บทที่ 2
วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 วัสดุการทดลอง

สัตว์ทดลองใช้พ่อโคพันธุ์อเมริกันบราห์มันอายุประมาณ 7 ปี จำนวน 3 ตัว ประกอบด้วย โคหมายเลข 5/36, 6/36 และ 217 ที่ทำการเลี้ยงอยู่ภายใต้สภาพแวดล้อมของศูนย์วิจัยการผสมเทียมขอนแก่น ต.ท่าพระ อ.เมือง จ.ขอนแก่น ได้ทำการรีดน้ำเชื้อของโคพ่อพันธุ์แล้วนำมาประเมินคุณภาพน้ำเชื้อสด ก่อนนำมาทำน้ำเชื้อแช่แข็ง สารกระตุ้นการเคลื่อนไหว ได้แก่

2.1.1 คาเฟอีน (Caffeine) ใช้ของบริษัท Sigma chemical Company. (St. Louis, MO.) USA.

2.1.2 เบต้า-กลูคูโรนิเดส (β-Glucuronidase) ใช้ของบริษัท Sigma chemical Company. (St. Louis, MO.) USA.

2.1.3 กลูทาไธโอน (Glutathione) ใช้ของบริษัท Sigma chemical Company. (St. Louis, MO.) USA.

2.2 การเตรียมสารเคมี

สารละลายบัพเฟอร์ (phosphate buffer saline) ประกอบด้วย NaCl 136.89 mM, Kcl 2.68 mM, Na_2HPO_4 4.29 mM, KH_2PO_4 1.47 mM (Juang et al., 1990)

คาเฟอีน (Caffeine 1,3,7-trimethyl 2,6-dioxy-purine) เตรียมโดยละลายคาเฟอีนในสารละลายบัพเฟอร์ (Cai and Marik, 1989) ให้ได้ความเข้มข้น 2 mM โดยคำนวนจากน้ำหนักโมเลกุลคาเฟอีน 194.2

เบต้า-กลูคูโรนิเดส (β-Glucuronidase) :Ec. 3.2.1.31 type VII-A from E.coli เตรียมโดยการละลายในโซเดียมคลอไรด์ 0.85% ให้ได้ 150 unit/ml (Hafs et al., 1994)

กลูทาไธโอน (Glutathione : C10H17N3O6S) ละลายลงไปในสารละลายน้ำเชื้อให้ได้ปริมาณ 5 mM. โดยคำนวณจากน้ำหนักโมเลกุลกลูทาไธโอน 307.3 (Sigha et al., 1996)

สารละลายน้ำเชื้อ (Extender) ใช้ตัวเจือจาง Egg yolk-Tris ซึ่งมีส่วนผสมดังตารางที่ 1.

สารย้อมสี eosin-nigrosin stain มีส่วนผสมคือ Sodiumcitrate dihydrate 3 กรัม ผสมกับน้ำกลั่นให้ได้ 100 cc. แล้วผสม eosin B 1 กรัม กับ nigrosin 5 กรัม ลงให้เข้ากันดี (สุจินต์และเทวินทร์, 2529)

สาร Sperm capacitation medium ดังแสดงในตารางที่ 2.

ตารางที่ 1 แสดงส่วนประกอบของสารละลายน้ำเชื้อ Egg yolk-Tris

ส่วนประกอบ	ปริมาณ
Tris (hydroxy methyl-amino methane)	30.28 g.
Citric acid	17.00 g.
Fructose	12.50 g.
Demineralized water	920.00 ml.
Glyceral (7%)	80.00 ml.
Egg yolk	20.00 %
Penicillin (Unit/cc.)	1,000
Streptomycin (μg/cc.)	1,000

ที่มา : สุรชัย (2538)

ตารางที่ 2 แสดงส่วนประกอบของสารละลาย Sperm capacitation medium

1. A-Solution ประกอบด้วย

ส่วนประกอบ	สัดส่วน
NaCl	4.3092 g.
Kcl	0.1974 g.
$CaCl_2.H_2O$	0.2171 g.
$NaH_2PO_4.2H_2O$	0.0840 g.
$MgCl_2.6H_2O$	0.0697 g.
Phenol red (0.5%)	0.1 ml.
Water	500 ml.

2. B-Solution ประกอบด้วย

ส่วนประกอบ	สัดส่วน
$NaHCO_3$	2.5873 g.
Phenol red (0.5%)	0.04 ml.
Water	200 ml.

