บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และวิธีการ

วิธีดำเนินการวิจัยแบ่งเป็น 3 การทดลอง ดังนี้

1. ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำยาสูตรต่าง ๆ ที่มีผลในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส

2. ศึกษาความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีต่อน้ำเชื้อ

3. ศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิในขั้นตอนการแช่แข็งและอัตราการเพิ่มอุณหภูมิในการละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง เพื่อใช้ในการผสมเทียม

3.1 การลดอุณหภูมิก่อนการแช่แข็ง (freezing rates)

3.2 การละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง (thawing temperature)

3.3 การทดสอบการปฏิสนธิ (fertilization rates)

1. การทดลองที่ 1 ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำยาสูตรต่าง ๆ ที่มีผลในการเก็บรักษาน้ำเชื้อในน้ำแข็งที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส

1.1 การเตรียมน้ำยา (extender) ชั่งสารเคมีตามส่วนประกอบของแต่จะสูตรน้ำยาดังแสดงไว้ในตารางที่ 1 วัด pH ของน้ำยาด้วยเครื่อง pH meter และปรับ pH ของน้ำยาให้เป็นกลาง (7.0) ถ้าเป็นกรดปรับโดยเติม 1 N NaOH ถ้าเป็นด่างปรับโดยเติม 1 N HCl นำน้ำยาที่เตรียมแล้วใส่ขวดแก้วที่มีฝาปิดเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส

1.2 การเตรียมน้ำเชื้อ การเตรียมน้ำเชื้อเลือกพ่อพันธุ์ปลาสวายที่แข็งแรงสมบูรณ์ไม่เป็นโรค มีอายุประมาณ 2-3 ปี มีน้ำหนักประมาณ 2 กก. ขึ้นไปจำนวน 3-5 ตัว โดยทั่วไปในช่วงฤดูผสมพันธุ์ (เม.ย. - ต.ค.) พ่อพันธุ์ปลาจะมีน้ำเชื้อดี (ดเชนทร เฉลิมวัฒน์, ม.ป.ป.) แต่ถ้าต้องการรวบรวมน้ำเชื้อให้ได้มาก ๆ ควรนำมาฉีดฮอร์โมนกระตุ้นการพัฒนาของน้ำเชื้อโดยใช้ฮอร์โมน LHRHa ที่มีชื่อการค้าว่า Suprefect ในอัตรา 15 ไมโครกรัม(µg.)ต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม(kg.) ร่วมกับ domperidone (ชื่อทางการค้า Motilium) 5 มิลลิกรัม(mg.)ต่อน้ำหนักปลา 1 kg. โดยฉีดเข้ากล้ามเนื้อใต้ครีบหลัง เหนือเส้นข้างลำตัวค่อนมาทางด้านหน้าของครีบหลังเล็กน้อย แล้วนำพ่อพันธุ์ไปพักไว้ในบ่อเพิ่มออกซิเจน หลังจากนั้น 4-8 ชั่วโมง จึงนำมารีดน้ำเชื้อใส่ลงในภาชนะที่สะอาด

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

และแห้ง รีดน้ำเชื้อปลาทั้งหมดรวมกัน และควรรีดอย่างระมัดระวัง ไม่ให้มีเลือด ปัสสาวะหรือน้ำปนเปื้อนน้ำเชื้อได้

1.3 การตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ

1.3.1 ตรวจเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิ ด้วยกล้องจุลทรรศน์ (40x) ซึ่งเป็นการตรวจสอบน้ำเชื้อก่อนหรือหลังการเก็บรักษา โดยหยดน้ำกลั่น 20 ไมโครลิตร(µl.) ลงบนสไลด์ หยดน้ำเชื้อ (~ 1 µl.) ลงบนสไลด์ใกล้หยดน้ำ ใช้กระจกปิดสไลด์ปิดกระจายน้ำเชื้อ ประเมินอสุจิที่เคลื่อนไหวเป็นเปอร์เซ็นต์ โดยให้ 100 เปอร์เซ็นต์ สำหรับอสุจิที่เคลื่อนไหวทั้งหมดภายใน field ที่มองผ่านกล้อง ให้เปอร์เซ็นต์ลดหลั่นกันตามการเคลื่อนไหวที่มองผ่านกล้อง เป็น 90, 80, 70, 60, 50, 40 , 30, 20, 10 และให้ 0 เปอร์เซ็นต์ สำหรับอสุจิที่ไม่มีการเคลื่อนไหวเลย

1.3.2 การย้อมสีอสุจิเพื่อตรวจดูตัวเป็นตัวตาย โดยใช้สี eosin-nigrosin การเตรียมสไลด์ ทำโดยหยดตัวอย่างน้ำเชื้อลงบนสไลด์อุ่น ๆ หยดสีลง 1-2 หยด คนให้เข้ากันอย่างรวดเร็ว เพื่อป้องกันไม่ให้น้ำเชื้อที่ยังมีชีวิตอยู่ตายเสียก่อน นำสไลด์อีกแผ่นหนึ่งมาแตะเบา ๆ บนหยดน้ำเชื้อผสมสีแล้วลากเบา ๆ เพื่อให้ตัวอย่างที่จะตรวจกระจายออกบาง ๆ ทำสไลด์ให้แห้งโดยใช้ลมร้อนเป่าหรือลนด้วยเปลวไฟ เมื่อนำไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100x ให้หยด emulsion oil ลงไป 1-2 หยด จะเห็นเชื้อตัวผู้ที่มีชีวิตมีลักษณะใสไม่ติดสี ส่วนตัวที่ตายจะติดสี สามารถนับและคำนวณเปอร์เซ็นต์เชื้อตัวผู้ที่มีชีวิตได้

1.3.3 การตรวจเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ (fertilization rates) เป็นการตรวจความสามารถของอสุจิในน้ำเชื้อที่เก็บรักษาในการเข้าผสมกับไข่สดเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสด สำหรับการทดลองนี้จะสังเกตไข่ที่ได้รับการผสมมีการแบ่งเซลล์ไปจนถึงระยะบลาสโตพอร์ปิด จึงเริ่มคำนวณเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ คัดเลือกแม่พันธุ์ปลาสวายที่มีลักษณะสมบูรณ์เพศ คือมีท้องอูม เป่งพื้นท้องนิ่ม ผนังท้องบาง ฉีดฮอร์โมน (Suprefect) ในอัตรา 20 µg. ร่วมกับ motilium 5 mg. ต่อน้ำหนักปลา 1 kg. หลังจากฉีดฮอร์โมน 12-16 ชั่วโมง จึงนำแม่ปลามารีดไข่ ใส่ภาชนะที่แห้งและสะอาด นำน้ำเชื้อที่เก็บรักษาไว้โดยวิธีแช่เข็งมาผสมกับไข่ โดยวิธีการผสมแบบแห้ง โดยใช้หลอดฉีดยาพลาสติกขนาด 1 มิลลิลิตร (ml.) ตัดปลายหลอดออกให้มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร (mm.) ดูดไข่ 0.2 ml. (~250 ฟอง) ใส่จานเพาะเชื้อ แล้วใช้ไมโครปิเปตดูดน้ำเชื้อในหลอดฟางปริมาตร 40 µl. ลงไปผสมกับไข่คนเบา ๆ ทิ้งไว้ประมาณ 1 นาที ล้างน้ำเชื้อส่วนเกินและเมือกออกแล้วใส่น้ำเพาะฟัก วางไว้ในที่อากาศถ่ายเท เปลี่ยนน้ำทุก ๆ 30 นาที หลังจากเพาะฟักประมาณ 45 นาที นับจำนวนไข่ที่มีการพัฒนาจนถึงระยะบลาสโตพอร์ปิด และนับจำนวนไข่ดีไข่เสีย เพื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ

170261

Q
639
W314
ค

ในการทดลองที่ 1 ทดสอบสูตรน้ำยา 7 สูตร คือ cortland salt solution (CSS), modified cortland salt solution (MC), frog ringer's solution (FRS), hang balance salt solution (HBSS), calcium free hang balance salt solution (CF-HBSS), extender 7 (Ex-7) และ 0.85 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์ (0.85% NaCl) เพื่อใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียสในอัตราส่วนน้ำเชื้อต่อน้ำยาเป็น 1:1,1:2 และ 1:4 โดยใช้น้ำเชื้อสำหรับทุกอัตราเจือจาง 100 µl. ใส่ลงในขวด tissue culture flask ขนาด 75 ลูกบาศก์เซนติเมตร ที่มีฝาปิดสนิทเพื่อป้องกันน้ำเข้าเขย่าเบา ๆ เพื่อให้น้ำเชื้อกับน้ำยาผสมเป็นเนื้อเดียวกัน และนำไปเก็บไว้ในถังน้ำแข็ง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ๆ ละ 3 ซ้ำย่อย (sub sampling) ตรวจสอบการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 และทุก ๆ 24 ชั่วโมง จนกระทั่งไม่พบว่ามีการเคลื่อนไหว และตรวจสอบตัวเป็นตัวตาย ด้วยการย้อมสี eosin-nigrosin ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 ของการทดลองและทุก ๆ 24 ชั่วโมง ชนิดและอัตราส่วนของน้ำยาที่เหมาะสมในการเก็บน้ำเชื้อแบบแช่เย็นจะพิจารณาจาก สูตรน้ำยาที่สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อไว้ได้นานที่สุดก่อนที่อสุจิจะหยุดเคลื่อนที่เมื่อถูกกระตุ้นด้วยน้ำกลั่น สำหรับชุดควบคุมมีวิธีปฏิบัติเช่นเดียวกันนี้ เพียงแต่ไม่ต้องเติมน้ำยาเจือจางลงไป

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบทางเคมี ออสโมลาลิตี และ pH ของสูตรน้ำยาต่าง ๆ เพื่อเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายแบบแช่เย็นที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส

ส่วนประกอบ	สูตรน้ำยา						
	CSS	MC	FRS	HBSS	C-F HBSS	Ex-7	0.85% NaCl
NaCl (g.)	7.25	1.88	6.5	8.0	8.89	5.780	8.5
$CaCl_2\ 2H_2O$ (g.)	0.23	0.23	0.16	0.16	-	0.103	-
KCl (g.)	0.38	7.20	0.14	0.40	0.44	2.558	-
$NaH_2PO_4H_2O$ (g.)	0.41	0.41	-	-	-	-	-
$Na_2HPO_42H_2O$ (g.)	-	-	-	0.12	0.13	-	-
$NaHCO_3$ (g.)	1.00	1.00	0.20	0.35	0.39	0.235	-
KH_2PO_4 (g.)	-	-	-	0.06	0.07	-	-
$MgCl_2\ 6H_2O$ (g.)	-	-	-	-	-	0.220	-
$MgSO_4\ 7H_2O$ (g.)	0.23	0.23	0.39	0.20	0.22	-	-
Glucose (g.)	1.00	1.00	-	1.00	1.11	-	-
Pyruvate (g.)	-	-	-	-	-	6.00	-
Citric acid (g.)	-	-	-	-	-	0.10	-
HEPES buffer (g.)	-	-	-	-	-	2.380	-
สารละลายKOH(ml.)	-	-	-	-	-	10	-
น้ำกลั่น (ml.)	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
สารปฏิชีวนะ (ml.)	5	5	5	5	5	5	5
ออสโมลาลิตี (mOsm/kg.)		292	255	286	320	310	282
pH ก่อนปรับ	7.5	7.61	8.31	7.83	7.78	7.00	7.12

หมายเหตุ

CSS คือ cortland salt solution

MC คือ modified cortland salt solution

FRS คือ frog ringer's solution

HBSS คือ hang balance salt solution

C-F HBSS คือ calcium-free hang balance salt solution

Ex-7 คือ extender 7

0.85%NaCl คือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ sodium chloride

HEPES buffer คือ 4-(2-Hydroxyethyl) -1-piperazineethane-sulfonic acid

สารละลายKOH คือ KOH 1.27 g. ละลายในน้ำกลั่น 100 ml.

สารปฏิชีวนะ คือ penicillin-streptomycin (Sigma Chemical Crop. St. Louis, Missouri;P0906) penicillin 5000 หน่วย และ streptomycin 5 mg. ใน 0.9 % NaCl 1 ml

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

1.4 วิเคราะห์ผลการทดลอง ใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (Two-way ANOVA) โดยวางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียล ใน RCBD (factorial in randomized complete block design) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของทรีตเมนต์ โดยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

2. การทดลองที่ 2 ศึกษาความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีต่อน้ำเชื้อ

2.1 การเตรียมน้ำยา น้ำยาสูตรที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อที่ได้จากการทดลองที่ 1 คือ สูตร extender 7

2.2 การเตรียมน้ำเชื้อ ปฏิบัติเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 แต่นำมาเจือจางในน้ำยา extender 7 ในอัตราส่วน 1:1 แล้วเก็บรักษาไว้ใน tissue culture flasks ที่แช่บนถังน้ำแข็ง

2.3 การเตรียมสารไครโอโพรเทคแทนท์ สารเคมีที่ใช้เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ 4 ชนิด ได้แก่ glycerol, DMSO, propylene glycol และ sucrose แต่ละชนิดใช้ความเข้มข้น 5 ระดับ คือ 3,6,9,12 และ 15 เปอร์เซ็นต์ โดยทำการเจือจางสารไครโอโพรเทคแทนท์ดังกล่าวในน้ำยาเจือจางสูตร extender 7 ซึ่งเป็นสูตรน้ำยาที่ได้ผลแล้วว่ามีประสิทธิภาพเก็บรักษาน้ำเชื้อได้ดีที่อุณหภูมิน้ำแข็ง แบ่งน้ำยาเจือจางออกเป็น 2 ส่วน เท่า ๆ กัน ส่วนหนึ่งไม่ผสมสารโอโพรเทคแทนท์ (ส่วนที่ 1) แต่อีกส่วนหนึ่ง (ส่วนที่ 2) ผสมสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีความเข้มข้นเป็น 2 เท่าของความเข้มข้นที่ต้องการ เมื่อจะเจือจางน้ำเชื้อให้ใช้น้ำยาส่วนแรกผสมกับน้ำเชื้อ เขย่าให้เข้ากัน แล้วเติมน้ำยาส่วนที่ผสมสารไครโอโพรเทคแทนท์ลงไปในหลอด microcentrifuge tube ที่มีขนาด 0.5 ml. เขย่าให้เข้ากัน ปิดฝาป้องกันน้ำเข้า นำเก็บรักษาในถังน้ำแข็ง (ตารางที่ 2) เมื่อนำน้ำยาในข้อ 1 ไปรวมกับน้ำยาในข้อ 2 (ตารางที่ 2) จะทำให้ความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ลดลงครึ่งหนึ่ง และจะได้ความเข้มข้น (final concentration) ตามต้องการ

ตารางที่ 2 ปริมาณของน้ำยา น้ำเชื้อ และสารไครโอโพรเทคแทนท์ ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

ส่วนผสม	ความเข้มข้นที่ต้องการ(final concentration)				
	3%	6%	9%	12%	15%
1. น้ำเชื้อ+น้ำยา(ส่วนที่ 1)	500	500	500	500	500
2. น้ำยา(ส่วนที่ 2)+ไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีความเข้มข้น 2 เท่าของfinal concentration	470+30	440+60	410+90	380+120	350+150
3. ปริมาตรรวม (µl.)	1000	1000	1000	1000	1000

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สำหรับ sucrose ซึ่งมีสถานะเป็นของแข็ง ต้องทำให้เป็นสารละลายก่อนนำมาเจือจางในน้ำยา มีวิธีปฏิบัติดังนี้ ชั่ง sucrose 30 g. ละลายในน้ำยา extender 7 จนมีปริมาตร 100 ml. จะได้สารละลาย sucrose ที่มีความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ และเตรียมสารละลาย sucrose อีก 4 ระดับความเข้มข้น คือ 6,12,18 และ 24 เปอร์เซ็นต์ โดยเจือจาง 30 เปอร์เซ็นต์ sucrose 1 ml. ด้วยน้ำยาในปริมาตรดังตารางที่ 3 เมื่อนำน้ำยาส่วนนี้ (ส่วนที่ 2) 500 µl. ไปรวมกันน้ำยาส่วนที่ 1 (น้ำยา+น้ำเชื้อ) อีก 500 µl. จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น (final concentration) ตามต้องการ (ตารางที่ 3) เมื่อผสมเสร็จนำเก็บรักษาในถังน้ำแข็ง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

ตารางที่ 3 การเตรียมสารละลาย sucrose 3,6,9,12,และ 15 เปอร์เซ็นต์จาก 30 เปอร์เซ็นต์

ความเข้มข้นที่ต้องการ (final concentration)	ความเข้มข้นที่ต้องเตรียม	30% sucrose (ml.)	extender 7 (ml.)	รวม (ml.)
3	6	1	5.0	6.0
6	12	1	2.5	3.5
9	18	1	1.6	2.6
12	24	1	1.25	2.25
15	30	1	1.0	2.0

2.4 การตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ นำน้ำเชื้อที่เก็บรักษาไว้ออกมาตรวจคุณภาพตามวิธีการตรวจเปอร์เซ็นต์ การเคลื่อนไหวของอสุจิที่เวลา 0,30,60 และ 120 นาที ชนิดและระดับความเข้มข้นของไครโอโพรเทคแทนท์ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อ จะพิจารณาจากสารละลายที่สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อให้มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิสูงที่สุด เป็นเวลานานที่สุด ก่อนหยุดเคลื่อนที่ภายหลังการกระตุ้นด้วยน้ำกลั่น และระยะ equilibration time ที่ใช้ในการทดลองที่ 3 จะพิจารณาจากการศึกษาความเป็นพิษในการทดลองนี้

2.5 วิเคราะห์ผลการทดลอง ใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (Two-way ANOVA) โดยวางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียล ใน RCBD (factorial in randomized complete block design) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของทรีตเมนต์ โดยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3. การทดลองที่ 3 ศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิในขั้นตอนการแช่แข็งและอัตราการเพิ่มอุณหภูมิในการละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง เพื่อใช้ในการผสมเทียม

จากการทดลองที่ 1 และ 2 จะได้ชนิดของน้ำยาเจือจาง และสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม ซึ่งมีประสิทธิภาพในการเก็บรักษาน้ำเชื้อ ให้มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวสูงสุด การทดลองที่ 3 มี 3 การทดลองย่อย คือ

3.1 การลดอุณหภูมิก่อนการแช่แข็ง (freezing rates)

3.1.1 การเตรียมน้ำยา การเตรียมน้ำเชื้อ และ การตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ ดำเนินการเช่นเดียวกับการทดลองที่ 2

3.1.2 การเตรียมสารไครโอโพรเทคแทนท์ ดำเนินการเช่นเดียวกับการทดลองที่ 2 โดยใช้ไครโอโพรเทคแทนท์ทั้ง 4 ชนิด ที่ความเข้มข้น 3,6,9,12,และ 15 เปอร์เซ็นต์

3.1.3 การลดอุณหภูมิก่อนการแช่แข็ง ใช้เครื่อง freeze control (model CL3000) ทำการศึกษา 3 โปรแกรม ได้แก่

3.1.3.1 โปรแกรมที่ 1 ลดอุณหภูมิอัตรา -3 องศาเซลเซียส/นาที (ภาพที่ 3)

3.1.3.2 โปรแกรมที่ 2 ลดอุณหภูมิอัตรา -5 องศาเซลเซียส/นาที (ภาพที่ 4)

3.1.3.3 โปรแกรมที่ 3 ลดอุณหภูมิอัตรา -10 องศาเซลเซียส/นาที (ภาพที่ 5)

ทั้ง 3 โปรแกรม ตั้งการทำงานของเครื่องเป็น 5 section ดังนี้

section 1 ใส่หลอดฟางลงใน freezing unit คอยจนอุณหภูมิของตัวอย่างในหลอดกับช่องใส่หลอดฟาง (freezing chamber) เป็น 25 องศาเซลเซียส

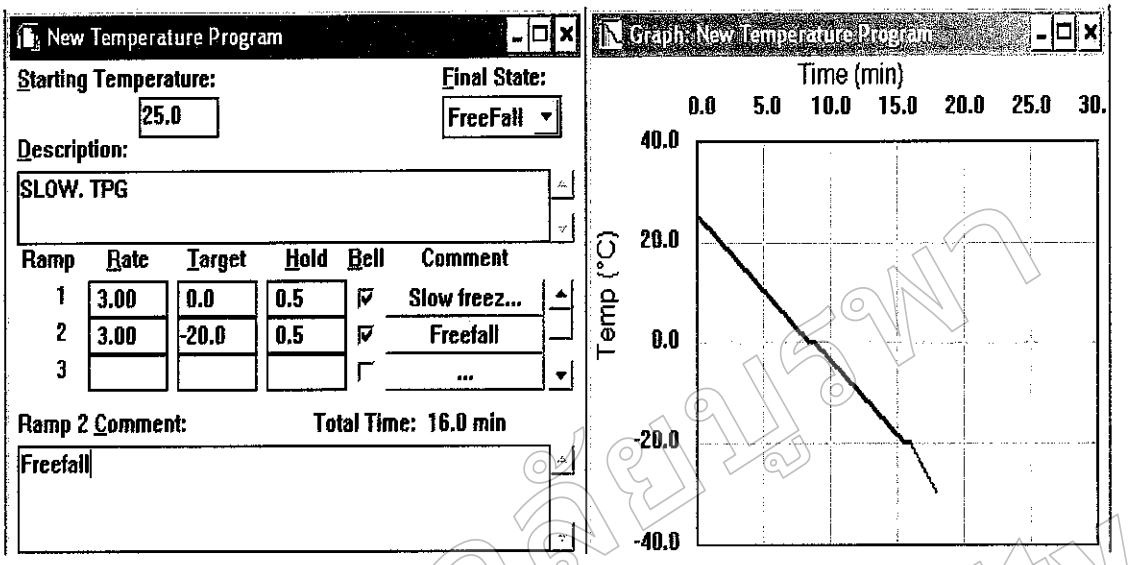
section 2 ลดอุณหภูมิจาก 25 องศาเซลเซียส ถึง 0 องศาเซลเซียส (ตามอัตราการลดอุณหภูมิของแต่ละโปรแกรม) แล้วพักไว้ (hold) 0.5 นาที

section 3 ลดอุณหภูมิจาก 0 องศาเซลเซียส ถึง -20 องศาเซลเซียส (ตามอัตราการลดอุณหภูมิของแต่ละโปรแกรม) แล้วพักไว้ (hold) 0.5 นาที

