

บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 การสังเคราะห์เพปไทด์ YANAVQV-NH₂ (T-) และ YANAVQIV-NH₂ (T+)

จากการสังเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนบางส่วนของปลาย C ของฮอร์โมนเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดจากก้านตากลุ่มก้ามกราม คือเพปไทด์ YANAVQV-NH₂ = T- (กรดอะมิโน 7 หน่วย) มีน้ำหนักโมเลกุล 762.87 คาลตัน และ YANAVQIV-NH₂ = T+ (กรดอะมิโน 8 หน่วย) มีน้ำหนักโมเลกุล 863.98 คาลตัน โดยวิธี solid phase peptide synthesis ซึ่งกรดอะมิโนจะถูกเติมเข้าไปทีละตัวตามลำดับจากปลาย C ไปยังปลาย N เกิดเป็นสายเพปไทด์บนเรซิน ในระหว่างสังเคราะห์ได้ติดตามประสิทธิภาพการคู่ควมของกรดอะมิโนของเพปไทด์ทั้งสอง พบว่าประสิทธิภาพการคู่ควมของเพปไทด์ T- และ T+ ในแต่ละขั้นไม่ต่ำกว่า 70 % แต่ไม่สามารถคำนวณประสิทธิภาพรวม (overall efficiency) เนื่องจากไม่ได้ทำการ capping เพื่อป้องกันการเกิด deletion sequence แสดงดังตารางที่ 3.1

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.1 ประสิทธิภาพการคู่ควมของกรดอะมิโน

กรดอะมิโน	ประสิทธิภาพการคู่ควม	
	YANAVQV-NH ₂	YANAVQIV-NH ₂
Val (V)	78.11%	75.81%
Thr (T)	—	74.78%
Gln (Q)	76.37%	74.78%
Val (V)	77.08%	74.09%
Ala (A)	75.68%	75.47%
Asn (N)	72.90%	73.75%
Ala (A)	74.64%	74.78%
Tyr (Y)	74.29%	73.75%

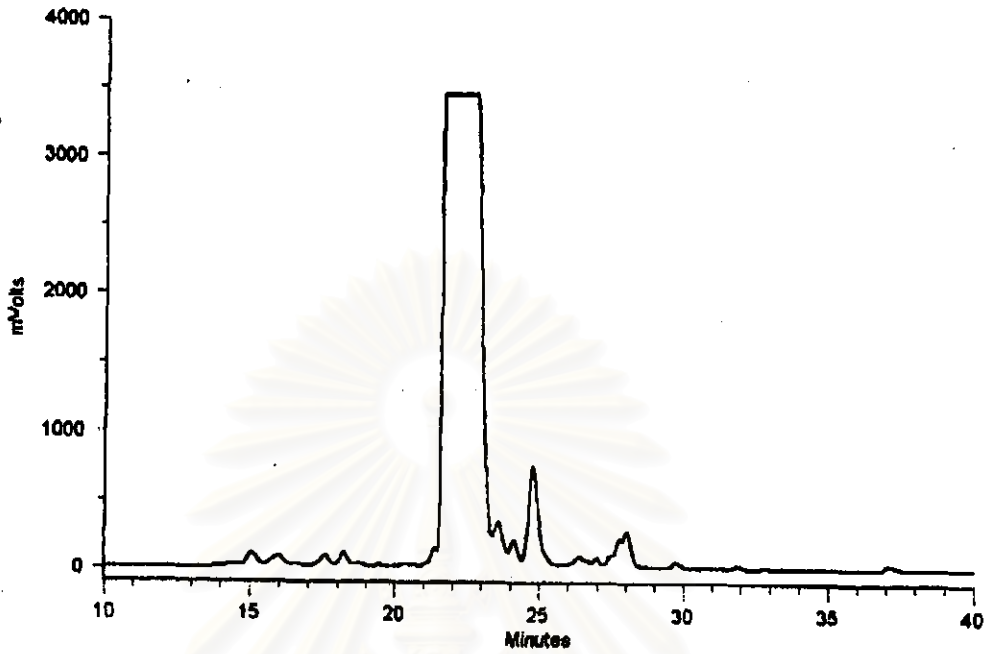
หลังจากได้เปปไทด์บนเรซินแล้ว ทำการแยกสายเปปไทด์ออกจากวัฏภาคของแข็ง โดยการ cleavage ด้วย 95% TFA และตกตะกอน crude เปปไทด์ด้วย diethyl ether จากนั้นนำ crude เปปไทด์ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ โดยผ่านกระบวนการ RP-HPLC ผ่านคอลัมน์ C18 และจะเปปไทด์ออกจากคอลัมน์ด้วย acetonitrile ใน 0.1% TFA ที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นจาก 0.8%- 48% อัตราการไหล 1 มิลลิเมตรต่อนาที ติดตามสารที่ออกจากคอลัมน์โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 215 nm และเก็บแฟรคชันทุกๆ 1 นาที พบว่าได้โครมาโทแกรมแสดงการแยก crude เปปไทด์ T- ดังรูปที่ 3.1 และจากการตรวจสอบน้ำหนักโมเลกุลของเปปไทด์ T- ที่แยกได้จากแฟรคชันต่างๆ โดยวิธี MALDI-TOF MS พบว่าเปปไทด์ T- กระจายอยู่ในแฟรคชันที่ 23 และ 24 โดยมีโซเดียมและโพแทสเซียมเกาะอยู่ในโมเลกุลด้วย ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยที่ตรวจพบเท่ากับ 763.65 (น้ำหนักโมเลกุลของเปปไทด์ T- ที่คำนวณเท่ากับ 762.87 คาลตัน), 785.65 (เปปไทด์ T- + Na⁺), 802.1 (เปปไทด์ T- + K⁺) นอกจากนี้ยังพบเปปไทด์ T- ในแฟรคชันที่ 25 แต่มีเปปไทด์ชนิดอื่นปะปนมาด้วย (รูปที่ 3.2) ดังนั้นจึงรวม เปปไทด์ T- จากแฟรคชันที่ 23 และ 24 เข้าด้วยกันและนำไปหาปริมาณเปปไทด์โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานโปรตีนที่วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 215 นาโนเมตร พบว่าสามารถสังเคราะห์เปปไทด์ T- เท่ากับ 1.82 มิลลิกรัม (ทางทฤษฎีเท่ากับ 7.82 มิลลิกรัม) คิดเป็นผลผลิตที่ได้ (yield) เท่ากับ 23.9 %

ในทำนองเดียวกันหลังจากนำ crude เปปไทด์ T+ ผ่านกระบวนการ RP-HPLC พบว่าได้โครมาโทแกรมดังรูปที่ 3.3 และจากการตรวจสอบน้ำหนักโมเลกุลของเปปไทด์ T+ จากแฟรคชันต่างๆ โดยวิธี MALDI-TOF MS พบว่าเปปไทด์ T+ กระจายอยู่ในแฟรคชันที่ 22 -24 และมีโมเลกุล

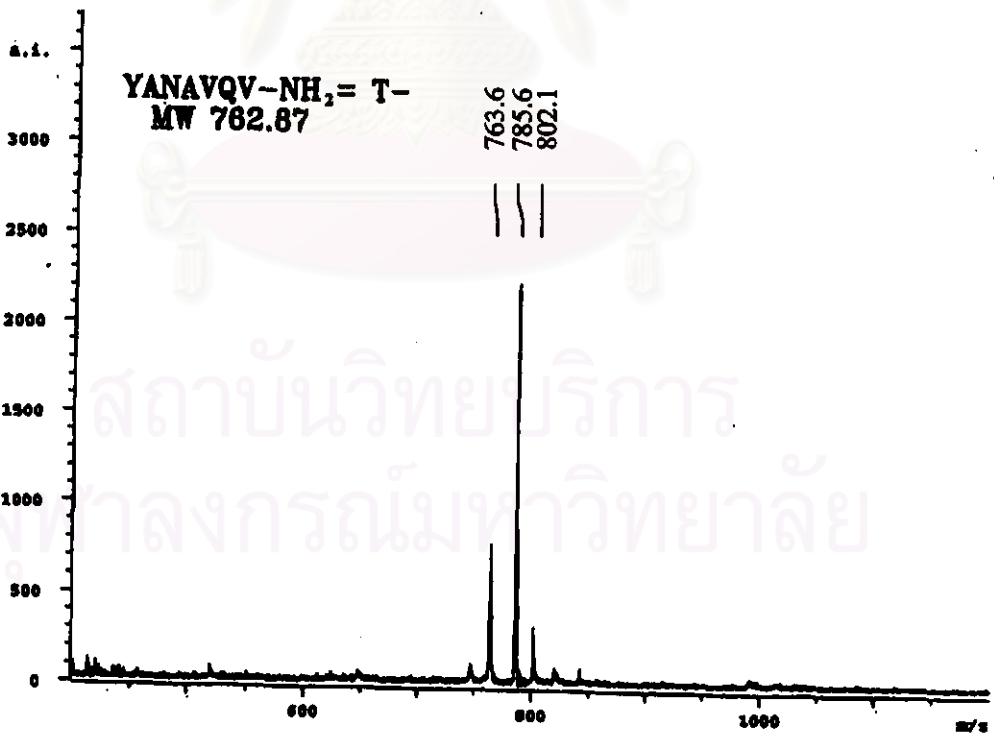
ของโซเดียมเกาะอยู่ในโมเลกุลของเพปไทด์ T+ ด้วยเช่นกัน สเปกตรัมรูปที่ 3.4 มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยที่ตรวจพบเท่ากับ 865.4 (น้ำหนักโมเลกุลของเพปไทด์ T+ ที่คำนวณได้เท่ากับ 863.98 คาทตัน), 887.0 (เพปไทด์ T+ + Na⁺) และในแฟรคชันที่ 25 พบเพปไทด์ T+ ปนอยู่กับเพปไทด์ชนิดอื่นเช่นกัน ดังนั้นจึงรวมเพปไทด์ T+ จากแฟรคชันที่ 22-24 เข้าด้วยกันและนำไปหาปริมาณเพปไทด์โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน โปรตีนที่วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 215 นาโนเมตร พบว่าสามารถสังเคราะห์เพปไทด์ T+ เท่ากับ 1.68 มิลลิกรัม (ทางทฤษฎีเท่ากับ 8.64 มิลลิกรัม) คิดเป็นผลผลิตที่ได้ (yield) เท่ากับ 19.4 %



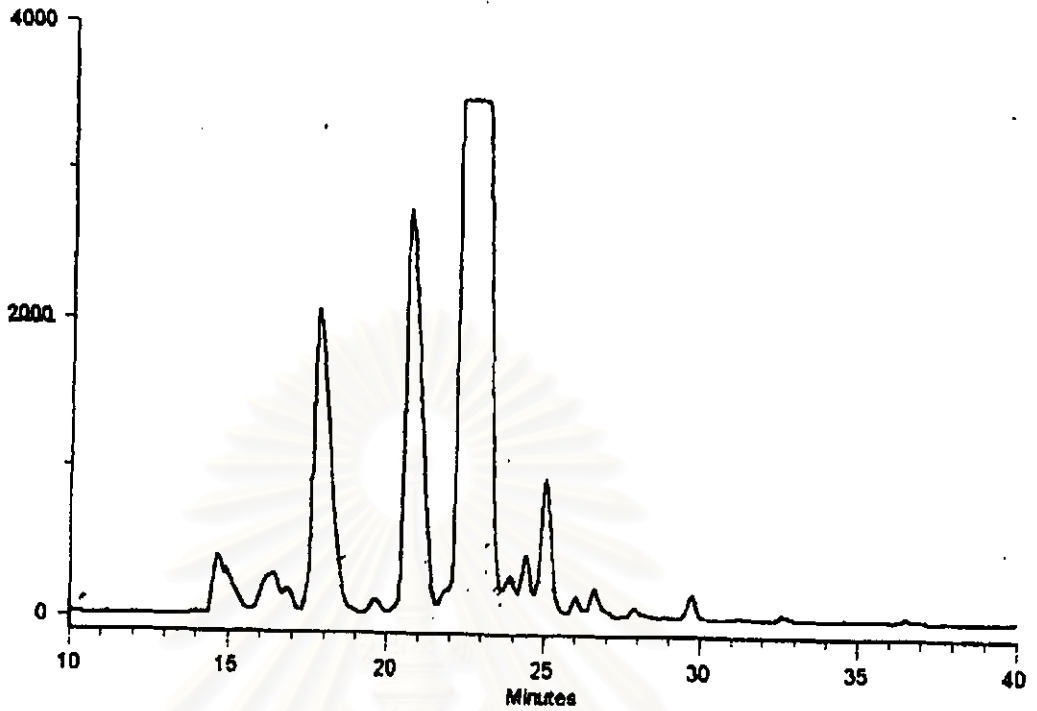
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



