

การเตรียมเซลล์เลี้ยงจากปลาน้ำจืดและการเพิ่มจำนวนของไวรัส



นางสาว สุมิตรา วัฒนนคร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2531

ISBN 974-568-942-4

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

013933

118037124

FRESH WATER FISH CELL CULTURE-PREPARATION
AND VIRAL MULTIPLICATION

Miss Sumittra Vattanodorn

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of the Master of Science
Inter-Department of Medical Microbiology
Graduate School
Chulalongkorn University

1988

ISBN 974-568-942-4

Copyright of the Graduate School, Chulalongkorn University

Thesis Title Fresh Water Fish Cell Culture-Preparation
and Viral Multiplication.
By Miss Sumittra Vattanodorn
Inter-Department Medical Microbiology
Thesis Advisor Associate Professor Dr.Wattana Wattanavijarn
Thesis Co-Advisor Dr. Kamonporn Tonguthai
Assistant Professor Dr.Jirasak Tangtrongpiros



Accepted by the Graduate school, Chulalongkorn
University in Partial Fulfillment of the Requirements for
the Master's Degree.

Thavarn VajrabhayaDean of Graduate School
(Professor Thavarn Vajrabhaya, Ph.D.)

Thesis Committee

Dilok YenbutraChairman
(Associate Professor Dilok Yenbutra, M.D.)
Wattana WattanavijarnThesis Advisor
(Associate Professor Wattana Wattanavijarn, D.V.M., Ph.D.)
K. TonguthaiMember
(Kamonporn Tonguthai, Ph.D.)
J. TangtrongpirosMember
(Assistant Professor Jirasak Tangtrongpiros, Doctorat 3^e Cycle)
Urasri TantaswasdiMember
(Urasri Tantaswasdi, D.V.M., Ph.D.)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสี่เหลี่ยมนี้เพียงแผ่นเดียว



สมิตรา วัฒนบุตร : การเตรียม เซลล์ เลี้ยงจากปลาน้ำจืดและการเพิ่มจำนวนของไวรัส
(FRESH WATER FISH CELL CULTURE-PREPARATION AND VIRAL MULTIPLICATION)

อ.ที่ปรึกษา : รศ.สพ.ญ.ดร.วัฒนา วัฒนวิจารย์, 139 หน้า.

ปลาน้ำจืดที่นำมาใช้ในการเตรียมเซลล์เลี้ยงปรุมภูมิได้แก่ ปลาหมอ ปลากระสง ปลาไน และ ปลายี่สกเทศ โดยตัดเอาส่วนหางของปลามาทำจุลินทรีย์ นำไปย่อยด้วยทริปซินและปั่นแยก เซลล์ออกมา เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ ภายใต้อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-7 วัน จากการศึกษา ด้วยวิธีนี้สามารถเพาะเลี้ยงเซลล์ได้จากปลาน้ำจืดทั้งสี่ชนิด เซลล์ที่ได้เป็นรูปกระสวย เซลล์จากปลาหมอ ที่มีขนาดตัวยาว 3-4 เซนติเมตร สามารถเพาะเลี้ยงได้มากกว่า 70 ครั้ง เซลล์ที่ได้จากปลาไนเลี้ยง ได้เพียง 50 ครั้ง และเซลล์จากปลากระสงเพาะเลี้ยงได้มากกว่า 120 ครั้ง ส่วนจากปลายี่สกเทศไม่ ได้ศึกษาต่อ

Infectious pancreatic necrosis virus, snakehead fish viruses and carp viruses สามารถเจริญได้ดีในเซลล์เลี้ยงของปลาหมอ และปลากระสง ส่วนเซลล์เลี้ยงของ ปลาไนไวรัสไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ในสภาวะเดียวกัน.

ภาควิชา สัตววิทยาของปลาและโรคปลา
สาขาวิชา สัตววิทยาของปลาและโรคปลา
ปีการศึกษา ๕.๕.3๐

ลายมือชื่อนิสิต สมิตรา วัฒนบุตร
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา วิมล วัฒนวิจารย์

พิมพ์ต้นฉบับบทความวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสี่เหลี่ยมนี้เพียงแผ่นเดียว



SUMITTRA VATTANODORN : FRESH WATER FISH CELL CULTURE-PREPARATION AND VIRAL MULTIPLICATION. THESIS ADVISOR : ASSO. PROF. WATTANA WATTANA VIJARN, Ph. D. 139 pp.

The caudal trunks of the freshwater fish, Anabas testudineus, Ophicephalus lucius, Cyprinus carpio and Lebeo rohita were cut off and normal flora were removed. These tissues were trypsinized with trypsin, these trypsinized cell were spun and placed in the growth medium and incubated at 28°C for 3-7 days. By this method, primary cell cultures were prepared from the fishes and showed a fibroblast-like morphology. Cell cultures from A. testudineus and O. lucius could be propagated for more than 70 passages and 120 passages respectively and cell culture from C. carpio could be propagated within 50 passages.

Infectious pancreatic necrosis virus, snakehead fish viruses and carp viruses multiplied in cell cultures of O. lucius and A. testudineus but not in C. carpio.

ภาควิชา Inter-Department Medical Microbiology
สาขาวิชา Medical Microbiology
ปีการศึกษา 1988

ลายมือชื่อนิสิต Sumittra Vattanodorn
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา W. Wattana vijan



ACKNOWLEDGEMENTS

I wish to express my appreciation and deepest gratitude to my advisor, Associate Professor Dr. Wattana Wattanavijarn, Head of Virology Unit, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, for her invaluable advice, encouragement and assistance during the course of this study and for her kindness and intensive review to this manuscript.

Grateful appreciation is also to my co-advisor, Dr. Kamonporn Tonguthai, National Inland Fisheries Institute, Freshwater Fisheries Division of Department of Fisheries and Assistant Professor Dr. Jirasak Tangtrongpiros, Head of Veterinary Medical Science, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University for their kindness, helpful suggestion of this thesis.

I sincerely thank to Stirling University for IPNV, biological products and equipments used in this work.

I am deep indebted and grateful appreciation to Dr. Rochelle Powtong, Faculty of Arts for her kindness, correcting grammar of this thesis.

Sincere appreciation, to Associate Professor Dilok Yenbutra, Department of Microbiology Unit, Faculty

of Medicine and Dr. Urasri Tantaswasdi, Chief of Virology Section, National Animal Health and Production Institute, Department of Livestock Development for accepting my candidature Master Degree of Inter-Department of Medical Microbiology.

Sincere thanks to Dean of Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, give an opportunity for me to study in Master Degree. And many thanks go to Virology Unit, Faculty of Veterinary Science where this work has been presented and supported for chemicals and equipments.

Final, my deep appreciation and gratitude to my parents and my relatives who encouraged and helped me every possible ways.



CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT	ii
ENGLISH ABSTRACT	iii
ACKNOWLEDGEMENT	iv
CONTENTS	vi
LIST OF TABLES	ix
LIST OF FIGURES	x
ABBREVIATIONS	xiii
CHAPTERS	
I INTRODUCTION	1
II REVIEW OF LITERATURE	
History	8
Physiological Salines Balanced Salt Solution.....	11
Cell Culture Media	15
Temperature and pH	21
Choices of Tissue and Their Preparation	23
Storage and Preservation of Fish Cells	30
Fish Cell Lines	33
Fish Virus	40

III MATERIALS AND METHODS

Donor Fish	61
Stock of Viruses	61
Freshwater Fish Cell Culture-	
Preparation	64
Subculturing and Propagation of Fish	
Cell Cultures	66
Growth Curve and Growth Optimal Tem-	
perature of Freshwater Fish Cell	
Culture	68
Studying Viral Multiplication in the	
Freshwater Fish Cell Cultures	69
Microbial Checking of the Cell	73
Cells Culture Preservation	74

IV RESULTS

Morphology of Freshwater Fish Cell	
Culture	75
Growth and Optimal Growth Temperature	
<u>Anabas testudineus</u>	83
<u>Cyprinus carpio</u>	83
<u>Ophicephalus lucius</u>	83
Sterility of the Cell Cultures	88
Cell Preservation	88
Subculturing and Propagation of	
the Cell Culture	91
Viral Multiplication	94

V	DISCUSSION AND CONCLUSIONS	102
	BIBLIOGRAPHY	109
	APPENDIX I.....	129
	APPENDIX II.....	136
	BIOGRAPHY	139

LIST OF TABLES

Table	Page
1. Composition of balanced salt solution.	13
2. General purpose culture media for fish cell tissue.	17
3. Antibiotics used in fish cell and tissue culture.	20
4. Proximate range of incubation temperature for fish cell and tissue culture.	22
5. Fish cell lines that freeze well in the media given.	31
6. A listing of teleost fish cell line, 1979.	38
7. A listing of virus isolated from known to occur in fish, 1979.	41
8. Dimension of herpesviruses detected in fish.	46
9. Technical information on the most suitable fish cell lines.	59
10. Virus multiplication in three kinds of the fish cell lines.	96

LIST OF FIGURES

Figure	Page
1. <u>Anabas testudineus</u> (Climbing perch).	62
2. <u>Cyprinus carpio</u> (Common carp).	62
3. <u>Lebeo rohita</u> (Rohu).	63
4. <u>Ophicephalus lucius</u> (Snakehead fish).	63
5. Diagram showing method for freshwater fish cell culture-preparation.	67
6. Diagram of viral dilution and inoculation.	71
7. Cell and tissue fragment suspension obtained by trypsinization of <u>Anabas testudineus</u> caudal trunks. This degree of dispersion was ideal for successful planting of a primary monolayer culture.	76
8. Photogarth of <u>Anabas testudineus</u> in the first passage after 3-5 days, showing characteristics of fibroblast-like morphology.	77
9. Photogarth of <u>Anabas testudineus</u> cells at the 12 th passage, 3-5 days, showing characteristics of fibroblast-like morphology.	78
10. Photogarth of <u>Cyprinus carpio</u> cells at the 10 th passage, 2 days, showing characteristics of fibroblast-like morphology.	80

11. Photogarth of Lebeo rohita cells at the 10th passage, 2 days, showing characteristics of fibroblast-like morphology. 81
12. Photogarth of O. lucius at the 10th passage, 2 days, showing characteristics of fibroblast-like morphology. 82
13. Mean number of cells from Anabas testudineus (27th passage) per 25 cm² flask after incubation for 7 days at selected temperature. 84
14. Growth of A. testudineus cells at different incubation temperature. Culture flask (25 cm²) were seeded with 1x10⁶ cell/ml and divided into 5 groups, each incubated at one of temperature : 37°, 28°, 22°, 16°, and 4°C. 85
15. Mean number of cells from Cyprinus carpio (29th passage) per 25 cm² after incubation for 7 days at selected temperature. 86
16. Growth of C. carpio cells at different incubation temperature. Culture flask (25 cm²) were seeded with 1x10⁶ cell/ml and divided into 5 groups, each incubated at one of temperature : 37°, 28°, 22°, 16°, and 4°C. 87
17. Mean number of cells from Ophicephalus lucius (29th passage) per 25 cm² after incubation for 7 days at selected temperature. 89

18. Growth of O. lucius cells at different incubation temperature. Culture flask (25 cm²) were seeded with 1x10⁶ cell/ml and divided into 5 groups, each incubated at one of temperature : 37°, 28°, 22°, 16°, and 4°C. 90
19. Photogarrph of a normal BF-2 cell line. 92
20. BF-2 cell lines showing cytopathic effect (CPE) caused by IPNV. 93
21. Cells cultured from Anabas testudineus showing cytopathic effect caused by SHV. 97
22. Cells cultured from O. lucius showing cytopathic effect caused by SHV. 98
23. IPN particle in BF-2 cell lines, 3 day after infection. Virion were found in the cytoplasm. 99
24. Icosahedral virus particles, 50-55 nm in diameter, in Ophicephalus lucius when infected with SHV. 100
25. Rhabdovirus-like in cell culture from Ophicephalus lucius when infected with SHV. 101

ABBREVIATIONS

BSS	balance salt solution
BME	Eagle's basal medium
CPE	cytophatic effect
cm	centimeter
°C	degree celcius
DDW	double distilled water
et al.	et alii
etc	et cetera
g	gram
IU	international unit
MEM	minimum essential medium
ml	milliliter
mm	millimeter
mM	milli mole
nm	nanometer
PBS	phosphate buffer saline
RTN	rainblow trout nephroblastoma
sp	species
TCID ₅₀	dilution of virus required to infect 50 % of culture
ug	microgram
ul	microliter
ug/ml	microgram per milliliter