

595.3
44350

9.3

การแยกและการทำให้บริสุทธิ์ของสารคล้าย FMRFamide
ในก้านตาของกุ้งก้ามกราม
โดยวิธี RP-HPLC

18 S.ศ. 2539

ปริญญานิพนธ์
ของ
วันเพ็ญ สหายทองคำ

เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาค้นคว้า
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิชาเอกเคมีชีวภาพ

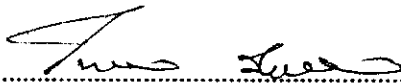
พฤษภาคม 2539

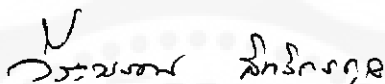
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ร. 52473

คณะกรรมการควบคุมและคณะกรรมการสอบได้พิจารณาปริญญานิพนธ์ฉบับนี้แล้ว
เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาดมหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิชาเอก
เคมีชีวภาพ ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒได้

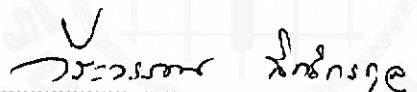
คณะกรรมการควบคุม

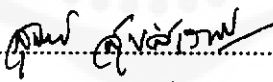
.....ประธาน
(รศ.ดร.ไพศาล สิทธีกรกุล)

.....กรรมการ
(ผศ.ดร.วีระวรรณ สิทธีกรกุล)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธาน
(รศ.ดร.ไพศาล สิทธีกรกุล)

.....กรรมการ
(ผศ.ดร.วีระวรรณ สิทธีกรกุล)

.....กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม
(ผศ.ดร.สุนิตย์ สุขสำราญ)

บัณฑิตวิทยาลัยอนุมัติให้รับปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาดม
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิชาเอกเคมีชีวภาพ ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ดร.ศิริยุภา พูลสุวรรณ)

วันที่ 10 เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2539

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความช่วยเหลือและคำแนะนำอย่างดียิ่งจาก รศ.ดร.ไพศาล สติธิกรกุล และ ศศ.ดร.วีระวรรณ สติธิกรกุล รวมทั้ง ศศ.ดร.สุนิตย์ สุขสำราญ ที่กรุณาร่วมเป็น กรรมการในการสอบ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบคุณ Prof. Dr. A.O.W. Stretton, University of Wisconsin-Madison ที่กรุณา อนุเคราะห์ให้โมโนโคลนอลแอนติบอดี FM-23 และ AF1-62 สำหรับใช้ในการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณศิวพร ลงยันต์ ที่ให้ความช่วยเหลือด้วยดีมาตลอดจนทำให้ปริญญานิพนธ์ ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ คุณสมปอง ใจดีเฉย ผู้ร่วมการวิจัยที่ให้คำแนะนำ ช่วยเหลือด้วยดีตลอดใน ระหว่างการทำวิจัย

ขอขอบคุณ คุณพาวณี จักรแสงชัยโชติ คุณหทัยชนก ศรีใส และคุณธิดา อมร ที่ช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจในการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอรำลึกถึง คุณสุภาพร จินตโกศลวิทย์ ผู้ล่วงลับไปแล้วที่คอยช่วยเหลือ แนะนำ และเป็น กำลังใจในระหว่างการศึกษาในระดับปริญญาโทด้วยดีตลอดมา

ขอโน้มรำลึกถึงพระคุณบิดา มารดา และพี่ ๆ ที่ให้กำลังใจและสนับสนุนในด้านการศึกษ แก่ผู้วิจัย จนสามารถทำปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จเรียบร้อยอย่างดียิ่ง และขอขอบคุณผู้ที่ให้ความ ช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ แต่ไม่ได้กล่าวถึงไว้ ณ ที่นี้ด้วย

วันเพ็ญ สาท่ายทองคำ

สารบัญ

บทที่

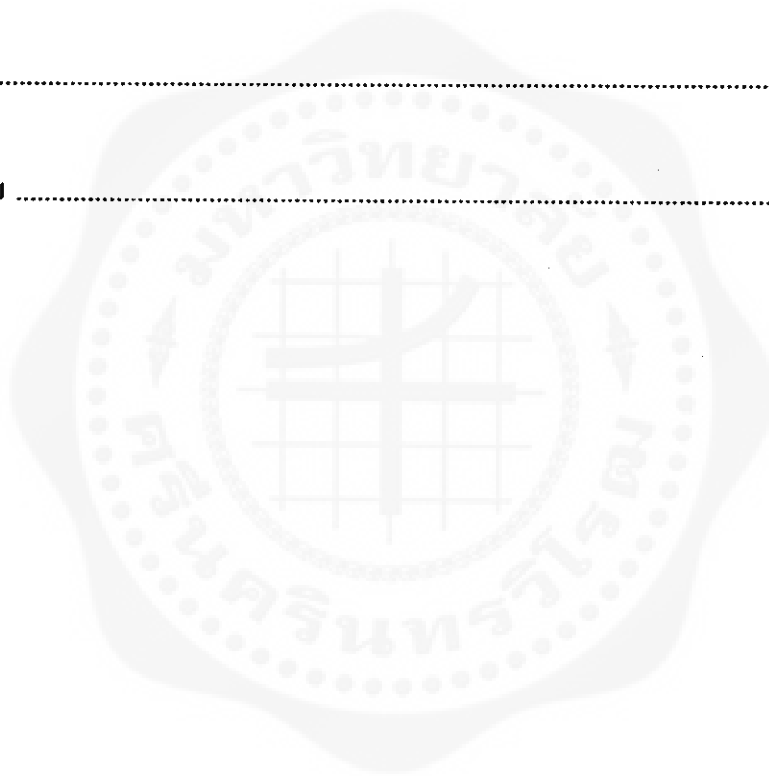
หน้า

1. บทนำ	1
ภูมิหลัง	1
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	7
ชีววิทยาของกุ้งก้ามกราม	17
ความมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า	20
ความสำคัญของการศึกษาค้นคว้า	20
ขอบเขตของการศึกษาค้นคว้า	20
นิยามศัพท์เฉพาะ	21
2. วิธีการวิจัย	22
สัตว์ทดลอง	22
อุปกรณ์และสารเคมี	22
วิธีดำเนินการทดลอง	24
การเก็บรวบรวมตูกุ้งก้ามกราม	25
การเตรียมสารสกัดจากก้านตาของกุ้งก้ามกราม	25
การเตรียมสารสกัดจากก้านตาก่อนนำไปทำให้บริสุทธิ์ ด้วยกระบวนการ RP-HPLC	25
การทำให้บริสุทธิ์ของสารคล้าย FMRFamide จากก้านตา ของกุ้งก้ามกรามด้วยกระบวนการ RP-HPLC	26
การตรวจหาสารคล้าย FMRFamide ในก้านตาของ กุ้งก้ามกรามโดยวิธี Dot-ELISA	26
การเตรียมเปปไทด์มาตรฐาน	27
การวิเคราะห์ข้อมูล	28

บทที่

หน้า

3. ผลการวิจัย	32
4. สรุปและอภิปรายผล	46
บรรณานุกรม	49
ภาคผนวก	56
ประวัติผู้วิจัย	58

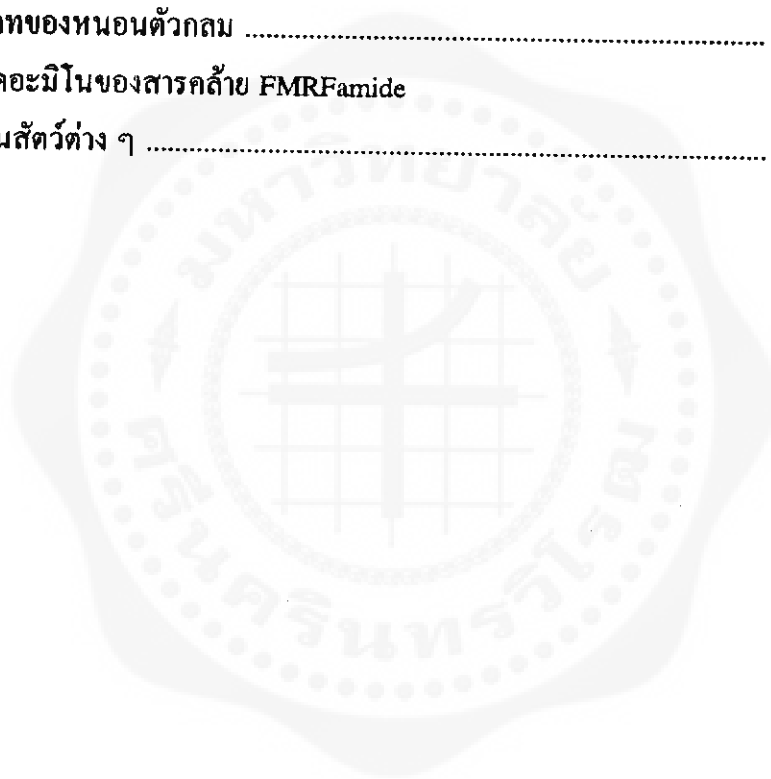


บัญชีตาราง

ตาราง

หน้า

1 ลำดับกรดอะมิโนของสารคล้าย FMRFamide ในระบบ	
ประสาทของพยาธิไส้เดือน	9
2 ลำดับกรดอะมิโนของสารคล้าย FMRFamide ในระบบ	
ประสาทของหนอนตัวกลม	13
3 ลำดับกรดอะมิโนของสารคล้าย FMRFamide	
ที่พบในสัตว์ต่าง ๆ	15



บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ

หน้า

1 ภาพกึ่งกัมกราม	19
2 ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดจากก้านตาของกึ่งกัมกราม	29
3 ขั้นตอนวิธีการของ Dot-ELISA ในการตรวจหา สารคล้าย FMRFamide	30
4 หลักการของ Dot-ELISA เพื่อตรวจหาแอนติเจน	31
5 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากก้านตากึ่งกัมกรามที่ผ่านกระบวนการ การ RP-HPLC ขั้นตอนแรกและรูปแสดงผลของ Dot-ELISA	36
6 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากก้านตากึ่งกัมกราม ที่ผ่านกระบวนการ RP-HPLC ขั้นตอนที่ 2	37
7 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากก้านตากึ่งกัมกราม ที่ผ่านกระบวนการ RP-HPLC ขั้นตอนที่ 3	38
8 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากก้านตากึ่งกัมกราม ที่ผ่านกระบวนการ RP-HPLC ขั้นตอนที่ 4	39
9 โครมาโตแกรมของการทำให้บริสุทธิ์ของเปปไทด์ I ที่ผ่านกระบวนการ RP-HPLC ขั้นตอนที่ 5-8	40
10 โครมาโตแกรมการทำให้บริสุทธิ์ของเปปไทด์ II และ III ที่ผ่านกระบวนการ RP-HPLC ขั้นตอนที่ 5-8	41
11 โครมาโตแกรมการทำให้บริสุทธิ์ของเปปไทด์ III ที่ผ่านกระบวนการ RP-HPLC ขั้นตอนที่ 5-8	42
12 โครมาโตแกรมการทำให้บริสุทธิ์ของเปปไทด์ IV ที่ผ่านกระบวนการ RP-HPLC ขั้นตอนที่ 5-8	43

13	โครมาโตแกรมการทำให้บริสุทธิ์ของเปปไทด์ V ที่ผ่านกระบวนการ RP-HPLC ขั้นตอนที่ 5-8	44
14	โครมาโตแกรมของ FMRFamide มาตรฐานที่ผ่าน กระบวนการ RP-HPLC และผลของ Dot-ELISA	45



บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

ในการควบคุมการทำงานของระบบต่าง ๆ ในร่างกายสัตว์กลุ่มครัสตาเซียน เช่น กุ้งและปู จะมีการควบคุมโดยระบบต่อมไร้ท่อ (endocrine system) ซึ่งเป็นระบบที่เกี่ยวข้องกับต่อมไร้ท่อ (endocrine gland) ซึ่งประกอบด้วย neurosecretory cell และ neurohemal organ โดยที่ neurosecretory cell จะเป็นแหล่งที่ทำหน้าที่ผลิตและสะสมฮอร์โมนที่สร้างขึ้นและปล่อยไปตามจุดต่าง ๆ เมื่อร่างกายต้องการ โดยฮอร์โมนจะแพร่ไปตามเลือดหรือฮีโมลิมฟ์ (hemolymph) ของสัตว์กลุ่มครัสตาเซียน ต่อมไซน์ัส (sinus gland) เป็น neurohemal organ ในก้านตา (eyestalk) ของสัตว์กลุ่มครัสตาเซียน จัดเป็นต่อมที่สำคัญในการสะสมและปล่อยฮอร์โมนที่สร้างจาก neurosecretory cell จากระบบประสาท ซึ่งเรียกว่านิวโรฮอร์โมน (neurohormone) (Fingerman. 1987)

นิวโรฮอร์โมนที่พบในก้านตาของสัตว์กลุ่มครัสตาเซียน เช่น ฮอร์โมนที่ยับยั้งการลอกคราบ (molt inhibiting hormone-MIH) (Chang, Bruce and Newcomb. 1987) ฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดของสัตว์กลุ่มครัสตาเซียน (crustacean hyperglycemic hormone-CHH) (Huberman and Aguilar. 1986) ฮอร์โมนที่ยับยั้งการพัฒนาการของรังไข่ (vitellogenesis inhibiting hormone-VIH หรือ gonad inhibiting hormone-GIH) (Soyez, Deijnen and Martin. 1987) ฮอร์โมนที่ควบคุมการกระจายตัวของรงควัตถุในโครมาโตฟอร์ (pigment dispersing hormone-PDH) (Kleinholz and others. 1986) และฮอร์โมนที่ควบคุมการรวมตัวของรงควัตถุในการเปลี่ยนสีตัว (red pigment concentrating hormone-RPCH) (Ferlund. 1974) สำหรับต่อมไร้ท่อที่สำคัญในสัตว์กลุ่มครัสตาเซียน ได้แก่ X-organ ในก้านตาเป็นแหล่งสร้างนิวโรฮอร์โมนดังกล่าวข้างต้นและส่งไปสะสมที่ต่อมไซน์ัส Postcommissural organ (PCO) เป็นแหล่งที่สะสมและปล่อยนิวโรฮอร์โมนที่เกี่ยวกับการเปลี่ยนสีตัว Pericardial organ (PO) เป็นแหล่งที่สะสมและปล่อยนิวโรฮอร์โมนที่กระตุ้นการทำงานของหัวใจ Y-organ เป็นแหล่งที่สร้าง สะสมและปล่อยฮอร์โมนที่ควบคุมการลอกคราบ Androgenic gland เป็นแหล่งที่สร้าง สะสมและปล่อยฮอร์โมนที่ควบคุมการเจริญเติบโตของอวัยวะเพศผู้ Ovary เป็นแหล่งสร้าง สะสมและปล่อยฮอร์โมนที่ควบคุมการเจริญเติบโตของอวัยวะเพศเมีย (Fingerman. 1987) ฮอร์โมนของสัตว์กลุ่มครัสตาเซียนมีลักษณะเป็นเปปไทด์ฮอร์โมน (peptide hormone) หรือสเตียรอยด์ฮอร์โมน (steroid hormone) เช่น สารคล้าย FMRFamide, small cardioactive peptide (SCP),

substance P, proctolin และ cholecystokinin (CCK) เป็นต้น ซึ่งนิวโรฮอร์โมนเหล่านี้อาจทำหน้าที่เป็นสารสื่อประสาท (neurotransmitter) หรือนิวโรโมดูเลเตอร์ (neuromodulator) โดยพบว่าสารคล้าย FMRFamide เป็นนิวโรฮอร์โมนที่ได้มีการศึกษาในสัตว์ต่าง ๆ มากมาย ตั้งแต่สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังจนถึงสัตว์มีกระดูกสันหลัง โดยมีการศึกษาถึงแหล่งที่ปรากฏ โครงสร้างและการทำงานของสารนี้ พบว่าฮอร์โมนกลุ่มนี้จะมีลำดับกรดอะมิโนที่แตกต่างกันได้หลายรูปแบบและการทำงานก็แตกต่างกันในสัตว์ต่าง ๆ รวมทั้งในสัตว์ชนิดเดียวกันก็สามารถมีสารนี้ได้หลายรูปแบบเช่นกัน (De Loof and Schoofs. 1990)

FMRFamide มีโครงสร้างเป็น tetrapeptide amide ประกอบด้วยกรดอะมิโน 4 หน่วย ได้แก่ เฟนิลอะลานีน (phenylalanine-Phe) เมไทโอนีน (methionine-Met) อาร์จินีน (arginine-Arg) และ เฟนิลอะลานีน มีลำดับกรดอะมิโนเป็น Phe-Met-Arg-Phe-NH₂ จัดเป็นนิวโรเปปไทด์ที่กระตุ้นการทำงานของหัวใจ (cardioexcitatory neuropeptide) ในสัตว์กลุ่มพวกหอย (Mollusc) สามารถแยกสกัดได้เป็นครั้งแรกจากปมประสาทของหอยสองฝา *Macrocallista nimbosa* (Price and Greenberg. 1977) ต่อมาได้มีรายงานการตรวจพบสารที่มีลักษณะโครงสร้างคล้ายกับสาร FMRFamide โดยจะมีโครงสร้างทางด้าน carboxyl terminal (C-terminal) เป็น -Arg-Phe-NH₂ (-RFamide) เหมือนกัน จึงทำให้พบสารนี้ได้หลายรูปแบบ (Dockray and others. 1983; Grimmelikhuijzen and Graff. 1986; Kobayashi and Muneoka. 1986; Krajniak and Price. 1990; Evans and others. 1991) ดังนั้นจึงเรียกสารเหล่านี้ว่าสารคล้าย FMRFamide (FMRFamide-like immunoreactivity-FLI; Trimmer, Kobierski and Kravitz. 1987 หรือ FMRFamide-related peptides-FaRPs; Krajniak. 1991 หรือ FMRFamide-like peptides-FLPs; Sithigorngul and Stretton. 1995) ซึ่งส่วนใหญ่จะพบว่าสารคล้าย FMRFamide จะมีการเรียงลำดับกรดอะมิโน 4 หน่วย ทางด้าน C-terminal เป็น Phe-X-Arg-Phe-NH₂ โดยที่ X อาจจะเป็น Met, Leu หรือ Ile ก็ได้ (Krajniak and Price. 1990) สารเหล่านี้เป็นนิวโรเปปไทด์ที่มีบทบาทต่อการทำงานของระบบต่าง ๆ ของร่างกาย คือกระตุ้นการทำงานของหัวใจ มีผลต่อการทำงานของระบบการหมุนเวียนโลหิตและระบบประสาทในสัตว์ต่าง ๆ (Beltz and Kravitz. 1986)

ในการศึกษาโดยวิธีอิมมูโนไซโตเคมีสทรี (immunocytochemistry) ได้มีรายงานการตรวจพบสารคล้าย FMRFamide ในบริเวณต่าง ๆ ของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังจนถึงสัตว์มีกระดูกสันหลัง ซึ่งส่วนใหญ่จะพบในส่วนของระบบประสาท (nervous system) (Grimmelikhuijzen, Dockray and Schot. 1982; Price. 1982; Grimmelikhuijzen and Graff. 1986; Cowden, Stretton and Davis. 1989;

Krajniak and Price. 1990; Evans and others. 1991; Anderson, Moosler and Grimmelikhuijzen. 1992) ใน pericardial organ (Trimmer, Kobierski and Kravitz. 1987; Krajniak. 1991) และใน ก้านตาของสัตว์กลุ่มครัสเตเชีย (วีระวรรณ ลิทธิกรกุล, ศิวาพร ลงยันต์ และไพศาล ลิทธิกรกุล. 2538; Mangerich and others. 1987; Mangerich and Keller. 1988)

ในสัตว์พวกซีเลนเทอเรท (coelenterate) จะพบสารคล้าย FMRFamide กระจายอยู่ในตัว เซลล์ประสาทและเส้นใยประสาท โดยจะพบจำนวนมากในบริเวณ lower peduncle region ใน เนื้อเยื่อชั้นนอก (ectoderm) ใกล้บริเวณบาซอล ดิสก์ (basal disk) และจะพบจำนวนน้อยในบริเวณ ไฮโปสโตม (hypostome) และหนดในชั้นของเนื้อเยื่อชั้นใน (endoderm) ของไฮดรา *Hydra attenuata* (Grimmelikhuijzen, Dockray and Schot. 1982) ต่อมาในปี 1992 แอนเดอร์สัน, มูสเลอร์ และกริมเมลิคฮุยเซน (Anderson, Moosler and Grimmelikhuijzen. 1992) ได้ศึกษาสารนี้ใน แมงกระพรุน 3 ชนิดคือ *Chrysaora hysoscella*, *Cyanea capillata* และ *Cyanea lamarckii* พบสาร คล้าย FMRFamide ในบริเวณที่คล้ายคลึงกัน โดยจะพบเส้นใยประสาทที่มีสารนี้กระจายในบริเวณ สับอัมเบรลลา (subumbrella) เอ็กอัมเบรลลา (exumbrella) และหนดในชั้นของเนื้อเยื่อชั้นใน และ พบตัวเซลล์ประสาทจำนวนมากในบริเวณหนดในชั้นของเนื้อเยื่อชั้นในเช่นกัน มีรายงานการตรวจ พบสารคล้าย FMRFamide ในสัตว์ในไฟลัมนีมาโทดา (phylum nematoda) กระจายอยู่ในตัวเซลล์ ประสาททั้งในบริเวณหัว หางและเส้นประสาทด้านข้าง (lateral line) ของพยาธิตัวกลม *Ascaris suum* ส่วนใหญ่จะพบสารนี้ในเซลล์ประสาทของวงแหวนรอบคอหอย (nerve ring) และบริเวณผิวของคอ หอย (pharyngeal neuron) โดยเซลล์ประสาทที่มีสารนี้จะทำหน้าที่เป็นทั้ง sensory neuron, interneuron และ motoneuron ซึ่งแสดงว่าสารคล้าย FMRFamide นี้จะมีผลโดยตรงต่อการเคลื่อนไหวของกล้ามเนื้อในพยาธิตัวกลมชนิดนี้ (Cowden and others. 1993) ส่วนในสัตว์พวกแอนเนลิด (annelid) จะพบสารคล้าย FMRFamide ในตัวเซลล์ประสาทและเส้นใยประสาทในส่วนของเส้น ประสาทด้านท้อง (ventral nerve cord) ของระบบประสาทส่วนกลาง (central nervous system) และ ระบบประสาทส่วนปลาย (peripheral nervous system) ของเพรียงดอกไม้ *Sabellastarte magnifica* (Diaz-Miranda, De Motto and Garcia-Arraras. 1991) ส่วนในปลิง *Hirudo medicinalis* พบสาร คล้าย FMRFamide ในเซลล์ประสาทชนิด motoneuron โดยสารนี้จะทำหน้าที่ในการควบคุมเกี่ยวกับการหดตัวของผนังลำตัว (body wall) และถ้ามีปริมาณของสารนี้สูงจะสามารถกระตุ้นความถี่และความ แรงในการหดตัวของกล้ามเนื้อในปลิงชนิดนี้ ทำให้การเคลื่อนที่ของลำตัวเร็วขึ้น (Evans and others. 1991) ในแม่เพรียง *Nereis virens* จะพบสารคล้าย FMRFamide ในตัวเซลล์ประสาทขนาดใหญ่

