

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
อุปกรณ์ และสารเคมี

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษา

1.1 อุปกรณ์สำหรับการรีดน้ำเชื้อแพะ

- 1) โยนีเทียม (Artificial vagina)
- 2) ขอบังคับแพะตัวเมีย
- 3) กระตักน้ำร้อน
- 4) หลอด (Tube) ขนาด 15 mL
- 5) กระจกฟอยล์

1.2 อุปกรณ์สำหรับใช้ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง

- 1) หลอด microtube (Eppendorf) ขนาด 1.5 mL
- 2) หลอด (Tube) ขนาด 15 mL
- 3) กระจกทึบ
- 4) กระบอกลั่น
- 5) เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
- 6) กระจกชั่งสาร
- 7) ซ้อนตักสาร
- 8) ปีกเกอร์ (Beaker)
- 9) แท่งแม่เหล็กกวนสาร (Magnetic bar)
- 10) เครื่องกวนสารพร้อมให้ความร้อน (Hotplate with stirrer)
- 11) เครื่องเขย่าสาร (Vortex)
- 12) Micropipette
- 13) Pipettes tips
- 14) เครื่อง Water bath
- 15) เครื่อง Osmometer
- 16) เครื่อง pH meter
- 17) เครื่อง Photometer SDM 1 (Minitube International AG, Germany)
- 18) ตู้แช่ 4°C
- 19) หลอดฟาง (French straws) ขนาด 0.25 mL
- 20) ถังไนโตรเจนเหลว
- 21) กล่องโฟม
- 22) ตะแกรงสำหรับวางหลอดน้ำเชื้อ
- 23) Cryocan และ Cryotube

1.3 อุปกรณ์สำหรับใช้ประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ ประกอบด้วย

1.3.1 การประเมินอัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการมีชีวิต

- 1) เครื่อง Computer assisted semen analysis (CASA) version 10 HTM-IVOS (Hamilton Thorne Biosciences, Beverly, MA, USA)
- 2) หลอด Microtube (Eppendorf) ขนาด 1.5 mL
- 3) Micropipette
- 4) Pipettes tips
- 5) เครื่อง Water bath
- 6) เครื่องอุ่น Slide (Slide warmers)
- 7) แผ่น Slide 2X-cell สำหรับเครื่อง CASA
- 8) แผ่น Cover glass
- 9) แผ่น Slide
- 10) กล้องจุลทรรศน์แบบ Compound microscope
- 11) ขวดสีชา

1.4 การประเมินด้วยเทคนิค SR-FTIR

- 1) หลอด Microtube (Eppendorf) ขนาด 1.5 mL
- 2) เครื่อง Centrifuge
- 3) เครื่อง Water bath
- 4) แผ่น BaF2 window ความหนา 0.5 mm
- 5) โถดูดความชื้น (Desiccator)
- 6) กล้องจุลทรรศน์อินฟราเรด Bruker Hyperion 2000-IR Microscope (Bruker Optik GmbH, Ettlingen, Germany)
- 7) ซอฟต์แวร์ OPUS 7.5 software (Bruker Optics Ltd.)
- 8) ซอฟต์แวร์ The Unscrambler X Multivariate data analysis software (version 10.4, Camo Analytics, Oslo, Norway)

1.5 การประเมินความสมบูรณ์เยื่อหุ้มอสุจิ ความสมบูรณ์อะโครโซม การทำงานของไมโทคอนเดรีย

- 1) หลอด Microtube (Eppendorf) ขนาด 1.5 mL
- 2) เครื่อง Centrifuge
- 3) เครื่อง Water bath
- 4) แผ่น Slide และ Cover glass
- 5) กล้อง Confocal laser scanning microscope (CLSM; Nikon/Ni-E, Japan)

13.4 การประเมินการเกิด lipid peroxidation ด้วยวิธี Thiobarbituric acid reactive substant (TBARS)

- 1) หลอด Microtube (Eppendorf) ขนาด 1.5 mL
- 2) เครื่อง Centrifuge
- 3) เครื่อง Water bath
- 4) ไมโครเพลท 96 ช่อง (96-well plate)
- 5) เครื่อง Multiskan GO with Thermo Scientific Skanlt software (Thermo Fisher scientific, N.Y.R. Limited Partnership, Bangkok, Thailand)

13.5 การประเมินระดับของการเกิด DNA methylation

- 1) หลอด Microtube (Eppendorf) ขนาด 1.5 mL
- 2) เครื่อง Centrifuge
- 3) เครื่อง Water bath
- 4) กล่องโฟม และน้ำแข็ง
- 5) Racks
- 6) เครื่อง Vortex
- 7) หลอดคอลิมน์ FATG
- 8) หลอด Collection tube
- 9) หลอด Elution tube
- 10) เครื่อง Nano drop 2000c UV-Vis spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, USA)
- 11) ตู้แช่ -20°C
- 12) เครื่อง Microplate spectrophotometer
- 13) Strip well
- 14) Parafilm M
- 15) Micropipette และ Tips
- 16) Multichannel pipette

13.6 การประเมินอัตราการผสมติด

- 1) ซองบังคับแพะตัวเมีย
- 2) คีมปากเปิด (Vaginal speculum)
- 3) ไฟฉาย
- 4) ปืนผสมเทียม
- 5) กระจกน้ำร้อน

- 6) เทอร์โมมิเตอร์
- 7) Forceps และกรรไกร
- 8) กระดาษทิชชู
- 9) สำลีชุบแอลกอฮอล์
- 10) พลาสติกซีท
- 11) ถุงมือ
- 12) สมุดจดบันทึกการผสมเทียม

2. สารเคมีที่ใช้ในการศึกษา

2.1 สารเคมีสำหรับเตรียมสาร Extender สาร Cryoprotectant และสาร Antioxidant

- 1) Tris
- 2) Citric acid
- 3) Fructose
- 4) Lincospecs
- 5) น้ำกลั่น
- 6) Andromed[®]
- 7) Glycerol
- 8) Egg yolk
- 9) Soybean lecithin
- 10) Glutathione
- 11) Cysteine
- 12) Vitamin E
- 13) Lactated ringers

2.2 สารเคมีสำหรับการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ

2.2.1 การประเมินอัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการมีชีวิต

- 1) Eosin B
- 2) Nigrosin
- 3) Sodium-citrate dehydrate
- 4) น้ำกลั่น

2.2.2 การประเมินด้วยเทคนิค SR-FTIR

- 1) NaCl 0.85%

- 2) น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave

2.2.3 การประเมินความสมบูรณ์เยื่อหุ้มอสุจิ ความสมบูรณ์อะโครโซม การทำงานของไมโทคอนเดรีย

- 1) Propidium iodide (PI)
- 2) Hoechst 33342 (H342)
- 3) Fluorescein isothiocyanate-conjugated pisum sativum agglutinin (FITC-PSA)
- 4) 5,5', 6,6'-tetrachloro 1,1', 3,3'-tetraethylbenzimidazolyl-carbocyanine iodide (JC-1)
- 5) Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS)
- 6) Dimethyl sulfoxide (DMSO)

2.2.4 การประเมินการเกิด lipid peroxidation ด้วยวิธี Thiobarbituric acid reactive substant (TBARS)

- 1) Trichloroacetic acid (TCA)
- 2) Thiobarbituric acid (TBA)
- 3) Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)

2.2.5 การประเมินระดับของการเกิด DNA methylation

- 1) ชุดสกัด Tissue genomic DNA extraction kit (Favorgen Biotech Corp, Ping-Tung, Taiwan) ประกอบด้วย
 - FATG1 buffer
 - FATG2 buffer
 - Proteinase K
 - W1 buffer
 - Wash buffer
- 2) NaCl 0.9%
- 3) RNase A
- 4) Dithiothreitol (DTT)
- 5) Ethanol 99%
- 6) ddH₂O
- 7) ผง Agarose
- 8) ชุดวิเคราะห์ global DNA methylation assay kit (5 Methyl Cytosine, Colorimetric, Abcam) ประกอบด้วย

- Negative control
- Positive control
- Binding Solution
- 1X wash buffer
- 5-mC antibody, 1000X
- Signal indicator, 1000X
- Enhancer solution, 1000X
- Developer solution
- Stop solution

2.2.6 การประเมินอัตราการผสมติด

- 1) ฮอร์โมน Progesterone รูปแบบ CIDR[®]-G
- 2) ฮอร์โมน Prostaglandin F2: PGF2 α (Estrumate[®])
- 3) ฮอร์โมน Pregnant mare serum gonadotrophin; PMSG (Folligon[®])
- 4) เจลหล่อลื่น
- 5) แอลกอฮอล์
- 6) น้ำยาฆ่าเชื้อ

ภาคผนวก ข

ตารางแสดงผลวิเคราะห์หาเรียนรู้

1. การศึกษาผลของ Combination ของสาร Cryoprotectant จากแหล่งเลชิติน ที่มาจากพืชและสัตว์ ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แบบแช่แข็ง

ตารางที่ ข.1 แสดงการวิเคราะห์หว่าเรียนซ์ผลของ Combination ของสาร Cryoprotectant จากแหล่งเล
ชิตินที่มาจากพืชและสัตว์ ต่ออัตราการเคลื่อนที่รวมของน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แช่แข็ง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	P-value
Between Groups (Treatment)	1676.712	4	419.178	172.204	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	60.855	25	2.434		
Total	1737.567	29			

ตารางที่ ข.2 แสดงการวิเคราะห์หว่าเรียนซ์ผลของ Combination ของสาร Cryoprotectant จาก
แหล่งเลชิตินที่มาจากพืชและสัตว์ต่ออัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของน้ำเชื้อแพะพันธุ์
บอร์แช่แข็ง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	P-value
Between Groups (Treatment)	1208.382	4	302.096	55.311	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	136.545	25	5.462		
Total	1344.927	29			

ตารางที่ ข.3 แสดงการวิเคราะห์หว่าเรียนซ์ผลของ Combination ของสาร Cryoprotectant จาก
แหล่งเลชิตินที่มาจากพืชและสัตว์ต่ออัตราการมีชีวิตของน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แช่แข็ง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	P-value
Between Groups (Treatment)	12816.300	4	3204.075	719.209	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	111.375	25	4.455		
Total	12927.675	29			

ตารางที่ ข.4 แสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนของ Combination ของสาร Cryoprotectant จากแหล่งเลซิดินที่มาจากพืชและสัตว์ต่อการเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุล (Lipid) ในเซลล์อสุจิแพะพันธุ์บอร์ที่เก็บแบบแช่แข็ง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	P-value
Between Groups (Treatment)	3809.515	4	952.379	516.569	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	46.092	25	1.844		
Total	3855.607	29			

ตารางที่ ข.5 แสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนของ Combination ของสาร Cryoprotectant จากแหล่งเลซิดินที่มาจากพืชและสัตว์ต่อการเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุล (Ester lipid) ในเซลล์อสุจิแพะพันธุ์บอร์ที่เก็บแบบแช่แข็ง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	P-value
Between Groups (Treatment)	131.040	4	32.760	152.490	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	5.371	25	0.215		
Total	136.411	29			

ตารางที่ ข.6 แสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนของ Combination ของสาร Cryoprotectant จากแหล่งเลซิดินที่มาจากพืชและสัตว์ ต่อการเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุล (Amide I) ในเซลล์อสุจิแพะพันธุ์บอร์ที่เก็บแบบแช่แข็ง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	P-value
Between Groups (Treatment)	2956.078	4	739.020	646.540	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	28.576	25	1.143		
Total	2984.654	29			

ตารางที่ ข.7 แสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนของ Combination ของสาร Cryoprotectant จากแหล่งเลซิดินที่มาจากพืชและสัตว์ ต่อการเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุล (Amide II) ในเซลล์อสุจิแพะพันธุ์บอร์ที่เก็บแบบแช่แข็ง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	P-value
Between Groups (Treatment)	101.298	4	25.325	67.496	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	9.380	25	0.375		
Total	110.678	29			

ตารางที่ ข.8 แสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนของ Combination ของสาร Cryoprotectant จากแหล่งเลซิดินที่มาจากพืชและสัตว์ ต่อการเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุล (Nucleic acid) ในเซลล์อสุจิแพะพันธุ์บอร์ที่เก็บแบบแช่แข็ง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	P-value
Between Groups (Treatment)	549.813	4	137.453	234.543	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	14.651	25	0.586		
Total	564.464	29			

ตารางที่ ข.9 แสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนของ Combination ของสาร Cryoprotectant จากแหล่งเลซิดินที่มาจากพืชและสัตว์ ต่อเปอร์เซ็นต์ Curve fitting ของสารชีวโมเลกุล (β -sheet) ในเซลล์อสุจิแพะพันธุ์บอร์ที่เก็บแบบแช่แข็ง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	P-value
Between Groups (Treatment)	4.503	4	1.126	0.458	0.765
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	24.573	10	2.457		
Total	29.076	14			

ตารางที่ ข.10 แสดงการวิเคราะห์หาเรียนซ์ผลของ Combination ของสาร Cryoprotectant จาก แหล่งเลซิดินที่มาจากพืชและสัตว์ ต่อเปอร์เซ็นต์ Curve fitting ของสารชีวโมเลกุล (α -helix) ในเซลล์อสุจิแพะพันธุ์บอร์ที่เก็บแบบแช่แข็ง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	P-value
Between Groups (Treatment)	88.112	4	22.028	8.813	0.003
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	24.994	10	2.499		
Total	113.105	14			

ตารางที่ ข.11 แสดงการวิเคราะห์หาเรียนซ์ผลของ Combination ของสาร Cryoprotectant จาก แหล่งเลซิดินที่มาจากพืชและสัตว์ ต่อเปอร์เซ็นต์ Curve fitting ของสารชีวโมเลกุล (β -turn) ในเซลล์อสุจิแพะพันธุ์บอร์ที่เก็บแบบแช่แข็ง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	P-value
Between Groups (Treatment)	19.003	4	4.751	3.858	0.038
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	12.315	10	1.232		
Total	31.318	14			

ตารางที่ ข.12 แสดงการวิเคราะห์หาเรียนซ์ผลของ Combination ของสาร Cryoprotectant จาก แหล่งเลซิดินที่มาจากพืชและสัตว์ต่อเปอร์เซ็นต์ Curve fitting ของสารชีวโมเลกุล (Antiparallel) ในเซลล์อสุจิแพะพันธุ์บอร์ที่เก็บแบบแช่แข็ง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	P-value
Between Groups (Treatment)	52.456	4	13.114	5.395	0.014
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	24.309	10	2.431		
Total	76.765	14			

2. การศึกษาผลของชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร Antioxidant ต่อคุณภาพของน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์ที่เก็บรักษาแบบแช่แข็ง

ตารางที่ ข.13 แสดงการวิเคราะห์หว่าเรียนซ์ผลของชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร Antioxidant ต่ออัตราการเคลื่อนที่รวมของน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แช่แข็ง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	P-value
Between Groups (Treatment)	2169.221	10	216.922	60.887	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	195.950	55	3.563		
Total	2365.171	65			

ตารางที่ ข.14 แสดงการวิเคราะห์หว่าเรียนซ์ผลของชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร Antioxidant ต่ออัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แช่แข็ง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	P-value
Between Groups (Treatment)	1356.784	10	135.678	46.670	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	159.894	55	2.907		
Total	1516.678	65			

ตารางที่ ข.15 แสดงการวิเคราะห์หว่าเรียนซ์ผลของชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร Antioxidant ต่ออัตราการมีชีวิตของน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แช่แข็ง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	P-value
Between Groups (Treatment)	1858.091	10	185.809	99.218	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	103.000	55	1.873		
Total	1961.091	65			

ตารางที่ ข.16 แสดงการวิเคราะห์หาเรียนซ์ผลของชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร Antioxidant ต่อความสมบูรณ์อะโครโซมของน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แช่แข็ง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	P-value
Between Groups (Treatment)	1768.091	10	176.809	125.477	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	77.500	55	1.409		
Total	1845.591	65			

ตารางที่ ข.17 แสดงการวิเคราะห์หาเรียนซ์ผลของชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร Antioxidant ต่อความสมบูรณ์เยื่อหุ้มเซลล์ของน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แช่แข็ง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	P-value
Between Groups (Treatment)	3243.273	10	324.327	246.041	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	72.500	55	1.318		
Total	3315.773	65			

ตารางที่ ข.18 แสดงการวิเคราะห์หาเรียนซ์ผลของชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร Antioxidant ต่อการทำงานของไมโทคอนเดรียของน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แช่แข็ง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	P-value
Between Groups (Treatment)	3567.273	10	356.727	213.261	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	92.000	55	1.673		
Total	3659.273	65			

ตารางที่ ข.19 แสดงการวิเคราะห์หว่าเรียนซ์ผลของชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร Antioxidant ต่อระดับ MDA ของน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แช่แข็ง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	P-value
Between Groups (Treatment)	15.027	10	1.503	17.103	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	4.832	55	0.088		
Total	19.859	65			

ตารางที่ ข.20 แสดงการวิเคราะห์หว่าเรียนซ์ผลของชนิดและระดับความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระ ต่อการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันของน้ำเชื้อแพะพันธุ์บอร์แช่แข็ง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	P-value
Between Groups (Treatment)	14.070	11	1.279	9.310	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	3.297	24	0.137		
Total	17.367	35			