รายงานวิจัย

เรื่อง

การย้อมสีเพื่อตรวจตัวเป็นตัวตายของอสุจิแพะโดยใช้สีทริพแพนบลู

Differential staining of goat spermatozoa with trypan blue

โดย

พีรศักดิ์ สุทธิโยธิน

คณะทรัพยากรธรรมชาติ

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Order Key 19098
BIB Key 157252

เลขหมู่ ...
เลขทะเบียน ...
30 มี.ค. 2542

การย้อมสีเพื่อตรวจตัวเป็นตัวตายของอสุจิแพะโดยใช้สีทริพแพนบลู

บทคัดย่อ

การย้อมสีตัวอสุจิแพะเพื่อตรวจตัวเป็นตัวตายโดยใช้สีทริพแพนบลู (trypan blue) พบว่าทริพแพนบลู สามารถย้อมติดสีอสุจิที่ตายและย้อมไม่ติดสีอสุจิที่มีชีวิต ในน้ำเชื้อที่ใช้กันอยู่เป็นประจำคือ น้ำเชื้อสด น้ำเชื้อที่กระทบต่อความเย็น น้ำเชื้อที่กระทบต่อความร้อน และน้ำเชื้อที่อุ่นไว้ที่ 37° เซลเซียส ได้ดีเทียบเท่ากับการย้อมสีโดยใช้สีอีโอซิน (eosin) ที่มีนิโกรซิน (nigrosin) เป็นสีพื้น

ผลจากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ค่าความสัมพันธ์ระหว่างตัวอสุจิที่ติดสีทั้งหัว ในตัวอย่างที่ย้อมด้วยทริพแพนบลูและที่ย้อมด้วยอีโอซิน สัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ทั้งในน้ำเชื้อสด ($r = 0.88$, $p < 0.001$) น้ำเชื้อที่กระทบต่อความเย็น ($r = 0.98$, $p < 0.001$) น้ำเชื้อที่กระทบต่อความร้อน ($r = 0.87$, $p < 0.001$) และน้ำเชื้อที่อุ่นไว้ที่ 37° เซลเซียส ($r = 0.86$, $p < 0.001$) ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างตัวอสุจิที่ติดสีครึ่งหัว ระหว่างที่ย้อมด้วยทริพแพนบลูและอีโอซิน ในน้ำเชื้อทุกแบบที่ทำการตรวจ ($p > 0.05$) ส่วนความสัมพันธ์ระหว่างตัวอสุจิที่ไม่ติดสีในส่วนหัวเมื่อย้อมด้วยทริพแพนบลูและอีโอซิน มีความสัมพันธ์อย่างนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งในน้ำเชื้อสด ($r = 0.87$, $p < 0.001$) น้ำเชื้อที่กระทบต่อความเย็น ($r = 0.98$, $p < 0.001$) น้ำเชื้อที่กระทบต่อความร้อน ($r = 0.85$, $p < 0.001$) และน้ำเชื้อที่อุ่นไว้ที่ 37° เซลเซียส($r = 0.85$, $p < 0.001$)

ความเย็นมีผลทำให้น้ำเชื้อมีอสุจิที่ติดสีเต็มหัวเพิ่มขึ้น การกระทบต่อความเย็นที่ 0° เซลเซียส เป็นเวลา 1, 2, 3 และ 5 นาที ทำให้การติดสีทริพแพนบลูเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 13.8 ± 0.9 ในน้ำเชื้อกลุ่มควบคุมเป็น 34.8 ± 4.6, 75.6 ± 2.2, 83.7 ± 2.1 และ 91.5 ± 0.6 ในน้ำเชื้อที่กระทบต่อความเย็นนาน 1, 2, 3 และ 5 นาที ตามลำดับ ($p <$

0.001) ในทำนองเดียวกันอสุจิติดสีอีโอซินเพิ่มขึ้นเมื่อกระทบต่อความเย็นนานขึ้น โดยพบว่าการติดสีเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 11.8 ± 1.0 ในน้ำเชื้อกลุ่มควบคุมเป็น 38.2 ± 3.6, 81.1 ± 2.5, 90.0 ± 1.7 และ 92.8 ± 0.8 ในน้ำเชื้อที่กระทบต่อความเย็นนาน 1, 2, 3 และ 5 นาที ตามลำดับ ($p < 0.001$)

ในน้ำเชื้อที่กระทบต่อความร้อนพบว่า การติดสีทริพแพนบลูมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น โดยพบการติดสีเต็มหัวร้อยละ 26.3 ± 2.2 ในน้ำเชื้อกลุ่มควบคุม และ 27.6 ± 3.0 ในน้ำเชื้อที่กระทบต่อความร้อนที่ 80° เซลเซียส นาน 2 วินาที มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) และเริ่มมีผลกระทบต่อการติดสีเมื่อกระทบต่อความร้อนนานมากขึ้น โดยเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมพบว่าร้อยละของการติดสีเต็มหัวเพิ่มเป็น 35.3 ± 2.4 ($p < 0.05$), 50.0 ± 2.1 ($p < 0.001$) และ 60.5 ± 1.8 ($p < 0.001$) ในน้ำเชื้อที่กระทบต่อความร้อนนาน 5, 10 และ 15 วินาที ตามลำดับ

ในทำนองเดียวกันอสุจิติดสีอีโอซินมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อกระทบต่อความร้อนนานขึ้น โดยพบว่าร้อยละของการติดสีเต็มหัวในน้ำเชื้อกลุ่มควบคุม (20.2 ± 1.4) และในน้ำเชื้อที่กระทบต่อความร้อนที่ 80° เซลเซียส นาน 2 วินาที (25.5 ± 2.3) มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) และเพิ่มขึ้นเป็น 29.5 ± 2.9 ($p < 0.05$), 46.3 ± 2.0 ($p < 0.001$) และ 57.2 ± 3.2 ($p < 0.001$) ในน้ำเชื้อที่กระทบต่อความร้อนนาน 5, 10 และ 15 วินาที ตามลำดับ

ผลของการเก็บน้ำเชื้อไว้ที่ 37° เซลเซียส เป็นเวลา 0, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง ในการทดลองนี้ไม่มีผลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยพบว่า การติดสีทริพแพนบลูมีค่าร้อยละ 33.8 ± 3.6, 41.3 ± 3.9, 42.4 ± 5.0 และ 37.5 ± 3.6 ในการเก็บไว้เป็นเวลา 0, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง ตามลำดับ ($p > 0.05$) ส่วนการติดสีอีโอซินมีค่าในทำนองเดียวกันคือติดสีร้อยละ 34.4 ± 3.8, 35.1 ± 3.4, 36.3 ± 4.1 และ 34.0 ± 4.2 ในการเก็บไว้เป็นเวลา 0, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง ตามลำดับ ($p > 0.05$)

การทดสอบความถูกต้องในการติดสีของตัวอสุจิที่ตายและการไม่ติดสีของอสุจิที่มีชีวิต ใช้วิธีเตรียมตัวอย่างน้ำเชื้อที่ทราบอัตราส่วนของอสุจิที่มีชีวิต (เคลื่อนที่) และทำการย้อมด้วยสีทริพแพนบลู และสีอีโอซิน โดยพบว่า การติดสีเต็มหัวทั้งทริพแพนบลู และอีโอ

ซิน มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับอัตราส่วนของอสุจิที่ไม่มีชีวิต (ไม่เคลื่อนที่) ($r = 0.93$ ในทริพแพนบลู, $p < 0.001$ และ $r = 0.91$ ในอีโอซิน, $p < 0.001$) นอกจากนั้นยังพบว่าการติดสีเต็มหัวของการย้อมสีทริพแพนบลู มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับการติดสีเต็มหัวของการย้อมสีอีโอซิน ($r = 0.97$, $p < 0.001$)

การทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าสีทริพแพนบลูให้ผลในการย้อมน้ำเชื้อแพะเพื่อตรวจตัวเป็นตัวตาย ได้อย่างถูกต้อง การติดสีมีค่าเทียบเคียงกับการย้อมด้วยสีอีโอซิน สามารถใช้ได้ในน้ำเชื้อหลายกลุ่มเช่น น้ำเชื้อสด น้ำเชื้อที่กระทบต่อความเย็น น้ำเชื้อที่กระทบต่อความร้อน และน้ำเชื้อที่อุ่นไว้ที่ 37° เซลเซียส ดังนั้นสีทริพแพนบลูจึงเป็นสีย้อมอีกชนิดหนึ่งที่สามารถใช้ย้อมอสุจิแพะเพื่อตรวจตัวเป็นตัวตายได้อย่างมีประสิทธิภาพ

Abstract

The ability of trypan blue to differentiate live and dead goat spermatozoa was studied and compare to that of eosin. Highly significant positive correlations were recorded between spermatozoa stained fully with trypan blue and eosin in fresh ($r = 0.88$, $p < 0.001$), cold shocked ($r = 0.98$, $p < 0.001$), hot shock ($r = 0.87$, $p < 0.001$) and aged ($r = 0.86$, $p < 0.001$) semen. There were, however, no significant correlations between half stained spermatozoa stained with trypan blue and eosin in fresh, cold shock, hot shock and aged semen sample studied. The correlation between the percentage of spermatozoa unstained with trypan blue and eosin was significant in fresh ($r = 0.87$, $p < 0.001$), cold shocked ($r = 0.98$, $p < 0.001$), hot shock ($r = 0.85$, $p < 0.001$) and aged ($r = 0.85$, $p < 0.001$) semen.

Cold shock increased the percentages of fully stained spermatozoa in both semen stained with trypan blue and eosin. For trypan blue, the percentages of fully stained spermatozoa increased from 13.8 ± 0.9 in control group to 34.8 ± 4.6, 75.6 ± 2.2, 83.7 ± 2.1 and 91.5 ± 0.6 in semen shocked for 1, 2, 3 and 5 minutes respectively (all $p < 0.001$). This pattern was the same for eosin and the percentaged of fully stained spermatozoa increased from 11.8 ± 1.0 in control group to 38.2 ± 3.6, 81.1 ± 2.5, 90.0 ± 1.7 and 92.8 ± 0.8 in semen shocked for 1, 2, 3 and 5 minutes respectively (all $p < 0.001$).

In hot shock semen the percentages of fully stained spermatozoa in both semen stained with trypan blue and eosin tended to increase and the effect showed when semen was shocked more than 2 seconds. For trypan blue, the percentaged of fully stained spermatozoa in control group (26.3 ± 2.2) was not different from semen shocked for 2 seconds (27.6 ± 3.0, $p > 0.05$) but increased to 35.3 ± 2.4 ($p < 0.05$), 50.0 ± 2.1 ($p < 0.001$) and 60.5 ± 1.8 ($p < 0.001$) in semen shocked for 5, 10 and 15 seconds respectively. This pattern revealed the same in semen

staiend with eosin and the percentaged of fully stained spermatozoa in control group (20.2 ± 1.4) was not different from semen shocked for 2 seconds (25.5 ± 2.3, $p > 0.05$) but increased to 29.5 ± 2.9 ($p < 0.05$), 46.3 ± 2.0 ($p < 0.001$) and 57.2 ± 3.2 ($p < 0.001$) in semen shocked for 5, 10 and 15 seconds respectively.

We found no different increased in the percentages of fully stained spermatozoa after incubation at 37° C for up to 3 hours. The percentages of stained spermatozoa stained with trypan blue were 33.8 ± 3.6, 41.3 ± 3.9, 42.4 ± 5.0 and 37.5 ± 3.6 in semen incubated for 0, 1, 2 and 3 hours respectively ($p > 0.05$). For eosin, the percentages of fully stained spermatozoa 34.4 ± 3.8, 35.1 ± 3.4, 36.3 ± 4.1 and 34.0 ± 4.2 in semen incubated for 0, 1, 2 and 3 hours respectively ($p > 0.05$).

Both trypan blue and eosin were a valid differential stains for buck spermatozoa and highly positive correlations were recorded between the known percentage of dead (immotile) spermatozoa and the percentage of fully stained spermatozoa ($r = 0.93$ for trypan blue, $p < 0.001$ and $r = 0.91$ for eosin, $p < 0.001$).

สารบัญ

การย้อมสีเพื่อตรวจตัวเป็นตัวตายของอสุจิแพะโดยใช้สีทริพแพนบลู ____ *1*

บทคัดย่อ ____ **1**

คำนำ ____ **6**

อุปกรณ์และวิธีการ ____ **8**

น้ำเชื้อและการรีดเก็บน้ำเชื้อ ____ 8

การย้อมสี ____ 9

การทดลองที่ 1 น้ำเชื้อสด ____ 11

การทดลองที่ 2 น้ำเชื้อที่กระทบต่อความเย็น ____ 11

การทดลองที่ 3 น้ำเชื้อที่กระทบต่อความร้อน ____ 12

การทดลองที่ 4 น้ำเชื้อที่อุ่นไว้ที่ 37° เซลเซียส ____ 12

การทดลองที่ 5 ความสัมพันธ์กับน้ำเชื้อที่ทราบอัตราส่วนของอสุจิที่เคลื่อนที่ ____ 13

การวิเคราะห์ข้อมูล ____ 14

ผลการทดลอง ____ **15**

การทดลองที่ 1 น้ำเชื้อสด ____ 15

การทดลองที่ 2 น้ำเชื้อที่กระทบต่อความเย็น ____ 15

การทดลองที่ 3 น้ำเชื้อที่กระทบต่อความร้อน ____ 19

การทดลองที่ 4 น้ำเชื้อที่อุ่นไว้ที่ 37° เซลเซียส ____ 22

การทดลองที่ 5 ความสัมพันธ์กับน้ำเชื้อที่ทราบอัตราส่วนของอสุจิที่เคลื่อนที่ ____ 24

วิจารณ์ ____ 29

กิตติกรรมประกาศ ____ 30

บรรณานุกรม ____ 31

คำนำ

การย้อมสีตัวอสุจิเพื่อตรวจตัวเป็นตัวตาย ใช้ทำการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ เพื่อตรวจสอบว่าน้ำเชื้อมีอสุจิที่มีชีวิตอยู่มากน้อยเท่าใด วิธีการนี้ใช้ตรวจยืนยันกับการตรวจการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิซึ่งการย้อมสีเป็นวิธีการที่ละเอียดกว่า แต่ก็ใช้เวลาในการตรวจมากกว่าเช่นกัน อย่างไรก็ตามการย้อมสีตัวอสุจิเพื่อตรวจตัวเป็นตัวตายก็ยังเป็นที่นิยมเนื่องจากให้ค่าความถูกต้องในการประมาณค่าตัวเป็นตัวตายได้ดี

สีที่นิยมใช้ในการตรวจตัวเป็นตัวตายโดยทั่วไปนิยมใช้สีอีโอซิน (eosin) โดยมีสีนิโกรซิน (nigrosin) เป็นสีพื้น โดยตั้งแต่ Lasley *et al.* (1942) ได้ค้นพบการย้อมสีอสุจิด้วยอีโอซิน ก็ได้มีการใช้อีโอซินเป็นสีย้อมเพื่อการตรวจตัวเป็นตัวตายของอสุจิในน้ำเชื้อของสัตว์ต่าง ๆ เป็นต้นมาถึงปัจจุบัน (Elliott, 1978)

วิธีการดังกล่าวใช้กันมาถึงปัจจุบันโดยได้พัฒนาดัดแปลงใช้ในสัตว์ชนิดต่าง ๆ กัน อย่างไรก็ตาม ยังมีรายงานแสดงให้เห็นถึงข้อด้อยของวิธีนี้ เช่น การพบเซลล์ที่ติสีเพิ่มมากขึ้นหลังจากเตรียมสไลด์ เมื่อมีกลีเซอรอลในสารเจือจางน้ำเชื้อ (Mixner and Saroff, 1954) หรือเกิดจากการเก็บสไลด์ที่ย้อมสีแล้วเป็นระยะเวลาหนึ่ง (Emmens, 1947; Buttle *et al.*, 1965) ดังนี้เป็นต้น

นอกจากนั้น ในการศึกษาการย้อมสี อะโครโซม (acrosome) เพื่อตรวจดู ปฏิกริยาอะโครโซม (acrosome reaction) ในกระบวนการปฏิสนธิ มีการใช้สีที่มีสีแดงย้อมส่วนหัวของ อะโครโซม ทำให้สับสนกับสีของอีโอซินในการย้อมตัวเป็นตัวตาย ได้มีการพยายามใช้ทริพ แพนบลู (trypan blue) เป็นตัวย้อมสีเพื่อตรวจตัวเป็นตัวตายแทนอีโอซินในสัตว์หลายชนิดเช่น แพะ (Kusunoki *et al.*, 1984) โค (Didion and Graves, 1986) แกะ (Didion *et al.*, 1989) ม้า (Didion *et al.*, 1989) และคน (Talbot and Chacon, 1981) แต่ยังมีรายงานการศึกษาวิธีการใช้ที่เหมาะสม และทดสอบความถูกต้องของการย้อมสีดังกล่าว รายงานออกมาน้อยมาก

Suttiyotin and Thwaites (1991, 1993) ได้ทำการศึกษาวิธีการย้อมดังกล่าวในแกะ และพบว่าวิธีการใช้ได้ผลดี แต่ยังไม่มีรายงานการใช้ในแพะ ดังนั้นการศึกษานี้มีจุดประสงค์หลักคือ

ก) ย้อมสีอสุจิของแพะด้วยทริพแพนบลู เปรียบเทียบกับการย้อมด้วยอีโอซิน ในน้ำเชื้อต่างๆ คือ น้ำเชื้อสด น้ำเชื้อที่กระทบต่อความเย็น น้ำเชื้อที่กระทบต่อความร้อน และน้ำเชื้อที่อุ่นไว้ที่ 37° เซลเซียส และ

ข) ทดสอบความถูกต้องของการติดสี โดยทำการย้อมน้ำเชื้อที่ทราบอัตราส่วนของอสุจิที่เคลื่อนที่ (มีชีวิต) และที่ไม่เคลื่อนที่ (ไม่มีชีวิต)

อุปกรณ์และวิธีการ

น้ำเชื้อและการรีดเก็บน้ำเชื้อ

น้ำเชื้อที่ใช้ได้จากการเก็บน้ำเชื้อจากแพะโตเต็มวัย โดยวิธีการกระตุ้นการหลั่งด้วยไฟฟ้า (พีรศักดิ์, 2528) ซึ่งทำการรีดเก็บในช่วงเช้าของแต่ละวัน การรีดเก็บน้ำเชื้อทุกครั้งทำการรีดเก็บน้ำเชื้อใส่ในหลอดทดลองปลายแหลมที่มีขีดวัดปริมาตร เมื่อรีดเก็บได้แล้วนำน้ำเชื้อใส่ในกระติกควบคุมอุณหภูมิเพื่อนำมายังห้องปฏิบัติการ กรณีที่มีการรีดเก็บหลายตัวอย่าง ในทุกครั้งที่รีดเก็บได้ใช้เวลารวมกันไม่เกิน 45 นาที ตั้งแต่รีดเก็บจนนำน้ำเชื้อมาถึงห้องทดลอง

การปฏิบัติการในห้องทดลอง ในเบื้องต้นน้ำเชื้อที่รีดเก็บได้มาหล่อเลี้ยงในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37° เซลเซียส ทำการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อเบื้องต้น ได้แก่

1. **ปริมาตร** โดยดูจากขีดวัดปริมาตรที่หลอดเก็บน้ำเชื้อ
2. **ความหนืด** (consistency) ประมาณด้วยสายตาออกเป็น 6 ระดับ (Salamon, 1976) คือ
   - ก. คล้ายครีมข้น
   - ข. คล้ายครีม
   - ค. คล้ายครีมจาง
   - ง. คล้ายนม
   - จ. ขุ่นเล็กน้อย
   - ฉ. ใสคล้ายน้ำ
3. **การเคลื่อนที่** (motility) หยดน้ำเชื้อลงบนกระจกส่องกล้องจุลทรรศน์ โดยไม่ทำการปิดกระจกบางทับ ส่องดูด้วนกล้องจุลทรรศน์ขนาดกำลังขยาย 150 เท่า ประมาณการเคลื่อนที่ด้วยสายตาแบ่งออกเป็น 11 ระดับ ตั้งแต่ 0 จนถึง 10 โดยค่า 10 เป็นค่าที่ดีที่สุด และ 0 เป็นค่าที่ต่ำที่สุด (Salamon, 1976)
4. **ความเข้มข้น** (concentration) ตรวจความเข้มข้นโดยใช้วิธีเทียบความเข้มข้นของแสง โดยการวัดค่าความเข้มข้นของแสง (optical density) ด้วยสเปคโตรโฟ

โตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร และทำการเปรียบเทียบหาค่าความเข้มข้นจากกราฟที่ได้เตรียมไว้ก่อนหน้านี้

ทำการคัดเลือกเฉพาะน้ำเชื้อที่มีความหนืดคล้ายครีมขึ้นไป, มีการเคลื่อนที่ไม่ต่ำกว่า 8 และมีความเข้มข้นไม่น้อยกว่า 2×10^{9} เซลล์/มล. มาใช้ในการทดลอง การตรวจการเคลื่อนที่ในแต่ละการทดลองเป็นการตรวจในสภาพที่น้ำเชื้อได้รับการเจือจางแล้ว ดังนั้นจึงทำการตรวจการเคลื่อนที่โดยใช้น้ำเชื้อ 50 ไมโครลิตร หยดลงบนกระจกส่องกล้องจุลทรรศน์ ที่อุ่นไว้ที่ 37° เซลเซียส ใช้กระจกบางขนาด 22×22 มม. ปิดทับ โดยใช้ความระมัดระวังให้กระจกบางปิดทับทุกส่วนของน้ำเชื้อและไม่มีฟองอากาศอยู่ภายใต้กระจกบาง หลังจากที่ได้ทำการปิดทับแล้ว ทั้งนี้เพื่อให้มีความหนาของน้ำเชื้อในการส่องตรวจมีค่าคงที่เพื่อลดความแปรปรวนในการประมาณค่าการเคลื่อนที่ การปฏิบัติดังกล่าวจะได้ความหนา (ความสูง) ของน้ำเชื้อที่ใช้ตรวจประมาณ 103 ไมครอน ซึ่งจะได้ค่าไม่ต่ำกว่า 60 ไมครอน เพื่อลดการรบกวนการว่ายในแนวตั้งของอสุจิตามที่ได้แนะนำไว้ (Rickmenspoel, 1962) หลังจากนั้นส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ขนาดกำลังขยาย 150 เท่า ประมาณการเคลื่อนที่ด้วยสายตาแบ่งออกเป็น 0 ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ โดยมีขั้นเพิ่มครั้งละ 10 เปอร์เซ็นต์

การย้อมสี

สีย้อมที่ใช้ในการทดลองคือ

1. ทริพแพนบลู ประกอบด้วย (Suttiyotin and Thwaites, 1991)

ก. ทริพแพนบลู	1.00	กรัม
ข. ทริส (Tris)	3.63	กรัม
ค. กลูโคส	0.49	กรัม
ง. กรดซิตริก	2.03	กรัม
จ. น้ำกลั่น เติมให้ครบ	100.00	มล.

2. อีโอซินนิโกรซิน ประกอบด้วย (Hancock, 1951)

ก. อีโอซิน	1.67	กรัม
ข. นิโกรซิน	10.00	กรัม
ค. น้ำกลั่น เติมให้ครบ	100.00	มล.

การย้อมสีทั้งของทริพแพนบลูและอีโอซิน ทำในหลอดทดลองขนาด 12×75 มม. โดยหยดสีและน้ำเชื้ออย่างละ 0.05 มล. ลงในหลอดทดลอง ควบคุมอุณหภูมิโดยใช้อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37° เซลเซียส สำหรับทริพแพนบลูใช้เวลาย้อม 1 นาที (Suttiyotin and Thwaites, 1991) และสำหรับอีโอซินใช้เวลาย้อม 5 นาที (Hancock, 1951)

หลังย้อมแล้ว ทำการเตรียมตัวอย่างให้เป็นรูปแผ่นบางเพื่อตรวจนับด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยการดูดตัวอย่างน้ำเชื้อที่ทำการย้อมแล้ว หยดลงบนสไลด์ที่ทำการอุ่นไว้ที่ 37° เซลเซียส ทำการสเมียร์ให้เป็นแผ่นบางโดยใช้สไลด์อีกแผ่นหนึ่งประกบเป็นมุมแหลมประมาณ 30° แล้วลากให้น้ำเชื้อแผ่เป็นแผ่นบางบนกระจก ทำให้แห้งโดยโบกในอากาศ นำสไลด์ที่เตรียมได้มาตรวจนับจำนวนอสุจิที่ติดสีและไม่ติดสี โดยส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ขนาดกำลังขยาย 400 เท่า และแบ่งแยกอสุจิดังนี้คือ

1. อสุจิที่ย้อมติดสีทั่วทั้งส่วนหัว
2. อสุจิที่ย้อมติดสีเฉพาะส่วนหลังอะโครโซม
3. อสุจิที่ย้อมไม่ติดสีในส่วนหัว

ทำการนับอย่างน้อยตัวอย่างละ 200 ตัว และนำส่วนที่มาวิเคราะห์ข้อมูลคือ ร้อยละของอสุจิที่ติดสีทั้งหัว ร้อยละของอสุจิที่ติดสีเพียงส่วนหลังอะโครโซม (ติดสีเพียงครึ่งหัว) และร้อยละของอสุจิที่ไม่ติดสีในส่วนหัว เพื่อไม่ให้มีข้อสงสัยจากปัจจัยของการเก็บสไลด์ที่ทำการสเมียร์แล้ว (Emmens, 1947; Buttle *et al.*, 1965) ในการทดลองที่รายงานนี้ได้ทำการอ่านสไลด์ให้แล้วแสร็จภายในวันที่ทำการสเมียร์

การทดลองที่ 1 น้ำเชื้อสด

ทำการรีดเก็บน้ำเชื้อครั้งละ 5 ตัวอย่าง จากแพะ 5 ตัว ทำการคัดน้ำเชื้อตามที่ได้อธิบายไว้ข้างต้น

นำน้ำเชื้อที่ผ่านการคัดเลือกแล้วแต่ละตัวอย่างมาเจือจางด้วยสารละลายทริสกลูโคส (ประกอบด้วยทริส 300 mM, กลูโคส 28 mM ในน้ำกลั่น และปรับ pH ด้วยกรดซิตริกจนได้ค่าเป็นกลาง; Suttiyotin and Thwaites, 1991) เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1×10^{9} เซลล์/มล. ทำการย้อมตัวอย่างน้ำเชื้อทั้ง 13 ตัวอย่าง ด้วยสีทั้ง 2 ชนิด ตามที่ได้อธิบายไว้แล้ว ทำซ้ำในแต่ละตัวอย่างให้ได้ทั้งสิ้น 4 ซ้ำ ทำการอ่านตัวอสุจิในแต่ละสไลด์ให้ได้ 200 ตัว โดยแยกเป็นชนิดต่างๆ ตามที่ได้อธิบายไว้แล้ว

และทำซ้ำอีกหลังจากทำการทดลองในชุดแรกเสร็จสิ้น รวมได้น้ำเชื้อที่ใช้ทั้งสิ้นจำนวน 13 ตัวอย่าง

การทดลองที่ 2 น้ำเชื้อที่กระทบต่อความเย็น

ทำการรีดเก็บน้ำเชื้อจากแพะอย่างน้อย 5 ตัว ทำการคัดน้ำเชื้อตามที่ได้อธิบายไว้ข้างต้น นำน้ำเชื้อที่คัดได้ (อย่างน้อยจากแพะ 5 ตัว) มารวมกัน เจือจางด้วยสารละลายทริสกลูโคส เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1×10^{9} เซลล์/มล. แบ่งน้ำเชื้อเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มละ 4 ซ้ำ ทำการช้อคโดยการจุ่มหลอดทดลองในอ่างน้ำแข็ง โดยให้กลุ่มแรกเป็นกลุ่มควบคุม กลุ่มที่ 2 จุ่มไว้เป็นเวลา 1 นาที กลุ่มที่ 3 จุ่มไว้เป็นเวลา 2 นาที กลุ่มที่ 4 จุ่มไว้เป็นเวลา 3 นาที และกลุ่มที่ 5 จุ่มไว้เป็นเวลา 5 นาที หลังจากกระทบด้วยความเย็นแล้ว นำหลอดทดลองมาควบคุมอุณหภูมิโดยใช้อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37° เซลเซียส ก่อนทำการย้อมสี

ทำการย้อมตัวอย่างน้ำเชื้อจากน้ำเชื้อ 5 กลุ่ม กลุ่มละ 4 ซ้ำ ในทันทีหลังการกระทบด้วยความเย็น โดยใช้สีทริพแพนบลู และสีอีโอซินตามที่ได้อธิบายไว้ข้างต้น ทำการสเมียร์และทำการอ่านตัวอสุจิในแต่ละสไลด์ให้ได้ 200 ตัว โดยแยกเป็นชนิดต่างๆ ตามที่ได้อธิบายไว้แล้ว

ทำการรีดเก็บน้ำเชื้อ จุ่มเพื่อกระทบต่อความเย็น และย้อมสี ซ้ำอีก 2 ครั้ง รวมได้น้ำเชื้อที่ใช้ทั้งสิ้นจำนวน 3 ชุดน้ำเชื้อ

การทดลองที่ 3 น้ำเชื้อที่กระทบต่อความร้อน

ทำการรีดเก็บน้ำเชื้อจากแพะอย่างน้อย 5 ตัว ทำการคัดน้ำเชื้อตามที่ได้อธิบายไว้ข้างต้น นำน้ำเชื้อที่คัดได้ (อย่างน้อยจากแพะ 5 ตัว) มารวมกัน เจือจางด้วยสารละลายทริสกลูโคส เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1×10^{9} เซลล์/มล. แบ่งน้ำเชื้อเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มละ 4 ซ้ำ ทำการช้อคโดยการจุ่มหลอดทดลองในอ่างน้ำอุณหภูมิที่ 80° เซลเซียส โดยให้กลุ่มแรกเป็นกลุ่มควบคุม กลุ่มที่ 2 จุ่มไว้เป็นเวลา 2 วินาที กลุ่มที่ 3 จุ่มไว้เป็นเวลา 5 วินาที กลุ่มที่ 4 จุ่มไว้เป็นเวลา 10 วินาที และกลุ่มที่ 5 จุ่มไว้เป็นเวลา 15 วินาที หลังจากกระทบด้วยความร้อนแล้ว นำหลอดทดลองมาควบคุมอุณหภูมิโดยใช้อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37° เซลเซียส

ทำการย้อมตัวอย่างน้ำเชื้อจากน้ำเชื้อ 5 กลุ่ม กลุ่มละ 4 ซ้ำ ในทันทีหลังการกระทบด้วยความร้อน โดยใช้สีทริพแพนบลู และสีอีโอซินตามที่ได้อธิบายไว้ข้างต้น ทำการสเมียร์และทำการอ่านตัวอสุจิในแต่ละสไลด์ให้ได้ 200 ตัว โดยแยกเป็นชนิดต่างๆ ตามที่ได้อธิบายไว้แล้ว

ทำการรีดเก็บน้ำเชื้อ จุ่มเพื่อกระทบต่อความร้อน และย้อมสี ซ้ำอีก 2 ครั้ง รวมได้น้ำเชื้อที่ใช้ทั้งสิ้นจำนวน 3 ชุดน้ำเชื้อ

การทดลองที่ 4 น้ำเชื้อที่อุ่นไว้ที่ 37° เซลเซียส

ทำการรีดเก็บน้ำเชื้อจากแพะอย่างน้อย 5 ตัว ทำการคัดน้ำเชื้อตามที่ได้อธิบายไว้ข้างต้น นำน้ำเชื้อที่คัดได้ (อย่างน้อยจากแพะ 5 ตัว) มารวมกัน เจือจางด้วยสารละลายทริสกลูโคส เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1×10^{9} เซลล์/มล. แบ่งน้ำเชื้อเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 4 ซ้ำ ทำการอุ่นน้ำเชื้อในหลอดทดลองโดยควบคุมไว้ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37° เซลเซียส โดยให้กลุ่มแรกเป็นกลุ่มควบคุม กลุ่มที่ 2 อุ่นไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง กลุ่มที่ 3 อุ่นไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และกลุ่มที่ 4 อุ่นไว้เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หลังอุ่นไว้เป็นระยะ

เวลาต่างๆ กันแล้ว นำหลอดทดลองมาควบคุมอุณหภูมิโดยใช้อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37° เซลเซียส

ทำการย้อมตัวอย่างน้ำเชื้อจากน้ำเชื้อ 4 กลุ่ม กลุ่มละ 4 ซ้ำ ในทันทีหลังจากอุ่นไว้เป็นระยะเวลาต่างๆ กันแล้ว โดยใช้สีทริพแพนบลู และสีอีโอซินตามที่ได้อธิบายไว้ข้างต้น ทำการสเมียร์และทำการอ่านตัวอสุจิในแต่ละสไลด์ให้ได้ 200 ตัว โดยแยกเป็นชนิดต่างๆ ตามที่ได้อธิบายไว้แล้ว

ทำการรีดเก็บน้ำเชื้อ จากอุ่นไว้เป็นระยะเวลาต่างๆ และย้อมสี ซ้ำอีก 3 ครั้ง รวมได้น้ำเชื้อที่ใช้ทั้งสิ้นจำนวน 4 ชุดน้ำเชื้อ

การทดลองที่ 5 ความสัมพันธ์กับน้ำเชื้อที่ทราบอัตราส่วนของอสุจิที่เคลื่อนที่

การทดลองนี้ตั้งจุดประสงค์เพื่อทดสอบความเที่ยงตรงในการย้อมสีของทริพแพนบลูและเปรียบเทียบกับสีย้อมอีโอซิน การทดลองใช้น้ำเชื้อที่ทราบอัตราส่วนของอสุจิที่เคลื่อนที่ซึ่งสามารถเตรียมได้โดยผสมน้ำเชื้อสดกับน้ำเชื้อที่ไม่มีการเคลื่อนที่ (ไม่มีชีวิต) ที่ได้เตรียมไว้ก่อนหน้าแล้ว การผสมในอัตราส่วนต่างๆ กันจะได้น้ำเชื้อที่มีอสุจิที่มีชีวิตและไม่มีชีวิตในจำนวนที่ทราบได้ ดังนั้นการย้อมสีและอ่านตัวอสุจิที่ติดสีจึงสามารถตรวจสอบความถูกต้องในการย้อมของสีชนิดต่างๆ ได้

การเตรียมน้ำเชื้อที่ทราบอัตราส่วนของอสุจิที่เคลื่อนที่ (Suttiyotin and Thwaites, 1991) มีวิธีการคือ รีดเก็บน้ำเชื้อจากแพะอย่างน้อย 8 ตัว ทำการรวมน้ำเชื้อทั้งหมดเข้าด้วยกัน แล้วทำการล้างด้วยสารละลายทริสกลูโคส โดยการปั่นน้ำเชื้อที่ 600 *g* เป็นเวลา 15 นาที เทสารละลายด้านบนออกและเติมด้วยสารละลายทริสกลูโคส หลังจากนั้นทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้อง (28° เซลเซียส) และทำการตรวจการเคลื่อนที่ของอสุจิด้วยกล้องจุลทรรศน์ขนาดกำลังขยาย 150 เท่า จากตัวอย่างน้ำเชื้อเป็นระยะๆ จนกระทั่งไม่มีตัวอสุจิที่เคลื่อนที่ได้หลงเหลืออยู่ ทำการล้างอสุจิด้วยสารละลายทริสกลูโคส ตามวิธีข้างต้นหลายๆ ครั้ง ทำการตรวจจนแน่ใจว่าไม่มีอสุจิที่มีชีวิตหลงเหลืออยู่แล้วจึงล้างครั้งสุดท้าย ทำการตรวจความเข้มข้นโดยการนับด้วนเครื่องนับเม็ดเลือดแดง และเจือจางน้ำเชื้อด้วย

สารละลายทริสกลูโคสให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1×10^{9} เซลล์/มล. เก็บน้ำเชื้อที่ได้ไว้ในตู้เย็นเป็นสารละลายที่ประกอบด้วยอสุจิที่ไม่มีชีวิต

ทำการรีดเก็บน้ำเชื้อจากแพะอย่างน้อย 5 ตัว ทำการคัดน้ำเชื้อตามที่ได้อธิบายไว้ข้างต้น นำน้ำเชื้อที่คัดได้ (อย่างน้อยจากแพะ 5 ตัว) มารวมกัน เจือจางด้วยสารละลายทริสกลูโคส เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1×10^{9} เซลล์/มล. ทำการตรวจการเคลื่อนที่ของอสุจิจากตัวอย่างน้ำเชื้อที่เจือจาง ทำการอุ่นและควบคุมอุณหภูมิน้ำเชื้อที่ประกอบด้วยอสุจิที่ไม่มีชีวิต (ที่เตรียมไว้แล้ว) ไว้ที่ 37° เซลเซียส และนำน้ำเชื้อที่ได้มาผสมกับน้ำเชื้อที่ประกอบด้วยอสุจิที่ไม่มีชีวิต ในอัตราส่วน 1:0, 3:1, 1:1, 1:3 และ 0:1 และควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 37° เซลเซียส ทำการย้อมสีน้ำเชื้อทั้ง 5 กลุ่ม กลุ่มละ 4 ซ้ำ โดยใช้ทริพแพนบลู และสีอีโอซินตามที่ได้อธิบายไว้แล้ว ทำการคำนวณร้อยละของอสุจิที่มีชีวิตในน้ำเชื้อทั้ง 5 กลุ่ม โดยใช้ค่าการเคลื่อนที่ที่ตรวจได้ในน้ำเชื้อสดและค่าตัวอสุจิที่ตาย (มีชีวิต 0 เปอร์เซ็นต์) จากน้ำเชื้อที่เตรียมไว้ก่อนหน้า

ทำการย้อมตัวอย่างน้ำเชื้อจากน้ำเชื้อทั้ง 5 กลุ่ม กลุ่มละ 4 ซ้ำ โดยใช้สีทริพแพนบลูและสีอีโอซินตามที่ได้อธิบายไว้ข้างต้น ทำการสเมียร์และทำการอ่านตัวอสุจิในแต่ละสไลด์ให้ได้ 200 ตัว โดยแยกเป็นชนิดต่างๆ ตามที่ได้อธิบายไว้แล้ว

ทำการรีดเก็บน้ำเชื้อ รวมน้ำเชื้อ ตรวจคุณภาพ เตรียมตัวอย่างน้ำเชื้อที่มีอัตราส่วนของอสุจิที่มีชีวิตต่างๆ กัน และย้อมสี ซ้ำอีก 3 ครั้ง รวมได้น้ำเชื้อที่ใช้ทั้งสิ้นจำนวน 4 ชุด น้ำเชื้อ

การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลร้อยละของอสุจิที่ติดสีเต็มหัว และอสุจิที่ไม่ติดสี ของน้ำเชื้อที่ย้อมสีทริพแพนบลูและสีอีโอซิน นำมาวิเคราะห์สหสัมพันธ์ (correlation analysis) และวิเคราะห์การถดถอย (regression analysis) ส่วนข้อมูลเกี่ยวกับกลุ่มทดลองที่ได้รับผลกระทบจากความเย็น ความร้อน และการเก็บไว้ที่ 37° เซลเซียส นำมาทำการวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) และทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยโดย Duncan's new multiple range test (Steel and Torrie, 1980)

ผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 น้ำเชื้อสด

น้ำเชื้อสดที่ได้รับการย้อมสีด้วยทริพแพนบลูและอีโอซิน มีค่าร้อยละของอสุจิที่ติดสีเต็มหัวมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($r = 0.88$, $p < 0.001$, ตารางที่ 1) ส่วนค่าความสัมพันธ์ของร้อยละของอสุจิที่ติดสีครึ่งหัวในสีย้อมทริพแพนบลูกับอีโอซินไม่มีความสัมพันธ์กันทางสถิติ ($r = -0.08$, $p > 0.05$) สำหรับค่าร้อยละของอสุจิที่ไม่ติดสีที่หัวมีความสัมพันธ์ระหว่างสีย้อมทริพแพนบลูกับอีโอซินอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($r = 0.87$, $p < 0.001$)

การทดลองที่ 2 น้ำเชื้อที่กระทบต่อความเย็น

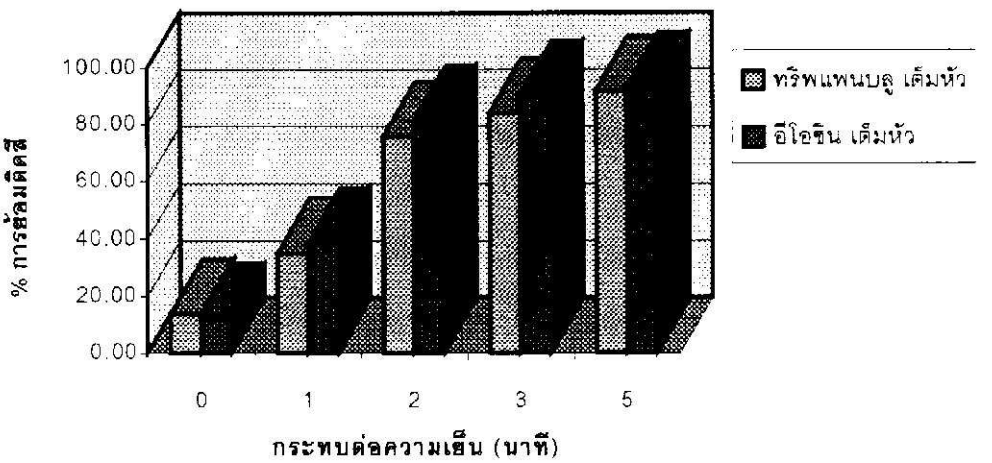
น้ำเชื้อที่กระทบต่อความเย็นในระดับต่าง ๆ กัน เมื่อได้รับการย้อมสีด้วยทริพแพนบลูและอีโอซิน มีค่าร้อยละของอสุจิที่ติดสีเต็มหัวมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($r = 0.98$, $p < 0.001$, ตารางที่ 1) ส่วนค่าความสัมพันธ์ของร้อยละของอสุจิที่ติดสีครึ่งหัวในสีย้อมทริพแพนบลูกับอีโอซินไม่มีความสัมพันธ์กันทางสถิติ ($r = 0.16$, $p > 0.05$) สำหรับค่าร้อยละของอสุจิที่ไม่ติดสีที่หัวมีความสัมพันธ์ระหว่างสีย้อมทริพแพนบลูกับอีโอซินอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($r = 0.98$, $p < 0.001$)

ผลของการกระทบต่อความเย็นทำให้น้ำเชื้อมีอสุจิที่ติดสีเต็มหัวเพิ่มขึ้น การกระทบต่อความเย็นที่ 0° เซลเซียส เป็นเวลา 1, 2, 3 และ 5 นาที ทำให้การติดสีทริพแพนบลูเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 13.8 ± 0.88 ในน้ำเชื้อกลุ่มควบคุมเป็น 34.8 ± 4.6, 75.6 ± 2.2, 83.7 ± 2.1 และ 91.5 ± 0.6 ในน้ำเชื้อที่กระทบต่อความเย็นนาน 1, 2, 3 และ 5 นาที ตามลำดับ ($p < 0.001$, รูปที่ 1) ในทำนองเดียวกันอสุจิติดสีอีโอซินเพิ่มขึ้นเมื่อกระทบต่อความเย็นนานขึ้น โดยพบว่าการติดสีเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 11.8 ± 1.0 ในน้ำเชื้อกลุ่มควบคุมเป็น 38.2 ± 3.6, 81.1 ± 2.5, 90.0 ± 1.7 และ 92.8 ± 0.8 ในน้ำเชื้อที่กระทบต่อความเย็นนาน 1, 2, 3 และ 5 นาที ตามลำดับ ($p < 0.001$)

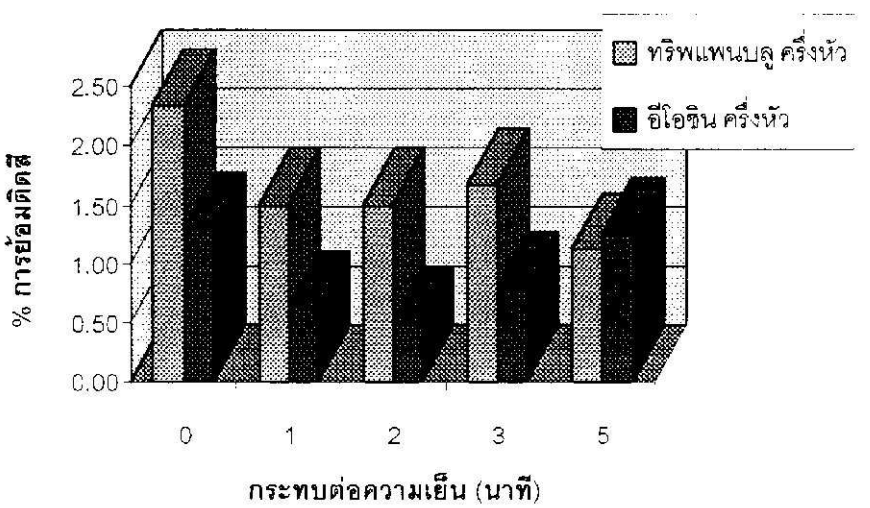
ตารางที่ 1 ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Coefficients of correlation) ระหว่างอสุจิที่ย้อมติดสีทริพแพนบลูและอีโอซิน

ทริพแพนบลู	อีโอซิน	น้ำเชื้อ			
		สด	กระทบความเย็น	กระทบความร้อน	อุ่นเก็บ
ติดสีเต็มหัว	ติดสีเต็มหัว	0.88*	0.98*	0.87*	0.86*
	ติดสีครึ่งหัว	-0.20	-0.06	-0.04	0.03
	ไม่ติดสี	-0.87*	-0.98*	-0.85*	-0.86*
ติดสีครึ่งหัว	ติดสีเต็มหัว	0.23	-0.38	0.06	-0.17
	ติดสีครึ่งหัว	-0.08	0.16	0.01	-0.14
	ไม่ติดสี	-0.22	0.38	-0.24	0.17
ไม่ติดสี	ติดสีเต็มหัว	-0.99*	-0.98*	-0.86*	-0.85*
	ติดสีครึ่งหัว	0.06	0.06	0.04	-0.02
	ไม่ติดสี	0.87*	0.98*	0.85*	0.85*

* $p < 0.001$

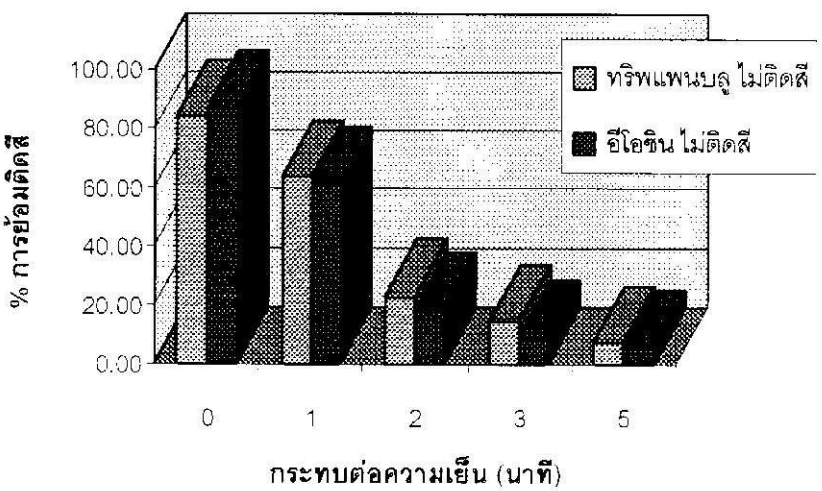


รูปที่ 1 ผลของการกระทบน้ำเชื้อแพะต่อความเย็นเป็นเวลา 0, 1, 2, 3, และ 5 นาที ที่มีต่อร้อยละของการย้อมติดสีทริพแพนบลูเต็มหัวของอสุจิ และย้อมติดสีอีโอซินเต็มหัวของอสุจิ



รูปที่ 2 ผลของการกระทบน้ำเชื้อแพะต่อความเย็นเป็นเวลา 0, 1, 2, 3, และ 5 นาที ที่มีต่อร้อยละของการย้อมติดสีทริพแพนบลูครึ่งหัวของอสุจิ และย้อมติดสีอีโอซินครึ่งหัวของอสุจิ

ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ในน้ำเชื้อที่กระทบต่อความเย็น และย้อมติดสีครึ่งหัวของอสุจิ ทั้งในการย้อมด้วยทริพแพนบลูและอีโอซิน (รูปที่ 2) และมีค่าระหว่าง 1.1 ถึง 2.8 เมื่อย้อมสีทริพแพนบลู และมีค่าค่าระหว่าง 0.5 ถึง 1.3 เมื่อย้อมสีอีโอซิน แต่มีแนวโน้มว่าการติดสีครึ่งหัวลดลงเมื่อกระทบต่อความเย็นนานขึ้น ส่วนการย้อมไม่ติดสีในส่วนหัวของอสุจิพบว่า การกระทบต่อความเย็นที่ 0° เซลเซียส เป็นเวลา 1, 2, 3 และ 5 นาที ทำให้การติดสีทริพแพนบลูลดลงจากร้อยละ 83.8 ± 1.0 ในน้ำเชื้อกลุ่มควบคุมเป็น 63.7 ± 4.6, 22.9 ± 2.3, 14.7 ± 2.0 และ 7.4 ± 0.7 ในน้ำเชื้อที่กระทบต่อความเย็นนาน 1, 2, 3 และ 5 นาที ตามลำดับ ($p < 0.001$, รูปที่ 3) ในทำนองเดียวกันอสุจิติดสีอีโอซินลดลงเมื่อกระทบต่อความเย็นนานขึ้น โดยพบว่าการติดสีลดลงจากร้อยละ 86.9 ± 1.1 ในน้ำเชื้อกลุ่มควบคุมเป็น 61.2 ± 3.6, 18.4 ± 2.6, 9.2 ± 1.7 และ 6.0 ± 0.9 ในน้ำเชื้อที่กระทบต่อความเย็นนาน 1, 2, 3 และ 5 นาที ตามลำดับ ($p < 0.001$)

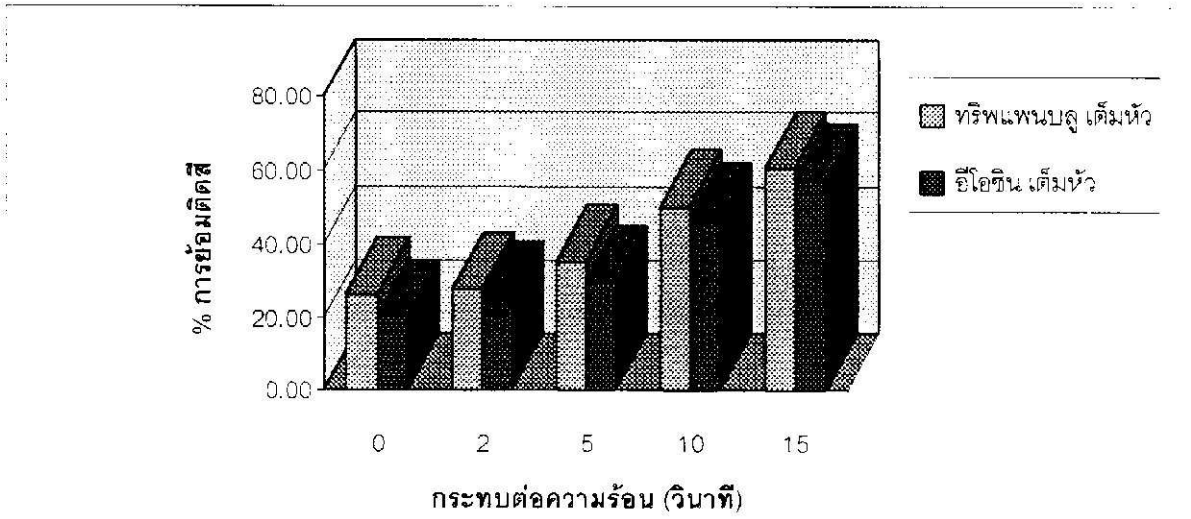


รูปที่ 3 ผลของการกระทบน้ำเชื้อแพะต่อความเย็นเป็นเวลา 0, 1, 2, 3, และ 5 นาที ที่มีต่อร้อยละของการย้อมไม่ติดสีทริพแพนบลูในส่วนหัวของอสุจิ และย้อมไม่ติดสีอีโอซินในส่วนหัวของอสุจิ

การทดลองที่ 3 น้ำเชื้อที่กระทบต่อความร้อน

ผลจากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ค่าความสัมพันธ์ระหว่างตัวอสุจิที่ติดสีทั้งหัว ในตัวอย่างที่ย้อมด้วยทริพแพนบลูและที่ย้อมด้วยอีโอซิน สัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ทั้งในน้ำเชื้อที่กระทบต่อความร้อน ($r = 0.87$, $p < 0.001$) และน้ำเชื้อที่อุ่นไว้ที่ 37° เซลเซียส ($r = 0.86$, $p < 0.001$, ตารางที่ 1)

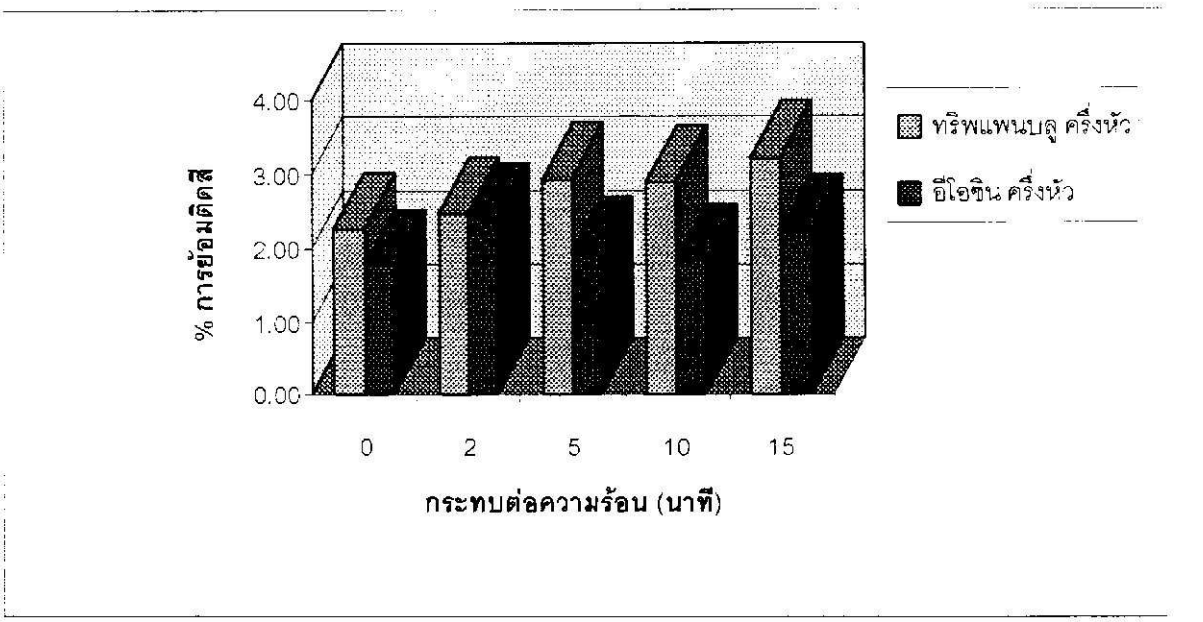
ในน้ำเชื้อที่กระทบต่อความร้อนพบว่า การติดสีทริพแพนบลูมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น โดยพบการติดสีเต็มหัวร้อยละ 26.3 ± 2.2 ในน้ำเชื้อกลุ่มควบคุม และ 27.6 ± 3.0 ในน้ำเชื้อที่กระทบต่อความร้อนที่ 80° เซลเซียส นาน 2 วินาที มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$, รูปที่ 4) และเริ่มมีผลกระทบต่อการติดสีเมื่อกระทบต่อความร้อนนานมากขึ้น โดยเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมพบว่าร้อยละของการติดสีเต็มหัวเพิ่มเป็น 35.3 ± 2.4 ($p < 0.05$), 50.0 ± 2.1 ($p < 0.001$) และ 60.5 ± 1.8 ($p < 0.001$) ในน้ำเชื้อที่กระทบต่อความร้อนนาน 5, 10 และ 15 วินาที ตามลำดับ



รูปที่ 4 ผลของการกระทบน้ำเชื้อแพะต่อความร้อนเป็นเวลา 0, 2, 5, 10 และ 15 วินาที ที่มีต่อร้อยละของการย้อมติดสีทริพแพนบลูเต็มหัวของอสุจิ และย้อมติดสีอีโอซิน เต็มหัวของอสุจิ

CENTRAL LIBRARY
PRINCE OF SONGKLA UNIVERSITY

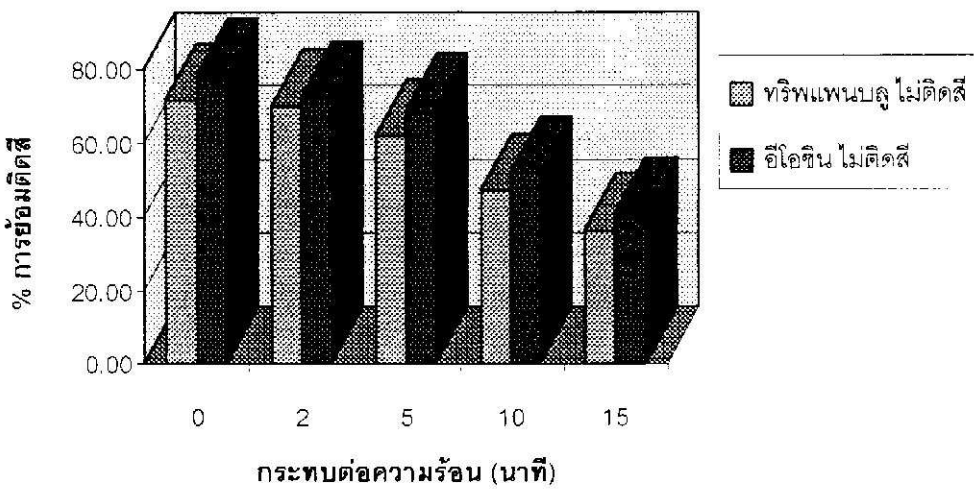
ในทำนองเดียวกันอสุจิติดสีอีโอซินมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อกระทบต่อความร้อนนานขึ้น โดยพบว่าร้อยละของการติดสีเต็มหัวในน้ำเชื้อกลุ่มควบคุม (20.2 ± 1.4) และในน้ำเชื้อที่กระทบต่อความร้อนที่ 80° เซลเซียส นาน 2 วินาที (25.5 ± 2.3) มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) และเพิ่มขึ้นเป็น 29.5 ± 2.9 ($p < 0.05$), 46.3 ± 2.0 ($p < 0.001$) และ 57.2 ± 3.2 ($p < 0.001$) ในน้ำเชื้อที่กระทบต่อความร้อนนาน 5, 10 และ 15 วินาที ตามลำดับ (รูปที่ 4)



รูปที่ 5 ผลของการกระทบน้ำเชื้อแพะต่อความร้อนเป็นเวลา 0, 2, 5, 10 และ 15 วินาที ที่มีต่อร้อยละของการย้อมติดสีทริพแพนบลูครึ่งหัวของอสุจิ และย้อมติดสีอีโอซิน ครึ่งหัวของอสุจิ

ความร้อนไม่มีผลทำให้ค่าร้อยละของอสุจิที่ติดสีครึ่งหัวของอสุจิ ทั้งในการย้อมสีทริพแพนบลู และการย้อมสีอีโอซิน มีค่าต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$, รูปที่ 5) โดยพบว่ามีค่าระหว่าง 2.3 ถึง 3.2 เมื่อย้อมสีทริพแพนบลู และมีค่าค่าระหว่าง 1.8 ถึง 2.4 เมื่อย้อมสีอีโอซิน อย่างไรก็ตามร้อยละของการย้อมไม่ติดสีทริพแพนบลูในส่วนหัวของอสุจิ (71.4 ± 2.2) ไม่แตกต่างจากน้ำเชื้อแพะที่กระทบต่อความร้อนเป็นเวลา 2 วินาที (69.9 ± 3.2, p

> 0.05) และลดลงเป็นร้อยละ 61.8 ± 2.4 ($p < 0.05$), 47.1 ± 2.1 ($p < 0.001$) และ 36.3 ± 1.7 ($p < 0.001$) ในน้ำเชื้อแพะที่กระทบต่อความร้อนเป็นเวลา 5, 10 และ 15 วินาที ตามลำดับ (รูปที่ 6) ส่วนการย้อมไม่ติดสีอีโอซินในส่วนหัวของอสุจิมีค่าลดลงเช่นกันโดยพบว่าร้อยละของอสุจิที่ย้อมไม่ติดสีในกลุ่มควบคุม (78.0 ± 1.4) ไม่แตกต่างจากน้ำเชื้อแพะที่กระทบต่อความร้อนเป็นเวลา 2 วินาที (72.1 ± 2.6, $p > 0.05$) และมีค่าลดลงเป็นร้อยละ 68.5 ± 3.0 ($p < 0.05$), 51.8 ± 2.0 ($p < 0.001$) และ 40.6 ± 3.2 ($p < 0.001$) ในน้ำเชื้อแพะที่กระทบต่อความร้อนเป็นเวลา 5, 10 และ 15 วินาที ตามลำดับ (รูปที่ 6)

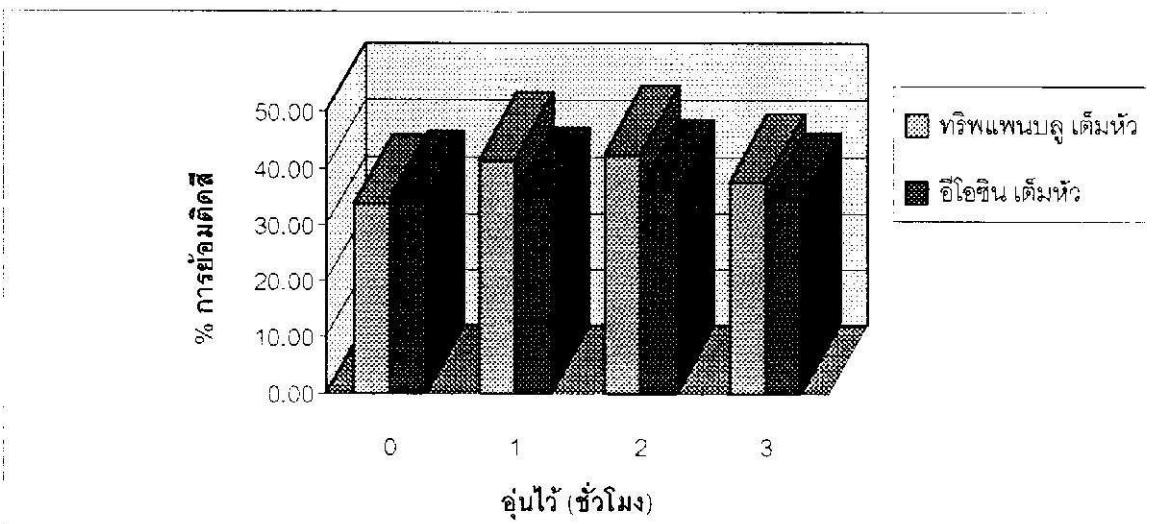


รูปที่ 6 ผลของการกระทบน้ำเชื้อแพะต่อความร้อนเป็นเวลา 0, 2, 5, 10 และ 15 วินาที ที่มีต่อร้อยละของการย้อมไม่ติดสีทริพแพนบลูในส่วนหัวของอสุจิ และย้อมไม่ติดสีอีโอซินในส่วนหัวของอสุจิ

การทดลองที่ 4 น้ำเชื้อที่อุ่นไว้ที่ 37° เซลเซียส

ค่าความสัมพันธ์ระหว่างตัวอสุจิที่ติดสีทั้งหัว ระหว่างตัวอย่างที่ย้อมด้วยทริพแพนบลู และที่ย้อมด้วยอีโอซิน มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งในน้ำเชื้อที่อุ่นไว้ที่ 37° เซลเซียส ($r = 0.86$, $p < 0.001$, ตารางที่ 1)

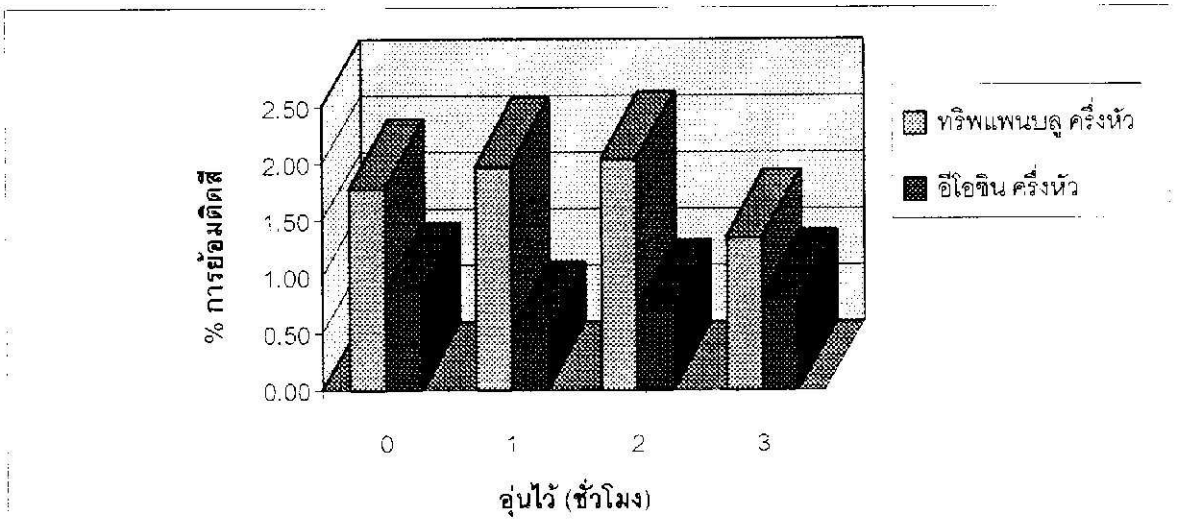
ผลของการเก็บน้ำเชื้อไว้ที่ 37° เซลเซียส เป็นเวลา 0, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง ในการทดลองนี้ไม่มีผลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยพบว่า การติดสีทริพแพนบลูมีค่าร้อยละ 33.8 ± 3.6, 41.3 ± 3.9, 42.4 ± 5.0 และ 37.5 ± 3.6 ในการเก็บไว้เป็นเวลา 0, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง ตามลำดับ ($p > 0.05$, รูปที่ 7) ส่วนการติดสีอีโอซินมีค่าในทำนองเดียวกันคือติดสีร้อยละ 34.4 ± 3.8, 35.1 ± 3.4, 36.3 ± 4.1 และ 34.0 ± 4.2 ในการเก็บไว้เป็นเวลา 0, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง ตามลำดับ ($p > 0.05$, รูปที่ 7)



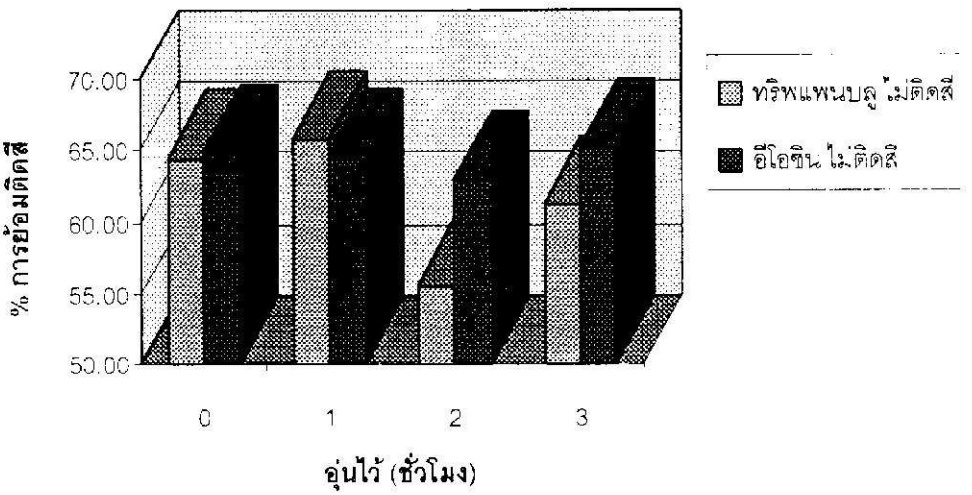
รูปที่ 7 ผลของการอุ่นน้ำเชื้อไว้ที่ 37° เซลเซียสเป็นเวลา 0, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง ที่มีต่อร้อยละของการย้อมติดสีทริพแพนบลูเต็มหัวของอสุจิ และย้อมติดสีอีโอซิน เต็มหัวของอสุจิ

การอุ่นน้ำเชื้อไว้ที่ 37° เซลเซียสเป็นเวลา 0, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง ไม่มีผลต่อร้อยละของอสุจิที่ติดสีครึ่งหัวของอสุจิ ทั้งในการย้อมสีทริพ แพนบลู และการย้อมสีอีโอซิน ($p > 0.05$, รูปที่ 8) โดยมีค่าเฉลี่ยร้อยละของการติดสีครึ่งหัวในทริพแพนบลูอยู่ระหว่าง 1.3 ถึง 2.0 และมีค่าเฉลี่ยร้อยละของการติดสีครึ่งหัวในอีโอซินอยู่ระหว่าง 0.5 ถึง 0.8

ส่วนการย้อมไม่ติดสีทริพแพนบลูในส่วนหัวของอสุจิมีค่าส่วนใหญ่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยพบร้อยละของการไม่ติดสีมีค่า 64.4 ± 3.5, 65.7 ± 3.8, 55.6 ± 4.9 และ 61.1 ± 3.7 ในน้ำเชื้อแพะที่อุ่นไว้ที่ 37° เซลเซียสเป็นเวลา 0, 1, 2 และ 3 ตามลำดับ (รูปที่ 9) มีกรณีเดียวคือการอุ่นไว้ที่ 37° เซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมงทำให้การย้อมไม่ติดสีเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) ส่วนการย้อมไม่ติดสีอีโอซินในส่วนหัวของอสุจิมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยพบว่าอสุจิที่ย้อมไม่ติดสีมีค่าร้อยละ 64.7 ± 3.8, 64.4 ± 3.5, 63.0 ± 4.1 และ 65.2 ± 4.2 ในน้ำเชื้อแพะที่อุ่นไว้ที่ 37° เซลเซียสเป็นเวลา 0, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง ตามลำดับ ($p > 0.05$)



รูปที่ 8 ผลของการอุ่นน้ำเชื้อไว้ที่ 37° เซลเซียสเป็นเวลา 0, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง ที่มีต่อร้อยละของการย้อมติดสีทริพแพนบลูครึ่งหัวของอสุจิ และย้อมติดสีอีโอซิน ครึ่งหัวของอสุจิ



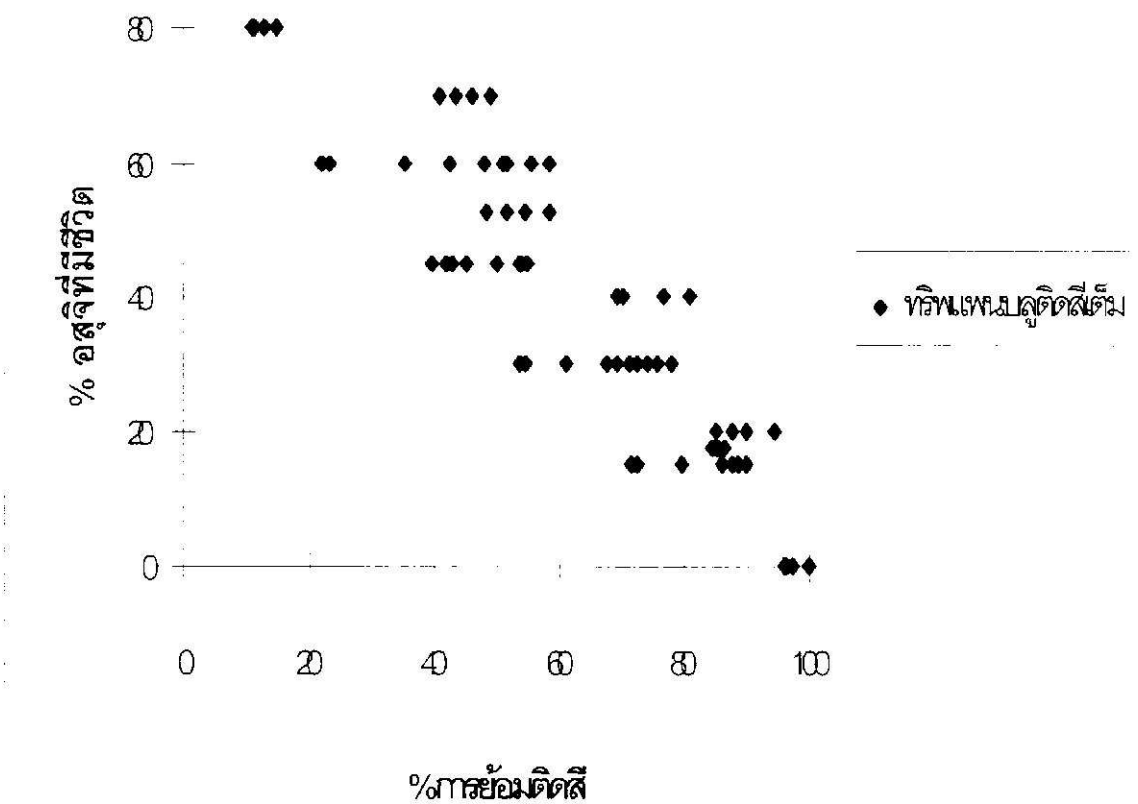
รูปที่ 9 ผลของการอุ่นน้ำเชื้อไว้ที่ 37° เซลเซียสเป็นเวลา 0, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง ที่มีต่อร้อยละของการย้อมไม่ติดสีทริพแพนบลูในส่วนหัวของอสุจิ และย้อมไม่ติดสีอีโอซินในส่วนหัวของอสุจิ

การทดลองที่ 5 ความสัมพันธ์กับน้ำเชื้อที่ทราบอัตราส่วนของอสุจิที่เคลื่อนที่

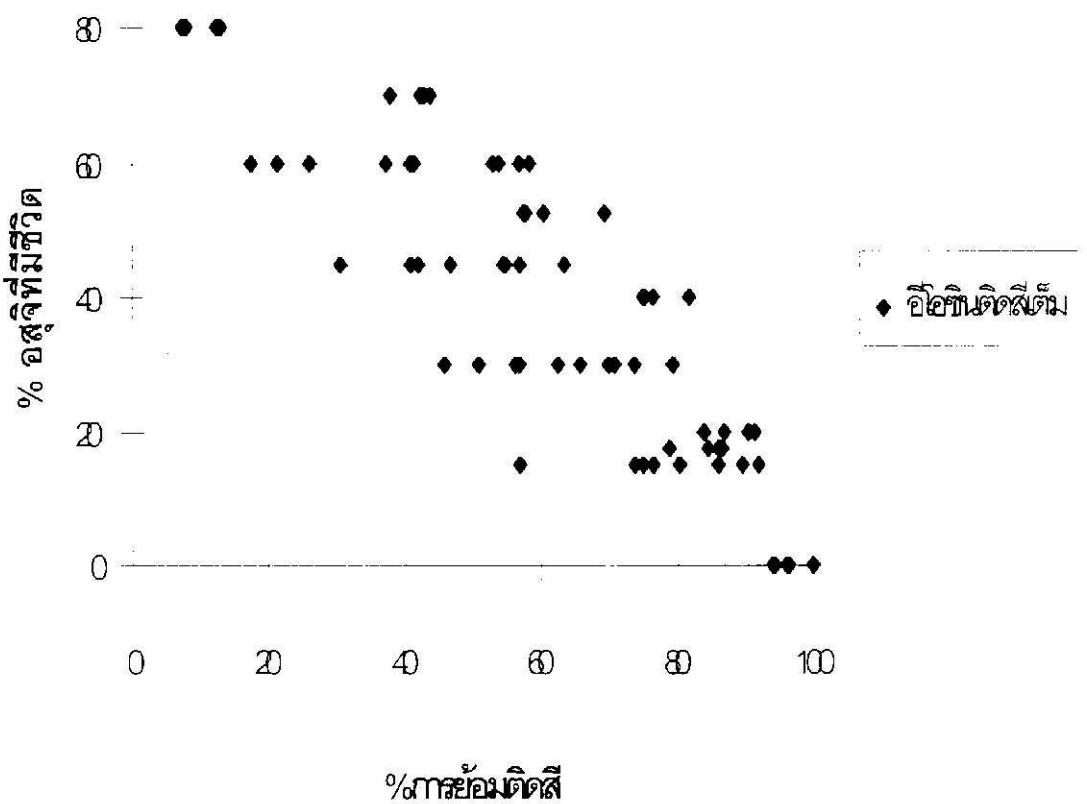
การทดสอบความถูกต้องในการติดสีของตัวอสุจิที่ตายและการไม่ติดสีของอสุจิที่มีชีวิต พบว่า

ใช้วิธีเตรียมตัวอย่างน้ำเชื้อที่ทราบอัตราส่วนของอสุจิที่มีชีวิต (เคลื่อนที่) และทำการย้อมด้วยสีทริพแพนบลู และสีอีโอซิน โดยพบว่า การติดสีเต็มหัวทั้งทริพแพนบลู และอีโอซิน มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับอัตราส่วนของอสุจิที่ไม่มีชีวิต (ไม่เคลื่อนที่) ($r = 0.93$ ในทริพแพนบลู, $p < 0.001$ และ $r = 0.91$ ในอีโอซิน, $p < 0.001$) นอกจากนั้นยังพบว่าการติดสีเต็มหัวของการย้อมสีทริพแพนบลู มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับการติดสีเต็มหัวของการย้อมสีอีโอซิน ($r = 0.97$, $p < 0.001$)

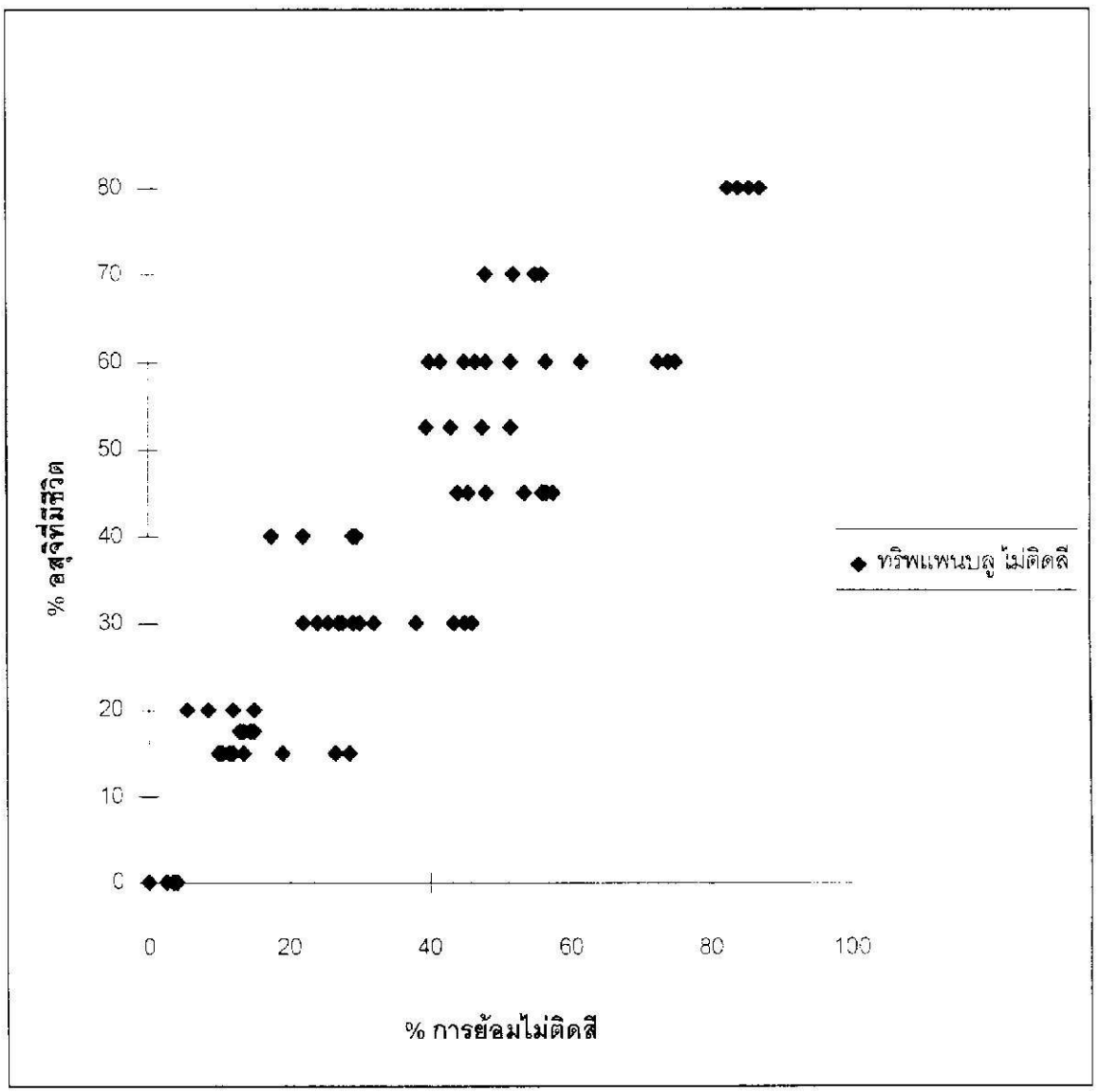
ค่าร้อยละของการติสีเต็มหัว การไม่ติดสี เมื่อย้อมด้วยสีทริพแพนบลูและสีอีโอซิน เมื่อเทียบกับร้อยละของอสุจิที่มีชีวิตแสดงไว้ในรูปที่ 10 ถึง 13



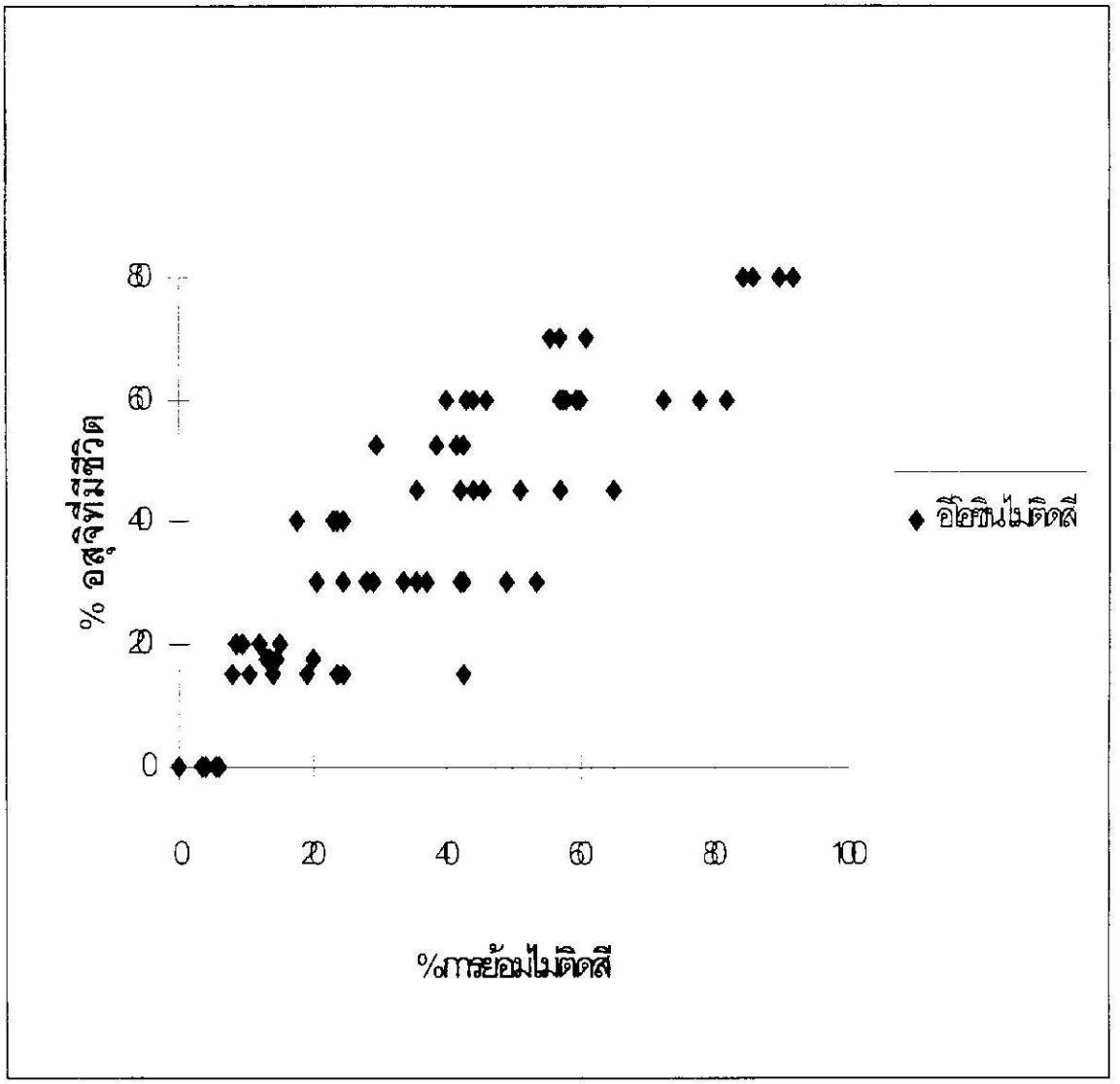
รูปที่ 10 แสดงค่าร้อยละของการย้อมติดสีทริพแพนบลูในส่วนหัวของอสุจิ เมื่อเทียบกับร้อยละของอสุจิที่มีชีวิต



รูปที่ 11 แสดงค่าร้อยละของการย้อมติดสีอีโอซินในส่วนหัวของอสุจิ เมื่อเทียบกับร้อยละของอสุจิที่มีชีวิต



รูปที่ 12 แสดงค่าร้อยละของการย้อมไม่ติดสีทริพแพนบลูในส่วนหัวของอสุจิ เมื่อเทียบกับร้อยละของอสุจิที่มีชีวิต



รูปที่ 13 แสดงค่าร้อยละของการย้อมไม่ติดสีอีโอซินในส่วนหัวของอสุจิ เมื่อเทียบกับร้อยละของอสุจิที่มีชีวิต

วิจารณ์

วิธีการย้อมสีเพื่อตรวจตัวเป็นตัวตายที่ใช้กันอยู่อย่างแพร่หลายคือ การย้อมโดยใช้สีอีโอซินที่มีนิโกรซินเป็นสีพื้น (Hancock, 1951) วิธีการนี้เริ่มมาจากการค้นพบของ Lasley *et al.* (1942) และเป็นที่นิยมใช้กันเรื่อยมาจนถึงปัจจุบัน อย่างไรก็ตามการใช้อีโอซินก็ยังมีข้อจำกัดในบางประการเช่น การย้อมสีเมื่อใช้กับน้ำเชื้อแช่แข็งที่มีกลีเซอรอลปนอยู่จะรบกวนกับการติดสีตามปกติได้ (Mixner and Saroff, 1954) หรือในบางกรณีมีการติดสีเพิ่มมากกว่าปกติเมื่อทำการเก็บสไลด์ที่ทำการสเมียร์ไว้ แล้วนำมาทำการตรวจอีกครั้งหนึ่ง (Emmens, 1947; Buttle *et al.*, 1965)

สีย้อมตัวเป็นตัวตายที่ได้ทำการทดสอบกันในอดีตมีอีกหลายชนิดเช่น รีเวคเตอร์โซลูเบิลบลู 706 (revector soluble blue 706; Crooke and Mandl, 1947) บรอมฟีนอลบลู (bromphenol blue; Kamar, 1959) และ ทริพแพนบลู (Wales, 1959; Hackett and Macpherson, 1965; Talbot and Chacon, 1981) สำหรับทริพแพนบลูเป็นสีที่นำมาใช้ในการย้อมเพื่อแยกตัวเป็นตัวตายของอสุจิในสัตว์ชนิดต่างๆ โดยเฉพาะการศึกษาปฏิกริยาอะโครโซมซึ่งจำเป็นต้องใช้สีย้อมสีอะโครโซมเป็นสีแดงเช่นกัน ทำให้ปะปนกับการย้อมเพื่อตรวจตัวเป็นตัวตายของอสุจิ อย่างไรก็ตามมีการใช้สีดังกล่าวในสัตว์หลายชนิดโดยยังมีการทดสอบความเที่ยงตรงของการย้อมสีน้อยมาก โดยเฉพาะการที่ทริพแพนบลูจะสามารถแยกตัวเป็นตัวตายของอสุจิได้หรือไม่

การทดลองเพื่อตรวจสอบการแยกตัวเป็นตัวตายของอสุจิแพะวิธีการหนึ่งคือทำการเปรียบเทียบกับการย้อมสีที่นิยมใช้กันมากในปัจจุบัน ซึ่งได้แก่สีอีโอซิน ในการทดลองที่ 1 ถึง 4 พบว่าร้อยละของอสุจิที่ติดสีเต็มหัวในสีย้อมทริพแพนบลูมีความสัมพันธ์กับของอีโอซินอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทุกการทดลอง แสดงให้เห็นว่าทริพแพนบลูสามารถย้อมสีได้เทียบเคียงกับอีโอซิน ทั้งในน้ำเชื้อสด น้ำเชื้อที่กระทบต่อความเย็น น้ำเชื้อที่กระทบต่อความร้อน และน้ำเชื้อที่อุ่นไว้ที่ 37° เซลเซียส อีกทั้งความสัมพันธ์ในกรณีของร้อยละของอสุจิที่ไม่ติดสีก็ให้ผลเช่นเดียวกัน เป็นการย้ำความมั่นใจว่าทริพแพนบลูสามารถย้อมสีได้เทียบเคียงกับอีโอซิน และเมื่อพิจารณาถึงค่าเฉลี่ยของอสุจิที่ติดสีเต็มหัวและของอสุจิที่

ไม่ติดสี เมื่อย้อมด้วยทริพแพนบลูเปรียบเทียบกับเมื่อย้อมด้วยอีโอซินพบว่ามีค่าใกล้เคียงกัน

วิธีการหนึ่งที่จะทำการทดสอบความเที่ยงตรงของสีย้อมแยกตัวเป็นตัวตายก็คือ ตรวจสอบว่าสีติดตัวอสุจิที่ตายได้ทั้งหมดหรือไม่ และในทำนองเดียวกันต้องตรวจดูว่าสีไม่ติดตัวอสุจิที่มีชีวิตเลย วิธีการดังกล่าวทำได้ยากนอกเสียจากจะทราบจำนวนอสุจิที่ตายและที่มีชีวิตในน้ำเชื้อได้อย่างแน่นอน การเตรียมสารละลายน้ำเชื้อที่ทราบอัตราส่วนของอสุจิที่มีชีวิตและไม่มีชีวิตได้อธิบายไว้แล้ว (Suttiyotin and Thwaites, 1991) ผลจากการย้อมสีน้ำเชื้อที่เตรียมให้มีจำนวนอสุจิที่มีชีวิตแน่นอน (การทดลองที่ 5) ทำให้ทราบว่าทั้งทริพแพนบลูและอีโอซินมีความสามารถในการย้อมสีได้อย่างถูกต้อง

การทดลองยังพบว่าการกระทบต่อความเย็น มีผลทำให้คุณภาพน้ำเชื้อ (ร้อยละของอสุจิที่มีชีวิต) ลดลง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานหลายรายงาน (Chong and Wales, 1962; Salamon and Lightfoot, 1967; Watson, 1981; Watson and Morris, 1987; Holt *et al.*, 1988) ส่วนน้ำเชื้อที่กระทบต่อความร้อนสามารถทำให้คุณภาพน้ำเชื้อลดลงได้ตามที่ควรจะเป็น และน้ำเชื้อที่อุ่นไว้ที่ 37° เซลเซียส มีผลน้อยต่อร้อยละของอสุจิที่มีชีวิต ซึ่งยังขัดแย้งกับรายงานอื่น (Martin and Richardson, 1976; Suttiyotin and Thwaites, 1992)

ผลของการทดลองในรายงานนี้แสดงให้เห็นว่าทริพแพนบลูสามารถย้อมอสุจิแพะที่ไม่มีชีวิตและย้อมไม่ติดอสุจิที่มีชีวิต โดยมีผลใกล้เคียงกับการย้อมด้วยอีโอซิน และทั้งทริพแพนบลูและอีโอซินสามารถย้อมสีติดอสุจิที่ไม่มีชีวิตได้อย่างถูกต้อง ททริพแพนบลูจึงเป็นสีตัวเลือกอีกทางหนึ่งซึ่งสามารถใช้ย้อมเพื่อแยกตัวเป็นตัวตายของอสุจิแพะได้

กิตติกรรมประกาศ

โครงการ 'การย้อมสีเพื่อตรวจตัวเป็นตัวตายของอสุจิแพะโดยใช้สีทริพแพนบลู' (NAT39079) ได้รับงบประมาณสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน

โครงการวิจัยได้รับความร่วมมืออย่างดีจากภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ ผู้วิจัยขอขอบคุณมา ณ ที่นี้

บรรณานุกรม

พีรศักดิ์ สุทธิโยธิน. 2528. การผสมเทียม. ภาควิชาสัตวศาสตร์, คณะทรัพยากรธรรมชาติ, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, หาดใหญ่.

Buttle, H.R.L., Hancock, J.L. and Purser, A.F. 1965. Counting dead spermatozoa in frozen semen. Anim. Prod., 7:59-65.

Chong, C.H. and Wales, R.G. 1962. The effect of cold shock on spermatozoa. Aust. J. Biol. Sci., 15:543-551.

Crooke, A.C. and Mandl, A.M. 1947. A rapid supra-vital staining method for assessing the viability of human spermatozoa. Nature, 159:749.

Didion, B.A. and Graves, C.N. 1986. In vivo capacitation and acrosome reaction of bovine sperm in estrous and diestrous cows. J. Anim. Sci., 62:1029-1033.

Didion, B.A., Dobrinski, J.R., Giles, J.R. and Graves, C.N. 1989. Staining procedure to detect viability and the true acrosome reaction in spermatozoa of various species. Gamete Res., 22:51-57.

Elliott, F.I. 1978. Semen evaluation. In G.W. Salisbury, N.L. VanDemark and J.R. Lodge (Eds.) "Physiology of Reproduction and Artificial Insemination of Cattle". W.H. Freeman, San Francisco, pp. 400-427.

Emmens, C.W. 1947. The motility and viability of rabbit spermatozoa at different hydrogen-ion concentrations. J. Physiol., 106:471-481.

Hackett, A.J. and Macpherson, J.W. 1965. A method for differential staining of bovine spermatozoa after extension in sterile milk. Can. Vet. J., 6:117-120.

Hancock, J.L. 1951. A staining technique for the study of temperature-shock in semen. Nature, 167:323-324.

Holt, W.V., Morris, G.J., Coulson, G. and North, R.D. 1988. Direct observation of cold-shock effects in rams spermatozoa with the use of a programmable cryopicroscope. J. Exp. Zool., 246:305-314.

Kamar, G.A.R. 1959. The differentiation of live from dead sperms in fowl semen. Stain Technol., 34:5-7.

Kusunoki, H., Yasui, T., Kato, S. And Kanda, S. 1984. Identification of acrosome-reacted goat spermatozoa by a simplified triple-stain technique. Jpn. J. Zootech. Sci., 55:832-837.

Lasley, J.F., Easley, G.T. and McKenzie, F.F. 1942. A staining method for the differentistion of live and dead spermatozoa. I. Applicability to the staining of ram spermatozoa. Anat,. Rec., 82:167-174.

Martin, I.C.A. and Richardson, B.A. 1976. Factors affecting the fertility of diluted ram semen. In G.J. Tomes, Robertson, D.E. and R.J. Lightfoot (Eds.) "Sheep Breeding". Western Australian Institute of Technology, Perth, pp. 467-474.

Mixner, J.P. and Saroff, J. 1954. Interference by glycerol with differential staining of bull spermatozoa as use with semen thawed from the frozen stage. J. Dairy Sci., 37:1094-1098.

Rickmenspoel, R. 1962. Biophysical approaches to the measurement of sperm motility. In D.W. Bishop (Ed.) "sperm motility". American Association for the Advancement of Acience, Washington DC, pp. 31-54.

Salamon, S. 1976. Artificial insemination of sheep. Publicity Press, Chippendale, N.S.W., 104 pp.

Salamon, S. and Lightfoot, R.J. 1967. Effect of cold shock, liquid storage, and pellet-freezing on successive ram ejaculates. Aust. J. Agric. Res. 18:959-972.

Steel, R.G.D. and Torrie, J.H. 1980. Principles and procedures of statistics: a biometrical approach. MaGraw-Hill, Singapore. 633 pp.

Suttiyotin, P. and Thwaites, C.J. 1991. The ability of trypan blue to differentiate live and dead ram spermatozoa. Anim. Reprod. Sci., 25:209-224.

Suttiyotin, P. and Thwaites, C.J. 1992. Comparison of a swim-up technique with the Hamilton Thorn Motility Analyser for a measurement of sperm velocity and motility. Reprod. Fertil. Dev., 4:153-160.

Talbot, P. and Chacon, R.S. 1981. A triple-stain technique for evaluating normal acrosome reactions of human sperm. J. Exp. Zool., 215:201-208.

Wales, R.G. 1959. The differential staining of human and dog spermatozoa. Aust. J. Exp. Biol., 37:433-440.

Watson, P.F. 1981. The effect of cold shock on sperm cell membranes. In G.J. Morris and A. Clarke (Eds.) "Effects of Low Temperature on Biological Membranes". Academic Press, London, pp.189-218.

Watson P.F. and Morris, G.J. 1987. Cold shock injury in aminal cells. In K. Bowler and B.J. Fuller (Eds.) "Temperature and Animal Cells". The company of Biologist Ltd., Cambridge, pp. 311-340.