

595.3
ว8485
ว.2

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์
ทุนอุดหนุนการวิจัย
จาก
งบประมาณแผ่นดินประจำปี 2541

การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนและการตรวจหาแหล่งสร้าง
ฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดของกุ้งก้ามกราม

Sequence Analysis and Immunocytochemical Localization
of Crustacean Hyperglycemic Hormone in the Giant
Freshwater Prawn *Macrobrachium rosenbergii*

วีระวรรณ สิทธิกรกุล ไพศาล สิทธิกรกุล นิรันดร์ บุญอิงเปรตพงศ์
ภาควิชาชีววิทยา และภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร # 115736

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณฝ่ายวิจัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ได้สนับสนุนให้ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2541 สถาบันเทคโนโลยีและวิศวกรรม พันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการส่งเคราะห์เปปไทด์ และภาค วิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ได้ให้การสนับสนุนจนโครงการวิจัยนี้สำเร็จไปด้วยดี

คณะผู้วิจัย

มกราคม 2542



สารบัญเรื่อง

หน้า

บทคัดย่อ	I
Abstract	II
บทนำ	1
วิธีการวิจัย	18
ผลการวิจัย	34
สรุปและอภิปรายผล	65
บรรณานุกรม	70



สารบัญรูป

รูปที่

หน้า

1	ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดและการสกัด CHH จากก้านตาของกิ้งก่ามกราม	23
2	ขั้นตอนการทดสอบประสิทธิภาพการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดของ CHH	24
3	ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดหยาบจากก้านตาของกิ้งก่ามกราม	25
4	ขั้นตอนการพิสูจน์โครงสร้างของ Mar-CHH-I	32
5	ขั้นตอนการตรวจสอบการคล้ายเปปไทด์ในแฟรคชันต่าง ๆ ที่แยกโดยวิธี dot-ELISA	33
6	ขั้นตอนการตรวจหาแหล่งสร้าง CHH ในเนื้อเยื่อก้านตาโดยวิธี Immunocytochemistry	34
7	ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ CHH 3 รูปแบบ	36
8	โครมาโตแกรมของสารสกัดจากก้านตาของกิ้งก่ามกรามที่สกัดด้วยสาร methanol acetic acid จำนวน 1,000 ก้านตา หลังจากผ่านกระบวนการ RP-HPLC ขั้นตอนแรก (คอลัมน์ : Delta-Pak C18 ; ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA)	37
9	โครมาโตแกรมของสารสกัดจากก้านตาของกิ้งก่ามกรามจำนวน 5,000 ก้านตา ที่ผ่านกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 2 จากแฟรคชันที่ 37 (คอลัมน์ : Bonda-Pak C8 ; ระบบตัวทำละลาย ACN/HFBA)	39

10	โครมาโตแกรมของสารสกัดจากก้านตาของกึ่งก้ามกรามจากแฟรคชัน ที่ 36 และ 37 ของขั้นตอนที่ 2 ที่ผ่านกระบวนการทาง RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 3 (คอลัมน์ : Delta-Pak C18 ; ระบบตัวทำละลาย ACN/TEA)	41
11	โครมาโตแกรมของสารสกัดจากก้านตาของกึ่งก้ามกรามแฟรคชันที่ 36 และ 37 ของขั้นตอนที่ 3 ผ่านกระบวนการทาง RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 4 (คอลัมน์ : Cyano ; ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA)	43
12	โครมาโตแกรมของสารสกัดจากก้านตาของกึ่งก้ามกรามจากแฟรคชันที่ 30 และ 31 ของขั้นตอนที่ 4 ผ่านกระบวนการทาง RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 5 (คอลัมน์ : Phenyl ; ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA)	44
13	โครมาโตแกรมของสารสกัดจากก้านตาของกึ่งก้ามกรามจากแฟรคชัน ที่ 33-35 ในขั้นตอนที่ 5 ผ่านกระบวนการทาง RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 6 (คอลัมน์ : C18 ; ระบบตัวทำละลาย ACN/TEA)	45
14	โครมาโตแกรมของสารสกัดจากก้านตาของกึ่งก้ามกรามจากแฟรคชันที่ 31-32 และ 33-34 ของขั้นตอนที่ 6 ผ่านกระบวนการทาง RP-HPLC ใน ขั้นตอนที่ 7 (คอลัมน์ : Cyano ; ระบบตัวทำละลาย ACN/HFBA)	47
15	โครมาโตแกรมของสารสกัดจากก้านตาของกึ่งก้ามกรามจากแฟรคชันที่ 30 และ 31 ของขั้นตอนที่ 7.1 และผ่านกระบวนการทาง RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 8 (คอลัมน์ : C18 ; ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA)	49
16	MALDI-TOF Mass spectroscopy ของ CHH-II (1) และ CHH-III (2) โดยใช้ อินซูลินเป็นตัวปรับ	51
17	Dot-ELISA แสดงความจำเพาะของแอนติซีรั่มต่อเปปไทด์ T- หรือ เปปไทด์ T+ ในการจับกับเปปไทด์ทั้งสองชนิด	57

สารบัญตาราง

ตารางที่

หน้า

1	การเปรียบเทียบวิธีการทำให้บริสุทธิ์และการศึกษาคุณลักษณะของ CHH ในสัตว์คริสตาเขียนชนิดต่าง ๆ	7
2	เปรียบเทียบชนิดและจำนวนกรดอะมิโนของ CHH ในสัตว์คริสตาเขียนบางชนิด	17
3	ความเข้มข้นของกลูโคสที่เพิ่มขึ้นในเลือดกึ่งที่ถูกตัดตาทั้งสองข้างก่อนฉีด และหลังจากฉีดสารสกัดจากก้านตาที่สกัดด้วย methanol:acetic acid (90:1) ในระดับความเจ็บปวดต่าง ๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง	35
4	ผลการตรวจสอบ CHH จากแฟรคชันต่าง ๆ ที่แยกได้จาก HPLC ในขั้นตอนที่ 1 ทั้งสามครั้ง (คอลัมน์ : Delta-Pak C18 ; ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA).....	38
5	เปรียบเทียบชนิดและจำนวนกรดอะมิโนของ CHH ในสัตว์คริสตาเขียนชนิดต่าง ๆ กับ CHH ของกิ้งก่ามกรม	52
6	แสดงผลการไตเตอร์ของแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อเปปไทด์ T-	54
7	แสดงผลการไตเตอร์ของแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อเปปไทด์ T+	55
8	ผลการตรวจหาฮอร์โมนเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดในแฟรคชัน ที่ 30, 35-40	60

- 18 RP-HPLC : โครมาโตแกรมของสารสกัดจากก้านตากุ้งก้ามกราม
จำนวน 200 ก้านตา (คอลัมน์ C18, ระบบตัวทำละลาย 12-64 %
acetonitrile ใน 0.1 % TFA) 58
- 19 Dot-ELISA โดยการใช้แอนติซีรั่มต่อเปปไทด์และตรวจหาสารคล้าย T-
และเปปไทด์ T+ในสารสกัดจากก้านตากุ้งก้ามกรามหลังจากผ่าน
กระบวนการทาง RP-HPLC พบสารคล้ายเปปไทด์ T- ในแฟรคชัน
ที่ 30 (1) และสารคล้ายเปปไทด์ T+ ในแฟรคชันที่ 38 (2) 59
- 20 ภาพตาข่ายของกุ้งก้ามกรามความหนา 50 μm เมื่อใช้แอนติซีรั่ม
ต่อเปปไทด์ T+ อัตราส่วน 1 : 5000 บริเวณติดสีน้ำตาลเป็นบริเวณ
ที่พบสารคล้ายเปปไทด์ T+ 62
- 21 การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรั่มต่อเปปไทด์ T+ โดยใช้ก้านตา
กุ้งก้ามกรามความหนา 8 ไมครอน บริเวณกลุ่มเซลล์ประสาทและต่อม
ไชนัสที่พบ CHH 63
- 22 ภาพตาข่ายของกุ้งกุลาดำ ความหนา 50 μm เมื่อใช้แอนติซีรั่ม
ต่อเปปไทด์ T+ อัตราส่วน 1 : 5000 บริเวณติดสีน้ำตาลเป็นบริเวณ
ที่พบสารคล้ายเปปไทด์ T+ 64

บทคัดย่อ

ได้ทำให้บริสุทธิ์และหาลำดับกรดอะมิโนของฮอร์โมนเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด (crustacean hyperglycemic hormone-CHH) ของกุ้งก้ามกรามเพิ่มอีก 2 รูปแบบได้แก่ CHH-II และ CHH-III พบว่าประกอบด้วยกรดอะมิโน 71 หน่วย ซึ่งคาดว่าควรจะประกอบด้วยกรดอะมิโน 72 หน่วยเช่นเดียวกับ CHH-I และได้สังเคราะห์เปปไทด์ YANAVQV-NH₂ (T-) และ YANAVQTV-NH₂ (T+) ซึ่งคาดว่าเป็นส่วนประกอบทางปลาย C ของ CHH-I โดยวิธี solid phase peptide synthesis จากนั้นนำเปปไทด์มาเชื่อมต่อกับโปรตีน bovine serum albumin (BSA) ก่อนนำไปปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาวเพื่อสร้างแอนติบอดี ความจำเพาะของแอนติซีรั่มที่ได้ต่อเปปไทด์ทั้งสองทดสอบโดยวิธี ELISA และ dot-ELISA จากการใช้ซีรั่มจากหนูตัวที่ตอบสนองดีที่สุดมาตรวจความสามารถในการจับของแอนติบอดีทั้งสองกับ CHH ในสารสกัดจากก้านตาที่ผ่านการแยกโดย RP-HPLC 1 ขั้นตอน พบว่าแอนติบอดีต่อเปปไทด์ T- สามารถจับกับสารในแฟรคชันที่ 30 ส่วนแอนติบอดีต่อเปปไทด์ T+ สามารถจับกับสารในแฟรคชันที่ 38 ซึ่งแฟรคชันที่แสดงการออกฤทธิ์ของฮอร์โมนอยู่ในแฟรคชันที่ 37-39 เท่านั้น จากการใช้แอนติบอดีทั้งสองตรวจหาแหล่งที่พบ CHH ในเนื้อเยื่อก้านตาโดยวิธี immunocytochemistry พบว่า แอนติบอดีต่อเปปไทด์ T- ไม่แสดงการจับเนื้อเยื่อส่วนใดในก้านตา แต่แอนติบอดีต่อเปปไทด์ T+ สามารถจับกับกลุ่มเซลล์ 24 ± 5 เซลล์ ใน medulla terminalis X organ และเส้นใยประสาทที่ทอดไปยังต่อมไชนัส แอนติบอดีนี้สามารถใช้ตรวจหา CHH ในก้านตาของกุ้งกุลาดำได้ ซึ่งได้ผลเช่นเดียวกันโดยพบเซลล์ที่มี CHH 35 ± 4 เซลล์ ซึ่งชี้ให้เห็นว่าแอนติบอดีต่อเปปไทด์ T+ สามารถจับกับ CHH ได้ ในขณะที่แอนติบอดีต่อเปปไทด์ T- ไม่สามารถจับกับเปปไทด์ CHH ได้ ดังนั้น CHH ของกุ้งก้ามกรามน่าจะประกอบด้วยกรดอะมิโน 72 หน่วย โดยมี threonine อยู่ในตำแหน่งที่ 71

ABSTRACT

Two more isoforms of crustacean hyperglycemic hormone (CHH-II and CHH-III) from the eyestalk of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*, were isolated and analysed for amino acid sequences consisting of 71 residues, however, both peptides should consist of 72 residues similar to CHH-I. Another experiment, heptapeptide (YANAVQV-NH₂ = T-) and octapeptide (YANAVQTV-NH₂ = T+), the putative C-terminus of CHH-I were synthesized by solid phase peptide synthesis and conjugated to bovine serum albumin, then used for immunization into swiss mice. Specificity of the antisera against both peptides was determined by indirect immunoperoxidase ELISA. The best response antiserum against each peptide was used to determine the presence of the natural CHH in the eyestalk extract after separated by one step of RP-HPLC using dot-ELISA. The peptide immunoreactive substances were found in fraction 30 using anti-T- antiserum and in fraction 38 using anti-T+ antiserum. However, the CHH activity was found only in the fractions of 37-39. Immunocytochemical localization of peptide immunoreactive substances in the eyestalk of *M. rosenbergii* using the anti-T- antiserum did not show any specific staining. In contrast, the anti-T+ antiserum revealed specific staining on a group of 24 ± 5 neurons in Medulla Terminalis Ganglionic X-organ and their processes through the sinus gland. Similar result also obtained in the eyestalk of the other species namely the giant tiger prawn *Penaeus monodon*, 35 ± 4 neuronal cells were recognized. These evidences show strong indication that the anti-T+ antibody can bind to the natural CHH while the anti-T- antibody can not, therefore this isoform of CHH in *M. rosenbergii* should consist of 72 residues and threonine is predicted to be present at position 71.

บทนำ



เป็นที่ทราบกันดีว่าในสัตว์พวกครัสตาเซีย (crustacean) โดยเฉพาะพวก decapod เช่น กุ้ง ปู กุ้งและ crayfish ก้านตา (eyestalk) เป็นแหล่งสร้างฮอร์โมนที่สำคัญเทียบเท่ากับต่อมใต้สมอง ในสัตว์มีกระดูกสันหลัง กระบวนการทางสรีรวิทยาหลายกระบวนการของพวกครัสตาเซียถูกควบคุมโดยนิวโรฮอร์โมน (neurohormone) ซึ่งสร้างจาก neurosecretory cell ซึ่งอยู่ในก้านตา กระบวนการเหล่านี้ได้แก่ การควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด การลอกคราบ การพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ การเคลื่อนที่ของรงควัตถุที่ผิวหนังหรือที่ตา สมดุลของน้ำและแร่ธาตุ อัตราการเต้นของหัวใจ รวมทั้งเมตาบอลิซึมของแคลเซียม ไนโตรเจน โปรตีนและคาร์โบไฮเดรต (Keller and Sedlmeier, 1988) ในปัจจุบันสามารถแยก ทำให้บริสุทธิ์ และศึกษาจนทราบถึงโครงสร้างทางเคมีและแหล่งที่ผลิตของฮอร์โมนบางชนิดในก้านตาของครัสตาเซียบางชนิดได้บ้างแล้ว เช่น ฮอร์โมนที่ควบคุมการกระจายตัวของรงควัตถุในตาเพื่อปรับตัวให้เข้ากับแสงในที่มืด (Pigment Dispersing Hormone-PDH) (Kleinholz et al., 1986; Rao and Riehm, 1988) ฮอร์โมนที่ควบคุมการรวมตัวของรงควัตถุภายในโครมาโตฟอร์ (Red Pigment Concentrating Hormone-RPCH) (Fernlund, 1974) ฮอร์โมนที่ยับยั้งการลอกคราบ (Molt Inhibiting Hormone-MIH) (Chang et al., 1987; Webster, 1991; Chung et al., 1996 Yang et al., 1996) ฮอร์โมนที่ยับยั้งพัฒนาการของรังไข่ (Vitellogenesis Inhibiting Hormone-VIH or Gonad Inhibiting Hormone-GIH) (Soyez et al., 1987; Aguilar et al., 1992) และฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดของสัตว์พวกครัสตาเซีย (Crustacean Hyperglycemic Hormone-CHH) (Martin et al., 1984; Huberman and Aguilar, 1986; Kegel et al., 1989; Soyez et al., 1990; Tensen and et al., 1991; Huberman et al., 1993; Yang et al., 1995)

ฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดของสัตว์พวกครัสตาเซียหรือ CHH (Crustacean Hyperglycemic hormone) เป็นสารประเภทโพลีเปปไทด์ที่ไวต่อความร้อน ถูกทำลายได้ง่ายโดยเอนไซม์โปรตีเอส (Beltz, 1988) ได้มีรายงานการแยกฮอร์โมนนี้จากสัตว์พวกครัสตาเซียต่าง ๆ หลายสปีชีส์แล้วทำให้บริสุทธิ์ และศึกษาถึงลักษณะต่างๆ ทางด้านชีววิทยาและชีวเคมีของฮอร์โมนนี้บ้างแล้วในบางสปีชีส์ พบว่า CHH ในสัตว์พวกครัสตาเซีย แต่ละสปีชีส์จะมีความแตกต่างกันบ้างในด้านส่วนประกอบและลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโน (Kegel et al., 1991; Huberman et al., 1993) ในสัตว์สปีชีส์เดียวกันอาจมี CHH ได้หลายรูปแบบ (polymorphism) เช่น ใน Mexican crayfish, *Procambarus bouvieri* พบ CHH 2 รูปแบบ คือ CHH-B และ CHH-C (Huberman and Aguilar, 1988) และในกุ้ง American lobster, *Homarus americanus* พบ CHH 2 กลุ่ม ซึ่งแต่ละกลุ่มประกอบด้วย CHH กลุ่มละ

2 รูปแบบ (Soyez et al., 1990) การที่ CHH มีหลายรูปแบบอาจเป็นไปได้ว่า CHH ผลิตมาจาก gene เดียว แต่มีการเปลี่ยนแปลงหลังจากถอดรหัสเป็นโปรตีน (postranslational modification) แล้วให้ CHH หลายรูปแบบ หรือ CHH อาจจะเป็นผลิตภัณฑ์ที่มาจากการเพิ่มจำนวน gene ก็ได้ (Huberman and Aguilar, 1988)

จากรายงานการศึกษาด้วยอิมมูโนไซโตเคมีสทรี (immunocytochemical study) ในกุ้ง crayfish, *Astacus leptodactylus* โดยใช้แอนติซีรัม (antiserum) ต่อ CHH ที่ผลิตได้ พบว่ากลุ่มของตัวเซลล์ประสาท (perikarya) ที่สร้าง CHH จะอยู่บริเวณที่เรียกว่า Medulla Terminalis Ganglionic X-organ (MTGXO) ในก้านตา และมีส่วนปลายประสาทแอกซอนไปสิ้นสุดที่บริเวณต่อมไซน์ส (sinus gland-SG) ซึ่งเป็น neurohemal organ ในก้านตา ต่อมาไซน์สจึงเป็นแหล่งสะสมและปล่อย CHH ไปยังเนื้อเยื่อเป้าหมาย (target tissue) โดยลำเลียงมาจาก neurosecretory cells ซึ่งอยู่ที่ X-organ (Kallen and Van Herp, 1981) ส่วนที่ MTGXO-SG system จะพบขนาดและจำนวนเซลล์ที่สร้าง CHH แตกต่างกันไปตามชนิดของสัตว์ครัสตาเซียนนั้น ๆ เช่น ในปูน้ำเค็ม *Carcinus maenas* มีเซลล์ขนาด 40 ไมโครเมตรจำนวน 40 เซลล์ที่ MTGXO ในกุ้ง crayfish, *Astacus leptodactylus* มีเซลล์ขนาด 50 ไมโครเมตรจำนวน 32 เซลล์ และในกุ้งมังกร *Palinurus* sp. มีเซลล์จำนวนมากถึง 150 เซลล์เป็นต้น (Keller and Sedlmeier, 1988) นอกจากนี้ยังพบว่าบางส่วนของฮอริโมนนี้อาจสร้างมาจากสมองส่วนโปรโตซีรีบรัม (protocerebrum) ของแมงสาบทะเล *Porcellio dilatatus* ระบบประสาทส่วนกลาง และ pericardial organ ของปู *Carcinus maenas* (Keller and Sedlmeier, 1988) และปมประสาทส่วนนอกของปูน้ำจืด *Barythelphusa guerini* (Gangotri et al., 1987) อย่างไรก็ตามแหล่งสร้าง CHH ในก้านตาจะเป็นตัวหลักในการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดเพราะแหล่งอื่น ๆ มีการสร้างน้อย ดังนั้นในการแยกสกัด CHH และทำให้บริสุทธิ์ในสัตว์ครัสตาเซียน เช่น ในแมงสาบทะเล *Porcellio dilatatus* (Martin et al., 1984) ในกุ้ง crayfish, *Procambarus bouvieri* (Huberman and Aguilar, 1988) ในปูน้ำเค็ม *Carcinus maenas* (Kegel et al., 1989) ในกุ้งล็อบสเตอร์ *Homarus americanus* (Soyez et al., 1990) และในกุ้ง crayfish, *Orconectes limosus* (Kegel et al., 1991) จึงใช้ก้านตาเป็นแหล่งสกัดฮอริโมนทั้งสิ้น

ได้มีรายงานเกี่ยวกับการออกฤทธิ์ข้ามกัน (cross-reactivity) ระหว่างสัตว์ครัสตาเซียนชนิดต่าง ๆ พบว่าการออกฤทธิ์ข้ามกันค่อนข้างจำกัด เช่น CHH ของปูน้ำเค็ม *Carcinus maenas* สามารถทำให้ระดับกลูโคสในเลือดเพิ่มได้ในปูก้ามดาบ *Uca pugilator* แต่ CHH จากกุ้ง crayfish, *Orconectes limosus* ไม่สามารถทำให้ระดับกลูโคสเพิ่มในปูก้ามดาบ *Uca pugilator* ปู *Carcinus maenas* และแมงสาบทะเล *Porcellio dilatatus* ได้ แต่จากการตรวจสอบปฏิกิริยาข้ามกันด้วยกระบวนการทาง RIA

(radioimmunoassay) พบว่ามีปฏิกิริยาข้ามกันระหว่าง CHH ของ *Carcinus maenas* กับแมงสาบทะเล *Porcellio dilatatus* (Martin et al., 1984) และกับ *Carcinus maenas* กับกุ้ง crayfish, *Orconectes limosus* (Keller and Sedlmeier, 1988) ซึ่งแสดงว่า CHH ในครัสตาเซียนแต่ละชนิดมีโครงสร้างบางส่วนของโมเลกุลคล้ายคลึงกันจึงออกฤทธิ์ข้ามกันได้ แต่ก็มีบางส่วนของโมเลกุลที่ออกฤทธิ์แตกต่างกันไปเป็นผลให้ปฏิกิริยาข้ามกันระหว่างสปีชีส์ค่อนข้างจำกัด ทั้งนี้เนื่องจากรีเซพเตอร์ (receptor) ในเนื้อเยื่อเป้าหมายจะมีความจำเพาะต่อฮอร์โมนเพียงชนิดเดียวหรือฮอร์โมนที่มีโครงสร้างของโมเลกุลคล้าย ๆ กันเท่านั้น ซึ่งส่วนของโมเลกุลที่แตกต่างกันไปนี้อาจเป็นเพราะมีการเปลี่ยนแปลงในระหว่างที่มีวิวัฒนาการ (Keller and Sedlmeier, 1988) จากเหตุผลดังกล่าวนี้เองทำให้สามารถอธิบายได้ว่าการที่ MIH (Molt Inhibiting Hormone) จากกุ้งอเมริกันล็อบสเตอร์ *Homarus americanus* แสดงคุณสมบัติของ CHH ในการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดได้เพราะฮอร์โมนทั้งสองชนิดในสัตว์ชนิดเดียวกันมีความคล้ายคลึงกันมากในด้านน้ำหนักโมเลกุลและลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโน (Kegel et al., 1991)

ดังนั้นการศึกษาฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึม (metabolic hormone) โดยเฉพาะฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดของกุ้งก้ามกราม (Crustacean Hyperglycemic Hormone-CHH) นี้จึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจ ถ้าสามารถแยกและทำให้ CHH บริสุทธิ์ได้ก็จะเป็นพื้นฐานไปสู่การศึกษาถึงโครงสร้างของ CHH ก่อนที่จะศึกษาถึงบทบาทของฮอร์โมนนี้ที่มีผลต่อกระบวนการทางสรีรวิทยาและการดำรงชีวิตของกุ้งก้ามกรามให้ได้ผลดีต่อไป นอกจากนี้จากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ CHH, MIH และ VIH (Vitellogenesis Inhibiting Hormone) พบว่าเปปไทด์ทั้ง 3 กลุ่มนี้มีลักษณะร่วมกันคือประกอบด้วยกรดอะมิโน 72-78 หน่วยและมีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกันและทุกฮอร์โมนประกอบด้วยซิสเตอีน (cystein) 6 หน่วยในส่วนของโมเลกุลส่วนที่คงที่ จึงจัดรวมอยู่ในกลุ่มเดียวกันเป็น CHH/MIH/VIH family (Kleijn and Van Herp, 1995) ดังนั้นการศึกษาโครงสร้างและการทำงานของฮอร์โมน CHH จึงเป็นพื้นฐานที่สำคัญในการศึกษาฮอร์โมนอื่น ๆ ที่มีบทบาทสำคัญในกุ้งชนิดต่าง ๆ ต่อไป

การศึกษาเกี่ยวกับฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดหรือ CHH เริ่มต้นจากรายงานการตัดก้านตาของปู *Callinectes sapidus* ออกและตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือด พบว่าจะมีระดับน้ำตาลในเลือดลดต่ำลง แต่เมื่อให้สารสกัดจากก้านตาลับเข้าไปจะมีผลทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดเพิ่มขึ้น จึงสรุปว่าปัจจัยที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด (diabetogenic factor) อยู่ในก้านตาของปู (Abramowitz, 1944) และจากการศึกษาต่อมาทำให้ทราบว่าปัจจัยนี้คือฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดของสัตว์พวกครัสตาเซียน การศึกษาถึงผลของการตัดก้านตาทั้งสองข้างของปูน้ำจืด *Barytelphusa guerini*

พบว่า การตัดก้านตา มีผลทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดเพิ่มขึ้น 1-2 ชั่วโมงแรก หลังจากการตัดก้านตา ทั้งนี้เนื่องมาจากการเกิด nervous shock ที่เกิดจากการตัดก้านตา หรือมีการปล่อยฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดออกมา ต่อมา ระดับน้ำตาลในเลือดจะลดลงและอยู่ในสภาวะเช่นนี้นานถึง 10 วัน เมื่อเปรียบเทียบระดับน้ำตาลในเลือดของปูปกติที่ไม่ตัดก้านตากับปูที่ตัดก้านตา ปรากฏว่าปูที่ตัดก้านตาจะมีระดับน้ำตาลในเลือดต่ำกว่าปูปกติ แต่เมื่อให้สารสกัดจากก้านตา กลับเข้าไปในปูที่ตัดก้านตา จะมีผลทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดเพิ่มขึ้น (Gangotri et al., 1987)

จากรายงานการศึกษาผลของการฉีดสารสกัดหนอยาบจากต่อมไชนัสของกุ้งล็อบสเตอร์ *Homarus americanus* เข้าไปในกุ้งล็อบสเตอร์ *Homarus gammarus* พบว่ามีผลทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดเพิ่มขึ้นสูงสุดหลังจากฉีดสารสกัดเข้าไป 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นระดับน้ำตาลในเลือดที่เพิ่มขึ้นนี้จะลดลงจนถึงระดับปกติเท่ากับกลุ่มควบคุม (Soyez et al., 1990) ในปี 1992 Sithigorngul et al. ได้ตรวจสอบฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดของกุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* เพื่อเป็นแนวทางในการแยกสกัดฮอร์โมนนี้และฮอร์โมนอื่น ๆ จากก้านตา กุ้งโดยเก็บตัวอย่างเลือดกุ้งในช่วงเวลาต่าง ๆ หลังจากวางไข่ พบว่าระดับน้ำตาลในเลือดของกุ้งปกติมีความแปรปรวนสูงมาก ทั้งนี้เนื่องจากในขณะเก็บตัวอย่างเลือดจากกุ้งอาจเป็นการกระตุ้นให้มีการเคลื่อนย้ายกลูโคสจากแหล่งสะสม แต่ในกุ้งที่ถูกตัดก้านตาออกทั้งสองข้างจะมีระดับน้ำตาลในเลือดต่ำและค่อนข้างคงที่ เพราะการตัดก้านตาเป็นการกำจัดฮอร์โมนสำคัญที่เพิ่มระดับกลูโคสในเลือด เมื่อฉีดสารสกัดจากก้านตา กุ้ง (2 ก้านตาต่อตัว) เข้าไปในกุ้งที่ถูกตัดก้านตาทั้งสองข้างและเก็บตัวอย่างเลือดในช่วงเวลาต่าง ๆ กันคือ 0, 1/2, 1, 2, 4, และ 6 ชั่วโมง พบว่าระดับน้ำตาลในเลือดเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและถึงจุดสูงสุดประมาณ 1 ชั่วโมง ส่วนการศึกษาระดับกลูโคสในเลือดของกุ้งที่ถูกตัดตาโดยใช้สารสกัดจากก้านตาที่เจือจางระดับต่าง ๆ ได้แก่ 2, 1/2, 1/8, 1/32, 1/125, 1/500 และ 1/2,000 ก้านตาต่อตัว พบว่าปริมาณของระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดจะแปรผันตามปริมาณของสารสกัดจากก้านตาที่ฉีดเข้าไป และสารสกัดจากก้านตาปริมาณ 1/500 ก้านตาสามารถชักนำให้ระดับน้ำตาลในเลือดเพิ่มขึ้นได้

ส่วนการศึกษาถึงอิทธิพลของเพศ น้ำหนัก อุณหภูมิ และความเข้มข้นของน้ำเกลือต่อระดับกลูโคสในเลือดของกุ้ง brown shrimp, *Crangon crangon* พบว่ากุ้งเพศผู้จะมีระดับกลูโคสสูงที่สุด รองลงมาคือกุ้งเพศเมียที่อยู่ในระยะฟักไข่ (ovigerous female) ส่วนกุ้งเพศเมียที่ไม่ได้อยู่ในระยะฟักไข่ (non-ovigerous female) จะพบกลูโคสต่ำที่สุด การที่กุ้งเพศเมียที่อยู่ในระยะฟักไข่พบระดับกลูโคส

มากกว่ากุ้งเพศเมียที่ไม่ได้อยู่ในระยะพักไข่ ทั้งนี้ก็เพราะว่าขณะที่กุ้งมีการพัฒนาของไข่และรังไข่จะมีการดึงกลูโคสที่สะสมอยู่ในรูปของไกลโคเจนที่บริเวณตับ-ตับอ่อนมาใช้ จึงทำให้ระดับกลูโคสในเลือดสูงกว่า และจะสูงเช่นนี้จนกระทั่งไข่พักเป็นตัวอ่อนระดับกลูโคสจึงลดลง ในด้านอิทธิพลของน้ำหนักร่างกาย กุ้งที่มีน้ำหนักตัวน้อยจะมีระดับกลูโคสสูงกว่ากุ้งที่มีน้ำหนักตัวมาก เมื่อนำกุ้งไปเลี้ยงในอ่างน้ำที่มีความเข้มข้นของน้ำเกลือต่าง ๆ กันคือ 6, 12, 18, 24, 30 และ 36 ppt. พบว่าระดับของกลูโคสในเลือดจะสูงที่สุดที่ความเข้มข้นของน้ำเกลือเป็น 12 ppt. และต่ำที่สุดเมื่อความเข้มข้นของน้ำเกลือเป็น 36 ppt. ส่วนการศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิต่อระดับกลูโคสในเลือด พบว่าจากการนำกุ้งไปเลี้ยงที่อุณหภูมิสูง (16-20 องศาเซลเซียส) กุ้งจะมีระดับกลูโคสในเลือดสูงกว่ากุ้งกลุ่มที่เลี้ยงในที่อุณหภูมิต่ำ (7-10 องศาเซลเซียส) ทั้งนี้เนื่องจากที่อุณหภูมิต่ำกุ้งมีเมตาบอลิซึมลดลง นอกจากนี้ยังพบอีกว่าในระหว่างการเก็บเลือดระดับน้ำตาลกลูโคสจะเพิ่มขึ้น เป็นเพราะว่าการเก็บเลือดเป็นการกระตุ้นกระบวนการเมตาบอลิซึมให้มีการเคลื่อนย้ายกลูโคสจากแหล่งสะสมได้แก่ ตับ-ตับอ่อนเข้าสู่ระบบหมุนเวียน เป็นการตอบสนองต่อการกระตุ้นเป็นผลให้ระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดสูงขึ้น (Spaargaren and Haefner, 1987)

สำหรับการแยกและการทำให้บริสุทธิ์เพื่อหาโครงสร้างและองค์ประกอบทางเคมี รวมทั้งลักษณะทางชีวเคมีของ CHH ในสัตว์กลุ่มครัสเตเชียชนิดต่าง ๆ มีดังนี้ (ตารางที่ 1)

การแยกสกัด CHH จากต่อมไชนัสของปูน้ำเค็ม *Carcinus maenas* จำนวน 1,065 ต่อมไชนัส โดยใช้สารละลายแอมโมเนียมอะซิเตตเข้มข้น 50 มิลลิโมลลาร์ (pH 8.5) และนำสารสกัดที่ได้ไปผ่าน polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) เลือกแถบโปรตีนที่แสดง activity ในการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดของปูก้ามดาบ *Uca pugilator* ไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เจลฟิลเตรชัน Sephadex G-50 พบ CHH ถูกชะออกมาตรงกับ fraction ที่ 60-68 ตรวจวัดปริมาณโปรตีนของฮอร์โมนบริสุทธิ์ที่ได้ พบว่ามีปริมาณโปรตีน 280 ไมโครกรัมโปรตีนทั้งหมดจากประมาณ 3.5 มิลลิกรัม จากนั้นนำ CHH ที่ได้ไปตรวจหากรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบโดยใช้ปฏิกิริยา dansylation และ Edman degradation และการย่อยด้วยเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ปรากฏว่า CHH ของปูน้ำเค็มนี้ประกอบด้วยกรดอะมิโน 57 หน่วย มีน้ำหนักโมเลกุล 6,726 ดาลตัน ปลาย N ถูกบดบัง (Keller and Wunderer, 1978)

ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบวิธีการทำให้บริสุทธิ์และการศึกษาคุณลักษณะของ CHH ในสัตว์
ครึ่งตาเขียนชนิดต่าง ๆ

ผู้วิจัยปี	สัตว์ทดลอง	วิธีการทำให้บริสุทธิ์และ การศึกษาคุณลักษณะ	ผลการวิจัย
Keller and Wunderer, 1978	<i>Carcinus maenas</i>	-PAGE -Gel filtration -Dansylation -Edman degradation	-กรดอะมิโน 57 หน่วย -น้ำหนักโมเลกุล 6,726 ดาลตัน -ปลาย N ถูกบล็อก
Martin et al., 1984	<i>Porcellio dilatatus</i>	-Sephadex G 50 -HPLC -Dansylation	-กรดอะมิโน 50-52 หน่วย -น้ำหนักโมเลกุล 5,800-6,100 ดาลตัน -ปลาย N ถูกบล็อก
Huberman and Aguilar, 1986	<i>Procambarus bouvieri</i>	-RP-HPLC -SDS-PAGE -Dansylation -IEF	-กรดอะมิโน 52 หน่วย -น้ำหนักโมเลกุล 6,042 ดาลตัน -พบซิสเตอีน 4 หน่วย -ปลาย N ถูกบล็อก -ปลาย C เป็นแวลีน -ไม่พบฮิสติดีน ทริปโตเฟน และเมไทโอนีน -มี pI 4.79
Kallen et al., 1986)	<i>Astacus leptodactylus</i>	-PAGE -SDS-PAGE -HPLC -DIA	-พบ CHH 2 พิก -น้ำหนักโมเลกุล 7,000 ดาลตัน

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ผู้วิจัย-ปี	สัตว์ทดลอง	วิธีการทำให้บริสุทธิ์และ การศึกษาคุณลักษณะ	ผลการวิจัย
Huberman and Aguilar, 1988	<i>Procambarus bouvieri</i>	-RP-HPLC -Dansylation -IEF	-กรดอะมิโน 52-53 หน่วย -น้ำหนักโมเลกุล 6,000-6,200 ดาลตัน -พบซิสเตอีน 6 หน่วย -ปลาย C เป็นไฮโดรฟิลิก -ปลาย N ถูกบดบัง -มี pI 4.79 -พบ CHH 2 รูปแบบ คือ CHH-B และ CHH-C
Kegel et al., 1989)	<i>Carcinus maenas</i>	-HPLC -DABITC-PITC double- coupling method	-กรดอะมิโน 72 หน่วย -น้ำหนักโมเลกุล 8,524 ดาลตัน -พบซิสเตอีน 6 หน่วย -ปลาย N และ ปลาย C ถูกบดบัง
Soyez et al., 1990	<i>Homarus americanus</i>	-RP-HPLC -FAB/MS -IEF	-พบ CHH 2 กลุ่ม -กลุ่มที่ 1 มีน้ำหนักโมเลกุล 8,633 ดาลตัน และมี pI 8.7 มีกรดอะมิโน 68 หน่วย -กลุ่มที่ 2 มีน้ำหนักโมเลกุล 8,578 ดาลตัน และมี pI 5.0 มีกรดอะมิโน 61 หน่วย

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ผู้วิจัย-ปี	สัตว์ทดลอง	วิธีการทำให้บริสุทธิ์และ การศึกษาคุณลักษณะ	ผลวิจัย
Tensen et al., 1991	<i>Homarus americanus</i>	-RP-HPLC -Edman degradation -FAB/MS	-กรดอะมิโน 72 หน่วย -พบ CHH 2 กลุ่ม -กลุ่มที่ 1 มีน้ำหนักโมเลกุล 8,578 ดาลตัน -กลุ่มที่ 2 มีน้ำหนักโมเลกุล 8,655 ± 25 ดาลตัน
Kegel et al., 1991	<i>Orconectes limosus</i>	-RP-HPLC -Edman degradation	-กรดอะมิโน 72 หน่วย -น้ำหนักโมเลกุล 8,400 ดาลตัน -ปลาย N เป็นไฮโดรอกซิล -ปลาย C เป็นแอมิโน -ซิสเตอีน 6 หน่วย
Martin et al., 1993	<i>Armadillidium vulgare</i>	-RP-HPLC -Edman degradation	-กรดอะมิโน 73 หน่วย -น้ำหนักโมเลกุล 8,729.3 ดาลตัน -ซิสเตอีน 6 หน่วย
Huberman and Aguilar, 1993	<i>Procambarus bouvieri</i>	-RP-HPLC -Edman degradation -MS	-กรดอะมิโน 72 หน่วย -น้ำหนักโมเลกุล 8,388 ดาลตัน -ซิสเตอีน 6 หน่วย
Smullen and Bently, 1994	<i>Nephrops norvegicus</i>	-RP-HPLC -ELISA -SDS-PAGE	-น้ำหนักโมเลกุล 8,000 ดาลตัน

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ผู้วิจัย-ปี	สัตว์ทดลอง	วิธีการทำให้บริสุทธิ์และ การศึกษาคุณลักษณะ	ผลวิจัย
Yang et al., 1995	<i>Penaeus japonicus</i>	-RP-HPLC -MALDI-TOF-MS -FAB/MS	-กรดอะมิโน 72 หน่วย -น้ำหนักโมเลกุล 8,353 ดาลตัน -ซีส테인 6 หน่วย
Sithigorngul et al., 1998	<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	-PR-HPLC -MALDI-TOF-MS -Edman degradation	-กรดอะมิโน 71 หน่วย -น้ำหนักโมเลกุล 8,538 ดาลตัน

PAGE = Polyacrylamide gel electrophoresis

HPLC = High performance liquid chromatography

RP-HPLC = Reverse phase high performance liquid chromatography

SDS-PAGE = Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

IEF = Isoelectric focusing

DIA = Dotting immunobinding assay

DABITC-PITC double coupling method

= Dimethylaminoazobenzene-4-isothiocyanate, Phenylisothiocyanate
double coupling method

FAB/MS = Fast atom bombardment-mass spectrometry

MALDI-TOF-MS = Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass
spectrometry

ส่วนรายงานการแยกสกัด CHH จากต่อมไชนัสของแมงสาบทะเล *Porcellio dilatatus* จำนวน 2,000 ต่อมไชนัส การสกัดทำโดยใช้ตัวทำละลาย 2 ชนิดเปรียบเทียบกันคือ แอมโมเนียมอะซีเตตเข้มข้น 0.1 โมลลาร์ (pH 8.5) และ กรดอะซิติกเข้มข้น 0.2 โมลลาร์ ตรวจวัดปริมาณโปรตีนโดยใช้ Lowry method พบว่าสารสกัดจากตัวทำละลายทั้งสองชนิดมีปริมาณโปรตีนเป็น 0.64 และ 0.41 มิลลิกรัมตามลำดับ จากนั้นนำสารสกัดที่ได้จากการสกัดโดยตัวทำละลายทั้งสองชนิดไปทำให้บริสุทธิ์ 2 ขั้นตอน คือ ขั้นแรกผ่าน gel chromatography Sephadex G-50 พบว่าสารสกัดที่ได้จากการสกัดโดยตัวทำละลายทั้งสองชนิดให้ลักษณะของโครมาโตแกรมออกมาเหมือนกัน กล่าวคือมีเพียงพีคเดียวเท่านั้นที่แสดง biological activity และถูกชะออกมาที่เวลาเดียวกัน นอกจากนี้ยังพบอีกว่าสารสกัดจากต่อมไชนัสที่สกัดด้วยกรดอะซิติกเข้มข้น 0.2 โมลลาร์ เมื่อผ่าน gel chromatography Sephadex G-50 แล้วจะมีปริมาณฮอริโมนลดลงประมาณร้อยละ 30 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการสกัดฮอริโมนโดยใช้กรดอะซิติกเข้มข้น 0.2 โมลลาร์ จะได้ปริมาณฮอริโมนต่ำกว่าการสกัดด้วยแอมโมเนียมอะซีเตตเข้มข้น 0.1 โมลลาร์ ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณโปรตีนที่วัดได้ เมื่อนำสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ Sephadex G-50 ของสารสกัดจากตัวทำละลายทั้งสองชนิดไปตรวจสอบประสิทธิภาพในการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดของ CHH ในสัตว์ทดลอง โดยวิธี Glucose Oxidase Method (Test Kit GOD, Perid, Boehringer) พบว่า fraction ที่ 41-55 แสดง activity การเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด จึงรวบรวมแล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์ขั้นตอนที่สองโดยใช้ HPLC, μ -Bondapak C18 column ได้โครมาโตแกรมออกมา 2 พีค Major peak แสดง activity ส่วน minor peak ไม่แสดง activity จากการศึกษาปฏิกิริยาข้ามระหว่างสปีชีส์ พบว่า CHH มีความจำเพาะมาก กล่าวคือ CHH จากสปีชีส์อื่น ๆ เช่น CHH จาก *Orconectes limosus* และ *Carcinus maenas* จะไม่แสดง activity ใน *Porcellio dilatatus* แต่ถ้าเป็นในสปีชีส์ที่ใกล้เคียงกัน เช่น CHH จาก *Carcinus maenas* และ *Uca pugilator* สามารถตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพได้ (Martin et al., 1984)

จากการแยกสกัด CHH จากต่อมไชนัสของกุ้ง Mexican crayfish, *Procambarus bouvieri* โดยใช้น้ำเป็นตัวสกัด จากนั้นนำสารที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ 2 ขั้นตอน โดยใช้ RP-HPLC (reverse phase HPLC) ขั้นตอนแรกใช้ Nova-Pak C18 column ผลจากการทำให้บริสุทธิ์ได้พีคที่ไม่สมมาตรเพียงพีคเดียว แล้วนำสารละลายที่เก็บได้ของพีคนี้ไปผ่านการทำให้บริสุทธิ์ขั้นตอนที่สองโดยใช้ μ -Bondapak-phenyl column พบว่าได้ 3 พีคคือ A, B, และ C โดยที่พีค B และ C แสดง activity การเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดเมื่อนำไปตรวจสอบทางชีวภาพ ขณะที่พีค A ไม่แสดง activity นี้ เมื่อนำมาตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยใช้ SDS-PAGE (sodium dodecyl-sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) โปรตีน

จากพิกัด B จะเคลื่อนที่แยกออกมาเป็นโปรตีนแถบเดี่ยว ๆ ไม่มีการปนเปื้อนจากโปรตีนอื่น ๆ และเมื่อเทียบน้ำหนักโมเลกุลกับโปรตีนมาตรฐานอยู่ในช่วง 6,000-6,500 ดาลตัน เมื่อนำมาแยกโดยใช้ IEF (isoelectric-focusing) พบว่าพิกัด B แยกออกมาเป็นโปรตีนแถบเดี่ยว ๆ ที่ pI เท่ากับ 4.79 จากการวิเคราะห์หากรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบ โดยใช้เครื่องวิเคราะห์กรดอะมิโน และหาลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโน โดยการย่อยด้วยกรดและเอนไซม์ต่าง ๆ รวมทั้งปฏิกิริยา dansylation พบว่าปลาย N ของเปปไทด์ B ถูกบล็อก ปลาย C เป็นไฮโซลิวซีน (Ile) ประกอบด้วยกรดอะมิโน 52 หน่วย คำนวณน้ำหนักโมเลกุลจากกรดอะมิโนได้เท่ากับ 6,042 ดาลตัน และพบซิสเตอีน (Cys) 4 หน่วย ซึ่งจะสร้าง disulfide bridge 2 ตำแหน่ง ไม่พบทริปโตเฟน (Trp) ฮิสติดีน (His) และเมไทโอนีน (Met) สำหรับพิกัด A อาจจะเป็น inactive precursor, inactive degradation product, modified hormone หรือโปรตีนอื่น ๆ ที่ชะออกมาพร้อมกับพิกัด B และ C ใน HPLC ขั้นตอนหนึ่ง (Huberman and Aguilar, 1986)

ในปี 1986 Kallen et al. ได้นำเนื้อเยื่อที่เป็นแหล่งของ CHH 3 บริเวณคือ ตัวเซลล์ (perikarya), axon tract และต่อมไชนัสของกุ้ง crayfish, *Astacus leptodactylus* มาสกัดและตรวจวิเคราะห์โดยเทคนิคทางชีวเคมี ได้แก่ PAGE, SDS-PAGE และ HPLC พร้อมกันนี้ได้นำวิธี dotting immunobinding assay (DIA) มาเป็นวิธีติดตาม CHH และตรวจสอบประสิทธิภาพในการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดของสัตว์ทดลองไปพร้อม ๆ กัน พบว่าหลังจากผ่าน PAGE แล้ว สารสกัดจากเนื้อเยื่อทั้ง 3 บริเวณเคลื่อนที่ออกมาได้ระยะทางเท่ากัน และสามารถเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดของสัตว์ทดลองและให้ผลบวกกับ DIA ได้เหมือนกัน แต่สารสกัดจากเซลล์ยังพบ minor peak อีกซึ่งเคลื่อนที่ออกมาได้ระยะทางน้อยกว่า major peak Minor peak นี้ อาจเป็นโปรฮอร์โมนของ CHH เมื่อนำสารที่ผ่าน PAGE ไปผ่าน SDS-PAGE พบว่าสารนี้เคลื่อนที่ออกมาเป็นแถบโปรตีนเดี่ยว ๆ และตรงกับแถบของโปรตีนมาตรฐานที่มีน้ำหนักโมเลกุล 7,000 ดาลตัน แล้วนำสารที่ให้ผลบวกกับ DIA หลังจากผ่าน PAGE ไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ RP-HPLC ปรากฏว่าสารนี้ถูกชะออกมา 2 พิกัดที่เวลา 28-29 และ 52-54 นาทีตามลำดับเหมือนกันทั้ง 3 เนื้อเยื่อ

ต่อมาในปี 1988 Huberman และ Aguilar ได้ศึกษาเปรียบเทียบโครงสร้างของ CHH 2 รูปแบบจากสัตว์ทดลองเดิม (*Procambarus bouvieri*) โดยแยกสกัด CHH จากต่อมไชนัสและทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ RP-HPLC, μ -Bondapak-phenyl column ระบบตัวทำละลายที่ใช้คือ 0.1 % trifluoroacetic acid (TFA) เป็นตัวทำละลาย A และ 60 % acetonitrile (ACN) 0.1 % TFA เป็นตัวทำละลาย B ปรากฏว่าได้ CHH ออกมา 2 พิกัด ซึ่งแยกจากกัน และทั้ง 2 พิกัดก็สามารถแสดง activity ในการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด พิกัดเหล่านี้พบว่าเป็น CHH 2 รูปแบบ คือ CHH-B และ CHH-C และอัตราส่วนของ CHH-B ต่อ

CHH-C เป็น 3:1 เมื่อนำ CHH ทั้งสองรูปแบบไปผ่าน SDS-PAGE พบว่าเปปไทด์ทั้งสองเคลื่อนที่ได้ระยะทางเท่า ๆ กันและไม่มีแถบโปรตีนอื่นมาปนเปื้อนเลย นอกจากนี้ยังพบว่า CHH ทั้งสองรูปแบบมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 6,000-6,500 ดาลตัน เมื่อเทียบกับแถบของโปรตีนมาตรฐานคือ aprotinin ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 6,500 ดาลตัน จากการวิเคราะห์กรดอะมิโน การย่อยด้วยเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ปฏิกริยา dansylation และการตรวจหากรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของเปปไทด์ ทั้ง CHH-B และ CHH-C มีความเหมือนกันอย่างมาก ได้แก่ น้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 6,000-6,200 ดาลตัน (คำนวณจากกรดอะมิโน) pI 4.79 ประกอบด้วยกรดอะมิโน 52-53 หน่วย มีซิสเตอีน (Cys) 4 หน่วย ไม่พบเมไทโอนีน (Met) ฮิสติดีน (His) ทริปโตเฟน (Trp) ปลาย N ถูกบล็อก ปลาย C เป็นไอโซลิวซีน (Ile) จำนวนกรดอะมิโนในพวกกรดและอนุพันธ์มี 12 หน่วย จำนวนกรดอะมิโนในพวกเบสมี 8 หน่วย CHH ทั้งสองรูปแบบมีความแตกต่างกันเล็กน้อยคือ จำนวนกรดอะมิโนลิซีน (Leu) และฟีนิลอะลานีน (Phe) รวมทั้ง hydrophobicity ซึ่งความแตกต่างนี้เนื่องมาจากจำนวนของ neutral hydrophobicity residues และหรือมีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นกับกรดอะมิโนพวกกรดภายหลัง ได้แก่ ปฏิกริยา amidation/deamidation

ได้มีรายงานการศึกษาถึงลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโนใน CHH จากปูน้ำเค็ม *Carcinus maenas* โดยแยกสกัด CHH จากต่อมไชนัสของปูชนิดนี้ แล้วนำสารที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ HPLC ให้โครมาโตแกรมออกมา 2 พีค ประกอบด้วย major peak และ minor peak ซึ่ง minor peak มี activity เพียงร้อยละ 10 ของ CHH ทั้งหมด จากการศึกษาลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโนของ CHH โดยการย่อยด้วยเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ และใช้ manual microsequencing, DABITC-PITC double coupling method (DABITC: 4-N, N-dimethylaminoazobenzene -4- isothiocyanate ; PITC : phenylisothiocyanate) พบว่า CHH ประกอบด้วยกรดอะมิโน 72 หน่วย มีน้ำหนักโมเลกุล 8,524 ดาลตัน มี ซิสเตอีน 6 หน่วย ซึ่งจะสร้าง disulfide bridge 3 ตำแหน่ง (ระหว่างตำแหน่งที่ 7-43, 23-39 และ 26-52) ทั้งปลาย N และปลาย C ถูกบล็อก นอกจากนี้ยังพบอีกว่า CHH มีลำดับการเรียงตัวไม่เหมือนกับเปปไทด์ฮอร์โมนหรือโปรตีนอื่น ๆ ที่เคยรู้จักมาก่อน (Kegel et al., 1989)

ในปี 1990 Soye et al. ได้แยกสกัด CHH จากต่อมไชนัสของกุ้งล็อบสเตอร์ *Homarus americanus* โดยใช้สารหลายชนิดสกัดได้แก่ กรดอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 10 กรดไฮโดรคลอริกที่ร้อน (80 °C) เข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร และกรดอะซิติกที่ร้อน (80 °C) ปรากฏว่า ถึงแม้จะใช้สารต่างชนิดกันสกัดหรือใช้สารชนิดเดียวกันสกัดแต่ใช้อุณหภูมิต่างกัน ก็ให้โครมาโตแกรมออกมาเหมือนกัน แต่การสกัดด้วยกรดอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 10 จะทำให้มีการสูญเสียฮอร์โมนไปบ้าง ขณะที่การสกัดด้วย

กรดอะมิโนที่ร้อน ปริมาณของฮอริโมนก็ยังคงสภาพไม่มีการเปลี่ยนแปลง จากนั้นนำสารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยกรดอะมิโนที่ร้อนไปผ่าน RP-HPLC Nucleosil C18 column ระบบตัวทำละลายที่ใช้คือ 0.1 % TFA ในน้ำ และ 0.1 % TFA ใน n-propanol ได้เปปไทด์ออกมา 3 กลุ่ม แต่ละกลุ่มประกอบด้วยเปปไทด์ย่อย ๆ 2 กลุ่มรวมกัน (กลุ่ม 1 คือ No.1, 2 กลุ่ม 2 คือ No.3, 4 และกลุ่ม 3 คือ No.5, 6) แต่มีเพียง 2 กลุ่มเท่านั้นที่แสดง activity ในการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดคือ กลุ่มที่ 1 และ กลุ่มที่ 3 ส่วนกลุ่มที่ 2 ไม่แสดง activity นี้เมื่อตรวจสอบในกุ้งล็อบสเตอร์ *Homarus gammarus* ขณะที่เมื่อทดสอบในกุ้ง crayfish, *Orconectes limosus* และ *Astacus leptodactylus* เปปไทด์ทั้งสามกลุ่มจะแสดง activity ได้ทั้งหมด เมื่อตรวจหาน้ำหนักโมเลกุลโดยใช้ FAB/MS (Fast atom bombardment-mass spectrometry) พบว่าพิกที่มี hydrophobic น้อย (No.1 และ No.2) มีน้ำหนักโมเลกุล 8,633 ดาลตัน เมื่อนำไปผ่าน IEF พบว่าเป็นเปปไทด์พวกเบส มี pI 8.7 ขณะที่พิกที่มี hydrophobic มาก (No.5 และ No.6) มีน้ำหนักโมเลกุล 8,577 ดาลตัน เป็นเปปไทด์พวกกรด มี pI 5.0 จากการวิเคราะห์กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของเปปไทด์ปรากฏว่าเปปไทด์ 1 และ 2 เปปไทด์ 5 และ 6 มีความเหมือนกันอย่างมาก มีความแตกต่างกันบ้างแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ได้แก่จำนวนกรดอะมิโนพวกอะโรมาติกที่เป็นองค์ประกอบของเปปไทด์ เมื่อตรวจวัดด้วย double UV detection ที่ 220/280 นาโนเมตร แต่ละกลุ่มของเปปไทด์ให้ค่าดูดกลืนแสงต่างกัน และจากการศึกษาศักยภาพในการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดพบว่า เปปไทด์ทั้ง 4 สามารถทำให้มีการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดได้เท่า ๆ กัน

ต่อมาในปี 1991 Tensen et al. ได้ศึกษาเปรียบเทียบลักษณะของ CHH 2 รูปแบบในกุ้งล็อบสเตอร์ *Homarus americanus* โดยสกัด CHH จากต่อมไชนัสด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่ร้อนเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร นำสารสกัดที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ 2 ขั้นตอนโดยใช้ RP-HPLC สามารถแยก CHH ออกมาได้ 2 กลุ่ม แต่ละกลุ่มประกอบด้วย CHH 2 รูปแบบ จากการนำเปปไทด์ทั้ง 2 กลุ่มมาศึกษาทางด้านลักษณะและองค์ประกอบทางเคมีโดยวิธีต่าง ๆ เพื่อเปรียบเทียบกัน ได้แก่ การย่อยด้วยเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ การวิเคราะห์กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบ การหาลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโนโดยวิธี Edman degradation และการหาน้ำหนักโมเลกุลโดยใช้ FAB/MS พบว่าเปปไทด์ทั้ง 2 กลุ่มประกอบด้วยกรดอะมิโน 72 หน่วย มีไฟโรกลูตาเมต (pGlu) ที่ปลาย N แต่มีความแตกต่างกันในด้านกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบ อัตราส่วนของกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ ลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโนรวมทั้งน้ำหนักโมเลกุลด้วย โดยที่เปปไทด์กลุ่มแรกมีน้ำหนักโมเลกุล 8,578 ดาลตัน ส่วนกลุ่มที่สองมีน้ำหนักโมเลกุล $8,655 \pm 25$ ดาลตัน

สำหรับการศึกษาลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโนในกุ้ง crayfish, *Orconectes limosus*

โดยสกัด CHH จากต่อมไชนัสและทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ RP-HPLC เลือกพีคที่มีปริมาณฮอร์โมนมากที่สุดมาหาลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโนในเปปไทด์ฮอร์โมนโดยวิธี manual Edman microsequencing พบว่าประกอบด้วยกรดอะมิโน 72 หน่วย มีไพรอกลูตามेतที่ปลาย N ส่วนปลาย C เป็นแวลีน มีซิสเตอีน 6 หน่วย ซึ่งจะสร้าง disulfide bridge 3 ตำแหน่ง (ระหว่างตำแหน่งที่ 7-43, 23-39 และ 26-52) เมื่อทำการตรวจสอบน้ำหนักโมเลกุลโดยคำนวณจากกรดอะมิโนที่ตรวจวิเคราะห์ได้และจากเจลฟิเลเทรชัน (gel filtration) พบว่าฮอร์โมนนี้มีน้ำหนักโมเลกุล 8,400 ดาลตัน เมื่อเปรียบเทียบจำนวนกรดอะมิโนใน CHH จาก *Orconectes limosus* กับ CHH จาก *Carcinus maenas* ปรากฏว่ามีกรดอะมิโนที่ซ้ำกันถึงร้อยละ 61 และซ้ำกับ MH จาก *Homarus americanus* ถึงร้อยละ 81 (Kegel et al., 1991)

ต่อมาในปี 1993 Huberman et al. ได้ศึกษาเปรียบเทียบโครงสร้างปฐมภูมิของ CHH จากสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำชนิดต่าง ๆ พบว่า CHH-isomorph ของ *Procambarus bouvieri* มีกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของฮอร์โมนนี้ซ้ำกับ CHH จาก *Orconectes limosus*, *Carcinus maenas* และ CHH-A, CHH-B ของ *Homarus americanus* ถึงร้อยละ 98.6, 61.1, 83.3 และ 79.2 ตามลำดับ ดังตารางที่ 2 ในปีเดียวกันได้มีรายงานการแยกสกัด CHH จากต่อมไชนัสของ wood lice, (isopod) *Armadillidium vulgare* จำนวน 600 ต่อมไชนัสด้วยกรดอะซิติกเข้มข้น 0.2 โมลต่อลิตร นำสารสกัดที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วย RP-HPLC ระบบสารละลายที่ใช้คือ ACN/TFA นำสารที่ชะออกจากคอลัมน์ของแต่ละ fraction ไปตรวจสอบประสิทธิภาพในการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดของสัตว์ทดลอง เลือก fraction ที่พบ CHH ไปตรวจสอบความบริสุทธิ์และตรวจหาน้ำหนักโมเลกุลโดยใช้เครื่องแมสสเปคโตรเมตรี พบว่า CHH ของ isopod มีน้ำหนักโมเลกุล 8,729.3 ดาลตัน และมีความบริสุทธิ์อย่างน้อย 90 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำ CHH ที่ได้ไปหาลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโนโดยการย่อยด้วยเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ และปฏิกิริยา Edman degradation พบว่าประกอบด้วยกรดอะมิโน 73 หน่วย มีซิสเตอีน 6 หน่วย ซึ่งจะสร้าง disulfide bridges 3 ตำแหน่ง คือระหว่างตำแหน่งที่ 7-43, 23-39 และ 26-52 ปลาย N ไม่ถูกบล็อก ปลาย C จะเกิดปฏิกิริยา amidation (Martin et al., 1993)

ในปี 1994 ได้มีรายงานการศึกษา CHH ใน Norway lobster, *Nephrops norvegicus* โดยสกัดฮอร์โมนนี้จากต่อมไชนัสด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร สารสกัดที่ได้สามารถทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดของสัตว์ทดลองเพิ่มขึ้นนานจนถึง 5 ชั่วโมง จึงนำสารสกัดไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ RP-HPLC Nucleosil C18 column พบว่าเมื่อตรวจวิเคราะห์ด้วย ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) โดยใช้ anti *Orconectes* CHH antiserum Fraction ที่แสดง activity ในการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดคือ 34-37 โดย fraction ที่ 35 และ 36 แสดง activity นี้ได้สูงที่สุด จากการตรวจ

หาน้ำหนักโมเลกุลของ CHH โดยใช้ SDS-PAGE พบว่าเปปไทด์ทั้งสองเคลื่อนที่ออกมาตรงกับแถบของโปรตีนมาตรฐานที่มีน้ำหนักโมเลกุล 8,000 ดาลตัน และมีแถบโปรตีนอื่น ๆ ประปรายบ้างเล็กน้อย (Smullen and Bently, 1994) และในปีเดียวกัน Sithigorngul et al., 1994 ได้ศึกษาแนวทางการแยก CHH เบื้องต้นในกุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* พบว่าการสกัดด้วยสารละลายเมทานอล-กรดอะซิติก (methanol : acetic acid / 90:1) ให้ผลดีทั้งในด้านการคงสภาพและความบริสุทธิ์ ซึ่งดีกว่าการใช้กรดอะซิติกเข้มข้น 2 โมลต่อลิตร กรดอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 10 และน้ำเดือด

ในปี 1995 Yang et al. ได้แยกสกัด CHH จากต่อมไชนัสของกุ้งทะเล *Penaeus japonicus* โดยใช้ต่อมไชนัสประมาณ 1,500 ต่อมสกัดใน 30 % ACN/NaCl ทำให้บริสุทธิ์โดย RP-HPLC ระบบสารละลาย ACN/TFA 1 ขั้นตอน ได้ CHH 5 รูปแบบ แต่สามารถหาลำดับกรดอะมิโนสมบูรณ์ได้เพียง 1 รูปแบบ ประกอบด้วยกรดอะมิโน 72 หน่วย น้ำหนักโมเลกุล 8,353 ดาลตัน ประกอบด้วย disulfide bridge 3 ตำแหน่งด้วยกัน

สำหรับ CHH ในกุ้งก้ามกราม ได้ทำการแยกสกัดจากก้านตาจำนวน 5,000 ก้านตาและสามารถทำให้บริสุทธิ์โดย RP-HPLC 8 ขั้นตอนจนหาลำดับกรดอะมิโนได้ 1 รูปแบบคือ Mar-CHH-I ประกอบด้วยกรดอะมิโน 71 หน่วย น้ำหนักโมเลกุล 8,538 ดาลตัน แต่จากการตรวจหาน้ำหนักโมเลกุลโดยใช้ MALDI-TOF MS พบว่าน่าจะประกอบด้วยกรดอะมิโน 72 หน่วย โดยที่ตำแหน่งที่ 71 ควรมี threonine เป็นองค์ประกอบและคาดว่าจะยังมี CHH อีกหลายรูปแบบที่ยังไม่สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ (Sithigorngul et al., 1999)

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้จึงเป็นความพยายามที่จะแยก CHH รูปแบบที่เหลือเพื่อนำมาหาลำดับกรดอะมิโน และพยายามพิสูจน์โครงสร้างทางปลาย C ของ Mar-CHH-I โดยใช้เทคนิคทางภูมิคุ้มกัน ได้แก่ สังเคราะห์เปปไทด์สายสั้น ๆ ที่คาดว่าจะเปปไทด์กรดอะมิโนทางปลาย C ของ Mar-CHH-I จำนวน 7 หน่วยที่ไม่มี threonine คือ YANAVQV-NH₂ (T-) และเปปไทด์ 8 หน่วยที่มี threonine คือ YANAVQIV-NH₂ (T+) จากนั้นนำไปเชื่อมต่อกับโปรตีนพาหะและนำไปฉีดในหนูขาวเพื่อสร้างแอนติบอดีจำเพาะต่อเปปไทด์ทั้งสอง สำหรับนำมาพิสูจน์โครงสร้างของ Mar-CHH-I ที่ได้จากก้านตา

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบชนิดและจำนวนกรดอะมิโนของ CHH ในสัตว์ครึ่งตัวขาเขียนบางชนิด
สีแดงแสดงกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน

		10		20		30
Mar	AILDQ	SCKGI	FDREL	FKKLD	RVCDD	CYNLY
Prb-I	pEVFDQ	ACKGI	YDRAI	FKKLD	RVCED	CYNLY
Orl	pEVFDQ	ACKGI	YDRAI	FKKLD	RVCED	CYNLY
Hoa-a	pEVFDQ	ACKGV	YDRNL	FKKLD	RVCED	CYNLY
Hoa-b	pEVFDQ	ACKGV	YDRNL	FKKLN	RVCED	CYNLY
Cam	pEIYDT	SCKGV	YDRAL	FNDLE	HVCDD	CYNLY
Pej	SLFDP	ACTGI	YDRQL	LRKLG	RLCDD	CYNVF
		40		50		60
Mar	RKPYV	AIDCR	RGCYQ	NLVFR	QCIQD	LQLMD
Prb-I	RKPYV	ATTCT	QNCYA	NSVFR	QCLDD	LLLID
Orl	RKPYV	ATTCT	QNCYA	NSVFR	QCLDD	LLLID
Hoa-a	RKPFV	ATTCT	ENCYS	NWVFR	QCLDD	LLLSL
Hoa-b	RKPFV	VTTCT	ENCYS	NRVFR	QCLDD	LLMID
Cam	RTSYV	ASACR	SNCYS	NLVFR	QCMDD	LLMMD
Pej	REPKV	ATGCR	SNCYH	NLIFK	DCLEY	LIPSH
		70				
Mar	DLDEY	ANAVQ	?V-NH ₂			
Prb-I	VVDEY	ISGVQ	TV-NH ₂			
Orl	VLDEY	ISGVQ	TV-NH ₂			
Hoa-a	VIDEY	VSNVQ	MV-NH ₂			
Hoa-b	VIDEY	VSNVQ	MV-NH ₂			
Cam	EFDQY	ARKVQ	MV-NH ₂			
Pej	LQEEH	MAAMQ	TV-NH ₂			

Mar	<i>Macrobrachium rosenbergii</i> (Sithigorngul et al.,1999)
Prb-I	<i>Procambarus bouvieri</i> (Huberman et al.,1993)
Orl	<i>Orconectes limosus</i> (Kegel et al.,1991)
Hoa-a	<i>Homarus americanus</i> ,CHH-A (Tensen et at.,1991)
Hoa-b	<i>Homarus americanus</i> ,CHH-B (Tensen et al.,1991)
Cam	<i>Carcinus maenas</i> (Weideman et al.,1989)
Pej	<i>Penaeus japonicus</i> (Yang et al.,1995)

วิธีการวิจัย



การศึกษาค้างนี้ได้แบ่งการทดลองออกเป็น 2 การทดลองคือ

1. การทำให้บริสุทธิ์และศึกษาลำดับกรดอะมิโนของ CHH รูปแบบใหม่เพิ่มเติมจาก Mar-CHH-I
2. การพิสูจน์โครงสร้างทางปลาย C ของ Mar-CHH-I โดยกระบวนการทางอิมมูโน

การทดลองที่ 1. การทำให้บริสุทธิ์และศึกษาลำดับกรดอะมิโนของ CHH รูปแบบใหม่เพิ่มเติมจาก Mar-CHH-I

1. สัตว์ทดลอง

กิ้งก่ามกรามเพศเมีย (*Macrobrachium rosenbergii* : De Man) ขนาดตัวโตเต็มวัย มีน้ำหนักประมาณ 25-30 กรัม ซื้อจากตลาดกลาง อำเภอพระนครศรีอยุธยา จังหวัดพระนครศรีอยุธยา นำกิ้งก่ามกรามเพศเมียมาพักเลี้ยงในบ่อซีเมนต์ขนาด 100x250x50 เซนติเมตร โดยเลี้ยงอาหารวันละ 2 ครั้ง ตอนเช้าและตอนเย็น อาหารที่เลี้ยงเป็นอาหารสำเร็จรูปชนิดเม็ดสำหรับกิ้งก่ามกราม ผลิตโดยบริษัทเครือ ป.เจริญพันธุ์ น้ำและอาหารที่เหลือจะถูกดูดทิ้งและเปลี่ยนน้ำในตอนเช้าของทุกวัน อุณหภูมิของน้ำที่ใช้เลี้ยงและทดลองอยู่ในระหว่าง 26-28 องศาเซลเซียส ความยาวช่วงแสงตามธรรมชาติ

2. การเก็บรวบรวมตากุ้ง

รวบรวมตากุ้งจำนวน 5,000 ตัว โดยใช้กรรไกรตัดก้านตาจากกิ้งก่ามกรามเพศเมียในขณะที่ยังมีชีวิตอยู่ แล้วนำไปแช่ให้แข็งทันทีบนก้อนน้ำแข็งแห้ง จากนั้นนำตากุ้งที่รวบรวมได้ไปเก็บไว้ในตู้เย็นที่มีอุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส จนกระทั่งต้องการใช้

3. การเตรียมสารสกัดและการสกัด CHH จากก้านตา

นำตากุ้งมาบดเป็นผงละเอียดในขณะที่เย็นจัด โดยบดในครกที่แช่ให้เย็นในน้ำแข็งแห้ง จากนั้นเทผงก้านตาลงในสารละลาย methanol : acetic acid (90:1) ในปริมาณ 0.5 มิลลิลิตรต่อก้านตา คนให้ทั่วและทิ้งไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นแยกตะกอนออกด้วยแรงเหวี่ยง 10,000 g เป็นเวลา 15 นาที แยกเอาส่วนน้ำใสเก็บไว้แล้วล้างตะกอนและสกัดซ้ำด้วยสารละลายและวิธีการเดิมอีกครั้ง รวมส่วนสารสกัดในสารละลายเข้าด้วยกัน แล้วนำไปประเหยเอกรดอะซิติกและเมทานอลออกด้วยเครื่อง vacuum concentrator จากนั้นเติมด้วย 0.1 % trifluoro-

acetic acid ในปริมาณเท่าเดิม นำสารละลายไปผ่านเพื่อดูดซับใน C18 Cartridge แล้วชะสารสกัดออกด้วย 50 % acetonitrile 0.1 % TFA นำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง vacuum concentrator แล้วปรับสารที่ได้ด้วย 80 % acetonitrile 0.1% TFA ให้มีความเข้มข้นของ acetonitrile ประมาณ 15 % แล้วเก็บสารที่ได้รวบรวมไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส แบ่งสารสกัดที่ได้จำนวน 50 แก้วนำไปทำ bioassay เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดที่ได้ และส่วนที่เหลือนำไปทำให้บริสุทธิ์ต่อในขั้นตอนที่ 4 (รูปที่ 1)

4. การทำให้ CHH บริสุทธิ์ด้วยกระบวนการทาง Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC)

นำสารสกัดจากก้านตาที่ได้จากข้อ 3 ไปปั่นด้วยแรงเหวี่ยง 10,000 g เป็นเวลา 15 นาที แยกสารละลายส่วนใสนำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC ใช้คอลัมน์ PrepPak C18 ขนาด 25X100 มิลลิเมตร และใช้ระบบตัวทำละลาย 2 ชนิดซึ่งประกอบด้วยปั๊ม A และปั๊ม B จากนั้นชะด้วย acetonitrile (ACN) ที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นตามลำดับ (concentration gradient) จาก 20-80 % B (A = 0.1 % TFA, B = 80 % ACN 0.1 % TFA) อัตราการไหล 5 มิลลิลิตร/นาที การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารละลาย B เป็น 1 % B ต่อนาที รวบรวมสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ลงในหลอดเก็บตัวอย่างโดยเครื่อง fraction collector ทุก ๆ 1 นาที แบ่งสารละลายออกไปทดสอบ โดยเติมสารละลายแต่ละส่วนด้วยสารละลาย bovine serum albumin (BSA) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 1 ไมโครกรัมต่อก้านตา แล้วระเหย acetonitrile และ TFA ให้แห้งด้วย vacuum concentrator จากนั้นนำไปตรวจหาฮอร์โมน CHH ตามวิธีในข้อ 5 โดยฉีดสารสกัดประมาณ 1-2 แก้วต่อกิ่ง 1 ตัว นำ fraction ที่ทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดเพิ่มขึ้นไปผ่าน HPLC โดยใช้คอลัมน์ PrepPak C8 ขนาด 25 X 100 มิลลิเมตร, Cyano, Phenyl และ C8 ขนาด 4.6 X 250 มิลลิเมตร และใช้ระบบตัวทำละลายต่าง ๆ ดังนี้ ACN/heptafluorobutyric acid (HFBA), ACN/TFA, ACN/TEA เก็บตัวอย่างทุก ๆ นาที นำพีคที่แสดง CHH activity ไปทำให้บริสุทธิ์ใน RP-HPLC ขั้นตอนไปรวม 8 ขั้นตอนจนได้ฮอร์โมนบริสุทธิ์ซึ่งจะปรากฏพีคบนโครมาโตแกรมเห็นเพียงพีคเดียว

5. การทดสอบประสิทธิภาพการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดของ CHH

นำกึ่งก้ามกรามเพศเมียมาตัดตาทั้งสองข้าง นำไปเลี้ยงให้อาหารตามปกติประมาณ 1-2 วัน แล้วให้อุดอาหารก่อนทำการทดลองเป็นเวลา 12 ชั่วโมง เก็บเลือดจากขาเดินคู่ที่ 4 ของกึ่งทุกตัว

ประมาณ 100 ไมโครลิตร แล้วฉีดด้วยสารสกัดจากก้านตาที่เจือจางระดับต่าง ๆ คือ 1:125, 1:25, 1:50, 1:25, 1:5 และ 1 ก้านตา/ตัว ด้วยน้ำเกลือ (*Macrobrachium rosenbergii* - isotonic physiological saline, pH 7.6 ; Nagamine and others. 1980) โดยฉีดประมาณ 100 ไมโครลิตร ที่ขาเดินคู่ที่ 2 หลังจากนั้น 1 ชั่วโมง เก็บเลือดจากขาเดินคู่ที่ 4 ประมาณ 100 ไมโครลิตร นำเลือดก่อนฉีดและหลังฉีดสารสกัดไปหาปริมาณน้ำตาลในเลือดโดยวิธี Glucose Oxidase Method หากระดับน้ำตาลในเลือดที่เพิ่มขึ้นหลังจากฉีดสารสกัดปริมาณต่าง ๆ นำไปเขียนกราฟเปรียบเทียบเพื่อหาประสิทธิภาพในการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดของสารสกัดจากก้านตา กลุ่มควบคุมฉีดด้วยน้ำเกลือปริมาตร 100 ไมโครลิตร จำนวนกุ้งที่ใช้ทดสอบในแต่ละ fraction ประมาณ 2-4 ตัว (รูปที่ 2)

การหากระดับน้ำตาลในเลือด เป็นการตรวจหาปริมาณกลูโคสในเลือด โดยใช้ Enzymatic Glucose Oxidase Colorimetric Determination ดัดแปลงจาก procedure No.510 (Sigma Diagnostic Kit) ทำโดยนำเลือดตัวอย่างมาทิ้งให้แข็งตัว เก็บเฉพาะน้ำใสของเลือดปริมาตร 5 ไมโครลิตร แล้วผสมกับสารละลายเอนไซม์และสี (glucose oxidase, peroxidase, o-Dianisidine-PGO) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ใน microtiter plate ทิ้งไว้ให้ทำปฏิกิริยา 30 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader คำนวณหาปริมาณกลูโคสในเลือดโดยเทียบกับค่าดูดกลืนแสงของกลูโคสมาตรฐาน

6. การเตรียมสารสกัดหยาบจากก้านตาของกุ้งก้ามกราม

ตัดก้านตากุ้งก้ามกรามเพศเมีย โดยใช้กรรไกรตัดบริเวณโคนของก้านตากุ้งที่ยังมีชีวิตอยู่ แช่แข็งทันทีในน้ำแข็งแห้ง รวบรวมเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส จากนั้นนำก้านตาที่เก็บรวบรวมได้จำนวน 250 ก้านตามาผ่าตัดเปลือกหุ้มตาออก แล้วนำมาบดในหลอดแก้ว (glass homogenizer) ในน้ำเกลือสำหรับกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*-isotonic physiological saline pH 7.6) ในอัตราส่วน 1 ก้านตาต่อสารละลายน้ำเกลือ 50 ไมโครลิตร และนำไปปั่นที่ความเร็ว 10,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แยกส่วนที่เป็นน้ำใสเก็บไว้ แล้วสกัดส่วนที่เป็นตะกอนซ้ำด้วยสารละลายน้ำเกลือและนำไปปั่นเช่นเดียวกันกับตอนแรก แยกส่วนน้ำใสที่ได้มารวมกับส่วนแรกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำไปใช้ (รูปที่ 3) สารสกัดที่ได้นี้จะนำไปใช้เป็น positive control ในระหว่างการศึกษาประสิทธิภาพการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดของ CHH ที่แยกได้จากกระบวนการ RP-HPLC

7. การคำนวณหาร้อยละของการคงสภาพของ CHH

การคำนวณหาร้อยละของการคงสภาพของฮอริโมน CHH ทำได้โดยเปรียบเทียบปริมาณฮอริโมนที่สามารถเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดได้ 1 หน่วย (25 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตรของเลือด) ในสารสกัดด้วยน้ำเกลือกับสารสกัดด้วย methanol acetic acid

ร้อยละของการคงสภาพของฮอริโมน CHH

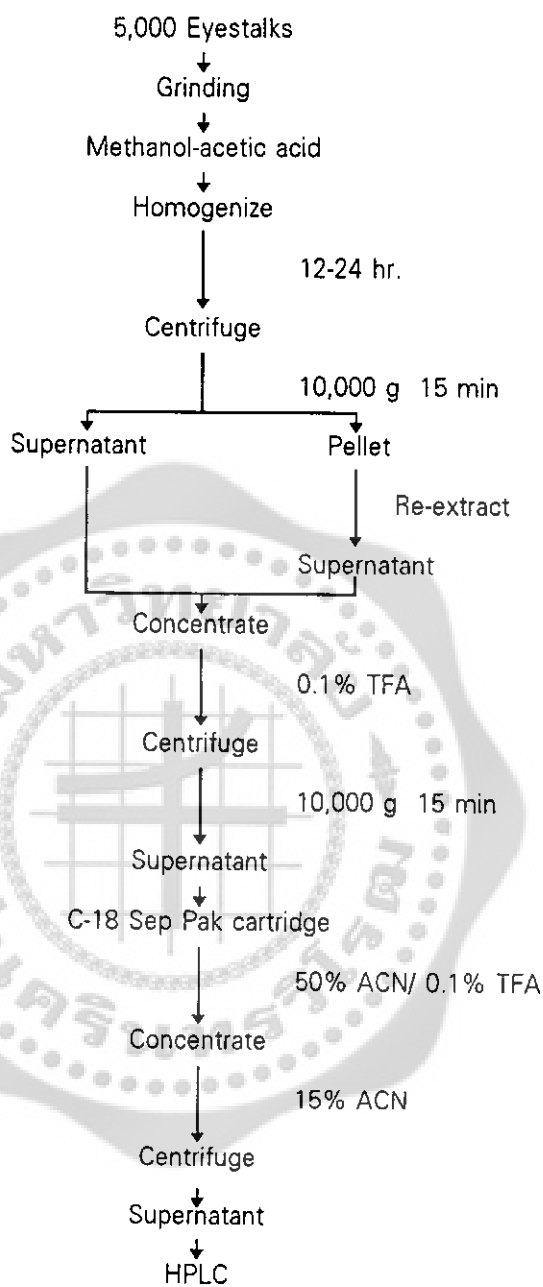
$$= \frac{\text{จำนวนก้านตาในสารสกัดด้วย methanol-acetic acid ที่สามารถเพิ่มระดับน้ำตาล 1 หน่วย}}{\text{จำนวนก้านตาใน fraction ของการทำให้บริสุทธิ์ที่สามารถเพิ่มระดับน้ำตาล 1 หน่วย}} \times 100$$

8. การหาน้ำหนักโมเลกุลของ CHH

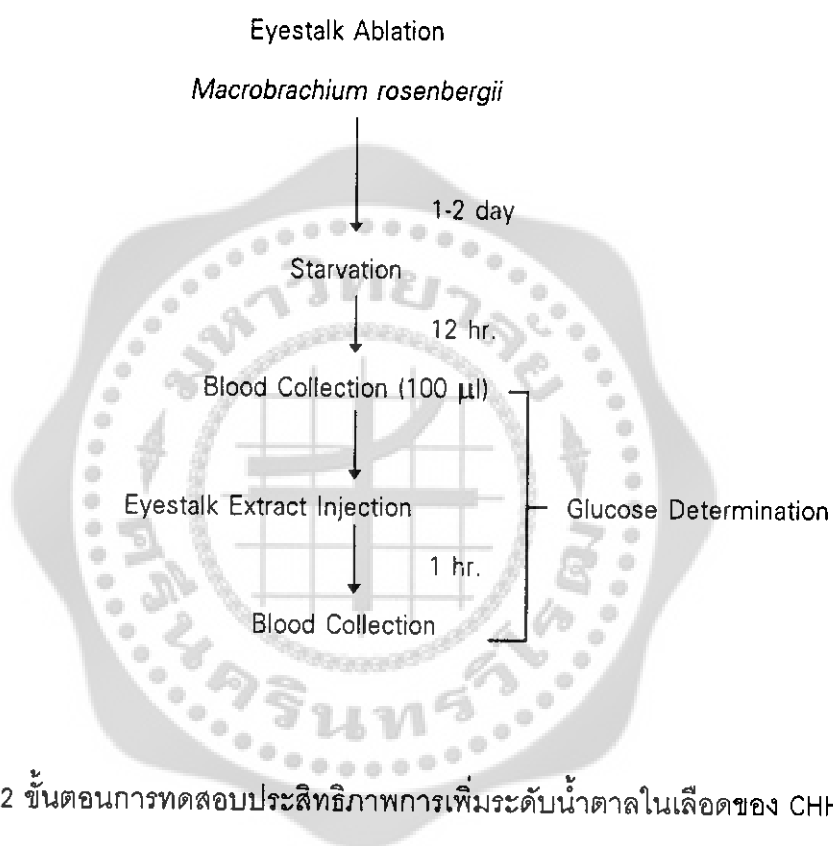
แบ่งแฟรคชันที่แสดงการออกฤทธิ์ของ CHH ที่คาดว่าบริสุทธิ์แล้วประมาณ 10-20 % นำไประเหยให้แห้งและนำไปหาน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธี Matrix-assist laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF) โดยใช้ sinapinic acid เป็นตัว Matrix โดยใช้ BIFLEX MALDI-TOF (Bruker Franzer Analytik GMBH) ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

9. การหาลำดับกรดอะมิโนของ CHH

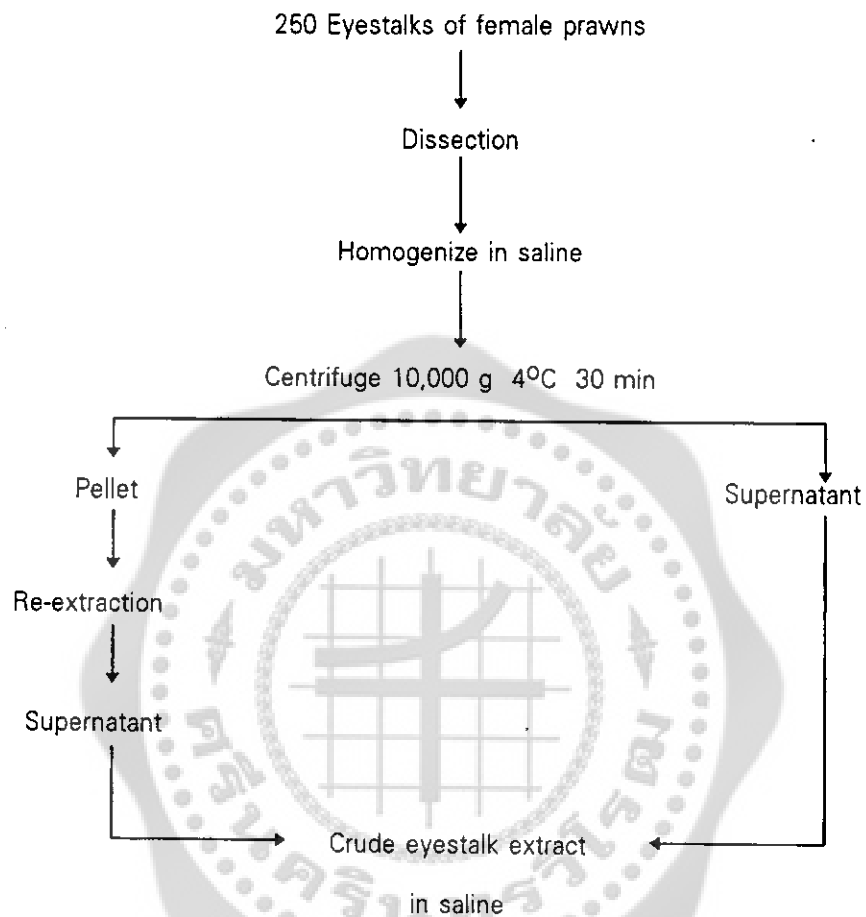
การหาลำดับกรดอะมิโนของ CHH ที่ทำให้บริสุทธิ์ทำโดยใช้ Applied Biosystems Procise Sequencer และได้รับความอนุเคราะห์จาก Dr. Robin J. Philp, Institute of Molecular and Cell Biology, National University of Singapore โดยนำฮอริโมนบริสุทธิ์ประมาณ 30 pmole มาทำให้เสียสภาพธรรมชาติใน 6 M guanidine hydrochloride, 0.5 M Tris, 5 mM dithiothreitol pH 8.5 จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยา alkylation ด้วย 4-vinylpyridine และกำจัดเกลือออกโดยกระบวนการ RP-HPLC โดยใช้ C18 column (Vydax) ขนาด 4.3X150 มม. ชะด้วย ACN/TFA ความเข้มข้น 5-60 %B โดยตัวทำละลาย B ประกอบด้วย 90 % ACN/0.08% TFA จากนั้นจึงแยกฮอริโมนไปหาลำดับกรดอะมิโนใน automated sequencer จำนวน 77 รอบ



รูปที่ 1 ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดและการสกัด CHH จากก้านตาของงูก้ามกรม



รูปที่ 2 ขั้นตอนการทดสอบประสิทธิภาพการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดของ CHH



รูปที่ 3 ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดหยาดจากก้านตาของกุ้งก้ามกราม.

การทดลองที่ II. การพิสูจน์โครงสร้างทางปลาย C ของ Mar-CHH-I

1. การสังเคราะห์เปปไทด์ YANAVQV-NH₂ (T-) และเปปไทด์ YANAVQTV-NH₂ (T+)

เปปไทด์ T- และเปปไทด์ T+ สังเคราะห์โดย Solid Phase Peptide Synthesis บน Novasyn TGR resin (Nova biochem) ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จากนั้นนำเปปไทด์ที่สังเคราะห์ได้ไปทำให้บริสุทธิ์โดย RP-HPLC ใช้ C18 column ขนาด 12.5 X 80 มม. ระบบสารละลาย acetonitrile/trifluoroacetic acid ตรวจเช็คความบริสุทธิ์และความถูกต้องของเปปไทด์ด้วย MALDI-TOF MS (รูปที่ 4)

2. การเชื่อมต่อเปปไทด์กับโปรตีนพาหะ (Carrier Protein)

นำเปปไทด์ที่สังเคราะห์ได้คือ เปปไทด์ T- และเปปไทด์ T+ มาเชื่อมต่อกับ bovine serum albumin (BSA) (BSA-T- และ BSA-T+) โดยผสมโปรตีน BSA 10 มิลลิกรัมกับเปปไทด์ T- หรือเปปไทด์ T+ 0.5 มิลลิกรัมใน PBS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย 25 % glutaraldehyde ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ทิ้งไว้เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง นำสารละลายผสมมาทำไดอะไลซิส (dialysis) ใน PBS เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยเปลี่ยน PBS ทุก 24 ชั่วโมง เพื่อกำจัด glutaraldehyde จากนั้นวัดปริมาตรสารละลายผสมหลังทำไดอะไลซิส และคำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีนรวมในสารละลายโดยประมาณจากน้ำหนักโปรตีนเริ่มต้น

เตรียม BSA เชื่อมกับไกลซีน (BSA-Gly) เพื่อใช้ในการดูดซับแอนติบอดีต่อโปรตีนพาหะ โดยผสม BSA 80 มิลลิกรัมกับไกลซีน 80 มิลลิกรัมใน PBS ปริมาตร 8 มิลลิลิตร เติมสารละลาย 25 % glutaraldehyde ปริมาตร 120 ไมโครลิตร จากนั้นทำเช่นเดียวกับการเตรียม BSA เชื่อมกับเปปไทด์

3. การปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาว

นำเปปไทด์ T- หรือเปปไทด์ T+ ที่เชื่อมกับ BSA แล้ว (BSA-T- หรือ BSA-T+) 0.5 มิลลิกรัม (75 ไมโครลิตร) ผสมกับ complete Freund's adjuvant ในอัตราส่วน 1:1 แล้วฉีดเข้าช่องท้องของหนูขาว จำนวน 4 ตัว ๆ ละ 150 ไมโครลิตรต่อ 1 ตัว หลังจากนั้นฉีดซ้ำอีก 3 ครั้งทุก 2 สัปดาห์โดยผสมกับ incomplete Freund's adjuvant ในอัตราส่วน 1:1 ในปริมาณเท่าเดิมกับการฉีดครั้งแรก เมื่อครบ 1 สัปดาห์หลังจากการฉีดครั้งที่ 4 เก็บเลือดหนูจากทางเบ้าตา ทิ้งให้แข็งตัว จากนั้นนำเลือดที่ได้ไป

ปั่นที่ 5000 g เป็นเวลา 15 นาที แยกส่วนใสที่เป็นซีรัมเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้

4. การดูดซับแอนติซีรัมต่อโปรตีน BSA ออกด้วย BSA-Gly

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

5. การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมในการจับเปปไทด์สังเคราะห์

5.1 การตรวจหาไตเตอร์ของแอนติซีรัมต่อเปปไทด์ T- และเปปไทด์ T+ ที่ได้โดยวิธี

indirect immunoperoxidase ELISA

นำสารละลาย BSA-T- หรือ BSA-T+ หรือ BSA-Gly ที่มีความเข้มข้นของโปรตีน 20 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตรใส่ในหลุม microtiter plate (ปริมาณโปรตีน 1 ไมโครกรัม/หลุม) บ่มที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS 150 ไมโครลิตร จำนวน 4 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที ล้างอีกครั้งด้วย 0.5 % Blotto เป็นเวลา 30 นาที เติม 5 % Blotto ที่มี BSA-Gly เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรละลายอยู่ ปริมาตร 50 ไมโครลิตรลงในหลุมทุกหลุม จากนั้นเติมแอนติซีรัมต่อเปปไทด์ T- หรือเปปไทด์ T+ ที่ได้จากหนูแต่ละตัวหลังจากดูดซับด้วย BSA-Gly ที่เจือจางในอัตราส่วน 1:1000 ปริมาตร 50 ไมโครลิตรแล้วทำการเจือจางครั้งละ 2 เท่า นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง ล้างด้วย 0.5 % Blotto จำนวน 4 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที เติม Goat anti-mouse IgG H and L chain horseradish peroxidase conjugate (GAM -HRP) ที่เจือจาง 1:1000 ใน 5 % Blotto และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง ล้างด้วย 0.5 % Blotto จำนวน 4 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที และล้างอีกครั้งด้วย PBS จากนั้นเติมสารละลายสับสเตรทซึ่งประกอบด้วยสารละลาย 0.1 % O-phenylenediamine dihydrochloride (OPD), 0.006 % hydrogenper-oxide ใน 0.1 M citrate buffer pH 4.5 ลงในหลุม ๆ ละ 70 ไมโครลิตรทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที และเติมกรดซัลฟูริก 1 N ทันทีลงในหลุม ๆ ละ 70 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader คำนวณหาไตเตอร์ของแอนติซีรัมต่อเปปไทด์โดยดูจากค่าการเจือจางสุดท้ายที่ค่าดูดกลืนแสงประมาณ 0.1 หน่วย

5.2 การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรั่มต่อเปปไทด์ T- และเปปไทด์ T+ โดยวิธี dot-ELISA

เจือจางสารละลายเปปไทด์ T- และเปปไทด์ T+ ให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ กันจากความเข้มข้นเริ่มต้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรด้วยสารละลาย BSA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หยดลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส ปริมาตร 1 ไมโครลิตร จากความเข้มข้นมากไปหาน้อย นำแผ่นไนโตรเซลลูโลสไปอบที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และอบต่อในไอของ glutaraldehyde ที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง แช่กระดาษไนโตรเซลลูโลสในสารละลาย 0.2 % glutaraldehyde ต่ออีกเป็นเวลา 30 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 4 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที นำไปแช่ใน 5 % Blotto เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำแผ่นกระดาษไนโตรเซลลูโลสไปปมในสารละลายแอนติซีรั่มต่อเปปไทด์ T- หรือเปปไทด์ T+ ที่เจือจางในอัตราส่วน 1 : 40,000 ใน 5 % Blotto ที่มี BSA-Gly 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรละลายอยู่ตามลำดับ เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง ล้างด้วย 0.5 % Blotto 4 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที บ่มต่อใน GAM-HRP ที่เจือจางในอัตราส่วน 1 : 1,000 ใน 5 % Blotto เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง ล้างด้วย 0.5 % Blotto 4 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที และล้างต่ออีกครั้งด้วย PBS เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปแช่ในสารละลายดึบสเตรทซึ่งประกอบด้วย 0.03 % diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB), 0.006 % hydrogenperoxide (H_2O_2) และ 0.05% cobalt chloride ($CoCl_2$) ใน PBS เป็นเวลา 5 นาที ล้างน้ำกลั่นหลาย ๆ ครั้ง

6. การทดสอบความสามารถของแอนติซีรั่มที่จำเพาะต่อเปปไทด์ T- และเปปไทด์ T+ ในการจับเปปไทด์ธรรมชาติ (Natural Peptide)

6.1 การใช้แอนติซีรั่มต่อเปปไทด์ T- และเปปไทด์ T+ เพื่อตรวจสอบสารคล้ายเปปไทด์ T- และเปปไทด์ T+ ในสารสกัดจากก้านตากุ้งก้ามกรามโดยวิธี dot-ELISA

6.1.1 การเก็บรวบรวมตากุ้งก้ามกราม

รวบรวมตากุ้งโดยใช้กรรไกรตัดบริเวณโคนตากุ้งขณะยังมีชีวิตอยู่ แช่ในน้ำแข็งแห้งทันที และเก็บไว้ที่ -70 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้

6.1.2 การเตรียมสารสกัดจากก้านตาในสารละลายเมทานอล กรดอะซิติกและน้ำ

นำตากุ้งจำนวน 200 กรัมตามาบดละเอียดพร้อมน้ำแข็งแห้งในครกหินที่แช่ให้เย็นจัด เติมน้ำตาลลงในสารละลายเมทานอล อะซิติกและน้ำ (90:1:9) 100 มิลลิลิตร (0.5 มิลลิลิตร/กรัมตากุ้ง) คน

ให้ทั่ว บดอีกครั้งด้วยเครื่องบด (homogenizer) และทิ้งไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นแยกตะกอนที่ 10,000 g เป็นเวลา 15 นาที แยกเอาส่วนใสเก็บไว้ ล้างตะกอนและสกัดซ้ำด้วยสารละลายและวิธีการเดิมอีกครั้ง รวมสารสกัดที่ได้จากการสกัดทั้งสองครั้งเข้าด้วยกัน ระเหยเอาเมทานอลและกรดอะซิติกออกด้วยเครื่องระเหยแห้ง (speed vaccum concentrator) จากนั้นเติม 1 % trifluoroacetic acid (TFA) ให้ในสารสกัดมีความเข้มข้นของ TFA เท่ากับ 0.1 % ปั่นแยกตะกอนอีกครั้งที่ 10,000 g เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสของสารสกัดไปดูดซับบน C18 Sep-Pak cartridge สะสมสารสกัดออกด้วย 50 % acetonitrile ใน 0.1%TFA แล้วนำไประเหยตัวทำละลายออก และเก็บสารสกัดไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

6.1.3 การแยกสารสกัดจากก้านตาโดย RP-HPLC

นำสารสกัดจากก้านตาที่แยกได้จากข้อ 6.1.2 มาละลายด้วย 15 % acetonitrile ใน 0.1 % TFA ปั่นแยกตะกอนที่ 10,000 g เป็นเวลา 15 นาที แยกส่วนใสและนำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC ผ่านคอลัมน์ C18 จากนั้นสะสมสารสกัดด้วย acetonitrile ที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นตามลำดับ (concentration gradient) จาก 12-64 % acetonitrile ใน 0.1 %TFA อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที และการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้น 0.8 % ต่อนาที ตรวจวัดสารที่ออกจากคอลัมน์ที่ความยาวคลื่น 215 นาโนเมตร รวบรวมสารละลายที่แยกได้จากคอลัมน์โดยเครื่องแฟรคชันคอลเลคเตอร์ (fraction collector) ทุก ๆ 1 นาที

6.1.4 การตรวจหาสารคล้ายเปปไทด์ T- และ เปปไทด์ T+ ในก้านตาโดยวิธี dot-ELISA

นำ fraction ที่ 11-59 หลังผ่านกระบวนการทาง RP-HPLC (ข้อ 6.1.3) ระเหยตัวทำละลายออก เติม BSA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร หยดลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส fraction ละ 1 ไมโครลิตรต่อจุด (40 ก้านตาต่อจุด) เรียงตามลำดับ fraction ที่แยกได้จาก RP-HPLC นำกระดาษไนโตรเซลลูโลสไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และอบต่อในไอของ glutaraldehyde ที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง แช่กระดาษไนโตรเซลลูโลสในสารละลาย 0.2 % glutaraldehyde ต่ออีกเป็นเวลา 30 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 4 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที นำไปแช่ใน 5 % blotto เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นจึงทำตามวิธีการ dot-ELISA โดยนำแผ่นกระดาษไนโตรเซลลูโลสไปบ่มในสารละลายแอนติซีรัมต่อเปปไทด์ T- หรือเปปไทด์ T+ ที่เจือจาง

ในอัตราส่วน 1:40,000 ใน 5 % blotto ที่มี BSA-Gly 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรละลายอยู่ตามลำดับ เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง ล้างด้วย 0.5 % blotto 4 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที บ่มต่อใน GAM-HRP ที่เจือจางในอัตราส่วน 1:1,000 ใน 5 % blotto เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง ล้างด้วย 0.5 % blotto 4 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที และล้างต่ออีกครั้งด้วย PBS เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปแช่ในสารละลายสับสเตรทซึ่งประกอบด้วย 0.03 % diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB), 0.006% hydrogenperoxide (H_2O_2) และ 0.05% cobalt chloride ($CoCl_2$) ใน PBS เป็นเวลา 5 นาที ล้างน้ำกลั่นหลาย ๆ ครั้ง (รูปที่ 5)

6.1.5 การตรวจหาฮอร์โมน CHH โดยวิธีการ bioassay

ทำการทดลองเช่นเดียวกับการทดลอง I. ข้อ 5 โดยใช้แฟรคชันที่แบ่งจากการทำ dot-ELISA

6.2 การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมโดยวิธี immunocytochemistry

6.2.1 การเตรียมเนื้อเยื่อในพาราฟิน (Paraffin section)

ตัดก้อนตาจากกึ่งก้ามกรามที่ยังมีชีวิตอยู่ ผ่าตัดและลอกเปลือกแข็งออก นำก้อนตาที่ได้ไปทำให้คงรูปใน Bouin's fixative เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ล้างโดยการเปิดน้ำประปาไหลผ่าน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำก้อนตาแช่ในตัวทำละลาย เพื่อดึงน้ำออกจากก้อนตา ตามลำดับดังนี้คือ แช่ในเอทานอล 70% เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ในเอทานอล 90% เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ในเอทานอล 95% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (เปลี่ยน 2 ครั้ง) ในบิวทานอล เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ในตัวทำละลายผสมระหว่างบิวทานอลกับไซลีนในอัตราส่วน 1:1 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ในไซลีน 2 ครั้ง ๆ ละ 1 ชั่วโมง ในตัวทำละลายผสมระหว่างไซลีนกับพาราฟลาสต์ในอัตราส่วน 1:1 เป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส ในพาราฟลาสต์ 3 ครั้ง ๆ ละ 1/2-1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปฝังในพาราฟลาสต์ ทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นตัดก้อนตาให้มีความหนา 50 ไมโครเมตรเรียงเป็นลำดับ (serial section) และติดเนื้อเยื่อก้อนตาแต่ละชิ้นเรียงตามลำดับบนสไลด์และนำไปอบให้แห้ง

6.2.2 กระบวนการทาง immunocytochemistry โดยวิธี indirect immunoperoxidase method

นำสไลด์เนื้อเยื่อก้อนตามาละลายเอาพาราฟลาสต์ออก และเติมน้ำเข้าเนื้อเยื่อ โดยแช่ในตัวทำละลายต่าง ๆ ครั้งละ 5 นาที ตามลำดับดังนี้ แช่ในไซลีน 3 ครั้ง ในตัวทำละลายผสมระหว่าง

โซลินกับบิวทานอลในอัตราส่วน 1:1 ในบิวทานอล ในเอทานอล 95 %, 90% และ 70 % ใน PBS 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที จากนั้นหยด 10 % calf serum ใน PBS (P_1^+) เป็นเวลา 30 นาที หยดแอนติซีรั่มต่อเปปไทด์ T- หรือเปปไทด์ T+ ที่เจือจาง 1:5000 ใน P_1^+ ให้คลุมเนื้อเยื่อ นำเนื้อเยื่อไปบ่มที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS 4 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที หยด GAM-HRP ที่เจือจาง 1:1000 ใน P_1^+ และนำเนื้อเยื่อไปบ่มที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS 4 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที นำเนื้อเยื่อจุ่มในสารละลายสับสเตรทซึ่งประกอบด้วย 0.006% hydrogen peroxide และ 0.03% diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) ที่ละลายใน PBS เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นหลาย ๆ ครั้ง

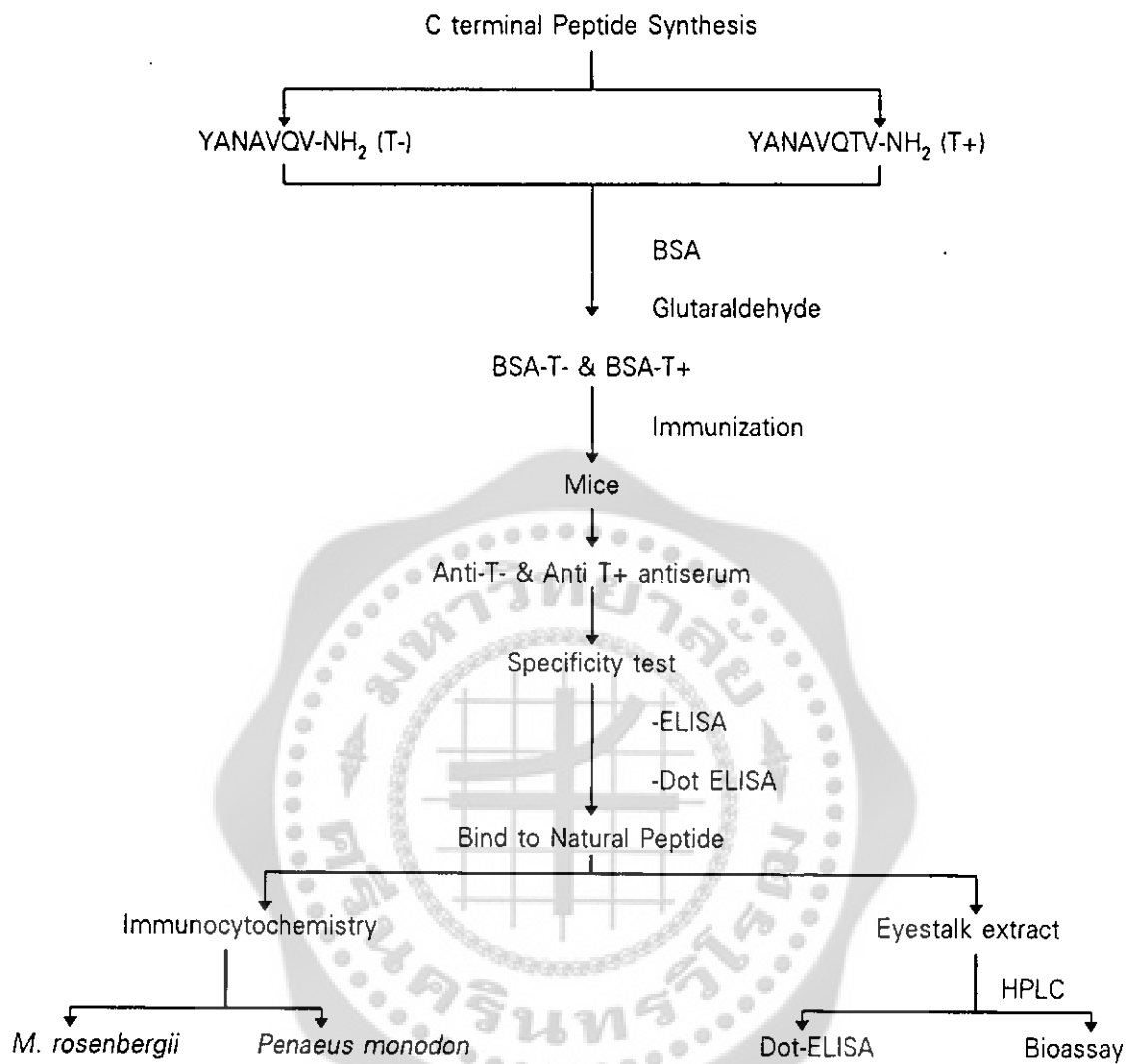
จากนั้นดึงน้ำออกและย้อมเนื้อเยื่อโดยแช่ในตัวทำละลายเป็นเวลาอย่างละ 5 นาที ตามลำดับดังนี้ แช่ในเอทานอล 70 %, 90 % และ 95 % ใน 0.02 % Eosin Y ในเอทานอล 95 % ในบิวทานอล ในตัวทำละลายผสมระหว่างบิวทานอลกับโซลินและในโซลิน 3 ครั้ง ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์โดยใช้เปอร์เมาท์ (permount)

6.2.3 การตรวจปฏิกิริยาข้ามของแอนติซีรั่มที่จำเพาะต่อเปปไทด์ T- และ เปปไทด์ T+ ในก้านตากุ้งกุลาดำด้วยวิธี immunocytochemistry

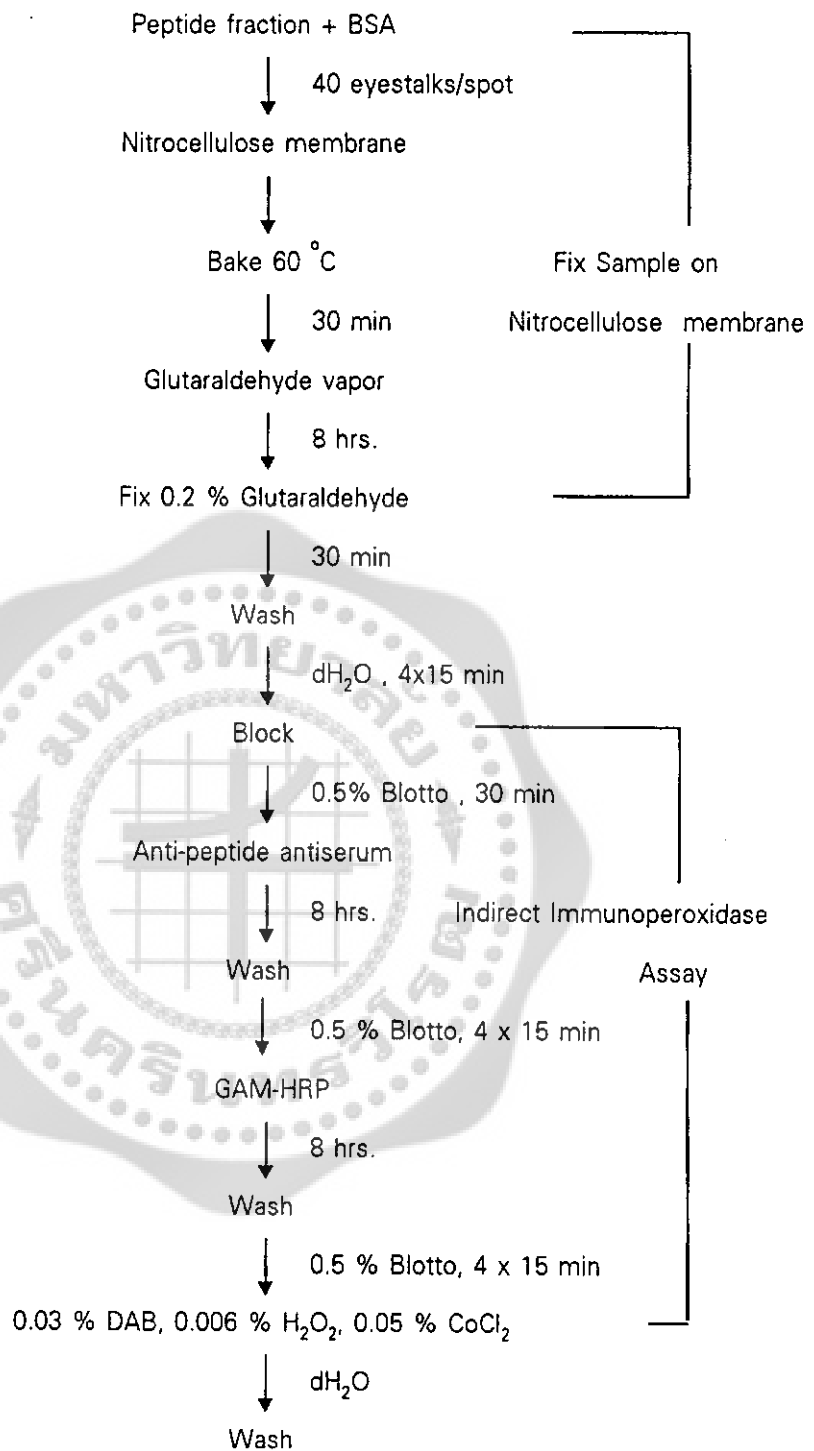
ใช้ก้านตากุ้งกุลาดำทำการทดลองทำเช่นเดียวกับก้านตากุ้งก้ามกราม

6.2.4 การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรั่มต่อ natural CHH โดยวิธี immunocytochemistry

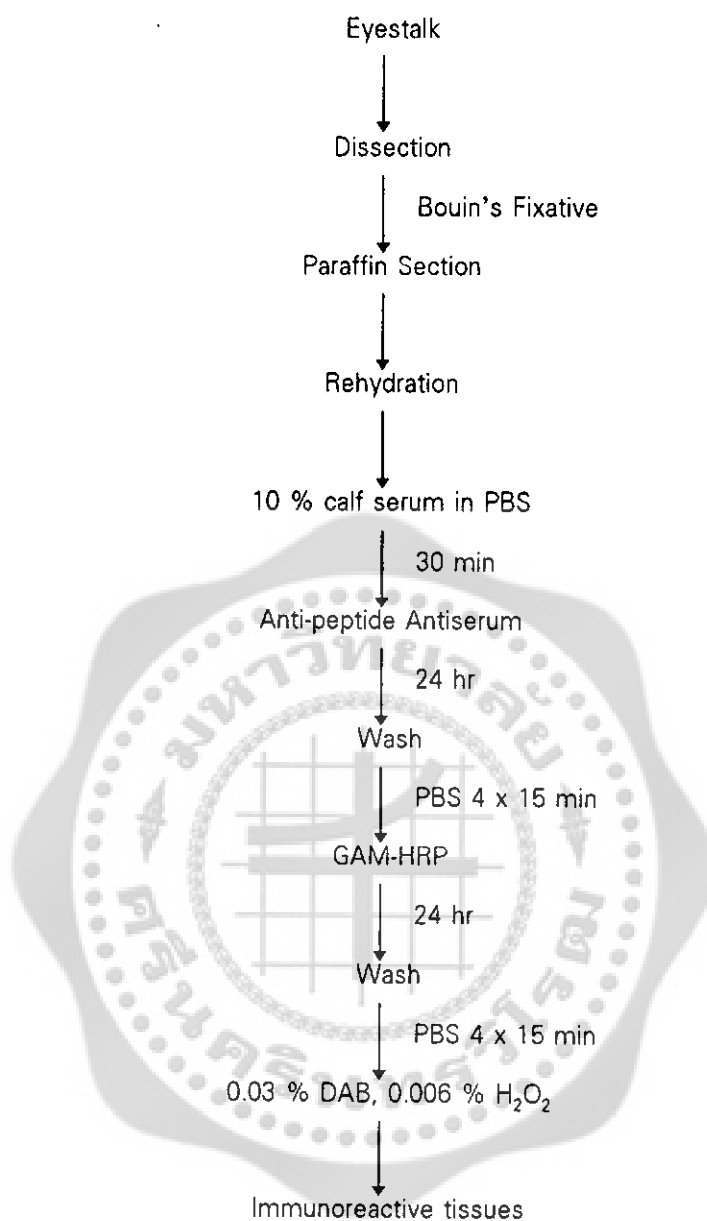
เตรียมเนื้อเยื่อก้านตาเช่นเดียวกับข้อ 6.2.1 แต่ตัดก้านตาให้มีความหนา 8 ไมโครเมตร จากนั้นนำไปผ่านกระบวนการทาง immunocytochemistry เช่นเดียวกับข้อ 6.2.2 โดยใช้แอนติซีรั่มต่อเปปไทด์ T+ ที่เจือจาง 1: 5000 ผสมกับ BSA-T+ หรือ BSA-Gly ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หยดบนเนื้อเยื่อสลับกัน



รูปที่ 4 ขั้นตอนการพิสูจน์โครงสร้างของ Mar-CHH-I



รูปที่ 5 ขั้นตอนการตรวจหาสารคล้ายเปปไทด์ในแฟรคชันต่าง ๆ ที่แยกโดยวิธี dot-ELISA



รูปที่ 6 ขั้นตอนการตรวจหาแหล่งสร้าง CHH ในเนื้อเยื่อก้านตาโดยวิธี immunocytochemistry

ผลการทดลอง



การทดลองที่ 1. การทำให้บริสุทธิ์และศึกษาลำดับกรดอะมิโนของ CHH รูปแบบใหม่เพิ่มเติมจาก Mar-CHH-I

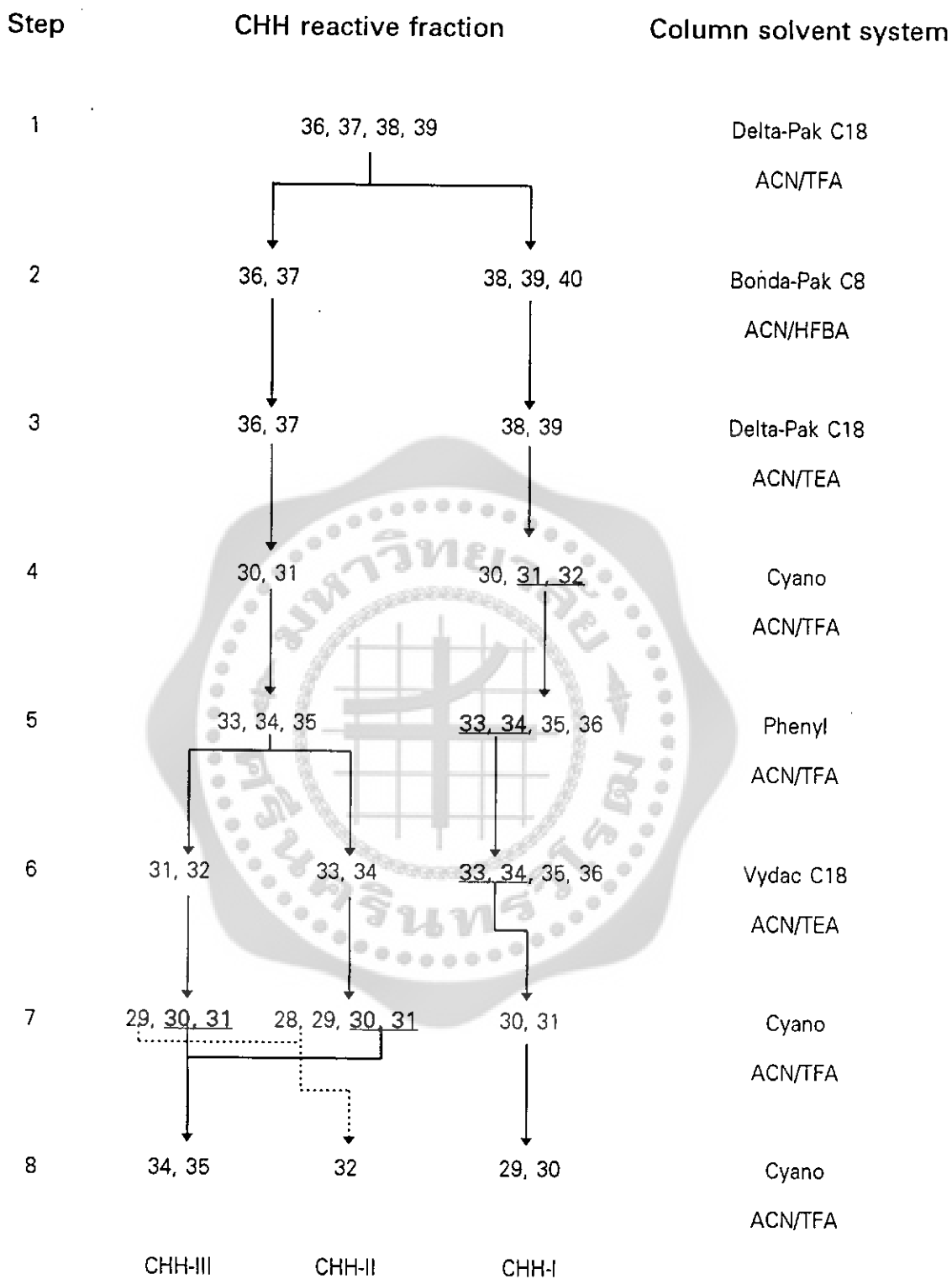
1. การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากก้านตาของกิ้งก่ามกราม

จากการสกัด CHH จากก้านตาของกิ้งก่ามกรามจำนวน 5,000 ก้านตาด้วยสารละลาย methanol-acetic acid แล้วนำสารสกัดที่ได้ไปทดสอบประสิทธิภาพการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดของกิ้งก่ามกราม โดยฉีดสารสกัดที่เจือจางระดับต่าง ๆ คือ 1:125, 1:50, 1:25, 1:5 และ 1 ก้านตา/ตัว กลับเข้าไปในกึ่งที่ถูกตัดตาทั้งสองข้าง หลังจากนั้นอีก 1 ชั่วโมงตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือดของสัตว์ทดลองพบว่าสารสกัดที่เตรียมได้มีประสิทธิภาพดีมาก กล่าวคือในสารสกัดที่เจือจางเป็น 1:50 (ตารางที่ 3) สามารถตรวจหา CHH ได้ 1 หน่วย (1 unit = ความสามารถของฮอร์โมนในการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด 25 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตรของเลือด) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการสกัด CHH ด้วยสารละลาย methanol-acetic acid ให้การคงสภาพของฮอร์โมนนี้ค่อนข้างสูง

เมื่อนำสารสกัดที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยกระบวนการทาง RP-HPLC โดยผ่านคอลัมน์และตัวทำละลายระบบต่าง ๆ กัน 8 ขั้นตอน (รูปที่ 7) และติดตามฮอร์โมนนี้โดยการทดสอบประสิทธิภาพการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดของสัตว์ทดลองในระหว่างการทำให้บริสุทธิ์ไปพร้อมกัน โดยใช้ enzymatic glucose oxidase colorimetric determination สามารถทำให้ CHH บริสุทธิ์ได้เพิ่มจาก Mar-CHH-I อีก 2 รูปแบบประกอบด้วยกรดอะมิโน 71 หน่วย มีลำดับกรดอะมิโนต่างกันเพียง 1 ตัว (ตารางที่ 5) สรุปขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์และขั้นตอนการใช้คอลัมน์และตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ดังรูปที่ 7

ตารางที่ 3 ความเข้มข้นของกลูโคสที่เพิ่มขึ้นในเลือดกึ่งที่ถูกตัดตาทั้งสองข้าง ก่อนฉีดและหลังจากฉีดสารสกัดจากก้านตาที่สกัดด้วย methanol:acetic acid (90:1) ในระดับความเจือจางต่าง ๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (จำนวนกึ่งที่ใช้ในแต่ละกลุ่มเท่ากับ 3 ตัว)

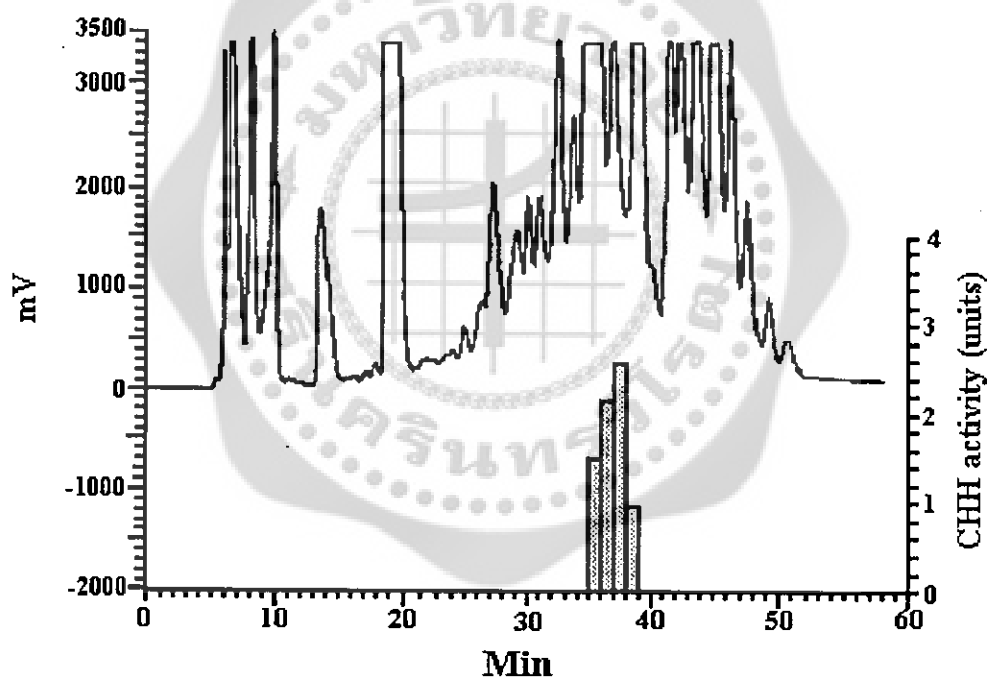
กลุ่มทดลอง	ความเข้มข้นของกลูโคส (มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร)		
	ก่อนฉีด	หลังฉีด	ระดับที่เพิ่มขึ้น
1. น้ำเกลือ	8.45	13.59	5.14
2. สารสกัด 1:125 ก้านตา/ตัว	11.58	19.75	8.17
3. สารสกัด 1:50 ก้านตา/ตัว	15.46	40.28	24.82
4. สารสกัด 1:25 ก้านตา/ตัว	19.74	72.35	52.61
5. สารสกัด 1:5 ก้านตา/ตัว	21.66	89.38	67.72
6. สารสกัด 1 ก้านตา/ตัว	16.81	94.24	77.43



รูปที่ 7 ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ CHH 3 รูปแบบ

2. การทำ CHH ให้บริสุทธิ์ขั้นตอนที่ 1

จากการนำสารสกัดจากก้านตาเริ่มต้นจำนวน 5,000 ก้านตาไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์ Delta-Pak C18 (25x100 มิลลิเมตร) ระบบตัวทำละลายที่ใช้คือ ACN/TFA โดยชะด้วย acetonitrile ที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นตามลำดับจาก 20-80% อัตราการไหล 5 มิลลิลิตรต่อนาที โดยแบ่งสารสกัดผ่านคอลัมน์ 3 ครั้ง กล่าวคือครั้งแรก 1,000 ก้านตา ส่วนครั้งที่ 2 และ 3 ครั้งละ 2,000 ก้านตา แบ่งสารสกัดที่แยกได้ไปทดสอบประสิทธิภาพการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดของกึ่งก้ามกราม โดยฉีดสารสกัดแต่ละแฟรคชันในปริมาณ 1 ก้านตาต่อตัวกลับเข้าไปในกึ่งก้ามกรามที่ถูกตัดตาทั้งสองข้างแฟรคชันละ 2 ตัว พบว่า CHH activity กระจายอยู่ในแฟรคชันต่าง ๆ คล้ายกันทั้ง 3 ครั้ง (รูปที่ 8) กล่าวคือ พบ CHH activity ในแฟรคชันที่ 36, 37, 38 และ 39 (ตารางที่ 4)



รูปที่ 8 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากก้านตาของกึ่งก้ามกรามที่สกัดด้วยสารละลาย methanol-acetic acid จำนวน 1,000 ก้านตา หลังจากผ่านกระบวนการ RP-HPLC ขั้นตอนแรก (คอลัมน์ : Delta-Pak C18 ; ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA) และแผนภูมิแท่งแสดงปริมาณของฮอร์โมน CHH (units) ที่ปรากฏในแฟรคชันที่ 36-39

ตารางที่ 4 ผลการตรวจสอบ CHH จากแฟรคชันต่าง ๆ ที่แยกได้จาก HPLC ในขั้นตอนที่ 1 ทั้งสามครั้ง (คอลัมน์ : Delta-Pak C18 ; ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA) ปริมาณฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด 25 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร = 1หน่วย/ก้านตา

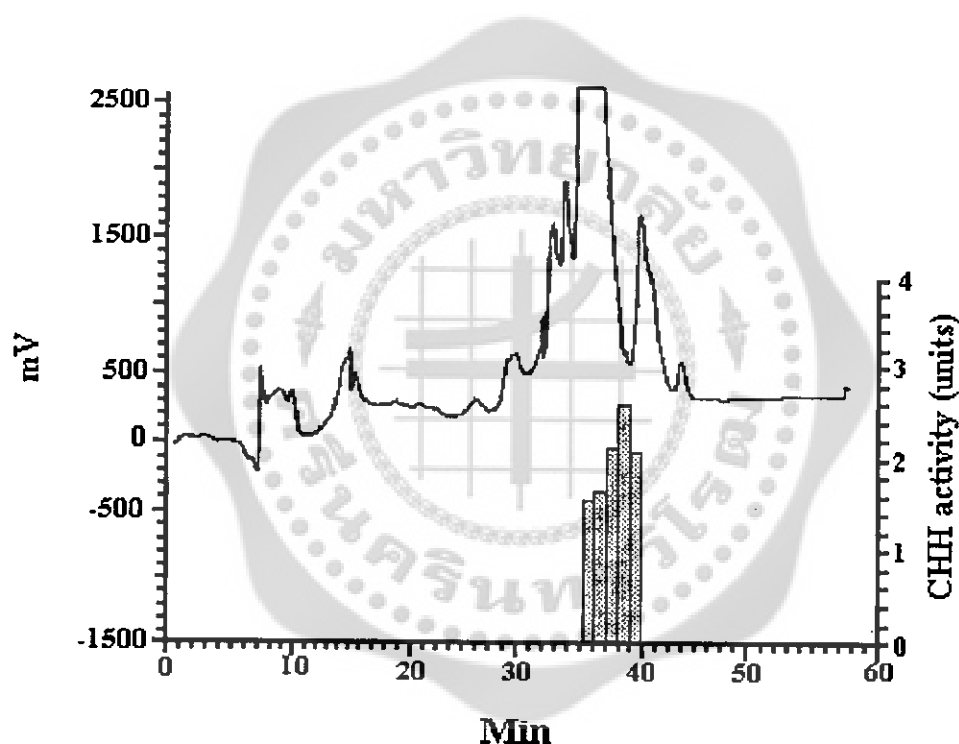
Fraction No.	ปริมาณฮอร์โมน (หน่วย/ก้านตา)		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
1-4	0.10	-	-
5-8	0.06	-	-
9-12	0.07	-	-
13-16	0.16	-	-
17-20	0.07	-	-
21-24	0.08	-	-
25-28	0.08	-	-
29	0.06	-	-
30	0.14	-	-
31	0.31	-	-
32	0.01	-	-
33	0.05	-	-
34	0.20	-	-
35	0.23	0.45	0.29
36	1.64 *	1.97 *	2.16 *
37	2.35 *	3.45 *	3.25 *
38	2.83 *	2.67 *	2.92 *
39	1.09 *	1.83 *	1.55 *
40	0.22	0.09	0.26
41-44	0.54	-	-
45-48	0.47	-	-
49-52	0.03	-	-
53-56	0.20	-	-

- ไม่ได้ทำการทดสอบ

* พบฮอร์โมน CHH มากกว่า 1 หน่วยซึ่งเป็นแฟรคชันที่จะนำไปทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่อไป

3. การทำ CHH ให้บริสุทธิ์ขั้นตอนที่ 2

จากการรวบรวมแฟรคชันที่พบ CHH activity ทั้ง 3 ครั้งในขั้นตอนที่ 1 มาผ่าน RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 2 โดยใช้คอลัมน์ Bonda-Pak C8 (25x100 มิลลิเมตร) ระบบตัวทำละลายที่ใช้คือ ACN/HFBA จากนั้นชะด้วย acetonitrile ที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นตามลำดับจาก 25-70% อัตราการไหล 5 มิลลิตรต่อนาที แบ่งสารสกัดที่แยกได้ไปตรวจสอบ activity ในการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดของกึ่งก้ามกราม โดยฉีดสารสกัดแต่ละแฟรคชันในปริมาณ 1 ไมครอลต่อตัวกลับเข้าไปในกึ่งที่ถูกตัดตาทั้งสองข้าง พบว่า CHH activity อยู่ในแฟรคชันที่ 36, 37, 38, 39 และ 40 (รูปที่ 9)

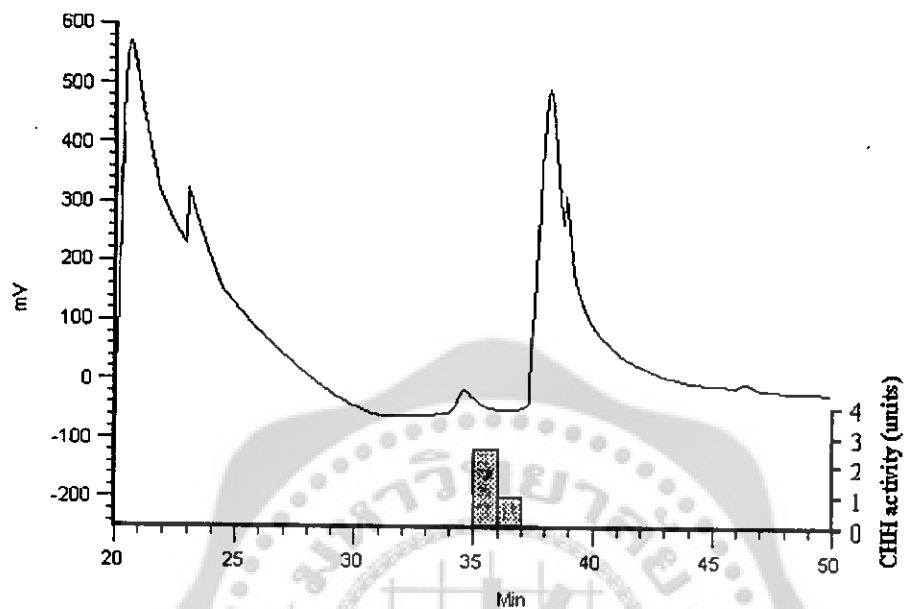


รูปที่ 9 โคโรมาโตแกรมของสารสกัดจากก้านตาของกึ่งก้ามกรามจำนวน 5,000 ก้านตาที่ผ่านกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 2 จากแฟรคชันที่ 37 (คอลัมน์ : Bonda-Pak C8 ; ระบบตัวทำละลาย ACN/HFBA) และแผนภูมิแท่งแสดงปริมาณของฮอร์โมน CHH (units) ที่ปรากฏในแฟรคชันที่ 36-40

4. การทำ CHH ให้บริสุทธิ์ขั้นตอนที่ 3

จากการรวบรวมแฟรคชันที่ 38 และ 39 ของการทำ CHH ให้บริสุทธิ์ขั้นตอนที่ 2 มาผ่านคอลัมน์ Delta-Pak C18 (25x100 มิลลิเมตร) ระบบตัวทำละลายที่ใช้คือ ACN/TEA จากนั้นชะด้วย acetonitrile ที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นตามลำดับจาก 15-80% อัตราการไหล 5 มิลลิลิตรต่อนาที แบ่งสารสกัดที่แยกได้ไปตรวจสอบ activity ในการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดของกึ่งกำมกราม โดยฉีดสารสกัดแต่ละแฟรคชันในปริมาณ 2 ไมโครลิตรต่อตัวกลับเข้าไปในกึ่งที่ถูกตัดตาทั้งสองข้าง พบว่า CHH activity อยู่ในแฟรคชัน ที่ 36-39 ซึ่งในแฟรคชัน 38-39 นำไปทำให้บริสุทธิ์จะให้ Mar-CHH-I ดังรายงานผลการวิจัยงบประมาณประจำปี 2539 และในผลงานตีพิมพ์ใน Journal Experimental Zoology (Sithigorngul et al., 1999)

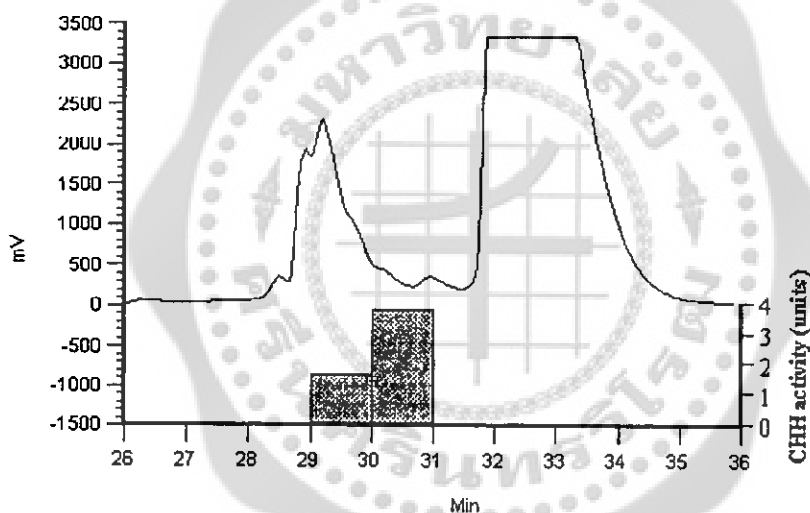
สำหรับแฟรคชัน 36 และ 37 นำมาผ่านคอลัมน์และตัวทำละลายระบบเดียวกันดังกล่าวข้างบน โดยแบ่งสารออกเป็น 2 ส่วนพบว่า CHH activity อยู่ในแฟรคชัน 36 และ 37 ทั้ง 2 ครั้งโดยส่วนของสิ่งปนเปื้อนจำนวนมากแยกออกอยู่ในแฟรคชันอื่นอย่างชัดเจน (รูปที่ 10) จึงรวมแฟรคชัน 36 และ 37 ของทั้งสองครั้งเข้าด้วยกันและนำไปทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนที่ 4



รูปที่ 10 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากก้านตาของกิ้งก่ามกรามจากแฟรคชันที่ 36 และ 37 ของขั้นตอนที่ 2 ที่ผ่านกระบวนการทาง RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 3 (คอลัมน์ : Delta-Pak C18 ; ระบบตัวทำละลาย ACN/TEA) และแผนภูมิแท่งแสดงปริมาณของฮอร์โมน CHH (units) ที่ปรากฏในแฟรคชัน 36-37

5. การทำ CHH ให้บริสุทธิ์ขั้นตอนที่ 4

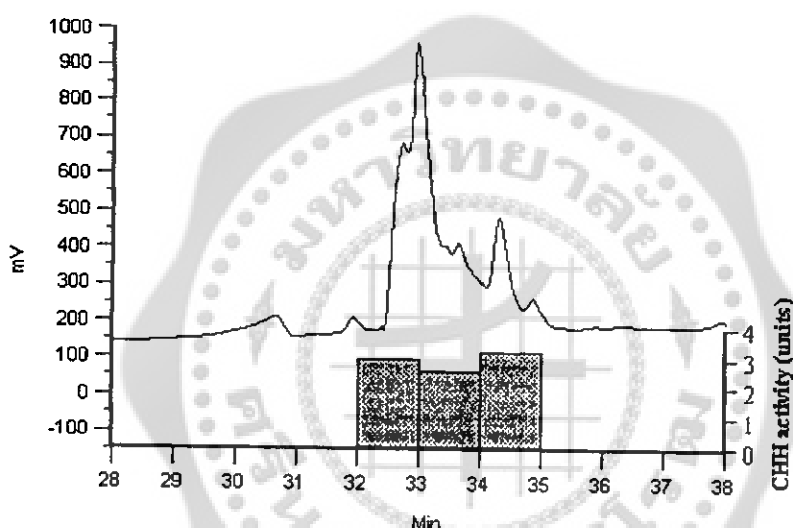
จากการรวบรวมแฟรคชันที่ 36 และ 37 ของการทำให้บริสุทธิ์ขั้นตอนที่ 3 มาผ่าน Microsorb-MV cyano column (4.6x250 มิลลิเมตร) ระบบตัวทำละลายที่ใช้คือ ACN/TFA จากนั้นชะด้วย acetonitrile ที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นตามลำดับจาก 20-75% อัตราการไหล 1 มิลลิตรต่อนาที (รูปที่ 11) จากโครมาโตแกรมจะเห็นว่าสารปนเปื้อนอื่น ๆ ส่วนใหญ่ถูกแยกออกจาก CHH ไปมากแล้วเมื่อเทียบกับพีคจากโครมาโตแกรมของขั้นตอนที่ 1, 2 และ 3 จากนั้นแบ่งสารสกัดที่แยกได้ไปตรวจสอบ CHH activity โดยฉีดสารสกัดแต่ละแฟรคชันในปริมาณ 10 ไมโครลิตรต่อหัวกลับเข้าไปในกึ่งที่ถูกตัดตาทั้งสองข้าง พบ CHH activity อยู่ในแฟรคชันที่ 30 และ 31 แต่พีคยังคงเชื่อมต่อกันอยู่



รูปที่ 11 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากก้านตาของกิ้งก่ามกรามแฟรคชันที่ 36 และ 37 ของขั้นตอนที่ 3 ผ่านกระบวนการทาง RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 4 (คอลัมน์ : Cyano ; ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA) และแผนภูมิแท่งแสดงปริมาณของฮอร์โมน CHH (units) ที่ปรากฏในแฟรคชันที่ 30 และ 31

6. การทำ CHH ให้บริสุทธิ์ขั้นตอนที่ 5

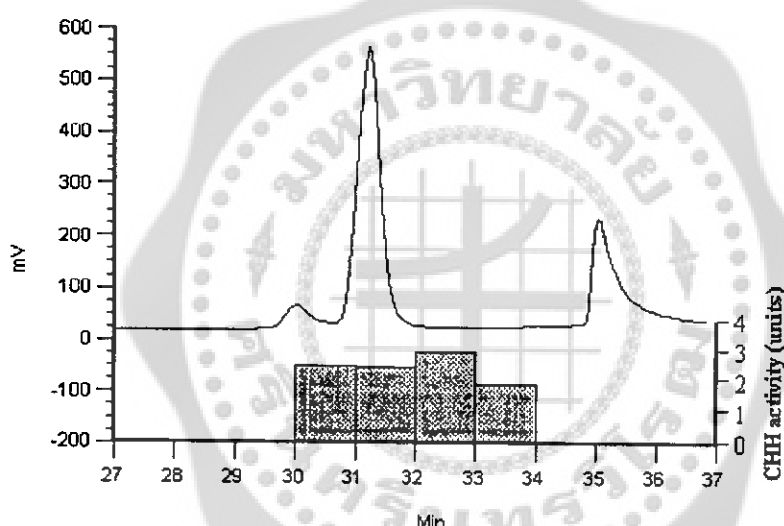
จากการรวบรวมแฟรคชันที่ 30 และ 31 ของการทำ CHH ให้บริสุทธิ์ขั้นตอนที่ 4 มาผ่าน Microsorb-MV phenyl column (4.6 x 250 มิลลิเมตร) ระบบตัวทำละลายที่ใช้คือ ACN/TFA จากนั้นชะด้วย acetonitrile ที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นตามลำดับจาก 20-65 % อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที แบ่งสารสกัดที่แยกได้ไปตรวจสอบ activity ในการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดของกึ่งกำมGRAM โดยฉีดสารสกัดแต่ละแฟรคชันในปริมาณ 20 ไมโครลิตรต่อตัวกลับเข้าไปในกึ่งที่ถูกต้องทั้งสองข้าง พบว่า CHH activity อยู่ในแฟรคชันที่ 33-35 (รูปที่ 12) ซึ่งยังไม่สามารถแยกพิคออกเช่นกัน



รูปที่ 12 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากก้านตาของกึ่งกำมGRAM จากแฟรคชันที่ 30 และ 31 ของขั้นตอนที่ 4 ผ่านกระบวนการทาง RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 5 (คอลัมน์ : Phenyl ; ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA) และแผนภูมิแท่งแสดงปริมาณของฮอร์โมน CHH (units) ที่ปรากฏในแฟรคชันที่ 33-35

7. การทำ CHH ให้บริสุทธิ์ขั้นตอนที่ 6

จากการรวบรวมแฟรคชันที่ 33-35 ของการทำให้บริสุทธิ์ขั้นตอนที่ 5 มาผ่านกระบวนการทาง RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 6 โดยใช้ Vydac C18 (4.6 x 250 มิลลิเมตร) ระบบตัวทำละลายที่ใช้คือ ACN/TEA จากนั้นชะด้วย acetonitrile ที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นตามลำดับจาก 15-80% อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที จากนั้นแบ่งสารสกัดที่แยกได้ไปตรวจสอบ CHH activity โดยฉีดสารสกัดแต่ละแฟรคชันในปริมาณ 40 ไมโครลิตรต่อตัวกลับเข้าไปในกึ่งที่ถูกต้องทั้งสองข้าง พบว่า CHH activity กระจายอยู่ใน แฟรคชัน ที่ 31-34 (รูปที่ 13) รวมอยู่ในพีคใหญ่พีคเดียวจึงแบ่งแฟรคชัน 31-32 และ 33-34 แยกในขั้นตอนต่อไป

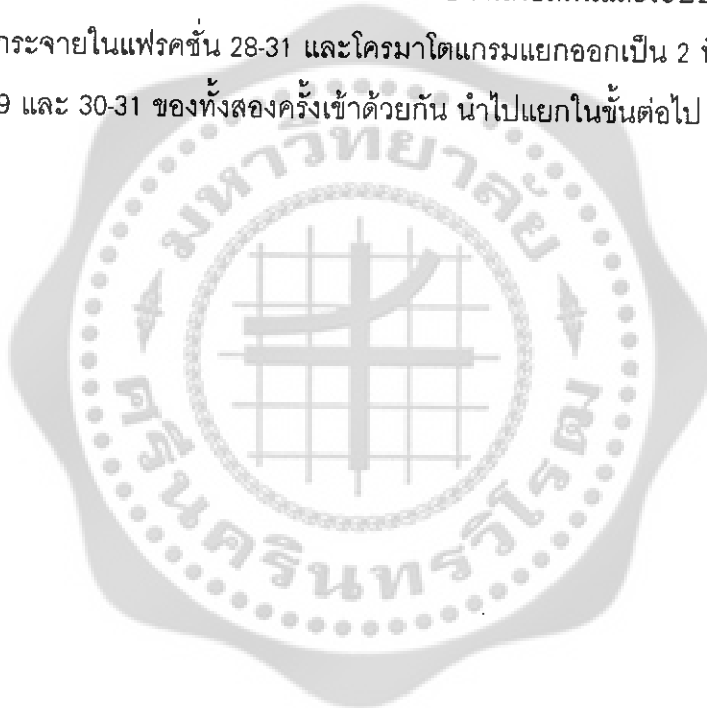


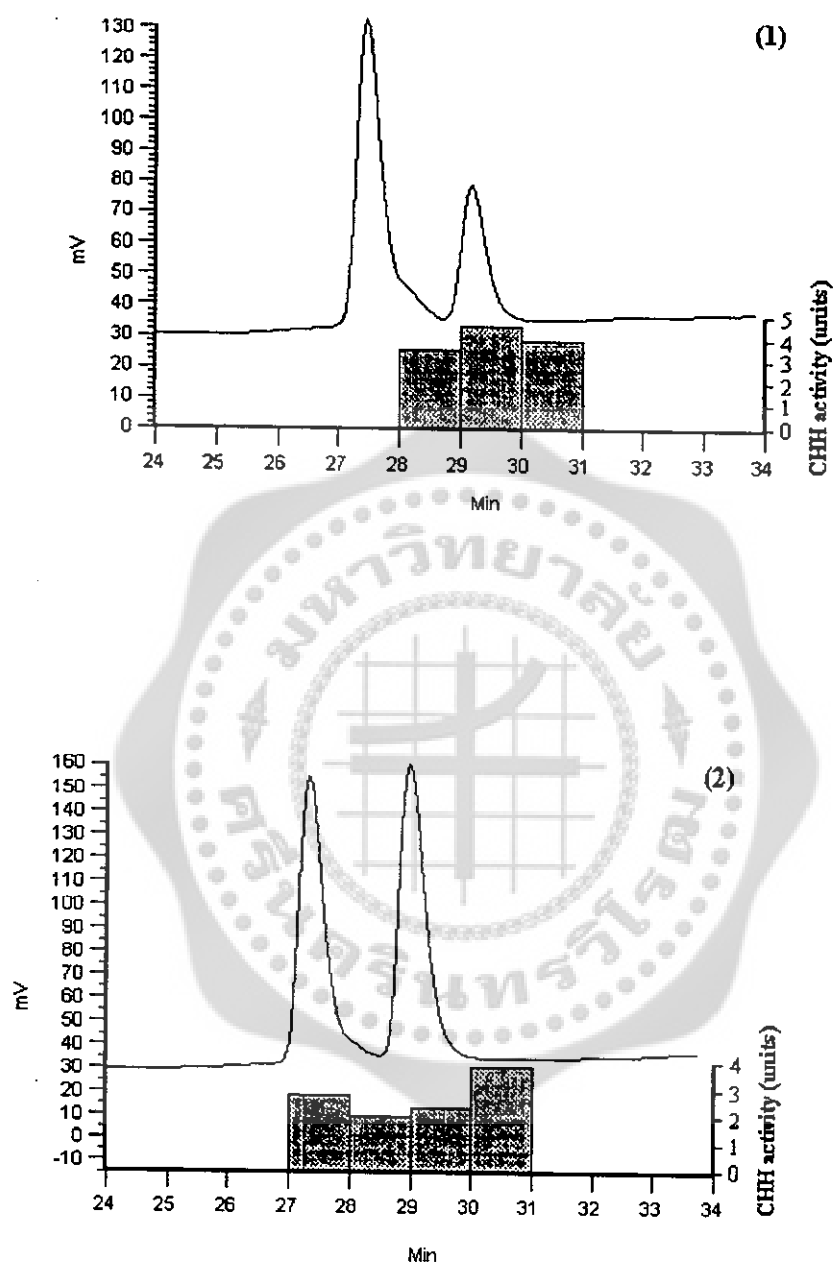
รูปที่ 13 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากก้านตาของกิ้งก่ามกรามจากแฟรคชันที่ 33-35 ในขั้นตอนที่ 5 ผ่านกระบวนการทาง RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 6 (คอลัมน์ : C18 ; ระบบตัวทำละลาย ACN/TEA) และแผนภูมิแท่งแสดงปริมาณของฮอร์โมน CHH (units) ที่ปรากฏในแฟรคชันที่ 31-34

8. การทำ CHH ให้บริสุทธิ์ขั้นตอนที่ 7

ขั้นตอนที่ 7 (1) เมื่อรวบรวมแฟรคชันที่ 31 และ 32 ของขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์จากขั้นตอนที่ 6 มาผ่านกระบวนการทาง RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 7 (รูปที่ 14.1) โดยใช้คอลัมน์ cyano ระบบตัวทำละลายที่ใช้คือ ACN/TFA จะด้วย acetonitrile ที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นตามลำดับ อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที แบ่งสารสกัดที่แยกได้ไปตรวจสอบ CHH activity ในสัตว์ทดลอง โดยฉีดสารสกัดแต่ละแฟรคชันในปริมาณ 40 ไมโครลิตรต่อตัว พบ CHH activity อยู่ในแฟรคชันที่ 29-31 ซึ่งโครมาโตแกรมจะเรียบและแยกเป็น 2 พีค แต่ CHH activity กระจายอยู่ใน 3 แฟรคชันคาดว่าจะได้ CHH ค่อนข้างบริสุทธิ์ 2 รูปแบบ

ขั้นตอนที่ 7 (2) ส่วนแฟรคชันที่ 33-34 เมื่อผ่านคอลัมน์และระบบตัวทำละลายเหมือนกัน พบ CHH กระจายในแฟรคชัน 28-31 และโครมาโตแกรมแยกออกเป็น 2 พีคชัดเจนจึงนำแฟรคชันที่ 28-29 และ 30-31 ของทั้งสองครั้งเข้าด้วยกัน นำไปแยกในขั้นต่อไป (รูปที่ 14.2)



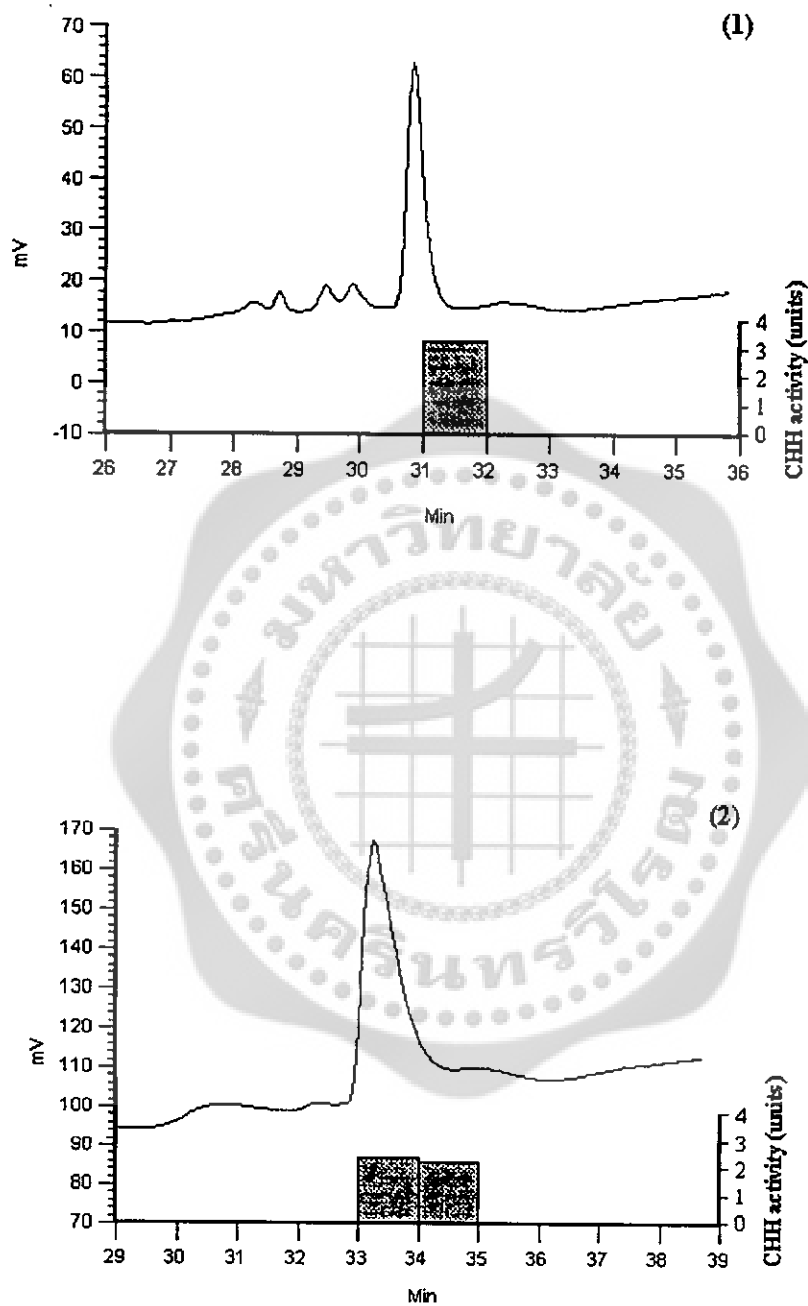


รูปที่ 14 โคโรมาโตแกรมของสารสกัดจากก้านตาของกิ้งก่ามกรามจากแฟรคชันที่ 31-32 และ 33-34 ของขั้นตอนที่ 6 ผ่านกระบวนการทาง RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 7 (คอลัมน์ : Cyano ; ระบบตัวทำละลาย ACN/HFBA) และแผนภูมิแท่งแสดงปริมาณของฮอร์โมน CHH (units) ที่ปรากฏในแฟรคชันที่ 29-31 (1) และ 28-31 (2)

9. การทำ CHH ให้บริสุทธิ์ขั้นตอนที่ 8

ขั้นตอนที่ 8.1 จากการนำแฟรคชันที่ 30 และ 31 ของการทำ CHH ให้บริสุทธิ์ขั้นตอนที่ 7.1 และ 7.2 มาผ่านกระบวนการทาง RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 8 โดยใช้คอลัมน์ cyano ระบบตัวทำละลายที่ใช้คือ ACN/TFA แล้วชะด้วย acetonitrile ที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นตามลำดับจาก 15-65% อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที แบ่งสารสกัดที่แยกได้ไปตรวจสอบ CHH activity ในสัตว์ทดลอง โดยฉีดสารสกัดแต่ละแฟรคชันในปริมาณ 50 ไมโครลิตรต่อตัว พบว่า CHH activity อยู่ในแฟรคชันที่ 29 และ 30 จากโครมาโตแกรมจะเห็นว่าสารปนเปื้อนอื่น ๆ ที่ปนมากับ CHH จากสารสกัดเริ่มต้น และผ่านการทำให้บริสุทธิ์ 8 ขั้นตอนได้ถูกแยกออกไปจนกระทั่งเหลือเพียง CHH ที่น่าจะบริสุทธิ์โดยดูจากโครมาโตแกรมเห็นเพียงพีคเดียว ซึ่งตรงกับการตรวจสอบ activity ของฮอร์โมน พบว่าอยู่ในแฟรคชันที่ 32 (รูปที่ 15.1)

ขั้นตอนที่ 8.2 ทำนองเดียวกันจากการนำแฟรคชันที่ 29 ของขั้นตอนที่ 7.1 และ 28-29 ของขั้นตอนที่ 7.2 มารวมกันและทำให้บริสุทธิ์โดยชะด้วย acetonitrile ความเข้มข้น 12-60 % ได้โครมาโตแกรมพีคเดียวเช่นกันตรงกับ CHH activity พบว่าอยู่ในแฟรคชันที่ 34-35 จึงคาดว่าน่าจะได้ CHH บริสุทธิ์อีกรูปแบบหนึ่ง (รูปที่ 15.2)



รูปที่ 15 โคโรมาโตแกรมของสารสกัดจากก้านตาของกิ้งก่ามกรามจากแฟรคชันที่ 30 และ 31 ของขั้นตอนที่ 7.1 และผ่านกระบวนการทาง RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 8 (คอลัมน์ : C18 ; ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA) และแผนภูมิแท่งแสดงปริมาณของฮอริโมน CHH (units) ที่ปรากฏในแฟรคชัน ที่ 32 (1) และแฟรคชันที่ 29 จากขั้นตอน 7.1 รวมกับ 28 และ 29 จากขั้นตอนที่ 7.2 พบ CHH อยู่แฟรคชันที่ 34 และ 35 (2)

10. การคำนวณหาร้อยละของการคงสภาพของ CHH

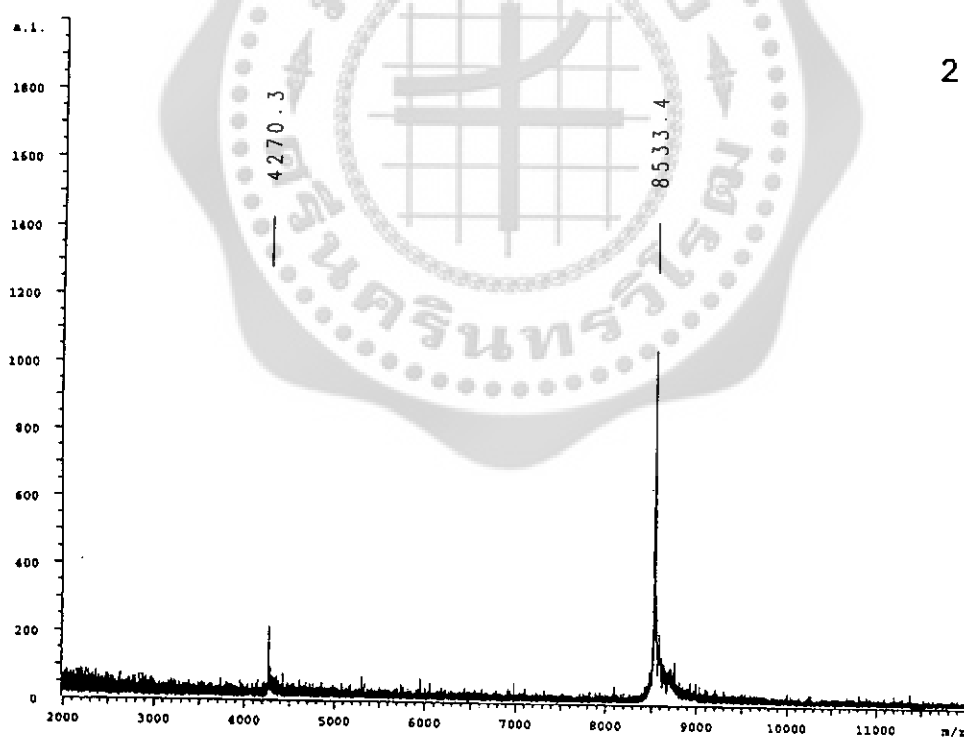
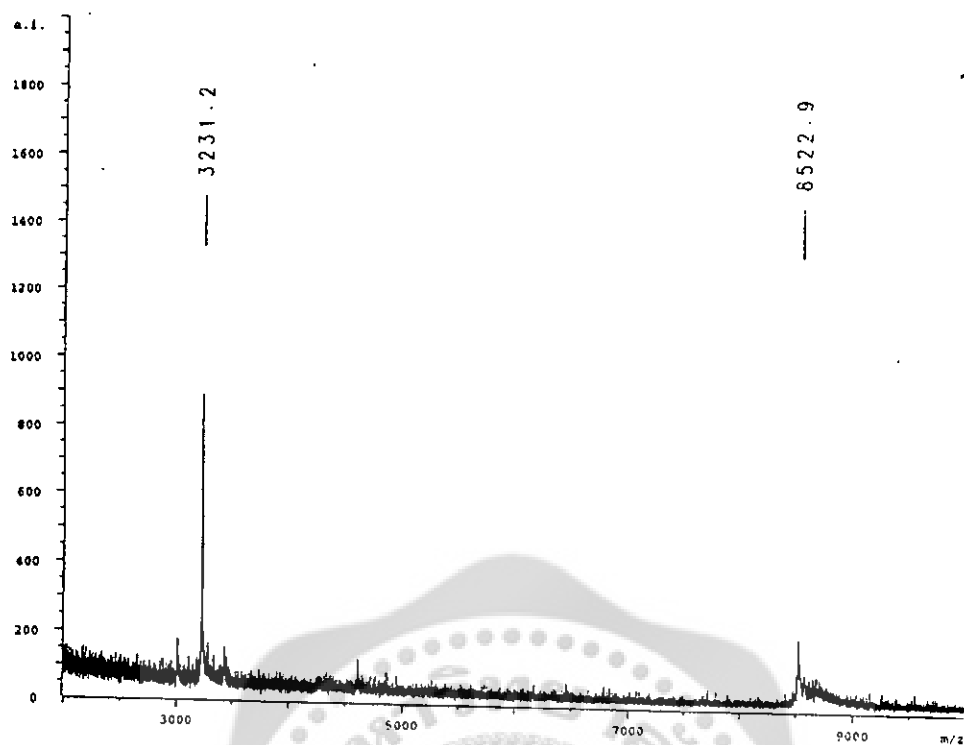
จากการสังเกตปริมาณสารสกัดจากก้านตาที่ใช้ในการทดสอบ activity ของ CHH พบว่า ต้องเพิ่มปริมาณสารสกัดในการทดสอบทุกขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์โดยเฉพาะในขั้นตอนที่ 8 จากการใช้สารสกัดปริมาณต่าง ๆ จัดให้กึ่งพบว่าสารสกัดในปริมาณ 50 ก้านตา พบว่า CHH-II สามารถเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดได้เพียง 80 หน่วยและ CHH-III สามารถเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดได้ 120 หน่วย ในขณะที่สารสกัดด้วย methanol-acetic acid ใช้ปริมาณสารสกัดเพียง 1:50 ก้านตาก็สามารถเพิ่มน้ำตาลได้ 1 หน่วย ดังนั้นฮอร์โมน CHH ที่ได้รับเท่ากับ 3.75 และ 4.8 % ของสารสกัดเริ่มต้น เท่านั้น

11. การตรวจสอบน้ำหนักโมเลกุลของ CHH

จากการแบ่งส่วนของ CHH-II และ CHH-III ประมาณ 10 % ของสารที่ทำให้บริสุทธิ์ได้ไป ตรวจหาน้ำหนักโมเลกุลของ CHH-II และ CHH-III พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 8522.9 และ 8533.4 ตามลำดับ โดยใน CHH-II คาดว่าอาจมีเปปไทด์อื่น ๆ ปะปนอยู่ด้วยแต่กรณีของ CHH-III ส่วนของ สารน้ำหนักโมเลกุล 4270.3 เป็น molecular ion ของ CHH-III (รูปที่ 16)

12. ลำดับกรดอะมิโนของ CHH

จากการหาลำดับกรดอะมิโนของ CHH พบว่า CHH ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 71 หน่วย เป็นซิสเตอีน (cystein) จำนวน 6 หน่วย อยู่ที่ตำแหน่งที่ 7, 23, 26, 39, 43 และ 52 ตามลำดับ ปลายด้าน N เป็นอะลานีน (alanine) ไม่ถูก block ด้วย pyroglutamate เหมือน CHH ในกึ่งและชนิดอื่น ๆ ปลายด้าน C ของ CHH-II เป็นซีรีน (serine) แต่ปลายของ CHH-III เป็นวาลีน (valine) เช่นเดียวกับ CHH-I แต่ลำดับกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 41 เป็นกลูตาเมท (glutamate) แทนที่อาร์จินีน (arginine) ใน CHH-I แต่ไม่พบธรีโอนีน (threonine) หรือเมไธโอนีน (methionine) ที่ตำแหน่งระหว่าง กลูตามิกกับวาลีนหรือซีรีนตัวสุดท้าย (ตารางที่ 5)



รูปที่ 16 MALDI-TOF Mass spectroscopy ของ CHH-II (1) และ CHH-III (2) โดยใช้อินซูลินเป็นตัว
ปรับ พิกัดแสดงน้ำหนักโมเลกุลของ CHH เท่ากับ 8522.9 และ 8533.4 ตามลำดับ

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบชนิดและจำนวนกรดอะมิโนของ CHH I-III ได้จากก้านตาของกุ้งก้ามกราม
สีแดงเป็นกรดอะมิโนที่แตกต่าง

		10		20		30		40
Mar-I	AILDQ	SCKGI	FDREL	FKKLD	RVCDD	CYNLY	RKPYV	AIDCR
Mar-II	AILDQ	SCKGI	FDREL	FKKLD	RVCDD	CYNLY	RKPYV	AIDCR
Mar-III	AILDQ	SCKGI	FDREL	FKKLD	RVCDD	CYNLY	RKPYV	AIDCR
		50		60		70		
Mar-I	RGCYQ	NLVFR	QCIQD	LQLMD	DLDEY	ANAVQ	TV-NH ₂	
Mar-II	RGCYQ	NLVFR	QCIQD	LQLMD	DLDEY	ANAVQ	?S-NH ₂	
Mar-III	EGCYQ	NLVFR	QCIQD	LQLMD	DLDEY	ANAVQ	?V-NH ₂	

การทดลองที่ II. การพิสูจน์โครงสร้างทางปลาย C ของ Mar-CHH-I โดยกระบวนการทางอิมมูโน

1. การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรั่มต่อเปปไทด์สังเคราะห์

1.1 การตรวจหาไตเตอร์ของแอนติซีรั่มที่จำเพาะต่อเปปไทด์ T- และเปปไทด์ T+ โดยวิธี indirect immunoperoxidase ELISA

จากการปลูกภูมิคุ้มกันโดยใช้เปปไทด์ T- และเปปไทด์ T+ เชื่อมกับ BSA ด้วย glutaraldehyde ตรวจหาไตเตอร์ของแอนติซีรั่มที่จำเพาะต่อเปปไทด์ T- และเปปไทด์ T+ โดยวิธี indirect immuno-peroxidase ELISA พบว่าแอนติซีรั่มที่ได้นั้นจะมีแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ BSA ประปรายอยู่ด้วย ดังนั้นก่อนที่จะนำแอนติซีรั่มที่ได้นี้ไปตรวจหาไตเตอร์ของแอนติซีรั่มที่จำเพาะต่อเปปไทด์ T- และเปปไทด์ T+ ตามวิธีการดังกล่าวจึงต้องกำจัดแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ BSA ออกไปให้ได้มากที่สุด โดยให้นำแอนติซีรั่มที่ได้นี้มาผสมกับ BSA ที่เชื่อมกับไกลซีน (BSA-Gly) ในอัตราส่วน 1 : 1000 บ่มทิ้งไว้ 12-24 ชั่วโมง บั่นแยกตะกอนออก และจึงนำแอนติซีรั่มดังกล่าวมาตรวจหาไตเตอร์ของแอนติซีรั่มที่จำเพาะต่อเปปไทด์ T- และเปปไทด์ T+ ต่อไป

จากการทดลองหาไตเตอร์ของแอนติซีรั่มที่จำเพาะต่อเปปไทด์ T- จากซีรั่มของหนูทั้ง 4 ตัว หลังจากการดูดซับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ BSA ออกแล้ว พบว่ายังไม่สามารถกำจัดแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ BSA ออกไปได้หมด ดังนั้นในการพิจารณาว่าจะนำแอนติซีรั่มจากหนูตัวใดไปใช้ในการทดลองต่อไปจึงพิจารณาแอนติซีรั่มที่ได้จากหนูตัวใดให้ไตเตอร์ต่อเปปไทด์ T- สูงสุด โดยนำไตเตอร์ของ BSA หักออกจากค่าไตเตอร์ของ BSA-T- ซึ่งจากการทดลองพบว่าแอนติซีรั่มจากหนูตัวที่ 4 ให้ไตเตอร์ที่จำเพาะต่อเปปไทด์ T- สูงสุด (1 : 128,000) จึงนำแอนติซีรั่มจากหนูตัวที่ 4 ไปใช้สำหรับการทดลองต่อไป (ตารางที่ 6)

สำหรับไตเตอร์ของแอนติซีรั่มที่จำเพาะต่อเปปไทด์ T+ พบว่าหนูตัวที่ 4 ให้ค่าไตเตอร์ต่อเปปไทด์ T+ สูงสุดเช่นกัน (1 : 64,000) จึงนำแอนติซีรั่มที่จำเพาะต่อเปปไทด์ T+ จากหนูตัวที่ 4 ไปใช้สำหรับการทดลองต่อไป (ตารางที่ 7) เมื่อเปรียบเทียบไตเตอร์ต่อเปปไทด์จากหนูทั้ง 4 ตัว พบว่าหนู 4 ตัวที่ได้รับการฉีดเปปไทด์ T- ให้ค่าไตเตอร์ใกล้เคียงกันมากกว่าหนูที่ได้รับการฉีดเปปไทด์ T+

ตารางที่ 6 แสดงผลการหาไตเตรตของแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อโปรตีน T- โดยดูจากค่าการเรืองแสงสุดท้ายที่ค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 0.1 หน่วย ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

แอนติเจน	หน่วยที่	ค่าการเรืองแสงของแอนติซีรัม											
		1:2,000	1:4,000	1:8,000	1:16,000	1:32,000	1:64,000	1:128,000	1:256,000	1:512,000	1:1,024,000	1:2,048,000	1:4,096,000
BSA-T-	1	*	*	*	*	*	*	2.34	1.48	0.84	0.44	0.22	0.12
	2	*	*	*	2.28	1.39	0.74	0.42	0.21	0.11	0.056	0.027	0.01
	3	*	*	*	*	*	*	*	*	2.08	1.25	0.66	0.31
	4	*	*	*	*	*	*	2.37	1.47	0.813	0.45	0.18	0.11
BSA-Gly	1	*	*	*	2.71	1.06	0.71	0.41	0.043	0.027	0.027	0.056	0.043
	2	*	2.33	0.16	0.95	0.047	0.028	0.015	0.001	0.002	0.002	0.005	0.004
	3	*	2.86	1.74	1.09	0.64	0.34	0.2	0.11	0.052	0.03	0.024	blank
	4	1.64	0.83	0.41	0.26	0.135	0.069	0.051	0.078	0.011	0.008	0.005	blank

 ค่าไตเตรตของ BSA-T-

 ค่าไตเตรตของ BSA-Gly

 ค่าไตเตรตของโปรตีน T-

ตารางที่ 7 แสดงผลการหาไตเตรทของแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อโปรตีน T+ โดยดูจากค่าการเจือจางสุดท้ายที่ค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 0.1 หน่วย ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

แอนติเจน	หน่วยที่	ค่าการเจือจางของแอนติซีรัม											
		1:2,000	1:4,000	1:8,000	1:16,000	1:32,000	1:64,000	1:128,000	1:256,000	1:512,000	1:1,024,000	1:2,048,000	1:4,096,000
BSA-T+	1	*	*	*	*	*	*	2.86	1.83	1.04	0.49	0.27	0.13
	2	*	*	*	*	*	*	2.3	1.2	0.5	0.37	0.18	0.007
	3	*	*	*	*	*	*	*	1.88	1.09	0.61	0.41	0.13
	4	*	*	*	2.81	1.72	1.53	0.56	0.27	0.15	0.14	0.09	0.14
BSA-Gly	1	*	*	*	*	*	0.67	0.39	0.09	0.06	0.146	0.11	0.004
	2	*	2.11	2.27	1.43	1.21	0.48	0.25	0.09	0.07	0.05	0.06	0.003
	3	*	2.38	2.12	1.22	0.98	0.57	0.47	0.48	0.37	0.038	0.065	blank
	4	1.05	0.71	0.67	0.42	0.27	0.15	0.05	0.025	0.005	0.002	0.006	blank

ค่าไตเตรทของ BSA-T+

ค่าไตเตรทของ BSA-Gly

ค่าไตเตรทของโปรตีน T+

1.2 การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมจำเพาะต่อเปปไทด์ T- และเปปไทด์ T+ โดยวิธี dot-ELISA

ปฏิกิริยาข้ามระหว่างแอนติซีรัมต่อเปปไทด์ T- และ แอนติซีรัมต่อเปปไทด์ T+ มีต่ำมากโดยที่แอนติซีรัมต่อเปปไทด์ T- สามารถตรวจหาเปปไทด์ T- ได้ต่ำน้อยกว่า 15 พิโคกรัมต่อจุด และไม่แสดงการจับกับเปปไทด์ T+ ที่ปริมาณ 4 นาโนกรัมต่อจุด ในทางกลับกันถึงแม้แอนติซีรัมต่อเปปไทด์ T+ สามารถตรวจหาเปปไทด์ T+ ได้น้อยเพียง 125 พิโคกรัมต่อจุด แต่ก็ไม่แสดงการจับกับเปปไทด์ T- ที่ปริมาณ 4 นาโนกรัมต่อจุดเช่นกัน (รูปที่ 17)

2. การทดสอบความสามารถของแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อเปปไทด์ T- และ T+ ในการจับกับเปปไทด์สภาพธรรมชาติ

2.1 การตรวจหาสารคล้ายเปปไทด์ T- และ T+ ในสารสกัดจากก้านตากุ้งก้ามกราม โดยวิธี dot-ELISA

จากการนำสกัดสารจากก้านตากุ้งก้ามกรามจำนวน 200 ก้านตา ที่สกัดด้วยสารละลายเมทานอล อะซิติกและน้ำ ในอัตราส่วน 90 :1: 9 ผ่านกระบวนการ RP-HPLC โดยใช้คอลัมน์ C18 และชะสารสกัดออกจากคอลัมน์ด้วย acetonitrile ที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นตามลำดับจาก 12-64 % acetonitrile ใน 0.1 % TFA อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที และติดตามสารที่ออกจากคอลัมน์โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 215 นาโนเมตร ได้โครมาโทแกรมดังรูปที่ 18 จากนั้นนำสารที่แยกได้จาก fraction ที่ 11-59 จำนวน แพรคชั่นละ 40 ก้านตา หยดลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลสตรวจหาสารคล้าย เปปไทด์ T-และเปปไทด์ T+ โดยใช้แอนติซีรัมที่จำเพาะต่อเปปไทด์ T- และเปปไทด์ T+ ตามลำดับด้วยวิธี dot- ELISA และใช้เปปไทด์ T- และเปปไทด์ T+ ที่เชื่อมกับโปรตีน BSA (BSA-T- หรือ BSA-T+) สำหรับเป็น positive control พบว่า เมื่อใช้แอนติ-ซีรัมที่จำเพาะต่อเปปไทด์ T- และเปปไทด์ T+ เมื่อเจือจางในอัตราส่วน 1 : 40,000 พบสารคล้ายเปปไทด์ T- ในแฟรคชั่นที่ 30 และสารคล้ายเปปไทด์ T+ ในแฟรคชั่นที่ 38 ตามลำดับ โดยสังเกตจากการปรากฏเป็นจุดสีเทาแกมน้ำเงิน ดังแสดงในรูปที่ 19

Anti T- Antiserum

Anti T+ Antiserum

T- T+

Peptide Contents

T- T+

•

4 ng

•

•

2 ng

•

1 ng

•

0.50 ng

•

0.25 ng

•

125 pg

•

62.50 pg

•

31.25 pg

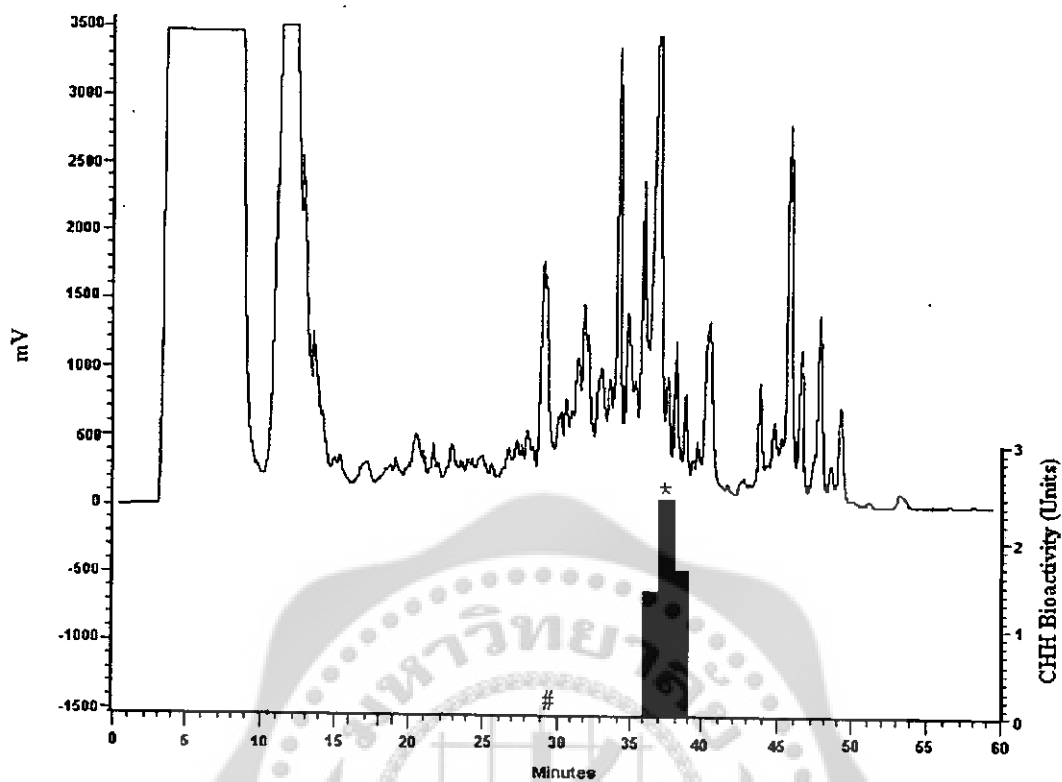
•

15.63 pg

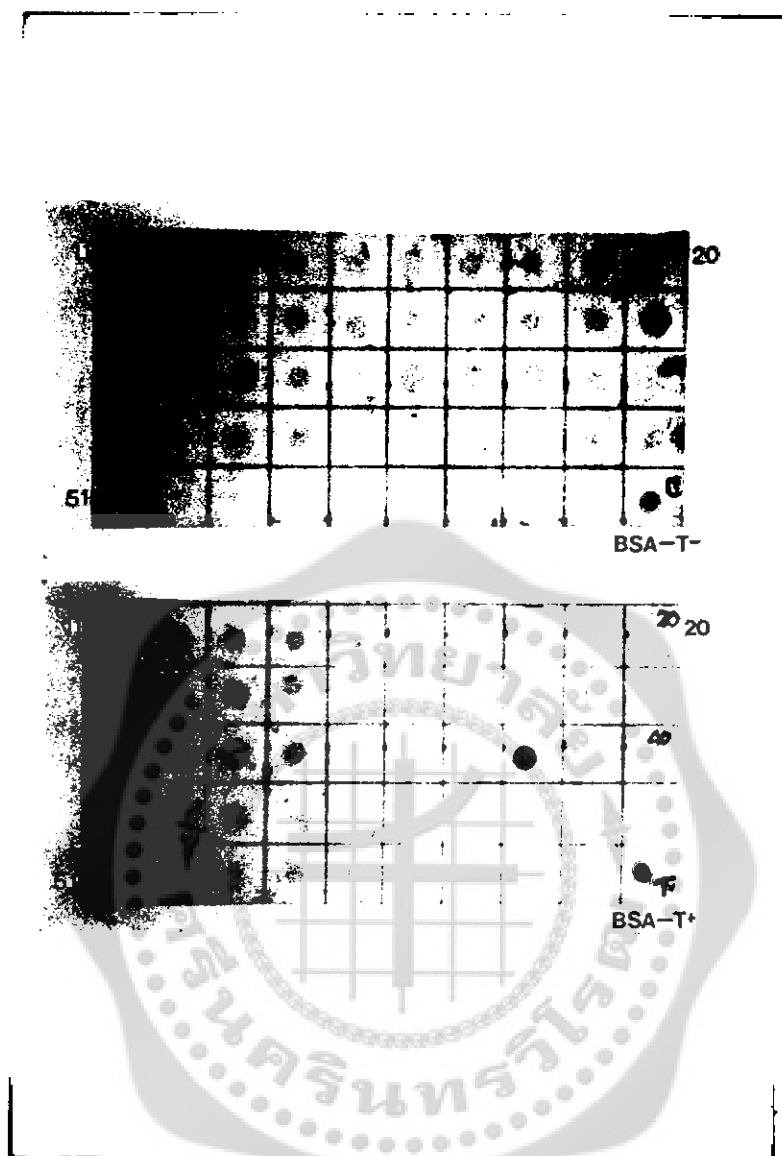
•

1 µg BSA

รูปที่ 17 Dot-ELISA แสดงความจำเพาะของแอนติซีรั่มต่อเปปไทด์ T- หรือเปปไทด์ T+ ในการจับกับเปปไทด์ทั้งสองชนิด



รูปที่ 18 RP-HPLC : โครมาโทแกรมของสารสกัดจากก้านตาทิ้งก้ามกรามจำนวน 200 ก้านตา (คอลัมน์ C18, ระบบตัวทำละลาย 12-64 % acetonitrile ใน 0.1 % TFA) และแผนภูมิแท่งแสดงปริมาณ CHH (หน่วย/ก้านตา) ที่ปรากฏในแฟรคชันที่ 37-39 (1 หน่วย/ก้านตา = ปริมาณ CHH ที่ทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดเพิ่มขึ้น 25 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร)
แฟรคชันที่ทำปฏิกิริยากับแอนติซีรั่มต่อเปปไทด์ T- * แฟรคชันที่ทำปฏิกิริยากับแอนติซีรั่มต่อเปปไทด์ T+



รูปที่ 19 Dot-ELISA โดยการใช้แอนติซีรั่มต่อเปปไทด์และตรวจหาสารคล้าย T- และเปปไทด์ T+ในสารสกัดจากก้านตากุ้งก้ามกรามหลังจากผ่านกระบวนการทาง RP-HPLC พบ สารคล้ายเปปไทด์ T- ใน fraction ที่ 30 (1) และสารคล้ายเปปไทด์ T+ ใน fraction ที่ 38 (2)

2.2. การตรวจหาการออกฤทธิ์ของฮอร์โมนเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด (CHH) โดยวิธี bioassay

จากการตรวจสอบสารคล้ายเปปไทด์ T- และเปปไทด์ T+ ในแฟรคชันที่ 30 และ 38 ตามลำดับหลังผ่านกระบวนการทาง HPLC โดยวิธี dot- ELISA จึงนำสารสกัดที่ได้จากแฟรคชันต่าง ๆ ไปตรวจหาการออกฤทธิ์ของฮอร์โมน CHH (CHH bioassay) โดยฉีดสารสกัดที่แยกได้จากแฟรคชันกลับเข้าไปในกึ่งกำมกรามที่ถูกตัดตาทั้งสองข้าง จากนั้น 1 ชั่วโมงเก็บเลือดกึ่งหลังจากฉีดสารสกัด นำเลือดกึ่งก่อนและหลังฉีดไปหาระดับน้ำตาลในเลือดที่เพิ่มขึ้นโดยวิธี glucose oxidase method พบว่าสารสกัดที่ได้จากแฟรคชัน ที่ 37, 38 และ 39 เท่านั้นที่ทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดกึ่งเพิ่มขึ้น นั่นแสดงว่าในแฟรคชันที่ 37, 38 และ 39 มีฮอร์โมน CHH กระจายอยู่ โดยแฟรคชันที่ 38 มี CHH activity มากที่สุด รองลงมาคือแฟรคชันที่ 39 และ 37 ตามลำดับ โดยมีปริมาณฮอร์โมน CHH เท่ากับ 2.44, 1.64 และ 1.44 หน่วย (unit) ตามลำดับ (ตารางที่ 8) และเมื่อฉีดสารสกัดที่ได้จาก fraction ที่ 30, 35-36 และ 40 พบว่าไม่ทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดกึ่งเพิ่มขึ้น นั่นคือแสดงการออกฤทธิ์ของ CHH ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับการตรวจหาสารคล้ายเปปไทด์ T+ ในสารสกัดจากก้านตา ส่วนแฟรคชันที่ 30 อาจเป็นสารที่คล้ายกับเปปไทด์ T- แต่ไม่มีคุณสมบัติของ CHH

ตารางที่ 8 ผลการตรวจหาฮอร์โมนเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดในแฟรคชัน ที่ 30, 35-40

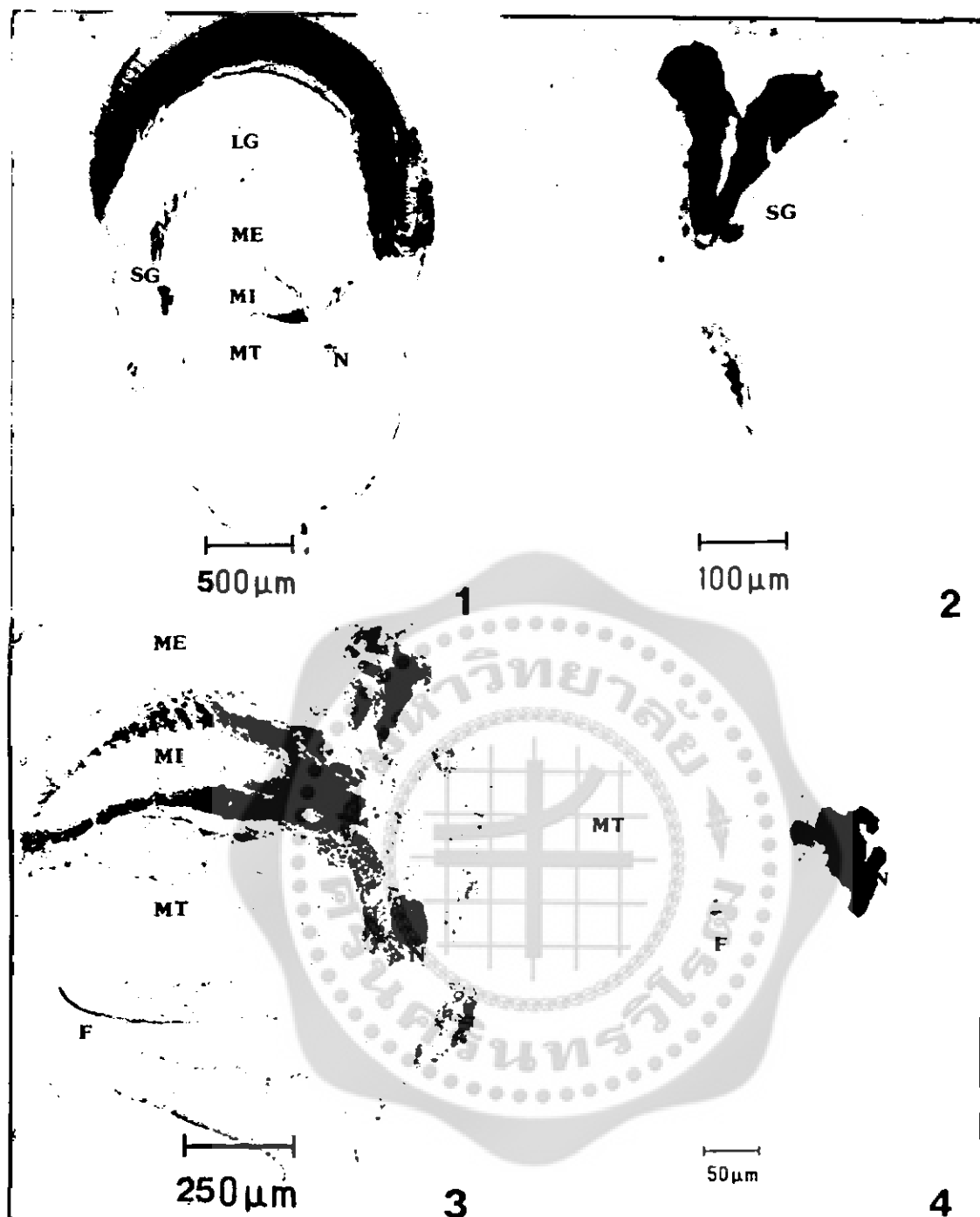
Fraction ที่	ปริมาณก้านตา (ก้านตา)	ความเข้มข้นกลูโคส (มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร)			ปริมาณฮอร์โมน หน่วย/ก้านตา
		ก่อนฉีด	หลังฉีด	เพิ่มขึ้น	
น้ำเกลือ	-	12.83	20.56	7.73	-
30	2	9.42	20.5	11.08	0.22
35	2	16.97	30.61	13.67	0.28
36	2	7.11	17.95	10.84	0.21
37	0.5	15.79	33.83	16.04	1.44
38	0.5	5.54	36.09	30.55	2.44
39	0.5	10.69	31.13	20.44	1.64
40	2	15.75	21.23	2.57	0.11

กำหนดให้ 1 หน่วย/ก้านตาเท่ากับปริมาณฮอร์โมน CHH ที่ทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดกึ่งเพิ่มขึ้น 25 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร

2.3 การตรวจหาความจำเพาะของแอนติซีรั่มต่อเปปไทด์ T- และเปปไทด์ T+ โดยวิธี immunocytochemistry

จากการใช้เนื้อเยื่อของก้านตากุ้งก้ามกรามที่มีความหนา 50 ไมโครเมตรเพื่อตรวจหาแหล่งที่สร้างฮอร์โมน CHH โดยใช้แอนติซีรั่มที่จำเพาะต่อเปปไทด์ T- และเปปไทด์ T+ ในอัตราส่วน 1 : 5,000 โดยวิธี immunocytochemistry พบว่า เมื่อใช้แอนติซีรั่มที่จำเพาะต่อเปปไทด์ T+ พบการติดสีน้ำตาลที่เซลล์ประสาทในบริเวณ x-organ จำนวน 24 ± 5 เซลล์ มีขนาด 18 ± 3 ไมโครเมตรและเส้นใยประสาทที่ส่งไปยังต่อมไชนัส (รูปที่ 20) แต่เมื่อใช้แอนติซีรั่มต่อเปปไทด์ T- กับเนื้อเยื่อก้านตาของกุ้งก้ามกรามเช่นกัน พบว่าไม่แสดงการติดสีน้ำตาลในบริเวณใด ๆ ภายในเนื้อเยื่อก้านตา อย่างไรก็ตามเพื่อเป็นการยืนยันความจำเพาะของแอนติบอดีต่อเปปไทด์ T+ ว่าการติดสีไม่ได้เกิดจากการปนเปื้อนของแอนติบอดีที่สามารถจับกับองค์ประกอบต่าง ๆ ในก้านตา โดยทำการทดลองหยดแอนติซีรั่มต่อเปปไทด์ T+ สลับกับแอนติซีรั่มต่อเปปไทด์ T+ ที่ดูดซับด้วย BSA-T+ ลงบนเนื้อเยื่อของก้านตากุ้งก้ามกรามความหนา 8 ไมครอน พบว่าบริเวณเซลล์ประสาทหรือต่อม-ไชนัสที่มีการติดสีน้ำตาลเมื่อใช้แอนติซีรั่มต่อเปปไทด์ T+ นั้น เมื่อใช้แอนติซีรั่มต่อเปปไทด์ T+ ที่ดูดซับด้วย BSA-T+ พบว่าการติดสีของบริเวณดังกล่าวหายไป (รูปที่ 21) แสดงว่าการติดสีบริเวณเซลล์ประสาทหรือต่อม-ไชนัสเป็นผลมาจากการเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเปปไทด์ T+ หรือ CHH นั้นเอง ไม่ใช่เกิดจากแอนติบอดีอื่น ๆ ที่ปะปนมาในซีรั่ม

นอกจากนี้จากการใช้แอนติซีรั่มที่จำเพาะต่อเปปไทด์ T+ ตรวจหาแหล่งสร้างฮอร์โมน CHH ในก้านตากุ้งกุลาดำ พบว่ามีการติดสีของเซลล์ประสาทในบริเวณ x-organ จำนวน 34 ± 4 เซลล์ ซึ่งมีขนาด 35 ± 4 ไมโครเมตร และพบที่เส้นใยประสาทและต่อม-ไชนัสเช่นกัน (รูปที่ 22) ดังนั้นจึงคาดว่า CHH ของกุ้งกุลาดำน่าจะมีลำดับกรดอะมิโนทางปลาย C คล้ายกับ CHH ของกุ้งก้ามกราม



รูปที่ 20 ภาพตาข่ายของกึ่งกัมกรามความหนา 50 μm เมื่อใช้แอนติซีรุ่มต่อเปปไทด์ T+ อัตราส่วน 1 : 5,000 บริเวณติดสีน้ำตาลเป็นบริเวณที่พบสารคล้ายเปปไทด์ T+

1. ภาพกำลังขยายต่ำแสดงองค์ประกอบในก้านตากึ่งกัมกราม
2. ภาพกำลังขยายสูงแสดงต่อมไฮโปฟิซีสน้ำตาลซึ่งเป็นบริเวณที่พบสารคล้ายเปปไทด์ T+ จากเขตรับแสง
3. ภาพกำลังขยายสูงแสดงกลุ่มเซลล์ประสาทที่พบสารคล้ายเปปไทด์ T+ และเส้นใยประสาทที่ส่งไปยังต่อมไฮโปฟิซีส
4. ภาพกำลังขยายสูงของกลุ่มเซลล์ประสาทที่พบสารคล้ายเปปไทด์ T+

LG = Lamina ganglionaris

ME = Medulla externa

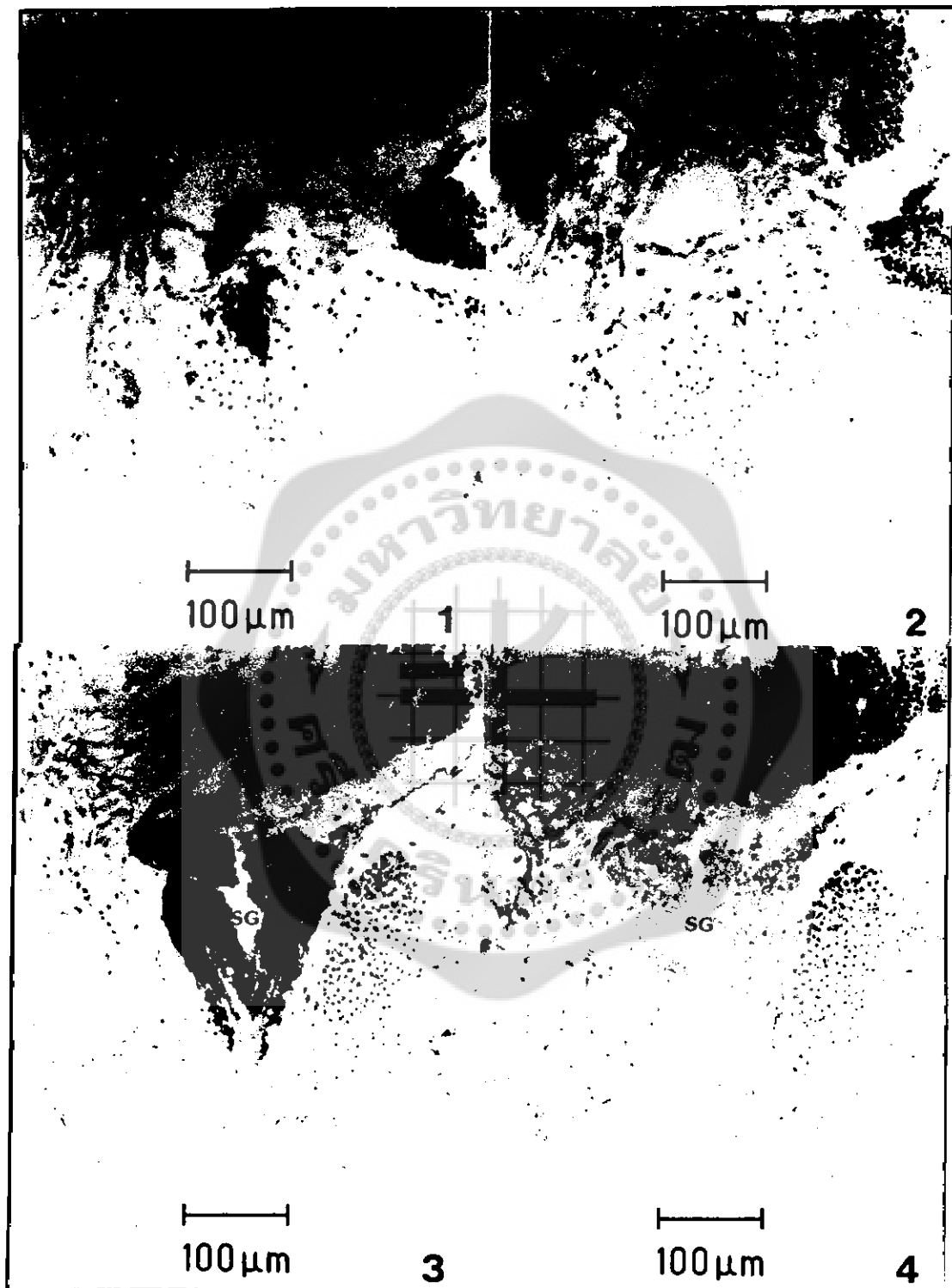
MI = Medulla interna

MT = Medula terminalis

SG = Sinus gland

N = Neuronal cell body

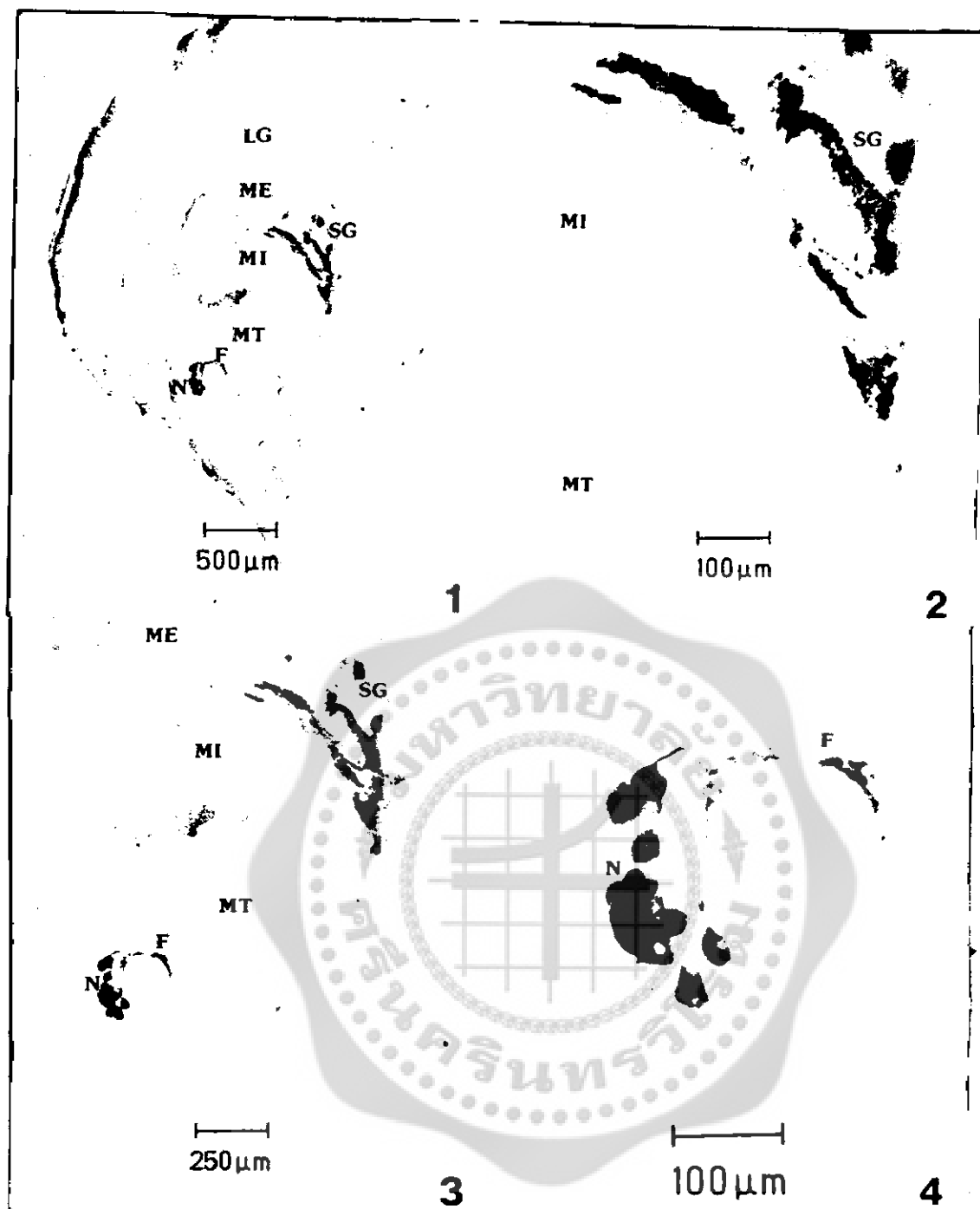
F = Nerve fiber



รูปที่ 21 การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรั่มต่อเปปไทด์ T+ โดยใช้ก้านตากุ้งก้ามกราม
ความหนา 8 ไมครอน บริเวณกลุ่มเซลล์ประสาทและต่อมไชนัสที่พบ CHH

SG = Sinus gland

N = Neuronal cell body



รูปที่ 22 ภาพตาข่ายของกึ่งกลางดำ ความหนา 50 μm เมื่อใช้แอนติซีรีมต่อเปปไทด์ T+ อัตราส่วน 1 : 5000 บริเวณติดสีน้ำตาลเป็นบริเวณที่พบสารคล้ายเปปไทด์ T+

1. ภาพกำลังขยายต่ำแสดงองค์ประกอบในก้านตากึ่งกลางดำ
2. ภาพกำลังขยายสูงแสดงต่อเส้นที่พบสารคล้ายเปปไทด์ T+ จากเขตรับเดียวกัน
3. ภาพกำลังขยายต่ำแสดงต่อเส้นและกลุ่มเซลล์ประสาท ติดสีน้ำตาล ซึ่งเป็นบริเวณที่พบสารคล้ายเปปไทด์ T+ จากเขตรับเดียวกัน
4. ภาพกำลังขยายสูงของกลุ่มเซลล์ประสาทที่พบสารคล้ายเปปไทด์ T+ จากเขตรับเดียวกัน

LG = Lamina ganglionaris

ME = Medulla externa

MI = Medulla interna

MT = Medula terminallis

SG = Sinus gland

N = Neuronal cell body

F = Nerve fiber



สรุปและอภิปรายผล

1. การทำให้บริสุทธิ์และศึกษาลำดับกรดอะมิโนของ CHH รูปแบบใหม่เพิ่มเติมจาก Mar-CHH-I

จากการหาลำดับกรดอะมิโนของฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดของสัตว์พวกครัสเตเชียชนิด CHH ของกุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* สามารถทำให้บริสุทธิ์ CHH เพิ่มได้อีก 2 รูปแบบซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโน 71 หน่วย โดยมีกรดอะมิโนต่างกันเพียงตำแหน่งเดียวได้แก่ กรดอะมิโนตัวสุดท้ายของ CHH-I เป็นซีรีน (serine) แทนที่จะเป็นวาลีน (valine) และตำแหน่งที่ 41 ของ CHH-III เป็นกรดอะมิโนในกลูตาเมต (glutamate) แทนที่จะเป็นอาร์จินีน (arginine) ซึ่งจากการพิสูจน์ทราบว่า CHH-I (ในการทดลองที่ II) ควรจะประกอบด้วยกรดอะมิโน 72 หน่วยโดยมีธีโรนีน (threonine) อยู่ที่ตำแหน่งที่ 71 ดังนั้นคาดว่า CHH-II และ CHH-III ควรประกอบด้วยกรดอะมิโน 72 หน่วยเช่นกัน จากการตรวจหาน้ำหนักโมเลกุลของ CHH-II และ CHH-III พบว่ามีน้ำหนัก 8522.9 และ 8533.4 ตามลำดับ ซึ่งถ้าประกอบด้วยกรดอะมิโน 71 หน่วยดังที่หาลำดับกรดอะมิโนได้ควรมีน้ำหนักเป็น 8404.7 และ 8419.7 (ค่าเฉลี่ย) หรือ 8399 และ 8414 (monoisotopic MW) ซึ่งจะเห็นว่ายังขาดกรดอะมิโนอีกหนึ่งหน่วย จึงคาดว่าน่าจะมีธีโรนีนอยู่ที่ตำแหน่งที่ 71 เหมือนกับ CHH-I ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 8538.1 (Sithigorngul et al., 1999) ซึ่งเป็นไปได้เพราะผลต่างของน้ำหนักโมเลกุลของ CHH-I และ CHH-II เท่ากับ 15.2 คาลตันใกล้เคียงกับผลต่างของน้ำหนักโมเลกุลระหว่างวาลีน (117.1) และ ซีรีน (105.1) และผลต่างระหว่าง CHH-I และ CHH-III เท่ากับ 27.1 คาลตันเท่ากับผลต่างระหว่าง อาร์จินีน (174.2) กับกลูตาเมตรวมกับไฮโดรเจน (147.1 + 22)

จากรายงานนี้จะเห็นว่า CHH ที่ได้มีความแตกต่างกันน้อยมากซึ่งอาจจะเกิดจาก variation ของ CHH ในประชากรของกุ้งต่าง ๆ แต่สำหรับทางด้านปลาย N นั้น กรดอะมิโนตัวแรกของ CHH ส่วนใหญ่ถูกปิดกั้นด้วย pyroglutamate (pE) ซึ่งในกุ้งก้ามกรามเป็นอะลานีน (alanine) ทำนองเดียวกับใน *Penaeus japonicus* ที่เป็นซีรีน จากการศึกษาพบว่า pyroglutamate ทางด้านปลาย N ของ CHH นี้ไม่เป็นส่วนของโมเลกุลที่มีความสำคัญทางชีววิทยาใด ๆ (Chung and Webster, 1996)

จากรายงานการทำให้ CHH บริสุทธิ์ในสัตว์ครัสเตเชียอื่น ๆ พบ CHH หลายรูปแบบ เช่น ใน Mexican crayfish, *Procambarus bouvieri* พบ CHH-B และ CHH-C (Huberman and Aguilar, 1988) ในปูน้ำเค็ม *Carcinus maenas* พบพิคที่มี CHH activity 2 พิค (Kegel et al., 1991) ในกุ้งล็อบสเตอร์ *Homarus americanus* พบ CHH 2 รูปแบบ (Tensen et al., 1991) กุ้งทะเล *Penaeus japonicus* พบ CHH 5 รูปแบบ (Yang et al., 1995)

แต่อย่างไรก็ตามการที่พบ CHH activity ในสารสกัดจากก้ามตาของกุ้งก้ามกรามในหลาย fraction อาจเกิดเนื่องจากการสกัดใช้ก้ามตาทั้งก้ามตาและวิธีการสกัดอาจได้ precursor ของ CHH (อาจอยู่ในรูป preprohormone หรือ prohormone) ออกมาด้วย เพราะจากรายงานการแยกสกัด CHH ในกุ้งล็อบสเตอร์ *Homarus americanus* ถึงแม้จะใช้เพียงต่อมไชนัสในการแยกสกัด CHH ก็สามารถพบ CHH-related peptide ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโน 38 หน่วยเพิ่มจากลำดับกรดอะมิโนของ CHH ที่เคยพบมา (Tensen et al., 1991) อย่างไรก็ตาม สิ่งที่ต้องคำนึงถึงอีกประการหนึ่งคือ ในระหว่างการแยกสกัด CHH ขั้นตอนต่าง ๆ อาจมีการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของ CHH เกิดขึ้น ทำให้คุณสมบัติทางกายภาพของโมเลกุลต่างไปจากเดิม เช่น อาจเกิดปฏิกิริยา oxidation ของกรดอะมิโนเช่น เมไทโอนีน และฮิสติดีน หรืออาจเกิดการ hydrolysis ของฮอริโมนทำให้พบส่วนของฮอริโมนกระจายไปในแฟรคชันต่าง ๆ

สิ่งที่น่าสังเกตอีกประการหนึ่งในการแยกสกัด CHH จะพบว่าในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์แต่ละขั้นตอน CHH activity จะลดลงเรื่อย ๆ ซึ่งการลดลงของ CHH activity นี้ไม่น่าเป็นสาเหตุจากการที่ CHH รูปแบบต่าง ๆ แยกจากกันเพียงอย่างเดียวเพราะ CHH activity ของ CHH บริสุทธิ์ที่ได้ในขั้นตอนที่ 8 เหลือประมาณ 1-2 % ของ CHH ในสารสกัดเริ่มต้น ดังนั้นจึงคาดว่าอาจมีการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของ CHH ในระหว่างการทำให้บริสุทธิ์ขั้นตอนต่าง ๆ โดยเฉพาะในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ด้วย phenyl column ซึ่งใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/HFBA พบว่า CHH activity สูญเสียไปมาก ดังนั้นจึงคาดว่า CHH จากกุ้งก้ามกรามมีระดับการคงสภาพต่ำมาก (labile) ในตัวทำละลายที่ใช้ และในระหว่างการทำให้บริสุทธิ์ขั้นตอนที่ 5-8 ระบบตัวทำละลายที่ใช้ อาจทำให้ CHH activity เสียไปได้ ซึ่งต่างจาก CHH จากสัตว์ครึ่งตัวครึ่งปลาชนิดอื่นที่มีการใช้ขั้นตอนการแยกสกัดที่รุนแรงก็ยังคงรักษา CHH activity ได้ เช่นในกรณีของ isopod, *Porcellio dilatatus* การแยกสกัด CHH ทำโดยใช้แอมโมเนียมอะซิเตตที่มีความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร (pH 8.5) กับการใช้กรดอะซิติกเข้มข้น 0.2 โมลต่อลิตร พบว่า CHH activity จากการแยกสกัดทั้งสองวิธีไม่แตกต่างกัน (Martin et al., 1984) กุ้ง crayfish, *Astacus leptodactylus* เป็นตัวอย่างที่แยกสกัดด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร และผ่าน SDS-PAGE (Kallen et al., 1986) กุ้งล็อบสเตอร์ *Homarus americanus* แยกสกัด CHH โดยใช้กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร (Tensen et al., 1991) หรือกรดไฮโดรคลอริกที่ร้อน 85 องศาเซลเซียส หรือในกรดอะซิติกที่ร้อน 80 องศาเซลเซียส (Soyez et al., 1990) ในกุ้งล็อบสเตอร์ *Nephrops norvegicus* แยกสกัด CHH ในกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร (Smullen and Bently, 1994) ก็ยังคงรักษา CHH activity อยู่ ซึ่งต่างจากการศึกษาการแยกสกัดเบื้องต้นของ CHH จากกุ้งก้ามกราม

Macrobrachium rosenbergii โดยใช้สารละลายต่าง ๆ พบว่าการแยกสกัดในน้ำเดือดหรือกรดอะซิติกเข้มข้น 2 โมลต่อลิตร การคงสภาพของ CHH activity ต่ำกว่าการแยกสกัดใน 90% methanol 1% acetic acid มาก (Sithigorngul et al., 1994) ดังนั้นจึงเชื่อได้ว่า CHH ในกุ้งก้ามกรามน่าจะมีลักษณะที่แตกต่างรวมทั้งการคงสภาพก็อาจแตกต่างจาก CHH ของสัตว์ครึ่งตัวครึ่งปลาอื่น ๆ

ข้อสังเกตในการทำให้บริสุทธิ์ของ CHH จากกุ้งก้ามกรามคือต้องใช้กระบวนการทาง RP-HPLC ระบบตัวทำละลายต่าง ๆ ถึง 8 ขั้นตอนจึงจะได้ CHH บริสุทธิ์ ซึ่งต่างจากรายงานการทำให้ CHH บริสุทธิ์ในสัตว์ครึ่งตัวครึ่งปลาชนิดอื่น ๆ ซึ่งใช้กระบวนการทาง RP-HPLC เพียง 1-3 ขั้นตอนก็สามารถทำให้ CHH บริสุทธิ์ได้ (Soyez et al., 1990, Tensen et al., 1991, Smullen and Bently, 1994) ทั้งนี้เพราะการเตรียมสารสกัด CHH ในการศึกษาเหล่านี้เตรียมจากต่อมไฮนัล การปนเปื้อนของสิ่งเจือปนต่าง ๆ ในสารสกัดจึงน้อยกว่าการใช้ทั้งก้ามสดตามที่ปฏิบัติในการแยกสกัด CHH จากกุ้งก้ามกราม

II. การพิสูจน์โครงสร้างทางปลาย C ของ CHH-I โดยใช้กระบวนการทางอิมมูโน

จากการทดสอบแอนติซีรัมที่ได้จากการปลูกภูมิคุ้มกันด้วยเปปไทด์ T+ และเปปไทด์ T- โดยวิธี dot-ELISA ต่อเปปไทด์ T+ และเปปไทด์ T- ชี้ให้เห็นว่า แอนติซีรัมทั้งสองมีความจำเพาะสูงมาก มีปฏิกิริยาข้ามกันต่ำมาก ถึงแม้เปปไทด์ T+ และเปปไทด์ T- มีกรดอะมิโนต่างกัน 1 หน่วยเท่านั้น ถึงแม้แอนติบอดีต่อเปปไทด์ T- จะมีแรงจับและความไวในการตรวจสอบเปปไทด์ T- สูงกว่าแอนติบอดีต่อเปปไทด์ T+ หลายเท่า แต่ก็ไม่สามารถจับกับ CHH ในสารสกัดจากก้ามสดโดยวิธี dot-ELISA และในเนื้อเยื่อก้ามสดโดยวิธี Immunocytochemistry ได้ ในขณะที่แอนติบอดีต่อเปปไทด์ T+ สามารถจับได้อย่างจำเพาะ ดังนั้นจึงเชื่อมั่นได้ว่า CHH ในกุ้งก้ามกรามน่าจะประกอบด้วยกรดอะมิโน 72 หน่วย (ตารางที่ 5) โดยมีรีโอโนนอยู่ในตำแหน่งที่ 71 คล้ายกับในกุ้ง crayfish (Huberman et al., 1993; Yasuda et al., 1994) และกุ้งทะเล *Penaeus japonicus* (Yang et al., 1995) ซึ่งมีวิวัฒนาการใกล้เคียงกว่าครึ่งตัวครึ่งปลาในในกลุ่มลอบสเตอร์และปูชนิดต่าง ๆ ที่กรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 71 ของ CHH เป็นเมไธโอนีน (Weidemann et al., 1989 ; Tensen et al., 1991)

ตำแหน่งเซลล์ประสาทที่พบ CHH นั้นพบเฉพาะเซลล์ประสาทบริเวณ MTGXO เท่านั้น เซลล์เหล่านี้ส่ง CHH ไปตามเส้นประสาทไปสะสมฮอริโมนที่ต่อมไฮนัล ซึ่งลักษณะของเซลล์ประสาทที่พบ CHH นี้มีลักษณะคล้ายกับเซลล์ประสาทที่พบ CHH ในก้ามสดของปูและกุ้ง crayfish ชนิดต่าง ๆ (Jarose and Keller, 1979; Van Herp and Buggenan, 1979; Dirksen et al., 1988) ซึ่งจำนวนเซลล์ที่พบ

CHH ในกุ้งก้ามกรามนั้นใกล้เคียงกับจำนวนเซลล์ที่พบในกุ้ง *Homarus gammarus* ซึ่งพบประมาณ 19 ± 4 เซลล์ (Rotllant et al., 1993) ขนาดของเซลล์ประสาทที่พบ CHH ในปู *Carcinus maenas* มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 30-40 ไมโครเมตร (Jarose and Kellen, 1979) โดยทั่วไปในปูชนิดต่าง ๆ เช่น *Carcinus maenas*, *Linocarcinus puber*, *Cancer pagurus*, *Uca pugilator* และ *Maja squinado* มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์ประสาทอยู่ในช่วง 35-45 ไมโครเมตร (Dirksen et al., 1988) แต่อย่างไรก็ตามใน *H. gammarus* ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์ประสาทนั้นมีขนาดเล็กกว่ามาก คือ ประมาณ 7 ± 1 ไมโครเมตรเท่านั้น

ตำแหน่งที่พบเซลล์ประสาทที่สร้าง CHH จะพบเซลล์ประสาทที่สร้าง GIH และ MIH ด้วย โดยจำนวนเซลล์ที่พบ GIH จะมีขนาดใกล้เคียงกัน และมีบางเซลล์จำนวนหนึ่งที่พบฮอร์โมน CHH และ GIH ในเซลล์เดียวกัน ซึ่งมีรายงานทั้งในกุ้งลอบสเตอร์ *H. gammarus* (Rotllant, 1993) และ *H. americanus* (Kellen and Meusy, 1989) แต่ในกรณีของ MIH จำนวนเซลล์ที่พบ CHH มีมากกว่าเซลล์ที่พบ MIH เท่าตัวและ ไม่พบว่ามีเซลล์ที่พบทั้ง CHH และ MIH ในเซลล์เดียวกัน (Dirksen et al., 1988 ; Klein et al., 1993) ซึ่งชี้ให้เห็นว่าฮอร์โมนทั้ง 3 ชนิดนี้มีการแสดงออกในเซลล์ต่างกัน จึงมีกระบวนการสร้างแยกจากกัน (Kellen and Meusy, 1993)

ความเข้มของเซลล์ที่ติดสีโดยกระบวนการ immunocytochemistry ที่ใช้แอนติซีรัมต่อเปปไทด์ T+ นั้น ในบางตัวอย่างมีเซลล์ติดสีความเข้มแตกต่างกัน ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าความแตกต่างในการติดสีต่างกันนั้น อาจเกิดจากเซลล์เหล่านั้นสร้าง CHH รูปแบบต่างกัน จึงมีความสามารถในการจับกับแอนติบอดีแตกต่างกันด้วย เพราะในคริสต์ทศวรรษหลายชนิดมีรายงานว่า พบ CHH มากกว่า 1 รูปแบบ (Huberman et al., 1988 ; Tensen et al., 1991) และในกุ้งก้ามกรามก็เช่นเดียวกัน (Sithigorngul et al., 1999) แต่อย่างไรก็ตามความแตกต่างของ CHH ในแต่ละรูปแบบมีน้อยมากในสัตว์ชนิดเดียวกัน ในการศึกษาด้วย electron microscope พบว่า ในตัวเซลล์ประสาทที่พบ CHH ในกุ้ง crayfish *Astacus leptodactylus* ที่ติดสีระดับต่าง ๆ กันนั้น มีความสัมพันธ์โดยตรงกับความหนาแน่นของ granule ที่บรรจุ CHH และคาดว่าเซลล์ประสาทที่ติดสีต่างกันนี้เปลี่ยนกลับไปกลับมาเป็นวงจรขึ้นอยู่กับการสังเคราะห์และปล่อยฮอร์โมนสู่ต่อมไชนัส (Kellen and Voorter, 1984)

เอกสารอ้างอิง



- Abramowitz, A.A., F.L., Hisaw and D.N., Papandrea. The occurrence of a diabetogenic factor in the eyestalk of crustaceans, in crustacean hyperglycemic hormone (CHH) and the regulation of carbohydrate metabolism : current perspectives. Biol. Bull. 86 : 1-5; 1944.
- Aguilar, M.B., L.S. Quackenbush, D.T. Hunt, J. Shabanowitz and A. Huberman. Identification, purification and initial characterization of the vitellogenesis inhibiting hormone from the mexican crayfish, *Procambarus bouvieri* (Ortmann). Comp. Biochem. Physiol. 102B : 491-498 ; 1992.
- Beltz, B.S. Crustacean neurohormone, In : Endocrinology of selected invertebrate types. Edited. H. Laufer and R.G.H. Downer, New York ; Alan R. Liss. Inc., pp. 235-258 ; 1988.
- 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.
- Chung, J.S. and S.G. Webster. Does the N-terminal pyroglutamate residue have any physiological significance for crab hyperglycemic peptides. Eur. J. Biochem. 240 : 358-364 ; 1996.
- Chung, J.S., M.C. Wilkinson and S.G. Webster. Determination of the amino acid sequence of the moult-inhibiting hormone from the edible crab, *Cancer pagurus*. Neuropeptides. 30 : 95-101 ; 1996.
- Dirksen H., S.G. Webster and R. Keller. Immunocytochemical demonstration of the neurosecretory system containing putative moult-inhibiting hormone and hyperglycemic hormone in the eyestalk of brachyuran crustaceans. Cell Tissue Res. 251: 3-12 ; 1988.
- Fernlund, P. Structure of the red pigment concentrating hormone of the shrimp *Pandalus borealis*, in the demonstration of substances immunologically related to the identified arthropod neuropeptide AKH/RPCH in the CNS of several invertebrate species. Biochem. Biophys. Acta. 371 : 304-311 ; 1974.
- Fernlund, P. and L. Josefsson. Crustacean color change hormone : Amino acid sequence and chemical synthesis. Science. 177 : 173-175 ; 1972.

- Gangotri, M.S., S.A.T. Venkatachari and N. Vasantha. Neuroendocrine control of blood sugar regulation in the freshwater crab, *Barytelphusa guerinii* (H. Milne Edwards) (Decapoda, potamidea). Crustacean. 53 (1) : 5-14 ; 1987.
- Huberman, A. and M.B. Aguilar. A neurosecretory hyperglycemic hormone from the sinus gland of the mexican crayfish, (*Procambarus bouvieri* : Ortmann)-I. Purification and biochemical characterization of the most abundant form of the hormone. Comp Biochem. Physiol. 85B (1) : 197-203 ; 1986.
- Huberman, A. and M.B. Aguilar. A neurosecretory hyperglycemic hormone from the sinus gland of the mexican crayfish, (*Procambarus bouvieri* : Ortmann)-II. Structural comparison of two isoforms of the hormone. Comp Biochem. Physiol. 91B (2) : 345-349 ; 1988.
- Huberman, A., M.B. Aguilar and K. Brew. Primary structure of the major isomorph of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH-I) from the sinus gland of the mexican crayfish, *Procambarus bouvieri* (Ortmann) : Interspecies comparison. Peptides 14 : 7-16 ; 1993.
- Jarose, P.P. and R. Keller. Immunocytochemical identification of hyperglycemic hormone-producing cells in the eyestalk of *Carcinus maenas*. Cell. Tissue Res. 204: 379-385 ; 1979.
- Kallen, J.L. and F. Van Herp. Localization of crustacean hyperglycemic hormone (CHH) in the X-organ sinus gland complex in the eyestalk of the crayfish, *Astacus leptodactylus* (Nordmann, 1942). J. Morphology. 170 : 347-355 ; 1981.
- Kallen, J.L., F.M.J. Reijntjens, D.J.M. Reters and F.V. Herp. Biochemical analysis of the crayfish, *Astacus leptodactylus*. Gen. Comp. Endocrinol. 61 : 248-259 ; 1986.
- Kegel, G., B. Reichwein, S. Weese, G. Gaus, J.P. Katalinic and R. Keller. Amino acid sequence of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH) from the shore crab, *Carcinus maenas*. FEBS Letters. 25 (1) : 10-14 ; 1989.
- Kegel, G., B. Reichwein, C.P. Tensen and R. Keller. Amino acid sequence of crustacean hyperglycemic hormone (CHH) from the crayfish, *Orconectes limosus* : Emergence of a novel neuropeptide family. Peptides. 12 : 909-913 ; 1991.

- Keller, R. and G. Wunderer. Purification and amino acid composition of the neurosecretory hyperglycemic hormone from the sinus gland of the shore crab, *Carcinus maenas*. Gen. Comp. Endocrinol. 34 : 328-335 ; 1978.
- Keller, R. and D. Sedlmeier. A metabolic hormone in crustaceans : The hyperglycemic neuropeptide. In : Endocrinology of selected invertebrate types. Edited. H. Laufer and R.G.H. Downer. Alan R. Liss. Inc., New York. p. 315-326 ; 1988.
- Klein, J.M., D.P.V. de Kleijn, G. Hunemeyer, R. Keller and W. Weidemann. Demonstration of the cellular expression of genes encoding molt-inhibiting hormone and crustacean hyperglycemic hormone in the eyestalk of the shore crab *Carcinus maenas*. Cell. Tissue Res. 274: 515-519 ; 1993.
- Kleijn, D.P.V. and F. Van Herp. Molecular biology of neurohormone precursors in the eyestalk of crustacea. Comp. Biochem. Physiol. 112B : 573-579 ; 1995.
- Kleinholz, L.H., K.R. Rao, J.P. Riehm, G.E. Tarr, L. Johnson and S. Norton. Isolation and sequence analysis of a pigment dispersing hormone from eyestalks of the crab, *Cancer magister*. Biol. Bull. 170 : 135-143 ; 1986.
- Martin, G., R. Keller, G. Kegel, G. Besse and P.P. Garos. The hyperglycemic neuropeptide of the terrestrial isopod, *Porcellio dilatatus*. I. Isolation and characterization. Gen Comp. Endocrinol. 55 : 208-216 ; 1984.
- Martin, G., P.P. Jaros, G. Besse and R. Keller. The hyperglycemic neuropeptide of the terrestrial isopod, *Porcellio dilatatus*. II. Immunocytochemical demonstration in neurosecretory structures of the nervous system. Gen. Comp. Endocrinol. 55 : 217-226 ; 1984.
- Martin, G., O. Sorokine and A.V. Dorsselaer. Isolation and molecular characterization of a hyperglycemic neuropeptide from the sinus gland of the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare* (Crustacea). J. Biochem. 211 : 601-607 ; 1993.
- Nagamine, C., A.W. Knight, A. Maggenti and G. Paxman. Effects of androgenic gland ablation on male primary and secondary sexual characteristics in the Malaysian prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (De Man) (Decapod, Palaemonidae), with first evidence of induced feminization in a nonhermaphroditic decapod. Gen.Comp. Endocrinol. 41 : 423-441 ; 1980.

- Rao, K.R. and J.P. Riehm. Pigment dispersing hormone : A novel family of neuropeptides from arthropods. *Peptides*. 9 : 153-159 ; 1988.
- Rotllant, G., D. De Kleijn, M. Charmentier-Daures, G. Charmantier and F. Van Herp. Localization of crustacean hyperglycemic hormone (CHH) and gonad inhibiting hormone (GIH) in the eyestalk of *Homarus gammarus* larvae by immunocytochemistry and *in situ* hybridization. *Cell. Tissue Res.* 271:507-512 ; 1993.
- Santos, E.A. and K. Keller. Review : Crustacean hyperglycemic hormone (CHH) and the regulation of carbohydrate metabolism : current perspectives. *Comp. Biochem. Physiol.* 106A (3) :405-411 ;1993.
- Schooneveld, H. , F. Van Herp and J. Van Minnen. Demonstration of substances immunologically related to the identified arthropod neuropeptides AKH/RPCH in the CNS of several invertebrate species. *Brain Research*. 406 : 224-232 ; 1987.
- Sedlmeier, D. and R. Keller. The mode of action of crustacean neurosecretory hyperglycemic hormone. I. Involvement of cyclic nucleotides. *Gen Comp. Endocrinol.* 45 : 82-90 ; 1981.
- Sedlmeier, D. The crustacean hyperglycemic hormone (CHH) releases amylase from the crayfish midgut gland. *Peptides*. 20 : 91-88 ; 1988.
- Sithigorngul, W., S. Ruengmanee-paitoon and P. Sithigorngul. Determination of crustacean hyperglycemic hormone in *Macrobrachium rosenbergii*. *Srinakharinwirot Univ. Sci. J.* 8 (1) : 38-46 ; 1992.
- Sithigorngul, W., P. Sithigorngul. and N. Boon-ingpirdpong. Purification of gonad inhibiting hormone in the in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. I : Preliminary study. National Budget (1993) Final Report. 55p.; 1994.
- Sithigorngul, W., S. Jaideechoey, W. Saraithongkum, S. Lonyant and P. Sithigorngul. Purification and characterization of an isoform of crustacean hyperglycemic hormone from the eyestalk of *Macrobrachium rosenbergii*. *J. Exp. Zool.* (inpress ; 1999)
- Smullen, R.P. and M.G. Bentley. Studies on crustacean hyperglycemic hormone of the Norway lobster, *Nephrops norvegicus* (L.). *Invert. Rep. Dev.* 26 (1) : 23-32 ; 1994.

- 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.
- Soyez, D., P.Y. Noel, J.E. Van Deijnen, M. Martin, A. Morel and G.G. Payen. Neuropeptides from the sinus gland of the lobster, *Homarus americanus* : Characterization of hyperglycemic peptides. Gen. Comp. Endocrinol. 79 : 261-274 1990.
- Soyez, D., J.P. Le Caer, P.Y. Noel and J. Rossier. Primary structure of two isoforms of the vitellogenesis inhibiting hormone from the lobster, *Homarus americanus*. Neuropeptides. 20 : 52-32 ; 1991.
- Spaargaren, D.H. and P.A. Haefner. The effect of environment osmotic conditions on blood and tissue glucose levels in the brown shrimp, *Crangon crangon* (L.). Comp. Biochem. Physiol. 87A (4) : 1045-1050 ; 1987.
- Tensen, C.P., D.P.V. De Kleijn and F. Van Herp. Characterization of hyperglycemic neuropeptides from the lobster, *Homarus americanus*. Peptides. 12 : 241-249 ; 1991.
- Van Herp, F. and H.J. M. Van Buggenum. Immunocytochemical localization of hyperglycemic hormone (HGH) in the neurosecretory system of the eyestalk of the crayfish *Astacus leptodactylus*. Experientia. 35: 1527-1529 ; 1979.
- Webster, S.G. Amino acid sequence of putative moult-inhibiting hormone from the crab *Carcinus maenas*. Proc. R. Soc. Lond. (Biol). 244 : 247-252 ; 1991.
- Weidemann, W., J. Gromoll and R. Keller. Cloning and sequence analysis of cDNA for precursor of a crustacean hyperglycemic hormone. FEBS Letters. 257: 31-34 ; 1989.
- Yang, W., K. Aida and H. Nagasawa. Amino acid sequences of a hyperglycemic hormone and its related peptides from the kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. Aquaculture. 135 : 215-212 ; 1995.
- Yang, W., K. Aida, A. Terauchi, H. Sonobe and H. Nagasawa. Amino acid sequence of a peptide with molt-inhibiting activity from the kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. Peptides. 17 : 197-202 ; 1996.

Yasuda, A., Y. Yasuda, T. Fujita and Y. Naya. Characterization of crustacean hyperglycemic hormone from the crayfish (*Procambarus clarkii*): Multiple of molecular forms by sterioinversion and diverse function. Gen. Comp. Endocrinol. 95:387-398 ; 1994.

