



ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การตรวจหาตัวอสุจิ

สกัดตัวอสุจิออกจากไม้พันก้านสำลีช่องคลอด(Vaginal swab) หรือวัตถุพยานที่สงสัย โดย
นำแช่ใน 1% NH_4OH ตั้งทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้องประมาณ 30-60 นาที น้ำยาจะมีลักษณะขุ่น นำไปปั่น
ที่ 2,400 rpm 5 นาที คูด่วนที่เป็นน้ำทิ้งไป คูด่วนที่เป็นตะกอนเกลี่ยบน microscopic slide วาง
ผึ่งให้แห้งในอุณหภูมิห้องจากนั้นนำไปย้อมสีด้วยวิธีของ OPPITZ

การเตรียมน้ำยา

Solution A: Nuclear fast red

ละลาย Nuclear fast red 0.1 กรัมใน 5% Aluminium sulfate 100 มล. ต้มประมาณ 5 นาทีทิ้งไว้
ให้เย็น กรอง ถ้าเติม Thymol เล็กน้อย เป็น preservative จะสามารถเก็บไว้ใช้ได้นานหลายเดือน

5% Aluminium sulfate ละลาย Aluminium sulfate 5 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มล.อุ่นน้ำยาให้ร้อน
เพื่อช่วยให้ละลายดีขึ้น

Solution B : Indigocarmin

ละลาย Indigocarmin 1 กรัม ใน Picric acid saturated solution 300 มล.นำไปกรองโดยใช้

กระดาษกรอง

วิธีย้อม

1. Fix cells ที่ smear บน slide โดยแช่ใน 95% Ethanol 15-30 นาที
2. แช่ใน Solution A 30 นาที
3. ล้างน้ำประปาเบาๆ
4. แช่ใน Solution B 20 นาที

5. แช่ใน 95% Ethanol 5 วินาที

6. เมื่อ slide แห้งแล้ว หยด Xylene และ mount

ส่วนของ Oval head ของตัวอสุจิจะติดสีม่วง ส่วน distal half จะใส Epithelial cells จะติดสีเขียวอ่อน Nucleus จะติดสีม่วง

การกำหนดปริมาณตัวอสุจิที่ตรวจพบ

นำ Slide ที่ได้ย้อมสี คราบน้ำสักรัดจากไม้พ่นก้านสำลีซับน้ำในช่องคลอด ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1 เซนติเมตร นำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ให้ทั่วทั้งคราบที่ได้เกลี่ยไว้ นับตัวอสุจิที่พบ แล้วให้เกรดตามจำนวนที่ตรวจพบดังนี้

- ตรวจไม่พบตัวอสุจิ ให้เกรด -ve
- ตรวจพบตัวอสุจิ 1 ตัว ให้เกรด Few
- ตรวจพบตัวอสุจิ 2-3 ตัว ให้เกรด 1+
- ตรวจพบตัวอสุจิ 4-5 ตัว ให้เกรด 2+
- ตรวจพบตัวอสุจิ 6-8 ตัว ให้เกรด 3+
- ตรวจพบตัวอสุจิ 9 ตัวขึ้นไป ให้เกรด 4+

with tail = ตัวอสุจิที่พบมีหาง

การตรวจ Acid phosphatase

การเตรียมน้ำยา

Stock solution A

Naphthanal Diazo Blue B (Fast Blue B Salt) 1 gm

Sodium acetate (hydrated) 20 gm

Glacial acetic acid	10	mL
Distilled water	100	mL
Stock solution B		
Sod.-Alpha-Naphthyl acid phosphate	0.08	gm
Distilled water	90	ml

Working solution

Stock solution A 1 mL + Stock solution B 9 mL

Mix, filter

เก็บสารละลายในขวดสีน้ำตาล คงตัวได้ 1-2 สัปดาห์

วิธีการตรวจ

นำ Working solution หยดลงบนคราบที่สงสัย

ผลบวก จะเกิดสีม่วงภายในเวลา 60 วินาที

การตรวจหาระดับ Acid phosphatase

การเตรียมตัวอย่าง

สกัดคราบอสุจิออกจากตัวอย่างไม้ฟันสำลี หรือวัตถุพยานที่สงสัย โดยนำแช่ใน NSS 2.5 ml ตั้งทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้องประมาณ 15-30 นาที น้ำจะมีลักษณะขุ่น นำไปปั่นที่ 2,400 rpm 5 นาที คูณส่วนที่เป็นน้ำไปทดสอบเบื้องต้น ตรวจวัดระดับ AP และตรวจหาหมู่เลือด คูณส่วนที่เป็นตะกอน เกลี่ยบน microscopic slide วางฝั่งให้แห้งในอุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปย้อมสีเพื่อตรวจหาตัวอสุจิ

การวัดระดับ AP

- เติม buffer substrate 0.50 ml ลงในหลอดทดลองขนาด 12x75 มิลลิเมตร
นำไปอุ่นใน water bath 37°C เป็นระยะเวลา 5 นาที
- เติมตัวอย่างของเหลวหรือ NSS (blank) 0.10 ml ลงไปในหลอดทดลอง
- แห่อบที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นระยะเวลา 30 นาที
- เติม color developer 2.5 ml
- ผสมสารละลายให้เข้ากัน นำไปอ่านค่า OD ที่ความยาวคลื่น 590 nm โดยเทียบกับ Blank

$$AP = OD \times 620.35 \quad U/L$$

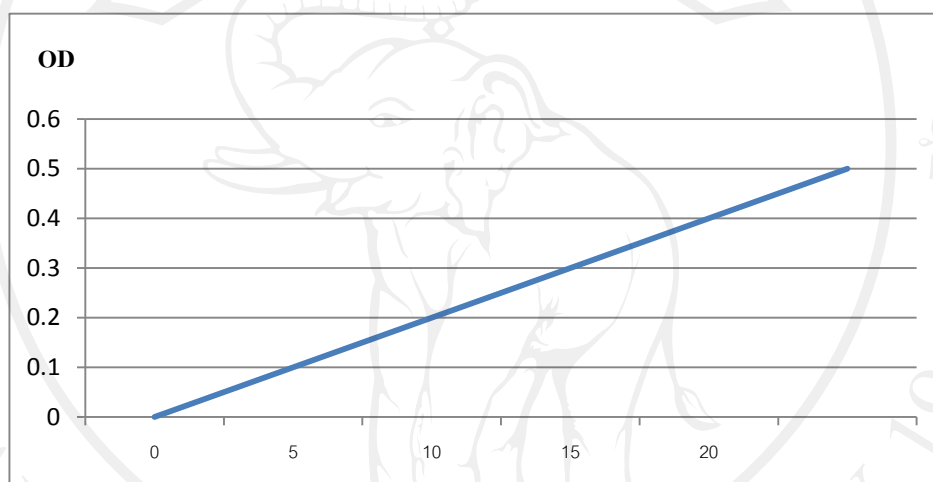
$$(\text{swab} + \text{กระดาษกรอง}) = AP \times 2 \quad U/L$$

ความเข้มข้น (U/L)	Working solution (mL)	Ethanol (mL)
1.5	0.5	4.5
3	1	4
6	2	3
9	3	2
12	4	1
15	5	0

ตารางที่ 5 แสดงความเข้มข้นและปริมาณของสารละลายมาตรฐาน

สำหรับการตรวจหาระดับ Acid phosphatase

- เติม buffered substrate 0.50 mL ลงในหลอดทดลอง 7 หลอด
- เติมสารละลายมาตรฐานที่เป็นค่าความเข้มข้นต่างๆ หรือ NSS (blank) 0.10 mL ลงไปในหลอดทดลองแต่ละหลอด
- เติม color developer 2.5 mL
- ผสมสารละลายให้เข้ากัน นำไปวัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 590 nm โดยเทียบกับ blank
- นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐาน



ภาพที่ 7 แสดงกราฟมาตรฐานสำหรับการตรวจหาปริมาณ Acid phosphatase activity

การเตรียมสารเคมีในการสกัดตัวอย่าง

1. การเตรียมน้ำยา Chelex ความเข้มข้น 5 %

Chelex 100 1 g

H₂O 20 ml

2. การเตรียม Proteinase k 100 mg/ml (Stock solution)

ผงสาร Proteinase k 0.1 g

ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1000 ml

การเตรียม Proteinase k 10 mg/ml (Working solution)

Proteinase k (100 mg/ml)	100	μl
เติมน้ำกลั่น	900	μl
จะได้ Proteinase k 10 mg/ml ปริมาตร 1 ml		

การเตรียมสารเคมีในกระบวนการการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค LAMP

1. การเตรียม Primer Mix ปริมาตร 100 μl

FIP	Primer Stock 100 μM	16	μl
BIP	Primer Stock 100 μM	16	μl
F3	Primer Stock 100 μM	2	μl
B3	Primer Stock 100 μM	2	μl
H ₂ O		64	μl
ผสมให้เข้ากันจะได้สารละลายที่มีปริมาตร 100			μl

2. การเตรียม dNTPs เข้มข้น Stock 2.5 mM each ปริมาตร 100 μl

dATP	Stock 100 mM	2.5	μl
dTTP	Stock 100 mM	2.5	μl
dCTP	Stock 100 mM	2.5	μl
dGTP	Stock 100 mM	2.5	μl
H ₂ O		90	μl

ผสมให้เข้ากันจะได้สารละลายที่มีปริมาตร 100 μl

การเตรียมสารละลายในกระบวนการแยกแอมป์เอ็นเอโดยผ่านกระแสไฟฟ้า(Acrylamide gel electrophoresis)

1. การเตรียม 34% Acrylamide solution

Acrylamide	16.18	g
N,N'methylenebisacrylamide	0.82	g

ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 50 ml

2. การเตรียม 10X Gel buffer (330 mM Tris)

Tris	8.0	g
------	-----	---

ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 200 ml

ปรับ pH ด้วยกรดซัลฟิวริก ให้เท่ากับ 4.5

3. การเตรียม 8.5% Acrylamide gel (ปริมาตร 37.015 มิลลิลิตร/ 1 แผ่น)

น้ำกลั่น	21.26	ml
10X Gel buffer	3.7	ml
34% Acrylamide solution	9.3	ml
87% Glycerol	2.55	ml
10% Ammonium persulfate	191.0	μ l
Tetramethylethylenediamine	14.0	μ l

ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันโดยใช้ Stirrer plate นาน 1 นาที ไม่ควรใช้ความแรงในการหมุนมากเกินไป โดยสังเกตไม่ให้เกิดฟองอากาศในส่วนผสม จากนั้นเทลงในชุดกระจกสำหรับเตรียมเจล ปักหัวสำหรับทำให้เกิดช่อง แล้วทิ้งเจลไว้ประมาณ 2 ชั่วโมง

4. การเตรียม 2.5X Running TBE buffer (Stock solution)

- Tris	54.0	g
- EDTA	3.72	g
- Boric acid	27.5	g

ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 2 l

วิธีเตรียม Working Solution

2.5X Running buffer (Stock solution)	1	l
น้ำกลั่น	1.5	l

5. การเตรียม Loading dye Glycerol & bromophenol blue (6X)

ขี้้ Bromophenol blue	25	mg
30% Glycerol	3	ml
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	10	ml

ผสมสารทั้งหมดจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

6. วิธีแยกแอมป์ดีเอ็นเอ

- เติม loading dye 2 μ l ลงไปใน LAMP product 25 μ l
- ใส่ LAMP product ที่เติม loading dye แล้วลงใน Acrylamide gel ที่เตรียมไว้ ปริมาณ 4 μ l
- ใช้กระแสไฟฟ้า 90 volt นาน 7 ชั่วโมง 30 นาที
- ทำการย้อมเจลด้วยวิธี Silver Staining

การย้อมเจดด้วยวิธี Silver staining

1. เติม 1% Nitric acid [3 ml 65% Nitric acid + น้ำกลั่น 200 ml] เขย่า 10 นาทีแล้วเททิ้ง
2. ล้างเจดด้วยน้ำกลั่น 5-10 วินาทีแล้วเททิ้ง 2 ครั้ง
3. เติม 0.012M Silver nitrate solution [0.4 g Silver nitrate + น้ำกลั่น 200 ml] เขย่า 35 นาทีแล้วเททิ้ง
4. ล้างเจดด้วยน้ำกลั่น 5-10 วินาทีแล้วเททิ้ง 2 ครั้ง
5. เติม 0.28 M Sodium carbonate และ 0.019% formalin [11.8 g Sodium carbonate + น้ำกลั่น 390 ml แล้วเติม 37% formalin 205 μ l] ลงไป 50 ml เมื่อสีของสารละลายเปลี่ยน เป็นสีน้ำตาลให้เททิ้ง และเติมส่วนที่เหลือลงไปเขย่าจนเห็นแถบดีเอ็นเอบนเจดชัดเจน
6. หยุดปฏิกิริยาด้วย 10% glacial acetic acid [20 ml 100% glacial acetic acid + น้ำกลั่น 180 ml] เขย่านาน 5 นาที
7. ล้างด้วยน้ำกลั่นประมาณ 200 ml นาน 1 นาที 3 ครั้งหรือจนหมดกลิ่น
8. ถ่ายรูปหรือนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง Gel dryer

ภาคผนวก ข

รายละเอียดตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

ตารางที่ 5 แสดงรายละเอียดของตัวอย่างน้ำขับช่องคลอดของผู้เสียหาย

ลำดับที่	ระยะเวลาที่เข้า รับการตรวจ	เวลาที่ให้ผลบวก ของการตรวจหา AP (วินาที)	ปริมาณ AP (U/ml)	ปริมาณที่ตรวจ พบตัวอสุจิ
1	24	15	-	2+
2	24	30	>1000	3+
3	24	32	>1000	4+
4	24	30	>1000	4+
5	24	20	>1000	4+
6	72	40	-	1+ with Tail
7	72	30	-	2+ with Tail
8	48	33	>1000	2+
9	48	12	>1000	3+
10	48	27	636	1+ with Tail
11	48	13	-	1+
12	48	40	-	2+ with Tail
13	24	25	-	1+
14	48	40	-	Few
15	48	40	-	1+

ตารางที่ 5 (ต่อ)

ลำดับที่	ระยะเวลาที่เข้า รับการตรวจ	เวลาที่ให้ผลบวก ของการตรวจหา AP (วินาที)	ปริมาณ AP (U/ml)	ปริมาณที่ตรวจ พบตัวอสุจิ
16	48	14	-	Few
17	24	30	-	Few
18	48	30	388	2+ with Tail
19	48	23	391	2+ with Tail
20	48	24	107	Few with Tail
21	48	44	121	1+
22	72	30	-	1+
23	72	30	-	1+
24	72	26	684	1+
25	72	29	862	1+
26	24	18	464	1+
27	48	30	>1000	2+ with Tail
28	48	33	>1000	2+ with Tail
29	48	7	>1000	2+
30	48	15	>1000	2+
31	72	9	-	-ve
32	24	7	-	-ve
33	48	8	212	-ve
34	48	22	85	-ve
35	48	20	372	-ve
36	48	21	92	-ve
37	48	10	-	-ve
38	48	20	-	-ve
39	48	13	-	-ve
40	24	ทันที	-	-ve

ตารางที่ 5 (ต่อ)

ลำดับที่	ระยะเวลาที่เข้า รับการตรวจ	เวลาที่ให้ผลบวก ของการตรวจหา AP (วินาที)	ปริมาณ AP (U/ml)	ปริมาณที่ตรวจ พบตัวอสุจิ
41	48	13	-	-ve
42	48	30	-	-ve
43	48	14	-	-ve
44	48	30	-	-ve
45	24	23	-	-ve
46	24	20	-	-ve
47	24	3	-	-ve
48	72	25	-	-ve
49	72	20	-	-ve
50	72	50	-	-ve
51	48	36	190	-ve
52	24	8	-	-ve
53	48	7	153	-ve
54	48	22	98	-ve
55	48	30	258	-ve
56	72	30	124	-ve
57	72	8	101	-ve
58	48	7	-	-ve
59	48	10	-	-ve
60	48	8	-	-ve

-ve = ตรวจไม่พบตัวอสุจิ

- = ไม่มีผลการตรวจหาปริมาณ Acid phosphatase

ภาคผนวก ค

ตารางค่าทางสถิติ

ตาราง 6 แสดงค่าไคสแควร์ที่ใช้ในการทดสอบสมมติฐาน

df	α														
	0.99	0.95	0.90	0.80	0.70	0.60	0.50	0.40	0.30	0.20	0.10	0.05	0.025	0.01	0.005
1	0.0002	0.004	0.016	0.064	0.15	0.28	0.46	0.71	1.07	1.64	2.71	3.84	5.02	6.64	7.88
2	0.02	0.10	0.21	0.45	0.71	1.02	1.39	1.83	2.41	3.22	4.61	5.99	7.38	9.21	10.6
3	0.12	0.35	0.58	1.01	1.42	1.87	2.37	2.95	3.67	4.64	6.25	7.82	9.35	11.4	12.8
4	0.29	0.71	1.06	1.65	2.19	2.75	3.36	4.05	4.88	5.99	7.78	9.49	11.1	13.3	14.9
5	0.55	1.15	1.61	2.34	3.00	3.66	4.35	5.13	6.06	7.29	9.24	11.1	12.8	15.1	16.8
6	0.87	1.64	2.20	3.07	3.83	4.57	5.35	6.21	7.23	8.56	10.7	12.6	14.5	16.8	18.6
7	1.24	2.17	2.83	3.82	4.67	5.49	6.35	7.28	8.38	9.80	12.0	14.1	16.0	18.5	20.3
8	1.65	2.73	3.49	4.59	5.53	6.42	7.34	8.35	9.52	11.0	13.4	15.6	17.5	20.1	21.9
9	2.09	3.33	4.17	5.38	6.39	7.36	8.34	9.41	10.7	12.2	14.7	16.9	19.0	21.7	23.6
10	2.56	3.94	4.87	6.18	7.27	8.29	9.34	10.5	11.8	13.4	15.9	18.3	20.5	23.2	25.2
20	8.26	10.9	12.4	14.6	16.3	17.8	19.3	20.9	22.8	25.0	28.4	31.4	34.2	37.6	39.9
30	14.9	18.5	20.6	23.4	25.5	27.4	29.3	31.3	33.5	36.3	40.3	43.8	46.9	50.9	53.7
40	22.2	26.5	29.1	32.4	34.9	37.1	39.3	41.6	44.2	47.3	51.8	55.8	59.3	63.7	66.8
50	29.7	34.8	37.7	41.5	44.3	46.9	49.3	51.9	54.7	58.2	63.2	67.5	71.4	76.2	79.5

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ – สกุล

นาย ชีระชัย วชิราวิโรจน์

วัน เดือน ปีเกิด

20 พฤษภาคม 2531

ประวัติการศึกษา

สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชากายภาพบำบัด
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 2553

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved