บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

สถานที่ทำการวิจัย

สถานที่ทำการทดลอง โรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา เริ่มทำการทดลองตอนที่ 1 ตั้งแต่เดือนเมษายน 2553-เมษายน 2554 เป็นระยะเวลา 13 เดือน การทดลองที่ 2 เดือนสิงหาคม 2553 การทดลองที่ 3.1 เดือนสิงหาคม ปี 2554 การทดลองที่ 3.2 เดือนตุลาคม ปี 2554 การทดลองที่ 4 เดือนพฤษภาคม ปี 2555 การทดลองที่ 5 ตั้งแต่เดือนสิงหาคม -ตุลาคม ปี 2555 เป็นระยะเวลา 3 เดือน

สัตว์ทดลอง

พ่อพันธุ์ปลาตะเพียนขาว จำนวน 30 ตัว ที่นำมาจากศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดชลบุรี และนำมาเลี้ยงไว้ในโรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์

อุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษา

1. จานแก้ว (petridish)
2. ถังน้ำแข็ง
3. ขวดแก้วฝาสีฟ้า ขนาด 250 ml
4. หลอดฝาเกลียว 0.25 และ0.5 ml
5. หลอด Cryovial ขนาด1.5 ml
6. ปากคีบ
7. ปืกเกอร์
8. Tissue culture flask
9. กะเกียงแอลกอฮอล์
10. ไม้จิ้มไฟ
11. ไมโครปิเปตขนาด 200 และ 1,000 µm
12. ถังเก็บไนโตรเจนเหลว
13. เครื่องมือแช่แข็ง Programmable Control rate freezer (Cryologic Pty. ltd รุ่น CL3000)
14. กรรไกร
15. pH meter

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

16. water bath
17. แท่งแก้วคนสาร
18. กระดาษชั่งสาร
19. กระบอกตวงขนาด 10 และ 100 ml
20. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
21. เครื่องมือ Osmometer
22. Hemacytometer

อุปกรณ์ที่ใช้ในการตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม

1. Slide และ cover slide
2. กล้องจุลทรรศน์
3. เข็มเขี่ย
4. น้ำกลั่น
5. นาฬิกาจับเวลา

อุปกรณ์ที่ใช้ในการตรวจสอบสเปิร์มที่มีชีวิต

1. Slide
2. กล้องจุลทรรศน์
3. ตะเกียงแอลกอฮอล์
4. กรรไกร
5. ไม้ขีดไฟ
6. สีย้อม Eosin และ Nigrosin

สารเคมี

1. สารละลายบัฟเฟอร์ (extender) 1 ชนิด คือCalcium - free Hank's balanced salt solution (Ca-F HBSS)
2. สารไครโอโพรเทคแทนท์ (cyoprotectant) 3 ชนิด คือ DMSO, methanol, Ethylene Glycol (EG)ซึ่งเป็นชนิดที่ออกฤทธิ์ภายในเซลล์โดยใช้ที่ระดับความเข้มข้น 5%, 10%, 15%, 20%
3. สีย้อมสเปิร์ม0.5% Eosin และ10% Nigrosin

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

วิธีดำเนินการวิจัยแบ่งออกเป็น 5 การทดลองดังนี้

การทดลองที่ 1 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำเชื้อในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่

การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของแรงดันออสโมติก (Osmotic pressure) ต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม

การทดลองที่ 3 การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวแบบแช่แข็งด้วยเครื่องมืออัตโนมัติ

การทดลองที่ 4 การแช่แข็งน้ำปลาตะเพียนขาวภายในกล่องโฟม โดยมีความสูงเหนือไอไนโตรเจนเหลว, ระยะเวลาที่ใช้ในการลดอุณหภูมิ และขนาดของภาชนะบรรจุน้ำเชื้อที่แตกต่างกัน

การทดลองที่ 5 ศึกษาผลของระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวในถังไนโตรเจนเหลว (- 196°C) เป็นระยะเวลานาน 3 เดือน

การทดลองที่ 1 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำเชื้อในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่

- Sperm motility เป็นการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม โดยการหยดน้ำจืดเพื่อกระกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่ พร้อมทั้งจับเวลาการเคลื่อนที่ของสเปิร์มจนกระทั่งสเปิร์มหยุดการเคลื่อนที่

- วัดค่า pH โดยการนำกระดาษวัด pH ไปจุ่มน้ำเชื้อ เทียบสีและอ่านค่าที่วัดได้

- Sperm concentration เป็นการคำนวณหาความหนาแน่นของสเปิร์ม โดยการนำน้ำเชื้อกับสารละลาย Ca-HBSS 1,000 เท่า และนำไปนับจำนวนที่พบบน haemacytometer แล้วคำนวณหาความหนาแน่นของสเปิร์ม

- Sperm viability การตรวจสอบสเปิร์มที่มีชีวิต โดยนำน้ำเชื้อไปย้อมสีโดยหยด 0.5 % Eosin ประมาณ 5 µl และหยด 10 % Nigrosin ทำการนับจำนวนสเปิร์มที่มีชีวิต (ไม่ติดสีย้อมจะมีสีขาว) และสเปิร์มไม่มีชีวิต (จะติดสีม่วง)

- Osmolality โดยการนำน้ำเชื้อมา centrifuge เพื่อแยก Seminal fluid ออกจากสเปิร์ม แล้วนำ seminal fluid ปริมาณ 10 µl มาวัดค่า Osmolality โดยใช้เครื่องมือ Osmometer

แผนภูมิการทดลองที่ 1 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำเชื้อในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่

เริ่มทำการทดลองตั้งแต่เดือน เมษายน 2553-เมษายน 2554 เป็นระยะเวลา 13 เดือน ทำการเก็บน้ำเชื้อทุกๆ เดือน จนครบระยะเวลาที่กำหนด

ภาพที่ 13 วิธีการศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำเชื้อในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่

หมายเหตุ บันทึกผลทุก ๆ เดือน จนครบช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การเตรียมตัวอย่างก่อนการทดลอง

นำปลาตะเพียนขาวเพศผู้ที่สมบูรณ์เพศ โดยมีอายุประมาณ 2 ปี เช็ดตัวปลาให้แห้ง โดยเฉพาะบริเวณช่องเพศก่อนการรีดน้ำเชื้อ ระวังไม่ให้น้ำเชื้อมีสิ่งอื่นปะปน เช่น น้ำเลือด ทำการรีดน้ำเชื้อจากปลาแต่ละตัวลงในจานแก้ว แล้วนำไปวางบนน้ำแข็ง เพื่อทำการทดลองต่อไป น้ำเชื้อที่นำมาใช้ทดลองมีสีขาวขุ่น และไม่มีปัสสาวะ เมือก หรือเลือดเจือปน

วิธีการทดลองที่ 1

1.1 นำน้ำเชื้อสดปลาตะเพียนขาวที่รีดได้มาวางบนน้ำแข็งประเมินการเคลื่อนที่โดยการหยดน้ำเชื้อประมาณ 1 µl ลงบนกระจกสไลด์ ที่สะอาดพร้อมกับปิดด้วย cover glass ที่หยดน้ำจืดเบา ๆ อย่างรวดเร็ว เพื่อกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่รีบนำไปส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่าแล้วประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม พร้อมทั้งจับเวลาการเคลื่อนที่ของสเปิร์มจนกระทั้งสเปิร์มหยุดการเคลื่อนที่ วิธีประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มตามวิธีของVuthiphandchai and Zohar (1999) โดยแบ่งเป็น 6 ระดับ คือ

100% คือ สเปิร์มมีจำนวน และการเคลื่อนที่ดีมากที่สุด
80% คือ สเปิร์มมีจำนวน และการเคลื่อนที่ดีมาก
60% คือ สเปิร์มมีจำนวน และการเคลื่อนที่ดี
40% คือ สเปิร์มมีจำนวน และการเคลื่อนที่ได้ปานกลาง
20% คือ สเปิร์มมีจำนวน และการเคลื่อนที่ได้เล็กน้อย
0% คือ สเปิร์มไม่มีการเคลื่อนที่

1.2 วัดค่า pH โดยการนำกระดาษวัด pH ไปจุ่มน้ำเชื้อ แล้วเทียบสีและอ่านค่าที่วัดได้

1.3 ความหนาแน่นของสเปิร์ม (Sperm concentration) จะประเมินโดยการเจือจางน้ำเชื้อ 5 µl ด้วยสารละลาย Ca-F HBSS1,000 เท่า ผสมให้เข้ากัน แล้วนำน้ำเชื้อที่เจือจางไปหยดบน haemacytometer แล้วนำไปส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่าและนับจำนวนที่พบ แล้วจึงคำนวณกลับหาความหนาแน่นของสเปิร์มตามวิธีของกฤษณ์ มงคลปัญญา (2536)

1.4 จำนวนสเปิร์มที่มีชีวิตโดยการหยดน้ำเชื้อประมาณ 5 µl ลงบนกระจกสไลด์ที่สะอาด หยดสีย้อม โดยหยด 0.5 % Eosin ประมาณ 5 µl และหยด 10 % Nigrosin ปริมาณเท่ากันลงบนสไลด์ที่มีน้ำเชื้อ เกลี่ยให้เข้ากันอย่างรวดเร็ว เพื่อป้องกันไม่ให้สเปิร์มที่มีชีวิตอยู่ตายเสียก่อน รีบทำสไลด์ให้แห้งโดยผ่านหลอดไฟ แต่ต้องระวังไม่ให้ร้อนจนเกินไปทำการนับจำนวนสเปิร์มที่มีชีวิตและสเปิร์มที่ไม่มีชีวิต ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลัง ขยาย 1000 เท่า จะพบว่าสเปิร์มที่มีชีวิตไม่ติดสีย้อม (ขาว) ส่วนสเปิร์มที่ไม่มีชีวิตจะติดสีแดงม่วง โดยการสุ่มนับสเปิร์มในหลาย ๆ พื้นที่บนสไลด์

อย่างน้อยสไลด์ละไม่ต่ำกว่า 300 ตัว แล้วบันทึกผลแล้วคำนวณเปอร์เซ็นต์สเปิร์มมีชีวิตตามวิธีของ วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย (2536)

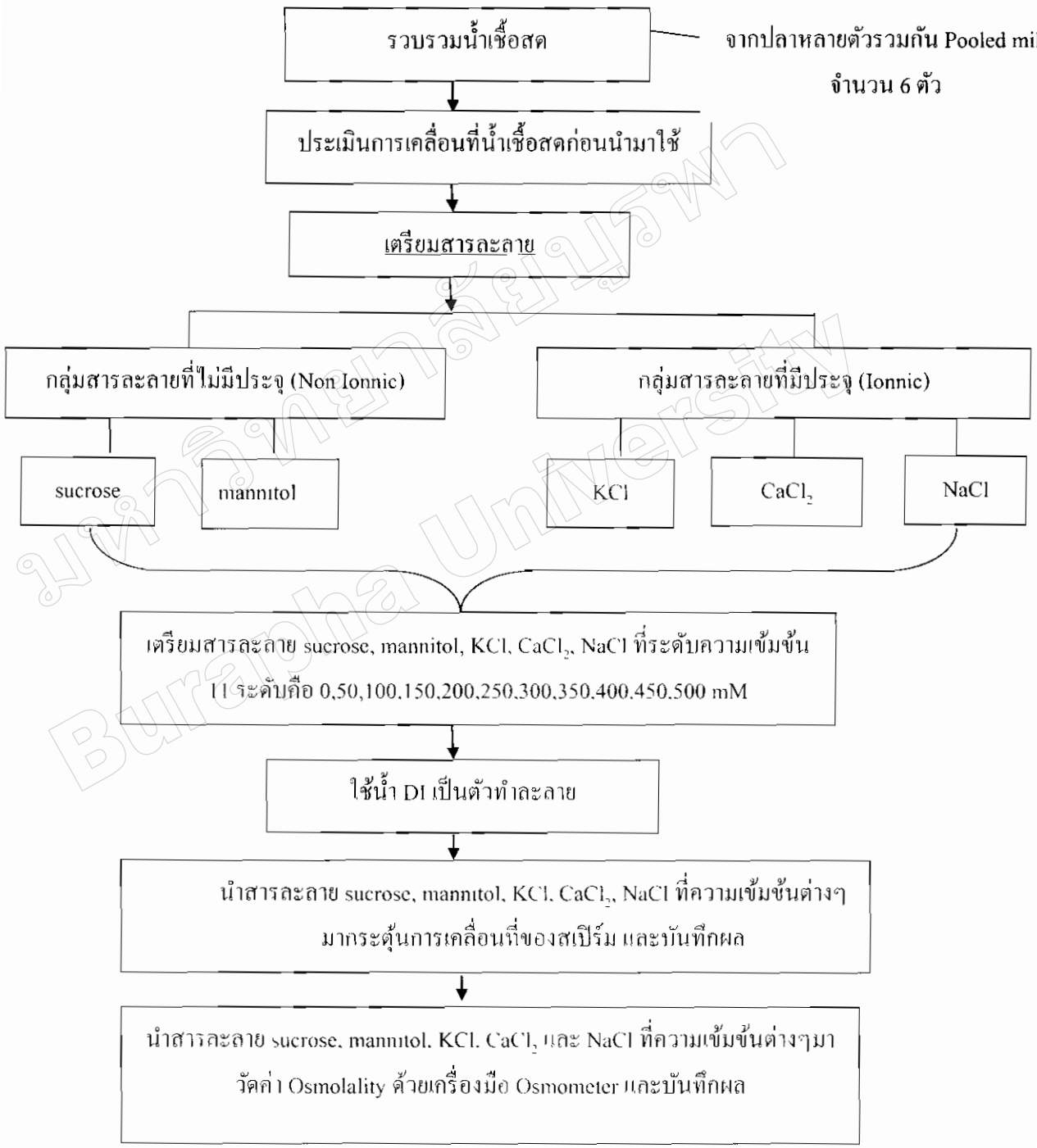
$$\% \text{ Sperm Viability} = \frac{\text{จำนวนสเปิร์มที่มีชีวิต (ตัวเป็น) x 100}}{\text{จำนวนสเปิร์มทั้งหมด (ตัวเป็น+ตัวตาย)}}$$

1.5 แรงดันออสโมติกของน้ำเชื้อ โดยการนำน้ำเชื้อมา centrifuge ด้วยความเร็ว 1500 rpm/min นาน 5 min ที่อุณหภูมิ -4°C เพื่อแยก Seminal fluid ออกจากสเปิร์ม แล้วนำ seminal fluid ปริมาณ 10 µl มาวัดค่า Osmolality โดยใช้เครื่องมือ Osmometer

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

แผนภูมิการทดลองที่ 2 ศึกษาผลของแรงดันออสโมติก (Osmotic pressure) ต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม

- ทำการทดลองในเดือนสิงหาคม 2553 เตรียมสารละลาย sucrose, mannitol, KCl, $CaCl_2$, NaCl, ที่ระดับความเข้มข้น 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 mM



ภาพที่ 14 การศึกษาผลของแรงดันออสโมติก (Osmotic pressure) ต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

วิธีการทดลองที่ 2 ศึกษาผลของแรงดันออสโมติก (Osmotic pressure) ต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม

ศึกษาเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ ของสเปิร์ม ปลาตะเพียนขาวในสารละลาย 2 กลุ่ม คือ กลุ่มมีประจุ NaCl, KCl และ $CaCl_2$ และกลุ่มไม่มีประจุ คือ sucrose และ mannitol ที่ระดับความเข้มข้น 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 ml โดยนำสารทั้งหมดที่ต้องการศึกษามาละลายใน deionized water และทำการทดลองในเดือนสิงหาคม 2553

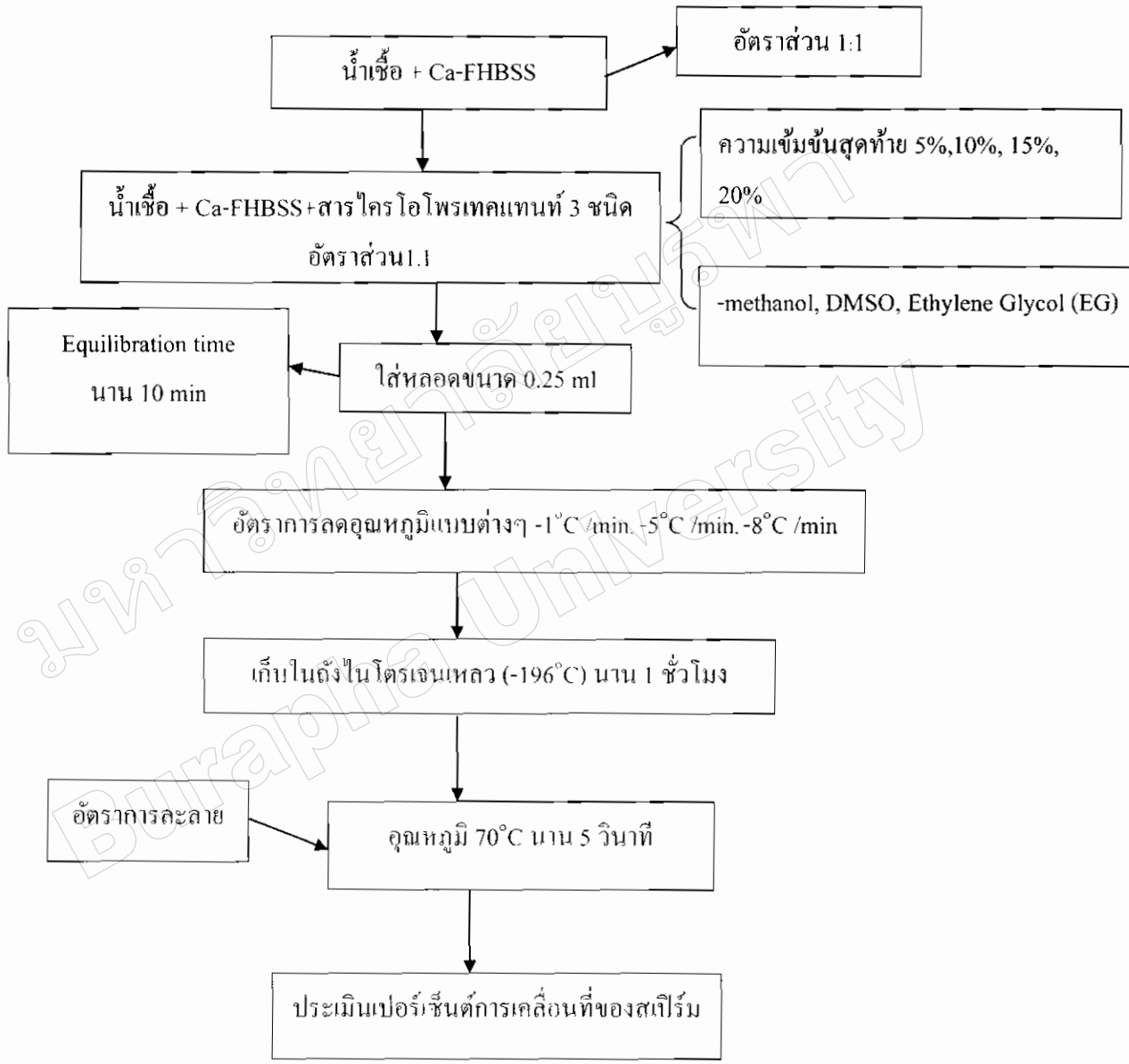
ศึกษาจุดที่สเปิร์มเริ่มเคลื่อนที่ (Thershold activation) และมีการเคลื่อนที่สูงสุด (Complete activation) ของสารละลายทุกสูตร โดยรวบน้ำเชื้อสดจากปลาตะเพียนขาวหลายๆตัวมารวมกันมาประเมินการเคลื่อนที่ ด้วยสารละลายทั้ง 2 กลุ่ม คือ NaCl, KCl, $CaCl_2$, sucrose และ mannitol ประเมินการเคลื่อนที่โดยนำน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว 5 ml ลงบนกระจกสไลด์ แล้วกระตุ้นด้วยสารละลายเคมี 100 µl ทั้ง 2 กลุ่ม จากความเข้มข้นน้อยไปหามาก จากนั้น นำน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า ทันทีแล้วประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม ตามวิธีของ Vuthiphandchai and Zohar (1999) โดยแบ่งเป็น 6 ระดับ คือน้ำเชื้อที่มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม เท่ากับ 0%, 20%, 40%, 60%, 80% และ100% ตามลำดับ

จากนั้นนำสารละลายแต่ละความเข้มข้นไปวัดระดับออสโมลารริตี้ด้วยเครื่องมือ Osmmometer เพื่อเปรียบเทียบผลระหว่างสารละลายกลุ่มที่มีประจุ และไม่มีประจุว่าการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวนั้นเกิดขึ้นจากปัจจัยด้านอิออนหรือค่าออสโมลาริตี้

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

แผนภูมิการทดลองที่ 3. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวแบบแช่แข็งด้วยเครื่องมืออัตโนมัติ

3.1 ศึกษาชนิดและระดับความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนน์ที่ความเข้มข้นและอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสม ต่อการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว



ภาพที่ 15 การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวแบบแช่แข็งด้วยเครื่องมืออัตโนมัติ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

วิธีการทดลองที่ 3.1ศึกษาชนิดและระดับความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ความเข้มข้นและอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสม ต่อการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว

การศึกษานี้เพื่อให้ทราบถึงชนิดและระดับความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ความเข้มข้นและอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสม ที่ใช้ในกระบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว และทำการทดลองในเดือนสิงหาคม ปี 2554 มีขั้นตอนดังนี้

1. เตรียมสารไครโอโพรเทคแทนท์ทั้ง 3 ชนิด คือ DMSO, Methanol, Ethylene glycol (EG) ที่ความเข้มข้น4 ระดับ คือ 5%, 10%, 15%, 20%

2. โดยการเจือจางสารไครโอโพรเทคแทนท์ ในสารละลายบัฟเฟอร์Ca-FHBSS แบ่งสารละลายบัฟเฟอร์เป็น 2 ส่วน เท่าๆกัน คือ

ส่วนที่ 1 นำน้ำเชื้อมาเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์Ca-FHBSS ในอัตราส่วน 1:1 โดยไม่ผสมสารไครโอโพรเทคแทนท์

ส่วนที่ 2 เจือจางสารละลายบัฟเฟอร์Ca-FHBSSในสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ความเข้มข้นเป็น 2 เท่า ของความเข้มข้นสุดท้ายที่ต้องการนำน้ำยาส่วนที่ 1 ผสมกับส่วนที่ 2 ในอัตราส่วน 1:1 จะทำให้ความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ลดลงครึ่งหนึ่งและจะได้ความเข้มข้นสุดท้าย (Final Concentration) ตามต้องการ

3. ดูดสารละลายน้ำเชื้อ 0.2 ml ใส่ในหลอดฟางขนาด 0.25 ml ปิดหลอดฟางด้วยครีมหนีบลนไฟ แล้วปล่อยให้น้ำเชื้ออยู่ในภาวะสมดุล (Equilibration time) นาน 10 min

4. นำหลอดฟางที่บรรจุน้ำเชื้อไปลดอุณหภูมิด้วยเครื่องมือแช่แข็งอัตโนมัติ Programmable freezing control (Cryologic Pty Ltd รุ่น CL3000) เริ่มทำการแช่แข็งโดยการลดอุณหภูมิจากอุณหภูมิเริ่มต้น 25°C ถึง 0°C พัก 0.5 min อุณหภูมิสุดท้าย 0 °C ถึง -40°C พัก 0.5 min โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิแบบต่าง ๆ คือ -1°C/min, -5°C/min และ -8°C/min

5. นำไปเก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลว (-196°C) นาน 1 วัน

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

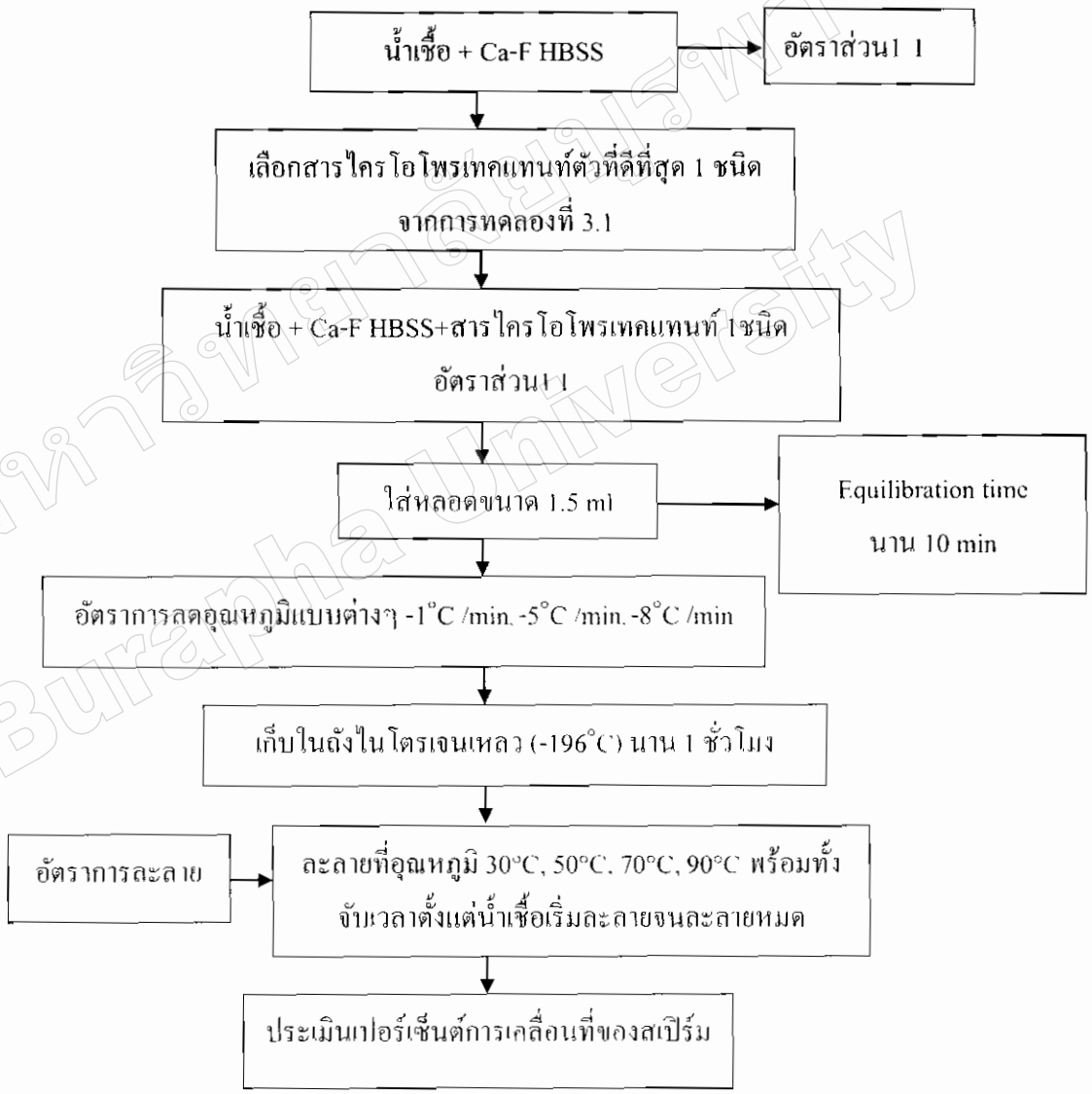
7. ทำการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 หลอดการทดลอง

วิเคราะห์ทางสถิติ

ข้อมูลที่ได้จะแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ±S.E; n = 3. และนำข้อมูลอัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (% sperm motility) ในและชุดการทดลองจะนำมาวิเคราะห์หาความแตกต่างทางสถิติ ด้วยวิธี

Two way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และเปรียบเทียบความแตกต่าง ของค่าเฉลี่ยในแต่ละชุดการทดลองด้วย Dunan's New Multiple Range Test (DMRT) โดยใช้โปรมแกรม SPSS

แผนภูมิการทดลองที่3.2 ศึกษาผลของขนาดหลอดที่ใช้บรรจุน้ำเชื้อและอัตราการเพิ่มอุณหภูมิ ในการละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง



ภาพที่ 16 วิธีการศึกษาผลของขนาดหลอดที่ใช้บรรจุน้ำเชื้อและอัตราการเพิ่มอุณหภูมิ ในการละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง

วิธีการทดลองที่ 3.2 ศึกษาผลของขนาดหลอดที่ใช้บรรจุน้ำเชื้อและอัตราการเพิ่มอุณหภูมิ ในการละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง

1. เตรียมสารไครโอโพรเทคแทนท์ DMSO ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 10%

2. โดยการเจือจางสารไครโอโพรเทคแทนท์ ในสารละลายบัฟเฟอร์Ca-FHBSS แบ่งสารละลายบัฟเฟอร์เป็น 2 ส่วน เท่าๆกัน คือ

ส่วนที่ 1 นำน้ำเชื้อมาเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ Ca-FHBSS ในอัตราส่วน 1:1 โดยไม่ผสมสารไครโอโพรเทคแทนท์

ส่วนที่ 2เจือจางสารละลายบัฟเฟอร์ Ca-FHBSS ในสารไครโอโพรเทคแทนท์ ที่ความเข้มข้นเป็น 2 เท่า ของความเข้มข้นสุดท้ายที่ต้องการนำน้ำยาส่วนที่ 1 ผสมกับส่วนที่ 2 ในอัตราส่วน 1:1 จะทำให้ความเข้มข้นของสาร ไครโอโพรเทคแทนท์ ลดลงครึ่งหนึ่ง และจะได้ความเข้มข้นสุดท้าย(FinalConcentration) ตามต้องการ

3. ดูดสารละลายน้ำเชื้อจากข้อ 1 มาปริมาตร 1 ml ใส่ในหลอดไครโอ (Cryotube) ที่มีขนาด 1.5 ml ปิดฝา ปล่อยให้น้ำเชื้ออยู่ในสภาวะสมดุล (Equilibration time) นาน 10min

4. นำหลอดไครโอ (Cryotube) ที่บรรจุน้ำเชื้อไปลดอุณหภูมิด้วยเครื่องมือแช่แข็งอัตโนมัติ Programmable freezing control (Cryologic Pty Ltd รุ่น CL3000) เริ่มทำการลดอุณหภูมิจากอุณหภูมิเริ่มต้น 25°C ถึง 0°C พัก 0.5 min อุณหภูมิสุดท้าย 0°C ถึง -40°C พัก 0.5 min

5. นำไปเก็บรักษาไว้ในถังไนโตรเจนเหลว (-196°C) นาน 1 ชั่วโมง

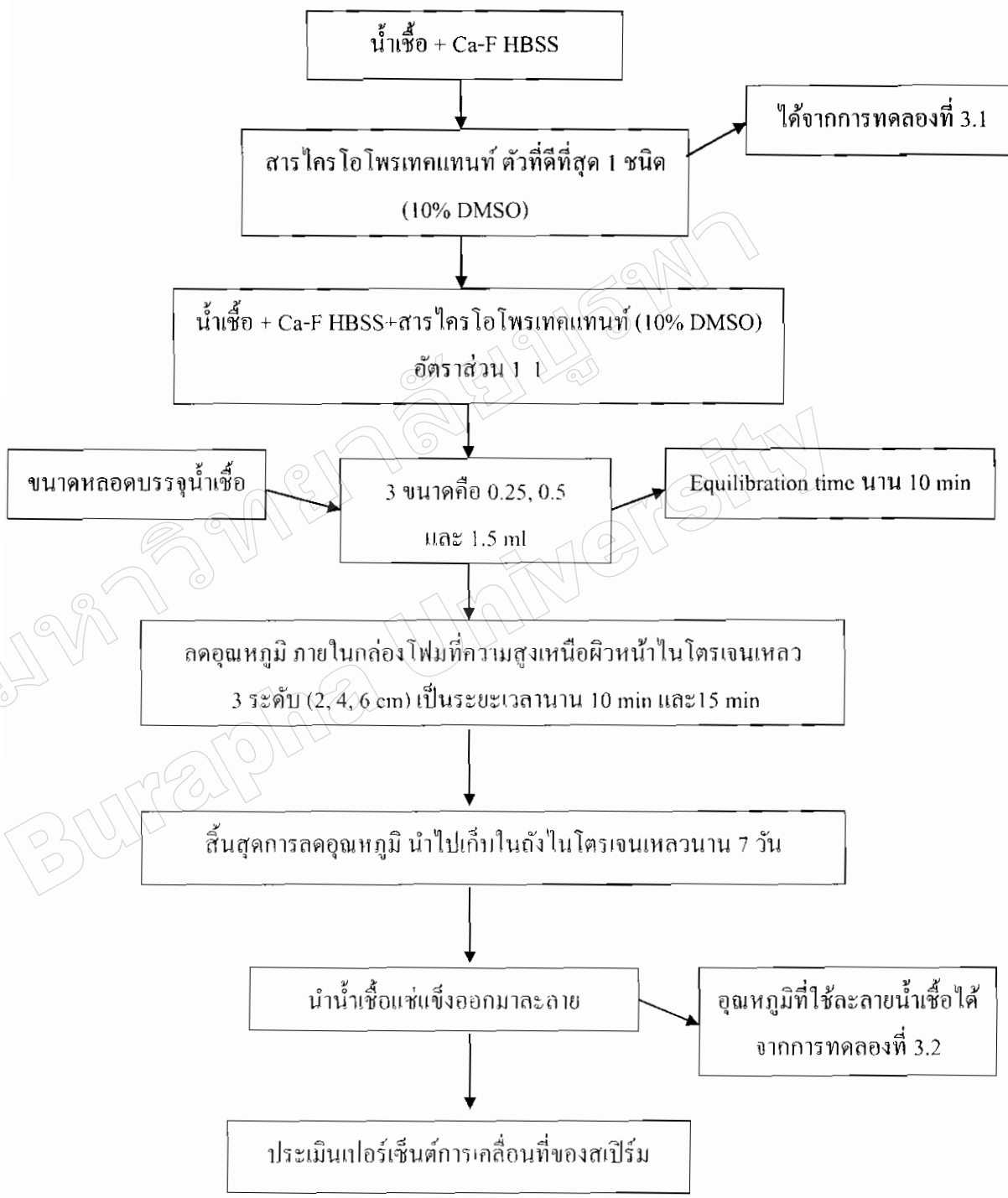
6. จากนั้นนำน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่ผ่านกระบวนการแช่แข็งที่เก็บรักษาไว้ในถังไนโตรเจนเหลว (-196°C) มาละลายน้ำ (Thawing) ที่อุณหภูมิ 30°C, 50°C, 70°C และ90°C พร้อมทั้งจับเวลาตั้งแต่น้ำเชื้อเริ่มละลายจนละลายหมด

7. ทำการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม 3 ซ้ำ และทำการทดลองในเดือนตุลาคม ปี 2554

วิธีเคราะห์ทางสถิติ

ข้อมูลที่ได้จะแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ±S.E; n = 3. และนำข้อมูลมาวิเคราะห์หาความแปรปรวนด้วยวิธี Two way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของทรีเม้นท์ โดยวิธี Dunan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรมแกรม SPSS

แผนภูมิการทดลองที่ 4 การแช่แข็งน้ำปลาตะเพียนขาวภายในกล่องโฟม โดยมีความสูงเหนือไอ



ภาพที่ 17 วิธีการแช่แข็งน้ำปลาตะเพียนขาวภายในกล่องโฟม (เครื่องมืออย่างง่าย)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การทดลองที่ 4 การแช่แข็งน้ำปลาตะเพียนขาวภายในกล่องโฟม โดยมีความสูงเหนือไอไนโตรเจนเหลว, ระยะเวลาที่ใช้ในการลดอุณหภูมิ และขนาดของภาชนะบรรจุน้ำเชื้อที่แตกต่างกัน

สารไครโอโพรเทคแทนท์ที่เหมาะสม 1 ชนิด คือ 10% DMSOใช้ความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 2, 4, 6 cm นาน 10 min และ15 min ขนาดหลอดทดลอง 3 ขนาด คือ 0.25, 0.5 และ 1.5 ml

1. ทำการทดลองเหมือนข้อที่ 1-2 (จากการทดลองที่ 3.2)

2. ดูดสารละลายน้ำเชื้อใส่หลอดขนาด 0.25 ml ปล่อยให้น้ำเชื้ออยู่ในสภาวะสมดุล (Equilibration time) นาน 10 min ที่อุณหภูมิห้อง 25°C

3. นำไปลดอุณหภูมิในกล่องโฟมขนาด 17×32×20 cm ที่บรรจุไนโตรเจนเหลว สูง 3 cm โดยการเทไนโตรเจนเหลวทิ้งไว้ 5 min พร้อมทั้งปิดฝากล่องเพื่อปรับอุณหภูมิภายในกล่องโฟม

4. เมื่อครบ 5 min จึงนำหลอดฟางขนาด 0.25 ml วางลงในกล่องโฟมที่ความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลวในระดับที่ต่างกัน 3 ระดับ คือ 2,4,6 cm โดยใช้เวลาการลดอุณหภูมิในกล่องโฟม 2 ระยะ คือ 10 min และ 15 min แล้วจดบันทึกอุณหภูมิที่ลดลงทุกๆ15 วินาที

5. เมื่อครบ 10 min ให้เขี่ยหลอดให้ตกไปอยู่ในไนโตรเจนเหลว จับเวลาอีก 10 min

6. จากนั้น นำหลอดตัวอย่างเก็บในถังไนโตรเจนเหลว (-196°C) เป็นระยะเวลา 7 วัน

7. ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1- 5 แต่เปลี่ยนหลอดบรรจุน้ำเชื้อเป็นหลอดขนาด 0.5 ml และ หลอดไครโอ (Cryotube) 1.5 ml ตามลำดับ

8. เมื่อครบกำหนดให้นำน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวมาละลายน้ำ (Thawing) อุณหภูมิที่ใช้ในการละลาย ขนาดหลอด 0.25 และ0.5 ml ละลายที่อุณหภูมิ 70°C นาน 5 วินาที และขนาดหลอด Cryovial 1.5 ml ละลายที่อุณหภูมิ 70°C นาน 70 วินาที

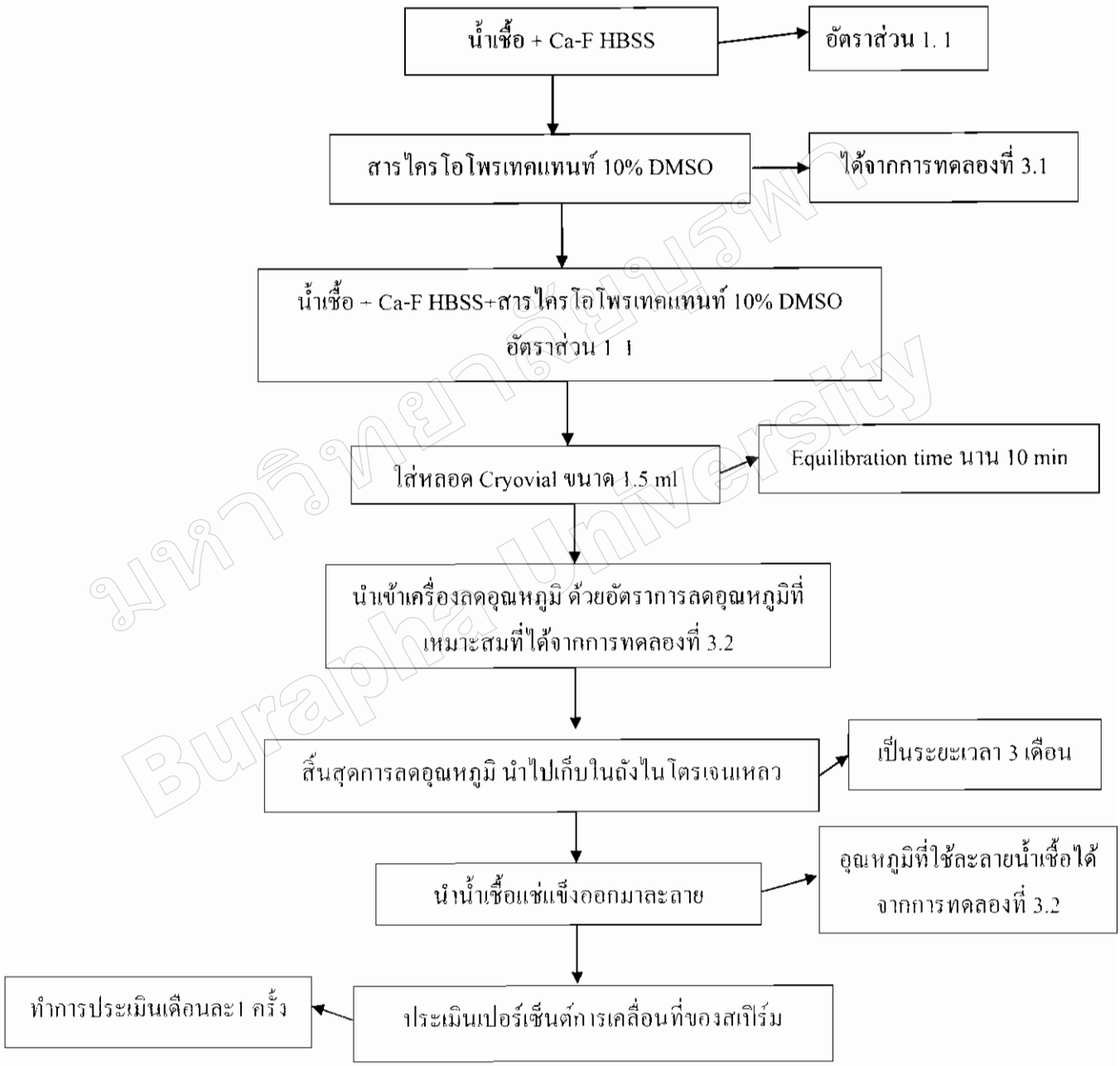
9. ทำการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม 3 ซ้ำ และได้ทำการทดลองในเดือนพฤษภาคม ปี 2555

วิธีเคราะห์ทางสถิติ

ข้อมูลที่ได้จะแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ±S.E; n = 3, และนำข้อมูลมาวิเคราะห์หาความแปรปรวนด้วยวิธี Two way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของทรีเม้นท์ โดยวิธี Dunan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรมแกรม SPSS

แผนภูมิการทดลองที่ 5

5.1 การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวแบบแช่แข็งด้วยเครื่องมืออัตโนมัติ



ภาพที่ 18 วิธีการศึกษาผลของระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวในถัง
ไนโตรเจนเหลว(-196°C) เป็นระยะเวลานาน 3 เดือนแช่แข็งด้วยเครื่องมืออัตโนมัติ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

วิธีการทดลองที่ 5 ศึกษาผลของระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวในถังไนโตรเจนเหลว (- 196°C) เป็นระยะเวลานาน 3 เดือน

5.2 การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวแบบแช่แข็งด้วยเครื่องมืออัตโนมัติ

1. เตรียมสารไครโอโพรเทคแทนท์ DMSO ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 10%

2. โดยการเจือจางสารไครโอโพรเทคแทนท์ ในสารละลายบัฟเฟอร์ Ca-FHBSS แบ่งสารละลายบัฟเฟอร์เป็น 2 ส่วน เท่า ๆ กัน คือ

ส่วนที่ 1 นำน้ำเชื้อมาเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ Ca-FHBSS ในอัตราส่วน1: 1 โดยไม่ผสมสารไครโอโพรเทคแทนท์

ส่วนที่ 2 เจือจางสารละลายบัฟเฟอร์ Ca-FHBSSในสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ความเข้มข้นเป็น 2 เท่า ของความเข้มข้นสุดท้ายที่ต้องการนำน้ำยาส่วนที่ 1 ผสมกับส่วนที่ 2 ในอัตราส่วน 1:1 จะทำให้ความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ ลดลงครึ่งหนึ่งและจะได้ความเข้มข้นสุดท้าย (Final Concentration) ตามต้องการ

3. ดูดสารละลายน้ำเชื้อ 1 ml ใส่หลอดไครโอ (Cryotube) ที่มีขนาด 1.5 ml ปิดฝา ปล่อยให้น้ำเชื้ออยู่ในสภาวะสมดุล (Equilibration time) นาน 10 min ที่อุณหภูมิห้อง 25°C

4. นำหลอดไครโอ (Cryotube) ที่บรรจุน้ำเชื้อไปลดอุณหภูมิด้วยเครื่องมือแช่แข็งอัตโนมัติ Programmable freezing control (Cryologic Pty Ltd รุ่น CL3000) เริ่มทำการแช่แข็งด้วยการลดอุณหภูมิ จากอุณหภูมิเริ่มต้น 25°C ถึง 0°C พัก 0.5 min อุณหภูมิสุดท้าย 0°C ถึง 40°C พัก 0.5 min โดยอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองที่ 3.2

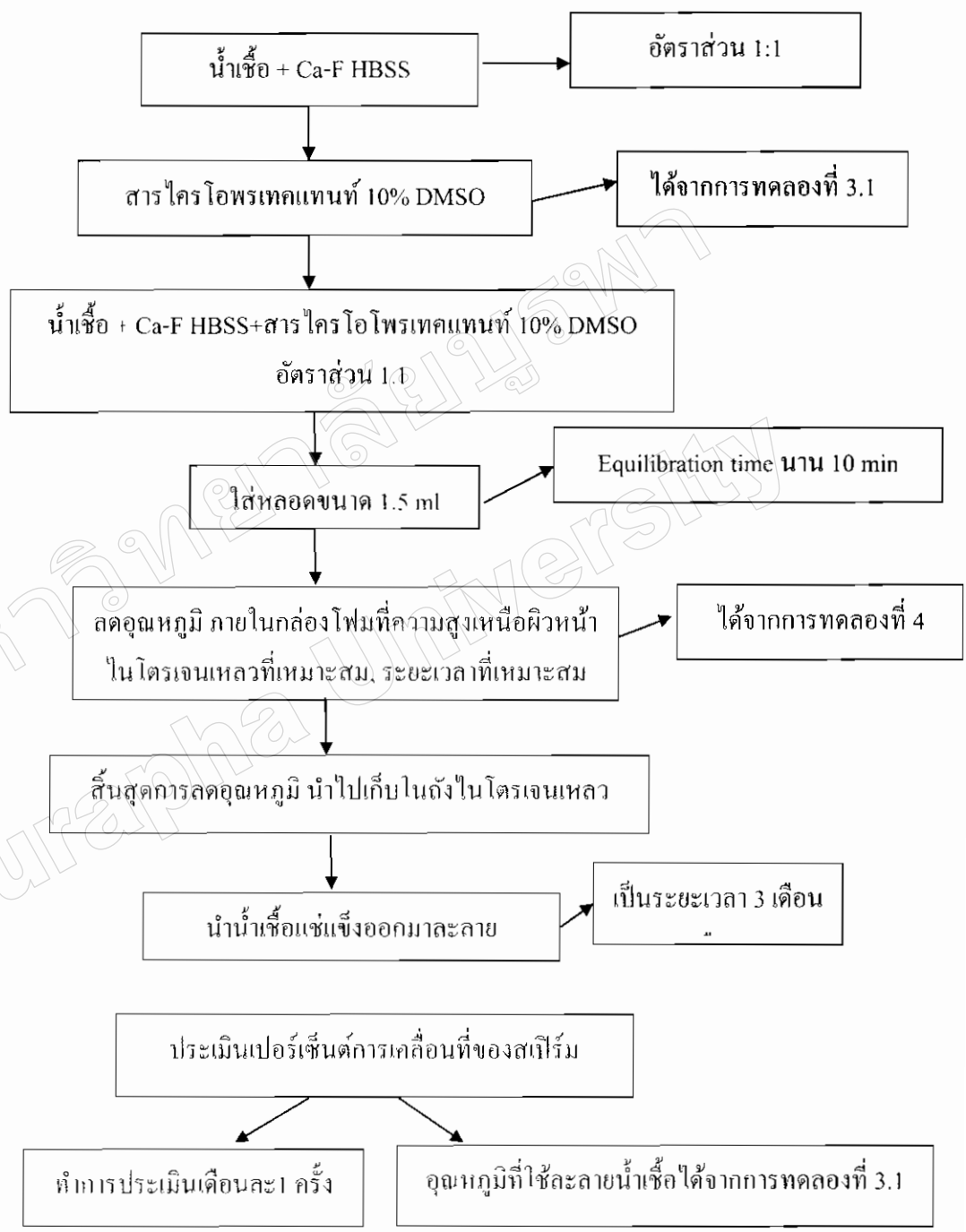
5. หลังจากนั้นนำน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาาที่ผ่านกระบวนการแช่แข็งที่เก็บรักษาไว้ในถังไนโตรเจนเหลว (-196°C) เป็นระยะเวลา 3 เดือน

6. เมื่อครบกำหนดเวลา ทุก ๆ 1 เดือน จึงนำน้ำเชื้อที่เก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลวมาละลายน้ำ (Thawing) โดยใช้อัตราการเพิ่มอุณหภูมิที่ดีที่สุด จากการทดลองที่ 3.2 เพื่อละลายน้ำเชื้อ

7. ทำการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม 3 ซ้ำ และได้ทำการทดลอง ตั้งแต่เดือนสิงหาคม -ตุลาคม ปี 2555 เป็นระยะเวลา 3 เดือน

แผนภูมิการทดลองที่ 5 ศึกษาผลของระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว

5.2 การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวภายในกล่องโฟม (เครื่องมืออย่างง่าย)



ภาพที่ 19 วิธีการศึกษาผลของระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวในถังไนโตรเจนเหลว(-196°C) เป็นระยะเวลานาน 3 เดือนแช่แข็งด้วยเครื่องมืออย่างง่าย

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

วิธีการทดลองที่ 5 ศึกษาผลของระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวในถังไนโตรเจนเหลว (-196 °C) เป็นระยะเวลานาน 3 เดือน

5.2 การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวภายในกล่องโฟม (เครื่องมืออย่างง่าย)

1. ทำการทดลองเหมือนข้อที่ 1-2 (จากการทดลองที่ 5.2)

2. ดูดสารละลายน้ำเชื้อ 1 ml ใส่หลอดไครโอ (Cryotube) ที่มีขนาด 1.5 ml ปิดฝา ปล่อยให้น้ำเชื้ออยู่ในสภาวะสมดุล (Equilibration time) นาน 10 min ที่อุณหภูมิห้อง 25 °C

3. นำหลอดไครโอ(Cryovial)ที่บรรจุน้ำเชื้อไปลดอุณหภูมิภายในกล่องโฟมขนาด 17×32×20 cm ที่ภายในบรรจุไนโตรเจนเหลวสูง 3 cm โดยการเทไนโตรเจนเหลว ทิ้งไว้ 5 min พร้อมทั้งปิดฝากล่องโฟมเพื่อปรับอุณหภูมิกล่องโฟม

4. เมื่อครบ 5 min นำหลอดไครโอ (Cryovial) ขนาดหลอด 1.5 ml วางลงในกล่องโฟมที่ความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลวที่เหมาะสม (จากการทดลองที่ 4)

5. จากนั้นนำหลอดไครโอ (Cryovial) มาเก็บรักษาไว้ในถังไนโตรเจนเหลว (-196°C) เป็นระยะเวลา 3เดือน

6. เมื่อครบกำหนดทุก ๆ 1 เดือน จึงนำน้ำเชื้อที่เก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลวมาละลาย (Thawing) โดยใช้อัตราการเพิ่มอุณหภูมิที่ดีที่สุด (จากการทดลองที่ 3.2) เดือนละ 3 หลอด

7. ทำการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม 3 ซ้ำ

วิธีเคราะห์ทางสถิติ

การทดลองที่ 5.1 และการทดลองที่ 5.2 ข้อมูลที่ได้จะแสดงเป็นค่าเฉลี่ย Mean ±S.E; n – 3. ด้วยโปรแกรม excel และนำข้อมูลมาวิเคราะห์หาความแปรปรวน ด้วยวิธีTwo way ANOVAและเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของทรีเม้นท์ โดยวิธี Dunan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรม SPSS

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University