



บทที่ 2

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการศึกษา

วัสดุอุปกรณ์การศึกษา

1. สัตว์ทดลอง กระบือทดลองเป็นของสถานีบำรุงพันธุ์สัตว์สุรินทร์ กรมปศุสัตว์

1.1 แม่กระบือตัวให้ เป็นกระบือปลักอายุระหว่าง 4-15 ปี ซึ่งเคยผ่านการให้ลูกมาแล้วอย่างน้อย 1 ตัว

1.2 แม่กระบือตัวรับ เป็นกระบืออายุระหว่าง 5-12 ปี ซึ่งเคยผ่านการให้ลูกมาแล้ว

1.3 กระบือปลักพ่อพันธุ์ที่ได้รับการเบี่ยงเบนลิงค์แล้วจำนวน 1 ตัว สำหรับตรวจเช็คการเป็นสัดของแม่กระบือตัวให้และตัวรับ

2. โรงเรือนสำหรับการทดลอง

2.1 โรงเรือนเลี้ยง ชนิดเลี้ยงแบบปล่อยลาน ตัวโรงเรือนโปร่ง หลังคามุงกระเบื้อง พื้นปูนซีเมนต์ มีรางน้ำและรางอาหารพร้อม

2.2 โรงเรือนปฏิบัติการ เป็นโรงเรือนที่แบ่งพื้นที่เป็นของสำหรับบังคับสัตว์ทดลองเพื่อปฏิบัติงานได้สะดวก

3. อาหารสัตว์ทดลอง

อาหารหยาบ ให้หญ้าสด หญ้าหมัก หญ้าแห้ง ขึ้นอยู่กับฤดูกาล ร่วมกับอาหารข้นและปล่อยลงแปลงหญ้าในตอนกลางวัน

4. ออร์โมนที่ใช้ในการเหนี่ยวนำให้ตกไข่ครั้งละหลายใบ และควบคุมการเป็นสัด

4.1 PMSG (Folligon[®] - Intervet)

4.2 FSH

4.3 PGF alpha (Prosovin[®] - Intervet)

4.4 PRID (Sanofi[®] France)

5. อุปกรณ์ในการล้างเก็บตัวอ่อน

- 5.1 foley catheter (เบอร์ 18 และ 20)
- 5.2 cervical dilator
- 5.3 stylette
- 5.4 speculum
- 5.5 rubber cup connection
- 5.6 ข้อต่อรูปตัว Y
- 5.7 คีมห้ามเลือด (artery forceps)
- 5.8 สายยางท่อน้ำยาไหลเข้าออก
- 5.9 กระจกตวง (cylinder) ขนาด 500 ลบ.ซม.
- 5.10 กระจกน็อคยาพลาสติก (ขนาด 5, 10 และ 20 ลบ.ซม.)
- 5.11 เข็มฉีดยา No.18
- 5.12 ขอบบังคับสัตว์ที่ยกพื้นด้านหน้าสูง
- 5.13 ถู่มือล้างพลาสติก
- 5.14 ขาตั้ง
- 5.15 กระจกฉายภาพฟิล์ม
- 5.16 น้ำยาล้างเก็บตัวอ่อน*
- 5.17 ขากล่อมประสาท**
- 5.18 ยาชา (xylocaine hydrochloride 2%)
- 5.19 ยาฆ่าเชื้อโรคและยาปฏิชีวนะ
- 5.20 ตัวหล่อลื่น (KY-jelly® - Johnson)

* = Dulbecco's phosphate buffer saline

** = Xylazine hydrochloride (Rompun® - Bayer)

6. อุปกรณ์ในการตรวจหาและประเมินคุณภาพตัวอย่าง

- 6.1 กล้อง stereomicroscope
- 6.2 จานเลี้ยงเชื้อ (petri-dish)
- 6.3 สไลด์หลุม (4-wells)
- 6.4 น้ำยาล้างตัวอย่าง

7. อุปกรณ์ในการเก็บตัวอย่างแช่แข็ง

- 7.1 หลอดเก็บตัวอย่าง (French mini straw) ขนาดบรรจุ 0.25 ml
- 7.2 หลอดดูดตัวอย่าง
- 7.3 น้ำยาเลี้ยงตัวอย่าง
- 7.4 ไนโตรเจนเหลว
- 7.5 เทอร์โมมิเตอร์

8. อุปกรณ์อื่น ๆ

เช่น เครื่องชั่งน้ำหนักกระป๋อง อุปกรณ์ทำความสะอาด เป็นต้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีศึกษา

1. คัดเลือกแม่กระบือตัวให้และตัวรับแยกจากฝูง

ก่อนเริ่มทำการทดลอง ต้องทำการคัดเลือกแม่กระบือตัวให้และตัวรับแยกฝูงออกมาเลี้ยงต่างหาก ซึ่งการคัดเลือกกระทำโดยอาศัยพันธุ์ประวัติ (pedigree) โดยเลือกแม่กระบือตัวให้จำนวน 28 ตัว ซึ่งผ่านการให้ลูกมาแล้วอย่างน้อยหนึ่งตัว แล้วพักกระบือรวมฝูงในคอกที่มีสภาพการเลี้ยงดูอย่างเดียวกันนานประมาณ 2 เดือน ระหว่างนี้ทำการตรวจ วงรอบการเป็นสัดของกระบือทดลอง โดยใช้กระบือพ่อพันธุ์ที่เบี่ยงเบนลิงค์แล้วเข้าตรวจสอบการเป็นสัดวันละ 2 เวลาเช้าและเย็น ในช่วงเช้าหลังการตรวจสัด ปล่อยกระบือทดลองลงแทะเล็มในแปลงหญ้า กระบือจะได้รับอาหารข้นตัวละประมาณ 2 กิโลกรัม ในช่วงบ่ายหลังเข้าคอกเรียบร้อยแล้ว

2. การศึกษาทดลอง

การศึกษาแบ่งออกเป็น 4 การทดลอง ดังนี้

2.1 การทดลองที่ 1 ศึกษาทดลองกับแม่กระบือตัวให้ 9 ตัว ดำเนินงานตามวิธีของ อลงกลด แทนอมทอง (2535) ดังนี้

2.1.1 กระตุ้นแม่กระบือตัวให้ ให้มีไข่ตกมากกว่าสภาวะปกติด้วย PMSG ระดับ 2,000 I.U. ต่อตัว โดยฉีดเข้ากล้ามเนื้อเพียงครั้งเดียวหลังจากที่แม่กระบือแสดงอาการเป็นสัดโดยธรรมชาติ ช่วงวันที่ 9-13 ของวงรอบการเป็นสัด

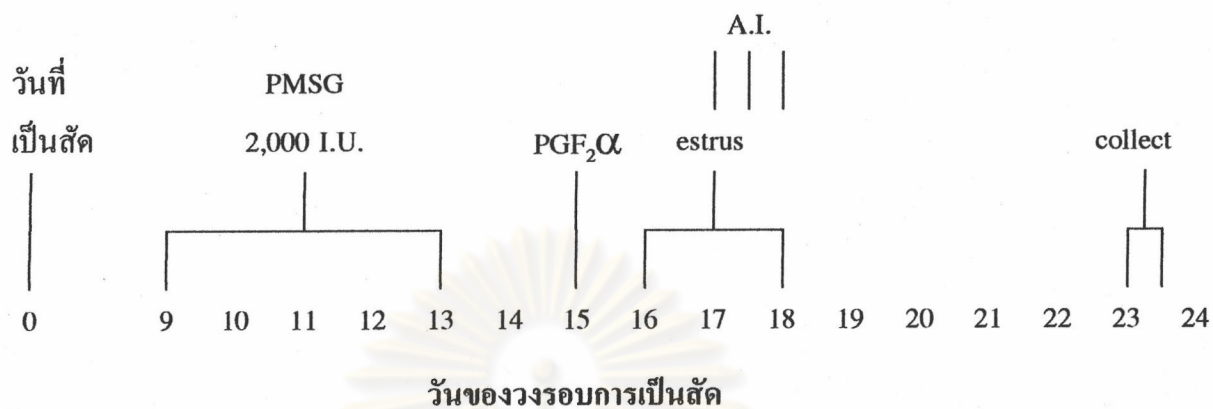
2.1.2 ต่อมาอีก 48 ชั่วโมง ทำการเหนี่ยวนำให้กระบือเป็นสัดด้วยการฉีด PGF₂ alpha 2 ml ต่อตัวเข้ากล้ามเนื้อ

2.1.3 หลังจากฉีด PGF₂ alpha 24-48 ชั่วโมงแล้ว ทำการตรวจสอบการเป็นสัด แล้วจึงทำการผสมเทียม โดยผสม 3 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 12 ชั่วโมง

2.1.4 หลังจากแม่กระบือเป็นสัด 6.0-6.5 วัน ทำการชะล้างตัวอ่อนตามวิธีของ Chainarong Lohachit et al. (1987)

2.1.5 นำน้ำยาที่ชะล้างตัวอ่อนออกมาได้ ไปตรวจหาและประเมิน คุณภาพตัวอ่อนภายใต้กล้อง stereomicroscope

2.1.6 ทำการเก็บตัวอ่อนในหลอดเก็บตัวอ่อน ขนาดบรรจุ 0.25 ml และทำการแช่แข็งตัวอ่อนที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส ในไนโตรเจนเหลว



หมายเหตุ

- วันที่ 0 = วันที่เริ่มต้นของการเป็นสัด
 A.I. = การผสมเทียม
 collect = การชะล้างเก็บตัวอ่อน

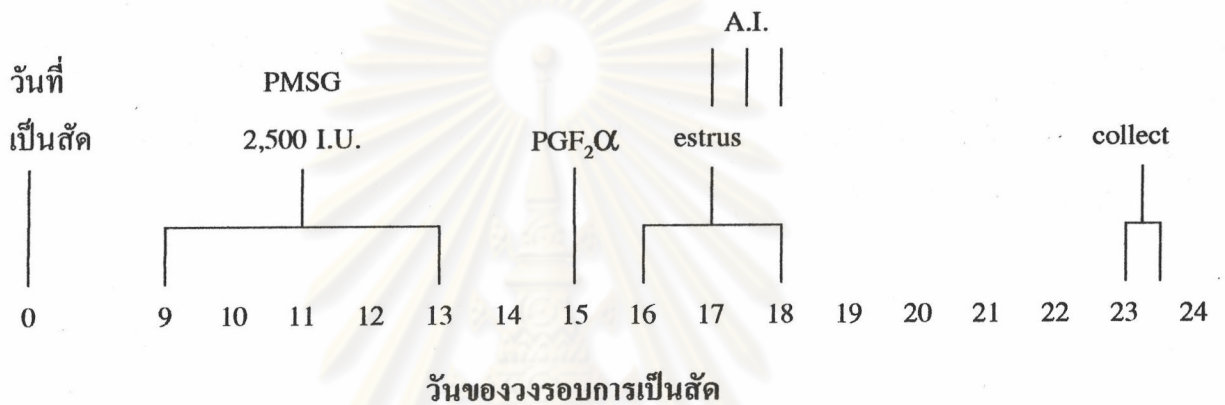
แผนภูมิที่ 1

แสดงโปรแกรมการกระตุ้นให้ไข่ตกเพิ่มขึ้นในการทดลองที่ 1 โดยใช้ PMSG ระดับ 2,000 I.U./ตัว ในวันที่ 9-13 หลังจากกระบือเป็นสัด ต่อมาอีก 48 ชั่วโมง ให้ PGF₂ alpha เมื่อกระบือเป็นสัด ทำการผสมเทียม โดยผสม 3 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 12 ชั่วโมง หลังจากกระบือเป็นสัด 6.0-6.5 วัน ทำการชะล้างเก็บตัวอ่อน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2 การทดลองที่ 2 ศึกษาจากแม่กระบือตัวให้ 9 ตัว

2.2.1 กระตุ้นแม่กระบือตัวให้ ให้มีไข่ตกมากกว่าสภาวะปกติด้วย PMSG จำนวน 2,500 I.U. ต่อตัว โดยฉีดเข้ากล้ามเนื้อเพียงครั้งเดียว หลังจากแสดงการเป็นสัดในช่วงวันที่ 9-13 ของวงรอบการเป็นสัด หลังจากนั้นดำเนินการเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 (ตั้งแต่ข้อ 2.1.2 - 2.1.6)



หมายเหตุ

วันที่ 0 = วันที่เริ่มต้นของการเป็นสัด

A.I. = การผสมเทียม

collect = การชะล้างเก็บตัวอ่อน

แผนภูมิที่ 2 แสดงโปรแกรมการกระตุ้นให้ไข่ตกเพิ่มขึ้น ในการทดลองที่ 2 โดยใช้ PMSG ระดับ 2,500 I.U./ตัว ในวันที่ 9-13 หลังจากกระบือเป็นสัด ต่อมาอีก 48 ชั่วโมง ให้ PGF₂ alpha เมื่อกระบือเป็นสัด ทำการผสมเทียม โดยผสม 3 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 12 ชั่วโมง หลังจากกระบือเป็นสัด 6.0-6.5 วัน ทำการชะล้างเก็บตัวอ่อน

2.3 การทดลองที่ 3 ศึกษาทดลองกับแม่กระบือตัวให้ 5 ตัว

2.3.1 แม่กระบือตัวให้ จะได้รับการเหนี่ยวนำให้เป็นสัดด้วย PRID โดยการสอดเข้าช่องคลอดคนาน 11 วัน ในขณะที่แม่กระบือตัวรับได้รับการเหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วย PGF₂ alpha 2 ครั้ง ห่างกัน 11 วัน (วันที่ฝัง PRID ในแม่ตัวให้ และฉีด PGF₂ alpha ครั้งที่หนึ่งในแม่ตัวรับเป็นวันเดียวกันถือเป็นวันที่ 0)

2.3.2 กระตุ้นแม่กระบือตัวให้ ให้มีไข่ตกมากกว่าสภาวะปกติด้วย PMSG ระดับ 2,500 I.U. ต่อตัว ในวันที่เอา PRID ออก และฉีด PGF₂ alpha 2 ml. ต่อตัว ก่อนฉีด PMSG และเอา PRID ออก 48 ชั่วโมง ในแม่กระบือตัวให้ ในขณะเดียวกันวันที่เอา PRID ออกในแม่กระบือตัวให้ ทำการฉีด PGF₂ alpha เข็มที่สองในแม่กระบือตัวรับ

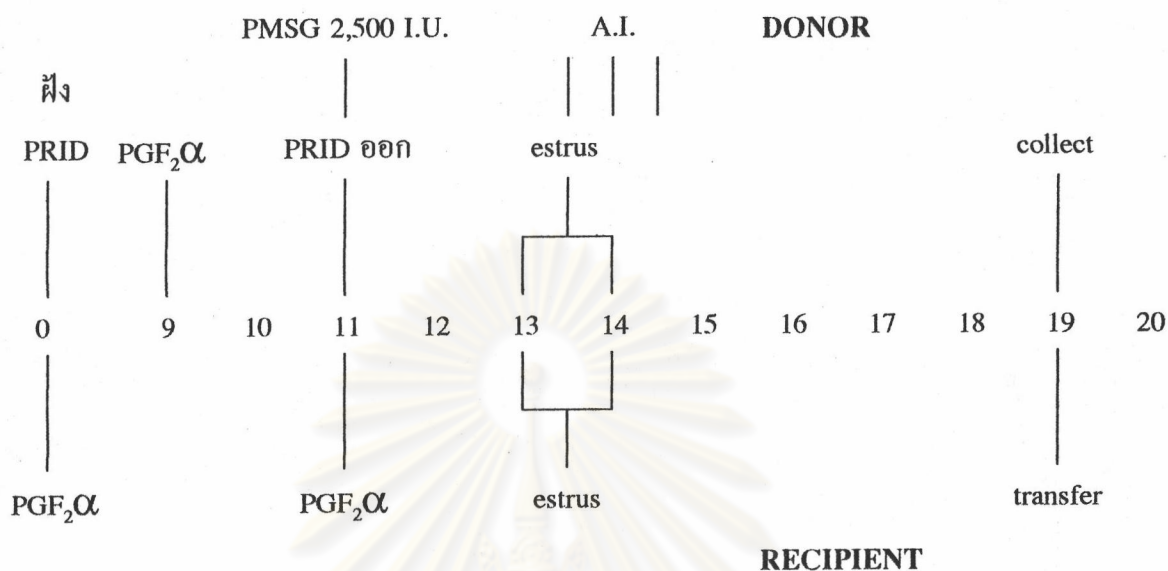
2.3.3 หลังเอา PRID ออกในแม่กระบือตัวให้ และฉีด PGF₂ alpha เข็มที่สอง ในแม่กระบือตัวรับ ทำการตรวจเช็คการเป็นสัดอย่างเข้มงวด โดยใช้กระบือพ่อพันธุ์ที่เบียงเบนถึงค้แล้ว

2.3.4 ทำการผสมเทียมแม่กระบือตัวให้ หลังจากแสดงอาการเป็นสัด 8-12 ชั่วโมง ผสม 3 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 12 ชั่วโมง ส่วนแม่กระบือตัวรับจะไม่ผสมปล่อยให้รอการถ่ายฝากตัวอ่อนต่อไป

2.3.5 ทำการชะล้างตัวอ่อนในวันที่ 6.0-6.5 หลังจากแม่กระบือเป็นสัด แล้ว ทำการตรวจหาและประเมินคุณภาพตัวอ่อนภายใต้กล้อง stereomicroscope

2.3.6 ทำการถ่ายฝากตัวอ่อนที่ชะล้างได้ไปยังแม่กระบือตัวรับ ที่มีวงจรการเป็นสัดเท่ากันหรือใกล้เคียงกันมากที่สุด หรือทำการละลายตัวอ่อนแช่แข็งจากการทดลองที่ 1 และ 2 เพื่อถ่ายฝากไปยังตัวรับ

2.3.7 ตรวจเช็คการตั้งท้องในแม่กระบือตัวรับ หลังถ่ายฝากตัวอ่อนแล้ว 90 วัน



หมายเหตุ

- วันที่ 0 = วันที่สอด PRID ในแม่กระบือตัวให้ และฉีด PGF₂ alpha ในแม่กระบือตัวรับ
- A.I. = การผสมเทียม
- collect = การชะล้างเก็บตัวอ่อน
- transfer = ย้ายฝากตัวอ่อนไปยังแม่กระบือตัวรับ

แผนภูมิที่ 3

(แถวบน) แสดงโปรแกรมการเหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วย PRID และกระตุ้นให้ตกไข่มากกว่าสภาวะปกติ ในการทดลองที่ 3 ด้วย PMSG ระดับ 2,500 I.U. ในแม่กระบือตัวให้ โดยให้วันเดียวกับที่เอา PRID ออก และให้ PGF₂ alpha 48 ชั่วโมงก่อนเอา PRID ออก เมื่อกระบือเป็นสัด ทำการผสมเทียม 3 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 12 ชั่วโมงหลังจากกระบือเป็นสัด 6.0-6.5 วัน ทำการชะล้างเก็บตัวอ่อน

(แถวล่าง) การเหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วย PGF₂ alpha ในแม่กระบือตัวรับ 2 ครั้ง ห่างกัน 11 วันเมื่อกระบือเป็นสัด รอรับการถ่ายฝากตัวอ่อนจากแม่กระบือตัวให้

2.4 การทดลองที่ 4 ศึกษาทดลองกับแม่กระบือตัวให้ 5 ตัว

2.4.1 แม่กระบือตัวให้และแม่กระบือตัวรับ จะได้รับการเหนี่ยวนำการเป็นสัด ด้วย PRID โดยสอดเข้าช่องคลอดเป็นเวลานาน 11 วัน

2.4.2 กระตุ้นแม่กระบือตัวให้ ให้มีไข่ตกมากกว่าสภาวะปกติด้วย FSH 32 mg ต่อตัว โดยแบ่งฉีดวันละ 2 ครั้ง เช้า เย็น เป็นเวลา 5 วัน ในปริมาณที่ลดลง โดยเริ่มเข็มที่หนึ่ง ในวันที่ 8 หลังจากฝัง PRID (วันที่ฝัง PRID เป็นวันที่ 0)

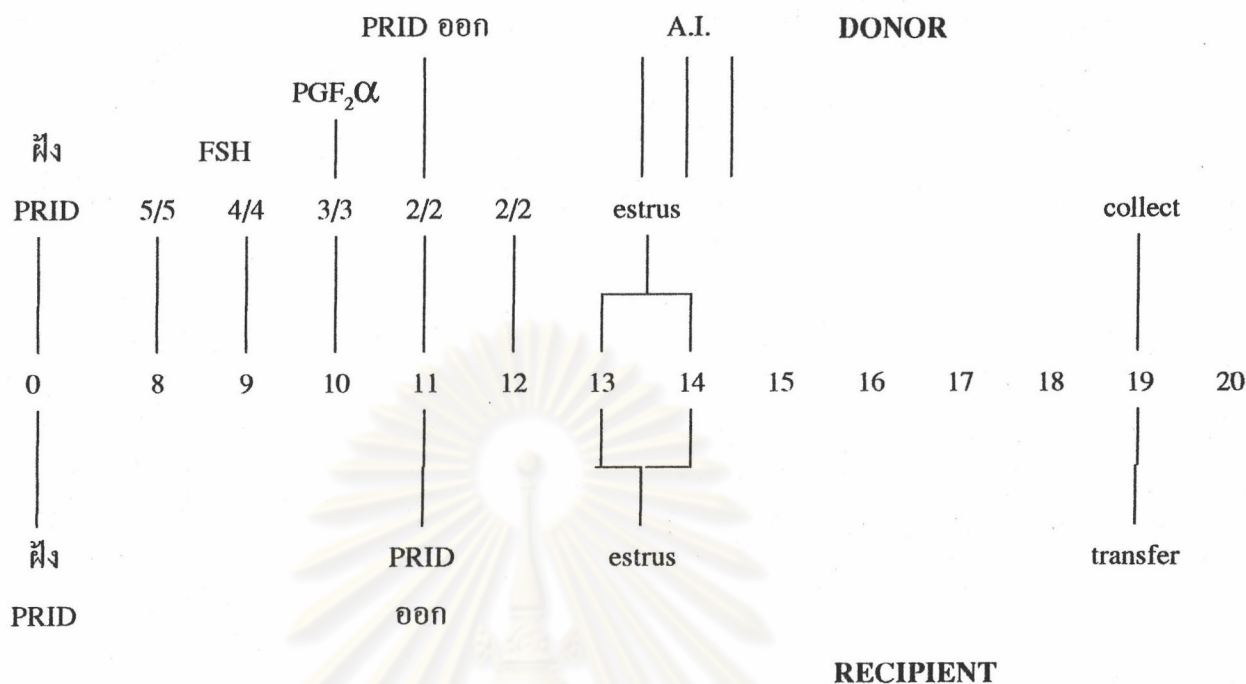
2.4.3 ฉีด PGF₂ alpha ต่อตัวในแม่กระบือตัวให้โดยให้ก่อนเอา PRID ออก 24 ชั่วโมง

2.4.4 หลังเอา PRID ออกในแม่กระบือตัวให้และแม่กระบือตัวรับ ทำการตรวจการเป็นสัดอย่างเข้มงวด ทำการผสมเทียมในแม่กระบือตัวให้หลังจากเป็นสัด 8-12 ชั่วโมง โดยผสม 3 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 12 ชั่วโมง ส่วนแม่กระบือตัวรับจะไม่ผสมปล่อยให้รอกการถ่าย ฝากตัวอ่อน

2.4.5 ดำเนินการเช่นเดียวกับการทดลองที่ 3 (ตั้งแต่ 2.3.5-2.3.7)



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



แผนภูมิที่ 4

(แถวบน) แสดงโปรแกรมการเหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วย PRID ในแม่กระบือตัวให้ และกระตุ้นให้ตกไข่มากกว่าสภาวะปกติ ในการทดลองที่ 4 ด้วย FSH 32 mg ต่อตัว โดยเริ่มให้ในวันที่ 8 หลังจากฝัง PRID และให้ติดต่อกันเป็นเวลา 5 วัน ในปริมาณที่ลดลง ให้วันละ 2 ครั้ง เข้าเย็น ก่อนเอา PRID ออก 24 ชั่วโมง ให้ PGF₂ alpha หลังเอา PRID ออก เมื่อกระบือเป็นสัด ทำการผสมเทียม 3 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 12 ชั่วโมง หลังเป็นสัด 6.0-6.5 ทำการชะล้างตัวอ่อน

(แถวล่าง) แสดงโปรแกรมการเหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วย PRID ในแม่กระบือตัวรับ หลังเอา PRID ออก เมื่อกระบือเป็นสัด รอรับการถ่ายฝากตัวอ่อนจากแม่กระบือตัวให้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย