การสังเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนบางส่วนของฮอร์โมนเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดจากกุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* เพื่อผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อฮอร์โมนเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด

นางสาวนันทิกา ปานจันทร์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีทางชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2541

ISBN 974-331-114-9

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I19336159

SYNTHESIS OF PARTIAL AMINO ACID SEQUENCE OF CRUSTACEAN HYPERGLYCEMIC HORMONE FROM *Macrobrachium rosenbergii* FOR ANTIBODY PRODUCTION AGAINST CRUSTACEAN HYPERGLYCEMIC HORMONE

Miss. Nanthika Panchan

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement

for the Degree of Master of Science in Biotechnology

Program of Biotechnology

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 1998

ISBN 974-331-114-9

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การสังเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนบางส่วนของฮอร์โมนเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดจากกุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* เพื่อผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อฮอร์โมนเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด
โดย	นางสาวนันทิกา ปานจันทร์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีทางชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. ไพศาล สิทธิกรกุล
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ดร. ธีรยุทธ วิไลวัลย์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์สุภวัฒน์ ชุติวงศ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิเชียร ริมพาณิชยกิจ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพศาล สิทธิกรกุล)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ดร. ธีรยุทธ วิไลวัลย์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. นลิน นิลอุบล)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

นันทิกา ปานจันทร์ : การสังเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนบางส่วนของฮอร์โมนเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดจากกุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* เพื่อผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อฮอร์โมนเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด (SYNTHESIS OF PARTIAL AMINO ACID SEQUENCE OF CRUSTACEAN HYPERGLYCEMIC HORMONE FROM *Macrobrachium rosenbergii* FOR ANTIBODY PRODUCTION AGAINST CRUSTACEAN HYPERGLYCEMIC HORMONE) อ.ที่ปรึกษา : ผศ.ดร. อมร เพชรสม, อ.ที่ปรึกษาร่วม : รศ.ดร. ไพศาล สิทธิกรกุล, ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์, 77 หน้า. ISBN 974-331-114-9

ได้สังเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนบางส่วนทางปลาย C ของฮอร์โมนเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดจากก้านตากุ้งก้ามกรามโดยวิธี solid phase peptide synthesis คือ เพปไทด์ YANAVQV-NH_2 (T-) และ เพปไทด์ YANAVQTV-NH_2 (T+) นำเพปไทด์เชื่อมกับโปรตีน BSA และใช้กระตุ้นให้หนูขาวเร้งแอนติบอดีต่อเพปไทด์ ตรวจหาไตเตอร์และคุณภาพของแอนติบอดีต่อเพปไทด์ทั้งสองโดยวิธี indirect immunoperoxidase ELISA และ dot-ELISA และใช้ซีรัมที่มีไตเตอร์สูงที่สุดตรวจหาฮอร์โมนเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดในสารสกัดจากก้านตาที่แยกด้วยกระบวนการทาง RP-HPLC โดยวิธี dot-ELISA พบสารคล้ายเพปไทด์ T- และเพปไทด์ T+ ในแฟรคชันที่ 30 และ 38 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามจากการตรวจหาการออกฤทธิ์ของฮอร์โมนเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด พบว่า แฟรคชันที่ 37-39 มีความสามารถในการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดกุ้ง แต่แฟรคชันที่ 30 ไม่มีความสามารถในการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดกุ้ง จากการใช้แอนติบอดีต่อเพปไทด์ทั้งสองเพื่อตรวจหาแหล่งที่พบฮอร์โมนเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดในก้านตาโดยวิธี immunocytochemistry พบว่า แอนติบอดีต่อเพปไทด์ T+ เท่านั้นที่มีการติดสีที่เซลล์ประสาทใน Medullu Terminalis Ganglionic X-Organ (MTGXO) จำนวน 24±5 เซลล์ ซึ่งมีเส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์เท่ากับ 18±3 ไมโครเมตร และที่เส้นใยประสาทที่ส่งไปยังต่อมไซนัส จากผลการทดลองครั้งนี้แสดงว่าเฉพาะแอนติบอดีต่อเพปไทด์ T+ เท่านั้นที่สามารถจับกับฮอร์โมนเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด ดังนั้นลำดับกรดอะมิโนของฮอร์โมนนี้น่าจะประกอบด้วยกรดอะมิโน 72 หน่วย โดยมีทรีโอนีนอยู่ในตำแหน่งที่ 71

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา ..-.....
สาขาวิชา ..เทคโนโลยีทางชีวภาพ.....
ปีการศึกษา .....2541.....

ลายมือชื่อนิสิต นันทิกา ปานจันทร์
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวเพียงแผ่นเดียว

3970809623 : MAJOR BIOTECHNOLOGY
KEY WORD: CRUSTACEAN HYPERGLYCEMIC HORMONE / *Macrobrachium rosenbergii* / PEPTIDE SYNTHESIS / ANTIBODY PRODUCTION

NANTHIKA PANCHAN : SYNTHESIS OF PARTIAL AMINO ACID SEQUENCE OF CRUSTACEAN HYPERGLYCEMIC HORMONE FROM *Macrobrachium rosenbergii* FOR ANTIBODY PRODUCTION AGAINST CRUSTACEAN HYPERGLYCEMIC HORMONE. THESIS ADVISOR : ASSIST. PROF. AMORN PETSOM, Ph.D. THESIS CO-ADVISSOR : ASSO. PROF. PAISARN SHITHIGORNGUL. Ph.D., TIRAYUT VILAIVAN. Ph.D. 77 pp.
ISBN 974-331-114-9

Heptapeptide (YANAVQV-NH_2 = T-) and octapeptide (YANAVQTV-NH_2 = T+), the putative C-terminal of crustacean hyperglycemic hormone (CHH) from the eyestalk of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*, were synthesized by solid phase peptide synthesis and conjugated to bovine serum albumin, then used to immunize swiss mice. The titer and quality of the anti-peptide antibodys were determined by indirect immunoperoxidase ELISA and dot-ELISA. The serum contain high titer of each anti-peptide antibody was used to detect the presence of the natural CHH in the eyestalk extract after separated by one step RP-HPLC with Dot-ELISA. The immunoreactive substances were found in fraction 30 with anti T- antibody and in fraction 38 with anti T+ antibody. However, the CHH bioactivity was found in only fraction 37-39. Immunocytochemical localization using the anti T- antibody did not show any specific staining, but the anti T+ antibody revealed staining on a group of 24±5 neurons with diameter 18±3 um in Medulla Terminalis Ganglioic X-organ (MTGXO) and their processes leading to the sinus gland. These evidences show strong indication that the anti T+ antibody can bind to the natural CHH therefore this isoform of the CHH in *M. rosenbergii* consists of 72 residues and threonine is likely to be present at position 71

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา - ลายมือชื่อนิสิต นันทิกา ปานจันทร์

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ปีการศึกษา 2541 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาระดับปริญญามหาบัณฑิตและวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จด้วยความสมบูรณ์ โดยได้รับความกรุณาจาก ผศ.ดร. อมร เพชรสม รศ.ดร. ไพศาล สิทธิกรกุล และอาจารย์ ดร. ธีรยุทธ วิไลวัลย์ ที่รับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาและที่ปรึกษาร่วมที่ให้คำแนะนำแนวทางการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณคณะบุคคลากรทุกท่านในสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความสะดวกในด้านอุปกรณ์ สารเคมีในการทำวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร. วีระวรรณ สิทธิกรกุล คุณศิวพร ลงยันต์ คุณจิรศักดิ์ ผู้ปลื้ม คุณนุชนาถ เกษมวงศ์ คุณจันทร์ทิพย์ คงสินรัตนชัย และคุณศิริรัตน์ นิสารัตนพร จากภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร ที่ให้ความช่วยเหลือและความสะดวกในด้านสถานที่ อุปกรณ์ สารเคมีในการทำวิจัย ตลอดจนแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณเพื่อนๆ และพี่ๆ เทคโนโลยีทางชีวภาพ ที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจสำหรับการทำวิจัยมาโดยตลอด

ขอขอบคุณ คุณวิชัญญา คงเจริญพร ที่เป็นกำลังใจสำหรับการทำวิจัยมาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ คุณน้า พี่สาวและน้องสาว ที่เป็นกำลังใจที่สำคัญและให้การสนับสนุนในการศึกษาด้วยดีมาตลอด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ
กิตติกรรมประกาศ..... ฉ
สารบัญ..... ช
สารบัญตาราง..... ฌ
สารบัญรูป..... ฎ
คำย่อ..... ฑ

บทที่

1 บทนำ

ภูมิหลัง..... 1
เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 3
การสังเคราะห์เพปไทด์บนวัฏภาคของแข็ง..... 8
Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) 14
Immunocytochemistry..... 17
มูลเหตุจูงใจ..... 19
ขอบเขตของงานวิจัย..... 19

2 วิธีการทดลอง

อุปกรณ์การทดลอง..... 20
สารเคมี..... 21
วิธีการทดลอง..... 24
2.1. การสังเคราะห์เพปไทด์โดยวิธี Solid phase peptide synthesis..... 24
2.1.1 การสังเคราะห์เพปไทด์ YANAVQV-NH_2 (T-)..... 24
2.1.2 การสังเคราะห์เพปไทด์ YANAVQTV-NH_2 (T+)..... 27
2.1.3 การแยก crude เพปไทด์ให้บริสุทธิ์โดยใช้ RP-HPLC..... 27
2.1.4 การตรวจสอบน้ำหนักโมเลกุลของเพปไทด์ T- และเพปไทด์ T+ โดย MALDI-TOF MS..... 28

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ หน้า

2.2. การผลิตแอนติบอดีต่อเพปไทด์ที่สังเคราะห์ขึ้น..... 30

2.2.1 การเชื่อมเพปไทด์ T- เพปไทด์ T+ และไกลซีนกับโปรตีน BSA ด้วยกลูตาราลดีไฮด์ (BSA-T- , BSA- T+ and BSA-Gly)..... 30

2.2.2 การกระตุ้นให้หนูขาวสร้างแอนติบอดีต่อเพปไทด์หนูขาว..... 30

2.3. การดูดซับแอนติบอดีต่อโปรตีน BSA ออกด้วย BSA-Gly..... 30

2.4. การทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อเพปไทด์ที่สังเคราะห์..... 31

2.4.1 การตรวจหาไตเตอร์ของแอนติบอดีต่อเพปไทด์ T- และ T+ ที่สังเคราะห์โดยวิธี indirect immunoperoxidase ELISA..... 31

2.4.2. การทดสอบความสามารถของแอนติบอดีต่อเพปไทด์ T- และ T+ ในการจับกับเพปไทด์ T- หรือเพปไทด์ T+ ที่สังเคราะห์ขึ้นและตรวจปฏิกิริยาข้ามระหว่างแอนติบอดีทั้งสองโดยวิธี dot-ELISA.30 32

2.5. การทดสอบความสามารถของแอนติบอดีต่อเพปไทด์ T- และเพปไทด์ T+ ในการจับเพปไทด์สภาพธรรมชาติ (Natural Peptide)..... 32

2.5.1 การตรวจหาสารคล้ายเพปไทด์ T- และเพปไทด์ T+ ในสารสกัดจากก้านตากุ้งก้ามกรามโดยวิธี dot-ELISA..... 32

2.5.1.1 การเก็บรวบรวมตากุ้งก้ามกราม..... 32

2.5.1.2 การเตรียมสารสกัดจากก้านตาในสารละลายเมทานอล กรดแอซิติกและน้ำ..... 33

2.5.1.3 การแยกสารสกัดจากก้านตาโดย RP-HPLC..... 33

2.5.1.4 การตรวจหาสารคล้ายเพปไทด์ T-และ เพปไทด์ T+ ในก้านตาโดยวิธี dot -ELISA..... 33

2.5.1.5. การตรวจหาฮอร์โมน CHH โดยวิธี biological activity test.. 34

2.5.1.5.1 การเตรียมเก็บตัวอย่างเลือดกุ้งก้ามกราม..... 34

2.5.1.5.2 การหาปริมาณน้ำตาลในเลือดโดยวิธี glucose oxidase..... 34

2.5.2 การตรวจหาแหล่งสร้าง CHH โดยวิธี immunocytochemistry ในก้านตากุ้งก้ามกราม..... 35

2.5.2.1 การเตรียมเนื้อเยื่อในพาราฟิน (Paraffin section)..... 35

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ หน้า

2.5.2.2 กระบวนการทาง immunocytochemistry โดยวิธี indirect immunoperoxidase method..... 35

2.5.2.3 การตรวจสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อเพปไทด์ T+ ในก้านตากุ้งก้ามกรามด้วยวิธี immunocytochemistry..... 36

