

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การเพาะฟักไข่เต่าตนุแบบควบคุมอุณหภูมิ

จากการเพาะฟักไข่เต่าตนุจำนวน 30 ฟอง แบบควบคุมอุณหภูมิในรังโฟมโดยแบ่งไปบ่มไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 34 °C และ 27 °C กล่องละ 15 ฟอง วัดอุณหภูมิที่ได้จริงตลอดการเพาะฟัก พบว่าในกล่องที่บ่มไว้ในตู้ที่ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 34 °C จะมีอุณหภูมิอยู่ในช่วง 33-35 °C ส่วนกล่องที่บ่มไว้ในตู้ที่ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 27 °C มีอุณหภูมิอยู่ในช่วง 26-28.5 °C เมื่อบ่มเป็นเวลา 45 วัน พบว่ามีลูกเต่าตนุจำนวน 2 ตัว ขึ้นมาบนผิวทรายในกล่องที่อยู่ในตู้ที่ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 34 °C และพบลูกเต่าตนุจำนวน 7 ตัว ขึ้นมาบนผิวทรายในกล่องที่อยู่ในตู้ที่ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 27 °C ที่บ่มเป็นเวลา 60-62 วัน เมื่อเวลาผ่านไป 2-3 วันหลังจากที่พบลูกเต่าขึ้นสู่ผิวทรายในกล่องทั้งสองแล้วจึงทำการขุดทรายขึ้นมาดูไข่ที่ไม่ฟักเป็นตัวแทนว่าไข่ในกล่องโฟมที่บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 34 °C ส่วนใหญ่มีราสีดำขึ้นอยู่ที่เปลือกไข่ ไข่เน่าและบางฟองมีลูกเต่าตายในไข่ พบว่าไข่บริเวณใกล้ผิวทรายแตกและมีซากลูกเต่าตายอยู่ในไข่ สำหรับไข่ในกล่องโฟมที่บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 27 °C พบว่าไข่ส่วนใหญ่เปลือกมีสีเขียวคล้ำภายในพบตัวอ่อนของเต่าตายอยู่ในไข่บางฟองไม่มีตัว ลูกเต่าตนุที่ฟักได้จะถูกอนุบาลอยู่เป็นเวลา 3-4 เดือน โดยเลี้ยงในน้ำทะเลซึ่งเตรียมจากเกลือทะเลสังเคราะห์ให้เนื้อปลา กุ้ง และหมึกสดเป็นอาหาร ในระหว่างการอนุบาลมีลูกเต่าตนุที่ได้จากการเพาะฟักที่อุณหภูมิ 27 °C ตาย 3 ตัว โดยหนึ่งตัวตายเมื่อมีอายุ 3 เดือน อีกสองตัวตายเมื่อมีอายุมากกว่า 4 เดือน

จึงเก็บเนื้อเชื้อไว้ที่ -80°C เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป ส่วนลูกเต่าที่ยังมีชีวิตอยู่ได้ทำการเจาะเลือดก่อนปล่อยกลับสู่ทะเล

4.2 การเตรียมโครโมโซมัลดีเอ็นเอของเต่าตนุ

เมื่อนำโครโมโซมัลดีเอ็นเอของเต่าตนุที่เตรียมได้จาก 1) เลือดของเต่าตนุตัวเต็มวัยที่ทราบเพศแล้วจำนวน 8 ตัว เป็นเพศผู้ 3 ตัว (M1 - M3) เพศเมีย 5 ตัว (F1 - F5) 2) เลือดของลูกเต่าตนุอายุประมาณ 3-4 เดือน ที่ได้จากการเพาะฟักแบบควบคุมอุณหภูมิจำนวน 6 ตัว โดยได้จากการฟักที่อุณหภูมิ 27°C จำนวน 4 ตัว (U1 - U4) จากการฟักที่อุณหภูมิ 35°C จำนวน 2 ตัว (U5 และ U6) และ 3) โครโมโซมัลดีเอ็นเอที่เตรียมจากเนื้อเยื่อตับและหัวใจของลูกเต่าตนุอายุไม่เกิน 6 เดือน จำนวน 21 ตัว (U7 - U27) ตามวิธีในหัวข้อ 3.3 มาตรวจวิเคราะห์โดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน $\lambda/Hind\ III$ ให้ผลดังรูปที่ 5 และ รูปที่ 6 ตามลำดับ ซึ่งจากรูปที่ 5 พบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเลือดส่วนใหญ่ยังอยู่ในรูปที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง มีขนาดใหญ่กว่า 23.3 กิโลเบส ยกเว้นดีเอ็นเอของเต่าตนุรหัส F5, U2, U4 และ U6 มีการแตกหักของดีเอ็นเอมาก ทำให้เห็นเป็นแถบตั้งแต่ขนาด 23.3 กิโลเบสลงมา จากรูปที่ 6 แสดงลักษณะของโครโมโซมัลดีเอ็นเอที่เตรียมได้จากเนื้อเยื่อพบว่ามีการแตกหักของโครโมโซมัลดีเอ็นเอที่เตรียมได้ในหลายตัวอย่าง โดยขนาดของชิ้นดีเอ็นเอมีตั้งแต่ขนาดใหญ่กว่า 23.3 กิโลเบสลงมาซึ่งการแตกหักของโครโมโซมัลดีเอ็นเอที่เตรียมได้จากเนื้อเยื่อนี้เกิดจากขั้นตอนการสกัดที่ต้องมีการบดเนื้อเยื่อให้ละเอียดโดยต้องทำให้เนื้อเยื่อเย็นจัดจนแข็งและละลายลงหลายครั้ง นอกจากนี้แรงบดทำให้ดีเอ็นเอแตกหักได้เช่นกัน ดังนั้นดีเอ็นเอที่เตรียมได้จากเนื้อเยื่อจึงแตกหักมากกว่าดีเอ็นเอที่เตรียมได้จากเซลล์เม็ดเลือด อย่างไรก็ตามขนาดของดีเอ็นเอส่วนใหญ่ในแต่ละตัวอย่างยังคงมีขนาดใหญ่จากการตรวจวิเคราะห์คุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอโดยการวัดค่า OD_{260} และค่า OD_{280} แล้วคำนวณ



รูปที่ 5 โครโมโซมดีเอ็นเอที่เตรียมจากเมล็ดของเต้าตนุ

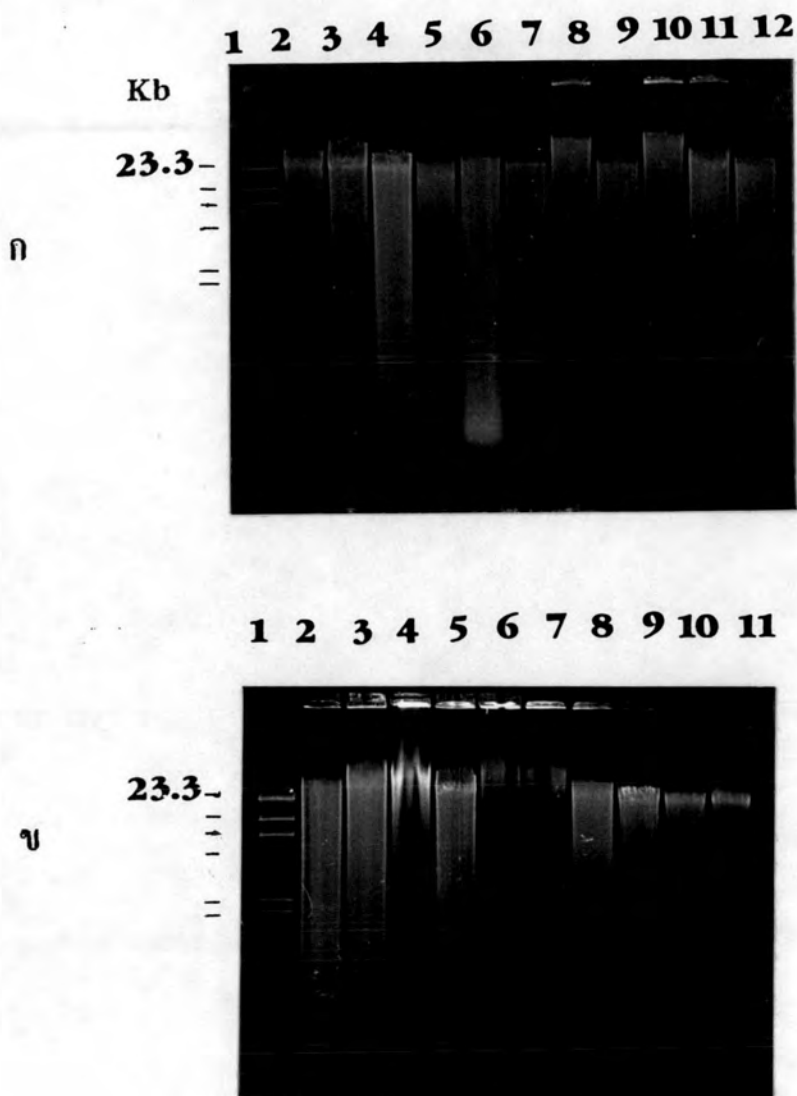
ช่องที่ 1 - ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ /*Hind* III

ช่องที่ 2-4 - ตัวอย่างโครโมโซมดีเอ็นเอของเต้าตนุเพศผู้รหัส M1, M2, M3 ตามลำดับ

ช่องที่ 5-9 - ตัวอย่างโครโมโซมดีเอ็นเอของเต้าตนุเพศเมียรหัส F1, F2, F3, F4, F5
ตามลำดับ

ช่องที่ 11,12 - ตัวอย่างโครโมโซมดีเอ็นเอของลูกเต้าตนุที่ได้จากการเพาะฟักที่อุณหภูมิคงที่
35 °C รหัส U5, U6 ตามลำดับ

ช่องที่ 10,13-15 - ตัวอย่างโครโมโซมดีเอ็นเอของลูกเต้าตนุที่ได้จากการเพาะฟักที่อุณหภูมิคงที่
27 °C รหัส U1, U2-U4 ตามลำดับ



รูปที่ 6 โครโมโซมดีเอ็นเอของลูกเต่าตนุที่เตรียมได้จากเซลล์กล้ามเนื้อตับและหัวใจ

ช่องที่ 1ก, 1ข - ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ /Hind III

ช่องที่ 2-12ก, 2-8ข - ตัวอย่างโครโมโซมดีเอ็นเอของลูกเต่าตนุที่ได้จากหน่วยงานอนุรักษ์
รหัส U7 - U24 ตามลำดับ

ช่องที่ 9-11ข - ตัวอย่างโครโมโซมดีเอ็นเอของลูกเต่าตนุที่ได้จากการเพาะฟักที่อุณหภูมิตั้งที่ 27°C รหัส U25 - U27 ตามลำดับ

หาค่าอัตราส่วนระหว่างค่า OD₂₆₀ ต่อค่า OD₂₈₀ เพื่อวิเคราะห์คุณภาพและคำนวณหาปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอจากค่า OD₂₆₀ ได้ผลดังตารางที่ 4 โดยพบว่าอัตราส่วนระหว่าง ค่า OD₂₆₀ ต่อค่า OD₂₈₀ ของโครโมโซมดีเอ็นเอที่ได้จากเลือดส่วนใหญ่อยู่ในช่วง 1.9-2.1 ซึ่งจากค่านี้สามารถบอกได้ว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีโปรตีนปนอยู่ในปริมาณที่ยอมรับได้ ($OD_{260:280} \geq 1.75$) สำหรับค่าอัตราส่วนระหว่างค่า OD₂₆₀ ต่อค่า OD₂₈₀ ของโครโมโซมดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อส่วนใหญ่มีค่าอยู่ในช่วง 1.8-1.9 ซึ่งต่ำกว่าค่าของดีเอ็นเอที่เตรียมได้จากเลือด แสดงว่าโครโมโซมดีเอ็นเอที่เตรียมได้จากเนื้อเยื่อมีปริมาณโปรตีนปนอยู่มากกว่าโครโมโซมดีเอ็นเอที่เตรียมได้จากเลือดแต่ยังมีปริมาณอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ สำหรับปริมาณดีเอ็นเอที่คำนวณจากค่า OD₂₆₀ โดยค่า OD₂₆₀ เท่ากับ 20 เมื่อความเข้มข้นของดีเอ็นเอเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร พบว่าปริมาณโครโมโซมดีเอ็นเอที่เตรียมได้จากเลือดมีค่าอยู่ในช่วง 100 - 300 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ส่วนปริมาณโครโมโซมดีเอ็นเอที่เตรียมได้จากเนื้อเยื่อคำนวณได้จากค่า OD₂₆₀ มีค่าอยู่ในช่วง 100-400 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ดังแสดงไว้ในตารางที่ 4 ซึ่งปริมาณดีเอ็นเอที่คำนวณมาจากดีเอ็นเอเพียงส่วนเดียวที่แยกออกมาใช้ในการทดลองไม่ใช่จากดีเอ็นเอที่เตรียมได้ทั้งหมด เนื่องจากปริมาณดีเอ็นเอของตัวอย่างที่เตรียมได้ส่วนใหญ่มีจำนวนมากและความเข้มข้นสูงจึงแบ่งดีเอ็นเอที่ละลายก่อนออกมาใช้ ดังนั้นจึงไม่สามารถคำนวณกลับไปหาปริมาณดีเอ็นเอที่เตรียมได้ทั้งหมดได้

4.3 การหาชิ้นดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างเพศในเต่าตนุตัวเต็มวัยที่ทราบเพศแล้ว

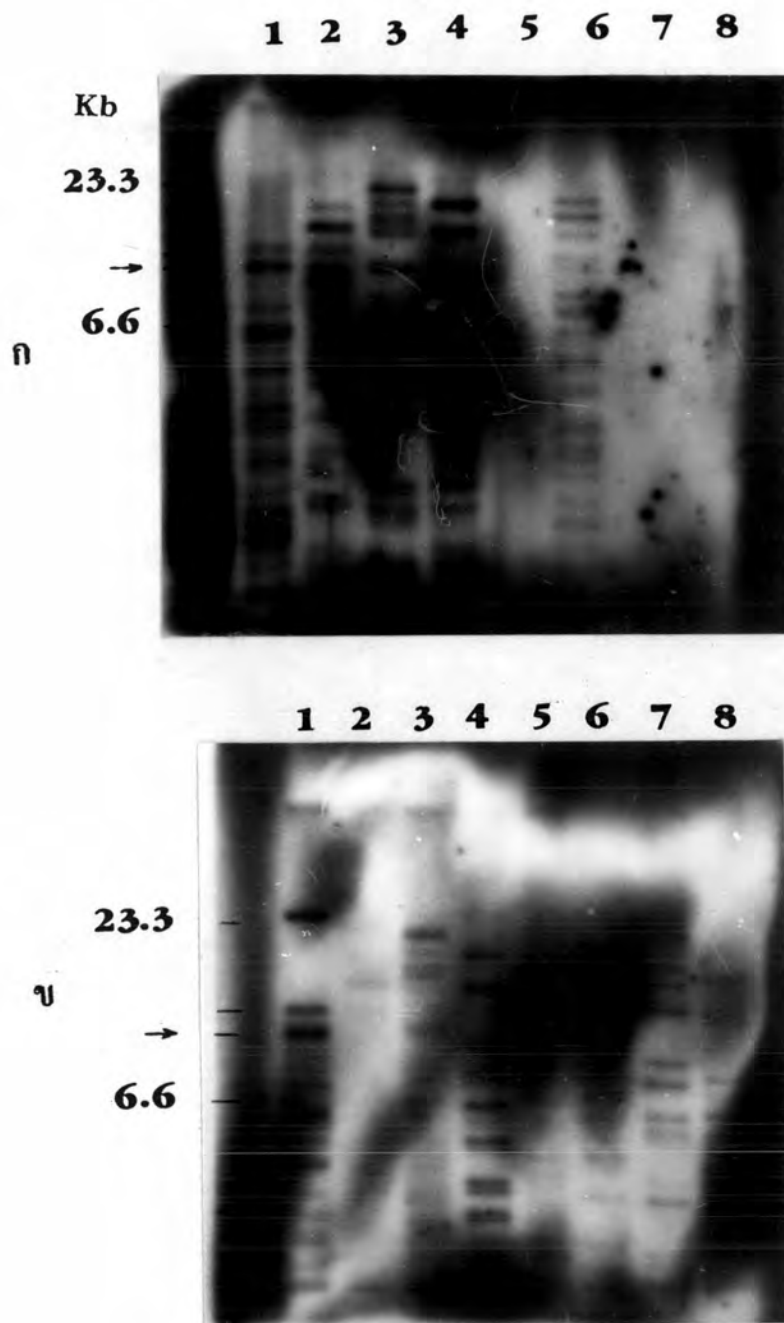
ด้วยวิธี เซาท์เทิร์นบลอตไฮบริดเซชัน

จากการนำโครโมโซมดีเอ็นเอของเต่าตนุตัวเต็มวัยที่ทราบเพศแล้วจำนวน 8 ตัว มาย่อยอย่างสมบูรณ์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ 11 ชนิด คือ *Bam*H I, *Bgl* II, *Bst*N I, *Eco*R I, *Hae* III, *Hind* III, *Hinf* I, *Nde* I, *Pst* I, *Pvu* II และ *Sau*3A I แล้วนำชิ้นดีเอ็นเอที่ย่อยด้วยเอนไซม์แต่ละชนิดมาทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสจากนั้นนำเจลมาทำเซาท์เทิร์นบลอตแล้วจึงนำแผ่น

ตารางที่ 4 ค่า OD₂₆₀, ค่า OD₂₈₀, อัตราส่วนระหว่างค่า OD₂₆₀ : ค่า OD₂₈₀ และ ปริมาณของ โครโมโซมดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเต้านม

| โครโมโซมดีเอ็นเอจากเซลล์เม็ดเลือด | | | | | โครโมโซมดีเอ็นเอจากเซลล์ตับและหัวใจ | | | | |
|-----------------------------------|-------------------|-------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|-------------------|-------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| รหัส ตัวอย่าง | OD ₂₆₀ | OD ₂₈₀ | OD ₂₆₀ : OD ₂₈₀ | ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (ng / μ l) | รหัส ตัวอย่าง | OD ₂₆₀ | OD ₂₈₀ | OD ₂₆₀ : OD ₂₈₀ | ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (ng / μ l) |
| M1 | 0.2558 | 0.1223 | 2.0921 | 127.90 | U7 | 0.2952 | 0.1744 | 1.6923 | 147.60 |
| M2 | 0.5463 | 0.2542 | 2.1490 | 273.15 | U8 | 0.3991 | 0.2050 | 1.9474 | 199.55 |
| M3 | 0.5717 | 0.2547 | 2.0080 | 285.85 | U9 | 0.4891 | 0.2510 | 1.9486 | 244.55 |
| F1 | 0.3297 | 0.1467 | 2.2474 | 164.85 | U10 | 0.2132 | 0.1280 | 1.665 | 106.60 |
| F2 | 0.3754 | 0.1796 | 2.0905 | 187.80 | U11 | 0.4293 | 0.2250 | 1.9084 | 214.65 |
| F3 | 0.3462 | 0.1640 | 2.1109 | 173.10 | U12 | 0.2240 | 0.1590 | 1.4088 | 112.00 |
| F4 | 0.3275 | 0.1155 | 2.3160 | 133.75 | U13 | 0.2840 | 0.1572 | 1.8066 | 142.00 |
| F5 | 0.6105 | 0.3063 | 1.9706 | 305.25 | U14 | 0.2151 | 0.1097 | 1.960 | 107.5 |
| U1 | 0.2280 | 0.1384 | 1.6474 | 114.00 | U15 | 0.2222 | 0.1167 | 1.9038 | 111.10 |
| U2 | 0.2364 | 0.1215 | 1.9456 | 118.20 | U16 | 0.2709 | 0.1431 | 1.8936 | 135.45 |
| U3 | 0.2450 | 0.1250 | 1.9600 | 122.50 | U17 | 0.3679 | 0.1904 | 1.9322 | 183.95 |
| U4 | 0.6060 | 0.2829 | 2.1421 | 303.00 | U18 | 0.3128 | 0.1654 | 1.8915 | 156.40 |
| U5 | 0.2692 | 0.1331 | 2.0210 | 134.60 | U19 | 0.4081 | 0.2154 | 1.8944 | 204.05 |
| U6 | 0.6010 | 0.2817 | 2.1334 | 300.50 | U20 | 0.2315 | 0.1218 | 1.9004 | 115.75 |
| | | | | | U21 | 0.3919 | 0.2573 | 1.5231 | 195.95 |
| | | | | | U22 | 0.3350 | 0.1600 | 2.0918 | 167.50 |
| | | | | | U23 | 0.3470 | 0.2090 | 1.6605 | 173.50 |
| | | | | | U24 | 0.2962 | 0.1572 | 1.8248 | 148.10 |
| | | | | | U25 | 0.2792 | 0.1530 | 1.8248 | 139.60 |
| | | | | | U26 | 0.2000 | 0.1074 | 1.8620 | 100.00 |
| | | | | | U27 | 0.2010 | 0.1056 | 1.9017 | 105.50 |

ในลอนเมมเบรนที่ได้มาไฮบริดซ์ที่อุณหภูมิ 55 °C กับดีเอ็นเอติดตาม GATA repeats จำนวน 21 เบส ที่ถูกติดฉลากด้วยสารกัมมันตภาพรังสี (γ - 32 P) ATP เมื่อตรวจผลการจับกันของดีเอ็นเอติดตามกับชิ้นดีเอ็นเอของเต้านุที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ต่างๆ ด้วยการทำออโตเรดิโอกราฟปรากฏว่าในชิ้นดีเอ็นเอของเต้านุที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I, *Eco*R I, *Hae* III, *Hinf* I, *Nde* I, *Pst* I, *Pvu* II และ *Sau*3A I พบแถบสีค่าของชิ้นดีเอ็นเอที่จับกับดีเอ็นเอติดตามอย่างจำเพาะเจาะจงขึ้นกระจายอยู่ทั่วไปทุกๆ ช่วงขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ สำหรับชิ้นดีเอ็นเอของเต้านุที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ *Bst*NI และ *Hind* III พบแถบสีค่าต่างๆ เป็นแถวยาวลงมาตามแนวของชิ้นดีเอ็นเอ (smear band) สำหรับเอนไซม์ *Bgl* II พบแถบสีค่าของชิ้นดีเอ็นเอที่จับอย่างจำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอติดตามขึ้นอยู่ติดกันมากจึงไม่สามารถแยกขนาดของแถบชิ้นดีเอ็นเอเหล่านี้ได้ เมื่อตรวจหาแถบของชิ้นดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างเพศของเต้านุพบว่าชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ *Hae* III ให้ความแตกต่างระหว่างเพศได้ผลในรูปแบบที่ 7 โดยพบแถบสีค่าของชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 8.35 กิโลเบส ขึ้นเป็นแถบเข้มเฉพาะในเต้านุเพศผู้ทั้ง 3 ตัวอย่าง แต่ไม่พบในเต้านุเพศเมียยกเว้นในตัวอย่าง F3 ซึ่งมองเห็นคล้ายแถบสีค่าแต่จางมากจึงคาดว่าจะเป็ชิ้นดีเอ็นเอคนละชิ้นกันกับชิ้นที่พบในเพศผู้ ดังแสดงในรูปแบบที่ 7 เนื่องจากตัวอย่างในเพศเมียของรูป 7ก พบแถบสีค่าขึ้นเพียง 2 ตัวอย่าง (F1 และ F3) จาก 5 ตัวอย่าง จึงทำการทดลองซ้ำได้ผลดังรูป 7ข ซึ่งเมื่อทำการทดลองซ้ำและตรวจหาแถบสีค่าของชิ้นดีเอ็นเอขนาด 8.35 กิโลเบส พบว่าในเพศเมียรหัส F1, F4 และ F5 ไม่พบแถบสีค่าขนาด 8.35 กิโลเบส สำหรับช่องที่มีตัวอย่างเพศเมียรหัส F2 และ F3 ไม่เห็นแถบสีค่าของชิ้นดีเอ็นเอขนาดดังกล่าวเช่นกันแต่มี background สูง สำหรับเอนไซม์อื่นๆ ไม่พบความแตกต่างระหว่างเพศรวมถึงในชิ้นดีเอ็นเอของเต้านุที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ *Bst*NI และ *Sau*3A I ซึ่งเคยมีรายงานว่าพบชิ้นดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างเพศเมื่อทำการไฮบริดซ์กับดีเอ็นเอติดตาม Bkm sequence ดังแสดงในรูปแบบที่ 8

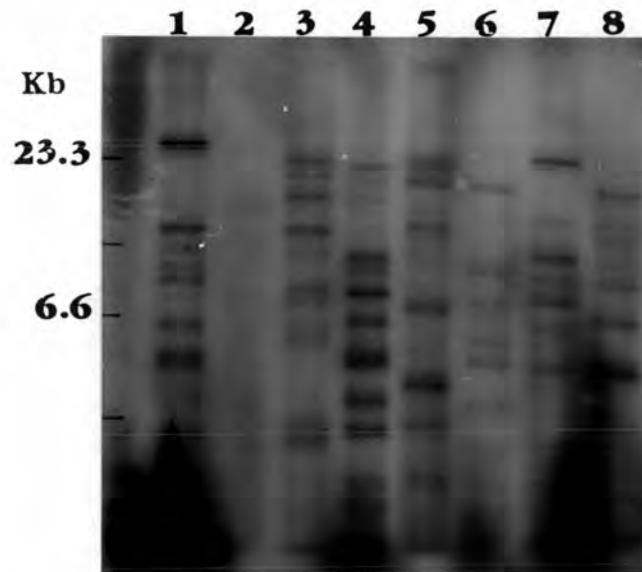


รูปที่ 7 การไฮบริไดซ์ของซันดีเอ็นเอที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae* III ด้วยดีเอ็นเอติดตาม

GATA repeat จำนวน 21 เบส

ช่องที่ 1- 8 ก,ข - ตัวอย่างจากเต่าตนุรหัส M1, M2, M3, F1, F2, F3, F4 และ F5 ตามลำดับ

→ - แสดงซันดีเอ็นเอขนาด 8.35 กิโลเบส



รูปที่ 8 การไฮบริดซ์ชิ้นดีเอ็นเอจากเต่าตนุที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sau3A I* ด้วย

ดีเอ็นเอติดตาม GATA repeats จำนวน 21 เบส

ช่องที่ 1- 8 - ดีเอ็นเอจากเต่าตนุรหัส M1, M2, M3, F1, F2, F3, F4, F5 ตามลำดับ

เนื่องจากจำนวนตัวอย่างจากเต่าตนุตัวเต็มวัยที่ทราบเพศแล้วมีจำนวนน้อยและผลการเตรียมโครโมโซมดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อของลูกเต่าตนุที่ตายซึ่งเก็บจากสถานีอนุรักษ์และลูกเต่าตนุที่ได้จากการเพาะฟักแบบควบคุมอุณหภูมิมีการแตกหักมากจึงได้แสดงในรูปที่ 5 และรูปที่ 6 จึงทำให้โครโมโซมดีเอ็นเอเหล่านี้ไม่เหมาะที่จะนำมาวิเคราะห์โดยการทำเซาท์เทิร์นบลอตไฮบริดเซชันซึ่งต้องการดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงเท่านั้นอีกทั้งโครโมโซมดีเอ็นเอที่ได้จากเลือดของลูกเต่าตนุมีปริมาณน้อย นอกจากนี้ขั้นตอนของเทคนิคเซาท์เทิร์นบลอตไฮบริดเซชันค่อนข้างยุ่งยากและต้องใช้สารกัมมันตรังสีจึงทดลองหาวิธีการตรวจเพศโดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ GATA repeats จำนวน 21 เบส เป็นดีเอ็นเอไพรเมอร์

4.4 การตรวจหาชิ้นดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างเพศของเต่าตนุตัวเต็มวัยที่ทราบเพศแล้วด้วย

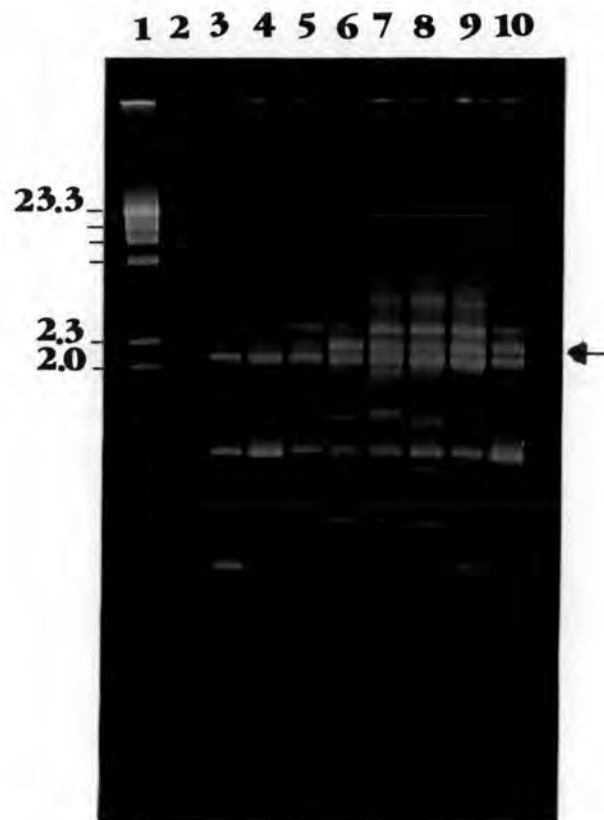
วิธี PCR

เพื่อหาภาวะการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่สามารถให้ความแตกต่างระหว่างเพศได้จึงนำโครโมโซมดีเอ็นเอของเต่าตนุที่ทราบเพศแล้วจำนวน 8 ตัว มาเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอด้วยการทำ PCR ตามภาวะที่ระบุในข้อ 3.6.3 โดยใช้ลำดับเบสที่ซ้ำๆ กันของ GATA repeats จำนวน 21 เบส เป็นดีเอ็นเอไพรเมอร์ใช้อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 2 นาที เพื่อเริ่มทำให้ดีเอ็นเอแยกเป็นสายเดี่ยวให้สมบูรณ์แล้วเข้ารอบการทำ PCR โดยเริ่มด้วยการทำให้ดีเอ็นเอเต่าตนุแยกเป็นสายเดี่ยวที่อุณหภูมิ 92°C เป็นเวลา 90 วินาที ภาวะในการทำให้ดีเอ็นเอไพรเมอร์เกาะกับดีเอ็นเอเต่าตนุทดลองใช้ 6 ภาวะ คือ 1) ที่อุณหภูมิ 53°C 2) ที่อุณหภูมิ 51°C 3) ที่อุณหภูมิ 49°C 4) ที่อุณหภูมิ 47°C 5) ที่อุณหภูมิ 45°C และ 6) ที่อุณหภูมิ 43°C เป็นเวลา 90 วินาที จากนั้นเข้าสู่ภาวะการต่อสายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 2 นาที ทำซ้ำ 37 รอบ ทำการต่อสายดีเอ็นเอครั้งสุดท้ายที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 7 นาทีนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR มาวิเคราะห์โดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

ในอะกาโรสเจลเข้มข้น 1.6 % ความยาว 12.5 เซนติเมตร ความต่างศักย์ไฟฟ้าคงที่ 120 โวลต์ เป็นเวลา 3-5 ชั่วโมง จากนั้นเปรียบเทียบแถบของผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้พร้อมทั้งคำนวณหาขนาดของแถบผลิตภัณฑ์ PCR เหล่านั้นโดยเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน $\lambda/Hind$ III ในกราฟ semi-logarithmic (ภาคผนวกที่ 5 และ ภาคผนวกที่ 6) ผลจากการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่าแถบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR ที่อุณหภูมิ annealing เท่ากับ 53° 51° 49° 47° 45° และ 43 °C มีรูปแบบต่างๆ กันโดยแถบดีเอ็นเอผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่คล้ายกันและที่อุณหภูมิ annealing เท่ากับ 53° และ 43°C จะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้น้อยลงและพบจำนวนแถบได้ลดลง มีข้อสังเกตว่าที่ทุกอุณหภูมิ annealing ที่ใช้ในการทำ PCR เมื่อใช้ดีเอ็นเอตัวอย่างในปริมาณเท่าๆ กัน (100-500 นาโนกรัม) จะพบแถบของชิ้นดีเอ็นเอขนาด 2.29 กิโลเบส ในเพศผู้จะมีความเข้มของแถบน้อยกว่าในเพศเมีย โดยเฉพาะผลการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR ที่อุณหภูมิ annealing เท่ากับ 49°C จะให้ความแตกต่างของชิ้นดีเอ็นเอขนาด 2.29 กิโลเบสนี้มากที่สุด ดังรูปที่ 9 ซึ่งจากผลดังกล่าวจึงได้ใช้เทคนิคนี้ทำการทดลองในลูกเต่าตนุที่ได้จากการเพาะฟักแบบควบคุมอุณหภูมิและลูกเต่าตนุที่แยกเพศได้จากการศึกษาลักษณะโกแนคมาเปรียบเทียบกัน

4.5 ผลการทดสอบการตรวจเพศในลูกเต่าตนุด้วยการทำ PCR

การเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอของลูกเต่าตนุโดยทำ PCR ที่อุณหภูมิ annealing เท่ากับ 49°C แล้วนำผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้มาทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (รูปที่ 10) พบว่าแถบดีเอ็นเอจากการทำ PCR ของลูกเต่าตนุสามารถจำแนกเพศได้เป็นเพศผู้ 16 ตัว และเพศเมีย 11 ตัว ซึ่งรายละเอียดการจำแนกของตัวอย่างแต่ละตัวแสดงไว้ในตารางที่ 5 จากแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR ของลูกเต่าตนุที่อุณหภูมิ annealing เท่ากับ 49°C พบว่าในดีเอ็นเอรหัส U1-U6, U7, U12 และ



รูปที่ 9 ผลการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอจากการทำ PCR ที่อุณหภูมิ

annealing เท่ากับ 49°C ของแต้คนตัวเต็มวัยที่ทราบเพศแล้ว

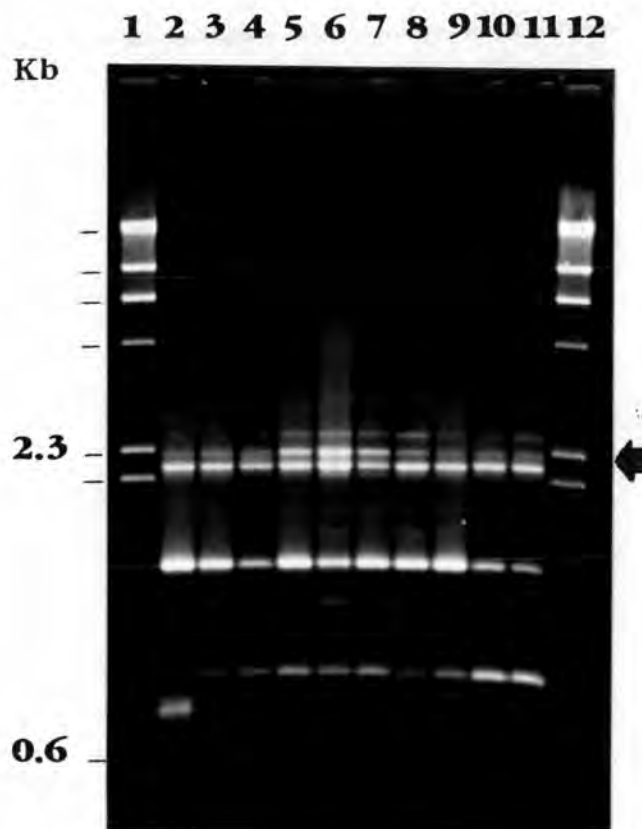
ช่องที่ 1 - ดีเอ็นเอมาตรฐาน $\lambda/Hind III$

ช่องที่ 2 - negative control

ช่องที่ 3-5 - ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอจากการทำ PCR ของแต้คนเพศผู้รหัส M1-M3

ช่องที่ 6-10 - ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอจากการทำ PCR ของแต้คนเพศเมียรหัส F4-F8

→ - แสดงชั้นดีเอ็นเอขนาด 2.29 กิโลเบส



รูปที่ 10 แลปดีเอ็นเอจากการทำ PCR ที่อุณหภูมิ annealing = 49 °C ของลูกเต่าตนุ

ช่องที่ 1,12 - ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ /Hind III

ช่องที่ 2-11 - ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอจากการทำ PCR ของลูกเต่าตนุรหัส U8, U9, U10, U13, U19, U21, U22, U24 และ U25 ตามลำดับ

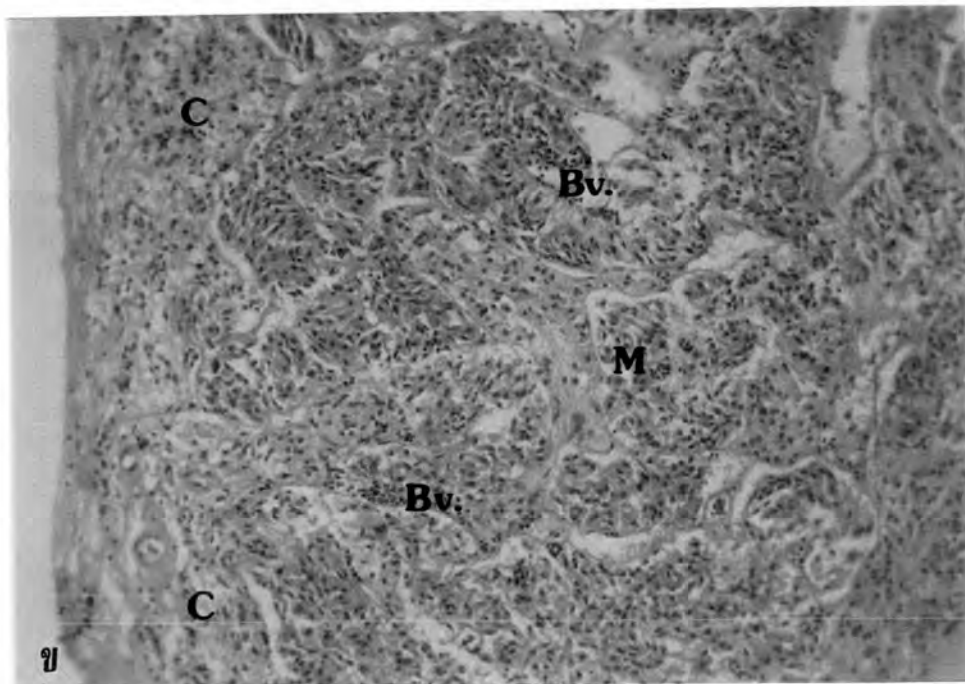
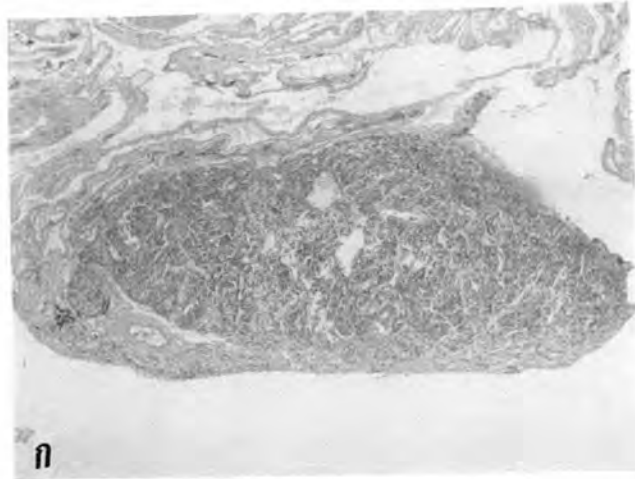
➡ - แสดงชั้นดีเอ็นเอขนาด 2.29 กิโลเบส

U21 มีการเพิ่มจำนวนของชั้นดีเอ็นเอได้น้อยใน 2 ลักษณะ คือ แบบที่มีแถบดีเอ็นเอบางแถบจางไป และแบบที่มีแถบดีเอ็นเอสั้นลงทุกแถบ เมื่อตรวจสอบดูพบว่าโครโมโซมดีเอ็นเอที่เตรียมได้ของ ตัวอย่างเหล่านี้มีการปนเปื้อนของโปรตีนในปริมาณสูงหรือเป็นตัวอย่างที่มีดีเอ็นเอเจือจางซึ่งเหตุนี้ อาจทำให้การตัดดีเอ็นเอลักษณะแถบดีเอ็นเอผิดพลาดได้ซึ่งได้ทำการตกตะกอนและทำให้มีความเข้มข้นสูงขึ้นก่อนที่จะนำมาทำ PCR เพื่อจำแนกลักษณะอีกครั้ง

4.6 การจำแนกเพศของลูกเต่าตนุโดยศึกษาลักษณะทางเนื้อเยื่อของโกแนด

เมื่อนำโกแนดของลูกเต่าตนุที่ได้จากบ่ออนุบาลของสถานีวิจัยแหล่งต่างๆ จำนวน 18 ตัวอย่าง (U7 - U24) และที่ได้จากการเพาะฟักที่อุณหภูมิ 27°ซ จำนวน 3 ตัวอย่าง (U25 - U27) มาตัดทำเป็นสไลด์ถาวรตามวิธีมาตรฐานและย้อมสี hematoxylin และ eosin แล้วนำมาศึกษา ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์เทียบกับลักษณะเนื้อเยื่อโกแนดของลูกเต่าหูกผู้และเพศเมียที่ ทำการศึกษาโดย Merchant-Larios และ Villalpando (1990) ซึ่งจำแนกประเภทของลักษณะเนื้อเยื่อโกแนดได้ 3 ประเภท คือ 1) ประเภทที่เซลล์ยังไม่มีการพัฒนาเปลี่ยนแปลงยังคงเป็นแบบ epithelial like cell ทั้งในส่วนเมดัลลา (medulla) และ คอร์เทกซ์ (cortex) ซึ่งไม่สามารถจำแนกลักษณะของเพศได้เนื่องจากตัวอย่างมีอายุน้อย 2) ประเภทที่มีการเรียงตัวของเนื้อเยื่อคล้ายอัณฑะ (testis) โดย ส่วนของคอร์เทกซ์เรียงตัวอยู่ที่ขอบเป็นแถวบางๆ คล้าย epithelial cells ของโกแนดที่ยังไม่มีการพัฒนาแต่ส่วน medulla cord เริ่มมีการเรียงตัวเป็นท่อขดไปมาชัดเจนขึ้นและ 3) ประเภทที่มีการเรียงตัวของเนื้อเยื่อคล้ายลักษณะของรังไข่ (ovary) ซึ่งเริ่มมองเห็นส่วนคอร์เทกซ์และเมดัลลา แยกกันโดยที่คอร์เทกซ์มีการจัดเรียงตัวกันอยู่บริเวณขอบอวัยวะเป็นขอบหนา ส่วนเมดัลลาจับตัวเป็นกลุ่มก้อนดังแสดงในภาคผนวกที่ 8 ผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่าลักษณะเนื้อเยื่อโกแนดของลูกเต่าตนุ 16 ใน 21 ตัวอย่างเริ่มมีการเจริญพัฒนาไปเป็นรังไข่หรืออัณฑะแล้ว โดยเฉพาะโกแนดของลูกเต่าตนุเพศผู้มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเนื้อเยื่อในลักษณะที่บอกได้แน่ชัดว่าเป็นอัณฑะคือ

มีการจัดเรียงตัวเป็นท่อเซมินิเฟอร์ส (seminiferous tubule) (รูปที่ 11) ส่วนเนื้อเยื่อของลูกเต่าตนุเพศเมียที่มีอายุใกล้เคียงกันพบการพัฒนาเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างโกแนดโดยพบการเรียงตัวเป็นบริเวณชั้นในหรือชั้นเมดัลลาจะพบเส้นเลือดและเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน บริเวณขอบรอบนอกเป็นชั้นคอร์เทกซ์จะประกอบด้วยเซลล์รูปร่างกลมๆ ขนาดค่อนข้างใหญ่นิวเคลียสกลมติดสีม่วงจัดเรียงตัวกันแน่นกว่าบริเวณชั้นเมดัลลาเรียงตัวอยู่รอบนอก (รูปที่ 12) ส่วนเนื้อเยื่อโกแนดที่ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงเป็นรังไข่หรืออณฑะนั้นเมื่อดูด้วยกำลังขยาย 200 เท่าจะประกอบด้วยเซลล์รูปร่างกลม นิวเคลียสกลมติดสีค่อนข้างเข้มขนาดเซลล์ค่อนข้างเล็กและมีขนาดเท่าๆ กันทั่วทั้งอวัยวะ (รูปที่ 13) จากผลการศึกษาสามารถแบ่งเป็นเต่าตนุเพศผู้ 8 ตัว เพศเมีย 8 ตัว และยังไม่สามารถแบ่งเพศ 5 ตัว (ตารางที่ 5 และ ตารางที่ 6) โดยตัวอย่างโกแนดของลูกเต่าตนุจากบ่ออนุบาลในหน่วยงานอนุรักษ์ไม่สามารถทราบอายุของลูกเต่าที่เก็บเป็นตัวอย่างได้สำหรับตัวอย่างโกแนดของลูกเต่าตนุที่ได้จากการเพาะฟักและอนุบาลในห้องทดลองที่สามารถจำแนกเพศได้เป็นลูกเต่าที่มีอายุ 4 เดือน ขึ้นไป ขณะที่ตัวอย่างโกแนดของลูกเต่าตนุที่ไม่สามารถจำแนกเพศได้มีอายุประมาณ 3 เดือน เมื่อนำผลการจำแนกเพศจากการทำ PCR และการศึกษาลักษณะเนื้อเยื่อรวมถึงเพศที่คาดว่าจะได้จากการเพาะฟักแบบควบคุมอุณหภูมิมาเทียบกันโดยนำผลจากตัวอย่างรหัส U25-U27 ซึ่งมีข้อมูลจากทั้งสามวิธีมาวิเคราะห์พบว่าผลจากเพศของลูกเต่าที่คาดว่าจะได้จากการควบคุมอุณหภูมิในการเพาะฟักไข่เทียบกับผลการจำแนกเพศโดยดูลักษณะเนื้อเยื่อของโกแนดตรงกันร้อยละ 50 (ตารางที่ 6) ผลจากการจำแนกเพศโดยดูลักษณะเนื้อเยื่อของโกแนดที่พัฒนาเป็นรังไข่หรืออณฑะแล้วเทียบกับผลการจำแนกเพศโดยการทำ PCR ตรงกันร้อยละ 100 (ตารางที่ 6 โดยใช้ข้อมูลเฉพาะจากตัวอย่างที่จำแนกเพศได้แล้ว U25และU27) และผลจากเพศของลูกเต่าที่คาดว่าจะได้จากการควบคุมอุณหภูมิในการเพาะฟักไข่กับผลการแยกเพศโดยการทำ PCR ตรงกันร้อยละ 66.7 (ตารางที่ 5) เมื่อนำผลการจำแนกเพศโดยการศึกษาลักษณะ โกแนดทั้งหมดเทียบกับผลการทำ PCR (ตารางที่ 6)



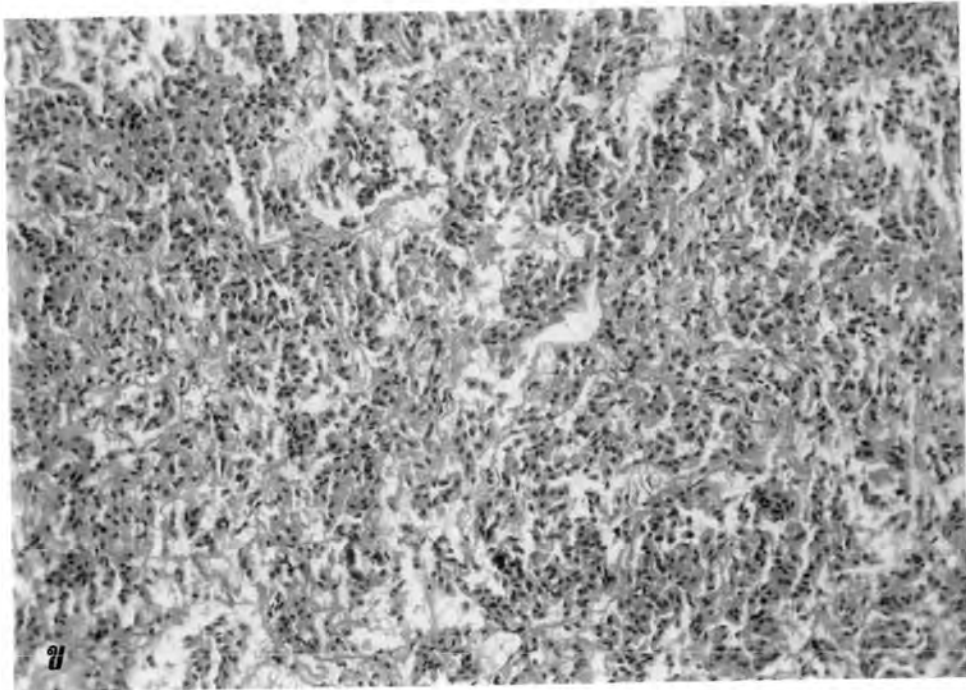
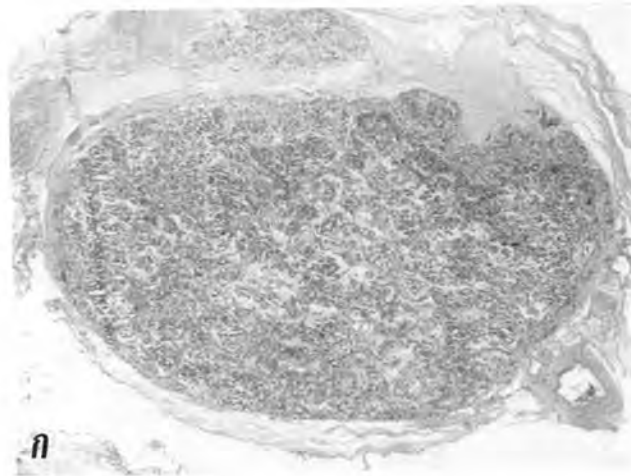
รูปที่ 12 ลักษณะรังไข่ของลูกเต่าตนุเพศเมียอายุ 4 เดือนขึ้นไป

ก - รังไข่ที่มีชั้นคอร์เทกซ์ (C) และเมดัลลา (M) (กำลังขยาย X40 ย้อมสี haematoxylin และ eosin)

ข - ภาพขยายของรังไข่ซึ่งชั้นคอร์เทกซ์ประกอบด้วยเซลล์เรียงตัวต่อกันหลายชั้น ส่วนชั้นเมดัลลา

ประกอบด้วยเส้นเลือด (Bv.) และเนื้อเยื่อเกี่ยวพันแทรกกระจายทั่วไป (กำลังขยาย X200

ย้อมสี haematoxylin และ eosin)



รูปที่ 13 ลักษณะโกแนคที่ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นรังไข่หรืออัมตะของลูกเต่าตนุ

ก - ภาพของโกแนคที่เนื้อเยื่อยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงจะประกอบด้วยเซลล์ที่ลักษณะคล้ายกันและยังไม่แยกเป็นชั้นคอร์เทกซ์และชั้นแมดูลลา (กำลังขยาย X40 ย้อมสี haematoxylin และ eosin)

ข - ภาพขยายของเซลล์ที่ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลง (กำลังขยาย X200 ย้อมสี haematoxylin และ eosin)

ตารางที่ 5 เพศของลูกเต่าที่คาดว่าจะได้จากการกำหนดอุณหภูมิเพาะฟักเทียบกับเพศที่จำแนกจากผล

PCR

| รหัสตัวอย่าง | อุณหภูมิที่ใช้เพาะฟัก (°C) | เพศจากการกำหนดอุณหภูมิ | ผล PCR | เปรียบเทียบผลการจำแนก |
|--------------|----------------------------|------------------------|---------|-----------------------|
| U1 | 27 | เพศผู้ | เพศผู้ | ตรงกัน |
| U2 | 27 | เพศผู้ | เพศเมีย | ไม่ตรงกัน |
| U3 | 27 | เพศผู้ | เพศผู้ | ตรงกัน |
| U4 | 27 | เพศผู้ | เพศเมีย | ไม่ตรงกัน |
| U25 | 27 | เพศผู้ | เพศผู้ | ตรงกัน |
| U26 | 27 | เพศผู้ | เพศผู้ | ตรงกัน |
| U27 | 27 | เพศผู้ | เพศเมีย | ไม่ตรงกัน |
| U5 | 34 | เพศเมีย | เพศเมีย | ตรงกัน |
| U6 | 34 | เพศเมีย | เพศเมีย | ตรงกัน |

ตารางที่ 6 เพศของลูกเต่าตนุจากการศึกษาลักษณะ โกลแนคเทียบกับเพศที่จำแนกจากผล PCR

| รหัส ตัวอย่าง | แหล่งที่มาของตัวอย่าง | ลักษณะ โกลแนค | ผล PCR | เปรียบเทียบผลการ จำแนก |
|---------------|--------------------------|---------------|---------|------------------------|
| U7 | สถานีอนุรักษ์ | เพศเมีย | เพศเมีย | ตรงกัน |
| U8 | สถานีอนุรักษ์ | เพศเมีย | เพศผู้ | ไม่ตรงกัน |
| U9 | สถานีอนุรักษ์ | ไม่ทราบเพศ | เพศผู้ | ไม่ได้เปรียบเทียบ |
| U10 | สถานีอนุรักษ์ | เพศผู้ | เพศผู้ | ตรงกัน |
| U11 | สถานีอนุรักษ์ | เพศผู้ | เพศผู้ | ตรงกัน |
| U12 | สถานีอนุรักษ์ | เพศผู้ | เพศผู้ | ตรงกัน |
| U13 | สถานีอนุรักษ์ | เพศเมีย | เพศเมีย | ตรงกัน |
| U14 | สถานีอนุรักษ์ | เพศผู้ | เพศผู้ | ตรงกัน |
| U15 | สถานีอนุรักษ์ | ไม่ทราบเพศ | เพศผู้ | ไม่ได้เปรียบเทียบ |
| U16 | สถานีอนุรักษ์ | เพศผู้ | เพศเมีย | ไม่ตรงกัน |
| U17 | สถานีอนุรักษ์ | เพศเมีย | เพศผู้ | ไม่ตรงกัน |
| U18 | สถานีอนุรักษ์ | ไม่ทราบเพศ | เพศผู้ | ไม่ได้เปรียบเทียบ |
| U19 | สถานีอนุรักษ์ | เพศเมีย | เพศเมีย | ตรงกัน |
| U20 | สถานีอนุรักษ์ | เพศผู้ | เพศผู้ | ตรงกัน |
| U21 | สถานีอนุรักษ์ | เพศเมีย | เพศเมีย | ตรงกัน |
| U22 | สถานีอนุรักษ์ | เพศผู้ | เพศผู้ | ตรงกัน |
| U23 | สถานีอนุรักษ์ | ไม่ทราบเพศ | เพศเมีย | ไม่ได้เปรียบเทียบ |
| U24 | สถานีอนุรักษ์ | เพศเมีย | เพศผู้ | ไม่ตรงกัน |
| U25 | เพาะฟักที่ 27°C (เพศผู้) | เพศผู้ | เพศผู้ | ตรงกัน |
| U26 | เพาะฟักที่ 27°C (เพศผู้) | ไม่ทราบเพศ | เพศผู้ | ไม่ได้เปรียบเทียบ |
| U27 | เพาะฟักที่ 27°C (เพศผู้) | เพศเมีย | เพศเมีย | ตรงกัน |

- ไม่ได้ทำการทดลอง

พบว่าได้ผลตรงกันถึงร้อยละ 75 สำหรับผลจากเพศของลูกเต่าตนุรหัส U1-U6 ที่คาดว่าจะได้จากควบคุมอุณหภูมิในการเพาะฟักเทียบกับผลการจำแนกเพศโดยการทำ PCR (ตารางที่ 5) พบว่าได้ผลตรงกันร้อยละ 67

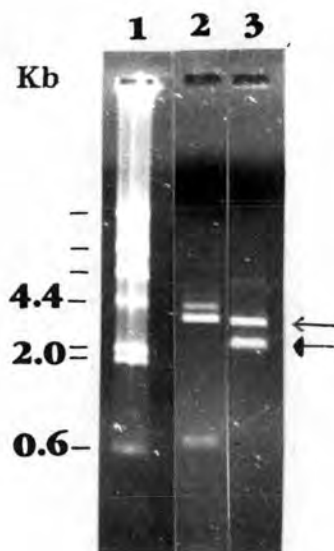
4.7 การศึกษาคุณสมบัติของชิ้นดีเอ็นเอขนาด 2.29 กิโลเบส ที่ได้จากการทำ PCR

เพื่อที่จะศึกษาสมบัติบางประการของชิ้นดีเอ็นเอขนาด 2.29 กิโลเบส ที่ได้จากการทำ PCR จึงจำเป็นต้องเตรียมชิ้นดีเอ็นเอขนาด 2.29 กิโลเบส เป็นจำนวนมาก เพื่อหลีกเลี่ยงการแยกชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวจากอะกาโรสเจลทุกครั้งที่ต้องการใช้จึงพยายามที่จะโคลนชิ้นดีเอ็นเอนี้ไว้ในเซลล์ของ *E. coli* โดยแยกชิ้นดีเอ็นเอขนาด 2.29 กิโลเบส ที่ได้จากการทำ PCR ออกจากอะกาโรสเจลโดยวิธีในข้อ 3.7.1 จากนั้นจึงนำมาเชื่อมกับดีเอ็นเอพาหะ pUC18 ที่ปลายมีเบส T ขึ้นออกมา 1 เบส (pGEM[®]-T Easy) ตามวิธีทำในข้อ 3.7.2 ผลการเชื่อมแสดงไว้ในรูปที่ 14 จากรูปแสดงให้เห็นว่ามีดีเอ็นเอถูกผสมเกิดขึ้น เมื่อนำดีเอ็นเอถูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* JM109 โดยการใช้กระแสไฟฟ้าแล้วตรวจผลการทรานสฟอร์มพบว่ามิโคโลนีสีขาวขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ X-gal plate จำนวน 53 โคโลนี เมื่อนำเชื้อมาเลี้ยงและทำการสกัดพลาสมิดแล้วตัดด้วย *EcoR* I ปรากฏว่าไม่พบชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการแทรกอยู่ในดีเอ็นเอพาหะ

พบว่าได้ผลตรงกันถึงร้อยละ 75 สำหรับผลจากเพศของลูกเต่าตนุรหัส U1-U6 ที่คาดว่าจะได้จากควบคุมอุณหภูมิในการเพาะฟักเทียบกับผลการจำแนกเพศโดยการทำ PCR (ตารางที่ 5) พบว่าได้ผลตรงกันร้อยละ 67

4.7 การศึกษาคุณสมบัติของชิ้นดีเอ็นเอขนาด 2.29 กิโลเบส ที่ได้จากการทำ PCR

เพื่อที่จะศึกษาสมบัติบางประการของชิ้นดีเอ็นเอขนาด 2.29 กิโลเบส ที่ได้จากการทำ PCR จึงจำเป็นต้องเตรียมชิ้นดีเอ็นเอขนาด 2.29 กิโลเบส เป็นจำนวนมาก เพื่อหลีกเลี่ยงการแยกชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวจากอะกาโรสเจลทุกครั้งที่ต้องการใช้จึงพยายามที่จะโคลนชิ้นดีเอ็นเอนี้ไว้ในเซลล์ของ *E. coli* โดยแยกชิ้นดีเอ็นเอขนาด 2.29 กิโลเบส ที่ได้จากการทำ PCR ออกจากอะกาโรสเจลโดยวิธีในข้อ 3.7.1 จากนั้นจึงนำมาเชื่อมกับดีเอ็นเอพาหะ pUC18 ที่ปลายมีเบส T ยื่นออกมา 1 เบส (pGEM[®]-T Easy) ตามวิธีทำในข้อ 3.7.2 ผลการเชื่อมแสดงไว้ในรูปที่ 14 จากรูปแสดงให้เห็นว่ามีดีเอ็นเอลูกผสมเกิดขึ้น เมื่อนำดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* JM109 โดยการใช้กระแสไฟฟ้าแล้วตรวจผลการทรานสฟอร์มพบว่า มีโคโลนีสีขาวขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ X-gal plate จำนวน 53 โคโลนี เมื่อนำเชื้อมาเลี้ยงและทำการสกัดพลาสมิดแล้วตัดด้วย *EcoR* I ปรากฏว่าไม่พบชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการแทรกอยู่ในดีเอ็นเอพาหะ



รูปที่ 14 ผลการเชื่อมชิ้นดีเอ็นเอขนาด 2.29 กิโลเบสจากการทำ PCRเชื่อมกับดีเอ็นเอ

พาหะ pGEM[®]-T Easy

ช่องที่ 1 - ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ /Hind III

ช่องที่ 2 - positive control ดีเอ็นเอลูกผสมของชิ้นดีเอ็นเอขนาด 0.6 กิโลเบสใน kit กับดีเอ็นเอ

พาหะ pGEM[®]-T Easy ขนาด 3.0 กิโลเบส

ช่องที่ 3 - ดีเอ็นเอลูกผสมของชิ้นดีเอ็นเอขนาด 2.29 กิโลเบสกับดีเอ็นเอพาหะ pGEM[®]-T

Easy

→ - ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 2.29 กิโลเบส

→ - ชิ้นดีเอ็นเอพาหะ pGEM[®]-T Easy