บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

สัตว์ทดลอง

1. หอยตะโกรมกรามขาว

อุปกรณ์และสารเคมี

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1.1 สิ่ว

1.2 ถุงมือ

1.3 เข็มเขี่ย

1.4 จานแก้ว

1.5 Eppendorf Tube

1.6 ไมโครปิเปต ขนาด 200 และ 1,000 ไมโครลิตร

1.7 ขวดแก้ว

1.8 Tissue Culture Flask

1.9 ฟอร์เซ็บ

1.10 กรรไกร

1.11 หลอดหยด

1.12 บีกเกอร์

1.13 หลอดฟาง

1.14 ตะเกียงบุนเซน

1.15 เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง

1.16 เทอร์โมมิเตอร์

1.17 เครื่องละลาย (Water Bath)

1.18 ถังน้ำแข็ง

1.19 ถังไนโตรเจนเหลว

1.20 เครื่องแช่แข็งอัตโนมัติ Programmable Freezer Controller

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2. อุปกรณ์ที่ใช้ประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ

2.1 Slide และ Cover Slide

2.2 กล้องจุลทรรศน์

2.3 น้ำทะเล 30 ppt

3. สารเคมี

3.1 น้ำยาบัฟเฟอร์ (Extender) สูตรต่าง ๆ คือ

3.1.1 Calcium Free Hank's Balanced Salt Solution (Ca-F HBSS) (Tiersch et al., 1997)

3.1.2 Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) (Tiersch, Goudie, & Carmichael, 1994)

3.1.3 Artificial Seawater (ASW) (Gwo et al., 2002)

3.1.4 DCSB4 (Bougrier & Rabenomanana, 1986)

3.2 สารไครโอโพรเทคแทนท์ (Cryoprotectant) ทั้ง 9 ชนิด คือ

3.2.1 DMSO	5%, 10%, 15%, 20%
3.2.2 Methanol	5%, 10%, 15%, 20%
3.2.3 Ethanol -	5%, 10%, 15%, 20%
3.2.4 Propylene Glycol	5%, 10%, 15%, 20%
3.2.5 Ethylene Glycol	5%, 10%, 15%, 20%
3.2.6 Glycerol	5%, 10%, 15%, 20%
3.2.7 Sucrose	5%, 10%, 15%, 20%
3.2.8 Trehalose	5%, 10%, 15%, 20%
3.2.9 Acetamide	5%, 10%, 15%, 20%

3.3 สีย้อมสเปิร์ม

3.3.1 0.5% Eosin

3.3.2 10% Nigrosin

(การเตรียมสารเคมีดูที่ภาคผนวก ก)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

วิธีวิจัย

1. การวางแผนการทดลอง

แบ่งการทดลองออกเป็น 4 การทดลอง คือ

การทดลองที่ 1 การศึกษาคุณภาพน้ำเชื้อของหอยตะโกรมกรามขาว

การทดลองที่ 2 การศึกษาประสิทธิภาพของน้ำยาบัฟเฟอร์สูตรต่าง ๆ ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยตะโกรมกรามขาวแบบแช่เย็นที่อุณหภูมิ 2-4°C

การทดลองที่ 3 การศึกษาความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีต่อสเปิร์มของหอยตะโกรมกรามขาว

การทดลองที่ 4 การศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อของหอยตะโกรมกรามขาวแบบแช่แข็ง

การทดลองที่ 4.1 การศึกษาผลของอัตราการลดอุณหภูมิแบบต่าง ๆ (-1, -2.5, -5, -7.5, -10 และ -12.5°C/ นาที) และอุณหภูมิสุดท้ายต่าง ๆ (-30°C และ -80°C) เก็บไว้ในไนโตรเจนเหลว (-196°C)

การทดลองที่ 4.2 การศึกษาอัตราการเพิ่มอุณหภูมิในการละลายน้ำเชื้อหอยตะโกรมกรามขาวแช่แข็ง

การทดลองที่ 4.3 การศึกษาผลของระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยตะโกรมกรามขาวในถังไนโตรเจนเหลว (-196°C)

2. การเตรียมตัวอย่างก่อนการทดลอง

นำหอยตะโกรมกรามขาวที่รวบรวมมาจาก จังหวัดสุราษฎ์ธานี มาชั่งน้ำหนัก วัดความกว้างและความยาวของหอยทั้งเปลือกและบันทึกผล แล้วทำความสะอาดเปลือกหอยก่อนทำการเก็บรวบรวมน้ำเชื้อ การเก็บรวบรวมน้ำเชื้อหอยทำโดยการเปิดเปลือกเอาตัวหอยออกมาก่อนรีดน้ำเชื้อนำตัวหอยมาชั่งน้ำหนักและบันทึกผล หลังจากนั้นใช้เข็มเขี่ยแทงตรงบริเวณ Gonad ซึ่งมีสีครีมขาว เอาน้ำเชื้อแตะบนสไลด์นำมาส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า เพื่อแยกเพศผู้ แล้วรีดน้ำเชื้อออกมา ข้อควรระวังห้ามให้เข็มเขี่ยโดนกระเพาะอาหาร และต้องเช็ดตัวหอยให้แห้งก่อนรีดน้ำเชื้อ ระวังน้ำเชื้อไม่ให้มีสิ่งปนเปื้อน น้ำเชื้อที่ดีควรมีสีขาวขุ่นและหนืด ทำการรีดใส่ใน Eppendorf Tube วางบนน้ำแข็ง

ก่อนการทดลองจะทำการประเมินคุณภาพของน้ำเชื้อสดโดยการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อจะพิจารณาจาก Parameter ที่สำคัญ ดังนี้

2.1 การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (Sperm Motility) ทำโดยการหยดน้ำเชื้อ 1 ไมโครลิตร ลงบนกระจกสไลด์ที่สะอาดแล้วจึงหยดน้ำทะเล 30 ppt ลงไป 50 ไมโครลิตร พร้อมกับปิดด้วย

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Cover Glass เบา ๆ อย่างรวดเร็ว เพื่อกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่ แล้วนำไปส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40X ทันที แล้วประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม โดยประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม 6 ระดับ คือ น้ำเชื้อที่มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 0%, 20%, 40%, 60%, 80% และ 100% ตามลำดับ (Vuthiphandchai and Zohar, 1999)

2.2 ความหนาแน่นของสเปิร์ม (Sperm Density) จะประเมินโดยการเจือจางน้ำเชื้อ 1 ไมโครลิตร ด้วยน้ำกลั่น 1,000 เท่า ผสมให้เข้ากันใน Eppendorf Tube แล้วนำน้ำเชื้อที่ถูกเจือจางไปหยดบน Hemacytometer แล้วนำไปส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10X และนับจำนวนสเปิร์มที่พบ แล้วจึงคำนวณกลับหาความหนาแน่นของสเปิร์ม (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536)

2.3 จำนวนสเปิร์มที่มีชีวิต (Sperm Viability) โดยการนำเอาน้ำเชื้อ 5 ไมโครลิตร มาย้อมสีด้วย Eosin-Nigrosin 5 ไมโครลิตร แล้วนำไปส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100X ทำการสุ่มนับจำนวนสเปิร์มที่มีชีวิต ซึ่งจะไม่ติดสีย้อม แล้วจึงคำนวณกลับหาเปอร์เซ็นต์ของสเปิร์มที่มีชีวิต (Fribourgh, 1966)

2.4 แรงดันออสโมซิสของน้ำเชื้อ (Osmolality) โดยการนำน้ำเชื้อมา Centrifuge ด้วยความเร็วสูงเพื่อแยก Seminal Fluid ออกจากสเปิร์ม แล้วนำ Seminal Fluid ปริมาณ 100 ไมโครลิตร มาวัดค่า Osmolality โดยใช้เครื่องมือ Osmometer

วิธีการทดลอง

การทดลองที่ 1 การศึกษาคุณภาพน้ำเชื้อของหอยตะโกรมกรามขาว

1. นำน้ำเชื้อหอยตะโกรมกรามขาว แบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่ 1 น้ำเชื้อสด (Fresh Milt) และส่วนที่ 2 น้ำเชื้อสดที่เจือจางในน้ำทะเลความเค็ม 30 ppt (Fresh Milt+Seawater 30 ppt) ใส่ใน Tissue Culture Flask

2. นำ Tissue Culture Flask ไปแช่ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส

3. นำน้ำเชื้อมาทำการประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มทุก ๆ 2 ชั่วโมง จนกระทั่งสเปิร์มหยุดการเคลื่อนที่เมื่อถูกกระตุ้นด้วยน้ำทะเลความเค็ม 30 ppt

การทดลองที่ 2 การศึกษาประสิทธิภาพของน้ำยาบัฟเฟอร์สูตรต่าง ๆ ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยตะโกรมกรามขาวแบบแช่เย็นที่อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส

1. เตรียมน้ำยาบัฟเฟอร์ (Extender) ทั้ง 4 สูตร คือ Ca-F HBSS, HBSS, ASW และ DCSB4 ใส่ใน Tissue Culture Flask ในแต่ละสูตรทำการทดลอง 3 ซ้ำ

2. นำน้ำเชื้อหอยตะโกรมกรามขาว ใส่ใน Tissue Culture Flask ที่มีน้ำยาแต่ละสูตรอยู่ อัตราส่วนน้ำเชื้อต่อน้ำยา คือ 1: 2 และ 1: 4 เขย่าเบา ๆ ผสมให้เข้ากัน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3. นำ Tissue Culture Flask ไปแช่ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส

4. นำน้ำเชื้อที่ถูกเจือจางด้วยน้ำยาบัฟเฟอร์มาประเมินหาเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มในระยะเวลาต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 0, 30 นาที, 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง หลังจากน้ำเชื้อถูกเจือจาง

การทดลองที่ 3 การศึกษาความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีต่อสเปิร์มของหอยตะโกรมกรามขาว

1. เตรียมสารไครโอโพรเทคแทนท์ทั้ง 9 ชนิด คือ DMSO, Methanol, Glycerol, Ethanol, Propylene Glycol, Sucrose, Ethylene Glycol, Trehalose และ Acetamide ที่ความเข้มข้น 4 ระดับ คือ 5%, 10%, 15% และ 20% โดยใช้น้ำยาบัฟเฟอร์ตัวที่ดีที่สุดคือ Ca-F HBSS (จากการทดลองที่ 2) ในการเจือจาง

2. นำน้ำเชื้อมาเจือจางในน้ำยาบัฟเฟอร์ตัวที่ดีที่สุด คือ Ca-F HBSS ในอัตราส่วนน้ำเชื้อต่อน้ำยา คือ 1: 2 เขย่าเบา ๆ ผสมให้เข้ากัน

3. ดูดน้ำเชื้อปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ใน Tissue Culture Flask

4. เติมสารไครโอโพรเทคแทนท์ อัตราส่วน 1: 1 โดยปริมาตร ผสมให้เข้ากันเขย่าเบา ๆ ที่อุณหภูมิห้อง (25°C)

5. ทำการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม หลังกระตุ้นด้วยน้ำทะเล 30 ppt ที่ระยะเวลาต่าง ๆ กันหลังการเจือจาง คือ 0, 10, 20, 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 นาที

6. ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

การทดลองที่ 4 การศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อของหอยตะโกรมกรามขาวแบบแช่แข็ง

การทดลองที่ 4.1 การศึกษาผลของอัตราการลดอุณหภูมิแบบต่าง ๆ (-1, -2.5, -5, -7.5, -10 และ -12.5°C/ นาที) และอุณหภูมิสุดท้ายต่าง ๆ (-30°C และ -80°C) เก็บไว้ในไนโตรเจนเหลว (-196°C)

1. เลือกสารไครโอโพรเทคแทนท์ตัวที่ดีที่สุดมา 3 ชนิด คือ DMSO, Methanol และ Propylene Glycol (จากการทดลองที่ 3)

2. นำน้ำเชื้อหอยตะโกรมกรามขาวมาเจือจางด้วยน้ำยาบัฟเฟอร์ตัวที่ดีที่สุด คือ Ca-F HBSS (จากการทดลองที่ 2)

3. ดูดน้ำเชื้อที่เจือจางน้ำยาผสมกับสารไครโอโพรเทคแทนท์ อัตราส่วน 1: 1 ผสมเข้ากันที่อุณหภูมิห้อง (25°C)

4. ดูดสารละลายน้ำเชื้อ 0.2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร ปิดหลอดฟางด้วยครีมหนีบลนไฟ แล้วปล่อยให้น้ำเชื้ออยู่ในภาวะสมดุล (Equilibration Time) นาน 10 นาที

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

5. นำหลอดฟางที่บรรจุน้ำเชื้อไปลดอุณหภูมิด้วยเครื่องแช่แข็งอัตโนมัติ Programmable Freezer Controler เริ่มทำการแช่แข็งโดยการลดอุณหภูมิจากอุณหภูมิเริ่มต้น 25°C จนถึงอุณหภูมิสุดท้ายต่าง ๆ (-30°C และ -80°C) โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิแบบต่าง ๆ (-1, -2.5, -5, -7.5, -10 และ -12.5°C/ นาที) เก็บไว้ในไนโตรเจนเหลว (-196°C) นาน 1 ชั่วโมง

6. หลังจากนั้นนำน้ำเชื้อหอยตะโกรมกรามขาวที่ผ่านการแช่แข็งมาละลายน้ำ (Thawing) ที่อุณหภูมิ 70°C นาน 5 วินาที เพื่อให้น้ำเชื้อละลาย

7. ทำการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม หลังกระตุ้นด้วยน้ำทะเล 30 ppt

การทดลองที่ 4.2 การศึกษาอัตราการเพิ่มอุณหภูมิในการละลายน้ำเชื้อของหอยตะโกรมกรามขาวแช่แข็ง

1. เลือกสารไครโอโพรเทคแทนท์ตัวที่ดีที่สุดคือ DMSO และอัตราการลดอุณหภูมิตัวที่ดีที่สุด คือ -1°C/ นาที (จากการทดลองที่ 4.1)

2. ทำการทดลองเหมือนข้อที่ 2-5 (จากการทดลองที่ 4.1) เริ่มทำการแช่แข็งโดยการลดอุณหภูมิจากอุณหภูมิเริ่มต้น 25°C จนถึงอุณหภูมิสุดท้าย -80°C โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิ -1°C/ นาที

3. หลังจากนั้นนำน้ำเชื้อหอยตะโกรมกรามขาวที่ผ่านการแช่แข็งมาละลายที่อุณหภูมิ 30°C นาน 5 วินาที เพื่อให้น้ำเชื้อละลาย

4. ทำการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม หลังกระตุ้นด้วยน้ำทะเล 30 ppt

5. ทำการทดลองเหมือนกันแต่เปลี่ยนอุณหภูมิที่ใช้ในการละลายเป็น 50°C และ 70°C นาน 5 วินาที

การทดลองที่ 4.3 การศึกษาผลของระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อของหอยตะโกรมกรามขาวในถังไนโตรเจนเหลว (-196°C)

1. ทำการทดลองเหมือนข้อที่ 1-2 (จากการทดลองที่ 4.2)

2. หลังจากนั้นนำน้ำเชื้อหอยตะโกรมกรามขาวที่ผ่านการแช่แข็ง แล้วนำมาเก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลว -196°C เป็นเวลา 6 เดือน

3. เมื่อครบกำหนดเวลาทุก ๆ 1 เดือน จึงนำน้ำเชื้อที่เก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลวมาละลาย (Thawing) โดยใช้อัตราการเพิ่มอุณหภูมิตัวที่ดีที่สุดคือ 70°C นาน 5 วินาที (จากการทดลองที่ 4.2) เพื่อให้น้ำเชื้อละลาย

4. ทำการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อโดยประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มและสเปิร์มที่มีชีวิตหลังกระตุ้นด้วยน้ำทะเล 30 ppt

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลที่ได้แสดงเป็น Mean ± SE นำมาทำการวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน Two-Way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของทรีตเม้นต์โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยโปรแกรม SPSS

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University