บทที่ 3
วิธีดำเนินการทดลอง

การรวบรวมน้ำเชื้อหอยนางรมปากจีบ

พ่อพันธุ์หอยนางรมปากจีบได้ถูกรวบรวมและลำเลียงมาจากชายฝั่งจังหวัดชลบุรี มายังโรงเพาะฟักของภาควิชาวาริชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพาในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ หอยถูกนำมาชั่งน้ำหนัก ก่อนที่จะถูกรีดน้ำเชื้อออกมา เพื่อประเมินคุณภาพของน้ำเชื้อเพื่อทราบข้อมูลการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำเชื้อที่จำเป็นเพื่อนำมาใช้วางแผนในการทดลอง โดยพิจารณาจาก parameter ที่สำคัญ ได้แก่ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (sperm motility) และ เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิต (sperm viability) เพื่อทราบถึงการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำเชื้อของหอยในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ว่ามีการเปลี่ยนแปลงอย่างไร เพื่อให้ได้ข้อมูลพื้นฐานที่จำเป็นต่อการแช่แข็งต่อไป

หอยนางรมปากจีบถูกนำมาทำความสะอาดเปลือกก่อนทำการเก็บรวบรวมน้ำเชื้อ การเก็บรวบรวมน้ำเชื้อหอย ทำโดยการเปิดเปลือกเอาตัวหอยออกมา แล้วใช้เข็มเขี่ยแทงตรงบริเวณ gonad ซึ่งมีสีครีมขาว เอาน้ำเชื้อแตะบนสไลด์ นำมาส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า เพื่อแยกเพศผู้ หลังจากนั้นทำการรวบรวมน้ำเชื้อ โดยน้ำเชื้อที่ใช้ในการศึกษาถูกรวบรวมจากหอยตัวผู้จำนวนมากหลายตัว (pooled milt samples) เพื่อลดความแปรปรวนของคุณภาพน้ำเชื้อ (individual variation) น้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีเท่านั้นที่จะถูกนำมาใช้ในการทำน้ำเชื้อแช่แข็งโดยต้องเป็นน้ำเชื้อที่มีลักษณะขาวขุ่น หนืด และไม่มีเมือกหรือน้ำย่อยกระเพาะอาหาร และจะต้องมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่สูง (มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์) เท่านั้น น้ำเชื้อที่มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มต่ำกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ไม่ได้นำมาใช้ในการทดลอง เพื่อให้มั่นใจว่า ขณะเริ่มทำการทดลองน้ำเชื้อหอยมีคุณภาพที่ดี หอยตัวผู้ที่มีน้ำเชื้อที่มีคุณภาพดี ผ่านหลักเกณฑ์ที่วางไว้ถูกรวบรวมน้ำเชื้อเพื่อนำไปศึกษาต่อไป โดยการใช้หลอด syringe รวบรวมน้ำเชื้อจากหอยจำนวนมากไปใส่ใน eppendorf tube แล้วจึงเก็บไว้บนน้ำแข็งเพื่อรักษาคุณภาพสเปิร์มไม่ให้มีการเปลี่ยนแปลง น้ำเชื้อเหล่านี้จะถูกเก็บไว้บนน้ำแข็งอย่างมากไม่เกิน 1 ชั่วโมง ในระหว่างขั้นตอนการแช่เย็น หรือแช่แข็งน้ำเชื้อ

การประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มทำโดยการหยดตัวอย่างน้ำเชื้อ (1 ไมโครลิตร) ลงบนกระจกสไลด์ที่สะอาดแล้วจึงหยดน้ำทะเลที่สะอาด 30 ppt ลงไป 50 ไมโครลิตรพร้อมกับปิดด้วย cover glass เบาๆอย่างรวดเร็ว เพื่อกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่แล้วจึงประเมินเปอร์เซ็นต์ที่สเปิร์มเคลื่อนที่ทันทีให้เสร็จภายใน 15 วินาที โดยใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มประเมินจาก จำนวณสเปิร์มที่เคลื่อนที่ไปข้างหน้าอย่างรวดเร็วเมื่อถูกกระตุ้นด้วยน้ำทะเล 30 ppt โดยแบ่งระดับที่ สเปิร์มเคลื่อนที่ไว้ 6 ระยะ คือ สเปิร์มที่เคลื่อนที่ได้ 0%, 20%,

40%, 60%, 80% และ 100% (Vuthiphandchai and Zohar, 1999) เปอร์เซนต์สเปิร์มที่มีชีวิตเช็ค โดยการนำเอาน้ำเชื้อ (5 ไมโครลิตร) มาย้อมสีด้วยสารละลาย eosin-nigrosin (5 ไมโครลิตร) แล้วจึงสุ่มนับจำนวนสเปิร์มที่มีชีวิตซึ่งจะไม่ติดสีย้อมโดยการใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า แล้วจึงคำนวณกลับหาเปอร์เซ็นต์ของสเปิร์มที่มีชีวิต

การศึกษาคุณภาพน้ำเชื้อหอยนางรม

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำเชื้อพ่อพันธุ์หอยนางรมปากจีบในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ได้มีการศึกษาโดยรวบรวมพันธุ์หอยที่เลี้ยงอยู่บริเวณแหลมแท่น ต.อ่างศิลา จ.ชลบุรี ทุกๆ เดือนตั้งแต่ เมษายน 2553 ถึง กรกฎาคม 2553 โดยรวบรวมพันธุ์หอยที่เลี้ยงบริเวณชายหาดในช่วงน้ำลงทุกๆเดือน การรวบรวมในแต่ละเดือนรวบรวมพันธุ์หอยมาประมาณ 12 กิโลกรัมและนำมาโรงเพาะฟัก คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพาภายในเวลา 30 นาที ทำความสะอาดเปลือกหอยโดยขูดเพรียงที่ติดเปลือกหอยออก แกะเปลือกหอยออก นำตัวอย่างของเซลล์สืบพันธุ์ออกมาไปดูใต้กล้องจุลทรรศน์ว่าเป็นไข่ หรือสเปิร์ม ซึ่งถ้าเป็นสเปิร์มก็เก็บตัวอย่างพ่อพันธุ์หอยเหล่านั้นไปใช้ในการทดลองต่อไป โดยปล่อยหอยไว้ในโรงเพาะฟัก ไม่ให้หอยสัมผัสน้ำทะเลเป็นเวลาไม่เกิน 1 วันก่อนการรวบรวมน้ำเชื้อ

ปริมาณน้ำเชื้อหอยที่รวบรวมได้ในแต่ละครั้งได้ถูกบันทึกไว้ และ การประเมินการเปลี่ยนแปลงคุณภาพสเปิร์มในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่พิจารณาจาก เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม ระยะเวลาการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม และเปอร์เซนต์การมีชีวิตของสเปิร์ม โดยนำน้ำเชื้อทั้งหมดที่รวบรวมได้มาในแต่ละเดือนจากหอยแต่ละตัวให้รวมเข้าเป็นเนื้อเดียวกัน (pooled semen) แล้วนำไปประเมินคุณภาพสเปิร์มตามที่กล่าวมาแล้ว 3 ซ้ำ

การศึกษาประสิทธิภาพของน้ำยาบัฟเฟอร์สูตรต่างๆ ที่ใช้เจือจางน้ำเชื้อ

การทดลองเริ่มจากการคัดเลือก และเตรียมสูตรน้ำยา หรือสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยนางรมจำนวน 5 สูตร ได้แก่ Artificial sea water (ASW), Calcium-free Hank's balanced salt solution (Ca-F-HBSS; Vuthiphandchai et al., 2009b), Ringer solution (Vuthiphandchai et al., 2009a), 0.85% NaCl และ Calcium-free saline (Ca-F Saline; Vuthiphandchai et al., 2007) โดยสารละลายทั้งหมดได้เตรียมใหม่ๆก่อนเริ่มการทดลอง และใช้ deionized water ในการเตรียมสารละลายแต่ละสูตร โดยใส่สารสารละลายบัฟเฟอร์ลงไปใน tissue culture flasks แล้วนำน้ำเชื้อหอยนางรม (pooled semen) ที่รวบรวมมาใหม่ๆใส่ลงไปใน tissue culture flasks ที่มีน้ำยาแต่ละสูตร ในอัตราส่วนต่างๆกัน ได้แก่ 1:1, 1:2 และ 1:3 โดยปริมาตร พร้อมกับใส่ penicillin-streptomycin 0.1% แล้วนำไปแช่ในตู้เย็นที่ควบคุมอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สารละลายบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆในปริมาณที่แตกต่างกันได้ถูกนำใส่ลงไปใน tissue

culture flasks แล้วจึงใส่น้ำเชื้อ (pooled milt) ปริมาณ 200 ไมโครลิตรลงไปในแต่ละ flask ให้ได้สัดส่วนตามที่ต้องการ สำหรับกลุ่มควบคุมใช้น้ำเชื้อสดที่รวบรวมออกมาไปแช่เย็น โดยไม่ได้ผสมน้ำยา (Control) สำหรับพ่อพันธุ์หอยที่ใช้ในการทดลองนี้ได้รวบรวมมา 1 วันก่อนเริ่มทดลองเพื่อต้องการให้ได้น้ำเชื้อหอยที่มากพอในการเจือจางกับสารละลายบัฟเฟอร์ การรวบรวมพ่อพันธุ์ได้รวบรวมมาทดลองใน 2 ช่วงเวลาของเดือน กุมภาพันธ์ และเมษายน แล้วหาค่าเฉลี่ยของคุณภาพน้ำเชื้อหอย โดยได้ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

การประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยนางรมปากจีบในสูตรน้ำยาแต่ละสูตรทำการประเมินในชั่วโมงที่ 0 (ประมาณ 10 นาทีหลังเริ่มต้นแช่เย็น) และชั่วโมงที่ 1, 2, 3, 6, 12, 24, 36 และ 48

การศึกษาความเข้มข้นของ cryoprotectant ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม

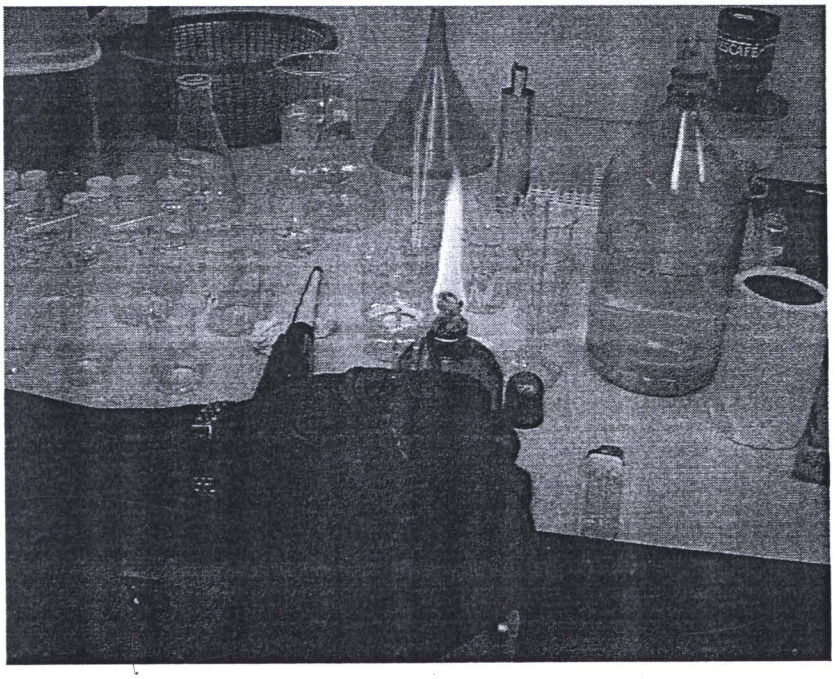
ในขั้นตอนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อต้องการทราบความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่เหมาะสมก่อนที่จะนำไปใช้ในขั้นตอนการทำน้ำเชื้อแช่แข็ง การทดลองเริ่มจากการนำน้ำเชื้อของหอยนางรมปากจีบ มาเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม (Ca-F saline) โดยใช้น้ำเชื้อ 100 ไมโครลิตร เจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร ภายใน tissue culture flask ขนาด 75 cm^3 ในขณะเดียวกัน สารไครโอโพรเทคแทนท์ ชนิดต่างๆ จะถูกเตรียมขึ้นมาและผสมเข้ากับน้ำเชื้อที่ถูกเจือจาง เพื่อให้ได้ระดับความเข้มข้นสุดท้ายของสารไครโอโพรเทคแทนท์ตามที่ต้องการ ได้แก่ dimethyl sulfoxide (DMSO), methanol, sucrose, trehalose, ethanol, formamide, propylene glycol, ethylene glycol, acetamidel และ glycerol ซึ่งจะออกฤทธิ์ภายในและภายนอกเซลล์ป้องกันเซลล์ขณะแช่แข็ง (Tiersch and Mazik, 2000) สารไครโอโพรเทคแทนท์แต่ละชนิดจะถูกผสมไปในน้ำเชื้อที่ถูกเจือจาง เพื่อให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 6 ระดับคือ 2.5, 5, 7.5, 10, 15 และ 20% ตามลำดับ การเช็คเปอร์เซ็นต์ของสเปิร์มที่เคลื่อนที่เมื่อกระตุ้นด้วยน้ำทะเลในการทดลองนี้ได้ทำในระยะเวลาต่างๆ กัน ตั้งแต่ 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 และ 180 นาที หลังจากใส่ cryoprotectant ลงไปในน้ำเชื้อที่เจือจาง การทดลองในขั้นนี้ทำให้ทราบเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่ระยะเวลาต่างๆกันในสารไครโพรเทคแทนท์ว่ามีความเป็นพิษมากน้อยเพียงไรก่อนที่จะทำการแช่แข็งน้ำเชื้อ การทดลองทำ 3 ซ้ำที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) โดยใช้ pooled milt ในช่วงเวลาต่างๆกัน

การศึกษาผลของอัตราการลดอุณหภูมิ ในการแช่แข็งน้ำเชื้อหอยนางรมปากจีบ

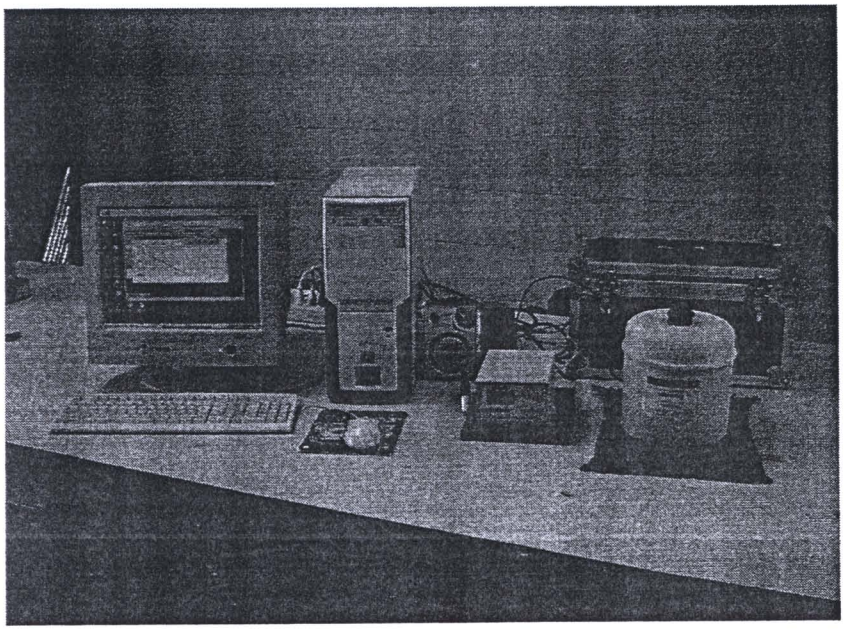
การศึกษาผลของอัตราการลดอุณหภูมิที่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยนางรมปากจีบที่แช่แข็ง ทำโดยนำน้ำเชื้อหอยนางรมปากจีบมาเจือจางใน Ca-F saline ในอัตราส่วน 1:1 แล้วใส่สารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ 3 ชนิด คือ DMSO, Propylene glycol และ Ethylene glycol

ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย (final concentration) 4 ระดับ (5%, 10%, 15% และ 20%) โดยทำการเจือจางที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) น้ำเชื้อถูกปล่อยไว้ไม่เกิน 10 นาที เพื่อให้เกิดสภาพสมดุลของสารละลาย (equilibrium) ก่อนที่น้ำเชื้อจะถูกรวบรวมไว้ในหลอดฟาง (French straw) ขนาด 0.25 มิลลิลิตร ในปริมาณ 0.2 มิลลิลิตรแล้วปิด ปลายหลอดฟางด้วยความร้อน (รูปที่ 5) การแช่แข็งน้ำเชื้อทำโดยนำหลอดฟางเหล่านี้ มาใส่ในเครื่องมือควบคุมการลดอุณหภูมิ (Controlled-rate programmable freezer; รูปที่ 6) ด้วยการลดอุณหภูมิแบบ one-step freezing ด้วยการใช้อัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) ต่างๆ กันตั้งแต่ 2.5, 5, 7.5, 10 และ 12.5 องศาเซลเซียส/นาที เริ่มลดอุณหภูมิจากอุณหภูมิเริ่มต้น (initial temperature) ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) ไปจนถึงอุณหภูมิสุดท้าย (final temperature) -30 องศาเซลเซียส น้ำเชื้อแช่แข็งถูกนำไปเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว (อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส) นาน 3 วันจึงละลายน้ำเชื้อ (thawing) เพื่อประเมินคุณภาพสเปิร์มโดยนำหลอดฟางมาแช่ในน้ำอุ่นที่มีอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 5 วินาที แล้วตัดปลายหลอดฟางนำน้ำเชื้อแช่แข็งที่ได้กลับคืนสภาพเป็นของเหลวมาประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (post thaw sperm motility) การทดลองทั้งหมดได้ทำ 6 ซ้ำ โดยการเลือกสารไครโอโพรเทคแทนท์ 3 ชนิดนี้มาทดลอง เนื่องจากเป็นการเลือสุ่มสารไครโอโพรเทคแทนท์มาแช่แข็งน้ำเชื้อ

การพัฒนาวิธีการแช่แข็งในช่วงต่อมาได้ทำการแช่แข็งด้วย DMSO, Propylene · glycol และ Ethylene glycol และลดอุณหภูมิด้วยการใช้อัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) ต่างๆ กันตั้งแต่ 2.5, 5, 7.5, 10 และ 12.5 องศาเซลเซียส/นาที เหมือนเดิมทุกอย่าง เริ่มลดอุณหภูมิจากอุณหภูมิเริ่มต้น (initial temperature) ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) แต่ลดอุณหภูมิจนกระทั่งถึงอุณหภูมิสุดท้าย (final temperature) เป็น -80 องศาเซลเซียส แล้วเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว นาน 3 วันจึงละลายน้ำเชื้อเพื่อประเมินคุณภาพสเปิร์ม การทดลองทั้งหมดได้ทำ 6 ซ้ำ การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อหอยนางรมปากจีบหลังแช่แข็งทำโดยนำหลอดฟางมาแช่ในน้ำอุ่นที่มีอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 5 วินาที แล้วประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มตามวิธีที่กล่าวมาแล้ว



รูปที่ 5 การปิดปลายหลอดฟางด้วยความร้อน



รูปที่ 6 เครื่องมือควบคุมการลดอุณหภูมิขณะแช่แข็งน้ำเชื้อ

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยนางรมปากจีบถูกนำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตราฐาน (standard deviation) โดยข้อมูลเปอร์เซนต์เหล่านี้ถูกนำมา arcsine-square root transformed และตรวจสอบว่าข้อมูลมีการกระจายปกติ (normal distribution) หรือไม่ก่อนการวิเคราะห์ทางสถิติ ข้อมูลในแต่ละชุดการทดลองของหอยนางรมปากจีบถูกนำมาวิเคราะห์หาความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธีการ Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างชุดการทดลองด้วย Duncan's new multiple range test โดยใช้โปรแกรมสถิติ SPSS 10.0 version