1.5% และ 3% FBS สามารถนำมาใช้เลี้ยงเซลล์แมลง Hz ได้ดี และมีราคาถูก สามารถนำมาใช้เลี้ยงเซลล์ Hz แทนสูตรอาหารดั้งเดิม ซึ่งมีราคาแพง (Sf-900 II ที่ผสม 10% FBS) ได้ดี และจากการตรวจสอบการใช้สารอาหารของเซลล์ Hz ทั้งขณะกำลังเจริญ หรือขณะถูก infect ด้วยไวรัสเมื่อใช้อาหารสูตรนี้ พบว่า กลูโคส และกรดอะมิโนชนิดกลูตามีนถูกใช้จนหมด ส่วนกรดอะมิโนชนิดอื่นมีมากเกินพอ

Abstract

177227

Baculovirus is one of biopesticides used to control the insect pest. This virus can be produced in insect cell culture. However, production of this virus in insect cell has a limitation that is the poor virus yield when performing serial passage. This study aims to optimize conditions for increasing production efficiency of *Helicoverpa armigera* NPV (HaSNPV) using several approaches such as optimization of virus inoculum, time of infection and use of supplement to enhance viral production, etc.

The results showed that optimum virus inoculum to infect insect cells at early log phase stage ($5x10^5$ cells/ml) was at MOI 0.5. With this low MOI, (e.g. MOI 0.5) multiple rounds of virus infection and maximum yield of virus can be obtained. Optimum time of harvest of virus stock to retain virus infection efficiency was studied. When virus stocks were harvested at 96 or 144 hours post infection (hpi), high yields of occluded virus were obserbed. However, virus inoculum should not be used after the 5^{th} passage because of the accumulation of FP (few polyhedra) mutant at the later passage. Maximum yield of occluded virus (ODV) was observed on day 8 after infection since all insect cells had been infected leading to maximum numbers the occlude virus. To further increase the yield of viruses, some supplements were investigated. Bovine Serum Albumin (BSA) at concentration higher than 10 g/l can be used to increase infection efficiency and viral production. Selenium in the form of sodium selenite or sodium selenate were also shown to increase cell viability and occluded virus production. The reduction of oxidative stress by selenium may be responsible for this results. When varieties of culture media for Hz cell growth and virus production were compared, it was found that one of the optimal cell culture media was IPL-41 supplemented with soy protein (5 g/l), 1.5% lipid mix (100X) และ 3% FBS can be used to replace the previous medium (Sf-900 II + 10% FBS) which is very expensive. With the fact that glucose and glutamine are the most utilized sources whereas of other amino acids were excess for cell consumption.