

ภาคผนวก

1. การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์

การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ Extender 7 และ Ca-F HBSS มีส่วนประกอบ มีดังนี้

Extender 7 ประกอบด้วย $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.0103 g., $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.0220 g., NaHCO_3 0.0235 g., KCl 0.2558 g., NaCl 0.5780g., pyruvate 0.6000 g., Citric acid 0.0100g., HEPES buffer 0.2380 g., KOH (1.27g/100mol) 1 ml ละลายในน้ำกลั่น 100 ml ปรับ pH 7.6

Ca-F HBSS ประกอบด้วย NaCl 0.8890 g., KCl 0.0440 g., $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0220 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.0130 g., KH_2PO_4 0.0070 g., NaHCO_3 0.0390 g., Glucose 0.1110 g. ละลายในน้ำกลั่น 100 ml ปรับ pH 7.6 (ศิริพร คชรัตน์ และคณะ, 2550)

2. การเตรียมสารละลายมีประจุ และไม่มีประจุ

ตารางภาคผนวก ก-1 การชั่งสารละลายกลุ่มมีประจุ NaCl , KCl และ $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ และกลุ่มไม่มีประจุ คือ Glucose และ Mannital ที่ระดับความเข้มข้น 0, 25, 50, 75 100, 125, 150, 200, 225, 250, 255, 275 และ 300 mM ละลายน้ำ deionized water 10 ml

ความเข้มข้น (mM)	สารเคมีกลุ่มมีประจุ และไม่มีประจุ (g/10 ml)				
	NaCl	KCl	CaCl ₂	Glucose	Mannital
25	0.0146	0.0186	0.0368	0.0451	0.0456
50	0.0292	0.0373	0.0735	0.0901	0.0911
75	0.0438	0.0559	0.1103	0.1352	0.1367
100	0.0584	0.0746	0.1470	0.1802	0.1822
125	0.0731	0.0932	0.1838	0.2253	0.2278
150	0.0877	0.1118	0.2205	0.2703	0.2733
175	0.1023	0.1305	0.2573	0.3154	0.3189
200	0.1169	0.1491	0.2940	0.3604	0.3644
225	0.1315	0.1677	0.3308	0.4055	0.4100
250	0.1461	0.1864	0.3675	0.4505	0.4555
275	0.1607	0.2050	0.4043	0.4956	0.5011
300	0.1753	0.2237	0.4410	0.5406	0.5466

3. การเตรียมสารไครโอโพรเทกแทนท์

การเตรียมสารไครโอโพรเทกแทนท์ ที่ใช้แช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกเทศโดยใช้บัฟเฟอร์ Extender 7

3.1 การเตรียมสารละลาย DMSO

- การเตรียมสารละลาย 10% DMSO

ปิเปต DMSO 1 ml เติมน้ำบัฟเฟอร์ Extender 7 ให้ได้ปริมาตร 10 ml

- การเตรียมสารละลาย 20% DMSO

ปิเปต DMSO 2 ml เติมน้ำบัฟเฟอร์ Extender 7 ให้ได้ปริมาตร 10 ml

- การเตรียมสารละลาย 30% DMSO

ปิเปต DMSO 3 ml เติมน้ำบัฟเฟอร์ Extender 7 ให้ได้ปริมาตร 10 ml

- การเตรียมสารละลาย 40% DMSO

ปิเปต DMSO 4 ml เติมน้ำบัฟเฟอร์ Extender 7 ให้ได้ปริมาตร 10 ml

3.2 การเตรียมสารละลาย Methanol

- การเตรียมสารละลาย 10% Methanol

ปิเปต Methanol 1 ml เติมน้ำบัฟเฟอร์ Extender 7 ให้ได้ปริมาตร 10 ml

- การเตรียมสารละลาย 20% Methanol

ปิเปต Methanol 2 ml เติมน้ำบัฟเฟอร์ Extender 7 ให้ได้ปริมาตร 10 ml

- การเตรียมสารละลาย 30% Methanol

ปิเปต Methanol 3 ml เติมน้ำบัฟเฟอร์ Extender 7 ให้ได้ปริมาตร 10 ml

- การเตรียมสารละลาย 40% Methanol

ปิเปต Methanol 4 ml เติมน้ำบัฟเฟอร์ Extender 7 ให้ได้ปริมาตร 10 ml

3.3 การเตรียมสารละลาย Glycerol

- การเตรียมสารละลาย 10% Glycerol

ปิเปต Glycerol 1 ml เติมน้ำบัฟเฟอร์ Extender 7 ให้ได้ปริมาตร 10 ml

- การเตรียมสารละลาย 20% Glycerol

ปิเปต Glycerol 2 ml เติมน้ำบัฟเฟอร์ Extender 7 ให้ได้ปริมาตร 10 ml

- การเตรียมสารละลาย 30% Glycerol

ปิเปต Glycerol 3 ml เติมน้ำบัฟเฟอร์ Extender 7 ให้ได้ปริมาตร 10 ml

- การเตรียมสารละลาย 40% Glycerol

ปิเปต Glycerol 4 ml เติมน้ำบัฟเฟอร์ Extender 7 ให้ได้ปริมาตร 10 ml

3.4 การเตรียมสารละลาย Ethanol

- การเตรียมสารละลาย 10% Ethanol

ปิเปต Ethanol 1 ml เติมน้ำฟอสเฟต Extender 7 ให้ได้ปริมาตร 10 ml

- การเตรียมสารละลาย 20% Ethanol

ปิเปต Ethanol 2 ml เติมน้ำฟอสเฟต Extender 7 ให้ได้ปริมาตร 10 ml

- การเตรียมสารละลาย 30% Ethanol

ปิเปต Ethanol 3 ml เติมน้ำฟอสเฟต Extender 7 ให้ได้ปริมาตร 10 ml

- การเตรียมสารละลาย 40% Ethanol

ปิเปต Ethanol 4 ml เติมน้ำฟอสเฟต Extender 7 ให้ได้ปริมาตร 10 ml

3.5 การเตรียมสารละลาย Propylene Glycol

- การเตรียมสารละลาย 10% Propylene Glycol

ปิเปต Propylene Glycol 1 ml เติมน้ำฟอสเฟต Extender 7 ให้ได้ปริมาตร 10 ml

- การเตรียมสารละลาย 20% Propylene Glycol

ปิเปต Propylene Glycol 2 ml เติมน้ำฟอสเฟต Extender 7 ให้ได้ปริมาตร 10 ml

- การเตรียมสารละลาย 30% Propylene Glycol

ปิเปต Propylene Glycol 3 ml เติมน้ำฟอสเฟต Extender 7 ให้ได้ปริมาตร 10 ml

- การเตรียมสารละลาย 40% Propylene Glycol

ปิเปต Propylene Glycol 4 ml เติมน้ำฟอสเฟต Extender 7 ให้ได้ปริมาตร 10 ml

3.6 การเตรียมสารละลาย Ethylene Glycol

- การเตรียมสารละลาย 10% Ethylene Glycol

ปิเปต Ethylene Glycol 1 ml เติมน้ำฟอสเฟต Extender 7 ให้ได้ปริมาตร 10 ml

- การเตรียมสารละลาย 20% Ethylene Glycol

ปิเปต Ethylene Glycol 2 ml เติมน้ำฟอสเฟต Extender 7 ให้ได้ปริมาตร 10 ml

- การเตรียมสารละลาย 30% Ethylene Glycol

ปิเปต Ethylene Glycol 3 ml เติมน้ำฟอสเฟต Extender 7 ให้ได้ปริมาตร 10 ml

- การเตรียมสารละลาย 40% Ethylene Glycol

ปิเปต Ethylene Glycol 4 ml เติมน้ำฟอสเฟต Extender 7 ให้ได้ปริมาตร 10 ml

การเตรียมสารไอโซโพรเทกแทนท์ ที่ใช้แช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกเทศโดยใช้บัฟเฟอร์ Ca-F HBSS

3.1 การเตรียมสารละลาย DMSO

- การเตรียมสารละลาย 10% DMSO

ปิเปต DMSO 1 ml เดิมบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS ให้ได้ปริมาตร 10 ml

- การเตรียมสารละลาย 20% DMSO

ปิเปต DMSO 2 ml เดิมบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS ให้ได้ปริมาตร 10 ml

- การเตรียมสารละลาย 30% DMSO

ปิเปต DMSO 3 ml เดิมบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS ให้ได้ปริมาตร 10 ml

- การเตรียมสารละลาย 40% DMSO

ปิเปต DMSO 4 ml เดิมบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS ให้ได้ปริมาตร 10 ml

3.2 การเตรียมสารละลาย Methanol

- การเตรียมสารละลาย 10% Methanol

ปิเปต Methanol 1 ml เดิมบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS ให้ได้ปริมาตร 10 ml

- การเตรียมสารละลาย 20% Methanol

ปิเปต Methanol 2 ml เดิมบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS ให้ได้ปริมาตร 10 ml

- การเตรียมสารละลาย 30% Methanol

ปิเปต Methanol 3 ml เดิมบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS ให้ได้ปริมาตร 10 ml

- การเตรียมสารละลาย 40% Methanol

ปิเปต Methanol 4 ml เดิมบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS ให้ได้ปริมาตร 10 ml

3.3 การเตรียมสารละลาย Glycerol

- การเตรียมสารละลาย 10% Glycerol

ปิเปต Glycerol 1 ml เดิมบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS ให้ได้ปริมาตร 10 ml

- การเตรียมสารละลาย 20% Glycerol

ปิเปต Glycerol 2 ml เดิมบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS ให้ได้ปริมาตร 10 ml

- การเตรียมสารละลาย 30% Glycerol

ปิเปต Glycerol 3 ml เดิมบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS ให้ได้ปริมาตร 10 ml

- การเตรียมสารละลาย 40% Glycerol

ปิเปต Glycerol 4 ml เดิมบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS ให้ได้ปริมาตร 10 ml

3.4 การเตรียมสารละลาย Ethanol

- การเตรียมสารละลาย 10% Ethanol

ปิเปต Ethanol 1 ml เติมน้ำบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS ให้ได้ปริมาตร 10 ml

- การเตรียมสารละลาย 20% Ethanol

ปิเปต Ethanol 2 ml เติมน้ำบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS ให้ได้ปริมาตร 10 ml

- การเตรียมสารละลาย 30% Ethanol

ปิเปต Ethanol 3 ml เติมน้ำบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS ให้ได้ปริมาตร 10 ml

- การเตรียมสารละลาย 40% Ethanol

ปิเปต Ethanol 4 ml เติมน้ำบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS ให้ได้ปริมาตร 10 ml

3.5 การเตรียมสารละลาย Propylene Glycol

- การเตรียมสารละลาย 10% Propylene Glycol

ปิเปต Propylene Glycol 1 ml เติมน้ำบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS ให้ได้ปริมาตร 10 ml

- การเตรียมสารละลาย 20% Propylene Glycol

ปิเปต Propylene Glycol 2 ml เติมน้ำบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS ให้ได้ปริมาตร 10 ml

- การเตรียมสารละลาย 30% Propylene Glycol

ปิเปต Propylene Glycol 3 ml เติมน้ำบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS ให้ได้ปริมาตร 10 ml

- การเตรียมสารละลาย 40% Propylene Glycol

ปิเปต Propylene Glycol 4 ml เติมน้ำบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS ให้ได้ปริมาตร 10 ml

3.6 การเตรียมสารละลาย Ethylene Glycol

- การเตรียมสารละลาย 10% Ethylene Glycol

ปิเปต Ethylene Glycol 1 ml เติมน้ำบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS ให้ได้ปริมาตร 10 ml

- การเตรียมสารละลาย 20% Ethylene Glycol

ปิเปต Ethylene Glycol 2 ml เติมน้ำบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS ให้ได้ปริมาตร 10 ml

- การเตรียมสารละลาย 30% Ethylene Glycol

ปิเปต Ethylene Glycol 3 ml เติมน้ำบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS ให้ได้ปริมาตร 10 ml

- การเตรียมสารละลาย 40% Ethylene Glycol

ปิเปต Ethylene Glycol 4 ml เติมน้ำบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS ให้ได้ปริมาตร 10 ml

4. การเตรียมสีย้อมสเปิร์ม

4.1 การเตรียม 0.5% Eosin

- Eosin 0.25 g ละลายน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร
- กรองด้วยกระดาษกรอง 45 ไมครอน จำนวน 2 ครั้ง

4.2 การเตรียม 10% Nigrosin

- Nigrosin 5 g ละลายน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร
- กรองด้วยกระดาษกรอง 45 ไมครอน จำนวน 2 ครั้ง