3. Working Solution ประกอบด้วย

ส่วนประกอบ	สัดส่วน
A-Solution	76 ml.
Pyruvate	0.01375 g.
Penicillin	10,000 IU
Streptomycin	10 mg.
B-Solution	24 ml.

ที่มา : Gordon (1994)

2.3 การละลายและการแช่แข็ง

เก็บน้ำเชื้อจากพ่อโคในเวลา 07.00 น. สัปดาห์ละ 2 ครั้ง โดยใช้ artificial vagina หลังจากนั้นทำการประเมินการเคลื่อนไหวหมู่ (mass movement) น้ำเชื้อที่ได้คะแนนบวก 3 (+ + +), บวก 3.5 (+ + + (+)) และบวก 4 (+ + + +) จะนำมาใช้ในการทดลองทำน้ำเชื้อแช่แข็ง จากนั้นนำน้ำเชื้อไปประเมินหาความเข้มข้นของตัวอสุจิโดยใช้คัลลอริมิเตอร์แล้วละลายกับตัวเจือจางน้ำเชื้อที่เตรียมโดยใส่สารคาเฟอีนหรือกลูทาไธโอน หรือ เบต้า-กลูคูโรนิเดส ให้ได้ความเข้มข้นของตัวเซลล์อสุจิ 120 X 10^6 เซลล์/มิลลิลิตร จากนั้นประเมินการเคลื่อนที่อีกครั้งโดยใช้กล้อง phase contrast microscope. ก่อนนำมาเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 10 °C นาน 3 ชั่วโมง ก่อนบรรจุหลอดประเมินการเคลื่อนที่ของอสุจิเป็นรายตัว น้ำเชื้อในหลอด (French straw) ขนาด 0.25 มิลลิลิตร แล้วนำไปอังไอในถังไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ - 150 °C นาน 15 นาที หลังจากนั้นจุ่มลงในไนโตรเจนเหลวที่ - 196 °C. ทิ้งไว้ 7 วัน สุ่มหลอดน้ำเชื้อจากถังไนโตรเจนเหลวมาทำการละลาย (thawing) โดยบ่มในน้ำอุ่นที่ 37 °C นาน 20 วินาที ที่ 0 และ 5 ชั่วโมงหลังการละลาย

2.4 การเก็บตัวอย่างและข้อมูล

2.4.1 การวัดการเคลื่อนที่ของอสุจิรายตัว

นำน้ำเชื้อหยดบนสไลด์ที่อุ่นอุณหภูมิ 37 °C แล้วปิดทับด้วยแผ่นกระจก (cover slide) ส่องดูการเคลื่อนที่ด้วยกล้อง phase contrast microscope กำลังขยาย 400 เท่า (Bearden and Fuguay, 1984) และให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิโดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของตัวอสุจิเคลื่อนที่ต่ออสุจิที่ไม่เคลื่อนที่พร้อมทั้งดูความแรงในการเคลื่อนไหวโดยแบ่งเป็นระดับคือ

0 % คือ ไม่เคลื่อนไหว

10 % คือ เคลื่อนไหว 10 ตัว ในจำนวน 100 ตัวที่นับ

40 % คือ เคลื่อนไหว 40 ตัว ในจำนวน 100 ตัวที่นับ

80 % คือ เคลื่อนไหว 80 ตัว ในจำนวน 100 ตัวที่นับ

100 % คือ เคลื่อนไหว 100 ตัว ในจำนวน 100 ตัวที่นับ

2.4.2 จำนวนอสุจิมีชีวิตและสภาพอะโครโซมของเซลล์อสุจิ

ใช้สีย้อม eosin-nigrosin ที่อุ่น 1 หยด แล้วหยดน้ำเชื้อ 1 หยด ผสมให้เข้ากันดีบนแผ่นกระจกอุ่นทิ้งไว้ 2-3 นาที แล้วนำมา smear บนแผ่นกระจกอีกแผ่น (สุจินต์และเทวินทร์, 2529) แล้วทำการนับด้วยกล้องphase contrast microscope กำลังขยาย 1,000 เท่า นับตัวที่มีชีวิตและที่ตาย โดยเซลล์อสุจิที่ตายจะมีสีชมพูหรือแดง ตัวที่มีชีวิตไม่มีสีและสีพื้นเป็นสีน้ำเงินแก่ของ nigrosin

2.5 แผนการดำเนินการทดลอง

แบ่งการทดลองออกเป็น 2 การทดลอง คือการทดลองที่ 1 ทำการทดลองเพื่อศึกษาคุณภาพน้ำเชื้อและการทดลองที่ 2 ทำการทดลองเพื่อศึกษาอัตราการผสมติดโดยการทำ sperm capacitation

การทดลองที่ 1 ทำการทดลองเพื่อตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อไก่ก่อนและหลังแช่แข็งโดยทำแผนการทดลองแบบสุ่มภายในบล็อก (Randomized Complete Blocks design) โดยใช้ระดับคุณภาพน้ำเชื้อเป็น block (3, 3.5, 4) ประกอบด้วย 4 ทรีทเมนต์ ดังแสดงในแผนการทดลอง

การทดลองที่ 2 เพื่อทดสอบอัตราการผสมติดโดยใช้น้ำเชื้อในแต่ละทรีทเมนต์จากการทดลองที่ 1 มาละลายในสารละลาย sperm capacitation medium บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำมาย้อมสี eosin-nigrosin ทำ smear นับจำนวนอสุจิมีชีวิตและดูสภาพของอะโครโซมที่เกิด acrosome reaction

แผนการทดลอง

block 1 คือ น้ำเชื้อ + + + (บวก 3)

block 2 คือ น้ำเชื้อ + + + (+) (บวก 3.5)

block 3 คือ น้ำเชื้อ + + + + (บวก 4)

กำหนดทรีทเมนต์ดังนี้

ทรีทเมนต์ 1 คือ กลุ่มควบคุม (น้ำเชื้อ + สารละลายน้ำเชื้อ)

ทรีทเมนต์ 2 คือ น้ำเชื้อ + คาเฟอีน 2 mM. ในสารละลายน้ำเชื้อ

ทรีทเมนต์ 3 คือ น้ำเชื้อ + กลูทาไธโอน 5 mM.ในสารละลายน้ำเชื้อ

ทรีทเมนต์ 4 คือ น้ำเชื้อ + เบต้า-กลูคูโรนิเดส 150 ยูนิต ในสารละลายน้ำเชื้อ

2.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลของการทดลองโดยใช้โปรแกรม SAS (1988) วิเคราะห์หาความแปรปรวนของการทดลองและใช้ Duncan 's New Multiple Range Test ดูแนวโน้มการตอบสนองแต่ละชนิดของสารที่เติมและความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของทรีทเมนต์

2.7 สถานที่ทำการทดลอง

1. ศูนย์วิจัยการผสมเทียมขอนแก่น ต.ท่าพระ อ.เมือง จ.ขอนแก่น

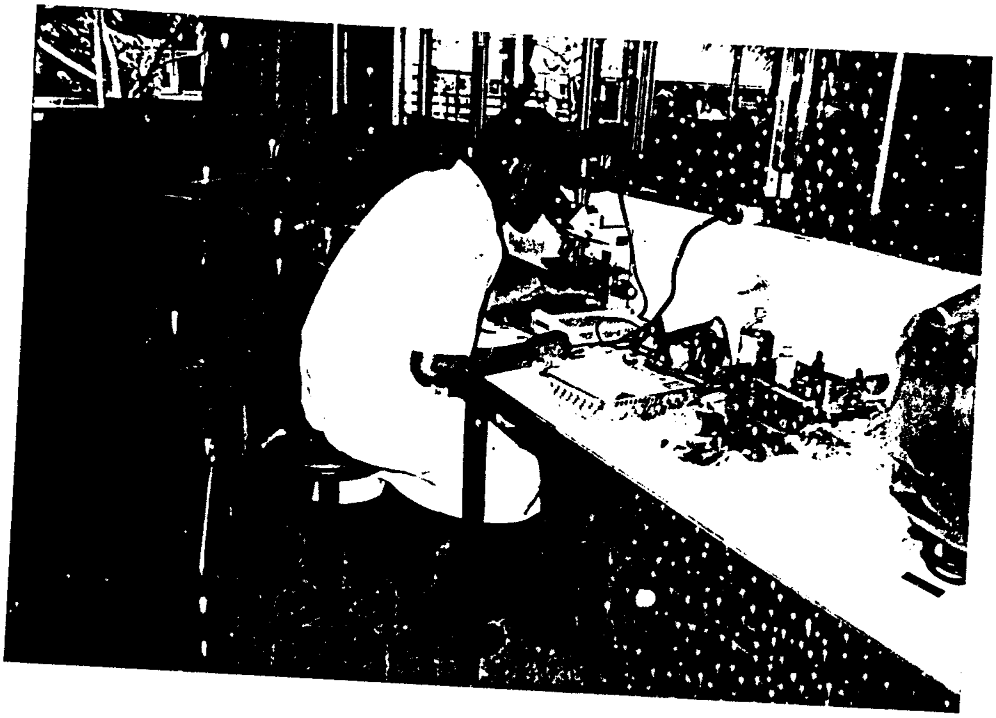
2. ห้องปฏิบัติการกายวิภาคและสรีรวิทยาสัตว์เลี้ยง ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

