บทที่ 3
วิธีดำเนินงานวิจัย

1. พ่อพันธุ์กุ้งแชบ๊วย

พ่อพันธุ์กุ้งแชบ๊วยสมบูรณ์เพศที่มีน้ำหนักเฉลี่ย 27.8 ± 6.21 กรัม ความยาวเฉลี่ย 15.18 ± 3.39 เซนติเมตร

2. วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือ

2.1 จานเพาะเชื้อ
2.2 หลอดทดลองขนาด 16×150 มิลลิเมตร
2.3 หลอดทดลองขนาด 13×100 มิลลิเมตร
2.4 ตะเกียงแอลกอฮอล์
2.5 หลอดเก็บรักษา (eppendrorf tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
2.6 เครื่องชั่ง
2.7 กล่องโฟม
2.8 ไมโครปิเปต
2.9 สไลด์และแผ่นปิดสไลด์
2.10 กล้องจุลทรรศน์
2.11 คีมคีบ
2.12 โกร่งบด
2.13 กรรไกรสแตนเลส
2.14 Cryovial tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
2.15 คอมพิวเตอร์และซอฟท์แวร์สำหรับการแช่แข็ง
2.16 ไนโตรเจนเหลวและถังเก็บไนโตรเจนเหลว
2.17 อ่างควบคุมอุณหภูมิ

3. สารเคมี

3.1 สีย้อม Eosin 0.5%
3.2 สีย้อม Nigrosin 10%
3.3 DMSO (dimethyl sulfoxide)
3.4 Methanol
3.5 Glycerol
3.6 Ethanol
3.7 Formamide
3.8 Propylene glycol
3.9 Ethylene glycol

3.10 Acetamide

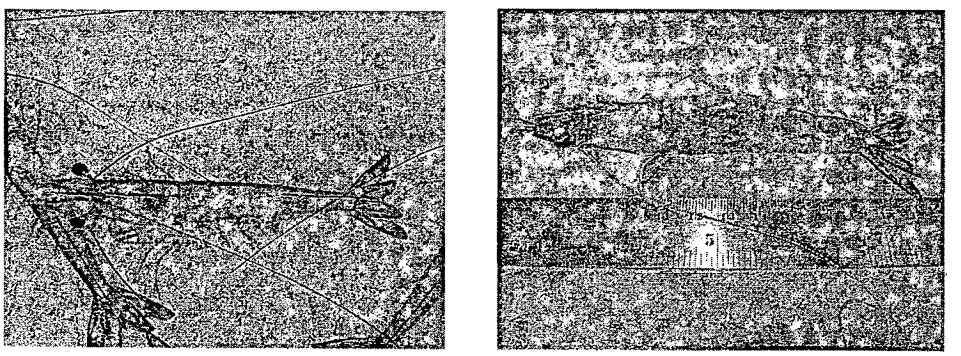
3.11 Trehalose

3.12 Sucrose

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การเก็บรวบรวมพ่อพันธุ์กุ้งแชบ๊วย

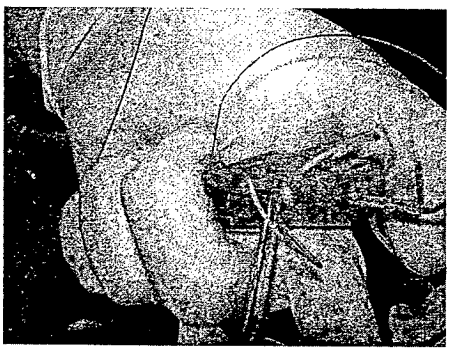
พ่อพันธุ์กุ้งแชบ๊วยที่สมบูรณ์เพศ (ภาพที่ 8) ซึ่งพิจารณาจากความขาวขุ่นของถุงน้ำเชื้อ (spermatophores) ที่อยู่บริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 5 ของพ่อพันธุ์กุ้งแชบ๊วยที่รวบรวมมาจากธรรมชาติ บริเวณเกาะสีชัง จ. ชลบุรี หรือบริเวณแหล่งผสมพันธุ์วางไข่ใกล้เคียงในช่วงเวลาต่าง ๆ กันในรอบปี โดยพ่อพันธุ์จะถูกชั่งน้ำหนัก และวัดความยาวของลำตัว โดยพ่อแม่พันธุ์จะถูกเลี้ยงในบ่อขนาด 3 x 4 x 1.5 เมตร ในโรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา การให้อาหารแก่พ่อพันธุ์กุ้งแชบ๊วยจะให้หมึกและแม่เพรียงวันละ 2 ครั้งประมาณ 10% น้ำหนักตัวต่อวัน และเปลี่ยนถ่ายน้ำทะเลที่สะอาดในบ่อพักพ่อพันธุ์ประมาณ 30% ทุก ๆ วัน พ่อพันธุ์จะถูกเลี้ยงให้ปรับตัวกับสภาพแวดล้อมใหม่ก่อนเริ่มทำการทดลองประมาณ 5-7 วัน และวัดคุณภาพน้ำระหว่างการเลี้ยงพ่อพันธุ์ พ่อพันธุ์ที่มีถุงน้ำเชื้อที่ยังพัฒนาไม่มากนัก เช่น มีสีขาวขุ่นเล็กน้อย หรือยังไม่มีถุงน้ำเชื้อจะไม่นำมาใช้ในการทดลองเพื่อให้มั่นใจว่าพ่อพันธุ์ทุกตัวที่ใช้ในการทดลองมีคุณภาพสเปิร์มดี ซึ่งสังเกตเบื้องต้นได้จากความขาวขุ่นของถุงน้ำเชื้อที่ยิ่งขาวขุ่นมากแสดงถึงคุณภาพสเปิร์มที่ดี ในขณะที่ถุงน้ำเชื้อที่ขาวขุ่นเล็กน้อย แสดงว่าสเปิร์มมีคุณภาพต่ำ



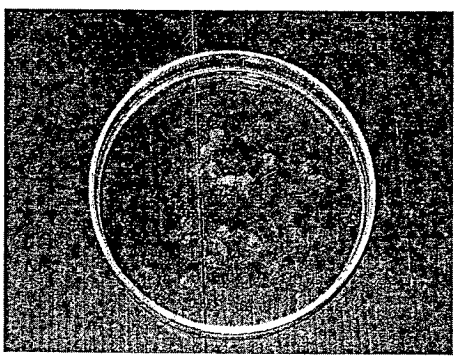
ภาพที่ 8 พ่อพันธุ์กุ้งแชบ๊วย

2. การรวบรวมถุงน้ำเชื้อ

การรวบรวมถุงน้ำเชื้อจากกุ้งแชบ๊วยทำโดยการใช้มือกดเบา ๆ บริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 5 ของพ่อพันธุ์กุ้งแชบ๊วยทั้ง 2 ข้างซึ่งมี petasma อยู่บริเวณนั้น เมื่อเริ่มเห็นถุงน้ำเชื้อโผล่ออกมาจึงใช้คีมคีบ (forcep) ที่สะอาดปราศจากเชื้อดึงเอาถุงน้ำเชื้อออกมาด้วยเทคนิคปลอดเชื้อเพื่อนำไปทดลองต่อไป (ภาพที่ 9 และ 10)



ภาพที่ 9 การดึงถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วย



ภาพที่ 10 ถุงน้ำเชื้อจากกุ้งแชบ๊วย

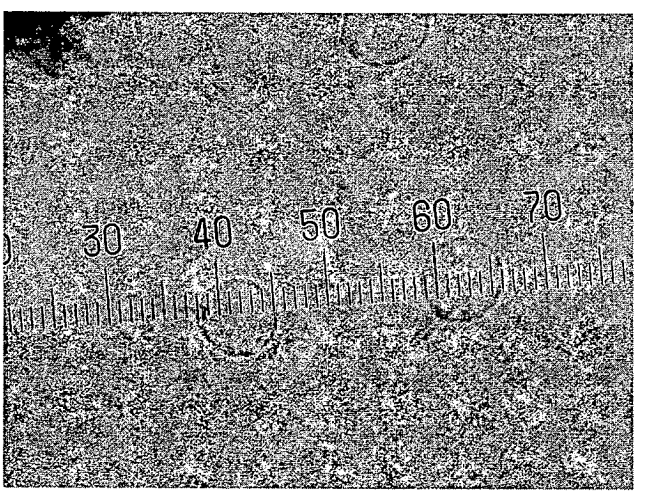
3. การศึกษาสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยแบบแช่แข็ง

การศึกษาหาสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยแบบแช่แข็ง ทำการทดสอบด้วยกระบวนการเดียวกับการแช่เย็น เนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว และให้ผลการทดสอบที่สอดคล้องกับกรรมวิธีการหาสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการแช่แข็งถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วย โดยเริ่มต้นจากการรวบรวมถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ ตั้งแต่ล้างตัวกุ้งให้สะอาด แล้วใช้คีมคีบที่สะอาดปราศจากเชื้อรวบรวมถุงน้ำเชื้อมาใส่ใน eppendorf tubes ที่ได้ทำการฆ่าเชื้อและมีสารละลายบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ อยู่ภายใน eppendorf tubes ในการทดลองจะใช้สารละลายบัฟเฟอร์ 5 ชนิด ได้แก่ Mineral oil, Ringer solution, Phosphate buffer, Ca-F-Saline และ 0.8% NaCl ใส่ลงในหลอดเก็บรักษา (eppendorf tube) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร โดยในแต่ละสูตรน้ำยา ทำการทดลอง 6 ซ้ำ

การเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยแบบแช่เย็นจะใส่ถุงน้ำเชื้อ 1 ถุงต่อหลอดเก็บรักษา 1 หลอด ปิดฝาให้สนิท แล้วนำหลอดไปเก็บรักษาในตู้เย็น ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 2-4 องศาเซลเซียส เก็บรักษาไว้เป็นเวลานาน 28 วัน โดยทำการประเมินคุณภาพถุงน้ำเชื้อทุก ๆ 7 วัน ได้แก่ เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิต (ประเมินด้วยการย้อมสีสเปิร์มด้วย eosin-nigrosin) และสังเกตการ

เปลี่ยนแปลงภายนอก (สี ความหนืดและความขุ่น) ของน้ำยาในหลอดเก็บรักษา รวมทั้งการบวมของถุงน้ำเชื้อ และสีและรูปร่างของถุงน้ำเชื้อขณะเก็บรักษาว่ามีลักษณะเปลี่ยนแปลงอย่างไร จากนั้นบันทึกผลที่ได้ แล้วประเมินสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาแบบแช่เย็นมากที่สุด

การประเมินการมีชีวิตของสเปิร์มกุ้งแชบ๊วยทำโดยนำถุงน้ำเชื้อมาบดเบา ๆ ให้ละเอียดด้วยโกร่งบดยา (glass homogenizer) ที่เติม 0.85% NaCl แล้วทำการย้อมสีเพื่อประเมินเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิต (percentage of sperm viability) โดยการนำเอาสเปิร์มที่ถูกเจือจาง (5 ul) มาย้อมสีด้วยสารละลาย eosin-nigrosin โดยหยด eosin ปริมาตรเท่ากับสารละลายสเปิร์ม ส่วน nigrosin หยดสองเท่าลงไปในภายหลัง ผสมให้เข้ากันแล้วนำ cover slide มาเกลี่ยบาง ๆ บน slide ทำการ fix ด้วยความร้อนโดยระวังไม่ให้ร้อนเกินไป สุ่มนับภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า (Fribourgh, 1966; Vuthiphandchai and Zohar, 1999) สเปิร์มที่มีชีวิต (viable sperm) จะไม่ดูดซึมสีหรือติดสีย้อม และตัวสเปิร์มที่ไม่มีชีวิต (dead sperm) จะดูดซับสี หรือติดสีย้อมสีม่วงแดง (ภาพที่ 11) โดยสุ่มนับสเปิร์ม 200 ตัว และทำทดลอง 3 ซ้ำ เพื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิต



ภาพที่ 11 การประเมินการมีชีวิตของสเปิร์มกุ้งแชบ๊วย

4. การศึกษาความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ต่อถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยแบบแช่แข็ง

เมื่อได้สารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยแบบแช่แข็ง ในขั้นตอนต่อมาจำเป็นต้องมีการศึกษาถึงความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ ซึ่งสารไครโอโพรเทคแทนท์เป็นสารที่ป้องกันการแข็งตัวของสเปิร์ม ดังนั้นในการศึกษาขั้นตอนนี้จะทำให้ทราบชนิดและความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่เหมาะสมก่อนที่จะนำไปใช้ในการแช่แข็งถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วย การศึกษาในขั้นตอนนี้จะทดสอบความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ 10 ชนิด ได้แก่ Dimethyl sulfoxide (DMSO), Methanol, Glycerol, Ethanol, Formamide, Propylene glycol, Ethylene glycol, Acetamide, Trehalose และ Sucrose ต่อการมีชีวิตของสเปิร์ม ซึ่ง

สารไครโอโพรเทคแทนท์แต่ละชนิดจะถูกเตรียมขึ้นมาโดยการเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม เพื่อให้มีความเข้มข้นสุดท้าย (Final concentration) ของสารไครโอโพรเทคแทนท์เท่ากับ 5%, 10%, 15% และ 20% ในการทดลองครั้งนี้ทำการทดลอง 4 ซ้ำ ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส)

การศึกษาในขั้นตอนนี้เริ่มต้นจากนำพ่อพันธุ์กุ้งแชบ๊วยที่สมบูรณ์เพศมาบีบบริเวณท้องกุ้งและใช้คีมคีบดึงถุงน้ำเชื้อออกมา หลังจากนั้นนำถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยมาแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม นาน 5 นาที และนำมาตัดเยื่อหุ้มรอบนอกถุงออกให้หมดให้เหลือแต่ถุงน้ำเชื้อ ทดสอบความเป็นพิษโดยนำถุงน้ำเชื้อที่ตัดเยื่อหุ้มด้านนอกออกแล้วมาใส่ในโกร่งบดยา (Glass homogenizer) แล้วเติมสารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดต่าง ๆ ที่ต้องการทดสอบ ปริมาตร 300 ไมโครลิตร แล้วจึงทำการบดถุงน้ำเชื้อเบา ๆ ให้ละเอียด จากนั้นประเมินการมีชีวิตของสเปิร์มในทุกการทดลองในระยะเวลาต่าง ๆ ได้แก่ ภายในเวลา 0, 10, 20, 30, 45 และ 60 นาที เมื่อถึงเวลาตามที่กำหนด นำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิต (% sperm viability) การทดลองในขั้นตอนนี้ทำให้ทราบว่าชนิดและความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อแช่แข็ง โดยเลือกเฉพาะสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่เป็นพิษน้อยมาใช้ในการแช่แข็งถุงน้ำเชื้อต่อไป

5. การศึกษาถึงผลของอัตราการลดอุณหภูมิต่อการแช่แข็งถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วย

วิธีการศึกษาขั้นตอนของการแช่แข็งถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยจะเริ่มโดยการเลือกชนิดของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีความเป็นพิษน้อยที่สุดมา 2-3 ชนิดที่ทราบจากการทดลองก่อนหน้านี้ โดยนำพ่อพันธุ์กุ้งแชบ๊วยที่สมบูรณ์เพศมาบีบเอาถุงน้ำเชื้อ หลังจากนั้นนำถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยมาแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมนาน 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง โดยตัดเยื่อหุ้มออกให้หมดเหลือแต่ถุงน้ำเชื้อ แล้วนำถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยมาแช่ในหลอด Cryotube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีสารไครโอโพรเทคแทนท์ ณ ความเข้มข้นที่เหมาะสม นาน 30 นาทีหรือตามระยะเวลาที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลอง นอกจากนี้สารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีความเป็นพิษต่ำที่ออกฤทธิ์ภายนอกเซลล์และภายในเซลล์จะถูกเลือกและนำมาใช้ร่วมกัน เพื่อศึกษาความเป็นพิษร่วมกันที่มีต่อสเปิร์มในถุงน้ำเชื้อเพื่อให้ได้ข้อมูลพื้นฐานที่จำเป็นสำหรับการแช่แข็งถุงน้ำเชื้อต่อไป

การแช่แข็งถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยในแต่ละชุดการทดลองใช้ 4 ซ้ำ ซึ่งการแช่แข็งใช้อัตราการลดอุณหภูมิต่าง ๆ กันในลักษณะ One-step freezing ดังนี้ อัตราการลดอุณหภูมิ –1, -2, -3, และ -4 องศาเซลเซียสต่อนาที จากอุณหภูมิเริ่มต้น 25 องศาเซลเซียส ถึง -30 องศาเซลเซียส hold 5 นาที และอัตราการลดอุณหภูมิ –1, -2, -3, และ -4 องศาเซลเซียสต่อนาที จากอุณหภูมิเริ่มต้น 25 องศาเซลเซียส ถึง -80 องศาเซลเซียส hold 5 นาที จากนั้นนำมาแช่ในถังไนโตรเจนเหลว เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาละลายที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที การแช่แข็งถุงน้ำเชื้อในลักษณะเช่นนี้จะมีการใช้เครื่องมือแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติ (Controlled-rate programmable freezer) เพื่อควบคุมการลดอุณหภูมิให้เที่ยงตรง

การทดสอบการมีชีวิตของน้ำเชื้อที่เก็บรักษาแบบแช่แข็ง และเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวทำโดยนำสารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ออกจากหลอด Cryotube และเติม Ca-Free saline เพื่อล้าง

ไครโอโพรเทคแทนท์ โดยแช่นาน 5 นาที ทำการบดถุงน้ำเชื้อ โดยเอาถุงน้ำเชื้อหลังการละลายมาใส่ในโกร่งบดยาและเติม Ca-Free saline แล้วจึงทำการบดถุงน้ำเชื้อเบา ๆ ให้ละเอียด ทำการประเมินเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิต โดยการย้อมสีสเปิร์ม รวมทั้งประเมินการเปลี่ยนแปลงคุณภาพสเปิร์มอื่น ๆ

6. การศึกษาผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการละลายถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยต่อการมีชีวิตของสเปิร์ม

นำถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยแช่แข็งที่ลดอุณหภูมิด้วยวิธีการทดลองที่ดีที่สุดจากการศึกษาจากข้อ 5 มาศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการละลายถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยแช่แข็ง โดยนำถุงน้ำเชื้อมาละลาย (Thawing) ในน้ำที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จากนั้นทำการประเมินเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตโดยการย้อมสีสเปิร์มด้วย Eosin-Nigrosin เปรียบเทียบกับการใช้อัตราการละลายถุงน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 50, 70 และ 90 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที

7. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยโปรแกรมทางสถิติ The statistical program for the social sciences (SPSS) version 11.5 เปรียบเทียบเชิงซ้อนด้วยวิธี Duncan's multiple range test โดยวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติเท่ากับ $P = 0.05$