จำนวน 50 เซลล์ ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10-85 ไมโครเมตรในบริเวณปมประสาทเหนือหลอดอาหาร (supraesophageal ganglia) และปมประสาทใต้หลอดอาหาร (subesophageal ganglia) และจะพบตัวเซลล์ประสาทขนาดเล็กและเส้นใยประสาทกระจายอยู่ในบริเวณรอบ ๆ หลอดอาหาร (circumesophageal ganglia connectives) (Krajniak and Greenberg, 1992)

ในสัตว์พวกมอลลัส เช่น หอยทาก *Achatina fulica* สารคล้าย FMRFamide จะกระจายอยู่ในส่วนของหัวใจ ปมประสาทสมอง (cerebral ganglia) และปมประสาทใต้หลอดอาหาร โดยจะพบสารนี้ในเซลล์ขนาดเล็ก จำนวน 50-70 เซลล์ ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 30-50 ไมโครเมตร ในปมประสาทสมอง และจะพบสารนี้ในตัวเซลล์ประสาทขนาดใหญ่จำนวน 6 เซลล์ มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 200-250 ไมโครเมตรในปมประสาทใต้หลอดอาหาร ส่วนในหัวใจจะพบสารนี้กระจายอยู่ในส่วนของเอเทรียม (atrium) โดยพบว่านิวโรเปปไทด์นี้ทำหน้าที่เป็นนิวโรโมดูเลเตอร์ในวงจรประสาทและเป็นนิวโรฮอร์โมนที่มีผลต่อการทำงานของหัวใจและควบคุมอัตราการเต้นของหัวใจ (Fujiwara-Sakata and Kobayashi, 1994) การศึกษาถึงสารที่กระตุ้นการทำงานของหัวใจในหอย *Rapana thomasiana* 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 เป็นนิวโรเปปไทด์ที่จะไปยับยั้งแอกทิวิตีของสารคล้าย FMRFamide ทำให้ความถี่ในการเต้นของหัวใจลดลง (Kobayashi and Muneoka, 1986) ส่วนในหอย *Mytilus edulis* สารคล้าย FMRFamide จะทำหน้าที่เป็นนิวโรโมดูเลเตอร์ในการยับยั้งแอกทิวิตีของเอ็นไซม์ acetylcholinesterase ในระบบประสาทของหอยชนิดนี้ (Raffa and Bianchi, 1986) ในหอยแครง (sea scallop) *Placopecten magellanicus* จะพบสารคล้าย FMRFamide ในระบบประสาท โดยพบตัวเซลล์ประสาทและเส้นใยประสาทที่มีสารนี้จำนวนมากในปมประสาทสมอง ปมประสาทพีดัล (pedal ganglia) และปมประสาทวิสเซอร์ลัล (visceral ganglia) และพบสารนี้กระจายอยู่จำนวนน้อยในบริเวณอวัยวะสืบพันธุ์ (gonad) หัวใจ และกล้ามเนื้อ (Too and Croll, 1995)

การศึกษาในสัตว์พวกครัสเตเชียจะพบสารคล้าย FMRFamide ในส่วนของ pericardial organ ของกุ้งอเมริกันล็อบสเตอร์ *Homarus americanus* ซึ่งสารนี้จะกระตุ้นการทำงานของหัวใจ (Trimmer, Kobierski and Kravitz, 1987) ส่วนในกุ้งแคริบเบียนล็อบสเตอร์ *Panulirus argus* จะพบสารคล้าย FMRFamide ในส่วนของสมอง ปมประสาทในก้านตา และเส้นประสาทด้านท้อง (Schmidt

and Ache. 1994) การศึกษาถึงแหล่งปรากฏของสารคล้าย FMRFamide ในก้านตาของกุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* พบว่ามีตัวเซลล์ประสาทที่มีสารนี้จำนวนมากกว่า 1000 เซลล์กระจายอยู่ในบริเวณ lamina ganglionalis (LG) บริเวณรอบ ๆ medulla externa (ME) บริเวณระหว่าง medulla interna (MI) และ medulla terminalis (MT) เส้นประสาทตา และต่อมไขมัน โดยจะพบว่าสารนี้กระจายอยู่ในเซลล์ประสาทที่ส่งไปยังบริเวณต่าง ๆ ของปมประสาท ซึ่งแสดงว่าสารคล้าย FMRFamide บางรูปแบบอาจมีบทบาทสำคัญในการส่งกระแสประสาท (nerve impulse) โดยอาจทำหน้าที่เป็นสารสื่อประสาทหรือนิวโรโมดูเลเตอร์ และบางรูปแบบอาจทำหน้าที่เป็นนิวโรฮอร์โมน เนื่องจากแขนงของเซลล์ประสาทบางกลุ่มมีสารนี้ไปสิ้นสุดที่ต่อมไขมัน อันเป็นแหล่งรวบรวมฮอร์โมนสำหรับหลั่งเข้าสู่กระแสโลหิต (วีระวรรณ สัทธกรกุล, ศิวาพร ลงยันต์ และไพศาล สัทธกรกุล. 2538) ได้มีการศึกษาในครัสตาเซียน 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 and others. 1987; Mangerich and Keller. 1988) ส่วนในระบบประสาทของปู *Cancer gracilis* และ *Cancer productus* จะพบสารนี้มีตำแหน่งร่วมกับสาร SCP_B ในปมประสาทบริเวณกระเพาะอาหาร (stomatogastric ganglia) (Callaway, Masinovsky and Graubard. 1987) ต่อมาได้มีการศึกษาโดยนำสารคล้าย FMRFamide ที่แยกสกัดได้จาก pericardial organ จากกุ้งอเมริกันล็อบสเตอร์ *Homarus americanus* มาทดสอบกับปู *Cancer magister* พบว่าสารนี้จะมีผลในการเพิ่มความแรงและความถี่ในการเต้นของหัวใจรวมทั้งเพิ่มอัตราการไหลของฮีโมลิม์ (Mc.Gaw and Mc.Mahon. 1995)

ในสัตว์พวกแมลง พบว่าในตั๊กแตน *Schistocerca gregaria* จะมีสารคล้าย FMRFamide ในส่วนของกล้ามเนื้อเอ็กเท็นเซอร์ของทibia (extensor tibia muscle) ของขาหลัง ซึ่งสารนี้จะเพิ่มอัตราการหดตัวและการคลายตัวของกล้ามเนื้อ โดยจะทำให้ความแรงของการหดตัวของกล้ามเนื้อเพิ่มขึ้น (Evan and Myers. 1986) และจะพบสารนี้ในตัวเซลล์ประสาทในปมประสาทส่วนอก (thoracic ganglia) ของแมลงวัน *Calliphora vomitoria* และพบในส่วน of ปมประสาทส่วนท้อง (abdominal ganglia) ของแมลงหวี่ *Drosophila melanogaster* (Lunquist and Nassel. 1990) ในแมลงจำพวกมวน *Rhodnius prolixus* พบสารนี้ในตัวเซลล์ในระบบประสาทส่วนกลางประมาณ 200 เซลล์ ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7.5-35 ไมโครเมตร โดยจะพบตัวเซลล์ในส่วน of สมองจำนวน 100

เซลล์ ในปมประสาทได้หลั่งอาหาร จำนวน 40 เซลล์ ในปมประสาทส่วนอกด้านหน้า (prothoracic ganglia) จำนวน 26 เซลล์ และกระจายอยู่ในส่วนของระบบประสาทที่กระเพาะอาหาร (stomatogastric nervous system) บริเวณนิวโรฮีมาล (neurohemal sites) และเส้นประสาทส่วนปลาย (peripheral nerve) บ้างเล็กน้อย (Tsang and Orchard. 1991)

ในสัตว์มีกระดูกสันหลัง เช่นในปลา *Scyliorhinus canicula* จะพบสารคล้าย FMRFamide ในส่วนของสมองและต่อมใต้สมอง หรือต่อมพิทูอิทารี (pituitary gland) โดยจะพบตัวเซลล์ที่มีสารนี้จำนวนมากในสับพาลเลียม (subpallium) และพบจำนวนน้อยในส่วนไฮโปธาลามัส (hypothalamus) นอกจากนี้ยังพบเส้นใยประสาทในสมองส่วนของเทเลนเซฟาลอน (telencephalon) และไดเอนเซฟาลอน (diencephalon) อีกด้วย (Vallarino and others. 1991) ในสัตว์ปีกจะพบสารคล้าย FMRFamide ในสมองไก่ โดยพบว่าถ้ามีปริมาณของสารนี้สูงจะมีผลทำให้ความดันโลหิตสูงขึ้น (Dockray and others. 1983) และจะพบสารนี้ในปริมาณสูงในส่วนไฮโปธาลามัส และพบในปริมาณต่ำในส่วนซีรีเบลลัม (cerebellum) และสเตรียตัม (striatum) ในสมองหนู (Dockray and Williams. 1983) ส่วนในระบบประสาทส่วนกลางของลิง จะพบตัวเซลล์ที่มีสารนี้กระจายอยู่ในส่วนของ amygdaloid complex, olfactory tubercle, cerebral cortex, basal ganglia, septum, caudate-putamen และ arcuate nucleus และพบเส้นใยประสาทบริเวณซีรีบรัล คอร์เทกซ์ (cerebral cortex) จนถึงไฮโปธาลามัส (Chen, Tsai and Shen. 1989)

ดังนั้นจากรายงานการตรวจพบสารคล้าย FMRFamide พบว่าจะกระจายอยู่ในส่วนต่าง ๆ ของร่างกายสัตว์ และเป็นเปปไทด์ฮอร์โมนที่มีความสำคัญต่อการทำงานของระบบต่าง ๆ ของร่างกาย เช่น ระบบหมุนเวียนโลหิต การทำงานของหัวใจ ระบบประสาท และระบบกล้ามเนื้อของสัตว์ต่าง ๆ ตั้งแต่สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังจนถึงสัตว์มีกระดูกสันหลัง

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในปี ค.ศ. 1977 ไพรซ์และกรีนเบิร์ก (Price and Greenberg, 1977) ได้แยกสกัดสารที่กระตุ้นการทำงานของหัวใจ (cardioexcitatory agent) จากปมประสาทของหอยสองฝา *Macrocallista nimbosa* โดยใช้เทคนิคทางโครมาโตกราฟีชนิด gel filtration, ion exchange chromatography และ thin layer chromatography ศึกษาลักษณะโครงสร้างของสารสกัดโดยนำไปหาลำดับกรดอะมิโนโดยใช้ Edman dansyl degradation และ tryptic digestion พบว่าสารนี้มีโครงสร้างเป็น tetrapeptide amide และมีลำดับกรดอะมิโนเป็น Phe-Met-Arg-Phe-NH₂ (FMRFamide) จากนั้นนำสารนี้ไปตรวจสอบทางชีวภาพกับกล้ามเนื้อหัวใจของหอยชนิดนี้ พบว่าถ้ามีปริมาณความเข้มข้นของสาร FMRFamide ที่แยกสกัดได้ประมาณ 10⁻⁸ โมล/ลิตร จะสามารถกระตุ้นอัตราการเต้นของหัวใจ ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้ถือว่าเป็นการแยกสกัดสาร FMRFamide ซึ่งเป็นนิวโรเปปไทด์ที่กระตุ้นการทำงานของหัวใจได้เป็นครั้งแรก

ต่อมาได้มีรายงานการศึกษาถึงการทำให้บริสุทธิ์ (purification) และการศึกษาถึงคุณลักษณะ (characterization) ของสาร FMRFamide และสารคล้าย FMRFamide ต่อการทำงานของระบบต่าง ๆ ของร่างกายของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังและสัตว์มีกระดูกสันหลังดังนี้

ในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง ได้มีการศึกษาสารคล้าย FMRFamide ของสัตว์ในไฟลัมซีเลนเทอราตา (phylum coelenterata) โดยใช้กรดอะซิติก (acetic acid) สกัดสารนี้จากระบบประสาทของไฮดรา *Hydra attenuata* จากนั้นนำมาผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟี (column chromatography) ชนิด gel filtration (Sephadex G-50 superfine) พบว่าสารนี้มีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกับสาร FMRFamide มาตรฐาน และใช้วิธี radioimmunoassay (RIA) ในการหาปริมาณของสารคล้าย FMRF พบว่ามีสารนี้ประมาณ 8 ± 5 พิโกโมลต่อตัวของไฮดรา (Grimmelikhuijzen, Dockray and Schot, 1982) ส่วนในแมงกระพรุน *Chrysaora hysoscella*, *Cyanea capillata*, *Cyanea lamarckii* ได้มีรายงานการสกัดสารคล้าย FMRFamide จากหนวด และเนื้อเยื่อในส่วนสับอัมเบรลลาของแมงกระพรุนทั้ง 3 สปีชีส์โดยใช้กรดอะซิติก ใช้วิธี RIA ในการหาปริมาณของสารคล้าย FMRFamide ในสารสกัด พบว่ามีปริมาณสารนี้ประมาณ 55 นาโนโมลต่อตัวของแมงกระพรุน (Anderson, Moosler and Grimme-likhuijzen, 1992) และได้มีการศึกษาสารคล้าย FMRFamide ในระบบประสาทของดอกไม้ทะเล *Anthopleura elegantissima* โดยสกัดด้วยกรดอะซิติกเช่นกัน นำไปผ่าน C18 Sep-Pak cartridge แล้วชะ (elute) สารสกัดด้วยเมทานอล 60 เปอร์เซ็นต์ นำไปผ่านคอลัมน์ cation exchange chromatography (CM-Sephadex G-25) จากนั้นนำไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้กระบวนการ RP-HPLC (reversed phase high

performance liquid chromatography) 6 ขั้นตอน โดยใช้คอลัมน์ Spherisorb ODS-2, Partisil ODS-3, Nucleosil C18, Spherisorb C8, Nucleosil propyl nitrile และ Nucleosil propylphenyl ใช้ระบบตัวทำละลาย 1 ระบบ คือ acetonitrile/ trifluoroacetic acid (ACN/TFA) ใช้วิธี RIA ในการติดตามสารระหว่างการทำให้บริสุทธิ์และหาปริมาณสาร พบว่ามีปริมาณสารคล้าย FMRFamide ประมาณ 3.2 ± 0.5 นาโนโมลต่อกรัมของสารสกัด จากนั้นนำไปหาลำดับกรดอะมิโนโดยวิธี Edman dansyl degradation พบว่าเป็นสารนิวโรเปปไทด์ที่มีลำดับกรดอะมิโนเป็น Glu-Gly-Arg-Phe-NH₂ (EGRFamide) (Grimmelikhuijzen and Graff. 1986)

ในปี 1989 คาวเดน, สเตรทตัน และเดวิด (Cowden, Stretton and David. 1989) ได้ศึกษาสารคล้าย FMRFamide จากกระบบประสาทของสัตว์พวกนีมาโทด (nematode) โดยการแยกสกัดสารนี้จากส่วนหัวของพยาธิไส้เดือน *Ascaris suum* ด้วยสารละลายเมทานอล-กรดอะซิติก (เมทานอล : กรดอะซิติก : น้ำ / 90 : 1 : 9) นำไปผ่าน C18 Sep-Pak cartridge จะสารสกัดออกด้วย 50% ACN/ 0.1% TFA ทำให้บริสุทธิ์โดยใช้กระบวนการ RP-HPLC 5 ขั้นตอน โดยใช้คอลัมน์ Whatman Partisil 5 ODS-3 และ Spherogel TSK 2500 PWHF ใช้ระบบตัวทำละลาย 3 ระบบคือ butanol/ TFA, ACN/TFA และ ACN/HFBA (heptafluorobutyric acid) ใช้วิธี RIA ในการติดตามสารระหว่างการทำให้บริสุทธิ์ หาลำดับกรดอะมิโนโดยใช้ Edman degradation พบว่าเป็นสาร heptapeptide amide และตั้งชื่อว่า AF1 มีลำดับกรดอะมิโนเป็น Lys-Asn-Glu-Phe-Ile-Arg-Phe-NH₂ (KNEFIRFamide) ต่อมาในปี 1995 คาวเดน และสเตรทตัน (Cowden and Stretton. 1995) ได้ศึกษาสารคล้าย FMRFamide ในพยาธิไส้เดือน *Ascaris suum* สกัดสารนี้จากส่วนหัวและหาง โดยใช้สารละลายเมทานอล-กรดอะซิติก (เมทานอล : กรดอะซิติก : น้ำ / 90 : 1 : 9) เช่นเดิม ผ่าน C18 Sep-Pak cartridge จะสารสกัดออกด้วย 50% ACN/ TFA ทำให้บริสุทธิ์โดยใช้กระบวนการ RP-HPLC 7 ขั้นตอน ใช้คอลัมน์ PrepPak C18, Whatman Magnum ODS-3, Cyano, Phenyl ใช้ระบบตัวทำละลาย 3 ระบบ คือ ACN/TFA, ACN/HFBA และ ACN/TEA (triethylamine) ใช้วิธี RIA ในการติดตามสารในระหว่างการทำให้บริสุทธิ์ หาลำดับกรดอะมิโนและน้ำหนักโมเลกุลใช้ automated Edman degradation, Matrix assisted laser desorption ionization mass spectrometry (MALDI-MS) พบสารคล้าย FMRFamide อีก 8 รูปแบบ ดังตาราง 1

ตาราง 1 ลำดับกรดอะมิโนของสารคล้าย FMRFamide ในระบบประสาทของพยาธิไส้เดือน
Ascaris suum ที่พบเพิ่มเติม (Cowden and Stretton. 1995)

ชื่อ	ลำดับกรดอะมิโน (Amino acid sequence)	น้ำหนักโมเลกุล (ดาลตัน)
AF3	AVPGVLRamide	857.7
AF4	GDVPGVLRamide	958.4
AF5	SGKPTFIRamide	1051.1
AF7	AGPRFIRamide	962.6
AF9	GLGPRPLRamide	1011.4
AF10	GFGDEMSMPGVLRamide	1573.2
AF11	SDIGISEPNFLRamide	1493.6
AF12	FGDEMSMPGVLRamide	1516.2

การศึกษาสาร FMRFamide และสารคล้าย FMRFamide ของสัตว์ในไฟลัมแอนเนลิดา (phylum annelida) โดยการสกัดสารนี้ในระบบประสาทของแม่เพรียง *Nereis virens* ด้วยอะซิโตน (acetone) ทำให้บริสุทธิ์ด้วยกระบวนการ RP-HPLC 2 ขั้นตอน โดยใช้คอลัมน์ Octyl C8 และใช้ระบบตัวทำละลาย 2 ระบบ คือ ACN/TFA และ butanol/TFA ใช้วิธี RIA ในการติดตามสารระหว่างการทำให้บริสุทธิ์และหาปริมาณสารนี้ พบว่ามีสารนี้ประมาณ 100-600 เฟมโตโมลต่อตัวของแม่เพรียง เมื่อหาลำดับกรดอะมิโนและน้ำหนักโมเลกุลโดยใช้ microsequencing analysis และ fast atom bombardment mass spectrometry (FAB-MS) พบว่าเป็นสาร tetrapeptide amide มีลำดับกรดอะมิโนเป็น Phe-Met-Arg-Phe-NH₂ (FMRFamide) มีน้ำหนักโมเลกุล 615.31 ดาลตัน (Krajniak and Price. 1990) ต่อมาในปี 1991 อีแวนส์และคนอื่นๆ (Evans and others. 1991) ได้สกัดสารคล้าย FMRFamide จากเส้นประสาท (nerve cord) ของปลิง *Hirudo medicinalis* ด้วยสารละลายเมทานอล-กรดอะซิติก (เมทานอล : กรดอะซิติก : น้ำ / 90 : 9 : 1) นำไปผ่าน C18 Sep-Pak cartridge จะสารสกัดออกด้วยเมทานอล ทำให้บริสุทธิ์โดยใช้กระบวนการ RP-HPLC 4 ขั้นตอน ใช้คอลัมน์ C18 μ Bondapak และ C18 Microsorb ใช้ระบบตัวทำละลาย 2 ระบบคือ ACN/TFA และ ACN/

HFBA ติดตามสารในระหว่างการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี RIA นำไปหาลำดับกรดอะมิโนด้วย Edman degradation พบสาร FMRFamide และสารคล้าย FMRFamide 4 รูปแบบ โดยมีลำดับกรดอะมิโนเป็น FLRFamide, YMRFamide, YLRFamide และ GGKYMRFamide

ในสัตว์กลุ่มพวกหอย (Mollusc) ก็มีการศึกษาโดยการสกัดสารคล้าย FMRFamide จากปมประสาทของหอยทาก *Helix aspersa* ด้วยอะซิโตน 80 เปอร์เซ็นต์ นำไปผ่าน C18 Sep-Pak cartridge จะสารสกัดออกด้วยเมทานอล จากนั้นนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคทางโครมาโตกราฟีชนิด cation exchange chromatography, thin layer chromatography และ RP-HPLC โดยใช้ระบบ isocratic และใช้คอลัมน์ C18 ติดตามสารระหว่างการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้วิธี RIA นำไปหาลำดับกรดอะมิโนโดยใช้ microsequencing analysis พบว่ามีลำดับกรดอะมิโนเป็น pGlu-Asp-Phe-Ile-Arg-Phe-NH₂ (pEDFIRFamide) (Price, 1982)

การศึกษาราคคล้าย FMRFamide ของสัตว์ในไฟลัมอาร์โธรโปดา (phylum arthropoda) ได้มีการศึกษาในสัตว์พวกครัสเตเชีย โดยการสกัดสารจากระบบประสาทส่วน pericardial organ ของกุ้งอเมริกันล็อบสเตอร์ *Homarus americanus* ด้วยสารละลายเมทานอล-กรดอะซิติก (เมทานอล : กรดอะซิติก : น้ำ / 90 : 1 : 9) ทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคทางโครมาโตกราฟีชนิด gel filtration (Sephadex G-25 superfine) และกระบวนการ RP-HPLC 3 ขั้นตอน โดยนำสารสกัดมาผ่าน C18 Sep-Pak cartridge จะสารสกัดออกด้วย 40% ACN/ 0.1% TFA ใช้คอลัมน์ C18 μ Bondapak และ C18 Supherisorb และใช้ระบบตัวทำละลาย 2 ระบบคือ ACN/TFA และ methanol/TFA ใช้วิธีติดตามสารระหว่างการทำให้บริสุทธิ์ด้วย RIA หาลำดับกรดอะมิโนโดยใช้ Edman degradation พบสารนี้ 2 รูปแบบ คือ Ser-Asp-Arg-Asn-Phe-Leu-Arg-Phe-NH₂ (SDRNFLRFamide) และ Thr-Asn-Arg-Asn-Phe-Leu-Arg-PheNH₂ (TNRNFLRFamide) (Trimmer, Kobierski and Kravitz, 1987) ส่วนการศึกษาในกุ้งก้ามกราม ได้มีรายงานการแยกสกัดและการทำให้บริสุทธิ์เบื้องต้นของสารคล้าย FMRFamide จากก้ามกุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* ด้วยสารละลายเมทานอล-กรดอะซิติก (เมทานอล : กรดอะซิติก : น้ำ / 90 : 1 : 9) และใช้กระบวนการ RP-HPLC ในการทำให้บริสุทธิ์ขั้นตอนแรก ใช้คอลัมน์ C18 Vydac ใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA และใช้วิธี Dot-ELISA (Dot Enzyme Linked Immunosorbent Assay) ในการตรวจสอบสารหลังจากแยกด้วยกระบวนการ RP-HPLC แล้ว พบว่าสารคล้าย FMRFamide กระจายอยู่ถึง 13 แฟรคชัน (fraction) ซึ่งคาดว่าในก้ามกุ้งก้ามกราม อาจมีสารคล้าย FMRFamide หลายรูปแบบในปริมาณที่ต่างกัน (วีระวรรณสิทธิกรกุล, ศิวาพร ลงยันต์ และไพศาล สิทธิกรกุล, 2538) ส่วนในปูม้า (blue crab) *Callinectes*

sapidus ได้สกัดสารคล้าย FMRFamide จาก pericardial organ และปมประสาทส่วนอกด้วยอะซิโตน ทำให้บริสุทธิ์ด้วยกระบวนการ RP-HPLC ใช้คอลัมน์ C18 Novapak และ Octyl C8 ใช้ระบบตัวทำละลาย 3 ระบบ คือ ACN/TFA, ACN/HFBA และ isopropanol/TFA ติดตามสารในระหว่างการทำให้บริสุทธิ์ด้วย RIA นำไปหาลำดับกรดอะมิโนและหาน้ำหนักโมเลกุลโดยใช้ microsequencing analysis และ FAB-MS พบว่ามีลำดับกรดอะมิโนเป็น Gly-Tyr-Asn-Arg-Ser-Phe-Leu-Arg-Phe-NH₂ (GYNRSFLRFamide) มีน้ำหนักโมเลกุล 1158 คาลตัน (Krajniak. 1991)

ในสัตว์กลุ่มพวกแมลง ซึ่งจัดอยู่ในไฟลัมอาร์โธรโปดาเช่นกัน ได้มีการศึกษาสารคล้าย FMRFamide ในระบบทางเดินอาหารตอนปลาย (hind gut) โดยการสกัดสารนี้จากหัวของแมลงสาบ *Leucophaea maderae* ด้วยสารละลายเมทานอล-กรดอะซิติก (เมทานอล : กรดอะซิติก : น้ำ / 90 : 1 : 9) ผ่าน C18 Sep-Pak cartridge จะสารสกัดออกด้วย 30% ACN/ 0.1% TFA (Holman, Cook and Nachman. 1986a) ทำให้บริสุทธิ์ด้วยกระบวนการ RP-HPLC ใช้คอลัมน์ μ Bondapak phenyl, Techsphere C18 และ Water I-125 Protein-Pac ใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA ใช้วิธีทางชีวภาพในการตรวจสอบสารระหว่างการทำให้บริสุทธิ์ นำไปหาลำดับกรดอะมิโนและหาน้ำหนักโมเลกุลโดยใช้ automated peptide sequencer และ mass spectroscopy พบว่ามีลำดับกรดอะมิโนเป็น pGlu-Asp-Val-Asp-His-Val-Phe-Leu-Arg-Phe-NH₂ (pEDVDHVFLRFamide) และมีน้ำหนักโมเลกุล 1257.7 คาลตัน โดยตั้งชื่อสารนี้ว่า Leucomyosuppressin (LMS) และจากการศึกษาพบสาร LMS ในปริมาณ 0.23 พิโคโมลต่อหัวของแมลงสาบ (Holman, Cook and Nachman. 1986b) ต่อมาในปี 1989 โรบบ แพคแมน และอีแวน (Robb, Packman and Evan. 1989) ได้ศึกษาสารคล้าย FMRFamide ในแมลงเช่นกัน โดยสกัดสารนี้จากระบบประสาทในส่วนเส้นประสาทส่วนอก (thoracic nerve cord) ของตั๊กแตน *Schistocerca gregaria* โดยใช้สารละลายเมทานอล-กรดอะซิติก (เมทานอล : กรดอะซิติก : น้ำ / 90 : 9 : 1) ทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ gel filtration (Sephadex G-15) และ RP-HPLC 2 ขั้นตอน ใช้คอลัมน์ C18 μ Bondapak และ C8 RP300 ใช้ระบบตัวทำละลาย 2 ระบบคือ ACN/HFBA และ ACN/TEA นำไปผ่าน C18 Sep-Pak cartridge จะสารสกัดออกด้วย 90% methanol/ 0.1% TFA ใช้วิธี RIA ในระหว่างการทำให้บริสุทธิ์ และหาลำดับกรดอะมิโนโดยใช้ Edman degradation พบว่ามีลำดับกรดอะมิโนเป็น Pro-Asp-Val-Asp-His-Val-Phe-Leu-Arg-Phe-NH₂ (PDVDHVFLRFamide)

ในสัตว์มีกระดูกสันหลัง ได้มีการศึกษาสารคล้าย FMRFamide ในสัตว์ปีกมีรายงานการสกัดสารนี้ในสมองไก่ โดยใช้ น้ำเคือดและกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5 โมล/ลิตร นำไปผ่าน C18 Sep-Pak cartridge จะสารสกัดออกด้วย ACN จากนั้นนำไปผ่านกระบวนการโครมาโตกราฟีชนิด cation

exchange chromatography (CM-Sephadex), gel filtration (Sephadex G-25) และ RP-HPLC ชนิด isocratic 3 ขั้นตอน ใช้คอลัมน์ C18 Vydac และ Phenyl ใช้ระบบตัวทำละลายเป็น ACN/TFA และใช้วิธี RIA ในระหว่างการทำให้บริสุทธิ์และหาปริมาณสาร พบว่ามีปริมาณสารคล้าย FMRFamide ประมาณ 5-8 พิโคโมลต่อกิโกรัมของสมองไก่ นำไปหาลำดับกรดอะมิโนโดยใช้ microsequencing analysis พบว่าเป็นสาร pentapeptide amide มีลำดับกรดอะมิโนเป็น Leu-Pro-Leu-Arg- Phe-NH₂ (LPLRFamide) (Dockray and others. 1983) ส่วนในหนู ได้มีการศึกษาสารคล้าย FMRFamide โดยการสกัดสารนี้จากสมองหนูโดยใช้สารสกัดเช่นเดียวกับการสกัดสารนี้จากสมองไก่ คือ ใช้น้ำเดือดและกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5 โมล/ลิตร ทำให้บริสุทธิ์โดยใช้กระบวนการทางโครมาโตกราฟีชนิด cation exchange chromatography (CM-Sephadex), gel filtration (Sephadex G-50 superfine) และใช้วิธี RIA ในการติดตามสารระหว่างการทำให้บริสุทธิ์และหาปริมาณ พบว่าสารนี้มีน้ำหนักโมเลกุลสูงและมีปริมาณสูงในไขสันหลังและไฮโปทาลามัส โดยพบว่ามีประมาณ 10 พิโคโมลต่อกรัมของสารสกัด และมีปริมาณต่ำในซีรีเบลลัมและสเตรียตัม (striatum) ซึ่งมีประมาณ 3.5 พิโคโมลต่อกรัมของสารสกัด (Dockray and Williams. 1983) ต่อมาในปี 1985 ดอคเครย์ (Dockray. 1985) ได้ศึกษาต่อโดยการสกัดสารคล้าย FMRFamide จากไขสันหลังของหนูโดยใช้วิธีการสกัดเช่นเดิม คือ ใช้น้ำเดือดและกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5 โมล/ลิตร นำไปผ่าน C18 Sep-Pak cartridge จะสารสกัดออกด้วย 50% ACN/ 0.1% TFA แล้วนำไปผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟีชนิด cation exchange chromatography (CM-Sephadex) และ RP-HPLC 3 ขั้นตอน ใช้คอลัมน์ C18 Techsil, Spherisorb Phenyl และ C18 Vydac ใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA ติดตามสารในระหว่างการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ RIA เมื่อหาลำดับกรดอะมิโนโดยใช้ microsequencing analysis พบว่ามีลำดับกรดอะมิโนเป็น Phe-Leu-Phe-Gln-Pro-Gln-Arg-Phe-NH₂ (FLFQPQRFamide หรือ F-8-F-NH₂)

ในปี 1991 สิทธิกรกุล, สเตรทตัน และคาวเดน (Sithigorngul, Stretton and Cowden. 1995) ได้พัฒนาวิธี Dot-ELISA ในการติดตามและตรวจหาเปปไทด์ฮอร์โมนที่มีขนาดเล็ก ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโนในช่วง 4-38 หน่วย และมีปริมาณน้อยอยู่ในช่วง 2-10 เฟมโตโมล หลังจากผ่านการแยกสารด้วยกระบวนการ RP-HPLC แล้ว ซึ่งวิธีการนี้เป็นวิธีที่ทำได้ง่าย สะดวก ไม่ต้องใช้เครื่องมือซับซ้อน และไม่ต้องใช้สารกัมมันตภาพรังสีที่ราคาแพงและอันตรายเหมือนวิธี RIA สามารถใช้วิธีการนี้ในการตรวจหาและติดตามสารคล้าย FMRFamide และสารคล้าย CCK ซึ่งเป็นเปปไทด์ฮอร์โมนที่มีขนาดเล็ก และมีปริมาณน้อยในระหว่างการทำให้บริสุทธิ์ด้วยกระบวนการ RP-HPLC จากพยาธิไส้เดือน *Ascaris suum* ได้สำเร็จ ต่อมาในปี 1995 สิทธิกรกุลและสเตรทตัน (Sithigorngul

and Stretton. 1995) ก็ได้สกัดสารคล้าย FMRFamide จากระบบประสาทของหนอนตัวกลม *Caenorhabditis elegans* โดยใช้สารละลายเมทานอล-กรดอะซิติก (เมทานอล : กรดอะซิติก : น้ำ / 90 : 1 : 9) นำไปผ่าน C18 Sep-Pak cartridge จะสารสกัดออกด้วย 50% ACN/ 0.1% TFA จากนั้นนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยกระบวนการ RP-HPLC 8 ขั้นตอน โดยใช้คอลัมน์ Delta-Pak C18, Microsorb-MV, Cyano, Microsorb-MV Phenyl และ Microsorb-MV C8 ใช้ระบบตัวทำละลาย 2 ระบบคือ ACN/TFA และ ACN/HFBA ใช้วิธี Dot-ELISA ในการติดตามสารระหว่างการทำให้บริสุทธิ์ หากลำดับกรดอะมิโนและน้ำหนักโมเลกุลโดยใช้ automated Edman degradation และ Maldi-MS พบสารคล้าย FMRFamide 9 รูปแบบ และมีน้ำหนักโมเลกุลดังตาราง 2

ตาราง 2 ลำดับกรดอะมิโนของสารคล้าย FMRFamide ในระบบประสาทของ หนอนตัวกลม *Caenorhabditis elegans* (Sithigorngul and Stretton. 1995)

ลำดับกรดอะมิโน	น้ำหนักโมเลกุล (ดาลตัน)
KHEYLRFamide	991.9
KPSFVRFamide	879.4
KNEFIRFamide	952.6
RNKFEFIRFamide	1256.2
APEASPFIRFamide	1134.1
HFYNFSSES RKPNFLRFamide	2175.1
SDNPFLRFamide	994.8
SADPNFLRFamide	1065.5
AAADPNFLRFamide	1120.5

จากรายงานการศึกษาการทำให้บริสุทธิ์ของสารคล้าย FMRFamide และลักษณะโครงสร้างของสารนี้ในสัตว์ต่าง ๆ ตั้งแต่สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังจนถึงสัตว์มีกระดูกสันหลัง (ตาราง 3) จะพบในส่วนของระบบประสาท pericardial organ และก้านตา (สัตว์ในกลุ่มครัสเตเชีย) โดยใช้กระบวนการ RP-HPLC ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารนี้จะต้องมีบทบาทสำคัญต่อระบบการทำงานของร่างกายใน

สัตว์ต่าง ๆ เหล่านี้ และจากรายงานการตรวจพบสารนี้ในก้านตาของกุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* โดยวิธีอิมมูโนไซโตเคมีสทรี พบสารนี้กระจายอยู่ในตัวเซลล์ประสาทและเส้นใยประสาท ในบริเวณต่าง ๆ ของก้านตากลุ่มก้ามกราม (วีระวรรณ สิทธิกรกุล, ศิวาพร ลงยันต์ และไพศาล สิทธิกรกุล. 2538) จึงเป็นที่น่าสนใจในการศึกษาโดยการทำให้บริสุทธิ์สารนี้จากก้านตาของกุ้งก้ามกราม เพื่อนำไปหาลักษณะโครงสร้างต่อไป

ดังนั้นการศึกษาค้างนี้จึงเป็นการแยกและการทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย FMRFamide จากก้านตากลุ่มก้ามกราม โดยกระบวนการ RP-HPLC ระบบต่าง ๆ ประกอบกับใช้วิธี Dot-ELISA ในการติดตามสารคล้าย FMRFamide ในแฟรคชันต่าง ๆ หลังจากการแยกด้วยกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนต่าง ๆ แล้ว ซึ่งคาดว่าวิธี Dot-ELISA สามารถทำได้อย่างมีประสิทธิภาพและรวดเร็ว เพราะวิธีนี้เป็นวิธีที่มีความไว (sensitivity) สูงเทียบเท่ากับ RIA แต่ไม่สิ้นเปลืองวัสดุและมีความรวดเร็วกว่า RIA มาก (Sithigorngul, Stretton and Cowden. 1991)

การที่เลือกกุ้งก้ามกรามมาใช้เป็นสัตว์ทดลอง เนื่องจากกุ้งก้ามกรามเป็นสัตว์ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย ความต้องการของผู้บริโภคมีปริมาณเพิ่มขึ้นอยู่ตลอดเวลาจึงมีการเพาะเลี้ยงกันมาก ดังนั้นถ้าสามารถแยกและทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย FMRFamide ซึ่งเป็นเปปไทด์ฮอร์โมนจากก้านตาของกุ้งก้ามกรามให้บริสุทธิ์ได้ ก็สามารถนำไปศึกษาถึงโครงสร้างของเปปไทด์ฮอร์โมนนี้ก่อนที่จะศึกษาถึงบทบาทของฮอร์โมนที่มีผลต่อกระบวนการทางสรีระและการดำรงชีวิตของกุ้งก้ามกรามอันอาจเป็นประโยชน์ต่อการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามต่อไปได้

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

ตาราง 3 ลำดับกรดอะมิโนของสารคล้าย FMRFamide ที่พบในสัตว์ต่าง ๆ

ไฟลัม/สปีชีส์	ลำดับกรดอะมิโน
Coelenterata	
<i>Anthopleura elegans</i> (Grimmelikhuijzen and Graff. 1986)	Glu-Gly-Arg-Phe-NH ₂
Nematoda	
<i>Ascaris suum</i> (Cowden, Stretton and Davis. 1989)	Lys-Asn-Glu-Phe-Ile-Arg-Phe-NH ₂
<i>Ascaris suum</i> (Cowden and Stretton. 1995)	Ala-Val-Pro-Gly-Val-Leu-Arg-Phe-NH ₂ Gly-Asp-Val-Pro-Gly-Val-Leu-Arg-Phe-NH ₂ Ser-Gly-Lys-Pro-Thr-Phe-Ile-Arg-Phe-NH ₂ Ala-Gly-Pro-Arg-Phe-Ile-Arg-Phe-NH ₂ Gly-Leu-Gly-Pro-Arg-Pro-Leu-Arg-Phe-NH ₂ Gly-Phe-Gly- Asp-Glu-Met-Ser-Met-Pro-Gly-Val-Leu-Arg-Phe-NH ₂ Ser- Asp-Ile-Gly-Ile-Ser-Glu-Pro-Asn-Phe-Leu-Arg-Phe-NH ₂ Phe-Gly- Asp-Glu-Met-Ser-Met-Pro-Gly-Val-Leu-Arg-Phe-NH ₂
<i>Caenorhabditis elegans</i> (Sithigorngul and Stretton. 1995)	Lys-His-Glu-Tyr-Leu-Arg-Phe-NH ₂ Lys-Pro-Ser-Phe-Val-Arg-Phe-NH ₂ Lys-Asn-Glu-Phe-Ile-Arg-Phe-NH ₂ Arg-Asn-Lys-Phe-Glu-Phe-Ile-Arg-Phe-NH ₂ Ala-Pro-Glu-Ala-Ser-Pro-Phe-Ile-Arg-Phe-NH ₂ His-Phe-Tyr-Asn-Phe-Ser- Ser-Glu-Ser-Arg-Lys-Pro-Asn-Phe-Leu-Arg-Phe-NH ₂ Ser-Asp-Asn-Pro-Phe-Leu-Arg-Phe-NH ₂

ตาราง 3 (ต่อ)

ไฟล์ม/สปีชีส์	ลำดับกรดอะมิโน
	Ser-Ala-Asp-Pro-Asn-Phe-Leu-Arg-Phe-NH ₂ Ala-Ala-Ala-Asp-Pro-Asn-Phe-Leu-Arg-Phe-NH ₂
Annelida	
<i>Nereis virens</i> (Krajniak and Price. 1990)	Phe-Met-Arg-Phe-NH ₂
<i>Hirudo medicinalis</i> (Evan and others. 1991)	Phe-Met-Arg-Phe-NH ₂ Phe-Leu-Arg-Phe-NH ₂ Tyr-Met-Arg-Phe-NH ₂ Tyr-Leu-Arg-Phe-NH ₂ Gly-Gly-Lys-Tyr-Met-Arg-Phe-NH ₂
Mollusca	
<i>Macrocallista nimbosa</i> (Price and Greenberg. 1977)	Phe-Met-Arg-Phe-NH ₂
<i>Helix aspersa</i> (Price. 1982)	pGlu-Asp-Phe-Ile-Arg-Phe-NH ₂
Arthropoda	
<i>Homarus americanus</i> (Trimmer, Kobierski and Kravitz. 1987)	Ser-Asp-Arg-Asn-Phe-Leu-Arg-Phe-NH ₂ Thr-Asn-Arg-Asn-Phe-Leu-Arg-Phe-NH ₂ Gly-Tyr-Asn-Ser-Phe-Leu-Arg-Phe-NH ₂
<i>Callinectes sapidus</i> (Krajniak. 1991)	
<i>Leucophaea maderae</i> (Holman, Cook and Nachman. 1986)	pGlu-Asp-Val-Asp-His-Val-Phe-Leu-Arg-Phe-NH ₂
<i>Schistocerca gregaria</i> (Robb, Packman and Evans. 1989)	Pro-Asp-Val-Asp-His-Val-Phe-Leu-Arg-Phe-NH ₂

ตาราง 3 (ต่อ)

ไฟลัม/สปีชีส์	ลำดับกรดอะมิโน
Chordata	
Chicken (Dockray and others. 1983)	Leu-Pro-Leu-Arg-Phe-NH ₂
Rat (Dockray. 1985)	Phe-Leu-Phe-Gln-Pro-Gln-Arg-Phe-NH ₂

ชีววิทยาของกุ้งก้ามกราม

กุ้งก้ามกราม (Giant fresh water prawn หรือ Giant river prawn) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Macrobrachium rosenbergii* อยู่ในวงศ์ Palaemonidae กุ้งก้ามกรามเป็นกุ้งน้ำจืดขนาดใหญ่มีก้ามใหญ่ ขาวสีครามสดถึงสีครามแก่ ขนาดใหญ่ที่เคยพบมีลำตัวยาวถึง 30 เซนติเมตรและมีน้ำหนักถึง 470 กรัม กุ้งก้ามกรามในแต่ละท้องถิ่นจะมีชื่อเรียกแตกต่างกันออกไป เช่น กุ้งใหญ่ แม่กุ้ง(ภาคใต้) กุ้งนาง กุ้งแห และกุ้งหลวง ลักษณะสีของกุ้งก้ามกรามโดยทั่วไปมีสีน้ำเงิน และบางท้องถิ่นที่พบว่าเป็นสีน้ำตาลปนแดง พบทั่วไปในแหล่งน้ำจืดธรรมชาติที่ติดต่อกับทะเลและแหล่งน้ำกร่อย บริเวณปากแม่น้ำ ลำคลอง และทะเลสาบ มีกระจายอยู่ทั่วไปในภูมิภาคแถบอินโดแปซิฟิก มีกระจายอยู่เกือบทั่วทุกภาคของประเทศไทย ภาคกลางมีปริมาณชุกชุมในลุ่มแม่น้ำเจ้าพระยา แม่น้ำท่าจีน แม่น้ำบางปะกง ภาคใต้มีมากในทะเลสาบสงขลา แม่น้ำตาปี แม่น้ำปัตตานี กุ้งก้ามกรามเป็นสัตว์น้ำที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจเป็นที่นิยมบริโภคของชาวไทย จึงมีราคาสูง ดังนั้นการจับกุ้งชนิดนี้จากแหล่งธรรมชาติจึงไม่เพียงพอ กรมประมงจึงได้ทำการเพาะขยายพันธุ์กุ้งก้ามกรามได้ตั้งแต่ปี 2512 เพื่อผลิตพันธุ์ลูกกุ้งก้ามกรามในการจำหน่ายแจกให้แก่เกษตรกรผู้เพาะเลี้ยง (มารุต ทรัพย์สุขสำราญ. 2520, ชนดี มุสิก. 2529, กลุ่มบัณฑิตเกษตรอาสา สาขาประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2530)

กุ้งก้ามกรามจัดอยู่ในจำพวกสัตว์น้ำที่ไม่มีกระดูกสันหลัง มีการจัดลำดับหมวดหมู่ทางอนุกรมวิธาน ดังนี้ (Dore and Frimodt. 1987)

Phylum	Arthropoda
Subphylum	Mandibulata
Class	Crustacea
Subclass	Malacostraca
Order	Decapoda
Suborder	Natantia
Infraorder	Caridea
Superfamily	Palaemonoidea
Family	Palaemonidae
Genus	<i>Macrobrachium</i>
Species	<i>rosenbergii</i>

ลักษณะที่สำคัญของกุ้งก้ามกราม คือ มีเปลือกคลุมตัว ลำตัวแบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ หัว ออก และท้อง ส่วนหัวและอกรวมกันเป็นปล้องเดียวกัน บนเปลือกคลุมหัว (carapace) ทางส่วนหน้ามีหนาม (spine) 2 อัน คือ เฮพาทิก สไปน์ (hepatic spine) และอินเทอร์นอล สไปน์ (internal spine) สองข้างแก้มมีร่องบรานคิโอสเตกัล (branchiostegal groove) ปรากฏอยู่ทั้งสองข้าง กรี (rostrum) มีลักษณะแบนข้างยาวเรียว โคนกรีหนาและนูน ตรงกลางโค้งแอ่นลง ปลายงอนขึ้น มีหยักคล้ายฟันเลื่อย สันกรील่างมีหยักประมาณ 8-14 หยัก สันกรีบนมีหยักประมาณ 12-15 หยัก ตามีก้านดาวยาวยื่นออกมาและเคลื่อนไหวได้หลายทิศทาง ส่วนลำตัวแบ่งออกเป็นปล้อง ๆ รวม 6 ปล้อง มีหนวด 2 คู่ ประกอบด้วยหนวดสั้น (antennule) และหนวดยาว (antenna) ซึ่งกึ่งใช้ในการสัมผัส มีขาเดิน (perciopod) ทำหน้าที่ในการเคลื่อนที่ จับอาหารและทำความสะอาดลำตัว มีจำนวน 3 คู่ ขาเดินคู่ที่ 1 และคู่ที่ 2 มีลักษณะเป็นก้าม (chelate) โดยขาคู่ที่ 1 ใช้ในการจับอาหารเข้าปาก และทำความสะอาดร่างกาย ส่วนขาคู่ที่ 3 มีขนาดยาวและใหญ่กว่าขาคู่ที่ 1 ใช้ประโยชน์ในการต่อสู้และจับเหยื่อ กุ้งจะใช้ส่วนของแมกซิลล่า (maxillae) ซึ่งมีสองคู่ และแมนดิเบิล (mandible) มี 1 คู่ ใช้ในการฉีกอาหารให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ เพื่อส่งผ่านไปยังหลอดอาหาร และกระเพาะตอนหลัง (pyloric) ส่วนท้องมี 5 ปล้อง มีขาว่ายน้ำ (pleopod) จำนวน 5 คู่ ปลายสุดเป็นหาง ประกอบด้วยแพนหาง (uropod) ข้างละ 1 คู่ ตรงส่วนกลางเป็นหางแหลม (telson) มีหนาม 4 คู่ ด้านบน 2 คู่ ตอนปลายอีก 1 คู่ (อาจ แจ่มเมฆ. 2519, บรรจง เทียนส่งรัมย์. 2521, ชมรมพัฒนาการประมง สโมสรนิสิตคณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2524 และปิยะพงศ์ โชติพันธ์. 2529)

ความแตกต่างของกุ้งก้ามกรามเพศผู้และเพศเมีย

กุ้งก้ามกรามที่มีขนาดโตเต็มวัยสามารถที่จะแยกเพศผู้และเพศเมียได้ง่าย คือ ตัวผู้จะมีขนาดใหญ่กว่าตัวเมีย ก้ามของกุ้งตัวผู้จะมีขนาดใหญ่กว่าก้ามของกุ้งตัวเมีย ช่องว่างระหว่างเปลือกหุ้มตัว (pleura) หรือช่องใต้ท้องของเพศผู้แคบกว่าเพศเมีย ขาวายน้ำ 4 คู่แรกของกุ้งตัวเมียมีขนาดเล็กละเอียดเห็นได้ชัดในฤดูวางไข่ ช่องสืบพันธุ์ (genital pore) ของเพศผู้อยู่ที่โคนขาคู่ที่ 5 ส่วนของเพศเมียอยู่ที่โคนขาเดินคู่ที่ 3 ที่ขาวายน้ำคู่ที่ 2 ของเพศเมียประกอบด้วยแอฟเพนดิก อินเทอร์น่า (appendix interna) และแอฟเพนดิก มาสคูลิน่า (appendix masculina) สำหรับขาวายน้ำคู่ที่ 2 ของเพศเมียประกอบด้วยแอฟเพนดิก อินเทอร์น่าเพียงอันเดียว (มารุต ทรัพย์สุขสำราญ. 2520, บรรจง เทียนส่งรัตน์. 2521, ชมรมพัฒนาการประมงสโมสรมิสิตคณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2524, ปิยะพงศ์ โชติพันธ์. 2529)



ภาพประกอบ 1 ภาพกุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii*

รูปบน เพศผู้ รูปล่าง เพศเมีย

ความมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า

1. เพื่อแยกสารคล้าย FMRFamide จากก้านตาของกุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* โดยที่สารยังคงสภาพอยู่
2. เพื่อทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย FMRFamide รูปแบบต่าง ๆ จากสารสกัดจากก้านตาของกุ้งก้ามกรามด้วยกระบวนการ RP-HPLC

ความสำคัญของการศึกษาค้นคว้า

1. สามารถเตรียมสารสกัดจากก้านตาของกุ้งก้ามกราม โดยที่ยังคงสภาพของฮอร์โมนที่ต้องการตรวจหาได้
2. สามารถใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ FMRFamide ในการตรวจหาสารคล้าย FMRFamide ในระหว่างการทำให้บริสุทธิ์ โดยวิธี Dot-ELISA ได้
3. สามารถทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย FMRFamide จากก้านตาของกุ้งก้ามกรามด้วยกระบวนการ RP-HPLC ได้

ขอบเขตของการศึกษาค้นคว้า

1. สกัดสารคล้าย FMRFamide จากก้านตาของกุ้งก้ามกราม
2. ทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย FMRFamide จากสารสกัดจากก้านตาของกุ้งก้ามกรามด้วยกระบวนการ RP-HPLC
3. ใช้วิธี Dot-ELISA ในการตรวจหาสารคล้าย FMRFamide ในระหว่างการทำให้บริสุทธิ์ด้วยกระบวนการ RP-HPLC
4. เตรียมเปปไทด์มาตรฐาน โดยใช้วิธี Dot-ELISA เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบปริมาณของสารคล้าย FMRFamide ที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์
5. ประเมินปริมาณของสารคล้าย FMRFamide ที่ทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนสุดท้าย โดยการเปรียบเทียบความเข้มของสีกับ FMRF immunoreactivity บนแผ่นไนโตรเซลลูโลส และเปรียบเทียบพีค (peak) ของสารคล้าย FMRFamide ที่ทำให้บริสุทธิ์กับพีคของเปปไทด์มาตรฐานที่รู้ปริมาณ

นิยามศัพท์เฉพาะ

1. สารคล้าย FMRFamide หมายถึง เปปไทด์ฮอร์โมนที่สามารถจับกับแอนติบอดีต่อ FMRFamide ส่วนใหญ่จะมีโครงสร้างทางด้านปลายของหมู่คาร์บอกซิลิก (carboxyl terminal) เป็น อาร์จินีน-ฟีนิลอะลานีนเอมิด (-Arg-Phe-NH₂; -RFamide)
2. RP-HPLC หรือ Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography หมายถึง กระบวนการโครมาโตกราฟีโดยใช้ระบบเคลื่อนที่ (mobile phase) เป็นของเหลวที่มีขั้ว (polar) และวัสดุที่ใช้ในการแยกสารในคอลัมน์ (packing material) เป็นสารที่ไม่มีขั้ว (non-polar) หรือมีขั้วน้อยมาก ซึ่งเป็นสารที่มีประสิทธิภาพสูงในการแยกสาร
3. Dot-ELISA หรือ Dot Enzyme Linked Immunosorbent Assay หมายถึง วิธีการที่ใช้ตรวจหาแอนติเจนที่มีปริมาณน้อยได้ถึงในระดับเฟมโตโมล (femtomole) โดยอาศัยหลักการทำปฏิกิริยากันระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการตรวจหา

บทที่ 2

วิธีการวิจัย

สัตว์ทดลอง

กึ่งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* ตัวโตเต็มวัย น้ำหนักประมาณ 15-35 กรัม จาก
อำเภอพระนครศรีอยุธยา จังหวัดพระนครศรีอยุธยา

อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์

1. เครื่องมือผ่าตัด
2. ครกหิน
3. เครื่องบด (homogenizer, Janke & Kunkel)
4. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge, Sigma Z-15)
5. เครื่องระเหยแห้ง (speed vacuum concentrator, Savant)
6. เครื่อง HPLC (high performance liquid chromatography, Gilson)
7. คอลัมน์ (column)

PrepPak C18	ขนาด 25 X 100 มิลลิเมตร (Waters)
PrepPak C8	ขนาด 25 X 100 มิลลิเมตร (Waters)
C8	ขนาด 4.6 X 250 มิลลิเมตร (Microsorb-MV, Rainin)
Cyano	ขนาด 4.6 X 250 มิลลิเมตร (Microsorb-MV, Rainin)
Phenyl	ขนาด 4.6 X 250 มิลลิเมตร (Microsorb-MV, Rainin)
8. เครื่องโซนิเคเตอร์ (sonicator, Crest)
9. เครื่องชั่ง
10. ตู้เย็น (refrigerator, Whirlpool) และอุณหภูมิต่ำ (ultrafreezer, -70°C, Revco)
11. ตู้อบ (hot air oven, Memmert)
12. C18 Sep-Pak cartridge (Waters)
13. แผ่นไนโตรเซลลูโลส (nitrocellulose membrane, Schleicher & Schuell)

14. ออโทปีเปต พร้อมทิพ (autopipette & tip)
15. ปีเปต พร้อมลูกยาง
16. ขวดรูปกรวยมีแขน (suction flask)
17. เครื่องดูดอากาศ (suction pump) พร้อมอุปกรณ์
18. กระบอกลีด
19. หลอดเซนตริฟิวส์ขนาดเล็ก 1.5 มิลลิลิตร (microcentrifuge tube)
20. หลอดพลาสติก
21. หลอดเซนตริฟิวส์
22. กล่องพลาสติกมีฝาปิด

สารเคมี

1. Methyl alcohol (analytical grade, Merck)
2. Glacial acetic acid (analytical grade, Merck)
3. Acetonitrile (ACN, HPLC grade, Lab Scan)
4. Trifluoroacetic acid (TFA, HPLC grade, Sigma)
5. Heptafluorobutyric acid (HFBA, HPLC grade, Sigma)
6. Bovine serum albumin (BSA, Sigma)
7. 0.15 M phosphate buffered saline (PBS) pH 7.2
(วิธีเตรียมดูภาคผนวก)
8. 25% glutaraldehyde (Sigma)
9. 5% blotto (5% non-fat dry milk, 0.1% triton X-100, 0.01% merthiolate ใน PBS)
(วิธีเตรียมดูภาคผนวก)
10. 30% hydrogenperoxide (H_2O_2)
11. Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Sigma)
12. 1% cobalt chloride ($CoCl_2$)

13. Antibody

FM-23 (mouse anti-FMRFamide antiserum)

AF1-62 (mouse anti-KNEFIRFamide antiserum)

แอนติบอดีทั้งสองได้รับความอนุเคราะห์จาก Dr. A.O.W. Stretton, University of Wisconsin-Madison ซึ่งแอนติบอดีทั้งสองเป็นโมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody) ผลิตโดยการปลูกภูมิคุ้มกันหนูขาวด้วย FMRFamide (FM-23) หรือ KNEFIRFamide (AF1-62) เชื่อมต่อกับ BSA โดยที่แอนติบอดีทั้งสองมีความจำเพาะกว้าง (broad specificity) และมีแรงจับสูง (high affinity) ต่อเปปไทด์ที่ประกอบด้วย -RFamide

14. Goat antimouse IgG H and L chain horseradish peroxidase conjugate
(GAM-HRP, Biorad)

15. FMRFamide (standard peptide, Sigma)

16. น้ำแข็งแห้ง

วิธีดำเนินการทดลอง

การทดลองประกอบด้วยขั้นตอนต่าง ๆ ดังต่อไปนี้คือ

1. การเก็บรวบรวมตัวอย่างกล้ามเนื้อ
2. การเตรียมสารสกัดจากกล้ามเนื้อของกิ้งก่า (ภาพประกอบ 2)
3. การเตรียมสารสกัดจากกล้ามเนื้อก่อนนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยกระบวนการ RP-HPLC
4. การทำให้สารละลาย FMRFamide จากกล้ามเนื้อของกิ้งก่าบริสุทธิ์ด้วยกระบวนการ RP-HPLC
5. การตรวจสอบสารละลาย FMRFamide ในกล้ามเนื้อของกิ้งก่าโดยวิธี Dot-ELISA หลังจากแยกด้วยกระบวนการ RP-HPLC (ภาพประกอบ 3)
6. เตรียมเปปไทด์มาตรฐานที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ด้วยวิธี Dot-ELISA

1. การเก็บรวบรวมตากุ้งก้ามกราม

ตัดตากุ้งก้ามกรามตัวโตเต็มวัย โดยใช้กรรไกรตัดบริเวณโคนของตากุ้งที่ยังมีชีวิตอยู่ แห่ตาที่ตัดได้ให้แห้งทันทีในน้ำแข็งแห้ง แล้วนำไปเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -70°C จนกระทั่งนำมาใช้

2. การเตรียมสารสกัดจากก้านตา (eyestalk extract) ของกุ้งก้ามกราม

นำตากุ้งที่เก็บรวบรวมไว้ 5,000 ตา มาบดให้เป็นผงละเอียดในขณะเย็นจัด ซึ่งจะบดรวมกับน้ำแข็งแห้งโดยใช้ครกหินในสภาวะที่เย็นจัดที่วางบนน้ำแข็งแห้ง แล้วสกัดสารจากก้านตาด้วยสารละลายเมทานอล-กรดอะซิติก (เมทานอล : กรดอะซิติก : น้ำ / 90 : 1 : 9) โดยนำผงละเอียดของตากุ้งใส่ลงในสารละลายเมทานอล-กรดอะซิติก ในปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร/ตา บดอีกครั้งด้วยเครื่องบด (homogenizer) แล้วพักในตู้เย็นอุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง เพื่อให้การสกัดเกิดโดยสมบูรณ์ จากนั้นนำไปปั่นแยกตะกอนออกโดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงด้วยแรงเหวี่ยง 10,000 g เป็นเวลา 15 นาที แยกเอาส่วนน้ำใส (supernatant) เก็บไว้ ส่วนตะกอนที่เหลือนำไปสกัดซ้ำอีกครั้งด้วยสารละลายเมทานอล-กรดอะซิติก นำไปปั่นแยกด้วยแรงเหวี่ยงเท่าเดิม รวมส่วนน้ำใสที่ได้จากการสกัดทั้งสองครั้งเข้าด้วยกัน นำสารสกัดที่ได้ไประเหยแห้งเพื่อกำจัดตัวทำละลายเมทานอลและกรดอะซิติกออกจนหมดด้วยเครื่องระเหยแห้ง (speed vacuum concentrator) เติม 1% TFA ในปริมาณที่ทำให้มีความเข้มข้นสุดท้ายในสารสกัดเป็น 0.1% TFA ปั่นแยกตะกอนอีกครั้งด้วยแรงเหวี่ยง 10,000 g เป็นเวลา 15 นาที แยกส่วนน้ำใสเก็บไว้ซึ่งเป็นสารสกัดจากก้านตาของกุ้งก้ามกราม วิธีการทำดัดแปลงจากวิธีการของ Cowden and others. 1993

3. การเตรียมสารสกัดจากก้านตาก่อนนำไปทำหับวิธีด้วยกระบวนการ RP-HPLC

นำสารสกัดจากก้านตาที่ได้จากข้อ 2 ไปผ่าน C18 Sep-Pak cartridge เพื่อดูดซับสารสกัดไว้ จากนั้นจึงชะด้วยตัวทำละลาย 50% ACN/ 0.1% TFA ระเหยตัวทำละลาย ACN ออกจนหมดด้วยเครื่องระเหยแห้ง นำไปเติมสารละลาย 80% ACN/ 0.1% TFA เพื่อปรับให้สารสกัดอยู่ในสารละลาย ACN ที่มีความเข้มข้นประมาณ 15% วิธีการทำดัดแปลงจากวิธีการของ Sithigorngul and Stretton. 1995

4. การทำให้บริสุทธิ์ของสารคล้าย FMRFamide จากก้านตาของกุ้งก้ามกรามด้วยกระบวนการ RP-HPLC

นำสารสกัดจากก้านตาที่ได้จากข้อ 3. ไปปั่นด้วยแรงเหวี่ยง 10,000 g เป็นเวลา 15 นาที แยกเอาส่วนสารละลายใสไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC 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) ทุก ๆ 1 นาที เลือกแฟรคชันที่มีสารคล้าย FMRFamide แล้วนำมาแยกสารคล้าย FMRFamide ให้บริสุทธิ์มากขึ้นโดยผ่านคอลัมน์ PrepPak C8, Cyano, Phenyl, และ C8 และใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA และ ACN/HFBA วิธีการทำดัดแปลงจากวิธีการของ Sithigorngul and Stretton. 1995

5. การตรวจหาสารคล้าย FMRFamide ในก้านตาของกุ้งก้ามกราม โดยวิธี Dot-ELISA หลังจากแยกด้วยกระบวนการ RP-HPLC

แบ่งแต่ละแฟรคชัน (10-25 ก้านตา/จุด) ที่รวบรวมได้จากการผ่านกระบวนการ RP-HPLC มาผสมกับโปรตีน 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 อบแผ่นไนโตรเซลลูโลสที่หยดสารแต่ละแฟรคชันให้แห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปบดต่อในไอของ 0.4% glutaraldehyde ที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 8 ชั่วโมง (ในขั้นตอนนี้ทำโดยวางแผ่นไนโตรเซลลูโลสไว้ในกล่องปิดฝาสนิทที่มีไอของ glutaraldehyde) นำไปฟิสิกซ์ (fix) ต่อด้วยสารละลาย 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 (ภาพประกอบ 3) แล้วนำไปตรวจดูความเข้มของสีในแต่ละจุด โดยบริเวณที่มีเปปไทด์คล้าย FMRFamide ที่ต้องการตรวจหาจะปรากฏเป็นสีเทาแกมน้ำเงินให้เห็น ซึ่งความเข้มของสีจะแปรผันโดยตรงกับปริมาณเปปไทด์ที่ปรากฏในจุดนั้น ๆ นำผลที่ได้จาก Dot-ELISA ไปเปรียบเทียบกับพีค (peak) ที่ได้จากโครมาโตแกรม (chromatogram) เพื่อใช้เลือกแฟรคชันที่จะนำไปผ่านกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนต่อไป วิธีการทำดัดแปลงจากวิธีการของ Sithigorngul, Stretton and Cowden. 1991

6. การเตรียมเปปไทด์มาตรฐาน (standard peptide) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ด้วยวิธี

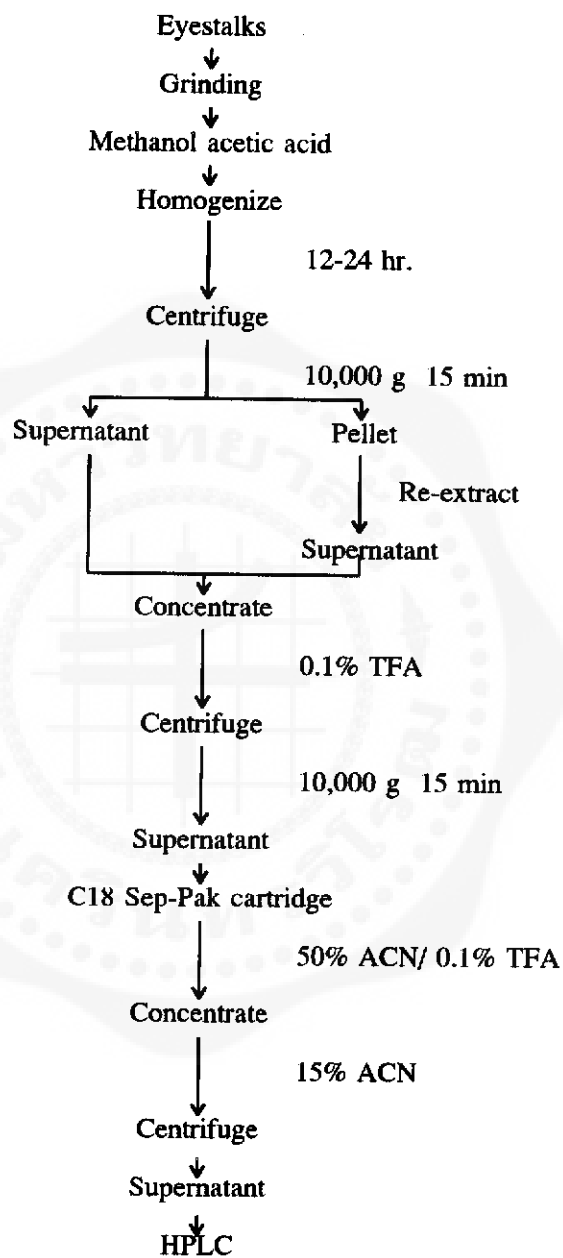
Dot-ELISA

นำเปปไทด์มาตรฐาน FMRFamide ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 598.8 คาลตัน มีความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาเจือจางด้วย BSA ที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรโดยเจือจางทีละ 2 เท่า (serial dilution) แล้วหยดเปปไทด์มาตรฐานลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเรียงตามลำดับความเข้มข้นจากมากไปน้อย หลังจากนั้นจึงทำตามวิธีการในข้อ 5. ใช้ความเข้มของสีในแต่ละจุดที่มีความเข้มข้นของเปปไทด์ FMRFamide มาตรฐานเพื่อเปรียบเทียบกับเปปไทด์ที่ได้จากการผ่านกระบวนการ RP-HPLC เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี Dot-ELISA แล้ว วิธีการทำดัดแปลงจากวิธีการของ Sithigorngul, Stretton and Cowden. 1991

การวิเคราะห์ข้อมูล

1. ตรวจสอบการเกิดสีของแต่ละแฟรคชันที่ได้จากการผ่านกระบวนการ RP-HPLC ชั้นแรกซึ่งหยดบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมื่อเสร็จกระบวนการ Dot-ELISA แล้ว เพื่อนำแฟรคชันที่ติดสีไปแยกด้วย RP-HPLC ในขั้นตอนต่อไป
2. เปรียบเทียบความเข้มของสีของจุดที่เกิดขึ้นกับความเข้มของสีของเปปไทด์มาตรฐาน (FMRFamide) ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ บนแผ่นไนโตรเซลลูโลส เมื่อผ่านกระบวนการ Dot-ELISA แล้ว
3. คุณลักษณะและความสูงของพีคจากโครมาโตแกรมที่ได้จากกระบวนการ RP-HPLC ในแต่ละขั้นตอน โดยดูเทียบกับพีคของ FMRFamide ที่ทราบปริมาณ และ FMRFamide immuno-reactivity บนแผ่นไนโตรเซลลูโลสจากผลที่ได้จาก Dot-ELISA ในขั้นตอนนั้น ๆ

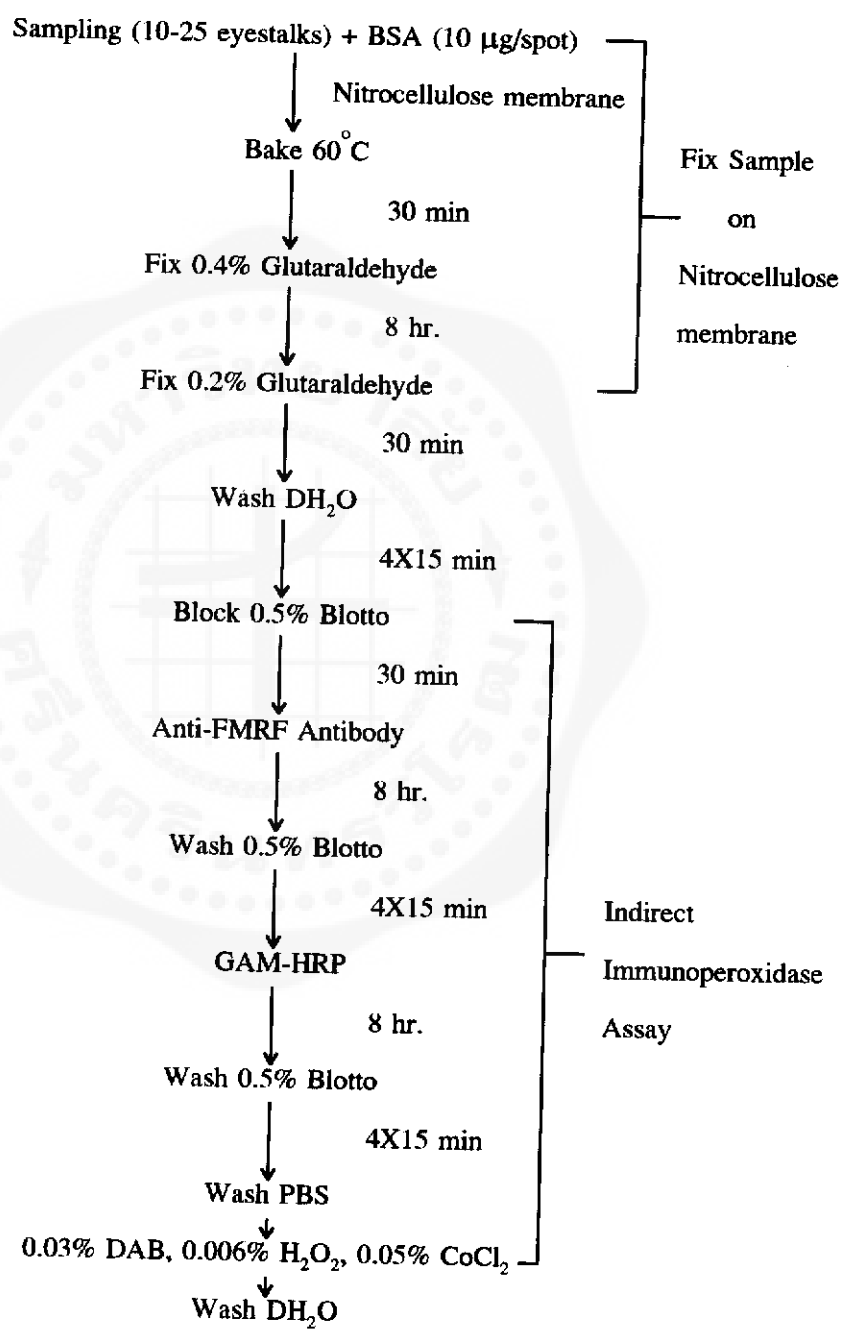
Preparation of Eyestalk Extract



ภาพประกอบ 2 ขั้นตอนวิธีการเตรียมสารสกัดจากก้านตากุ้งก้ามกราม

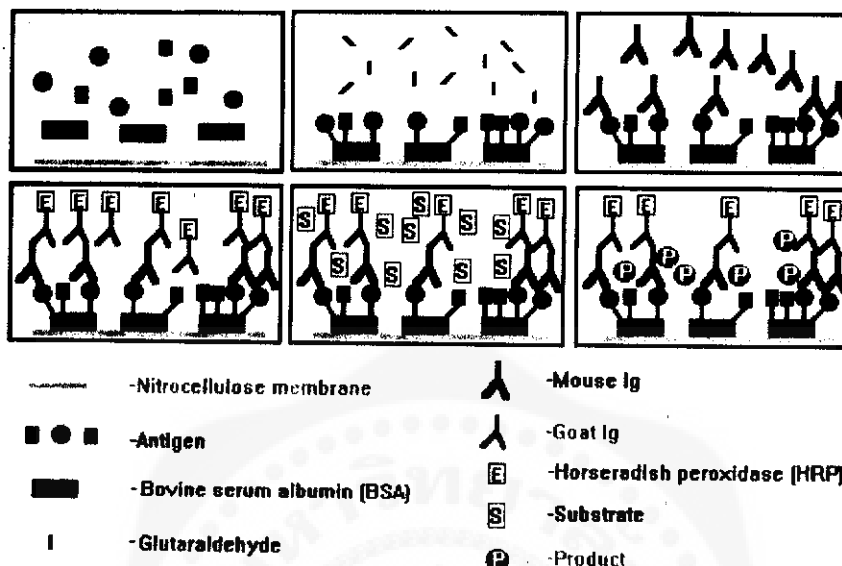
Dot-ELISA

(Dot Enzyme Linked Immunosorbent Assay)



ภาพประกอบ 3 ขั้นตอนวิธีการของ Dot-ELISA ในการตรวจหาสารคล้าย FMRFamide

Dot-ELISA



ภาพประกอบ 4 สรุปหลักการของ Dot-ELISA เพื่อตรวจหาแอนติเจน (ขั้นตอนจากซ้ายไปขวา และ บนลงล่าง) 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

บทที่ 3

ผลการวิจัย

1. FMRFamide มาตรฐานที่ใช้เปรียบเทียบกับสารคล้าย FMRFamide ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว

จากการใช้เปปไทด์มาตรฐาน FMRFamide ปริมาณ 500 นาโนกรัม ผ่านกระบวนการ RP-HPLC โดยใช้คอลัมน์ Cyano ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA ซึ่งคล้ายกับขั้นตอนสุดท้ายของการทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย FMRFamide พบพีคของ FMRFamide อยู่ในช่วง 1 นาที ความสูงของพีคประมาณ 150 มิลลิโวลต์ (ภาพประกอบ 14.1) 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 (ภาพประกอบ 14.2) ซึ่งจะใช้ความเข้มสุดท้ายของสีจุดที่สามารถตรวจสอบได้โดยใช้วิธี Dot-ELISA (156 พิโคโมล) เทียบเท่ากับสารคล้าย FMRFamide ปริมาณ 1 หน่วย

2. การทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย FMRFamide จากก้านตักก้ามกรามโดย RP-HPLC ในขั้นตอนแรก

จากการนำสารสกัดจากก้านตักจำนวน 5,000 ก้านมาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์ PrepPak C18 (25 X 100 มิลลิเมตร) โดยใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA (20-80 %B การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้น 1 %B ต่อนาที อัตราการไหลของสารละลาย 5 มิลลิตรต่อนาที และเก็บแฟรคชันทุก ๆ 1 นาที) โดยแบ่งสารสกัดผ่านคอลัมน์ 3 ครั้ง ครั้งแรก 1,000 คา ครั้งที่ 2 และ 3 ประมาณครั้งละ 2,000 คา เมื่อแบ่งสารละลายในแต่ละแฟรคชันมาตรวจหาสารคล้าย FMRFamide โดยวิธี Dot-ELISA พบการกระจายของสารคล้าย FMRFamide กระจายอยู่ในแฟรคชันต่าง ๆ คล้ายกันทั้ง 3 ครั้ง (ภาพประกอบ 5) คือพบในช่วงแฟรคชันที่ 26-40 และแฟรคชันที่ 47-48 โดยช่วงพีคที่มีความเข้มของสารคล้าย FMRFamide สูงสุดอยู่ในแฟรคชันที่ 30 และ 37-38 ดังนั้นในการทำให้บริสุทธิ์ขั้นตอนต่อไปจึงรวมแฟรคชันที่ 26-31 (กลุ่มที่ 1) และ 36-38 (กลุ่มที่ 2) ของการแยกด้วย RP-HPLC ทั้ง

3 ครั้งเข้าด้วยกัน ส่วนแฟรคชันที่ 32-35, 39-40 และ 47-48 ความเข้มของสารคล้าย FMRamide อยู่ในระดับต่ำมาก จึงยังไม่นำมาศึกษาในการทดลองนี้

3. การทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย FMRamide จากก้านตาข่ายแก้วกรมในขั้นตอนที่ 2

จากการทำให้บริสุทธิ์สารสกัดจากก้านตาข่ายแก้วในขั้นตอนที่สองโดยใช้คอลัมน์ PrepPak C8 (25 X 100 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/HFBA (35-90 %B การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้น 1 %B ต่อนาที อัตราการไหลของสารละลาย 5 มิลลิตรต่อนาที และเก็บแฟรคชันทุก ๆ 1 นาที) พบการกระจายของสารคล้าย FMRamide ในแฟรคชันที่ 33 และ 35-37 (จากตัวอย่างที่ได้จากแฟรคชันของกลุ่มที่ 1 ในขั้นตอนที่ 1) และแฟรคชันที่ 45 (จากตัวอย่างที่ได้จากแฟรคชันของกลุ่มที่ 2 ในขั้นตอนที่ 1) (ภาพประกอบ 6) ความเข้มของสารคล้าย FMRamide ค่อนข้างสูงในทุกแฟรคชัน จึงรวบรวมแฟรคชันที่พบสารคล้าย FMRamide ของแต่ละกลุ่มเข้าด้วยกันเพื่อใช้ผ่านคอลัมน์ในขั้นตอนต่อไป

4. การทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย FMRamide จากก้านตาข่ายแก้วกรมในขั้นตอนที่ 3

ในขั้นตอนที่ 3 ใช้ Microsorb-MV Cyano column (4.6 X 250 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA (20-30 %B การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้น 0.5 %B ต่อนาทีในช่วงแรก และ 30-70 %B การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้น 1 %B ต่อนาที อัตราการไหลของสารละลาย 1 มิลลิตรต่อนาที) สารคล้าย FMRamide กระจายติดต่อกันในแฟรคชันที่ 26-34 (จากแฟรคชันของกลุ่มที่ 1) และแฟรคชันที่ 45-47 และ 49 (จากแฟรคชันของกลุ่มที่ 2) (ภาพประกอบ 7) จึงได้แยกแต่ละแฟรคชันออกมาทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่อไป บางแฟรคชันเท่านั้นที่สามารถนำมาแยกจนแน่ใจว่าได้เปปไทด์บริสุทธิ์จำนวน 5 ชนิด ซึ่งจะกล่าวถึงขั้นตอนการแยกบริสุทธิ์ของเปปไทด์แต่ละตัวโดยใช้ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์แตกต่างกันเล็กน้อย

สำหรับการทำให้บริสุทธิ์ของเปปไทด์ทั้ง 5 ชนิด ในขั้นตอนที่ 4 และ 5 จะใช้กระบวนการทำให้บริสุทธิ์เหมือนกันคือ ในขั้นตอนที่ 4 ใช้ Microsorb-MV Cyano column (4.6 X 250 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/HFBA (25-40 %B การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้น 0.5 %B ต่อนาทีในช่วงแรก และ 40-70 %B การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้น 1 %B ต่อนาที อัตราการไหล 1 มิลลิตรต่อนาที) (ภาพประกอบ 8) และในขั้นตอนที่ 5 ใช้ Microsorb-MV Phenyl column (4.6 X 250 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA (25-40 %B การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้น 0.5 %B ต่อนาทีในช่วงแรกและ 40-65 %B การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้น 1 %B ต่อนาที อัตราการไหล 1 มิลลิตรต่อนาที)

5. การทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย FMRFamide เปปไทด์ I

การทำให้บริสุทธิ์เปปไทด์ I ในขั้นตอนที่ 6 ใช้ Microsorb-MV C8 column (25 X 100 มิลลิเมตร) ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA ขั้นตอนที่ 7 ใช้คอลัมน์เดิมแต่ใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/HFBA แทน และในขั้นตอนที่ 8 ใช้คอลัมน์และระบบตัวทำละลายเหมือนกับขั้นตอนที่ 4 จะพบว่า ในขั้นตอนที่ 4 โครมาโตแกรมให้ฟีกกว้างเพียงฟีกเดียว (ภาพประกอบ 8) แต่เมื่อนำไปผ่านการทำให้บริสุทธิ์ขั้นตอนที่ 5, 6 และ 7 จะพบว่าสารคล้าย FMRFamide เปปไทด์ I อยู่ปะปนกับสารอื่น ๆ จนกระทั่งในขั้นตอนที่ 8 จึงปรากฏเป็นฟีกเดียว (ภาพประกอบ 9) ซึ่งเมื่อนำไปทดสอบโดยผ่านคอลัมน์เดิมอีกครั้งไม่พบร่องรอยของสารปนเปื้อนจึงเชื่อว่าได้เปปไทด์ I ที่ค่อนข้างบริสุทธิ์ ค่าความสูงของฟีกประมาณ 5 มิลลิโวลต์ ซึ่งเมื่อประมาณปริมาณของเปปไทด์ I เทียบกับฟีกของ FMRFamide มาตรฐานแล้วคาดว่าเปปไทด์ที่ได้มีประมาณ 17 นาโนกรัม ค่าความเข้มของจุดประมาณ 8 หน่วยต่อ 25 ก้านตา ดังนั้นปริมาณของเปปไทด์ I เมื่อเทียบกับปริมาณเปปไทด์เริ่มต้นในการทำให้บริสุทธิ์ขั้นตอนที่ 1 เท่ากับร้อยละ 4 ของเปปไทด์กลุ่มที่ 1

6. การทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย FMRFamide เปปไทด์ II และ III

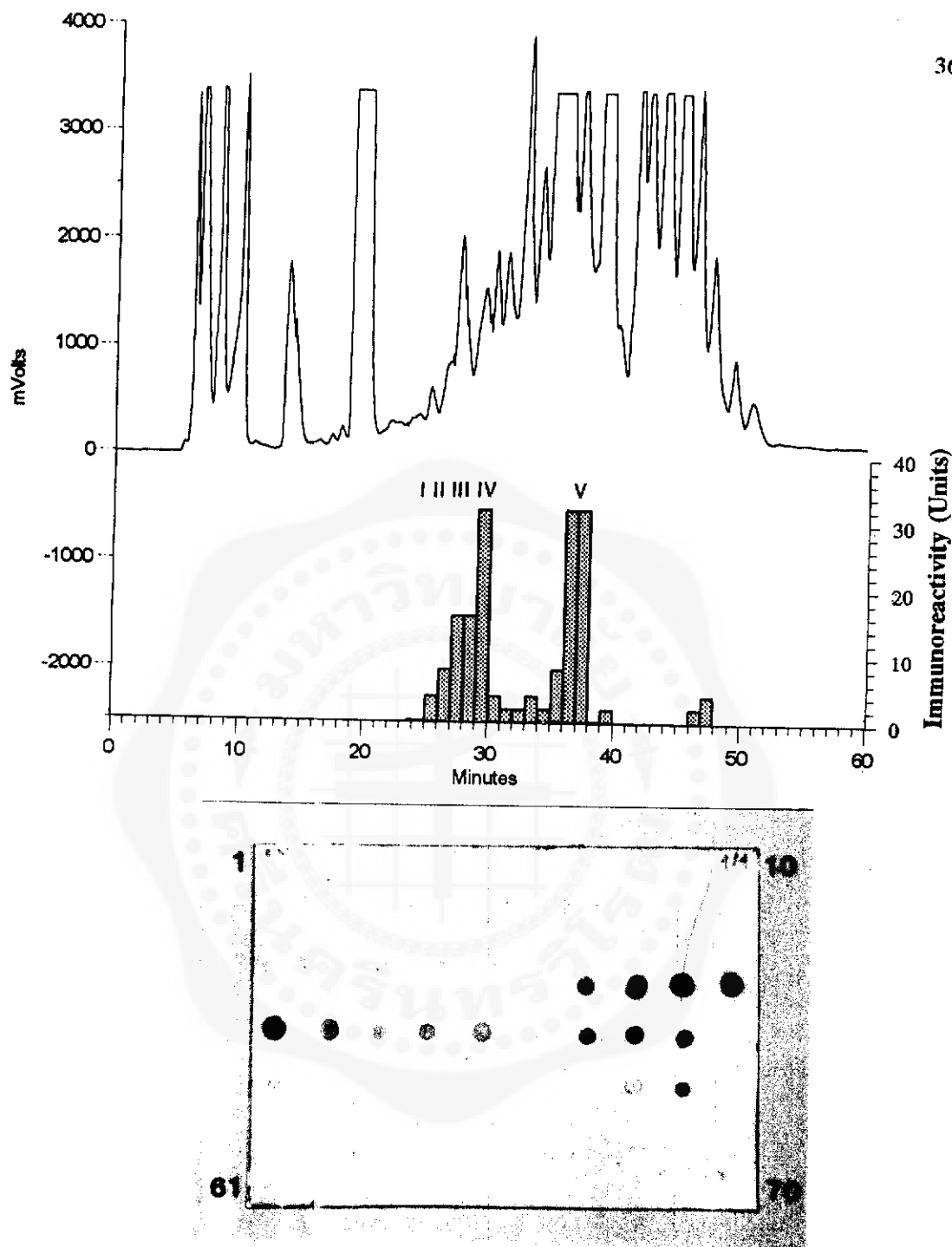
การทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย FMRFamide เปปไทด์ II และ III ในขั้นตอนที่ 6 ใช้เหมือนขั้นตอนที่ 5 แต่ในขั้นตอนที่ 7 ใช้ Microsorb-MV C8 column (25 X 100 มิลลิเมตร) ระบบตัวทำละลาย ACN/HFBA และในขั้นตอนที่ 8 ใช้คอลัมน์เดิมแต่เปลี่ยนระบบตัวทำละลายเป็น ACN/TFA ในการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนที่ 4, 5 และ 6 เปปไทด์ II และ III รวมอยู่ในฟีกของสารปนเปื้อนตัวเดียวกันตลอด (ภาพประกอบ 8, 10 และ 11) จนกระทั่งในขั้นตอนที่ 7 เปปไทด์ II จึงแยกอยู่บริเวณฐานของสารปนเปื้อน และเปปไทด์ III แยกห่างออกมา ทำให้สามารถแยกเปปไทด์ II และ III ออกจากกันได้บริสุทธิ์ในขั้นตอนที่ 8 ซึ่งได้ทดสอบโดยการผ่านคอลัมน์ Microsorb-MV Cyano column ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA ในขั้นตอนที่ 9 และไม่พบสิ่งแปลกปลอม ความสูงของฟีกของเปปไทด์ II และ III มีขนาดใกล้เคียงกันถึงประมาณ 2.5 มิลลิโวลต์ จึงคาดว่าพบเปปไทด์ทั้งสองประมาณ 8 นาโนกรัม ค่าความเข้มของจุดของเปปไทด์ II เท่ากับ 8 หน่วยต่อ 25 ก้านตาและเปปไทด์ III เท่ากับ 4 หน่วยต่อ 25 ก้านตา ดังนั้นปริมาณของเปปไทด์ II และ III เมื่อเทียบกับปริมาณเปปไทด์เริ่มต้นในการทำให้บริสุทธิ์ขั้นตอนที่ 1 เท่ากับร้อยละ 4 และ 2 ของเปปไทด์กลุ่มที่ 1

7. การทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย FMRFamide เปปไทด์ IV

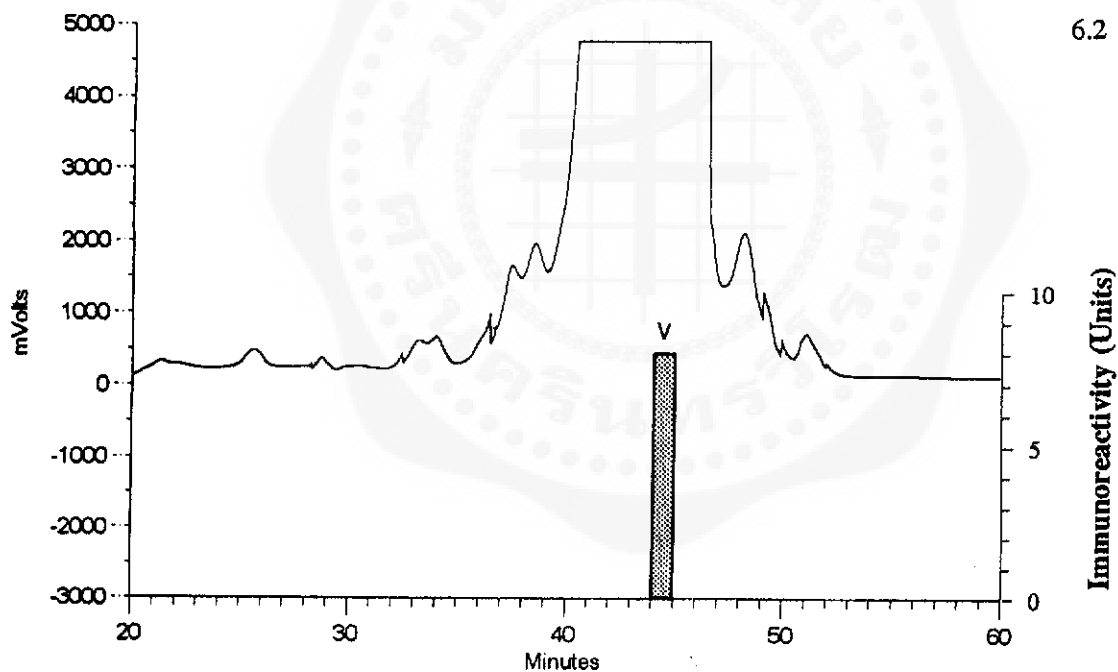
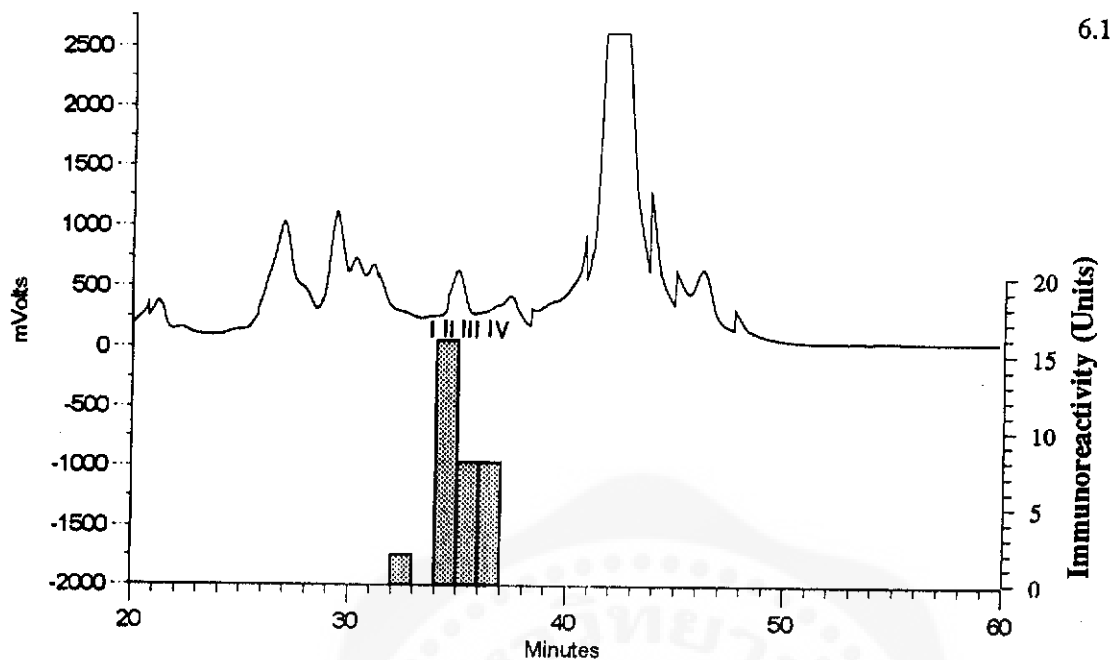
เปปไทด์ IV ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนที่ 6 และ 7 เช่นเดียวกับเปปไทด์ II และ III แต่ในขั้นตอนที่ 8 เหมือนกับเปปไทด์ I เปปไทด์ IV สามารถสังเกตเห็นฟีกได้ตั้งแต่การทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนที่ 4 เป็นต้นมา ในขั้นตอนที่ 5 และ 6 มีสิ่งเจือปนเล็กน้อยซึ่งสามารถกำจัดออกได้อย่างสมบูรณ์ในขั้นตอนที่ 7 ซึ่งจากการผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนที่ 8 ไม่พบสิ่งเจือปนใด ๆ จากความสูงของพีคประมาณ 9 มิลลิโวลต์ จึงคาดว่าเปปไทด์นี้มีประมาณ 30 นาโนกรัม และจากค่าความเข้มของจุดเท่ากับ 8 หน่วยต่อ 25 กานดา ดังนั้นปริมาณของเปปไทด์ IV เมื่อเทียบกับปริมาณเปปไทด์เริ่มต้นในการทำให้บริสุทธิ์ขั้นตอนที่ 1 เท่ากับร้อยละ 4 ของเปปไทด์กลุ่มที่ 1

8. การทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย FMRFamide เปปไทด์ V

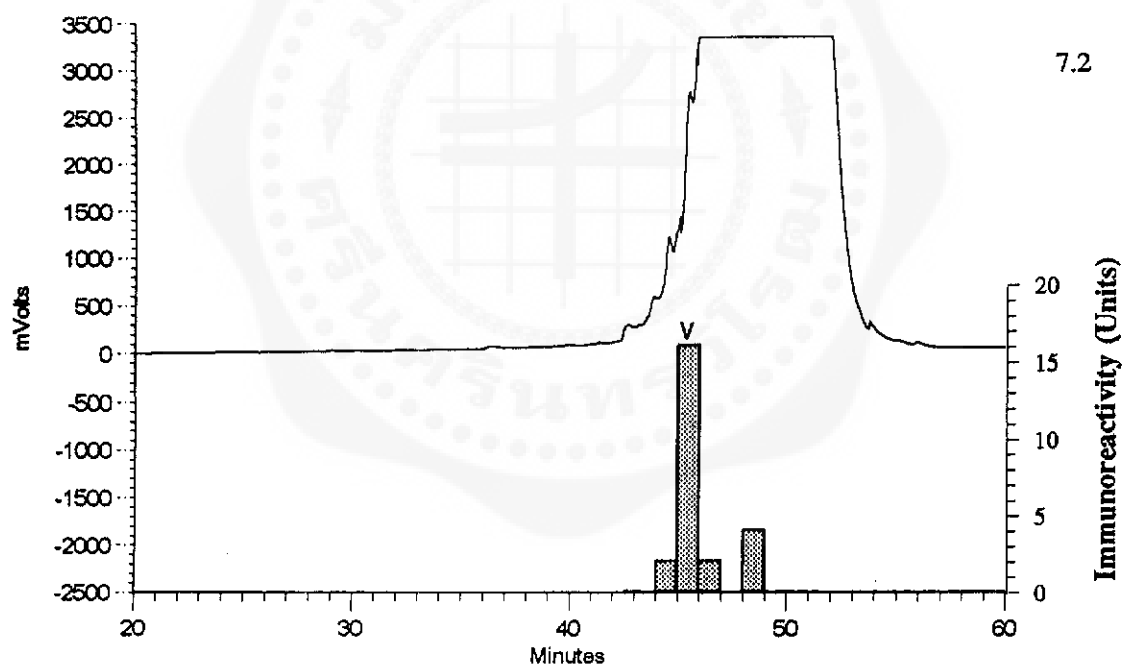
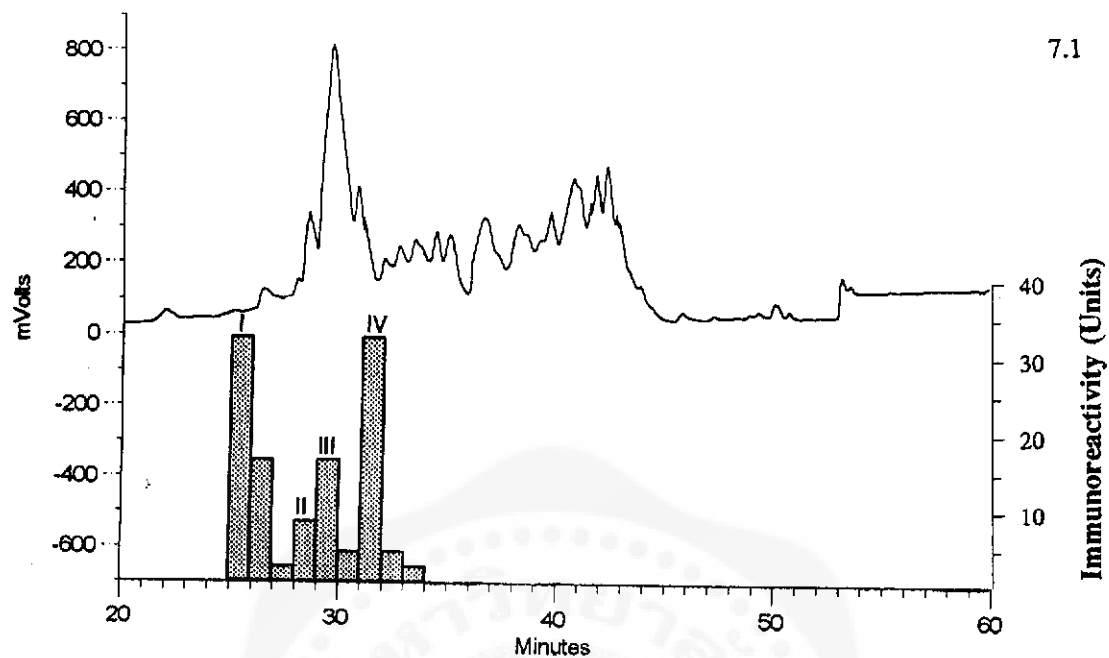
ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ของเปปไทด์ V เหมือนกับการทำให้บริสุทธิ์เปปไทด์ I เปปไทด์ V เป็นเปปไทด์ที่อยู่ในสารปนเปื้อนจำนวนมาก ไม่สามารถสังเกตเห็นฟีกได้เลยจนกระทั่งในขั้นตอนที่ 7 และ 8 จึงจะสามารถสังเกตเห็นฟีกแยกออกจากสิ่งเจือปนได้ ซึ่งจากการผ่านคอลัมน์ต่อมาอีก 2 ครั้ง คือ Microsorb-MV Cyano Column ระบบตัวทำละลาย ACN/HFBA และ ACN/TFA ไม่พบสิ่งเจือปนในฟีกนี้อีก จึงเชื่อว่าสามารถทำให้เปปไทด์ V บริสุทธิ์ได้ตั้งแต่ขั้นตอนที่ 8 แล้ว จากความสูงของพีคประมาณ 7 มิลลิโวลต์ คาดว่าเปปไทด์นี้มีประมาณ 23 นาโนกรัม และจากค่าความเข้มของจุดเท่ากับ 8 หน่วยต่อ 25 กานดา ดังนั้นปริมาณของเปปไทด์ V เมื่อเทียบกับปริมาณเปปไทด์เริ่มต้นในการทำให้บริสุทธิ์ขั้นตอนที่ 1 ประมาณเท่ากับร้อยละ 4 ของเปปไทด์กลุ่มที่ 2



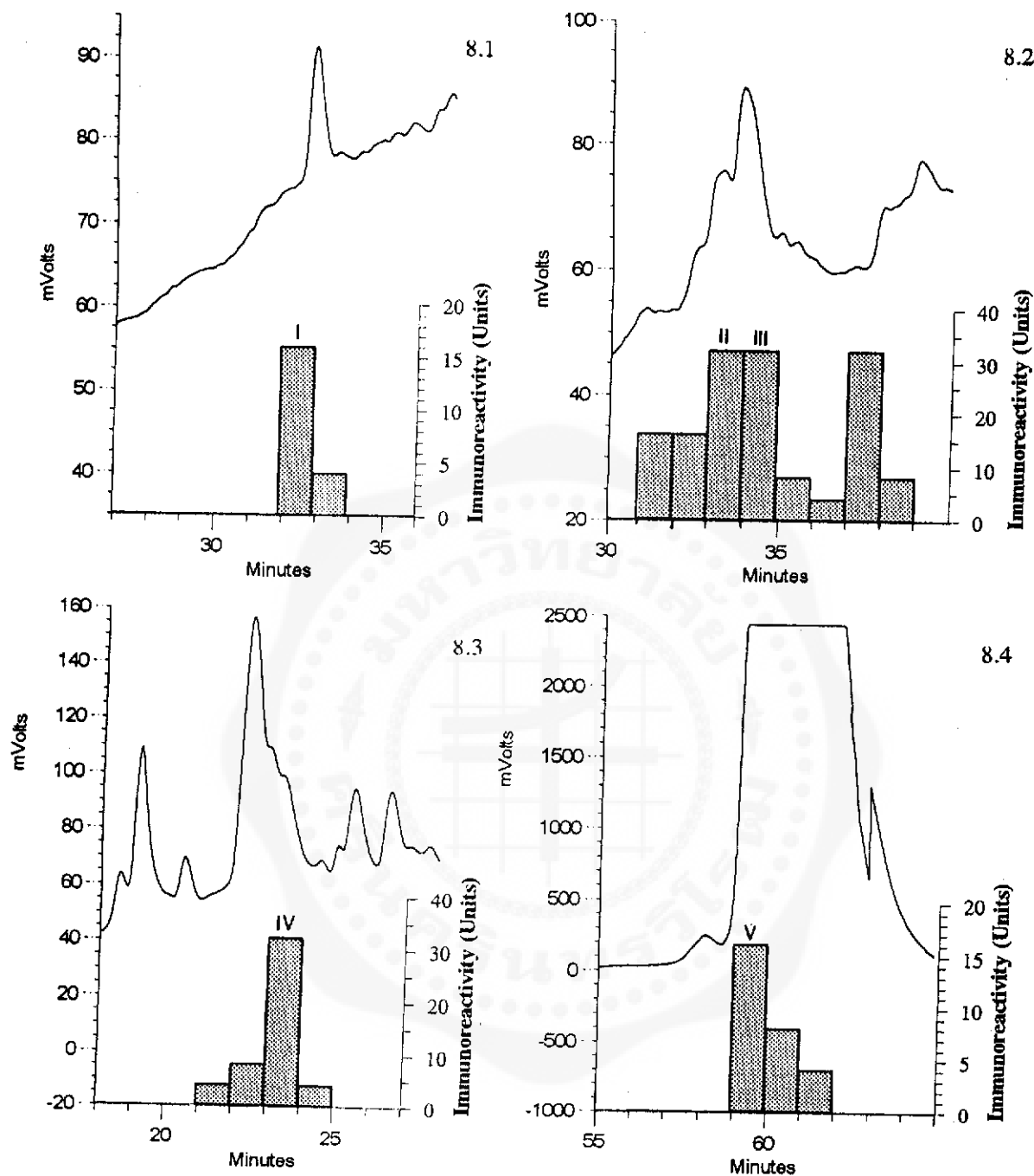
ภาพประกอบ 5 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากก้านตาทึงก้ามกรามจำนวน 1,000 ก้านตา หลังจากผ่านกระบวนการ RP-HPLC ขั้นตอนแรก (คอลัมน์ : PrepPak C18; ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA) และแผนภูมิแท่งแสดงความเข้มของสีจุด ซึ่งสรุปจาก FMRamide immunoreactivity บนแผ่นไนโตรเซลลูโลส พบสารคล้าย FMRamide ในแฟรคชันที่ 26-40 และ 47-48 ตัวเลขเหนือแผนภูมิแท่งเป็นชื่อของเปปไทด์ที่สามารถทำให้บริสุทธิ์จากกลุ่มของแฟรคชันต่าง ๆ



ภาพประกอบ 6 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากก้านตาทิ้งก้ำมกรมจำนวน 5,000 ก้านตา ที่ผ่านกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 2 (คอลัมน์ : PrepPak C8; ระบบตัวทำละลาย ACN/HFBA) 6.1 แสดงโครมาโตแกรมกลุ่มที่ 1 (แฟรคชั่น 26-31) 6.2 แสดงโครมาโตแกรมกลุ่มที่ 2 (แฟรคชั่น 36-38) และแผนภูมิแท่งแสดงความเข้มของสารคล้าย FMRamide ในแต่ละแฟรคชั่น ตัวเลขเหนือแผนภูมิแท่งเป็นชื่อของเปปไทด์ที่สามารถทำให้บริสุทธิ์จากแฟรคชั่นต่าง ๆ



ภาพประกอบ 7 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากก้านดาฮุ้งก้ามกรามที่ผ่านกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 3 (คอลัมน์ : Cyano; ระบบสารละลาย ACN/TFA) 7.1 แสดงโครมาโตแกรมของแฟรคชันกลุ่มที่ 1 7.2 แสดงโครมาโตแกรมของแฟรคชันกลุ่มที่ 2 และแผนภูมิแท่งแสดงความเข้มของสารคล้าย FMRFamide ในแต่ละแฟรคชัน ตัวเลขเหนือแผนภูมิแท่งเป็นชื่อของเปปไทด์ที่สามารถทำให้บริสุทธิ์จากแฟรคชันต่าง ๆ



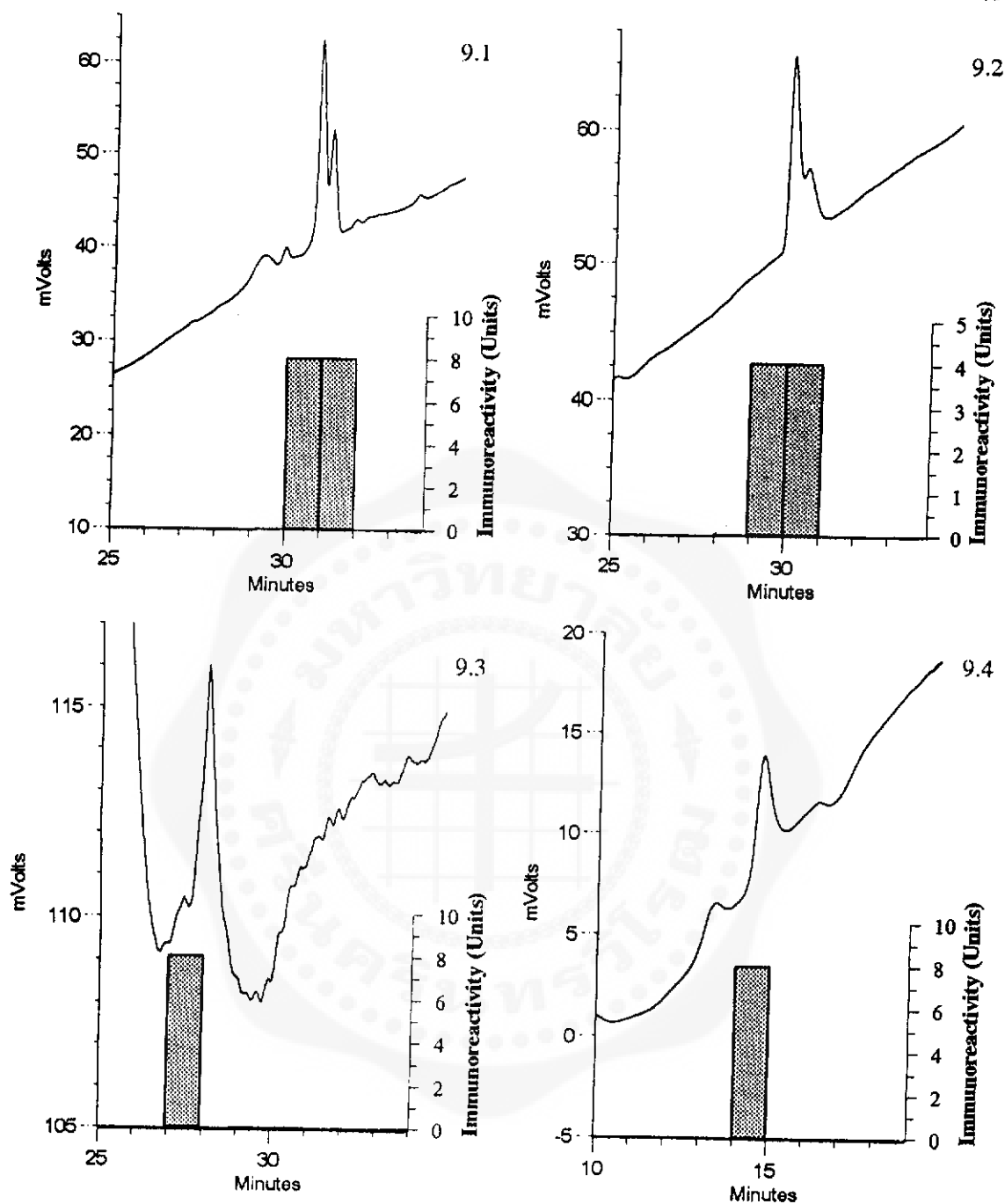
ภาพประกอบ 8 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากก้านตาคุ้งก้ามกรามที่ผ่านกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 4 (คอลัมน์ : Cyano; ระบบตัวทำละลาย ACN/HFBA)

8.1 แสดงโครมาโตแกรมของแฟรคชันที่มีสารคล้าย FMRFamide เปปไทด์ I

8.2 แสดงโครมาโตแกรมของแฟรคชันที่มีสารคล้าย FMRFamide เปปไทด์ II และ III

8.3 แสดงโครมาโตแกรมของแฟรคชันที่มีสารคล้าย FMRFamide เปปไทด์ IV

8.4 แสดงโครมาโตแกรมของแฟรคชันที่มีสารคล้าย FMRFamide เปปไทด์ V



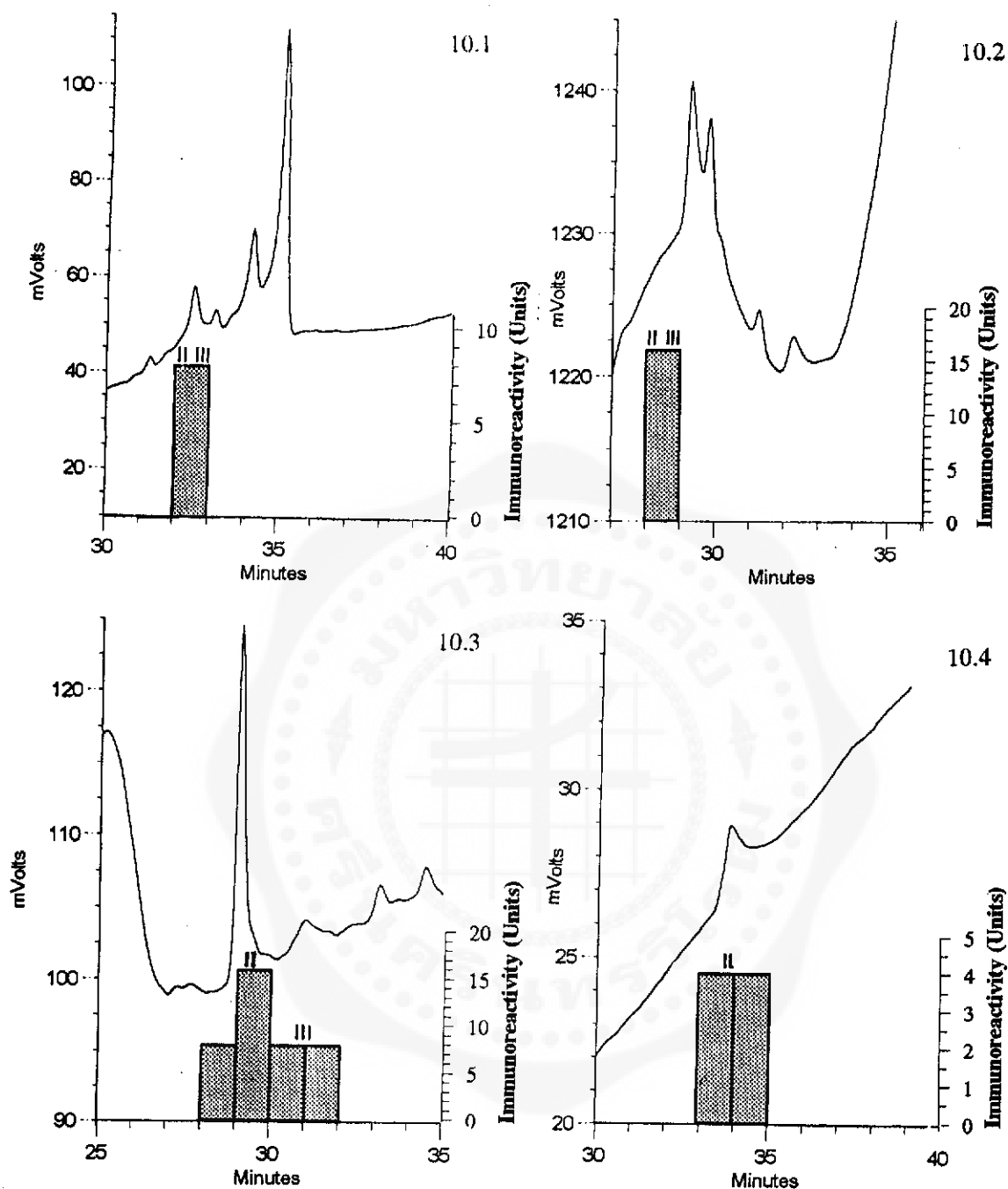
ภาพประกอบ 9 โครมาโตแกรมการทำให้บริสุทธิ์ของเปปไทด์ I โดยผ่านกระบวนการ RP-HPLC
ในขั้นตอนที่ 5-8

9.1 ขั้นตอนที่ 5 ใช้คอลัมน์ Phenyl ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA

9.2 ขั้นตอนที่ 6 ใช้คอลัมน์ C8 ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA

9.3 ขั้นตอนที่ 7 ใช้คอลัมน์ C8 ระบบตัวทำละลาย ACN/HFBA

9.4 ขั้นตอนที่ 8 ใช้คอลัมน์ Cyano ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA ขั้นตอนนี้ให้เปปไทด์ I ที่บริสุทธิ์



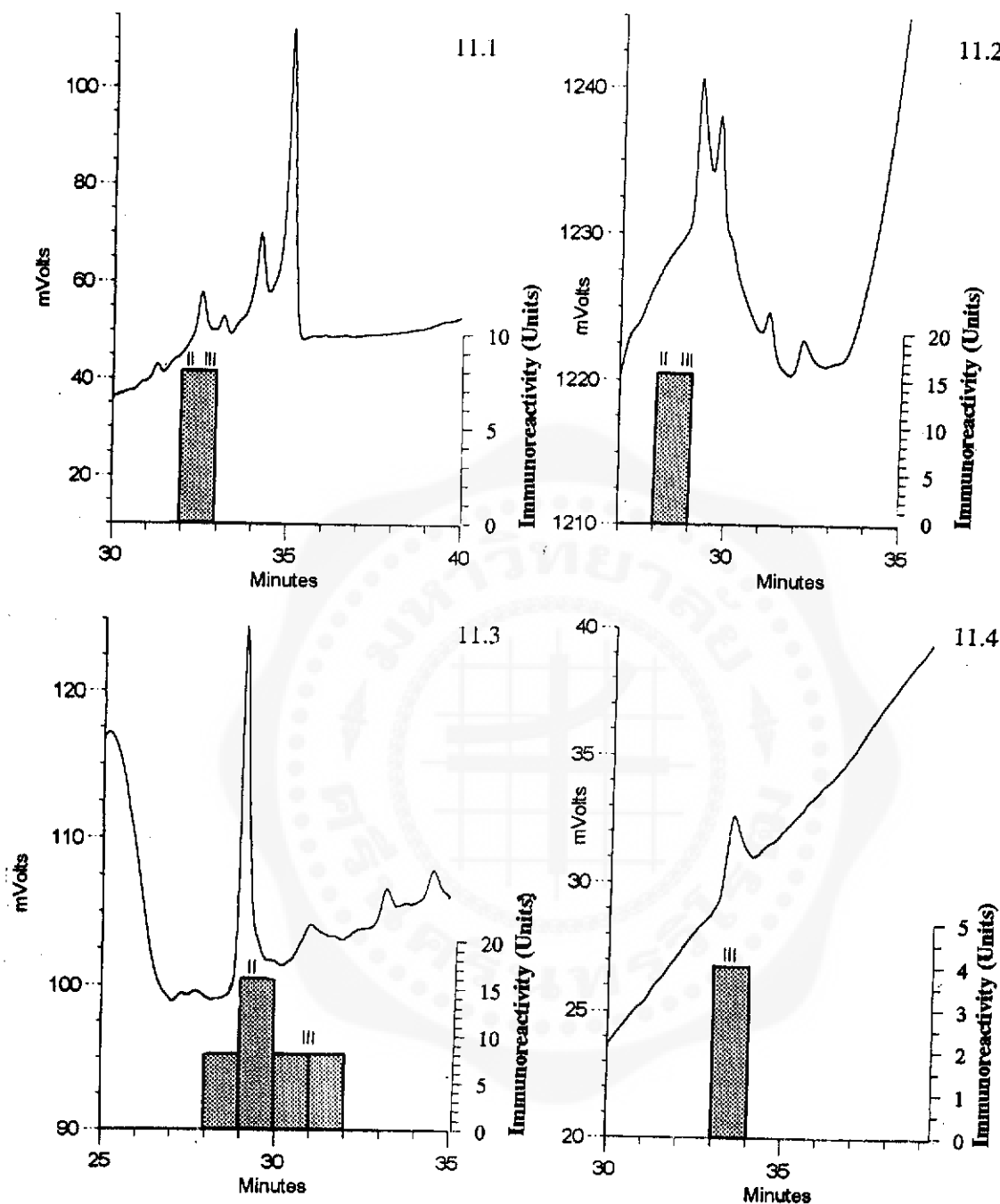
ภาพประกอบ 10 โครมาโตแกรมการทำให้บริสุทธิ์ของเปปไทด์ II และ III โดยผ่านกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 5-8

10.1 ขั้นตอนที่ 5 ใช้คอลัมน์ Phenyl ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA

10.2 ขั้นตอนที่ 6 ใช้คอลัมน์ C8 ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA

10.3 ขั้นตอนที่ 7 ใช้คอลัมน์ C8 ระบบตัวทำละลาย ACN/HFBA

10.4 ขั้นตอนที่ 8 ใช้คอลัมน์ C8 ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA ขั้นตอนนี้ให้เปปไทด์ II ที่บริสุทธิ์



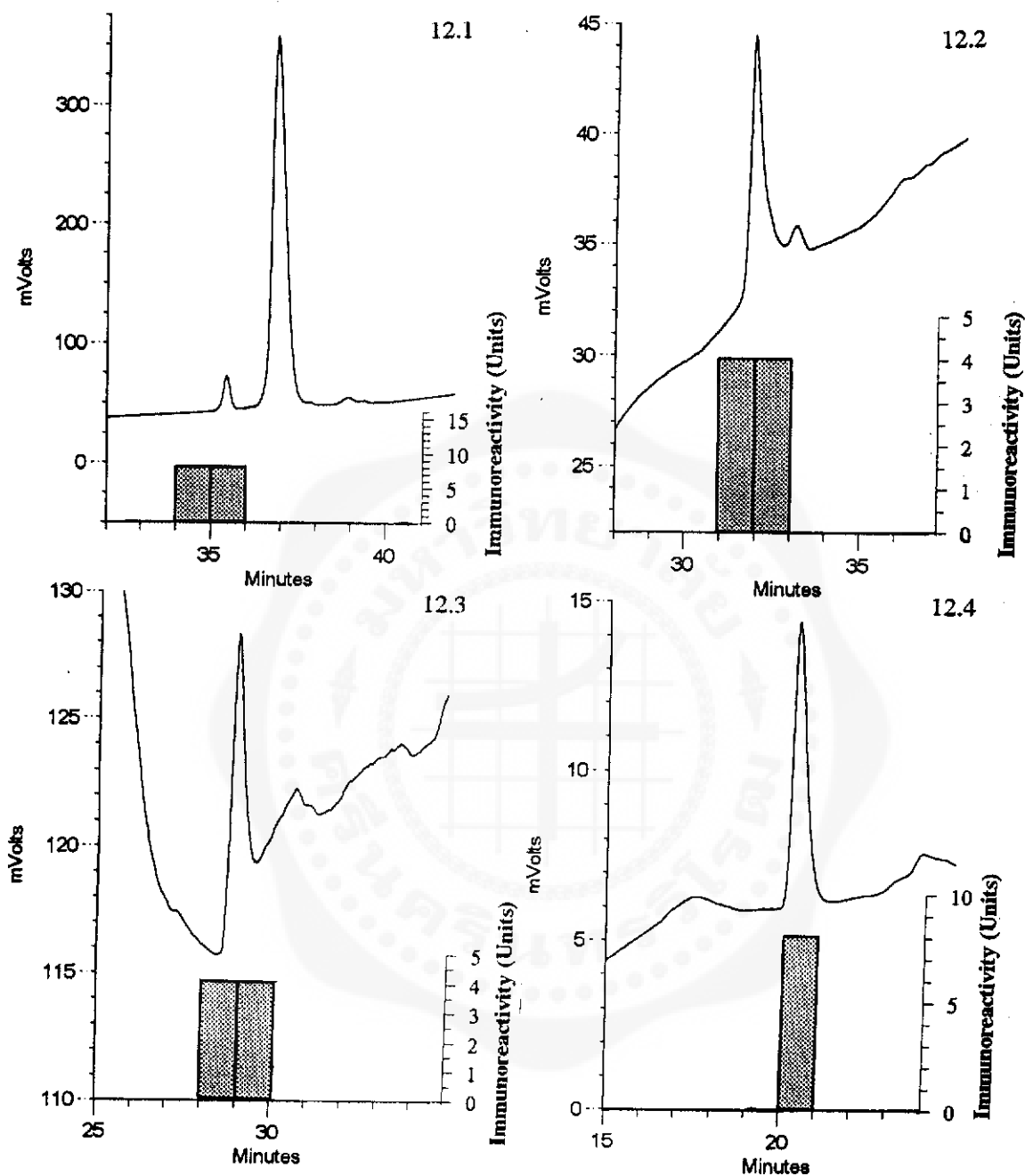
ภาพประกอบ 11 โครมาโตแกรมการทำให้บริสุทธิ์ของเปปไทด์ III โดยผ่านกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 5-8

11.1 ขั้นตอนที่ 5 ใช้คอลัมน์ Phenyl ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA

11.2 ขั้นตอนที่ 6 ใช้คอลัมน์ Phenyl ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA

11.3 ขั้นตอนที่ 7 ใช้คอลัมน์ C8 ระบบตัวทำละลาย ACN/HFBA

11.4 ขั้นตอนที่ 8 ใช้คอลัมน์ C8 ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA ขั้นตอนนี้ให้เปปไทด์ III ที่บริสุทธิ์



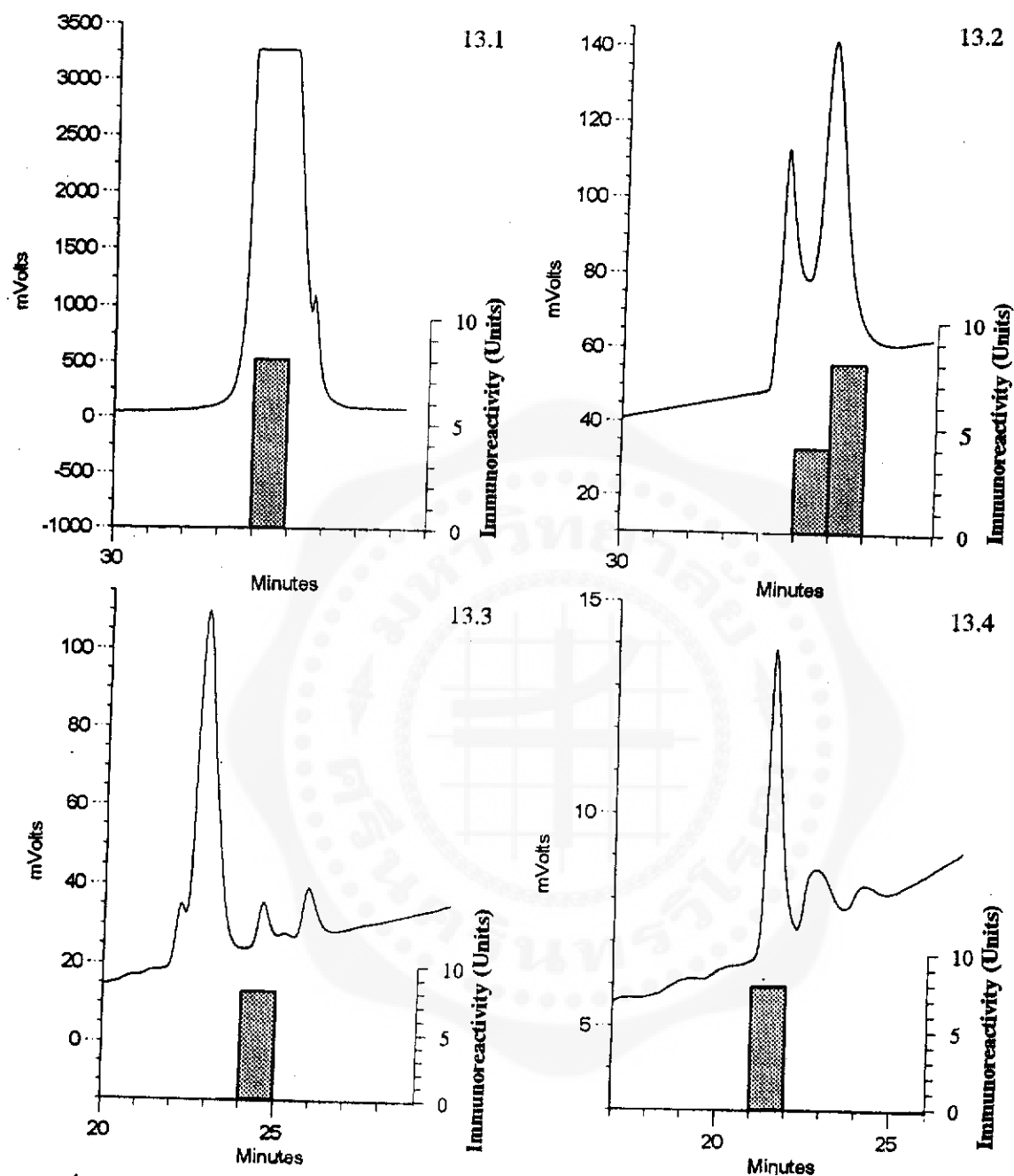
ภาพประกอบ 12 โครมาโตแกรมการทำให้บริสุทธิ์ของเปปไทด์ IV โดยผ่านกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 5-8

12.1 ขั้นตอนที่ 5 ใช้คอลัมน์ Phenyl ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA

12.2 ขั้นตอนที่ 6 ใช้คอลัมน์ Phenyl ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA

12.3 ขั้นตอนที่ 7 ใช้คอลัมน์ C8 ระบบตัวทำละลาย ACN/HFBA

12.4 ขั้นตอนที่ 8 ใช้คอลัมน์ Cyano ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA ขั้นตอนนี้ให้เปปไทด์ IV ที่บริสุทธิ์



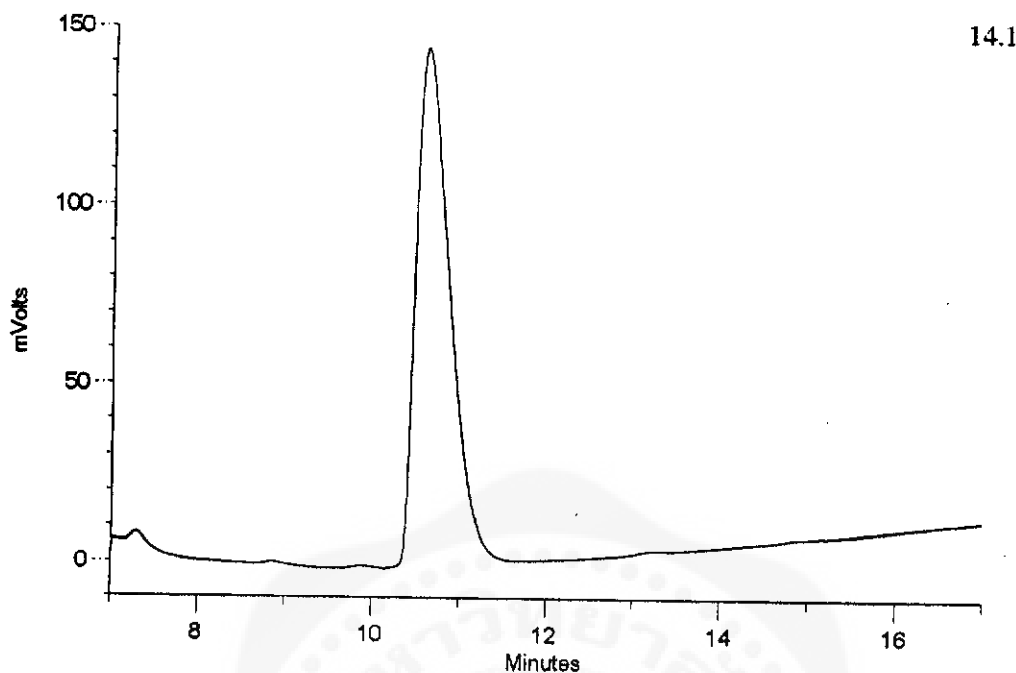
ภาพประกอบ 13 โครมาโตแกรมการทำให้บริสุทธิ์ของเปปไทด์ V โดยผ่านกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 5-8

13.1 ขั้นตอนที่ 5 ใช้คอลัมน์ Phenyl ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA

13.2 ขั้นตอนที่ 6 ใช้คอลัมน์ C8 ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA

13.3 ขั้นตอนที่ 7 ใช้คอลัมน์ Cyano ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA

13.4 ขั้นตอนที่ 8 ใช้คอลัมน์ Cyano ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA ขั้นตอนนี้ให้เปปไทด์ V ที่บริสุทธิ์



14.2

32 หน่วย	●	5 นาโนกรัม
16 หน่วย	●	2.5 นาโนกรัม
8 หน่วย	●	1.25 นาโนกรัม
4 หน่วย	●	625 พิโคกรัม
2 หน่วย	●	312 พิโคกรัม
1 หน่วย	●	156 พิโคกรัม
		BSA 1 ไมโครกรัม

Standard FMRFamide

ภาพประกอบ 14 FMRFamide มาตรฐานที่ใช้ในการเปรียบเทียบกับสารคล้าย FMRFamide ในตัวอย่าง
 14.1 โครมาโตแกรมของ FMRFamide มาตรฐาน ปริมาณ 500 นาโนกรัม ที่ผ่านกระบวนการ
 RP-HPLC โดยใช้คอลัมน์ Cyano ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA 14.2 ผลของ Dot-ELISA ของ
 FMRFamide มาตรฐานปริมาณต่าง ๆ

บทที่ 4

สรุปและอภิปรายผล

จากการทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย FMRFamide จากก้านตาของกุ้งก้ามกรามจำนวน 5,000 ก้านตา ได้เปปไทด์บริสุทธิ์ 5 รูปแบบ ในปริมาณ 8-30 นาโนกรัม คาดว่ายังมีเปปไทด์คล้าย FMRFamide อีกหลายรูปแบบที่ยังไม่สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ เพราะปริมาณของเปปไทด์ที่ถูกแยกลดน้อยลงจนความไวในการตรวจสอบด้วยวิธี Dot-ELISA ลดลง จนยากที่จะตรวจสอบได้

จากการประมาณค่า immunoreactivity ของเปปไทด์ที่ได้แต่ละตัวอยู่ในช่วง 2-4 % ของเปปไทด์เริ่มต้นในขั้นตอนแรก ซึ่งถ้าดูโดยประมาณแล้วจะเห็นว่าผลที่ได้ต่ำมาก คือผลรวมของเปปไทด์ 4 รูปแบบ ในกลุ่มที่ 1 เพียง $4+4+4+2 = 14$ % และกลุ่มที่ 2 เพียง 4 % ทั้งนี้อาจเนื่องจากการสูญเสียของเปปไทด์ในระหว่างการทำให้บริสุทธิ์ เพราะว่าเปปไทด์ที่ได้มีปริมาณน้อยมาก การจับติดภาชนะเพียงเล็กน้อยก็อาจเป็นสาเหตุทำให้มีการสูญเสียของเปปไทด์มีเปอร์เซ็นต์สูงมาก และอีกประการหนึ่ง ชนิดของเปปไทด์ที่ยังไม่สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ยังไม่ทราบว่าอีกกี่ชนิด อนึ่งในการประมาณค่าความเข้มของจุด (immunoreactivity intensity) เป็นวิธีที่ประมาณด้วยสายตา ซึ่งค่อนข้างหยาบ ทำให้มีความผิดพลาดในการประมาณค่าได้มาก ดังนั้นในการประเมินผลลัพธ์ของวิธี HPLC ที่ใช้ในการทำให้เปปไทด์บริสุทธิ์ยังไม่อาจประเมินได้ชัดเจนนัก แต่จากการประเมินค่าความสูงของพีคในการทำให้บริสุทธิ์ 2 ขั้นตอนสุดท้าย พบว่าความสูงพีคของเปปไทด์ที่เกือบบริสุทธิ์หรือบริสุทธิ์แล้ว พบว่าความสูงของพีคใกล้เคียงกัน และค่าความเข้มของจุดใกล้เคียงกัน จึงคาดว่าในกระบวนการ HPLC น่าจะให้ผลลัพธ์ของเปปไทด์ค่อนข้างสูงใกล้เคียง 100 % ดังนั้นการลดค่าความเข้มของจุดของเปปไทด์บริสุทธิ์ในขั้นตอนสุดท้ายเมื่อเทียบกับค่าความเข้มของจุดในการทำให้บริสุทธิ์ขั้นตอนแรก น่าจะเกิดจากการสูญเสียของเปปไทด์ในส่วนด้านข้างของพีค หรือจับติดภาชนะที่ใช้บรรจุ และเปปไทด์แยกออกจากส่วนผสมมากกว่ามีการสูญเสียเนื่องจากกระบวนการทำให้บริสุทธิ์โดย HPLC

จากผลการทดลองนี้เป็นที่ทราบแน่ชัดว่าเปปไทด์คล้าย FMRFamide ในกุ้งก้ามกรามมีอยู่หลายรูปแบบ ซึ่งคาดว่าอาจมีมากกว่า 10 รูปแบบ สำหรับเปปไทด์ที่ทำให้บริสุทธิ์จากการทดลอง 5 รูปแบบนี้ อาจมีลักษณะคล้ายกับเปปไทด์ที่รายงานในกุ้งอเมริกันล็อบสเตอร์ *Homarus americanus* 2 รูปแบบ (Trimmer, Kobierski and Kravitz, 1987) และในปู *Callinectes sapidus* 1 รูปแบบ (Krajniak, 1991) หรืออาจเป็นรูปแบบต่างออกไปก็ได้ เพราะเปปไทด์ทั้ง 3 รูปแบบล้วนมีลำดับกรดอะมิโนทางด้าน C-terminus เป็น -FLRFamide ซึ่งจากการทดสอบโดยใช้โมโนโคลนอล-

แอนติบอดีผลิตจากการปลูกภูมิคุ้มกันด้วย KHEYLRFamide แอนติบอดีนี้จับกับเปปไทด์ในก้านดา
กึ่งก้านกรามได้ไม่ดีเท่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตจาก KNEFIRFamide และ FMRFamide ดัง
นั้นเปปไทด์ที่ได้จากการทดลองนี้อาจมีรูปแบบที่ต่างไปจากรูปแบบที่เคยรายงานทั้ง 3 รูปแบบก็ได้
แต่อย่างไรก็ตามจำเป็นที่จะต้องมีการวิเคราะห์โดยใช้ mass spectral analysis และการหาลำดับกรดอะมิ-
โนต่อไปจึงสรุปผลได้

จะเห็นได้ว่าเปปไทด์คล้าย FMRFamide ในสัตว์แต่ละชนิดมีรูปแบบจำนวนมากว่า 10 รูป
แบบ เช่นในพยาธิตัวกลม *Ascaris suum* (Cowden, Stretton and Davis. 1989; Cowden and Stretton.
1995) หนอนตัวกลม *Caenorhabditis elegans* (Sithigorngul and Stretton. 1995) พวกรกและ
แมลง (De Loof and Schoofs. 1990) และมีการค้นพบสารคล้าย FMRFamide ในสัตว์อื่น ๆ เพิ่มขึ้น
ตลอดเวลา การที่ค้นพบสารคล้าย FMRFamide จำนวนน้อยรูปแบบในสัตว์ต่าง ๆ อาจเนื่องจากใน
การทำให้บริสุทธิ์เหล่านั้นใช้ RIA เป็นวิธีติดตามสารคล้าย FMRFamide ซึ่งเป็นวิธีที่สิ้นเปลืองแรงงาน
และสารเคมีราคาแพงจำนวนมาก ทำให้ไม่สามารถใช้วิธีนี้ติดตามการปรากฏของ FMRFamide หลาย ๆ
รูปแบบในครั้งเดียวกันได้ ต่างจากการใช้วิธี Dot-ELISA (Sithigorngul, Stretton and Cowden.
1991) ซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายสะดวก ไม่สิ้นเปลืองสารเคมี ราคาถูก และสามารถรู้ผลภายใน 24 ชั่วโมง โดย
มีความไวในการตรวจสอบเทียบเท่า RIA จึงสามารถใช้วิธีนี้ติดตามสารคล้าย FMRFamide ใน
ระหว่างการทำให้บริสุทธิ์ได้หลาย ๆ รูปแบบในเวลาเดียวกัน (Sithigorngul and Stretton. 1995)

FMRFamide เป็นเปปไทด์ที่พบกว้างขวาง พบในระบบประสาทและทางเดินอาหารของ
สิ่งมีชีวิตตลอดทั่วอาณาจักรสัตว์ตั้งแต่ซีเลนเทอเรจนถึงสัตว์มีกระดูกสันหลัง ดังนั้นสารคล้าย
FMRFamide น่าจะมีบทบาทสำคัญในการดำรงชีวิตของสัตว์ โดยเฉพาะในสัตว์มีกระดูกสันหลัง
พบสารคล้าย FMRFamide ในส่วนต่าง ๆ ของสมองและไขสันหลัง (Chen, Tsai and Shen. 1989;
Majane, Panula and Yang. 1989) สำหรับบทบาทของสารคล้าย FMRFamide ในทางสรีรวิทยาของ
สัตว์มีกระดูกสันหลัง เช่น FMRFamide มีผลต่อสถานะตื่นเต้นในหนู (Muthal and Chopde. 1994)
ระดับของสารคล้าย FMRFamide ในต่อมใต้สมองมีปริมาณลดลงเมื่อหนูได้รับการกระตุ้นให้เกิด
สถานะ hyperosmotic ในเลือด (Majane and Yang. 1991) และในไก่ สารคล้าย FMRFamide ก่อให้
เกิดการเพิ่มความดันโลหิต (Dockray and others. 1983) การที่พบสารคล้าย FMRFamide หลายรูป
แบบจำนวนมากมานี้ยังเป็นที่สงสัยว่าสารคล้าย FMRFamide รูปแบบต่าง ๆ เหล่านี้มีบทบาทหน้าที่
เหมือนกันหรือต่าง ๆ กันในกระบวนการสรีรวิทยา ถ้าเหมือนทำไมจึงต้องมีสารคล้าย FMRFamide
หลายรูปแบบจำนวนมาก แต่อย่างไรก็ตามการค้นพบสารคล้าย FMRFamide หลายรูปแบบจำนวน

มากนี้เป็นการยืนยันถึงวิวัฒนาการของฮอร์โมนต่าง ๆ ว่าอาจเกิดจาก gene duplication และ gene amplification จากนั้นจึงมีการเปลี่ยนแปลงเป็นฮอร์โมนต่าง ๆ ที่มีรูปแบบต่างกันออกไป ในแมลงหวี่และหอยพบว่าภายใน 1 transcript ประกอบด้วย FMRFamide จำนวนมากและหลายรูปแบบ (De Loof and Schoofs. 1990)

ดังนั้นการพิสูจน์ทราบถึงรูปแบบต่าง ๆ ของ FMRFamide จึงเป็นพื้นฐานที่สำคัญในการศึกษาบทบาทของสารคล้าย FMRFamide รูปแบบต่าง ๆ ในกระบวนการทางสรีรวิทยาของกุ้งและยังเป็นแนวทางที่จะใช้ลำดับกรดอะมิโนของสารคล้าย FMRFamide ที่ทราบแล้วสำหรับการศึกษาอื่นที่สร้างสารคล้าย FMRFamide เพื่อการพิสูจน์ทราบรูปแบบของ FMRFamide ในตัวกุ้งทั้งหมดได้ ซึ่งนอกจากจะให้ความรู้ในแง่วิวัฒนาการของฮอร์โมนของฮอว์โมนและยังจำเป็นสำหรับการสังเคราะห์สารคล้าย FMRFamide รูปแบบต่าง ๆ เพื่อศึกษาบทบาททางสรีรวิทยาของสารคล้าย FMRFamide ต่อไป



บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

- บรรจง เทียนสงรัสมิ. หลักการเลี้ยงกุ้งก้ามกราม คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ ; 2521.
- บัณฑิตเกษตรอาสา, กลุ่ม. กุ้งก้ามกราม สาขาประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ ; 2530.
- ปิยะพงศ์ โชติพันธ์. การเลี้ยงกุ้งก้ามกราม คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ ; 2529.
- พัฒนาการประมง, ชมรม. การเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกราม วิทยาสารประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ ; 2524.
- มารุต ทรัพย์สุขสำราญ. การเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามในเมืองไทย วิทยาสารประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ ; 2520.
- ชนัด มุสิก. การเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกราม คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ ; 2529.
- วีระวรรณ สิทธิกรกุล, ศิวาพร ลงขันต์ และไพศาล สิทธิกรกุล. “สารคล้าย FMRFamide ในก้ามตาของกุ้งก้ามกราม,” วารสารวิทยาศาสตร์ มศว. 11 (1) : 15-28 ; 2538.
- อาจ แจ่มเมฆ. สัตว์วิทยาทั่วไป คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ ; 2519.
- Anderson, P.A.V., A. Moosler and C.J.P. Grimmelikhuijzen. “The presence and distribution of antho-RFamide-like material in scyphomedusae,” Cell Tissue Res. 267 : 67-74 ; 1992.
- Beltz, B.S. and E.A. Kravitz. “Aminergic and peptidergic neuromodulation in crustacea,” J. Exp. Biol. 124 : 115-141 ; 1986.
- Callaway, J.C., B. Masinovsky and K. Graubard. “Co-localization of SCP_B-like and FMRFamide-like immunoreactivities in crustacean nervous systems,” Brain Research. 405 : 295-304 ; 1987.
- Chang, E.S., M.J. Bruce and R.W. Newcomb. “Purification and amino acid composition of a peptide with molt inhibiting activity from the lobster, *Homarus americanus*,” Gen. Comp. Endocrinol. 65 : 56-64 ; 1987.

- Chen, S.T., M.S. Tsai and C.L. Shen. "Distribution of FMRFamide-like immunoreactivity in the central nervous system of the Formosan Monkey *Macaca cyclopsis*," Peptides. 10 : 825-834 ; 1989.
- Cowden, C. and A.O.W Stretton. "Eight novel FMRFamide like neuropeptide isolated from the nematode *Ascaris suum*," Peptides. 16(3) : 491-500 ; 1995.
- Cowden, C., A.O.W. Stretton and R.E. Davis. "AF1, a sequenced bioactive neuropeptide isolated from the nematode *Ascaris suum*," Neuron. 2 : 1465-1473 ; 1989.
- Cowden, C. and others. "Localization and differential expression of FMRFamide-like immunoreactivity in the nematode *Ascaris suum*," J. Comp. Neurol. 333 : 455-468 ; 1993.
- De Loof, A. and L. Schoofs. "Homologies between the amino acid sequences of some vertebrate peptide hormones and peptides isolated from invertebrate sources," Comp. Biochem. Physiol. 95B(3) : 459-468 ; 1990.
- Diaz-Miranda, L., G.E. De Motta and J.E. Garcia-Arraras. "Localization of neuropeptides in the nervous system of the marine annelid *Sabellastarte magnifica*," Cell Tissue Res. 266 : 209-217 ; 1991.
- Dockray, G.J. "Characterization of FMRFamide-like immunoreactivity in rat spinal cord by region-specific antibodies in radioimmunoassay and HPLC," J. Neurochem. 152-158 ; 1985.
- Dockray, G.J. and R.G. Williams. "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 ; 1983.
- Dockray, G.J. and others. "A novel active pentapeptide from chicken brain identified by antibodies to FMRFamide," Nature. 305 : 328-330 ; 1983.
- Dore, I. and C. Frimodt. An illustrated guide to shrimp of the world. New York, Van Nostrand 86-87 ; 1987.
- Evans, P.D. and C.M. Myers. "The modulatory actions of FMRFamide and related peptides on locust skeletal muscle," J. Exp. Biol. 126 : 403-422 ; 1986.

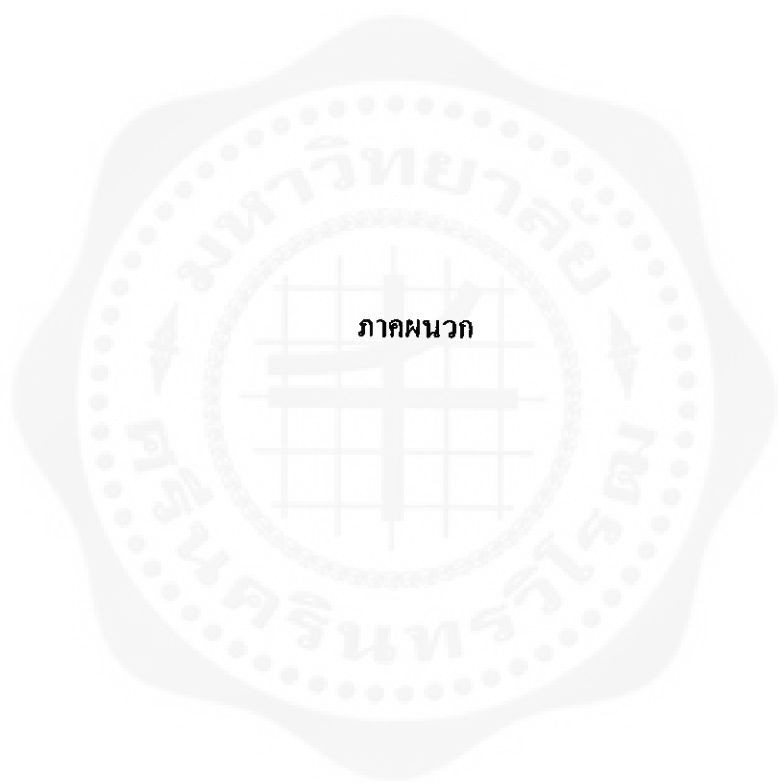
- Evans, B.D. and others. "Identification of RFamide neuropeptides in the medicinal leech," Peptides. 12 : 897-908 ; 1991.
- Fernlund, P. "Structure of the red pigment concentrating hormone of the shrimp *Pandalus borealis* in the demonstration of substance immunologically related to the identified arthropod neuropeptide AKH/RPCH in the CNS of several invertebrate species," Biochem. Biophys. Acta. 371 : 304-311 ; 1974.
- Fingerman, M. "The endocrine mechanisms of crustaceans," J. Crusta. Biol. 7(1) : 1-24 ; 1987.
- Fujiwara-Sakata, M. and M. Kobayashi. "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 ; 1994.
- Grimmelikhuijzen, C.J.P., and D. Graff. "Isolation of Glu-Gly-Arg-Phe-NH₂ (Antho-RFamide), a neuropeptide from sea anemones," Proc. Natl. Acad. Sci. 83 : 9817-9821 ; 1986.
- Grimmelikhuijzen, C.J.P., G.J. Dockray and L.P.C. Schot. "FMRFamide-like immunoreactivity in the nervous system of hydra," Histochemistry. 73 : 499-508 ; 1982.
- Holman, G.M., B.J. Cook and R.J. Nachman. "Isolation, primary structure and synthesis of two neuropeptides from *Leucophaea maderae* : members of a new family of cephalomyotropins," Comp. Biochem. Physiol. 84C(2) : 205-211 ; 1986a.
- "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 ; 1986b.
- Huberman, A. and M.B. Aguilar. "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 ; 1986.
- Kleinholz and others. "Isolation and sequence analysis of a pigment-dispersing hormone from eyestalks of the crab, *Cancer magister*," Bio. Bull. 170 : 135-143 ; 1986.

- Kobayashi, M. and Y. Muneoka. "Structure requirements for FMRFamide-like activity on the heart of the prosobranch *Rapana thomasi*," Comp. Biochem. Physiol. 84C(2) : 349-352 ; 1986.
- Krajniak, K.G. and M.J. Greenberg. "The localization of FMRFamide in the nervous and somatic tissues of *Nereis virens* and its effects upon the isolated esophagus," Comp. Biochem. Physiol. 101C(1) : 93-100 ; 1992.
- Krajniak, K.G. and D.A. Price. "Authentic FMRFamide is present in the polychaete *Nereis virens*," Peptides. 11 : 75-77 ; 1990.
- Krajniak, K.G. "The identification and structure-activity relations of cardioactive FMRFamide-related peptide from the blue crab *Callinectes sapidus*," Peptides. 12 : 1295-1302 ; 1991.
- Lundquist, T. and D.R. Nassel. "Substance P, FMRFamide, and Gastrin /Cholecystokinin-like immunoreactive neurons in the thoraco-abdominal ganglia of the flies *Drosophila* and *Calliphora*," J. Comp. Neurol. 294 : 161-178 ; 1990.
- Majane, E.A. and H.Y.T. Yang. "Mammalian FMRF-NH₂-like peptide in rat pituitary : Decrease by osmotic stimulus," Peptides. 12 : 1303-1308 ; 1991.
- Majane, E.A., P. Panula and H.Y.T. Yang. "Rat brain regional distribution and spinal cord neuronal pathway of FLFQPQRF-NH₂, a mammalian FMRF-NH₂-like peptide," Brain Research. 494 : 1-12 ; 1989.
- Mangerich, S. and R. Keller. "Localization of pigment-dispersing hormone (PDH) immunoreactivity in the central nervous system of *Carcinus maenas* and *Orconectes limosus* (Crustacea), with reference to FMRFamide immunoreactivity in *O. limosus*," Cell Tissue Res. 253 : 199-208 ; 1988.
- Mangerich, S. and others. "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 ; 1987.
- Mc. Gaw, I.J. and B.R. Mc. Mahon. "The FMRFamide-related peptides F1 and F2 alter hemolymph distribution and cardiac output in the crab *Cancer magister*," Biol. Bull. 188 : 186-196 ; 1995.

- Muthal, A.V. and C.T. Chopde. "Anxiolytic effect of neuropeptide FMRFamide in rats," Neuropeptides. 27 : 105-108 ; 1994.
- Price, D.A. "The FMRFamide-like peptide of *Helix aspersa*," Comp. Biochem. Physiol. 72C : 325-328 ; 1982.
- Price, D.A. and M.J. Greenberg. "Structure of a molluscan cardioexcitatory neuropeptide," Science. 197 : 670-671 ; 1977.
- Raffa, R.B. and C.P. Bianchi. "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 ; 1986.
- Robb, S., L.C. Packman and P.D. Evans. "Isolation, Primary structure and bioactivity of FLRFamide. A FMRFamide-like neuropeptide from the locust, *Schistocerca gregaria*," Biochem. and Biophys. Res. Comm. 160(2) : 850-856 ; 1989.
- Schmidt, M. and B.W. Ache. "FMRFamide-like immunoreactivity in presumptive chemosensory afferents of the spiny lobster, *Panulirus argus*," Brain research. 653 : 315-324 ; 1994.
- Sithigorngul, P. and A.O.W. Stretton. "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 ; 1995.
- Sithigorngul, P., A.O.W. Stretton and C. Cowden. "A versatile dot-ELISA method with femtomole sensitivity for detecting small peptides," J. Immuno. Meth. 141 : 23-32 ; 1991.
- Soyez, D., J.E. Van Deijnen and M. Martin. "Isolation and characterization of a vitellogenesis inhibiting factor from sinus gland of the lobster, *Homarus americanus*," J. Exp. Zool. 244 : 479-484 ; 1987.
- Too, C.K.L. and R.P. Croll. "Detection of FMRFamide-like immunoreactivities in the sea scallop *Placopecten magellanicus* by immunohistochemistry and Western blot analysis," Cell Tissue Res. 281 : 295-304 ; 1995.

- Trimmer, B.A., L.A. Kobierski and E.A. Kravitz. "Purification and characterization of FMRFamide-like immunoreactive substances from the lobster nervous system : Isolation and sequence analysis of two closely related peptides," J. Comp. Neurol. 266 : 16-26 ; 1987.
- Tsang, P.W. and I. Orchard. "Distribution of FMRFamide-related peptides in the blood-feeding bug, *Rhodnius prolixus*," J. Comp. Neurol. 331 : 17-32 ; 1991.
- Vallarino, M. and others. "Distribution of FMRFamide-like immunoreactivity in the brain of the elasmobranch fish *Scyliorhinus canicula*," Peptides. 12 : 1321-1328 ; 1991.





การเตรียมสารเคมี

1. ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน (Phosphate Buffered Saline-PBS) 0.15 โมลาร์ พีเอช 7.2

NaCl	8.00	กรัม
KCl	0.20	กรัม
KH_2PO_4	0.20	กรัม
Na_2HPO_4	1.15	กรัม
หรือ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.15	กรัม
H_2O (distilled water)	1,000.00	มิลลิลิตร

2. สารละลาย Blotto 5 %

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

3. สารละลายสับสเตรท

Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)	30	มิลลิกรัม
Hydrogenperoxide (H_2O_2) 30%	20	ไมโครลิตร
Cobalt chloride (Co_2Cl_2) 1%	5	มิลลิลิตร
สารละลาย PBS 0.15 โมลาร์ พีเอช 7.2	100	มิลลิลิตร

ประวัติย่อของผู้วิจัย

ชื่อ นางสาววันเพ็ญ ชื่อสกุล สาทราชทองคำ

เกิดวันที่ 28 เดือน ธันวาคม พุทธศักราช 2508

สถานที่เกิด กรุงเทพมหานคร

สถานที่อยู่ปัจจุบัน บ้านเลขที่ 12 หมู่ 1 ถนนสุขุมวิท 93

แขวงบางจาก เขตพระโขนง

กรุงเทพ ฯ 10250

สถานที่ทำงาน มหาวิทยาลัยศรีปทุม เลขที่ 61 ถนนพหลโยธิน

แขวงจตุจักร เขตบางเขน กรุงเทพ ฯ 10900

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2527 มัธยมตอนปลาย (แผนกวิทยาศาสตร์) จากโรงเรียนมัธยม
วัดธาตุทอง กรุงเทพ ฯ

พ.ศ. 2531 ค.บ. (เคมี) จากสถาบันราชภัฏจันทรเกษม
กรุงเทพ ฯ

พ.ศ. 2539 วท.ม. (เคมีชีวภาพ) จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ประสานมิตร กรุงเทพ ฯ

การแยกและทำให้บริสุทธิ์ของสารคล้าย FMRFamide
ในก้านตาของกิ้งก่ามกราม
โดยวิธี RP-HPLC



บทคัดย่อ
ของ
วันเพ็ญ สหราชทองคำ

เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิชาเอกเคมีชีวภาพ
พฤษภาคม 2539

จากการใช้กระบวนการ RP-HPLC 8 ขั้นตอนในการแยกและทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย FMRFamide ในก้านตาของกิ้งก่ามรกต และใช้วิธีการ Dot-ELISA ติดตามตรวจสอบแฟรคชัน ที่มีนิวโรเปปไทด์คล้าย FMRFamide ด้วยการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สร้างโดยการปลูก ภูมิคุ้มกันในหนูขาวด้วย FMRFamide หรือ KNEFIRFamide สามารถทำให้นิวโรเปปไทด์คล้าย FMRFamide บริสุทธิ์ได้ 5 รูปแบบ ซึ่งนิวโรเปปไทด์บางรูปแบบหรืออาจทั้ง 5 รูปแบบน่าจะ แตกต่างจากนิวโรเปปไทด์คล้าย FMRFamide ที่มีรายงานมาก่อนในสัตว์กลุ่มครีเสตาเซียน



**ISOLATION AND PURIFICATION OF FMRFamide-LIKE SUBSTANCES
IN THE EYESTALK OF GIANT FRESHWATER PRAWN,
Macrobrachium rosenbergii BY RP-HPLC**



**AN ABSTRACT
BY
WANPEN SARAITHONGKUM**

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

May 1996

Five FMRFamide-like neuropeptides were isolated from an extract of eyestalks from the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* using eight steps of RP-HPLC. The detection of FMRFamide-immunoreactivity was done by Dot-ELISA using monoclonal antibodies raised against FMRFamide or KNEFIRFamide. Some of them or possibly all of them are different from those previously described in crustacean.