2.8 ระยะเวลาทำการทดลอง

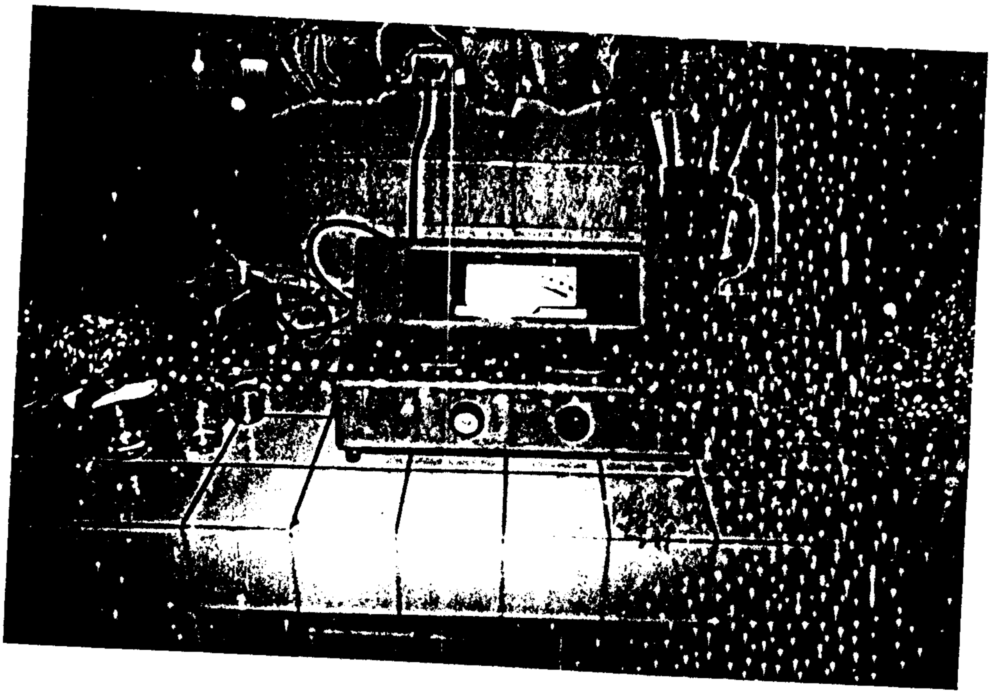
ทำการทดลองในช่วงเดือนพฤศจิกายน 2539- มกราคม 2541

วิเคราะห์ตัวอย่างช่วงเดือนมกราคม-มิถุนายน 2541

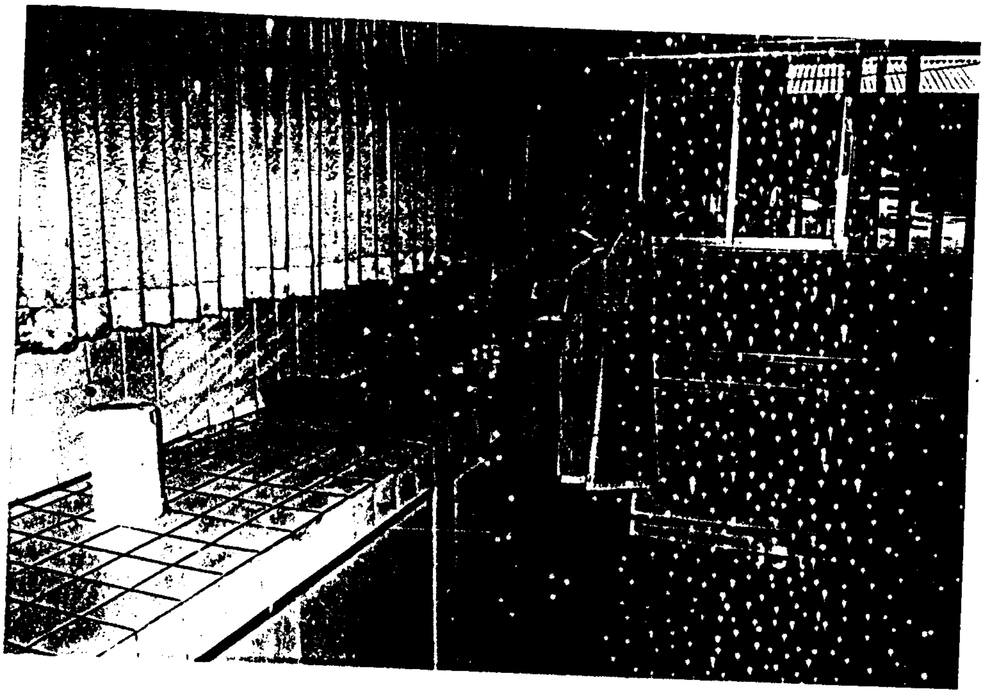
ภาพที่ 1 การรีดน้ำเชื้อพ่อพันธุ์โคโดยใช้อวัยวะเพศเมียเทียม (Artificial vagina)



ภาพที่ 2 การตรวจการเคลื่อนไหวของอสุจิโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ (phase contrast microscope)

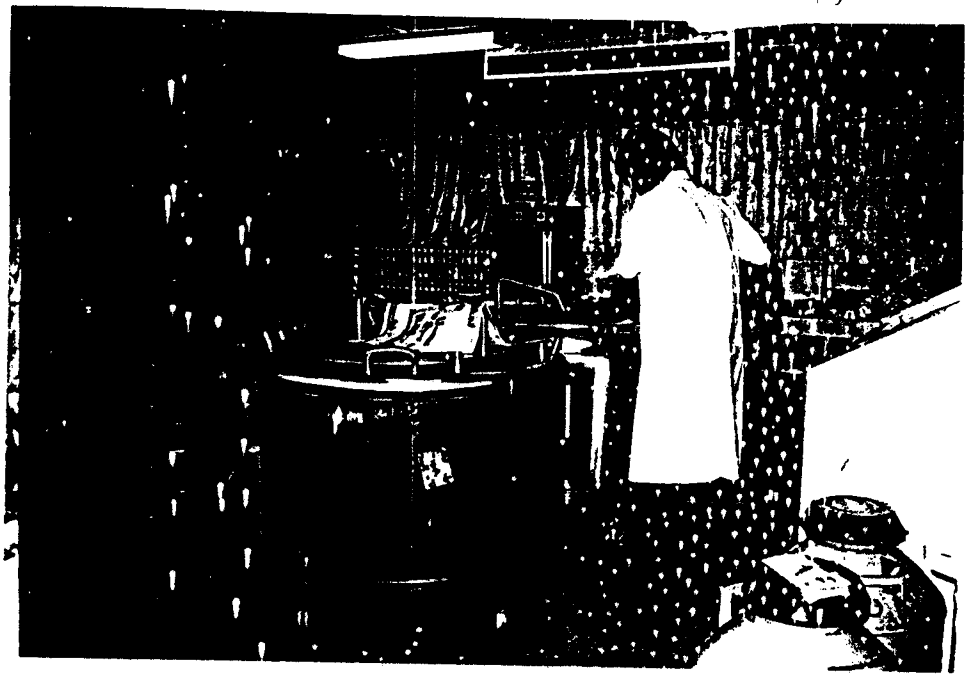


ภาพที่ 3 เครื่องคัลลอริมิเตอร์ใช้สำหรับวัดเปอร์เซ็นต์การผ่านของแสง (Transmittance)

