บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างปลากะพงแดงเพศผู้ที่สมบูรณ์เพศ อายุประมาณ 5 ปี จำนวน 9 ตัว น้ำหนักเฉลี่ย 4-7 กิโลกรัม

2. อุปกรณ์ที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อ

   2.1 บีกเกอร์

   2.2 ถังน้ำแข็ง

   2.3 หลอดฟาง

   2.4 ตะเกียงแอลกอฮอล์

   2.5 Forcept

   2.6 ตราชั่ง

   2.7 ไม้บรรทัด

   2.8 เครื่องชั่ง 3 ตำแหน่ง

   2.9 ถังเก็บไนโตรเจนเหลว

   2.10 เครื่องลดอุณหภูมิ Programmable Freezing Control

   2.11 ไมโครปิเปต

   2.12 Tissue Culture Flask

   2.13 เครื่อง Freeze Control

   2.14 Disposable Syringe ขนาด 5 ml และ 1 ml

3. อุปกรณ์ในการตรวจสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม

   3.1 Slide และ Cover Slide

   3.2 กล้องจุลทรรศน์

   3.3 เข็มเขี่ย

   3.4 หลอดหยด

   3.5 Water Bath

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารเคมี

น้ำยาเก็บรักษาสเปิร์ม

Marine Fish Ringer (MFR)

Extender 251 (E251)

0.1 M Sodium Citrate (CT)

Calcium Free Hank's Balance Salt Solution (CF-HBSS)

Hank's Balance Salt Solution (HBSS)

NaCl 0.85%

Cortland

Ca-F Saline

Ringer

Saline Base

สารไครโอโพรเทคแทนท์

Dimethylsulfoxide (DMSO)	5% 10% 15% 20%
Glycerol	5% 10% 15% 20%
Propylene Glycol	5% 10% 15% 20%
Ethylene Glycol	5% 10% 15% 20%
Formamide	5% 10% 15% 20%
Methanol	5% 10% 15% 20%
Ethanol	5% 10% 15% 20%
Sucrose	5% 10% 15% 20%
Trehalose	5% 10% 15% 20%
Acetamide	5% 10% 15% 20%

วิธีดำเนินการ

วิธีดำเนินการวิจัยแบ่งเป็น 3 ขั้นตอนหลัก ๆ ดังนี้

1. ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำยา (Extender) สูตรต่าง ๆ
2. ศึกษาความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่มีต่อน้ำเชื้อ
3. ศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิในขั้นตอนการแช่แข็งและอัตราการเพิ่มอุณหภูมิในการละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การทดลองที่ 1 ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำยาสูตรต่าง ๆ

1. การเตรียมน้ำยา (Extender) 10 สูตร คือ Marine Fish Ringer (MFR), Extender 251 (E251), 0.1 M Sodium Citrate (CT), Calcium Free Hank's Balance Salt Solution (CF-HBSS), Hank's Balance Salt Solution (HBSS), NaCl 0.85%, Cortland, Saline Base, Ringer และ Ca-F Saline

2. การเตรียมน้ำเชื้อ เช็ดเมือกและน้ำบริเวณที่ท้องตัวปลาให้แห้ง ใช้มือกดที่บริเวณท้องรีดลงมาด้านช่องเพศ จะได้น้ำเชื้อสีขาวขุ่น ใช้บีกเกอร์รองรับน้ำเชื้อ ระวังอย่าให้น้ำทะเลหรือของเสียในตัวปลาปะปนมากับน้ำเชื้อที่รีดออกมา

3. การตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อ นำน้ำเชื้อที่ได้ตรวจสอบดูการเคลื่อนที่ (Motility) และย้อมสีดูตัวเป็นตัวตาย เพื่อหาเปอร์เซ็นต์ตัวเป็น (% Live Cell หรือ % LC) ตามวิธีของเกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน (2540)

4. การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำยาสูตรต่าง ๆ เพื่อใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส ในอัตราส่วนน้ำเชื้อต่อน้ำยา 1: 1, 1: 2, 1: 4 และ 1: 6 โดยใช้น้ำเชื้อสำหรับทุกอัตราเจือจาง 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในขวด Tissue Culture Flask เขย่าเบา ๆ เพื่อให้น้ำเชื้อกับน้ำยาผสมเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำไปเก็บไว้ในถังน้ำแข็ง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ตรวจสอบการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิที่เวลา 0, 3, 6, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง จนกระทั่งไม่พบว่ามีการเคลื่อนที่เมื่อถูกกระตุ้น และตรวจสอบตัวเป็นตัวตายด้วยการย้อมสี ชนิดและอัตราส่วนของน้ำยาที่เหมาะสมในการเก็บน้ำเชื้อแบบแช่เย็นจะพิจารณาจาก สูตรน้ำยาที่สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อไว้ได้นานที่สุดก่อนที่อสุจิจะหยุดเคลื่อนที่เมื่อถูกกระตุ้นด้วยน้ำทะเล

การทดลองที่ 2 ศึกษาความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีต่อน้ำเชื้อ

1. การเตรียมน้ำยา น้ำยาสูตรที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อที่ได้จากการทดลองที่ 1

2. การเตรียมน้ำเชื้อ ปฏิบัติเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 แต่นำมาเจือจางในน้ำยาสูตรที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองที่ 1 ในอัตราส่วนที่เหมาะสมแล้วเก็บรักษาไว้ใน Tissue Culture Flask ที่แช่ในถังน้ำแข็ง

3. การเตรียมสารไครโอโพรเทคแทนท์ สารเคมีที่ใช้เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ 10 ชนิด คือ DMSO, Glycerol, Propylene Glycol, Ethylene Glycol, Formamide, Methanol, Ethanol, Sucrose, Trehalose และ Acetamide แต่ละชนิดใช้ความเข้มข้นสุดท้าย 4 ระดับ คือ 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ โดยทำการเจือจางสารไครโอโพรเทคแทนท์ดังกล่าวในน้ำยาสูตรที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองที่ 1 แบ่งน้ำยาเจือจางออกเป็น 2 ส่วน เท่า ๆ กัน ส่วนหนึ่งนำน้ำเชื้อมาเจือจางในน้ำยาสูตรที่เหมาะสมโดยไม่ผสมสารไครโอโพรเทคแทนท์ (ส่วนที่ 1) แต่อีกส่วนหนึ่ง (ส่วนที่ 2)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

เจือจางน้ำยาสูตรที่เหมาะสมในสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีความเข้มข้นเป็น 2 เท่าของความเข้มข้นสุดท้ายที่ต้องการ เมื่อจะเจือจางน้ำเชื้อให้ใช้น้ำยาส่วนแรกผสมกับน้ำเชื้อ เขย่าให้เข้ากันแล้วเติมน้ำยาส่วนที่ผสมสารไครโอโพรเทคแทนท์ เขย่าให้เข้ากัน แล้วเก็บไว้ในถังน้ำแข็ง เมื่อนำน้ำยาใน ส่วนที่ 1 รวมกับน้ำยาในส่วนที่ 2 จะทำให้ความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ลดลงครึ่งหนึ่ง และจะได้ความเข้มข้นสุดท้าย (Final Concentration) ตามต้องการ

4. การตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อ นำน้ำเชื้อที่เก็บรักษาไว้ออกมาตรวจสอบดูการเคลื่อนที่ (Motility) ตามวิธีของเกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน (2540) ทุก ๆ ครึ่งชั่วโมง ชนิดและระดับความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่เหมาะสมในการเก็บน้ำเชื้อ จะพิจารณาจากสารละลายที่สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อให้มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ได้สูงและนานที่สุด ก่อนที่อสุจิจะหยุดเคลื่อนที่เมื่อถูกกระตุ้นด้วยน้ำทะเล

การทดลองที่ 3 ศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิในขั้นตอนการแช่แข็ง

จากการทดลองที่ 1 และ 2 จะได้ชนิดของน้ำยาเจือจาง และสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม ซึ่งมีประสิทธิภาพในการเก็บรักษาน้ำเชื้อ ให้มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่สูงสุด ซึ่งมีการทดลอง ดังนี้

1. การลดอุณหภูมิก่อนการแช่แข็ง (Freezing Rate)

1.1 การเตรียมน้ำยา การเตรียมน้ำเชื้อ และการตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อ ดำเนินการเช่นเดียวกับการทดลองที่ 2

1.2 การเตรียมสารไครโอโพรเทคแทนท์ ดำเนินการเช่นเดียวกับการทดลองที่ 2 โดยใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ที่เป็นพิษน้อย (ทราบจากการทดลองที่ 2) ที่ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์

1.3 การลดอุณหภูมิก่อนการแช่แข็ง ใช้เครื่อง Freeze Control

เมื่อน้ำเชื้อได้ถูกเจือจางด้วยสารไครโอโพรเทคแทนท์ บีบปลายอีกด้านของหลอดให้ปิดสนิทด้วยปากคีบลนไฟ แล้วนำหลอดบรรจุน้ำเชื้อไปลดอุณหภูมิด้วยอัตราการลดอุณหภูมิต่าง ๆ กัน (3, 6, 9, 12, 15 องศาเซลเซียสต่อนาที) จนอุณหภูมิสุดท้ายเป็น -40 และ -80 องศาเซลเซียส แล้วจึงนำไปลงแช่ในถังไนโตรเจนเหลวซึ่งมีอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส

2. การละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง ภายหลังการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งเป็นเวลา 1 ชั่วโมง, 30 วัน, 60 วัน และ 90 วัน จากนั้นนำหลอดน้ำเชื้อแช่แข็งออกมาละลาย โดยการอุ่นใน Water Bath ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 6 วินาที และนำน้ำเชื้อส่วนหนึ่งไปตรวจสอบดูการเคลื่อนที่ตามวิธีของเกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน (2540)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University