

การเปรียบเทียบลักษณะเฉพาะของนิ่วโรเปปไทด์จากก้านตาของกิ้งกูดดำ *Panaeus monodon*
โดยใช้ไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟีและเมทริกซ์-แอสซิสเทดเลเซอร์ดีซอร์พชัน
ไอออนไนเซชันแมสสเปกโทรเมทรี



นางสาวสุรีย์ วิเศษสมบัติ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2544

ISBN 974-03-1181-4

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

COMPARISON OF NEUROPEPTIDE PROFILES FROM THE EYESTALK OF
Penaeus monodon USING HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY AND
MATRIX-ASSISTED LASER DESORPTION IONIZATION MASS SPECTROMETRY



Miss Suree Wisetsombat

สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Biotechnology

Program of Biotechnology

Faculty of Science

Academic Year 2001

ISBN 974-03-1181-4

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การเปรียบเทียบลักษณะเฉพาะของนิวโรเปปไทด์จากก้านตาของ กิ้งกูดำ <i>Penaeus monodon</i> โดยใช้ไฮเพอร์ฟอร์แมนซีลิควิ ดโครมาโทกราฟีและเมทริกซ์-แอสซีสเทดเลเซอร์ดีซอร์พชันไอออ ไนเซชันแมสสเปกโทรเมทรี
โดย	นางสาวสุรีย์ วิเศษสมบัติ
สาขาวิชา	เทคโนโลยีทางชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. ไพศาล สิทธีกรกุล

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโทบริหาร

.....รองคณบดีฝ่ายบริหาร

(รองศาสตราจารย์ ดร. พัทธมน์ การเที่ยง) รักษาราชการแทนคณบดีคณะวิทยาศาสตร์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สมเกียรติ งามประเสริฐสิทธิ์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพศาล สิทธีกรกุล)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. สมเกียรติ ปิยะธีรธิตีวรกุล)

สุรีย์ วิเศษสมบัติ : การเปรียบเทียบลักษณะเฉพาะของนิวโรเปปไทด์จากก้านตาของกุ้ง
กุลาดำ *Penaeus monodon* โดยใช้ไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟีและเมทริกซ์-
แอสซิสเทดเลเซอร์ดีซอร์ปชันไอออไนเซชันแมสสเปกโตรเมทรี (COMPARISON OF
NEUROPEPTIDE PROFILES FROM THE EYESTALK OF *Penaeus monodon*
USING HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY AND MATRIX-
ASSISTED LASER DESORPTION IONIZATION MASS SPECTROMETRY)
อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร.อมร เพชรสม, อ.ที่ปรึกษาร่วม : รศ.ดร.ไพศาล ลีทธิกรกุล, 115 หน้า.
ISBN 974-03-1181-4.

การแยกสารคล้ายแพนครีเอทิกโพลีเปปไทด์ (PP-like substance) จากก้านตาของกุ้ง
กุลาดำจำนวน 7,500 ก้านตาโดยการสกัดด้วยสารละลายเมทานอล-กรดอะซิติก-น้ำ (90 : 1 : 9)
นำไปแยกผ่าน C18 Sep-Pak cartridge และนำไปทำให้บริสุทธิ์ต่อด้วย RP-HPLC 5-6 ขั้นตอน
โดยใช้คอลัมน์ C18, C8 และ Cyano ระบบตัวทำละลาย 3 ระบบคือ acetonitrile /
trifluoroacetic acid, acetonitrile / heptafluorobutyric acid และ acetonitrile / triethylamine
การติดตามสารคล้าย PP ในระหว่างการทำให้บริสุทธิ์ใช้วิธี Dot-enzyme linked immunosorbant
assay (Dot-ELISA) โดยใช้ rabbit anti-human pancreatic polypeptide C-terminal hexapeptide
(PP6) antiserum จากแฟรกชันที่ 19, 23, 24, 26 และ 27 ของ RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 1 ได้สาร
คล้าย PP ที่คาดว่ามีความบริสุทธิ์มากพอที่จะนำไปหาลำดับของกรดอะมิโนต่อไป 4 รูปแบบ
ได้แก่ PPL1, PPL2, PPL3 และ PPL4 มีน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกันคือ 801.5, 1137.1, 1050.0
และ 1165.9 ดาลตัน ตามลำดับ เมื่อตรวจหาน้ำหนักโมเลกุลโดย Matrix assisted laser
desorption ionization time-of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) จากน้ำหนักโมเลกุล
ที่ได้จึงคาดว่าสารคล้าย PP ที่แยกได้นี้เป็นเปปไทด์สายสั้นที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนไม่เกิน
9 หน่วย คล้ายกับ PYF จากสมองของปลาหมึกกล้วย *Loligo vulgaris* แต่มีน้ำหนักโมเลกุลที่ต่าง
ออกไปจึงคาดว่าสารคล้าย PP ที่ได้นี้จะมีกรดอะมิโนในสายของเปปไทด์ที่แตกต่างกัน

ภาควิชา.....เทคโนโลยีชีวภาพ
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2544

ลายมือชื่อนิสิต.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4172512023 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORD : *Penaeus monodon* / PANCREATIC POLYPEPTIDE / EYESTALK

SUREE WISETSOMBAT : COMPARISON OF NEUROPEPTIDE PROFILES FROM THE EYESTALK OF *Penaeus monodon* USING HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY AND MATRIX-ASSISTED LASER DESORPTION IONIZATION MASS SPECTROMETRY.

THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. AMORN PETSOM, Ph.D., THESIS

COADVISOR : ASSOC. PROF. PAISARN SITHIGORNGUL, Ph.D., 115 pp.

I S B N 9 7 4 - 0 3 - 1 1 8 1 - 4

Isolation of the PP-like substances (PPLs) in *Penaeus monodon* was performed using 7,500 eyestalks extracted in methanol-acetic acid-water (90 : 1 : 9). The extract was partially purified using C18 cartridge and was further purified by 5 to 6 steps of RP-HPLC using C18, C8 and Cyano column with 3 solvent systems ; acetonitrile / trifluoroacetic acid, acetonitrile / heptafluorobutyric acid and acetonitrile / triethylamine and the detection of PPLs in the fractions during each step of purification was by Dot-enzyme linked immunosorbant assay (Dot-ELISA) using polyclonal antiserum raised against human pancreatic polypeptide C-terminal hexapeptide (PP6). Four isoforms of PPLs (PPL1, PPL2, PPL3 and PPL4) obtained from fractions 19, 23, 24, 26 and 27 of the first RP-HPLC step and having molecular weight of 801.5, 1137.1, 1050.0 and 1165.9 dalton, respectively, determined by Matrix assisted laser desorption ionization time-of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). From the molecular weight of these isoforms, it revealed that these peptides should not consisted of more than nine amino acid residues which were similar to that of PYF found in the brain of squid, *Loligo vulgaris*. However the different molecular weight that obtained are expected to be different amino acid in peptide chain from brain squid PYF and PP-like peptides from other animals.

Program.....Biotechnology....	Student's signature.....
Field of study..Biotechnology....	Advisor's signature.....
Academic year.....2001.....	Co-advisor's signature.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจาก รศ.ดร. อมร เพชรสม รศ.ดร.ไพศาล สิทธิกรกุล ที่รับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาและอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ซึ่งท่านได้ให้แนวความคิด คำแนะนำ และข้อคิดเห็นต่าง ๆ ตลอดระยะเวลาในการทำวิจัยรวมทั้งตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.สมเกียรติ งามประเสริฐสิทธิ์ ที่กรุณาเป็นประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รศ.ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ และ รศ.ดร.สมเกียรติ ปิยะธีรดิตรกุล ที่กรุณาร่วมเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์และช่วยตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณคณะผู้บริหารและบุคลากรทุกท่านในสถาบันเทคโนโลยีทางชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือและความสะดวกในด้านอุปกรณ์ สถานที่และสารเคมีในการดำเนินงานวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.วีระวรรณ สิทธิกรกุล ดร.ศิวาพร ลงยันต์ จากภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร ที่ให้คำแนะนำและความช่วยเหลือในด้านสถานที่อุปกรณ์และสารเคมีในการทำวิจัยอย่างดียิ่ง

ขอขอบคุณ Prof. Dr. A.O.W. Stretton, University of Wisconsin-Madison ที่กรุณาอนุเคราะห์โพลีโคลนอลแอนติบอดี PP6 สำหรับใช้ในการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณนันทิกา ปานจันทร์ คุณพอจิต วิโนทพรรษ์ คุณดวงใจ งามสม คุณสมบัติ รักประทานพร คุณยัยนั๊บ แวและ ที่ให้คำแนะนำและเป็นกำลังใจในการทำวิจัยมาโดยตลอด

ขอขอบคุณเพื่อน ๆ พี่ ๆ และน้อง ๆ ที่สถาบันเทคโนโลยีทางชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจในการทำวิจัยมาโดยตลอด

ท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณมารดาที่ให้การสนับสนุนทางการศึกษาในด้านการเงินและเป็นกำลังใจในการทำวิจัยมาโดยตลอด รวมทั้งขอขอบคุณพี่สาว ที่ให้ความเข้าใจและความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ ที่เป็นกำลังอันสำคัญยิ่งต่อผู้วิจัยตลอดมา และขอขอบคุณผู้ที่ช่วยเหลือทุกท่านที่มีได้กล่าวนามไว้ในที่นี้

สารบัญ

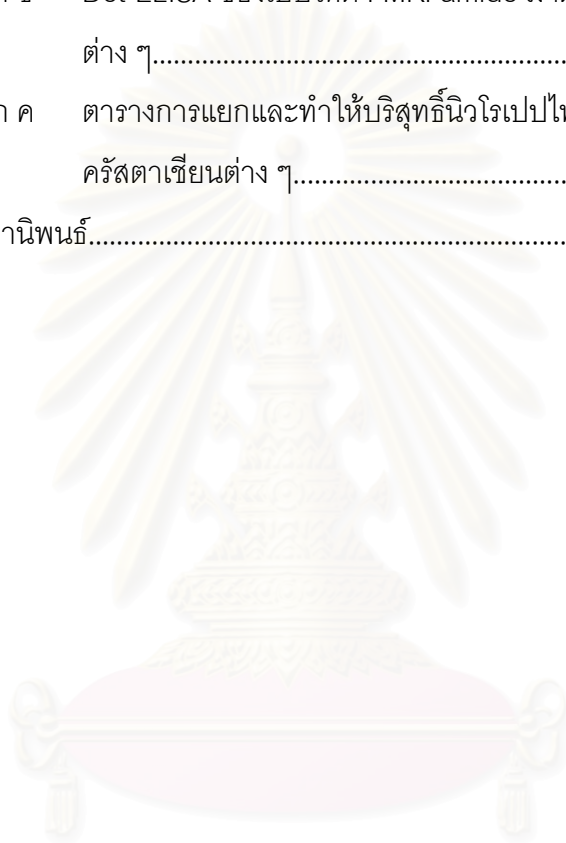
	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
1.3 ขอบเขตของการวิจัย.....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
2.1 แนวคิดและทฤษฎี.....	5
2.2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
2.2.1 เปปไทด์ไทโรซีน-ไทโรซีน (Peptide YY, PYY).....	6
2.2.2 นิวโรเปปไทด์ไทโรซีน (Neuropeptide Y, NPY).....	10
2.2.3 แพนครีเอติกโพลีเปปไทด์ (Pancreatic Polypeptide, PP).....	17
2.2.4 Invertebrate NPY-like peptides (Neuropeptide F, NPF).....	24
2.3 ชีววิทยาของกิ้งกูดาค้า.....	39
2.3.1 ลักษณะทั่วไป.....	40
2.3.2 การผสมพันธุ์.....	42
2.3.3 วงจรชีวิต.....	42
2.3.4 การวิวัฒนาการและการเปลี่ยนรูปร่างของกิ้ง.....	43
2.3.5 การลอกคราบ.....	44
2.3.6 ความแตกต่างระหว่างกิ้งกูดาค้าเพศผู้และเพศเมีย.....	44
2.3.7 โครงสร้างภายในก้านตากลิ้งกูดาค้า.....	46

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.3.8 นิวโรเปปไทด์ต่าง ๆ ที่พบในสัตว์กลุ่มครัสเตเชีย.....	49
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	52
3.1 สัตว์ทดลอง.....	52
3.2 อุปกรณ์และสารเคมี.....	52
3.3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	55
3.3.1 การเก็บรวบรวมก้านตาของกิ้งกูดดำ.....	55
3.3.2 การเตรียมสารสกัดจากก้านตา (eyestalk extract) ของกิ้งกูดดำ.....	55
3.3.3 การทำให้บริสุทธิ์ของสารคล้าย PP6 จากก้านตาของกิ้งกูดดำด้วย กระบวนการ RP-HPLC.....	58
3.3.4 การตรวจหาสารคล้าย PP6 ในก้านตาของกิ้งกูดดำ โดยใช้วิธี Dot-ELISA (Dot-Enzyme Linked Immunosorbent Assay) หลังจากแยกด้วยกระบวนการ RP-HPLC.....	62
3.3.5 การหาน้ำหนักโมเลกุล โดย Matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS).....	64
4 ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย.....	65
4.1 การทำให้บริสุทธิ์สารคล้ายแพนครีเอติกโพลีเปปไทด์จากก้านตาของกิ้งกูดดำ ในขั้นตอนแรก.....	65
4.2 การทำให้บริสุทธิ์สารคล้ายแพนครีเอติกโพลีเปปไทด์จากก้านตาของกิ้งกูดดำ ในขั้นตอนที่ 2 – ขั้นตอนที่ 6.....	69
4.3 การหาน้ำหนักโมเลกุลของสารคล้าย PP โดย Matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS).....	83
5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	88
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	88
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	88
รายการอ้างอิง.....	89

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
ภาคผนวก.....	105
ภาคผนวก ก การเตรียมสารเคมี.....	106
ภาคผนวก ข Dot-ELISA ของเปปไทด์ FMRFamide มาตรฐานที่ความเข้มข้น ต่าง ๆ.....	109
ภาคผนวก ค ตารางการแยกและทำให้บริสุทธิ์นิวโรเปปไทด์ต่าง ๆ ในสัตว์กลุ่ม ครัสตาเซียนต่าง ๆ.....	110
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	115



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
2.1 การแยกสกัดและทำให้บริสุทธิ์ PP family ในสัตว์ต่าง ๆ.....	28
2.2 ลำดับกรดอะมิโนของ PP family ที่พบในสัตว์ต่าง ๆ.....	32
2.3 ตำแหน่งที่พบ PP family ในสัตว์ต่าง ๆ.....	35
2.4 หน้าที่ของ PP family ที่พบในหนูและสุนัข.....	38
3.1 แสดงขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ด้วยกระบวนการ RP-HPLC.....	61
4.1 แสดงน้ำหนักโมเลกุลของสารคล้าย PP ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วย กระบวนการ RP-HPLC.....	84

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพประกอบ	หน้า
2.1 โครงสร้างภายนอกโดยทั่วไปของกุ้งกุลาดำ <i>Penaeus monodon</i>	41
2.2 ภาพจากด้านท้องของกุ้งกุลาดำแสดงขาว่ายน้ำ พีเทสมา และทีไลคัม.....	45
2.3 ภาพวาดแสดงพีเทสมาของกุ้งกุลาดำเพศผู้และทีไลคัมของกุ้งกุลาดำเพศเมีย.....	45
2.4 ตา และ ก้านตา ของกุ้ง <i>Palaemon</i>	47
2.5 โครงสร้างภายในก้านตาของกุ้งกุลาดำ.....	48
3.1 ขั้นตอนวิธีการเตรียมสารสกัดจากก้านตาของกุ้งกุลาดำ.....	57
3.2 ขั้นตอนวิธีการของ Dot-ELISA (Dot-Enzyme Linked Immunosorbent Assay) ในการตรวจหาสารคล้าย PP.....	63
4.1 โคโรมาโตแกรมของสารสกัดจากก้านตาของกุ้งกุลาดำจำนวน 2,500 ก้านตา หลังจากผ่าน กระบวนการ RP-HPLC ขั้นตอนแรก.....	65
4.2 PP immunoreactivity ของแฟรคชันต่าง ๆ ที่ได้จากกระบวนการ RP-HPLC ขั้นตอนแรก.....	67
4.3 FMRamide immunoreactivity ของแฟรคชันต่าง ๆ ที่ได้จากกระบวนการ RP-HPLC ขั้นตอนแรก.....	67
4.4 ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ของสารคล้าย PP ด้วยกระบวนการ RP-HPLC กลุ่มต่าง ๆ.....	68
4.5 ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย PP ด้วยกระบวนการ RP-HPLC ของสารคล้าย PP กลุ่มที่ 1.....	70
4.6 โคโรมาแกรมของสารสกัดกลุ่มที่ 1 จากก้านตาของกุ้งกุลาดำจำนวน 7,500 ก้านตา ที่ผ่านกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 2.....	71
4.7 โคโรมาโตแกรมการทำให้บริสุทธิ์ของเปปไทด์ในกลุ่มที่ 1 คือ PLP1 และแมสสเปกตรัม ของ PLP1.....	72
4.8 ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย PP ด้วยกระบวนการ RP-HPLC ของสารคล้าย PP กลุ่มที่ 2.....	74
4.9 โคโรมาแกรมของสารสกัดกลุ่มที่ 2 จากก้านตาของกุ้งกุลาดำจำนวน 7,500 ก้านตา ที่ผ่านกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 2.....	75
4.10 โคโรมาโตแกรมการทำให้บริสุทธิ์ของเปปไทด์ในกลุ่มที่ 2 คือ PLP2 และแมสสเปกตรัม ของ PLP2.....	76

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
4.11 ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย PP ด้วยกระบวนการ RP-HPLC ของสารคล้าย PP กลุ่มที่ 3.....	79
4.12 โครมาแกรมของสารสกัดกลุ่มที่ 3 จากก้านตาของกุ่มกุลาดำจำนวน 7,500 ก้านตา ที่ผ่านกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 2.....	80
4.13 โครมาโตแกรมการทำให้บริสุทธิ์ของเปปไทด์ในกลุ่มที่ 3 คือ PLP3 และแมสสเปกตรัม ของ PLP3.....	81
4.14 โครมาโตแกรมการทำให้บริสุทธิ์ของเปปไทด์ในกลุ่มที่ 3 คือ PLP4 และแมสสเปกตรัม ของ PLP4.....	82

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

กุ้งกุลาดำเป็นสินค้าส่งออกอันดับหนึ่งของประเทศไทยมีบทบาทสำคัญในตลาดโลก โดยในปี 2542 สหรัฐอเมริกาได้นำเข้ากุ้งกุลาดำจากประเทศไทยทั้งหมดเป็นยอดรวม 114,500 ตัน ซึ่งนับเป็นครั้งแรกของไทย ที่ส่งกุ้งเข้าตลาดสหรัฐอเมริกาได้มากขนาดนี้ นอกจากตลาดสหรัฐอเมริกานี้แล้ว ยังมีตลาดที่สำคัญอื่น ๆ อีก คือ ญี่ปุ่น ยุโรป ออสเตรเลียและเกาหลี (ไพบูลย์ พลสุวรรณา และคณะ, 2543) ทางด้านส่วนแบ่งการผลิตนั้น ไทยมีส่วนแบ่งการผลิตเป็นอันดับ 1 มาตั้งแต่ปี 2534 โดยในปี 2541 ไทยผลิตได้ถึง 242,000 ตัน ส่วนแบ่งการผลิตของประเทศไทยเป็น 32.8 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ประเทศคู่แข่ง คือ อินเดีย มีส่วนแบ่งการผลิตเป็น 28 เปอร์เซ็นต์ และอินโดนีเซีย มีส่วนแบ่งการผลิตเป็น 17 เปอร์เซ็นต์ (ทรงศักดิ์ ศรีบุญจิตต์, 2544) จากข้อมูลนี้ชี้ให้เห็นความสำคัญของกุ้งกุลาดำที่มีต่อตลาดภายในประเทศและตลาดโลก จึงควรมีการค้นคว้าวิจัยเพื่อพัฒนาศักยภาพในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำให้สูงขึ้น

กระบวนการเมแทบอลิซึมต่าง ๆ ภายในตัวสัตว์กลุ่มครัสเตเชียจะถูกควบคุมโดยฮอร์โมนต่าง ๆ ซึ่งเป็นพวกนิวโรเปปไทด์ โดยแหล่งผลิตฮอร์โมนที่สำคัญคือ นิวโรซีครีทอรีเซลล์ (neurosecretory cell) และระบบประสาทส่วนกลาง (central nervous system [CNS]) แต่ระบบที่ได้รับความสนใจมากที่สุดคือ ระบบเอกซ์ออร์แกน-ต่อมไซแนส (X-organ sinus gland [XO-SG]) ในก้านตา โดยต่อมไซแนสเป็นอวัยวะที่เก็บสะสมและปล่อยนิวโรฮอร์โมนต่าง ๆ (Huberman, Aguilar and Quackenbush, 1995 ; Dominique, De Kleijn and Van Herp, 1995) เช่น red pigment concentrating hormone (RPCH) ควบคุมการรวมตัวของรงควัตถุภายในตาในการเปลี่ยนสีตัว (Fernlund and Josefsson, 1972), pigment dispersing hormone (PDH) ควบคุมการกระจายตัวของรงควัตถุในโครมาโทฟอร์ (Kleinholz *et al.*, 1986 ; Lohr, 1993), molt inhibiting hormone (MIH) ควบคุมการลอกคราบ (Webster, 1986), crustacean hyperglycemic hormone (CHH) ควบคุมการหมุนเวียนระดับของกลูโคสในเลือด (Santos and Keller, 1993) และ gonad inhibiting hormone (GIH) หรือ vitellogenesis inhibiting hormone (VIH) ควบคุมการพัฒนาของรังไข่ (Soyez, Deijnen and Martin, 1987) เป็นต้น X-organ จะอยู่ในบริเวณก้านตา (eyestalk) ของสัตว์กลุ่มครัสเตเชีย ประกอบด้วยนิวโรซีครีทอรีเซลล์เป็นแหล่งสร้างนิวโรฮอร์โมนและส่งไปสะสมที่ต่อมไซแนส Postcommissural organ (PCO) เป็นแหล่งสะสมและหลั่งนิวโรฮอร์โมนที่เกี่ยวกับการเปลี่ยนสีตัว Pericardial organ (PO) เป็นแหล่งสะสมและหลั่ง

นิวโรฮอโมนที่กระตุ้นการทำงานของหัวใจ Y-organ เป็นแหล่งสร้างฮอโมนที่ควบคุมการลอกคราบ (molting hormone) Androgenic gland เป็นแหล่งสร้างฮอโมนที่ควบคุมการเจริญของอวัยวะเพศผู้ รั้งไข่ (ovary) เป็นแหล่งสร้างฮอโมนที่ควบคุมการเจริญเติบโตของอวัยวะเพศเมีย (Fingerman, 1987) ต่อมไชนัสประกอบด้วยส่วนปลายของเส้นใยประสาทแอกซอนที่พองออก ซึ่งมีต้นกำเนิดมาจากตัวเซลล์ประสาทที่ตั้งอยู่ในที่ต่าง ๆ ภายในปมประสาทก้านตา ตัวเซลล์ประสาทรวมกันเป็นกลุ่มเรียกว่า X-organ โดยมีชื่อเรียกแตกต่างกันไปเพื่อระบุตำแหน่ง เช่น Medulla Terminalis Ganglionic X-organ หรือ Sensory Pore X-organ (SPX) เป็นต้น สารที่สร้างขึ้นภายในตัวเซลล์ประสาทเคลื่อนไปตามแอกซอนไปสิ้นสุดที่ต่อมไชนัสแล้วจึงปล่อยเข้าสู่กระแสเลือด (Carlisle and Knowles, 1959) นอกจากฮอโมนที่กล่าวถึงมาแล้ว ยังมีรายงานการพบเปปไทด์ฮอโมนอีกหลายชนิดในก้านตาของสัตว์กลุ่มครัสเตเชีย เช่น FMRFamide (Callaway, Masinovsky and Graubard, 1987 ; Keller, 1992 ; Schmidt and Ache, 1994), small cardioactive peptide (SCP) (Callaway, Masinovsky and Graubard, 1987), substance P (Schmidt and Ache, 1994), proctolin (Keller, 1992), และ cholecystokinin (CCK) (Turrogiano and Selverston, 1989) ซึ่งเปปไทด์ฮอโมนเหล่านี้อาจทำหน้าที่เป็นสารสื่อประสาท (neurotransmitter) หรือ นิวโรโมดูเลเตอร์ (neuromodulator) (Callaway, Masinovsky and Graubard, 1987 ; Keller, 1992 ; Schmidt and Ache, 1994 ; Turrogiano and Selverston, 1989) สำหรับแพนครีเอติกโพลีเปปไทด์ (pancreatic polypeptide, PP) และสารคล้ายแพนครีเอติกโพลีเปปไทด์ (PP-like substance) นั้น มีรายงานการตรวจพบ การแยก การทำให้บริสุทธิ์ และการหาลำดับกรดอะมิโนของสารนี้ในสัตว์มีกระดูกสันหลังเป็นส่วนใหญ่ สำหรับในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง มีรายงานพบในพยาธิตัวแบน, *Moniezia expansa* (Maule *et al.*, 1991) terrestrial tubellarian, *Artioposthia triangulata* (Curry *et al.*, 1992) ปลาหมึกกล้วย, *Loligo vulgaris* (Smart *et al.*, 1991) proteocephalidean cestode, *Proteocephalus pollanicola* (Marks *et al.*, 1993c) และหอยฝาเดียว, *Helix aspersa* (Leung *et al.*, 1994)

การศึกษาเกี่ยวกับสารคล้าย PP นี้ในกิ้งกูดดำมีเพียงการตรวจหาตำแหน่งที่พบสารคล้าย PP ในก้านตาของกิ้งกูดดำ (จันทร์ทิพย์ คงสินรัตนชัย, 2543) และการสกัดสารคล้าย PP จากต่อมไชนัส (พูลศิริ พุกฤษ์กานนท์, 2542) ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งในการศึกษาสารคล้าย PP จากก้านตาของกิ้งกูดดำ เพื่อที่จะแยกและทำให้บริสุทธิ์ อันจะนำไปสู่การตรวจหาโครงสร้างของลำดับกรดอะมิโนและศึกษาถึงหน้าที่ของสารคล้าย PP ที่มีบทบาทต่อการดำรงชีวิตของกิ้งกูดดำต่อไป

ในการวิจัยครั้งนี้ เป็นการแยกและทำให้บริสุทธิ์ของสารคล้าย PP จากก้านตาของกิ้งกูดดำ โดยใช้กระบวนการ reverse-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) ในสภาวะต่าง ๆ และติดตามสารคล้าย PP ในแฟรกชันต่าง ๆ หลังจากผ่านการแยกในแต่ละขั้นตอนโดยใช้วิธี dot-enzyme linked immunosorbant assay (Dot-ELISA) เนื่องจากเป็นวิธีที่มีความไว (sensitivity) สูงเทียบเท่ากับ radioimmunoassay (RIA) แต่ไม่สิ้นเปลืองวัสดุและมีความรวดเร็วกว่า RIA มาก (Sithigorngul, Stretton and Cowden, 1991) และตรวจหาน้ำหนักโมเลกุลของสารคล้าย PP ที่แยกได้ด้วย matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) ซึ่งมีความไวในการวิเคราะห์สูง (ในช่วง attomole ถึง femtomole) จึงสามารถใช้กับสารที่มีปริมาณน้อยได้ดีและใช้ multisample probe จึงทำให้สามารถเตรียมหลาย ๆ ตัวอย่างได้พร้อมกัน ดังนั้นการเตรียมและการวิเคราะห์จึงทำได้อย่างรวดเร็ว (Siuzdak, 1996) สารคล้าย PP ที่บริสุทธิ์ซึ่งได้จากการแยกนี้ สามารถนำไปศึกษาลักษณะโครงสร้างและองค์ประกอบทางเคมีตลอดจนบทบาทที่สำคัญในกระบวนการเมแทบอลิซึม กลไกการออกฤทธิ์ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการพัฒนาวิธีการในการเพาะเลี้ยงกิ้งกูดดำต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อแยกสกัดสารคล้ายแพนครีเอทิกโพลีเปปไทด์จากก้านตาของกิ้งกูดดำ (*Penaeus monodon*)
2. เพื่อให้บริสุทธิ์สารคล้ายแพนครีเอทิกโพลีเปปไทด์รูปแบบต่าง ๆ จากสารสกัดจากก้านตาของกิ้งกูดดำ ด้วยกระบวนการ RP-HPLC โดยใช้วิธี Dot-ELISA และ Mass Spectrometry ในการติดตามสารระหว่างการทำให้บริสุทธิ์

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1. แยกสกัดสารคล้าย PP จากก้านตาของกิ้งกูดดำ
2. ทำให้สารคล้าย PP ที่แยกสกัดได้บริสุทธิ์ด้วยกระบวนการ RP-HPLC
3. ใช้วิธี Dot-ELISA ติดตามสารคล้าย PP ในแฟรกชันต่าง ๆ หลังจากผ่านการแยกในแต่ละขั้นตอนของการทำให้บริสุทธิ์ด้วยกระบวนการ RP-HPLC
4. ตรวจหาน้ำหนักโมเลกุลของสารคล้าย PP รูปแบบต่าง ๆ ที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ MALDI-TOF MS

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้สารคล้าย PP บริสุทธิ์ที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลจากก้านตาของกึ่งกูดำ เพื่อนำไปตรวจหาโครงสร้างและลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโนต่อไป



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แนวคิดและทฤษฎี

แพนกรีเอติกโพลีเปปไทด์ (pancreatic polypeptide, PP), เปปไทด์ไทโรซีน-ไทโรซีน (peptide YY, PYY) และนิวโรเปปไทด์ไทโรซีน (neuropeptide Y, NPY) เป็นสารที่จัดอยู่ในกลุ่มที่เรียกว่า pancreatic polypeptide (PP) family หรือ neuropeptide Y (NPY) superfamily เนื่องจากเปปไทด์ทั้งสามมีโครงสร้างคล้ายคลึงกันคือ ประกอบด้วยกรดอะมิโน 36 หน่วย (ยกเว้น PYY ในไก่ ซึ่งจะประกอบด้วยกรดอะมิโน 37 หน่วย) ที่ปลายคาร์บอกซีหรือปลายซี (C-terminus) มีไทโรซีนเอไมด์ (tyrosine amide, Y-NH₂) และมีโครงสร้างตติยภูมิ (tertiary structure) คล้ายกัน (Larhammar, Blomqvist and Soderberg, 1993 ; Maule, Halton and Shaw, 1995) PP family มีโครงสร้างที่หลากหลายแต่มีกรดอะมิโนในสายเปปไทด์ที่คงที่ในตำแหน่งที่ 5, 8, 12, 27, 33 และ 35 คือ Pro⁵, Pro⁸, Ala¹², Tyr²⁷, Arg³³ และ Arg³⁵ (Maule, Halton and Shaw, 1995)

เปปไทด์ไทโรซีน-ไทโรซีน (peptide YY, PYY) ประกอบด้วยกรดอะมิโน 36 หน่วย มีปลายอะมิโนหรือปลายเอ็น (N-terminus) เป็นไทโรซีน (tyrosine, Y) และปลายคาร์บอกซีหรือปลายซีเป็นไทโรซีนเอไมด์ (tyrosine amide, Y-NH₂) เป็นฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับระบบทางเดินอาหาร (Tatemoto, 1982 ; Larhammar, Blomqvist and Soderberg, 1993)

นิวโรเปปไทด์ไทโรซีน (neuropeptide Y, NPY) ประกอบด้วยกรดอะมิโน 36 หน่วย มีปลายเอ็นเป็นไทโรซีนและปลายซีเป็นไทโรซีนเอไมด์คล้ายกับ PYY พบว่า NPY อาจเป็นสารสื่อประสาท (neurotransmitter) หรือนิวโรฮอร์โมน (neurohormone) ที่มีบทบาททางสรีรวิทยาในระบบประสาทส่วนกลาง (Tatemoto, Carlquist and Mutt, 1982) และเป็นนิวโรเปปไทด์ในสมองที่มีมากที่สุดซึ่งถูกสังเคราะห์ขึ้นโดย chromaffin cell ใน adrenal medulla และโดยเซลล์ประสาทที่อยู่ภายในระบบประสาทส่วนกลาง (central nervous system) และระบบประสาทนอกส่วนกลาง (peripheral nervous system) (Maule, Halton and Shaw, 1995)

แพนกรีเอติกโพลีเปปไทด์ (pancreatic polypeptide, PP) ประกอบด้วยกรดอะมิโน 36 หน่วย สร้างจากเซลล์พีพี (PP cell) หรือเซลล์เอฟ (F cell) ในไอส์เลตส์ออฟแลงเกอฮานส์ (islets of Langerhans) ที่ตับอ่อนและพบเซลล์ชนิดนี้อยู่ที่บริเวณขอบ ๆ ของไอส์เลตส์ ฤทธิ์ทางชีวภาพของ PP ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด ในคนพบว่าถ้าได้รับอาหารที่มีโปรตีนสูงจะตรวจพบ PP ในเลือดเพิ่มสูงขึ้น การคัดหลั่งของ PP จะถูกยับยั้งได้โดยโซมาโตสแตติน (somatostatin) ซึ่งเป็น

ฮอร์โมนที่สร้างจากไฮโปทาลามัสของปลาน้ำจืดเช่นกัน ความเข้มข้นของ PP ในคนจะสูงขึ้นตามอายุ ส่วนในนก PP อาจมีฤทธิ์เป็นตัวกระตุ้นการคัดหลั่งของกรดและเปปซินจากกระเพาะ (Norris, 1997)

นิวโรเปปไทด์เอฟ (neuropeptide F, NPF) พบได้ทั่วไปและจำนวนมากในระบบประสาทของพวกสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังบางชนิด เช่น ในพยาธิตัวแบน, *Moniezia expansa* (Maule *et al.*, 1991) ปลาหมึกกล้วย, *Loligo vulgaris* (Smart *et al.*, 1991) และหอยฝาเดียว, *Helix aspersa* (Leung *et al.*, 1994) มีโครงสร้างคล้ายกับ PP family ของพวกสัตว์มีกระดูกสันหลัง จึงเป็นคล้ายกับ precursor ของ vertebrate PP family โดยบทบาทของ NPF ยังไม่เป็นที่แน่ชัด แต่การที่พบได้ทั่วไปในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง จึงบ่งบอกได้ว่าน่าจะมีบทบาทที่สำคัญในระบบประสาทของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง (Maule, Halton and Shaw, 1995)

2.2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.2.1 เปปไทด์ไทโรซีน-ไทโรซีน (Peptide YY, PYY)

PYY พบครั้งแรกในลำไส้หมู (porcine) โดย Tatemoto และ Mutt ในปี 1978 ในระหว่างการแยกและทำให้บริสุทธิ์ฮอร์โมนซีครีติน (secretin) (Tatemoto and Mutt, 1978) ต่อมาในปี 1980 จึงได้ทำการศึกษาและทำให้บริสุทธิ์ โดยการสกัดเนื้อเยื่อลำไส้เล็กส่วนบนด้วย 0.5 M acetic acid และนำไปจับกับ alginic acid โดยชะออกด้วย 0.2 M HCl ตกตะกอนด้วย NaCl อิมัตว สกัดอีกครั้งด้วย 66% ethanol นำไปแยกผ่าน gel filtration (Sephadex G-25) สกัดต่อด้วย methanol เพื่อแยกส่วนที่ละลายได้ใน methanol ออกมา เมื่อนำไประเหย methanol ออกแล้วจึงนำไปแยกต่อด้วย ion exchange chromatography (CM-cellulose, CMC) นำมาแยกผ่าน CMC column อีกครั้ง ก่อนจะนำไปผ่าน gel filtration (Sephadex G-25), ion exchange (CMC) และ HPLC (Bondapak C-18) ต่อไป และติดตาม PYY ในแต่ละแฟรกชันโดยใช้วิธีทางเคมี โดยการตัดด้วย thermolysin และวัดปริมาณของ isoleucine amide หรือ tyrosine amide ที่หลุดออกมา พบว่าเป็นเปปไทด์ชนิดใหม่และใช้ระบบตัวอักษรเดี่ยวตั้งชื่อเป็นเปปไทด์ (Peptide, P) มีปลายอะมิโนเป็นไทโรซีน (tyrosine, Y) และปลายคาร์บอกซีเป็นไทโรซีนเอไมด์ (tyrosine amide, $-Y-NH_2$) จึงเรียก PYY ประกอบด้วยกรดอะมิโน 36 หน่วย มีลำดับของกรดอะมิโนที่ปลายอะมิโนเป็น Tyr-Pro-Ala-Lys-Pro-Glu-Ala-Pro-Gly และมีกรดอะมิโนทางปลายคาร์บอกซีเป็น Tyr-NH₂ มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของซีครีตินในตับอ่อนของแมว การฉีด porcine PYY ในปริมาณ 5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม จะลดการหลั่งของไบคาร์บอเนต (bicarbonate) ลงไปประมาณ

30% เมื่อเหนี่ยวนำโดยการให้ซีครีตินในปริมาณ 0.2 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และ PYY ยังมีผลต่อการหดตัวของผนังลำไส้ของหนูตะเภา (guinea pig) เมื่อฉีดเข้าไปในปริมาณ 0.5-5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมอีกด้วย (Tatemoto and Mutt, 1980)

ต่อมาในปี 1982 Tatemoto ได้แยก PYY ออกมาจากเนื้อเยื่อส่วนบนของลำไส้เล็กของหมูอีกครั้ง ด้วย ion exchange chromatography (CM-cellulose), gel filtration chromatography (Sephadex G-25), ion exchange chromatography (CM-cellulose) และ RP-HPLC (μ Bondapak C18 ; mobile phase เป็น 34% ethanol / 5 mM ammonium acetate / 0.2% acetonitrile) ตามลำดับ และติดตาม PYY ในแต่ละแฟรกชันโดยใช้วิธีทางเคมี โดยการหาปริมาณของ COOH-terminal amide หลังจากย่อยด้วย trypsin หรือ thermolysin แล้ว และหา tyrosine amide ที่หลุดออกมาในรูปของ fluorescent Dns derivative ด้วย thin layer chromatography (TLC) บน polyamide layer ได้ PYY ที่มีความบริสุทธิ์สูงในปริมาณ 0.15 ไมโครกรัมต่อกรัม เมื่อนำมาหาลำดับของกรดอะมิโนโดยการตัดด้วย trypsin และ chymotrypsin พบว่า PYY ที่ได้ประกอบด้วยกรดอะมิโน 36 หน่วย และมีลำดับของกรดอะมิโนเป็น YPAKPEAPGEDASPEELSRYYASLRHYLNLVTRQRY-NH₂ และมีผลยับยั้งการหลั่งไบคาร์บอเนตและของเหลวจากตับอ่อนและยับยั้งการหลั่งของโปรตีนที่ถูกกระตุ้นด้วยซีครีตินเพียงอย่างเดียว หรือที่ถูกกระตุ้นด้วยซีครีตินร่วมกับ cholecystokinin ในแมวเมื่อใช้ในปริมาณ 10-100 พิโคโมลต่อกิโลกรัม (Tatemoto, 1982a)

ในปีเดียวกัน El-Salhy และคณะได้ตรวจหาการกระจายของ PYY immunoreactive cell ในพวกสัตว์มีปีก domestic fowl โดยใช้วิธีการ peroxidase-antiperoxidase (PAP) ด้วยแอนติซีรัมจากกระต่ายต่อ porcine PYY (No. 69D) (อัตราส่วน 1 : 2,500) พบ PYY immunoreactive cell ในลำไส้ส่วนดูโอดินัม (duodenum) และเจจูนัม (jejunum) โดยไม่พบในบริเวณที่เป็นหลอดอาหาร (oesophagus), crop, proventriculus, gizzard ลำไส้ส่วนอิลีียม (ileum), โคลอน (colon), เรคตัม (rectum) และ rectal caeca (El-Salhy *et al.*, 1982)

ในคน Lundberg และคณะพบ PYY จากตับอ่อนและลำไส้ส่วนโคลอน เมื่อศึกษาด้วยวิธี indirect immunofluorescence โดยใช้ rabbit anti-PYY antiserum อัตราส่วน 1 : 100 และการฉีด porcine PYY เข้าไปในหลอดเลือดแดง (superior mesentery) ของแมวในปริมาณ 150 พิโคโมลต่อกิโลกรัมต่อนาที จะมีผลเพิ่มการบีบตัวของหลอดเลือดแดง ทำให้ความดันหลอดเลือดแดงเพิ่มขึ้น แต่อัตราการเต้นของหัวใจลดลง และมีผลยับยั้งการเคลื่อนไหวของลำไส้ส่วนเจจูนัมและโคลอน พร้อมกันนี้ยังได้มีการศึกษา PYY ในแมว หนูแรทและหนูตะเภา ด้วยวิธีการ

เดียวกันในบริเวณลำไส้เล็ก ตับอ่อน สมอ ปมประสาทซิมพาเทติก ต่อมไทรอยด์ ต่อมหมวกไต และท่อนาสเปิร์ม ในแมวจะพบ PYY ในเซลล์ที่อยู่ในบริเวณลำไส้ส่วนอิลีียมและโคลอน ส่วนในหนูแรทและหนูตะเภาพบเซลล์ที่มี PYY จำนวนมากอยู่ในบริเวณลำไส้เล็กส่วนโคลอนและเรคตัม และจะพบมากที่สุดบริเวณไฮสเลตส์ออฟแลงเกอฮานส์ (islets of Langerhans) ในตับอ่อน โดยไม่พบ immunoreactivity ในบริเวณสมอ ปมประสาทซิมพาเทติก ต่อมใต้สมอง ต่อมไทรอยด์ ต่อมหมวกไต ท่อนาสเปิร์ม กระเพาะและลำไส้ส่วนดูโอดีนัม โดยจากวิธีการ RIA ของเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ของหนูแรทที่สกัดด้วย 1 M acetic acid ที่อุณหภูมิ 95°C และนำไปแยกผ่าน SP-Sephadex C-25 ion-exchange column ใน mobile phase เป็น pyridine / formic acid พบว่าในลำไส้ส่วนดูโอดีนัมจะมี PYY ปริมาณน้อยกว่า 17 พิโคโมลต่อกรัม เจจูนัมมีปริมาณน้อยกว่า 40 พิโคโมลต่อกรัม อิลีียมมีปริมาณ 68-378 พิโคโมลต่อกรัม โคลอนมีปริมาณ 710-1,312 พิโคโมลต่อกรัม ตับอ่อนมีปริมาณ 68-270 พิโคโมลต่อกรัม สมอมีในปริมาณ 20 พิโคโมลต่อกรัมและพลาสมาจะมี PYY ในปริมาณน้อยกว่า 5 พิโคโมลต่อกรัม (Lundberg *et al.*, 1982)

ต่อมาในปี 1988 Tatemoto และคณะได้แยก PYY จากลำไส้ส่วนโคลอนของคน โดยการสกัดด้วยน้ำเดือดและกรดอะซิติก และนำไปจับกับ alginic acid โดยชะออกด้วย 0.2 M HCl ตกตะกอนด้วย NaCl อิมิตัว นำไปแยกผ่าน gel filtration (Sephadex G-25), ion exchange (CM cellulose) และ RP-HPLC 3 ขั้นตอน (Chemosorb 5-ODS-H : mobile phase เป็น ACN / 0.1% TFA, ACN / 5 mM phosphate buffer pH 6.5 และ ACN / 0.1% TFA ตามลำดับ) ตรวจหา PYY โดยใช้วิธีการทางเคมี และหาลำดับของกรดอะมิโนด้วยวิธี Edman degradation ใน gas-phase sequencer พบว่า PYY ประกอบด้วยกรดอะมิโน 36 หน่วย มีลำดับของกรดอะมิโนเป็น YPIKPEAPGEDASPEELNRYASLRHYLNLVTRQRY-NH₂ ซึ่งจะแตกต่างจากในหนู 2 ตำแหน่งคือ ตำแหน่งที่ 3 (อะลานีนแทนที่ไฮโซลิวซีน) และตำแหน่งที่ 18 (ซีรีนแทนที่แอสปาราจिन) (Tatemoto *et al.*, 1988)

ในปี 1986 Miyachi และคณะได้สกัด PYY จากทางเดินอาหารของหนูแรทด้วย 1 N acetic acid และหาปริมาณโดยใช้วิธี RIA พบว่าจากบริเวณทางเดินอาหารส่วนดูโอดีนัมไปยังปลายของโคลอนของหนูแรทมีความเข้มข้นของ PYY เพิ่มขึ้น และที่บริเวณโคลอนมีความเข้มข้นของ PYY 298.7-449.5 พิโคโมลต่อกรัม ซึ่งมากกว่าบริเวณดูโอดีนัมถึง 100-200 เท่า ส่วนบริเวณต่อมใต้สมองและตับอ่อนมีความเข้มข้นของ PYY เป็น 6.8 และ 6.3 พิโคโมลต่อกรัม ความเข้มข้นของ PYY ที่เยื่อบุผิวกระเพาะอาหารชั้นมิวโคซาจะมากกว่าเยื่อบุผิวชั้นกล้ามเนื้อในลำไส้เล็กส่วนโคลอน ซีคัมและเรคตัม (Miyachi *et al.*, 1986)

ต่อมาในปี 1993 Wager-Page และคณะพบว่าในหนูแรท PYY จะเพิ่มความดันเลือดเฉลี่ย (mean arterial pressure, MAP) และในขณะเดียวกันก็มีผลเพิ่มการเคลื่อนไหวของกระเพาะและลำไส้ด้วย (Wager-Page *et al.*, 1993)

ในสุนัข Pappas, Debas และ Taylor พบว่า PYY มีผลยับยั้งการหลั่งกรดในกระเพาะ (Pappas, Debas and Taylor, 1986)

การศึกษา PYY ในปลากระดูกแข็ง daddy sculpin, *Cottus corpius* ในปี 1987 โดยการสกัดจากส่วน islet organ (Brockmann bodies) ของปลา และแยกโดย gel filtration พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 5,000-6,000 ดาลตัน แยกต่อไปโดยใช้ RP-HPLC 2 ขั้นตอน ด้วย μ Bondapak alkylphenyl column ในระบบ mobile phase เป็น 50 mM ammonium acetate / acetonitrile และ Brownlee Aquapore RP-300 column ในระบบ mobile phase เป็น TFA / ACN / H₂O จะได้ PP-like peptide ในปริมาณ 0.16 มิลลิกรัมต่อกรัม ซึ่งเมื่อนำไปหาลำดับของกรดอะมิโนโดย gas phase sequencer พบว่า PP-like peptide นี้เป็น sculpin pancreatic peptide YY หรือ sPY ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโน 36 หน่วย และมีลำดับของกรดอะมิโนเป็น YPPQPESPGGNASPEDWAKYHAAVRHYVNLITRQRY-NH₂ (Cutfield, Carne and Cutfield, 1987)

ต่อมาในปี 1992 Jensen และ Conlon ได้ศึกษา PYY ในปลากระดูกแข็งคือจากสมองและกระเพาะของปลาเทราท์ (trout), *Oncorhynchus mykiss* โดยการสกัดด้วยกรด-แอลกอฮอล์ (ethanol : 0.7 M HCl / 3 : 1, v/v) และผ่าน Sep-Pak C18 cartridge 10 อันต่อกัน โดยชะสารออกด้วย ACN : H₂O : TFA (70 : 29.9 : 0.1, v/v/v) สำหรับส่วนสมองของปลาเทราท์ จะทำให้บริสุทธิ์โดยผ่าน RP-HPLC 4 ขั้นตอน (Vydac 218TP510 (C18), Vydac 214TP54 (C4), Vydac 219TP5415 phenyl และ Vydac 218TP54 (C18) ; mobile phase เป็น ACN / H₂O / TFA) และสำหรับส่วนกระเพาะของปลาเทราท์จะทำให้บริสุทธิ์โดยผ่าน gel filtration (Biogel P-10) และ RP-HPLC 4 ขั้นตอน (Vydac 218TP54 (C18), Vydac 214TP54 (C4), Vydac 219TP5415 phenyl และ Vydac 218TP54 (C18) ; mobile phase เป็น ACN / H₂O / TFA) ติดตามสาร PYY โดยใช้วิธี RIA ด้วย antiserum 8999 ซึ่งสร้างขึ้นเพื่อจับกับลำดับกรดอะมิโน 6 หน่วยทางด้านปลายคาร์บอกซีซึ่งเพิ่ม cystein เข้าไปด้วย (Cys-Ile-Thr-Arg-Gln-Arg-Tyr-NH₂) จะได้ PYY ที่บริสุทธิ์จากส่วนสมองในปริมาณ 400 พิโคโมลต่อ 77 กรัม และจากกระเพาะในปริมาณ 7 นาโนโมลต่อ 1,090 กรัม นำไปหาโครงสร้างปฐมภูมิโดย automated Edman degradation พบว่ามีโครงสร้างเหมือนกันคือมีลำดับของกรดอะมิโนเป็น YPPKPENPG-

EDAPPEELAKYYIALRHYINLITRQRY-NH₂ และยังมีเหมือนกับ PYY จากตับอ่อนของ Coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* ซึ่งเป็นสปีชีส์ที่ใกล้เคียงกันอีกด้วย (Jensen and Conlon, 1992)

ในพยาธิตัวกลม (roundworm), *Ascaris suum* ซึ่งอยู่ในลำไส้เล็กของหนู Brownlee และคณะพบว่า immunoreactivity ที่พบมากที่สุดในระบบประสาทส่วนกลาง (CNS) คือ immunoreactivity ต่อ PYY antisera โดยพบในเซลล์และเส้นใยประสาทใน ganglia ที่เกี่ยวข้องกับ anterior nerve ring และใน main nerve cord และ commissure ของ main nerve cord เมื่อศึกษาทาง immunocytochemistry ด้วยวิธี indirect immunofluorescence ซึ่งใช้ PYY301 antiserum ต่อ synthetic peptide YY (PYY) ซึ่งจำเพาะต่อ non-C-terminal อัตราส่วน 1 : 250 (Brownlee *et al.*, 1993)

ปี 1994 Agungpriyono และคณะได้รายงานการศึกษาตำแหน่งที่พบ PYY-immunoreactive cell ในทางเดินอาหารของกระวาง Lesser mouse deer, *Tragulus javanicus* ซึ่งเป็น primitive ruminant ที่มีขนาดเล็กที่สุด โดยการย้อมสีทาง immunohistochemistry ด้วยวิธี avidin-biotin peroxidase และใช้แอนติบอดีต่อ PYY อัตราส่วน 1 : 10,000 โดยพบมากในลำไส้ใหญ่ส่วนโคลอนและเรคตัม (Agungpriyono *et al.*, 1994)

2.2.2 นิวโรเปปไทด์ไทโรซีน (Neuropeptide Y, NPY)

NPY พบครั้งแรกในสมองของหนู ในปี 1982 ในการแยกเปปไทด์จากสมอง โดยสกัดด้วยเมทานอลและแยกผ่าน gel filtration chromatography (Sephadex G-25), ion exchange chromatography (CM-cellulose) และ RP-HPLC (μ Bondapak C18 ; mobile phase เป็น 40% ethanol / 5 mM ammonium acetate / 0.2% acetic acid และ μ Bondapak C18 ; mobile phase เป็น TFA / H₂O / ACN) ตามลำดับ และติดตาม NPY จากแต่ละแฟร็กชันด้วยวิธีการทางเคมี โดยการหาปริมาณของ tyrosine amide ที่ปล่อยออกมาหลังจากการย่อยด้วย trypsin หรือ thermolysin แล้ว พบว่าเมื่อแยกผ่าน Sephadex G-25 และ CM-cellulose แล้วจะสามารถแยก NPY ออกจากซีครีตินและ vasoactive intestinal peptide (VIP) ได้ และพีคที่ได้จาก RP-HPLC แสดง retention time ที่แตกต่างกับ PYY และ PP (Tatemoto, Carlquist and Mutt, 1982) และเมื่อใช้วิธี dansyl Edman subtractive ในการหาลำดับของกรดอะมิโนของ NPY ที่ได้จะได้โครงสร้างปฐมภูมิประกอบด้วยกรดอะมิโน 36 หน่วย มีลำดับของกรดอะมิโนเป็น YPSKPD-NPGEDAPAEDLARYYSALRHYINLIT-RQRY-NH₂ ซึ่งคล้ายกับ PYY ที่แยกได้จากลำไส้ของหนู

70% และคล้ายกับ PP 50% จึงสรุปได้ว่า NPY, PYY และ PP จัดเป็น peptide family กลุ่มเดียวกัน และพบว่า NPY ยังมีหน้าที่ทางชีววิทยาในการยับยั้งการหลั่งสารในตับอ่อนที่ถูกกระตุ้นโดยซีครีตินได้เช่นเดียวกับ PP และ PYY (Tatemoto, 1982b)

ในคน (*Homo sapiens*) ปี 1983 Adrian และคณะได้ศึกษา NPY ในสมองคน ด้วยแอนติบอดีต่อ NPY ของหมู (porcine NPY) อัตราส่วน 1 : 24,000 โดยใช้วิธีการ RIA ในการหาปริมาณของ NPY ของสมองซึ่งสกัดใน 0.5 M acetic acid ที่เดือด พบ NPY ปริมาณมากในสมองส่วน caudate, nucleus accumbens, amygdala, putamen และ hypothalamus ในความเข้มข้น 534.0, 305.0, 262.0, 243.0 และ 182.0 พิโคโมลต่อกรัม ตามลำดับ และเมื่อแยกผ่าน RP-HPLC จะได้พีคเดียวเช่นเดียวกับ NPY ของหมู แต่ไม่ได้อยู่ที่ตำแหน่งเดียวกัน แสดงว่ามีความแตกต่างเล็กน้อยระหว่าง NPY ของคนกับหมู และจากวิธีการทาง immunocytochemistry จะพบ NPY neuronal cell จำนวนมากโดยเฉพาะใน caudate และ putamen และจากการพบ NPY ปริมาณมากในสมอง NPY จึงน่าจะเป็นสารสื่อประสาทหรือนิวโรโมดูเลเตอร์ที่มีบทบาททางชีววิทยาในระบบประสาทส่วนกลาง (Adrian *et al.*, 1983)

นอกจากนี้ในปีเดียวกัน Gu และคณะยังได้นำหัวใจส่วนเอเตรียม (atrium) ซ้ายและขวา, เวนทริเคิล (ventricle) ซ้ายและขวา, simuatrial (S-A) node, atrioventricular (A-V) nodes, atrial และ ventricular septum, เนื้อเยื่อรอบ ๆ หลอดเลือดโคโรนารีและส่วน root ของ aorta มาศึกษาหาปริมาณของ NPY-like peptide จากเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ในหัวใจของคนโดยสกัดด้วย acetic acid ที่เดือด และนำไปทำ RIA พบปริมาณสูงสุดเป็น 22.1 ± 3.7 พิโคโมลต่อกรัม ในบริเวณ A-V node และเนื้อเยื่อรอบ ๆ หลอดเลือดโคโรนารีมีปริมาณสูงรองลงมาคือเป็น 19.6 ± 6.2 พิโคโมลต่อกรัม สำหรับบริเวณอื่น ๆ ของหัวใจจะมี NPY-like peptide อยู่ในช่วง 10-14 พิโคโมลต่อกรัม การวิเคราะห์สารสกัดด้วย RP-HPLC (Bondapak C18 : mobile phase เป็น TFA / H₂O / ACN) จะได้พีคเดียวของ NPY immunoreactive peptide ในตำแหน่งเดียวกับของ NPY จากสมองคน และเมื่อหาการกระจายของ NPY-like immunoreactive nerves โดยใช้วิธีการ immunofluorescence (ด้วย porcine NPY antisera อัตราส่วน 1 : 600) และ peroxidase antiperoxidase (PAP) staining (ด้วย porcine NPY antisera อัตราส่วน 1 : 4,000) จะพบ NPY-like immunoreactive nerves จำนวนมากตลอดทั้งหัวใจ โดยส่วนใหญ่จะอยู่ตามเส้นใยกล้ามเนื้อหัวใจ (cardiac muscle fibres) ซึ่งจะมีมากในบริเวณของ S-A และ A-V nodes นอกจากนี้ยังพบมากในหลอดเลือดโคโรนารีอีกด้วย ด้วยเหตุที่พบ NPY-like peptide ในปริมาณมากในหัวใจคนจึง

น่าจะเป็นไปได้ที่เปปไทด์ชนิดนี้จะเกี่ยวข้องในการควบคุมการหดตัวของกล้ามเนื้อหัวใจ (myocardial contractility) (Gu *et al.*, 1983)

ในปีเดียวกัน Hokfelt และคณะได้รายงานการปรากฏร่วมกันของ NPY-like peptide และ catecholamines (adrenaline) ในเซลล์ประสาทของสมองเด็กทารกส่วนเมดัลลา-ออบลองกาตา (medulla oblongata) ด้วยวิธี indirect immunofluorescence histochemistry โดยใช้ rabbit anti-NPY antiserum อัตราส่วน 1 : 100 จะพบเซลล์และเส้นใยประสาทของ NPY เป็นจำนวนมากในเมดัลลาออบลองกาตาส่วนล่าง โดยเซลล์จะมีขนาด 50 ไมครอน และการปรากฏร่วมกันของ NPY และ adrenaline ในระบบประสาทนอกส่วนกลาง และเมื่อฉีด NPY เข้าไปในหนูจะมีผลลดความดันเลือด ดังนั้น NPY-like peptide จึงน่าจะทำงานร่วมกับสารสื่อประสาทหลักคือ adrenaline ในการลดความดันเลือด (Hokfelt *et al.*, 1983)

ในปีเดียวกัน Lundberg และคณะได้นำเนื้อเยื่อระบบประสาทและระบบอื่น ๆ ของคนที่เสียชีวิตภายใน 36 ชั่วโมง มาศึกษาด้วยวิธี indirect immunofluorescence โดยใช้ antiserum 102B ซึ่งสร้างขึ้นอย่างมีความจำเพาะต่อ NPY สูง ในอัตราส่วน 1 : 20,000 พบเซลล์ที่มี NPY หนาแน่นในระบบประสาทซิมพาเทติก pelvic plexus และมีใยประสาทมากมายบริเวณ traversing sensory neuron และพบที่หัวใจห้องบนขวาและล่างซ้าย โคโรนารีอาร์เทอร์ และ bronchial ganglia หลอดเลือดแดงเลี้ยงสมองส่วนหน้า หลอดเลือดแดงเลี้ยงต่อมน้ำลาย หลอดเลือดฝอยในท่อไต (ureter) ยูรีทรา (urethra) ervice ปัสสาวะ ช่องคลอด (vagina) มดลูก (uterus) รั้งไข่ ต่อมไพโรสเตต (prostate gland) และท่อนาสเปิร์ม นอกจากนี้ยังพบเซลล์ที่มี NPY ในทางเดินอาหารที่กล้ามเนื้อเรียบของหลอดอาหาร ervice ลำไส้เล็กส่วนดูโอดีนัม โคลอนและบริเวณ intestinal ganglionic plexus ervice รอบ ๆ หลอดเลือด ภายใน lamina propria ของ ervice ชั้นมิวโคซาและยังพบที่ต่อมไร้ท่อในไฮโปทาลามัสของสัตว์ฟันแทะ และจากวิธีการ RIA ของเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ของหนูแรทที่สกัดด้วย 1 M acetic acid ที่อุณหภูมิ 95°C และนำไปแยกผ่าน SP-Sephadex C-25 ion-exchange column ใน mobile phase เป็น pyridine / formic acid พบว่าเนื้อเยื่อบริเวณปมประสาทซิมพาเทติก (S1 sympathetic ganglion) ปมประสาทสติลเลท (stellate ganglia) หลอดเลือดแดงเลี้ยงสมองส่วนหน้า (anterior cerebral artery) โคโรนารีอาร์เทอร์ หัวใจห้องบนขวาและซ้ายปอดมี NPY ปริมาณ 392 ± 47 , 395 ± 94 , 47 ± 11 , 32 ± 14 , 143 ± 33 และ 24 ± 4 พิโคโมลต่อกรัม ตามลำดับ นอกจากนี้ยังได้ศึกษาในหนูแมว และหนูตะเภาด้วยวิธีการเดียวกัน พบว่าในหนูจะมี NPY cell อยู่ที่ต่อมอะดรีนัล ในทางเดินอาหารจะพบ NPY cell ในชั้นกล้ามเนื้อของหลอดอาหาร ervice ดูโอดีนัมและโคลอน

นอกจากนี้ยังพบ NPY cell จำนวนมากในปมประสาทและยังพบที่ต่อมไร้ท่อในไฮโปทาลามัสของปลิง และจากเนื้อเยื่อบริเวณสมอง coeliac ganglion ปมประสาท สัตว์เลื้อยคลาน ต่อมหมวก-ไต หัวใจห้องบนขวา หลอดเลือดแดงเลี้ยงสมองส่วนหน้า ม้าม ดูโอดีนัม พบว่ามี NPY ปริมาณระหว่าง 13-922 พิโคโมลต่อกรัม ส่วนในแมวและหนูตะเภาพบเซลล์ที่มีสารคล้าย NPY ที่ หัวใจห้องบนขวาและห้องล่างซ้าย โดยในแมวจะพบ NPY จากเนื้อเยื่อปมประสาท ต่อมหมวกไต หัวใจ หลอดเลือดแดงเลี้ยงสมองส่วนหน้า ม้าม หลอดเลือดแดงเลี้ยงต่อมน้ำลาย หลอดเลือดแดงเลี้ยงปอด ต่อมน้ำลายใต้ขากรรไกร ขั้วปอดและหลอดลม มี NPY ในปริมาณระหว่าง 5-2,914 พิโคโมลต่อกรัม ส่วนในหนูตะเภาพบว่าเนื้อเยื่อบริเวณปมประสาทสัตว์เลื้อยคลาน หัวใจห้องบนขวา ม้าม และต่อมน้ำลายเป็รมี NPY ปริมาณระหว่าง 126-792 พิโคโมลต่อกรัม (Lundberg *et al.*, 1983)

ต่อมาในปี 1984 Dawbarn, Hunt และ Emson ได้นำเนื้อเยื่อสมองของคนที่ เสียชีวิตภายใน 36 ชั่วโมง มาศึกษาตำแหน่งและปริมาณของสารคล้าย NPY โดยใช้วิธีการทาง immunohistochemistry ในการหาตำแหน่งของเซลล์ที่มีสารคล้าย NPY ด้วย rabbit anti-NPY antiserum อัตราส่วน 1 : 1,000 และตรวจหาตำแหน่งด้วยวิธี PAP จะพบเซลล์ที่มีสารคล้าย NPY ในบริเวณ cortex และ striatum โดยตัวเซลล์มีขนาด 20 ไมครอน และเมื่อนำสมองส่วนต่าง ๆ มา สกัดสารคล้าย NPY ออกจากเนื้อเยื่อด้วย 1 M acetic acid ที่เดือด นำไปแยกผ่าน gel filtration (Sephadex G50) และ RP-HPLC (μ Bondapak C18 : mobile phase เป็น ACN / H₂O) และ นำมาหาปริมาณของสารคล้าย NPY ที่ได้ด้วยวิธี RIA พบว่ามีในปริมาณ 1.4-38.1 พิโคโมลต่อกรัม โดยมีมากในส่วน Brodmann area, amygdala, hippocampus และ caudate nucleus ตามลำดับ (Dawbarn, Hunt and Emson, 1984)

ต่อมาในปี 1993 Shaw และคณะได้ใช้ antiserum 161 ที่สร้างขึ้นเพื่อจับกับ ปลายคาร์บอกซีของ NPY (กรดอะมิโน 10 หน่วย) ซึ่งไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับ PP ในการศึกษา NPY ในเซลล์มะเร็งในคน โดยสกัดด้วย ethanol : 0.7 M HCl (3 : 1) และหาปริมาณของ NPY โดยวิธี RIA แยก NPY โดยใช้ RP-HPLC 3 ขั้นตอน (Partisil 2 ODS-3, Supelcosil LC 308 และ Vydac 208TP54 : mobile phase เป็น TFA / H₂O / ACN) ได้ NPY ประมาณ 600 พิโคโมลต่อ 0.1 กรัม หาลำดับของกรดอะมิโนด้วย mass spectroscopy ที่ใช้ Biolon 20 K plasma desorption time-of-flight พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 4,270 ดาลตัน จาก gas-phase sequencing ได้โครงสร้างปฐมภูมิเป็น YPSKPDNPGEDAPAEDMARYYSALRHYINLITRQRY-NH₂ (Shaw *et al.*, 1983)

ในสมองหนูแรท (Rat), *Rattus norvegicus* Allen และคณะได้ศึกษาตำแหน่ง และปริมาณของ NPY และ PP-like immunoreactivity โดยใช้วิธีทาง immunocytochemistry และ RIA ด้วยการสกัดด้วย 0.5 M acetic acid จะพบ immunoreactive cell body และ fiber ในบริเวณ cortex, limbic และ hypothalamus เป็นส่วนใหญ่ และมี NPY ในปริมาณมากกว่า เปปไทด์อื่น ๆ ที่พบในสมองของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม คือมีอยู่ในปริมาณระหว่าง 27-980 พิโคโมลต่อกรัม เมื่อแยกสารสกัดผ่านคอลัมน์โดยใช้ RP-HPLC และนำมาตรวจหาโดยใช้วิธีการ RIA พบ NPY-immunoreactivity แต่ไม่พบ aPP-immunoreactivity และจากวิธีการ double immunostaining จะพบทั้ง NPY และ aPP-like immunoreactivity อยู่ในเซลล์เดียวกัน (Allen *et al.*, 1983)

ในปีเดียวกันนี้ Stjernquist และคณะได้ทำการศึกษาค้นหาตำแหน่งของ NPY ในหนูแรท โดยนำท่อนอวัยวะสืบพันธุ์ของหนูเพศเมียในบริเวณ uterine horn, cervix, fallopian tube และรังไข่ ย้อมโดยใช้วิธี indirect immunofluorescence พบกลุ่มเส้นใยประสาทที่มีสารคัดหลั่ง NPY ทั่วไปใน uterine horn และ cervix, fallopian tube และรังไข่ โดยพบเส้นใยประสาทมากที่สุดที่บริเวณ cervix และยังได้รายงานว่ามีผลต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบปากมดลูกของหนูแรทในหลอดทดลอง (Stjernquist *et al.*, 1983)

และต่อมาในปี 1993 Wager-page และคณะยังพบว่า NPY มีผลในการเพิ่มการเคลื่อนไหวของลำไส้เล็กส่วนดูโอดินัมและลำไส้ใหญ่ส่วนโคลอนในหนู (Wager-page *et al.*, 1993)

ในปี 1988 Bjenming และ Holmgren ได้รายงานถึงตำแหน่งที่พบสารคัดหลั่งเปปไทด์ NPY ในพวกปลากระดูกอ่อน ได้แก่ ปลากระเบน 4 สปีชีส์ด้วยกัน ได้แก่ thornback ray (*Raja clavata*), painted ray (*Raja microocellata*), spotted ray (*Raja montagui*) และ Cockoo ray (*Raja naevus*) และในพวกปลากระดูกแข็ง ได้แก่ carp (*Cyprinus carpio*) และ Atlantic cod (*Gadus morhua*) โดยนำกระเพาะ ลำไส้และเรคตัม มาทำให้คงสภาพใน parabenso-quinone และย้อมโดยใช้วิธี indirect immunoperoxidase ด้วย rabbit anti-porcine NPY antiserum อัตราส่วน 1 : 200 จะพบเซลล์ประสาทของ NPY บริเวณกระเพาะ ลำไส้และเรคตัมใน *R. clavata*, *R. microocellata* และ *R. naevus* สำหรับ *R. montagui* ไม่พบเซลล์ประสาทของ NPY ในบริเวณลำไส้ ซึ่งตรงข้ามกับใน *G. morhua* ที่พบเซลล์ประสาทของ NPY เฉพาะในส่วนของลำไส้เท่านั้น สำหรับใน *C. carpio* พบเซลล์ประสาทของ NPY ในบริเวณลำไส้และเรคตัม โดยไม่มีการตรวจพบในกระเพาะ (Bjenming and Holmgren, 1988)

ต่อมาในปี 1991 ได้มีรายงานการศึกษา NPY ในปลากระดูกอ่อน (Class Chondrichthyes) คือ ปลา small-spotted dogfish, *Scyliorhinus canicula* โดยสกัด NPY-related peptide จากตับอ่อนด้วยกรด-แอลกอฮอล์ (ethanol : 0.7 M HCl / 3: 1 v/v) นำไปผ่าน SepPak C18 cartridge ที่ต่อกัน 3 อัน เปปไทด์จะถูกชะออกมาที่ 70% acetonitrile และนำไปทำให้บริสุทธิ์ผ่านกระบวนการ RP-HPLC 3 ขั้นตอน คือ ผ่านคอลัมน์ Vydac 218TP510 C18, Ultrapore C3 และ Vydac 214TP54 C4 (mobile phase เป็น ACN / H₂O / TFA) และตรวจหา NPY-related peptide ด้วยวิธี RIA ด้วย antiserum PP221 ซึ่งสร้างขึ้นเพื่อจับกับ synthetic C-terminal hexapeptide ของ human PP (Leu-Thr-Arg-Pro-Arg-Tyr-NH₂) จะได้ NPY-related peptide ในปริมาณ 16 นาโนโมลต่อกรัม เมื่อนำมาวิเคราะห์โครงสร้างปฐมภูมิด้วย automated Edman degradation พบว่าประกอบด้วยกรดอะมิโน 36 หน่วย คือ YPPKPEN-PGEDAPPEELAKYYSALRHYINLITRQRY-NH₂ และเมื่อฉีด NPY ที่ปริมาณ 0.5-4 นาโนโมล เข้าที่ celiac artery พบว่ามีผลเพิ่มความดันหลอดเลือดแดง (Conlon, Balasubramaniam and Hazon, 1991)

นอกจากนี้ในปีเดียวกัน Conlon และคณะยังได้รายงานการพบ peptide methionine-tyrosine (PMY) ซึ่งมีปลายอะมิโนเป็น methionine และปลายคาร์บอกซีเป็น tyrosine ในลำไส้เล็กของปลาปากกลมทะเล (lamprey) *Petromyzon marinus* (Class Cyclostomata) ซึ่งมีความเหมือนกับ pig NPY ในลำดับของกรดอะมิโน 64% ซึ่งมากกว่า pig PYY (61%) และ pig PP (42%) โดยสกัด PMY ด้วยกรด-แอลกอฮอล์ (ethanol : 0.7 M HCl / 3: 1 v/v) นำไปผ่าน SepPak C18 cartridge ที่ต่อกัน 12 อัน เปปไทด์จะถูกชะออกมาที่ 70% acetonitrile และนำไปทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านกระบวนการ gel permeation chromatography (Sephacryl S-100 column) RP-HPLC 3 ขั้นตอน คือ ผ่านคอลัมน์ Vydac 218TP510 C18, Ultrapore C3 และ Vydac 214TP54 C4 (mobile phase เป็น ACN / H₂O / TFA) และตรวจหา PMY ด้วยวิธี RIA ด้วย antiserum PP221 ซึ่งสร้างขึ้นเพื่อจับกับ synthetic C-terminal hexapeptide ของ human PP (Leu-Thr-Arg-Pro-Arg-Tyr-NH₂) จะได้ PMY ในปริมาณ 26 นาโนโมลต่อ 164 กรัม เมื่อนำมาวิเคราะห์โครงสร้างปฐมภูมิด้วย automated Edman degradation พบว่าประกอบด้วยกรดอะมิโน 36 หน่วย คือ MPPKPDNPSDASPEELSKYMLAVRNYINLITRQRY-NH₂ (Conlon *et al.*, 1991)

ต่อมาในปี 1992 Jensen และ Conlon ได้ศึกษา NPY จากสมองของปลาแอตแลนติกคอด (Atlantic cod), *Gadus morhua* และปลาเทราท์ (trout), *Oncorhynchus*

mykiss โดยการสกัดด้วยกรด-แอลกอฮอล์ (ethanol : 0.7 M HCl / 3 : 1, v/v) และผ่าน Sep-Pak C18 cartridge 10 อันต่อกัน โดยชะสารออกด้วย ACN : H₂O : TFA (70 : 29.9 : 0.1, v/v/v) ทำให้บริสุทธิ์ โดยผ่าน RP-HPLC 4 ชั้นตอน (Vydac 218TP510 (C18), Vydac 214TP54 (C4), Vydac 219TP5415 phenyl และ Vydac 218TP54 (C18) ; mobile phase เป็น ACN / H₂O / TFA) ติดตามสาร NPY โดยใช้วิธี RIA ด้วย antiserum 8999 จะได้ NPY ที่บริสุทธิ์จากสมองของ *G. morhua* ในปริมาณ 4 นาโนโมลต่อ 250 กรัม และจากสมองของ *O. mykiss* ในปริมาณ 250 พิโคโมลต่อ 77 กรัม นำไปหาโครงสร้างปฐมภูมิโดย automated Edman degradation พบว่า cod NPY มีลำดับของกรดอะมิโนเป็น YPIKPENPGEDAPADELAKYYSALRHYINLITRQRY-NH₂ ซึ่งแตกต่างกับลำดับของกรดอะมิโนของ trout NPY 4 ตำแหน่ง คือ Ile ในตำแหน่งที่ 3 เปลี่ยนเป็น Val, Ala ในตำแหน่งที่ 14 เปลี่ยนเป็น Thr, Asp ในตำแหน่งที่ 15 เปลี่ยนเป็น Glu และ Ser ในตำแหน่งที่ 22 เปลี่ยนเป็น Thr (Jensen and Conlon, 1992)

ต่อมาในปี 1997 ได้มีรายงานการศึกษาการกระจายของ NPY ในสมองปลากระดุกแข็ง bichir, *Polypterus senegalus* โดยใช้วิธีการ streptavidin-biotin peroxidase complex โดยใช้ rabbit anti-porcine NPY antiserum ในอัตราส่วน 1 : 3,000 พบเซลล์ประสาทที่มี NPY หนาแน่นมากที่สุดที่ diencephalon บริเวณ ventral hypothalamus, thalamic nucleus, periventricular preoptic nucleus นอกจากนี้ยังพบในบริเวณ pallial zone ของ telencephalon บริเวณ tegmentum ของ mesencephalon และบริเวณ intermedioventralis ของ rhombencephalon และพบเส้นใยประสาทที่มี NPY อย่างหนาแน่นใน ventral telencephalon, hypothalamus และ ventrolateral area ของ rhombencephalon ส่วนในต่อมใต้สมอง (hypophysis) พบเส้นใยประสาทที่มี NPY immunoreactivity มาก แต่ในส่วน neural lobe พบ NPY immunoreactivity น้อย (Chiba, 1997)

ในพวกครัสเตเชีย (Class Crustacea) ในปี 1996 Honma และคณะ พบสารคล้าย NPY ในสมองปู *Chiromantes haematocheir* เมื่อนำส่วนหัวจนถึงส่วนอก (cephalothorax) และส่วนท้อง (abdomen) มาตรวจหาด้วยวิธี streptavidin-biotin peroxidase complex โดยใช้ rabbit anti-synthetic porcine NPY antiserum ในอัตราส่วน 1 : 3,000 พบกลุ่มเซลล์ที่มีสารคล้าย NPY ทั่วไปในสมองปู บริเวณ cephalic ganglion และ neuropile และพบเส้นใยประสาทบริเวณ protocerebrum, deutocerebrum และ tritocerebrum (Honma *et al.*, 1996)

จากการศึกษาของบราวน์ลีและคณะพบ immunoreactivity ของ NPY โดยใช้ RPN1702 antiserum ต่อ synthetic porcine neuropeptide Y (NPY) อัตราส่วน 1 : 400 ใน

ventral และ lateral nerve cords ของพยาธิตัวกลมในหนู, *Ascaris suum* (Brownlee *et al.*, 1993)

2.2.3 แพนครีเอติกโพลีเปปไทด์ (Pancreatic Polypeptide, PP)

แพนครีเอติกโพลีเปปไทด์ (PP) พบครั้งแรกโดย Kimmel, Pollock and Hazelwood ในปี 1968 ในระหว่างการแยกสกัดอินซูลินจากตับอ่อนของไก่, *Gallus gallus domesticus* โดยสกัดสารจากตับอ่อนด้วย acidified ethanol (water : 95% ethanol : H₂SO₄, 155 : 825 : 206 v/v/v) และแยกสารสกัดโดยใช้วิธี gel filtration chromatography (Sephadex G-50), displacement chromatography (DEAE-cellulose) และ crystallization ตามลำดับ และตรวจหา PP โดยวิธี RIA สามารถแยก avian PP (aPP) ได้จากขั้นตอน displacement chromatography aPP ที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุล 4,240 ดาลตัน มีค่า isoelectric point อยู่ระหว่าง 6-7 ประกอบด้วยกรดอะมิโน 36 หน่วย และลำดับของกรดอะมิโนเป็น GPSQPTYPGDDAPV-EDLIRFYDNLQQYLNWVTRHRY-NH₂ และมี aPP อยู่ในตับอ่อนไก่ในปริมาณ 4 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม มีผลทางกายภาพเมื่อใช้ในปริมาณเป็นมิลลิกรัม โดยทำให้เกิดการเพิ่มการหลั่งกรด และเปปซินของกระเพาะ (Kimmel, Hayden and Pollock, 1975)

ในปี 1979 Gersell, Gingerich และ Greider ศึกษาปริมาณและการกระจายในระดับเซลล์ของ PP ในตับอ่อนของคนและสุนัข (canine) โดยสกัดสารจากตับอ่อนโดยใช้ acidified alcohol และตรวจหาโดยใช้วิธี RIA, immunoperoxidase localization และ cell quantitation ด้วยแอนติบอดีต่อ PP ของวัว (bovine PP, bPP) อัตราส่วน 1 : 500 พบว่า ปริมาณของ PP สูงสุดที่ตับอ่อนส่วนหน้าทั้งในคนและสุนัข โดยมีปริมาณเฉลี่ยเป็น 119.9 และ 118.48 ไมโครกรัมต่อกรัม ตามลำดับ สำหรับตับอ่อนส่วนกลางปริมาณเฉลี่ยเป็น 6.5 และ 18.02 ไมโครกรัมต่อกรัม และส่วนหลังเป็น 9.7 และ 14.02 ตามลำดับ และพบ F-cell ในคนอยู่ที่บริเวณขอบของไอส์เลตส์ (periphery of the islets) และมีบางเซลล์กระจายอยู่ตลอดทั้งท่อ (ducts) และต่อมมีท่อ (acini) ส่วนในสุนัขจะพบ F-cell อยู่ในบริเวณท่อ ต่อมมีท่อและไอส์เลตส์ (Gersell, Gingerich and Greider, 1979)

ในปี 1997 Okita และคณะพบว่าการหลั่งของ PP ในสุนัขถูกควบคุมโดยระดับน้ำตาลในเลือดและอาหารที่รับประทานเข้าไปโดยมีกลไกของเส้นประสาททวารกัส-โคลิเนอร์จิก (vagus-cholinergic nerve) เป็นตัวควบคุมที่สำคัญโดยเฉพาะช่วงการหลั่ง PP ในระยะเซฟาเลียคเฟส (cephalic phase) (Okita *et al.*, 1997)

ต่อมาในปี 1984 Schwartz และคณะสกัดตับอ่อนของคนด้วยกรด-แอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 68% (0.1 mol HCl / 1 L ethanol) แยกด้วย gel filtration (Bio-Gel P-30) และ ion exchange (DEAE Sephadex) ทำให้บริสุทธิ์ต่อด้วยกระบวนการ RP-HPLC (Nucleosil 10 C18; mobile phase เป็น 0.1% TFA / H₂O / ACN) ตรวจหา PP ด้วยวิธี polyacrylamide slab gel electrophoresis หาลำดับของกรดอะมิโนโดยใช้ Beckman 890C spinning cup sequencer พบว่ามีลำดับของกรดอะมิโนเป็น APLEPVYPGDNATPEQMAQYAADLRRYINMLTRPRY-NH₂ (Schwartz *et al.*, 1984)

ในปี 1992 Lukinius และคณะได้ศึกษา PP ในตัวอ่อนคนที่กำลังพัฒนาขณะตั้งครรภ์ที่ได้ทำให้แท้งอย่างถูกต้องตามกฎหมายโดยใช้สารพรอสตาแกลนดิน (prostaglandin) แล้วนำเนื้อเยื่อตับอ่อนขนาด 1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร มาทำอิมมูโนโกลด์เลเบลลิงแบบการติดฉลากซ้อน (double labelling) โดยใช้ rabbit anti-PP antiserum (polyclonal) อัตราส่วน 1 : 1,000 พบว่าตับอ่อนของตัวอ่อนคนอายุ 14 สัปดาห์ สามารถสร้างฮอร์โมนได้ทั้งอินซูลิน กลูคากอน โซมาโตสแตติน และ PP โดยเก็บสะสมภายในเซลล์เดียวกันและภายในแกรนูลเดียวกันของเซลล์ ต่อมาไร้ท่อในตับอ่อน แกรนูลจะเป็น polyhormonal granule เมื่ออายุของทารกเพิ่มขึ้น เซลล์ของต่อมไร้ท่อจะเติบโตขึ้น โดยจะพบเซลล์ที่สร้างฮอร์โมนชนิดเดียวคือเซลล์ที่มี PP ก่อน ต่อมาพบเซลล์ที่มีโซมาโตสแตติน ส่วนเซลล์ที่มีอินซูลินและกลูคากอนจะพบตอนหลังจากทารกเกิดแล้ว ดังนั้นจึงเชื่อว่าเซลล์ของต่อมไร้ท่อในตับอ่อนทารกสามารถสังเคราะห์ฮอร์โมนหลักในไฮโปเธาลัส-ออปฟแลงเกอฮานส์และเปปไทด์หลายชนิดเก็บสะสมไว้ในแกรนูลเดียวกัน สำหรับทารกอายุ 14 สัปดาห์จะพบเซลล์ที่มี PP ซึ่งบรรจุด้วยแกรนูลที่มี PP เป็น mature granule กระจายอยู่รอบ ๆ ไฮโปเธาลัสของตับอ่อน แกรนูลมีลักษณะทรงกลมใสและขนาดเท่า ๆ กัน แกรนูลมีขนาดเฉลี่ย 140 ± 60 นาโนเมตร นอกจากนั้นยังได้มีการศึกษา PP ในตัวอ่อนหมูที่กำลังพัฒนาในครรภ์ด้วยวิธีการเดียวกัน พบฮอร์โมนอินซูลิน กลูคากอน โซมาโตสแตติน และ PP ภายในแกรนูลเดียวกันของเซลล์ของต่อมไร้ท่อในตับอ่อนของตัวอ่อนของหมูอายุ 50-90 วัน จัดเป็น polyhormonal granule เมื่ออายุของตัวอ่อนเพิ่มขึ้นและเซลล์ของต่อมไร้ท่อเติบโตขึ้นพบว่า polyhormonal granule จะค่อย ๆ หายไปในตัวอ่อนของหมูอายุ 70 วัน (Lukinius *et al.*, 1992)

ต่อมาในปี 1994 Chen และคณะได้ศึกษา PP จากทางเดินอาหารของหมูอายุ 3 เดือน โดยศึกษาในบริเวณกระเพาะอาหารส่วนแอนโทรไพโรลิก (antropyloric stomach) ลำไส้เล็ก ส่วนดูโอดีนัม เจจูนัม อิลีียม ลำไส้ใหญ่ส่วนโคลอน และตับอ่อน ใช้ rabbit anti-synthetic human PP antiserum ที่สังเคราะห์ขึ้น ในอัตราส่วน 1 : 1,800 พบเซลล์ที่มี PP ที่เยื่อผิวชั้นมิวโคซาของกระเพาะอาหารส่วนแอนโทรไพโรลิส เยื่อผิวชั้นมิวโคซาของลำไส้ใหญ่ส่วนโคลอน ลำไส้ส่วนดูโอดีนัม ต่อมบรูเนอร์ (Brunner's gland) ที่ลำไส้เล็ก และตับอ่อนพบ PP มากที่สุด แต่ไม่พบเซลล์ที่มี PP ที่ลำไส้เล็กส่วนเจจูนัมและอิลีียม (Chen *et al.*, 1994)

ในปี 1982 El-Salhy และคณะได้ศึกษาตำแหน่งของ PP-immunoreactive cell ในทางเดินอาหารของ domestic fowl โดยใช้วิธีการ PAP ด้วย rabbit antiserum ต่อ avian PP (อัตราส่วน 1 : 8,000) พบ PP-immunoreactive cell มากใน ลำไส้ส่วนเจจูนัม, ดูโอดีนัม, อิลีียม และโคลอน ตามลำดับ โดยไม่พบในบริเวณหลอดอาหาร, crop, proventriculus, gizzard, เรคตัม และ rectal caeca (El-Salhy *et al.*, 1982)

ในแคะ ปี 1984 Calingasan และคณะ ได้รายงานการศึกษาตำแหน่งที่พบ PP ที่เซลล์ของต่อมไร้ท่อในทางเดินอาหาร โดยนำทางเดินอาหารและตับอ่อนของแกะมาข้อมโดยใช้วิธี PAP ด้วย rabbit anti-bovine PP antiserum อัตราส่วน 1 : 5,000 พบเซลล์ที่มี PP ที่บริเวณดูโอดีนัม เจจูนัม อิลีียม ซีคัม โคลอน เรคตัม โดยบริเวณลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่จะมีเซลล์ PP ที่มีลักษณะเป็นรูปไข่หรือปิรามิด ส่วนในตับอ่อนจะเด่นชัดและเป็นจำนวนมากในต่อมไร้ท่อ แต่ในต่อมมีท่อ จะพบค่อนข้างน้อยและเซลล์จะอยู่อย่างกระจัดกระจายอยู่ด้านในของท่อในตับอ่อน โดยเซลล์ที่อยู่นอกไฮสเลตส์อาจอยู่เดี่ยวหรืออยู่เป็นกลุ่ม (Calingasan *et al.*, 1984)

ในปี 1984 Kimmel และคณะได้แยก PP จากตับอ่อนของหนูแรท, *Rattus norvegicus* โดยการสกัดตับอ่อนส่วน ventral lobe หรือ duodenal lobe ซึ่งมีเซลล์ PP มากที่สุด ด้วยสารละลายกรด-แอลกอฮอล์ และแยกด้วยวิธี gel filtration chromatography (Sephadex G-50), ion-exchange chromatography (DEAE-cellulose) และ RP-HPLC (Zorbax TMS ; mobile phase เป็น TFA / 2-methoxyethanol / H₂O / ACN, และ Vydac C-18 ; mobile phase เป็น TFA / H₂O / ACN ตามลำดับ) ตามลำดับ และติดตาม PP ด้วย RIA โดยใช้แอนติบอดีต่อเปปไทด์ 6 หน่วยจากปลายคาร์บอกซีของ bPP ได้ rat PP (rPP) ในปริมาณ 2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และพบว่า rPP ประกอบด้วยกรดอะมิโน 36 หน่วย เมื่อนำมาหาลำดับของกรดอะมิโนด้วยวิธี Edman degradation จะได้ลำดับของกรดอะมิโนเป็น APLEPMYPGDYATHEQRAQYETQLR-RYINTLTRPRY-NH₂ และ methionine หน่วยเดียวในสายของเปปไทด์จะเกิด oxidize เป็น

methionine sulfoxide ได้ง่าย ซึ่งจะทำให้เกิดพีคของ PP เป็น 2 พีค ในการแยกด้วย RP-HPLC และเปปไทด์ตามธรรมชาติสามารถถูก reduce ได้ด้วย mercaptoethanol (Kimmel *et al.*, 1984)

ต่อมาในปี 1995 Elayat, El-Naggar และ Tahir ได้ศึกษาตำแหน่งที่พบ PP ในตับอ่อนของหนูแรท ด้วยวิธี avidin-biotin complex โดยใช้ rabbit anti-human PP antiserum (ความเข้มข้น 1 : 5,000) พบเซลล์ที่มี PP อยู่อย่างกระจัดกระจายในต่อมไร้ท่อของตับอ่อน โดยในตับอ่อนบริเวณดูโอเดนิ่มส่วนล่างจะพบ PP cell ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางของนิวเคลียสขนาด 6.297 ± 0.14 ไมโครเมตร จำนวน $1,679 \pm 168$ เซลล์ต่อไฮสเลตส์ ที่บริเวณดูโอเดนิ่มส่วนบนพบ PP cell ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางของนิวเคลียสขนาด 6.182 ± 0.10 ไมโครเมตร จำนวน 143 ± 20 เซลล์ต่อไฮสเลตส์ ที่บริเวณกระเพาะจะพบ PP cell มีเส้นผ่านศูนย์กลางของนิวเคลียสขนาด 6.341 ± 0.15 ไมโครเมตร จำนวน 435 ± 32 เซลล์ต่อไฮสเลตส์ และส่วนที่บริเวณม้ามจะพบ PP cell มีเส้นผ่านศูนย์กลางของนิวเคลียสขนาด 6.389 ± 0.12 ไมโครเมตร จำนวน 405 ± 30 เซลล์ต่อไฮสเลตส์ (Elayat, El-Naggar and Tahir, 1995)

จากการศึกษาของ Murphy และคณะในปี 1981 พบว่า hPP₁₋₃₆ มีผลลดระดับของอินซูลินในหนูแรท (Murphy *et al.*, 1981) และต่อมาในปี 1993 McTigue, Edwards และ Rogers พบว่า PP มีผลต่อการเพิ่มการหลั่งกรดไฮโดรคลอริกและการเคลื่อนไหวของกระเพาะส่วนแอนทรัม (antrum) ของหนูแรท (McTigue, Edwards and Rogers, 1993) และในปีเดียวกัน Wager-Page และคณะยังพบว่า PP มีผลเพิ่มความดันภายในลูเมน (lumen) ของลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่ในหนูแรท (Wager-Page *et al.*, 1993)

ในปี 1986 Rombout และคณะได้ศึกษาตำแหน่งที่พบและการปรากฏร่วมของ PP และ FMRFamide ในตับอ่อนและทางเดินอาหารของหนูเม้าส์ (mouse) และปลากระดูกแข็ง *Barbus conchonus* โดยใช้วิธี PAP ด้วย guinea pig anti-bovine PP antiserum อัตราส่วน 1 : 2,000, guinea pig anti-porcine PP antiserum อัตราส่วน 1 : 800 และ guinea pig anti-FMRFamide antiserum อัตราส่วน 1 : 2,000 พบการปรากฏร่วมของ PP และ FMRFamide ในตับอ่อนของหนูและปลา (Rombout *et al.*, 1986) และต่อมาในปีเดียวกัน Rombout, Bol และ Taverne-Thiele ได้ศึกษาเพิ่มเติมในปลาชนิดเดียวกัน โดยเปลี่ยนไปใช้วิธี protein A-gold ใช้อนุภาคทองขนาด 7 นาโนเมตร (white phosphorus) และอนุภาคทองขนาด 12 นาโนเมตร (sodium ascorbate) และตรวจดูผลด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบแกรนูลที่มี PP ขนาด 174 นาโนเมตร (Rombout, Bol and Taverne-Thiele, 1986)

ในพวกปลากระดูกแข็ง (Class Osteichthyes) ปี 1986 Carrillo และคณะได้ศึกษาตำแหน่งที่พบ PP ในตับอ่อนของปลากะพงทะเล (seabass) *Dicentrarchus labrax* โดยใช้วิธี PAP ด้วย rabbit anti-bovine PP antiserum อัตราส่วน 1 : 2,000 พบ bPP cell ที่ประกอบด้วยแกรนูลซึ่งมีความทึบของแสงอิเล็กตรอนต่าง ๆ กัน เป็นจำนวนมากกระจายทั่วไปในไซโตพลาซึมของเซลล์ในต่อมไร้ท่อของตับอ่อน โดยจะมีการเรียงตัวเป็น insulin cell และ somatostatin cell รวมอยู่ตรงกลางและ glucagon cell และ PP cell ที่ชั้นรอบนอก (Carrillo *et al.*, 1986)

ในปี 1997 ได้มีรายงานการศึกษาถึงตำแหน่งที่พบ PP ในปลากระดูกแข็งพวกปลาตัวแบน turbot, *Scophthalmus maximus* โดยนำทางเดินอาหารและทั้งตัวของตัวอ่อน (larvae) ช่วงต้นพัฒนาการในระยะต่าง ๆ มา้อมด้วยเทคนิคอิมมูโนฟลูออเรสซิน โดยใช้ rabbit anti-salmon PP antiserum อัตราส่วน 1 : 700 และ rabbit anti-bPP antiserum อัตราส่วน 1 : 500 พบเซลล์ที่มี bPP (bovine PP) และ sPP (salmon PP) ในตัวอ่อนปลาระยะที่ 3 อายุ 8-10 วัน ระยะที่ 4 อายุ 11-15 วัน และ ระยะที่ 5 อายุ 17-20 วัน นอกจากนี้ยังพบเซลล์และเส้นใยประสาทที่มี sPP บริเวณต่อมไร้ท่อในลำไส้เล็กระยะที่ 5 อายุ 24 วัน และ ระยะที่ 6 อายุ 41 วัน โดยตรวจไม่พบเซลล์ bPP และ sPP ในระยะที่ 1 อายุ 1-4 วัน และระยะที่ 2 อายุ 5-7 วัน โดยเฉพาะบริเวณกระเพาะของตัวอ่อนปลา *S. maximus* ตรวจไม่พบปฏิกิริยาทางอิมมูโนต่อ bPP และ sPP ในทุกช่วงระยะเวลาของพัฒนาการ (Reinecke, Muller and Segner, 1997)

ในสิ่งมีชีวิตจำพวกสัตว์ปีก (Class Aves) Langslow, Kimmel และ Pollock ได้สกัด PP จาก ตับอ่อนของสัตว์ปีก 7 สปีชีส์ คือ แม่ไก่ (domestic chicken) นกพิราบ (pigeon) ห่าน (domestic goose) เป็ด (domestic duck) นกปากเป็ด (roseate spoonbill, *Ajoia ajajia*) นกเค้าแมว (great horned owl, *Bufo virginianus*) และ นกเหยี่ยวหางแดง (immature red-tailed hawk, *Buteo jamaicensis*) ด้วยกรด-แอลกอฮอล์ และหาปริมาณของ PP โดยใช้วิธี RIA ด้วย guinea pig anti-aPP serum อัตราส่วน 1 : 100 พบว่ามี aPP อยู่ในปริมาณ 4.60, 0.54, 4.23, 5.78, 5.05, 2.23 และ 6.28 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ตามลำดับ นอกจากนี้ยังได้ศึกษาในสิ่งมีชีวิตจำพวกสัตว์เลื้อยคลาน (Class Reptilia) 2 สปีชีส์ คือ เต่า, *Pseudemys scripta elegans* และจระเข้, *Caiman sclerops* ด้วยวิธีการเดียวกัน พบว่าในตับอ่อนมี aPP อยู่ในปริมาณ 1.30 และ 11.40 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ตามลำดับ (Langslow, Kimmel and Pollock, 1973)

ต่อมาในปี 1974 ได้มีการศึกษาถึงตำแหน่งและลักษณะเซลล์ที่มี PP ในตับอ่อนของไก่ใช้ rabbit anti- aPP antiserum อัตราส่วน 1 : 20 หรือ 1 : 5 พบเซลล์ที่มี PP จำนวนมาก

กระจายอยู่ในเยื่อพาราไคมาของต่อมมีท่อในตับอ่อนของไก่ และพบแกรนูโลที่มี PP อยู่จำนวนมากในไซโตพลาซึมของเยื่อพาราไคมาของต่อมมีท่อในตับอ่อน เซลล์ที่มี PP มีลักษณะหลายเหลี่ยมหรือแหลมหัวแหลมท้าย พบเซลล์ที่มี aPP มากสุดในตับอ่อนไก่หลังจากฟักออกจากไข่ 1 วัน และยังได้รายงานว่าบทบาทของ aPP ในไก่ที่ทำให้จัดเป็นฮอร์โมนจากตับอ่อนคือ 1) ไหลเวียนในกระแสโลหิตที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ภายหลังการทานอาหาร 2) มีอิทธิพลกับกิจกรรมทางด้านชีวภาพ 3) ผลิตจากเซลล์ต่อมไร้ท่อ และ 4) เก็บสะสมที่แกรนูโลในไซโตพลาซึม (Larsson *et al.*, 1974)

ในสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ (Class Amphibia) ปี 1988 Pollock และคณะได้แยกสกัดสาร PP จากตับอ่อนของกบ *Rana catesbeiana* ด้วยกรด-แอลกอฮอล์ (H_2O : 95% ethanol : H_2SO_4 / 13 : 70 : 17 v/v/v) และแยกด้วย gel filtration (Sephadex G-50) และแยกต่อด้วย RP-HPLC (C18 column 2 ขั้นตอน ; mobile phase เป็น 0.1% TFA / H_2O / ACN และ 0.1% TFA / H_2O / isopropyl alcohol ตามลำดับ) ตรวจหา PP โดยวิธี RIA ด้วย rabbit antibody ที่สร้างขึ้นเพื่อจับกับ synthetic hexapeptide ทางปลายคาร์บอกซีของ mammalian PP ทั่วไป พบว่ามีปริมาณ PP ที่แยกสกัดได้ 21 ไมโครกรัมต่อกรัม เมื่อนำมาหาลำดับของกรดอะมิโนโดยใช้ Beckman 121 MB amino acid analyzer พบว่าประกอบด้วยกรดอะมิโน 36 หน่วย มีลำดับของกรดอะมิโนเป็น APSEPHHPGDQATPDQLAQYYSPLYQYITFITRPRF-NH₂ (Pollock *et al.*, 1988)

ในสิ่งมีชีวิตจำพวกสัตว์เลื้อยคลาน (Class Reptilia) ปี 1984 Lance และคณะได้ทำการสกัดตับอ่อนของจระเข้, *Alligator mississippiensis* ด้วยกรด-แอลกอฮอล์ และแยกด้วย gel filtration (Sephadex G-50), ion exchange (DEAE-cellulose) และ HPLC (Zorbax-TMS : mobile phase ประกอบด้วย 0.1% TFA / H_2O / 5% 2-methoxyethanol / ACN v/v/v/v) ตรวจหา PP โดยวิธี RIA โดยใช้ rabbit antiserum PP221 พบว่ามีปริมาณ PP ที่แยกสกัดได้ 17.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และหาลำดับของกรดอะมิโนโดยใช้วิธี automated N-terminal sequence analysis พบว่าประกอบด้วยกรดอะมิโน 36 หน่วย คือ TPLQPKYPGDGAPVEDLIQFYNDLQQYLNVT-RPRF-NH₂ (Lance *et al.*, 1984)

ในกระต่าย ปี 1993 Marks และคณะได้สกัดตับอ่อนของกระต่าย (rabbit) ด้วยกรด-แอลกอฮอล์ (ethanol : 0.7 M HCl / 3 : 1 v/v) แยกด้วย gel filtration (Sephadex G-50) และ RP-HPLC 2 ขั้นตอน (Partisil 10 ODS-3 และ Vydac 208TP54 C-8 ตามลำดับ ; mobile phase เป็น TFA / H_2O / ACN) ตรวจหา PP โดยวิธี RIA ซึ่งใช้ rabbit antiserum PP221

อัตราส่วน 1 : 8,000 ได้ PP บริสุทธิ์ปริมาณ 194 พิโคโมลต่อกรัม หากลำดับของกรดอะมิโนโดยใช้ automated Edman degradation พบว่าประกอบด้วยกรดอะมิโน 36 หน่วย มีลำดับเป็น APPEPVYPGDDATPEQMAEYVADLRRYINMLTRPRY-NH₂ และมีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 4,196 ดาลตัน (Marks *et al.*, 1993b) นอกจากนี้ในปีเดียวกัน Marks และคณะยังได้รายงานการทำให้บริสุทธิ์และศึกษาโครงสร้างปฐมภูมิของ PP จากตับอ่อนของนกอีโก (Eurasian crows) 5 สปีชีส์ คือ *Pica pica*, *Garrulus glandarius*, *Corvus corone*, *Corvus frugilegus* และ *Corvus monedula* ด้วยวิธีการเดียวกับในกระต่าย พบว่าสามารถแยก PP ได้ในปริมาณ 5.6, 4.1, 5.8, 10.9 และ 14.7 นาโนโมลต่อกรัม ตามลำดับ มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย 4,166 ± 2 ดาลตัน และประกอบด้วยกรดอะมิโน 36 หน่วย มีลำดับของกรดอะมิโนเป็น APAQPAYPGDDAPVEDLLRF-YNDLQQYLVNVTTRPRY-NH₂ เหมือนกัน (Marks *et al.*, 1993a)

ในระบบประสาทส่วนกลางของพยาธิตัวกลมในหมู, *Ascaris suum* พบ immunoreactivity ต่อ PP221 antiserum ซึ่งสร้างขึ้นเพื่อจับกับกรดอะมิโน 6 หน่วย จากปลายคาร์บอกซี (C-terminal hexapeptide amide) (กรดอะมิโนลำดับที่ 31-36) ของ PP ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (mammalian PP) ซึ่งจะจำเพาะต่อปลายคาร์บอกซี อัตราส่วน 1 : 200 ใน main nerve cords และพบ immunoreactivity ต่อ PP204 antiserum ซึ่งสร้างขึ้นเพื่อจับกับ bPP ซึ่งจะจำเพาะต่อช่วงกลางถึงปลายอะมิโน อัตราส่วน 1 : 200 ใน ventral nerve cord และ dorsal nerve cord (Brownlee *et al.*, 1993)

ในปี 1994 Barton และคณะได้แยก PP จากตับอ่อนของนกนางนวล (herring gull), *Larus argentatus* ที่สกัดด้วย ethanal : 0.7 M HCl, 3 : 1 v/v โดยใช้วิธี RIA ด้วยแอนติซีรัม PP221 ซึ่งสร้างขึ้นเพื่อจับกับกรดอะมิโน 6 หน่วย จากปลายคาร์บอกซี (C-terminal hexapeptide amide) (กรดอะมิโนลำดับที่ 31-36) ของ PP ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม แยกโดยใช้วิธีการ gel permeation chromatography (Sephadex G-50) และตามด้วย RP-HPLC (Whatman Partisil 10 ODS3 reverse-phase column และ Vydac 208 TPS4 reverse-phase C-8 column ตามลำดับ และใช้ระบบ mobile phase เป็น TFA / H₂O / ACN) สามารถแยกได้ gull PP หนึ่งรูปแบบ ในความเข้มข้น 5 นาโนโมลต่อกรัม และเมื่อนำมาหาลำดับของกรดอะมิโนโดย automated Edman degradation ซึ่งใช้ Applied Biosystems 470 A gas-phase sequencer จะได้โครงสร้างปฐมภูมิประกอบด้วยกรดอะมิโน 36 หน่วย มีลำดับเป็น GPVQPTYPGDD-APVEDLVRFYNDLQQYLVNVTTRHRY-NH₂ ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลจากการคำนวณเป็น 4,235.6 ดาลตัน โดยโครงสร้างปฐมภูมิที่ได้นี้แตกต่างจากของไก่ 4 หน่วย ที่ตำแหน่งที่ 3 (Val / Ser),

18 (Val / Ile), 22 (Asn / Asp) และ 23 (Asp / Asn) ซึ่งแสดงว่า avian PP (aPP) เป็นเปปไทด์ที่มีการรักษาโครงสร้างปฐมภูมิไว้ได้สูง (highly conserved regulatory peptide) (Barton *et al.*, 1994)

ปี 1994 Agungpriyono และคณะได้รายงานการศึกษาตำแหน่งที่พบ bPP-immunoreactive cell ในทางเดินอาหารของกระเจิง (Lesser mouse deer), *Tragulus javanicus* โดยการย้อมสีทาง immunohistochemistry ด้วยวิธี avidin-biotin peroxidase และใช้แอนติบอดีต่อ bPP อัตราส่วน 1 : 10,000 จะพบ bPP-immunoreactive cells มากในกระเพาะส่วน abomasum และพบบ้างในส่วนของ gastric gland และ pyloric gland สำหรับในลำไส้เล็กพบ bPP-immunoreactive cell ที่ villi และ crypt ที่บริเวณอวัยวะส่วนปลาย ส่วนในลำไส้ใหญ่จะพบที่ ซีคัม โคลอนและเรคตัม โดยพบมากที่โคลอนส่วนขวาง (transverse colon), (Agungpriyono *et al.*, 1994)

ในปี 2542 พูลศิริ พงษ์กานนท์ ได้สกัด PP จากต่อมไชนัสของกิ้งกูดดำ โดยสกัดด้วยเมทานอล-กรดอะซิติก-น้ำ (90 : 1 : 9) ดูดซับด้วย C18 Sep-Pak cartridge และทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ RP-HPLC 2 ขั้นตอน (C18 column ; mobile phase เป็น ACN / TFA และ C8 column ; mobile phase เป็น ACN / HFBA ตามลำดับ) พบสารคล้าย PP มีน้ำหนักโมเลกุล 6897.7-6906.3 ดาลตัน (พูลศิริ พงษ์กานนท์, 2542)

ในปี 2543 จันทรทิพย์ คงสินรัตนชัย ได้ตรวจหาแหล่งที่พบสารคล้าย PP ในก้านตากลิ้งกูดดำด้วยวิธี indirect immunoperoxidase โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ PP (anti-human LTRPRYamide antiserum) พบสารคล้าย PP ในเซลล์ประสาทที่บริเวณรอบ ๆ medulla externa (E) บริเวณระหว่าง medulla interna (I) กับ medulla terminalis (T) และบริเวณรอบ ๆ (T) และพบว่าเซลล์ประสาทที่มีสารคล้าย PP มีปริมาณเฉลี่ยประมาณ 200 เซลล์ต่อ ก้านตา โดยพบมากที่บริเวณรอบ ๆ E นอกจากนี้ยังพบสารคล้าย PP ในเส้นใยประสาทที่ E, I, T ต่อมไชนัส และเส้นประสาทตา จึงสรุปว่าสารคล้าย PP อาจทำหน้าที่เป็นสารสื่อประสาทหรือนิวโรโมดูเลเตอร์ และนิวโรฮอริโมน (จันทรทิพย์ คงสินรัตนชัย, 2543)

2.2.4 Invertebrate NPY-like peptides (Neuropeptide F, NPF)

NPF พบครั้งแรกในพยาธิตัวแบน (parasitic platyhelminth), *Moniezia expansa* ซึ่งเป็นพยาธิตัวแบนที่มีขนาดใหญ่ (โตได้จนถึง 5 เมตร ในลำไส้ของแกะ) โดยการนำ *M. expansa* มาสกัดด้วยกรด-แอลกอฮอล์ (ethanol : 0.7 M HCl / 3 : 1 v/v) นำไปผ่าน C18 Sep

Pak cartridge แยกด้วย gel permeation (Sephadex G50) และ RP-HPLC 4 ชั้นตอน (Partisil 10 ODS-3, Supelcosil LC-18DB, Supelcosil LC-3DP และ Supelcosil LC-308 ตามลำดับ ; mobile phase เป็น 0.1% TFA / H₂O / ACN) ตรวจหา PP-like peptide ด้วยวิธี RIA โดยใช้ antiserum PP221 และหาน้ำหนักโมเลกุลโดยใช้ ²⁵²Cf-plasma desorption mass-spectroscopy ได้เป็น 4,599 ± 10 ดาลตัน เมื่อนำไปหาลำดับของกรดอะมิโนโดยใช้ automated gas-phase Edman degradation พบว่าประกอบด้วยกรดอะมิโน 39 หน่วย มีกรดอะมิโนทางปลายคาร์บอกซีเป็นฟีนิลอะลานีน (Phe, F) มีลำดับของกรดอะมิโนเป็น PDKDFIVNPSDLVLDN-KAALRDYLRQINEYFAIIGRPRF-NH₂ มีปฏิกิริยาข้ามกับ FMRFamide antiserum มีโครงสร้างปฐมภูมิคล้ายกับ PP family ในพวก vertebrate จึงเรียก เปปไทด์นี้ว่าเป็น neuropeptide F (NPF) นอกจากนี้จากการทำ immunocytochemistry โดยใช้ PP221 antiserum อัตราส่วน 1 : 200 จะพบ NPF cell ตลอดทั้งระบบประสาทส่วนกลางและระบบประสาทนอกส่วนกลาง (Maule *et al.*, 1991)

ต่อมาในปี 1992 Curry และคณะได้แยกเปปไทด์จาก terrestrial tubellarian, *Artioposthia triangulata* โดยการนำมาสกัดด้วยกรด-แอลกอฮอล์ (ethanol : 0.7 M HCl / 3 : 1 v/v) นำไปผ่าน C18 Sep Pak cartridge 10 อัน ต่อกัน แยกด้วย gel permeation (Sephadex G50) และ RP-HPLC 3 ชั้นตอน (Partisil 10 ODS-3, Supelcosil LC-308 C8 และ Supelcosil LC-3DP ตามลำดับ ; mobile phase เป็น 0.1% TFA / H₂O / ACN) ตรวจหา PP-like peptide ด้วยวิธี RIA โดยใช้ antiserum PP221 และหาน้ำหนักโมเลกุลโดยใช้ ²⁵²Cf-plasma desorption mass-spectroscopy ได้เป็น 4,440 ดาลตัน เมื่อนำไปหาลำดับของกรดอะมิโนโดยใช้ automated gas-phase Edman degradation พบว่าประกอบด้วยกรดอะมิโน 36 หน่วย มีกรดอะมิโนทางปลายคาร์บอกซีเป็นฟีนิลอะลานีน (Phe, F) มีลำดับของกรดอะมิโนเป็น KVVHLRPRSS-FSSEDEYQIYLRNVSKYIQLYGRPRF-NH₂ และจากการทำ immunocytochemistry โดยใช้ PP221 antiserum อัตราส่วน 1 : 200 จะพบ NPF cell ตลอดทั้งระบบประสาทส่วนกลางและระบบประสาทนอกส่วนกลาง (Curry *et al.*, 1992)

ในปีเดียวกัน Smart และคณะพบเปปไทด์ไทโรซีน-ฟีนิลอะลานีน (peptide YF, PYF) ซึ่งเป็นเปปไทด์คล้าย NPF ชนิดใหม่ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 9 หน่วย มีปลายอะมิโนเป็นไทโรซีนและปลายคาร์บอกซีเป็นฟีนิลอะลานีนจากสมองของปลาหมึกกล้วย (squid), *Loligo vulgaris* โดยการนำมาสกัดด้วยกรด-แอลกอฮอล์ (ethanol : 0.7 M HCl / 3 : 1 v/v) นำไปผ่าน C18 Sep Pak cartridge 4 อัน ต่อกัน แยกด้วย gel permeation (Sephadex G50) และ RP-

HPLC 2 ชั้นตอน (Supelcosil LC-308 และ Supelcosil LC-3DP ตามลำดับ ; mobile phase เป็น 0.1% TFA / H₂O / ACN) ตรวจหา PP-like peptide ด้วยวิธี RIA โดยใช้ antiserum PP221 และหาน้ำหนักโมเลกุลโดยใช้ ²⁵²Cf-plasma desorption mass-spectroscopy ได้เป็น 1,093.1 ± 0.7 ดาลตัน เมื่อนำไปหาลำดับของกรดอะมิโนโดยใช้ automated gas-phase Edman degradation พบว่าประกอบด้วยกรดอะมิโน 9 หน่วย มีกรดอะมิโนทางปลายคาร์บอกซีเป็นฟีนิลอะลานีน (Phe, F) มีลำดับของกรดอะมิโนเป็น YAIVARPRF-NH₂ (Smart *et al.*, 1991)

ในปี 1993 Marks และคณะได้ศึกษา NPF ใน proteocephalidean cestode, *Proteocephalus pollanicola* ซึ่งอยู่ในกระเพาะส่วนไพลอริกของ Lough Neagh pollan, *Coregonus autumnalis* ด้วยแอนติซีรั่มที่จำเพาะต่อทั้งโมเลกุล (กรดอะมิโนลำดับที่ 1-39), 792(1) และแอนติซีรั่มที่จำเพาะต่อกรดอะมิโน 10 หน่วยจากปลายคาร์บอกซี (กรดอะมิโนลำดับที่ 30-39), 790(1) ของ NPF จาก *M. expansa* , แอนติซีรั่ม PP221 (อัตราส่วน 1:200) และแอนติซีรั่มที่จำเพาะต่อ FMRFamide, 494(2) โดยใช้วิธีการทาง immunocytochemistry พบว่า *P. pollanicola* มีนิวโร-เปปไทด์ที่คล้ายกับ NPF จาก *M. expansa* ในด้านปลายคาร์บอกซี แต่แตกต่างกันช่วงกลางถึงปลายอะมิโน โดยมีรูปแบบของ immunoreactivity ที่ได้จากแอนติซีรั่ม 790(1), PP221 และ 494(2) เหมือนกัน คือที่เส้นใยประสาทและตัวเซลล์ของทั้งระบบประสาทส่วนกลางและรอบ ๆ ซึ่งรวมถึงระบบประสาทที่เกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์ของเพศเมีย และจากวิธีการ RIA พบ NPF ในปริมาณ 58.74 นาโนกรัมต่อกรัม ในสารสกัดจาก acidified ethanol (ethanol : 0.7 M HCl, 3 : 1, v/v) ของ *P. pollanicola* และเมื่อแยกโดยใช้วิธี gel permeation chromatography (Sephadex G-50) และตามด้วย RP-HPLC (Partisil 10 C-18 ODS3, Vydac C4 และ Vydac C8 reverse phase column ตามลำดับ และใช้ mobile phase เป็น TFA / H₂O / ACN) จะได้น้ำหนักโมเลกุลเป็น 4,400-4,700 ดาลตัน เช่นเดียวกับ NPF จาก *M. expansa* และสามารถแยก NPF ได้เป็น 2 รูปแบบ ซึ่งมี retention time แตกต่างกับ NPF จาก *M. expansa* และ *A. triangulata* แต่ได้เปปไทด์บริสุทธิ์ในปริมาณที่น้อยเกินกว่าจะนำไปหาลำดับของกรดอะมิโนได้ (Marks *et al.*, 1993c)

ในพวกหอยฝาเดียว (gastropod mollusc) Leung และคณะได้ศึกษา immunocytochemistry ในหอย garden snail, *Helix aspersa* และพวกสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังอื่น ๆ ตรวจหาการกระจายของ neuropeptide F (NPF) ในสมอง ปมประสาทรอบ ๆ หลอดอาหาร และทั้งตัวโดยได้ผลิต NPF3 antisera จากสายของเปปไทด์ที่สังเคราะห์ตามลำดับของกรดอะมิโน 9 หน่วย จากปลายอะมิโนของ NPF จาก *H. aspersa* (Ser-Thr-Gln-Met-Leu-Ser-Pro-Pro-Glu)

เพื่อใช้ในการตรวจหาด้วยวิธี indirect immunofluorescence และเปรียบเทียบผลที่ได้จากการใช้ NPF3 กับ PP221 (อัตราส่วน 1 : 200 ใน PBS) พบว่าทั้งสองแอนติซีรัมจะเกิดปฏิกิริยาข้ามกันอย่างสมบูรณ์กับบริเวณปลายคาร์บอกซีของ NPF จาก *H. aspersa* โดยรูปแบบของ immunostaining ที่ได้จะเหมือนกัน คือมีมากและเป็นบริเวณกว้างในระบบประสาทส่วนกลางและระบบประสาทนอกส่วนกลาง เช่นเดียวกับในสัตว์ตระกูลเดียวกัน คือ garden snail, *Helix pomatia* และพวก prosobranch gastropods 2 ชนิด ได้แก่ whelk, *Buccinum undatum* และ periwinkle, *Littorina littorea* โดยใน *H. aspersa* จะพบที่สมอง ทำ ก้านตา หลอดอาหาร ลำไส้เล็ก ต่อมไทรอยด์ หัวใจ หลอดเลือดและไต นอกจากนี้ยังพบในเส้นใยประสาททั่วไปตลอดปมประสาท สมอง เส้นประสาทตา บริเวณไขว้ของเส้นประสาทตา ปมประสาทบริเวณรอบ ๆ หลอดอาหาร และพบหนาแน่นภายในปมประสาทตามร่างกายและเส้นใยประสาทรอบ ๆ ปมประสาท และตลอดระบบประสาทส่วนปลาย เส้นใยประสาทเล็ก ๆ ที่ผ่านเข้าไปในกล้ามเนื้อเท้า และพบหนาแน่นบริเวณประสาทลำตัว (nerve trunk) ใน *H. pomatia* พบที่สมอง ทำและก้านตา ใน *B. undatum* และ *L. littorea* จะพบที่สมองและเท้า แต่ในเนื้อเยื่อประสาทของ cephalopod mollusc, *L. vulgaris* และ cestode, *M. expansa* จะให้ positive immunostaining กับ PP221 เท่านั้น และเมื่อเปรียบเทียบ immunostaining ที่ได้จาก NPF3 กับแอนติซีรัมที่สร้างขึ้นเพื่อจับกับ FMRFamide (FMRF494) จะพบในบริเวณเดียวกันเป็นส่วนใหญ่ โดยมีเซลล์ประสาทเพียงเล็กน้อยที่มี immunoreactivity กับแอนติซีรัมเพียงชนิดเดียวเท่านั้น (Leung *et al.*, 1994)

ตารางที่ 2.1 สรุปการศึกษาการแยกสกัดและทำให้บริสุทธิ์ PP family ในสัตว์ต่าง ๆ ที่มีการศึกษาแล้ว และโครงสร้างปฐมภูมิของ PP family ที่พบ สรุปในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.3 สรุปตำแหน่งที่พบ PP family ในสัตว์ต่าง ๆ และตารางที่ 2.4 สรุปหน้าที่ของ PP family ที่พบในหนูและสุนัข

สงวนลิขสิทธิ์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.1 การแยกสกัดและทำให้บริสุทธิ์ PP family ในสัตว์ต่าง ๆ

Animals	Extraction	Purification	Detection	Results	References
Porcine	Upper intestinal 0.5 M acetic acid	Gel filtration Ion exchange RP-HPLC	Chemical	PYY N-terminal sequence	Tatemoto and Mutt, 1980
Porcine	Upper intestinal 0.5 M acetic acid	Ion exchange Gel filtration RP-HPLC	Chemical	PYY Amino acid sequence	Tatemoto, 1982a
Human	Colon 0.5 M acetic acid	Gel filtration Ion exchange RP-HPLC	Chemical	PYY Amino acid sequence	Tatemoto <i>et al.</i> , 1988
Daddy sculpin	Brockman bodies	Gel filtration RP-HPLC	Peak	PYY Amino acid sequence	Cutfield, Carne and Cutfield, 1987
Cod Trout	Brain, Stomach Ethanol : 0.7 M HCl (3 : 1 v/v)	SepPak C18 RP-HPLC	RIA	PYY, NPY Amino acid sequence	Jensen and Conlon, 1992
Porcine	Brain 0.5 M acetic acid	Gel filtration Ion exchange RP-HPLC	Chemical	NPY Amino acid sequence	Tatemoto, 1982b
Human	Tumor Ethanol : 0.7 M HCl (3 : 1 v/v)	RP-HPLC	RIA	NPY MW 4,270 Da Amino acid sequence	Shaw <i>et al.</i> , 1993

Animals	Extraction	Purification	Detection	Results	References
Dogfish	Pancreas Ethanol : 0.7 M HCl (3 : 1 v/v)	SepPak C18 RP-HPLC	RIA	NPY Amino acid sequence	Conlon, Balasu- bramaniam and Hazon, 1991
Lamprey	Small intestine Ethanol : 0.7 M HCl (3 : 1 v/v)	SepPak C18 Gel filtration RP-HPLC	RIA	PMY MW 4201.4 Da Amino acid sequence	Conlon <i>et al.</i> , 1991
Chicken	Pancreatic H ₂ O : ethanol : H ₂ SO ₄ (155 : 825 : 206 v/v/v)	Gel filtration Ion exchange	RIA	PP MW 4200 Da	Kimmel, Pollock and Hazelwood , 1968
Chicken	Pancreatic H ₂ O : ethanol : H ₂ SO ₄ (155 : 825 : 206 v/v/v)	Gel filtration Ion exchange	RIA	PP MW 4240 Da Amino acid sequence	Kimmel, Hayden and Pollock, 1975
Human	Pancreas 0.1 mol HCl / 1 L ethanol	Gel filtration Ion exchange RP-HPLC	Gel electrophoresis	PP Amino acid sequence	Schwartz <i>et al.</i> , 1984
Rat	Pancreas 0.1 mol HCl / 1 L ethanol	Gel filtration Ion exchange RP-HPLC	RIA	PP Amino acid sequence	Kimmel <i>et al.</i> , 1984

Animals	Extraction	Purification	Detection	Results	References
Bullfrog	Pancreas H ₂ O : ethanol : H ₂ SO ₄ (155 : 825 : 206 v/v/v)	Gel filtration RP-HPLC	RIA	PP Amino acid sequence	Pollock <i>et al.</i> , 1988
Alligator	Pancreas H ₂ O : ethanol : H ₂ SO ₄ (155 : 825 : 206 v/v/v)	Gel filtration Ion exchange RP-HPLC	RIA	PP Amino acid sequence	Lance <i>et al.</i> , 1984
Rabbit	Pancreas Ethanol : 0.7 M HCl (3 : 1 v/v)	Gel filtration RP-HPLC	RIA	PP MW 4196 Da Amino acid sequence	Marks <i>et al.</i> , 1993b
Eurasian crows	Pancreas Ethanol : 0.7 M HCl (3 : 1 v/v)	Gel filtration RP-HPLC	RIA	PP MW 4166 Da Amino acid sequence	Marks <i>et al.</i> , 1993c
Herring gull	Pancreas Ethanol : 0.7 M HCl (3 : 1 v/v)	Gel filtration RP-HPLC	RIA	PP MW 4237 Da Amino acid sequence	Barton <i>et al.</i> , 1994
Flatworm	Whole Ethanol : 0.7 M HCl (3:1v/v)	Gel filtration RP-HPLC	RIA	NPF MW 4599 Da Amino acid sequence	Maule <i>et al.</i> , 1991

Animals	Extraction	Purification	Detection	Results	References
Turbellarian	Whole Ethanol : 0.7 M HCl (3 : 1 v/v)	Gel filtration RP-HPLC	RIA	NPF MW 4440 Da Amino acid sequence	Curry <i>et al.</i> , 1992
Squid	Brain Ethanol : 0.7 M HCl (3 : 1 v/v)	Gel filtration RP-HPLC	RIA	PYF MW 1093 Da Amino acid sequence	Smart <i>et al.</i> , 1992
Giant tiger prawn	Sinus gland Methanal : acetic acid : H ₂ O (90 : 1 : 9 v/v/v)	SepPak C18 RP-HPLC	Dot-ELISA	PP-like peptide MW 6897.7- 6906.3 Da	พลศิริ พฤษ์กานนท์, 2542

หมายเหตุ

RIA = Radioimmunoassay

RP-HPLC = Reversed phase-high performance liquid chromatography

MW = Molecular weight

Da = Dalton

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.2 ลำดับกรดอะมิโนของ PP family ที่พบในสัตว์ต่าง ๆ

Animal	Amino acid sequence	References
PYY		
Porcine	YPAKP EAPGE DASPE ELSRY YASLR HYLNL VTRQR Y-NH ₂	Tatemoto, Carlquist and Mutt, 1982
Human, <i>Homo sapiens</i>	YP IKP EAPGE DASPE ELNRY YASLR HYLNL VTRQR Y-NH ₂	Tatemoto <i>et al.</i> , 1988
Sculpin, <i>Cottus corpius</i>	YPPQP DSPGG NASPE DWAKY HAAVR HYVNL ITRQR Y-NH ₂	Cutfield, Carne and Cutfield, 1987
Trout, <i>Oncorhynchus mykiss</i>	YPPKP ENPGE DAPPE ELAKY Y IALR HYINL ITRQR Y-NH ₂	Jensen and Conlon, 1992
NPY		
Porcine	YPSKP DNPGE DAPAE DLARY YSALR HYINL ITRQR Y-NH ₂	Tatemoto, 1982b
Cod, <i>Gadus morhua</i>	YPIDP ENPGE DAPAD ELAKY YSALR HYINL ITRQR Y-NH ₂	Jensen and Conlon, 1992
Trout, <i>Oncorhynchus mykiss</i>	YPVKP ENPGE DAPTA ELAKY YIALR HYINL ITRQR Y-NH ₂	Jensen and Conlon, 1992

Animal	Amino acid sequence	References
Human, <i>Homo sapiens</i>	YPSKP DNPGE DAPAE DMARY YSALR HYINL ITRQR Y-NH ₂	Shaw <i>et al.</i> , 1993
Dogfish, <i>Scyliorhinus canicula</i>	YPPKP ENPGE DAPPE ELAKY YSALR HYINL ITRQR Y-NH ₂	Conlon, Balasu- bramaniam and Hazon, 1991
PMY		
Lamprey, <i>Petromyzon marinus</i>	MPPKP DNPSP DASPE ELSKY MLAVA DYIAL ITRQR Y-NH ₂	Conlon <i>et al.</i> , 1991
PP		
Chicken	GPSQP TYPGD DAPVE DLIRF YDNLQ QYLVN VTRHR Y-NH ₂	Kimmel, Hayden and Pollock, 1975
Human, <i>Homo sapiens</i>	APLEP VYPGD NATPE QMAQY AADLR RYINM LTRPR Y-NH ₂	Schwartz <i>et al.</i> , 1984
Rat, <i>Rattus norvegicus</i>	APLEP MYPGD YATHE QRAQY ETQLR RYINT LTRPR Y-NH ₂	Kimmel <i>et al.</i> , 1984
Bullfrog, <i>Rana catesbeiana</i>	APSEP HHPGD QATPD QLAQY YSDLY QYITF ITRPR F-NH ₂	Pollock <i>et al.</i> , 1988

Animal	Amino acid sequence	References
Alligator, <i>Alligator mississippiensis</i>	TPLQP KYPGD GAPVE DLIQF YNDLQ QYLNV VTRPR F-NH ₂	Lance <i>et al.</i> , 1984
Rabbit, <i>Oryctolagus cuniculus</i>	APPDP VYPGD DATPE QMAEY VADLR RYINM LTRPR Y-NH ₂	Marks <i>et al.</i> , 1993
Eurasian crows, <i>Pica pica</i> , <i>Garrulus glandarius</i> , <i>Corvus corone</i> , <i>Corvus frugilegus</i> , <i>Corvus monedula</i>	APAQP AYPGD DAPVE DLLRF YNDLQ QYLNV VTRPR Y-NH ₂	Marks <i>et al.</i> , 1993c
Herring gull, <i>Larus argentatus</i>	GPVQP TYPGD DAPVE DLVRF YNDLQ QYLNV VTRHR Y-NH ₂	Barton <i>et al.</i> , 1994
NPF		
Parasitic flatworm, <i>Moniezia expansa</i>	PDK DFIVN PSDLV LDNKA ALRDY LRQIN EYFAI IGRPR F-NH ₂	Maule <i>et al.</i> , 1991
Turbellarian, <i>Artioposthia triangulata</i>	KVHL RPRSS FSEED EYQIY LRNVS KYIQL YGRPR F-NH ₂	Curry <i>et al.</i> , 1992
PYF		
Squid, <i>Loligo vulgaris</i>	YAI VARPR F-NH ₂	Smart <i>et al.</i> , 1992

ตารางที่ 2.3 ตำแหน่งที่พบ PP family ในสัตว์ต่าง ๆ

Animal	Localization	References
Human	<ul style="list-style-type: none"> - F-cell and periphery of islets of endocrine pancreas - Scatter throughout the ducts and acini - Colocalization of insulin, glucagons) 	Gersell, Gingerich and Greider, 1979 Lukinius <i>et al.</i> , 1992
Lesser mouse deer <i>Tragulus javanicus</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Gastrointestinal tract, gastric gland or pyloric gland in the abomasums 	Agungpriyono <i>et al.</i> , 1994
Sheep	<ul style="list-style-type: none"> - Endocrine and exocrine of pancreas - Stomach : cardia, fundus, pylorus - Small intestine : duodenum, jejunum - Cell type : pyramid or oval 	Calingason <i>et al.</i> , 1984
Porcine	<ul style="list-style-type: none"> - Colocalization of insulin, glucagons, somatostatin and pancreatic polypeptide in islet of fetal porcine (polyhormonal granule) - Antropylic region, Brunner gland of duodenum and pancreas 	Lukinius <i>et al.</i> , 1992 Chen <i>et al.</i> , 1994
Canine	<ul style="list-style-type: none"> - Right lobe, body and tail of pancreas 	Gersell, Gingerich and Greider, 1979

Animal	Localization	References
Mouse	- Colocalization of PP and glucagons in stomach and endocrine pancreas	Rombout <i>et al.</i> , 1986
Rat	- Pancreas	Elayat, El-Naggar and Tahir, 1995
Chicken	- Exocrine parenchyma of pancreas - Polygonal or spindle-shaped aPP cell - aPP cells numerous at hatching - PPIR cells in duodenum, jejunum, ileum and conlon - Basal lamina of gut lumen	Larsson <i>et al.</i> , 1974 El-Salhy <i>et al.</i> , 1982
Sea Bass <i>Dicentrachus labrax</i>	- Endocrine and exocrine of pancreas	Carrilo <i>et al.</i> , 1986
<i>Barbus conchoniuis</i>	- Colocalization of PP-like peptide and glucagons in gut	Rombout <i>et al.</i> , 1986
Turbot <i>Scophthalmus meximus</i>	- Small intestine	Reinecke, Muller and Segner, 1997

Animal	Localization	References
Garden snail <i>Helix pomatia</i>	- Brain, eyestalk and foot	Leung <i>et al.</i> , 1994
Garden snail <i>Helix aspersa</i>	- Brain, eyestalk, foot, oesophagus, intestine, digestive gland, heart, blood vessel, kidney, common duct, dart sac and albumin gland	Leung <i>et al.</i> , 1994
Whelk <i>Buccinum undatum</i>	- Brain and foot	Leung <i>et al.</i> , 1994
Periwinkle <i>Littorina littorea</i>	- Brain and foot	Leung <i>et al.</i> , 1994
Squid <i>Loligo vulgaris</i>	- Brain	Leung <i>et al.</i> , 1994
Flatworm <i>Moniezia expansa</i>	- Neural tissue	Leung <i>et al.</i> , 1994
Giant tiger prawn	- Neuron around medulla externa, between medulla interna and medulla terminalis and in medulla terminalis - Neuropils of medulla externa, medulla interna, medulla terminalis, sinus gland	จันทร์ทิพย์ คงสินรัตน์ชัย, 2543

ตารางที่ 2.4 หน้าที่ของ PP family ที่พบในหนูและสุนัข

Animals	Function	References
Dog	- Increase glucose concentration	Okita <i>et al.</i> , 1997
Rat	- Inhibit insulin secretion	Murphy <i>et al.</i> , 1981
	- Stimulate gastric acid secretion and motility	McTigue, Edwards and Rogers, 1993
	- Increase gastric emptying	
	- Increase duodenal and colonic intraluminal pressure	Wager-Page <i>et al.</i> , 1993
	- Decrease mean arterial pressure	

2.3 ชีววิทยาของกุ้งกุลาดำ

การจัดลำดับหมวดหมู่ทางอนุกรมวิธานของกุ้งกุลาดำ (Solis, 1988)

Phylum	Arthropoda
Class	Crustacea
Subclass	Malacostraca
Order	Decapoda
Suborder	Natantia
Infraorder	Penaeidae
Superfamily	Penaeidae
Family	Penaeidae Rafinesque, 1815
Genus	<i>Penaeus</i> Fabricius, 1798
Subgenus	<i>Penaeus</i>
Species	<i>monodon</i>

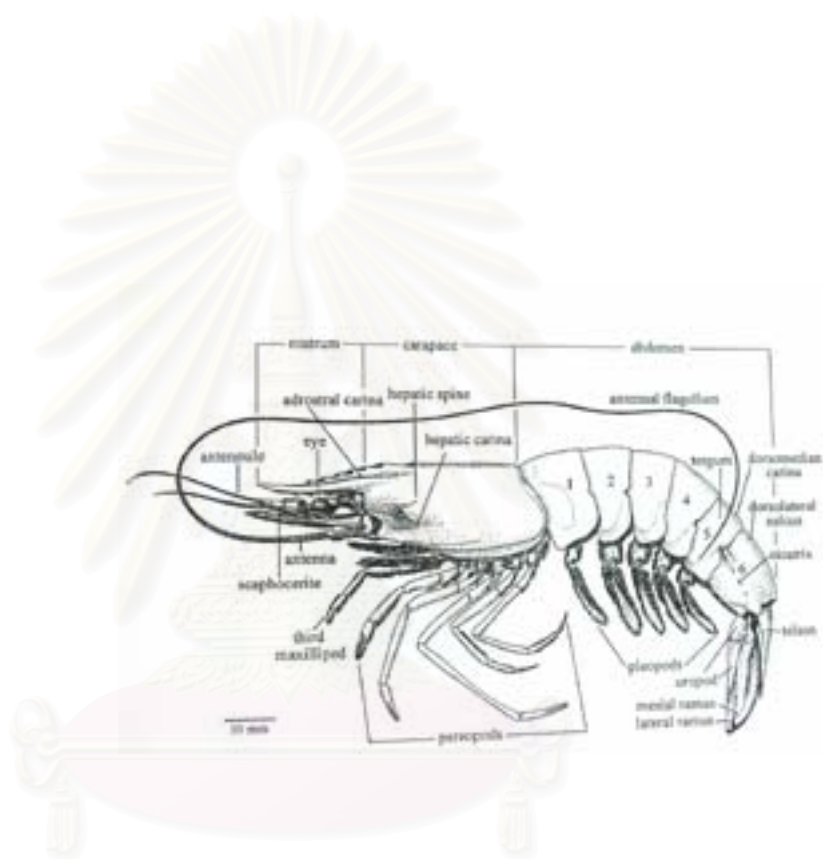
กุ้งกุลาดำ หรือกุ้งทะเล หรือกุ้งม้าลาย มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Penaeus monodon* Fabricius มีชื่อเป็นภาษาอังกฤษว่า Tiger prawn หรือ Jumbo tiger prawn (วัลลภ คงเพิ่มพูน, 2532) และมีชื่อภาษาอังกฤษที่องค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ (FAO) ใช้อยู่คือ Giant tiger prawn เป็นกุ้งทะเลที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในวงศ์ Penaeidae แหล่งกำเนิดดั้งเดิมอยู่ในทะเลแถบอินโดแปซิฟิกตะวันตก ออฟริกาตะวันออกและตะวันตกเฉียงใต้ และคาบสมุทรอินเดีย (พรธนิภา หาญวิวัฒน์กิจ, 2532) มีถิ่นอาศัยอยู่ที่น่านน้ำแถบใต้หวัน ไทย มาเลเซีย อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ และพบมากในออสเตรเลีย และอินเดีย ในประเทศไทยพบทั่วไปในอ่าวไทย และพบมากในบริเวณนอกฝั่งทะเลจังหวัดชุมพรถึงนครศรีธรรมราชและทางด้านทะเลอันดามันบริเวณนอกฝั่งของจังหวัดระนองและภูเก็ต ชอบอาศัยในบริเวณที่มีพื้นดินเป็นดินทรายปนโคลนหรือทรายปน

เปลือกหอยและหินปะการังและสามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมในแหล่งน้ำกร่อยหรือในบ่อเลี้ยงได้ (ปกรณ ชุ่นประเสริฐ, 2531 ; สุวิทย์ ชีนสินธุ์, 2531)

2.3.1 ลักษณะทั่วไป

กุ้งมีลำตัวเป็นข้อปล้อง ทั้งหมดมีประมาณ 19 ปล้อง แต่ละปล้องมีระยางค์หนึ่งคู่ ระยางค์แต่ละคู่มีหน้าที่แตกต่างกัน ลำตัวของกุ้งแบ่งออกได้สามส่วนใหญ่ ๆ คือ หัว ออก และลำตัว ส่วนหัวมีห้าปล้องแต่รวมเป็นปล้องเดียว มีเปลือกคลุม เปลือกหุ้มตัวตอนหน้าสุดของปล้องที่หนึ่งจะยื่นเป็นพื้นแหลมไปข้างหน้าเรียกว่า กรี ได้กรีมี่ตาหนึ่งคู่ ปากกุ้งอยู่ระหว่างขากรรไกร ส่วนหัวมีระยางค์ห้าคู่ สองคู่แรกเป็นหนวดใช้ในการสัมผัส ระยางค์คู่ที่สามได้แก่ ขากรรไกรล่าง มีหน้าที่ในการขบเคี้ยวอาหาร ส่วนคู่ที่สี่และคู่ที่ห้าเป็นขากรรไกรบน มีหน้าที่เช่นเดียวกับขากรรไกรล่าง ส่วนอกมีแปดปล้อง ได้แก่ ปล้องที่ 6-13 ระยางค์สามคู่แรก (ระยางค์คู่ที่ 6, 7 และ 8) อยู่บนอก เรียกว่า maxillipeds มีหน้าที่ช่วยในการกินอาหาร ระยางค์คู่ที่ 9, 10 และ 11 มีลักษณะเป็นก้าม ก้ามแต่ละคู่จะมีขนาดและความยาวใกล้เคียงกัน อันเป็นลักษณะเฉพาะของกุ้งทะเลในวงศ์ Penaeidae ระยางค์สามคู่นี้ มีหน้าที่ช่วยในการจับฉวยอาหารเข้าปาก หรือป้องกันตัวเมื่อมีภัย ส่วนระยางค์คู่ที่ 12 และคู่ที่ 13 เป็นขาใช้สำหรับเดิน เคลื่อนไหว และทำความสะอาดลำตัว ลำตัวมีหกปล้อง เปลือกปล้องท้องอันที่สองไม่ทับปล้องแรก ระยางค์คู่ที่ 14, 15, 16, 17 และ 18 มีลักษณะคล้ายใบพายใช้สำหรับว่ายน้ำ ส่วนระยางค์คู่ที่ 19 หรือหางประกอบด้วยแพนหางและหางรูปพัดยกขึ้นลงได้ตามต้องการ (บรรจง เทียนส่งวัฒณี, 2530)

กุ้งกุลาดำเป็นกุ้งทะเลที่มีขนาดลำตัวใหญ่ มีหนวดหลายไม่เด่นชัด กรืออยู่ในแนวระนาบซึ่งมีสันแนวเฉียงไปทางตาคุ้ง กรีด้านบนมีพื้น 6-8 ซี่ ด้านหลังมี 2-4 ซี่ ในขณะที่ยังมีชีวิตอยู่ ลำตัวจะเป็นสีม่วงแดง มีแถบสีน้ำตาลหรือดำพาดขวางลำตัวด้านหลังเป็นปล้อง ๆ ประมาณ 9 ลายที่ขอบหางและขาว่ายน้ำมีขนาดเล็ก ๆ สีน้ำตาลอมแดง และปลายขาเดินคู่ที่ 1, 2 มีสีน้ำตาลเข้ม (สุวิทย์ ชีนสินธุ์, 2531) (ภาพประกอบ 2.1)



สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพประกอบ 2.1 โครงสร้างภายนอกโดยทั่วไปของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* (Solis, 1988)

2.3.2 การผสมพันธุ์

การผสมพันธุ์จะเกิดขึ้นหลังจากที่ตัวเมียลอกคราบใหม่ ๆ เพราะตัวผู้สามารถที่จะสอดถุงน้ำเชื้อเข้าไปในตัวเมียในระยะนี้เท่านั้น โดยกึ่งตัวผู้ 1-3 ตัว จะว่ายน้ำไล่ตามกึ่งตัวเมีย ขณะที่กึ่งตัวเมียว่ายน้ำในแนวตั้งขึ้นสู่ผิวน้ำในระยะประมาณ 50-80 เซนติเมตร โดยจะมีกึ่งตัวผู้เพียงตัวเดียวที่ว่ายตามขึ้นไปทันและขนานกับกึ่งตัวเมีย โดยจะอยู่ทางด้านล่างของตัวเมีย ต่อมากึ่งตัวผู้จะหยายท้องของมันติดกับด้านท้องของตัวเมีย เมื่อท้องติดกันแล้วสักครู่ตัวผู้จะหมุนตัวกลับอย่างรวดเร็วและกอดรัดตัวเมียโดยจะอตัวของมันและยกหัวขึ้น ตัวผู้จะกระดกหัวและหางเป็นจังหวะต่อเนื่องกัน ซึ่งจะเป็นระยะที่ตัวผู้สอดถุงน้ำเชื้อเข้าไปอยู่ในตัวเมีย จนกระทั่งถึงเวลาที่กึ่งพร้อมที่จะวางไข่ ตัวเมื่อก็จะปล่อยเชื้อตัวผู้ออกมาผสมกับไข่ที่ละน้อยติดต่อกัน แต่ถ้าตัวเมียยังไม่พร้อมที่จะวางไข่เนื่องจากรังไข่ยังไม่เจริญเต็มที่ ถุงน้ำเชื้อก็จะถูกบีบออกมาพร้อมกับเปลือกในระหว่างการลอกคราบครั้งต่อไป การลอกคราบจะมีขึ้นทุก 2-3 อาทิตย์ และระยะในการลอกคราบประมาณ 5 วัน ซึ่งจะเกิดขึ้นเฉพาะกลางคืน และกึ่งก็จะกอดรัดเพื่อผสมพันธุ์เฉพาะในตอนกลางคืนหลังการลอกคราบ ถุงน้ำเชื้อใหม่ก็จะถูกสอดเข้าไปอีกครั้งในตัวเมียตัวหนึ่งสามารถรับน้ำเชื้อตัวผู้มากกว่า 2 ตัวขึ้นไป (สมชาย คำนึงถิ่น, 2532)

2.3.3 วงจรชีวิต

กึ่งกุลาดำวางไข่ในทะเล กึ่งที่มีอายุประมาณ 12-13 เดือน จะวางไข่ในทะเลลึกที่ระดับน้ำประมาณ 15-30 เมตร ใกล้กับพื้นทะเล กึ่งขนาด 70-150 กรัม จะวางไข่ครั้งละประมาณ 1,000,000-1,200,000 ฟอง กึ่งชนิดนี้ส่วนมากจะผสมพันธุ์กันในเวลากลางคืน โดยตัวผู้จะสอดอวัยวะเพศที่เรียกว่า พีเทสมา (petesma) เข้าไปในอวัยวะเพศเมียที่เรียกว่า ทีไรคัม (thelycum) พร้อมกับปล่อยน้ำเชื้อเข้าไปเก็บไว้ในถุงเก็บน้ำเชื้อเพื่อรอโอกาสที่จะผสมกับไข่ในระยะหลัง เมื่อไข่แก่และสุกเต็มที่ก็จะถูกขับออกมาทางช่องเพศตรงโคนขาเดินคู่ที่สามและจะได้รับการผสมกับน้ำเชื้อตัวผู้ ซึ่งจะไหลออกจากถุงเก็บน้ำเชื้อทางรูเปิดเล็ก ๆ ที่บริเวณขาเดินคู่ที่สี่ของตัวเมีย แม่กึ่งจะใช้เวลาวางไข่ครั้งหนึ่ง ๆ ประมาณ 3-5 นาที ไข่ที่ผสมแล้วขณะที่ปล่อยสู่ทะเลใหม่ ๆ จะมีลักษณะกลม ไข่จะค่อย ๆ พัฒนาจนฟักเป็นตัว ภายในเวลาประมาณ 15 ชั่วโมง กึ่งวัยอ่อนจะวิวัฒนาการและเปลี่ยนรูปร่างไปตามขั้นตอน และเมื่อถึงบริเวณชายฝั่งก็จะเลี้ยงตัวอยู่ในบริเวณนี้จนกระทั่งโตเต็มวัยจึงอพยพกลับสู่ทะเลและผสมพันธุ์วางไข่ต่อไปอีก (วัลลภ คงเพิ่มพูน, 2532)

2.3.4 การพัฒนาการและการเปลี่ยนรูปร่างของกุ้ง

1. ลูกกุ้งวัยอ่อนระยะที่หนึ่ง (nauplius)

ลูกกุ้งที่ฟักออกจากไข่ใหม่ ๆ จะมีขนาดเล็ก รูปร่างค่อนข้างกลม มีระยางค์ 3 คู่ ระยะนี้ลูกกุ้งจะยังไม่กินอาหาร แต่จะได้อาหารจากถุงอาหาร (yolk sac) ที่ติดตัวมา ลูกกุ้งจะอยู่ในระยะนี้ประมาณ 1-3 วัน ลอกคราบ 6 ครั้ง และใช้ชีวิตเป็นแพลงตอนอาศัยอยู่ตามหน้าดิน

2. ลูกกุ้งวัยอ่อนระยะที่สอง (zoea)

ลูกกุ้งจะมีลำตัวยาวขึ้น ส่วนหัวโตเห็นได้ชัด ลูกกุ้งจะค่อย ๆ ลอยตัวขึ้นสู่ผิวน้ำ และเริ่มกินอาหาร ซึ่งส่วนใหญ่เป็นพวกแพลงค์ตอนพืชขนาด 50-100 ไมครอน ลูกกุ้งจะเริ่มออกไปไกลฝั่งมากขึ้น กุ้งจะอยู่ในระยะนี้ประมาณ 4-5 วัน ลอกคราบ 3 ครั้ง แต่ละครักรูปร่างจะเปลี่ยนไปจากเดิม ระยะนี้ถือเป็นระยะสำคัญมากที่สุด หากลูกกุ้งผ่านระยะนี้ไปได้ก็มักมีอัตราการรอดตายสูง

3. ลูกกุ้งวัยอ่อนระยะที่สาม (mysis)

ลูกกุ้งในระยะนี้มีลักษณะคล้ายพ่อแม่มากขึ้น ลำตัวมองเห็นเป็นส่วนหัวและส่วนท้อง ขาสำหรับเดินมองเห็นชัดขึ้น เริ่มมีข้อปล้อง แต่การว่ายน้ำยังอยู่ในลักษณะหัวชี้ลงอยู่ ระยะนี้สามารถกินโรติเฟอร์ (rotifer) ไรน้ำเค็ม (artemia) ไข่แดง ระยะนี้ใช้เวลา 3-4 วัน ลอกคราบรวม 3 ครั้ง

4. ลูกกุ้งวัยอ่อนระยะที่สี่

ลูกกุ้งจะเริ่มว่ายน้ำเฉียงขึ้นเหมือนพ่อแม่ จะอยู่ในระยะนี้ประมาณ 7 วัน ลอกคราบ 3 ครั้ง มีลำตัวยาว 5.56 มิลลิเมตร เริ่มมีระยางค์เกือบครบเหมือนกุ้งเต็มวัย

จากกุ้งวัยอ่อนระยะที่สี่นี้ ลูกกุ้งจะพัฒนาการไปเรื่อย ๆ จนเข้าสู่วัยรุ่น (juvenile) กุ้งจะอยู่ระยะที่สี่นี้ประมาณ 30 วัน มีความยาวประมาณ 1.2-2 เซนติเมตรหนักประมาณ 1.01-1.02 กรัม ลูกกุ้งในระยะนี้จะเลี้ยงตัวอยู่บริเวณป่าไม้ชายเลน หรือในแหล่งน้ำกร่อยประมาณ 3-4 เดือน ก็จะได้เป็นกุ้งวัยรุ่น เมื่อมีอายุได้ประมาณ 6 เดือน กุ้งจะเดินทางออกสู่ทะเลเพื่อผสมพันธุ์ต่อไป

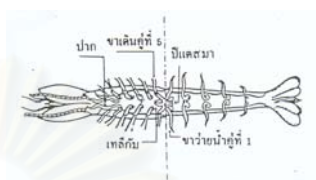
(พรรณิภา หาญวิวัฒนกิจ, 2532)

2.3.5 การลอกคราบ

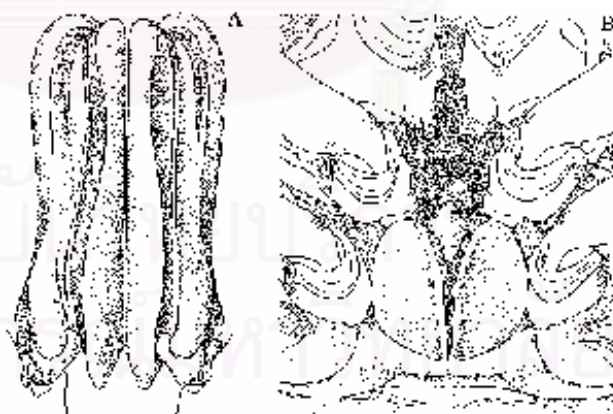
กุ้งจำเป็นต้องลอกคราบเพื่อการเจริญเติบโต ทั้งนี้เพราะเปลือกกุ้งเป็นอวัยวะที่ไม่สามารถเพิ่มขนาดได้เหมือนกับเปลือกหอยหรือกระดองเต่าได้ ดังนั้นในการเพิ่มขนาดตัวของกุ้งแต่ละครั้งจึงจำเป็นต้องสลัดเอาเปลือกเก่าทิ้งไปแล้วสร้างเปลือกใหม่ที่มีขนาดใหญ่กว่าขึ้นมาแทน กุ้งจะเริ่มลอกคราบตั้งแต่ฟักออกจากไข่เพียงไม่กี่ชั่วโมง และจะลอกคราบไปเรื่อย ๆ ตลอดชีวิต ก่อนที่กุ้งจะลอกคราบจะมีการสะสมอาหารในร่างกายมากกว่าปกติโดยเฉพาะสารที่สร้างเปลือก เพราะเปลือกจะต้องแข็งตัวโดยเร็ว หลังจากลอกคราบแล้ว เมื่อกุ้งสลัดเปลือกออกหมด ลำตัวจะขยายใหญ่ขึ้น และเปลือกจะแข็งตัวภายใน 3-8 ชั่วโมง การลอกคราบของกุ้งแต่ละครั้งอยู่ภายใต้การควบคุมของระบบประสาทส่วนกลางและฮอร์โมนสองชนิดที่อยู่ในก้านตา ดังนั้นถ้ามีการตัดก้านตาออกจะทำให้กุ้งลอกคราบได้เร็วขึ้น แต่โดยทั่วไปกุ้งจะลอกคราบช้าหรือเร็วนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่น ๆ หลายอย่างด้วย เช่น วัยของกุ้ง อาหาร แสง และอุณหภูมิ ถ้าสภาพแวดล้อมเหมาะสมกับกุ้งจะลอกคราบห่างกันครั้งละประมาณ 20-30 วัน (วัลลภ คงเพิ่มพูน, 2532)

2.3.6 ความแตกต่างระหว่างกุ้งกุลาดำเพศผู้และเพศเมีย

กุ้งกุลาดำเป็นสัตว์ที่มีเพศแยกกัน โดยปกติกุ้งเพศเมียมักจะมีขนาดใหญ่กว่ากุ้งเพศผู้ที่อายุเท่ากัน การที่จะแยกได้ว่าเป็นกุ้งเพศเมียหรือกุ้งเพศผู้ได้นั้น สังเกตได้จากกุ้งเพศผู้จะมีพีเทสมาซึ่งพัฒนามาจากส่วนของแขนงอันใน (endopod) ของระยางค์ว่ายน้ำคู่ที่หนึ่ง พีเทสมามีลักษณะคล้ายเตี้ยอย่างแข็ง 2 อันซ้ายขวาติดกันด้วยคิวติเคิล (cuticle) บาง ๆ ทับซ้อนกันที่บริเวณโคนขา และสามารถคลี่ออกเป็นแผ่นกว้างได้ กุ้งวัยรุ่นเพศผู้ที่พีเทสมาจะยึดติดกับส่วนโคนขาว่ายน้ำ เมื่อถึงการลอกคราบครั้งสุดท้ายเพื่อเป็นกุ้งโตเต็มวัย ขอบของพีเทสมาประมาณครึ่งหนึ่งจะแผ่ออกติดกันตลอดอัน และมีปุ่มคล้ายตั้งทำหน้าที่ช่วยในการยึดติดในเวลาผสมพันธุ์ ส่วนในกุ้งเพศเมียนั้นสังเกตได้จากบริเวณส่วนท้องของตัวเมียจะมีติ่งแบน ๆ เรียกว่าทีไลค์มีลักษณะคล้ายลอนหรือพูเล็ก ๆ หลายอันเรียงกันอยู่ตรงบริเวณโคนขาเดินคู่ที่สี่และห้า ซึ่งด้านในมีถุงสำหรับเก็บน้ำเชื้อตัวผู้ไว้ในเวลาที่มีการผสมพันธุ์และมีท่อนำไข่เปิดออกโคนขาเดินคู่ที่สาม (ปิยะพงศ์ โชติพันธุ์, 2529 ; พูลศิริ พุทธิรักษานนท์, 2542 ; จันทรทิพย์ คงสินรัตนชัย, 2543) (ภาพประกอบ 2.2 และ 2.3)



ภาพประกอบ 2.2 ภาพจากด้านท้องของกิ่งกุหลาดำแสดงขาวายน้ำ ปิเตสมาและที่ไลคัม (บรรจง เทียนสงรัตมี, 2530)

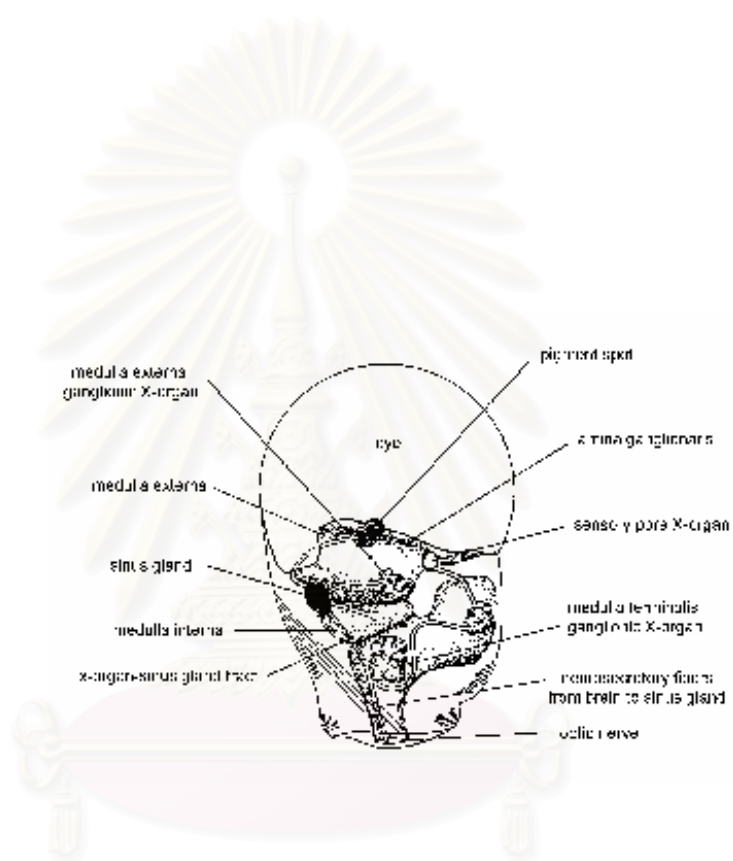


ภาพประกอบ 2.3 ภาพวาดแสดงปิเตสมาของกิ่งกุหลาดำเพศผู้ (ชาย) และที่ไลคัมของกิ่งกุหลาดำเพศเมีย (ขวา) (Farfante and Kensley, 1997)

