

การแยกและการทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย FMRamide
จากก้านตาของกิ้งกูดดำ

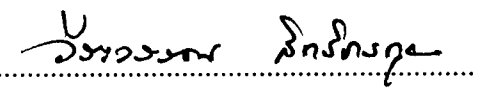
ปริญญานิพนธ์
ของ
จิรศักดิ์ ผู้ปลื้ม

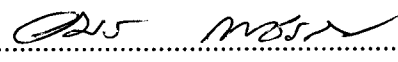
เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิชาเอกเคมีชีวภาพ
มกราคม 2542
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

คณะกรรมการควบคุมและคณะกรรมการสอบได้พิจารณาปฏิญานพนธ์ฉบับนี้แล้ว
เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
วิชาเอก เคมีชีวภาพ ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒได้

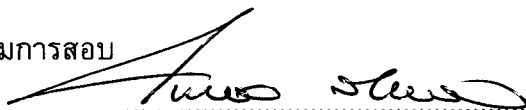
คณะกรรมการควบคุม

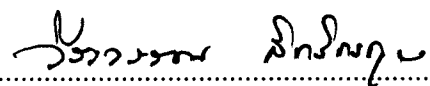
.....ประธาน
(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพศาล สิทธิกรกุล)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วีระวรรณ สิทธิกรกุล)

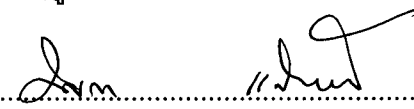
.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธาน
(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพศาล สิทธิกรกุล)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วีระวรรณ สิทธิกรกุล)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม)

.....กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม
(ดร. จินดา แท้มบรรจง)

บัณฑิตวิทยาลัยอนุมัติให้รับปฏิญานพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิชาเอกเคมีชีวภาพ ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ ดร. เสริมศักดิ์ วิศาลาภรณ์)

วันที่ 16 เดือน พฤษภาคม 2541

ประกาศขอบคุณการ

ปริญญานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความช่วยเหลือและคำแนะนำอย่างดียิ่งจาก
รศ. ดร. ไพศาล สิทธิกรกุล ผศ. ดร. วีระวรรณ สิทธิกรกุล และ ผศ. ดร. อมร เพชรสม รวมทั้ง
ดร. จินดา แต้มบรรจง ที่กรุณาร่วมเป็นกรรมการสอบ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง
ไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบคุณ Prof. Dr. A. O. W. Stretton, University of Wisconsin-Madison ที่
กรุณาอนุเคราะห์ให้โมโนโคลนอลแอนติบอดี FM-23, AF1-62 และ AF2-32 สำหรับใช้ในการ
วิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณศิวพร ลงยันต์ ที่ให้ความช่วยเหลือด้วยดีมาตลอดจนทำให้ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณ คุณธิดา อมร ผู้ร่วมการวิจัยที่ให้คำแนะนำ ช่วยเหลือด้วยดีตลอดใน
ระหว่างการทำวิจัย

ขอขอบคุณ คุณนันทิกา ปานจันทร์ นิสิตปริญญาโท จากสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพ
และวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในการวิเคราะห์หา
น้ำหนักโมเลกุลของสารที่ได้จากการวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณพานิ จักรแสงชัยโชติ คุณนุชนาท เกษมวงษ์ ที่ช่วยเหลือและเป็นที่
กำลังใจในการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอโน้มล่ำลึกถึงพระคุณบิดา มารดา และน้อง ๆ ที่ให้กำลังใจและสนับสนุนในด้านการ
ศึกษาแก่ผู้วิจัย จนสามารถทำปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จเรียบร้อยอย่างดียิ่ง และขอขอบคุณผู้
ให้ความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ แต่ไม่ได้กล่าวไว้ ณ ที่นี้ด้วย

จิรศักดิ์ ผู้ปลื้ม

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง.....	1
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	9
ชีววิทยาของกิ้งกูดดำ.....	20
ความมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า.....	23
ความสำคัญของการศึกษาค้นคว้า.....	23
ขอบเขตของการศึกษาค้นคว้า.....	23
2 วิธีการวิจัย	
สัตว์ทดลอง.....	26
อุปกรณ์และสารเคมี.....	26
วิธีดำเนินการทดลอง.....	28
การเก็บรวบรวมก้านตากิ้งกูดดำ.....	29
การเตรียมสารสกัดจากก้านตาของกิ้งกูดดำ.....	29
การเตรียมสารสกัดจากก้านตาก่อนนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วย กระบวนการ RP-HPLC (Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography).....	29
การทำให้บริสุทธิ์ของสารคล้าย FMRFamide จากก้านตาของกิ้งกูดดำ ด้วยกระบวนการ RP-HPLC	30
การเตรียมเปปไทด์มาตรฐาน.....	31
การตรวจหาสารคล้าย FMRFamide ในก้านตาของกิ้งกูดดำโดยวิธี Dot-ELISA.....	32
การหาน้ำหนักโมเลกุลโดย MALDI-TOF MS (Matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry).....	33
การวิเคราะห์ข้อมูล.....	34
3 ผลการวิจัย.....	38

บทที่

หน้า

4 สรุปและอภิปรายผล.....	69
บรรณานุกรม.....	74
ภาคผนวก.....	83
ประวัติผู้วิจัย.....	85

บัญชีตาราง

ตาราง	หน้า
1 การแยกสกัดและทำให้บริสุทธิ์ FMRFamide และสารคล้าย FMRFamide (FMRFamide-like substances) ในสัตว์ต่างๆ.....	16
2 ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ด้วยกระบวนการ RP-HPLC.....	35
3 น้ำหนักโมเลกุลของสารคล้าย FMRFamide ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ ด้วยกระบวนการ RP-HPLC.....	68
4 ลำดับกรดอะมิโนและน้ำหนักโมเลกุลของสารคล้าย FMRFamide ในสัตว์ พวกครัสเตเชีย.....	73

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ

หน้า

1 โครงสร้างภายนอกโดยทั่วไปของกุ้งกุลาดำ.....	24
2 ลักษณะของกุ้งกุลาดำเพศผู้และกุ้งกุลาดำเพศเมีย.....	25
3 ขั้นตอนวิธีการเตรียมสารสกัดจากก้านตาของกุ้งกุลาดำ.....	36
4 ขั้นตอนการตรวจหาสารคล้าย FMRFamide โดยวิธีการของ Dot-ELISA.....	37
5 รูปแสดงผลของ Dot-ELISA ของเปปไทด์ FMRFamide มาตรฐาน.....	44
6 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากก้านตาของกุ้งกุลาดำที่ผ่านกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนแรก และรูปแสดงผล Dot-ELISA.....	45
7 ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย FMRFamide ด้วยกระบวนการ RP-HPLC.....	46
8 ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย FMRFamide ด้วยกระบวนการ RP-HPLC ของสารคล้าย FMRFamide กลุ่มที่ 1.....	47
9 โครมาโตแกรมของสารสกัดกลุ่มที่ 1 ในขั้นตอนที่ 2.....	48
10 โครมาโตแกรมการทำให้บริสุทธิ์ของเปปไทด์กลุ่มที่ 1 และแมสสเปกตรัม ของสารคล้าย FMRFamide PFM1.....	49
11 ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย FMRFamide ด้วยกระบวนการ RP-HPLC ของสารคล้าย FMRFamide กลุ่มที่ 2.....	50
12 โครมาโตแกรมของสารสกัดกลุ่มที่ 2 ในขั้นตอนที่ 2.....	51
13 โครมาโตแกรมการทำให้บริสุทธิ์ของเปปไทด์กลุ่มที่ 2 และแมสสเปกตรัม ของสารคล้าย FMRFamide PFM2 และ PFM3.....	52
14 โครมาโตแกรมการทำให้บริสุทธิ์ของเปปไทด์กลุ่มที่ 2 และแมสสเปกตรัม ของสารคล้าย FMRFamide PFM4 และ PFM5.....	53
15 โครมาโตแกรมการทำให้บริสุทธิ์ของเปปไทด์กลุ่มที่ 2 และแมสสเปกตรัม ของสารคล้าย FMRFamide PFM6.....	54
16 ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย FMRFamide ด้วยกระบวนการ RP-HPLC ของสารคล้าย FMRFamide กลุ่มที่ 3.....	55
17 โครมาโตแกรมของสารสกัดกลุ่มที่ 3 ในขั้นตอนที่ 2.....	56
18 โครมาโตแกรมการทำให้บริสุทธิ์ของเปปไทด์กลุ่มที่ 3 และแมสสเปกตรัม ของสารคล้าย FMRFamide PFM7 และ PFM8.....	57

19	ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย FMRFamide ด้วยกระบวนการ RP-HPLC ของสารคล้าย FMRFamide กลุ่มที่ 4.....	58
20	โครมาโตแกรมของสารสกัดกลุ่มที่ 4 ในขั้นตอนที่ 2.....	59
21	โครมาโตแกรมการทำให้บริสุทธิ์ของเปปไทด์กลุ่มที่ 4 และแมสสเปกตรัม ของสารคล้าย FMRFamide PFM9 และ PFM10.....	60
22	โครมาโตแกรมการทำให้บริสุทธิ์ของเปปไทด์กลุ่มที่ 4 และแมสสเปกตรัม ของสารคล้าย FMRFamide PFM11.....	61
23	ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย FMRFamide ด้วยกระบวนการ RP-HPLC ของสารคล้าย FMRFamide กลุ่มที่ 5.....	62
24	โครมาโตแกรมของสารสกัดกลุ่มที่ 5 ในขั้นตอนที่ 2.....	63
25	โครมาโตแกรมการทำให้บริสุทธิ์ของเปปไทด์กลุ่มที่ 5 และแมสสเปกตรัม ของสารคล้าย FMRFamide PFM12 และ PFM13.....	64
26	โครมาโตแกรมการทำให้บริสุทธิ์ของเปปไทด์กลุ่มที่ 5 และแมสสเปกตรัม ของสารคล้าย FMRFamide PFM14 และ PFM15.....	65
27	โครมาโตแกรมการทำให้บริสุทธิ์ของเปปไทด์กลุ่มที่ 5 และแมสสเปกตรัม ของสารคล้าย FMRFamide PFM16 และ PFM17.....	66
28	โครมาโตแกรมการทำให้บริสุทธิ์ของเปปไทด์กลุ่มที่ 5 และแมสสเปกตรัม ของสารคล้าย FMRFamide PFM18.....	67

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

เป็นที่ทราบกันดีว่าในการควบคุมการทำงานของระบบต่างๆ ในร่างกายของสัตว์พวกครัสตาเซียน (crustacean) โดยเฉพาะพวก (decapoda) เช่น กุ้ง ปู กุ้ง และ crayfish จะมีการควบคุมโดยระบบต่อมไร้ท่อ (endocrine system) ซึ่งประกอบด้วย neurosecretory cell และ neurohemal organ โดยที่ neurosecretory cell จะเป็นแหล่งที่ทำหน้าที่ผลิตและหลั่งนิวโรฮอร์โมน (neurohormone) ที่สร้างขึ้นไปตามส่วนต่างๆ ของร่างกายโดยฮอร์โมนจะแพร่ไปตามเลือดหรือฮีโมลิมป์ (hemolymph) สำหรับต่อมไร้ท่อที่สำคัญในสัตว์กลุ่มครัสตาเซียน ได้แก่ X-organ ในก้านตา (eyestalk) จะประกอบด้วย neurosecretory cell ซึ่งเป็นแหล่งสร้างนิวโรฮอร์โมนและไปสะสมที่ต่อมไซนัส (sinus gland) Postcommissural organ (PCO) เป็นแหล่งที่สะสมและหลั่งนิวโรฮอร์โมนที่เกี่ยวกับการเปลี่ยนสีตัว Pericardial organ (PO) เป็นแหล่งที่สะสมและหลั่งนิวโรฮอร์โมนที่กระตุ้นการทำงานของหัวใจ Y-organ เป็นแหล่งที่สร้างฮอร์โมนที่ควบคุมการลอกคราบ (molting hormone) Androgenic gland เป็นแหล่งที่สร้างฮอร์โมนที่ควบคุมการเจริญของอวัยวะเพศผู้ รังไข่ (ovary) เป็นแหล่งที่สร้างฮอร์โมนที่ควบคุมการเจริญเติบโตของอวัยวะเพศเมีย (Fingerman, 1987) ในก้านตาของสัตว์กลุ่มพวกครัสตาเซียนเป็นแหล่งสำคัญในการสร้างฮอร์โมนต่างๆ เช่น ฮอร์โมนที่ยับยั้งการลอกคราบ (molt inhibiting hormone-MIH) (Chang, Bruce and Newcomb, 1987) ฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด (crustacean hyperglycemic hormone-CHH) (Huberman and Aguilar, 1986) ฮอร์โมนที่ควบคุมการกระจายตัวของรงควัตถุของโครมาโตฟอร์ (pigment dispersing hormone-PDH) (Kleinholz and others, 1986) ฮอร์โมนที่ควบคุมการรวมตัวของรงควัตถุในการเปลี่ยนสีตัว (red pigment concentrating hormone-RPCH) (Fenlund, 1974) และฮอร์โมนที่ยับยั้งพัฒนาการของรังไข่ (vitellogenesis inhibiting hormone-VIH) (Soyez, Deijnen and Martin, 1987) มีรายงานการพบเปปไทด์ฮอร์โมนอีกหลายชนิดในสัตว์กลุ่มครัสตาเซียน เช่น FMRFamide, small cardioactive peptide (SCP), substance P, proctolin และ cholecystokinin (CCK) ซึ่งเปปไทด์ฮอร์โมนเหล่านี้อาจทำหน้าที่เป็นสารสื่อประสาท (neurotransmitter) หรือ นิวโรโมดูเลเตอร์ (neuromodulator) (Callaway, Masinosky, Graubard, 1987; Keller, 1992; Schmidt and Ache, 1994; Turrogiano and Selverston, 1989) สำหรับ FMRFamide นั้นเป็นเปปไทด์ฮอร์โมนชนิดหนึ่งที่น่าสนใจซึ่งมีการศึกษาในสัตว์ต่างๆ มากมายทั้งในสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังและสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง

ในปัจจุบันกุ้งกุลาดำ *Peneaus monodon* เป็นสัตว์น้ำที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่งของประเทศไทย ซึ่งมีผู้นิยมบริโภคทั้งในประเทศและต่างประเทศ จัดเป็นสินค้าส่งออกอันดับต้นๆ ของประเทศไทย เมื่อปี 2538 ได้มีรายงานว่าประเทศไทยส่งออกกุ้งกุลาดำเป็นอันดับหนึ่งของโลก มีปริมาณถึง 168,946 เมตริกตัน มูลค่าประมาณ 49,827.52 ล้านบาท (คมสัน ลีลาคหกิจ. 2539)

ข้อดีของกุ้งกุลาดำ คือ เป็นกุ้งทะเลที่มีขนาดใหญ่ มีเนื้อแน่น รสชาติดี ราคาสูง จะไม่ตายง่ายในกรณีที่อุณหภูมิเปลี่ยนแปลงไปสูงหรือต่ำอย่างรวดเร็ว ความเค็มของน้ำเพิ่มขึ้นหรือลดลงในทันทีทันใดก็จะไม่ตาย แต่ชะงักการเจริญเติบโตเท่านั้น (ปัญญา สุวรรณสมุทร. 2534)

สำหรับการศึกษาเกี่ยวกับระบบฮอร์โมนของกุ้งกุลาดำนี้นี้ยังมีอยู่น้อย ดังนั้นการศึกษาระบบฮอร์โมนในกุ้งชนิดนี้จึงเป็นสิ่งจำเป็นและน่าจะเป็นประโยชน์ในการที่จะทราบถึงบทบาทการทำงานของฮอร์โมนที่มีผลทางสรีรวิทยาของระบบต่างๆ ในกุ้ง เพื่อใช้ในการพัฒนา และเพิ่มผลผลิตกุ้งต่อไปได้ และได้มีรายงานการตรวจพบสารคล้ายนิวโรเปปไทด์ (neuropeptide) ในก้านตาของกุ้งกุลาดำด้วยวิธีอิมมูโนไซโตเคมีสตรี้ (immunocytochemistry) พบว่ามีสารคล้ายนิวโรเปปไทด์หลายชนิด เช่น pigment dispersing hormone (α PDH and β PDH), FMRFamide และ cholecystokinin (CCK) กระจายอยู่ในบริเวณต่างๆ ซึ่งบทบาทการทำงานของสารคล้ายนิวโรเปปไทด์เหล่านี้ยังไม่ทราบแน่ชัด แต่คาดว่าจะทำหน้าที่เป็นนิวโรฮอร์โมน หรือสารสื่อประสาท หรือ นิวโรโมดูเลเตอร์ (วิระวรรณ สิทธิกรกุล และคนอื่นๆ. 2537)

ได้มีรายงานการตรวจพบ FMRFamide และสารคล้าย FMRFamide (FMRFamide like substance) และรายงานการแยกและการทำให้บริสุทธิ์ รวมทั้งการหาลำดับกรดอะมิโนของสารนี้มากมายตั้งแต่สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังไปจนถึงสัตว์มีกระดูกสันหลัง ในรายงานการตรวจพบ FMRFamide ครั้งแรกโดยแยกสกัดสารนี้จากปมประสาท (ganglion) ของหอยสองฝา *Macrocallista nimbosa* และพบว่า FMRFamide มีโครงสร้างเป็น tetrapeptide amide ประกอบด้วยกรดอะมิโน 4 หน่วยซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนเป็น Phe-Met-Arg-Phe-NH₂ (FMRFamide) และเป็นนิวโรเปปไทด์ที่มีฤทธิ์กระตุ้นการทำงานของหัวใจ (cardioexcitatory neuropeptide) (Price and Greenberg. 1977)

จากการศึกษาสารคล้าย FMRFamide ในสัตว์ต่างๆ พบว่าสารนี้เป็นนิวโรเปปไทด์ที่มีบทบาทต่อการทำงานของระบบต่างๆ ในร่างกาย คือ กระตุ้นการทำงานของหัวใจ กระตุ้นการหดตัวและคลายตัวของกล้ามเนื้อลาย (skeletal muscle) มีผลต่อการทำงานของระบบหมุนเวียนของโลหิตและระบบประสาท โดยสารนี้จะมีโครงสร้างคล้ายกับ FMRFamide และพบว่ามีโครงสร้างหลายรูปแบบ ซึ่งจะมีลำดับกรดอะมิโนแตกต่างกัน แต่จะมีโครงสร้างทางด้านปลาย C

(carboxy terminus) เป็น -RFamide (-Arg-Phe-NH₂) เหมือนกัน (Dockray and others. 1983; Grimmelikhuijzen and Graff. 1986; Evan and Myers. 1986; Kobayashi and Muneoka. 1986; Krajniak and Price. 1990; Evan and others. 1991) ดังนั้นจึงเรียกสารคล้าย FMRFamide เหล่านี้ว่า FMRFamide like immunoreactivity; FLI (Trimmer, Kobierski and Kravitz. 1987) หรือ FMRFamide-related peptide; FaRPs (Krajniak. 1991) หรือ FMRFamide-like peptides; FLPs (Sithigorngul and Stretton. 1995) ซึ่งส่วนใหญ่จะพบว่าสารคล้าย FMRFamide มีการเรียงลำดับกรดอะมิโน 4 หน่วยทางด้านปลาย C เป็น Phe-X-Arg-Phe-NH₂ โดยที่ X อาจจะเป็น Met, Leu หรือ Ile ก็ได้ (Krajniak and Price. 1990)

จากการศึกษาถึงตำแหน่งที่พบสารคล้าย FMRFamide และบทบาทการทำงานของสารนี้ในสัตว์ต่างๆมีรายงานดังนี้ ในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังพวกซีเลนเทอเรต (Phylum Coelenterate) มีการศึกษาในไฮดรา *Hydra attenuata* พบสารคล้าย FMRFamide ในระบบประสาท โดยสารนี้จะกระจายอยู่ในตัวเซลล์ประสาทและเส้นใยประสาทที่ชั้น ectoderm ในบริเวณ lower peduncle region ใกล้กับบริเวณ basal disk และกระจายอยู่ในบริเวณ hypostome ในปริมาณมาก และในชั้น ectoderm ที่หนวดในปริมาณน้อย ซึ่งบทบาทการทำงานของนิวโรเปปไทด์นี้ยังไม่ทราบแน่ชัด (Grimmelikhuijzen, Dockray and Schot. 1982) ในระบบประสาทของแมงกระพรุน *Chrysaora hysocella*, *Cyanea capillata* และ *Cyanea lamarckii* จะพบสารคล้าย FMRFamide ในบริเวณที่คล้ายคลึงกัน โดยพบสารนี้ในร่างแหประสาท (nerve net) ที่บริเวณ subumbrella ectoderm และ exumbrella ectoderm และพบที่เซลล์ประสาทจำนวนมากในบริเวณฐานของหนวดในชั้น ectoderm ซึ่งสารนี้อาจทำหน้าที่เป็นสารสื่อประสาทในระบบประสาทของแมงกระพรุน (Anderson, Moosler and Grimmelikhuijzen. 1992) ในสัตว์พวกดอกไม้ทะเล *Anthopleura elegantissima* พบสารคล้าย FMRFamide (Antho-RFamide) ที่บริเวณถุงเวซิเคิลของเซลล์ประสาท และบริเวณร่างแหประสาทของหนวด (tentacle nerve plexus) ซึ่ง Antho-RFamide นี้จะมีบทบาทเป็นสารสื่อประสาทในดอกไม้ทะเล (Westfall and Grimmelikhuijzen. 1993)

ในสัตว์กลุ่มพวกหนอนตัวแบน (Phylum Platyhelminthes) พบสารคล้าย FMRFamide กระจายอยู่ทั่วร่างกายทั้งในระบบประสาทส่วนกลางและระบบประสาทนอกส่วนกลางของหนอนตัวแบน *Bdelloura candida* ได้แก่ในสมอง เส้นประสาทตามแนวยาวของสัตว์ (longitudinal nerve cord) เส้นประสาทแนวขวางและเส้นประสาทที่เชื่อมตัวด้านข้าง (transverse and lateral commissures) และพบที่กลุ่มใยประสาทบริเวณคอหอย (pharyngeal plexus) กลุ่มใยประสาทใต้กล้ามเนื้อและผิวหนัง (subepidermal and

submuscular plexuses) ส่วนต่างๆ ของอวัยวะสืบพันธุ์ ซึ่งเปปไทด์นี้อาจทำหน้าที่เป็นสารสื่อประสาทหรือนิวโรโมดูเลเตอร์ในการควบคุมการหดตัวของกล้ามเนื้อ (Johnston and others. 1996) พยาธิตัวแบน *Polystom nearcticum* พบสารคล้าย FMRFamide ในระบบประสาทส่วนกลางบริเวณ cerebral ganglion เส้นใยประสาทที่เชื่อมระหว่าง ganglionic region และระบบประสาทส่วนปลายพบที่บริเวณปากดูด (oral sucker) คอหอย เส้นใยประสาทใต้กล้ามเนื้อและผิวหนังที่เชื่อมต่อไปยังเส้นประสาทตามยาว ซึ่งคาดว่าสารนี้อาจมีบทบาทเกี่ยวกับกลไกการสืบพันธุ์ในหนอนชนิดนี้ (Armstrong and others. 1997)

จากการศึกษาระบบประสาทของพวกหนอนตัวกลม (Phylum Nematoda) ในปลิง *Hirudo medicinalis* พบสารคล้าย FMRFamide ในเซลล์ประสาทบริเวณ segmental ganglion และสมอง ซึ่งพบว่าสารนี้จะเพิ่มการหดตัวของกล้ามเนื้อ (Evans and Calabrese. 1989) ส่วนในระบบประสาทของแม่เพรียง *Nereis virens* พบสารคล้าย FMRFamide กระจายอยู่ในปมประสาทส่วน supraesophageal ganglia, subesophageal ganglia และ intersegmental ganglia โดยจะทำหน้าที่เป็นสารสื่อประสาท (Krajniak and Greenberg. 1992) ในพยาธิไส้เดือน *Ascaris suum* จะพบสารคล้าย FMRFamide ในเซลล์ประสาทส่วน pharynx และ pharyngeal ganglion โดยเซลล์ประสาทเหล่านี้เป็นทั้ง sensory neuron, interneuron และ motor neuron คาดว่าสารนี้อาจจะทำหน้าที่เป็นสารสื่อประสาท (Cowden and others. 1993)

กลุ่มพวกอาร์โทรพอด (Phylum Arthropoda) มีรายงานการศึกษานี้ในพวกแมลง (Insecta) เช่น ในผีเสื้อกลางคืน *Manduca sexta* พบสารคล้าย FMRFamide ที่บริเวณสมองส่วน protocerebral neurosecretory cells (NSCs) และที่ปลายประสาทในส่วนของ corpora cardiaca และ corpora allata สารนี้อาจมีบทบาทเป็นสารสื่อประสาท หรือนิวโรฮอร์โมน (Carrol, Carrow and Calabrese. 1986) ตั๊กแตน *Schistocerca gregaria* จะมีสารคล้าย FMRFamide ในส่วนของกล้ามเนื้อ extensor tibiae ของขาหลัง โดยสารนี้จะเพิ่มอัตราการหดตัว (contraction) และการคลายตัว (relaxation) ของกล้ามเนื้อ โดยจะทำให้ความแรง (amplitude) ของการหดตัวของกล้ามเนื้อเพิ่มขึ้น (Evans and Myers. 1986) ส่วนการศึกษาในระบบประสาทของแมลงหวี่ *Drosophila melanogaster* และแมลงวัน *Calliphora vomitoria* โดยใช้วิธี PAP (peroxidase antiperoxidase) พบว่ามีสารคล้าย FMRFamide (FMRFamide like immunoreactivity; FLI) ในตัวเซลล์ประสาทจำนวน 130 เซลล์ที่บริเวณปมประสาทส่วนอกและส่วนท้อง (thoraco abdominal ganglia) ของแมลงวัน และจำนวน 64 เซลล์ในปมประสาทส่วนท้อง (abdominal ganglia) ของแมลงหวี่ สารนี้อาจแสดงบทบาทเป็นสารสื่อประสาทหรือนิวโรโมดูเลเตอร์ (Lundquist and Nassel. 1990)

เมื่อใช้วิธี PAP ในการศึกษาหาตำแหน่งที่พบสารคล้าย FMRFamide ในสัตว์
 ครัสตาเซียน (crustacean) สองชนิดคือ ปู *Carcinus maenas* และ กุ้งเครย์ฟิช (crayfish)
Orconectes limosus พบว่าสารนี้จะกระจายอยู่ในก้านตา (eyestalk) ในบริเวณที่คล้ายคลึง
 กัน โดยจะอยู่ในบริเวณเส้นประสาทตา (optic nerve) ในส่วนของ medulla interna และ
 medulla terminalis (Mangerich and others. 1987) ในกุ้งอเมริกันล็อบสเตอร์
 (American lobster) *Homarus americanus* พบสารคล้าย FMRFamide มีโครงสร้างเป็น
 octapeptide (Trimmer, Kobierski and Kravitz. 1987) และสารนี้จะเพิ่มความแรง
 (amplitude) ของการเต้นของหัวใจและเพิ่มการหดตัวของกล้ามเนื้อลาย (skeletal muscle)
 (Worden, Kravitz and Goy. 1995) สารคล้าย FMRFamide ในกุ้งเครย์ฟิช *Procambarus*
clarkii พบที่ระบบประสาทส่วนกลางโดยพบอยู่ในตัวเซลล์ประสาท (somata) แอ็กซอน
 (axon) และที่ระบบหมุนเวียนของโลหิต ที่ระบบประสาทนอกส่วนกลางพบใน pericardial
 organ, thoracic root และทางเดินอาหารตอนปลาย (hindgut) สารนี้มีบทบาทเป็นนิวโร-
 ฮอร์โมนในกุ้งเครย์ฟิช ซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวกับการทำงานของระบบหมุนเวียนโลหิตและการ
 ขับถ่าย (Mercier. 1991) ต่อมาในปี 1995 สเคอเรตต์และคนอื่นๆ (Skerrett and
 others. 1995) ได้ทำการศึกษาในกุ้งชนิดเดียวกัน พบสารคล้าย FMRFamide สองชนิด
 คือ NF₁ (Asn-Arg-Asn-Phe-Leu-Arg-Phe-NH₂) หรือ (NRNFLRFamide) และ DF₂
 (Asp-Arg-Asn-Phe-Leu-Arg-Phe-NH₂) หรือ (DRNFLRFamide) จะเพิ่มความถี่และ
 ความแรงการหดตัวของหัวใจ ส่วนในกุ้งมังกร (spiny lobster) *Panulirus argus* ได้พบ
 สารคล้าย FMRFamide ที่ระบบประสาทส่วนกลาง (CNS) ในชั้น sensory afferent บริเวณ
 ปลายประสาทที่เกี่ยวกับการมองเห็นและการรับกลิ่น ซึ่งอาจทำหน้าที่เป็นสารสื่อประสาท
 (Schmidt and Ache. 1994) และได้มีการศึกษาสารคล้าย FMRFamide ในกุ้งชนิดเดียว
 กันนี้ในบริเวณ interneuron ที่ dorsal giant cell ซึ่งเป็นตำแหน่งร่วมของ serotonin และ
 FMRFamide หรือเป็นกลุ่มของเซลล์ประสาทของ olfactory lobe ใน glomeruli ซึ่งสารนี้
 อาจทำหน้าที่เป็นสารสื่อประสาท หรือ นิวโรโมดูเลเตอร์ (Schmidt and Ache. 1997) ใน
 ปู *Cancer magister* ได้มีการศึกษาบทบาทการทำงานของสารคล้าย FMRFamide จาก
 เปปไทด์ F₁ (TNRNFLRFamide) และ F₂ (SDRNFLRFamide) ซึ่งเป็นเปปไทด์ที่แยกได้
 จาก pericardial organ ของกุ้งล็อบสเตอร์ พบว่าเปปไทด์ทั้งสองเป็น cardioinhibitory
 peptide ในปู *Cancer magister* ซึ่งสารนี้มีผลลดอัตราการเต้นของหัวใจ (McGaw and
 others. 1995)

จากรายงานการศึกษาศารคล้าย FMRFamide ในสัตว์พวกมอลลัส (Phylum
 Mollusca) พบสารคล้าย FMRFamide ในหอยแมลงภู่มิ *Mytilus edulis* บริเวณกล้ามเนื้อคือ
 anterior byssus retractor muscle อาจทำหน้าที่เป็นสารสื่อประสาทและทำหน้าที่ในการ

ยับยั้งแอกทิวิตีของเอนไซม์ acetylcholinesterase ในระบบประสาทของหอยชนิดนี้ (Raffa and Bianshi. 1986) ส่วนในหอย *Rapana thomasi* พบว่า FMRFamide มีแอกทิวิตีลดลง เนื่องจากสาร small cardioactive peptide B (SCP_B) จะเป็นตัวยับยั้งแอกทิวิตีของสารคล้าย FMRFamide โดยทำให้ความถี่ในการเต้นของหัวใจลดลง (Kobayashi and Muneoka. 1986) และมีรายงานการตรวจพบสารคล้าย FMRFamide ในหอยทาก *Achatina fulica* พบว่าสารนี้จะกระจายอยู่ทั่วไปในส่วนหัวใจและที่ตัวเซลล์ประสาทจำนวน 50-70 เซลล์ของปมประสาทซีรีบรัล (cerebral ganglia) ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 30-50 ไมโครเมตร ส่วนในปมประสาทใต้หลอดอาหาร (subesophageal ganglia) จะพบในเซลล์ประสาทจำนวน 6 เซลล์ ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 200-250 ไมโครเมตร พบว่าสารคล้าย FMRFamide นี้จะมีบทบาทควบคุมอัตราการเต้นของหัวใจในหอยชนิดนี้ (Fujiwara-Sakata and Kobayashi. 1994) ส่วนการศึกษาสารคล้าย FMRFamide ในหอยแครง (sea scallop) *Placopecten magellanicus* พบสารนี้ที่เซลล์ประสาทและเส้นใยประสาทในส่วนของปมประสาทสมอง (cerebral ganglia) ปมประสาทพิดัล (pedal ganglia) และปมประสาทพาริโอโทวิสเซอร์ล (parietovisceral ganglia) และยังพบสารนี้กระจายอยู่รอบในบริเวณทางเดินอาหาร (gut) กล้ามเนื้อยึดก้าม (adductor muscle) หัวใจและอวัยวะสืบพันธุ์ (gonad) ซึ่งอาจทำหน้าที่เป็นสารสื่อประสาทหรือนิวโรโมดูเลเตอร์ (Too and Croll. 1995) จากการศึกษาทางอิมมูโนไซโตเคมีสตรียในหอยทะเล *Aplysia californica* พบสารคล้าย FMRFamide ในปริมาณสูงบริเวณ atrium และ atrioventricular valve ประมาณ 50-150 pmol/g สารนี้อาจทำหน้าที่เป็นสารสื่อประสาทหรือนิวโรโมดูเลเตอร์ ซึ่งมีผลต่อการหดตัวและคลายตัวของหัวใจ (Harris, Lesser and Ono. 1995) ในหอย *Limax marginatus* พบสารคล้าย FMRFamide ในบริเวณ olfactory organ ที่หนวด เป็นเซลล์ประสาทที่อยู่ใน lobule ของ tentacle ganglia และพบที่ ganglia ring ในส่วนของ central ganglion, pedal ganglion, pleural ganglion, parietal ganglion และ single visceral ganglion ซึ่งอาจทำหน้าที่เป็นสารสื่อประสาทหรือนิวโรโมดูเลเตอร์ (Suzuki and others. 1997)

สำหรับพวกสัตว์มีกระดูกสันหลัง ปลาฉลาม *Scyliorhinus canicular* พบสารนี้ในส่วนสมองส่วน telecephalon และ diencephalon และ ต่อมใต้สมอง ซึ่งอาจจะทำหน้าที่เป็นนิวโรฮอร์โมน หรือนิวโรโมดูเลเตอร์ (Vallarino and others. 1991) ในปลาไหล *Lamprey japonica* พบสารคล้าย FMRFamide ในส่วนของต่อมใต้สมองส่วนหน้า (anterior neurohypophysis) ซึ่งสารนี้ทำหน้าที่เป็นสารสื่อประสาท หรือนิวโรโมดูเลเตอร์ และเป็นนิวโรฮอร์โมน (Ohtomi, Fuji and Kobayashi. 1989)

จากการแยกสกัดสารคล้าย FMRFamide ในสมองของไก่พบว่ามีการสร้างเป็น pentapeptide amide ซึ่งสารนี้อาจทำหน้าที่เป็นสารสื่อประสาทหรือนิวโรโมดูเลเตอร์ เมื่อนำไปทดสอบในหนูพบว่าถ้ามีปริมาณสารนี้เพิ่มสูงขึ้นจะมีผลทำให้ความดันโลหิตเพิ่มสูงขึ้น (Dockray and others. 1983)

ส่วนในหนูพบสารคล้าย FMRFamide ในปริมาณที่สูงในส่วนของไขสันหลัง (spinal cord) และไฮโปทาลามัส (hypothalamus) และมีปริมาณน้อยในส่วนของซีรีเบลลัม (cerebellum) และ striatum และพบว่าถ้าเพิ่มความดันออสโมติกในสมองของหนูจะทำให้สารนี้ลดลง (Dockray and Williams. 1983; Majane and Yang .1991)

เมื่อศึกษาโดยวิธีอิมมูโนไซโตเคมีสตรียในลิง *Macaca cyclopsis* พบสารคล้าย FMRFamide ในระบบประสาทส่วนกลาง โดยสารนี้จะกระจายอยู่ในส่วนของ amygdaloid complex, olfactory tubercle, cerebral cortex, basal ganglia, septum, caudate putamen และ arcuate nucleus ของสมองส่วนหน้าจำนวนมาก ซึ่งจะทำหน้าที่กระตุ้นการหมุนเวียนโลหิต (Chen, Tsai and Shen. 1989)

ดังนั้นจะพบว่าสารคล้าย FMRFamide เป็นเปปไทด์ฮอร์โมนที่มีความสำคัญต่อการทำงานของระบบต่างๆ ของร่างกาย คือ ระบบการหมุนเวียนโลหิต และการทำงานของหัวใจ ระบบประสาท และกล้ามเนื้อของสัตว์ต่างๆ ตั้งแต่สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังไปจนถึงสัตว์มีกระดูกสันหลัง

เนื่องจากได้มีการศึกษาแหล่งปรากฏของสารคล้าย FMRFamide ในก้านตาของกุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* โดยพบสารนี้กระจายอยู่ในตัวเซลล์ชนิดต่างๆ และแขนงของเซลล์ประสาทที่ส่งไปยังบริเวณต่างๆ ของปมประสาท ดังนั้นสารคล้าย FMRFamide บางรูปแบบอาจมีบทบาทสำคัญในการส่งกระแสประสาท (nerve impulse) โดยอาจทำหน้าที่เป็นสารสื่อประสาทหรือนิวโรโมดูเลเตอร์ และบางรูปแบบอาจทำหน้าที่เป็นนิวโรฮอร์โมนเนื่องจากแขนงประสาทจากเซลล์ประสาทบางกลุ่มที่มีสารคล้าย FMRFamide ไปสิ้นสุดที่ต่อมไชนัส อันเป็นแหล่งรวบรวมฮอร์โมนสำหรับหลั่งเข้าสู่กระแสโลหิต (วิระวรรณและคนอื่นๆ. 2538) และจากการศึกษาการแยกและทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย FMRFamide โดยใช้กระบวนการ Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) 8 ขั้นตอน ใช้ระบบตัวทำละลาย acetonitrile (ACN) และ trifluoroacetic acid (TFA), heptafluorobutyric acid หรือ triethylamine ใช้คอลัมน์ PrepPak C18, PrepPak C8, cyano, phenyl, C8 จากนั้นใช้วิธี Dot-Enzyme Link Immunosorbent Assay (Dot-ELISA) ในการติดตามสารคล้าย FMRFamide สามารถทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย FMRFamide 5 รูปแบบดังนี้ FLP1 Asp-Arg-Asn-Phe-Leu-Arg-Phe-NH₂ (DRNFLRFamide), FLP2 Ala-Asp-Lys-Asn-Phe-Leu-Arg-Phe-NH₂

(ADKNFLRFamide), FLP3 Asn-Tyr-Asp-Lys-Asn-Phe-Leu-Arg-Phe-NH₂
 (NYDKNFLRFamide), FLP4 Ala-Pro-Ala-Leu-Arg-Leu-Arg-Phe-NH₂ (APAL-
 RLRFamide), FLP5 Asp-Arg-Tyr-Pro-Ala-Leu-Arg-Leu-Arg-Phe-NH₂
 (DRTPALRLRFamide) Asp-Arg-Tyr-Pro-Ala-Leu-Arg-Leu-Arg-Phe-NH₂
 (วันเพ็ญ สาหรัยทองคำ. 2539; Sithigorngul and others. 1998)

จากการตรวจพบสารคล้าย FMRFamide ในก้านตาของกิ้งกูดดำโดยวิธีอิมมูโน-
 ไฮโดรเคมีสตรียพบเซลล์ประสาทที่มีสารคล้าย FMRFamide จำนวนมากติดสีที่ความเข้ม
 ต่างๆ กันกระจายอยู่ในบริเวณดังนี้คือ lamina ganglinalis (LG) บริเวณรอบๆ medulla
 externa (ME) กับ medulla terminalis (MT) และบริเวณ MT ในบริเวณ LG พบเซลล์
 ประสาทขนาดเล็กเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5- 10 μ m จำนวนมากประมาณ 3000
 เซลล์ ในบริเวณรอบๆ ME พบเซลล์ประสาทขนาดเล็กจำนวนมากประมาณ 1500 เซลล์
 เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5-10 μ m ส่วนบริเวณระหว่าง medulla interna (MI) กับ MT
 พบเซลล์ประสาทขนาด 10-42 μ m ติดสีระดับต่างๆ จำนวน 65-183 เซลล์ กระจายอยู่
 เป็นกลุ่มๆ เซลล์ประสาทในบริเวณนี้ส่งเส้นใยประสาทไปยังบริเวณต่างๆ คือ ME, MI, MT
 และ ต่อมไชนัส ในบริเวณ MT พบเซลล์ประสาทขนาด 10-40 μ m ติดสีระดับต่างๆ
 จำนวน 153-347 เซลล์ นอกจากนี้ยังพบสารคล้าย FMRFamide ในเส้นใยประสาทใน
 optic nerve (ON) (วีระวรรณ สิทธิกรกุล และคนอื่นๆ. 2537) จึงมีความสนใจที่จะศึกษา
 การแยกและทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย FMRFamide ในก้านตาของกิ้งกูดดำ และใช้วิธี Dot-
 ELISA ในการติดตามสารนี้ในระหว่างการทำให้บริสุทธิ์ เนื่องจากกิ้งกูดดำเป็นสัตว์ที่มี
 ความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย ดังนั้นถ้าสามารถแยกและทำให้สารคล้าย
 FMRFamide ในก้านตาของกิ้งกูดดำบริสุทธิ์ได้ก็สามารถนำไปตรวจหาโครงสร้างของ
 ลำดับกรดอะมิโนและศึกษาถึงหน้าที่ของสารคล้าย FMRFamide ที่มีบทบาทต่อการดำรง
 ชีวิตของกิ้งกูดดำต่อไป

นอกจากนี้การทราบถึงโครงสร้างของสารคล้าย FMRFamide รูปแบบต่างๆ เป็นสิ่งที่
 น่าสนใจเนื่องจากพบว่าฮอร์โมนกลุ่มนี้มีรูปแบบต่างๆ มากมายในสัตว์เกือบทุกไฟลัม
 (Phylum) การทราบถึงโครงสร้างของสารคล้าย FMRFamide รูปแบบต่างๆ เหล่านั้นเพื่อเป็น
 แนวทางที่จะศึกษาบทบาทการทำงานของสารคล้าย FMRFamide รูปแบบต่างๆ ว่ามีบทบาท
 การทำงานแตกต่างกันหรือไม่อย่างไร และการที่มีฮอร์โมนคล้ายๆ กันเป็นจำนวนหลายๆ รูป
 แบบมีความสำคัญอย่างไร

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในการศึกษาสารคล้าย FMRFamide ได้มีรายงานการศึกษาการแยกและการทำให้บริสุทธิ์ FMRFamide และสารคล้าย FMRFamide ในสัตว์ต่างๆ มากมายตั้งแต่สัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลังไปจนถึงสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง (ตาราง 1) ซึ่งมีรายงานการแยกสกัด FMRFamide เป็นครั้งแรกจากปมประสาทของหอยสองฝา *Macrocallista nimbosa* โดยไพร์ชและกรีนเบิร์ก (Price and Greenberg. 1977) ได้ใช้เทคนิคทางโครมาโตกราฟีชนิด gel filtration, ion-exchange chromatography, thin layer chromatography และใช้วิธี Edman degradation ในการหาลำดับของกรดอะมิโน พบว่าเป็นนิวโรเปปไทด์นี้มีโครงสร้างเป็น tetrapeptide amide และมีลำดับกรดอะมิโนเป็น Phe-Met-Arg-Phe-NH₂ (FMRFamide) และพบว่า FMRFamide ปริมาณความเข้มข้น 10^{-8} โมลาร์ต่อลิตร สารนี้จะมีผลกระตุ้นอัตราการเต้นของหัวใจในหอยชนิดนี้

จากการศึกษาสารคล้าย FMRFamide ในระบบประสาทของไฮดรา *Hydra attenuata* โดยการสกัดด้วยกรดอะซิติกและปิโตรเลียมอีเทอร์ แล้วแยกผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟีชนิด gel filtration (sephadex G-50) และใช้วิธี radioimmunoassay (RIA) ติดตามสารคล้าย FMRFamide ซึ่งพบว่ามีปริมาณ 8 พิโคโมล/กรัม (Grimmerlikhuizen, Dockray and Schot. 1982) และมีรายงานการแยกสกัดและการทำให้บริสุทธิ์ในดอกไม้ทะเล *Anthopleura elegantissima* โดยนำมาสกัดด้วยกรดอะซิติก จากนั้นนำไปแยกผ่าน C18 Sep-Pak cartridge, cation exchange CM-Sephadex (C-25) และไปทำให้บริสุทธิ์ต่อด้วยกระบวนการ HPLC 3 ขั้นตอนและตรวจหาสารนี้ระหว่างการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี RIA หลังจากทำให้บริสุทธิ์แล้ว พบว่านิวโรเปปไทด์นี้มีลำดับกรดอะมิโนเป็น pGlu-Gly-Arg-Phe-NH₂ (pEGRFamide) (Grimmelikhuijzen and Graff. 1986) ส่วนในแมงกระพรุน *Chrysaora hysocella*, *Cyanea capillata* และ *Cyanea lamarckii* ได้นำหนวดและเนื้อเยื่อในชั้น subumbrella ectoderm มาแยกสกัดด้วยกรดอะซิติก จากนั้นนำสารสกัดมาแยกผ่านกระบวนการโครมาโตกราฟีชนิด C18 Sep-Pak cartridge, cation exchange sephadex (C-25) และ HPLC 3 ขั้นตอน ใช้วิธี RIA ตรวจวัดสารคล้าย FMRFamide พบว่ามีปริมาณสารนี้ประมาณ 55 นาโนโมลต่อตัว (Anderson, Moosler and Grimmelikhuijzen. 1992)

พวกหนอนตัวแบนมีการศึกษาในพยาธิตัวตืด *Moniezia expansa* ได้มีรายงานการแยกสกัดสารคล้าย FMRFamide ด้วยตัวทำละลาย acid alcohol (ethanol:0.7M HCl / 3:1) และนำไปทำให้บริสุทธิ์โดยแยกผ่าน C18 Sep-Pak cartridge, Sephadex G-50 (fine) และ HPLC 3 ขั้นตอน ติดตามสารคล้าย FMRFamide ด้วยวิธี RIA ในระหว่างการทำให้บริสุทธิ์ พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุล 785.4 ดาลตันและมีลำดับกรดอะมิโนเป็น Gly-Asn-Phe-Phe-Arg-

Phe-NH₂ (GNFFRFamide) (Maule and others. 1993) ส่วนในหนอนตัวแบน (Turbellarian) *Dugesia tigrina* ได้ทำการแยกสกัดโดยใช้ ethanol/0.7M HCl ในอัตราส่วน 3:1 (V/V) แล้วแยกผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟีชนิด gel filtration (Sephadex G-50) และ C18 Sep-Pak cartridge แล้วทำให้บริสุทธิ์ต่อยวกระบวนการทาง HPLC 3 ขั้นตอนและใช้วิธี RIA ในการติดตามสารคล้าย FMRFamide หลังจากทำให้บริสุทธิ์พบว่ามือน้ำหนักโมเลกุล 658.7 ดาลตัน และมีลำดับกรดอะมิโนเป็น Gly-Thr-Ile-Arg-Phe-NH₂ (GTIRFamide) (Johnston, Show and Halton. 1995) ในปี 1996 จอห์นสตันและคนอื่นๆ (Johnston and others. 1996) ได้แยกสกัดสารคล้าย FMRFamide ในหนอนตัวแบน *Bdelloura candida* ด้วยตัวทำละลาย ethanol/0.7 M HCl ในอัตราส่วน 3:1 แล้วแยกผ่าน C18 Sep-Pak Cartridge นำไปทำให้บริสุทธิ์ต่อการแยกผ่าน gel-permeation (sephadex G-50) และติดตามสารคล้าย FMRFamide ด้วยวิธี RIA และทำให้บริสุทธิ์ต่อยว HPLC 4 ขั้นตอน ได้สารคล้าย FMRFamide 2 รูปแบบดังนี้ FaRP1 และ FaRP2 มือน้ำหนักโมเลกุล 653.8 และ 596.1 ดาลตัน และหาลำดับกรดอะมิโนด้วยวิธี Edman degradation มีโครงสร้างดังนี้ FaRP1 คือ Gly-Tyr-Ile-Arg-Phe-NH₂ (GYIRFamide) และ FaRP2 คือ Tyr-Ile-Arg-Phe-NH₂ (YIRFamide)

ในปี 1989 คาวเดน, สเตรตตันและเดวิส (Cowden, Stretton and Davis. 1989) ได้ศึกษาสารคล้าย FMRFamide จากระบบประสาทของพวกนีมาโทด โดยการแยกสกัดสารนี้จากส่วนหัวของพยาธิตัวกลม *Ascaris suum* ด้วยสารละลาย acid methanol (เมทานอล:กรดอะซิติก:น้ำ / 90:1:9) นำไปแยกผ่าน C18 Sep-Pak cartridge ทำให้บริสุทธิ์โดยใช้กระบวนการ RP-HPLC 5 ขั้นตอน ใช้วิธี RIA ในการติดตามสารระหว่างการทำให้บริสุทธิ์และหาลำดับกรดอะมิโนด้วยวิธี Edman degradation พบว่าเป็นสาร heptapeptide (AF1) มีลำดับกรดอะมิโนเป็น Lys-Asn-Glu-Phe-Ile-Arg-Phe-NH₂ (KNEFIRFamide) ต่อมาในปี 1995 คาวเดนและสเตรตตัน (Cowden and Stretton. 1995) ได้ทำการศึกษาสารคล้าย FMRFamide ในสัตว์ชนิดเดียวกันนี้ โดยแยกสกัดจากส่วนหัวและหางของพยาธิตัวกลม โดยใช้ตัวทำละลาย acid methanol แล้วแยกผ่าน C18 Sep-Pak cartridge และทำให้บริสุทธิ์ต่อยวกระบวนการ RP-HPLC 7 ขั้นตอน ใช้ RIA ในการติดตามสารระหว่างการทำให้บริสุทธิ์ หาลำดับกรดอะมิโนด้วยวิธี Edman degradation และหาน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธี Matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) พบสารคล้าย FMRFamide 8 รูปแบบ AF3 Ala-Val-Pro-Gly-Val-Leu-Arg-Phe-NH₂ (AVPGVLRFamide), AF4 Gly-Asp-Val-Pro-Gly-Val-Leu-Arg-Phe-NH₂ (GDV-PGVLRFamide), AF5 Ser-Gly-Lys-Pro-Trp-Phe-Ile-Arg-Phe-NH₂ (SGKPTFIRFamide), AF7 Ala-Gly-Pro-Arg-Phe-Ile-Arg-Phe-NH₂ (AGPRFIRFamide), AF9 Gly-

Leu-Gly-Pro-Arg-Pro-Leu-Arg-Phe-NH₂ (GLGPRPLRFamide), AF10 Gly-Phe-Gly-Asp-Glu-Met-Ser-Met-Pro-Gly-Val-Leu-Arg-Phe-NH₂ (GFGDEMSMPGVLRamide), AF11 Ser-Asp-Ile-Gly-Ile-Ser-Glu-Asp-Asn-Phe-Leu-Arg-Phe-NH₂ (SDIGISEDNFLRFamide), AF12 Phe-Gly-Asp-Glu-Met-Ser-Met-Pro-Gly-Val-Leu-Arg-Phe-NH₂ (FGDEMSMPGVLRamide)

ส่วนในแม่เพรียง *Nereis virens* ได้แยกสกัดสารคล้าย FMRFamide จากระบบประสาทด้วยอะซีโตน แล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์ต่อด้วยกระบวนการ RP-HPLC 2 ขั้นตอน และติดตามสารคล้าย FMRFamide ด้วยวิธี RIA พบสารคล้าย FMRFamide 100-600 เฟมโตโมลต่อตัว แล้วนำไปหาน้ำหนักโมเลกุลและลำดับกรดอะมิโนพบว่า มีน้ำหนักโมเลกุล 615.32 ดาลตัน และมีลำดับกรดอะมิโนเป็น Phe-Met-Arg-Phe-NH₂ (FMRFamide) (Krajniak and Price. 1990) ส่วนนอแวนและคนอื่นๆ (Evans and others. 1991) ได้แยกสารคล้ายนิวโรเปปไทด์ (-RFamide) จากระบบประสาทส่วนกลางของปลิง *Hirudo medicinalis* โดยสกัดด้วยตัวทำละลาย metanol acetic acid (methanol:acetic acid:H₂O / 90:9:1) แล้วนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยการแยกผ่าน C18 Sep-Pak cartridge และ HPLC 4 ขั้นตอน ติดตามสารนี้ด้วยวิธี RIA หลังจากทำให้บริสุทธิ์แล้วพบว่ามีนิวโรเปปไทด์ 5 รูปแบบคือ Tyr-Met-Arg-Phe-NH₂ (YMRamide), Phe-Met-Arg-Phe-NH₂ (FMRFamide), Tyr-Leu-Arg-Phe-NH₂ (YLRamide), Phe-Leu-Arg-Phe-NH₂ (FLRamide) และ Gly-Gly-Lys-Tyr-Met-Arg-Phe-NH₂ (GGKYMRamide)

จากรายงานการศึกษาสารคล้าย FMRFamide ในสัตว์พวกมอลลัสโดยการแยกสกัดสารคล้าย FMRFamide จากปมประสาทของหอยทาก *Helix aspersa* ด้วยอะซีโตนแล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์ต่อด้วยกระบวนการ isocratic HPLC ติดตามสารนี้ในระหว่างการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี RIA พบว่ามีลำดับกรดอะมิโนเป็น Glu-Asn-Phe-Ile-Arg-Phe-NH₂ (ENFIRamide) (Price. 1982) ในปลาหมึกกระดอง *Sepia officinalis* ได้ทำการแยกสกัดสารคล้าย FMRFamide จากผิวหนังส่วนท้องของครีบน้ำตัยและขาด้วยกรดอะซิติก 0.1% และทำให้บริสุทธิ์โดยแยกผ่าน C18 Sep-Pak Cartridge และใช้กระบวนการ HPLC 3 ขั้นตอน ติดตามสารนี้ในระหว่างทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีตรวจผลการเพิ่มของจุดสีบนลำตัวของปลาหมึก (chromatophore bioassay) พบว่ามี 4 พิกที่แสดงผลทางชีววิทยา และมี 2 พิกที่ถูกชะในช่วงเวลาเดียวกับ Phe-Met-Arg-Phe-NH₂ (FMRFamide) และ Ala-Leu-Ser-Gly-Asp-Ala-Phe-Leu-Arg-Phe-NH₂ (ALSGDAFLRFamide) (Loi and others. 1996)

จากการศึกษาสารคล้าย FMRFamide ในสัตว์พวกครัสเตเชียโดยนำระบบประสาทส่วน pericardial organ ของกุ้งล็อบสเตอร์ *Homarus americanus* มาแยกสกัดด้วยตัวทำละลาย methanol/acetic acid (methanol:acetic acid / 99:1) จากนั้นนำ

ไปแยกผ่าน gel filtration chromatography แล้วไปทำให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วยกระบวนการทาง HPLC 3 ขั้นตอนโดยติดตามสารคล้าย FMRFamide ด้วยวิธี RIA นำไปศึกษาลำดับกรดอะมิโนพบว่ามิโครสร้างเป็น octapeptide amide 2 รูปแบบ คือ Ser-Asp-Arg-Asn-Phe-Leu-Arg-Phe-NH₂ (SDRNFLRFamide) และ Thr-Asn-Arg-Asn-Phe-Leu-Arg-Phe-NH₂ (TNRNFLRFamide) (Trimmer, Kobierski and Kravitz. 1987) ส่วนในกุ้งเครย์ฟิช *Procambarus clarkii* ได้ทำการแยกสกัดจากส่วน pericardial organ ซึ่งใช้ตัวทำละลาย methanol:acetic acid:water (90:9:1) แล้วนำไปแยกผ่าน C18 Sep-Pak cartridge และ HPLC 2 ขั้นตอน พบว่าสารที่แยกได้นี้มีผลต่อความแรงและเพิ่มอัตราการเต้นของหัวใจในกุ้ง (Mercier.1991) ต่อมาในปี 1993 เมอร์เซียและคนอื่นๆ (Mercier and others. 1993) ได้แยกสกัดและทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย FMRFamide จากส่วน pericardial organ ของกุ้งชนิดเดียวกัน ด้วยตัวทำละลาย methanol:acetic acid:water (90:9:1) ทำให้บริสุทธิ์โดยแยกผ่าน C18 Sep-Pak cartridge และ RP-HPLC 2 ขั้นตอน และตรวจหาเปปไทด์ -Arg-Phe-NH₂ ด้วยวิธี RIA จากการหาลำดับกรดอะมิโนด้วยวิธี Edman degradation ได้เปปไทด์ที่มีโครงสร้าง 2 รูปแบบดังนี้คือ (NF₁) Asn-Arg-Asn-Phe-Leu-Arg-Phe-NH₂ (NRNFLRFamide) และ (DF₂) Asp-Arg-Asn-Phe-Leu-Arg-Phe-NH₂ (DRNFLRFamide) ส่วนในปูม้า (blue crab) *Callinectes sapidus* ได้ทำการแยกสกัดสารนี้จาก pericardial organ และ thoracic ganglia ด้วยอะซิโตน ได้ทำให้บริสุทธิ์โดยแยกผ่านกระบวนการทาง HPLC และตรวจหาสารคล้าย FMRFamide โดยวิธี RIA หลังจากทำให้บริสุทธิ์แล้วนำไปหาน้ำหนักโมเลกุลและลำดับกรดอะมิโนพบว่า มีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 1159 ดาลตัน และมีลำดับกรดอะมิโนเป็น Gly-Tyr-Asn-Arg-Ser-Phe-Leu-Arg-Phe-Arg-NH₂ (GYNRSFLRFamide) (Krajniak. 1991) ต่อมาในปี 1993 ยาสุดะ, นายาและ นากานิชิ (Yasuda, Naya and Nakanishi. 1993) ได้แยกสกัดสารคล้าย FMRFamide จากก้านตาของปูม้า *Callinectes sapidus* ด้วยอะซิโตนแล้วนำไปแยกผ่านคอลัมน์ gel filtration (Sephadex G-75) และ HPLC 2 ขั้นตอน และติดตามสารคล้าย FMRFamide โดยวิธี carboxy terminal analysis หลังจากทำให้บริสุทธิ์แล้วพบว่า มีสารคล้าย FMRFamide 2 รูปแบบ จากการหาโครงสร้างลำดับกรดอะมิโนเป็นดังนี้คือ CP1 ประกอบด้วย pGlu-Gly-Arg-Phe-NH₂ (pEGRFamide) และ CP2 ประกอบด้วย pGlu-Leu-Gly-Arg-Phe-NH₂ (pELGRFamide)

ในปี ค.ศ.1989 โรบบ์, แพ็คแมนและอีแวนส์ (Robb, Packman and Evans. 1989) ได้ทำการศึกษาในตั๊กแตน *Schistocerca gregaria* โดยแยกสกัดจาก thoracic nerve cord ด้วยตัวทำละลาย acidified methanol (methanol:acetic acid:water / 90:9:1) จากนั้นนำไปแยกผ่าน gel filtration, chromatography, C18 Sep-Pak cartridge และไปทำให้

บริสุทธิ์ด้วย HPLC 2 ขั้นตอน และติดตามสารคล้าย FMRFamide ด้วยวิธี RIA จากการศึกษาลำดับกรดอะมิโนพบว่า มีลำดับกรดอะมิโนเป็น Pro-Asp-Val-Asp-His-Val-Phe-Leu-Arg-Phe-NH₂ (PDVDHVFLRFamide) ในแมลงวัน *Calliphora vomitoria* ได้มีการแยกสกัดและศึกษาโครงสร้างของ neuropeptide (calliFMRFamide) จาก thoracic ganglia ด้วยตัวทำละลาย 80% methanol/0.1M HCl และนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วย HPLC 5 ขั้นตอนติดตามสารคล้าย FMRFamide ในระหว่างการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี RIA แยกสารคล้าย FMRFamide ได้ 14 รูปแบบดังนี้ Thr-Pro-Gln-Gln-Asp-Phe-Met-Arg-Phe-NH₂ (TPQQDFMRFamide), Thr-Pro-Ser-Gln-Asp-Phe-Met-Arg-Phe-NH₂ (TPSQDFMRFamide), Pro-Ser-Pro-Gln-Asp-Phe-Met-Arg-Phe-NH₂ (PSPQDFMRFamide), Lys-Pro-Asn-Gln-Asp-Phe-Met-Arg-Phe-NH₂ (KPNQDFMRFamide), Ala-Pro-Gly-Gln-Asp-Phe-Met-Arg-Phe-NH₂ (APGQDFMRFamide), Ala-Ser-Gly-Gln-Asp-Phe-Met-Arg-Phe-NH₂ (ASGQDFMRFamide), Ala-X-Gly-Gln-Asp-Phe-Met-Arg-Phe-NH₂ (AXGQDFMRFamide), Gly-Ala-Asn-Asp-Phe-Met-Arg-Phe-NH₂ (GANDFMRFamide), Ser-Val-Asn-Thr-Lys-Asn-Asp-Phe-Met-Arg-Phe-NH₂ (SVNTKNDFMRFamide), Ser หรือ Thr หรือ Ala-Pro-Asn-Arg-Asp-Phe-Met-Arg-Phe-NH₂ (S,T,APNRDFMRFamide) Pro-Asp-Asn-Phe-Met-Arg-Phe-NH₂ (PDNFMRFamide), Ala-Ala-Gly-Gln-Asp-Asn-Phe-Met-Arg-Phe-NH₂ (AAGQDNFMRFamide), Ala-Gly-Gln-Asp-Gly-Phe-Met-Arg-Phe-NH₂ (AGQDGFMRamide), (Ala)-Pro-Asn-Gln-Pro-Ser-Asp-Asn-(Met)-Ile-Arg-Phe-NH₂ (APNQPSDNMIRamide) (Duve and others. 1992) ส่วนวินสตรีและแลมบร้าว (Veenstra and Lambrou. 1995) ได้แยกสกัดสารคล้าย FMRFamide จากทางเดินอาหารส่วนกลาง (midgut) ของแมลงสาบอเมริกัน *Periplaneta americana* โดยแยกสกัดด้วยตัวทำละลาย Benett's mixture ซึ่งประกอบไปด้วย 1 M hydrochloric acid, 5% formic acid, 1% sodium chloride, 1% trifluoroacetic acid แล้วทำให้บริสุทธิ์โดยแยกผ่าน C18 Sep-Pak cartridge และ HPLC 4 ขั้นตอนและตรวจหาสารคล้าย FMRFamide ด้วยวิธี RIA จากการห่าน้ำหนักโมเลกุลและโครงสร้างลำดับกรดอะมิโน พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 1316.03 ดาลตัน และมีลำดับกรดอะมิโนเป็น Ala-Asn-Arg-Ser-Pro-Ser-Leu-Arg-Leu-Arg-Phe-NH₂ (ANRSPSLRLRFamide) ส่วนผีเสื้อกลางคืน *Manduca sexta* ได้มีการแยกสกัดสารคล้าย FMRFamide ในส่วน segmental ganglion ด้วยตัวทำละลาย methanol : water (50:50) และแยกผ่าน C18 Sep-Pak cartridge และ HPLC 2 ขั้นตอนแล้วติดตามสารคล้าย FMRFamide ด้วยวิธี ELISA สามารถแยกเปปไทด์ได้ 2 รูปแบบมีการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนดังนี้ (Mas FLRFamide II) Gly-Asn-Ser-Phe-Leu-Arg-Phe-NH₂

(GNSFLRFamide) และ (Mas FLRFamide III) pGlu-Asp-Val-Val-His-Ser-Phe-Leu-Arg-Phe-NH₂ (pEDVVHSFLRFamide) (Kingan and others. 1996)

ส่วนในสัตว์ปีกได้มีการศึกษาสารคล้าย FMRFamide ในไก่ โดยนำส่วนสมองของไก่แยกสกัดด้วยน้ำเดือดแล้วทำให้เป็นกรดด้วยกรดอะซิติก 0.5 M จากนั้นนำไปผ่าน C18 Sep-Pak cartridge, CM sephadex ion-exchange chromatography, gel filtration (Sephadex G-25) แล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์ต่อด้วย HPLC 2 ขั้นตอน และติดตามสารคล้าย FMRFamide ด้วยวิธี RIA หลังจากทำให้บริสุทธิ์แล้วนำไปหาลำดับกรดอะมิโนพบว่าประกอบด้วย Leu-Pro-Leu-Arg-Phe-NH₂ (LPLRFamide) (Dockray and others. 1983)

ในหนูได้มีการศึกษาสารคล้าย FMRFamide ในสมองซึ่งสกัดในน้ำเดือดเช่นเดียวกัน แล้วทำให้บริสุทธิ์โดยใช้กระบวนการทางโครมาโตกราฟี คือ Sep-Pak cartridge, ion-exchange chromatography (CM sephadex), gel filtration (G-50) และติดตามสารคล้าย FMRFamide ด้วยวิธี RIA พบว่าในไฮโปธาลัมัสและไฮโปทาลามัสมีสารนี้ปริมาณสูง ส่วนในซีรีเบลลัม และ striatum พบว่ามีสารนี้อยู่ในปริมาณที่ต่ำ (Dockray and Williams. 1983) ต่อมาได้มีการศึกษาสารคล้าย FMRFamide ในสมองของหนูโดยสกัดด้วยกรดอะซิติก 1 N แล้วนำไปแยกผ่าน C18 Sep-Pak cartridge นำไปทำให้บริสุทธิ์ต่อด้วยกระบวนการ HPLC และใช้วิธีทาง RIA ในการติดตามสารคล้าย FMRFamide หลังจากทำให้บริสุทธิ์แล้วนำไปหาลำดับกรดอะมิโนพบว่าเป็น Phe-Leu-Phe-Gln-Pro-Gln-Arg-Phe-NH₂ (F-8-F-NH₂) (FLFQPQRFamide) (Majane, Panula and Yang. 1989)

ในปี ค.ศ. 1985 หยางและคนอื่นๆ (Yang and others. 1985) ได้แยกสกัดสารคล้าย FMRFamide จากสมองของวัวจากส่วน medulla oblongata และ midbrain ด้วยกรดอะซิติก นำมาทำให้บริสุทธิ์โดยแยกผ่าน C18 Sep-Pak cartridge, affinity column chromatography แล้วแยกผ่าน HPLC 2 ขั้นตอน และตรวจหาสารคล้าย FMRFamide ด้วยวิธี RIA หลังจากทำให้บริสุทธิ์ แล้วนำไปหาลำดับกรดอะมิโนได้ 2 รูปแบบคือ Ala-Gly-Glu-Gly-Leu-Ser-Ser-Pro-Phe-Trp-Ser-Leu-Ala-Ala-Pro-Gln-Arg-Phe-NH₂ (AGEGLSSPFWSLAAPQRFamide) และ Phe-Leu-Phe-Gln-Pro-Gln-Arg-Phe-NH₂ (FLFQPQRFamide)

ในปี ค.ศ. 1991 สิทธิกรกุล, สเตรตตันและคาวเดน (Sithigorngul, Stretton and Cowden. 1991) ได้พัฒนาวิธี Dot-ELISA ในการติดตามเปปไทด์ที่มีขนาดเล็กและปริมาณน้อยในระดับเฟมโตโมลหลังจากผ่านกระบวนการแยกด้วย HPLC แล้วซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายและไม่ยุ่งยากและไม่ต้องใช้สารกัมมันตภาพรังสีเหมือน RIA โดยใช้วิธีนี้ในการติดตาม

สารคล้ายเปปไทด์ CCK และสารคล้าย FMRFamide ซึ่งเป็นเปปไทด์ขนาดเล็กและมีปริมาณน้อยในระหว่างการทำให้บริสุทธิ์ของสารทั้งสองชนิดนี้จากพยาธิไส้เดือน *Ascaris suum* ต่อมาในปี 1995 สิทธิกรกุลและสเตรตตัน (Sithigorngul and Stretton. 1995) ก็ได้ทำการทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย FMRFamide จากระบบประสาทของหนอนตัวกลม *Caenorhabditis elegans* โดยแยกสกัดด้วยสารละลาย methanol acetic acid (methanol:acetic acid:H₂O / 90:1:9) ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ด้วย HPLC 8 ขั้นตอนและใช้วิธี Dot-ELISA ในการติดตามเปปไทด์ในระหว่างการทำให้บริสุทธิ์ เมื่อศึกษา น้ำหนักโมเลกุลและลำดับกรดอะมิโนพบว่า *C. elegans* มีสารคล้าย FMRFamide 9 รูปแบบซึ่งมีน้ำหนักกรดอะมิโนและน้ำหนักโมเลกุล (ดาลตัน) ดังนี้ Lys-His-Glu-Tyr-Leu-Arg-Phe-NH₂ (KHEYLRFamide) 991.9, Lys-Pro-Ser-Phe-Val-Arg-Phe-NH₂ (KPSFVRFamide) 879.9, Lys-Asn-Glu-Phe-Ile-Arg-Phe-NH₂ (KNEFIRFamide) 952.6, Arg-Asn-Lys-Phe-Glu-Phe-Ile-Arg-Phe-NH₂ (RNKFEFIRFamide) 1256.2, Ala-Pro-Glu-Ala-Ser-Pro-Phe-Ile-Arg-Phe-NH₂ (APEASPFIRFamide) 1134.1, His-Phe-Tyr-Asn-Phe-Ser-Ser-Glu-Ser-Arg-Lys-Pro-Asn-Phe-Leu-Arg-Phe-NH₂ (HFYNFSSESARKPNFLRFamide) 2175.6, Ser-Asp-Asn-Pro-Phe-Leu-Arg-Phe-NH₂ (SDNPFLRFamide) 994.8, Ser-Ala-Asp-Pro-Asn-Phe-Leu-Arg-Phe-NH₂ (SADPNFLRFamide) 1065.5, Ala-Ala-Ala-Asp-Pro-Asn-Phe-Leu-Arg-Phe-NH₂ (AAADPNFLRFamide) 1120.5

เนื่องจากมีรายงานการตรวจพบนิวโรเปปไทด์ในก้านตาของกิ้งกูดดำพบสารคล้าย FMRFamide จะกระจายอยู่ในเซลล์ประสาทในก้านตากิ้งกูดดำ (วีระวรรณ สิทธิกรกุล. และคนอื่นๆ 2537) ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงเป็นการการแยกและทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย FMRFamide จากก้านตาของกิ้งกูดดำโดยกระบวนการ RP-HPLC ระบบต่างๆ ประกอบกับใช้วิธี Dot-ELISA ในการติดตามสารคล้าย FMRFamide ใน fraction ต่างๆ หลังจากผ่านการแยกในขั้นตอนต่างๆ ซึ่งคาดว่าจะสามารถทำได้อย่างมีประสิทธิภาพและรวดเร็วเพราะวิธี Dot-ELISA เป็นวิธีที่มีความไว (sensitivity) สูงเทียบเท่ากับ RIA แต่ไม่สิ้นเปลืองวัสดุและมีความรวดเร็วกว่า RIA มาก (Sithigorngul, Stretton and Cowden. 1991)

ตาราง 1 การแยกสกัดและทำให้บริสุทธิ์ FMRFamide และสารคล้าย FMRFamide (FMRFamide-like substances) ในสัตว์ต่างๆ

Name/Year	Animals	Extraction	Purification	Detection	Result
Price and Greenberg 1977	<i>Macrocallista nimbosa</i> (ganglia)	-	Gel filtration Ion exchange TLC	Bioassays (heart muscle)	FMRFamide
Price 1982	<i>Helix aspersa</i> (ganglia)	Acetone	RP-HPLC	RIA	ENFIRFamide
Grimerlikhujzen and others 1982	<i>Hydra attenuata</i> (whole)	0.5 M Acetic acid	Gel filtration Sephadex G-50	RIA	8 pmol/gram
Grimerlikhujzen and Graft 1986	<i>Anthopleura elegantissima</i> (whole)	0.5 M Acetic acid	Cation exchange CM-Sephadex C-25 RP-HPLC	RIA	pEGRFamide
Anderson and others 1992	<i>Chrysaora hypocella</i> <i>Cyanea capillata</i> <i>Cyanea lamakii</i> (tentacle and subumbrella tissue)	0.5 M Acetic acid	Cation exchange CM-Sephadex C-25 RP-HPLC	RIA	55 nmol/animal
Maule and others 1993	<i>Moniezia expansa</i> (whole)	Ethanol: 0.7 M HCl (3:1)	Gel filtration Sephadex G-50 RP-HPLC	RIA	GNFFRFamide
Johnston and others 1995	<i>Dugesia tigrina</i> (whole)	Ethanol: 0.7 M HCl (3:1)	Gel filtration Sephadex G-50 RP-HPLC	RIA	GTIRFamide
Johnston and others 1996	<i>Bdelloura candida</i> (whole)	Ethanol: 0.7 M HCl (3:1)	Gel filtration Sephadex G-50 RP-HPLC	RIA	GYIRFamide YIRFamide
Cowden and others 1989	<i>Ascaris suum</i> (head)	Methanol: acetic acid:H ₂ O (90:1:9)	RP-HPLC	RIA	KNEFIRFamide

ตาราง 1 ต่อ

Name/Year	Animals	Extraction	Purification	Detection	Result
Cowden and Stretton 1995	<i>Ascaris suum</i> (head+tail)	Methanol: acetic acid:H ₂ O (90:1:9)	RP-HPLC	RIA	AVPGVLRamide GDVPGVLRamide SGKPTFIRamide AGPRFIRamide GLGPRPLRamide GFGDE- MSMPGVLRamide SDI- GISEDNFLRamide FGDE- MSMPGVLRamide
Sithigorngul and Stretton 1995	<i>Caenorhab- ditis elegans</i> (whole)	Methanol: acetic acid:H ₂ O (90:1:9)	RP-HPLC	Dot- ELISA	KHEYLRamide KPSFVRamide KNEFIRamide RNKFEFIRamide APEASPFIRamide HFYNFSS- ESRKNPFLRamide SDNPFLRamide SADPNFLRamide AAADPNFLRamide
Krajniak and Price 1990	<i>Nereis virens</i> (ganglia)	Acetone	RP-HPLC	RIA	100-600 fmol/animal FMRamide
Evans and others 1991	<i>Hirudo medicinalis</i> (central nervous system)	Methanol: acetic acid:H ₂ O (90:9:1)	RP-HPLC	RIA	YMRamide FMRamide YLRamide FLRamide GGKYMRamide
Trimmer and others 1987	<i>Homarus americanus</i> (pericardial organ)	Methanol: acetic acid (99:1)	Gel filtration Sephadex G-25 RP-HPLC	RIA	SDRNFLRamide TNRNFLRamide

ตาราง 1 ต่อ

Name/Year	Animals	Extraction	Purification	Detection	Result
Krajniak 1991	<i>Callinectes sapidus</i> (pericardial organ and thoracic ganglia)	Acetone	RP-HPLC	RIA	GYNRSFLRFamide
Mercier and others 1993	<i>Procamburus clakii</i> (pericardial organ)	Methanol: acetic acid:H ₂ O (90:9:1)	RP-HPLC	RIA	NRNFLRFamide DRNFLRFamide
Yasuda and others 1993	<i>Callinectes sapidus</i> (eyestalk)	Acetone	Gel filtration Sephadex G-75 RP-HPLC	Carboxy terminal analysis	pEGRFamide pELGRFamide
Sithigorngul and others 1998	<i>Macrobra- chium rosenbergii</i> (eyestalk)	Methanol: acetic:H ₂ O (90:1:9)	RP-HPLC	Dot- ELISA	DRNFLRFamide ADKNFLRFamide NYDKNFLRFamide APALRLRFamide DRTPALRLRFamide
Robb and others 1989	<i>Schitocera gregaria</i> (thoracic nerve cord)	Methanol: acetic acid:H ₂ O (90:9:1)	Gel filtration Sephadex G-15 RP-HPLC	RIA	PDVDHVFLRFamide
Duve and others 1992	<i>Calliphora vomitoria</i> (thoracic ganglia)	80 % methanol: 0.1 M HCl	RP-HPLC	RIA	TPQQDFMRFamide TPSQDFMRFamide PSPQDFMRFamide KPNQDFMRFamide APGQDFMRFamide ASGQDFMRFamide AXGQDFMRFamide GANDFMRFamide SV- NTKNDFMRFamide

ตาราง 1 ต่อ

Name/Year	Animals	Extraction	Purification	Detection	Result
					STPNRDFMRFamide APDNFMRFamide AAGQDNFMRFamide AGQDGFMRFAmide
Veenstra and Lambrou 1995	<i>Periplaneta americana</i> (midgut)	Benett 's mixture	RP-HPLC	RIA	AN-RSPSLRLRFamide
Kingan and others 1996	<i>Manduca sexta</i> (segmental ganglia)	Methanol: water (50:50)	RP-HPLC	ELISA	GNSFLRFamide pE-DVVHSFLRFamide
Dockray and others 1983	Chicken (brain)	Boiling water	Ion exchange (CM-Sephadex) Gel filtration Sephadex G-25 RP-HPLC	RIA	LPLRFamide
Majane and others 1989	Rat (brain)	Acetic acid 1 Normal	RP-HPLC	RIA	FLFQPQRFamide
Yang and others 1985	Cow (brain)	Acetic acid 1 Normal	Affinity chromatography RP-HPLC	RIA	AGEGLSSP-FWSLAAPQRFamide FLFQPQRFamide

Dot-ELISA = Dot-Enzyme Linked Immunosorbent Assay

ELISA = Enzyme Linked Immunosorbent Assay

RIA = Radioimmunoassay

RP-HPLC = Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography

TLC = Thin Layer Chromatography

ชีววิทยาของกุ้งกุลาดำ

กุ้งกุลาดำเป็นกุ้งทะเลชนิดหนึ่ง มีลำตัวค่อนข้างใหญ่ จึงมีชื่อเรียกโดยทั่วไปว่า Giant Tiger Prawn และมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Peneaus monodon* Fabricius (Solis. 1988)

กุ้งกุลาดำเป็นกุ้งที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในวงศ์ Penaeidae ถิ่นที่อาศัยของกุ้งกุลาดำ ได้แก่ น่านน้ำแถบใต้หวัน ไทย มาเลเซีย อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ และที่พบมากได้แก่ ออสเตรเลีย และอินเดีย กุ้งชนิดนี้อยู่ในเขตร้อน ชอบอาศัยอยู่บริเวณน้ำลึกห่างออกจากฝั่ง และชอบพื้นที่ที่เป็นดินทราย สามารถทนอยู่ที่น้ำที่อุณหภูมิสูง และความเค็มต่ำ เช่น บริเวณป่าชายเลน เป็นกุ้งที่มีการเจริญเติบโตรวดเร็ว (วัลลภ คงเพิ่มพูน. 2531) สำหรับประเทศไทย พบกุ้งชนิดนี้มากที่บริเวณนอกฝั่งทะเลจังหวัดชุมพรถึงนครศรีธรรมราช และทางด้านทะเลอันดามัน บริเวณนอกฝั่งของจังหวัดระนองและภูเก็ต ชอบอาศัยอยู่ในที่พื้นดินเป็นดินทรายปนโคลน หรือทรายปนเปลือกหอยและหินปะการัง กุ้งกุลาดำจะวางไข่ตลอดทั้งปี (ปัญญา สุวรรณสมุท. 2534)

การจัดลำดับหมวดหมู่ทางอนุกรมวิธานของกุ้งกุลาดำ มีการจัดลำดับดังนี้ (Holthuis. 1980)

Phylum	Arthropoda
Class	Crustacean
Subclass	Malacostraca
Order	Decapoda
Suborder	Natantia
Infraorder	Penaeidae
Family	Penaeidae
Genus	Penaeus
Species	monodon

ลักษณะทั่วไป

กุ้งกุลาดำเป็นกุ้งที่มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว ในขณะที่ยังมีชีวิตอยู่ลำตัวจะมีสีม่วงแดง มีแถบสีน้ำตาลหรือดำพาดขวางลำตัวเป็นปล้องๆ โดยขาว่ายน้ำมีสีเหลืองเป็นปล้องๆ เปลือกหัวเกลี้ยงไม่มีขน หนวดมีสีดำไม่มีลาย ฟันกรีด้านบนมี 7-8 ซี่ ด้านล่าง 3 ซี่ ช่องด้านกรีดทั้งสองด้าน มีลักษณะแคบและยาวไม่ถึงฟันกรีดอันสุดท้าย ที่ขาเดินคู่ที่ 5 ไม่มีระยางค์อันนอก (วัลลภ คงเพิ่มพูน. 2531)

กุ้งกุลาดำมีลำตัวเป็นข้อปล้อง ทั้งหมดมีประมาณ 19 ข้อปล้อง แต่ละปล้องมีระยางค์ 1 คู่ ระยางค์แต่ละคู่มีหน้าที่แตกต่างกัน ลำตัวของกุ้งแบ่งออกได้ 3 ส่วนใหญ่ๆ คือ หัว อก และ

ลำตัว ส่วนหัวมี 5 ปล้อง แต่รวมเป็นปล้องเดียว มีเปลือกคลุม เปลือกหุ้มตัวตอนหน้าสุดของปล้องที่ 1 จะยื่นเป็นพื้นแหลมไปข้างหน้าเรียกว่า “กริ” ได้กริมีตาหนึ่งคู่ ปากกึ่งอยู่ระหว่างขากรรไกร ส่วนหัวมีระยะ 5 คู่ ซึ่ง 2 คู่แรกเป็นหมวดใช้ในการสัมผัส ระยะคู่ที่ 3 ได้แก่ขากรรไกรล่าง มีหน้าที่ในการคบเคี้ยวอาหาร ส่วนระยะคู่ที่ 4 และคู่ที่ 5 เป็นขากรรไกรบน มีหน้าที่เช่นเดียวกับขากรรไกรล่าง ส่วนอกมี 8 ปล้อง ได้แก่ ปล้องที่ 6-13 ระยะ 3 คู่แรก (ระยะคู่ที่ 6, 7 และ 8) อยู่บนอกเรียกว่า maxillipods มีหน้าที่ช่วยในการกินอาหาร ระยะคู่ที่ 9, 10 และ 11 มีลักษณะเป็นก้าม ก้ามแต่ละคู่จะมีขนาดและความยาวใกล้เคียงกัน อันเป็นลักษณะเฉพาะของกุ้งทะเลในวงศ์ Penaeidae ระยะสามคู่นี้มีหน้าที่ช่วยในการจับฉวยอาหารเข้าปากหรือป้องกันตัวเมื่อมีภัย ส่วนระยะคู่ที่ 12 และคู่ที่ 13 เป็นขาสำหรับเดิน เคลื่อนไหว และทำความสะอาดลำตัว ส่วนลำตัวมี 6 ปล้อง เปลือกปล้องท้องอันที่ 2 ไม่ทับกับปล้องแรก ระยะคู่ที่ 14, 15, 16, 17 และ 18 มีลักษณะคล้ายใบพาย ใช้สำหรับว่ายน้ำ ส่วนระยะคู่ที่ 19 หรือ หาง ประกอบด้วย แพนหางและหางรูปพัด สามารถยกขึ้นลงได้ (บรรจง เทียนสงรัสมิ. 2529; บังอร ศรีมุกดา. 2530) (ภาพประกอบ 1)

วงจรชีวิต

กุ้งกุลาดำวางไข่ในทะเล กุ้งที่มีอายุประมาณ 12-18 เดือน จะวางไข่ในทะเลลึกที่ระดับน้ำประมาณ 15-30 เมตร ใกล้กับพื้นท้องทะเล กุ้งกุลาดำขนาด 70-150 กรัม จะวางไข่ประมาณ 1,000,000 ฟอง (บรรจง เทียนสงรัสมิ. 2529; วัลลภ คงเพิ่มพูน. 2531) แม้กุ้งจะใช้เวลาวางไข่ครั้งหนึ่งๆ ประมาณ 3-5 นาที ไข่ที่ผสมแล้วขณะที่ปล่อยสู่ทะเลใหม่ๆ จะมีลักษณะกลม ไข่จะค่อยๆ พัฒนาจนฟักเป็นตัว ภายในเวลาประมาณ 15 ชั่วโมง กุ้งวัยอ่อนจะพัฒนาการเปลี่ยนรูปร่างไปตามขั้นตอน จากนั้นตัวอ่อนจะค่อยๆ เคลื่อนตัวเข้าหาชายฝั่งบริเวณป่าไม้ชายเลนเพื่อดำรงชีวิตและเลี้ยงตัวอยู่ในบริเวณนี้จนกระทั่งโตเต็มวัยจึงอพยพกลับสู่ทะเลและผสมพันธุ์วางไข่ต่อไป (บรรจง เทียนสงรัสมิ 2530; บังอร ศรีมุกดา. 2530; วัลลภ คงเพิ่มพูน. 2531)

เปลือกกุ้งเป็นอวัยวะที่ไม่สามารถที่จะเพิ่มขนาดได้ดังเช่น กระดองเต่าหรือเปลือกหอย ดังนั้นในการเพิ่มขนาดตัวของกุ้งแต่ละครั้งจึงจำเป็นต้องสลัดเอาเปลือกเก่าทิ้งไป แล้วสร้างเปลือกใหม่ที่มีขนาดใหญ่ขึ้นมาแทน กุ้งจะเริ่มลอกคราบตั้งแต่ฟักออกจากไข่เพียงไม่กี่ชั่วโมง และลอกคราบไปเรื่อยๆ จนชั่วชีวิต ก่อนที่กุ้งจะลอกคราบจะมีการสะสมอาหารในร่างกายมากกว่าปกติ โดยเฉพาะสารที่สร้างเปลือก เพราะเปลือกจะต้องแข็งโดยเร็วหลังจากลอกคราบแล้ว เมื่อกุ้งสลัดเปลือกออกหมดลำตัวจะขยายใหญ่ขึ้น และเปลือกจะแข็งตัวภายใน 2-8 ชั่วโมง

การลอกคราบของกุ้งแต่ละครั้ง จะควบคุมโดยประสาทส่วนกลางและฮอร์โมนที่อยู่ในก้านตา ดังนั้นถ้ามีการตัดก้านตาออกจะทำให้กุ้งลอกคราบได้เร็วขึ้น และรังไข่ก็เจริญขึ้นเช่นเดียวกัน แต่โดยทั่วไปแล้วในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมกุ้งจะใช้เวลาในการลอกคราบห่างกันครั้งละประมาณ 22-27 วัน และหลังจากที่กุ้งได้รับการผสมจากเชื้อตัวผู้แล้วประมาณ 30-45 นาที จะเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงภายในไข่และฟักออกเป็นตัวภายใน 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นตัวอ่อนจะเปลี่ยนแปลงไปเรื่อยๆ จนกระทั่งโตเต็มที่ (ปิยะพงษ์ โชติพันธ์. 2529; วัลลภ คงเพิ่มพูน. 2531)

การสืบพันธุ์

การผสมพันธุ์ของกุ้งจะเริ่มขึ้นเมื่อกุ้งมีอายุประมาณ 8 เดือน (ปิยะพงษ์ โชติพันธ์, 2529) โดยธรรมชาติแล้วกุ้งกุลาดำจะผสมพันธุ์กันได้ก็ต่อเมื่อตัวเมียผ่านการลอกคราบใหม่ๆ เท่านั้น เมื่อตัวผู้เห็นตัวเมียลอกคราบใหม่ๆ จะพยายามว่ายน้ำเข้าประกบ ในระยะนี้ถ้าตัวผู้หิวจัดกุ้งตัวเมียอาจจะกินกุ้งตัวเมียได้ แต่ถ้าอาหารสมบูรณ์ กุ้งไม่หิว กุ้งตัวผู้จะพยายามเคล้าเคลียเร่งเร้าให้ตัวเมียว่ายน้ำไปด้วยกัน ถ้าสำเร็จกุ้งทั้งคู่จะว่ายน้ำขานานกันไป โดยกุ้งตัวผู้จะอยู่ข้างล่างและตัวเมียอยู่ข้างบน เมื่อได้จังหวะจะหงายท้องชิดพร้อมกับถายน้ำเชื้อให้กุ้งตัวเมีย กุ้งชนิดนี้ส่วนมากจะผสมพันธุ์ในเวลากลางคืน โดยตัวผู้จะสอดอวัยวะที่เรียกว่าพีเทสมา (Petasma) เข้าไปในอวัยวะเพศเมียที่เรียกว่าทิลคัม (Thelycum) พร้อมกับปล่อยน้ำเชื้อไว้ในถุงเก็บน้ำเชื้อ เพื่อรอโอกาสผสมกับไข่ในระยะหลัง เมื่อไข่แก่และสุกเต็มที่จะถูกขับออกมาทางช่องเปิดตรงโคนขาเดินคู่ที่ 3 และจะได้รับการผสมกับน้ำเชื้อตัวผู้ซึ่งจะไหลออกจากถุงเก็บน้ำเชื้อทางรูเปิดเล็กๆ ที่บริเวณขาเดินคู่ที่ 4 ของตัวเมีย แม้กุ้งใช้เวลาวางไข่ครั้งหนึ่งๆ ประมาณ 3-5 นาที ไข่ที่ผสมแล้วขณะที่ถูกขับออกมาใหม่ๆ จะมีลักษณะกลม มีเมือกห่อหุ้ม ไข่จะค่อยๆ เปลี่ยนไปเป็นรูปผลึก ในระยะหลังในระยะนี้ ไข่จะมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.25 มิลลิเมตร ไข่กุ้งในตระกูล Penaeus โดยทั่วไปจะหนักกว่าน้ำทะเลเล็กน้อยจึงมักจม แต่บางแห่งกระแสน้ำอาจจะพัดพาเอาไข่บางส่วนขึ้นมาผิวน้ำได้ ไข่ที่ผสมแล้วที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส จะเจริญและฟักออกเป็นตัวภายในเวลา 15 ชั่วโมง จากนั้นลูกกุ้งจะมีพัฒนาการและเปลี่ยนรูปร่างไปตามขั้นตอน (บรรจง เทียนสงรัสมิ. 2529)

ความแตกต่างของกุ้งกุลาดำเพศผู้และเพศเมีย

กุ้งกุลาดำเป็นสัตว์ที่มีเพศแยกกัน โดยปกติกุ้งเพศเมียมักจะมีขนาดใหญ่กว่ากุ้งเพศผู้ที่อายุเท่ากัน การที่จะแยกได้ว่าเป็นกุ้งเพศเมียหรือกุ้งเพศผู้ได้นั้น สังเกตได้จากกุ้งเพศผู้จะมีพีเทสมาซึ่งพัฒนามาจากส่วนของแขนงอินโน (endopod) ของระยางค์ว่ายน้ำคู่ที่หนึ่ง พีเทสมามีลักษณะคล้ายเตี้อย่างแข็ง 2 อันซ้ายขวาติดกันด้วยคิวติเคิล (cuticle) บางๆ ทับซ้อนกันที่บริเวณโคนขา และสามารถคลี่ออกเป็นแผ่นกว้างได้ กุ้งวัยรุ่นเพศผู้ที่มีพีเทสมาจะยึดติดกับส่วนโคนขาว่ายน้ำ เมื่อการลอกคราบครั้งสุดท้ายเพื่อเป็นกุ้งโตเต็มวัย ขอบของพีเทสมาประมาณ

ครึ่งหนึ่งจะแผ่ออกติดกันตลอดอัน และมีปุ่มคล้ายดิ่งทำหน้าที่ช่วยในการยึดติดในเวลาผสมพันธุ์ กุ้งเพศผู้จะมีท่อส่งน้ำเชื้อไปเปิดออกบริเวณขาเดินคู่ที่ 5 และปล่อยน้ำเชื้อออกทางช่องเปิดไปที่บริเวณด้านท้องหรือด้านหลังของทูลៃคัมของกุ้งเพศเมีย ซึ่งบริเวณนี้จะมีขนอ่อนๆ ช่วยโบกพัดให้น้ำเชื้อตัวผู้เข้าไปสู่ถุงเก็บน้ำเชื้อของตัวเมีย ส่วนในกุ้งเพศเมียนั้นสังเกตได้จากบริเวณส่วนท้องของตัวเมียจะมีติ่งแบนๆ เรียกว่าทูลៃคัม มีลักษณะคล้ายลอนหรือพูเล็กๆ หลายอันเรียงกันอยู่ตรงบริเวณโคนขาเดินคู่ที่สี่และห้า ซึ่งด้านในมีถุงสำหรับเก็บน้ำเชื้อตัวผู้ไว้ในเวลาที่มีการผสมพันธุ์และมีท่อนำไข่เปิดออกโคนขาเดินคู่ที่สาม (ปิยะพงษ์ โชติพันธ์. 2529; โครงการหนังสือเกษตรชุมชน. 2534; บังอร ศรีมุกดา. 2530) (ภาพประกอบ 2)

ความมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า

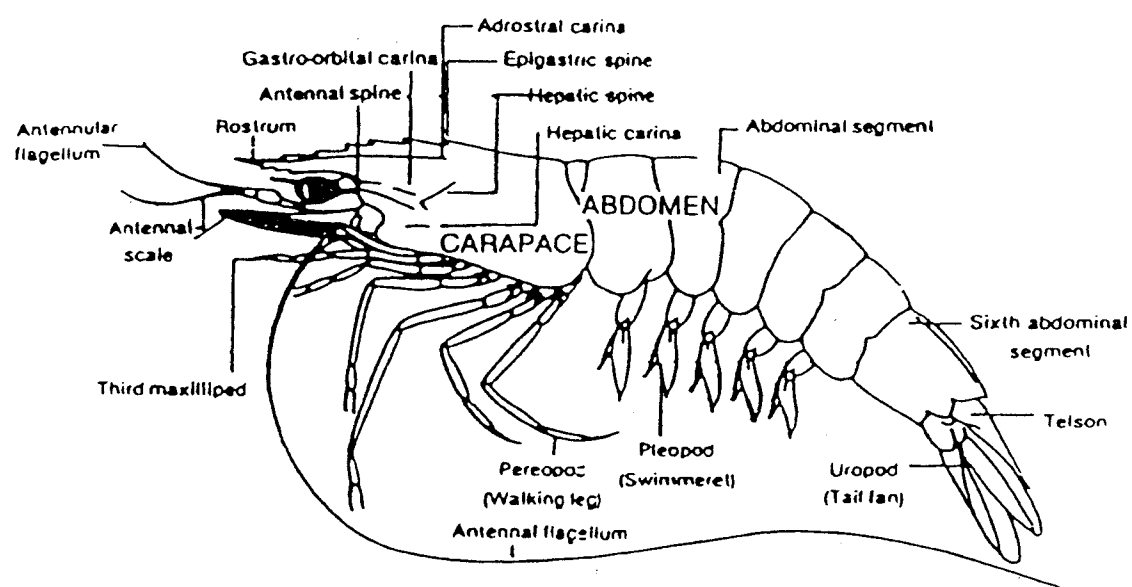
1. เพื่อแยกสกัดสารคล้าย FMRFamide จากก้านตาของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon*
2. เพื่อทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย FMRFamide รูปแบบต่างๆ จากสารสกัดจากก้านตาของกุ้งกุลาดำด้วยกระบวนการ RP-HPLC โดยใช้วิธี Dot-ELISA ในการตรวจสอบหาสารคล้าย FMRFamide ในระหว่างการแยกและการทำให้บริสุทธิ์

ความสำคัญของการศึกษาค้นคว้า

1. สามารถทราบวิธีแยกและทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย FMRFamide
2. สามารถใช้เป็นความรู้พื้นฐานในการพิสูจน์ทราบโครงสร้างและลำดับของกรดอะมิโน ซึ่งจะเป็นแนวทางในการศึกษาบทบาทของฮอร์โมนนี้ในการดำรงชีวิตของกุ้งกุลาดำต่อไปได้

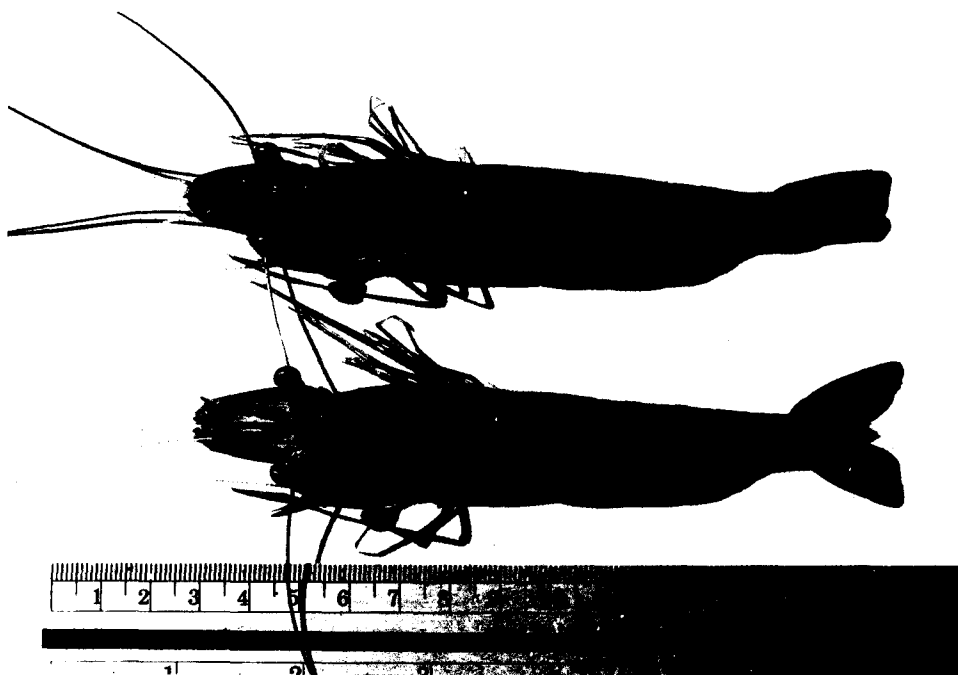
ขอบเขตของการศึกษาค้นคว้า

1. ทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย FMRFamide จากสารสกัดจากก้านตาของกุ้งกุลาดำด้วยกระบวนการ RP-HPLC
2. ใช้วิธี Dot-ELISA ในการติดตามสารคล้าย FMRFamide ในระหว่างการทำให้บริสุทธิ์ด้วยกระบวนการ RP-HPLC
3. ตรวจสอบน้ำหนักโมเลกุลของสารคล้าย FMRFamide ที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์โดย matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)

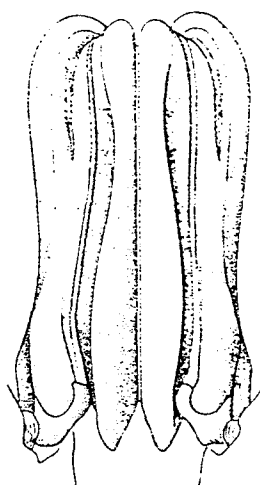


ภาพประกอบ 1 โครงสร้างภายนอกโดยทั่วไปของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon*
(Solis. 1988)

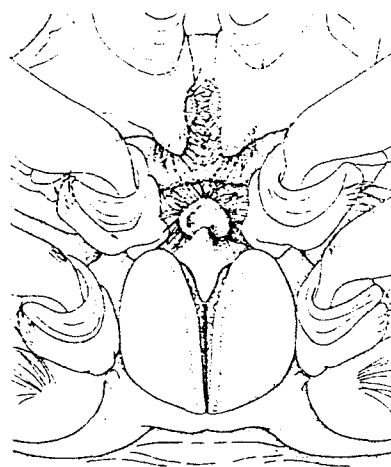
(ก)



(ข)



พีเทสมา (Petasma)



ทีไลคัม (Thelycum)

ภาพประกอบ 2 ลักษณะของกุ้งกุลาดำเพศผู้และเพศเมีย

(ก) ภาพกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* รูปบน เพศผู้ รูปล่าง เพศเมีย

(ข) ภาพแสดงพีเทสมาของกุ้งกุลาดำเพศผู้ และทีไลคัมของกุ้งกุลาดำเพศเมีย

(Farfante and Kensley. 1997)

บทที่ 2

วิธีการวิจัย

สัตว์ทดลอง

กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) อายุ 3-4 เดือน ชื้อจากตำบลบางเลน
จังหวัดนครปฐม

อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์

1. เครื่องมือผ่าตัด
2. ครกหินที่แช่ให้เย็นจัด
3. เครื่องบดเนื้อเยื่อ (homogenizer, Janke & Kunkel)
4. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge, Sigma Z-15)
5. เครื่องระเหยแห้ง (speed vacuum concentrator, Savant)
6. เครื่องดูดอากาศ (suction pump) พร้อมอุปกรณ์
7. แผ่นไนโตรเซลลูโลส (nitrocellulose membrane, Schleicher & Schuell)
8. เครื่องโซนิเคเตอร์ (sonicator, Crest)
9. C18 Sep-Pak cartridge (Waters)
10. เครื่อง HPLC (high performance liquid chromatography, Gilson)
11. คอลัมน์ (column) ชนิดต่าง ๆ
 - PrepPak C18 ขนาด 25 x 100 มิลลิเมตร (Waters)
 - PrepPak C8 ขนาด 25 x 100 มิลลิเมตร (Waters)
 - C8 ขนาด 4.6 x 250 มิลลิเมตร (Microsorb-MV, Rainin)
 - Cyano ขนาด 4.6 x 250 มิลลิเมตร (Microsorb-MV, Rainin)
 - Phenyl ขนาด 4.6 x 250 มิลลิเมตร (Microsorb-MV, Rainin)
12. Matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) (Bruker)
13. หลอดเซนตริฟิวจ์

14. Autopipette พร้อม tip
15. Measuring pipette พร้อมลูกยาง
16. กล่องพลาสติกมีฝาปิด
17. ขวดรูปกรวยมีแขน (suction flask)
18. ตู้แช่แข็ง (Whirlpool) และ ultrafreezer (-25°C , -70°C , Revco)
19. ตู้อบ (hot air oven, Memmert)
20. เครื่องชั่ง
21. กระบอกล้างยา
22. หลอดพลาสติก

สารเคมี

1. น้ำแข็งแห้ง (dry ice)
2. Methanol (analytical grade, Merck)
3. Acetic acid (analytical grade, Merck)
4. Acetonitrile (ACN, analytical grade, Mallinckrodt)
5. Acetonitrile (ACN, HPLC grade, Mallinckrodt)
6. Trifluoroacetic acid (TFA, HPLC grade, Sigma)
7. Heptafluorobutyric acid (HFBA, HPLC grade, Sigma)
8. Triethylamine (TEA, HPLC grade, Sigma)
9. 0.15 M phosphate buffered saline (PBS) pH 7.2 (วิธีเตรียมดูภาคผนวก)
10. Bovine serum albumin (BSA, Sigma)
11. 25% glutaraldehyde (Sigma)
12. 0.4% glutaraldehyde in PBS
13. 0.2% glutaraldehyde in PBS
14. 5% blotto (วิธีเตรียมดูภาคผนวก)
15. 0.05% blotto
16. Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB; Sigma)
17. 30% hydrogen peroxide (H_2O_2)
18. 1% cobalt chloride (CoCl_2)
19. สารละลาย A (0.1% TFA หรือ 0.1% HFBA หรือ 0.01 M TEA)

20. สารละลาย B (80% ACN / 0.1% TFA หรือ 80% ACN / 0.1% HFBA หรือ 80% ACN / 0.01 M TEA)

21. Antibodies

FM-23 (mouse anti-FMRFamide monoclonal antibody)

AF1-62 (mouse anti-KNEFIRFamide monoclonal antibody)

AF2-32 (mouse anti-KHEYLRFamide monoclonal antibody)

แอนติบอดีทั้งสามได้รับความอนุเคราะห์จาก Dr. Anthony. O. W. Stretton, Department of Zoology, University of Wisconsin-Madison ประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งแอนติบอดีทั้งสามเป็นโมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody) ผลิตโดยการปลูกภูมิคุ้มกันหนูขาวด้วย FMRFamide (FM-23) หรือ KNEFIRFamide (AF1-62) หรือ KHEYLRFamide (AF2-32) เชื่อมต่อกับ BSA โดยที่แอนติบอดีทั้งสามมีความจำเพาะกว้าง (broad specificity) และมีแรงจับสูง (high affinity) ต่อเปปไทด์ที่ประกอบด้วย -RFamide

22. Goat anti-mouse IgG H and L chain horseradish peroxidase conjugate (GAM-HRP, Biorad)

23. FMRFamide (standard peptide; Sigma)

24. α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CCA, Sigma)

25. Human angiotensin II (standard, Sigma)

วิธีดำเนินการทดลอง

การทดลองประกอบไปด้วยขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้

1. การเก็บรวบรวมตากุ้งกุลาดำ
2. การเตรียมสารสกัดจากก้านตา (eyestalk extract) ของกุ้งกุลาดำ
3. การเตรียมสารสกัดจากก้านตาก่อนนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยกระบวนการ RP-HPLC (Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography)
4. การทำให้บริสุทธิ์ของสารคล้าย FMRFamide จากก้านตาของกุ้งกุลาดำด้วยกระบวนการ RP-HPLC
5. การตรวจหาสารคล้าย FMRFamide ในก้านตาของกุ้งกุลาดำโดยใช้วิธี Dot-ELISA (Dot-Enzyme Linked Immunosorbent Assay) หลังจากแยกด้วยกระบวนการ RP-HPLC
6. การเตรียมเปปไทด์มาตรฐานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ด้วยวิธี Dot-ELISA

7. การหามวลโมเลกุลของสารคล้าย FMRFamide ด้วย MALDI-TOF MS (Matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry)

1. การเก็บรวบรวมตากุ้งกุลาดำ

รวบรวมตากุ้งกุลาดำที่มีอายุ 3-4 เดือน โดยใช้กรรไกรตัดบริเวณโคนของตากุ้งที่ยังมีชีวิตอยู่แล้วนำไปแช่บนน้ำแข็งแห้งที่บรรจุในถุงพลาสติกทันที นำตากุ้งที่รวบรวมได้ทั้งหมด 9,000 ก้านตากุ้งไปเก็บไว้ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -70°C จนกระทั่งนำมาใช้

2. การเตรียมสารสกัดจากก้านตาของกุ้งกุลาดำ

บดก้านตากุ้ง 9,000 ก้านตากุ้งที่รวบรวมไว้ให้เป็นผงละเอียดในขณะที่เย็นจัด โดยบดรวมกับน้ำแข็งแห้งในครกหินในสภาวะที่เย็นจัดซึ่งวางอยู่บนน้ำแข็งแห้ง แล้วสกัดสารจากก้านตากุ้งด้วยสารละลาย methanol acetic acid และน้ำ (methanol : acetic acid : H_2O = 90 : 1 : 9) ในปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร / ก้านตา บดซ้ำอีกครั้งด้วยเครื่อง homogenizer นำไปเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง เพื่อให้การสกัดเกิดโดยสมบูรณ์ จากนั้นนำไปแยกตะกอนออกโดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยง ด้วยแรงเหวี่ยง 10,000 g เป็นเวลา 15 นาที แยกเอาส่วนน้ำใส (supernatant) เก็บไว้ ส่วนตะกอน (pellet) ที่เหลือนำไปสกัดซ้ำอีกครั้งด้วยสารละลาย methanol acetic acid และเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นแยกตะกอนด้วยแรงเหวี่ยงเท่าเดิม แยกเอาส่วนน้ำใสเก็บไว้ นำสารสกัดที่ได้ไประเหยด้วยเครื่องระเหยแห้ง (speed vacuum concentrator) เพื่อกำจัดตัวทำละลาย methanol และ acetic acid ให้หมดไป เติม 1% trifluoroacetic acid (TFA) ในปริมาณที่ทำให้ความเข้มข้นของสารสกัดเป็น 0.1% TFA (1:10 / V:V) ปั่นแยกตะกอนอีกครั้งด้วยแรงเหวี่ยง 10,000 g เป็นเวลา 15 นาที แยกส่วนสารละลายใสเก็บไว้ (ดัดแปลงจากวิธีการของ Cowden and others. 1993) (ภาพประกอบ 3)

3. การเตรียมสารสกัดจากก้านตากุ้งก่อนนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยกระบวนการ

RP-HPLC

นำสารสกัดจากก้านตากุ้งที่ได้จากข้อ 2. ไปแยกผ่าน C18 Sep-Pak cartridge เพื่อดูดซับสารสกัดไว้ จากนั้นจึงชะด้วยสารละลาย 50% ACN / 0.1% TFA และ 80% ACN / 0.1% TFA ระเหยตัวทำละลาย ACN ออกจนหมดด้วยเครื่อง speed vacuum

concentrator นำไปเติมสารละลาย 80% ACN / 0.1% TFA เพื่อปรับให้สารสกัดอยู่ในสารละลาย ACN ที่มีความเข้มข้นประมาณ 10% ACN (1:8 / V:V) (ดัดแปลงจากวิธีการของ Sithigorngul and Stretton. 1995) (ภาพประกอบ 3)

4. การทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย FMRFamide จากก้านตากุ้งกุลาดำด้วยกระบวนการ RP-HPLC

ในขั้นตอนที่ 1 นำสารสกัดจากก้านตาจำนวน 9,000 ก้านตาที่ได้ประมาณ 1 มิลลิลิตร จากข้อ 3. ไปปั่นด้วยแรงเหวี่ยง 10,000 g เป็นเวลา 15 นาที แยกเอาสารละลายส่วนใสไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC โดยผ่านคอลัมน์ PrepPak C18 ขนาด 25 x 100 มิลลิเมตร จากนั้นชะด้วยสารละลายผสมของ A (A=0.1% TFA) และ B (B=80% ACN/0.1% TFA) ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นจาก 15% จนถึง 80% ของสารละลาย B โดยมีอัตราการไหล 5 มิลลิลิตรต่อนาที และการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารละลาย B ด้วยอัตรา 1% ต่อนาที โดยแบ่งสารสกัดผ่านคอลัมน์ 8 ครั้ง ครั้งแรก 1,000 ตา ครั้งที่ 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 8 ประมาณครั้งละ 1,000 - 1,500 ตา เก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ลงในหลอดพลาสติกโดยเครื่องแฟรคชันคอลเลคเตอร์ (fraction collector) ทุกๆ 1 นาที ตรวจสอบแฟรคชันที่มีสารคล้าย FMRFamide แล้วนำมาแยกสารคล้าย FMRFamide ให้บริสุทธิ์มากขึ้น โดยผ่านคอลัมน์และสารละลายระบบต่างๆ (ตาราง 2) (ดัดแปลงจากวิธีการของ Sithigorngul and Stretton. 1995)

ในขั้นตอนที่ 2 ใช้คอลัมน์ PrepPak C8 (25x100 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/HFBA (15-65%B การเปลี่ยนความเข้มข้น 1% ต่อนาที อัตราการไหลของสารละลาย 5 มิลลิลิตรต่อนาทีและเก็บแฟรคชันทุกๆ 1 นาที) :

ในขั้นตอนที่ 3 - ขั้นตอนที่ 7 ใช้คอลัมน์และตัวทำละลายต่างๆ ดังนี้
(ตาราง 2)

กลุ่มที่ 1 ในขั้นตอนที่ 3 ใช้ Microsorb MV Cyano column (4.6x250 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA (10-80%B) การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้น 1% B ต่อนาที โดยมีอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ส่วนในขั้นตอนที่ 4 ใช้ Microsorb MV C8 column (4.6x250 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA (10-60%B) จากนั้นนำไปแยกต่อในขั้นตอนที่ 5 โดยใช้ Microsorb MV Cyano column (4.6x250 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/HFBA (10-70%B) ส่วนขั้นตอนที่ 6 ใช้ Microsorb MV Cyano column (4.6x250 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA (10-50%B)

กลุ่มที่ 2 ในขั้นตอนที่ 3 ใช้ Microsorb MV C8 column (4.6x250 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA (10-70%B) การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้น 1%B ต่อนาที โดยมี อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ในขั้นตอนที่ 4 โดยใช้ Microsorb MV Cyano column (4.6x250 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำละลายเป็น ACN/HFBA (20-80%B) จากนั้นนำไปแยก ต่อในขั้นตอนที่ 5 ใช้ Microsorb MV Phenyl column (4.6x250 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำละลาย เป็น ACN/TFA (10-70%B) และขั้นตอนที่ 6 ใช้ Microsorb MV Cyano column (4.6x250 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA (10-45%B)

กลุ่มที่ 3 ในขั้นตอนที่ 3 ใช้ Microsorb MV C8 column (4.6x250 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/TEA (10-70%B) การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้น 1%B ต่อนาที โดยมี อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ในขั้นตอนที่ 4 โดยใช้ Microsorb MV Cyano column (4.6x250 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/HFBA (20-80%B) จากนั้นนำไปแยกต่อใน ขั้นตอนที่ 5 โดยใช้ Microsorb MV Cyano หรือ C8 column (4.6x250 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำ ละลาย ACN/TFA (20-70%B) หรือ ACN/HFBA (20-80%B) และขั้นตอนที่ 6 ใช้ Microsorb MV C8 column (4.6x250 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/TEA (10-60%B) ในขั้น- ตอนที 7 ใช้ Microsorb MV C8 column ใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA (15-55%B)

กลุ่มที่ 4 ในขั้นตอนที่ 3 ใช้ Microsorb MV C8 column (4.6x250 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/TEA (10-70%B) การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้น 1%B ต่อนาที โดยมี อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ในขั้นตอนที่ 4 โดยใช้ Microsorb MV Cyano column (4.6x250 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/HFBA (20-80%B) โดยเปลี่ยนแปลงความ เข้มข้น 1%B ต่อนาที ขั้นตอนที่ 5 ใช้ Microsorb MV Cyano หรือ C8 column (4.6x250 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA (15-80%B) หรือ ACN/HFBA (20-70%B) และ ขั้นตอนที่ 6 ใช้ Microsorb MV C8 column (4.6x250 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/HFBA (10-70%B) หรือ ACN/TFA (15-55%B) ในขั้นตอนที่ 7 ใช้ Microsorb MV C8 column (4.6x250 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA (15-55%B)

กลุ่มที่ 5 ในขั้นตอนที่ 3 ใช้ Microsorb MV C8 column (4.6x250 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/TEA (10-60%B) การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้น 1%B ต่อนาที โดยมี อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที จากนั้นนำไปแยกต่อในขั้นตอนที่ 4 โดยใช้ Microsorb MV Cyano column (4.6x250 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/HFBA (20-80%B) โดย เปลี่ยนแปลงความเข้มข้น 1 %B ต่อนาที ส่วนการแยกในขั้นตอนที่ 5 ใช้ Microsorb MV Cyano หรือ C8 column (4.6x250 มิลลิเมตร) โดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น ACN/TFA (15-70%B)

หรือ ACN/HFBA (20–70%B) ในขั้นตอนที่ 6 โดยใช้ Microsorb MV C8 column (4.6x250 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำละลายเป็น ACN/TFA (15–55%B) หรือ ACN/TEA (10–60%B) ในขั้นตอนที่ 7 โดยใช้ Microsorb MV C8 column (4.6x250 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA (10–60%B)

5. การเตรียมเปปไทด์มาตรฐานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ด้วยวิธี Dot-ELISA

นำเปปไทด์มาตรฐาน FMRFamide ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 598.8 ดาลตัน มีความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาเจือจางด้วย BSA ที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรให้มีความเข้มข้นเป็น 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.6, 0.8, 0.4, 0.2, 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ แล้วหยดเปปไทด์มาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 1 ไมโครลิตรลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเรียงตามความเข้มข้นมากไปน้อย นำแผ่นไนโตรเซลลูโลสที่หยดสารแล้วไปอบที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปอบต่อในไอของ 0.4% glutaraldehyde ที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 8 ชั่วโมง นำไปตรึง (fix) ต่อในสารละลาย 0.2% glutaraldehyde เป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำแผ่นไนโตรเซลลูโลสมาล้างด้วยน้ำกลั่น 4 ครั้งๆ ละ 15 นาที แล้วนำไปบล็อก (block) ด้วย 0.5 % blotto เป็นเวลา 30 นาที ตรวจหาเปปไทด์ด้วยวิธี indirect immunoperoxidase assay โดยนำแผ่นไนโตรเซลลูโลสไปบ่มในส่วนผสมของแอนติบอดี 3 ชนิดคือ mouse anti-FMRFamide monoclonal antibody (FM-23) ที่เจือจาง 1:50, mouse anti-KNEFIRFamide monoclonal antibody (AF1-62) ที่เจือจาง 1:100 และ mouse anti-KHEYLRFamide monoclonal antibody (AF2-32) ที่เจือจาง 1:250 เป็นเวลา 8 ชั่วโมง ล้างด้วย 0.5% blotto 4 ครั้งๆ ละ 15 นาที แล้วจึงนำไปบ่มใน goat anti-mouse IgG H+L horseradish peroxidase conjugate (GAM-HRP) ที่เจือจางด้วย 5% blotto 1:1,000 เป็นเวลา 8 ชั่วโมง ล้างแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วย 0.5% blotto 4 ครั้งๆ ละ 15 นาที และล้างต่อด้วย PBS 1 ครั้ง จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยากับสารละลาย 0.006% hydrogen peroxide (H_2O_2) 0.03% diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) 0.05% cobalt chloride ($CoCl_2$) เป็นเวลา 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นหลายๆ ครั้งบริเวณที่มีสารคล้าย FMRFamide จะปรากฏเห็นเป็นจุดสีเทาแกมน้ำเงินบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส (ภาพประกอบ 4) ใช้ความเข้มข้นของสีในแต่ละจุดที่มีความเข้มข้นของเปปไทด์ FMRFamide มาตรฐานเพื่อเปรียบเทียบกับเปปไทด์ที่ได้จากการผ่านกระบวนการ RP-HPLC เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี Dot-ELISA แล้ว (ดัดแปลงจากวิธีการของ Sithigorngul and others. 1991)

6. การตรวจหาสารคล้าย FMRFamide ในก้านตากุ้งกุลาดำโดยวิธี Dot-ELISA

หลังจากแยกด้วยกระบวนการ RP-HPLC

แบ่งตัวอย่างของแต่ละแฟรคชันประมาณ 2-40 ไมโครลิตร (20-400 ก้านตา/จุด) ที่ได้จากการผ่านกระบวนการ RP-HPLC มาผสมกับ BSA ที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งละลายใน PBS ปริมาตร 5 ไมโครลิตร/จุด นำไประเหยแห้งในเครื่อง speed vacuum concentrator จากนั้นเติมน้ำกลั่นในปริมาตร 1 ไมโครลิตร/จุด หยดสารละลายแต่ละแฟรคชันบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส เรียงตามลำดับแฟรคชันที่ได้จากการผ่านกระบวนการ HPLC หลังจากนั้นจึงทำตามวิธีในข้อ 5. นำผลที่ได้จาก Dot-ELISA ไปเปรียบเทียบกับพิกที่ได้จากโครมาโตแกรม (chromatogram) ที่แยกด้วย RP-HPLC เพื่อใช้เลือกแฟรคชันที่จะนำไปผ่านกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนต่อไป (ดัดแปลงจากวิธีการของ Sithigorngul and others. 1991)

7. การหาน้ำหนักโมเลกุลโดย MALDI-TOF MS

นำแฟรคชันของสารคล้าย FMRFamide ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนสุดท้าย มาแบ่งสารละลายให้มีจำนวนก้านตาประมาณ 450-900 ก้านตา แล้วระเหยตัวทำละลายออกให้หมดด้วยเครื่องระเหยแห้ง จากนั้นนำไปหาน้ำหนักโมเลกุลด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS ซึ่งมีวิธีการดังนี้

1) การเตรียม matrix “film” บน steel target

โดยนำสารละลายอิมตัวของ α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CCA) ที่ละลายในอะซิโตน ไปปั่นแยกตะกอนออกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง แยกส่วนที่เป็นของเหลวใส่ไปหยดลงบนช่องตัวอย่างประมาณ 1 ไมโครลิตรและทิ้งไว้ให้แห้ง

2) การเตรียมสารตัวอย่าง

นำสารตัวอย่างไปละลายใน 0.1 %TFA/acetonitrile (2:1) 5 ไมโครลิตร แล้วหยดสารตัวอย่างประมาณ 1 ไมโครลิตรลงบนช่องตัวอย่างที่มี matrix เคลือบอยู่ ทิ้งไว้ให้แห้ง

3) การเตรียมสารมาตรฐาน (standard)

เตรียมสารมาตรฐาน human angiotensin II ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 1.047 กิโลดาลตันที่มีความเข้มข้น 100 pmol/ml โดยเจือจางด้วย 0.1% TFA/acetonitrile (2:1 / V:V) ในอัตราส่วน 1:5 แล้วหยดสารมาตรฐานประมาณ 1 ไมโครลิตรลงบนช่องตัวอย่างที่มี matrix เคลือบอยู่ ทิ้งไว้ให้แห้ง

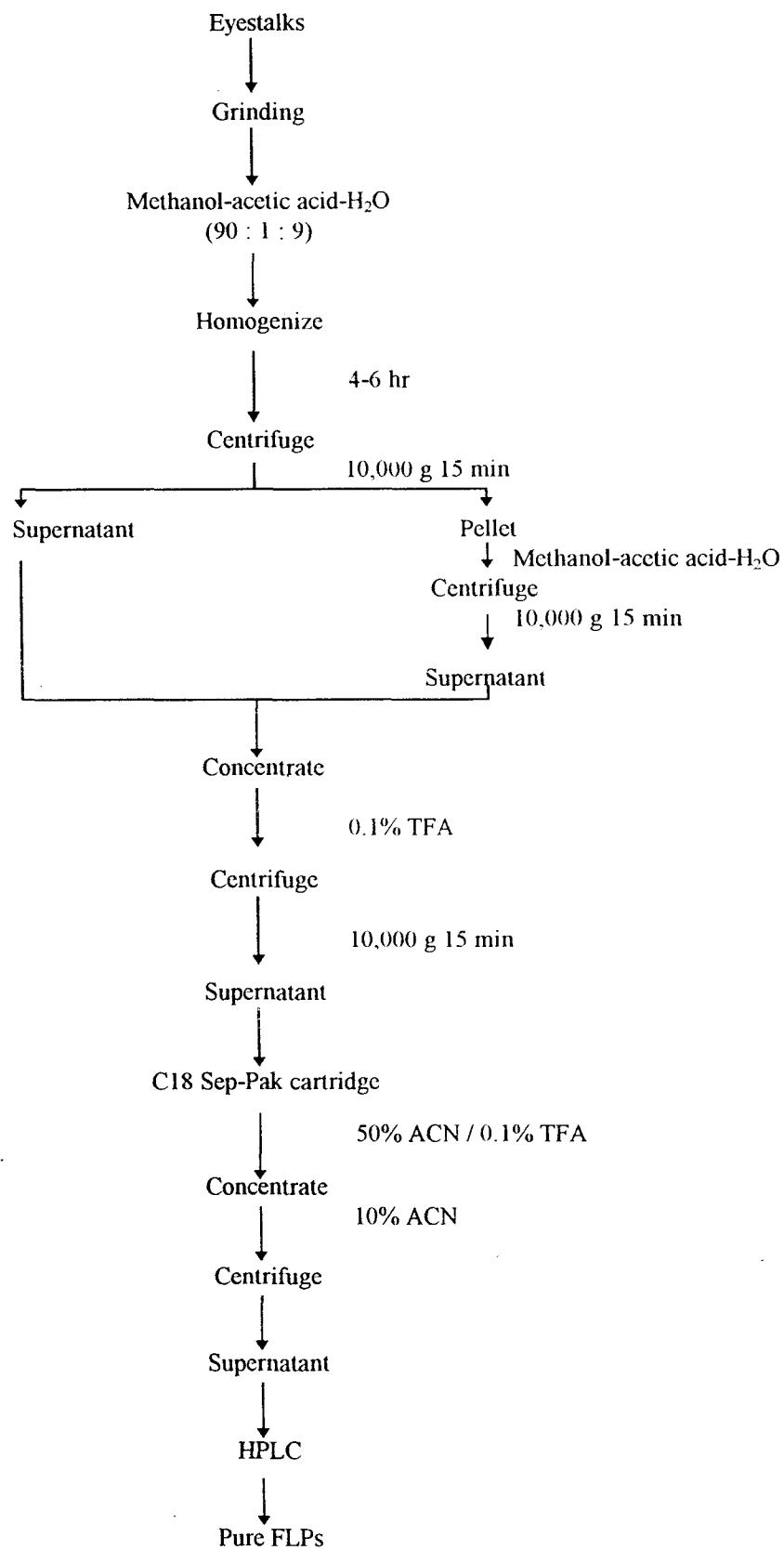
4) นำไปหาน้ำหนักโมเลกุลโดยเครื่อง MALDI-TOF MS ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีวิเคราะห์ข้อมูล

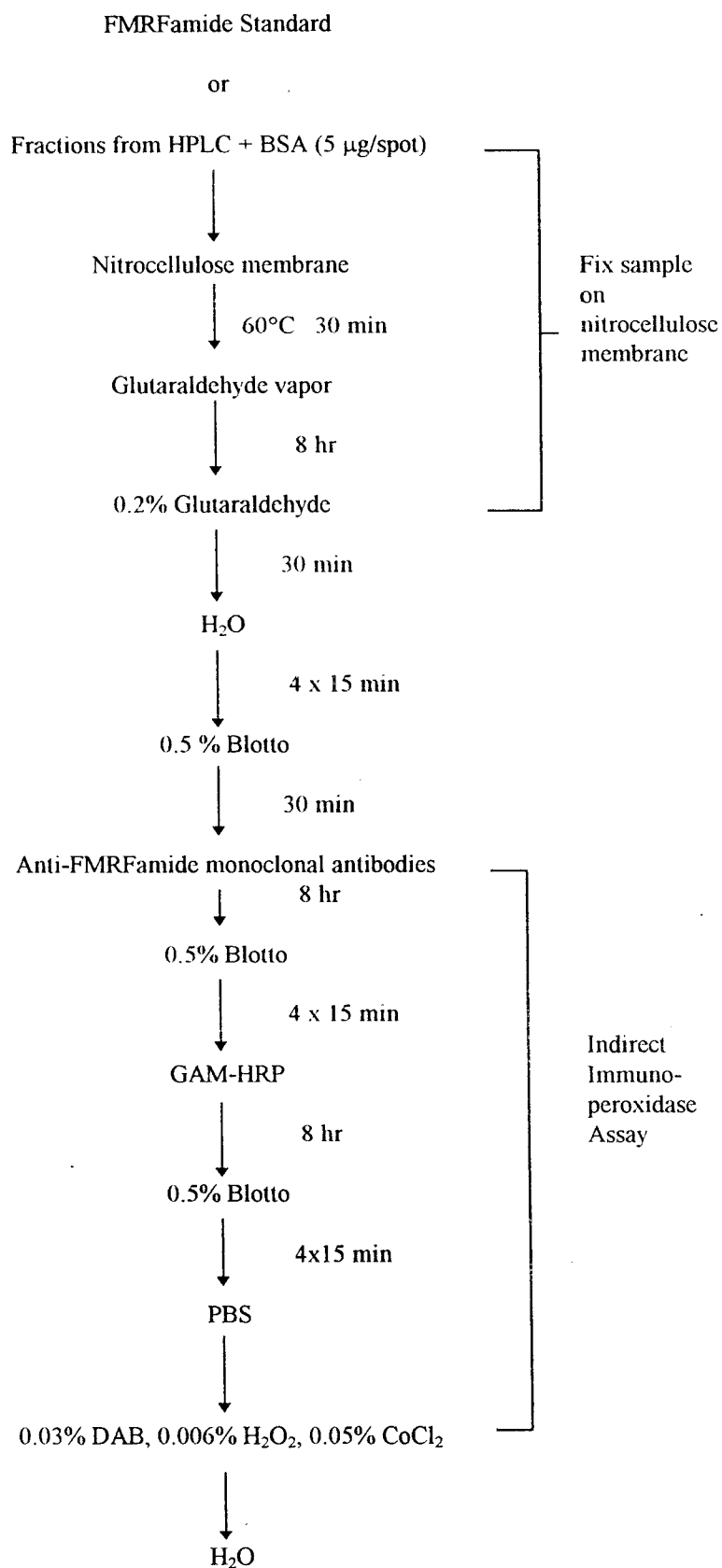
1. สังเกตการเกิดสีของแต่ละแฟรคชันที่ได้จากการผ่านกระบวนการ RP-HPLC ขั้นแรก ซึ่งหยดบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสหลังจากเสร็จกระบวนการ Dot-ELISA แล้ว นำแฟรคชันที่ติดสีที่คาดว่าจะมีสารคล้าย FMRFamide ไปแยกต่อด้วย RP-HPLC ในขั้นตอนต่อไป
2. เปรียบเทียบความเข้มของสีของจุดที่เกิดขึ้นกับความเข้มของสีของเปปไทด์มาตรฐาน FMRFamide ที่มีความเข้มข้นต่างๆ
3. ศึกษาลักษณะและความสูงของพีคจากโครมาโตแกรมที่ได้จากกระบวนการ RP-HPLC ในแต่ละขั้นตอน โดยเปรียบเทียบกับพีคของ FMRFamide standard ที่ทราบปริมาณ และเทียบกับ FMRFamide standard immunoreactivity บนแผ่นไนโตรเซลลูโลสจากผลที่ได้จาก Dot-ELISA ในขั้นตอนนั้นๆ
4. ตรวจสอบความบริสุทธิ์และหาน้ำหนักโมเลกุลโดย mass spectrometry

ตาราง 2 แสดงขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ด้วยกระบวนการ RP-HPLC

Step	Column	Column size (mm)	Counter ion	Gradient of Acetonitrile (percent)	Duration (min)	Flow rate (ml/min)
1.	PrepPak C18	25x100	TFA	15-80%	65	5
2.	PrepPak C8	25x100	HFBA	15-65%	50	5
3.	Microsorb-MV					
	-Cyano	4.6x250	TFA	10-80%	70	1
	-C8	4.6x250	TEA	10-70%	60	1
4.	Microsorb-MV					
	-C8	4.6x250	TFA	10-60%	50	1
	-Cyano	4.5x250	HFBA	20-80%	60	1
5.	Microsorb-MV					
	-Cyano	4.6x250	HFBA	10-70%	60	1
			TFA	20-70%	50	1
	-Phenyl	4.6x250	TFA	10-70%	60	1
	-C8	4.6x250	HFBA	20-80%	60	1
			TFA	15-80%	65	1
6.	Microsorb-MV					
	-Cyano	4.6x250	TFA	10-50%	40	1
	-C8	4.6x250	TEA	10-60%	50	1
			HFBA	10-70%	60	1
			TFA	15-55%	40	1
7.	Microsorb-MV					
	-C8	4.6x250	TFA	10-60%	50	1



ภาพประกอบ 3 ขั้นตอนวิธีการเตรียมสารสกัดจากก้านตาของกุ้งกุลาดำ



ภาพประกอบ 4 ขั้นตอนการทำ Dot-ELISA (Dot-Enzyme Linked Immunosorbant Assay)

บทที่ 3

ผลการวิจัย

1. Dot ELISA ของ FMRFamide มาตรฐาน

จากการใช้เปปไทด์มาตรฐาน FMRFamide ที่เจือจางในระดับต่างๆ มาตรวจสอบด้วยวิธี Dot-ELISA โดยใช้แอนติบอดีต่อ FMRFamide สามารถตรวจพบ FMRFamide ปริมาณน้อยที่สุดประมาณ 0.2 นาโนกรัม (ประมาณ 200 พิโคโมล) โดยความเข้มของจุดสีจะแปรผันตามปริมาณของ FMRFamide อยู่ในช่วง 0.2-1.6 นาโนกรัม (ภาพประกอบ 5) ส่วนปริมาณของ FMRFamide ที่มากกว่า 1.6 นาโนกรัม พบว่าความเข้มของจุดสีไม่สามารถสังเกตเห็นความแตกต่างได้ การประมาณปริมาณของสารคล้าย FMRFamide จึงใช้ปริมาณ FMRFamide มาตรฐานที่ให้ความเข้มของสีที่สามารถสังเกตเห็นได้ชัดเจนที่สุดคือ 0.2 นาโนกรัม เท่ากับหนึ่งหน่วยของสารคล้าย FMRFamide ซึ่งช่วงความเข้มของจุดสีที่ตรวจสอบได้อยู่ในระหว่าง 1-16 หน่วย สำหรับเปปไทด์จากก้านตาที่ทำให้บริสุทธิ์แต่ละขั้นตอนโดยแบ่งสารละลายในแต่ละแฟรคชันมาตรวจหาสารคล้าย FMRFamide โดยวิธี Dot-ELISA และประมาณปริมาณของสารคล้าย FMRFamide โดยเทียบความเข้มของจุดสีที่ได้กับจุดสีมาตรฐาน (ภาพประกอบ 5)

2. การทำให้บริสุทธิ์ของสารคล้าย FMRFamide จากก้านตาของกิ้งกูดดำโดย RP-HPLC ในขั้นตอนแรก

จากการนำสารสกัดจากก้านตาจำนวน 9,000 ก้านตา มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์ PrepPak C18 (25x100 มิลลิเมตร) โดยใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA (15-80%B (A=0.1% TFA และ B=80% ACN/0.1% TFA) การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้น 1% B ต่อนาที โดยมีอัตราการไหล 5 มิลลิลิตรต่อนาทีและเก็บแฟรคชันทุกๆ 1 นาที) โดยแบ่งสารสกัดผ่านคอลัมน์ 8 ครั้ง ครั้งแรก 1,000 ตา ครั้งที่ 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 8 ประมาณครั้งละ 1,000-1,500 ตา (ภาพประกอบ 6) พบการกระจายของสารคล้าย FMRFamide กระจายอยู่ในแฟรคชันต่างๆ คล้ายกันทั้ง 8 ครั้ง คือพบอยู่ในช่วงแฟรคชันที่ 27-28 และแฟรคชันที่ 31-45 โดยช่วงพีคที่มีความเข้มของสารคล้าย FMRFamide สูงสุดอยู่ในแฟรคชันที่ 33 และแฟรคชัน 43-45 ดังนั้นในการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่อไปจึงรวมแฟรคชันที่ 27-28 (กลุ่มที่ 1) แฟรคชันที่ 31-32 (กลุ่มที่ 2) แฟรคชันที่ 33 (กลุ่มที่ 3) แฟรคชันที่ 34-35 (กลุ่มที่ 4) และแฟรคชันที่ 36-38 (กลุ่มที่ 5) ของการแยกด้วย RP-HPLC ทั้ง 8 ครั้งเข้า

ด้วยกัน (ภาพประกอบ 7) ส่วนแฟรคชันที่ 39-45 ยังไม่สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้เนื่องจากตัวอย่างของสารคล้าย FMRFamide สูญหายไปในช่วงขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์

3. การทำให้บริสุทธิ์ของสารคล้าย FMRFamide จากก้านตาของกึ่งกลาดำในขั้นตอนที่ 2

จากการนำสารคล้าย FMRFamide แต่ละกลุ่ม (กลุ่มที่ 1- กลุ่มที่ 5) จากก้านตาในขั้นตอนที่ 1 มาทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนที่ 2 โดยใช้คอลัมน์ PrepPak C8 (25x100 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/HFBA (15-65%B การเปลี่ยนความเข้มข้น 1% B ต่อนาที อัตราการไหลของสารละลาย 5 มิลลิตรต่อนาทีและเก็บแฟรคชันทุกๆ 1 นาที) พบการกระจายของสารคล้าย FMRFamide ในกลุ่มที่ 1 แฟรคชันที่ 47 (ภาพประกอบ 8, 9) ในกลุ่มที่ 2 พบในแฟรคชันที่ 37-40 (ภาพประกอบ 11, 12) ในกลุ่มที่ 3 พบในแฟรคชันที่ 38-41 (ภาพประกอบ 16, 17) ในกลุ่มที่ 4 พบในแฟรคชันที่ 38-41 (ภาพประกอบ 19, 20) ในกลุ่มที่ 5 พบในแฟรคชันที่ 38-42 (ภาพประกอบ 23, 24) ความเข้มของสารคล้าย FMRFamide ค่อนข้างสูงในทุกแฟรคชัน จึงรวบรวมแฟรคชันที่พบสารคล้าย FMRFamide ของแต่ละกลุ่มเข้าด้วยกันเพื่อแยกผ่านคอลัมน์ในขั้นตอนต่อไป

4. การทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย FMRFamide จากก้านตาของกึ่งกลาดำในขั้นตอนที่ 3 - ขั้นตอนที่ 7

ในขั้นตอนที่ 3 จะนำแฟรคชันของแต่ละกลุ่ม (กลุ่มที่ 1-5) ไปทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนต่างๆ (ตาราง 2) ดังนี้

กลุ่มที่ 1 (ภาพประกอบ 8) จากการแยกผ่านขั้นตอนที่ 2 (ภาพประกอบ 9) แล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนที่ 3 โดยใช้ Microsorb MV Cyano column (4.6x250 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA (10-80%B) การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้น 1% ต่อ นาที โดยมีอัตราการไหล 1 มิลลิตรต่อนาที พบการกระจายของสารคล้าย FMRFamide อยู่ในแฟรคชันที่ 52 และ 54 ส่วนในขั้นตอนที่ 4 ใช้ Microsorb MV C8 column (4.6x250 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA (10-60%B) พบสารคล้าย FMRFamide ในแฟรคชันที่ 30 จากนั้นนำไปแยกต่อในขั้นตอนที่ 5 โดยใช้ Microsorb MV Cyano column (4.6x250 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/HFBA (10-70%B) พบสารคล้าย FMRFamide ในแฟรคชันที่ 53 ส่วนขั้นตอนที่ 6 ใช้ Microsorb MV Cyano column (4.6x250 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA (10-50%B) สามารถแยกเปปไทด์ของสารคล้าย FMRFamide ที่คาดว่ามีความบริสุทธิ์มากพอในแฟรคชันที่ 15 ปรากฏออกมา

เพียงพิดเดียว ค่าความสูงของพิดประมาณ 2 มิลลิโวลต์ (ภาพประกอบ 10.1) ซึ่งเมื่อประมาณปริมาณเปปไทด์ของสารคล้าย FMRFamide (PFM1) เปรียบเทียบกับความเข้มของสีของจุดเปปไทด์มาตรฐาน FMRFamide ที่ความเข้มข้นต่างๆ จะเท่ากับ 1 หน่วยต่อเมื่อใช้ 1100 กันดา

กลุ่มที่ 2 (ภาพประกอบ 11) จากการแยกผ่านขั้นตอนที่ 2 (ภาพประกอบ 12) แล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนที่ 3 โดยใช้ Microsorb MV C8 column (4.6x250 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA (10-70%B) การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้น 1%B ต่อนาที โดยมีอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที พบการกระจายของสารคล้าย FMRFamide อยู่ในแฟรคชันที่ 26-33 ในขั้นตอนที่ 4 ใช้ Microsorb MV Cyano column (4.6x250 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำละลายเป็น ACN/HFBA (20-80%B) พบการกระจายของสารคล้าย FMRFamide อยู่ในแฟรคชันที่ 28-34 จากนั้นนำไปแยกต่อในขั้นตอนที่ 5 ใช้ Microsorb MV Phenyl column (4.6x250 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำละลายเป็น ACN/TFA (10-70%B) พบการกระจายของสารคล้าย FMRFamide อยู่ในแฟรคชันที่ 29-34 และขั้นตอนที่ 6 ใช้ Microsorb MV Cyano column (4.6x250 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA (10-45%B) สามารถทำให้บริสุทธิ์เปปไทด์ของสารคล้าย FMRFamide ได้ 5 รูปแบบ คือ เปปไทด์ PFM2 พบในแฟรคชันที่ 25 (ภาพประกอบ 13.1), PFM3 พบในแฟรคชันที่ 33 (ภาพประกอบ 13.3), PFM4 พบในแฟรคชัน 25 (ภาพประกอบ 14.1), PFM5 พบในแฟรคชันที่ 25 (ภาพประกอบ 14.3) และ PFM6 พบในแฟรคชันที่ 25 (ภาพประกอบ 15.1) ซึ่งแยกออกมาได้เป็นพิดเดียว มีค่าความสูงของพิดประมาณ 6, 17, 2, 3 และ 1 มิลลิโวลต์ เปรียบเทียบกับความเข้มของสีจุดของเปปไทด์มาตรฐาน FMRFamide ที่ความเข้มต่างๆ จะเท่ากับ 1 หน่วยต่อเมื่อใช้ 400-800 กันดา

กลุ่มที่ 3 (ภาพประกอบ 16) หลังจากแยกผ่านขั้นตอนที่ 2 (ภาพประกอบ 17) แล้วนำไปแยกต่อในขั้นตอนที่ 3 โดยใช้ Microsorb MV C8 column (4.6x250 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/TEA (10-70%B) การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้น 1%B ต่อนาที โดยมีอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที พบการกระจายของสารคล้าย FMRFamide อยู่ในแฟรคชันที่ 39-41 ในขั้นตอนที่ 4 โดยใช้ Microsorb MV Cyano column (4.6x250 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/HFBA (20-80%B) พบสารคล้าย FMRFamide ในแฟรคชันที่ 51-53 จากนั้นนำไปแยกต่อในขั้นตอนที่ 5 โดยใช้ Microsorb MV Cyano หรือ C8 column (4.6x250 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA (20-70%B) หรือ ACN/HFBA (20-80%B) พบสารคล้าย FMRFamide ในแฟรคชันที่ 35-36 และขั้นตอนที่ 6 ใช้ Microsorb MV C8 column (4.6x250 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/TEA (10-

60%B) สามารถทำให้บริสุทธิ์เปปไทด์ของสารคล้าย FMRFamide ได้ 1 รูปแบบ คือ เปปไทด์ PFM7 ในแฟรคชันที่ 39 (ภาพประกอบ 18.1) ซึ่งเป็นพีคก่อนข้างบริสุทธิ์ ค่าความสูงของพีคประมาณ 2 มิลลิโวลต์ ส่วนแฟรคชันที่ยังไม่บริสุทธิ์นำไปแยกต่อในขั้นตอนที่ 7 โดยใช้ Microsorb MV C8 column ใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA (15-55%B) สามารถทำให้บริสุทธิ์เปปไทด์ของสารคล้าย FMRFamide (PFM8) พบในแฟรคชันที่ 32 มีค่าความสูงของพีคประมาณ 2 มิลลิโวลต์ (ภาพประกอบ 18.3) ซึ่งเมื่อประมาณปริมาณของสารคล้าย FMRFamide ที่ได้ทำให้บริสุทธิ์ เปรียบเทียบกับความเข้มข้นของสีของเปปไทด์มาตรฐาน FMRFamide ที่ความเข้มข้นต่างๆ จะเท่ากับ 1 หน่วยต่อเมื่อใช้ 300 ก้านดา

กลุ่มที่ 4 (ภาพประกอบ 19) จากการแยกผ่านขั้นตอนที่ 2 (ภาพประกอบ 20) แล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนที่ 3 โดยใช้ Microsorb MV C8 column (4.6x250 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/TEA (10-70%B) การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้น 1%B ต่อ นาที โดยมีอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที พบการกระจายของสารคล้าย FMRFamide อยู่ในแฟรคชันที่ 34-41 ในขั้นตอนที่ 4 ใช้ Microsorb MV Cyano column (4.6x250 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/HFBA (20-80%B) โดยเปลี่ยนแปลงความเข้มข้น 1%B ต่อ นาที พบการกระจายของสารคล้าย FMRFamide อยู่ในแฟรคชันที่ 49-56 ส่วนขั้นตอนที่ 5 ใช้ Microsorb MV Cyano หรือ C8 column (4.6x250 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA (15-80%B) หรือ ACN/HFBA (20-70%B) พบการกระจายของสารคล้าย FMRFamide อยู่ในแฟรคชันที่ 32-42 และขั้นตอนที่ 6 ใช้ Microsorb MV C8 column (4.6x250 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/HFBA (10-70%B) หรือ ACN/TFA (15-55%B) สามารถทำให้บริสุทธิ์เปปไทด์ของสารคล้าย FMRFamide ได้ 2 รูปแบบ คือ เปปไทด์ PFM10 พบในแฟรคชันที่ 31 (ภาพประกอบ 21.3) และ เปปไทด์ PFM11 พบในแฟรคชันที่ 32 (ภาพประกอบ 22.1) ซึ่งมีค่าความสูงของพีคประมาณ 6 และ 9 มิลลิโวลต์ ส่วนสารคล้าย FMRFamide ที่ยังไม่บริสุทธิ์ นำไปแยกต่อในขั้นตอนที่ 7 โดยใช้ Microsorb MV C8 column (4.6x250 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA (15-55%B) สามารถทำให้บริสุทธิ์เปปไทด์ของสารคล้าย FMRFamide ได้อีก 1 รูปแบบ คือ เปปไทด์ PFM9 พบในแฟรคชันที่ 29 (ภาพประกอบ 21.1) ซึ่งมีค่าความสูงของพีคประมาณ 1 มิลลิโวลต์ เมื่อประมาณปริมาณของสารคล้าย FMRFamide ที่คาดว่าบริสุทธิ์ เปรียบเทียบกับความเข้มข้นของจุดสีของจุดเปปไทด์มาตรฐาน FMRFamide ที่ความเข้มข้นต่างๆ จะเท่ากับหนึ่งหน่วยต่อเมื่อใช้ 200-600 ก้านดา

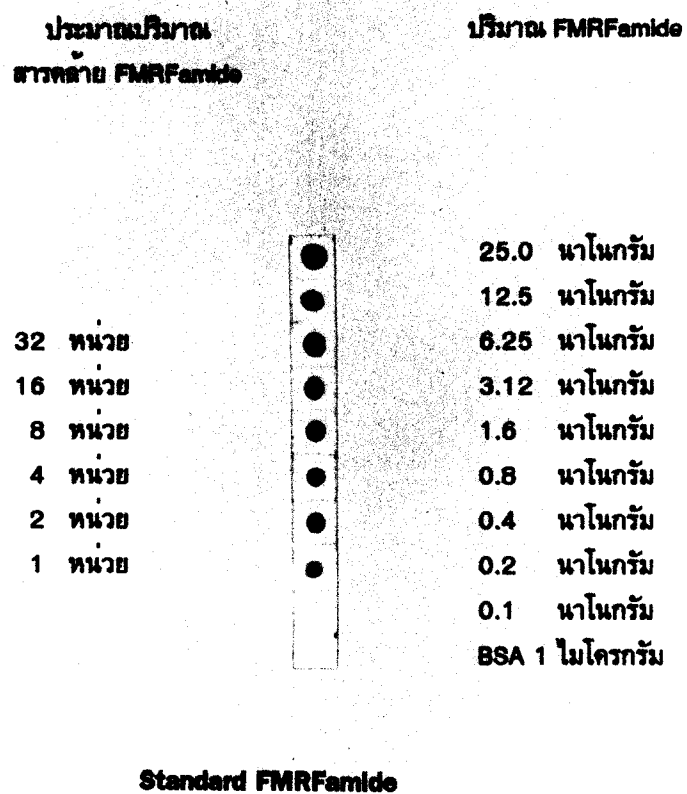
กลุ่มที่ 5 (ภาพประกอบ 23) จากการแยกผ่านขั้นตอนที่ 2 (ภาพประกอบ 24) แล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์ต่อในขั้นตอนที่ 3 โดยใช้ Microsorb MV C8 column (4.6x250 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/TEA (10-60%B) การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้น

1%B ต่อหน้าที่ โดยมีอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที พบการกระจายของสารคล้าย FMRF-amide อยู่ในแฟรคชันที่ 38-42 จากนั้นนำไปแยกต่อในขั้นตอนที่ 4 โดยใช้ Microsorb MV Cyano column (4.6x250 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/HFBA (20-80%B) โดยเปลี่ยนแปลงความเข้มข้น 1 %B ต่อหน้าที่ พบการกระจายของสารคล้าย FMRFamide อยู่ในแฟรคชันที่ 48-55 ส่วนการแยกในขั้นตอนที่ 5 ใช้ Microsorb MV Cyano หรือ C8 column (4.6x250 มิลลิเมตร) โดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น ACN/TFA (15-70%B) หรือ ACN/HFBA (20-70%B) สามารถทำให้บริสุทธิ์เปปไทด์ของสารคล้าย FMRFamide ได้ 1 รูปแบบ คือ เปปไทด์ PFM18 พบในแฟรคชันที่ 41 (ภาพประกอบ 28.1) มีค่าความสูงของพีคประมาณ 11 มิลลิโวลต์ ส่วนแฟรคชันอื่นๆ นำไปทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนที่ 6 โดยใช้ Microsorb MV C8 column (4.6x250 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำละลายเป็น ACN/TFA (15-55%B) หรือ ACN/TEA (10-60%B) สามารถทำให้บริสุทธิ์เปปไทด์ของสารคล้าย FMRF-amide ได้ 4 รูปแบบคือ เปปไทด์ PFM12 พบในแฟรคชันที่ 39 (ภาพประกอบ 25.1), เปปไทด์ PFM13 พบในแฟรคชันที่ 39 (ภาพประกอบ 25.3) เปปไทด์ PFM16 พบในแฟรคชันที่ 38 (ภาพประกอบ 27.1) และเปปไทด์ PFM 17 พบในแฟรคชันที่ 38 (ภาพประกอบ 27.3) มีค่าความสูงของพีค 2, 1, 1 และ 35 มิลลิโวลต์ ส่วนแฟรคชันที่ยังไม่บริสุทธิ์นำไปทำให้บริสุทธิ์ต่อในขั้นตอนที่ 7 โดยใช้ Microsorb MV C8 column (4.6x250 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA (10-60%B) สามารถทำให้บริสุทธิ์เปปไทด์ของสารคล้าย FMRFamide ได้ 2 รูปแบบคือ เปปไทด์ PFM14 พบในแฟรคชันที่ 41 (ภาพประกอบ 26.1) และเปปไทด์ PFM15 พบในแฟรคชันที่ 38 (ภาพประกอบ 26.3) ซึ่งมีความสูงของพีคประมาณ 18 และ 1 มิลลิโวลต์ เมื่อประมาณปริมาณของสารคล้าย FMRF-amide ที่คาดว่าบริสุทธิ์แล้วเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของจุดของเปปไทด์มาตรฐาน FMRF-amide ที่ความเข้มข้นต่างๆ จะเท่ากับ 200-800 ก้านดา

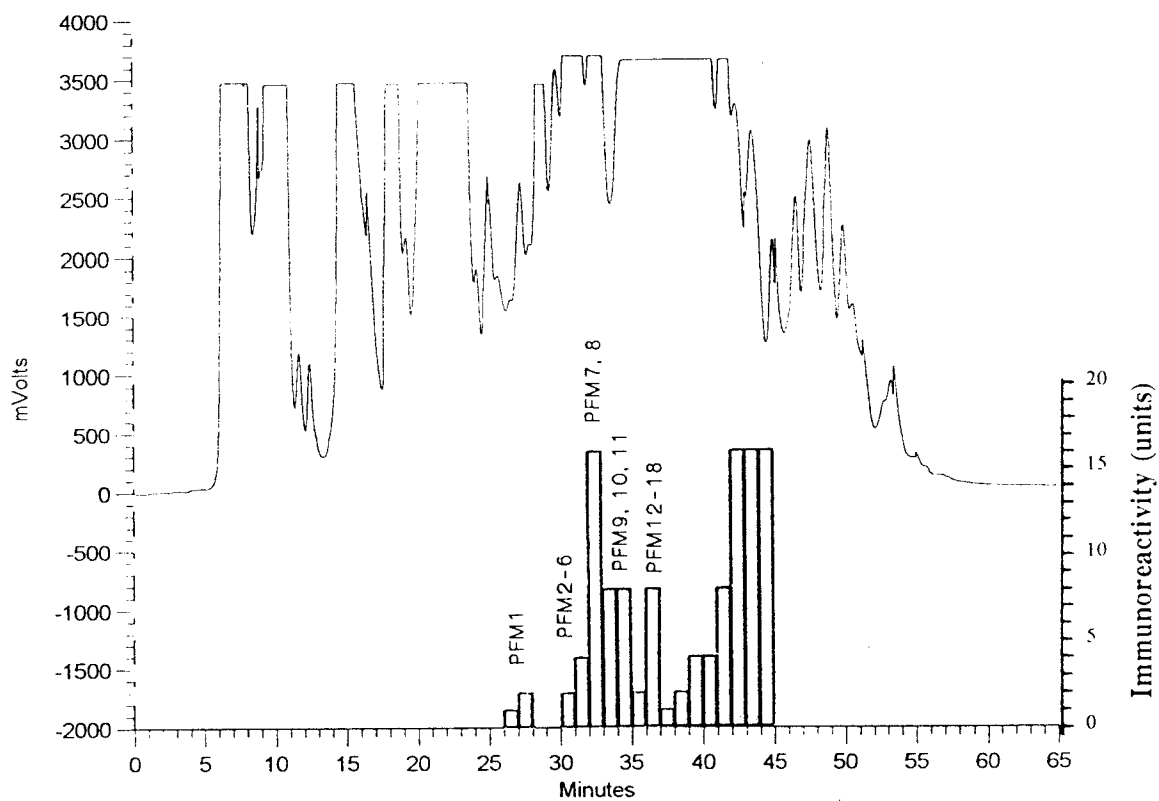
5. การตรวจหาน้ำหนักโมเลกุลของสารคล้าย FMRFamide โดย Mass Spectrometry

จากการนำตัวอย่างเปปไทด์ของสารคล้าย FMRFamide ไปตรวจหาน้ำหนักโมเลกุลโดย Matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) พบเปปไทด์ที่มีมวลโมเลกุลต่างๆ กัน ดังนี้ PFM1 มีน้ำหนักโมเลกุล 1169.7, PFM2 มีน้ำหนักโมเลกุล 1121.2 และ 1143.3, PFM3 มีน้ำหนักโมเลกุล 1260.0, 1281.9 และ 1298.2, PFM4 มีน้ำหนักโมเลกุล 1119.5 และ 1141.5, PFM5 มีน้ำหนักโมเลกุล 1119.8, PFM6 มีน้ำหนักโมเลกุล 1122.9 และ 1145.0, PFM7 มีน้ำหนักโมเลกุล 990.7, 1832.6 และ 2034.9, PFM8 มีน้ำหนักโมเลกุล 1303.4 และ

1325.6, PFM9 มีน้ำหนักโมเลกุล 1120.2 และ 1142.4, PFM10 มีน้ำหนักโมเลกุล 1024.8 และ 1046.9, PFM11 มีน้ำหนักโมเลกุล 1301.8 และ 1323.9, PFM12 มีน้ำหนักโมเลกุล 1068.5, PFM13 มีน้ำหนักโมเลกุล 2677.3, PFM14 มีน้ำหนักโมเลกุล 1381.4, PFM15 มีน้ำหนักโมเลกุล 1383.3 และ 1440.4, PFM16 มีน้ำหนักโมเลกุล 1425.3, PFM17 มีน้ำหนักโมเลกุล 1451.7 และ PFM18 มีน้ำหนักโมเลกุล 1123.1, 1145.3 และ 1161.5 ตาราง 3 แสดงค่าน้ำหนักโมเลกุลซึ่งเปปไทด์บางตัวมีค่าความแตกต่างของมวลสารในแต่ละพีคประมาณ 22 และ 37 ดาลตัน (ซึ่งใกล้เคียงกับน้ำหนักของ โซเดียมและโปแตสเซียม) จึงคาดว่าน่าจะเป็นอนุพันธ์ของสารคล้าย FMRFamide ที่มีโซเดียมและโปแตสเซียมเกาะอยู่ในปริมาณต่างๆ (ภาพประกอบ 10-28) ดังนั้นสารคล้าย FMRFamide ที่แยกได้น่าจะมีความบริสุทธิ์เพียงพอที่จะนำไปหาลำดับกรดอะมิโนต่อไป



ภาพประกอบ 5 Dot-ELISA ของเปปไทด์ FMRFamide มาตรฐานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ
 สำหรับใช้ในการเปรียบเทียบกับสารคัดหลั่ง FMRFamide ในตัวอย่าง เพื่อประมาณปริมาณ
 ของสารคัดหลั่ง FMRFamide ในขั้นตอนต่างๆ ในระหว่างการทำให้บริสุทธิ์



1

10

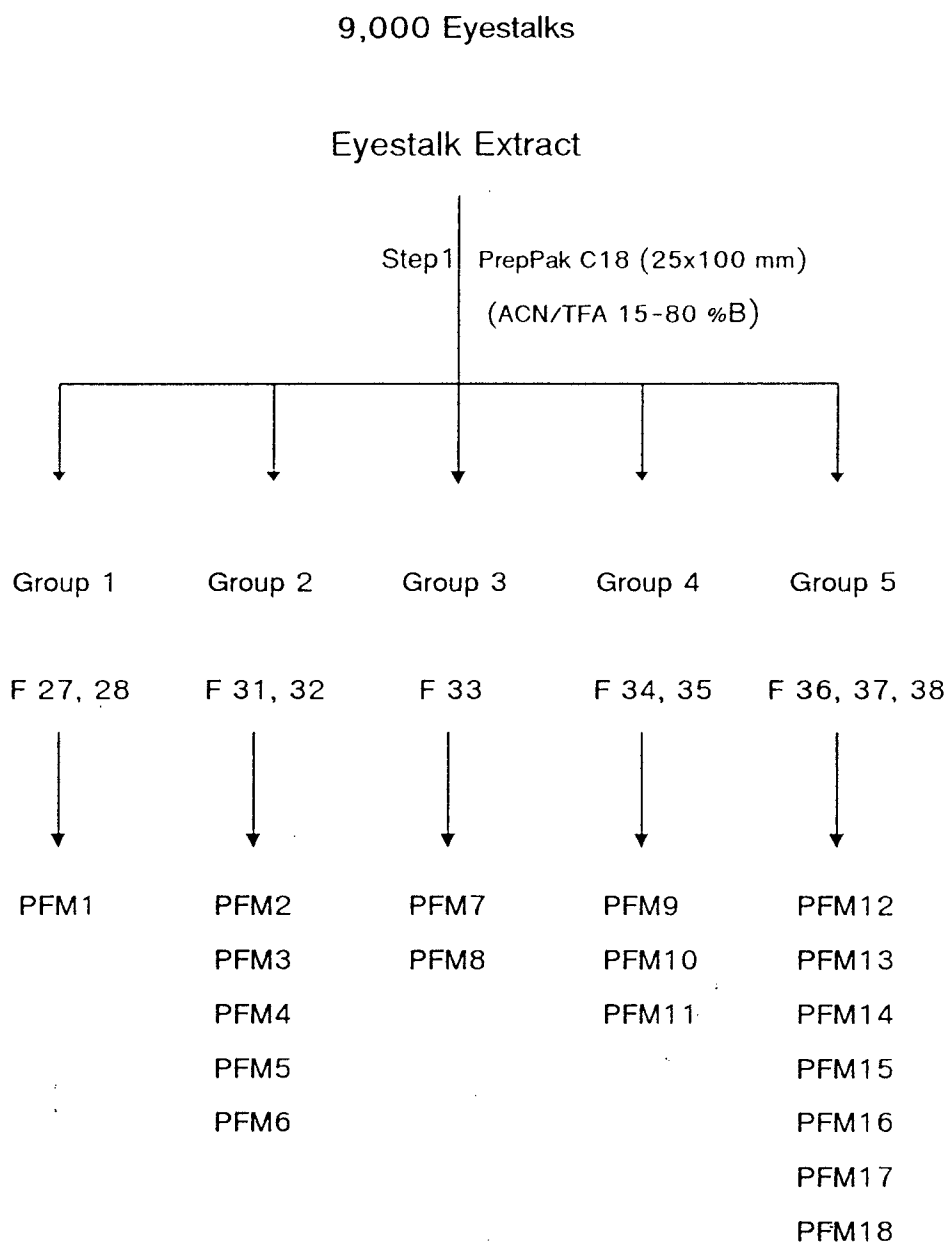


71

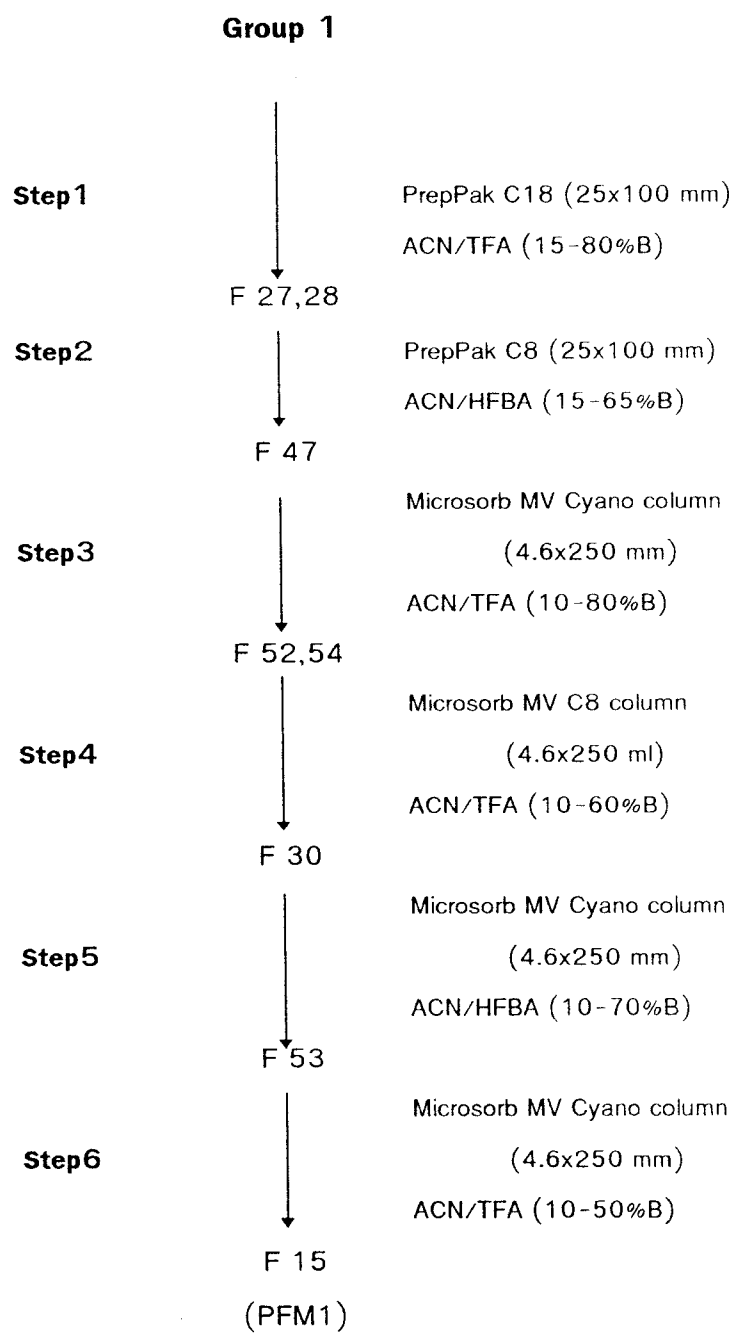
80

15 ต

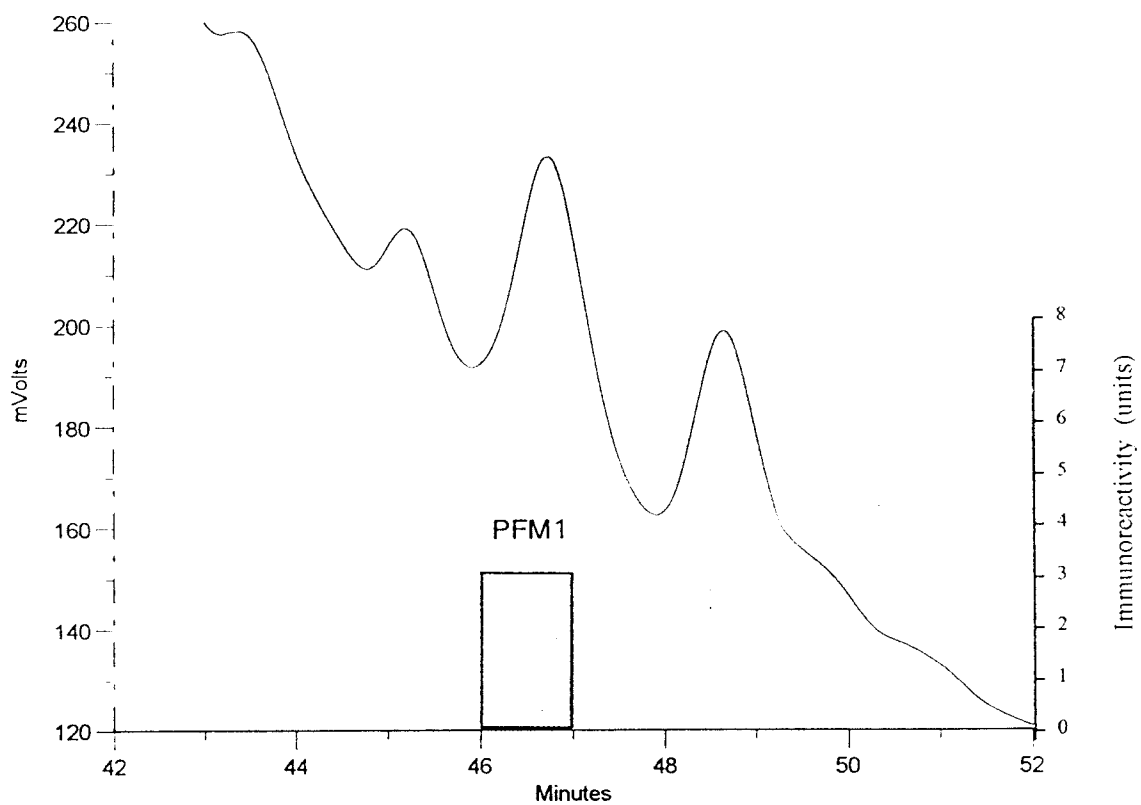
ภาพประกอบ 6 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากก้านดาถั่งภูสดำจำนวน 1,500 ก้านดา หลังจากผ่านกระบวนการ RP-HPLC ขั้นตอนแรก (คอลัมน์ : PrepPak C18 ; ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA) และแผนภูมิแท่งแสดงความเข้มข้นของสีจุด ซึ่งสรุปจาก FMRFamide immunoreactivity บนแผ่นไนโตรเซลลูโลส พบสารคล้าย FMRFamide ในแฟรคชันที่ 27-28 และ 31-45 ตัวเลขเหนือแผนภูมิแท่งเป็นชื่อของเปปไทด์ที่สามารถทำให้บริสุทธิ์จากแฟรคชันกลุ่มต่างๆ



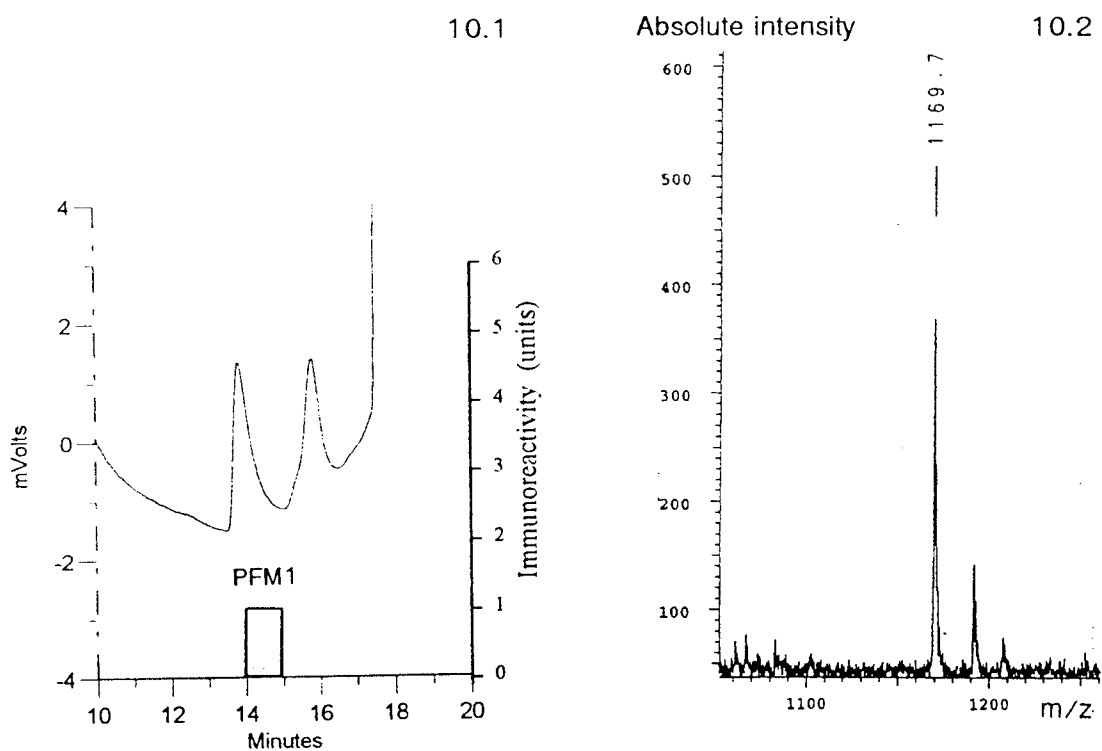
ภาพประกอบ 7 ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ของสารคล้าย FMRFamide ด้วยกระบวนการ RP-HPLC กลุ่มต่างๆ จากการแยกด้วยคอลัมน์ : PrepPak C18 ; ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA และ เปปไทด์ของสารคล้าย FMRFamide ที่แยกได้จากแฟรคชันกลุ่มต่างๆ



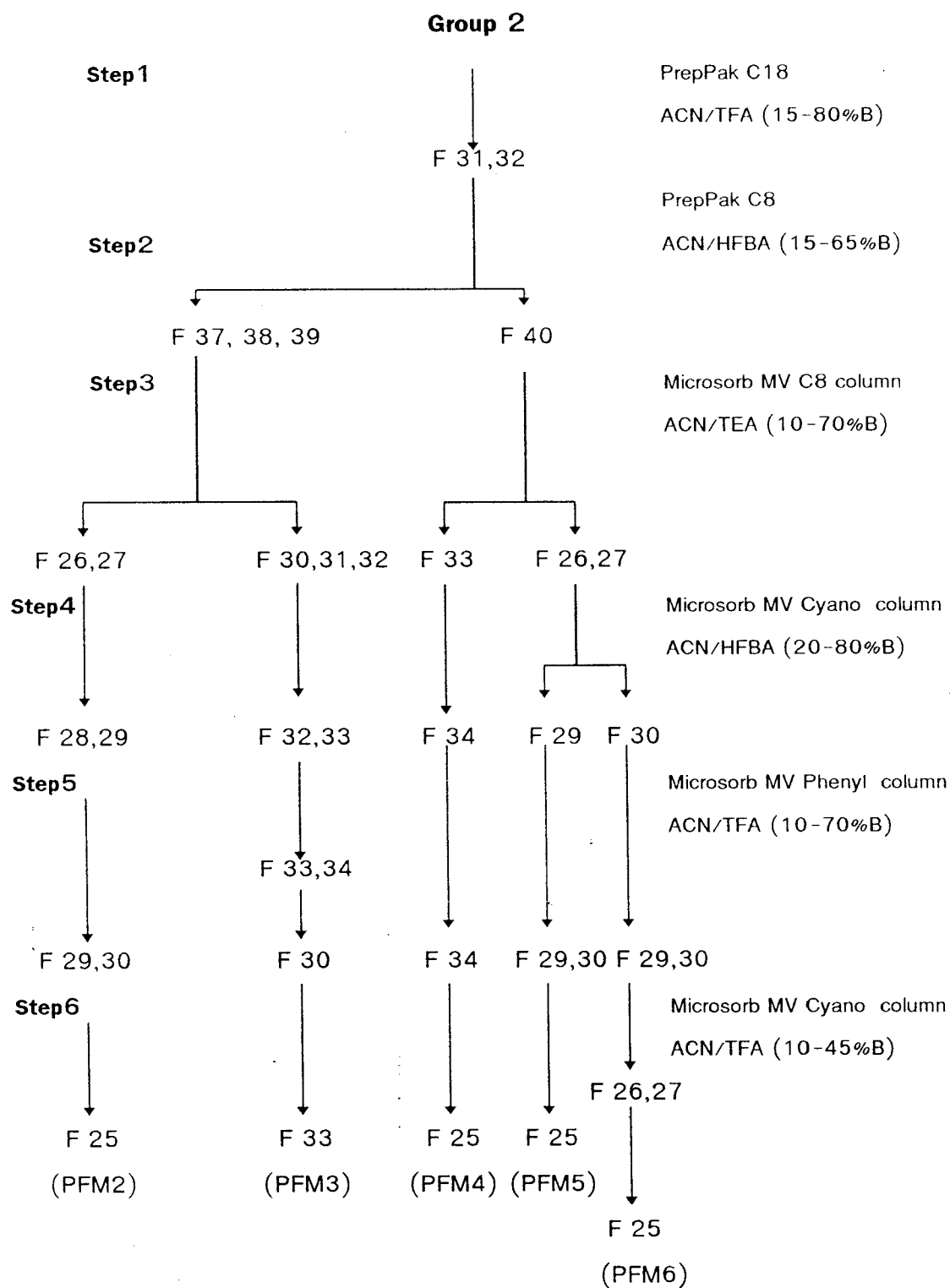
ภาพประกอบ 8 ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย FMRFamide ด้วยกระบวนการ RP-HPLC ของสารคล้าย FMRFamide กลุ่มที่ 1



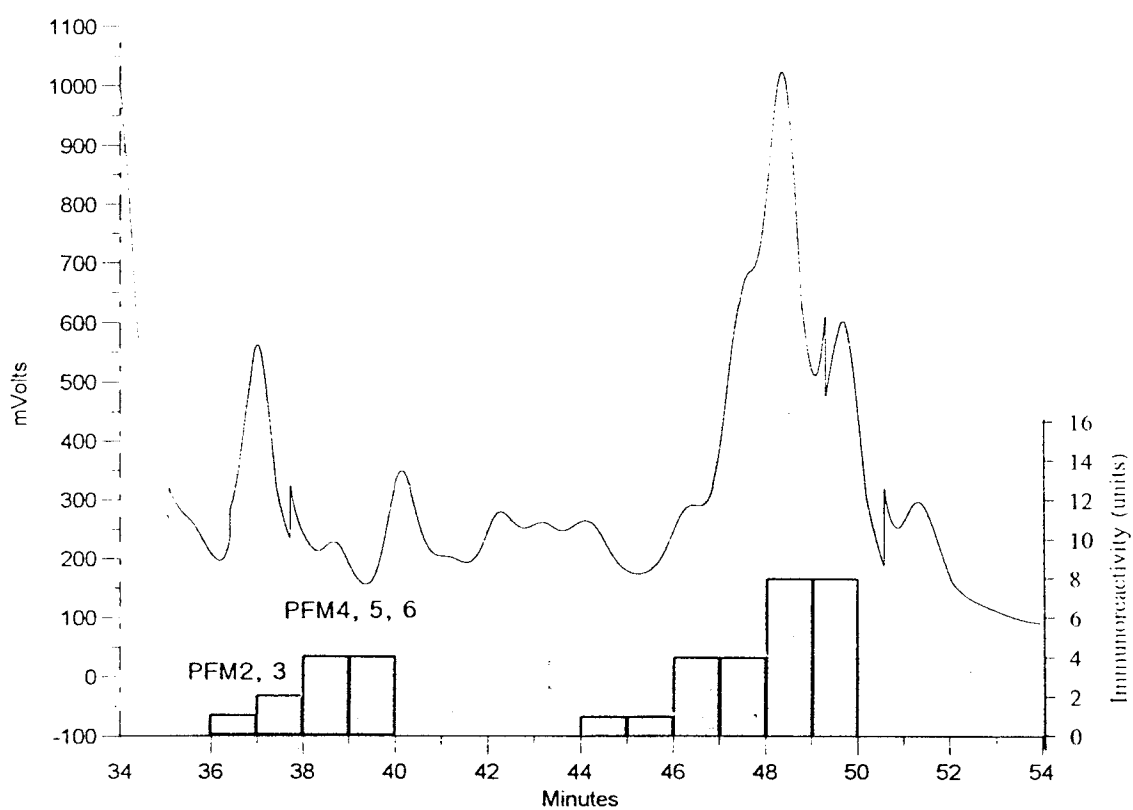
ภาพประกอบ 9 โครมาโตแกรมของสารสกัดกลุ่มที่ 1 จากก้านตาของกุ่มกูด้าจำนวน 9,000 ก้านตาที่ผ่านกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 2 (คอลัมน์ : PrepPak C8 ; ระบบตัวทำละลาย ACN/HFBA) และแผนภูมิแท่งแสดงความเข้มข้นของสารคล้าย FMRFamide ในแฟรคชันที่ 47 ตัวเลขเหนือแผนภูมิแท่งเป็นชื่อของเปปไทด์ที่สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้



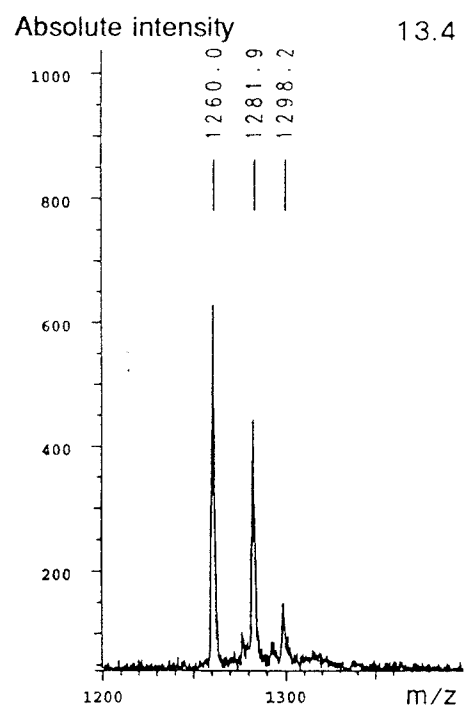
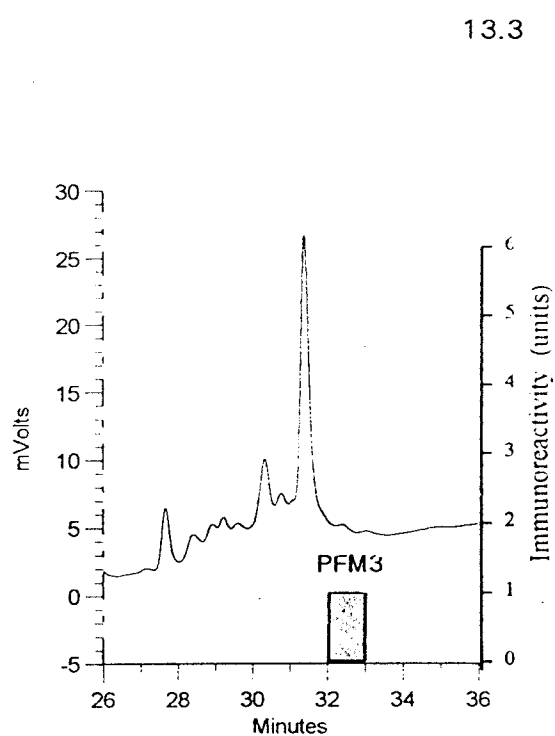
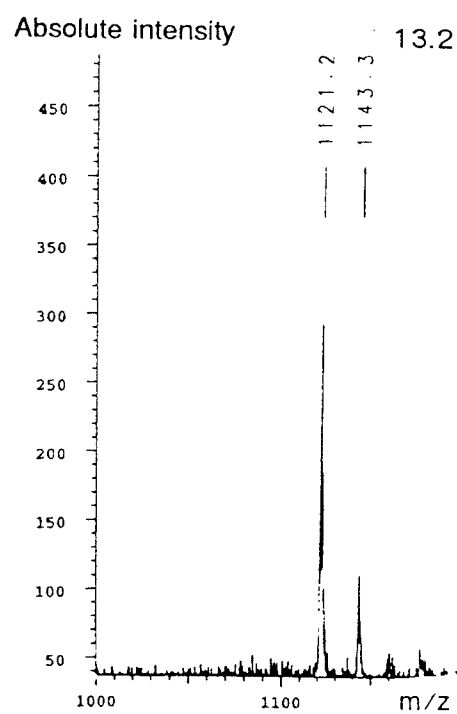
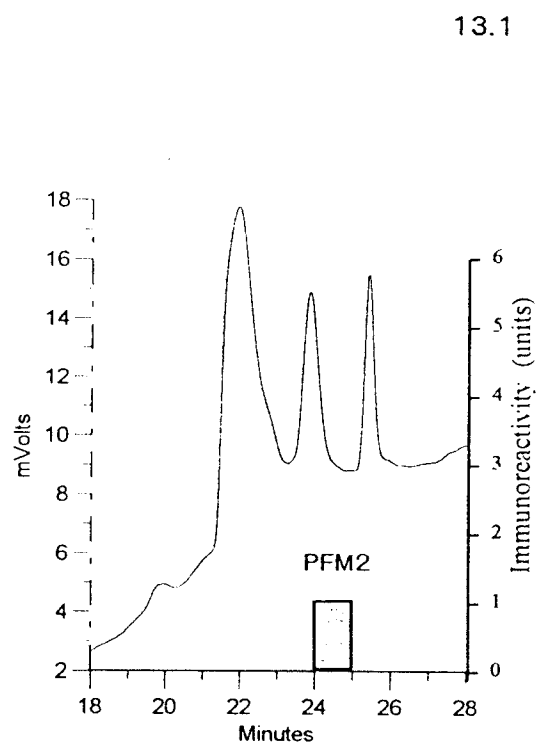
ภาพประกอบ 10 โครมาโตแกรมการทำให้บริสุทธิ์ของเปปไทด์ในกลุ่มที่ 1 คือ PFM1 (10.1) โดยผ่านกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 6 ใช้คอลัมน์ C8 ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA และแมสสเปกตรัมของสารคล้าย FMRamide PFM1(10.2)



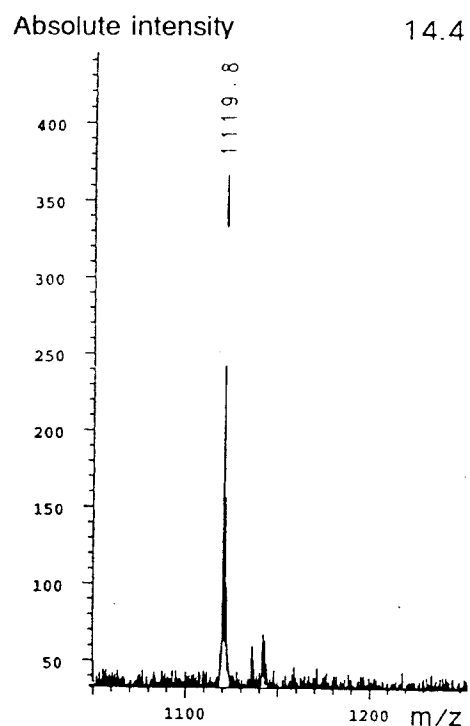
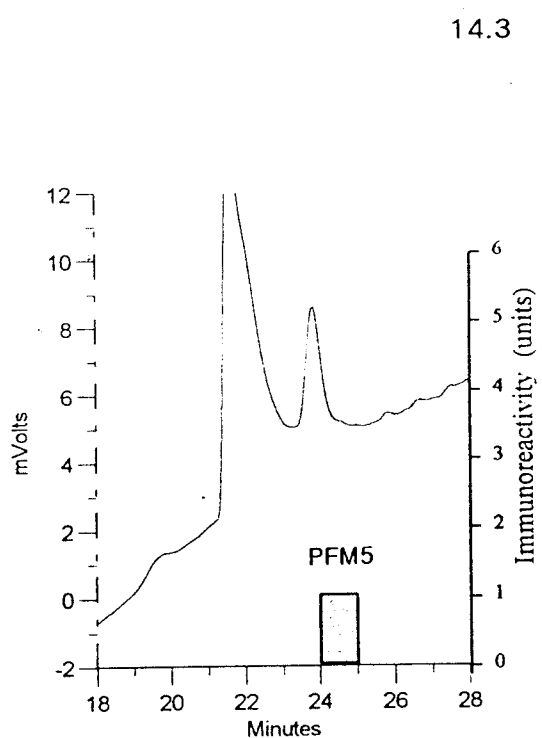
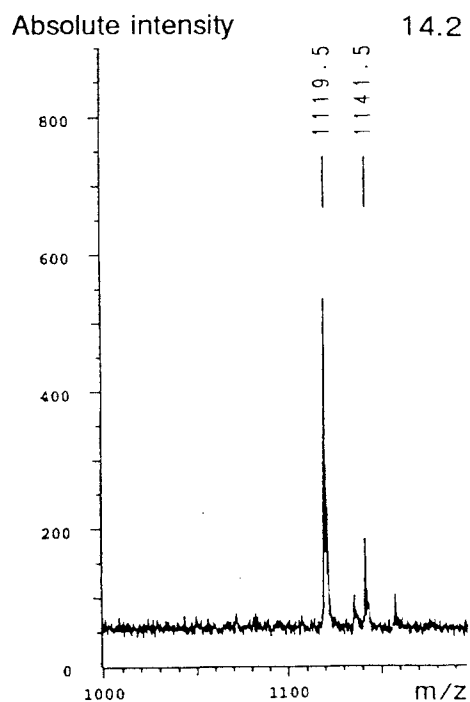
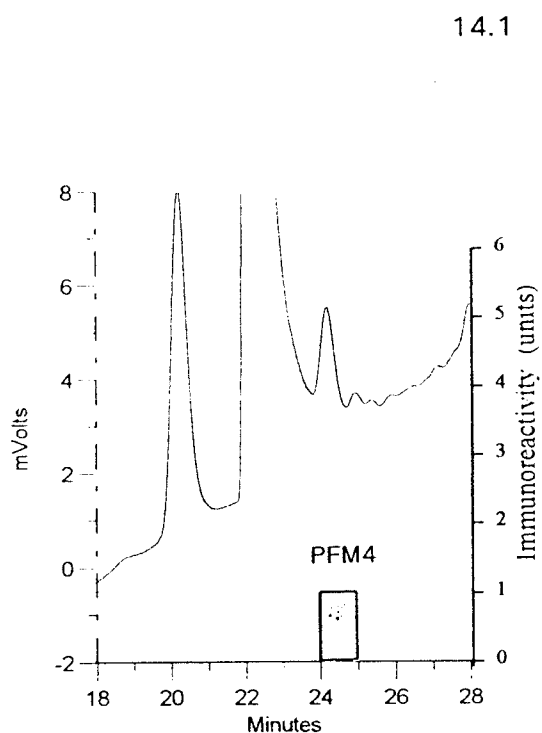
ภาพประกอบ 11 ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย FMRFamide ด้วยกระบวนการ RP-HPLC ของสารคล้าย FMRFamide กลุ่มที่ 2



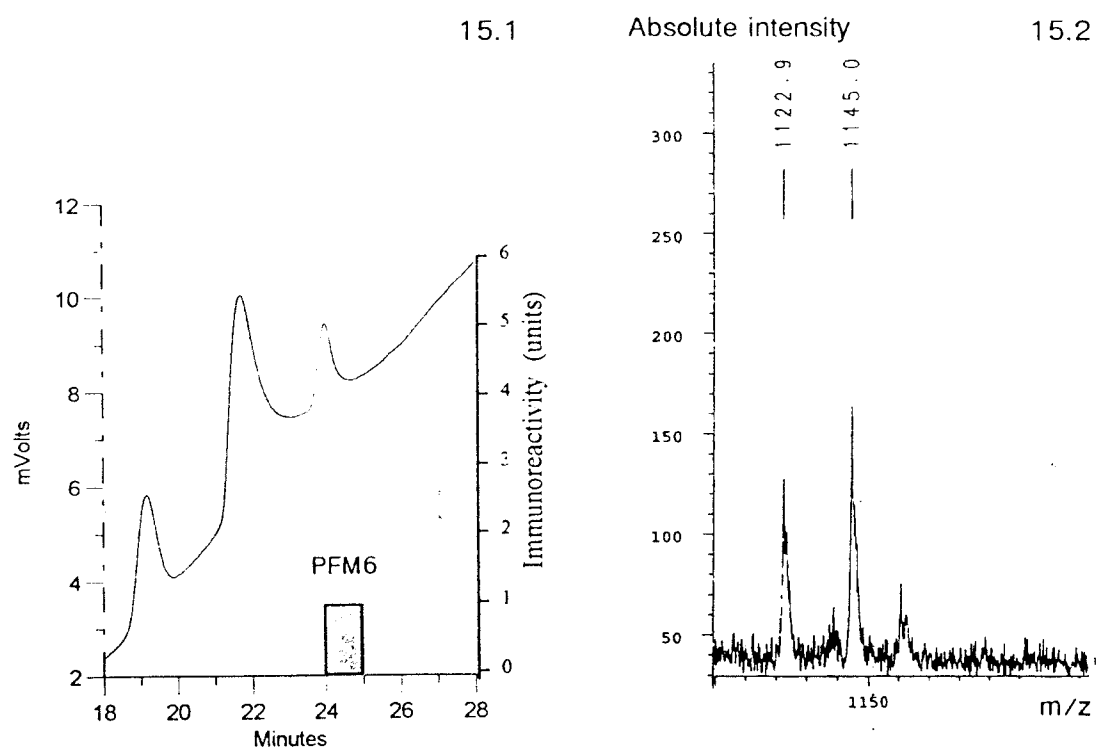
ภาพประกอบ 12 โครมาโตแกรมของสารสกัดกลุ่มที่ 2 จากก้านตาของกิ้งกูดดำจำนวน 9,000 ก้านตา ที่ผ่านกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 2 (คอลัมน์ : PrepPak C8 ; ระบบตัวทำละลาย ACN/HFBA และแผนภูมิแท่งแสดงความเข้มข้นของสารคล้าย FMRFamide ในแต่ละแฟรคชัน ตัวเลขเหนือแผนภูมิแท่งเป็นชื่อของเปปไทด์ที่สามารถทำให้บริสุทธิ์



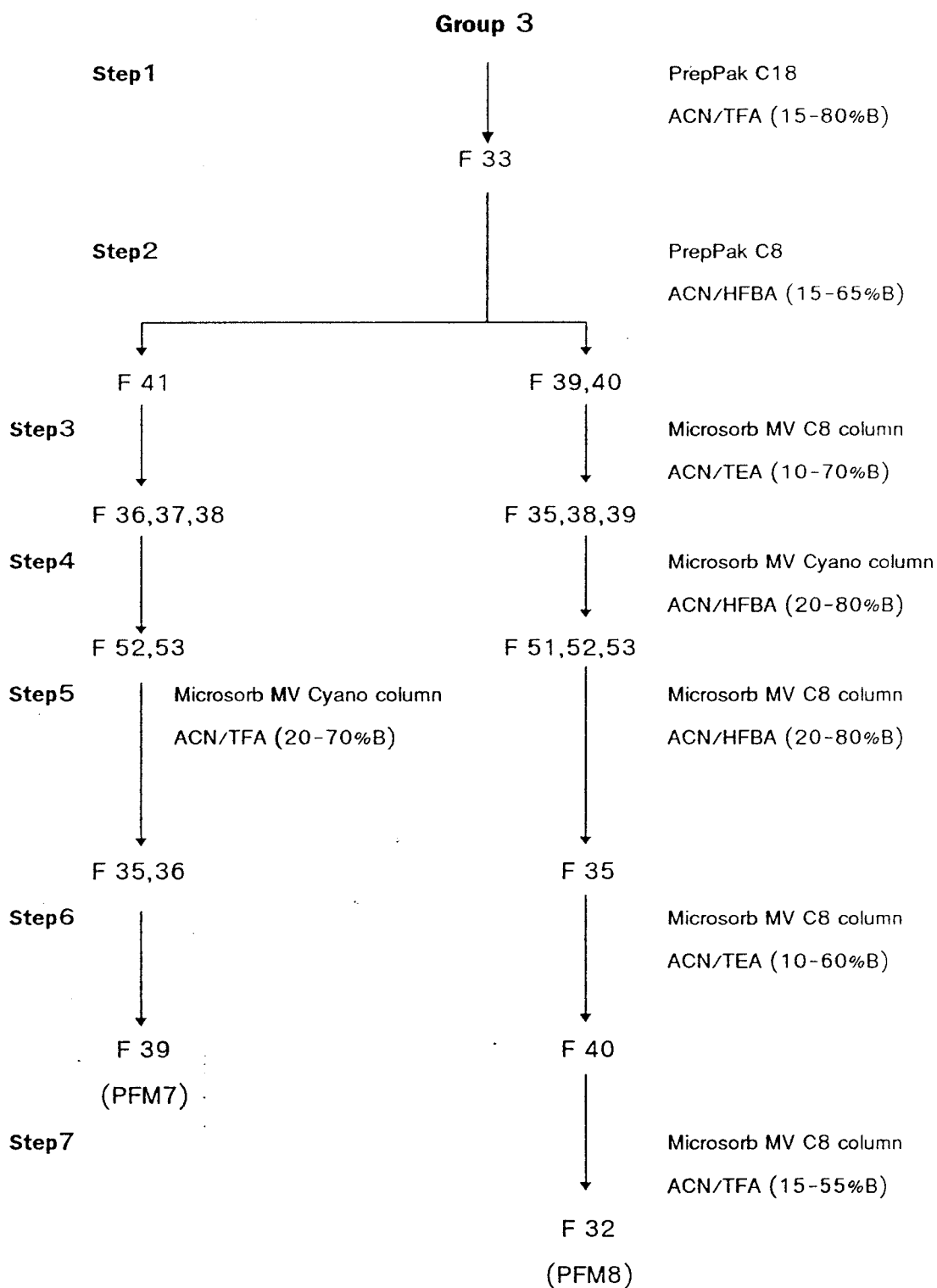
ภาพประกอบ 13 โครมาโตแกรมการทำให้บริสุทธิ์ของเปปไทด์ในกลุ่มที่ 2 คือ PFM2 (13.1) และ PFM3 (13.3) ในขั้นตอนที่ 6 โดยผ่านกระบวนการ RP-HPLC ใช้คอลัมน์ Cyano ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA และแมสสเปกตรัมของสารคล้าย FMRFamide PFM2 (13.2) และ PFM3 (13.4)



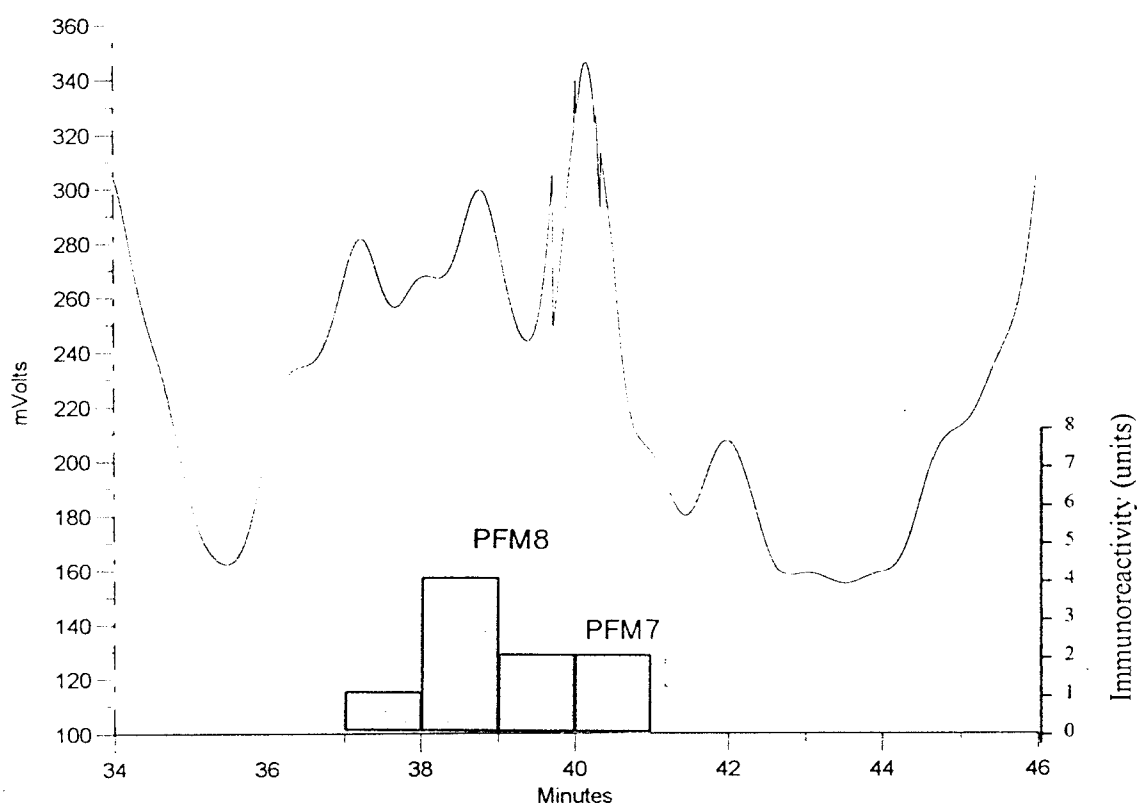
ภาพประกอบ 14 โครมาโตแกรมการทำให้บริสุทธิ์ของเปปไทด์ในกลุ่มที่ 2 คือ PFM4 (14.1) และ PFM5 (14.3) ในขั้นตอนที่ 6 โดยผ่านกระบวนการ RP-HPLC ใช้คอลัมน์ Cyano ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA และแมสสเปกตรัมของสารคล้าย FMRamide PFM4 (14.2) และ PFM5 (14.4)



ภาพประกอบ 15 โครมาโตแกรมการทำให้บริสุทธิ์ของเปปไทด์ในกลุ่มที่ 2 คือ PFM6 (15.1) ในขั้นตอนที่ 6 โดยผ่านกระบวนการ RP-HPLC ใช้คอลัมน์ Cyano ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA และแมสสเปกตรัมของสารคล้าย FMRamide PFM6 (15.2)

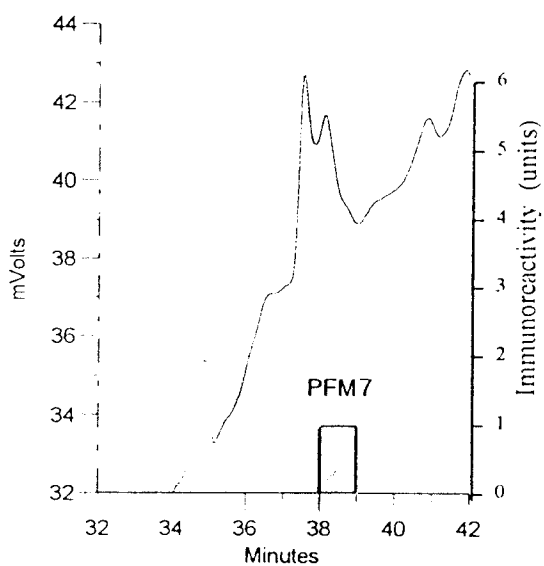


ภาพประกอบ 16 ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย FMRamide ด้วยกระบวนการ RP-HPLC ของสารคล้าย FMRamide กลุ่มที่ 3

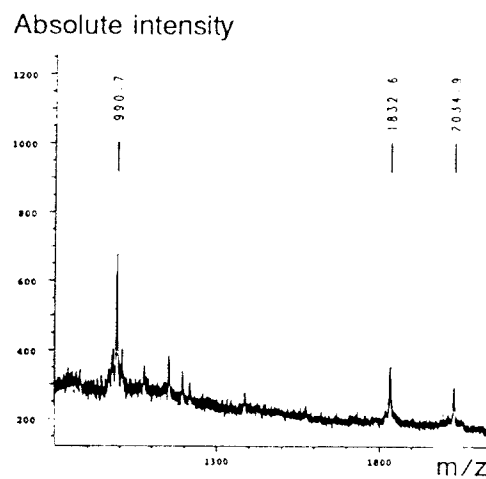


ภาพประกอบ 17 โครมาโตแกรมของสารสกัดกลุ่มที่ 3 จากก้านตาของกุ่มกุลาด้าจำนวน 9,000 ก้านตา ที่ผ่านกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 2 (คอลัมน์ : PrepPak C8 ; ระบบตัวทำละลาย ACN/HFBA) และแผนภูมิแท่งแสดงความเข้มข้นของสารคล้าย FMRF-amide ในแต่ละแฟรคชัน ตัวเลขเหนือแผนภูมิแท่งเป็นชื่อของเปปไทด์ที่สามารถทำให้บริสุทธิ์

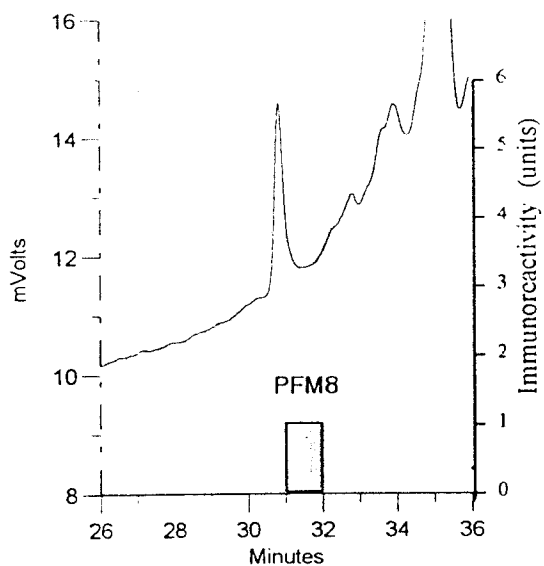
18.1



18.2

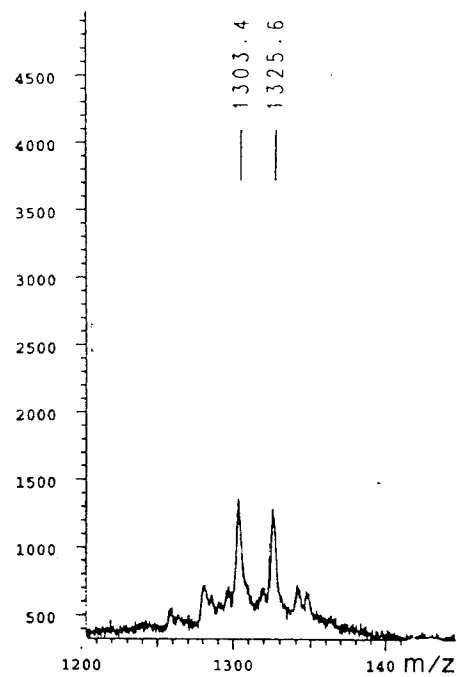


18.3

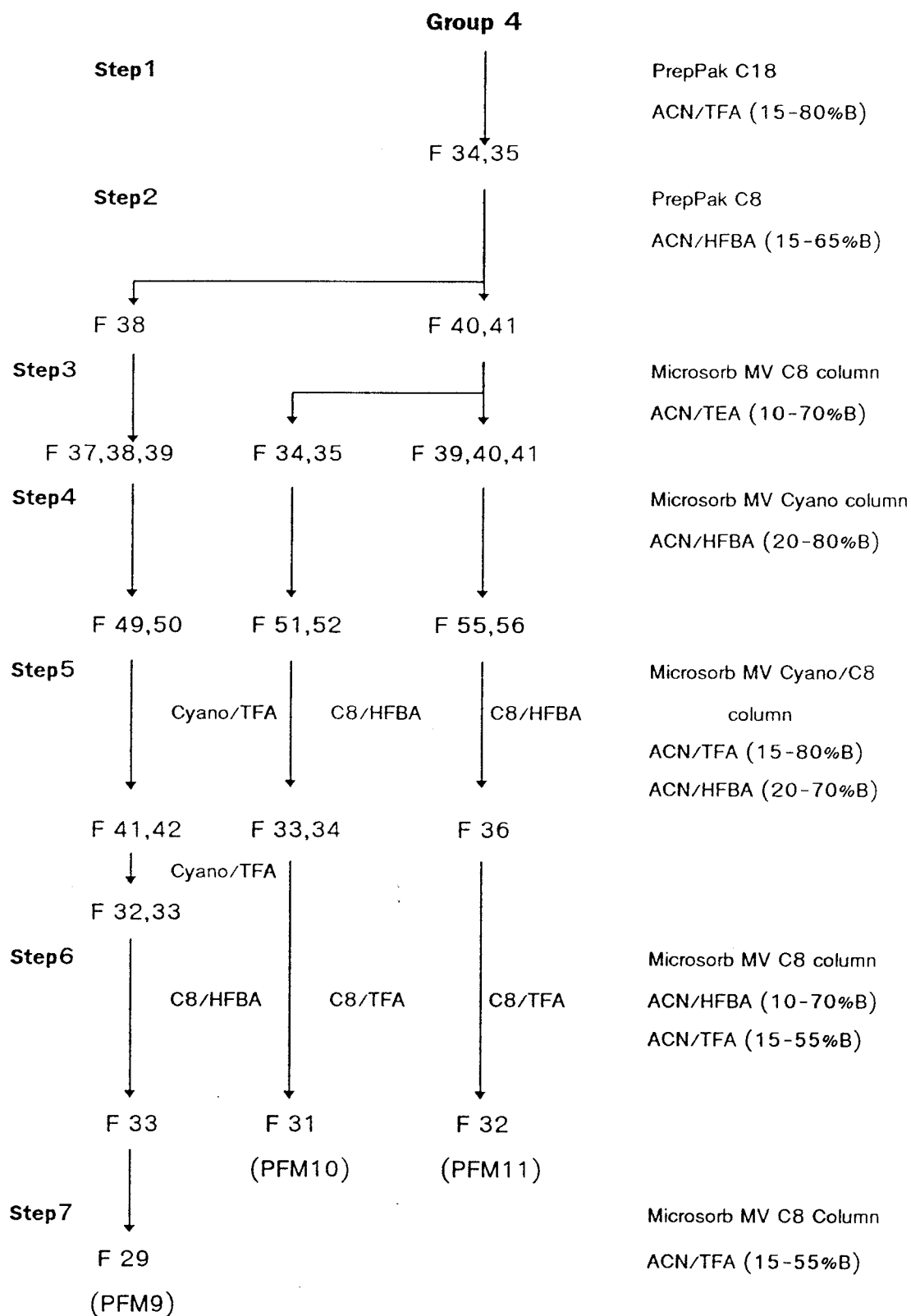


Absolute intensity

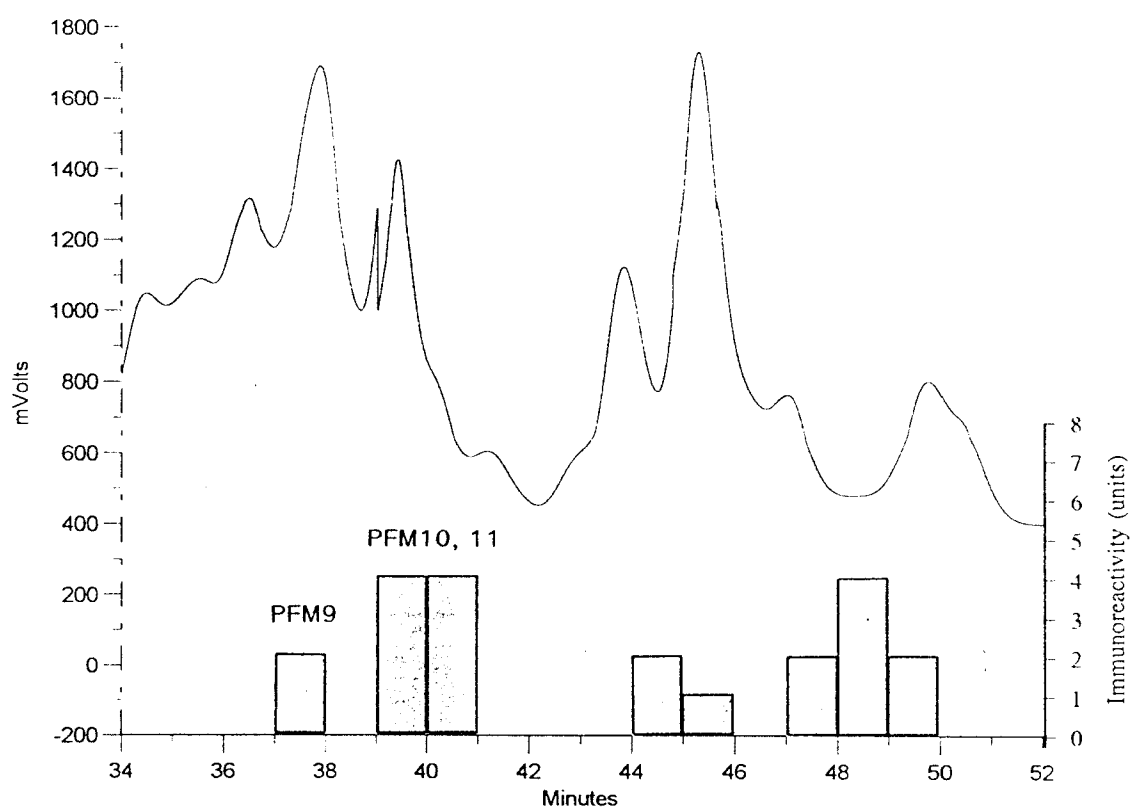
18.4



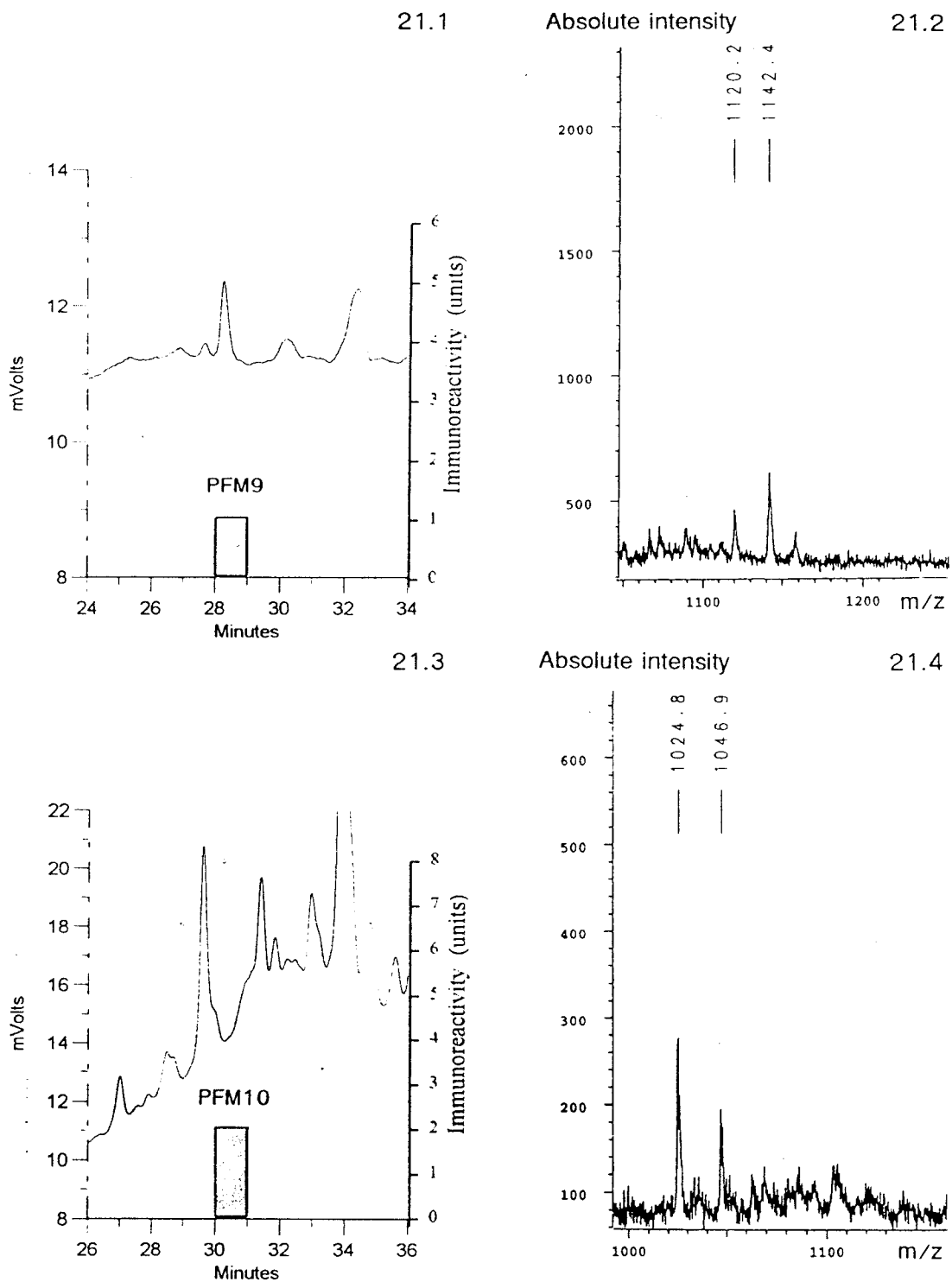
ภาพประกอบ 18 โครมาโตแกรมการทำให้บริสุทธิ์ของเปปไทด์ในกลุ่มที่ 3 PFM7(18.1) และ PFM8 (18.3) ในขั้นตอนที่ 6 และขั้นตอนที่ 7 โดยผ่านกระบวนการ RP-HPLC ใช้คอลัมน์ C8 ระบบตัวทำละลาย ACN/TEA หรือ ACN/TFA และแมสสเปกตรัมของสารคล้าย FMRFamide PFM7 (18.2) และ PFM8 (18.4)



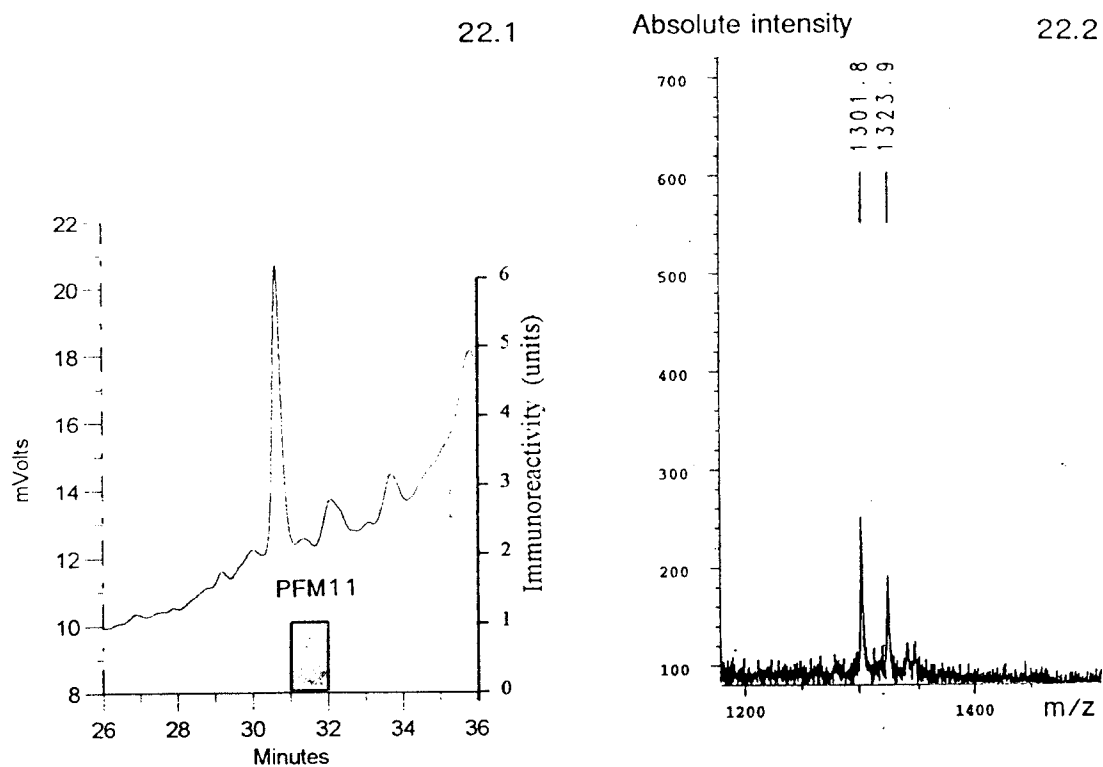
ภาพประกอบ 19 ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย FMRFamide ด้วยกระบวนการ RP-HPLC ของสารคล้าย FMRFamide กลุ่มที่ 4



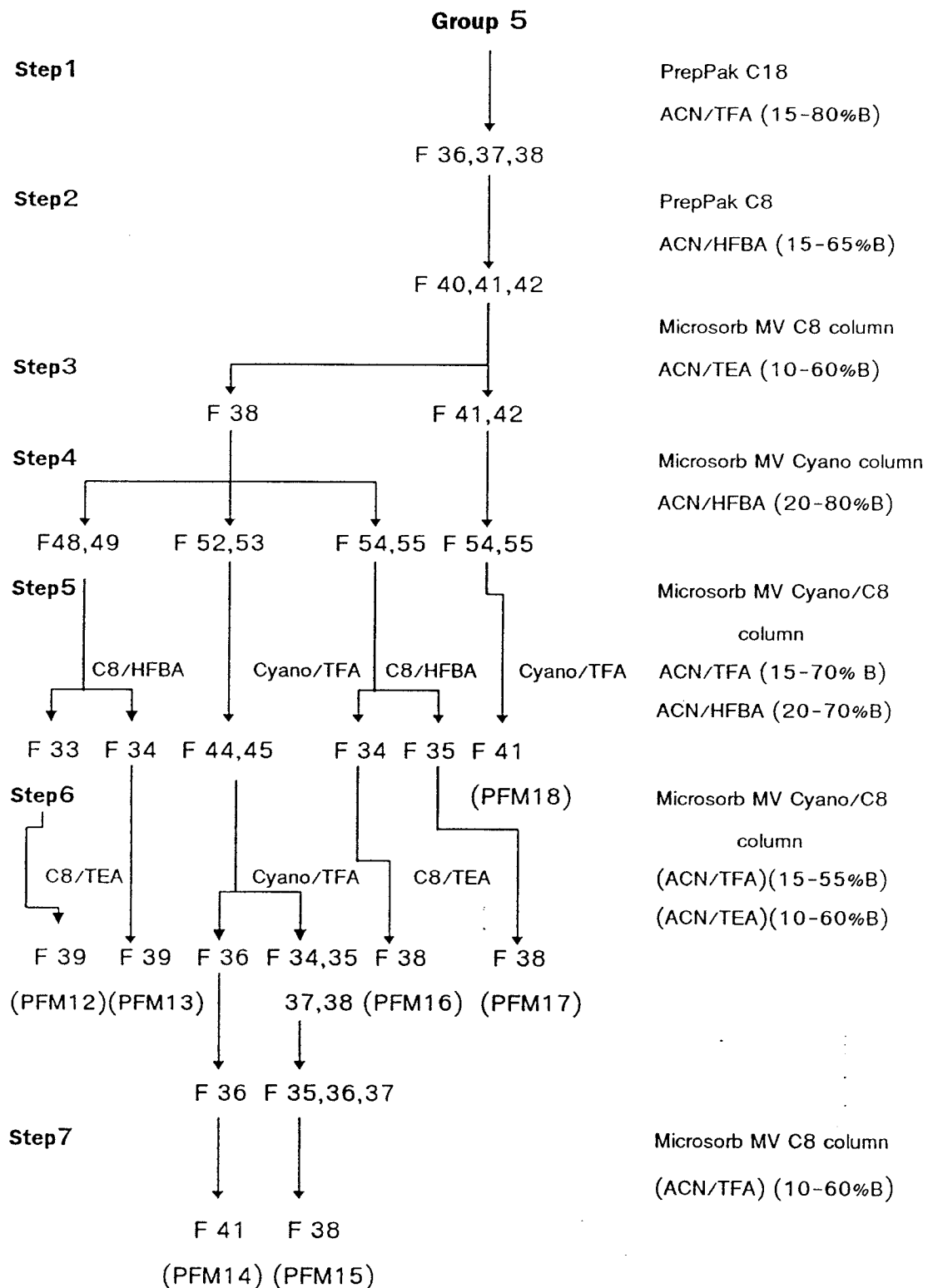
ภาพประกอบ 20 โครมาโตแกรมของสารสกัดกลุ่มที่ 4 จากก้านตาของกุ่มกุลาดำจำนวน 9,000 ก้านตา ที่ผ่านกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 2 (คอลัมน์ : PrepPak C8 ; ระบบตัวทำละลาย ACN/HFBA) และแผนภูมิแท่งแสดงความเข้มข้นของสารคล้าย FMRF-amide ในแต่ละแฟรคชัน ตัวเลขเหนือแผนภูมิแท่งเป็นชื่อของเปปไทด์ที่สามารถทำให้บริสุทธิ์



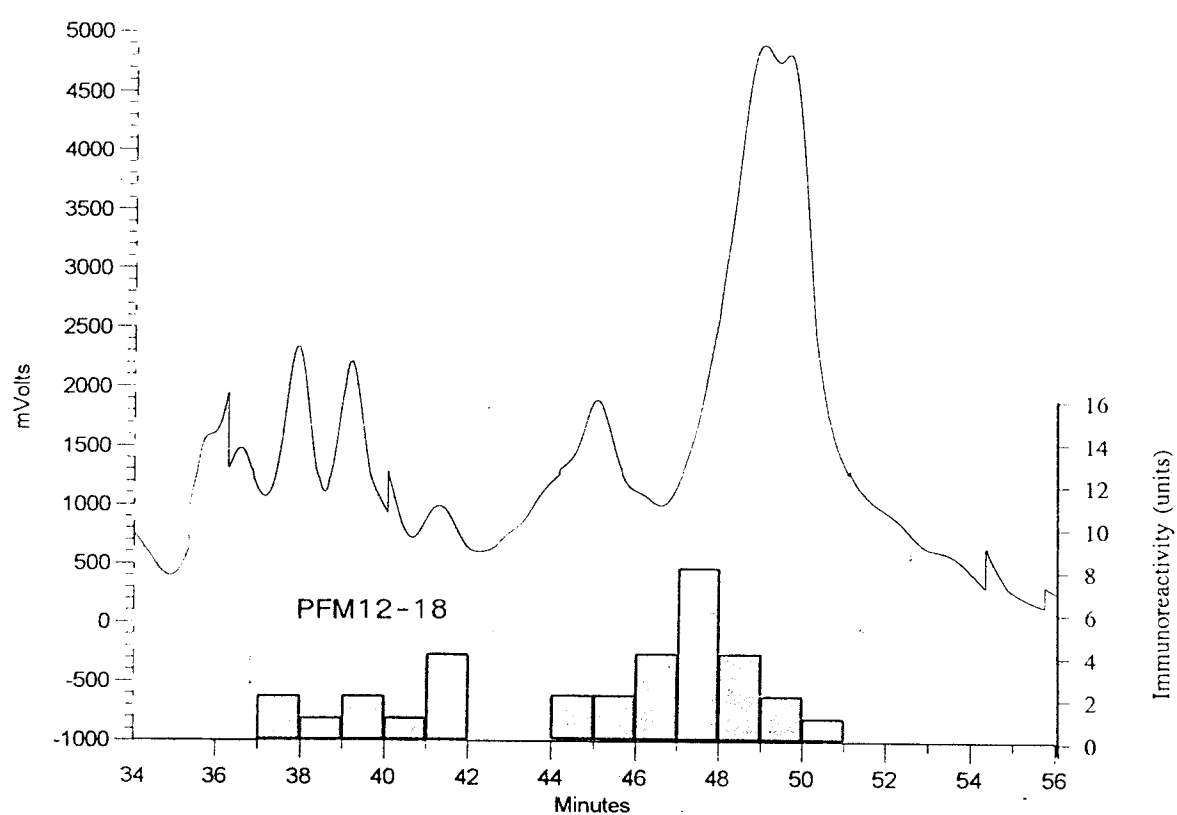
ภาพประกอบ 21 โครมาโตแกรมการทำให้บริสุทธิ์ของเปปไทด์กลุ่มที่ 4 คือ PFM9 (21.1), และ PFM10 (21.3) ในขั้นตอนที่ 6 และขั้นตอนที่ 7 โดยผ่านกระบวนการ RP-HPLC ใช้คอลัมน์ C8 ระบบตัวทำละลาย ACN/HFBA หรือ ACN/TFA และแมสสเปกตรัมของสารคล้าย FMRFamide PFM9 (21.2) และ PFM10 (21.4)



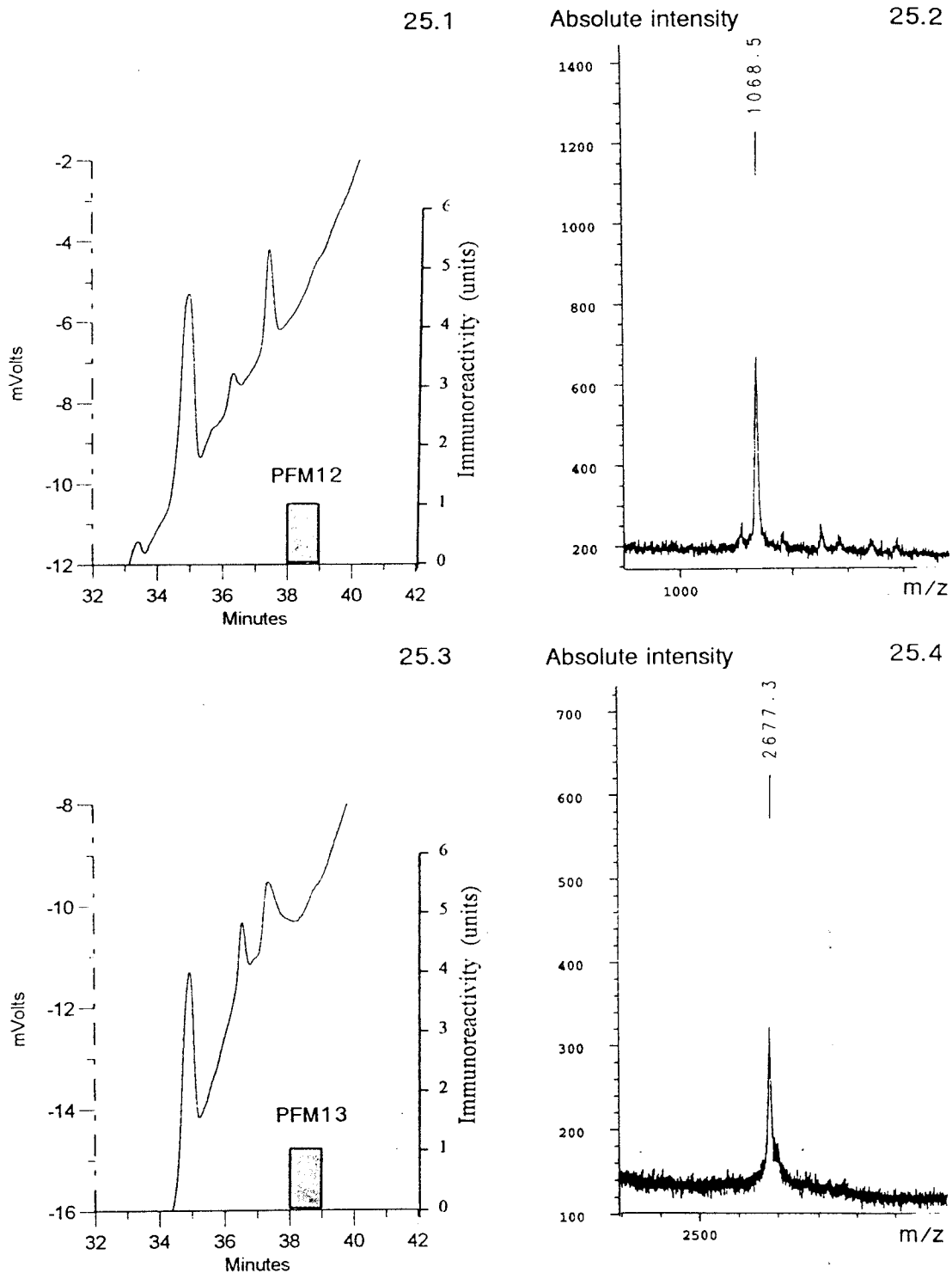
ภาพประกอบ 22 โคโรมาโตแกรมการทำให้บริสุทธิ์ของเปปไทด์กลุ่มที่ 4 คือ PFM11 (22.1)
 ในขั้นตอนที่ 6 โดยผ่านกระบวนการ RP-HPLC ใช้คอลัมน์ C8 ระบบตัวทำละลาย
 ACN/TFA และแมสสเปกตรัมของสารคล้าย FMRFamide PFM11 (22.2)



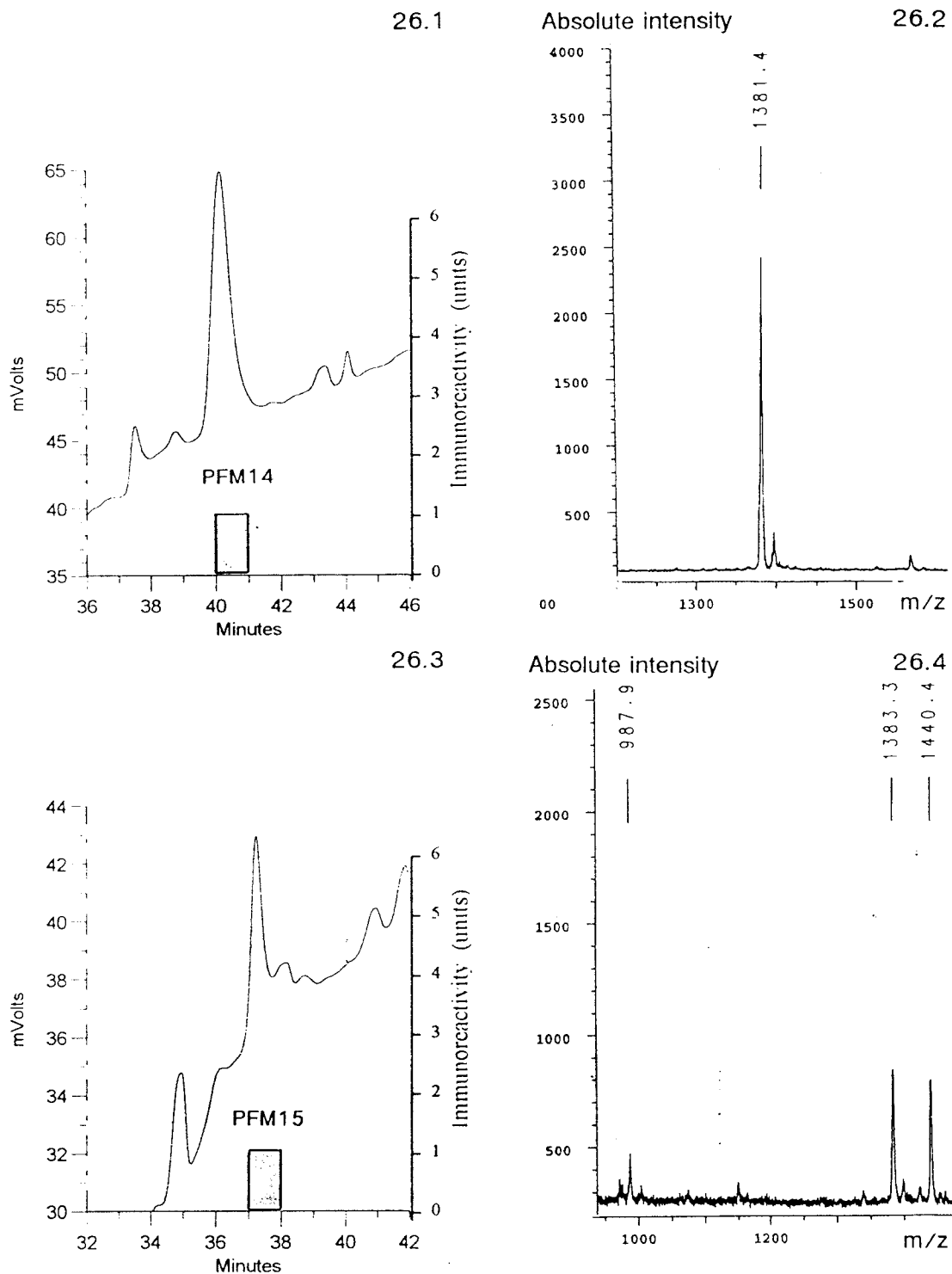
ภาพประกอบ 23 ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย FMRFamide ด้วยกระบวนการ RP-HPLC ของสารคล้าย FMRFamide กลุ่มที่ 5



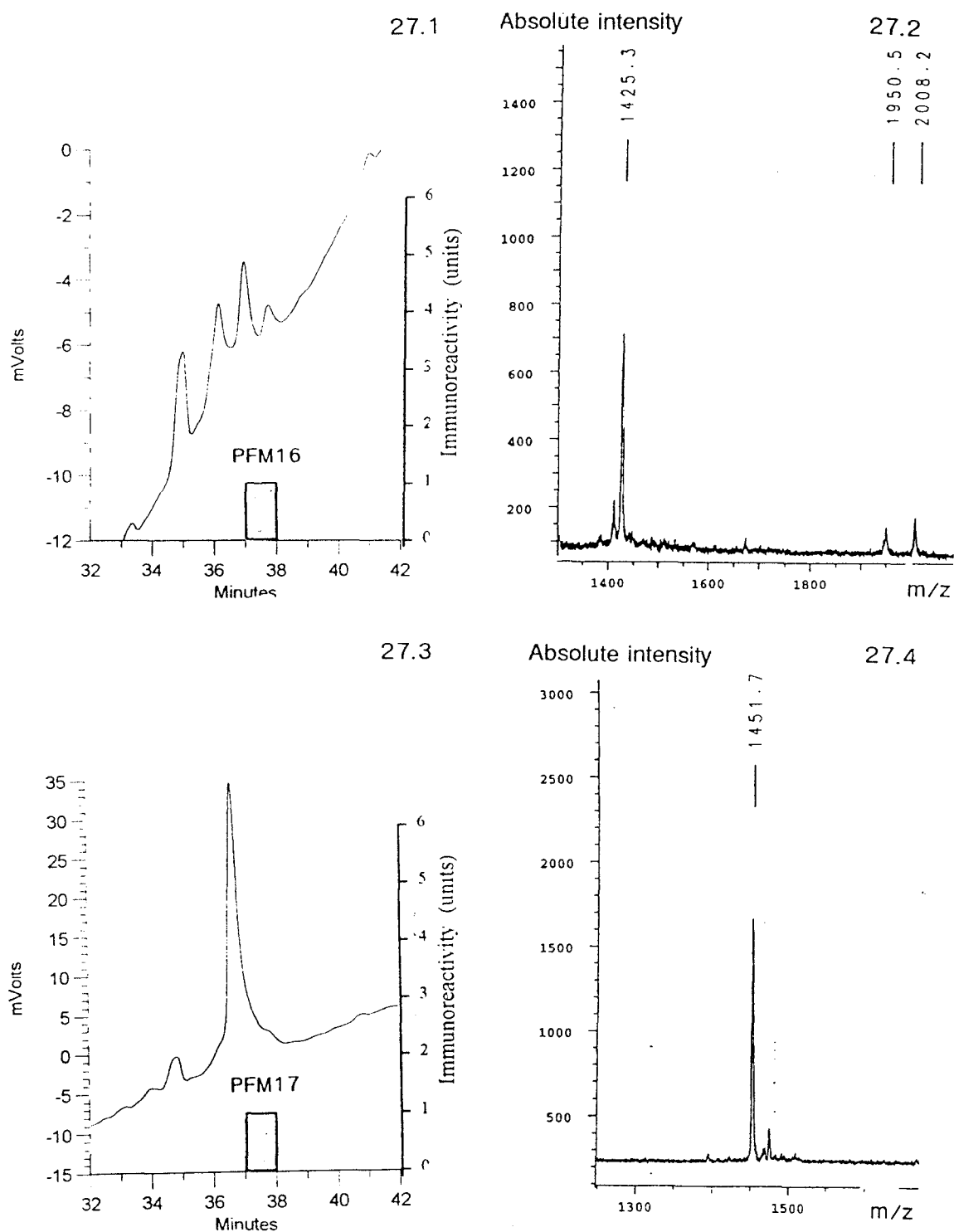
ภาพประกอบ 24 โครมาโตแกรมของสารสกัดกลุ่มที่ 5 จากก้านตาของกุ่มกุลาดำจำนวน 9,000 ก้านตาที่ผ่านกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 2 (คอลัมน์ : PrepPak C8 ; ระบบตัวทำละลาย ACN/HFBA และแผนภูมิแท่งแสดงความเข้มข้นของสารคล้าย FMRFamide ในแต่ละแฟรคชัน ตัวเลขเหนือแผนภูมิแท่งเป็นชื่อของเปปไทด์ที่สามารถทำให้บริสุทธิ์



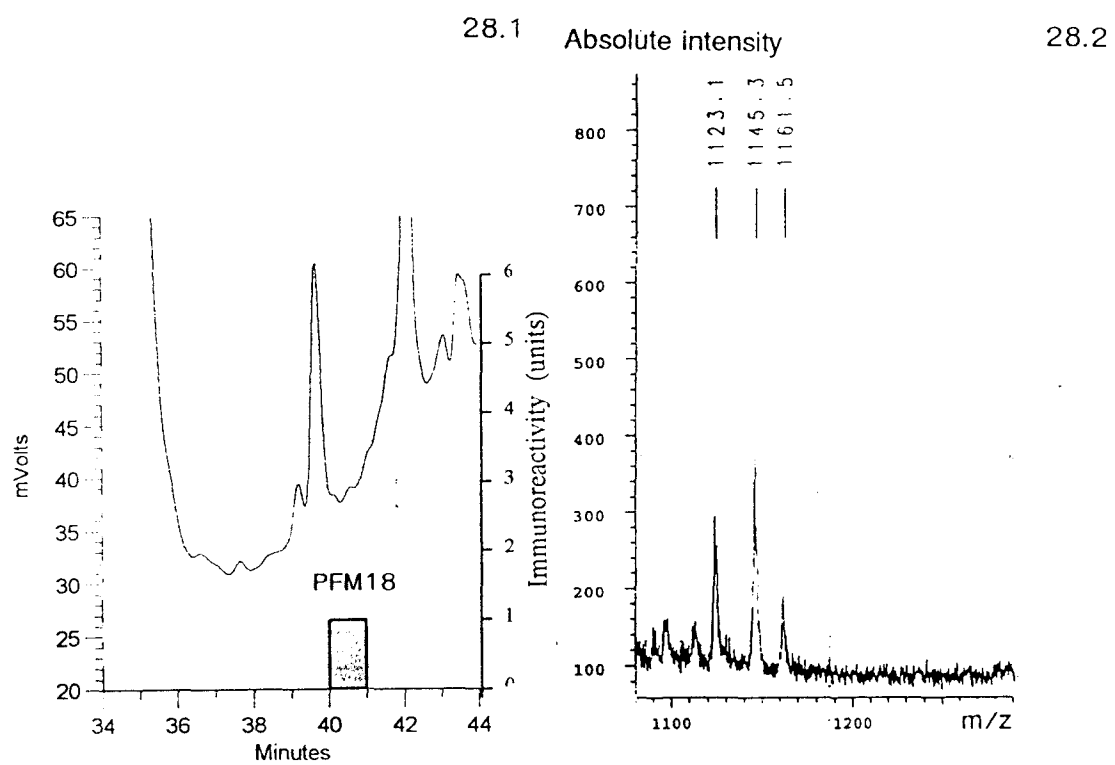
ภาพประกอบ 25 โครมาโตแกรมการทำให้บริสุทธิ์ของเปปไทด์กลุ่มที่ 5 PFM12 (25.1) และ PFM13 (25.3) ในขั้นตอนที่ 6 โดยผ่านกระบวนการ RP-HPLC ใช้คอลัมน์ C8 ระบบตัวทำละลาย ACN/TEA และแมสสเปกตรัมของสารคล้าย FMRFamide PFM12 (25.2) และ PFM13 (25.4)



ภาพประกอบ 26 โครมาโตแกรมการทำให้บริสุทธิ์ของเปปไทด์กลุ่มที่ 5 PFM14 (26.1) และ PFM15 (26.3) ในขั้นตอนที่ 7 โดยผ่านกระบวนการ RP-HPLC ใช้คอลัมน์ C8 ระบบตัวทำละลาย ACN/TEA และแมสสเปกตรัมของสารคล้าย FMRamide PFM14 (26.2) และ PFM15 (26.4)



ภาพประกอบ 27 โครมาโตแกรมการทำให้บริสุทธิ์ของเปปไทด์กลุ่มที่ 5 PFM16 (27.1) และ PFM17 (27.3) ในขั้นตอนที่ 6 โดยผ่านกระบวนการ RP-HPLC ใช้คอลัมน์ C8 ระบบตัวทำละลาย ACN/TEA และแมสสเปกตรัมของสารคล้าย FMRFamide PFM16 (27.2) และ PFM17 (27.4)



ภาพประกอบ 28 โคโรมาโตแกรมการทำให้บริสุทธิ์ของเปปไทด์กลุ่มที่ 5 PFM18 (28.1) ในขั้นตอนที่ 5 โดยผ่านกระบวนการ RP-HPLC ใช้คอลัมน์ Cyano ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA และแมสสเปกตรัมของสารคล้าย FMRFamide PFM18 (28.2)

ตาราง 3 แสดงน้ำหนักโมเลกุลของสารคล้าย FMRFamide ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วย
กระบวนการ RP-HPLC

สารคล้าย FMRFamide	น้ำหนักโมเลกุล (dalton)	ความสูงของพีค (mV)
PFM1 F. 15	1169.7	2
PFM2 F. 25	<u>1121.2</u> , 1143.3*	6
PFM3 F. 33	<u>1260.0</u> , 1281.9*, 1298.2**	17
PFM4 F. 25	<u>1119.5</u> , 1141.5*	2
PFM5 F. 25	1119.8	3
PFM6 F. 25	<u>1122.9</u> , 1145.0	1
PFM7 F. 39	<u>990.7</u> , 1832.6 [☆] , 2034.9 [☆]	2
PFM8 F. 32	<u>1303.4</u> , 1325.6*	3
PFM9 F. 29	<u>1120.2</u> , 1142.4*	1
PFM10 F. 31	<u>1024.8</u> , 1046.9*	6
PFM11 F. 32	<u>1301.8</u> , 1323.9*	9
PFM12 F. 39	1068.5	2
PFM13 F. 39	2677.3	1
PFM14 F. 41	1381.4	18
PFM15 F. 38	987.9 [☆] , <u>1383.3</u> , 1440.4 [☆]	5
PFM16 F. 38	<u>1425.3</u> , 1950.5 [☆] , 2008.2 [☆]	2
PFM17 F. 38	1451.7	35
PFM18 F. 41	<u>1123.1</u> , 1145.3*, 1161.5**	11

* อนุพันธ์ของเปปไทด์ที่มีโซเดียม

** อนุพันธ์ของเปปไทด์ที่มีโปแทสเซียม

☆ เปปไทด์ที่มีความปนเปื้อน

บทที่ 4

สรุปและอภิปรายผล

จากการทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย FMRFamide จากก้านตาของกึ่งกลาดำจำนวน 9,000 ก้านตา สามารถแยกเปปไทด์ของสารคล้าย FMRFamide ได้บริสุทธิ์ 18 แพรคชัน ซึ่งเมื่อนำเปปไทด์ของสารคล้าย FMRFamide ที่แยกได้ 18 แพรคชันนี้ไปวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลโดย MALDI-TOF-MS พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 990.7-2679.3 ดาลตัน (ตาราง 3) ซึ่งผลที่ได้จากการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลนี้ พบว่าบางแพรคชันมีพีคของสารที่มีมวลโมเลกุลแตกต่างกันประมาณ 22 หรือ 38 ดาลตันปะปนมาด้วย เช่น PFM3 มีน้ำหนักโมเลกุล 1260.0, 1281.9 และ 1298.2 ดาลตัน (ตาราง 3 และภาพประกอบ 8-28) ซึ่งคาดว่าจะจะเป็นอนุพันธ์ของสารคล้าย FMRFamide ที่มีโซ่เดียมหรือโปแทสเซียมประกอบอยู่ในปริมาณต่างๆ กัน

สารคล้าย FMRFamide ที่ได้นี้บางแพรคชันอาจเป็นรูปแบบเดียวกันเพราะมีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกันมาก (ความแปรปรวนของการหาน้ำหนักโมเลกุลโดย MALDI-TOF-MS มีความคลาดเคลื่อนประมาณ 0.1%) เช่น PFM4 (1119.5) และ PFM5 (1119.8) PFM2 (1121.2) และ PFM6 (1122.9) เพราะในขั้นตอนที่ 2 เปปไทด์เหล่านี้ปรากฏในแพรคชันกลุ่มเดียวกันคือ (กลุ่มที่ 2) แต่อาจจะถูกแยกออกจากกันในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ขั้นตอนต่างๆ สำหรับเปปไทด์ PFM9 (1120.2) คาดว่าจะมีลำดับกรดอะมิโนต่างจากเปปไทด์ PFM4 และ PFM5 ถึงแม้จะมีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกันมากก็ตาม เพราะขั้นตอนการแยกด้วย RP-HPLC ในขั้นตอนแรก PFM9 (กลุ่มที่ 4) แยกออกจาก PFM4 และ PFM5 (กลุ่มที่ 2) ชัดเจน และทำนองเดียวกันกับเปปไทด์ PFM18 (1123.1) ซึ่งแยกออกจากเปปไทด์ PFM2 และ PFM6 ชัดเจนในการแยกด้วย RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 1 แต่อย่างไรก็ตาม PFM18 มีน้ำหนักใกล้เคียงกับ PFM10 (1024.8) และ PFM16 (1025.3) ซึ่งในขั้นตอนการแยกด้วย HPLC ในขั้นตอนที่ 1 อยู่ในแพรคชันใกล้เคียงกัน (กลุ่มที่ 4 และ 5) แต่กรณีของเปปไทด์ PFM14 (1381.4) และ PFM15 (1383.3) ถึงแม้จะมีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกันและพบในแพรคชันกลุ่มเดียวกัน (กลุ่มที่ 5) ในการแยกด้วย RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 1 ก็ตาม น่าจะมีลำดับกรดอะมิโนต่างกันเพราะมีมวลโมเลกุลต่างกัน 2 หน่วย และ retention time ในการแยกขั้นตอนขั้นสุดท้ายต่างกันอย่างชัดเจน (ภาพประกอบ 23) ดังนั้นจึงคาดว่าจะได้เปปไทด์คล้าย FMRFamide รูปแบบต่างๆ กันอย่างน้อย 15 รูปแบบ

จาก mass profile ของ PFM7, PFM15 และ PFM16 (ภาพประกอบ 18, 26 และ 27) ชี้ให้เห็นว่าในแพรคชันประกอบด้วยเปปไทด์มากกว่า 1 ชนิด แต่เนื่องจากปริมาณของสาร

เหลือน้อยมากไม่สามารถแยกต่อให้บริสุทธิ์ขึ้นได้ และในกรณีของ PFM7 และ PFM16 ปริมาณของเปปไทด์หลักสูงกว่าเปปไทด์ที่ปนเปื้อนมากอาจสามารถนำไปหาลำดับกรดอะมิโนได้

จากผลการทดลองนี้ทำให้ทราบว่าเปปไทด์ของสารคล้าย FMRFamide ในกิ้งกูดดำ มีอยู่หลายรูปแบบ และอาจมีมากกว่า 20 รูปแบบ สำหรับเปปไทด์ที่ทำให้บริสุทธิ์จากการทดลอง 18 แฟรคชันนี้ คาดว่าลำดับกรดอะมิโนต่างจากเปปไทด์ในรายงานที่พบมา (ตาราง 4) คือ ในกิ้งกูดอเมริกันลอกสเตอร์ *Homarus americanus* ซึ่งมี 2 รูปแบบ (Trimmer, Kobierski and Kravitz. 1987) และในปู *Callinectes sapidus* มี 1 รูปแบบ (Krajniak. 1991) ในกิ้งเครย์ฟิช *Procamburus clakii* มี 2 รูปแบบ (Mercier and others. 1993) ในปู *Callinectes sapidus* มี 2 รูปแบบ (Yasuda, Naya and Nakanishi. 1993) ในกิ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* มี 5 รูปแบบ (Sithigorngul and others. 1998) ทั้งนี้เพราะ น้ำหนักโมเลกุลของเปปไทด์ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ต่างจากเปปไทด์ในกิ้งและปูเหล่านั้น มีเพียง PFM12 (1068.5) ที่มีน้ำหนักใกล้เคียงกับเปปไทด์ F2 (1066.24) จากกิ้งลอกสเตอร์ *Homarus americanus* (ตาราง 4) แต่อย่างไรก็ตามคาดว่าเปปไทด์ทั้งสองน่าจะมี ลำดับกรดอะมิโนต่างกับเปปไทด์ที่ได้ทั้ง 18 แฟรคชัน และน่าจะมีลำดับกรดอะมิโนทางด้าน C-terminus เป็น -RFamide เหมือนกัน เนื่องจากการติดตามสารคล้าย FMRFamide โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตจากการปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาวด้วย FMRFamide, KHEFIRFamide และ KHEYLRFamide

จากตาราง 1 จะเห็นได้ว่าการตรวจพบสารคล้าย FMRFamide ในสัตว์หลายชนิด ตั้งแต่สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังไปจนถึงสัตว์มีกระดูกสันหลัง และมีการรายงานสารคล้าย FMRFamide ในสัตว์อื่นๆ จำนวนหลายรูปแบบในสัตว์ชนิดเดียวกัน เช่น ในพยาธิไส้เดือน *Ascaris suum* ได้มีการตรวจพบสารคล้าย FMRFamide 13 รูปแบบ (Cowden and Stretton. 1995) ในหนอนตัวกลม *Caenorhabditis elegans* พบ 9 รูปแบบ (Sithigorngul and Stretton. 1995) ในปลิง *Hirudo medicinalis* พบ 5 รูปแบบ (Evans and others. 1991) ในกิ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* พบ 5 รูปแบบ (Sithigorngul and others. 1998) ในแมลงหวี่ *Calliphora vomitoria* พบ 13 รูปแบบ (Duve and others. 1992) การที่พบสารคล้าย FMRFamide จำนวนน้อยรูปแบบในสัตว์บางชนิด อาจเนื่องจากระบวนการแยกสกัด การทำให้บริสุทธิ์ และวิธีตรวจสอบซึ่งใช้วิธี RIA เป็นวิธีที่ติดตามสารคล้าย FMRFamide ซึ่งเป็นวิธีที่สิ้นเปลืองแรงงานและสารเคมีราคาแพงจำนวนมากทำให้ไม่สามารถใช้วิธีนี้ติดตามการปรากฏของสารคล้าย FMRFamide หลายรูปแบบในครั้งเดียวกันได้ ต่างจากการใช้วิธี Dot-ELISA (Sithigorngul, Stretton and Cowden. 1991) ซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก ไม่สิ้นเปลืองสารเคมี ราคาถูก และสามารถรู้ผลภายใน 24 ชั่วโมง โดยมีความไวในการตรวจสอบเทียบ

เท่า RIA จึงสามารถใช้วิธีนี้ในการติดตามสารคล้าย FMRFamide ในระหว่างการทำให้บริสุทธิ์ได้หลายรูปแบบในเวลาเดียวกัน (Sithigorngul and Stretton, 1995)

จากการทดลองคาดว่าจะยังมีเปปไทด์ของสารคล้าย FMRFamide อีกหลายรูปแบบที่ยังไม่สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ เพราะจากขั้นตอนการแยกด้วยกระบวนการ RP-HPLC ยังมีแฟรคชันที่ให้ผลบวกต่อ anti-FMRFamide ทั้งสามชนิด บางแฟรคชันที่ยังไม่สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ เนื่องจากมีปริมาณของสารปนเปื้อนสูง และปริมาณของเปปไทด์ลดน้อยลงในแต่ละขั้นตอนของการทำให้บริสุทธิ์จนยากที่จะตรวจสอบโดยวิธี Dot-ELISA (สังเกตจากความเข้มสีของจุดจางมาก) ถึงแม้จะใช้ก้านตาจำนวนมากสำหรับทดลองก็ตาม การที่ปริมาณของเปปไทด์น้อยลงอาจเกิดจากการสูญเสียของเปปไทด์ในระหว่างการทำให้บริสุทธิ์ ถ้านำไปทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่อไปอาจมีปริมาณของสารน้อยมากจนยากที่จะตรวจสอบด้วยวิธี Dot-ELISA แต่อย่างไรก็ตามจากการทดลองจะสังเกตพบว่าเมื่อนำแฟรคชันที่มีสารคล้าย FMRFamide ไปผ่านการทำให้บริสุทธิ์มากขึ้น ความเข้มสีของจุดของสารคล้าย FMRFamide ที่ตรวจสอบด้วยกระบวนการ Dot-ELISA จะลดลง จะต้องใช้ปริมาณของสารในการตรวจสอบเพิ่มขึ้นเพื่อจะได้เห็นความเข้มของสีของจุดของเปปไทด์ได้ชัดเจน เมื่อเปรียบเทียบกับกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนแรกจะเห็นว่า จะใช้ปริมาณของสารในการตรวจสอบน้อย (ประมาณ 15 ก้านตา) ให้ผลความเข้มสีของจุดสูงกว่าในขั้นตอนที่ 6-7 ที่ต้องใช้ถึง 400-800 ก้านตา ซึ่งความเข้มของสีของจุดของเปปไทด์ที่จางลงนี้น่าจะเกิดจากการสูญเสียของเปปไทด์ในส่วนด้านข้างของพิด และสูญเสียเปปไทด์จากการแบ่งสารละลายบางส่วนไปตรวจหาสารคล้าย FMRFamide ในระหว่างขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ ทำให้ปริมาณของเปปไทด์ที่แยกได้ลดลง และจากการตรวจดูลักษณะของ mass spectrum ที่ได้จากตัวอย่างในแฟรคชันที่คาดว่าแยกสารคล้าย FMRFamide ได้บริสุทธิ์ โดยพบว่าในแต่ละแฟรคชันให้พิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างๆ กัน ประมาณ 22 หรือ 38 ดาลตัน ดังนั้นจึงคาดว่าในระหว่างการทำให้บริสุทธิ์อาจมีหมู่โซเดียมและโปแทสเซียมมาจับหรือเกิดการ oxidation ของกรดอะมิโนบางตัว อาจทำให้เปปไทด์มีคุณสมบัติในการจับกับแอนติบอดีเปลี่ยนไปจึงต้องเพิ่มปริมาณของสารในการตรวจสอบในการทำให้บริสุทธิ์ของแต่ละขั้นตอน ส่วนสารคล้าย FMRFamide บางแฟรคชันที่ยังไม่บริสุทธิ์เนื่องมาจากยังมีส่วนที่คาบเกี่ยวกับสารปนเปื้อนที่มีในแฟรคชัน ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าอาจมีเปปไทด์ของสารคล้าย FMRFamide อีกหลายแฟรคชันที่ยังไม่สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ เพราะปริมาณของเปปไทด์ที่ถูกแยกได้ลดน้อยลง จนความไวในการตรวจสอบด้วยวิธี Dot-ELISA ลดลงจนยากที่จะตรวจสอบได้

การใช้วิธี Dot-ELISA นี้เป็นวิธีที่ประมาณด้วยสายตา โดยดูจากความเข้มสีของจุดของเปปไทด์มาตรฐาน FMRFamide ที่ความเจือจางต่างๆ กับความเข้มสีของจุดของสารคล้าย FMRFamide ที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ สำหรับในการทดลองนี้ยังไม่สามารถประมาณ

ปริมาณที่แน่นอนของสารคล้าย FMRFamide ที่บริสุทธิ์ได้ เนื่องจาก affinity ของแอนติบอดีของเปปไทด์เหล่านี้ต่างจาก affinity ต่อ FMRFamide มาตรฐานเพราะมีลำดับกรดอะมิโนต่างกัน และจากการประมาณปริมาณของสารคล้ายนี้จะเห็นได้ว่าสารที่ได้มีปริมาณน้อยเกินกว่าจะนำไปหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีทั่วไป

การศึกษาในครั้งนี้ จึงเป็นแนวทางในการทราบขั้นตอนการแยกและการทำให้บริสุทธิ์ของสารคล้าย FMRFamide โดยที่สารนี้ยังคงสภาพและยืนยันประสิทธิภาพของวิธี Dot-ELISA (Sithigorngul, Stretton and Cowden. 1991) ในการติดตามสารนี้ในระหว่างการทำให้บริสุทธิ์ ซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก ไม่สิ้นเปลืองสารเคมี และใช้สารในปริมาณน้อยกว่าวิธีอื่น ในการตรวจสอบหาสารคล้าย FMRFamide ซึ่งวิธีนี้มีความไวในการตรวจสอบเทียบเท่ากับวิธี RIA แต่ไม่มีอันตรายเพราะไม่ต้องใช้สารกัมมันตภาพรังสี

ดังนั้นการทำให้บริสุทธิ์ของสารคล้าย FMRFamide ในก้านตาของกิ้งกูด้าแพรคชันต่าง ๆ เพื่อหาปริมาณโครงสร้างของกรดอะมิโน จะเป็นพื้นฐานสำคัญในการศึกษาบทบาทและการทำงานของสารเหล่านี้ต่อไป ซึ่งจะเป็นแนวทางที่จะศึกษาถึงวิวัฒนาการของฮอร์โมนในกลุ่ม FMRFamide ในสัตว์ต่างๆ ตั้งแต่สัตว์ชั้นต่ำจนถึงสัตว์มีกระดูกสันหลัง บทบาทและความสัมพันธ์ในการทำงานของสารคล้าย FMRFamide รูปแบบต่างๆ ต่อไปได้

ตาราง 4 แสดงลำดับกรดอะมิโนและน้ำหนักโมเลกุลของสารคล้าย FMRFamide ในสัตว์พวก
ครัสตาเซียน

Animals	Peptides	Sequence	MW.(dalton)
<i>Homarus americanus</i> ¹	F1	SDRNFLRFamide	1053.20
	F2	TNRNFLRFamide	1066.24
<i>Callinectes sapidus</i> ²	FaRP	GYNRSFLRFamide	1158.34
<i>Procambarus clarkii</i> ³	NF1	NRNFLRFamide	955.13
	DF2	DRNFLRFamide	966.12
<i>Callinectes sapidus</i> ⁴	CP1	pEGRFamide	506.57
	CP2	pELGRFamide	619.73
<i>Macrobrachium rosenbergii</i> ⁵	FLP1	DRNFLRFamide	966.12
	FLP2	ADKNFLRFamide	1009.19
	FLP3	NYDKNFLRFamide	1215.39
	FLP4	APALRLRFamide	942.19
	FLP5	DRTPALRLRFamide	1243.40

1. Trimmer and others. 1987.

2. Krajniak. 1991.

3. Mercier and others. 1993.

4. Yasuda and others. 1993.

5. Sithigorngul and others. 1998.

บรรณานุกรม .

บรรณานุกรม

- คมสัน ลีลาคหกิจ. “ความเคลื่อนไหวในแวดวงวิชาการ เขาซื้อขายกุ้งกุลาดำกันอย่างไร,” วารสารการประมง. 49(5): 465-468; 2539.
- บรรจง เทียนสงัรตม์. การเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล. หน้า 1-35. กรุงเทพฯ: อักษรเจริญทัศน์, 2529.
- บังอร ศรีมุกดา. การเพาะกุ้งกุลาดำ. เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 55 สถานีประมงน้ำจืดร้อย ะยอง: 2-12; 2530.
- ปัญญา สุวรรณสมุทร. กุ้งแชบ๊วยและกุ้งกุลาดำ. หน้า 7-8. กรุงเทพฯ: โครงการหนังสือเกษตรชุมชน, 2534.
- ปิยพงศ์ โชติพันธ์. การเลี้ยงกุ้ง. หน้า 27-30. โครงการคู่มือการประกอบอาชีพสำหรับประชาชน ของศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2529.
- วันเพ็ญ สาหร่ายทองคำ. การแยกและการทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย FMRFamide ในก้านตาของกุ้งก้ามกรามโดยวิธี RP-HPLC. วิทยานิพนธ์. วท. ม. (เคมีชีวภาพ). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร, 2539. อัดสำเนา.
- วัลลภ คงเพิ่มพูน. กุ้งกุลาดำ หน้า 5-37. กรุงเทพฯ: โครงการหนังสือเกษตรชุมชน, 2531.
- วีระวรรณ สิทธิกรกุล และคนอื่นๆ. “การตรวจหาไนโรเปปไทด์ในก้านตาของกุ้งกุลาดำโดยปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกัน,” วารสารวาริชศาสตร์. 1(1): 1-19; 2537.
- วีระวรรณ สิทธิกรกุล, ศิวพร ลงยันต์ และ ไพศาล สิทธิกรกุล. “สารคล้าย FMRFamide-like substances in the eyestalk of *Macrobrachium rosenbergii*,” วารสารวิทยาศาสตร์ มศว. 11: 15-28; 2538.
- วีระวรรณ สิทธิกรกุล และคนอื่นๆ. “การแยกบริสุทธิ์สารคล้าย FMRFamide จากก้านตาของกุ้งก้ามกราม,” รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ ทนอดหนุนการวิจัย จาก งบประมาณแผ่นดินประจำปี 2540. ภาควิชาชีววิทยา และ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร, 2540.
- Anderson, P. A. V., A. Moosler and C. J. P. Grimmelikhuijzen. “The presence and distribution of Antho-RFamide-like material in scyphomedusa,” Cell Tissue Res. 267: 67-74; 1992.

- Armstrong, E. P. and others. "Immunocytochemical evidence for the involvement of an FMRFamide-related peptides in egg product in the flatworm parasite *Polystoma nearticum*," J. Comp. Neurol. 377: 41-48; 1997.
- Callaway, J. C. , B. Masinovsky and K. Graubard. "Co-localization of SCP_B-like and FMRFamide-like immunoreactivities in crustacean nervous system," Brain Res. 405: 259-304; 1987.
- Carroll, L. S., G. M. Carrow and R. L. Calabrese. "Localization and release of FMRFamide-like immunoreactivity in the cerebral neuroendocrine system of *Manduca sexta*," J. Exp. Biol. 12B: 1-14; 1986.
- 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 : 55-64; 1987.
- Chen, S.-T., M. S. Tsai and C. L. Shen. "Distribution of FMRFamide-like immunoreactivity in the central nervous system of the formosan monkey (*Maccaca cyclopsis*)," Peptide. 10: 825-834; 1989.
- Cowden, C., A. O. W. Stretton and R. E. Davis. "AF1, a sequenced bioactive neuropeptide isolated from the nematode *Ascaris suum*," Neuron. 2: 1415-1473; 1989.
- Cowden, C. and others. "Localization and differential expression of FMRFamide-like immunoreactivity in the nematode *Ascaris suum*," J. Comp. Neurol. 333: 455-468; 1993.
- Cowden, C. and A. O. W. Stretton. "Eight novel FMRFamide-like neuropeptides isolated from the nematode *Ascaris suum*," Peptide. 16 (3): 491-500; 1995.
- Dockray, G. J. and others. "A novel active pentapeptide from chicken brain identified by antibodies to FMRFamide," Nature. 305 : 328-330; 1983.
- Dockray, G. J. and R. G. Williams. "FMRFamide-like immunoreactivity in rat brain: Development of radioimmunoassays and its application in studies of distribution and chromatography properties," Brain Research. 266: 295-303; 1983.

- Dore, I. and C. Frimodt. An illustrated guide to shrimp of the world. New York : Van Nostrand, 152-153; 1987.
- Duve, H. and others. "Isolation, structure and activity of -Phe-Met-Arg-Phe-NH₂ neuropeptide (designated calliFMRFamides) from the blowfly *Calliphora vomitoria*," Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89: 2326-2330; 1992.
- Duve, H. and A. H. Thorpe. "Gastrin/Cholecystokinin (CCK)-like immunoreactive neurones in brain of the blowfly, *Calliphora erythrocephala* (Diptera)," Gen. Comp. Endocrinol. 43: 381-391; 1981.
- Evans, P. D. and C. M. Myers. "The modulatory action of FMRFamide and related peptides on locust skeletal muscle," J. Exp. Biol. 126: 403-422; 1986.
- Evans, B.D. and R.L. Calabrese. "Small cardioactive peptide-like immunoreactivity and its co-localization with FMRFamide-like immunoreactivity in the central nervous system of the leech *Hirudo medicinalis*," Cell Tissue Res. 257: 187-199; 1989.
- Evans, B. D. and others. "Identification of RFamide neuropeptides in the medicinal leech," Peptide. 12: 897-908; 1991.
- Farfante, I. P. and B. Kensley. Penaeoid and sergestoid shrimps and prawns of the world key and diagnoses for the families and genera. . Memories du museum national d'Histoire naturelle, Paris, 130-133; 1997.
- 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.
- Fingerman, M. "The endocrine mechanism of crustacean," J. Crusta. Biol. 7(1): 1-24; 1987.
- Fujiwara-Sukuta, M. and M. Kobayaski. "Localization of FMRFamide and ACEP-1 like immunoreactivity in the nervous system and heart of a pulmonate mollusc, *Achatina fulica*," Cell Tissue Res. 278 : 451-480 ; 1994.

- Grimmelikhuijzen, C. J. P., G. D. Dockray and L. P. C. Schot. "FMRFamide-like immunoreactivity in the nervous system of Hydra," Histochemistry. 73: 499-508; 1982.
- Grimmelikhuijzen, C. J. P and D. Graff. "Isolation of <Glu-Gly-Arg-Phe-NH₂ (Antho-RFamide), a neuropeptide from sea anemone," Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83: 9817-9821; 1986.
- Harris, L. L., W. Lesser and J. K. Ono. "FMRFamide is endogenous to the *Aplysia* heart" Cell Tissue Res. 282: 331-341; 1995.
- Holthuis, L. B. FAO species catalogue Vol. 1 shrimps and prawns of the world. FAO fisheries synopsis No. 125 (1): 50; 1980.
- Huberman, A. and M. B. Aguilar. "A neurosecretory hyperglycemic hormone from the sinus gland of the Mexican crayfish, (*Procambarus bouvieri* : Ortamann)-1. Purification and biochemical characterization of the most abundant form of the hormone," J. Comp. Biochem. Physiol. 85B (1): 197-203; 1986.
- Johnston, R. N. and others. "GYIRFamide: A novel FMRFamide-related peptide (FaRP) from the triclad tubellarian, *Dugesia tigrina*," Biochem. Biophys. Res. Com. 209(2): 689-697; 1995.
- Johnston, R. N. and others. "Isolation, localization, and bioactivity of the FMRFamide-related neuropeptide GYIRFamide and YIRFamide from the marine turbellarian *Bdelloura candida*," J. Neurochem. 67: 814-821; 1996.
- Keller, R. "Crustacean neuropeptide : Structure, function and comparative aspects," Experientia. 48 : 439-448 ; 1992.
- Kleinholz, and others. "Isolation and sequence analysis of a pigment-dispersing hormone from eyestalks of the crab, *Cancer magister*," Biol. Bull. 170: 135-143; 1986.
- Kingan, T. G. and others. "Characterization of two myothopic neuropeptides in the FMRFamide family from the segmental ganglia of the moth *Manduca sexta*: Candidate neurohormones and neuromodulators," J. Exp. Biol. 199: 1095-1104; 1996.

- Kobayashi, M. and Y. Muneoka. "Structural requirements for FMRFamide-like activity on the heart of the prosobranch *Rapana thomasi*," Comp. Biochem. Physiol. 84C: 349-352; 1986.
- Krajniak, K. C. and D. A. Price. "Authentic FMRFamide is present in the polychaete *Nereis virens*," Peptide. 11: 75-77; 1990.
- Krajniak, K. G. "The identification and structure activity relation of a cardioactive FMRFamide-related peptide from the blue crab *Callinectes sapidus*," Peptide. 12: 1295-1302; 1991.
- Krajniak, K. C. and M. J. Greenberg. "The localization of FMRFamide in the nervous and somatic tissue of *Nereis virens* and its effect upon the isolated esophagus," Comp. Biochem. Physiol. 101C: 93-100; 1992.
- Loi, P. K. and others. "Peptidergic regulation of chromatophore function in the European cuttlefish *Sepia officinalis*," J. Exp. Biol. 199: 1177-1187; 1996.
- Lundquist, T. and D. R. Nassel. "Substance P-, FMRFamide-, and Gastrin/Cholecystokinin-like immunoreactive nervous in the thoraco abdominal ganglia of the flies *Drosophila* and *Calliphora*," J. Comp. Neurol. 294: 161-178; 1990.
- Mangerich, S. and others. "Immunocytochemical localization of pigment dispersing hormone (PDH) and its coexistence with FMRFamide immunoreactive material in the eyestalk of the decapod crustaceans *Carcinus maenas* and *Orconectes limosus*," Cell Tissue Res. 250: 365-375; 1987.
- Mangerich, S. and R. Keller. "Localization of pigment-dispersing hormone (PDH) immunoreactivity in the central nervous system of *Carcinus maenas* and *Orconectes limosus* (Crustacea), with reference to FMRFamide immunoreactivity in *O. limosus*," Cell Tissue Res. 253: 199-208; 1988.
- Majane, E. A., P. Panula and H.-Y. T. Yang. "Rat brain region distribution and spinal cord neuronal pathway of FLFQPQRF-NH₂, a mammalian FMRF-NH₂-like peptide," Brain Research. 494: 1-12; 1989.
- Maule, A. and others. "GNFFRFamide: A novel FMRFamide-immunoreactive peptide isolate from the sheep tapeworm," Biochem. Biophys. Res. Com. 193(3): 1054-1060; 1993.

- McGaw, I. J. and others. "Crustacean cardioexcitatory peptides may inhibit the heart *in vivo*," J. Exp. Biol. 198: 2547-2550; 1995.
- Mercier, A. J. " FMRFamide-like immunoreactivity in the crayfish nervous system," J. Exp. Biol. 156: 519-538; 1991.
- Mercier, A. J. and others. "Isolation of two FMRFamide-related peptides from crayfish pericardial organs," Peptide. 14: 137-143; 1993.
- Ohtomi, M., K. Fuji and H. Kobayashi. "Distribution of FMRFamide-like immunoreactivity in the brain and neurohypophysis of the lamprey, *Lampetra japonica*," Cell Tissue Res. 256: 581-584; 1989.
- Price, D. A. and M. J. Greenberg. "Structure of molluscan cardioexcitatory neuropeptide," Science. 197: 670-671; 1977.
- Price, D. A. "The FMRFamide-like peptide of *Helix aspersa*," Comp. Biochem. Physiol. 72C: 325-328; 1982.
- Raffa, R. B. and C. P. Bianchi. "Future evidence for a neuromodulatory role of FMRFamide involving intracellular Ca^{2+} pools in smooth muscle of *Mytilus edulis*," Comp. Biochem. Physiol. 84C: 23-28; 1986.
- Robb, S., L. C. Packman and P. D. Evans. "Isolation, primary structure and bioactivity of SchistoFLRFamide, a FMRFamide-like neuropeptide from the locust, *Schistocera gregaria*," Biochem. Biophys. Res. Com. 160: 850-856; 1989.
- Schmidt, M. and B.W. Ache. "FMRFamide-like immunoreactivity in presumptive chemosensory afferents of spiny lobster, *Panulirus argus*," Brain Research. 653: 315-324; 1994.
- Schmidt, M. and B. W. Ache. "Immunocytochemical analysis of glomerular regionalization and neuronal diversity in the olfactory deutocerebrum of the spiny lobster," Cell Tissue Res. 287: 541-563; 1997.
- Sithigorngul, P., A. O. W. Stretton and C. Cowden. "A versatile dot-ELISA method with femtomole sensitivity for detecting small peptides," J. Immunol. Methods. 141: 23-32; 1991.

- Sithigorngul, P. and A. O. W. Stretton. "Sixmore FMRFamide-like peptide from the nematode *Caenorhabditis elegans* : Four new and two old," Third progress report for biotechnology career fellowship the Rockefeller foundation: 1-18; 1995.
- Sithigorngul, P. and others. "Novel FMRFamide-like neuropeptides from the eyestalk of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*," Comp. Biochem. Physiol. 120B: 587-595; 1998.
- Skerrett, M. and others. "Physiological effect of two FMRFamide-related peptides from the crayfish *Procambarus clarkii*," J. Exp. Biol. 198: 109-116; 1995.
- Solis, N. B. Biology and Culture of *Penaeus monodon*. Philippines. Asian Fisheries Development center, 1988.
- Soyes, 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.
- Suzuki, H. and others. "FMRFamide-like-immunoreactivity primary sensory neurons in the olfactory system of the terrestrial mollusc, *Limax marginatus*," Cell Tissue Res. 289: 339-345; 1997.
- Swales, L. S. and P. D. Evans. "Distribution of SchistoFLRFamide-like immunoreactivity in the adult ventral nervous system of the locust, *Schistocerca gregaria*," Cell Tissue Res. 281: 339-348; 1995.
- Too, C. K. L. and R. P. Croll. "Detection of FMRFamide-like immunoreactivities in the sea scallop *Placopecten magellanicus* by immunohistochemistry and Western blot analysis," Cell Tissue Res. 281: 295-304; 1995.
- Trimmer, B. A., L. A. Kobierski and E. A. Kravitz. "Purification and characterization of FMRFamide like immunoreactive substance from the lobster nervous system: Isolation and sequence analysis of two closely related peptides," J. Comp. Neural. 266: 16-26; 1987.
- Turrigiano, G. G. and A. I. Selverton. "Cholecystokinin-like peptides is a modulator of a crustacean central pattern generator," J. Neurosci. 9 (7): 2486-2501; 1989.
- Vallarino, M. and others. "Distribution of FMRFamide-like immunoreactivity in the brain of the elasmobranch fish *Scyliorhinus canicula*," Peptide. 12: 1321-1328; 1991.

- Veenstra, J. A. and G. Lambrou. "Isolation of a novel RFamide peptide from the midgut of the american cockroach, *Periplaneta americana*," Biochem. Biophys. Res. Comm. 213 (2): 519-524; 1995.
- Westfall, J. A. and G. A. P. Grimmelikhuijzen. "Antho-RFamide immunoreactivity in neuronal synaptic and nonsynaptic vesicle of sea anemone," Biol. Bull. 185: 109-114; 1993.
- Williams, R. G. and G. Dockray. "Immunohistochemical studies of FMRFamide immunoreactivity in rat brain," Brain Reserch. 276: 213-229; 1983.
- Worden, M. K., E. A. Kravitz and M. F. Goy. "Peptide F1, an N-terminally extended analog of FMRFamide, enhances contractile activity in multiple target tissues in lobster," J. Exp. Biol. 198: 97-108; 1995.
- Yang, H.-Y. T. and others. "Isolation, sequencing, synthesis, and phamacological characterization of two brain neuropeptide that modulate the action of morphine," Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82: 7757-7761; 1985.
- Yasuda, A., Y. Naya and K. Nakanishi. "Isolation of Antho- RFamide related peptides from the eyestalks of the blue crab," Comp. Bipchem. Physiol. 104B: 235-240; 1993.

ภาคผนวก

การเตรียมสารเคมี

1. สารละลาย Triethylamine (TEA) 0.1 โมลาร์ พีเอช 5.35 (stock solution)

TEA		1.01 กรัม
H ₂ O (distilled water)	ปรับปริมาตรเป็น	100 มิลลิลิตร
Acetic acid (adjust pH to 5.35)		

2. ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลิน (Phosphate Buffered Saline-PBS) 0.15 โมลาร์ พีเอช 7.2

NaCl		8.00 กรัม
KCl		0.20 กรัม
KH ₂ PO ₄		0.20 กรัม
Na ₂ HPO ₄		1.15 กรัม
หรือ Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O		2.15 กรัม
H ₂ O (distilled water)	ปรับปริมาตรเป็น	1,000 มิลลิลิตร

3. สารละลาย Blotto 5%

นมพร่องมันเนย		5.0 กรัม
สารละลายเมอร์ไธโอเลต 1%		1.0 มิลลิลิตร
Triton X-100		0.1 มิลลิลิตร
สารละลาย PBS 0.15 โมลาร์ พีเอช 7.2 ปรับปริมาตรเป็น		100.0 มิลลิลิตร

4. สารละลายสับสเตรท

Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)		30 มิลลิกรัม
Hydrogenperoxide (H ₂ O ₂) 30%		20 ไมโครลิตร
Cobalt chloride (Co ₂ Cl ₂) 1%		5 มิลลิลิตร
สารละลาย PBS 0.15 โมลาร์ พีเอช 7.2 ปรับปริมาตรเป็น		100 มิลลิลิตร

ประวัติย่อของผู้วิจัย

ชื่อ นายจิรศักดิ์ ชื้อสกุล ผู้ปัสั้ม

เกิดวันที่ 21 เดือน มีนาคม พุทธศักราช 2515

สถานที่เกิด กรุงเทพฯ

สถานที่อยู่ปัจจุบัน บ้านเลขที่ 131 หมู่ 6 ตำบลในคลองบางปลากด
อำเภอพระสมุทรเจดีย์ จังหวัดสมุทรปราการ 10290

ประวัติการศึกษา

พ.ศ.2533 มัธยมปลาย (แผนกวิทยาศาสตร์) จากโรงเรียน

บางปะอิน “ราชานุเคราะห์ ๑” พระนครศรีอยุธยา

พ.ศ.2537 กศ.บ. เคมี จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

วิทยาเขต บางเขน กรุงเทพฯ

พ.ศ.2541 วท.ม. (เคมีชีวภาพ) จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ประสานมิตร กรุงเทพฯ

การแยกและการทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย FMRamide
จากก้านตาของกิ้งกูดดำ

บทคัดย่อ
ของ
จิรศักดิ์ ผู้ป้อม

เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิชาเอกเคมีชีวภาพ
มกราคม 2542

การแยกสารคล้าย FMRFamide จากก้านตาของกิ้งกูดจำนวน 9000 ก้านตาในตัวทำละลายเมทานอล-กรดอะซิติก-น้ำ หลังจากนำสารสกัดแยกผ่าน C18 Sep-Pak cartridge และล้างด้วย 50% acetonitrile/0.1% trifluoroacetic acid แล้วนำไปทำปฏิกิริยาต่อด้วย RP-HPLC 5-7 ขั้นตอนโดยใช้คอลัมน์ C18, C8, cyano, phenyl และระบบตัวทำละลาย 3 ระบบคือ ACN/TFA, ACN/heptafluorobutyric acid และ ACN/triethylamine การติดตามสารคล้าย FMRFamide ในระหว่างการทำให้บริสุทธิ์ใช้วิธี Dot-ELISA โดยใช้ mouse anti-FMRFamide monoclonal antibody (FM-23), mouse anti-KNEFIRFamide monoclonal antibody (AF1-62) และ mouse anti-KHEYLRFamide AF2-32) จากแฟรคชัน 10 แฟรคชันของ RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 1 สามารถทำให้บริสุทธิ์เปปไทด์ของสารคล้าย FMRFamide ได้ 18 แฟรคชัน ซึ่งจากการตรวจหาน้ำหนักโมเลกุลของสารคล้าย FMRFamide ในแฟรคชันเหล่านี้พบว่ามีย่านน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 990-2679 ดาลตัน แตกต่างจากสารคล้าย FMRFamide ที่รายงานในสัตว์ครึ่งตัวอื่น ๆ ทั้งสิ้น จึงคาดว่าสารคล้าย FMRFamide ที่ได้จากการทดลองครั้งนี้จะมีลำดับกรดอะมิโนแตกต่างจากลำดับกรดอะมิโนของสารคล้าย FMRFamide ที่เคยรายงานมาก่อน

ISOLATION AND PURIFICATION OF FMRFamide-LIKE SUBSTANCES FROM THE
EYESTALK OF GIANT TIGER PRAWN

Penaeus monodon

AN ABSTRACT

BY

JIRASAK PUPUEM

Present in partial fulfillment of requirements for the Master
of Science degree in Biological Chemistry
at Srinakharinwirot University

January 1999

Isolation of the FMRFamide-like peptides (FLPs) in *Penaeus monodon* was performed using 9000 eyestalks extracted in methanol-acetic acid-water (90:1:9). After the extract was partially purified using the C18 cartridge and eluted with 50% acetonitrile (ACN) / 0.1% trifluoroacetic acid (TFA), it was further purified by 5–7 steps of RP-HPLC using 4 kinds of columns: C18, C8, cyano and phenyl columns, and 3 solvent systems: ACN/TFA, ACN/heptafluoroacetic acid (HFBA), ACN/triethylamine (TEA). Dot-ELISA using combination of monoclonal antibodies made against FMRFamide (FM-23), KNEFIRFamide (AF1-62) and KNEYLRFamide (AF2-32) was used to detect FLPs in the fractions during each step of purification. Eighteen isoforms of FLPs were obtained from the first ten positive fractions of the first purified step. The molecular weight of these peptides determined by MALDI-TOF mass spectrometry revealed that these peptides are different from previous FLPs obtained from other crustaceans. Therefore, most of the peptides from *P. monodon* are expected to be new sequences.