บทที่ 3

วิธีดำเนินการทดลอง

วัสดุอุปกรณ์ และสารเคมี

บีกเกอร์ขนาดต่างๆ

ขวดรูปชมพู่ขนาด 125 250 และ 500 มิลลิลิตร

ไมโครปิเปตขนาดต่างๆ

กระดาษกรอง

เครื่องชั่งแบบทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง

เครื่องปั่นผสม (Vortex mixer)

เครื่องแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติ (Controlled-rate programmable freezer)

กล้อง stereo microscope

Osmometer

Hemacytometer

ถังเก็บไนโตรเจนเหลวขนาดใหญ่ (dewar)

ตู้ควบคุมอุณหภูมิต่ำ

ตู้ autoclave

ตู้อบเครื่องแก้ว (hot air oven)

Glass micropipette ขนาด 5,10 และ 100 µl

French Straw 0.25 และ 0.5 mL

Cryotubes 1.5 mL

Canister

canes

Vial tubes

rack

Tissue culture flasks

Thermocouple probe thermometer (K-type, HI 91530K, Hanna Instruments Inc.)

ไนโตรเจนเหลว

พ่อแม่พันธุ์ปลากะพงขาว

อุปกรณ์ที่ใช้ในการผสมเทียมไข่ปลา

สารเคมีประเภทต่างๆที่ใช้ในการแช่แข็ง การผสมเทียมและการย้อมสี

1. พ่อแม่พันธุ์ปลากะพงขาวและการวางแผนการทดลอง

พ่อแม่พันธุ์ปลากะพงขาวที่มีน้ำหนัก 2.9-3.8 กิโลกรัม ได้ถูกรวบรวมและลำเลียงจากบริเวณจังหวัดชลบุรี และจังหวัดฉะเชิงเทราที่มีโรงเพาะฟักปลากะพงขาว และฟาร์มปลากะพงขาวมายังโรงเพาะฟักของภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ระหว่างปี พ.ศ. 2551-2553 พ่อพันธุ์ที่รวบรวมได้ในแต่ละครั้ง ซึ่งรวบรวมมาครั้งละไม่ต่ำกว่า 10 ตัวได้ถูกลำเลียงมาในถังขนาด 500 ลิตรที่ใส่น้ำแข็งควบคุมอุณหภูมิ และใช้เวลาเดินทางไม่เกิน 2 ชั่วโมงมายังมหาวิทยาลัยบูรพา แล้วนำมาพักในบ่อซิเมนต์ขนาด 5 ตันในอัตรา 1 ตัวต่อตารางเมตร ให้อาหารปลาเป็ดวันละ 1 ครั้ง และปรับความเค็มสุดท้ายของน้ำที่ใช้เลี้ยงปลาเป็น 30 ppt เนื่องจากพ่อพันธุ์ที่ได้ส่วนใหญ่เลี้ยงในกระชังในแม่น้ำบริเวณปากแม่น้ำ ที่มีความเค็มผันแปรตามฤดูกาล หรือฝนตก การปรับความเค็มให้พ่อพันธุ์เหล่านี้จะค่อยเพิ่มความเค็มวันละประมาณ 3-4 ppt และเมื่อความเค็มเป็น 30 ppt ก็ทำการเลี้ยงพ่อพันธุ์ไปอย่างน้อย 5 วันก่อนเริ่มทำการทดลองในแต่ละครั้ง และทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำทะเลที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยคลอรีนประมาณ 10-20% ทุกๆ 3 วัน โดยหยุดการให้อาหารพ่อพันธุ์ 2 วันก่อนการรวบรวมน้ำเชื้อ

พ่อพันธุ์ปลาที่ใช้ทดลองในการทดสอบผลของสารไครโอโพรเทคแทนท์ และแช่แข็งน้ำเชื้อได้ถูกชั่งน้ำหนัก วัดความยาว ก่อนเริ่มการทดลอง โดยพ่อพันธุ์ปลากะพงขาวที่สมบูรณ์เพศทั้งหมดได้ถูกนำมาฉีดฮอร์โมนกระตุ้นพ่อพันธุ์ปลาสร้างน้ำเชื้อ (spermiation) ด้วย Suprefact (gonadotropin-releasing hormone analogue หรือGnRHa) อัตรา 25 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และ Domperidone (dopamine antagonist) อัตรา 5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม หลังจากฉีดฮอร์โมน 10-12 ชั่วโมงจึงทำการรีดน้ำเชื้อ โดยพ่อพันธุ์ปลากะพงขาวถูกสลบด้วย 2-phenoxyethanol ปริมาณ 200 ppm แล้วนำมาเช็ดบริเวณช่องท้องให้แห้งสนิทเพื่อรวบรวมน้ำเชื้อสด (fresh milt) ออกมาด้วย syringe ขนาด 1 ซีซี โดยทำการรีดบริเวณท้องปลาตามความยาวท้องให้น้ำเชื้อสด (fresh milt) ไหลออกมา แล้วนำน้ำเชื้อสดที่ได้เก็บไว้ไปวางไว้บนน้ำแข็ง อย่างไรก็ตามในระหว่างก่อนการรีดน้ำเชื้อต้องกดบริเวณช่องเพศเพื่อให้ปัสสาวะทั้งหมดออกมาก่อนการรีดน้ำเชื้อ เพราะว่าปัสสาวะสามารถกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่ ซึ่งจะทำให้เมื่อนำน้ำเชื้อเหล่านั้นมาแช่แข็งจะประสบความล้มเหลวทันที เพราะน้ำเชื้อที่มีคุณภาพต่ำอันเนื่องจากมีปัสสาวะปนอยู่ตั้งแต่เริ่มการทดลอง จะทำให้สเปิร์มจะถูกกระตุ้นให้เคลื่อนที่ทันที จึงไม่มีพลังงานเหลืออยู่เมื่อนำมาแช่แข็งในภายหลัง จึงทำให้น้ำเชื้อที่มีปัสสาวะปนเมื่อนำมาแช่แข็ง สเปิร์มจะไม่เคลื่อนที่หลังการละลาย (thawing) แม้จะควบคุมตัวแปรต่างๆในระหว่างการแช่แข็งไว้ได้ดีก็ตาม ซึ่งในประเด็นนี้ได้พยายามคัดเลือกน้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีมาใช้ อย่างไรก็ตามในกรณีที่ไม่สามารถรีดน้ำเชื้อสดออกมาได้นั้น พ่อพันธุ์ที่มีความเหมาะสมได้ถูกสลบด้วย 2-phenoxyethanol ในอัตรา 200 ppm แล้วทำการผ่าตัดเอาอัณฑะ (testis) ออกมาทั้ง 2 ถุงแล้วนำมาชั่งน้ำหนักเพื่อคำนวณหาดัชนีความสมบูรณ์เพศ

(gonadosomatic index หรือ GSI) พร้อมกับใช้มีดปลายแหลมตัดปลายบริเวณถุงอัณฑะให้ขาด แล้วรีดน้ำเชื้อทั้งหมดให้ออกจากถุงอัณฑะ โดยรีดจากด้านที่ไม่ได้ถูกตัดออกไปทางด้านที่ถูกตัด

น้ำเชื้อที่ใช้ในการศึกษาถูกรวบรวมจากตัวผู้หลายตัว (pooled milt samples) อย่างน้อย 4 ตัว ในแต่ละครั้งของการทดลองเพื่อลดความแปรปรวนของคุณภาพน้ำเชื้อ (individual variation) สำหรับนำไปใช้ในแต่ละชุดการทดลอง การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อสดได้พิจารณาจาก parameters ที่สำคัญ ได้แก่การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (sperm motility) และความหนาแน่นของสเปิร์ม (sperm density) น้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีเท่านั้นที่ถูกนำมาใช้ในการทำน้ำเชื้อแช่แข็ง โดยเป็นน้ำเชื้อที่มีลักษณะขาวขุ่น และไม่มีเมือก หรือ เลือดปน และมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่สูง (มากกว่า 80เปอร์เซ็นต์) (รูปที่ 8) น้ำเชื้อที่มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มต่ำกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ไม่ได้นำมาใช้ในการทดลองแช่แข็งเพื่อให้มั่นใจว่าขณะเริ่มการทดลองน้ำเชื้อปลากะพงขาวมีคุณภาพที่ดีพอ พ่อพันธุ์ปลากะพงขาวที่มีน้ำเชื้อที่มีคุณภาพดี ผ่านหลักเกณฑ์ที่กำหนดไว้ได้ถูกรวบรวมน้ำเชื้อเพื่อนำไปแช่แข็ง หรือทดสอบความเป็นพิษกับสารไครโอโพรเทตแทนท์ (cryoprotectant) โดยการใช้หลอด syringe รวบรวมน้ำเชื้อไปใส่ใน tissue culture flask หรือ cryotube แล้วจึงเก็บไว้บนน้ำแข็งเพื่อรักษาคุณภาพสเปิร์มไม่ให้มีการเปลี่ยนแปลงก่อนเริ่มการแช่แข็ง น้ำเชื้อเหล่านี้ถูกเก็บไว้บนน้ำแข็งอย่างมากไม่เกิน 20 นาทีก่อนเริ่มการทดลอง อย่างไรก็ตามการศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำเชื้อพ่อพันธุ์ในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ก็ได้มีการศึกษาโดยนำพ่อพันธุ์ที่ได้มาจากเพื่อมารวบรวมน้ำเชื้อ โดยไม่ได้ฉีดฮอร์โมนกระตุ้นเพื่อทราบการเปลี่ยนแปลงคุณภาพสเปิร์มเกี่ยวกับความหนาแน่นของสเปิร์ม การเคลื่อนที่และการมีชีวิตของสเปิร์มในปี พศ. 2551-2552

2. การประเมินคุณภาพสเปิร์มของน้ำเชื้อปลากะพงขาว

ความหนาแน่นของสเปิร์มประเมินโดยการเจือจางน้ำเชื้อ (10 ไมโครลิตร) ด้วยน้ำทะเล (sterile seawater) โดยเจือจาง 500 เท่า ผสมให้เข้ากันใน vial ด้วยการใช้ vortexer แล้วจึงนำน้ำเชื้อที่ถูกเจือจางไปหยดบน hemacytometer และ นับจำนวนสเปิร์มที่พบโดยการใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า แล้วจึงคำนวณกลับหาความหนาแน่นของสเปิร์ม การประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มทำโดยการหยดตัวอย่างน้ำเชื้อ (5 ไมโครลิตร) ลงบนกระจกสไลด์ที่สะอาดแล้วจึงหยดน้ำทะเลลงไป 100 ไมโครลิตร พร้อมกับปิดด้วย cover glass เบาๆอย่างรวดเร็วเพื่อกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่แล้วจึงประเมินเปอร์เซนต์ที่สเปิร์มเคลื่อนที่ทันทีให้เสร็จภายใน 15 วินาที โดยใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า (รูปที่ 9) เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (percentage of motile sperm) ประเมินจาก จำนวณสเปิร์มที่เคลื่อนที่ไปข้างหน้าอย่างรวดเร็วเมื่อถูกกระตุ้นด้วยน้ำทะเล โดยแบ่งระดับที่สเปิร์มเคลื่อนที่ไว้ 6 ระดับ คือ สเปิร์มที่เคลื่อนที่ได้ 0%, 20%, 40%, 60%, 80% และ 100% (Vuthiphandchai and Zohar, 1999) ความหนาแน่นของสเปิร์มได้ทำการประเมิน

เฉพาะในการทดลองที่ศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำเชื้อสดปลากะพงขาวในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่เท่านั้น

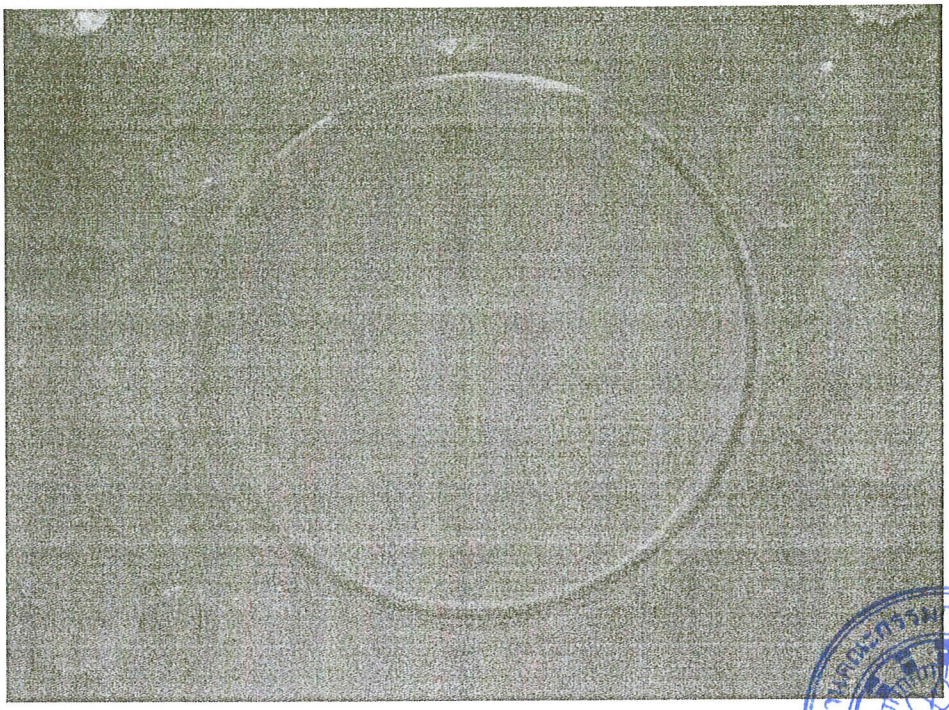
การประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่แช่แข็ง (post-thaw sperm motility assessment) ทำโดยนำน้ำเชื้อที่ได้แช่แข็งไว้ในถังไนโตรเจนเหลวออกมาละลาย (thawing) โดยการเพิ่มอุณหภูมิเพื่อให้ของแข็งกลับคืนสู่สภาพของเหลว น้ำเชื้อแช่แข็งที่อยู่ในหลอดฟาง (French straw) ขนาด 0.25 หรือ 0.5 ซีซี หรือน้ำเชื้อแช่แข็งที่ได้เก็บรักษาไว้ในหลอดไครโอไวออล (cryovial) ได้ถูกนำมาแช่ในน้ำที่มีอุณหภูมิประมาณ 70 องศาเซลเซียส จนกระทั่งสังเกตุเห็นน้ำเชื้อละลายหมดก็ทำการเทน้ำเชื้อออกมาประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มด้วยการหยดตัวอย่างน้ำเชื้อที่ละลายจำนวน 20 ไมโครลิตรลงบนกระจกสไลด์แล้วหยดน้ำทะเลลงไป 100 ไมโครลิตร พร้อมกับปิดด้วย cover glass เบาๆอย่างรวดเร็วเพื่อกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่แล้วจึงประเมินเปอร์เซนต์ที่สเปิร์มเคลื่อนที่ทันทีให้เสร็จภายใน 15 วินาทีตามวิธีการที่กล่าวมาแล้ว การประเมินการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มของแต่ละชุดการทดลองมี 3 ซ้ำ (triplicate) โดยในแต่ละสไลด์ได้ประมาณเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มบนสไลด์ 3 จุดด้วยการเลื่อนสไลด์ไปมาอย่างรวดเร็วและประเมิน 3 ค่าภายใน 15 วินาที ทำให้การการประเมินการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีทั้งหมด 9 ซ้ำย่อย (pseudoreplicate) ในทุกๆการทดลองเพื่อเพิ่มความถูกต้องในการประเมินให้มากขึ้น

การประเมินการมีชีวิตของสเปิร์มประเมินจากการนำเอาน้ำเชื้อสด (5 ไมโครลิตร) มาย้อมสีด้วยสารละลาย eosin-nigrosin (5 ไมโครลิตร) แล้วจึงสุ่มนับจำนวน สเปิร์มที่มีชีวิตซึ่งจะไม่ติดสีย้อมภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า แล้วจึงคำนวณกลับหาเปอร์เซนต์ของสเปิร์มที่มีชีวิต (percentage of viable sperm) (Fribourgh, 1966)

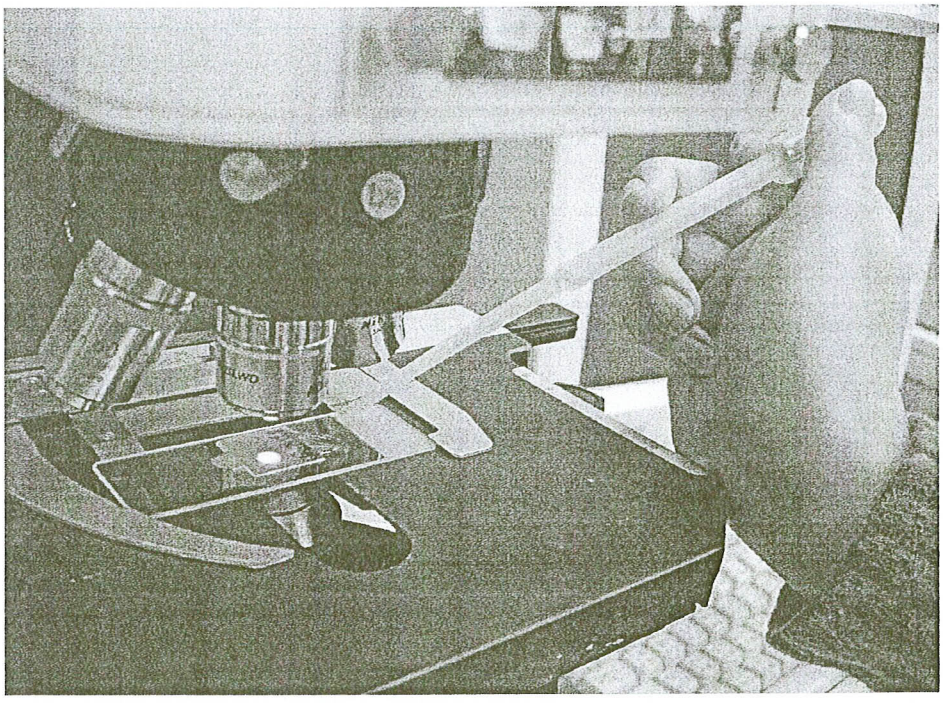
3. การพัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลากะพงขาว

3.1 <u>การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของ cryoprotectant ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงขาวแบบแช่แข็ง</u>

ในขั้นตอนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อต้องการทราบชนิดและความเข้มข้นของ cryoprotectant ที่เหมาะสมก่อนที่จะนำไปใช้ในการทำน้ำเชื้อแบบแช่แข็งโดยการประเมินความเป็นพิษ (toxicity test) ของไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม ดังนั้นการประเมิน toxicity test ของสารไครโอโพรเทคแทนท์จึงเป็นสิ่งจำเป็นเบื้องแรกในการพัฒนาหา protocol ที่เหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา การทดลองเริ่มจากนำน้ำเชื้อปลากะพงขาวที่รวบรวมมาใหม่ (freshly collected milt) มาเจือจางในสารละลาย Ca-F HBSS (calcium free hank's balanced salt solution) ซึ่งเป็นสารละลายบัฟเฟอร์ที่นิยมใช้เป็นส่วนผสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาที่ไม่มีเกล็ด (Mongkonpunya et al., 1995) โดยที่ Ca-F HBSS ไม่มีผลกระตุ้นให้สเปิร์มมีการเคลื่อนที่แต่จะไปทำหน้าที่เจือจางน้ำเชื้อ โดยที่สเปิร์มปลากะพงขาวยังคงมีคุณภาพดังเดิมไม่เปลี่ยนแปลงได้เป็นน้ำเชื้อ extended milt



รูปที่ 8 น้ำเชื้อปลากะพงขาวคุณภาพดี



รูปที่ 9 การประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม

ในขณะเดียวกัน cryoprotectants ชนิดต่างๆ 10 ชนิดที่ออกฤทธิ์ภายนอกเซลล์และภายในเซลล์ (propylene glycol, acetamide, glycerol, formamide, ethylene glycol, DMSO, ethanol, sucrose, trehalose, methanol) ได้ถูกเตรียมขึ้นมาโดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS เป็นตัวทำละลาย แล้วจึงผสมเข้ากับน้ำเชื้อที่ถูกเจือจางไว้ก่อน เพื่อให้ได้ระดับความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ตามที่ต้องการ

การเจือจางน้ำเชื้อปลากะพงขาวด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS และสารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดต่างๆในแต่ละชุดการทดลองได้ทำที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) โดยใช้อัตราส่วนของน้ำเชื้อที่เจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS (extended milt) : สารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดต่างๆ เท่ากับ 1:1 ภายใน tissue culture flask ขนาด 25 cm^3 และประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่เวลาต่างๆกันจนกระทั่งสเปิร์มหยุดเคลื่อนที่เมื่อกระตุ้นด้วยน้ำทะเล สารละลายไครโอโพรเทคแทนท์แต่ละชนิดถูกเตรียมความเข้มข้นเริ่มต้นให้มีค่าเป็น 2 เท่าของที่ต้องการด้วยการผสมไปในน้ำเชื้อที่ถูกเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS เพื่อให้มีความเข้มข้นสุดท้าย (final concentration) ของไครโอโพรเทคแทนท์เป็น 5%, 10%, 15% และ 20% การเช็คประเมินเปอร์เซ็นต์ของสเปิร์มที่เคลื่อนที่ในการทดลองนี้ทำในระยะเวลาต่างๆกันหลังจากใส่ฮไครโอโพรเทคแทนท์ลงไปในน้ำเชื้อที่ถูกเจือจาง ตั้งแต่เวลา 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180 นาที โดยเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มกับกลุ่มควบคุมซึ่งใช้น้ำเชื้อที่เจือจางด้วยน้ำทะเล

การประเมินความเป็นพิษของไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีต่อสเปิร์มได้ทำการทดลอง 6 ซ้ำในแต่ละการทดลอง การทดลองในขั้นตอนนี้ทำให้ทราบว่าไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดใด และความเข้มข้นช่วงใดที่เป็นพิษหรือทำให้สเปิร์มตาย ทำให้สามารถพิจารณาเลือกเฉพาะไครโอโพรเทคแทนท์ที่เป็นพิษน้อยมาใช้ในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลากะพงขาวต่อไป ทำให้ทราบข้อมูลพื้นฐานถึงเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่ระยะเวลาต่างๆกันก่อนที่จะทำการแช่แข็งว่าสารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดใด และที่ความเข้มข้นใดมีความเป็นพิษต่อน้ำเชื้อปลากะพงขาวน้อย ซึ่งข้อมูลเหล่านี้ได้ถูกนำมาใช้ประกอบในการ design protocol ระหว่างการแช่แข็งต่อไป น้ำเชื้อที่ถูกรวบรวมมาจากช่วงฤดูกาลผสมพันธุ์วางไข่ต่างๆกันได้ถูกนำมาใช้เพื่อประเมินค่าเฉลี่ยของการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังจากถูกเจือจางในไครโอโพรเทคแทนท์ชนิด และความเข้มข้นต่างๆกัน โดยทดลอง 3 ซ้ำ

3.2 <u>ผลของอัตราการลดอุณหภูมิ (cooling rate) ที่มีต่อการแช่แข็งน้ำเชื้อปลากะพงขาว</u>

การผลิตน้ำเชื้อปลากะพงขาวแบบแช่แข็ง เริ่มจากการนำเอาน้ำเชื้อปลากะพงขาวมาเจือจางในสารละลาย Ca-F HBSS ในอัตราส่วน 1:1 แล้วจึงผสมไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดที่ได้ screening จากผลการทดลองข้อที่ 3.1 (propylene glycol, DMSO, methanol, ethanol และ acetamide) ใน

ระดับความเข้มข้นสุดท้ายที่แตกต่างกันตั้งแต่ 5%, 10%, 15%, 20% และ 25% แล้วปล่อยไว้ให้อยู่ในภาวะสมดุลย์ (equilibration period) นาน 10 นาทีอุณหภูมิห้องก่อนที่จะถูกรวบรวมไว้ในหลอดฟาง (French straw) ขนาด 0.25 มิลลิลิตรแล้วปิดปลายหลอดให้แน่น (รูปที่ 10 และ 11)

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลากะพงขาวทำโดยนำหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตรที่มีน้ำเชื้อเหล่านี้มาแช่แข็งในเครื่องมือแช่แข็งอัตโนมัติ (controlled-rate programmable freezer) ทำ 6 ซ้ำ โดยการใช้อัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) ต่างๆกันตั้งแต่ -3, -5 และ -10 องศาเซลเซียส/นาที เพื่อประเมินประสิทธิภาพระหว่างการลดอุณหภูมิแช่แข็งโดยเครื่องมือแช่แข็งอัตโนมัติ (รูปที่ 12) น้ำเชื้อปลากะพงขาวที่ลดอุณหภูมิต่ำลงถึง -40 องศาเซลเซียสก็ถูกนำมาเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลวซึ่งมีอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส นาน 3 วันก่อนที่จะถูกนำมาเพิ่มอุณหภูมิอย่างรวดเร็วในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิประมาณ 70 องศาเซลเซียสจนน้ำเชื้อละลาย (thawing) แล้วจึงนำไปเช็คเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม การแช่แข็งน้ำเชื้อปลากะพงขาวที่กล่าวมาข้างต้นนี้ได้ทำการแช่แข็งทั้งในช่วงต้นฤดู ช่วงกลางฤดู และช่วงปลายฤดูที่ปลากะพงขาวมีน้ำเชื้อ (spermiation period) โดยได้ทดลองทั้งในปีพ.ศ. 2551 และ 2552

ในขั้นตอนสุดท้ายของการพัฒนา protocol ทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ดีที่สุด 3 ตัว (propylene glycol, DMSO และ acetamide) ในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลากะพงขาวด้วยการนำน้ำเชื้อที่เจือจางใน Ca-F HBSS มาผสมสารไครโอโพรเทคแทนท์ทั้ง 3 ตัวให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 5, 10, 15 และ 20% และใช้อัตราการลดอุณหภูมิ -10°C/นาที จากอุณหภูมิห้องจนถึง -40°C ก่อนนำน้ำเชื้อไปเก็บในไนโตรเจนเหลวนาน 3 วันตามวิธีการที่ได้กล่าวมาแล้วโดยทดลองในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตรแล้วนำมาละลาย (thawing) โดยได้ทดลอง 6 ซ้ำในช่วงปลายฤดูผสมพันธุ์วางไข่ในปีพ.ศ. 2552

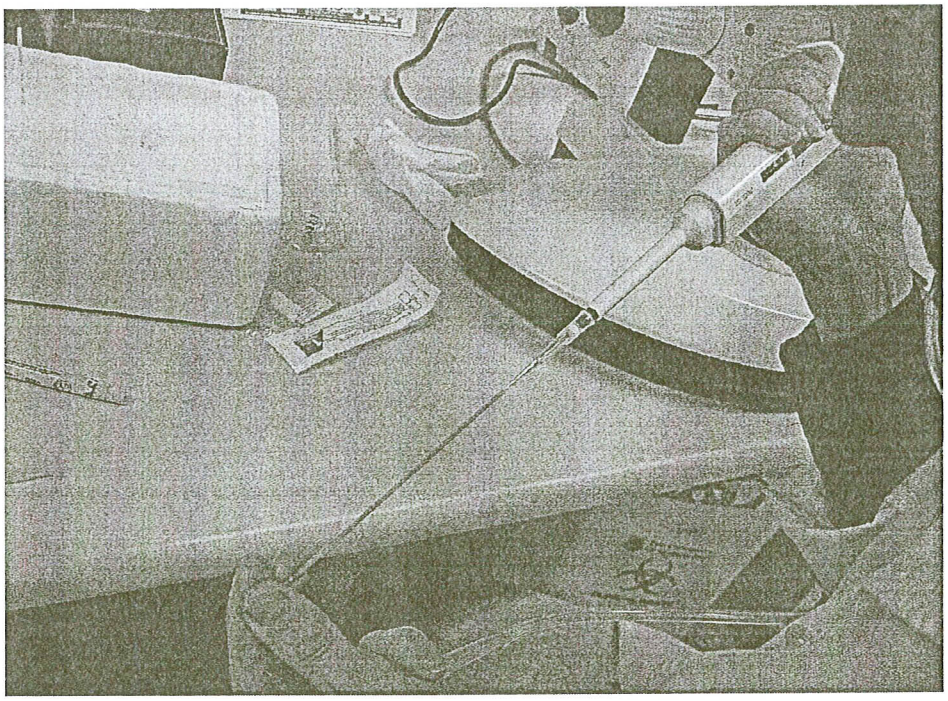
3.3 <u>การแช่แข็งน้ำเชื้อปลากะพงขาวอย่างง่ายในถังโฟม</u>

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลากะพงขาวอย่างง่าย เริ่มจากการนำเอาน้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีในช่วงปลายฤดูผสมพันธุ์วางไข่ในปีพ.ศ. 2552 มาเจือจางในสารละลาย Ca-F HBSS ในอัตราส่วน 1:1 แล้วจึงผสม DMSO ในระดับความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10% แล้วปล่อยไว้ให้อยู่ในภาวะสมดุลย์ (equilibration period) นาน 10 นาทีที่อุณหภูมิห้องก่อนที่น้ำเชื้อจะถูกรวบรวมไว้ในหลอดฟาง (straw) ขนาด 0.25 มิลลิลิตรเพื่อแช่แข็งต่อไป โดยทำ 6 ซ้ำ

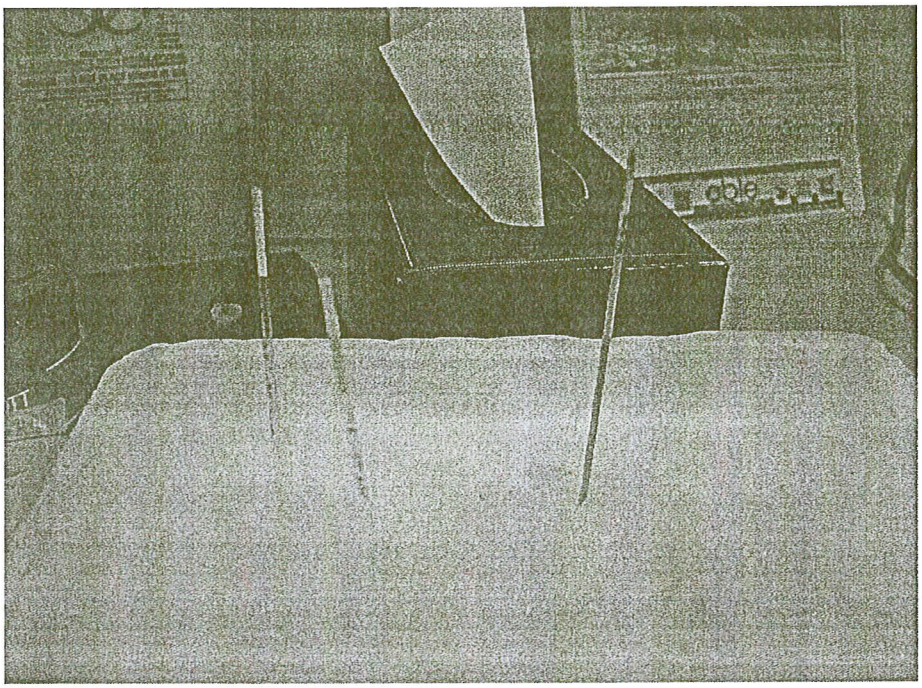
การแช่แข็งน้ำเชื้อปลากะพงขาวทำโดยนำหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตรที่มีน้ำเชื้อมาแช่ในไอของไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen vapor) ในถังโฟม โดยใส่ไนโตรเจนเหลวสูงประมาณ 1 นิ้วในถังโฟมแล้วนำลวดตาข่าย มาวางให้ได้ความสูงตามที่ต้องการเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen surface) ได้แก่ 2, 4 และ 6 เซนติเมตร เป็นเวลา 10 นาที แล้ววางหลอดฟางแนวนอนบนลวดตาข่าย การวัดการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิที่ความสูงต่างๆกันเหนือผิวหน้า

ไนโตรเจนเหลวทำโดยใช้ thermocouple-probe thermometer ในการวัดการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิทุกๆ 1 วินาที โดยการให้ส่วนปลายของ probe ไปอยู่ด้านข้างของถังโฟมที่ความสูงต่างๆกันแล้วทำการบันทึกข้อมูลการลดลงของอุณหภูมิขณะแช่แข็งน้ำเชื้อตั้งแต่เริ่มต้นจนเสร็จสิ้นการแช่แข็งน้ำเชื้อ แล้วนำข้อมูลที่ได้มาแสดงความสัมพันธ์ของระยะเวลาการอบในไอไนโตรเจนเหลว และการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิเมื่อเวลาผ่านไป สำหรับ การแช่แข็งน้ำเชื้อในลักษณะเช่นนี้มีเมื่อครบกำหนดเวลาที่น้ำเชื้ออยู่ในไอไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen vapor) ก็นำหลอดฟางทั้งหมดลงในไนโตรเจนเหลวด้วยการใช้ forcep จับแล้วปล่อยลงไปในไนโตรเจนเหลวทันที

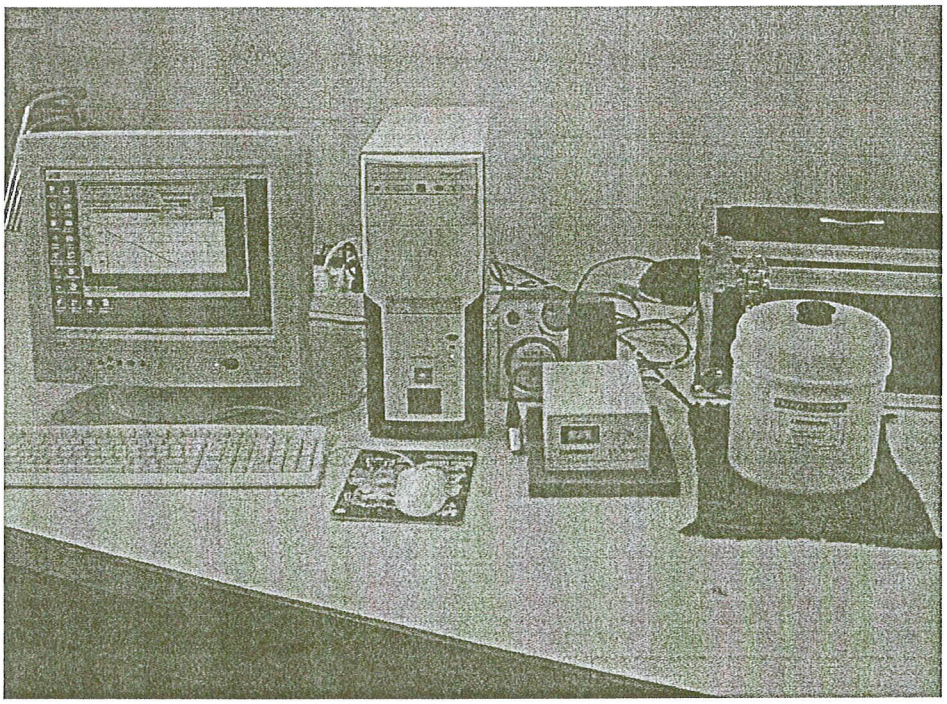
น้ำเชื้อปลากะพงขาวที่แช่แข็งอย่างง่ายในถังโฟมเมื่อลดอุณหภูมิและทราบการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิที่แต่ละความสูงซึ่งทราบโดยการวัดด้วย thermocouple-probe thermometer type K ก็ถูกนำมาเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลวซึ่งมีอุณหภูมิ -196°C นาน 2 วัน ก่อนที่จะถูกนำมาเพิ่มอุณหภูมิอย่างรวดเร็วในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิประมาณ 70 องศาเซลเซียส จนน้ำเชื้อละลาย (thawing) แล้วจึงนำไปเช็คเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มตามวิธีที่ได้กล่าวมาแล้ว



รูปที่ 10 การรวบรวมน้ำเชื้อใส่ในหลอดฟาง



รูปที่ 11 การปิดหลอดฟางก่อนการแช่แข็ง



รูปที่ 12 การแช่แข็งน้ำเชื้อปลากะพงขาวด้วยการใช้เครื่องมือลดอุณหภูมิอัตโนมัติ

3.4 การแช่แข็งน้ำเชื้อปลากะพงขาวในปริมาณต่างๆกัน

น้ำเชื้อปลากะพงขาวที่มีคุณภาพดีได้ถูกนำมาแช่แข็งในหลอดฟางขนาด 0.25 และ 0.5 มิลลิลิตร และหลอดไครโอไวออล (cryovial) ขนาด 2 มิลลิลิตรในช่วงปลายฤดูผสมพันธุ์วางไข่ในปีพ.ศ. 2552 ทำการทดลอง 6 ซ้ำ โดยนำน้ำเชื้อสดมาเจือจางในสารละลาย Ca-F HBSS ในอัตรส่วน 1:1 แล้วผสม DMSO ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 10% แล้วนำไปแช่แข็งด้วยอัตราการลดอุณหภูมิ 10°C/นาทีด้วยเครื่องลดอุณหภูมิอัตโนมัติ จากอุณหภูมิห้องถึงอุณหภูมิสุดท้าย -40°C แล้วนำไปเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวแล้วทำการละลายน้ำเชื้อเพื่อประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม รวมทั้งประเมินการมีชีวิตของสเปิร์มทุกๆเดือนนาน 3 เดือนเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อแช่แข็งที่เก็บรักษาไว้ 1 ชั่วโมง (เดือนที่ 0)

3.5 การทดสอบความสามารถในการปฏิสนธิกับไข่ของน้ำเชื้อปลากะพงขาวแช่แข็ง

การทดสอบความสามารถในการปฏิสนธิของน้ำเชื้อปลากะพงขาวที่เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวทำโดยการผสมเทียม เริ่มจากกระตุ้นการตกไข่แม่ปลากะพงขาว 4 ตัว (4.5-5.6 กิโลกรัม) ด้วยการฉีดฮอร์โมนกระตุ้นการตกไข่ที่มีชื่อว่า Lutenizing Hormone Releasing Hormone analogue (LHRHa) (มีชื่อทางการค้าว่า Suprefect) ในอัตรา 25-30 ไมโครกรัม/กิโลกรัม ร่วมกับ Domperidone (มีชื่อทางการค้าว่า Motilium) ในอัตรา 5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม แล้วพักแม่ปลาไว้ 10-12 ชั่วโมง แล้วจึงรีดไข่ออกมาและเช็คคุณภาพไข่ก่อนการผสมเทียมโดยดูจากลักษณะรูปร่างและความสุกของไข่ โดยได้ใช้ไข่ที่มีคุณภาพดีเท่านั้นในการผสมเทียม การรวบรวมไข่ปลาทำโดยนำแม่พันธุ์ปลากะพงขาวที่มีการตกไข่มาสลบด้วย 2-phenoxyethanol 200 ppm แล้วรีดไข่ใส่ในจานแก้ว (petridish) ที่วางบนน้ำแข็ง จากนั้นใช้กระบอกฉีดยาพลาสติกขนาด 1 มิลลิลิตรที่ตัดด้านปลายดูดไข่แล้วนำไปใส่ในจานแก้วอีกใบประมาณ 0.2 มิลลิลิตร

การผสมเทียมทำโดยนำน้ำเชื้อปลากะพงขาวที่ได้แช่แข็งในช่วงต้นฤดูผสมพันธุ์วางไข่ในปี พ.ศ. 2553 ด้วยการใช้อัตราการลดอุณหภูมิ -10 องศาเซลเซียส/นาที มาเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลวในระยะเวลา 16 วันมาประเมินความสามารถในการปฏิสนธิกับไข่ โดยเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสดเป็นกลุ่มควบคุม น้ำเชื้อปลากะพงขาวได้ถูกนำมาละลายที่อุณหภูมิที่เหมาะสมเพื่อเข้ากลับสู่สภาพเหลวตามเดิม (ละลายที่อุณหภูมิ 70-80 องศาเซลเซียส) แล้วตัดหลอดฟางออกแล้วเทน้ำเชื้อที่ละลายลงไปบนไข่ในจานแก้วที่ดูดไข่มาประมาณ 0.2 มิลลิลิตรก่อนหน้านี้ โดยใช้จำนวนสเปิร์มประมาณ 400,000 ตัวต่อการปฏิสนธิไข่ 1 ใบ (sperm to egg ratio) การผสมเทียมทำโดยเทน้ำเชื้อแช่แข็งเหล่านั้นลงไปบนไข่ (6 replication) แล้วเทน้ำทะเลที่สะอาดท่วมไข่เล็กน้อยพร้อมกับผสมให้ไข่กับน้ำเชื้อเข้าเป็นเนื้อเดียวกันด้วยการใช้ขนไก่คนเบาๆ จากนั้นทำการล้างไข่ด้วยน้ำทะเล 2 ครั้งแล้วปล่อยให้ไข่ปลากะพงขาวพัฒนาในจานแก้วโดยให้น้ำทะเลท่วมไข่ตลอดเวลาและเปลี่ยนน้ำทะเลทุกๆ 1-2 ชั่วโมงจนไข่ฟักเป็นลูกปลาวัยอ่อน

การประเมินจำนวนสเปิร์มที่ใช้ผสมกับไข่ตามสัดส่วนที่กำหนดทำโดยการใช้ haemocytometer ประเมินความหนาแน่นน้ำเชื้อแช่แข็งในเบื้องต้น แล้วคำนวณกลับว่าต้องการผสมเทียมไข่กี่ใบ ก็จะทราบว่าต้องใช้น้ำเชื้อแช่แข็งปริมาณเท่าใดในการผสมเทียมกับไข่ หรือทราบว่าต้องใช้หลอดฟางกี่หลอดในการผสมกับไข่ การประเมินเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิของไข่ประเมินเมื่อไข่ปลาพัฒนาถึงระยะ gastrula stage โดยคำนวณจากจำนวนไข่ที่ปฏิสนธิต่อจำนวนไข่ที่นับทั้งหมดแล้วคูณด้วย 100 และทำ 6 ซ้ำต่อชุดการทดลอง สำหรับกลุ่มควบคุมใช้น้ำเชื้อสดที่รวบรวมมาใหม่ๆ ซึ่งต้องมีเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มไม่ต่ำกว่า 80% ในการผสมเทียมกับไข่ และน้ำเชื้อสดก็มีการคำนวณว่าในการปฏิสนธิไข่ทั้งหมดในจานแก้วนั้นต้องใช้ปริมาณน้ำเชื้อเท่าไรด้วยหลักการเช่นเดียวกันที่ใช้ sperm to egg ratio เท่ากัน สำหรับการคำนวณเปอร์เซ็นต์การฟักของไข่ทำโดยคำนวณจากลูกปลาที่ฟักออกมาเป็นตัวต่อไข่ทั้งหมดที่ทำการผสมเทียม

3.6 <u>การศึกษาผลของระยะเวลาการเก็บรักษาที่มีต่อคุณภาพน้ำเชื้อปลากะพงขาวแช่แข็ง</u>

น้ำเชื้อปลากะพงขาวที่มีคุณภาพดีจากพ่อพันธุ์ 5 ตัวได้ถูกนำมาแช่แข็งในช่วงต้นฤดูผสมพันธุ์วางไข่ในปี พ.ศ. 2553 โดยใช้ protocol ที่เหมาะสมที่ได้พัฒนาขึ้นมา โดยนำน้ำเชื้อสดมาเจือจางในสารละลาย Ca-F HBSS ในอัตรส่วน 1:1 แล้วผสม DMSO ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 10% แล้วนำไปแช่แข็งด้วยอัตราการลดอุณหภูมิ 10°C/นาทีด้วยเครื่องลดอุณหภูมิอัตโนมัติ ทำการทดลอง 6 ซ้ำ

น้ำเชื้อปลากะพงขาวที่ได้ถูกแช่แข็งไว้ในหลอดฟางขนาด 0.5 มิลลิลิตร และเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลาต่างๆกันนาน 6 เดือน และถูกนำออกมาละลาย (thawing) ทุกๆเดือนด้วยอุณหภูมิที่เหมาะสม เพื่อประเมินการเปลี่ยนแปลงของคุณภาพน้ำเชื้อระหว่างเก็บรักษา โดยประเมินจากเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม และเปอร์เซนต์สเปิร์มที่มีชีวิตทุกๆเดือน เพื่อประเมินผลของระยะเวลาการเก็บรักษาที่อาจมีต่อการเคลื่อนที่ และการมีชีวิตของน้ำเชื้อที่ผ่านการแช่แข็ง น้ำเชื้อปลาที่แช่แข็งและเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลวนาน 3 ชั่วโมงถูกนำมาละลายแล้วประเมินคุณภาพสเปิร์มจัดเป็นน้ำเชื้อปลาที่แช่แข็งในเดือนที่ 0

4. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ข้อมูลเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม และเปอร์เซนต์การมีชีวิตของสเปิร์มรวมทั้งเปอร์เซนต์การปฏิสนธิ และเปอร์เซนต์การฟักถูกนำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตราฐาน (standard deviation) โดยข้อมูลเปอร์เซนต์เหล่านี้ถูกนำมา arcsine-square root transformed และตรวจสอบว่าข้อมูลมีการกระจายปกติ (mormal distribution) ก่อนการวิเคราะห์ทางสถิติ ข้อมูลในแต่ละชุดการทดลองของปลากะพงขาว ถูกนำมาวิเคราะห์หาความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธีการ Analysis of variance (one-way ANOVA หรือ two-way ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และ

เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างชุดการทดลองด้วย Duncan's new multiple range test โดยใช้โปรแกรมสถิติ SPSS 10.0 version