2.5.3 การตรวจปฏิกิริยาข้ามของแอนติบอดีต่อเพปไทด์ T-และเพปไทด์ T+ ในก้านตากุ้งกุลาดำ ด้วยวิธี immunocytochemistry..... 36

3 ผลการทดลอง

3.1. การสังเคราะห์เพปไทด์ YANAVQV-NH_2 (T-) และ YANAVQTV-NH_2 (T+)..... 41

3.2. การทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อเพปไทด์ที่สังเคราะห์..... 46

3.2.1 การตรวจหาไตเตอร์ของแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเพปไทด์ T- และ เพปไทด์ T+ โดยวิธี indirect immunoperoxidase ELISA..... 46

3.2.2. การทดสอบความสามารถของแอนติบอดีต่อเพปไทด์ T- และ เพปไทด์ T+ ในการจับกับเพปไทด์ T- และ T+ ที่สังเคราะห์ขึ้นและ ตรวจปฏิกิริยาข้ามของแอนติบอดีทั้งสองโดยวิธี dot-ELISA..... 49

3.3. การทดสอบความสามารถของแอนติบอดีต่อเพปไทด์ T- และ เพปไทด์ T+ ในการจับกับเพปไทด์สภาพธรรมชาติ..... 50

3.3.1 การตรวจหาสารคล้ายเพปไทด์ T- และเพปไทด์ T+ ในสารสกัด จากก้านตากุ้งก้ามกรามโดยวิธี dot-ELISA และ การตรวจหาการ ออกฤทธิ์ของฮอร์โมนเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด (CHH) โดยวิธี biological activity test 50

3.3.2 การตรวจหาแหล่งที่พบ CHH โดยวิธี immunocytochemistry. ในก้านตากุ้งก้ามกรามและกุ้งกุลาดำ..... 53

4 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง..... 58

เอกสารอ้างอิง..... 62

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก กราฟมาตรฐานโปรตีน BSA ที่ความยาวคลื่น 215 นาโนเมตร..... 69

ภาคผนวก ข MALDI-TOF MS สเปกตรัมของแฟรคชันต่างๆ ของเพปไทด์ T- ที่ได้ จากการสังเคราะห์โดยวิธี solid phase peptide synthesis..... 70

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ หน้า

ภาคผนวก ค.. MALDI-TOF MS สเปกตรัมของแฟรคชันต่างๆ ของเพปไทด์ T- ที่ได้จากการสังเคราะห์โดยวิธี solid phase peptide synthesis..... 72

ภาคผนวก ง การเตรียมสารเคมี..... 74

ประวัติผู้เขียน..... 77

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

3.1 ประสิทธิภาพการสู่ควบของกรดอะมิโน..... 42

3.2 แสดงผลการหาไตเตอร์ของแอนติบอดีต่อเพปไทด์ T- โดยดูจากค่าการเจือจาง ชุดท้ายที่ค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 0.1 หน่วย ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร..... 47

3.3 แสดงผลการหาไตเตอร์ของแอนติบอดีต่อเพปไทด์ T+ โดยดูจากค่าการเจือจาง ชุดท้ายที่ค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 0.1 หน่วย ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร..... 48

3.4 ผลการตรวจหาฮอร์โมนเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด ในแฟรคชัน ที่ 30 , 35-40..... 51

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1.1	เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ CHH ในสัตว์ครัสทาเชียนชนิดต่างๆ	7
1.2	โครงสร้างทางเคมีของเรซิน NovaSyn TGR	8
1.3	หมู่ปกป้องหมู่อะมิโน ที่ใช้ใน SPPS	10
1.4	ตัวอย่างหมู่ปกป้องหมู่แขนงข้างสำหรับกรดอะมิโนที่หมู่อะมิโนถูกป้องกันโดยหมู่ Fmoc	10
1.5	กลไกการกระตุ้นหมู่คาร์บอกซิลิกและการคู่ควบกับหมู่อะมิโนอิสระเกิดพันธะเพปไทด์	11
1.6	โครงสร้างทางเคมีของ HBTU	11
1.7	ขั้นตอนการสังเคราะห์เพปไทด์บนวัฏภาคของแข็ง	13
1.8	วิธีการทาง ELISA	16
2.1	อุปกรณ์ที่ใช้ในการสังเคราะห์	25
2.2	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและค่าการดูดกลืนแสงของ dibenzofulvene-piperidine หลังจากผ่านการ deprotect Fmoc-glycine ด้วยสารละลาย 20% piperidine ใน DMF	26
2.3	แผ่นโลหะสำหรับใส่ตัวอย่างในเครื่อง MALDI-TOF MS	28
2.4	ขั้นตอนการสังเคราะห์เพปไทด์ YANAVQV-NH_2 (T-) และ YANAVQTV-NH_2 (T+)	29
2.5	ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดจากก้านตากุ้งก้ามกราม	37
2.6	ขั้นตอนการตรวจหาสารคล้ายเพปไทด์โดยวิธี dot-ELISA	38
2.7	ขั้นตอนการตรวจหาฮอร์โมนเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดกุ้งก้ามกราม	39
2.8	ขั้นตอนการตรวจหาแหล่งสร้าง CHH ในเนื้อเยื่อก้านตาโดยวิธี Immunocytochemistry	40
3.1	RP-HPLC : โครมาโทแกรมของ crude เพปไทด์ T-	44
3.2	สเปกตรัมของเพปไทด์ T- โดย MALDI-TOF MS	44
3.3	RP-HPLC : โครมาโทแกรมของ crude เพปไทด์ T+	45
3.4	สเปกตรัมของเพปไทด์ T+ โดย MALDI-TOF MS	45

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่		หน้า
3.5	dot-ELISA แสดงความสามารถของแอนติบอดีต่อเพปไทด์ T- หรือเพปไทด์ T+ ในการจับกับเพปไทด์ T-หรือเพปไทด์ T+ ที่สังเคราะห์ขึ้น.....	49
3.6	RP-HPLC : โครมาโทแกรมของสารสกัดจากก้านตากุ้งก้ามกรามจำนวน 200 ก้านตา	52
3.7	dot-ELISA โดยการใช้แอนติบอดีต่อเพปไทด์ และ ตรวจหาสารคล้าย T- และ T+ ใน สารสกัดจากก้านตากุ้งก้ามกรามหลังจากผ่านกระบวนการทาง RP-HPLC.....	52
3.8	ตาขวาของกุ้งก้ามกราม ความหนา 50 ไมโครเมตร เมื่อใช้แอนติบอดีต่อเพปไทด์ T+ อัตราส่วน 1 : 5000 บริเวณติดสีน้ำตาลเป็นบริเวณที่พบ CHH.....	54
3.9	การทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อเพปไทด์ T+ ในก้านตากุ้งก้ามกราม ความหนา 8 ไมครอน แสดงกลุ่มเซลล์ประสาท.....	55
3.10	การทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อเพปไทด์ T+ในก้านตากุ้งก้ามกราม ความหนา 8 ไมครอน แสดงต่อมไซนัส.....	56
3.11	ภาพตาซ้ายของกุ้งกลาดำ ความหนา 50 ไมโครเมตร เมื่อใช้แอนติบอดีต่อเพปไทด์ T+ อัตราส่วน 1 : 5000 บริเวณติดสีน้ำตาลเป็นบริเวณที่พบ CHH.....	57
4.1	ลำดับกรดอะมิโนของ CHH ของกุ้งก้ามกรามที่คาดว่ามีทริโอนีนอยู่ที่ตำแหน่งที่ 71...	61

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำย่อ

Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
Boc	t-Butoxycarbonyl
DMF	N,N-Dimethyformamide
HBTU	2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,13,3-tetramethyluronium hexaflurophosphate
DIPEA	N-Ethyldiisopropylamine
TFA	Trifluoroacetic acid
Ala	อะลานีน (Alanine, A)
Asn	แอสปาราจีน (Asparagine, N)
Gln	กลูตามีน (Glutamine, Q)
Gly	ไกลซีน (Glycine, G)
Thr	ทรีโอนีน (Threonine, T)
Tyr	ไทโรซีน (Tyrosine, Y)
Val	วาลีน (Valine, V)
Trt	Trityl
tBu	t-Butyl
PBS	Phosphate Buffered saline 0.15 M, pH 7.2
BSA	Bovine serum albumin
OPD	o-Phenylenediamine dihydrochloride
DAB	Diaminobenzidine tetrahydrochloride

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย