

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษาผลของสารไครโอโพรเทคแทนท์ ชนิดต่างๆ ต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งปลาตุกเทศ โดยใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ 3 ชนิด ชนิดละ 3 ระดับในน้ำเชื้อแช่แข็งปลาตุกเทศที่ทำการแช่แข็งตามวิธีการของ Lahnsteiner และ คณะ (2003) เปรียบเทียบผลลัพธ์ในเชิงคุณภาพโดยใช้วิธีการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งที่ละลายแล้วต่อการพัฒนาตัวอ่อนของปลาตุกเทศ ในระยะปฏิสนธิ ระยะแรกของบลาสตูลา (early blastula stage) ระยะท้ายของบลาสตูลา (late blastula stage) ระยะ แกสตรูลา (gastrula stage) ระยะ ลำตัวเกิดปล้อง (body segmented appearance stage) หรือ โซไมต์ (somite stage) และระยะฟักออกเป็นตัว (hatching stage)

1. วัสดุอุปกรณ์ สารเคมีและวิธีการ

1.1 วัสดุอุปกรณ์ในการทดลอง

- 1) เครื่องกลั่นน้ำ จำนวน 2 เครื่องเพื่อผลิตน้ำกลั่นที่บริสุทธิ์โดยกลั่น 2 ครั้ง
- 2) ถังน้ำรูปทรงสี่เหลี่ยมขนาดบรรจุ 1 ลูกบาศก์เมตรพร้อมฝาปิด
- 3) ชุดอุปกรณ์ให้อากาศ ได้แก่ แอร์ปั๊ม ท่อลม หัวทราย ข้อต่อและตัวปรับลม
- 4) สายยางขนาดต่างๆ
- 5) เครื่องชั่งสารเคมี ชนิดมีจุดทศนิยม 3 ตำแหน่ง
- 6) ขวดรูปหมฟุ้งขนาดบรรจุ 1 ลิตร (Erlenmeyer's flask)
- 7) เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดใช้แท่งแม่เหล็ก (magnetic stirrer)
- 8) เครื่องเขย่าภาคไฟฟ้า
- 9) กระบอกตวงขนาด 500 มล
- 10) อลูมิเนียมฟอยล์ (aluminum foil)
- 11) กล้องจุลทรรศน์ชนิดสเตอริโอไมโครสโคป (stereo microscope)
- 12) หลอดทดสอบขนาดบรรจุ 1 มล
- 13) สติกเกอร์ติดจานทดลอง
- 14) อัลกอฮอล์เช็ดแผล
- 15) กระติกเทอร์มอสใส่น้ำร้อน
- 16) นาฬิกาจับเวลา

- 17) เครื่องนับแบบกด
- 18) กล้องโฟมบรรจุในโตรเจนเหลว
- 19) Holtfreter's Solution
- 20) เครื่องปิดหลอดน้ำเชื้อ
- 21) งานเพาะเชื้อชนิดที่ทำจากแก้ว 100x15 มม.
- 22) หลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 0.5 มล.
- 23) น้ำยาล้างเครื่องแก้ว
- 24) ถังเก็บในโตรเจนเหลว
- 25) อุปกรณ์จับ บังคับปลาและเลี้ยงปลา เช่น เครื่องเป่าออกซิเจน ถังพลาสติกขนาดใหญ่สำหรับเลี้ยงปลา ฯลฯ
- 26) ปลาตุ๊กเทศเมียแม่พันธุ์ท้องแก่ 30 ตัว

1.2 สารเคมี

- 1) Methanol (03760, Fluka)
- 2) Dimethyl Sulfoxide DMSO (D5879, Sigma)
- 3) Glycerol (G6279, Sigma)
- 4) MgSO_4 hepta hydrate (M1880, Sigma)
- 5) liquid nitrogen
- 6) ซอร์โมนซูพรีแฟกซ์ (suprefact, Buserelin acetate, Aventis Pharma Deutschland GmbH, Frankfurt am Main, Germany)
- 7) Molax-M (domperidone maleate 10 มก. , Siam Bheasach Co., Ltd., Thailand)

2. การดำเนินการทดลอง

2.1 วางแผนการทดลอง

การทดลองการเปรียบเทียบผลของสารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดต่างๆต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งปลาดุกเทศใช้การวางแผนการทดลองชนิดการจัดทริทเมนต์แบบแฟคตอเรียลร่วมกับกลุ่มควบคุม (augmented factorial experiments) โดยใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ 3 ชนิดในสูตรสารที่ใช้เจือจางน้ำเชื้อปลาสำหรับแช่แข็ง คือ เมทานอล ไดเมทิลซัลฟอกไซด์และกลีเซอรอล โดยที่สารทั้ง 3 ชนิดถูกใช้ที่ระดับความเข้มข้นทั้ง 3 ระดับ เท่ากันคือ 10.0 12.5 และ 15.0 เปอร์เซ็นต์ นำปัจจัยดังกล่าวจัดเป็น treatment combination ศึกษาพร้อมกับทริทเมนต์ที่เป็นตัวควบคุม (control treatment) ในที่นี้คือน้ำเชื้อสด ซึ่งทริทเมนต์ที่ใช้ทั้งหมดในการทดลองจะจัดได้เป็น $(a \times b) + 1$ หรือ $(3 \times 3) + 1$

เมื่อ a เป็นระดับในปัจจัย A คือ ชนิดของสารไครโอโพรเทคแทนต์ 3 ชนิดคือ เมธานอล ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ และกลีเซอรอล และ b เป็นระดับในปัจจัย B คือ ความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนต์ แต่ละชนิด 3 ระดับ คือ 10.0 , 12.5 และ 15.0 เปอร์เซ็นต์ ใช้ linear contrast ช่วยในการวิเคราะห์ โดยประกอบด้วยสูตรน้ำเชื้อ 10 ทริตเมนต์ ดังนี้

สูตรที่ 1 น้ำเชื้อสด

สูตรที่ 2 น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็งสูตรเมธานอล 10.0 เปอร์เซ็นต์

สูตรที่ 3 น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็งสูตรเมธานอล 12.5 เปอร์เซ็นต์

สูตรที่ 4 น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็งสูตรเมธานอล 15.0 เปอร์เซ็นต์

สูตรที่ 5 น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็งสูตรไดเมทิลซัลฟอกไซด์ 10.0 เปอร์เซ็นต์

สูตรที่ 6 น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็งสูตรไดเมทิลซัลฟอกไซด์ 12.5 เปอร์เซ็นต์

สูตรที่ 7 น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็งสูตรไดเมทิลซัลฟอกไซด์ 15.0 เปอร์เซ็นต์

สูตรที่ 8 น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็งสูตรกลีเซอรอล 10.0 เปอร์เซ็นต์

สูตรที่ 9 น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็งสูตรกลีเซอรอล 12.5 เปอร์เซ็นต์

สูตรที่ 10 น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็งสูตรกลีเซอรอล 15.0 เปอร์เซ็นต์

2.2 ส่วนประกอบของน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็งที่ใช้ในการทดลอง

น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็ง ซึ่งใช้ในการทดลองนี้มีปริมาณสารเคมีที่เท่ากันทุกสูตร ประกอบไปด้วย 75 mmol/l NaCl 70 mmol/l KCl 2 mmol/l CaCl_2 1 mmol/l MgSO_4 20 mmol/l Tris และ 67 mmol/l glycine และใช้สารไครโอโพรเทคแทนต์แตกต่างกัน 3 ชนิดในสูตรน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็ง คือ เมธานอล ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ กลีเซอรอล โดยที่สารทั้ง 3 ชนิดถูกใช้ที่ระดับความเข้มข้นทั้ง 3 ระดับ เท่ากันคือ 10.0 12.5 และ 15.0 เปอร์เซ็นต์ซึ่งจะได้สูตรน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็งในสูตรที่ 2-10 ใช้เก็บรักษาสpermatozoa ของปลาดุกเทศแช่แข็งรวมทั้งหมด 9 สูตร ดังตารางที่ 3 ส่วนสูตรที่ 1 คือน้ำเชื้อสุจิปลาดุกเทศสดเป็นกลุ่มควบคุม

ตารางที่ 3 แสดงสูตรน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็งที่ใช้เก็บรักษาอสุจิปลาอุกเทศ

ส่วนประกอบ	สูตรที่ 2-4	สูตรที่ 5-7	สูตรที่ 8-10
NaCl	75 mmol/l	75 mmol/l	75 mmol/l
KCl	70 mmol/l	70 mmol/l	70 mmol/l
CaCl ₂	2 mmol/l	2 mmol/l	2 mmol/l
MgSO ₄	1 mmol/l	1 mmol/l	1 mmol/l
Tris	20 mmol/l	20 mmol/l	20 mmol/l
glycine	67 mmol/l	67 mmol/l	67 mmol/l
Methanol (%)	10.0,12.5,15.0	-	-
DMSO (%)	-	10.0,12.5,15.0	-
Glycerol (%)	-	-	10.0,12.5,15.0

2.3 การเตรียมสัตว์ทดลอง

1) การเตรียมแม่พันธุ์ปลาอุกเทศ

ใช้แม่พันธุ์ปลาอุกเทศ ที่มีอายุ 8-10 เดือนมีไข่เต็มท้องที่ได้จาก บี เอ็ม ฟาร์มซึ่งเป็นฟาร์มปลาอุกเทศพันธุ์แท้ อำเภอเมืองจังหวัดกาฬสินธุ์ จับปลาแม่พันธุ์ในช่วงเวลา 16.00-17.00 น. ก่อนวันที่จะทำการทดลอง โดยบรรจุปลาแม่พันธุ์ในถุงกระสอบอาหารที่เจาะช่องระบายอากาศ ใช้เครื่องพ่นอากาศขณะเคลื่อนย้ายจากจังหวัดกาฬสินธุ์มาจังหวัดขอนแก่น เดินทาง 2 ชม นำมาทดลองที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาสัตวศาสตร์และวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น เปลี่ยนถ่ายแม่พันธุ์ปลาอุกเทศลงถังพลาสติกขนาดประมาณ 1 ลูกบาศก์เมตร ถึงละ 1 ตัวบรรจุน้ำที่กรองคลอรีนแล้วลงพอมทว่มกิริบหลังปลาละลายปฏิบัติวิธีวนะคลอเตตราซัยคลิน เพื่อลดการติดเชื้อในปลา พ่นอากาศเต็มทีเพื่อให้ปลาสมบูรณ์แข็งแรง ทำการกระตุ้นการตกไข่โดยใช้ฮอร์โมนสังเคราะห์ suprefact (buserelin acetate) ในอัตราส่วน 25 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัมผสมกับ motilium (domperidone maleate) 5.0 มิลลิกรัมต่อแม่ปลาน้ำหนัก 1 กิโลกรัมบดและละลายด้วยน้ำกลั่นโดยฉีดเข้ากล้ามเนื้อใต้ครีบลึงด้วยเข็มเบอร์ 26 ขนาด 0.5 นิ้วน้ำยาที่เตรียมได้บรรจุในกระบอกฉีดขนาดบรรจุ 1 ม.ล. ปรับให้มีปริมาณ 1 ม.ล. เวลาที่ฉีดปลา คือ 22.00 น. ปลาอุกเทศ จะรัดไข่ได้ในระยะเวลา 10 ชั่วโมงภายหลังให้ยาพักรอดำเนินการในขั้นตอนต่อไป

2) การเตรียมฟอพันธุ์ปลาอุกเทศและการเตรียมน้ำเชื้อแช่แข็ง

ฟอพันธุ์ปลาอุกเทศที่ใช้ในการทดลองได้จากโรงงานไส้กรอกปลาอุกเทศอำเภอมือเมือง จังหวัดกาฬสินธุ์ โดยใช้วิธีเก็บถุงน้ำเชื้อปลาอุกเทศภายหลังจากการชำแหละที่โรงงานไส้กรอกปลาอุกเทศ อำเภอมือเมือง จังหวัดกาฬสินธุ์ ในเวลา 05.00 น. นำถุงน้ำเชื้อมาจากช่องท้องของปลาเพศผู้ คัดเลือกถุงน้ำเชื้อที่มีลักษณะสมบูรณ์ ซึ่งมีขนาดใหญ่ มีของเหลวใสอยู่ภายใน (Mansour et al, 2004) โดยคัดเลือกจากปลาอุกเทศเพศผู้โตเต็มวัย น้ำหนักประมาณ 3 กก. ทำการกำจัดโลหิตบริเวณถุงน้ำเชื้อโดยใช้ผ้าซับโลหิตทำการเก็บถุงน้ำเชื้อปลาอุกเทศเพศผู้โดยบรรจุในถุงพลาสติกเพื่อป้องกันน้ำและเพื่อรักษาคุณภาพ ไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 4-6 ชม. โดยมีน้ำหนักประมาณ 500 กรัม นำกลับมาทำการแช่แข็งที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาสัตวศาสตร์และวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ คัดเลือกถุงน้ำเชื้อที่เก็บรักษาไว้นานมาบดและกรองด้วยผ้าขาวบาง น้ำเชื้อส่วนหนึ่งนำไปผสมไข่ปลาอุกเทศเป็นน้ำเชื้อสด น้ำเชื้อส่วนมากจะนำมาใส่ในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็งที่มีอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่เตรียมไว้แล้ว และ cryoprotectant ชนิดต่างๆ ผสมน้ำเชื้อแต่ละสูตรนำมาผสมรวมกันกับสารละลายน้ำเชื้อในอัตราส่วน 1:3 (น้ำเชื้อ:สารละลายน้ำเชื้อ) ตามวิธีการของ Lahnsteiner และ คณะ (2003) ปรับสมดุลของน้ำเชื้อที่ผสมแล้วเป็นเวลา 5 นาที ทำการบรรจุลงหลอดเก็บน้ำเชื้อขนาด 0.5 มล. หลอดแล้วใช้ดินน้ำมันสีปิดด้านบนของหลอดเพื่อกำหนดชนิดของสาร cryoprotectants ที่ระดับต่างๆ กันวางหลอดน้ำเชื้อที่ได้เหนือโอของไนโตรเจนเหลวที่ระดับความสูง 4 ซม. เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นเทหลอดน้ำเชื้อลงแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวแล้วเก็บน้ำเชื้อแช่แข็งในถังไนโตรเจนเหลวนำไปทำการทดลองในลำดับต่อไป

2.4 การละลายน้ำเชื้อและการผสมเทียม

เมื่อต้องการทำละลายน้ำเชื้อแช่แข็งเพื่อนำไปผสมเทียม ให้นำหลอดเก็บน้ำเชื้อออกจากแช่แข็งแช่ลงในน้ำที่มีอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 วินาทีแล้วจึงเปลี่ยนมาลงในน้ำอุ่นอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 วินาทีตามวิธีการของ Lahnsteiner และ คณะ (2003) นำไปใช้ผสมพันธุ์กับไข่ปลาอุกเทศโดยใช้วิธีแช่แข็งที่ละลายแล้ว 3 หลอด ต่อไข่ 1 ช้อนชา โดยการผสมแบบแห้งที่ปฏิบัติกันโดยทั่วไปในงานเพาะเลี้ยงตัวอ่อน ผสมไข่กับน้ำเชื้อให้เข้ากันดีโดยใช้ไม้พันสำลีทวน 2 นาที ใส่น้ำกลั่นกระตุ้นการปฏิสนธิแล้วเทน้ำหลังผสมทิ้ง ใส่น้ำละลายไฮโดรฟรเตอร์แทนที่เพื่อใช้ในการเลี้ยงตัวอ่อนตั้งแต่การปฏิสนธิจนถึงการฟักออกนำไปตรวจดูผลการทดลองด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอไมโครสโคป

2.5 การรีดไข่ปลา

จากการฉีดฮอร์โมนเร่งไข่ปลา เวลาที่ฉีดปลา คือ 22.00 น. ปลาอุกเทศ จะรีดไข่ได้ในระยะเวลา 10 ชั่วโมงภายหลังให้ยา เมื่อครบเวลาที่กำหนดคือ 8.00 น. ทำการรีดไข่ปลา ไข่ที่ดีจะไหลออกจากช่องเพศของปลาเพศเมียได้ง่าย ไข่แต่ละฟองจะแยกออกจากกัน ไม่ติดเป็นกระจุก ไข่ที่รีดได้จะเป็นสีเขียวเข้มซึ่งเป็นสีเฉพาะประจำพันธุ์ของปลาอุกเทศและควรรีดไข่ออกจากแม่ปลาได้ไม่น้อยกว่า 80 เปอร์เซนต์ จึงจะเป็นไข่ที่ดีและจะต้องไม่มีเลือดหรือของเหลวชนิดอื่นเจือปน เมื่อได้ไข่ปลามากพอ ตักไข่ 1 ช้อนชาบรรจุในจานทดลองนำไข่ไปผสมกับน้ำเชื้อเพศผู้สดและน้ำเชื้อเพศผู้ ที่ละลายแล้วจากน้ำเชื้อแช่แข็ง ดำเนินการทดลองในลำดับต่อไป

2.6 บันทึกผลการทดลอง

ทำการหาอัตราการปฏิสนธิซึ่งจะทำการนับไข่ที่ปฏิสนธิ (fertilized ova) และไข่ที่ไม่ปฏิสนธิ (unfertilized ova) ได้ตั้งแต่ระยะเริ่มแรกของการปฏิสนธิภายใต้กล้องจุลทรรศน์ สเตอริโอไมโครสโคปโดยสังเกตเห็นส่วนของไซโกตเจริญเป็นก้อนกลมในเวลาประมาณ 18 นาที หลังจากนั้นมีการแบ่งเซลล์เป็นลำดับ จนกระทั่งระยะฟักออกเป็นตัว ใช้เครื่องนับแบบกด นับตัวอ่อนภายในไข่ที่มีลักษณะตรงตามค่าที่สังเกตต่าง ๆ ดังนี้ ระยะการปฏิสนธิ ระยะบลาสตูลา ระยะแรก ระยะ บลาสตูลาระยะท้าย ระยะแกสตรูลา ระยะโซไมท์ ระยะตัวอ่อนฟักออกเป็นตัว นำไปคำนวณเป็นร้อยละบันทึกข้อมูลช่วงเวลาและอัตราการพัฒนาของตัวอ่อนที่ระยะต่างๆของปลาอุกเทศ ในแต่ละระยะโดยใช้ข้อสังเกตการพัฒนาของตัวอ่อนของปลาอุกเทศ ดังนี้

ระยะการปฏิสนธิ(fertilized ovum)	ที่ 0-36 นาทีหลังการผสมเทียม
ระยะบลาสตูลาระยะแรก (early blastula stage)	ที่ 3 ชั่วโมงหลังการผสมเทียม
ระยะ บลาสตูลาระยะท้าย (late blastula stage)	ที่ 6 ชั่วโมงหลังการผสมเทียม
ระยะแกสตรูลา (gastrula stage)	ที่ 10 - 12 ชั่วโมงหลังการผสมเทียม
ระยะโซไมท์ (somite)	ที่ 18 - 24 ชั่วโมงหลังการผสมเทียม
ระยะตัวอ่อนฟักออกเป็นตัว (hatching)	ที่ 24 – 36 ชั่วโมงหลังการผสมเทียม

2.7 การเลี้ยงตัวอ่อนปลา

ทำการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนปลาในจานเพาะเลี้ยงตัวอ่อน ในสารละลายไฮโดรฟิเตอร์ ซึ่งประกอบด้วย NaCl, KCl, CaCl₂ และ NaHCO₃ เท่ากับ 60 0.7 0.3 0.3 มิลลิโมลต่อลิตร (ตารางที่ 3) ที่อุณหภูมิห้องที่ 25 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยนถ่ายน้ำทุก 1 – 2 ชม. ตรวจพัฒนาการของตัวอ่อนในแต่ละระยะ เช่น ระยะปฏิสนธิ ระยะบลาสตูลาระยะแรก ระยะ บลาสตูลาระยะท้าย ระยะแกสตรูลา ระยะโซไมท์และระยะที่ตัวอ่อนฟักออกเป็นตัว ด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอไมโครสโคป (stereo microscope) กำลังขยาย 5 เท่า

ตารางที่ 4 ชนิดและปริมาณของสารเคมีของสารละลายไฮลด์ฟรีเตอร์

ชนิดและปริมาณของสารเคมี	mM	g/L
60 mmol/l NaCl,	60 mmol/l	3.500
0.7 mmol/l KCl,	0.7 mmol/l	0.050
0.3 mmol/l CaCl ₂ ,	0.3 mmol/l	0.120
0.3 mmol/l NaHCO ₃	0.3 mmol/l	0.200

ที่มา : Tung (1963).

3. สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการภาควิชาสัตยศาสตร์และวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น

4. ช่วงเวลาทำการทดลอง

เดือน กุมภาพันธ์ 2549 ถึง เดือน กรกฎาคม 2550