

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์  
ทุนอุดหนุนการวิจัย  
จาก  
งบประมาณแผ่นดินประจำปี 2540

การแยกบริสุทธิ์สารคล้ายฮอร์โมน FMRFamide  
จากก้านตาของกุ้งก้ามกราม

Purification of FMRFamide-like Substances  
from the Eyestalk of the Giant Freshwater Prawn  
*Macrobrachium rosenbergii*

595.3  
n498  
ร.3

วีระวรรณ สิทธิกรกุล ไพศาล สิทธิกรกุล  
นรินทร์ บุญอิงเพชรพงศ์ และ ศิวาพร ลงยันต์  
ภาควิชาชีววิทยา และภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์  
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

๕๙๕.๓  
๓๕๙๘  
จ.๓

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์  
ทุนอุดหนุนการวิจัย  
จาก  
งบประมาณแผ่นดินประจำปี 2540

การแยกบริสุทธิ์สารคล้ายฮอร์โมน FMRFamide  
จากก้านตาของกุ้งก้ามกราม

Purification of FMRFamide-like Substances  
from the Eyestalk of the Giant Freshwater Prawn  
*Macrobrachium rosenbergii*

๒๕๔๓, 2543

วีระวรรณ สิทธิกรกุล ไพศาล สิทธิกรกุล  
นิรันดร์ บุญอิงเพริศพงศ์ และ ศิวาพร ลงยันต์  
ภาควิชาชีววิทยา และภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์  
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

# 102.265

## กิติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ฝ่ายวิจัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร ที่ได้สนับสนุนให้ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2540 Dr. Antony O.W. Stretton, Department of Zoology, University of Wisconsin, Madison, U.S.A. ที่ได้อนุเคราะห์ monoclonal antibodies FM-23 และ AF1-62 ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อมรเพชรสม ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ และสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้อนุเคราะห์ในการหาน้ำหนักโมเลกุลของสารคล้าย FMRFamide Dr. Robin J. Philp Institute of Molecular and Cell Biology, The National University of Singapore, Singapore ที่ได้อนุเคราะห์หาลำดับกรดอะมิโนของสารคล้าย FMRFamide และภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร ที่ได้ให้การสนับสนุนจนโครงการวิจัยนี้สำเร็จไปด้วยดี

ผลงานวิจัยนี้ได้รับรางวัลโปสเตอร์ดีเด่นเนื้อหาวิชาการ สาขาชีววิทยา จากการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีครั้งที่ 23 ระหว่างวันที่ 20-22 ตุลาคม 2540 ที่จังหวัดเชียงใหม่ ได้นำขึ้นทูลเกล้าถวายสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ ในวันพระเทพรัตนราชสุดา เมื่อวันที่ 25 พฤศจิกายน 2540 ณ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร และได้รับการตอบรับเพื่อลงตีพิมพ์ในวารสาร Comparative Biochemistry and Physiology

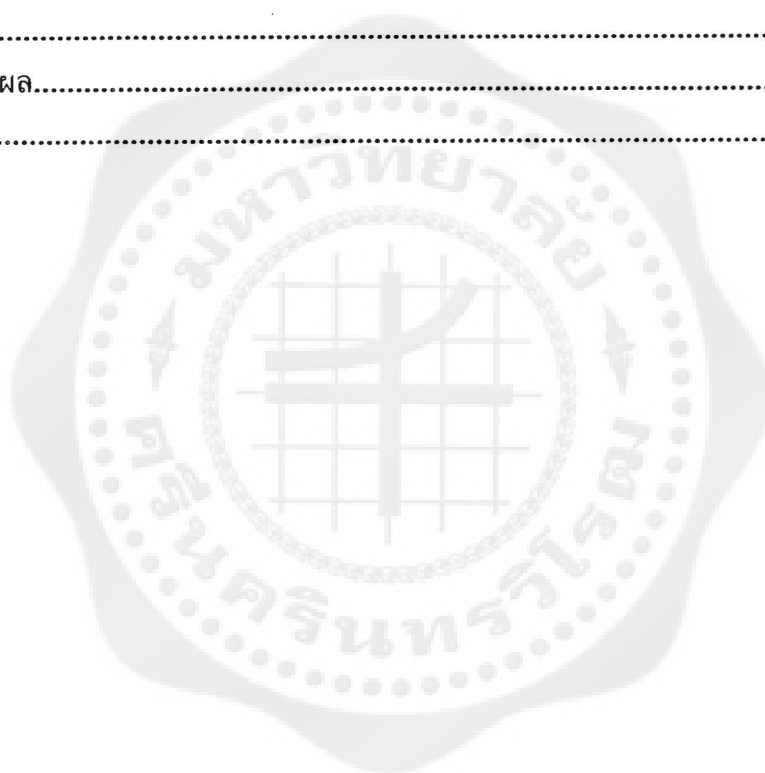
คณะผู้วิจัย

เมษายน 2541

# สารบัญเรื่อง

หน้า

สารบัญตาราง.....	I
สารบัญรูป.....	II
บทคัดย่อ.....	1
Abstract.....	3
บทนำ.....	5
วิธีการวิจัย.....	16
ผลการทดลอง.....	27
สรุปและอภิปรายผล.....	42
เอกสารอ้างอิง.....	46



## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ลำดับกรดอะมิโนของ FLPs (FMRFamide-like peptides) ในลัตว์ชนิดต่าง ๆ.....	12
2 ชนิดและขนาดของคอลัมน์ ระบบตัวทำละลาย เฟอร์เซนต์ของ acetonitrile ระยะเวลาและอัตราการไหลที่ใช้ในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์.....	24
3 ลำดับกรดอะมิโน น้ำหนักโมเลกุลและปริมาณ (recovery) ของ FLPs (1-5) ของกึ่งกัมกราม.....	40
4 เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ 2 subfamilies ของ FLPs ในกึ่งกัมกราม และคริสตาเซียนต่าง ๆ.....	41

## สารบัญรูป

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



**บพคัด้ย่อ**

การแยกสารคล้าย FMRFamide จากก้านตาจำนวน 5,000 ก้านตาทำโดยสกัดก้านตาที่บดละเอียดในเมทานอล-กรดอะซิติก-น้ำ (90:1:9) หลังจากนั้นสารสกัดผ่าน C18 cartridge แล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไปด้วย RP-HPLC 8 ขั้นตอนโดยใช้คอลัมน์ C18, C8, cyano และ phenyl และระบบตัวทำละลาย 3 ระบบคือ ACN/TFA, ACN/HFBA และ ACN/TEA การติดตามสารคล้าย FMRFamide ระหว่างการแยกบริสุทธิ์ใช้วิธี Dot-ELISA ด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดี FM-23 (สร้างต่อ FMRFamide) และ AF1-62 (สร้างต่อ KNEFIRFamide) การศึกษาครั้งนี้สามารถทำให้บริสุทธิ์เปปไทด์คล้าย FMRFamide ได้ 5 รูปแบบจาก 6 fractions ของ RP-HPLC ขั้นตอนที่ 1 เปปไทด์ 3 รูปแบบประกอบด้วยลำดับกรดอะมิโน 4 ตำแหน่งทางด้านปลาย C เหมือนกับเปปไทด์ที่พบใน pericardial organ ของล็อบสเตอร์ *Homarus americanus*, crayfish *Procambarus clarkii* และปู *Callinectes sapidus* แต่ลำดับกรดอะมิโนทางด้านปลาย N แตกต่างกัน เปปไทด์อีก 2 รูปแบบเป็นชนิดใหม่ (APALRLRFamide) และ (DRTPALRLRFamide) ประกอบด้วยลำดับกรดอะมิโน 6 ตำแหน่งทางด้านปลาย C คล้ายกับที่พบในแมงดาทะเล *Limulus polyphemus* และแมลงสาบ *Periplaneta americana* เปปไทด์ทั้ง 2 รูปแบบนี้แตกต่างจากรูปแบบที่มีรายงานในสัตว์พวกครัสเตเชียชนิดต่างๆ จากหลักฐานนี้เป็นเครื่องชี้ว่าอาจมียืนมากกว่า 1 ยืนทำหน้าที่ถอดรหัสให้เปปไทด์คล้าย FMRFamide ในกุ้งก้ามกราม



**ABSTRACT**

Isolation of the FMRFamide-like neuropeptides (FLPs) from the eyestalk of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* was performed using 5,000 ground eyestalks extracted in methanol-acetic acid-water (90:1:9). After the extract was partially purified using C18 cartridges, it was further purified by 8 steps of RP-HPLC using 4 kinds of columns: C18, C8, cyano and phenyl, and 3 solvent systems: acetonitrile (ACN)/trifluoroacetic acid, ACN/heptafluoroacetic acid and ACN/triethylammonium acetate. Dot-ELISA, using a mixture of two monoclonal antibodies, FM-23 (made against FMRFamide) and AF1-62 (made against KNEFIRFamide), was used to monitor FLPs in the fractions during the purification processes. Two subfamilies of five FLPs were obtained from the first six fractions of the first step of purification by RP-HPLC; four of them are new sequences. Three FLPs, DRNFLRFamide, ADKNFLRFamide and NYDKNFLRFamide share 5-7 common C-terminus residues with those found in the pericardial organs of *Homarus americanus*, *Callinectes sapidus* and *Procambarus clarkii*. The other two FLPs, APALRLRFamide and DRTPALRLRFamide, share 6 common residues at the C-terminus with those found in *Limulus polyphemus* and *Periplaneta americana*. These findings suggest that more than one transcript might be responsible for encoding FLPs in *M. rosenbergii*.



## บทนำ

การควบคุมการทำงานของระบบต่าง ๆ ในร่างกายของสัตว์กลุ่มครัสเตเชีย (crustacean) เช่น กุ้งและปู ส่วนหนึ่งมีการควบคุมโดยระบบต่อมไร้ท่อ (endocrine system) ซึ่งเป็นระบบที่ประกอบด้วย neurosecretory cell และ neurohemal organ โดย neurosecretory cell ทำหน้าที่ผลิตและลำเลียงฮอร์โมนที่สร้างขึ้นไปสะสมยัง neurohemal organ บริเวณต่าง ๆ เพื่อรอการหลั่งเข้าสู่เลือดหรือฮีโมลิมป์ (hemo-lymph) สำหรับต่อมไร้ท่อที่สำคัญในสัตว์กลุ่มครัสเตเชีย 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 externa terminalis เป็นกลุ่ม neurosecretory cell ที่สำคัญ ทำหน้าที่สร้างฮอร์โมนหลายชนิด และส่งไปสะสมที่ต่อมไซนัส (sinus gland) ซึ่งเป็น neurohemal organ ฮอร์โมนเหล่านี้ได้แก่ ฮอร์โมนที่ยับยั้งการลอกคราบ (molt inhibiting hormone-MIH) (Chang, Bruce and Newcomb, 1987) ฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดของสัตว์กลุ่มครัสเตเชีย (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 ในก้านตาของสัตว์พวกครัสเตเชียโดยกระบวนการ immunocytochemistry โดยใช้แอนติซีรัมต่อฮอร์โมนชนิดต่าง 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) ซึ่งเป็นเครื่องชี้ว่าสารคล้ายฮอร์โมนเหล่านี้ น่าจะมีบทบาทเป็นนิวโรฮอร์โมน (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) จากการผลิตแอนติซีรัมต่อ 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 ตรงบริเวณไฮโปสโตม (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) กลุ่มใยประสาทบริเวณคอหอย (pharyngeal plexus) กลุ่มใยประสาทใต้กล้ามเนื้อและผิวหนัง (subepidermal and submuscular plexuses) ส่วนต่างๆ ของอวัยวะสืบพันธุ์ (Johnston et al., 1996b) แสดงถึงความสำคัญของ FLI ว่ามีบทบาทเกี่ยวกับการทำงานของระบบประสาทตลอดลำตัว ได้มีรายงานการทำให้บริสุทธิ์ FLP ในหนอนตัวแบนหลายชนิด ได้แก่ พยาธิใบไม้ในแกะ *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 เซลล์ประสาทในส่วนของคอหอย (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) และเพรียงดอกไม้ *Sabellastarte magnifica* (Diaz-Miranda et al., 1991) สำหรับการทำให้บริสุทธิ์ในปลิง *Hirudo nudiolinolis* 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) โดยพบว่านิวโรเปปไทด์นี้ทำหน้าที่เป็นนิวโรโมดูเลเตอร์ในวงจรประสาทและเป็นนิวโรฮอร์โมนที่มีผลต่อการทำงานของหัวใจและควบคุมอัตราการเต้นของหัวใจ (Fujiwara-Sakata and Kobayashi, 1994) การศึกษาถึงสารที่กระตุ้นการทำงานของหัวใจในหอย *Rapana thomasiana* โดยใช้วิธีการทดสอบทางชีวภาพ (bioassay) พบว่า ถ้าใช้สาร 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 ปมประสาทพีดัล (pedal ganglia) และปมประสาทวิสเซอร์ลัล (visceral ganglia) และพบสารนี้กระจายอยู่จำนวนน้อยในบริเวณอวัยวะสืบพันธุ์ (gonad) หัวใจ และกล้ามเนื้อ (Too and Croll, 1995)

ในสัตว์กลุ่มหอยนี้ นอกจากในหอย 2 ฝา *Macrocallista nimbosa* ซึ่งมีรายงานพบเฉพาะ FMRFamide แล้ว สัตว์ในกลุ่มนี้ทุกชนิดจะพบ FMRFamide ด้วยเช่นกัน ในทากทะเล *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 ในปมประสาทส่วนนอกของแมลงวัน *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)

ในสัตว์พวกครัสตาเซียน (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 ลิทธิกรกุล และคณะ 2538) ได้มีการศึกษาในครัสตาเซียน 2 ชนิด คือ ปู *Carcinus maenas* และกุ้ง crayfish *Orconectes limosus* จะพบสารคล้าย FMRFamide กระจายตัวอยู่ในปมประสาทตา (optic ganglia) ในบริเวณที่คล้ายคลึงกันในก้านตา โดยจะพบตัวเซลล์ประสาทขนาดใหญ่ที่มีสารนี้ในส่วนของ 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* พบว่าสารนี้จะมีผลในการเพิ่มความแรงและความถี่ในการเต้นของหัวใจรวมทั้งเพิ่มอัตราการไหลของฮีโมลิมพ์ (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 และเส้นประสาทกลางตัว (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) และจะพบสารนี้ในปริมาณสูงในส่วนของไซสันหลังและไฮโปทาลามัส และพบในปริมาณต่ำในส่วนของซีรีเบลลัม (cerebellum) และเสตริยัตัม (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) จนถึงไซสันหลัง (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 มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการทำงานระบบต่าง ๆ ของร่างกาย ซึ่งอาจทำหน้าที่เป็นได้ทั้งสารสื่อประสาท (neurotransmitter) นิวโรโมดูเลเตอร์ (neuromodulator) และนิวโรฮอร์โมน (neurohormone) ขึ้นอยู่กับรูปแบบและเนื้อเยื่อเป้าหมายนั้น ๆ จากการศึกษาการปรากฏของ FLI ในก้านตากลุ่มก้ามกราม พบ FLI ในเซลล์ประสาทต่าง ๆ มากมาย (วีระวรรณ และคณะ 2538) ซึ่งยังไม่มีรายงานการพิสูจน์ทราบโครงสร้างของ FLP จากก้านตาของกุ้งก้ามกราม นอกจากใน pericardial organ จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะแยกสกัดและทำให้บริสุทธิ์ FLP เพื่อนำไปหาโครงสร้างต่อไป

ตั้งนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงเป็นการแยกและการทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย FMRFamide จากก้านตากลุ่มก้ามกรามโดยกระบวนการ Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) ระบบต่าง ๆ ประกอบกับใช้วิธี Dot-Enzyme Link Immuno-sorbent Assay (Dot-ELISA) ในการติดตามสารคล้าย FMRFamide ในแฟรคชันต่าง ๆ หลังจากการแยกด้วยกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนต่าง ๆ แล้ว ซึ่งคาดว่าวิธี Dot-ELISA สามารถทำได้อย่างมีประสิทธิภาพและรวดเร็ว เพราะวิธีนี้เป็นวิธี

ที่มีความไว (sensitivity) สูงเทียบเท่ากับ Radioimmunoassay (RIA) แต่ไม่สิ้นเปลืองวัสดุและมีความรวดเร็วกว่า RIA มาก (Sithigomgul, Stretton and Cowden, 1991)

การที่เลือกกึ่งกัมมการมาใช้เป็นสัตว์ทดลอง เนื่องจากกึ่งกัมมการเป็นสัตว์ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย ความต้องการของผู้บริโภคมีปริมาณเพิ่มขึ้นอยู่ตลอดเวลาจึงมีการเพาะเลี้ยงกันมาก ดังนั้นถ้าสามารถแยกและทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย FMRFamide ซึ่งเป็นเปปไทด์ฮอร์โมนจากก้านตาของกึ่งกัมมการให้บริสุทธิ์ได้ ก็สามารถนำไปศึกษาถึงโครงสร้างของเปปไทด์ฮอร์โมนนี้ก่อนที่จะศึกษาถึงบทบาทของฮอร์โมนนี้ที่มีผลต่อกระบวนการทางสรีระและการดำรงชีวิตของกึ่งกัมมการอันอาจเป็นประโยชน์ต่อการเพาะเลี้ยงกึ่งกัมมการต่อไปได้

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

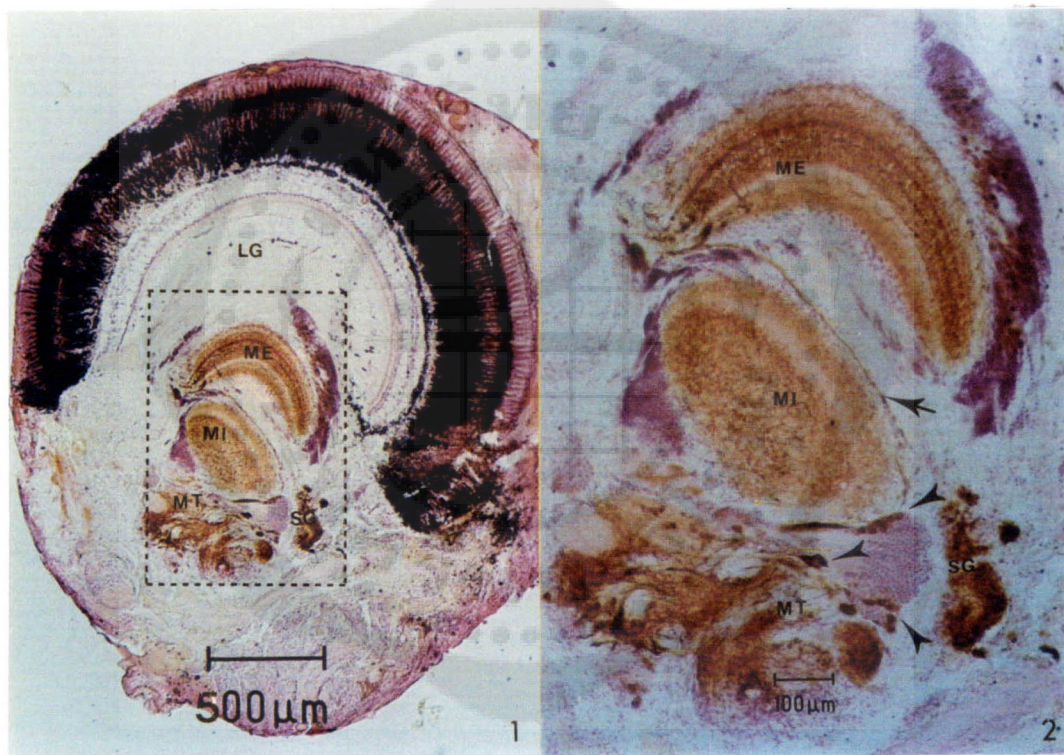
ตารางที่ 1 ลำดับกรดอะมิโนของ FLPs (FMRFamide-like peptides) ในสัตว์ชนิดต่าง ๆ

Phylum/Species	Amino acid sequence	Reference
<b>Cocenterata</b> <i>Anthopleura tissima</i>	pEGRFa	Grimmelikhajzen and Graff, 1986
<b>Platyhelminthes</b> <i>Dugesia tigrina</i>	GYIRFa	Johnston et al., 1995
<i>Bdelloura candida</i>	GYIRFa 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> <i>Ascaris suum</i>	KNEFIRFa KHEYLRFa KSAYMRFa SGKPTFIRFa FIRFa AGPRFIRFa AVPGVLRFa GFGDEMSMPGVLRFa FGDEMSMPGVLRFa SDIGISEPNFLRFa PNFLRFa GLGPRPLRFa	Cowden and Stretton, 1995
<i>Caenorhaditis elegan</i>	KHEYLRFa KPSFVRFa KNEFIRFa RNKFEFIRFa APEASPFIRFa HFYNFSSSRKPNFLRFa SDNPFLRFa SADPNFLRFa AAANPNFLRFa	Sithigorngul and Stretton, 1995
<b>Annelida</b> <i>Nereis virens</i>	FMRFa	Krajniak and Price, 1990
<i>Hirudo medicinalis</i>	FMRFa FLRFa YMRFa YLRFa 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 FLRFa QFYRFa EFLRFa GDPFLRFa SDPFLRFa SDPFFRFa SDPYLRFa	Saunders et al., 1991
<i>Aplysia</i>	FMRFa FLRFa	Cottrell , 1989
<i>Helix</i>	FMRFa FLRFa PQDPFLRFa NDPFLRFa SDPFLRFa	Cottrell , 1989
<i>Siphonaria</i>	FMRFa FLRFa GDPFLRFa NDPFLRFa	Cottrell , 1989
<i>Octopus vulgaris</i>	FMRFa FLRFa AFLRFa 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 TRFa	Brown et al., 1994

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

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(FMRFanide-like peptides) ในก้านตาของกุ้งก้ามกราม

*Macrobrachium rosenbergii*

LG = Lamina ganglionalis

ME = Medulla externa

MI = Medulla interna

MT = Medulla terminalis

# วิธีการวิจัย



## สัตว์ทดลอง

กิ้งก่ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* ตัวโตเต็มวัย น้ำหนักประมาณ 15–35 กรัม รวบรวมซื้อจากตลาดกลาง จังหวัดพระนครศรีอยุธยา

## วิธีการ

### 1. การเก็บรวบรวมตากุ้งก้ามกราม

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

### 2. การเตรียมสารสกัดจากก้านตา (eyestalk extract) ของกิ้งก่ามกราม

นำตากุ้งที่เก็บรวบรวมไว้ประมาณ 5,000 ตา มาบดให้เป็นผงละเอียดในขณะเย็นจัด ซึ่งจะบดรวมกับน้ำแข็งแห้งโดยใช้ครกหินในสภาวะที่เย็นจัดที่วางบนน้ำแข็งแห้ง แล้วสกัดสารจากก้านตาด้วยสารละลายเมทานอล-กรดอะซิติก (เมทานอล : กรดอะซิติก : น้ำ / 90:1:9) โดยนำผงละเอียดของตากุ้งใส่ลงในสารละลายเมทานอล-กรดอะซิติก ในปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร/ตา บดอีกครั้งด้วยเครื่องบด (homogenizer, Janke & Kunkel) แช่ในตู้เย็นอุณหภูมิ  $4^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 12–24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นแยกตะกอนออกโดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงด้วยแรงเหวี่ยง 10,000 g เป็นเวลา 15 นาที แยกเอาส่วนน้ำใส (supernatant) เก็บไว้ส่วนตะกอนที่เหลือนำไปสกัดซ้ำอีกครั้งด้วยสารละลายเมทานอล-กรดอะซิติก นำไปปั่นแยกด้วยแรงเหวี่ยงเท่าเดิม รวมส่วนน้ำใสที่ได้จากการสกัดทั้งสองครั้งเข้าด้วยกัน นำสารสกัดที่ได้ไประเหยแห้งเพื่อกำจัดตัวทำละลายเมทานอลและกรดอะซิติกออกจนหมดด้วยเครื่องระเหยแห้ง (speed vacuum concentrator, Savant) เติม 1% trifluoroacetic acid (TFA) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายในสารสกัดเป็น 0.1% TFA ปั่นแยกตะกอนด้วยแรงเหวี่ยง 10,000 g เป็นเวลา 15 นาที แยกส่วนน้ำใสเก็บไว้ซึ่งเป็นสารสกัดจากก้านตาของกิ้งก่ามกราม (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 จากก้านตาของกิ้งก่ามกราคมด้วยกระบวนการ 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 Sithigomgul and Stretton. 1995

#### 5. การตรวจหาสารคล้าย FMRFamide ในก้านตาของกิ้งก่ามกราคม 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 ออบแผ่นไนโตรเซลลูโลสที่หยดสารแต่ละแฟรคชันให้แห้งในตู้ที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปอบในไอของ 0.4% glutaraldehyde ที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 8 ชั่วโมง (ในขั้นตอนนี้ทำโดยวางแผ่นไนโตรเซลลูโลสไว้ในกล่องปิดฝาสนิทที่มีไอของ glutaraldehyde) นำไปตรึง (fix) ช้ำด้วยสารละลาย 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), 0.05% cobalt chloride (CoCl<sub>2</sub>) 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 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรโดยเจือจางทีละ 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 % มาวิเคราะห์หา น้ำหนักโมเลกุล 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

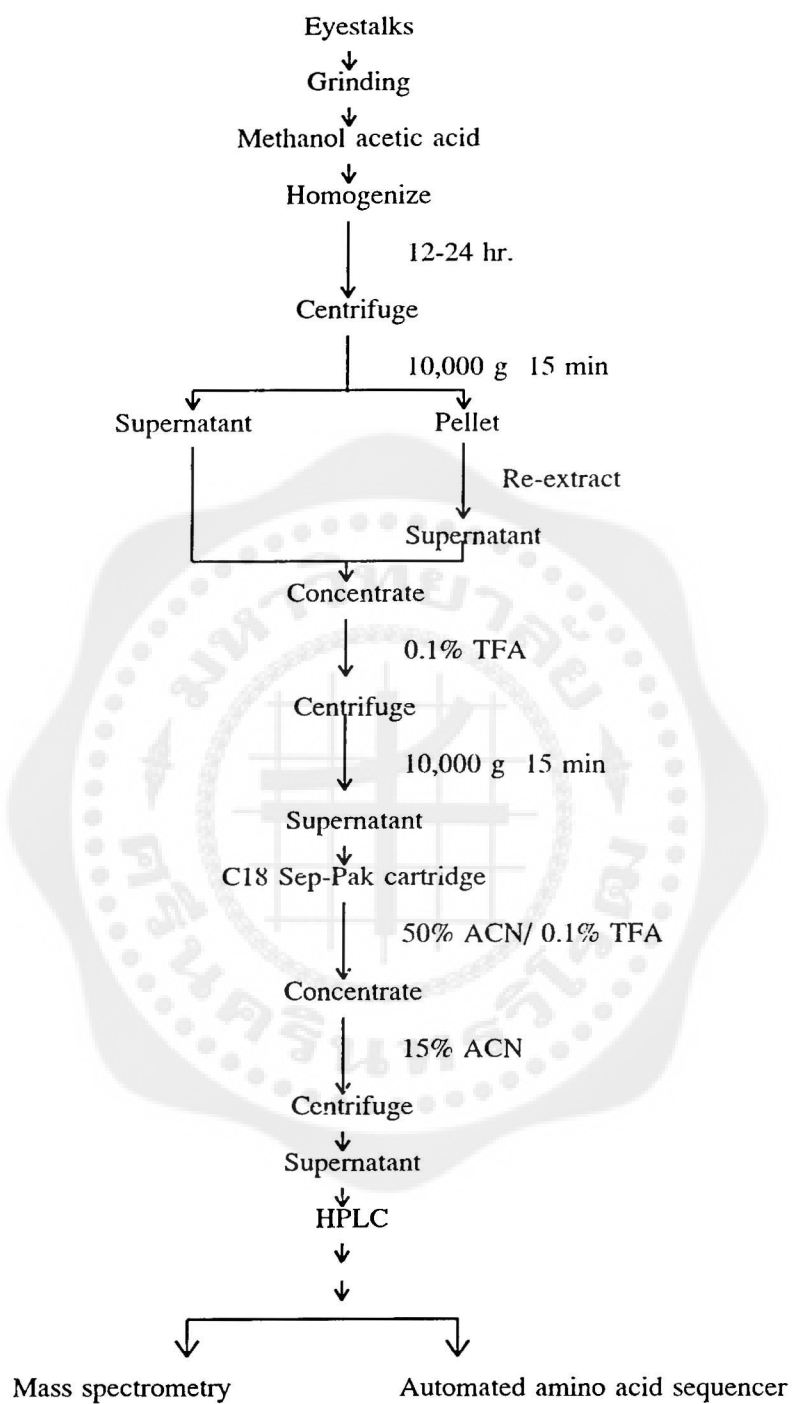
1. ตรวจสอบสังเกตการเกิดสีของแต่ละแฟรคชันที่ได้จากการผ่านกระบวนการ RP-HPLC ชั้นแรกซึ่งหยดบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมื่อเสร็จกระบวนการ Dot-ELISA แล้ว เพื่อนำแฟรคชันที่ติดสีไปแยกด้วย RP-HPLC ในขั้นตอนต่อไป

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

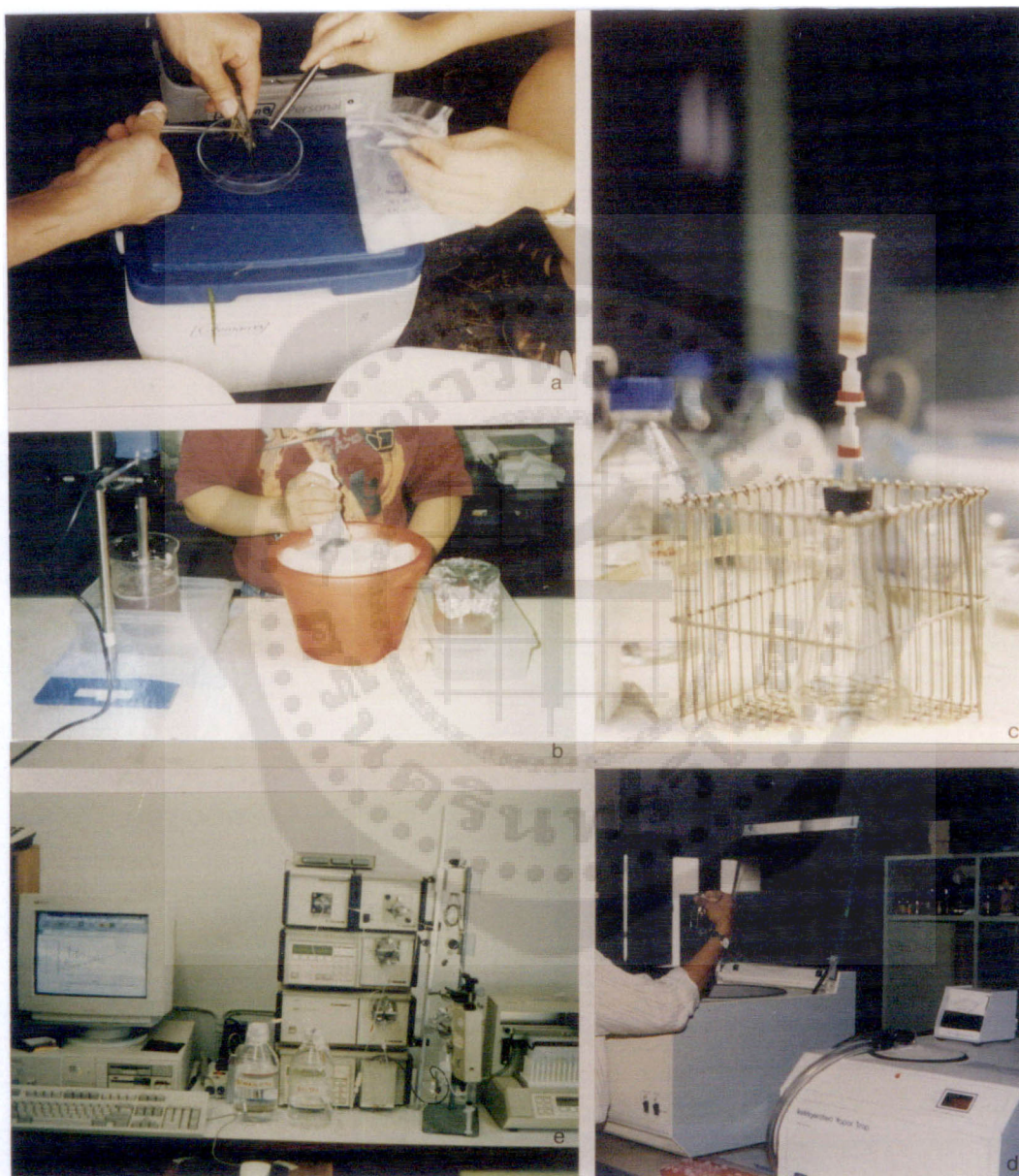
นำเปปไทด์บริสุทธิ์ประมาณ 50-70% ของแฟรคชันที่ได้ไปตรวจหาลำดับกรดอะมิโนโดย automated Edman degradation (Applied Biosystems Process Sequencer) โดย Dr. Robin J. Philp ณ Institute of Molecular and Cell Biology, National University of Singapore ประเทศสิงคโปร์ ปริมาณกรดอะมิโนตัวแรกที่ได้รับในการหาลำดับกรดอะมิโน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



รูปที่ 2 ขั้นตอนวิธีการเตรียมสารสกัดจากก้านตากุ้งก้ามกรามและการทำให้บริสุทธิ์ FLPs

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





ตารางที่ 2 ชนิดและขนาดของคอลัมน์ ระบบตัวทำละลาย เปอร์เซนต์ของ acetonitrile ระยะเวลาและอัตราการไหลที่ใช้ในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์

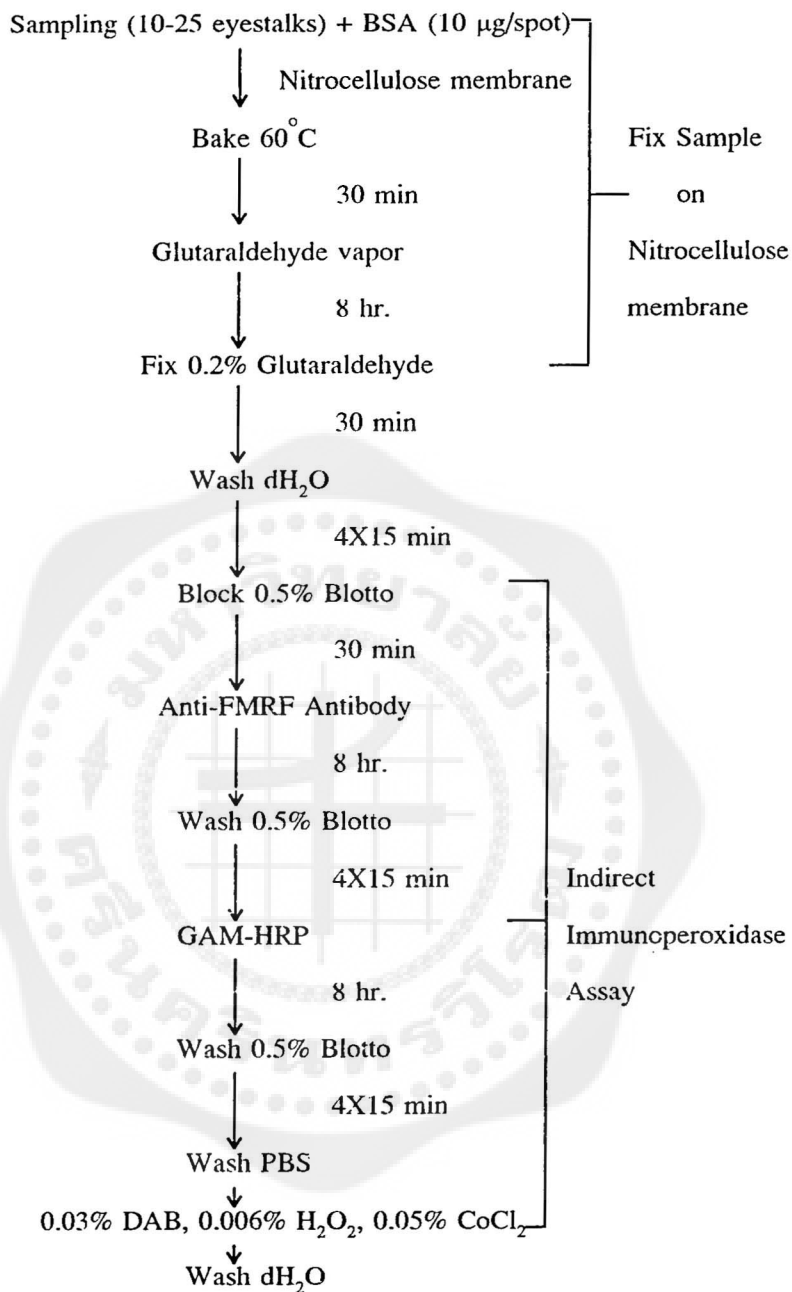
Step	Column Type	Column size (mm)	Counter-ion	Gradient of Acetonitrile (percent)	Duration (min)	Flow rate (ml/min)
1	Delta-Pak C18	25 x 100	TFA	16 - 64	60	5
2	Bondapak C8	25 x 100	HFBA	20 - 56	45	5
3	Bondapak C8	25 x 100	TEA	12 - 48	45	5
4	Microsorb MV Cyano	4.6 x 250	TFA	16 - 52	45	1
5	Microsorb MV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

HFBA = Heptafluorobutyric acid (HPLC grade, Sigma)

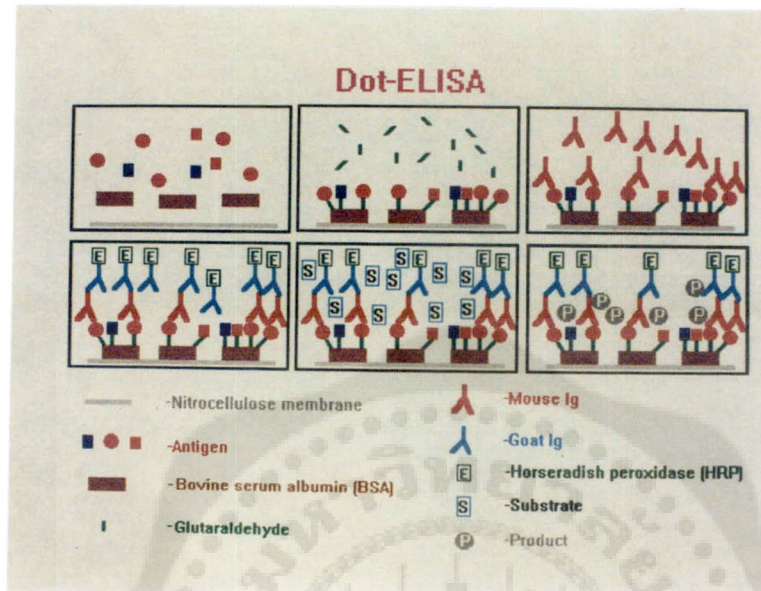
TFA = Trifluoroacetic acid (HPLC grade, Sigma)

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



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



**ผลการทดลอง**

### 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 จากก้านตา กุ้ง ก้ามกราม โดย 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 ประมาณครั้งละ 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 C18 ระบบตัวทำละลาย ACN/HFBA พบการกระจายของ FLP อยู่ในช่วงแฟรคชันที่ 25-35 โดยแฟรคชันที่ 26-29 มีความเข้มของ FLI สูงสุด จึงนำแฟรคชันเหล่านี้ไปทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่อไป (รูปที่ 8)

### 4. การทำให้บริสุทธิ์ FLP ในขั้นตอนที่ 3

ใช้คอลัมน์ PrepPak 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 4 รูปแบบด้วยกันคือ FLP1, FLP2, FLP4 และ FLP5 ส่วนกลุ่มที่ 2 แฟรคชัน 32-35 สามารถทำให้บริสุทธิ์ FLP 1 รูปแบบได้แก่ FLP3 (รูปที่ 9 และ 10)

#### 5. การวิเคราะห์ FLP โดย Mass Spectrometry

จากการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโดย MALDI-TOF mass spectrometry พบว่าเปปไทด์ทั้ง 5 ชนิดให้ mass profile น้ำหนักโมเลกุลของเปปไทด์ทั้ง 5 ชนิดเพียง 1 พีกที่น้ำหนักโมเลกุลต่าง ๆ กัน แสดงให้เห็นว่าเปปไทด์ทั้ง 5 ชนิดเป็นเปปไทด์รูปแบบต่าง ๆ กัน และมีความบริสุทธิ์สูง สามารถนำไปตรวจหาลำดับกรดอะมิโนได้ (รูปที่ 11)

#### 6. การวิเคราะห์หาลำดับกรดอะมิโน

จากการใช้ automated Edman degradation 10 รอบ พบว่า FLP ทั้ง 5 รูปแบบ ประกอบด้วยกรดอะมิโน 7-10 หน่วยต่าง ๆ กัน โดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ FLP1, FLP2 และ FLP3 มีกรดอะมิโน 5-6 หน่วยเหมือนกัน ส่วนปลาย C ของสายเปปไทด์ประกอบด้วย NFLRFamide และกลุ่มที่ 2 คือ FLP4 และ FLP5 มีเปปไทด์ส่วนปลาย C เหมือนกัน 7 หน่วยคือ PALRLRFamide ซึ่งจากปริมาณกรดอะมิโนที่ได้ในแต่ละรอบของการตัดจะมีปริมาณชนิดเดียวกัน นอกจาก phenylalanine ตัวสุดท้ายซึ่งได้ปริมาณที่น้อยมาก เนื่องจากตัวกรดอะมิโนอาจหลุดออกในช่วงการล้างหลังจากตัดกรดอะมิโนตัวรองสุดท้าย (รูปที่ 12)

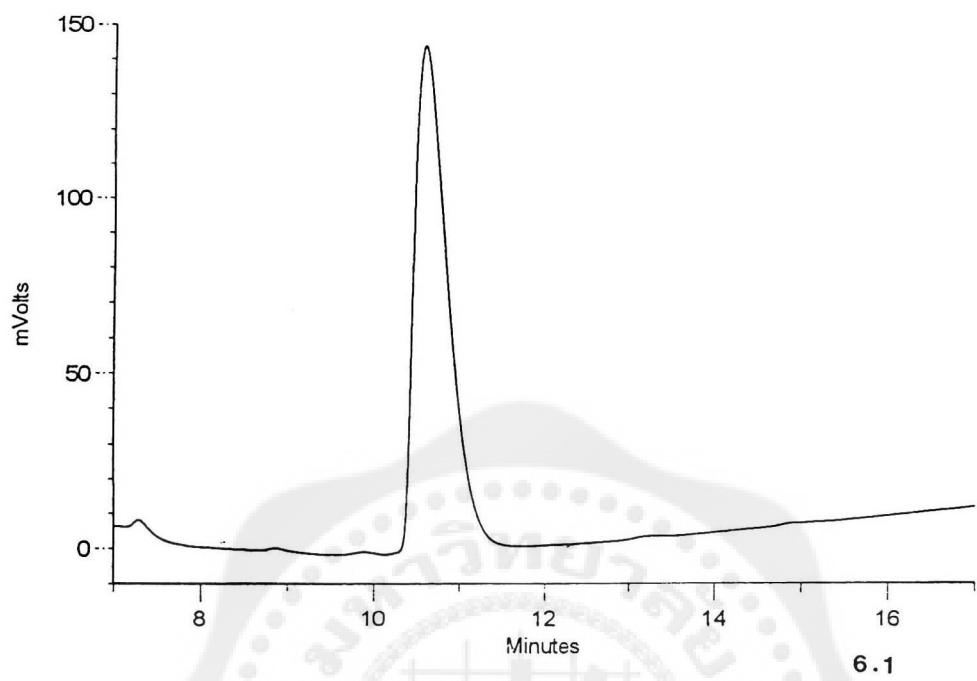
จากการคำนวณน้ำหนักโมเลกุลของเปปไทด์จากลำดับกรดอะมิโนที่ได้ พบว่าน้ำหนักโมเลกุลที่คำนวณได้ใกล้เคียงกับน้ำหนักโมเลกุลของเปปไทด์ที่หาได้จาก Mass Spectrometry (ตารางที่ 3) ซึ่งแอนติบอดีที่ใช้นั้นเป็นแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ -RFamide ดังนั้นจึงเป็นการยืนยันได้ว่าลำดับกรดอะมิโนที่ได้นั้นถูกต้อง

จากปริมาณกรดอะมิโนที่ได้รับในรอบแรกของการหาลำดับกรดอะมิโน นำมาคำนวณหาปริมาณเปปไทด์ที่ได้ทั้งหมด พบว่าเปปไทด์ที่ได้อยู่ในช่วง 100-280 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





6.1

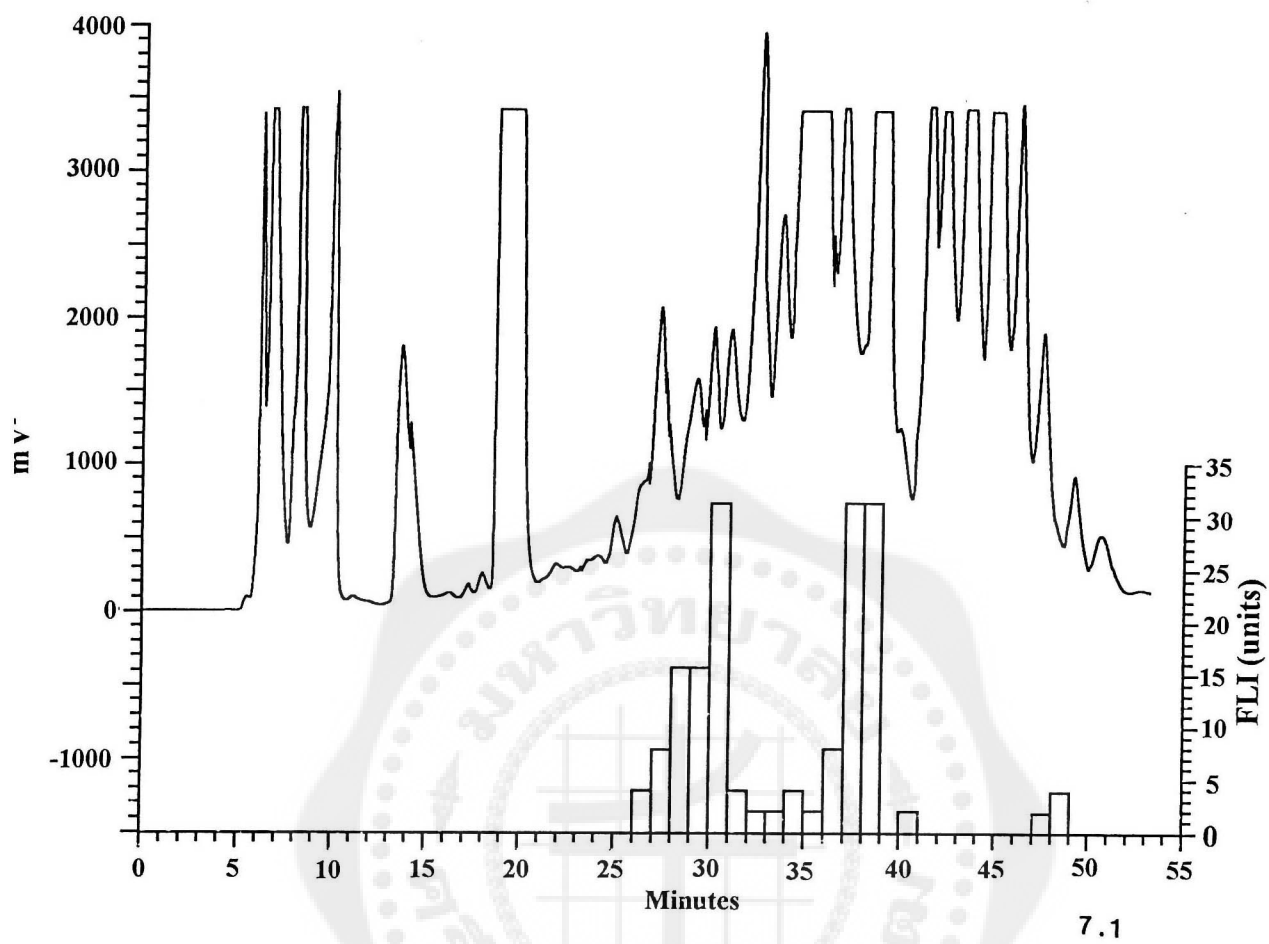


6.2

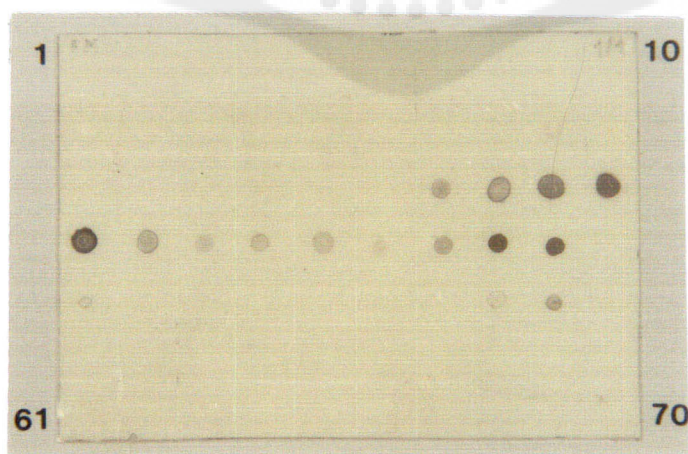
รูปที่ 7 การทำให้บริสุทธิ์ FLPs จากสารสกัดจากก้านตาดด้วย RP-HPLC ขั้นตอนแรก

- 7.1 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากก้านตาดึงก้ามกรามจำนวน 1,000 ก้านตาด หลังจากผ่านกระบวนการ RP-HPLC ขั้นตอนแรก (คอลัมน์ : PrepPak C18 ; ระบบตัวทำละลาย : ACN/TFA) และแผนภูมิแท่ง แสดงปริมาณของ FLP (unit) ที่ได้จากการแบ่งตัวอย่างประมาณ 10 ก้านตาด/จุด จากแฟรคชันต่างๆ 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 ก้านตาด

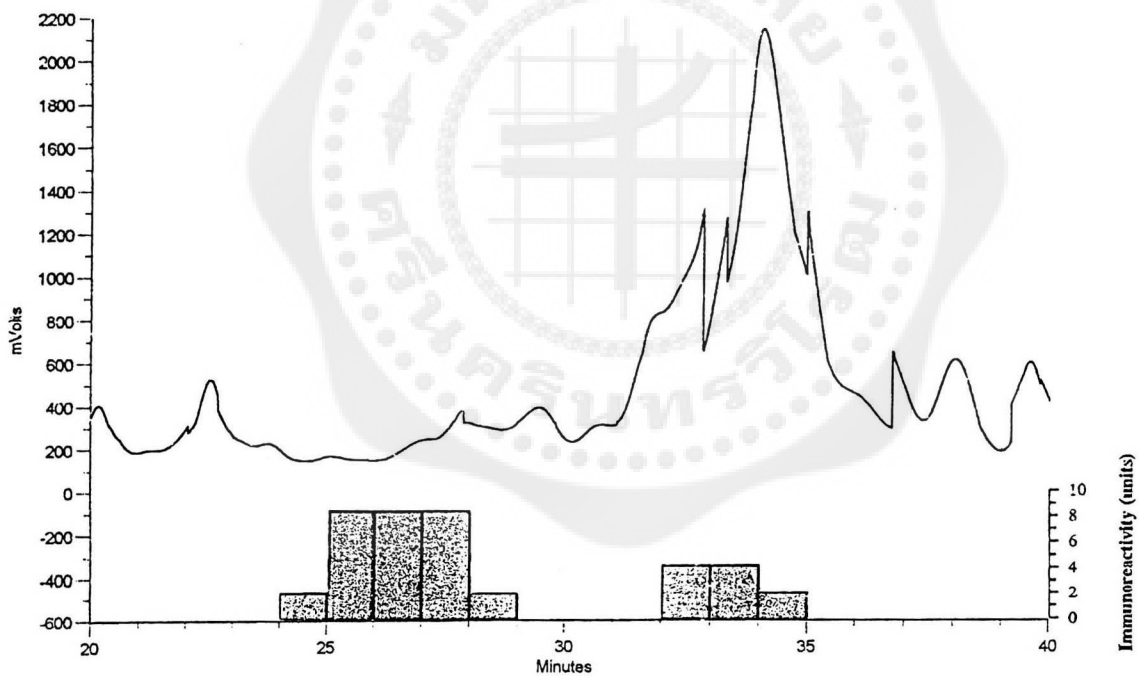




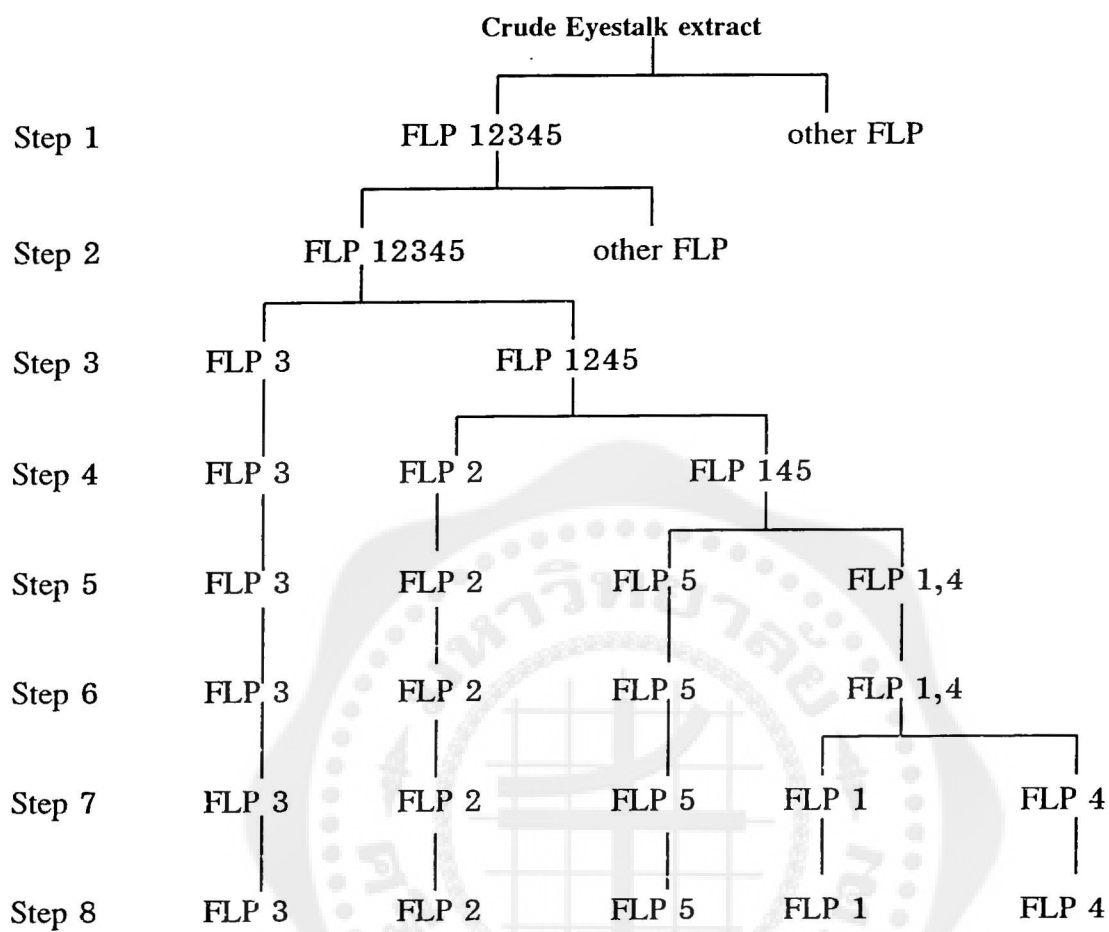
7.1



7.2



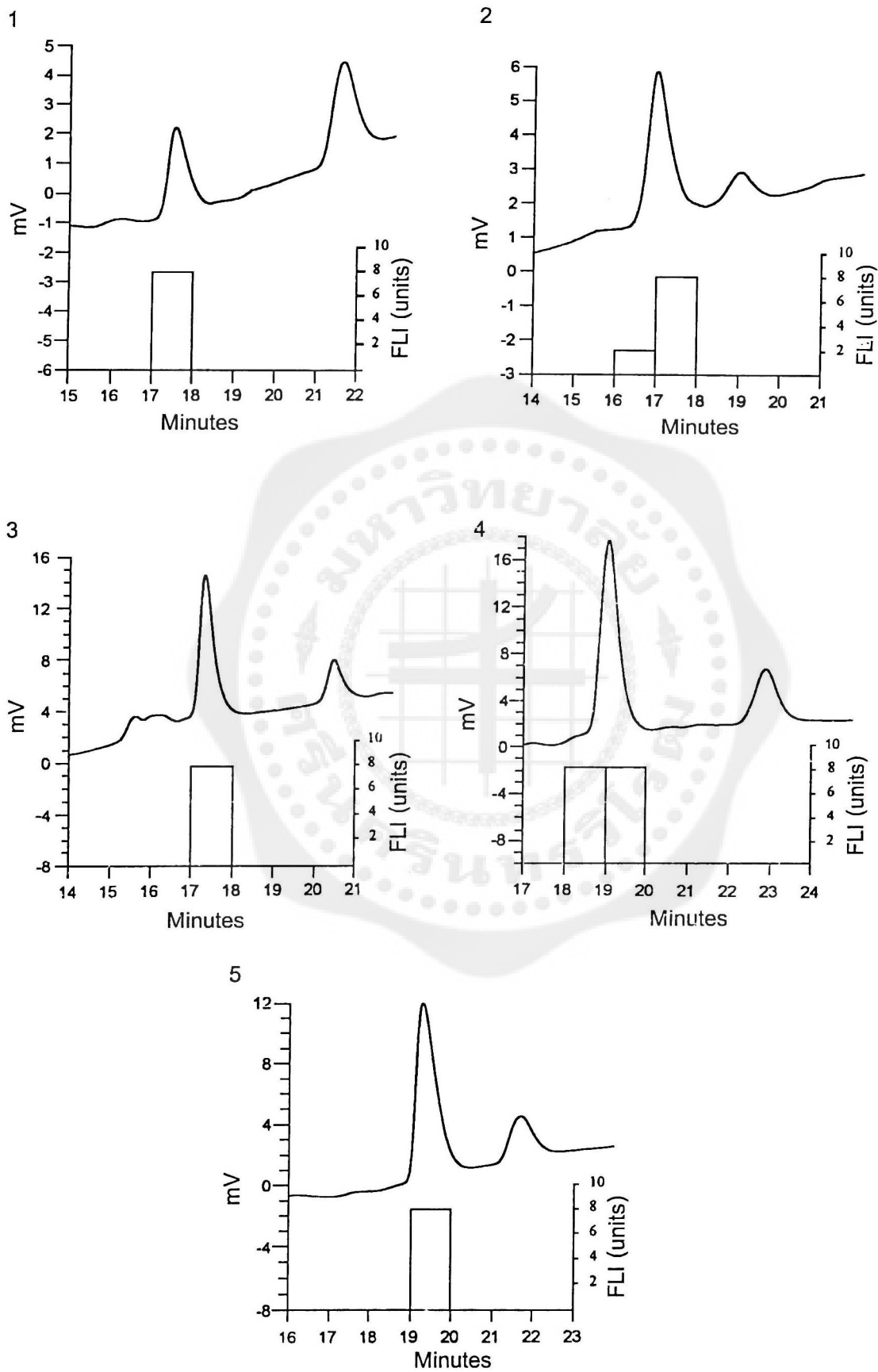
รูปที่ 8 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากก้านตาแพรดชั้นที่ 27-32 จำนวน 5,000 ก้านตา หลังจากผ่านกระบวนการ RP-HPLC ขั้นตอนที่ 2 (คอลัมน์ : PrePak C8 : ระบบตัวทำละลาย ACN/HFBA) และแผนภูมิแท่งแสดงปริมาณ FLP (unit) ที่ได้จากการแบ่งตัวอย่างประมาณ 10 ก้านตา/จุด ในการทำ Dot-ELISA

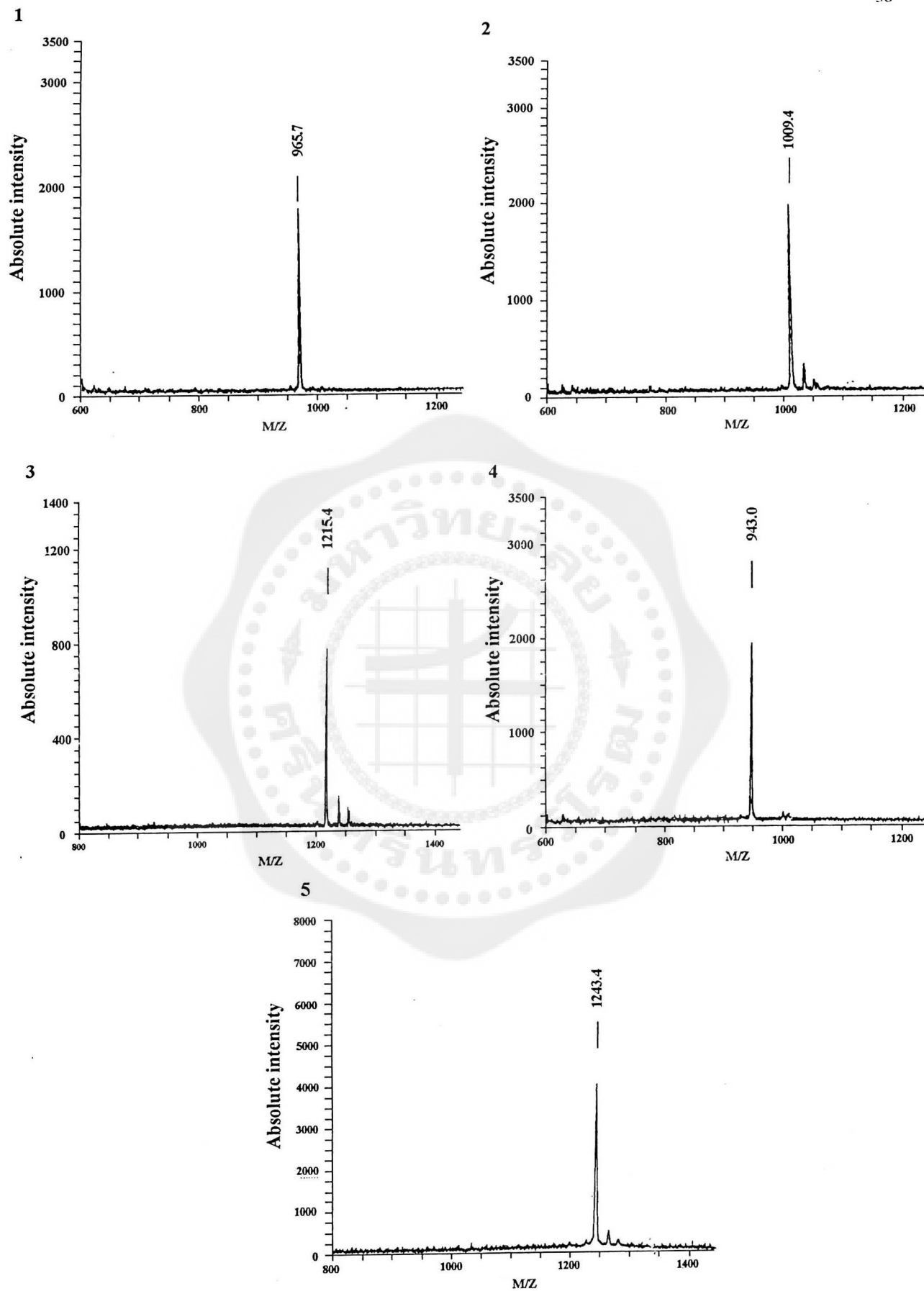


รูปที่ 9 การแยกในขั้นตอนที่ 1 ถึงขั้นตอนสุดท้าย

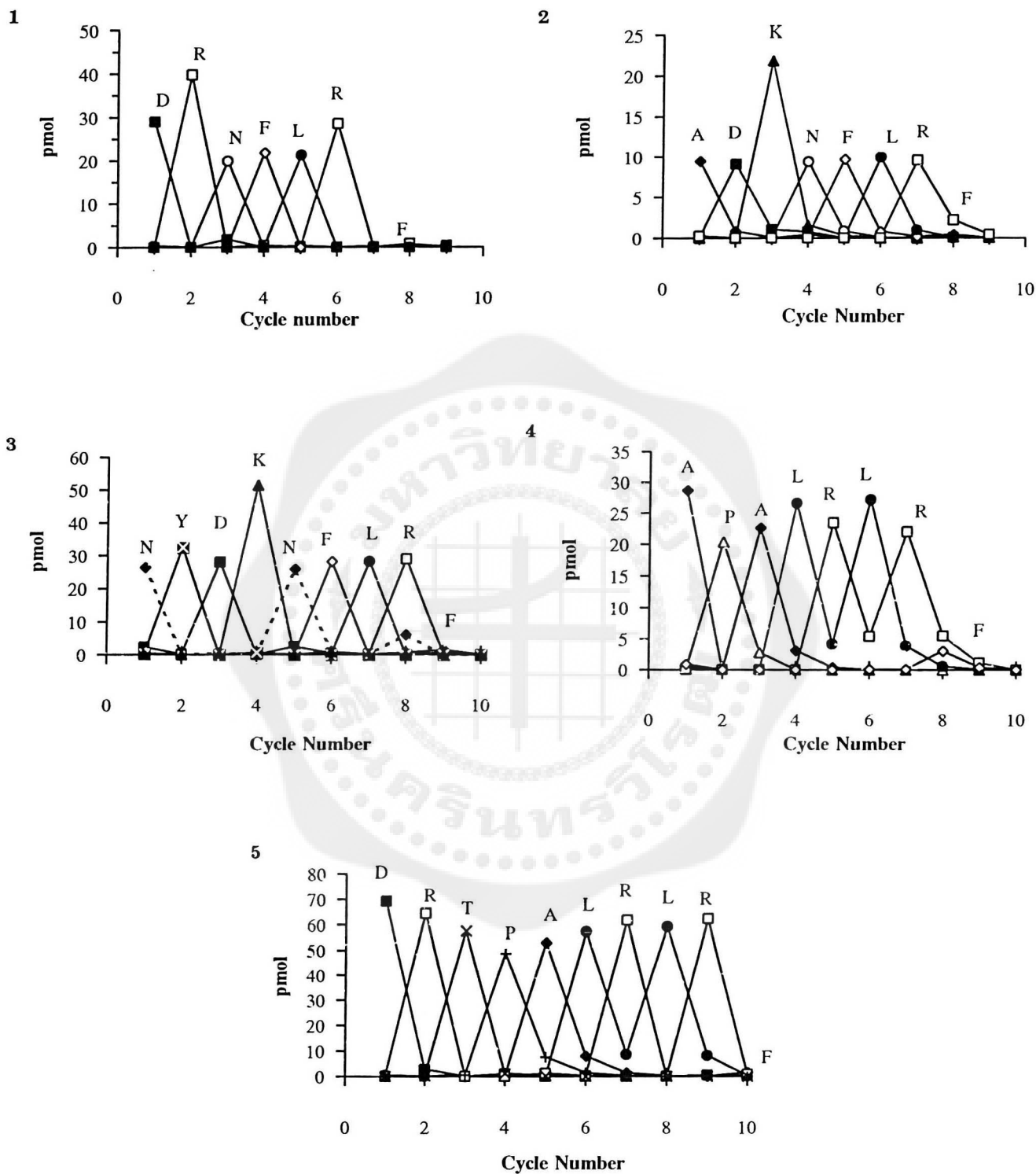
รูปที่ 10 การทำให้บริสุทธิ์ FLPs (1-5) ด้วย RP-HPLC ขั้นตอนสุดท้าย (ขั้นตอนที่ 8; คอลัมน์: cyano; ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA) แผนภูมิแท่งแสดง FLP unit ซึ่งประมาณจากการใช้ ก้านตา 50 ก้านตา ( $1\text{mV} = 0.001\mu$ )







รูปที่ 11 Matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry of 5 FLPs (1-5) โดยใช้ synthetic FMRamide เป็นตัวเทียบ (calibrant)



รูปที่ 12 การหาลำดับกรดอะมิโนของ FPLs (1-5) โดย Edmann degradation

ตารางที่ 3 ลำดับกรดอะมิโน นำหนักโมเลกุลและปริมาณ (recovery) ของ FLPs (1-5) ของกึ่งก้ามกราม

Name	Sequence	Expected Mass	Observed Mass	Amount (pmol)
Mar-FLP1	DRNFLRFamide	966.12	965.70	120
Mar-FLP2	ADKNFLRFamide	1009.19	1009.40	100
Mar-FLP3	NYDKNFLRFamide	1215.39	1215.40	130
Mar-FLP4	APALRLRFamide	942.17	943.00	180
Mar-FLP5	DRTPALRLRFamide	1243.49	1243.40	280



ตารางที่ 4 เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ 2 subfamilies ของ FLPs ในกุ้งก้ามกราม และครัสตาเซียนต่าง 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	GYNRSEFLRFamide	Krajniak, 1991.
<i>Procambarus clarkii</i>	NF1	NRNFLRFamide	Mercier et al., 1993.
	DF2	DRNFLRFamide	Mercier et al., 1993.
<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	FLP1	DRNFLRFamide	This study
	FLP2	ADKNFLRFamide	”
	FLP3	NYDKNFLRFamide	”
	FLP4	APALRLRFamide	”
	FLP5	DRTPALRLRFamide	”
<i>Limulus polyphemus</i>	HP	GGRSPSLRLRFamide	Gaus et al., 1993.
<i>Periplaneta americana</i>	-	ANRSPSLRLRFamide	Veenstra & Lambrou, 1995.

หมายเหตุ : Residue ที่ขีดเส้นใต้คือกรดอะมิโนที่เหมือนกับในสปีชีส์อื่น ๆ

สรุปและอภิปรายผล



จากการทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย FMRFamide จากก้านตาของกิ้งก่ามกรามจำนวน 5,000 ก้านตา ได้เปปไทด์บริสุทธิ์ 5 รูปแบบ ในปริมาณ 100–280 pmol คาดว่ายังมีเปปไทด์คล้าย FMRFamide อีกหลายรูปแบบที่ยังไม่สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ เพราะปริมาณของเปปไทด์ที่ถูกแยกกลดน้อยลงจนความไวในการตรวจสอบด้วยวิธี Dot-ELISA ลดลง จนยากที่จะตรวจสอบได้ ทั้งนี้เนื่องจากการสูญเสียของเปปไทด์ในระหว่างการทำให้บริสุทธิ์ เพราะว่าเปปไทด์ที่มีปริมาณน้อยมาก การจับติดภาชนะเพียงเล็กน้อยก็อาจเป็นสาเหตุทำให้มีการสูญเสียของเปปไทด์มีเปอร์เซ็นต์สูงมาก และอีกประการหนึ่ง ชนิดของเปปไทด์ที่ยังไม่สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ยังไม่ทราบว่ามีย่อที่ชนิด หนึ่งในการประมาณค่าความเข้มของจุด (immunoreactivity intensity) เป็นวิธีที่ประมาณด้วยสายตา ซึ่งค่อนข้างหยาบ ทำให้มีความผิดพลาดในการประมาณค่าได้มาก ดังนั้นในการประเมินผลลัพธ์ของวิธี HPLC ที่ใช้ในการทำให้เปปไทด์บริสุทธิ์ยังไม่อาจประเมินได้ชัดเจนนัก แต่จากการประเมินค่าความสูงของพีคในการทำให้บริสุทธิ์ 2 ขั้นตอนสุดท้าย พบว่าความสูงของพีคของเปปไทด์ที่เกือบบริสุทธิ์หรือบริสุทธิ์แล้ว พบว่าความสูงของพีคใกล้เคียงกัน และค่าความเข้มของจุดใกล้เคียงกัน จึงคาดว่าในกระบวนการ HPLC น่าจะให้ผลลัพธ์ของเปปไทด์ค่อนข้างสูงใกล้เคียง 100% ดังนั้นการลดค่าความเข้มของจุดของเปปไทด์บริสุทธิ์ในขั้นตอนสุดท้ายเมื่อเทียบกับค่าความเข้มของจุดในการทำให้บริสุทธิ์ขั้นตอนแรก น่าจะเกิดจากการสูญเสียของเปปไทด์ในส่วนด้านข้างของพีค หรือจับติดภาชนะที่ใช้บรรจุ และเปปไทด์แยกออกจากส่วนผสมมากกว่ามีการสูญเสียเนื่องจากกระบวนการทำให้บริสุทธิ์โดย HPLC

เปปไทด์ 5 รูปแบบ (Mar FLP1–5) ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ 4 รูปแบบเป็นเปปไทด์รูปแบบใหม่ สามารถจัดกลุ่มได้เป็น 2 กลุ่มย่อย คือ กลุ่มย่อยที่ 1 ที่มีลำดับกรด -D-NFLRFamide เหมือนกัน และกลุ่มย่อยที่ 2 ที่มีส่วนลำดับกรด -PALRLRFamide เหมือนกัน (ตารางที่ 2)

สำหรับ Mar FLP1 มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับเปปไทด์ DF2 ที่พบใน pericardial organ ของกิ้ง crayfish *Procambarus clarkii* (Mercier et al., 1993) ลำดับเปปไทด์ในกลุ่มที่ 1 Mar FLP1–3 นั้นมีลำดับกรดอะมิโน 5–7 หน่วยเหมือนกับปลาย C ของเปปไทด์ F1 และ F2 ที่พบในกิ้งลอกสเตอร์ *Homarus americanus* (Trimmer et al., 1987) เปปไทด์ NF1 และ DF2 จากกิ้ง crayfish *Procambarus clarkii* (Mercier et al., 1993) และเปปไทด์ Cal-FaRP จากปูม้า *Callinectes sapidus* (Krajniak, 1991)

สำหรับเปปไทด์ในกลุ่มย่อยที่ 2 Mar-FLP4 และ 5 มีลักษณะต่างจากเปปไทด์ที่พบในคริสต์ดาเซียน อื่นๆ มาก เปปไทด์ทั้ง 2 นี้มีลำดับกรดอะมิโน 6–7 หน่วยทางปลาย C เหมือนกับ Lip-HP จากแมงดาทะเล *Limulus polyphemus* (Gaus et al., 1993) และ head peptide จากแมลงสาบ *Periplaneta americana* (Veenstra and Lambrou, 1995) (ตารางที่ 4)

จะเห็นได้ว่า FLP ในกิ้งก่ามกราม มีจำนวนหลายรูปแบบอาจมากกว่า 10 รูปแบบ ซึ่งจากการค้นพบในสัตว์อื่น เช่นในพยาธิไส้เดือน *Ascaris* (Cowden and Stretton, 1995) หนอนตัวกลม *Caenorhaditis elegans* (Sithigomgul and Stretton, 1995) ปลิง *Hirudo medicinalis* (3)

หอย *Helix aspera* (Lesser and Greeberg, 1993) หอยคัน *Lymnaea stagnalis* (Saunders et al., 1991) แมลงหวี่ *Drosophila* (Schneider and Taghert, 1988) ล้วนพบ FLP หลายรูปแบบในสัตว์ชนิดเดียวกัน (ตาราง 1)

สำหรับในกิ้งก่ามกรมจะเห็นว่า FLP ทั้ง 5 รูปแบบมีสภาพแตกต่างกันสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย ซึ่งเป็นเครื่องชี้ว่าอาจมียืนมากกว่า 2 transcripts สำหรับถอดรหัสให้ FLP ในกิ้งก่ามกรมซึ่งตรงกับที่รายงานในหอยคัน *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 ความแตกต่างของเปปไทด์ ส่วนใหญ่มีความแตกต่างทางปลาย N อาจไม่มีความสำคัญในแง่การทำงาน อาจเป็นเพียงเสริมการทำงานของลำดับกรดอะมิโนทางด้านปลาย C โดยทางด้านปลาย N เป็นส่วนที่ช่วยให้การจับของเปปไทด์กับรีเซพเตอร์มี affinity แตกต่างกัน เช่นในกรณีของ F1 และ F2 จากกิ้งก่ามกรม แสดงผลคล้ายคลึงกันในการกระตุ้นการเต้นของหัวใจและระบบหมุนเวียนโลหิตของปู *Cancer magister* แต่ F1 ออกฤทธิ์รุนแรงกว่า F2 (McGaw and McMahon, 1995) แต่ในทางกลับกันเปปไทด์แต่ละรูปแบบในกลุ่มย่อยอาจมีรีเซพเตอร์จำเพาะ เช่นกรณีของ NF1 และ DF2 ซึ่งพบว่าออกฤทธิ์ในการเพิ่มการหลั่ง neurotransmitter จากปลายซินแนปส์ของ extensor-muscle ของกิ้ง crayfish *Procambarus clarkii* แต่ NF1 เพิ่ม muscle input resistance ในขณะที่ DF2 ไม่เพิ่ม ซึ่งบทบาทของ FLP รูปแบบต่าง ๆ เหล่านี้อาจช่วยทำงานเสริมกันเพื่อช่วยการทำงานของเซลล์ประสาทชนิดต่าง ๆ เพื่อการแสดงออกของพฤติกรรมที่เหมาะสม

จากการศึกษาโดยใช้เทคนิคทาง immunocytochemistry (วีระวรรณ สิทธิกรกุลและคณะ 2538) ตรวจหาแหล่งปรากฏของ FLI ในก้านตากลิ้งก่ามกรม พบว่า FLP อยู่ในเซลล์ประสาทจำนวนมากกว่า 1,000 เซลล์ และในแขนงประสาทที่ส่งเข้าสู่ neuropil บริเวณ Medulla Externa, Medulla Intema และ Medulla Terminalis ซึ่งเป็นเครื่องชี้ว่า FLI ในกิ้งก่ามกรม อาจทำหน้าที่เป็น neurotransmitter หรือ neuromodulator และ FLI ยังพบในต่อมไชนัส ซึ่งเป็นจุดที่ฮอร์โมนหลั่งเข้าสู่ระบบเลือด เป็นเครื่องชี้ว่า FLP อาจทำหน้าที่เป็น neurohormone ด้วย FLP ในกลุ่ม -PALRLRFamide มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกับ head peptide I (PERPP<sub>OH</sub>SLKTRFamide) ของยุงลาย *Aedes aegypti* ซึ่งเปปไทด์นี้ทำหน้าที่เป็นฮอร์โมนที่ยับยั้งพฤติกรรมออกหาเหยื่อในยุง (Brown et al., 1994) ซึ่งบทบาทของ FLP ในกิ้งก่ามกรมยังไม่มีการศึกษา

ดังนั้นการพิสูจน์ทราบถึงรูปแบบต่าง ๆ ของ FMRFamide จึงเป็นพื้นฐานที่สำคัญในการศึกษาบทบาทของสารคล้าย FMRFamide รูปแบบต่าง ๆ ในกระบวนการทางสรีรวิทยาของกิ้งก่าและยังเป็นแนวทางที่จะใช้ลำดับกรดอะมิโนของสารคล้าย FMRFamide ที่ทราบแล้วสำหรับการศึกษายีนที่สร้างสารคล้าย FMRFamide เพื่อการพิสูจน์ทราบรูปแบบของ FMRFamide ในตัวกิ้งทั้งหมดได้ ซึ่งนอกจากจะให้ความ

รู้ในแง่วิวัฒนาการของยีนของฮอริโมนแล้ว และยังจำเป็นสำหรับการสังเคราะห์สารคล้าย FMRFamide รูป  
แบบต่าง ๆ เพื่อศึกษาถึงบทบาททางสรีรวิทยาของสารคล้าย FMRFamide ต่อไป





เอกรสารอ้างอิง

วีระวรรณ สิทธิกรกุล, ไพศาล สิทธิกรกุล, สันติ เรืองมณีไพฑูรย์, สุนิสา แสงมงคลพิพัฒน์ และเปี่ยมศักดิ์ เมนะเสวต. 2537. การตรวจหานิวโรเปปไทด์ในก้านตาของกิ้งกูดดำโดยปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกัน. วารสารวาริชศาสตร์ 1(1) : 1-19.

วีระวรรณ สิทธิกรกุล, ศิวพร ลงยันต์ และไพศาล สิทธิกรกุล. 2538. สารคล้าย FMRFamide ในก้านตาของกิ้งก่ามกรม. 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. Garcia-Arraras. 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 thomasiana*. *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 hemolymph 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 FLRFamide. 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/FMRamide-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> (FMRamide). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85 : 1993-1997.
- Sithigomgul, P. and A.O.W. Stretton. 1995. Six more FMRamide-like peptides from the nematode *Caenorhabditis elegans* : four new and two old. Third progress report for biotechnology career fellowship. The Rockefeller foundation. 1-18.
- Sithigomgul, P., A.O.W. Stretton and C. Cowden. 1991. A versatile dot-ELISA method with femtomole sensitivity for detecting small peptides. *J. Immunol. Meth.* 141 : 23-32.
- 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 FMRamide-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 FMRamide-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 FMRamide-related peptides in the blood-feeding bug, *Rhodnius prolixus*. *J. Comp. Neurol.* 331 : 17-32.
- Vallarino, M., M.T. Salsotto-Cattaneo, M. Feuilloley and H. Vaudry. 1991. Distribution of FMRamide-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*.