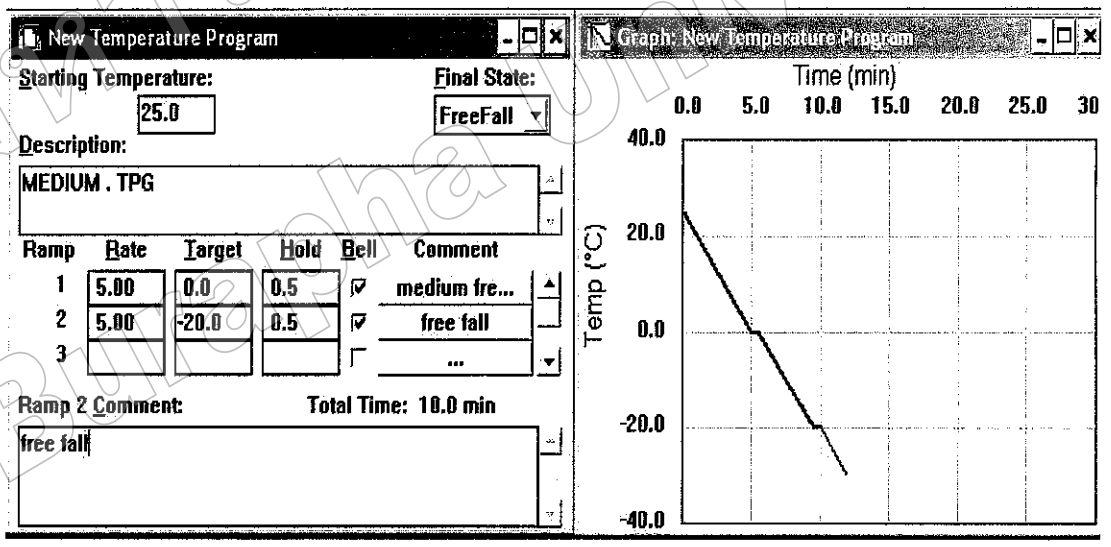
section 4 ลดอุณหภูมิจาก -20 องศาเซลเซียส ถึง -40 องศาเซลเซียส อย่างอิสระ (free fall)

section 5 จบการทำงาน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

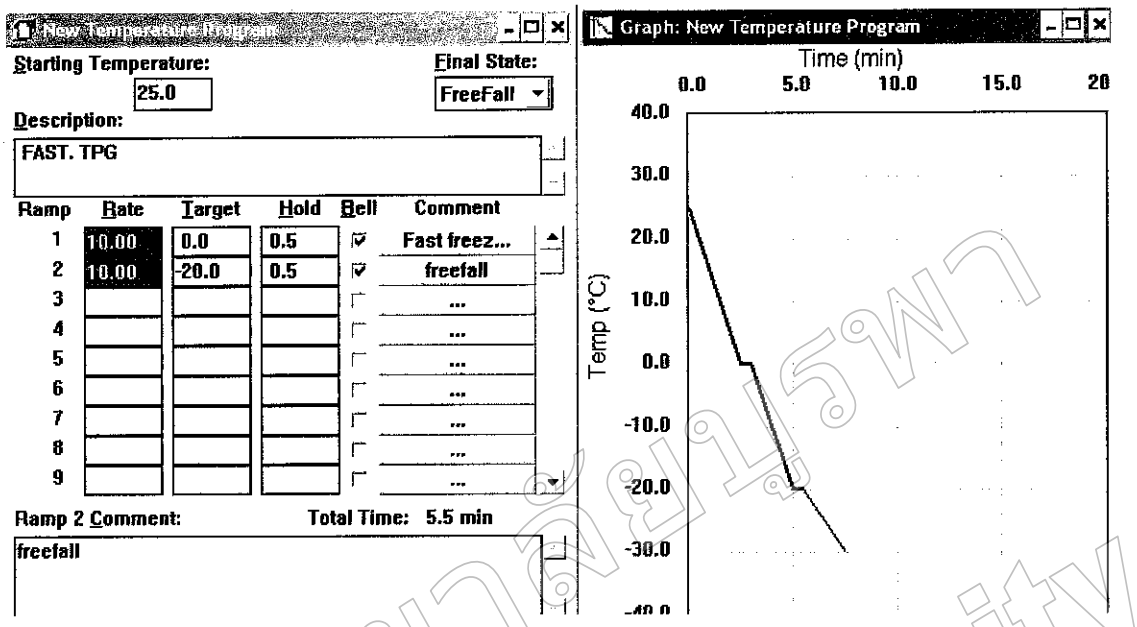


ภาพที่ 3 โปรแกรมที่ 1 คือ การลดอุณหภูมิในอัตรา -3 องศาเซลเซียส/นาที



ภาพที่ 4 โปรแกรมที่ 2 คือ การลดอุณหภูมิในอัตรา -5 องศาเซลเซียส/นาที

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 5 โปรแกรมที่ 3 คือการ ลดอุณหภูมิในอัตรา -10 องศาเซลเซียส/นาที

เมื่อเสร็จสิ้นการลดอุณหภูมิ บีบปลายอีกด้านของหลอดให้ปิดสนิทด้วยปากคีบลนไฟ แล้วนำหลอดบรรจุน้ำเชื้อใส่ลงในกระบอก canister ที่แช่อยู่ในถังบรรจุไนโตรเจนเหลว ซึ่งมีอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ประมาณ 7 วัน ทำการทดสอบการทดลองละ 6 หลอด (3 หลอดเพื่อทดสอบอัตราการเพิ่มอุณหภูมิอีก 3 หลอด สำหรับทดสอบการปฏิสนธิ) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.1.4 วิเคราะห์ผลการทดลอง ใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (Two-way ANOVA) โดยวางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียล ใน RCBD (factorial in randomized complete block design) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของทรีตเมนต์ โดยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ด้วยโปรแกรม SPSS 11.0 for windows.

3.2 การละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง

ภายหลังการเก็บน้ำเชื้อแช่แข็งลงในถังไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 7 วัน นำหลอดน้ำเชื้อแช่แข็งออกมาละลาย โดยนำน้ำเชื้อที่ผ่านการลดอุณหภูมิแต่ละโปรแกรมไปแกว่งละลายในอ่างปรับอุณหภูมิ (water bath) ที่ 3 ระดับอุณหภูมิ คือ 40, 60 และ 80 องศาเซลเซียส บันทึกเวลาการละลายจากเริ่มต้น (-196 องศาเซลเซียส) จนถึงน้ำเชื้อละลาย (0 องศาเซลเซียส) นำน้ำเชื้อส่วนหนึ่งไปตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ตามวิธีการตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

วิเคราะห์ผลการทดลอง ใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (Two-way ANOVA) โดยวางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียล ใน RCBD (factorial in randomized complete block design) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของทรีตเมนต์ โดยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

3.3 การทดสอบการปฏิสนธิ

ผลการทดลองที่ 3.1 และ 3.2 ทำให้ทราบอัตราการลดอุณหภูมิและระดับอุณหภูมิที่ใช้ในการละลายทั้ง 3 ระดับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (p>.05) จึงเลือกใช้อัตราการลดอุณหภูมิโปรแกรมที่ 2 (-5 องศาเซลเซียส/นาที) และระดับอุณหภูมิที่ใช้ในการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งที่ 60 องศาเซลเซียสมาใช้ในการทดสอบการปฏิสนธิตามวิธี การตรวจคุณภาพน้ำเชื้อในการทดลองที่ 1 และชนิดของสารไครโอไพรเทคแทนท์ที่มีผลในการเก็บรักษาน้ำเชื้อได้ดีคือ DMSO และ propylene glycol ที่ทุกระดับความเข้มข้นจะถูกนำมาตรวจสอบการปฏิสนธิเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสด

วิเคราะห์ผลการทดลอง ใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (Two-way ANOVA) โดยวางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียล ใน RCBD (factorial in randomized complete block design) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของทรีตเมนต์ โดยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University