



ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University  
All rights reserved

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมีสำหรับใช้ในขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค LAMP และเทคนิค PCR การแยกแถบดีเอ็นเอโดยผ่านกระแสไฟฟ้า และการย้อมเจลด้วยวิธี Silver staining

การเตรียมสารเคมีในกระบวนการการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค LAMP

1. การเตรียม 5 mM each dNTPs Solution

- 100 mM dATP	10.0	μl
- 100 mM dCTP	10.0	μl
- 100 mM dGTP	10.0	μl
- 100 mM dTTP	10.0	μl
- น้ำ	160	μl

ผสมให้เข้ากันจะได้สารละลายที่มีปริมาตร 200 μl

2. การเตรียม Primer mix solution

- 100 μM FIP primer	16	μl
- 100 μM BIP primer	16	μl
- 100 μM LF primer	8	μl
- 100 μM LB primer	8	μl
- 100 μM F3 primer	2	μl
- 100 μM B3 primer	2	μl
- น้ำ	48	μl

ผสมให้เข้ากันจะได้สารละลายที่มีปริมาตร 100 μl

### การเตรียมสารเคมีในกระบวนการการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR

#### 1. การเตรียม 10X Taq Buffer ซึ่งสารปริมาณดังนี้

- 500 mM Tris pH8.4	20.0	ml
- 2.0 M KCl	12.5	ml
- 150 mM MgCl <sub>2</sub>	5.0	ml
- 1% Bovine Serum Albumin	5.0	ml
- 100% Tween 20	0.25	ml

เติมน้ำให้มีปริมาตรรวมเท่ากับ 50 ml

#### 2. การเตรียม 1 mM each dNTPs Solution

- 100 mM dATP	10.0	μl
- 100 mM dCTP	10.0	μl
- 100 mM dGTP	10.0	μl
- 100 mM dTTP	10.0	μl
- น้ำ	960.0	μl

ผสมให้เข้ากันจะได้สารละลายที่มีปริมาตร 1000 μl

#### 3. การเตรียม 0.25U/μl Taq DNA polymerase

- ชุด 5U/μl Taq DNA polymerase	5.0	μl
- น้ำ	95.0	μl

ผสมกันจะได้สารละลายที่มีปริมาตร 100 μl

4. การเตรียม 5  $\mu$ M each Primer mix solution

- 100 $\mu$ M Forward primer	5.0	$\mu$ l
- 100 $\mu$ M Backward primer	5.0	$\mu$ l
- น้ำ	90.0	$\mu$ l

ผสมกันจะได้สารละลายที่มีปริมาตร 100  $\mu$ l

## การเตรียมสารละลายในกระบวนการแยกแอมป์ดีเอ็นเอโดยผ่านกระแสไฟฟ้า(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 sulfate	191.0	$\mu$ l
- Tetramethylethylenediamine	14.0	$\mu$ l

ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันโดยใช้ Sterrier plate นาน 1 นาที โดยสังเกตไม่ให้เกิดฟองอากาศจากนั้น  
เทลงในชุดกระจกสำหรับเตรียมเจลปฏิกิริยาสำหรับทำให้เกิดช่อง 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 2000 ml

วิธีเตรียม Working Solution (1000 ml)

- 2.5X Running buffer (Stock solution)	400	ml
- น้ำกลั่น	600	ml

5. การเตรียม Loading dye

- Bromophenol blue	0.04	g
- 87% Glycerol	500	$\mu$ l
- น้ำกลั่น	500	$\mu$ l

ผสมสารทั้งหมดจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

6. วิธีแยกแถบดีเอ็นเอ

- ใช้ปริมาณ LAMP product 5  $\mu$ l ผสม loading dye 1  $\mu$ l โหลกลงบนแผ่นเจล
- ใช้กระแสไฟฟ้า 90 volt นาน 5 ชั่วโมง
- ทำการย้อมเจลด้วยวิธี Silver Staining

**การย้อมเจดด้วยวิธี Silver staining**

1. เติม 1% Nitric acid [2.8 ml 70% 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  $\mu$ l ] ลงไป 50 ml เมื่อสีของสารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลให้เททิ้ง และเติมส่วนที่เหลือลงไปเขย่าจนเห็นแถบสีเอ็นอบนเจดชัดเจน
6. หยุดปฏิกิริยาด้วย 10% glacial acetic acid [20 ml 100% glacial acetic acid + น้ำกลั่น 200 ml ] เขย่า 5 นาที
7. ล้างด้วยน้ำกลั่นประมาณ 200 ml นาน 1 นาที 3 ครั้งหรือจนหมดกลิ่น
8. ถ่ายรูปหรือนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง Gel dryer

ภาคผนวก ข

รายละเอียดตัวอย่างศพที่ใช้ในการศึกษา

ตาราง 7 แสดงรายละเอียดของตัวอย่างศพที่วินิจฉัยว่าตายจากสาเหตุการจมน้ำจำนวน 16 ศพ

ตัวอย่างลำดับที่	รายละเอียด
1	ชายอายุ 21 ปี จมน้ำคูเมืองผลการชันสูตรพบลักษณะที่บ่งบอกการจมน้ำชัดเจน
2	ชายอายุ 39 ปี จมน้ำสระว่ายน้ำสมิทธิเรสซิเดนซ์ผลการชันสูตรพบลักษณะที่บ่งบอกการจมน้ำชัดเจน
3	ชายไม่ทราบอายุ เสียชีวิตที่โรงพยาบาลมหาราช (จมน้ำแล้วถูกช่วยชีวิต แต่มาเสียชีวิตในภายหลัง)
4	ชายอายุ 50 ปีจมน้ำคูเมือง สภาพศพเน่าผลการชันสูตรพบว่าปอดบวมน้ำปานกลาง มีน้ำในกระเพาะ
5	ชายอายุ 34 ปี จมน้ำแม่ปิง สภาพศพเริ่มเน่า ผลการชันสูตรพบว่า มีน้ำอยู่เต็มกระเพาะอาหาร
6	ชายอายุ 40 ปี จมน้ำแม่ปิง ผลการชันสูตรพบลักษณะที่บ่งบอกการจมน้ำชัดเจน
7	ชายอายุ 60 ปี พบศพนอนคว่ำในคูน้ำตื้น ผลการชันสูตรพบว่ามีปอดบวมน้ำและพบโคลนในหลอดลม มีโรคประจำตัวคือโรคหัวใจ
8	หญิงอายุ 40 ปีจมน้ำแม่ควาผลการชันสูตรพบลักษณะที่บ่งบอกการจมน้ำชัดเจน
9	หญิงอายุ 76 ปี พบศพในอ่างอาบน้ำ มีกลิ่นแอลกอฮอล์คละคลุ้ง

ตาราง 7 (ต่อ)

ตัวอย่างลำดับที่	รายละเอียด
10	ชายอายุ 25 ปี ผลการชันสูตรพบว่า ปอดบวมน้ำมาก ภาวะอาหารมีน้ำเต็ม มีฟองอากาศในหลอดลม
11	ชายอายุ 65 ปี พบศพในลำเหมืองสาธารณะหน้าโรงพยาบาลแมคเคนพบว่า ปอดบวมน้ำและไม่พบบาดแผลภายนอก
12	ชายอายุ 47 ปี พบศพอยู่บริเวณกลางทุ่งนา ต.ขุนคอง อ.หางดง ผลการชันสูตรพบว่าตัวเปื้อนโคลน ในหลอดลมมีเศษโคลน ปอดบวมน้ำ
13	ชายอายุ 13 ปีจมน้ำปึง ตำบลป่าตัน สภาพศพหน้าพบโคลนในภาวะอาหาร
14	ชายอายุ 54 ปี พบศพในหนองบัว ผลการชันสูตรพบว่า มีปอดบวมน้ำเต็ม มีฟองฟอด (fine forth) ชัดเจน
15	ชายอายุ 17 ปี เสียชีวิตที่โรงพยาบาลมหาราช ได้รับการรักษา 3-4 ชั่วโมง ก่อนเสียชีวิต
16	ชายอายุ 46 ปี จัมนอเตอร์ไซค์จมน้ำที่ ต.แม่แฝกใหม่ อ.สันทราย การชันสูตรพบปอดบวมน้ำ มีน้ำในภาวะอาหาร มีแผลบาดเจ็บภายนอก



ตาราง 8 แสดงรายละเอียดของตัวอย่างศพที่วินิจฉัยว่าตายจากสาเหตุอื่นจำนวน 16 ศพ

ตัวอย่างลำดับที่	รายละเอียด
1	ชายอายุ 41 ปี เสียชีวิตที่โรงพยาบาลลานนา ผลการชันสูตรพบว่าสมองบวมฐานกะโหลกแตก
2	หญิงอายุ 64 ปี ตายบริเวณที่พัก ผลการชันสูตรพบว่า เลือดออกปอด ตายจากปอดอักเสบ
3	ชายอายุ 29 ปี ตายในที่เกิดเหตุ ตายจากอุบัติเหตุจากรถ ผลการชันสูตรพบว่าเลือดออกในกะโหลกและช่องท้อง ปอดและตับฉีกขาด
4	หญิงอายุ 63 ปี ตายในที่เกิดเหตุ ตายจากอุบัติเหตุจากรถ ผลการชันสูตรพบว่าบาดเจ็บในช่องอกและศีรษะ
5	ชายอายุ 62 ปี ตายในที่เกิดเหตุ ตายจากอุบัติเหตุจากรถ ผลการชันสูตรพบว่าคอหัก บาดเจ็บในช่องอก ตับแตก
6	ชายอายุ 47 ปี ตายในที่เกิดเหตุจากการแขวนคอ ไม่พบบาดแผล
7	ชายอายุ 52 ปี ตายในที่เกิดเหตุผลการชันสูตรพบว่า กล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดปอดบวมน้ำมาก
8	ชายอายุ 54 ปี ตายที่โรงพยาบาลจากโรครธรรมชาติ ผลการชันสูตรพบว่า มีเส้นเลือดฝอยในสมองแตก
9	หญิงอายุ 24 ปี ตายในที่เกิดเหตุ ตายจากอุบัติเหตุจากรถ ผลการชันสูตรพบว่าคอหัก กระดูกหักหลายที่ เลือดออกในกะโหลกและช่องท้อง
10	ชายไม่ทราบอายุ ตายในที่เกิดเหตุ ตายจากอุบัติเหตุจากรถ
11	ชายอายุ 35 ปี ตายในที่เกิดเหตุ จากการถูกยิง ผลการชันสูตรพบว่า มีเลือดออกที่ปอดและหัวใจ
12	ชายอายุ 48 ปี ตายที่บ้าน ผลการชันสูตรพบว่า ปอดบวมน้ำ ตายจากโรคหัวใจ
13	ชายอายุ 33 ปี ตายในที่เกิดเหตุ จากการถูกยิงบริเวณลำตัว
14	ชายอายุ 6 ปี ตายที่โรงพยาบาล มีอาการปอดติดเชื้อ ผลการชันสูตรพบว่าปอดบวม
15	ชายอายุ 64 ปี ตายจากอุบัติเหตุจากรถ การวินิจฉัยพบ ซีโรรงหักนิ้วมิมือรถลอคที่แก้มและเข่า

## ตาราง 8 (ต่อ)

ตัวอย่างลำดับที่	รายละเอียด
16	ชายอายุ 46 ปี ตายด้วยโรคธรรมชาติ การวินิจฉัยพบเลือดออกในสมอง

ภาคผนวก ค

ตารางค่าทางสถิติ

ตาราง 9 แสดงค่าไคสแควร์ที่ใช้ในการทดสอบสมมติฐาน

df	$\alpha$														
	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



ชื่อ - สกุล

นางสาวอนิศา เนตตกุล

วัน เดือน ปีเกิด

20 ธันวาคม 2530

ประวัติการศึกษา

สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต วิทยาศาสตรศึกษาศาสตร์  
มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง 2553

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University  
All rights reserved