



ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ก

การตรวจหาตัวอสุจิ (sperm)

จากการศึกษาหลายแห่งพบว่าตัวอสุจิสามารถอยู่ในช่องคลอดได้นานที่สุด 7-14 วัน
สำหรับวิธีการตรวจทำได้ 2 วิธีคือ

1. วิธีเกลี่ยป้ายเปียก (wet smear) โดยป้ายสิ่งที่เก็บโดยก้านไม้พันสำลี (swab) ลงบนแผ่น
สไลด์แล้วหยดน้ำเกลือออร์เมท ลงบนคราบบนสไลด์ 1-2 หยด ปิดด้วยแผ่น cover slip แล้วนำไป
ตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ดูว่าพบตัวอสุจิหรือไม่และหากว่าตรวจพบก็สามารถระบุได้ว่าตัวอสุจิ
เคลื่อนที่ได้หรือไม่ซึ่งอาจจะบ่งอายุของตัวอสุจิได้ การตรวจด้วยวิธีนี้ทำได้ง่ายและรวดเร็ว
อย่างไรก็ดีต้องอาศัยสิ่งส่งตรวจที่มีลักษณะเป็นของเหลว หากเป็นคราบที่แห้งก็ไม่สามารถใช้วิธีนี้
ได้ นอกจากนี้ผู้ตรวจยังต้องมีความชำนาญเป็นพิเศษอีกด้วย ดังนั้นหากการตรวจหาตัวอสุจิโดยวิธี
ดังกล่าวนี้แล้วไม่พบก็ควรนำไปย้อมสีตรวจดูอีกรอบ

2. วิธีย้อมสี (stain) ทำได้หลายวิธีแต่วิธีที่นิยมได้แก่ การย้อมด้วย hematoxylin and eosin
หรือ H&E stain เนื่องจากทำได้สะดวกและมองเห็นตัวอสุจิได้ง่ายกว่าวิธีการอื่นๆ โดยหัวของ
ตัวอสุจิจะติดสีน้ำเงินม่วงในขณะที่พื้นหลังเป็นสีชมพู นอกจากนี้วิธีใหม่ที่เริ่มเป็นที่นิยมคือ
วิธี oppitz method ซึ่งส่วนหัวของตัวอสุจิจะติดสีแดงในขณะที่พื้นหลังจะเห็นเป็นสีเขียว
อย่างไรก็ดีการตรวจด้วยวิธีนี้ต้องใช้ความชำนาญในการย้อมสูง

1. การตรวจหาตัวอสุจิด้วยวิธี oppitz method

สกัดตัวอสุจิออกจาก Swab หรือวัตถุพยานที่สงสัย โดยการแช่ 1% NH_4OH ที่งัวที่อุณหภูมิห้อง
ประมาณ 30-60 นาที น้ำยาจะเริ่มเป็นสีขุ่น



นำไปปั่นตกที่ความเร็ว 2,400 รอบต่อวินาที นาน 5 นาที แล้วดูดส่วนน้ำทิ้งไป



นำส่วนที่เป็นตะกอนไปเกลี่ยบน microscopic slide แล้วผึ่งให้แห้ง



นำไปย้อมสีด้วยวิธีการ Oppitz's test

วิธีการย้อมสีด้วย Oppitz's test

1.1. การเตรียมน้ำยา

สารละลาย A (Nuclear fast red)

- เตรียมสารละลาย Nuclear fast red 0.1 g. ละลายใน 5% Aluminium sulfate 100 ml. แล้ว

นำไปต้มนาน 5 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วกรองให้สารละลายมีความใส

(การเตรียม 5% Aluminium sulfate คือ ละลาย Aluminium sulfate 5 g. ในน้ำกลั่น 100 ml. อุณหภูมิร้อนเพื่อช่วยให้ละลายดีขึ้น)

สารละลาย B (Indigocarmin)

- ละลาย Indigocarmin 1 g. ใน Picric acid saturated solution 300 ml. แล้วกรองให้

สารละลายมีความใส

1.2. วิธีการย้อมสี

Fix cell ที่ smear บน slide โดยแช่ใน 95% Ethanol 15-30 นาที



แช่ในสารละลาย A (ที่เตรียมข้างต้น) นาน 15-30 นาที



ล้างน้ำเบาๆ



แช่ในสารละลาย B (ที่เตรียมข้างต้น) นาน 10-20 นาที

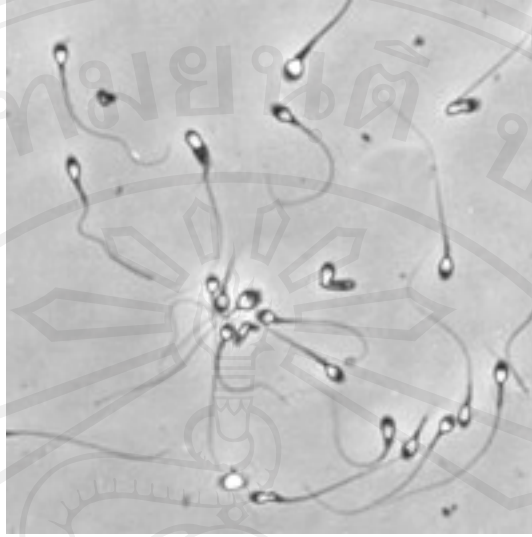


แช่ใน 95% Ethanol นาน 5 วินาที



เมื่อ slide แห้งแล้วให้นำไปจุ่มใน Xylene แล้วปิดแผ่น slide ด้วย cover slide

หมายเหตุ : ส่วนหัวของตัวอสุจิ จะติดสีแดง, Nucleus จะติดสีม่วง, Epithelial cell จะติดสีเขียวอ่อน
(ดังภาพที่ 10)



ภาพที่ 10 แสดงการติดสีของตัวอสุจิ จากการย้อมสีด้วยวิธี Oppitz's test

2. การตรวจ Acid phosphatase

2.1. การเตรียมน้ำยา

Stock สารละลาย A (Fast blue B salt)

Naphthanil Diazo Blue B 1 gm.

Sodium acetate (hydrated) 20 gm.

Glacial acetic acid 10 ml.

Distilled water 100 ml.

Stock สารละลาย B

Sod-Alpha-Naphthyl acid phosphate 0.08 gm.

Distilled water 90 ml.

Working solution

Stock สารละลาย A 1 ml. + Stock สารละลาย B 9 ml.

จากนั้นผสมจนเข้ากันแล้วกรอง

เก็บสารละลายในขวดสีน้ำตาล คงตัวเก็บไว้ใช้ได้ 1-2 สัปดาห์

2.2. วิธีการตรวจ

นำ Working solution หยดลงบนคราบที่สงสัย



ถ้าผลเป็น positive จะเปลี่ยนเป็นสีม่วง ภายใน 60 วินาที

เกณฑ์การกำหนดปริมาณตัวสูกิจที่ตรวจพบ

จากแผ่น Slide ที่ได้ย้อมสีคราบอสุจิไว้ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1 เซนติเมตร นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ให้ทั่วทั้งคราบที่เคลือบไว้ นับจำนวนตัวสูกิจที่พบโดยใช้เกณฑ์การระบุปริมาณตัวสูกิจ ดังนี้

- ตรวจพบตัวสูกิจ 1-2 ตัว ให้ใช้สัญลักษณ์แสดงปริมาณการตรวจพบเป็น 1+
- ตรวจพบตัวสูกิจ 3-5 ตัว ให้ใช้สัญลักษณ์แสดงปริมาณการตรวจพบเป็น 2+
- ตรวจพบตัวสูกิจ 6-8 ตัว ให้ใช้สัญลักษณ์แสดงปริมาณการตรวจพบเป็น 3+

หมายเหตุ : ถ้าในตัวอย่างตะกอนแขวนลอยจากแผ่น Slide ที่ได้ย้อมสีคราบอสุจิไว้ ตรวจพบว่ามิตัวอสุจิที่ไม่สมบูรณ์อยู่เพียง 1 ตัวในคราบ จะถือว่าน้ำซั้วช่องคลอดนั้นเป็นผลลบ (Negative) และถ้าพบตัวอสุจิเพียงตัวเดียวแต่มีทุกส่วนครบสมบูรณ์จะถือว่าน้ำซั้วช่องคลอดนั้นเป็นผลบวก (Positive) ทั้งนี้

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมีต่างๆสำหรับใช้ในขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค PCR การแยก แลบดีเอ็นเอโดยผ่านกระแสไฟฟ้า และการย้อมเจลด้วยวิธี Silver staining

1. การเตรียมสารละลายในกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR)

การเตรียมส่วนผสมใน master mix

1. การเตรียม Taq 10X buffer ซังสารปริมาณดังนี้

- 200 mM Tris pH 8.4	20.0	ml
- 500 mM KCl	12.5	ml
- 15 mM MgCl ₂	5.0	ml
- 1 mg/ml BSA	50.0	mg
- 0.5% Tween 20	0.25	ml

เติมน้ำให้มีปริมาตรรวมเป็น 50.0 ml

2. การเตรียม 100 mM Dilution of dNTPs ซังสารปริมาณดังนี้

- 100 mM dATP	10.0	μl
- 100 mM dCTP	10.0	μl
- 100 mM dGTP	10.0	μl
- 100 mM dTTP	10.0	μl
- H ₂ O	960.0	μl

ผสมให้เข้ากันจะได้สารละลายที่มีปริมาตรรวมเท่ากับ 1000.0 μl

3. การเตรียม DNA-polymerase เจือจาง (ปริมาณ 100 μl)

ดูด Taq DNA-polymerase เข้มข้น 5 u/μl มาปริมาณ 5 μl จากนั้นเติมน้ำลงไป 95 μl จะได้

DNA-polymerase ปริมาณ 100 μl

อัตราส่วนผสมใน Master mix สำหรับทำ PCR คุณดสารปริมาณดังนี้

- water	2	μl
-10X buffer	1	μl
- dNTPs	1	μl
- Taq DNA-polymerase เจือจาง	1	μl
- primer DYS 393	1	μl

ผสมสารทั้งหมดรวมกันจะได้ปริมาตรรวมเท่ากับ 6 μl (ที่ใช้ต่อ 1 ตัวอย่าง)

การเตรียมน้ำยา primer ผสม ความเข้มข้น 5 μM ของ primer แต่ละชนิด (ตำแหน่ง DYS390)

โดยเตรียมจาก stock ที่มีความเข้มข้น 10 μM ของแต่ละ Primer (Forward และ Reverse)

โดยเตรียมปริมาตรครั้งละ 100 μl ดังนี้

- นำสารละลายของ Primer Forward และ Primer Reverse มาอย่างละ 50 μl ผสมใน Microcentrifuge tube ก็จะได้ 5 μM each Primers mix ปริมาตร 100 μl

2. การเตรียม loading dye สำหรับใช้ในการโหลดเจล

- ชั่ง bromophenol blue ปริมาตร 0.04 g ละลายลงใน 87% glycerol ปริมาตร 500 μl และ น้ำกลั่นปริมาตร 500 μl

- เขย่าให้เข้ากันจน bromophenol blue ละลายเป็นเนื้อเดียวกันกับ glycerol และ น้ำกลั่น จากนั้นสามารถนำไปใช้ได้

3. การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการย้อมเจล

1. การเตรียม 1% Nitric acid

- เติม 65% nitric ปริมาตร 3 ml. ลงในน้ำกลั่นปริมาตร 200 ml. คนให้เข้ากัน

2. การเตรียม 0.012 M Silver nitrate

- ชั่งสาร silver nitrate 0.4 g. แล้วเติมน้ำกลั่นลงไป 200 ml. คนให้เข้ากันด้วย เครื่องเขย่า (shaker) จนละลาย

3. การเตรียม 0.28 M Sodium carbonate

- ชั่งสาร Sodium carbonate 11.8 g. แล้วเติมน้ำกลั่นลงไป 390 ml. คนให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า (shaker) จนละลายหมดแล้วเติม 0.019% formalin ลงไป

4. การเตรียม 2.5X Running buffer (Stock solution)

-Tris	54.0 g
-EDTA	3.73 g
-Boric acid	27.5 g
-ละลายในน้ำกลั่น	2 L

ก่อนนำ Stock solution มาใช้ในการแยกแถบ DNA ต้องนำ Stock solution ไปเจือจางด้วยน้ำกลั่นก่อน ตามปริมาณ ดังนี้

-Running buffer (Stock solution)	1 L
-น้ำกลั่น	1.5 L

หน้าที่ของสารเคมีที่ใช้ในการทำ PCR

- | | |
|-------------------|--|
| 1. 10X Taq buffer | - ช่วยปรับการทำงานของเอนไซม์ DNA-polymerase |
| 2. dNTPs | - เปรียบเสมือนวัตถุดิบที่ใช้ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ |
| 3. Primer | - เป็นดีเอ็นเอสายสั้นๆ ที่มีการออกแบบมาให้เป็นจุดเริ่มต้นของการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ |
| 4. DNA-polymerase | - เป็นเอนไซม์สำคัญทำหน้าที่ในการสังเคราะห์ DNA |
| 5. DNA template | - เป็นดีเอ็นเอแม่แบบหรือต้นฉบับที่ต้องการเพิ่มจำนวน |
| 6. water | - ช่วยปรับความเข้มข้นของส่วนผสมทุกตัวให้มีความลงตัว |

ภาคผนวก ค

ตารางที่ 5 ข้อมูลตัวอย่างน้ำซับช่องคลอดของผู้เสียหาย ที่มาตรวจที่ภาควิชานิติเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ตั้งแต่ช่วง 1 มกราคม 2550 – 31 ธันวาคม 2551 ทั้ง 60 ตัวอย่าง ที่คัดเลือกมาทำการวิจัย

ลำดับ ที่	เวลาที่มา ตรวจหลังถูก กระทำชำเรา (ชั่วโมง)	เวลาที่ใช้ตรวจ AP ด้วย color test (วินาที)	ปริมาณ AP (u/ml)	Sperm (0=ไม่พบ, 1=พบ)	ปริมาณที่ตรวจ พบตัวอสุจิ
1	36	50	944	1	2+
2		30	963	0	-
3		55	571	0	-
4	18	12	1000	1	3+
5		10	1000	1	2+
6	21	40	325	0	-
7		50	495	0	-
8	33	35	565	0	-
9		35	416	0	-
10		40	410	0	-
11	48	25	1000	1	2+
12		55	466	0	-
13	22	24	1000	1	2+
14		17	1000	1	2+
15		6	1000	1	3+
16		14	1000	1	2+
17	4	25	641	1	1+

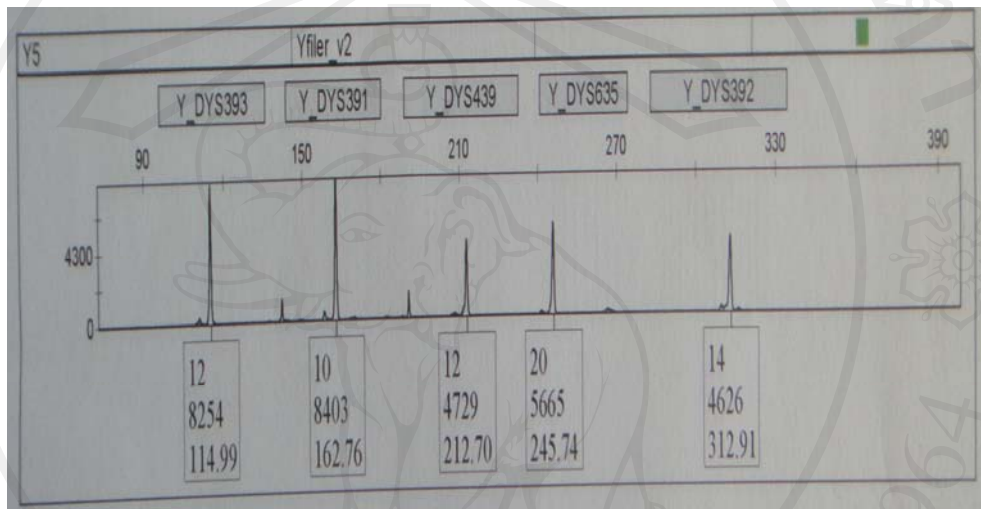
ลำดับ ที่	เวลาที่มา ตรวจหลังถูก กระทำชำเรา (ชั่วโมง)	เวลาที่ใช้ตรวจ AP ด้วย color test (วินาที)	ปริมาณ AP (u/ml)	Sperm (0=ไม่พบ, 1=พบ)	ปริมาณที่ตรวจ พบตัวอสุจิ
18	27	30	419	1	2+
19		12	1000	1	2+
20		33	1000	1	2+
21	18	35	1000	1	1+
22		49	759	1	1+
23	36	10	866	1	1+
24		9	1000	1	2+
25		12	854	1	2+
26	20	ทันที	963	0	-
27		ทันที	495	0	-
28		ทันที	446	0	-
29	12	28	291	1	1+
30		26	668	1	1+
31	19	30	987	0	-
32		14	1000	0	-
33	11	9	1000	1	2+
34		4	1000	1	2+
35		7	1000	1	2+
36	5	36	956	0	-
37		13	1000	0	-
38		28	1000	0	-
39	2	ทันที	758	1	1+
40	24	9	1000	1	2+
41		20	1000	0	-
42		27	1000	0	-

ลำดับ ที่	เวลาที่มา ตรวจหลังถูก กระทำชำเรา (ชั่วโมง)	เวลาที่ใช้ตรวจ AP ด้วย color test (วินาที)	ปริมาณ AP (u/ml)	Sperm (0=ไม่พบ, 1=พบ)	ปริมาณที่ตรวจ พบตัวอสุจิ
43	5	10	1000	1	2+
44		2	1000	1	2+
45		5	1000	1	3+
46	27	40	644	0	-
47		ทันที	512	0	-
48		ทันที	572	0	-
49	18	20	900	1	3+
50		24	533	1	2+
51		5	1000	1	3+
52	7	47	403	0	-
53		21	1000	0	-
54		32	767	0	-
55	24	ทันที	382	0	-
56	32	24	430	0	-
57		20	515	0	-
58		26	299	0	-
59	23	40	300	0	-
60	8	40	689	0	-

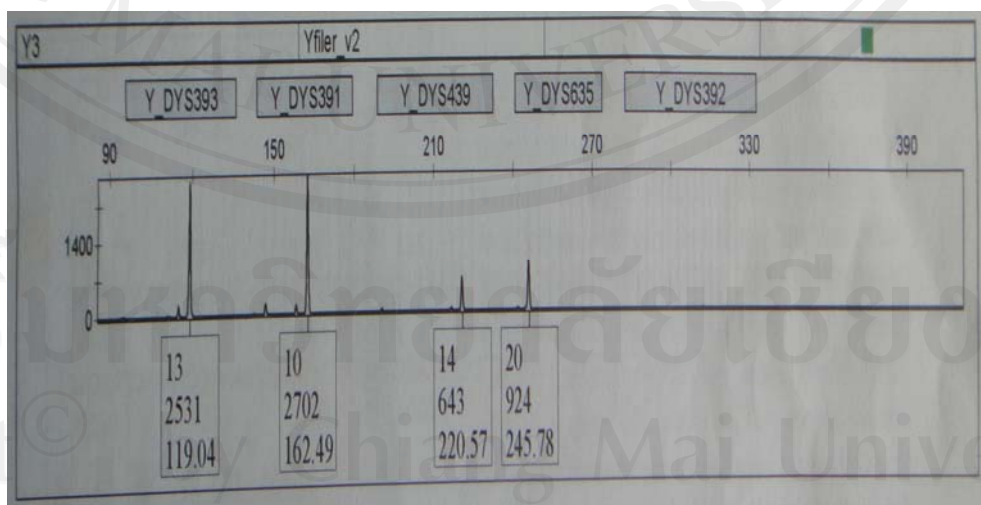
ภาคผนวก ง

ภาพ Electropherogram ของตัวอย่าง DNA ตำแหน่ง DYS 393

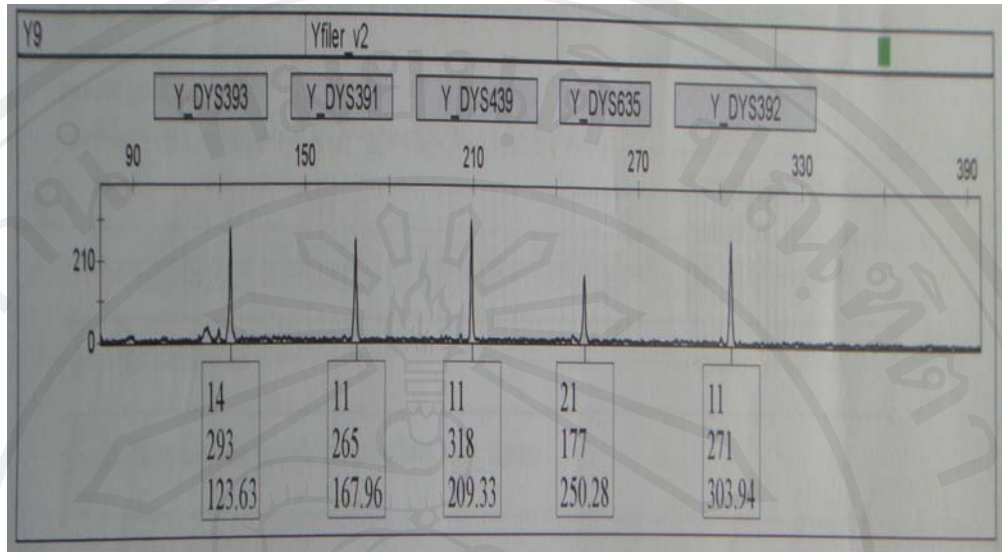
ที่นำมาเป็น DNA มาตรฐาน



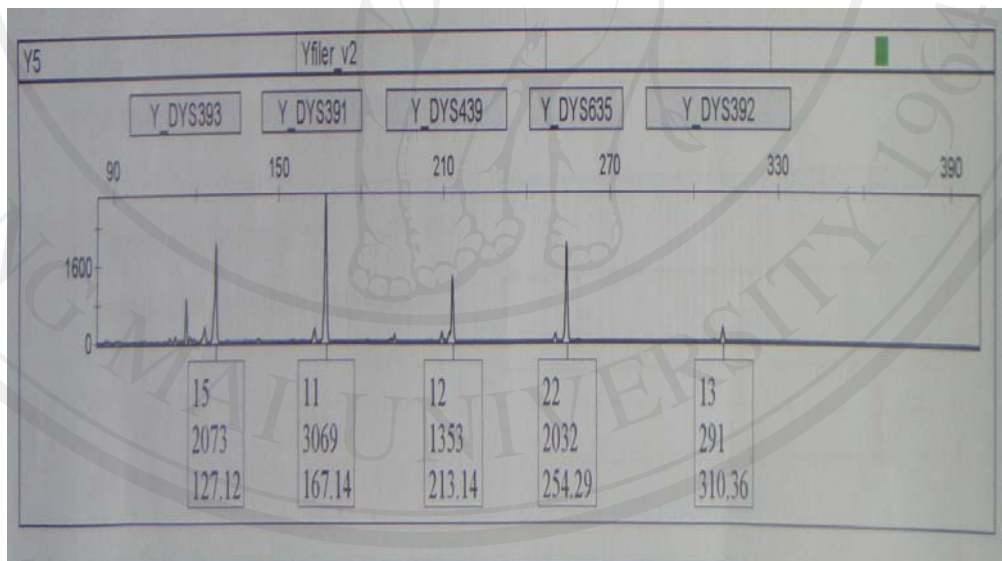
A แสดงตัวอย่างเลือดจากชายคนที่ 1 ซึ่งมีจำนวนชุดเบสซ้ำๆกัน 12 ชุด



B แสดงตัวอย่างเลือดจากชายคนที่ 2 ซึ่งมีจำนวนชุดเบสซ้ำๆกัน 13 ชุด



C แสดงตัวอย่างเลือดจากชายคนที่ 3 ซึ่งมีจำนวนชุดเบสซ้ำๆกัน 14 ชุด



D แสดงตัวอย่างเลือดจากชายคนที่ 4 ซึ่งมีจำนวนชุดเบสซ้ำๆกัน 15 ชุด

ภาพที่ 11 แสดง GeneMapper® ID electropherogram จากตัวอย่างเลือดผู้ชายทั้งหมด

4 คน ในตำแหน่ง DYS 393

ภาคผนวก จ

แสดงสูตรการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี McNemar chi-square test

$$\chi^2 = \frac{(|A - D| - 1)^2}{A + D}$$

ตารางที่ 6 แสดงการเปรียบเทียบระหว่างการตรวจ ตัวอสุจิกับดีเอ็นเอตำแหน่ง DYS393

อสุจิ	DYS390	
	ผลลบ	ผลบวก
ผลลบ	7 (C)	23 (D)
ผลบวก	3 (A)	27 (B)

เมื่อนำค่าที่ได้ในตารางมาแทนค่าสูตรการคำนวณจะได้ ดังนี้

$$\chi^2 = \frac{(|3 - 23| - 1)^2}{3 + 23}$$

$$\chi^2 = 13.885$$

ตารางที่ 7 แสดงผลวิเคราะห์ทางสถิติด้วย McNemar chi-square test โดยใช้โปรแกรม SPSS 16

Sperm & DYS393

		DYS393	
		-	+
Sperm	-	7	23
	+	3	27

Test Statistics^b

		Sperm & DYS393
N		60
Exact Sig. (2-tailed)		.000 ^a

a. Binomial distribution used.

b. McNemar Test

ตารางที่ 8 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย t-test independent โดยใช้โปรแกรม SPSS 16

Independent Samples Test (ระหว่างกลุ่ม sperm negative กับ กลุ่ม sperm positive ปริมาณ 1+)

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	T	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
con	Equal variances assumed	.282	.599	.283	35	.779	.05238	.18495	-.32309	.42785
	Equal variances not assumed			.261	8.317	.800	.05238	.20045	-.40682	.51158

Independent Samples Test (ระหว่างกลุ่ม sperm negative กับ กลุ่ม sperm positive ปริมาณ 2+)

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	T	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
con1	Equal variances assumed	14.556	.000	-1.610	46	.114	-.17778	.11043	-.40007	.04451
	Equal variances not assumed			-1.848	45.744	.071	-.17778	.09620	-.37145	.01590

Independent Samples Test (ระหว่างกลุ่ม sperm negative กับ กลุ่ม sperm positive ปริมาณ 3+)

	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
	F	Sig.	T	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
								Lower	Upper
con2 Equal variances assumed	11.859	.002	-1.198	33	.240	-.23333	.19480	-.62965	.16299
Equal variances not assumed			-2.971	29.000	.006	-.23333	.07854	-.39397	-.07270

Independent Samples Test (ระหว่างกลุ่ม sperm positive ปริมาณ 1+ กับ กลุ่ม sperm positive ปริมาณ 2+)

	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
	F	Sig.	T	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
								Lower	Upper
con3 Equal variances assumed	10.567	.004	-1.609	23	.121	-.23016	.14308	-.52614	.06582
Equal variances not assumed			-1.195	7.118	.270	-.23016	.19261	-.68410	.22378

Independent Samples Test (ระหว่างกลุ่ม sperm positive ปริมาณ 1+ กับ กลุ่ม sperm positive ปริมาณ 3+)

	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
	F	Sig.	T	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
								Lower	Upper
con4 Equal variances assumed	18.519	.002	-1.291	10	.226	-.28571	.22131	-.77883	.20740
Equal variances not assumed			-1.549	6.000	.172	-.28571	.18443	-.73699	.16556

Independent Samples Test (ระหว่างกลุ่ม sperm positive ปริมาณ 2+ กับ กลุ่ม sperm positive ปริมาณ 3+)

	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
	F	Sig.	T	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
								Lower	Upper
con6 Equal variances assumed	1.213	.283	-.518	21	.610	-.05556	.10721	-.27850	.16739
Equal variances not assumed			-1.000	17.000	.331	-.05556	.05556	-.17277	.06166

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล

นางสาวศราลักษณ์ ศักดิ์เกียรติชัย

วัน เดือน ปี เกิด

5 เมษายน 2530

ประวัติการศึกษา

สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนสันกำแพง
ปีการศึกษา 2545สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนสันกำแพง
ปีการศึกษา 2548สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2552