2.3.7 โครงสร้างภายในก้านตากลูกลาดำ

กิ้งมีตาประกอบเป็นอวัยวะรับสัมผัสซึ่งประกอบด้วยห้องเล็ก ๆ ที่เรียกว่า ออมมาทีเดีย (ommatidia) เป็นรูปกรวยจำนวนประมาณ 2,500 หน่วย แต่ละหน่วยมีม่านตา เซลล์ม่านตา 2 เซลล์ และเซลล์เม็ดสี บริเวณฐานเป็นเซลล์ที่ไวต่อแสงเรียกเรตินา ติดต่อไปยังสมองทางเซลล์ประสาท การมองเห็นของกิ้งจึงมีเขตจำกัดในแต่ละอมมาทีเดีย และภาพซึ่งปรากฏแก่ตากลิ้งทั้งหมดนั้นจะประกอบด้วยภาพเล็ก ๆ หลายภาพรวมกัน มองเห็นเป็นภาพเดียว (สุรินทร์ มัจฉาชีพ, 2526)

ตากลิ้งเมื่อลอกเปลือกแข็ง (exoskeleton) ภายนอกก้านตาออก โครงสร้างจากภายนอกเข้าไปจะเป็นเรตินา (retina) lamina ganglionaris (L), ถัดเข้าไปมีปมประสาทตา (optic ganglia) ซึ่งแบ่งออกเป็น 3 บริเวณ ได้แก่ medulla externa (E), medulla interna (I), และ medulla terminalis (T) ปมประสาทแต่ละบริเวณมีเซลล์ประสาท (neuronal cell body) ในบริเวณต่าง ๆ ของตากลิ้ง จะทำหน้าที่ผลิตฮอร์โมนส่งไปตามเส้นใยประสาท (nerve fiber) ซึ่งปล่อยออกและสะสมที่ต่อมไซนัส (sinus gland, S) และหลังเข้าสู่กระแสเลือดหรือฮีโมลิมป์ (haemolymph) ของกิ้ง นอกจากนี้ยังมีเส้นใยประสาทเชื่อมต่อไปยังเส้นประสาทตา (optic nerve, O) และส่งเข้าสู่สมอง (brain) (ภาพประกอบ 2.4 และ 2.5) (จันทร์ทิพย์ คงสินรัตน์ชัย, 2543)



สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพประกอบ 2.4 ตา และ ก้านตา ของกุ้ง *Palaemon* (Carlisle and Knowles, 1959)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพประกอบ 2.5 โครงสร้างภายในก้านตาของผึ้งกุลาดำ

L	=	Lamina ganglionaris	E	=	Medulla externa
I	=	Medulla interna	T	=	Medulla terminalis
S	=	Sinus gland	O	=	Optic nerve

(จันทร์ทิพย์ คงสินรัตน์ชัย, 2543)

2.3.8 นิวโรเปปไทด์ต่าง ๆ ที่พบในสัตว์กลุ่มครัสเตเชีย

Red pigment concentrating hormone (RPCH) เป็น crustacean neuropeptide ตัวแรกที่ทราบโครงสร้างอย่างสมบูรณ์ โดยแยกจากก้านตาของกุ้ง *Pandalus borealis* (Fernlund and Josefsson, 1968) มีโครงสร้างเป็น octapeptide มวลโมเลกุลประมาณ 1000 ดาลตัน มีบทบาทในการควบคุมรงควัตถุในการเปลี่ยนสีตัว นิวโรเปปไทด์ตัวต่อมาคือ Pigment dispersing hormone (PDH) ซึ่งได้ศึกษาการแยกและหาลำดับกรดอะมิโนจากก้านตา *Pandalus borealis* (Fernlund, 1976) พบว่าเป็น octadecapeptide ทำหน้าที่ควบคุมการกระจายตัวของรงควัตถุในโครมาโทฟอร์

ในช่วงระยะสิบปีที่ผ่านมา มีผู้ให้ความสนใจกับ CHH, MIH และ VIH เป็นอย่างมาก โดยนิวโรฮอร์โมนทั้งสามจัดอยู่ในเปปไทด์ตระกูลเดียวกัน เรียกว่า CHH/MIH/VIH family ซึ่งมีลักษณะร่วมกันดังนี้

- 1) มีซิสเตอีน 6 หน่วย ในตำแหน่งเดียวกัน
- 2) เกิดพันธะไดซัลไฟด์ที่ตำแหน่ง C^7-C^{43} , $C^{23}-C^{39}$, $C^{26}-C^{52}$
- 3) ความยาวของสายเปปไทด์ประกอบด้วยกรดอะมิโน 72-78 หน่วย
- 4) มีกรดอะมิโนที่เหมือนกันอยู่จำนวนมาก

(Van Herp, 1998)

CHH เป็นฮอร์โมนที่มีอยู่มากในต่อมไฮนัส มีบทบาทในกระบวนการเมแทบอลิซึม โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด ซึ่งโครงสร้างปฐมภูมิของ CHH ตัวแรกศึกษาได้จาก *Carcinus maenas* ต่อมาได้มีการแยกสกัดและศึกษาโครงสร้างของ CHH ในครัสเตเชียอีกหลายสปีชีส์ พบว่า CHH เป็นสารประเภทโพลีเปปไทด์ ซึ่งส่วนใหญ่ประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 72 หน่วย มีซิสเตอีน 6 หน่วย ทำให้เกิดพันธะไดซัลไฟด์ 3 พันธะ มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 8,000-9,000 ดาลตัน ซึ่งขึ้นอยู่กับสปีชีส์พวกครัสเตเชียแต่ละชนิด โดยมีความแตกต่างกันในส่วนประกอบและลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโน ในสปีชีส์เดียวกันอาจมี CHH ได้หลายรูปแบบ (polymorphism) เช่น *Homarus americanus* พบ CHH 2 รูปแบบ ซึ่งรูปแบบแรกมีน้ำหนักโมเลกุล 8,578 และรูปแบบที่สองมีน้ำหนักโมเลกุล $8,655 \pm 25$ ดาลตัน (Tensen et al., 1991) โครงสร้างปฐมภูมิของนิวโรเปปไทด์ที่มีทั้ง molt-inhibiting และ

hyperglycemic activity อธิบายไว้ใน *H. americanus* (Chang, Prestwich and Bruce, 1990) และ *Penaeus japonicus* (Yang *et al.*, 1996) ส่วน putative MIH ซึ่งมีผลในการยับยั้งการสร้าง ecdysteroid ใน Y-organ ที่เลี้ยงภายในหลอดทดลอง ได้มีการศึกษาใน *C. maenas* (Webster, 1991) และ *Procambarus clarkii* (Nagasawa *et al.*, 1996) ขณะที่การศึกษาลำดับกรดอะมิโนของ VIH มีเพียงใน *H. americanus* (Soyez *et al.*, 1991) และ *Procambarus bouvieri* (Aguilar *et al.*, 1992)

ยังมีรายงานการพบเปปไทด์ฮอร์โมนอีกหลายชนิดในก้านตาของสัตว์กลุ่มครัสเตเชีย เช่น FMRFamide (Callaway, Masinovsky and Graubard, 1987 ; Keller, 1992 ; Schmidt and Ache, 1994), small cardioactive peptide (SCP) (Callaway, Masinovsky and Graubard, 1987), substance P (Schmidt and Ache, 1994), proctolin (Keller, 1992), และ cholecystinin (CCK) (Turrogiano and Selverston, 1989) ซึ่งเปปไทด์ฮอร์โมนเหล่านี้อาจทำหน้าที่เป็นสารสื่อประสาท (neurotransmitter) หรือ นิวโรโมดูเลเตอร์ (neuromodulator) (Callaway, Masinovsky and Graubard, 1987 ; Keller, 1992 ; Schmidt and Ache, 1994 ; Turrogiano and Selverston, 1989) สำหรับแพนกรีเอติกโพลีเปปไทด์ (pancreatic polypeptide, PP) และสารคล้ายแพนกรีเอติกโพลีเปปไทด์ (PP-like substance) นั้น มีรายงานการตรวจพบ การแยก การทำให้บริสุทธิ์ และการหาลำดับกรดอะมิโนของสารนี้ในสัตว์มีกระดูกสันหลังเป็นส่วนใหญ่ สำหรับในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง มีรายงานพบในพยาธิตัวแบน, *Moniezia expansa* (Maule *et al.*, 1991) terrestrial tubellarian, *Artioposthia triangulata* (Curry *et al.*, 1992) ปลาหมึกกล้วย, *Loligo vulgaris* (Smart *et al.*, 1991) proteocephalidean cestode, *Proteocephalus pollanicola* (Marks *et al.*, 1993c) และหอยฝาเดียว, *Helix aspersa* (Leung *et al.*, 1994) ดังได้กล่าวมาแล้วข้างต้น

FMRFamide พบครั้งแรกจากปมประสาทของหอยสองฝา มีโครงสร้างเป็น tetrapeptide amide ประกอบด้วยกรดอะมิโน 4 หน่วย ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนเป็น Phe-Met-Arg-Phe-NH₂ และจัดเป็นนิวโรเปปไทด์ที่มีฤทธิ์กระตุ้นการทำงานของหัวใจ (cardioexcitatory neuropeptide) (Price and Greenberg, 1977) ต่อมาได้มีรายงานการตรวจพบสารที่มีลักษณะโครงสร้างคล้ายกับสาร FMRFamide โดยจะมีโครงสร้างทางด้าน C-terminal เป็น -Arg-Phe-NH₂ (-RFamide) เหมือนกัน จึงทำให้พบสารนี้ได้หลายรูปแบบ ดังนั้นจึงเรียกลักษณะเหล่านี้ว่า สารคล้าย FMRFamide ซึ่งส่วนใหญ่จะพบว่า สารคล้าย FMRFamide มีการเรียงลำดับกรดอะมิโน 4 หน่วยทางด้าน C-terminal เป็น Phe-X-Arg-Phe-NH₂ โดยที่ X อาจจะเป็น Met, Leu หรือ lie ก็ได้

(Krajniak and Price, 1990) จากการศึกษาสารคล้าย FMRFamide ในสัตว์ต่าง ๆ พบว่าเป็น
นิวโรเปปไทด์ที่มีบทบาทต่อการทำงานของระบบต่าง ๆ ในร่างกายคือ กระตุ้นการทำงานของหัวใจ
กระตุ้นการหดตัวและคลายตัวของกล้ามเนื้อลาย และมีผลต่อการทำงานของระบบหมุนเวียน
โลหิตและระบบประสาท

สำหรับรายงานเกี่ยวกับนิวโรเปปไทด์ต่าง ๆ ที่พบในสัตว์กลุ่มครัสเตเชียเขียนนี้ได้
สรุปไว้เป็นตารางในภาคผนวก ค



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สัตว์ทดลอง

กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) อายุ 3-4 เดือน ซึ่งจากบ่อเลี้ยงในพื้นที่อำเภอ
พระประแดง จังหวัดสมุทรปราการ

3.2 อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์

1. ครกหินที่แช่ให้เย็นจัด
2. เครื่องมือผ่าตัด
3. เครื่องบดเนื้อเยื่อ (homogenizer, Janke & Kunkel)
4. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge, Sigma Z-15)
5. เครื่องระเหยแห้ง (speed vacuum concentrator, Savant)
6. เครื่องดูดอากาศ (suction pump) พร้อมอุปกรณ์
7. แผ่นไนโตรเซลลูโลส (nitrocellulose membrane, Schleicher & Schuell)
8. เครื่องโซนิเคเตอร์ (sonicator, Crest)
9. C18 Sep-Pak cartridge (Waters)
10. เครื่อง HPLC (high performance liquid chromatography, Gilson)
11. คอลัมน์ (column) ชนิดต่าง ๆ

PrepPak C18 ขนาด 25 x 100 มิลลิเมตร (Waters)

PrepPak C8 ขนาด 25 x 100 มิลลิเมตร (Waters)

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

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

12. Matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) (Bruker)
13. Autopipette พร้อม tip
14. กล่องพลาสติกมีฝาปิด
15. Measuring pipette พร้อมหลอดยาง
16. ขวดรูปกรวยมีแขน (suction flask)
17. ขวดรูปกรวย (flask)
18. บีกเกอร์ (beaker) ขนาดต่าง ๆ
19. ตู้แช่แข็ง (Whirlpool) และ ultrafreezer (-25 °C และ -70 °C, Revco)
20. ตู้อบ (hot air oven, Memmert)
21. เครื่องชั่ง
22. กระบอกฉีดยา (syringe)
23. หลอดเก็บสารพลาสติก ขนาด 5 มิลลิเมตร และ 1.5 มิลลิเมตร (microcentrifuge tube)
24. เครื่องเก็บแฟรคชัน (fraction collector, BIO-RAD)
25. หลอดพลาสติก (centrifuge tube)

สารเคมี

1. น้ำแข็งแห้ง (dry ice)
2. Methanol (analytical grade, Merck)
3. Acetic acid (analytical grade, Merck)

4. Acetonitrile (ACN, analytical grade, Merck)
5. Acetonitrile (ACN, HPLC grade, Merck)
6. Trifluoroacetic acid (TFA, HPLC grade, Sigma)
7. Heptafluorobutyric acid (HFBA, HPLC grade, Sigma)
8. Triethylamine (TEA, HPLC grade, Sigma)
9. 0.15 M phosphate buffered saline (PBS) pH 7.2 (วิธีเตรียมดูภาคผนวก ก)
10. Bovine serum albumin (BSA, Sigma)
11. 25% glutaraldehyde (Sigma)
12. 5% blotto (วิธีเตรียมดูภาคผนวก ก)
13. 0.5% blotto
14. Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Sigma)
15. 30% hydrogen peroxide (H_2O_2)
16. 1% cobalt chloride ($CoCl_2$)
17. Antibody–Rabbit anti–human PP6 antiserum
18. Goat anti–rabbit IgG H and L chain horseradish peroxidase conjugate (GAR–HRP, Biorad)
19. น้ำกลั่น 3 ครั้ง
20. α -cyano–4–hydroxycinnamic acid (CCA, Sigma)
21. Human angiotensinII (standard, Sigma)

3.3 วิธีดำเนินการวิจัย

การทดลองประกอบด้วยขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้

1. การเก็บรวบรวมก้านตาของกิ้งกูดดำ
2. การเตรียมสารสกัดจากก้านตา (eyestalk extract) ของกิ้งกูดดำ
3. การทำให้บริสุทธิ์ของสารคล้าย PP6 จากก้านตาของกิ้งกูดดำด้วยกระบวนการ Reverse phase - High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC)
4. การตรวจหาสารคล้าย PP6 ในก้านตาของกิ้งกูดดำ โดยใช้วิธี Dot-ELISA (Dot-Enzyme Linked Immunosorbent Assay) หลังจากแยกด้วยกระบวนการ RP-HPLC
5. การหาน้ำหนักโมเลกุล โดย Matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)

3.3.1 การเก็บรวบรวมก้านตาของกิ้งกูดดำ

ตัดก้านตาของกิ้งกูดดำที่มีอายุประมาณ 3-4 เดือน จำนวน 7,500 ก้านตา โดยใช้กรรไกรตัดบริเวณโคนของตากิ้งกูดดำที่ยังมีชีวิตอยู่ แล้วนำไปวางบนน้ำแข็งแห้งทันที หลังจากนั้น นำก้านตากิ่งที่รวบรวมได้ไปเก็บรักษาไว้ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -70°C จนกระทั่งถึงเวลาที่ต้องการนำมาสกัดแยกเปปไทด์

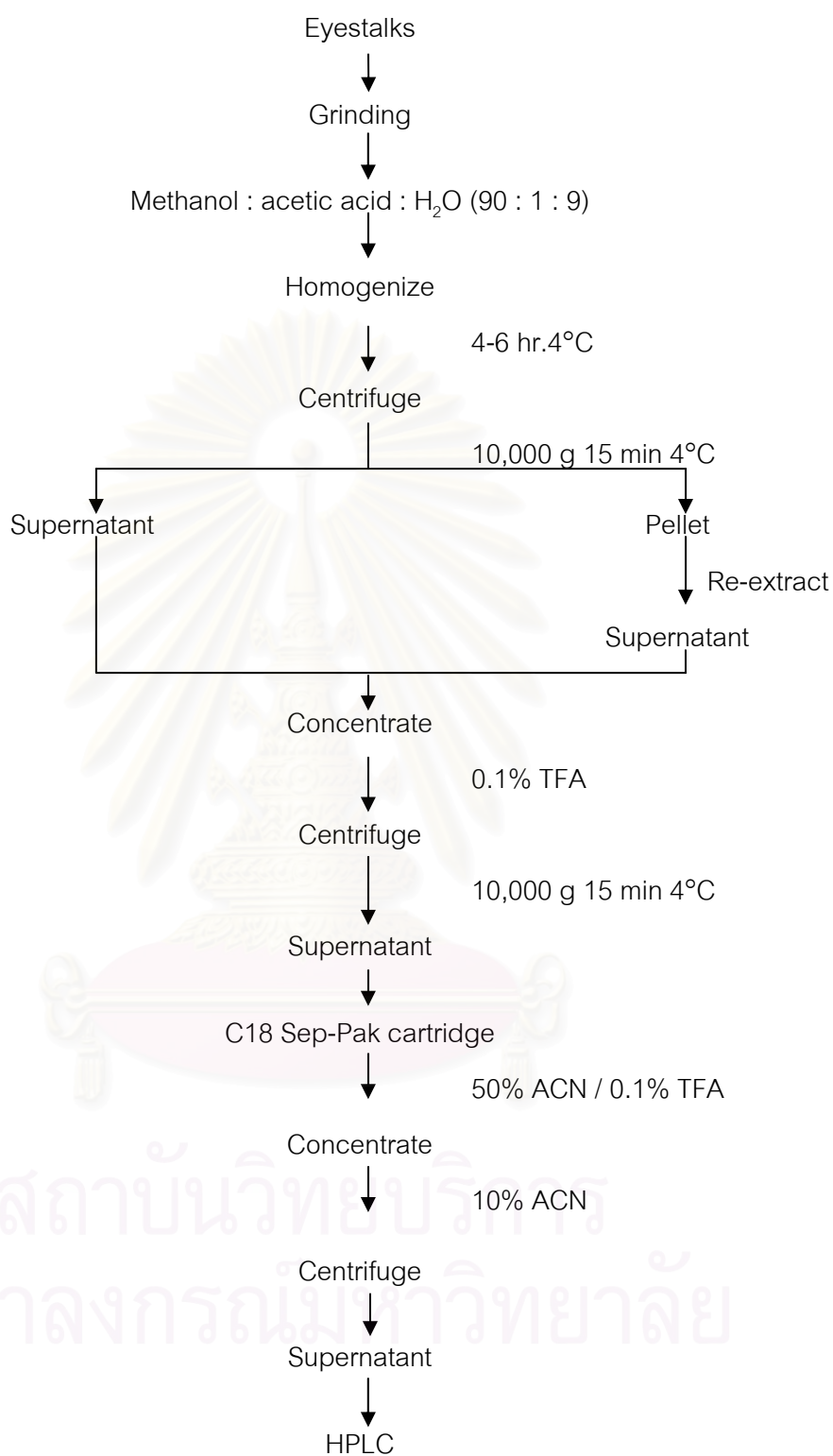
3.3.2 การเตรียมสารสกัดจากก้านตา (eyestalk extract) ของกิ้งกูดดำ

นำก้านตากิ่งที่เก็บรวบรวมไว้จำนวน 7,500 ก้านตา มาบดเป็นผงละเอียดในขณะที่ยื่นจัด โดยบดรวมกับน้ำแข็งแห้งในครก นำผงก้านตาที่ได้มาสกัดสารจากก้านตาด้วยสารละลาย acid alcohol (methanol : acetic acid : H_2O / 90 : 1 : 9) ในปริมาณ 0.5 มิลลิลิตรต่อก้านตา บดซ้ำอีกครั้งด้วยเครื่อง homogenizer นำไปเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง เพื่อให้การสกัดเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ จากนั้นนำไปแยกตะกอนออกโดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยง ด้วยแรงเหวี่ยง 10,000 g เป็นเวลา 15 นาที แยกเอาส่วนสารละลายใส (supernatant) เก็บไว้ ตะกอน (pellet) นำไปสกัดซ้ำอีกครั้งด้วยสารละลาย acid alcohol ตาม

วิธีการเติม นำสารที่สกัดได้ไประเหยเอากรดอะซิติกและเมทานอลออกด้วยเครื่องระเหยแห้ง (speed vacuum concentrator) แล้วจึงเติม 1% trifluoroacetic acid (TFA) ในปริมาณที่ทำให้ความเข้มข้นของสารสกัดเป็น 0.1% TFA (1 : 10 / v : v) ปั่นแยกตะกอนอีกครั้งด้วยเครื่องเหวี่ยง 10,000 g เป็นเวลา 15 นาที แยกส่วนสารละลายใสเก็บไว้ นำไปแยกผ่าน C18 Sep-Pak cartridge เพื่อดูดซับสารสกัดไว้ จากนั้นจึงชะสารสกัดออกด้วย 50% acetonitrile และ 80% acetonitrile ใน 0.1% TFA นำสารสกัดที่ได้ไประเหยตัวทำละลาย acetonitrile ออกจนหมดด้วยเครื่องระเหยแห้ง แล้วจึงเติมสารละลาย 80% acetonitrile ใน 0.1% TFA เพื่อปรับให้สารสกัดอยู่ในสารละลายที่มีความเข้มข้น 10% acetonitrile (ภาพประกอบ 3.1) (ดัดแปลงจากวิธีการของ Sithigorngul and Stretton, 1995)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพประกอบ 3.1 ขั้นตอนวิธีการเตรียมสารสกัดจากก้านตาของกิ้งกูดดำ

3.3.3 การทำให้บริสุทธิ์ของสารคล้าย PP6 จากก้านตาของกึ่งกลาดำด้วย กระบวนการ RP-HPLC

นำสารสกัดจากก้านตาจำนวน 7,500 ก้านตา ประมาณ 1.5 มิลลิลิตร ไปปั่นด้วย เครื่องเหวี่ยง แรงเหวี่ยง 10,000 g นาน 15 นาที และแยกเอาสารละลายส่วนใสไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC ในขั้นตอนที่ 1

ขั้นตอนที่ 1 ใช้คอลัมน์ PrepPak C18 ขนาด 25 x 100 มิลลิเมตร จากนั้นชะด้วย สารละลาย A (A = 0.1% TFA) และ B (B = 80% acetonitrile ใน 0.1% TFA) ที่มีความเข้มข้น เริ่มต้นจาก 15% จนถึง 80% ของสารละลาย B โดยมีอัตราการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ สารละลาย B เป็น 1% ต่อนาที และอัตราการไหล 5 มิลลิลิตรต่อนาที โดยแบ่งสารสกัดผ่าน ค อ ลั ม น์ 3 ครั้ง ครั้งละ 2,500 ก้านตา (0.5 มิลลิลิตร) เก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ลงในหลอด พลาสติกขนาด 5 มิลลิลิตร โดยเครื่องแฟร็กชันคอลเลคเตอร์ (fraction collector) ทุก ๆ 1 นาที ติดตามสารที่ออกจากคอลัมน์ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 215 นาโนเมตร นำไป ตรวจหาสารคล้าย PP โดยใช้วิธี Dot-ELISA

ในขั้นตอนที่ 2 – ขั้นตอนที่ 6 ใช้คอลัมน์และตัวทำละลายต่าง ๆ ดังนี้

กลุ่มที่ 1 และ 2 ในขั้นตอนที่ 2 ใช้คอลัมน์ PrepPak C8 ขนาด 25 x 100 มิลลิเมตร ชะด้วยสารละลาย A (0.1% HFBA) และ B (80% acetonitrile ใน 0.1% HFBA) โดยมีความเข้มข้นเริ่มต้นจาก 10% จนถึง 60% ของสารละลาย B หรือ 15% จนถึง 65% ของ สารละลาย B โดยมีอัตราการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารละลาย B เป็น 1% ต่อนาที และ อัตราการไหลของสารละลาย 5 มิลลิลิตรต่อนาที และอัตราการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ สารละลาย B เป็น 1% ต่อนาที เก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ลงในหลอดพลาสติกขนาด 5 มิลลิลิตร โดยเครื่องแฟร็กชันคอลเลคเตอร์ (fraction collector) ทุก ๆ 1 นาที ติดตามสารที่ออก จากคอลัมน์โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 215 นาโนเมตร นำไปตรวจหาสารคล้าย PP โดยใช้วิธี Dot-ELISA ขั้นตอนที่ 3 ใช้คอลัมน์ Microsorb-MV Cyano ขนาด 4.6 x 250 มิลลิเมตร ชะด้วยสารละลาย A (0.1% HFBA) B (80% acetonitrile ใน 0.1% HFBA) ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น จาก 10% จนถึง 55% ของสารละลาย B อัตราการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ B เป็น 1% ต่อนาที และอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ขั้นตอนที่ 4 ใช้คอลัมน์ Microsorb-MV Cyano ขนาด 4.6 x 250 มิลลิเมตร ชะด้วยสารละลาย A (0.1% HFBA) และ B (80% acetonitrile ใน

0.1% HFBA) ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นจาก 20% จนถึง 50% ของสารละลาย B โดยที่ความเข้มข้นเริ่มต้นเป็น 20-35% B จะใช้อัตราการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ B เป็น 0.5% ต่อนาที เพื่อแยกเปปไทด์จากขั้นตอนที่ 3 ให้ดีขึ้น ต่อจากนั้นจึงใช้อัตราการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ B เป็น 1% ต่อนาที เพื่อชะสารเปปไทด์ที่ตกค้างออกจากคอลัมน์ให้หมด อัตราการไหล 1 มิลลิลิตร ต่อนาที และในขั้นตอนที่ 5 ใช้คอลัมน์ Microsorb-MV C8 ขนาด 4.6 x 250 มิลลิเมตร ชะด้วยสารละลาย A (0.1% TFA) และ B (80% acetonitrile ใน 0.1% TFA) ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นจาก 10% จนถึง 40% ของสารละลาย B โดยที่ความเข้มข้นเริ่มต้นเป็น 10-25% B จะใช้อัตราการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ B เป็น 0.5% ต่อนาที เพื่อแยกเปปไทด์จากขั้นตอนที่ 4 ให้ดีขึ้น ต่อจากนั้นจึงใช้อัตราการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ B เป็น 1% ต่อนาที เพื่อชะสารเปปไทด์ที่ตกค้างออกจากคอลัมน์ให้หมด อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที เก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ลงในหลอดพลาสติกขนาด 1 มิลลิลิตร โดยเครื่องแฟร็กชันคอลเลคเตอร์ (fraction collector) ทุก ๆ 1 นาที ติดตามสารที่ออกจากคอลัมน์ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 215 นาโนเมตร นำไปตรวจหาสารคล้าย PP โดยใช้วิธี Dot-ELISA

กลุ่มที่ 3 ในขั้นตอนที่ 2 ใช้คอลัมน์และระบบตัวทำละลายเช่นเดียวกับกลุ่มที่ 2 ขั้นตอนที่ 3 ใช้คอลัมน์ Microsorb-MV C8 ขนาด 4.6 x 250 มิลลิเมตร ชะด้วยสารละลาย A (TEA 0.01 M) และ B (80% acetonitrile ใน TEA 0.01 M) ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นจาก 10% จนถึง 70% ของสารละลาย B อัตราการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ B เป็น 1% ต่อนาที และอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ขั้นตอนที่ 4 ใช้คอลัมน์ Microsorb-MV Cyano ขนาด 4.6 x 250 มิลลิเมตร ชะด้วยสารละลาย A (0.1% HFBA) และ B (80% acetonitrile ใน 0.1% HFBA) ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นจาก 20% จนถึง 65% ของสารละลาย B อัตราการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ B เป็น 1% ต่อนาที ใช้อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ขั้นตอนที่ 5 ใช้คอลัมน์ Microsorb-MV Cyano ขนาด 4.6 x 250 มิลลิเมตร ชะด้วยสารละลาย A (0.1% TFA) และ B (80% acetonitrile ใน 0.1% TFA) ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นจาก 5% จนถึง 45% ของสารละลาย B อัตราการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ B เป็น 1% ต่อนาที และอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที และในขั้นตอนที่ 6 ใช้คอลัมน์ Microsorb-MV C8 ขนาด 4.6 x 250 มิลลิเมตร ชะด้วยสารละลาย A (0.1% TFA) และ B (80% acetonitrile ใน 0.1% TFA) ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นจาก 5% จนถึง 35% ของสารละลาย B โดยที่ความเข้มข้นเริ่มต้นเป็น 5-10% B จะใช้อัตราการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ B เป็น 1% ต่อนาที หลังจากนั้นที่ความเข้มข้นเป็น 10-20% ใช้อัตราการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ B เป็น 0.5% ต่อนาที เพื่อแยกเปปไทด์จากขั้นตอนที่ 5 ให้ดีขึ้น ต่อจากนั้นจึงใช้อัตราการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ B เป็น 1% ต่อนาที เพื่อชะสารเปปไทด์ที่ตกค้างออกจาก

คอลัมน์ให้หมด อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที คอลัมน์ Microsorb-MV Cyano ขนาด 4.6 x 250 มิลลิเมตร ะด้วยสารละลาย A (0.1% TFA) และ B (80% acetonitrile ใน 0.1% TFA) ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นจาก 5% จนถึง 35% ของสารละลาย B โดยที่ความเข้มข้นเริ่มต้นเป็น 5-20% B จะใช้อัตราการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ B เป็น 0.5% ต่อนาที เพื่อแยกเปปไทด์จากขั้นตอนที่ 5 ให้ดีขึ้น หลังจากนั้นใช้อัตราการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ B เป็น 1% ต่อนาที เพื่อชะสารเปปไทด์ที่ตกค้างออกจากคอลัมน์ให้หมด อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อ นาที เก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ลงในหลอดพลาสติกขนาด 1 มิลลิลิตร โดยเครื่องแฟร็กชันคอลเลคเตอร์ (fraction collector) ทุก ๆ 1 นาที หรือใช้คอลัมน์ Microsorb-MV Cyano ขนาด 4.6 x 250 มิลลิเมตร ะด้วยสารละลาย A (0.1% TFA) และ B (80% acetonitrile ใน 0.1% TFA) ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นจาก 5% จนถึง 35% ของสารละลาย B โดยที่ความเข้มข้นเริ่มต้นเป็น 5-20% B จะใช้อัตราการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ B เป็น 0.5% ต่อนาที เพื่อแยกเปปไทด์จากขั้นตอนที่ 5 ให้ดีขึ้น หลังจากนั้นใช้อัตราการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ B เป็น 1% ต่อนาที เพื่อชะสาร เปปไทด์ที่ตกค้างออกจากคอลัมน์ให้หมด อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที เก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ลงในหลอดพลาสติกขนาด 1 มิลลิลิตร โดยเครื่องแฟร็กชันคอลเลคเตอร์ (fraction collector) ทุก ๆ 1 นาที ติดตามสารที่ออกจากคอลัมน์ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 215 นาโนเมตร นำไปตรวจหาสารคล้าย PP โดยใช้วิธี Dot-ELISA

ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ด้วยกระบวนการ RP-HPLC โดยสรุปดังแสดงในตารางที่

3.1

การทำให้บริสุทธิ์ของสารสกัดจากก้านตาในแต่ละขั้นตอนจะใช้วิธีการ Dot-ELISA (Dot-Enzyme Linked Immunosorbent Assay) ติดตามในระหว่างการทำให้บริสุทธิ์ (วิธีการดัดแปลงจากวิธีการของ Sithigorngul and Stretton, 1995)

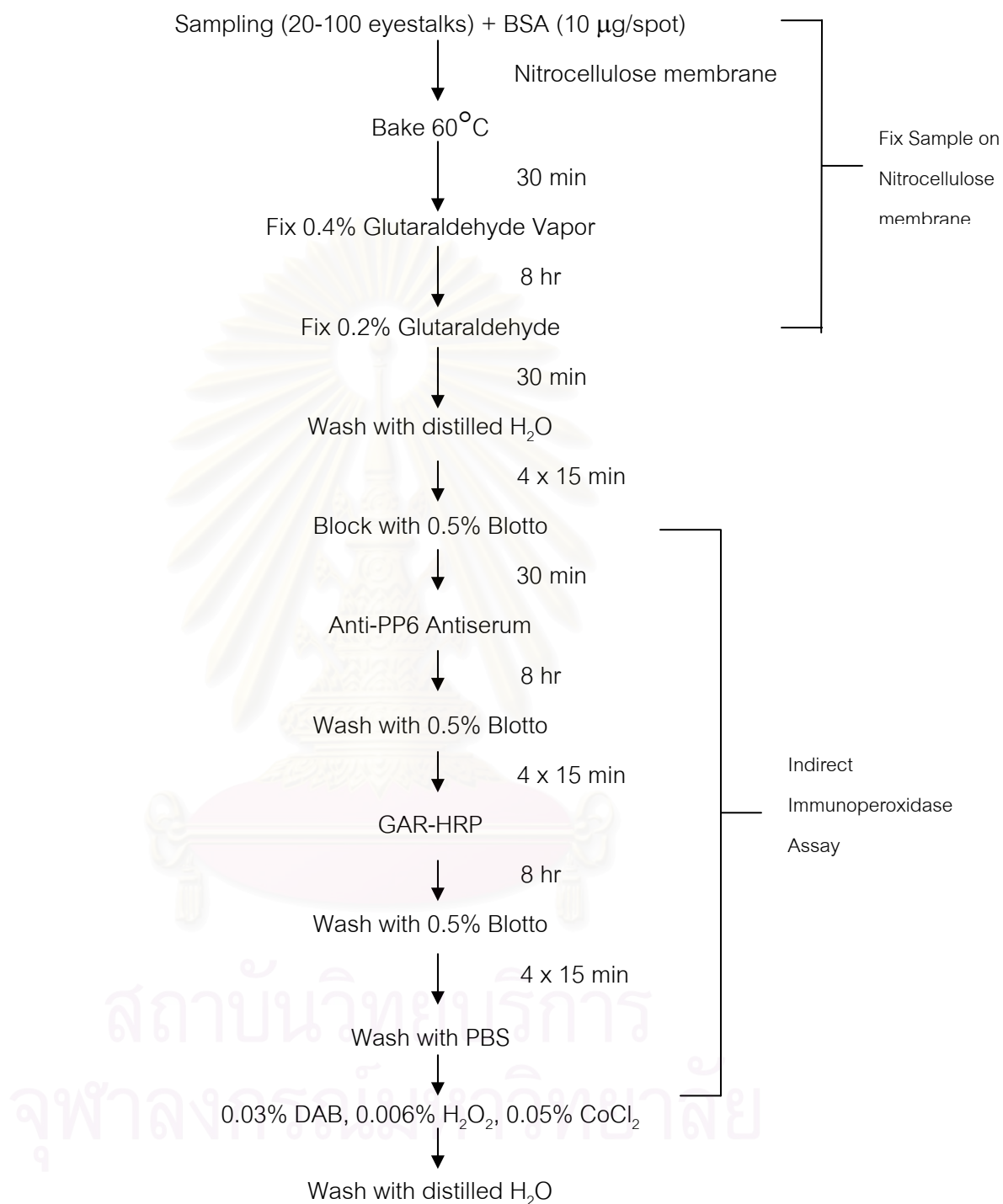
ตารางที่ 3.1 แสดงขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ด้วยกระบวนการ RP-HPLC

Step	Column	Column size (mm)	Counter ion	Gradient of acetonitrile (percent)	Duration (minutes)	Flow rate (ml/min)
1.	PrepPak C18	25 x 100	TFA	12-64	65	5
2.	PrepPak C8	25 x 100	HFBA	8-48	50	5
				12-52	50	5
3.	Microsorb-MV					
	- Cyano	4.6 x 250	HFBA	8-44	45	1
	- C8	4.6 x 250	TEA	8-56	60	1
4.	Microsorb-MV					
	- Cyano	4.6 x 250	HFBA	16-40	45	1
				16-52	45	1
5.	Microsorb-MV					
	- C8	4.6 x 250	TFA	8-32	45	1
	- Cyano	4.6 x 250	TFA	4-36	40	1
6.	Microsorb-MV					
	- C8	4.6 x 250	TFA	4-28	40	1
	- Cyano	4.6 x 250	TFA	4-28	45	1

3.3.4 การตรวจหาสารคล้าย PP6 ในก้านตาของกิ้งกูดดำ โดยใช้วิธี Dot-ELISA (Dot-Enzyme Linked Immunosorbent Assay) หลังจากแยกด้วยกระบวนการ RP-HPLC

แบ่งสารละลายของแต่ละแฟรกชันประมาณ 20-540 ก้านตาต่อจุด ที่ได้จากการผ่านกระบวนการ RP-HPLC ผสมกับโปรตีน bovine serum albumin (BSA) ที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งละลายใน phosphate buffered saline (PBS) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ต่อจุด แล้วนำไปหยดลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเรียงตามลำดับแฟรกชันที่ได้จากการผ่านกระบวนการ RP-HPLC นำแผ่นไนโตรเซลลูโลสที่หยดสารแต่ละแฟรกชันไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง โดยวางแผ่นไนโตรเซลลูโลสไว้ในกล่องปิดฝาสนิทที่มีไอของ glutaraldehyde แล้วนำไปแช่ต่อในสารละลาย 0.2% glutaraldehyde เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นล้างแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วย น้ำกลั่น 4 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที แล้วนำไปบล็อก (block) ด้วย 0.5% blotto เป็นเวลา 30 นาที เพื่อเป็นการป้องกันการจับของแอนติบอดีบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสแบบไม่จำเพาะ

จากนั้นตรวจหาเปปไทด์ด้วยวิธี indirect immunoperoxidase assay ทำโดยนำแผ่นไนโตรเซลลูโลสไปบ่มในสารละลาย rabbit anti-human PP6 antiserum (เจือจาง 1 : 12,000) เป็นเวลา 8 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย 0.5% blotto 4 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที แล้วจึงนำไปบ่มต่อใน goat anti-rabbit IgG H+L horseradish peroxidase conjugate (GAR-HRP) เจือจาง 1 : 1,000 ด้วย 5% blotto เป็นเวลา 8 ชั่วโมง ล้างแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วย 0.5% blotto 4 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที และล้างต่อด้วย PBS 1 ครั้ง จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยาในสารละลายซึ่งประกอบด้วย 0.03% diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB), 0.006% hydrogen peroxide (H_2O_2), 0.05% cobalt chloride ($CoCl_2$) เป็นเวลา 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นหลาย ๆ ครั้ง (ภาพประกอบ 3.2) นำไปตรวจดูความเข้มของสีในแต่ละจุด โดยบริเวณที่เกิดปฏิกิริยาทางอิมมูโนกับแอนติบอดีจะปรากฏเห็นเป็นจุดสีเทาแกมน้ำเงิน นำผลที่ได้จาก Dot-ELISA ไปเปรียบเทียบกับพีคที่ได้จากโครมาโตแกรมที่แยกด้วย RP-HPLC เพื่อใช้เลือกแฟรกชันที่จะนำไปผ่านกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนต่อไป (วิธีการดัดแปลงจากวิธีการของ Sithigorngul, Stretton and Cowden, 1991)



ภาพประกอบ 3.2 ขั้นตอนวิธีการของ Dot-ELISA (Dot-Enzyme Linked Immunosorbent Assay) ในการตรวจหาสารคล้าย PP

3.3.5 การหาน้ำหนักโมเลกุล โดย Matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)

นำแฟรกชันของสารเปปไทด์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนสุดท้าย มาแบ่งสารละลายประมาณ 50 ไมโครลิตร แล้วระเหยตัวทำละลาย acetonitrile ออกให้หมดด้วยเครื่องระเหยแห้ง จากนั้นนำไปหาน้ำหนักโมเลกุลด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS ตามขั้นตอนต่อไปนี้

1. การเตรียม matrix “film” บนแผ่นโลหะ (probe)

นำสารละลายอิมิตัวของ α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CCA) ที่ละลายในอะซิโตนไปปั่นแยกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง หยดส่วนที่เป็นของเหลวใส่ลงบน probe ในช่องสำหรับใส่ตัวอย่าง ช่องละ 1 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ให้แห้ง

2. การเตรียมสารตัวอย่าง

นำสารตัวอย่างไปละลายใน 0.1% TFA : acetonitrile (2 : 1) ปริมาตร 3 ไมโครลิตร แล้วหยดสารตัวอย่างปริมาตร 1 ไมโครลิตร ลงบนช่องตัวอย่างที่มี matrix เคลือบอยู่ ทิ้งไว้ให้แห้ง

3. การเตรียมสารมาตรฐาน (standard)

เตรียมสารมาตรฐาน human angiotensin II และ bovine insulin ที่มีความเข้มข้น 100 พิโคโมลต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 1,047 และ 5,734 ดาลตัน ตามลำดับ แล้วหยดสารมาตรฐาน 1 ไมโครลิตร ลงบนช่องตัวอย่างที่มี matrix เคลือบอยู่ ทิ้งไว้ให้แห้ง

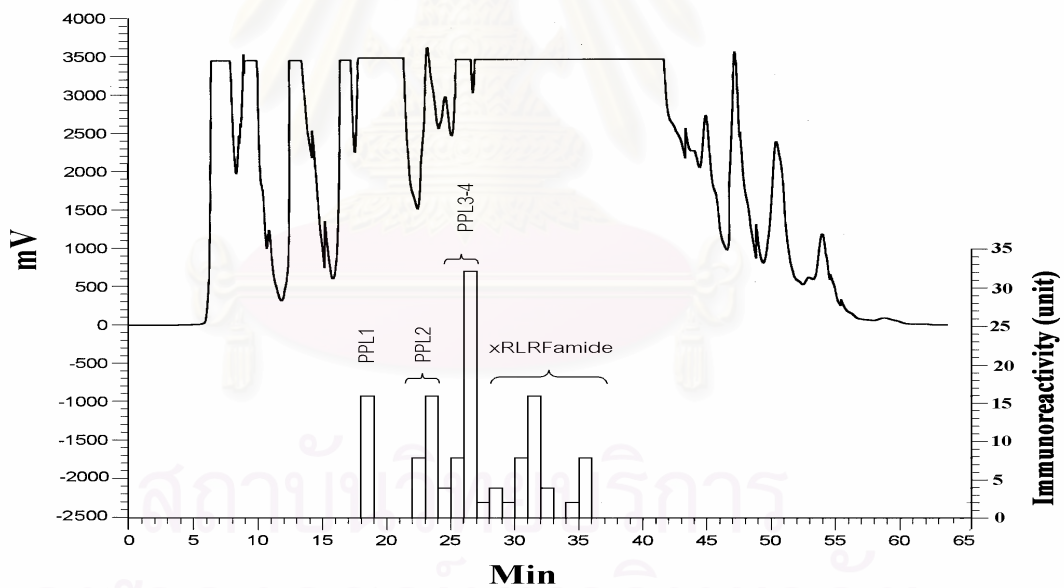
4. นำแผ่นโลหะเข้าเครื่อง MALDI-TOF MS เพื่อหาน้ำหนักโมเลกุลโดยใช้ linear, positive ion mode

บทที่ 4

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย

4.1 การทำให้บริสุทธิ์สารคล้ายแพนครีเอติกโพลีเปปไทด์จากก้านตาของกิ้งกูดำในขั้นตอนแรก

จากการนำสารสกัดจากก้านตาของกิ้งกูดำจำนวน 7,500 ก้านตา ที่สกัดด้วยสารละลายเมทานอล-กรดอะซิติก-น้ำ ในอัตราส่วน 90:1:9 มาผ่านกระบวนการ RP-HPLC โดยใช้คอลัมน์ PrepPak C18 (25 x 100 มิลลิเมตร) และชะด้วย acetonitrile ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นจาก 12% จนถึง 64% acetonitrile ใน 0.1% TFA โดยมีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นเป็น 1% ของ 80% acetonitrile ใน 0.1% TFA ต่อเวลาที่ อัตราการไหล 5 มิลลิลิตรต่อเวลาที่ เก็บแฟรกชันทุก ๆ 1 นาที โดยแบ่งสารสกัดผ่านคอลัมน์ 3 ครั้ง ครั้งละประมาณ 2,500 ก้านตา ติดตามสารคล้าย PP ที่ออกจากคอลัมน์โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 215 นาโนเมตร ได้โครมาโตแกรมที่คล้ายกันทั้ง 3 ครั้ง ดังภาพประกอบ 4.1



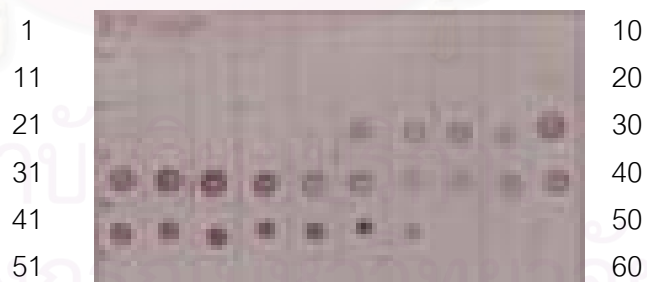
ภาพประกอบ 4.1 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากก้านตากิ้งกูดำจำนวน 2,500 ก้านตา หลังจากผ่านกระบวนการ RP-HPLC ขั้นตอนแรก (คอลัมน์: PrepPak C18 ; ระบบตัวทำละลาย ACN / TFA) และแผนภูมิแท่งแสดงความเข้มข้นของสารคล้าย PP ซึ่งสรุปจาก PP immunoreactivity บนแผ่นไนโตรเซลลูโลส พบสารคล้าย PP ในแฟรกชันที่ 19, 23, 24, 26, 27, 32, 33 และ 36 ตัวเลขเหนือแผนภูมิแท่งเป็นชื่อของเปปไทด์ที่สามารถทำให้บริสุทธิ์จากแฟรกชันกลุ่มต่าง ๆ

จากนั้นเก็บแฟรกชันที่ผ่านออกจากคอลัมน์ทุก ๆ 1 นาที แบ่งสารละลายในแต่ละแฟรกชันมาตรวจหาสารคล้าย PP ด้วยวิธี Dot-ELISA บนแผ่นไนโตรเซลลูโลส โดยใช้ปริมาณแต่ละจุดเทียบเท่ากับ 20 ไมโครลิตร พบการกระจายของสารคล้าย PP กระจายอยู่ในแฟรกชันต่าง ๆ คล้ายกันทั้ง 3 ครั้ง คือพบในแฟรกชันที่ 19, 23, 24, 26, 27, 32, 33 และ 36 ดังภาพประกอบ 4.2 โดยในแฟรกชันที่ 32, 33 และ 36 เป็นแฟรกชันที่มีสารคล้าย FMRFamide เนื่องจากทำปฏิกิริยากับ monoclonal antibodies ต่อ FLP ได้ดี (ภาพประกอบ 4.3) (Sithigorngul *et al.*, 2002) จึงแยกออกจากการศึกษาครั้งนี้ และในการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่อไปจะรวมแฟรกชันใกล้เคียงเข้าด้วยกันโดยแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม คือ แฟรกชันที่ 19 (กลุ่มที่ 1), แฟรกชันที่ 23-24 (กลุ่มที่ 2) และแฟรกชันที่ 26-27 (กลุ่มที่ 3) ของการแยกด้วย RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 1 ทั้ง 3 ครั้ง เข้าด้วยกัน (ภาพประกอบ 4.4)

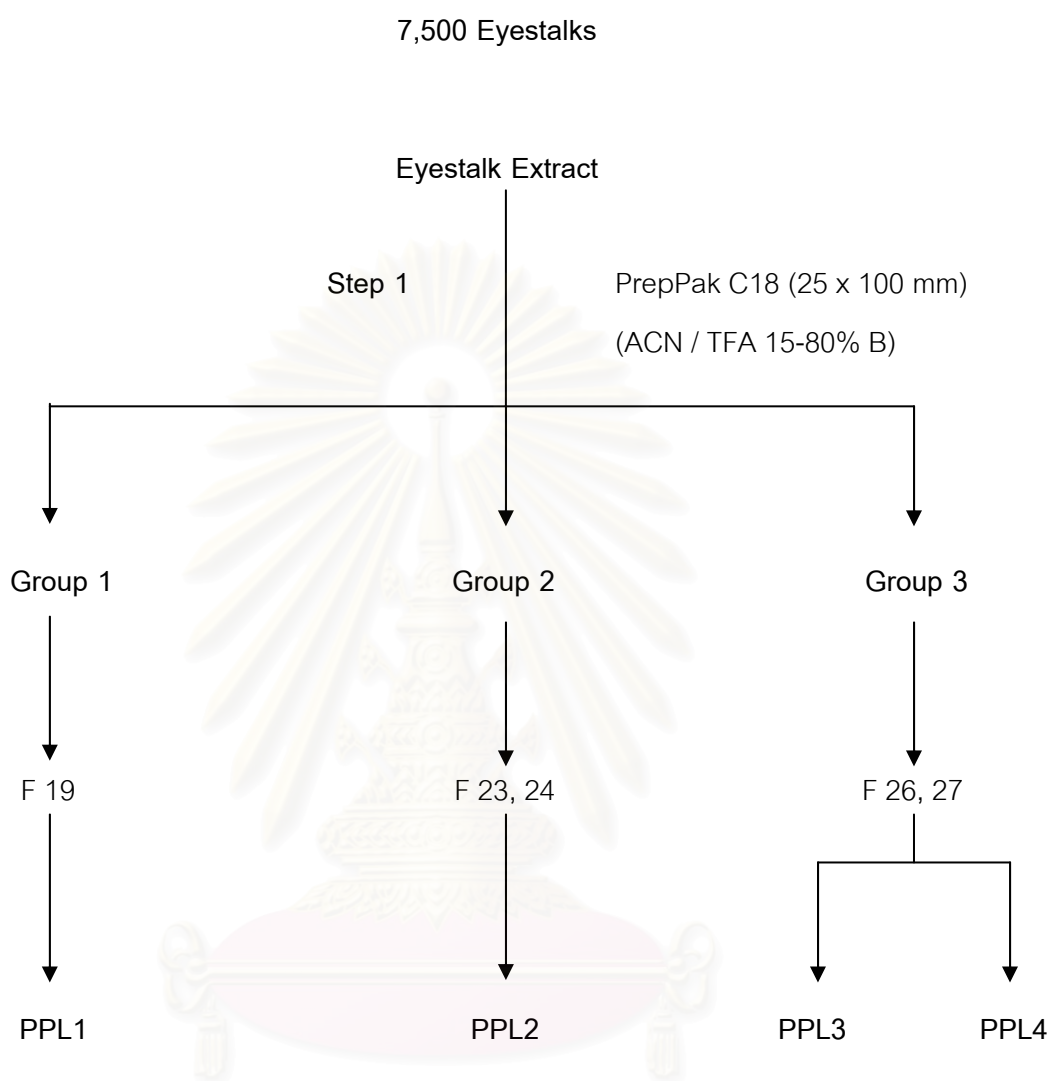
การใช้วิธี Dot-ELISA ในการตรวจหาสารคล้าย PP เป็นวิธีที่ประมาณด้วยสายตา โดยดูจากความเข้มสีของจุดของเปปไทด์มาตรฐาน FMRFamide (จีรศักดิ์ ผู้ปลื้ม, 2542) ที่ความเจือจางต่าง ๆ กับความเข้มสีของจุดของสารคล้าย PP ที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ สำหรับในการวิจัยนี้ยังไม่สามารถประมาณปริมาณที่แน่นอนของสารคล้าย PP ที่บริสุทธิ์ได้ เนื่องจาก affinity ของแอนติบอดีของเปปไทด์เหล่านี้ต่างจาก affinity ต่อ FMRFamide มาตรฐานเพราะมีลำดับกรดอะมิโนต่างกัน และจากการประมาณปริมาณของสารคล้าย PP นี้จะเห็นได้ว่าสารที่ได้มีปริมาณน้อยเกินกว่าจะนำไปหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีทั่วไป



ภาพประกอบ 4.2 PP immunoreactivity ของแฟรกชันต่าง ๆ ที่ได้จากกระบวนการ RP-HPLC ขั้นตอนแรก ในการตรวจหาสารคล้าย PP ด้วยวิธี Dot-ELISA บนแผ่นไนโตรเซลลูโลส พบสารคล้าย PP ในแฟรกชันที่ 19, 23, 24, 26, 27, 32, 33 และ 36



ภาพประกอบ 4.3 FMRFamide immunoreactivity ของแฟรกชันต่าง ๆ ที่ได้จากกระบวนการ RP-HPLC ขั้นตอนแรก ในการตรวจหาสารคล้าย FMRFamide ด้วยวิธี Dot-ELISA บนแผ่นไนโตรเซลลูโลส



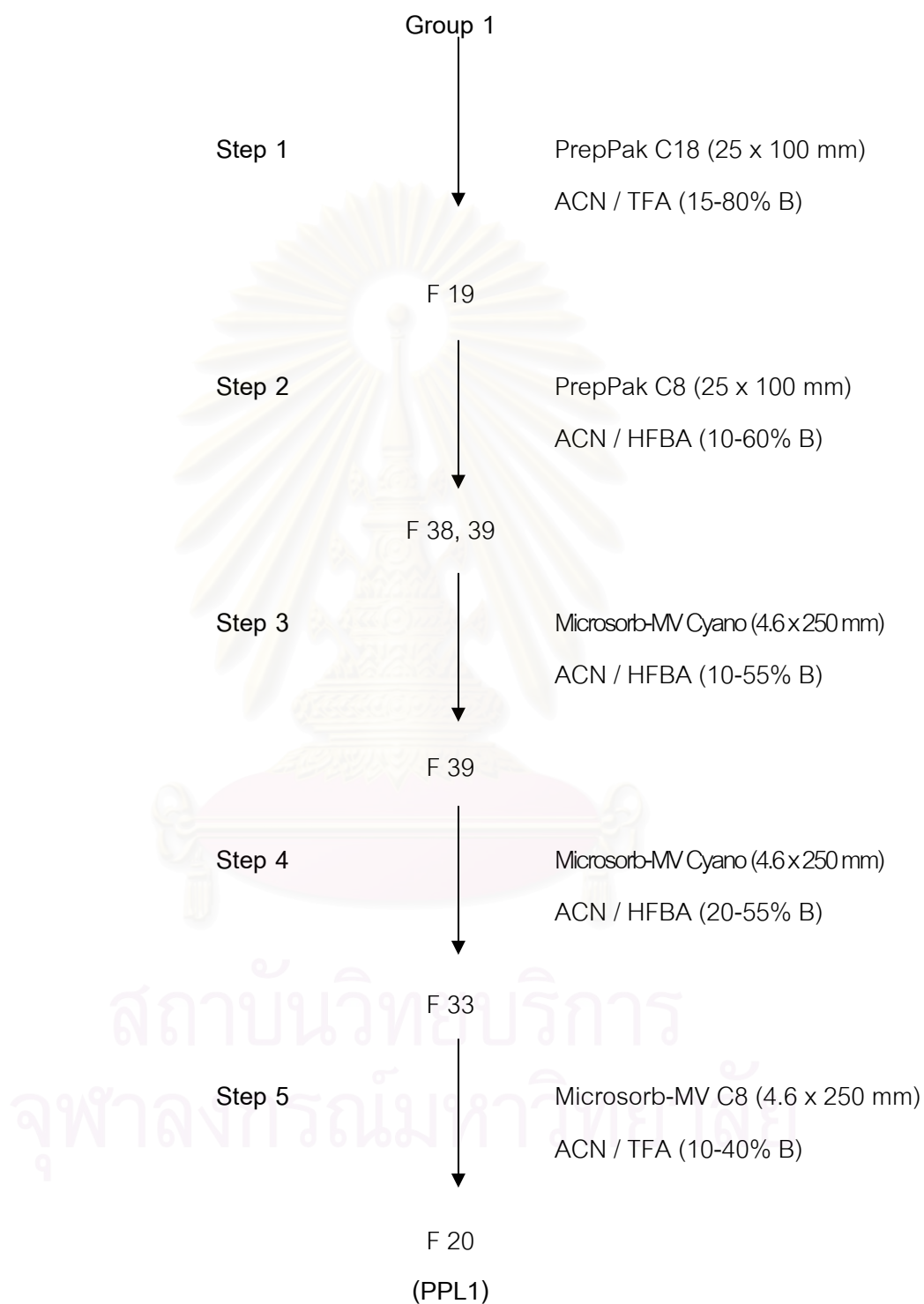
สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพประกอบ 4.4 ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ของสารคล้าย PP ด้วยกระบวนการ RP-HPLC กลุ่มต่าง ๆ จากการแยกด้วยคอลัมน์ : PrepPak C18 ; ระบบตัวทำละลาย ACN / TFA และเปปไทด์ของสารคล้าย PP ที่แยกได้จากแฟรกชันกลุ่มต่าง ๆ

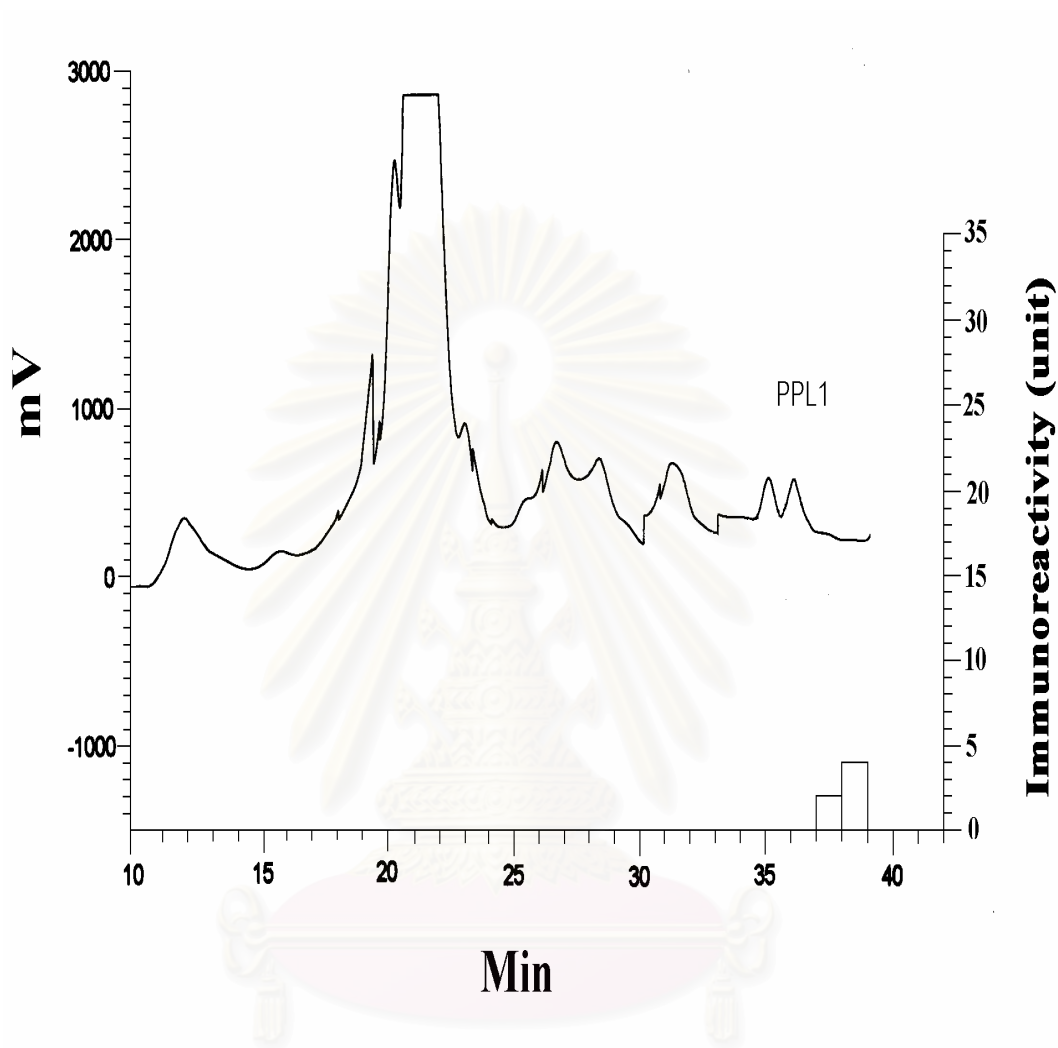
4.2 การทำให้บริสุทธิ์สารคล้ายแพนครีเอติคโพลีเปปไทด์จากก้านตาของกิ้งกูดดำในขั้นตอนที่ 2 - ขั้นตอนที่ 6

ในขั้นตอนที่ 2 จะนำแฟรกชันของแต่ละกลุ่ม (กลุ่มที่ 1-3) ไปทำให้บริสุทธิ์ต่อโดยผ่านกระบวนการ R P - H P L C ในขั้นตอนต่าง ๆ (ตารางที่ 3 . 1) ดังนี้

กลุ่มที่ 1 (ภาพประกอบ 4.5) จากการนำสารคล้าย PP ที่ได้จากการแยกด้วย RP-HPLC ในขั้นตอนแรกในแฟรกชันที่ 19 มาทำให้บริสุทธิ์ต่อในขั้นตอนที่ 2 โดยใช้คอลัมน์ PrepPak C8 (25 x 100 มิลลิเมตร) และชะด้วย acetonitrile ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นจาก 8% จนถึง 48% acetonitrile ใน 0.1% HFBA พบการกระจายของสารคล้าย PP ที่แฟรกชันที่ 38 และ 39 (ในช่วงความเข้มข้นของ acetonitrile เป็น 33-35% ใน 0.1% HFBA) ดังภาพประกอบ 4.6 ในขั้นตอนที่ 3 ใช้คอลัมน์ Microsorb-MV Cyano (4.6 x 250 มิลลิเมตร) และชะด้วย acetonitrile ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นจาก 8% จนถึง 44% acetonitrile ใน 0.1% HFBA จะพบการกระจายของสารคล้าย PP อยู่ในแฟรกชันที่ 39 (ในช่วงความเข้มข้นของ acetonitrile เป็น 34-35% ใน 0.1% HFBA) ในขั้นตอนที่ 4 ใช้คอลัมน์ Microsorb-MV Cyano (4.6 x 250 มิลลิเมตร) และชะด้วย acetonitrile ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นจาก 16% จนถึง 40% acetonitrile จะพบการกระจายของสารคล้าย PP อยู่ในแฟรกชันที่ 33 (ในช่วงความเข้มข้นของ acetonitrile เป็น 26-28% ใน 0.1% HFBA) ในขั้นตอนที่ 5 ใช้คอลัมน์ Microsorb-MV C8 (4.6 x 250 มิลลิเมตร) และชะด้วย acetonitrile ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นจาก 8% จนถึง 32% acetonitrile จะสามารถแยกเปปไทด์ของสารคล้าย P P ที่คาดว่าจะมีความบริสุทธิ์มากพอในแฟรกชันที่ 20 (ในช่วงความเข้มข้นของ acetonitrile เป็น 13-14% ใน 0.1% TFA) ปรากฏออกมาเพียงพีคเดียว (PPL1) ค่าความสูงของพีคประมาณ 13 มิลลิโวลท์ (ภาพประกอบ 4.7 (A)) ซึ่งเมื่อประมาณปริมาณเปปไทด์ของสารคล้าย PP (PPL1) เปรียบเทียบกับความเข้มของสีของจุดเปปไทด์มาตรฐาน FMRamide (จีรศักดิ์ ผู้ปล้ำ, 2 5 4 2) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ จะเท่ากับ 8 หน่วย เมื่อใช้ 1 2 0 ก้านตา

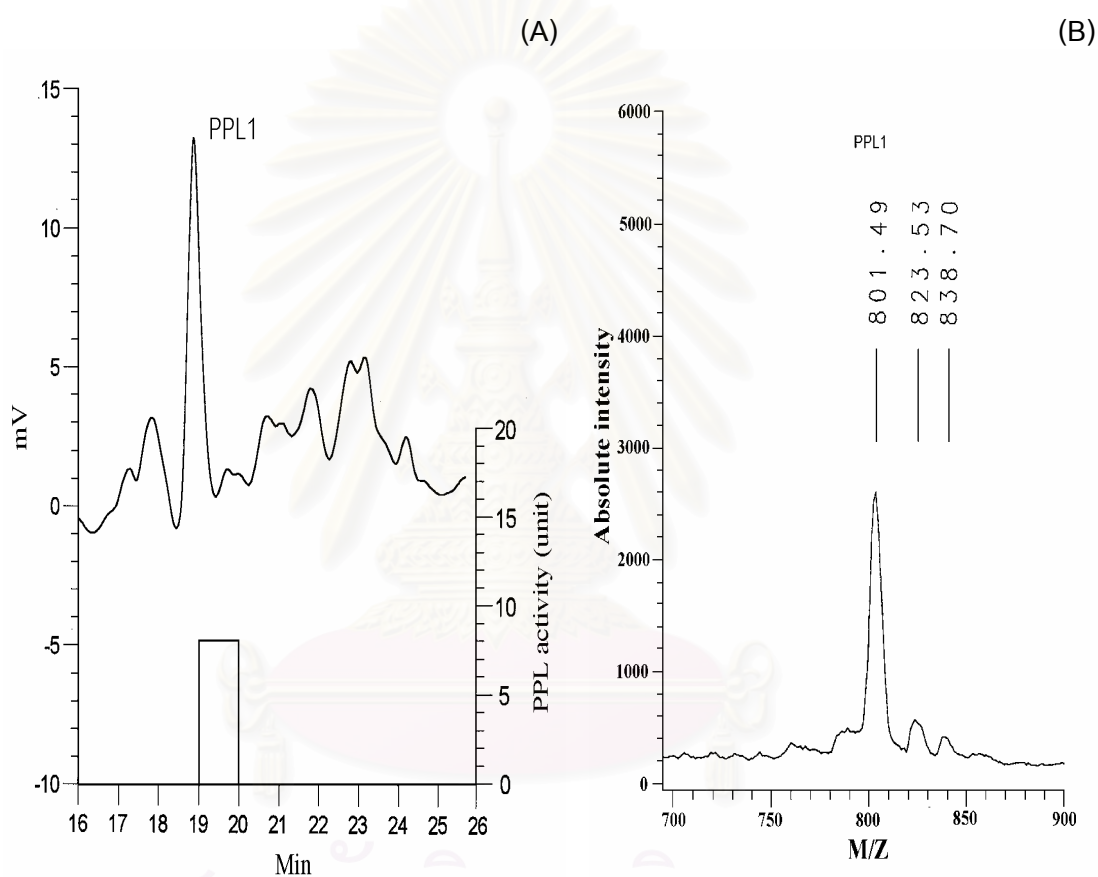


ภาพประกอบ 4.5 ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย PP ด้วยกระบวนการ RP-
H P L C ของสารคล้าย P P กลุ่มที่ 1



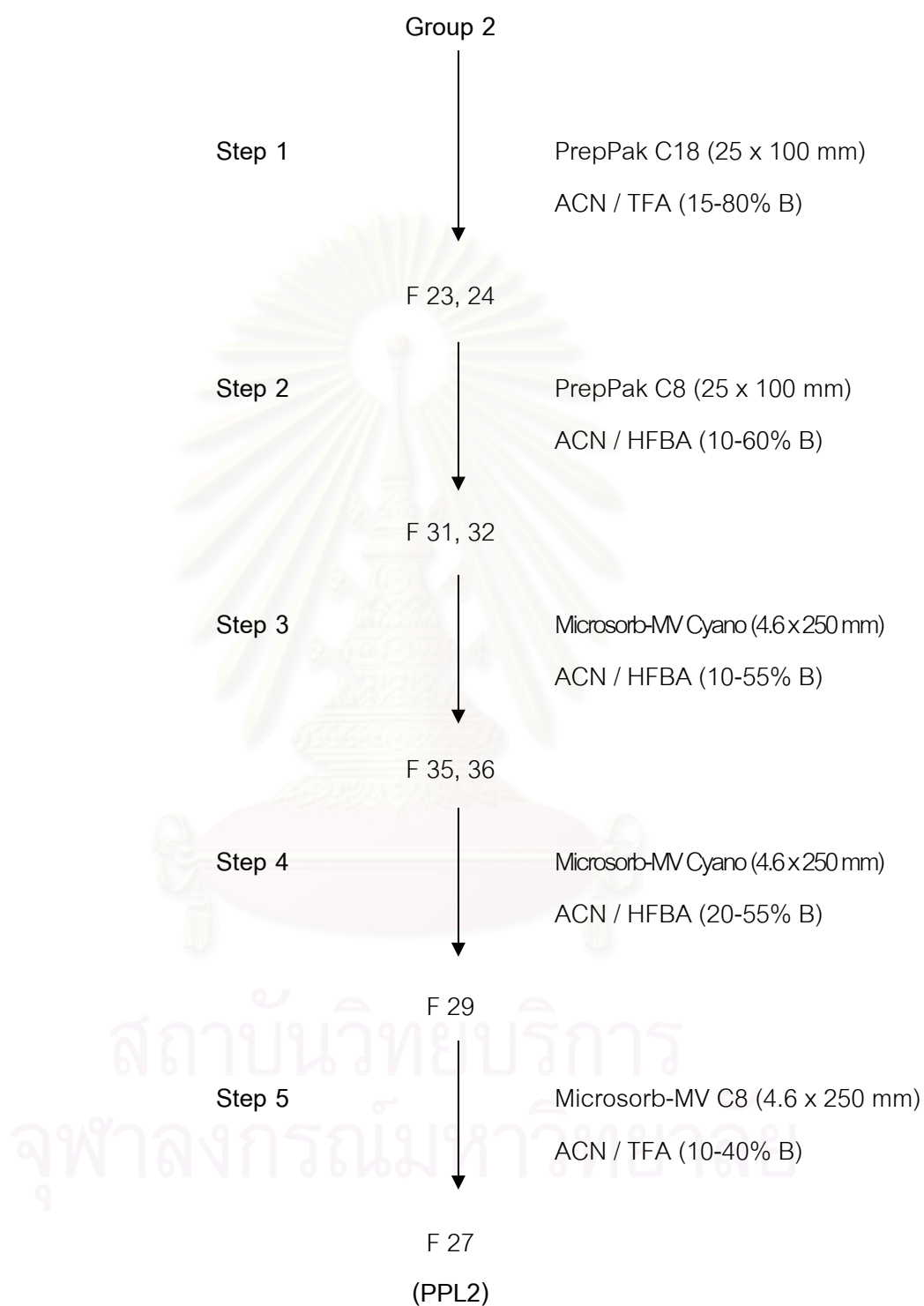
สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพประกอบ 4.6 โครมาแกรมของสารสกัดกลุ่มที่ 1 จากก้านตาของกุ่มกุลาดำจำนวน 7,500 ก้านตา ที่ผ่านกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 2 (คอลัมน์ : PrepPak C8 ; ระบบตัวทำละลาย ACN / HFBA) และแผนภูมิแท่งแสดงความเข้มข้นของสารคล้าย PP ในแฟรกชันที่ 38 และ 39 ตัวเลขเหนือพีคเป็นชื่อของเปปไทด์ที่สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้

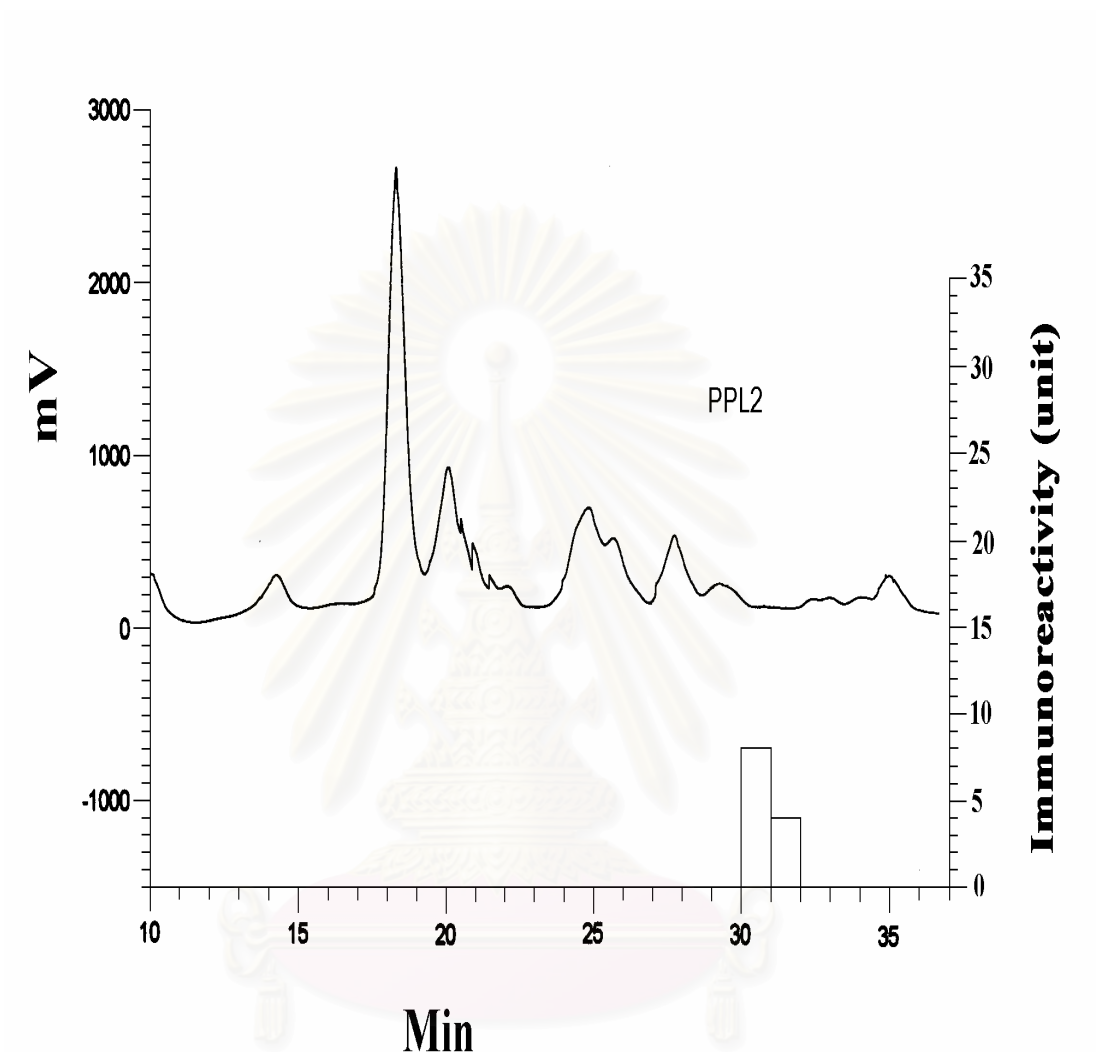


ภาพประกอบ 4.7 โครมาโตแกรมการทำให้บริสุทธิ์ของเปปไทด์ในกลุ่มที่ 1 คือ PPL1 โดยผ่านกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 5 ใช้คอลัมน์ Microsorb-MV C8 ระบบตัวทำละลาย ACN / TFA (A) และแมสสเปกตรัมของสารคล้าย PP ; PPL1 (B)

กลุ่มที่ 2 (ภาพประกอบ 4.8) จากการนำสารคล้าย PP ที่ได้จากการแยกด้วย RP-HPLC ในขั้นตอนแรกในแฟรกชันที่ 23-24 มารวมกันและทำให้บริสุทธิ์ต่อในขั้นตอนที่ 2 โดยใช้คอลัมน์ PrepPak C8 (25 x 100 มิลลิเมตร) และชะด้วย acetonitrile ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นจาก 12% จนถึง 52% acetonitrile ใน 0.1% HFBA พบการกระจายของสารคล้าย PP ที่แฟรกชันที่ 31 และ 32 (ในช่วงความเข้มข้นของ acetonitrile เป็น 32-34% ใน 0.1% HFBA) ดังภาพประกอบ 4.9 ใน ขั้นตอนที่ 3 ใช้คอลัมน์ Microsorb-MV Cyano (4.6 x 250 มิลลิเมตร) และชะด้วย acetonitrile ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นจาก 8% จนถึง 44% acetonitrile ใน 0.1% HFBA จะพบการกระจายของสารคล้าย PP อยู่ในแฟรกชันที่ 35-36 (ในช่วงความเข้มข้นของ acetonitrile เป็น 31-33% ใน 0.1% HFBA) ใน ขั้นตอนที่ 4 ใช้คอลัมน์ Microsorb-MV Cyano (4.6 x 250 มิลลิเมตร) และชะด้วย acetonitrile ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นจาก 16% จนถึง 40% acetonitrile พบการกระจายของสารคล้าย PP อยู่ในแฟรกชันที่ 29 (ในช่วงความเข้มข้นของ acetonitrile เป็น 25-26% ใน 0.1% HFBA) ใน ขั้นตอนที่ 5 ใช้คอลัมน์ Microsorb-MV C8 (4.6 x 250 มิลลิเมตร) และชะด้วย acetonitrile ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นจาก 8% จนถึง 32% acetonitrile จะสามารถแยกเปปไทด์ของสารคล้าย PP ที่คาดว่าจะมีความบริสุทธิ์มากพอในแฟรกชันที่ 27 (ในช่วงความเข้มข้นของ acetonitrile เป็น 16-17% ใน 0.1% TFA) ปรากฏออกมาเพียงพีคเดียว (PPL2) ค่าความสูงของพีคประมาณ 55 มิลลิโวลท์ (ภาพประกอบ 4.10 (A)) ซึ่งเมื่อประมาณปริมาณเปปไทด์ของสารคล้าย PP (PPL2) เปรียบเทียบกับความเข้มข้นของสีของจุดเปปไทด์มาตรฐาน FMRamide (จีรศักดิ์ ผู้ปลื้ม, 2542) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ จะเท่ากับ 16 หน่วย เมื่อใช้ 120 ก้านตา

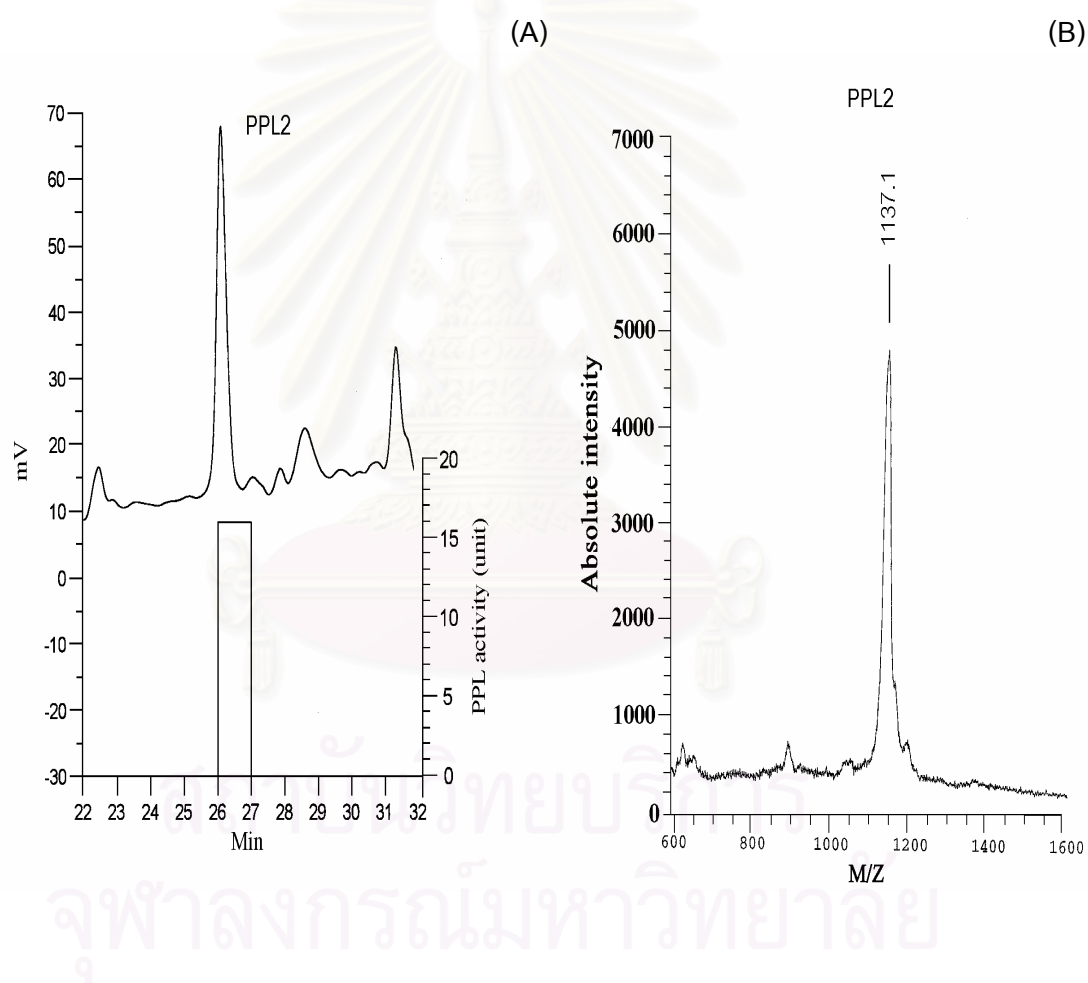


ภาพประกอบ 4.8 ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย PP ด้วยกระบวนการ RP-HPLC ของสารคล้าย PP กลุ่มที่ 2



สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพประกอบ 4.9 โคโรมาแกรมของสารสกัดกลุ่มที่ 2 จากก้านตาของกิ้งกูดดำ จำนวน 7,500 ก้านตา ที่ผ่านกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 2 (คอลัมน์ : PrepPak C8 ; ระบบตัวทำละลาย ACN / HFBA) และแผนภูมิแท่งแสดงความเข้มข้นของสารคล้าย PP ในแฟรกชันที่ 31 และ 32 ตัวเลขเหนือฟีดเป็นชื่อของเปปไทด์ที่สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้



ภาพประกอบ 4.10 โครมาโตแกรมการทำให้บริสุทธิ์ของเปปไทด์ในกลุ่มที่ 2 คือ PPL2 โดยผ่านกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 5 ใช้คอลัมน์ Microsorb-MV C8 ระบบตัวทำละลาย ACN / TFA (A) และแมสสเปกตรัมของสารคล้าย PP ; PPL2 (B)

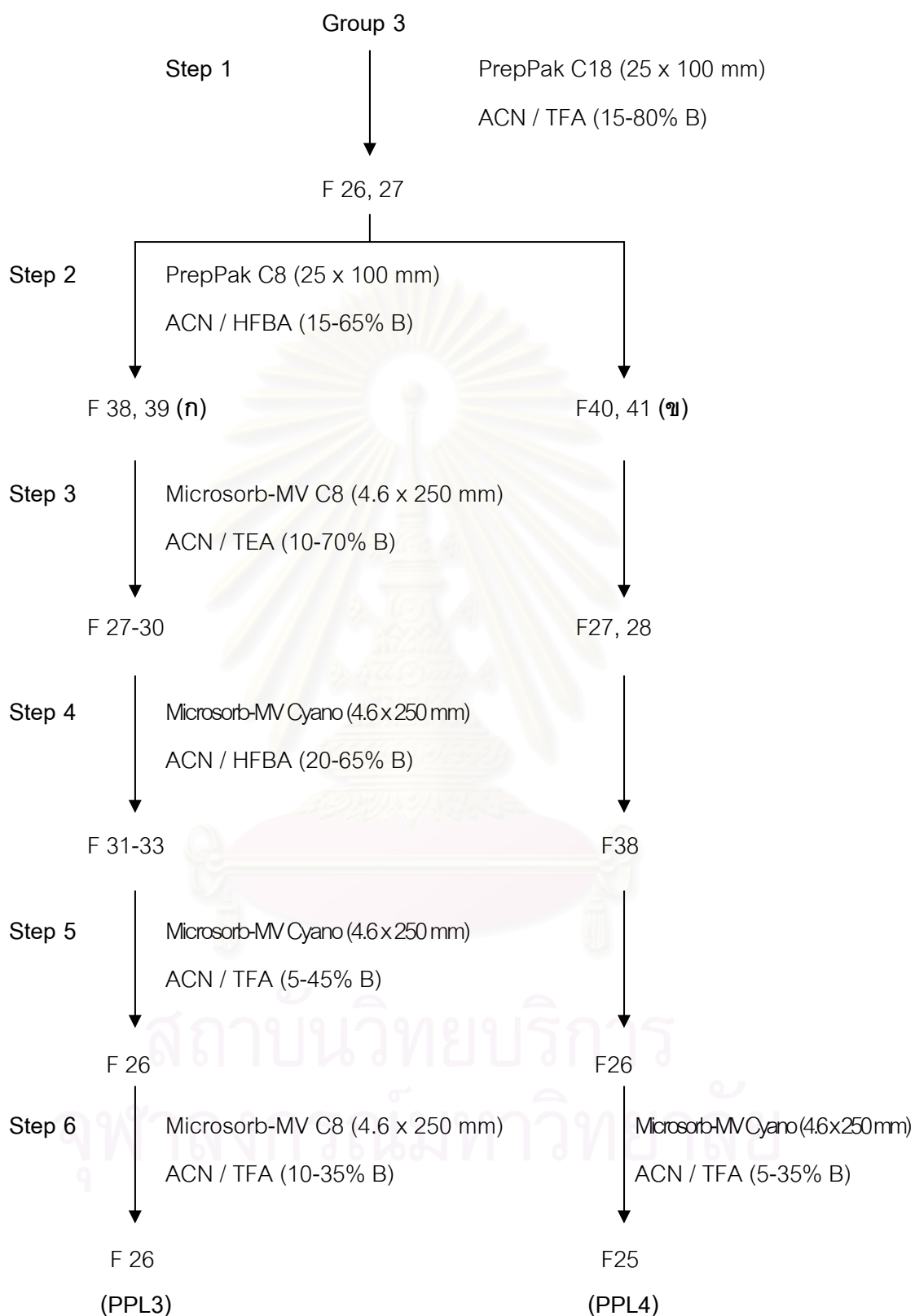
กลุ่มที่ 3 (ภาพประกอบ 4.11) จากการนำสารคล้าย PP ที่ได้จากการแยกด้วย RP-HPLC ในขั้นตอนแรกในแฟรกชันที่ 26-27 มารวมกันและทำให้บริสุทธิ์ต่อใน ขั้นตอนที่ 2 โดยใช้คอลัมน์และระบบตัวทำละลายเช่นเดียวกับในกลุ่มที่ 2 จะพบการกระจายของสารคล้าย PP ในแฟรกชันที่ 38-41 (ในช่วงความเข้มข้นของ acetonitrile เป็น 37-41% ใน 0.1% HFBA) ดังภาพประกอบ 4.12 ความเข้มข้นของสารคล้าย PP ค่อนข้างสูงในทุกแฟรกชัน จึงรวบรวมแฟรกชันที่พบสารคล้าย PP เข้าด้วยกันเพื่อแยกผ่านคอลัมน์ในขั้นตอนต่อไป โดยรวมแฟรกชันที่ 38 เข้ากับแฟรกชันที่ 39 (ก) และแฟรกชันที่ 40 เข้ากับแฟรกชันที่ 41 (ข) เนื่องจากอยู่ในช่วงพีคที่ต่างกัน

ในขั้นตอนที่ 3 ใช้คอลัมน์ Microsorb-MV C8 (4.6 x 250 มิลลิเมตร) และชะด้วย acetonitrile ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นจาก 8% จนถึง 56% acetonitrile ใน TEA 0.01 M จาก (ก) พบการกระจายของสารคล้าย PP อยู่ในแฟรกชันที่ 27-30 (ในช่วงความเข้มข้นของ acetonitrile เป็น 24-28% ใน TEA 0.01 M) และจาก (ข) พบการกระจายของสารคล้าย PP อยู่ในแฟรกชันที่ 27-28 (ในช่วงความเข้มข้นของ acetonitrile เป็น 24-26% ใน TEA 0.01 M) ใน ขั้นตอนที่ 4 ใช้คอลัมน์ Microsorb-MV Cyano (4.6 x 250 มิลลิเมตร) และชะด้วย acetonitrile ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นจาก 16% จนถึง 52% acetonitrile (ก) พบการกระจายของสารคล้าย PP อยู่ในแฟรกชันที่ 31-33 (ในช่วงความเข้มข้นของ acetonitrile เป็น 36-38% ใน 0.1% HFBA) และ (ข) พบการกระจายของสารคล้าย PP อยู่ในแฟรกชันที่ 38 (ในช่วงความเข้มข้นของ acetonitrile เป็น 41-42% ใน 0.1% HFBA) ใน ขั้นตอนที่ 5 ใช้คอลัมน์ Microsorb-MV Cyano (4.6 x 250 มิลลิเมตร) และชะด้วย acetonitrile ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นจาก 4% จนถึง 36% acetonitrile (ก) พบการกระจายของ สารคล้าย PP อยู่ในแฟรกชันที่ 26 (ในช่วงความเข้มข้นของ acetonitrile เป็น 20-21% ใน 0.1% TFA) และ (ข) พบการกระจายของสารคล้าย PP อยู่ในแฟรกชันที่ 26 (ในช่วงความเข้มข้นของ acetonitrile เป็น 20-21% ใน 0.1% TFA) ในขั้นตอนที่ 6 (ก) ใช้คอลัมน์ Microsorb-MV C8 (4.6 x 250 มิลลิเมตร) และชะด้วย acetonitrile ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นจาก 4% จนถึง 28% acetonitrile จะสามารถแยกเปปไทด์ของสารคล้าย PP ที่คาดว่าจะมีความบริสุทธิ์มากพอในแฟรกชันที่ 26 (ในช่วงความเข้มข้นของ acetonitrile เป็น 14-15% ใน 0.1% TFA) ปรากฏออกมาเพียงพีคเดียว (PPL3) ค่าความสูงของพีคประมาณ 6 มิลลิโวลท์ (ภาพประกอบ 4.13 (B)) ซึ่งเมื่อประมาณปริมาณเปปไทด์ของสารคล้าย PP (P P L 3) เปรียบเทียบกับความเข้มข้นของสี่ของจุดเปปไทด์มาตรฐาน FMRamide (จิรศักดิ์ ผู้ปลื้ม, 2542) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ จะเท่ากับ 16 หน่วย เมื่อใช้ 300 ก้านตา และ (ข) ใช้คอลัมน์ Microsorb-MV Cyano (4.6 x 250 มิลลิเมตร) และชะด้วย acetonitrile ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นจาก 4% จนถึง 28% acetonitrile จะสามารถแยกเปปไทด์ของสารคล้าย P P ที่คาดว่าจะมีความบริสุทธิ์มากพอในแฟรกชันที่ 2 5 (ในช่วงความเข้มข้นของ

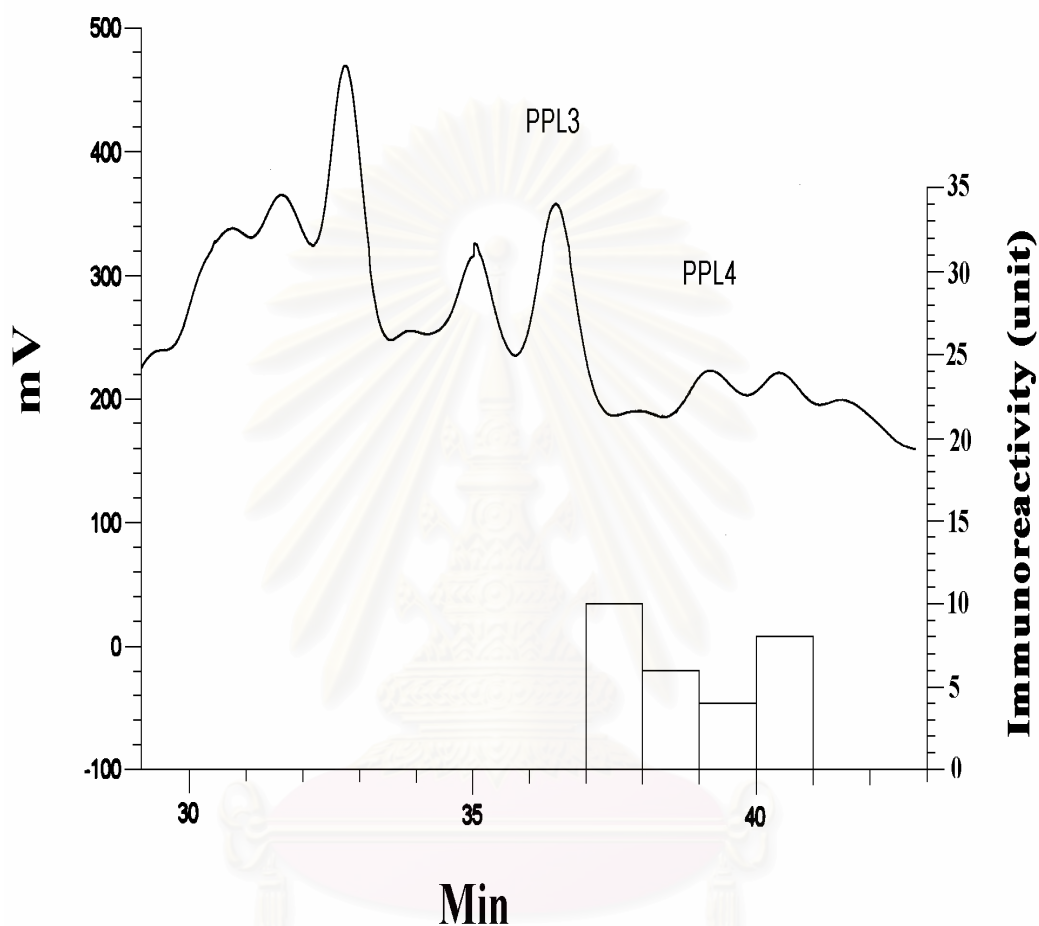
acetonitrile เป็น 14-15% ใน 0.1% TFA) ปรากฏออกมาเพียงพีคเดียว (PPL4) ค่าความสูงของพีคประมาณ 2.5 มิลลิโวลต์ (ภาพประกอบ 4.14 (A)) ซึ่งเมื่อประมาณปริมาณเปปไทด์ของสารคล้าย PP (PPL4) เปรียบเทียบกับความเข้มของสีของจุดเปปไทด์มาตรฐาน FMRamide (จิรศักดิ์ ผู้ปลื้ม, 2542) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ จะเท่ากับ 16 หน่วย เมื่อใช้ 120 ก้านตา



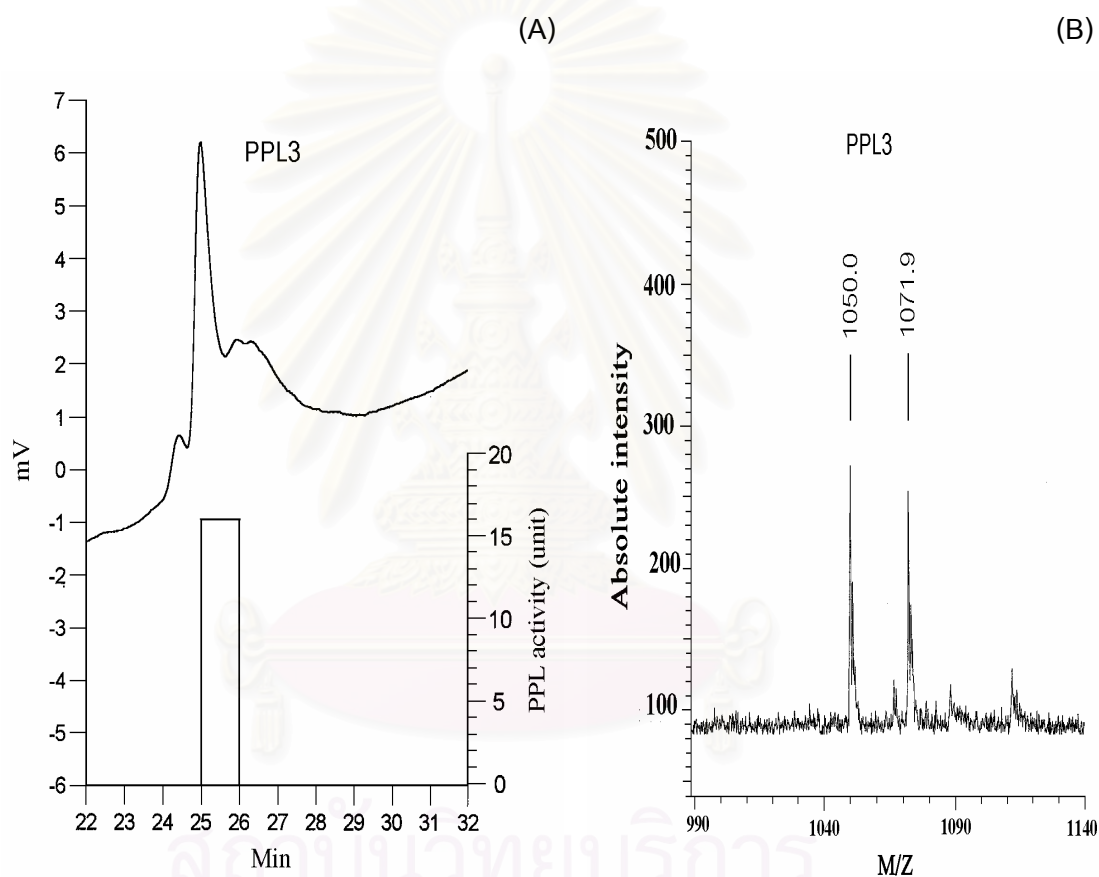
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



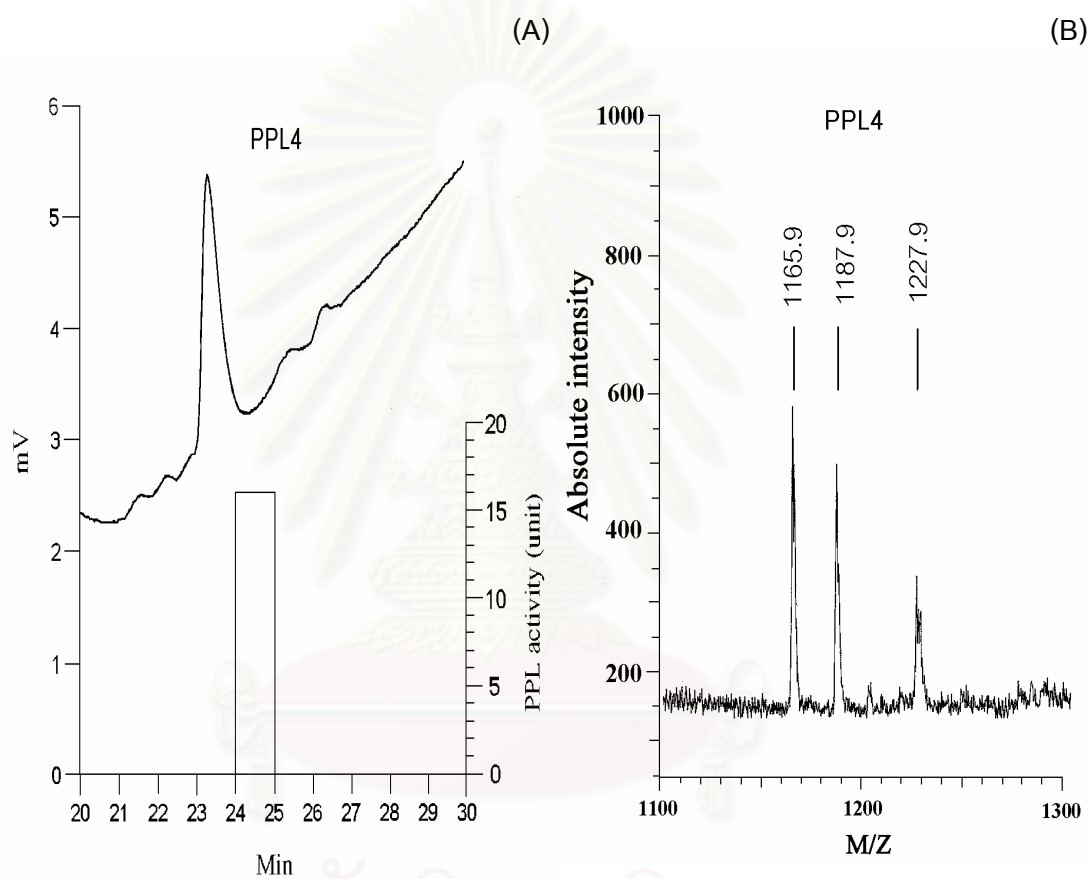
ภาพประกอบ 4.11 ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย PP ด้วยกระบวนการ RP-HPLC ของสารคล้าย PP กลุ่มที่ 3



ภาพประกอบ 4.12 โคโรมาแกรมของสารสกัดกลุ่มที่ 3 จากก้านตาของกิ้งกูดดำ จำนวน 7,500 ก้านตา ที่ผ่านกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 2 (คอลัมน์ : PrepPak C8 ; ระบบตัวทำละลาย ACN / HFBA) และแผนภูมิแท่งแสดงความเข้มข้นของสารคล้าย PP ในแฟรกชันที่ 38 และ 39 (กลุ่มที่ 3) และแฟรกชันที่ 40 และ 41 (กลุ่มที่ 4) ตัวเลขเหนือพีคเป็นชื่อของเปปไทด์ที่สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้



ภาพประกอบ 4.13 โครมาโตแกรมการทำให้บริสุทธิ์ของเปปไทด์ในกลุ่มที่ 3 คือ PPL3 (A) โดยผ่านกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 6 ใช้คอลัมน์ Microsorb-MV C8 ระบบตัวทำละลาย ACN / TFA และแมสสเปกตรัมของสารคล้าย PP ; PPL3 (B)



ภาพประกอบ 4.14 โครมาโตแกรมการทำให้บริสุทธิ์ของเปปไทด์ในกลุ่มที่ 3 คือ PPL4 โดยผ่านกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 6 ใช้คอลัมน์ Microsorb-MV Cyano ระบบตัวทำละลาย ACN / TFA (A) และแมสสเปกตรัมของสารคล้าย PP; PPL4 (B)

4.3 การหาน้ำหนักโมเลกุลของสารคล้าย PP โดย Matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)

จากการนำตัวอย่างเปปไทด์ของสารคล้าย P P ที่คาดว่าจะมีความบริสุทธิ์สูงไปตรวจหาน้ำหนักโมเลกุลโดย Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) พบเปปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่าง ๆ กัน ดังนี้ PPL1 มีน้ำหนักโมเลกุล 801.5 และ 823.5 (ภาพประกอบ 4.7 (B)), PPL2 มีน้ำหนักโมเลกุล 1137.1 (ภาพประกอบ 4.10 (B)), PPL3 มีน้ำหนักโมเลกุล 1050.0 และ 1071.9 (ภาพประกอบ 4.13(B)) และ PPL4 มีน้ำหนักโมเลกุล 1165.9, 1187.9 และ 1227.9 (ภาพประกอบ 4.4(B)) ตารางที่ 4.1 แสดงค่าความแตกต่างของมวลสารในแต่ละพีคประมาณ 22 และ 40 ดาลตัน (ซึ่งใกล้เคียงกับน้ำหนักของโซเดียมและโพแทสเซียม) จึงคาดว่าน่าจะเป็นอนุพันธ์ของสารคล้าย PP ที่มีโซเดียมและโพแทสเซียมเกาะอยู่ในปริมาณต่าง ๆ ดังนั้นสารคล้าย PP ที่แยกได้จึงน่าจะมีความบริสุทธิ์เพียงพอที่จะนำไปหาลำดับกรดอะมิโนต่อไป

ตารางที่ 4.1 แสดงน้ำหนักโมเลกุลของสารคล้าย PP ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วย
กระบวนการ R P - H P L C

สารคล้าย PP	น้ำหนักโมเลกุล (Dalton)	ความสูงของพีค (mV)
PPL1 F 20	801.5, 823.5*	13
PPL2 F 27	1137.1	55
PPL3 F 26	1050.0, 1071.9*	6
PPL4 F 25	1165.9, 1187.9*, 1227.9**	2.5

* อนุพันธ์ของเปปไทด์ที่มีไซโตเดียม

** อนุพันธ์ของเปปไทด์ที่มีไซโตเดียมและโพแทสเซียม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารคล้าย PP ที่ได้นี้ น่าจะมีรูปแบบที่แตกต่างกันเนื่องจากมีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน มากเกินกว่าที่จะเกิดจากความแปรปรวนของการหาน้ำหนักโมเลกุลโดย MALDI-TOF MS ซึ่งมีความคลาดเคลื่อนประมาณ 0.1%

จากผลการวิจัยนี้ทำให้ทราบว่าเปปไทด์ของสารคล้าย PP ในกิ้งกูดามีอยู่หลายรูปแบบ และจากน้ำหนักโมเลกุลที่ได้จึงคาดว่าสารคล้าย PP ที่แยกได้นี้เป็นเปปไทด์สายสั้นที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนไม่เกินกว่า 9 หน่วย คล้ายกับ PYY จากสมองของปลาหมึกกล้วย *Loligo vulgaris* ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 1093.1 ± 0.7 ดาลตัน แต่มีน้ำหนักโมเลกุลที่ต่างออกไปจึงคาดว่าสารคล้าย PP ที่ได้นี้ น่าจะมีลำดับของกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน และสามารถคาดการณ์ได้ว่าสารคล้าย PP ที่แยกได้นี้ น่าจะมีลำดับกรดอะมิโนทางด้าน C-terminus เป็นได้ทั้ง -RYamide (เช่นเดียวกับ PYY, NPY และ PP) และ -RFamide (เช่นเดียวกับ NPF และ PYP) เนื่องจากติดตามสารคล้าย PP โดยใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตจากการปลูกภูมิคุ้มกันในกระต่ายด้วย human LTRPRYamide ซึ่งมีความจำเพาะต่อแอนติเจนค่อนข้างต่ำ จึงมีโอกาที่จะเกิดปฏิกิริยาข้ามได้เช่นเดียวกับที่เกิดกับ FMRFamide (Leung *et al.*, 1994) แต่ในการศึกษาคั้งนี้ได้แยกแพรกชั้นที่พบสารคล้าย FMRFamide ได้แก่แพรกชั้นที่ 32,33 และ 36 (Sithigorngul *et al.*, 2002) ออกไปก่อนแล้ว จึงคาดว่าสารคล้าย PP ที่แยกได้ไม่น่าจะเป็นสารคล้าย FMRFamide

จากตารางที่ 2.1-2.3 แสดงให้เห็นว่ามีการตรวจพบสารคล้าย PP ในสัตว์หลายชนิดตั้งแต่สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังไปจนถึงสัตว์มีกระดูกสันหลัง โดยใน proteocephalidean cestode, *Proteocephalus pollanicola* พบ NPF 2 รูปแบบ จึงเป็นไปได้ที่สารคล้าย PP ในกิ้งกูดดำจะมีอยู่หลายรูปแบบ โดยการที่พบสารคล้าย PP จำนวนน้อยรูปแบบในสัตว์ส่วนใหญ่อาจเนื่องจากกระบวนการแยกสกัด การทำให้บริสุทธิ์ และวิธีตรวจสอบที่ใช้วิธี RIA เป็นวิธีติดตามสารคล้าย PP ซึ่งเป็นวิธีที่สิ้นเปลืองแรงงานและสารเคมีราคาแพงจำนวนมากทำให้ไม่สามารถใช้วิธีนี้ติดตามการปรากฏของสารคล้าย PP หลายรูปแบบในครั้งเดียวกันได้ ต่างจากการใช้วิธี Dot-ELISA (Sithigorngul, Stretton and Cowden, 1991) ซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก ไม่สิ้นเปลืองสารเคมี ราคาถูก และสามารถรู้ผลภายใน 24 ชั่วโมง โดยมีความไวในการตรวจสอบเทียบเท่า RIA จึงสามารถใช้วิธีนี้ในการติดตามสารคล้าย PP ในระหว่างการทำให้บริสุทธิ์ได้หลายรูปแบบในเวลาเดียวกัน (Sithigorngul and Stretton, 1995) ในการวิจัยนี้จะนำเปปไทด์ที่แยกได้ซึ่งคาดว่าบริสุทธิ์ไปวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลโดยใช้ MALDI-TOF MS เพื่อดูว่ามีสารอื่นปนเปื้อนในเปปไทด์หรือไม่ วิธีนี้มีข้อดีคือ สามารถเตรียมหลาย ๆ ตัวอย่างได้พร้อม ๆ กัน จึงทำให้การวิเคราะห์สะดวก รวดเร็ว มีความไว (sensitivity) สูงจึงสามารถใช้กับสารที่มีปริมาณน้อยได้ดี

เหมาะสำหรับการวิเคราะห์สารประกอบที่ซับซ้อน (complex mixture) หรือสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (Siuzdak, 1996)

จากการวิจัยคาดว่ายังมีเปปไทด์ของสารคล้าย PP อีกหลายรูปแบบที่ยังไม่สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ เพราะจากขั้นตอนการแยกด้วยกระบวนการ RP-HPLC ยังมีแฟรกชันที่ให้ผลบวกต่อ anti-PP antiserum บางแฟรกชันที่ยังไม่สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ เนื่องจากมีปริมาณของสารปนเปื้อนสูง และปริมาณของเปปไทด์ลดน้อยลงในแต่ละขั้นตอนของการทำให้บริสุทธิ์จนยากที่จะตรวจสอบโดยวิธี Dot-ELISA (สังเกตจากความเข้มสีของจุดจางมาก) ถึงแม้จะใช้ก้านตาจำนวนมากสำหรับวิจัยก็ตาม การที่ปริมาณของเปปไทด์น้อยลงอาจเกิดจากการสูญหายของเปปไทด์ในระหว่างการทำให้บริสุทธิ์ ถ้านำไปทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่อไปอาจมีปริมาณของสารน้อยมากจนยากที่จะตรวจสอบด้วยวิธี Dot-ELISA แต่อย่างไรก็ตามจากการวิจัยจะสังเกตพบว่ามีแฟรกชันที่มีสารคล้าย PP ไปผ่านการทำให้บริสุทธิ์มากขึ้น ความเข้มสีของจุดของสารคล้าย PP ที่ตรวจสอบด้วยกระบวนการ Dot-ELISA จะลดลง จะต้องใช้ปริมาณของสารในการตรวจสอบเพิ่มขึ้นเพื่อจะให้เห็นความเข้มของสีของจุดของเปปไทด์ได้ชัดเจน เมื่อเปรียบเทียบกับกระบวนการ RP-HPLC ในขั้นตอนแรก จะเห็นว่าใช้ปริมาณของสารในการตรวจสอบน้อย (ประมาณ 20 ก้านตา) ให้ผลความเข้มสีของจุดสูงกว่าในขั้นตอนที่ 5-6 ที่ต้องใช้ถึง 120-300 ก้านตา ซึ่งความเข้มของสีของจุดของเปปไทด์ที่จางลงนี้น่าจะเกิดจากการสูญหายของเปปไทด์ในส่วนด้านข้างของพีค และสูญเสียบเปปไทด์จากการแบ่งสารละลายบางส่วนไปตรวจหาสารคล้าย PP ในระหว่างขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ ทำให้ปริมาณของเปปไทด์ที่แยกได้ลดลง และจากการตรวจดูลักษณะของ mass spectrum ที่ได้จากตัวอย่างในแฟรกชันที่คาดว่าแยกสารคล้าย PP ได้บริสุทธิ์นี้ พบว่าในแต่ละแฟรกชันให้พีคที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่าง ๆ กัน ประมาณ 22 หรือ 40 ดาลตัน ดังนั้นจึงคาดว่าในระหว่างการทำให้บริสุทธิ์อาจมีหมู่ไฮเดียมและโพแทสเซียมมาจับ หรือเกิดการ oxidation ของกรดอะมิโนบางตัว อาจทำให้เปปไทด์มีสมบัติในการจับกับแอนติบอดีเปลี่ยนไป จึงต้องเพิ่มปริมาณของสารในการตรวจสอบในการทำให้บริสุทธิ์ของแต่ละขั้นตอน ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าอาจมีเปปไทด์ของสารคล้าย PP อีกหลายแฟรกชันที่ยังไม่สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ เพราะปริมาณของเปปไทด์ที่ถูกแยกได้ลดน้อยลง จนความไวในการตรวจสอบด้วยวิธี Dot-ELISA ลดลงจนยากที่จะตรวจสอบได้

สำหรับรายงานเกี่ยวกับสารคล้าย PP จากต่อมไฮนัสของกิ้งกูดดำ ซึ่งพบสารคล้าย PP เพียง 1 รูปแบบ ที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 6897.7-6906.3 ดาลตัน (พูลศิริ พุฒิกานนท์, 2542) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกับสารคล้าย PP ที่แยกได้จากการวิจัยในครั้งนี้ จึงคาดว่าอาจเนื่องมาจากสารคล้าย PP ที่ได้จากการทดลองในครั้งนี้มาจากส่วนของ ganglion อื่น ๆ ที่ไม่ใช่

ต่อมไชนัสเช่น ในบริเวณรอบ ๆ medulla externa (E) บริเวณระหว่าง medulla interna (I) กับ medulla terminalis (T) และบริเวณรอบ ๆ T เป็นต้น ทั้งนี้เพราะจากการตรวจหาสารคล้าย PP ใน ก้านตาของกิ้งกูดำโดยปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกัน พบว่ามีเซลล์ประสาทในบริเวณต่าง ๆ จำนวนมากและจำนวนแปรปรวนสูงในแต่ละก้านตา ที่ให้ผลบวกต่อแอนติบอดี (จันทร์ทิพย์ คงสินรัตนชัย, 2543) นอกจากนั้นการใช้ส่วนทั้งหมดของก้านตาในการสกัดยังทำให้ต้องใช้ขั้นตอนในการทำให้บริสุทธิ์มากถึง 5-7 ขั้นตอน จึงอาจเกิดการสูญหายของเปปไทด์ในระหว่างขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ได้



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการนำสารสกัดจากก้านตาของกุ่มกุลาดำจำนวน 7,500 ก้านตา มาทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย PP ด้วยกระบวนการ RP-HPLC 5-6 ขั้นตอน โดยใช้คอลัมน์ C18, C8 และ Cyano ระบบตัวทำละลาย 3 ระบบ คือ acetonitrile / trifluoacetic acid, acetonitrile / heptafluorobutyric acid และ acetonitrile / triethylamine และติดตามสารคล้าย PP ในระหว่างการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้วิธี Dot-ELISA สามารถแยกเปปไทด์ของสารคล้าย PP ได้บริสุทธิ์ 4 แพรกชั้น คือ PPL1, PPL2, PPL3 และ PPL4 ซึ่งเมื่อนำไปวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลโดย MALDI-TOF MS พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 801.5, 1137.1, 1050.0 และ 1165.9 ดาลตัน ตามลำดับ เนื่องจากแต่ละแฟรกชันที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกันจึงคาดว่าเปปไทด์ที่แยกได้ทั้ง 4 แพรกชั้น น่าจะมีกรดอะมิโนในสายของเปปไทด์ที่แตกต่างกัน

5.2 ข้อเสนอแนะ

การศึกษาในครั้งนี้ เป็นแนวทางในการแยกสกัดสารเปปไทด์รูปแบบต่าง ๆ จากก้านตาและทราบขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์และคงสภาพอยู่ได้ ซึ่งจะทำให้การแยกสกัดสารเปปไทด์รูปแบบอื่น ๆ ทำได้รวดเร็วและมีประสิทธิภาพสูงขึ้น

การทำให้บริสุทธิ์ของสารคล้าย PP ในก้านตาของกุ่มกุลาดำแฟรกชันต่าง ๆ เพื่อนำไปหาลำดับโครงสร้างของกรดอะมิโน จะเป็นพื้นฐานสำคัญในการศึกษาบทบาทและการทำงานของสารเหล่านี้ที่มีผลต่อกระบวนการทางสรีรวิทยาและการดำรงชีวิตของกุ่มกุลาดำ อันอาจเป็นประโยชน์ต่อการเพาะเลี้ยงกุ่มกุลาดำต่อไปได้ นอกจากนี้การทราบถึงโครงสร้างของสารเปปไทด์จากก้านตาของกุ่มกุลาดำรูปแบบต่าง ๆ ยังเป็นพื้นฐานในการศึกษาเกี่ยวกับยีนที่ถอดรหัสให้สารเปปไทด์ เหล่านี้ รวมทั้งการศึกษาถึงบทบาทการทำงานของสารเปปไทด์ที่มีรูปแบบต่าง ๆ ว่ามีบทบาทแตกต่างกันหรือไม่ และการที่มีเปปไทด์คล้าย ๆ กันเป็นจำนวนหลาย ๆ รูปแบบมีความสำคัญอย่างไร ซึ่งนอกจากจะให้ความรู้ในแง่วิวัฒนาการของยีนของสารเปปไทด์แล้ว ยังจำเป็นสำหรับการสังเคราะห์เปปไทด์รูปแบบต่าง ๆ และการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี เพื่อศึกษาถึงบทบาททางสรีรวิทยาของเปปไทด์ต่อไป

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- จันทร์ทิพย์ คงสินรัตนชัย. 2543. การตรวจหาตำแหน่งของสารคล้ายแพนครีเอติคโพลีเปปไทด์และสารคล้าย FMRFamide ในก้านตาทิ้งกูดำ *Penaeus monodon*. วิทยานิพนธ์ปริญญา มหาบัณฑิต วิชาเอกเคมีชีวภาพ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร.
- จิรศักดิ์ ผู้ปล้ำม. 2542. การแยกและการทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย FMRFamide จากก้านตาของกิ้งกูดำ. วิทยานิพนธ์ปริญญา มหาบัณฑิต วิชาเอกเคมีชีวภาพ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร.
- ทองศักดิ์ ศรีบุญจิตต์. 2544. สถานภาพการผลิต การตลาดของกิ้งไทยในเวทีโลกและผลกระทบต่อเชิงสังคม เศรษฐศาสตร์ของการเลี้ยงกิ้งกูดำ. อินไซด์กิ้งไทย. 2 : 3-8.
- บรรจง เทียนสงฆ์ศรี. 2530. การเพาะเลี้ยงกิ้งทะเล. กรุงเทพฯ : อักษรเจริญทัศน์.
- ปกรณีย์ อุ่นประเสริฐ. 2531. เทคนิคการเพาะเลี้ยงกิ้งกูดำ. กรุงเทพฯ : ช่อนนทรี.
- ปิยะพงศ์ โชติพันธุ์. 2529. การเลี้ยงกิ้ง. โครงการคู่มือการประกอบอาชีพสำหรับประชาชนของศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ สำนักส่งเสริมและฝึกอบรม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- พรรณนิภา หาญวิวัฒน์กิจ. 2532. การวิเคราะห์เศรษฐกิจการผลิตกิ้งกูดำในประเทศไทย. เอกสารเศรษฐกิจการประมง เลขที่ 5 / 2532. กรุงเทพฯ : ฝ่ายวิจัยเศรษฐกิจการประมง กองนโยบายและแผนงานประมง กรมประมง.
- พูลศิริ พุกฤษ์กานนท์. 2542. การทำให้บริสุทธิ์และจำแนกชนิดเปปไทด์จากต่อมไซนัสของกิ้งกูดำ. วิทยานิพนธ์ปริญญา มหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สหสาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ไพบุลย์ พลสุวรรณนา, สุรศักดิ์ ดิลกเกียรติ, เลิศ ทิสยากร และ จินดา จงกมานนท์. 2543. สถานการณ์ การตลาด และการผลิตกิ้งกูดำ. สัตว์น้ำ. 130 : 13-15.
- วัลลภ คงเพิ่มพูน. 2532. กิ้งกูดำ. กรุงเทพฯ : โครงการหนังสือเกษตรชุมชน.

สมชาย คำนึ่งถิ่น. 2532. ฟาร์มกุ้งทะเล. กรุงเทพฯ : โครงการหนังสือเกษตรชุมชน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุรินทร์ มัจฉาชีพ. 2526. สัตวศาสตร์ ตอนที่ 1 : สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง. กรุงเทพฯ : โครงการตำรา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ บางแสน.

สุวิทย์ ชีนสินธุ์. 2531. การเลี้ยงกุ้งแชบ๊วยและกุ้งกุลาดำ. กรุงเทพฯ : ศูนย์หนังสือเกษตร.



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาษาอังกฤษ

- Adrian, T. E., Allen, J.M., Bloom, S.R., Ghatel, M.A., Rossor, M.N., Roberts, G.W., Crow, T.J., Tatemoto, K. And Polak, J.M. 1983. Neuropeptide Y distribution in human brain. Nature. 306 : 584-586.
- Aguilar, M.B., Falchetto, R., Shabanowitz, J., Hunt, D.F. and Huberman, A. 1996. Complete primary structure of the molt-inhibiting hormone (MIH) of the Mexican crayfish *Procambarus bouvieri* (Ortmann). Peptides. 17(3) : 367-374.
- Aguilar, M.B., Quackenbush, L.S., Hunt, D.F., Shabanowitz, J. and Huberman, A. 1992. Identification, purification and initial characterization of the vitellogenesis-inhibiting hormone from the Mexican crayfish *Procambarus bouvieri* (Ortmann). Comp. Biochem. Physiol. 102B : 491-498.
- Agungpriyono, S., Yamada, J., Kitamura, N., Yamamoto, Y., Said, N., Sigit, K. And Yamashita, T. 1994. Immunohistochemical study of the distribution of endocrine cells in the gastrointestinal tract of the lesser mouse deer (*Tragulus javanicus*). Acta. Anal. 151 : 232-238.
- Allen, Y.S., Adrian, T.E., Allen, J.M., Tatemoto, K., Crow, T.J., Bloom, S.R. and Polak, J.M. 1983. Neuropeptide Y distribution in the rat brain. Science. 221 : 877-879.
- Barton, C.L., Shaw, C., Halton, D.W. and Thim, L. 1994. Isolation and Structural Characterisation of Herring Gull (*Larus argentatus*) Pancreatic Polypeptide. Gen. Comp. Endocrinol. 93 : 255-259.
- Bjenming, C. and Holmgren, S. 1988. Neuropeptides in the fish gut. Neurochem. 88 : 155-163.
- Brownlee, D.J.A., Fairweather, I., Johnston, C.F., Smart, D., Shaw, C. and Halton, D.W. 1993. Immunocytochemical demonstration of neuropeptides in the central nervous system of the roundworm, *Ascaris suum* (Nematoda : Ascaroidea). Parasitol. 106 : 305-316.

- Calingasan, M.Y., Kitamura, N., Yamada, J., Oomori, Y. And Yamashita, T. 1984. Immunocytochemical study of the gastroenteropancreatic endocrine cells of the sheep. Acta. Anat. 118 : 171-180.
- Callaway, J.C., Masinovsky, B. and Graubard, K. 1987. Co-localization of SCP_B-like and FMRFamide-like immunoreactivities in crustacean nervous system. Brain Res. 405 : 259-304.
- Carlisle, D.B. and Knowles, F. 1959. Endocrine control in crustaceans. Cambridge : University Press.
- Carrillo, M., Zanuy, S., Duve, H. and Thorpe, A. 1986. Identification of hormone-producing cells of the endocrine pancreas of the sea bass, *Dicentrarchus labrax*, by ultrastructural immunocytochemistry. Gen. Comp. Endocrinol. 61 : 287-301.
- 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*. General and Comparative Endocrinology. 65 : 56-64.
- Chang, E.S., Prestwich, G.D. and Bruce, M.J. 1990. Amino acid sequence of a peptide with both molt-inhibiting and hyperglycemic activities in the lobster, *Homarus americanus*. Biochem Biophys. Res. Commun. 171(2) : 818-826.
- Chen, Z.-W., Bergman, T., Ostenson, C.-G., Hoog, A., Naslund, J., Norberg, A., Carlquist, M., Efendic, S., Mutt, V. And Jornvall, H. 1994. A porcine gut polypeptide identical to the pancreatic hormone PP (pancreatic polypeptide). FEBS Letters. 341 : 239-243.
- Chiba, A. 1997. Distribution of neuropeptide Y-like immunoreactivity in the brain of the bichir, *Polypterus senegalus*, with special regard to the terminal nerve. Cell Tissue Res. 289 : 275-284.

- Conlon, J.M., Balasubramaniam, A., Hazon, N. 1991. Structural characterization and biological activity of a neuropeptide Y-related peptide from the dogfish *Scyliorhinus canicula*. Endocrinol. 128(5) : 2273-2279.
- Conlon, J.M., Bjornholm, B., Jorgensen, F.S., Youson, J.H., Schwartz, T.W. 1991. Primary structure and conformational analysis of peptide methionine-tyrosine, a peptide related to neuropeptide Y and peptide YY isolated from lamprey intestine. Eur. J. Biochem. 199 : 293-298.
- Curry, W.J., Shaw, C., Johnston, C.F., Thim, L. and Buchanan, K.D. 1992. Neuropeptide F : primary structure from the turbellarian, *Artioposthia triangulata*. Comp. Biochem. Physiol. 101C : 269-274.
- Cutfield, S.M., Carne, A., Cutfield, J.F. 1987. The amino-acid sequences of sculpin islet somatostatin-28 and peptide YY. FEBS. 214(1) : 57-61.
- Dawbarn, D., Hunt, S.P. and Emson, P.C. 1984. Neuropeptide Y : regional distribution chromatographic characterization and immunohistochemical demonstration in post-mortem human brain. Brain Res. 296 : 168-173.
- De Kleijn, D.P.V. and Van Herp, P. 1995. Molecular biology of neurohormone precursors in the eyestalk of Crustacea. Comp. Biochem. Physiol. 112B(4) : 573-579.
- Ei – Salhy, M., Wilander, E., Grimelius, L., Terenius, L., Lundberg, J.M. and Tatemoto, K. 1982. The distribution of polypeptide YY (PYY) and pancreatic polypeptide (PP) immunoreactive cells in the domestic fowl. Histochem. 75 : 25-30.
- Elayat, A.A., El-Naggar, M.M. and Tahir, M. 1995. An immunocytochemical and morphometric study of the rat pancreatic islets. J. Anat. 186 : 629-637.
- Farfante, I.P. and Kensley, B. 1997. Penaeoid and sergestoid shrimps and prawns of the world : key and diagnoses for the families and genera. Memories du museum national d'Histoire naturelle. Paris. 132.

- Fernlund, P. and Josefsson, L. 1968. Chromactivating hormones of *Pandalus borealis*. Isolation and purification of the red-pigment-concentrating hormone. Biochem. Biophys. Acta. 158 : 262-267.
- Fernlund, P. and Josefsson, L. 1972. Crustacean color change hormone : amino acid sequence and chemical synthesis. Science. 177 : 173-175.
- Fernlung, P. 1976. Structure of a light-adapting hormone from the shrimp, *Pandalus borealis*. Biochem. Biophys. Acta. 439 : 17-25.
- Fingerman, M. 1987. The endocrine mechanism of crustacean. J. Crusta. Biol. 7(1) : 1-24.
- Gersell, D.J., Gingerich, R.L. and Greider, M.H. 1979. Regional Distribution and Concentration of Pancreatic Polypeptide. Diabetes. 28 : 11-15.
- Gu, J., Polak, J.M., Adrian, T.E., Allen, J.M., Tatemoto, K. and Bloom, S.R. 1983. Neuropeptide tyrosine (NPY)-a major cardiac neuropeptide. Lancet. (May 7) : 1008-1010.
- Holfelt, T., Lundberg, J.M., Latercrantz, H., Tatemoto, K., Mutt, V., Lindberg, J., Terenius, L., Everitt, B.J., Fuxe, K., Agnati, L. and Goldstein, M. 1983. Occurrence of neuropeptide Y (NPY)-like immunoreactivity in catecholamine neurons in the human medulla oblongata. Neuroscience Letters. 36 : 217-222.
- Honma, Y., Takano, K., Chiba, A. and Oka, S. 1996. Immunohistochemical localization of neuropeptides in the cephalic ganglion of the land crab *Chiromantes haematocheir*. Fisheries Science. 62(6) : 909-913.
- 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. Comp. Biochem. Physiol. 85B(1) : 197-203.

- Huberman, A. and Aguilar, M.B. 1988. A neurosecretory hyperglycemic hormone from the sinus gland of the Mexican crayfish, *Procambarus bouvieri* (Ortmann)-II. Structural comparison of two isoforms of the hormone. Comp. Biochem. Physiol. 91B(2) : 345-349.
- Huberman, A. and Aguilar, M.B. 1989. A neuropeptide with molt-inhibiting hormone activity from the sinus gland of the Mexican crayfish *Procambarus bouvieri* (Ortmann). Comp. Biochem. Physiol. 93B(2) : 299-305.
- Huberman, A., Aguilar, M.B., Brew, K., Shabanowitz, J. and Hunt, D.F. 1993. Primary structure of the major isomorph of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH-I) from the sinus gland of the Mexican crayfish, *Procambarus bouvieri* (Ortmann) : interspecies comparison. Peptides. 14 : 7-16.
- Huberman, A., Aguilar, M.B. and Quackenbush, L.S. 1995. A neuropeptide family from the sinus gland of the Mexican crayfish, *Procambarus bouvieri* (Ortmann). Aquaculture. 135 : 149-160.
- Jensen, J. and Conlon, J.M. 1992. Characterization of peptides related to neuropeptide tyrosine and peptide tyrosine-tyrosine from the brain and gastrointestinal tract of teleost fish. Eur. J. Biochem. 210 : 405-410.
- Kegel, G., Reichwein, B., Tensen, C.P. and Keller, R. 1991. Amino acid sequence of crustacean hyperglycemic hormone (CHH) from the crayfish, *Orconectes limosus* : emergence of a novel neuropeptide family. Peptides. 12 : 909-913.
- Kegel, G., Reichwein, B., Weese, S., Graus, G., Peter-Katalinie, J. and Keller, R. 1989. Amino acid sequence of crustacean hyperglycemic hormone (CHH) from the shore crab, *Carcinus maenas*. FEBS. Lett. 225(1) : 10-14.
- Keller, R. 1992. Crustacean neuropeptides : Structure, function and comparative aspects. Experientia. 48 : 439-448.

- Keller, R. and Wunderer, G. 1978. Purification and amino acid composition of the neurosecretory hyperglycemic hormone from the sinus gland of the shore crab, *Carcinus maenas*. Gen. Comp. Endocrinol. 34 : 328-335.
- Kimmel, J.R., Hayden, L.J. and Pollock, H.G. 1975. Isolation and Characterization of a New Pancreatic Polypeptide Hormone. J. Biol. Chem. 250(24) : 9369-9376.
- Kimmel, J.R., Pollock, H.G. and Hazelwood, R.L. 1968. Isolation and Characterization of Chicken Insulin. Endocrinol. 83 : 1323-1330.
- Kimmel, J.R., Pollock, H.G., Chance, R.E.J., Johnson, M.G., Reeve, J.R., Taylor, I.L., Miller, C. and Shively, J.E. 1984. Pancreatic polypeptide from rat pancreas. Endocrinology. 114 : 1725-1731.
- Kleinholz, L.H., Rao, K.R., Riehm, J.P., Tarr, G.E., Johnson, L. and Norton, S. 1986. Isolation and sequence analysis of a pigment-dispersing hormone from eyestalks of the crab, *Cancer magister*. Biol. Bull. 170 : 135-143.
- Krajniak, K.C. and Price, D.A. 1990. Authentic FMRFamide is present in the polychaete *Nereis virens*. Peptide. 11 : 75-77.
- Krajniak, K.C. 1991. The identification and structure activity relation of a cardioactive FMRFamide-related peptide from the blue crab, *Callinectes sapidus*. Peptides. 12 : 1295-1302.
- Lance, V., Hamilton, J.W., Rouse, J.B., Kimmel, J.R. and Pollock, H.G. 1984 Isolation and characterization of reptilian insulin, glucagon, and pancreatic polypeptide : complete amino acid sequence of alligator (*Alligator mississippiensis*) insulin and pancreatic polypeptide. Gen. Comp. Endocrinol. 55 : 112-124.
- Langslow, D.R., Kimmel, J.R. and Pollock, H.G. 1973. Studies of the distribution of a new avian pancreatic polypeptide and insulin among birds, reptiles, amphibians and mammals. Endocrinol. 93 : 558-565.

- Larhammar, D., Blomqvist, A.G. and Soderberg, C. 1993. Evolution of neuropeptide Y and its related peptides. Comp. Biochem Physiol. 106C(3) : 743-752.
- Larsson, L.-I., Sundler, F., Hakanson, R., Pollock, H.G. and Kimmel, J.R. 1974. Localization of APP, a postulated new hormone, to a pancreatic endocrine cell type. Histochem. 42 : 377-382.
- Leung, S.P., Shaw, C., Johnston, C.F. and Irvine, G.B. 1994. Immunohistochemical distribution of neuropeptides F (NPF) in the gastropod mollusc *Helix aspersa*, and in several other invertebrates. Cell tissue Res. 275 : 383-393.
- Lohr, L., Klein, J., Webster, S.G. and Dircksen, H. 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.
- Lukinius, A., Ericsson, J.L.E., Grimelius, L. and Korsgren, O. 1992. Ultrastructural studies of the ontogeny of fetal human and porcine pancreas, with special reference to colocalization of the four major islet hormones. Develop. Bio. 153 : 376-385.
- Lundberg, J.M., Tatemoto, K., Terenius, L., Hellstrom, P.M., Mutt, V., Hokfelt, T. 1982. Localization of peptide YY (PYY) in gastrointestinal endocrine cells and effects on intestinal blood flow and motility. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 79 : 4471-4475.
- Lundberg, J.M., Terenius, L., Hokfelt, T. and Goldstein, M. 1983. High levels of neuropeptide Y in peripheral noradrenergic neurons in various mammals including man. Neuroscience Letters. 42 : 167-172.
- Marks, N.J., Maule, A.G., Halton, D.W., Shaw, C. and Johnston, C.F. 1993a. Distribution and Immunochemical Characteristics of Neuropeptide F (NPF) (*Moniezia expansa*)-Immunoreactivity in *Proteocephalus pollanicola* (Cestoda : Proteocephalidea). Comp. Biochem. Physiol. 104C(3) : 381-386.

- Marks, N.J., Shaw, C., Halton, D.W., Curry, W.J. and Thim, L. 1993b. Rabbit pancreatic polypeptide. Comp. Biochem. Physiol. 106B(4) : 883-887.
- Marks, N.J., Shaw, C., Halton, D.W., Maule, A.G., Curry, W.J., Verhaert, P. and Thim, L. 1993c. Isolation and primary structure of a novel avian pancreatic polypeptide from five species of Eurasian crow. Regul. Pept. 47 : 187-194.
- Maule, A.G., Halton, D.W. and Shaw, C. 1995. Neuropeptide F : a ubiquitous invertebrate neuromediator?. Hydrobiologia. 305 : 297-303.
- Maule, A.G., Shaw, G.C., Halton, D.W., Thim, L., Johnston, C.F., Fairweather, I. Buchanan, K.D. 1991. Neuropeptide F : a novel parasitic flatworm regulatory peptide from *Moniezia expansa* (Cestoda : Cyclophyllidea). Parasitol. 102 : 309-316.
- McTigue, D.M., Edwards, N.K. and Rogers, R.C. 1993. Pancreatic polypeptide in dorsal vagal complex stimulates gastric acid secretion and motility in the rats. Am. J. Physiol. 265 : G1169-G1176.
- Mercier, A.J., Orchard, I., Tebrugge, V. and Skerett, M. 1993. Isolation of two FMRFamide-related peptides from crayfish pericardial organs. Peptides. 14 : 137-143.
- Miyachi, S., Jitsuishi, W., Miyoshi, A., Fujita, S., Mizuchi, K. and Takemoto, K. 1986. The distribution of polypeptide YY-like immunoreactivity in rat tissues. Endocrinol. 118 : 2163-2167.
- Murphy, W.A., Fries, J.L., Meyers, C.A. and Coy, D.H. 1981. Human pancreatic polypeptide innibits insulin release in the rat. Biochem. Biophys. Res. Com. 101 : 189-193.

- Nagasawa, H., Yang, W-J., Shimizu, H., Aida, H., Tsutsumi, H., Terauchi, A. and Sonebe, H. 1996. Isolation and amino acid sequence of molt-inhibiting hormone from the American crayfish, *Procambarus clarkii*. Biosci. Biotech. Biochem. 60(3): 554-556.
- Norris, O.D. 1997. Chemical regulators of metabolism. Vertebrate Endocrinology. USA : Academic Press.
- Okita, M., Inui, A., Baba, S. and Kasuga, M. 1997. Central cholinergic regulation of pancreatic polypeptide secretion in conscious dogs. J. Endocrinol. 154 : 311-317.
- Pappas, T.N., Debas, H.T. and Taylor, I.L. 1986. Enterogastrone-like Effect of Peptide YY is Vagally Mediated in the Dog. J. Clin. Invest. 77 : 49-53.
- Pollock, H.G., Hamilton, J.W., Rouse, J.B., Ebner, K.E. and Rawitch, A.B. 1988. Isolation of peptide hormones from the pancreas of the bullfrog (*Rana catesbeiana*). Amino acid sequences of pancreatic polypeptide, oxyntomodulin, and two glucagon-like peptides. J. Biol. Chem. 263(20) : 9746-9751.
- Price, D.A. and Greenberg, M.J. 1977. Structure of molluscan cardioexcitatory neuropeptide. Science. 197 : 670-671.
- Reinecke, M., Muller, C. and Segner, H. 1997. An immunohistochemical analysis of the ontogeny, distribution and coexistence of 12 regulatory peptides and serotonin in endocrine cells and nerve fibers of the digestive tract of the turbot, *Scophthalmus maximus*, Teleostei. Anat. Embryol. 195 : 87-102.
- Rombout, J.H.W.M., Bol, J. and Taverne-Thiele, J.J. 1986. Ultrastructural characterization of immunoreactive enteroendocrine cells in *Barbus conchoniis* (Teleostei, cyprinidae). Biochem. 85 : 467-473.

- Rombout, J.H.W.M., van der Grinten, C.P.M., Peeze, Binkhorst, F.M., Taverne-Thiele, J.J., Schooneveld, K. 1986. Immunocytochemical identification and localization of peptide hormones the gastro-entero-pancreatic (GEP) endocrine system the mouse and a stomachless fish, *Barbus conchonus*. Biochem. 84 : 471-483.
- Santos, E.A. and Keller, R. 1993. Crustacean hyperglycemic hormone (CHH) and the regulation of carbohydrate metabolism : current perspectives. Comp. Biochem. Physiol. 106A(3) : 405-411.
- Schmidt, M. and Ache, B.W. 1994. Descending neurons with dopamine-like or with substance P / FMRFamide-like immunoreactivity target the somata of olfactory interneurons in the brain of spiny lobster, *Panulirus argus*. Cell Tissue Res. 278 : 337-352.
- Schwartz, T.W., Hansen, H.F., Hakanson, R., Sundler, F. and Tager, H.S. 1984. Human pancreatic icosapeptide : Isolation, sequence, and immunocytochemical localization of the COOH-terminal fragment of the pancreatic polypeptide precursor. Proc. Natl. Acad. Sci. 81 : 708-712.
- Shaw, C., Cormican, K., Thim, L., Maule, A.G., Sloan, J.M. and Buchanan, K.D. 1993. Neuropeptide Y and neuropeptide Y 3-36: isolation from human pancreatic endocrine tumours. Regulatory Peptides. 45 : 387-394.
- Sithigorngul, P. and Stretton, A.O.W. 1995. Sixmore FMRFamide-like peptide from the nematode *Caenorhabditis elegans* : Four new and two old. Third progress report for biotechnology career fellowship the Rockefeller foundation : 1-18.
- Sithigorngul, P., Pupuem, J., Krungkasem, C., Longyant, S., Panchan, N., Sithigorngul, W. and Petsom, A. 2002. Seven novel FMRFamide-like neuropeptide sequences from the eyestalk of the giant tiger prawn *Penaeus monodon*. Comp. Biochem. Physiol. 131B. 325-337.

- Sithigorngul, P., Sairathongkum, W., Jaideechoey, S., Longyant, S. and Sithigorngul, W. 1998. Novel FMRFamide-like neuropeptides from the eyestalk of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. Comp. Biochem. Physiol. 120B : 587-595.
- 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.
- Siuzdak, G. 1996. Ionization Techniques : Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionization. Mass spectrometry of biotechnology. San Diego : Academic Press.
- Smart, D., Shaw, C., Johnston, C., Thim, L., Halton, D. And Buchanan, K. 1992. Peptide tyrosine phenylalanine : a novel neuropeptide F-related nonapeptide from the brain of the squid, *Loligo vulgaris*. Biochem. Biophys. Res. Comm. 186 : 1616-1623.
- Solis, N.B. 1988. Biology and culture of *Penaeus monodon*. Philippines. Asian Fisheries Development Center.
- Soyez, D., Deijnen, J.E.V. and Martin, M. 1987. Isolation and Characterization of a Vitellogenesis-Inhibiting Factor from Sinus Glands of the Lobster, *Homarus americanus*. J. Exp. Zool. 244 : 479-484.
- Soyez, D., Le Caer, J.P., Noel, P.Y. and Rosier, I. 1991. Primary structure of two isoforms of the vitellogenesis inhibiting hormone from the lobster, *Homarus americanus*. Neuropeptide. 20 : 25-32.
- Soyez, D., Noel, D.Y., Van Deijnen, J.E., Martin, M., Morel, A. and Payen, G.G. 1990. Neuropeptides from the sinus gland of the lobster *Homarus americanus* : Characterization of hyperglycemic peptides. Gen. Comp. Endocrinol. 79 : 261-274.

- Stjernquist, M., Emson, P., Owman, Ch., Sjöberg, N.-O., Sundler, F. and Tatemoto, K. 1983. Neuropeptide Y in the female reproductive tract of the rat. Distribution of nerve fibres and motor effects. Neuroscience Letters. 39 : 279-284.
- Tatemoto, K. 1982a. Isolation and characterization of peptide YY (PYY), a candidate gut hormone that inhibits pancreatic exocrine secretion. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 79 : 2514-2518.
- Tatemoto, K. 1982b. Neuropeptide Y : Complete amino acid sequence of the brain peptide. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 79 : 5485-5489.
- Tatemoto, K. and Mutt, V. 1978. Chemical determination of polypeptide hormones. Acad. Sci. USA. 75(9) : 4115-4119.
- Tatemoto, K. and Mutt, V. 1980. Isolation of two novel candidate hormones using a chemical method for finding naturally occurring polypeptides. Nature. 285 : 417-418.
- Tatemoto, K., Carlquist, M. and Mutt, V. 1982. Neuropeptide Y-a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide. Nature. 296 : 659-660.
- Tatemoto, K., Nakano, I., Makk, G., Angwin, P., Mann, M., Schilling, J. and Go, V.L. 1988. Isolation and primary structure of human peptide YY. Biochem. Biophys. Res. Commun. 157(2) : 713-717.
- Tensen, C.P., Janssen, K.P.C., Soye, D. and Van Herp, F. 1991. Comparative characterization of hyperglycemic neuropeptides from the lobster, *Homarus americanus*. Peptides. 12 : 241-249.
- Terauchi, A., Tsutsumi, H., Yang, W.-J., Aida, K., Nagasawa, H. and Sonobe, H. 1996. A novel neuropeptide with molt-inhibiting activity from the sinus gland of the crayfish, *Procambarus clarkii*. Zoological science. 13 : 295-298.

- Turrigiano, G.G. and Selverston, A.I. 1989. Cholecystokinin-like peptides is a modulator of a crustacean central pattern generator. J. Neurosci. 9(7) : 2486-2501.
- Van Herp, F. 1998. Recent Advances in Arthropod Endocrinology. In Coast, G.M. and Webster, S.G., (eds.), Society for Experimental Biology Seminar Series 65, 53-70. Cambridge Univ. Press.
- Wager-Page, S.A., Raizada, E., Veale, W. and Davison, J.S. 1993. Peripheral modulation of duodenal and Conlonic motility and arterial pressure by neuropeptide Y, neuropeptide fragment 13-36, peptide YY, and pancreatic polypeptide in rats : Cholinergic mechanisms. Can. J. Physiol. Pharmacol. 71 : 768-775.
- Webster, S.G. 1986. Neurohormonal control of ecdysteroid biosynthesis by *Carcinus maenas* Y-organ in vitro and preliminary characterization fo the putative molt-inhibiting hormone (MIH). Gen. Comp. Endocrinol. 61 : 237-247.
- Webster, S.G. 1991. Amino acid sequence of putative molt-inhibiting hormone from the crab, *Carcinus maenas*. Proc. R. Soc. Lond. B. 224 : 247-252.
- Yang, W-J., Aida, K. and Nagasawa, H. 1995. Amino acid sequences of a hyperglycemic hormone and its related peptides from the kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. Aquaculture. 135 : 205-212.
- Yang, W-J., Aida, K., Terauchi, A., Sonobe, H. and Nagasawa, H. 1996. Amino acid sequence of a peptide with molt-inhibiting activity from the kuruma prawn *Penaeus japonicus*. Peptides. 17(2) : 197-202.
- Yasuda, A., Yasuda, Y., Fujita, T. and Naya, Y. 1994. Characterization of crustacean hyperglycemic hormone from the crayfish (*Procambarus clarkii*) : multiplicity of molecular stereoversion and diverse functions. Gen. Comp. Endocrinol. 95 : 387-398.

Yasuda, A., Naya, Y. and Nakanishi, K. 1993. Isolation of Antho-RFamide related peptides from the eyestalks of the blue crab, *Callinectes sapidus*. Comp. Biochem. Physiol. 104B : 235-240.



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก
การเตรียมสารเคมี

1. สารละลาย 1% Trifluoroacetic acid (TFA)

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

2. สารละลาย 1% Heptafluoroacetic acid (HFBA)

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

3. สารละลาย Triethylamine (TEA) 0.1 M pH 5.35

TEA		1.01	กรัม
H ₂ O (triple distilled water)	ปรับปริมาตรเป็น	100	มิลลิลิตร
Acetic acid (adjust pH to 5.35)			

4. สารละลาย 0.1% TFA

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

5. สารละลาย 0.1% HFBA

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

6. สารละลาย TEA 0.01 M

TEA 0.1 M		10	มิลลิลิตร
H ₂ O (triple distilled water)	ปรับปริมาตรเป็น	100	มิลลิลิตร

7. 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

8. 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

9. สารละลาย 80% acetonitrile ใน TEA 0.01 M

Acetonitrile (HPLC grade)		80	มิลลิลิตร
TEA 0.1 M		10	มิลลิลิตร
H ₂ O (triple distilled water)	ปรับปริมาตรเป็น	100	มิลลิลิตร

10. 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
H ₂ O (distiled water)	ปรับปริมาตรเป็น	1,000.00	กรัม

11. สารละลาย Blotto 5%

นมพร่องมันเนย	5.0	กรัม
สารละลายเมอร์ไธโอเลต 1%	1.0	มิลลิลิตร
Triton X-100	0.1	มิลลิลิตร
สารละลาย PBS 0.15 M, pH 7.2 ปริมาณปรับเป็น	100	มิลลิลิตร

12. สารละลายสับเซตรท

Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)	30	มิลลิกรัม
30% Hydrogenperoxide (H ₂ O ₂)	20	ไมโครลิตร
1% Cobalt chloride (Co ₂ Cl ₂)	5	มิลลิลิตร
สารละลาย PBS 0.15 M, pH 7.2 ปริมาณปรับเป็น	100	มิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

Dot-ELISA ของเปปไทด์ FMRFamide มาตรฐานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(จิระศักดิ์ ผู้ปลื้ม, 2542)

ภาคผนวก ค

ตารางการแยกและทำให้บริสุทธิ์นิวโรเปปไทด์ต่าง ๆ ในสัตว์กลุ่มครัสเตเชียชนิดต่าง ๆ

Animals	Extraction	Purification	Detection	Results	References
<i>Carcinus maenas</i>	Sinus gland 50 mM NH ₄ Ac	PAGE Gel filtration Sephadex G-50	Bioassay Dansylation Edman degradation	Hyperglycemic activity 57 residues MW 6,726 Da	Keller and Wonderer, 1978
<i>C. maenas</i>	Sinus gland	RP-HPLC	DABITC- PITC	Cam-CHH 72 residues MW 8,524 Da	Kegel <i>et al.</i> , 1989
<i>C. maenas</i>	Sinus gland	Gel filtration	<i>in vitro</i> bioassay RIA	putative MIH heat-stable MW 6-14 kDa	Webster, 1986
<i>C. maenas</i>	Sinus gland	RP-HPLC	Automated Edman degradation	Cam-MIH 78 residues MW 9,181 Da	Webster, 1991
<i>Homarus americanus</i>	Sinus gland 0.1 N HCl 80°C	Sep-Pak C18 cartridge RP-HPLC PAGE	Bioassay RIA	MIH activity Amino acid MW 8,700 Da	Chang, Bruce and Newcomb, 1987
<i>H. americanus</i>	Sinus gland 0.1 N HCl 80°C	RP-HPLC	Bioassay Edman degradation	Hoa-MIH 71 residues CHH activity	Chang, Prestwich and Bruce, 1990

Animals	Extraction	Purification	Detection	Results	References
<i>H. americanus</i>	Sinus gland 10% acetic acid 1N HCl 85°C acetic acid 80°C	RP-HPLC	Bioassay FAB-MS IEF	CHH 2 groups 68 residues MW 8,633 Da MW 8,578 Da	Soyez <i>et al.</i> , 1990
<i>H. americanus</i>	Sinus gland	RP-HPLC	Edman degradation FAB-MS	CHH 2 groups 72 residues MW 8,578 Da MW 8,655±25 Da	Tensen <i>et al.</i> , 1991
<i>H. americanus</i>	Sinus gland 0.1 N HCl 80°C	RP-HPLC SDS-urea-PAGE	Bioassay Micro sequencing	HoA-VIH 77 residues MW 9,135 Da	Soyez, Deijnen and Martin, 1987
<i>Orconectes limosus</i>	Sinus gland	RP-HPLC Gel filtration	Edman degradation DABITC- PITC	Ori-CHH 72 residues MW 8,400 Da	Kegel <i>et al.</i> , 1991
<i>Procambarus bouvieri</i>	Sinus gland	RP-HPLC SDS-PAGE	Bioassay Dansylation	CHH 52 residues MW 6,042 Da	Huberman and Aguilar, 1986
<i>P. bouvieri</i>	Sinus gland	SDS-PAGE	Bioassay Dansylation	CHH-B, CHH-C 52-53 residues MW 6-6.2 kDa	Huberman and Aguilar, 1988

Animals	Extraction	Purification	Detection	Results	References
<i>P. bouvieri</i>	Sinus gland	RP-HPLC SDS-PAGE	<i>in vitro</i> assay Dansylation	MIH activity 53-55 residues MW 6,243- 6,402 Da no Trp, His, Met	Huberman and Aguilar, 1989
<i>P. bouvieri</i>	Sinus gland	RP-HPLC	Edman degradation EI-MS	CHH-I 72 residues MW 8,388 Da	Huberman <i>et al.</i> , 1993
<i>P. bouvieri</i>	Sinus gland	RP-HPLC	Manual Edman degradation MALDI-TOF MS	Prb-MIH 72 residues MW 8,322 Da	Aguilar <i>et al.</i> , 1996
<i>P. bouvieri</i>	Sinus gland	RP-HPLC	<i>in vitro</i> bioassay Dansyl method	Prb-VIH 72-74 residues MW 8,388±2 Da	Aguilar <i>et al.</i> , 1992
<i>Procambarus clarkii</i>	Sinus gland	Gel filtration Sephadex G-75 RP-HPLC	Bioassay	CHH activity Prc-CHH-I, Prc-CHH-II 72 residues	Yasuda <i>et al.</i> , 1994
<i>P. clarkii</i>	Sinus gland 0.9% NaCl in 80% ACN	RP-HPLC	<i>in vitro</i> bioassay RIA	MIH activity	Terauchi <i>et al.</i> , 1996

Animals	Extraction	Purification	Detection	Results	References
<i>P. clarkii</i>	Sinus gland	RP-HPLC	Edman degradation	Prc-MIH 75 residues	Nagasawa <i>et al.</i> , 1996
<i>P. clarkii</i>	Pericardial organ	RP-HPLC	RIA	NRNFLRF amide MW 506.57 Da DRNFLRF amide MW 619.73 Da	Mercier <i>et al.</i> , 1993
<i>Penaeus japonicus</i>	Sinus gland 0.9% NaCl in 30% ACN	RP-HPLC	Bioassay	Pej-CHH 72 residues MW 8,353 Da	Yang <i>et al.</i> , 1995
<i>P. japonicus</i>	Sinus gland	RP-HPLC	<i>in vitro</i> bioassay RIA	Pej-MIH 77 residues Cam-MIH	Yang <i>et al.</i> , 1996
<i>Callinectes sapidus</i>	Pericardial organ and thoracic ganglia	RP-HPLC	RIA	GYNRSFLRF amide MW 1,158.34 Da	Krajniak, 1991
<i>C. sapidus</i>	Eyestalk	Gel filtration Sephadex G-75 RP-HPLC	Carboxy terminal analysis	pEGRFamide MW 955.13 Da PELGRFamide MW 966.12 Da	Yasuda, Naya and Nakanishi , 1993
<i>Penaeus monodon</i>	Eyestalk	RP-HPLC	Dot-ELISA	PFM 1-18 MW 990-2,679 Da	จิระศักดิ์ ผู้ปลื้ม, 2542

Animals	Extraction	Purification	Detection	Results	References
<i>M. rosenbergii</i>	Eyestalk	RP-HPLC	Dot-ELISA	DRNFLRF amide MW 966.12 Da ADKNFLRF amide MW 1,009.19 Da NYDKNFLRF amide MW 1,215.39 Da APALRLRF amide MW 942.19 Da DRTPALRLRF amide MW 1,243.40 Da	Sithigorngul <i>et al.</i> , 1998

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวสุรีย์ วิเศษสมบัติ เกิดวันที่ 3 กรกฎาคม พ.ศ. 2520 ที่จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี สาขาวิทยาศาสตร์ทั่วไป (สิ่งแวดล้อม) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2540 และได้เข้าศึกษาต่อในระดับบัณฑิตศึกษา หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2541



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย