



ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ก

ตาราง 5 ข้อมูลตัวอย่างน้ำขับช่องคลอดของผู้เสียหาย ที่มาตรวจที่ภาควิชานิติเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ตั้งแต่ช่วง 1 มกราคม 2550 – 31 ธันวาคม 2551 ทั้ง 60 ตัวอย่าง ที่คัดเลือกมาทำการวิจัย

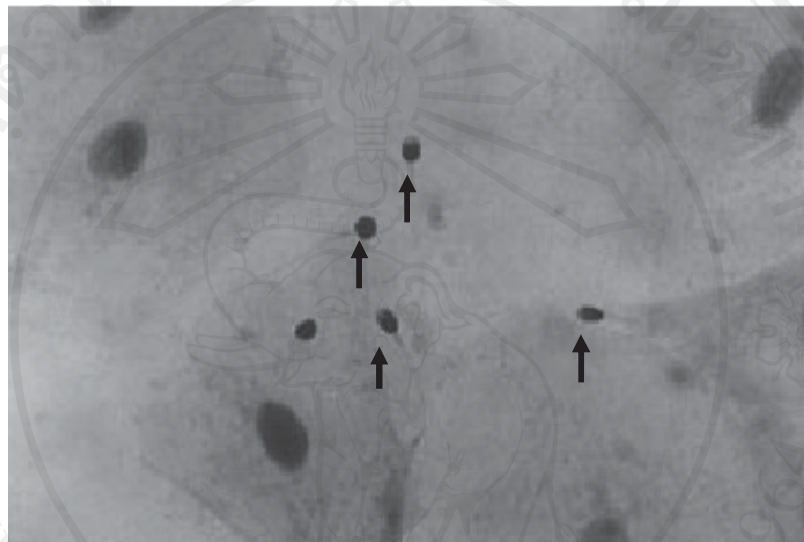
ลำดับ ที่	เวลาที่มา ตรวจหลังถูก กระทำชำเรา (ชั่วโมง)	เวลาที่ใช้ตรวจ AP ด้วย color test (วินาที)	ปริมาณ AP (u/l)	Sperm (0=ไม่พบ, 1=พบ)	ปริมาณที่ตรวจ พบตัวสุมิ
1	36	50	944	1	2+
2		30	963	0	-
3		55	571	0	-
4	18	12	1000	1	3+
5		10	1000	1	2+
6	21	40	325	0	-
7		50	495	0	-
8	33	35	565	0	-
9		35	416	0	-
10		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/l)	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/l)	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 ข

แสดงเกณฑ์การกำหนดปริมาณตัวอสุจิที่พบในน้ำขับช่องคลอดของผู้เสียหาย จากการตรวจหาตัวอสุจิด้วยเทคนิคการย้อมสีแบบ Oppitz's test



ภาพ 10 แสดงตัวอย่าง ที่ตรวจพบตัวอสุจิ (ลูกศรชี้)

วิธีการตรวจหาตัวอสุจิ คือ ดูตะกอนแขวนลอยที่ได้จากการสกัดไม่สวอปป้ายช่องคลอดของผู้เสียหายประมาณ 3 ไมโครลิตร หยดลงบนสไลด์ แล้วเกลี่ยให้เป็นพื้นที่วงกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 เซนติเมตร ย้อมสี Oppitz ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ให้ทั่วทั้งคราบที่เกลี่ยไว้ แล้วนับจำนวนตัวอสุจิที่พบ ซึ่งเกณฑ์การระบุปริมาณตัวอสุจิ กำหนดดังนี้

1. กลุ่มที่ตรวจพบตัวอสุจิ 1-2 ตัว ให้ใช้สัญลักษณ์แสดงการตรวจพบเป็น 1+
2. กลุ่มที่ตรวจพบตัวอสุจิ 3-5 ตัว ให้ใช้สัญลักษณ์แสดงการตรวจพบเป็น 2+
3. กลุ่มที่ตรวจพบตัวอสุจิ 6-8 ตัว ให้ใช้สัญลักษณ์แสดงการตรวจพบเป็น 3+
4. กลุ่มที่ตรวจพบตัวอสุจิจำนวนมาก จนไม่สามารถจะนับจำนวนได้หมด ให้ใช้สัญลักษณ์แสดงการตรวจพบเป็น 4+

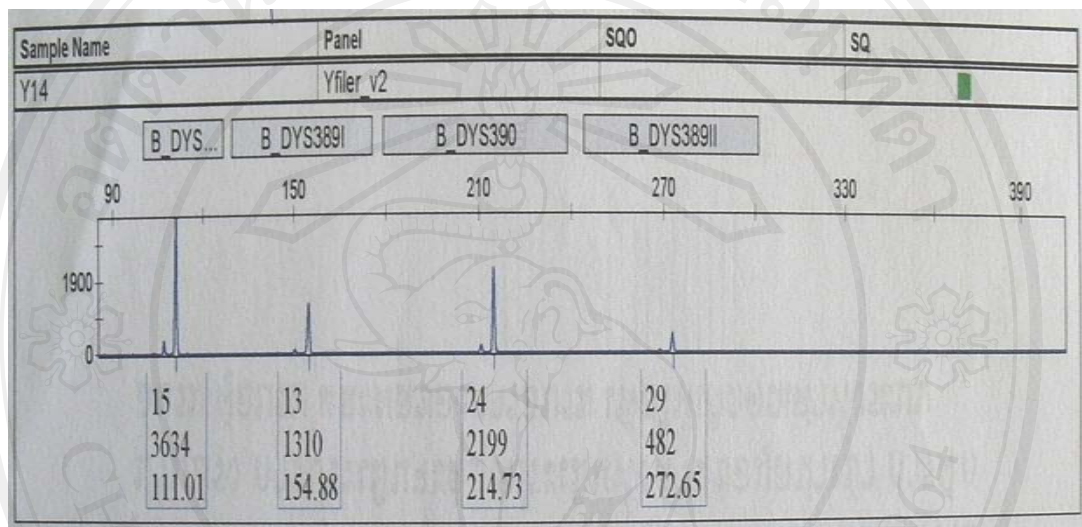
หมายเหตุ : ถ้าในตัวอย่างตะกอนแขวนลอยที่ได้จากการสกัดไม้สวอปป้ายช่องคลอดของผู้เสียหาย ตรวจพบว่า มีตัวอสุจิที่ไม่สมบูรณ์เพียง 1 ตัวเดียวในคราบ เราจะถือว่า น้ำซั้บช่องคลอดนั้นให้ผลเป็นลบ หรือตรวจไม่พบตัวอสุจิ แต่ถ้าในตัวอย่างตะกอนแขวนลอย มีการตรวจพบตัวอสุจิที่สมบูรณ์เพียงตัวเดียว ให้ถือว่า น้ำซั้บช่องคลอดนั้นให้ผลเป็นบวก หรือตรวจพบตัวอสุจิ ทันที



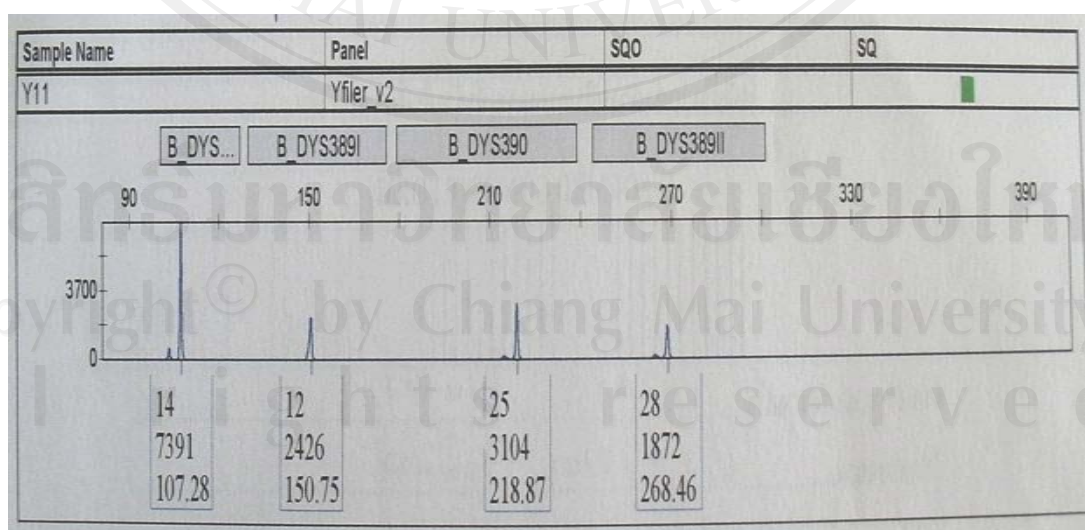
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ก

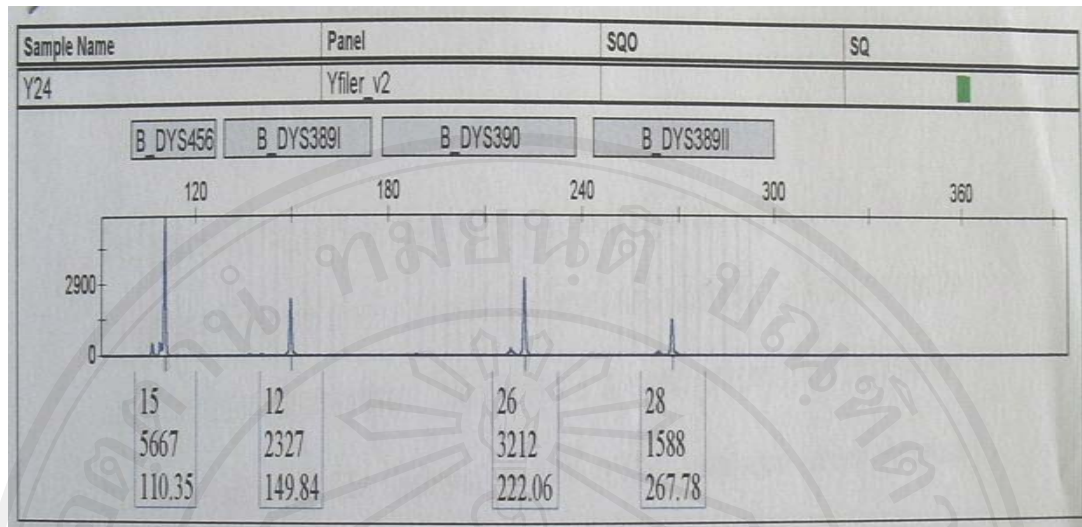
แสดงผลการตรวจลักษณะดีเอ็นเอ ด้วย Applied Biosystems



ภาพ 11 แสดง GeneMapper® ID electropherogram จากตัวอย่างเลือด ชายคนที่ 1 ซึ่งมีจำนวนชุดเบสซ้ำๆกัน 24 ชุด (อัลลีล 24) ในตำแหน่ง DYS390



ภาพ 12 แสดง GeneMapper® ID electropherogram จากตัวอย่างเลือด ชายคนที่ 2 ซึ่งมีจำนวนชุดเบสซ้ำๆกัน 25 ชุด (อัลลีล 25) ในตำแหน่ง DYS390



ภาพ 13 แสดง GeneMapper® ID electropherogram จากตัวอย่างเลือด ชายคนที่ 3 ซึ่งมีจำนวนชุดเบสซ้ำๆกัน 26 ชุด (อัลลีล 26) ในตำแหน่ง DYS390

ภาคผนวก ง

วิธีการเตรียมสารเคมีต่างๆสำหรับใช้ในขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค PCR การแยก
แถบดีเอ็นเอโดยผ่านกระแสไฟฟ้า และการย้อมเจลด้วยวิธี Silver staining

1. การเตรียมสารเคมีสำหรับใช้ในขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

1.1 **Jump start** : ใช้น้ำยาสำเร็จจากบริษัท SIGMA® ซึ่งในตัวน้ำยาจะประกอบไปด้วย
20 mM Tris-HCl, pH8, 100 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 0.002% Gelatin, 0.4 mM each dNTP(dATP,
dCTP, dGTP, dTTP), Inert dye, Stabilizers, 0.06 unit/μl Taq DNA Polymerase, JumpStart Taq
antibody.

1.2 **5 μM each Primers mix (ตำแหน่ง DYS390)** : โดยเตรียมจาก stock ที่มีความเข้มข้น
10 μM ของแต่ละ Primer ดังนั้น ถ้าเราต้องการเตรียม Primer mix ปริมาตร 100 μl วิธีเตรียม คือ นำ
สารละลายของ Primer F และ Primer R อย่างละ 50 μl มาผสมใน Microcentrifuge tube เราก็จะได้
5 μM each Primers mix ปริมาตร 100 μl

2. การเตรียมสารเคมีสำหรับใช้ในขั้นตอนการแยกแถบดีเอ็นเอ (PCR product)

2.1 วิธีเตรียม 34% Acrylamide solution

- Acrylamide 16.18 g
- N,N'methylenebisacrylamide 0.81 g
- เติมน้ำกลั่นลงไปในส่วนที่ชั่งเสร็จแล้วให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 50 ml.

2.2 วิธีเตรียม 10X Gel buffer (330 mM Tris)

- ชั่ง Tris 8.0 g (ละลายในน้ำกลั่น)
- ปรับ pH ด้วย Sulfuric acid ให้ได้ pH = 4.5
- เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 200 ml

2.3 วิธีเตรียม 8.5% Acrylamide gel (ปริมาตร 37 มิลลิตร / 1 แผ่น)

- | | | |
|--------------------------------------|-------|----|
| - น้ำกลั่น | 21.26 | ml |
| - 10X Gel buffer | 3.7 | ml |
| - Acrylamide solution | 9.3 | ml |
| - 87% Glycerol | 2.55 | ml |
| - 10% Ammoniumpersulfate | 191.0 | μl |
| - Tetramethylethylenediamine (TEMED) | 14.0 | μl |
- ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันโดยใช้ Stirrer plate นาน 1 นาที ไม่ควรใช้ความแรงในการหมุนมากเกินไป สังเกตโดยไม่ให้เกิดฟองอากาศในส่วนผสม
- นำสารผสมเทลงในชุดกระจกสำหรับเตรียมเจล (ที่เตรียมไว้แล้ว) ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 2 ชั่วโมงจึงนำไปใช้ในการแยกแอมป์ดีเอ็นเอ (PCR product) ได้

2.4 วิธีเตรียม 2.5X Running TBE buffer (Stock solution)

- | | | |
|--|------|----|
| - 89 mM Tris | 5.4 | g |
| - 2 mM EDTA | 3.72 | g |
| - 89 mM Boric acid | 27.5 | g |
| - เติมน้ำกลั่นลงในสารให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ | 2000 | ml |

Working Solution (เตรียม 1000 ml)

- | | | |
|-----------------------------------|-----|----|
| - Running buffer (Stock solution) | 400 | ml |
| - น้ำกลั่น | 600 | ml |

3. การเตรียมสารเคมีสำหรับใช้ในขั้นตอนการย้อมเจล (1 แผ่น)

3.1 เตรียม 1% Nitric acid: ดูดสารละลายของ 65% Nitric acid ปริมาตร 3.076 ml (หรือประมาณ 3 ผสมลงในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้เท่ากับ 200 ml (คนให้เข้ากัน)

3.2 เตรียม 0.012 M Silver nitrate solution: ชั่งสาร Silver nitrate 0.4 g นำไปละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้เท่ากับ 200 ml

3.3 เตรียม 0.28 M Sodium carbonate: ชั่งสาร Sodium carbonate 11.8 g นำไปละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้เท่ากับ 390 ml

3.4 เตรียม 0.019% Formalin : คัดสารละลายของ 40% Formalin ปริมาตร 0.18525 ml (หรือประมาณ 185 μ l) ผสมลงไปในสารละลาย Sodium carbonate (ที่เตรียมไว้ในข้อ 3.3)

3.5 เตรียม 10% Glacial acetic acid : คัดสารละลายของ 100% Glacial acetic acid ปริมาตร 20 ml ผสมลงในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้เท่ากับ 200 ml (คนให้เข้ากัน)



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก จ

แสดงสูตรวิเคราะห์ทางสถิติด้วย McNemar chi-square test

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

ตาราง 6 การเปรียบเทียบระหว่างการตรวจ ตัวอสุจิกับดีเอ็นเอ ตำแหน่ง DYS390

อสุจิ	DYS390	
	ผลลบ	ผลบวก
ผลลบ	18 (a)	12 (b)
ผลบวก	7 (c)	23 (d)

เมื่อนำค่าในตารางมาแทนค่าในสูตรการคำนวณจะได้ ดังนี้

$$\begin{aligned}\chi^2 &= \frac{(|18 - 23| - 1)^2}{18 + 23} \\ &= 0.390243902\end{aligned}$$

ตาราง 7 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย McNemar chi-square test โดยใช้โปรแกรม SPSS 16

Test Statistics ^b	
	อสุจิ & DYS390
N	60
Exact Sig. (2-tailed)	.359 ^a

a. Binomial distribution used.

b. McNemar Test

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นางสาวปณณภา ขาวีระ
วัน เดือน ปี เกิด	10 กรกฎาคม 2529
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนแม่ทาวิทยาคม ปีการศึกษา 2545 สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนสวนบุญโญปถัมภ์ ลำพูน ปีการศึกษา 2548 สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2552

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved