การแยกและการทำให้บริสุทธิ์สารคล้ายฮอร์โมนโคลีซิสโตไคนิน จากก้านตากุ้งกุลาดำ

ปริญญานิพนธ์

ของ

ธิดา อมร

เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิชาเอกเคมีชีวภาพ
มีนาคม 2541

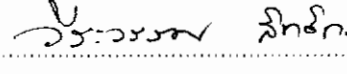
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

คณะกรรมการควบคุมและคณะกรรมการสอบได้พิจารณาปริญญานิพนธ์ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิชาเอกเคมีชีวภาพ ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒได้

คณะกรรมการควบคุม

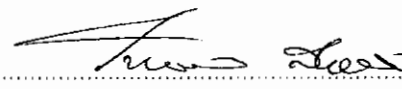
.....ประธาน

(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพศาล สิทธิกรกุล)

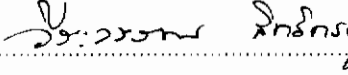

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วีระวรรณ สิทธิกรกุล)

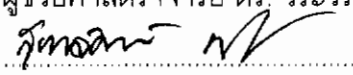
คณะกรรมการสอบ


.....ประธาน

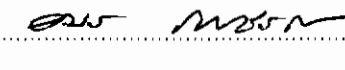
(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพศาล สิทธิกรกุล)


.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วีระวรรณ สิทธิกรกุล)

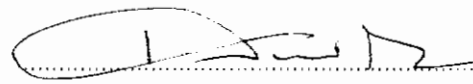

.....กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม

(รองศาสตราจารย์ ดร. สุภาลักษณ์ ปรัชชญาสิทธิกุล)


.....กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม)

บัณฑิตวิทยาลัยอนุมัติให้รับปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิชาเอกเคมีชีวภาพ ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ


.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ศาสตราจารย์ ดร. เสริมศักดิ์ วิศาลาภรณ์)

วันที่ 12 เดือน มีนาคม พ.ศ. 2541

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความช่วยเหลือและคำแนะนำอย่างดียิ่งจาก รศ.ดร. ไพศาล สิทธิกรกุล และ ผศ.ดร. วีระวรรณ สิทธิกรกุล รวมทั้งรศ.ดร. สุภาลักษณ์ ปรัชญาสิทธิกุล และ ผศ.ดร. อมร เพชรสม ที่กรุณาร่วมเป็นกรรมการในการสอบ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบคุณ คุณนันทิกา ปานจันทร์ นิสิตปริญญาโท จากสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพ และวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในการวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของสารที่ได้จากการวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณพาณี จักรแสงชัยโชติ คุณศิวาพร ลงยันต์ คุณจีรศักดิ์ ผู้ปลื้ม และคุณนุชนาถ เกษมวงศ์ ที่ช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ และเป็นกำลังใจในการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอน้อมรำลึกถึงพระคุณบิดา ผู้ล่วงลับไปแล้ว และขอขอบพระคุณมารดาและทุก ๆ คนในครอบครัว ที่ให้กำลังใจและสนับสนุนในด้านการศึกษาแก่ผู้วิจัย จนสามารถทำปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี และขอขอบคุณผู้ที่ให้ความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ แต่ไม่ได้กล่าวถึงไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ธิดา อมร

สารบัญ

บทที่ หน้า

1 บทนำ 1

ภูมิหลัง 1

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 7

ชีววิทยาของกุ้งกุลาดำ 15

ความมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า 19

ความสำคัญของการศึกษาค้นคว้า 19

ขอบเขตของการศึกษาค้นคว้า 19

2 วิธีการวิจัย 28

สัตว์ทดลอง 28

อุปกรณ์และสารเคมี 28

วิธีดำเนินการทดลอง 30

การเก็บรวบรวมตากุ้งกุลาดำ 30

การเตรียมสารสกัดจากก้านตาของกุ้งกุลาดำ 30

การเตรียมสารสกัดจากก้านตาก่อนนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยกระบวนการ RP-HPLC (Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography 31

การทำให้บริสุทธิ์ของสารคล้าย CCK จากก้านตาของกุ้งกุลาดำ ด้วยกระบวนการ RP-HPLC 31

การตรวจหาสารคล้าย CCK ในก้านตาของกุ้งกุลาดำ โดยวิธี Dot-ELISA (Dot-Enzyme Linked Immunosorbant Assay)..... 33

การเตรียมเปปไทด์มาตรฐาน 34

วิธีการทดสอบสารคล้าย CCK 34

การหาน้ำหนักโมเลกุลโดย MALDI-TOF-MS (Matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry)..... 35

การวิเคราะห์ข้อมูล 36

บทที่ หน้า

3 ผลการวิจัย 41

4 สรุปและอภิปรายผล 59

บรรณานุกรม 64

ภาคผนวก 72

ประวัติผู้วิจัย 76

บัญชีตาราง

ตาราง **หน้า**

1 การแยกสกัดและทำให้บริสุทธิ์ CCK และสารคล้าย CCK (CCK-LI) ในสัตว์ต่าง ๆ 20
2 ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ด้วยกระบวนการ RP-HPLC 38
3 ลำดับกรดอะมิโนของ CCK และสารคล้าย CCK ในสัตว์ต่าง ๆ 63

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ **หน้า**

1 โครงสร้างภายนอกโดยทั่ว ๆ ไปของกุ้งกุลาดำ 26

2 ลักษณะของกุ้งกุลาดำเพศผู้และเพศเมีย..... 27

3 ขั้นตอนวิธีการเตรียมสารสกัดจากก้านตาของกุ้งกุลาดำ 37

4 ขั้นตอนการตรวจหาสารคล้าย CCK โดยวิธีการของ Dot-ELISA 39

5 ขั้นตอนวิธีการทดสอบสารคล้าย CCK 40

6 รูปแสดงผลของ Dot-ELISA ของเปปไทด์ CCK8 มาตรฐาน 45

7 ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย CCK ด้วยกระบวนการ RP-HPLC 46

8 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากก้านตากุ้งกุลาดำที่ผ่านกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนแรก 47

9 รูปแสดงผลของ Dot-ELISA จากสารสกัดของก้านตากุ้งกุลาดำที่ผ่านกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนแรก และผลการทดสอบสารคล้าย CCK 48

10 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากก้านตาของกุ้งกุลาดำกลุ่มที่ 1 หรือเปปไทด์ I จำนวน 3,000 ก้านตา ที่ผ่านกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 2 49

11 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากก้านตาของกุ้งกุลาดำกลุ่มที่ 1 หรือเปปไทด์ I จำนวน 8,700 ก้านตา ที่ผ่านกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 3 50

12 โครมาโตแกรมการทำให้บริสุทธิ์ของสารคล้าย CCK เปปไทด์ I ที่ผ่านกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 4 51

13 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากก้านตาของกุ้งกุลาดำกลุ่มที่ 2 หรือเปปไทด์ II และ III จำนวน 3,000 ก้านตา ที่ผ่านกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 2 52

14 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากก้านตาของกุ้งกุลาดำกลุ่มที่ 2 หรือเปปไทด์ II และ III จำนวน 3,000 ก้านตา ที่ผ่านกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 3 53

15 โครมาโตแกรมการทำให้บริสุทธิ์ของสารคล้าย CCK เปปไทด์ II ที่ผ่านกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 4 54

ภาพประกอบ **หน้า**

16 โครมาโตแกรมการทำให้บริสุทธิ์ของสารคล้าย CCK เปปไทด์ III ที่ผ่านกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 4 55
17 แมสสเปกตรัมของสารคล้าย CCK เปปไทด์ I 56
18 แมสสเปกตรัมของสารคล้าย CCK เปปไทด์ II 57
19 แมสสเปกตรัมของสารคล้าย CCK เปปไทด์ III 58

บทที่ 1
บทนำ

ภูมิหลัง

การควบคุมการทำงานของระบบต่าง ๆ ในร่างกายของสัตว์กลุ่มครัสตาเซียน (crustacean) เช่น กุ้ง ปู กั้ง และ crayfish ส่วนหนึ่งจะมีการควบคุมโดยระบบต่อมไร้ท่อ (endocrine system) ซึ่งประกอบด้วย neurosecretory cell และ neurohemal organ โดยที่ neurosecretory cell จะเป็นแหล่งที่ทำหน้าที่ผลิตและหลั่งนิวโรฮอร์โมน (neurohormone) ที่สร้างขึ้นและส่งไปตามส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย โดยฮอร์โมนจะหมุนเวียนไปตามกระแสเลือดหรือฮีโมลิมป์ (hemolymph) สำหรับต่อมไร้ท่อที่สำคัญในสัตว์กลุ่มครัสตาเซียน ได้แก่ X-organ ในก้านตา (eyestalk) ประกอบด้วย neurosecretory cell ซึ่งเป็นแหล่งสร้างนิวโรฮอร์โมนส่งไปสะสมที่ต่อมไซนัส (sinus gland) Postcommissural organ (PCO) เป็นแหล่งที่สะสมและหลั่งนิวโรฮอร์โมนที่เกี่ยวกับการเปลี่ยนสีตัว Pericardial organ (PO) เป็นแหล่งที่สะสมและหลั่งนิวโรฮอร์โมนที่กระตุ้นการทำงานของหัวใจ Y-organ เป็นแหล่งที่สร้างฮอร์โมนที่ควบคุมการลอกคราบ (molting hormone) Androgenic gland เป็นแหล่งที่สร้างฮอร์โมนที่ควบคุมการเจริญเติบโตของอวัยวะเพศผู้ รังไข่ (ovary) เป็นแหล่งที่สร้างฮอร์โมนที่ควบคุมการเจริญเติบโตของอวัยวะเพศเมีย (Fingerman. 1987) ในก้านตาของสัตว์กลุ่มครัสตาเซียนเป็นแหล่งสำคัญในการสร้างฮอร์โมนหลายชนิด เช่น ฮอร์โมนที่ยับยั้งการลอกคราบ (molt inhibiting hormone-MIH) (Chang, Bruce and Newcomb. 1987) ฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด (crustacean hyperglycemic hormone-CHH) (Huberman and Aguilar. 1986) ฮอร์โมนที่ควบคุมการกระจายตัวของรงควัตถุในโครมาโตฟอร์ (pigment dispersing hormone-PDH) (Kleinholz and others. 1986) ฮอร์โมนที่ควบคุมการรวมตัวของรงควัตถุในการเปลี่ยนสีตัว (red pigment concentrating hormone-RPCH) (Fernlund. 1974) และฮอร์โมนที่ยับยั้งการพัฒนาการของรังไข่ (vitellogenesis inhibiting hormone-VIH) (Soyez, Deijnen and Martin. 1987) มีรายงานการพบสารคล้ายเปปไทด์ฮอร์โมน (peptide hormone) อีกหลายชนิดในก้านตาสัตว์กลุ่มครัสตาเซียน เช่น FMRFamide, small cardioactive peptide (SCP), substance P, proctolin และ cholecystokinin (CCK) ซึ่งเปปไทด์ฮอร์โมนเหล่านี้อาจทำหน้าที่เป็นสารสื่อประสาท (neurotransmitter) หรือนิวโรโมดูเลเตอร์ (neuromodulator) (Callaway, Masinovsky and Graubard. 1987; Keller. 1992; Schmidt and Ache. 1994; Turrigiano and Selverston. 1989) สำหรับ CCK นั้นเป็นเปปไทด์ฮอร์โมนชนิดหนึ่งที่น่าสนใจซึ่งมีการศึกษาในสัตว์ต่าง ๆ มากมายทั้งในสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังและสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลัง

CCK เป็นเปปไทด์ฮอร์โมนที่พบทั้งในสมองและลำไส้ของสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง ซึ่งจะพบได้หลายรูปแบบ เช่น CCK8, CCK33, CCK39 และ CCK58 จึงมีการกระจายของโมเลกุลรูปแบบต่าง ๆ กันของ CCK ทั้งในบริเวณสมองและลำไส้ โดยในสมองจะพบ CCK8 และ CCK58 มาก ส่วนในลำไส้จะพบ CCK33 และ CCK39 มาก (Eng and Yalow. 1989) และยังพบว่ากรดอะมิโน 5 ตัวสุดท้ายทางด้าน C-terminus (...Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH_2) จะเหมือนกับฮอร์โมนแกสตริน (gastrin) ซึ่งเป็นส่วนของโมเลกุลที่สำคัญในการแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพ จึงทำให้ CCK และแกสตรินมีฤทธิ์ทางชีวภาพใกล้เคียงกัน (Nichols and others. 1988) ดังนั้นการใช้แอนติซีรัมในการตรวจหาตำแหน่งของสารนี้ด้วยวิธีอิมมูโนไซโตเคมิสทรี (immunocytochemistry) จะไม่สามารถแยกแยะระหว่างเปปไทด์ 2 ชนิดนี้ได้ จึงเรียกสารนี้ว่าสารคล้าย CCK (CCK-like substance)

จากรายงานการศึกษาบทบาทของ CCK ในสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังชั้นสูง เช่น ในหนู กระต่าย สุนัข และคน พบว่า CCK มีบทบาทในการควบคุมการเคลื่อนไหวของลำไส้เล็กในหนูตะเภา (Hedner, Persson and Rorsman. 1967) กระตุ้นการบีบตัวของถุงน้ำดีในหนูตะเภาและกระต่าย (Amer. 1968) กระตุ้นการหลั่งเปปซิโนเจน (pepsinogen) จากต่อมในกระเพาะอาหาร (gastric gland) ของกระต่าย (Hersey, May and Schyberg. 1983) ในสุนัข CCK จะมีบทบาทในการกระตุ้นการหลั่งเอนไซม์จากตับอ่อน เพิ่มการไหลของน้ำดีและไบคาร์บอเนต (bicarbonate) จากตับ กระตุ้นการหลั่งอินซูลินจากตับอ่อน และกระตุ้นการหลั่งไบคาร์บอเนตจากกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กส่วนต้น (Stening and Grossman. 1969; Jones and Grossman. 1970; Williams and Champagne. 1979; Konturek and others. 1985) สำหรับบทบาทของ CCK ในคน พบว่า CCK จะกระตุ้นการหดตัวของกระเพาะอาหารและถุงน้ำดี (Cameron, Phillips and Summerskill. 1967) ส่วนการศึกษาบทบาทของฮอร์โมนแกสตรินในสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นสูง เช่น ในสุนัข และคน พบว่าฮอร์โมนนี้จะมีผลในการกระตุ้นการหลั่งน้ำย่อย หรือกรดจากกระเพาะอาหาร (gastric acid) (Gregory and others. 1964) จากการศึกษาบทบาทของ CCK และฮอร์โมนแกสตรินดังที่กล่าวข้างต้น แสดงว่า CCK และฮอร์โมนแกสตรินนี้อาจจะมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่เป็นลักษณะเฉพาะตัวของสัตว์แต่ละชนิด

จากรายงานการตรวจพบสารคล้าย CCK ในบริเวณต่าง ๆ ของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังจนถึงสัตว์มีกระดูกสันหลัง พบว่าสารคล้าย CCK ส่วนใหญ่พบในส่วนของระบบประสาท (nervous system) ของสัตว์ ทั้งในสมอง ทางเดินอาหาร และในก้านตาของสัตว์กลุ่มครัสตาเซียน

ในสัตว์พวกซีเลนเทอเรท (coelenterate) พบสารคล้าย CCK ที่บริเวณเซลล์ประสาทรับความรู้สึก (sensory nerve cell) ในเนื้อเยื่อชั้นนอก (ectoderm) ที่บริเวณปากของไฮดรา *Hydra*

attenuata ส่วนในดอกไม้ทะเล (sea anemone) *Tealia felina* พบสารคล้าย CCK ที่เส้นประสาทภายในมีโซเกลีย (mesoglea) ของบริเวณหนวด (tentacle) และช่องปาก (oral disk) และพบที่เซลล์ประสาทในเนื้อเยื่อชั้นใน (endoderm) ของบริเวณลำตัว สำหรับบทบาทของสารคล้าย CCK ที่พบในไฮดราและดอกไม้ทะเลนั้นยังไม่ทราบเป็นที่แน่ชัด แต่ในไฮดราสารนี้อาจจะทำหน้าที่เป็นสารสื่อประสาทในการตอบสนองต่อการกินอาหาร (Grimmelikhuijzen, Sundler and Rehfeld. 1980)

ส่วนในสัตว์พวกแอนเนลิด (Annelid) เช่น แม่เพรียง (marine worm) *Nereis diversicolor* ได้พบสารตั้งต้นของ CCK (prepro CCK) ในเซลล์ประสาทที่ ganglionic nuclei ชนิดต่าง ๆ ในสมอง และพบที่เส้นใยประสาทในนิวโรไพล์ (neuropile) ส่วนในเส้นประสาทด้านท้อง (ventral nerve cord) พบสารตั้งต้นของ CCK ที่ตัวเซลล์ประสาทในบริเวณส่วนหน้าของเส้นประสาทด้านท้อง (anterior ventral nerve cord) และในบริเวณส่วนกลางของเส้นประสาทด้านท้อง (medial ventral nerve cord) และพบในเส้นประสาทตลอดนิวโรไพล์และที่ส่วนปลายของเส้นประสาทที่แตกไปแต่ละปล้อง (segmentary nerve) นอกจากนี้ยังพบสารนี้ในเซลล์หลายเซลล์ของทางเดินอาหารตอนกลาง (midgut) สำหรับบทบาทของสารนี้ในระบบประสาทจะทำหน้าที่เป็นสารสื่อประสาทและนิวโรโมดูเลเตอร์ ส่วนในลำไส้เล็กจะทำหน้าที่เป็นฮอร์โมน (Guissi-Kadri and others. 1991)

ในสัตว์พวกมอลลัส (mollusc) มีรายงานการตรวจพบสารคล้าย CCK ในหอยทาก *Helix aspersa* โดยพบสารนี้มีตำแหน่งร่วม (colocalization) ในเซลล์ที่สร้างเซอโรโทนิน (serotonin-containing neuron) ในปมประสาทซีรีบรัล (cerebral ganglia) (Osborne, Cuello and Dockray. 1982) ส่วนในหอยนางรมลอย *Pecten maximus* พบสารคล้าย CCK ที่ neurosecretory cell ของปมประสาทซีรีบรัล สารคล้าย CCK นี้อยู่ตรงด้านข้างพูส่วนหน้า (anterior lobe) ของแต่ละปมประสาทซึ่งอยู่ใกล้กับต่อมสร้างน้ำย่อย (digestive gland) และตรงเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของซีรีโบรพีดัล (cerebro-pedal connective) และยังพบสารนี้ประมาณ 5-7 เซลล์ภายในปมประสาทวิสเซอรัล (visceral ganglia) ที่อยู่ใกล้กับกล้ามเนื้อแอดดัคเตอร์ (adductor muscle) ส่วนในอวัยวะเกี่ยวกับการย่อยอาหาร (digestive organ) จะพบสารนี้ตรงส่วนฐานของทิวบูล (tubule) ของต่อมสร้างน้ำย่อยและพบที่บริเวณคิวติเคิล (cuticle) ของ gastric shield และพบบ้างในลูเมน (lumen) ของกระเพาะอาหาร เมื่อทดสอบการเปลี่ยนแปลงปริมาณของสารคล้าย CCK หลังการกินอาหารของหอยพบว่าสารนี้จะมีปริมาณเพิ่มขึ้น แสดงว่าสารนี้จะมีบทบาทในการควบคุมกระบวนการเกี่ยวกับการย่อยอาหารของหอยนางรมลอยนี้ (Donval, Bellon and Wormhoudtt. 1992)

สำหรับสัตว์ในกลุ่มครัสตาเซียน (crustacean) มีรายงานการตรวจพบสารคล้าย CCK ในกุ้งมังกร *Panulirus interruptus* กระจายอยู่ในส่วนของระบบประสาทที่บริเวณกระเพาะอาหาร

(stomatogastric nervous system) ซึ่งสารนี้จะพบที่เส้นประสาทนำส่ง และนิวโรพิล (neuropil) ของปมประสาทที่กระเพาะอาหาร (stomatogastric ganglion) โดยจะพบสารนี้ที่เส้นใยประสาท 1 หรือ 2 เส้นใย หรือกลุ่มมัดเส้นใยประสาทจากเส้นประสาทที่กระเพาะอาหาร (stomatogastric nerve) ไปยังปมประสาทที่กระเพาะอาหารและแขนงที่จะเข้าไปยังปมประสาท และยังพบสารนี้ที่เส้นใยประสาท 1 หรือ 2 เส้นใยในเส้นประสาทที่หลอดอาหารส่วนต้น (superior esophageal nerve) และเส้นประสาทที่เชื่อมต่อจากเส้นประสาทที่กระเพาะอาหารไปยัง commissural ganglia ซึ่งจะพบสารนี้เพียงเล็กน้อยที่นิวโรพิลตรงบริเวณเชื่อมต่อระหว่างเส้นประสาทที่หลอดอาหารส่วนต้นและเส้นประสาทที่กระเพาะอาหาร ส่วนใน commissural ganglia จะพบสารนี้ในนิวโรพิล ตัวเซลล์ประสาท (somata) และเส้นประสาทที่ยื่นไปยังสมองและปมประสาทส่วนท้อง (abdominal ganglia) นอกจากนี้ยังพบสารคล้าย CCK ที่เส้นใยประสาทหลายเส้นใยใน optic nerve ส่วนในสมองจะพบสารนี้ที่เส้นใยประสาท ตัวเซลล์ประสาท และนิวโรพิล สำหรับสารคล้าย CCK ที่พบในกุ้งชนิดนี้จะทำหน้าที่เป็นนิวโรโมดูเลเตอร์ เช่น จะมีบทบาทในการควบคุมการทำงานของลำไส้ (Turrigiano and Selverston. 1989) และพบว่าการเปลี่ยนแปลงระดับของสารคล้าย CCK ในเลือดของกุ้งมังกรจะมีผลต่อการกระตุ้นการทำงานของ gastric mill หลังจากการกินอาหาร โดยพบว่าภายหลังการกินอาหารระดับของสารคล้าย CCK ในฮีโมลิมป์จะเพิ่มขึ้นซึ่งจะกระตุ้นการทำงานของ gastric mill และพบว่าเมื่อฉีด CCK8-SO_4 เข้าไปใน ventral artery ของกุ้งมังกรจะมีผลทำให้ระดับของ CCK ในฮีโมลิมป์สูงขึ้นซึ่งมีผลกระตุ้นการทำงานของ gastric mill ส่วนผลจากการใส่สาร proglumide ซึ่งเป็นตัวยับยั้ง (competitive antagonist) ต่อ CCK พบว่าจะยับยั้งการทำงานของ gastric mill แสดงว่าสารคล้าย CCK จำเป็นต่อการชักนำการทำงานของ gastric mill หลังจากการกินอาหาร (Turrigiano and Selverston. 1990) ต่อมาได้มีการศึกษาโดยนำสารคล้าย CCK ที่แยกสกัดจากกระเพาะอาหารของกุ้งทะเล *Nephrops norvegicus* มาทดสอบกับกุ้ง crayfish *Orconectes limosus* พบว่ามีสารคล้าย CCK บางรูปแบบจะกระตุ้นการหลั่งเอนไซม์ protease จากต่อมทางเดินอาหารส่วนกลาง (midgut gland) ของกุ้ง crayfish นี้ได้ (Favrel and others. 1991) ในการศึกษาถึงแหล่งปรากฏของสารคล้าย CCK ในก้านตาของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* พบว่ามีสารนี้ที่เซลล์ประสาทขนาดใหญ่ จำนวน 9-13 เซลล์อยู่ในบริเวณระหว่าง medulla interna (MI) กับ medulla terminalis (MT) เซลล์เหล่านี้ส่งเส้นใยประสาทไปที่บริเวณต่อมไซนัส ในบางก้านตามีเซลล์ขนาดเล็กติดสีจางเพิ่มขึ้นประมาณ 4-46 เซลล์ในบริเวณเดียวกันนี้ และมี 2-3 เซลล์ในบริเวณ MT จากลักษณะการกระจายของสารคล้าย CCK คาดว่าสารคล้าย CCK จะถูกส่งไปสะสมที่ต่อมไซนัสเพื่อการลำเลียงเข้าสู่กระแสโลหิต จึงอาจเรียกได้ว่าสารคล้าย CCK มีลักษณะเช่นเดียวกับฮอร์โมนทั่วไป

(วีระวรรณ สิทธิกรกุล และคณะ. 2537) ส่วนในปู *Cancer magister* พบสารคล้าย CCK มีอยู่มากในกระเพาะอาหาร ฮีโมลิมป์ และ carapace (Larson and Vigna. 1983) และมีรายงานการพบสารคล้าย CCK ในส่วนของระบบประสาทที่เกี่ยวกับกระเพาะอาหารของปู *Cancer borealis* โดยการใช้แอนติบอดี 3 ชนิดที่ทำปฏิกิริยาต่อ CCK พบว่าจากการใช้แอนติบอดีแต่ละชนิดจะพบสารนี้กระจายแตกต่างกันในระหว่างกลุ่มเซลล์ประสาทของระบบประสาทที่เกี่ยวกับกระเพาะอาหาร จากผลของรายงานนี้แสดงว่าอาจมีสารคล้าย CCK หลายรูปแบบที่พบในส่วนของระบบประสาทที่เกี่ยวกับกระเพาะอาหารของปูชนิดนี้ (Christie and others. 1995)

ในสัตว์พวกแมลง (insect) พบสารคล้าย CCK ในแมลงวัน (blowfly) *Calliphora erythrocephala* โดยพบสารนี้ภายใน median neurosecretory cell ซึ่งอยู่ใน pars intercerebralis และที่บริเวณต่าง ๆ ของสมอง (Duve and Thrope. 1981) ส่วนในแมลงหวี่ *Drosophila melanogaster* และแมลงวัน *Calliphora vomitoria* พบสารคล้าย CCK ในปมประสาทส่วนอก (thoracic ganglia) และปมประสาทส่วนท้อง (Lundquist and Nassel. 1990) นอกจากนี้ยังพบนิวโรเปปไทด์คล้าย CCK สกัดได้จากส่วนหัวของแมลงสาบ *Leucophaea maderae* เรียกว่า leucosulfakinin ซึ่งนิวโรเปปไทด์นี้มีผลทำให้เกิดการหดตัวของทางเดินอาหารตอนปลาย (hindgut) (Nachman and others. 1986a) และยังพบนิวโรเปปไทด์คล้าย CCK อีกชนิดหนึ่งที่แยกมาจากส่วนหัวของแมลงสาบนี้เรียกว่า leucosulfakinin II พบว่านิวโรเปปไทด์นี้ทำให้เกิดการหดตัวของทางเดินอาหารตอนปลายเช่นกัน (Nachman and others. 1986b) ส่วนในแมลงสาบอเมริกา *Periplaneta americana* พบนิวโรเปปไทด์คล้าย CCK 2 ชนิดแยกจาก corpora cardiaca ของแมลงสาบเรียกว่า perisulfakinin และ non-sulfate leucosulfakinin II พบว่า perisulfakinin นั้นจะกระตุ้นการหดตัวของทางเดินอาหารตอนปลาย ส่วน non-sulfate leucosulfakinin II จะไม่กระตุ้นการหดตัวของทางเดินอาหารตอนปลาย (Veenstra. 1989) ในแมลงปอ (odonata) *Aeschna cyanea* พบสารคล้าย CCK ตรงบริเวณโปรโตซีรีบรัม (protocerebrum) จำนวน 20 เซลล์ ปมประสาทใต้หลอดอาหาร (suboesophageal ganglion) จำนวน 15 เซลล์ และพบสารนี้ในไตรโตซีรีบรัม (tritocerebrum), optic lobe และปมประสาทส่วนหน้า (frontal ganglion) ของระบบประสาทที่กระเพาะอาหาร ส่วนใน corpora cardiaca พบสารนี้ภายใน intrinsic cell และปลายแอกซอน (axon) (Andries and others. 1989)

ส่วนสัตว์ในไฟลัมเอคไคโนเดอมาตา (echinodermata) พบสารคล้าย CCK ในระบบประสาทที่ลำไส้ของปลิงทะเล *Holothuria mexicana, Holothuria glaberri* และ *Stichopus badionotus* โดยพบที่เซลล์ของชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันด้านนอก (external connective tissue layer) สารนี้อยู่ในโครงสร้างคล้ายแกรนูล (granule) หรือ เวซิเคิล (vesicle) กระจายตลอดตัวเซลล์ไปถึงใยประสาท

แอกซอนและไปยังกล้ามเนื้อ (circular muscle) และเนื้อเยื่อเกี่ยวพันด้านใน (internal connective tissue) และพบสารนี้ที่ร่างแหของเส้นใยประสาทในชั้นกล้ามเนื้อ (muscle layer) จากการศึกษาพบว่า CCK มีผลในการชักนำการคลายความตึงของกล้ามเนื้อในลำไส้ของปลิงทะเล (Garcia-Arraras, Torres-Avillan and Ortiz-Miranda. 1991)

ในสัตว์พวกโปรโตคอร์เดท (protochordate) เช่น เพรียงหัวหอม *Styela plicata* พบสารคล้าย CCK ในเซลล์ประสาทและเส้นใยประสาทของปมประสาทซีรีบรัล และพบสารนี้กระจายอยู่ในบาง glandular lobule ของ neural gland (Pestarino. 1985) ต่อมามีรายงานการสกัดสารคล้าย CCK จาก neural ganglion ของเพรียงหัวหอม *Ciona intestinalis* และตั้งชื่อสารคล้าย CCK นี้ว่า cionin (Johnsen and Rehfeld. 1990) และเมื่อศึกษาผลของ cionin ต่อเซลล์ที่กระเพาะอาหารส่วน fundus ของสุนัข (canine) และกล้ามเนื้อของกระเพาะปัสสาวะ (gallbladder muscle) ของหมู (porcine) และวัว (bovine) พบว่า cionin จะมีผลในการหลั่ง somatostatin จากเซลล์ที่กระเพาะอาหารส่วน fundus ของสุนัข กระตุ้นการหดตัวของถุงน้ำดีในหมู และมีการแย่งจับกับ CCK radioligand (^{125}I-D-Tyr-Gly-[(Nle^{28,31})-CCK-(26-33)]) ต่อชั้นกล้ามเนื้อที่ถุงน้ำดีของหมูและของวัว ซึ่งผลการแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพของ cionin นี้จะคล้ายคลึงกับ CCK8 มากกว่าแกสตริน แสดงว่า cionin เป็นเปปไทด์ที่มีการออกฤทธิ์คล้ายคลึงกับ CCK มากกว่าแกสตรินในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Schjoldager and others. 1991)

ในสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังมีรายงานตรวจพบสารคล้าย CCK ในปลากระดูกแข็ง (teleost) *Sparus auratus L.* ที่เนื้อเยื่อบุผิวตรงฐานของกระเพาะอาหารส่วนไพโลรัส และลำไส้ส่วนต้น (Elbal and Agulleiro. 1986) ส่วนในต่อมใต้สมองของปลาทอง *Carassius auratus* พบสารคล้าย CCK จำนวนมากที่เส้นใยประสาทภายใน pars distalis ส่วนต้น ซึ่งเส้นใยประสาทนี้กระจายอยู่ระหว่างเซลล์ gonadotroph และ somatotroph และจะพบสารนี้เล็กน้อยใน pars distalis ส่วนหลัง เมื่อนำ sulfated CCK8 มาทดสอบในปลานี้พบว่ามีผลในการกระตุ้นการหลั่ง gonadotropin-II (GtH-II) และ growth hormone (GH) จากต่อมใต้สมอง (Himick. 1993) ต่อมามีรายงานการศึกษาสารคล้าย CCK ในปลาทองจะพบสารนี้ในต่อมใต้สมอง และไฮโปธาลามัส (hypothalamus) ของสมอง และการศึกษา receptor autoradiography พบว่าสารคล้าย CCK จะจับกับรีเซฟเตอร์ที่ต่อมใต้สมองและที่บริเวณของสมอง ส่วนผลจากการฉีด sulfated CCK8 เข้าไปในช่องท้อง หรือ โพรงสมองช่องที่ 3 ของปลานี้ พบว่า CCK จะมีผลในการยับยั้งการกินอาหารและทำให้ GH ในซีรัมเพิ่มขึ้น (Himick and Peter. 1995) และมีรายงานตรวจพบสารคล้าย CCK ที่สมอง กระเพาะอาหาร (antrum) และลำไส้เล็กของกบ *Rana catesbeiana* และเต่า *Pseudomys scripta* (Johnsen and Rehfeld. 1992)

และพวกสัตว์ปีกมีรายงานการพบสารคล้าย CCK ในกระเพาะอาหารของไก่ โดยพบว่าสารนี้สามารถกระตุ้นการหลั่งกรดจากกระเพาะอาหาร แต่ไม่กระตุ้นการหลั่งเอนไซม์จากตับอ่อน (Dimaline, Young and Gregory. 1986)

ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมพบสารคล้าย CCK จำนวนมากที่เส้นประสาทใน neocortex, hippocampus, amygdaloid nuclei, ไฮโปธาลามัส ไขสันหลัง (spinal cord) และในลำไส้ใหญ่ (colon) ของหนูตะเภา (Larsson and Rehfeld. 1979) ส่วนในกระจง (mouse deer) *Tragulus javanicus* จะพบสารคล้าย CCK ที่ลำไส้เล็กตอนต้น (duodenum) และพบเล็กน้อยที่ต่อมบรูนเนอร์ (Brunner gland) (Agungpriyono and others. 1994)

จากรายงานการตรวจพบสารคล้าย CCK พบว่าสารนี้จะกระจายในระบบประสาทส่วนต่าง ๆ ของสัตว์ทั้งในสมอง ทางเดินอาหารของสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลังจนถึงสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง และยังพบในก้านตาของสัตว์กลุ่มครัสตาเซียน ซึ่งสารนี้น่าจะมีความสำคัญต่อการทำงานของระบบต่าง ๆ ในร่างกาย เช่น ระบบย่อยอาหาร ระบบประสาท

เนื่องจากการพบสารคล้าย CCK ในสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลังนี้เป็นสิ่งที่น่าสนใจเพราะถ้าทราบถึงโครงสร้างของเปปไทด์คล้าย CCK รูปแบบต่าง ๆ ก็จะเป็นพื้นฐานในการศึกษาถึงวิวัฒนาการของฮอร์โมนกลุ่มนี้ในอาณาจักรสัตว์ได้ และยังเป็นแนวทางที่จะศึกษาถึงบทบาทการทำงานของสารคล้าย CCK รูปแบบต่าง ๆ นี้ว่ามีบทบาทแตกต่างกันหรือไม่ และการที่มีฮอร์โมนคล้าย ๆ กันเป็นจำนวนหลายรูปแบบนั้นจะมีความสำคัญอย่างไร

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในการศึกษา CCK และสารคล้าย CCK ได้มีรายงานการศึกษาถึงการทำให้บริสุทธิ์และคุณลักษณะของ CCK และสารคล้าย CCK ทั้งในสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลังและสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังดังนี้ (ตารางที่ 1)

ในสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลัง ได้มีการศึกษาสารคล้าย CCK ของสัตว์ในไฟลัมซีเรนเทอราตา โดยนำไฮดรา *Hydra attenuata* และดอกไม้ทะเล *Tealia ferina* มาต้มในน้ำเดือด แล้วนำสารสกัดที่ได้ไปตรวจหาสารคล้าย CCK ด้วยวิธี radioimmunoassay (RIA) พบว่าในไฮดรามีสารนี้ประมาณ 5 เฟมโทโมลต่อตัวของไฮดรา ส่วนในดอกไม้ทะเลมีสารนี้ประมาณ 2 นาโนโมลต่อตัว (Grimmelikhuijzen, Sundler and Rehfeld. 1980)

ในปี 1982 ลาร์ซันและวิกนา (Larson and Vigna. 1982) ได้นำเนื้อเยื่อชนิดต่าง ๆ ของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังบางชนิดมาสกัดด้วยน้ำเดือด แล้วนำสารสกัดที่ได้ไปตรวจหาสารคล้าย CCK ด้วยวิธี RIA พบว่าสัตว์ในไฟลัมซีเลนเทอราตาจะพบสารนี้ที่ทางเดินอาหาร และมีโซเกลียของแอนโทซัว (anthozoa) *Anthopleura xanthogrammica* 184 เฟมโทโมลต่อกรัม สัตว์ในไฟลัมเอคโท-พรอคตา (phylum ectoprocta) พบสารนี้ที่ลำตัวของไบรโอซัว (bryozoa) *Bugula sp.* 541 เฟมโทโมลต่อกรัม และพบสารคล้าย CCK ในสัตว์ไฟลัมแอนนิลิดา (phylum annelida) ได้แก่ ไส้เดือนดิน *Lumbricus terrestris* ที่ระบบประสาทส่วนกลาง 172 เฟมโทโมลต่อกรัม ที่ผนังลำตัว 130 เฟมโท-โมลต่อกรัม และที่ทางเดินอาหารส่วนหน้า 52 เฟมโทโมลต่อกรัม และในพวกโพลีคีตา (poly-chaeta) *Abarenicola pacifica* พบสารนี้ที่ทางเดินอาหาร 324 เฟมโทโมลต่อกรัม สำหรับสัตว์ในไฟลัมอาร์โทโปดา (phylum arthropoda) ในกลุ่มครัสตาเซียนจะพบสารคล้าย CCK ที่หลอดอาหารของปู *Cancer magister* 618 เฟมโทโมลต่อกรัม กระเพาะอาหาร 2,800 เฟมโทโมลต่อกรัม ทาง-เดินอาหารส่วนกลาง 104 เฟมโทโมลต่อกรัม และที่ทางเดินอาหารส่วนปลาย 130 เฟมโทโมลต่อกรัม ในปูแม่หอบ *Upogebia pugettensis* พบสารนี้ในทางเดินอาหาร 150 เฟมโทโมลต่อกรัม ส่วนสัตว์ในกลุ่มพวกเมอโรสโตมาตา (merostomata) ได้แก่ แมงดาทะเล *Limulus polyphemous* พบสารนี้ในทางเดินอาหารส่วนหน้า 40 เฟมโทโมลต่อกรัม ทางเดินอาหารส่วนหลัง (posterior gut) 85 เฟมโทโมลต่อกรัม และระบบประสาทส่วนกลาง 112 เฟมโทโมลต่อกรัม ส่วนสัตว์ในไฟ-ลัมมอลลัสกา (phylum mollusca) พบสารคล้าย CCK ในพวกหอยฝาเดียว *Busycon canaliculatus* ที่ทางเดินอาหาร 55 เฟมโทโมลต่อกรัม hepatopancreas 60 เฟมโทโมลต่อกรัม ไต 73 เฟมโทโมล ต่อกรัม และฮีโมลิมป์ 52 เฟมโทโมลต่อกรัม ส่วนในหอยทากทะเล *Aplysia californica* จะพบสารนี้ที่ทางเดินอาหาร 296 เฟมโทโมลต่อกรัมและที่ระบบประสาทส่วนกลาง 141 เฟมโทโมลต่อกรัม และสัตว์ในไฟลัมคอร์ดาตา (chordata) ได้แก่เพรียงหัวหอม *Styela montereyensis* พบสารนี้ที่ทางเดินอาหาร 616 เฟมโทโมลต่อกรัม และส่วนลำตัว 443 เฟมโทโมลต่อกรัม

ในสัตว์พวกแอนนิลิดมีการศึกษาสารคล้าย CCK ในแม่เพรียง *Nereis diversicolor* โดยนำส่วนโปรสโตเมียม (prostomium) และส่วนลำตัว มาสกัดด้วยน้ำเดือดและกรดอะซิติกเข้มข้น 0.5 โมลต่อลิตร จากนั้นนำสารสกัดส่วนลำตัวไปผ่าน C18 Sep-Pak cartridge และชะสารสกัดออกด้วย 50% ACN / 0.1% TFA นำสารสกัดที่ได้นี้ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการทางโครมาโตกราฟีชนิด affinity chromatography และ RP-HPLC 2 ขั้นตอน ใช้คอลัมน์ ultrasphere (ODS) C18 และระบบตัวทำละลายคือ ACN / TFA สำหรับสารสกัดที่ได้จากส่วนโปรสโตเมียมนั้นนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยกระบวนการ RP-HPLC เพียงอย่างเดียว โดยใช้คอลัมน์และระบบตัวทำละลายเหมือน

กับสารสกัดที่ได้จากส่วนลำตัว แล้วใช้วิธี RIA ในการตรวจหาสารคล้าย CCK ในระหว่างการทำให้บริสุทธิ์ พบว่ามีสารคล้าย CCK อย่างน้อย 4 ชนิดที่เกิดปฏิกิริยาทางอิมมูโน (Smiri, Bulet and Andries. 1992)

ในปี 1992 ดอนแวล, เบลลอน และวอร์มฮูด (Donval, Bellon and Wormhoudt. 1992) ได้ศึกษาสารคล้าย CCK ของหอยนางรมลอย *Pecten maximus* โดยนำเนื้อเยื่อของปมประสาทซีรีบรัล อวัยวะย่อยอาหารได้แก่ ต่อมสร้างน้ำย่อย และ gastric shield และฮีโมลิมป์มาสกัดด้วยน้ำเดือด แล้วนำสารสกัดที่ได้มาหาปริมาณของสารคล้าย CCK ด้วยวิธี RIA พบว่าสารคล้าย CCK ในปมประสาทซีรีบรัลมีประมาณ 115.9 $\pm$ 17.1 พิโคกรัมต่อกรัมของน้ำหนักเปียก อวัยวะย่อยอาหารมีสารนี้ประมาณ 189.9 $\pm$ 15.8 พิโคกรัมต่อกรัมของน้ำหนักเปียก ส่วนในฮีโมลิมป์มีประมาณ 14.2 $\pm$ 8.3 พิโคโมลต่อกรัมของน้ำหนักเปียก เมื่อนำสารสกัดของทั้ง 3 เนื้อเยื่อมาทำให้บริสุทธิ์โดยกระบวนการโครมาโตกราฟีชนิดเจลฟิลเทรชั่น (Sephadex G-50) พบว่าในปมประสาทซีรีบรัลและอวัยวะย่อยอาหาร จะพบสารคล้าย CCK 2 พีค พีคแรกมีน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่า 20,000 ดาลตัน และอีกพีคมีขนาดเล็กน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 1,000 และ 1,500 ดาลตัน ส่วนในฮีโมลิมป์พบสารคล้าย CCK ที่มีขนาดเล็กมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 1,000 ดาลตัน

ส่วนสัตว์พวกครัสตาเชียนมีรายงานการสกัดสารคล้าย CCK ในกุ้งทะเล *Nephrops norvegicus* โดยนำส่วนกระเพาะอาหารของกุ้งมาสกัดด้วยน้ำเดือดและนำสารสกัดไปทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านกระบวนการโครมาโตกราฟีชนิดเจลฟิลเทรชั่น (Sephadex G-50) และใช้วิธี RIA ในการติดตามสารนี้ พบว่าสารคล้าย CCK เกิดปฏิกิริยาทางอิมมูโน 4 พีค (พีค A, C ,D และ E) สารคล้าย CCK ทั้ง 4 พีคนี้จะมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 1,000-2,000 ดาลตัน ซึ่งพีค A จะมีน้ำหนักโมเลกุลสูงและพีค C, D และ E จะมีขนาดเล็ก จากนั้นนำแต่ละแฟรคชั่นของพีค C, D, และ E มาผ่าน C18 Sep-Pak cartridge และชะออกด้วย 70% n-propanol / 0.1% TFA นำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยกระบวนการ RP-HPLC 4 ขั้นตอน โดยใช้คอลัมน์ ODS C18 ใช้ระบบตัวทำละลาย n-propanol / 0.1% TFA คอลัมน์ phenyl microbondapak คอลัมน์ Nucleosil 300 A คอลัมน์ Vydac peptide C18 ตามลำดับ ใช้ระบบตัวทำละลาย ACN / TFA แล้วตรวจหาสารคล้าย CCK โดยวิธี RIA ในระหว่างขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ จะพบสารคล้าย CCK 4 รูปแบบ (เปปไทด์ C1, C2, D1, E) จากการทำให้บริสุทธิ์พบว่าเปปไทด์ D1 นั้นค่อนข้างบริสุทธิ์ ส่วนเปปไทด์ C1, C2, E ยังมีสิ่งปนเปื้อนอยู่ จึงนำเปปไทด์ D1 ไปหาลำดับของกรดอะมิโนโดย applied biosystem gas phase sequenator พบว่าเปปไทด์ D1 ประกอบด้วยกรดอะมิโน 9 หน่วย และมีลำดับของกรดอะมิโนเป็น Ser-Glu-Gly-Gly-Gln-Asp-Phe-Trp-Leu เมื่อนำสารคล้าย CCK ทั้ง 4 เปปไทด์นี้ไปศึกษาฤทธิ์

ทางชีวภาพ พบว่าเปปไทด์ C1 และ E จะกระตุ้นการหลั่งเอนไซม์ protease จากต่อมของทางเดินอาหารตอนกลางของกุ้ง crayfish *Orconectes limosus* (Favrel and others. 1991)

ส่วนการศึกษาสารคล้าย CCK ในกุ้งมังกร *Panulirus interruptus* โดยสกัดจาก pericardial organs (PCOs), stomatogastric ganglia (STGs) และก้านตา ด้วยสารละลายเมทานอลที่ผสม phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) 5 มิลลิโมลต่อลิตร และกรดอะซิติก 0.5 โมลต่อลิตร นำสารสกัดที่ได้จากเนื้อเยื่อทั้ง 3 ชนิดไปตรวจหาสารคล้าย CCK ด้วยวิธี RIA พบว่าสารสกัดจากส่วน PCOs ให้ปริมาณสารคล้าย CCK สูงที่สุด แล้วนำสารสกัดที่ได้จากเนื้อเยื่อทั้ง 3 ชนิดไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยกระบวนการโครมาโตกราฟีชนิด fast protein liquid chromatography (FPLC) โดยใช้คอลัมน์ pepRPCHR 10/10 ระบบตัวทำละลายที่ใช้คือ ACN / TFA และใช้วิธี RIA ติดตามสารคล้าย CCK ในระหว่างการทำให้บริสุทธิ์ พบว่ามีพีคที่เกิดปฏิกิริยาทางอิมมูโน 5 พีค (พีค A-E) เหมือนกันทั้งใน 3 เนื้อเยื่อ แต่ในสารสกัดจาก STGs มีพีคที่เกิดปฏิกิริยาทางอิมมูโนเพิ่มมาอีก 2 พีค (พีค F และ G) เมื่อนำฮีโมลิมป์ก่อนการกินอาหารและหลังการกินอาหาร 1 ชั่วโมงของกุ้งชนิดนี้มาสกัดด้วยสารละลายเมทานอลที่ผสม PMSF 5 มิลลิโมลต่อลิตร และนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยกระบวนการ FPLC และตรวจหาสารคล้าย CCK ด้วยวิธี RIA พบว่าสารสกัดจากฮีโมลิมป์ก่อนการกินอาหารตรวจไม่พบสารคล้าย CCK ส่วนสารสกัดหลังการกินอาหาร 1 ชั่วโมง พบว่ามีพีคที่เกิดปฏิกิริยาทางอิมมูโน 5 พีค (พีค A-E) ในการทดสอบทางชีววิทยาของพีค A-E พบว่ามีพีค E เพียงพีคเดียวที่กระตุ้นการทำงานของ gastric mill จากนั้นนำพีค A-E ไปทำให้บริสุทธิ์ต่อด้วยกระบวนการ HPLC ใช้คอลัมน์ Vydac C18 และระบบตัวทำละลายที่ใช้คือ ACN / TFA พบว่าพีค A-D แต่ละพีคเมื่อผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยกระบวนการ HPLC แล้วจะแยกออกมาเป็นพีคเดียว ส่วนในพีค E จะแยกออกมาเป็น 2 พีคที่เกิดปฏิกิริยาทางอิมมูโน แต่มีเพียงพีคเดียวที่จะกระตุ้นการทำงานของ gastric mill และพบว่าพีค E จะถูกยับยั้งโดยสาร proglumide ซึ่งลดการกระตุ้นการทำงานของ gastric mill แสดงว่าพีค E นี้จะมีบทบาทในการกินอาหารและชักนำการทำงานของ gastric mill ในกุ้งชนิดนี้ (Turrigiano and others. 1994)

มีรายงานการศึกษาสารคล้าย CCK โดยนำเนื้อเยื่อชนิดต่าง ๆ ของปู *Cancer magister* มาสกัดด้วยน้ำเดือด และตรวจหาสารคล้าย CCK ด้วยวิธี RIA พบว่าสารคล้าย CCK มีอยู่มากในส่วนต้นของกระเพาะส่วนคาร์ดิแอค (anterior cardiac stomach) 13 พิโคโมลต่อกรัม ที่ gastric mill 4.6 พิโคโมลต่อกรัม ที่กระเพาะอาหารส่วนไพโลรัส 2.3 พิโคโมลต่อกรัม ที่ carapace 2.6 พิโคโมลต่อกรัม และฮีโมลิมป์ 109 พิโคโมลต่อกรัม แล้วนำสารสกัดจากส่วนกระเพาะอาหาร carapace และฮีโมลิมป์นี้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยกระบวนการโครมาโตกราฟีชนิดเจลฟิลเทรชั่น (Sephadex

G-50 superfine) และใช้วิธี RIA ในการติดตามสารคล้าย CCK จะพบเปปไทด์ขนาดใหญ่ที่เกิดปฏิกิริยาทางอิมมูโนในสารสกัดส่วนกระเพาะอาหาร ส่วนสารสกัดจาก carapace และฮีโมลิมป์จะพบเปปไทด์ขนาดเล็กที่เกิดปฏิกิริยาทางอิมมูโน เมื่อนำสารสกัดจากกระเพาะอาหารมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยกระบวนการโครมาโตกราฟีชนิด anion exchange chromatography (DEAE cellulose (DE-53)) และใช้วิธี RIA ในการติดตามสารในระหว่างการทำให้บริสุทธิ์ จะพบพีคใหญ่ 3 พีค (พีค II, III, IV) แล้วนำสารคล้าย CCK ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์นี้ไปศึกษาคุณสมบัติทางชีววิทยา พบว่าในพีค III จะยับยั้งการจับกันของ CCK33 กับรีเซฟเตอร์ของ CCK ในสมองหนู แต่ไม่ยับยั้งการจับกันของ CCK33 กับรีเซฟเตอร์ของ CCK ในตับอ่อนของหนู ส่วนในพีค II และ IV ไม่สามารถยับยั้งการจับกัน ของ CCK33 กับรีเซฟเตอร์ของ CCK ทั้งในสมองและตับอ่อนของหนู และพบว่าสารคล้าย CCK ทั้ง 3 พีคนี้ไม่สามารถกระตุ้นการหลั่งกรดจากกระเพาะอาหาร และการหลั่งเอนไซม์ amylase จากตับอ่อนของหนู จากผลเหล่านี้แสดงว่าสารคล้าย CCK ของปูชนิดนี้อาจมีโครงสร้างคล้ายกับแกสตรินและ CCK แต่จะแตกต่างกันที่ลำดับของกรดอะมิโนตรงส่วน C-terminus ซึ่งเป็นส่วนแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพของแกสตรินและ CCK (Larson and Vigna. 1983)

ในสัตว์พวกแมลง มีรายงานการศึกษาสารคล้าย CCK โดยการนำเอาส่วนหัวของแมลงวัน *Calliphora vomitoria* มาสกัดด้วยน้ำเดือด แล้วนำสารสกัดที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยกระบวนการทางโครมาโตกราฟีชนิด immunoaffinity chromatography และตรวจหาสารคล้าย CCK ด้วยวิธี RIA พบว่ามีสารนี้ประมาณ 1.9 $\pm$ 0.6 พิโคโมลต่อกรัม จากนั้นนำไปทำให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นโดยกระบวนการโครมาโตกราฟีชนิดเจลฟิลเทรชั่น (Sephadex G-50) แล้วใช้วิธี RIA ในการติดตามสารในระหว่างการทำให้บริสุทธิ์ จะพบพีค 2 พีคที่เกิดปฏิกิริยาทางอิมมูโนจากการแยกโดยเจลฟิลเทรชั่น (Dockray, Duve and Thorpe. 1981) ส่วนในแมลงสาป *Leucophaea maderae* ได้นำส่วนหัวมาสกัดด้วยสารละลายเมทานอล-กรดอะซิติก (เมทานอล : กรดอะซิติก : น้ำ - 90 : 1 : 9) นำสารสกัดที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยกระบวนการ HPLC 4 ขั้นตอน โดยใช้คอลัมน์ 4 ชนิด คือ Waters μBondapakphenyl, Rainin Microsorb C1, Techsphere 3 C18 และ Waters I-125 Protein-Pac ตามลำดับ ใช้ระบบตัวทำละลาย 1 ระบบคือ ACN / TFA จากการทำให้บริสุทธิ์ในแต่ละขั้นตอน จะตรวจหาสารคล้าย CCK ด้วยวิธีทางชีวภาพโดยดูผลการเปลี่ยนแปลงความถี่ในการหดตัวของทางเดินอาหารตอนปลายของแมลงสาป นำแฟรคชั่นที่บริสุทธิ์แล้วไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบของกรดอะมิโนโดย microsequencing analysis พบว่าเปปไทด์นี้ประกอบด้วยกรดอะมิโน 11 หน่วย และมีลำดับโครงสร้างของกรดอะมิโนเป็น Glu-Gln-Phe-Glu-Asp-Tyr-Gly-His-Met-Arg-Phe-NH_2 จากการหา tyrosine sulfate (Tyr(SO_3)) พบว่ามีโครงสร้างของกรดอะมิโนที่สมบูรณ์เป็น

Glu-Gln-Phe-Glu-Asp-Tyr(SO_3)-Gly-His-Met-Arg-Phe-NH_2 และเรียกชื่อนิวโรเปปไทด์นี้ว่า leuco-sulfakinin (Nachman and others. 1986a) และจากการสกัดและผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีเดียวกันนี้ในส่วนหัวของแมลงสาป *Leucophaea maderae* พบนิวโรเปปไทด์อีกชนิดหนึ่งซึ่งถูกบล็อคที่ปลาย N-terminus ด้วย pyroglutamic acid และหาลำดับกรดอะมิโนโดย microsequencing analysis พบว่าประกอบด้วยกรดอะมิโน 10 หน่วย และมีลำดับของกรดอะมิโนเป็น pGlu-Ser-Asp-Asp-Tyr-Gly-His-Met-Arg-Phe-NH_2 และจากการหา tyrosine sulfate พบว่ามีโครงสร้างที่สมบูรณ์เป็น pGlu-Ser-Asp-Asp-Tyr(SO_3)-Gly-His-Met-Arg-Phe-NH_2 และเรียกชื่อนิวโรเปปไทด์นี้ว่า leuco-sulfakinin II (Nachman and others. 1986b)

การศึกษาในแมลงสาปอเมริกัน *Periplaneta americana* โดยใช้ส่วน corpora cardiaca มาสกัดด้วยสารละลาย Bennett's mixture ซึ่งประกอบด้วย 1% NaCl, 5% formic acid, 1% trifluoro-acetic acid (TFA) และ 1M HCl ละลายในน้ำและเติม thiodiglycol ลงไป 12 ไมโครลิตร แล้วนำสารสกัดที่ได้ไปผ่าน C18 Sep-Pak cartridge ชะสารสกัดด้วย 32% ACN / 0.1%TFA นำไปทำให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นด้วยกระบวนการ HPLC โดยใช้คอลัมน์ Spherisorb ODS-II ใช้ระบบตัวทำละลาย 2 ระบบคือ ACN / HFBA และ ACN / TFA ตรวจหาสารคล้าย CCK ด้วยวิธีทางชีวภาพโดยดูผลจากการหดตัวของทางเดินอาหารตอนปลาย พบนิวโรเปปไทด์ 2 ชนิด เมื่อนำไปวิเคราะห์หาลำดับโดย automated gas phase seguencing และหา tyrosine sulfate พบว่าประกอบด้วยกรดอะมิโน 11 หน่วย และมีลำดับโครงสร้างของกรดอะมิโนเป็น Glu-Gln-Phe-Asp-Asp-Tyr(SO_3)-Gly-His-Met-Arg-Phe-NH_2 เรียกชื่อนิวโรเปปไทด์นี้ว่า perisulfakinin ส่วนนิวโรเปปไทด์อีกชนิดหนึ่งปลาย N-terminus ถูกบล็อคเป็น pyroglutamic acid นิวโรเปปไทด์นี้จะไม่พบหมู่ซัลเฟตที่กรดอะมิโนไทโรซีนซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโน 10 หน่วย และมีลำดับโครงสร้างของกรดอะมิโนเป็น pGlu-Ser-Asp-Asp-Tyr-Gly-His-Met-Arg-Phe-NH_2 เรียกว่า non-sulfate leucosulfakinin II (Veenstra. 1989)

ในสัตว์พวกโปรโตคอร์เดต (protochordate) โดยใช้ส่วน neural ganglion ของ *Ciona intestinalis* มาสกัดด้วยน้ำเดือด และนำสารสกัดที่ได้ไปผ่าน C18 Sep-Pak cartridge แล้วชะสารสกัดด้วย 35% ACN / 1% acetic acid จากนั้นนำไปผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ด้วยกระบวนการโครมาโตกราฟีชนิด ion exchange chromatography (Mono Q column) และ RP-HPLC ใช้คอลัมน์ Vydac C4 ใช้ระบบตัวทำละลายคือ ACN / TFA และใช้วิธี RIA ติดตามสารคล้าย CCK ในระหว่างขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ นำไปหาลำดับกรดอะมิโนโดย automated Edman degradation พบว่าประกอบด้วยกรดอะมิโน 8 หน่วย และมีลำดับของกรดอะมิโนเป็น Asn-Tyr-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH_2 เมื่อนำเปปไทด์ที่ได้ไปย่อยด้วยเอนไซม์ aminopeptidase และวิเคราะห์กรดอะมิโน

โดย aminoquant analyzer พบว่าจะมีหมู่ซัลเฟตที่กรดอะมิโนไทโรซีนทั้งสองหน่วย ดังนั้นโครงสร้างที่สมบูรณ์จะเป็น Asn-Tyr(SO_3)-Tyr(SO_3)-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH_2 และตั้งชื่อสารคล้าย CCK นี้ว่า cionin (Johnsen and Rehfeld. 1990)

ในสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังมีรายงานการสกัดสารคล้าย CCK ในปลาฉลาม *Squalus acanthias* โดยนำส่วนของชั้นกล้ามเนื้อ และชั้นมิวโคซ่า (mucosa layer) ของกระเพาะอาหารส่วนคาร์ดิแอค กระเพาะอาหารส่วนไพโลรัส ลำไส้ และไส้ตรง (rectum) มาสกัดด้วยน้ำเดือดและกรดอะซิติกเข้มข้น 0.5 โมลต่อลิตรแล้วตรวจหาสารคล้าย CCK ด้วยวิธี RIA พบว่าในการสกัดด้วยน้ำเดือดจะให้ปริมาณสารคล้าย CCK สูงกว่าการสกัดด้วยกรดอะซิติก และสารคล้าย CCK จะพบทั้งในส่วนของชั้นกล้ามเนื้อและชั้นมิวโคซ่าของส่วนลำไส้ทั้งหมด ซึ่งสารนี้จะพบมากในชั้นมิวโคซ่าของลำไส้ ส่วนในกระเพาะอาหารส่วนไพโลรัสจะพบสารนี้ในปริมาณน้อยและไม่พบสารนี้ในกระเพาะอาหารส่วนคาร์ดิแอค นำสารที่สกัดด้วยน้ำเดือดจากชั้นมิวโคซ่าของลำไส้มาผ่านคอลัมน์ DEAE-52 ติดตามสารคล้าย CCK ด้วยวิธี RIA พบว่ามีสารคล้าย CCK หลายแฟรคชั่นที่เกิดปฏิกิริยาทางอิมมูโน (Aldman, Jonsson and Jensen.1989)

มีรายงานการสกัดสารคล้าย CCK ในกบ *Rana catesbeiana* และเต่า *Pseudomys scripta* โดยนำส่วนสมอง กระเพาะอาหาร และลำไส้เล็กมาสกัดด้วยน้ำเดือด แล้วนำสารสกัดที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยกระบวนการทางโครมาโตกราฟีชนิดเจลฟิลเทรชั่น (Sephadex G-50 superfine) และ anion exchange chromatography (Mono Q column) ตรวจหาสารคล้าย CCK ด้วยวิธี RIA พบว่าในสัตว์ทั้ง 2 ชนิดจะมีเปปไทด์ขนาดเล็กที่เกิดปฏิกิริยาทางอิมมูโนในส่วนของสมอง ส่วนที่กระเพาะอาหาร และลำไส้เล็กจะมีเปปไทด์ขนาดใหญ่ จากนั้นนำเปปไทด์ขนาดใหญ่ที่ได้จากส่วนกระเพาะอาหารของสัตว์ทั้ง 2 ชนิด มาทำให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นด้วยกระบวนการ RP-HPLC โดยใช้ระบบที่แตกต่างกัน 5 ระบบ คือ ระบบ A1 ใช้คอลัมน์ Polygosil C4 ระบบตัวทำละลายที่ใช้คือ ethanol / TFA ระบบ A2 ใช้คอลัมน์ Aquapore-phenyl ระบบตัวทำละลายที่ใช้คือ ACN / TFA ระบบ A3 คอลัมน์ที่ใช้คือ Vydac C4 และใช้ระบบตัวทำละลายเดียวกันกับระบบ A2 ระบบ A4 ใช้คอลัมน์ Vydac C4 เช่นกันแต่ระบบตัวทำละลายที่ใช้คือ ACN / ammonium acetate ระบบ A5 ใช้คอลัมน์ Vydac C8 ระบบตัวทำละลายที่ใช้คือ ACN / TFA และระบบ B ใช้ anion exchange chromatography (Mono Q column) แล้วติดตามสารคล้าย CCK ด้วยวิธี RIA ในขั้นตอนระหว่างการทำให้บริสุทธิ์ จากนั้นนำไปหาลำดับกรดอะมิโนโดย automatic protein sequencer พบว่าเปปไทด์ที่ทำให้บริสุทธิ์จากส่วนกระเพาะอาหารของกบประกอบด้วยกรดอะมิโน 47 หน่วย และมีลำดับของกรดอะมิโนเป็น Asp-Leu-Leu-Ala-Ser-Leu-Thr-His-Glu-Gln-Lys-Gln-Leu-Ile-Met-Ser-Gln-

Leu-Leu-Pro-Glu-Leu-Leu-Ser-Glu-Leu-Ser-Asn-Ala-Glu-Asp-His-Leu-His-Pro-Met-Arg-Asp-Arg-Asp-Tyr-Ala-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH_2 และมีหมู่ซัลเฟตเกาะอยู่ที่กรดอะมิโนไทโรซีนในตำแหน่งที่ 41 ส่วนเปปไทด์ที่ทำให้บริสุทธิ์จากส่วนกระเพาะอาหารของเต่าประกอบด้วยกรดอะมิโน 52 หน่วย และมีลำดับของกรดอะมิโนเป็น Asp-Leu-Leu-Glu-Ala-Leu-Ser-Gln-Asp-Gln-Lys-Leu-Leu-Met-Ala-Lys-Phe-Leu-Pro-His-Ile-Tyr-Ala-Glu-Leu-Ala-Asn-Arg-Glu-Gly-Asn-Trp-His-Glu-Asp-Ala-Ala-Leu-Arg-Pro-Leu-His-Asp-His-Asp-Tyr-Pro-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH_2 และไม่มีหมู่ซัลเฟตเกาะที่กรดอะมิโนไทโรซีน (Johnsen and Rehfeld. 1992)

ในสัตว์ปีกมีรายงานการสกัดสารคล้าย CCK ในกระเพาะอาหารของไก่ โดยใช้น้ำเดือดแล้วนำสารสกัดไปผ่านกระบวนการโครมาโตกราฟีชนิดเจลฟิลเทรชั่น (Sephadex G-50) และ RP-HPLC ใช้คอลัมน์ Water μBondapak C18, Techsil C18 และ Vydac C18 ระบบตัวทำละลายที่ใช้คือ ACN ตรวจหาสารคล้าย CCK ด้วยวิธี RIA และหาลำดับของกรดอะมิโนโดย applied bio-system gas phase sequenator พบว่ามีกรดอะมิโน 36 หน่วย และมีลำดับของกรดอะมิโนเป็น Phe-Leu-Pro-His-Val-Phe-Ala-Glu-Leu-Ser-Asp-Arg-Lys-Gly-Phe-Val-Gln-Gly-Asn-Gly-Ala-Val-Glu-Ala-Leu-His-Asp-His-Phe-Tyr-Pro-Asp-Trp-Met-Asp-Phe-NH_2 (Dimaline, Young and Gregory. 1986)

มีรายงานการศึกษาการทำให้บริสุทธิ์ของ CCK8 จากสมองของกระต่ายและหนูตะเภา โดยนำมาสกัดด้วยเมทานอล แล้วนำสารสกัดไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยกระบวนการโครมาโตกราฟีชนิด anion exchange chromatography (QMA Sep-Pak) และ HPLC ใช้คอลัมน์ Nova C18 ระบบตัวทำละลายที่ใช้คือ ACN / TFA และใช้วิธี RIA ในการติดตามสาร นำไปหาลำดับของกรดอะมิโนโดย gas phase sequencer พบว่า CCK8 จากสมองของกระต่ายมีลำดับกรดอะมิโนเป็น Asp-Tyr-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH_2 ส่วนในสมองของหนูตะเภา CCK8 มีลำดับกรดอะมิโนเป็น Asp-Tyr-Val-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH_2 (Eng and Yalow. 1987) และมีการศึกษา CCK ในสมองหมู โดยการนำสมองของหมูมาสกัดด้วยน้ำเดือด และกรดอะซิติก แล้วนำไปผ่านกระบวนการโครมาโตกราฟี โดยใช้ Sephadex G-25, ion exchange chromatography (CM-cellulose), Sephadex G-50 และ RP-HPLC 2 ขั้นตอน ใช้คอลัมน์ μBondapak C18 ระบบตัวทำละลายที่ใช้ คือ ethanol / acetic acid และ ACN / TFA และใช้วิธีทางชีวภาพในการตรวจหา CCK โดยดูการหดตัวของถุงน้ำดีในหนูตะเภา นำไปหาลำดับกรดอะมิโนโดย Beckman 121 M amino acid analyzer พบว่ามีกรดอะมิโน 58 หน่วย และมีลำดับของกรดอะมิโนเป็น Ala-Val-Gln-Lys-Val-Asp-Gly-Glu-Ser-Arg-Ala-His-Leu-Gly-Ala-Leu-Leu-Ala-Arg-Tyr-Ile-Gln-Gln-Ala-Arg-Lys-Ala-Pro-Ser-Gly-Arg-Val-Ser-Met-Ile-Lys-

Asn-Leu-Gln-Ser-Leu-Asp-Pro-Ser-His-Arg-Ile-Ser-Asp-Arg-Asp-Tyr(SO_3)-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH_2 (Tatemoto and others. 1984)

ในปี 1991 สิทธิกรกุล สเตรทตัน และคาวเดน (Sithigorngul, Stretton and Cowden. 1991) ได้พัฒนาวิธี Dot-ELISA ในการติดตามและตรวจหาเปปไทด์ฮอร์โมนที่มีขนาดเล็กและมีปริมาณน้อยในระดับเฟมโทโมลหลังจากผ่านการแยกสารด้วยกระบวนการ RP-HPLC แล้ว วิธีการนี้เป็นวิธีที่ทำได้ง่าย สะดวก ไม่ต้องใช้เครื่องมือซับซ้อน และไม่ต้องใช้สารกัมมันตภาพรังสีที่ราคาแพงและอันตรายเหมือนวิธี RIA ซึ่งสามารถใช้วิธีการนี้ในการติดตามสารคล้าย FMRFamide และสารคล้าย CCK ซึ่งเป็นนิวโรเปปไทด์ที่มีขนาดเล็กและมีปริมาณน้อยจากพยาธิไส้เดือน *Ascaris suum* ในระหว่างการทำให้บริสุทธิ์ด้วยกระบวนการ HPLC ได้สำเร็จ

จากรายงานการศึกษาการทำให้บริสุทธิ์ของสารคล้าย CCK และโครงสร้างของลำดับกรดอะมิโนของสารนี้ในสัตว์ต่าง ๆ ตั้งแต่สัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลังจนถึงสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง พบว่าสารนี้ส่วนใหญ่จะพบในส่วนสมอง ทางเดินอาหาร และในก้านตาของสัตว์กลุ่มครัสตาเซียน แสดงว่าสารนี้จะมีบทบาทสำคัญต่อระบบการทำงานของร่างกายในสัตว์เหล่านี้

จากรายงานการตรวจพบสารนี้ในก้านตาของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* ด้วยวิธีอิมมูโนไซโตเคมิสทรี โดยพบสารนี้ที่เซลล์ประสาทในบริเวณระหว่าง medulla interna กับ medulla terminalis ของก้านตากุ้งกุลาดำ (วีระวรรณ สิทธิกรกุล และคณะ. 2537) จึงเป็นที่น่าสนใจในการศึกษาการทำให้บริสุทธิ์ของสารคล้าย CCK ในก้านตาของกุ้งกุลาดำ เพื่อนำไปหาโครงสร้างลำดับของกรดอะมิโนอันเป็นพื้นฐานในการศึกษาบทบาทและการทำงานของนิวโรเปปไทด์นี้ต่อไป ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงเป็นการแยกและการทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย CCK จากก้านตาของกุ้งกุลาดำ โดยกระบวนการ RP-HPLC ระบบต่าง ๆ ประกอบกับการใช้วิธี Dot-ELISA ในการติดตามสารคล้าย CCK ในแฟรคชั่นต่าง ๆ หลังจากผ่านการแยกในแต่ละขั้นตอนของกระบวนการ RP-HPLC ซึ่งคาดว่าจะสามารถทำได้อย่างมีประสิทธิภาพและรวดเร็ว เพราะวิธี Dot-ELISA เป็นวิธีที่มีความไว (sensitive) สูงเทียบเท่ากับ RIA แต่ไม่สิ้นเปลือง และไม่มีอันตรายเพราะไม่ต้องใช้สารกัมมันตภาพรังสี (Sithigorngul, Stretton and Cowden. 1991)

ชีววิทยาของกุ้งกุลาดำ

กุ้งกุลาดำเป็นกุ้งทะเลชนิดหนึ่ง มีขนาดใหญ่ มีชื่อเป็นภาษาอังกฤษว่า giant tiger prawn และมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Penaeus monodon* กุ้งชนิดนี้อยู่ในวงศ์ Penaeidae (Dore and Frimodt. 1987) ถิ่นอาศัยของกุ้งกุลาดำ ได้แก่ น่านน้ำแถบไต้หวัน ไทย มาเลเซีย อินโดนีเซีย

ฟิลิปปินส์ และพบมากที่ออสเตรเลียและอินเดีย (วัลลภ คงเพิ่มพูน. 2531) สำหรับประเทศไทย พบกุ้งชนิดนี้มากที่บริเวณนอกฝั่งทะเลจังหวัดชุมพรถึงนครศรีธรรมราช และทางด้านทะเลอันดามันบริเวณนอกฝั่งของจังหวัดระนองและภูเก็ต (ปัญญา สุวรรณสมุทร. 2534) กุ้งชนิดนี้อยู่ในเขตร้อนชอบอาศัยอยู่ในบริเวณน้ำลึกห่างออกจากฝั่ง และชอบพื้นทะเลที่เป็นดินทราย สามารถทนอยู่ในน้ำที่มีอุณหภูมิสูง และความเค็มต่ำ เช่น บริเวณป่าชายเลน (วัลลภ คงเพิ่มพูน. 2531)

การจัดลำดับหมวดหมู่ทางอนุกรมวิธานของกุ้งกุลาดำ มีการจัดลำดับ ดังนี้ (Holthuis. 1980)

Phylum	Arthropoda
Class	Crustacea
Subclass	Malacostraca
Order	Decapoda
Suborder	Natantia
Infraorder	Penaeidae
Family	Penaeidae
Genus	Penaeus
Species	monodon

ลักษณะทั่วไปของกุ้งกุลาดำ

กุ้งกุลาดำเป็นกุ้งที่มีการเจริญเติบโตรวดเร็ว ในขณะที่ยังมีชีวิตอยู่ลำตัวจะเป็นสีม่วงแดง มีแถบสีน้ำตาลหรือดำพาดขวาง ลำตัวเป็นปล้อง ๆ โคนขาว่ายน้ำมีแถบสีเหลืองเป็นปล้อง ๆ เปลือกหัวเกลี้ยงไม่มีขน หนวดมีสีดำไม่มีลาย ฟันกรีด้านบนมี 7-8 ซี่ ด้านล่างมี 3 ซี่ ร่องข้างกรีทั้งสองด้านมีลักษณะแคบและยาวไม่ถึงฟันกรีอันสุดท้าย ที่ขาเดินคู่ที่ 5 ไม่มีระยางค์อันนอก (วัลลภ คงเพิ่มพูน. 2531) ลักษณะที่สำคัญของกุ้งกุลาดำโดยทั่วไป คือ ลำตัวเป็นข้อปล้องมีทั้งหมดประมาณ 19 ปล้อง แต่ละปล้องมีระยางค์ 1 คู่ ระยางค์แต่ละคู่มีหน้าที่แตกต่างกันออกไป ลำตัวแบ่งออกเป็น 3 ส่วนใหญ่ ๆ คือ ส่วนหัว ส่วนอก และลำตัว ส่วนหัวมี 5 ปล้องแต่รวมเป็นปล้องเดียวมีเปลือกคลุม เปลือกหุ้มตัวตอนหน้าสุดของปล้องที่หนึ่งจะยื่นเป็นฟันแหลมไปข้างหน้าเรียกว่า "กรี" ใต้กรีมีตา 1 คู่ ปากกุ้งอยู่ระหว่างขากรรไกร ส่วนหัวมีระยางค์ 5 คู่ สองคู่แรก

เป็นหนวดใช้ในการสัมผัส ระยางค์คู่ที่ 3 ได้แก่ ขากรรไกรล่าง มีหน้าที่ในการขบเคี้ยวอาหาร ส่วนระยางค์คู่ที่ 4 และคู่ที่ 5 เป็นขากรรไกรบนมีหน้าที่เช่นเดียวกับขากรรไกรล่าง ส่วนอกมี 8 ปล้อง ได้แก่ ปล้องที่ 6-13 ระยางค์ 3 คู่แรก (คู่ที่ 6, 7 และ 8) อยู่บนอก เรียก maxilliped มีหน้าที่ช่วยในการกินอาหาร ระยางค์คู่ที่ 9, 10 และ 11 มีลักษณะเป็นก้าม ก้ามแต่ละคู่จะมีขนาดและความยาวใกล้เคียงกันซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของกุ้งทะเลในวงศ์ Penaeidae ระยางค์ 3 คู่นี้มีหน้าที่ช่วยในการจับฉวยอาหารเข้าปากหรือป้องกันตัวเมื่อมีภัย ส่วนระยางค์คู่ที่ 12 และ 13 เป็นขาใช้สำหรับเดิน เคลื่อนไหว และทำความสะอาดตัว และในส่วนลำตัวมี 6 ปล้อง เปลือกปล้องท้องอันที่สองไปทับปล้องแรก ระยางค์คู่ที่ 14, 15, 16, 17 และ 18 มีลักษณะคล้ายใบพายใช้สำหรับว่ายน้ำ ส่วนระยางค์คู่ที่ 19 หรือหาง ประกอบด้วยแพนหางและหางรูปพัด สามารถยกขึ้นลงได้ตามต้องการ (บรรจง เทียนส่งรัศมี. 2530; บังอร ศรีมุกดา. 2530) (ภาพประกอบ 1)

วงจรชีวิตของกุ้งกุลาดำ

กุ้งกุลาดำมีอายุประมาณ 18-24 เดือน วางไข่ในทะเลที่ระดับน้ำลึกประมาณ 30-40 เมตร ใกล้กับพื้นดิน กุ้งกุลาดำขนาด 50-150 กรัม จะวางไข่ประมาณ 1,000,000-1,200,000 ฟอง ไข่ของกุ้งในตระกูล Penaeus โดยทั่วไปจะหนักมากกว่าน้ำทะเลเล็กน้อย จึงมักจม แต่บางแห่งกระแสน้ำอาจจะพัดพาเอาไข่บางส่วนขึ้นมายังผิวน้ำได้ ไข่ที่ผสมแล้วจะเจริญและฟักออกมาเป็นตัวภายในเวลาประมาณ 15 ชั่วโมง จากนั้นกุ้งวัยอ่อนจะพัฒนา และเปลี่ยนรูปร่างไปตามขั้นตอน และเมื่อถึงบริเวณชายฝั่งก็จะหากินอยู่ในบริเวณนี้จนกระทั่งโตเต็มวัยจึงอพยพกลับสู่ทะเลและผสมพันธุ์วางไข่ต่อไป (บรรจง เทียนส่งรัศมี. 2330; วัลลภ คงเพิ่มพูน. 2531)

การสืบพันธุ์

กุ้งในตระกูล *Penaeus* จะมีการผสมพันธุ์ก็ต่อเมื่อตัวเมียได้ลอกคราบแล้ว และอยู่ในสภาพที่เปลือกยังนิ่มอยู่เท่านั้น ตัวผู้เมื่อเห็นตัวเมียลอกคราบใหม่ ๆ จะพยายามว่ายน้ำเข้าประกบ ในระยะนี้ถ้ากุ้งตัวผู้หิวจัด กุ้งตัวผู้อาจจะกินกุ้งตัวเมียก็ได้ แต่ถ้าอาหารอุดมสมบูรณ์ก็จะผสมพันธุ์ กุ้งตัวผู้จะพยายามเคล้าเคลียและเร่งเร้าตัวเมียให้ว่ายน้ำไปด้วยกัน กุ้งทั้งคู่จะว่ายน้ำขนานกันไปโดยกุ้งตัวผู้จะอยู่ข้างล่างและตัวเมียอยู่ข้างบน เมื่อได้จังหวะกุ้งตัวผู้จะหงายท้องชิดตัวเมียพร้อมกับถ่ายน้ำเชื้อ (sperm) ให้กุ้งตัวเมีย น้ำเชื้อตัวผู้จะถูกเก็บไว้ในถุงน้ำเชื้อของตัวเมียเพื่อรอโอกาสที่จะผสมกับไข่ในขณะวางไข่ต่อไป (บรรจง เทียนส่งรัศมี. 2530; บังอร ศรีมุกดา. 2530; วัลลภ คงเพิ่มพูน. 2531)

กุ้งชนิดนี้ส่วนมากจะผสมพันธุ์กันในเวลากลางคืน โดยตัวผู้จะสอดอวัยวะเพศที่เรียกว่า พีเทสมา (petasma) เข้าไปในอวัยวะเพศเมียที่เรียกว่า ทีไลคัม (thelycum) พร้อมกับปล่อยน้ำเชื้อเข้าไปเก็บไว้ในถุงเก็บน้ำเชื้อเพื่อรอโอกาสที่จะผสมกับไข่ในระยะหลัง เมื่อไข่แก่และสุกเต็มที่ก็จะถูกขับออกมาทางช่องเปิดตรงโคนขาเดินคู่ที่ 3 และจะได้รับการผสมกับน้ำเชื้อตัวผู้ซึ่งจะไหลออกจากถุงเก็บน้ำเชื้อทางรูเปิดเล็ก ๆ ที่บริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 4 ของตัวเมีย แม่กุ้งจะใช้เวลาวางไข่ครั้งหนึ่ง ๆ ประมาณ 3-5 นาที ไข่ที่ผสมแล้วขณะที่ปล่อยสู่น้ำทะเลใหม่ ๆ จะมีลักษณะกลม มีเมือกห่อหุ้ม และจะค่อย ๆ เปลี่ยนเป็นรูปผลึกในระยะหลัง ระยะนี้ไข่จะมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.25 มิลลิเมตร แล้วไข่จะค่อย ๆ พัฒนาจนฟักเป็นตัว จากนั้นลูกกุ้งจะมีวิวัฒนาการและเปลี่ยนแปลงรูปร่างต่อไป (บรรจง เทียนสงรัศมี. 2530; วัลลภ คงเพิ่มพูน. 2531)

ความแตกต่างของกุ้งกุลาดำเพศผู้และเพศเมีย

กุ้งกุลาดำเป็นสัตว์ที่มีเพศแยกกัน โดยปกติกุ้งเพศเมียมักจะมีขนาดใหญ่กว่ากุ้งเพศผู้ที่มีอายุเท่ากัน การที่จะแยกได้ว่าเป็นกุ้งเพศผู้หรือเพศเมียนั้น สังเกตได้จากกุ้งเพศผู้จะมีพีเทสมาซึ่งพัฒนามาจากส่วนของแขนงอันใน (endopod) ของระยางค์ว่ายน้ำคู่ที่ 1 พีเทสมามีลักษณะคล้ายเดือยยาวแข็ง 2 อัน ซ้ายขวาติดกันด้วยคิวติเคิล (cuticle) บาง ๆ ทบซ้อนกันบริเวณโคนขา และสามารถคลี่ออกเป็นแผ่นกว้างได้ กุ้งวัยรุ่นเพศผู้นั้นพีเทสมาจะยึดติดกับส่วนโคนขาว่ายน้ำเมื่อการลอกคราบครั้งสุดท้ายเพื่อเป็นกุ้งที่โตเต็มวัย ขอบของพีเทสมาประมาณครึ่งหนึ่งจะแผ่ออกติดกันตลอดอันและมีปุ่มคล้ายติ่ง ทำหน้าที่ช่วยในการยึดติดในเวลาผสมพันธุ์ กุ้งเพศผู้จะมีท่อส่งน้ำเชื้อไปเปิดออกบริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 5 และปล่อยน้ำเชื้อออกทางช่องเปิดไปที่บริเวณด้านท้องหรือด้านหลังของทีไลคัมของกุ้งเพศเมีย ซึ่งบริเวณนี้จะมีขนอ่อน ๆ ช่วยโบกพัดให้น้ำเชื้อตัวผู้เข้าไปสู่ถุงเก็บน้ำเชื้อของตัวเมีย ส่วนในกุ้งเพศเมียนั้นสังเกตได้จากบริเวณส่วนท้องของตัวเมียจะมีติ่งแบน ๆ เรียกว่า ทีไลคัม มีลักษณะคล้ายลอนหรือพู่เล็ก ๆ หลายอันเรียงกัน อยู่ตรงบริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 4 และ 5 ซึ่งด้านในมีถุงสำหรับเก็บน้ำเชื้อตัวผู้ไว้ในเวลาที่มีการผสมพันธุ์ และมีท่อนำไข่ไปเปิดออกบริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 3 (โครงการหนังสือเกษตรชุมชน. 2534; บังอร ศรีมุกดา. 2530) (ภาพประกอบ 2)

ความมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า

1. เพื่อแยกสกัดสารคล้าย CCK จากก้านตาของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon*

2. เพื่อทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย CCK รูปแบบต่าง ๆ จากสารสกัดจากก้านตาของกุ้งกุลาดำด้วยกระบวนการ RP-HPLC โดยใช้วิธี Dot-ELISA ในการตรวจหาสารคล้าย CCK ในระหว่างการแยกและทำให้บริสุทธิ์

ความสำคัญของการศึกษาค้นคว้า

1. ทราบวิธีแยกและทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย CCK จากก้านตาของกุ้งกุลาดำด้วยกระบวนการ RP-HPLC แล้วตรวจสอบสารนี้ด้วยวิธี Dot-ELISA ในการติดตามสารระหว่างการทำให้บริสุทธิ์

2. สามารถนำสารคล้าย CCK ที่ทำให้บริสุทธิ์ได้ไปตรวจหาน้ำหนักโมเลกุล และหาโครงสร้างลำดับของกรดอะมิโนต่อไป เพื่อจะเป็นแนวทางในการศึกษาบทบาทของฮอร์โมนนี้ในการดำรงชีวิตของกุ้งกุลาดำซึ่งเป็นสัตว์เศรษฐกิจต่อไปได้

ขอบเขตของการศึกษาค้นคว้า

1. แยกสกัดสารคล้าย CCK จากก้านตาของกุ้งกุลาดำ

2. ทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย CCK จากสารสกัดจากก้านตาของกุ้งกุลาดำด้วยกระบวนการ RP-HPLC

3. ใช้วิธี Dot-ELISA ติดตามสารคล้าย CCK ในระหว่างการทำให้บริสุทธิ์ด้วยกระบวนการ RP-HPLC

4. เตรียมเปปไทด์มาตรฐานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ด้วยวิธี Dot-ELISA เพื่อใช้เปรียบเทียบปริมาณของสารคล้าย CCK ที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ โดยดูจากความเข้มสีของจุดที่เป็นสารคล้าย CCK กับความเข้มของสีของเปปไทด์มาตรฐาน CCK8 ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ

5. ตรวจหาน้ำหนักโมเลกุลของสารคล้าย CCK ที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ โดย MALDI-TOF-MS

ตาราง 1 การแยกสกัดและการทำให้บริสุทธิ์ CCK และสารคล้าย CCK (CCK-LI) ในสัตว์ต่าง ๆ

Name-Year	Animal	Extraction	Purification	Detec-tion	Result
Grimmelik huijzen, Sundler and Rehfeld. 1980	*Hydra attenuata* (hydra) *Tealia ferina* (sea anemone)	Boiling - water	-	RIA	CCK-LI-5 fmol/animal CCK-LI-2 nmol/animal
Dockray, Duve and Thrope. 1981	*Calliphora vomitoria* (blowfly)	Boiling - water	-Immunoaffi-nity chroma-tography -Gel filtration	RIA	CCK-LI -Brain (2 peaks)
Larson and Vigna. 1982	*Anthopleura xanthogramica* (anthozoa) *Bugula Sp.* (bryozoa) *Lumbricus terrestris* (oligochaeta)	Boiling - water	-	RIA	CCK-LI -Gut and mesoglia-184 fmol/g -Body-541 fmol/g -Central nervous system-172 fmol/g -Body wall-130 fmol/g -Anterior gut-52 fmol/g

ตาราง 1 (ต่อ)

Name-Year	Animal	Extraction	Purification	Detec-tion	Result
	Abarenicola pacifica (polychaeta)				-Gut-324 fmol/g
	Cancer magister (crustacean)				-Esophagus-618 fmol/g -Stomach-2,800 fmol/g -Midgut-104 fmol/g -Hindgut-130 fmol/g
	Upogebia pugettensis (crustacean)				-Gut-150 fmol/g
	Limulus polyphemous (merostomata)				-Anterior gut-40 fmol/g -Posterior gut-85 fmol/g -CNS-112 fmol/g
	Busycon canaliculatus (gastropod)				-Gut-55 fmol/g -Hepatopancreas-60 fmol/g -Kidney-73 fmol/g -Hemolymph-52 fmol/g

ตาราง 1 (ต่อ)

Name-Year	Animal	Extraction	Purification	Detec-tion	Result
	Aplysia californica (gastropod) *Styela montere-yensis* (protochordate				-Gut-296 fmol/g -CNS-141 fmol/g -Gut-616 fmol/g -Body-443 fmol/g
Larson and Vigna. 1983	*Cancer magister* (crustacean)	Boiling - water	-Gel filtration -Anion - exchange	RIA	CCK-LI -Stomach large peptide (3 peaks) -Carapace & hemolymph small peptide
Tatemoto and others. 1984	Pig	Boiling - water Acetic acid	-Sephadex G-25 -Ion exchange chromato-graphy -Sephadex G-50 -RP-HPLC	Bio-assay	CCK -Brain-58 residues AVQKVDGESRAHLGA-LLARYIQQARKAPSG-RVSMIKNLQSLDPSH-RISDRDY(so$_3$)MGWM-DFamide
Nachman and others. 1986a	*Leucophaea maderae* (cockroach)	Methanol : Acetic acid : H_2O (90:1:9)	-HPLC	Bio-assay	CCK-LI -Head-11 residues EQFEDY(so$_3$)GHM-RFamide

ตาราง 1 (ต่อ)

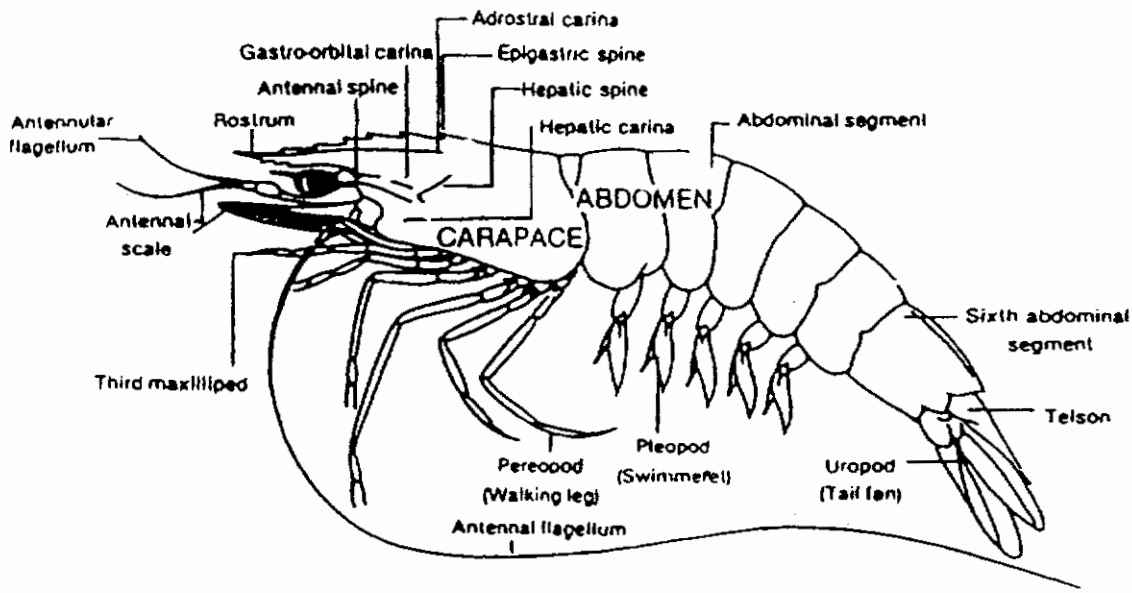
Name-Year	Animal	Extraction	Purification	Detec-tion	Result
Nachman and others. 1986b	*Leucophaea maderae* (cockroach)	Methanol : Acetic acid : H_2O (90:1:9)	-HPLC	Bio-assay	CCK-LI -Head-10 residues pESDDY(so_3)GHM-RFamide
Dimaline, Young and Gregory. 1986	Chicken	Boiling water	-Gel filtration -RP-HPLC	RIA	CCK-LI -Antrum-36 residues FLPHVFAELSDRKGF-VQGNGAVEALHDHF-YPDWMDFamide
Eng and Yalow. 1987	Guinea pig Rabbit	Methanol	-Anion ex-change chro-matography	RIA	CCK -Brain-8 residues DYVGWMDFamide DYMGWMDFamide
Veenstra. 1989	*Periplaneta americana* (american cockroach)	Bennett's mixture	-HPLC	bio-assay	CCK-LI -Head-11 residues EQFDDY(so_3)GHM-Rfamide -Head-10 residues pESDDYGHMRFamide
Aldman, Jonsson and Jensen. 1989	*Squalus acanthias* (dogfish)	Boiling - water Acetic acid	-DEAE-52 (Diethyl - amino ethyl)	RIA	CCK-LI -Mucosa intestine (multiple peaks)

ตาราง 1 (ต่อ)

Name-Year	Animals	Extraction	Purification	Detec-tion	Result
Johnsen and Rehfeld. 1990	*Ciona intestinalis* (protochordate)	Boiling - water	-Ion exchange chromato-graphy -RP-HPLC	RIA	CCK-LI -Neural ganglion- 8 residues $NY(so_3)Y(so_3)GWM$-DFamide
Favrel and others. 1991	*Nephrops norvegicus* (crustacean)	Boiling - water	-Gel filtration -RP-HPLC	RIA	CCK-LI -Stomach-9 residues SEGGQDFWL
Smiri, Bulet and Andries. 1992	*Nereis diversicolor* (polychaeta)	Boiling - water Acetic acid	-Affinity chromato-graphy -RP-HPLC	RIA	CCK-LI -Prostomium and body (4 fractions)
Donval, Bellon and Worm-houdt. 1992	*Pecten maximus* (bivalve mollusc)	Boiling - water	-Gel filtration	RIA	CCK-LI -Cerebral ganglia & digestive organs (2 peaks) MW > 20,000 Da and MW ≈ 1,000 - 1,500 Da -Hemolymph MW ≈ 1,000 Da

ตาราง 1 (ต่อ)

Name-Year	Animals	Extraction	Purification	Detec-tion	Result
Johnsen and Rehfeld. 1992	*Rana catesbeina* (frog) *Pseudomys scripta* (turtle)	Boiling - water	-Gel filtration -Anion ex-change chro-matography -RP-HPLC	RIA	CCK -Antrum-47 residues DLLASLTHEQKQLIM-SQLLPELLSELSNAE-DHLHPMRDRDY(so_3)-AGWMDFamide -Antrum-52 residues DLLEALSNDNKLLMA-KFLPHIYAELANREG-NWHEDAALRPLHDH-DYPGWMDFamide
Turrigiano and others. 1994	*Panulirus interruptus* (crustacean)	Methanol Acetic acid	-FPLC -HPLC	RIA	CCK-LI -PCOs, eyestalk and hemolymph (5 peaks) -STGs (7 peaks)

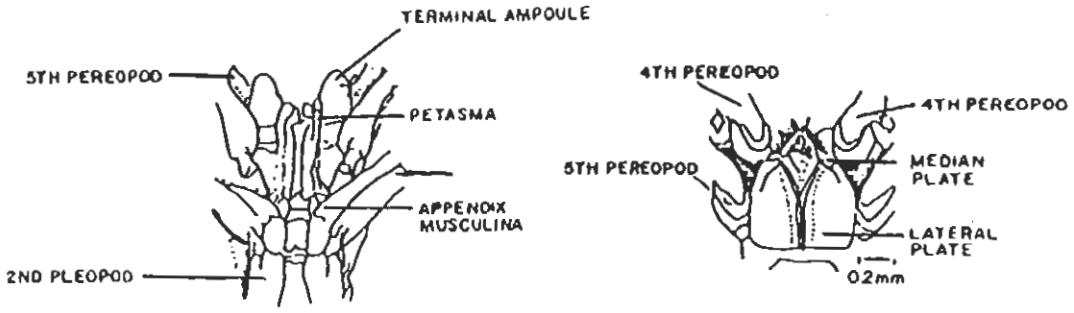


ภาพประกอบ 1 โครงสร้างภายนอกโดยทั่ว ๆ ไปของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon*

(Solis. 1988)

(ก)

(ข)



พีเทสมา (Petasma) ทีไลคัม (Thelycum)

ภาพประกอบ 2 ลักษณะของกุ้งกุลาดำเพศผู้และเพศเมีย

(ก) ภาพกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon*

รูปบน เพศเมีย รูปล่าง เพศผู้

(ข) ภาพแสดงพีเทสมาของกุ้งกุลาดำเพศผู้ และทีไลคัมของกุ้งกุลาดำเพศเมีย (Solis. 1988)

บทที่ 2
วิธีการวิจัย

สัตว์ทดลอง

กุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* อายุประมาณ 3-4 เดือน น้ำหนักประมาณ 15-35 กรัม ซื้อจากตำบลบางเลน จังหวัดนครปฐม

อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์

1. เครื่องมือผ่าตัด
2. เครื่องบด (homogenizer, Janke & Kunkel)
3. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge, Sigma Z-15)
4. เครื่องระเหยแห้ง (speed vacuum concentrator, Savant)
5. เครื่องดูดอากาศ (suction pump) พร้อมอุปกรณ์
6. ขวดรูปกรวยมีแขน (suction flask)
7. เครื่องชั่ง
8. กระบอกฉีดยา
9. หลอดเซนตริฟิวจ์ขนาดเล็ก 1.5 มิลลิลิตร (microcentrifuge tube)
10. หลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 30 มิลลิลิตร
11. หลอดพลาสติก (polypropylene test tube)
12. ออโทปิเปตพร้อมทิพ (autopipette & tip)
13. ปิเปตพร้อมลูกยาง
14. กล่องพลาสติกมีฝาปิด
15. ครกหิน
16. แผ่นไนโตรเซลลูโลส 0.45 ไมครอน (nitrocellulose membrane, Schleicher &Schuell)
17. ตู้เย็น (refrigerator, Whirlpool) และอุลตราฟรีซเซอร์ (ultrafreezer, -70°C, Revco)
18. ตู้อบ (hot air oven, Memmert)
19. เครื่องโซนิเคเตอร์ (sonicator, Crest)
20. C18 Sep-Pak cartridge (Waters)
21. เครื่อง HPLC (high performance liquid chromatography, Gilson)

22. คอลัมน์ (column)

    PrepPak C18 ขนาด 25 x 100 มิลลิเมตร (Waters)

    PrepPak C8 ขนาด 25 x 100 มิลลิเมตร (Waters)

    C8 ขนาด 4.6 x 250 มิลลิเมตร (Microsorb-MV, Rainin)

    Cyano ขนาด 4.6 x 250 มิลลิเมตร (Microsorb-MV, Rainin)

23. Matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (Bruker)

24. อุปกรณ์อื่น ๆ

สารเคมี

1. น้ำแข็งแห้ง (dry ice)
2. Methanol (analytical grade, Merck)
3. Acetic acid (analytical grade, Merck)
4. Acetonitrile (ACN, analytical grade, Mallinckrodt)
5. Acetonitrile (ACN, HPLC grade, Mallinckrodt)
6. Trifluoroacetic acid (TFA, HPLC grade, Sigma)
7. Heptafluorobutyric acid (HFBA, HPLC grade, Sigma)
8. 0.15 M phosphate buffered saline (PBS) pH 7.2 (วิธีเตรียมดูที่ภาคผนวก)
9. Bovine serum albumin (BSA, Sigma)
10. 25% glutaraldehyde (Sigma)
11. 5% blotto (วิธีเตรียมดูที่ภาคผนวก)
12. Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Sigma)
13. 30% hydrogenperoxide (H_2O_2)
14. 1% cobalt chloride ($CoCl_2$)
15. Rabbit anti-CCK antiserum (Immuno nuclear coorperation)
16. Goat anti-rabbit IgG H and L chain horseradish peroxidase conjugate (GAR-HRP, Biorad)
17. Synthetic CCK8 fragment 26-33 amide non-sulfated (standard peptide, Sigma)
18. α-cyano-4-hydroxycinnamic acid (CCA, Sigma)
19. Human angiotensin II (standard, Sigma)

วิธีดำเนินการทดลอง

การทดลองประกอบด้วยขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้คือ

1. การเก็บรวบรวมตากุ้งกุลาดำ
2. การเตรียมสารสกัดจากก้านตาของกุ้งกุลาดำ
3. การเตรียมสารสกัดจากก้านตาก่อนนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยกระบวนการ RP-HPLC (Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography)
4. การทำให้บริสุทธิ์ของสารคล้าย CCK จากก้านตาของกุ้งกุลาดำด้วยกระบวนการ RP-HPLC
5. การตรวจหาสารคล้าย CCK ในก้านตาของกุ้งกุลาดำโดยวิธี Dot-ELISA (Dot-Enzyme Linked Immunosorbant Assay) หลังจากแยกด้วยกระบวนการ RP-HPLC
6. การเตรียมเปปไทด์มาตรฐานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ด้วยวิธี Dot-ELISA
7. การทดสอบสารคล้าย CCK
8. การหามวลโมเลกุลของสารคล้าย CCK ด้วย MALDI-TOF-MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry)

1. การเก็บรวบรวมตากุ้งกุลาดำ

ตัดตากุ้งกุลาดำที่มีอายุประมาณ 3-4 เดือน โดยใช้กรรไกรตัดบริเวณโคนของตากุ้งที่ยังมีชีวิตอยู่ นำตาที่ตัดได้ไปแช่แข็งทันทีในน้ำแข็งแห้งที่บรรจุไว้ในถุงพลาสติก รวบรวมเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -70°C จนกระทั่งนำมาใช้

2. การเตรียมสารสกัดจากก้านตา (eyestalk extract) ของกุ้งกุลาดำ

นำตากุ้งที่เก็บรวบรวมไว้จำนวนประมาณ 8,700 ตา มาบดให้เป็นผงละเอียดในขณะที่เย็นจัด โดยบดรวมกับน้ำแข็งแห้งในครกหินที่สภาวะเย็นจัดซึ่งวางอยู่บนน้ำแข็งแห้ง แล้วสกัดสารจากก้านตาด้วยสารละลายเมทานอล-กรดอะซิติก (เมทานอล : กรดอะซิติก : น้ำ / 90 : 1 : 9) โดยนำผงละเอียดของตากุ้งที่บดมาใส่ลงในสารละลายเมทานอล-กรดอะซิติก ในปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรต่อตา บดอีกครั้งด้วยเครื่องบด (homogenizer) แช่ไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง เพื่อให้การสกัดสมบูรณ์ จากนั้นนำไปปั่นแยกตะกอนออกโดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยง ด้วยแรงเหวี่ยง 10,000 g เป็นเวลา 15 นาที แยกเอาส่วนน้ำใส (supernatant) เก็บไว้ ส่วนตะกอนที่เหลือนำไปสกัดซ้ำอีกครั้งด้วยสารละลายเมทานอล-กรดอะซิติก นำไปปั่นแยก

ตะกอนออกด้วยแรงเหวี่ยงเท่าเดิม แยกเอาส่วนน้ำใสออก รวมสารสกัดเข้าด้วยกันและนำสารสกัดที่ได้นี้ไประเหยด้วยเครื่องระเหยแห้ง (speed vacuum concentrator) เพื่อกำจัดตัวทำละลายเมทานอลและกรดอะซิติกออก เติม 1% trifluoroacetic acid (TFA) ในปริมาณที่ทำให้ความเข้มข้นในสารสกัดเป็น 0.1% TFA (วิธีเตรียมดูภาคผนวก) ปั่นแยกตะกอนอีกครั้งด้วยแรงเหวี่ยง 10,000 g เป็นเวลา 15 นาที แยกส่วนน้ำใสเก็บไว้ซึ่งเป็นสารสกัดจากก้านตาของกุ้งกุลาดำ (ภาพประกอบ 3) (วิธีการทำดัดแปลงจากวิธีการของ Cowden and others. 1993)

3. การเตรียมสารสกัดจากก้านตาก่อนนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยกระบวนการ RP-HPLC

นำสารสกัดจากก้านตาที่ได้จากข้อ 2. ไปผ่าน C18 Sep-Pak cartridge เพื่อดูดซับสารสกัดไว้ จากนั้นจึงชะด้วยตัวทำละลาย 50% acetonitrile / 0.1% TFA (วิธีเตรียมดูภาคผนวก) ระเหยตัวทำละลาย acetonitrile ออกจนหมดด้วยเครื่องระเหยแห้ง นำไปเติมสารละลาย 80% acetonitrile / 0.1% TFA (วิธีเตรียมดูภาคผนวก) เพื่อปรับให้สารสกัดอยู่ในสารละลาย acetonitrile ที่มีความเข้มข้นประมาณ 10% acetonitrile (วิธีการทำดัดแปลงจากวิธีการของ Sithigorngul and Stretton. 1995)

4. การทำให้บริสุทธิ์ของสารคล้าย CCK จากก้านตาของกุ้งกุลาดำด้วยกระบวนการ RP-HPLC

นำสารสกัดจากก้านตาประมาณ 8,700 ตา ที่ได้จากข้อ 3. ไปปั่นด้วยแรงเหวี่ยง 10,000 g เป็นเวลา 15 นาที แยกเอาส่วนสารละลายใสเก็บไว้ แล้วแบ่งสารสกัดผ่านคอลัมน์ 6 ครั้ง ครั้งละประมาณ 1,000-2,000 ตา นำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC ซึ่งเป็นขั้นตอนแรก โดยผ่านคอลัมน์ PrepPak C18 ขนาด 25 x 100 มิลลิเมตร จากนั้นชะด้วยสารละลาย A และ B โดยมีความเข้มข้นเริ่มต้นจาก 15-60% B (A = 0.1% TFA, B = 80% acetonitrile / 0.1% TFA) อัตราการไหลของสารละลาย 5 มิลลิลิตรต่อนาที และการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ B เป็น 1% ต่อนาทีในช่วงแรกและ 60-90% B โดยเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ B เป็น 1.5% ต่อนาที เก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ลงในหลอดพลาสติกโดยเครื่องแฟรคชั่นคอลเลคเตอร์ (fraction collector) ทุก ๆ 1 นาที นำสารละลายในแต่ละแฟรคชั่นไปทดสอบหาสารคล้าย CCK ด้วยวิธี Dot-ELISA แฟรคชั่นที่มีสารคล้าย CCK จะปรากฏเห็นเป็นจุดสีเทาแกมน้ำเงิน แล้วนำแฟรคชั่นที่ติดสีนี้มาทดสอบสารคล้าย CCK ดังวิธีทำในข้อ 7 เลือกแฟรคชั่นที่มีสารคล้าย CCK แล้วนำมาแยกให้บริสุทธิ์มากขึ้น โดยผ่านคอลัมน์และสารละลายระบบต่าง ๆ ตามลำดับ (ตาราง 2)

ขั้นตอนที่ 2 ใช้คอลัมน์ PrepPak C8 ขนาด 25 x 100 มิลลิเมตร ชะด้วยสารละลาย A และ B โดยมีความเข้มข้นเริ่มต้นจาก 25-40% B (A = 0.1% heptafluorobutyric acid (HFBA), B = 80% acetonitrile / 0.1% HFBA) อัตราการไหลของสารละลาย 5 มิลลิลิตรต่อนาที และการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ B เป็น 1.5% ต่อนาทีในช่วงแรกและ 40-75% B โดยเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ B เป็น 1% ต่อนาที เก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ลงในหลอดพลาสติกโดยเครื่องแฟรคชั่นคอลเลคเตอร์ ทุก ๆ 1 นาที

ขั้นตอนที่ 3 ใช้คอลัมน์ Microsorb-MV C8 ขนาด 4.6 x 250 มิลลิเมตร ชะด้วยสารละลาย A และ B โดยมีความเข้มข้นเริ่มต้นจาก 25-75%B (A = 0.1% HFBA, B = 80% acetonitrile / 0.1% HFBA) อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที และการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ B เป็น 1.1% ต่อนาที เก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ลงในหลอดพลาสติกโดยเครื่องแฟรคชั่นคอลเลคเตอร์ ทุก ๆ 1 นาที

ขั้นตอนที่ 4 ใช้คอลัมน์ Microsorb-MV Cyano ขนาด 4.6 x 250 มิลลิเมตร ชะด้วยสารละลาย A และ B โดยมีความเข้มข้นเริ่มต้นจาก 15-20% B (A = 0.1% TFA, B = 80% acetonitrile / 0.1% TFA) อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที และการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ B เป็น 1% ต่อนาทีในช่วงแรก ชะที่ 20-35% B โดยเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ B เป็น 0.5% ต่อนาที และ 40-50% B โดยเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ B เป็น 1 % ต่อนาที เก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ลงในหลอดพลาสติกโดยเครื่องแฟรคชั่นคอลเลคเตอร์ ทุก ๆ 1 นาที การทำให้บริสุทธิ์ของสารคล้าย CCK ในแต่ละขั้นตอนนั้นจะใช้วิธีการ Dot-ELISA ติดตามสารนี้ในระหว่างการทำให้บริสุทธิ์ (วิธีการทำดัดแปลงจากวิธีการของ Sithigorngul and Stretton. 1995)

5. การตรวจหาสารคล้าย CCK ในก้านตาของกุ้งกุลาดำโดยวิธี Dot-ELISA หลังจากแยกด้วยกระบวนการ RP-HPLC

แบ่งสารละลายของแต่ละแฟรคชั่นประมาณ 20-400 ก้านตา ที่ได้จากการผ่านกระบวนการ RP-HPLC ผสมกับโปรตีน BSA ที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรซึ่งละลายใน phosphate buffered saline (PBS) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร นำไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้ง จากนั้นเติมน้ำกลั่นลงไปปริมาตร 1 ไมโครลิตร แล้วนำไปหยดลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส (nitrocellulose membrane) เรียงตามลำดับแฟรคชั่นที่ได้จากการผ่านกระบวนการ RP-HPLC นำแผ่นไนโตรเซลลูโลสที่หยดสารแต่ละแฟรคชั่นไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 30 นาที ต่อจากนั้นนำไปอบต่อในไอของ glutaraldehyde ที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 8 ชั่วโมง โดยวางแผ่นไนโตรเซลลูโลสไว้ในกล่องปิดฝาสนิทที่มีไอของ glutaraldehyde แล้วนำไปแช่ต่อในสารละลาย 0.2% glutaraldehyde เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นล้างแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วยน้ำกลั่น 4 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที แล้วนำไปบล็อค (block) ด้วย 0.5% blotto เป็นเวลา 30 นาที เพื่อเป็นการป้องกันการจับของแอนติบอดีบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสแบบไม่จำเพาะ

การตรวจหาเปปไทด์ด้วยวิธี indirect immunoperoxidase assay ทำโดยนำแผ่นไนโตรเซลลูโลสไปบ่มในสารละลาย rabbit anti-CCK antiserum ที่เจือจาง 1:10,000 ด้วย 5% blotto เป็นเวลา 8 ชั่วโมง เนื่องจากแอนติบอดีที่ใช้เป็น rabbit anti-CCK antiserum ในขั้นตอนการเตรียมแอนติบอดีจึงต้องใส่ตัวดูดซับคือ BSA ที่เชื่อมติดกับไกลซีนด้วย glutaraldehyde (Gly-BSA) (วิธีเตรียมดูภาคผนวก) เพื่อลดการจับของแอนติบอดีต่อ BSA ที่ปะปนอยู่ใน anti-CCK antiserum กับ BSA บนแผ่นไนโตรเซลลูโลส หลังจากบ่มด้วย rabbit anti-CCK antiserum นำแผ่นไนโตรเซลลูโลสไปล้างด้วย 0.5% blotto 4 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที แล้วจึงนำไปบ่มใน goat anti-rabbit IgG H+L horseradish peroxidase เจือจาง 1:1,000 ด้วย 5% blotto เป็นเวลา 8 ชั่วโมง ล้างแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วย 0.5% blotto 4 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที และล้างต่อด้วย PBS 1 ครั้ง จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยาในสารละลายสับสเตรทซึ่งประกอบด้วย 0.03% diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB), 0.006% hydrogen peroxide (H_2O_2), 0.05% cobalt chloride ($CoCl_2$) เป็นเวลา 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นหลาย ๆ ครั้ง (ภาพประกอบ 4) นำไปตรวจดูความเข้มของสีในแต่ละจุด โดยบริเวณที่เกิดปฏิกิริยาทางอิมมูโนกับแอนติบอดีจะปรากฏเห็นเป็นจุดสีเทาแกมน้ำเงิน นำผลที่ได้จาก Dot-ELISA ไปเปรียบเทียบกับพีค (peak) ที่ได้จากโครมาโตรแกรม (chromatogram) เพื่อเลือกแฟรคชั่นที่มีสารคล้าย CCK แล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์โดยกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนต่อไป (วิธีการทำดัดแปลงจากวิธีการของ Sithigorngul, Stretton and Cowden. 1991)

6. การเตรียมเปปไทด์มาตรฐาน (standard peptide) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ด้วยวิธี Dot-ELISA

นำเปปไทด์มาตรฐาน CCK8 ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 1063.2 ดาลตัน มีความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาเจือจางด้วย BSA ที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เจือจางครั้งละ 2 เท่า (two fold serial dilutions) โดยมีความเข้มข้นเป็น 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.6, 0.8, 0.4, 0.2 และ 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ แล้วหยดเปปไทด์มาตรฐานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเรียงตามลำดับความเข้มข้นจากมากไปน้อย นำแผ่นไนโตรเซลลูโลสที่หยดเปปไทด์มาตรฐานแล้วไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นจึงทำตามวิธีการ Dot-ELISA ในข้อ 5 ใช้ความเข้มของสีในแต่ละจุดที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ของเปปไทด์มาตรฐาน CCK8 เปรียบเทียบกับเปปไทด์ที่ได้จากการผ่านกระบวนการ RP-HPLC เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี Dot-ELISA แล้ว เพื่อใช้ประมาณปริมาณของสารคล้าย CCK ที่ผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ (วิธีการทำดัดแปลงจากวิธีการของ Sithigorngul, Stretton and Cowden, 1991)

7. วิธีการทดสอบสารคล้าย CCK

ในการทดสอบสารคล้าย CCK ด้วยวิธี Dot-ELISA เพื่อให้แน่ใจว่าปฏิกิริยา Dot-ELISA เกิดจากแอนติบอดีต่อ CCK จับกับสารคล้าย CCK นำแฟรคชั่นที่ให้ผลบวกต่อ anti-CCK antiserum หยดลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเป็นจำนวน 2 แผ่น ในปริมาณเท่ากัน นำไปผ่านกระบวนการ Dot-ELISA โดยเปรียบเทียบแผ่นไนโตรเซลลูโลสที่บ่มในแอนติซีรัมที่ดูดซับด้วย Gly-BSA กับการใส่ในแอนติซีรัมที่ถูกดูดซับด้วย CCK8-BSA (วิธีเตรียมดูภาคผนวก) แล้วทำการตรวจหาเปปไทด์ด้วยวิธี indirect immunoperoxidase assay ตามวิธี Dot-ELISA ในข้อ 5. เปรียบเทียบปฏิกิริยาทางอิมมูโน (immunoreactivity) ของสารคล้าย CCK ที่ได้ระหว่างแอนติบอดีทั้ง 2 ชุด กรณีของสารคล้าย CCK ที่พบในแฟรคชั่นเมื่อใส่ในแอนติซีรัมที่ถูกดูดซับด้วย CCK8-BSA ความเข้มข้นของจุดจะจางลงหรือหายไป แต่ถ้าปฏิกิริยาทางอิมมูโนในแฟรคชั่นนั้นเกิดจากปฏิกิริยาของแอนติบอดีที่ปะปนอยู่ในแอนติซีรัมกับแอนติเจนอื่นในแฟรคชั่นที่ไม่ใช่สารคล้าย CCK จะให้ผลบวกเหมือนเดิม (ภาพประกอบ 5)

8. การหาน้ำหนักโมเลกุล โดย MALDI-TOF-MS

นำแฟรคชั่นของสารคล้าย CCK ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนสุดท้าย มาแบ่งสารละลายประมาณ 450-870 ก้านตา แล้วระเหยตัวทำละลาย acetonitrile ออกให้หมดด้วยเครื่องระเหยแห้ง จากนั้นนำไปหาน้ำหนักโมเลกุล ด้วยเครื่อง MALDI-TOF-MS ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพ และวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งมีวิธีการทำดังนี้

1) การเตรียม matrix "film" บน steel target

นำสารละลายอิ่มตัวของ CCA (α-cyano-4-hydroxycinnamic acid) ที่ละลายในอะซีโตน ไปปั่นแยกตะกอนออกโดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยง แยกส่วนของเหลวใสไปหยดลงบนช่องตัวอย่างประมาณ 1 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ให้แห้ง

2) การเตรียมสารตัวอย่าง

นำสารตัวอย่างไปละลายใน 0.1% TFA : acetonitrile (2:1) 5 ไมโครลิตร แล้วหยดสารตัวอย่างประมาณ 1 ไมโครลิตร ลงบนช่องตัวอย่างที่มี matrix เคลือบอยู่ ทิ้งไว้ให้แห้ง

3) การเตรียมสารมาตรฐาน (standard)

เตรียมสารมาตรฐาน human angiotensin II ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 1.047 กิโลดาลตัน มีความเข้มข้น 100 พิโคโมลต่อไมโครลิตร โดยเจือจางด้วย CCA ที่ละลายใน 0.1% TFA : acetonitrile (2:1) (CCA : 0.1% TFA / acetonitrile (1 : 5)) แล้วหยดสารมาตรฐานประมาณ 1 ไมโครลิตร ลงบนช่องตัวอย่างที่มี matrix เคลือบอยู่ ทิ้งไว้ให้แห้ง

4) นำไปหาน้ำหนักโมเลกุลโดยเครื่อง MALDI-TOF MS

การวิเคราะห์ข้อมูล

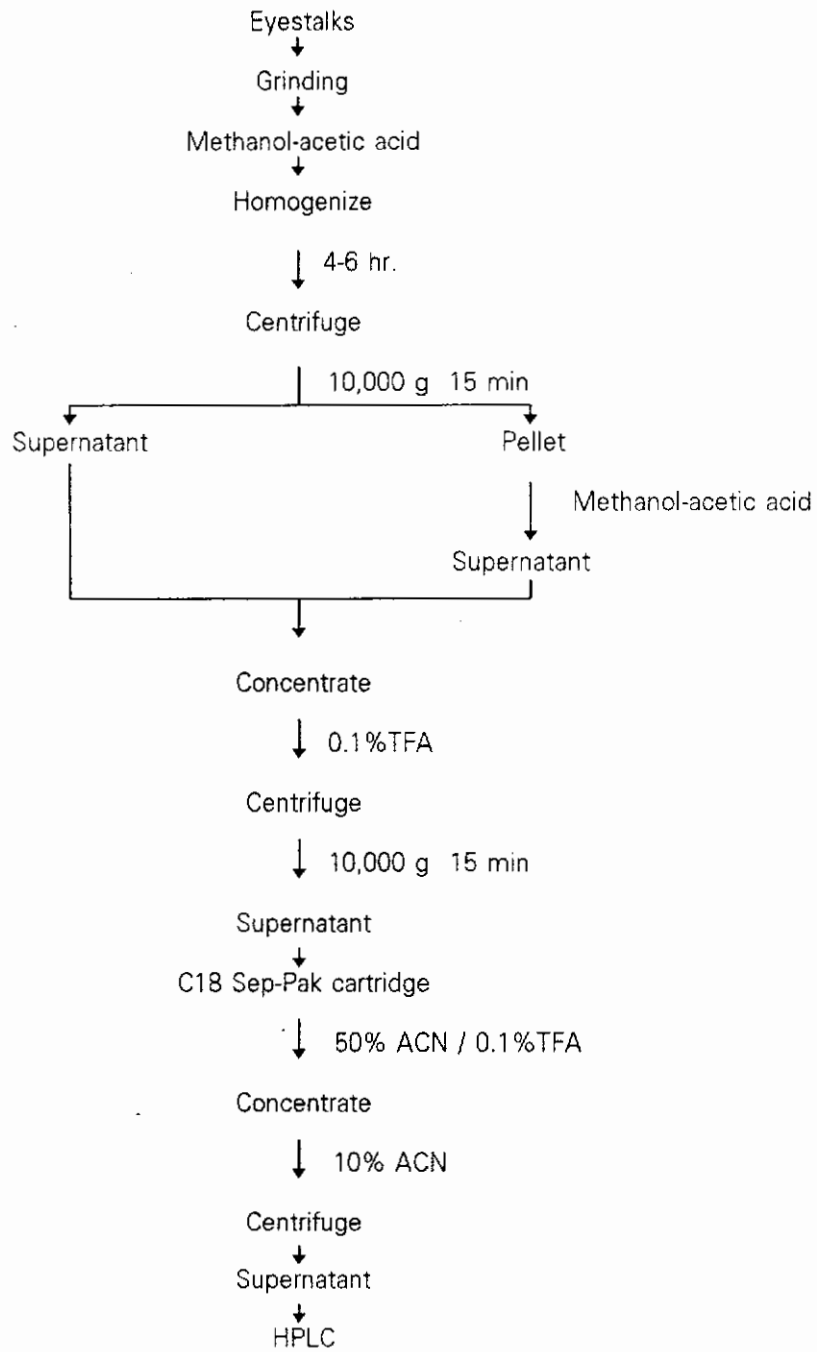
1. ตรวจดูการเกิดสีเทาแกมน้ำเงินของตัวอย่างจากแต่ละแฟรคชั่นที่ได้จากการผ่านกระบวนการ RP-HPLC ซึ่งหยดบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสหลังจากเสร็จกระบวนการ Dot-ELISA แล้ว เพื่อนำแฟรคชั่นที่ติดสีซึ่งคาดว่ามีสารคล้าย CCK ไปแยกต่อด้วยกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนต่อไป

2. เปรียบเทียบความเข้มของสีของจุดที่เกิดขึ้นกับความเข้มของสีของจุดของเปปไทด์มาตรฐาน CCK8 ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ บนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมื่อผ่านกระบวนการ Dot-ELISA แล้ว

3. ดูลักษณะและความสูงของพีคจากโครมาโตรแกรมที่ได้จากกระบวนการ RP-HPLC ในแต่ละขั้นตอน

4. ทดสอบว่าสารที่ได้เป็นสารคล้าย CCK โดยทดสอบการทำปฏิกิริยาของตัวอย่างในแฟรคชั่นกับแอนติซีรัมที่ดูดซับด้วย CCK8-BSA

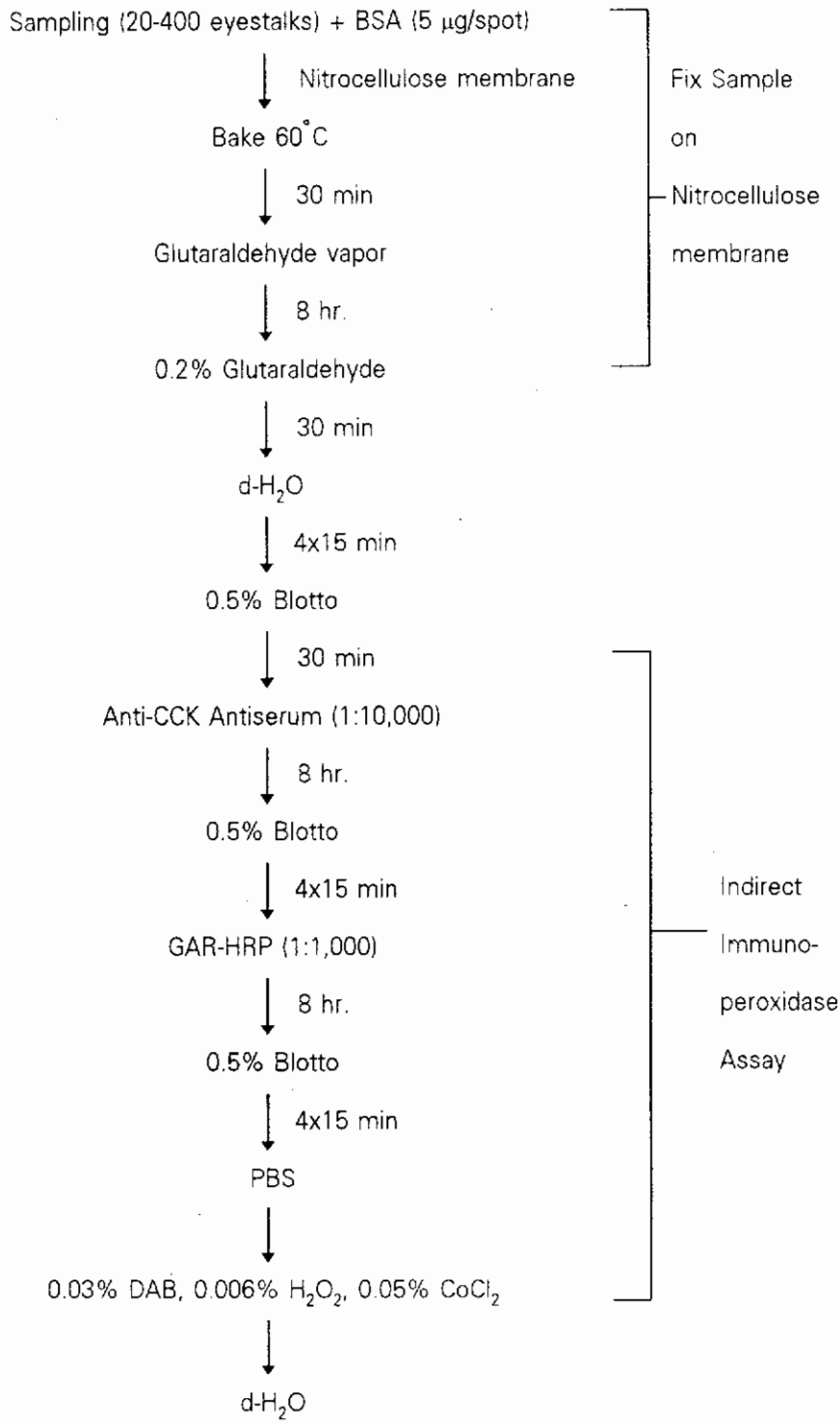
5. ตรวจความบริสุทธิ์และน้ำหนักโมเลกุลโดย mass spectrometry



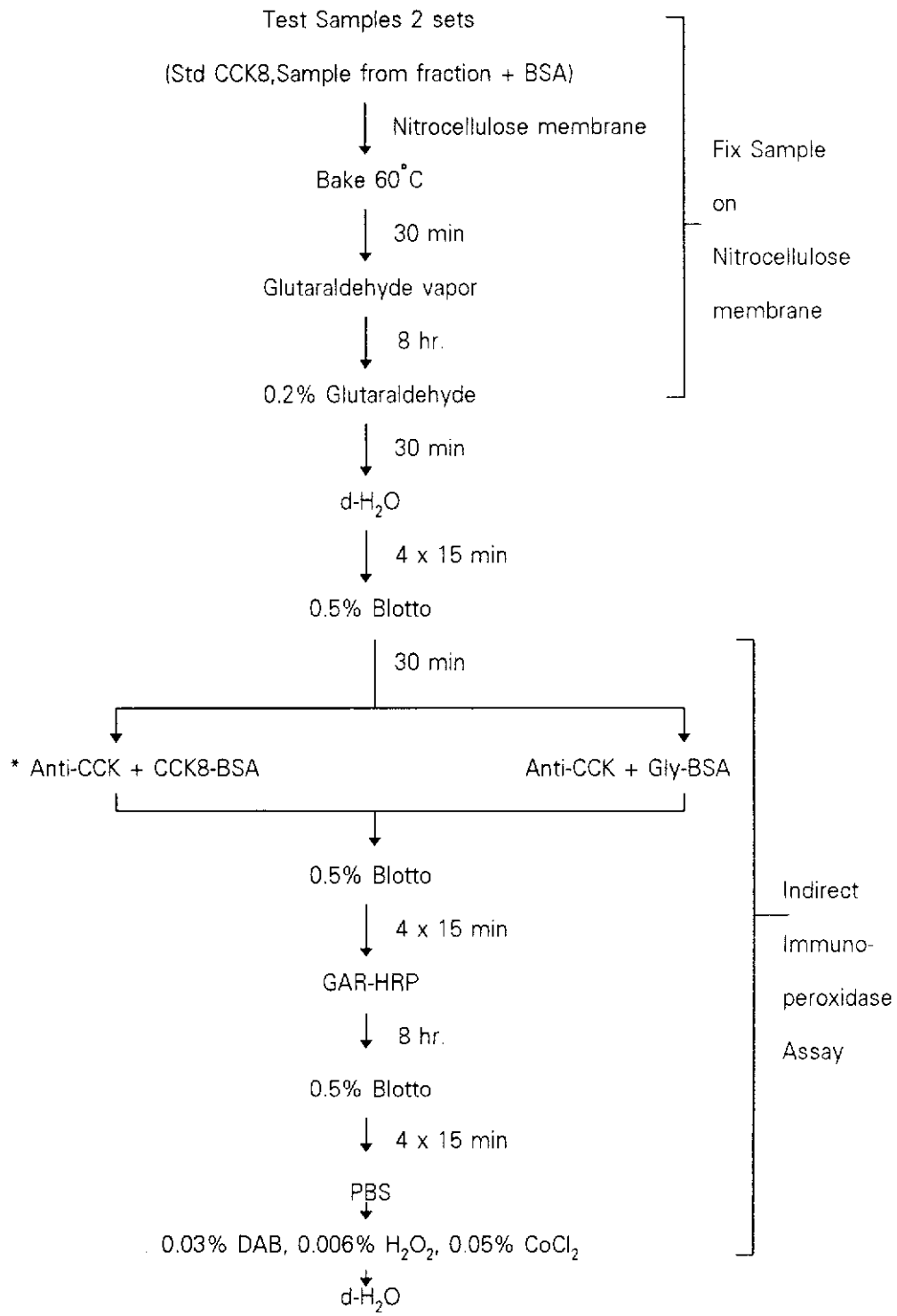
ภาพประกอบ 3 ขั้นตอนวิธีการเตรียมสารสกัดจากก้านตาของกุ้งกุลาดำ

ตาราง 2 แสดงขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ด้วยกระบวนการ RP-HPLC

Step	Column Type	Column Size (mm)	Counter-ion	Gradient of Acetonitrile (percent)	Duration (min)	Flow rate (ml/min)
1	PrepPaK C18	25 x 100	TFA	15-90%	65	5
2	PrepPak C8	25 x 100	HFBA	25-75%	50	5
3	Microsorb-MV C8	4.6 x 250	HFBA	25-75%	50	1
4	Microsorb-MV Cyano	4.6 x 250	TFA	15-50%	35	1



ภาพประกอบ 4 ขั้นตอนการตรวจหาสารคล้าย CCK โดยวิธีการของ Dot-ELISA (Dot-Enzyme Linked Immunosorbant Assay)



ภาพประกอบ 5 ขั้นตอนวิธีการทดสอบสารคล้าย CCK โดยการดูดซับแอนติบอดีต่อ CCK ด้วย CCK8-BSA (Preabsorption of Anti-CCK)

บทที่ 3
ผลการวิจัย

Dot-ELISA ของ CCK8 มาตรฐาน

จากการใช้เปปไทด์มาตรฐาน CCK8 ที่เจือจางระดับต่าง ๆ มาตรวจสอบโดยวิธี Dot-ELISA โดยใช้แอนติบอดีต่อ CCK8 สามารถตรวจพบ CCK8 ปริมาณที่น้อยที่สุดประมาณ 0.1 นาโนกรัม (ประมาณ 100 เฟมโทโมล) โดยความเข้มของจุดสีจะแปรผันตามปริมาณของ CCK8 อยู่ในช่วง 0.1-3.12 นาโนกรัม ส่วนปริมาณของ CCK8 ที่มากกว่า 3.12 นาโนกรัม พบว่าความเข้มของจุดสีไม่สามารถสังเกตเห็นความแตกต่างได้ การประมาณปริมาณของสารคล้าย CCK จึงใช้ปริมาณ CCK8 มาตรฐานที่ให้ความเข้มของสีที่สามารถสังเกตได้ชัดเจนที่จุด 0.2 นาโนกรัมเท่ากับ 1 หน่วยของสารคล้าย CCK ซึ่งช่วงความเข้มของจุดสีที่ตรวจสอบได้อยู่ในช่วงระหว่าง 1-16 หน่วย (ภาพประกอบ 6)

การทำให้บริสุทธิ์ของสารคล้าย CCK

จากการทำให้บริสุทธิ์ของสารคล้าย CCK จากสารสกัดของก้านตากุ้งกุลาดำ ด้วยกระบวนการ RP-HPLC และใช้วิธี Dot-ELISA ติดตามสารนี้ในระหว่างการทำให้บริสุทธิ์ สามารถแยกสารคล้าย CCK ได้ 3 รูปแบบ (peptide I, peptide II, และ peptide III) ดังขั้นตอนการแยกบริสุทธิ์ดังนี้ (ภาพประกอบ 7)

จากการนำสารสกัดของก้านตากุ้งกุลาดำ จำนวน 8,700 ก้านตา ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 1 โดยแบ่งสารสกัดผ่านคอลัมน์ ประมาณ 6 ครั้ง ครั้งละประมาณ 1,000-2,000 ก้านตา หลังจากเสร็จกระบวนการ RP-HPLC แล้วแบ่งสารละลายในแต่ละแฟรคชั่นมาตรวจหาสารคล้าย CCK โดยวิธี Dot-ELISA พบว่ามีแฟรคชั่นที่ติดสีเข้มอยู่ในช่วงแฟรคชั่นที่ 45-47 และ 53-64 โดยแฟรคชั่นที่ 53-64 ให้สีเข้มมากกว่าแฟรคชั่นที่ 45-47 ซึ่งให้ผลคล้ายกันจากการแบ่งสารสกัดผ่านคอลัมน์ในแต่ละครั้ง (ภาพประกอบ 8) แต่จากการนำแฟรคชั่นที่ให้ผลบวกต่อ anti-CCK antiserum นี้ ไปทดสอบว่าแฟรคชั่นใดเป็นสารคล้าย CCK โดยนำแฟรคชั่นที่ต้องการทดสอบตั้งแต่แฟรคชั่นที่ 45-47 และ 55 และ 63 ไปผ่านกระบวนการ Dot-ELISA โดยเปรียบเทียบระหว่างการบ่มในแอนติซีรัมที่ถูกดูดซับด้วย Gly-BSA กับการบ่มในแอนติซีรัมที่ถูกดูดซับด้วย CCK8-BSA พบว่าที่แฟรคชั่นที่ 45-47 และ CCK8 มาตรฐาน ความเข้มสีของจุดจะจางลงเมื่อบ่มในแอนติซีรัมที่ถูกดูดซับด้วย CCK8-BSA ส่วนแฟรคชั่นที่ 55 และ 63 ยังติดสีเข้มเหมือนเดิมทั้ง 2 การทดลอง (ภาพประกอบ 9) จึงเป็นการยืนยันว่าแฟรคชั่นที่ 45-47 นั้นมี

สารคล้าย CCK อยู่จริงไม่ได้เกิดจากปฏิกิริยาของแอนติบอดีอื่นในซีรัมทำปฏิกิริยากับแอนติเจนที่ไม่ใช่สารคล้าย CCK ในก้านตาของกุ้งกุลาดำ ดังเช่นในแฟรคชั่นที่ 53-64 ดังนั้นจึงรวมแฟรคชั่นที่ 45 (กลุ่มที่ 1) และแฟรคชั่นที่ 46 กับ 47 (กลุ่มที่ 2) ของการแยกด้วย RP-HPLC ทั้ง 6 ครั้งเข้าด้วยกันแล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่อไป

<u>การทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย CCK กลุ่มที่ 1</u>

จากการรวมแฟรคชั่นที่ 45 ของสารคล้าย CCK จากขั้นตอนที่ 1 แล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 2 โดยแบ่งสารสกัดผ่านคอลัมน์ 3 ครั้ง ครั้งแรกประมาณ 2,700 ก้านตา ครั้งที่ 2 และ 3 ครั้งละประมาณ 3,000 ก้านตา ตรวจหาสารคล้าย CCK ด้วยวิธี Dot-ELISA พบว่าให้ผลคล้ายกันจากการแบ่งสารสกัดผ่านคอลัมน์ทั้ง 3 ครั้ง คือ พบสารคล้าย CCK ติดสีอยู่ในแฟรคชั่นที่ 32 (ภาพประกอบ 10) จึงรวมสารคล้าย CCK แฟรคชั่นที่ 32 ของการแยกด้วย RP-HPLC ทั้ง 3 ครั้งเข้าด้วยกัน และนำไปทำให้บริสุทธิ์ต่อด้วยกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 3 ทำการตรวจหาสารคล้าย CCK ด้วยวิธี Dot-ELISA พบการกระจายของสารคล้าย CCK ติดสีอยู่ช่วงแฟรคชั่นที่ 28-32 (ภาพประกอบ 11) จึงแยกสารละลายมาทำให้บริสุทธิ์ต่อในขั้นตอนที่ 4 โดยการรวมแฟรคชั่นที่ 28 กับ 29 ตรวจหาสารคล้าย CCK พบว่าสามารถแยกได้เปปไทด์ที่ค่อนข้างบริสุทธิ์ในแฟรคชั่นที่ 18 (เปปไทด์ I) (ภาพประกอบ 12) จากลักษณะของโครมาโตแกรมจะเห็นว่าสารคล้าย CCK เปปไทด์ I จะปรากฏเห็นเป็นพีคเดียว ซึ่งแยกจากสิ่งปนเปื้อนอื่น ๆ จึงคาดว่า สารคล้าย CCK เปปไทด์ I ที่ได้นั้นมีความบริสุทธิ์มากพอ แต่อาจจะมีสิ่งปนเปื้อนปนอยู่บ้างเล็กน้อย เนื่องจากที่ฐานของพีคยังมีติ่งเล็ก ๆ ติดอยู่ ค่าความเข้มสีของจุดของสารคล้าย CCK เปปไทด์ I เมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มสีของจุดของเปปไทด์มาตรฐาน CCK8 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ จะเท่ากับ 1 หน่วยต่อ 200 ก้านตา และค่าความสูงของพีคประมาณ 32 มิลลิโวลท์

ส่วนสารละลายที่รวมจากแฟรคชั่นที่ 30 กับ 31 และ แฟรคชั่นที่ 32 ในขั้นตอนที่ 3 เมื่อนำมาผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนที่ 4 นี้ ยังไม่สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้

<u>การทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย CCK กลุ่มที่ 2</u>

จากการรวมแฟรคชั่นที่ 46 กับ 47 ของสารคล้าย CCK จากขั้นตอนที่ 1 แล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 2 โดยแบ่งสารสกัดผ่านคอลัมน์ 3 ครั้ง ครั้งแรกประมาณ 2,700 ก้านตา ครั้งที่ 2 และ 3 ครั้งละประมาณ 3,000 ก้านตา นำไปตรวจหาสารคล้าย CCK ด้วยวิธี Dot-ELISA พบว่าให้ผลคล้ายกันจากการแบ่งสารสกัดผ่านคอลัมน์ทั้ง 3 ครั้ง คือ พบสารคล้าย CCK ติดสีอยู่ในแฟรคชั่นที่ 34 และ 35 โดยมีความเข้มสีของจุดสูงสุดในแฟรคชั่นที่ 34

(ภาพประกอบ 13) ดังนั้นจึงนำแฟรคชั่นที่ 34 นี้ไปทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่อไป ส่วนแฟรคชั่นที่ 35 มีความเข้มสีของจุดจางมากจึงไม่ได้นำมาศึกษา จากการนำสารคล้าย CCKแฟรคชั่นที่ 34 ของขั้นตอนที่ 2 มาทำให้บริสุทธิ์ต่อในขั้นตอนที่ 3 พบการกระจายของสารคล้าย CCK ติดสีอยู่ในช่วงแฟรคชั่นที่ 36, 37 และ 39, 40 โดยมีความเข้มสีของจุดสูงสุดในแฟรคชั่นที่ 36 และแฟรคชั่นที่ 39 ซึ่งให้ผลคล้ายกันจากการผ่านคอลัมน์ทั้ง 3 ครั้ง (ภาพประกอบ 14) ดังนั้นจึงแยกสารละลายแต่ละแฟรคชั่นคือแฟรคชั่นที่ 36 และแฟรคชั่นที่ 39 มาทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่อไป ส่วนแฟรค-ชั่นที่ 37 และแฟรคชั่นที่ 40 มีความเข้มสีของจุดค่อนข้างต่ำและมีสารปนเปื้อนปริมาณสูง จึงไม่ได้นำมาศึกษา

จากการนำสารคล้าย CCK แฟรคชั่นที่ 36 ของการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนที่ 3 มาผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 4 แล้วตรวจหาสารคล้าย CCK ด้วยวิธี Dot-ELISA พบว่าสารคล้าย CCK ติดสีอยู่ในแฟรคชั่นที่ 19 (เปปไทด์ II) จากการแยกผ่านคอลัมน์ทั้ง 3 ครั้ง (ภาพประกอบ 15) เมื่อพิจารณาจากโครมาโตแกรมของสารคล้าย CCK จำนวน 3,000 ก้าน-ตา จะเห็นว่าสารคล้าย CCK เปปไทด์ II จะปรากฏเห็นเป็นพีคเดียว ซึ่งแยกจากสิ่งปนเปื้อนอื่น ๆ ดังนั้นจึงคาดว่าสารคล้าย CCK ที่ได้นั้นค่อนข้างบริสุทธิ์มากพอ แต่อาจจะมีสิ่งปนเปื้อนอยู่บ้างเล็กน้อย เนื่องจากที่ฐานของพีคยังมีติ่งของสารปนเปื้อนติดอยู่ ค่าความเข้มสีของจุดของสาร-คล้าย CCK เปปไทด์ II เมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มสีของจุดของเปปไทด์มาตรฐาน CCK8 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ จะเท่ากับ 1 หน่วยเมื่อใช้ 150 ก้านตา และค่าความสูงของพีคประมาณ 15 มิลลิโวลท์

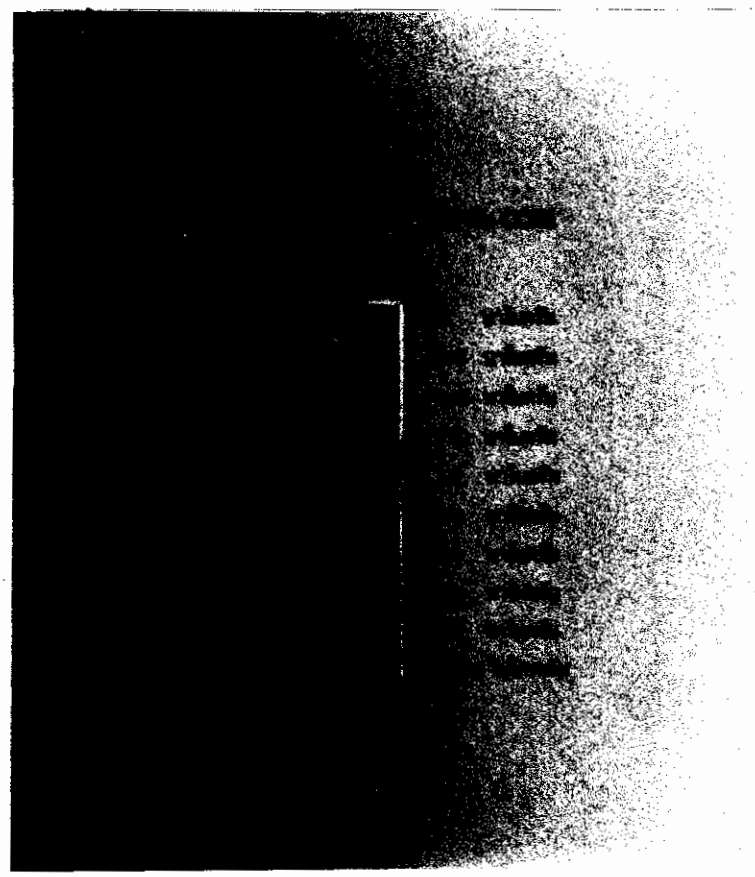
เมื่อนำสารคล้าย CCK แฟรคชั่นที่ 39 ของการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนที่ 3 มาผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 4 โดยผ่านคอลัมน์ 3 ครั้ง (ครั้งละ 2,700, 3,000 และ 3,000 ก้านตา) แล้วตรวจหาสารคล้าย CCK ด้วยวิธี Dot-ELISA พบว่าสารคล้าย CCK ติดสีคล้ายกันอยู่ในแฟรคชั่นที่ 22 จากการผ่านคอลัมน์ในสองครั้งแรก ส่วนในครั้งที่ 3 พบว่าสารคล้าย CCK ติดสีอยู่ในแฟรคชั่นที่ 20 (เปปไทด์ III) ซึ่งคลาดเคลื่อนจากสองครั้งแรก คาดว่าอาจจะเกิดจากความแปรปรวนของการจัดสภาพในการทดลองบางประการ (ภาพประกอบ 16) จากโครมาโตแกรมของสารคล้าย CCK เปปไทด์ III จะปรากฏเห็นเป็นพีคแยกออกมาจากพีคของสิ่งปนเปื้อนอื่น ๆ จึงคาดว่าสารคล้าย CCK ที่ได้นี้ค่อนข้างจะบริสุทธิ์ ค่าความเข้มสีของจุดของสารคล้าย CCK เปปไทด์ III เมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มสีของจุดของเปปไทด์มาตรฐาน CCK8 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ จะเท่ากับ 2 หน่วยเมื่อใช้ 150 ก้านตา และค่าความสูงของพีคประมาณ 50 มิลลิโวลท์

จากการทดลองเมื่อนำสารสกัดจากก้านตาของกุ้งกุลาดำ มาผ่านการทำให้บริสุทธิ์ของสารคล้าย CCK ในแต่ละขั้นตอน พบว่าจะมีการสูญเสีย immunoreactivity นี้ในระหว่างการทำให้บริสุทธิ์ค่อนข้างสูง ดังนั้นการใช้วิธี Dot-ELISA ติดตามสารนี้ในระหว่างขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์จึงจำเป็นต้องใช้ปริมาณของสารตัวอย่างเพิ่มขึ้นในการตรวจสอบด้วยวิธีนี้ในแต่ละขั้นตอน เพื่อจะได้เห็นความเข้มสีของจุดของเปปไทด์อย่างชัดเจน

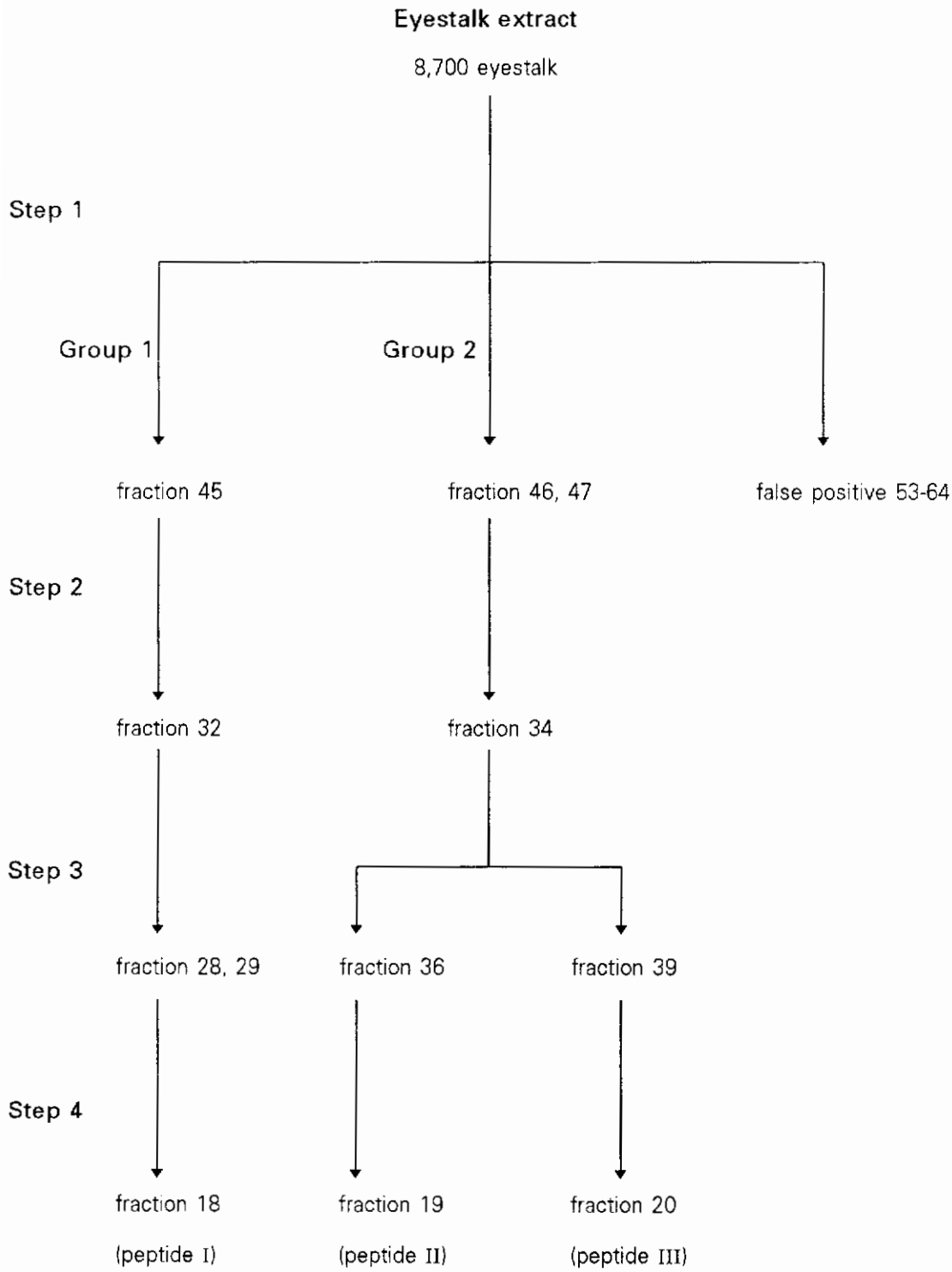
<u>การตรวจหาน้ำหนักโมเลกุลของสารคล้าย CCK โดย mass spectrometry</u>

จากการนำตัวอย่างของ เปปไทด์ I, II, III นำไปตรวจหามวลโมเลกุลโดย Matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) พบเปปไทด์ I พีคหลักอยู่ที่มวลโมเลกุล 1941.5 ดาลตัน และมีพีคของสารที่มีมวลโมเลกุลใกล้เคียงกันปะปนมาด้วย ซึ่งมีค่าความแตกต่างของมวลของสารในแต่ละพีคประมาณ 22 ดาลตัน ซึ่งมีค่าเท่ากับมวลของโซเดียม จึงคาดว่ามวลของสารในพีคย่อย ๆ เหล่านี้ อาจเป็นอนุพันธ์ของสารคล้าย CCK ที่มีโซเดียมเกาะอยู่ในปริมาณต่าง ๆ กัน (ภาพประกอบ 17)

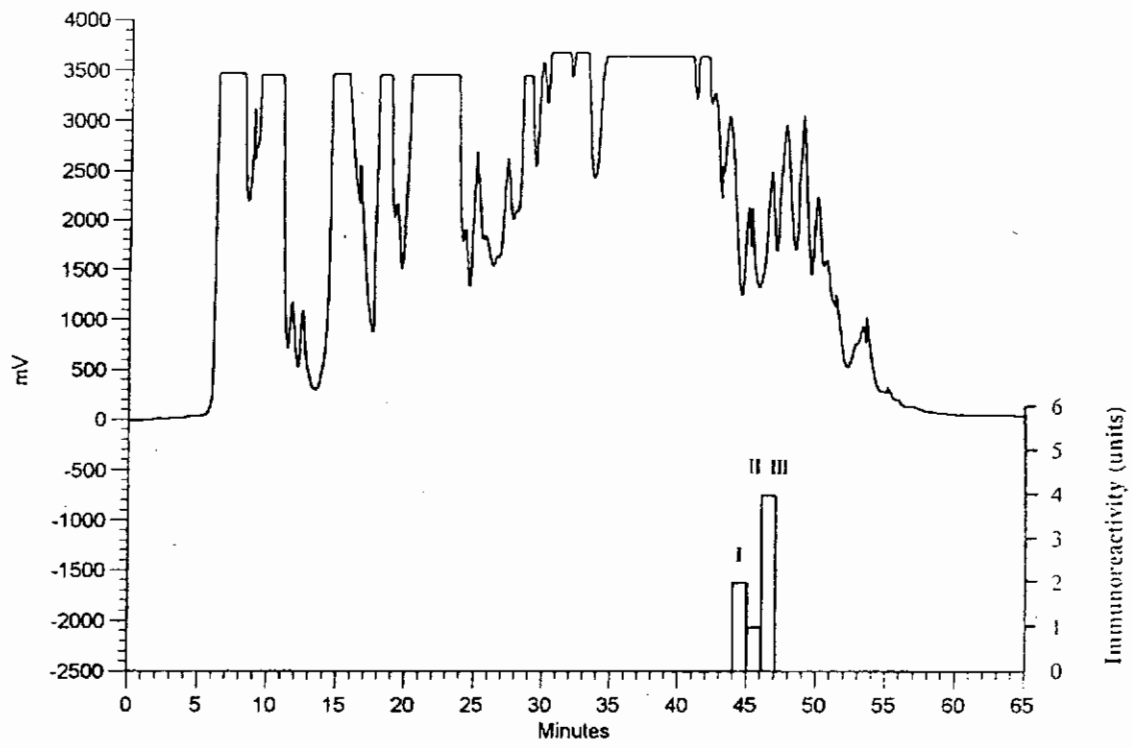
สำหรับ เปปไทด์ II และ III มีลักษณะเช่นเดียวกัน มีมวลอยู่ในพีคหลักที่ 1930.6 และ 1914.1 ดาลตัน ตามลำดับ และมวลของพีคย่อยมีน้ำหนักต่างออกไปประมาณ 22 และ 37 ดาลตัน (ซึ่งใกล้เคียงกับน้ำหนักโมเลกุลของโซเดียมกับโปแตสเซียม) จึงคาดว่าน่าจะเป็นอนุพันธ์ของสารคล้าย CCK ที่มีโซเดียมและโปแตสเซียมเกาะอยู่ในปริมาณต่าง ๆ กัน (ภาพประกอบ 18 และ 19) ดังนั้นสารคล้าย CCK ที่แยกบริสุทธิ์ได้น่าจะมีความบริสุทธิ์เพียงพอที่จะนำไปหาลำดับกรดอะมิโนต่อไป



ภาพประกอบ 6 Dot-ELISA ของเปปไทด์ CCK8 มาตรฐานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ สำหรับใช้ในการเปรียบเทียบกับสารคล้าย CCK ในตัวอย่าง เพื่อประมาณปริมาณของสารคล้าย CCK ในขั้นตอนต่าง ๆ ในระหว่างการทำให้บริสุทธิ์

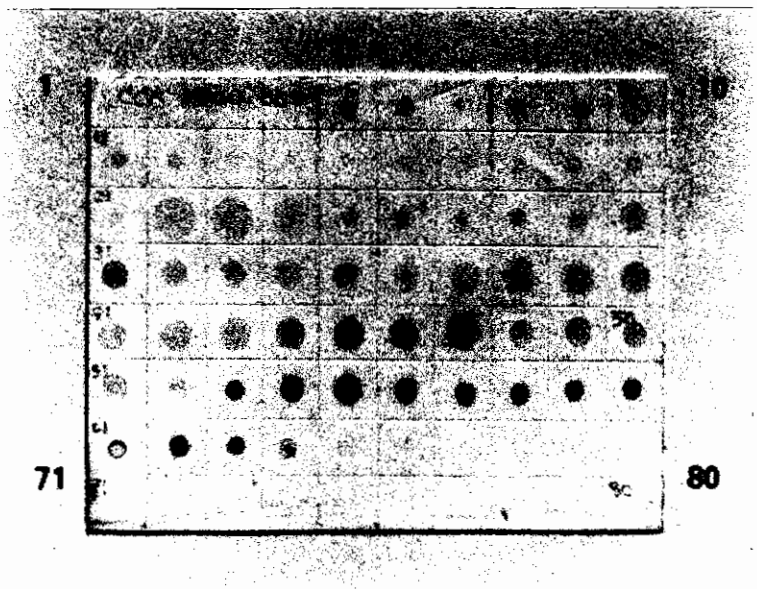


ภาพประกอบ 7 ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย CCK ด้วยกระบวนการ RP-HPLC

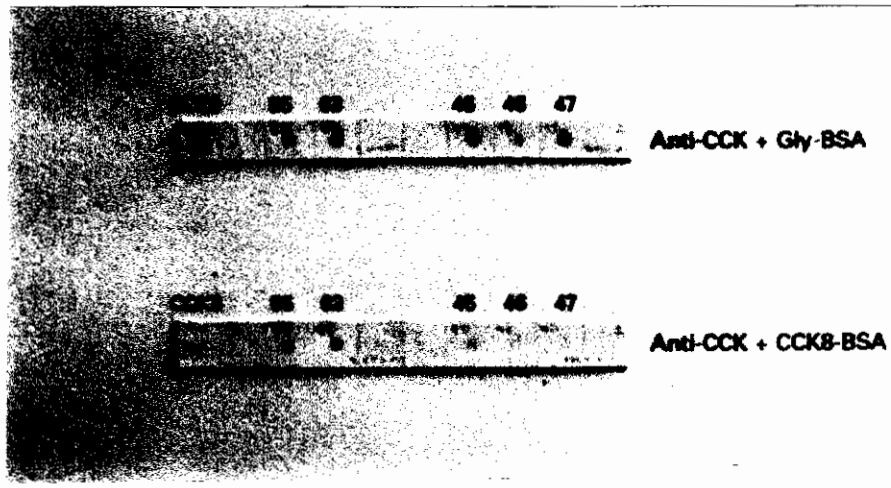


ภาพประกอบ 8 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากก้านตาของกุ้งกุลาดำ จำนวน 1,500 ก้านตา หลังจากผ่านกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนแรก (คอลัมน์ : PrepPak C18 ; ระบบตัวทำละลาย ACN / TFA) แผนภูมิแท่งอนุมานจากความเข้มสีของจุดจากปฏิกิริยาทางอิมมูโนของสารคล้าย CCK (CCK immunoreactivity) บนแผ่นไนโตรเซลลูโลส ตัวเลขเหนือแผนภูมิแท่งเป็นชื่อของเปปไทด์ที่สามารถทำให้บริสุทธิ์จากกลุ่มของแฟรคชั่นต่าง ๆ

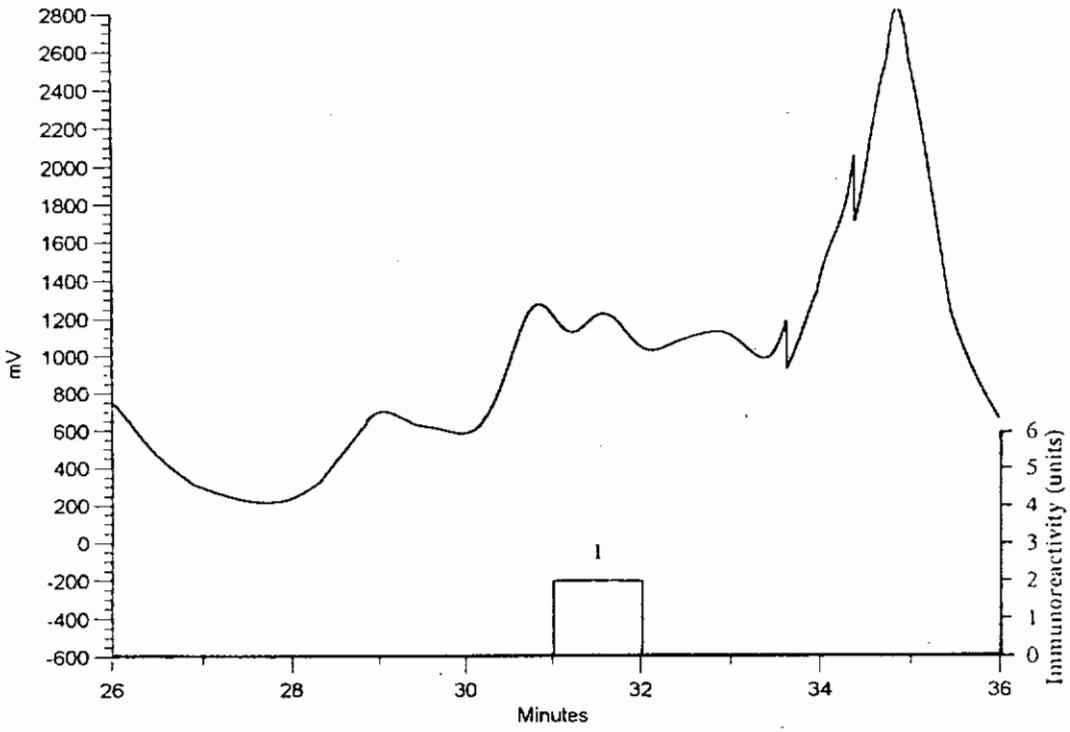
(ก)



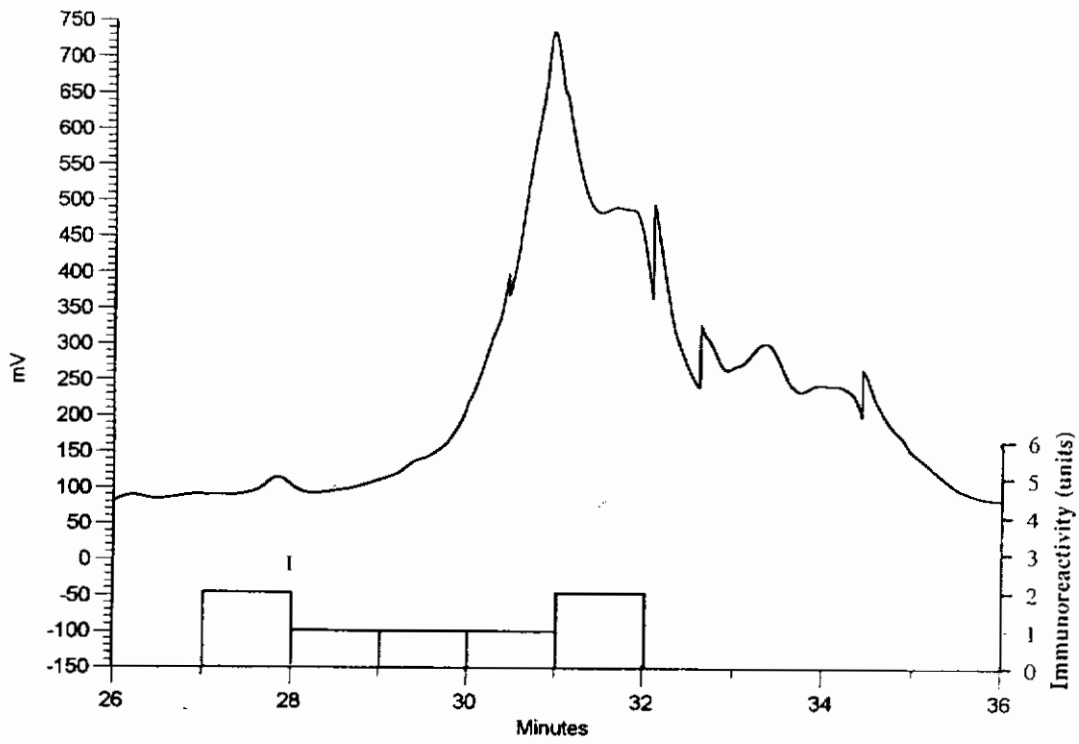
(ข)



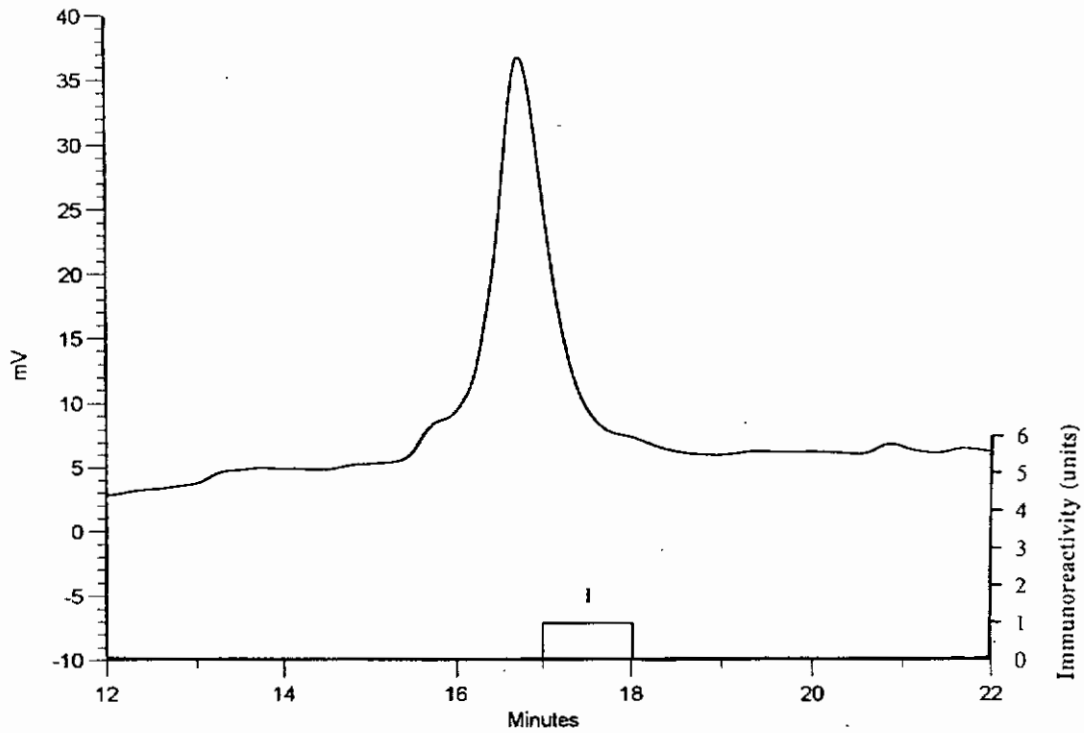
ภาพประกอบ 9 Dot-ELISA (ก). ของสารสกัดจากก้านตาที่ผ่านกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนแรก ซึ่งแบ่งมาทดสอบแต่ละจุดปริมาณเทียบเท่ากับประมาณ 20 ก้านตา แฟรคชั่นที่ติดสีแตกต่างจาก background ได้แก่ แฟรคชั่น 45-47 และ 53-64 (ข). จากการนำแฟรคชั่นที่ 45-47, 55 และ 63 มาบ่มใน anti-CCK ที่ดูดซับด้วย Gly-BSA กับ CCK8-BSA จะพบว่าในแผ่นไนโตรเซลลูโลสที่บ่มในแอนติซีรัมที่ถูกดูดซับด้วย CCK8-BSA ความเข้มสีของจุดจากแฟรคชั่น 45-47 จะจางจนเกือบหายไป ในขณะที่ความเข้มสีของจุดจากแฟรคชั่น 55 และ 63 ไม่เปลี่ยนแปลง



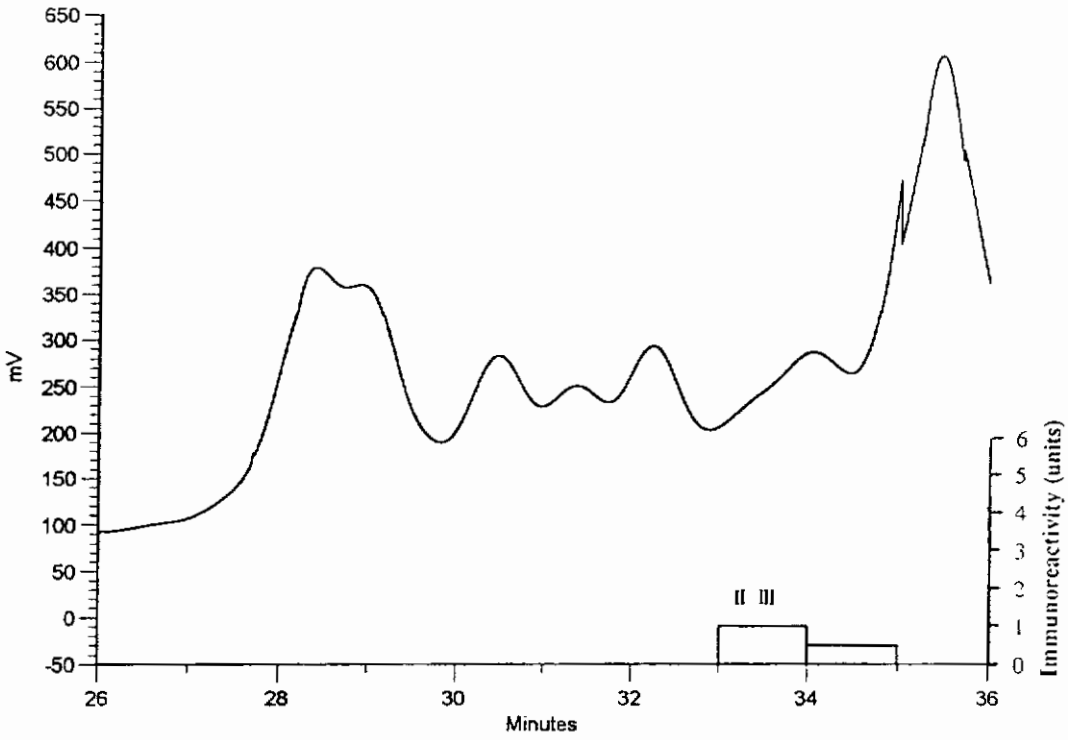
ภาพประกอบ 10 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากก้านตาของกุ้งกุลาดำกลุ่มที่ 1 (จากแฟรคชั่นที่ 45) จำนวน 3,000 ก้านตา หลังจากผ่านกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 2 (คอลัมน์ : PrepPak C8 ; ระบบตัวทำละลาย ACN / HFBA แผนภูมิแท่งอนุมานจากความเข้มสีของจุดจาก CCK immunoreactivity บนแผ่นไนโตรเซลลูโลส ซึ่งแบ่งมาทดสอบประมาณ 30 ก้านตาต่อจุด ตัวเลขเหนือแผนภูมิแท่งเป็นชื่อของเปปไทด์ที่สามารถทำให้บริสุทธิ์จากแฟรคชั่นนี้



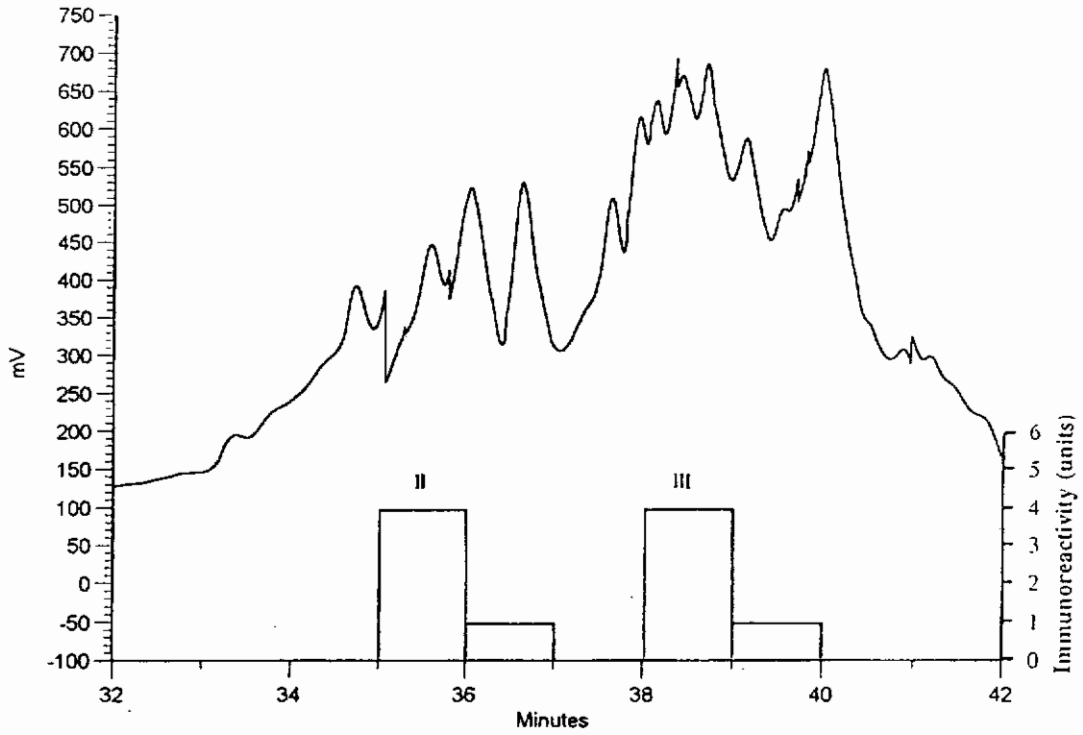
ภาพประกอบ 11 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากก้านตาของกุ้งกุลาดำกลุ่มที่ 1 (จากแฟรคชั่นที่ 32) จำนวน 8,700 ก้านตา หลังจากการผ่านกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 3 (คอลัมน์ : C8 ; ระบบตัวทำละลาย ACN / HFBA) แผนภูมิแท่งอนุมานจากความเข้มสีของจุดจาก CCK immunoreactivity บนแผ่นไนโตรเซลลูโลส ซึ่งแบ่งมาทดสอบประมาณ 100 ก้านตาต่อจุด ตัวเลขเหนือแผนภูมิแท่งเป็นชื่อของเปปไทด์ที่สามารถทำให้บริสุทธิ์จากแฟรคชั่นนี้



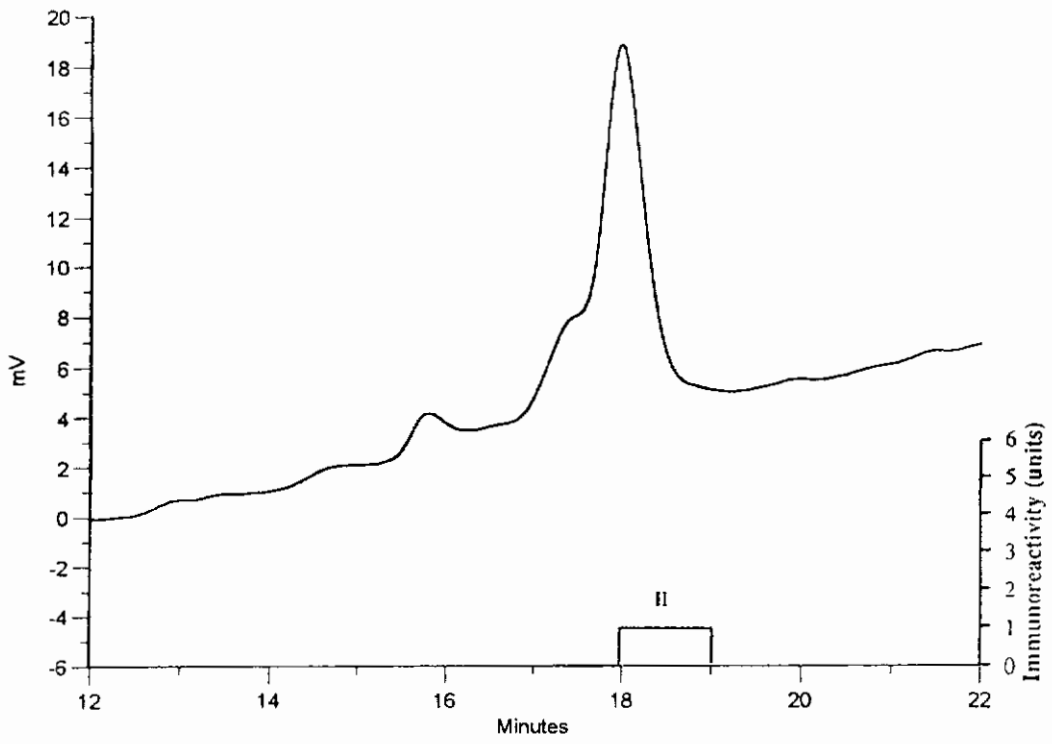
ภาพประกอบ 12 โครมาโตแกรมของสารคล้าย CCK เปปไทด์ I (จากแฟรคชั่นที่ 28 กับ 29) จากสารสกัดของก้านตากุ้งกุลาดำ จำนวน 8,700 ก้านตา หลังจากการผ่านกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 4 (คอลัมน์ : Cyano ; ระบบตัวทำละลาย ACN / TFA) แผนภูมิแท่งอนุมานจากความเข้มสีของจุดจาก CCK immunoreactivity บนแผ่นไนโตรเซลลูโลส ซึ่งแบ่งมาทดสอบประมาณ 200 ก้านตาต่อจุด ตัวเลขเหนือแผนภูมิแท่งเป็นชื่อของเปปไทด์ที่ทำให้บริสุทธิ์จากแฟรคชั่นนี้



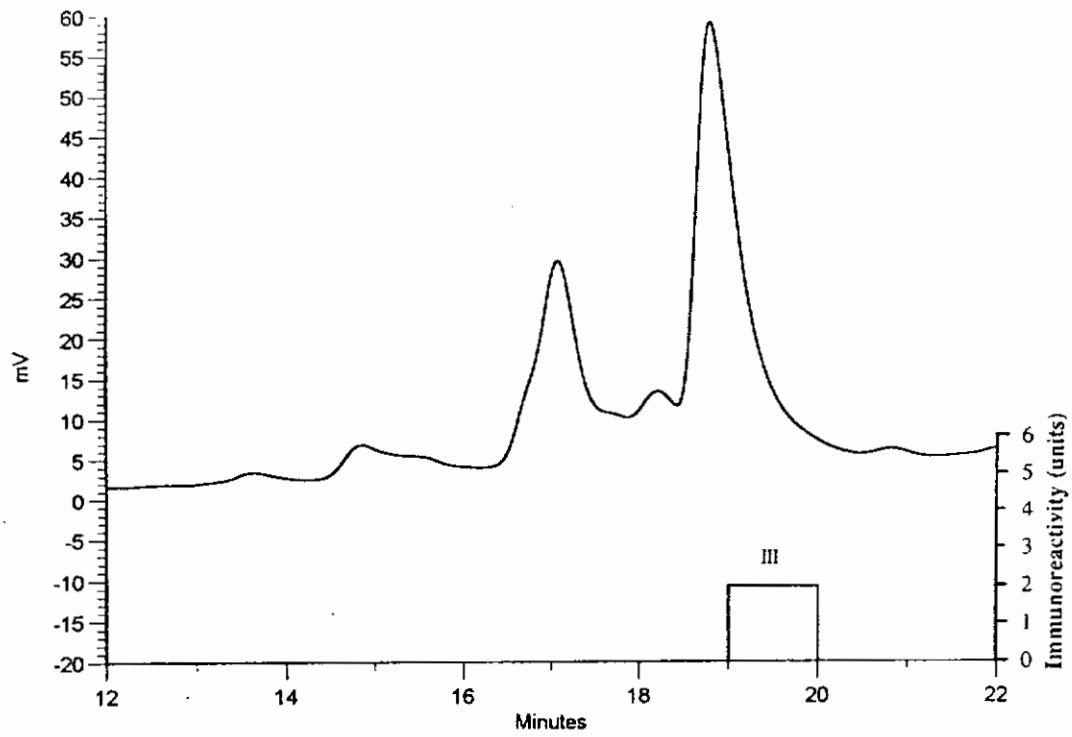
ภาพประกอบ 13 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากก้านตาของกุ้งกุลาดำกลุ่มที่ 2 (จากแฟรคชั่นที่ 46,47) จำนวน 3,000 ก้านตา หลังจากผ่านกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 2 (คอลัมน์ : PrepPak C8 ; ระบบตัวทำละลาย ACN / HFBA) แผนภูมิแท่งอนุมานจากความเข้มสีของจุดจาก CCK immunoreactivity บนแผ่นไนโตรเซลลูโลส ซึ่งแบ่งมาทดสอบประมาณ 60 ก้านตาต่อจุด ตัวเลขเหนือแผนภูมิแท่งเป็นชื่อของเปปไทด์ที่สามารถทำให้บริสุทธิ์จากแฟรคชั่นนี้



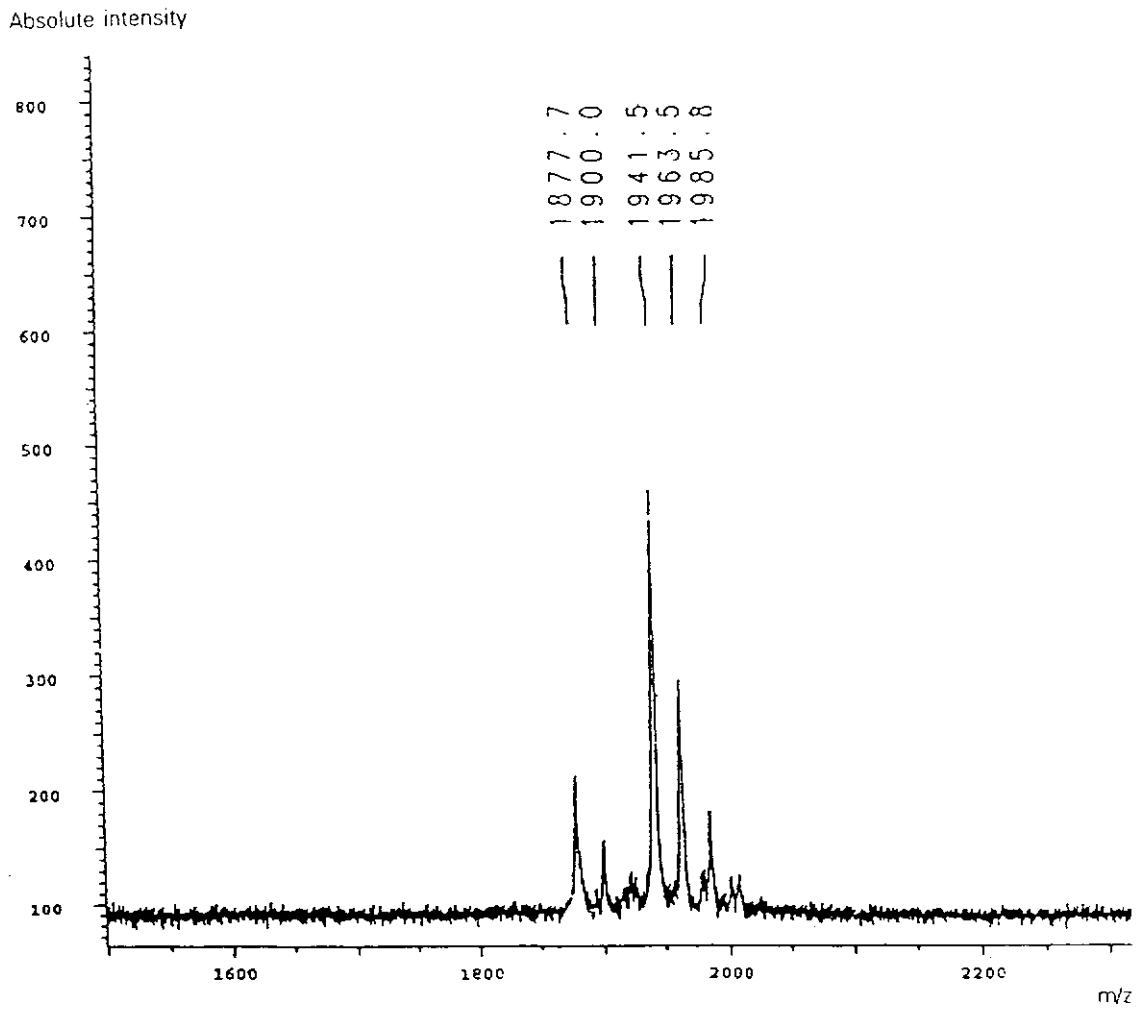
ภาพประกอบ 14 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากก้านตาของกุ้งกุลาดำกลุ่มที่ 2 (จากแฟรคชั่นที่ 34) จำนวน 3,000 ก้านตา หลังจากการผ่านกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 3 (คอลัมน์ : C8 ; ระบบตัวทำละลาย ACN / HFBA) แผนภูมิแท่งอนุมานจากความเข้มสีของจุดจาก CCK immunoreactivity บนแผ่นไนโตรเซลลูโลส ซึ่งแบ่งมาทดสอบประมาณ 100 ก้านตาต่อจุด ตัวเลขเหนือแผนภูมิแท่งเป็นชื่อของเปปไทด์ที่สามารถทำให้บริสุทธิ์จากแฟรคชั่นนี้



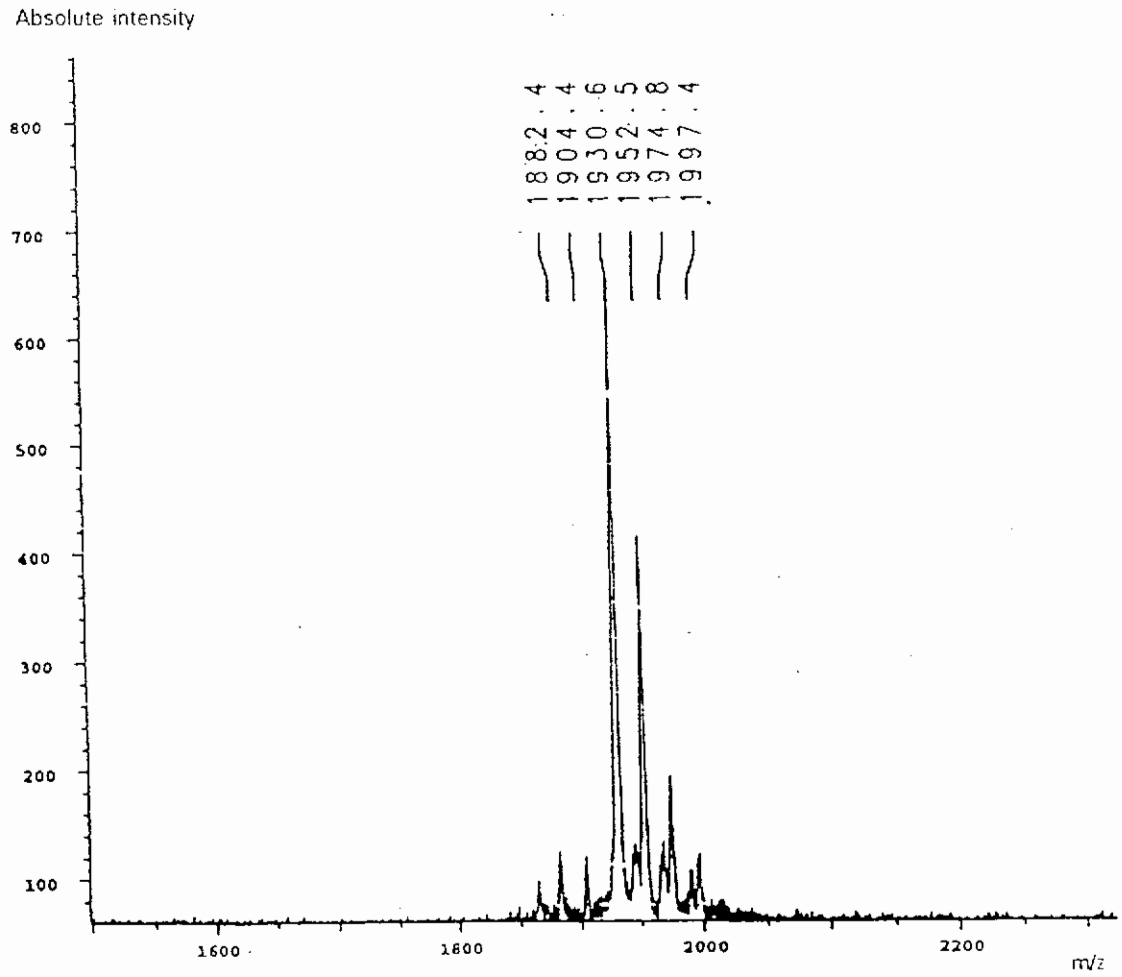
ภาพประกอบ 15 โครมาโตแกรมของสารคล้าย CCK เปปไทด์ II (จากแฟรคชั่นที่ 36) จากสาร-สกัดของก้านตากุ้งกุลาดำ จำนวน 3,000 ก้านตา หลังจากการผ่านกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 4 (คอลัมน์ : Cyano ; ระบบตัวทำละลาย ACN / TFA) แผนภูมิแท่งอนุมานจากความเข้มสีของจุดจาก CCK immunoreactivity บนแผ่นไนโตรเซลลูโลส ซึ่งแบ่งมาทดสอบประมาณ 150 ก้านตาต่อจุด ตัวเลขเหนือแผนภูมิแท่งเป็นชื่อของเปปไทด์ที่สามารถทำให้บริสุทธิ์จากแฟรคชั่นนี้



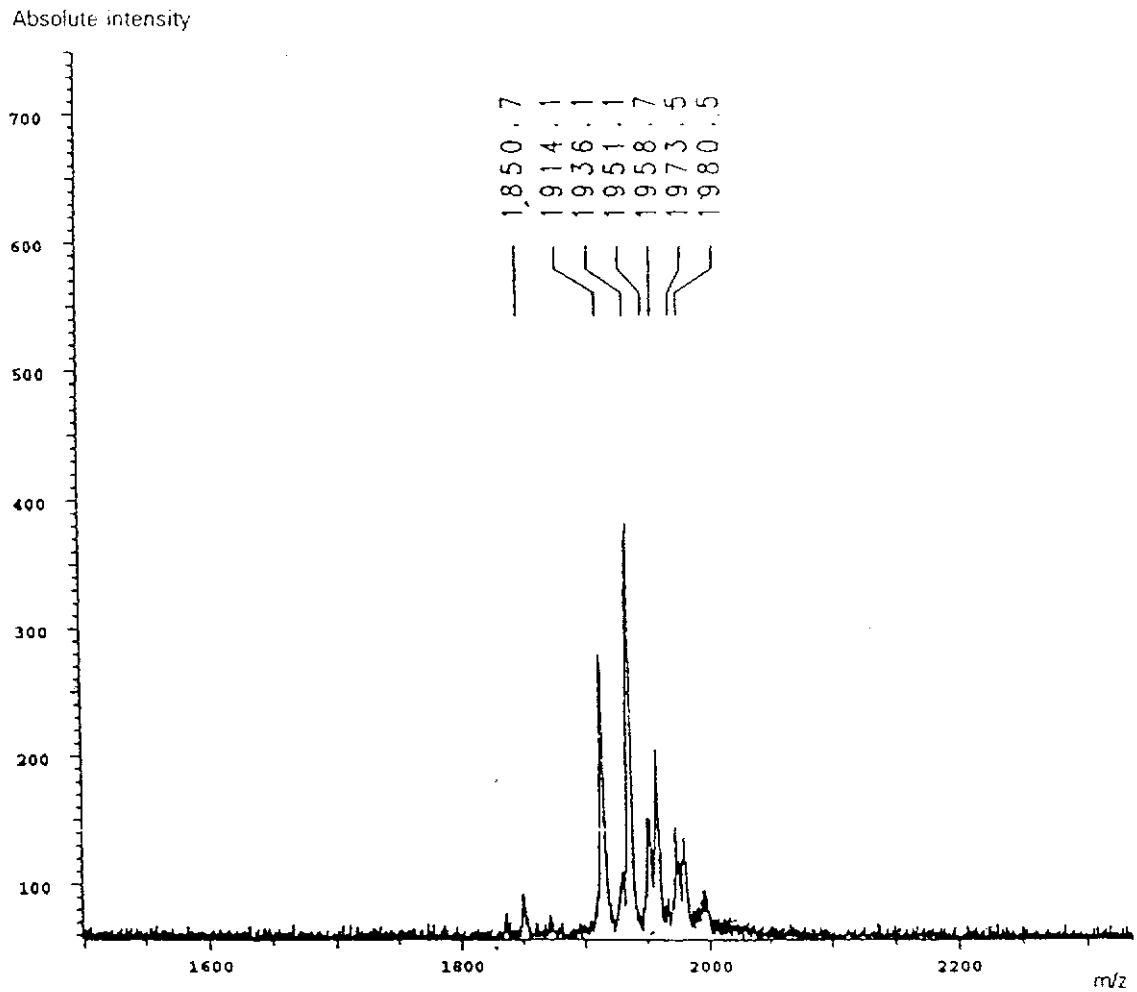
ภาพประกอบ 16 โครมาโตแกรมของสารคล้าย CCK เปปไทด์ III (จากแฟรคชั่นที่ 39) จากสาร-สกัดของก้านตากุ้งกุลาดำ จำนวน 3,000 ก้านตา หลังจากการผ่านกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 4 (คอลัมน์ : Cyano ; ระบบตัวทำละลาย ACN / TFA) แผนภูมิแท่งอนุมานจากความเข้มสีของจุดจาก CCK immunoreactivity บนแผ่นไนโตรเซลลูโลส ซึ่งแบ่งมาทดสอบประมาณ 150 ก้านตาต่อจุด ตัวเลขเหนือแผนภูมิแท่งเป็นชื่อของเปปไทด์ที่สามารถทำให้บริสุทธิ์จากแฟรคชั่นนี้



ภาพประกอบ 17 แมสสเปกตรัมของสารคล้าย CCK เปปไทด์ I



ภาพประกอบ 18 แมสสเปกตรัมของสารคล้าย CCK เปปไทด์ II



ภาพประกอบ 19 แมสสเปกตรัมของสารคล้าย CCK เปปไทด์ III

บทที่ 4
สรุปและอภิปรายผล

ในการทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย CCK จากก้านตาของกุ้งกุลาดำ จำนวน 8,700 ก้านตา สามารถแยกเปปไทด์คล้าย CCK ได้บริสุทธิ์ 3 รูปแบบ ซึ่งเมื่อนำเปปไทด์คล้าย CCK ที่แยกได้ทั้ง 3 รูปแบบนี้ไปวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลโดย MALDI-TOF-MS พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลที่พีคหลักประมาณ 1941.5, 1930.6 และ 1914.1 ดาลตัน ซึ่งผลที่ได้จากการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลนี้จะมีพีคของสารที่มีมวลโมเลกุลแตกต่างกันประมาณ 22 หรือ 37 ดาลตันปะปนมาด้วย (ภาพประกอบ 17,18 และ 19) จึงคาดว่าอาจจะเป็นอนุพันธ์ของสารคล้าย CCK ที่มีโซเดียมหรือโปแตสเซียมเกาะอยู่ในปริมาณต่าง ๆ กัน คาดว่าสารคล้าย CCK ทั้ง 3 รูปแบบอาจมีโครงสร้างต่างกันเพียงเล็กน้อยเพราะมีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกัน และอาจมีหมู่ซัลเฟตมาจับที่ไทโรซีน จึงทำให้สามารถรวมตัวกับหมู่โซเดียมและโปแตสเซียมได้หลายอะตอม ดังสารคล้าย CCK ที่พบในเพรียงหัวหอม *Ciona intestinalis* มีหมู่ซัลเฟตถึง 2 หมู่ (Johnsen and Rehfeld. 1990) ในขณะที่สารคล้าย CCK ที่พบในแมลงสาบ *Leucophaea madaerae* (Nachman and others. 1986a, b) และ *Periplaneta americana* (Veenstra. 1989) พบหมู่ซัลเฟตเพียง 1 หมู่

สำหรับรายงานเกี่ยวกับสารคล้าย CCK ในสัตว์พวกครัสตาเซียนมีเพียงรูปแบบเดียวที่ทราบโครงสร้าง คือ ในกุ้งลอบสเตอร์ *Nephrops norvegicus* พบว่ามีลำดับของกรดอะมิโนเป็น SEGGQDFWL (ตาราง 3) (Favrel and others. 1991) ซึ่งจะเห็นว่าโครงสร้างแตกต่างจาก CCK ทั่ว ๆ ไปมาก อีกทั้งไม่มีหมู่ amide ที่ปลายด้าน C หรือ ไทโรซีนซึ่งพบทั่วไปใน CCK ซึ่งอาจเป็นตำแหน่งที่สำคัญในการจับของแอนติบอดีต่อ CCK ดังนั้นลำดับกรดอะมิโนของสารคล้าย CCK นี้อาจไม่ใช่สารคล้าย CCK ที่สมบูรณ์ หรืออาจเกิดจากการ identify ผิดพลาด เนื่องจากแอนติซีรัมต่อ CCK มีแอนติบอดีปะปนมาที่สามารถจับกับสารอื่น ๆ ในสารสกัดได้ดี ซึ่งในการทดลองนี้พบว่าในแอนติ-ซีรัมที่ใช้นี้มีแอนติบอดีที่สามารถจับสารในแฟรคชั่นอื่น ๆ ซึ่งให้ปฏิกิริยาชัดเจนดีกว่าปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีต่อ CCK กับสารคล้าย CCK ที่ต้องการ ซึ่งจากการใช้แอนติซีรัมที่ดูดซับด้วย CCK8 พบว่าแอนติบอดีส่วนปะปนอยู่ยังคงสามารถจับกับแอนติเจนนี้ได้อยู่อย่างดีไม่มีการลดระดับของปฏิกิริยาดังเช่นแฟรคชั่นที่ใช้ในการแยกบริสุทธิ์เหล่านี้ (ภาพประกอบ 7) ดังนั้นจึงคาดว่าสารคล้าย CCK ที่ได้จากการทดลองนี้น่าจะแตกต่างจากที่รายงานในกุ้งลอบสเตอร์และน่าจะเป็นสารคล้าย CCK ที่พบในสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง แต่จากน้ำหนักโมเลกุลคาดว่าจะประกอบด้วยกรดอะมิโน 15-17 หน่วย ซึ่งใกล้เคียงกับขนาดของ gastrin-17 จึงเป็นไปได้เพราะแอนติซีรัมที่

ใช้เป็นแอนติบอดีสร้างต่อ CCK8 ซึ่งไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง CCK และแกสตรินได้ จากตาราง 1 จะเห็นว่ามีการตรวจพบสารคล้าย CCK อย่างกว้างขวางในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังชนิดต่าง ๆ เช่น ไฮดรา *Hydra attenuata* และ ดอกไม้ทะเล *Tealia ferina* (Grimmelikhuijzen, Sundler and Rehfeld. 1980) แอนโทซัว *Anthopleura xanthogramica* ไบรโอซัว *Bugula Sp.* ไส้เดือนดิน *Lumbricus terrestris* พวกโพลีคีตา *Abarenicola pacifica* ปู *Cancer magister* ปูแม่หอบ *Upogebia pugettensis* แมงดาทะเล *Limulus polyphemous* หอยฝาเดียว *Busycon canaliculatus* หอยทากทะเล *Aplysia californica* เพรียงทะเล *Styela montereyensis* (Larson and Vigna. 1982) แม่เพรียง *Nereis diversicolor* (Smiri, Bulet and Andries. 1992) หอยนางรมลอย *Pecten maximus* (Donval, Bellon and Wormhoudt. 1992) กุ้งมังกร *Panulirus interruptus* (Turrigiano and others. 1994) ปู *Cancer magister* (Larson and Vigna. 1983) แมลงวัน *Calliphora vomitoria* (Dockray, Duve and Thorpe. 1981) ปลาฉลาม *Squalus acanthias* (Aldman, Jonsson and Jensen. 1989) แต่มีรายงานเกี่ยวกับการแยกบริสุทธิ์ซึ่งทราบโครงสร้างเพียงในแมลง ซึ่งใช้วิธีการทางชีวภาพ (Nachman and others. 1986a, b; Veenstra. 1989) และในกุ้ง *Nephrops norvegicus* (Favrel and others. 1991) เพรียงหัวหอม *Ciona intestinalis* (Johnsen and Rehfeld. 1990) เท่านั้นที่ใช้กระบวนการ RIA ในการตรวจสอบ ทั้งนี้คาดว่าการที่ในสัตว์หลายชนิดไม่สามารถทำการแยกบริสุทธิ์จนถึงไม่สามารถทราบโครงสร้างได้ เนื่องจากแอนติซีรัมระดับ RIA (RIA grade antiserum) สำหรับ CCK นั้นยากที่จะผลิต และระหว่างการแยกบริสุทธิ์ CCK อาจมีการเปลี่ยนแปลงของสารคล้าย CCK จนแอนติซีรัมไม่สามารถจับได้ ซึ่งในการทดลองนี้ได้ชี้ให้เห็นถึงประสิทธิภาพของ Dot-ELISA ที่สามารถใช้ตรวจหาสารคล้าย CCK ได้ดี เพราะสามารถทำได้แม่นยำ รวดเร็ว มีความไวสูง ราคาถูก และไม่ยุ่งยากเท่ากระบวนการทาง RIA และที่สำคัญก็คือสามารถใช้กับแอนติซีรัมเกรดต่ำกว่า RIA grade ได้ ซึ่งสามารถจัดหาและผลิตได้ง่ายกว่า RIA grade สำหรับผลของน้ำหนักโมเลกุลของสารคล้าย CCK ทั้ง 3 รูปแบบนั้นมีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกัน จึงคาดว่าเปปไทด์ที่ได้นี้มีความบริสุทธิ์มากพอที่จะนำไปหาลำดับของกรดอะมิโนต่อไปได้

คาดว่ายังมีเปปไทด์คล้าย CCK อีกหลายรูปแบบที่ยังไม่สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ เพราะจากขั้นตอนการแยกโดยกระบวนการ RP-HPLC ยังมีแฟรคชั่นที่ให้ผลบวกต่อ anti-CCK antiserum บางแฟรคชั่นที่ยังไม่สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ เนื่องจากปริมาณของเปปไทด์น้อยลงจนยากที่จะตรวจสอบด้วยวิธี Dot ELISA ได้ (สังเกตจากความเข้มสีของจุดจางมาก) ถึงแม้จะใช้ก้านตาจำนวนมากสำหรับทดลองก็ตาม การที่ปริมาณของเปปไทด์น้อยลงอาจเกิดจากการสูญหายของเปปไทด์ในระหว่างการทำให้บริสุทธิ์ ถ้านำไปทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่อไปอาจมีปริมาณของสาร

น้อยมากจนยากที่จะตรวจสอบด้วยวิธี Dot-ELISA ได้ แต่อย่างไรก็ดีจากการทดลองจะสังเกตพบว่าเมื่อนำแฟรคชั่นที่มีสารคล้าย CCK ไปผ่านการทำให้บริสุทธิ์มากขึ้น ความเข้มสีของจุดของสารคล้าย CCK ที่ตรวจสอบด้วยกระบวนการ Dot-ELISA จะลดลง จนต้องใช้ปริมาณของสารในการตรวจสอบเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ เพื่อจะได้เห็นความเข้มสีของจุดของเปปไทด์ชัดเจนขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับการทำให้บริสุทธิ์ด้วยกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนแรกจะเห็นว่าจะใช้ปริมาณของสารในการตรวจสอบน้อย (ประมาณ 20 ก้านตา) ให้ผลความเข้มสีของจุดสูงกว่าในขั้นตอนที่ 4 ซึ่งต้องใช้ถึง 150-200 ก้านตา ซึ่งความเข้มสีของจุดของเปปไทด์ที่จางลงนี้น่าจะเกิดจากการสูญหายของเปปไทด์ไปบางส่วน เช่น อาจมีสารจับติดอยู่กับภาชนะที่ใช้ในการทดลอง การสูญหายของเปปไทด์ในส่วนด้านข้างของพีค และสูญเสียเปปไทด์จากการแบ่งสารละลายบางส่วนไปตรวจหาสารคล้าย CCK ในระหว่างขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ ทำให้ปริมาณของเปปไทด์ที่ถูกแยกลดน้อยลง และจากการตรวจดูลักษณะของ mass profile ที่ได้จากตัวอย่างในแฟรคชั่นที่คาดว่าแยกสารคล้าย CCK ได้บริสุทธิ์ พบว่าแต่ละแฟรคชั่นให้พีคจำนวนมากที่น้ำหนักโมเลกุลต่าง ๆ กัน ประมาณ 22, 16 หรือ 37 ดาลตัน ดังนั้นจึงคาดว่าในระหว่างการแยกบริสุทธิ์อาจมีหมู่โซเดียมและโปแตสเซียมมาจับหรือเกิดการ oxidation ของกรดอะมิโนบางตัว ทำให้คุณสมบัติในการจับกับแอนติบอดีเปลี่ยนไป จึงต้องเพิ่มปริมาณของสารในการตรวจสอบเพิ่มขึ้นในการทำให้บริสุทธิ์ในแต่ละขั้นตอน ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าอาจจะมีเปปไทด์คล้าย CCK อีกหลายรูปแบบที่ยังไม่สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ เพราะปริมาณของเปปไทด์ที่ถูกแยกลดน้อยลงจนความไวในการตรวจสอบด้วยวิธี Dot-ELISA ลดลง จนยากที่จะตรวจสอบได้ และการใช้วิธี Dot-ELISA นี้เป็นวิธีที่ประมาณด้วยสายตาโดยดูจากความเข้มสีของจุด ซึ่งไม่ละเอียดพอ ทำให้มีความผิดพลาดในการประมาณค่าได้มาก สำหรับในการทดลองนี้ยังไม่สามารถประมาณปริมาณของสารคล้าย CCK ที่บริสุทธิ์ที่แน่นอนได้ เพราะสารที่ได้มีปริมาณน้อยมากจากการเปรียบเทียบปริมาณของสารคล้าย CCK โดยดูจากความเข้มสีของจุดของเปปไทด์มาตรฐาน CCK8 ที่ความเจือจางระดับต่าง ๆ กับความเข้มสีของจุดของสารคล้ายCCK ที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Dot-ELISA จากการประมาณปริมาณของสารคล้าย CCK นี้จะเห็นว่าสารที่ได้นี้มีปริมาณน้อยเกินกว่าจะนำไปหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีต่าง ๆ ได้ แต่จากการประเมินผลลัพธ์ของ CCK ที่ได้ในแฟรคชั่นจากปฏิกิริยาทางอิมมูโนที่ได้นี้ได้น้อยกว่า 1% ของขั้นตอนแรก ซึ่งเป็นผลลัพธ์ที่ต่างจากความเป็นจริง เพราะคาดว่ามีสารคล้าย CCK ส่วนใหญ่ในแฟรคชั่นไม่สามารถหรือสามารถทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัมได้ต่ำกว่าขั้นตอนแรก ๆ รวมอยู่ด้วย

การศึกษาในครั้งนี้ จึงเป็นแนวทางในการทราบขั้นตอนการแยกและการทำให้บริสุทธิ์ของสารคล้าย CCK โดยที่สารนี้ยังคงสภาพ และยืนยันประสิทธิภาพของวิธี Dot-ELISA (Sithigorngul, Stretton and Cowden. 1991) ในการติดตามสารนี้ในระหว่างการทำให้บริสุทธิ์ ซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก ไม่สิ้นเปลืองสารเคมี และใช้สารในปริมาณน้อยกว่าวิธีอื่นในการตรวจหาสารคล้าย CCK ซึ่งวิธีนี้มีความไวในการตรวจสอบเทียบเท่ากับวิธี RIA แต่ไม่มีอันตรายเพราะไม่ต้องใช้สารกัมมันตภาพรังสี

ดังนั้นการทำให้บริสุทธิ์ของสารคล้าย CCK ในก้านตาของกุ้งกุลาดำรูปแบบต่าง ๆ เพื่อนำไปหาลำดับโครงสร้างของกรดอะมิโนอันเป็นพื้นฐานสำคัญในการศึกษาบทบาทและการทำงานของสารนี้ต่อไป ซึ่งจะเป็นแนวทางที่จะศึกษาถึงวิวัฒนาการของ CCK ในสัตว์ต่าง ๆ ตั้งแต่สัตว์ชั้นต่ำจนถึงสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นสูง และบทบาทการทำงานของสารคล้าย CCK รูปแบบต่าง ๆ ว่าเป็นอย่างไร มีความเกี่ยวข้องสัมพันธ์กันหรือไม่

ตาราง 3 ลำดับกรดอะมิโนของ CCK และสารคล้าย CCK ในสัตว์ต่าง ๆ

Phylum/Species	Sequence
Arthropoda	
Nephrops norvegicus (Favrel and others. 1991)	SEGGQDFWL
Leucophaea maderae (Nachman and others. 1986a)	EQFEDY(SO_3)GHMRFamide
Leucophaea maderae (Nachman and others. 1986b)	pESDDY(SO_3)GHMRFamide
Periplaneta americana (Veenstra. 1989)	EQFDDY(SO_3)GHMRFamide pESDDYGHMRFamide
Chordata	
Ciona intestinalis (Johnsen and Rehfeld. 1990)	NY(SO_3)Y(SO_3)GWMDFamide
Rana catesbeiana (Johnsen and Rehfeld. 1992)	DLLASLTHEQKQLIMSQLLPELLSELSNAEDH- LHPMRDRDY(SO_3)AGWMDFamide
Pseudomys scripta (Johnsen and Rehfeld. 1992)	DLLEALSNDNKLLMAKFLPHIYAELANREGN- WHEDAALRPLHDHDYPGWMDFamide
Chicken (Dimaline, Young and Gregory. 1986)	FLPHVFAELSDRKGFVQGNGAVEALHDHFYP- DWMDFamide
Guinea pig (Eng and Yalow. 1987)	DYVGWMDFamide
Rabbit (Eng and Yalow. 1987)	DYMGWMDFamide
Pig (Tatemoto and others. 1984)	AVQKVDGESRAHLGALLARYIQQARKAPSGR- VSMIKNLQSLDPSHRISDRDY(SO_3)MGWMD- Famide

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

โครงการหนังสือเกษตรชุมชน. ฟาร์มกุ้งทะเล. หน้า 1-10. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : เพรสโปรดักส์, 2533.

บรรจง เทียนส่งรัศมี. การเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล. หน้า 1-35. กรุงเทพฯ : อักษรเจริญทัศน์, 2529.

บังอร ศรีมุกดา. การเพาะกุ้งกุลาดำ. หน้า 2-12. เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 55. สถานีประมงน้ำกร่อย จังหวัดระยอง, 2530.

ปัญญา สุวรรณสมุทร. กุ้งแชบ๊วยและกุ้งกุลาดำ. หน้า 7-8. กรุงเทพฯ : โครงการหนังสือเกษตรชุมชน, 2534.

ปิยะพงศ์ โชติพันธุ์. การเลี้ยงกุ้ง. หน้า 27-30. โครงการคู่มือการประกอบอาชีพสำหรับประชาชน ของศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2529.

วีระวรรณ สิทธิกรกุล และคนอื่น ๆ. "การตรวจหานิวโรเปปไทด์ในก้านตาของกุ้งกุลาดำโดยปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกัน," วารสารวาริชศาสตร์. 1(1) : 1-19 ; 2537.

วัลลภ คงเพิ่มพูน. กุ้งกุลาดำ. หน้า 5-37. กรุงเทพฯ : โครงการหนังสือเกษตรชุมชน, 2531.

Aldman, G., A.C. Jonsson and J. Jensen. "Gastrin/CCK-like peptides in the spiny dogfish, *Squalus acanthias* concentrations and actions in the gut," Comp. Biochem. Physiol. 92C : 103-108 ; 1989.

Agungpriyono, S. and others. "Immunohistochemical study of the distribution of endocrine cells in the gastrointestinal tract of the lesser mouse deer (*Tragulus javanicus*)," Acta Anat. 151 : 232-238 ; 1994.

Amer, M.S. "Studies with cholecystokinin.II. Cholecystokinetic potency of porcine gastrins I and II and related peptides in three systems," Endocrinology. 84 : 1277-1281 ; 1969.

Andries, J.C. and others. "Gastrin/cholecystokinin-like immunoreactivity in the nervous system of *Aeschna cyanea* (Insecta, Odonata)," Cell Tissue Res. 257 : 105-113 ; 1989.

Bradford, M.M. "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding," Anal. Biochem. 72 : 533-544 ; 1976.

Callaway, J.C., B. Masinovsky and K. Graubard. "Co-localization of SCP_B-like and FMRFamide-like immunoreactivities in crustacean nervous system," Brain Res. 405 : 295-304 ; 1987.

Cameron, A.J., S.F. Phillips and W.H.J. Summerskill. "Effect of cholecystokinnin on motility of human stomach and gallbladder muscle in vitro," Clin. Res. 15 : 416 ; 1967.

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.

Christie, A.E. and others. "Immunocytochemical localization of multiple cholecystokinin-like peptides in the stomatogastric nervous system of the crab *Cancer borealis*," J. Exp. Biol. 198 : 263-271 ; 1995

Cowden, C. and others. "Localization and differential expression of FMRFamide-like immunoreactivity in the nematode *Ascaris suum*," J. Comp. Neurol. 333 : 455-468 ; 1993.

Dimaline, R., J. Young and H. Gregory. "Isolation from chicken antrum, and primary amino acid sequence of a novel 36-residue peptide of the gastrin/CCK family," FEBS. 205 : 318-322 ; 1986.

Dockray, G.J., H. Duve and A. Thorpe. "Immunochemical characterization of gastrin/cholecystokinin-like peptides in the brain of the blowfly, *Calliphora vomitoria*," Gen.Comp.Endocrinol. 45 : 491-496 ; 1981.

Donval, A., C. Bellon and A.V. Wormhoudtt. "Gastrin/cholecystokinin-like peptides in a bivalve mollusc *Pecten maximus*. Immunochemical characterization and post-prandial variations,"Comp. Biochem. Physiol. 101C(1) : 75-79 ; 1992.

Dore, I. and C. Frimodt. An illustrated guide to shrimp of the world. p. 152-153. New York : Van Nostrand, 1987.

Duve, H. And A. Thorpe. "Gastrin/Cholecystokinin (CCK)-like Immunoreactive neurones in the brain of the blowfly, *Calliphora erythrocephala* (Diptera)," Gen. Comp. Endocrinol. 43 : 381-391 ; 1981.

Elbal, M.T. and B. Agulleiro. "An immunocytochemical and ultrastructural study of endocrine cells in the gut of teleost fish, *Sparus auratus L.*," Gen. Comp. Endocrinol. 64 : 339-354 ; 1986

Eng, J. And R.S. Yalow. "Purification of neuropeptides:cholecystokinin and vasoactive intestinal peptide," Methods in Enzymology. 168 : 302-308; 1989.

Favrel, P. and others. "Structure and biological activity of crustacean gastrointestinal peptides identified with antibodies to gastrin/cholecystokinin," Biochimic. 73 : 1233-1239; 1991.

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.

Fingerman, M. "The endocrine mechanisms of crustacean," J. Crusta. Biol. 7(1) : 1-24 ; 1987.

Gar-cia-Arraras, J.E., I. Torres-Avillan and S. Ortiz-Miranda. "Cells in the intestinal system of holothurians (echinodermata) express cholecystokinin-like immunoreactivity," Gen. Comp. Endocrinol. 83 : 233-242 ; 1991.

Gregory, H. "The antral hormone gastrin," Nature. 204 : 931-933 ; 1964.

Grimmelikhuijzen, C.J.P., F. Sundler and J.F. Rehfeld. "Gastrin/CCK-like immunoreactivity in the nervous system of coelenterates," Histochemistry. 69: 61-68; 1980.

Guissi-Kadri, S. and others. "Precursors of neuropeptides in the marine worm *Nereis diversicolor In Vitro* translation of a precursor related to human prepro-cholecystokinin and immunolocalization of this precursor in the nervous system," Biol. Cell. 71 : 81-87 ; 1991.

Hedner, P., H. Persson and G. Rorsman. "Effect of cholecystokinin on small intestine," Acta Physiol. Scand. 70 : 250-254 ; 1967.

Hersey, S.J., D. May and D. Schyberg. "Stimulation of pepsinogen release from isolated gastric glands by cholecystiokinin-like peptides," Am. J. Physiol. 244 : G192-G197 ; 1983.

Himick, B.A. and R.E. Peter., "Neuropeptide regulation of feeding and growth hormone secretion in fish," Netherlands Journal of Zoology. 45 : 3-9 ; 1995.

Himick B.A. and others. " CCK/gastrin-like immunoreactivity in the goldfish pituitary: regulation of pituitary hormone secretion by CCK-like peptides in vitro," Gen. Comp. Endocrinol. 92 : 88-103 ; 1993.

Holthuis, L.B. FAO Species Catalogue Vol. 1 Shrimps and Prawns of the World. FAO Fisheries Synopsis 125(1) : 50 ; 1980.

Huberman, A. and M.B. Aguilar. "A neurosecretory hyperglycemic hormone from the sinus gland of the Mexican crayfish, (*Procambarus bouvieri* : Ortamann)-I. Purification and biochemical characterization of the most abundant form of the hormone," Comp. Biochem. Physiol. 85B (1) : 197-203 ; 1986.

Johnsen, A.H. and J.F. Rehfeld. "Cionin: a disulfotyrosyl hybrid of cholecystokinin and gastrin from the neural ganglion of the protochordate *Ciona intestinalis*," J. Biol. Chem. 25 3054-3058 ; 1990.

Johnsen, A.H. and J.F. Rehfeld,. "Identification of cholecystokinin/gastrin peptides in frog and turtle evidence that cholecystokinin is phylogenetically older than gastrin,"Eur. J. Biochem. 297 : 419-428 ; 1992.

Jones, R.S. and M.I. Grossman. "Choleretic effects of cholecystokinin, gastrin I and caerulein in the dog," Am. J. Physiol. 219 : 1014-1018 ; 1970.

Keller, R. "Crastacean neuropeptides : Structure, functions and comparative aspects," Experientia. 48 : 439-448 ; 1992.

Kleinholz, L.H. and others. "Isolation and sequence analysis of a pigment-dispersing hormone from eyestalks of the crab, *Cancer magister*," Biol. Bull. 170 : 135-143 ; 1986.

Konturek and others. "Gut hormones in stimulation of gastroduodenal alkaline secretion in concious dogs," Am. J. Physiol. 248 : G687-G691 ; 1985.

Larsson, L.-I. and J.F. Rehfeld. "Localization and molecular heterogeneity of cholecystokinin in the central and peripheral nervous system," Brain Res. 165 : 201-218 ; 1979.

Larson, B.A. and S.R. Vigna. "Gastrin/cholecystokinin-like immunoreactive peptides in the dungeness crab, *Cancer magister* (Dana) : immunochemical and biological characterization," Regulatory Peptides. 7 : 155-170 ; 1983.

Larson, B.A. and S.R. Vigna. "Species and tissue distribution of cholecystokinin/gastrin-like substances in some invertebrates," Gen. Comp. Endocrinol. 50 : 469-475 ; 1983.

Lundquist, T. and D.R. Nassel. "Substance P-, FMRFamide-, and Gastrin/cholecystokinin-like immunoreactive neurons in the thoraco-abdominal ganglia of the flies *Drosophila* and *Calliphora*," J. Comp. Neurol. 294 : 161-178 ; 1990.

Nachman, R.J. and others. "Leucosulfakinin, a sulfated insect neuropeptide with homology to gastrin and cholecystokinin," Science. 234 : 71-73 ; 1986a.

Nachman, R.J. and others. "Leucosulfakinin II a blocked sulfated insect neuropeptide with homology to cholecystokinin and gastrin," Biochem. Biophy. Res. Commun. 140(1) : 357-364 ; 1986b.

Nichols, R., S.A. Schneuwly and T.E. Dixon. "Identification and characterization of a *Drosophila* homologue to the vertebrate neuropeptide cholecystokinin," J. Biol. Chem. 263(25) : 12167-12170 ; 1988.

Osborne, N.N., A.C. Cuello and G.J. Dockray., "Substance P and cholecystokinin-like peptides in *Helix* neurons and cholecystokinin and serotonin in a giant neuron," Science. 216 : 409-411 ; 1982

Pestarino, M. "CCK-like peptides in the neural complex of a protochordate," Peptides. 6(3) : 389-392 ; 1985.

Schjoldager, B. and others. "Cionin, aprotochordean hybrid of cholecystokinin and gastrin : biological activity in mammalian systems," Am. J. Physiol. 260 : G977-G982 ; 1991.

Schmidt, M. and B.W. Ache. "Descending neurons with dopamine-like or with substance P/ FMRFamide-like immunoreactivity target the somata of olfactory interneurons in the brain of spiny lobster, *Panulirus argus*," Cell Tissue Res. 278 : 337-352 ; 1994.

Sithigorngul, P. and A.O.W. Stretton. "Six more FMRFamide-like peptides from the nematode *Caenorhabditis elegans* : four new and two old," Third progress report for biotechnology career fellowship. The Rockefeller Foundation. 1-18 ; 1995.

Sithigorngul, P., A.O.W. Stretton and C. Cowden. "A versatile dot-ELISA method with femtomole sensitivity for detecting small peptides," J. Immunol. Methods. 141 : 23-32 ; 1991.

Sithigorngul, P., C. Cowden and A.O.W. Stretton. "Heterogeneity of cholecystokinin/gastrin-like immunoreactivity in the nervous system of the nematode *Ascaris suum*," J. Comp. Neurol. 370 : 427-442 ; 1996

Smiri, Y., P. Bulet and J.C. Andries. "Molecular heterogeneity of gastrin/cholecystokinin-like immunoreactive peptides in *Nereis diversicolor* (Annelida, Polychaeta," Comp. Biochem. Physiol. 101C(1) : 71-73 ; 1992.

Solis, N.B. Biology and Culture of *Penaeus monodon*. p 6-10. Philippines. Asian Fisheries Development Center, 1988.

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.

Stening, G.F. and M.I. Grossman. "Gastrin-related peptides as stimulants of pancreatic and gastric secretion," Am. J. Physiol. 217(1) : 262-266 ; 1969.

Tatemoto and others. "Isolation and characterization of cholecystokinin-58 (CCK-58) from porcine brain," FEBS. 174(2) : 289-293 ; 1984.

Turrigiano, G.G. and others. " Partial purification, tissue distribution and modulatory activity of a crustacean cholecystokinin-like peptide," J. Exp. Biol. 187 : 181-200 ; 1994.

Turrigiano, G.G. and A.I. Selverston. "Cholecystokinin-like peptides is a modulator of a crustacean central pattern generator," J. Neurosci. 9 (7) : 2486-2501 ; 1989.

Turrigiano, G.G. and A.I. Selverston. "A cholecystokinin-like hormone activates a feeding-related neural circuit in lobster," Nature. 344 : 866-868 ; 1990.

Veenstra J.A. "Isolation and structure of two gastrin/CCK-like neuropeptides from the American cockroach homologous to the leucosulfakinins," Neuropeptides. 14 : 145-149 ; 1989.

Williams R.H. and J. Champagne. "Effect of cholecystokinin, secretin, and pancreatic polypeptide, insulin, and glucagon," Life science. 25 : 947-956 ; 1979.

ภาคผนวก

การเตรียมสารเคมี

1. สารละลาย 1% Trifluoroacetic acid (TFA)

TFA		1 มิลลิลิตร
H_2O (triple distilled water)	ปรับปริมาตรเป็น	100 มิลลิลิตร

2. สารละลาย 1% Heptafluoro butyric acid (HFBA)

HFBA		1 มิลลิลิตร
H_2O (triple distilled water)	ปรับปริมาตรเป็น	100 มิลลิลิตร

3. สารละลาย 0.1% TFA

1% TFA		10 มิลลิลิตร
H_2O (triple distilled water)	ปรับปริมาตรเป็น	100 มิลลิลิตร

4. สารละลาย 0.1% HFBA

1% HFBA		10 มิลลิลิตร
H_2O (triple distilled water)	ปรับปริมาตรเป็น	100 มิลลิลิตร

5. สารละลาย 80% acetonitirle ใน 0.1% TFA

Acetonitrile (HPLC-grade)		80 มิลลิลิตร
1% TFA		10 มิลลิลิตร
H_2O (triple distilled water)	ปรับปริมาตรเป็น	100 มิลลิลิตร

6. สารละลาย 50% acetonitrile ใน 0.1% TFA

Acetonitrile (HPLC-grade)		50 มิลลิลิตร
1% TFA		10 มิลลิลิตร
H_2O (triple distilled water)	ปรับปริมาตรเป็น	100 มิลลิลิตร

7. สารละลาย 80% acetonitrile ใน 0.1% HFBA

Acetonitrile (HPLC-grade)		80 มิลลิลิตร
1% HFBA		10 มิลลิลิตร
H_2O (triple distilled water)	ปรับปริมาตรเป็น	100 มิลลิลิตร

8. ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ (Phosphate Buffered Saline-PBS) 0.15 โมลาร์ พีเอช 7.2

NaCl		8.00 กรัม
KCl		0.20 กรัม
KH_2PO_4		0.20 กรัม
Na_2HPO_4		1.15 กรัม
หรือ $Na_2HPO_4.7H_2O$		2.15 กรัม
H_2O (distilled water)	ปรับปริมาตรเป็น	1,000.00 มิลลิลิตร

9. สารละลาย Blotto 5%

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

10. สารละลายสับสเตรท

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

11. การตรวจหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีแบรดฟรอด

11.1 เตรียมโปรตีนมาตรฐาน BSA ในช่วงความเข้มข้น 0.01-0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ละลายใน PBS

11.2 เจือจางโปรตีนที่ต้องการตรวจหาให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ

11.3 ดูดสารละลายโปรตีนมาตรฐานและโปรตีนที่ต้องการตรวจหาลงในหลอดทดลอง หลอดละ 1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Bradford reagent ลงไปหลอดละ 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 2 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร และคำนวณปริมาณของโปรตีนที่ต้องการตรวจหาโดยเทียบจากกราฟของโปรตีนมาตรฐาน

12. การเตรียมสารละลายแบรดฟรอด รีเอเจนต์ (Bradford Reagent)

Coomassie Brilliant Blue G-250		100 มิลลิกรัม
95% ethanol		50 มิลลิลิตร
85% phosphoric acid		100 มิลลิลิตร
H_2O (distilled water)	ปรับปริมาตรเป็น	1,000 มิลลิลิตร

13. การเตรียม CCK8-BSA และ Gly-BSA

ละลาย CCK8 หรือ glycine 0.25 มิลลิกรัมในน้ำ 50 ไมโครลิตร และผสมกับ BSA 20 มิลลิกรัมที่ละลายในน้ำ 200 ไมโครลิตร แล้วเติม PBS ที่ pH 7.4 ปริมาณ 350 ไมโครลิตร และ 8% glutaraldehyde ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ให้ทำปฏิกิริยาข้ามคืน นำ BSA ที่เชื่อมต่อกับ CCK8 และที่เชื่อมต่อกับ Gly ไปทำการไดอะไลซ์ (dialyze) ในน้ำกลั่น 2 ลิตร ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 2 วันโดยเปลี่ยนน้ำกลั่น 4 ครั้ง หลังจากไดอะไลซ์เสร็จแล้วนำสารที่ได้ไปผสมกับ PBS ในปริมาณเท่ากัน หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีแบรดฟรอด (Bradford, 1976) โดยใช้ BSA เป็นโปรตีนมาตรฐาน (วิธีการทำดัดแปลงจากวิธีการของ Sithigorngul ,Cowden and Stretton. 1996)

ประวัติย่อของผู้วิจัย

ชื่อ นางสาวธิดา ชื่อสกุล อมร

เกิดวันที่ 18	เดือน กันยายน	พุทธศักราช 2515
สถานที่เกิด		กรุงเทพฯ
สถานที่อยู่ปัจจุบัน		บ้านเลขที่ 249 ซอยแสงอุทัย
		สุขุมวิท 50 เขตพระโขนง
		กรุงเทพฯ 10250

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2533	มัธยมปลาย (แผนกวิทยาศาสตร์) จากโรงเรียนสาธิต มัธยมวิทยาลัยครูเพชรบุรี วิทยาลงกรณ์ กรุงเทพฯ
พ.ศ. 2537	กศ.บ. เคมี จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ วิทยาเขต บางเขน
พ.ศ. 2540	วท.ม. เคมีชีวภาพ จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ วิทยาเขต ประสานมิตร

การแยกและการทำให้บริสุทธิ์สารคล้ายฮอร์โมนโคลีซิสโตไคนิน จากก้านตากุ้งกุลาดำ

บทคัดย่อ

ของ

ธิดา อมร

เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิชาเอกเคมีชีวภาพ
มีนาคม 2541

การแยกสารคล้าย CCK จากก้านตาของกุ้งกุลาดำจำนวน 8,700 ก้านตา ทำโดยสกัดก้านตาที่บดละเอียดในสารละลายเมทานอล-กรดอะซิติก-น้ำ (90 : 9 : 1) หลังจากนำสารสกัดผ่าน C18 cartridge แล้ว นำไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไปด้วย RP-HPLC 4 ขั้นตอน โดยใช้คอลัมน์ PrepPak C18, PrepPak C8, Microsorb-MV C8 และ Microsorb-MV Cyano และระบบตัวทำละลาย 2 ระบบ คือ acetonitrile (ACN) / trifluoroacetic acid และ ACN / heptafluorobutyric acid การติดตามสารคล้าย CCK ระหว่างการแยกบริสุทธิ์ใช้วิธี Dot-ELISA โดยใช้ rabbit anti-CCK antiserum การศึกษาครั้งนี้สามารถทำเปปไทด์คล้าย CCK ให้บริสุทธิ์ได้ 3 รูปแบบจาก 3 ลำดับส่วนของ RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 1 ผลการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโดย MALDI-TOF-MS พบว่าเปปไทด์ 3 รูปแบบนี้มีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกัน คือ 1941.5, 1930.6 และ 1914.1 ดาลตัน อาจเป็นไปได้ว่าเปปไทด์ 3 รูปแบบนี้อาจจะมีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกัน แต่มีกรดอะมิโนบางตัวที่ต่างกัน

ISOLATION AND PURIFICATION OF CHOLECYSTOKININ-LIKE SUBSTANCES FROM THE EYESTALK OF THE GIANT TIGER PRAWN *Penaeus monodon*

AN ABSTRACT

BY

TIDA AMON

Presented in partial fulfillment of requirements for the

Master of Science Degree in Biological Chemistry

at Srinakarinwirot University

March 1998

Isolation of the CCK-like peptides from the eyestalks of *Penaeus monodon* was performed by extracting ground 8,700 eyestalks with in methanol-acetic-water (90 : 1 : 9). After the extract was partially purified from C18 cartridge, it was further purified by 4 steps of RP-HPLC using 4 kinds of column; PrepPak C18, PrepPak C8, Microsorb-MV C8 and Microsorb-MV Cyano, and 2 solvent systems: acetonitrile (ACN) / trifluoroacetic acid, ACN / heptafluoro-butyric acid. Dot-ELISA using rabbit anti-CCK antiserum made against CCK was used to detect CCK-like peptides in the fraction during each step of purification. Three isoforms of CCK-like peptides were obtained from the three fractions of the first step of purication by RP-HPLC. Molecular weight of the three peptides determined using MALDI-TOF-MS technique are 1941.5, 1930.6 and 1914.1 daltons. These CCK-like substances may have similar sequences but different only few amino acids.