

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ทุนอุดหนุนการวิจัย
จากงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2543

การสร้างแอนติบอดีต่อเปปไทด์ 10 หน่วยทางปลายซีของ
ฮอร์โมนยับยั้งพัฒนาการของรังไข่และความสามารถในการ
จับกับฮอร์โมนธรรมชาติในก้านตาของกุ้งกุลาดำ

Antibody Production against Gonad Inhibiting Hormone
C-terminal Decapeptide and Its Binding Capacity to the
Natural Peptide in the Eyestalk of *Penaeus monodon*

วีระวรรณ สิทธิกรกุล ไพศาล สิทธิกรกุล และ ศิวาพร ลงยันท์
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณฝ่ายส่งเสริมการวิจัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ได้สนับสนุนให้ทุนอุดหนุนตามโครงการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประจำปี 2543 สถาบันเทคโนโลยีและวิศวกรรมพื้นฐาน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ได้ให้การสนับสนุนจนโครงการวิจัยนี้สำเร็จไปด้วยดี

คณะผู้วิจัย

ตุลาคม 2544



บทคัดย่อ

การผลิตแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อฮอร์โมนที่ยับยั้งการสร้างไข่แดง (vitellogenesis inhibiting hormone, VIH) ของกุ้งอเมริกันล็อบสเตอร์ *Homarus americanus* ฮอร์โมนยับยั้งการเจริญของรังไข่ (gonad inhibiting hormone, GIH) ของกุ้งตะกาด *Metapenaeus ensis* และ CMG-peptide (CHH-MIH-GIH peptide) ของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* ทำโดยการปลูกภูมิคุ้มกันหนูขาวด้วยเปปไทด์สังเคราะห์ ขนาด 15-20 หน่วยของกรดอะมิโนทางด้านปลาย C ของ peptide ทั้ง 3 แล้วเชื่อมต่อกับ bovine serum albumin จากการใช้เทคนิค immunocytochemistry ตรวจสอบเปปไทด์เหล่านี้ในก้านตา พบว่า anti-VIH antiserum และ anti-GIH antiserum ไม่แสดงความจำเพาะกับโครงสร้างใด ในขณะที่ anti-CMG antiserum สามารถแสดงความจำเพาะกับเซลล์ประสาท 2 เซลล์ที่มีใยประสาทไปสิ้นสุดและแผ่ในต่อมไชนัสซึ่งเป็นบริเวณที่สะสมและหลั่งฮอร์โมน เซลล์ประสาททั้งสองนี้พบในบริเวณเดียวกับเซลล์ประสาทที่พบฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาล (crustacean hyperglycemic hormone, CHH) ซึ่งมีถึง 34 ± 4 เซลล์แต่ต่างเซลล์กัน นอกจากนี้ anti-CMG antiserum ยังสามารถแสดง immunoreactivity กับแฟรคชันของสารสกัดจากก้านตากุ้งกุลาดำหลังจากผ่านการแยกด้วย RP-HPLC 1 ขั้นตอนซึ่งต่างจาก CHH จากหลักฐานเหล่านี้ชี้ให้เห็นว่า CMG-peptide อาจมีบทบาททางสรีรวิทยาแตกต่างจาก CHH ในระบบการควบคุมโดยฮอร์โมนในกุ้งกุลาดำ

Abstract

Antisera against various hormones including vitellogenesis inhibiting hormone (VIH) of the American lobster *Homarus americanus*, gonad inhibiting hormone (GIH) of the grass shrimp *Metapenaeus ensis* and CMG-peptide (CHH-MIH-GIH) of the black tiger prawn *Penaeus monodon* were generated by immunization of mice with C-terminal 15-20 residues of synthetic peptide conjugated with bovine serum albumin. The antisera specific to VIH and GIH did not demonstrate specific binding to any structure in the eyestalk of *P. monodon* by means of immunocytochemistry. In contrast, anti-CMG peptide antiserum recognized two neurosecretory cells in which their processes terminated and arborized in sinus gland. These two neurons located in the same area as crustacean hyperglycemic hormone (CHH) containing cells, consisted of 34 ± 4 cells. The anti-CMG antiserum also demonstrated immunoreactivities in a few fractions of *P. monodon* eyestalk extract, different from the fractions containing CHH after one step separation with RP-HPLC. This evidence indicated that CMG-peptide and CHH may have different physiological roles in hormonal regulations of *P. monodon*.

สารบัญ

	หน้า
คำนำ	1
การวิจัยที่เกี่ยวข้องและคล้ายคลึงกับงานวิจัยที่จะทำ	3
วิธีการทดลอง	
แผนการดำเนินการทดลองโดยรวมของการวิจัย	7
การสังเคราะห์เปปไทด์	7
การเชื่อมต่อเปปไทด์กับโปรตีนพาหะ	7
การปลูกหมักร่วมกันในหนูขาว	8
การดูดซับแอนติชีรัมต่อโปรตีน BSA ออกด้วย BSA-Gly	8
การทดสอบความจำเพาะของแอนติชีรัมในการจับเปปไทด์	8
สังเคราะห์ด้วยวิธี indirect immunoperoxidase ELISA	
การทดสอบความสามารถของแอนติชีรัมที่จำเพาะต่อเปปไทด์	9
ในการจับกับเปปไทด์ธรรมชาติ (natural protein)	
ผลการทดลอง	
การสังเคราะห์เปปไทด์ปลาย C	18
ความจำเพาะของแอนติชีรัมต่อ Hoa-VIH, Mee-GIH และ Pem-CMG	18
สรุปผลการทดลอง	34
เอกสารอ้างอิง	37

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ยืนยันผลการสังเคราะห์เปปไทด์ทางปลาย C ของ Hoa-VIH, Mee-GIH และ Pem-CMG โดยการวิเคราะห์ด้วย MALDI-TOF-MS	20

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1 เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน	5
2 สรุปขั้นตอนวิธีดำเนินการวิจัย	12
3 ขั้นตอนการทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรั่มในการจับเปปไทด์สังเคราะห์ด้วยวิธี indirect immunoperoxidase ELISA	13
4 ขั้นตอนการตรวจหาแหล่งสร้างเปปไทด์ในเนื้อเยื่อภานตาโดยวิธี immunocytochemistry	14
5 ขั้นตอนการแยกสารสกัดจากภานตา	15
6 ขั้นตอนการตรวจสารคล้ายเปปไทด์ในเฟรคชันต่าง ๆ ที่แยกโดยวิธี dot-ELISA	16
7 Spectrum ของเปปไทด์ทางปลาย C ของ Hoa-VIH วิเคราะห์โดย MALDI-TOF-MS	21
8 Spectrum ของเปปไทด์ทางปลาย C Mee-GIH วิเคราะห์โดย MALDI-TOF-MS	22
9 Spectrum ของเปปไทด์ทางปลาย C ของ Pem-CMG วิเคราะห์โดย MALDI-TOF-MS	23
10 Immunocytochemistry ของภานตากุ้งกุลาดำ แสดง 2 เซกชันต่อกันเปรียบเทียบตำแหน่งของ neurosecretory cell ที่พบ CMG peptide และ CHH	24
11 Immunocytochemistry ของภานตากุ้งกุลาดำบริเวณ sinus gland 2 เซกชันต่อกันโดยใช้ anti CMG antiserum และ anti T ⁺ antiserum	26
12 การตรวจสอบความจำเพาะของ anti CMG antiserum โดยวิธี immunocytochemistry ในภานตาของกุ้งกุลาดำ	28
13 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามระหว่าง anti CMG-15 antiserum และ anti T ⁺ antiserum ต่อ CMG peptide (CMG) และ T ⁺ peptide (T ⁺) โดยวิธี dot ELISA	30
14 RP-HPLC ขั้นตอนแรกของการสกัดจากภานตากุ้งกุลาดำจำนวน 2,500 ภานตาที่แยกด้วย C18 Prep-Pak column	32

คำนำ



จากรายงานสถานภาพของการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในประเทศไทย ปัญหาที่สำคัญประการหนึ่งสำหรับการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล เช่น กุ้งกุลาดำ คือการขาดแคลนแม่พันธุ์และพ่อพันธุ์กุ้ง โดยเฉพาะแม่พันธุ์กุ้งที่มีคุณภาพดีส่วนใหญ่ต้องจับจากทะเลซึ่งหายากและมีราคาค่อนข้างสูง นำมาบิบบตาเพื่อชักนำให้รังไข่เจริญ (Menasveta, 1990) วิธีการนี้นอกจากผลที่ได้จะไม่แน่นอนเพราะเป็นการทำลายสมดุลของฮอร์โมนต่างๆ ในตัวกุ้งอย่างรุนแรง ยังผลให้การผลิตไข่ไม่สมบูรณ์ อัตราการผสม อัตราการรอดของลูกกุ้งต่ำ และแม่พันธุ์กุ้งตาย (Primavera, 1985) ต้องหาแม่พันธุ์กุ้งมาทดแทนตลอดเวลา เป็นผลให้เพิ่มต้นทุนการผลิตกุ้งวัยอ่อนและขาดแคลนแม่พันธุ์กุ้งอยู่เสมอ

จากการศึกษาที่แล้วมามีหลักฐานว่าในกุ้งและปูมีฮอร์โมนที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการพัฒนาของรังไข่ (gonad inhibiting hormone-GIH) อยู่ในก้านตา (eyestalk) เมื่อทำลายก้านตาโดยวิธีบิบบตาหรือวิธีการอื่นๆ จะมีผลชักนำให้เกิดการพัฒนาของรังไข่ (Anilkumar and Adiyodi, 1980; Browdy and Samocha, 1985; Emmerson, 1983) และเมื่อฉีดสารสกัดจากก้านตาเข้าไปในกุ้งที่ถูกทำลายก้านตาจะมีผลยับยั้งการพัฒนาของรังไข่ (Kulkarni and Nagabhushanam, 1980) ส่วนฮอร์โมนอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของรังไข่อาจพบในแหล่งอื่น ๆ แต่ยังไม่มียืนยันหลักฐานแน่ชัดว่ามีอยู่ที่ชนิดและสร้างจากส่วนใดของระบบประสาทบ้าง

ความพยายามที่จะชักนำให้กุ้งทะเลวางไข่โดยวิธีอื่นโดยที่ไม่กระทบกระเทือนหรือทำลายระบบฮอร์โมนอื่นในก้านตาอย่างถาวร ทำโดยการปรับสภาพแวดล้อมต่าง ๆ เช่น ความเข้มของแสง ความยาวช่วงแสง คลื่นแสงช่วงต่าง ๆ อุณหภูมิ ความเค็ม ความเป็นกรด-เบสของน้ำทะเลและสภาวะโภชนาการต่าง ๆ (Crococ and Kerr, 1986; Hillier, 1984; Wurts and Stickney, 1984) ในกุ้งทะเลผลที่ได้ส่วนใหญ่ไม่เป็นที่น่าพอใจ ถ้าไม่มีการทำลายก้านตาควบคู่กันไป ความพยายามอีกวิธีโดยอาศัยหลักที่ว่าควบคุมพัฒนาการของรังไข่ อาจอยู่ภายใต้อิทธิพลของฮอร์โมนอื่นซึ่งอยู่ภายนอกก้านตาที่ทำหน้าที่กระตุ้นพัฒนาการของรังไข่ ได้มีการใช้สารสกัดจากระบบประสาทส่วนต่าง ๆ เช่น จากสมองและปมประสาทส่วนนอก (Eastman-Reks and Fingerman, 1984; Takayanagi et al., 1986) หรือฮอร์โมนที่พบในสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังเช่น 17 α -hydroxy-progesterone (Yano, 1984) และ Human Chorionic Gonadotropin-HCG (Bomirski and Klek-Kawinska, 1976; Nagabushanum and Serojini, 1987) และ Hypophyseal Gonadotropins (Reddy et al., 1987) ทดลองฉีดในกุ้งชนิดต่าง ๆ แต่ผลการทดลองยังไม่เป็นที่ยืนยันชัดว่าฮอร์โมนเหล่านี้สามารถใช้เร่งการพัฒนาของรังไข่ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

เนื่องจากฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการพัฒนาของรังไข่ (GIH) เป็นตัวหลักในการควบคุมพัฒนาการของรังไข่ ดังนั้นการลดอิทธิพลของ GIH นี้ชั่วคราวอาจเป็นไปได้โดยใช้กระบวนการทางภูมิคุ้มกันวิทยา เพราะเป็นที่ทราบแน่ชัดแล้วว่าการใช้แอนติบอดีสามารถหยุดยั้งกิจกรรมของสารต่างๆ รวมทั้งฮอร์โมนได้อย่างเฉพาะเจาะจง (Harper et al., 1983; Nagayama et al., 1982; Thanos et al., 1984) ดังนั้นการใช้แอนติบอดีจำเพาะต่อ GIH เพื่อลดปริมาณของฮอร์โมนนี้ในตัวกุ้งจึงอาจเป็นแนวทางใหม่ในการชักนำพัฒนาการของรังไข่ในกุ้ง เพราะวิธีนี้นอกจากจะไม่เป็นการกระทบกระเทือนต่อสภาพการทำงานของฮอร์โมนอื่นๆ แล้ว ผลการยับยั้งยังเป็นการเกิดแบบชั่วคราว กุ้งสามารถกลับมา

มีสภาพเหมือนปกติได้ มีรายงานการสร้างแอนติบอดีต่อ HCG เพื่อใช้ในการคุมกำเนิดในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมนี้สำเร็จเป็นอย่างดี (Stevens, 1986) แอนติบอดีนี้สามารถจะถูกผลิตในรูปของ monoclonal antibodies ซึ่งจะสามารถผลิตได้ในปริมาณมากเท่าที่ต้องการและในราคาไม่แพงนัก นอกจากนี้แอนติบอดีจำเพาะต่อ GIH ยังสามารถใช้ประโยชน์ในการศึกษาถึงหน้าที่และกิจกรรมต่าง ๆ ของฮอร์โมนนี้ในกุ้งได้ด้วย ทั้งนี้แนวทางการวิจัยนี้ยังไม่มีผู้ใดเริ่มดำเนินการในประเทศไทย (Menasveta, 1990)

อย่างไรก็ตามก่อนที่จะสามารถผลิตแอนติบอดีต่อ GIH ได้ จำเป็นต้องแยกสกัด GIH ให้มีความบริสุทธิ์และปริมาณมากพอที่จะใช้ฉีดในสัตว์ทดลองเพื่อชักนำให้สร้างแอนติบอดีต่อ GIH ให้ได้เสียก่อน เนื่องจากปริมาณฮอร์โมนนี้ในกุ้งแต่ละตัวมีปริมาณน้อย จึงจำเป็นต้องใช้กุ้งสำหรับแยกสกัดรวมทั้งหมด GIH เป็นจำนวนมาก (5,000-20,000 ตัว) ซึ่งปัญหานี้ทำให้การศึกษาการแยกสกัด GIH จากกุ้งกุลาดำโดยตรงกระทำได้ยากมาก เพราะกุ้งกุลาดำตัวเมียขนาดโตเต็มวัยต้องจับจากทะเลเท่านั้น ทั้งมีปริมาณไม่เพียงพอและราคาแพง จากการศึกษาเกี่ยวกับการทำงานของฮอร์โมนอื่น ๆ ในก้ามดาบพบว่า ฮอร์โมนเหล่านี้ออกฤทธิ์ข้ามกันได้ระหว่างกุ้งและปูชนิดต่าง ๆ เช่น Red Pigment Concentrating Hormone-RPCH (Kleinholz, 1975) Pigment Dispersing Hormone-PDH (Roa and Riehm, 1988) Crustacean Hyperglycemic Hormone-CHH (Kallen et al., 1986; Keller and Wunderer, 1978) และ Neurodepressing Hormone (Huberman et al., 1979) เป็นต้น

นอกจากนี้จากการทดสอบ GIH ที่ศึกษามาในกุ้งและปูชนิดต่าง ๆ ก็ยังพบว่าโครงสร้างทางเคมีนี้อาจคล้ายกัน สามารถแยกสกัดจากสัตว์ชนิดหนึ่งไปทดสอบในสัตว์อีกชนิดหนึ่งได้ เช่น (1) สารสกัดจากปู *Cancer magister* นำไปใช้ทดสอบในกุ้ง *Crangon crangon* (Bomirski et al., 1981) (2) สารสกัดจากกุ้งมังกร *Panulirus argus* นำไปใช้ทดสอบในปูก้ามดาบ *Uca pugilator* (Quackenbush and Hernkind, 1983) และ (3) สารสกัดจากกุ้งล็อบสเตอร์ *Homarus americanus* นำไปทดสอบในกุ้ง *Palaemonetes varians* (Soyez et al., 1987) ความพยายามที่จะทำให้บริสุทธิ์ GIH สามารถทำได้แต่มีความยากมาก มีรายงานความสำเร็จของการทำให้บริสุทธิ์ของ Vitellogenesis Inhibiting Hormone (VIH) ซึ่งคาดว่าอาจเป็นตัวเดียวกับ GIH ในกุ้งล็อบสเตอร์ *Homarus americanus* พบว่าเป็นเปปไทด์น้ำหนักโมเลกุล 9135 ดาลตัน ประกอบด้วยกรดอะมิโน 77 หน่วย (Soyez et al., 1991) มีลักษณะโครงสร้างคล้ายกับฮอร์โมนที่ควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด (Crustacean Hyperglycemic Hormone-CHH) ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโน 71 หน่วยคือมี disulfide bridge 2 แห่งและมีกรดอะมิโนซ้ำกัน 27 % (Chang et al., 1993)

ได้มีรายงานการแยกและทำให้บริสุทธิ์รูปแบบต่าง ๆ ของ CHH เพิ่มขึ้นและสร้างแอนติบอดีต่อเปปไทด์ทางด้านปลาย C ของ CHH ของกุ้งก้ามกราม ซึ่งพบว่าแอนติบอดีที่ได้สามารถจับกับเปปไทด์ธรรมชาติที่พบในสารสกัดจากก้ามดาบโดยวิธี dot-ELISA และในก้ามดาบโดยตรงโดยวิธี immunocytochemistry ในกุ้งก้ามกรามและกุ้งกุลาดำ ซึ่งแสดงให้เห็นถึงว่าฮอร์โมนในกุ้งทั้งสองกลุ่มคล้ายคลึงกัน แอนติบอดีสามารถทำปฏิกิริยาข้ามกันได้ (Sithigorngul et al., 1999) ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้จึงเป็น

การสร้างแอนติบอดีต่อเปปไทด์ทางด้านปลาย C ของ VIH ที่ทราบลำดับกรดอะมิโนของกุ้งอเมริกัน
 ลอบสเตอร์ *Homarus americanus* และนำมาทดสอบการจับของแอนติบอดีในกุ้งกุลาดำโดยตรง

จากการใช้แอนติบอดีในการตรวจสอบเปปไทด์ในสารสกัดซึ่งมีปริมาณน้อยมากนั้นสามารถ
 ตรวจสอบโดยกระบวนการวิธี dot-ELISA (Sithigorngul et al., 1991) และในเนื้อเยื่อโดยวิธี immunocyto-
 chemistry (Sithigorngul et al., 1996) ซึ่งการสร้างแอนติบอดีต่อเปปไทด์สายสั้น ๆ ของบางส่วนของ
 CHH หรือฮอร์โมนเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดในกุ้งก้ามกราม (Sithigorngul et al., 1999) ได้ชี้ให้เห็นแล้ว
 ว่าแอนติบอดีที่ได้สามารถจับกับเปปไทด์ธรรมชาติจากก้ามตาได้ดี และสามารถทำปฏิกิริยาข้ามกับ
 เปปไทด์ในกุ้งกุลาดำได้ด้วย จึงได้สร้างแอนติบอดีต่อเปปไทด์ทางปลายซีของ VIH ที่ทราบลำดับกรด
 อะมิโนแล้วคือ VIH ของกุ้งอเมริกันลอบสเตอร์ แอนติบอดีที่ได้สามารถจับกับฮอร์โมนในกุ้งกุลาดำได้
 เช่น แอนติบอดีต่อ CHH ของกุ้งก้ามกราม

การวิจัยที่เกี่ยวข้องและคล้ายคลึงกับงานวิจัยที่จะทำ

Neurosecretory cells ในก้ามตา (eyestalk) ของสัตว์กลุ่มครัสเตเชีย (crustacean)
 เช่น กุ้ง ปู เป็นแหล่งผลิตฮอร์โมนหลายชนิด ซึ่งมีหน้าที่ในการควบคุมกระบวนการต่าง ๆ ทางสรีรวิทยา
 เช่น การลอกคราบ การพัฒนาของรังไข่ การเปลี่ยนสีตัว การควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด เป็นต้น
 สำหรับรายงานการทำให้บริสุทธิ์ GIH พบว่ามีเพียงรายงานการทำให้บริสุทธิ์ฮอร์โมนยับยั้งการสะสมไข่
 แดง (VIH) ซึ่งคาดว่าเป็นฮอร์โมนชนิดเดียวกับ GIH ในกุ้งลอบสเตอร์ *Homarus americanus* (Soyez
 et al., 1987) และสามารถหาลำดับกรดอะมิโน พบว่าเป็นเปปไทด์น้ำหนักรวม 9135 ดาลตัน
 ประกอบด้วยกรดอะมิโน 77 หน่วยดังรูปที่ 1 (Soyez et al., 1991) ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายกับฮอร์โมน
 ยับยั้งการลอกคราบ (Molt Inhibiting Hormone-MIH) และฮอร์โมนเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด (CHH)
 โดยมี disulfide bridge 2 แห่งและลำดับกรดอะมิโนคล้ายกับ CHH และ MIH 53 และ 57 % จากการ
 โคลนยีนของ GIH จาก mRNA พบกรดอะมิโนทางปลาย C เพิ่มอีก 4 หน่วยคือ -AGRK (de-Kleijn et
 al., 1994) (รูปที่ 1) การมี GRK ทางปลาย C ซึ่งเป็นตำแหน่งที่มีกระบวนการ post translation
 modification โดยการตัดตำแหน่ง G ทำให้ปลาย amide ยังคงติดอยู่กับกรดอะมิโนตัวสุดท้าย
 (Schnieder and Taghert, 1988) ดังนั้นจึงคาดว่าปลาย C ของ GIH น่าจะเป็น A-NH₂ ดังนั้นลำดับ
 กรดอะมิโนที่คาดว่าจะสังเคราะห์จะเป็น GEIDQFRKWWSILRAamide

จากรายงานการโคลนยีนของ GIH ในกุ้งตะกาด *Metapenaeus ensis* (Chan and Gu,
 1997) โดยใช้ข้อมูลลำดับกรดอะมิโนของ VIH ของ *Homarus americanus* สามารถแปลเป็นลำดับ
 กรดอะมิโนคล้าย GIH ของ *H. americanus* (รูปที่ 1) แต่ตรงปลาย C ของเปปไทด์ไม่พบ glycine และ
 basic amino acid จึงคาดว่าลักษณะทางปลาย C ของเปปไทด์ไม่น่าจะเป็น amide จึงสังเคราะห์เปป-
 ไทด์ปลาย C จำนวน 20 หน่วยดังนี้ EDEID KFRVW ISILN PGGAW

นอกจากนี้ยังมีรายงานการโคลนยีนของเปปไทด์ในกลุ่ม CHH/MIH/GIH family จากกุ้ง
 กุลาดำโดยตรงโดยใช้ข้อมูลจาก conserve region ของเปปไทด์ในกลุ่มนี้ ได้ยีนของเปปไทด์ที่มีลักษณะ
 ต่างจาก CHH ทั้ง 5 รูปแบบที่เคยรายงาน (Udomkit et al., 2000) ชื่อว่า Pem-CMG หรือ *Penaeus*

monodon-CMG (CMG ย่อมาจาก CHH-MIH-GIH) (รูปที่ 1) Pem-CMG อาจเป็นเปปไทด์อื่น ๆ ที่ต่างจาก CHH ของกิ้งกูดดำ นอกจากนี้ตรงปลาย C ประกอบด้วย QRLGK จึงคาดว่าปลาย C ของเปปไทด์นี้น่าจะเป็น amide จึงสังเคราะห์เปปไทด์นี้ทางปลาย C จำนวน 15 หน่วย ดังนี้ ...RPRQRN QYRAALQRLamide การทดลองนี้จึงได้สังเคราะห์เปปไทด์ทั้ง 3 ชนิดโดยสังเคราะห์ยาวกว่าที่เสนอไว้ในโครงการ (10 หน่วย) เป็น 15-20 หน่วยเพื่อสร้างแอนติบอดีต่อส่วนต่าง ๆ ของโมเลกุลให้มีความหลากหลายมากขึ้นและเพื่อนำมาสร้างแอนติบอดีและทดสอบการจับของแอนติบอดีต่อเปปไทด์เหล่านี้กับ natural peptide ในก้านตากุ้งกูดดำโดยวิธี immunocytochemistry และ dot-ELISA ต่อไป



Hoa-VIH	ASA	WFTND	ECPGV	MGNRD	LYEKV	AWVCN	DCANI	FRNND	VGVMC	KKDCF
Mee-GIH	VDESSA	FSIDY	TCTGA	MGNRD	IYNKV	SRVCD	DCANI	YRLPG	LDGMC	RNRCE
Pem-CMG		SLSFR	<u>SCTGA</u>	<u>Y-DRE</u>	<u>LLVRL</u>	<u>DRVCE</u>	<u>DCYNV</u>	<u>YRDVG</u>	<u>VAAEC</u>	<u>RSNCF</u>
PM-spg-II		ANFDP	<u>SCAGV</u>	<u>Y-NRE</u>	<u>LLGRL</u>	<u>SRLCL</u>	<u>DCYNV</u>	<u>FREPK</u>	<u>VATEC</u>	<u>RSNCF</u>
(Pem-CHH)										
Hoa-VIH		HTMDF	LWCVY	ATERH	GEIDQ	FRKWV	SILRA	GRK		
Mee-GIH		NNFWF	MICLR	AAKRE	DEIDK	FRVWI	SILNP	GGAW		
Pem-CMG		<u>HNEVF</u>	<u>LYCVD</u>	<u>YMFRP</u>	<u>RQRNQ</u>	<u>YRAAL</u>	<u>QRLGK</u>			
PM-spg-II		<u>YNPVF</u>	<u>VQCLE</u>	<u>YLIPA</u>	<u>DLHEE</u>	<u>YQAHV</u>	<u>QTVGK</u>			
(Pem-CHH)										

รูปที่ 1 เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ vitellogenesis inhibiting hormone จากกุ้งล็อบสเตอร์ *Homarus americanus* Hoa-VIH (de Kleijn et al., 1994) gonad inhibiting hormone จากกุ้งตะกาด *Metapenaeus ensis* Mee-GIH (Chan and Gu, 1997) เปปไทด์ CMG จากกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* Pem-CMG (Udomkit et al., 2000) และ crustacean hyperglycemic hormone จากกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* Pem-CHH หรือ PM-spg-II (Davey et al., 2000) ตัวอักษรที่ขีดเส้นใต้แสดงลำดับกรดอะมิโนที่เหมือนกันระหว่าง CMG กับ CHH



แผนการดำเนินการทดลองโดยรวมของการวิจัยนี้มีดังนี้ (รูปที่ 2)

1. การสังเคราะห์เปปไทด์
2. การเชื่อมต่อเปปไทด์กับโปรตีนพาหะ (carrier protein)
3. การปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาว
4. การดูดซับแอนติซีรั่มต่อโปรตีน BSA ออกด้วย BSA-Gly
5. การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรั่มในการจับเปปไทด์สังเคราะห์ด้วยวิธี indirect immunoperoxidase ELISA
6. การทดสอบความสามารถของแอนติซีรั่มที่จำเพาะต่อเปปไทด์ในการจับกับเปปไทด์ธรรมชาติ (natural protein)

1. การสังเคราะห์เปปไทด์

การสังเคราะห์สายเปปไทด์ทางด้านปลาย C ของ Hoa-VIH ที่มีกรดอะมิโนจำนวน 15 หน่วย Mee-GIH ที่มีกรดอะมิโนจำนวน 20 หน่วย และ Pem-CMG ที่มีกรดอะมิโนจำนวน 15 หน่วย ใช้วิธี solid phase peptide synthesis โดย Rebecca P. Ettling, Biotechnology Resource Laboratory, Medical University of South Carolina, USA มีลำดับดังนี้

Hoa-VIH	GEIDQFRKWVSILRAamide
Mee-GIH	EDEIDKFRVWISILNPGGAW
Pem-CMG	RPRQRNQYRAALQRLamide

Hoa = *Homarus americanus*

Mee = *Metapenaeus ensis*

Pem = *Penaeus monodon*

VIH = vitellogenesis inhibiting hormone

GIH = gonad inhibiting hormone

CMG = CHH-MIH-GIH

ส่วนความบริสุทธิ์และความถูกต้องของเปปไทด์ทั้ง 3 ที่สังเคราะห์ขึ้น ได้ตรวจสอบด้วย Matrix-assist laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. การเชื่อมต่อเปปไทด์กับโปรตีนพาหะ (carrier protein)

นำเปปไทด์ที่สังเคราะห์ได้คือ Hoa-VIH, Mee-GIH และ Pem-CMG มาเชื่อมต่อกับ bovine serum albumin (BSA) ได้ Hoa-VIH-BSA, Mee-VIH-BSA และ Pem-CMG-BSA ซึ่งเป็น peptide conjugate ทำโดยผสมโปรตีน BSA 10 มิลลิกรัมกับเปปไทด์ 1 มิลลิกรัมใน PBS (phosphate buffered saline) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมน้ำละลาย 25 % glutaraldehyde ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ทิ้งไว้เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง นำสารละลายผสมมาทำไดอะไลซิส (dialysis) ใน PBS เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

โดยเปลี่ยน PBS ทุก 24 ชั่วโมง เพื่อกำจัด glutaraldehyde จากนั้นวัดปริมาณสารละลายผสมหลังทำไดอะไลซิส และคำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีนรวมในสารละลายโดยประมาณจากน้ำหนักโปรตีนเริ่มต้น

เตรียม BSA เชื่อมกับกรดอะมิโนไกลซีน (BSA-Gly) เพื่อใช้ในการดูดซับแอนติบอดีต่อโปรตีนพาหะโดยผสม BSA 80 มิลลิกรัมกับไกลซีน 8 มิลลิกรัมใน PBS ปริมาตร 8 มิลลิลิตร เติมสารละลาย 25 % glutaraldehyde ปริมาตร 160 ไมโครลิตร จากนั้นทำเช่นเดียวกับการเตรียม BSA เชื่อมกับเปปไทด์

3. การปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาว

นำเปปไทด์ที่เชื่อมกับ BSA แล้วทั้ง 3 ชนิดคือ Hoa-VIH-BSA, Mee-VIH-BSA และ Pem-CMG-BSA แยกกันชนิดละ 0.5 มิลลิกรัม (ปริมาตร 75 ไมโครลิตร) ผสมกับ complete Freund's adjuvant ในอัตราส่วน 1:1 แล้วฉีดเข้าช่องท้องของหนูเมาส์ (mouse) จากศูนย์สัตว์ทดลอง ศาเลียมมหาวิทยาลัยมหิดลชนิดละ 4 ตัว ๆ ละ 150 ไมโครลิตรต่อ 1 ตัว หลังจากนั้นฉีดซ้ำอีก 3 ครั้งทุก 2 สัปดาห์ โดยผสมกับ incomplete Freund's adjuvant ในอัตราส่วน 1:1 ในปริมาณเท่ากับการฉีดครั้งแรก เมื่อครบ 1 สัปดาห์หลังจากการฉีดครั้งที่ 4 เก็บเลือดหนูจากทางเบ้าตา ทั้งให้เลือดแข็งตัว จากนั้นนำเลือดที่ได้ไปปั่นที่ 5000 g เป็นเวลา 15 นาที แยกส่วนใสที่เป็นซีรัมเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้

4. การดูดซับแอนติซีรัมต่อโปรตีน BSA ออกด้วย BSA-Gly

นำแอนติซีรัมที่ได้จากหนูแต่ละตัวมาเจือจางด้วยสารละลาย BSA-Gly ที่มีความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในอัตราส่วน 1:1000 บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6-12 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นที่ 10,000 g เป็นเวลา 10 นาที เก็บสารละลายส่วนใสสำหรับการทดลองต่อไป

5. การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมในการจับเปปไทด์สังเคราะห์ด้วยวิธี indirect immunoperoxidase ELISA

นำสารละลายเปปไทด์ที่เชื่อมต่อกับ BSA คือ Hoa-VIH-BSA, Mee-VIH-BSA, Pem-CMG-BSA และ BSA-Gly ที่แต่ละชนิดมีความเข้มข้นของโปรตีน 20 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตรใส่ในหลุม microtiter plate (ปริมาณโปรตีน 1 ไมโครกรัม/หลุม) บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS 150 ไมโครลิตรจำนวน 4 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที ล้างอีกครั้งด้วย 0.5 % Blotto เป็นเวลา 30 นาที เติม 5 % Blotto ที่มี BSA-Gly เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรละลายอยู่ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในหลุมทุกหลุม จากนั้นเติมแอนติซีรัมต่อเปปไทด์ชนิดต่าง ๆ ที่ได้จากหนูแต่ละตัวหลังจากดูดซับด้วย BSA-Gly ที่เจือจางในอัตราส่วน 1:1000 ปริมาตร 50 ไมโครลิตรแล้วทำการเจือจางครั้งละ 2 เท่า นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง ล้างด้วย 0.5 % Blotto จำนวน 4 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที เติม Goat anti-mouse IgG H and L

chain horseradish peroxidase conjugate (GAM-HRP) ที่เจือจาง 1:1000 ใน 5 % Blotto และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง ล้างด้วย 0.5 % Blotto จำนวน 4 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที และล้างอีกครั้งด้วย PBS จากนั้นเติมสารละลายสับสเตรทซึ่งประกอบด้วย สารละลาย o-phenylenediamine dihydrochloride (OPD) เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรที่มี 0.006 % hydrogen peroxide ใน citrate buffer 0.1 โมลาร์, pH 4.5 ผสมอยู่ ลงในหลุม ๆ ละ 70 ไมโครลิตร ทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที และเติมกรดซัลฟูริก 1 N ทันทีก่อนในหลุม ๆ ละ 70 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตรด้วยเครื่อง microplate reader คำนวณหาไตเตอร์ของแอนติซีรั่มต่อเปปไทด์โดยดูจากค่าการเจือจางสุดท้ายที่ค่าดูดกลืนแสงประมาณ 0.1 หน่วยเทียบกับ titer ของแอนติซีรั่มต่อ BSA-Gly (รูปที่ 3)

6. การทดสอบความสามารถของแอนติซีรั่มที่จำเพาะต่อเปปไทด์ในการจับกับเปปไทด์ธรรมชาติ (natural protein)

6.1 การทดสอบความสามารถของแอนติบอดีในการจับกับ natural peptide ในก้านตา โดยวิธี immunocytochemistry (รูปที่ 4)

6.1.1 การเตรียมเนื้อเยื่อในพาราฟิน (paraffin section)

ตัดก้านตาจากกึ่งกลางค้ำที่ยังมีชีวิตอยู่ ผ่าตัดและลอกเปลือกแข็งออก นำก้านตาที่ได้ไปทำให้คงรูปใน Bouin's fixative เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ล้างโดยการเปิดน้ำประปาไหลผ่านเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำก้านตาแช่ในตัวทำละลายเพื่อตึงน้ำออกจากก้านตาตามลำดับดังนี้คือ แช่ในเอทานอล 70 % เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ในเอทานอล 90 % เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ในเอทานอล 95 % เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (เปลี่ยน 2 ครั้ง) ในบิวทานอลเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ในตัวทำละลายผสมระหว่างบิวทานอลกับไซลีนในอัตราส่วน 1:1 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ในไซลีน 2 ครั้ง ๆ ละ 1 ชั่วโมง ในตัวทำละลายผสมระหว่างไซลีนกับพาราฟลาสต์ในอัตราส่วน 1:1 เป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส ในพาราฟลาสต์ 3 ครั้ง ๆ ละ 1/2 - 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปฝังในพาราฟลาสต์ทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นตัดก้านตาให้มีความหนา 50 ไมโครเมตรเรียงเป็นลำดับ (serial section) และติดเนื้อเยื่อก้านตาแต่ละชิ้นเรียงตามลำดับบนสไลด์และนำไปอบให้แห้ง

6.1.2 กระบวนการทาง immunocytochemistry โดยวิธี indirect immunoperoxidase method

นำสไลด์เนื้อเยื่อก้านตามาละลายเอาพาราฟลาสต์ออก และเติมน้ำเข้าเนื้อเยื่อ โดยแช่ในตัวทำละลายต่าง ๆ ครั้งละ 5 นาทีตามลำดับดังนี้ แช่ในไซลีน 3 ครั้ง ในตัวทำละลายผสมระหว่างไซลีนกับบิวทานอลในอัตราส่วน 1:1 ในบิวทานอล ในเอทานอล 95 %, 90 %, และ 70 % ใน PBS 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที จากนั้นหยด 10 % calf serum ใน PBS (P_1^+) เป็นเวลา 30 นาที หยดแอนติซีรั่มต่อเปปไทด์ชนิดต่าง ๆ ที่เจือจาง 1:5000 ใน P_1^+ ให้คลุมเนื้อเยื่อ นำเนื้อเยื่อไปบ่มที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS 4 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที หยด GAM-HRP ที่เจือจาง 1:1000 ใน P_1^+

และนำเนื้อเยื่อไปบ่มที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS 4 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที นำเนื้อเยื่อจุ่มในสารละลายสับสเตรทซึ่งประกอบด้วย 0.006 % hydrogen peroxide และ 0.03 % diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) ที่ละลายใน PBS เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นหลาย ๆ ครั้ง

จากนั้นดึงน้ำออกและย้อมเนื้อเยื่อโดยแช่ในตัวทำละลายเป็นเวลาอย่างละ 5 นาที ตามลำดับดังนี้ แช่ในเอทานอล 70 %, 90 % และ 95 % ใน 0.02 % Eosin Y ในเอทานอล 95 % ในบิวทานอล ในตัวทำละลายผสมระหว่างบิวทานอลกับไซลีนและไนไซลีน 3 ครั้ง ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์โดยใช้เปอร์เม้าท์ (permount)

ทำการทดลองเช่นเดียวกันโดยใช้แอนติซีรั่มจำเพาะต่อปลาย C ของ CHH จากกิ้งก่ามกราม (anti T⁺ antiserum) ที่เตรียมได้จากการศึกษาครั้งก่อน (Sithigorngul et al., 1999) เพื่อเปรียบเทียบผล

6.1.3 การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรั่มต่อ natural peptide โดยวิธี

immunocytochemistry

เตรียมเนื้อเยื่อก้านตาเช่นเดียวกับ 6.1.1 แต่ตัดก้านตาให้มีความหนา 8 ไมโครเมตร จากนั้นนำไปผ่านกระบวนการทาง immunocytochemistry เช่นเดียวกับ 6.1.2 โดยใช้แอนติซีรั่มต่อเปปไทด์ชนิดต่าง ๆ ที่เจือจาง 1:5000 ผสมกับ BSA-peptide conjugate หรือ BSA-Gly ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หยดบนเนื้อเยื่อสลับกัน

6.2 การทดสอบความสามารถของแอนติซีรั่มในการจับกับ natural peptide ในสารสกัดจากก้านตาโดยวิธี dot-ELISA (รูปที่ 5 และ 6)

6.2.1 การเก็บรวบรวมตากุ้งกุลาดำ

รวบรวมตากุ้งโดยใช้กรรไกรตัดบริเวณโคนตากุ้งขณะยังมีชีวิตอยู่ แช่ในน้ำแข็งแห้งทันที และเก็บไว้ที่ -70 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้

6.2.2 การเตรียมสารสกัดจากก้านตาในสารละลายเมทานอล กรดอะซิติกและน้ำ

นำตากุ้งจำนวน 2,500 ก้านตามาบดละเอียดพร้อมน้ำแข็งแห้งในครกหินที่แช่ให้เย็น จัดเทผงก้านตาลงในสารละลายเมทานอล อะซิติกและน้ำ (90:1:9) 100 มิลลิลิตร (0.5 มิลลิลิตร/ก้านตา) คนให้ทั่ว บดอีกครั้งด้วยเครื่องบด (homogenizer-Janke & Kunkel) และทิ้งไว้ที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 -6 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นแยกตะกอนที่ 10,000 g เป็นเวลา 15 นาที แยกเอาส่วนใสเก็บไว้ล้างตะกอนและสกัดซ้ำด้วยสารละลายและวิธีการเดิมอีกครั้ง รวมสารสกัดที่ได้จากการสกัดทั้งสองครั้งเข้าด้วยกัน ระเหยเอาเมทานอลและกรดอะซิติกออกด้วยเครื่องระเหยแห้ง (speed vacuum concentrator -Savant) จากนั้นเติม 1% trifluoroacetic acid (TFA) ให้ในสารสกัดมีความเข้มข้นของ TFA เท่ากับ 0.1 % ปั่นแยกตะกอนอีกครั้งที่ 10,000 g เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสของสารสกัดไป

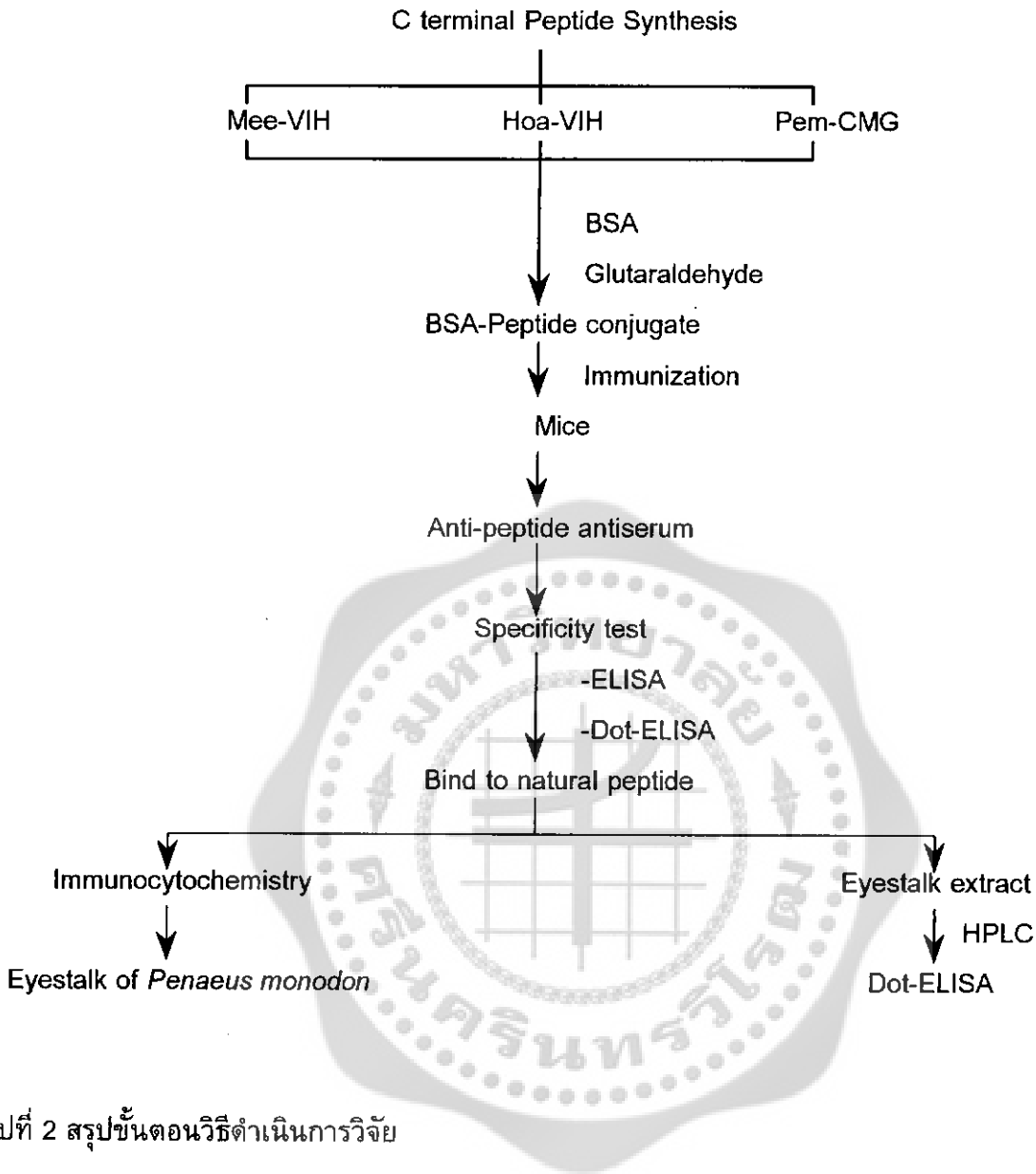
ดูดซับบน C18 Sep- Pak cartridge จะสารสกัดออกด้วย 50 % acetonitrile ใน 0.1%TFA แล้วนำไประเหยตัวทำละลายออก และเก็บสารสกัดไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

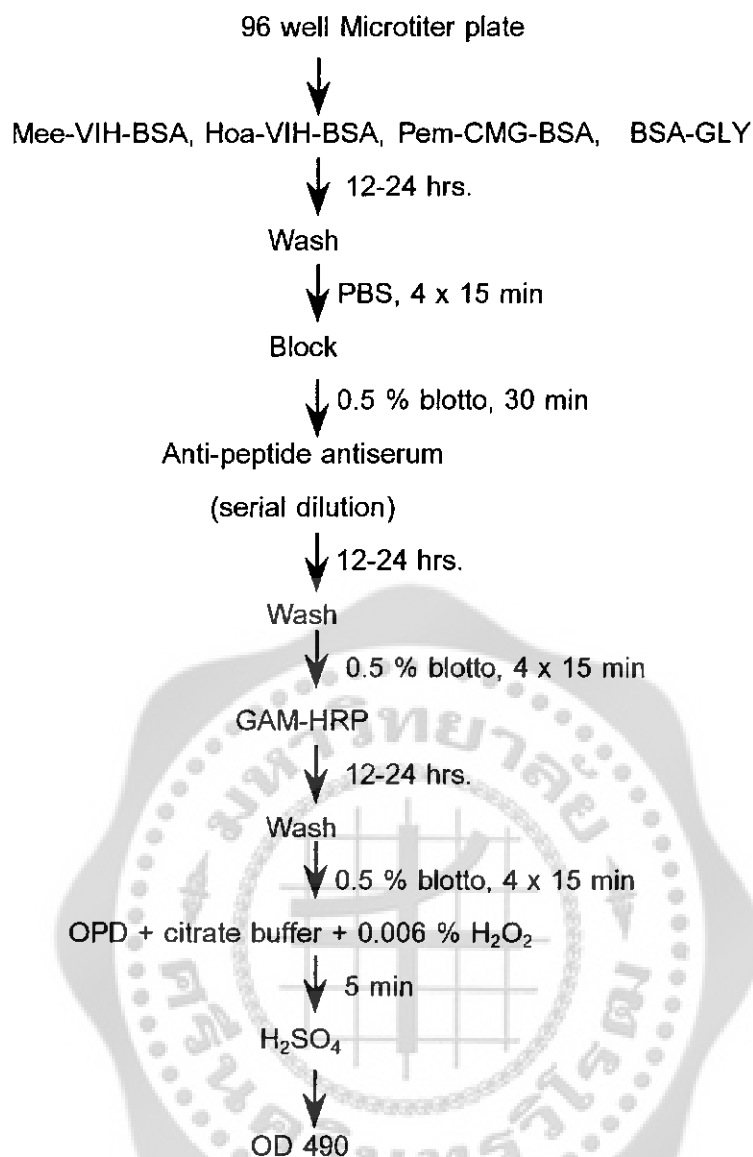
6.2.3 การแยกสารสกัดจากก้านตาโดย RP-HPLC

นำสารสกัดจากก้านตาที่แยกได้จากข้อ 6.2.3 มาละลายด้วย 15 % acetonitrile ใน 0.1 % TFA บั่นแยกตะกอนที่ 10,000 g เป็นเวลา 15 นาที แยกส่วนใสและนำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC (Gilson) ผ่านคอลัมน์ C18 จากนั้นจะสารสกัดด้วย acetonitrile ที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นตามลำดับ (concentration gradient) จาก 12- 64% acetonitrile ใน 0.1 % TFA อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที และการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้น 0.8 % ต่อนาที ตรวจวัดสารที่ออกจากคอลัมน์ด้วยความยาวคลื่น 215 นาโนเมตร รวบรวมสารละลายที่แยกได้จากคอลัมน์โดยเครื่องแฟรคชันคอลเลคเตอร์ (fraction collector) ทุก ๆ 1 นาที (รูปที่ 5)

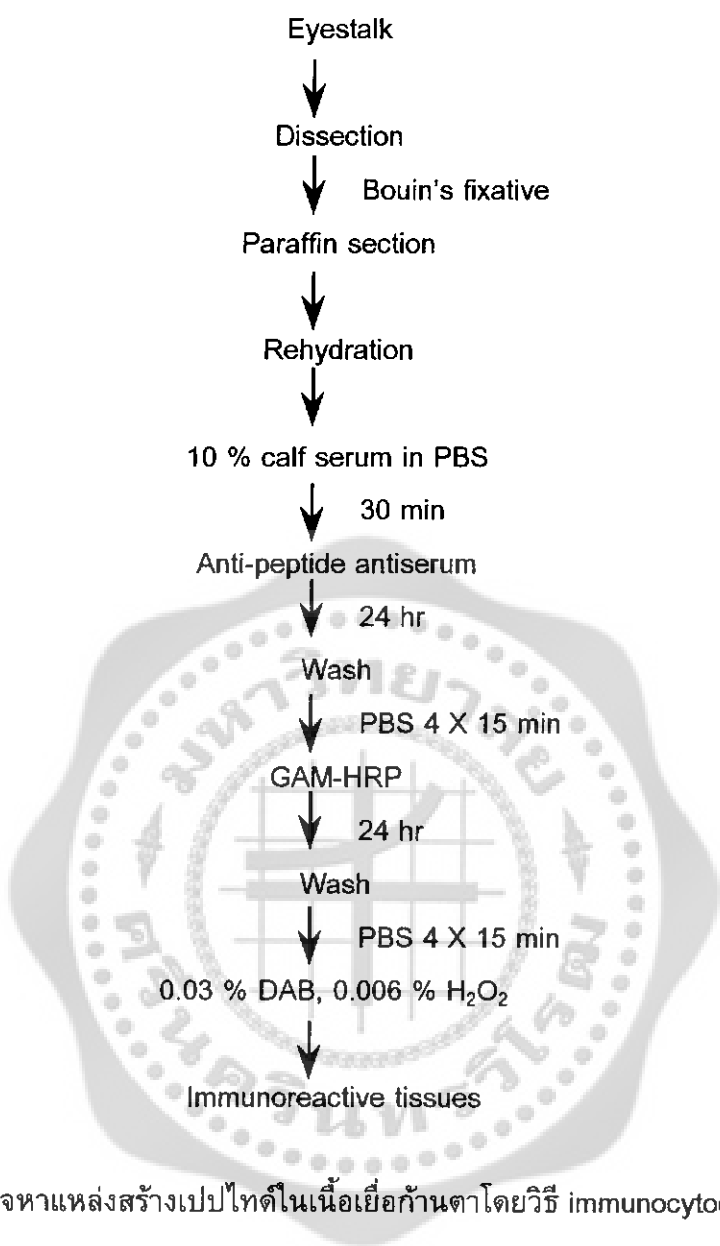
6.2.4 การตรวจหาสารคล้ายเปปไทด์ในก้านตาโดยวิธี dot-ELISA

นำ fraction ที่ 6-60 หลังผ่านกระบวนการทาง RP-HPLC (ข้อ 6.2.3) ระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง speed vacuum concentrator เติม BSA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร หยดลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส fraction ละ 1 ไมโครลิตรต่อจุด (100 ก้านตาต่อจุด) เรียงตามลำดับ fraction ที่แยกได้จาก RP-HPLC นำกระดาษไนโตรเซลลูโลสไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีและอบต่อในไอของ glutaraldehyde ที่ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง แخذกระดาษไนโตรเซลลูโลสในสารละลาย 0.2 % glutaraldehyde ต่ออีกเป็นเวลา 30 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 4 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที นำไปแช่ใน 5 % blotto เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำแผ่นกระดาษไนโตรเซลลูโลสไปบ่มในสารละลายแอนติซีรั่มต่อเปปไทด์ชนิดต่าง ๆ แต่ละชนิดที่เจือจางในอัตราส่วน 1: 40,000 ใน 5 % blotto ที่มี BSA-Gly 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรละลายอยู่ตามลำดับ เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง ล้างด้วย 0.5 % blotto 4 ครั้ง ๆ ละ 15 นาทีบ่มต่อใน GAM-HRP ที่เจือจางในอัตราส่วน 1:1,000 ใน 5 % blotto เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง ล้างด้วย 0.5 % blotto 4 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที และล้างต่ออีกครั้งด้วย PBS เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปแช่ในสารละลายสับสเตรทซึ่งประกอบด้วย 0.03 % diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB), 0.006 % hydrogen peroxide (H_2O_2) และ 0.05 % cobalt chloride ($CoCl_2$) ใน PBS เป็นเวลา 5 นาที ล้างน้ำกลั่นหลาย ๆ ครั้ง (รูปที่ 6)

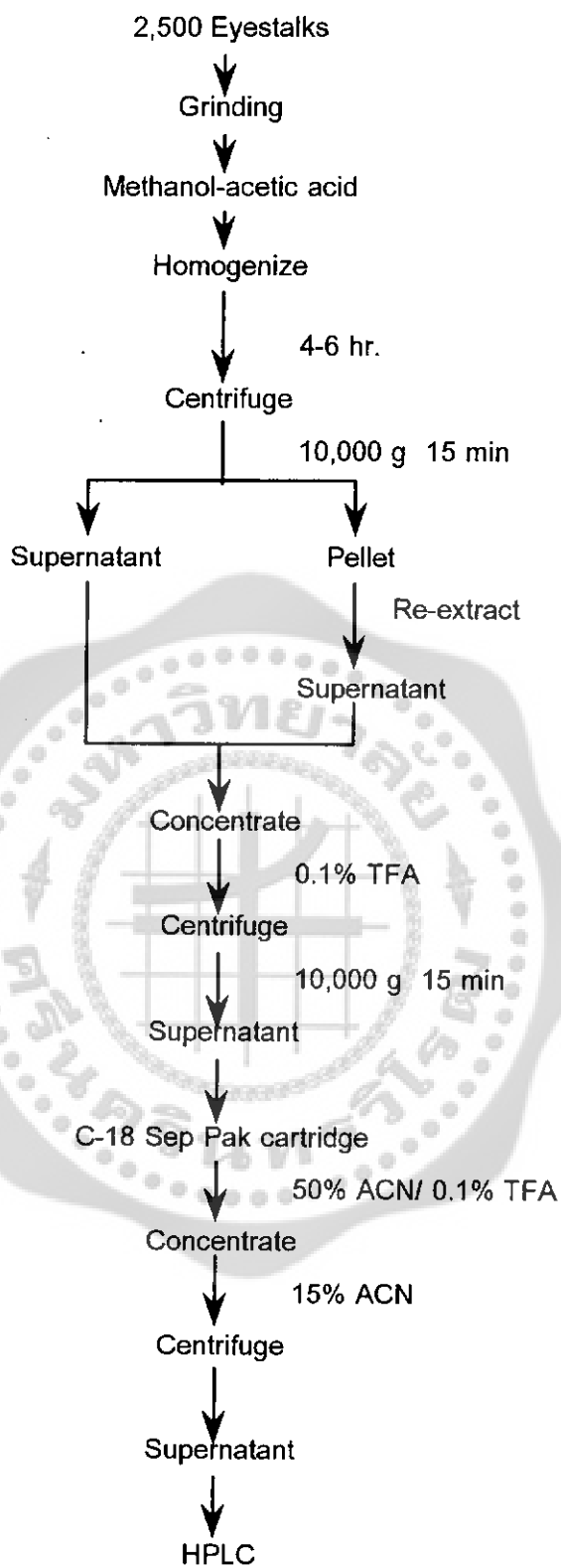




รูปที่ 3 ขั้นตอนการทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรั่มในการจับเปปไทด์สังเคราะห์ด้วยวิธี indirect immunoperoxidase ELISA



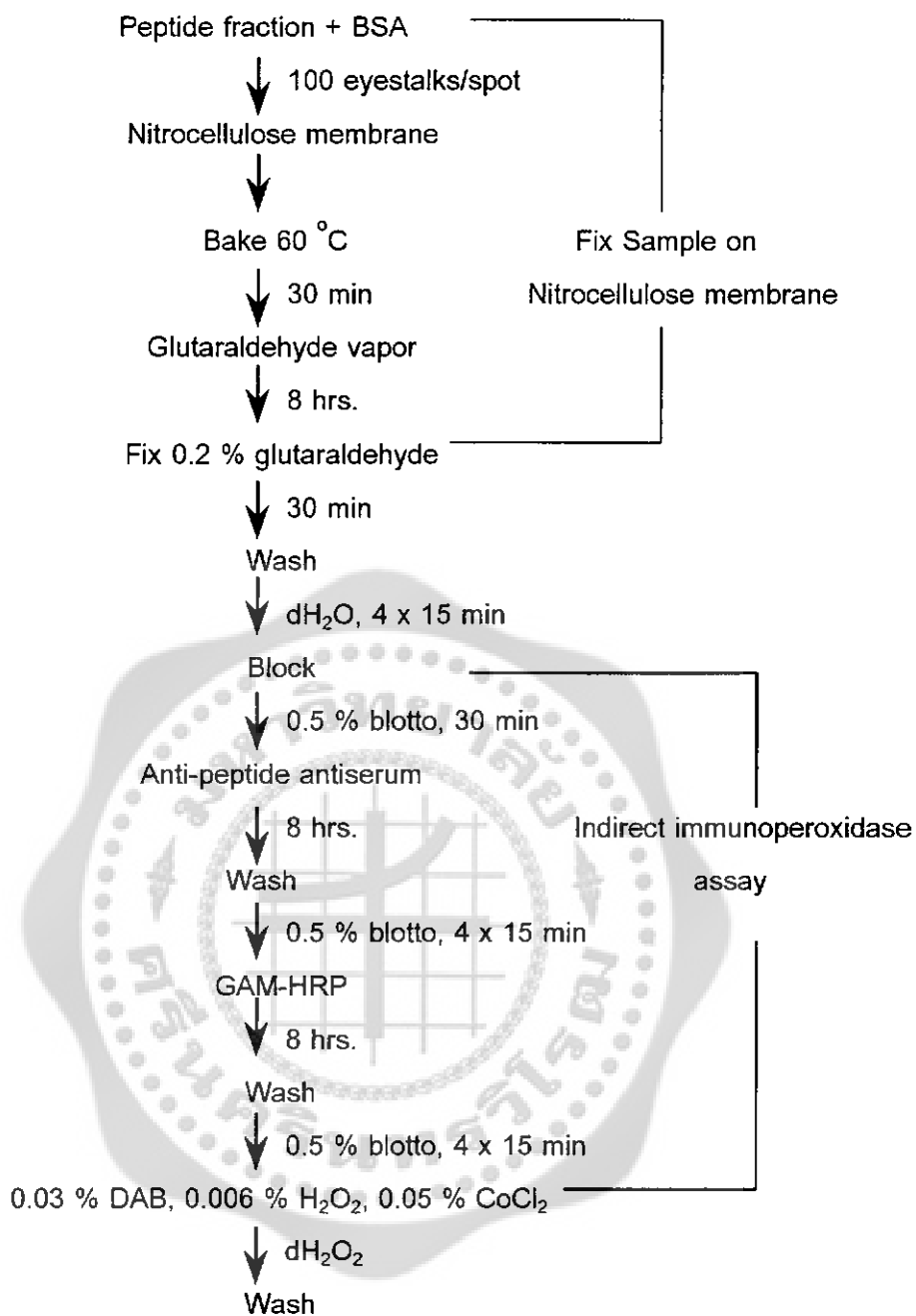
รูปที่ 4 ขั้นตอนการตรวจหาแหล่งสร้างเปปไทด์ในเนื้อเยื่อแกนตาโดยวิธี immunocytochemistry



รูปที่ 5 ขั้นตอนการแยกสารสกัดจากก้านตา

ผลการทดลอง





รูปที่ 6 ขั้นตอนการตรวจสอบสารคล้ายเปปไทด์ในแฟรคชันต่าง ๆ ที่แยกโดยวิธี dot-ELISA

ผลการทดลอง



การสังเคราะห์เปปไทด์ปลาย C

การสังเคราะห์เปปไทด์ปลาย C ของฮอร์โมนที่คาดว่าจะมีคุณสมบัติเป็น GIH จากกุ้ง 3 ชนิดคือ Hoa-VIH ที่มีจำนวนกรดอะมิโน 15 หน่วย Mee-GIH ที่มีจำนวนกรดอะมิโน 20 หน่วยและ Pem-CMG ที่มีจำนวนกรดอะมิโน 15 หน่วย พบว่าน้ำหนักโมเลกุลของเปปไทด์สังเคราะห์ที่ตรวจสอบโดย MALDI-TOF MS มีค่าใกล้เคียงกับน้ำหนักโมเลกุลของเปปไทด์ที่คำนวณได้ (ตารางที่ 1) ซึ่งชี้ให้เห็นว่าเปปไทด์ที่สังเคราะห์มีลำดับกรดอะมิโนถูกต้องตามต้องการ และนอกจากนี้ยังมีความบริสุทธิ์สูงมาก มีเปปไทด์ขนาดเล็กและใหญ่กว่าปะปนมาเพียงเล็กน้อย (รูปที่ 7, 8 และ 9) จึงสามารถนำไปเชื่อมต่อกับ BSA และฉีดให้หนู เพื่อใช้ในการสร้างแอนติบอดีได้เลยโดยไม่ต้องผ่านการทำให้บริสุทธิ์เพิ่มเติม

ความจำเพาะของแอนติซีรัมต่อ Hoa-VIH, Mee-GIH และ Pem-CMG

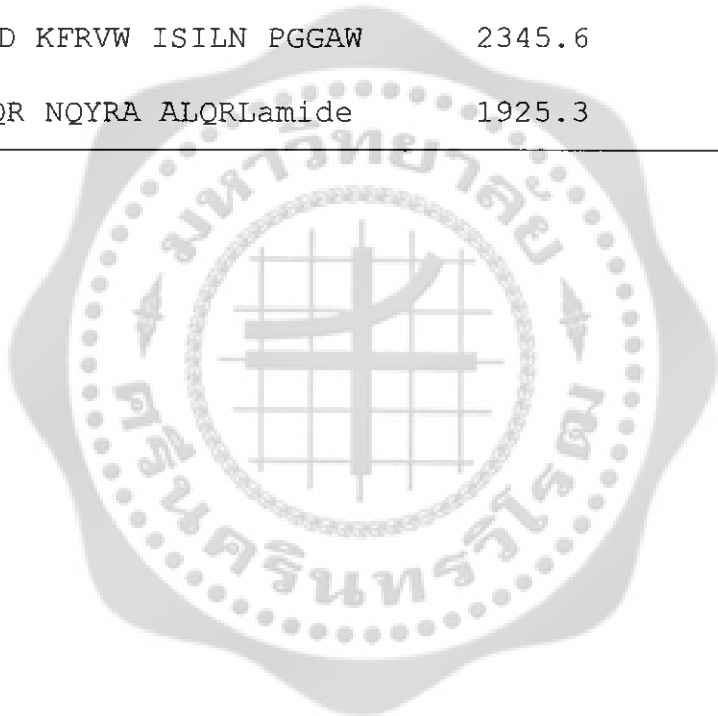
จากการทดสอบแอนติซีรัมจากหนูทั้ง 4 ตัวที่ฉีดด้วย peptide conjugate ทั้ง 3 ชนิดคือ Hoa-VIH-BSA, Mee-VIH-BSA และ Pem-CMG-BSA โดย ELISA เทียบกับ glycine-BSA พบว่าสามารถสร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อเปปไทด์ทั้ง 3 ชนิดได้ดีคือ anti Hoa-VIH antiserum, anti Mee-VIH antiserum และ anti Pem-CMG antiserum แต่จากการนำแอนติซีรัมที่ได้ไปทดสอบการจับของแอนติบอดีกับเปปไทด์ธรรมชาติในก้านตาของกุ้งกุลาดำโดยวิธี immunocytochemistry พบว่ามีเพียง anti Pem-CMG antiserum เท่านั้นที่สามารถจับอย่างจำเพาะกับเซลล์ประสาทและ sinus gland ส่วน anti Hoa-VIH antiserum และ anti Mee-GIH antiserum ไม่พบการจับแบบจำเพาะกับโครงสร้างใด ๆ ในก้านตา แสดงว่า VIH จากกุ้งอเมริกันลอกบสเตอร์ *Homarus americanus* และ GIH จากกุ้งตะกาด *Metapenaeus ensis* ในส่วนปลาย C มีความแตกต่างจากเปปไทด์ของกุ้งกุลาดำมากจนไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามของแอนติซีรัมทั้งสองซึ่งแตกต่างจากกรณีของ anti Pem-CMG antiserum สามารถจับกับเปปไทด์ได้ดี ซึ่งจากการทดลองเปรียบเทียบกับ anti T⁺ antiserum (Sithigorngul et al., 1999) ซึ่งเป็นแอนติซีรัมต่อเปปไทด์ปลาย C ที่คาดว่าจะมีฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด (CHH) ของกุ้งก้ามกราม พบว่าสามารถจับกับเซลล์ประสาทและ sinus gland เช่นเดียวกัน โดยจับเซลล์ในกลุ่มเดียวกัน แต่ต่างเซลล์โดย anti T⁺ antiserum สามารถจับแอนติเจนในเซลล์ประสาทถึง 34 ± 4 เซลล์และบริเวณส่วนใหญ่ของ sinus gland (รูปที่ 10 และ 11) แต่กรณีของ anti Pem-CMG antiserum สามารถจับกับแอนติเจนในเซลล์ประสาทเพียง 2 เซลล์และ sinus gland มีการติดสีเล็กน้อยกระจายอยู่ทั่วไป ซึ่งต่างจากการจับของ anti T⁺ antiserum อย่างชัดเจน (รูปที่ 10 และ 11) การจับของแอนติซีรัมทั้ง 2 กับโครงสร้างต่าง ๆ ภายในก้านตาที่มีความจำเพาะต่อเปปไทด์เพราะจากการใช้ anti CMG-15 antiserum ผสมกับ BSA-CMG-15 ทำให้ immunoreactivity ในโครงสร้างต่าง ๆ เหล่านั้นจะลดหายไป (รูปที่ 12) และจากการทดสอบโดยใช้ CMG-15 peptide และ T⁺ peptide หยดบนกระดาษไนโตรเซลลูโลสที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ และบ่มด้วย antiserum ทั้ง 2 ชนิด พบว่า anti CMG-15 antiserum สามารถจับกับ CMG-15 peptide เท่านั้นไม่จับกับ T⁺ peptide และในทำนองเดียวกัน anti T⁺ antiserum ก็สามารถจับกับ T⁺ peptide เท่านั้นไม่จับกับ CMG-15 peptide (รูปที่ 13)

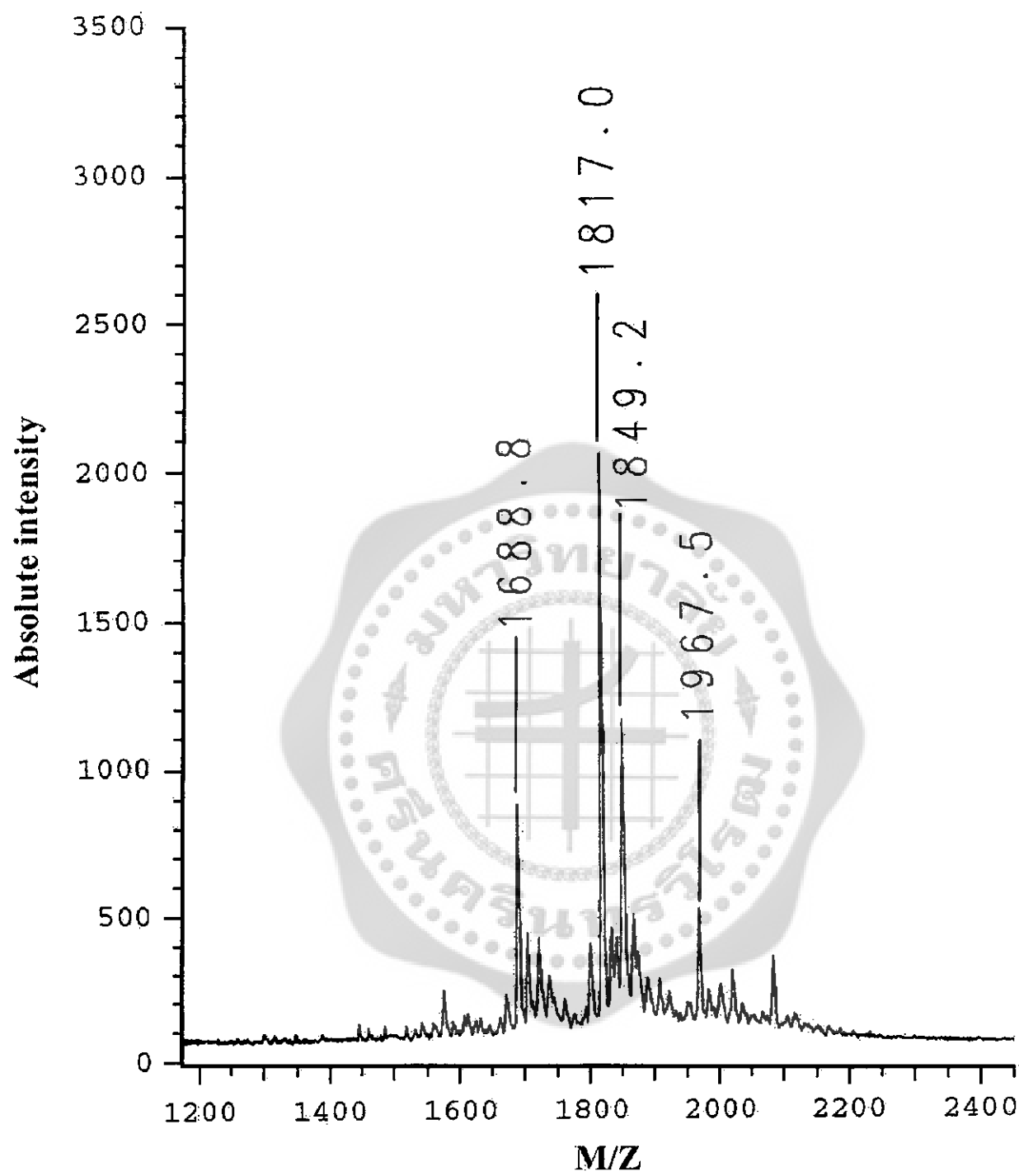
จากการตรวจสอบความสามารถในการจับกับ natural peptide ที่สกัดจากก้านตาโดย methanol-acetic acid และแยกด้วย RP-HPLC ของ anti Pem-CMG antiserum เทียบกับ anti T⁺ antiserum โดยวิธี dot-ELISA พบว่าแอนติซีรัมทั้งสองจับกับเปปไทด์ในแฟรคชันต่างกันชัดเจนคือ anti Pem-CMG antiserum จับกับเปปไทด์ในแฟรคชันที่ 20-22 ขณะที่ anti T⁺ antiserum จับกับเปปไทด์ในแฟรคชันที่ 48-51 (รูปที่ 14) ประกอบกับการใช้แอนติซีรัมทั้งสองจับกับเปปไทด์ที่สังเคราะห์ทั้ง 2 ชนิดพบว่าแอนติซีรัมทั้ง 2 ชนิดไม่มีปฏิกิริยาข้ามกันแต่อย่างใด จึงเป็นที่มั่นใจได้ว่าแอนติซีรัมทั้ง 2 จับกับเปปไทด์ธรรมชาติต่างชนิดกัน



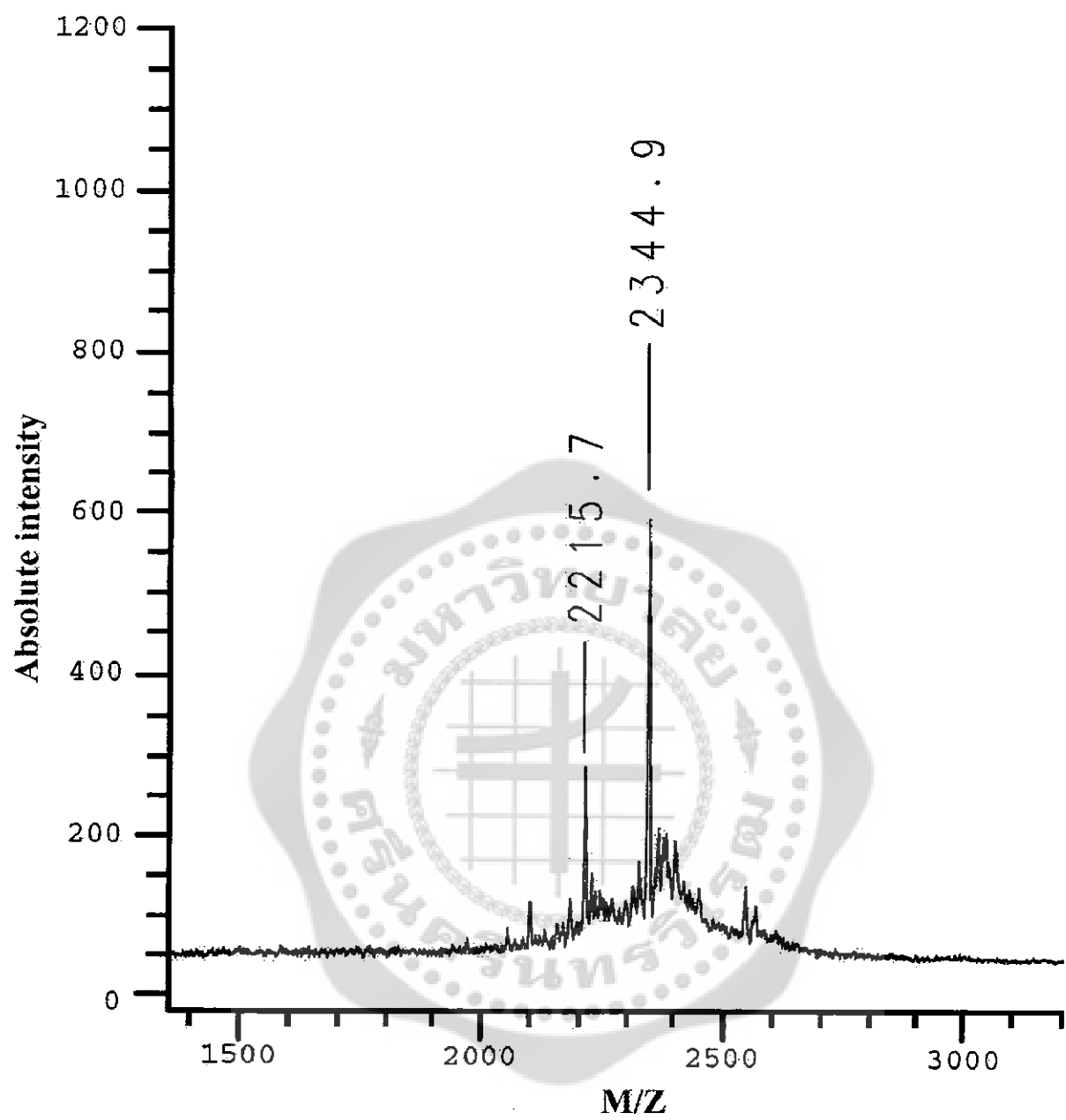
ตารางที่ 1 ยืนยันผลการสังเคราะห์เปปไทด์ทางปลาย C ของ Hoa-VIH, Mee-GIH และ Pem-CMG โดยการวิเคราะห์ด้วย MALDI-TOF-MS

Peptide	Sequences	Expected mass (daltons)	Observed mass (daltons)
Hoa-VIH	GEIDQ FRKWV SILRAamide	1817.1	1817.0
Mee-GIH	EDEID KFRVW ISILN PGGAW	2345.6	2344.9
Pem-CMG	RPRQR NQYRA ALQRLamide	1925.3	1926.9

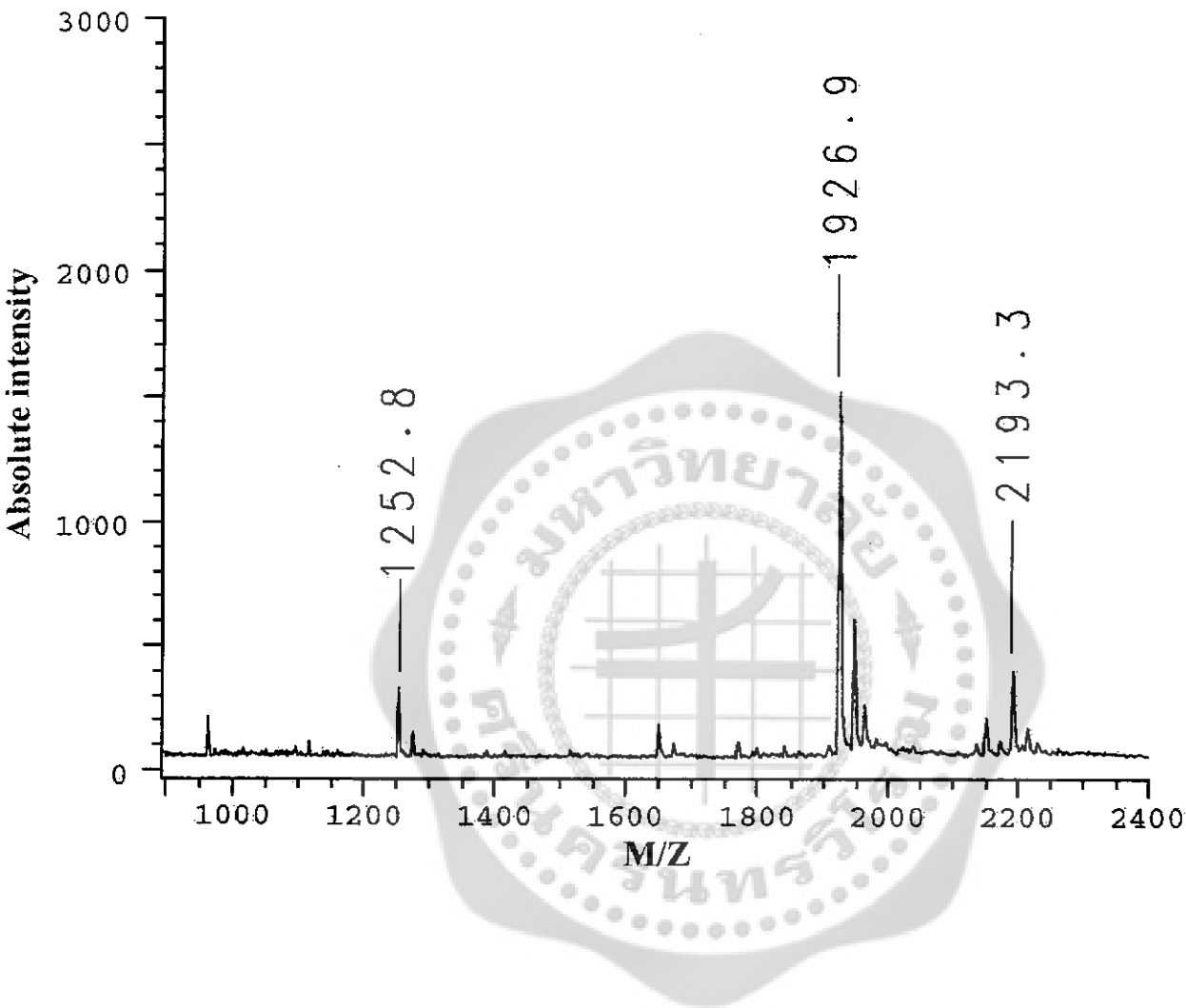




รูปที่ 7 Spectrum ของเปปไทด์ทางปลาย C ของ Hoa-VIH วิเคราะห์โดย MALDI-TOF-MS

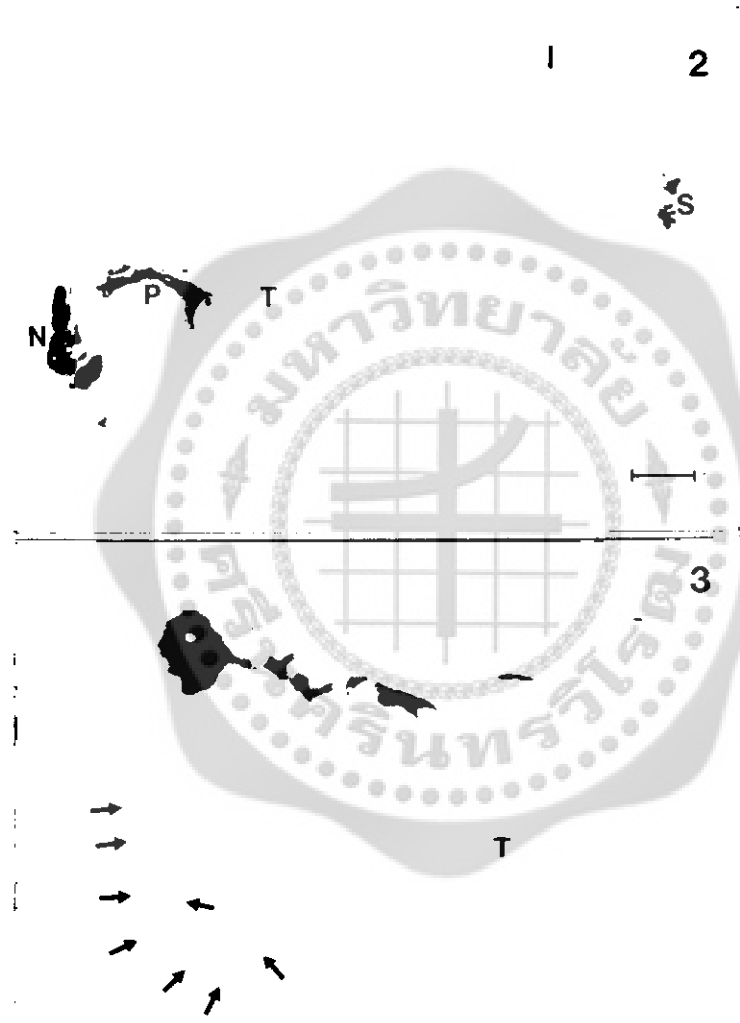
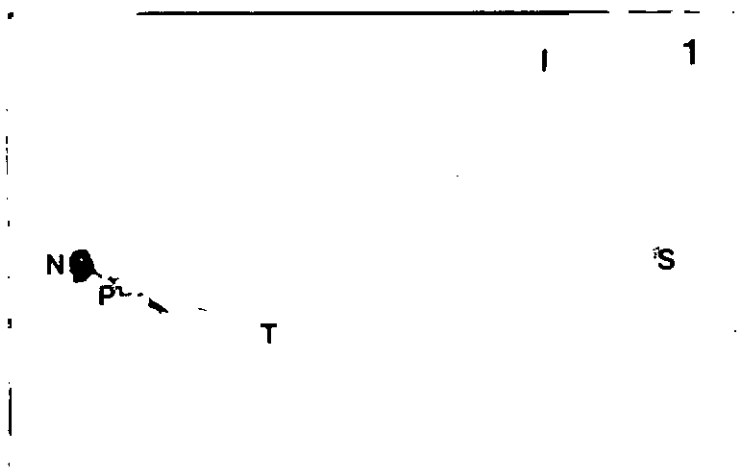


รูปที่ 8 Spectrum ของเปปไทด์ทางปลาย C ของ Mee-GIH วิเคราะห์โดย MALDI-TOF-MS



รูปที่ 9 Spectrum ของเปปไทด์ทางปลาย C ของ Pem-CMG วิเคราะห์โดย MALDI-TOF-MS

รูปที่ 10 Immunocytochemistry ของก้านตากลังกลาต่ำ แสดง 2 เซกชันต่อกันเปรียบเทียบตำแหน่งของ neurosecretory cell ที่พบ CMG peptide (1 และ 3) และ CHH (2 และ 4) ภาพ 1 และ 2 เป็นภาพกำลังขยายต่ำแสดงตำแหน่งตัวเซลล์ (N) แอกลอน (P) ที่นำไปไทด์ไปเก็บสะสมและรอการหลั่งเข้ากระแสโลหิตที่ sinus gland (S) ภาพ 3 และ 4 แสดงกำลังขยายสูงของตัวเซลล์ที่พบ CMG peptide และ CHH ในเซลล์ตำแหน่งต่างกัน ลูกศรยาวแสดงตำแหน่งตัวเซลล์ที่พบ CHH แต่ไม่ถูกจับโดย anti CMG antiserum (3) ลูกศรสั้นแสดงตำแหน่งตัวเซลล์ที่พบ CMG peptide แต่ไม่ถูกจับโดย anti T+ antiserum เช่นเดียวกัน I = medulla interna T = medulla terminalis เส้น = 100 μ m



รูปที่ 11 Immunocytochemistry ของก้านตาทิงกูลาตำบลบริเวณ sinus gland 2 เซกชันต่อกันโดยใช้ anti CMG antiserum (1) และ anti T⁺ antiserum (2) ตำแหน่งที่พบเปปไทด์ทั้ง 2 อยู่ทั่วตลอดทั้ง sinus gland แต่บริเวณปลายแอกซอนของ CMG peptide มีจำนวนน้อยกว่า CHH มาก
I = medulla interna เส้น = 100 μ m



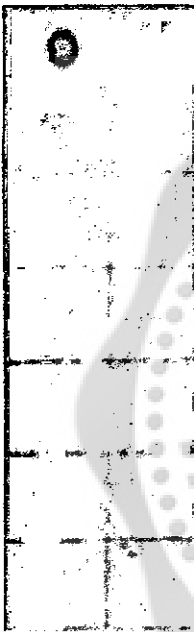
รูปที่ 12 การตรวจสอบความจำเพาะของ anti CMG antiserum โดยวิธี immunocytochemistry ในก้าน
ตาของกิ้งกูดำบริเวณตัวเซลล์ประสาท (1, 2) และ sinus gland (3, 4) 2 เซกชันต่อกันโดย
ใช้ anti CMG antiserum (1 : 5,000) ผสมกับ BSA-glycine (1, 3) หรือ BSA-CMG-15 (2, 4)
ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร พบว่าการติดสีของตัวเซลล์ประสาทและ sinus gland จะ
หายไปเมื่อแอนติซีรัมถูกดูดซับด้วย BSA-CMG-15

รูปที่ 13 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามระหว่าง anti CMG-15 antiserum และ anti T⁺ antiserum ต่อ CMG peptide (CMG) และ T⁺ peptide (T⁺) โดยวิธี dot ELISA ใช้ peptide เจือจางระดับต่าง ๆ ความเข้มข้นของ antiserum ทั้ง 2 ชนิดที่ใช้ 1 : 40,000 เท่า

Anti-CMG Antiserum

Anti-T+ Antiserum

CMG T+



5 ng

2.5 ng

1.25 ng

0.625 ng

0.312 ng

0.16 ng

BSA

CMG T+



รูปที่ 14 RP-HPLC ขั้นตอนแรกของสารสกัดจากก้านตากุ้งกุลาดำจำนวน 2,500 ก้านตาที่แยกด้วย C18 Prep-Pak column (Waters) กราฟแท่งได้ Chromatogram แสดงความเข้มของ immunoreactivity ที่แสดงโดย anti CMG antiserum  และ anti T⁺ antiserum  อนุมานจาก dot ELISA (1) จาก 2 ภาพล่าง Nitrocellulose membrane หยดด้วยเปปไทด์แต่ละแฟรคชันปริมาณสารสกัดเทียบเท่ากับ 100 ก้านตาทำปฏิกิริยากับ anti-CMG-15 antiserum (2) และจำนวนเทียบเท่ากับ 50 ก้านตาทำปฏิกิริยากับ anti T⁺ antiserum (3) ตัวเลขด้านขวา-ซ้ายของแผ่น nitrocellulose แสดงเลขที่แฟรคชันของแถวแรกและแถวสุดท้าย

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง



การสังเคราะห์เปปไทด์ปลาย C ทั้ง 3 ชนิดคือ Hoa-VIH, Mee-GIH และ Pem-CMG ซึ่งเมื่อตรวจสอบโดย MALDI-TOF-MS แล้วพบว่าลำดับกรดอะมิโนถูกต้องตามต้องการและมีความบริสุทธิ์สูง ซึ่งสามารถใช้สร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อเปปไทด์ทั้งสามได้ดีคือ anti Hoa-VIH antiserum, anti Mee-GIH antiserum และ anti Pem-CMG antiserum แต่ anti Hoa-VIH antiserum และ anti Mee-GIH antiserum ไม่มีปฏิกิริยาข้ามใด ๆ กับเปปไทด์ในก้านตาของกุ้งกุลาดำในขณะที่ anti Pem-CMG antiserum สามารถจับกับเซลล์ประสาทและ sinus gland ได้อย่างดี แสดงว่าเปปไทด์ส่วนปลาย C ทั้ง 20 หน่วยของ Mee-GIH และ 15 หน่วยของ Hoa-VIH แตกต่างจากเปปไทด์ธรรมชาติในก้านตาของกุ้งกุลาดำมากจึงไม่แสดงปฏิกิริยาข้ามใด ๆ ที่ตรวจสอบได้ ในขณะที่ anti Pem-CMG antiserum ซึ่งเป็นของกุ้งกุลาดำสามารถจับกับเปปไทด์ธรรมชาติในก้านตาของกุ้งกุลาดำได้ ดังนั้นการที่แอนติซีรัมทั้งสองไม่จับกับเปปไทด์ธรรมชาติในก้านตาของกุ้งกุลาดำจึงไม่น่าเกิดจากความผิดพลาดใด ๆ ในการทดลอง ทั้งนี้เพราะ anti T⁺ antiserum ซึ่งสร้างจากการปลูกภูมิคุ้มกันด้วยเปปไทด์ส่วนปลาย C ของ crustacean hyperglycemic hormone (CHH) ของกุ้งก้ามกรามซึ่งมีกรดอะมิโนตรงปลาย C เหมือนกับ CHH ของกุ้งกุลาดำเพียง 4 หน่วย (Davey et al., 2000) Anti T⁺ antiserum สามารถแสดงปฏิกิริยาข้ามกับเปปไทด์ธรรมชาติในก้านตาของกุ้งกุลาดำได้อย่างดี (Sithigorngul et al., 1999) ซึ่งแสดงว่าเปปไทด์ Hoa-VIH และ Mee-GIH ต่างจากเปปไทด์ของกุ้งกุลาดำอย่างมาก ซึ่งเปปไทด์ที่สังเคราะห์ทั้งสองชนิดค่อนข้างยาวประกอบด้วยกรดอะมิโน 15-20 หน่วย ถ้ามีส่วนคล้ายกันน่าจะจับกับเปปไทด์ส่วนต้นในจากปลาย C ได้บ้าง

ในทำนองเดียวกันจากการใช้ปลาย C ของเปปไทด์ Pem-CMG ที่มีกรดอะมิโนจำนวน 15 หน่วยโดยปลายเป็นLamide พบว่าสามารถจับเปปไทด์ธรรมชาติในก้านตา (immunocytochemistry) และในสารสกัดจากก้านตาของกุ้งกุลาดำได้ ซึ่งชี้ให้เห็นว่าตำแหน่ง GK ตรงปลายเป็นตำแหน่งเฉพาะในกระบวนการแปรรูปเป็นเปปไทด์โดยเอ็นไซม์จำเพาะที่ตัดหมู่ NH₂ ของ glycine ให้ติดต่ออยู่กับกรดอะมิโนตัวสุดท้าย ดังนั้นจึงเป็นการยืนยันว่าปลาย C ของ Pem-CMG peptide เป็นLamide

จากการเปรียบเทียบการจับของ anti Pem-CMG antiserum กับ anti T⁺ antiserum กับเปปไทด์ธรรมชาติในก้านตาทั้งโดยวิธี immunocytochemistry ของก้านตาและ dot ELISA ของสารสกัดจากก้านตาของกุ้งกุลาดำที่แยกโดยกระบวนการ RP-HPLC 1 ขั้นตอน ชี้ชัดเจนว่าแอนติซีรัมทั้งสองจับกับเปปไทด์ต่างชนิดกัน CMG peptide จึงต่างจาก CHH และสร้างโดยเซลล์ประสาทต่างเซลล์กันในกลุ่มเซลล์ประสาทบริเวณใกล้เคียงกัน ซึ่งชี้ให้เห็นว่ามีการแสดงออกของยีนที่สร้างเปปไทด์ทั้งสองแยกจากกัน ดังนั้นการหลั่งของ CMG peptide จึงอิสระจากการหลั่ง CHH ทำให้เห็นว่า CMG peptide อาจมีหน้าที่ต่างจาก CHH ของ *Penaeus monodon* ซึ่งมีอยู่ถึง 5 รูปแบบ (Davey et al., 2000) และอีกประการหนึ่งเซลล์ที่พบ CMG มีจำนวนน้อยมากเพียง 2 เซลล์ จึงคาดว่าอาจมีหน้าที่จำเพาะต่างออกไป ในกุ้งล็อบสเตอร์ *Homarus gammarus* จำนวนเซลล์ที่พบ CHH และ GIH มีจำนวนใกล้เคียงกัน และมีเซลล์จำนวนน้อยที่พบฮอร์โมนทั้งสองชนิด (Rotllant et al., 1993) การพบ CHH และ VIH ในเซลล์เดียวกันมีรายงานในกุ้งล็อบสเตอร์ *Homarus americanus* เช่นกัน (Kallen et al., 1984) แต่ในกรณีของปูชนิดต่าง ๆ พบว่าเซลล์ประสาทที่พบ CHH มีจำนวนประมาณ 2 เท่าของเซลล์ที่พบ MIH

(molt inhibiting hormone) แต่ไม่พบฮอร์โมนทั้ง 2 ชนิดอยู่รวมในเซลล์เดียวกันไม่ว่าจะตรวจสอบโดยวิธี immunocyto-chemistry (Dirksen et al., 1988) หรือ in situ hybridization (Klein et al., 1993)

จากการใช้ anti T⁺ antiserum กับ CHH ของกุ้งก้ามกรามและกุ้งกุลาดำ พบว่าแอนติบอดีสามารถจับกับ CHH จากกุ้งทั้งสองได้ดี (ทั้ง immunohistochemistry และ dot-ELISA) แต่จากการทดลองการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของ CHH ในกุ้งทั้งสองพบว่ามีปฏิกิริยาข้ามกันน้อยมาก (ไม่ได้รายงานผลการทดลอง) ทั้งนี้เนื่องจากลำดับกรดอะมิโนของ CHH ระหว่างกุ้งทั้งสองเหมือนกันเพียง 44-47% เท่านั้น ซึ่งคล้ายกับผลการทดลองโดยวิธี immunocytochemistry ในแอนติซีรั่มของปู *Carcinus maenas* สามารถจับกับ CHH ของปูชนิดต่าง ๆ ได้เช่น *Linocarcinus puber*, *Cancer pagusus*, *Uca pagilator*, *Maja squinado* (Dirksen et al., 1988) และใน crustacean กลุ่ม isopod *Porcellio dilatatus* (Martin et al., 1984) *Oniscus asellus* (Nussbaum and Dirksen 1995) หรือโดย radioimmunoassay ในกุ้ง crayfish *Orconectes sp.* (Keller et al., 1985) และใน isopod *Porcellio dilatatus* (Martin et al., 1984) แต่ปฏิกิริยาข้ามของการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของ CHH ระหว่างปูต่าง ๆ เช่น *Carcinus sp.* กับ *Uca sp.* มีปฏิกิริยาข้ามกันได้ดี แต่ไม่มีปฏิกิริยาทางการออกฤทธิ์ทางชีววิทยากันระหว่างปูกับ crayfish (*Orconectes sp.*) (Keller et al., 1985) ซึ่งการทดสอบโดยการใช้ CHH จับกับเมมเบรนของ hepatopancreas ระหว่างปู *Carcinus maenas* และ *Orconectes limosus* ได้ผลทำนองเดียวกัน (Kunmer and Keller 1993) ซึ่ง CHH ระหว่างปู และ crayfish มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกันถึง 64% ก็ตาม แต่ในกรณีของ CMG peptide นั้นเหมือนกับ CHH ของกุ้งกุลาดำรูปแบบต่าง ๆ ประมาณ 41-51% (Udomkit et al., 2000) และสร้างจากเซลล์ประสาทแยกจากกันชัดเจน CMG peptide จึงน่าจะมีบทบาทการทำงานต่างจาก CHH ซึ่งจำเป็นต้องทดสอบต่อไป โดยการสร้าง monoclonal antibody ต่อ CMG-peptide เพื่อผลิตแอนติบอดีจำนวนมากเพื่อใช้ทดสอบการยับยั้งการทำงานของ CMG-peptide ในร่างกายกุ้งต่อไป



- Anilkumar, G. and K.G. Adiyodi. 1980. Ovarian Growth, Induced by Eyestalk Ablation During the Prebreeding Season is not Normal in the Crab, *Paratelphusa hydrodromous* (Herbst). Inter. J. Invert. Reprod. 2:95-105.
- Bomirski, A. and E. Klek-Kawinsha. 1976. Stimulation of Oogenesis in the Sand Shrimp, *Crangon crangon*, by a Human Gonadotropin. Gen. Comp. Endo. 30 :239-242.
- Bomirski, A., M. Arendarzk, E. Kawinsha and L.H. Kleinholz. 1981. Partial Characterization of Crustacean Gonad Inhibiting Hormone. Inter. J. Invert. Reprod. 3 :213-219.
- Browdy, C.L. and T.M. Samocha. 1985. The Effect of Eyestalk Ablation on Spawning, Molting and Mating of *Penaeus semisulcatus* de Haan. Aquaculture. 49:19-29.
- Chan, S.M. and P.L. GU. 1997. Molecular Cloning of Neuropeptide cDNA in the Sand Shrimp *Metapenaeus ensis*, Advances in Comparative Endocrinology 1 Proceedings of the XIIIth International Congress of Comparative Endocrinology p 63-67. Edit : S. Kawashima and S. Kikuyama.
- Chang, E.S., M.J. Bruce and S.L. Tamone. 1993. Regulation of Crustacean Molting : A Multi-Hormonal System. Am. Zool. 33:324-329.
- Crococ, P.J. and J.D. Kerr. 1986. Factors Affecting Induction of Maturation and Spawning of the Tiger Prawn, *Penaeus esculentus* (Haswell), under Laboratory Conditions. Aquaculture. 58 : 203-214.
- Davey M.L., M.R. Hall, R.H. Willis, R.W.A. Oliver, M.J. Thurn and K.J. Wilson. 2000. Five Crustacean Hyperglycemic Family Hormones of *Penaeus monodon* : Complementary DNA Sequence and Identification in Single Sinus Glands by Electrospray Ionization-Fourier Transform Mass Spectrometry. Mar. Biotechnol. 2 :80-91.
- Eastman-Reks, S.B. and M. Fingerman. 1984. In Vitro Synthesis of Vitellin by the Ovary of the Fiddler Crab, *Uca pugilator*. J. Exp. Zool. 233 : 111-113.
- Emmerson, W.D. 1983. Maturation and Growth of Ablated and Unablated *Penaeus monodon* Fabricius. Aquaculture. 32 : 235-241.
- Gangotri, M.S., S.A.T. Venkatachari and N. Vasantha. 1987. Neuroendocrine Control of Blood Sugar Regulation in the Freshwater Crab, *Barytelphusa guerini* (H. Milne Edwards) (Decapoda, Potamidea). Crustacean. 53(1) : 5-14.
- Harper, G.P., Y.A. Barde, D. Edgar, D. Ganten, F. Hefti, R. Heumann, K.W. Naujoks, H. Rohrer, J.E. Turner, and H. Thoenen. 1983. Biological and Immunological Properties of the Nerve Growth Factor From Bovine Seminal Plasma: Comparison With the Properties of Mouse Nerve Growth Factor. Neuroscience. 8(2): 375-387.

- Hillier, A.G. 1984. Artificial Condition Influencing the Maturation and Spawning of Sub-adult *Penaeus monodon* (Fabricinus). *Aquaculture*. 36 : 179-184.
- Huberman, A., H. Arechiga, A. Cimeti, J. De La Rosa, and C. Aramburo. 1979. Isolation and Purification of Neurodepressing Hormone From the Eyestalk of *Procambarus bouvieri* (Ortmann). *Eur J. Biochem.* 99:203-208.
- Huberman, A., M.B. Aquillar, K. Brew, J. Shabanowitz and D.F. Hunt. 1993. Primary Structure of the Major Isomorph of the Crustacean Hyperglycemic Hormone (CHH-I) from the Sinus Gland of the Mexican Crayfish, *Procambarus bouvieri* (Ortmann) Interspecies Comparison. *Peptides*. 14:7-16.
- Kallen, J.L., F.M.Y. Reijntjens, D.J.M. Peters and F. Van Herp. 1986. Biochemical Analysis of the Crustacean Hyperglycemic Hormone of the Crayfish *Astacus leptodactylus*. *Gen. Comp. Endo.* 61 : 248-259.
- Kallen, J. and J.J. Meusy. 1989. Do the Neurohormones VIH or CHH of Crustacean have a Common Precursor? Immunolocalization of VIH and CHH in the X-organ Sinus Gland Complex of the Lobster, *Homarus americanus*. *Invert. Reprod. Dev.* 16 : 43-52.
- Kegel, G., B. Reichwen, C.P. Tensen and R. Keller. 1991. Amino Acid Sequence of Crustacean Hyperglycemic Hormone (CHH) from the Crayfish, *Orconetes limosus* : Emergence of a Novel Neuropeptide Family. *Peptides*. 12 : 909-913.
- Keller, R. and G. Wunderer. 1978. Purification and Amino Acid Composition of the Neurosecretory Hyperglycemic Hormone from the Sinus Gland of the Shore Crab, *Carcinus maenas*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 34 : 328-335.
- Keller, R., P.P. Jaros and G. Kedel. 1985. Crustacean Hyperglycemic Neuropeptide. *American Zoologist*. 25(11) : 207-222.
- Kleinholz, L.H. 1975. Purified Hormones from the Crustacean Eyestalk and their Physiological Specificity. *Nature*. 258:256-257.
- Kleinholz, L.H. and R. Keller. 1973. Comparative Studies in Crustacean Neurosecretory Hyperglycemic Hormones. I. The Initial Survey. *Gen. Comp. Endocri.* 21 : 554-564.
- de Kleijn, D.P.V., F.J.G.T Sleutels, G.J.M Martens and F. Van Herp. 1994. Cloning and Expression of mRNA Encoding Prepro-gonad Inhibiting Hormone (GIH) in the Lobster *Homarus americanus* *FEBS Letter*. 353 : 255-258.
- Kulkarni, G.K. and R. Nagabhushanam. 1980. Role of Ovary Inhibiting Hormone from Eyestalks of Marine Penaeid Prawns (*Parapenaeopsis hardwickii*) during Ovarian Development Cycle. *Aquaculture*. 19:3-19.

- Kummer, G. and R. Keller. 1993. High Affinity Binding of Crustacean Hyperglycemic Hormone (CHH) to Hepatopancreas Plasma Membranes of the Crab *Carcinus maenas* and the Crayfish *Orconectes limosus*. *Peptides*. 14 : 103-108.
- Menasveta, P. 1990. Proceedings of the International Symposium on Application of Biotechnology for Small Industries Development in Developing Countries. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology. Bangkok, Thailand. p. 55-63.
- Nagabhushanam, R. and R. Sarojini. 1987. Effect of Vertebrate Gonadotropins in the Ovary of the Prawn *Cardina rajudhari*. In : Proceeding of the First Congress of the Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology No. 2, Nagoya University Corporation Printing Section. pp 170-172.
- Nagayama, H., R.M. Withy, and M.A. Raftery. 1982. Use of Monoclonal Antibody Top Purify the Tetrodotoxin Binding Component from the Electroplax of *Electrophorus electricus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 70:7575-7579.
- Primavera, J.H. 1985. A Review of Maturation and Reproduction in Closed Thelycum Penaeids. In: Proceeding of the First International Conference on the Culture of Penaeid Prawn/ Shrimps, Iloilo City, Philippines, 1985. SEAFDEC Aquaculture Department.
- Quackenbush, L.S. and W.F. Hermkind. 1983. Partial Characterization of Eyestalk Hormone Controlling Molt and Gonadal Development in the Spiny Lobster, *Panulirus argus*. *J. Crust. Biol.* 3 (1) : 34-44.
- Rao, K.R. and J.P. Riehm. 1988. Pigment-Dispersing Hormone : An Novel Family of Neuropeptides from Arthropods. *Peptides*. 9:153-159.
- Reddy, T.S.N., P.C.S. Reddy and R. Nagabhushanam. 1987. Hypophysial Gonadotropins (FSH and LH) and its Effect on the Ovaries of Freshwater Prawn, *Macrobrachium lamarii*. In : Proceeding of the First Congress of the Asia and Oceania society for Comparative Endocrinology (AOSCE), Nagoya University Corporation Printing Section. pp 175-176.
- Immunocytochemical Study. *J. Comp. Neurol.* 294:362-376.
- Schnieder, L.E. and P.H. Taghert. 1988. Isolation and Characterization of a *Drosophila* gene that encodes multiple neuropeptides related to Phe-Met-Arg-Phe-NH₂ (FMRFamide). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 85 : 1993-1997.
- Sithigorngul, P., A.O.W. Stretton and C. Cowden. 1991. A Versatile dot-ELISA Method with Femtomole Sensitivity for Detecting Small Peptides. *J. Immunol. Meth.* 141:23-32.
- Sithigorngul, P., C. Cowden and A.O.W. Stretton. 1996. Heterogeneity of Cholecystokinin/gastrin-like Immunoreactivity in the Nervous System of the Nematode *Ascaris suum*. *J. Comp. Neurol.* 370 : 427-442.

- Sithigorngul, P., N. Panchan, T. Vilaivan, W. Sithigorngul and A. Petsom. 1999. Immunochemical Analysis and Immunocytochemical Localization of Crustacean Hyperglycemic Hormone from the Eyestalk of *Macrobrachium rosenbergii*. *Comp. Biochem. Physiol.* 124 B : 73-80.
- Soyez, D., J.E. Van Deijnen and M. Martin. 1987. Isolation and Characterization of a Vitellogenesis Inhibiting Factor from Sinus Gland of the Lobster, *Homarus americanus*. *J. Exp. Zool.* 244 : 479-484.
- Soyez, D., J.P. Le Caer, P.Y. Noel and J. Rossier. 1991. Primary Structure of Two Isoforms of the Vitellogenesis Inhibiting Hormone from the Lobster, *Homarus americanus*. *Neuropeptides.* 20:25-32.
- Steven, V.O. 1986. Use of Synthetic Peptides as Immunogens for Developing a Vaccine Against Human Chorionic Gonadotropin. In *Ciba Foundation Symposium: Synthetic Peptides as Antigens.* John Wiley & Son. New York. p.119.
- Takayanagi, H., Y. Yamamoto and N. Takeda. 1986. An Ovary Stimulation Factor in the Shrimp, *Paratya compressa*. *J. Exp. Zool.* 240 : 203-209.
- Tensen, C.P., K.P.C. Janssen, D. Soye and F. Van Herp. 1991 Comparative Characterization of Hyperglycemic Neuropeptides from the Lobster *Homarus americanus*. *Peptides.* 12 :241-249.
- Thanos, S., F. Bonheffer and U. Rutishauser. 1984. Fiber-Fiber Interaction and Tectal Cues Influence the Development of the Chicken Retinotectal Protection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81:1906-1910.
- Udomkit A., S. Chaoluck, B. Sonthayanon, S. Panyim. 2000. Molecular Cloning of cDNA Encoding a Member of CHH/MIH/GIH Family from *Penaeus monodon* and Analysis of Its Gene Structure. *J. Exp. Marine Biology and Ecology* 244 : 145-156.
- Wurts, W.A. and R.R. Stickney. 1984. An Hypothesis on the Light Requirements for Spawning Penaeid Shrimp, with Emphasis on *Penaeus setiferus*. *Aquaculture.* 41 : 93-98.
- Yano, I. 1984. Induction of Rapid Spawning in Kuruma Prawns, *Penaeus japonicus*, through Unilateral Eyestalk Enucleation. *Aquaculture.* 40 : 265-268.