595.3
ว835ร

15 พ.ค. 2541

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์
ทุนอุดหนุนการวิจัย
จาก
งบประมาณแผ่นดินประจำปี 2539

การแยกบริสุทธิ์ฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดของกุ้งก้ามกราม

Purification of Crustacean Hyperglycemic Hormone in the Giant Freshwater Prawn *Macrobrachium rosenbergii*

วีระวรรณ สิทธิกรกุล ไพศาล สิทธิกรกุล นิรันดร์ บุญอิงเพริศพงศ์
ภาควิชาชีววิทยา และภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

9758

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณฝ่ายวิจัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร ที่ได้สนับสนุนให้ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2539 และภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร ที่ได้ให้การสนับสนุนจนโครงการวิจัยนี้สำเร็จไปด้วยดี

คณะผู้วิจัย

กรกฎาคม 2540

สารบัญเรื่อง

หน้า

บทคัดย่อ I

Abstract II

บทนำ 1

วิธีการวิจัย 20

ผลการวิจัย 28

สรุปและอภิปรายผล 50

บรรณานุกรม 54

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1 การเปรียบเทียบวิธีการทำให้บริสุทธิ์และการศึกษาคุณลักษณะของ CHH ในสัตว์ครัสตาเซียนชนิดต่าง ๆ 7

2 เปรียบเทียบชนิดและจำนวนกรดอะมิโนของ CHH ในสัตว์ครัสตาเซียนบางชนิด 16

3 ความเข้มข้นของกลูโคสที่เพิ่มขึ้นในเลือดกุ้งที่ถูกตัดตาทั้งสองข้างก่อนฉีดและหลังจากฉีดสารสกัดจากก้านตาที่สกัดด้วย methanol:acetic acid (90:1) ในระดับความเจือจางต่าง ๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30

4 ผลการตรวจสอบ CHH จาก fraction ต่าง ๆ ที่แยกได้จาก HPLC ในขั้นตอนที่ 1 ทั้งสามครั้ง (คอลัมน์ : PrepPak C18 ; ระบบตัวทำละลาย ACN/-TFA) 33

5 เปรียบเทียบชนิดและจำนวนกรดอะมิโนของ CHH ในสัตว์ครัสตาเซียนชนิดต่าง ๆ กับ CHH ของกุ้งก้ามกราม 49

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	เปรียบเทียบลักษณะของกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) เพศผู้และกุ้งก้ามกรามเพศเมีย	19
2	ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดและการสกัด CHH จากก้านตาของกุ้งก้ามกราม	25
3	ขั้นตอนการทดสอบประสิทธิภาพการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดของ CHH	26
4	ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดหยาบจากก้านตาของกุ้งก้ามกราม	27
5	โครมาโตแกรมของสารสกัดจากก้านตาของกุ้งก้ามกรามที่สกัดด้วยสาร methanol acetic acid จำนวน 1,000 ก้านตา หลังจากผ่านกระบวนการ RP-HPLC ขั้นตอนแรก (คอลัมน์ : PrepPak C18 ; ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA)	32
6	โครมาโตรแกรมของสารสกัดจากก้านตาของกุ้งก้ามกรามจำนวน 5,000 ก้านตา ที่ผ่านกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 2 จาก fraction ที่ 37 (คอลัมน์ : PrepPak C8 ; ระบบตัวทำละลาย ACN/HFBA)	35
7	โครมาโตแกรมของสารสกัดจากก้านตาของกุ้งก้ามกรามจาก fraction ที่ 36 และ 37 ของขั้นตอนที่ 2 ที่ผ่านกระบวนการทาง RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 3 (คอลัมน์ : PrepPak C18 ; ระบบตัวทำละลาย ACN/TEA)	37
8	โครมาโตแกรมของสารสกัดจากก้านตาของกุ้งก้ามกราม fraction ที่ 38 ของขั้นตอนที่ 3 ผ่านกระบวนการทาง RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 4 (คอลัมน์ : Cyano ; ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA)	39

รูปที่ หน้า

9 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากก้านตาของกุ้งก้ามกรามจาก fraction ที่ 31 และ 32 ของขั้นตอนที่ 4 ผ่านกระบวนการทาง RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 5 (คอลัมน์ : Phenyl ; ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA) 41

10 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากก้านตาของกุ้งก้ามกรามจาก fraction ที่ 33 และ 34 ในขั้นตอนที่ 5 ผ่านกระบวนการทาง RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 6 (คอลัมน์ : Cyano ; ระบบตัวทำละลาย ACN/TEA) 43

11 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากก้านตาของกุ้งก้ามกรามจาก fraction ที่ 33-34 ของขั้นตอนที่ 6 ผ่านกระบวนการทาง RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 7 (คอลัมน์ : Cyano ; ระบบตัวทำละลาย ACN/HFBA) 45

12 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากก้านตาของกุ้งก้ามกรามจาก fraction ที่ 30 และ 31 ผ่านกระบวนการทาง RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 8 (คอลัมน์ : C18 ; ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA) 47

บทคัดย่อ

การแยกสกัดฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด (Crustacean Hyperglycemic Hormone-CHH) จากก้านตาของกุ้งก้ามกรามโดยใช้ก้านตาจำนวน 5,000 ก้านตา บดและสกัดด้วยสารละลาย methanol-acetic acid และผ่าน C18 cartridge ก่อนนำไปแยกโดยใช้กระบวนการ RP-HPLC 8 ขั้นตอน ประกอบด้วยคอลัมน์ 4 ชนิดได้แก่ C18, C8, cyano และ phenyl column และใช้ระบบตัวทำละลาย 3 ระบบคือ acetonitrile (ACN)/trifluoroacetic acid, ACN/heptafluorobutyric acid และ ACN/triethylamine การติดตามการปรากฏของ CHH ใน fraction ต่าง ๆ ทำโดยการฉีดสารที่แยกได้ให้กุ้งก้ามกรามที่ถูกตัดตาทั้งสองข้างและตรวจความสามารถของสารสกัดในการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด สามารถทำให้บริสุทธิ์ CHH และนำมาหาลำดับกรดอะมิโนได้ 1 รูปแบบ CHH ที่ทำให้บริสุทธิ์ได้นี้ประกอบด้วยกรดอะมิโน 71 หน่วย มีลำดับกรดอะมิโนประมาณ 60 % คล้ายกับ CHH ของกุ้ง crayfish *Orconectes limosus, Procambarus bouvieri,* กุ้งลอบสเตอร์ *Homarus americanus* และปู *Carcinus maenas* แต่สำหรับลำดับกรดอะมิโนประมาณ 45 % คล้ายกับ CHH ของกุ้งทะเล *Penaeus joponicus* ดังนั้น CHH ในกุ้งก้ามกรามจึงมีลักษณะเฉพาะตัวแตกต่างจากสัตว์ครัสตาเซียนในกลุ่มอื่น ๆ และคาดว่าอาจมีมากกว่า 1 รูปแบบ

ABSTRACT

Crustacean hyperglycemic hormone of *Macrobrachium rosenbergii* was isolated from 5,000 frozen powdered eyestalks extracted in methanol acetic acid. After the extract was partially purified by PrepPak C18 cartridge, it was further purified by 8 steps of RP-HPLC using four kinds of columns : C18, C8, cyano and phenyl columns; and with three solvent systems : acetonitrile (ACN)/ trifluoroacetic acid, ACN/heptafluorobutyric acid and ACN/triethylamine. Detection of CHH during purification was done by injection of the extracts into eyeablated prawns and determination the ability of the extract on elevation of glucose in hemolymph. The complete amino acid sequence analysis was performed on one isoform of CHH consisting of 71 residues. The sequence of the CHH shows considerable similarity (~60 %) to that of CHH of the crayfishes *Orconectes limosus* and *Procambarus bouvieri*, the american lobster *Homarus americanus* and the shore crab *Carcinus maenas* and less similarity (~45 %) to that of CHH of *Penaeus japonicus*. It is expected that there might be more than one isoforms of CHH in *M. rosenbergii*.

บทนำ

เป็นที่ทราบกันดีว่าในสัตว์พวกครัสตาเซียน (crustacean) โดยเฉพาะพวก decapod เช่น กุ้ง ปู กั้งและ crayfish ก้านตา (eyestalk) เป็นแหล่งสร้างฮอร์โมนที่สำคัญเทียบเท่ากับต่อมใต้สมองในสัตว์มีกระดูกสันหลัง กระบวนการทางสรีรวิทยาหลายกระบวนการของพวกครัสตาเซียนถูกควบคุมโดยนิวโรฮอร์โมน (neurohormone) ซึ่งสร้างจาก neurosecretory cells ซึ่งอยู่ในก้านตา กระบวนการเหล่านี้ได้แก่ การควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด การลอกคราบ การพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ การเคลื่อนที่ของรงควัตถุที่ผิวตัวหรือที่ตา สมดุลของน้ำและแร่ธาตุ อัตราการเต้นของหัวใจ รวมทั้งเมตาบอลิสมของแคลเซียม ไขมัน โปรตีนและคาร์โบไฮเดรต (Keller and Sedlmeier, 1988) ในปัจจุบันสามารถแยก ทำให้บริสุทธิ์ และศึกษาจนทราบถึงโครงสร้างทางเคมีและแหล่งที่ผลิตของฮอร์โมนบางชนิดของสัตว์บางชนิดได้บ้างแล้ว เช่น ฮอร์โมนที่ควบคุมการกระจายตัวของรงควัตถุในตาเพื่อปรับตัวให้เข้ากับแสงในที่มืด (Pigment Dispersing Hormone-PDH) (Kleinholz et al., 1986; Rao and Riehm, 1988) ฮอร์โมนที่ควบคุมการรวมตัวของรงควัตถุภายในโครมาโตฟอร์ (Red Pigment Concentrating Hormone-RPCH) (Fernlund, 1974) ฮอร์โมนที่ยับยั้งการลอกคราบ (Molt Inhibiting Hormone-MIH) (Chang et al., 1987; Webster, 1991; Chung et al., 1996 Yang et al., 1996) ฮอร์โมนที่ยับยั้งพัฒนาการของรังไข่ (Vitellogenesis Inhibiting Hormone-VIH or Gonad Inhibiting Hormone-GIH) (Soyez et al., 1987; Aguilar et al., 1992) และฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดของสัตว์พวกครัสตาเซียน (Crustacean Hyperglycemic Hormone-CHH) (Martin et al., 1984; Huberman and Aguilar, 1986; Kegel et al., 1989; Soyez et al., 1990; Tensen and et al., 1991; Huberman et al., 1993; Yang et al., 1995)

ฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดของสัตว์พวกครัสตาเซียนหรือ CHH (Crustacean Hyperglycemic hormone) เป็นสารประเภทโพลีเปปไทด์ที่ไวต่อความร้อน ถูกทำลายได้ง่ายโดยเอนไซม์โปรตีเอส (Beltz, 1988) ได้มีรายงานการแยกฮอร์โมนนี้จากสัตว์พวกครัสตาเซียนต่าง ๆ หลายสปีชีส์แล้วทำให้บริสุทธิ์ และศึกษาถึงลักษณะต่างๆ ทางด้านชีววิทยาและชีวเคมีของฮอร์โมนนี้บ้างแล้วในบางสปีชีส์ พบว่า CHH ในสัตว์พวกครัสตาเซียน แต่ละสปีชีส์จะมีความแตกต่างกันบ้างในด้านส่วนประกอบและลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโน (Kegel et al., 1991; Huberman et al., 1993) ในสัตว์สปีชีส์เดียวกันอาจมี CHH ได้หลายรูปแบบ (polymorphism) เช่น ใน Mexican crayfish, *Procambarus bouvieri* พบ CHH 2 รูปแบบ คือ CHH-B และ CHH-C (Huberman and Aguilar, 1988) และในกุ้ง American lobster, *Homarus americanus* พบ CHH 2 กลุ่ม ซึ่งแต่ละกลุ่มประกอบด้วย CHH กลุ่มละ

2 รูปแบบ (Soyez et al., 1990) การที่ CHH มีหลายรูปแบบอาจเป็นไปได้ว่า CHH ผลิตมาจาก gene เดียว แต่มีการเปลี่ยนแปลงหลังจากถอดรหัสเป็นโปรตีน (postranslational modification) แล้วให้ CHH หลายรูปแบบ หรือ CHH อาจจะเป็นผลิตภัณฑ์ที่มาจากการเพิ่มจำนวน gene ก็ได้ (Huberman and Aguilar, 1988)

จากรายงานการศึกษาด้วยอิมมูโนไซโตเคมีสทรี (immunocytochemical studies) ในกุ้ง crayfish, *Astacus leptodactylus* โดยใช้แอนติซีรัม (antiserum) ต่อ CHH ที่ผลิตได้ พบว่ากลุ่มของตัวเซลล์ประสาท (perikarya) ที่สร้าง CHH จะอยู่บริเวณที่เรียกว่า Medulla Terminalis Ganglionic X-organ (MTGXO) ในก้านตา และมีส่วนปลายประสาทแอกซอนไปสิ้นสุดที่บริเวณต่อมไซนัส (sinus gland-SG) ซึ่งเป็น neurohemal organ ในก้านตา ต่อมไซนัสจึงเป็นแหล่งสะสมและปล่อย CHH ไปยังเนื้อเยื่อเป้าหมาย (target tissue) โดยลำเลียงมาจาก neurosecretory cells ซึ่งอยู่ที่ X-organ (Kallen and Van Herp, 1981) ส่วนของ MTGXO-SG system ขนาดและจำนวนเซลล์ที่สร้าง CHH แตกต่างกันไปตามชนิดของสัตว์ครัสตาเซียนนั้น ๆ เช่น ในปูน้ำเค็ม *Carcinus maenus* มีเซลล์ขนาด 40 ไมโครเมตร จำนวน 40 เซลล์ที่ MTGXO ในกุ้ง crayfish, *Astacus leptodactylus* มีเซลล์ขนาด 50 ไมโครเมตร จำนวน 32 เซลล์ และในกุ้งมังกร *Palinurus* sp. มีเซลล์จำนวนมากถึง 150 เซลล์เป็นต้น (Keller and Sedlmeier, 1988) นอกจากนี้ยังพบว่าบางส่วนของฮอร์โมนนี้อาจสร้างมาจากสมองส่วนโปรโตซีรีบรัม (protocerebrum) ของแมงสาบทะเล *Porcellio dilatatus* ระบบประสาทส่วนกลาง และ pericardial organ ของปู *Carcinus maenas* (Keller and Sedlmeier. 1988) และปมประสาทส่วนอกของปูน้ำจืด *Barythelphusa guerini* (Gangotri et al., 1987) อย่างไรก็ตามแหล่งสร้าง CHH ในก้านตาจะเป็นตัวหลักในการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดเพราะแหล่งอื่น ๆ มีการสร้างน้อย ดังนั้นในการแยกสกัด CHH และทำให้บริสุทธิ์ในสัตว์ครัสตาเซียน เช่น ในแมงสาบทะเล *Porcellio dilatatus* (Martin et al., 1984) ในกุ้ง crayfish, *Procambarus bouvieri* (Huberman and Aguilar, 1988) ในปูน้ำเค็ม *Carcinus maenas* (Kegel et al., 1989) ในกุ้งลอบสเตอร์ *Homarus americanus* (Soyez et al., 1990) และในกุ้ง crayfish, *Orconectes limosus* (Kegel et al., 1991) จึงใช้ก้านตาเป็นแหล่งสกัดฮอร์โมนทั้งสิ้น

ได้มีรายงานเกี่ยวกับการออกฤทธิ์ข้ามกัน (cross-reactivity) ระหว่างสัตว์ครัสตาเซียนชนิดต่าง ๆ พบว่าการออกฤทธิ์ข้ามกันค่อนข้างจำกัด เช่น CHH ของปูน้ำเค็ม *Carcinus maenas* สามารถทำให้ระดับกลูโคสในเลือดเพิ่มได้ในปูก้ามดาบ *Uca pugilator* แต่ CHH จากกุ้ง crayfish, *Orconectes limosus* ไม่สามารถทำให้ระดับกลูโคสเพิ่มในปูก้ามดาบ *Uca pugilator* ปู *Carcinus*

maenas และแมงสาบทะเล *Porcellio dilatatus* ได้ แต่จากการตรวจสอบปฏิกิริยาข้ามกันด้วยกระบวนการทาง RIA (radioimmunoassay) พบว่ามีปฏิกิริยาข้ามกันระหว่าง CHH ของ *Carcinus maenas* กับแมงสาบทะเล *Porcellio dilatatus* (Martin et al., 1984) และปู *Carcinus maenas* กับกุ้ง crayfish, *Orconectes limosus* (Keller and Sedlmeier, 1988) ซึ่งแสดงว่า CHH ในครัสตาเซียนแต่ละชนิดมี โครงสร้างบางส่วนของโมเลกุลคล้ายคลึงกันจึงออกฤทธิ์ข้ามกันได้ แต่ก็มีบางส่วนของโมเลกุลที่ออกฤทธิ์แตกต่างกันไปเป็นผลให้ปฏิกิริยาข้ามกันระหว่างสปีชีส์ค่อนข้างจำกัด ทั้งนี้เนื่องจากรีเซ็พเตอร์ (receptor) ในเนื้อเยื่อเป้าหมายจะมีความจำเพาะต่อฮอร์โมนเพียงชนิดเดียวหรือฮอร์โมนที่มีโครงสร้างของโมเลกุลคล้าย ๆ กันเท่านั้น ซึ่งส่วนของโมเลกุลที่แตกต่างกันไปนี้อาจเป็นเพราะมีการเปลี่ยนแปลงในระหว่างที่มีวิวัฒนาการ (Keller and Sedlmeier, 1988) จากเหตุผลดังกล่าวนี้เองทำให้สามารถอธิบายได้ว่าการที่ MIH (Molt Inhibiting Hormone) จากกุ้งอเมริกันลอบสเตอร์ *Homarus americanus* แสดงคุณสมบัติของ CHH ในการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดได้เพราะฮอร์โมนทั้งสองชนิดมีความคล้ายคลึงกันมากในด้านน้ำหนักโมเลกุลและลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโน (Kegel et al., 1991)

ดังนั้นการศึกษาฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิสม (metabolic hormone) โดยเฉพาะฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดของกุ้งก้ามกราม (Crustacean Hyperglycemic Hormone-CHH) นี้จึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจ ถ้าสามารถแยกและทำให้ CHH บริสุทธิ์ได้ก็จะเป็นพื้นฐานไปสู่การศึกษาถึงโครงสร้างของ CHH ก่อนที่จะศึกษาถึงบทบาทของฮอร์โมนนี้ที่มีผลต่อกระบวนการทางสรีรวิทยาและการดำรงชีวิตของกุ้งก้ามกรามให้ได้ผลดีต่อไป นอกจากนี้จากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ CHH, MIH และ VIH (Vitellogenesis Inhibiting Hormone) พบว่าเปปไทด์ทั้ง 3 กลุ่มนี้มีลักษณะร่วมกันคือประกอบด้วยกรดอะมิโน 72-78 หน่วยและมีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกันและทุกฮอร์โมนประกอบด้วยซีสเตอีน (cystein) 6 หน่วยในส่วนของโมเลกุลส่วนที่คงที่ จึงจัดรวมอยู่ในกลุ่มเดียวกันเป็น CHH/MIH/VIH family (Kleijn and Van Herp, 1995) ดังนั้นการศึกษาโครงสร้างและการทำงานของฮอร์โมน CHH จึงเป็นพื้นฐานที่สำคัญในการศึกษาฮอร์โมนอื่น ๆ ที่มีบทบาทสำคัญในกุ้งชนิดต่าง ๆ ต่อไป

การศึกษาเกี่ยวกับฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดหรือ CHH เริ่มต้นจากรายงานที่การตัดก้านตาของปู *Callinectes sapidus* ออกและตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือด พบว่าจะมีระดับน้ำตาลในเลือดลดต่ำลง แต่เมื่อให้สารสกัดจากก้านตากลับเข้าไปจะมีผลทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดเพิ่มขึ้น

จึงสรุปว่าปัจจัยที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด (diabetogenic factor) อยู่ในก้านตาของปู (Abramowitz, 1944) และจากการศึกษาต่อมาทำให้ทราบว่าปัจจัยนี้คือฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดของสัตว์พวกครัสตาเซียน การศึกษาถึงผลของการตัดก้านตาทั้งสองข้างของปูน้ำจืด *Barytelphusa guerini* พบว่าการตัดก้านตามีผลทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดเพิ่มขึ้น 1-2 ชั่วโมงแรกหลังจากการตัดก้านตา ทั้งนี้เนื่องมาจากการเกิด nervous shock ที่เกิดจากการตัดก้านตาหรือมีการปล่อยฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดออกมา ต่อมาระดับน้ำตาลในเลือดจะลดลงและอยู่ในสภาวะเช่นนี้นานถึง 10 วัน เมื่อเปรียบเทียบระดับน้ำตาลในเลือดของปูปกติที่ไม่ตัดก้านตากับปูที่ตัดก้านตา ปรากฏว่าปูที่ตัดก้านตาจะมีระดับน้ำตาลในเลือดต่ำกว่าปูปกติ แต่เมื่อให้สารสกัดจากก้านตากลับเข้าไปในปูที่ตัดก้านตาจะมีผลทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดเพิ่มขึ้น (Gangotri et al., 1987)

จากรายงานการศึกษาผลของการฉีดสารสกัดหยาบจากต่อมไซนัสของกุ้งลอบสเตอร์ *Homarus americanus* เข้าไปในกุ้งลอบสเตอร์ *Homarus gammarus* พบว่ามีผลทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดเพิ่มขึ้นสูงสุดหลังจากฉีดสารสกัดเข้าไป 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นระดับน้ำตาลในเลือดที่เพิ่มขึ้นนี้จะลดลงจนถึงระดับปกติเท่ากับกลุ่มควบคุม (Soyez et al., 1990) ในปี 1992 Sithigorngul et al. ได้ตรวจสอบฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดของกุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* เพื่อเป็นแนวทางในการแยกสกัดฮอร์โมนนี้และฮอร์โมนอื่น ๆ จากก้านตากุ้งโดยเก็บตัวอย่างเลือดกุ้งในช่วงเวลาต่าง ๆ หลังจากวางไข่ พบว่าระดับน้ำตาลในเลือดของกุ้งปกติมีความแปรปรวนสูงมาก ทั้งนี้เนื่องจากในขณะเก็บตัวอย่างเลือดจากกุ้งอาจเป็นการกระตุ้นให้มีการเคลื่อนย้ายกลูโคสจากแหล่งสะสม แต่ในกุ้งที่ถูกตัดก้านตาออกทั้งสองข้างจะมีระดับน้ำตาลในเลือดต่ำและค่อนข้างคงที่ เพราะการตัดก้านตาเป็นการกำจัดฮอร์โมนสำคัญที่เพิ่มระดับกลูโคสในเลือด เมื่อฉีดสารสกัดจากก้านตากุ้ง (2 ก้านตาต่อตัว) เข้าไปในกุ้งที่ถูกตัดก้านตาทั้งสองข้างและเก็บตัวอย่างเลือดในช่วงเวลาต่าง ๆ กันคือ 0, 1/2, 1, 2, 4, และ 6 ชั่วโมง พบว่าระดับน้ำตาลในเลือดเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและถึงจุดสูงสุดประมาณ 1 ชั่วโมง ส่วนการศึกษาระดับกลูโคสในเลือดของกุ้งที่ถูกตัดตาโดยใช้สารสกัดจากก้านตาที่เจือจางระดับต่าง ๆ ได้แก่ 2, 1/2, 1/8, 1/32, 1/125, 1/500 และ 1/2,000 ก้านตาต่อตัว พบว่าปริมาณของระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดจะแปรผันตามปริมาณของสารสกัดจากก้านตาที่ฉีดเข้าไป และสารสกัดจากก้านตาปริมาณ 1/500 ก้านตาสามารถชักนำให้ระดับน้ำตาลในเลือดเพิ่มขึ้นได้

ส่วนการศึกษาถึงอิทธิพลของเพศ น้ำหนัก อุณหภูมิ และความเข้มข้นของน้ำเกลือต่อระดับกลูโคสในเลือดของกุ้ง brown shrimp, *Crangon crangon* พบว่ากุ้งเพศผู้จะมีระดับกลูโคสสูงที่สุด รองลงมาคือกุ้งเพศเมียที่อยู่ในระยะฟักไข่ (ovigerous female) ส่วนกุ้งเพศเมียที่ไม่ได้อยู่ในระยะฟักไข่ (non-ovigerous female) จะพบกลูโคสต่ำที่สุด การที่กุ้งเพศเมียที่อยู่ในระยะฟักไข่พบระดับกลูโคสมากกว่ากุ้งเพศเมียที่ไม่ได้อยู่ในระยะฟักไข่ ทั้งนี้ก็เพราะว่าขณะที่กุ้งมีการพัฒนาของไข่และรังไข่จะมีการดึงกลูโคสที่สะสมอยู่ในรูปของไกลโคเจนที่บริเวณตับ-ตับอ่อนมาใช้ จึงทำให้ระดับกลูโคสในเลือดสูงกว่า และจะสูงเช่นนี้จนกระทั่งไข่ฟักเป็นตัวอ่อนระดับกลูโคสจึงลดลง ในด้านอิทธิพลของน้ำหนักตัว กุ้งที่มีน้ำหนักตัวน้อยจะมีระดับกลูโคสสูงกว่ากุ้งที่มีน้ำหนักตัวมาก เมื่อนำกุ้งไปเลี้ยงในอ่างน้ำที่มีความเข้มข้นของน้ำเกลือต่าง ๆ กันคือ 6, 12, 18, 24, 30 และ 36 ppt. พบว่าระดับของกลูโคสในเลือดจะสูงที่สุดที่ความเข้มข้นของน้ำเกลือเป็น 12 ppt. และต่ำที่สุดเมื่อความเข้มข้นของน้ำเกลือเป็น 36 ppt. ส่วนการศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิต่อระดับกลูโคสในเลือด พบว่าจากการนำกุ้งไปเลี้ยงที่อุณหภูมิสูง (16-20 องศาเซลเซียส) กุ้งจะมีระดับกลูโคสในเลือดสูงกว่ากุ้งกลุ่มที่เลี้ยงในที่อุณหภูมิต่ำ (7-10 องศาเซลเซียส) ทั้งนี้เนื่องจากที่อุณหภูมิต่ำกุ้งมีเมตาบอลิสมลดลง นอกจากนี้ยังพบอีกว่าในระหว่างการเก็บเลือดระดับน้ำตาลกลูโคสจะเพิ่มขึ้น เป็นเพราะว่าการเก็บเลือดเป็นการกระตุ้นกระบวนการเมตาบอลิสมให้มีการเคลื่อนย้ายกลูโคสจากแหล่งสะสมได้แก่ ตับ-ตับอ่อนเข้าสู่ระบบหมุนเวียน เป็นการตอบสนองต่อการกระตุ้นเป็นผลให้ระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดสูงขึ้น (Spaargaren and Haefner, 1987)

สำหรับการแยกและการทำให้บริสุทธิ์เพื่อหาโครงสร้างและองค์ประกอบทางเคมี รวมทั้งลักษณะทางชีวเคมีของ CHH ในสัตว์กลุ่มครัสตาเซียนชนิดต่าง ๆ ดังนี้ (ตารางที่ 1)

การแยกสกัด CHH จากต่อมไซนัสของปูน้ำเค็ม *Carcinus maenas* จำนวน 1,065 ต่อมไซนัส โดยใช้สารละลายแอมโมเนียมอะซีเตตเข้มข้น 50 มิลลิโมลลาร์ (pH 8.5) และนำสารสกัด ที่ได้ไปผ่าน polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) เลือกแถบโปรตีนที่แสดง activity ในการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดของปูก้ามดาบ *Uca pugilator* ไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เจลฟิลเตรชัน Sephadex G-50 พบ CHH ถูกชะออกมาตรงกับ fraction ที่ 60-68 ตรวจวัดปริมาณโปรตีนของฮอร์โมนบริสุทธิ์ที่ได้ พบว่ามีปริมาณโปรตีน 280 ไมโครกรัมโปรตีนทั้งหมดจากประมาณ 3.5 มิลลิกรัม จากนั้นนำ CHH ที่ได้ไปตรวจหากรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบโดยใช้ปฏิกิริยา dansylation และ Edman degra-

dation และการย่อยด้วยเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ปรากฏว่า CHH ของปูน้ำเค็มนี้ประกอบด้วยกรดอะมิโน 57 หน่วย มีน้ำหนักโมเลกุล 6,726 ดาลตัน ปลาย N ถูกบล็อค (Keller and Wunderer, 1978)

ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบวิธีการทำให้บริสุทธิ์และการศึกษาคุณลักษณะของ CHH ในสัตว์ครัสตาเซียนชนิดต่าง ๆ

ผู้วิจัย-ปี	สัตว์ทดลอง	วิธีการทำให้บริสุทธิ์และการศึกษาคุณลักษณะ	ผลการวิจัย
Keller and Wunderer, 1978	*Carcinus maenas*	-PAGE -Gel filtration -Dansylation -Edman degradation	-กรดอะมิโน 57 หน่วย -น้ำหนักโมเลกุล 6,726 ดาลตัน -ปลาย N ถูกบล็อค
Martin et al., 1984	*Porcellio dilatatus*	-Sephadex G 50 -HPLC -Dansylation	-กรดอะมิโน 50-52 หน่วย -น้ำหนักโมเลกุล 5,800-6,100 ดาลตัน -ปลาย N ถูกบล็อค
Huberman and Aguilar, 1986	*Procambarus bouvieri*	-RP-HPLC -SDS-PAGE -Dansylation -IEF	-กรดอะมิโน 52 หน่วย -น้ำหนักโมเลกุล 6,042 ดาลตัน -พบซิสเตอีน 4 หน่วย -ปลาย N ถูกบล็อค -ปลาย C เป็นแวลีน -ไม่พบฮิสติดีน ทริปโตเฟน และเมไธโอนีน -มี pI 4.79

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ผู้วิจัย-ปี	สัตว์ทดลอง	วิธีการทำให้บริสุทธิ์และการศึกษาคุณลักษณะ	ผลการวิจัย
Kallen et al., 1986)	*Astacus leptodactylus*	-PAGE -SDS-PAGE -HPLC -DIA	-พบ CHH 2 พีค -น้ำหนักโมเลกุล 7,000 ดาลตัน
Huberman and Aguilar, 1988	*Procambarus bouvieri*	–RP-HPLC -Dansylation -IEF	-กรดอะมิโน 52-53 หน่วย -น้ำหนักโมเลกุล 6,000-6,200 ดาลตัน -พบซิสเตอีน 6 หน่วย -ปลาย C เป็นไอโซลิวซีน -ปลาย N ถูกบล็อค -มี pI 4.79 -พบ CHH 2 รูปแบบ คือ CHH-B และ CHH-C
Kegel et al., 1989)	*Carcinus maenas*	-HPLC -DABITC-PITC double-coupling method	-กรดอะมิโน 72 หน่วย -น้ำหนักโมเลกุล 8,524 ดาลตัน -พบซิสเตอีน 6 หน่วย -ปลาย N และ ปลาย C ถูกบล็อค

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ผู้วิจัย-ปี	สัตว์ทดลอง	วิธีการทำให้บริสุทธิ์และการศึกษาคุณลักษณะ	ผลวิจัย
Soyez et al., 1990	*Homarus americanus*	-RP-HPLC -FAB/MS -IEF	-พบ CHH 2 กลุ่ม -กลุ่มที่ 1 มีน้ำหนักโมเลกุล 8,633 ดาลตัน และมี pI 8.7 มีกรดอะมิโน 68 หน่วย -กลุ่มที่ 2 มีน้ำหนักโมเลกุล 8,578 ดาลตัน และมี pI 5.0 มีกรดอะมิโน 61 หน่วย
Tensen et al., 1991	*Homarus americanus*	-RP-HPLC -Edman degradation -FAB/MS	-กรดอะมิโน 72 หน่วย -พบ CHH 2 กลุ่ม -กลุ่มที่ 1 มีน้ำหนักโมเลกุล 8,578 ดาลตัน -กลุ่มที่ 2 มีน้ำหนักโมเลกุล 8,655 $\pm$ 25 ดาลตัน
Kegel et al., 1991	*Orconectes limosus*	-RP-HPLC -Edman degradation	-กรดอะมิโน 72 หน่วย -น้ำหนักโมเลกุล 8,400 ดาลตัน -ปลาย N เป็นไพโรกลูตาเมต -ปลาย C เป็นแวลีน -ซิสเตอีน 6 หน่วย
Martin et al., 1993	*Armadillidium vulgare*	-RP-HPLC -Edman degradation	-กรดอะมิโน 73 หน่วย -น้ำหนักโมเลกุล 8,729.3 ดาลตัน -ซิสเตอีน 6 หน่วย

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ผู้วิจัย-ปี	สัตว์ทดลอง	วิธีการทำให้บริสุทธิ์และการศึกษาคุณลักษณะ	ผลวิจัย
Huberman and Aguilar, 1993	*Procambarus bouvieri*	-RP-HPLC -Edman degradation -MS	-กรดอะมิโน 72 หน่วย -น้ำหนักโมเลกุล 8,388 ดาลตัน -ซิสเตอีน 6 หน่วย
Smullen and Bently, 1994	*Nephrops norvegicus*	-RP-HPLC -ELISA -SDS-PAGE	-น้ำหนักโมเลกุล 8,000 ดาลตัน
Yang et al., 1995	*Penaeus japonicus*	-RP-HPLC -MALDI-TOF-MS -FAB/MS	-กรดอะมิโน 72 หน่วย -น้ำหนักโมเลกุล 8,353 ดาลตัน -ซีสเตอีน 6 หน่วย

PAGE = Polyacrylamide gel electrophoresis

HPLC = High performance liquid chromatography

RP-HPLC = Reversed phase high performance liquid chromatography

SDS-PAGE = Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

IEF = Isoelectric focusing

DIA = Dotting immunobinding assay

DABITC-PITC double couping method

= Dimethylaminoazobenzene-4-isothiocyanate, Phenylisothiocyanate double coupling method

FAB/MS = Fast atom bombardment-mass spectrometry

MALDI-TOF-MS = Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry

ส่วนรายงานการแยกสกัด CHH จากต่อมไซนัสของแมงสาบทะเล *Porcellio dilatatus* จำนวน 2,000 ต่อมไซนัส การสกัดทำโดยใช้ตัวทำละลาย 2 ชนิดเปรียบเทียบกันคือ แอมโมเนียมอะซีเตตเข้มข้น 0.1 โมลลาร์ (pH 8.5) และ กรดอะซิติกเข้มข้น 0.2 โมลลาร์. ตรวจวัดปริมาณโปรตีนโดยใช้ Lowry method พบว่าสารสกัดจากตัวทำละลายทั้งสองชนิดมีปริมาณโปรตีนเป็น 0.64 และ 0.41 มิลลิกรัมตามลำดับ จากนั้นนำสารสกัดที่ได้จากการสกัดโดยตัวทำละลายทั้งสองชนิดไปทำให้บริสุทธิ์ 2 ขั้นตอน คือ ขั้นแรกผ่าน gel chromatography Sephadex G-50 พบว่าสารสกัดที่ได้จากการสกัดโดยตัวทำละลายทั้งสองชนิดให้ลักษณะของโครมาโตแกรมออกมาเหมือนกัน กล่าวคือมีเพียงพีคเดียวเท่านั้นที่แสดง biological activity และถูกชะออกมาที่เวลาเดียวกัน นอกจากนี้ยังพบอีกว่าสารสกัดจากต่อมไซนัสที่สกัดด้วยกรดอะซิติกเข้มข้น 0.2 โมลลาร์ เมื่อผ่าน gel chromatography Sephadex G-50 แล้วจะมีปริมาณฮอร์โมนลดลงประมาณร้อยละ 30 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการสกัดฮอร์โมนโดยใช้กรดอะซิติกเข้มข้น 0.2 โมลลาร์ จะได้ปริมาณฮอร์โมนต่ำกว่าการสกัดด้วยแอมโมเนียมอะซีเตตเข้มข้น 0.1 โมลลาร์ ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณโปรตีนที่วัดได้ เมื่อนำสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ Sephadex G-50 ของสารสกัดจากตัวทำละลายทั้งสองชนิดไปตรวจสอบประสิทธิภาพในการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดของ CHH ในสัตว์ทดลอง โดยวิธี Glucose Oxidase Method (Test Kit GOD, Perid, Boehringer) พบว่า fraction ที่ 41-55 แสดง activity การเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด จึงรวบรวมแล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์ขั้นตอนที่สองโดยใช้ HPLC, μ -Bondapak C18 column ได้โครมาโตแกรมออกมา 2 พีค Major peak แสดง activity ส่วน minor peak ไม่แสดง activity จากการศึกษาปฏิกิริยาข้ามระหว่างสปีชีส์ พบว่า CHH มีความจำเพาะมาก กล่าวคือ CHH จากสปีชีส์อื่น ๆ เช่น CHH จาก *Orconectes limosus* และ *Carcinus maenas* จะไม่แสดง activity ใน *Porcellio dilatatus* แต่ถ้าเป็นในสปีชีส์ที่ใกล้เคียงกัน เช่น CHH จาก *Carcinus maenas* และ *Uca pugilator* สามารถตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพได้ (Martin et al., 1984)

จากการแยกสกัด CHH จากต่อมไซนัสของกุ้ง Mexican crayfish, *Procambarus bouvieri* โดยใช้น้ำเป็นตัวสกัด จากนั้นนำสารที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ 2 ขั้นตอน โดยใช้ RP-HPLC (reversed phase HPLC) ขั้นตอนแรกใช้ Nova-Pak C18 column ผลจากการทำให้บริสุทธิ์ได้พีคที่ไม่สมมาตรเพียงพีคเดียว แล้วนำสารละลายที่เก็บได้ของพีคนี้ไปผ่านการทำให้บริสุทธิ์ขั้นตอนที่สองโดยใช้ μ-Bondapak-phenyl column พบว่าได้ 3 พีคคือ A, B, และ C โดยที่พีค B และ C แสดง activity การเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดเมื่อนำไปตรวจสอบทางชีวภาพ ขณะที่พีค A ไม่แสดง activity นี้ เมื่อนำมาตรวจสอบ

ความบริสุทธิ์โดยใช้ SDS-PAGE (sodium dodecyl-sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) โปรตีนจากพีค B จะเคลื่อนที่แยกออกมาเป็นโปรตีนแถบเดี่ยว ๆ ไม่มีการปนเปื้อนจากโปรตีนอื่น ๆ และเมื่อเทียบน้ำหนักโมเลกุลกับโปรตีนมาตรฐานอยู่ในช่วง 6,000-6,500 dalton เมื่อนำมาแยกโดยใช้ IEF (isoelectric-focusing) พบว่าพีค B แยกออกมาเป็นโปรตีนแถบเดี่ยว ๆ ที่ pI เท่ากับ 4.79 จากการวิเคราะห์หากรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบ โดยใช้เครื่องวิเคราะห์กรดอะมิโน และหาลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโน โดยการย่อยด้วยกรดและเอนไซม์ต่าง ๆ รวมทั้งปฏิกิริยา dansylation พบว่าปลาย N ของเปปไทด์ B ถูกบล็อค ปลาย C เป็นไอโซลิวซีน (Ile) ประกอบด้วยกรดอะมิโน 52 หน่วย คำนวณน้ำหนักโมเลกุลจากกรดอะมิโนได้เท่ากับ 6,042 dalton และพบซิสเตอีน (Cys) 4 หน่วย ซึ่งจะสร้าง disulfide bridge 2 ตำแหน่ง ไม่พบทริปโตเฟน (Trp) ฮิสติดีน (His) และเมไธโอนีน (Met) สำหรับพีค A อาจจะเป็น inactive precursor, inactive degradation product, modified hormone หรือโปรตีนอื่น ๆ ที่ชะออกมาพร้อมกับพีค B และ C ใน HPLC ขั้นตอนที่หนึ่ง (Huberman and Aguilar, 1986)

ในปี 1986 Kallen et al. ได้นำเนื้อเยื่อที่เป็นแหล่งของ CHH 3 บริเวณคือ ตัวเซลล์ (perikarya), axon tract และต่อมไซนัสของกุ้ง crayfish, *Astacus leptodactylus* มาสกัดและตรวจวิเคราะห์โดยเทคนิคทางชีวเคมี ได้แก่ PAGE, SDS-PAGE และ HPLC พร้อมกันนี้ได้นำวิธี dotting immunobinding assay (DIA) มาเป็นวิธีติดตาม CHH และตรวจสอบประสิทธิภาพในการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดของสัตว์ทดลองไปพร้อม ๆ กัน พบว่าหลังจากผ่าน PAGE แล้ว สารสกัดจากเนื้อเยื่อทั้ง 3 บริเวณเคลื่อนที่ออกมาได้ระยะทางเท่ากัน และสามารถเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดของสัตว์ทดลองและให้ผลบวกกับ DIA ได้เหมือนกัน แต่สารสกัดจากเซลล์ยังพบ minor peak อีกซึ่งเคลื่อนที่ออกมาได้ระยะทางน้อยกว่า major peak Minor peak นี้อาจเป็นโปรฮอร์โมนของ CHH เมื่อนำสารที่ผ่าน PAGE ไปผ่าน SDS-PAGE พบว่าสารนี้เคลื่อนที่ออกมาเป็นแถบโปรตีนเดี่ยว ๆ และตรงกับแถบของโปรตีนมาตรฐานที่มีน้ำหนักโมเลกุล 7,000 ดาลตัน แล้วนำสารที่ให้ผลบวกกับ DIA หลังจากผ่าน PAGE ไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ RP-HPLC ปรากฏว่าสารนี้ถูกชะออกมา 2 พีคที่เวลา 28-29 และ 52-54 นาทีตามลำดับเหมือนกันทั้ง 3 เนื้อเยื่อ

ต่อมาในปี 1988 Huberman และ Aguilar ได้ศึกษาเปรียบเทียบโครงสร้างของ CHH 2 รูปแบบจากสัตว์ทดลองเดิม (*Procambarus bouvieri*) โดยแยกสกัด CHH จากต่อมไซนัสและทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ RP-HPLC, μ-Bondapak-phenyl column ระบบตัวทำละลายที่ใช้คือ 0.1 % trifluoroacetic acid (TFA) เป็นตัวทำละลาย A และ 60 % acetonitrile (ACN) 0.1 % TFA เป็นตัวทำละลาย B ปรากฏว่า

ได้ CHH ออกมา 2 พีค ซึ่งแยกจากกัน และทั้ง 2 พีคก็สามารถแสดง activity ในการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด พีคเหล่านี้พบว่าเป็น CHH 2 รูปแบบ คือ CHH-B และ CHH-C และอัตราส่วนของ CHH-B ต่อ CHH-C เป็น 3:1 เมื่อนำ CHH ทั้งสองรูปแบบไปผ่าน SDS-PAGE พบว่าเปปไทด์ทั้งสองเคลื่อนที่ได้ระยะทางเท่า ๆ กันและไม่มีแถบโปรตีนอื่นมาปนเปื้อนเลย นอกจากนี้ยังพบว่า CHH ทั้งสองรูปแบบมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 6,000-6,500 dalton เมื่อเทียบกับแถบของโปรตีนมาตรฐานคือ aprotinin ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 6,500 dalton จากการวิเคราะห์กรดอะมิโน การย่อยด้วยเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ปฏิกิริยา dansylation และการตรวจหากรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของเปปไทด์ ทั้ง CHH-B และ CHH-C มีความเหมือนกันอย่างมาก ได้แก่ น้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 6,000-6,200 dalton (คำนวณจากกรดอะมิโน) pI 4.79 ประกอบด้วยกรดอะมิโน 52-53 หน่วย มีซิสเตอีน (Cys) 4 หน่วย ไม่พบเมไธโอนีน (Met) ฮิสติดีน (His) ทริปโตเฟน (Trp) ปลาย N ถูกบล็อค ปลาย C เป็นไอโซลิวซีน (Ile) จำนวนกรดอะมิโนพวกกรดและอนุพันธ์มี 12 หน่วย จำนวนกรดอะมิโนพวกเบสมี 8 หน่วย CHH ทั้งสองรูปแบบมีความแตกต่างกันเล็กน้อยคือ จำนวนกรดอะมิโนลิวซีน (Leu) และฟีนิลอะลานีน (Phe) รวมทั้ง hydrophobicity ซึ่งความแตกต่างนี้เนื่องมาจากจำนวนของ neutral hydrophobicity residues และหรือมีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นกับกรดอะมิโนพวกกรดภายหลัง ได้แก่ปฏิกิริยา amidation/ deamidation

ได้มีรายงานการศึกษาถึงลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโนใน CHH จากปูน้ำเค็ม *Carcinus maenas* โดยแยกสกัด CHH จากต่อมไซนัสของปูชนิดนี้ แล้วนำสารที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ HPLC ให้โครมาโตแกรมออกมา 2 พีค ประกอบด้วย major peak และ minor peak ซึ่ง minor peak มี activity เพียงร้อยละ 10 ของ CHH ทั้งหมด จากการศึกษาลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโนของ CHH โดยการย่อยด้วยเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ และใช้ manual microsequencing, DABITC-PITC double coupling method (DABITC:4-N, N-dimethylaminoazobenzene -4- isothiocyanate ; PITC : phenylisothiocyanate) พบว่า CHH ประกอบด้วยกรดอะมิโน 72 หน่วย มีน้ำหนักโมเลกุล 8,524 dalton มี ซิสเตอีน 6 หน่วย ซึ่งจะสร้าง disulfide bridge 3 ตำแหน่ง (ระหว่างตำแหน่งที่ 7-43, 23-39 และ 26-52) ทั้งปลาย N และปลาย C ถูกบล็อค นอกจากนี้ยังพบอีกว่า CHH มีลำดับการเรียงตัวไม่เหมือนกับเปปไทด์ฮอร์โมนหรือโปรตีนอื่น ๆ ที่เคยรู้จักมาก่อน (Kegel et al., 1989)

ในปี 1990 Soyez et al. ได้แยกสกัด CHH จากต่อมไซนัสของกุ้งลอบสเตอร์ *Homarus americanus* โดยใช้สารหลายชนิดสกัดได้แก่ กรดอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 10 กรดไฮโดรคลอริกที่ร้อน

(80 °C) เข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร และกรดอะซิติกที่ร้อน (80 °C) ปรากฏว่า ถึงแม้จะใช้สารต่างชนิดกันสกัด หรือ ใช้สารชนิดเดียวกันสกัดแต่ใช้อุณหภูมิต่างกัน ก็ให้โครมาโตแกรมออกมาเหมือนกัน แต่การสกัดด้วยกรดอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 10 จะทำให้มีการสูญเสียฮอร์โมนไปบ้าง ขณะที่การสกัดด้วยกรดอะซิติกที่ร้อน ปริมาณของฮอร์โมนก็ยังคงสภาพไม่มีการเปลี่ยนแปลง จากนั้นนำสารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยกรดอะซิติกที่ร้อนไปผ่าน RP-HPLC Nucleosil C18 column ระบบตัวทำละลายที่ใช้ คือ 0.1 % TFA ในน้ำ และ 0.1 % TFA ใน n-propanol ได้เปป-ไทด์ออกมา 3 กลุ่ม แต่ละกลุ่มประกอบด้วยเปปไทด์ย่อย ๆ 2 กลุ่มรวมกัน (กลุ่ม 1 คือ No.1, 2 กลุ่ม 2 คือ No.3, 4 และกลุ่ม 3 คือ No.5, 6) แต่มีเพียง 2 กลุ่มเท่านั้นที่แสดง activity ในการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดคือ กลุ่มที่ 1 และ กลุ่มที่ 3 ส่วนกลุ่มที่ 2 ไม่แสดง activity นี้เมื่อตรวจสอบในกุ้งลอบสเตอร์ *Homarus gammarus* ขณะที่เมื่อทดสอบในกุ้ง crayfish, *Orconectes limosus* และ *Astacus leptodactylus* เปปไทด์ทั้งสามกลุ่มจะแสดง ac-tivity ได้ทั้งหมด เมื่อตรวจหาน้ำหนักโมเลกุลโดยใช้ FAB/MS (Fast atom bombardment-mass spectrometry) พบว่าพีคที่มี hydrophobic น้อย (No.1 และ No.2) มีน้ำหนักโมเลกุล 8,633 dalton เมื่อนำไปผ่าน IEF พบว่าเป็นเปปไทด์พวกเบส มี pI 8.7 ขณะที่พีคที่มี hydrophobic มาก (No.5 และ No.6) มีน้ำหนักโมเลกุล 8,577 dalton เป็นเปปไทด์พวกกรด มี pI 5.0 จากการวิเคราะห์กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของเปปไทด์ปรากฏว่าเปปไทด์ 1และ 2 เปปไทด์ 5 และ 6 มีความเหมือนกันอย่างมาก มีความแตกต่างกันบ้างแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ได้แก่จำนวนกรดอะมิโนพวกอะโรมาติกที่เป็นองค์ประกอบของเปปไทด์ เมื่อตรวจวัดด้วย double UV detection ที่ 220/280 นาโนเมตร แต่ละกลุ่มของเปปไทด์ให้ค่าดูดกลืนแสงต่างกัน และจากการศึกษาศักยภาพในการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด พบว่า เปปไทด์ทั้ง 4 สามารถทำให้มีการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดได้เท่า ๆ กัน

ต่อมาในปี 1991 Tensen et al. ได้ศึกษาเปรียบเทียบลักษณะของ CHH 2 รูปแบบในกุ้งลอบสเตอร์ *Homarus americanus* โดยสกัด CHH จากต่อมไซนัสด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่ร้อนเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร นำสารสกัดที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ 2 ขั้นตอนโดยใช้ RP-HPLC สามารถแยก CHH ออกมาได้ 2 กลุ่ม แต่ละกลุ่มประกอบด้วย CHH 2 รูปแบบ จากการนำเปปไทด์ทั้ง 2 กลุ่มมาศึกษาทางด้านลักษณะและองค์ประกอบทางเคมีโดยวิธีต่าง ๆ เพื่อเปรียบเทียบกัน ได้แก่ การย่อยด้วยเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ การวิเคราะห์กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบ การหาลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโนโดยวิธี Edman degradation และการหาน้ำหนักโมเลกุลโดยใช้ FAB/MS พบว่าเปปไทด์ทั้ง 2 กลุ่มประกอบด้วยกรดอะมิโน 72 หน่วย มีไพโรกลูตาเมต (pGlu) ที่ปลาย N แต่มีความแตกต่างกัน

ในด้านกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบ อัตราส่วนของกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ ลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโนรวมทั้งน้ำหนักโมเลกุลด้วย โดยที่เปปไทด์กลุ่มแรกมีน้ำหนักโมเลกุล 8,578 dalton ส่วนกลุ่มที่สองมีน้ำหนักโมเลกุล 8,655 ± 25 dalton

สำหรับการศึกษาลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโนในกุ้ง crayfish, *Orconectes limosus* โดยสกัด CHH จากต่อมไซนัสและทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ RP-HPLC เลือกพีคที่มีปริมาณฮอร์โมนมากที่สุดมาหาลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโนในเปปไทด์ฮอร์โมนโดยวิธี manual Edman microsequencing พบว่าประกอบด้วยกรดอะมิโน 72 หน่วย มีไพโรกลูตาเมตที่ปลาย N ส่วนปลาย C เป็นแวลีน มีซิสเตอีน 6 หน่วย ซึ่งจะสร้าง disulfide bridge 3 ตำแหน่ง (ระหว่างตำแหน่งที่ 7-43, 23-39 และ 26-52) เมื่อทำการตรวจสอบน้ำหนักโมเลกุลโดยคำนวณจากกรดอะมิโนที่ตรวจวิเคราะห์ได้และจากเจลฟิลเตรชัน (gel filtration) พบว่าฮอร์โมนนี้มีน้ำหนักโมเลกุล 8,400 dalton เมื่อเปรียบเทียบจำนวนกรดอะมิโนใน CHH จาก *Orconectes limosus* กับ CHH จาก *Carcinus maenas* ปรากฏว่ามีกรดอะมิโนที่ซ้ำกันถึงร้อยละ 61 และซ้ำกับ MIH จาก *Homarus americanus* ถึงร้อยละ 81 (Kegel et al., 1991)

ต่อมาในปี 1993 Huberman et al., 1993 ได้ศึกษาเปรียบเทียบโครงสร้างปฐมภูมิของ CHH จากสัตว์ครัสตาเซียนชนิดต่าง ๆ พบว่า CHH-isomorph ของ *Procambarus bouvieri* มีกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของฮอร์โมนนี้ซ้ำกับ CHH จาก *Orconectes limosus, Carcinus maenas* และ CHH-A, CHH-B ของ *Homarus americanus* ถึงร้อยละ 98.6, 61.1, 83.3 และ 79.2 ตามลำดับ ดังตารางที่ 2 ในปีเดียวกันได้มีรายงานการแยกสกัด CHH จากต่อมไซนัสของ wood lice, (isopod) *Armadillidium vulgare* จำนวน 600 ต่อมไซนัสด้วยกรดอะซิติกเข้มข้น 0.2 โมลต่อลิตร นำสารสกัดที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วย RP-HPLC ระบบสารละลายที่ใช้คือ ACN/TFA นำสารที่ชะออกจากคอลัมน์ของแต่ละ fraction ไปตรวจสอบประสิทธิภาพในการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดของสัตว์ทดลอง เลือก fraction ที่พบ CHH ไปตรวจสอบความบริสุทธิ์และตรวจหาน้ำหนักโมเลกุลโดยใช้เครื่องแมสสเปคโตรมีตรี พบว่า CHH ของ isopod มีน้ำหนักโมเลกุล 8,729.3 ดาลตัน และมีความบริสุทธิ์อย่างน้อย 90 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำ CHH ที่ได้ไปหาลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโนโดยการย่อยด้วยเอนไซม์ชนิด ต่าง ๆ และปฏิกิริยา Edman degradation พบว่าประกอบด้วยกรดอะมิโน 73 หน่วย มีซิสเตอีน 6 หน่วย ซึ่งจะสร้าง disulfide bridges 3 ตำแหน่ง คือระหว่างตำแหน่งที่ 7-43, 23-39 และ 26-52 ปลาย N ไม่ถูกบล็อค ปลาย C จะเกิดปฏิกิริยา amidation (Martin et al., 1993)

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบชนิดและจำนวนกรดอะมิโนของ CHH ในสัตว์ครัสตาเซียนบางชนิด สีแดงแสดงกรดอะมิโนที่แตกต่างจาก CHH ของ *Procambarus bouvieri* (Huberman et al., 1993)

		10		20		30		40
Prb-I	pEVFDQ	ACKGI	YDRAI	FKKLD	RVCED	CYNLY	RKPYV	ATTCR
Orl	pEVFDQ	ACKGI	YDRAI	FKKLD	RVCED	CYNLY	RKPYV	ATTCR
Hoa-a	pEVFDQ	ACKGV	YDRNL	FKKLD	RVCED	CYNLY	RKPFV	ATTCR
Hoa-b	pEVFDQ	ACKGV	YDRNL	FKKLN	RVCED	CYNLY	RKPFI	VTTCR
Cam	pEIYDT	SCKGV	YDRAL	FNDLE	HVCDD	CYNLY	RTSYV	ASACR
Pej	SLFDP	ACTGI	YDRQL	LRKLG	RLCDD	CYNVF	REPKV	ATGCR

		50		60		70	
Prb-I	QNCYA	NSVFR	QCLDD	LLLID	VVDEY	ISGVQ	TV-NH_2
Orl	QNCYA	NSVFR	QCLDD	LLLID	VLDEY	ISGVQ	TV-NH_2
Hoa-a	ENCYS	NWVFR	QCLDD	LLLSD	VIDEY	VSNVQ	MV-NH_2
Hoa-b	ENCYS	NRVFR	QCLDD	LLMID	VIDEY	VSNVQ	MV-NH_2
Cam	SNCYS	NLVFR	QCMDD	LLMMD	EFDQY	ARKVQ	MV-NH_2
Pej	SNCYH	NLIFL	DCLEY	LIPSH	LQEEH	MAAMQ	TV-NH_2

Hoa-a *Homarus americanus* CHH-A
Prb-I *Procambarus bouvieri*
Hoa-b *Homarus americanus* CHH-B
Orl *Orconectes limosus*
Cam *Carcinus maenas*
Pej *Penaeus japonicus*

ในปี 1994 ได้มีรายงานการศึกษา CHH ใน Norway lobster, *Nephrops norvegicus* โดยสกัดฮอร์โมนนี้จากต่อมไซนัสด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร สารสกัดที่ได้สามารถทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดของสัตว์ทดลองเพิ่มขึ้นนานจนถึง 5 ชั่วโมง จึงนำสารสกัดไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ RP-HPLC Nucleosil C18 column พบว่าเมื่อตรวจวิเคราะห์ด้วย ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) โดยใช้ anti *Orconectes* CHH antiserum fraction ที่แสดง activity ในการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดคือ 34-37 โดย fractionที่ 35 และ 36 แสดง activity นี้ได้สูงที่สุด จากการตรวจหาน้ำหนักโมเลกุลของ CHH โดยใช้ SDS-PAGE พบว่าเปปไทด์ทั้งสองเคลื่อนที่ออกมาตรงกับแถบของโปรตีนมาตรฐานที่มีน้ำหนักโมเลกุล 8,000 dalton และมีแถบโปรตีนอื่น ๆ ปะปนอยู่บ้างเล็กน้อย (Smullen and Bently, 1994) และในปีเดียวกัน Sithigorngul et al., 1994 ได้ศึกษาแนวทางการแยก CHH เบื้องต้นในกุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* พบว่าการสกัดด้วยสารละลายเมทานอล-กรดอะซิติก (methanol : acetic acid / 90:1) ให้ผลดีทั้งในด้านการคงสภาพและความบริสุทธิ์ ซึ่งดีกว่าการใช้กรดอะซิติกเข้มข้น 2 โมลต่อลิตร กรดอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 10 และน้ำเดือด

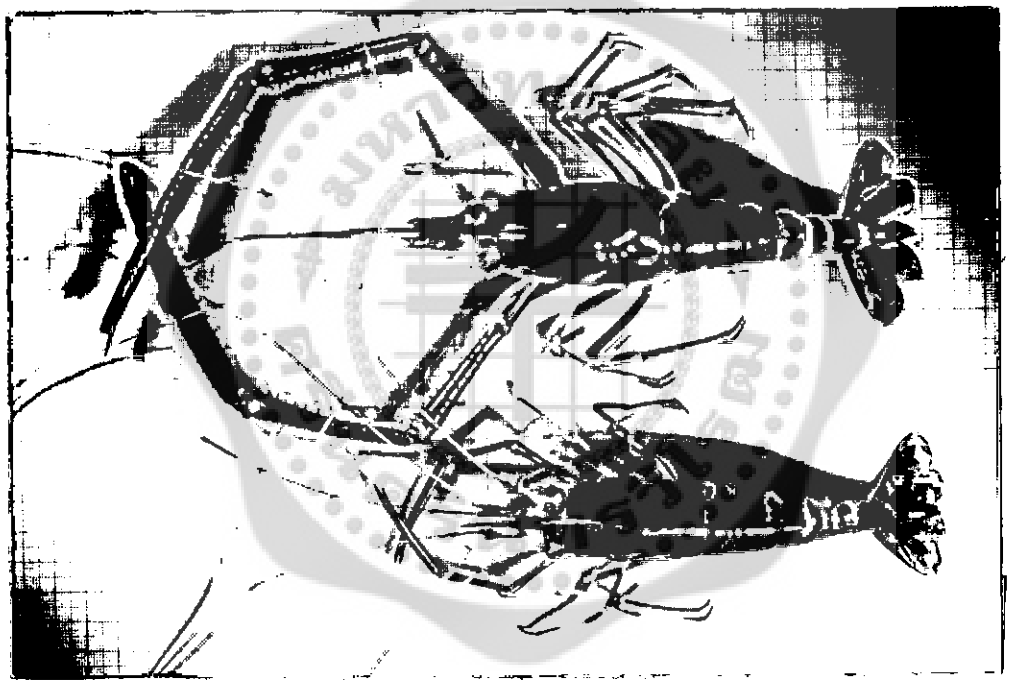
ในปี 1995 Yang et al. ได้แยกสกัด CHH จากต่อมไซนัสของกุ้งทะเล *Penaeus japonicus* โดยใช้ต่อมไซนัสประมาณ 1,500 ต่อมสกัดใน 30 % ACN/NaCl ทำให้บริสุทธิ์โดย RP-HPLC ระบบสารละลาย ACN/TFA 1 ขั้นตอน ได้ CHH 5 รูปแบบ แต่สามารถหาลำดับกรดอะมิโนสมบูรณ์ได้เพียง 1 รูปแบบ ประกอบด้วยกรดอะมิโน 72 หน่วย น้ำหนักโมเลกุล 8,353 dalton ประกอบด้วย disulfide bridge 3 ตำแหน่งด้วยกัน

การศึกษาในครั้งนี้เป็นการแยกฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดจากก้านตาของกุ้งก้ามกรามและทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เครื่อง HPLC (High Performance Liquid Chromatography) ความรู้ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้จะเป็นแนวทางในการแยกและทำให้บริสุทธิ์ฮอร์โมนชนิดอื่น ๆ จากก้านตากุ้งได้เป็นอย่างดี เมื่อแยกและทำให้ CHH บริสุทธิ์ได้แล้วสามารถนำไปศึกษาลักษณะโครงสร้าง องค์ประกอบทางเคมี น้ำหนักโมเลกุล แหล่งสร้าง ตลอดจนบทบาทที่สำคัญในกระบวนการเมตาบอลิสม กลไกการออกฤทธิ์ รวมทั้งการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ CHH เพราะแอนติบอดีที่ได้อาจมีปฏิกิริยาข้ามกับฮอร์โมนอื่น ๆ ที่มีส่วนของโมเลกุลใกล้เคียงกับ CHH เช่น VIH, MIH เป็นต้น ช่วยให้การแยกและทำให้ฮอร์โมนเหล่านี้บริสุทธิ์ทำได้ง่ายขึ้น เพราะสามารถใช้การทดสอบทางภูมิคุ้มกันมาช่วยในระหว่างการแยกฮอร์โมนด้วย โดยเฉพาะ VIH ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่ยับยั้งการพัฒนาของรังไข่ ถ้าทราบแนวทางการควบคุมฮอร์โมนนี้ได้ จะมีประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งทั้ง

น้ำจืดและน้ำเค็มเป็นอย่างมากในแง่ของการขาดแคลนแม่พันธุ์กุ้งได้

การศึกษาในครั้งนี้เลือกใช้กุ้งก้ามกรามเป็นสัตว์ทดลองเพราะยังไม่มีรายงานการศึกษาฮอร์โมนนี้ในกุ้งชนิดนี้มาก่อน นอกจากนี้กุ้งก้ามกรามยังมีลักษณะที่ได้เปรียบกว่ากุ้งชนิดอื่น ๆ อีก คือมีขนาดใหญ่ สะดวกในการเก็บตัวอย่างเลือดและฉีดสารสกัด และเป็นกุ้งที่เจริญเติบโตในน้ำจืด จึงทำให้สะดวกในการเลี้ยงดู อีกทั้งยังมีข้อมูลค่อนข้างพร้อมในการเลี้ยงดู ราคาไม่แพงเกินไป สามารถหาซื้อได้ง่ายตลอดระยะเวลาการทดลอง เพราะมีเกษตรกรจำนวนมากที่เลี้ยงกุ้งก้ามกรามขายเป็นอาชีพ โดยเฉพาะในเขตจังหวัดใกล้เคียงกับกรุงเทพ ฯ ได้แก่ สุพรรณบุรี นครปฐม พระนครศรีอยุธยา เป็นต้น ทำให้การลำเลียงกุ้งมาเลี้ยงที่สถานที่ทดลองไม่ยุ่งยากมากนัก กุ้งไม่บอบช้ำจนเกินไป สามารถนำมาเลี้ยงและทดลองต่อไปได้เป็นอย่างดี

ดังนั้นการศึกษาจึงเป็นการแยก CHH จากก้านตาของกุ้งก้ามกราม โดยสกัดด้วยสารละลายเมทานอล-กรดอะซิติก (methanol : acetic acid / 90:1) นำสารสกัดที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์โดยผ่าน RP-HPLC โดยใช้คอลัมน์และระบบตัวทำละลายต่าง ๆ กัน การทดสอบประสิทธิภาพในการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดของ CHH ทำโดยตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือดของกุ้งที่ถูกตัดตาหลังจากฉีดสารสกัดที่แยกสกัดได้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ซึ่งเป็นเวลาที่ระดับน้ำตาลจาก CHH แสดงกิจกรรมสูงสุด (Sithigorngul et al., 1992) เมื่อได้ CHH ที่บริสุทธิ์แล้ว จึงนำไปหาลำดับกรดอะมิโนของฮอร์โมน



รูปที่ 1 เปรียบเทียบลักษณะของกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) เพศผู้และกุ้งก้ามกรามเพศเมีย ภาพบนเพศผู้ ภาพล่างเพศเมีย

วิธีการวิจัย

1. สัตว์ทดลอง

กุ้งก้ามกรามเพศเมีย (*Macrobrachium rosenbergii* : De Man) ขนาดตัวโตเต็มวัย มีน้ำหนักประมาณ 25-30 กรัม ซื้อจากตลาดกลาง อำเภอพระนครศรีอยุธยา จังหวัดพระนครศรีอยุธยา นำกุ้งก้ามกรามเพศเมียมาพักเลี้ยงในบ่อซีเมนต์ขนาด 100x250x50 เซ็นติเมตร โดยเลี้ยงอาหารวันละ 2 ครั้ง ตอนเช้าและตอนเย็น อาหารที่เลี้ยงเป็นอาหารสำเร็จรูปชนิดเม็ดสำหรับกุ้งก้ามกราม ผลิตโดยบริษัทเครือ ป.เจริญพันธุ์ น้ำและอาหารที่เหลือจะถูกดูดทิ้งและเปลี่ยนน้ำในตอนเช้าของทุกวัน อุณหภูมิของน้ำที่ใช้เลี้ยงและทดลองอยู่ในระหว่าง 26-28 องศาเซลเซียส ความยาวช่วงแสงตามธรรมชาติ

2. การเก็บรวบรวมตากุ้ง

รวบรวมตากุ้งจำนวน 5,000 ตา โดยใช้กรรไกรตัดก้านตาจากกุ้งก้ามกรามเพศเมียในขณะที่ยังมีชีวิตอยู่ แล้วนำไปแช่ให้แข็งทันทีบนก้อนน้ำแข็งแห้ง จากนั้นนำตากุ้งที่รวบรวมได้ไปเก็บไว้ในตู้เย็นที่มีอุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส จนกระทั่งต้องการใช้

3. การเตรียมสารสกัดและการสกัด CHH จากก้านตา (รูปที่ 2)

นำตากุ้งมาบดเป็นผงละเอียดในขณะที่เย็นจัด โดยบดในครกที่แช่ให้เย็นในน้ำแข็งแห้ง จากนั้นเทผงก้านตาลงในสารละลาย methanol : acetic acid (90:1) ในปริมาณ 0.5 มิลลิลิตรต่อก้านตา คนให้ทั่วและทิ้งไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นแยกตะกอนออกด้วยแรงเหวี่ยง 10,000 g เป็นเวลา 15 นาที แยกเอาส่วนน้ำใสเก็บไว้แล้วล้างตะกอนและสกัดซ้ำด้วยสารละลายและวิธีการเดิมอีกครั้ง รวมส่วนสารสกัดในสารละลายเข้าด้วยกัน แล้วนำไประเหยเอากรดอะซิติกและเมทานอลออกด้วยเครื่อง vacuum concentrator จากนั้นเติมด้วย 0.1 % trifluoroacetic acid ในปริมาณเท่าเดิม นำสารละลายไปผ่านเพื่อดูดซับใน C18 Cartridge แล้วชะสารสกัดออกด้วย 50 % acetonitrile 0.1 % TFA นำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง vacuum concentrator แล้วปรับสารที่ได้ด้วย 80 % acetonitrile 0.1% TFA ให้มีความเข้มข้นของ acetonitrile ประมาณ 15 % แล้วเก็บสารที่ได้รวบรวมไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส แบ่งสารสกัดที่ได้จำนวน 50 ก้านตาไปทำ bioassay เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดที่ได้ และส่วนที่เหลือนำไปทำให้บริสุทธิ์ต่อในขั้นตอนที่ 4

4. การทำให้ CHH บริสุทธิ์ด้วยกระบวนการทาง Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC)

นำสารสกัดจากก้านตาที่ได้จากข้อ 3 ไปปั่นด้วยแรงเหวี่ยง 10,000 g เป็นเวลา 15 นาที แยกสารละลายส่วนใสนำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC ใช้คอลัมน์ PrepPak C18 ขนาด 25X100 มิลลิเมตร และใช้ระบบตัวทำละลาย 2 ชนิดซึ่งประกอบด้วยปั๊ม A และปั๊ม B จากนั้นชะด้วย acetonitrile ที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นตามลำดับ (concentration gradient) จาก 20-80% B (A=0.1% TFA, B=80% ACN 0.1% TFA) อัตราการไหล 5 มิลลิลิตร/นาที การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารละลาย B เป็น 1% B ต่อนาที รวบรวมสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ลงในหลอดเก็บตัวอย่างโดยเครื่อง fraction collector ทุก ๆ 1 นาที แบ่งสารละลายออกไปทดสอบ โดยเติมสารละลายแต่ละส่วนด้วยสารละลาย bovine serum albumin (BSA) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 1ไมโครกรัมต่อก้านตา แล้วระเหย acetonitrile และ TFA ให้แห้งด้วย vacuum concentrator จากนั้นนำไปตรวจหาฮอร์โมน CHH ตามวิธีในข้อ 5 โดยฉีดสารสกัดประมาณ 1-2 ก้านตาต่อกุ้ง 1 ตัว นำ fraction ที่ทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดเพิ่มขึ้นไปผ่าน HPLC โดยใช้คอลัมน์ PrepPak C8 ขนาด 25 X 100 มิลลิเมตร, Cyano, Phenyl และ C8 ขนาด 4.6 X 250 มิลลิเมตร และใช้ระบบตัวทำละลายต่าง ๆ ดังนี้ acetonitrile/ heptafluorobutyric acid (HFBA), acetonitrile/TFA, acetonitrile/TEA เก็บตัวอย่างทุก ๆ นาที นำพีคที่แสดง CHH activity ไปทำให้บริสุทธิ์ใน RP-HPLC ขั้นต่อไปรวม 8 ขั้นตอนจนได้ฮอร์โมนบริสุทธิ์ซึ่งจะปรากฏพีคบนโครมาโตแกรมเห็นเพียงพีคเดียว

5. การทดสอบประสิทธิภาพการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดของ CHH (รูปที่ 3)

นำกุ้งก้ามกรามเพศเมียมาตัดตาทั้งสองข้าง นำไปเลี้ยงให้อาหารตามปกติประมาณ 1-2 วัน แล้วให้อดอาหารก่อนทำการทดลองเป็นเวลา 12 ชั่วโมง เก็บเลือดจากขาเดินคู่ที่ 4 ของกุ้งทุกตัว ประมาณ 100 ไมโครลิตร แล้วฉีดด้วยสารสกัดจากก้านตาที่เจือจางระดับต่าง ๆ คือ 1:125, 1:25, 1:50, 1:25, 1:5 และ 1 ก้านตา/ตัว ด้วยน้ำเกลือ (*Macrobrachium rosenbergii* - isotonic physiological saline, pH 7.6 ; Nagamine and others. 1980) โดยฉีดประมาณ 100 ไมโครลิตร ที่ขาเดินคู่ที่ 2 หลังจากนั้น 1 ชั่วโมง เก็บเลือดจากขาเดินคู่ที่ 4 ประมาณ 100 ไมโครลิตร นำเลือดก่อนฉีดและหลังฉีดสารสกัดไปหาปริมาณน้ำตาลในเลือดโดยวิธี Glucose Oxidase Method หาระดับน้ำตาลในเลือดที่เพิ่มขึ้นหลังจากฉีดสารสกัดปริมาณต่าง ๆ นำไปเขียนกราฟเปรียบเทียบเพื่อหาประสิทธิภาพในการ

เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดของสารสกัดจากก้านตา กุ้งกลุ่มควบคุมฉีดด้วยน้ำเกลือปริมาตร 100 ไมโครลิตร จำนวนกุ้งที่ใช้ทดสอบในแต่ละ fraction ประมาณ 2-4 ตัว

การหาระดับน้ำตาลในเลือด เป็นการตรวจหาปริมาณกลูโคสในเลือด โดยใช้ Enzymatic Glucose Oxidase Colorimetric Determination ดัดแปลงจาก procedure No.510 (Sigma Diagnostic Kit) ทำโดยนำเลือดตัวอย่างมาทิ้งให้แข็งตัว เก็บเฉพาะน้ำใสของเลือดปริมาตร 5 ไมโครลิตร แล้วผสมกับสารละลายเอนไซม์และสี (glucose oxidase, peroxidase, o-Dianisidine-PGO) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ใน microtiter plate ทิ้งไว้ให้ทำปฏิกิริยา 30 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader คำนวณหาปริมาณกลูโคสในเลือดโดยเทียบกับค่าดูดกลืนแสงของกลูโคสมาตรฐาน

6. **การเตรียมสารสกัดหยาบจากก้านตาของกุ้งก้ามกราม** (รูปที่ 4)

ตัดก้านตากุ้งก้ามกรามเพศเมีย โดยใช้กรรไกรตัดบริเวณโคนของก้านตากุ้งที่ยังมีชีวิตอยู่แช่แข็งทันทีในน้ำแข็งแห้ง รวบรวมเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส จากนั้นนำก้านตาที่เก็บรวบรวมได้จำนวน 250 ก้านตามาผ่าตัดเปลือกหุ้มตาออก แล้วนำมาบดในหลอดแก้ว (glass homogenizer) ในน้ำเกลือสำหรับกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*-isotonic physiological saline pH 7.6) ในอัตราส่วน 1 ก้านตาต่อสารละลายน้ำเกลือ 50 ไมโครลิตร และนำไปปั่นที่ความเร็ว 10,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แยกส่วนที่เป็นน้ำใสเก็บไว้ แล้วสกัดส่วนที่เป็นตะกอนซ้ำด้วยสารละลายน้ำเกลือและนำไปปั่นเช่นเดียวกันกับตอนแรก แยกส่วนน้ำใสที่ได้มารวมกับส่วนแรกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำไปใช้ สารสกัดที่ได้นี้จะนำไปใช้เป็น positive control ในระหว่างการทดสอบประสิทธิภาพการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดของ CHH ที่แยกได้จากกระบวนการ RP-HPLC

7. **การคำนวณหาร้อยละของการคงสภาพของ** CHH

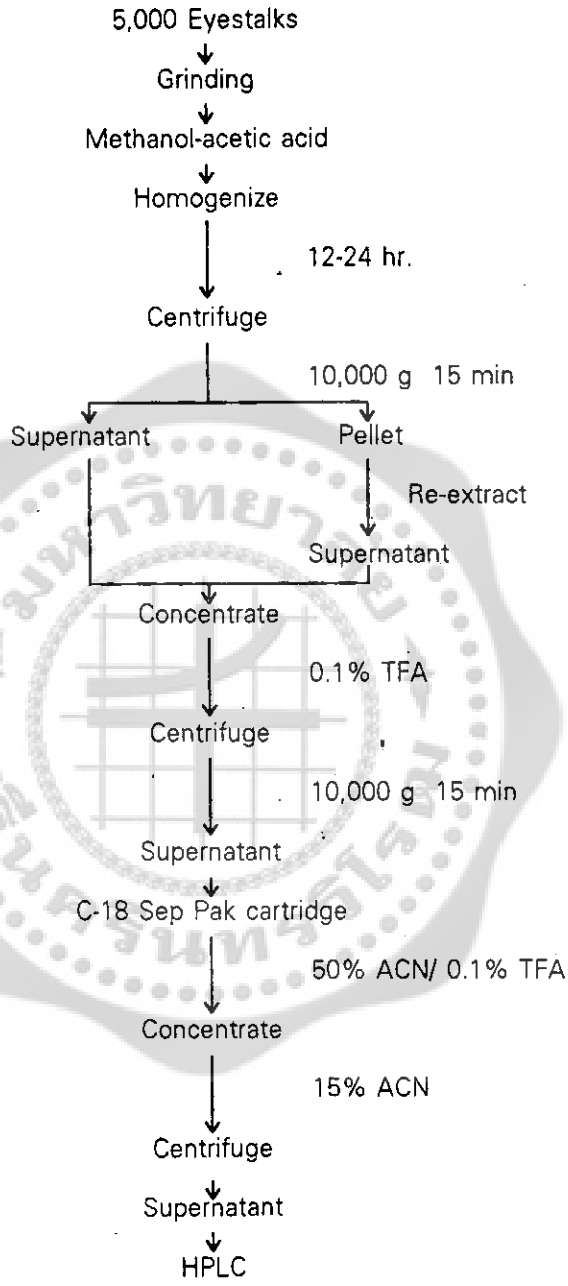
การคำนวนหาร้อยละของการคงสภาพของฮอร์โมน CHH ทำได้โดยเปรียบเทียบปริมาณฮอร์โมนที่สามารถเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดได้ 1 หน่วย (25 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตรของเลือด) ในสารสกัดด้วยน้ำเกลือกับสารสกัดด้วย methanol acetic acid

ร้อยละของการคงสภาพของฮอร์โมน CHH

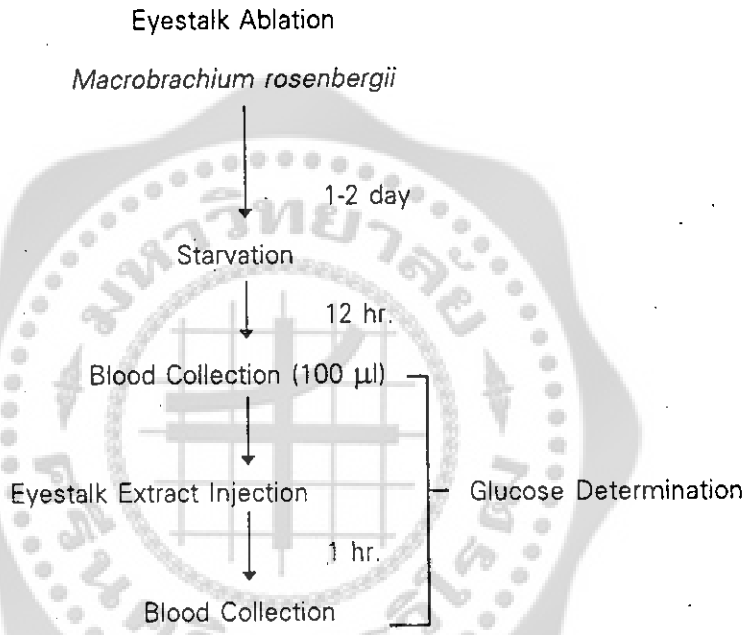
$$= \frac{\text{จำนวนก้านตาในสารสกัดด้วย methanol-acetic acid ที่สามารถเพิ่มระดับน้ำตาล 1 หน่วย}}{\text{จำนวนก้านตาใน fraction ของการทำให้บริสุทธิ์ที่สามารถเพิ่มระดับน้ำตาล 1 หน่วย}} \times 100$$

8. การหาลำดับกรดอะมิโนของ CHH

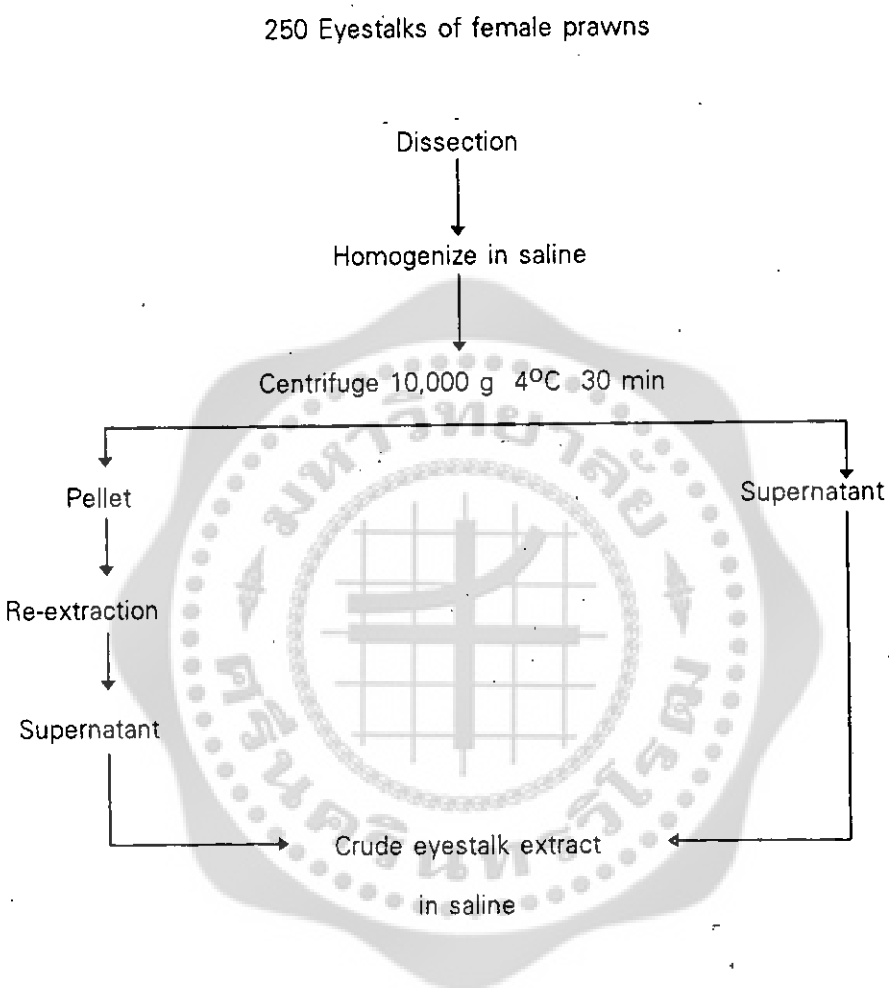
การหาลำดับกรดอะมิโนของ CHH ที่แยกบริสุทธิ์ทำโดยใช้ Applied Biosystems Procise Sequencer โดย Dr. Robin J. Philp, Institute of Molecular and Cell Biology, National University of Singapore โดยนำฮอร์โมนบริสุทธิ์ประมาณ 30 pmole มาทำให้เสียสภาพธรรมชาติใน 6M guanidine hydrochloride, 0.5 M Tris, 5 mM dithiothreitol pH 8.5 จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยา alkylation ด้วย 4-vinylpyridine และกำจัดเกลือออกโดยกระบวนการ RP-HPLC โดยใช้ C18 column (Vydax) ขนาด 4.3 X150 ม.ม. ชะด้วย ACN/TFA ความเข้มข้น 5-60 %B โดยตัวทำละลาย B ประกอบด้วย 90 % ACN/0.08% TFA จากนั้นจึงแยกฮอร์โมนไปหาลำดับกรดอะมิโนใน automated sequencer จำนวน 77 รอบ



รูปที่ 2 ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดและการสกัด CHH จากก้านตาของกุ้งก้ามกราม



รูปที่ 3 ขั้นตอนการทดสอบประสิทธิภาพการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดของ CHH



รูปที่ 4 ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดหยาบจากก้านตาของกุ้งก้ามกราม

ผลการวิจัย

1. การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากก้านตาของกุ้งก้ามกราม

จากการสกัด CHH จากก้านตาของกุ้งก้ามกรามจำนวน 5,000 ก้านตาด้วยสารละลาย methanol-acetic acid แล้วนำสารสกัดที่ได้ไปทดสอบประสิทธิภาพการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดของกุ้งก้ามกราม โดยฉีดสารสกัดที่เจือจางระดับต่าง ๆ คือ 1: 125, 1:50, 1:25, 1:5 และ 1 ก้านตา/ตัว กลับเข้าไปในกุ้งที่ถูกตัดตาทั้งสองข้าง หลังจากนั้นอีก 1 ชั่วโมงตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือดของสัตว์ทดลองพบว่าสารสกัดที่เตรียมได้มีประสิทธิภาพดีมาก กล่าวคือในสารสกัดที่เจือจางเป็น 1:50 (ตารางที่ 3) สามารถตรวจหา CHH ได้ 1 หน่วย (1 unit= ความสามารถของฮอร์โมนในการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด 25 มิลลิกรัม/ 100 มิลลิลิตรของเลือด) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการสกัด CHH ด้วยสารละลาย methanol-acetic acid ให้การคงสภาพของฮอร์โมนนี้ค่อนข้างสูง

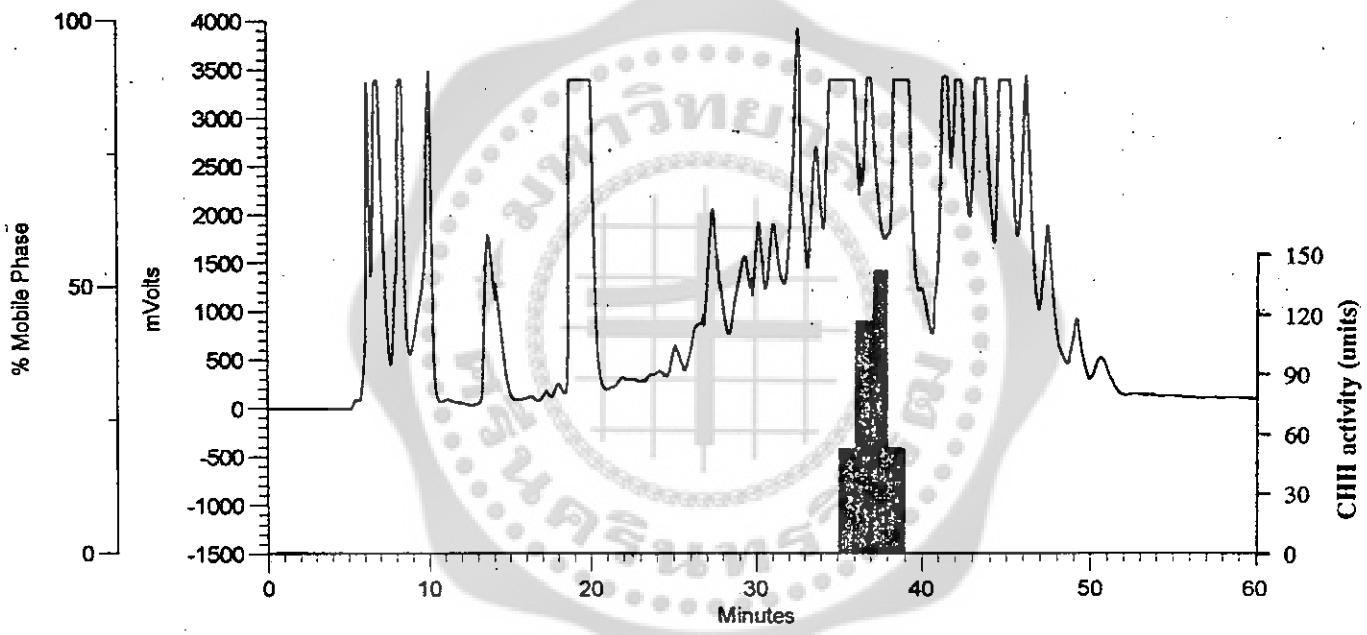
เมื่อนำสารสกัดที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยกระบวนการทาง RP-HPLC โดยผ่านคอลัมน์และตัวทำละลายระบบต่าง ๆ กัน และติดตามฮอร์โมนนี้โดยการทดสอบประสิทธิภาพการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดของสัตว์ทดลองในระหว่างการทำให้บริสุทธิ์ไปพร้อมกัน โดยใช้ enzymatic glucose oxidase colorimetric determination สามารถทำให้ CHH บริสุทธิ์ได้ 1 รูปแบบ

ตารางที่ 3 ความเข้มข้นของกลูโคสที่เพิ่มขึ้นในเลือดกุ้งที่ถูกตัดตาทั้งสองข้าง ก่อนฉีดและหลังจากฉีดสารสกัดจากก้านตาที่สกัดด้วย methanol:acetic acid (90:1) ในระดับความเจือจางต่าง ๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (จำนวนกุ้งที่ใช้ในแต่ละกลุ่มเท่ากับ 3 ตัว)

กลุ่มทดลอง	ความเข้มข้นของกลูโคส (mg/100ml)		
	ก่อนฉีด	หลังฉีด	ระดับที่เพิ่มขึ้น
1. น้ำเกลือ	8.45	13.59	5.14
2. สารสกัด 1:125 ก้านตา/ตัว	11.58	19.75	8.17
3. สารสกัด 1:50 ก้านตา/ตัว	15.46	40.28	24.82
4. สารสกัด 1:25 ก้านตา/ตัว	19.74	72.35	52.61
5. สารสกัด 1:5 ก้านตา/ตัว	21.66	89.38	67.72
6. สารสกัด 1 ก้านตา/ตัว	16.81	94.24	77.43

2. การทำ CHH ให้บริสุทธิ์ขั้นตอนที่ 1

จากการนำสารสกัดจากก้านตาเริ่มต้นจำนวน 5,000 ก้านตาไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์ PrepPak C18 (25x100 มิลลิเมตร) ระบบตัวทำละลายที่ใช้คือ ACN/TFA โดยชะด้วย acetonitrile ที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นตามลำดับจาก 20-80% อัตราการไหล 5 มิลลิลิตรต่อนาที โดยแบ่งสารสกัดผ่านคอลัมน์ 3 ครั้ง กล่าวคือครั้งแรก 1,000 ก้านตา ส่วนครั้งที่ 2 และ 3 ครั้งละ 2,000 ก้านตา แบ่งสารสกัดที่แยกได้ไปทดสอบประสิทธิภาพการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดของกุ้งก้ามกราม โดยฉีดสารสกัดแต่ละ fraction ในปริมาณ 1 ก้านตาต่อตัวกลับเข้าไปในกุ้งก้ามกรามที่ถูกตัดตาทั้งสองข้าง fraction ละ 2 ตัว พบว่า CHH activity กระจายอยู่ใน fraction ต่าง ๆ คล้ายกันทั้ง 3 ครั้ง (รูปที่ 5) กล่าวคือ พบ CHH activity ใน fraction ที่ 36, 37, 38 และ 39 (ตารางที่ 4)



รูปที่ 5 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากก้านตาของกุ้งก้ามกรามที่สกัดด้วยสารละลาย methanol-acetic acid จำนวน 1,000 ก้านตา หลังจากผ่านกระบวนการ RP-HPLC ขั้นตอนแรก (คอลัมน์ : PrepPak C18 ; ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA) และแผนภูมิแท่งแสดงปริมาณของฮอร์โมน CHH (units) ที่ปรากฏใน fraction ที่ 36-39

ตารางที่ 4 ผลการตรวจสอบ CHH จาก fraction ต่าง ๆ ที่แยกได้จาก HPLC ในขั้นตอนที่ 1 ทั้งสามครั้ง (คอลัมน์ : PrepPak C18 ; ระบบตัวทำละลาย ACN/-TFA) ปริมาณฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด 25 mg/100 ml = 1หน่วย/ก้านตา

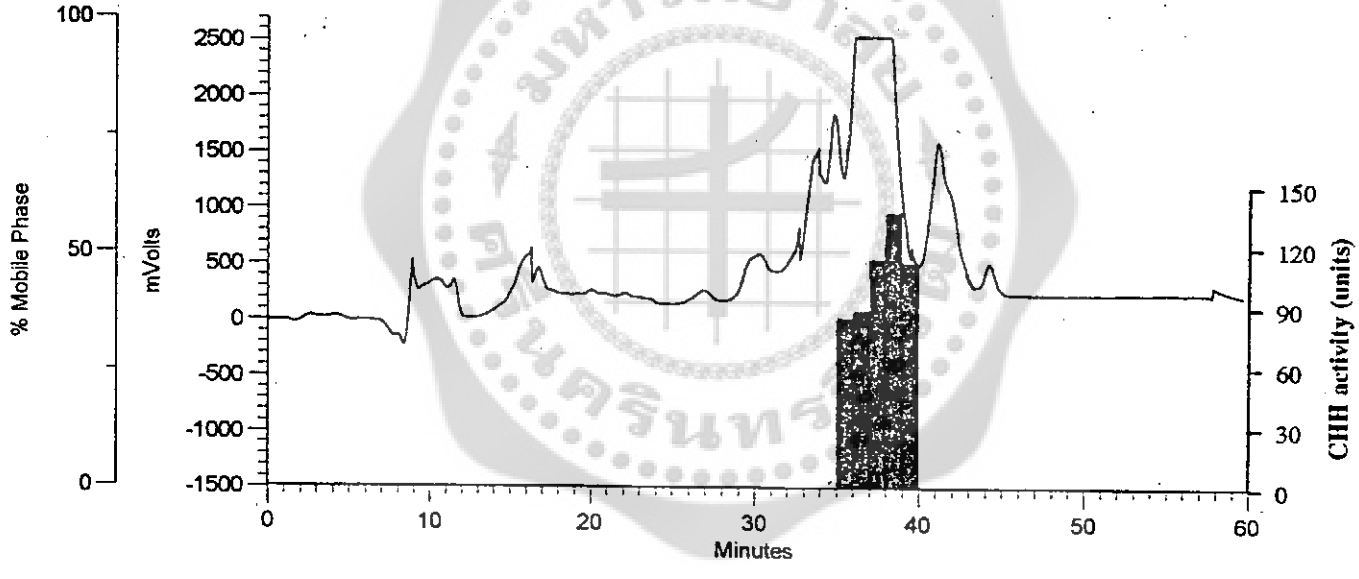
Fraction No.	ปริมาณฮอร์โมน (หน่วย/ก้านตา)		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
1-4	0.10	-	-
5-8	0.06	-	-
9-12	0.07	-	-
13-16	0.16	-	-
17-20	0.07	-	-
21-24	0.08	-	-
25-28	0.08	-	-
29	0.06	-	-
30	0.14	-	-
31	0.31	-	-
32	0.01	-	-
33	0.05	-	-
34	0.20	-	-
35	0.23	0.45	0.29
36	1.64 *	1.97 *	2.16 *
37	2.35 *	3.45 *	3.25 *
38	2.83 *	2.67 *	2.92 *
39	1.09 *	1.83 *	1.55 *
40	0.22	0.09	0.26
41-44	0.54	-	-
45-48	0.47	-	-
49-52	0.03	-	-
53-56	0.20	-	-

- ไม่ได้ทำการทดสอบ

* พบฮอร์โมน CHH มากกว่า 1 หน่วยซึ่งเป็น fraction ที่จะนำไปทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่อไป

3. การทำ CHH ให้บริสุทธิ์ขั้นตอนที่ 2

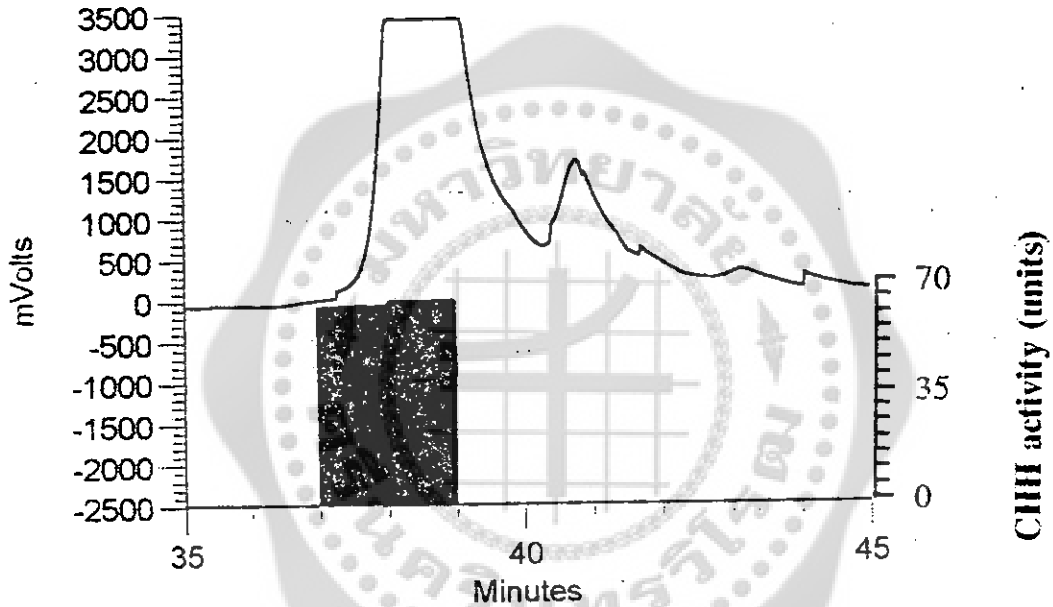
จากการรวบรวม fraction ที่พบ CHH activity ทั้ง 3 ครั้งในขั้นตอนที่ 1 มาผ่าน RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 2 โดยใช้คอลัมน์ PrepPak C8 (25x100 มิลลิเมตร) ระบบตัวทำละลายที่ใช้คือ ACN/-HFBA จากนั้นชะด้วย acetonitrile ที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นตามลำดับจาก 25-70% อัตราการไหล 5 มิลลิลิตรต่อนาที แบ่งสารสกัดที่แยกได้ไปตรวจสอบ activity ในการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดของกุ้งก้ามกราม โดยฉีดสารสกัดแต่ละ fraction ในปริมาณ 1 ก้านตาต่อตัวกลับเข้าไปในกุ้งที่ถูกตัดตาทั้งสองข้าง พบว่า CHH activity อยู่ใน fraction ที่ 36, 37, 38, 39 และ 40 (รูปที่ 6)



รูปที่ 6 โครมาโตรแกรมของสารสกัดจากก้านตาของกุ้งก้ามกรามจำนวน 5,000 ก้านตาที่ผ่านกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 2 จาก fraction 36-39 (คอลัมน์ : PrepPak C8 ; ระบบตัวทำละลาย ACN/HFBA) และแผนภูมิแท่งแสดงปริมาณของฮอร์โมน CHH (units) ที่ปรากฏใน fraction ที่ 36-40

4. การทำ CHH ให้บริสุทธิ์ขั้นตอนที่ 3

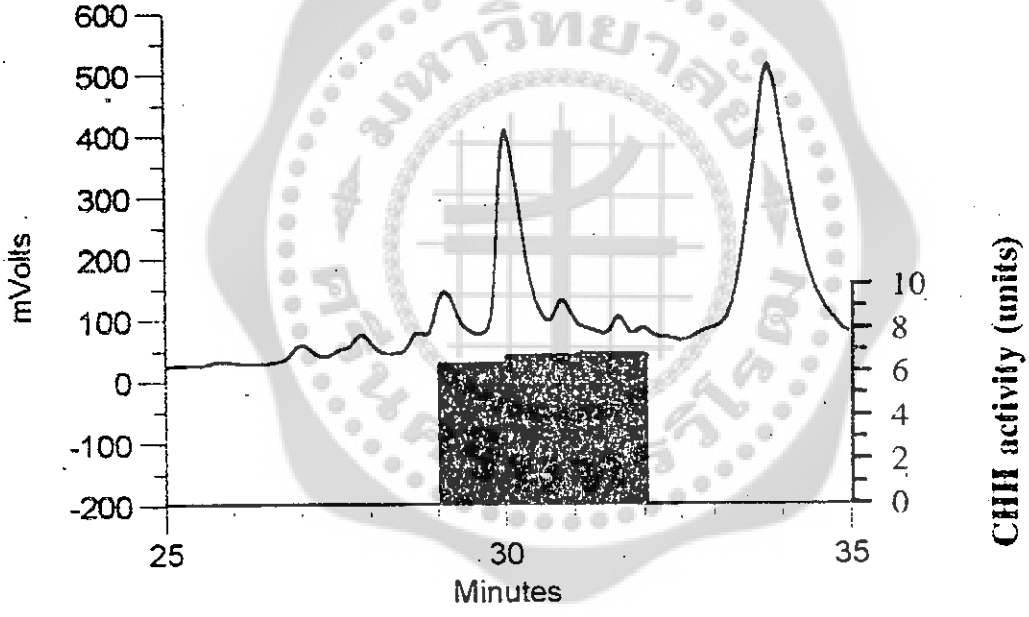
จากการรวบรวม fraction ที่ 38 และ 39 ของการทำ CHH ให้บริสุทธิ์ขั้นตอนที่ 2 มาผ่านคอลัมน์ PrepPak C18 (25x100 มิลลิเมตร) ระบบตัวทำละลายที่ใช้คือ ACN/TEA จากนั้นชะด้วย acetonitrile ที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นตามลำดับจาก 15-80% อัตราการไหล 5 มิลลิลิตรต่อนาที (รูปที่ 7) แบ่งสารสกัดที่แยกได้ไปตรวจสอบ activity ในการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดของกุ้งก้ามกราม โดยฉีดสารสกัดแต่ละ fraction ในปริมาณ 2 ก้านตาต่อตัวกลับเข้าไปในกุ้งที่ถูกตัดตาทั้งสองข้าง พบว่า CHH activity อยู่ใน fraction ที่ 38 และ 39



รูปที่ 7 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากก้านตาของกุ้งก้ามกรามจาก fractionที่ 38 และ 39 ของขั้นตอนที่ 2 ที่ผ่านกระบวนการทาง RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 3 (คอลัมน์ : PrepPak C18 ; ระบบตัวทำละลาย ACN/TEA) และแผนภูมิแท่งแสดงปริมาณของฮอร์โมน CHH (units) ที่ปรากฏใน fraction 38-39

5. การทำ CHH ให้บริสุทธิ์ขั้นตอนที่ 4

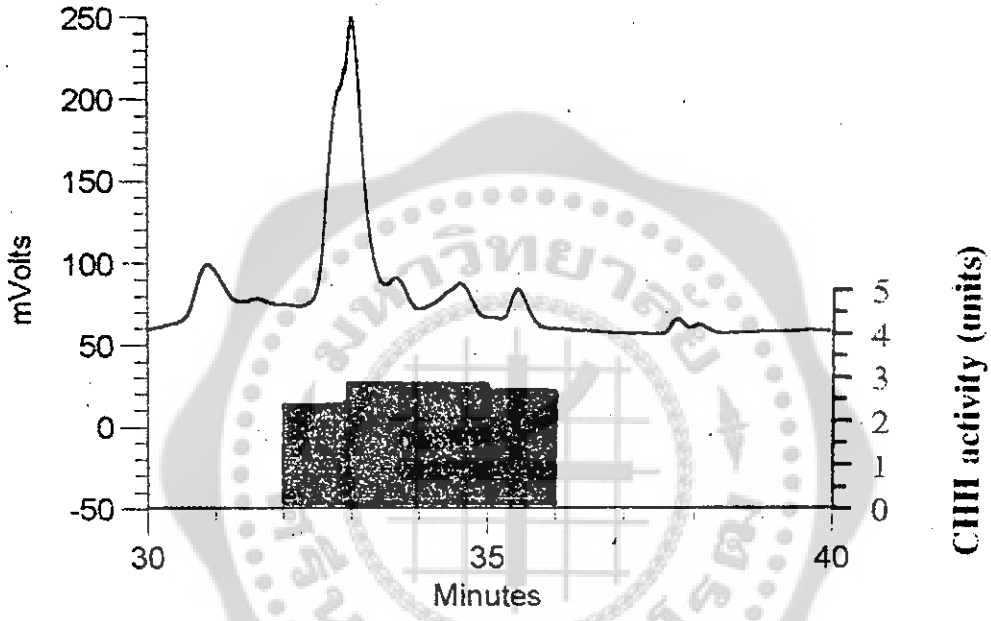
จากการรวบรวม fraction ที่ 38 ของการทำให้บริสุทธิ์ขั้นตอนที่ 3 มาผ่าน Microsorb-MV cyano column (4.6x250 มิลลิเมตร) ระบบตัวทำละลายที่ใช้คือ ACN/TFA จากนั้นชะด้วย aceto-nitrile ที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นตามลำดับจาก 20-75% อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที (รูปที่ 8) จากโครมาโตแกรมจะเห็นว่าสารปนเปื้อนอื่น ๆ ได้แยกออกจาก CHH ไปในระดับหนึ่งแล้วเมื่อเทียบกับพีคจากโครมาโตแกรมของขั้นตอนที่ 1, 2 และ 3 จากนั้นแบ่งสารสกัดที่แยกได้ไปตรวจสอบ CHH activity โดยฉีดสารสกัดแต่ละ fraction ในปริมาณ 10 ก้านตาต่อตัวกลับเข้าไปในกุ้งที่ถูกตัดตาทั้งสองข้าง พบ CHH activity อยู่ใน fraction ที่ 30, 31 และ 32



รูปที่ 8 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากก้านตาของกุ้งก้ามกราม fraction ที่ 38 ของขั้นตอนที่ 3 ผ่านกระบวนการทาง RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 4 (คอลัมน์ : Cyano ; ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA) และแผนภูมิแท่งแสดงปริมาณของฮอร์โมน CHH (units) ที่ปรากฏใน fraction ที่ 30, 31 และ 32

6. การทำ CHH ให้บริสุทธิ์ขั้นตอนที่ 5

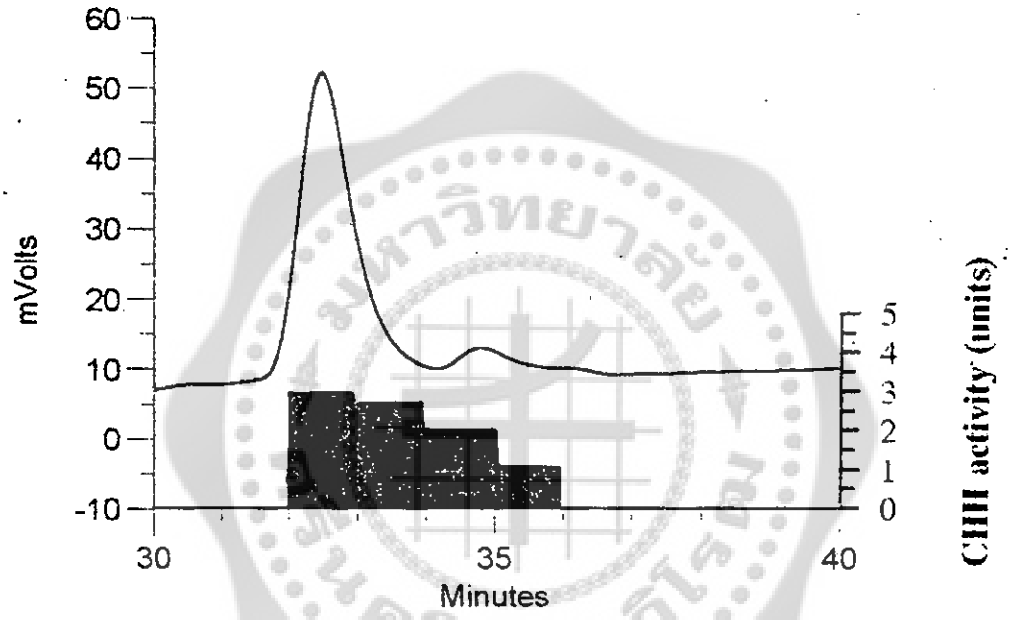
จากการรวบรวม fraction ที่ 31 และ 32 ของการทำ CHH ให้บริสุทธิ์ขั้นตอนที่ 4 มาผ่าน Microsorb-MV phenyl column (4.6x250 มิลลิเมตร) ระบบตัวทำละลายที่ใช้คือ ACN/TFA จากนั้นชะด้วย acetonitrile ที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นตามลำดับจาก 20-65% อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที แบ่งสารสกัดที่แยกได้ไปตรวจสอบ activity ในการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดของกุ้งก้ามกราม โดยฉีดสารสกัดแต่ละ fraction ในปริมาณ 20 ก้านตาต่อตัวกลับเข้าไปในกุ้งที่ถูกตัดตาทั้งสองข้าง พบว่า CHH activity อยู่ใน fraction ที่ 33-36 (รูปที่ 9)



รูปที่ 9 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากก้านตาของกุ้งก้ามกรามจาก fraction ที่ 31 และ 32 ของขั้นตอนที่ 4 ผ่านกระบวนการทาง RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 5 (คอลัมน์ : Phenyl ; ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA) และแผนภูมิแท่งแสดงปริมาณของฮอร์โมน CHH (units) ที่ปรากฏใน fraction ที่ 33-36

7. การทำ CHH ให้บริสุทธิ์ขั้นตอนที่ 6

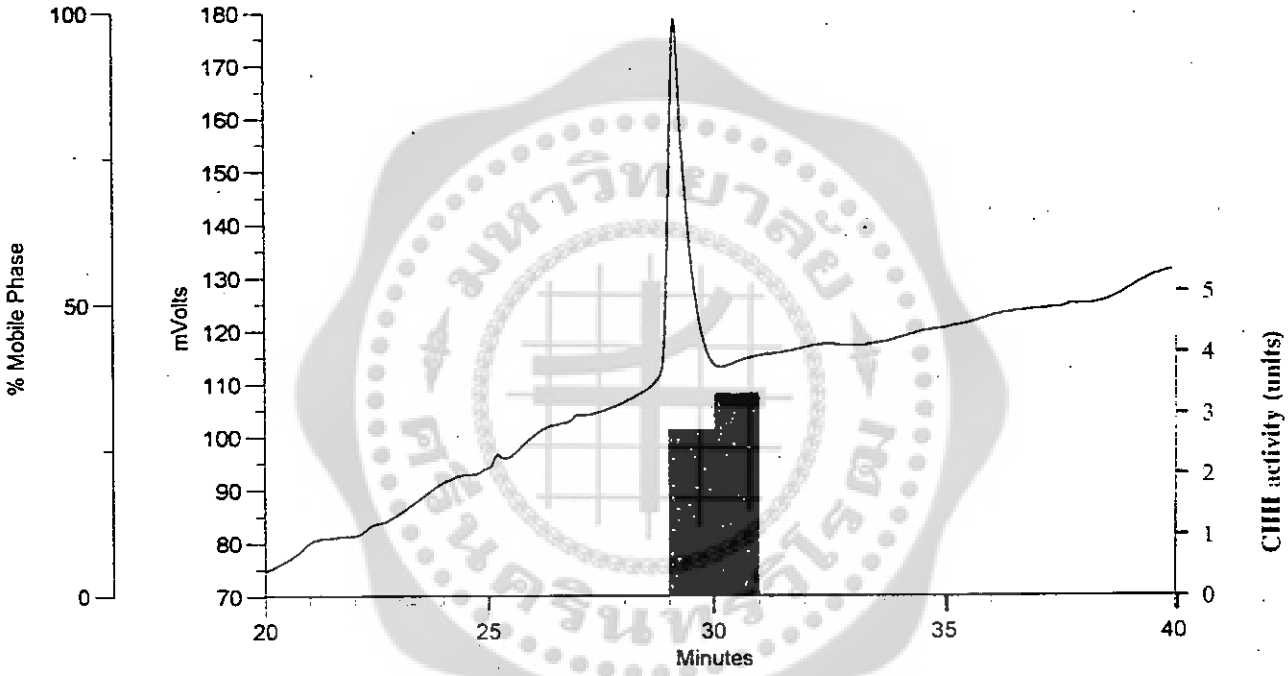
จากการรวบรวม fraction ที่ 33 และ 34 ของการทำให้บริสุทธิ์ขั้นตอนที่ 5 มาผ่านกระบวนการทาง RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 6 โดยใช้ Microsorb-MV cyano column (4.6x250 มิลลิเมตร) ระบบตัวทำละลายที่ใช้คือ ACN/TEA จากนั้นชะด้วย acetonitrile ที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นตามลำดับจาก 15-80% อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที จากนั้นแบ่งสารสกัดที่แยกได้ไปตรวจสอบ CHH activity โดยฉีดสารสกัดแต่ละ fraction ในปริมาณ 40 ก้านตาต่อตัวกลับเข้าไปในกุ้งที่ถูกตัดตาทั้งสองข้าง พบว่า CHH activity กระจายอยู่ใน fraction ที่ 33-36 (รูปที่ 10)



รูปที่ 10 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากก้านตาของกุ้งก้ามกรามจาก fraction ที่ 33 และ 34 ในขั้นตอนที่ 5 ผ่านกระบวนการทาง RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 6 (คอลัมน์ : Cyano ; ระบบตัวทำละลาย ACN/TEA) และแผนภูมิแท่งแสดงปริมาณของฮอร์โมน CHH (units) ที่ปรากฏใน fraction ที่ 33-36

8. การทำ CHH ให้บริสุทธิ์ขั้นตอนที่ 7

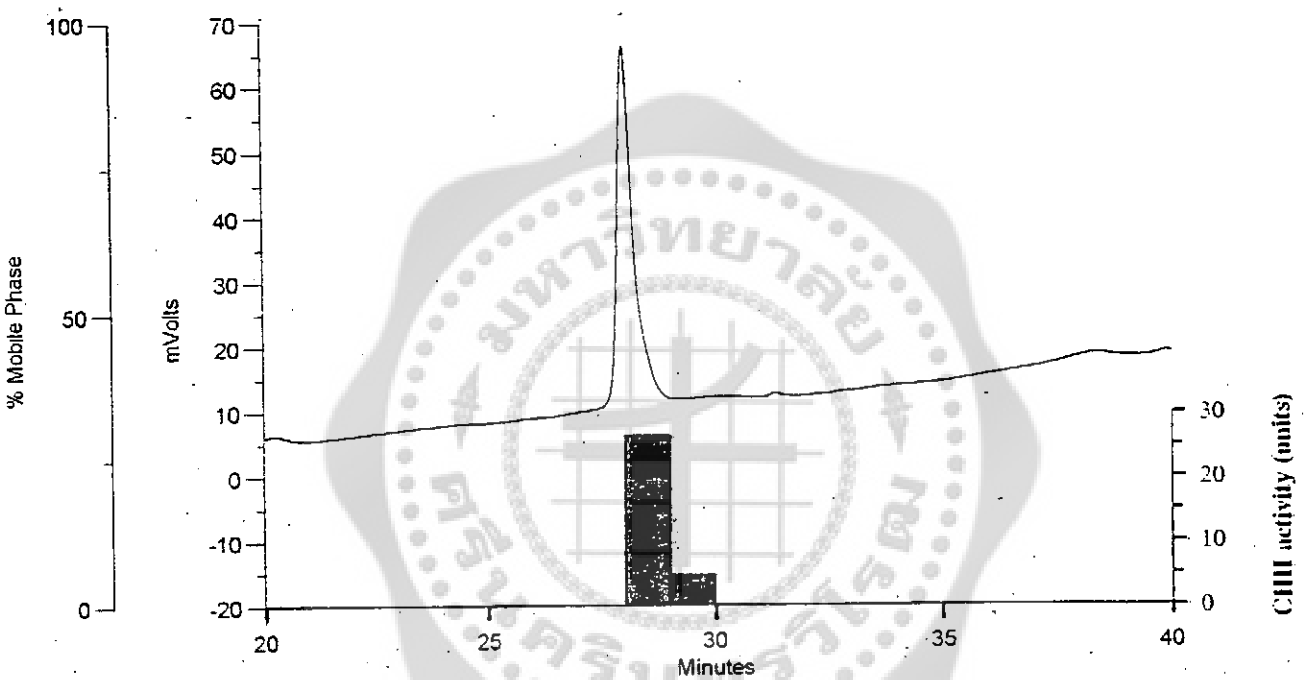
เมื่อรวบรวม fraction ที่ 30 และ 31 ของขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์จากขั้นตอนที่ 6 มาผ่านกระบวนการทาง RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 7 (รูปที่ 11) โดยใช้คอลัมน์ cyano ระบบตัวทำละลายที่ใช้คือ ACN/HFBA ชะด้วย acetonitrile ที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นตามลำดับ อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที แบ่งสารสกัดที่แยกได้ไปตรวจสอบ CHH activity ในสัตว์ทดลอง โดยฉีดสารสกัดแต่ละ fraction ในปริมาณ 40 ก้านตาต่อตัว พบ CHH activity อยู่ใน fraction ที่ 33 และ 34 ซึ่ง chromatogram จะเรียบและเป็นพีคเดียว แต่ CHH activity กระจายอยู่ใน 2 fraction คาดว่าน่าจะได้ CHH ค่อนข้างบริสุทธิ์ จึงนำทั้ง 2 fraction นี้ไปผ่านกระบวนการทาง HPLC อีกขั้นตอน



รูปที่ 11 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากก้านตาของกุ้งก้ามกรามจาก fraction ที่ 33-34 ของขั้นตอนที่ 6 ผ่านกระบวนการทาง RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 7 (คอลัมน์ : Cyano ; ระบบตัวทำละลาย ACN/HFBA) และแผนภูมิแท่งแสดงปริมาณของฮอร์โมน CHH (units) ที่ปรากฏใน fraction ที่ 30-31

9. การทำ CHH ให้บริสุทธิ์ขั้นตอนที่ 8

จากการนำ fraction ที่ 30 และ 31 ของการทำ CHH ให้บริสุทธิ์ขั้นตอนที่ 7 มาผ่านกระบวนการทาง RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 8 โดยใช้คอลัมน์ C18 ระบบตัวทำละลายที่ใช้คือ ACN/TFA แล้วชะด้วย acetonitrile ที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นตามลำดับจาก 15-65% อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที แบ่งสารสกัดที่แยกได้ไปตรวจสอบ CHH activity ในสัตว์ทดลอง โดยฉีดสารสกัดแต่ละ fraction ในปริมาณ 50 ก้านตาต่อตัว พบว่า CHH activity อยู่ใน fraction ที่ 29 และ 30 จากโครมาโตแกรมจะเห็นว่าสารปนเปื้อนอื่น ๆ ที่ปนมากับ CHH จากสารสกัดเริ่มต้น และผ่านการทำให้บริสุทธิ์ 8 ขั้นตอนได้ถูกแยกออกไปจนกระทั่งเหลือเพียง CHH ที่น่าจะบริสุทธิ์โดยดูจากโครมาโตแกรมเห็นเพียงพีคเดียว ซึ่งตรงกับการตรวจสอบ activity ของฮอร์โมน พบว่าส่วนใหญ่อยู่ใน fraction ที่ 29 ส่วน fraction ที่ 30 พบเพียงเล็กน้อย (รูปที่ 12)



รูปที่ 12 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากก้านตาของกุ้งก้ามกรามจาก fraction ที่ 30 และ 31 ผ่านกระบวนการทาง RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 8 (คอลัมน์ : C18 ; ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA) และแผนภูมิแท่งแสดงปริมาณของฮอร์โมน CHH (units) ที่ปรากฏใน fraction ที่ 29 และ 30

10. การคำนวณหาร้อยละของการคงสภาพของ CHH

จากการสังเกตปริมาณสารสกัดจากก้านตาที่ใช้ในการทดสอบ activity ของ CHH พบว่าต้องเพิ่มปริมาณสารสกัดในการทดสอบทุกขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์โดยเฉพาะในขั้นตอนที่ 8 จากการใช้สารสกัดปริมาณต่าง ๆ ฉีดให้กุ้งพบว่าสารสกัดในปริมาณ 50 ก้านตาจึงสามารถเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดได้เพียง 30 หน่วย ในขณะที่สารสกัดด้วย methanol-acetic acid ใช้ปริมาณสารสกัดเพียง 1:50 ก้านตาก็สามารถเพิ่มน้ำตาลได้ 1 หน่วย ดังนั้นฮอร์โมน CHH ที่ได้รับเท่ากับ 3.6% ของสารสกัดเริ่มต้นเท่านั้น

11. ลำดับกรดอะมิโนของ CHH

จากการหาลำดับกรดอะมิโนของ CHH พบว่า CHH ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 71 หน่วย เป็นซีสเตอีน (cystein) จำนวน 6 หน่วย อยู่ที่ตำแหน่งที่ 7, 23, 26, 39, 43 และ 52 ตามลำดับ ปลายด้าน N เป็นอาลานีน (alanine) ไม่ถูก block ด้วย pyroglutamate เหมือน CHH ในกุ้งและปูชนิดอื่น ๆ ปลายด้าน C เป็นวาลีน (valine) เช่นเดียวกับ CHH อื่น ๆ แต่ไม่พบธีโอนีน (theonine) หรือเมไธโอนีน (methionine) ที่ตำแหน่งระหว่างกลูตามิกกับวาลีนตัวสุดท้าย (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบชนิดและจำนวนกรดอะมิโนของ CHH ในสัตว์ครัสตาเซียนชนิดต่าง ๆ กับ CHH ของกุ้งก้ามกราม สีแดงเป็นกรดอะมิโนที่แตกต่างจาก CHH ของกุ้งก้ามกราม

		10		20		30		40
Mar	AILDQ	SCKGI	FDREL	FKKLD	RVCDD	CYNLY	RKPYV	AIDCR
Prb-I	pEVFDQ	ACKGI	YDRAI	FKKLD	RVCED	CYNLY	RKPYV	ATTCR
Orl	pEVFDQ	ACKGI	YDRAI	FKKLD	RVCED	CYNLY	RKPYV	ATTCR
Hoa-a	pEVFDQ	ACKGV	YDRNL	FKKLD	RVCED	CYNLY	RKPFV	ATTCR
Hoa-b	pEVFDQ	ACKGV	YDRNL	FKKLN	RVCED	CYNLY	RKPFI	VTTCR
Cam	pEIYDT	SCKGV	YDRAL	FNDLE	HVCDD	CYNLY	RTSYV	ASACR
Pej	SLFDP	ACTGI	YDRQL	LRKLG	RLCDD	CYNVF	REPKV	ATGCR

		50		60		70	
Mar	RGCYQ	NLVFR	QCIQD	LQLMD	DLDEY	ANAVQ	-V-NH_2?
Prb-I	QNCYA	NSVFR	QCLDD	LLLID	VVDEY	ISGVQ	TV-NH_2
Orl	QNCYA	NSVFR	QCLDD	LLLID	VLDEY	ISGVQ	TV-NH_2
Hoa-a	ENCYS	NWVFR	QCLDD	LLLSD	VIDEY	VSNVQ	MV-NH_2
Hoa-b	ENCYS	NRVFR	QCLDD	LLMID	VIDEY	VSNVQ	MV-NH_2
Cam	SNCYS	NLVFR	QCMDD	LLMMD	EFDQY	ARKVQ	MV-NH_2
Pej	SNCYH	NLIFL	DCLEY	LIPSH	LQEEH	MAAMQ	TV-NH_2

Mar *Macrobrachium rosenbergii*
Hoa-a *Homarus americanus* CHH-A
Prb-I *Procambarus bouvieri*
Hoa-b *Homarus americanus* CHH-B
Orl *Orconectes limosus*
Cam *Carcinus maenas*
Pej *Penaeus japonicus*

สรุปและอภิปรายผล

จากการหาลำดับกรดอะมิโนของฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดของสัตว์พวกครัสตาเซียนหรือ CHH ของกุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* พบว่า ประกอบด้วยกรดอะมิโน 71 หน่วย ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับลำดับกรดอะมิโนของ CHH ในกุ้ง Mexican crayfish, *Procambarus bouvieri* 66.66 % crayfish, *Orconectes limosus* 68.06 % กุ้งลอบสเตอร์ *Homarus americanus* CHH-A 65.27 % และ CHH-B 58.33 % ปูน้ำเค็ม *Carcinus maenas* 62.5 % และกุ้งทะเล *Penaeus japonicus* 44.44 %

CHH ที่พบทุกรูปแบบประกอบด้วยซีสเตอีน (cystein) 6 หน่วยอยู่ที่ตำแหน่งเดียวกัน ดังนั้นจึงคาดว่า disulfide bridge ของ CHH ในกุ้งก้ามกรามจึงน่าจะคล้ายกับที่พบใน CHH ของกุ้งและปูเหล่านี้คือที่ตำแหน่ง 7-43, 23-39 และ 26-52 (Kegel et al., 1989)

สำหรับกรดอะมิโนตัวสุดท้ายทางด้านปลาย C (C-terminus) เป็นวาลีน (valine) เหมือนกันใน CHH ทุกรูปแบบและมีหมู่ NH_2 มาต่อ จึงคาดว่าในกุ้งก้ามกรามน่าจะอยู่ในรูป V-NH_2 เช่นเดียวกัน แต่ในตำแหน่งที่ 71 CHH ทุกรูปแบบจะเป็นธรีโอนีน (threonine) หรือเมไธโอนีน (methionine) แต่ในกุ้งก้ามกรามไม่พบ สำหรับลำดับกรดอะมิโนภายในสายเปปไทด์ของ CHH ในกุ้งและปูชนิดต่าง ๆ ยกเว้นกุ้งทะเล *Penaeus japonicus* จะมีลักษณะคล้ายกันกับของกุ้งก้ามกรามมาก เนื่องจากกุ้ง crayfish ลอบสเตอร์และปูอยู่ในสายวิวัฒนาการใกล้เคียงกับกุ้งก้ามกรามมากกว่า ส่วนกุ้งทะเล *Penaeus japonicus* มีลักษณะต่างออกไปจากกุ้งในกลุ่มนี้เนื่องจากอยู่ในสายวิวัฒนาการที่ห่างไปจากกุ้งและปูในกลุ่มนี้ แต่อย่างไรก็ตามลำดับกรดอะมิโนของ CHH ในทุกสปีชีส์ (species) จะประกอบด้วยส่วนอนุรักษ์ต้นแบบ (conserved regions) เหมือนกันคือตำแหน่งของซีสเตอีน, ปลาย C และส่วนแกนภายในสายเปปไทด์ตลอดสายประกอบด้วยกรดอะมิโนซึ่งมีคุณสมบัติคล้าย ๆ กัน (Kleijn and Van Herp, 1995)

สำหรับทางด้านปลาย N นั้นกรดอะมิโนตัวแรกของ CHH ส่วนใหญ่ถูกปิดกั้นด้วย pyroglutamate (pE) ซึ่งในกุ้งก้ามกรามเป็นอาลานีน (alanine) ทำนองเดียวกับใน *Penaeus japonicus* ที่เป็นซีรีน (serine) จากการศึกษาพบว่า pyroglutamate ทางด้านปลาย N ของ CHH นี้ไม่เป็นส่วนของโมเลกุลที่มีความสำคัญทางชีววิทยาใด ๆ (Chung and Webster, 1996)

จากการทดลองนี้คาดว่า CHH ของกุ้งก้ามกรามยังมีอีกหลายรูปแบบที่ยังไม่สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ เพราะจากขั้นตอนการแยกโดย HPLC ขั้นตอนแรกจะพบ CHH activity กระจายอยู่ 3-4 fraction เสมอ นอกจากโครมาโตแกรมของสารสกัดจากก้านตาที่ผ่าน HPLC ในขั้นตอนที่ 7 พบ CHH

activity ในพีคเดียว จึงจำเป็นต้องมีการแยก fraction ที่เหลือให้บริสุทธิ์ต่อไป เพื่อพิสูจน์ได้ว่า fraction เหล่านั้นมี CHH รูปแบบที่แตกต่างไปจากรูปแบบที่ได้นี้ จากรายงานการทำให้ CHH บริสุทธิ์ในสัตว์ครัสตาเซียนอื่น ๆ พบ CHH หลายรูปแบบ เช่นใน Mexican crayfish, *Procambarus bouvieri* พบ CHH-B และ CHH-C (Huberman and Aguilar, 1988) ในปูน้ำเค็ม *Carcinus maenas* พบพีคที่มี CHH activity 2 พีค (Kegel et al., 1991) ในกุ้งลอบสเตอร์ *Homarus ameri-canus* พบ CHH 2 รูปแบบ (Tensen et al., 1991) กุ้งทะเล *Penaeus japonicus* พบ CHH 5 รูปแบบ (Yang et al., 1995)

แต่อย่างไรก็ตามการที่พบ CHH activity ในสารสกัดจากก้านตาของกุ้งก้ามกรามในหลาย fraction อาจเกิดเนื่องจากว่าการสกัดใช้ก้านตาทั้งก้านตาและวิธีการสกัดอาจได้ precursor ของ CHH (อาจอยู่ในรูป preprohormone หรือ prohormone) ออกมาด้วย เพราะจากรายงานการแยกสกัด CHH ในกุ้งลอบสเตอร์ *Homarus americanus* ถึงแม้จะใช้เพียงต่อมไซนัสในการแยกสกัด CHH ก็สามารถพบ CHH-related peptide ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโน 38 หน่วยเพิ่มจาก CHH (Tensen et al., 1991) อย่างไรก็ดี สิ่งที่ควรคำนึงถึงอีกประการหนึ่งคือ ในระหว่างการแยกสกัด CHH ขั้นตอนต่าง ๆ อาจมีการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของ CHH เกิดขึ้น ทำให้คุณสมบัติทางกายภาพของโมเลกุลต่างไปจากเดิม เช่น อาจเกิดปฏิกิริยา oxidation ของกรดอะมิโนเช่น เมไธโอนีนและฮิสติดีน หรืออาจเกิดการ hydrolysis ของฮอร์โมนทำให้พบส่วนของฮอร์โมนกระจายไปใน fraction ต่าง ๆ

สิ่งที่น่าสังเกตอีกประการหนึ่งในการแยกสกัด CHH จะพบว่าในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์แต่ละขั้นตอน CHH activity จะลดลงเรื่อย ๆ ซึ่งการลดลงของ CHH activity นี้ไม่น่าเป็นสาเหตุจากการที่ CHH รูปแบบต่าง ๆ แยกจากกันเพียงอย่างเดียวเพราะ CHH activity ของ CHH บริสุทธิ์ที่ได้ในขั้นตอนที่ 8 เหลือประมาณ 1-2 % ของ CHH ในสารสกัดเริ่มต้น ดังนั้นจึงคาดว่าอาจมีการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของ CHH ในระหว่างการทำให้บริสุทธิ์ขั้นตอนต่าง ๆ โดยเฉพาะในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ด้วย phenyl column ซึ่งใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/HFBA พบว่า CHH activity สูญเสียไปมาก ดังนั้นจึงคาดว่า CHH จากกุ้งก้ามกรามมีระดับการคงสภาพต่ำมาก (labile) ในตัวทำละลายที่ใช้ และในระหว่างการทำให้บริสุทธิ์ขั้นตอนที่ 5-8 ระบบตัวทำละลายที่ใช้อาจทำให้ CHH activity เสียไปได้ ซึ่งต่างจาก CHH จากสัตว์ครัสตาเซียนชนิดอื่นที่มีการใช้ขั้นตอนการแยกสกัดที่รุนแรงก็ยังคงรักษา CHH activity ได้ เช่นในกรณีของ isopod, *Porcellio dilatatus* การแยกสกัด CHH ทำโดยใช้แอมโมเนียม-อะซีเตตที่มีความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร (pH 8.5) กับการใช้กรดอะซิติกเข้มข้น 0.2 โมลต่อลิตร พบ

ว่า CHH activity จากการแยกสกัดทั้งสองวิธีไม่แตกต่างกัน (Martin et al., 1984) กุ้ง crayfish, *Astacus leptodactylus* เป็นตัวอย่างที่แยกสกัดด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร และผ่าน SDS-PAGE (Kallen et al., 1986) กุ้งลอบสเตอร์ *Homarus americanus* แยกสกัด CHH โดยใช้กรดไฮโดร-คลอริกเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร (Tensen et al., 1991) หรือกรดไฮโดรคลอริกที่ร้อน 85 องศาเซลเซียส หรือในกรดอะซิติกที่ร้อน 80 องศาเซลซียส (Soyez et al., 1990) ในกุ้งลอบสเตอร์ *Nephrops norvegicus* แยกสกัด CHH ในกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร (Smullen and Bntly, 1994) ก็ยังคงรักษา CHH activity อยู่ ซึ่งต่างจากการศึกษาการแยกสกัดเบื้องต้นของ CHH จากกุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* โดยใช้สารละลายต่าง ๆ พบว่าการแยกสกัดในน้ำเดือดหรือกรดอะซิติกเข้มข้น 2 โมลต่อลิตร การคงสภาพของ CHH activity ต่ำกว่าการแยกสกัดใน 90% methanol 1% acetic acid มาก (Sithigorngul et al., 1994) ดังนั้นจึงเชื่อได้ว่า CHH ในกุ้งก้ามกรามน่าจะมีลักษณะที่แตกต่างรวมทั้งการคงสภาพก็อาจแตกต่างจาก CHH ของสัตว์ครัสตาเซียนอื่น ๆ

ข้อสังเกตในการทำให้บริสุทธิ์ของ CHH จากกุ้งก้ามกรามคือต้องใช้กระบวนการทาง RP-HPLC ระบบตัวทำละลายต่าง ๆ ถึง 8 ขั้นตอนจึงจะได้ CHH บริสุทธิ์ ซึ่งต่างจากรายงานการทำให้ CHH บริสุทธิ์ในสัตว์ครัสตาเซียนชนิดอื่น ๆ ซึ่งใช้กระบวนการทาง RP-HPLC เพียง 1-3 ขั้นตอนก็สามารถทำให้ CHH บริสุทธิ์ได้ (Soyez et al., 1990, Tensen et al., 1991, Smullen and Bently, 1994) ทั้งนี้เพราะการเตรียมสารสกัด CHH ในการศึกษาเหล่านี้เตรียมจากต่อมไซนัส การปนเปื้อนของสิ่งเจือปนต่าง ๆ ในสารสกัดจึงน้อยกว่าการใช้ทั้งก้านตาดังที่ปฏิบัติในการแยกสกัด CHH จากกุ้งก้ามกราม

การศึกษาครั้งนี้จึงเป็นการศึกษาที่สำคัญ เพราะสามารถทราบขั้นตอนที่ทำให้ CHH บริสุทธิ์และคงสภาพอยู่ได้ ซึ่งจะทำให้การแยกสกัด CHH รูปแบบอื่น ๆ ทำได้รวดเร็วและมีประสิทธิภาพสูงขึ้น และเป็นข้อมูลในการศึกษาการแยกสกัดฮอร์โมนขนาดใหญ่อื่น ๆ โดยเฉพาะ Molt inhibiting Hormone-MIH, Gonad Inhibiting Hormone-GIH หรือ Vitellogenesis Inhibiting Hormone -VIH ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่มีขนาดและลำดับกรดอะมิโนใกล้เคียงกับ CHH (Kleijn and Van Herp, 1995; Yang et al., 1997) นอกจากนี้การศึกษาเกี่ยวกับ CHH ในกุ้งก้ามกรามจะมีประโยชน์กับอุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งต่อไป เพราะฮอร์โมนนี้มีความสำคัญกับกระบวนการเมตาบอลิสมของกุ้งโดยตรง

บรรณานุกรม

Abramowitz, A.A., F.L., Hisaw and D.N., Papandrea. The occurence of a diabetogenic factor in the eyestalk of crustaceans, in crustacean hyperglycemic hormone (CHH) and the regulation of carbohydrate metabolism : current perspectives. Biol. Bull. 86 : 1-5; 1944.

Aguilar et al. Identification, purification and initial characterization of the vitellogenesis inhibiting hormone from the mexican crayfish, *Procambarus bouvieri* (Ortmann). Comp. Biochem. Physiol. 102B : 491-498 ; 1992.

Beltz, B.S. Crustacean neurohormone, In : Endocrinology of selected invertebrate types. Edited. H. Laufer and R.G.H. Downer, New York ; Alan R. Liss. Inc., pp. 235-258 ; 1988.

Chang, E.S., M.J. Bruce and R.W. Newcomb. Purification and amino acid composition of a peptide with molt inhibiting activity from the lobster, *Homarus americanus*. Gen. Comp. Endocrinol. 65 : 56-64 ; 1987.

Chung, J.S. and S.G. Webster. Does the N-terminal pyroglutamate residue have any physiological significance for crab hyperglycemic peptides. Eur. J. Biochem. 240 : 358-364; 1996.

Chung, J.S. M.C. Wilkinson and S.G. Webster. Determination of the amino acid sequence of the moult-inhibiting hormone from the edible crab, *Cancer pagurus*. Neuropeptides. 30 : 95-101, 1996.

Fernlund, P. and L. Josefsson. Crustacean color change hormone : Amino acid sequence and chemical synthesis. Science. 177 : 173-175 ; 1972.

Fernlund, P. Structure of the red pigment concentrating hormone of the shrimp *Pandalus borealis*, in the demonstration of substances immunologically related to the identified arthropod neuropeptide AKH/RPCH in the CNS of several invertebrate species. Biochem. Biophys. Acta. 371 : 304-311 ; 1974.

Gangotri, M.S., S.A.T. Venkatachari and N. Vasantha. Neuroendocrine control of blood sugar regulation in the freshwater crab, *Barytelphusa guerinil* (H. Miline Edward) (Decapoda, potamidea). Crustacean. 53 (1) : 5-14 ; 1987.

Huberman, A. and M.B. Aguilar. A neurosecretory hyperglycemic hormone from the sinus gland of the mexican crayfish, (*Procambarus bouvieri* : Ortmann)-I. Purification and biochemical characterization of the most abundant form of the hormone. Comp Biochem. Physiol. 85B (1) : 197-203 ; 1986.

Huberman, A. and M.B. Aguilar. A neurosecretory hyperglycemic hormone from the sinus gland of the mexican crayfish, (*Procambarus bouvieri* : Ortmann)-II. Structural comparison of two isoforms of the hormone. Comp Biochem. Physiol. 91B (2) : 345-349 ; 1988.

Huberman, A. M.B. Aguilar and K. Brew. Primary structure of the major isomorph of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH-I) from the sinus gland of the mexican crayfish, *Procambarus bouvieri* (Ortmann) : Interspecies comparision. Peptides 14 : 7-16 ; 1993.

Kallen, J.L. and F. Van Herp. Localization of crustacean hyperglycemic hormone (CHH) in the X-organ sinus gland complex in the eyestalk of the crayfish, *Astacus leptodactylus* (Nordmann, 1942). J. Morphology. 170 : 347-355 ; 1981.

Kallen, J.L. et al. Biochemical analysis of the crayfish, *Astacus leptodactylus*. Gen. Comp. Endocrinol. 61 : 248-259 ; 1986.

Kegel, G. et al. Amino acid sequence of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH) from the shore crab, *Carcinus maenas*. FEBS Letters. 25 (1) : 10-14 ; 1989.

Kegel, G. et al. Amino acid sequence of crustacean hyperglycemic hormone (CHH) from the crayfish, *Orconectes limosus* : Emergence of a novel neuropeptide family. Peptides. 12 : 909-913 ; 1991.

Keller, R. and G. Wunderer. Purification and amino acid composition of the neurosecretory hyperglycemic hormone from the sinus gland of the shore crab, *Carcinus maenas*. Gen. Comp. Endocrinol. 34 : 328-335 ; 1978.

Keller, R., P.P. Jaros and G. Kegal. Crustacean hyperglycemic neuropeptides. Amer Zool. 25 : 207-221 ; 1985.

Keller, R. and D. Sedlmeier. A metabolic hormone in crustaceans : The hyperglycemic neuropeptide. In : Endocrinology of selected invertebrate types. Edited. H. Laufer and R.G.H. Downer. Alan R. Liss. Inc., New York. Pp. 315-326 ; 1988.

Kleijn, D.P.V. and F. Van Herp. Molecular biology of neurohormone precursors in the eyestalk of crustacea. Comp. Biochem. Physiol. 112B : 573-579 ; 1995.

Kleinholz, L.H. et al. Isolation and sequence analysis of a pigment dispersing hormone from eyestalks of the crab, *Cancer magister*. Biol. Bull. 170 : 135-143 ; 1986.

Martin, G., R. Keller, G. Kegel, G. Besse and P.P. Garos. The hyperglycemic neuropeptide of the terrestrial isopod, *Porcellio dilatalus*. I. Isolation and characterization. Gen Comp. Endocrinol. 55 : 208-216 ; 1984.

Martin, G., P.P. Jaros, G. Besse and R. Keller. The hyperglycemic neuropeptide of the terrestrial isopod, *Porcellio dilatalus*. II. Immunocytochemical demonstration in neurosecretory structures of the nervous system. Gen. Comp. Endocrinol. 55 : 217-226 ; 1984.

Martin, G., O. Sorokine and A.V. Dorsselaer. Isolation and molecular characterization of a hyperglycemic neuropeptide from the sinus gland of the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare* (Crustacea). J. Biochem. 211 : 601-607 ; 1993.

Nagamine, C. et al. Effects of androgenic gland ablation on male primary and secondary sexual characteristics in the Malaysian prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (De Man) (Decapod, Palaemonidae), with first evidence of induced feminization in a nonhermaphroditic decapod. Gen.Comp. Endocrinol. 41 : 423-441 ; 1980.

Rao, K.R. and J.P. Riehm. Pigment dispersing hormone : A novel family of neuropeptides from arthropods. Peptides. 9 : 153-159 ; 1988.

Santos, E.A. and K. Keller. Review : Crustacean hyperglycemic hormone (CHH) and the regulation of carbohydrate metabolism : current perspectives. Comp. Biochem. Physiol. 106A (3) :405-411 ;1993.

Schooneveld, H. et al. Demonstration of substances immunologically related to the identified arthropod neuropeptides AKH/RPCH in the CNS of several invertebrate species. Brain Research. 406 : 224-232 ; 1987.

Sedlmeier, D. and R. Keller. The mode of action of crustacean neurosecretory hyperglycemic hormone. I. Involvement of cyclic nucleotides. Gen Comp. Endocrinol. 45 : 82-90 ; 1981.

Sedlmeier, D. The crustacean hyperglycemic hormone (CHH) releases amylase from the crayfish midgut gland. Peptides. 20 : 91-88 ; 1988.

Sithigorngul, W., S. Ruengmaneepaitoon and P. Sithigorngul. Determineation of crustacean hyperglycemic hormone in *Macrobrachium rosenbergii*. Srinakharinwirot Univ. Sci. J. 8 (1) : 38-46 ; 1992.

Smullen, R.P. and M.G. Bentley. Studies on crustacean hyperglycemic hormone of the Norway lobster, *Nephrops norvegicus* (L.). Invert. Rep. Dev. 26 (1) : 23-32 ; 1994.

Soyez, D., J.E. Van Deijnen and M. Martin. Isolation and characterization of a vitellogenesis inhibiting factor from sinus gland of the lobster, *Homarus americanus*. J. Exp. Zool. 244 : 479-484 ; 1987.

Soyez, D. et al. Neuropeptides from the sinus gland of the lobster, *Hormarus americanus* : Characterization of hyperglycemic peptides. Gen. Comp. Endocrinol. 79 : 261-274 1990.

Soyez, D. et al. Primary structure of two isoforms of the vitellogenesis inhibiting hormone from the lobster, *Homarus americanus*. Neuropeptides. 20 : 52-32 ; 1991.

Spaargaren, D.H. and P.A. Haefner. The effect of environment osmotic conditions on blood and tissue glucose levels in the brown shrimp, *Crangon crangon* (L.). Comp. Biochem. Physiol. 87A (4) : 1045-1050 ; 1987.

Tensen, C.P. et al. Characterization of hyperglycemic neuropeptides from the lobster, *Homarus americanus*. Peptides. 12 : 241-249 ; 1991.

Webster, S.G. Amino acid sequence of putative moult-inhibiting hormone from the crab *Carcinus maenas*. Proc. R. Soc. Lond. (Biol). 244 : 247-252 ; 1991.

Yang, W., K. Aida and H. Nagasawa. Amino acid sequences of a hyperglycemic hormone and its related peptides from the kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. Aquaculture. 135 : 215-212 ; 1995.

Yang, W., K. Aida, A. Terauchi, H. Sonobe and H. Nagasawa. Amino acid sequence of a peptide with molt-inhibiting activity from the kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. Peptides. 17 : 197-202 ; 1996.