

การหาลำดับกรดอะมิโนของฮอร์โมนจากต่อมก้านตากลูโกลาต้า *Penaeus monodon* ด้วยเทคนิค  
เมทริกซ์แอสซีสเทดเลเซอร์ดิซอร์พชั่นไอออไนเซชันแมสสเปกโทรเมทรี



นายไพบูลย์ พรมณี

สถาบันวิทยบริการ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาเทคโนโลยีทางชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์

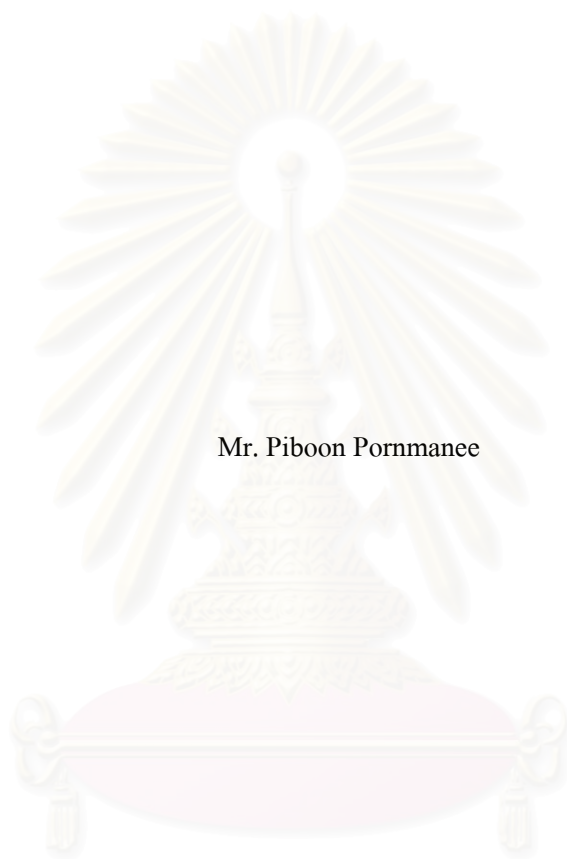
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2544

ISBN 974-17-0766-5

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

AMINO ACID SEQUENCE OF HORMONE FROM EYESTALK OF GIANT TIGER PRAWN  
*Penaeus monodon* USING MATRIX-ASSISTED LASER DESORPTION IONIZATION MASS  
SPECTROMETRY



Mr. Piboon Pornmanee

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

Chulalongkorn University

Academic Year 2001

ISBN 974-17-0766-5

หัวข้อวิทยานิพนธ์      การหาลำดับกรดอะมิโนของฮอร์โมนจากต่อมก้านตาคุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* ด้วยเทคนิคเมทริกซ์แอสซีสเทดเลเซอร์ดิซอร์พชัน ไอออไนเซชันแมสสเปกโทรเมทรี

โดย                              นายไพบุลย์ พรหมณี

สาขาวิชา                      เทคโนโลยีทางชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษา              รองศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม

---

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....รองคณบดีฝ่ายบริหาร  
(รองศาสตราจารย์ ดร. พิพัฒน์ การเที่ยง) รักษาราชการแทนคณบดีคณะวิทยาศาสตร์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา  
(รองศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม)

.....กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปั่นพานิชการ)

.....กรรมการ  
(อาจารย์ ดร. พลกฤษณ์ แสงวณิช)

ไพบูลย์ พรหมณี : การหาลำดับกรดอะมิโนของฮอร์โมนจากต่อมก้านตากลูตาต้า *Penaeus monodon* ด้วยเทคนิคเมทริกซ์แอสซิสต์เลเซอร์ไอออไนเซชันแมสสเปกโตรเมตรี ( AMINO ACID SEQUENCE OF HORMONE FROM EYESTALK OF GIANT TIGER PRAWN *Penaeus monodon* USING MATRIX ASSISTED LASER DESORPTION IONIZATION MASS SPECTROMETRY) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.อมร เพชรสม , 68 หน้า. ISBN 974-17-0766-5

ได้ศึกษาวิธีการหาลำดับกรดอะมิโนในสายเปปไทด์ด้วยวิธีการ Post Source Decay Fragmentation โดยใช้เครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์แบบ MALDI-TOF วิธีการนี้ได้ปรับให้หาลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์ที่ทราบแล้วคือ ACTH และ angiotensin II และพบว่าลำดับที่ได้ถูกต้อง จึงนำวิธีการนี้ไปหาลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์ FMRFamide ตัวหนึ่งที่แยกได้จากก้านตากลูตาต้า และ เปปไทด์ CHH ตัวหนึ่งที่แยกได้จากก้านตากลูตาต้า พบว่าลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์ทั้งสองคือ Ala-Pro-Ala -Leu -Arg -Leu -Arg -Phe และ His-Glu -Glu -Tyr -Gln- Ala-His- Val-Gln-Thr-Val ตามลำดับ โดยลำดับกรดอะมิโนและเปปไทด์ทั้งสองยืนยันได้ด้วยวิธีการ Edman degradation

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา...เทคโนโลยีทางชีวภาพ  
สาขาวิชา .....

ลายมือชื่อนิสิต.....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2544

## 4172384023 :MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORD: *Penaeus monodon*/MALDI-TOF MS/ Crustacean Hyperglycaemic Hormone

PIBOON PORNMANEE : AMINO ACID SEQUENCE OF HORMONE FROM  
EYESTALK OF TIGER PRAWN *Penaeus monodon* USING MATRIX-ASSISTED  
LASER DESORPTION IONIZATION MASS SPECTROMETRY. THESIS ADVISER :  
ASSOC. PROF. AMORN PETSOM, PhD., 68 PP. ISBN 974-17-0766-5

The amino acid sequencing of peptide using Post Source Decay Fragmentation in a MALDI-TOF mass spectrometer has been investigated. The method has been optimized for amino acid sequencing of the known peptides, ACTH and angiotensin II and it was found that the sequences were correctly determined. The method was applied to amino acid sequencing of an FMRFamide isolated from the eye stalks of *Macrobrachium resenbergtii* and a CHH peptide isolated from *Penaeus monodon*. It was found that the amino acid sequencing of both peptides were Ala-Pro-Ala -Leu -Arg -Leu -Arg -Phe and His-Glu -Glu -Tyr -Gln- Ala-His- Val-Gln-Thr-Val, respectively. The amino acid sequences of these two peptides were confirmed by Edman degradation method.



Program.....Biotechnology.....

Student's signature.....

Field of study.....

Advisor's signature.....

Academic year .....2001....

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ดี ด้วยความกรุณาจากรองศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม ที่รับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ ดร. พลกฤษณ์ แสงวณิช ที่ให้คำแนะนำ ข้อคิดต่างๆ ในการทำงาน และที่กรุณารับเป็นกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ กระผมขอขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้เป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ ที่กรุณารับเป็นประธานในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ และ รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ ที่กรุณารับเป็นกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ไพศาล สิทธิกรกุล และคุณนันทิกา ปานจันทร์ ที่กรุณาเอื้อเฟื้อสารตัวอย่าง

ขอขอบพระคุณ ดร.จรัญ ใจหนักแน่น และคุณพยุงศักดิ์ ตั้งหลักมงคล ที่ให้คำแนะนำ ความช่วยเหลือในการใช้เครื่อง Mass spectrometer

ขอขอบพระคุณบุคลากรทุกท่านในสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความสะดวกในด้านอุปกรณ์ สารเคมีในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัว ที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจในการทำวิจัยตลอดมา

สุดท้ายนี้ ขอขอบคุณ เพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ biotech ทุกคน ที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจมาตลอด

ความดีของการศึกษา และคุณค่าของวิทยานิพนธ์นี้ ข้าพเจ้าขออุทิศแด่บูรพาจารย์ และผู้มีพระคุณทุกท่าน

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ญ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	3
ขอบเขตของงานวิจัย.....	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
เทคนิคผลิตไอออนแบบ ESI.....	5
เทคนิคผลิตไอออนแบบ MALDI-TOF .....	6
การแตกตัวของสารในเครื่อง MALDI-TOF .....	10
การหาลำดับกรดอะมิโนด้วยเทคนิค Post source decay .....	12
เมทริกซ์.....	17
การแปรผล.....	18
ลักษณะทางชีววิทยาของกุ้งกุลาดำ.....	19
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	27
3 วิธีการทดลอง.....	29
อุปกรณ์และสารเคมี.....	29
โปรตีนตัวอย่าง.....	30
สารมาตรฐาน.....	30
การเตรียมเมทริกซ์.....	30
การเตรียมสารละลายตัวอย่าง.....	30
การหาน้ำหนักโมเลกุล.....	31
การทำ Post source decay.....	33

## สารบัญต่อ

	หน้า
4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	34
ผลการทดลองของสารมาตรฐาน.....	34
ผลการทดลองของสารตัวอย่าง.....	40
วิจารณ์ผลการทดลอง.....	46
5 สรุปผลการทดลอง.....	48
รายการอ้างอิง.....	49
ภาคผนวก.....	54
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	68



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
2.1	แสดงเมทริกซ์และคุณสมบัติของแต่ละชนิด.....17
4.1	แสดงน้ำหนักโมเลกุลของชิ้นส่วนต่างๆที่แตกตัวของ ACTH fragment 18-38 ซึ่งได้จากการคำนวณด้วยคอมพิวเตอร์.....36
4.2	แสดงน้ำหนักโมเลกุลของชิ้นส่วนต่างๆที่แตกตัวของ Human angiotensin II.....39
4.3	แสดงผลการคำนวณน้ำหนักโมเลกุลของชิ้นส่วนต่างๆที่แตกตัวของ FMRF amide จากก้านตากุ้งก้ามกราม.....42
4.4	แสดงน้ำหนักโมเลกุลของชิ้นส่วนที่แตกตัวของ CHH ซึ่งได้จากการคำนวณ ด้วยคอมพิวเตอร์.....45
ก.1	แสดงน้ำหนักโมเลกุลของกรดอะมิโนแต่ละตัว .....55



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญรูปภาพ

รูปที่	หน้า
2.1	แสดงการทำให้สารตัวอย่างแตกตัวเป็นประจุในเครื่อง Electrospray ionization mass spectrometer .....5
2.2	แสดงการเกิดประจุของละอองฝอยสารตัวอย่างในเครื่อง Electrospray Mass spectrometry.....6
2.3	การทำให้สารแตกตัวเป็นไอออนด้วยพลังงานจากเลเซอร์ในเครื่อง MALDI-TOF .....8
2.4	แสดงหลักการทำงานของเครื่อง MALDI-TOF ..... 8
2.5	แสดงหลักการทำงานของเครื่องในระบบ Linear.....9
2.6	แสดงการทำงานระบบ reflectron.....9
2.7	แสดงหลักการทำงานของ reflectron.....10
2.8	แสดงการแตกตัวแบบ prompt fragmentation.....11
2.9	แสดงการแตกตัวแบบ metastable fragmentation.....12
2.10	แสดงการแตกตัวแบบ post source decay.....13
2.11	ตัวอย่างแสดงการแตกตัวที่ความต่างศักย์ต่าง ๆ ของ reflectron..... 14
2.12	ตัวอย่างแสดง Post source decay mass spectrum ที่ได้ .....15
2.13	แสดงชิ้นส่วนต่าง ๆ ที่มีโอกาสเกิดขึ้นจากการแตกตัวของโปรตีน.....16
2.14	แสดง Post source decay mass spectrum ที่ได้และการแปรผล.....18
2.15	โครงสร้างภายนอกโดยทั่วไปของกิ้งกูดาค่า <i>Penaeus monodon</i> .....21
2.16	ภาพจากด้านท้องของกิ้งกูดาค่าแสดงขาว่ายน้ำ พิเทสมาและที่ไลคัม .....24
2.17	ภาพวาดแสดงพิเทสมาของกิ้งกูดาค่าเพศผู้ (ซ้าย) และที่ไลคัมของกิ้งกูดาค่าเพศเมีย (ขวา).....25
2.18	แสดงโครงสร้างภายในก้านตากลิ้งกูดาค่า.....26
3.1	แสดงเครื่อง BIFLEX Bruker MALDI-TOF MS.....31
3.2	แสดง probe ที่ใส่สารตัวอย่าง.....32
3.3	แสดงตำแหน่งที่ใส่สารตัวอย่าง.....32
4.1	แสดง Mass spectrum ของ ACTH Fragment 18-39.....34
4.2	แสดง Post source decay mass spectrum ของ ACTH fragment 18-38.....35
4.3	Mass spectrum ของ Human angiotensin II.....37
4.4	Post source decay mass spectrum ของ Human angiotensin II.....38
4.5	แสดง Mass spectrum ของ FMRF amide จากก้านตากลิ้งกูดาค่า.....40

## สารบัญรูปภาพต่อ

รูปที่		หน้า
4.6	Post source decay mass spectrum ของ FMRF amide จากก้านตากลู่ก้ามกราม.....	41
4.7	แสดง Mass spectrum ของ CHH จากกึ่งกลาด้า.....	43
4.8	Post source decay mass spectrum ของ CHH จากกึ่งกลาด้า.....	44
ข.1	แมสสเปกตรัมของ CHH จากก้านตากลู่ก้ามกรามที่ความต่างศักย์ Reflectron 20.00 kV.....	56
ข.2	แมสสเปกตรัมของ CHH จากก้านตากลู่ก้ามกรามที่ความต่างศักย์ Reflectron 17.52 kV.....	57
ข.3	แมสสเปกตรัมของ CHH จากก้านตากลู่ก้ามกรามที่ความต่างศักย์ Reflectron 14.97 kV.....	58
ข.4	แมสสเปกตรัมของ CHH จากก้านตากลู่ก้ามกรามที่ความต่างศักย์ Reflectron 11.28 kV.....	59
ข.5	แมสสเปกตรัมของ CHH จากก้านตากลู่ก้ามกรามที่ความต่างศักย์ Reflectron 8.49 kV.....	60
ข.6	แมสสเปกตรัมของ CHH จากก้านตากลู่ก้ามกรามที่ความต่างศักย์ Reflectron 6.39 kV.....	61
ข.7	แมสสเปกตรัมของ CHH จากก้านตากลู่ก้ามกรามที่ความต่างศักย์ Reflectron 4.81 kV.....	62
ข.8	แมสสเปกตรัมของ CHH จากก้านตากลู่ก้ามกรามที่ความต่างศักย์ Reflectron 3.63 kV.....	63
ข.9	แมสสเปกตรัมของ CHH จากก้านตากลู่ก้ามกรามที่ความต่างศักย์ Reflectron 2.73 kV.....	64
ข.10	แมสสเปกตรัมของ CHH จากก้านตากลู่ก้ามกรามที่ความต่างศักย์ Reflectron 1.55 kV.....	65
ข.11	แมสสเปกตรัมของ CHH จากก้านตากลู่ก้ามกรามที่ความต่างศักย์ Reflectron 1.18 kV.....	66
ข.12	แมสสเปกตรัมของ CHH จากก้านตากลู่ก้ามกรามที่ความต่างศักย์ Reflectron 0.94 kV.....	67

# บทที่ 1

## บทนำ

### ความเป็นมาและปัญหา

กุ้งเป็นสัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะ กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) และกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) ในปีหนึ่งๆ สามารถสร้างรายได้ให้กับประเทศไทยปีละหลายหมื่นล้านบาท ในปัจจุบันจึงมีการศึกษาค้นคว้าวิจัยถึงลักษณะทางชีววิทยาของกุ้งในกลุ่มนี้กันอย่างกว้างขวาง เพื่อที่จะพัฒนาการเพาะเลี้ยง เพิ่มผลผลิตให้มากขึ้น ป้องกันรักษาโรคที่เกิดกับตัวกุ้ง และแก้ไขผลกระทบที่เกิดกับสิ่งแวดล้อม การศึกษาวิจัยถึงลักษณะทางชีววิทยาของกุ้งประเด็นสำคัญที่มีการศึกษากันมากคือการศึกษาถึงระบบฮอร์โมนในตัวกุ้ง เนื่องจากสัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียมีฮอร์โมนจะเป็นสารสำคัญในการควบคุมการเจริญเติบโต ควบคุมเมตาโบลิซึม ตลอดจนควบคุมการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของร่างกาย (Sun, 1994) ยังมีฮอร์โมนและสารคล้ายฮอร์โมนอีกหลายชนิดที่เราไม่ทราบหน้าที่และโครงสร้างที่ชัดเจน ต้องมีการศึกษาค้นคว้ากันต่อไป

แหล่งผลิตฮอร์โมนที่สำคัญในสัตว์กลุ่มครัสเตเชียคือเซลล์นิวโรเซครีทอรี (neurosecretory cell) หรือระบบประสาทส่วนกลาง (Central Nervous System C.N.S) โดยจะทำหน้าที่สร้างและส่งฮอร์โมนไปเก็บที่ต่อมไซนัส (sinus gland) ซึ่งจะอยู่บริเวณบริเวณก้านตา (eyestalk) (Yang, 1995) โดยต่อมไซนัสเป็นอวัยวะสำคัญที่ทำหน้าที่เก็บสะสม และปล่อยฮอร์โมนเหล่านั้นไปมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงในร่างกาย ฮอร์โมนที่สำคัญมีหลายชนิดเช่น Red Pigment Concentrating Hormone (RPCH) ทำหน้าที่ควบคุมการรวมตัวของรงควัตถุภายในตาในการเปลี่ยนสีตัว Pigment Dispersing Hormone (PDH) ทำหน้าที่ควบคุมการกระจายตัวของรงควัตถุในโครมาโตฟอร์ Molt Inhibiting Hormone (MIH) ทำหน้าที่ควบคุมการลอกคราบ Crustacean Hyperglycaemic Hormone (CHH) ทำหน้าที่ควบคุมการหมุนเวียนของระดับกลูโคสในเลือด Gonad Inhibiting Hormone (GIH) หรือ Vitellogenesis Inhibiting Hormone (VIH) ทำหน้าที่ควบคุมการพัฒนาของรังไข่ นอกจากนี้ยังมีการค้นพบเปปไทด์ฮอร์โมนอีกหลายชนิดในก้านตาของสัตว์ในกลุ่มนี้เช่น FMRF amide, Small Cardioactive Peptide (SCP), Substance P, Proctolin, cholecystokinin (CCK) และมีอีกหลายชนิดที่กำลังศึกษาอยู่ซึ่งยังไม่สามารถระบุชนิดได้

ในการศึกษาถึงฮอร์โมนของสัตว์ในกลุ่มนี้ ในขั้นตอนของการสกัดแยกให้ได้สารบริสุทธิ์และหาหน้าหนักโมเลกุลนั้นเราได้ประสบความสำเร็จเป็นอย่างมาก สามารถสกัดแยกเปปไทด์จากก้านตาของกุ้งกุลาดำและกุ้งก้ามกรามนำมาหาหน้าหนักโมเลกุลได้หลายชนิด ชิดา อมร สามารถสกัดแยกสารคล้าย CCK จากก้านตากุ้งกุลาดำได้ 3 รูปแบบโดยมีหน้าหนักโมเลกุล 1,941.5, 1960.6 และ 1,914.1 ดาลตัน ตาม

ลำดับ (ธิดา อมร, 2541) ต่อมา จีรศักดิ์ ผู้ปลื้ม สามารถสกัดแยกสารคล้าย FMRFamide จากก้านตาของ กุลาดำได้ 18 รูปแบบ มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 990.7-2,679.3 ดาลตัน (จีรศักดิ์ ผู้ปลื้ม, 2542) สมปอง ใจดีเฉย สกัดแยก CHH จากก้านตาของก้ามกรามได้ 1 รูปแบบและอีกหลายรูปแบบที่ยังไม่สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ (สมปอง ใจดีเฉย, 2539) วิธีการหาน้ำหนักโมเลกุลจะหาโดยใช้เครื่อง Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF) สำหรับขั้นตอนของการหา ลำดับกรดอะมิอนั้น ยังไม่ก้าวหน้าเท่าที่ควร เนื่องจากเราไม่สามารถหาลำดับกรดอะมิอนี้ได้เอง ต้องส่งไปหาลำดับกรดอะมิอนี้ที่ต่างประเทศทำให้ล่าช้า ราคาแพง ส่งผลให้งานวิจัยและการพัฒนาในด้านอื่นๆ ล่าช้าตามไปด้วย

การเรียงลำดับของกรดอะมิอนในสายโปรตีนเป็นลักษณะจำเพาะของโปรตีนนั้นๆ การหาลำดับกรดอะมิอนจึงเป็นวิธีการที่ทำให้เราสามารถจำแนกชนิดของโปรตีนได้ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อ การศึกษาในงานวิทยาศาสตร์ด้านต่างๆเช่น ด้านการจัดจำแนกสิ่งมีชีวิต (Taxonomy) ด้านวิวัฒนาการ (evolution) ด้านพันธุกรรม (genetic) ด้านการสังเคราะห์โปรตีน (protein synthesis) สำหรับวิธีการหา ลำดับกรดอะมิอนี้มีผู้คิดค้นมานานแล้วโดย Ferric Sanger สามารถหาลำดับกรดอะมิอนของอินซูลิน จากวัวได้เป็นคนแรกในปี ค.ศ.1953 แต่วิธีที่ได้รับความนิยมในปัจจุบันคือวิธี Edman degradation คิดค้นโดย Perb Edman ในปี ค.ศ.1956 วิธีนี้มีหลักการคือการใช้ Phenyl isothiocyanate (PITC) ไปจับกับ กรดอะมิอนตรงปลาย N-terminal ของสายเปปไทด์ ได้สารที่เรียกว่า PTC polypeptide หลังจากนั้นใช้ Thiazolinone derivative มาชะล้างเอากรดอะมิอนตัวที่โดนจับให้หลุดออกมาเป็นกรดอะมิอนตัวเดียวๆ แล้วแยกนำไปวิเคราะห์ต่อว่าเป็นกรดอะมิอนตัวใด โดยต้องทำอย่างนี้กับกรดอะมิอนทุกตัวจนกว่าจะหมดสายเปปไทด์ (Voet And Voet, 1995) วิธีนี้มีข้อเสียคือใช้ปริมาณสารตัวอย่างจำนวนมาก ใช้เวลา ทำนานและยังทำให้โปรตีนเกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพ (Arnott et al, 1993) จะเห็นได้ว่าวิธีนี้ไม่เหมาะ ในการหาลำดับกรดอะมิอนของเปปไทด์ที่สกัดได้จากก้านตาของกิ้ง เนื่องจากสารที่สกัดได้มีปริมาณ น้อย ในการสกัดแต่ละครั้งต้องใช้ปริมาณกิ้งจำนวนมาก จากการศึกษพบว่าในการสกัดแยกเปปไทด์ จากก้านตาของกิ้งก้ามกรามโดยไพศาล สิทธิกรกุล ใช้ก้านตาถึง 5,000 ก้านตา (Sithigorngul et al, 1998) ในการสกัดแยกเปปไทด์จากก้านตาของกุลาดำของธิดา อมร ใช้ก้านตาถึง 8,700 ก้านตา (ธิดา อมร, 1998) กิ้งที่ใช้มีราคาแพงจึงทำให้สิ้นเปลืองงบประมาณเป็นจำนวนมาก

ในงานวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยได้ใช้เทคนิคใหม่ในการหาลำดับกรดอะมิอนมาใช้คือการหาลำดับกรด อะมิอนโดยใช้เครื่อง Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF) ใช้เทคนิคที่เรียกว่า post source decay หรือเรียกว่าเทคนิค post source decay MALDI-TOF เทคนิคนี้คิดค้นโดย Chait ในปี1993 (Chait et al, 1993) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ยอมรับกัน

ว่าสามารถหาลำดับกรดอะมิโนได้รวดเร็ว ใช้สารตัวอย่างปริมาณน้อยโดยใช้ปริมาณสารในระดับ picomole (Huberty et al, 1993) Marco และคณะใช้เครื่อง Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF) หาลำดับกรดอะมิโนของฮอร์โมนจากก้านตากลุ่ม *Jasus lalandii* พบว่าใช้ปริมาณก้านตาประมาณ 400 ก้านตา (Marco et al, 1998) เมื่อเทียบกับวิธี gel electrophoresis, size exclusive chromatography และ sedimentation analysis เทคนิคนี้มีความรวดเร็วและแม่นยำมากกว่า (Smith and Zhang, 1994) เทคนิคนี้ยังสามารถทราบถึง post translation modification ของโปรตีนที่ใช้ในการวิเคราะห์อีกด้วย (Aebbersold and Goodlet, 2001) นอกจากนี้ยังลดขั้นตอนการทำงานโดยสามารถหาน้ำหนักโมเลกุลและลำดับกรดอะมิโนได้ในขั้นตอนเดียว ทำให้สิ้นเปลืองสารน้อย เพื่อความสะดวกในการทำและเพิ่มความน่าเชื่อถือของวิธีการ ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาโปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่มาช่วยในการตรวจสอบลำดับกรดอะมิโนที่หาได้จากเทคนิคนี้ เช่น โปรแกรม protein prospector, General/Mass Analysis (GPMW) ทำให้เราทราบว่าผลที่ได้ถูกต้องหรือไม่ ผลที่ได้จึงมีความน่าเชื่อถือมากขึ้น

ในงานวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยคาดว่า การหาลำดับกรดอะมิโนด้วยเทคนิค Post source decay Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF) หรือ post source decay MALDI TOF จะเป็นประโยชน์ต่อการหาลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์ที่สกัดจากก้านตาของกุ้งและสารสกัดเปปไทด์อื่นๆ โดยเฉพาะสารที่มีปริมาณน้อยต่อไป

### วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อใช้เทคนิค post source decay Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry หาลำดับของกรดอะมิโนของเปปไทด์ที่สกัดได้จากก้านตาของกุ้งกุลาดำ
2. เพื่อพัฒนาวิธีการหาลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์อื่นๆ โดยเฉพาะเปปไทด์ที่มีปริมาณน้อยต่อไป

### ขอบเขตของงานวิจัย

1. ใช้เทคนิค MALDI-TOF หาน้ำหนักโมเลกุลของ CHH เปปไทด์
2. ใช้เทคนิค post source decay MALDI-TOF หาลำดับกรดอะมิโนของ ACTH และ angiotensin II จากนั้นจึงนำไปใช้กับ FMRamide ที่สกัดได้จากก้านตากลุ่มก้ามกราม และ CHH เปปไทด์ที่สกัดได้จากก้านตาของกุ้งกุลาดำ
3. วิเคราะห์ผลลำดับกรดอะมิโนจากฐานข้อมูลโปรตีนโดยใช้ web search engine

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถหาลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์ที่สกัดได้จากก้านตาของกิ้งกูดำโดยใช้เทคนิค  
Post source decay Mass spectrometry ได้



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

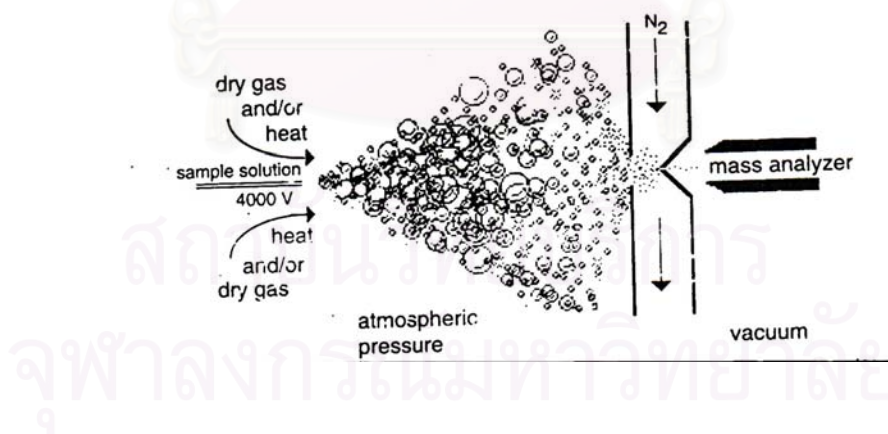
## บทที่ 2

### ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เครื่อง Mass spectrometer เป็นเครื่องมือที่ใช้หาน้ำหนักโมเลกุลของสาร ผู้ที่คิดค้นได้เป็นคนแรกคือ J.J Thomson ในปี ค.ศ. 1912 (Siuzdak, 1996) ในสมัยนั้นเป็นเครื่องมือง่าย ๆ ไม่ซับซ้อน ปัจจุบันมีการพัฒนาก้าวหน้าไปมากมีประสิทธิภาพสูงขึ้น เครื่อง Mass spectrometer เป็นเครื่องมือที่มีประโยชน์ต่องานด้านต่างๆ เช่น งานด้าน เคมี ชีวเคมี วิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีชีวภาพ และอื่นๆ อีกหลายสาขา มีการพัฒนาเครื่อง Mass spectrometer ออกมาหลายระบบ มีประสิทธิภาพสูง และเหมาะกับงานด้านต่างๆ ตัวอย่างระบบเครื่องที่ใช้กันแพร่หลาย

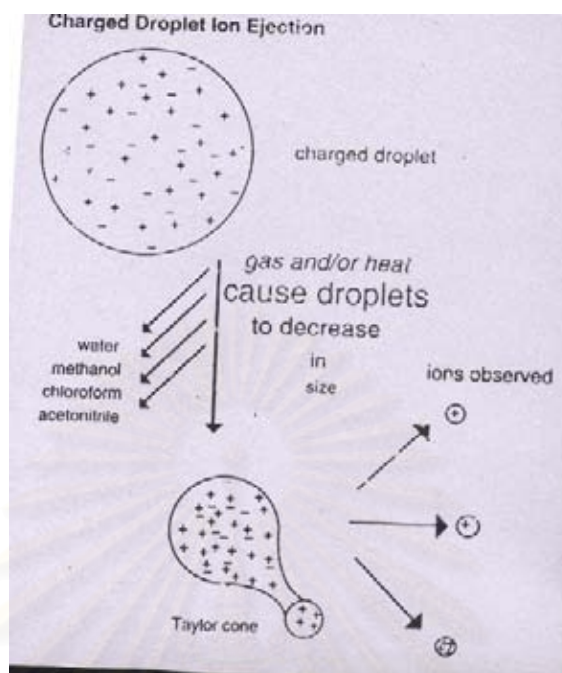
#### 2.1 เทคนิคการผลิตไอออนแบบ Electrospray Ionization Mass Spectrometry (ESI-MS)

เป็นเครื่องที่ทันสมัยระบบหนึ่ง หลักการทำงานของเครื่องจะฉีดสารตัวอย่างด้วยเข็มขนาดเล็กให้เป็นละอองฝอย ซึ่งจะทำให้สารตัวอย่างแตกตัวเป็นไอออนวิ่งเข้าไปในระบบการวิเคราะห์ของเครื่อง เครื่องระบบนี้มีข้อดีคือจะไม่โดนรบกวนโดยเมทริกซ์ (Siuzdak, 1996) และสามารถต่อกับเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) และ Gas Chromatography (GC) ได้



รูปที่ 2.1 แสดงหลักการทำให้สารตัวอย่างแตกเป็นประจุในเครื่อง Electrospray Ionization Mass Spectrometry (Siuzdak, 1996)





รูปที่ 2.2 แสดงการเกิดประจุของละอองฝอยสารตัวอย่างในเครื่อง Electro Spray Ionization Mass Spectrometry (Siuzdak, 1996)

## 2.2 เทคนิคการผลิตไอออนแบบ Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF)

เครื่อง MALDI-TOF ถูกพัฒนาโดย Karas และคณะ ในปี ค.ศ. 1987 เป็นเครื่องที่ดีกว่าระบบอื่นคือ มีความแม่นยำในการหาน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในระดับ  $\pm 0.5-0.01\%$  ทนทานต่อการรบกวนของสารปนเปื้อนในตัวอย่าง (Siuzdak, 1996) สามารถหาน้ำหนักโมเลกุลของสารได้สูงถึง 200 กิโลดาลตัน ใช้ปริมาณสารตัวอย่างจำนวนน้อย โดยใช้ปริมาณระดับ Femtomoles ถึง Picomoles เท่านั้น (Huberty, 1993) ค่าใช้จ่ายในการดูแลรักษาและการปฏิบัติงานน้อย เนื่องจากระบบของเครื่องไม่ต้องใช้ก๊าซเหมาะกับการวิเคราะห์ทางด้านชีวโมเลกุลและ โพลีเมอร์

หลักการทำงานของเครื่อง MALDI-TOF MS คือการใช้แสงเลเซอร์ยิงไปที่สารตัวอย่างที่ผสมกับเมทริกซ์ ซึ่งแห้งเคลือบบางๆ (Film) ติดอยู่บนแผ่นเหล็ก (Target) มีกระแสไฟฟ้าความต่างศักย์สูงอยู่ ทำให้สารตัวอย่างแตกตัวเกิดเป็นประจุไฟฟ้า (Ionization) วิ่งผ่านสนามแม่เหล็กไปสู่ดีเทคเตอร์ (Chait and Kent, 1992) ขนาดของประจุ หรือน้ำหนักโมเลกุลจะแปรผันตามเวลาที่ประจุวิ่งไปสู่ดีเทคเตอร์ (Siuzdak, 1996)

## สมการของเครื่อง MALDI-TOF

$$mV^2/2 = ev$$

$$V^2 = (2ev/m)$$

$$V = (2ev/m)^{1/2}$$

$$D/T = (2ev/m)^{1/2}$$

$$T = (m/2ev)^{1/2} D$$

$$T \propto (m)^{1/2}$$

m คือ มวล

V คือความเร็ว

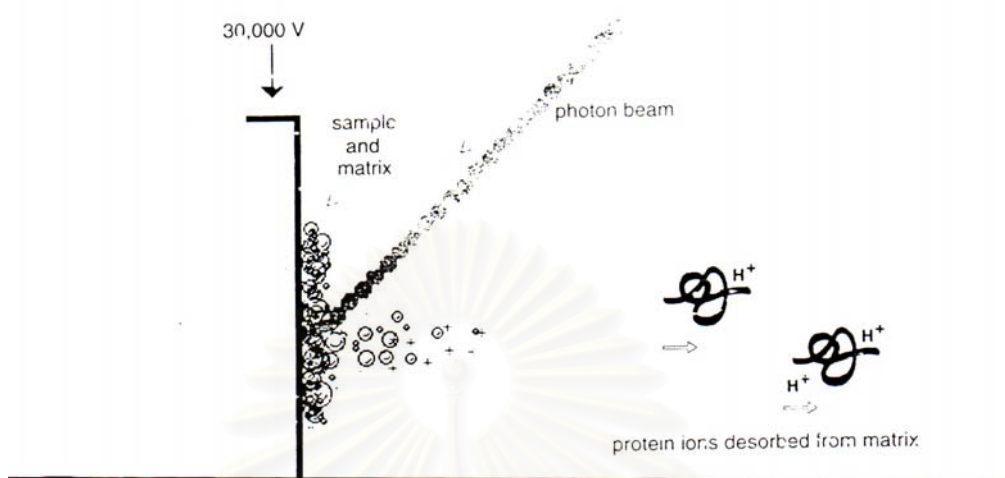
e คือค่าประจุไฟฟ้า

v คือความต่างศักย์ไฟฟ้า

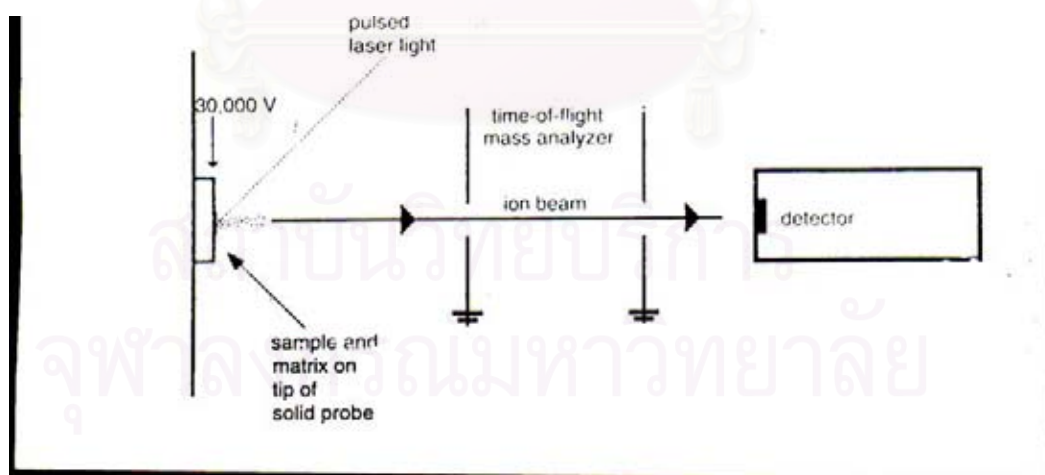
T คือเวลาที่ใช้วิ่ง

D คือระยะทาง

จากสมการแสดงให้เห็นว่า เวลาในการเคลื่อนที่ของประจุในสนามแม่เหล็ก (T) จะแปรผันตามรากที่สองของมวลของประจุ (M) ค่าที่ได้จะอยู่ในรูปของ m/z z คือค่าของประจุของสารตัวอย่างที่แตกตัว โดยค่าของประจุจะมีค่า +1, +2, หรือ +3 ขึ้นกับจำนวน H<sup>+</sup> ที่มาจับกับสารตัวอย่างที่แตกตัว แต่เครื่องในระบบ MALDI-TOF จะแตกตัวให้ประจุ +1 เป็นส่วนมาก ค่าที่ได้จึงเป็นค่าของมวลที่มีประจุ +1 ซึ่งค่าที่ได้คือค่าของมวลนั่นเอง



รูปที่ 2.3 รูปแสดงการทำให้สารแตกตัวเป็นไอออนด้วยพลังงานจากเลเซอร์ในเครื่อง MALDI-TOF (Siuzdak, 1996)



รูปที่ 2.4 แสดงหลักการทำงานของเครื่อง MALDI-TOF (Siuzdak, 1996)

### 2.3 ระบบ Linear และระบบ Reflectron ในเครื่อง MALDI-TOF MS

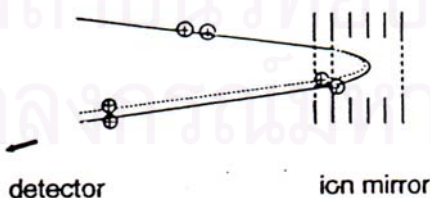
ระบบ Linear และ ระบบ Reflectron เป็นระบบที่แตกต่างในด้านของประสิทธิภาพของการตรวจวัด โดยแต่ละระบบจะมีคุณสมบัติที่แตกต่างกันดังนี้

**Linear** เป็นระบบที่สามารถหาน้ำหนักโมเลกุลของสารที่มีขนาดใหญ่ แต่จะมีความสามารถในการแยก (resolving power) ต่ำ ระบบนี้จะมี resolving power ( $m/\Delta m$ ) ประมาณ 100-400 (hwfm; half width full maximum)



รูปที่ 2.5 แสดงหลักการของระบบ Linear

**reflectron** ระบบนี้มี resolving power ( $m/\Delta m$ ) สูงกว่าระบบ Linear โดยมีค่าประมาณ 1200 (hwfm; half width full maximum) มีความแม่นยำ 0.05% (Yu et al, 1993) สามารถแยกพีคของไอโซโทปของสารออกมาได้ แต่มีข้อจำกัดคือสามารถหาน้ำหนักของสารที่มีมวลขนาดเล็ก (<3000 ดาลตัน) ระบบนี้จะจำเป็นมากในการหาลำดับกรดอะมิโน



รูปที่ 2.6 แสดงหลักการของระบบ Reflectron

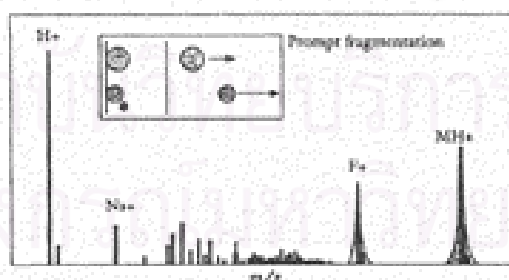
หลักการทํางานของ Reflectron คือ การสร้างสนามแม่เหล็กที่บริเวณปลายทางที่ประจุวิ่ง สนามแม่เหล็กที่เกิดขึ้นจะผลักประจุที่วิ่งเข้ามา ซึ่งประจุที่วิ่งเข้ามามีโมเมนตัมก็ไม่เท่ากัน แรงที่ประจุพุ่งเข้าไปในสนามแม่เหล็กจึงไม่เท่ากัน ทำให้เข้าไปได้ระยะลึกต่างกัน โดยประจุที่มีขนาดใหญ่จะเข้าไปได้ลึกกว่าประจุขนาดเล็ก ในช่วงที่ประจุโค่นผลักกลับออกมา ประจุที่มีขนาดใหญ่ซึ่งวิ่งเข้าไปลึกจะใช้เวลาวิ่งกลับออกมานานกว่า เครื่องจะแยกขนาดของประจุโดยใช้ความแตกต่างของเวลาช่วงนี้ แต่ Reflectron ก็มีข้อจำกัดคือ หาน้ำหนักโมเลกุลของชิ้นส่วนที่แตกตัวได้ในช่วงแคบๆ

## 2.4 การแตกตัวของสารในเครื่อง MALDI-TOF

เครื่องระบบ MALDI-TOF สารตัวอย่างที่นำมาหาน้ำหนักโมเลกุล จะเกิดการแตกตัวเนื่องมาจากพลังงานที่ได้รับจากแสงเลเซอร์ และผลของสนามแม่เหล็ก สามารถแบ่งชนิดของการแตกตัวออกเป็นสามชนิดตามตำแหน่งที่เกิดคือ

### 2.4.1 Promp fragmentation

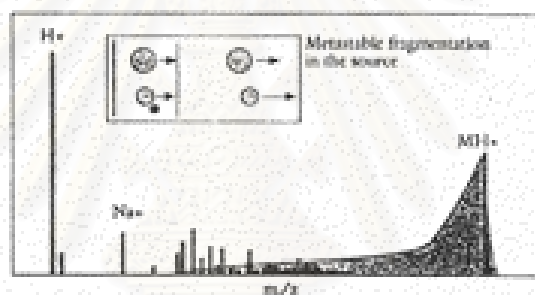
การแตกตัวแบบนี้จะเกิดที่บริเวณจุดเริ่มต้นหรือใกล้กับจุดเริ่มต้นมากๆ ชิ้นส่วนที่แตกตัวได้จะรับพลังงานและมีความเร็วเริ่มต้นเท่ากัน วิ่งเข้าสู่สนามแม่เหล็กพร้อมกัน ผลที่ได้จะเป็นไปตามกฎคือเวลาจะแปรผันตามรากที่สองของมวล ตัวอย่างแมสสเปกทรมการแตกตัวที่ได้แสดงดังรูปที่ 2.7



รูปที่ 2.7 แสดงการแตกตัวแบบ Promp fragmentation (Cotter , 1997)

#### 2.4.2 Metastable fragmentation

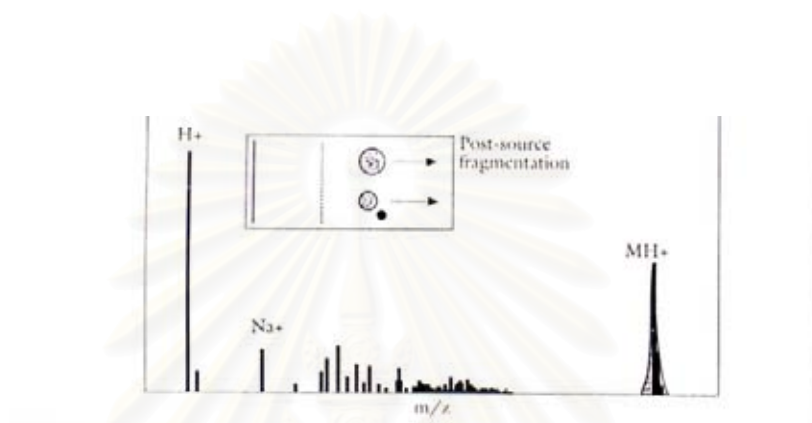
การแตกตัวแบบนี้จะเกิดบริเวณระหว่างจุดเริ่มต้นกับจุดที่เป็นสนามแม่เหล็ก ชิ้นส่วนที่ได้จะมีความเร็วเริ่มต้นไม่เท่ากัน น้ำหนักโมเลกุลของชิ้นส่วนที่แตกตัวออกมาจะไม่ถูกต้อง ทำให้เกิดสัญญาณรบกวน ตัวอย่างเมสสเปกตรัมของการแตกตัวที่ได้แสดงดังรูปที่ 2.8



รูปที่ 2.8 แสดงการแตกตัวแบบ Metastable fragmentation (Cotter, 1997)

#### 2.4.3 Post source decay fragmentation

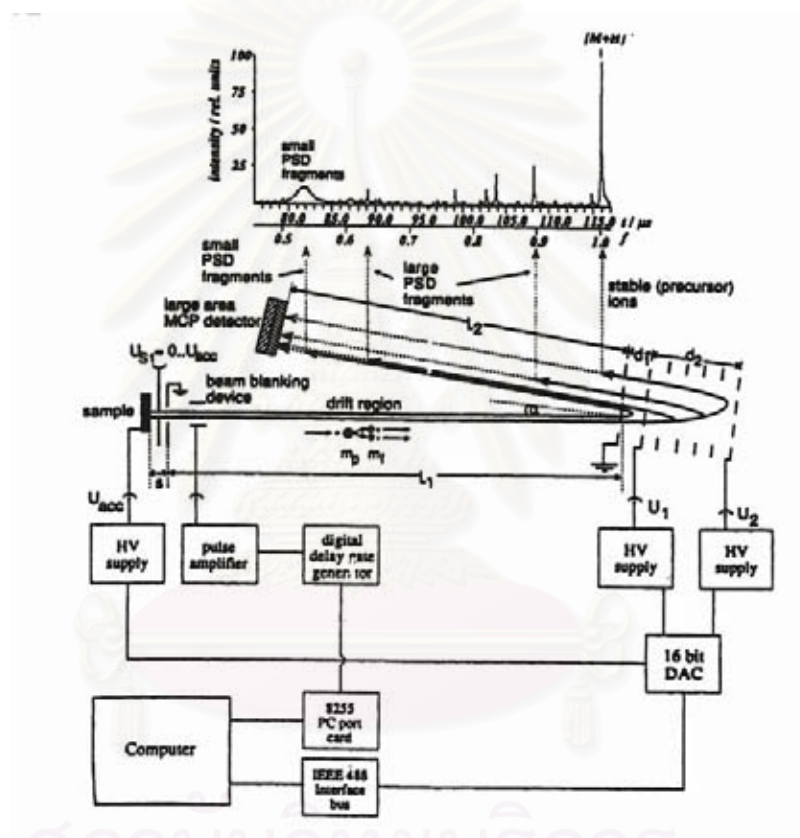
การแตกตัวแบบนี้จะเกิดในบริเวณสนามแม่เหล็กหรือบริเวณที่เรียกว่า Drift of region ประจุที่แตกตัวจะมีความเร็วเริ่มต้นเท่ากัน น้ำหนักโมเลกุลที่ได้จะมีความถูกต้อง การแตกตัวแบบนี้สามารถนำมาหาลำดับกรดอะมิโน เรียกว่าเทคนิค Post source decay mass spectrometry ตัวอย่างเมสสเปกตรัมของการแตกตัวที่ได้แสดงดังรูปที่ 2.9



รูปที่ 2.9 แสดงการแตกตัวแบบ Post source decay (Cotter , 1997)

## 2.5 การหาลำดับกรดอะมิโนด้วยเทคนิค Post source decay Mass spectrometry

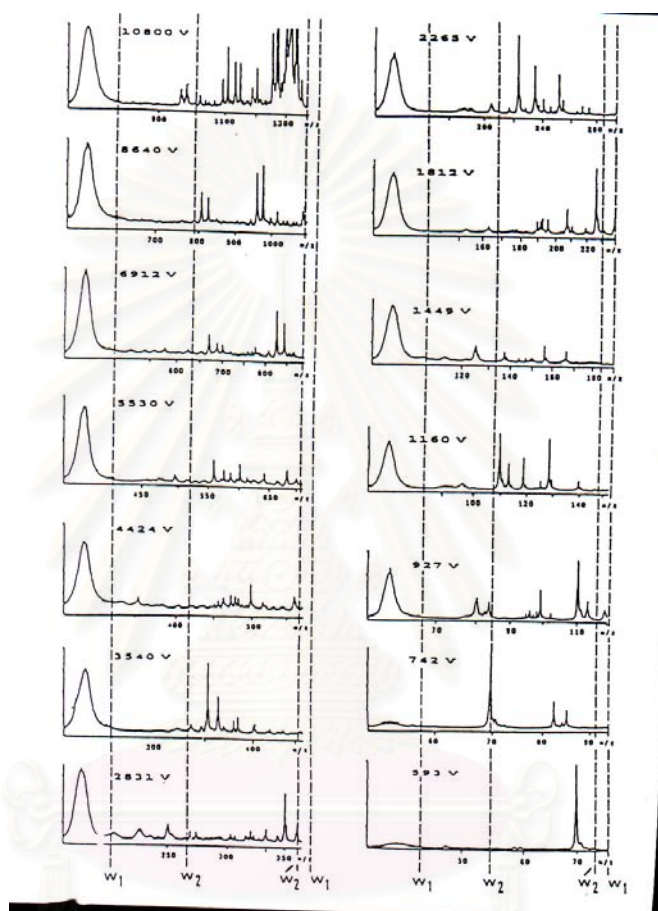
เทคนิค **Post source decay Mass spectrometry** ทำโดยการวัดขนาดน้ำหนักโมเลกุลของประจุที่แตกตัวออกมา โดยวัดเป็นช่วง ซึ่งเราสามารถกำหนดช่วงขนาดของประจุที่วิ่งเข้ามาให้อยู่ในช่วงที่เราต้องการ โดยการปรับความต่างศักย์ไฟฟ้าที่สร้างสนามแม่เหล็กของ Reflectron ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้าสูงสนามแม่เหล็กจะมีความแรงมาก ประจุขนาดเล็กไม่สามารถวิ่งเข้าไปได้ แต่ที่ความต่างศักย์ต่ำความแรงของสนามแม่เหล็กจะลดลง ประจุขนาดใหญ่จะวิ่งทะลุผ่านเลยเข้าไป แต่ประจุที่มีขนาดเล็กจะโดนผลักออกมาสู่ดีเทคเตอร์พอดี ผลที่ได้คือสเปกตรัมการแตกตัวที่ความต่างศักย์ของ Reflectron ต่างๆ โดยเครื่องจะบันทึกค่าที่วัดได้ หลังจากนั้นจะใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ต่อสเปกตรัมที่ได้เป็นสเปกตรัมแสดงน้ำหนักโมเลกุลของชิ้นส่วนที่แตกตัวได้ทั้งหมดของเปปไทด์เรียกว่า Post source decay mass spectrum



รูปที่ 2.10 ตัวอย่างแสดงการทำ post source decay (Cotter, 1997)

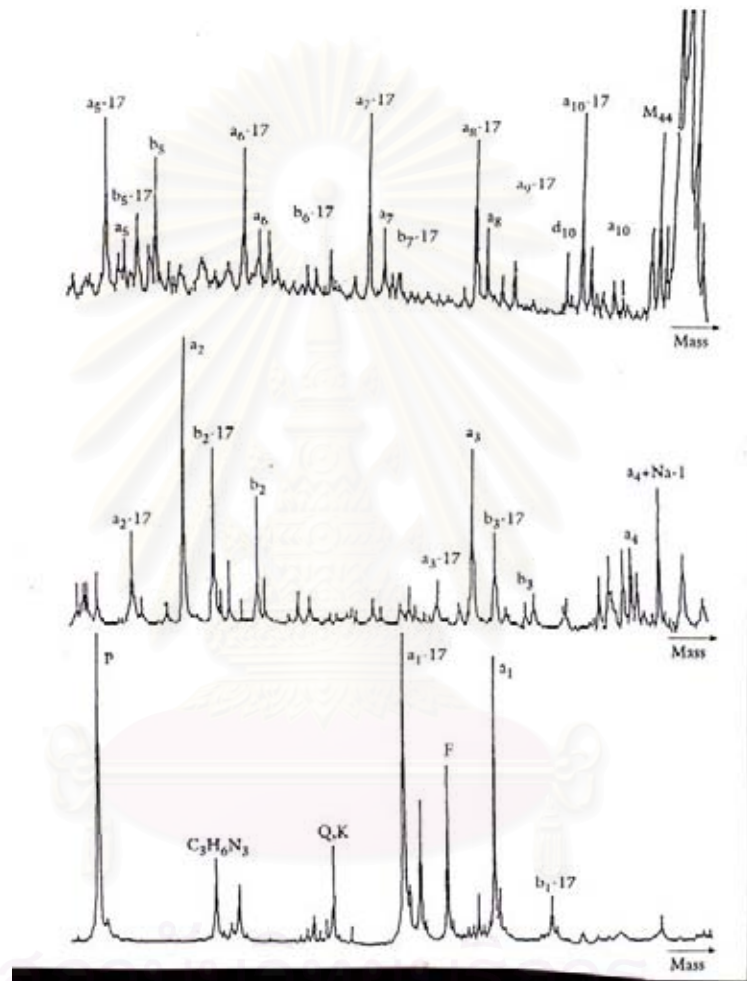
จากรูปแสดงการทำ post source decay โดยมี Reflectron เป็นอุปกรณ์สำคัญในการทำ และใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ในการประมวลผล





รูปที่ 2.11 ตัวอย่างแสดงการวัดขนาดน้ำหนักโมเลกุลเป็นช่วงโดยจะวัดที่ความต่างศักย์ต่างๆของ Reflectron (Cotter, 1997)

จากรูปแสดงน้ำหนักโมเลกุลของชิ้นส่วนต่างๆที่แตกตัวและวัดที่ความต่างศักย์ต่างๆของ reflectron เครื่องจะบันทึกน้ำหนักโมเลกุลในช่วงน้ำหนัก  $w_2$ ---- $w_2$  หลังจากนั้นจะนำค่าที่ได้แต่ละช่วงมาต่อกันเป็นแมสสเปกตรัมแสดงน้ำหนักของชิ้นส่วนต่างๆที่แตกตัวเรียกว่า Post source decay mass spectrum ดังรูปที่ 2.12

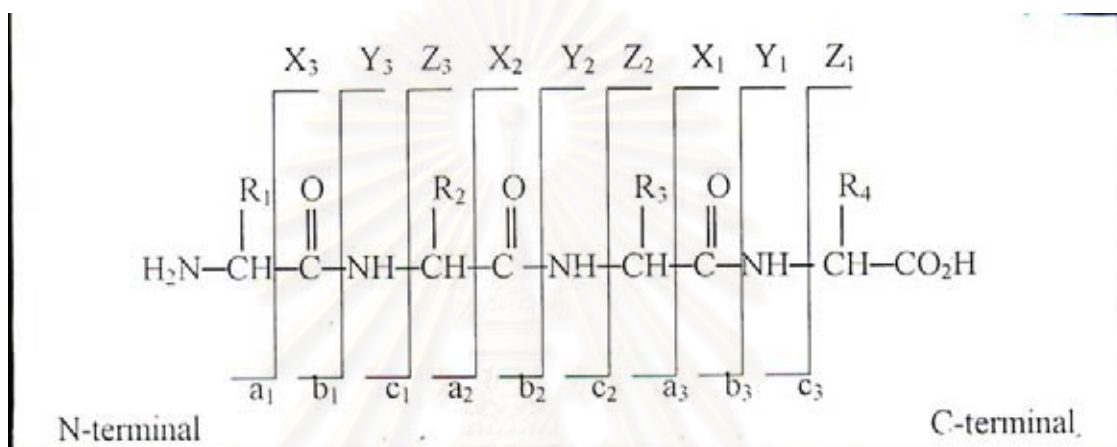


รูปที่ 2.12 ตัวอย่างแสดง Post source decay mass spectrum ที่ได้ (Cotter, 1997)

จากรูประบุพีคที่เป็น a ไอออน b ไอออน และพีคที่ขาดหมู่  $\text{NH}_3^+ (-17)$  ตรวจสอบความถูกต้องของพีคที่ระบุด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ และแปลผลจากพีคที่ได้เป็นลำดับกรดอะมิโน

## 2.6 รูปแบบการแตกตัวของโปรตีน

เมื่อโปรตีนแตกตัวจะขาดออกเป็นชิ้นส่วนต่างๆ เราสามารถแบ่งชนิดการแตกตัวเป็น 2 แบบ ใหญ่ๆ คือ การแตกตัวจากปลาย C-terminal การแตกตัวแบบนี้ได้ชิ้นส่วนชนิด x, y, z และการแตกตัวจากปลาย N-terminal การแตกตัวแบบนี้ได้ชิ้นส่วนชนิด a, b, c



รูปที่ 2.13 แสดงชิ้นส่วนต่างๆ ที่มีโอกาสเกิดขึ้นจากการแตกตัวของโปรตีน

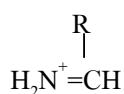
(Findlay and Geisow, 1989)

จากรูปแสดงการแตกตัวของสายเปปไทด์ ซึ่งมีการแตกตัวที่เป็นระบบ มีชื่อที่ใช้เรียกชิ้นส่วนต่างๆ ดังนี้

การแตกตัวหากขาดจากปลาย N-terminal ไปทางปลาย C-terminal ชิ้นส่วนที่ได้จะเรียกชิ้น a<sub>1</sub>, b<sub>1</sub>, c<sub>1</sub>, a<sub>2</sub>, b<sub>2</sub>, c<sub>2</sub>, a<sub>3</sub>, b<sub>3</sub>, c<sub>3</sub>... a<sub>n</sub>, b<sub>n</sub>, c<sub>n</sub>

การแตกตัวหากขาดจากปลาย C-terminal ไปทางปลาย N-terminal ชิ้นส่วนที่ได้จะเรียกชิ้น z<sub>1</sub>, y<sub>1</sub>, x<sub>1</sub>, z<sub>2</sub>, y<sub>2</sub>, x<sub>2</sub>, z<sub>3</sub>, y<sub>3</sub>, x<sub>3</sub>... z<sub>n</sub>, y<sub>n</sub>, x<sub>n</sub>

สำหรับชิ้น a<sub>1</sub> จะมีชื่อเรียกว่าชิ้น immonium ion เนื่องจากเมื่อขาดออกมาจะเกิดพันธะคู่ที่ตำแหน่ง N และ C ได้เป็น



immonium ion จะมีน้ำหนักโมเลกุลจำเพาะในกรดอะมิโนแต่ละตัว

## 2.7 เมทริกซ์ (Matrix)

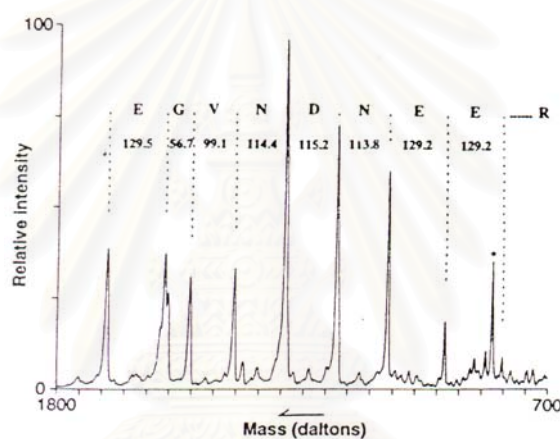
เมทริกซ์เป็นสารที่ทำหน้าที่ดูดพลังงานจากเลเซอร์แล้วถ่ายพลังงานให้แก่สารตัวอย่าง ทำให้สารตัวอย่างแตกตัวเป็นไอออน (Fitzgerald et al, 1993) เมทริกซ์เป็นสารสำคัญในเครื่องระบบ MALDI TOF สารที่ใช้เป็นเมทริกซ์มีด้วยกันหลายชนิด แต่ละชนิดเหมาะกับสารตัวอย่างที่แตกต่างกันแสดงดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 แสดงเมทริกซ์และคุณสมบัติของแต่ละชนิด (Kellner et al, 1994)

Matrix	Wavelength [nm]	Comments
2,5-dihydroxy benzoic acid (DHB)	337, 355	
DHB + 10% 5-methoxy salicylic acid	337, 355	used for masses >20 000 Da
Sinapinic acid	337, 355	
$\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid	337, 355	produces more highly charged molecular ions
Nicotinic acid	266	
4-hydroxy picolinic acid	337, 355	used for oligonucleotides
Succinic acid	2.94, 10.6 $\mu$ m	
Glycerol	2.94, 10.6 $\mu$ m	liquid matrix

## 2.8 การแปลผล Post source decay mass spectrum เป็นลำดับกรดอะมิโน

การแปลผลจาก Post source decay mass spectrum นั้น ทำได้โดยการดูความแตกต่างของพีคในช่วงความแตกต่างของแต่ละพีคจะตรงกับน้ำหนักโมเลกุลของกรดอะมิโนตัวใดตัวหนึ่ง เมื่อเราทราบว่าเป็นกรดอะมิโนตัวใด สามารถนำมาเรียงเป็นลำดับกรดอะมิโนสายเค็มได้ (Chait et al, 1993) สิ่งที่เราต้องทราบในการแปลผลคือน้ำหนักของกรดอะมิโนทุกตัว



รูปที่ 2.14 แสดง Post source decay mass spectrum ที่ได้และการแปลผล (Chait et al, 1993)

การแตกตัวของเปปไทด์ส่วนมากจะได้ชิ้นส่วนชนิด b และชนิด a ชิ้นส่วนชนิดนี้เกิดจากการขาดจากปลาย N-terminal ไปสู่ C-terminal ดังนั้นลำดับกรดอะมิโนที่หาได้จะเรียงจากปลายปลาย N-terminal ไป C-terminal

จากโครมาโตแกรมจะเห็นได้ว่าเมื่อเราดูที่ผลต่างของแต่ละพีคก็จะเท่ากับน้ำหนักโมเลกุลของกรดอะมิโนพอดีสามารถเรียงตามลำดับได้เป็นกรดอะมิโนจากปลาย N-terminal ไปสู่ C-terminal ได้ดังนี้

Leu-Arg-Arg-Ala-Pro-Gly-Leu-Ile-Tyr-Asn-Asn

## 2.9 ลักษณะทางชีววิทยาของกุ้งกุลาดำ

### 2.9.1 ลักษณะทั่วไปของกุ้งกุลาดำ

การจัดหมวดหมู่กุ้งกุลาดำตามหลักอนุกรมวิธาน(Solis, 1988)

Phylum	Arthropoda
Class	Crustacea
Subclass	Malacostraca
Order	Decapoda
Suborder	Natantia
Inflaorder	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) ใช้อ้างอิงคือ Giant tiger prawn เป็นกุ้งทะเลที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในวงศ์ Penaeidae แหล่งกำเนิดดั้งเดิมอยู่ในทะเลแถบอินโดแปซิฟิกตะวันตก ออฟริกาตะวันออกและตะวันตกเฉียงใต้ และคาบสมุทรอินเดีย (พรตทิภา หาญวิวัฒน์กิจ, 2532) มีถิ่นอาศัยอยู่ที่น่านน้ำแถบใต้หวัน ไทย มาเลเซีย อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ และพบมากในออสเตรเลีย และอินเดีย ในประเทศไทยพบทั่วไปในอ่าวไทย และพบมากในบริเวณนอกฝั่งทะเลจังหวัดชุมพรถึงนครศรีธรรมราช และทางด้านทะเลอันดามันบริเวณนอกฝั่งของจังหวัดระนองและภูเก็ต ชอบอาศัยในบริเวณที่มีพื้นดินเป็นดินทรายปนโคลนหรือทรายปนเปลือกหอยและหินปะการังและสามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมในแหล่งน้ำกร่อยหรือในบ่อเลี้ยงได้ (ปกรณ อุ่นประเสริฐ, 2531 ; สุวิทย์ ชื่นสินธุ์, 2531)

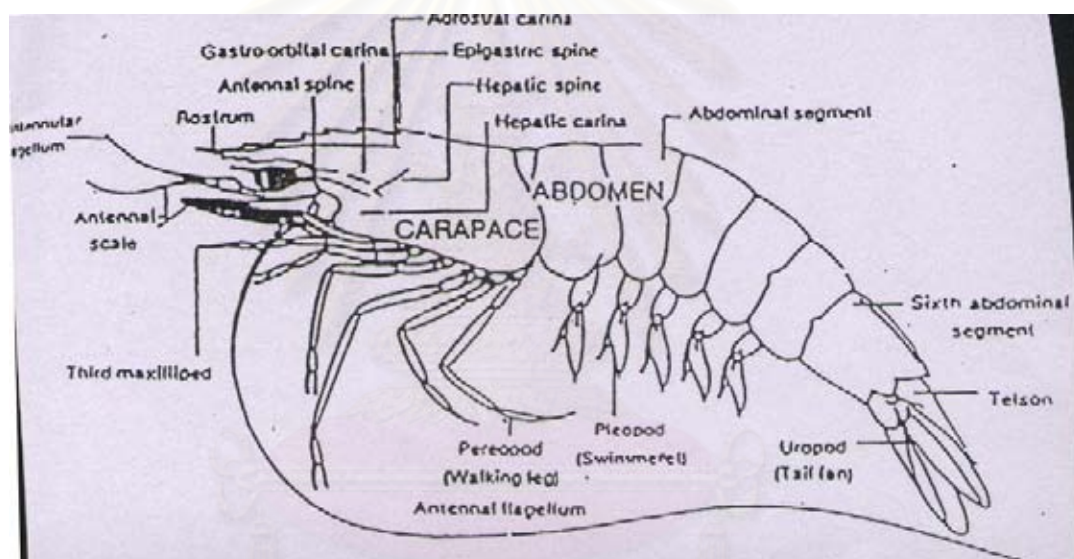
กุ้งมีลำตัวเป็นข้อปล้อง ทั้งหมดมีประมาณ 19 ปล้อง แต่ละปล้องมีระยางค์หนึ่งคู่ ระยางค์แต่ละคู่มีหน้าที่แตกต่างกัน ลำตัวของกุ้งแบ่งออกได้สามส่วนใหญ่ ๆ คือ หัว ออก และลำตัว ส่วนหัวมีห้าปล้อง แต่รวมเป็นปล้องเดียว มีเปลือกคลุม เปลือกหุ้มตัวตอนหน้าสุดของปล้องที่หนึ่งจะยื่นเป็นฟันแหลมไป

ข้างหน้าเรียกว่า กริ ได้กริมิตาหนึ่งคู่ ปากกึ่งอยู่ระหว่างขากรรไกร ส่วนหัวมีระยางค์ห้าคู่ สองคู่แรกเป็นหนวดใช้ในการสัมผัส ระยางค์คู่ที่สามได้แก่ ขากรรไกรล่าง มีหน้าที่ในการขบเคี้ยวอาหาร ส่วนคู่ที่สี่และคู่ที่ห้าเป็นขากรรไกรบน มีหน้าที่เช่นเดียวกับขากรรไกรล่าง ส่วนอกมีแปดปล้อง ได้แก่ ปล้องที่ 6-13 ระยางค์สามคู่แรก (ระยางค์คู่ที่ 6, 7 และ 8) อยู่บนอกเรียกว่า maxillipeds มีหน้าที่ช่วยในการกินอาหาร ระยางค์คู่ที่ 9, 10 และ 11 มีลักษณะเป็นก้าม ก้ามแต่ละคู่จะมีขนาดและความยาวใกล้เคียงกัน อันเป็นลักษณะเฉพาะของกุ้งทะเลในวงศ์ Penaeidae ระยางค์สามคู่นี้ มีหน้าที่ช่วยในการจับฉวยอาหารเข้าปาก หรือป้องกันตัวเมื่อมีภัย ส่วนระยางค์คู่ที่ 12 และคู่ที่ 13 เป็นขาใช้สำหรับเดิน เคลื่อนไหว และทำความสะอาดลำตัว ลำตัวมีหกปล้อง เปลือกปล้องที่สองไม่ทับปล้องแรก ระยางค์คู่ที่ 14, 15, 16, 17 และ 18 มีลักษณะคล้ายใบพายใช้สำหรับว่ายน้ำ ส่วนระยางค์คู่ที่ 19 หรือหางประกอบด้วยแพนหางและหางรูปพัดยกขึ้นลงได้ตามต้องการ (บรรจง เทียนส่งรัมย์, 2530)

กุ้งกุลาดำเป็นกุ้งทะเลที่มีขนาดลำตัวใหญ่ มีหนวดหลายไม่เด่นชัด กริอยู่ในแนวระนาบซึ่งมีสันแนวเฉียงไปทางตาคุ้ง กริด้านบนมีฟัน 6-8 ซี่ ด้านหลังมี 2-4 ซี่ ในขณะที่ยังมีชีวิตอยู่ลำตัวจะเป็นสีม่วงแดง มีแถบสีน้ำตาลหรือดำพาดขวางลำตัวด้านหลังเป็นปล้อง ๆ ประมาณ 9 ลาย ที่ขอบหางและขาว่ายน้ำมีขนเล็ก ๆ สีน้ำตาลอมแดง และปลายขาเดินคู่ที่ 1, 2 มีสีน้ำตาลเข้ม (สุวิทย์ ชื่นสินธุ์, 2531)

## 2.9.2 การผสมพันธุ์

การผสมพันธุ์จะเกิดขึ้นหลังจากที่ตัวเมียลอกคราบใหม่ ๆ เพราะตัวผู้สามารถที่จะสอดถุงน้ำเชื้อเข้าไปในตัวเมียในระยะนี้เท่านั้น โดยกุ้งตัวผู้ 1-3 ตัว จะว่ายน้ำไล่ตามกุ้งตัวเมีย ขณะที่กุ้งตัวเมียว่ายน้ำในแนวตั้งขึ้นสู่ผิวน้ำในระยะประมาณ 50-80 เซนติเมตร โดยจะมีกุ้งตัวผู้เพียงตัวเดียวที่ว่ายน้ำตามขึ้นไปทันและขนานกับกุ้งตัวเมีย โดยจะอยู่ทางด้านล่างของตัวเมีย ต่อมากุ้งตัวผู้จะหงายท้องของมันติดกับด้านท้องของตัวเมีย เมื่อท้องติดกันแล้วสักครู่ตัวผู้จะหมุนตัวกลับอย่างรวดเร็วและกอดรัดตัวเมีย โดยจะงอตัวของมันและยกหัวขึ้น ตัวผู้จะกระดกหัวและหางเป็นจังหวะต่อเนื่องกัน ซึ่งจะเป็นระยะที่ตัวผู้สอดถุงน้ำเชื้อเข้าไปอยู่ในตัวเมีย จนกระทั่งถึงเวลาที่กุ้งพร้อมที่จะวางไข่ ตัวเมียก็จะปล่อยเชื้อตัวผู้ออกมาผสมกับไข่ที่ละน้อยติดต่อกัน แต่ถ้าตัวเมียยังไม่พร้อมที่จะวางไข่เนื่องจากรังไข่ยังไม่เจริญเต็มที่ ถุงน้ำเชื้อก็จะถูกบีบออกมาพร้อมกับเปลือกในระหว่างการลอกคราบครั้งต่อไป การลอกคราบจะมีขึ้นทุก 2-3 อาทิตย์ และระยะในการลอกคราบประมาณ 5 วัน ซึ่งจะเกิดขึ้นเฉพาะกลางคืน และกุ้งก็จะกอดรัดเพื่อผสมพันธุ์เฉพาะในตอน กลางคืนหลังการลอกคราบ ถุงน้ำเชื้อใหม่ก็จะถูกสอดเข้าไปอีกครั้งในตัวเมียตัวหนึ่งสามารถรับ น้ำเชื้อตัวผู้มากกว่า 2 ตัวขึ้นไป (สมชาย คำนิงถิ่น, 2532)



## สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 2.15 โครงสร้างภายนอกโดยทั่วไปของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* (Solis, 1988)



### 2.9.3 วงจรชีวิต

กุ้งกุลาดำวางไข่ในทะเล กุ้งที่มีอายุประมาณ 12-13 เดือน จะวางไข่ในทะเลลึกที่ระดับน้ำประมาณ 15-30 เมตร ใกล้กับพื้นทะเล กุ้งขนาด 70-150 กรัม จะวางไข่ครั้งละประมาณ 1,000,000-1,200,000 ฟอง กุ้งชนิดนี้ส่วนมากจะผสมพันธุ์กันในเวลากลางคืน โดยตัวผู้จะสอดอวัยวะเพศที่เรียกว่า เพ็ทสมา (petesma) เข้าไปในอวัยวะเพศเมียที่เรียกว่า ทีไลคัม (thelycum) พร้อมกับปล่อยน้ำเชื้อเข้าไปเก็บไว้ในถุงเก็บน้ำเชื้อเพื่อรอโอกาสที่จะผสมกับไข่ในระยะหลัง เมื่อไข่แก่และสุกเต็มที่ก็จะถูกขับออกมาทางช่องเพศตรงโคนขาเดินคู่ที่สามและจะได้รับการผสมกับน้ำเชื้อตัวผู้ ซึ่งจะไหลออกจากถุงเก็บน้ำเชื้อทางรูเปิดเล็ก ๆ ที่บริเวณขาเดินคู่ที่สี่ของตัวเมีย แม่กุ้งจะใช้เวลาวางไข่ครั้งหนึ่ง ๆ ประมาณ 3-5 นาที ไข่ที่ผสมแล้วขณะที่ปล่อยสู่ทะเลใหม่ ๆ จะมีลักษณะกลม ไข่จะค่อย ๆ พัฒนาจนฟักเป็นตัวภายในเวลาประมาณ 15 ชั่วโมง กุ้งวัยอ่อนจะวิวัฒนาการและเปลี่ยนรูปร่างไปตามขั้นตอน และเมื่อถึงบริเวณชายฝั่งก็จะเลี้ยงตัวอยู่ในบริเวณนี้จนกระทั่งโตเต็มวัยจึงอพยพกลับสู่ทะเลและผสมพันธุ์วางไข่ต่อไปอีก (วัลลภ คงเพิ่มพูน, 2532)

### 2.9.4 การวิวัฒนาการและการเปลี่ยนรูปร่างของกุ้ง

#### 1. ลูกกุ้งวัยอ่อนระยะที่หนึ่ง (nauplius)

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

#### 2. ลูกกุ้งวัยอ่อนระยะที่สอง (zoea)

ลูกกุ้งจะมีลำตัวยาวขึ้น ส่วนหัวโตเห็นได้ชัด ลูกกุ้งจะค่อย ๆ ลอยตัวขึ้นสู่ผิวน้ำและเริ่มกินอาหาร ซึ่งส่วนใหญ่เป็นพวกแพลงค์ตอนพืชขนาด 50-100 ไมครอน ลูกกุ้งจะเริ่มออกไปไกลฝั่งมากขึ้น กุ้งจะอยู่ในระยะนี้ประมาณ 4-5 วัน ลอกคราบ 3 ครั้ง แต่แต่ละครั้งรูปร่างจะเปลี่ยนไปจากเดิม ระยะนี้ถือเป็นระยะสำคัญมากที่สุด หากลูกกุ้งผ่านระยะนี้ไปได้ก็มักมีอัตราการรอดตายสูง

### 3. ลูกกุ้งวัยอ่อนระยะที่สาม (mysis)

ลูกกุ้งในระยะนี้มีลักษณะคล้ายพ่อแม่มากขึ้น ลำตัวมองเห็นเป็นส่วนหัวและส่วนท้อง ขาคำหรับเดินมองเห็นชัดขึ้น เริ่มมีข้อปล้อง แต่การว่ายน้ำยังอยู่ในลักษณะหัวจิ้งลงอยู่ ระยะนี้สามารถกิน โรติเฟอร์ (Rotifer) ไรน้ำเค็ม (artemia) ไข่แดง ระยะนี้ใช้เวลา 3-4 วัน ลอกคราบรวม 3 ครั้ง

### 4. ลูกกุ้งวัยอ่อนระยะที่สี่

ลูกกุ้งจะเริ่มว่ายน้ำเชิงขึ้นเหมือนพ่อแม่ จะอยู่ในระยะนี้ประมาณ 7 วัน ลอกคราบ 3 ครั้ง มีลำตัวยาว 5.56 มิลลิเมตร เริ่มมีระยางค์เกือบครบเหมือนกุ้งเต็มวัย

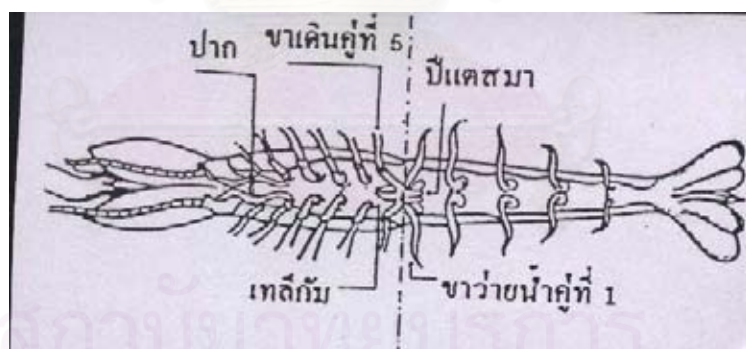
จากกุ้งวัยอ่อนระยะที่สี่นี้ ลูกกุ้งจะวิวัฒนาการ ไปเรื่อย ๆ จนเข้าสู่วัยรุ่น (Juvenile) กุ้งจะอยู่ระยะที่สี่นี้ประมาณ 30 วัน มีความยาวประมาณ 1.2-2 เซนติเมตร หนักประมาณ 1.01-1.02 กรัม ลูกกุ้งในระยะนี้จะเลี้ยงตัวอยู่บริเวณป่าไม้ชายเลน หรือในแหล่งน้ำกร่อยประมาณ 3-4 เดือน ก็จะโตเป็นกุ้งวัยรุ่น เมื่อมีอายุได้ประมาณ 6 เดือน กุ้งจะเดินทางออกสู่ทะเลเพื่อผสมพันธุ์ต่อไป (พรรณนิภา หาญวิวัฒนกิจ, 2532)

#### 2.9.5 การลอกคราบ

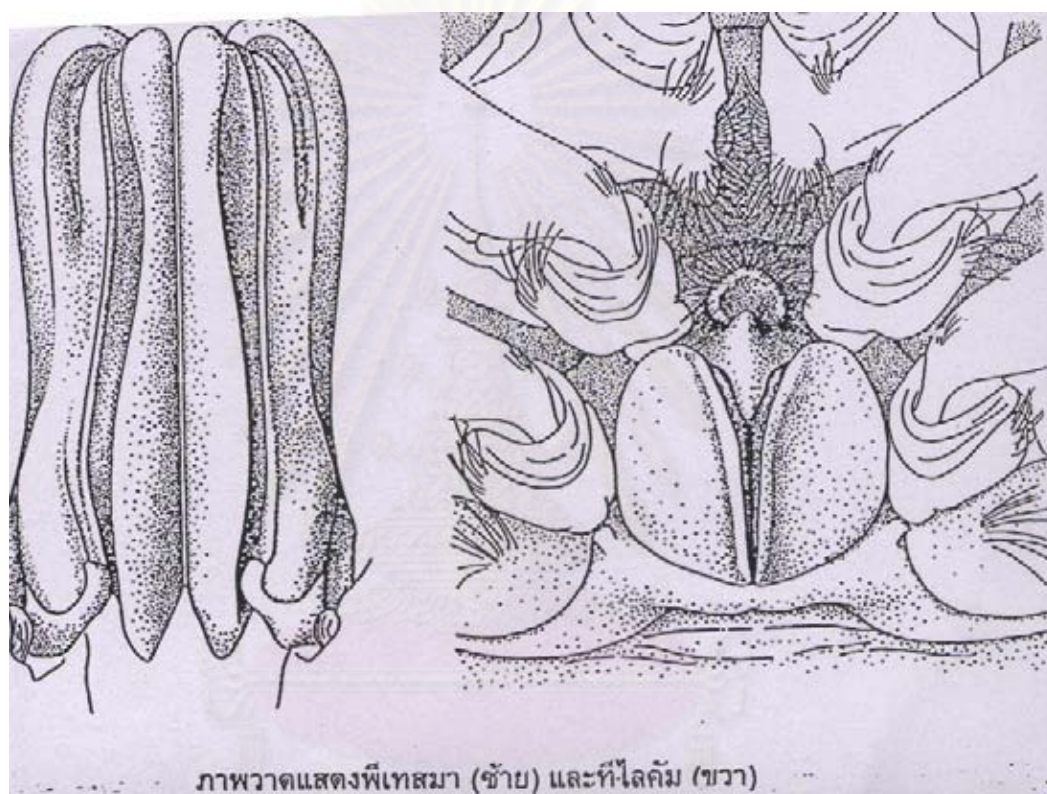
กุ้งจำเป็นต้องลอกคราบเพื่อการเจริญเติบโต ทั้งนี้เพราะเปลือกกุ้งเป็นอวัยวะที่ไม่สามารถเพิ่มขนาดได้เหมือนกับเปลือกหอยหรือกระดองเต่าได้ ดังนั้นในการเพิ่มขนาดตัวของกุ้งแต่ละครั้งจึงจำเป็นต้องสลัดเอาเปลือกเก่าทิ้งไปแล้วสร้างเปลือกใหม่ที่มีขนาดใหญ่กว่าขึ้นมาแทน กุ้งจะเริ่มลอกคราบตั้งแต่ฟักออกจากไข่เพียงไม่กี่ชั่วโมง และจะลอกคราบไปเรื่อย ๆ ตลอดชีวิตก่อนที่กุ้งจะลอกคราบจะมีการสะสมอาหารในร่างกายมากกว่าปกติโดยเฉพาะสารที่สร้างเปลือก 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)

### 2.9.6 ความแตกต่างระหว่างกุ้งกุลาดำเพศผู้และเพศเมีย

กุ้งกุลาดำเป็นสัตว์ที่มีเพศแยกกัน โดยปกติกุ้งเพศเมียมักจะมีขนาดใหญ่กว่ากุ้งเพศผู้ที่อายุเท่ากัน การที่จะแยกได้ว่าเป็นกุ้งเพศเมียหรือกุ้งเพศผู้ได้นั้น สังเกตได้จากกุ้งเพศผู้จะมีพีเทสมาซึ่งพัฒนามาจากส่วนของแขนงอันใน (endopod) ของระยางค์ว่ายน้ำคู่ที่หนึ่ง พีเทสมามีลักษณะคล้ายเคียวอย่างแข็ง 2 อัน ซ้ายขวาติดกันด้วยคิวติเคิล (cuticle) บาง ๆ ทับซ้อนกันที่บริเวณ โคนขา และสามารถคลี่ออกเป็นแผ่นกว้างได้ กุ้งวัยรุ่นเพศผู้นั้นพีเทสมาจะยึดติดกับส่วน โคนขาว่ายน้ำ เมื่อถึงการลอกคราบครั้งสุดท้ายเพื่อเป็นกุ้งโตเต็มวัย ขอบของพีเทสมาประมาณครึ่งหนึ่งจะแผ่ออกติดกันตลอดอัน และมีปุ่มคล้ายดิ่งทำหน้าที่ช่วยในการยึดติดในเวลาผสมพันธุ์ ส่วนในกุ้งเพศเมียนั้นสังเกตได้จากบริเวณส่วนท้องของตัวเมียจะมีดิ่งแบน ๆ เรียกว่าทีไลคัม มีลักษณะคล้ายลอนหรือพูเล็ก ๆ หลายอันเรียงกันอยู่ตรงบริเวณ โคนขาเดินคู่ที่สี่และห้า ซึ่งด้านในมีถุงสำหรับเก็บน้ำเชื้อตัวผู้ไว้ในเวลามีการ ผสมพันธุ์และมีท่อนำไปไข่เปิดออก โคนขาเดินคู่ที่สาม (ปิยะพงศ์ โชติพันธุ์, 2529 ; พูลศิริ พุทธิศกานนท์, 2542 ; จันทร์ทิพย์ คงสินรัตนชัย, 2543)



รูปที่ 2.16 ภาพจากด้านท้องของกุ้งกุลาดำแสดงขาว่ายน้ำ พีเทสมาและทีไลคัม (บรรจง เทียนสงรัสมิ, 2530)



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

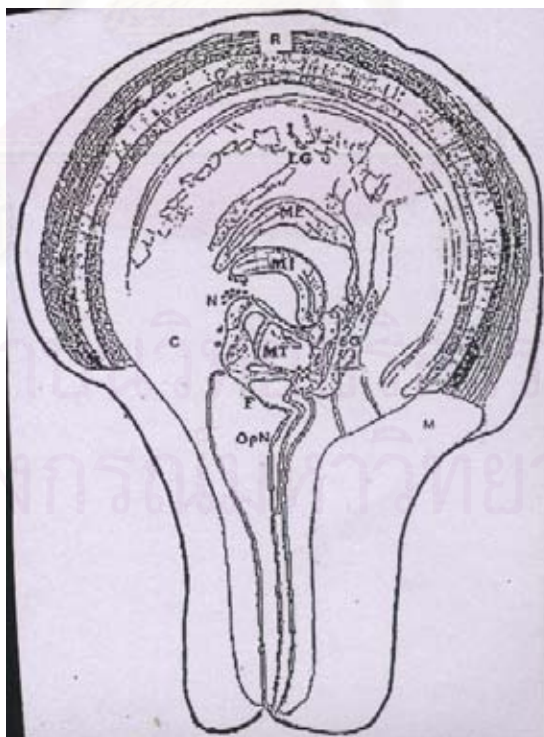
รูปที่ 2.17 ภาพวาดแสดงพีเทสมาของกึ่งกลาดำเพศผู้ (ซ้าย) และทีไลคัมของกึ่งกลาดำเพศเมีย (ขวา)

(Farfante and Kensley, 1997)

### 2.9.7 โครงสร้างภายในก้านตากลูกลาค่า

กึ่งมีตาประกอบเป็นอวัยวะรับสัมผัสซึ่งประกอบด้วยห้องเล็ก ๆ ที่เรียกว่า ออมมาทีเดีย (ommatidia) เป็นรูปกรวยจำนวนประมาณ 2,500 หน่วย แต่ละหน่วยมีม่านตา เซลล์ม่านตา 2 เซลล์ และ เซลล์เม็ดสี บริเวณฐานเป็นเซลล์ที่ไวต่อแสงเรียกเรตินา ติดต่อไปยังสมองทางเซลล์ประสาท การมองเห็นของกึ่งจึงมีเขตจำกัดในแต่ละอมมาทีเดีย และภาพซึ่งปรากฏแก่ตากลึ่งทั้งหมดนั้นจะประกอบด้วย ภาพเล็ก ๆ หลายภาพรวมกัน มองเห็นเป็นภาพเดียว (สุรินทร์ มัจฉาชีพ, 2526)

ตากลึ่งเมื่อลอกเปลือกแข็ง (Exoskeleton) ภายนอกก้านตาดอก โครงสร้างจากภายนอกเข้าไปจะเป็นเรตินา (retina, R) lamina ganglionaris (LG), ถัดเข้าไปมีปมประสาทตา (optic ganglia) ซึ่งแบ่งออกเป็น 3 บริเวณ ได้แก่ medulla externa (ME), medulla interna (MI), และ medulla terminalis (MT) ปมประสาทแต่ละบริเวณมีเซลล์ประสาท (neuronal cell body, N) ในบริเวณต่าง ๆ ของตากลึ่ง จะทำหน้าที่ผลิตฮอร์โมนส่งไปตามเส้นใยประสาท (nerve fiber) ซึ่งปล่อยออกและสะสมที่ต่อมไซนัส (sinus gland, SG) และหลังเข้าสู่กระแสเลือดหรือฮีโมลิมป์ (haemolymph) ของกึ่ง นอกจากนี้ยังมีเส้นใยประสาทเชื่อมต่อไปยังเส้นประสาทตา (optic nerve, OpN) และส่งเข้าสู่สมอง (brain) (ภาพประกอบ 2.18) (จันทร์ทิพย์ คงสินรัตนชัย, 2543)



รูปที่ 2.18 แสดงโครงสร้างภายในก้านตากลูกลาค่า

## งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการใช้เครื่อง Mass spectrometer มาหาลำดับกรดอะมิโน

จากการศึกษาค้นคว้างานวิจัยที่ผ่านมาในเรื่องของการใช้เครื่อง Mass spectrometry หาลำดับกรดอะมิโนโดยพบว่า ในปี ค.ศ. 1959 Biemann, Seibl and Gapp เป็นกลุ่มแรกที่นำเครื่อง Mass spectrometer มาหาลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์ (Siuzdak, 1996) แต่ในรายงานไม่ได้บอกรายละเอียดว่าเป็นเครื่องแบบใด ต่อมาในปี ค.ศ.1988 Michel และคณะใช้เครื่อง Tandem Quadrupole Fourier Transform Mass Spectrometry หาลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนที่อยู่ในคลอโรพลาสต์ของต้นผักขม หลังจากนั้นในปี ค.ศ.1989 Bieber และคณะได้ใช้เครื่องมือแบบเดียวกันหาลำดับกรดอะมิโนของพิษงู กะปะ

สำหรับการใช้เครื่อง MALDI TOF พบว่า ในปี ค.ศ.1993 Chait และคณะก็ประสบความสำเร็จในการใช้เครื่อง MALDI-TOF mass spectrometry หาลำดับกรดอะมิโนได้เป็นกลุ่มแรก โดยบอกว่าเทคนิคนี้เป็นเทคนิคที่ใช้ปริมาณสารตัวอย่างน้อย ทำได้รวดเร็ว สามารถอ่านผลได้ในขั้นตอนเดียว (one step readout) ต่างจากวิธี Edman degradation ที่ต้องทำหลายขั้นตอนและใช้เวลานาน หลังจากนั้นเทคนิคการหาลำดับกรดอะมิโนโดยการใช้เครื่อง MALDI-TOF mass spectrometry ก็เป็นที่นิยมทำกันแพร่หลาย ในรอบ 10 ปีมีงานวิจัยที่ใช้เทคนิคนี้มากมาย ในปี ค.ศ.1996 Veeleart และคณะได้ใช้เทคนิค Post source decay MALDI-TOF mass spectrometry หาลำดับกรดอะมิโนของ myoinhibiting peptide ซึ่งเป็นเปปไทด์ที่ทำหน้าที่ยับยั้งการบีบตัวของกล้ามเนื้อท่อนำไข่ของ *Schistocerca gregaria* ซึ่งเป็นสัตว์จำพวกคั้งเตนที่อาศัยอยู่ในทะเลทราย โดยสกัดแยกออกมาจากสมองแยกออกมาได้ 8 ชนิดและพบว่าทั้ง 8 ชนิดนี้มี Leu ที่ปลาย C-terminal เหมือนกับพวกแมงสาบและจิ้งหรีด ในปี ค.ศ.1999 Schilling และคณะได้ใช้เทคนิค Post source decay MALDI-TOF mass spectrometer หาลำดับกรดอะมิโนของ cyclic peptide โดยพบว่าเมื่อเกิดการแตกตัว วงของ peptide จะขาดออกเป็นเส้นตรงและยืนยันว่าวิธีนี้สามารถหาลำดับกรดอะมิโนของ cyclic peptide ได้ (Schilling et al, 1999) ในปีเดียวกัน Jespersen และคณะได้หาลำดับกรดอะมิโนของ neuropeptide ที่สกัดจากต่อมใต้สมองของ *Xenopus leavis* ซึ่งเป็นสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำชนิดหนึ่งโดยพบว่าสารที่สกัดได้มีน้ำหนักโมเลกุล 1,392.7 ดาลตัน จากการหาลำดับกรดอะมิโนพบว่าอยู่ในกลุ่ม vasotocin แต่ที่มี lys-Arg ที่ปลาย C-terminal แสดงว่าเป็นสารตั้งต้นของ vasotocin สารทั้งคู่นี้มี disulfide และไม่เป็นเส้นตรง ในปี ค.ศ.2000 Deng และคณะได้ใช้เทคนิค MALDI-TOF-MS-FAST หาลำดับกรดอะมิโน ของ angiotensin II และ adrenocorticotrophic hormone fragment 18-39 และรายงานว่าการทำ FAST เป็นการหาลำดับกรดอะมิโนที่รวดเร็วมีความแม่นยำสูงวิธีหนึ่งในปี ค.ศ.2001 Marvin และคณะได้ใช้เทคนิค post source decay MALDI-TOF mass spectrometry

หาลำดับกรดอะมิโนของ neuropeptide ที่ควบคุมการหดตัวของกล้ามเนื้อในสัตว์พวกหอยโดยสกัดมาจากปมประสาทของปลาหมึก นำมาหาน้ำหนักโมเลกุล โดยเครื่อง MALDI-TOF MS ได้ 756.6 ดาลตัน และใช้เทคนิค post source decay หาลำดับกรดอะมิโน ลำดับกรดอะมิโนที่ได้คือ Val-Tyr-Ser-Ala-Pro-Gly-OH พบว่า neuropeptide ปล่อยมาจากปลายเส้นประสาทไปมีผลต่ออวัยวะเป้าหมายไม่สามารถตรวจได้ในน้ำเหลือง

จากการศึกษาค้นคว้าเรื่อง CHH พบว่าในปี ค.ศ.1989 Kegel และคณะใช้เทคนิค manual microsequencing หาลำดับกรดอะมิโนของ CHH ที่สกัดได้จากปูน้ำเค็ม *Carcinus maenas* และหาน้ำหนักโมเลกุลโดยใช้เครื่อง FAB MS พบว่าประกอบด้วยกรดอะมิโน 72 หน่วยน้ำหนักโมเลกุล 8,524 ดาลตัน ในปี ค.ศ. 1995 Yang และคณะหาลำดับกรดอะมิโนของ CHH และสารคล้ายอีก 4 ชนิดจากกุ้ง *Penaeus japonicus* พบว่า CHH มีลำดับกรดอะมิโน 72 หน่วยน้ำหนักโมเลกุล 8,353 ดาลตัน ส่วนสารคล้ายอีก 4 ชนิดมีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกับ CHH มีน้ำหนักโมเลกุล 8,368, 8,487, 8,328 และ 8,314 ดาลตันตามลำดับในปี ค.ศ.1998 Marco และคณะ หาลำดับกรดอะมิโนของฮอร์โมน CHH ที่สกัดได้จากก้านตาของกุ้ง *Jansus lalandii* พบว่ามีลำดับกรดอะมิโนเหมือนสัตว์น้ำอื่น 51-76% จะมีส่วนต่างกันตรงปลาย N-terminal และพบว่าการหาลำดับกรดอะมิโนด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS ใช้จำนวนก้านตาน้อยกว่า 400 ก้านตาใน ปี 2000 Davey และคณะ ได้สกัดแยก CHH จากก้านตาของกุ้งกุลาดำได้ 5 ชนิดและใช้เครื่อง electrospray ionization-Fourier transform mass spectrometry หาลำดับ DNA จากการเปรียบเทียบในฐานข้อมูล DNA เปปไทด์ที่ได้จัดอยู่กลุ่มเหมือนกับ CHH-like type I hormones ซึ่งประกอบด้วยกลุ่มของ CHI-Is และ molt-inhibiting hormone (MIH) จากกุ้ง lobster *Homarus americanus*

### บทที่ 3

#### วิธีการทดลอง

#### 3.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

##### อุปกรณ์

1. เครื่อง Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF) รุ่น BIFLEX บริษัท Bruker ประเทศเยอรมัน
2. เครื่องชั่งแบบละเอียด (Electronic Balance) รุ่น fx-180 บริษัท A&D ประเทศญี่ปุ่น
3. เครื่องเขย่าผสม (Vortex-Mixer) รุ่น Vortex-genie No.2 บริษัท Scientific Industries ประเทศสหรัฐอเมริกา
4. Auto pipette รุ่น pipetman บริษัท Gilson ประเทศฝรั่งเศส
5. เครื่องผลิตน้ำ DDI labconco รุ่น 90005-03c-บริษัท BEC THAI ประเทศไทย
6. ตู้แช่แข็ง  $-70^{\circ}\text{C}$  รุ่น MDF 790 AI บริษัท Sanyo ประเทศญี่ปุ่น

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
1.Methanol (HPLC grade)	BDH	อังกฤษ
2.Acetonitrile (HPLC grade)	Mallinckrodt	สหรัฐอเมริกา
3.Acetone (AR grade)	Mallinckrodt	สหรัฐอเมริกา
4.Trifluoroacetic acid	Sigma	สหรัฐอเมริกา
5. $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinamic acid (CCA)	Sigma	สหรัฐอเมริกา
6.Sinapinic Acid	Sigma	สหรัฐอเมริกา
7.Human angiotensin II (Ag II)	Sigma	สหรัฐอเมริกา
8.Adrenocorticotrophic Hormone Fragment 18-39	Sigma	สหรัฐอเมริกา
9.Peptide sequence standard	Sigma	สหรัฐอเมริกา
10.Insulin from bovine pancreas	Fluka	สวิตเซอร์แลนด์



### 3.2 โพรตีนตัวอย่าง

โพรตีนตัวอย่างเป็นฮอร์โมน CHH บริสุทธิ์ที่สกัดได้จากก้านตากลุ่มกุลาดำ โดยสกัดด้วยเมทานอล-กรดอะซิติก-น้ำ (90 : 1 : 9) ดูดซับด้วย C18 Sep-Pak cartridge และทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ RP-HPLC 4 ขั้นตอน (Prepak C18 column ; mobile phase เป็น ACN / TFA, Microsorb MV C8 column ; mobile phase เป็น ACN / HFBA, Microsorb MV cyano ; mobile phase เป็น ACN / HFBA และ Microsorb MV cyano ; mobile phase เป็น ACN / TFA ตามลำดับ) และตรวจหาสารคล้าย CHH ด้วยวิธี Dot-ELISA ซึ่งใช้แอนติบอดีต่อเปปไทด์สังเคราะห์ YANAVQTV-NH<sub>2</sub> (T+) ที่ได้จาก นันทิกา ปานจันทร์ ในปี 2541 (นันทิกา ปานจันทร์, 2541) นอกจากนี้ยังมี FMRF amide สกัดจากก้านตากลุ่มก้ามกราม เป็นเปปไทด์อีกตัวที่นำมาทดสอบ

### 3.3 สารมาตรฐาน

สารมาตรฐานที่ใช้คือ Adrenocorticotropin Hormone (ACTH) Fragment 18-39 และ Human angiotensin II (Ag II)

### 3.4 การเตรียมเมทริกซ์ (Matrix)

ในการทดลองครั้งนี้ใช้  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (CCA) เป็นเมทริกซ์โดยมีวิธีการเตรียมคือ

ซึ่ง  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (CCA) 2 mg ละลายในสารละลายที่มีส่วนผสมของ acetonitrile 100  $\mu$ l และ สารละลาย 0.1% TFA 100  $\mu$ l ใช้เครื่องเขย่าผสมช่วยในการละลาย สารอาจละลายไม่หมดมีตะกอนเหลืออยู่บ้าง เก็บส่วนที่เป็นของเหลวมาใช้ หากใช้ไม่หมดเหลือเก็บไว้ในตู้เย็นสารจะมีประสิทธิภาพลดลงหากเก็บไว้เกิน 1 เดือน (Keough et al, 1999)

### 3.5 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

มีวิธีการเตรียมคือ นำสารตัวอย่างละลายใน 0.1% trifluoroacetic acid โดยเตรียมให้มีปริมาณความเข้มข้นประมาณ 1 picomol/microlite หากใช้ไม่หมดเก็บไว้ที่ 0 องศาเซลเซียสสามารถนำมาใช้ใหม่ได้

สำหรับการเตรียมตัวอย่างบน Probe เพื่อนำเข้าเครื่องวิเคราะห์มีวิธีการเตรียมดังนี้

ใช้ autopipett หยดเมทริกซ์ 1  $\mu$ l ลงบน probe แล้วหยดสารละลายตัวอย่างที่เตรียมไว้ตามลงไปปริมาณเท่ากัน ผสมให้เข้ากันโดยใช้ปลาย autopipet กดไปมาหรือดูดสารผสมด้วย autopipett แล้วพ่นออกมา 2-3 ครั้ง ใช้ air dry เป่าให้แห้ง หากสารตัวอย่างมีเกลือปนเปื้อนให้หยด

นำลงไปบนprobe ที่ไว้ 2-10 วินาทีแล้วเทออกสามารถล้างเกลือได้(Vorm et al, 1994) หลังจากนั้นเป่าให้แห้งเหมือนเดิม นำเข้าเครื่องเพื่อวิเคราะห์ ระบบสูญญากาศของเครื่องจะทำให้สารคงสภาพเดิมได้นานเกิน 10 ชั่วโมงโดยไม่มีผลต่อการตรวจวัด(Beavis and Chait, 1990)

### 3.6 การหาน้ำหนักโมเลกุล

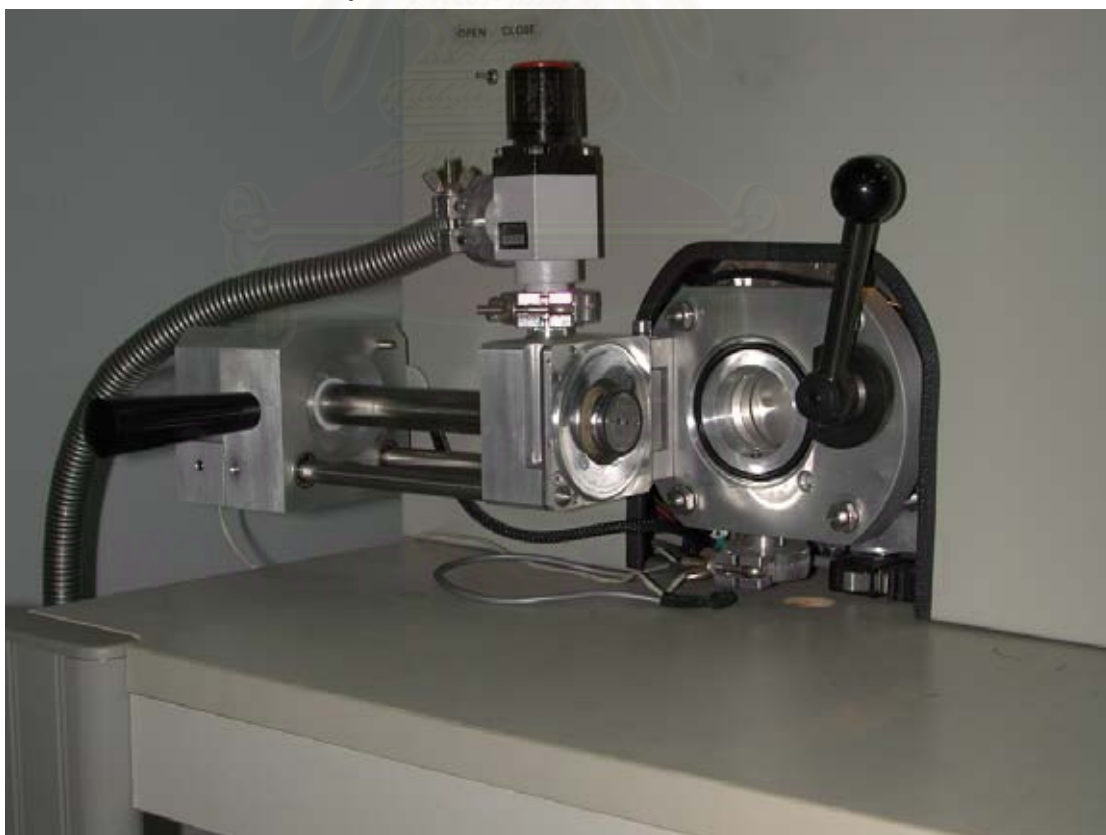
เครื่องMALDI-TOF MSที่ใช้จะมี ความแรงของ laser power 200 micro joule ความดันที่  $3 \times 10^{-6}$  mbar ความต่างศักย์ที่สารตัวอย่าง 20 kV ใช้ reflectron mode ความต่างศักย์ ที่ reflectron 20 kV ยิ่งเลเซอร์ 20-30 ครั้งทั่วทุกจุดบน probe ใช้ Adrenocorticotropic Hormone Fragment 18-39, Human angiotensin II (Ag II) และ Insulin from bovine pancreas เป็นสารมาตรฐานหาน้ำหนักโมเลกุล



รูปที่ 3.1แสดงเครื่อง BIFLEX Bruker MALDI-TOF MS



รูปที่ 3.2 แสดง Probe ที่ใส่สารตัวอย่าง



รูปที่ 3.3 แสดงตำแหน่งที่ใส่สารตัวอย่าง

### 3.7 การทำ post source decay

ทำ Post source decay ที่ความต่างศักย์ของ reflectron ต่างๆ ดังนี้คือ 20, 17.52, 14.97, 11.278, 8.487, 6.392, 4.815, 3.627, 2.728, 2.057, 1.547, 1.18, 0.94, 0.747 kV ใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่เรียกว่า FAST (Fragment Analysis Structure ToF) มาต่อแมสสเปกตรัมของแต่ละความต่างศักย์ ได้ผลเป็นแมสสเปกตรัมของการแตกตัวของสายเปปไทด์สายเดิม หรือที่เรียกว่า post source decay mass spectrum

หลังจากนั้นนำแมสสเปกตรัมที่ได้มาแปลเป็นลำดับกรดอะมิโน และเปรียบเทียบกับผลจากการคำนวณด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์เพื่อตรวจสอบความถูกต้อง

### 3.8 การตรวจสอบการหาลำดับกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม Protein prospector at JPSL ver 3.4.1

โปรแกรม Protein prospector at JPSL สามารถใช้ได้ทาง Internet website <http://jpsl.ludwig.edu.au/> โปรแกรมนี้เป็นโปรแกรมที่ได้พัฒนามาจากความร่วมมือของ Protein Structure Laboratory (Ludwig Institute (Melbourne) & The Walter and Eliza Hall Institute) and the UCSF Mass Spectrometry Facility

### 3.8 การตรวจสอบลำดับกรดอะมิโนที่ได้กับฐานข้อมูลโปรตีน

การตรวจสอบลำดับกรดอะมิโนที่ได้กับฐานข้อมูลโปรตีน ตรวจสอบทางอินเทอร์เน็ต web site [www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 4

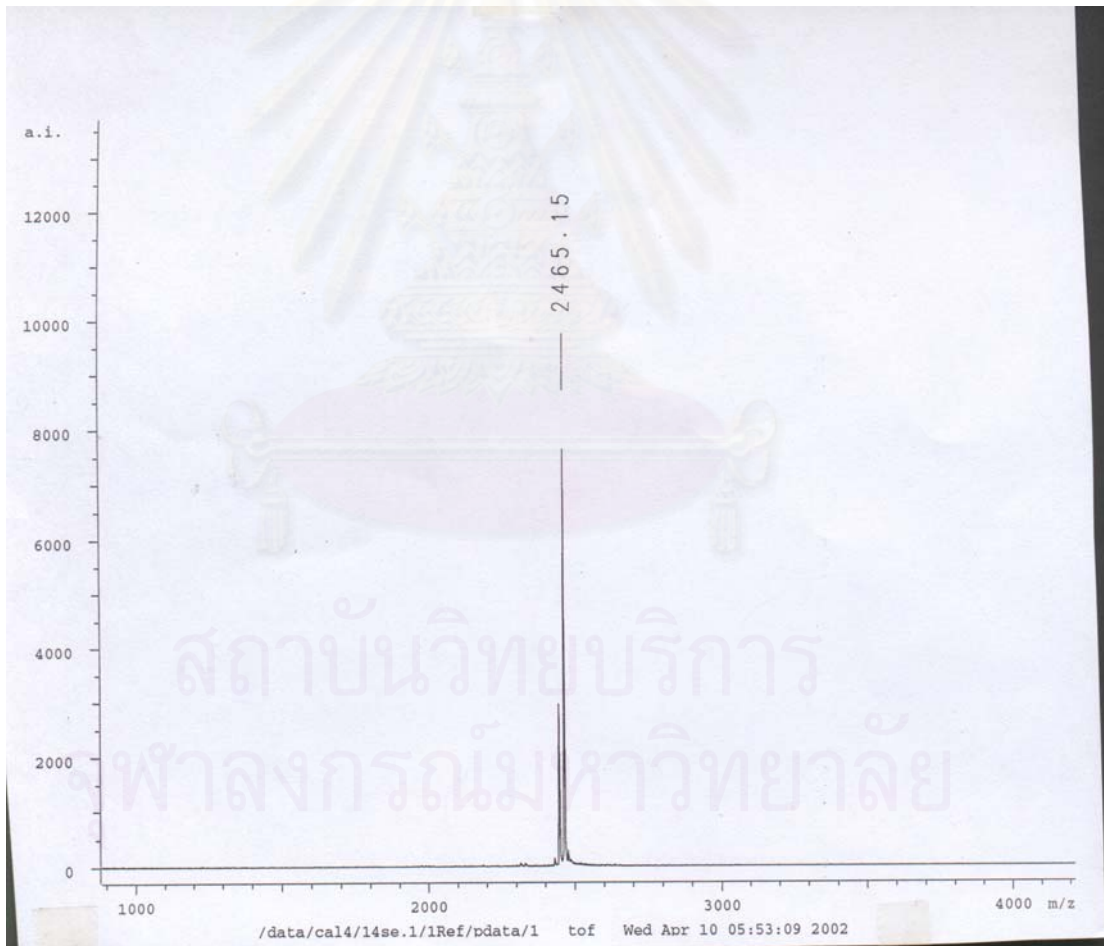
### ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

#### 4.1 ผลการหาลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนมาตรฐาน

เปปไทด์มาตรฐานที่ใช้คือ Adrenocorticotrophic Hormone Fragment 18-39 (ACTH Fragment 18-39) และ Human angiotensin II (Ag II) นำมาหาลำดับกรดอะมิโนด้วยเทคนิค post source decay MALDI-TOF เพื่อทดสอบความถูกต้องของวิธีการ ได้ผลการทดลองดังนี้

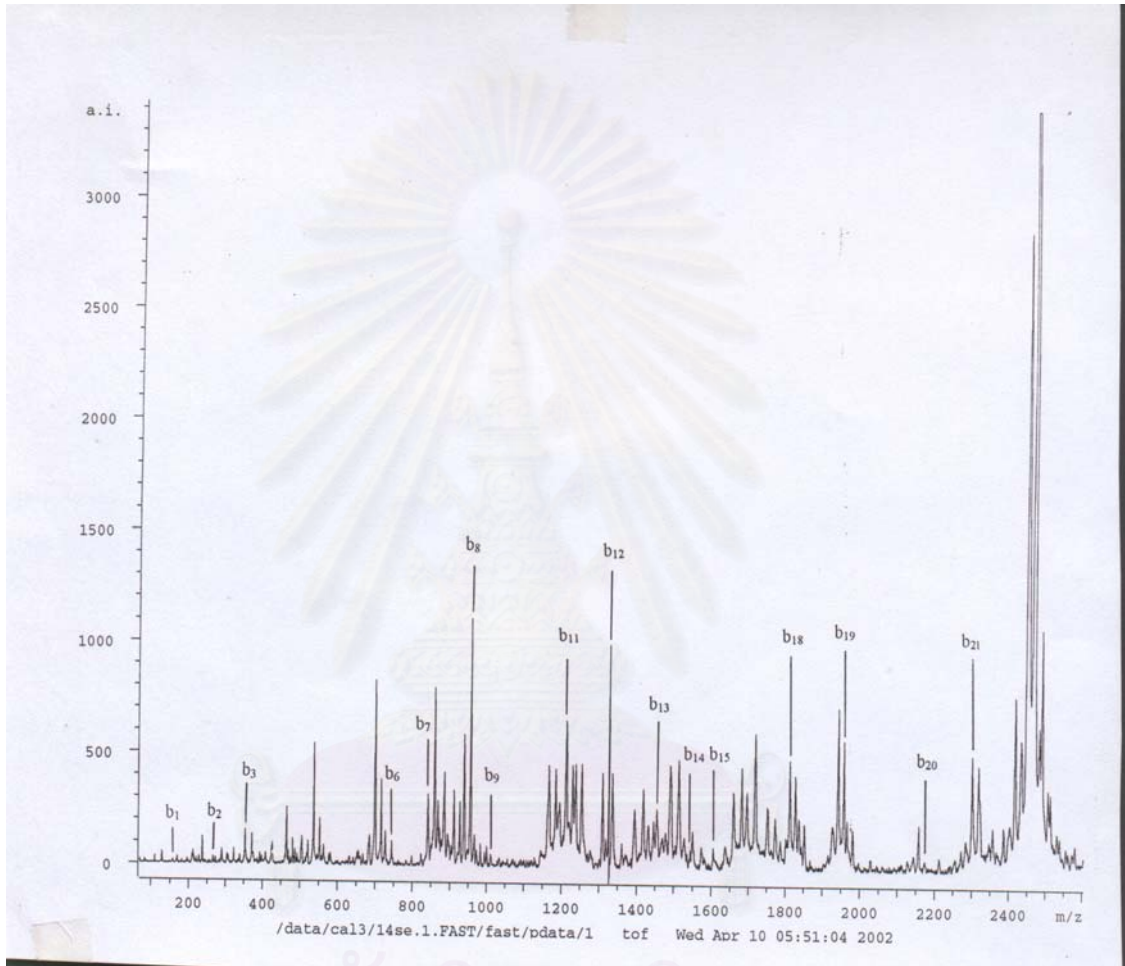
##### 4.1.1 Adrenocorticotrophic Hormone Fragment 18-39 (ACTH Fragment 18-39)

น้ำหนักโมเลกุลของของ ACTH Fragment 18-39 หาโดยใช้เครื่อง MALDI-TOF Mass spectrometer ผลที่ได้แสดงดังรูปที่ 4.1



รูปที่ 4.1 แสดง Mass spectrum ของ ACTH Fragment 18-39

จาก Mass spectrum ของ ACTH Fragment 18-39 นำหนักโมเลกุลที่ได้คือ 2465.15 ดาลตัน หลังจากหาหน้าหนักโมเลกุลของ ACTH Fragment 18-39 แล้วใช้เทคนิค Post source decay เพื่อหาลำดับกรดอะมิโน ผลของ Post source decay mass spectrum ที่ได้แสดงดังรูป 4.2



รูปที่ 4.2 แสดง Post source decay mass spectrum ของ ACTH fragment 18-38

จาก Post source decay mass spectrum ของ ACTH fragment 18-38 แสดงพีคของ b ไอออน ส่วนพีคอื่นๆ เป็นพีคของ a, c, x, y, z ไอออน และพีคของสิ่งปนเปื้อน สามารถตรวจสอบความถูกต้องของพีคที่ระบุได้ โดยการเทียบกับผลจากการคำนวณด้วยคอมพิวเตอร์ ผลจากการคำนวณด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ นำหนักโมเลกุลของแต่ละชิ้นส่วนที่แตกตัวแสดงดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แสดงน้ำหนักโมเลกุลของชิ้นส่วนต่างๆที่แตกตัวของ ACTH fragment 18-38 ซึ่งได้จากการคำนวณด้วยคอมพิวเตอร์

N-terminal ions													
a ions	129.11	229.17	325.24	453.33	552.4	715.46	812.51	926.56	983.58	1054.62	1183.66	1258.69	1427.73
b ions	157.11	254.16	353.23	481.33	580.39	743.45	840.51	954.55	1011.57	1082.61	1211.65	1325.68	1455.72
b+H <sub>2</sub> O ions	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
c ions	174.14	---	370.26	498.35	597.42	760.48	---	671.58	1028.6	1099.64	1228.68	1343.71	1472.75

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
H - R - P - V - K - V - Y - P - N - G - A - E - D - E													
22 - 21 - 20 - 19 - 18 - 17 - 16 - 15 - 14 - 13 - 12 - 11 - 10													
---	2335.08	2238.02	2138.96	2010.86	1911.79	1748.73	1651.68	1537.63	1480.61	1409.57	1280.53	1165.51	
---	2309.1	2212.05	2112.98	1984.68	1885.81	1722.75	1625.7	1511.65	1454.63	1383.6	1254.55	1139.53	
---	2307.08	2210.03	2110.95	1982.87	1883.8	1720.73	1623.68	1509.64	1452.62	1381.58	1252.54	1137.51	
---	---	2195.03	2095.95	1955.86	1869.79	---	1609.68	1455.64	1438.61	1367.58	1238.53	1123.51	

	14	15	16	17	18	19	20	21	22
S - A - E - A - F - P - L - E - F - O H									
9 - 8 - 7 - 6 - 5 - 4 - 3 - 2 - 1									
	1514.76	1585.8	1714.84	1765.86	1932.95	2030	2143.08	2272.12	---
	1542.76	1613.79	1742.83	1813.87	1960.94	2057.99	2171.08	2300.12	---
	---	---	---	---	---	---	2133.09	2318.13	---
	1459.75	1630.82	1759.86	1830.9	1977.97	---	2188.1	2317.15	---

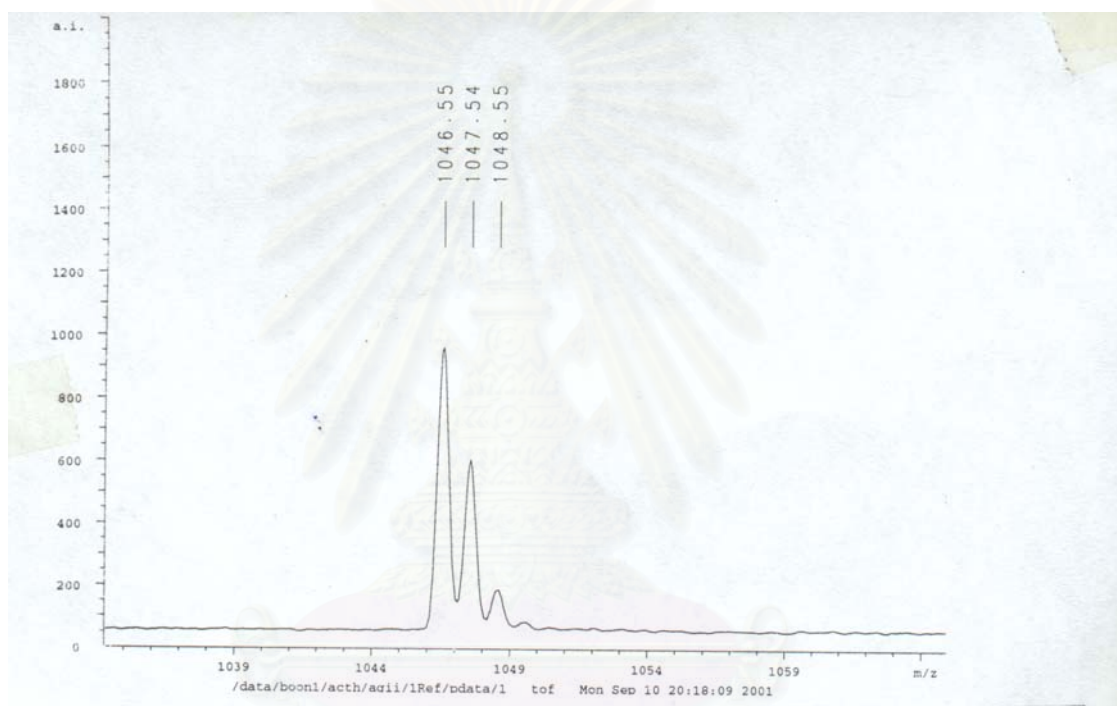
  

C-terminal ions										
x ions	1036.46	923.43	878.39	749.35	678.31	531.25	434.19	321.11	192.07	
y ions	1010.48	923.45	852.41	723.37	652.33	505.27	408.21	295.13	166.09	
Y ions	1006.47	921.44	850.4	721.35	650.32	503.25	406.2	293.11	164.07	
Z ions	992.45	907.43	835.4	707.35	635.32	---	352.15	279.11	150.07	

หลังจากตรวจสอบความถูกต้องแล้ว แปลผลที่ได้เป็นลำดับกรดอะมิโน ลำดับกรดอะมิโนของ ACTH fragment 18-38 คือ Arg-Pro-Val-Lys-Val-Tyr-Pro-Asn-Gly-Ala-Glu-Asp-Glu-Ser-Ala-Glu-Ala-Phe-Pro-Leu-Glu-Phe

#### 4.1.2 Human angiotensin II (Ag II)

น้ำหนักโมเลกุลของ Human angiotensin II (Ag II) หาด้วยเครื่อง MALDITOF Mass spectrometer ผลที่ได้แสดงในรูปที่ 4.3

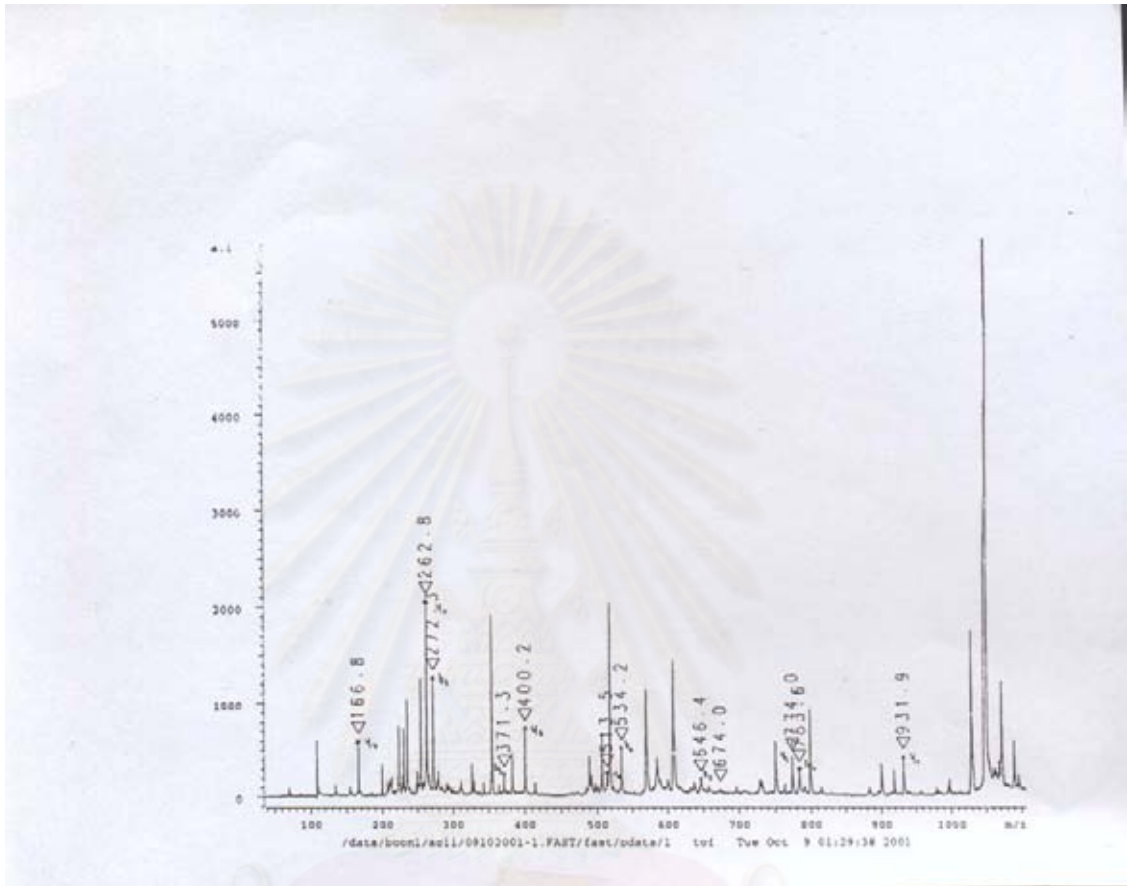


สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4.3 Mass spectrum ของ Human angiotensin II



จาก Mass spectrum น้ำหนักโมเลกุลของ Human angiotensin II ที่ได้คือ 1046.55 ดาลตัน และ  
 พิกที่ได้อัตมาคือพิกของไอโซโทป



รูปที่ 4.4 Post source decay mass spectrum ของ Human angiotensin II

Post source decay mass spectrum ของ Human angiotensin II ระบุพิกของ b ไอออน และ y ไอออน โดยตรวจสอบความถูกต้องกับผลที่ได้จากการคำนวณด้วยคอมพิวเตอร์ ดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 แสดงน้ำหนักโมเลกุลของชิ้นส่วนต่างๆที่แตกตัวของ Human angiotensin II ซึ่งได้จากการคำนวณด้วยคอมพิวเตอร์

N-terminal ions										
a-NH <sub>3</sub> ions	—	227.11	326.18	489.25	602.33	739.39	836.44	—		
a ions	88.04	244.14	343.21	506.27	619.36	756.42	853.47	—		
b-NH <sub>3</sub> ions	—	255.11	354.18	517.24	630.33	767.38	864.44	—		
b ions	116.03	272.14	371.20	534.27	647.35	784.41	881.46	—		
b+H <sub>2</sub> O ions	—	—	—	—	—	802.42	899.47	—		
c ions	133.06	289.16	388.23	551.29	664.38	801.44	—	—		
		1	2	3	4	5	6	7	8	
	H-	D	R	V	Y	I	H	P	F	-OH
		8	7	6	5	4	3	2	1	
C-terminal ions										
	—	957.49	801.39	702.33	539.26	426.18	289.12	192.07	x ions	
	—	931.52	775.41	676.35	513.28	400.20	263.14	166.09	y ions	
	—	914.49	—	—	—	—	—	—	y-NH <sub>3</sub> ions	
	—	929.50	773.40	674.33	511.27	398.18	261.12	164.07	Y ions	
	—	915.50	759.40	660.33	497.26	384.18	—	150.07	z ions	

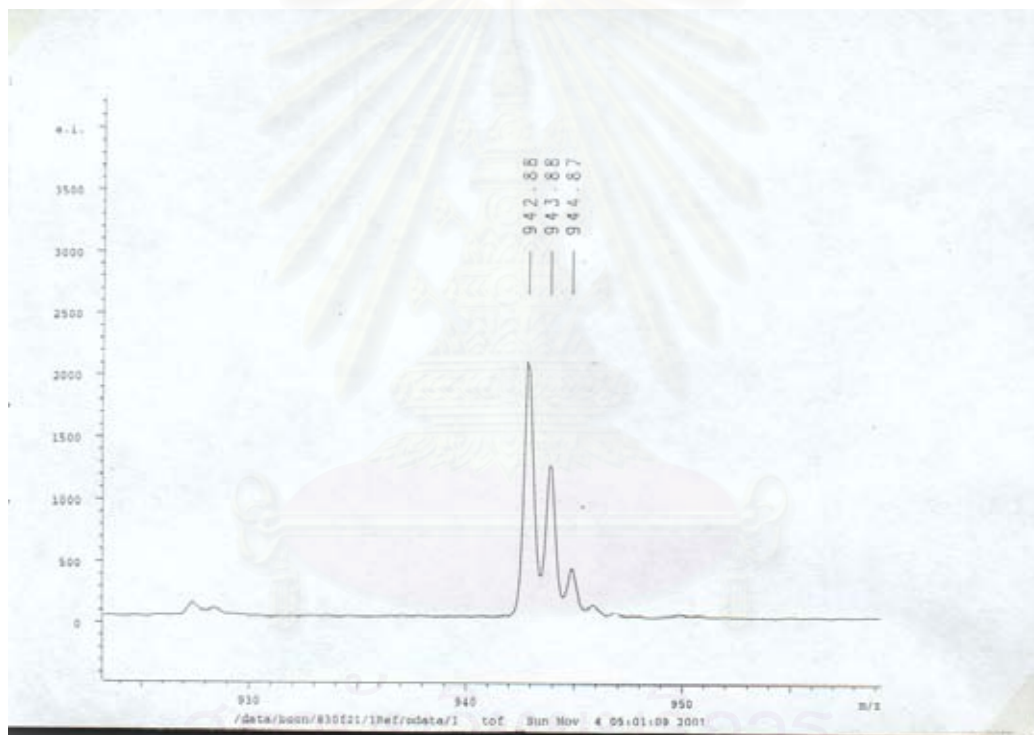
จากผล Post source decay mass spectrum ลำดับกรดอะมิโนของ Human angiotensin II ที่ได้  
คือ Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe

## 4.2 การหาลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์ตัวอย่าง

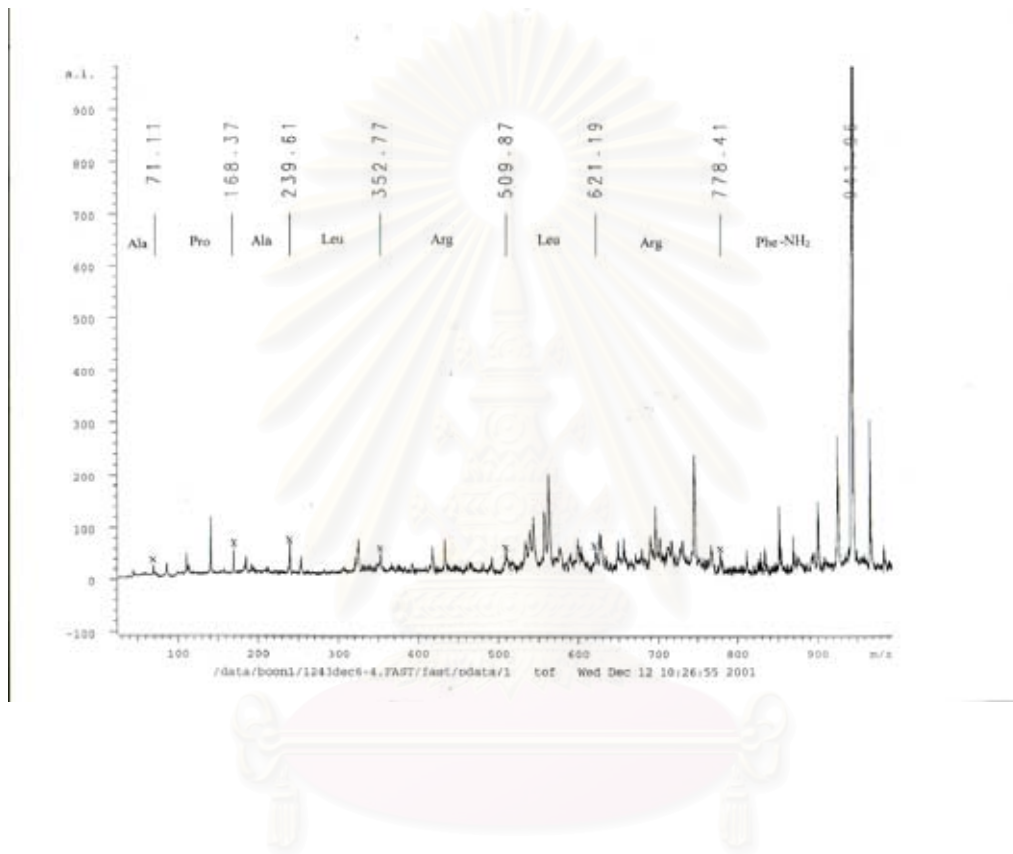
เปปไทด์ตัวอย่างที่ใช้มี 2 ชนิด คือ FMRF amide จากก้านตาของกิ้งก่ามกราม และ CHH จากก้านตาของกิ้งก่าดำ

### 4.2.1 FMRF amide จากก้านตาของกิ้งก่ามกราม

น้ำหนักโมเลกุลของ FMRF amide จากก้านตาของกิ้งก่ามกรามหาด้วยเครื่อง MALDI TOF แสดงดังรูป 4.5



รูปที่ 4.5 Mass spectrum แสดงน้ำหนักโมเลกุลของ FMRF amide จากก้านตาของกิ้งก่ามกราม จาก Mass spectrum น้ำหนักโมเลกุลที่ได้ คือ 942.88 คาลตัน พิกัดมาคือฟิสิกของไอโซโทป



รูปที่ 4.6 Post source decay mass spectrum ของ FMRF amide จากก้านตาของกิ้งก่ามกรม

จาก Post source decay mass spectrum ของ FMRF amide จากก้านตาของกิ้งก่ามกรม ระบุพิกัดที่เป็น b ไอออนเพื่อนำมาเรียงเป็นลำดับกรดอะมิโน ตรวจสอบความถูกต้องโดยดูจากผลการคำนวณด้วยเครื่องคอมพิวเตอร์ดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 แสดงผลจากการคำนวณน้ำหนักโมเลกุลของชิ้นส่วนต่างๆที่แตกตัว ของ FMRF amide จาก  
 ก้านตาของกุ้งก้ามกราม

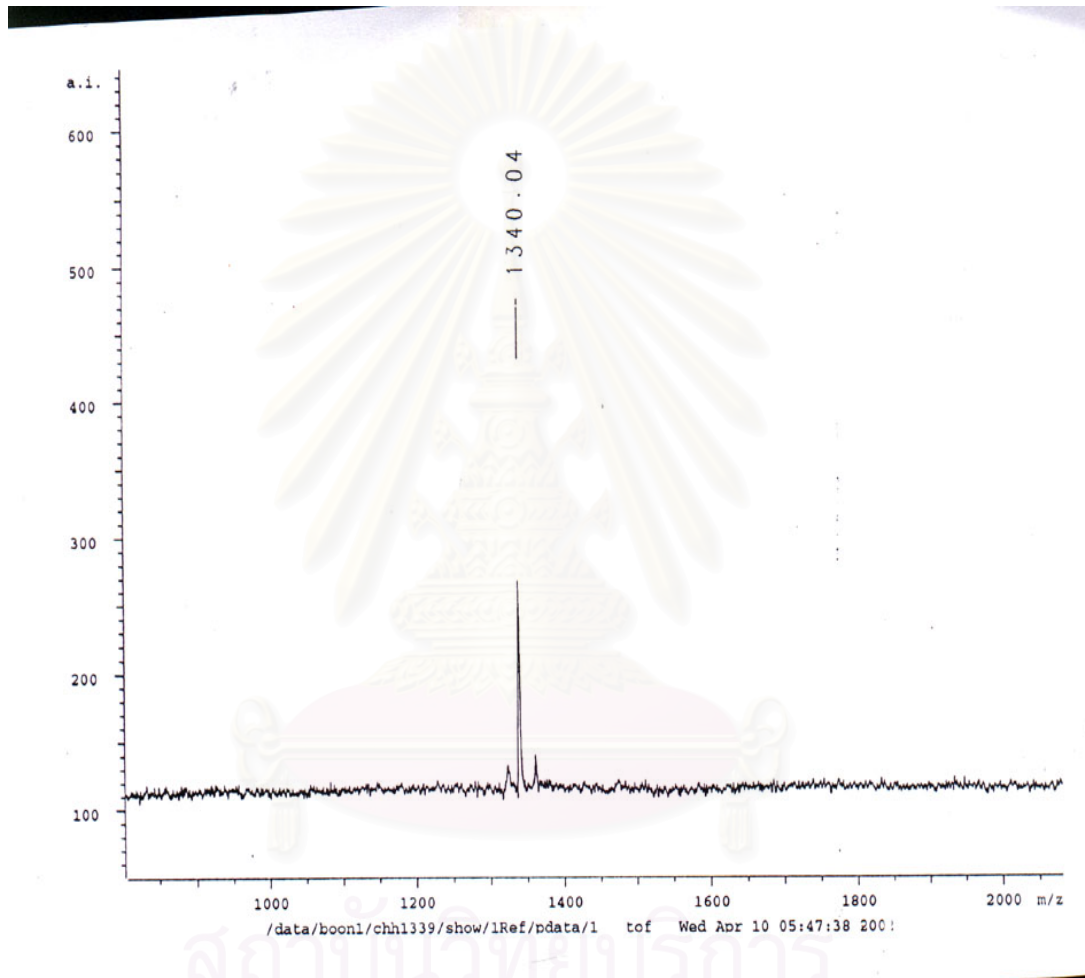
N-terminal ions									
a-NH <sub>3</sub> ions	---	---	---	---	464.30	577.38	733.48	---	
a ions	44.05	141.10	212.14	325.22	481.33	594.41	750.51	---	
b-NH <sub>3</sub> ions	---	---	---	---	492.29	605.38	761.48	---	
b ions	72.04	169.10	240.13	353.22	509.32	622.40	778.51	---	
b+H <sub>2</sub> O ions	---	---	---	---	---	640.41	796.52	---	
	1	2	3	4	5	6	7	8	
	H - A	P	A	L	R	L	R	F - OH	
	8	7	6	5	4	3	2	1	
C-terminal ions									
	---	872.55	775.49	704.46	591.37	435.27	322.19	166.09	y ions
	---	855.52	758.47	687.43	574.35	418.25	305.16	---	y-NH <sub>3</sub> ions

สถาบันวิทยบริการ  
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลำดับกรดอะมิโนที่ได้คือ Ala-Pro-Ala-Leu-Arg-Leu-Arg-Phe

#### 4.2.3 เปปไทด์ตัวอย่างเป็น CHH ที่สกัดได้จากก้านตาทิ้งกุลาดำ

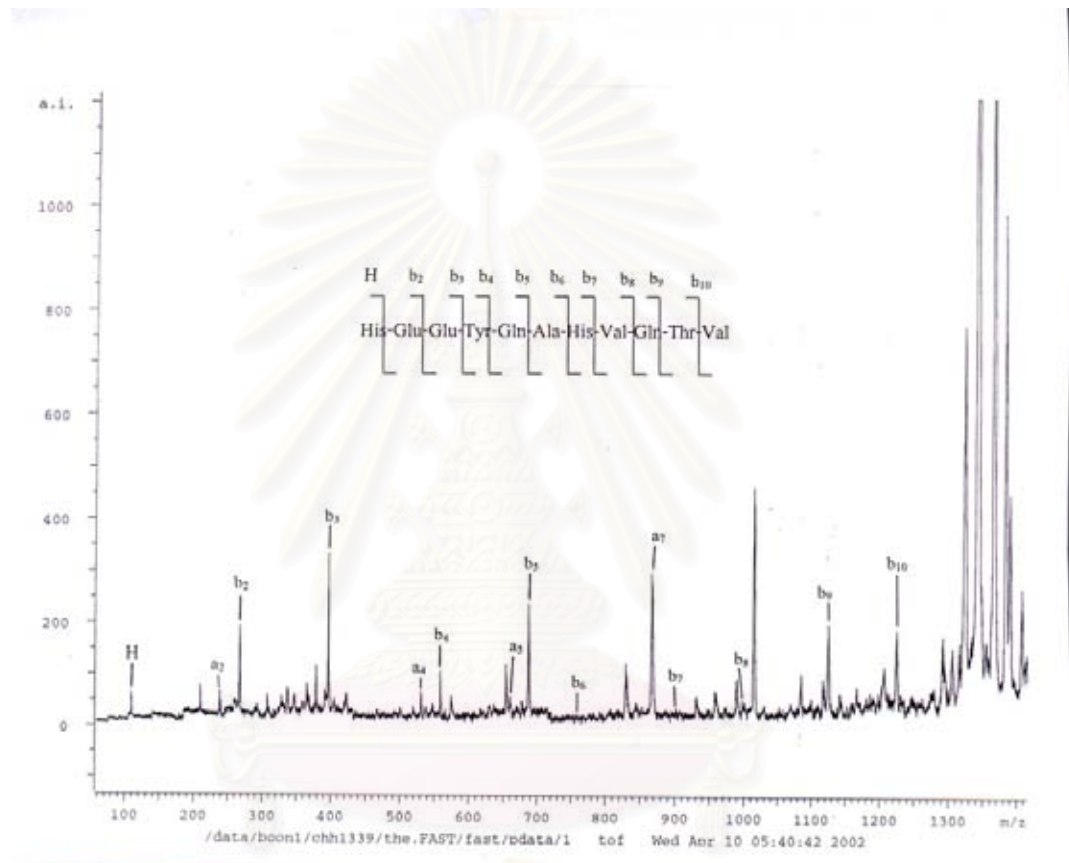
นำ CHH มาหาน้ำหนักโมเลกุลด้วยเครื่อง MALDI TOF ผลที่ได้แสดงดังรูปที่ 4.7



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4.7 แสดง Mass spectrum ของ CHH

จาก Mass spectrum น้ำหนักโมเลกุลของ CHH ที่ได้คือ 1340.04 ดาลตัน



## สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4.8 Post source decay mass spectrum ของ CHH

จาก Post source decay mass spectrum ของ CHH ระบุพีคที่เป็น b ไอออน และ y ไอออน ตรวจสอบค่าที่ได้กับผลจากการคำนวณด้วยคอมพิวเตอร์ดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 แสดงน้ำหนักโมเลกุลของชิ้นส่วนที่แตกตัวของ CHH ซึ่งได้จากการคำนวณด้วยคอมพิวเตอร์

N-terminal ions												
a-NH <sub>3</sub> ions	---	---	---	---	642.25	713.29	850.35	949.42	1077.48	1178.52	---	
a ions	110.07	239.11	368.16	531.22	659.28	730.32	867.37	966.44	1094.50	1195.55	---	
b-NH <sub>3</sub> ions	---	---	---	---	670.25	741.28	878.34	977.41	1105.47	1206.52	---	
b ions	138.07	267.11	396.15	559.22	687.27	758.31	895.37	994.44	1122.50	1223.54	---	
b+H <sub>2</sub> O ions	---	---	---	---	---	---	---	---	1140.51	1241.56	---	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
H-	H	E	E	Y	Q	A	H	V	Q	T	V	-OH
	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	
												C-terminal ion
	---	1203.56	1074.52	945.48	782.42	654.36	583.32	446.26	347.19	219.13	118.09	y ions
	---	1186.54	1057.50	928.45	765.39	637.33	566.29	429.23	330.17	---	---	y-NH <sub>3</sub> ions

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลำดับกรดอะมิโนที่ได้คือ His-Glu-Glu-Tyr-Gln-Ala-His-Val-Gln-Thr-Val



### 4.3 วิจารณ์ผลการทดลอง

Crustacean Hyperglycaemic Hormone (CHH) รูปแบบหนึ่ง สกัดจากก้านตาของกุ้งกุลาดำ *Peneaus monodon* ด้วยเทคนิคทาง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ตรวจสอบสารที่ได้ด้วยวิธี Dot-ELISA ซึ่งใช้แอนติบอดีต่อเปปไทด์สังเคราะห์ของ CHH นำหน้าหนักโมเลกุลด้วยเครื่อง Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometer (MALDI-TOF) นำหนักโมเลกุลที่หาได้เท่ากับ 1,340.04 ดาลตัน และหาลำดับกรดอะมิโนด้วยเทคนิค post source decay (PSD) ลำดับกรดอะมิโนที่หาได้คือ His-Glu-Glu-Tyr-Gln-Ala-His-Val-Gln-Thr-Val (HEEYQAHVQTV) จากผลการทดลองพบว่า CHH ที่สกัดได้จากก้านตาของกุ้งกุลาดำรูปแบบนี้มีลำดับกรดอะมิโนที่มีปลาย C-terminal เป็น valine ซึ่งเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของ CHH ในสัตว์กลุ่มครัสเตเชียนอื่นๆ มีลำดับกรดอะมิโน 3 หน่วยทางปลาย C-terminal เหมือนกับ *Peneaus japonicus* มีลำดับกรดอะมิโน 4 หน่วยทางปลาย C-terminal เหมือนกับ *Procambarus bouvieri*, *Orconectes limosus* จากผลการทดลอง CHH ที่สกัดมาได้เป็นรูปแบบหนึ่งของ CHH สามารถทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี CHH แสดงว่าเป็น CHH รูปแบบหนึ่งแต่มีขนาดเล็กกว่า CHH ที่พบในสัตว์กลุ่มครัสเตเชียนอื่น โดยมีลำดับกรดอะมิโน 11 หน่วย แต่ CHH ที่พบในสัตว์กลุ่มครัสเตเชียนอื่น มีลำดับกรดอะมิโนมากกว่า 70 หน่วย

จากการค้นข้อมูลในฐานข้อมูลโปรตีนพบว่าเปปไทด์ที่ได้มีลำดับกรดอะมิโนที่เหมือนกับส่วนหนึ่งของฮอร์โมน CHH ที่สกัดได้จากก้านตาของกุ้งกุลาดำ 2 รูปแบบดังนี้ ลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์ที่ได้คือ HEEYQAHVQTV

CHH gi 4138875

SCKGVYDREL LGGLSRLCDD CYNVFREPKV ATECRSNCFY NSVQVQCLEY  
LIPADLHEEY QAHVQTVGK

CHH gi 1264320

MTAFRLVAVA LAVVVVACSTT WARSLEGSSS PVASLIRGRS LSKRANFDPS  
CAGVYNRELL GRLSRLCDDC YNVFREPKVA TECRSNCFYN PVFVQCLEYL IPADLHEEYQ  
AHVQTVGK

ตำแหน่งที่ขีดเส้นคือตำแหน่งที่มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับเปปไทด์ที่หาได้

สำหรับการหาลำดับกรดอะมิโนด้วยเทคนิค Post source decay (PSD) นับว่าเป็นเทคนิคที่มีประโยชน์ต่องานวิจัยเรื่องกึ่งเป็นอย่างมาก ข้อดีของเทคนิคนี้คือใช้ปริมาณสารตัวอย่างน้อย ซึ่งจะสามารถลดปัญหาการใช้สัตัวทดลอง ที่ผ่านมาในการทำแต่ละครั้งต้องใช้ปริมาณกึ่งจำนวนมาก นอกจากนี้ยังส่งผลให้ลดปริมาณคนทำ ปริมาณสารเคมีและระยะเวลาตามไปด้วย อีกอย่างหนึ่งในงานวิจัยเรื่องกึ่งได้มีการใช้เครื่องเครื่อง matrix Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometer (MALDI-TOF) เพื่อหาน้ำหนักโมเลกุลอยู่แล้ว ดังนั้นหากสามารถหาลำดับกรดอะมิโนได้ด้วยจะทำให้ลดจำนวนขั้นตอนในการทำและการเตรียมตัวอย่าง เตรียมตัวอย่างครั้งเดียวหาได้ทั้งน้ำหนักโมเลกุลและลำดับกรดอะมิโนได้เลย สำหรับเทคนิค post source decay ยังสามารถตรวจสอบความถูกต้องของลำดับกรดอะมิโนที่หาได้ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ ได้อีกด้วย



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลอง

การทดลองใช้เครื่อง Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF) หาลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์ โดยใช้เทคนิค post source decay ในขั้นแรกใช้เทคนิคนี้หาลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์มาตรฐานคือ ACTH และ angiotensin II ลำดับกรดอะมิโนที่หาได้ตรงกับลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์มาตรฐาน หลังจากนั้นจึงหาลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์ตัวอย่าง โดยเปปไทด์ตัวอย่างที่ใช้คือ FMRF amide ที่สกัดมาจากก้านตาของกุ้งก้ามกรามและ Crustacean Hyperglycaemic Hormone (CHH) ที่สกัดมาจากก้านตาของกุ้งกุลาดำ ลำดับกรดอะมิโนที่ได้คือ Ala-Pro-Ala -Leu -Arg -Leu -Arg -Phe และ His-Glu -Glu -Tyr -Gln- Ala-His- Val-Gln-Thr -Val ตามลำดับ ผลการทดลองที่ได้เมื่อเทียบกับผลจากการหาลำดับกรดอะมิโนด้วยเทคนิคEdman degradation ผลที่ได้ตรงกัน นำลำดับกรดอะมิโนของ CHH ที่หาได้ไปสืบค้นจากฐานข้อมูลโปรตีนทางอินเทอร์เน็ตพบว่า มีลำดับกรดอะมิโนตรงกับส่วนหนึ่งของลำดับกรดอะมิโนของCHH จากกุ้งกุลาดำ 2 รูปแบบ

ในการทดลองพบว่า การหาลำดับกรดอะมิโนโดยเทคนิค Post source decay เป็นเทคนิคที่มีความแม่นยำ ทำได้รวดเร็ว และยังใช้ปริมาณสารตัวอย่างน้อย

## รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- จันทร์ทิพย์ คงสินรัตนชัย. 2543. การตรวจหาตำแหน่งของสารคล้ายแพนক্রีเอติกโพลีเปปไทด์และสารคล้าย FMRFamide ในก้านตาคุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาวิชาเอกเคมีชีวภาพ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร.
- จิรศักดิ์ ผู้ปลื้ม. 2542. การแยกและการทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย FMRFamide จากก้านตาคุ้งกุลาดำ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร.
- ธิดา อมร. 2541. การแยกและการทำให้บริสุทธิ์สารคล้ายฮอร์โมนโคลิซิสโตโคคินินจากก้านตาคุ้งกุลาดำ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร.
- บรรจง เทียนสงรัสมิ์. 2530. การเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล. กรุงเทพฯ : อักษรเจริญทัศน์.
- ปกรณ์ อุ่นประเสริฐ. 2531. เทคนิคการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. กรุงเทพฯ : ชอนนทรี.
- ปิยะพงศ์ โชติพันธุ์. 2529. การเลี้ยงกุ้ง. โครงการคู่มือการประกอบอาชีพสำหรับประชาชนของศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ สำนักส่งเสริมและฝึกอบรม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- พรรณิภา หาญวิวัฒน์กิจ. 2532. การวิเคราะห์เศรษฐกิจการผลิตกุ้งกุลาดำในประเทศไทย. เอกสารเศรษฐกิจการประมง เลขที่ 5 / 2532. กรุงเทพฯ : ฝ่ายวิจัยเศรษฐกิจการประมง กองนโยบายและแผนงานประมง กรมประมง.
- พูลศิริ พุกภัยกานนท์. 2542. การทำให้บริสุทธิ์และจำแนกชนิดเปปไทด์จากต่อมไซนัสของกุ้งกุลาดำ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สหสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- วัลลภ คงเพิ่มพูน. 2532. กุ้งกุลาดำ. กรุงเทพฯ : โครงการหนังสือเกษตรกรชุมชน.
- สมชาย คำนึ่งถิ่น. 2532. ฟาร์มกุ้งทะเล. กรุงเทพฯ : โครงการหนังสือเกษตรกรชุมชน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สมปอง ใจดีหลาย. 2539. การแยกฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดจากก้านตาคุ้งก้ามกราม. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร.
- สุวิทย์ ชื่นสินธุ์. 2531. การเลี้ยงกุ้งแชบ๊วยและกุ้งกุลาดำ. กรุงเทพฯ : ศูนย์หนังสือเกษตรกร.

## ภาษาอังกฤษ

- Aebersold, R. and Goodlett, D. R. 2001. Mass Spectrometry In Proteomics. Chem. Rev. 101: 269- 295
- Arnott, D., Shabanowitz, J. and Hunt, D. F. 1993. Mass Spectrometry of Proteins and Peptides: Sensitive and Accurate Mass Measurement and Sequence Analysis. Clin. Chem. 39(9): 2005- 2009.
- Beavis, R. D. and Chait, B. T. 1990. High-Accuracy Molecular Mass Determination of Proteins Using Matrix-Assisted Laser Desorption Mass Spectrometry. Anal. Chem. 62: 1836- 1840.
- Bieber, A. L., Becker, R.R., McParland, R., Hunt, D.F., Shabanowitz, J., Yutes III, J.R., Martino, P.A. and Johnson, G.R. 1990. The Complete Sequence of the Acidic Subunit from Mojave Toxin Determined by Edman Degradation and Mass Spectrometry. Biochemica et Biophysica Acta. 1037: 413-421.
- Chait, B. T., Wang, R., Beavis,R.C.,and Kent, S.B.H. 1993. Protein Ladder Sequence. Science. 262 : 89-92.
- Chait, B.T. and Kent, S. B. H. 1992. Weighing Naked Protein: Practical, High-Accuracy Mass Measurement of Peptides and Proteins. Science. 257: 1885-1894.
- Cotter, R.J.,1997. Time of Flight Mass Spectrometry. Washington, DC. ACS professional Reference Book.
- Davey, M.L., Hall, M.R., Willis, R.H., Oliver, R.W., Thurn, M.J. and Wilson, K.J. 2000. Five Crustacean Hyperglycaemic Family Hormone of *Penaeus monodon*: Complementary DNA Sequence and Identification In Single Sinus Glands by Electrospray Ionization-Transform Mass Spectrometry. Mar. Biotechnol. 2(1): 80-91
- Deng, H. M., Lai, ZH., Zhu, QM. and Zhao, SK. 2000. Application of the Fragments and Structure Analysis of Matrix-Assisted Laser Desorption /Ionization Time of Flight Mass Spectrometry In Peptide Sequencing. Acta Biochemica et Biophysica Sinica. 32(2): 179- 182.

- Farfante, I.P. and Kensley, B. 1997. Peneoid 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.
- Findlay, J.B.C. and Geisow, M.J. 1989. Protein Sequencing a Practical Approach: Oxford. LRL press.
- Fitzgerald, M.C., Parr, G. R. and Smith, L. M. 1993. Basic Matrices for the Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Proteins and Oligonucleotides. Anal. Chem. 65: 3204-3211.
- Haebel, S. and Kehr, J. 2001. Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry Peptide Mass Fingerprints and Post Source Decay a Tool for the Identification and Analysis of Phloem Proteins From *Cacurbita maxima* Duch. Separated by Two-Dimension Polyacrylamide Gel Electrophoresis. Planta. 213(4): 586-593.
- Huberty, M. C., Vath, J.E., Yu, W. and Martin, S.A. 1993. Site Specific Carbohydrate Identification In Recombinant Proteins Using MALDI-TOF. Anal.Chem. 65: 2791-2800.
- Jespersen, S., Chaurand, P., VanStrien, F.J.C., Splengler, B. and Vander Greff, J. 1999. Direct Sequencing of Neuropeptides In Biological Tissue By MALDI PSD Mass Spectrometry. Analytical Chemistry. 71(3): 660-666.
- Kelner, R., Lottspich, F. and Meyer, H.E.1994. Microcharacterization of Proteins. Weinheim: VCH.
- Keough, T., Youngquist, R. S. and Lacey, M. P. 1999. A Method for High Sensitivity Peptide Sequencing Using Post Source Decay Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry. Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 96: 7131-7136.
- Marco, G.H., Brandt, W., and Gade, G. 1998. Elucidation of the Amino acid Sequence of a Crustatean Hyperglycaemic Hormone from the Spiny Lobster, *Jasus lalandii*. Biochemica and Biophysica Research Communications. 248: 578-583
- Marvin, L.F., Zantylly, C., Leprince, J., Vaudry, H. and Henry, J. 2001. Characterization of a Novel Officinalis Neuropeptide Using MALDI-TOF MS and Post Source Decay Analysis. Peptide. 22: 1391-1396.

- Michel, H., Hunt, D.F., Shabanowitz, J. and Bennett, J. 1988. Tandem Mass Spectrometry Reveals That Three Photosystem II Proteins of Spinach Chloroplasts Contain *N*-Acetyl-*O*- Phosphothreonine at Their NH<sub>2</sub> Termini. The Journal of Biological Chemistry. 263(3): 1123-1130.
- Reiber, D. C., Grover, T. A. and Brown, R. B. 1988. Identifying Proteins Using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization In Source Fragmentation Data Combined with Database Searching. Anal.Chem. 70: 673-683.
- Schilling, B., Wang, W., McMurray, JS. And Medzihradzky, KF. 1999. Fragmentation And Sequencing of Cyclic Peptide by Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Post Source Decay Mass Spectrometry. Rapid communication in mass spectrometry. 13(21): 2174-2179.
- Sithigorngul, P., Saraithongkum, W., Jaideechoey, S., Longyant, S. and Sithigorngul, W. 1998. Novel FMRFamide Like Neuropeptides Form The Eyestalk of the Giant Fresh Water Prawn *Macrobrachium rosenbergii*. Comparative Biochemistry and Physiology part B.120: 587-590.
- Siuzdak,g. 1996. Mass Spectrometry for Biotechnology. San Diego: Academic press.
- Smith, D. L. and Zhang, Z. 1994. Mass Spectrometry As a Tool for Studying Protein High Order Structure and Dynamics. Mass Spectrom. Review.13: 411-429.
- Solis, N.B. 1988. Biology and culture of *Penaeus monodon*. Philippines. Asian Fisheries Development Center.
- Sun, P. S. 1994. Molecular Cloning and Sequence Analysis of a cDNA Encoding a Malt-Inhibiting Hormone-Like Neuropeptide from the White Shrimp *Penaeus vannamei*. Molecular Marine Biology and Biotechnology. 3(1): 1-6.
- Veelaert, D. Devreese, B., Schoolfs, J., VanBeeumen, j., VanderBroeck, J., Tobe, SS. and Deloof, A. 1996. Isolation and Characterization of Eight Myoinhibiting Peptides from the Desert Locust, *Schistocera gregaria*: New Member Of The Cockroach Allatostatin Family. Molecular and cellular Endocrinology. 122(2): 183-190.

- Vinh, J., Loyaux, D., Redeker, V. and Bossier, J. 1997. Sequence Branched Peptides With CID/PSD MALDI-TOF In The Low Picomole Range: Application To Structure Study the Posttranslational Polyglycylation of Tubulin. Analytical chemistry. 69(19): 3979-3985.
- Voet, D. and Voet, J.D. 1995. Biochemistry. New York: Wiley
- Vorm, O., Roepstorff, P. and Mann, M. 1994. Improved Resolution and Very High Sensitivity in MALDI TOF of Matrix Surfaces Made by Fast Evaporation. Anal. Chem. 66: 3281-3287
- Wen, D.T. 1992. Primary Structure of Gal $\beta$ 1,3(4) GLCNac  $\alpha$ 2,3-Sialytransferase Determined By Mass Spectrometry Sequence Analysis and Molecular Cloning. The Journal of Biological Chemistry. 267: 21011-21019.
- Yang, W.-J., Aida, K., Terauchi, A., Sonobe, H. and Nagasawa, H. 1996. Amino Acid Sequence Of a Peptide With Malt-Inhibiting Activity from the Kuruma Prawn *Penaeus japonicus*. Peptide. 17(2): 197-202.
- Yu, W., Vath, J.E., Huberty, M.C. and Martin, S.A. 1993. Identification of the Facile Gas-Phase Cleavage of the Asp-Pro And Asp-Xxx Peptide Bonds In Matrix-Assisted Laser Desorption Time of Flight Mass Spectrometry. Anal.Chem. 65: 3015-3023





ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

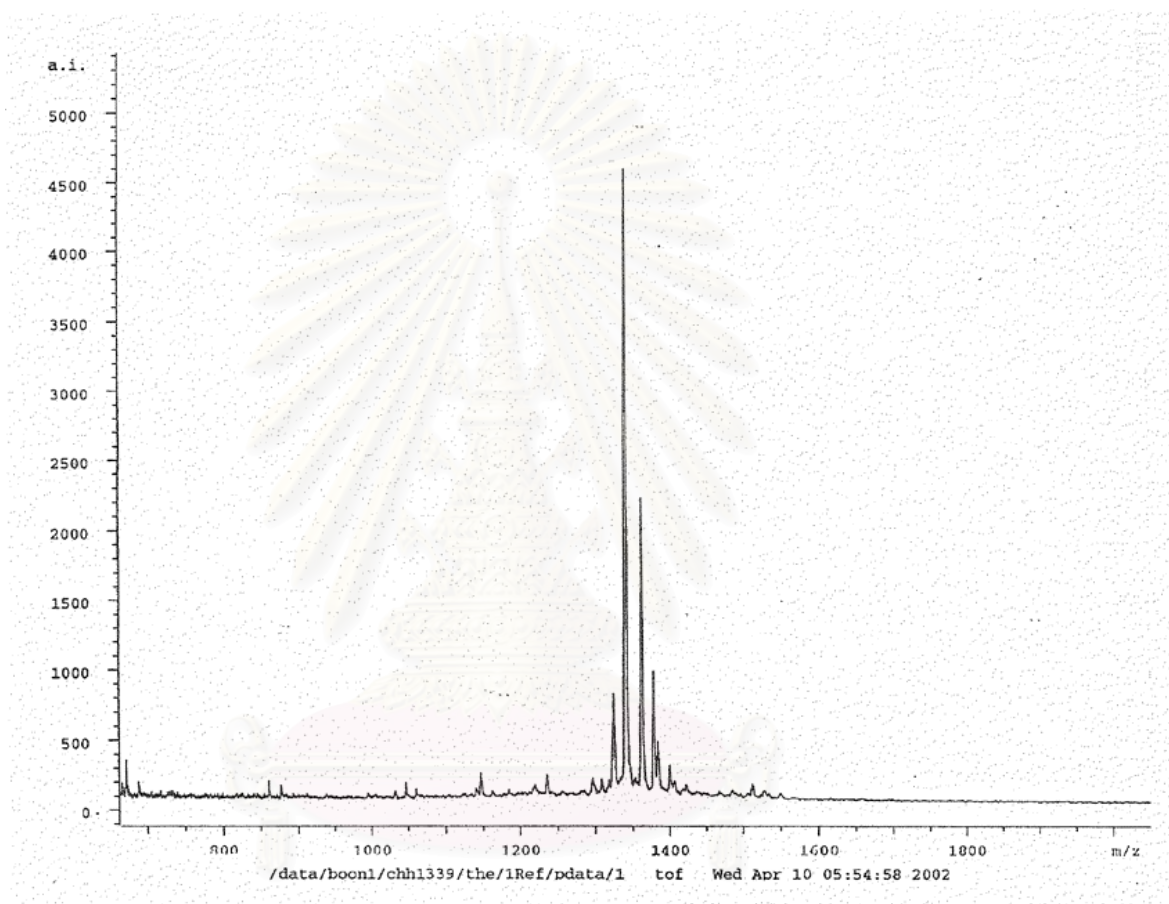
## ภาคผนวก ก

ตารางที่ ก.1 แสดงน้ำหนักโมเลกุลของกรดอะมิโนแต่ละตัว

Amino acid	Letter code		Mass	
	Three	One	Monoisotopic	Average
Glycine	Gly	G	57,021	57,052
Alanine	Ala	A	71,037	71,079
Serine	Ser	S	87,032	87,078
Proline	Pro	P	97,053	97,117
Valine	Val	V	99,068	99,133
Threonine	Thr	T	101,048	101,105
Cysteine	Cys	C	103,009	103,139
Isoleucine	Ile	I	113,084	113,159
Leucine	Leu	L	113,084	113,159
Asparagine	Asn	N	114,043	114,104
Aspartic acid	Asp	D	115,027	115,089
Glutamine	Gln	Q	128,059	128,131
Lysine	Lys	K	128,095	128,174
Glutamic acid	Glu	E	129,043	129,116
Methionine	Met	M	131,040	131,193
Histidine	His	H	137,059	137,141
Phenylalanine	Phe	F	147,068	147,177
Arginine	Arg	R	156,101	156,188
Tyrosine	Tyr	Y	163,063	163,176
Tryptophan	Trp	W	186,079	186,213

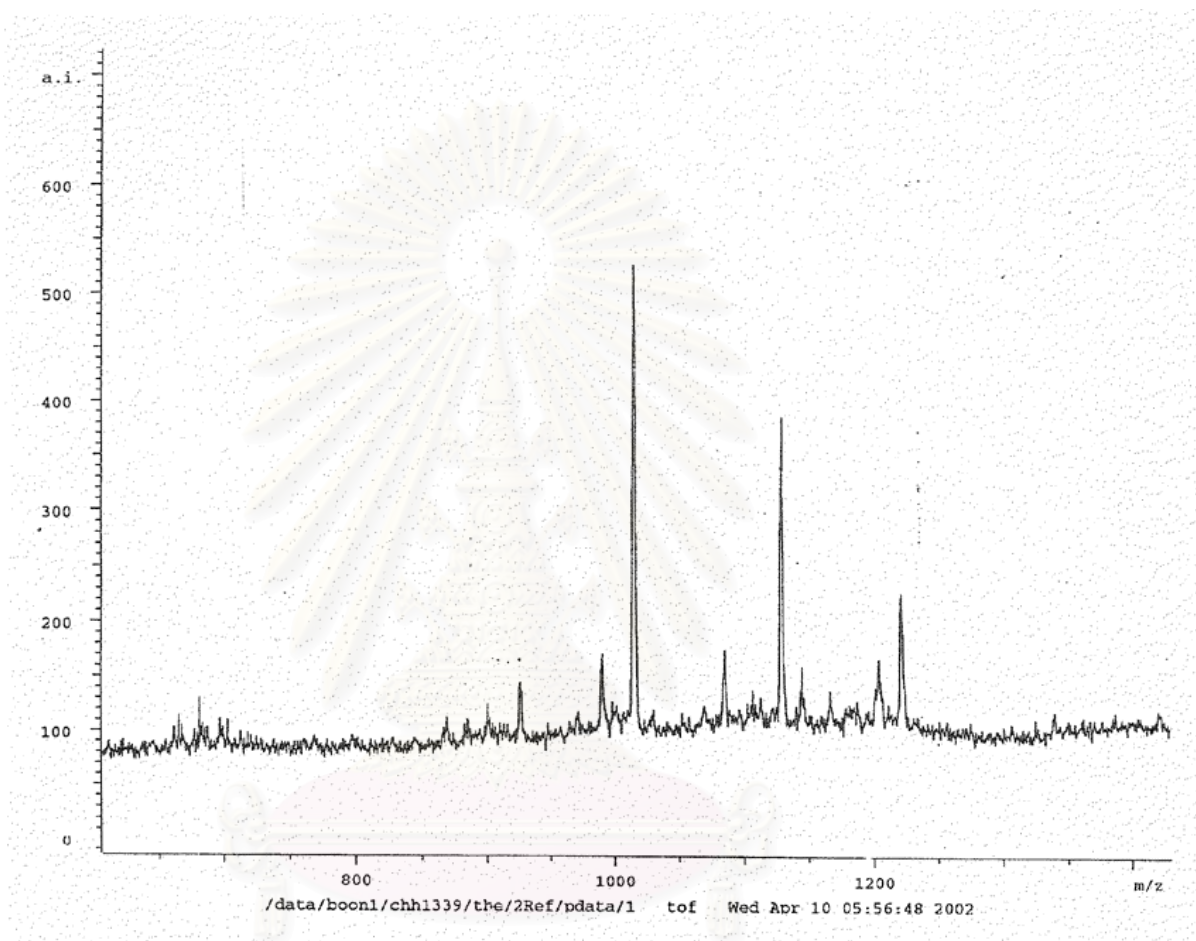
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก ข



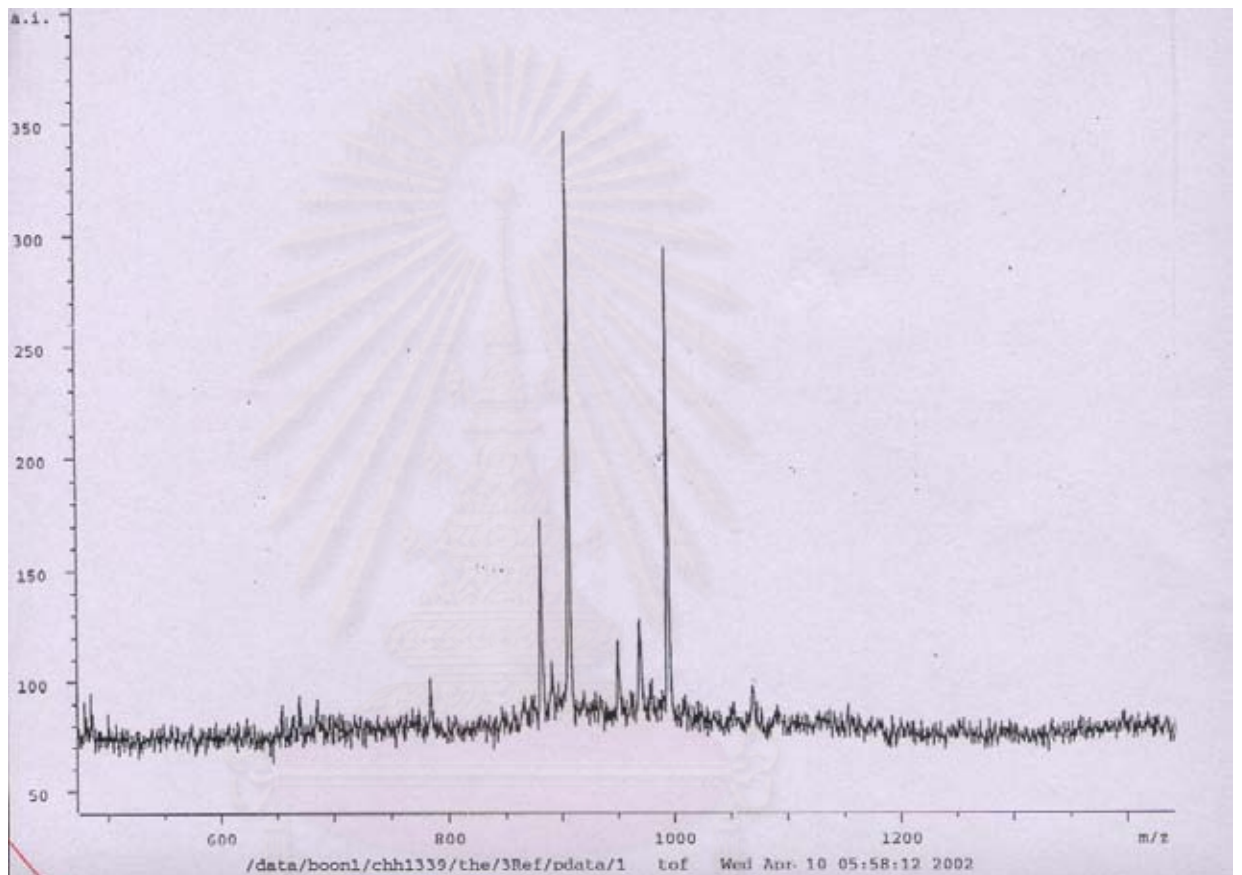
สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ ข.1 แมสสเปกตรัมของ CHH จากก้านตาทิ้งกุลาดำวัดที่ความต่างศักย์ Reflectron 20.00 kV



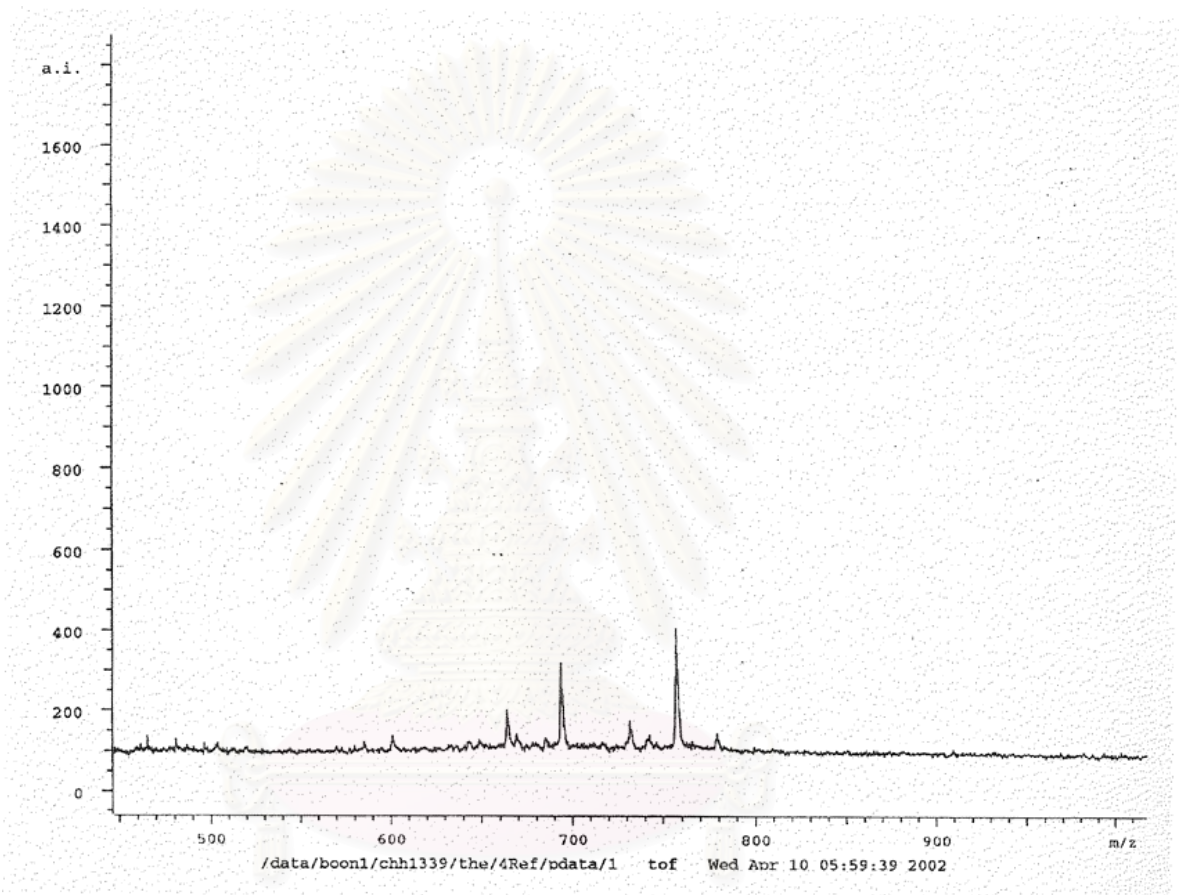
สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ ข.2 แมสสเปกตรัมของ CHH จากก้านตากลูกลาดำวัดที่ความต่างศักย์ Reflectron 17.52 kV



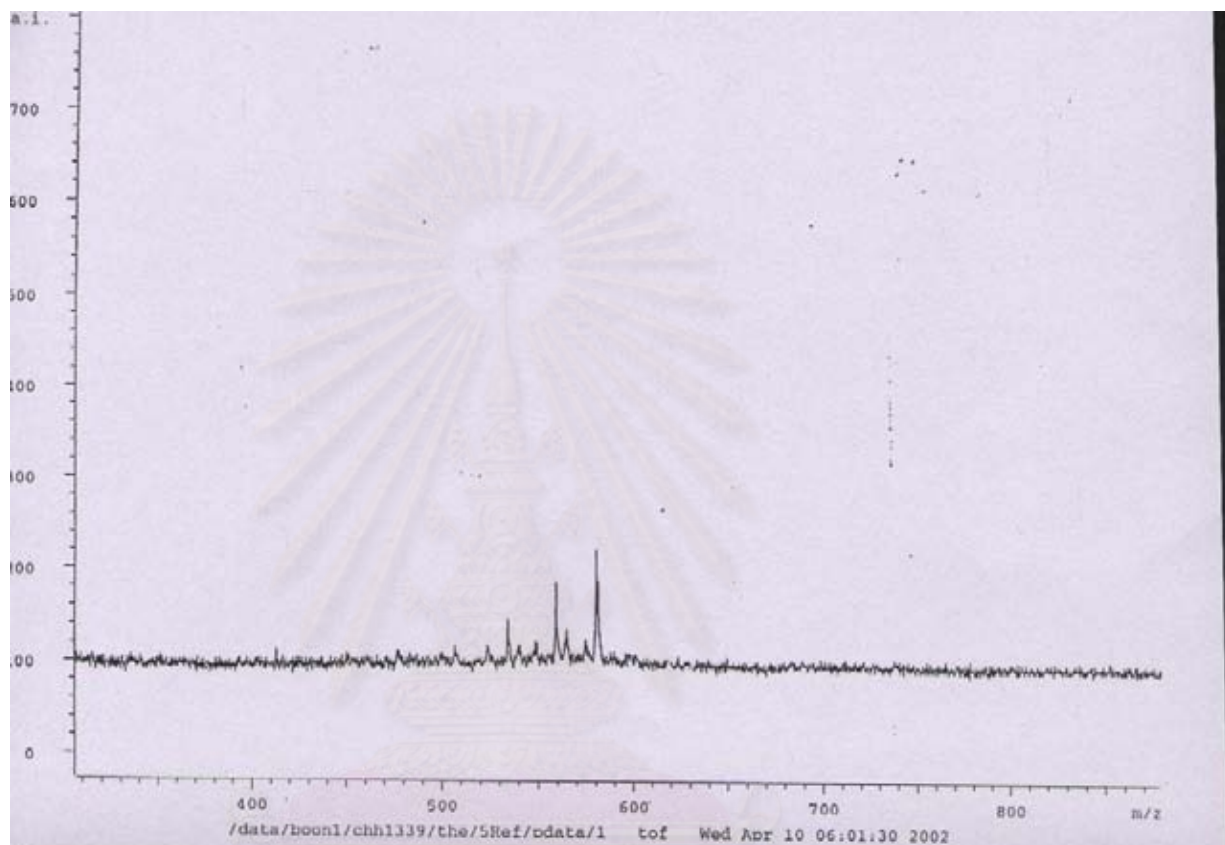
## สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ ข.3 แมสสเปกตรัมของ CHH จากก้านตาทิ้งกลาดำวัดที่ความต่างศักย์ Reflectron 14.97 kV



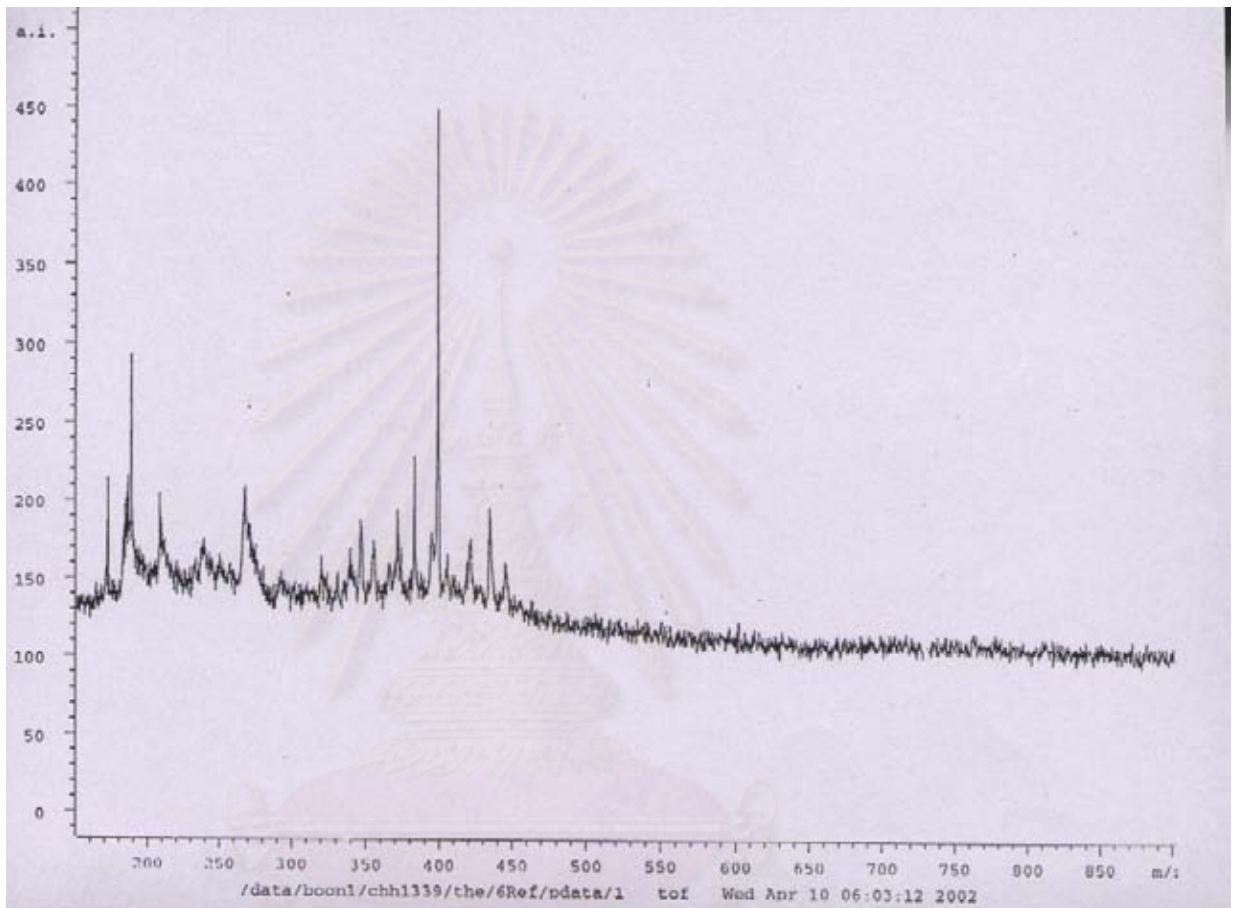
# สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ ข.4 แมสสเปกตรัมของ CHH จากก้านตาทิ้งกลาดำวัดที่ความต่างศักย์ Reflectron 11.28 kV



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

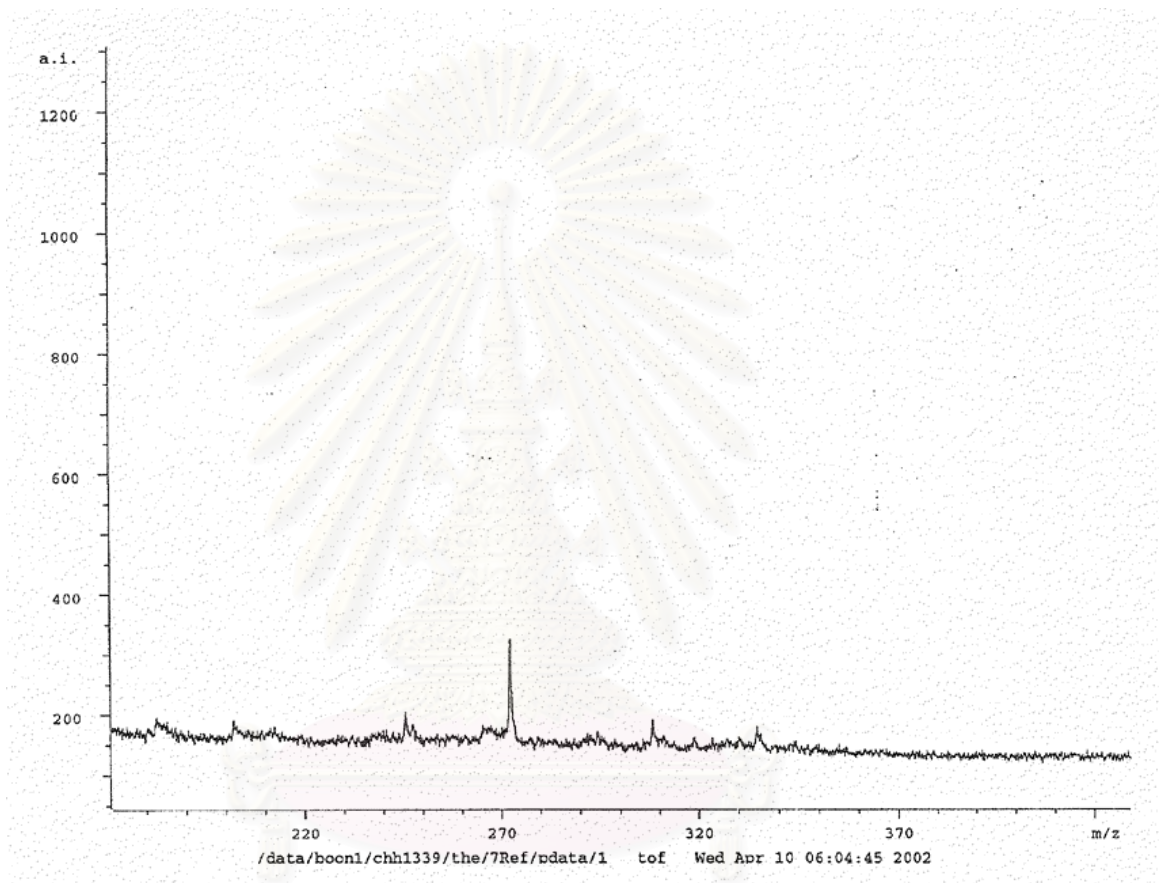
รูปที่ ข.5 แมสสเปกตรัมของ CHH จากก้านตาทิ้งกุกูลาดำวัดที่ความต่างศักย์ Reflectron 8.49 kV



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

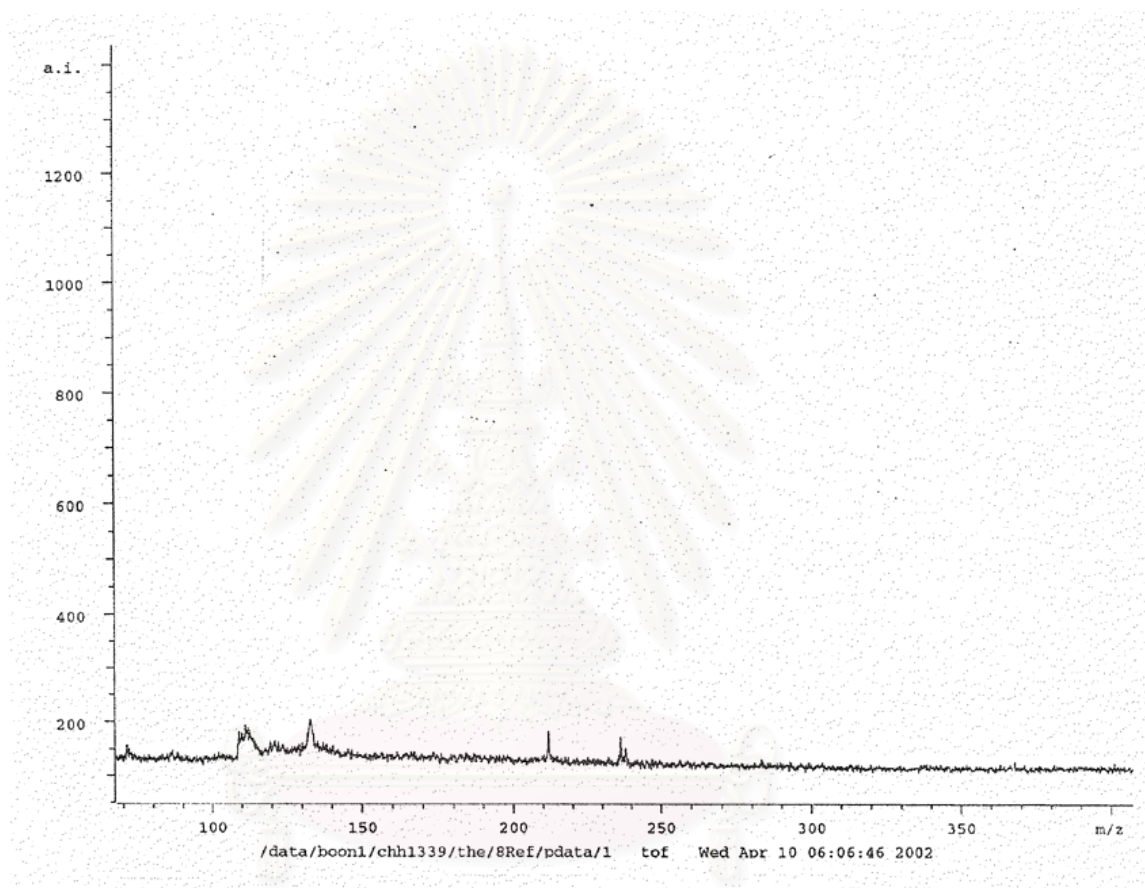
รูปที่ ข.6 แมสสเปกตรัมของ CHH จากก้านตาทิ้งกุดาคำวัดที่ความต่างศักย์ Reflectron 6.39 kV





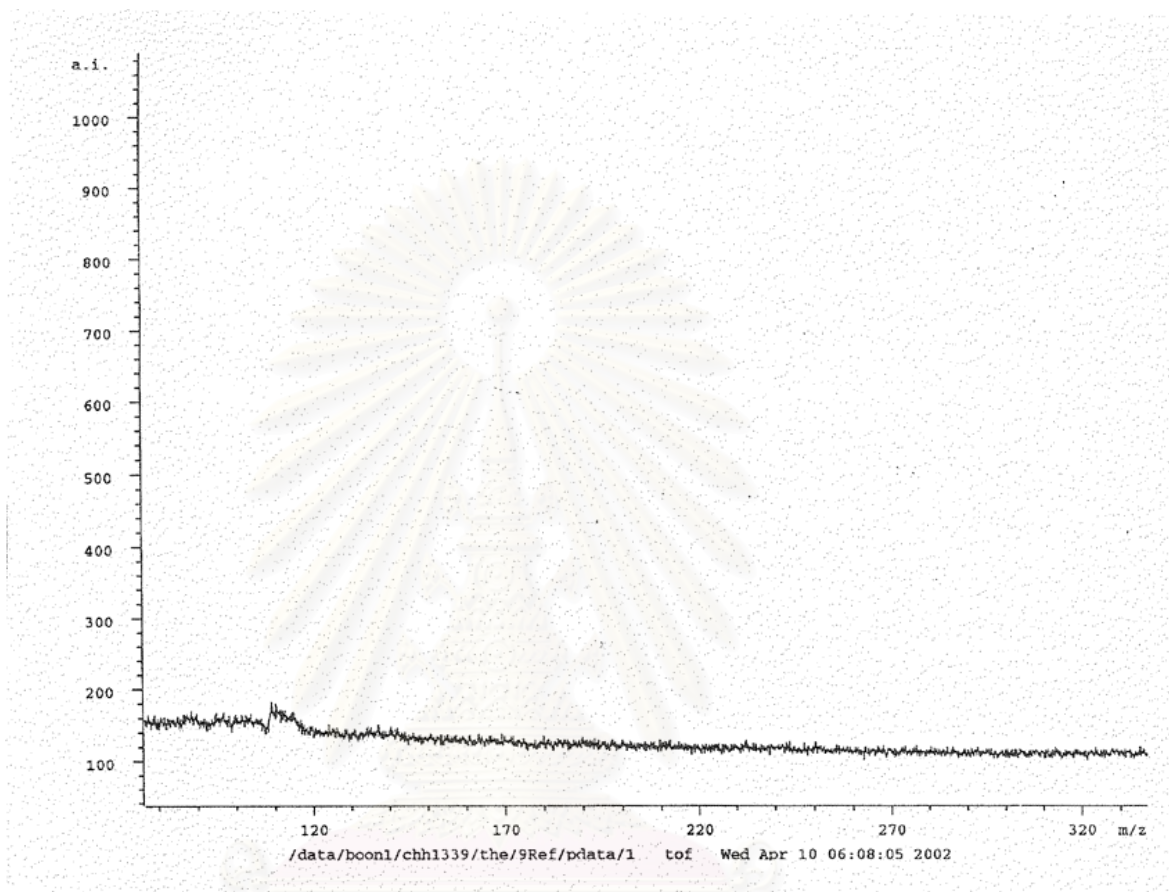
สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ ข.7 แมสสเปกตรัมของ CHH จากก้านตากลึงกุลาดำวัดที่ความต่างศักย์ Reflectron 4.81 kV



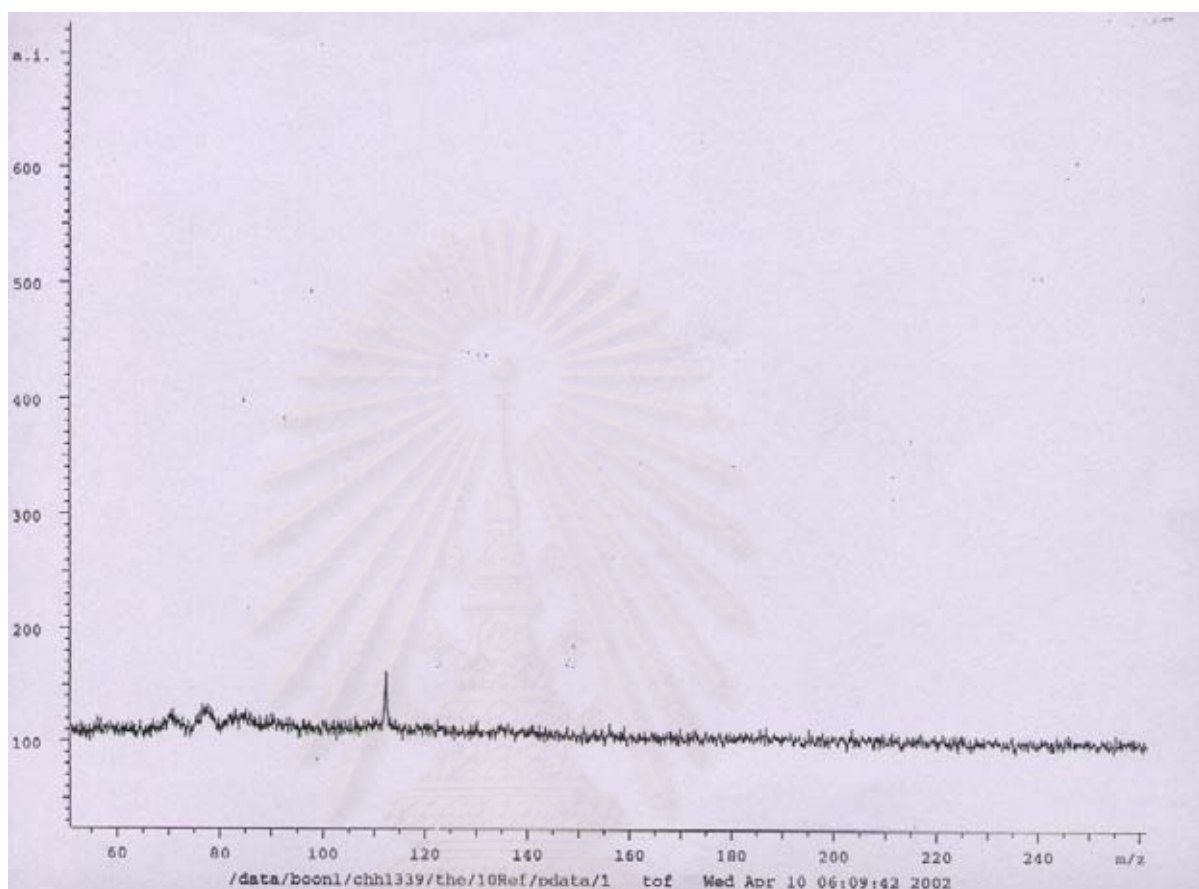
สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ ข.8 แมสสเปกตรัมของ CHH จากก้านตาทิ้งกุลาดำวัดที่ความต่างศักย์ Reflectron 3.63 kV



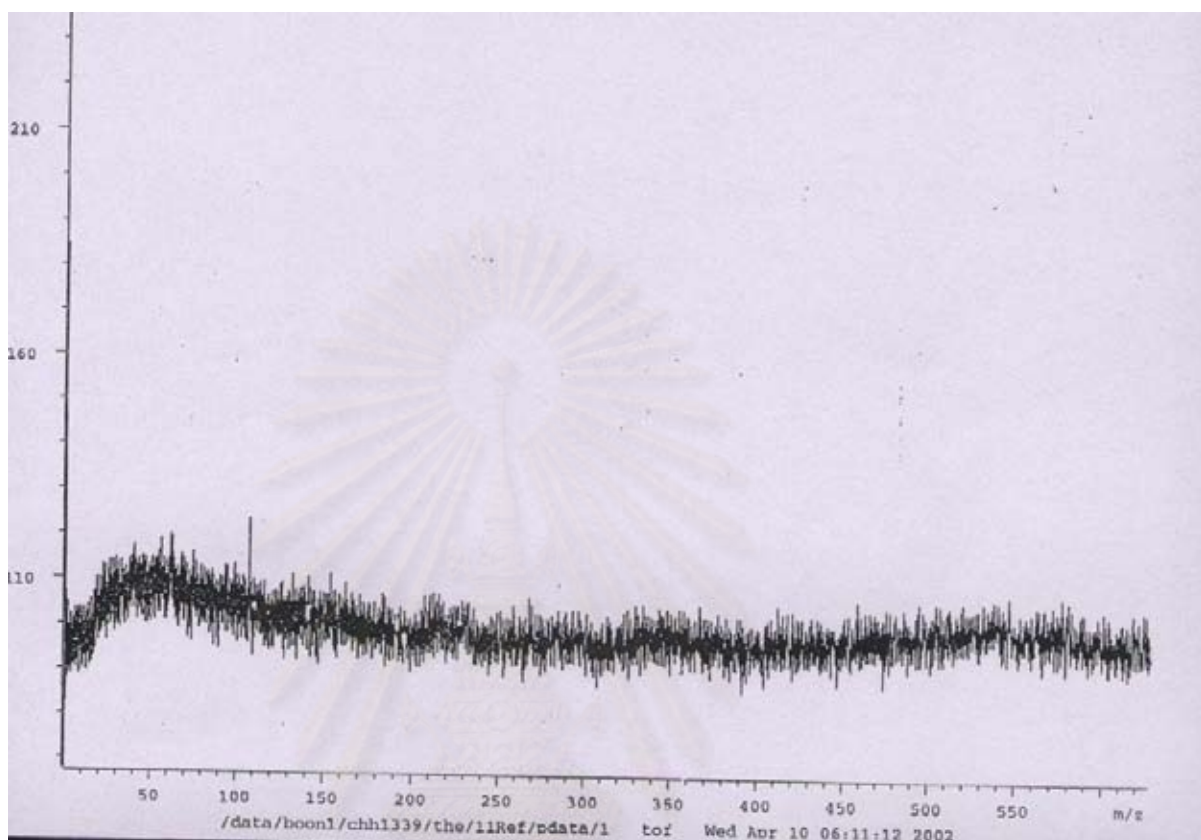
สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ ข.9 แมสสเปกตรัมของ CHH จากก้านตาทิ้งกุดดำวัดที่ความต่างศักย์ Reflectron 2.73 kV



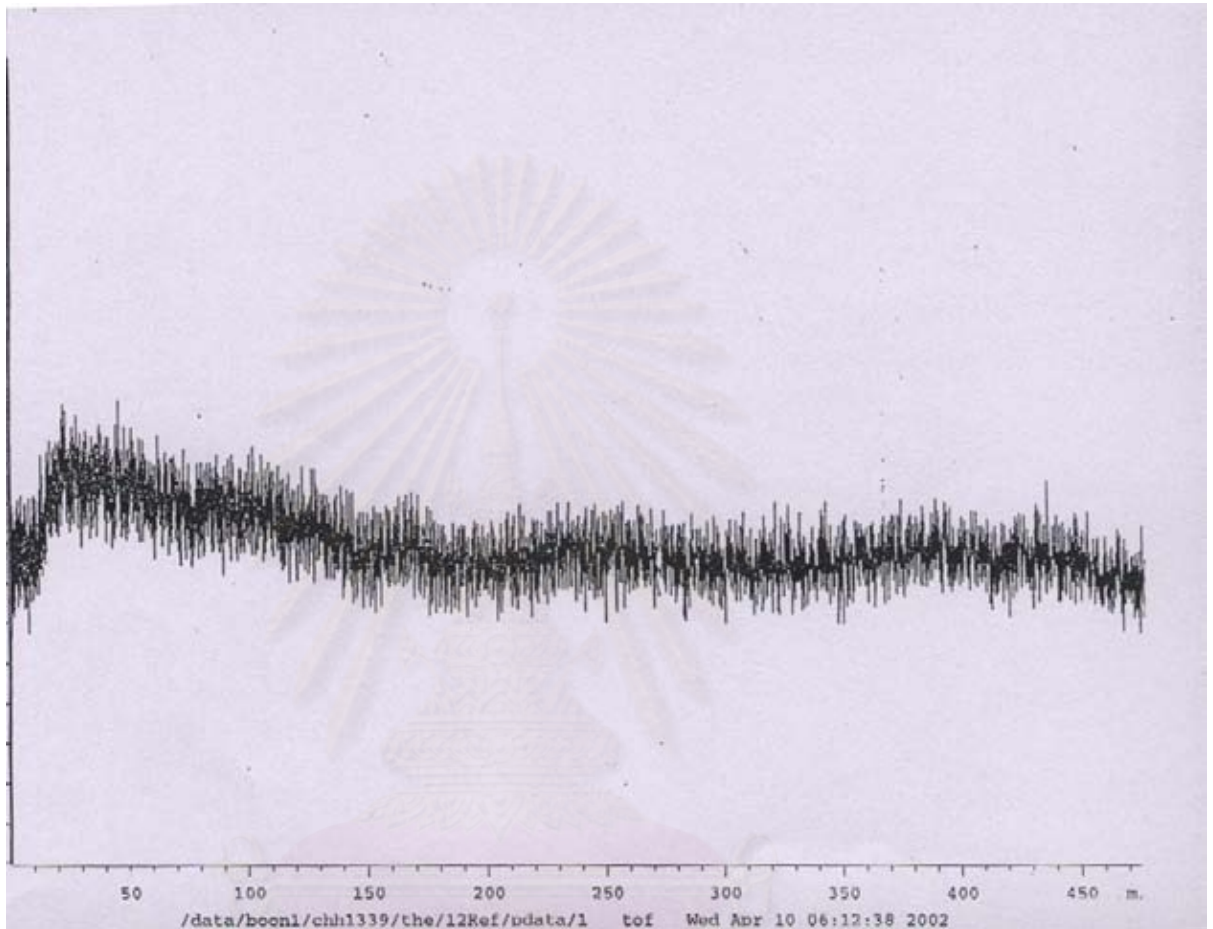
สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ ข.10 แมสสเปกตรัมของ CHH จากก้านตาทิ้งกุลาดำวัดที่ความต่างศักย์ Reflectron 1.55 kV



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ ข.11 แมสสเปกตรัมของ CHH จากก้านตาทิ้งกลาดำวัดที่ความต่างศักย์ Reflectron 1.18 kV



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ ข.12 แมสสเปกตรัมของ CHH จากก้านตาทิ้งกูดำวัดที่ความต่างศักย์ Reflectron 0.94 kV

### ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นาย ไพบุลย์ พรหมณี เกิดเมื่อวันที่ 20 มีนาคม พ.ศ. 2518 ที่จังหวัดพัทลุง สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเทคนิคการแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยเมื่อปีการศึกษา 2540 และได้เข้าศึกษาต่อในระดับบัณฑิตศึกษา หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2541



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย