ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 1 แสดงเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของสเปิร์มที่ผ่านปฏิกิริยาความเป็นพิษต่อเซลล์ของโคเบอร์ 862

	Cytotoxic Dilution				
	0	100	300	900	2700
Live sperm	53.05389	38.89897	28.10811	28.61073	28.74780
(%)	49.74619	46.64634	34.29752	35.47009	35.28346
	54.58167	35.60831	23.63636	31.97279	32.28346
	56.92308	40.22140	26.59574	26.90583	28.65854
	45.31250	33.70166	17.72152	26.66670	25.02804

ตาราง 2 แสดงเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของสเปิร์มที่ผ่านปฏิกิริยาความเป็นพิษต่อเซลล์ของโคเบอร์ 863

	Cytotoxic Dilution				
	0	100	300	900	2700
Live sperm	52.79777	24.65462	15.14019	32.68608	36.55275
(%)	51.48156	25.96491	12.81700	39.30070	41.73554
	34.21726	31.66895	28.95501	32.60183	33.34132
	33.83686	31.14721	26.33588	29.83871	31.02916
	48.27586	31.83857	13.265306	30.93923	37.82051

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 3 แสดงเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของสเปิร์มที่ผ่านปฏิกิริยาความเป็นพิษต่อเซลล์ของโคเบอร์ RJ888

	Cytotoxic Dilution				
	0	100	300	900	2700
Live sperm	36.57143	34.46541	28.04348	25.3558	29.19680
(%)	31.87889	24.23581	22.10702	21.42635	23.61446
	35.70416	30.86734	28.78788	24.91954	28.07407
	30.61538	27.92661	22.32877	21.69231	22.62162
	41.75012	39.80198	35.38462	27.97561	31.52210

ตาราง 4 แสดงสัดส่วนของสเปิร์มที่มีโครโมโซมวายที่ผ่านปฏิกิริยาความเป็นพิษต่อเซลล์ของโคเบอร์ 862

	Cytotoxic Dilution				
	0	100	300	900	2700
Y sperm (%)	17.01493	13.89578	8.69565	7.73333	8.43750
	17.77778	13.88235	10.28369	9.30233	12.50842
	14.36464	13.05970	8.65385	6.66667	8.53932
	15.55556	12.28669	8.67257	6.62983	10.02571
	13.89427	10.71429	7.79221	8.95522	11.39241

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 5 แสดงสัดส่วนของสเปิร์มที่มีโครโมโซมวายที่ผ่านปฏิกิริยาความเป็นพิษต่อเซลล์ของโคเบอร์ 863

	Cytotoxic Dilution				
	0	100	300	900	2700
Y sperm (%)	13.48253	6.18231	4.34202	4.28056	5.76830
	11.48430	5.01201	4.90884	1.91388	7.04225
	17.63341	7.91900	4.01695	3.15582	4.77223
	10.23891	6.66667	5.44747	2.60223	6.83230
	15.88785	5.48673	4.59184	4.32220	4.77223

ตาราง 6 แสดงสัดส่วนของสเปิร์มที่มีโครโมโซมวายที่ผ่านปฏิกิริยาความเป็นพิษต่อเซลล์ของโคเบอร์ RJ888

	Cytotoxic Dilution				
	0	100	300	900	2700
Y sperm (%)	25.30120	19.54023	16.74560	16.51282	16.90601
	19.90132	16.60650	16.43836	16.33875	16.79790
	10.55777	10.06188	8.72947	5.43319	7.16332
	26.56250	17.11711	17.05426	15.51724	19.41176
	19.44444	17.16738	16.89189	15.63118	16.20725

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การเตรียม Phosphate Buffer Saline (PBS 10X) pH 7.4

NaCl	80	กรัม
$Na_2HPO_4.2H_2O$	14.4	กรัม
KH_2PO_4	2.4	กรัม
KCl	2	กรัม

ละลายในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 7.4 ด้วย 1 *N* NaOH หรือ 20 % HCl เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรครบ 1,000 มิลลิลิตร เก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การเตรียม Phosphate Buffer Saline (PBS 1X) pH 7.4

PBS 10X	100	มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรครบ 1,000 มิลลิลิตร เก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การเตรียม Coating buffer (pH 9.6)

Na_2CO_3	1.5	กรัม
$NaHCO_3$	2.93	กรัม

ละลายในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 9.6 ด้วย 1 *N* NaOH หรือ 20 % HCl เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรครบ 1,000 มิลลิลิตร เก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การเตรียมสารละลายสำหรับการล้าง (washing buffer)

PBS 10X	400	มิลลิลิตร
Tween 20	2	มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรครบ 4,000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

การเตรียมสารละลาย 3 % fish gelatin

Fish gelatin	3	มิลลิลิตร
Coating buffer	100	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน เก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การเตรียม Substrate buffer pH 5

Citric acid (monohydrate) 10.30 กรัม

$Na_2HPO_4.12H_2O$ 18.16 กรัม

เติมน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 5 ด้วย 1 *N* NaOH หรือ 20 % HCl เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรครบ 1,000 มิลลิลิตร เก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การเตรียมสารละลายสำหรับพัฒนาสีของ ELISA

O-phenylenediamine acetate (O.P.D.) 0.018 กรัม

Substrate buffer 12 มิลลิลิตร

ทำในหลอดทดลองที่หุ้มด้วยอะลูมิเนียมฟอยด์เพื่อกันแสง เขย่าโดยใช้เครื่อง Vortex mixer เมื่อ O.P.D. ละลายแล้วจึงเติม 0.03 % ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) 20 ไมโครลิตร (เตรียมเมื่อใช้)

การเตรียมสารละลายหยุดปฏิกิริยา (stop solution)

H_2SO_4 (98 %) 21.36 มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรครบ 200 มิลลิลิตร เก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การเตรียม Iscove's Modified Dulbecco's medium (IMDM) pH 7.4

Iscove's Modified Dulbecco's medium 17.7 กรัม

$NaHCO_3$ 3.024 กรัม

2-mercaptoethamol (2-ME) 1 มิลลิลิตร

ละลาย IMDMและ $NaHCO_3$ ในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร กรองด้วย syringe filter ขนาด 0.2 ไมครอน ปรับ pH ให้ได้ 7.4 ด้วย 1 *N* NaOH หรือ 20 % HCl เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรครบ 1,000 มิลลิลิตร นำไปกรองในตู้ปลอดเชื้ออีกครั้งด้วย filter membrane ขนาด 0.1 ไมครอน ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 47 มิลลิเมตร ใช้กรวย filtration assembly ที่ประกอบเข้ากับ side arm flask ขนาด 1 ลิตร กรองโดยอาศัยเครื่องดูดสุญญากาศ (vacumm pump) ขณะกรองใส่ 2-ME เก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส อุ่นที่ 37 องศาเซลเซียสก่อนนำมาใช้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การเตรียม 10 % Fetal bovine serum (10 % FBS)

Fetal bovine serum 10 มิลลิลิตร

IMDM 90 มิลลิลิตร

Penstrep 2 มิลลิลิตร

เตรียมในตู้ปลอดเชื้อ เก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส อุ่นที่ 37 องศาเซลเซียสก่อนนำมาใช้

การเตรียม 2-mercaptoethamol (2-ME)

2-ME 35 ไมโครลิตร

ปรับปริมาตรให้ครบ 10 มิลลิลิตรด้วย IMDM เก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การเตรียม Binding buffer pH 7.0

$Na_2HPO_4.12H_2O$ 3.6 กรัม

ละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 7 ด้วย1 *N* NaOH หรือ 20 % HCl เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรครบ 1,000 มิลลิลิตร กรองด้วยด้วย syringe filter ขนาด 0.2 ไมครอน เก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การเตรียม Elution buffer pH 2.7

Glycine 0.75 กรัม

ละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 2.7 ด้วย1 *N* NaOH หรือ 20 % HCl เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรครบ 1,000 มิลลิลิตร กรองด้วยด้วย syringe filter ขนาด 0.2 ไมครอน เก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การเตรียม Neutralization buffer pH 9.0

Tris 157.6 กรัม

ละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 9 ด้วย1 *N* NaOH หรือ 20 % HCl เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรครบ 1,000 มิลลิลิตร กรองด้วยด้วย syringe filter ขนาด 0.2 ไมครอน เก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การเตรียม extender

Tris	3.028 กรัม
Citric acid	1.675 กรัม
Fructose	1.25 กรัม
Antibiotic	1 มิลลิลิตร

ใส่ Tris, Citric acid และ Fructose ในน้ำร้อนประมาณ 90 องศาเซลเซียส คนให้ละลายรอให้อุณหภูมิเหลือ 40 องศาเซลเซียสแล้วจึงเติม antibiotic จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รีดน้ำเชื้อพ่อโคขาวลำพูน โดยใช้โคเพศเมียที่เป็นสัดเป็นตัวล่อ

ตรวจคุณภาพน้ำเชื้อแล้วนำมาเจือจางด้วย extender เพื่อให้มีจำนวนสเปิร์ม 30 ล้านเซลล์ต่อหลอดน้ำเชื้อ 1 หลอด

ลดอุณหภูมิให้เหลือ 4 องศาเซลเซียส โดยบ่มในตู้เย็นเป็นเวลา 4 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

นำน้ำเชื้อมาบรรจุใส่หลอด โดยทำในตู้เย็นซึ่งควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส

เมื่อทำการบรรจุน้ำเชื้อใส่หลอดแล้ว ต้องทำการอุดด้วยผงอุดเพื่อปิดหลอดน้ำเชื้อ

หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เรียงน้ำเชื้อบนถาดเหล็กแล้วนำไปอังไอไนโตรเจนเพื่อลดอุณหภูมิให้ได้ประมาณ -196 องศาเซลเซียส แล้วทำการเก็บลงถังไนโตรเจน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวกรองสุรางค์ ดำรงศรี
วัน เดือน ปี เกิด	10 พฤศจิกายน 2526
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมปลาย โรงเรียนสุโขทัยวิทยาคม ปีการศึกษา 2543
	สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี วิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ.) สาขาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2547
ทุนการศึกษา	ได้รับทุนอุดหนุนบัณฑิตศึกษา โครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและ วิจัยสาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปี 2550-2551

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved