

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ



242886

**การศึกษาไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอตำแหน่ง DYS 393 จากตัวอย่าง
สำลีป้ายช่องคลอดเพื่อเป็นตัวบ่งชี้ของการมีเพศสัมพันธ์**

ศราลักษณ์ ศักดิ์เกียรติชัย

**วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์**

**บัณฑิตวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
สิงหาคม 2554**



**การศึกษาไมโครเซกเทิลไลท์ดีเอ็นเอตำแหน่ง DYS 393 จากตัวอย่าง
สำลีป้ายช่องคลอดเพื่อเป็นตัวบ่งชี้ของการมีเพศสัมพันธ์**

ศราลักษณ์ ตักดีเกียรติชัย

**การค้นคว้าแบบอิสระนี้เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัยเพื่อเป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์**

**บัณฑิตวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
สิงหาคม 2554**

การศึกษาไมโครเซกเทิลไลท์ดีเอ็นเอตำแหน่ง DYS 393 จากตัวอย่างสำลีป้ายช่องคลอด
เพื่อเป็นตัวบ่งชี้ของการมีเพศสัมพันธ์

ศราลักษณ์ ศักดิ์เกียรติชัย

การค้นคว้าแบบอิสระนี้ได้รับการพิจารณาอนุมัติให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์

คณะกรรมการสอบการค้นคว้าแบบอิสระ



.....ประธานกรรมการ

ศ.พญ. เลิศลักษณ์ ภูพัฒน์

อาจารย์ที่ปรึกษาการค้นคว้าแบบอิสระ



.....

ศ.นพ. ชานินทร์ ภูพัฒน์



.....กรรมการ

ศ.นพ. ชานินทร์ ภูพัฒน์



.....กรรมการ

พ.ต.อ วันชัย ฉันทชล

25 สิงหาคม 2554

© ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเชียงใหม่

กิตติกรรมประกาศ

การค้นคว้าแบบอิสระครั้งนี้สำเร็จลงได้ด้วยความช่วยเหลือจาก ศ.นพ.ธานินทร์ ภูพัฒน์ อาจารย์ที่ปรึกษาการค้นคว้าแบบอิสระ ที่ได้ให้คำปรึกษา รวมไปถึงการแนะนำวิธีแก้ไขปัญหาต่างๆ ที่เกิดขึ้นตลอดระยะเวลาที่ได้ทำการค้นคว้าแบบอิสระ รวมไปถึงคอยตรวจทานแก้ไขจนการค้นคว้าแบบอิสระครั้งนี้เสร็จสมบูรณ์ ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณ ศ.นพ.ธานินทร์ ภูพัฒน์ ศ.พญ.เลิศลักษณ์ ภูพัฒน์ และ พ.ศ.อ.วันชัย ฉันทชล ที่กรุณาได้รับเป็นกรรมการสอบการค้นคว้าแบบอิสระในครั้งนี้ และขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์ทุกท่านที่ให้คำแนะนำเป็นอย่างดีตลอดมา

ขอขอบคุณ คุณสุทัศน์ ศรีดวงแก้ว และ คุณพัชรินทร์ มหาวงศ์ (เจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการนิติพันธุศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่) นพ. วิศาล วรสุวรรณรักษ์ (แพทย์นิติเวช) และคุณกิติยาภรณ์ พลาพล คุณกิตติพรหม เทพรัตน์ และ คุณสุภัก ลออชาติชน (เจ้าหน้าที่ประจำศูนย์สวนดอกกัญชาพันธุศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่) ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาและช่วยอำนวยความสะดวกในการทำงานด้านปฏิบัติการให้สำเร็จด้วยดี และขอขอบคุณ คุณอัญญรัตน์ บุญชูวิทย์ เจ้าหน้าที่ประสานงานสาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์ที่คอยช่วยเหลือประสานงานต่างๆกับทางมหาวิทยาลัย รวมทั้งญาติผู้เกี่ยวข้องทุกท่าน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง คุณพ่อ คุณแม่ และเพื่อนๆทุกคน ที่ได้ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจให้ทำการค้นคว้าแบบอิสระครั้งนี้ผ่านไปได้อย่างดี

หากการค้นคว้าแบบอิสระในครั้งนี้มีข้อขาดตกบกพร่องหรือผิดพลาดประการใด ผู้เขียนก็ขออภัยมา ณ ที่นี้ด้วย และหวังว่าการค้นคว้าแบบอิสระครั้งนี้คงมีประโยชน์ต่อผู้ที่ได้ศึกษา ผู้ที่มีความสนใจในงานทางด้านนี้ รวมไปถึงหน่วยงานที่เกี่ยวข้องไม่มากนักน้อย

ศราลักษณ์ ศักดิ์เกียรติชัย

ชื่อเรื่องการค้นคว้าแบบอิสระ	การศึกษาไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอตำแหน่ง DYS 393 จากตัวอย่างสำลีป้ายช่องคลอดเพื่อ เป็นตัวบ่งชี้ของการมีเพศสัมพันธ์
ผู้เขียน	นางสาวศรลัทภรณ์ ศักดิ์เกียรติชัย
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (นิติวิทยาศาสตร์)
อาจารย์ที่ปรึกษาการค้นคว้าแบบอิสระ	ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ธานีทร ภูพัฒน์

บทคัดย่อ

242886

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการตรวจดีเอ็นเอของโครโมโซมเพศชายในตำแหน่ง DYS 393 เปรียบเทียบกับการตรวจหาตัวสูจิจากน้ำซ้บช่องคลอดของผู้เสียหายเพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้การมีเพศสัมพันธ์ ซึ่งทำการทดลองกับตัวอย่างน้ำซ้บช่องคลอดจากภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ตรวจพบเอนไซม์ Acid Phosphatase จำนวน 60 ตัวอย่าง ที่แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่ตรวจพบตัวสูจิในปริมาณ 1+, 2+ และ 3+ รวมทั้งหมด 30 ตัวอย่าง และอีก 30 ตัวอย่างคือกลุ่มที่ตรวจไม่พบตัวสูจิ จากนั้นสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีแบบไม่แยกชนิดเซลล์ (total extraction) และเพิ่มปริมาณ โดยวิธี PCR ก่อนนำไปแยกใน 8.5% acrylamide gels พบว่า โอกาสของการตรวจพบตำแหน่ง DYS 393 บนโครโมโซมเพศชาย มีความแตกต่างจากผลการทดสอบด้วยวิธีการตรวจหาตัวสูจิที่ค่า $p < 0.001$ และโอกาสที่ตรวจพบจะแปรผันตามปริมาณของตัวสูจิที่มีในตัวอย่าง ซึ่งถือได้ว่าการตรวจหาดีเอ็นเอตำแหน่ง DYS393 บนโครโมโซมเพศชาย สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้การมีเพศสัมพันธ์ได้ และยังช่วยเพิ่มน้ำหนักของวัตถุพยานในคดีที่มีการกระทำชำเราเพิ่มมากขึ้นและสามารถใช้เป็นประโยชน์ในการดำเนินคดีหรือเป็นพยานหลักฐานช่วยในการเอาผิดผู้ร้ายกรณีที่มีการล่วงละเมิดทางเพศได้มากขึ้น

Independent Study Title A Study of Microsatellite DNA DYS 393 from
Vaginal Swabs as an Indicator of Sexual
Intercourse

Author Miss Saraluck Sakkiattichai

Degree Master of Science (Forensic Science)

Independent Study Advisor Prof. Tanin Bhoopat, M.D.

ABSTRACT

242886

This study was conducted to learn the chance of detection evidence of abuse by examining the differences between DYS 393 locus on Y-chromosome and spermatozoa from vaginal swabs of the raped victims. The Y-STR locus DYS 393 was compared with the Oppitz staining method. 60 acid phosphatase positive vaginal swabs from the Department of Forensic Medicine were divided into 2 groups : sperm positive and sperm negative. The sperm positive group was further divided into three subgroups depending on the amount of spermatozoa (1+, 2+ and 3+). Total DNA was extracted and amplified using PCR; the PCR product was analyzed on polyacrylamide gels. The chance of detection of spermatozoa was different using either the amplification of locus DYS393 or the Oppitz test ($p < 0.001$) and the opportunity to detect locus DYS393 varies with the amount of sperm cells in the specimen.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญภาพ	ฉ
อักษรย่อและสัญลักษณ์	ญ
บทที่ 1 บทนำ	1
ที่มาและความสำคัญของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของการค้นคว้า	12
สมมติฐานการค้นคว้า	12
ขอบเขตการค้นคว้า	12
ประโยชน์ที่ได้รับจากการศึกษาค้นคว้าเชิงทฤษฎีและ/หรือเชิงประยุกต์	12
บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	13
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	15
สถานที่ทำการวิจัย	15
วัสดุและอุปกรณ์ในการทดลอง	15
สารเคมีในการทดลอง	16
วิธีการทดลอง	17
1. ตัวอย่างและการเก็บตัวอย่าง	17
1.1 การกำหนดขนาดตัวอย่าง	17
1.2 การคัดเลือกตัวอย่าง	19
2. การสร้างอัลลีลมาตรฐาน (Allelic ladders)	20
3. วิธีการตรวจ microsatellite DNA	21

4.การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction)	22
5.การแยกแถบดีเอ็นเอ โดยการผ่านกระแสไฟฟ้า (Electrophoresis)	23
6.การย้อมเจลด้วยวิธี Silver staining	24
7.การอ่านและแปลผลการทดลอง	25
บทที่ 4 ผลการค้นคว้าและอภิปรายผลการค้นคว้า	26
บทที่ 5 สรุปผลการค้นคว้า	39
บรรณานุกรม	40
ภาคผนวก	44
ภาคผนวก ก การตรวจหาตัวสูจิ	45
ภาคผนวก ข การเตรียมสารเคมีต่างๆสำหรับใช้ในขั้นตอนการเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR การแยกแถบดีเอ็นเอโดยผ่านกระแสไฟฟ้า และการย้อมเจลด้วยวิธี Silver staining	51
ภาคผนวก ค ข้อมูลตัวอย่างน้ำซับช่องคลอดของผู้เสียหายทั้ง 60 ตัวอย่าง	54
ภาคผนวก ง ภาพ Electropherogram ของตัวอย่าง DNA ตำแหน่ง DYS 393 ที่นำมาเป็น DNA มาตรฐาน	57
ภาคผนวก จ แสดงการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย McNemar chi-square test	59
ประวัติผู้เขียน	

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
1 การเปรียบเทียบระหว่างการตรวจ PSA กับ ดีเอ็นเอของ SRY gene	18
2 ส่วนผสมในการเตรียม polyacrylamide gel 8.5%	23
3 แสดงผลการตรวจพบ microsatellite DNA บนโครโมโซมเพศชายตำแหน่ง DYS 393 จากน้ำซ้บช่องคลอดของผู้เสียหายเปรียบเทียบกับ การตรวจพบตัวอสุจิ	29
4 เปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างการตรวจพบ Microsatellite DNA และการตรวจ พบตัวอสุจิ	32
5 ข้อมูลตัวอย่างน้ำซ้บช่องคลอดของผู้เสียหายทั้ง 60 ตัวอย่าง	54
6 การเปรียบเทียบระหว่างการตรวจ ตัวอสุจิกับดีเอ็นเอตำแหน่ง DYS393	59
7 ผลวิเคราะห์ทางสถิติด้วย McNemar chi-square test	60
8 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย t-test independent โดยใช้โปรแกรม spss 16	61

สารบัญภาพ

ภาพ	หน้า
1 แสดงโมเลกุลของดีเอ็นเอที่บิดเป็นเกลียวคล้ายบันไดเวียน	4
2 แสดงโครโมโซมทั้งหมด 23 คู่	5
3 แสดงตัวอย่างวิธีการตรวจดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RFLP และ PCR	7
4 แสดงส่วนของดีเอ็นเอที่แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำกันเป็นชุด	8
5 แสดงตำแหน่งดีเอ็นเอบนโครโมโซมเพศชาย	11
6 แสดงลักษณะการจัดเรียงตัวของเบสเป็นชุดๆที่ซ้ำกันของตำแหน่ง DYS 393	11
7 แสดงอัลลีลมาตรฐานของโครโมโซมเพศชายตำแหน่ง DYS 393	26
8 แสดงแถบดีเอ็นเอจากตัวอย่างน้ำขับช่องคลอดของผู้เสียหายที่ถูกกระทำชำเรา เปรียบเทียบ กับตัวอย่างเลือดของผู้หญิง, ตัวอย่างเลือดผู้ชาย (positive control) และอัลลีลมาตรฐาน	28
9 9.1 แสดงโอกาสการตรวจพบลักษณะ Microsatellite DNA บนโครโมโซมเพศชาย ตำแหน่ง DYS 393 เทียบกับกลุ่มที่ตรวจพบตัวสุจิและกลุ่มที่ตรวจไม่พบตัวสุจิ	33
9.2 แสดงโอกาสการตรวจพบลักษณะ Microsatellite DNA บนโครโมโซมเพศชาย ตำแหน่ง DYS 393 เทียบกับตัวสุจิในแต่ละกลุ่มแบ่งตามปริมาณที่ตรวจพบตัวสุจิ	33
9.3 แสดงโอกาสการตรวจพบลักษณะ Microsatellite DNA บนโครโมโซมเพศชาย ตำแหน่ง DYS 393 เทียบกับการตรวจพบตัวสุจิ	35
10 แสดงการติดสีของตัวสุจิ จากการย้อมสีด้วยวิธี Oppitz's test	48
11 แสดง GeneMapper® ID electropherogram จากตัวอย่างเลือดผู้ชายทั้งหมด 4 คน ในตำแหน่ง DYS 393	57

อักษรย่อและสัญลักษณ์

°C	=	องศาเซลเซียส
g	=	กรัม
μl	=	ไมโครลิตร
ml	=	มิลลิลิตร
mg	=	มิลลิกรัม
%	=	เปอร์เซ็นต์
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
PCR	=	Polymerase chain reaction
sec	=	วินาที
μM	=	ไมโครโมลาร์
M	=	โมลาร์
bp	=	คู่เบส
AP	=	Acid Phosphatase
PSA	=	Prostate-Specific Antigen