บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 แผนการดำเนินการวิจัย

การศึกษาการปรับปรุงเทคนิคการเก็บรักษาน้ำเชื้อกระบือปลักแบบแช่แข็ง ใช้พ่อพันธุ์กระบือปลักจำนวน 4 ตัว (4 บล็อก) จำนวนซ้ำ 4 ซ้ำ แบ่งการทดลองออกเป็น 3 การทดลอง คือ

การทดลองที่ 1 ศึกษาผลของการแยกเซมินอลพลาสมาต่อคุณภาพน้ำเชื้อแบบแช่แข็งของกระบือปลัก (ดังภาพที่ 3-1) ใช้แผนการทดลองแบบบล็อกสมบูรณ์ (Randomized Complete Block Design : RCBD) โดยแบ่งทรีทเมนต์ออกเป็น 3 ทรีทเมนต์ ดังนี้

1) น้ำเชื้อที่ไม่ได้ปั่นแยกเซมินอลพลาสมา (กลุ่มควบคุม)
2) น้ำเชื้อปั่นที่ความเร็ว 3,700 รอบ 3 นาที ไม่แยกเซมินอลพลาสมา
3) น้ำเชื้อปั่นที่ความเร็ว 3,700 รอบ 3 นาที และแยกเซมินอลพลาสมา

การทดลองที่ 2 ศึกษาอิทธิพลของสารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็งต่อคุณภาพน้ำเชื้อแบบแช่แข็งของกระบือปลัก ใช้แผนการทดลองแบบบล็อกสมบูรณ์ (Randomized Complete Block Design : RCBD) ทดสอบชนิดของสารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็ง 4 ชนิด คือ Glycerol, Dimethylsulfoxide (DMSO), Dimethylacetamide (DMA) และ Dimethylformamide (DMF) ชนิดละ 3 ระดับ คือ ที่ความเข้มข้น 5, 7 และ 9% (ดังภาพที่ 3-2) โดยแบ่งทรีทเมนต์ของงานทดลองออกเป็น 12 ทรีทเมนต์ ดังนี้

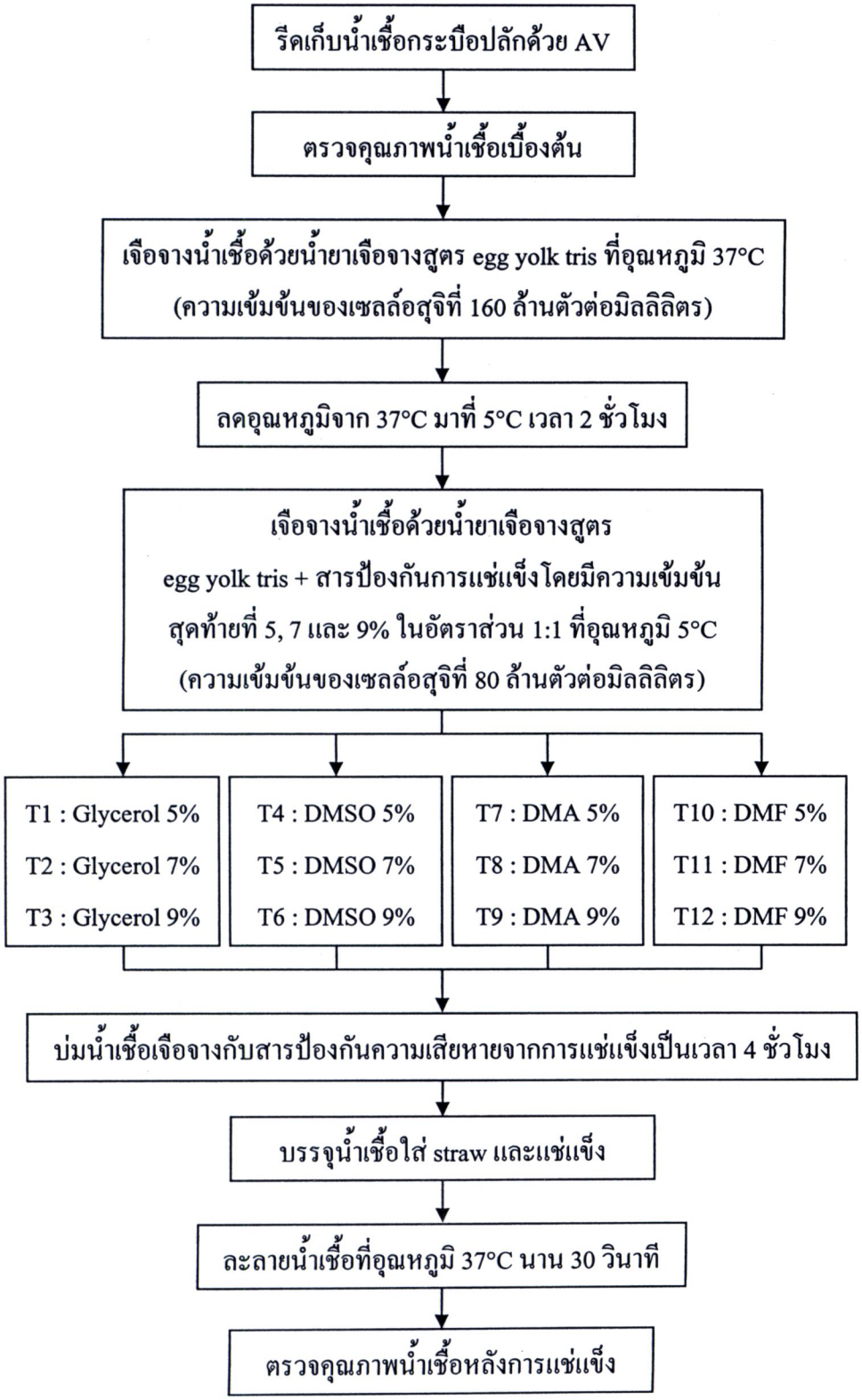
1) Glycerol ที่ความเข้มข้น 5%
2) Glycerol ที่ความเข้มข้น 7%
3) Glycerol ที่ความเข้มข้น 9%
4) DMSO ที่ความเข้มข้น 5%
5) DMSO ที่ความเข้มข้น 7%
6) DMSO ที่ความเข้มข้น 9%
7) DMA ที่ความเข้มข้น 5%
8) DMA ที่ความเข้มข้น 7%
9) DMA ที่ความเข้มข้น 9%
10) DMF ที่ความเข้มข้น 5%
11) DMF ที่ความเข้มข้น 7%
12) DMF ที่ความเข้มข้น 9%

