

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ทุนอุดหนุนการวิจัย

จาก

งบประมาณแผ่นดินประจำปี ๒๕๔๒

การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของสารคล้ายฮอร์โมน FMRF  
(รูปแบบใหม่) จากก้านตาของกุ้งก้ามกราม

Sequence Analysis of FMRFamide-like Substances  
(New Isoforms) from the Eyestalk of the Giant  
Freshwater Prawn *Macrobrachium rosenbergii*

วีระวรรณ สิทธิกรกุล ไพศาล สิทธิกรกุล

และ ศิวาพร ลงยันต์

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

#142713

## กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ฝ่ายวิจัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร ที่ได้สนับสนุนให้ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2542 Dr. Antony O.W. Stretton, Department of Zoology, University of Wisconsin, Madison, U.S.A. ที่ได้อนุเคราะห์ monoclonal antibody FM-23 และ FM1-62 รองศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม ภาคเคมี คณะวิทยาศาสตร์ และสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้อนุเคราะห์ในการหาน้ำหนักโมเลกุลของสารคล้าย FMRFamide และภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร ที่ได้ให้การสนับสนุนจนโครงการวิจัยนี้สำเร็จไปด้วยดี

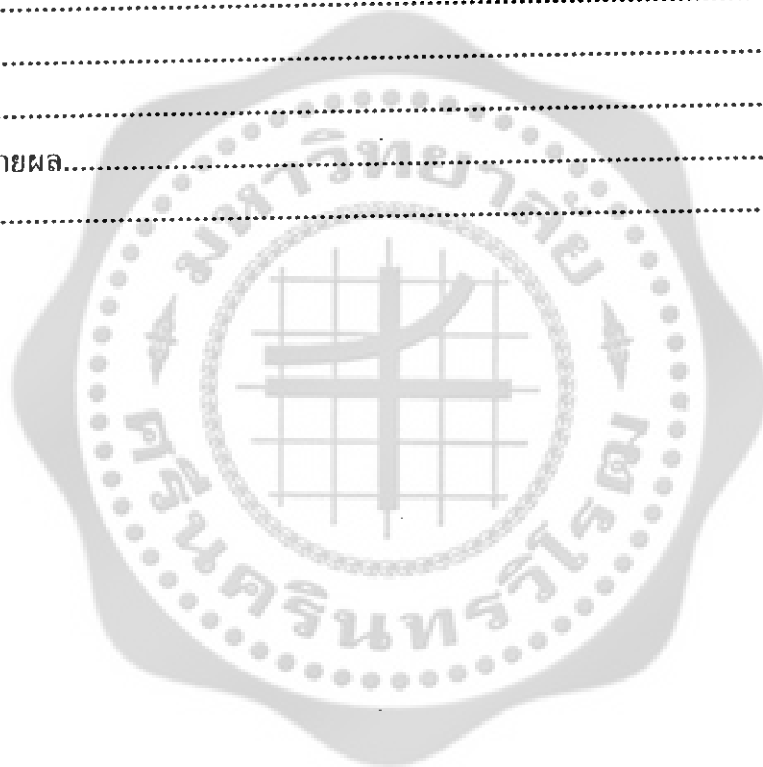
ผลงานวิจัยนี้ได้นำเสนอในภาคบรรยายของการประชุมนานาชาติ Winter Neuropeptide Conference 2000, Invertebrate Division ซึ่งจัดโดย International Neuropeptide Society, มหาวิทยาลัยศิลปากร และศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ที่โรงแรม Royal Garden Resort อำเภอหัวหิน จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ระหว่างวันที่ 10-15 ธันวาคม 2542 ทั้งนี้ คณะผู้วิจัยได้จัดพิมพ์เป็น manuscript เรื่อง Three more novel FMRFamide-like neuropeptide sequences from the eyestalk of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* และ submitted ไปยังวารสารนานาชาติชื่อ PEPTIDES แล้ว

คณะผู้วิจัย  
เมษายน 2543

# สารบัญเรื่อง

หน้า

|                       |    |
|-----------------------|----|
| สารบัญตาราง.....      | I  |
| สารบัญรูป .....       | II |
| บทคัดย่อ.....         | 1  |
| Abstract.....         | 3  |
| บทนำ.....             | 5  |
| วิธีการวิจัย.....     | 16 |
| ผลการทดลอง.....       | 27 |
| สรุปและอภิปรายผล..... | 42 |
| เอกสารอ้างอิง.....    | 45 |



## สารบัญตาราง

| ตารางที่                                                                                                                          | หน้า |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 1 ลำดับกรดอะมิโนของ FLPs (FMRFamide-like peptides) ในสัตว์<br>ชนิดต่าง ๆ.....                                                     | 12   |
| 2 ชนิดและขนาดของคอลัมน์ ระบบตัวทำละลาย เปอร์เซ็นต์ของ acetonitrile<br>ระยะเวลาและอัตราการไหลที่ใช้ในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์..... | 24   |
| 3 ลำดับกรดอะมิโน น้ำหนักโมเลกุลและปริมาณ (recovery) ของ FLPs (6-8)<br>ของกึ่งกัมกราม.....                                         | 40   |
| 4 เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ 2 subfamilies ของ FLPs ในกึ่งกัมกราม<br>และคริสตาเซียนต่าง ๆ.....                                  | 41   |

## สารบัญรูป

| รูปที่                                                                                                                                                                                                      | หน้า |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 1 Immunocytochemistry ของ FLPs(FMRFamide-like peptides)<br>ในก้านตาของกุ้งก้ามกราม <i>Macrobrachium rosenbergii</i> .....                                                                                   | 15   |
| 2 ขั้นตอนวิธีการเตรียมสารสกัดจากก้านตากุ้งก้ามกรามและการทำให้<br>บริสุทธิ์ FLPs.....                                                                                                                        | 21   |
| 3 การเก็บรวบรวมตากุ้ง (a) การเตรียมสารสกัดจากก้านตา (b) การระเหย<br>แห้งสารสกัดด้วย speed vacuum concentrater (c) การนำสารสกัดผ่าน<br>C18 SepPak cartridge (d) และการทำให้บริสุทธิ์ FLPs ด้วย RP-HPLC ..... | 22   |
| 4 ขั้นตอนวิธีการของ Dot-ELISA (Dot-Enzyme Linked Immunosorbent<br>Assay) ในการตรวจหาสารคล้าย FMRFamide.....                                                                                                 | 25   |
| 5 สรุปหลักการของ Dot-ELISA เพื่อตรวจหาแอนติเจน.....                                                                                                                                                         | 26   |
| 6 FMRFamide standard ที่ใช้ในการเปรียบเทียบกับสารคล้าย FMRFamide<br>ในตัวอย่าง.....                                                                                                                         | 30   |
| 7 การทำให้บริสุทธิ์ FLPs จากสารสกัดจากก้านตาด้วย RP-HPLC<br>ขั้นตอนแรก.....                                                                                                                                 | 32   |
| 8 การทำให้บริสุทธิ์ FLPs ด้วย RP-HPLC ขั้นตอนที่สอง.....                                                                                                                                                    | 34   |
| 9 การทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนที่ 1 ถึงขั้นตอนสุดท้าย.....                                                                                                                                                    | 35   |
| 10 การทำให้บริสุทธิ์ FLPs (6-8) ด้วย RP-HPLC ขั้นตอนที่สุดท้าย.....                                                                                                                                         | 36   |
| 11 Matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry of 3 FLPs<br>(6-8) ใช้ synthetic FMRFamide เป็นตัวเทียบ (calibrant).....                                                                   | 38   |
| 12 การหาลำดับกรดอะมิโนของ FLPs (6-8) โดย Edmann degradation.....                                                                                                                                            | 39   |



ได้เคยรายงานการทำให้บริสุทธิ์เปปไทด์คล้าย FMRFamide 5 รูปแบบ (Mar-FLP1,2,3,4 และ 5) จากก้านตาของกิ้งก่ามกราม (Sithigomgul et al, 1998) ส่วนการศึกษาครั้งนี้สามารถจำแนกเปปไทด์คล้าย FMRFamide ได้เพิ่มอีก 3 รูปแบบ (Mar-FLP6-8) จากแฟรคชันที่มีปฏิกิริยาน้อยทางอิมมูโนของสารสกัดจากก้านตาจำนวน 5000 ก้านตา ที่สกัดด้วยเมทานอล/กรดอะซิติก/น้ำ (90:1:9) ทำให้บริสุทธิ์ด้วย RP-HPLC 8 ขั้นตอน และติดตามด้วยวิธี dot-ELISA คือ GYGDRNFLRFamide, DGGRNFLRFamide และ VSHNNNFLRFamide เปปไทด์ทั้ง 3 ประกอบด้วยลำดับกรดอะมิโน 5-6 ตำแหน่งทางด้านปลาย C เหมือนกับ Mar-FLP1,2 และ 3 จากหลักฐานนี้แสดงว่าความหลากหลายและความซับซ้อนของโครงสร้างของกลุ่ม FLP เหมือนกับที่พบในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังอื่นๆ





In addition to five FMRFamide-like peptides (FLPs) (Mar-FLP1,2,3,4 and 5) isolated from the eyestalk of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (Sithigorngul et al.,1998) , three more new FLPs (Mar-FLP6-8) were identified from minor immunoreactive fractions of 5,000 eyestalks extracted in methanol/acetic acid/water (90:1:9) purified by 8 steps of RP-HPLC and monitored by dot-ELISA : GYGDRNFLRFamide, DGGRNFLRFamide and VSHNNFLRFamide. These three peptides share 5-6 common residues at the C-terminus with Mar-FLP1,2 and 3. This evidence revealed that the structural diversity and complexity of the FLP family were similar to that found in other invertebrates.





# บทนำ

การควบคุมการทำงานของระบบต่าง ๆ ในร่างกายของสัตว์กลุ่มครัสตาเซีย (crustacean) เช่น กุ้งและปู ส่วนหนึ่งมีการควบคุมโดยระบบต่อมไร้ท่อ (endocrine system) ซึ่งเป็นระบบที่ประกอบด้วย neurosecretory cell และ neurohemal organ โดย neurosecretory cell ทำหน้าที่ผลิตและลำเลียงฮอร์โมนที่สร้างขึ้นไปสะสมยัง neurohemal organ บริเวณต่าง ๆ เพื่อรอการหลั่งเข้าสู่เลือดหรือฮีโมลิมป์ (hemo-lymph) สำหรับต่อมไร้ท่อที่สำคัญในสัตว์กลุ่มครัสตาเซีย ได้แก่ Postcommissural organ (PCO) เป็นแหล่งที่สะสมและปล่อยนิวโรฮอร์โมนที่เกี่ยวกับการเปลี่ยนสีตัว Pericardial organ (PO) เป็นแหล่งที่สะสมและปล่อยนิวโรฮอร์โมนที่กระตุ้นการทำงานของหัวใจ Y-organ เป็นแหล่งที่สร้าง สะสมและปล่อยฮอร์โมนที่ควบคุมการลอกคราบ Ovary เป็นแหล่งสร้าง สะสมและปล่อยฮอร์โมนที่ควบคุมการเจริญเติบโตของอวัยวะเพศเมีย (Fingerman, 1987) Androgenic gland เป็นแหล่งที่สร้าง สะสมและปล่อยฮอร์โมนที่ควบคุมการพัฒนาและการเจริญเติบโตของอวัยวะเพศผู้ (Hasegawa, 1993) X-organ ในก้านตาบริเวณ extema terminalis เป็นกลุ่ม neurosecretory cell ที่สำคัญ ทำหน้าที่สร้างฮอร์โมนหลายชนิด และส่งไปสะสมที่ต่อมไซนัส (sinus gland) ซึ่งเป็น neurohemal organ ฮอร์โมนเหล่านี้ได้แก่ ฮอร์โมนที่ยับยั้งการลอกคราบ (molt inhibiting hormone-MIH) (Chang, Bruce and Newcomb, 1987) ฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดของสัตว์กลุ่มครัสตาเซีย (crustacean hyperglycemic hormone-CHH) (Huberman and Aguilar, 1986) ฮอร์โมนที่ยับยั้งการพัฒนาของรังไข่ (vitellogenesis inhibiting hormone-VIH หรือ gonad inhibiting hormone-GIH) (Soyez, Deijnen and Martin, 1987) ฮอร์โมนที่ควบคุมการกระจายตัวของรงควัตถุในโครมาโตฟอร์ (pigment dispersing hormone-PDH) (Kleinholz et al., 1986) และฮอร์โมนที่ควบคุมการรวมตัวของรงควัตถุในการเปลี่ยนสีตัว (red pigment concentrating hormone-RPCH) (Femlund, 1974)

จากการศึกษาการปรากฏของฮอร์โมนต่าง ๆ ในก้านตาของสัตว์พวกครัสตาเซียโดยกระบวนการ immunocytochemistry โดยใช้แอนติซีรั่มต่อฮอร์โมนชนิดต่าง ๆ พบว่าในก้านตายังพบสารคล้ายฮอร์โมนอีกหลายชนิด เช่น FMRFamide,  $\alpha$ melanocyte stimulating hormone ( $\alpha$ MSH), oxytocin, vasotocin, gastrin, cholecystokinin, secretin และ glucagon สารคล้ายฮอร์โมนเหล่านี้ส่วนใหญ่พบในเซลล์ประสาทที่มีแขนงประสาทส่งไปยังต่อมไซนัส (Van Deijnen et al., 1985; วีระวรรณและคณะ 2537) ซึ่งเป็นเครื่องชี้ว่าสารคล้ายฮอร์โมนเหล่านี้น่าจะมีบทบาทเป็นนิวโรฮอร์โมน (neurohormone) ที่สำคัญในกระบวนการควบคุมการทำงานของร่างกาย

FMRFamide มีโครงสร้างเป็น tetrapeptide amide ประกอบด้วยกรดอะมิโน 4 หน่วย ได้แก่ เฟนิลอะลานีน (phenylalanine-Phe) เมไธโอนีน (methionine-Met) อาร์จินีน (arginine-Arg) และ เฟนิลอะลานีน มีลำดับกรดอะมิโนเป็น Phe-Met-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> (FMRFamide) เป็นนิวโรเปปไทด์ที่กระตุ้นการทำงานของหัวใจ (cardioexcitatory neuropeptide) ในสัตว์กลุ่มพวกหอย (Mollusc) สามารถแยกสกัดได้เป็นครั้งแรกจากปมประสาทของหอยสองฝา *Macrocallista nimbosa* (Price and Greenberg, 1977) จากการผลิตแอนติซีรั่มต่อ FMRFamide เพื่อใช้ในการตรวจสอบหรือตรวจวัดสาร

คล้าย FMRFamide (FMRFamide-like immureactivity-FLI) พบ FLI ในเซลล์ประสาทของสัตว์ทุกชนิดที่มีการศึกษา จากการแยกสกัดและทำให้บริสุทธิ์ FLI ในสัตว์ชนิดต่าง ๆ พบเปปไทด์คล้าย FMRFamide (FMRFamide-like peptide-FLP) รูปแบบต่าง ๆ มากมาย และในสัตว์บางชนิดสามารถทำให้บริสุทธิ์ FLP ได้หลายรูปแบบ (ตารางที่ 1)

ในสัตว์พวกซีเลนเทอเรท (Coelenterate) จะพบ FLI กระจายอยู่ในตัวเซลล์ประสาทและเส้นใยประสาท โดยจะพบที่ชั้น ectoderm ใน lower peduncle region ใกล้กับบริเวณบาซอลดิสก์ (basal disk) และที่ ectoderm ตรงบริเวณไฮโปสโทม (hypostome) และที่ ectoderm ของหนวดของไฮดรา *Hydra attenuata* (Grimmelikhuijzen, et al., 1982) การศึกษา FLI ในแมงกระพรุน 3 ชนิดคือ *Chrysaora hysoscella*, *Cyanea capillata* และ *Cyanea lamarkii* พบ FLI ในบริเวณที่คล้ายคลึงกัน โดยจะพบร่างแหประสาท (nerve net) ที่มีสารนี้กระจายในบริเวณ subumbrella ectoderm และ exumbrella ectoderm และพบตัวเซลล์ประสาทจำนวนมากในชั้น ectoderm ของหนวด (Anderson et al., 1992) จากรายงานการทำให้บริสุทธิ์ FLI ใน sea anemone *Anthopleura elegantissima* พบ FLP 1 รูปแบบ คือ Glu-Gly-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> (Grimmelikhuijzen and Graff, 1986)

ในสัตว์กลุ่มหนอนตัวแบน (Platyhelminthes) ในหนอนตัวแบน *Bdelloura candida* พบ FLI กระจายอยู่ทั่วร่างกายทั้งในระบบประสาทส่วนกลางและนอกส่วนกลาง ได้แก่ในสมอง เส้นประสาทตามแนวยาวของสัตว์ (longitudinal nerve cord) เส้นประสาทแนวขวางและเส้นประสาทเชื่อมต่อทางด้านข้าง (transverse and lateral commissures) กลุ่มใยประสาทบริเวณคอกออย (pharyngeal plexus) กลุ่มใยประสาทใต้กล้ามเนื้อและผิวหนัง (subepidermal and submuscular plexuses) ส่วนต่างๆ ของอวัยวะสืบพันธุ์ (Johnston et al., 1996b) แสดงถึงความสำคัญของ FLI ว่ามีบทบาทเกี่ยวกับการทำงานของระบบประสาทตลอดลำตัว ได้มีรายงานการทำให้บริสุทธิ์ FLP ในหนอนตัวแบนหลายชนิด ได้แก่ พยาธิใบไม้ในกะ *Moniezia expansa* พบ FLP 1 รูปแบบ (Maule et al., 1993) หนอนตัวแบนบนบก (New Zealand Terrestrial Turbellarian) *Artioposthia triangulata* พบ FLP 1 รูปแบบ (Maule et al., 1994) พลานาเรีย *Dugesia tigrina* พบ FLP 1 รูปแบบ (Johnston et al., 1995) และหนอนตัวแบน *Bdelloura candida* พบ FLP 2 รูปแบบ (Johnston et al., 1996a)

ส่วนสัตว์ในกลุ่มหนอนตัวกลม (Nematode) พบ FLI กระจายอยู่ทั่วระบบประสาท ปมประสาทส่วนหัว ส่วนหางและเส้นข้างตัว เส้นประสาทกลางตัว เซลล์ประสาทในส่วนของคอกออย (pharynx) ซึ่งเซลล์ประสาทที่มี FLI นั้นมีทั้งเซลล์ประสาทที่ทำหน้าที่รับความรู้สึก (sensory neuron) เซลล์ประสาทสั่งงาน (motoneuron) และเซลล์ประสาทประสานงาน (interneuron) (Cowden et al., 1995) จากรายงานการทำให้บริสุทธิ์และพิสูจน์โครงสร้างของ FLP ในพยาธิตัวกลม *Ascaris suum* พบ FLP 12 รูปแบบ (Cowden and Stretton, 1995) ในหนอนตัวกลม *Caenorhabditis elegans* พบ FLP 9 รูปแบบ (Sithigomgul and Stretton, 1995)

ได้มีรายงานการพบ FLI ในสัตว์กลุ่มหนอนปล้อง (Annelid) คือพบ FLI ทั่วไปในระบบประสาทส่วนกลางของปลิง *Hirudo nudicinalis* (Evan and Calabrese, 1989) และเพรียงตอกไม้ *Sabellastarte magnifica* (Diaz-Miranda et al., 1991) สำหรับการทำให้บริสุทธิ์ในปลิง *Hirudo nudicinalis* พบ FLP 5 รูปแบบ (Evan et al., 1991)

ในสัตว์พวกมอลลัส (Mollusc) เช่น หอยทาก *Achatina fulica* สารคล้าย FMRFamide จะกระจายอยู่ในส่วนของหัวใจ ปมประสาทสมอง (cerebral ganglia) และปมประสาทใต้หลอดอาหาร (sub-esophageal ganglion) โดยจะพบสารนี้ในเซลล์ขนาดเล็ก จำนวน 50-70 เซลล์ ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 30-50 ไมโครเมตรในปมประสาทสมอง และจะพบสารนี้ในตัวเซลล์ประสาทขนาดใหญ่จำนวน 6 เซลล์ มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 200-250 ไมโครเมตรในปมประสาทใต้หลอดอาหาร ส่วนในหัวใจจะพบสารนี้กระจายอยู่ในส่วนของเอเทรียม (atrium) โดยพบว่านิวโรเปปไทด์นี้ทำหน้าที่เป็นนิวโรโมดูเลเตอร์ในวงจรประสาทและเป็นนิวโรฮอโมนที่มีผลต่อการทำงานของหัวใจและควบคุมอัตราการเต้นของหัวใจ (Fujiwara-Sakata and Kobayashi, 1994) การศึกษาถึงสารที่กระตุ้นการทำงานของหัวใจในหอย *Rapana thomasi* โดยใช้วิธีการทดสอบทางชีวภาพ (bioassay) พบว่าถ้าใช้สาร FMRFamide ที่แยกสกัดจากหอยสองฝา *Macrocallista nimbosa* ที่มีความเข้มข้นถึง  $10^{-8}$  โมล/ลิตร จะทำให้ความถี่ในการเต้นของหัวใจในหอยชนิดนี้เพิ่มขึ้น และเมื่อใช้นิวโรเปปไทด์ small cardioactive peptide B ( $SCP_B$ ) ที่มีความเข้มข้น  $10^{-5}$  โมล/ลิตร ทดสอบร่วมด้วย พบว่าจะทำให้ความถี่ในการเต้นของหัวใจลดลง 60-70 % ซึ่งแสดงว่า  $SCP_B$  เป็นนิวโรเปปไทด์ที่จะไปยับยั้งแอกทิวิตี (activity) ของสารคล้าย FMRFamide ทำให้ความถี่ในการเต้นของหัวใจลดลง (Kobayashi and Muneoka, 1986) ส่วนในหอย *Mytilus edulis* สารคล้าย FMRFamide จะทำหน้าที่เป็นนิวโรโมดูเลเตอร์ในการยับยั้งแอกทิวิตีของเอนไซม์ acetylcholinesterase ในระบบประสาทของหอยชนิดนี้ (Raffa and Bianchi, 1986) ในหอยแครง (sea scallop) *Placopecten magellanicus* จะพบสารคล้าย FMRFamide ในระบบประสาท โดยพบตัวเซลล์ประสาทและเส้นใยประสาทที่มีสารนี้จำนวนมากในปมประสาทสมอง ปมประสาทพิดัล (pedal ganglia) และปมประสาทวิสเซอร์ล (visceral ganglia) และพบสารนี้กระจายอยู่จำนวนน้อยในบริเวณอวัยวะสืบพันธุ์ (gonad) หัวใจ และกล้ามเนื้อ (Too and Croll, 1995)

ในสัตว์กลุ่มหอยนี้ นอกจากในหอย 2 ฟา *Macrocallista nimbosa* ซึ่งมีรายงานพบเฉพาะ FMRFamide แล้ว สัตว์ในกลุ่มนี้ทุกชนิดจะพบ FMRFamide ด้วยเช่นกัน ในหอยทะเล *Aplysia californica* และในหอยชนิดอื่น พบ FLP รูปแบบอื่นๆ เพิ่มขึ้นด้วย เช่น ในหอย *Siphonasia* sp. พบเพิ่มอีก 2 รูปแบบ หอย *Helix* sp. และปลาหมึก *Octopus vulgaris* พบเพิ่มอีก 3 รูปแบบ (Cottrell, 1989) แต่ในหอยน้ำจืด *Lymnaea stagnalis* พบ FLP เพิ่มอีก 6 รูปแบบ (Saunders et al., 1991)

ในกลุ่มสัตว์ขาปล้อง (Arthropod) มีการศึกษา FLI ในสัตว์ต่าง ๆ มากมายได้แก่ กลุ่มพวกแมลง (Insect) พบ FLI ในปมประสาทส่วนอกของแมลงวัน *Calliphora vomitoria* (Duve, 1992)

ปมประสาทส่วนท้องของแมลงหวี่ *Drosophila* sp. (Lunquist and Nassel, 1990) ในแมลงดูดเลือด *Rhodnius prolixus* พบ FLI ในระบบประสาทส่วนกลาง ปมประสาทใต้หลอดอาหาร ปมประสาทส่วนอก และเซลล์ประสาทในส่วนกระเพาะอาหาร (stomatogastric nervous system) และที่บริเวณหลังซอร์โมน (neurohaemal site) (Tsang and Orchard, 1991) ในพวกแมลงมีรายงานการพิสูจน์ทราบโครงสร้างของ FLP รูปแบบต่าง ๆ ได้แก่ ในแมลงสาบ *Leucophaea maderae* 5 รูปแบบ (Nachman et al., 1986a, 1986b; Holman et al., 1986; Veenstra, 1989) แมลงสาบ *Periplasmeta americana* 1 รูปแบบ (Veenstra and Lambrou, 1995) ตั๊กแตน *Schistocerca gregaria* 1 รูปแบบ (Robb et al., 1989) blowfly *Calliphora vomitoria* (Duve, 1993) ไหม *Manduca sexta* 1 รูปแบบ (Kingan et al., 1996) ยุง 2 รูปแบบ (Brown et al., 1994) แมลงหวี่ 5 รูปแบบ (Schneider and Taghert, 1988)

ในสัตว์พวกครัสเตเชีย (Crustacea) จะพบ FLI ใน pericardial organ ของกุ้งอเมริกันล็อบสเตอร์ (lobster) *Homarus americanus* ซึ่งทำหน้าที่กระตุ้นการทำงานของหัวใจ (Trimmer et al., 1987) การศึกษาในกุ้งคาร์ิบเบียนล็อบสเตอร์ *Panulirus argus* จะพบ FLI ในส่วนสมอง ปมประสาทในก้านตา และเส้นประสาทด้านท้อง (Schmidt and Ache, 1994) การศึกษาถึงแหล่งปรากฏของสารคล้าย FMRFamide ในก้านตาของกุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* พบว่ามีตัวเซลล์ประสาทที่มีสารนี้จำนวนมากกว่า 1,000 เซลล์กระจายอยู่ในบริเวณ lamina ganglionalis (LG) บริเวณรอบ ๆ medulla externa (ME) บริเวณระหว่าง medulla interna (MI) และ medulla terminalis (MT) เส้นประสาทตาและต่อมไชนัส โดยจะพบว่าสารนี้กระจายอยู่ในเซลล์ประสาทที่ส่งไปยังบริเวณต่าง ๆ ของปมประสาท ซึ่งแสดงว่าสารคล้าย FMRFamide บางรูปแบบอาจมีบทบาทสำคัญในการส่งกระแสประสาท (nerve impulse) โดยอาจทำหน้าที่เป็นสารสื่อประสาทหรือนิวโรโมดูเลเตอร์ และบางรูปแบบอาจทำหน้าที่เป็นนิวโรฮอร์โมน เนื่องจากแขนงของเซลล์ประสาทบางกลุ่มมีสารนี้ไปสิ้นสุดที่ต่อมไชนัส อันเป็นแหล่งรวบรวมฮอร์โมนสำหรับหลังเข้าสู่กระแสโลหิต (รูปที่ 1, วีระวรรณ สิทธิกรกุล และคณะ 2538) ได้มีการศึกษาในครัสเตเชีย 2 ชนิด คือ ปู *Carcinus maenas* และกุ้ง crayfish *Orconectes limosus* จะพบสารคล้าย FMRFamide กระจายตัวอยู่ในปมประสาทตา (optic ganglia) ในบริเวณที่คล้ายคลึงกันในก้านตา โดยจะพบตัวเซลล์ประสาทขนาดใหญ่ที่มีสารนี้ในส่วน of medulla interna และ medulla terminalis และยังพบว่าสารนี้จะมีตำแหน่งร่วมกับฮอร์โมนที่ช่วยในการกระจายตัวของเม็ดสีในโครมาโตฟอร์ (pigment dispersing hormone-PDH) (Mangerich et al., 1987; Mangerich and Keller, 1988) ส่วนในระบบประสาทของปู *Cancer gracilis* และ *Cancer productus* จะพบสารนี้มีตำแหน่งร่วมกับสาร SCP<sub>B</sub> ในปมประสาทบริเวณกระเพาะอาหาร (stomatogastric ganglia) (Callaway et al., 1987) ต่อมาได้มีการศึกษาโดยนำสารคล้าย FMRFamide ที่แยกสกัดได้จาก pericardial organ จากกุ้งอเมริกันล็อบสเตอร์ *Homarus americanus* มาทดสอบกับปู *Cancer magister* พบว่าสารนี้จะมีผลในการเพิ่มความแรงและความถี่ในการเต้นของหัวใจรวมทั้งเพิ่มอัตราการไหลของฮีโมลิม์ (McGaw and McMahon, 1995)

การพิสูจน์ทราบโครงสร้างของ FLP จาก pericardial organ ของกุ้งอเมริกันล็อบสเตอร์ *Homarus americanus* พบ FLP 2 รูปแบบ (Trimmer et al., 1987) ปูน้ำเค็ม *Callinectes sapidus* พบ FLP 1 รูปแบบ (Krajniak, 1991) กุ้ง Crayfish *Procambarus clarkii* (Mercier et al., 1993) พบ FLP 2 รูปแบบ ในแมงดาทะเล *Limulus polyphemus* พบ FLI ในสมอง ปมประสาท หัวใจ และเส้นประสาทกลาง ตัว (Groome, 1993) และจากการแยกสกัด FLP จากส่วนของสมองของแมงดาทะเลนี้พบ FLP 5 รูปแบบ (Gaus et al., 1993)

ในสัตว์มีกระดูกสันหลัง เช่นในปลา *Scyliorhinus canicula* จะพบสารคล้าย FMRFamide ในส่วนของสมองและต่อมใต้สมอง (pituitary gland) โดยจะพบตัวเซลล์ที่มีสารนี้จำนวนมากในสับพาลเลียม (subpallium) และพบจำนวนน้อยในส่วนของไฮโปทาลามัส (hypothalamus) นอกจากนี้ยังพบเส้นใยประสาทในสมองส่วนของเทเลนเซฟาลอน (telencephalon) และไดเอนเซฟาลอน (diencephalon) อีกด้วย (Vallarino et al., 1991) ในสัตว์ปีกจะพบสารคล้าย FMRFamide ในสมองไก่ โดยพบว่าถ้ามีปริมาณของสารนี้สูงจะมีผลทำให้ความดันโลหิตสูงขึ้น (Dockray et al., 1983) และจะพบสารนี้ในปริมาณสูงในส่วนของไขสันหลังและไฮโปทาลามัส และพบในปริมาณต่ำในส่วนของซีรีเบลลัม (cerebellum) และสเตรียตัม (striatum) ในสมองหนู (Dockray and Williams, 1983) ส่วนในระบบประสาทส่วนกลางของลิง จะพบตัวเซลล์ที่มีสารนี้กระจายอยู่ในส่วนของ amygdaloid complex, olfactory tubercle, cerebral cortex, basal ganglia, septum, caudate-putamen และ arcuate nucleus และพบในเส้นใยประสาทที่บริเวณซีรีบรัลคอร์เทกซ์ (cerebral cortex) จนถึงไขสันหลัง (Chen et al., 1989) การทำให้บริสุทธิ์ FLP ในสัตว์มีกระดูกสันหลังมีรายงานในไก่ *Gallus gallus* ซึ่งพบ FLP 1 รูปแบบ (Dockray et al., 1983) ส่วนในวัว *Bos taurus* พบ FLP 2 รูปแบบ (Yang et al., 1985)

จะเห็นได้ว่า FMRFamide และ FLP ต่าง ๆ ปรากฏอยู่ในเซลล์ประสาทจำนวนมาก ทั้งในระบบประสาทส่วนกลางและนอกส่วนกลาง และการศึกษาในสัตว์หลายชนิดพบว่า FLP มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการทำงานของระบบต่างๆ ของร่างกาย ซึ่งอาจทำหน้าที่เป็นได้ทั้งสารสื่อประสาท (neurotransmitter) นิวโรโมดูเลเตอร์ (neuromodulator) และนิวโรฮอร์โมน (neurohormone) ขึ้นอยู่กับรูปแบบและเนื้อเยื่อเป้าหมายนั้นๆ จากการศึกษาการปรากฏของ FLI ในก้านตาทิ้งก้ามกราม พบ FLI ในเซลล์ประสาทต่างๆ มากมาย ทั้งนี้จากการศึกษาเบื้องต้นในการแยกสกัด FLI ในก้านตาทิ้งก้ามกรามโดยใช้ HPLC 1 ขั้นตอน พบ FLI ที่สามารถตรวจโดยวิธีการ dot-ELISA ซึ่งเป็นวิธีการที่มีความไวสูงมาก (สามารถพบ FLI จากสารสกัดจากก้านตาเพียง 10 ก้านตา) ทำให้สามารถใช้ติดตามการทำให้บริสุทธิ์ได้ (วีระวรรณและคณะ 2538) ต่อมาทางคณะผู้วิจัยสามารถทำให้บริสุทธิ์และหาลำดับกรดอะมิโนของ FLI ได้ 5 รูปแบบ เป็นรูปแบบใหม่ 4 แบบ (Sithigomgul et al., 1998) ซึ่งจากการวิจัยครั้งนี้พบว่ายังมี FLI อีกหลายรูปแบบที่ยังไม่ได้ทำให้บริสุทธิ์เพื่อหาลำดับกรดอะมิโน

ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงเป็นการทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย FMRFamide จากก้านตาทิ้งก้ามกรามเพิ่มเติม โดยกระบวนการ Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC)

ระบบต่าง ๆ ประกอบกับใช้วิธี Dot-Enzyme Link Immunosorbent Assay (Dot-ELISA) ในการติดตามสารคล้าย FMRFamide ในแฟรคชันต่าง ๆ หลังจากการแยกด้วยกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนต่าง ๆ แล้ว ซึ่งคาดว่าวิธี Dot-ELISA สามารถทำได้อย่างมีประสิทธิภาพและรวดเร็ว เพราะวิธีนี้เป็นวิธีที่มีความไว (sensitivity) สูงเทียบเท่ากับ Radioimmunoassay (RIA) แต่ไม่สิ้นเปลืองวัสดุและมีความรวดเร็วกว่า RIA มาก (Sithigomgul, Stretton and Cowden, 1991)

การที่เลือกกุ้งก้ามกรามมาใช้เป็นสัตว์ทดลอง เนื่องจากกุ้งก้ามกรามเป็นสัตว์ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย ความต้องการของผู้บริโภคมีปริมาณเพิ่มขึ้นอยู่ตลอดเวลาจึงมีการเพาะเลี้ยงกันมาก ดังนั้นถ้าสามารถแยกและทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย FMRFamide ซึ่งเป็นเปปไทด์ฮอร์โมนจากก้ามตาของกุ้งก้ามกรามได้หมดทุกรูปแบบ ก็สามารถนำไปศึกษาถึงโครงสร้างของเปปไทด์ฮอร์โมนนี้ก่อนที่จะศึกษาถึงบทบาทของฮอร์โมนนี้มีผลต่อกระบวนการทางสรีระและการดำรงชีวิตของกุ้งก้ามกรามอันอาจเป็นประโยชน์ต่อการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามต่อไปได้

นอกจากนี้การทราบถึงโครงสร้างของเปปไทด์คล้าย FMRFamide รูปแบบต่าง ๆ ยังเป็นพื้นฐานในการศึกษาวิวัฒนาการของฮอร์โมนกลุ่มนี้ในอาณาจักรสัตว์อีกด้วย เนื่องจากพบว่าฮอร์โมนกลุ่มนี้เป็นฮอร์โมนที่มีรูปแบบต่าง ๆ มากมายและพบในสัตว์ทุกไฟลัม การทราบถึงโครงสร้างของสารคล้าย FMRFamide รูปแบบต่าง ๆ จึงเป็นพื้นฐานสำคัญในการศึกษาวิวัฒนาการเกี่ยวกับโครงสร้างของยีนที่ถอดรหัสให้สารคล้าย FMRFamide เหล่านี้ และยังเป็นแนวทางที่จะศึกษาถึงบทบาทการทำงานของสารคล้าย FMRFamide รูปแบบต่าง ๆ ว่ามีบทบาทแตกต่างกันหรือไม่ และการที่มีฮอร์โมนคล้าย ๆ กันเป็นจำนวนหลาย ๆ รูปแบบมีความสำคัญอย่างไร

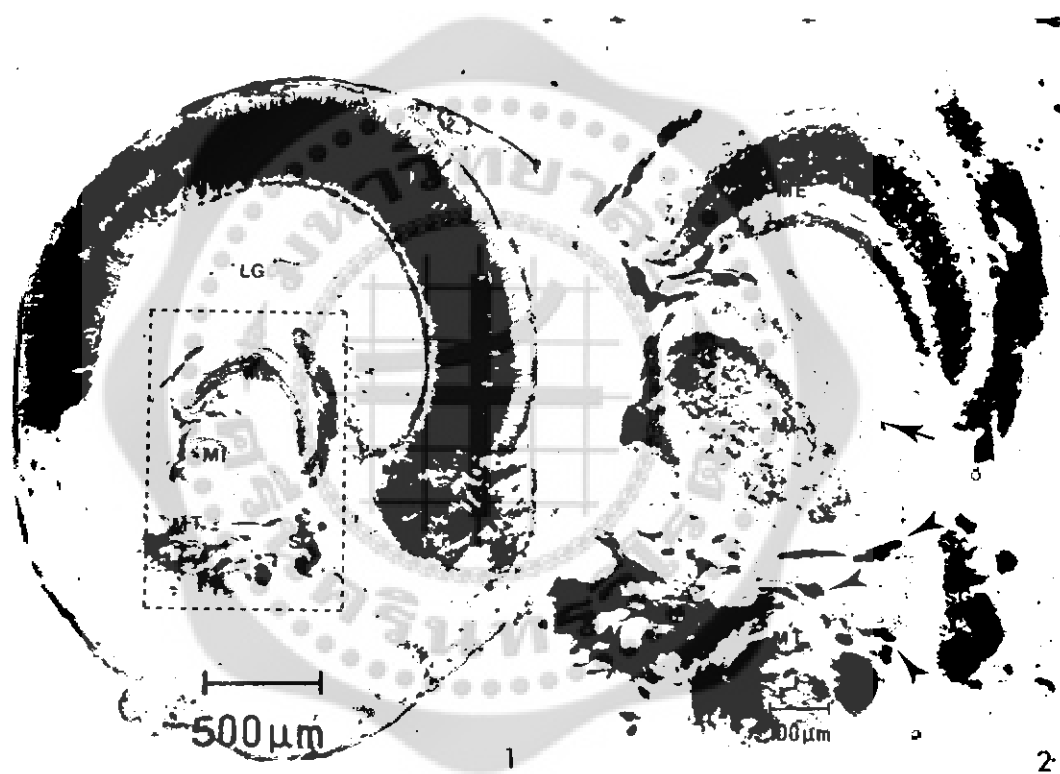
ตารางที่ 1 ลำดับกรดอะมิโนของ FLPs (FMRFamide-like peptides) ในสัตว์ชนิดต่างๆ

| Phylum/Species                                    | Amino acid sequence                                                                                                                                                | Reference                        |
|---------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| <b>Coelenterata</b><br><i>Anthopleura tissima</i> | pEGRFa                                                                                                                                                             | Grimmelikhaijzen and Graff, 1986 |
| <b>Platyhelminthes</b><br><i>Dugesia tigrina</i>  | GYIRFa                                                                                                                                                             | Johnston et al., 1995            |
| <i>Bdelloura candida</i>                          | GYIRFa<br>YIRFa                                                                                                                                                    | Johnston et al., 1996            |
| <i>Moneizia expansa</i>                           | GNFFRFa                                                                                                                                                            | Maule et al., 1993               |
| <i>Artioposthia triangulata</i>                   | RYIRFa                                                                                                                                                             | Maule et al., 1994               |
| <b>Nematoda</b><br><i>Ascaris suum</i>            | KNEFIRFa<br>KHEYLRFa<br>KSA YMRFa<br>SGKPTFIRFa<br>FIRFa<br>AGPRFIRFa<br>AVPGVLRFa<br>GFGDEMSMPGVLRFa<br>FGDEMSMPGVLRFa<br>SDIGISEPNFLRFa<br>PNFLRFa<br>GLGPRPLRFa | Cowden and Stretton, 1995        |
| <i>Caenorhaditis elegan</i>                       | KHEYLRFa<br>KPSFVRFa<br>KNEFIRFa<br>RNKFEFIRFa<br>APEASPFIRFa<br>HFYNFSSES RKPNFLRFa<br>SDNPFLRFa<br>SADPNFLRFa<br>AAANPNFLRFa                                     | Sithigorngul and Stretton, 1995  |
| <b>Annelida</b><br><i>Nereis virens</i>           | FMRFa                                                                                                                                                              | Krajniak and Price, 1990         |
| <i>Hirudo medicinalis</i>                         | FMRFa<br>FLRFa<br>YMRFa<br>YLRFa<br>GGKYMRFa                                                                                                                       | Evans et al., 1991               |

| Phylum/Species               | Amino acid sequence                                                                | Reference                      |
|------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|
| <b>Mollusca</b>              |                                                                                    |                                |
| <i>Macrocallista nimbosa</i> | FMRFa                                                                              | Price and Greenberg , 1997     |
| <i>Lymnaea stagnalis</i>     | FMRFa<br>FLRFa<br>QFYRFa<br>EFLRFa<br>GDPFLRFa<br>SDPFLRFa<br>SDPFFRFa<br>SDPYLRFa | Saunders et al., 1991          |
| <i>Aplysia</i>               | FMRFa<br>FLRFa                                                                     | Cottrell , 1989                |
| <i>Helix</i>                 | FMRFa<br>FLRFa<br>PQDPFLRFa<br>NDPFLRFa<br>SDPFLRFa                                | Cottrell , 1989                |
| <i>Siphonaria</i>            | FMRFa<br>FLRFa<br>GDPFLRFa<br>NDPFLRFa                                             | Cottrell , 1989                |
| <i>Octopus vulgaris</i>      | FMRFa<br>FLRFa<br>AFLRFa<br>TFLRFa                                                 | Cottrell , 1989                |
| <b>Arthropoda</b>            |                                                                                    |                                |
| <i>Leucophaea maderae</i>    | pEDVDHVFLRFa                                                                       | Peeff, Orchard and Lange, 1993 |
| <i>Periplaneta americana</i> | ANRSPSLRLRFa                                                                       | Veenstra and Lambrou, 1995     |
| <i>Schistocerca gregaria</i> | PDVDHVFLRFa                                                                        | Robb, Packman, Evans, 1989     |
| <i>Aedes aegypti</i>         | pERPP <sub>OH</sub> SLKTRFa<br>TRFa                                                | Brown et al., 1994             |

| Phylum/Species                   | Amino acid sequence                                                | Reference                   |
|----------------------------------|--------------------------------------------------------------------|-----------------------------|
| <i>Calliphora vomitoria</i>      | APGQDFMRFa<br>TPQQDFMRFa<br>TPSQDFMRFa<br>TPSQDFMRFa<br>KPNQDFMRFa | Duve et al., 1992           |
| <i>Drosophila</i>                | SDNFMRFa<br>PDNFMRFa<br>SPKQDFMRFa<br>TPAEDFMRFa<br>DPKQDFMRFa     | Schneider and Taghert, 1988 |
| <i>Limulus polyphemus</i>        | GGRSPSLRLRFa                                                       | Gaus et al., 1993           |
| <i>Homarus americanus</i>        | SDRNFLRFa<br>TNRNFLRFa                                             | Trimmer et al., 1987        |
| <i>Callinectes sapidus</i>       | GYNSFLRFa                                                          | Krajniak, 1991              |
| <i>Procambarus clarkii</i>       | NRNFLRFa<br>DRNFLRFa                                               | Mercier et al., 1993        |
| <i>Macrobrachium rosenbergii</i> | DRNLLRFa<br>ADKNFLRFa<br>NYDKNFLRFa<br>APALRLRFa<br>DRTPALRLRFa    | Sithigorngul et al., 1998   |
| <b>Chordata</b>                  | LPLRFa                                                             | Dockray et al., 1983        |
| <i>Gallus gallus</i>             | FLFQPQRFa                                                          | Yang et al., 1985           |
| <i>Bos taurus</i>                | AGQGLSSPFWSLAAPQRFa                                                |                             |

Gly = G, Leu = L, Phe = F, Ser = S, Met = M, Asp = D, Arg = R,  
 Ala = A, Ile = I, Tyr = Y, Thr = T, Asn = N, Glu = E, His = H,  
 Val = V, Pro = P, Trp = W, Cys = C, Glu = Q, Lys = K



รูปที่ 1 Immunocytochemistry ของ FLPS(FMRFamide-like peptides) ในก้านตาของกุ้งก้ามกราม

*Macrobrychium rosenbergii*

LG = Lamina ganglionalis

ME = Medulla externa

MI = Medulla interna

MT = Medulla terminalis



**วิธีกรวิจัย**

## สัตว์ทดลอง

กุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* ตัวโตเต็มวัย น้ำหนักประมาณ 15-35 กรัม รวบรวมซื้อจากตลาดกลาง จังหวัดพระนครศรีอยุธยา

## วิธีการ

### 1. การเก็บรวบรวมตากุ้งก้ามกราม

ตัดตากุ้งก้ามกรามตัวโตเต็มวัย โดยใช้กรรไกรตัดบริเวณโคนของตากุ้งที่ยังมีชีวิตอยู่ แขนงที่ตัดได้ให้แช่ทันทีในน้ำแข็งแห้ง แล้วนำไปเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ  $-70^{\circ}\text{C}$  จนกระทั่งนำมาใช้ (รูปที่ 2 และ 3)

### 2. การเตรียมสารสกัดจากก้านตา (eyestalk extract) ของกุ้งก้ามกราม

นำตากุ้งที่เก็บรวบรวมไว้ประมาณ 5,000 ตัว มาบดให้เป็นผงละเอียดในขณะเย็นจัด ซึ่งจะบดรวมกับน้ำแข็งแห้งโดยใช้ครกหินในสภาวะที่เย็นจัดที่วางบนน้ำแข็งแห้ง แล้วสกัดสารจากก้านตาด้วยสารละลายเมทานอล-กรดอะซิติก (เมทานอล : กรดอะซิติก : น้ำ / 90:1:9) โดยนำผงละเอียดของตากุ้งใส่ลงในสารละลายเมทานอล-กรดอะซิติก ในปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร/ตา บดอีกครั้งด้วยเครื่องบด (homogenizer, Janke & Kunkel) แขนในตู้เย็นอุณหภูมิ  $4^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นแยกตะกอนออกโดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงด้วยแรงเหวี่ยง 10,000 g เป็นเวลา 15 นาที แยกเอาส่วนน้ำใส (supernatant) เก็บไว้ ส่วนตะกอนที่เหลือนำไปสกัดซ้ำอีกครั้งด้วยสารละลายเมทานอล-กรดอะซิติก นำไปปั่นแยกด้วยแรงเหวี่ยงเท่าเดิม รวมส่วนน้ำใสที่ได้จากการสกัดทั้งสองครั้งเข้าด้วยกัน นำสารสกัดที่ได้ไประเหยแห้งเพื่อกำจัดตัวทำละลายเมทานอลและกรดอะซิติกออกจนหมดด้วยเครื่องระเหยแห้ง (speed vacuum concentrator, Savant) เติม 1% trifluoroacetic acid (TFA) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายในสารสกัดเป็น 0.1% TFA ปั่นแยกตะกอนด้วยแรงเหวี่ยง 10,000 g เป็นเวลา 15 นาที แยกส่วนน้ำใสเก็บไว้ซึ่งเป็นสารสกัดจากก้านตาของกุ้งก้ามกราม (รูปที่ 2 และ 3) วิธีการทำดัดแปลงจากวิธีการของ Cowden et al., 1993

### 3. การเตรียมสารสกัดจากก้านตาก่อนนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยกระบวนการ Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC)

นำสารสกัดจากก้านตาที่ได้จากข้อ 2 ไปผ่าน C18 Sep-Pak cartridge (Waters) เพื่อดูดซับสารสกัดไว้ จากนั้นจึงชะด้วยตัวทำละลาย 50% acetonitrile (ACN)/ 0.1% TFA ระเหยตัวทำละลาย ACN

ออกจนหมดด้วยเครื่องระเหยแห้ง นำไปเติมสารละลาย 80% ACN/ 0.1% TFA เพื่อปรับให้สารสกัดอยู่ในสารละลาย ACN ที่มีความเข้มข้นประมาณ 15% (รูปที่ 2 และ 3)

#### 4. การทำให้บริสุทธิ์ของสารคล้าย FMRFamide จากก้านตาของกิ้งก่ามกรมด้วยกระบวนการ RP-HPLC

นำสารสกัดจากก้านตาที่ได้จากข้อ 3. ไปปั่นด้วยแรงเหวี่ยง 10,000 g เป็นเวลา 15 นาที แยกเอาส่วนสารละลายใสไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC (Gilson) โดยผ่านคอลัมน์ PrepPak C18 จากนั้นชะด้วย ACN ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นจาก 20 - 80% B (A=0.1% TFA, B=80% ACN/ 0.1% TFA) โดยมีอัตราการไหล 5 มิลลิลิตรต่อนาทีและการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ ACN 1% ต่อนาที เก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ลงในหลอดพลาสติกโดยเครื่องแฟรคชัน คอลเลคเตอร์ (fraction collector, Gilson) ทุก ๆ 1 นาที เลือกแฟรคชันที่มีสารคล้าย FMRFamide แล้วนำมาแยกสารคล้าย FMRFamide ให้บริสุทธิ์มากขึ้น โดยผ่านคอลัมน์ PrepPak C8, Cyano, Phenyl, และ C8 และใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA และ ACN/HFBA (ตารางที่ 2, รูปที่ 2 และ 3) วิธีการทำดัดแปลงจากวิธีการของ Sithigorngul and Stretton. 1995

#### 5. การตรวจหาสารคล้าย FMRFamide ในก้านตาของกิ้งก่ามกรม โดยวิธี Dot-Enzyme Link Immunosorbent Assay (Dot-ELISA) หลังจากแยกด้วยกระบวนการ RP-HPLC

แบ่งแต่ละแฟรคชัน (10-25 ก้านตา/จุด) ที่รวบรวมได้จากการผ่านกระบวนการ RP-HPLC มาผสมกับโปรตีน bovine serum albumin (BSA) ที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งละลายใน phosphate buffered saline (PBS) 10 ไมโครลิตร/จุด นำไประเหยแห้งในเครื่องระเหยแห้ง จากนั้นเติมน้ำกลั่นในปริมาตร 1 ไมโครลิตร/จุด หยด (spot) สารละลายในแต่ละแฟรคชัน บนแผ่นไนโตรเซลลูโลส (nitrocellulose membrane) เรียงตามลำดับแฟรคชันที่ได้จากการผ่านกระบวนการ RP-HPLC ออบแผ่นไนโตรเซลลูโลสที่หยดสารแต่ละแฟรคชันให้แห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปอบในไอของ 0.4% glutaraldehyde ที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 8 ชั่วโมง (ในขั้นตอนนี้ทำโดยวางแผ่นไนโตรเซลลูโลสไว้ในกล่องปิดฝาสนิทที่มีไอของ glutaraldehyde) นำไปตรึง (fix) ชัดด้วยสารละลาย 0.2% glutaraldehyde เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นล้างแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วยน้ำกลั่น 4 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที แล้วนำไปบล็อก (block) ด้วย 0.5% blotto เป็นเวลา 30 นาที

จากนั้นตรวจหาเปปไทด์ด้วยวิธี indirect immunoperoxidase assay โดยนำแผ่นไนโตรเซลลูโลสไปบ่มในสารละลาย mouse anti-FMRFamide antiserum (FM-23) ที่เจือจางด้วย 5% blotto (1 : 50)

และ mouse anti-KNEFIRFamide antiserum (AF1-62) ที่เจือจาง 1 : 100 เป็นเวลา 8 ชั่วโมง ล้างด้วย 0.5% blotto จำนวน 4 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที แล้วจึงบ่มในสารละลาย goat anti-mouse IgG horseradish peroxidase conjugate (GAM-HRP) ที่เจือจางด้วย 5% blotto (1 : 1,000) เป็นเวลา 8 ชั่วโมง ล้างแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วย 0.5% blotto 4 ครั้ง ๆ ละ 15 นาทีและล้างต่อด้วย PBS จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยาในสารละลายสับสเตรทที่มี 0.03% diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB), 0.006% hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), 0.05% cobalt chloride ( $CoCl_2$ ) เป็นเวลา 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นหลาย ๆ ครั้ง แล้วนำไปตรวจดูความเข้มของสีในแต่ละจุด โดยบริเวณที่มีเปปไทด์คล้าย FMRFamide ที่ต้องการตรวจหาจะปรากฏเป็นสีเทาแกมน้ำเงินให้เห็น ซึ่งความเข้มของสีจะแปรผันโดยตรงกับปริมาณเปปไทด์ที่ปรากฏในจุดนั้น ๆ นำผลที่ได้จาก Dot-ELISA ไปเปรียบเทียบกับพีค (peak) ที่ได้จากโครมาโตแกรม (chromatogram) เพื่อใช้เลือกแฟรคชันที่จะนำไปผ่านกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนต่อไป (รูปที่ 2,3,4 และ 5)

#### 6. Dot-ELISA ของเปปไทด์มาตรฐาน (standard peptide)

นำเปปไทด์มาตรฐาน FMRFamide ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 598.8 ดาลตัน มีความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาเจือจางด้วย BSA ที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรโดยเจือจางที่ละ 2 เท่า (serial dilution) แล้วหยดเปปไทด์มาตรฐานลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเรียงตามลำดับความเข้มข้นจากมากไปน้อย หลังจากนั้นจึงทำตามวิธีการในข้อ 5. ใช้ความเข้มของสีในแต่ละจุดที่มีความเข้มข้นของเปปไทด์ FMRFamide มาตรฐานเพื่อเปรียบเทียบกับเปปไทด์ที่ได้จากการผ่านกระบวนการ RP-HPLC เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี Dot-ELISA แล้ว

#### 7. การวิเคราะห์ด้วย Mass Spectrometry

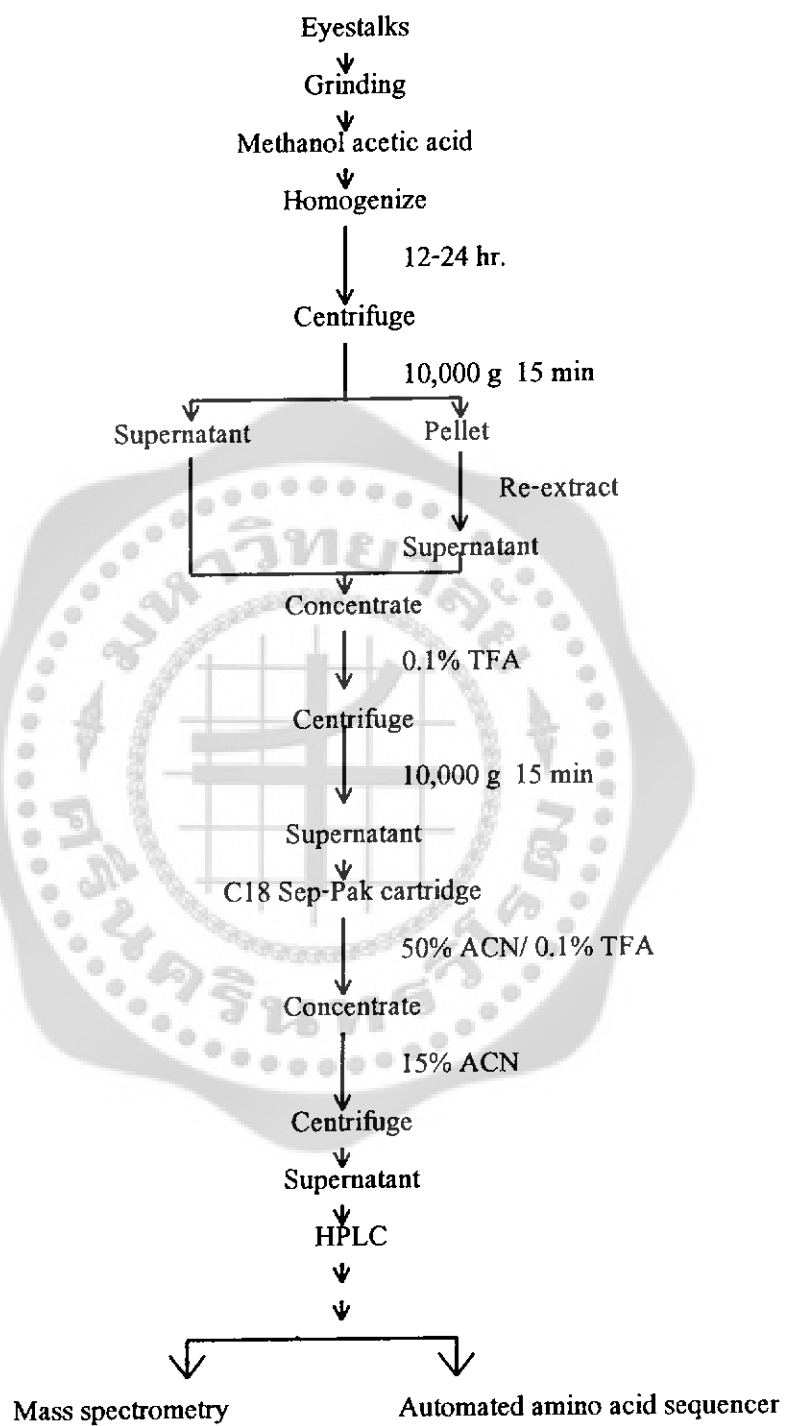
นำสารคล้าย FMRFamide จากแฟรคชันที่คาดว่าบริสุทธิ์ประมาณ 5-10 % มาวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุล โดยใช้ matrix-assist laser desorption mass spectrometry (MALDI - TOF) โดยใช้ sinapinic acid เป็น matrix ด้วยเครื่อง BIFLEX MALDI - TOF (Bruker-Franzer Analytik GMBH ณ สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

### 8. การวิเคราะห์ข้อมูล

1. ตรวจสอบการเกิดสีของแต่ละแฟรคชันที่ได้จากการผ่านกระบวนการ RP-HPLC ชั้นแรกซึ่งหยดบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมื่อเสร็จกระบวนการ Dot-ELISA แล้ว เพื่อนำแฟรคชันที่ติดสีไปแยกด้วย RP-HPLC ในขั้นตอนต่อไป
2. เปรียบเทียบความเข้มของสีของจุดที่เกิดขึ้นกับความเข้มของสีของเปปไทด์มาตรฐาน (FMRF-amide standard) ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ บนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมื่อผ่านกระบวนการ Dot-ELISA แล้ว
3. สังเกตลักษณะและความสูงของพีคจากโครมาโตแกรมที่ได้จากกระบวนการ RP-HPLC ในแต่ละขั้นตอน โดยเทียบกับพีคของ FMRFamide standard ที่ทราบปริมาณ และ FMRFamide immuno-reactivity บนแผ่นไนโตรเซลลูโลสจากผลที่ได้จาก Dot-ELISA ในขั้นตอนนั้น ๆ

### 9. การตรวจหาลำดับกรดอะมิโน

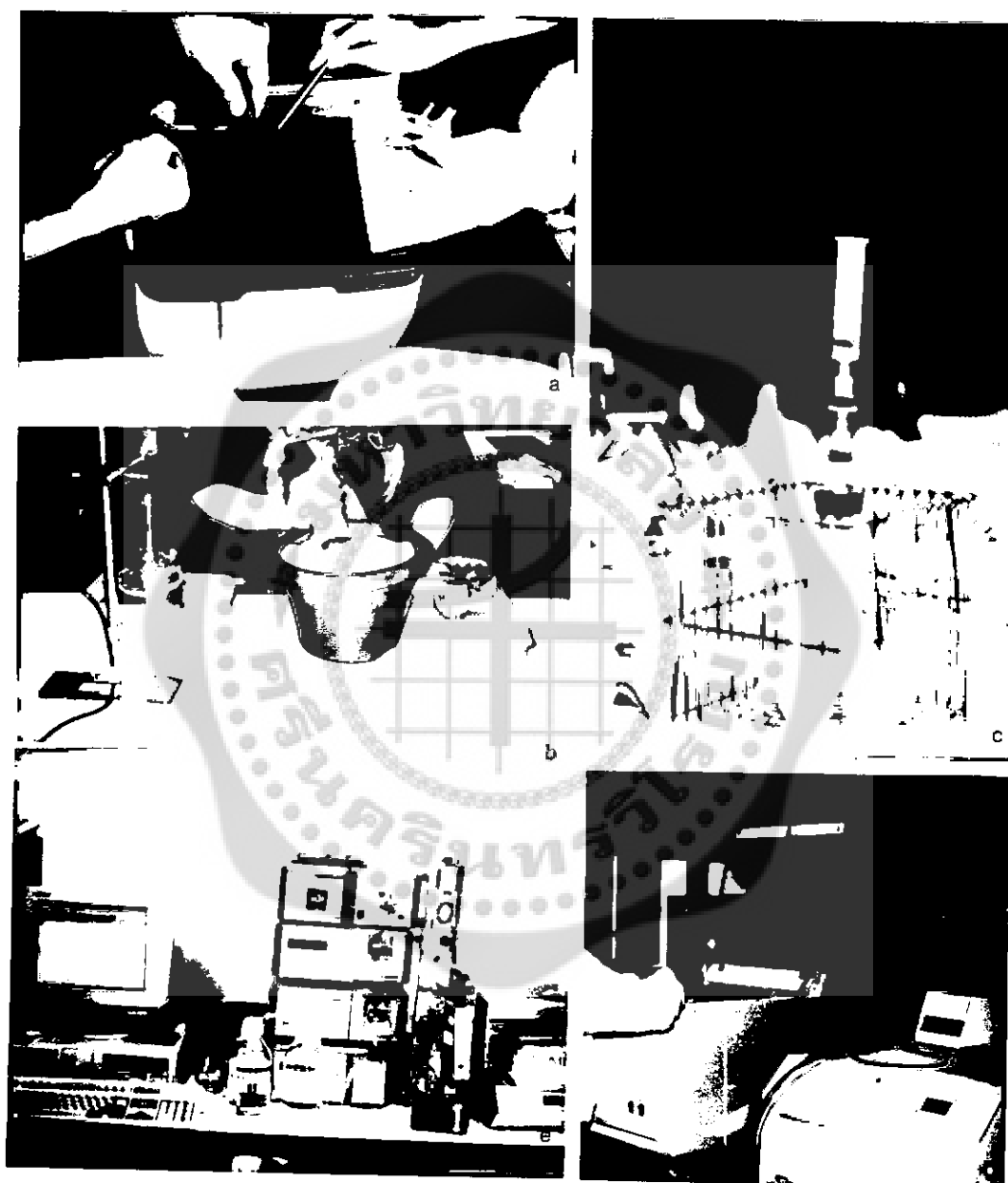
นำเปปไทด์บริสุทธิ์ประมาณ 50-70% ของแฟรคชันที่ได้ไปตรวจหาลำดับกรดอะมิโนโดย automated Edman degradation (Applied Biosystems Process Sequencer) โดย Dr. Robin J. Philp ณ Institute of Molecular and Cell Biology, National University of Singapore ประเทศสิงคโปร์ ปริมาณกรดอะมิโนตัวแรกที่ได้รับในการหาลำดับกรดอะมิโน นำไปคำนวณหาปริมาณเปปไทด์ที่ได้ในแต่ละแฟรคชัน



รูปที่ 2 ขั้นตอนวิธีการเตรียมสารสกัดจากก้านตากุ้งก้ามกรามและการทำให้บริสุทธิ์ FLPs

- รูปที่ 3 (a) การเก็บรวบรวมตากุ้ง  
(b) การเตรียมสารสกัดจากก้านตา  
(c) การระเหยแห้งสารสกัดด้วย speed vacuum concentrater  
(d) การนำสารสกัดผ่าน C18 Sep-Pak cartridge  
(e) การทำให้บริสุทธิ์ FLPs ด้วย RP-HPLC





ตารางที่ 2 ชนิดและขนาดของคอลัมน์ ระบบตัวทำละลาย เปอร์เซนต์ของ acetonitrile ระยะเวลาและอัตรา  
การไหลที่ใช้ในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์

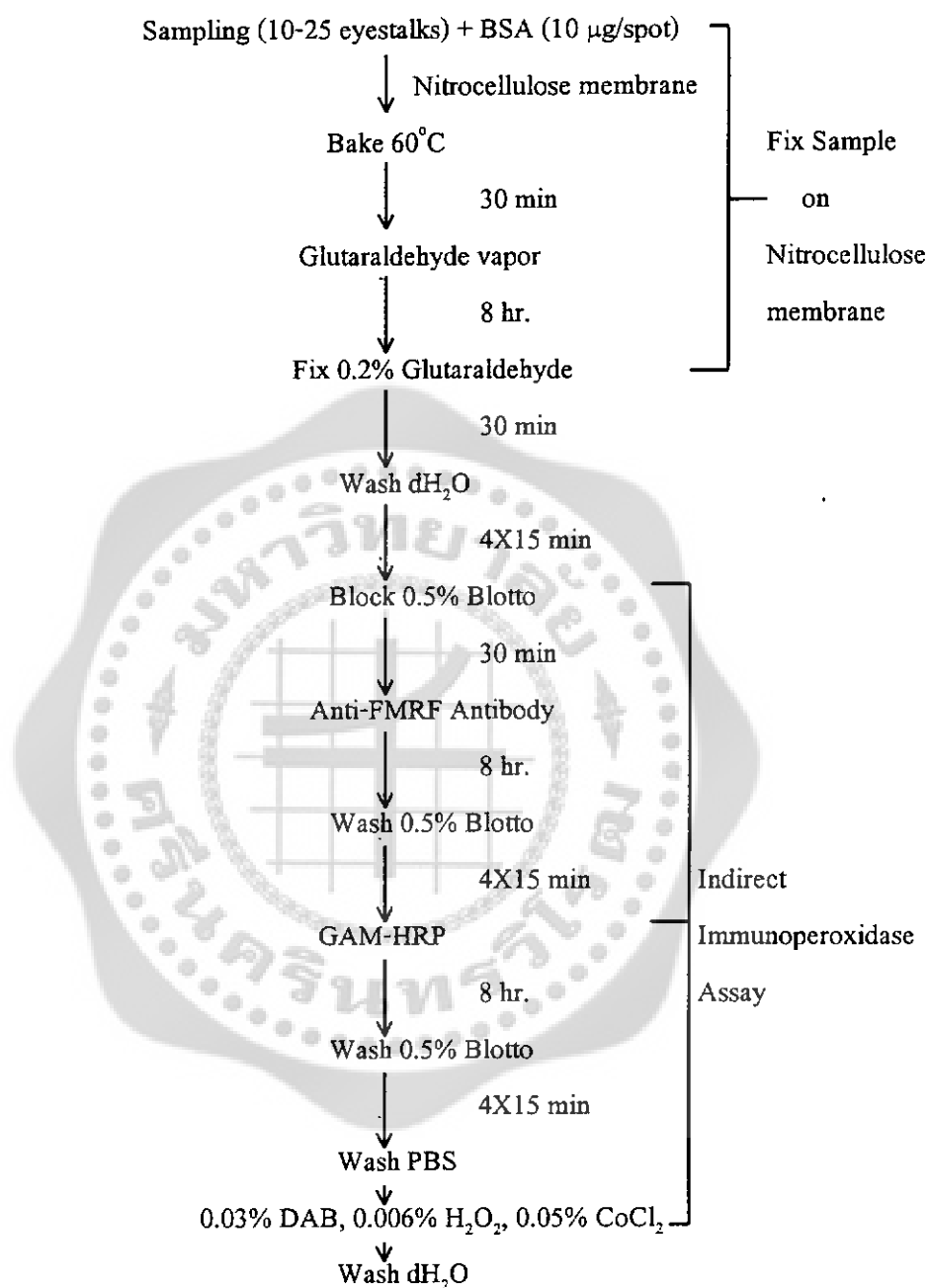
| Step | Column Type            | Column size<br>(mm) | Counter-ion | Gradient of<br>Acetonitrile<br>(percent) | Duration<br>(min) | Flow rate<br>(ml/min) |
|------|------------------------|---------------------|-------------|------------------------------------------|-------------------|-----------------------|
| 1    | Delta-Pak<br>C18       | 25 x 100            | TFA         | 16 - 64                                  | 60                | 5                     |
| 2    | Bondapak<br>C8         | 25 x 100            | HFBA        | 20 - 56                                  | 45                | 5                     |
| 3    | Bondapak<br>C18        | 25 x 100            | TEA         | 12 - 48                                  | 45                | 5                     |
| 4    | Microsorb MV<br>Cyano  | 4.6 x 250           | TFA         | 16 - 52                                  | 45                | 1                     |
| 5    | Microsorb MV<br>Cyano  | 4.6 x 250           | HFBA        | 20 - 56                                  | 45                | 1                     |
| 6    | Microsorb MV<br>Phenyl | 4.6 x 250           | TFA         | 20 - 52                                  | 40                | 1                     |
| 7    | Microsorb MV<br>C8     | 4.6 x 250           | TFA         | 12 - 60                                  | 60                | 1                     |
| 8    | Microsorb MV<br>Cyano  | 4.6 x 250           | TFA         | 12 - 44                                  | 40                | 1                     |

HFBA = Heptafluorobutyric acid (HPLC grade, Sigma)

TFA = Trifluoroacetic acid (HPLC grade, Sigma)

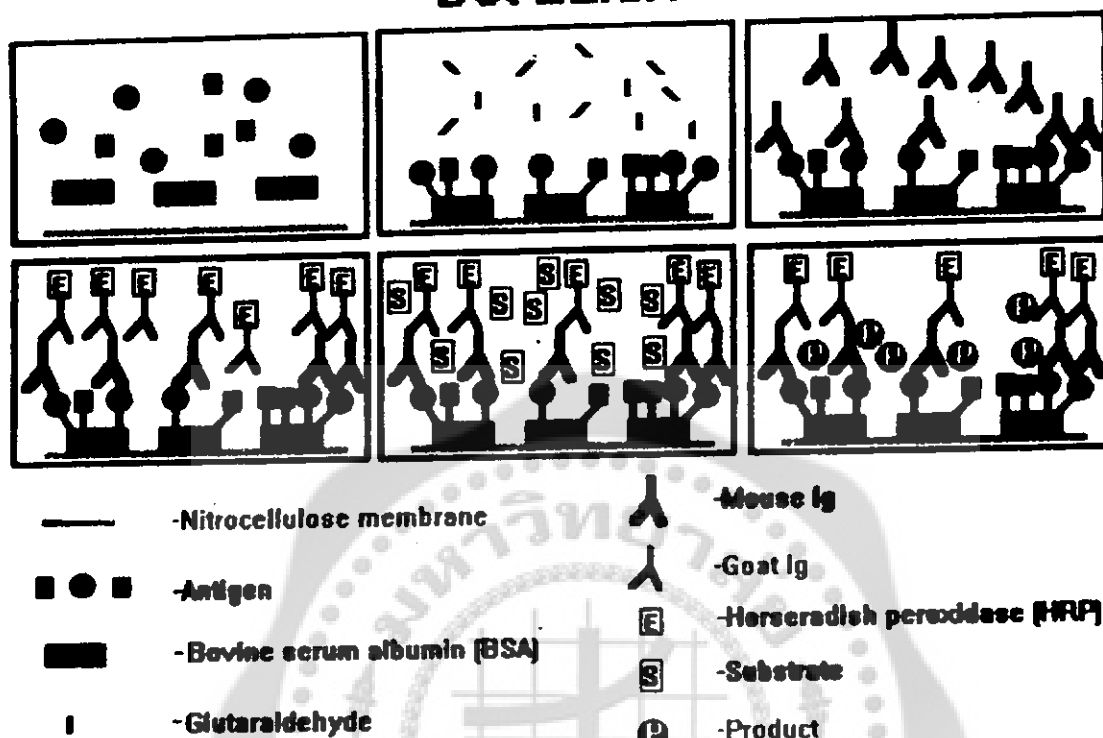
TEA = Triethylamine (HPLC grade, Sigma)

หมายเหตุ : Delta-Pak C18 column และ Bondapak C8 column ซื้อจาก Waters ส่วน Microsorb MV column ซื้อจาก Rainin Instrument Co.



รูปที่ 4 ขั้นตอนวิธีการของ Dot-ELISA (Dot-Enzyme Linked Immunosorbent Assay) ในการตรวจหาสารคล้าย FMRFamide

## Dot-ELISA



รูปที่ 5 สรุปหลักการของ Dot-ELISA เพื่อตรวจหาแอนติเจน (ขั้นตอนจากซ้ายไปขวา และบนลงล่าง) มีดังต่อไปนี้

1. ผสมสารตัวอย่าง (สารละลายที่มีเปปไทด์ที่ต้องการตรวจหา) กับ BSA แล้วหยดลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส

2. นำแผ่นไนโตรเซลลูโลสไปอบในโอของ glutaraldehyde เพื่อให้ glutaraldehyde เชื่อมต่อเปปไทด์ที่มีขนาดเล็กกับ BSA ที่ติดอยู่บนแผ่นไนโตรเซลลูโลส

3. นำแผ่นไนโตรเซลลูโลสไปบ่มกับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเปปไทด์ที่ต้องการตรวจหา (วงกลมสีแดง) แอนติบอดีที่จำเพาะต่อเปปไทด์จะจับกับเปปไทด์ที่ต้องการตรวจหา

4. นำแผ่นไนโตรเซลลูโลสไปบ่มกับแอนติบอดีตัวที่สองที่จำเพาะต่อแอนติบอดีตัวที่ 1 โดยแอนติบอดีตัวที่สองจะติดฉลากด้วยเอนไซม์

5. เติมสารละลายสับสเตรทของเอนไซม์

6. เอนไซม์จะเปลี่ยนสับสเตรท (โดยทั่วไปเป็นสารละลายไม่มีสี) เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีสีและตกตะกอนลงบนบริเวณที่มีแอนติบอดีจับอยู่



### 1. FMRFamide standard ที่ใช้เปรียบเทียบกับ FLP ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว

จากการใช้เปปไทด์มาตรฐาน FMRFamide ปริมาณ 500 นาโนกรัม ผ่านกระบวนการ RP-HPLC โดยใช้คอลัมน์ Cyano ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA ซึ่งคล้ายกับขั้นตอนสุดท้ายของการทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย FMRFamide พบพีคของ FMRFamide อยู่ในช่วง 1 นาที ความสูงของพีคประมาณ 150 มิลลิโวลต์ (รูปที่ 6) จึงใช้ความสูงของพีคของ FMRFamide ในการประมาณปริมาณของสารคล้าย FMRFamide ที่ได้จากตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบจากความสูงของพีคของ FMRFamide มาตรฐานกับสารคล้าย FMRFamide บริสุทธิ์ที่ได้จากขั้นตอนสุดท้าย

สำหรับการใช้เปปไทด์มาตรฐาน FMRFamide ความเข้มข้นต่าง ๆ มาตรวจสอบโดยใช้วิธี Dot-ELISA พบว่าปริมาณของ FMRFamide ที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจสอบโดยวิธีนี้ประมาณ 156 พิโคโมล และเมื่อปริมาณ FMRFamide เพิ่มมากขึ้นความเข้มของสีจุดจะเพิ่มขึ้นจนถึงความเข้มของสีจุดสูงสุดมีปริมาณสารคล้าย FMRFamide ประมาณ 5 นาโนกรัม (รูปที่ 6) ซึ่งจะใช้ความเข้มสุดท้ายของสีจุดที่สามารถตรวจสอบได้โดยวิธี Dot-ELISA (156 พิโคโมล) เทียบเท่ากับสารคล้าย FMRFamide ปริมาณ 1 หน่วย

### 2. การทำให้บริสุทธิ์ FLP จากก้านตาข่ายกัมมกรามโดย RP-HPLC ในขั้นตอนแรก

จากการนำสารสกัดจากก้านตาจำนวน 5,000 ก้านตา มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์ PrepPak C18 (25 X 100 มิลลิเมตร) ตัวทำละลายโดยแบ่งสารสกัดผ่านคอลัมน์ 3 ครั้ง ครั้งแรก 1,000 ตา ครั้งที่ 2 และ 3 ประมาณครึ่งละ 2,000 ตา เมื่อแบ่งสารละลายในแต่ละแฟรคชันมาตรวจหาสารคล้าย FMRF-amide โดยวิธี Dot-ELISA พบการกระจายของสารคล้าย FMRFamide กระจายอยู่ในแฟรคชันต่าง ๆ คล้ายกันทั้ง 3 ครั้ง (รูปที่ 7) คือพบในช่วงแฟรคชันที่ 27-39 และแฟรคชันที่ 41 และ 47-48 โดยช่วงพีคที่มีความเข้มของสารคล้าย FMRFamide สูงสุดอยู่ในแฟรคชันที่ 29-31 และ 38-39 ดังนั้นในการทำให้บริสุทธิ์ขั้นตอนต่อไปจึงรวมแฟรคชันที่ 27-32 ของการแยกด้วย RP-HPLC ทั้ง 3 ครั้งเข้าด้วยกัน ส่วนแฟรคชันที่ 33-39 และ 41 ยังไม่สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ในการศึกษาครั้งนี้

### 3. การทำให้บริสุทธิ์ FLP ในขั้นตอนที่ 2

จากการนำแฟรคชันที่ 27-32 ของขั้นตอนที่ 1 มาผ่านคอลัมน์ PrepPak C8 ระบบตัวทำละลาย ACN/HFBA พบการกระจายของ FLP อยู่ในช่วงแฟรคชันที่ 26-31 โดยแฟรคชันที่ 26-29 มีความเข้มของ FLI สูงสุด จึงนำแฟรคชันเหล่านี้ไปทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่อไป (รูปที่ 8)

### 4. การทำให้บริสุทธิ์ FLP ในขั้นตอนที่ 3-ขั้นตอนที่ 8

ใช้คอลัมน์ PrepPak C18 ระบบตัวทำละลาย ACN/TEA พบการกระจายของ FLP ในช่วงแฟรคชันที่ 29-35 จึงแยกแฟรคชันออกเป็น 2 กลุ่มตามลักษณะของโครมาโตแกรม โดยรวมแฟรคชันที่ 29-

ใช้คอลัมน์ PrepPak C18 ระบบตัวทำละลาย ACN/TEA พบการกระจายของ FLP ในช่วงแฟรคชันที่ 29-35 จึงแยกแฟรคชันออกเป็น 2 กลุ่มตามลักษณะของโครมาโตแกรม โดยรวมแฟรคชันที่ 29-31 และ 32-35 ไว้ด้วยกันเพื่อใช้แยกในขั้นตอนต่อไป กลุ่มแรกแฟรคชันที่ 29-31 เมื่อผ่านคอลัมน์ชนิดต่าง ๆ (ตามตารางที่ 2 ที่ใช้ analytical column ชนิดต่าง ๆ ร่วมกับระบบตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ อีก 5 ขั้นตอน) สามารถทำให้บริสุทธิ์ FLP 5 รูปแบบด้วยกันคือ FLP1, FLP2, FLP4, FLP5 และ FLP 6 ส่วนกลุ่มที่ 2 แฟรคชัน 32-35 สามารถทำให้บริสุทธิ์ FLP 3 รูปแบบได้แก่ FLP3, FLP7 และ FLP8 (รูปที่ 9 และ 10) ซึ่ง FLP1-5 ได้รายงานไปแล้ว ส่วน FLP6-8 แยกได้เพิ่มเติมในการทดลองครั้งนี้

## 5. การวิเคราะห์ FLP โดย Mass Spectrometry

จากการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโดย MALDI-TOF mass spectrometry พบว่าเปปไทด์ทั้ง 3 ชนิด (FLP6-8) ให้ mass profile น้ำหนักโมเลกุลของเปปไทด์ทั้ง 3 ชนิดเพียง 1 พิกที่น้ำหนักโมเลกุลต่าง ๆ กัน แสดงให้เห็นว่าเปปไทด์ทั้ง 3 ชนิดเป็นเปปไทด์รูปแบบต่าง ๆ กัน และมีความบริสุทธิ์สูงสามารถนำไปตรวจหาลำดับกรดอะมิโนได้ (รูปที่ 11)

## 6. การวิเคราะห์หาลำดับกรดอะมิโน

จากการใช้ automated Edman degradation 10 รอบ พบว่า FLP ทั้ง 3 รูปแบบ ประกอบด้วยกรดอะมิโน 9-10 หน่วยต่าง ๆ กัน มีกรดอะมิโน 5-6 หน่วยเหมือนกัน ส่วนปลาย C ของสายเปปไทด์ประกอบด้วย NFLRFamide ซึ่งจากปริมาณกรดอะมิโนที่ได้ในแต่ละรอบของการตัดจะมีปริมาณชนิดเดียวกัน นอกจาก phenylalanine ตัวสุดท้ายซึ่งได้ปริมาณที่น้อยมาก เนื่องจากตัวกรดอะมิโนอาจหลุดออกในช่วงการล้างหลังจากตัดกรดอะมิโนตัวรองสุดท้าย (รูปที่ 12)

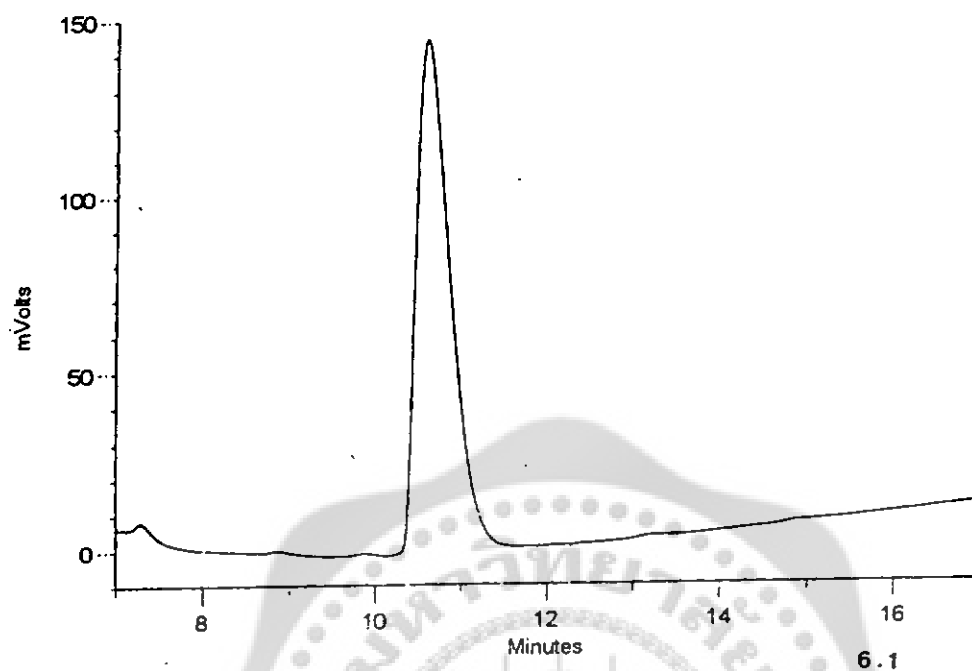
จากการคำนวณน้ำหนักโมเลกุลของเปปไทด์จากลำดับกรดอะมิโนที่ได้ พบว่าน้ำหนักโมเลกุลที่คำนวณได้ใกล้เคียงกับน้ำหนักโมเลกุลของเปปไทด์ที่หาได้จาก Mass Spectrometry (ตารางที่ 3) ซึ่งแอนติบอดีที่ใช้นั้นเป็นแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ -RFamide ดังนั้นจึงเป็นการยืนยันได้ว่าลำดับกรดอะมิโนที่ได้นั้นถูกต้อง

จากปริมาณกรดอะมิโนที่ได้รับในรอบแรกของการหาลำดับกรดอะมิโน นำมาคำนวณหาปริมาณเปปไทด์ที่ได้ทั้งหมด พบว่าเปปไทด์ที่ได้อยู่ในช่วง 15-50 pmol (ตารางที่ 3)

รูปที่ 6 FMRFamide standard ที่ใช้ในการเปรียบเทียบกับสารคล้าย FMRFamide ในตัวอย่าง

- 6.1 โครมาโตแกรมของ FMRFamide standard ปริมาณ 500 นาโนกรัมที่ผ่านกระบวนการ RP-HPLC โดยใช้คอลัมน์ Cyano ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA
- 6.2 Two-fold serial dilution ของ FMRFamide standard ปริมาณต่าง ๆ ด้วยวิธี Dot-ELISA โดยใช้ anti-FMRFamide antibody ซึ่งสามารถตรวจสอบได้น้อยที่สุดถึง 0.25 pmol/จุด





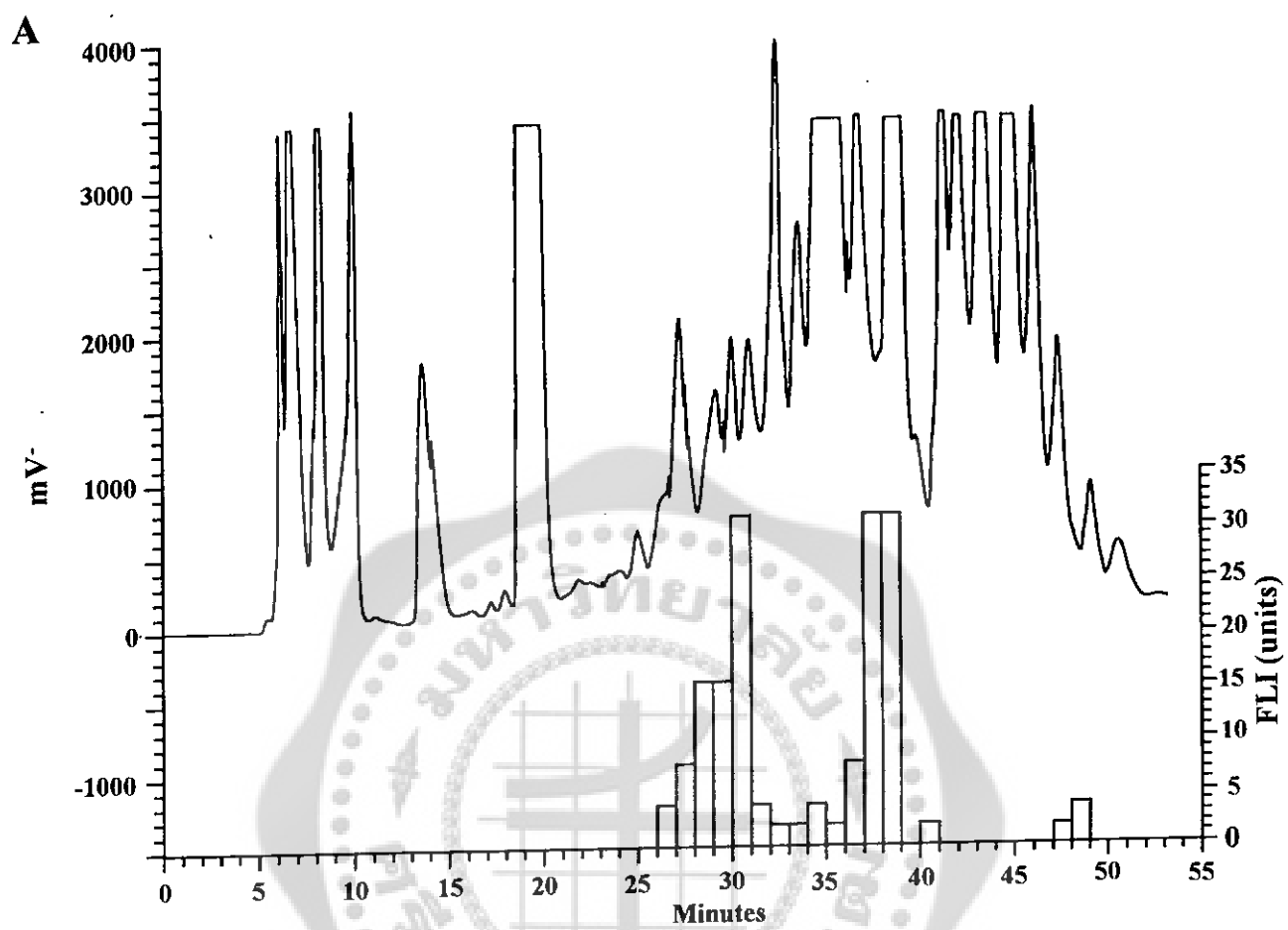
### Standard FMRamide

|               |         |
|---------------|---------|
| 32 units      | 5 ng    |
| 16 units      | 2.5 ng  |
| 8 units       | 1.25 ng |
| 4 units       | 625 pg  |
| 2 units       | 312 pg  |
| 1 unit        | 156 pg  |
| BSA 1 $\mu$ g |         |

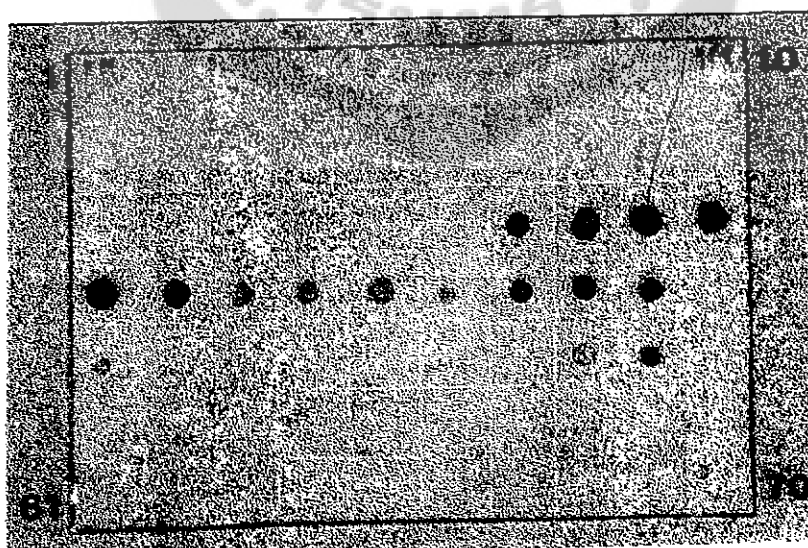
รูปที่ 7 การทำให้บริสุทธิ์ FLPs จากสารสกัดจากก้านตาดด้วย RP-HPLC ขั้นตอนแรก

- 7.1 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากก้านตากู้กัมกรามจำนวน 1,000 ก้านตา หลังจากผ่านกระบวนการ RP-HPLC ขั้นตอนแรก (คอลัมน์ : PrepPak C18 ; ระบบตัวทำละลาย : ACN/TFA) และแผนภูมิแท่ง แสดงปริมาณของ FLP (unit) ที่ได้จากการแบ่งตัวอย่างประมาณ 10 ก้านตา/จุด จากแฟรคชันต่าง ๆ ในการทำ Dot-ELISA นำเฉพาะแฟรคชันที่ 27-32 ไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไปในขั้นตอนที่ 2 ( $1\text{mV} = 0.001\ \mu$ )
- 7.2 Dot-ELISA ของแฟรคชันที่ 1-70 หลังจากผ่านกระบวนการ RP-HPLC ขั้นตอนแรก แต่ละจุดใช้ตัวอย่างประมาณ 10 ก้านตา
- ในการทดลองนี้ใช้แฟรคชันที่เก็บไว้ที่ออกมาในช่วงเวลา 27-30 นาที สำหรับการทำให้บริสุทธิ์

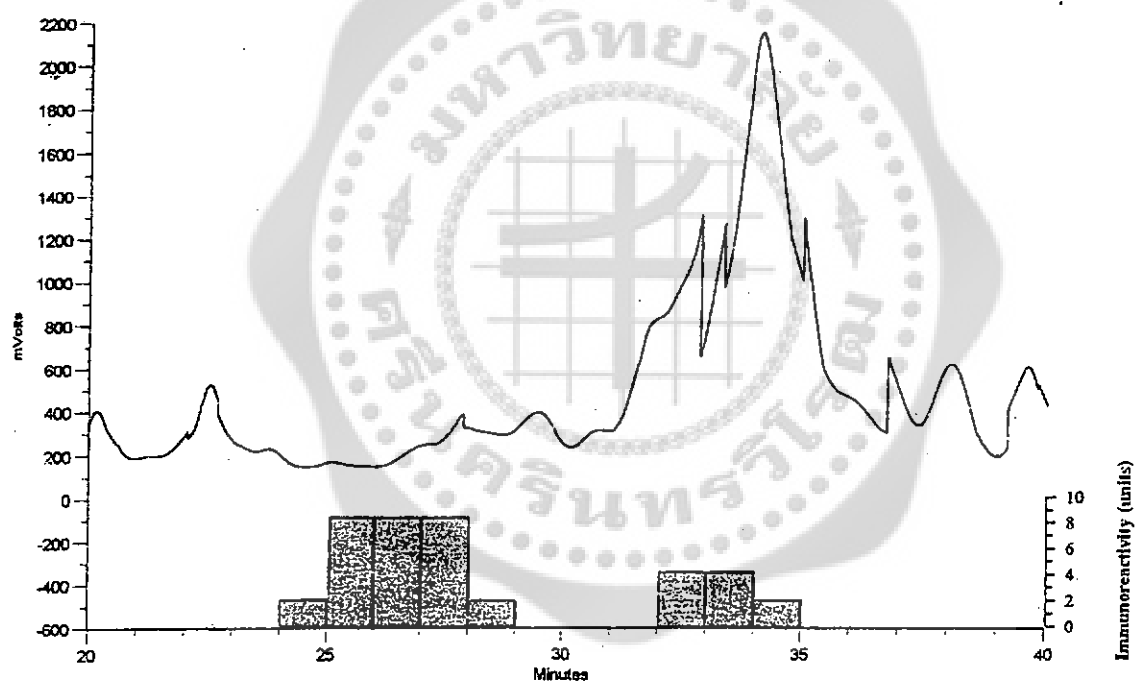




7.1

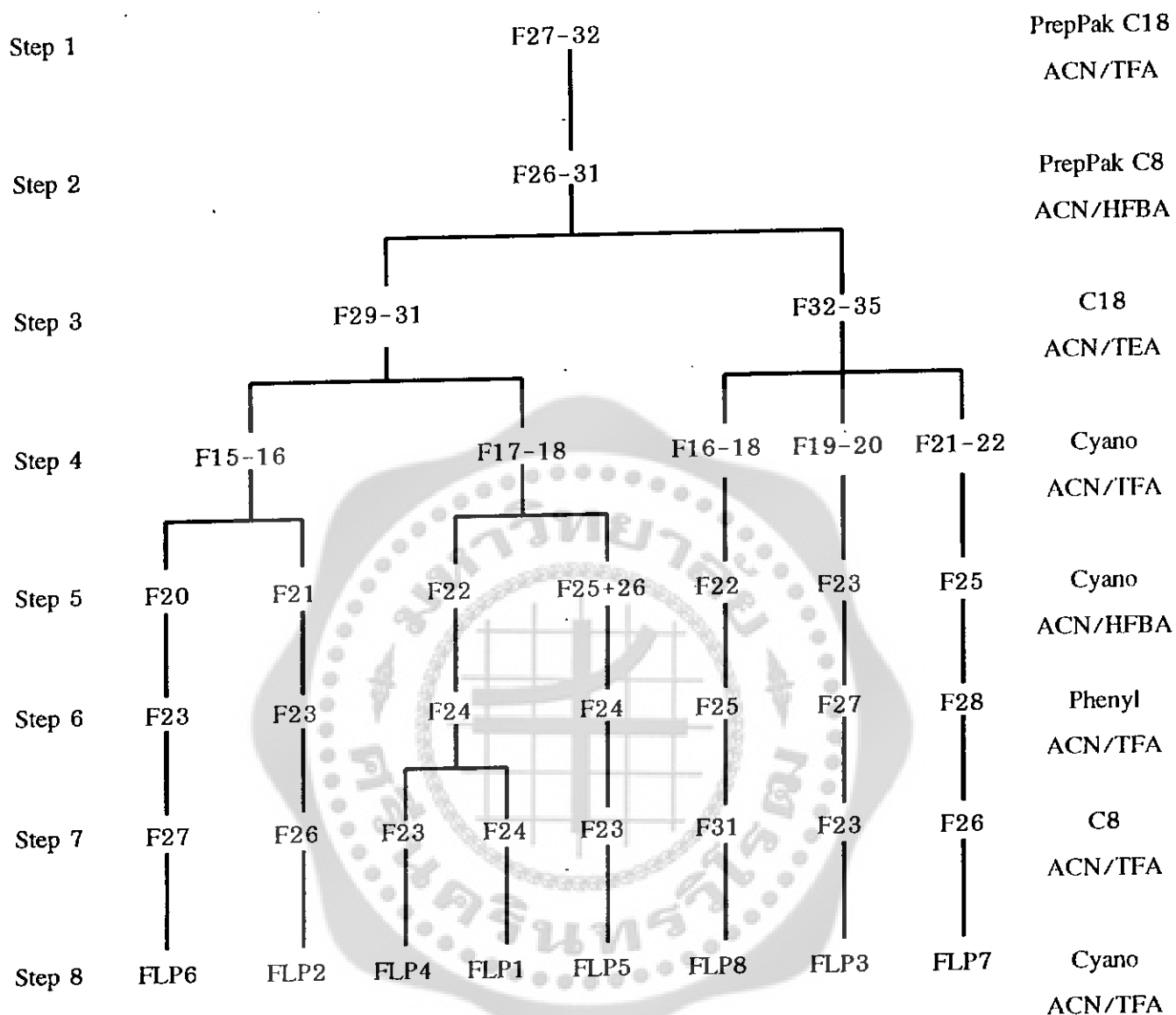
**B**

7.2



รูปที่ 8 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากก้านตาแพรคชั้นที่ 27-32 จำนวน 5,000 ก้านตา หลังจากผ่าน กระบวนการ RP-HPLC ขั้นตอนที่ 2 (คอลัมน์ : PrePak C8 : ระบบตัวทำละลาย ACN/ HFBA) และแผนภูมิแท่งแสดงปริมาณ FLP (unit) ที่ได้จากการแบ่งตัวอย่างประมาณ 10 ก้านตา/จุด ในการทำ Dot-ELISA

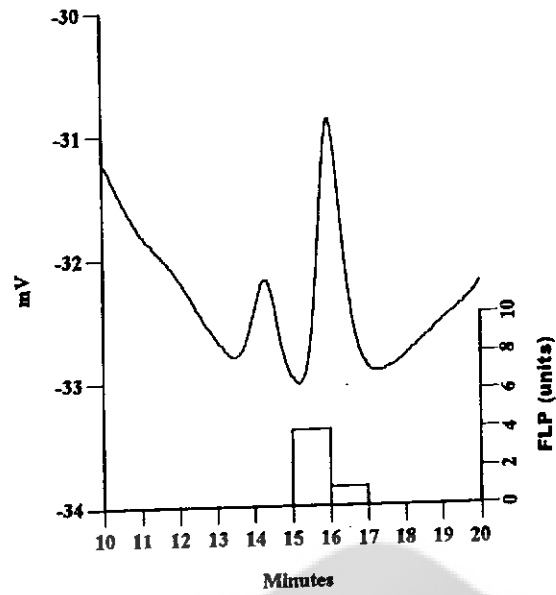
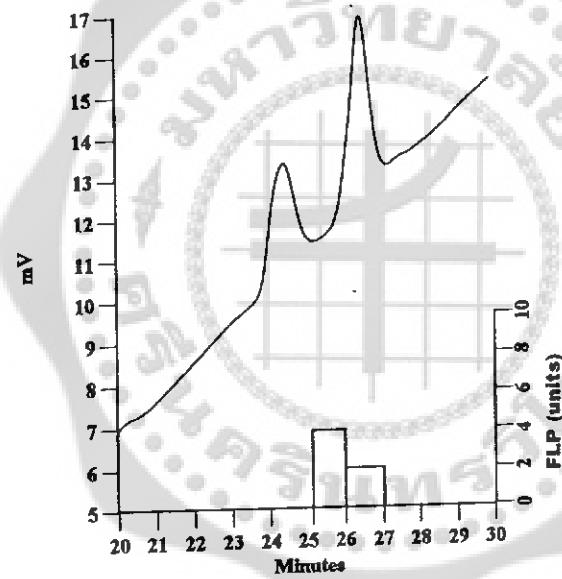
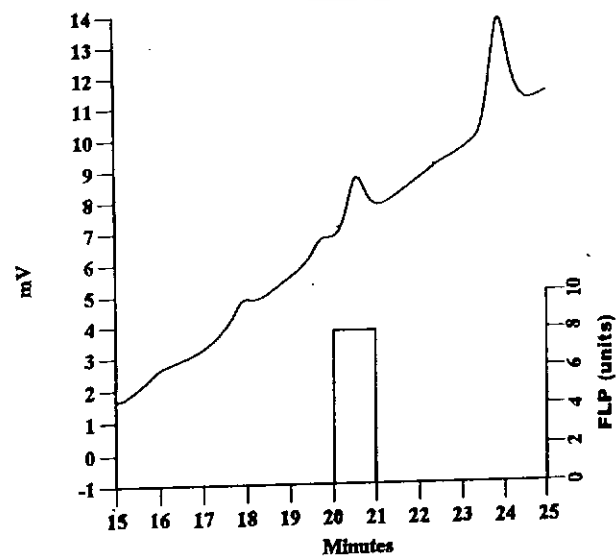
## Purification Step of Mar-FLP

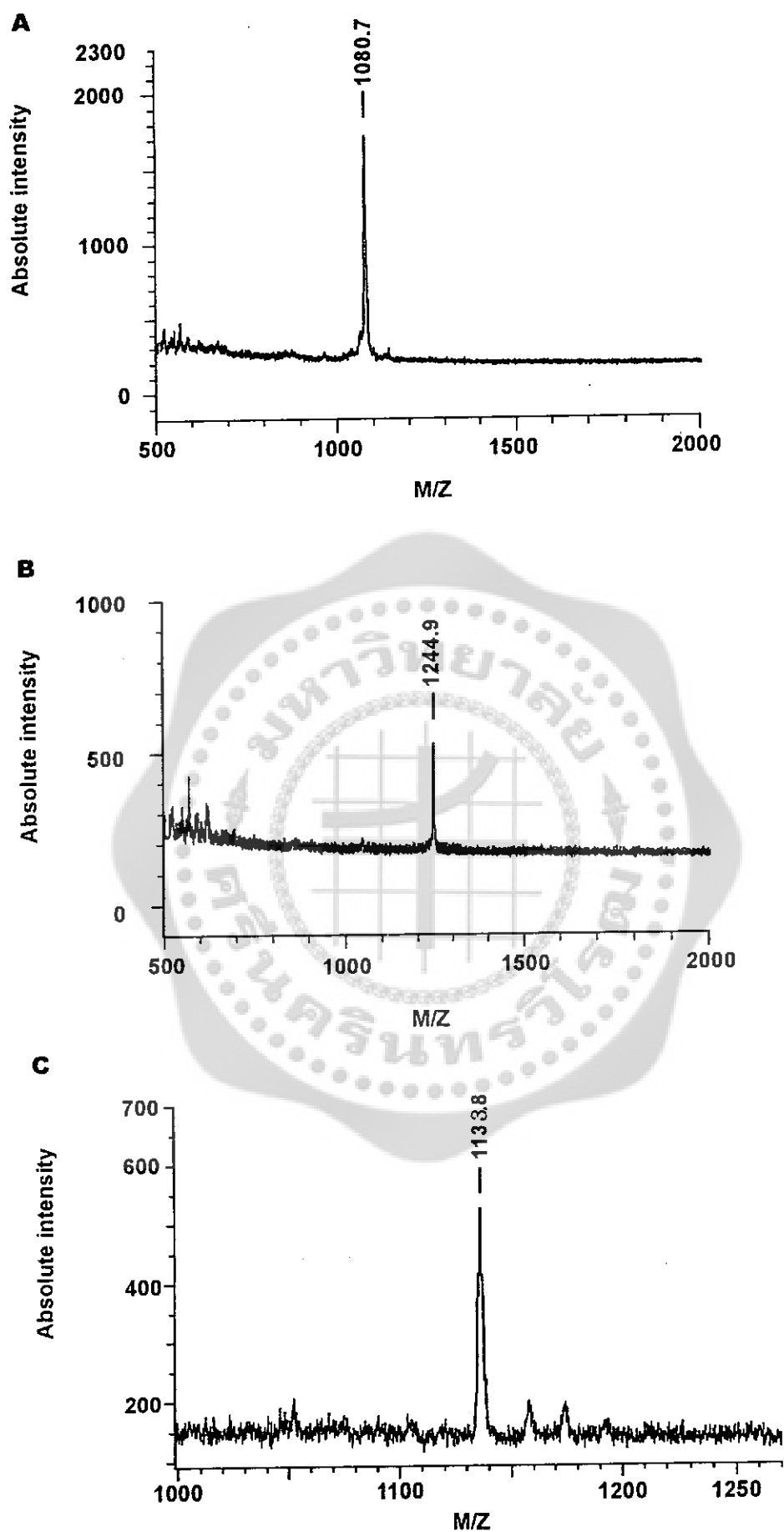


รูปที่ 9 ไดอะแกรมการทำให้บริสุทธิ์ Mar-FLPs โดยนำสารสกัดผ่าน C18 cartridge ทำให้บริสุทธิ์ต่อยด้วย RP-HPLC 8 ขั้นตอน โดยใช้คอลัมน์ 6 คอลัมน์และระบบตัวทำละลาย 3 ระบบ เก็บแฟรคชันของ FLP สำหรับศึกษาต่อไป

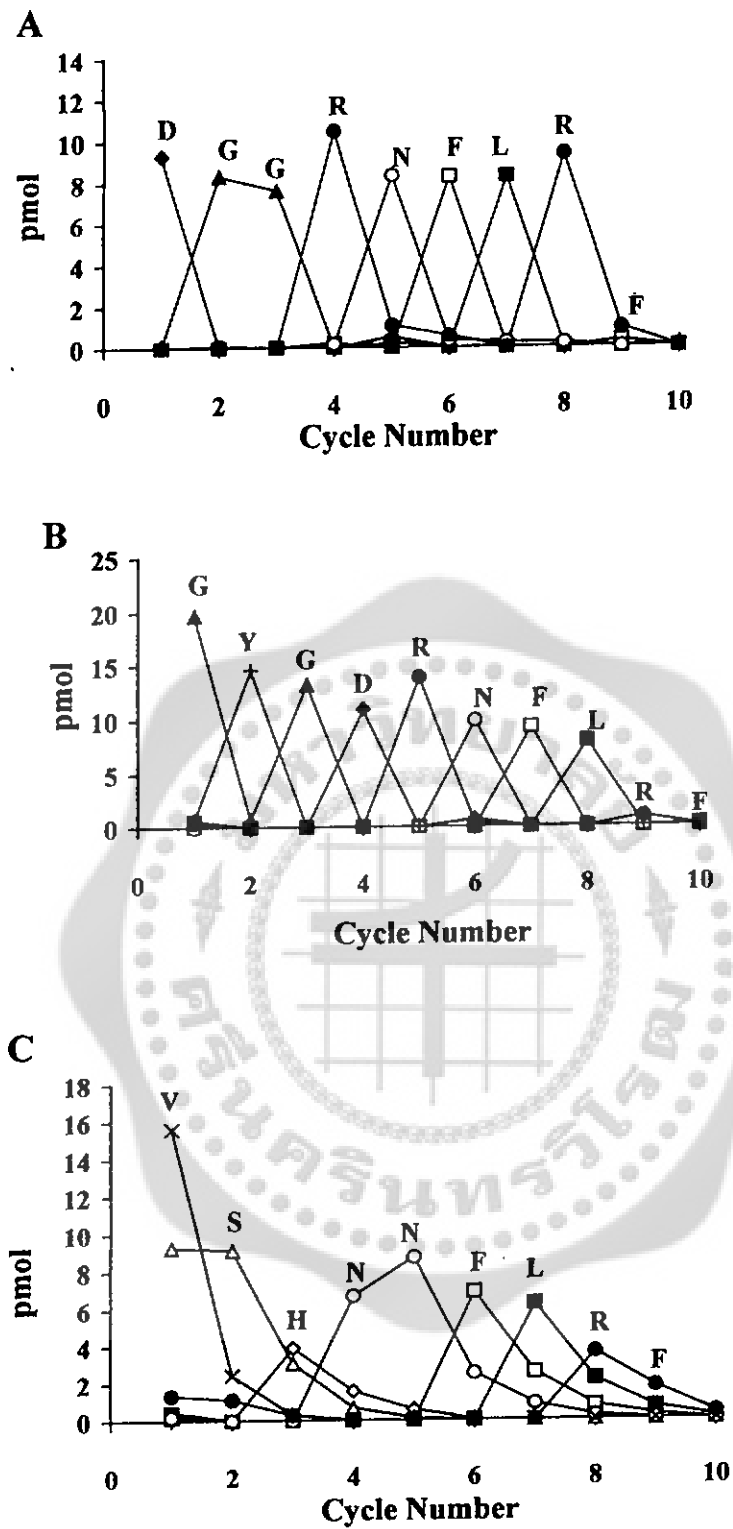
รูปที่ 10 การทำให้บริสุทธิ์ FLPs (6-8) ด้วย RP-HPLC ขั้นตอนสุดท้าย (ขั้นตอนที่ 8; คอลัมน์: cyano; ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA) แผนภูมิแท่งแสดง FLP unit ซึ่งประมาณจากการใช้ ก้านดา 50 ก้านดา ( $1\text{mV} = 0.001\mu$ )



**A****B****C**



รูปที่ 11 Matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry of 3 FLPs (6-8) โดยใช้ synthetic FMRFamide เป็นตัวเทียบ (calibrant)



รูปที่ 12 การหาลำดับกรดอะมิโนของ 3 FPLs (6-8) โดย Edmann degradation แสดงปริมาณของ parathyroid hormone (PTH)-amino acid ในแต่ละ cycle ตัวอักษรที่แตกต่างแสดงแต่ละชนิดของกรดอะมิโน ไม่พบการปนเปื้อนของเปปไทด์

ตารางที่ 3 ลำดับกรดอะมิโน น้ำหนักโมเลกุลและปริมาณ (recovery) ของ FLPs (6-8) ของกึ่งก้ามกราม

| Name     | Sequence        | Expected Mass | Observed<br>Mass | Amount<br>(pmol) |
|----------|-----------------|---------------|------------------|------------------|
| Mar-FLP6 | DGGRNFLRFamide  | 1080.2        | 1080.7           | 25               |
| Mar-FLP7 | GYGDRNFLRFamide | 1243.4        | 1244.9           | 50               |
| Mar-FLP8 | VSHNNFLRFamide  | 1132.3        | 1133.8           | 15               |



ตารางที่ 4 เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ 2 sbfamilies ของ FLPs ในกุ้งก้ามกราม และครัสเตเชียอื่นต่าง ๆ

| Animal                           | Peptide | Sequence         | Reference                 |
|----------------------------------|---------|------------------|---------------------------|
| <i>Homarus americanus</i>        | F1      | SDRNFLRFamide    | Trimmer et al., 1987      |
|                                  | F2      | TNRNFLRFamide    | Trimmer et al., 1987      |
| <i>Callinectes sapidus</i>       | FaRP    | GYNRSFLRFamide   | Krajniak, 1991            |
| <i>Procambarus clarkii</i>       | NF1     | NRNFLRFamide     | Mercier et al., 1993      |
|                                  | DF2     | DRNFLRFamide     | Mercier et al., 1993      |
| <i>Macrobrachium rosenbergii</i> | FLP1    | DRNFLRFamide     | Sithigorngul et al., 1998 |
|                                  | FLP2    | ADKNFLRFamide    | Sithigorngul et al., 1998 |
|                                  | FLP3    | NYDKNFLRFamide   | Sithigorngul et al., 1998 |
|                                  | FLP6    | DGGRNFLRFamide   | This study                |
|                                  | FLP7    | GYGDRNFLRFamide  | This study                |
|                                  | FLP8    | VSHNNFLRFamide   | This study                |
|                                  | FLP4    | APALRLRFamide    | Sithigorngul et al., 1998 |
|                                  | FLP5    | DRTPALRLRFamide  | Sithigorngul et al., 1998 |
| <i>Limulus polyphemus</i>        | HP      | GGRSPSLRLRFamide | Gaus et al., 1993         |
| <i>Periplaneta americana</i>     | -       | ANRSPSLRLRFamide | Veenstra & Lambrou, 1995  |

หมายเหตุ : Residue ที่ขีดเส้นใต้คือกรดอะมิโนที่เหมือนกับโนสปีชีส์อื่น ๆ

# สรุปและอภิปรายผลการทดลอง



จากการทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย FMRFamide จากก้านตาของกุ้งก้ามกรามจำนวน 5,000 ก้านตา สามารถแยกเปปไทด์รูปแบบใหม่เพิ่มขึ้นอีก 3 รูปแบบ ซึ่งเป็นเปปไทด์ที่มีลำดับกรดอะมิโนใหม่ทั้งหมด เปปไทด์เหล่านี้มีลักษณะคล้ายกับ Mar FLP 1-3 เนื่องจากมีกรดอะมิโนด้านปลาย C เหมือนกัน ประมาณ 4-5 หน่วย และคล้ายกับเปปไทด์ที่พบใน pericardial organ F1 และ F2 ของกุ้งมังกร *Homarus americanus* (Trimmer et al., 1987) เปปไทด์ Cal-FaRP จากปูม้า *Callinectes sapidus* (Krajiniak, 1991) เปปไทด์ NF1 และ DF2 จากกุ้ง crayfish *Procambarus clarkii* (Mercier et al., 1993) ดังนั้นเปปไทด์ FLP ที่พบในกุ้งก้ามกรามในกลุ่มย่อยแรกจึงมีจำนวนเพิ่มขึ้นเป็น 6 รูปแบบ ในขณะที่เปปไทด์ในกลุ่มย่อยที่สองไม่มีการพบเพิ่มเติมในการศึกษาครั้งนี้ (ตารางที่ 4) แต่อย่างไรก็ดียังพบว่าสารคล้าย FMRFamide อีกหลายแฟรคชันยังไม่สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ เนื่องจากปฏิกิริยาทางอิมมูโนของสารคล้าย FMRFamide หายไปเมื่อทำการแยกหลาย ๆ ขั้นตอน ซึ่งเปปไทด์ทั้ง 3 รูปแบบนี้ ปริมาณที่สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้มีปริมาณต่ำกว่าในการศึกษาครั้งแรกมาก คืออยู่ในช่วงระหว่าง 15-50 pmole เท่านั้น (ตารางที่ 3) แสดงว่าเปปไทด์บางรูปแบบอาจมีการสร้างน้อยกว่าบางรูปแบบ ซึ่งอาจมีการแสดงออกในเซลล์ประสาทที่แตกต่างกันหรืออาจเป็นเพราะมีการสูญเสียเปปไทด์เหล่านี้ในระหว่างการทำให้บริสุทธิ์มากกว่าเปปไทด์รูปแบบอื่นๆ

จะเห็นได้ว่า FLP ในกุ้งก้ามกราม มีจำนวนหลายรูปแบบอาจมากกว่า 10 รูปแบบ ซึ่งจากการค้นพบในสัตว์อื่น ๆ เช่นในพยาธิไส้เดือน *Ascaris suum* (Cowden and Stretton, 1995) หนอนตัวกลม *Caenorhaditis elegans* (Sithigomgul and Stretton, 1995) ปลิง *Hirudo medicinalis* (Evans et al., 1991) หอย *Helix aspera* (Saunders et al., 1991) แมลงหวี่ *Drosophila* (Schneider and Taghert, 1988) ล้วนพบ FLP หลายรูปแบบในสัตว์ชนิดเดียวกัน (ตารางที่ 1)

สำหรับในกุ้งก้ามกรามจะเห็นว่า FLP ทั้ง 8 รูปแบบมีสภาพแตกต่างกัน สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย ซึ่งเป็นเรื่องชี้ว่าอาจมียืนมากกว่า 2 transcripts สำหรับถอดรหัสให้ FLP ในกุ้งก้ามกราม ซึ่งตรงกับที่รายงานในหอยคัน *Lymnaea stagnalis* ว่า FMRFamide gene สามารถเลือกตัดทอนให้ 2 transcripts คือ transcript ที่ถอดรหัสให้ tetrapeptide และ heptapeptide แยกกัน ซึ่งแสดงออกในเซลล์ประสาทแต่ละเซลล์ (Saunders et al., 1991)

ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดถึงเหตุผลว่าในสัตว์แต่ละชนิดทำไมจึงต้องมีเปปไทด์ FLP กลุ่มย่อย ๆ มากมาย ความแตกต่างของเปปไทด์ส่วนใหญ่มีความแตกต่างทางปลาย N อาจไม่มีความสำคัญในแง่การทำงาน อาจเป็นเพียงเสริมการทำงานของลำดับกรดอะมิโนทางด้านปลาย C โดยทางด้านปลาย N เป็นส่วนที่ช่วยให้การจับของเปปไทด์กับรีเซพเตอร์มี affinity แตกต่างกัน เช่นในกรณีของ F1 และ F2 ของกุ้งlobster แสดงผลคล้ายคลึงกันในการกระตุ้นการเต้นของหัวใจและระบบหมุนเวียนโลหิตของปู *Cancer magister* แต่ F1 ออกฤทธิ์รุนแรงกว่า F2 (McGaw and McMahon, 1995) แต่ในทางกลับกัน เปปไทด์แต่ละรูปแบบในกลุ่มย่อยอาจมีรีเซพเตอร์จำเพาะ เช่นกรณีของ NF1 และ DF2 ซึ่งพบว่าออกฤทธิ์ในการเพิ่มการหลั่ง neurotransmitter จากปลายซินแนปส์ของ extensor muscle ของกุ้ง crayfish

*Procambarus clarkii* แต่ NF1 เพิ่ม muscle input resistance ในขณะที่ DF2 ไม่เพิ่ม ซึ่งบทบาทของ FLP รูปแบบต่าง ๆ เหล่านี้อาจช่วยทำงานเสริมกันเพื่อช่วยการทำงานของเซลล์ประสาทชนิดต่าง ๆ เพื่อการแสดงออกของพฤติกรรมที่เหมาะสม

จากการศึกษาโดยเทคนิคทาง immunocytochemistry (วีระวรรณ ลิทธิกรกุลและคณะ 2538) ตรวจหาแหล่งปรากฏของ FLI ในก้านตากลุ่มก้ามกราม พบว่า FLP อยู่ในเซลล์ประสาทจำนวนมากกว่า 1,000 เซลล์ และในแขนงประสาทที่ส่งเข้าสู่ neuropil บริเวณ Medulla Interna และ Medulla Terminalis ซึ่งเป็นเครื่องชี้ว่า FLI ในก้านตากลุ่มกราม อาจทำหน้าที่เป็น neurotransmitter หรือ neuromodulator และ FLI ยังพบในต่อมไชนัส ซึ่งเป็นจุดที่ฮอร์โมนหลังเข้าสู่ระบบเลือด เป็นเครื่องชี้ว่า FLP อาจทำหน้าที่เป็น neurohormone ด้วย FLP ในกลุ่ม -PALRLRFamide มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกับ head peptide I (PERPP<sub>OH</sub>SLKTRFamide) ของยุงลาย *Aedes aegypti* ซึ่งเปปไทด์นี้ทำหน้าที่เป็นฮอร์โมนที่ยับยั้งพฤติกรรมการออกหาเหยื่อในยุง (Brown et al., 1994) ซึ่งบทบาทของ FLP ในก้ามกรามยังไม่มีการศึกษา

ดังนั้นการพิสูจน์ทราบถึงรูปแบบต่าง ๆ ของ FMRFamide รูปแบบต่าง ๆ ในกระบวนการทางสรีรวิทยาของกุ้งและยังเป็นแนวทางที่จะใช้ลำดับกรดอะมิโนของสารคล้าย FMRFamide ที่ทราบแล้วสำหรับการศึกษายีนที่สร้างสารคล้าย FMRFamide เพื่อการพิสูจน์ทราบรูปแบบของ FMRFamide ในตัวกุ้งทั้งหมดได้ ซึ่งนอกจากจะให้ความรู้ในแง่วิวัฒนาการของยีนของฮอร์โมนแล้ว และยังจำเป็นสำหรับการสังเคราะห์สารคล้าย FMRFamide รูปแบบต่าง ๆ เพื่อศึกษาบทบาททางสรีรวิทยาของสารคล้าย FMRFamide ต่อไป

# เอกสารอ้างอิง



- วีระวรรณ สิทธิกรกุล, ไพศาล สิทธิกรกุล, สันติ เรืองมณีไพฑูรย์, สุนิสา แสงมงคลพัฒน์ และเปี่ยมศักดิ์ เมนะเสวต. 2537. การตรวจหานิวโรเปปไทด์ในก้านตาของกิ้งก่าปลาโดยปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกัน. วารสารวาริชศาสตร์ 1(1) : 1-19.
- วีระวรรณ สิทธิกรกุล, ศิวาพร ลงยันต์ และไพศาล สิทธิกรกุล. 2538. สารคล้าย FMRFamide ในก้านตาของกิ้งก่าปลา. วารสารวิทยาศาสตร์ มศว. 11 (1) : 15-28.
- Anderson, P.A.V., A. Moosler and C.J.P. Grimmelikhuijzen. 1992. The presence and distribution of antho-RFamide-like material in scyphomedusae. Cell Tissue Res. 267 : 67-74.
- Brown, M.R., M.J. Klowden, J.W. Crim and L. Young. 1994. Endogenous regulation of mosquito host-seeking behavior by neuropeptide. J. Insect. Physiol. 40 (5) : 399-406.
- Callaway, J.C., B. Masinovsky and K. Graubard. 1987. Co-localization of SCP<sub>B</sub>-like and FMRFamide-like immunoreactivities in crustacean nervous systems. Brain Research. 405 : 295-304.
- Chang, E.S., M.J. Bruce and R.W. Newcomb. 1987. Purification and amino acid composition of a peptide with molt inhibiting activity from the lobster, *Homarus americanus*. Gen. Comp. Endocrinol. 65 : 56-64.
- Chen, S.T., M.S. Tsai and C.L. Shen. 1989. Distribution of FMRFamide-like immunoreactivity in the central nervous system of the Formosan Monkey *Macaca cyclopsis*. Peptides. 10 : 825-834.
- Cottrell, G.A. 1989. The Biology of the FMRFamide-series of peptides in molluscs with special reference to *Helix*. Comp. Biochem. Physiol. 93A (1) : 41-45.
- Cowden, C. and A.O.W Stretton. 1995. Eight novel FMRFamide like neuropeptide isolated from the nematode *Ascaris suum*. Peptides. 16 (3) : 491-500.
- Cowden, C., P. Sithigorngul, P. Brackley, J. Guastella and A.O.W. Stretton. 1993. Localization and differential expression of FMRFamide-like immunoreactivity in the nematode *Ascaris suum*. J. Comp. Neurol. 333 : 455-468.

- Diaz-Miranda, L., G.E. de Motta and J.E. García-Arriaga. 1991. Localization of neuropeptides in the nervous system of the marine annelid *Sabellastarte magnifica*. *Cell Tissue Res.* 266 : 209-217.
- Dockray, G.J. and R.G. Williams. 1983. FMRFamide-like immunoreactivity in rat brain : development of a radioimmunoassay and its application in studies of distribution and chromatographic properties. *Brain Research.* 266 : 295-303.
- Dockray, G.J., J.R. Reeve, J. Shiveley, R.J. Gayton and C.S. Barnard 1983. A novel active pentapeptide from chicken brain identified by antibodies to FMRFamide. *Nature.* 305 : 328-330.
- Duve, H., A.J. Elia, I. Crohard, A.H. Johnson and A. Thorpe. 1993. The effects of Calli FMRF-amides and other FMRFamide-related neuropeptides on the activity of the heart of the blow fly *Calliphora vomitoria*. *J. Insect. Physiol.* 39 (1) : 31-40.
- Evans, P.D. and C.M. Myers. 1986. The modulatory actions of FMRFamide and related peptides on locust skeletal muscle. *J. Exp. Biol.* 126 : 403-422.
- Evans, B.D. and R.L. Calabrese. 1989. Small cardioactive peptide-like immunoreactivity and its colocalization with FMRFamide-like immunoreactivity in the central nervous system of the leech *Hirudo medicinalis*. *Cell Tissue Res.* 257 : 187-199.
- Evans, B.D., J.Pohl, N.A. Kartsonis and R.L. Calabrese. 1991. Identification of RFamide neuropeptides in the medicinal leech. *Peptides.* 12 : 897-908.
- Fernlund, P. 1974. Structure of the red pigment concentrating hormone of the shrimp *Pandalus borealis* in the demonstration of substance immunologically related to the identified arthropod neuropeptide AKH/RPCH in the CNS of several invertebrate species. *Biochem. Biophys. Acta.* 371 : 304-311.
- Fingerman, M. 1987. The endocrine mechanisms of crustaceans. *J. Crusta. Biol.* 7(1) : 1-24.
- Fujiwara-Sakata, M. and M. Kobayashi. 1994. Localization of FMRFamide and ACEP-1-like immunoreactivities in the nervous system and heart of pulmonate mollusc, *Archatina fulica*. *Cell Tissue Res.* 278 : 451-460.

- Gaus, G., K.E. Dobile, D.A. Price, M.J. Greenberg, T.D. Lee and B.A. Battelle. 1993. The sequences of five neuropeptides isolated from *Limulus* using antisera to FMRFamide. Biol. Bull. 184 : 322-329.
- Grimmelikhuijzen, C.J.P., and D. Graff. 1986. Isolation of Glu-Gly-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> (Antho-RFamide), a neuropeptide from sea anemones. Proc. Natl. Acad. Sci. 83 : 9817-9821.
- Grimmelikhuijzen, C.J.P., G.J. Dockray and L.P.C. Schot. 1982. FMRFamide-like immunoreactivity in the nervous system of hydra. Histochemistry. 73 : 499-508.
- Groome, J.R. 1993. Distribution and partial characterization of FMRFamide-like peptides in the horseshoe crab, *Limulus polyphemus*. Comp. Biochem. Physiol. 104C (1) : 79-85.
- Hasegawa, Y., E. Hirose and Y. Katakura. 1993. Hormonal Control of sexual differentiation and reproduction in Crustacea. Am. Zool. 33 : 403-411.
- Holman, G.M., B.J. Cook and R.J. Nachman. 1986b. Isolation, primary structure and synthesis of leucomyosuppressin, an insect neuropeptide that inhibits spontaneous contractions of the cockroach hindgut. Comp. Biochem. Physiol. 85C (2) : 329-333.
- Huberman, A. and M.B. Aguilar. 1986. A neurosecretory hyperglycemic hormone from the sinus gland of the Mexican crayfish *Procambarus bouvieri*-Purification and Biochemical characterization of the most abundant form the hormone. Comp. Biochem. Physiol. 85B(1) : 197-203.
- Johnston, R.N., C. Shaw, D.W. Halton, P. Verhaert and J. Baqura. 1995. GYIRFamide : A novel FMRFamide-related peptide (FaRF) from the triclad turbellarian, *Dugesia trigrina*. Biochem. Biophys. Res. Comm. 209 (2) : 689-697.
- Johnston, R.N., C. Shaw, D.W. Halton, P. Verhaert, K.L. Blair, G.P. Brennev, D.A. Price and P.A.V. Anderson. 1996a. Isolation localization and biactivity of novel FMRFamide-related neuropeptides from the marine turbellarian, *Bdelloura candida*. J. Neurochem. 67 : 814-821.

- Johnston, R.N., D.W. Halton, P.A.V. Anderson, C.F. Johnston and C. Shaw. 1996b. The peptidergic nervous system of the triclad turbellarian *Bdelloura candida* (Maricola, Bdellouridae) : An immunocytochemical study using an antiserum raised to an endogenous neuropeptide, GYIRFamide. *J. Comp. Neurol.* 376 : 214-222.
- Kingan, T.G., J. Shahanowitz, D.F. Hunt and J. Witten. 1996. Characterization of two myotropic neuropeptides in the FMRFamide family from segmental ganglia of the moth *Manduca sexta* : Candidate neurohormones and neuromodulators. *J. Environ. Biol.* 199 : 1095-1104.
- Kleinholz, L.H., K. Ranga Rao., J.P. Riehm, G.E. Tarr, L. Johnson and S. Norton. 1986. Isolation and sequence analysis of a pigment-dispersing hormone from eyestalks of the crab, *Cancer magister*. *Bio. Bull.* 170 : 135-143.
- Kobayashi, M. and Y. Muneoka. 1986. Structure requirements for FMRFamide-like activity on the heart of the prosobranch *Rapana thomasi*. *Comp. Biochem. Physiol.* 84C (2) : 349-352.
- Krajniak, K.G. 1991. The identification and structure-activity relations of cardioactive FMRFamide-related peptide from the blue crab *Callinectes sapidus*. *Peptides.* 12 : 1295-1302.
- Lesser, W. and M.J. Greenberg. 1993. Cardiac regulation by endogenous small cardioactive peptides and FMRFamide-related peptides in the snail *Helix aspersa*. *J. Exp. Biol.* 178 : 205-230.
- Lundquist, T. and D.R. Nassel. 1990. Substance P, FMRFamide, and gastrin/cholecystokinin-like immunoreactive neurons in the thoraco-abdominal ganglia in the flies. *Drosophila* and *Calliphora*. *J. Comp. Neurol.* 294 : 161-178.
- Mangerich, S. and R. Keller. 1988. 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.
- Mangerich, S., R. Keller, H. Dirksen, K.R. Rao and J.P. Riehm. 1987. Immunocytochemical localization of pigment-dispersing hormone (PDH) and its coexistence with FMRFamide immunoreactive material in the eyestalks of the decapod crustaceans *Carcinus maenas* and *Orconectes limosus*. *Cell Tissue Res.* 250 : 365-375.

- Maule, A.G., C. Shaw, D.H. Halton and L. Thin. 1993. GNFFRFamide: A novel FMRFamide immunoreactive peptide isolated from the sheep tapeworm, *Moniezia expansa*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 193 (3) : 1054-1060.
- Maule, A.G., C. Shaw, D.H. Halton, W.J. Curry and L. Thin. 1994. RYIRFamide : A turbellarian FMRFamide related peptide (FaRP). *Regul. Pept.* 50 : 37-43.
- McGaw, I.J. and B.R. McMahon. 1995. The FMRFamide-related peptides F1 and F2 alter hemo-lymph distribution and cardiac output in the crab *Cancer magister*. *Biol. Bull.* 188 : 186-196.
- Mercier, A.J., I. Orchard, V. TeBrugge and M. Skerrett. 1993. Isolation of two FMRFamide-related peptides from crayfish pericardial organs. *Peptides.* 14 : 137-143.
- Nachman, R.J., G.M. Holman, W.F. Haddon and N. Ling. 1986a. Leucosulfakinin, a sulfated insect neuropeptide with homology to gastrin and cholecystokinin. *Science.* 234 : 71-73.
- Nachman, R.J., G.M. Holman, B.J. Cook, W.F. Haddon and N. Ling. 1986b. Leucosulfakinin II, a blocked sulfated insect neuropeptide with homology to cholecystokinin and gastrin. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 140 : 357-365.
- Price, D.A. and M.J. Greenberg. 1977. Structure of a molluscan cardioexcitatory neuropeptide. *Science.* 197 : 670-671.
- Raffa, R.B. and C.P. Bianchi. 1986. Further evidence for a neuromodulatory role of FMRFamide involving intracellular  $Ca^{2+}$  pools in smooth muscle of *Mytilus edulis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 84C(1) : 23-28.
- Robb, S., L.C. Packman and P.D. Evans. 1989. Isolation, Primary structure and bioactivity of FLRF-amide. A FMRFamide-like neuropeptide from the locust, *Schistocerca gregaria*. *Biochem. and Biophys. Res. Comm.* 160 (2) : 850-856.
- Saunders, S.E., K. Bright, E. Kellett, P.R. Benjamin and J. F. Burke. 1991. Neuropeptides Gly-Asp-Pro-Phe-Leu-Arg-Phe-amide (GDPFLRFamide) and Ser-Asp-Pro-Phe-Leu-Arg-Phe-amide (SDPF-LRFamide) are encoded by an exon 3' to Phe-Met-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> (FMRFamide) in the snail *Lymnaea stagnalis*. *J. Neurosci.* II (3) : 740-745.

- Schmidt, M. and B.W. Ache. 1994. Descending neurons with dopamine-like or with substance P/FMRFamide-like immunoreactivity target the somata of olfactory interneurons in the brain of the spiny lobster, *Panulirus argus*. *Cell Tissue Res.* 278 : 337-352.
- Schnider, L.E. and P.H. Taghert. 1988. Isolation and characterization of a *Drosophila* gene that encodes multiple neuropeptides related to Phe-Met-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> (FMRFamide). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85 : 1993-1997.
- Sithigorngul, P. and A.O.W. Stretton. 1995. Six more FMRFamide-like peptides from the nematode *Caenorhabditis elegans* : four new and two old. Third progress report for biotechnology career fellowship. The Rockefeller foundation. 1-18.
- Sithigorngul, P., A.O.W. Stretton and C. Cowden. 1991. A versatile dot-ELISA method with femtomole sensitivity for detecting small peptides. *J. Immuno. Meth.* 141 : 23-32.
- Sithigorngul, P., W. Saraithongkum, S. Jaideechoey, S. Longyant and W. Sithigorngul. 1998. Novel FMRFamide-like neuropeptides from the eyestalk of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Comp. Biochem. Physiol.* 120B : 587-595.
- Soyez, D., J.E. Van Deijnen and M. Martin. 1987. Isolation and characterization of a vitellogenesis-inhibiting factor from sinus glands of the lobster, *Homarus americanus*. *J. Exp. Zool.* 244 : 479-484.
- Too, C.K.L. and R.P. Croll. 1995. Detection of FMRFamide-like immunoreactivities in the sea scallop *Placopecten magellanicus* by immunohistochemistry and Western blot analysis. *Cell Tissue Res.* 281 : 295-304.
- Trimmer, B.A., L.A. Kobierski and E.A. Kravitz. 1987. Purification and characterization of FMRFamide-like immunoreactive substances from the lobster nervous system : Isolation and sequence analysis of two closely related peptides. *J. Comp. Neurol.* 266 : 16-26.
- Tsang, P.W. and I. Orchard. 1991. Distribution of FMRFamide-related peptides in the blood-feeding bug, *Rhodnius prolixus*. *J. Comp. Neurol.* 331 : 17-32.

- Vallarino, M., M.T. Salsotto-Cattaneo, M. Feuilloy and H. Vaudry. 1991. Distribution of FMRF-amide-like immunoreactivity in the brain of the elasmobranch fish *Scyliorhinus canicula*. *Peptides*. 12 : 1321-1328.
- Van Deijnen, J.E., F. Vek and F. Van Herp. 1985. An immunocytochemistry study of the optic ganglia of the crayfish *Astacus leptodactylus* (Nordmann 1842) with antisera against biological active peptides of vertebrates and invertebrates. *Cell Tissue Res*. 240 : 175-183.
- Veenstra, J.A. and G. Lambrou. 1995. Isolation of a novel RFamide peptide from the midgut of the American cockroach, *Periplaneta americana*.

