บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

สัตว์ทดลอง

พ่อพันธุ์หอยนางรมปากจีบที่รวบรวมจากธรรมชาติ ขนาดความยาวและความสูงของเปลือกประมาณ 4 เซนติเมตร และ 6.5 เซนติเมตร โดยใช้พ่อพันธุ์หอยนางรมปากจีบในแต่ละชุดการทดลองครั้งละประมาณ 5 กิโลกรัม

สถานที่และระยะเวลาในการทดลอง

สถานที่ทำการทดลอง คือ โรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา เริ่มทำการทดลองตั้งแต่เดือนมีนาคม พ.ศ. 2553 ถึงกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2555

อุปกรณ์และสารเคมี

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง
   1.1 สิ่ว
   1.2 ถุงมือ
   1.3 จานแก้ว
   1.4 เข็มเขี่ย
   1.5 ไมโครปิเปต ขนาด 200 และ 1000 ไมโครลิตร
   1.6 Tissue culture flask
   1.7 ฟอร์เซ็บ
   1.8 กรรไกร
   1.9 บีกเกอร์
   1.10 หลอดฟาง
   1.11 ตะเกียง
   1.12 เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง
   1.13 เทอร์โมมิเตอร์
   1.14 water bath
   1.15 ถังน้ำแข็ง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

1.16 ถังไนโตรเจนเหลว

1.17 เครื่องแช่แข็งอัตโนมัติ Programmable Freezer Controller (Cryologic Pty Ltd รุ่น CL3000)

อุปกรณ์ที่ใช้ในการตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม

1. Slide และ cover slide
2. กล้องจุลทรรศน์
3. เข็มเขี่ย
4. น้ำทะเล (ความเค็มเท่ากับ 30 ppt)

อุปกรณ์ที่ใช้ในการตรวจสอบเปอร์เซ็นต์สเปิร์มมีชีวิต

1. Slide
2. กล้องจุลทรรศน์
3. ตะเกียงแอลกอฮอล์
4. สีย้อม Eosin – Nigrosin
5. Oil Immersion

สารเคมี

สารละลายเอ็กซ์เทนเดอร์สูตรต่างๆ คือ

1. Calcium Free Hank's Balanced salt solution (Ca-F HBSS) (Christensen & Tiersch, 1997)

2. Calcium-Free saline salt solution (Ca-F saline)

3. สารไครโอโพรเทคแทนท์ 3 ชนิด คือ DMSO, Propylene glycol และ Ethylene glycol ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 5%, 10% และ 15%

4. สารที่ใช้ปรับเกรด-เบส คือ 10% HCl และ 10% NaOH

5. สีย้อมสเปิร์ม

- 0.5% Losin
- 10% Nigrosin

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

วิธีเก็บรวบรวมน้ำเชื้อหอยนางรมปากจีบ

การเก็บรวบรวมน้ำเชื้อหอยนางรม (ภาพที่ 6) ทำได้โดยการเปิดเปลือกเอาตัวหอยออกมา (ภาพที่ 7) แล้วใช้เข็มเขี่ยบริเวณ gonad ซึ่งมีสีครีมขาว (ภาพที่ 8) แตะน้ำเชื้อลงบนสไลด์แล้วนำมาส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า เพื่อทำการแยกเพศ (ภาพที่ 9) แล้วรีดน้ำเชื้อออกมาใส่ภาชนะที่เตรียมไว้ ระวังห้ามให้เข็มเขี่ยโดนกระเพาะอาหาร และต้องเช็ดตัวหอยให้แห้งก่อนรีดน้ำเชื้อเพื่อไม่ให้มีสิ่งปนเปื้อนปนกับสเปิร์ม น้ำเชื้อที่ดีควรมีสีขาวขุ่นและหนืด ทำการรีดน้ำเชื้อสดใส่ใน eppendorf tube วางบนน้ำแข็ง (ภาพที่ 10)

น้ำเชื้อสดที่ใช้ในการทดลองจะทำการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อสด โดยประเมินจากการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม ถ้าสเปิร์มมีการเคลื่อนที่มากกว่า 80% จึงนำน้ำเชื้อที่ได้ไปทำการทดลองต่อไป (Jianlin, 2008)

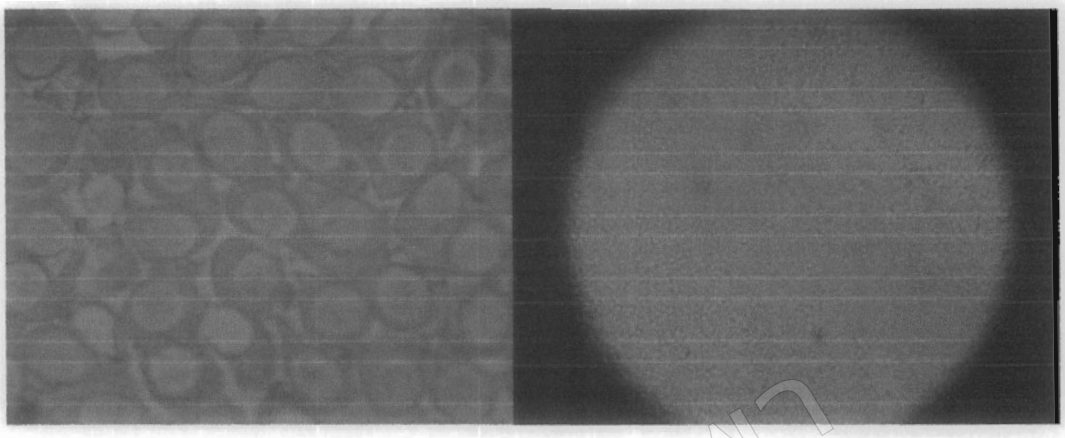
ภาพที่ 6 หอยนางรมปากจีบ (*Saccostrea cucullata*)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

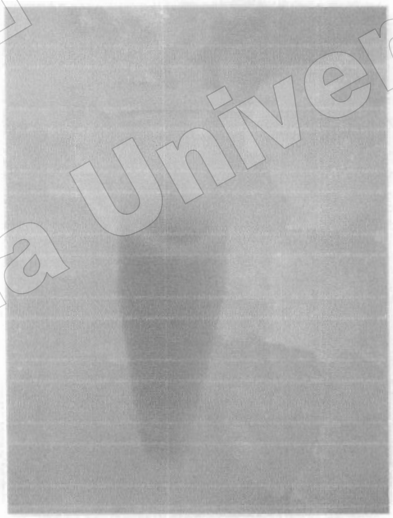
ภาพที่ 7 การแกะหอยนางรม

ภาพที่ 8 บริเวณ gonad ของหอยนางรมปากจีบซึ่งมีสีครีมขาว

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 9 ไข่และสเปิร์มหอยนางรมปากจีบใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า



ภาพที่ 10 น้ำเชื้อสดใส่ใน eppendorf tube วางบนน้ำแข็ง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

วิธีการทดลอง

1. วางแผนการทดลอง

แบ่งการทดลองออกเป็น 2 การทดลอง คือ

การทดลองที่ 1 การเปลี่ยนแปลงคุณภาพสเปิร์มหอยนางรมปากจีบในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่

การทดลองที่ 2 การแช่แข็งน้ำเชื้อหอยนางรมปากจีบ

การทดลองที่ 2.1 ศึกษาชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยนางรมปากจีบ

การทดลองที่ 2.2 ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์และอัตราการลดอุณหภูมิที่ใช้ในการแช่แข็งน้ำเชื้อหอยนางรมปากจีบ

1. การเตรียมตัวอย่างก่อนการทดลอง

นำหอยนางรมปากจีบที่รวบรวมมาจากธรรมชาติ จังหวัดชลบุรี ทำความสะอาดเปลือกหอยก่อนทำการเก็บรวบรวมน้ำเชื้อ การเก็บรวบรวมน้ำเชื้อหอยทำโดยการเปิดเปลือกเอาตัวหอยออกมา แล้วใช้เข็มเขี่ยบริเวณ gonad ซึ่งมีสีครีมขาว แตะน้ำเชื้อลงบนสไลด์แล้วนำมาส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า เพื่อทำการแยกเพศ แล้วรีดน้ำเชื้อออกมาใส่ภาชนะที่เตรียมไว้ ระวังห้ามให้เข็มเขี่ยโดนกระเพาะอาหาร และต้องเช็ดตัวหอยให้แห้งก่อนรีดน้ำเชื้อเพื่อไม่ให้มีสิ่งปนเปื้อนปนกับสเปิร์ม น้ำเชื้อที่ดีควรมีสีขาวขุ่นและหนืด ทำการรีดน้ำเชื้อสดใส่ใน eppendorf tube วางบนน้ำแข็ง

การทดลองที่ 1 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพสเปิร์มหอยนางรมปากจีบในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่

รวบรวมน้ำเชื้อหอยนางรมปากจีบทุกเดือน ตั้งแต่เดือนมีนาคม 2553 ถึงเดือน กุมภาพันธ์ 2554 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ (1 ซ้ำ ใช้หอยนางรมเพศผู้ 100 ตัว)

1.1 ประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (Sperm motility) ตามวิธีการของ Vuthiphandchai and Zohar (1999)

หยดน้ำเชื้อหอย 1 ไมโครลิตร ลงบนกระจกสไลด์ที่สะอาดแล้วจึงหยดน้ำทะเล 30 ppt ลงไป 50 ไมโครลิตร แล้วปิดด้วย cover glass เบา ๆ อย่างรวดเร็ว เพื่อกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่ แล้วนำไปส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40X ทันที แล้วประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม 6 ระดับ คือ 0%, 20%, 40%, 60%, 80% และ 100% ตามลำดับ

1.2 ความหนาแน่นของสเปิร์ม (Sperm density) ตามวิธีการของ กฤษณ์ มงคลปัญญา (2536)

การประเมินความหนาแน่นของสเปิร์มทำโดยการเจือจางน้ำเชื้อ 5 ไมโครลิตร ด้วยน้ำกลั่น 1,000 เท่า ผสมให้เข้ากันใน eppendorf tube แล้วนำน้ำเชื้อที่ถูกเจือจางไปหยดลงบน Hemacytometer แล้วนำไปส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10X และนับจำนวนสเปิร์มที่พบแล้วจึงคำนวณกลับหาความหนาแน่นของสเปิร์ม

1.3 สเปิร์มที่มีชีวิต (Sperm viability) ตามวิธีการของ Fribourgh (1996)

หยดน้ำเชื้อประมาณ 5 ไมโครลิตร ลงบนกระจกสไลด์ ที่สะอาด หยดสีย้อม Eosin – Nigrosin โดยหยด 0.5% Eosin ประมาณ 5 ไมโครลิตร และหยด 10% Nigrosin ปริมาณเท่ากันลงบนสไลด์ที่มีน้ำเชื้อ เกลี่ยให้เข้ากันอย่างรวดเร็ว เพื่อป้องกันไม่ให้สเปิร์มที่มีชีวิตอยู่ตายเสียก่อนรีบทำสไลด์ให้แห้งโดยผ่านเปลวไฟ แต่ต้องระวังไม่ให้ร้อนจนเกินไป ทำการนับจำนวนสเปิร์มที่มีชีวิต และสเปิร์มที่ไม่มีชีวิต ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100X โดยสเปิร์มที่มีชีวิตจะไม่ติดสีย้อม (ขาว) ส่วนสเปิร์มที่ไม่มีชีวิตจะติดสีแดงม่วง แล้วจึงคำนวณกลับหาเปอร์เซ็นต์ของสเปิร์มที่มีชีวิต

1.4 แรงดันออสโมติกของน้ำเชื้อ (Sperm osmotic pressure)

การประเมินแรงดันออสโมติกทำโดยการนำน้ำเชื้อมา Centrifuge ด้วยความเร็ว 5000/นาที นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ -4°C เพื่อแยก seminal fluid ออกจากสเปิร์ม แล้วนำ seminal fluid ปริมาณ 100 ไมโครลิตร วัดค่า osmolality โดยใช้เครื่องมือ Osmometer

การทดลองที่ 2 การแช่แข็งน้ำเชื้อหอยนางรมปากจีบ

การทดลองที่ 2.1 ศึกษาชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มของหอยนางรมปากจีบ

1. นำน้ำเชื้อหอยนางรมปากจีบที่ได้มาวางบนน้ำแข็ง

2. ทำการเตรียมน้ำยาบัฟเฟอร์ 2 ชนิด คือ Ca-F HBSS และ Ca-F saline

- Calcium-free Hank's balanced salt solution (Ca-F HBSS) ประกอบด้วย NaCl 0.8890 g, KCL 0.0440 g, Na2HPO4.2H2O 0.0130 g, NaHCO3 0.0390 g, KH2PO4 0.0070 g, MgSO4.7H2O 0.00220 g, Glucose 0.1110 g ละลายในน้ำกลั่น 100 ml และปรับ pH 7.6

- Calcium-free saline (Ca-F saline) ประกอบด้วย NaCl 21.63 g, KCL 1.12 g, H3BO3 0.53 g, NaOH 0.19 g, MgSO4.7H2O 4.93 g ละลายในน้ำกลั่น 1000 ml และปรับ pH 7.4

3. ใช้ไมโครปิเปตดูดน้ำเชื้อสดใส่ลงใน Tissue culture flask ที่มีน้ำยาสูตร Ca-F HBSS และ Ca-F saline โดยใช้อัตราส่วนของน้ำเชื้อต่อน้ำยาเป็น 1:4 เขย่าเบา ๆ ให้น้ำเชื้อกันน้ำยาผสมเป็นเนื้อเดียวกัน

4. นำ Tissue culture flask ไปแช่ตู้เย็นที่อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส

5. ทำการประเมินหาเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการเจือจาง ตั้งแต่ 0, 30 นาที, 1, 3, 6, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

6. ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

การทดลองที่ 2.2 ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์และอัตราการลดอุณหภูมิที่ใช้ในการแช่แข็งน้ำเชื้อหอยนางรมปากจีบ

1. นำน้ำเชื้อหอยนางรมปากจีบมาเจือจางในน้ำยาบัฟเฟอร์ที่ดีที่สุด (จากการทดลอง 2.1)

2. เตรียมสารไครโอโพรเทคแทนท์ 3 ชนิด คือ DMSO, Propylene glycol และ Ethylene glycol ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 5%, 10% และ 15% โดยเจือจางสารไครโอโพรเทคแทนท์ในน้ำยาบัฟเฟอร์ที่ดีที่สุดแล้วนำมาวางบนน้ำแข็ง

3. ดูดน้ำเชื้อที่เจือจางน้ำยาบัฟเฟอร์ (ข้อ1) มาผสมกับ DMSO ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 5%, 10% และ 15% ในอัตราส่วน 1:1 เขย่าเบา ๆ ให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน

4. จากนั้นปล่อยให้น้ำเชื้ออยู่ในภาวะสมดุลนาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (25°C) ระหว่างที่รอ นำหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร ดูดน้ำเชื้อที่ผสมสารไครโอโพรเทคแทนท์ ใส่ในหลอดฟางปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร แล้วปิดหลอดฟางให้สนิทด้วยฟอร์เซ็บเลนไฟ

5. นำหลอดฟางไปทำการลดอุณหภูมิ ด้วยเครื่องมืออัตโนมัติ Programmable freezing control (Cryologic Pty Ltd รุ่น CL3000) โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิแบบต่าง ๆ (3, 5 และ 7°C / min)

- จากอุณหภูมิเริ่มต้น 25°C ถึง 0°C พัก 30 วินาที
- อุณหภูมิสุดท้าย 0°C ถึง -40°C พัก 30 วินาที

6. หลังจากลดอุณหภูมิเสร็จแล้ว นำตัวอย่างทั้งหมด มาเก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลว (-196°C) เป็นเวลา 1 วัน

7. ประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ โดยการนำหลอดฟางที่บรรจุน้ำเชื้อมาละลายใน water bath ที่อุณหภูมิ 70°C นาน 5 วินาที

8. ทำการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม หลังกระตุ้นด้วยน้ำทะเล

9. ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

การประเมินคุณภาพของน้ำเชื้อ

นำหลอดฟางที่แช่ในถังไนโตรเจนเหลว มาละลายที่อุณหภูมิ 70°C นาน 5 วินาที ตัดหลอดฟาง นำน้ำเชื้อออกมาเพื่อประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ ดังนี้

1. การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (% Motility) ตามวิธีการของ Vuthiphandchai and Zohar (1999)

หยดน้ำเชื้อประมาณ 5 ไมโครลิตร ลงบนกระจกสไลด์ ที่สะอาด พร้อมกับปิดด้วย Cover glass ที่หยดน้ำทะเล อย่างรวดเร็ว เพื่อกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่รีบนำไปส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า ภายในเวลาไม่เกิน 1 นาที ประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม 6 ระดับ คือ 0%, 20%, 40%, 60%, 80% และ 100% ตามลำดับ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

การวิเคราะห์สถิติ

ข้อมูลเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของสเปิร์ม รวมทั้งความหนาแน่นของสเปิร์มและค่าออสโมลาลิตี้ของสเปิร์ม ได้แสดงออกมาเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนเฉลี่ย (Mean ±S.E; n=3) ทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของชุดการทดลองด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบสองทาง (Two-Way ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างชุดการทดลองโดยวิธี Dunan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ SPSS

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University