



UNIVERSITI PUTRA MALAYSIA

**PENGHASILAN SEL HIBRIDOMA MENGGUNAKAN
TEKNIK ELEKTRIFUSION**

MUHAJIR BIN HAMID

FSMB 1995 3

**PENGHASILAN SEL HIBRIDOMA MENGGUNAKAN
TEKNIK ELEKTROFUSION**

Oleh

MUHAJER BIN HAMID

Tesis dikemukakan kepada Universiti Pertanian
Malaysia Sebagai Memenuhi Syarat untuk Mendapat
Ijazah Master Sains di Fakulti Sains Makanan dan
Bioteknologi, Universiti Pertanian Malaysia

1995



PENGHARGAAN

Segala pujian bagi Allah s.w.t, tuhan semesta alam yang telah memberi kekuatan untuk menyempurnakan penyelidikan dan tesis ini.

Ribuan terima kasih kepada Dr. Abdul Manaf Ali, Prof. Madya Dr. Khatijah Mohd Yusoff dan Dr. Suhaimi Napis di atas segala bimbingan, cadangan dan tunjuk ajar yang telah diberikan. Tidak lupa juga untuk Prof. Madya Dr. Rahmah Mohammed iaitu pemeriksa luar kerana memberi kerjasama yang sepenuhnya dalam menjayakan pengajian ini.

Ucapan terima kasih juga kepada semua pegawai dan pembantu penyelidik di Fakulti Sains Makanan dan Bioteknologi yang telah banyak membantu kerja-kerja penyelidikan.

Buat ibu, ayah dan isteri yang dikasihi, terima kasih di atas segala doa dan dorongan yang diberikan. Semoga Allah memberkati segala usaha kalian selama ini.

ISI KANDUNGAN

	Muka surat
PENGHARGAAN	ii
SENARAI JADUAL	vii
SENARAI RAJAH	ix
SENARAI GAMBAR	xi
SENARAI SINGKATAN	xii
ABSTRAK	xiii
ABSTRACT	xv
BAB	
1 PENGENALAN	1
2 SOROTAN LITERATUR	5
Teknologi Hibridoma	5
Teknik Pelakuran Secara Biologikal	6
Mekanisme Pelakuran	7
Teknik Pelakuran Secara Kimia	10
Mekanisme Pelakuran Kimia.....	12
Aglutinasi	12
Pelakuran Membran	13
Pengembangan Sel	14
Teknik Pelakuran Secara Elektrofusion	14
Mekanisme Pelakuran Elektrofusion.....	15



Pembentukan Penjajaran Sel	16
Pelakuran Membran Sel.....	20
Pelakuran Membran Nukleus	24
Faktor yang mempengaruhi Proses Elektrofusi	26
Medan Dielektroforesis	26
Spesifikasi Medan Arus Terus	27
Ciri Membran Sel	28
Media Pelakuran	29
Pra-perawatan Enzim	30
Suhu	31
Instrumen untuk Proses Elektrofusi	32
Generator Isyarat Medan Arus Elektrik	32
Turus Pelakuran	34
Applikasi Elektrofusi Dalam Penyelidikan Masa Kini	34
Penghasilan Antibodi dan Sistem Pertahanan Badan	36
Penghasilan Antibodi Monoklon	39
Applikasi Antibodi Monoklon	42
Perihal Antigen Yang Digunakan	44
3 BAHAN DAN KAEDAH	47
Penyediaan Kultura Sel	47
Kultura Sel Miloma	47
Kultura Sel Limfosit	47



Penyediaan Media	48
Media Pengkulturan	48
Media Pelakuran	49
Keperluan Sistem Pelakuran	49
Sistem Pembekal Isyarat Elektrik	50
Turus Pelakuran	50
Agen Biologi	51
Kajian Kemandirian Sel	52
Penentuan Peratus Kemandirian dan Kepekatan Sel	52
Faktor Tekanan Osmotik Media Pelakuran	53
Faktor Medan Elektrik Arus Ulang Alik	54
Faktor Medan Elektrik Arus Terus	54
Penentuan Parameter Untuk Penjajaran Sel	55
Penentuan Parameter Untuk Proses Pelakuran Sel	55
Penyediaan Antibodi Monoklon Terhadap Virus Sampar Ayam	57
Pengimunan	57
Penyediaan Ampaian Sel Makrofaj	58
Pelakuran Sel	59
Pengasaan Antibodi	60
Pengklonan Sel Hibridoma	61

Pengkelasan Imunoglobulin	63
Analisis Immunoblot	64
4 KEPUTUSAN DAN PERBINCANGAN	68
Kajian Kesan Osmolariti Terhadap Kemandirian Sel	68
Kesan Osmolariti Terhadap Kemandirian Sel Limfosit	69
Kesan Osmolariti Keatas Kemandirian Sel Miloma	73
Kesan Medan Arus Elektrik Terhadap Kemandirian dan Pelakuran Sel	77
Kesan Medan Elektrik Arus Ulang Alik	77
Penjajaran Sel	83
Kesan Medan Arus Terus	88
Kesan Medan Arus Terus Dalam Penghasilan Hibridoma	94
Kesan Osmotik Dalam Penghasilan Hibridoma	98
Analisis Titer Antiserum Imunasasi	99
Penghasilan Sel Hibridoma Secara Elektrofusien	103
Pengklonan Hibridoma Dan Pengkelasan Antibodi Monoklon	110
Analisis Immunoblot	116
5 KESIMPULAN	119
RUJUKAN	122
LAMPIRAN	138
VITA	160



SENARAI JADUAL

Jadual		muka surat
1	Ciri-ciri Protin Struktur Bagi Virus Sampar Ayam	46
2	Parameter-parameter Pelakuran Yang Dipilih Untuk Penghasilan Hibridoma ...	106
3	Klon-klon Hibridoma dan Pengkelasan Antibodi Monoklon	114
4	Ketumpatan Optik Antibodi Monoklon Dalam Kajian Tindakbalas Silang	115
5	Amaun Inositol dan Glukosa Yang Diperlukan Untuk Mencapai Osmolariti Tertentu	138
6	Kemandirian Sel Limfosit Selepas Didedahkan Dalam Media Inositol	139
7	Kemandirian Sel Limfosit Selepas Didedahkan Dalam Media Glukosa	140
8	Peratus Kemandirian Sel Sp2/0-Ag14 Selepas Didedahkan Dalam Media Inositol	141
9	Peratus Kemandirian Sel Sp2/0-Ag14 Selepas Didedahkan Dalam Media Glukosa	142
10	Peratus Pembentukan Penjajaran Sel Selepas Pendedahan Arus Ulang Alik	143
11	Peratus Kemandirian Sel Selepas Didedahkan Dalam Arus Ulang Alik Pada Kekuatan 350 V/cm Dalam Tempoh Tertentu	144
12	Peratus Kemandirian Sel Selepas Didedahkan Dalam Arus Terus (D.C.)	145
13	Peratus Kemandirian Sel Dalam Arus Terus Pada Kekuatan 3 kV/cm Dalam Tempoh Masa Tertentu	146



14	Peratus Kemandirian Sel Selepas Didedahkan Pada Arus Terus Dengan Kekuatan 3 kV/cm Dalam bilangan Denyutan Yang Berbeza	147
15	Peratus Kemandirian Sel Selepas Didedahkan Dalam Arus Arus Ulang Alik Pada Kekuatan Voltan Yang Berbeza Selama 2 Minit	148
16	Peratus Kemandirian Sel Selepas Didedahkan Dalam Arus Ulang Alik Dengan Kekuatan Voltan 350 V/cm Pada Nilai Frekuensi Yang Berbeza	149
17	Titer Mencit Balb/C Selepas Diimmunisasi Dengan Virus Newcastle Disease	150
18	Peratus Kemandirian Sel Sp2/0-Ag14 Selepas Dikulturkan Dalam Media HAT Yang Berbeza Kepekatan	151



SENARAI RAJAH

Rajah		muka surat
1	Fenomena Sel Yang Didedahkan Dalam Medan Arus Elektrik Pada Nilai Tertentu	19
2	Gambarajah Skema Pembentukan Liang Pada Membran Sel Bila Didedahkan dalam Medan Arus Elektrik	22
3	Penyusunan Semula Membran Sel Selepas Didedahkan Dalam Medan Elektrik	24
4	Struktur Molekul IgG Yang Mengandungi 4 Rantai Polipeptida	38
5	Tapak Jalan Metabolik Semasa Pemilihan Hibridoma Dalam Media Yang Mengandungi Hipoxantina, Aminopterin dan Timidina	41
6	Prosedur Asas Untuk Penghasilan Sel Hibridoma	43
7	Peratus Kemandirian Relatif Sel Limfosit Selepas Didedahkan Di Dalam Media Pelakuran Inositol	70
8	Peratus Kemandirian Relatif Sel Limfosit Selepas Didedahkan Di Dalam Media Pelakuran Glukosa	71
9	Peratus Kemandirian Relatif Sel Sp2/0-Ag14 Selepas Didedahkan Dalam Media Pelakuran Inositol	74
10	Peratus Kemandirian Relatif Sel Sp2/0-Ag14 Selepas Didedahkan Dalam Media Pelakuran Glukosa	75
11	Peratus Kemandirian Relatif Sel Sp2/0-Ag14 dan Limfosit Selepas Didedahkan Pada Arus Ulang Alik Dalam Tempoh Berbeza.....	78



12	Peratus Kemandirian Relatif Sel Sp2/0-Ag14 dan Limfosit Selepas Didedahkan Pada Arus Ulang Alik Pada Nilai Voltan Yang Berbeza	80
13	Peratus Kemandirian Relatif Sel Sp2/0-Ag14 dan Limfosit Selepas Didedahkan Pada Arus Ulang Alik Pada Nilai Frekuensi Berbeza	82
14	Peratus Pembentukan Penjajaran Sel Sp2/0-Ag14 dan Limfosit Pada Nilai Voltan Yang Berbeza	86
15	Peratus Kemandirian Relatif Sel Sp2/0-Ag14 dan Limfosit Selepas Didedahkan Pada Arus Terus Dalam Tempoh Masa Berbeza	89
16	Peratus Kemandirian Relatif Sel Sp2/0-Ag14 dan Limfosit Selepas Didedahkan Pada Arus Terus Pada Kekuatan Voltan Berbeza	92
17	Peratus Kemandirian Relatif Sel Sp2/0-Ag14 dan Limfosit Selepas Didedahkan Pada Arus Terus Pada Bilangan Denyutan Berbeza	93
18	Peratus Koloni Hibridoma/ Telaga Yang Terbentuk Hasil Proses Pelakuran Pada Nilai Voltan Arus Terus Yang Berbeza	95
19	Peratus Pembentukan Koloni Hibridoma Melalui Cara Perawatan Media Pelakuran Yang Berbeza Osmolariti	97
20	Peratus Pembentukan Koloni Hibridoma / Telaga Yang terhasil Melalui Penggunaan Media Pelakuran Yang Berbeza	100
21	Titer Antiserum Yang Didapati Dari Serum Mencit Yang Diimmunisasi Dengan Virus Sampar Ayam	102
22	Peratus Kemandirian Relatif Sel Sp2/0-Ag14 Selepas 5 Hari Dikultur Dalam Media Yang Mengandungi Aminopterin Pada Kepekatan Berbeza	106



SENARAI GAMBAR

Gambar		muka surat
1	Gambar Pada Pembesaran 40 kali Menunjukkan Penjajaran Sel Sp2/0- Ag14 Selepas Didedahkan Pada Arus Ulang Alik	84
2	Gambar Pada Pembesaran 40 Kali Menunjukkan Penjajaran Sel Limfosit Selepas Didedahkan Dalam Arus Ulang Alik	85
3	Pembentukan Koloni Selepas 10 Hari Menjalani Proses Pelakuran	109
4	Perkembangan Sel Hibridoma Selepas Menjalani Pengklonan Pencairan Terhadap.....	112
5	Analisa Immunoblot Pada Membran Nitroselulosa	117
6	Alatradas Osmometer Jenis Osmomat Ø30-D Yang Digunakan Untuk Mengukur Nilai Osmolariti Media Pelakuran	152
7	Alat Radas Sistem Pembekal Isyarat Arus Elektrik Jenis BIOJET CF	153
8	Turus Pelakuran Terbuka Yang Digunakan Untuk Melihat Proses Penjajaran dan Pelakuran Sel	154
9	Turus Pelakuran Helikal	155

SENARAI SINGKATAN

PEG	-	Polietilina Glikol.
DMSO	-	Dimetil Sulfida
μM	-	mikrometer
V/cm	-	volt per sentimeter
kV/cm	-	kilovolt per sentimeter
kHz	-	kilohertz
mHz	-	megahertz
mV	-	milivolt
psm	-	pusingan per minit
μl	-	mikroliter
μmolar	-	mikromolar
mOs/kg	-	miliosmolar per kilogram
HAT	-	Hipoxantina, Aminopterin, Timidina
HT	-	Hipoxantina, Timidina
μg	-	mikrogram
ATP	-	Adenosina trifosfat
NDV	-	Virus Newcastle Disease



Abstrak tesis yang dikemukakan kepada Senat Universiti Pertanian Malaysia sebagai memenuhi syarat untuk mendapat Ijazah Master Sains.

**PENGHASILAN SEL HIBRIDOMA MENGGUNAKAN
TEKNIK ELEKTROFUSION**

oleh

MUHAJIR BIN HAMID
1995

Pengerusi : Dr. Abdul Manaf Bin Ali

Fakulti : Sains Makanan dan Bioteknologi.

Pelakuran sel-sel somatik untuk menghasilkan sel hibrid adalah teknik yang telah meluas digunakan dalam kebanyakan bidang biologi sel. Elektrofusion adalah di antara teknik yang digunakan untuk tujuan pelakuran sel. Fenomena pemecahan membran secara berbalik apabila diaruh oleh arus elektrik adalah faktor utama berlakunya pelakuran sel. Parameter yang sesuai seperti kekuatan medan arus elektrik, komposisi media pelakuran, jenis sel dan cara pengendalian perlu dikaji selidik sebelum melakukan proses pelakuran.

Kajian dibuat untuk memilih beberapa parameter yang sesuai dalam penghasilan sel hibridoma melalui pelakuran sel Sp2/-Ag14 dengan sel limfosit mencit yang diimmunisasi dengan Virus Sampar Ayam (NDV) strain AF2240. Kajian kemandirian menunjukkan osmolariti media pelakuran, kekuatan dan masa pendedahan medan elektrik adalah parameter yang memberi kesan kepada kemandirian



sel. Media pelakuran inositol didapati lebih baik sebagai media pelakuran berbanding media pelakuran glukosa berdasarkan kepada peratus penghasilan sel hibridoma dan kemampuan dalam mengekalkan tahap kemandirian sel. Arus ulang alik pada voltan 350 v/cm dan frekuensi 2 MHz didapati sesuai untuk proses penjajaran sel limfosit dan Sp2/0-Ag14. Arus terus pada voltan 3 kV/cm dengan tiga kali denyutan pada tempoh masa 10 mikrosaat bagi setiap denyutan adalah berkesan untuk mengaruh pelakuran sel. Perawatan dengan media hipo-osmolar 75 mOs/kg juga dapat meninggikan kemungkinan untuk berlakunya pelakuran. Teknik elektrofusion juga didapati sesuai digunakan jika kepekatan sel yang digunakan adalah kurang daripada 10^6 /ml. Tetapi jika sel yang digunakan adalah pada kepekatan tinggi iaitu melebihi 10^7 /ml, teknik PEG adalah lebih sesuai kerana lebih murah dan mudah.

Dalam penghasilan antibodi monoklon, teknik elektrofusion telah berjaya menghasilkan beberapa klon sel hibridoma yang merembeskan antibodi monoklon terhadap virus Sampar Ayam (NDV). Pengelasan antibodi juga telah dibuat dan didapati kebanyakan klon merembeskan antibodi kelas IgG yang mempunyai rantai ringan jenis lambda. Analisis imunoblot menunjukkan antibodi monoklon bertindakbalas dengan protein antigen subunit F₂.



Abstract of thesis submitted to the Senate of Universiti Pertanian Malaysia in fulfilment of the requirements for the degree of Master of Science.

**PRODUCTION OF HYBRIDOMA USING
ELECTROFUSION TECHNIQUE**

BY

**MUHAJIR BIN HAMID
1995**

Chairman : Dr. Abdul Manaf Ali

Faculty : Food Science and Biotechnology.

The fusion of somatic cells to produce hybrids is a technique that is widely used in many areas of cell biology. The electrofusion technique is an alternative way that can be used for cell fusion. In electrofusion, reversible membrane breakdown of the cell membrane is a key step. The optimum conditions such as field strength, fusion media composition, cell type and operation techniques have to be carefully studied.

In this study, various conditions for obtaining hybrids of the Sp2-0 Ag14 and murine lymphocytes immunized with Newcastle Disease Virus (NDV) Strain AF2240 by electrofusion technique were investigated. This study showed that field strength, time exposure and osmolarity influenced the viability of the cells.



Based on the percentage of hybridoma cells produced and the ability in maintaining the level of viability, inositol was a better media compared with glucose as a fusion media. An alternate current field of 350 V/cm with 2 MHz frequency was the optimum condition for the alignment of Sp2/0-Ag14 and Lymphocytes cells. A direct current field at 3 kV/cm of 3 time pulses was used to form membrane pores and also to induce membrane fusion. Treatment with hypo osmolar media also enhanced the yield. Electrofusion technique more efficient if the concentration of cells used are below than 10^6 /ml. However, if cells concentration are more than 10^7 /ml, PEG technique more preferable because it is more easy and inexpensive.

The electrofusion technique has succeeded in producing a few hybridoma clone cells which secreted monoclonal antibodies against Newcastle Disease Virus. Most of the clones secreted IgG₁. Immunoblotting analysis showed that the monoclonal antibodies reacted with protein antigen of the F₂ subunit.



BAB 1

PENGENALAN

Pembentukan sejenis jujukan sel hibrid yang berkeupayaan untuk menghasilkan antibodi spesifik terhadap sesuatu antigen pertama kali diperkenalkan oleh Kohler dan Milstein (1975). Teknik ini adalah hasil daripada percantuman antara sel miloma dengan sel limfosit dari haiwan terimun. Sel hibrid yang terhasil dikenali sebagai sel hibridoma yang mempunyai sifat seperti sel miloma yang dapat hidup berterusan secara *in vitro* dan sifat sel limfosit yang merembeskan antibodi. Ianya berupaya untuk menghasilkan antibodi secara *in vitro*. Antibodi yang dihasilkan oleh sesuatu klon hibridoma juga dikenali sebagai antibodi monoklon. Antibodi ini mempunyai kelebihan kerana sifatnya yang monospesifik iaitu ia bertindakbalas terhadap satu penentu antigenik sahaja. Disebabkan ciri ini, antibodi monoklon menjadi semakin berguna dalam ujian serologi khususnya dalam bidang perubatan, diagnosis dan pertanian.

Sel miloma adalah sel yang telah mengalami transformasi dan berkebolehan untuk hidup berterusan secara *in vitro*. Ianya penting dalam penghasilan sel hibridoma sebagai sel pasangan untuk menerbitkan sifat tak mortal kepada sel hibridoma yang terhasil.



Kebanyakan sel miloma adalah sel mutan dan tidak menghasilkan enzim hipoxantina guanina fosforibosil transferase (HPRT). Ciri ini membantu dalam proses penyaringan sel hibridoma dalam media pemilih.

Sel limfosit B adalah sel yang berfungsi sebagai sel penghasil antibodi. Sel ini boleh didapati daripada tisu limpa, periferal atau nodul limfa. Kajian tentang interaksi sel-sel yang terlibat dalam proses transformasi sel limfosit untuk menghasilkan sel limfosit yang merembeskan antibodi telah banyak dijalankan (Cooper & Lawton, 1974; Sell, 1987).

Proses percantuman atau pelakuran antara dua sel ini boleh dilakukan samada melalui teknik biologi, kimia atau fizik. Melalui teknik biologi, virus Sendai sering digunakan sebagai agen pelakuran manakala dalam teknik secara kimia pula, polietilena glikol (PEG) biasa digunakan sebagai agen pelakuran. Kedua-dua teknik konvensional ini telah lama dikaji dan dipraktikkan dalam penghasilan hibridoma. Namun penggunaan teknik ini masih terhad dan tidak banyak manipulasi dapat dilakukan untuk meningkatkan kualiti penghasilan sel hibridoma (Zimmermann, 1986).

Satu cara untuk mengatasi faktor penghad ini adalah melalui teknik elektrofusion. Teknik ini berjaya memberi pilihan kepada

para pengkaji biologi sel untuk meneruskan kajian mereka. Elektrofusi adalah satu teknik pelakuran secara fizik dan telah diperkenalkan pada awal tahun 1980an (Senda *et al.*, 1979; Zimmermann & Scheurich, 1981). Secara umumnya, mekanisme elektrofusi boleh dibahagikan kepada dua proses. Pertama, sel didedahkan kepada arus elektrik ulang-alik untuk merangsang pembentukan penjajaran sel. Kedua, bila sel-sel berada dalam keadaan bersentuhan dan membentuk rangkaian, denyutan arus terus dikenakan untuk merangsang pembentukan liang pada membran sel. Pembentukan liang ini akan merangsang percantuman membran sel yang bersentuhan melalui proses penyusunan semula membran.

Kejayaan teknik elektrofusi amat bergantung kepada faktor biologi dan fizikal. Faktor biologi termasuklah jenis sel, media pelakuran, pra-perawatan dan media kultur manakala faktor fizikal adalah voltan arus elektrik, konfigurasi elektrod dan suhu. Sehingga kini, teknik ini masih diperingkat kajian lanjut dan belum berkemampuan untuk mengambil alih teknik kimia dan biologi secara keseluruhan. Walau bagaimanapun elektrofusi mempunyai potensi cerah tidak hanya dalam kajian pelakuran sel tetapi juga dalam kajian membran dan genetik. Antara kelebihan elektrofusi adalah ianya boleh digunakan untuk kebanyakan jenis sel dan proses boleh dikawal dan dimanipulasikan bergantung

kepada jenis sel. Proses pelakuran juga boleh dilihat dibawah mikroskop dan bebas daripada sebarang bahan kimia toksik.

Sungguhpun elektrofusion telah digunakan secara meluas dalam kajian penghibridan somatik, tahap optimum dan permasalahan dalam pengendalian teknik ini masih belum dikaji secara mendalam.

Tujuan kajian ini adalah untuk melihat sejauh mana saling tindakbalas antara sistem biologi dengan sifat medan elektrik memberi kesan kepada fisio-struktur sel seterusnya mencari satu parameter yang optimum untuk melakukan pelakuran secara elektrofusion. Hasil daripada kajian ini akan dapat dibandingkan dengan kaedah pelakuran yang lain serta mengenalpasti permasalahan yang timbul semasa menjalankan proses elektrofusion. Kajian ini juga diharapkan dapat menghasilkan sel hibridoma yang menghasilkan antibodi monoklon terhadap Virus Sampar Ayam (NDV) melalui teknik elektrofusion. Dengan terhasilnya hibridoma melalui teknik elektrofusion ini, diharap ianya dapat dijadikan model bagi membuka jalan kepada penghasilan antibodi monoklon yang lain.

BAB 2

SOROTAN LITERATUR

Teknologi Hibridoma

Teknologi penghibridan sel adalah salah satu teknik yang sering digunakan dalam kajian biologi sel. Teknik ini pertama kali diperkenalkan pada tahun 1909 oleh Kuster (Zimmermann, 1989). Pada awal tahun 1970an, teknologi penghibridan telah berkembang bukan sahaja dalam kajian sel mamalia tetapi meliputi sel bakteria (Gabor & Hotchkiss, 1979), fungi, yis (Noda *et al.*, 1990), protoplast tumbuhan (Kao & Michayluk, 1974) dan blastomer (Kubiak & Tarkowski, 1985). Sehingga kini, pelbagai teknik penghibridan sel telah digunakan seperti teknik kimia (Gefter *et al.*, 1977), biologi (Poste, 1970), medan arus elektrik (Schmitt *et al.*, 1989), dan manipulasi berion (Dahl *et al.*, 1978).

Keputusan teknik penghibridan sel mula mendapat perhatian para pengkaji apabila Kohler dan Milstein (1975) telah berjaya menghasilkan jujukan sel yang merembeskan antibodi spesifik terhadap sel darah merah biri-biri. Jujukan sel tersebut dikenali sebagai sel hibridoma yang dihasilkan daripada pelakuran sel miloma dengan sel limpa mencit yang diimmunisasikan terlebih dahulu dengan sel darah merah biri-biri.



Kini teknik pelakuran sel diperkembangkan bukan sahaja untuk penghasilan monoklon antibodi tetapi untuk proses manipulasi genetik (Bates, 1985) dan kajian membran (Dimitrov & Jain, 1984).

Teknik Pelakuran Secara Biologikal.

Teknik pelakuran secara biologi telah bermula pada awal 1960 an. Pada tahun 1962, Okada telah memperkenalkan penggunaan virus Sendai dalam penghibridan ampaiian sel Tumor Ehrlich untuk menghasilkan sel polinuklear secara *in vitro*. Henry dan Watkins (1965) telah menggunakan virus Sendai ternyahaktif bagi melakurkan sel HeLa dengan sel tumor Ehrlich untuk menghasilkan sel yang bersifat heterokarion. Kajian mereka mendapati pertambahan kepekatan virus Sendai nyahaktif akan mengurangkan peratus pelakuran sel. Peratus pelakuran melalui perantaraan virus aktif juga didapati lebih rendah berbanding dengan virus tak aktif. Seterusnya, mereka mencadangkan peratus pengurangan ini berlaku kerana kesan perencatan atau disebut sebagai kesan toksik tidak spesifik.

Harter dan Choppin (1967) pula melaporkan virus Visna juga berkebolehan dalam mengaruh pelakuran sel BHK2-F. Dalam kajian mereka, virus Visna yang telah dinyahaktifkan melalui pendedahan kepada sinaran ultra lembayung selama 5 minit masih berupaya mengaruh pelakuran sel walaupun jangkitan virus menurun lebih 99%. Walau bagaimanapun peratus pelakuran menurun jika proses

nyabaktif virus dilanjutkan selama 15 menit. Kajian mereka juga membuktikan virus aktif tidak diperlukan dalam pelakuran sel. Terdapat banyak lagi virus yang dilaporkan berkeupayaan untuk mengaruh pelakuran sel seperti virus Measles, Herpes, Vaccinia, Smallpox, Mouse Hepatitis, Mumps dan Influenza (Harter dan Choppin, 1962).

Pelakuran melalui perantaraan virus tak aktif juga menjadi pelopor kepada perkembangan teknologi hibridoma. Pada tahun 1975, Kohler dan Milstein telah berjaya menghasilkan hibridoma yang merembeskan antibodi melalui perantaraan virus Sendai tak aktif. Kini, teknik pelakuran melalui aruhan virus tidak lagi menjadi teknik yang popular dikalangan penyelidik. Ini disebabkan teknik kimia dan fizik telah mengambil alih teknologi tersebut. Penggunaan virus sebagai agen pelakuran juga terhad, rumit dan masalah kontaminasi virus (Poste *et al.*, 1973, Roos *et al.*, 1983).

Mekanisme Pelakuran

Sungguhpun terdapat banyak bukti yang menyatakan bahawa virus adalah agen biologi yang dapat mengaruh pelakuran sel, tetapi mekanisme sebenar pelakuran adalah sesuatu yang kompleks. (Knutton dan Pasternak, 1979). Okada (1962) mencadangkan satu hipotesis bahawa pelakuran sel terjadi akibat perubahan membran sel yang bersentuhan. Walau bagaimanapun perkaitan diantara

proses pelakuran oleh virus dan fagositosis virus masih tidak diketahui.

Harris dan Schneeberger (1966) menggunakan elektron mikroskop mengkaji mekanisme pelakuran keatas beberapa spesies virus Sendai tetapi peranan sebenar virus dalam proses pelakuran masih tidak jelas. Ini mungkin disebabkan peringkat awal tindakbalas virus dengan sel tidak dapat diperhatikan (Hosaka & Koshi, 1968). Penggunaan mikroskop elektron dalam kajian mekanisme dilanjutkan oleh Hosaka dan Koshi (1968). Pelakuran sel tumor Ehrlich melalui perantaraan virus Sendai digunakan dalam kajian mereka. Melalui pemerhatian mereka, proses pelakuran sel berlaku dalam turutan seperti berikut:

a) Aglutinasi sel tumor .

Proses aglutinasi dilakukan melalui penjerapan virus dan mengaruh pembentukan agregasi sel. Proses ini didapati tidak mengaruh pelakuran sel.

b) Perlekatan diantara membran sel sejiran pada suhu 37°C.

c) Pemecahan mikro pada membran sel dan pembentukan jambatan sitoplasmik.

d) Pembesaran jambatan sitoplasmik.

e) Percantuman dua sel membentuk sel hibrid.

Dalam aspek kajian morfologi, didapati sampul virus terlibat dalam mekanisme tindakbalas pelekatan membran yang bersebelahan.