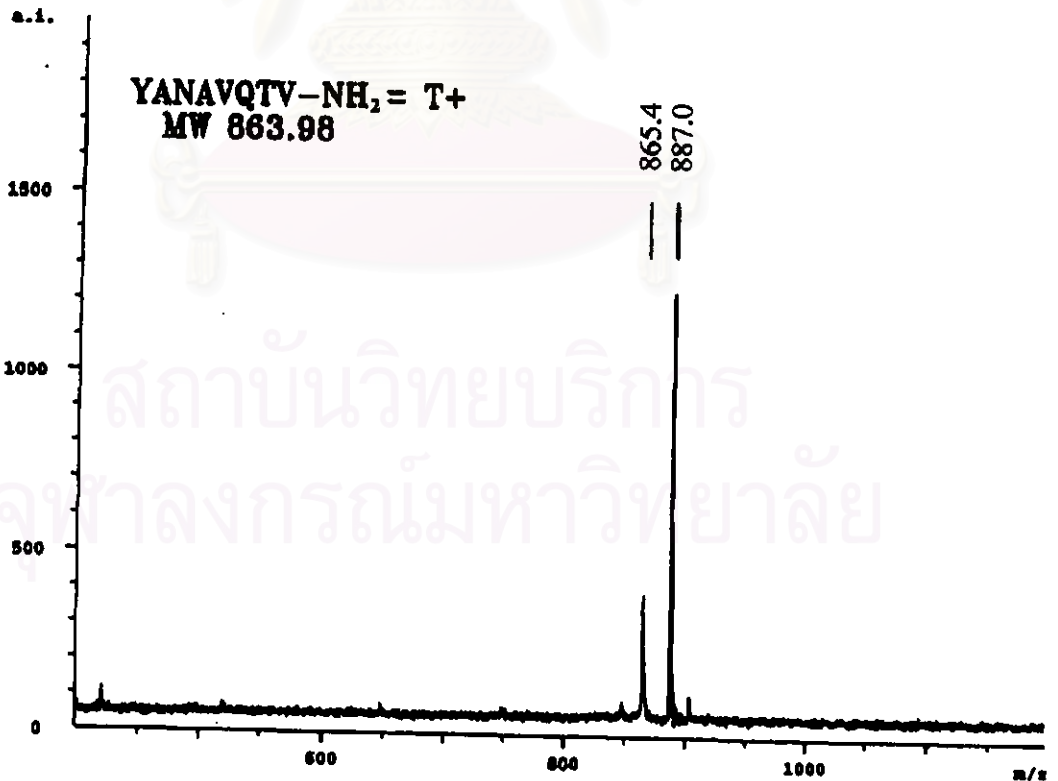
รูปที่ 3.1 RP-HPLC : โครมาโทแกรมของ crude เปปไทด์ T-
(คอลัมน์ C 18 , ระบบตัวทำละลาย 0.8% - 48% acetonitrile ใน 0.1 % TFA)



รูปที่ 3.2 สเปกตรัมของเปปไทด์ T- โดย MALDI-TOF MS



รูปที่ 3.3 RP-HPLC : โครมาโทแกรมของ crude เปปไทด์ T+
(คอลัมน์ C 18, ระบบตัวทำละลาย 0.8% - 48% acetonitrile ใน 0.1% TFA)



รูปที่ 3.4 สเปกตรัมของเปปไทด์ T+ โดย MALDI-TOF MS

3.2. การทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อเพปไทด์ที่สังเคราะห์

3.2.1 การตรวจหาไตเตอร์ของแอนติบอดีต่อเพปไทด์ T- และเพปไทด์ T+ โดยวิธี

indirect immunoperoxidase ELISA

เมื่อนำซีรัมจากหนู ซึ่งได้จากการกระตุ้นให้สร้างภูมิคุ้มกันด้วยเพปไทด์ T- และ T+ ที่เชื่อมกับ BSA ตรวจหาไตเตอร์ของแอนติบอดีต่อเพปไทด์ T- และเพปไทด์ T+ โดยวิธี indirect immunoperoxidase ELISA เนื่องจากซีรัมที่ได้นั้นจะมีแอนติบอดีต่อ BSA ปะปนอยู่ด้วย ดังนั้นก่อนที่จะนำซีรัมที่ได้ไปตรวจหาไตเตอร์ของแอนติบอดีต่อเพปไทด์ T- และเพปไทด์ T+ ตามวิธีการดังกล่าวจึงต้องกำจัดแอนติบอดีต่อ BSA ออกไปให้ได้มากที่สุด โดยการนำซีรัมที่ได้มาทำปฏิกิริยากับ BSA ที่เชื่อมกับไกลซิน (BSA-Gly) ในอัตราส่วน 1 : 1000 บ่มทิ้งไว้ 6-12 ชั่วโมง ปั่นแยกตะกอนออกและจึงนำซีรัมดังกล่าวมาตรวจหาไตเตอร์ของแอนติบอดีต่อเพปไทด์ T- และ T+ ต่อไป




จากการทดลองหาไตเตอร์ของแอนติบอดีต่อเพปไทด์ T- จากซีรัมของหนูทั้ง 4 ตัว หลังจากการดูดซับแอนติบอดีต่อ BSA ออกแล้ว พบว่าซีรัมจากหนูตัวที่ 3 และ 4 ให้ค่าไตเตอร์ของแอนติบอดีต่อเพปไทด์ T- สูงสุด คือ 1:128,000 (ตารางที่ 3.2) แต่ซีรัมจากหนูตัวที่ 4 ให้ไตเตอร์ของแอนติบอดีต่อ BSA ต่ำกว่าซีรัมที่ได้จากหนูตัวที่ 3 ดังนั้นจึงนำซีรัมที่มีแอนติบอดีต่อเพปไทด์ T- จากหนูตัวที่ 4 ไปใช้สำหรับการทดลองต่อไป

สำหรับไตเตอร์ของแอนติบอดีต่อเพปไทด์ T+ พบว่าซีรัมจากหนูตัวที่ 4 ให้ค่าไตเตอร์ต่อเพปไทด์ T+ สูงสุด คือ 1:64,000 (ตารางที่ 3.3) จึงนำซีรัมที่มีแอนติบอดีต่อเพปไทด์ T+ จากหนูตัวที่ 4 ไปใช้สำหรับการทดลองต่อไป เมื่อเปรียบเทียบไตเตอร์ต่อเพปไทด์จากหนูทั้ง 4 ตัว พบว่าหนู 4 ตัวที่ได้รับการฉีดเพปไทด์ T- ให้ค่าไตเตอร์ใกล้เคียงกันมากกว่าหนูที่ได้รับการฉีดเพปไทด์ T+

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย




ตารางที่ 3.2 แสดงผลการหาโคเคอร์ของแอนติบอดีต่อเพปไทด์ T- โดยดูจากค่าการเจือจางสุดท้ายที่ค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 0.1 หน่วย ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

แอนติเจน	หน่วยตัวที่	ค่าการเจือจางของแอนติบอดี											
		1:2,000	1:4,000	1:8,000	1:16,000	1:32,000	1:64,000	1:128,000	1:256,000	1:512,000	1:1,024,000	1:2,048,000	1:4,096,000
BSA-T-	1	*	*	*	*	*	*	2.34	1.48	0.84	0.44	0.22	0.12
	2	*	*	*	2.28	1.39	0.74	0.42	0.21	0.11	0.056	0.027	0.01
	3	*	*	*	*	*	*	*	*	2.08	1.25	0.66	0.31
	4	*	*	*	*	*	*	2.37	1.47	0.813	0.45	0.18	0.11
BSA-Gly	1	*	*	*	2.71	1.06	0.71	0.11	0.043	0.027	0.027	0.056	0.043
	2	*	2.33	0.16	0.08	0.047	0.028	0.015	0.001	0.002	0.002	0.005	0.004
	3	*	2.86	1.74	1.09	0.64	0.34	0.20	0.11	0.052	0.03	0.024	blank
	4	1.64	0.83	0.41	0.26	0.135	0.069	0.051	0.078	0.011	0.008	0.005	blank

-  ค่าโคเคอร์ของแอนติบอดีต่อ BSA-T-
-  ค่าโคเคอร์ของแอนติบอดีต่อ BSA-Gly
-  ค่าโคเคอร์ของแอนติบอดีต่อเพปไทด์ T-
- * ค่าการดูดกลืนแสงสูงจนวัดไม่ได้

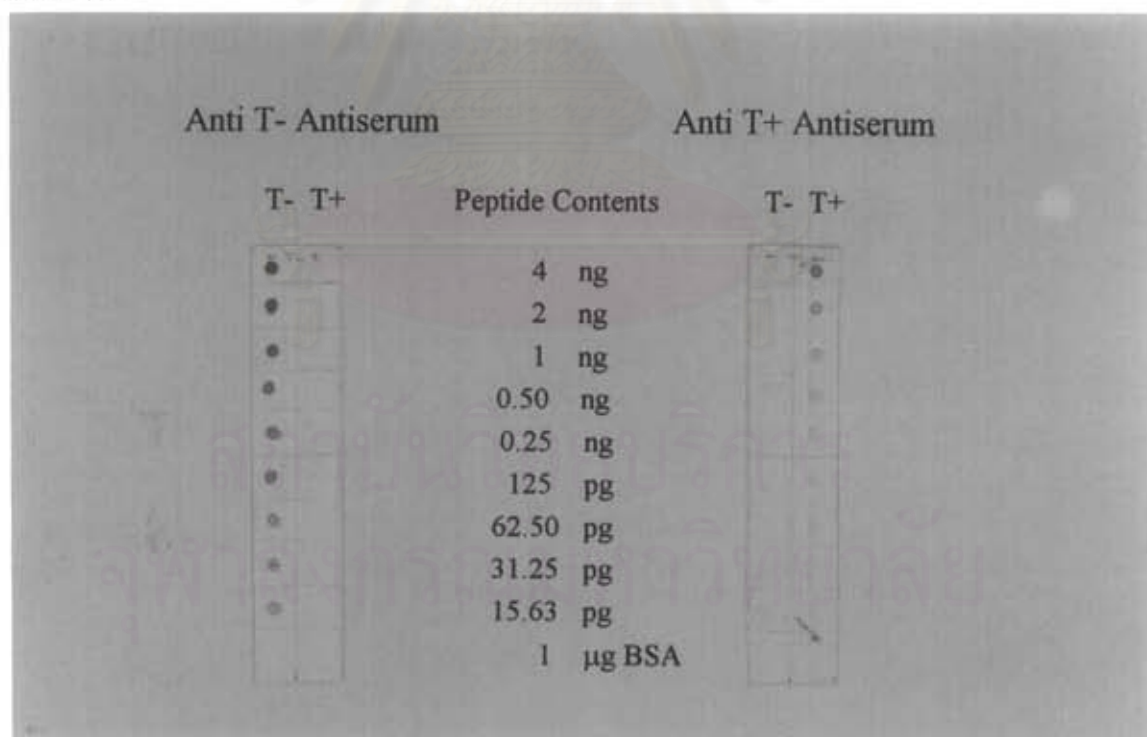
ตารางที่ 3.3 แสดงผลการหาโคเคอร์ของแอนติบอดีต่อเพปไทด์ T+ โดยดูจากค่าการเจือจางสุดท้ายที่ค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 0.1 หน่วย ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

แอนติเจน	หน่วยตัวที่	ค่าการเจือจางของแอนติบอดี											
		1:2,000	1:4,000	1:8,000	1:16,000	1:32,000	1:64,000	1:128,000	1:256,000	1:512,000	1:1,024,000	1:2,048,000	1:4,096,000
BSA-T+	1	*	*	*	*	*	*	2.86	1.83	1.04	0.49	0.27	0.13
	2	*	*	*	*	*	*	2.3	1.2	0.5	0.37	0.18	0.007
	3	*	*	*	*	*	*	*	1.88	1.09	0.61	0.41	0.13
	4	*	*	*	2.81	1.72	1.03	0.56	0.27	0.15	0.14	0.09	0.14
BSA-Gly	1	*	*	*	*	*	0.67	0.39	0.09	0.06	0.146	0.11	0.004
	2	*	2.11	2.27	1.43	1.21	0.48	0.25	0.09	0.07	0.05	0.06	0.003
	3	*	2.38	2.12	1.22	0.98	0.57	0.47	0.48	0.37	0.088	0.065	blank
	4	1.05	0.71	0.67	0.42	0.27	0.15	0.05	0.025	0.005	0.002	0.006	blank

-  ค่าโคเคอร์ของแอนติบอดีต่อ BSA-T+
-  ค่าโคเคอร์ของแอนติบอดีต่อ BSA-Gly
-  ค่าโคเคอร์ของแอนติบอดีต่อเพปไทด์ T+
- * ค่าการดูดกลืนแสงสูงจนวัดไม่ได้

3.2.2. การทดสอบความสามารถของแอนติบอดีต่อเพปไทด์ T- และเพปไทด์ T+ ในการจับกับ เพปไทด์ T- และ T+ ที่ตั้งเคราะห์ขึ้นและตรวจปฏิกิริยาข้ามของแอนติบอดีทั้งสองโดยวิธี dot-ELISA

จากการทดสอบความสามารถของแอนติบอดีต่อเพปไทด์ T- และ T+ ในการจับกับเพปไทด์ T- และ T+ ที่ตั้งเคราะห์ขึ้นและตรวจปฏิกิริยาข้ามระหว่างแอนติบอดีทั้งสอง โดยการเจือจางเพปไทด์ T- และ T+ ให้มีปริมาณต่างๆ หยดลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส และนำไปบ่มในแอนติบอดีทั้งสองที่เจือจางในอัตราส่วน 1: 40,000 โดยวิธี dot-ELISA พบว่าแอนติบอดีต่อเพปไทด์ T- สามารถจับกับเพปไทด์ T- ได้น้อยกว่า 15 พิโคกรัมต่อจุด และไม่แสดงการจับกับเพปไทด์ T+ ที่ปริมาณ 4 นาโนกรัมต่อจุด ในทำนองเดียวกันแอนติบอดีต่อเพปไทด์ T+ สามารถจับกับเพปไทด์ T+ ได้น้อยกว่า 125 พิโคกรัมและไม่แสดงการจับกับเพปไทด์ T- ที่ปริมาณ 4 นาโนกรัมต่อจุดเช่นกัน ซึ่งจากการทดลองชี้ให้เห็นว่าแอนติบอดีต่อเพปไทด์ T- และแอนติบอดีต่อเพปไทด์ T+ มีปฏิกิริยาข้ามระหว่างกันต่ำมาก (รูปที่ 3.5)



รูปที่ 3.5 dot-ELISA แสดงความสามารถของแอนติบอดีต่อเพปไทด์ T- หรือเพปไทด์ T+ ในการจับกับเพปไทด์ T-หรือเพปไทด์ T+ ที่ตั้งเคราะห์ขึ้น

3.3. การทดสอบความสามารถของแอนติบอดีต่อเพปไทด์ T- และเพปไทด์ T+ ในการจับกับเพปไทด์ สภาพธรรมชาติ

3.3.1 การตรวจหาสารคล้ายเพปไทด์ T- และเพปไทด์ T+ ในสารสกัดจากก้านตากล้ง ก้ามกรามโดยวิธี dot-ELISA และ การตรวจหาการออกฤทธิ์ของฮอร์โมนเพิ่มระดับ น้ำตาลในเลือด (CHH) โดยวิธี biological activity test

จากการนำสารสกัดจากก้านตากล้งก้ามกรามจำนวน 200 ก้านตากล้ง ที่สกัดด้วยสารละลาย
เมทานอล อะซิติกและน้ำ ในอัตราส่วน 90 : 1 : 9 ผ่านกระบวนการ RP-HPLC โดยใช้คอลัมน์ C18 และ
ชะสารสกัดออกจากคอลัมน์ด้วย acetonitrile ที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นตามลำดับจาก 12-64 %
acetonitrile ใน 0.1% TFA อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที และติดตามสารที่ออกจากคอลัมน์โดย
วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 215 นาโนเมตร ได้โครมาโทแกรมดังรูปที่ 3.6 จากนั้นนำสารที่
แยกได้จากแฟรคชันที่ 11-59 จำนวนแฟรคชันละ 40 ก้านตากล้งโดยประมาณ หยดลงบนกระดาษ
ในโครมาโทกราฟตรวจหาสารคล้าย เพปไทด์ T- และ T+ โดยใช้แอนติบอดีต่อ T- และ T+ ตามลำดับ
ด้วยวิธี dot-ELISA และใช้ เพปไทด์ T- และ T+ ที่เชื่อมกับโปรตีน BSA (BSA-T- หรือ BSA-T+)
สำหรับเป็น positive control พบว่า เมื่อใช้แอนติบอดีต่อเพปไทด์ T- และ T+ เมื่อเจือจางใน อัตราส่วน
1:40,000 พบสารคล้ายเพปไทด์ T- ในแฟรคชันที่ 30 และสารคล้ายเพปไทด์ T+ ในแฟรคชันที่ 38
ตามลำดับ โดยสังเกตจากการปรากฏเป็นจุดสีเทาแกมน้ำเงิน ดังแสดงในรูปที่ 3.7

จากการตรวจพบสารคล้ายเพปไทด์ T- และ T+ ใน แฟรคชันที่ 30 และ 38 ตามลำดับ หลัง
ผ่านกระบวนการทาง HPLC โดยวิธี dot-ELISA จึงนำสารสกัดที่ได้จากแฟรคชันต่างๆ ไปตรวจหา
การออกฤทธิ์ของฮอร์โมน CHH (CHH biological activity test) โดยฉีดสารสกัดที่แยกได้จาก
แฟรคชันกลับเข้าไปในก้างก้ามกรามที่ถูกตัดตาทั้งสองข้าง จากนั้น 1 ชั่วโมง เก็บเลือดก้างหลังจากฉีด
สารสกัด นำเลือดก้างก่อนและหลังฉีดไปหาระดับน้ำตาลในเลือดที่เพิ่มขึ้น โดยวิธี glucose oxidase
พบว่าสารสกัดที่ได้จากแฟรคชัน ที่ 37, 38 และ 39 เท่านั้นที่ทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดก้างเพิ่มขึ้น นั้น
แสดงว่าในแฟรคชันที่ 37, 38 และ 39 มีฮอร์โมน CHH กระจายอยู่ โดยแฟรคชันที่ 38 มี CHH
activity มากที่สุด รองลงมาคือแฟรคชันที่ 39 และ 37 ตามลำดับ โดยมีปริมาณฮอร์โมน CHH เท่ากับ
2.44 ,1.64 และ 1.44 หน่วย (unit) ตามลำดับ (รูปที่ 3.6) และเมื่อฉีดสารสกัดที่ได้จากแฟรคชันที่ 30,
35-36 และ 40 พบว่าไม่ทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดก้างเพิ่มขึ้น นั่นคือไม่แสดงการออกฤทธิ์ของ CHH
ดังนั้นการตรวจหา CHH โดยวิธี biological activity test เป็นการยืนยันว่าแอนติบอดีต่อเพปไทด์ T+

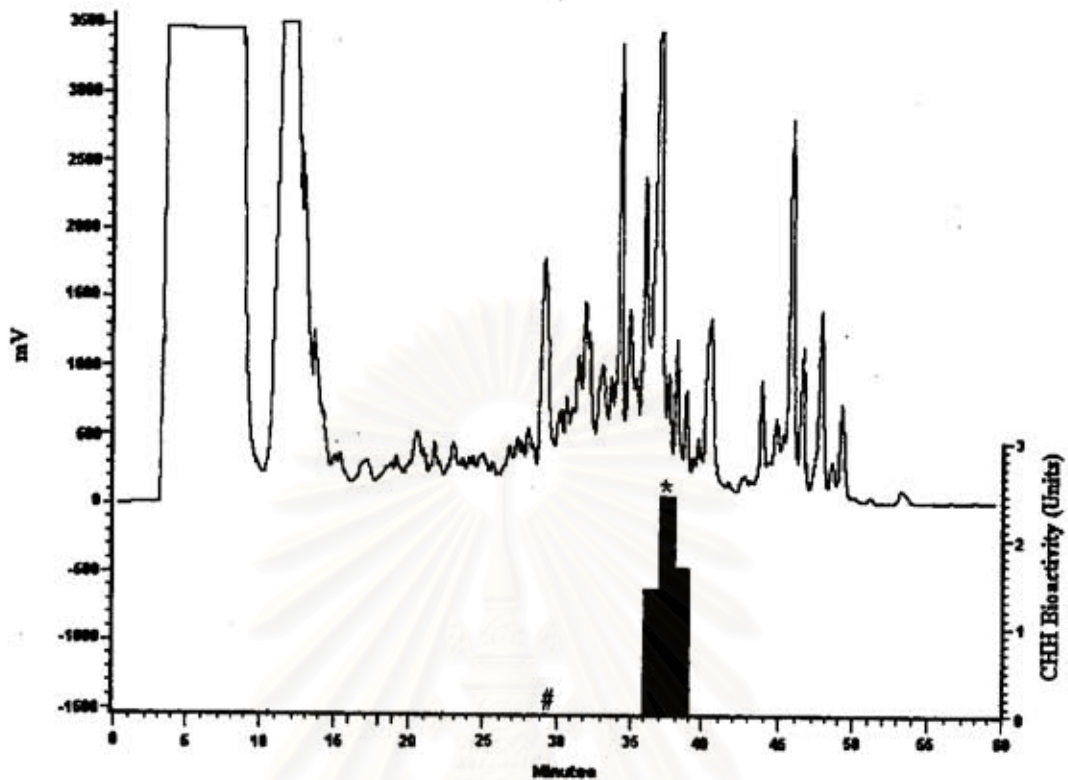
สามารถจับกับ CHH ในก้านตาได้ ในขณะที่แอนติบอดีต่อเพปไทด์ T- สามารถจับกับสารที่คล้ายกับ เพปไทด์ T- แต่ไม่มีคุณสมบัติของ CHH

ตารางที่ 3.4 ผลการตรวจหาฮอร์โมนเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด ในเฟรคชัน ที่ 30 , 35-40

เฟรคชันที่	ปริมาณก้านตา (ก้านตา)	ความเข้มข้นกลูโคส(มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร)			ปริมาณฮอร์โมน หน่วย/ก้านตา
		ก่อนฉีด	หลังฉีด	เพิ่มขึ้น	
น้ำเกลือ		12.83	20.56	7.73	0.15
30	2	9.42	20.5	11.08	0.22
35	2	16.97	30.61	13.67	0.28
36	2	7.11	17.95	10.84	0.21
37	0.5	15.79	33.83	18.04	1.44
38	0.5	5.54	36.09	30.55	2.44
39	0.5	10.69	31.13	20.44	1.64
40	2	15.75	21.32	6.57	0.11

กำหนดให้ 1 หน่วยของ CHH เท่ากับ ปริมาณฮอร์โมน CHH ที่ทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดสูงเพิ่มขึ้น 25 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร

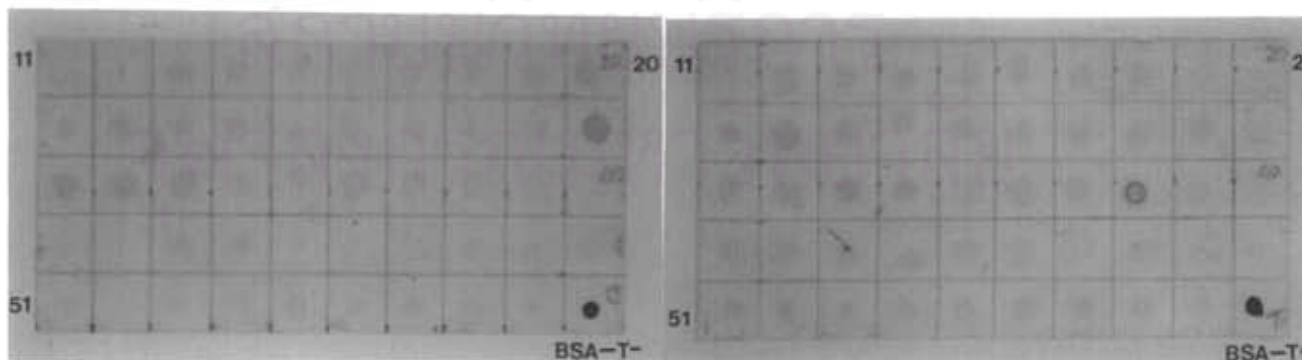
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3.6 RP-HPLC : โครมาโทแกรมของสารสกัดจากก้านดาถุ้งก้ามกรามจำนวน 200 ก้านดา (คอลัมน์ C18, ระบบตัวทำละลาย 12-64 % acetonitrile ใน 0.1 % TFA) และแผนภูมิแท่งแสดงปริมาณ CHH (หน่วย/ก้านดา) ที่ปรากฏในแฟรคชันที่ 37-39 (1 หน่วยของ CHH = ปริมาณ CHH ที่ทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดเพิ่มขึ้น 25 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิิตร) # แฟรคชันที่ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีต่อเพปไทด์ T- * แฟรคชันที่ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีต่อเพปไทด์ T+

ภาพ 1

ภาพ 2

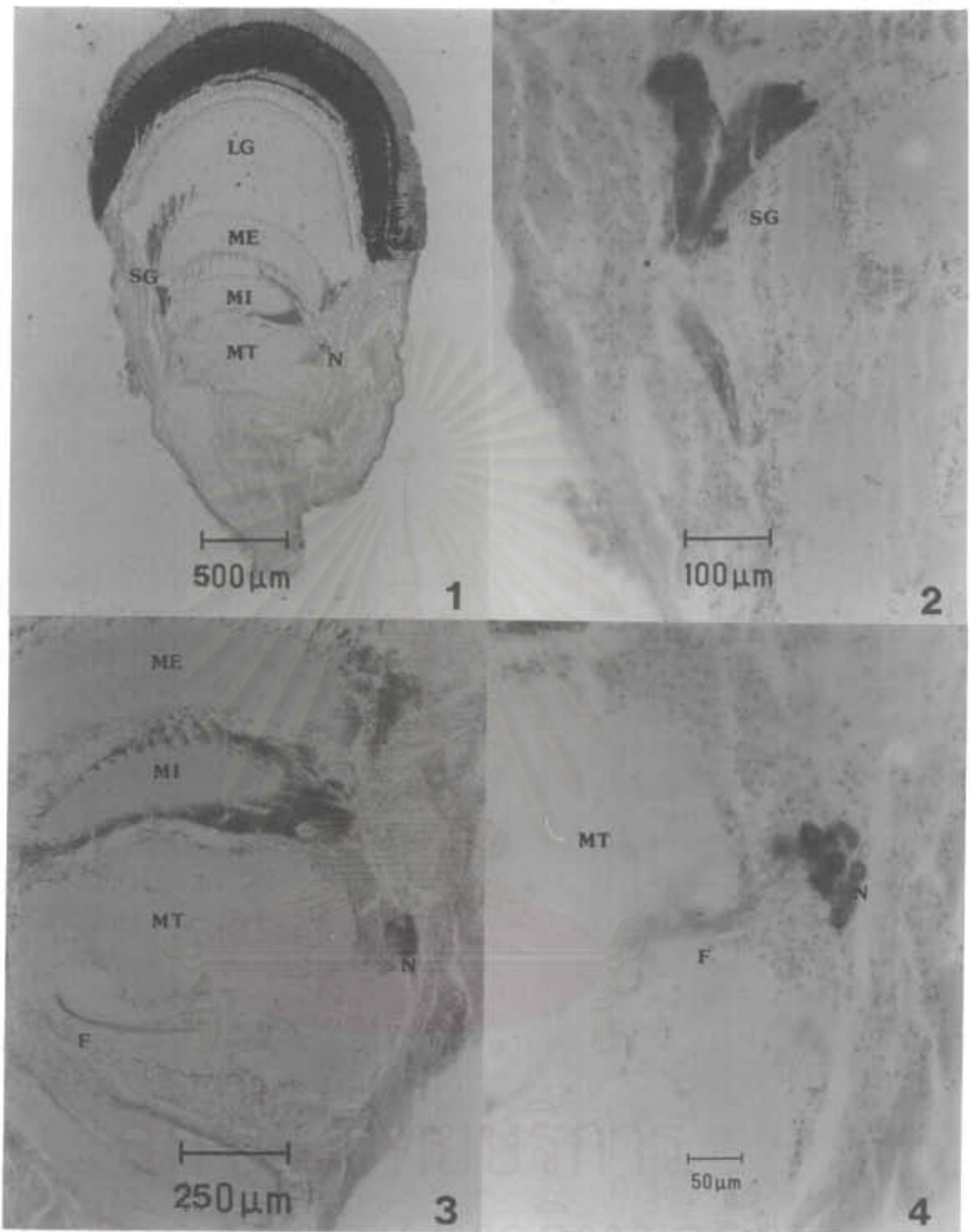


รูปที่ 3.7 Dot-ELISA โดยการใช้แอนติบอดีต่อเพปไทด์และตรวจหาสารคล้าย T- และเพปไทด์ T+ ในสารสกัดจากก้านดาถุ้งก้ามกรามหลังจากผ่านกระบวนการทาง RP-HPLC พบสารคล้ายเพปไทด์ T- ในแฟรคชันที่ 30 (ภาพ 1) และสารคล้ายเพปไทด์ T+ ในแฟรคชันที่ 38 (ภาพ 2)

3.3.2 การตรวจหาแหล่งที่พบ CHH โดยวิธี immunocytochemistry ในก้านตา กุ้งก้ามกรามและกุ้งกุลาดำ

จากการใช้เนื้อเยื่อของก้านตา กุ้งก้ามกรามที่มีความหนา 50 ไมโครเมตร เพื่อตรวจหาแหล่งที่พบฮอร์โมน CHH โดยใช้แอนติบอดีต่อเพปไทด์ T- และเพปไทด์ T+ ในอัตราส่วน 1:5000 โดยวิธี immunocytochemistry พบว่า เมื่อใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อเพปไทด์ T+ พบการติดสีน้ำตาลที่เซลล์ประสาทในบริเวณ medulla terminalis ganglionic x-organ (MTGXO) จำนวน 24 ± 5 เซลล์ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์ประมาณ 18 ± 3 ไมโครเมตร และเส้นใยประสาทที่ส่งไปยังต่อมไชนัส (รูปที่ 3.8) แต่เมื่อใช้แอนติบอดีต่อเพปไทด์ T- กับเนื้อเยื่อก้านตาของกุ้งก้ามกรามเช่นกัน พบว่า ไม่แสดงการติดสีน้ำตาลในบริเวณใดๆ ภายในเนื้อเยื่อก้านตา คาดว่าแอนติบอดีอาจมีปฏิกิริยาข้ามอ่อนๆ กับโปรตีนบางชนิดและกระจายอยู่ในส่วนต่างๆ ในก้านตา ซึ่งไม่สามารถตรวจพบในก้านตาได้โดยตรง อย่างไรก็ตาม เพื่อเป็นการยืนยันความจำเพาะของแอนติบอดีต่อเพปไทด์ T+ ว่าการติดสีไม่ได้เกิดจากการปนเปื้อนของแอนติบอดีที่สามารถจับกับองค์ประกอบต่างๆ ในก้านตา โดยทำการทดลองหยดแอนติบอดีต่อเพปไทด์ T+ คู่กับแอนติบอดีต่อเพปไทด์ T+ ที่ถูกจับด้วย BSA-T+ ลงบนเนื้อเยื่อของก้านตา กุ้งก้ามกรามความหนา 8 ไมครอน พบว่าบริเวณเซลล์ประสาทหรือต่อมไชนัสที่มีการติดสีน้ำตาลเมื่อใช้แอนติบอดีต่อเพปไทด์ T+ นั้น เมื่อใช้แอนติบอดีต่อเพปไทด์ T+ ที่ถูกจับด้วย BSA-T+ พบว่าการติดสีของบริเวณดังกล่าวหายไป นั่นแสดงว่าการติดสีบริเวณเซลล์ประสาทหรือต่อมไชนัสเป็นผลมาจากการเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีต่อเพปไทด์ T+ หรือ CHH นั้นเอง ไม่ใช่เกิดจากแอนติบอดีอื่นๆ ที่ปะปนมาในซีรัม (รูปที่ 3.9-3.10)

นอกจากนี้จากการใช้แอนติบอดีต่อเพปไทด์ T+ ตรวจหาแหล่งที่พบฮอร์โมน CHH ในก้านตา กุ้งกุลาดำ พบว่ามีการติดสีของเซลล์ประสาทในบริเวณ MTGXO จำนวน 34 ± 4 เซลล์ ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 35 ± 4 ไมโครเมตร เส้นใยประสาท และต่อมไชนัสเช่นกัน (รูปที่ 3.11) ดังนั้นจึงคาดว่า CHH ของกุ้งกุลาดำน่าจะมีลำดับกรดอะมิโนทางปลาย C คล้ายกับ CHH ของกุ้งก้ามกราม



รูปที่ 3.8 ตาขาวของกึ่งก้ามกราม ความหนา 50 ไมโครเมตร เมื่อใช้แอนติบอดีต่อพหุโปรตีน T+ อัตราส่วน

1:5000 บริเวณติดกับน้ำตาตเป็นบริเวณที่พบ CHH

1. ภาพกำลังขยายต่ำแสดงต่อมไซนัสและกลุ่มเซลล์ประสาท
2. ภาพกำลังขยายสูงจากเขตรัศมีใกล้เคียงแสดงต่อมไซนัส
3. ภาพกำลังขยายต่ำจากเขตรัศมีใกล้เคียงแสดงกลุ่มเซลล์ประสาทและเส้นใยประสาทที่ส่งไปยังต่อมไซนัส
4. ภาพกำลังขยายสูงของกลุ่มเซลล์ประสาท

LG = Lamina ganglionaris

MI = Medulla interna

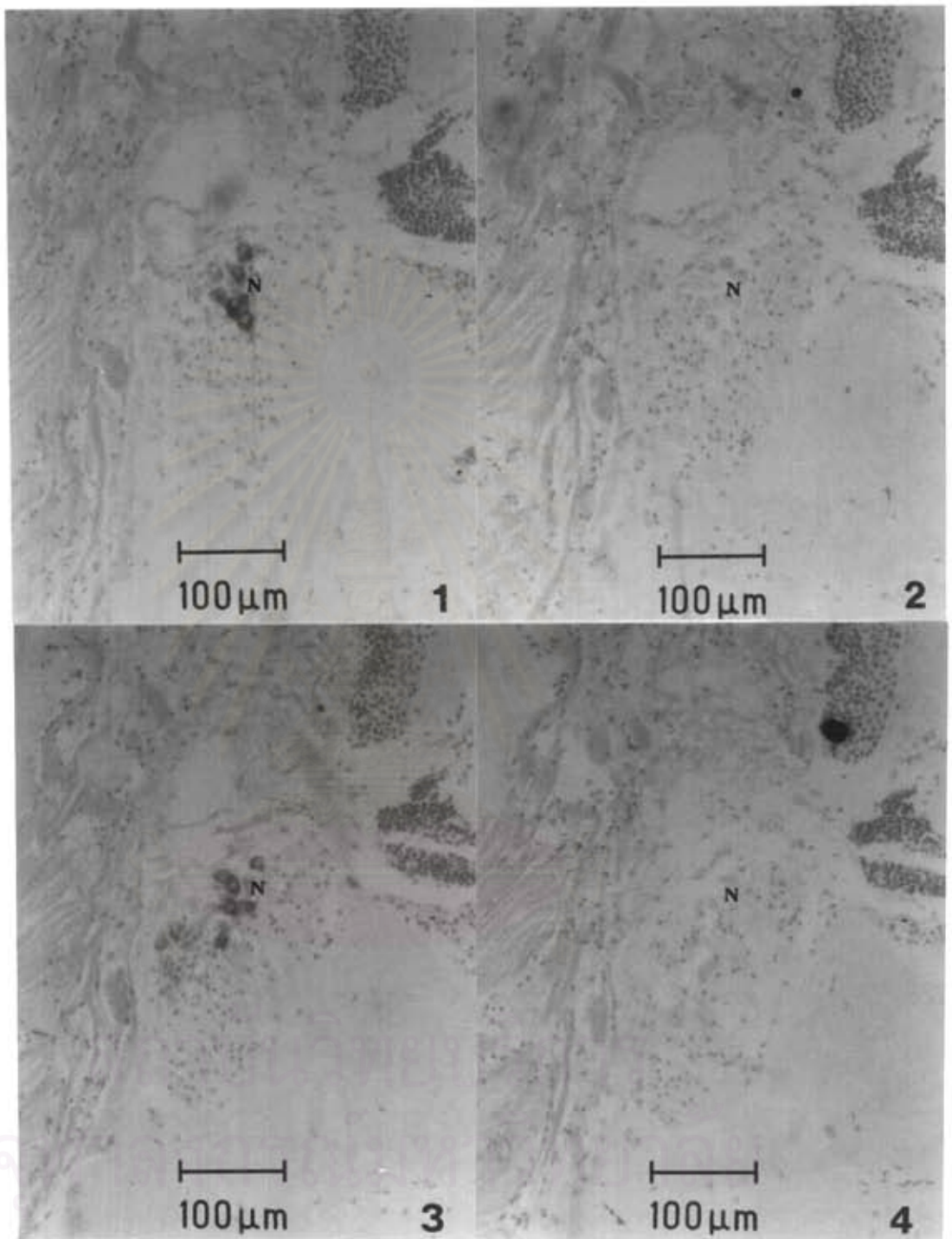
SG = Sinus gland

F = Nerve fiber

ME = Medulla externa

MT = Medulla terminalis

N = Neuronal cell body

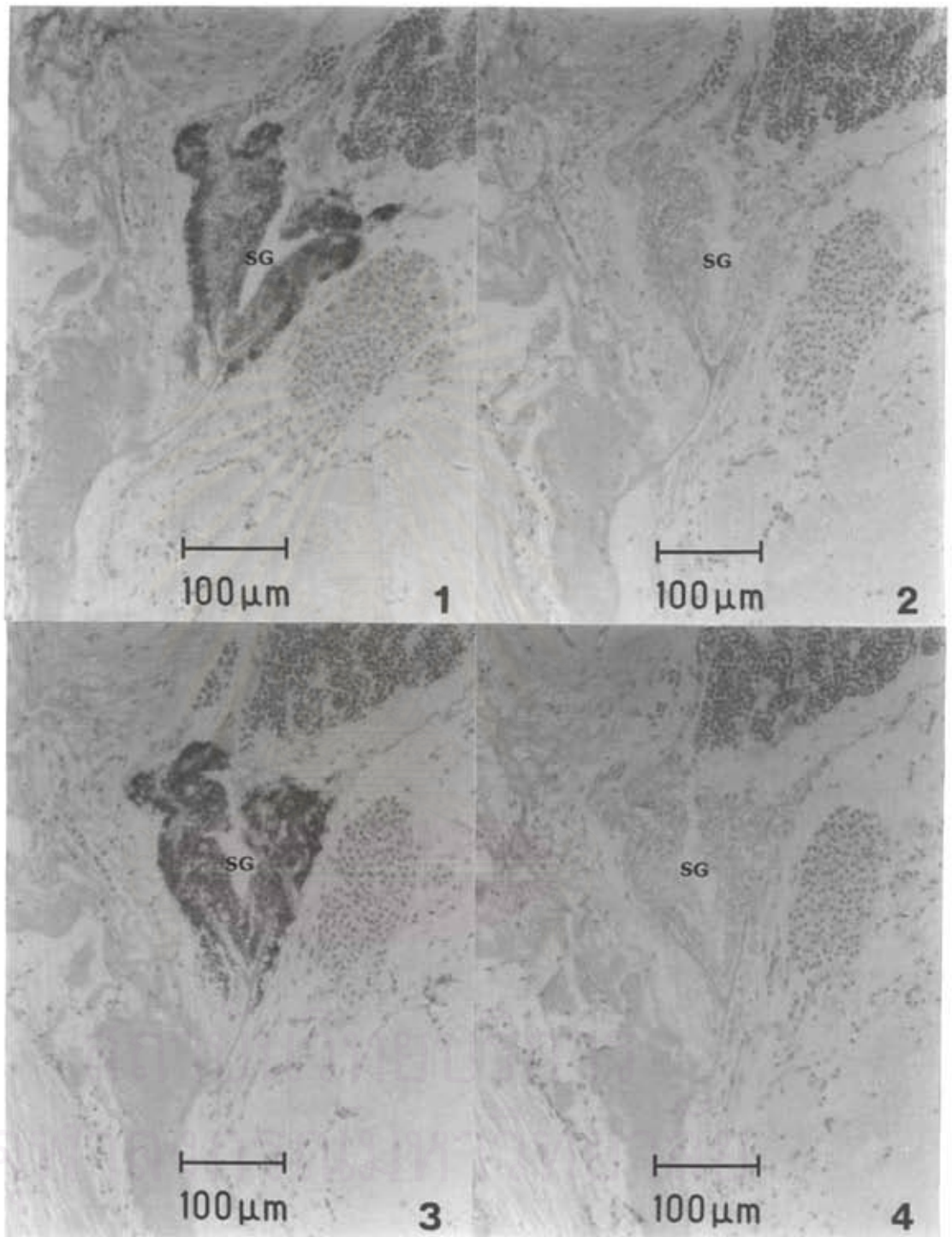


รูปที่ 3.9 การทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อเพปไทด์ T+ ในก้านตาหูก้ามกราม ความหนา 8 ไมครอน แสดงกลุ่มเซลล์ประสาท

1. และ 3. หยดด้วยแอนติบอดีต่อเพปไทด์ T+

2. และ 4. หยดด้วยแอนติบอดีต่อเพปไทด์ T+ ที่ถูกจับด้วย BSA-T+

SG = Sinus gland



รูปที่ 3.10 การทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อเพปไทด์ T+ ในก้านตาข่ายก้ามกราม ความหนา 8 ไมครอน แสดงต่อมไซนัส

1. และ 3. หยดด้วยแอนติบอดีต่อเพปไทด์ T+

2. และ 4. หยดด้วยแอนติบอดีต่อเพปไทด์ T+ ที่ติดรับด้วย BSA-T+

SG = Sinus gland