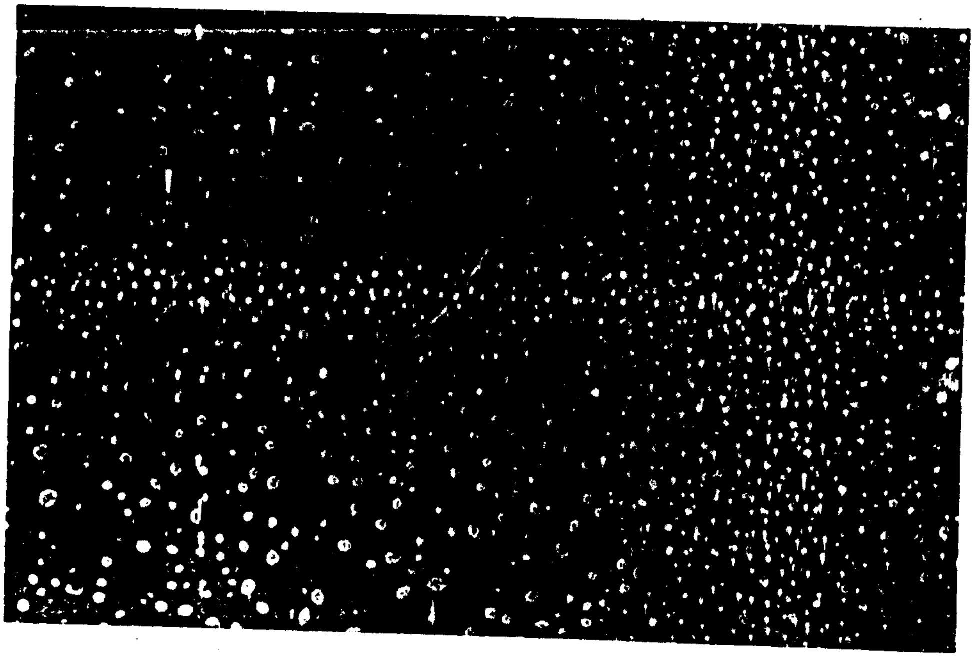


ภาพที่ 4 การเจือจางน้ำเชื้อโคโดยใช้สารละลาย Egg-yolk Tris

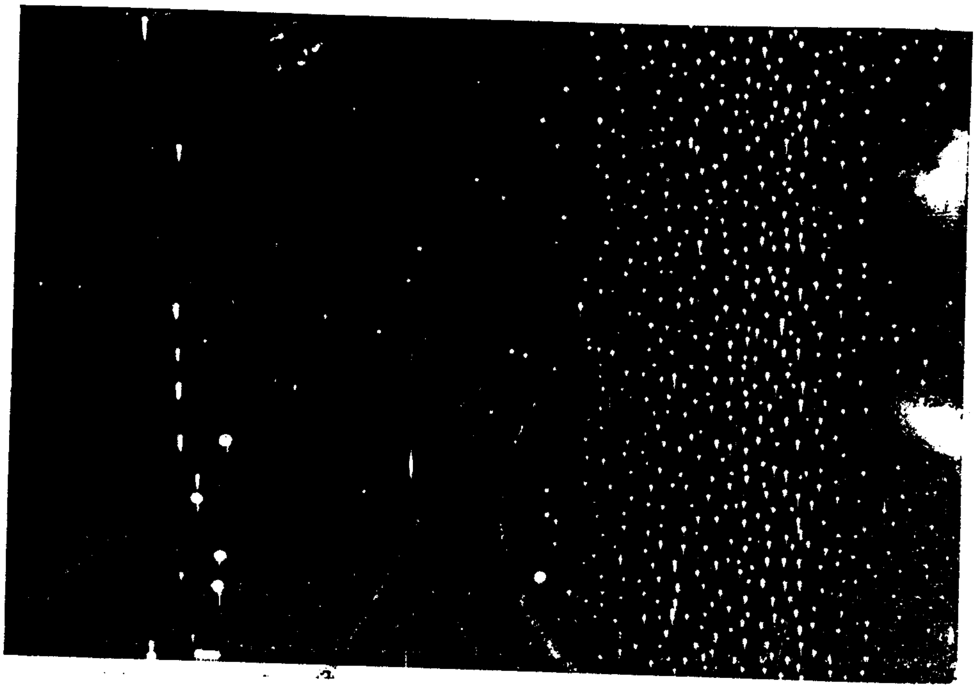
ภาพที่ 5 การบรรจุน้ำเชื้อใส่หลอด (Frence straw) ขนาด 0.25 ml.



ภาพที่6 การนำหลอดบรรจุน้ำเชื้อมาอังไอไนโตรเจนที่อุณหภูมิ -150 °C. นาน 15 นาที ก่อนนำไปเก็บในถังไนโตรเจนเหลว



ภาพที่7 อสุจิมีชีวิตภายหลังจากทำ capacitation แล้วย้อมสี eosin-nigrosin



ภาพที่ 8 อสุจิที่ตายภายหลังจากทำ capacitation แล้วย้อมสี eosin-nigrosin