

การแยกและทำให้บริสุทธิ์สารคล้ายพิกเมนต์สีสเปอรฺ์ซิงฮอร์โมน
จากก้านตาของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon*

ปริญญาโท
ของ
ปิยนาท เกียรติสมชาย

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิชาเอกเคมีชีวภาพ
กันยายน 2544
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

๕๙๕.3843

ปี ๒๕๓๓

๑๓

การแยกและทำให้บริสุทธิ์สารคล้ายพริกเมนดีดีสเพอร์ซิงฮอร์โมน
จากก้านตาของกิ้งกูดดำ *Penaeus monodon*

บทคัดย่อ
ของ
ปิยนาท เกียรติสมชาย

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิชาเอกเคมีชีวภาพ

กันยายน 2544

๕๙๕.๓๘๔๓

ปิยนาก เกียรติสมชาย. (2544). การแยกและทำให้บริสุทธิ์สารคล้ายพิกเมนต์ดีสเพอร์ซิงฮอร์โมนจากก้านตาของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon*. ปริญญาโท วท.ม. (เคมีชีวภาพ). กรุงเทพฯ : บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.
คณะกรรมการควบคุม : รองศาสตราจารย์ ดร. ไพศาล สิทธิกรกุล, รองศาสตราจารย์ ดร. วีระวรรณ สิทธิกรกุล, อาจารย์ ดร. ศิวาพร ลงยันต์.

การแยกสารคล้าย PDH จากก้านตาของกุ้งกุลาดำจำนวน 7,500 ก้านตา ทำโดยสกัดก้านตาที่บดละเอียดในสารละลายเมทานอล-กรดอะซิติก-น้ำ (90 : 1 : 9) หลังจากนั้นสารสกัดแยกผ่าน C18 Sep-Pak cartridge และชะด้วย 50% acetonitrile (ACN)/0.1% trifluoroacetic acid (TFA) แล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์ต่อด้วย RP-HPLC 5-7 ขั้นตอนโดยใช้ PrepPak C18 column, PrepPak C8 column, Microsorb MV C8 column, Microsorb MV Cyano column และระบบตัวทำละลาย 2 ระบบคือ ACN/TFA และ ACN/ heptafluoroacetic acid (HFBA) ติดตามสารคล้าย PDH ในระหว่างการทำให้บริสุทธิ์ใช้วิธี dot-Enzyme Linked Immunosorbent Assay (dot-ELISA) โดยใช้ rabbit anti-βPDH polyclonal antibody จากแฟรคชัน 17 แฟรคชันของ RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 1 สามารถทำให้บริสุทธิ์ไปโตด์ของสารคล้าย PDH ได้ 18 แฟรคชัน ซึ่งจากการตรวจหาน้ำหนักโมเลกุลของสารคล้าย PDH ในแฟรคชันเหล่านี้ด้วย MALDI-TOF-MS พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 1048.7-1953.1 ดาลตัน โดยสารคล้าย PDH ที่พบมีความแตกต่างๆ จากที่เคยรายงานในสัตว์พวกครัสตาเซียอื่นๆ อยู่บ้าง จึงคาดว่าสารคล้าย PDH ที่ได้จากการทดลองครั้งนี้ น่าจะมีลำดับกรดอะมิโนแตกต่างจากลำดับกรดอะมิโนของสารคล้าย PDH ที่เคยมีรายงานมาก่อน

ISOLATION AND PURIFICATION OF PIGMENT DISPERSING HORMONE-LIKE
SUBSTANCES FROM THE EYESTALKS OF GIANT TIGER PRAWN

Penaeus monodon

AN ABSTRACT

BY

PIYANART KIATSOMCHAI

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

September 2001

Piyanart Kiatsomchai. (2001). *Isolation and Purification of Pigment Dispersing Hormone-Like Substances from the Eyestalks of Giant Tiger Prawn *Penaeus monodon**. Master thesis, M.Sc. (Biological Chemistry). Bangkok : Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committee : Assoc. Prof. Dr. Paisarn Sithigorngul, Assoc. Prof. Dr. Weerawan Sithigorngul, Dr. Siwaporn Longyant.

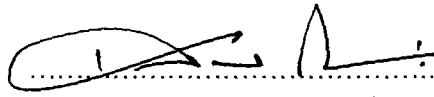
Isolation of the PDH-like peptides from the eyestalks of *Penaeus monodon* was performed by extracting ground 7,500 eyestalks with in methanol-acetic acid-water (90 : 1 : 9). The extract was partially purified using the C18 cartridge, eluted with 50% acetonitrile (ACN)/0.1% trifluoroacetic acid (TFA) and further purified by 5-7 steps of RP-HPLC using 4 kinds of column ; PrepPak C18, PrepPak C8, Microsorb MV C8 and Microsorb MV Cyano, and 2 solvent systems : ACN/TFA, ACN/heptafluoroacetic acid (HFBA). Dot-Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Dot-ELISA) using rabbit anti- β PDH polyclonal antibody made against PDH was used to detect PDH-like peptides in the fraction during each step of purification. Eighteen fractions of PDH-like peptides were obtained from the first seventeen positive fractions of the first purification step. The molecular weights of these peptides determined by MALDI-TOF mass spectrometry are between 1048.7-1953.1 dalton. These peptides are different from PDH of other crustaceans. Therefore, most of the PDH-like peptides from *P. monodon* are expected to be new peptides.

ปริญญาานิพนธ์
เรื่อง


การแยกและทำให้บริสุทธิ์สารคล้ายพิกเมนต์ดีสเปอร์ซิงฮอริโมน
จากก้านตาของกิ้งกูดดำ *Penaeus monodon*

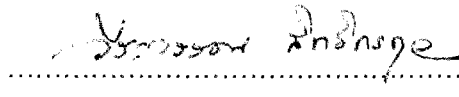
ของ
นางสาวปิยนถ เกียรติสมชาย

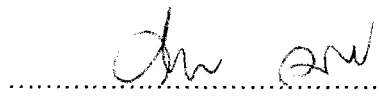
ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิชาเอกเคมีชีวภาพ
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

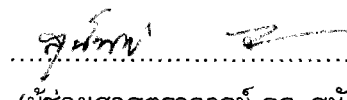

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ ดร. เสริมศักดิ์ วิศาลาภรณ์)
วันที่ ๒๑ เดือน กันยายน พ.ศ. ๒๕๔๔

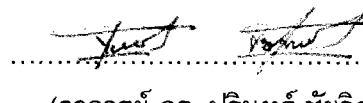
คณะกรรมการสอบปริญญาานิพนธ์


..... ประธาน
(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพศาล สิทธิกรกุล)


..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. วีระวรรณ สิทธิกรกุล)


..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร. ศิวาพร ลงยันต์)


..... กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุนันท์ ชัยนะกุล)


..... กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม
(อาจารย์ ดร. ปรินทร์ ชัยวิสุทธางกูร)

ประกาศคุณูปการ

ปริญญาานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความช่วยเหลือและคำแนะนำอย่างดียิ่งจาก รองศาสตราจารย์ ดร. ไพศาล สิทธิกรกุล รองศาสตราจารย์ ดร. วีระวรรณ สิทธิกรกุล และ อาจารย์ ดร. ศิวาพร ลงยันต์ รวมทั้งผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพันธ์ ชัยนะกุล และ อาจารย์ ดร. ปรีนทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร ที่กรุณาร่วมเป็นกรรมการสอบ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่าง สูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อนันต์ พุทธิยาสถาพร ที่กรุณาร่วม เป็นกรรมการสอบเค้าโครงปริญญาานิพนธ์

ขอขอบคุณ Dr. R. Rao มหาวิทยาลัยเวสต์ฟลอริดา สหรัฐอเมริกาที่กรุณาอนุเคราะห์ rabbit β -PDH polyclonal antibody สำหรับใช้ในการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณศิริรัตน์ นิสารัตนพร ผู้ร่วมการวิจัยที่ให้คำแนะนำ ช่วยเหลือด้วยดีมา โดยตลอดในระหว่างการทำวิจัย

ขอขอบคุณ คุณนันทิกา ปานจันทร์ นิสิตปริญญาเอกจากสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพ และวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในการวิเคราะห์หา น้ำหนักโมเลกุลของสารที่ได้จากการวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณจีรศักดิ์ ผู้ปลื้ม คุณดวงใจ งามสม คุณพอจิต วิโนทพรรษ์ ที่ช่วย เหลือให้คำแนะนำและเป็นกำลังใจอย่างดียิ่งในการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอโน้มรำลึกถึงพระคุณบิดา มารดา และน้องๆ ที่สนับสนุนในด้านการศึกษาและเป็น กำลังใจแก่ผู้วิจัยมาโดยตลอด จนทำให้ปริญญาานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จเรียบร้อยด้วยดี และขอ ขอบคุณผู้มีพระคุณที่ให้การช่วยเหลือในด้านต่างๆ ทุกท่านที่มีได้กล่าวนามในที่นี้ด้วย

ปิยนาด เกียรติสมชาย

สารบัญ

| บทที่ | | หน้า |
|-------|--|------|
| 1 | บทนำ..... | 1 |
| | ภูมิหลัง..... | 1 |
| | ความมุ่งหมายของการวิจัย..... | 7 |
| | ความสำคัญของการวิจัย..... | 7 |
| | ขอบเขตของการวิจัย..... | 7 |
| 2 | เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... | 8 |
| | ชีววิทยาของกิ้งกูดดำ..... | 8 |
| | Pigment Dispersing Hormone (PDH)..... | 16 |
| | แหล่งที่พบและหน้าที่..... | 16 |
| | การแยกและทำให้บริสุทธิ์..... | 21 |
| 3 | วิธีดำเนินการวิจัย..... | 29 |
| | สัตว์ทดลอง..... | 29 |
| | อุปกรณ์และสารเคมี..... | 29 |
| | วิธีดำเนินการทดลอง..... | 31 |
| | การเก็บรวบรวมก้านตากิ้งกูดดำ..... | 31 |
| | การเตรียมสารสกัดจากก้านตาของกิ้งกูดดำ..... | 31 |
| | การเตรียมสารสกัดจากก้านตาก่อนไปทำให้บริสุทธิ์ด้วย กระบวนการ reversed phase-high performance liquid chromatography (RP-HPLC)..... | 32 |
| | การทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย PDH จากก้านตากิ้งกูดดำด้วย กระบวนการ RP-HPLC..... | 32 |
| | การตรวจหาสารคล้าย PDH ในก้านตากิ้งกูดดำโดยวิธี dot-Enzyme Linked Immunosorbent Assay (dot-ELISA)..... | 34 |
| | การหาน้ำหนักโมเลกุลโดย MALDI-TOF MS (matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry)..... | 35 |
| | การวิเคราะห์ข้อมูล..... | 35 |

สารบัญ (ต่อ)

| บทที่ | หน้า |
|-------------------------|------|
| 4 ผลการวิจัย..... | 39 |
| 5 สรุปและอภิปรายผล..... | 82 |
| บรรณานุกรม..... | 86 |
| ภาคผนวก..... | 94 |
| ประวัติย่อผู้วิจัย..... | 98 |

บัญชีภาพประกอบ

| ภาพประกอบ | หน้า |
|---|------|
| 1 แสดงการกระจายตัวหรือรวมตัวของเม็ดสีภายใน chromatophore..... | 2 |
| 2 ภาพวาดของ ommatidium ในตาประกอบของกุ้ง <i>Palaemon spp.</i> | 3 |
| 3 ระบบต่อมไร้ท่อของสัตว์พวก crustacean..... | 6 |
| 4 แสดงส่วนประกอบต่างๆ ภายในตาและก้านตาของกุ้ง <i>Palaemon</i> | 6 |
| 5 โครงสร้างภายนอกโดยทั่วไปของกุ้งกุลาดำ..... | 13 |
| 6 การพัฒนาของลูกกุ้งทะเลวัยอ่อนและการแบ่งระยะของการเจริญเติบโต..... | 14 |
| 7 ลักษณะของกุ้งกุลาดำเพศผู้และเพศเมีย..... | 15 |
| 8 ขั้นตอนวิธีการเตรียมสารสกัดจากก้านตาของกุ้งกุลาดำ..... | 37 |
| 9 ขั้นตอนการทำ dot-ELISA..... | 38 |
| 10 Chromatogram ของสารสกัดจากก้านตาของกุ้งกุลาดำที่ผ่านกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนแรกและรูปแสดงผล dot-ELISA..... | 45 |
| 11 ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย PDH ด้วยกระบวนการ RP-HPLC..... | 46 |
| 12 ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย PDH ด้วยกระบวนการ RP-HPLC ของสารคล้าย PDH กลุ่มที่ 1..... | 47 |
| 13 Chromatogram ของสารสกัดกลุ่มที่ 1 ในขั้นตอนที่ 2..... | 48 |
| 14 Chromatogram การทำให้บริสุทธิ์ของเปปไทด์กลุ่มที่ 1 และ mass spectrum ของสารคล้าย PDH PDL1..... | 49 |
| 15 ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย PDH ด้วยกระบวนการ RP-HPLC ของสารคล้าย PDH กลุ่มที่ 2..... | 50 |
| 16 Chromatogram ของสารสกัดกลุ่มที่ 2 ในขั้นตอนที่ 2..... | 51 |
| 17 Chromatogram การทำให้บริสุทธิ์ของเปปไทด์กลุ่มที่ 2 และ mass spectrum ของสารคล้าย PDH PDL2 และ PDL3..... | 52 |
| 18 Chromatogram การทำให้บริสุทธิ์ของเปปไทด์กลุ่มที่ 2 และ mass spectrum ของสารคล้าย PDH PDL4 และ PDL5..... | 53 |
| 19 ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย PDH ด้วยกระบวนการ RP-HPLC ของสารคล้าย PDH กลุ่มที่ 3..... | 54 |
| 20 Chromatogram ของสารสกัดกลุ่มที่ 3 ในขั้นตอนที่ 2..... | 55 |
| 21 Chromatogram การทำให้บริสุทธิ์ของเปปไทด์กลุ่มที่ 3 และ mass spectrum ของสารคล้าย PDH PDL6..... | 56 |

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

| ภาพประกอบ | | หน้า |
|-----------|---|------|
| 22 | ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย PDH ด้วยกระบวนการ RP-HPLC ของสารคล้าย PDH กลุ่มที่ 4..... | 57 |
| 23 | Chromatogram ของสารสกัดกลุ่มที่ 4 ในขั้นตอนที่ 2..... | 58 |
| 24 | Chromatogram การทำให้บริสุทธิ์ของเปปไทด์กลุ่มที่ 4 และ mass spectrum ของสารคล้าย PDH PDL7..... | 59 |
| 25 | ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย PDH ด้วยกระบวนการ RP-HPLC ของสารคล้าย PDH กลุ่มที่ 5..... | 60 |
| 26 | Chromatogram ของสารสกัดกลุ่มที่ 5 ในขั้นตอนที่ 2..... | 61 |
| 27 | Chromatogram การทำให้บริสุทธิ์ของเปปไทด์กลุ่มที่ 5 และ mass spectrum ของสารคล้าย PDH PDL8..... | 62 |
| 28 | ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย PDH ด้วยกระบวนการ RP-HPLC ของสารคล้าย PDH กลุ่มที่ 6..... | 63 |
| 29 | Chromatogram ของสารสกัดกลุ่มที่ 6 ในขั้นตอนที่ 2..... | 64 |
| 30 | Chromatogram การทำให้บริสุทธิ์ของเปปไทด์กลุ่มที่ 6 และ mass spectrum ของสารคล้าย PDH PDL9 และ PDL10..... | 65 |
| 31 | ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย PDH ด้วยกระบวนการ RP-HPLC ของสารคล้าย PDH กลุ่มที่ 7..... | 66 |
| 32 | Chromatogram ของสารสกัดกลุ่มที่ 7 ในขั้นตอนที่ 2..... | 67 |
| 33 | Chromatogram การทำให้บริสุทธิ์ของเปปไทด์กลุ่มที่ 7 และ mass spectrum ของสารคล้าย PDH PDL11..... | 68 |
| 34 | ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย PDH ด้วยกระบวนการ RP-HPLC ของสารคล้าย PDH กลุ่มที่ 8..... | 69 |
| 35 | Chromatogram ของสารสกัดกลุ่มที่ 8 ในขั้นตอนที่ 2..... | 70 |
| 36 | Chromatogram การทำให้บริสุทธิ์ของเปปไทด์กลุ่มที่ 8 และ mass spectrum ของสารคล้าย PDH PDL12..... | 71 |
| 37 | ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย PDH ด้วยกระบวนการ RP-HPLC ของสารคล้าย PDH กลุ่มที่ 9..... | 72 |
| 38 | Chromatogram ของสารสกัดกลุ่มที่ 9 ในขั้นตอนที่ 2..... | 73 |

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

| ภาพประกอบ | หน้า |
|---|------|
| 39 Chromatogram การทำให้บริสุทธิ์ของเปปไทด์กลุ่มที่ 9 และ mass spectrum ของสารคล้าย PDH PDL13 และ PDL14..... | 74 |
| 40 Chromatogram การทำให้บริสุทธิ์ของเปปไทด์กลุ่มที่ 9 และ mass spectrum ของสารคล้าย PDH PDL15..... | 75 |
| 41 Chromatogram ของสารสกัดกลุ่มที่ 9 ในขั้นตอนที่ 2..... | 76 |
| 42 Chromatogram การทำให้บริสุทธิ์ของเปปไทด์กลุ่มที่ 9 และ mass spectrum ของสารคล้าย PDH PDL16..... | 77 |
| 43 ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย PDH ด้วยกระบวนการ RP-HPLC ของสารคล้าย PDH กลุ่มที่ 10..... | 78 |
| 44 Chromatogram ของสารสกัดกลุ่มที่ 10 ในขั้นตอนที่ 2..... | 79 |
| 45 Chromatogram การทำให้บริสุทธิ์ของเปปไทด์กลุ่มที่ 10 และ mass spectrum ของสารคล้าย PDH PDL17 และ PDL18..... | 80 |
| 46 รูปแสดงผล dot-ELISA ของเปปไทด์ FMRFamide มาตรฐาน..... | 95 |

บัญชีตาราง

| ตาราง | | หน้า |
|-------|--|------|
| 1 | การแยกสกัดและทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย PDH ในสัตว์ต่างๆ..... | 26 |
| 2 | แสดงลำดับกรดอะมิโนของสารคล้าย PDH ที่พบในสัตว์ต่างๆ..... | 28 |
| 3 | แสดงขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย PDH ด้วยกระบวนการ RP-HPLC | 36 |
| 4 | แสดงน้ำหนักโมเลกุลของสารคล้าย PDH ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วย กระบวนการ RP-HPLC..... | 81 |

บทที่ 1

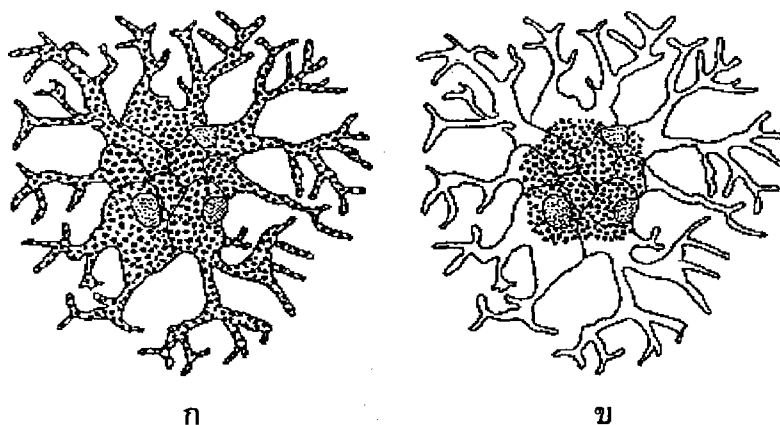
บทนำ

ภูมิหลัง

เป็นที่ทราบกันว่าในสัตว์พวก crustacean มีความสามารถที่จะปรับเปลี่ยนสีตัวและปรับการเคลื่อนที่ของเม็ดสี (pigment granule) ภายใน chromatophore และ retinal pigment cell ในตาประกอบ (compound eye) ต่อที่มีดและที่สว่างได้ การเปลี่ยนแปลงสีตัวและการปรับการเคลื่อนที่ของเม็ดสีเป็นผลมาจากอิทธิพลของฮอร์โมน 2 ชนิดที่มีหน้าที่ตรงข้ามกันคือ pigment dispersing hormone (PDH) และ red pigment concentrating hormone (RPCH) ซึ่งมีผลทำให้เกิดการกระจายตัวหรือรวมตัวของเม็ดสีภายใน chromatophore และ retinal pigment cell (Rao and Riehm. 1989; Nery and others. 1997; Renn and others. 1999) หน้าที่ของเม็ดสีคือ ช่วยในการปรับตัวของสัตว์ให้เข้ากับสภาพแวดล้อมเพื่อการอยู่รอดและหาอาหาร โดยจะเห็นได้ชัดในกุ้งที่อาศัยบริเวณปะการังจะมีสีแดง ม่วงจัด หรือสีใกล้เคียงกับบริเวณที่อาศัย (ประจวบ หล้าอุบล. 2528)

Chromatophore

Chromatophore จะพบอยู่ตามผิวหนังและอวัยวะภายในบางอวัยวะเช่น อวัยวะสืบพันธุ์ (gonad) ทางเดินอาหาร (gut) และเส้นประสาท (nerve cord) เป็นต้น Chromatophore ของสัตว์พวก crustacean แบ่งออกเป็น 4 ชนิดคือ Melanophore เป็นเซลล์เม็ดสีที่มีสีน้ำตาลหรือสีดำ Leucophore เป็นเซลล์เม็ดสีที่มีสีขาว Erythrophore เป็นเซลล์เม็ดสีที่มีสีแดงและ Xanthophore เป็นเซลล์เม็ดสีที่มีสีเหลือง การที่ chromatophore มีสีต่างๆ ขึ้นอยู่กับเม็ดสีที่เป็นองค์ประกอบอยู่ภายใน chromatophore นั้นๆ โดยที่ภายใน chromatophore อาจมีเม็ดสีเป็นองค์ประกอบเพียงชนิดเดียวหรือมากกว่าหนึ่งชนิดก็ได้ การที่เม็ดสีเคลื่อนที่ไปมาภายในเซลล์ทำให้ดูเหมือนว่า chromatophore มีการแผ่ขยายหรือหดตัว (Rao. 1985) เม็ดสีส่วนใหญ่จะมีสีขาว สีแดง สีเหลือง สีฟ้า สีน้ำตาลเข้มและสีดำ (Ruppert and Barnes. 1994) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของสารที่เป็นองค์ประกอบ เช่น เม็ดสีสีขาวเป็นสารพวก pteridine และ purine เม็ดสีสีแดงและสีเหลืองเป็นสารพวก carotenoid เม็ดสีสีน้ำตาลและสีดำเป็นสารพวก melanin (Rao and Riehm. 1988) ส่วนเม็ดสีสีฟ้าเป็นสารพวก carotenoid ที่รวมตัวกับโปรตีน (Cheesman and Prebble. 1966) รูปร่างของ chromatophore ดังแสดงในภาพประกอบ 1



ภาพประกอบ 1 แสดงการกระจายตัวหรือรวมตัวของเม็ดสีภายใน chromatophore
(Ruppert and Barnes. 1994)

ก = เม็ดสีกระจายตัวอยู่เต็มตัวเซลล์และแขนงเซลล์

ข = เม็ดสีรวมตัวอยู่ตรงกลางเซลล์

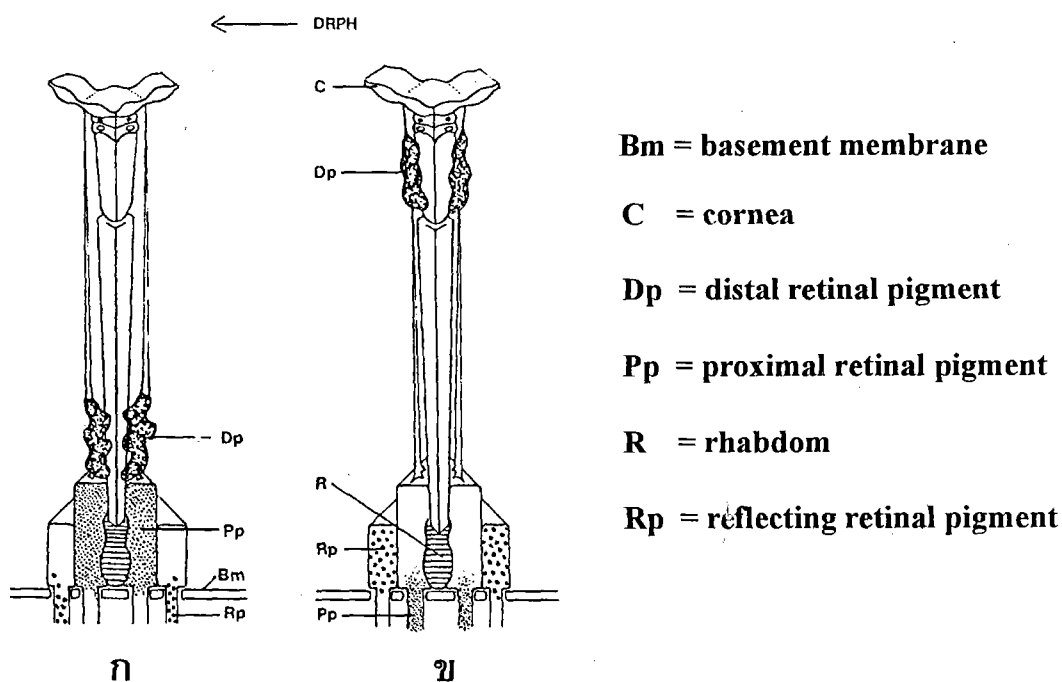
การปรับเปลี่ยนสีตัวของสัตว์ให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมภายนอกนั้นเกี่ยวข้องกับปัจจัย 2 ประการคือ การเปลี่ยนแปลงลักษณะของสีตัว (morphological color change) และการเปลี่ยนแปลงทางด้านสรีระของสีตัวภายในตัวกึ่ง (physiological color change) (Ruppert and Barnes. 1994) การเปลี่ยนแปลงลักษณะของสีตัวนี้เกี่ยวข้องกับลักษณะของเม็ดสีและจำนวนเม็ดสีภายใน chromatophore ซึ่งขึ้นอยู่กับบริเวณพื้นที่ที่สัตว์อาศัยอยู่และความเข้มของแสงบริเวณนั้นโดยการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นนี้จะใช้เวลานาน (Ruppert and Barnes. 1994) ตัวอย่างเช่น กุ้งสกุล Palaemonetes ปริมาณเม็ดสีสีฟ้า สีแดงและสีเหลืองจะน้อยลงถ้ากุ้งอาศัยบริเวณพื้นที่ที่มีสีอ่อนหรือสีขาว แต่ถ้าพื้นที่ที่อาศัยเป็นสีเข้มแล้วเม็ดสีสีแดงและสีฟ้าจะเพิ่มขึ้น (ประจวบ หล้าอุบล. 2528) ส่วนการเปลี่ยนแปลงของเม็ดสีเกี่ยวกับรูปร่างนั้นอาจกินเวลาหลายวันหรือเป็นสัปดาห์กว่าการเปลี่ยนแปลงจะสมบูรณ์ การเปลี่ยนแปลงสีในลักษณะเช่นนี้ขึ้นอยู่กับจำนวนเม็ดสีที่มีต่อหน่วยของพื้นที่หรือขึ้นอยู่กับปริมาณของเม็ดสีต่อ chromatophore หรือร่วมกับปริมาณของเม็ดสีและปริมาณของ chromatophore ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้จะมองไม่เห็นในระยะแรก (ประจวบ หล้าอุบล. 2528)

การเปลี่ยนแปลงทางด้านสรีระของสีตัวภายในตัวกึ่งนี้เกิดขึ้นได้เร็วมาก ภายในไม่กี่นาทีกหรือชั่วโมง ซึ่งการเปลี่ยนแปลงแบบนี้เกือบจะไม่เกี่ยวข้องกับรูปร่างของ chromatophore และจำนวนของเม็ดสีเลย แต่จะขึ้นอยู่กับ การกระจายหรือรวมตัวของเม็ดสีภายใน chromatophore ถ้าเม็ดสีเข้าไปรวมกันที่จุดใดจุดหนึ่งมาก สัตว์จะดูตัวซีดหรือตัวขาวขึ้น แต่ถ้าเม็ดสีกระจายทั่วไปสัตว์จะมีสีตัวเข้มขึ้น (ประจวบ หล้าอุบล. 2528)

Retinal Pigment Cell

Retinal Pigment Cell เป็นตัวควบคุมการตอบสนองต่อแสงที่มาจากกระทบ rhabdom ซึ่งเป็นส่วนที่ทำหน้าที่รับแสง โดยจะพบ retinal pigment cell อยู่ใน ommatidium ของตาประกอบ ในกรณีที่แสงเข้ามาที่ ommatidium มาก retinal pigment จะเคลื่อนที่ไปบังแสงทำให้แสงเข้ามาตกกระทบที่ rhabdom ได้น้อยลง (Fingerman. 1987) ใน ommatidium จะพบ retinal pigment cell อยู่ 3 ชนิดคือ distal retinal pigment cell จะพบอยู่ในเนื้อเยื่อรอบๆ crystalline cone และ proximal retinal pigment cell พบอยู่ทั่วไปภายใน retinular cell ส่วน reflecting retinal pigment cell จะพบอยู่บริเวณฐานของ retinular cell (Rao. 1985)

ในที่สว่างพบว่า distal retinal pigment จะเคลื่อนที่มาอยู่ด้านล่างของเซลล์และกระจายตัวออก และ proximal retinal pigment จะกระจายตัวอยู่เหนือเยื่อที่ฐานของเซลล์ (basement membrane) ส่วน reflecting retinal pigment ยังคงอยู่ใต้เยื่อที่ฐานของเซลล์ ในทางกลับกันพบว่าในที่มืด distal retinal pigment จะเคลื่อนที่มารวมกันใต้ cornea ซึ่งอยู่ด้านบน และ proximal retinal pigment จะเคลื่อนที่ลงมาอยู่ใต้เยื่อที่ฐานของเซลล์ ส่วน reflecting retinal pigment จะเคลื่อนที่มาอยู่เหนือเยื่อที่ฐานของเซลล์ซึ่งเป็นการช่วยในการสะท้อนแสง (Rao. 1985 ; Thurman. 1988) ดังภาพประกอบ 2



ภาพประกอบ 2 ภาพวาดของ ommatidium ในตาประกอบของกุ้ง *Palaemon spp.*

(Josefsson. 1983)

ก. ในที่สว่าง

ข. ในที่มืด

การเคลื่อนที่ของเม็ดสีภายใน chromatophore และการปรับการเคลื่อนที่ของเม็ดสีต่อที่มืดและที่สว่างใน ommatidium ของ crustacean จะถูกควบคุมโดย neurohormone จากก้านตา (eyestalk) Neurohormone นี้มีหลายชนิดแต่เท่าที่ทราบในปัจจุบันมีอยู่ 2 กลุ่ม ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่ทำงานตรงกันข้าม (antagonistic action) (Bellon-Humbert, Van Herp and Schooneveld. 1986; Kleinholz and others. 1986; Rao and Riehm. 1989) ดังนี้

ฮอร์โมนกลุ่มที่ 1 ฮอร์โมนที่ช่วยในการรวมตัว (aggregation หรือ concentration) ของเม็ดสีใน chromatophore และฮอร์โมนที่ช่วยในการปรับการเคลื่อนที่ของเม็ดสีภายใน ommatidium ต่อที่มืด ฮอร์โมนกลุ่มนี้ที่ทราบโครงสร้างแล้วคือ RPCH โดยมีโครงสร้างเป็น octapeptide (Fernlund and Josefsson. 1972; Rao and Riehm. 1993)

ฮอร์โมนกลุ่มที่ 2 ฮอร์โมนที่ช่วยในการกระจายตัว (dispersion) ของเม็ดสีใน chromatophore และฮอร์โมนที่ช่วยในการปรับการเคลื่อนที่ของเม็ดสีใน ommatidium ต่อที่สว่าง ฮอร์โมนในกลุ่มนี้ที่ทราบโครงสร้างแล้วคือ PDH ซึ่งพบว่ามียูหลายรูปแบบโดยมีโครงสร้างเป็น octadecapeptide (Fernlund. 1976; Rao and others. 1985; Kleinholz and others. 1986; Rao and Riehm. 1988; Yang and others. 1999)

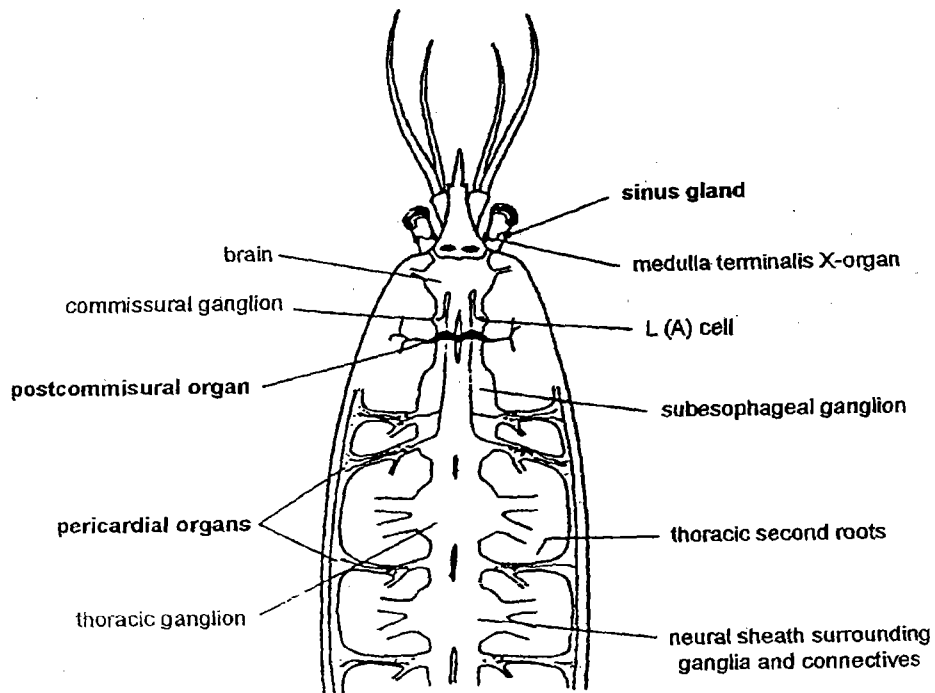
ในสัตว์พวก crustacean จะมีระบบต่อมไร้ท่อ (endocrine system) ในการผลิตและหลั่งฮอร์โมนหลายชนิดที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการทำงานของระบบต่างๆ ในร่างกาย ซึ่งระบบต่อมไร้ท่อนี้จะประกอบไปด้วย neurohemal organ คือต่อมไซนัส (sinus gland) ซึ่งเป็นแหล่งเก็บสะสมฮอร์โมน และ neurosecretory cell ซึ่งเป็นแหล่งที่ทำหน้าที่ผลิตและหลั่ง neurohormone ที่สร้างขึ้นไปตามส่วนต่างๆ ของร่างกายโดยฮอร์โมนจะแพร่ไปตามเลือดหรือ hemolymph สำหรับต่อมไร้ท่อ (endocrine gland) ที่สำคัญในสัตว์กลุ่ม crustacean ได้แก่ X-organ ในก้านตาจะประกอบไปด้วย neurosecretory cell ซึ่งเป็นแหล่งผลิตและหลั่ง neurohormone ไปสะสมที่ต่อมไซนัส ส่วน postcommissural organ (PCO) เป็นแหล่งเก็บสะสมและหลั่ง neurohormone ที่เกี่ยวกับการเปลี่ยนสีตัว (color change hormone) Pericardial organ (PO) เป็นแหล่งสะสมและหลั่ง neurohormone ที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการกระตุ้นการทำงานของหัวใจ Y-organ เป็นแหล่งผลิตฮอร์โมนที่ทำหน้าที่กระตุ้นให้มีการลอกคราบ (molting hormone) เกิดขึ้น Androgenic gland เป็นแหล่งผลิตฮอร์โมนที่ควบคุมการเจริญเติบโตของอวัยวะเพศผู้ รังไข่ (ovary) เป็นแหล่งผลิตฮอร์โมนที่ควบคุมการเจริญเติบโตของอวัยวะเพศเมีย (Fingerman. 1987) ต่อมไร้ท่อของสัตว์พวก crustacean ดังแสดงในภาพประกอบ 3

ในก้านตาของสัตว์พวก crustacean (ภาพประกอบ 4) เป็นแหล่งสร้างและเก็บสะสมฮอร์โมนที่สำคัญหลายชนิด เช่น ฮอร์โมนที่ควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด (Crustacean Hyperglycemic Hormone-CHH) (Huberman and Aguilar. 1986; Nussbaum and Dircksen. 1995) ฮอร์โมนที่ยับยั้งการลอกคราบ (Molting Inhibiting Hormone-MIH) (Chang, Bruce and Newcomb. 1987; Nussbaum and Dircksen. 1995) ฮอร์โมนที่ยับยั้งการสะสมไข่แดง

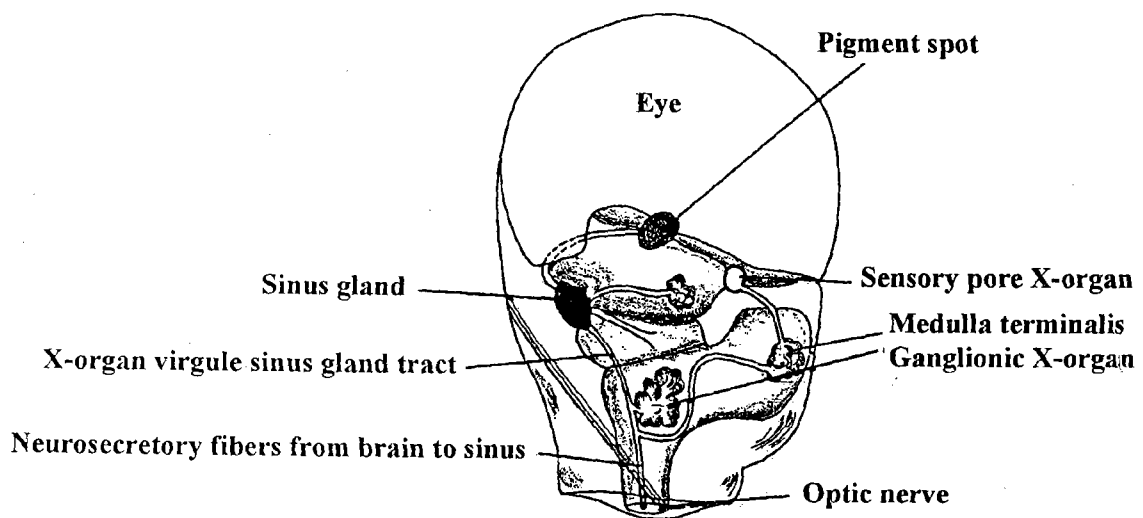
(Vitellogenesis Inhibiting Hormone-VIH) หรือฮอร์โมนที่ยับยั้งการเจริญของรังไข่ (Gonad Inhibiting Hormone-GIH) (Soyez, Deijnen and Martin. 1987) ฮอร์โมนที่ช่วยในการกระตุ้น การเต้นของหัวใจ (FMRFamide-like peptide) (Mercier and others. 1993) รวมทั้ง RPCH (Fernelund and Josefsson. 1972; Rao and Riehm. 1991; Klein and others. 1995; Nussbaum and Dirksen. 1995; Yang and others. 1999) และ PDH (Fernelund. 1976; Rao and Riehm. 1991; Yang and others. 1999) สำหรับ PDH นั้นเป็นเปปไทด์ฮอร์โมน ชนิดหนึ่งที่น่าสนใจซึ่งมีการศึกษาในสัตว์พวก crustacean และแมลงต่างๆ เป็นส่วนใหญ่

เนื่องจากกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* เป็นกุ้งที่มีความแข็งแรง เลี้ยงง่าย เหมาะสม ที่จะเลี้ยงในบ่อเพราะมีความอดทนและสามารถปรับตัวให้เข้ากับการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ และความเค็มของน้ำได้ดี ไม่ตายง่ายในกรณีที่อุณหภูมิเปลี่ยนแปลงขึ้นสูงหรือต่ำลงอย่างรวดเร็ว หรือในกรณีที่ความเค็มของน้ำเพิ่มขึ้นหรือลดลงในทันทีทันใดก็จะไม่ตาย แต่จะชะงักการเจริญ เติบโตเท่านั้น และนอกจากนี้กุ้งกุลาดำยังเป็นกุ้งทะเลที่มีขนาดใหญ่ มีเนื้อแน่น รสชาติดี (ปัญญา สุวรรณสมุทร. 2534) จึงเป็นที่นิยมของผู้บริโภคจำนวนมากทั้งภายในประเทศและต่าง ประเทศ จัดเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศ โดยจัดเป็นสินค้าส่งออกอันดับต้น ๆ ของ ประเทศ (คมสัน ลีลาคหกิจ. 2539)

สำหรับการศึกษาเกี่ยวกับระบบฮอร์โมนของกุ้งกุลาดำนี้ยังมีอยู่น้อย ดังนั้นการศึกษา ถึงระบบฮอร์โมนในกุ้งชนิดนี้น่าจะเป็นประโยชน์ในการนำไปหาโครงสร้างปฐมภูมิและศึกษาถึง บทบาทการทำงานของฮอร์โมนที่มีผลทางสรีรวิทยาของกุ้ง เพื่อนำไปใช้ในการพัฒนาและปรับปรุงคุณภาพผลผลิตของกุ้งกุลาดำต่อไป



ภาพประกอบ 3 ระบบต่อมไร้ท่อของสัตว์พวก crustacean (Beltz. 1988)



ภาพประกอบ 4 แสดงส่วนประกอบต่างๆ ภายในตาและก้านตาของกุ้ง *Palaemon* (Ruppert and Barnes. 1994)

ความมุ่งหมายของการวิจัย

1. เพื่อแยกสกัดสารคล้าย PDH จากก้านตากุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon*
2. เพื่อให้บริสุทธิ์สารคล้าย PDH รูปแบบต่างๆ จากสารสกัดจากก้านตากุ้งกุลาดำ
3. เพื่อศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของสารคล้าย PDH รูปแบบต่างๆ ที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์แล้ว

ความสำคัญของการวิจัย

1. สามารถแยกและทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย PDH รูปแบบต่างๆ
2. ทำให้ทราบถึงน้ำหนักโมเลกุลของสารคล้าย PDH รูปแบบต่างๆ ที่ได้จากการแยกและทำให้บริสุทธิ์
3. สามารถนำสารคล้าย PDH ที่ผ่านการแยกและทำให้บริสุทธิ์แล้วไปตรวจหาลำดับกรดอะมิโน (amino acid sequencing) และทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ (biological activity) ของฮอร์โมนต่อไปได้ ซึ่งเป็นประโยชน์ในการศึกษาเกี่ยวกับฮอร์โมนนี้ที่มีผลทางสรีรวิทยาและบทบาทในการดำรงชีวิตของกุ้ง เพื่อเป็นแนวทางในการปรับปรุงคุณภาพผลผลิตของกุ้งกุลาดำต่อไป

ขอบเขตของการวิจัย

1. การแยกและทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย PDH จากก้านตากุ้งกุลาดำโดยใช้กระบวนการ reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC)
2. การตรวจหาสารคล้าย PDH ในระหว่างการแยกและทำให้บริสุทธิ์โดยใช้วิธี dot-Enzyme Linked Immunosorbent Assay (dot-ELISA)
3. การตรวจหาน้ำหนักโมเลกุลของสารคล้าย PDH รูปแบบต่างๆ ที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ด้วย matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ชีววิทยาของกุ้งกุลาดำ

กุ้งกุลาดำ มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Penaeus monodon* Fabricius และมีชื่อสามัญว่า Giant Tiger Prawn หรือ Jumbo Tiger Prawn อยู่ในวงศ์ Penaeidae และจัดเป็นกุ้งที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในวงศ์ (วัลลภ คงเพิ่มพูน. 2531)

การจัดลำดับหมวดหมู่ทางอนุกรมวิธานของกุ้งกุลาดำ มีการจัดลำดับดังนี้ (Holthuis. 1980)

| | |
|------------|--------------|
| Phylum | Arthropoda |
| Class | Crustacean |
| Subclass | Malacostraca |
| Order | Decapoda |
| Suborder | Natantia |
| Infraorder | Penaeidae |
| Genus | Penaeus |
| Species | monodon |

ถิ่นอาศัยของกุ้งกุลาดำได้แก่ น่านน้ำแถบใต้หวัน ไทย มาเลเซีย อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ และที่พบมากได้แก่ ออสเตรเลียและอินเดีย กุ้งชนิดนี้อยู่ในเขตร้อนชอบอาศัยอยู่ในบริเวณน้ำลึกห่างออกจากฝั่ง และชอบพื้นทะเลที่เป็นดินทราย สามารถอยู่ในน้ำที่มีอุณหภูมิช่วง 12-37 องศาเซลเซียส และอยู่ในน้ำที่มีช่วงความเค็มค่อนข้างกว้างคือประมาณ 0.2-70 ส่วนในหนึ่งพัน แต่จะโตเร็วในบ่อที่มีช่วงความเค็มระหว่าง 10-20 ส่วนในหนึ่งพัน เป็นกุ้งที่มีการเจริญเติบโตรวดเร็ว ชอบหากินตามพื้น บ่อ กินอาหารได้ตลอดเวลา ไม่ค่อยตื่นตกใจ ทนต่อการจับ (วัลลภ คงเพิ่มพูน. 2531; บรรจง เทียนส่งรัมย์. 2529) สำหรับประเทศไทยพบแพร่กระจายอยู่ทั่วไปในอ่าวไทย พบมากที่บริเวณนอกฝั่งทะเลจังหวัดชุมพรถึงนครศรีธรรมราช และทางด้านทะเลอันดามัน บริเวณนอกฝั่งของจังหวัดระนอง และภูเก็ต กุ้งกุลาดำจะวางไข่ตลอดทั้งปีแต่ชุกในช่วงเดือนพฤษภาคม-สิงหาคม (ปัญญา สุวรรณสมุทร. 2534)

ลักษณะทั่วไปของกุ้งกุลาดำ

กุ้งกุลาดำมีลักษณะที่เด่นชัดคือ ลำตัวมีสีแดงอมน้ำตาลถึงน้ำตาลเข้มเป็นลายพาดขวาง ด้านหลังประมาณ 9 ลาย ที่ขอบหางและขาว่ายน้ำมีขนาดเล็กๆ สีน้ำตาลอมแดงและปลายขาเดินคู่ที่ 1 และ 2 มีสีน้ำตาลเข้ม (ปัญญา สุวรรณสมุทร. 2534) เปลือกหัวเกลี้ยงไม่มีขน หนวดมีสีดำไม่มีลาย ฟันกรีด้านบนมี 7-8 ซี่ ด้านล่างมี 3 ซี่ ร่องข้างกรีดทั้งสองด้านมีลักษณะแคบและยาวไม่ถึงฟันกรีดอันสุดท้าย ที่ขาเดินคู่ที่ 5 ไม่มีระยางค์อันนอก (วัลลภ คงเพิ่มพูน. 2531) มีลำตัวเป็นข้อปล้องทั้งหมด มี 19 ปล้อง แต่ละปล้องมีระยางค์หนึ่งคู่ ระยางค์แต่ละคู่มีหน้าที่แตกต่างกัน ลำตัวของกุ้งแบ่งออกได้เป็นสามส่วนใหญ่ๆ คือ หัว ออก และลำตัว ส่วนหัวมี 5 ปล้องแต่รวมเป็นปล้องเดียวมีเปลือกคลุมเปลือกหุ้มตัวตอนหน้าสุดของปล้องที่หนึ่งจะยื่นเป็นพื้นแหลมไปข้างหน้าเรียกว่า กรี ได้กรีมิดาหนึ่งคู่ ปากกุ้งอยู่ระหว่างขากรรไกร ส่วนหัวมีระยางค์ห้าคู่ สองคู่แรกเป็นหนวดใช้ในการสัมผัสระยางค์คู่ที่สามได้แก่ ขากรรไกรล่าง มีหน้าที่ในการขบเคี้ยวอาหาร ส่วนคู่ที่สี่และคู่ที่ห้าเป็นขากรรไกรบน มีหน้าที่เช่นเดียวกับขากรรไกรล่าง ส่วนอกมี 8 ปล้อง ได้แก่ ปล้องที่ 6-13 ระยางค์สามคู่แรก (ระยางค์คู่ที่ 6, 7 และ 8) อยู่บนอกเรียกว่า maxillipeds มีหน้าที่ช่วยในการกินอาหาร ระยางค์คู่ที่ 9, 10 และ 11 มีลักษณะเป็นก้าม ก้ามแต่ละคู่จะมีขนาดและความยาวใกล้เคียงกัน ระยางค์สามคู่นี้มีหน้าที่ช่วยในการจับฉวยอาหารเข้าปากหรือป้องกันตัวเมื่อมีภัย ส่วนระยางค์คู่ที่ 12 และคู่ที่ 13 เป็นขาใช้สำหรับเดิน เคลื่อนไหว และทำความสะอาดลำตัว ส่วนของลำตัวมี 6 ปล้อง เปลือกปล้องท้องอันที่สองไม่ทับปล้องแรก ระยางค์คู่ที่ 14, 15, 16, 17 และ 18 มีลักษณะคล้ายใบพายใช้สำหรับว่ายน้ำ ส่วนระยางค์คู่ที่ 19 หรือหางประกอบด้วยแพนหางและหางรูปพัดยกขึ้นลงได้ (บรรจง เทียนสงรัศมี. 2529) (ภาพประกอบ 5)

วงจรชีวิต

กุ้งกุลาดำมีอายุขัยประมาณ 18-24 เดือน กุ้งที่มีอายุประมาณ 12-18 เดือน จะวางไข่ในทะเลลึกที่ระดับน้ำประมาณ 15-30 เมตร ใกล้กับพื้นทะเล กุ้งขนาด 70-150 กรัม จะวางไข่ครั้งละประมาณ 1,000,000-1,200,000 ฟอง แม้กุ้งจะใช้เวลาวางไข่ครั้งหนึ่งๆ ประมาณ 3-5 นาที ไข่ที่ผสมแล้วขณะที่ปล่อยสู่ทะเลใหม่ๆ จะมีลักษณะกลม จากนั้นไข่จะค่อยๆ พัฒนาจนฟักเป็นตัวภายในเวลาประมาณ 15 ชั่วโมง กุ้งวัยอ่อนจะวิวัฒนาการและเปลี่ยนรูปร่างไปตามขั้นตอนและเมื่อถึงบริเวณชายฝั่งก็จะเลี้ยงตัวอยู่ในบริเวณนี้จนกระทั่งโตเต็มวัยจึงอพยพกลับสู่ทะเลและผสมพันธุ์วางไข่ต่อไปอีก (บรรจง เทียนสงรัศมี. 2529; วัลลภ คงเพิ่มพูน. 2531)

กุ้งจำเป็นต้องลอกคราบเพื่อการเจริญเติบโต เปลือกกุ้งเป็นอวัยวะที่ไม่สามารถที่จะเพิ่มขนาดได้ ดังนั้นในการเพิ่มขนาดตัวของกุ้งแต่ละครั้งจึงจำเป็นต้องสลัดเอาเปลือกเก่าทิ้งไปแล้วสร้าง

เปลือกใหม่ที่มิขนาดใหญ่อื่นมาแทน กุ้งจะเริ่มลอกคราบตั้งแต่ฟักออกจากไข่เพียงไม่กี่ชั่วโมง และลอกคราบไปเรื่อย ๆ จนชั่วชีวิต ก่อนที่กุ้งจะลอกคราบจะมีการสะสมอาหารในร่างกายมากกว่าปกติ โดยเฉพาะสารที่สร้างเปลือก เพราะเปลือกจะต้องแข็งโดยเร็วหลังจากลอกคราบแล้ว เมื่อกุ้งสลัดเปลือกออกหมดลำตัวจะขยายใหญ่ขึ้นและเปลือกจะแข็งตัวภายใน 2-8 ชั่วโมง การลอกคราบของกุ้งแต่ละครั้งจะถูกควบคุมโดยระบบประสาทส่วนกลางและฮอร์โมนที่อยู่ในก้านตา ดังนั้นถ้ามีการตัดก้านตาออกจะทำให้กุ้งลอกคราบได้เร็วขึ้นและรังไข่ก็เจริญขึ้นเช่นกัน แต่โดยทั่วไปแล้วในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมกุ้งจะใช้เวลาในการลอกคราบห่างกันครั้งละประมาณ 22-27 วัน

การผสมพันธุ์ของกุ้งจะเริ่มขึ้นเมื่อกุ้งมีอายุประมาณ 8 เดือน หลังจากที่กุ้งเพศเมียลอกคราบใหม่ ๆ กุ้งเพศผู้จะเข้าทำการผสมทันที โดยการจับคู่แล้วสอดอวัยวะเพศผู้เข้าไปในถุงเก็บน้ำเชื้อของเพศเมีย หลังจากนั้นจะปล่อยน้ำเชื้อเข้าไปเก็บในถุงนี้ รอจนกระทั่งไข่มีความพร้อม กุ้งเพศเมียจึงปล่อยไข่ออกมาพร้อม ๆ กับปล่อยน้ำเชื้อออกจากถุง ให้มาผสมกันภายนอก และหลังจากที่กุ้งได้รับการผสมจากเชื้อเพศผู้แล้วประมาณ 30-45 นาที จะเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงภายในไข่และฟักออกเป็นตัวอ่อน หลังจากนั้นตัวอ่อนจะเจริญเปลี่ยนแปลงไปเรื่อย ๆ จนกระทั่งโตเต็มที่ ซึ่งสามารถแบ่งระยะการเจริญเติบโตของตัวอ่อนได้ดังนี้คือ

1. ลูกกุ้งวัยอ่อนในระยะหนึ่งหรือระยะนอเพเลียส (nauplius) เป็นลูกกุ้งที่ฟักออกจากไข่ใหม่ ๆ จะมีขนาดเล็ก มองด้วยตาเปล่าไม่เห็น มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างทั้งหมด 6 ครั้งภายใน 40-50 ชั่วโมง ระยะนี้ลูกกุ้งยังไม่กินอาหาร แต่จะได้อาหารส่วนใหญ่จากถุงอาหารที่ติดตัวมา และจะมีชีวิตส่วนใหญ่อยู่ตามหน้าดิน ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น 6 ระยะดังนี้

นอเพเลียสที่ 1 ขนาดลำตัวประมาณ 0.30 มิลลิเมตร รูปร่างค่อนข้างกลม หัวโต เรียวเล็กไปทางด้านหาง มีระยางค์ 3 คู่ มีตาอันเดียวอยู่ระหว่างระยางค์คู่ที่ 1

นอเพเลียสที่ 2 ขนาดลำตัวประมาณ 0.30-0.38 มิลลิเมตร ระยางค์เริ่มแบ่งตัวออกเป็นปล้อง หนามปลายหางใหญ่ และยาวออก

นอเพเลียสที่ 3 ขนาดลำตัวประมาณ 0.30-0.36 มิลลิเมตร เริ่มปรากฏฐานของระยางค์ท้อง ปลายหางเรียวเล็ก มีหนาม 3 คู่

นอเพเลียสที่ 4 ขนาดลำตัวประมาณ 0.30-0.40 มิลลิเมตร ปลายของระยางค์ท้องแยกออกเป็น 2 แฉก มีหนามที่ปลายหาง 4 คู่

นอเพเลียสที่ 5 ขนาดลำตัวประมาณ 0.30-0.44 มิลลิเมตร เริ่มมีเปลือกหัว ขากรรไกรกลม ลำตัวยาวออก ปลายหางแยกเป็น 2 แฉก

นอเพเลียสที่ 6 ขนาดลำตัวประมาณ 0.30-0.50 มิลลิเมตร เปลือกหัวใหญ่ขึ้น ขากรรไกรยาวออกมีหนามที่ปลายหาง 7 คู่

2. ลูกกุ้งวัยอ่อนระยะที่สองหรือระยะโปรโตซัวเอีย (protozoa) ลูกกุ้งจะมีลำตัวยาวขึ้น ส่วนหัวเห็นได้ชัด ลูกกุ้งจะค่อยๆ ลอยตัวขึ้นสู่ผิวน้ำ และเริ่มกินอาหาร อาหารของลูกกุ้งในระยะนี้ ส่วนใหญ่เป็นพวกแพลงก์ตอนพืชเล็กๆ ลูกกุ้งจะเริ่มเดินทางเข้าหาฝั่ง และจะอยู่ในระยะที่สอง ประมาณ 4 วัน มีการเปลี่ยนแปลงลอกคราบ 3 ครั้ง แต่ละครั้งจะมีรูปร่างดังนี้ คือ

โปรโตซัวเอียที่ 1 ขนาดลำตัวยาว 0.85-1.00 มิลลิเมตร ลำตัวแบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือส่วนหัว ส่วนอก และส่วนท้อง ส่วนอกแยกเป็น 6 ปล้อง ส่วนหัวมีเปลือกคลุมตลอด ตายังอยู่ภายในเปลือกมองเห็นเป็นจุดดำ แยกออกเป็น 2 ตา แต่ยังไม่มีการมองเห็น ระวังค์คู่ที่ 3 เปลี่ยนหน้าที่จากการช่วยในการว่ายน้ำมาทำหน้าที่ในการช่วยกินอาหาร ปลายหางจะมีหนาม 7 คู่ ระบบทางเดินอาหารเห็นได้ชัดเจนตลอดลำตัว

โปรโตซัวเอียที่ 2 ขนาดลำตัวยาว 1.20-1.40 มิลลิเมตร ตาโผล่พ้นเปลือกหัวมีก้านตายาว กรีแหลมยื่นไปข้างหน้าและงุ้มลงด้านล่างเล็กน้อย ระหว่างตามีหนาม 1 คู่บนเปลือกหัว เปลือกหัวเริ่มขยายออกคลุมส่วนอก และที่ส่วนท้องเริ่มแบ่งเป็น 5 ปล้อง ส่วนหางแยกเป็น 2 แฉก และมีขนข้างละ 7 เส้น

โปรโตซัวเอียที่ 3 ขนาดลำตัวยาว 1.50-2.00 มิลลิเมตร แพนหางชั้นนอกมีขนาดใหญ่กว่าแพนหางชั้นใน รอบๆ แพนหางมีขน มีระวังค์ว่ายน้ำเกิดขึ้นที่ปล้องอกทั้ง 5 ปล้อง

3. ลูกกุ้งวัยอ่อนระยะที่สามหรือระยะไมซิส (mysis) ลูกกุ้งในระยะนี้มีลักษณะคล้ายพ่อแม่มากขึ้น สามารถมองเห็นได้ชัด จะอยู่ในระยะนี้ประมาณ 7 วัน มีการเปลี่ยนแปลง 3 ระยะ คือ

ไมซิสที่ 1 ส่วนหัวกับส่วนอกเชื่อมติดกัน ระวังค์ยังคงทำหน้าที่ว่ายน้ำ ปลายระวังค์แบ่งเป็น 2 แฉก ส่วนท้องแบ่งเป็น 6 ปล้อง หนามบนปล้องท้องที่ 1 และ 2 หายไป ปลายหางมีหนาม 8 คู่ หนวดคู่ที่ 1 เริ่มแบ่งเป็น 3 ปล้อง ปลายหางเป็น 2 แฉก ลำตัวมีความยาวประมาณ 2.50-3.00 มิลลิเมตร

ไมซิสที่ 2 ส่วนหัวกับส่วนอกเชื่อมติดกันอย่างสมบูรณ์ มีเปลือกหัวคลุมตลอด ระวังค์คู่ที่ 1 ถึง 3 ตรงปลายเปลี่ยนเป็นก้ามหนีบ ระวังค์ว่ายน้ำที่ปล้องท้องเจริญขึ้น หนามบนปล้องที่ 3 หายไป หางเว้าเล็กน้อย ลำตัวมีความยาวประมาณ 4.04-4.50 มิลลิเมตร

4. ลูกกุ้งวัยอ่อนในระยะที่สี่หรือระยะโพสลาวา (postlarva) คือระยะตัวอ่อนขั้นสุดท้าย ระยะนี้ลูกกุ้งจะมีตัวยาวประมาณ 5.50 มิลลิเมตร ลูกกุ้งมีระวังค์ครบเหมือนกุ้งเต็มวัย ลูกกุ้งจะวิวัฒนาการไปเรื่อยๆ จนเข้าสู่กุ้งวัยรุ่น โดยแบ่งเป็น 25 ระยะ ภายใน 25 วัน เรียกว่าโพสลาวาที่ 1 (พี 1) เรื่อยไปจนถึงโพสลาวาที่ 25 (พี 25) หลังการลอกคราบแต่ละครั้งรูปร่างลักษณะจะเปลี่ยนแปลงไปสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ลูกกุ้งจะมีสีเหลืองใส มีลายหรือจุดเกิดขึ้น กริยาวออก หนามบนลำตัวหายไปหมด ลูกกุ้งจะเลี้ยงตัวอยู่บริเวณป่าชายเลน หรือในแหล่งน้ำกร่อยประมาณ 3-4 เดือน ก็จะเติบโต

เป็นกุ้งวัยรุ่น เมื่ออายุได้ประมาณ 6 เดือน กุ้งจะเดินทางสู่ทะเลเพื่อผสมพันธุ์ต่อไป (ปิยะพงศ์ โชติพันธ์. 2529; วัลลภ คงเพิ่มพูน. 2531) (ภาพประกอบ 6)

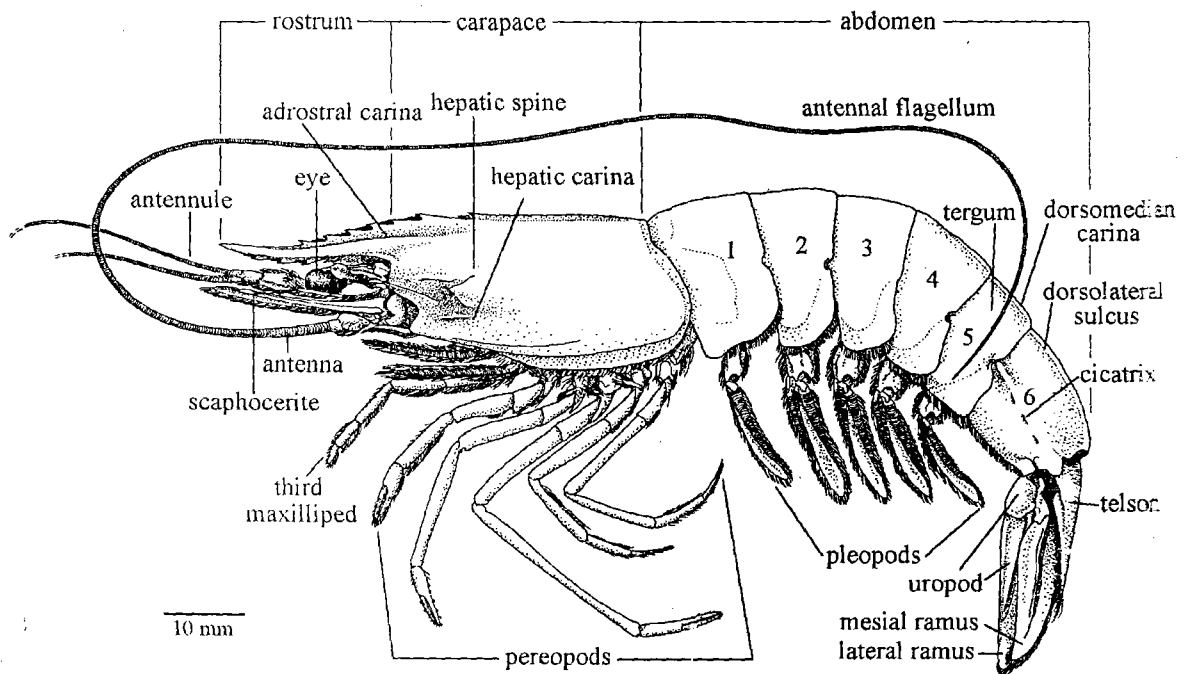
การสืบพันธุ์

การผสมพันธุ์ของกุ้งจะเกิดขึ้นหลังจากที่เพศเมียลอกคราบใหม่ๆ เพราะเพศผู้สามารถจะสอดถุงน้ำเชื้อเข้าไปในเพศเมียในระยะนี้เท่านั้น โดยกุ้งเพศผู้ 1-3 ตัว จะว่ายน้ำไล่ตามกุ้งเพศเมีย ขณะที่กุ้งเพศเมียว่ายน้ำในแนวตั้งขึ้นสู่ผิวน้ำในระยะประมาณ 50-80 เซนติเมตร จะมีเพศผู้เพียงตัวเดียวที่ว่ายน้ำตามขึ้นไปทันและชานานกับกุ้งเพศเมีย โดยจะอยู่ทางด้านล่างของเพศเมีย ต่อมากุ้งเพศผู้จะหงายทางด้านท้องของมันติดกับด้านท้องของเพศเมีย เมื่อท้องติดกันแล้วสักครู่เพศผู้จะหมุนตัวกลับอย่างรวดเร็ว และกอดรัดเพศเมียโดยจะอตัวของมันและยกหัวขึ้น เพศผู้จะกระดกหัวและหางเป็นจังหวะต่อเนื่องกันซึ่งจะเป็นระยะที่เพศผู้สอดถุงน้ำเชื้อเข้าไปอยู่ในเพศเมีย จนกระทั่งถึงเวลาที่กุ้งพร้อมจะวางไข่ เพศเมียจะปล่อยเชื้อเพศผู้ออกมาผสมกับไข่ที่ละน้อยติดต่อกัน (โครงการหนังสือเกษตรชุมชน. 2533) โดยไข่จะถูกขับออกมาทางช่องเปิดตรงโคนขาเดินคู่ที่สาม และผสมกับน้ำเชื้อเพศผู้ซึ่งไหลออกจากถุงเก็บน้ำเชื้อทางรูเปิดเล็กๆ ที่บริเวณโคนขาเดินคู่ที่สี่ของเพศเมีย แม่กุ้งใช้เวลาวางไข่ครั้งหนึ่งๆ ประมาณ 3-5 นาที ไข่ที่ผสมแล้วขณะที่ถูกขับออกมาใหม่จะมีลักษณะกลม มีเมือกห่อหุ้ม ไข่จะค่อยๆ เปลี่ยนเป็นรูปผลึกในระยะหลัง ระยะนี้ไข่จะมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.25 มิลลิเมตร ไข่กุ้งในตระกูล Penaeus โดยทั่วไปจะหนักมากกว่าน้ำทะเลเล็กน้อยจึงมักจม แต่บางแห่งกระแสน้ำอาจจะพัดพาเอาไข่บางส่วนขึ้นมายังผิวน้ำก็ได้ ไข่ที่ผสมแล้วที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส จะเจริญและฟักออกเป็นตัวภายในเวลา 15 ชั่วโมง จากนั้นลูกกุ้งจะวิวัฒนาการและเปลี่ยนรูปร่างไปตามขั้นตอน (บรรจง เทียนสังข์ศรี. 2529) แต่ถ้าในกรณีที่เพศเมียยังไม่พร้อมที่จะวางไข่ เนื่องจากรังไข่ยังไม่เจริญเต็มที่ ถุงน้ำเชื้อก็就会被ขับออกมาพร้อมกับเปลือกในระหว่างการลอกคราบครั้งต่อไป การลอกคราบจะมีขึ้นทุก 2-3 อาทิตย์ และระยะในการลอกคราบประมาณ 5 วัน ซึ่งจะเกิดขึ้นเฉพาะกลางคืน และกุ้งก็จะกอดรัดเพื่อผสมพันธุ์เฉพาะในตอนกลางคืนหลังการลอกคราบ ถุงน้ำเชื้อใหม่จะถูกสอดเข้าไปอีกครั้ง ในเพศเมียตัวหนึ่งสามารถรับน้ำเชื้อเพศผู้มากกว่าสองตัวขึ้นไป (โครงการหนังสือเกษตรชุมชน. 2533)

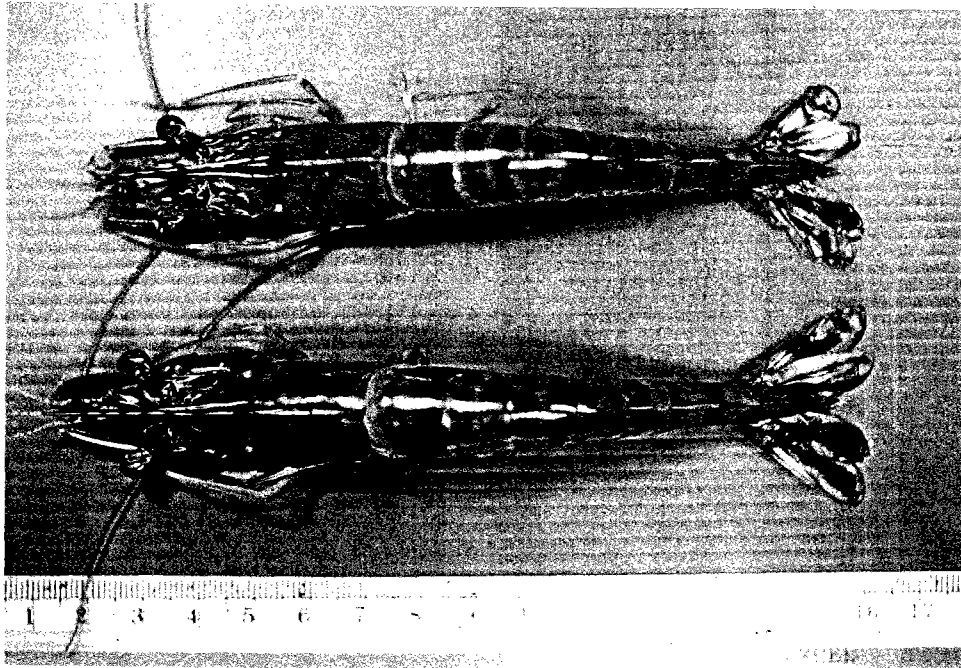
ความแตกต่างของกุ้งกุลาดำเพศผู้และเพศเมีย

กุ้งเป็นสัตว์ที่มีเพศแยกกันโดยปกติกุ้งเพศเมียมักจะมีขนาดใหญ่กว่ากุ้งเพศผู้ที่มีอายุเท่ากัน การที่จะแยกได้ว่าเป็นกุ้งเพศผู้หรือเพศเมียนั้นสังเกตได้จากตรงบริเวณโคนขาว่ายน้ำคู่ที่ 1 จะมีอวัยวะเพศผู้เป็นแผ่นเชื่อมติดกันเรียกว่า petasma สำหรับส่งน้ำเชื้อและจะมีท่อส่งน้ำเชื้อไปเปิด

ออกบริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 5 ส่วนกึ่งเพศเมียสังเกตได้จากตรงบริเวณระหว่างโคนขาเดินคู่ที่ 4 และ 5 นั้นจะมีถุงเก็บน้ำเชื้อที่ได้รับจากเพศผู้หลังจากผสมพันธุ์แล้ว ลักษณะเป็นดิ่งแบนเรียกว่า thelycum และจะมีท่อไขไปเปิดออกบริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 3 (ปิยพงศ์ โชติพันธ์. 2529; โครงการหนังสือเกษตรชุมชน. 2533) (ภาพประกอบ 7)

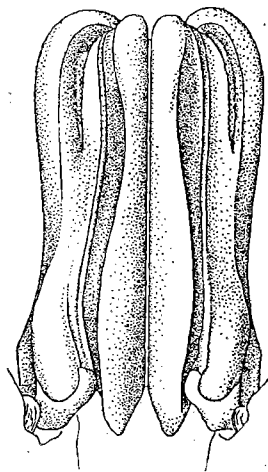


ภาพประกอบ 5 โครงสร้างภายนอกโดยทั่วไปของกุ้งกุลาดำ (Farfante and Kensley. 1997)



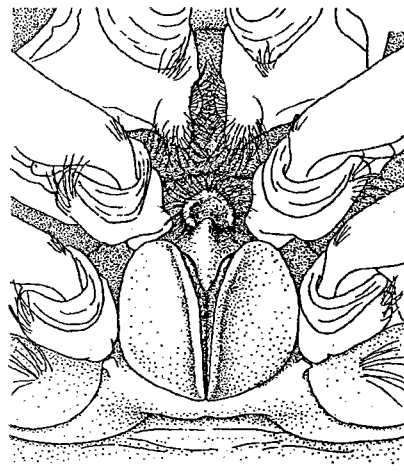
(ก)

(ข)



1mm

Petasma



5mm

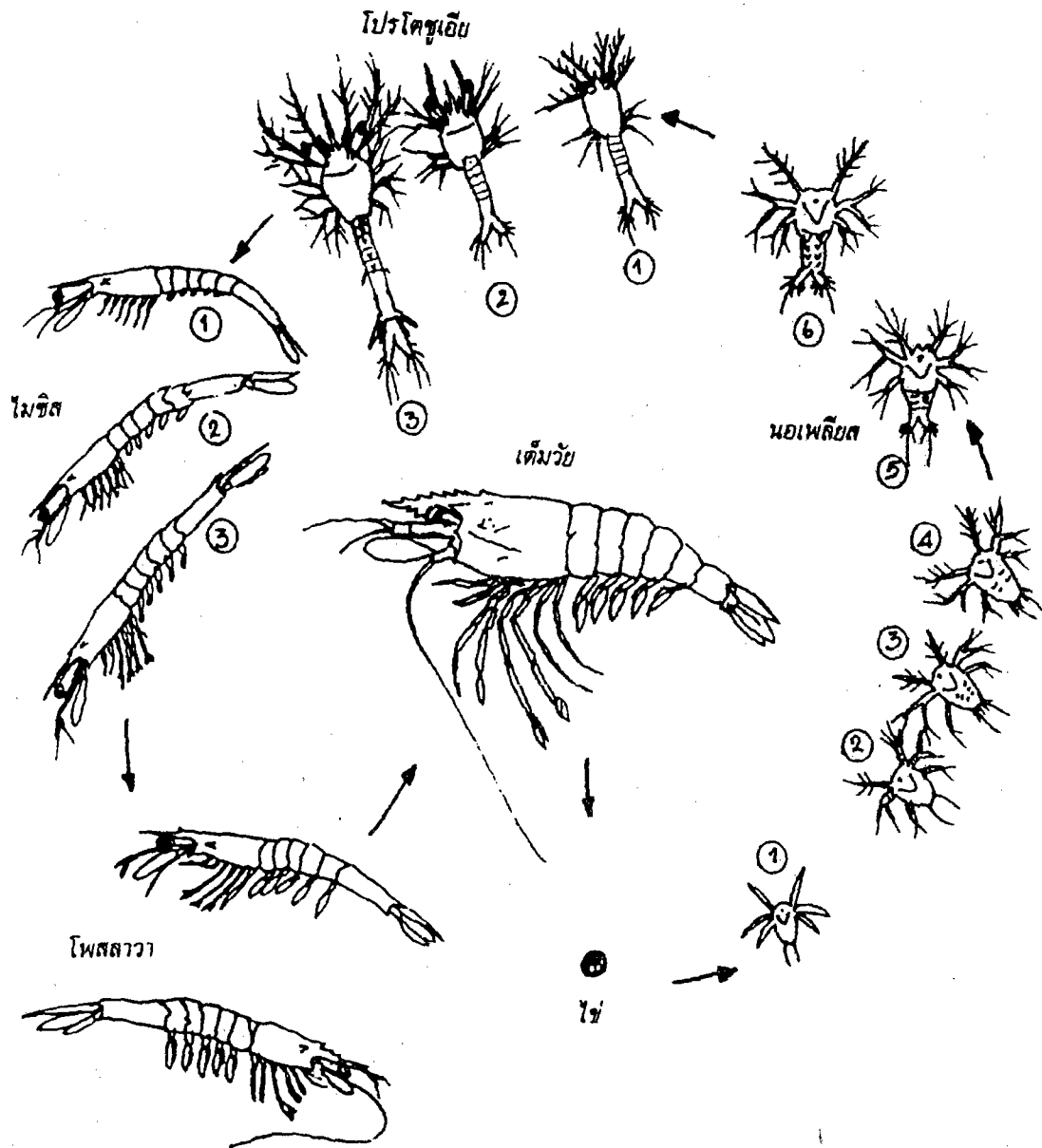
Thelycum

ภาพประกอบ 7 ลักษณะของกุ้งกุลาดำเพศผู้และเพศเมีย

(ก) ภาพกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* รูปบนแสดงกุ้งเพศผู้ รูปล่างแสดงกุ้งเพศเมีย

(ข) ภาพแสดง Petasma ของกุ้งกุลาดำเพศผู้ และ Thelycum ของกุ้งกุลาดำเพศเมีย

(Farfante and Kensley. 1997)



ภาพประกอบ 6 การพัฒนาของลูกกุ้งทะเลวัยอ่อนและการแบ่งระยะของการเจริญเติบโต (ปิยพงศ์ โชติพันธุ์. 2529)

Pigment Dispersing Hormone (PDH)

แหล่งที่พบและหน้าที่

จากการศึกษาถึงตำแหน่งที่พบสารคล้าย PDH และบทบาทการทำงานของสารนี้ใน crustacean ต่างๆ มีรายงานดังนี้

รายงานการตรวจหาเส้นประสาทที่มี light-adapting distal retinal pigment hormone (DRPH) ในก้านตาและระบบประสาทส่วนกลางของกุ้ง crayfish *Orconectes immunis* โดยใช้วิธี indirect immunofluorescence method พบว่าเซลล์ประสาทในก้านตาที่มี DRPH อยู่ในบริเวณปมประสาทที่ตาที่เรียกว่า medulla interna (MI), medulla externa (ME) และ lamina ganglionaris (LG) และพบ DRPH ที่เส้นใยประสาทซึ่งมีลักษณะเป็นปุ่มๆ (varicose fiber) ใน neuropil ของปมประสาทที่ทั้งสามบริเวณ ส่วนในสมองพบว่าเซลล์ประสาทที่มี DRPH ส่วนใหญ่จะอยู่เป็นกลุ่มในบริเวณ neuropil หลายบริเวณ (Schueler and others. 1986)

ในการศึกษาเปรียบเทียบตำแหน่งที่พบ β -PDH ในก้านตาปู *Carcinus maenas* และในกุ้ง crayfish *Orconectes limosus* โดยใช้วิธี indirect peroxidase-antiperoxidase method (PAP) พบว่า crustacean ทั้งสองชนิดมีรูปแบบการกระจายของฮอร์โมนที่คล้ายคลึงกันกล่าวคือ จะพบกระจายอยู่บริเวณเซลล์ประสาทขนาดใหญ่ซึ่งอยู่บริเวณระหว่างปมประสาทที่ตาสองบริเวณคือ MI และ medulla terminalis (MT) และพบเซลล์ประสาทขนาดเล็กใน LG ส่วนใน *C. maenas* พบเซลล์ประสาทจำนวน 2-4 เซลล์ในบริเวณ MT นอกจากนี้เซลล์ประสาทที่อยู่ระหว่าง MI และ MT ยังส่งฮอร์โมนไปตามเส้นใยประสาทไปยังบริเวณ ME, MI, MT และต่อมไชนัส (Mangerich and others. 1987)

จากการใช้วิธี PAP เช่นเดียวกันเพื่อศึกษาใน crustacean 4 ชนิดคือ ปู *Carcinus maenas*, กุ้ง *Cancer pagurus*, กุ้ง *Uca pugilator* และ กุ้ง crayfish *Orconectes limosus* โดยศึกษารายละเอียดของโครงสร้างที่ปลาย axon ภายในต่อมไชนัส ซึ่งเป็นบริเวณที่หลั่ง β -PDH ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่าที่ปลาย axon จะประกอบไปด้วย neurosecretory granule ซึ่งมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 90-130 นาโนเมตร โดยที่ granule เหล่านี้จะหลั่ง β -PDH ไปยัง hemolymph lacunae (Dirksen and others. 1987)

มีรายงานการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ α -PDH ที่แยกได้จากกุ้ง *Pandalus borealis* และ β -PDH ที่แยกได้จากปูก้ามดาบ *Uca pugilator* และ ปู *Cancer magister* พบว่าประกอบด้วยกรดอะมิโน 18 หน่วยเหมือนกัน แต่มีการเรียงตัวของลำดับกรดอะมิโนต่างกัน ในตำแหน่ง ที่ 3, 4, 11, 13, 16 และ 17 เมื่อทดสอบผลการกระตุ้นการกระจายตัวของ melanophore

พบว่า β -PDH แสดงประสิทธิภาพในการกระตุ้นมากกว่า α -PDH 21 เท่าและเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ α -PDH ที่มีกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 3 แตกต่างกันทั้งหมด 7 รูปแบบด้วยกันคือ มีกรดอะมิโนเป็น (A^3 , I^3 , N^3 , Q^3 , D^3 , E^3 และ K^3) α -PDH) พบว่าการกระจายตัวของ melanophore มีดังนี้ E^3 (325%), D^3 (58%), N^3 (26%), Q^3 (11%), A^3 (8%), K^3 (0.73%) และ I^3 (0.66%) จะเห็นได้ว่า E^3 α -PDH มีประสิทธิภาพทำให้ melanophore กระจายตัวได้ดีและมีประสิทธิภาพมากกว่า α -PDH ส่วน K^3 α -PDH และ I^3 α -PDH มีประสิทธิภาพต่ำเมื่อเทียบกับ α -PDH (Jorenby, Riehm and Rao. 1987)

ได้มีการศึกษาในระบบประสาทของปู *Carcinus maenas* และกุ้ง crayfish *Orconeces limosus* เช่นเดียวกันโดยใช้วิธี PAP พบว่าในปมประสาทบริเวณสมอง (cerebral ganglion) ของสัตว์ทั้ง 2 มีเซลล์ประสาทที่พบ β -PDH จำนวนเท่ากันคือ ประมาณ 10-12 เซลล์ ส่วนในปู *C. maenas* จะพบเซลล์ประสาทที่มี β -PDH 1 เซลล์ในแต่ละ commissural ganglion และจำนวนหลายเซลล์ในปมประสาทบริเวณอก (thoracic ganglion) ส่วนใน *O. limosus* พบเซลล์ประสาทที่มี β -PDH จำนวน 4 เซลล์ในเส้นประสาทด้านท้อง นอกจากนี้ยังพบ β -PDH ที่เส้นใยประสาทในบริเวณ central ganglia ของสัตว์ทั้งสองชนิด (Mangerich and Keller. 1988)

จากการศึกษาโครงสร้างของ α -PDH ที่แยกได้จากกุ้ง *Pandalus borealis* และ β -PDH ที่แยกได้จากปูก้ามดาบ *Uca pugilator* และ ปู *Cancer magister* พบว่าประกอบด้วยกรดอะมิโน 18 หน่วยเหมือนกัน แต่มีการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนต่างกัน 6 ตำแหน่ง (ตำแหน่งที่ 3, 4, 11, 13, 16 และ 17) พบว่า β -PDH แสดงประสิทธิภาพในการกระตุ้นการกระจายตัวของ melanophore มากกว่า α -PDH 21 เท่า และเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ α -PDH กับ α -PDH ที่มีลำดับกรดอะมิโนในตำแหน่งต่างๆ เป็นดังนี้คือ L^4 , L^{11} , K^{13} , N^{16} , D^{17} และ E^3 , L^4 α -PDH โดย L^{11} , K^{13} , N^{16} และ D^{17} α -PDH แสดงประสิทธิภาพในการกระจายตัวของ melanophore เหมือนกับ α -PDH ส่วน L^4 α -PDH และ E^3 , L^4 α -PDH แสดงผลการกระจายตัวของ melanophore มากกว่า α -PDH 2.4 และ 4 เท่าตามลำดับ (Hintz, Riehm and Rao. 1989)

ในการตรวจหาสารคล้าย PDH ในก้านตาของปู *Callinectes sapidus* และกุ้ง *Pandalus danae* โดยใช้ antiserum ที่สร้างต่อ α -PDH และ β -PDH พบว่าการกระจายของเซลล์ประสาทที่พบสารคล้าย α -PDH และ β -PDH ของปู *C. sapidus* และกุ้ง *P. danae* มีรูปแบบคล้ายคลึงกันคือ จะพบอยู่ในบริเวณแขนงใยประสาทและต่อมไชนัส แต่จะพบว่าเซลล์ประสาทส่วนใหญ่ของปู *C. sapidus* จะพบสารคล้าย β -PDH มากกว่า α -PDH ส่วนในกุ้งจะพบสารคล้าย α -PDH และ β -PDH ในเซลล์ประสาทคล้ายคลึงกัน (Phillips and others. 1990)

จากการใช้ antibody ที่สร้างต่อ β -PDH ของปูก้ามดาบ *Uca pugilator* ในการตรวจหาตำแหน่งที่พบสารคล้าย PDH ในระบบประสาทของกระเพาะอาหาร (stomatogastric nervous system) ของ crustacean ทั้ง 5 ชนิดคือ ปู *Cancer borealis*, *Cancer antennarius* กุ้ง lobster *Panulirus interruptus*, *Homarus americanus* และกุ้ง crayfish *Procambarus clarkii* โดยผลการศึกษาไม่พบเซลล์ประสาทที่มี PDH ในบริเวณ stomatogastric ganglion (STG) และ esophageal ganglion (EG) ใน crustacean ทั้ง 5 ชนิด แต่พบว่าจะพบเส้นใยประสาทที่สร้างสารคล้าย PDH บริเวณ STG ในกุ้ง *P. interruptus* เพียงชนิดเดียว ส่วนในบริเวณ circumesophageal ganglia (CG) จะพบเซลล์ประสาทและเส้นใยประสาทใน crustacean ทั้ง 5 ชนิด โดยในปู *C. borealis* พบเซลล์ประสาทขนาดใหญ่ 1 เซลล์ ใน *C. antennarius* พบเซลล์ประสาทขนาดเล็กถึงใหญ่ 3 เซลล์ ในกุ้ง *P. clarkii* พบเซลล์ประสาทขนาดกลาง 3-8 เซลล์ ใน *H. americanus* พบเซลล์ขนาดเล็ก 1-4 เซลล์และใน *P. interruptus* พบเซลล์ขนาดเล็ก 13-17 เซลล์ นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์ประสาทขนาดเล็กในปู *C. antennarius* จะส่งเส้นใยประสาทไปยังบริเวณ inferior esophagus ติดต่อกับบริเวณ CG ฝั่งตรงข้ามด้วย จากการศึกษาในครั้งนี้คาดว่า PDH น่าจะมีบทบาทเป็น neuromodulator (Mortin and Marder. 1991)

สำหรับการ cloning cDNA ของ PDH จาก X-organ ในก้ามดาบของปู *Carcinus maenas* พบว่า signal peptide ประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 22 หน่วย ส่วน PDH precursor-related peptide (PPRP) ซึ่งเป็นเปปไทด์ที่ยังไม่ทราบหน้าที่ ประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 33 หน่วยและ mature PDH ประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 18 หน่วย มีลำดับกรดอะมิโนดังนี้ NSELINSILGLPKV MNDA-NH₂ (Klein and others. 1992)

ส่วนการศึกษา PDH ในระดับ mRNA ในก้ามดาบของกุ้ง crayfish *Orconectes limosus* โดยการ clone และหาลำดับ cDNA ผลจากการคัดเลือกสามารถแยกได้ 1 clone โดยมีความยาว 228 base pair (bp) พบว่า signal peptide ประกอบด้วยกรดอะมิโน 20 หน่วย PPRP ประกอบด้วยกรดอะมิโน 33 หน่วยและ PDH ประกอบด้วยกรดอะมิโน 18 หน่วย โดยมีลำดับกรดอะมิโนเป็น NSELINSILGLPKVMNEA-NH₂ (Kleijn and others. 1993)

ในการตรวจหาตำแหน่งที่พบสารคล้าย PDH ในสมองของแมลงหวี่ wild-type *Drosophila melanogaster* โดยใช้วิธี PAP และ indirect immunofluorescence (ใช้ Texas red หรือ fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugate goat anti-rabbit) เป็นสารเรืองแสงที่ติดฉลากบนแอนติบอดีตัวที่สอง) ใช้แอนติบอดีที่สร้างต่อ β -PDH ในการศึกษาเซลล์ประสาทที่พบสารคล้าย PDH โดยพบการกระจายของเซลล์ประสาทในตัวเซลล์ประสาทบริเวณ Medulla (Me) จำนวน 8 เซลล์ ซึ่งเป็นเซลล์ประสาทที่มีขนาดใหญ่ 4 เซลล์และขนาดเล็ก 4 เซลล์ ซึ่งเซลล์ประสาทเหล่านี้จะ

ส่งแขนงใยประสาทไปยังบริเวณ Me และ posterior optic tract (POT) นอกจากนี้ยังพบว่ายังมีแขนงใยประสาทบางส่วนยื่นไปทางด้านบนเชื่อมโยงไปยังบริเวณ calyces (Ca) ซึ่งในบริเวณนี้พบเซลล์ประสาท 2 เซลล์ โดยมีการแตกแขนงเส้นใยประสาทไปยังบริเวณ pare intercerebralis (Pi) และมีการแตกแขนงเส้นใยประสาทผ่านทาง median bundle (MB) ไปยังบริเวณรอบ ๆ หลอดอาหาร (esophageal forame) (Helfrich-Forster and Homberg, 1993).

จากการตรวจหาสารคล้าย PDH ในก้านตาของกุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* กุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* และกุ้งตะกาด *Metapenaeus affinis* โดยใช้ antiserum ที่สร้างต่อ PDH 2 รูปแบบ (α -PDH และ β -PDH) เพื่อศึกษาการกระจายของฮอร์โมนทั้งสองชนิดนี้ด้วยวิธี indirect immunoperoxidase โดยใช้ section หนา และศึกษาการปรากฏร่วมและการปรากฏแยกของฮอร์โมนทั้งสองโดยใช้ section บาง และใส่ antiserum ทั้งสองสลับกัน พบว่าการกระจายของเซลล์ประสาทที่พบสารคล้าย α -PDH และ β -PDH มีรูปแบบคล้ายคลึงกันคือ พบในตัวเซลล์ประสาทบริเวณระหว่าง MI กับ MT และที่บริเวณ MT ซึ่งเซลล์ประสาทเหล่านี้ส่งแขนงใยประสาทไปยังบริเวณ ME, MI, MT, sinus gland (SG) และในเส้นประสาทตาด้วย เซลล์ประสาทส่วนใหญ่ในบริเวณเหล่านี้จะพบทั้งสารคล้าย α -PDH และ β -PDH อยู่ร่วมกัน แต่ในกุ้งก้ามกรามพบว่าเซลล์ประสาทบางเซลล์ในบริเวณ LG จะพบเฉพาะสารคล้าย β -PDH เท่านั้น ส่วนในกุ้งกุลาดำ เซลล์ประสาทบางเซลล์ในบริเวณ MT จะพบเฉพาะ α -PDH เท่านั้น การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการกระจายของ PDH รูปแบบต่างๆ อาจอยู่ในเซลล์ประสาทเซลล์เดียวกันหรือแยกกันอยู่ต่างเซลล์ (สุนิสสา, 2536; สุนิสสา, วีระวรรณ และไพศาล, 2537)

จากการทำ cDNA จากก้านตาของ blue crab *Callinectes sapidus* ผลจากการคัดเลือกสามารถแยก clone ได้ 2 clone (PDH I และ PDH II) PDH I-cDNA มีความยาว 497 bp (รวม poly (A) tail) ส่วน PDH II-cDNA มีความยาว 414 bp (รวม poly (A) tail) พบว่าทั้ง 2 clone มีโครงสร้างเหมือนกับ β -PDH และเมื่อศึกษา clone ของ PDH I-cDNA ทาง phylogenetic พบว่ามีโครงสร้างคล้ายคลึงกับปู *Carcinus maenas* เมื่อทำ bioassay พบว่า PDH II-cDNA มีผลทำให้การกระจายของ melanophore มากกว่า PDH I-cDNA 400 เท่า PDH I มีลำดับกรดอะมิโนเป็น NSELINSILGLPKVMNDA-NH₂ และ PDH II มีลำดับกรดอะมิโนเป็น NSELINLLGISALMNEA-NH₂ (Klein and others, 1994)

จากการตรวจหาเซลล์ประสาทของปู *Cancer borealis* ในบริเวณ STG, PO และ SG โดยใช้ antiserum ที่สร้างต่อสารคล้ายฮอร์โมนทั้ง 14 ชนิดคือ β -PDH, crustacean cardioactive peptide (CCAP), cholecystokinin (CCK₂₄₃₋₄, CCK_{36-9H} และ CCK_{37-4E}), γ -aminobutyric acid (GABA), locustatachykinin (LomTK), myomodulin (MYO), buccalin (BUC), serotonin (5-HT),

FLRFamide (FLRF), RPCH, proctolin (PROC) และ allatostatin (AST) พบว่าจะพบสารคล้าย RPCH, PROC, AST ในบริเวณ STC, PO และ SG ส่วน BUC, CCK_{C36-9H}, CCK₂₃₄₋₄, GABA, MYO, 5-HT, LomTK และ FLRF จะพบในบริเวณ STC และ PO CCK_{C37-4E} จะพบในบริเวณ STC เท่านั้น CCAP จะพบในบริเวณ PO เท่านั้นและ PDH จะพบในบริเวณ SG เท่านั้น (Christie, Skiebe and Marder. 1995)

จากการทำ cDNA จากก้านตาของกุ้ง *Penaeus vannamei* โดยใช้เทคนิค PCR ได้ clone ทั้งหมด 75,000 clone คัดเลือก clone ที่มีความจำเพาะโดยใช้ PDH-probe พบว่าสามารถแยก clone ที่มีความจำเพาะต่อ PDH ได้ 3 clone (266 bp, 435 bp และ 468 bp) โดย clone แรกมีความยาว 435 bp ประกอบด้วยบริเวณ signal peptide มีลำดับกรดอะมิโน 22 หน่วย PPRP มีลำดับกรดอะมิโน 34 หน่วยและ PDH sequence ประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 18 หน่วย ส่วน clone ที่สองมีความยาว 468 bp ประกอบด้วยบริเวณ signal peptide มีลำดับกรดอะมิโน 23 หน่วย ส่วนบริเวณ PPRP และบริเวณ PDH sequence ประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 34 หน่วย และ 18 หน่วยตามลำดับ ซึ่งเท่ากับที่พบใน clone แรก ส่วน clone ที่สามมีความยาว 266 bp พบเพียงแต่ส่วนของ PPRP และ PDH sequence โดย PDH sequence ที่ได้มีความแตกต่างจาก clone แรก และ clone ที่สองตรงลำดับกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 11 โดยมีลำดับกรดอะมิโนเป็น L (โดยที่ clone แรกและ clone ที่สองเป็น I) clone ที่ 1 และ 2 มีลำดับกรดอะมิโนดังนี้ NSELINSLLGIPKVMN-DA-NH₂ ส่วน clone ที่ 3 มีลำดับกรดอะมิโนดังนี้ NSELINSLLGIPKVMNDA-NH₂ (Desmoucelles-Carette, Sellos and Van Wormhoudt. 1996)

ส่วนในตั๊กแตน *Schistocerca gregaria* ได้ศึกษาการพัฒนาของเซลล์ประสาทที่พบสารคล้าย PDH ในสมองและเปรียบเทียบกับเซลล์ประสาทที่พบสารคล้าย urotensin I และ mas-allatotropin จากการศึกษาโดยใช้วิธี PAP พบกลุ่มเซลล์ประสาทที่พบสารคล้าย PDH ในบริเวณ Me และ lamina (La) ส่วนกลุ่มเซลล์ประสาทที่พบสารคล้าย urotensin I และ mas-allatotropin พบบริเวณกลุ่มเซลล์เดียวกันกับที่พบสารคล้าย PDH คือ urotensin I พบบริเวณ La และ mas-allatotropin พบบริเวณ Me เมื่อศึกษาด้วยวิธี double immunofluorescence (urotensin I ใช้ DTAF fluorescence และ mas-allatotropin ใช้ Texas red fluorescence เป็นสารเรืองแสงที่ติดฉลากบนแอนติบอดีตัวที่สอง) จะเห็นว่าเซลล์ที่พบ PDH, urotensin I และ mas-allatotropin เป็นเซลล์คนละเซลล์กัน และจากการศึกษาพบว่าตัวเซลล์ประสาทที่พบสารคล้าย PDH จะส่งแขนงไปประสาทไปยังบริเวณ Me, La, accessory medulla (AMe), posterior optic tubercles (POTu) และ superior protocerebrum (SP) อีกด้วย (Homberg and Prakash. 1996)

ในการศึกษาการกระจายของเซลล์ประสาทที่พบสารคล้าย PDH ในสมองบริเวณ AMe ของแมลงสาบ *Leucophaea maderae* โดยพบว่า AMe ประกอบไปด้วย vesicles 4 ชนิดคือ granular, small, medium-sized และ large นอกจากนี้ยังพบตัวเซลล์บริเวณ Me ส่งแขนงใยประสาทเข้าไปยังบริเวณ AMe, POT และยังคงพบว่ามีแขนงใยประสาทจากบริเวณ PO แดกแขนงเข้าไปยังบริเวณ Me และ La อีกด้วย (Reischig and Stengl. 1996)

จากการศึกษา PDF (pigment dispersing factor) ในระดับ mRNA ในสมองของแมลงหัว *Drosophila melanogaster* เพื่อสร้าง cDNA โดยใช้เทคนิค PCR พบว่าสามารถแยก clone ที่มีความจำเพาะต่อ PDF ได้ 1 clone ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนทั้งหมด 102 หน่วยโดยประกอบไปด้วยบริเวณ signal peptide มีลำดับกรดอะมิโน 16 หน่วย บริเวณ PDF-associated peptide (PAP) มีลำดับกรดอะมิโน 63 หน่วย (ตำแหน่งที่ 17-79) และบริเวณ mature PDF ประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 18 หน่วย (ตำแหน่งที่ 83-100) โดยมีลำดับกรดอะมิโนเป็น NSELINSLLSLPKMNDA-NH₂ (Park and Hall. 1998)

ได้มีการศึกษาการกระจายของเซลล์ประสาทที่พบสารคล้าย PDH ในระบบประสาทส่วนกลางของพวกหอยทาก *Helix pomatia* และหอยกาบเดี่ยว *Lymnaea stagnalis* โดยใช้ antibody ที่สร้างต่อ β -PDH ของปูก้ามดาบ *Uca pugilator* พบว่าพบตัวเซลล์ประสาทที่พบสารคล้าย PDH ในระบบประสาทของทั้ง *H. pomatia* และ *L. stagnalis* โดยจำนวนเซลล์ประสาทที่พบ PDH ใน *H. pomatia* (700-900 เซลล์) มีมากกว่า *L. stagnalis* (50-60 เซลล์) (Elekes and Nassel. 1999)

จากการศึกษาผลของสารคล้าย PDH, CCAP, PROC, malatonin และ 20-hydroxyecdysone (20-HE) ต่อการกระจายตัวของ erythrochore ใน chromatophore ของ freshwater shrimp *Macrobrachium potituna* พบว่า PROC, 20-HE และ melatonin ไม่มีผลต่อการกระจายตัวของ erythrochore ส่วน CCAP แสดงการกระตุ้นการกระจายตัวของ erythrochore ได้ โดยมีฤทธิ์ไม่มากนักเมื่อเทียบกับ PDH แต่เมื่อทดสอบผลการรวมตัวของ erythrochore โดยผสม PCH กับ CCAP, malatonin, 20-HE และ PROC พบว่ามีประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดการรวมตัวของ erythrochore น้อยลง (Nery, Sliva and Lauro Castrucci. 1999)

การแยกและทำให้บริสุทธิ์ PDH

การเปลี่ยนสีตัวของสัตว์พวก crustacean ได้มีการศึกษากันมานานแล้ว โดยในกุ้ง *Crangon vulgaris* พบว่าสารตั้งต้นที่ผลิตมาอยู่ในเลือดเป็นตัวควบคุมการเคลื่อนที่ของเม็ดสีใน chromatophore ของพวก crustacean (Koller. 1927) ต่อมาได้มีการศึกษาในกุ้ง *Palaemonetes*

vulgaris พบว่าฮอร์โมนที่อยู่ในเนื้อเยื่อก้านตาเป็นตัวควบคุมการเปลี่ยนสีตัวของสัตว์โดยทำงานตรงกันข้ามกันคือ ช่วยในการรวมตัวและกระจายตัวของเม็ดสี (Perkins. 1928)

จากการแยกสกัด PDH โดยวิธี electrophoresis และเทคนิคทาง chromatography ดังตาราง 1 พบว่า PDH มีอยู่หลายรูปแบบ ซึ่งแตกต่างกันไปใน crustacean แต่ละชนิด (ตาราง 2)

มีรายงานการแยกสกัด PDH เป็นครั้งแรกจากเนื้อเยื่อก้านตาของ *Pandalus borealis* โดยเรียกชื่อฮอร์โมนนี้ว่า DRPH ซึ่งฮอร์โมนนี้เป็นฮอร์โมนที่ช่วยในการปรับการเคลื่อนที่ของเม็ดสีภายใน ommatidium ของตาประกอบต่อที่สว่างโดยทำการบดก้านตาแล้วสกัดด้วย 99% ethanol:0.1 M NH₃ (700:300) จากนั้นแยกสกัดด้วย organic phase ของ 1-butanol:0.1 M NH₃ (1:1), cyclohexane:butanol (4:1) และใช้เทคนิคทาง chromatography ชนิด gel filtration (Sephadex G-25), cation-exchange chromatography (CM-Sephadex C-25), gel filtration (Sephadex G-25 superfine), electrophoresis, thin layer chromatography และใช้ Edman degradation ในการหาลำดับกรดอะมิโนพบว่า มีน้ำหนักโมเลกุล 2,000 ดาลตัน (Fernlund. 1971) มีโครงสร้างเป็น octadecapeptide ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนเป็น NSGMINSILGIPRVMTEA-NH₂ (Fernlund. 1976) ซึ่งเมื่อศึกษาต่อมาใน crustacean อื่นหลายชนิดทำให้ทราบว่าฮอร์โมน DRPH และ α -PDH ที่แยกสกัดได้จากก้าง *P. borealis* เป็นฮอร์โมนชนิดเดียวกัน (Josefsson. 1983)

จากการแยกสกัด β -PDH จากปูก้ามตา *Uca pugilator* โดยนำส่วนของก้านตาจำนวน 8,500 ก้านตา (17 กรัม) มาบดแล้วสกัดด้วยน้ำเดือด นำไปแยกผ่าน Bio-Rex 70 จากนั้นแยกสกัดด้วย organic phase ของ 1-butanol:0.1 M NH₃ (1:1), cyclohexane:butanol (4:1) นำมาทำให้บริสุทธิ์โดยแยกผ่านกระบวนการ chromatography ชนิด gel filtration (Sephadex G-50), cation exchange chromatography (CM Sephadex C-25), partition chromatography (Sephadex G-50) ตามด้วย RP-HPLC (Whatman Partisil 10 ODS-2) และใช้ Edman degradation ในการหาลำดับกรดอะมิโนพบว่า เป็น neuropeptide ที่มีโครงสร้างเป็น octadecapeptide มีลำดับกรดอะมิโนเป็น NSELINSILGLPKVMNDA-NH₂ และพบว่า PDH ที่แยกได้นี้มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับ PDH ที่แยกได้จากก้าง *Pandalus borealis* ในตำแหน่งที่ 5-10:INSILG และมีลำดับกรดอะมิโนต่างกัน 6 ตำแหน่งคือ ตำแหน่งที่ 3, 4, 11, 13, 16 และ 17 (Rao and others. 1985)

สำหรับการแยกสกัด β -PDH จากเนื้อเยื่อก้านตาของปู *Cancer magister* จำนวน 1,250 ก้านตา (100 กรัม) โดยใช้ 99% ethanol:0.1 M NH₃ (700:300) จากนั้นแยกสกัดต่อด้วย organic phase ของ 1-butanol:0.1 M NH₃ (1:1), cyclohexane:butanol (4:1) นำมาทำให้บริสุทธิ์โดยแยกผ่าน column chromatography ชนิด gel filtration (Sephadex G-25), cation exchange chromatography (CM Sephadex C-25), partition chromatography (Sephadex G-50-superfine) และ

RP-HPLC (Whatman Partisil 10 ODS-2) หาลำดับกรดอะมิโนโดยใช้ Edman degradation พบว่ามีโครงสร้างและลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับปูก้ามดาบ *U. pugilator* (Kleinholz and others. 1986)

จากการแยกสกัด pigment dispersing factor (PDF) โดยนำส่วนหัวของจิ้งหรีด *Achaeta domestica* มาแยกสกัดด้วยน้ำเดือด นำไปแยกผ่านคอลัมน์ Bio-Rex 70 จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ต่อโดยแยกผ่านกระบวนการทาง chromatography ชนิด gel filtration (Sephadex G-25), cation exchange chromatography (CM Sephadex C-25), partition chromatography (Sephadex G-25) แล้วตามด้วย RP-HPLC (Whatman Partisil 10 ODS-2) และใช้ Edman degradation ในการหาลำดับกรดอะมิโนพบว่ามีโครงสร้างเป็น octadecapeptide มีลำดับกรดอะมิโนเป็น NSEIINSLGLPKVLNDA-NH₂ (Rao and others. 1986)

ส่วนการแยกสกัด PDF โดยนำส่วนหัวของตั๊กแตน lubber grasshopper *Romalea microptera* 1,000 ตัว (130 กรัม) มาแยกสกัดด้วยน้ำเดือด นำไปผ่าน Bio-Rex 70 จากนั้นแยกสกัดด้วย organic phase ของ 1-butanol:0.1 M NH₃ (1:1), cyclohexane:butanol (4:1) นำสารสกัดที่ได้แยกผ่านกระบวนการ chromatography ในขั้นตอนต่างๆ ดังนี้ gel filtration (Sephadex G-25), cation exchange chromatography (CM Sephadex C-25), partition chromatography (Sephadex G-25) และตามด้วย RP-HPLC (Whatman Partisil 10 ODS-2) และใช้ Edman degradation ในการหาลำดับกรดอะมิโนพบว่ามีโครงสร้างเป็น octadecapeptide มีลำดับกรดอะมิโนเป็น NSEIINSLGLPKLLNDA-NH₂ ซึ่งจะเห็นได้ว่าการเรียงลำดับของกรดอะมิโนมีความคล้ายคลึงกับ β -PDH ที่แยกได้จากปู *Uca pugilator* และ *Cancer magister* ประมาณ 78% และมีการเรียงลำดับของกรดอะมิโนคล้ายคลึงกับ α -PDH ที่แยกได้จากกุ้ง *Pandalus borealis* ประมาณ 50% (Rao and others. 1987)

จากการแยกสกัด PDH จากต่อมไซนัสของปู *Callinectes sapidus* โดยผ่าตัดเอาต่อมไซนัสออกมาจากก้ามตาประมาณ 500 ต่อมนั้นเก็บใน 100% ethanol แยกสกัดสารออกจากก้ามตาด้วย ammonia ที่อิ่มตัวใน butanol จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยกระบวนการ RP-HPLC อีกครั้งหนึ่ง ใช้ Edman degradation ในการหาลำดับกรดอะมิโนพบว่ามีลำดับกรดอะมิโนเป็น NSELINSILGLPKVMNDA-NH₂ ซึ่งพบว่ามีโครงสร้างเหมือนกับ β -PDH ของปูก้ามดาบ *Uca pugilator* และปู *Cancer magister* (Mohrher and others. 1990)

ส่วนการแยกสกัด PDH จากกุ้ง crayfish *Procombarus clarkii* โดยนำส่วนของก้ามตาประมาณ 10,280 ก้ามตามาบดและสกัดด้วยน้ำเดือด นำไปแยกผ่าน Bio-Rex 70 จากนั้นแยกสกัดด้วย organic phase ของ 1 butanol:0.1 M. NH₃ (1:1) และ cyclohexane:butanol (4:1) นำสาร

สกัดที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์โดยแยกผ่านกระบวนการ chromatography ชนิด gel filtration (Sephadex G-50), cation exchange chromatography (CM Sephadex C-25), partition chromatography (Sephadex G-25) ตามด้วย RP-HPLC (whatman Partisil 10 ODS-2) และใช้ Edman degradation ในการหาลำดับกรดอะมิโนพบว่าลำดับกรดอะมิโนเป็น NSELINSILGLPKVMN-DA-NH₂ ซึ่งลำดับกรดอะมิโนที่ได้มีความแตกต่างจาก β -PDH ที่แยกได้จากปูก้ามดาบ *Uca pugilator* เพียงตำแหน่งเดียวคือตำแหน่งที่ 17 จากลำดับกรดอะมิโนที่แตกต่างกันแสดงถึงประสิทธิภาพของ PDH ต่อการกระจายเม็ดสีแตกต่างกันกล่าวคือ PDH ของ *P. clarkii* มีประสิทธิภาพทำให้การกระจายตัวของเม็ดสีสีดำและเม็ดสีสีขาวได้น้อยกว่า β -PDH ประมาณ 4-7 เท่าเมื่อทดสอบในปูก้ามดาบ *U. pugilator* และพบว่า PDH ของ *P. clarkii* มีประสิทธิภาพทำให้การกระจายตัวของเม็ดสีสีแดงได้มากกว่า β -PDH ประมาณ 4 เท่าเมื่อทดสอบในปู *P. clarkii* (McCallum and others. 1991)

จากการตรวจหาสารคล้าย PDH ในระบบประสาทและในก้านตาของปู *Carcinus maenas* ด้วย ELISA พบว่าสารคล้าย PDH ส่วนใหญ่จะกระจายอยู่ในปมประสาทที่ก้านตาและต่อมไซเนส จากนั้นได้ทำการแยกสกัดสารคล้าย PDH จากปมประสาทที่ก้านตาและต่อมไซเนสจำนวน 300 ก้านตา โดยสกัดด้วย 5% formic acid, 1% TFA, 1% NaCl และ 1 N HCl จากนั้นแยกผ่าน anti-PDH IgG-protein A-Sepharose column และทำให้บริสุทธิ์ต่อยกกระบวนการ RP-HPLC ตรวจหาสารคล้าย PDH จากกระบวนการแยกและทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี sandwich-ELISA โดยใช้ antiserum ที่สร้างต่อ β -PDH (anti- β -PDH IgG antiserum) เป็น antibody ตัวแรกและใช้ antiserum ที่สร้างต่อ β -PDH ที่ติดด้วย biotin เป็น antibody ตัวที่สอง จากนั้นใส่ streptavidin ที่เชื่อมด้วยเอนไซม์ peroxidase ไปจับกับ biotin ใช้ FAB-mass spectroscopy ในการหาน้ำหนักโมเลกุลพบว่าน้ำหนักโมเลกุล 1,927.2 ดาลตัน จากนั้นหาลำดับกรดอะมิโนด้วย Edman degradation พบว่ามีลำดับกรดอะมิโนเป็น NSELINSILGLPKVMNDA-NH₂ ซึ่งลำดับกรดอะมิโนที่ได้เหมือนกับ β -PDH (Lohr and others. 1993)

จากการแยกสกัด chromatophoretropic neuropeptide hormone จากต่อมไซเนสของกุ้ง kuruma prawn *Penaeus japonicus* โดยผ่าตัดเอาต่อมไซเนสจำนวน 300 ต่อมออกมาจากก้านตาของกุ้งที่มีน้ำหนักตัวประมาณ 20 \pm 2 กรัม จากนั้นแยกสกัดสารด้วย 0.9% NaCl:acetonitrile (7:3) นำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยกระบวนการ RP-HPLC 2 ขั้นตอน (การทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย RPCH ขั้นตอนที่แรกใช้ Asahi Pak ODP-50 column และขั้นตอนที่สองแยกด้วย TSK gel ODS-120T column ส่วนการทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย PDH ใช้ Asahi Pak OPD-50 column ทั้งสองขั้นตอน ติดตามสารคล้าย RPCH และ PDH ด้วยวิธี bioassay) พบฮอร์โมนที่มีผลต่อการรวมตัวของเม็ดสี เมื่อหาลำดับ

กรดอะมิโนพบว่าฮอร์โมนนี้คือ RPCH ให้ชื่อว่า Pej-RPCH และพบเปปไทด์ 2 ชนิด ซึ่งแสดงหน้าที่เหมือนกับ PDH โดยเปปไทด์ทั้ง 2 ชนิดนี้ประกอบไปด้วยกรดอะมิโนทั้งหมด 18 หน่วย มีลำดับกรดอะมิโนต่างกันในด้านที่ 11, 14 และ 16 โดยเรียกเปปไทด์ทั้ง 2 ชนิดนี้ว่า Pej-PDH-I และ Pej-PDH-II มีลำดับกรดอะมิโนดังนี้ NSELINSLLGIPKVMTDA-NH₂ และ NSELIASLLGLPKFMIDA-NH₂ (Yang and others. 1999)

ตาราง 1 การแยกสกัดและทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย PDH ในสัตว์ต่างๆ

| ผู้วิจัย/ปี | สัตว์ทดลอง | สารสกัด | การทำให้บริสุทธิ์ | การตรวจสอบ | ผล |
|----------------------------------|--|---|--|------------|--|
| Fernlund. 1971, 1976 | <i>Pandalus borealis</i> (Prawn) | 99% ethanol : 0.1 M NH ₃ (700 : 300) | Gel filtration (Sephadex G-25) Cation exchange (CM-Sephadex C-25) Electrophoresis Thin layer | Bioassay | α-PDH |
| Rao and others. 1985 | <i>Uca pugilator</i> (Crab) | Boiling water | Gel filtration (Sephadex G-50) Cation exchange (CM-Sephadex C-25) Partition chromatography (Sephadex G-50) RP-HPLC | Bioassay | β-PDH |
| Kleinholz and others. 1986 | <i>Cancer magister</i> (Crab) | 99% ethanol : 0.1 M NH ₃ (700 : 300) | Gel filtration (Sephadex G-25) Cation exchange (CM-Sephadex C-25) Partition chromatography (Sephadex G-50) RP-HPLC | Bioassay | β-PDH |
| Rao and others. 1986 | <i>Acheta domesticus</i> (Cricket) | Boiling water | Gel filtration (Sephadex G-25) Cation exchange (CM-Sephadex C-25) Partition chromatography (Sephadex G-25) RP-HPLC | Bioassay | NSEIINSL LGLPKVL NDA-NH ₂ |
| Rao and others. 1987 | <i>Romalea micorptera</i> (Grasshopper) | Boiling water | Gel filtration (Sephadex G-25) Cation exchange (CM-Sephadex C-25) Partition chromatography (Sephadex G-25) RP-HPLC | Bioassay | NSEIINSL LGLPKLL NDA-NH ₂ |

ตาราง 1 (ต่อ)

| ผู้วิจัยปี | สัตว์ทดลอง | สารสกัด | การทำให้บริสุทธิ์ | การตรวจสอบ | ผล |
|---------------------------|--|--|--|----------------|--|
| Mohrherr and others. 1990 | <i>Callinectes sapidus</i> (Crab) | Ammonia-saturated butanol | RP-HPLC | Bioassay | β -PDH |
| McCallum and others. 1991 | <i>Procambarus clarkii</i> (crayfish) | Boiling water | Gel filtration (Sephadex G-50) Cation exchange (CM-Sephadex C-25) Partition chromatography (Sephadex G-25) RP-HPLC | Bioassay | NSELINSI LGLPKVM NEA-NH ₂ |
| Lohr and others. 1993 | <i>Cacinus maenas</i> (Crab) | 5% formic acid, 1% TFA, 1%NaCl and 1 N HCl | RP-HPLC | Sandwich-ELISA | β -PDH |
| Yang and others. 1999 | <i>Penaeus japonicus</i> (Prawn) | 0.9% NaCl : acetonitrile (7:3) | RP-HPLC | Bioassay | - NSELINSI LGIPKVM TDA-NH ₂ - NSELINSI LGLPKFM IDA-NH ₂ |

ตาราง 2 แสดงลำดับกรดอะมิโนของสารคล้าย PDH ที่พบในสัตว์ต่างๆ ตัวหนาแสดงกรดอะมิโนที่มีโครงสร้างเหมือนกับ β -PDH

| สัตว์ทดลอง | ลำดับกรดอะมิโน | เอกสารอ้างอิง |
|---------------------------------|--|---|
| Prawn | | |
| <i>Pandalus borealis</i> | NSGMINSILGIPRVMT EA-NH ₂ | Fernlund. 1976 |
| <i>Pandalus jordani</i> | NSGMINSILGIPRVMT EA-NH ₂ NSGMINSILGIPKVMADA-NH ₂ NSELINSLLGLPKVMTDA-NH ₂ | Rao and Riehm.1993; Desmoucelles-Carette,Sellos and Van Wormhoudt.1996 |
| <i>Penaeus aztecus</i> | NSELINSLLGIPKVMNDA -NH ₂ | Rao and Riehm. 1993 |
| <i>Penaeus vannamei</i> | NSELINSLLGIPKVMNDA -NH ₂ NSELINSLLGLPKVMNDA-NH ₂ | Desmoucelles-Carette,Sellos and Van Wormhoudt.1996 |
| <i>Penaeus japonicus</i> | NSELINSLLGIPKVMTDA -NH ₂ NSELINSLLGLPKFMIDA-NH ₂ | Yang and others. 1999 |
| <i>Procambarus clarkii</i> | NSELINSILGLPKVMNEA -NH ₂ | McCallum and others. 1991 |
| <i>Orconectes limosus</i> | NSELINSILGLPKVMNEA -NH ₂ | De Kleijn and others. 1993 |
| <i>Orconectes immunis</i> | NSELINSILGLPKVMNEA -NH ₂ | Rao and Riehm.1993; Desmoucelles-Carette,Sellos and Van Wormhoudt.1996 |
| <i>Pacifastacus leniusculus</i> | NSELINSILGLPKVMNDA -NH ₂ | Rao and Riehm.1993; Desmoucelles-Carette,Sellos and Van Wormhoudt.1996 |
| Crab | | |
| <i>Uca pugilator</i> | NSELINSILGLPKVMNDA -NH ₂ | Rao and others. 1985 |
| <i>Cancer magister</i> | NSELINSILGLPKVMNDA -NH ₂ | Kleinholz and others. 1986 |
| <i>Carcinus maenas</i> | NSELINSILGLPKVMNDA -NH ₂ | Klein and others. 1992 |
| <i>Callinectes sapidus</i> | NSELINSILGLPKVMNDA -NH ₂ NSELINSLLGISALMNEA-NH ₂ | Klein and others. 1994 |
| <i>Carausius morosus</i> | NSELINSLLALPKVLNDA -NH ₂ | http:// www.biologie.uni-regensburg.de/ Zoologie/Schneuwly/Hofbauer/chrono.htm |
| Isopod | | |
| <i>Amadillidium vulgare</i> | NSELINSLLGAPRVLNNA -NH ₂ | Desmoucelles-Carette,Sellos and Van Wormhoudt. 1996 |
| Insect | | |
| <i>Acheta domesticus</i> | NSEIINSLLGLPKVLNDA -NH ₂ | Rao and others. 1986 |
| <i>Romaléa microptera</i> | NSEIINSLLGLPKLLNDA -NH ₂ | Rao and others. 1987 |
| <i>Periplaneta americana</i> | NSELINSLLGLPKVLNDA -NH ₂ | Rao and Riehm.1993; Desmoucelles-Carette,Sellos and Van Wormhoudt.1996 |
| <i>Drosophila melanogaster</i> | NSELINSLLSLPKNMNDA -NH ₂ | http:// www.biologie.uni-regensburg.de/ Zoologie/Schneuwly/Hofbauer/chrono.htm |

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

สัตว์ทดลอง

กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) อายุ 3-4 เดือน น้ำหนักประมาณ 15-35 กรัม ชื้อจากตำบลในคลองบางปลากด อำเภอพระสมุทรเจดีย์ จังหวัดสมุทรปราการ

อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์

1. เครื่องมือผ่าตัด
2. ครกหินที่แช่เย็นจัด
3. เครื่องบดเนื้อเยื่อ (homogenizer, Janke & Kunkel)
4. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge, Sigma Z-15)
5. เครื่องระเหยแห้ง (speed vacuum concentrator, Savant)
6. เครื่องดูดอากาศ (suction pump) พร้อมอุปกรณ์
7. เครื่องโซนิเคเตอร์ (sonicator, Crest)
8. C18 Sep-Pak cartridge (Waters)
9. เครื่อง HPLC (high performance liquid chromatography, Gilson)
10. คอลัมน์ (column) ชนิดต่างๆ
 - 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, Rainnin)
 - Cyano ขนาด 4.6 x 250 มิลลิเมตร (Microsorb-MV, Rainnin)
11. หลอดเซนตริฟิวจ์
12. แผ่นไนโตรเซลลูโลส (nitrocellulose membrane, Schleicher & Schuell)
13. Autopipette พร้อม tip
14. Measuring pipette พร้อมลูกยาง
15. กล่องพลาสติกมีฝาปิด
16. ขวดกรอง (filter or suction flask)
17. ขวดรูปกรวย (flask)
18. ปีกเกอร์ (beaker) ขนาดต่างๆ
19. ตู้แช่แข็ง (freezer-25°C และ ultrafreezer-70°C, Revco)

20. ตู้อบ (hot air oven, Memmert)
21. เครื่องชั่ง
22. กระบอกฉีดยา (syringe)
23. หลอดพลาสติกขนาด 5 มิลลิลิตร และขนาด 1.5 มิลลิลิตร (microcentrifuge tube)
24. Matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS, Bruker) ได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารเคมี

1. น้ำแข็งแห้ง (dry ice)
2. Methanol (analytical grade, Merck)
3. Acetic acid (analytical grade, Merck)
4. Acetonitrile (ACN, analytical grade, Mallinkrodt)
5. Acetonitrile (ACN, HPLC grade, Mallinkrodt)
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
9. Bovine serum albumin (BSA, Sigma)
10. 25% glutaraldehyde (Sigma)
11. 5% blotto (นมพร้อมมันเนย 5 กรัม, 1% merthiolate 1 มิลลิลิตร, triton-x 100 0.1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วย 0.15 M PBS pH 7.2)
12. 0.5% blotto
13. Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Sigma)
14. 30% hydrogen peroxide (H_2O_2)
15. 1% cobalt chloride ($CoCl_2$)
16. สารละลาย A (0.1% TFA หรือ 0.1% HFBA)
17. สารละลาย B (80% ACN/0.1% TFA หรือ 80% ACN/0.1% HFBA)
18. Rabbit anti- β -PDH polyclonal antibody
ได้รับความอนุเคราะห์จาก Professor K. Ranga Rao มหาวิทยาลัยเวสต์ฟลอริดา ประเทศสหรัฐอเมริกา

19. Goat anti-rabbit IgG Heavy and Light chain-horseradish-peroxidase conjugate (GAR-HRP, Biorad)

วิธีดำเนินการทดลอง

การทดลองประกอบไปด้วยขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

1. การเก็บรวบรวมตากุ้งกุลาดำ
2. การเตรียมสารสกัดจากก้านตา (eyestalk extract) ของกุ้งกุลาดำ
3. การเตรียมสารสกัดจากก้านตาดำก่อนนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยกระบวนการ RP-HPLC
4. การทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย PDH จากก้านตากุ้งกุลาดำด้วยกระบวนการ RP-HPLC
5. การตรวจหาสารคล้าย PDH ในก้านตากุ้งกุลาดำโดยวิธี dot-ELISA หลังจากทำให้บริสุทธิ์ด้วยกระบวนการ RP-HPLC
6. การหามวลโมเลกุลของสารคล้าย PDH ด้วย MALDI-TOF MS

1. การเก็บรวบรวมตากุ้งกุลาดำ

รวบรวมตากุ้งกุลาดำที่มีอายุ 3-4 เดือน โดยใช้กรรไกรตัดบริเวณโคนของตากุ้งที่ยังมีชีวิตอยู่ แล้วนำไปแช่บนน้ำแข็งแห้งที่บรรจุในถุงพลาสติกทันที นำตากุ้งที่รวบรวมได้ประมาณ 7,500 ก้านตา ไปเก็บไว้ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส จนกระทั่งนำมาทำการทดลอง

2. การเตรียมสารสกัดจากก้านตาของกุ้งกุลาดำ

นำก้านตากุ้งที่เก็บรวบรวมไว้ประมาณ 7,500 ก้านตา มาบดกับน้ำแข็งแห้งให้เป็นผงละเอียดในครกหินที่เย็นจัดซึ่งวางอยู่บนน้ำแข็งแห้ง จากนั้นนำก้านตาที่บดเป็นผงละเอียดแล้วมาสกัดสารจากก้านตาด้วยสารละลาย methanol, acetic acid และน้ำ ด้วยอัตราส่วน 90:1:9 ในปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร/ก้านตา บดก้านตาซ้ำอีกครั้งด้วยเครื่อง homogenizer แล้วนำไปเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง เพื่อให้การสกัดเกิดขึ้นโดยสมบูรณ์ จากนั้นนำไปแยกตะกอนออกโดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ด้วยแรงเหวี่ยง 10,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แยกเอาสารละลายใส (supernatant) เก็บไว้ ส่วนของตะกอน (pellet) ที่เหลือนำไปสกัดซ้ำอีกครั้งด้วยสารละลายและกรรมวิธีเดียวกันกับที่กล่าวมาแล้วขั้นต้น นำสารสกัดที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกให้หมดด้วยเครื่องระเหยแห้ง (speed vacuum concentrator) จากนั้นเติม 1% trifluoroacetic acid (TFA) ในปริมาณที่ทำให้ความเข้มข้นของสารสกัดเป็น 0.1% TFA นำไปปั่นแยกตะกอนอีกครั้งด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่แรงเหวี่ยง

10,000 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แยกสารละลายใส่เก็บไว้ (ดัดแปลงจากวิธีการของ Cowden and other. 1993)

3. การเตรียมสารสกัดจากก้านตาก่อนนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยกระบวนการ

RP-HPLC

นำสารสกัดจากก้านตาที่ได้จากข้อ 2 ไปแยกผ่าน C18 Sep-Pak cartridge เพื่อดูดซับสารสกัดไว้ จากนั้นชะด้วยสารละลาย 50% ACN/0.1% TFA และ 80% ACN/0.1% TFA นำไประเหยตัวทำละลาย ACN ออกจนหมดด้วยเครื่อง speed vacuum concentrator นำไปเติมสารละลาย 50% ACN/0.1% TFA เพื่อปรับให้สารสกัดอยู่ในสารละลาย ACN ที่มีความเข้มข้นประมาณ 10% ACN (ดัดแปลงจากวิธีการของ Sithigorngul and Stretton. 1995)

4. การทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย PDH จากก้านตากุ้งกุลาดำด้วยกระบวนการ

RP-HPLC

ในขั้นตอนที่ 1 นำสารสกัดจากก้านตาจำนวน 7,500 ก้านตา ที่ได้ประมาณ 1 มิลลิกรัมจากข้อ 3 ไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่แรงเหวี่ยง 5,000 g เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นแยกเอาสารละลายใส่เก็บไว้ แล้วแบ่งสารสกัดผ่าน column 3 ครั้ง ครั้งละประมาณ 2,500 ก้านตา นำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC โดยผ่าน PrepPak C18 column ขนาด 25x100 มิลลิเมตร จากนั้นชะด้วยสารละลายผสมของ A และ B ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นจาก 15-80% B (A=0.1% TFA, B=80% ACN/0.1% TFA) อัตราการไหล 5 มิลลิเมตรต่อนาที และสารละลาย B มีอัตราการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้น 1% ต่อนาที วัดการดูดกลืนแสงด้วย UV detector ที่ 215 นาโนเมตร เก็บสารละลายที่ออกจาก column ทุกๆ 1 นาทีลงในหลอดพลาสติกขนาด 5 มิลลิกรัมด้วยเครื่อง fraction collector ตรวจสอบ fraction ที่มีสารคล้าย PDH โดยใช้วิธี dot-ELISA Fraction ที่มีสารคล้าย PDH จะปรากฏเห็นเป็นจุดสีเทาแกมน้ำเงิน จากนั้นนำ fraction ที่มีสารคล้าย PDH มาแยกและทำให้บริสุทธิ์มากขึ้นโดยผ่าน column และสารละลายระบบต่างๆ (ตาราง 3) (ดัดแปลงจากวิธีการของ Sithigorngul and Stretton. 1995)

ในขั้นตอนที่ 2 ใช้ PrepPak C8 column ขนาด 25x100 มิลลิเมตร ชะด้วยสารละลายผสมของ A และ B ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นจาก 15-80% B (A=0.1% heptafluorobutyric acid (HFBA), B=80% ACN/0.1% HFBA) อัตราการไหลของสารละลาย 5 มิลลิเมตรต่อนาที และการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารละลาย B เป็น 1% ต่อนาที เก็บสารละลายที่ออกจาก column ลงในหลอดพลาสติกขนาด 5 มิลลิกรัมด้วยเครื่อง fraction collector ทุกๆ 1 นาที

ในขั้นตอนที่ 3 ใช้ Microsorb MV Cyano column ขนาด 4.6x250 มิลลิเมตร ชะด้วยสารละลายผสมของ A และ B ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นจาก 10-70% B (A=0.1% HFBA,

B=80% ACN/0.1% HFBA) อัตราการไหลของสารละลาย 1 มิลลิลิตรต่อนาที และการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารละลาย B เป็น 1% ต่อนาที เก็บสารละลายที่ออกจาก column ทุกๆ 1 นาทีลงในหลอดพลาสติกขนาด 1 มิลลิลิตรด้วยเครื่อง fraction collector

ในขั้นตอนที่ 4-7 ใช้ column และตัวทำละลายต่างๆ ดังนี้ (ตาราง 3)

กลุ่มที่ 1 ในขั้นตอนที่ 4 ใช้ Microsorb MV Cyano column (4.6x250 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/HFBA (15-45% B) อัตราการไหลของสารละลาย 1 มิลลิลิตรต่อนาที ส่วนการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารละลาย B เป็น 1% ต่อนาที ส่วนในขั้นตอนที่ 5 นั้นใช้ Microsorb MV C8 column (4.6x250 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA (10-40% B)

กลุ่มที่ 2-3 ในขั้นตอนที่ 4 ใช้ Microsorb MV Cyano column (4.6x250 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/HFBA (15-60% B) อัตราการไหลของสารละลาย 1 มิลลิลิตรต่อนาที ส่วนการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารละลาย B เป็น 1% ต่อนาที ส่วนในขั้นตอนที่ 5 นั้นใช้ Microsorb MV C8 column (4.6x250 มิลลิเมตร) โดยใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA (10-45% B) อัตราการไหลของสารละลาย 1 มิลลิลิตรต่อนาที และเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารละลาย B เป็น 1% ต่อนาที จากนั้นนำไปแยกต่อในขั้นตอนที่ 6 โดยใช้ Microsorb MV C8 column (4.6x250 มิลลิเมตร) และระบบตัวทำละลาย ACN/TFA (10-45% B) เช่นเดียวกับในขั้นตอนที่ 5

กลุ่มที่ 4-6 ในขั้นตอนที่ 4 ใช้ Microsorb MV Cyano column (4.6x250 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA (5-40% B) อัตราการไหลของสารละลาย 1 มิลลิลิตรต่อนาที และเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารละลาย B เป็น 1% ต่อนาที จากนั้นนำไปแยกต่อในขั้นตอนที่ 5 โดยใช้ Microsorb MV Cyano column (4.6x250 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA (5-40% B) เช่นเดียวกับในขั้นตอนที่ 4

กลุ่มที่ 7-8 ในขั้นตอนที่ 4 ใช้ Microsorb MV Cyano column (4.6x250 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/HFBA (30-70% B) อัตราการไหลของสารละลาย 1 มิลลิลิตรต่อนาที ส่วนการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารละลาย B เป็น 1% ต่อนาที ส่วนในขั้นตอนที่ 5 นั้นใช้ Microsorb MV C8 column (4.6x250 มิลลิเมตร) โดยใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA (30-60% B)

กลุ่มที่ 9 ในขั้นตอนที่ 4 ใช้ Microsorb MV Cyano column (4.6x250 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/HFBA (30-65% B) อัตราการไหลของสารละลาย 1 มิลลิลิตรต่อนาที ส่วนการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารละลาย B เป็น 1% ต่อนาที จากนั้นนำไปแยกต่อในขั้นตอนที่ 5 โดยใช้ Microsorb MV C8 column (4.6x250 มิลลิเมตร) โดยใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA (25-60% B) อัตราการไหลของสารละลาย 1 มิลลิลิตรต่อนาที ส่วน fraction

ที่ยังไม่บริสุทธิ์นำมาแยกต่อในขั้นตอนที่ 6 และ 7 โดยใช้ Microsorb MV Cyano column (4.6x250 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA (20-65% B)

กลุ่มที่ 10 ในขั้นตอนที่ 4 ใช้ Microsorb MV C8 column (4.6x250 มิลลิเมตร) โดยใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA (30-60% B) อัตราการไหลของสารละลาย 1 มิลลิลิตรต่อ นาที และเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารละลาย B เป็น 1% ต่อ นาที จากนั้นนำไปแยกต่อใน ขั้นตอนที่ 5 โดยใช้ Microsorb MV C8 column (4.6x250 มิลลิเมตร) โดยใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA (30-60% B) อัตราการไหลของสารละลาย 1 มิลลิลิตรต่อ นาที และเปลี่ยนแปลง ความเข้มข้นของสารละลาย B เป็น 1% ต่อ นาที ส่วน fraction ที่ยังไม่บริสุทธิ์นำมาแยกต่อใน ขั้นตอนที่ 6 และ 7 โดยใช้ Microsorb MV Cyano column (4.6x250 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัว- ทำละลาย ACN/TFA (20-65% B) จากการทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย PDH ในแต่ละขั้นตอนนั้นจะ ใช้วิธีการ dot-ELISA ติดตามสารนี้ในระหว่างการทำให้บริสุทธิ์

5. การตรวจหาสารคล้าย PDH ในก้านตากุ้งกุลาดำโดยวิธี dot-ELISA หลังจาก แยกด้วยกระบวนการ RP-HPLC

แบ่งตัวอย่างของแต่ละ fraction ที่ได้จากการผ่านกระบวนการ HPLC ประมาณ (15-300 ก้านตา/จุด) มาผสมกับ BSA ที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (BSA ละลายอยู่ใน PBS) จำนวน 2 ไมโครลิตร/จุด จากนั้นนำไประเหยแห้งในเครื่อง speed vacuum concentrator เติมน้ำกลั่น 1 ไมโครลิตร/จุด หยดสารละลายแต่ละ fraction บนแผ่น nitrocellulose โดยเรียง ตามลำดับ fraction ที่ได้จากการผ่านกระบวนการ HPLC นำแผ่น nitrocellulose ที่หยดสารแล้ว ไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปอบในไอของ 0.4% glutaraldehyde ที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 4-8 ชั่วโมง นำไปตรึง (fix) ต่อในสารละลาย 0.2% glutaraldehyde เป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำแผ่น nitrocellulose มาล้างด้วยน้ำกลั่น 4 ครั้งๆ ละ 15 นาที นำไป block ด้วย 0.5% blotto เป็นเวลา 30 นาที ตรวจหาเปปไทด์ด้วยวิธี indirect immunoperoxidase assay โดยนำแผ่น nitrocellulose ไปบ่มใน rabbit anti-β-PDH polyclonal antibody ที่เจือจาง 1:20,000 เป็นเวลา 8 ชั่วโมง ล้างด้วย 0.5% blotto 4 ครั้งๆ ละ 15 นาที จากนั้นนำไปบ่มใน goat anti-rabbit IgG Heavy and Light chain-horseradish-peroxidase conjugate (GAR-HRP) ที่เจือจาง 1:1,200 เป็นเวลา 8 ชั่วโมง ล้างแผ่น nitrocellulose ด้วย 0.5% blotto 4 ครั้งๆ ละ 15 นาที ล้างต่อด้วย PBS 1 ครั้ง จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยากับสาร ละลาย 0.006% hydrogen peroxide (H₂O₂) 0.03% diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) และ 0.05% cobalt chloride (CoCl₂) เป็นเวลา 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นหลายๆ ครั้ง บริเวณที่มีสารคล้าย PDH จะปรากฏเป็นจุดสีเทาแกมน้ำเงินบนแผ่น nitrocellulose จากนั้นนำ ผลที่ได้จาก dot-ELISA ไปเปรียบเทียบกับพีคที่ได้จาก chromatogram เพื่อใช้เลือก fraction ที่

จะนำไปผ่านกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนต่อไป (ดัดแปลงจากวิธีการของ Sithigorngul Stretton and Cowden. 1991)

6. การหามวลโมเลกุลของสารคล้าย PDH ด้วย MALDI-TOF MS

นำ fraction ของสารคล้าย PDH ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนสุดท้ายมาแบ่งสารละลายประมาณ 375-1,125 ไมโครลิตร (50-150 ไมโครลิตร) แล้วระเหยตัวทำละลายออกให้หมดด้วยเครื่องระเหยแห้ง จากนั้นนำไปหาน้ำหนักโมเลกุลด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS ซึ่งมีวิธีการดังนี้

1) การเตรียม matrix "film" บน steel target

โดยนำสารละลายอิมิตัวของ α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CCA) ที่ละลายใน acetone ไปปั่นแยกตะกอนออกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่แรงเหวี่ยง 3,000 g เป็นเวลา 5 นาที แยกส่วนที่เป็นสารละลายใส่ไปหยดลงบนแผ่นโลหะ (target) ในช่องสำหรับใส่ตัวอย่างช่องละ 1 ไมโครลิตร แล้วทิ้งไว้ให้แห้ง

2) การเตรียมสารตัวอย่าง

นำสารตัวอย่างประมาณ 50-150 ไมโครลิตร ที่ผ่านการระเหยตัวทำละลายออกจนหมดแล้วมาละลายใน 0.1% TFA/acetonitrile (2:1) ประมาณ 3 ไมโครลิตร จากนั้นหยดสารละลายตัวอย่างประมาณ 1 ไมโครลิตรลงบนช่องตัวอย่างที่มี matrix เคลือบอยู่ ทิ้งไว้ให้แห้ง

3) การเตรียมสารมาตรฐาน (standard)

เตรียมสารมาตรฐาน human angiotensin II ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 1.047 กิโลดาลตัน ที่มีความเข้มข้น 100 pmol/ml โดยเจือจางด้วย 0.1% TFA/acetonitrile (2:1) ในอัตราส่วน 1:5 แล้วหยดสารมาตรฐานประมาณ 1 ไมโครลิตรลงบนช่องตัวอย่างที่มี matrix เคลือบอยู่ ทิ้งไว้ให้แห้ง

4) นำไปหาน้ำหนักโมเลกุลโดยเครื่อง MALDI-TOF MS

การวิเคราะห์ข้อมูล

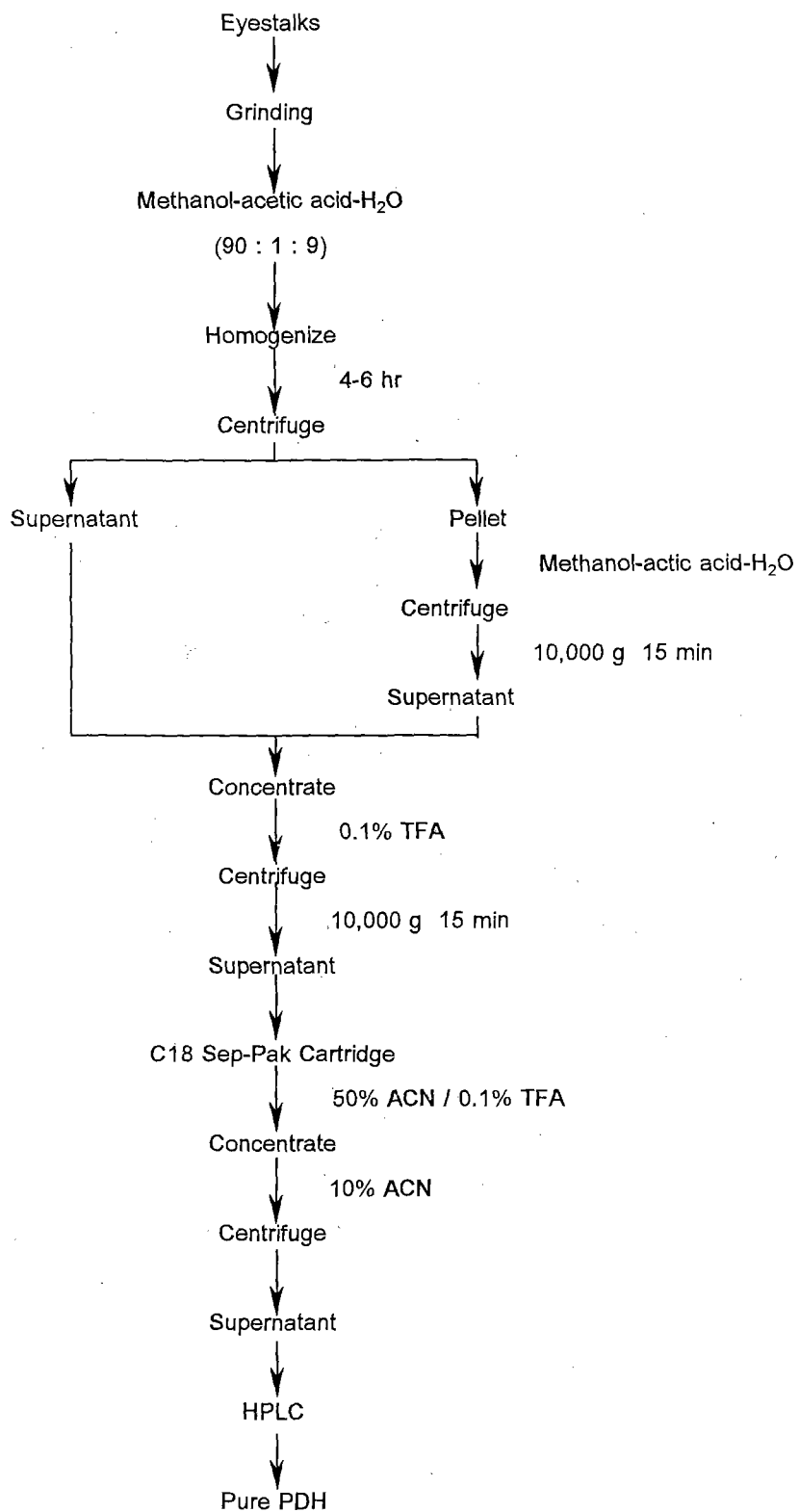
1. สังเกตการเกิดสีเทาแกมน้ำเงินของตัวอย่างแต่ละ fraction ที่ได้จากการผ่านกระบวนการ RP-HPLC ชั้นแรกซึ่งหยดบนแผ่น nitrocellulose หลังจากเสร็จสิ้นกระบวนการ dot-ELISA แล้วนำ fraction ที่ติดสีที่คาดว่าจะมีสารคล้าย PDH ไปแยกต่อด้วยกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนต่อไป

2. ศึกษาลักษณะและความสูงของพีคจาก chromatogram ที่ได้จากการผ่านกระบวนการ RP-HPLC ในแต่ละขั้นตอน โดยเปรียบเทียบกับผลที่ได้จาก dot-ELISA ในขั้นตอนนั้น ๆ

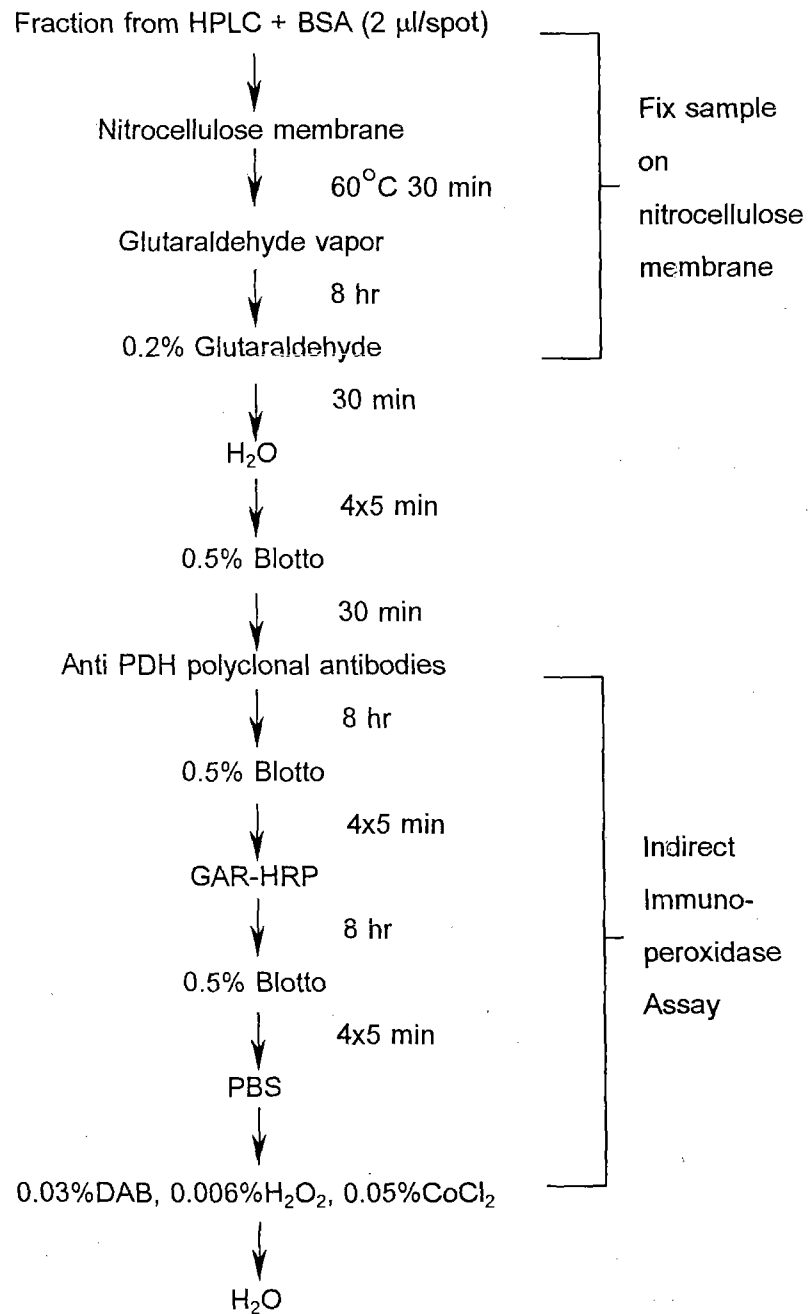
3. ตรวจสอบความบริสุทธิ์และหาน้ำหนักโมเลกุลโดย mass spectrometry

ตาราง 3 แสดงขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย PDH ด้วยกระบวนการ RP-HPLC

| Step | Column | Column size (mm) | Counter ion | Gradient of acetonitrile (percent) | Duration (min) | Flow rat (ml/min) |
|------|-------------------------|---------------------|----------------|--|-------------------|----------------------|
| 1 | PrepPak C18 | 25x100 | TFA | 15-80% | 75 | 5 |
| 2 | PrepPak C8 | 25x100 | HFBA | 15-80% | 75 | 5 |
| 3 | Microsorb MV - Cyano | 4.6x250 | HFBA | 10-70% | 60 | 1 |
| 4 | Microsorb MV - Cyano | 4.6x250 | HFBA | 15-70% | 55 | 1 |
| | | | TFA | 5-40% | 35 | 1 |
| | - C8 | | TFA | 30-60% | 30 | 1 |
| 5 | Microsorb MV - Cyano | 4.6x250 | TFA | 5-40% | 35 | 1 |
| | - C8 | | TFA | 10-60% | 50 | 1 |
| 6 | Microsorb MV - Cyano | 4.6x250 | TFA | 25-65% | 40 | 1 |
| | - C8 | | TFA | 10-45% | 35 | 1 |
| 7 | Microsorb MV - Cyano | 4.6x250 | TFA | 20-40% | 20 | 1 |



ภาพประกอบ 8 ขั้นตอนวิธีการเตรียมสารสกัดจากก้านตาของกิ้งกูดดำ



ภาพประกอบ 9 ขั้นตอนการทำ dot-ELISA (dot-Enzyme linked Immunosorbant Assay).

บทที่ 4 ผลการวิจัย

1. การทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย PDH จากก้านตากุ้งกุลาดำโดย RP-HPLC ในขั้นตอนแรก

จากการนำสารสกัดจากก้านตาจำนวน 7,500 ก้านตา มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ Prep-Pak C18 column (25x100 มิลลิเมตร) โดยใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นจาก 15-80% B (A=0.1% TFA และ B=80% ACN/0.1% TFA) การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้น 1% B ต่อนาที โดยมีอัตราการไหล 5 มิลลิลิตรต่อนาที และเก็บ fraction ทุก 1 นาที โดยแบ่งสารสกัดผ่าน column 3 ครั้ง ครั้งละ 2,500 ก้านตา (ภาพประกอบ 10) พบการกระจายของสารคล้าย PDH กระจายอยู่ใน fraction ต่าง ๆ คล้ายกันทั้ง 3 ครั้ง คือพบอยู่ในช่วง fraction ที่ 23-26, 29-33, 35-36, 40-51 และ 53-54 โดยช่วงพีคที่มีความเข้มข้นของสารคล้าย PDH สูงสุดอยู่ใน fraction ที่ 25-26, 29-31, 45 และ 47 ดังนั้นในการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นต่อไปจึงรวม fraction ที่ 23 (กลุ่มที่ 1) fraction ที่ 25-26 (กลุ่มที่ 2) fraction ที่ 29 (กลุ่มที่ 3) fraction ที่ 30-31 (กลุ่มที่ 4) fraction ที่ 32-33 (กลุ่มที่ 5) fraction ที่ 36 (กลุ่มที่ 6) fraction ที่ 40-41 (กลุ่มที่ 7) fraction ที่ 44-45 (กลุ่มที่ 8) fraction ที่ 46-47 (กลุ่มที่ 9) fraction ที่ 49-50 (กลุ่มที่ 10) ของการแยก RP-HPLC ทั้ง 3 ครั้งเข้าด้วยกัน (ภาพประกอบ 11) ส่วน fraction ที่ 24, 35, 42-43, 48, 51 และ 53-54 ยังไม่สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้เนื่องจากตัวอย่างของสารคล้าย PDH สูญหายไประหว่างขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์

2. การทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย PDH จากก้านตาของกุ้งกุลาดำในขั้นตอนที่ 2

จากการนำสารคล้าย PDH แต่ละกลุ่ม (กลุ่มที่ 1-10) ในขั้นตอนที่ 1 มาทำให้บริสุทธิ์ต่อในขั้นตอนที่ 2 โดยใช้ PrepPak C8 column (25x100 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/HFBA (15-80% B) การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้น 1% B ต่อนาที อัตราการไหลของสารละลาย 5 มิลลิลิตรต่อนาที และเก็บ fraction ทุกๆ 1 นาที พบการกระจายของสารคล้าย PDH ในกลุ่มที่ 1 fraction ที่ 27 (ภาพประกอบ 12, 13) กลุ่มที่ 2 พบใน fraction ที่ 28-30 (ภาพประกอบ 15,16) กลุ่มที่ 3 พบใน fraction ที่ 27-28 (ภาพประกอบ 19, 20) กลุ่มที่ 4 พบใน fraction ที่ 24, 28 (ภาพประกอบ 22, 23) กลุ่มที่ 5 พบใน fraction ที่ 28 (ภาพประกอบ 25, 26) กลุ่มที่ 6 พบใน fraction ที่ 30-32 (ภาพประกอบ 28, 29) กลุ่มที่ 7 พบใน fraction ที่ 25 (ภาพประกอบ 31, 32) กลุ่มที่ 8 พบใน fraction ที่ 29-30 (ภาพประกอบ 34, 35) กลุ่มที่ 9 พบใน fraction ที่ 46-47, 49-50 (ภาพประกอบ 37, 38, 41) กลุ่มที่ 10 พบใน fraction ที่ 30 (ภาพประกอบ 43, 44) ความเข้มข้นของสารคล้าย PDH ค่อนข้างสูงในทุก fraction จากนั้นจึงรวบรวมสารคล้าย PDH ของแต่ละกลุ่มเข้าด้วยกันเพื่อแยกผ่าน column ในขั้นตอนต่อไป

3. การทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย PDH จากก้านตาของกุ้งกุลาดำในขั้นตอนที่ 3

ในขั้นตอนที่ 3 จะนำ fraction ของแต่ละกลุ่ม (กลุ่มที่ 1-10) ไปทำให้บริสุทธิ์ต่อในขั้นตอนที่ 3 โดยใช้ Microsorb MV Cyano column ขนาด 4.6x250 มิลลิเมตร ใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/HFBA (10-70% B) การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นเป็น 1% ต่อนาที โดยมีอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที พบการกระจายของสารคล้าย PDH อยู่ในกลุ่มที่ 1 ใน fraction ที่ 26 กลุ่มที่ 2 พบใน fraction ที่ 20-21 และ 23 กลุ่มที่ 3 พบใน fraction ที่ 33 กลุ่มที่ 4 พบใน fraction ที่ 22 กลุ่มที่ 5 พบใน fraction ที่ 22 กลุ่มที่ 6 พบใน fraction ที่ 25-26 และ 29 กลุ่มที่ 7 พบใน fraction ที่ 17-19 กลุ่มที่ 8 พบใน fraction ที่ 21 กลุ่มที่ 9 พบใน fraction ที่ 19-22 กลุ่มที่ 10 พบใน fraction ที่ 21-22 จากนั้นรวบรวม fraction ที่มีสารคล้าย PDH ของแต่ละกลุ่มแยกผ่าน column ในขั้นตอนต่อไป

4. การทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย PDH จากก้านตาของกุ้งกุลาดำในขั้นตอนที่ 4-6

ในขั้นตอนที่ 3 จะนำ fraction ของแต่ละกลุ่ม (กลุ่มที่ 1-10) ไปทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนต่างๆ (ตาราง 3) ดังนี้

กลุ่มที่ 1 (ภาพประกอบ 12) จากการแยกผ่านขั้นตอนที่ 3 แล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์ต่อในขั้นตอนที่ 4 โดยใช้ Microsorb MV Cyano column (4.6x250 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/HFBA (15-45% B) การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นเป็น 1% ต่อนาที โดยมีอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที พบการกระจายของสารคล้าย PDH อยู่ใน fraction ที่ 20 และ 21 ส่วนในขั้นตอนที่ 5 ใช้ Microsorb MV C8 column (4.6x250 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA (10-40% B) สามารถแยกเปปไทด์ของสารคล้าย PDH ที่คาดว่าจะมีความบริสุทธิ์มากพอใน fraction ที่ 24 ปรากฏออกมาเพียงพีคเดียว ค่าความสูงของพีคประมาณ 17 มิลลิโวลต์ (ภาพประกอบ 14.1) ซึ่งเมื่อประมาณปริมาณเปปไทด์ของสารคล้าย PDH (PDL1) เปรียบเทียบกับความเข้มของสีของจุดเปปไทด์ FMRFamide มาตรฐานที่มีความเข้มข้นต่างๆ (จิรัชศักดิ์ ผู้ปลื้ม. 2542) จะเท่ากับ 1 หน่วยต่อเมื่อใช้ 120 ก้านตา

กลุ่มที่ 2 (ภาพประกอบ 15) จากการแยกผ่านขั้นตอนที่ 3 แล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์ต่อในขั้นตอนที่ 4 โดยใช้ Microsorb MV Cyano column (4.6x250 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/HFBA (15-50% B) การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นเป็น 1% ต่อนาทีตามลำดับ โดยมีอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที พบการกระจายของสารคล้าย PDH อยู่ใน fraction ที่ 23 และ 25-27 ส่วนในขั้นตอนที่ 5 ใช้ Microsorb MV C8 column (4.6x250 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA (10-40% B) สามารถแยกเปปไทด์ของสารคล้าย PDH ที่คาดว่าจะมีความบริสุทธิ์มากพอใน fraction ที่ 28 และ 33 ปรากฏออกมาเพียงพีคเดียว ค่าความสูงของพีคประมาณ 2 และ 3 มิลลิโวลต์ (ภาพประกอบ 17.1 และ 18.3) ซึ่งเมื่อประมาณปริมาณเปปไทด์

ของสารคล้าย PDH (PDL2 และ PDL5) เปรียบเทียบกับความเข้มข้นของสีของจุดเปปไทด์ FMRFamide มาตรฐานที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ (จีรศักดิ์ ผู้ปลื้ม. 2542) จะเท่ากับ 1 หน่วยต่อเมื่อใช้ 120 และ 150 ก้านตา และนอกจากนี้ยังพบการกระจายของสารคล้าย PDH ใน fraction ที่ 31 และ 32 จากนั้นนำมาแยกต่อในขั้นตอนที่ 6 โดยใช้ Microsorb MV C8 column (4.6x250 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA (10-40% B) สามารถแยกเปปไทด์ของสารคล้าย PDH ที่คาดว่าจะมีความบริสุทธิ์มากพอใน fraction ที่ 31 ปรากฏออกมาเพียงพีคเดียว ค่าความสูงของพีคประมาณ 48 และ 30 มิลลิโวลต์ตามลำดับ (ภาพประกอบ 17.3 และ 18.1) ซึ่งเมื่อประมาณปริมาณเปปไทด์ของสารคล้าย PDH (PDL3 และ PDL4) เปรียบเทียบกับความเข้มข้นของสีของจุดเปปไทด์ FMRFamide มาตรฐานที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ (จีรศักดิ์ ผู้ปลื้ม. 2542) จะเท่ากับ 2 หน่วยต่อเมื่อใช้ 225 ก้านตาตามลำดับ

กลุ่มที่ 3 (ภาพประกอบ 19) จากการแยกผ่านขั้นตอนที่ 3 แล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์ต่อในขั้นตอนที่ 4 โดยใช้ Microsorb MV Cyano column (4.6x250 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำละลาย ACN / HFBA (20-60% B) การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นเป็น 1% ต่อนาที โดยมีอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที พบการกระจายของสารคล้าย PDH อยู่ใน fraction ที่ 24 ส่วนในขั้นตอนที่ 5 ใช้ Microsorb MV C8 column (4.6x250 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA (20-45% B) พบการกระจายของสารคล้าย PDH อยู่ใน fraction ที่ 19 จากนั้นนำมาแยกต่อในขั้นตอนที่ 6 โดยใช้ Microsorb MV C8 column (4.6x250 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA (20-45% B) เช่นเดียวกับในขั้นตอนที่ 5 สามารถแยกเปปไทด์ของสารคล้าย PDH ที่คาดว่าจะมีความบริสุทธิ์มากพอใน fraction ที่ 19 ปรากฏออกมาเพียงพีคเดียว ค่าความสูงของพีคประมาณ 10 มิลลิโวลต์ (ภาพประกอบ 21.1) ซึ่งเมื่อประมาณปริมาณเปปไทด์ของสารคล้าย PDH (PDL6) เปรียบเทียบกับความเข้มข้นของสีของจุดเปปไทด์ FMRFamide มาตรฐานที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ (จีรศักดิ์ ผู้ปลื้ม. 2542) จะเท่ากับ 1 หน่วยต่อเมื่อใช้ 262.5 ก้านตา

กลุ่มที่ 4 (ภาพประกอบ 22) จากการแยกผ่านขั้นตอนที่ 3 แล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์ต่อในขั้นตอนที่ 4 โดยใช้ Microsorb MV Cyano column (4.6x250 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA (5-40% B) การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นเป็น 1% ต่อนาที โดยมีอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที พบการกระจายของสารคล้าย PDH อยู่ใน fraction ที่ 22 ส่วนในขั้นตอนที่ 5 ใช้ Microsorb MV Cyano column (4.6x250 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA (5-40% B) สามารถแยกเปปไทด์ของสารคล้าย PDH ที่คาดว่าจะมีความบริสุทธิ์มากพอใน fraction ที่ 19 ปรากฏออกมาเพียงพีคเดียว ค่าความสูงของพีคประมาณ 33 มิลลิโวลต์ (ภาพประกอบ 24.1) ซึ่งเมื่อประมาณปริมาณเปปไทด์ของสารคล้าย PDH (PDL7) เปรียบเทียบกับความเข้มข้นของสีของจุดเปปไทด์ FMRFamide มาตรฐานที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ (จีรศักดิ์ ผู้ปลื้ม. 2542) จะเท่ากับ 1 หน่วยต่อเมื่อใช้ 187.5 ก้านตา

กลุ่มที่ 5 (ภาพประกอบ 25) จากการแยกผ่านชั้นตอนที่ 3 แล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์ต่อในชั้นตอนที่ 4 โดยใช้ Microsorb MV Cyano column (4.6x250 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA (5-40% B) การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นเป็น 1% ต่อนาที โดยมีอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที พบการกระจายของสารคล้าย PDH อยู่ใน fraction ที่ 21 ส่วนในชั้นตอนที่ 5 ใช้ Microsorb MV Cyano column (4.6x250 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA (5-40% B) สามารถแยกเปปไทด์ของสารคล้าย PDH ที่คาดว่าจะมีความบริสุทธิ์มากพอใน fraction ที่ 19 ปรากฏออกมาเพียงพีคเดียว ค่าความสูงของพีคประมาณ 15 มิลลิโวลท์ (ภาพประกอบ 27.1) ซึ่งเมื่อประมาณปริมาณเปปไทด์ของสารคล้าย PDH (PDL8) เปรียบเทียบกับความเข้มข้นของสีของจุดเปปไทด์ FMRFamide มาตรฐานที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ (จีรศักดิ์ ผู้ปลื้ม. 2542) จะเท่ากับ 2 หน่วยต่อเมื่อใช้ 262.5 ก้านตา

กลุ่มที่ 6 (ภาพประกอบ 28) จากการแยกผ่านชั้นตอนที่ 3 แล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์ต่อในชั้นตอนที่ 4 โดยใช้ Microsorb MV Cyano column (4.6x250 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA (5-40% B) การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นเป็น 1% ต่อนาที โดยมีอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที พบการกระจายของสารคล้าย PDH อยู่ใน fraction ที่ 25 และ 22-23 ส่วนในชั้นตอนที่ 5 ใช้ Microsorb MV Cyano column (4.6x250 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA (5-40% B) สามารถแยกเปปไทด์ของสารคล้าย PDH ที่คาดว่าจะมีความบริสุทธิ์มากพอใน fraction ที่ 25 และ 22 ปรากฏออกมาเพียงพีคเดียว ค่าความสูงของพีคประมาณ 35 และ 60 มิลลิโวลท์ (ภาพประกอบ 30.1 และ 30.3) ซึ่งเมื่อประมาณปริมาณเปปไทด์ของสารคล้าย PDH (PDL9 และ PDL10) เปรียบเทียบกับความเข้มข้นของสีของจุดเปปไทด์ FMRFamide มาตรฐานที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ (จีรศักดิ์ ผู้ปลื้ม. 2542) จะเท่ากับ 2 หน่วยต่อเมื่อใช้ 337.5 ก้านตามลำดับ

กลุ่มที่ 7 (ภาพประกอบ 31) จากการแยกผ่านชั้นตอนที่ 3 แล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์ต่อในชั้นตอนที่ 4 โดยใช้ Microsorb MV Cyano column (4.6x250 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/HFBA (30-70% B) การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นเป็น 1% ต่อนาที โดยมีอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที พบการกระจายของสารคล้าย PDH อยู่ใน fraction ที่ 19-20 และ 20 ส่วนในชั้นตอนที่ 5 ใช้ Microsorb MV C8 column (4.6x250 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA (30-60% B) สามารถแยกเปปไทด์ของสารคล้าย PDH ที่คาดว่าจะมีความบริสุทธิ์มากพอใน fraction ที่ 20 ปรากฏออกมาเพียงพีคเดียว ค่าความสูงของพีคประมาณ 1 มิลลิโวลท์ (ภาพประกอบ 33.1) ซึ่งเมื่อประมาณปริมาณเปปไทด์ของสารคล้าย PDH (PDL11) เปรียบเทียบกับความเข้มข้นของสีของจุดเปปไทด์ FMRFamide มาตรฐานที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ (จีรศักดิ์ ผู้ปลื้ม. 2542) จะเท่ากับ 2 หน่วยต่อเมื่อใช้ 150 ก้านตา

กลุ่มที่ 8 (ภาพประกอบ 34) จากการแยกผ่านชั้นตอนที่ 3 แล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์ต่อในชั้นตอนที่ 4 โดยใช้ Microsorb MV Cyano column (4.6x250 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำ-

ละลาย ACN/HFBA (30-60% B) การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นเป็น 1% ต่อนาที โดยมีอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที พบการกระจายของสารคล้าย PDH อยู่ใน fraction ที่ 25-26 ส่วนในขั้นตอนที่ 5 ใช้ Microsorb MV C8 column (4.6x250 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA (25-55% B) สามารถแยกเปปไทด์ของสารคล้าย PDH ที่คาดว่าจะมีความบริสุทธิ์มากพอใน fraction ที่ 28 ปรากฏออกมาเพียงพีกเดียว ค่าความสูงของพีกประมาณ 60 มิลลิโวลท์ (ภาพประกอบ 36.1) ซึ่งเมื่อประมาณปริมาณเปปไทด์ของสารคล้าย PDH (PDL12) เปรียบเทียบกับความเข้มของสีของจุดเปปไทด์ FMRFamide มาตรฐานที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ (จรัสศักดิ์ ผู้ปลื้ม. 2542) จะเท่ากับ 3 หน่วยต่อเมื่อใช้ 75 ก้านตา

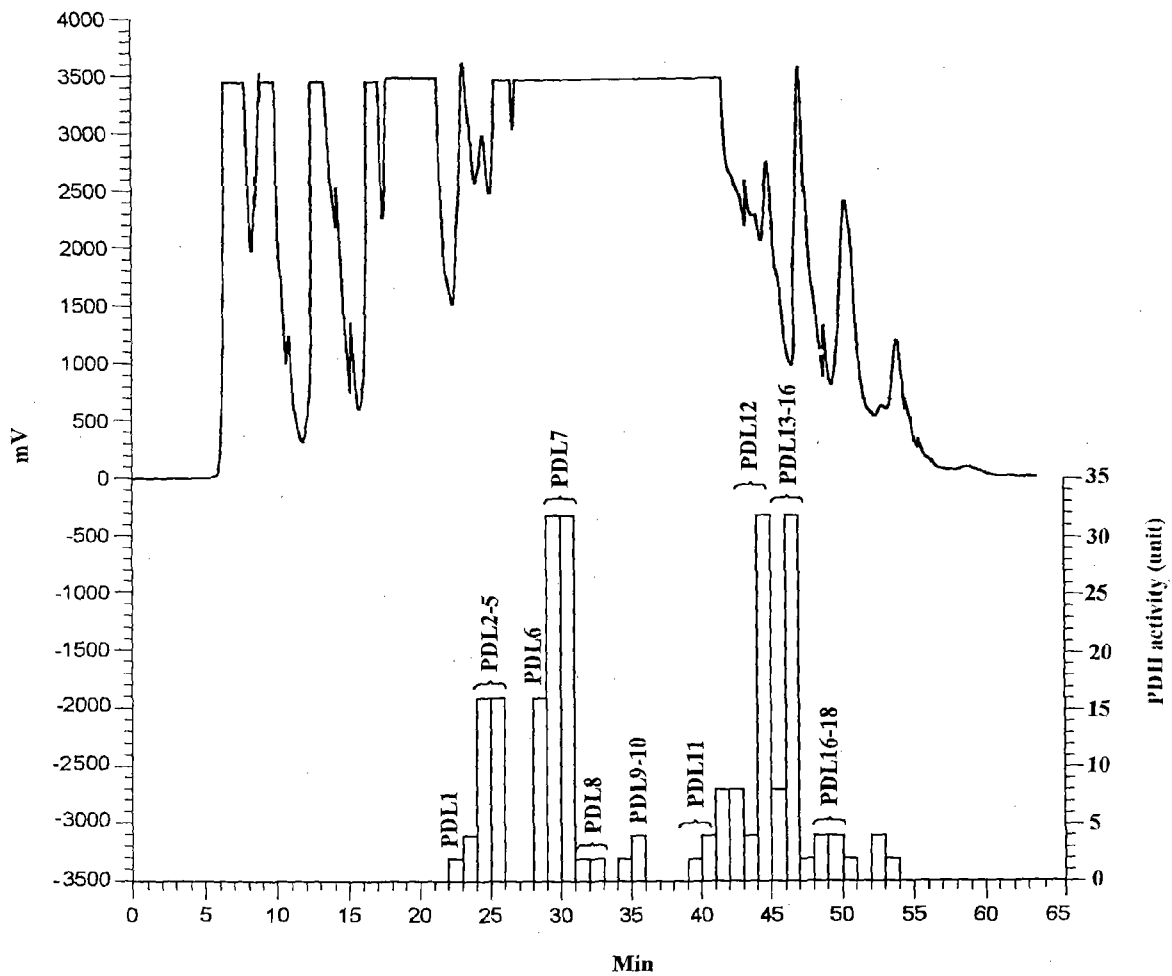
กลุ่มที่ 9 (ภาพประกอบ 37) จากการแยกผ่านขั้นตอนที่ 3 แล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์ต่อในขั้นตอนที่ 4 โดยใช้ Microsorb MV Cyano หรือ C8 column (4.6x250 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/HFBA (30-65% B) หรือ ACN/TFA (30-60% B) การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นเป็น 1% ต่อนาที โดยมีอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที พบการกระจายของสารคล้าย PDH อยู่ใน fraction ที่ 23-26 และ 31-33 ส่วนในขั้นตอนที่ 5 ใช้ Microsorb MV C8 column (4.6x250 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA (25-60% B) สามารถแยกเปปไทด์ของสารคล้าย PDH ที่คาดว่าจะมีความบริสุทธิ์มากพอใน fraction ที่ 27-28, 29-30 และ 29 ปรากฏออกมาเพียงพีกเดียว ค่าความสูงของพีกประมาณ 270 และ 2.9 มิลลิโวลท์ ตามลำดับ (ภาพประกอบ 39.1, 39.3 และ 40.1) ซึ่งเมื่อประมาณปริมาณเปปไทด์ของสารคล้าย PDH (PDL13, PDL14 และ PDL15) เปรียบเทียบกับความเข้มของสีของจุดเปปไทด์ FMRFamide มาตรฐานที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ (จรัสศักดิ์ ผู้ปลื้ม. 2542) จะเท่ากับ 2, 2 และ 1 หน่วยต่อเมื่อใช้ 150, 120 และ 120 ก้านตา ส่วน fraction ที่ 24-27 นำมาแยกต่อในขั้นตอนที่ 6 โดยใช้ Microsorb MV Cyano column (4.6x250 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA (25-65% B) พบการกระจายของสารคล้าย PDH อยู่ใน fraction ที่ 17 ส่วนในขั้นตอนที่ 7 ใช้ Microsorb MV Cyano column (4.6x250 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA (20-40% B) สามารถแยกเปปไทด์ของสารคล้าย PDH ที่คาดว่าจะมีความบริสุทธิ์มากพอใน fraction ที่ 23 ปรากฏออกมาเพียงพีกเดียว ค่าความสูงของพีกประมาณ 2 มิลลิโวลท์ (ภาพประกอบ 42.1) ซึ่งเมื่อประมาณปริมาณเปปไทด์ของสารคล้าย PDH (PDL16) เปรียบเทียบกับความเข้มของสีของจุดเปปไทด์ FMRFamide มาตรฐานที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ (จรัสศักดิ์ ผู้ปลื้ม. 2542) จะเท่ากับ 2 หน่วยต่อเมื่อใช้ 262.5 ก้านตา

กลุ่มที่ 10 (ภาพประกอบ 43) จากการแยกผ่านขั้นตอนที่ 3 แล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์ต่อในขั้นตอนที่ 4 โดยใช้ Microsorb MV C8 column (4.6x250 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA (30-60% B) การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นเป็น 1% ต่อนาที โดยมีอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที พบการกระจายของสารคล้าย PDH อยู่ใน fraction ที่ 23-26 ส่วนในขั้นตอนที่ 5 ใช้ Microsorb MV C8 column (4.6x250 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA

(30-60% B) สามารถแยกเปปไทด์ของสารคล้าย PDH ที่คาดว่ามีความบริสุทธิ์มากพอใน fraction ที่ 25-26 ปรากฏออกมาเพียงพีคเดียว ค่าความสูงของพีคประมาณ 33 มิลลิโวลท์ (ภาพประกอบ 45.1) ซึ่งเมื่อประมาณปริมาณเปปไทด์ของสารคล้าย PDH (PDL17) เปรียบเทียบกับความเข้มของสีของจุดเปปไทด์มาตรฐาน FMRFamide ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ (จิรศักดิ์ ผู้ปลื้ม. 2542) จะเท่ากับ 3 หน่วยต่อเมื่อใช้ 90 ก้านตา ส่วน fraction ที่ 24-27 นำไปแยกต่อในขั้นตอนที่ 6 โดยใช้ Microsorb MV Cyano column (4.6x250 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA (25-65% B) พบการกระจายของสารคล้าย PDH อยู่ใน fraction ที่ 18-19 ส่วนในขั้นตอนที่ 7 ใช้ Microsorb MV Cyano column (4.6x250 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA (20-40% B) สามารถแยกเปปไทด์ของสารคล้าย PDH ที่คาดว่ามีความบริสุทธิ์มากพอใน fraction ที่ 23 ปรากฏออกมาเพียงพีคเดียว ค่าความสูงของพีคประมาณ 3 มิลลิโวลท์ (ภาพประกอบ 45.3) ซึ่งเมื่อประมาณปริมาณเปปไทด์ของสารคล้าย PDH (PDL18) เปรียบเทียบกับความเข้มของสีของจุดเปปไทด์มาตรฐานที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ (จิรศักดิ์ ผู้ปลื้ม. 2542) จะเท่ากับ 2 หน่วยต่อเมื่อใช้ 262.5 ก้านตา

5. การตรวจหาน้ำหนักโมเลกุลของสารคล้าย PDH โดย Mass spectrometry

จากการนำตัวอย่างเปปไทด์ของสารคล้าย PDH ไปตรวจหาน้ำหนักโมเลกุลโดย Matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) พบเปปไทด์ที่มีมวลโมเลกุลต่างกัน ดังนี้ PDL1 มีน้ำหนักโมเลกุล 1928.4 PDL2 มีน้ำหนักโมเลกุล 1926.6 และ 1949.0 PDL3 มีน้ำหนักโมเลกุล 1075.5, 1097.7, 1114.0 และ 1143.3 PDL4 มีน้ำหนักโมเลกุล 1075.3, 1097.5 และ 1113.5 PDL5 มีน้ำหนักโมเลกุล 1062.1, 1075.2, 1084.1 1097.3, 1106.3 และ 1143.2 PDL6 มีน้ำหนักโมเลกุล 1058.4, 1074.4, 1096.5, 1112.5, 1197.9 และ 1220.0 PDL7 มีน้ำหนักโมเลกุล 1045.6, 1061.5, 1076.1, 1083.8 และ 1099.3 PDL8 มีน้ำหนักโมเลกุล 1045.3, 1061.1, 1083.2 และ 1099.2 PDL9 มีน้ำหนักโมเลกุล 1048.7 และ 1070.9 PDL10 มีน้ำหนักโมเลกุล 1372.5, 1394.9, 1429.9, 1452.0 และ 1468.2 PDL11 มีน้ำหนักโมเลกุล 1953.1 และ 1991.6 PDL12 มีน้ำหนักโมเลกุล 1928.2, PDL13 มีน้ำหนักโมเลกุล 1388.8, 1411.5 และ 1427.8 PDL14 มีน้ำหนักโมเลกุล 1630.4 PDL15 มีน้ำหนักโมเลกุล 1555.4 PDL16 มีน้ำหนักโมเลกุล 1819.5, 1860.6, 1947.3, 1969.6, 1985.4, 2007.8 และ 2024.0 PDL17 มีน้ำหนักโมเลกุล 1916.3 PDL18 มีน้ำหนักโมเลกุล 1934.5, 1948.8, 1971.2 และ 1987.4 ตาราง 4 แสดงค่าน้ำหนักโมเลกุลซึ่งเปปไทด์บางตัวมีค่าความแตกต่างของมวลสารในแต่ละพีคประมาณ 22 และ 38 ดาลตัน (ซึ่งใกล้เคียงกับน้ำหนักของโซเดียมและโปแทสเซียม) จึงคาดว่าน่าจะเป็นอนุพันธ์ของสารคล้าย PDH ที่มีโซเดียมและโปแทสเซียมเกาะอยู่ในปริมาณต่างๆ (ภาพประกอบ 14-45) ดังนั้นสารคล้าย PDH ที่แยกได้น่าจะมีความบริสุทธิ์เพียงพอที่จะนำไปหาลำดับกรดอะมิโนต่อไป



1

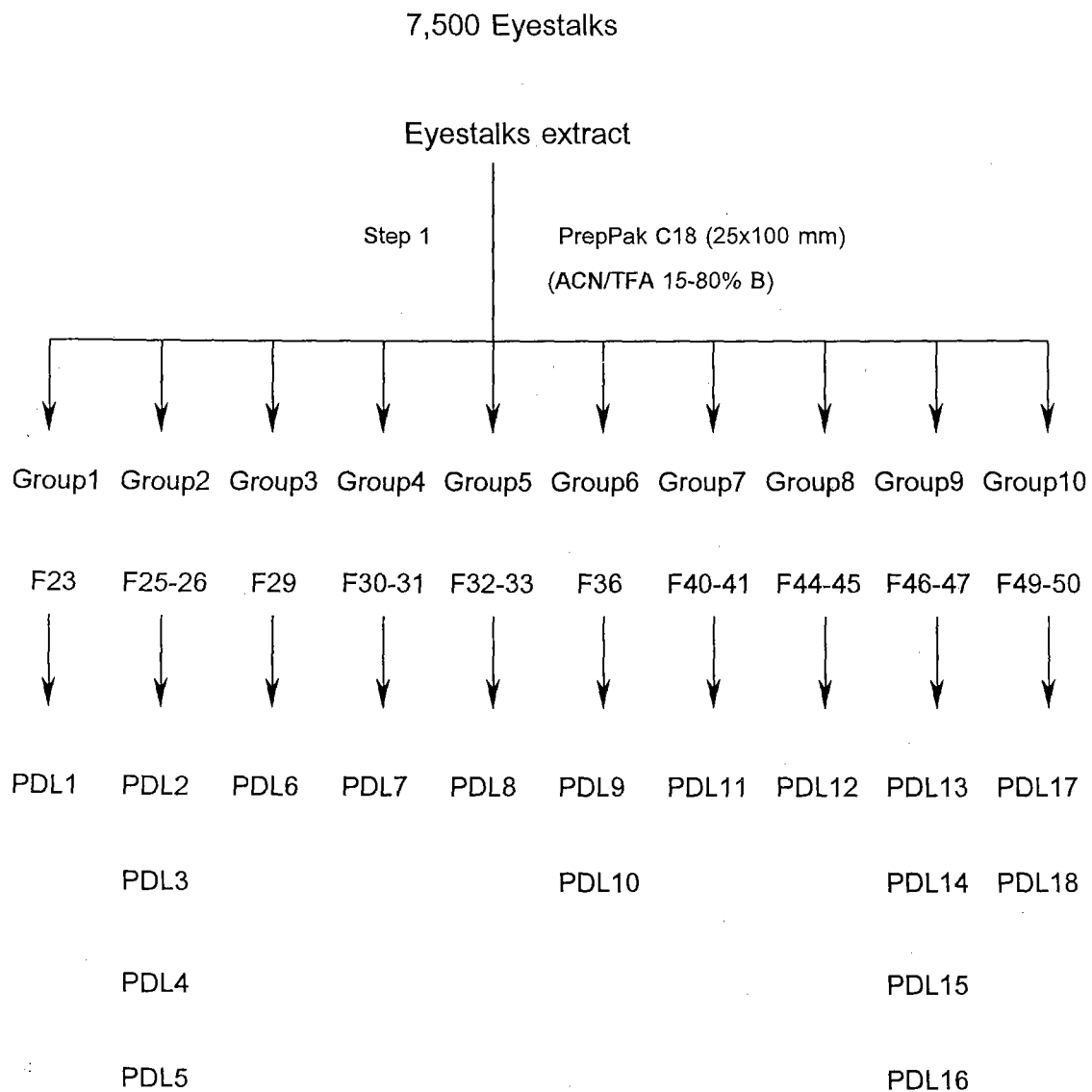
10

61

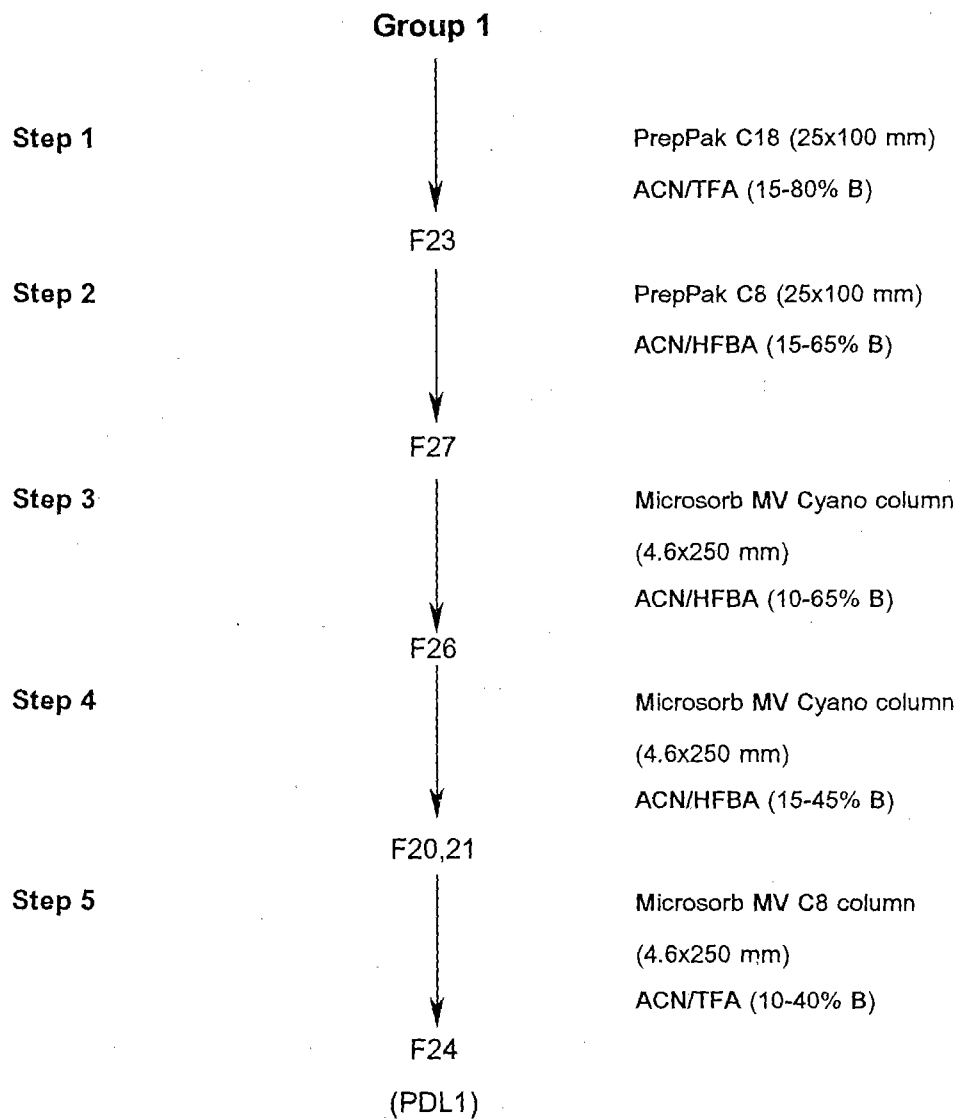
70

20 ตา

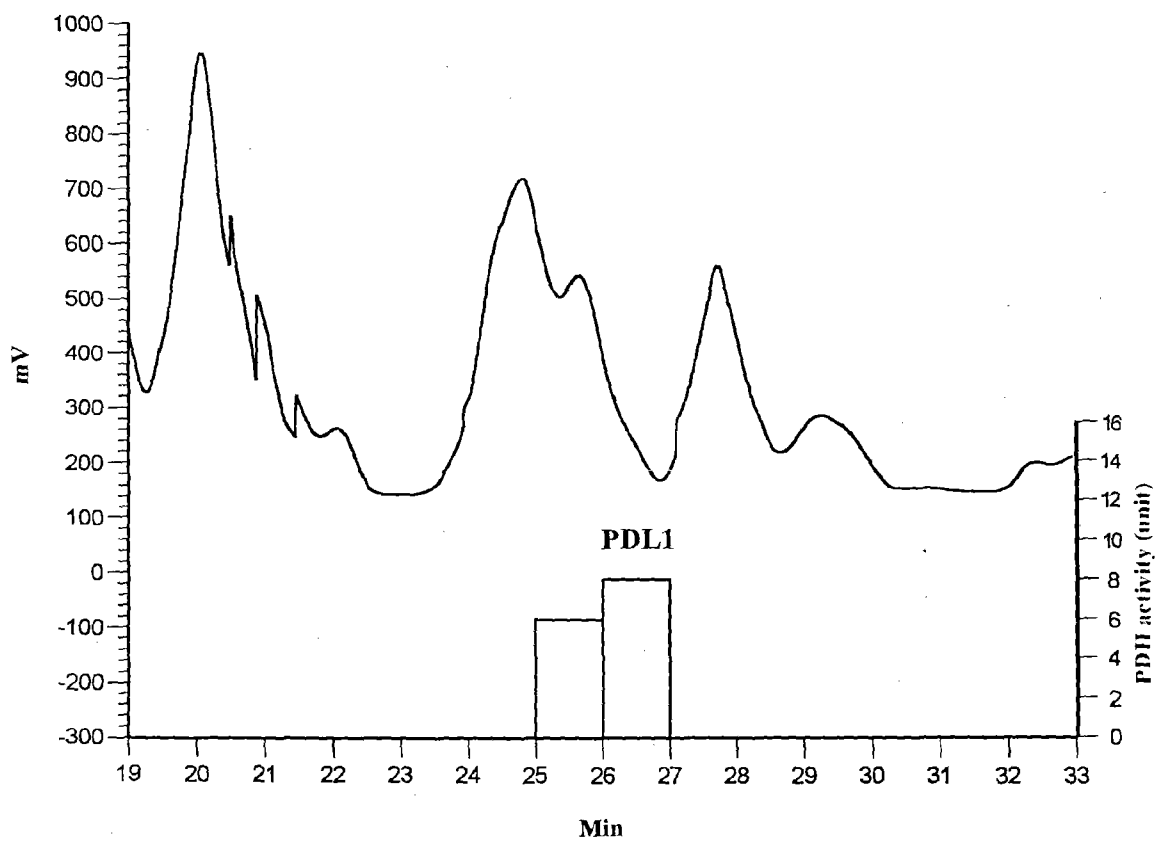
ภาพประกอบ 10 Chromatogram ของสารสกัดจากก้านตาทิ้งกุลาดำจำนวน 2,500 ก้านตาทิ้งหลังจากผ่านกระบวนการ RP-HPLC ขั้นตอนแรก (PrepPak C18 column ; ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA) และแผนภูมิแท่งแสดงความเข้มของสีจุด ซึ่งสรุปจาก PDH immunoreactivity บนแผ่น nitrocellulose พบสารคล้าย PDH ใน fraction ที่ 23-26, 29-33, 35-36, 40-51 และ 53-54 ตัวเลขเหนือแผนภูมิแท่งเป็นชื่อของเปปไทด์ที่สามารถทำให้บริสุทธิ์จาก fraction กลุ่มต่างๆ



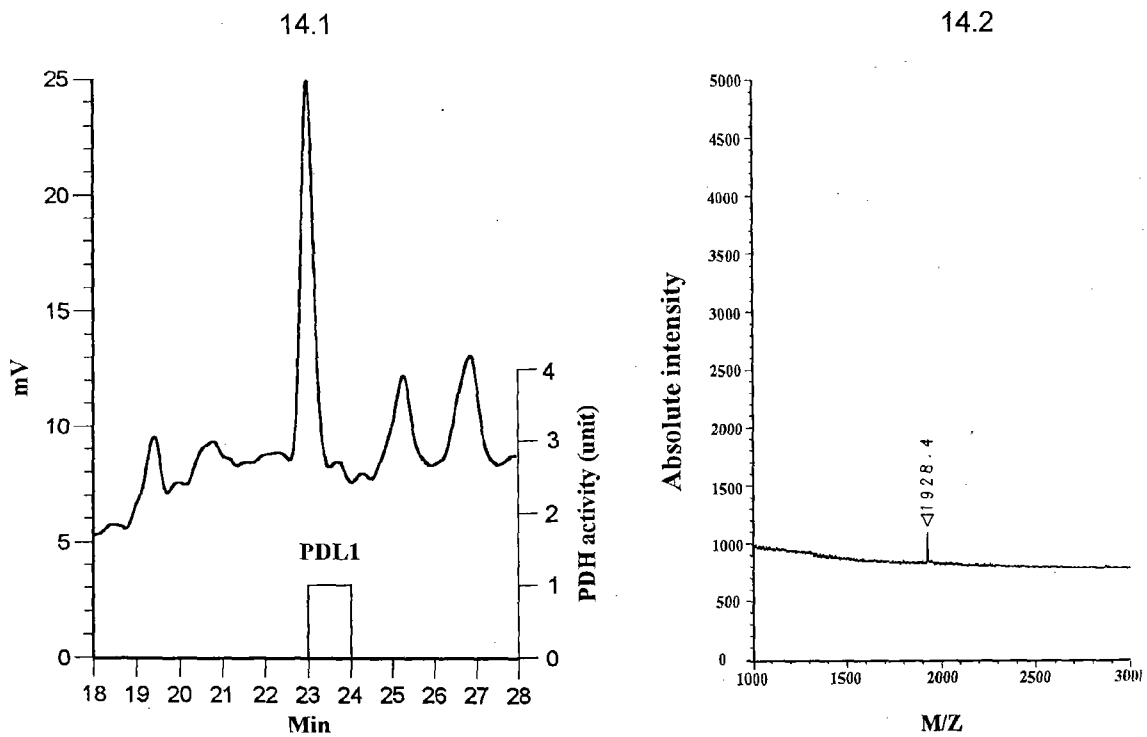
ภาพประกอบ 11 ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ของสารคล้าย PDH ด้วยกระบวนการ RP-HPLC กลุ่มต่างๆ จากการแยกด้วย PrepPak C18 ; ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA และเปปไทด์ของสารคล้าย PDH ที่แยกได้จาก fraction กลุ่มต่างๆ



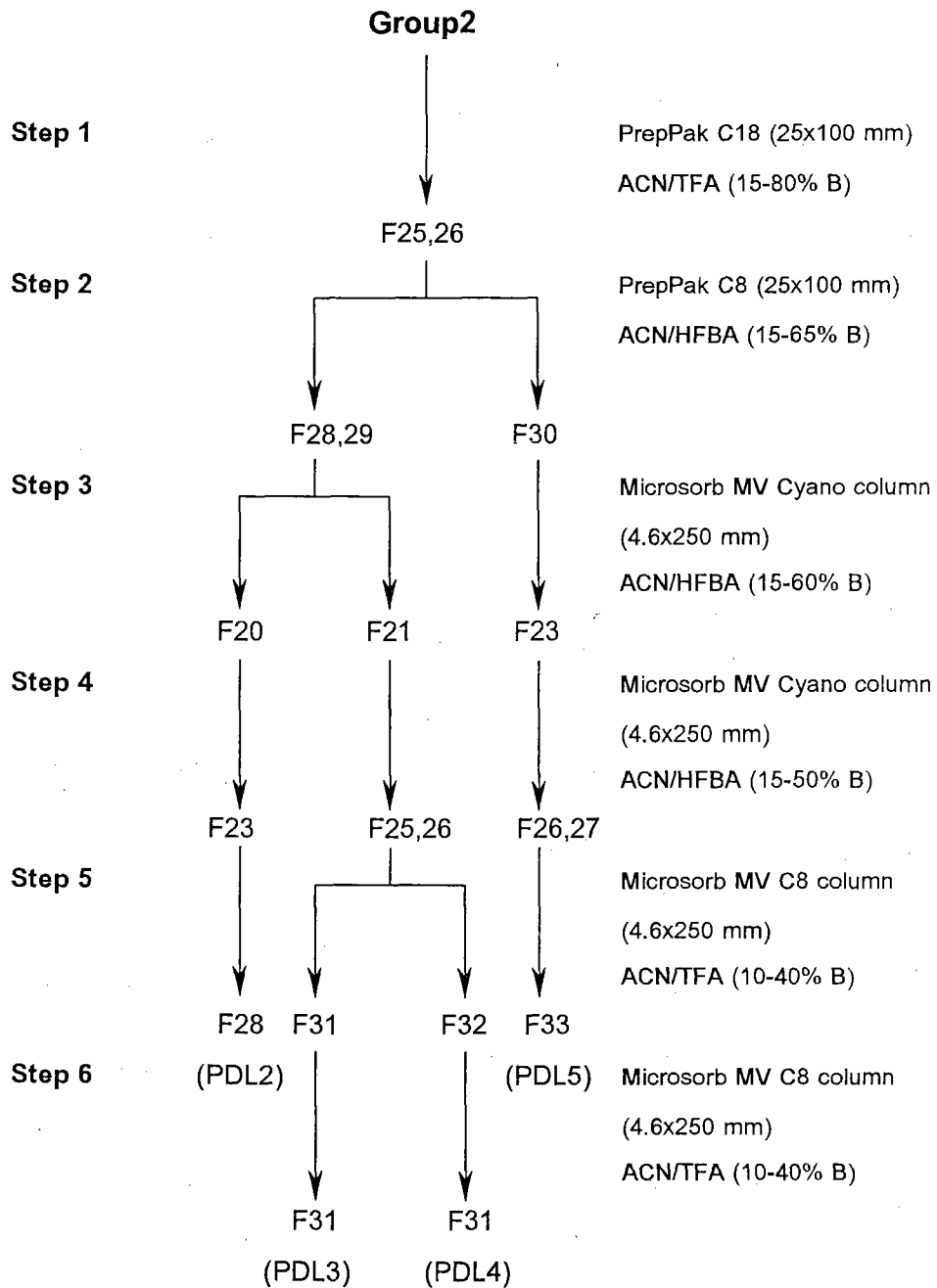
ภาพประกอบ 12 ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย PDH ด้วยกระบวนการ RP-HPLC ของ
สารคล้าย PDH กลุ่มที่ 1



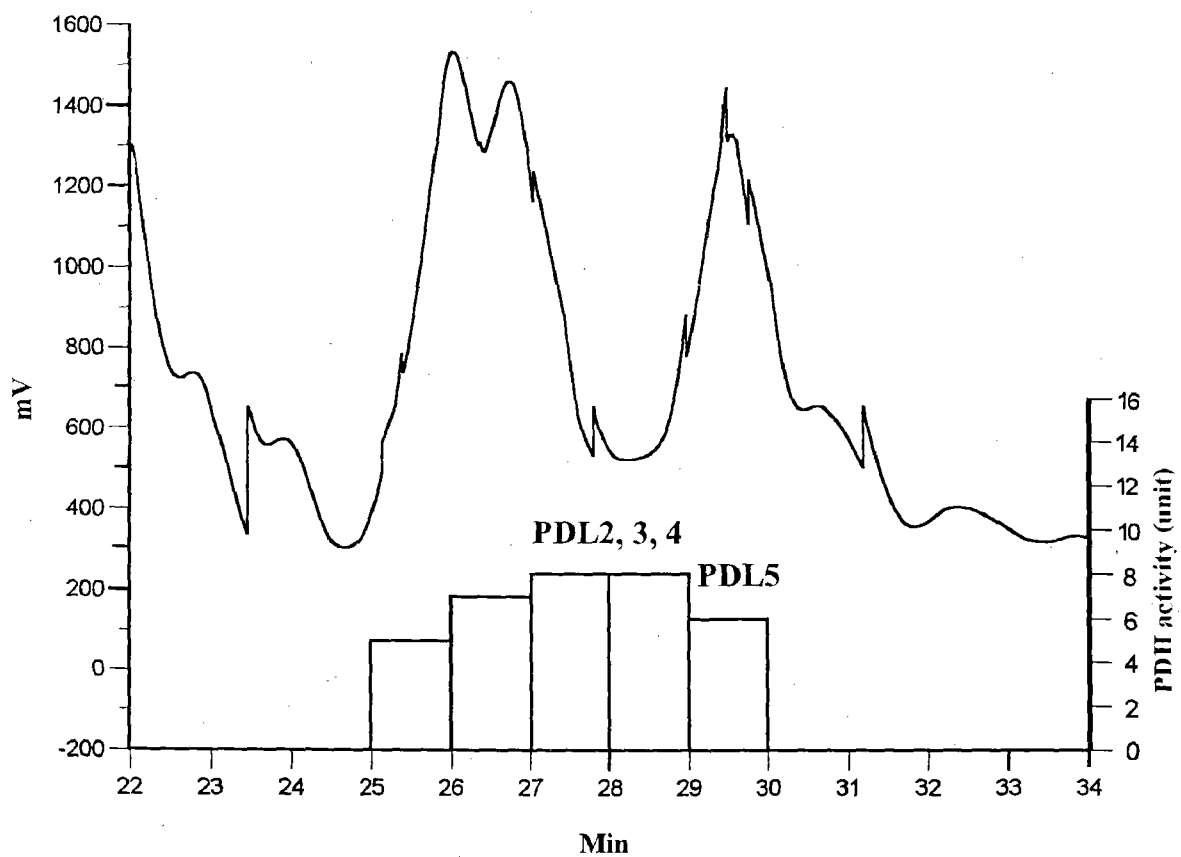
ภาพประกอบ 13 Chromatogram ของสารสกัดกลุ่มที่ 1 จากก้านตากุ้งกุลาดำจำนวน 7,500 ก้านตาที่ผ่านกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 2 (PrepPak C8 column ; ระบบตัวทำละลาย ACN/HFBA) และแผนภูมิแท่งแสดงความเข้มข้นของสารคล้าย PDH ใน fraction ที่ 26-27 ตัวเลขเหนือแผนภูมิแท่งเป็นชื่อของเปปไทด์ที่สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้



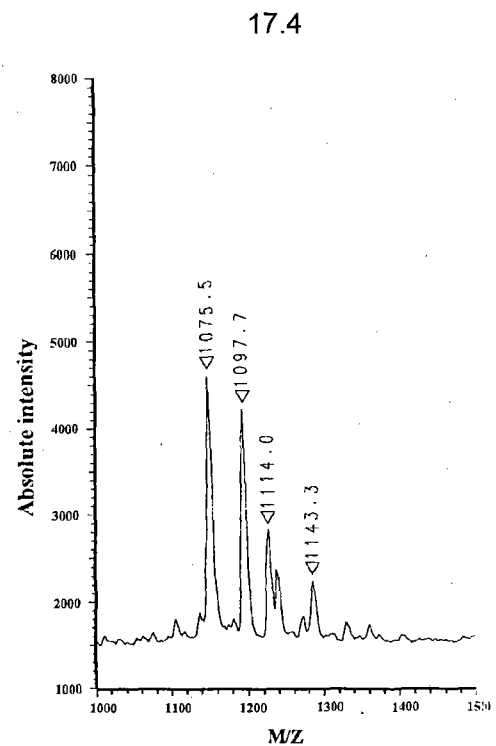
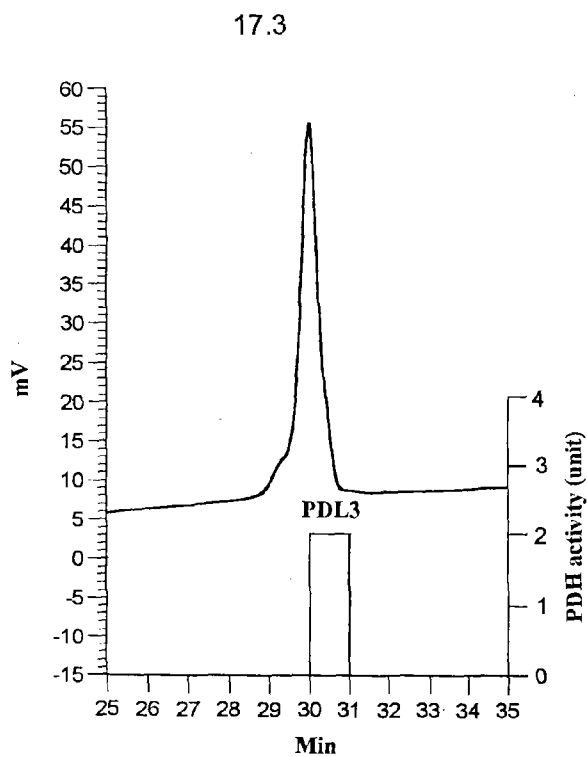
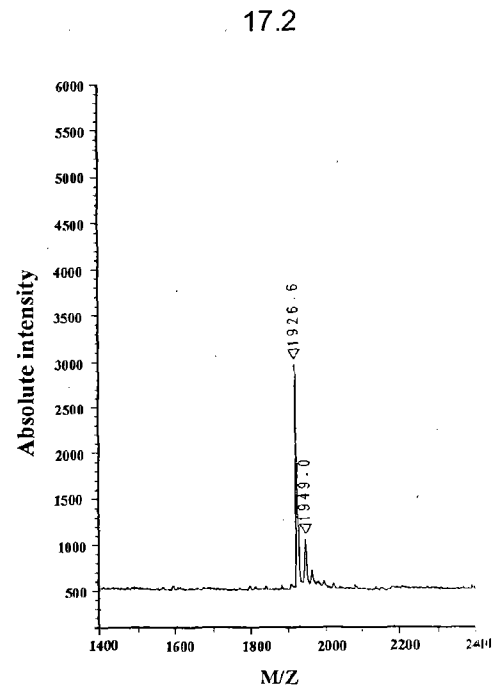
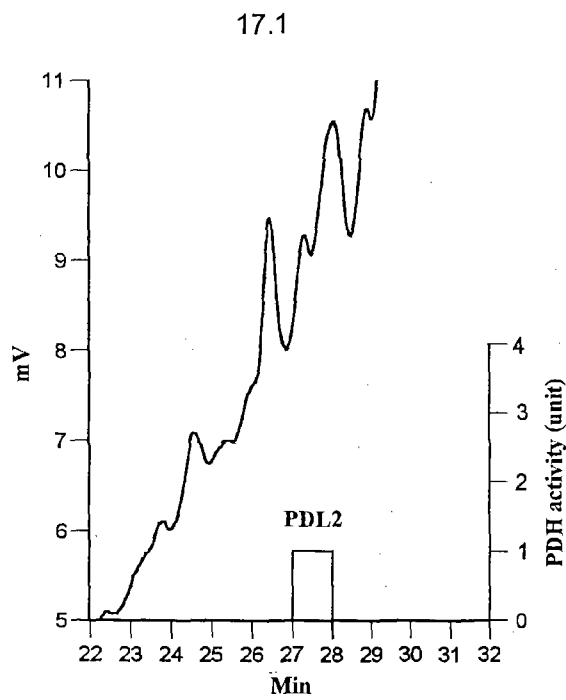
ภาพประกอบ 14 Chromatogram การทำให้บริสุทธิ์ของเปปไทด์ในกลุ่มที่ 1 คือ PDL1 (14.1) โดยผ่านกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 5 ใช้ Microsorb MV C8 column ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA และ mass spectrum ของสารคล้าย PDH PDL1 (14.2)



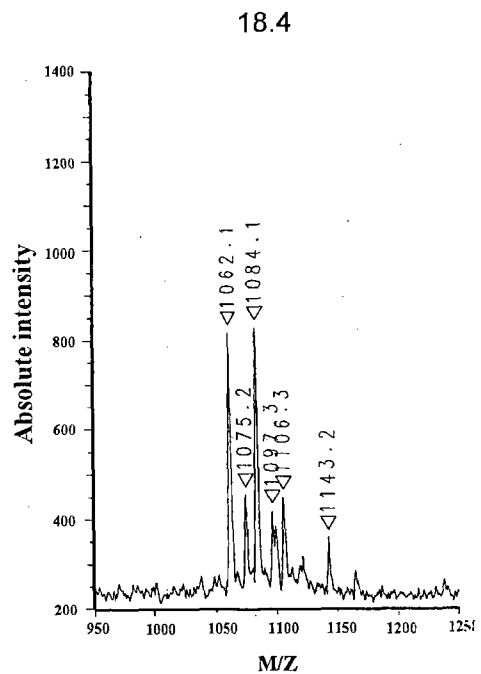
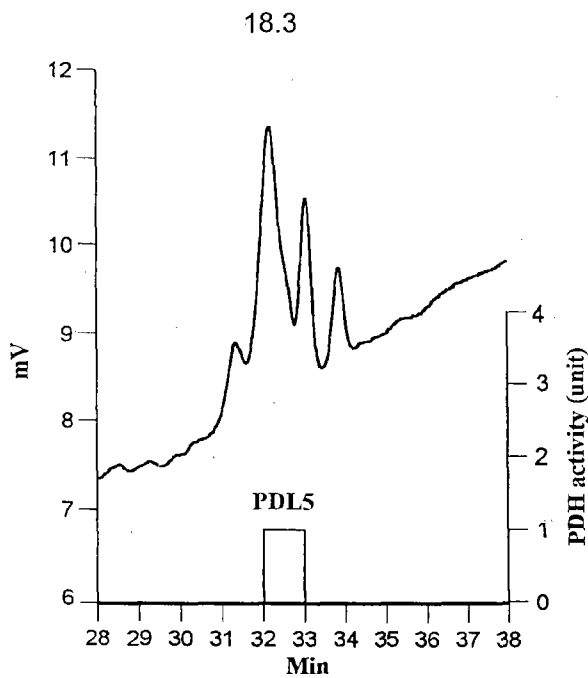
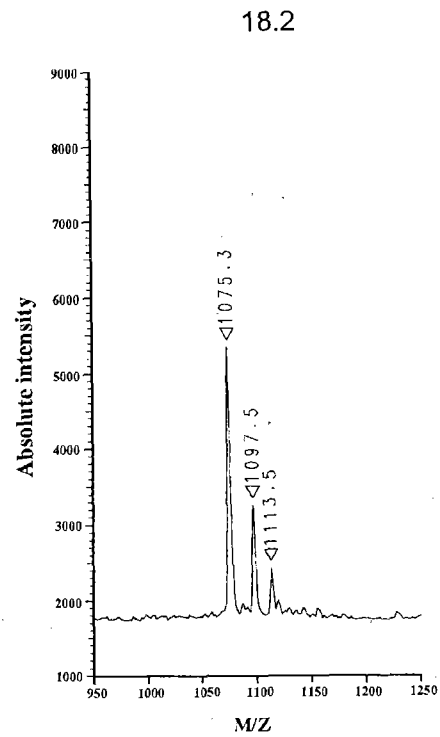
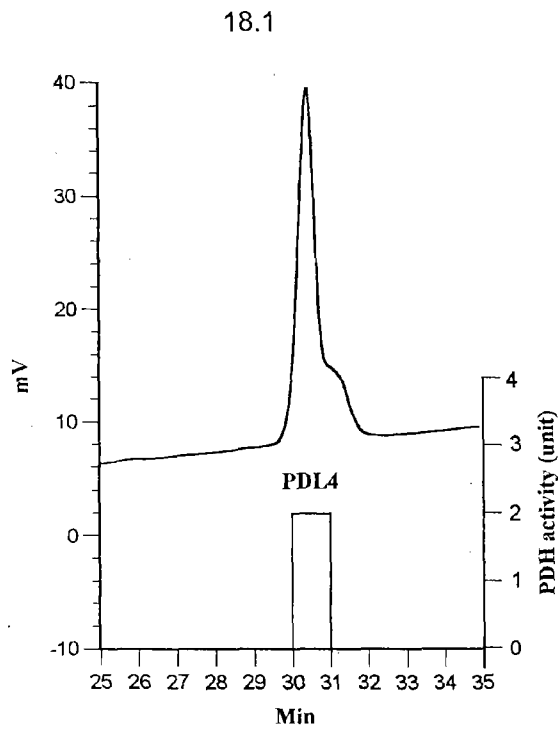
ภาพประกอบ 15 ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย PDH ด้วยกระบวนการ RP-HPLC ของ
สารคล้าย PDH กลุ่มที่ 2



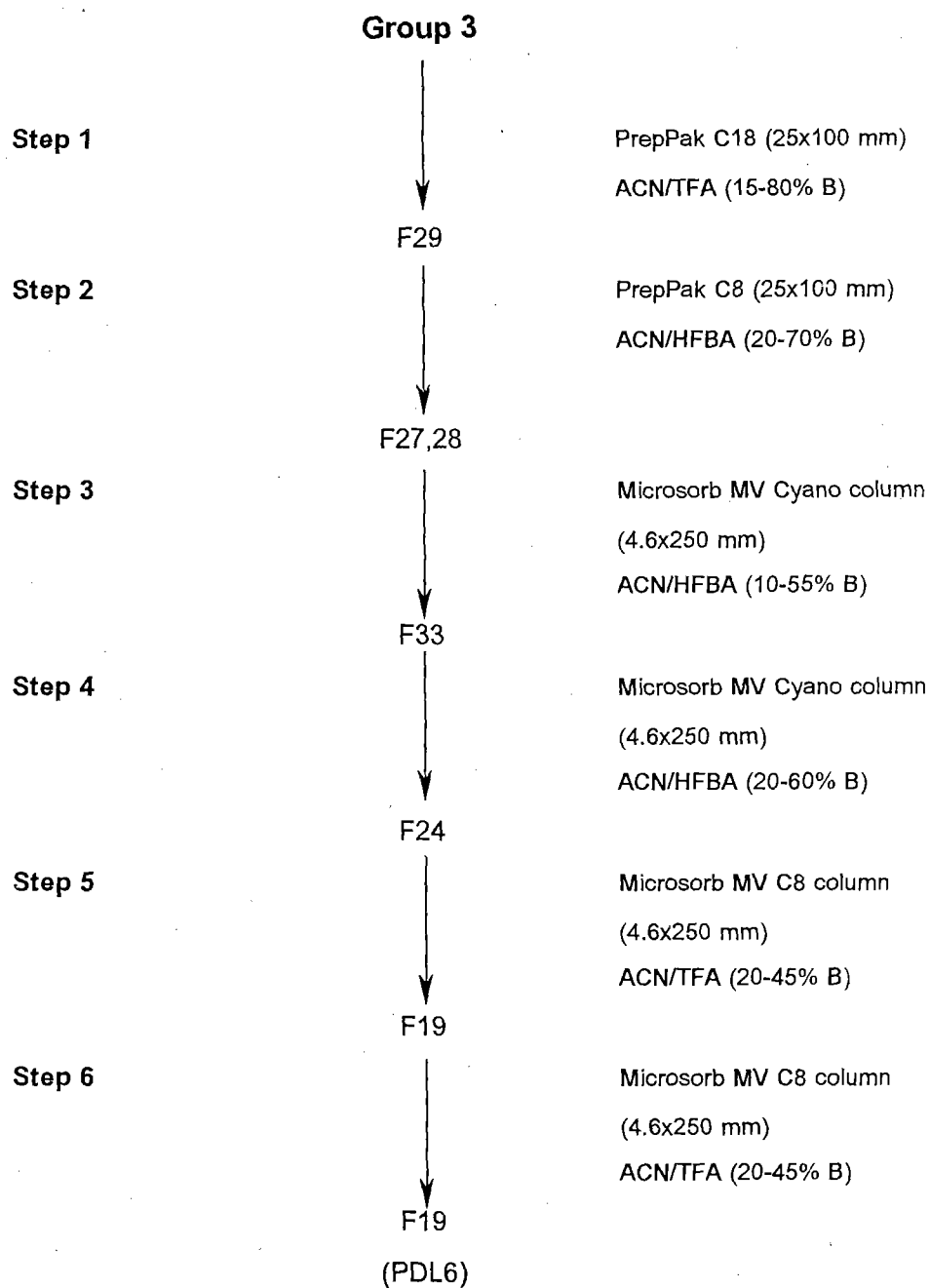
ภาพประกอบ 16 Chromatogram ของสารสกัดกลุ่มที่ 2 จากก้านตาทองกุลาดำจำนวน 7,500 ก้านตาทองที่ผ่านกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 2 (PrepPak C8 column ; ระบบตัวทำละลาย ACN/HFBA) และแผนภูมิแท่งแสดงความเข้มข้นของสารคล้าย PDH ใน fraction ที่ 26-30 ตัวเลขเหนือแผนภูมิแท่งเป็นชื่อของเปปไทด์ที่สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้



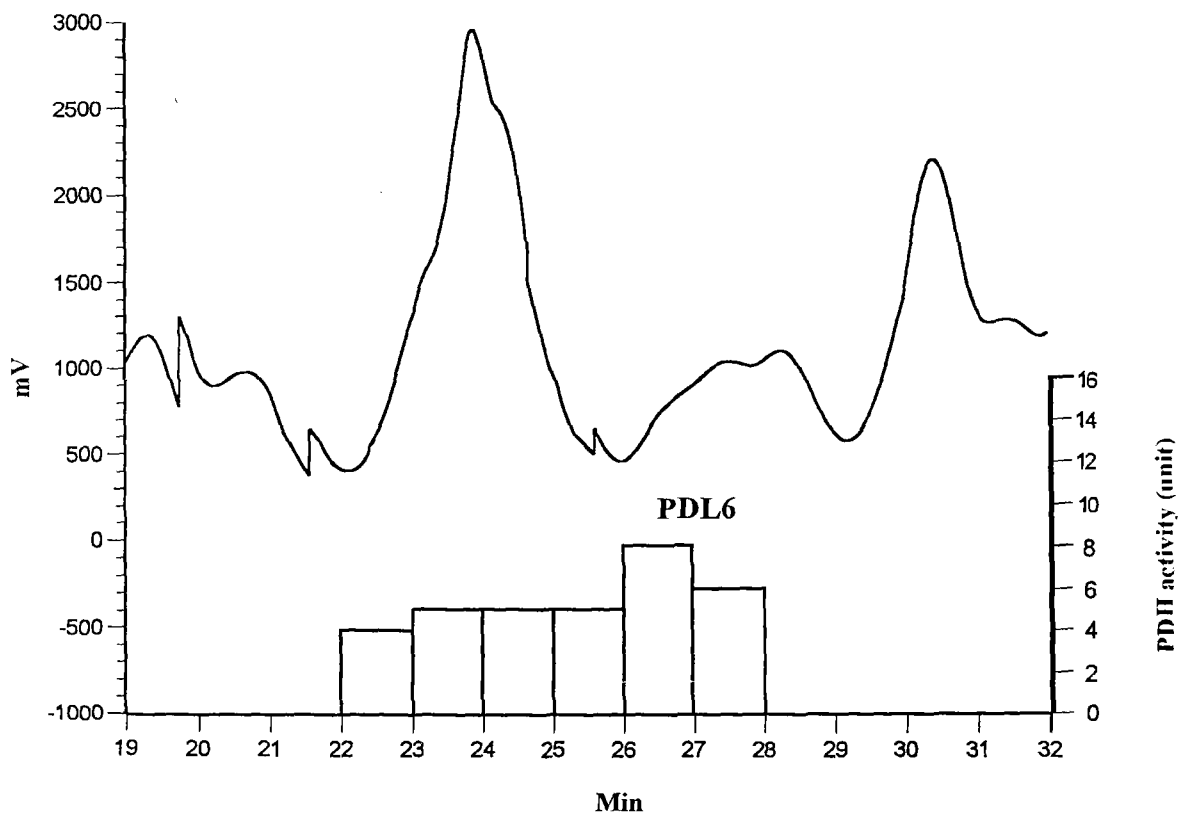
ภาพประกอบ 17 Chromatogram การทำให้บริสุทธิ์ของเปปไทด์กลุ่มที่ 2 คือ PDL2 (17.1) และ PDL3 (17.3) ในขั้นตอนที่ 5 และขั้นตอนที่ 6 โดยผ่านกระบวนการ RP-HPLC ใช้ Microsorb MV C8 ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA และ mass spectrum ของสารคล้าย PDH PDL2 (17.2) และ PDL3 (17.4)



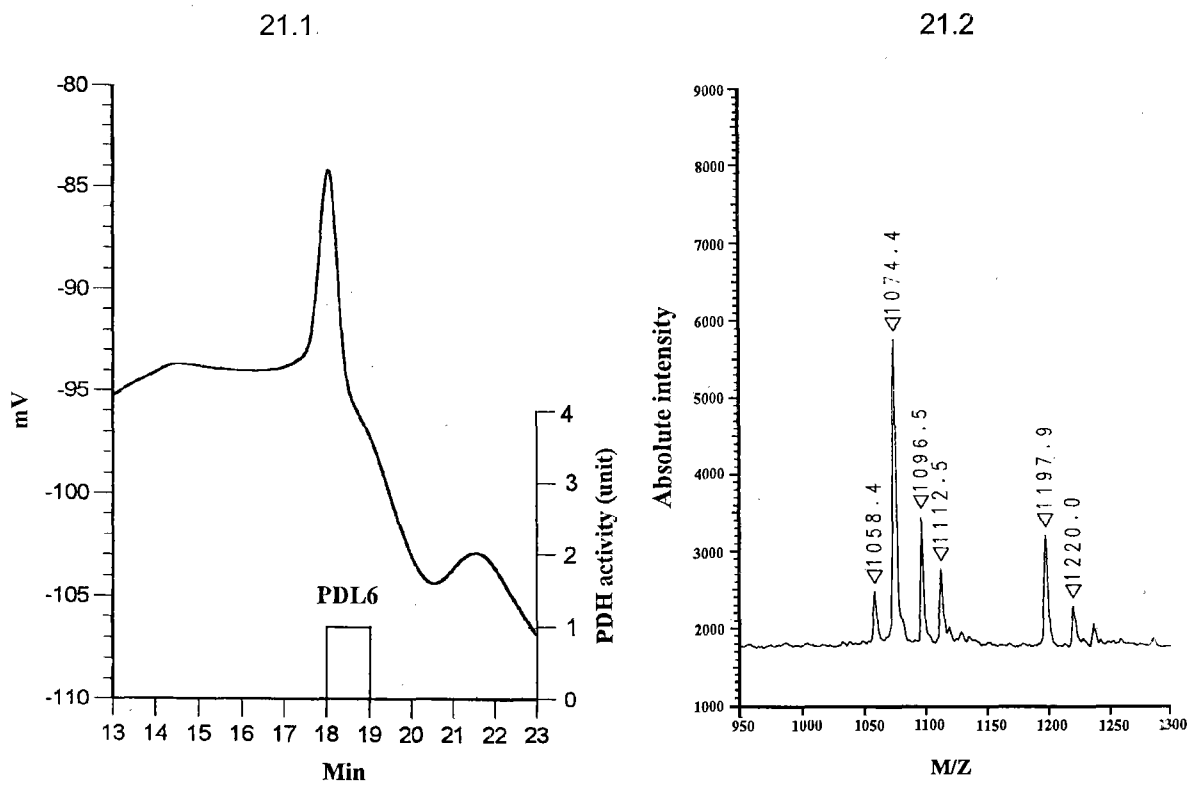
ภาพประกอบ 18 Chromatogram การทำให้บริสุทธิ์ของเปปไทด์กลุ่มที่ 2 คือ PDL4 (18.1) และ PDL5 (18.3) ในขั้นตอนที่ 6 และขั้นตอนที่ 5 โดยผ่านกระบวนการ RP-HPLC ใช้ Microsorb MV C8 ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA และ mass spectrum ของสารคล้าย PDH PDL4 (18.2) และ PDL5 (18.4)



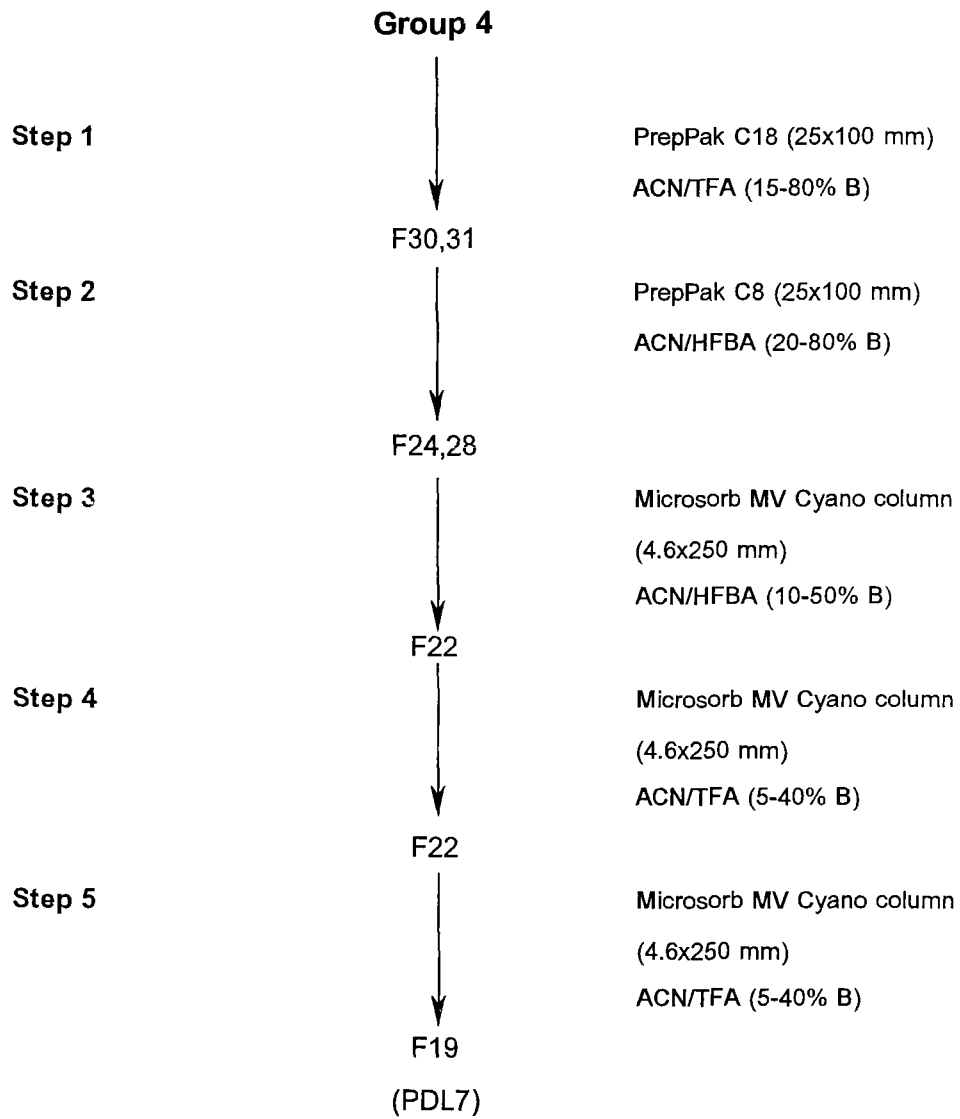
ภาพประกอบ 19 ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย PDH ด้วยกระบวนการ RP-HPLC ของสารคล้าย PDH กลุ่มที่ 3



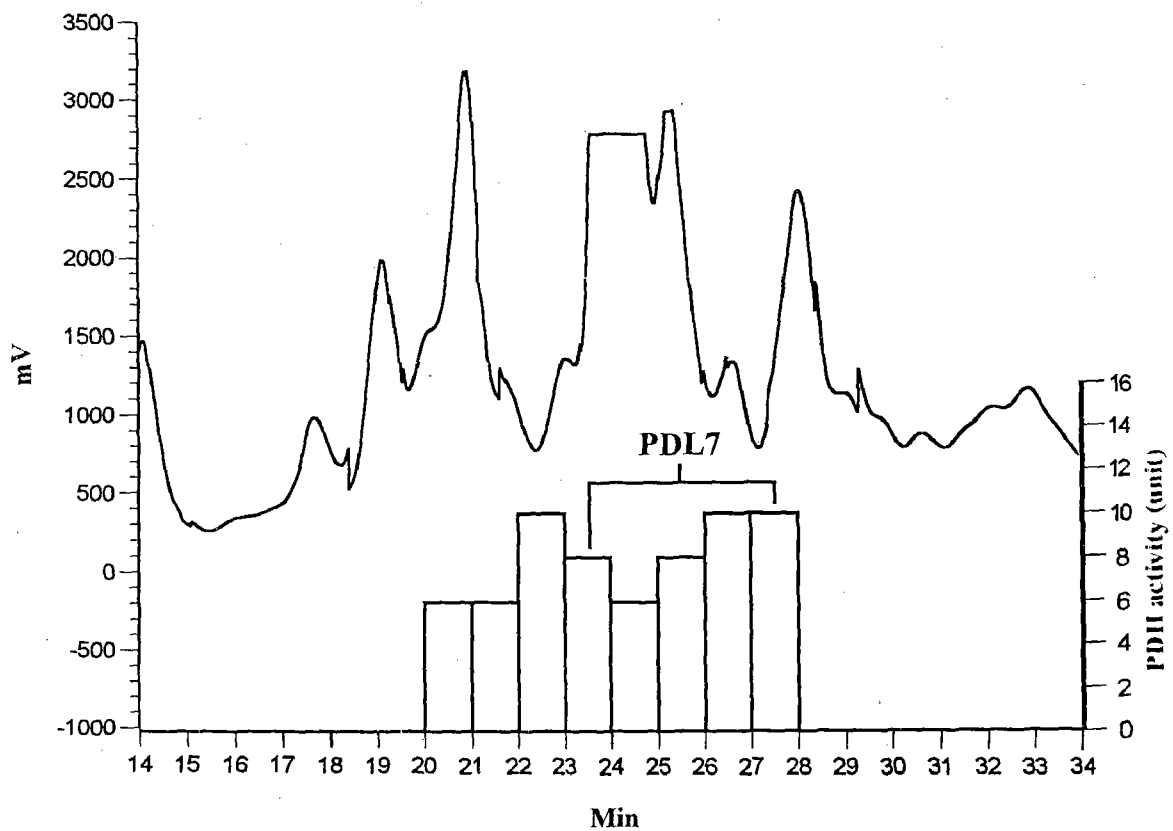
ภาพประกอบ 20 Chromatogram ของสารสกัดกลุ่มที่ 3 จากก้านตาทองกล้าดำจำนวน 7,500 ก้านตาที่ผ่านกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 2 (PrepPak C8 column ; ระบบตัวทำละลาย ACN/HFBA) และแผนภูมิแท่งแสดงความเข้มของสารคล้าย PDH ใน fraction ที่ 23-28 ตัวเลขเหนือแผนภูมิแท่งเป็นชื่อของเปปไทด์ที่สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้



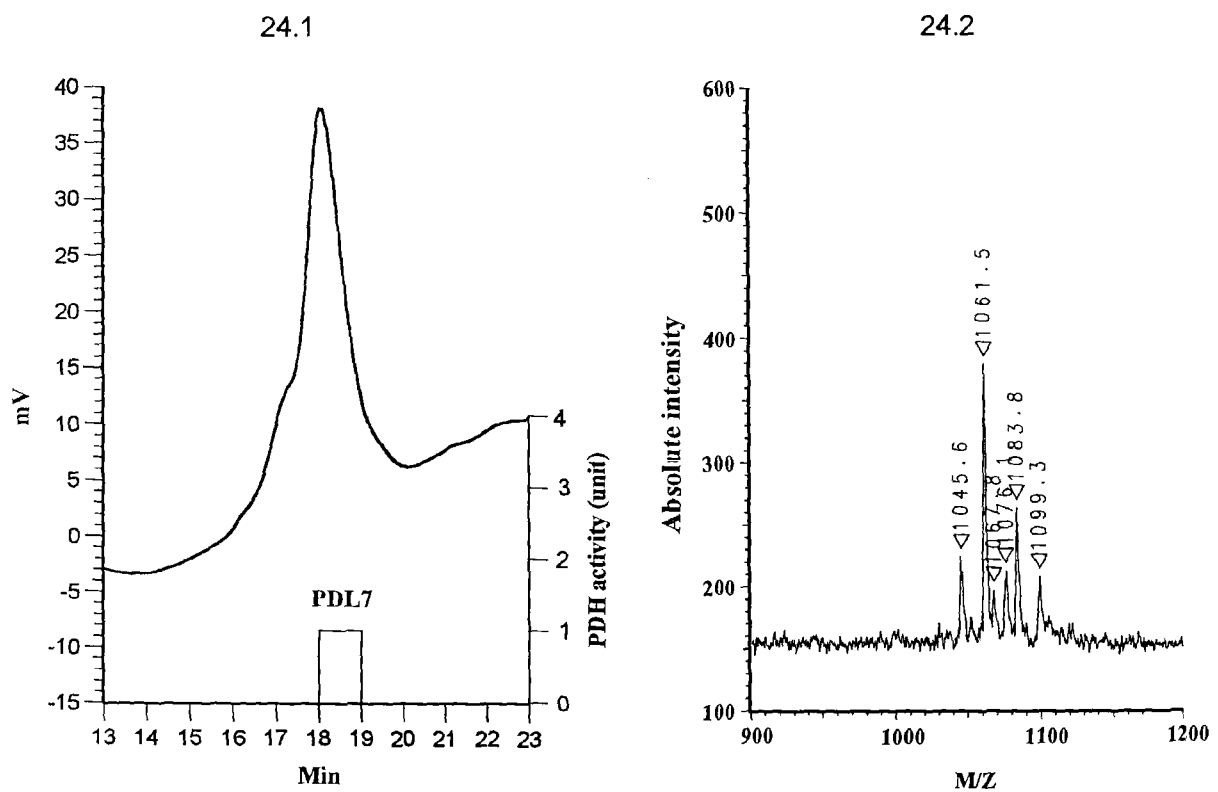
ภาพประกอบ 21 Chromatogram การทำให้บริสุทธิ์ของเปปไทด์กลุ่มที่ 3 คือ PDL6 (21.1) ในขั้นตอนที่ 6 โดยผ่านกระบวนการ RP-HPLC ใช้ Microsorb MV C8 ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA และ mass spectrum ของสารคล้าย PDH PDL6 (21.2)



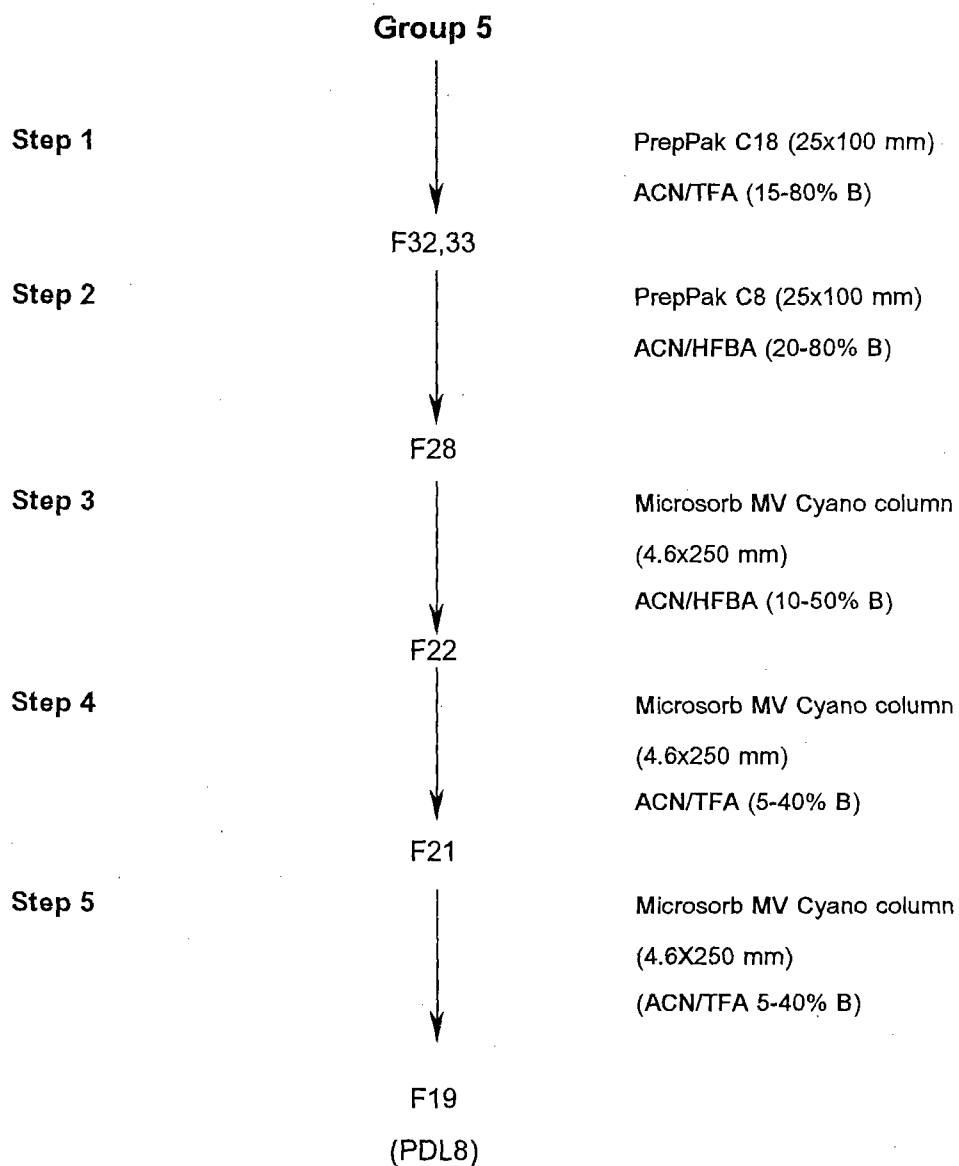
ภาพประกอบ 22 ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย PDH ด้วยกระบวนการ RP-HPLC ของ
สารคล้าย PDH กลุ่มที่ 4



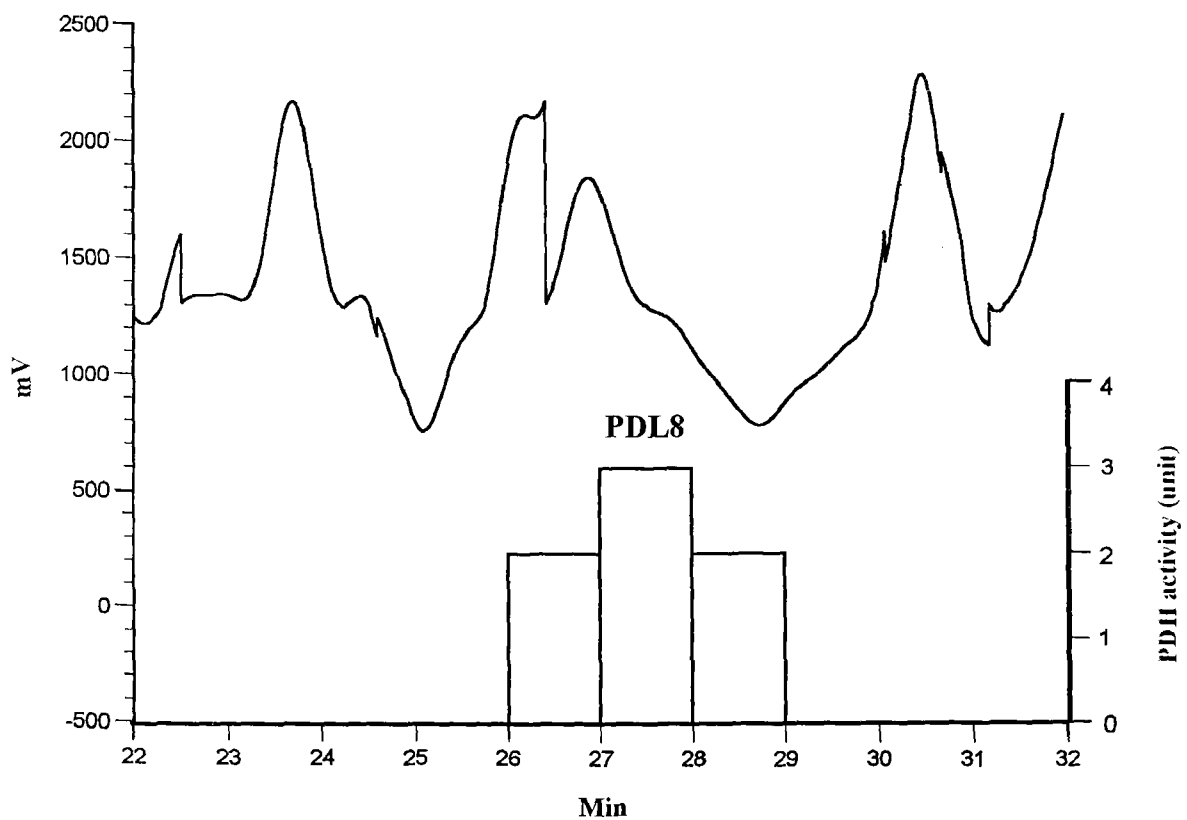
ภาพประกอบ 23 Chromatogram ของสารสกัดกลุ่มที่ 4 จากก้านตากุ้งกุลาดำจำนวน 7,500 ก้านตาที่ผ่านกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 2 (PrepPak C8 column ; ระบบตัวทำละลาย ACN/HFBA) และแผนภูมิแท่งแสดงความเข้มของสารคล้าย PDH ใน fraction ที่ 21-28 ตัวเลขเหนือแผนภูมิแท่งเป็นชื่อของเปปไทด์ที่สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้



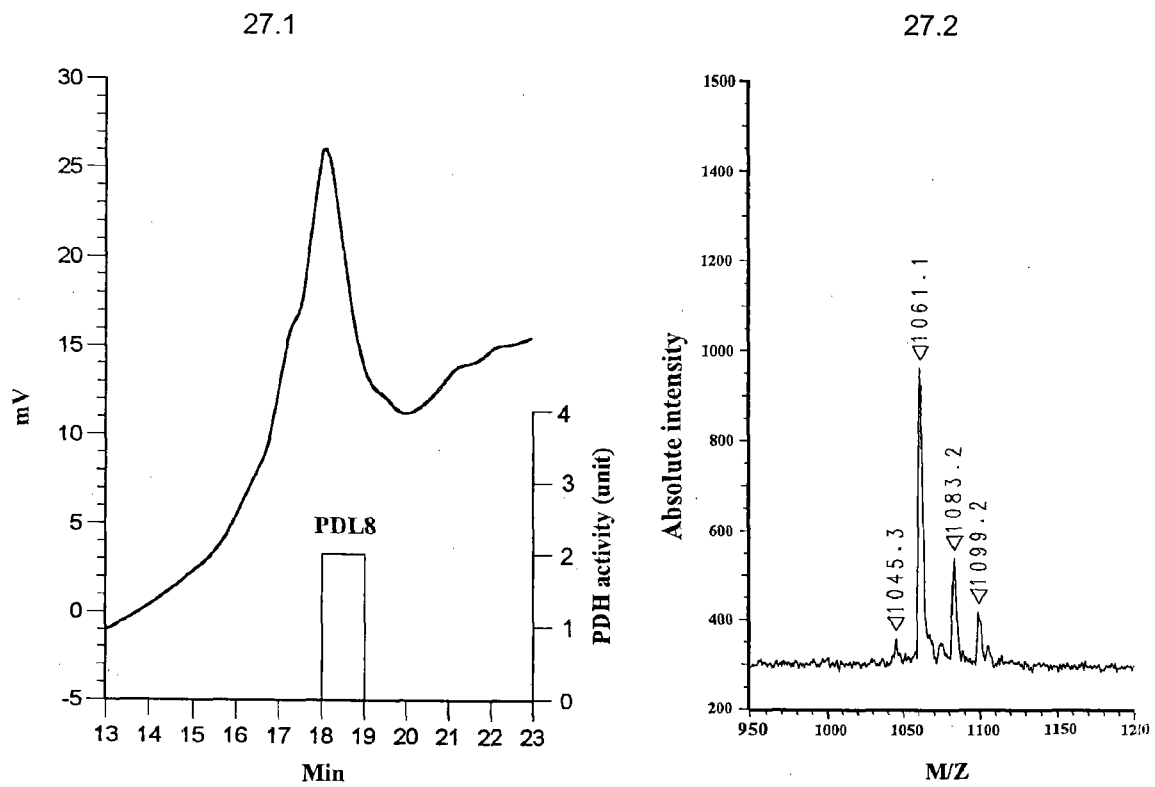
ภาพประกอบ 24 Chromatogram การทำให้บริสุทธิ์ของเปปไทด์กลุ่มที่ 4 คือ PDL7 (24.1) ในขั้นตอนที่ 5 โดยผ่านกระบวนการ RP-HPLC ใช้ Microsorb MV Cyano column ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA และ mass spectrum ของสารคล้าย PDH PDL7 (24.2)



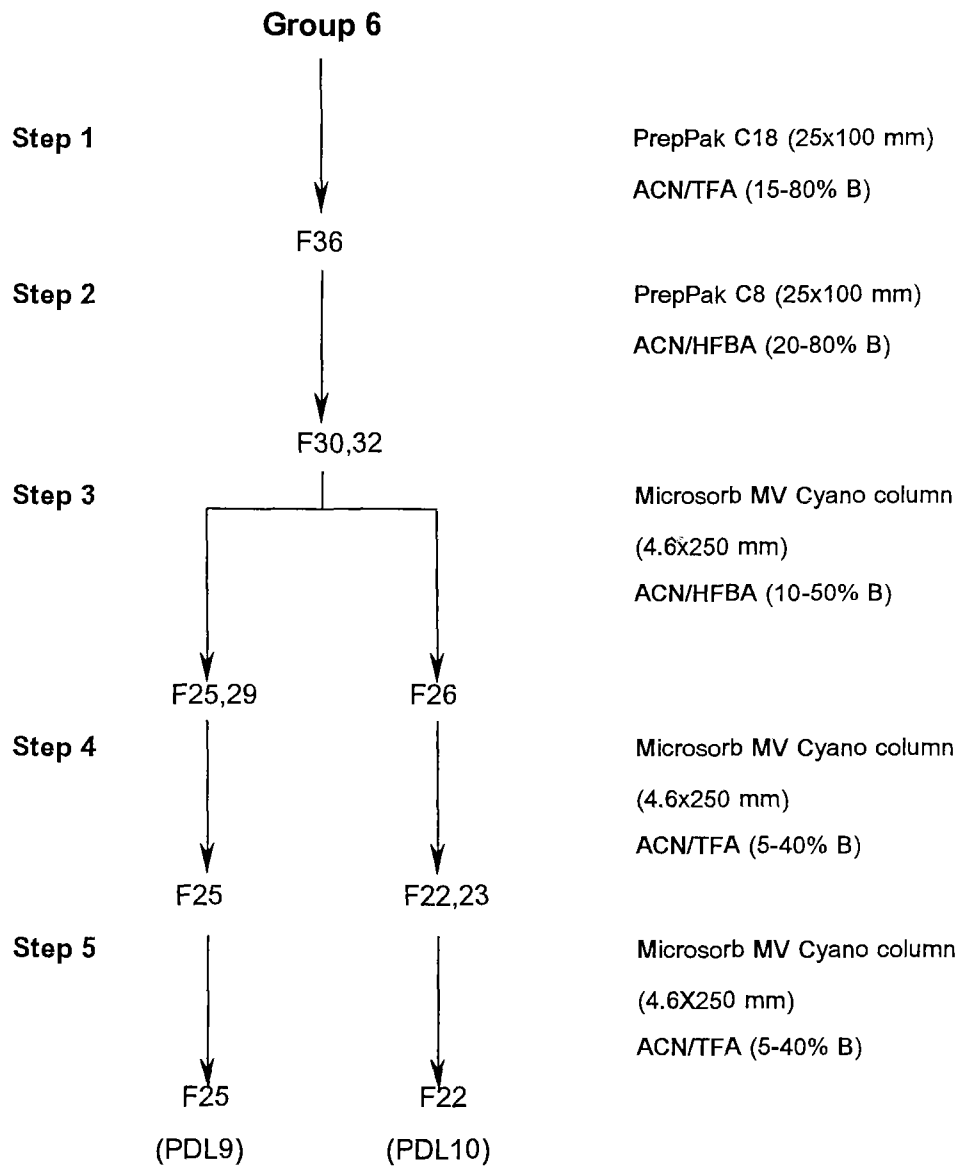
ภาพประกอบ 25 ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย PDH ด้วยกระบวนการ RP-HPLC ของสารคล้าย PDH กลุ่มที่ 5



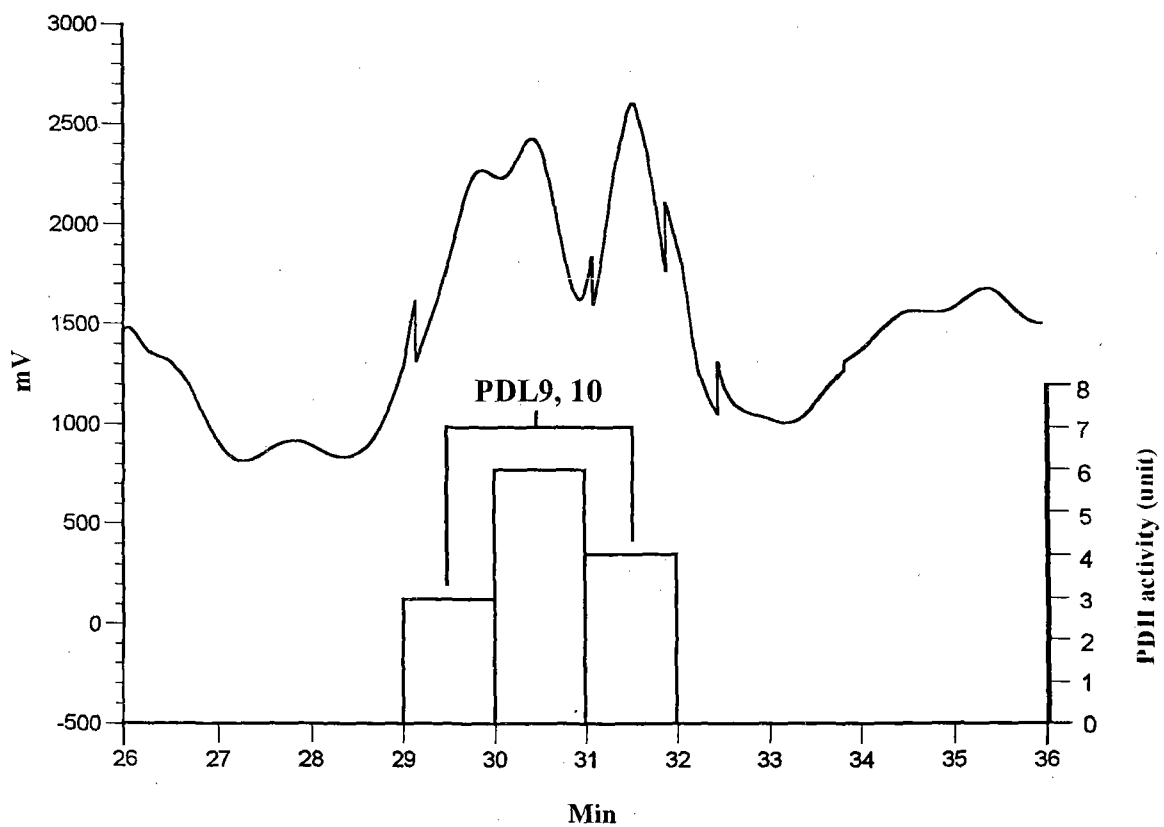
ภาพประกอบ 26 Chromatogram ของสารสกัดกลุ่มที่ 5 จากก้านตาทองกุลาจำนวน 7,500 ก้านตาที่ผ่านกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 2 (PrepPak C8 column ; ระบบตัวทำละลาย ACN/HFBA) และแผนภูมิแท่งแสดงความเข้มของสารคล้าย PDH ใน fraction ที่ 27-29 ตัวเลขเหนือแผนภูมิแท่งเป็นชื่อของเปปไทด์ที่สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้



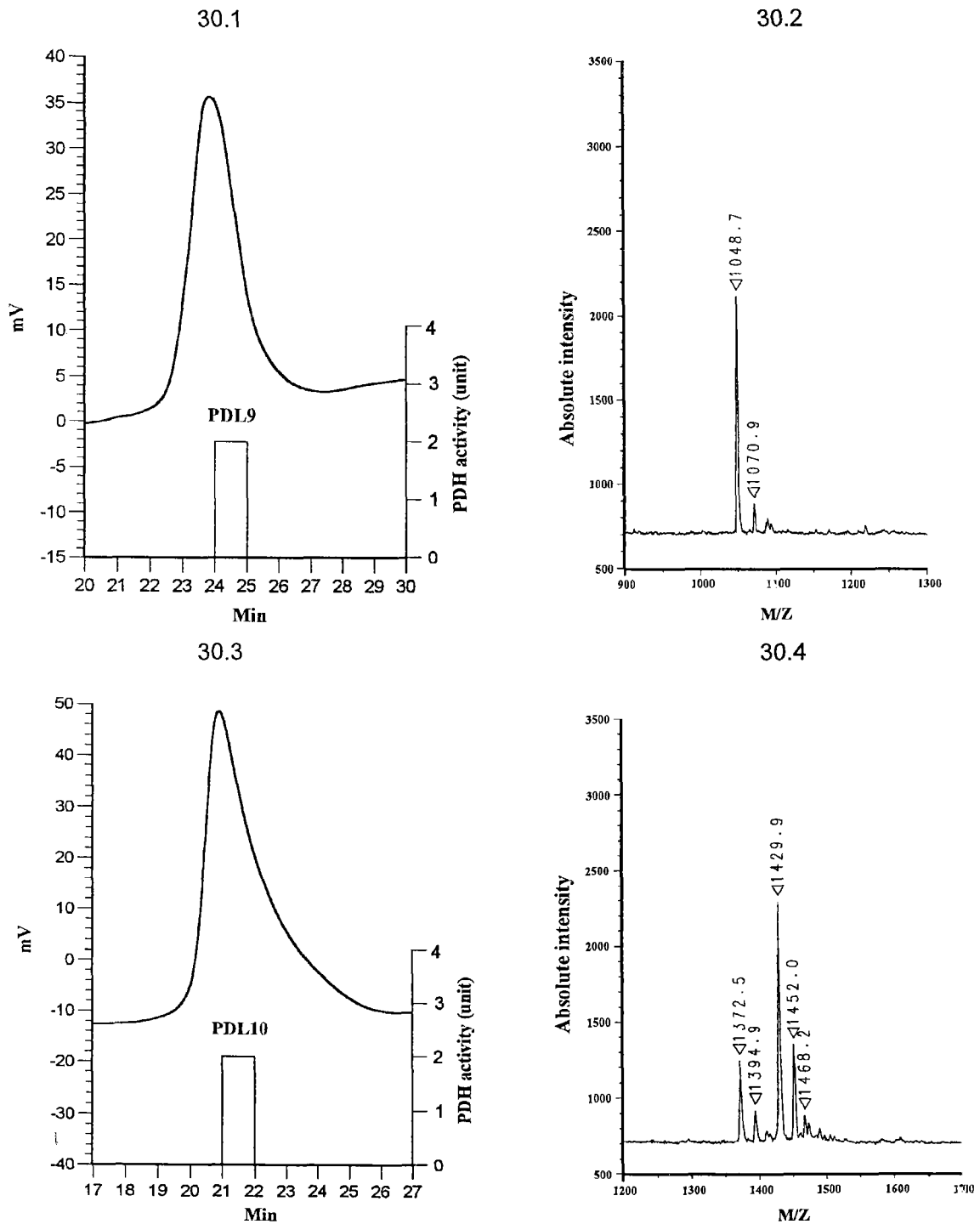
ภาพประกอบ 27 Chromatogram การทำให้บริสุทธิ์ของเปปไทด์กลุ่มที่ 5 คือ PDL8 (27.1) ในขั้นตอนที่ 5 โดยผ่านกระบวนการ RP-HPLC ใช้ Microsorb MV Cyano column ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA และ mass spectrum ของสารคล้าย PDH PDL8 (27.2)



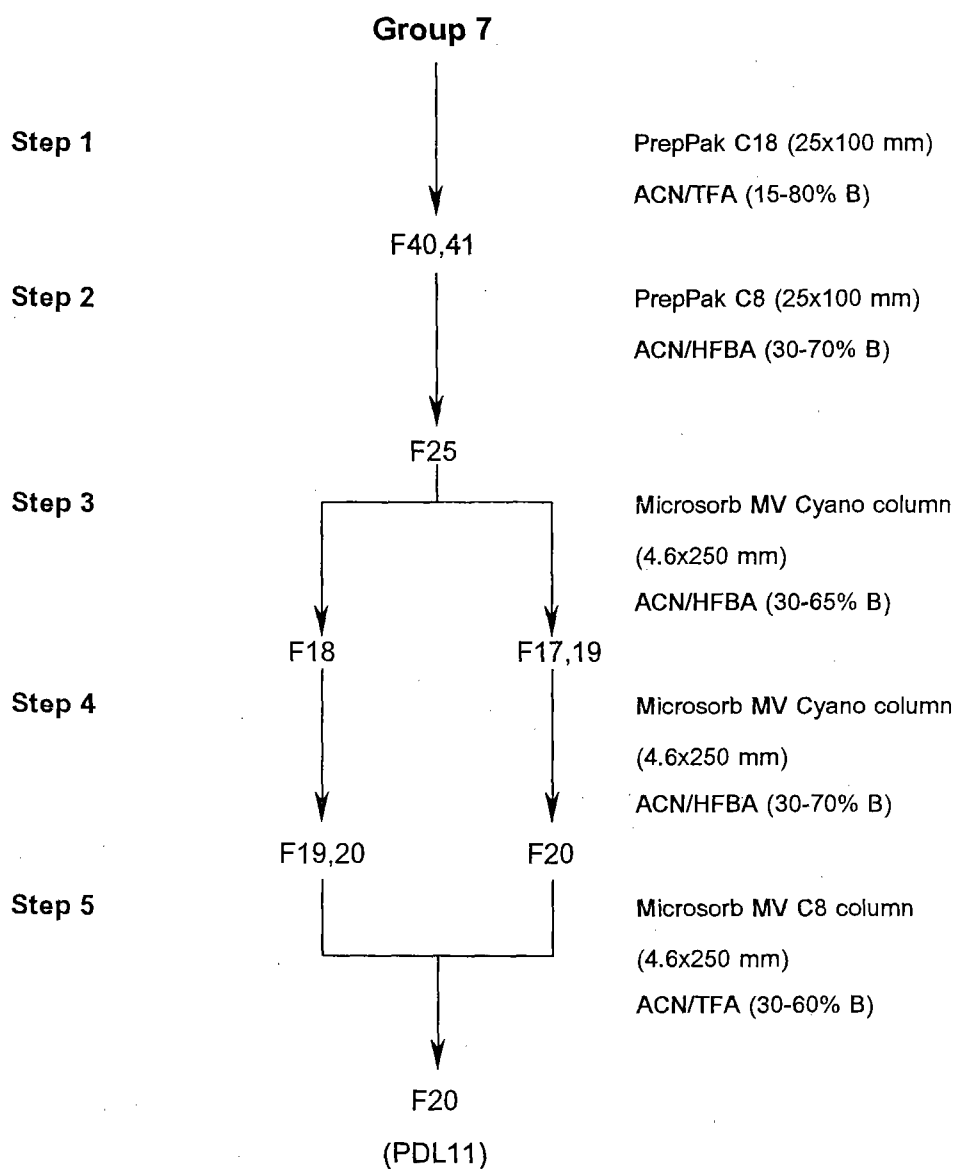
ภาพประกอบ 28 ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย PDH ด้วยกระบวนการ RP-HPLC ของสารคล้าย PDH กลุ่มที่ 6



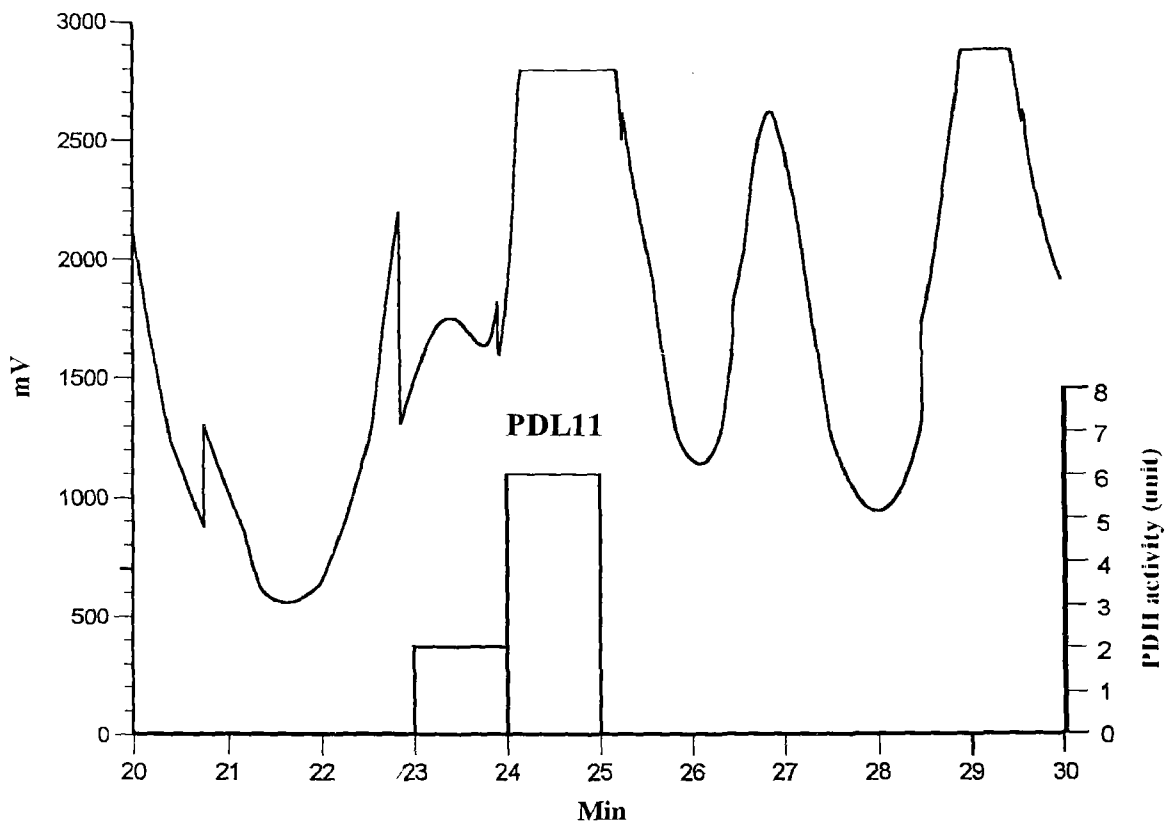
ภาพประกอบ 29 Chromatogram ของสารสกัดกลุ่มที่ 6 จากก้านตาทิ้งกุลาจำนวน 7,500 ก้านตาที่ผ่านกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 2 (PrepPak C8 column ; ระบบตัวทำละลาย ACN/HFBA) และแผนภูมิแท่งแสดงความเข้มข้นของสารคล้าย PDH ใน fraction ที่ 30-32 ตัวเลขเหนือแผนภูมิแท่งเป็นชื่อของเปปไทด์ที่สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้



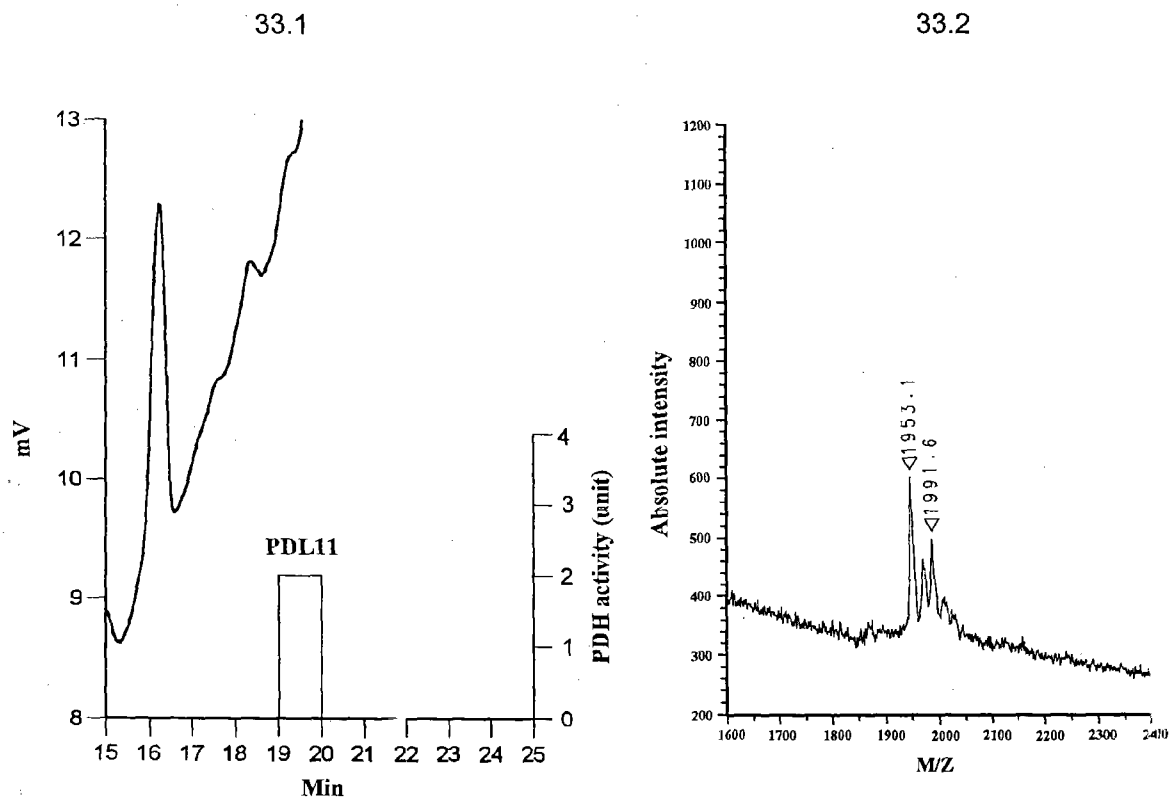
ภาพประกอบ 30 Chromatogram การทำให้บริสุทธิ์ของเปปไทด์กลุ่มที่ 6 คือ PDL9 (30.1) และ PDL10 (30.3) ในขั้นตอนที่ 5 โดยผ่านกระบวนการ RP-HPLC ใช้ Microsorb MV Cyano column ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA และ mass spectrum ของสารคล้าย PDH PDL9 (30.2) และ PDL10 (30.4)



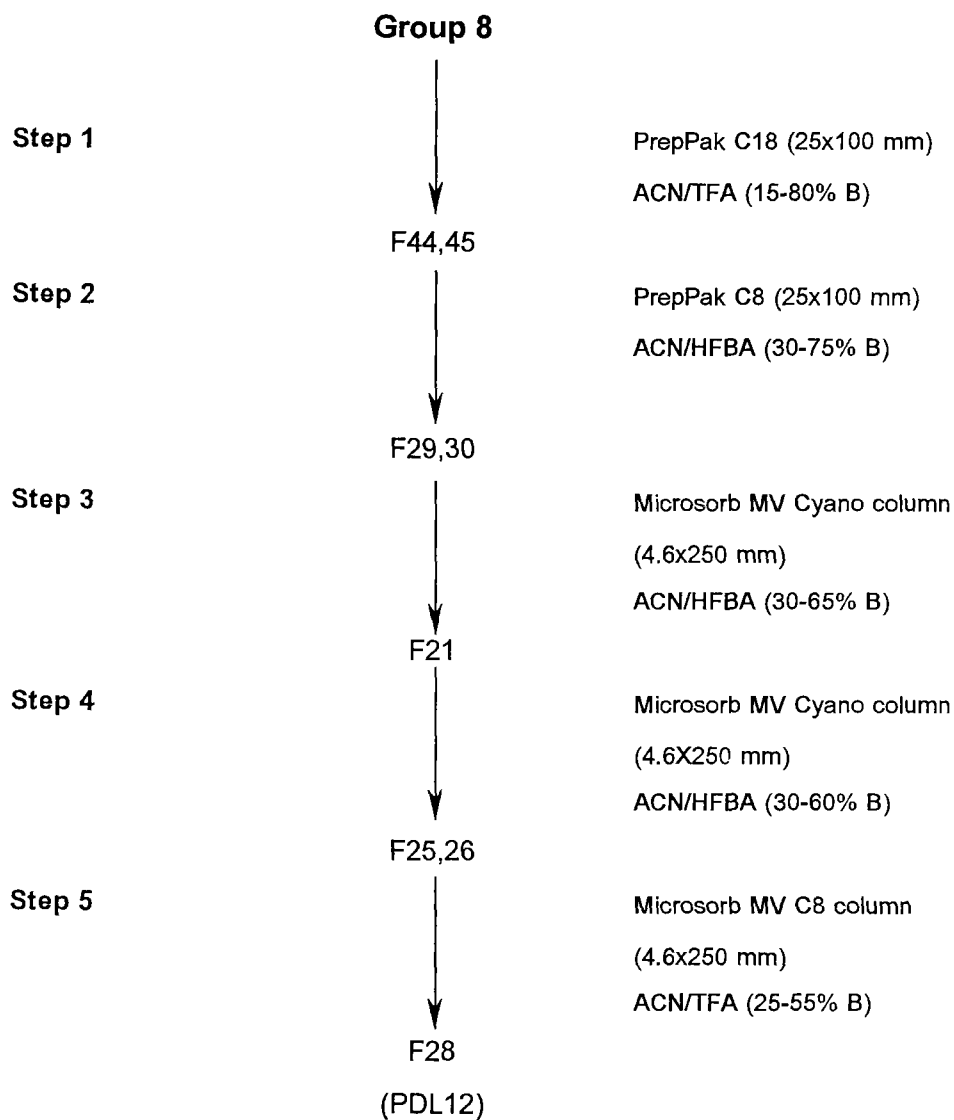
ภาพประกอบ 31 ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย PDH ด้วยกระบวนการ RP-HPLC ของสารคล้าย PDH กลุ่มที่ 7



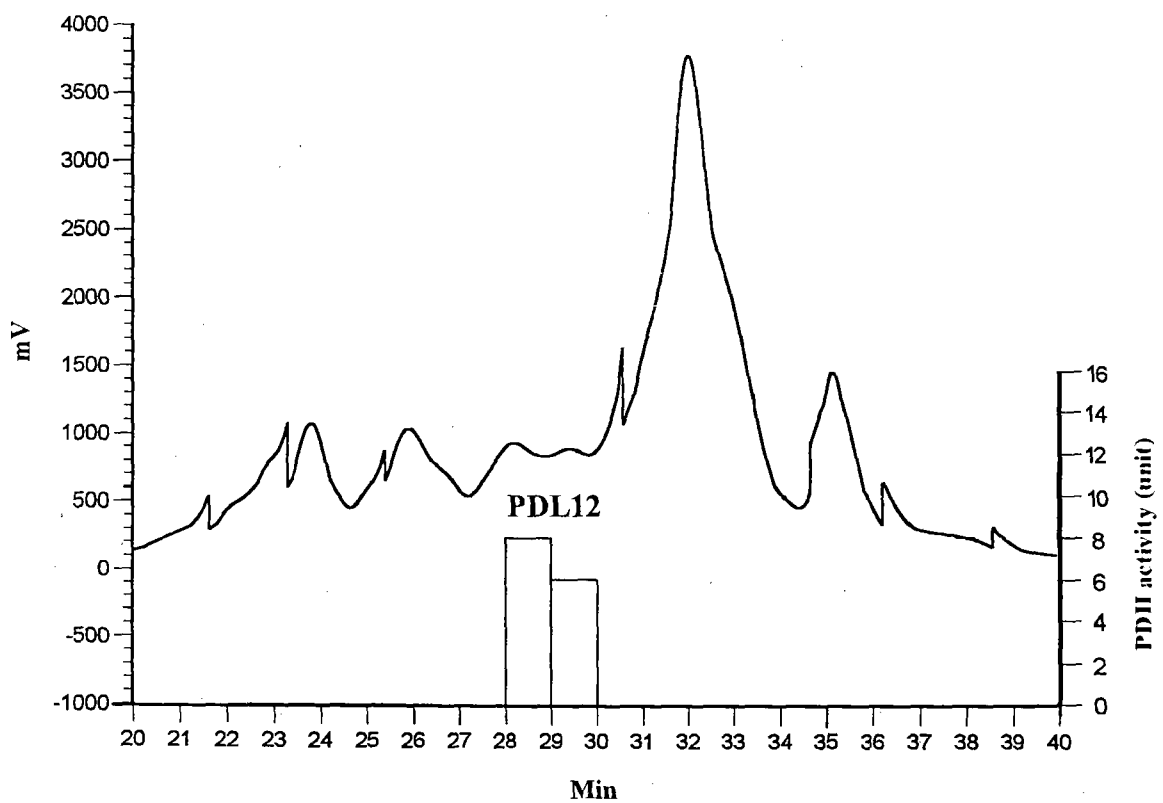
ภาพประกอบ 32 Chromatogram ของสารสกัดกลุ่มที่ 7 จากก้านตาทองกล้าดำจำนวน 7,500 ก้านตาทองกล้าดำที่ผ่านกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 2 (PrepPak C8 column ; ระบบตัวทำละลาย ACN/HFBA) และแผนภูมิแท่งแสดงความเข้มของสารคล้าย PDH ใน fraction ที่ 24-25 ตัวเลขเหนือแผนภูมิแท่งเป็นชื่อของเปปไทด์ที่สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้



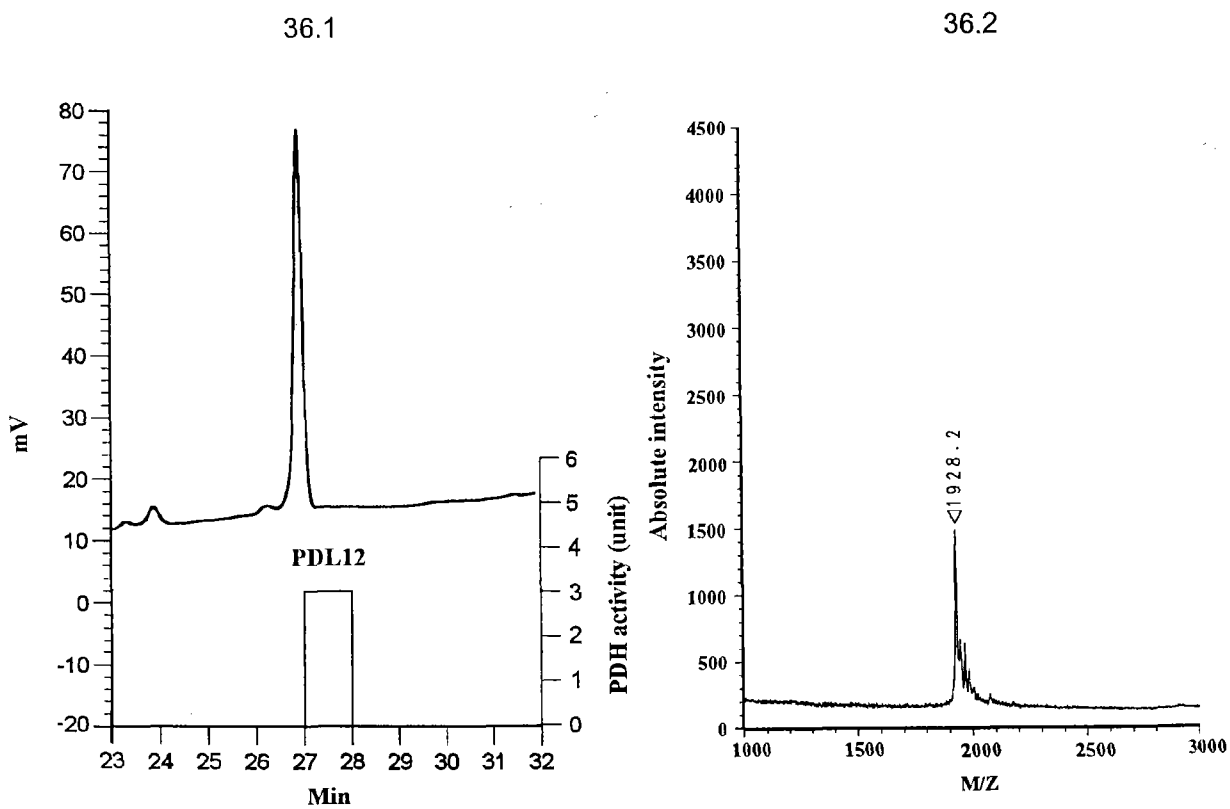
ภาพประกอบ 33 Chromatogram การทำให้บริสุทธิ์ของเปปไทด์กลุ่มที่ 7 คือ PDL11 (33.1) ในขั้นตอนที่ 5 โดยผ่านกระบวนการ RP-HPLC ใช้ Microsorb MV C8 column ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA และ mass spectrum ของสารคล้าย PDH PDL11 (33.2)



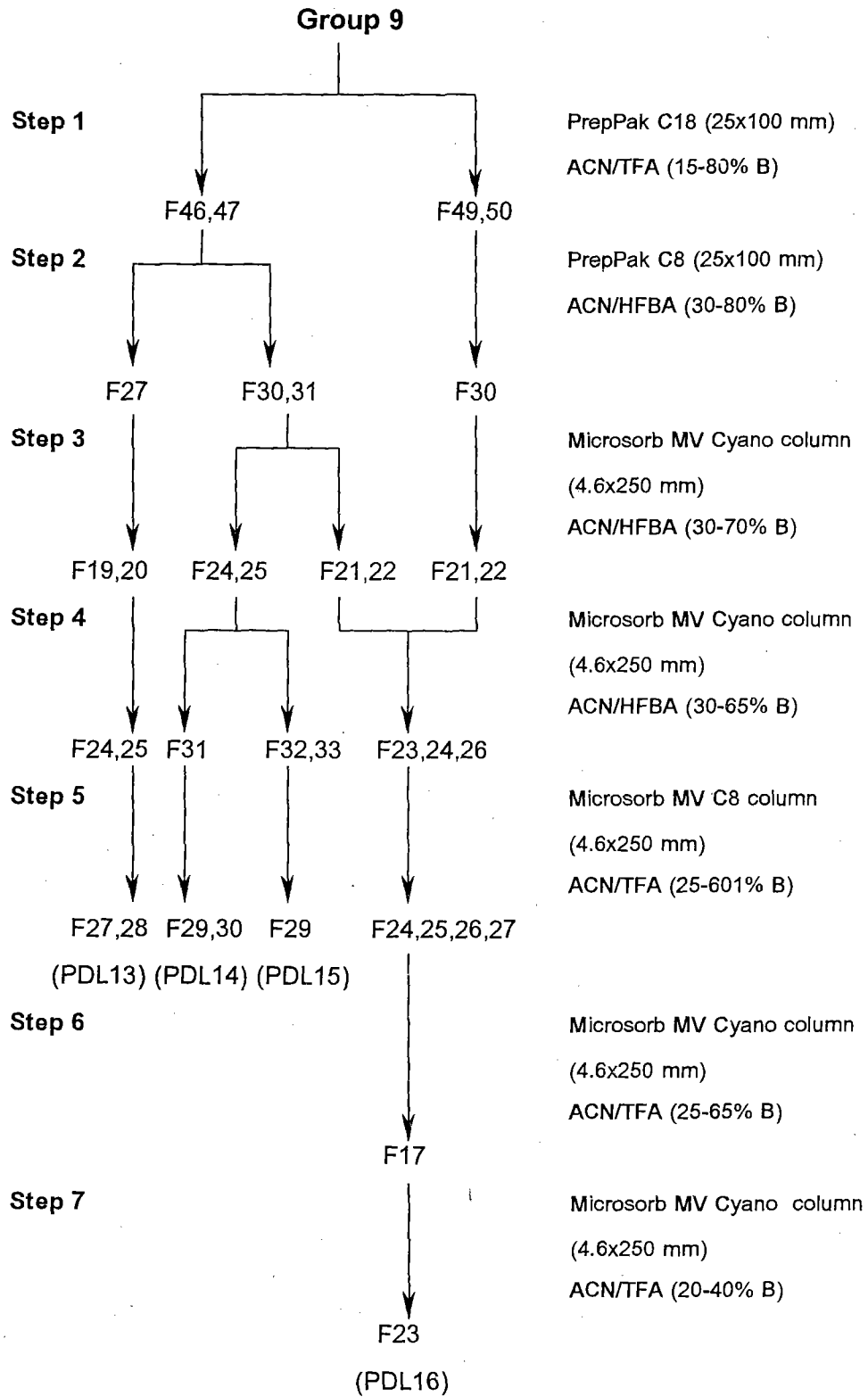
ภาพประกอบ 34 ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย PDH ด้วยกระบวนการ RP-HPLC ของสารคล้าย PDH กลุ่มที่ 8



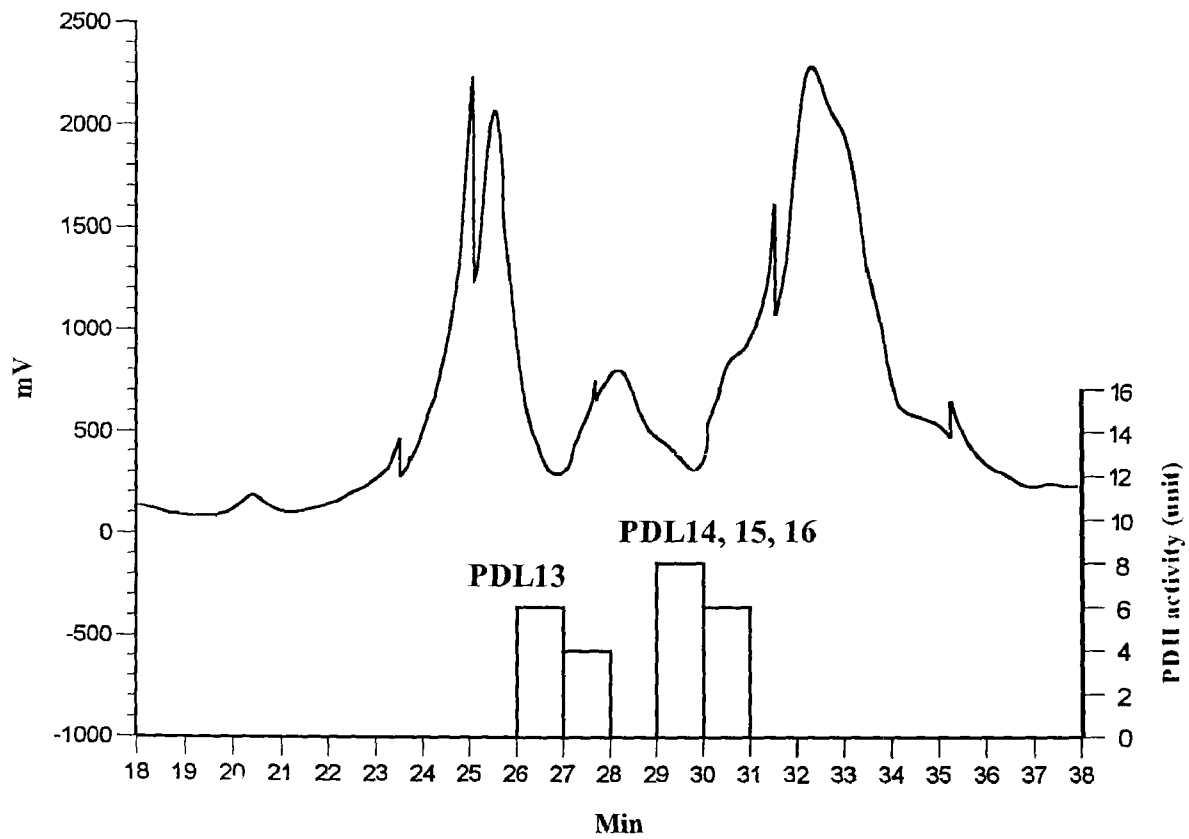
ภาพประกอบ 35 Chromatogram ของสารสกัดกลุ่มที่ 8 จากก้านตาทองกล้าดำจำนวน 7,500 ก้านตาที่ผ่านกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 2 (PrepPak C8 column ; ระบบตัวทำละลาย ACN/HFBA) และแผนภูมิแท่งแสดงความเข้มของสารคล้าย PDH ใน fraction ที่ 29-30 ตัวเลขเหนือแผนภูมิแท่งเป็นชื่อของเปปไทด์ที่สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้



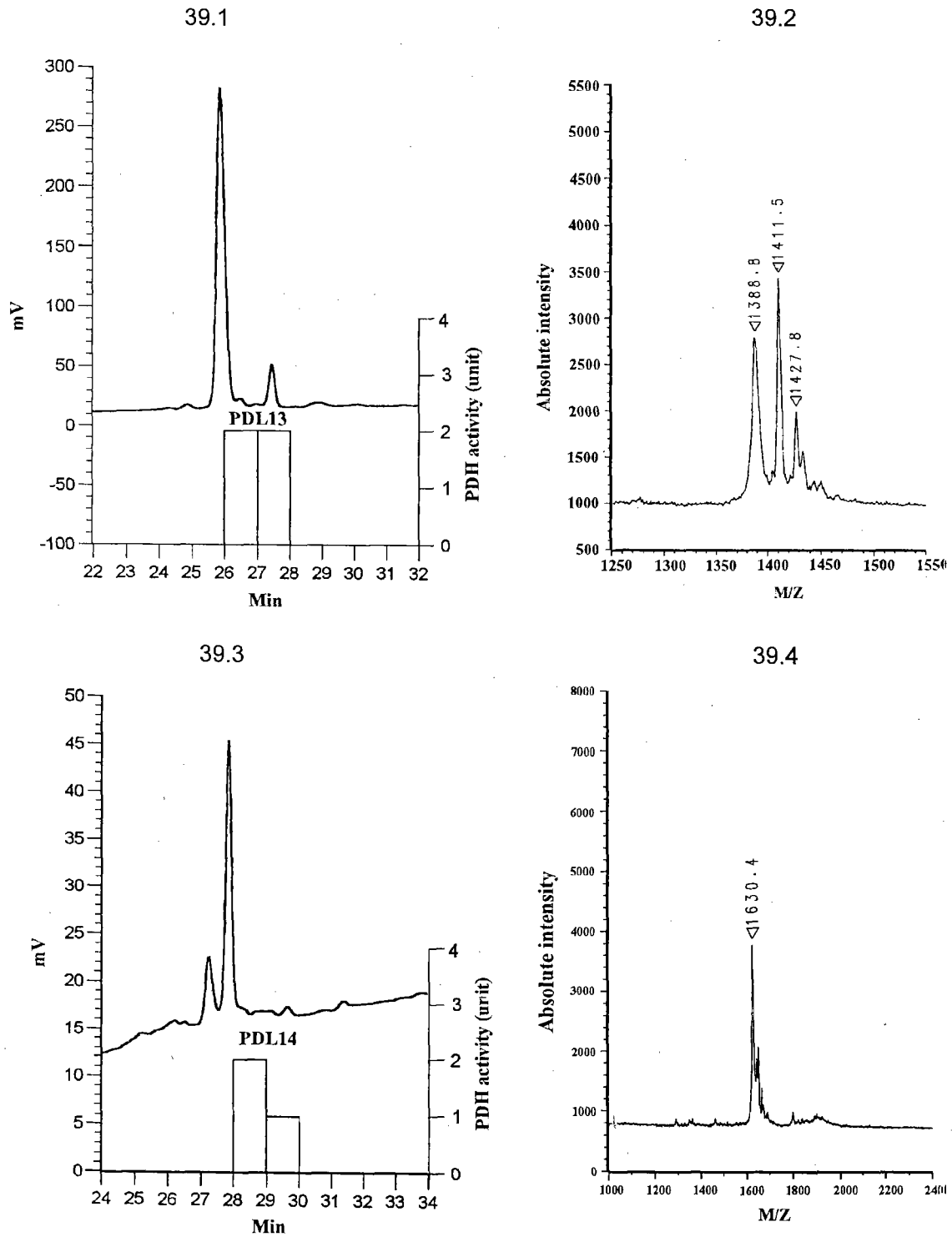
ภาพประกอบ 36 Chromatogram การทำให้บริสุทธิ์ของเปปไทด์กลุ่มที่ 8 คือ PDL12 (36.1) ในขั้นตอนที่ 5 โดยผ่านกระบวนการ RP-HPLC ใช้ Microsorb MV C8 column ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA และ mass spectrum ของสารคล้าย PDH PDL12 (36.2)



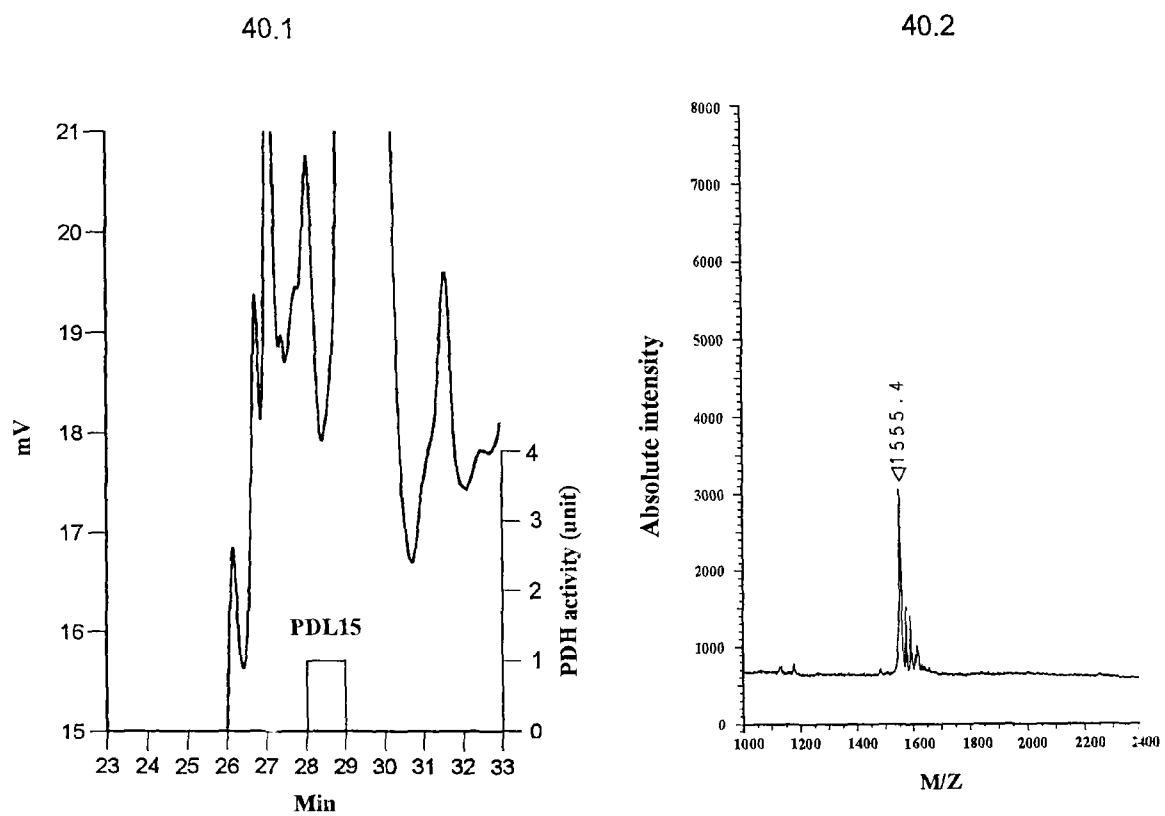
ภาพประกอบ 37 ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย PDH ด้วยกระบวนการ RP-HPLC ของสารคล้าย PDH กลุ่มที่ 9



ภาพประกอบ 38 Chromatogram ของสารสกัดกลุ่มที่ 9 จากก้านตากุ้งกุลาดำจำนวน 7,500 ก้านตาที่ผ่านกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 2 (PrepPak C8 column ; ระบบตัวทำละลาย ACN/HFBA) และแผนภูมิแท่งแสดงความเข้มของสารคล้าย PDH ใน fraction ที่ 30-31 ตัวเลขเหนือแผนภูมิแท่งเป็นชื่อของเปปไทด์ที่สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้

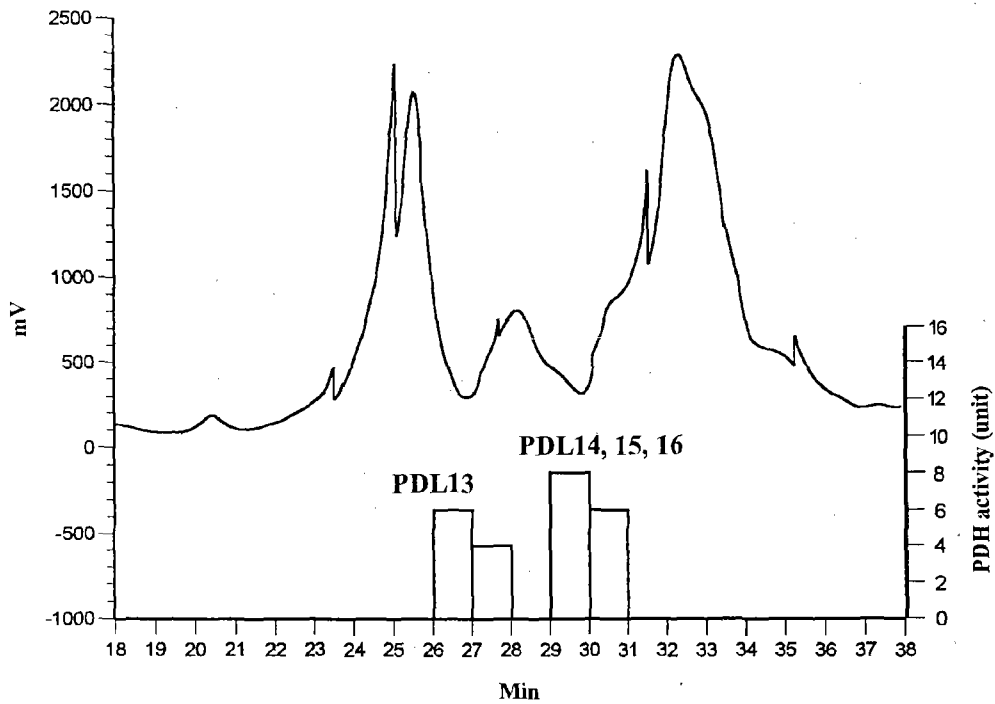


ภาพประกอบ 39 Chromatogram การทำให้บริสุทธิ์ของเปปไทด์กลุ่มที่ 9 คือ PDL13 (39.1) และ PDL14 (39.3) ในขั้นตอนที่ 5 โดยผ่านกระบวนการ RP-HPLC ใช้ Microsorb MV C8 column ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA และ mass spectrum ของสารคล้าย PDH PDL13 (39.2) และ PDL14 (39.4)

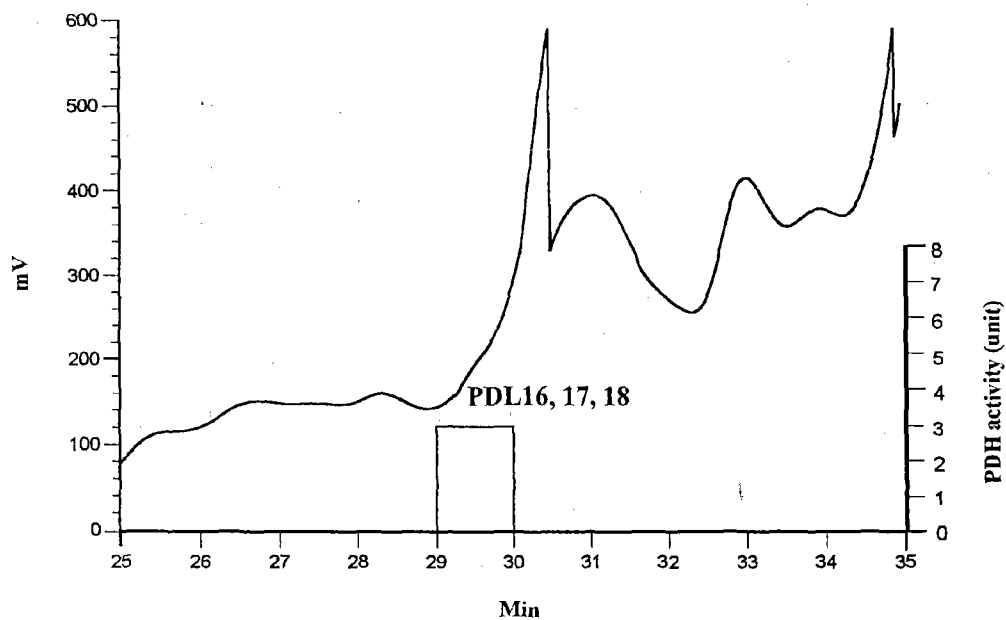


ภาพประกอบ 40 Chromatogram การทำให้บริสุทธิ์ของเปปไทด์กลุ่มที่ 9 คือ PDL15 (40.1) ในขั้นตอนที่ 5 โดยผ่านกระบวนการ RP-HPLC ใช้ Microsorb MV C8 column ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA และ mass spectrum ของสารคล้าย PDH PDL15 (40.2)

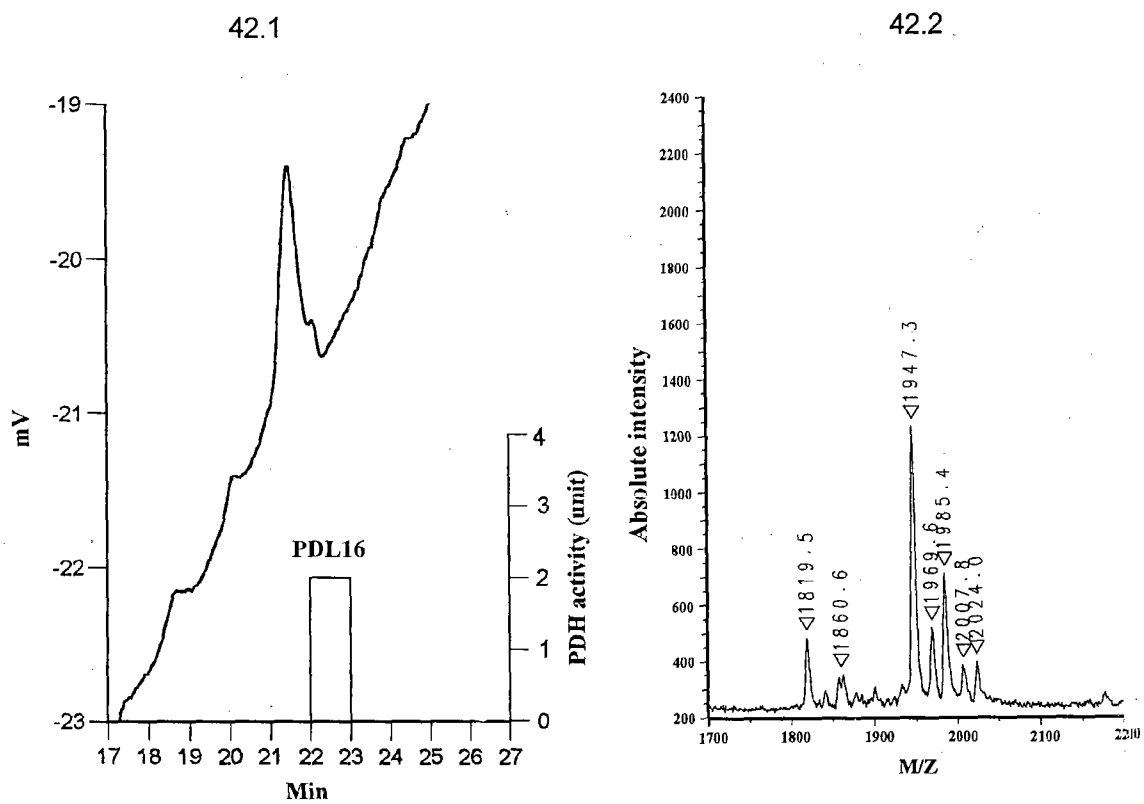
41.1



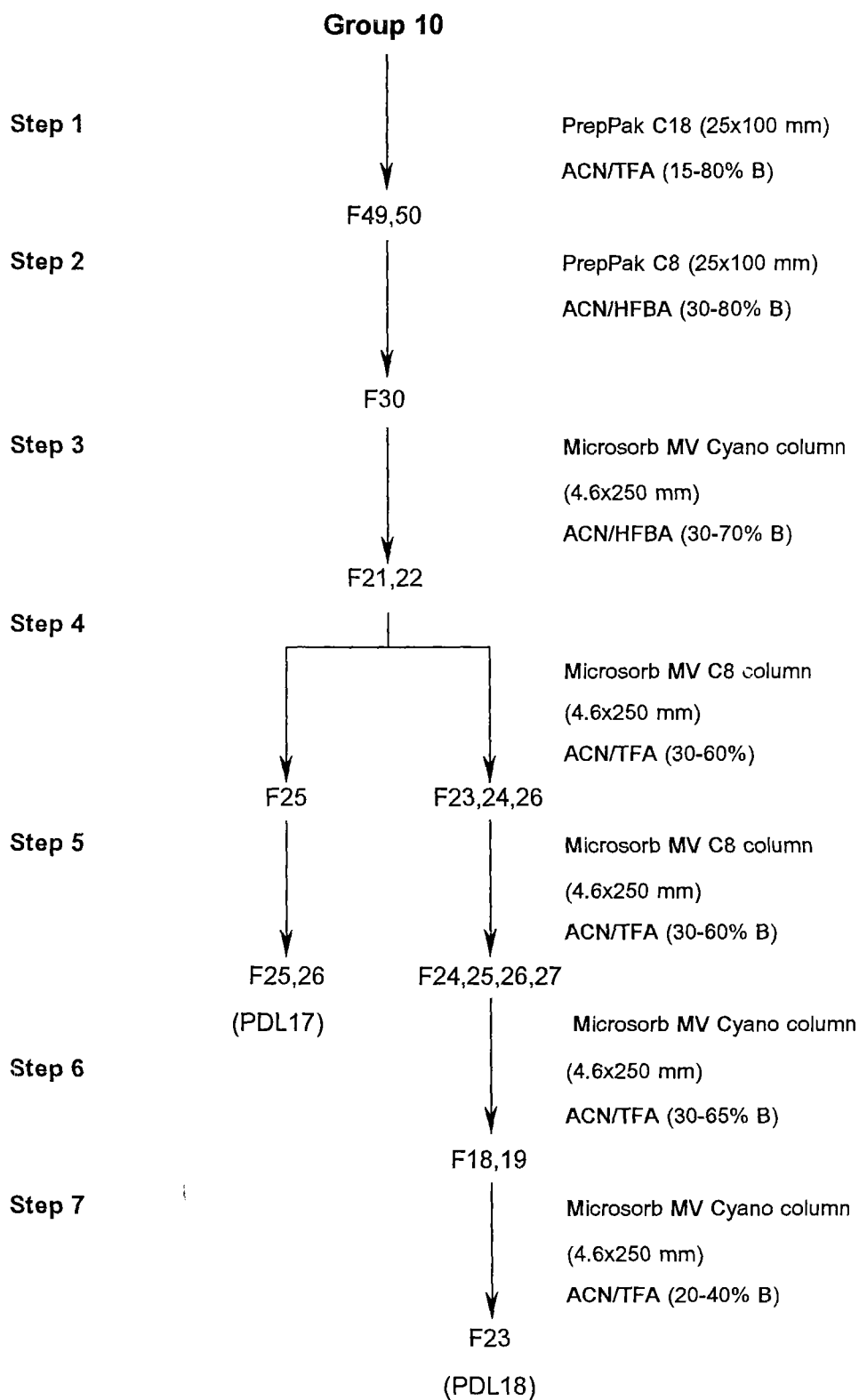
41.2



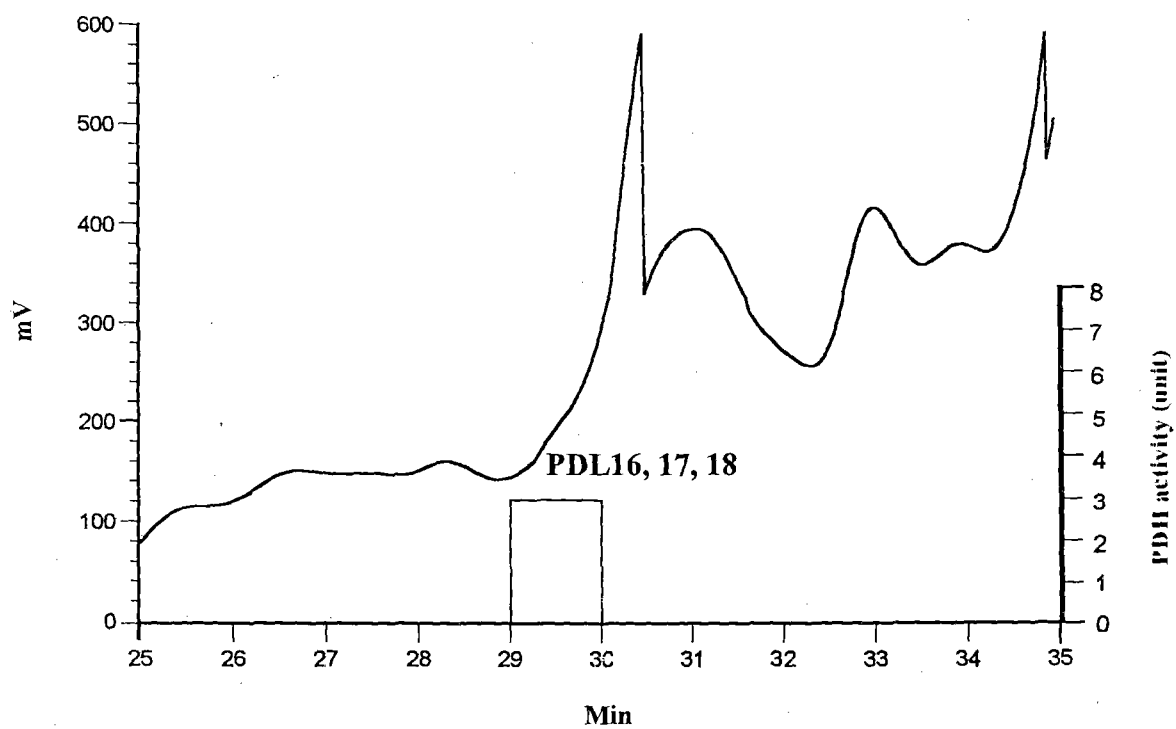
ภาพประกอบ 41 Chromatogram ของสารสกัดกลุ่มที่ 9 จากก้านตากลุ่มกุลาดำจำนวน 7,500 ก้านตาที่ผ่านกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 2 (PrepPak C8 column ; ระบบตัวทำละลาย ACN/HFBA) และแผนภูมิแท่งแสดงความเข้มของสารคล้าย PDH ใน fraction ที่ 30-31 (41.1) และ 30 (41.2) ตัวเลขเหนือแผนภูมิแท่งเป็นชื่อของเปปไทด์ที่สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้



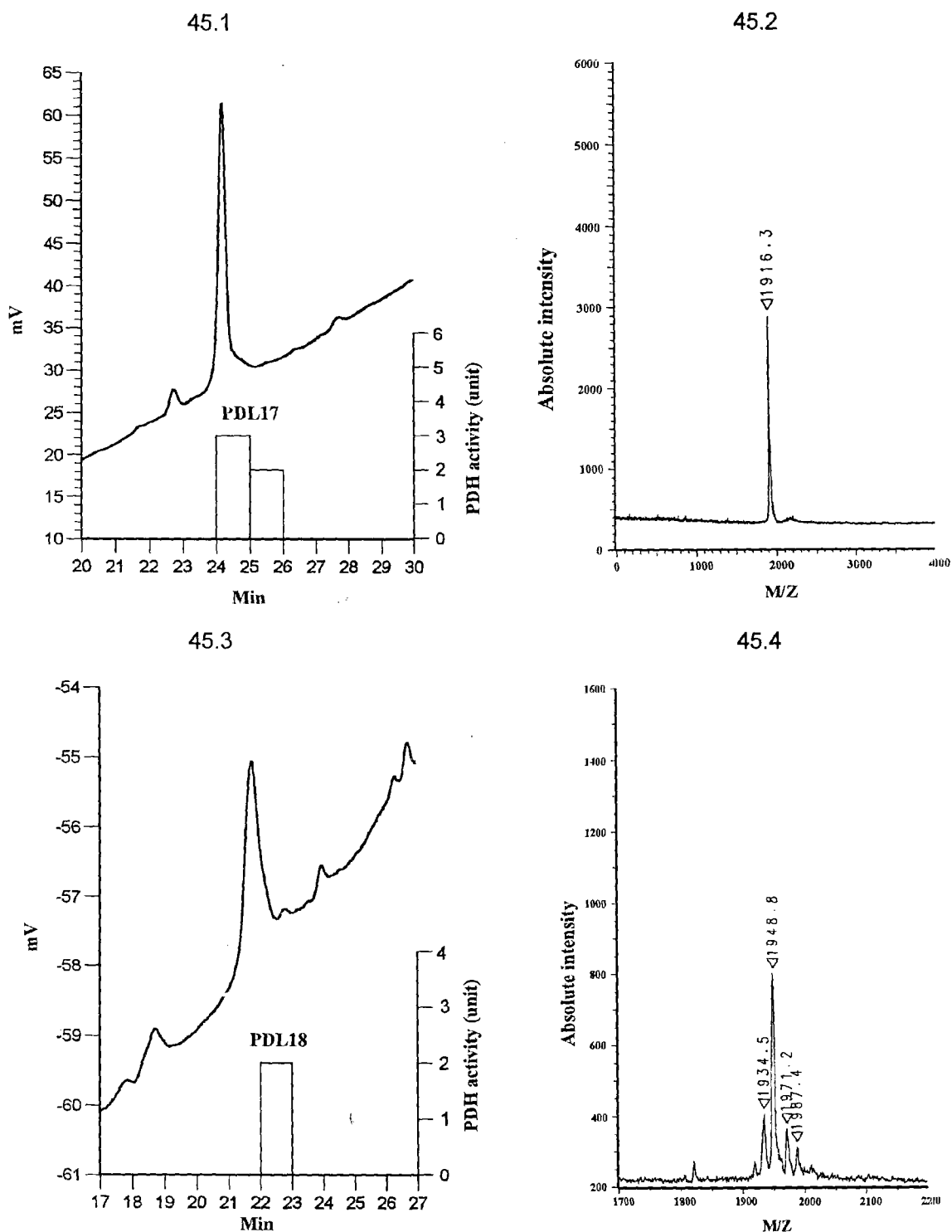
ภาพประกอบ 42 Chromatogram การทำให้บริสุทธิ์ของเปปไทด์กลุ่มที่ 9 คือ PDL16 (42.1) ในขั้นตอนที่ 7 โดยผ่านกระบวนการ RP-HPLC ใช้ Microsorb MV Cyano column ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA และ mass spectrum ของสารคล้าย PDH PDL16 (42.2)



ภาพประกอบ 43 ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย PDH ด้วยกระบวนการ RP-HPLC ของสารคล้าย PDH กลุ่มที่ 10



ภาพประกอบ 44 Chromatogram ของสารสกัดกลุ่มที่ 10 จากก้านตากุ้งกุลาดำจำนวน 7,500 ก้านตาที่ผ่านกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 2 (PrepPak C8 column ; ระบบตัวทำละลาย ACN/HFBA) และแผนภูมิแท่งแสดงความเข้มของสารคล้าย PDH ใน fraction ที่ 30 ตัวเลขเหนือแผนภูมิแท่งเป็นชื่อของเปปไทด์ที่สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้



ภาพประกอบ 45 Chromatogram การทำให้บริสุทธิ์ของเปปไทด์กลุ่มที่ 10 คือ PDL17 (45.1) และ PDL18 (45.3) ในขั้นตอนที่ 5 โดยผ่านกระบวนการ RP-HPLC ใช้ Microsorb MV C8 และ Cyano column ระบบตัวทำละลาย ACN/TFA และ mass spectrum ของสารคล้าย PDH PDL17 (45.2) และ PDL18 (45.4)

ตาราง 4 แสดงน้ำหนักโมเลกุลของสารคล้าย PDH ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยกระบวนการ RP-HPLC

| Fraction step 1 | สารคล้าย PDH | Fraction Step สุดท้าย | น้ำหนักโมเลกุล (dalton) | ความสูงของพีค (mV) |
|-----------------|--------------|-----------------------|--|--------------------|
| F23 | PDL1 | F24 | <u>1928.4</u> | 17 |
| F25-26 | PDL2 | F28 | <u>1926.6</u> , 1949.0* | 2 |
| F25-26 | PDL3 | F31 | <u>1075.5</u> , 1097.7*, 1114.0 [⊕] , 1143.3 [⊕] | 48 |
| F25-26 | PDL4 | F31 | <u>1075.3</u> , 1097.5*, 1113.5 [⊕] | 30 |
| F25-26 | PDL5 | F33 | <u>1062.1</u> , 1084.1*, 1106.3**, <u>1075.2</u> , 1097.3*, 1143.2 [⊕] | 3 |
| F29 | PDL6 | F19 | 1058.4, <u>1074.4[⊕]</u> , 1096.5*, 1112.5 [⊕] , <u>1197.9</u> , 1220.0* | 10 |
| F30-31 | PDL7 | F19 | 1045.6, <u>1061.5[⊕]</u> , 1076.1 [⊕] , 1083.8*, 1099.3 [⊕] | 33 |
| F32-33 | PDL8 | F19 | 1045.3, <u>1061.1[⊕]</u> , 1083.2*, 1099.2 [⊕] | 15 |
| F36 | PDL9 | F25 | <u>1048.7</u> , 1070.9* | 35 |
| F36 | PDL10 | F22 | <u>1372.5</u> , 1394.9*, <u>1429.9</u> , 1452.0*, 1468.2 [⊕] | 60 |
| F40-41 | PDL11 | F20 | <u>1953.1</u> , 1991.6 [⊕] | 1 |
| F44-45 | PDL12 | F28 | <u>1928.2</u> | 60 |
| F46-47 | PDL13 | F27-28 | <u>1388.8</u> , 1411.5*, 1427.8 [⊕] | 270 |
| F46-47 | PDL14 | F29-30 | <u>1630.4</u> | 28 |
| F46-47 | PDL15 | F29 | <u>1555.4</u> | 2.9 |
| F46-47 | PDL16 | F23 | 1819.5 [⊕] , 1860.6 [⊕] , <u>1947.3</u> , 1969.6*, 1985.4 [⊕] , 2007.8* [⊕] , 2024.0 ^{⊕⊕} | 2 |
| F49-50 | PDL17 | F25-26 | <u>1916.3</u> | 33 |
| F49-50 | PDL18 | F23 | 1934.5, <u>1948.8[⊕]</u> , 1971.2*, 1987.4 [⊕] | 3 |

เปปไทด์หลัก

⊕ เปปไทด์ที่อาจถูก oxidized

* อนุพันธ์ของเปปไทด์ที่มีโซเดียม

⊕ อนุพันธ์ของเปปไทด์ที่มีโปแทสเซียม

** อนุพันธ์ของเปปไทด์ที่มีโซเดียม 2 อะตอม

⊕⊕ อนุพันธ์ของเปปไทด์ที่มีโปแทสเซียม 2 อะตอม

*⊕ อนุพันธ์ของเปปไทด์ที่มีโซเดียมและโปแทสเซียม

⊕ เปปไทด์ที่มีความปนเปื้อน

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผล

จากการทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย PDH จากก้านตาของกึ่งกลาดำจำนวน 7,500 ก้านตา สามารถแยกเปปไทด์ของสารคล้าย PDH ได้บริสุทธิ์ 18 fraction ซึ่งเมื่อนำเปปไทด์ของสารคล้าย PDH ที่แยกได้ทั้งหมด 18 fraction นี้ไปวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลโดย MALDI-TOF-MS พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 1048.7-1953.1 ดาลตัน (ตาราง 4) และจากผลการทดลอง พบว่าสารคล้าย PDH ที่แยกได้มีบาง fraction มีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกันมาก ซึ่งคาดว่าสารคล้าย PDH ที่แยกได้มีบาง fraction อาจเป็นรูปแบบเดียวกัน (ความแปรปรวนของการหาน้ำหนักโมเลกุลโดย MALDI-TOF-MS มีความคลาดเคลื่อนประมาณ 0.1%) เช่น PDL3 (1075.5) กับ PDL4 (1075.3) คาดว่าอาจเป็นรูปแบบเดียวกันเพราะในขั้นตอนที่ 2 เปปไทด์เหล่านี้ปรากฏใน fraction กลุ่มเดียวกันคือ กลุ่มที่ 2 แต่อาจถูกแยกออกจากกันในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ขั้นตอนต่าง ๆ ส่วน PDL7 (1061.5) กับ PDL8 (1061.1) และ PDL16 (1947.3) กับ PDL18 (1948.8) คาดว่าอาจเป็นรูปแบบเดียวกันเพราะในขั้นตอนที่ 1 เปปไทด์เหล่านี้ปรากฏใน fraction ใกล้เคียงกัน (30-31 และ 32-33 46-47 และ 49-50) แต่ถูกจับแยกออกจากกันในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ ส่วน PDL1 (1928.4) PDL2 (1926.6) และ PDL12 (1928.2) คาดว่าน่าจะมีลำดับกรดอะมิโนแตกต่างกันเพราะ PDL1 (1928.4) และ PDL2 (1926.6) ถึงแม้ว่าจะมีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกัน และพบใน fraction กลุ่มใกล้เคียงกัน (กลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 2) ก็ตาม น่าจะมีลำดับกรดอะมิโนต่างกันเพราะมีมวลโมเลกุลต่างกัน 2 หน่วย และ retention time ในการแยกขั้นตอนสุดท้ายต่างกันอย่างชัดเจน (ภาพประกอบ 12 และ 15) ส่วน PDL2 (1926.6) และ PDL12 (1928.2) คาดว่าน่าจะมีลำดับกรดอะมิโนแตกต่างกันเพราะมีมวลโมเลกุลต่างกัน 2 หน่วย และมี retention time ในการแยกด้วย RP-HPLC ในขั้นตอนแรกแตกต่างกันอย่างชัดเจน (ภาพประกอบ 10) สำหรับ PDL1 (1928.4) และ PDL12 (1928.2) ถึงแม้ว่าจะมีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกันมากก็ตามแต่คาดว่าน่าจะมีลำดับกรดอะมิโนต่างกันเพราะมี retention time ในการแยกด้วย RP-HPLC ในขั้นตอนแรกและขั้นตอนสุดท้ายต่างกันอย่างชัดเจน (ภาพประกอบ 10, 12 และ 34)

จากผลการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของสารคล้าย PDH ด้วย MALDI-TOF-MS พบว่า fraction บาง fraction มีพีคของสารที่มีมวลโมเลกุลแตกต่างกันประมาณ 22 หรือ 38 ดาลตัน ประปรมาด้วย เช่น PDL2 มีน้ำหนักโมเลกุล 1926.2 และ 1949.0 ดาลตัน PDL4 มีน้ำหนักโมเลกุล 1075.3, 1097.5 และ 1113.5 ดาลตัน เป็นต้น (ตาราง 4 และภาพประกอบ 12-45) ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นอนุพันธ์ของสารคล้าย PDH ที่มีโซ่เดียมหรือโปแทสเซียมประกอบอยู่ในปริมาณต่างๆ กัน

จาก Mass profile ของ PDL3, PDL5 และ PDL16 (ภาพประกอบ 17, 18 และ 42) ซึ่งให้เห็นว่าใน fraction ประกอบด้วยเปปไทด์มากกว่า 1 ชนิด แต่เนื่องจากปริมาณของสารเหลือ น้อยมากไม่สามารถแยกต่อให้บริสุทธิ์ขึ้นได้ และนอกจากนี้จะเห็นได้ว่าปริมาณของเปปไทด์ หลักสูงกว่าเปปไทด์ที่ปนเปื้อนมากคาดว่าน่าจะสามารถนำไปหาลำดับกรดอะมิโนได้

จากผลการทดลองนี้ทำให้ทราบว่าเปปไทด์ของสารคล้าย PDH ในกุ้งกุลาดำมีอยู่ หลายรูปแบบ สำหรับเปปไทด์ที่ทำให้บริสุทธิ์จากการทดลอง 18 fraction นี้คาดว่าน่าจะมีลำดับ กรดอะมิโนต่างจากเปปไทด์ในรายงานที่พบมา (ตาราง 2) จะเห็นได้ว่า peptide คล้าย PDH ที่ ได้บาง fraction มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 1926.6-1928.4 ดาลตัน ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกับ β -PDH (กุ้ง *Pacifastacus leniusculus*, ปู *Uca pugilator*, *Cancer magister* และ *Carcinus maenus*) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 1927.2 ดาลตัน (Lohr and others. 1993) และมีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกับกุ้ง *Penaeus aztecus* และ *Penaeus vannamei* (1927.27 ดาลตัน) ซึ่งคาดว่าน่าจะมีการจัดเรียงตัวของลำดับกรดอะมิโนเหมือนกัน หรืออาจแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย ส่วนสารคล้าย PDH บาง fraction ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 1916.3 ดาลตัน ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกับกุ้ง *Penaeus japonicus* (1914.27 ดาลตัน) ซึ่งคาดว่าอาจจะมีการเรียงตัวของลำดับกรดอะมิโนคล้ายคลึงกันหรือแตกต่างกัน 1-2 ตำแหน่ง และจากรายงานลำดับกรดอะมิโนที่พบในสัตว์ต่างๆ คือ ในกุ้ง *Pandalus borealis* มี 1 รูปแบบ (Fernlund. 1976) ในกุ้ง *Pandalus jordani* มี 3 รูปแบบ (Rao and Riehm. 1993; Desmoucellles-Carette, Sellos and Van Wormhoudt. 1996) ในกุ้ง *P. aztecus* มี 1 รูปแบบ (Keller. 1992; Rao and Riehm. 1993) ในกุ้ง *P. vannamei* มี 2 รูปแบบ (Desmoucellles-Carette, Sellos and Van Wormhoudt. 1996) ในกุ้ง *P. japonicus* มี 2 รูปแบบ (Yang and others. 1999) ในกุ้ง crayfish *Procambarus clarkii* มี 1 รูปแบบ (McCallum and others. 1991) ในกุ้ง crayfish *Orconectes limosus* มี 1 รูปแบบ (De Kleijn and others. 1993) ในกุ้ง crayfish *Orconectes immunis* มี 1 รูปแบบ (Rao and Riehm. 1993, Desmoucellles-Carette, Sellos and Van Wormhoudt. 1996) ในกุ้ง *P. leniusculus* มี 1 รูปแบบ (Rao and Riehm. 1993; Desmoucellles-Carette, Sellos and Van Wormhoudt. 1996) ในปูก้ามดาบ *U. pugilator* มี 1 รูปแบบ (Rao and others. 1985; Keller. 1992) ในปู *C. magister* มี 1 รูปแบบ (Kleinholz and others. 1986) ในปู *C. maenas* มี 1 รูปแบบ (Klein and others. 1992) ในปู *Callinectes sapidus* มี 2 รูปแบบ (Mohrher and others. 1990; Klein and others. 1994) ในปู *Carausius morosus* มี 1 รูปแบบ (<http://www.biologie.uniregenburg.de/Zoologie/Schneuwly/Hofbauer/chrono.htm>) ในจิ้งหรีด *Acheta domesticus* มี 1 รูปแบบ (Rao and others. 1986; Keller. 1992) ในตั๊กแตน *Romalea microptera* มี 1 รูปแบบ (Rao and others. 1987; Keller. 1992) ใน *Periplaneta americana* มี 1 รูปแบบ (Rao and Riehm. 1993; Desmoucellles-Carette, Sellos and Van Wormhoudt. 1996) ในแมลงหริ่ง

Drosophila melanogaster มี 1 รูปแบบ ([Http://www.biologie.uni-regensburg.de/Zoologie/Schneuwly/Hofbauer/chrono.htm](http://www.biologie.uni-regensburg.de/Zoologie/Schneuwly/Hofbauer/chrono.htm); Park Hall. 1998) และใน isopod *Armadillidium vulgare* มี 1 รูปแบบ (Desmoucellles-Carette, Sellos and Van Wormhoudt. 1996)

จากสารคล้าย PDH ที่แยกและทำให้บริสุทธิ์ได้ทั้งหมด 18 fraction คาดว่าน่าจะได้สารคล้าย PDH ที่มีรูปแบบแตกต่างกันออกไปประมาณ 10 ตัว โดยมีเปปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกับ PDH ที่มีรายงานการตรวจพบในสัตว์ต่างๆ ประมาณ 6 ตัว ส่วนที่เหลือ คาดว่าน่าจะเป็นสารคล้าย PDH รูปแบบใหม่ หรืออาจจะเป็นสารคล้าย PDH เหล่านี้ที่โดนย่อยสลายไปก็ได้ ซึ่งจะต้องนำไปหาลำดับกรดอะมิโนต่อไป

Dot-ELISA (Sithigorngul, Stretton and Cowden. 1991) เป็นวิธีที่ง่าย สะดวก ไม่สิ้นเปลือง และสามารถรู้ผลภายใน 24 ชั่วโมงโดยมีความไวในการตรวจสอบเทียบเท่า RIA แต่ไม่มีอันตรายเพราะไม่ต้องใช้สารกัมมันตภาพรังสี จึงสามารถใช้วิธีนี้ในการติดตามสารเปปไทด์ในระหว่างการทำให้บริสุทธิ์ได้หลายรูปแบบในเวลาเดียวกัน (Sithigorngul and Stretton. 1995) ในการทดลองนี้จะนำเปปไทด์ที่แยกได้จากแต่ละขั้นตอนของการทำให้บริสุทธิ์ไปวิเคราะห์หาหน้าหนักโมเลกุลโดยใช้ MALDI-TOF-MS เพื่อดูว่ามีสารอื่นปนเปื้อนในเปปไทด์หรือไม่ วิธีนี้มีข้อดีคือสามารถเตรียมหลาย ๆ ตัวอย่างได้พร้อม ๆ กัน ทำให้การวิเคราะห์สะดวก รวดเร็ว มีความไว (sensitivity) สูง จึงสามารถใช้กับสารที่มีปริมาณน้อยได้ดี เหมาะสำหรับการวิเคราะห์สารประกอบที่ซับซ้อน (complex mixture) หรือสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (Barh, Karas and Hillenkamp. 1994)

จากการทดลองคาดว่ายังมีเปปไทด์ของสารคล้าย PDH อีกหลายรูปแบบที่ยังไม่สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ เพราะจากขั้นตอนการแยกด้วยกระบวนการ RP-HPLC ยังมี fraction ที่ให้ผลบวกต่อ anti-PDH antiserum บาง fraction ที่ยังไม่สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ เนื่องจากมีปริมาณสารปนเปื้อนสูง และปริมาณของเปปไทด์ลดน้อยลงในแต่ละขั้นตอนของการทำให้บริสุทธิ์จนยากที่จะตรวจสอบโดยวิธี dot-ELISA ได้ (สังเกตจากความเข้มสีของจุดจางมาก) ถึงแม้จะใช้ก้านตาจำนวนมากสำหรับทดลองก็ตาม การที่ปริมาณของเปปไทด์ลดน้อยลงอาจเกิดจากการสูญเสียของเปปไทด์ในระหว่างการทำให้บริสุทธิ์ ถ้านำไปทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่อไป อาจมีปริมาณของสารน้อยมากจนยากที่จะตรวจสอบด้วยวิธี dot-ELISA แต่อย่างไรก็ตามจากการทดลองจะสังเกตพบว่ามี fraction ที่มีสารคล้าย PDH ไปผ่านการทำให้บริสุทธิ์มากขึ้น ความเข้มสีของจุดของสารคล้าย PDH ที่ตรวจสอบด้วยกระบวนการ dot-ELISA จะลดลง จะต้องใช้ปริมาณของสารในการตรวจสอบเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ เพื่อจะได้เห็นความเข้มสีของจุดเปปไทด์ได้ชัดเจนขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับ การทำให้บริสุทธิ์ด้วยกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนแรกจะเห็นว่า จะใช้ปริมาณของสารในการตรวจสอบน้อย (ประมาณ 20 ก้านตา) ให้ผลความเข้มสีของจุดสูงกว่าในขั้นตอนที่ 5-7 ที่ต้องใช้ถึง 75-262.5 ก้านตา ซึ่งความเข้มสีของจุดของเปปไทด์ที่จางลงนี้น่าจะเกิดจากการสูญเสียของเปปไทด์บางส่วนเช่น อาจจะมีสารบางส่วนติด

อยู่กับหลอดที่ใช้เก็บสารในระหว่างขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ หรือเกิดการสูญหายของเปปไทด์ ในส่วนด้านข้างพีค และสูญเสียเปปไทด์จากการแบ่งสารละลายบางส่วนไปตรวจหาสารคล้าย PDH ในระหว่างขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ ทำให้ปริมาณเปปไทด์ที่แยกได้ลดน้อยลง และจากการตรวจดูลักษณะของ mass profile ที่ได้จากตัวอย่างใน fraction ที่คาดว่าแยกสารคล้าย PDH ได้บริสุทธิ์ โดยพบว่าในแต่ละ fraction ให้พีคที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างๆ กันประมาณ 22, 16 หรือ 38 ดาลตัน ดังนั้นจึงคาดว่าในระหว่างการทำให้บริสุทธิ์อาจมีหมู่ไซเดียมและโปแทสเซียมมาจับ หรือเกิดการ oxidation ของกรดอะมิโนบางตัว ทำให้คุณสมบัติในการจับ antibody เปลี่ยนไป จึงต้องเพิ่มปริมาณของสารในการตรวจสอบเพิ่มมากขึ้นจึงเป็นไปได้ว่าจะมีเปปไทด์ของสารคล้าย PDH อีกหลายรูปแบบที่ยังไม่สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ เพราะปริมาณเปปไทด์ที่ถูกแยก ลดน้อยลงจนความไวในการตรวจสอบด้วย dot-ELISA ลดลง จนยากที่จะตรวจสอบได้

การติดตามสารคล้าย PDH โดยใช้วิธี dot-ELISA เป็นการประมาณด้วยสายตาโดยดูจากความเข้มสีของจุด ซึ่งไม่ละเอียดพอ ทำให้มีความผิดพลาดในการประมาณค่าได้มาก สำหรับการทดลองนี้ยังไม่สามารถประมาณปริมาณของสารคล้าย PDH ที่บริสุทธิ์ในปริมาณที่แน่นอนได้เนื่องจากไม่มีเปปไทด์ PDH มาตรฐานที่เจอจางในระดับต่างๆ ซึ่งในการเปรียบเทียบความเข้มสีของจุดของสารคล้าย PDH ที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี dot-ELISA โดยจะประมาณปริมาณของสารคล้าย PDH เปรียบเทียบกับปริมาณของเปปไทด์ FMRFamide มาตรฐานที่เจอจางในระดับต่างๆ (จิสต์กัจ ฟูบลิ้ม. 2542) แทนและจากการประมาณปริมาณของสารคล้าย PDH นี้จะเห็นได้ว่าสารที่ได้นี้มีปริมาณน้อยเกินกว่าจะนำไปหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีต่างๆ ได้

การศึกษาในครั้งนี้จึงเป็นแนวทางในการทราบขั้นตอนการแยกและทำให้บริสุทธิ์ของสารคล้าย PDH โดยสารนี้ยังคงสภาพ และยืนยันประสิทธิภาพของวิธี dot-ELISA (Sithigorngul, Stretton and Cowden. 1991) ในการติดตามสารนี้ในระหว่างการทำให้บริสุทธิ์ ซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายสะดวก ไม่สิ้นเปลืองสารเคมี และใช้สารในปริมาณน้อยกว่าวิธีอื่นในการตรวจหาสารคล้าย PDH ซึ่งวิธีนี้มีความไวในการตรวจสอบและใช้สารน้อยกว่าวิธี bioassay โดยมีความไวในการตรวจสอบเทียบเท่าวิธี RIA แต่ไม่มีอันตรายเพราะไม่ต้องใช้สารกัมมันตภาพรังสี

การแยกและการทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย PDH จากก้านตากุ้งกุลาดำจะสามารถนำไปสู่การหาลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโน อันเป็นพื้นฐานสำคัญในการศึกษาถึงการทำงานและบทบาทของเปปไทด์เหล่านี้ที่มีผลต่อกระบวนการทางสรีรวิทยาและการดำรงชีวิตของกุ้งกุลาดำ ซึ่งจะเป็นแนวทางที่จะศึกษาถึงวิวัฒนาการของฮอร์โมนในกลุ่ม PDH ในสัตว์ต่างๆ นอกจากนี้ยังเป็นแนวทางในการศึกษาบทบาทและความสัมพันธ์ในการทำงานของสารคล้าย PDH รูปแบบต่างๆ ว่ามีบทบาทแตกต่างกันหรือไม่ และการที่มีเปปไทด์คล้ายๆ กันเป็นจำนวนหลายๆ รูปแบบมีความสำคัญอย่างไร ซึ่งนอกจากจะให้ความรู้ในแง่วิวัฒนาการของยีนแล้วยังเป็นประโยชน์สำหรับการสังเคราะห์เปปไทด์รูปแบบต่างๆ และการผลิต monoclonal antibody เพื่อใช้ในการตรวจสอบสารคล้าย PDH ในสัตว์ต่างๆ ต่อไปได้

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

- คมสัน ลีลาคหกิจ. (2539). "การเคลื่อนไหวในแวดวงวิชาการ เขาซื้อขายกึ่งกันอย่างไร," *วารสารการประมง*. 49(5) : 465-468.
- โครงการหนังสือเกษตรชุมชน. (2533). *ฟาร์มกุ้งทะเล*. หน้า 1-10. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : เพรสโปรดักส์.
- จิระศักดิ์ ผู้ปลื้ม. (2542). *การแยกและการทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย FMRFamide จากก้านตาของ กุ้งกุลาดำ*. ปริญญาโท วท.ม. (เคมีชีวภาพ). กรุงเทพฯ : บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. ถ่ายเอกสาร.
- บรรจง เทียนสงฆ์. (2530). *การเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล*. หน้า 1-35. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : อักษรเจริญทัศน์.
- ปัญญา สุวรรณสมุทร. (2534). *กุ้งแชบ๊วยและกุ้งกุลาดำ*. หน้า 7-9. กรุงเทพฯ : โครงการหนังสือเกษตรชุมชน.
- ปิยพงศ์ โชติพันธ์. (2529). *การเลี้ยงกุ้ง*. หน้า 27-30. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : โครงการคู่มือการประกอบอาชีพสำหรับประชาชนของศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ประจวบ หล้าอุบล. (2528). *วงจรชีวิตของกุ้งทะเล*. หน้า 114-122. กรุงเทพฯ : ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- วัลลภ คงเพิ่มพูน. (2531). *กุ้งกุลาดำ*. หน้า 5-39. กรุงเทพฯ : โครงการหนังสือเกษตรชุมชน.
- สุนิสา แสงมงคลพิพัฒน์. (2536). *การตรวจหาฟิگเมนต์ดีสเพอร์ซิงฮอร์โมนในก้านตาของ กุ้งก้ามกราม กุ้งกุลาดำและกุ้งตะกาดด้วยวิธีอิมมูโนไซโตเคมีสทรี*. ปริญญาโท วท.ม. (เคมีชีวภาพ). กรุงเทพฯ : บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. ถ่ายเอกสาร.
- สุนิสา แสงมงคลพิพัฒน์, วีระวรรณ สิทธิกรกุล และไพศาล สิทธิกรกุล. (2537). "การตรวจหาสารคล้ายฟิگเมนต์ดีสเพอร์ซิงฮอร์โมนในก้านตาของกุ้งก้ามกรามด้วยวิธีอิมมูโนไซโตเคมีสทรี," *วารสารวิทยาศาสตร์ มศว*. 10(1) : 34-43.
- Bellon-Humbert, C., Van Herp, F. and Schooneveld, H. (1986). "Immunocytochemical Study of the Red Pigment Concentrating Material in the Eyestalk of the Prawn *Palaemon serratus* Pennant Using Rabbit Antisera Against the Insect Adipokinetic Hormone," *Biol. Bull.* 171 : 647-659.

- Bahr, U., Karas, M. and Hillenkamp, F. (1994). "Analysis of Biopolymers by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI) Mass Spectrometry," in : *Microcharacterization of Protein*. Kellner, R., Lottspeich, F. and Meyer, H. E. (eds.). p.149-164. New York : VCH Publishers Inc.
- Beltz, B.S. (1988). "Crustacean Neurohormones," in : *Endocrinology of Selected Invertebrate Types*. Laufer, H. and Downer, R.G.H. (eds.). Vol.2. p.235-258. New York : A. R. Liss.
- Chang, E.S., Bruce, M.J. and Newcomb, R.W. (1987). "Purification and Amino Acid Composition of a Peptide with Molt-Inhibiting Activity from the Lobster, *Homarus americanus*," *Gen. Comp. Endocrinol.* 65 : 55-64.
- Cheesman, D.F. and Prebble, J. (1966). "Astaxanthin Ester as a Prosthetic Group : A Caroteno-Protein from the Hermit Crab," *Comp. Biochem. Physiol.* 17 : 929-935.
- Christie, A.E., Skiebe, P. and Marder, E. (1995). "Matrix of Neuromodulators in Neurosecretory Structures of the Crab *Cancer borealis*," *J. Exp. Biol.* 198 : 2431-2439.
- Cowden, C. and others. (1993). "Localization and Differential Expression of FMRFamide-Like Immunoreactivity in the Nematode *Ascaris suum*," *J. Comp. Neurol.* 333 : 455-468.
- Desmoucelles-Carette, C., Sellos, D. and Van Wormhoudt, A. (1996). "Molecular Cloning of the Precursors of Pigment Dispersing Hormone in Crustaceans," *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 221 : 739-743.
- Dirksen, H. and others. (1987). "The Ultrastructure of Nerve Endings Containing Pigment-Dispersing Hormone (PDH) in Crustacean Sinus Glands : Identification by an Antiserum Against a Synthetic PDH," *Cell Tissue Res.* 250 : 377-387.
- Elekes, K. and Nassel, D.R. (1999). "Pigment-Dispersing Hormone-Like Immunoreactive Neurons in the Central Nervous System of the Gastropods *Helix pomatia* and *Lymnaea stagnalis*," *Cell Tissue Res.* 295 : 339-348.
- Farfante, I.P. and Kensley, B. (1997). "Penaeoid and Sergestoid Shrimps and Prawns of the World Keys and Diagnoses for the Families and Genera," *Me'moires Du Muse'um National D' Histoire Naturelle Tome.* 175 : 130-133.

- Fernlund, P. (1971). "Chromactivating Hormones of *Pandalus borealis*; Isolation and Purification of a Light-Adapting Hormone," *Biochem. Biophys. Acta.* 237 : 519-529.
- _____. (1976). "Structure of a Light-Adapting Hormone From the Shrimp, *Pandalus borealis*," *Biochem. Biophys. Acta.* 439 : 17-25.
- Fernlund, P. and Josefsson, L. (1972). "Crustacean Color Change Hormone : Amino Acid Sequence and Chemical Synthesis," *Science.* 177 : 173-175.
- Fingerman, M. (1987). "The Endocrine Mechanisms of Crustaceans," *J. Crusta. Biol.* 7(1) : 1-24.
- Helfrich-Forster, C. and Homberg, U. (1993). "Pigment-Dispersing Hormone-Immuno-Reactive Neurons in the Nervous System of Wild-Type *Drosophila melanogaster* and of Several Mutants with Altered Circadian Rhythmicity," *J. Comp. Neurol.* 337 : 177-190.
- Hintz, M.F., Riehm, J.P. and Rao, K.R. (1989). "Synthesis and Assay of Structural Intermediates of Crustacean Pigment-Dispersing Hormone (α - and β -PDH)," *Invert. Reprod. Develop.* 16 : 135-139.
- Holthuis, L.B. (1980). *FAO Species Catalogue Vol.1-Shrimps and Prawns of the World.* FAO Fisheries Synopsis. 125(1) : 50.
- Homberg, U. and Prakash, N. (1996). "Development of Pigment-Dispersing Hormone-Like Immunoreactivity in the Brain of the Locust *Schistocerca gregaria* : Comparison with Immunostaining for Urotensin I and Mas-allatotropin," *Cell Tissue Res.* 285 : 127-139.
- Huberman, A. and Aguilar, M.B. (1986). "A Neurosecretory Hyperglycemic Hormone from the Sinus Gland of the Mexican Crayfish, (*Procambarus bouvieri* : Ortmann)-I. Purification and Biochemical Characterization of the Most Abundant form of the Hormone," *J. Comp. Biochem. Physiol.* 85B(1) : 197-203.
- Jorenby, W.H., Riehm, J.P. and Rao, K.R. (1987). "Position 3 Analogues of a Crustacean Pigment-dispersing Hormone : Synthesis and Biological Activity," *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 143(2) : 652-657.
- Josefsson, L. (1983). "Invertebrate Neuropeptide Hormones," *Int. J. Pept. Protein Res.* 21 : 459-470.
- Keller, R. (1992). "Crustacean Neuropeptides : Structures, Functions and Comparative Aspects," *Experientia.* 48 : 439-448.

- de Kleijn, D.P.V. and others. (1993). "Structure and Localization of mRNA Encoding a Pigment Dispersing Hormone (PDH) in the Eyestalk of the Crayfish *Orconectes limosus*," *FEBS. Lett.* 321(2,3) : 251-255.
- Klein, J.M. and others. (1992). "Molecular Cloning of Crustacean Pigment Dispersing Hormone Precursor," *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 189(3) : 1509-1514.
- _____. (1994). "Molecular Cloning of Two Pigment-Dispersing Hormone (PDH) Precursors in the Blue Crab *Callinectes sapidus* Reveals a Novel member of the PDH neuropeptide family," *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 205(1) : 410-416.
- _____. (1995). "A Highly Conserved Red Pigment-Concentrating Hormone Precursor in the Blue Crab *Callinectes sapidus*," *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 212(1) : 151-158.
- Kleinholz, L.H. and others. (1986). "Isolation and Sequence Analysis of a Pigment-Dispersing Hormone from Eyestalks of the Crab, *Cancer magister*," *Biol. Bull.* 170 : 135-143.
- Koller, G. (1927). "Uber Chromatophoren-System, Farbensinn und Farbwechsel Bei *Crangon vulgaris*," *Z. Vergl. Physiol.* 5 : 191-246. in : Fingerman, M. (1985). "The physiology and pharmacology of crustacean chromatophores," *Amer. Zool.* 25 : 233-252.
- Lohr, J. and others. (1993). "Quantification, Immunoaffinity Purification and Sequence Analysis of a Pigment-Dispersing Hormone of the Shore Crab, *Carcinus maenas* (L.)," *Comp. Biochem. Physiol.* 104B(4) : 699-706.
- McCallum, M.L. and others. (1991). "Primary Structure and Relative Potency of an Analog of β -PDH (Pigment-Dispersing Hormone) from the Crayfish *Procambarus clarkii*," *Pigment Cell Res.* 4 : 201-208.
- Mangerich, S. and others. (1987). "Immunocytochemical Localization of Pigment-Dispersing Hormone (PDH) and its Coexistence with FMRFamide-immunoreactive Material in the Eyestalks of the Decapod Crustaceans *Carcinus maenas* and *Orconectes limosus*," *Cell Tissue Res.* 250 : 365-375.
- Mangerich, S. and Keller, R. (1988). "Localization of Pigment-Dispersing Hormone (PDH) Immunoreactivity in the Central Nervous System of *Carcinus maenas* and *Orconectes limosus* (Crustacea), with Reference to FMRFamide Immunoreactivity in *O. limosus*," *Cell Tissue Res.* 253 : 199-208.

- Mercier, A.J. and others. (1993). "Isolation of Two FMRFamide-Related Peptides from Crayfish Pericardial organs," *Peptide*. 14 : 137-143.
- Mohrherr, C.J. and others. (1990). "Isolation of β -PDH from Sinus Glands of the Blue Crab *Callinectes sapidus*," *Am. Zool.* 30 : 28A.
- Martin, L.I. and Marder, E. (1991). "Differential Distribution of β -Pigment-Dispersing Hormone (β -PDH)-Like Immunoreactivity in the Stomatogastric Nervous System of Five Species of Decapod Crustaceans," *Cell Tissue Res.* 265 : 19-33.
- Nery, L.E.M. and others. (1997). "Cellular Signalling of PCH-Induced Pigment Aggregation in the Crustacean *Macrobrachium potiana* Erythrophones," *J. Comp. Physiol.* 167B : 570-575.
- Nery, L.E.M., da Silva, M.A. and Castrucci, A.M.L. (1999). "Possible Role of Non-Classical Chromatophorotropins on the Regulation of the Crustacean Erythrophone," *J. Exp. Zool.* 284 : 711-716.
- Nussbaum, T and Dircksen, H. (1995). "Neuronal Pathways of Classical Crustacean Neurohormones in the Central Nervous System of the Woodlouse, *Oniscus asellus* (L.)." *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 347B : 139-154.
- Park, J.H. and Hall, J.C. (1998). "Isolation and Chronobiological Analysis of a Neuropeptide Pigment-Dispersing Factor Gene in *Drosophila melanogaster*," *J. Biol. Rhythms.* 13(3) : 219-228.
- Phillips, J.M. and others. (1990). "Immunocytochemical Studies of the Distribution of α - and β -PDH in *Callinectes sapidus* and *Pandalus danae*," *Am. Zool.* 30 : 28A.
- Perkins, E.B. (1928). "Color Changes in Crustaceans, Especially in *Palaemonetes*," *J. Exp. Zool.* 50 : 71-105. in : Fingerman, M. (1985) "The Physiology and Pharmacology of Crustacean Chromatophores," *Amer. Zool.* 25 : 233-252.
- Rao, K.R. (1985). "Pigmentary Effector," in : *The Biology of Crustacea Vol.9 Integument, Pigments, and Hormonal Processes*. Bliss, D.E. and Mantel, L. H. (eds.). p.395-462. Orlando : Academic Press.
- Rao, K.R. and others. (1985). "Characterization of a Pigment-Dispersing Hormone in Eyestalks of the Fiddler Crab *Uca pugilator*," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82 : 5319-5322.
- _____. (1986). "Isolation and Partial Sequence Analysis of an Analog of Crustacean Pigment-Dispersing Hormone (PDH) From the Cricket, *Acheta domestica*," *Soc. Neurosci. Abstr.* 12 : 244.

- Rao, K.R. and others. (1987). "Primary Structure of an Analog of Crustacean Pigment-Dispersing Hormone from the Lubber Grasshopper *Romalea microptera*," *J. Bio. Chem.* 262(6) : 2672-2675.
- Rao, K.R. and Riehm, J.P. (1988). "Chemistry of Crustacean Chromatophorotropins," in *Advances in Pigment Cell Research*. Bagnara, J.T. (ed.). p.407-422. New York : Alan R. Liss.
- _____. (1988). "Pigment-dispersing hormones : a novel family of neuropeptides from arthropods," *Peptides*. 9 : 153-159.
- _____. (1989). "The Pigment-Dispersing Hormone Family : Chemistry, Structure-activity Relations, and Distribution," *Biol.Bull.* 177 : 225-229.
- _____. (1991). "Structure-Activity Relations of Crustacean Neuropeptides," in : *Shrimp Research*. Dougherty, W.J. and Davidson, M.A. (eds.). p.107-123. Netherland : Elsevier Science Publishers B.V.
- _____. (1993). "Pigment-Dispersing Hormone," in : *The Melanotropic Peptide Vol. 680 of the Annals of the New York Academy of Science*. p.78-88.
- Reischig, T. and Stengl, M. (1996). "Morphology and Pigment-Dispersing Hormone Immunocytochemistry of the Accessory Medulla, the Presumptive Circadian Pacemaker of the Cockroach *Leucophaea maderae* : a Light-and Electron-Microscopic Study," *Cell Tissue Res.* 285 : 305-319.
- Renn, S.C.P. and others. (1999). "A *pdf* Neuropeptide Gene Mutation and Ablation of PDF Neurons Each Cause Severe Abnormalities of Behavioral Circadian Rhythms in *Drosophila*," *Cell*. 99 : 791-802.
- Ruppert, E.E. and Barnes, R.D. (1994). "Crustaceans," in : *Invertebrate Zoology*. p.678-787. New York : Saunders College Publishing.
- Schueler, P.A. and others. (1986). "Immunohistochemical Mapping of Distal Retinal Pigment Hormone in the Crayfish Central Nervous System," *Soc. Neuroci. Abstr.* 12 : 242.
- Sithigorngul, P. and Stretton, A.O.W. (1995). "Six More FMRFamide-Like Peptides from the Nematode *Caenorhabditis elegans* : Four New and Two Old," *Third Progress Report for Biotechnology Career Fellowship the Rockefeller Foundation*. 1-18.
- Sithigorngul, P., Stretton, A.O.W. and Cowden, C. (1991). "A Versatile Dot-ELISA Method with Femtomole Sensitivity for Detecting Small Peptides," *J. Immunol. Methods*. 141 : 23-32.

- Soyez, D., Van Deijnen, J.E. and Martin, M. (1987). "Isolation and Characterization of a Vitellogenesis-Inhibiting Factor from Sinus Gland of the Lobster, *Homarus americanus*," *J. Exp. Zool.* 244 : 479-484.
- Thurman, C.L. (1988). "Rhythmic Physiological Color Change in Crustacea : A Review," *Comp. Biochem. Physiol.* 91C(1) : 177-185.
- Yang, W.J., Aida, K. and Nagasawa, H. (1999). "Characterization of Chromatophoretropic Neuropeptides from the Kuruma Prawn *Penaeus japonicus*," *Gen. Comp. endocrinol.* 114(30) : 415-424.
- [http : //www.biologie.uni-regensburg.de/Zoologie/Schneuwly/Hofbauer/chrono.htm](http://www.biologie.uni-regensburg.de/Zoologie/Schneuwly/Hofbauer/chrono.htm)

ภาคผนวก

| ประมาณปริมาณ สารคล้าย FMRFamide | | ปริมาณ FMRFamide |
|------------------------------------|---|------------------|
| | ● | 25.0 นาโนกรัม |
| | ● | 12.5 นาโนกรัม |
| 32 หน่วย | ● | 6.25 นาโนกรัม |
| 16 หน่วย | ● | 3.12 นาโนกรัม |
| 8 หน่วย | ● | 1.6 นาโนกรัม |
| 4 หน่วย | ● | 0.8 นาโนกรัม |
| 2 หน่วย | ● | 0.4 นาโนกรัม |
| 1 หน่วย | ● | 0.2 นาโนกรัม |
| | ● | 0.1 นาโนกรัม |
| | ● | BSA 1 ไมโครกรัม |

Standard FMRFamide

ภาพประกอบ 46 Dot-ELISA ของเปปไทด์ FMRFamide มาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ (จිරศักดิ์ ผู้ปลื้ม. 2542) สำหรับใช้ในการเปรียบเทียบกับสารคล้าย PDH ในตัวอย่าง เพื่อประมาณปริมาณของสารคล้าย PDH ในขั้นตอนต่างๆ ในระหว่างการทำให้บริสุทธิ์

การเตรียมสารเคมี

1. สารละลาย 1% trifluoroacetic acid (TFA)

| | | | |
|---|-----------------|-----|-----------|
| TFA | | 1 | มิลลิลิตร |
| H ₂ O (triple distilled water) | ปรับปริมาตรเป็น | 100 | มิลลิลิตร |

2. สารละลาย 1% heptafluoro butyric acid (HFBA)

| | | | |
|---|-----------------|-----|-----------|
| HFBA | | 1 | มิลลิลิตร |
| H ₂ O (triple distilled water) | ปรับปริมาตรเป็น | 100 | มิลลิลิตร |

3. สารละลาย 0.1% TFA

| | | | |
|---|-----------------|-----|-----------|
| 1% TFA | | 10 | มิลลิลิตร |
| H ₂ O (triple distilled water) | ปรับปริมาตรเป็น | 100 | มิลลิลิตร |

4. สารละลาย 0.1% HFBA

| | | | |
|---|-----------------|-----|-----------|
| 1% HFBA | | 10 | มิลลิลิตร |
| H ₂ O (triple distilled water) | ปรับปริมาตรเป็น | 100 | มิลลิลิตร |

5. สารละลาย 80% acetonitrile ใน 0.1% TFA

| | | | |
|---|-----------------|-----|-----------|
| Acetonitrile (HPLC-grade) | | 80 | มิลลิลิตร |
| 1% TFA | | 10 | มิลลิลิตร |
| H ₂ O (triple distilled water) | ปรับปริมาตรเป็น | 100 | มิลลิลิตร |

6. สารละลาย 50% acetonitrile ใน 0.1% TFA

| | | | |
|---|-----------------|-----|-----------|
| Acetonitrile (HPLC-grade) | | 50 | มิลลิลิตร |
| 1% TFA | | 10 | มิลลิลิตร |
| H ₂ O (triple distilled water) | ปรับปริมาตรเป็น | 100 | มิลลิลิตร |

7. สารละลาย 80% acetonitrile ใน 0.1% HFBA

| | | | |
|---|-----------------|-----|-----------|
| Acetonitrile (HPLC-grade) | | 80 | มิลลิลิตร |
| 1% HFBA | | 10 | มิลลิลิตร |
| H ₂ O (triple distilled water) | ปรับปริมาตรเป็น | 100 | มิลลิลิตร |

การเตรียมสารเคมี (ต่อ)

8. สารละลาย 50% acetonitrile ใน 0.1% HFBA

| | | |
|---|-----|-----------|
| Acetonitrile (HPLC-grade) | 50 | มิลลิลิตร |
| 1% HFBA | 10 | มิลลิลิตร |
| H ₂ O (triple distilled water) ปรับปริมาณเป็น | 100 | มิลลิลิตร |

9. Phosphate buffered saline (PBS) 0.15 M pH 7.2

| | | |
|--|----------|-----------|
| NaCl | 8.00 | กรัม |
| KCl | 0.20 | กรัม |
| KH ₂ PO ₄ | 0.20 | กรัม |
| Na ₂ HPO ₄ | 1.15 | กรัม |
| หรือ Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O | 2.15 | กรัม |
| H ₂ O (distilled water) ปรับปริมาณเป็น | 1,000.00 | มิลลิลิตร |

10. สารละลาย 5% blotto

| | | |
|---|--------|-----------|
| นมพร่องมันเนย | 5.00 | กรัม |
| 1% Merthiolate | 1.00 | มิลลิลิตร |
| Triton X-100 | 0.10 | มิลลิลิตร |
| สารละลาย PBS 0.15 M pH 7.2 ปรับปริมาณเป็น | 100.00 | มิลลิลิตร |

11. สารละลาย 0.5% blotto

| | | |
|---|-----|-----------|
| 5% blotto | 10 | มิลลิลิตร |
| สารละลาย PBS 0.15 M pH 7.2 ปรับปริมาณเป็น | 100 | มิลลิลิตร |

12. สารละลายสับสเตรท

| | | |
|---|-----|-----------|
| Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) | 30 | มิลลิกรัม |
| 30% Hydrogenperoxide (H ₂ O ₂) | 20 | ไมโครลิตร |
| 1% Cobalt chloride (CoCl ₂) | 5 | มิลลิลิตร |
| สารละลาย PBS 0.15 M pH 7.2 ปรับปริมาณเป็น | 100 | มิลลิลิตร |

ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

| | |
|---------------------|--|
| ชื่อ | นางสาวปิยนาท เกียรติสมชาย |
| วันเดือนปีเกิด | 5 ธันวาคม 2519 |
| สถานที่เกิด | กรุงเทพฯ |
| สถานที่อยู่ปัจจุบัน | บ้านเลขที่ 79/42 หมู่ 1 ตำบลลำผักกูด อำเภอธัญบุรี จังหวัดปทุมธานี 12110 |

ประวัติการศึกษา

| | |
|-----------|---|
| พ.ศ. 2533 | มัธยมศึกษาปีที่ 3 (แผนกอังกฤษ-คณิต) จากโรงเรียนธัญรัตน์ ปทุมธานี |
| พ.ศ. 2536 | มัธยมศึกษาปีที่ 6 (แผนกวิทย์-คณิต) จากโรงเรียนธัญรัตน์ ปทุมธานี |
| พ.ศ. 2540 | กศ.บ. (ชีววิทยา) จากมหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี |
| พ.ศ. 2544 | วท.ม. (เคมีชีวภาพ) จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร กรุงเทพฯ |