บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

การศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะบอร์แบบแช่แข็ง มีการดำเนินการทดลองทั้งในภาคสนามและห้องปฏิบัติการ สำหรับการดำเนินการในภาคสนามที่ฟาร์มแพะแกะ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ฟาร์มเกษตรกรหมวดเที่ยงฟาร์ม อำเภอโนนไทย สหกรณ์การเกษตรด่านขุนทดจำกัด อำเภอด่านขุนทด และฟาร์มเกษตรกร บ้านหนองกราด อำเภอด่านขุนทด จังหวัดนครราชสีมา และในส่วนของห้องปฏิบัติการใช้ห้องปฏิบัติการกลางโรงเพาะฟัก AF2-2001 ฟาร์มมหาวิทยาลัย ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 10 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพการย้ายฝากตัวอ่อนและเซลล์สืบพันธุ์สัตว์ อำเภอปากช่อง จังหวัด นครราชสีมา และสถาบันวิจัยแสงซินโครตรอน (องค์การมหาชน) โดยงานวิจัยนี้แบ่งออกเป็น 2 การทดลอง ดังนี้

การทดลองที่ 1 การศึกษาผลของ Combination สาร Cryoprotectant จากแหล่งเลซิตินที่มาจากพืชและสัตว์ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แบบแช่แข็ง โดยทำการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อจากอัตราการเคลื่อนที่รวม อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า อัตราการมีชีวิต และการเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุลในเซลล์อสุจิแพะ โดยใช้เทคนิค SR-FTIR

การทดลองที่ 2 ทำการเลือกทรีตเมนต์ที่ให้ผลดีที่สุดในการทดลอง 1 มาศึกษาผลของชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร Antioxidant ต่อคุณภาพของน้ำเชื้อแพะบอร์แบบแช่แข็ง การเกิดกระบวนการ DNA methylation และอัตราการผสมติด

โดยมีการเตรียมสัตว์ทดลอง พร้อมทั้งวิธีการศึกษา ดังนี้

3.1 การเตรียมสัตว์ทดลอง

แพะพ่อพันธุ์บอร์ จำนวน 2 ตัว อายุประมาณ 2-3 ปี มีระดับคะแนนร่างกายที่ 3.0 น้ำหนักอยู่ในช่วง 60-70 กิโลกรัม เลี้ยงในฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยการเลี้ยงแบบแยกคอกเป็นรายตัว ให้อยู่ในสภาพแวดล้อม กินอาหารแบบเดียวกัน คือ อาหารข้นผสมสำเร็จรูปที่มีปริมาณโปรตีน 18% อาหารหยาบ (ข้าวโพดหมัก) โดยให้อาหาร 2.5% ของน้ำหนักตัว และให้กินน้ำแบบเต็มที่ ทำการถ่ายพยาธิ ฉีดยาบำรุงให้กับพ่อพันธุ์แพะทุกตัว โดยงานวิจัยนี้มีการขออนุญาตใช้สัตว์ดังหมายเลขคำขอคือ U1-02632-2559

3.2 วิธีการศึกษา

3.2.1 การรีดน้ำเชื้อ

ขั้นตอนการรีดน้ำเชื้อประกอบไปด้วยขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

1) คัดเลือกพ่อพันธุ์ที่มีความสมบูรณ์พันธุ์ จากนั้นเช็ดทำความสะอาดอวัยวะเพศด้วยน้ำสะอาดและแอลกอฮอล์ วัดอุณหภูมิร่างกายไม่เกิน 40°C และเตรียมอุปกรณ์สำหรับรีดน้ำเชื้อ

2) นำแพะตัวเมียที่เป็นสัดมาล็อคไว้ในซองบังคับเพื่อเป็นตัวล่อ ปล่อยให้พ่อพันธุ์ขึ้นทับตัวเมีย และสวมโยนีเทียม (Artificial vagina) ไว้ที่อวัยวะเพศของพ่อพันธุ์ จากนั้นพ่อพันธุ์จะปล่อยน้ำเชื้ออย่างรวดเร็ว เมื่อได้น้ำเชื้อแล้วถอด tube ออกจากช่องคลอดเทียม ปิดจุก และห่อด้วยฟอยล์เพื่อป้องกันแสง และนำส่งห้องปฏิบัติการ

3) นำน้ำเชื้อที่รีดได้มาบ่มที่อุณหภูมิ 37°C และทำการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อเบื้องต้น โดยประเมินจากเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ ซึ่งจะต้องมีอัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ 70% ขึ้นไป โดยใช้ Computer Assisted Semen Analysis (CASA) (HTT-CEROS, Hamilton Thorne Biosciences, Beverly, MA, USA)

4) วัดความเข้มข้นของน้ำเชื้อ (sperm/mL) ด้วยเครื่อง Photometer SDM 1 (Minitube International AG, Germany) ซึ่งค่าความเข้มข้นของน้ำเชื้อแพะที่นำศึกษามาจะต้องอยู่ในช่วง 1,100-6,500 ล้านตัว/mL นำน้ำเชื้อที่รีดได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 2,500 g เป็นเวลา 3 นาที และนำส่วนเซมินอลพลาสมา มาวัดค่าออสโมลาลิตี้โดยใช้เครื่องออสโมมิเตอร์ โดยขณะตรวจวัดจะรักษาอุณหภูมิน้ำเชื้อโดยการแช่ในอ่างน้ำอุ่น 37°C จากนั้นนำน้ำเชื้อไปเก็บรักษาแบบแช่แข็ง โดยมีขั้นตอน ดังแสดงในการทดลองที่ 1

3.2.2 การทดลองที่ 1 การศึกษาผลของ Combination ของสาร Cryoprotectant จากแหล่งเลซิตินที่มาจากพืชและสัตว์ ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แบบแช่แข็ง

การศึกษาผลของ Combination ของสาร Cryoprotectant ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แช่แข็ง เปรียบเทียบการใช้แหล่งเลซิตินที่มาจากพืช (Soybean lecithin) และแหล่งเลซิตินจากสัตว์ (Egg yolk) โดยใช้สูตรทางการค้า (Andromed) เป็นตัวควบคุม มีการวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely randomized design; CRD) จำนวน 6 ซ้ำ/ทรีตเมนต์ โดยมีขั้นตอนการศึกษาดังนี้

1) เตรียมส่วนประกอบของสาร Tris-base extender (Tris 250 mM, Citric acid 88.5 mM, Fructose 69.38 mM และ Lincospecs 300 µL) ที่มีค่า pH และ Osmolality เท่ากับ 6.08$\pm$0.01 และ 321$\pm$1.83 mOsm/kg ตามลำดับ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับค่า pH และ Osmolality ของน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์ (6.18$\pm$0.11 และ 321$\pm$4.42 mOsm/kg) จากนั้นเติมสาร Cryoprotectant ที่ใช้ในแต่ละทรีตเมนต์ ดังนี้ T1: Glycerol 5% + Soybean lecithin 1%, T2:

Glycerol 5% + Soybean lecithin 3%, T3: Glycerol 5% + Egg yolk 10%, T4: Glycerol 5% + Egg yolk 18% และ T5: สูตรทางการค้า (Andromed) เป็นตัวควบคุม รายละเอียดของทรีตเมนต์ดังแสดงในตารางที่ 3.1

2) นำน้ำเชื้อสด และสาร Cryodiluent (สาร Extender + สาร Cryoprotectant) มาบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ทำการตรวจวัดอัตราการเคลื่อนที่ โดยเจือจางน้ำเชื้อสดในสาร Extender (ใช้น้ำเชื้อสด 7 µL และสาร Extender 500 µL) ประเมินอัตราการเคลื่อนที่ด้วยเครื่อง CASA หากอัตราการเคลื่อนที่ต่ำกว่า 70% ทำการคัดทิ้ง

3) ตรวจวัดความเข้มข้น จำนวนอสุจิ/mL ด้วยเครื่อง Photometer (SDM 1, Minitab International AG, Germany) โดยหยดน้ำเชื้อปริมาตร 22 µL ลงบนแผ่น Microcuvette SDM 1 และบันทึกความเข้มข้น โดยน้ำเชื้อที่นำมาใช้ต้องมีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 1,100–6,500 ล้านตัว/mL

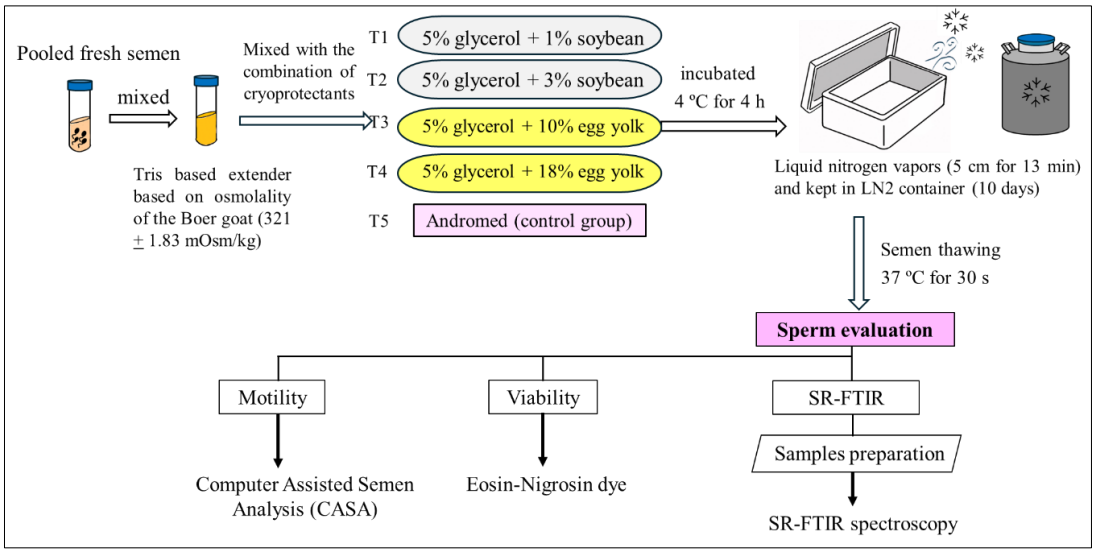
4) นำน้ำเชื้อมารวมกัน จากนั้นแบ่งน้ำเชื้อไปล้างเซมินอลพลาสมาด้วย Lactated ringers โดยใช้น้ำเชื้อ 1 mL ต่อ Lactated ringers 9 mL จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,500 g นาน 3 นาที ที่อุณหภูมิ 25°C และนำมาตรวจวัดความเข้มข้นหลังล้างเซมินอลพลาสมาอีกครั้งเพื่อนำไปใช้ศึกษาในทรีตเมนต์ที่มี Egg yolk เป็นสาร Cryoprotectant จากนั้นเติมสาร Cryodiluent และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

5) บรรจุน้ำเชื้อใส่หลอดฟางขนาด 0.25 mL โดยบรรจุหลอดละ 150 ล้านตัว/โดส ซึ่งจะบรรจุน้ำเชื้อปริมาตร 0.23 mL ต่อหลอด ปิดหลอดด้วยผงอุด (Sealing powder) และจุ่มบริเวณที่อุดในน้ำเป็นเวลา 30 วินาที แล้วจึงเช็ดให้แห้ง นำหลอดไปเรียงบนตะแกรงในกล่องโฟมที่บรรจุไนโตรเจนเหลว และทำการลดอุณหภูมิโดยใช้วิธีการอังไอไนโตรเจนเหลว วางตัวอย่างให้ห่างจากผิวไอไนโตรเจน 5 เซนติเมตร (อุณหภูมิ -120°C) เป็นเวลา 13 นาที จากนั้นนำหลอดน้ำเชื้อไปเก็บในถังไนโตรเจนเหลว ที่อุณหภูมิ -196°C เป็นเวลา 10 วัน

6) นำหลอดน้ำเชื้อมาละลายในน้ำอุ่น 37°C นาน 30 วินาที ก่อนนำไปประเมินอัตราการเคลื่อนที่รวม อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า อัตราการมีชีวิต และการเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุลในเซลล์อสุจิแพะพันธุ์บอร์ ดังแสดงในภาพที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 แผนการทดลองการศึกษาผลของ Combination ของสาร Cryoprotectant จากแหล่งเลซิตินที่มาจากพืชและสัตว์ ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แบบแช่แข็ง โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely random design (CRD) ซึ่งประกอบด้วย จำนวน 5 ทรีตเมนต์ โดยใช้ Andromed ที่เป็นสูตรทางการค้าเป็นตัวควบคุม

Treatment	Cryoprotectant	Total motility (%)	Progressive motility (%)	Viability (%)	SR-FTIR
T1	Glycerol 5% + Soybean lecithin 1%				
T2	Glycerol 5% + Soybean lecithin 3%				
T3	Glycerol 5% + Egg yolk 10%				
T4	Glycerol 5% + Egg yolk 18%				
T5	Andromed (control)				



ภาพที่ 3.1 แผนภาพการทดลองที่ 1 การศึกษาผลของ Combination ของสาร Cryoprotectant จากแหล่งเลซิตินที่มาจากพืชและสัตว์ ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แบบแช่แข็ง

3.2.2.1 การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็ง

จากรายงานที่ผ่านมาของ Mazur (1984) และ Gao and Critser (2000) พบว่า ระยะเวลาการเก็บส่วนใหญ่ไม่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง ณ อุณหภูมิ -196ºC แต่คุณภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งขึ้นอยู่กับปัจจัยหลักที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการแช่แข็ง เช่น สาร Extender สาร Cryoprotectant และอัตราการลดอุณหภูมิ เป็นต้น อย่างไรก็ตาม เซลล์อาจมีผลกระทบมาจาก

รังสีชนิดก่อไอออนในไนโตรเจนเหลวได้ แต่เกิดได้น้อยมาก (Woods *et al*., 2016) ดังนั้นในการศึกษานี้ ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะเป็นระยะเวลา 10 วัน ที่อุณหภูมิ -196ºC จากนั้นนำน้ำเชื้อแช่แข็งมาละลายที่อุณหภูมิ 37ºC เป็นเวลา 30 วินาที ก่อนการประเมินพารามิเตอร์ต่างๆ ดังต่อไปนี้

1) การประเมินอัตราการเคลื่อนที่รวม (Total motility) และอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (Progressive motility)

ประเมินอัตราการเคลื่อนที่รวม และอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า โดยใช้เครื่อง CASA (HTT-CEROS, Hamilton Thorne Biosciences, Beverly, MA, USA) โดยการนำน้ำเชื้อสดมาเจือจางด้วยสาร Extender (อัตราส่วนน้ำเชื้อสด 7 µL ต่อสาร Extender 500 µL) และในส่วนของน้ำเชื้อแช่แข็ง นำน้ำเชื้อแช่แข็งมาละลายที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 วินาที แล้วนำมาเจือจางด้วยสาร Extender (อัตราส่วนน้ำเชื้อแช่แข็ง 1 µL ต่อสาร Extender 18 µL) โหลดตัวอย่างน้ำเชื้อ 3 µL ลงบน slide 2X-cell แล้วปิดด้วยแผ่น Cover glass จากนั้นประเมินอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิด้วยเครื่อง CASA โดยมีการกำหนดค่า Sperm analysis setup สำหรับประเมินอัตราการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อแพะ ดังแสดงในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 ค่า Sperm setup ของน้ำเชื้อแพะ

Temperature (˚C)	37.0
Apply sort	0
Frames Acquired	30
Frames rate (Hz)	60
Minimum contrast	25
Minimum Cell Size (pixels)	4
Minimum Static Contrast	15
Straightness (STR) Threshold (%)	80
VAP Cutoff (µm/sec)	5
Prog. Min VAP (µm/sec)	20
VSL Cutoff (µm/sec)	20
Cell Size (pixels)	4
Cell Intensity	50
Static Head Size	0.72-8.82
Static Head Intensity	0.14-1.84
Static Elongation	0-47
Slow Cell Motile	Yes
Magnification	1.92
Video Frequency	60
Bright Field	No
Chamber depth (µm)	20
Field Selection Mode	Auto

2) การประเมินอัตราการมีชีวิต (Viability)

การศึกษาอัตราการมีชีวิตใช้เทคนิคการย้อมสีด้วย Eosin และ Nigrosin โดยมีวิธีการเตรียมสีย้อมและขั้นตอนการศึกษาอัตราการมีชีวิต ดังนี้

2.1) วิธีการเตรียมสีย้อม มีขั้นตอนดังนี้

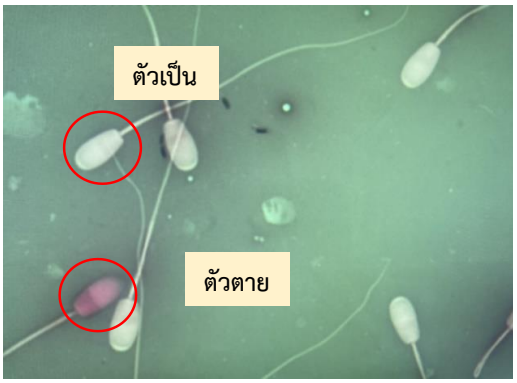
ชั่งสาร Eosin B 1 g, Nigrosin 5 g, และ Sodium citrate dehydrate 1.5 g ใส่ในบีกเกอร์ (Beaker) และเติมน้ำกลั่น 100 mL โดยให้ความร้อนขณะเตรียมสาร เมื่อละลายเข้ากันดีแล้วนำไปกรอง จนไม่มีตะกอนเหลืออยู่ แล้วนำสีย้อมที่เก็บได้ไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

2.2) วิธีการศึกษาอัตราการมีชีวิต มีขั้นตอนดังนี้

2.2.1) หยดสี Eosin – Nigrosin ลงบนแผ่นสไลด์ 1 หยด (ประมาณ 5 µL) แล้วหยดน้ำเชื้อสด 2 µL หรือน้ำเชื้อแช่แข็ง 10 µL ของแต่ละทรีตเมนต์ ผสมน้ำเชื้อและสีย้อมให้เข้ากัน

2.2.2) ใช้แผ่นสไลด์อีกแผ่นหนึ่งเกลี่ยน้ำเชื้อให้กระจายบางๆ โดยเกลี่ยเพียงครั้งเดียว รอจนสไลด์แห้ง จากนั้นหยดน้ำยาทาเล็บลงบนแผ่นสไลด์ 1-2 หยด แล้วปิดด้วยแผ่น Cover glass แล้วนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า

2.2.3) นับจำนวนเซลล์ตัวเป็นและตัวตาย โดยการสุ่มนับ 5 บริเวณๆ ละ 20 เซลล์ โดยที่เซลล์ตัวเป็นจะมีลักษณะสีขาว (ไม่ติดสีย้อม) ส่วนตัวตายจะติดสีย้อมเป็นสีชมพูแดงหรือสีม่วง ดังแสดงในภาพที่ 3.2



ภาพที่ 3.2 อสุจิมีชีวิตมีลักษณะสีขาว และอสุจิตายจะติดสีชมพูแดงหรือม่วงเข้ม เมื่อย้อมด้วยสี Eosin-Nigrosin (ภายใต้กล้อง Compound microscope กำลังขยาย 400 เท่า)

3) การประเมินน้ำเชื้อด้วยเทคนิค SR-FTIR

นำเทคนิค SR-FTIR มาช่วยประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ เพื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุล (โปรตีน ไขมัน และกรดนิวคลิอิก) เนื่องจากเป็นเทคนิคที่สามารถวิเคราะห์ได้รวดเร็ว ใช้ปริมาณตัวอย่างน้ำเชื้อน้อย และลดการวิเคราะห์ในการใช้สารเคมี อีกทั้งยัง

สามารถดูการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในระดับชีวโมเลกุลได้ โดยมีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง ดังแสดงในภาพที่ 3.3 และมีขั้นตอนการประเมินตัวอย่างเซลล์อสุจิด้วยเทคนิค SR-FTIR ดังนี้

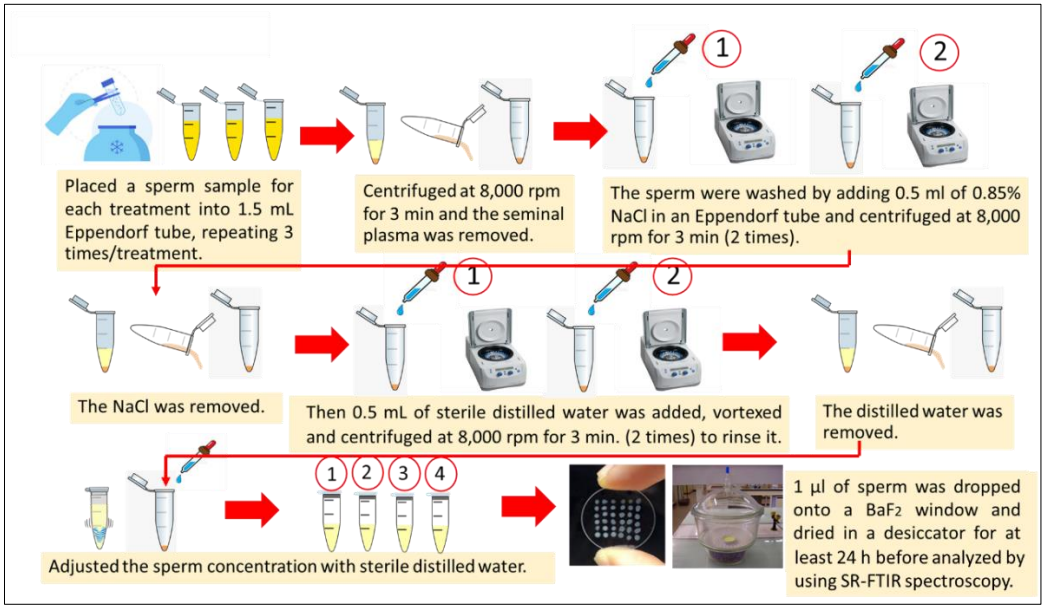
3.1) ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างน้ำเชื้อเพื่อศึกษาด้วยเทคนิค SR-FTIR มีรายละเอียดดังนี้

3.1.1) นำตัวอย่างน้ำเชื้อแช่แข็งที่เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว -196°C มาบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นนำตัวอย่างแต่ละทรีตเมนต์ใส่ในหลอด Eppendorf ขนาด 1.5 mL นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 rpm นาน 3 นาที เพื่อตกตะกอนแยกตัวอสุจิออกจากเซมินอลพลาสมา และสาร Cryodiluent โดยทำ 3 ซ้ำต่อทรีตเมนต์

3.1.2) กำจัดเซมินอลพลาสมาส่วนบนทิ้ง ให้เหลือเฉพาะเซลล์อสุจิที่ตกตะกอน จากนั้นนำไปล้างด้วย 0.85% NaCl ปริมาตร 0.5 mL ลงในหลอด Eppendorf นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 rpm นาน 3 นาที โดยจะล้างเซลล์อสุจิด้วย 0.85% NaCl จำนวน 2 ครั้ง

3.1.3) เท 0.85% NaCl ทิ้งให้เหลือเฉพาะเซลล์อสุจิ ล้างเซลล์อสุจิด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ โดยเติมน้ำกลั่นปริมาตร 0.5 mL และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 rpm นาน 3 นาที จำนวน 2 ครั้ง

3.1.4) เทน้ำกลั่นทิ้งให้เหลือเฉพาะเซลล์อสุจิ และปรับความเข้มข้นของเซลล์อสุจิโดยการเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อประมาณ 50 µL จากนั้นหยดตัวอย่างเซลล์อสุจิปริมาตร 1 µL ลงบน BaF2 window ที่มีขนาดความหนา 0.5 mm และนำตัวอย่างไปทำให้แห้งในโถดูดความชื้น (Desiccator) อย่างน้อย 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปวิเคราะห์



ภาพที่ 3.3 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างน้ำเชื้อเพื่อศึกษาด้วยเทคนิค SR-FTIR

3.2) ขั้นตอนการประเมินตัวอย่างเซลล์อสุจิด้วยเทคนิค SR-FTIR มีรายละเอียดดังนี้

3.2.1) ประเมินตัวอย่างเซลล์อสุจิด้วยเทคนิค SR-FTIR โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อินฟราเรด Bruker Hyperion 2000-IR Microscope (Bruker Optik GmbH, Ettlingen, Germany) ทำการวัดในโหมดการส่องผ่าน (Transmission) โดยใช้โปรแกรม OPUS 7.5 software (Bruker Optics Ltd.) ในการบันทึกข้อมูล ทำการเก็บข้อมูลสเปกตรัมการดูดกลืนแสงอินฟราเรดที่ช่วง 4000-900 cm^{-1} และตั้งค่า Resolution เท่ากับ 6 cm^{-1} ค่า Scan time เท่ากับ 64 scan โดยวัดตัวอย่าง 200 สเปกตรัมต่อทรีตเมนต์

3.2.2) นำสเปกตรัมที่ได้ของแต่ละทรีตเมนต์ มาเฉลี่ยให้ได้ทรีตเมนต์ละ 100 สเปกตรัม จากนั้นนำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม The Unscrambler X Multivariate data analysis software (version 10.4, Camo Analytics, Oslo, Norway) ในการวิเคราะห์อนุพันธ์อันดับสอง (2^{nd} derivative) โดยใช้ Savitzky–Golay algorithm และ Vector normalize ที่ครอบคลุมพื้นที่ช่วงเลขคลื่น 3000-2800 cm^{-1} และ 1800-900 cm^{-1} จากนั้นวิเคราะห์เพื่อดูความแตกต่างของอสุจิในแต่ละทรีตเมนต์ด้วยการทำ Principal component analysis (PCA)

3.2.3) นำสเปกตรัมของแต่ละทรีตเมนต์มาเฉลี่ยให้ได้ทรีตเมนต์ละ 6 สเปกตรัม ในการหาพื้นที่ใต้กราฟ (Integral area) เพื่อเปรียบเทียบสารชีวโมเลกุลของเซลล์อสุจิที่พบในแต่ละทรีตเมนต์ ได้แก่ 3000–2800 cm^{-1} (CH_2/CH_3 ในกรดไขมัน), 1750-1700 cm^{-1} (C=O Ester from lipid, Phospholipid), 1700–1600 cm^{-1} (Amide I), 1600–1500 cm^{-1} (Amide II) และ 1250–900 cm^{-1} (Nucleic acid, Carbohydrate, Fingerprint region; DNA และ RNA) (Pachetti *et al*., 2020; Pongsetkul *et al*., 2023) นอกจากนี้ วิเคราะห์โครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีนจากสัดส่วนการปรับเส้นโค้ง (Curve fitting) ของสารชีวโมเลกุล Amide I ในช่วงสเปกตรัม 1700-1600 cm^{-1} เพื่อหาเปอร์เซ็นต์ของ α-helix, β-sheet, β-turn, และ Antiparallel โดยใช้ Gaussian และ Lorentzian functions ในโปรแกรม OPUS 7.5 software (Bruker Optics Ltd., Ettlingen, Germany)

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ นำข้อมูลอัตราการเคลื่อนที่รวม อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า อัตราการมีชีวิต และการเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุลในเซลล์อสุจิแพะไป Transformed โดยใช้ Box-Cox และทดสอบการกระจายตัวของข้อมูลโดยใช้ The proc univariate และ Shapiro-wilk tests จากนั้นวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของทรีตเมนต์ด้วยวิธี Duncan’s test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรม SAS version 9.0 (2002)

3.2.3 การทดลองที่ 2 ผลของชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร Antioxidant ต่อคุณภาพน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์ที่ทำการเก็บรักษาแบบแช่แข็ง

ทำการเลือกทรีตเมนต์ที่ให้ผลดีที่สุดในการทดลอง 1 คือ Tris-based extender ร่วมกับ Combination ของ Glycerol 5% + Egg yolk 18% มาศึกษาชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร Antioxidant และศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ DNA methylation โดยใช้สาร Antioxidant 3 ชนิด ที่ระดับ 3 ความเข้มข้น ดังนี้ 1) GSH ที่ระดับความเข้มข้น 1, 3, และ 5 mM 2) Cysteine ที่ระดับความเข้มข้น 6, 9, และ 12 mM และ 3) Vitamin E ที่ระดับความเข้มข้น 1, 2, และ 3 mM เปรียบเทียบกับน้ำเชื้อที่ไม่มีการเติมสาร Antioxidant และใช้สูตรทางการค้า (Andromed) เป็นตัวควบคุม ดังแสดงในตารางที่ 3.3 โดยมีการวางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 6 ซ้ำ/ทรีตเมนต์ และมีขั้นตอนการศึกษา ดังนี้

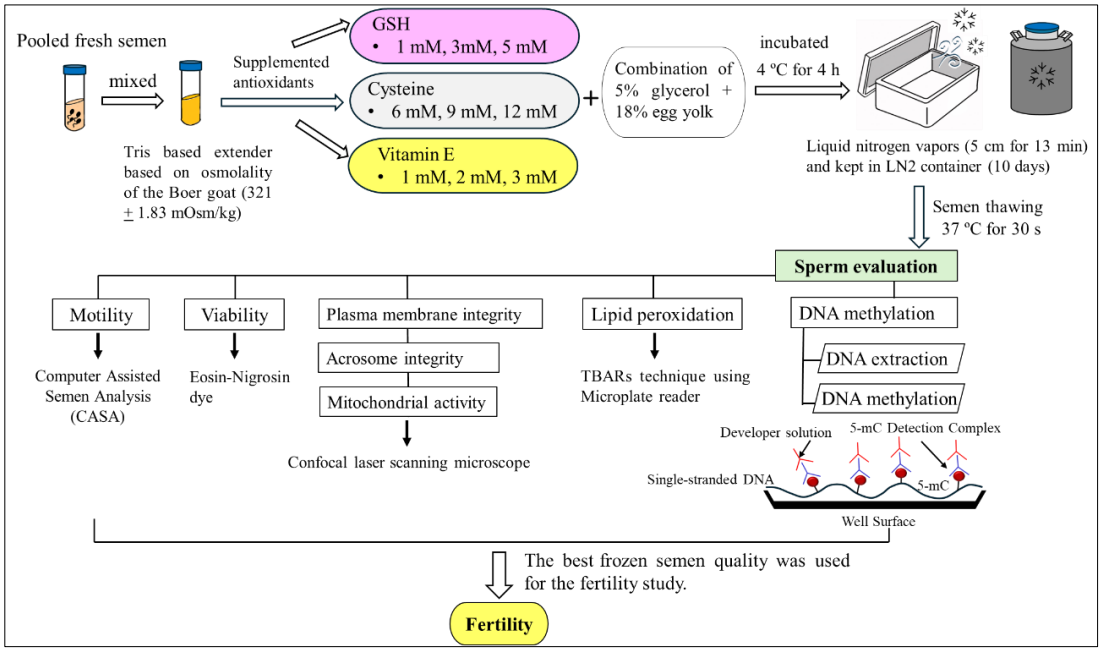
1) นำน้ำเชื้อสดที่มีอัตราการเคลื่อนที่ 70% ขึ้นไป ตรวจวัดความเข้มข้น จำนวนอสุจิ/mL ด้วยเครื่อง Photometer (SDM 1, Minitab International AG, Germany) น้ำเชื้อที่นำมาศึกษาต้องมีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 1,100–6,500 ล้านตัว/mL

2) นำน้ำเชื้อแพะแต่ละตัวมาผสมรวมกัน ทำการเติมสาร Tris-base extender ตามการทดลองที่ 1 จากนั้นเติมสาร Antioxidant แต่ละชนิดที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ และเติมสาร Cryoprotectant [Egg yolk (18%) + Glycerol (5%)] โดยให้มีความเข้มข้นของอสุจิ 150 ล้านตัว/โดส และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำน้ำเชื้อไปบรรจุในหลอดฟาง ขนาด 0.25 mL ทำการลดอุณหภูมิด้วยวิธีการอังไอไนโตรเจนเหลว โดยวางห่างจากผิวไนโตรเจน 5 เซนติเมตร (อุณหภูมิ -120°C) เป็นเวลา 13 นาที ก่อนเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว ที่อุณหภูมิ -196°C เป็นเวลา 10 วัน

3) นำหลอดน้ำเชื้อมาละลายในน้ำอุ่น 37°C นาน 30 วินาที ก่อนนำไปประเมินอัตราการเคลื่อนที่รวม อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า อัตราการมีชีวิต ความสมบูรณ์อะโครโซม ความสมบูรณ์เยื่อหุ้มเซลล์ การทำงานของไมโทคอนเดรีย การเกิดปฏิกิริยา Lipid peroxidation การเกิดกระบวนการ DNA methylation และนำทรีตเมนต์ที่ให้ผลดีที่สุด ไปทดสอบอัตราการผสมติด ดังแสดงในภาพที่ 3.4

ตารางที่ 3.3 แผนการทดลองการศึกษาผลของสาร Antioxidant 3 ชนิด (GSH, Cysteine, และ Vitamin E) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อคุณภาพน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์ที่ทำการเก็บรักษาแบบแช่แข็ง โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD

Antioxidant	Total motility (%)	Progressive motility (%)	Viability (%)	Acrosome integrity (%)	Membrane integrity (%)	Mitochondria activity (%)	MDA (nmol/mL)	DNA methylation
GSH 1 mM								
GSH 3 mM								
GSH 5 mM								
Cysteine 6 mM								
Cysteine 9 mM								
Cysteine 12 mM								
Vitamin E 1 mM								
Vitamin E 2 mM								
Vitamin E 3 mM								
No antioxidant								
Andromed (Control)								



ภาพที่ 3.4 แผนภาพการทดลองที่ 2 การศึกษาผลของชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร Antioxidant ต่อคุณภาพของน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แช่แข็ง

3.2.3.1 การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็ง

หลังจากทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะเป็นระยะเวลา 10 วัน ที่อุณหภูมิ -196°C นำน้ำเชื้อแช่แข็งมาละลายที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 วินาที ก่อนการประเมินพารามิเตอร์ต่างๆ ดังต่อไปนี้

1) การประเมินอัตราการเคลื่อนที่รวม อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และอัตราการมีชีวิต รายละเอียดขั้นตอนการศึกษา ดังแสดงในหัวข้อที่ 3.2.2.1 ในส่วนของการประเมินอัตราการเคลื่อนที่ และการประเมินอัตราการมีชีวิต

2) การประเมินความสมบูรณ์เยื่อหุ้มอสุจิ (Membrane integrity) ความสมบูรณ์อะโครโซม (Acrosome integrity) และการทำงานของไมโทคอนเดรีย (Mitochondria activity)

ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มอสุจิ ความสมบูรณ์อะโครโซม และการทำงานของไมโทคอนเดรีย ประเมินโดยการบ่มเซลล์อสุจิด้วยสาร Propidium iodide (PI), Hoechst 33342 (H342), Fluorescein isothiocyanate-conjugated pisum sativum agglutinin (FITC-PSA) และ 5,5', 6,6'-Tetrachloro 1,1', 3,3'-tetraethylbenzimidazolyl-carbocyanine iodide (JC-1) โดยมีวิธีการเตรียมสาร ตามการศึกษาของ Celeghini *et al*. (2007) และเตรียมตัวอย่างตามการศึกษาของ Nguyen *et al*. (2019) โดยมีรายละเอียด ดังนี้

2.1) นำตัวอย่างน้ำเชื้อปริมาตร 10 µL มาเจือจางกับสาร Extender ปริมาตร 180 µL ลงในหลอด Eppendorf ขนาด 1.5 mL ที่อุ่นแล้ว และเติม H342 ปริมาตร 10 µL (40 µg/mL H342 ใน Dulbecco's phosphate-buffered saline; DPBS)

2.2) บ่มเป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 38°C หลังจากนั้นทำการเติม PI ปริมาตร 2 µL (0.5 mg/mL PI ใน DPBS), JC-1 ปริมาตร 15 µL (153 µmol/L JC-1 ใน DMSO) และ FITC-PSA ปริมาตร 20 µL (100 µg/mL FITC-PSA ใน DPBS) ลงในตัวอย่าง

2.3) บ่มตัวอย่างเป็นเวลา 8 นาที ที่อุณหภูมิ 38°C และเพื่อเป็นการลดการเรืองแสงของพื้นหลัง สาร H342, PI, FITC-PSA, และ JC-1 โดยการเติม DPBS ปริมาตร 200 µL และทำการล้างเซลล์อสุจิ โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 800 g เป็นเวลา 2 นาที (Chelucci *et al*., 2015)

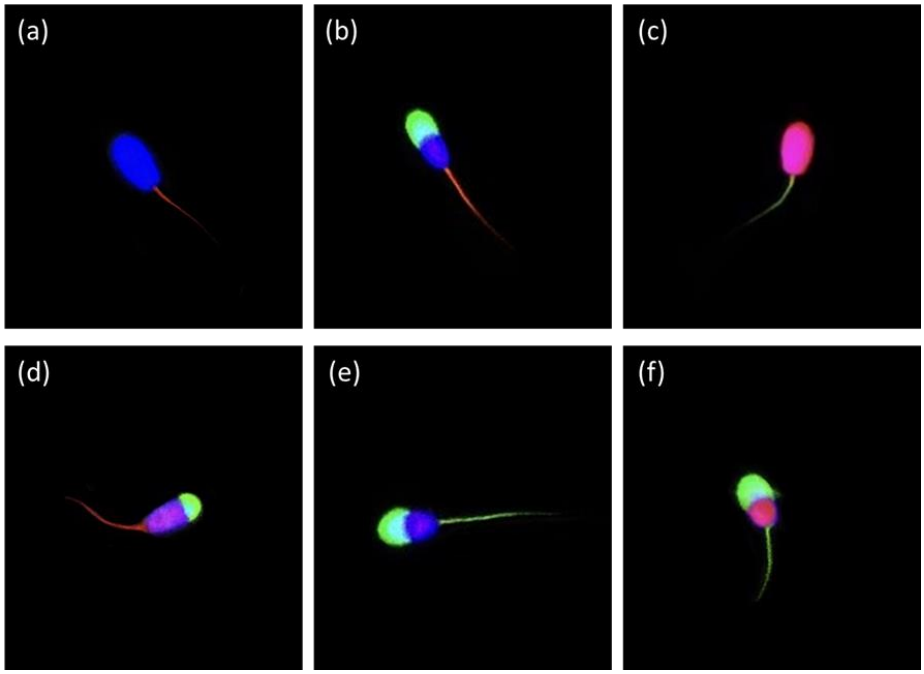
2.4) เอาส่วนใสออก และทำการละลายตะกอนอีกครั้งด้วย DPBS ปริมาตร 100 µL หลังจากนั้น ดูดตัวอย่างอสุจิที่ย้อมสี ปริมาตร 8 µL ลงบนสไลด์ และปิด Cover slipped

2.5) ประเมินความสมบูรณ์เซลล์อสุจิ อะโครโซม และการทำงานของไมโทคอนเดรีย โดยใช้กล้อง Confocal laser scanning microscope (CLSM; Nikon/Ni-E, Japan) ด้วยกำลังขยาย 400 เท่า นับเซลล์อสุจิจำนวน 200 เซลล์/ตัวอย่าง โดยพบการติดสีของอสุจิบริเวณอะโครโซม เซลล์อสุจิที่สมบูรณ์ เยื่อหุ้มอะโครโซมติดสีน้ำเงินหรือแดง บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ติดสีน้ำเงิน และบริเวณเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรียติดสีแดงอมส้ม ในส่วนของเซลล์อสุจิที่ไม่สมบูรณ์ หรือถูกทำลาย จะมีส่วนของเยื่อหุ้มอะโครโซมติดสีเขียว บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ติดสีแดง และไมโทคอนเดรียที่ติดสีเขียว ดังแสดงในภาพที่ 3.5

3) การประเมินระดับการเกิดปฏิกิริยา Lipid peroxidation โดยประเมินจากปริมาณ Malondialdehyde (MDA) ที่เกิดขึ้นด้วยวิธี Thiobarbituric acid reactive substant (TBARs)

การประเมินระดับการเกิด Lipid peroxidation โดยประเมินจากปริมาณ MDA ที่เกิดขึ้นด้วยวิธี TBARs โดยมีการเตรียมตัวอย่างดัดแปลงตามวิธีการศึกษาของ Merati and Farshad (2021) โดยมีขั้นตอนรายละเอียด ดังนี้

3.1) นำน้ำเชื้อแช่แข็งมาละลายที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นนำน้ำเชื้อปริมาตร 100 µL ผสมกับ 20% (w/v) Trichloroacetic acid (TCA) ปริมาตร 125 µL เพื่อเป็นการตกตะกอนโปรตีน จากนั้นเติม 0.05 M EDTA ปริมาตร 125 µL และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1200 g เป็นเวลา 15 นาที



ภาพที่ 3.5 เซลล์อสุจิที่ย้อมด้วยสารเรืองแสง H324, PI, FITC-PSA และ JC-1 ภายใต้กล้อง Confocal laser scanning microscope (กำลังขยาย 400 เท่า) โดย (a) เซลล์อสุจิที่มีเยื่อหุ้มอสุจิ อะโครโซมสมบูรณ์ และการทำงานของไมโทคอนเดรียสูง (b) เยื่อหุ้มอสุจิสมบูรณ์ อะโครโซมถูกทำลาย และการทำงานของไมโทคอนเดรียสูง (c) เยื่อหุ้มอสุจิถูกทำลาย อะโครโซมสมบูรณ์ และการทำงานของไมโทคอนเดรียต่ำ (d) เยื่อหุ้มอสุจิสมบูรณ์ อะโครโซมถูกทำลาย และการทำงานของไมโทคอนเดรียสูง (e) เยื่อหุ้มอสุจิสมบูรณ์ อะโครโซมถูกทำลาย และการทำงานของไมโทคอนเดรียต่ำ (f) เยื่อหุ้มอสุจิและอะโครโซมถูกทำลาย การทำงานของไมโทคอนเดรียต่ำ

3.2) ทำการดูดส่วนใสใส่ Eppendorf ปริมาตร 100 µL จากนั้นเติม 0.2% (w/v) Thiobarbituric acid (TBA) ปริมาตร 125 µL และบ่มที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 10-15 นาที ทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง และห่อด้วยฟอยล์เพื่อป้องกันแสงก่อนนำไปวิเคราะห์

3.3) จากนั้นนำตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่อง Multiskan GO with Thermo Scientific SkanIt software (Thermo Fisher sciencetific, N.Y.R. Limited Partnership, Bangkok, Thailand) ที่ความยาวคลื่น 532 nm

4) การประเมินระดับของการเกิด DNA methylation

การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการศึกษาในส่วนของกระบวนการ DNA methylation ของน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แบบแช่แข็ง ประกอบด้วย 2 ขั้นตอนหลัก คือ 1) การสกัดดีเอ็นเอ และ 2) การวิเคราะห์ DNA methylation โดยมีรายละเอียดดังนี้

4.1) การสกัดดีเอ็นเอ

ทำการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัด Tissue genomic DNA extraction kit (Favorgen Biotech Corp, Ping-Tung, Taiwan) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

4.1.1) นำน้ำเชื้อแช่แข็งที่มีความเข้มข้น 200 ล้านตัว (ปริมาตร 230 µL) มาละลายที่อุณหภูมิ 4°C และในกรณีของน้ำเชื้อสดแพะพันธุ์บอร์ ที่มีความเข้มข้นเฉลี่ย 3,416-4,190 ล้านตัว/mL (ปริมาตร 60 µL) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที

4.1.2) ดูดส่วนใสออก ให้เหลือแต่ตะกอนอสุจิ และเติมสาร 0.9% NaCl ปริมาตร 1.5 mL นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 2 นาที

4.1.3) ดูดส่วนใสออก ให้เหลือแต่ตะกอนอสุจิ ทำการเติมสารบัฟเฟอร์ FATG1 ปริมาตร 200 µL จากนั้นเติม RNase A ความเข้มข้น 20 mg/mL ปริมาตร 10 µL ผสมให้เข้ากันโดยใช้ไมโครปิเปต และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที

4.1.4) เติม Proteinase K ความเข้มข้น 10 mg/mL ปริมาตร 20 µL ผสมให้เข้ากันโดยใช้ไมโครปิเปต จากนั้นบ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 56°C เป็นเวลา 30 นาที และนำไป Vortex ทุกๆ 10 นาทีในระหว่างที่ทำการบ่ม

4.1.5) เติมสารละลาย Dithiothreitol (DTT) ความเข้มข้น 1 M ปริมาตร 10 µL ผสมให้เข้ากัน จากนั้นบ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 56°C เป็นเวลา 30-60 นาที จนกว่าตัวอย่างจะเปลี่ยนเป็นสีใส และนำไป Vortex ทุกๆ 10 นาทีในระหว่างที่ทำการบ่ม

4.1.6) ทำการเติมบัฟเฟอร์ FATG2 ปริมาตร 200 µL ผสมให้เข้ากันโดยใช้ไมโครปิเปต และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้น Spin down ตัวอย่างเพื่อให้ตัวอย่างที่เกาะบริเวณขอบหลอดมารวมกัน

4.1.7) เติม 99% Ethanol ปริมาตร 200 µL ผสมให้เข้ากัน จากนั้นทำการวางคอลัมน์ FATG ลงในหลอด Collection tube ดูดส่วนผสมตัวอย่างทั้งหมดไปยังคอลัมน์ FATG อย่างระมัดระวัง และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที

4.1.8) ล้างคอลัมน์ FATG ด้วยสารบัฟเฟอร์ W1 ปริมาตร 500 µL นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที

4.1.9) ล้างคอลัมน์ FATG ด้วยสารบัฟเฟอร์ Wash ปริมาตร 750 µL นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบ 14,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นทำให้คอลัมน์ FATG แห้ง โดยการนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที

4.1.10) วางคอลัมน์ FATG ลงในหลอด Elution tube และเติม ddH_2O ปริมาตร 50 µL ลงบริเวณกึ่งกลางของคอลัมน์ FATG วางทิ้งไว้เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที เพื่อให้ ddH_2O ชะดีเอ็นเอลงมายังหลอด Elution tube จากนั้นนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปวิเคราะห์คุณภาพ และความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Nano drop 2000c UV-Vis spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, USA) ซึ่งสามารถวัดความเข้มข้น และความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ โดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260/280 nm ค่าเฉลี่ยความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ ควรอยู่ในช่วง 1.6-1.8 ng/ µL (Santella, 2006) และทำการตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอโดยการใช้เทคนิค Agarose gel electrophoresis โดยดีเอ็นเอที่ผ่านการตรวจสอบคุณภาพและความเข้มข้นสามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะนำมาใช้วิเคราะห์ DNA methylation ต่อไปได้

4.2) การวิเคราะห์ DNA methylation

วิเคราะห์ DNA methylation โดยการใช้ชุด Global DNA methylation assay kit (5 Methyl Cytosine, Colorimetric, Abcam) โดยการอ่านค่าการดูดกลืนแสงใน Microplate spectrophotometer ซึ่งเปอร์เซ็นต์ของ DNA methylated นั้นแปรผันตามความเข้มของ Optical density (OD) ที่วัดได้ โดยมีขั้นตอนการศึกษา ดังนี้

4.2.1) การจับดีเอ็นเอ (DNA Binding)

1) การเตรียม Negative control: โดยเติมสาร Binding solution ปริมาตร 100 µL และสารละลาย Negative control ปริมาตร 2 µL

2) การเตรียม Positive control: โดยเติมสาร Binding Solution ปริมาตร 100 µL และสารละลาย Positive control ปริมาตร 2 µLที่ความเข้มข้นต่างกัน (0.1%-5%) เพื่อสร้างเส้นโค้งมาตรฐาน

3) การเตรียมตัวอย่าง: เติมสาร Binding solution ปริมาตร 100 µL และตัวอย่าง DNA ที่สกัด ความเข้มข้น 100 ng ปริมาตร 4 µL

4) ผสมตัวอย่างสารละลายโดยเขย่าเบาๆ เพื่อให้แน่ใจว่าสารละลายทั้งหมดตกลงด้านล่างของ Wells จากนั้นปิดด้วย Parafilm M และบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 60 นาที

5) ในช่วง 10 นาทีสุดท้ายของการบ่มตัวอย่าง ให้เตรียมสารละลาย 5-mC Detection complex solution: 1X Wash buffer ที่เจือจางแล้ว 1 mL ให้เติม

5-mC Antibody 1000X ปริมาตร 1 µL ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติม Signal indicator ปริมาตร 1 µL, 1000X และ Enhancer solution, 1000X ปริมาตร 0.5 µL ผสมให้เข้ากัน

6) หลังจากการบ่ม 60 นาที ทำการกำจัดส่วนของสาร Binding solution ทิ้ง จากนั้นล้างด้วย 1X Wash buffer ที่เจือจางแล้ว ปริมาตร 150 µL เป็นจำนวน 3 ครั้ง ก่อนนำไปศึกษาขั้นตอนการตรวจจับและวัดสัญญาณของดีเอ็นเอ

4.2.2) การตรวจจับและวัดสัญญาณของดีเอ็นเอ (Methylated DNA detection and signal measurement)

1) เติมสารละลาย 5-mC Detection complex solution ปริมาตร 50 µL จากนั้นปิดฝา และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 50 นาที

2) กำจัดสารละลาย 5-mC Detection complex solution ทิ้ง และล้างด้วย 1X Wash buffer ที่เจือจางแล้วปริมาตร 150 µL จำนวน 5 ครั้ง

3) เติม Developer solution ปริมาตร 100 µL ลงในแต่ละคอลัมน์ให้พร้อมกันโดยใช้ Multichannel pipette จากนั้นทำการเขย่าเบาๆ เป็นเวลา 5-10 วินาที และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3-4 นาที สังเกตสีที่เปลี่ยนไป โดยสาร Developer solution จะเปลี่ยนเป็นสีฟ้าอมน้ำเงินเมื่อมี DNA methylated เพียงพอ และในส่วนของ Negative control จะไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงของสี

4) เมื่อสีในส่วนของ Positive control ความเข้มข้นสุดท้าย (5%) เปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินเข้ม ให้หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยเติม Stop solution ปริมาตร 100 µL ลงในแต่ละคอลัมน์ให้พร้อมกันโดยใช้ Multichannel pipette เพื่อให้ปฏิกิริยาหยุดลงในเวลาเดียวกัน จากนั้นผสมสารละลายโดยเขย่าเบาๆ กับพื้นผิวเรียบ และรอประมาณ 1-2 นาทีเพื่อให้ปฏิกิริยาสีหยุดสนิท สีจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองหลังจากเติม Stop solution และอ่านค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้ Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 450 nm ภายใน 2-15 นาที

4.2.3) การคำนวณ DNA methylation โดยหาเปอร์เซ็นต์ของ 5-mC

คำนวณเปอร์เซ็นต์ของ DNA methylation โดยการสร้างเส้นโค้งมาตรฐานและพล็อตค่า OD เทียบกับ Positive control เพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน และกำหนดความชันของเส้นโค้งมาตรฐาน โดยใช้โปรแกรม Microsoft excel

คำนวณเปอร์เซ็นต์ของ Methylated DNA (5-mC) ใน DNA โดยใช้สูตรต่อไปนี้

$$5\text{-}mC\% = \frac{\text{Sample OD - Negative Control OD*}}{\text{Slope x S}} \times 100\%$$

โดย Sample OD คือ ค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้จากตัวอย่าง, Negative control OD คือ ค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้จาก Negative control, Slope คือ ค่า b ที่ได้จากสมการถดถอยเชิงเส้น (y = a[x] + b) จากการสร้างเส้นโค้งมาตรฐาน และ S คือปริมาณ DNA ของตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา มีหน่วยเป็น ng (โดยในการศึกษานี้ใช้ 100 ng)

5) การประเมินอัตราการผสมติด

ประเมินอัตราการผสมติดโดยคัดเลือกทรีตเมนต์ที่ให้ผลดีจากพารามิเตอร์ต่างๆ ไปทดสอบอัตราการผสมติด เปรียบเทียบกับสูตรทางการค้า โดยใช้แพะเนื้อเพศเมียพันธุ์บอร์ อายุ 11 เดือน ระดับคะแนนร่างกาย 2.5-3.0 เลี้ยงในโรงเรือนแบบเปิด ให้หญ้าสดเป็นแหล่งอาหารหยาบ และน้ำสะอาดให้กินอย่างเต็มที่ ใช้แม่แพะทั้งหมด 17 ตัว จากฟาร์มแพะของเกษตรกร บ้านหนองกราด อำเภอด่านขุนทด จังหวัดนครราชสีมา ใช้วิธีการเหนี่ยวนำการเป็นสัดโดยการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนสังเคราะห์ ด้วยวิธีการสอด CIDR เข้าไปภายในช่องคลอดเป็นระยะเวลา 13 วัน และฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน Prostaglandin F2: PGF2α (Estrumate) 0.5 mL/ตัว และ Pregnant mare serum gonadotrophin: PMSG (Folligon) 200 IU/ตัว โดยฉีดเข้ากล้ามเนื้อบริเวณคอ สังเกตการเป็นสัด และทำการผสมเทียมแพะโดยกำหนดเวลา ทำการผสมเทียม 2 ครั้ง โดยผสมเทียมครั้งแรกที่ 36 ชั่วโมงหลังจากถอดฮอร์โมน และผสมเทียมครั้งที่ 2 ที่ 56 ชั่วโมงหลังถอดฮอร์โมน ในช่วงเดือน ธันวาคม 2566 – มกราคม 2567 หลังจากผสมเทียม 45 วัน ทำการตรวจการผสมติดโดยใช้เครื่องอัลตราซาวด์ (PL-3018I Digital ultrasound scanner, Xuzhou Palmary Electronics Co.,Ltd., China) และบันทึกผล

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ นำข้อมูลอัตราการเคลื่อนที่รวม อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า อัตราการมีชีวิต ความสมบูรณ์เยื่อหุ้มอสุจิ ความสมบูรณ์อะโครโซม การทำงานของไมโทคอนเดรีย ปริมาณ MDA และ DNA methylation ไป Transformed โดยใช้ Box-Cox และทดสอบการกระจายตัวของข้อมูลโดยใช้ The proc univariate และ Shapiro-wilk tests จากนั้นวิเคราะห์ ANOVA เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของทรีตเมนต์ด้วยวิธี Duncan’s test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรม SAS version 9.0 (2002)

เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มของทรีตเมนต์ที่มีการเสริม Antioxidant กับกลุ่มที่ไม่มีการเสริม และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มของทรีตเมนต์ที่มีการเสริม Antioxidant กับสูตรทางการค้า โดยใช้ Orthogonal contrasts ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรม SAS version 9.0 (2002)

ทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่าง DNA methylation กับอัตราการเคลื่อนที่รวม อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า อัตราการมีชีวิต ความสมบูรณ์อะโครโซม ความสมบูรณ์เยื่อหุ้มเซลล์ การทำงานของไมโทคอนเดรีย และปริมาณ MDA ด้วยวิธี Pearson's correlation

นอกจากนี้ วิเคราะห์ข้อมูลผลการผสมติดระหว่างน้ำเชื้อสูตร Tris-based extender + Glycerol (5%) + Egg yolk (18%) + GSH (1 mM) และสูตรทางการค้า (Andromed) โดยใช้ Descriptive statistics โดยรายงานข้อมูลในรูปของร้อยละ (Percentile)