การทดลองที่ 3 ศึกษาอิทธิพลของระดับอุณหภูมิก่อนการแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว (plunge temperature) และอุณหภูมิในการละลายน้ำเชื้อ (thawing temperature) ต่อคุณภาพน้ำเชื้อแบบแช่แข็งของกระบือปลัก (ดังภาพที่ 3-3) ใช้แผนการทดลองที่จัดทรีทเมนต์แบบแฟคตอเรียลในการ

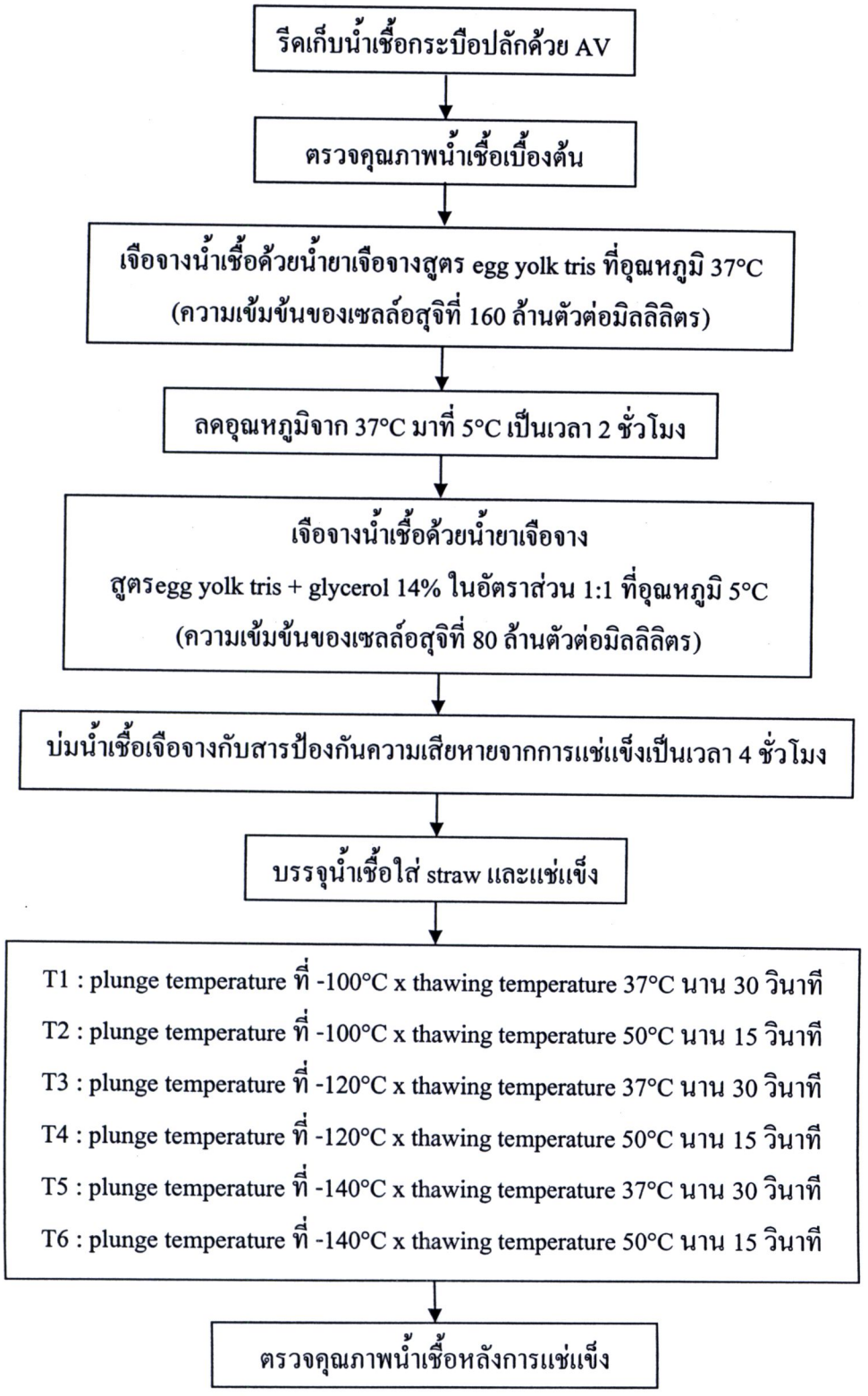
ทดลองแบบบล็อกสมบูรณ์ (Factorial experiments in RCBD) ปัจจัย A คือ อุณหภูมิก่อนการแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวมี 3 ระดับ คือ การลดอุณหภูมิจากอุณหภูมิ 5°C มาที่ -100, -120 และ -140°C ปัจจัย B คือ อุณหภูมิในการละลายน้ำเชื้อมี 2 ระดับ คือ การละลายน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 วินาที และที่อุณหภูมิ 50°C นาน 15 วินาที มี 6 ทรีทเมนต์ (combination) คือ

1) plunge temperature ที่ -100°C x thawing temperature ที่ 37°C นาน 30 วินาที
2) plunge temperature ที่ -100°C x thawing temperature ที่ 50°C นาน 15 วินาที
3) plunge temperature ที่ -120°C x thawing temperature ที่ 37°C นาน 30 วินาที
4) plunge temperature ที่ -120°C x thawing temperature ที่ 50°C นาน 15 วินาที
5) plunge temperature ที่ -140°C x thawing temperature ที่ 37°C นาน 30 วินาที
6) plunge temperature ที่ -140°C x thawing temperature ที่ 50°C นาน 15 วินาที

ภาพที่ 3-1 แผนภาพขั้นตอนการทำการทดลองที่ 1



ภาพที่ 3-2 แผนภาพขั้นตอนการทำการทดลองที่ 2



ภาพที่ 3-3 แผนภาพขั้นตอนการทำการทดลองที่ 3

3.2 การเก็บข้อมูล

3.2.1 บันทึกข้อมูลคุณภาพน้ำเชื้อเบื้องต้น ได้แก่ ปริมาตรน้ำเชื้อ (volume) อัตราการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิแบบหมู่ (mass movement) อัตราการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิแบบตรงไปข้างหน้า (progressive motility) ความเข้มข้นของเซลล์อสุจิ (sperm concentration) และร้อยละของเซลล์อสุจิมีชีวิต (percentage of live sperm) เพื่อใช้ในการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อก่อนนำมา ใช้ในการทดลอง

3.2.2 บันทึกข้อมูลคุณภาพน้ำเชื้อหลังการแช่แข็ง โดยประเมินลักษณะการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิด้วยเครื่อง CASA (computer assisted sperm analysis) ประกอบด้วยค่า total motility (MOT), progressive motility (PMOT), average path velocity (VAP), straight line velocity (VSL), curvilinear velocity (VCL), amplitude of lateral head displacement (ALH), beat cross frequency (BCF), linearity (LIN), straightness (STR) และ velocity distribution (rapid, medium, slow และ static) (Muino et al., 2008; Contri et al., 2010) โดย

MOT (%) = เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รวมของเซลล์อสุจิ

PMOT (%) = เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่แบบตรงไปข้างหน้าของเซลล์อสุจิ

VAP (μm/s) = ความเร็วเฉลี่ยในการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิตามเส้นโค้ง

