

## 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

สมพงษ์ 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 แต่ก็ได้เกิดการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง จนกระทั่งปลายปี พ.ศ. 2483 ถึงต้นปี พ.ศ. 2493 จึงได้มีการพัฒนาหลายด้านที่ทำให้การเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเครื่องมือสำคัญสำหรับนักวิทยาศาสตร์ ซึ่งสามารถสรุปเหตุการณ์สำคัญต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นตามประวัติความเป็นมาของการเพาะเลี้ยงเซลล์ (ตารางที่ 1) <sup>(1)</sup> 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 <sup>(2)</sup> ง) อีกทั้งยังช่วยลดปริมาณการใช้สัตว์ทดลอง ตามพระราชบัญญัติสัตว์

เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ (พรบ.) คุ้มครองสัตว์ทดลอง <sup>(3)</sup> อย่างไรก็ตาม การทดลองในหลอดทดลองนั้นก็มีข้อจำกัดบางประการ เช่น ผู้ปฏิบัติงานต้องมีความชำนาญอย่างมาก ค่าใช้จ่ายสูง คุณสมบัติของเซลล์สามารถเปลี่ยนแปลงได้ในช่วงเริ่มต้น เซลล์ยังสามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมของการเลี้ยงที่แตกต่างกันได้โดยการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ต่าง ๆ และสภาพแวดล้อมในร่างกายไม่เหมือนในสภาวะจำลองในหลอดทดลอง เป็นต้น

### สิ่งจำเป็นสำหรับงานเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์

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

### ตารางที่ 1. เหตุการณ์สำคัญที่เกิดขึ้นในการเพาะเลี้ยงเซลล์ <sup>(1)</sup>

|      |                                                                                                                                                                                                |
|------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 2450 | Ross Harrison ปลูกฝังเซลล์ประสาทของกบในก้อนน้ำเหลือง ด้วยวิธี 'hanging drop' และสังเกตการเติบโตของเส้นใยประสาทในหลอดทดลองเป็นเวลาหลายสัปดาห์ เขาได้รับขนานนามว่าเป็นบิดาแห่งการเพาะเลี้ยงเซลล์ |
| 2483 | การใช้ยาปฏิชีวนะเพนิซิลลินและสเตรปโตมัยซินในอาหารเลี้ยงเชื้อช่วยลดปัญหาการปนเปื้อนในเซลล์เพาะเลี้ยง                                                                                            |
| 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 ที่ใช้ในมนุษย์ที่ผลิตจากแบคทีเรียลูกผสมได้รับการยอมรับสำหรับใช้ในงานการรักษา                                                                                                   |
| 2533 | ผลิตภัณฑ์โปรตีนลูกผสมถูกนำมาใช้ทางคลินิก (HBsAg, factor VIII, HIVgp120, CD4, GM-CSF, EGF, moAbs, IL-2)                                                                                         |

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

3. **ตู้เย็นและตู้แช่แข็ง** (refrigerators and freezers) ทั้งสองรายการนี้มีความสำคัญมาก สำหรับการเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ที่  $4^{\circ}\text{C}$  และสำหรับเอนไซม์ เช่น trypsin และส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเซลล์บางอย่าง เช่น กลูตามีน และซีรั่ม นอกจากนั้นยังต้องใช้ตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิต่ำกว่า  $-20^{\circ}\text{C}$  ในการเก็บส่วนที่เหลือจากการแบ่งของซีรั่ม สารอาหารและยาปฏิชีวนะ น้ำยาบางชนิดอาจถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ  $-20^{\circ}\text{C}$  แต่หากต้องการเก็บรักษาเซลล์ไว้ อาจจำเป็นต้องจัดเก็บในไนโตรเจนเหลวหรือช่องแช่แข็งที่อุณหภูมิต่ำกว่า  $-70^{\circ}\text{C}$

4. **กล้องจุลทรรศน์** (microscopes) ชนิด inverted microscope เป็นสิ่งจำเป็นในงานเพาะเลี้ยงเซลล์ เพื่อใช้ในการตรวจสอบดูสภาพเซลล์ที่เพาะเลี้ยงใน flasks หรือ dishes เป็นสิ่งสำคัญที่สามารถรับรู้การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ (morphology) ในระหว่างการเพาะเลี้ยงเซลล์ เนื่องจากสิ่งเหล่านี้เป็นข้อบ่งชี้แรก ๆ ของการเสื่อมสภาพของการเพาะเลี้ยงเซลล์ กล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดาที่มีกำลังขยาย 100x เพียงพอสำหรับการนับจำนวนเซลล์ปกติใน haemocytometer อย่างไรก็ตามอาจต้องใช้กล้องจุลทรรศน์ที่มีคุณภาพดีกว่านี้สำหรับการศึกษาคromosome analysis หรือ autoradiography

5. **ภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์** (tissue culture ware) มีการผลิตพลาสติกเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่หลากหลาย ซึ่งเป็นโพลีสไตรีนที่ได้รับการผลิตเป็นพิเศษ การใช้พลาสติกเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เหมาะสมมีผลต่อการเติบโตของเซลล์ และเป็นสิ่งสำคัญมากที่ต้องทดสอบการเติบโตของเซลล์เมื่อมีการเปลี่ยนภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์จากแหล่งผลิตอื่น ๆ จากที่เคยใช้อยู่ เพื่อให้แน่ใจว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงมีการเติบโตได้ดีก่อนการใช้จริง

6. **อุปกรณ์เครื่องมือล้างและฆ่าเชื้อ** (washing up and sterilizing facilities) ความพร้อมใช้งานของ plastic tissue culture ที่ใช้ครั้งเดียวไม่มีความจำเป็นต้องทำการล้างแต่เครื่องแก้ว เช่น ปิเปต ควรนำไปแช่ในผงซักฟอกที่เหมาะสมจากนั้นผ่านขั้นตอนการล้างอย่างเข้มข้นแล้วนำไปแช่ในน้ำกลั่นก่อนการอบแห้งและการฆ่าเชื้อ ปิเปตควรเสียบด้วยสาลี่ที่ไม่ดูดซับก่อนใส่ลงในภาชนะสำหรับการฆ่าเชื้อเครื่องแก้ว เช่น ปิเปตแก้ว ขวดแก้ว บีกเกอร์ ควรห่อปกคลุมด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ก่อน แล้วจึงนำไปฆ่าเชื้อในเตาอบลมร้อน (hot air oven) ที่อุณหภูมิ  $160^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 3 ชั่วโมง อุปกรณ์อื่น ๆ เช่น automatic pipette tips และขวด ให้ทำการปิดฝาแบบหลวม ๆ แล้วนำไปตั้งที่  $121^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 20 นาที (autoclave) ตัวบ่งชี้การฆ่าเชื้อเช่นแถบทดสอบการฆ่าเชื้อเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับแต่ละชุดการฆ่าเชื้อ เพื่อให้แน่ใจว่าเครื่องสามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ

7. **ไนโตรเจนแช่แข็ง** (liquid nitrogen deep freezer) การเก็บรักษาเซลล์ด้วยการแช่แข็ง (cryopreservation and storage of cell lines) <sup>(4)</sup> เพื่อลดความเสี่ยงของการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ ลดความเสี่ยงของการปนเปื้อนข้ามกับเซลล์อื่น ๆ ลดความเสี่ยงของการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม การเปลี่ยนแปลงทางรูปร่างของเซลล์ ทั้งยังเป็นการดำเนินการทดลองที่สอดคล้องกับการใช้เซลล์ตาม passage number หลักการพื้นฐานของการเก็บรักษาด้วยการแช่แข็งที่ประสบความสำเร็จ คือ การแช่แข็งอย่างช้า ๆ และละลายอย่างรวดเร็ว “a slow freeze and quick thaw” โดยการแช่แข็งเซลล์ค่อย ๆ ลดความเย็นที่อัตรา  $1^{\circ}\text{C}$  ถึง  $3^{\circ}\text{C}$  ต่อนาที,  $-20^{\circ}\text{C}$  ข้ามคืน,  $-80^{\circ}\text{C}$  1 - 2 วัน หลังจากนั้นจึงค่อยย้ายไปแช่ในไนโตรเจนเหลว ซึ่งสามารถเก็บเซลล์ไว้ได้นานหลายสิบปี ส่วนในการละลายเซลล์ต้องทำอย่างรวดเร็ว โดยการแช่ในอ่างน้ำอุณหภูมิ  $37^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 3 - 5 นาที และเจือจางทันทีหลังจากละลาย คุณสมบัติของ cell lines ที่ทำการ cryopreservation โดยเซลล์ต้องมีความสมบูรณ์ จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตมากกว่าร้อยละ 90 ไม่มีสัญญาณการปนเปื้อน

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

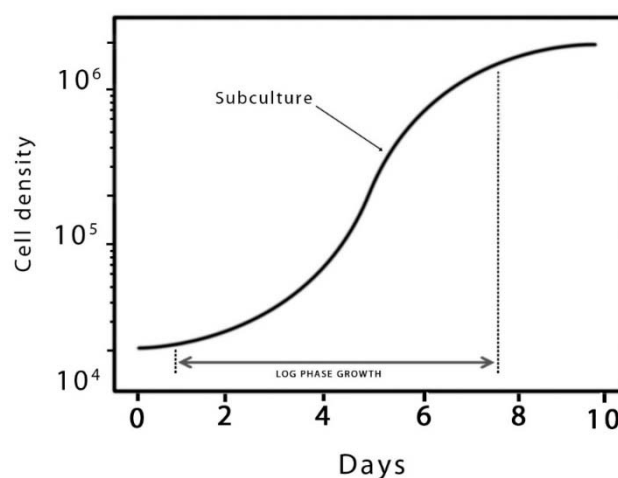
8. การจัดหา น้ำกลั่น (double distilled or reverse osmosis) เป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ และการล้างเครื่องแก้วต่าง ๆ จึงจำเป็นต้องมีการตรวจสอบค่าความเป็นกรดต่างของน้ำกลั่นอย่างสม่ำเสมอ เนื่องจากความผันแปรในคุณภาพของน้ำที่ใช้ อาจเป็นสาเหตุของการเปลี่ยนแปลงในผลลัพธ์บางอย่างในการเพาะเลี้ยงเซลล์ได้

9. การทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรอง (filter sterilization) อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่สามารถนึ่งฆ่าเชื้อได้ ต้องผ่านการกรองด้วยแผ่นกรองขนาดรูพรุน 0.22 ไมครอนเมตร โดยหัวกรองขนาดต่าง ๆ สามารถหาได้ในกรอกแบบที่หลากหลายของบริษัทต่าง ๆ เพื่อให้สามารถกรองในปริมาณที่แตกต่างกัน เช่น บริษัท Millipore, บริษัท Gelman

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

10. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuges) เครื่องปั่นเหวี่ยงจำเป็นต้องมีตัวควบคุมความเย็น เซลล์ที่ปั่นเหวี่ยงจะต้องมีฝาที่ปิดสนิท ความแรง 100g นั้นมากพอที่จะทำให้เซลล์ตกตะกอน ถ้าแรง g ที่สูงกว่านี้อาจเกิดการทำลายเซลล์ หากหลุดแตกในเครื่องปั่นแยกให้นำถ้วยปั่นทั้งหมดออกแล้วทำความสะอาดทันที

11. ระบบบัฟเฟอร์ (buffering systems) เซลล์ส่วนใหญ่ต้องการสภาวะความเป็นกรดเป็นด่างในช่วง pH 7.2 - 7.4 เซลล์ไฟโบรบลาสต์ (fibroblasts) ต้องการค่า pH ที่สูงขึ้น (7.4 - 7.7) ในขณะที่เซลล์ที่ถูกเปลี่ยนรูปแบบต่อเนื่องนั้นต้องการกรดมากกว่า (7.0 - 7.4) ระบบบัฟเฟอร์ที่ใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ( $\text{CO}_2$ ) สมดุลกับอาหารเลี้ยงเซลล์ในรูปของกรดคาร์บอนิกและโปรตอน ( $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} = \text{H}_2\text{CO}_3 = \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$ ) ปกติเราจะใช้ปริมาณ 5 - 10%  $\text{CO}_2$  ในบรรยากาศภายในตู้  $\text{CO}_2$  incubator ซึ่งเป็นต้นทุนต่ำปลอดสารพิษและยังให้ประโยชน์ทางเคมีอื่น ๆ กับเซลล์ นอกจากนี้ยังมีการใช้ chemical buffering ได้แก่ HEPES โดยมีความสามารถในการรักษาสภาวะของ



รูปที่ 1. ระยะการเจริญเติบโตของเซลล์ logarithmic (Log) growth phase : เซลล์มีการเจริญเติบโตอย่างสมบูรณ์ และมีการเพิ่มขึ้นของความหนาแน่นของเซลล์แบบทวีคูณ จำนวนประชากรของเซลล์นั้นถือว่ามียุคภาพมากที่สุดในระยะนี้ ดังนั้นจึงขอแนะนำให้ประเมินการทำงานของเซลล์และการเก็บรักษาเซลล์ในระยะนี้<sup>(5)</sup>

บัฟเฟอร์ที่เหนือกว่าในช่วงค่า pH 7.2 - 7.4 แต่ราคาค่อนข้างแพง ไม่ต้องการ CO<sub>2</sub> และอาจเป็นพิษต่อเซลล์ บางชนิดในการใช้ความเข้มข้นสูง ๆ ส่วนใหญ่ในอาหารเลี้ยงเซลล์สำเร็จรูป มีส่วนประกอบของ phenol red เพื่อใช้บ่งชี้สภาวะของความเป็นกรดเป็นด่าง โดยสีของอาหารเลี้ยงเซลล์ มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นสีเหลือง (acid) หรือสีม่วง (alkali)

### องค์ประกอบพื้นฐานของอาหารเลี้ยงเซลล์

1. **เกลืออนินทรีย์** (inorganic salts) เพื่อรักษาสมดุลออสโมติกของเซลล์ ควบคุมเยื่อหุ้มเซลล์ด้วยการให้โซเดียม โพแทสเซียม และแคลเซียมไอออน นอกจากนั้นยังมีความจำเป็นในเซลล์เมทริกซ์ที่ใช้สำหรับ cell attachment และเป็นโคแฟกเตอร์เอนไซม์
2. **ซีรัม** (serum) หนึ่งในองค์ประกอบที่สำคัญที่สุดของอาหารเลี้ยงเซลล์ ประกอบไปด้วยโปรตีนอัลบูมิน (albumins) ปัจจัยต่าง ๆ ที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์ ฮอร์โมน กรดอะมิโน กลูโคส สารยับยั้ง trypsin (trypsin inhibitors) และไขมัน ซีรัมที่ใช้บ่อยที่สุด คือ fetal bovine serum (FBS) โดยคุณสมบัติของ fetal calf/bovine serum (FCS & FBS) <sup>(6, 7)</sup> ได้แก่ ปัจจัยการเจริญเติบโตและฮอร์โมน ช่วยให้เซลล์ยึดเกาะได้ดี มีปัจจัยที่ช่วยจับและต่อต้านพิษ มีการใช้ FCS & FBS เพื่อเลี้ยงเซลล์มาเป็นเวลายาวนาน แต่ค่อนข้างมีราคาแพง โดยก่อนใช้จำเป็นต้องทำ heat inactivation (56°C นาน 30 นาที) หรือการฉายรังสีแกมมา เพื่อเป็นการทำลายคอมพลีเมนต์ อิมมูโนโกลบูลิน และไวรัสบางตัว ก่อนใช้เพื่อการเลี้ยงเซลล์
3. **วิตามิน** (vitamins) เป็นสารตั้งต้นสำหรับ co-factors จำนวนมาก ในกลุ่มของวิตามิน บี จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตและการเพิ่มจำนวนของเซลล์ โดยวิตามินทั่วไปที่พบในอาหารเลี้ยงเซลล์คือ riboflavin, thiamine และ biotin
4. **ยาปฏิชีวนะและยาต้านเชื้อรา** (antibiotics and antimycotics) <sup>(8, 9)</sup> ได้แก่ penicillin, streptomycin,

gentamicin, amphotericin B ช่วยลดความเสี่ยงของการปนเปื้อนจากแบคทีเรียและเชื้อรา แต่อาจทำให้เซลล์สามารถกลายเป็นเซลล์ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ หรือการเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างของเซลล์ (phenotype) ได้ ควรหลีกเลี่ยงการใส่ยาต้านจุลชีพโดยเฉพาะอย่างยิ่งในการเพาะเลี้ยงเซลล์ในระยะยาว

### ชนิดของเซลล์เพาะเลี้ยง (types of cell culture)

1. **เซลล์เพาะเลี้ยงปฐมภูมิ** (primary cell culture) <sup>(11)</sup> 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) <sup>(12, 13)</sup> เป็นเซลล์ที่มาจาก primary or secondary cell culture ที่มีคุณสมบัติเป็นอมตะ (immortal) อันเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงบางอย่าง (transformations) โดยส่วนใหญ่ที่พบบ่อยจะเป็นเซลล์มะเร็งหรือเซลล์ที่มีการเปลี่ยนแปลงด้วยไวรัส เช่น Epstein-Barr virus หนึ่งในเซลล์ที่ใช้บ่อยที่สุด คือ เซลล์รังไข่จีนหนูแฮมสเตอร์ (CHO) เซลล์ SH-SY-5Y เป็นเซลล์ที่ได้มาจากเซลล์ประสาทของมนุษย์



รูปที่ 2. การเพาะเลี้ยงเซลล์ปฐมภูมิ (primary cell culture) จากเซลล์ม้ามของหนู ซึ่งเป็นเซลล์ที่ได้มาจากการเก็บโดยตรงจากสัตว์ทดลอง <sup>(11)</sup>

#### 4. เซลล์ไลน์ต่อเนื่อง (continuous cell lines)<sup>(14, 15)</sup>

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)<sup>(16)</sup> เพื่อการศึกษาพื้นฐานของเซลล์ชีววิทยา ปฏิกริยาระหว่างสารก่อโรคและเซลล์ ผลกระทบของยาหรือยาที่ผลิตได้ใหม่ต่อเซลล์ (toxicity testing) การประเมินผลและการกระตุ้นอายุของเซลล์ การศึกษาทางโภชนาการ ฯลฯ

2. การวิจัยโรคมะเร็ง (cancer research)<sup>(17 - 18)</sup> สำหรับการศึกษาผลของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติต่อเซลล์มะเร็ง หน้าทีของสารเคมีต่าง ๆ ต่อเซลล์มะเร็ง ไวรัส หรือรังสี เพื่อเปลี่ยนแปลงเซลล์ที่เลี้ยงปกติไปเป็นเซลล์มะเร็ง ฯลฯ

3. ไวรัสวิทยา (virology) สำหรับศึกษาการเพาะเชื้อไวรัสเพื่อผลิตวัคซีนและใช้เพื่อศึกษาวงจรการติดเชื้อ

4. พันธุวิศวกรรม (genetic engineering)<sup>(19)</sup> การผลิตโปรตีนหรือแอนติบอดีเชิงพาณิชย์ หรือการผลิตไวรัสจำนวนมากเพื่อใช้ในการผลิตวัคซีนตัวอย่างเช่น polio, rabies, chicken pox, hepatitis B และ measles

5. การบำบัดด้วยยีน (gene therapy)<sup>(20)</sup> 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) <sup>(21)</sup> เป็นเทคนิคของการปฏิสนธิสังเคราะห์ โดยการนำเซลล์ไข่ ซึ่งถูกปฏิสนธิภายนอกของสตรี ซึ่งเป็นวิธีหลักในการแก้ไขปัญหาสตรีไม่สามารถมีบุตรได้ (infertility) โดยสรุปแล้ว กระบวนการนี้เกี่ยวข้องกับการควบคุมกระบวนการผลิตไข่ของสตรี ด้วยการนำไข่ออกมารอกร่างกายและปล่อยให้สุกปฏิสนธิกับไข่ภายในหลอดทดลอง หลังจากนั้นจึงถ่ายไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิแล้วหรือเอ็มบริโอไปยังมดลูกของสตรี เพื่อให้การตั้งครรภ์นั้นสมบูรณ์

### การประยุกต์ใช้ทางด้านการบริการโลหิต

การค้นพบหมู่โลหิตเริ่มต้นตั้งแต่ทศวรรษที่ 20 โดย Landsteiner ได้ค้นพบหมู่โลหิต A, B และ O ต่อมาอีก 2 ปีได้ค้นพบหมู่โลหิต AB หลังจากนั้นนักวิทยาศาสตร์ได้มีการศึกษาทางด้านหมู่โลหิตพบหมู่โลหิตจำนวนมากครั้งล่าสุดมีการรายงานในที่ประชุม ครั้งที่ 34 International Society of Blood Trans-fusion เมื่อปี พ.ศ. 2559 ที่ Dubai, United Arab Emirates <sup>(22)</sup> สามารถจัดแบ่งหมู่โลหิตได้ 36 ระบบ ซึ่งพบว่าบนเม็ดเลือดแดงมีแอนติเจน 346 ชนิด และแอนติเจนที่อยู่บนเกล็ดเลือดมี 33 ชนิด ในจำนวนนี้หมู่โลหิต ABO เป็นระบบที่สำคัญที่สุดรองลงมา คือ หมู่โลหิตระบบ Rh นอกจากระบบ ABO และ Rh แล้วยังมีหมู่โลหิตอีกกลุ่มที่มีแอนติบอดีเกิดขึ้น

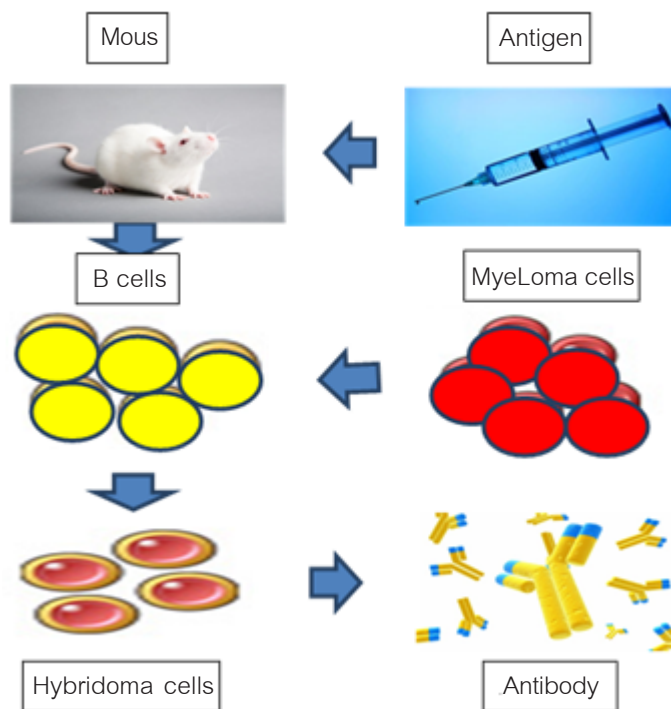
เองตามธรรมชาติ อาจทำให้เกิดปัญหาจากการที่เม็ดเลือดแดงมีอายุสั้นกว่าปกติ (short survival) หมู่โลหิตเหล่านี้ได้แก่ หมู่โลหิตระบบ Lewis, P1PK และ MNS ในปี พ.ศ. 2518 Kohler และ Milstein ได้ค้นพบวิธีการผลิตเซลล์สายพันธุ์ที่ผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะและสามารถเลี้ยงได้ในหลอดทดลองให้มีชีวิตยืนยาว โดยอาศัยหลักการ hybridization หรือผสมรวมกันของเซลล์ ซึ่งเป็นพื้นฐานของการผลิตเซลล์สายพันธุ์ของงานโมโนโคลนัลในปัจจุบัน ส่วนการผลิตแอนติบอดีต่อหมู่โลหิตด้วยวิธีโมโนโคลนัล เริ่มขึ้นในปี พ.ศ. 2523 โดย Voak D. และคณะ ผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดีต่อหมู่โลหิตเอ รวมทั้งในปี พ.ศ. 2530 Sacks S. และคณะ สามารถผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดีต่อหมู่โลหิตบีได้สำเร็จ ต่อมาได้มีการผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดีต่อหมู่โลหิตในระบบ ABO, ระบบ Rh และในระบบอื่นๆ อีกมากมาย ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทยจึงได้นำความรู้เรื่องการเพาะเลี้ยงเซลล์ และเทคโนโลยีเซลล์ลูกผสม (hybridoma technology) <sup>(23)</sup> นี้มาใช้ในการผลิตน้ำยาตรวจหมู่โลหิตชนิดต่าง ๆ ในปี พ.ศ. 2530 โดยแพทย์หญิง สร้อยสอางค์ พิกุลสด <sup>(24 - 25)</sup> เริ่มศึกษาค้นคว้าการผลิตน้ำยาตรวจหมู่โลหิตในระบบ ABO จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธีเทคโนโลยีเซลล์ลูกผสม จนประสบความสำเร็จได้ moAB anti-B ชนิดแรก ในปี พ.ศ. 2534 และเจ้าหน้าที่ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย รุ่นต่อมา ได้แก่ นางสาวทัศนีย์ สกฤตดำรงคพานิช นางรัชณี แก้วมงคล นายอุดม ตั้งต้อย <sup>(26)</sup> นางสาวริกา เมฆฉาย นางสาวกาญจนา เขียมอัมพร นายสมพงศ์ บุญให้ <sup>(27)</sup> 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 ทำให้เกิดประโยชน์ด้านการธนาคารเลือดเป็นอย่างมาก ช่วยลดการนำเข้าน้ำยาตรวจหมู่โลหิตจากต่างประเทศปีละมากกว่าสิบล้านบาท และยังช่วยเพิ่มรายได้ให้กับสภากาชาดไทยไม่ต่ำกว่าปีละสิบล้านบาทอีกด้วย ในอนาคต ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

ยังใช้หลักการเทคโนโลยีเซลล์ลูกผสม เพื่อค้นหาเซลล์สายพันธุ์ที่สร้างแอนติบอดีต่อหมู่โลหิตชนิดหายากที่ยังขาดแคลน และเป็นที่ต้องการของผู้ปฏิบัติงานทางด้านงานธนาคารเลือดต่อไป เช่น moAB anti-IgG, moAB anti-Le<sup>a</sup>, moAB anti-Le<sup>b</sup> 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 จึงช่วยให้มีโอกาสประสบความสำเร็จในงานวิจัยมากขึ้น เช่นเดียวกับศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ที่ได้นำความรู้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์นี้มาพัฒนาและประยุกต์ใช้ในงานบริการโลหิต จนประสบความสำเร็จและก่อให้เกิดประโยชน์อย่างมาก



รูปที่ 3. เทคโนโลยีเซลล์ลูกผสม (hybridoma technology) เพื่อผลิตโปรตีนเชิงพาณิชย์หรือการผลิตแอนติบอดี <sup>(27)</sup>

## 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, Tannirandom 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. สร้อยสง่างค์ พิกุลสด, รัชนี พลเทียร, ประภาศรี แก้วกิติโรจน์, กัญญ์ชลา อุทิศ, อุดม ตั้งต้อย, จินตนา ทับรอด. การผลิตน้ำยาตรวจหมู่โลหิต โมโนโคลนัลแอนติ-เอ โดยใช้เทคนิคไฮบริโดมา ของศูนย์บริการโลหิตฯ. *วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต* 2535;2:373-81.
25. สร้อยสง่างค์ พิกุลสด, รัชนีพลเทียร, กัญญ์ชลา อุทิศ, ประภาศรี แก้วกิติโรจน์, อุดม ตั้งต้อย, จินตนา ทับรอด. การผลิตน้ำยาตรวจหมู่โลหิตของศูนย์ บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย โดยใช้ ไฮบริโดมาเทคนิค: II การศึกษาประสิทธิภาพ ของน้ำยาตรวจหมู่โลหิตแอนติ-บีชนิดโมโน โคลนัลแอนติบอดีเปรียบเทียบกับน้ำยาโมโน โคลนัลของต่างประเทศและน้ำยาชนิดโพลีโคลนัล ของศูนย์ฯ. *วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์ บริการโลหิต* 2535;2:295-302.
26. อุดม ตั้งต้อย, สุวิทย์โพธิ์นิมิตร, อัจฉรา ศิริพงษ์ษานุสิทธิ์, สาริกา เมฆฉาย, ทศนีย์ สกุลดำรงค์พานิช. การพัฒนาการผลิตน้ำยาตรวจหมู่โลหิต โมโน โคลนัล แอนติ-เอ ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย. *วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์ บริการโลหิต* 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.