VSL (μm/s) = ความเร็วเฉลี่ยในการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิจากจุดเริ่มต้นไปยังจุดสุดท้าย

VCL (μm/s) = ความเร็วเฉลี่ยในการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิตามจริง

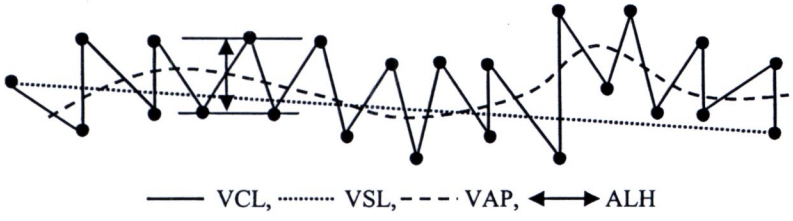
ALH (μm) = ค่าเฉลี่ยของระยะห่างในการเคลื่อนที่ของส่วนหัวของเซลล์อสุจิ

BCF (Hz) = ความถี่ของจังหวะการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิ

LIN (%) = ความตรงในการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิ คำนวณจาก(VSL/VCL) x 100

STR (%) = แนวตรงในการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิ คำนวณจาก (VSL/VAP) x 100

velocity distribution = ความเร็วในการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิ ซึ่งแบ่งออกเป็นค่า rapid (VAP > 80 μm/s), medium (80 μm/s > VAP > 25 μm/s), slow (VAP < 25 μm/s), และ static (VAP = 0) (Contri et al., 2010) และประเมินความสมบูรณ์ของอะโครโซม ด้วยการย้อมสี FITC-PNA



ภาพที่ 3-4 ลักษณะการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิ

ที่มา : ดัดแปลงจาก Mortimer (2000)

3.3 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การทดลองที่ 1 และการทดลองที่ 2 วิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (Analysis of Variances : ANOVA) ตามแผนการทดลองแบบบล็อกสมบูรณ์ (Randomized Complete Block Design : RCBD) และวิเคราะห์เปรียบเทียบค่าความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยในแต่ละปัจจัยการทดลองด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test โดยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป Statistical Analysis System (SAS, 1998) โดยมีแบบจำลองทางสถิติดังนี้

โมเดล $Yij = \mu + \rho i + \tau j + \varepsilon ij$

เมื่อกำหนดให้

Yij = ค่าสังเกตจากบล็อกที่ i , ทรีทเมนต์ที่ j

μ = ค่าเฉลี่ยรวมของค่าสังเกต

ρi = อิทธิพลเนื่องจากบล็อก ที่ระดับ i

τj = อิทธิพลเนื่องจากทรีทเมนต์ ที่ระดับ j

εij = ความคลาดเคลื่อนของงานทดลอง

การทดลองที่ 3 วิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (Analysis of Variances : ANOVA) ตามแผนการทดลองที่จัดทรีทเมนต์แบบแฟคตอเรียลในการทดลองแบบบล็อกสมบูรณ์ (Factorial experiments in RCBD) และวิเคราะห์เปรียบเทียบค่าความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยในแต่ละปัจจัยการทดลองด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test โดยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป Statistical Analysis System (SAS, 1998) โดยมีแบบจำลองทางสถิติดังนี้

โมเดล $Yijk = \mu + \rho i + \alpha j + \beta k + \alpha\beta jk + \varepsilon ijk$

เมื่อกำหนดให้

$Yijk$ = ค่าสังเกตจากทรีทเมนต์ (combination) ที่ jk ซ้ำที่ i

μ = ค่าเฉลี่ยรวมของค่าสังเกต

ρi = อิทธิพลเนื่องจากบล็อก ที่ระดับ i

αj = อิทธิพลเนื่องจากปัจจัย A คือ plunge temperature ที่ระดับ j

βk = อิทธิพลเนื่องจากปัจจัย B คือ thawing temperature ที่ระดับ k

$\alpha\beta jk$ = อิทธิพลร่วมเนื่องจากปัจจัย A และ B คือ plunge temperature และ thawing temperature

εijk = ความคลาดเคลื่อนของงานทดลอง

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 สัตว์ทดลองและโรงเรือน

พ่อพันธุ์กระบือปลัก อายุเฉลี่ย 13.5 ปี น้ำหนักเฉลี่ย 906.25±29.26 กิโลกรัม จำนวน 4 ตัว เลี้ยงภายใต้สภาพแวดล้อมของศูนย์ผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อพันธุ์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ต.ท่าพระ อ.เมือง จ.ขอนแก่น นำน้ำเชื้อที่มีอัตราการเคลื่อนที่แบบตรงไปข้างหน้า 70% ขึ้นไปมาใช้ในการทดลอง

3.4.2 การจัดการอาหาร

พ่อพันธุ์กระบือปลักแต่ละตัวได้รับอาหารหยาบวันละ 2 ครั้ง ในเวลา 10.00 และ 15.00 น. ให้หญ้าสดครั้งละ 25 กิโลกรัม และได้รับอาหารข้นวันละ 2 ครั้งๆละ 3 กิโลกรัม ในเวลา 08.00 และ 13.00 น. มีน้ำสะอาดให้สัตว์กินตลอดระยะเวลาที่ทำการทดลอง

3.4.3 การรีดเก็บน้ำเชื้อ

ใช้น้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์กระบือปลัก ซึ่งทำการรีดเก็บน้ำเชื้อโดยใช้ช่องคลอดเทียม (artificial vagina) ซึ่งก่อนรีดน้ำเชื้อจะต้องทำความสะอาดพ่อพันธุ์ก่อนทุกครั้งและใช้กระบือเพศเมียเป็นตัวล่อให้กระบือพ่อพันธุ์ขึ้นเพื่อหลั่งน้ำเชื้อ รีดช่วงเช้าเวลาประมาณ 08.00 น. โดยรีดสัปดาห์ละ 2 ครั้ง คือ วันอังคารและวันศุกร์

3.4.4 การแยกเซมินอลพลาสมาและการเจือจางน้ำเชื้อ

การทดลองที่ 1 นำน้ำเชื้อที่รีดได้แบ่งออกเป็น 3 ส่วนในปริมาตรเท่ากัน ส่วนที่ 1 นำมาเจือจางด้วยน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อสูตร egg yolk tris ส่วนที่ 2 และ 3 นำน้ำเชื้อไปปั่นที่ความเร็ว 3,700 รอบนาน 3 นาที เพื่อให้เซมินอลพลาสมากับเซลล์อสุจิแยกเป็นชั้น ใช้ไมโครปิเปตดูดเซมินอลพลาสมาออกเฉพาะในส่วนที่ 3 แล้วนำมาเจือจางน้ำเชื้อด้วยน้ำยาเจือจางสูตร egg yolk tris ซึ่งจะต้องปรับให้มีความเข้มข้นของเซลล์อสุจิประมาณ 160 ล้านตัวต่อมิลลิลิตร ส่วน**การทดลองที่ 2 และ 3** เจือจางน้ำเชื้อด้วยน้ำยาเจือจางสูตร egg yolk tris และปรับให้มีความเข้มข้นของเซลล์อสุจิประมาณ 160 ล้านตัวต่อมิลลิลิตร

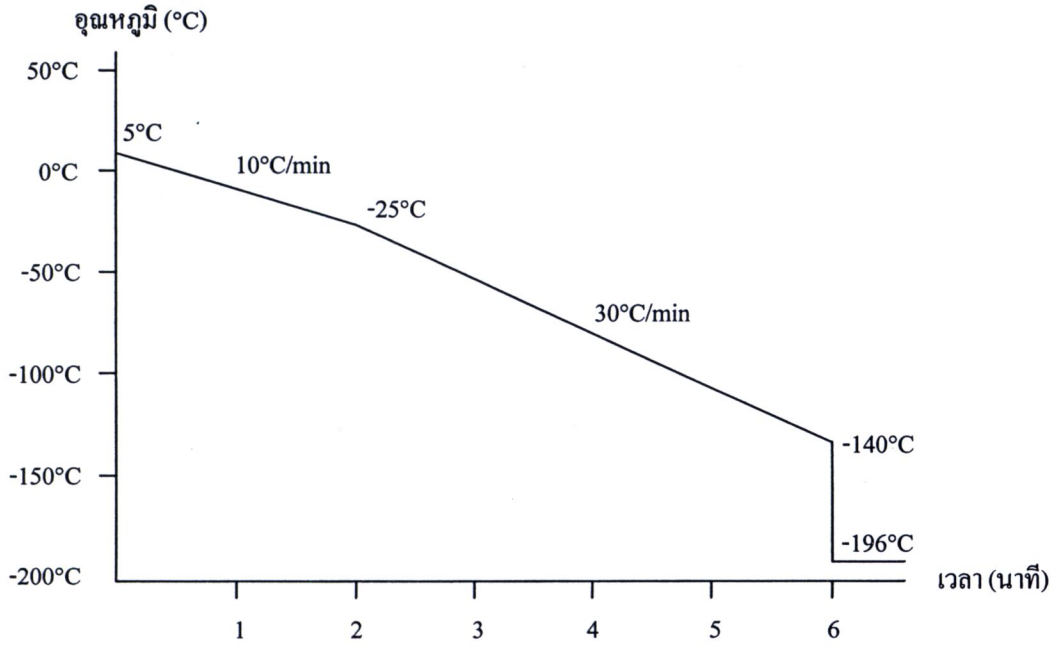
3.4.5 การควบคุมอุณหภูมิและลดอุณหภูมิน้ำเชื้อ

นำน้ำเชื้อที่เจือจางมาใส่ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ ซึ่งมีอุณหภูมิ 5°C ซึ่งอุณหภูมิของน้ำเชื้อจะค่อยๆ ลดจากอุณหภูมิ 37°C มาที่อุณหภูมิ 5°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเติมน้ำยาเจือจางในส่วนที่ 2 ซึ่งประกอบด้วยน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อสูตร egg yolk tris และ Glycerol ซึ่งในการแช่แข็งน้ำเชื้อแช่แข็งกระบือปลักจะใช้ Glycerol ที่ความเข้มข้น 7% เป็นสารป้องกันการความเสียหายจากการแช่แข็ง สำหรับการทดลองที่ 1 และ 3 ส่วนการทดลองที่ 2 จะต้องมีการเติมสารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็ง ประกอบด้วย Glycerol ความเข้มข้น 5, 7 และ 9%, DMSO ความเข้มข้น 5, 7 และ 9%, DMA ความเข้มข้น 5, 7 และ 9% และ DMF ความเข้มข้น 5, 7 และ 9% ตามทรีทเมนต์ และปรับให้มีความเข้มข้นของ

เซลล์อสุจิอยู่ที่ 80 ล้านตัวต่อมิลลิลิตร การเติมน้ำยาเจือจางในส่วนที่ 2 ต้องเติมแบบค่อยเป็นค่อยไป เพื่อให้เซลล์อสุจิค่อยๆปรับตัวภายในเวลา 1 ชั่วโมง และมีการบ่มน้ำเชื้อเจือจางกับสารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็งอีก 4 ชั่วโมง

3.4.6 การบรรจุน้ำเชื้อและการแช่แข็งน้ำเชื้อ

หลังจากทำการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อก่อนทำการแช่แข็งแล้วจึงบรรจุน้ำเชื้อใส่หลอดฟาง (straw) ขนาด 0.25 มิลลิลิตร และอุดด้วย polyvinyl alcohol จากนั้นนำมาเรียงบน lack และแช่แข็งโดยใช้เครื่องผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งแบบอัตโนมัติของบริษัท IMV รุ่น Digitcool 5300 ซึ่งกระบวนการลดอุณหภูมิในการทดลองที่ 1 และ 2 แบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน คือขั้นที่ 1 จะเริ่มที่อุณหภูมิ 5°C ไปที่อุณหภูมิ -25°C ด้วยอัตราเร็ว -10°C ต่อนาที และขั้นที่ 2 จากอุณหภูมิ -25°C ไปที่อุณหภูมิ -140°C ด้วยอัตราเร็ว -30°C ต่อนาที (ปาริฉัตร, 2544) ดังภาพที่ 3-5



ภาพที่ 3-5 กระบวนการลดอุณหภูมิน้ำเชื้อแช่แข็ง
ที่มา : ดัดแปลงจาก ปาริฉัตร (2544)

ส่วนการทดลองที่ 3 อัตราการลดอุณหภูมิจะเท่ากันในแต่ละขั้น แต่อุณหภูมิก่อนการแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวจะแตกต่างกัน ซึ่งมี 3 ระดับคือ -100, -120 และ -140°C จากนั้นนำน้ำเชื้อเก็บลงในถังซึ่งมีไนโตรเจนเหลวอุณหภูมิ -196°C

3.4.7 การละลายน้ำเชื้อ

ในการทดลองที่ 1 และ 2 การละลายน้ำเชื้อเพื่อตรวจคุณภาพหลังการแช่แข็งนั้นจะทำละลายน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 วินาที ส่วนในการทดลองที่ 3 ทำการเปรียบเทียบการละลายน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 15 วินาทีร่วมด้วย

3.4.8 การเก็บข้อมูลคุณภาพน้ำเชื้อ

3.4.8.1 คุณภาพน้ำเชื้อเบื้องต้น

1) ปริมาตรน้ำเชื้อ (volume) โดยวัดปริมาตรน้ำเชื้อที่รีดได้ ซึ่งน้ำเชื้อจะถูกเก็บไว้ในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร จากนั้นทำการอ่านค่าตามปริมาณที่รีดได้

2) ความเข้มข้นของน้ำเชื้อ (concentration) เก็บข้อมูลการตรวจความเข้มข้นของน้ำเชื้อโดยใช้เครื่อง spectrophotometer โดยดูดน้ำเชื้อปริมาณ 20 ไมโครลิตร ลงใน cuvette ที่มีโซเดียมซิเตรต 2.9% ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปใส่เครื่อง spectrophotometer ซึ่งจะแสดงออกมาเป็นค่าความเข้มข้นเปรียบเทียบกับปริมาณแสงที่ผ่านแล้วนำมาเปรียบเทียบกับตารางมาตรฐานที่บอกค่าความเข้มข้นกับปริมาณแสงที่ผ่าน

3) การเคลื่อนที่แบบหมู่ (mass motility) โดยหยดน้ำเชื้อลงบนสไลด์ที่วางบน warm plate ซึ่งมีอุณหภูมิ 37°C จากนั้นนำมาส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า โดยประเมินการเคลื่อนที่เป็นค่าคะแนน 0-5 (เทวินทร์, 2542) คือ

5 ดีมาก น้ำเชื้อความเข้มข้นสูง มีการเคลื่อนที่เป็นลูกคลื่นเร็ว สังเกตเป็นรายตัวไม่ได้ มีเซลล์อสุจิเคลื่อนที่ประมาณ 90% หรือสูงกว่า

4 ดี อสุจิเคลื่อนที่แรง แต่ความแรงของคลื่นไม่เท่าระดับ 5 มีเซลล์อสุจิเคลื่อนที่ประมาณ 70-85%

3 ปานกลาง การเคลื่อนที่เป็นคลื่นเล็กน้อยและช้า สามารถสังเกตการเคลื่อนที่รายตัวได้ มีเซลล์อสุจิเคลื่อนที่ได้ 45-65%

2 ต่ำ ไม่พบลักษณะการเคลื่อนที่ลักษณะคลื่น มีเซลล์อสุจิเคลื่อนที่ได้ประมาณ20-40%

1 ต่ำมาก ประมาณ 10% ของเซลล์อสุจิเท่านั้นที่เคลื่อนที่ได้

0 อสุจิตาย ไม่พบการเคลื่อนที่

4) การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (progressive motility) ทำการประเมินหลังจากการเจือจางด้วยน้ำยาเจือจางสังเกตดูการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิรายตัว โดยหยดน้ำเชื้อลงบนสไลด์ที่วางบน warm plate ซึ่งมีอุณหภูมิประมาณ 37°C ปิดด้วย coverslip จากนั้นนำมาส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า และสังเกตอัตราการเคลื่อนที่ตรงไปข้างหน้าของเซลล์อสุจิ ให้ค่าคะแนนการเคลื่อนที่เป็นร้อยละของอสุจิทั้งหมด (เทวินทร์, 2542)

5) ร้อยละของเซลล์อสุจิที่มีชีวิต (percentage of live sperm) ด้วยวิธีการย้อมสีอิโอซิน-นิโกรซิน (เทวินทร์, 2542) ซึ่งมีวิธีการดังนี้

1. ใช้น้ำเชื้อ 1 หยดผสมกับสีอิโอซิน-นิโกรซิน 2 หยด ลงใน microtube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ประมาณ 3 นาที

2. หยดส่วนผสมของสีและน้ำเชื้อลงบนสไลด์ที่วางบน warm plate ซึ่งมีอุณหภูมิ 37°C แล้วใช้สไลด์อีกแผ่นปาดให้หยดน้ำเชื้อกระจายออกเป็นแถบบางๆ (smear) และทำให้แห้งโดยเร็ว

3. นำสไลด์มาส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า เซลล์อสุจิที่ติดสีและไม่ติดสีอิโอซิน-นิโกรซิน โดยเซลล์อสุจิที่ไม่ติดสีคืออสุจิที่มีชีวิต ส่วนเซลล์อสุจิที่ตายหรือผนังเซลล์บกพร่องจะติดสีของสีอิโอซิน-นิโกรซิน ตรวจนับอสุจิรวมทั้งหมด 300 ตัวและนำมาคำนวณเป็นร้อยละของอสุจิมีชีวิตต่ออสุจิทั้งหมด

3.4.8.2 คุณภาพน้ำเชื้อหลังการแช่แข็ง

1) ลักษณะการเคลื่อนที่ของอสุจิ

1. นำน้ำเชื้อแช่แข็งมาละลายที่น้ำอุ่นอุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นตัดหลอดฟาง และนำน้ำเชื้อมาใส่ใน microtube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

2. ดูดน้ำเชื้อปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงบนแผ่นสไลด์ชนิด 2Xcell ซึ่งจะใช้สำหรับตรวจกับเครื่อง CASA และปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ และวางสไลด์ลงบนที่วางสไลด์ ซึ่งสไลด์จะเคลื่อนเข้าไปในเครื่อง CASA ซึ่งมีอุณหภูมิ 37°C

3. เครื่องจะตรวจคุณภาพน้ำเชื้ออัตโนมัติซึ่งประกอบด้วยค่า total motility (MOT), progressive motility (PMOT), average path velocity (VAP), straight line velocity (VSL), curvilinear velocity (VCL), amplitude of lateral head displacement (ALH), beat cross frequency (BCF), linearity (LIN), straightness (STR) และ velocity distribution (rapid, medium, slow และ static) (Muino et al., 2008; Contri et al. , 2010)

2) ความสมบูรณ์ของอะโครโซม (acrosome integrity) (Axner et al., 2004)

1. นำน้ำเชื้อแช่แข็งมาละลายที่น้ำอุ่นอุณหภูมิ 37°C นาน 30 วินาที จากนั้นตัดหลอดฟางและนำน้ำเชื้อมาใส่ใน microtube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

2. ดูดน้ำเชื้อปริมาตร 5 ไมโครลิตร หยดลงบนแผ่นสไลด์และเสมียร์ จากนั้นปล่อยให้แห้งในอากาศ

3. นำไปแช่ใน 95% ethanol นาน 3 นาที

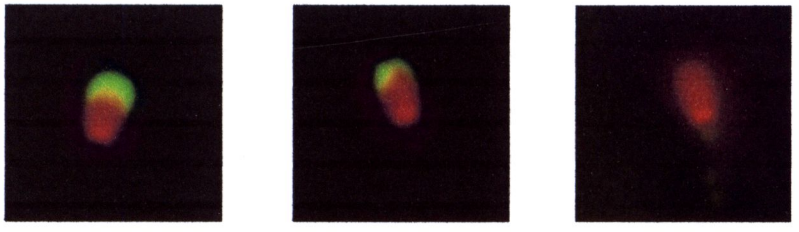
4. ดูด FITC-PNA 5 ไมโครลิตร และ propidium iodide solution 8 ไมโครลิตร ลงใน microtube ผสมให้เข้ากันและหยดลงบนแผ่นสไลด์บริเวณที่เสมียร์น้ำเชื้อและปิดด้วยกระจกปิดสไลด์

5. ใส่ลงในกล่องทึบชื้น และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4°C นาน 30 นาที

6. ล้างสไลด์ด้วยน้ำกลั่น โดยปล่อยให้น้ำไหลผ่านจนกระจกปิดสไลด์หลุด

7. หยด antifade solution ลงบนบริเวณที่ย้อมสี และปิดด้วยกระจกปิดสไลด์

8. นำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด fluorescent กำลังขยาย 1000 เท่า ซึ่งจะพบรูปแบบของอะโครโซม 3 รูปแบบคือ 1) intact acrosome เซลล์อสุจิติดสีแดง ส่วนของ อะโครโซมจะติดสีเขียวและบริเวณขอบของอะโครโซมเรียบสม่ำเสมอกันเนื่องจากไม่มีความเสียหายเกิดขึ้น 2) damaged acrosome เซลล์อสุจิติดสีแดง โดยส่วนของอะโครโซมจะติดสีเขียวและบริเวณขอบของอะโครโซมไม่เรียบเนื่องจากมีความเสียหายเกิดขึ้น และ 3) missing acrosome เซลล์อสุจิติดสีแดงและส่วนของอะโครโซมหลุดออกจากเซลล์อสุจิ (Cheng et al., 1996) และนับจำนวนเซลล์อสุจิทั้งหมด 200 ตัวและนำมาหาค่าเฉลี่ยเปรียบเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์



A B C

ภาพที่ 3-6 รูปแบบอะโครโซมของเซลล์อสุจิกระบือปลัก A (intact acrosome); B (damaged acrosome) และ C (missing acrosome)

3.5 สถานที่ทำการวิจัย

3.5.1 ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

3.5.2 ห้องปฏิบัติการภาควิชาศัลยศาสตร์และวิทยาการสืบพันธุ์ และห้องปฏิบัติการภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

3.5.3 ศูนย์ผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อพันธุ์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จ.ขอนแก่น

3.5.4 ศูนย์ผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อพันธุ์ผสมเทียมลำพญากลาง จ.ลพบุรี

3.6 ระยะดำเนินการวิจัย

ทำการทดลองในระหว่าง 1 กันยายน พ.ศ. 2551 ถึง 31 มีนาคม พ.ศ. 2553