บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ประเทศไทยเป็นประเทศที่ผลิตกุ้งในระบบเพาะเลี้ยงมากที่สุดในโลก และกุ้งระบบเพาะเลี้ยงของไทย คือ "กุ้งกุลาดำ" โดยปริมาณการผลิตกุ้งของไทยในแต่ละปี ไทยใช้บริโภคภายในประเทศเพียงร้อยละ 5 ของปริมาณการผลิตเท่านั้น ที่เหลือส่งออกจำหน่ายต่างประเทศ ในระยะเวลา 5 ปี (พ.ศ. 2537 - พ.ศ. 2541) ประเทศไทยส่งออกกุ้งและผลิตภัณฑ์เฉลี่ยปีละ 2 แสนเมตริกตัน มูลค่าการส่งออกเฉลี่ยปีละ 5 หมื่นล้านบาท (โจเซลีน แนวพนิช และคณะ, 2542)

ข้อดีของกุ้งกุลาดำ คือ เป็นกุ้งทะเลที่มีขนาดใหญ่ มีเนื้อแน่นและรสชาติดี มีความอดทนและปรับตัวให้เข้ากับการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิและความเค็มของน้ำได้ดี คือจะไม่ตายง่ายในกรณีที่อุณหภูมิเปลี่ยนแปลงไปสูงหรือต่ำอย่างรวดเร็ว หรือความเค็มของน้ำเพิ่มขึ้นหรือลดลงในทันทีทันใดก็จะไม่ตาย แต่จะชะงักการเจริญเติบโตเท่านั้น (ปัญญา สุวรรณสมุทร, 2534)

ปัญหาที่สำคัญประการหนึ่งในการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ คือ การขาดแคลนแม่พันธุ์กุ้งที่จะนำมาเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตลูกกุ้งสนองตอบต่อผู้เลี้ยงกุ้งโดยทั่วไป เนื่องจากการเพาะพันธุ์ลูกกุ้งจะต้องอาศัยแม่พันธุ์กุ้งไข่แก่ ซึ่งเดิมนั้นจะสามารถจับได้จากธรรมชาติในทะเลแถบฝั่งมหาสมุทรอินเดีย แต่จากการขยายการเลี้ยงกุ้งกุลาดำออกไปอย่างกว้างขวาง ปริมาณการใช้แม่พันธุ์กุ้งเพิ่มมากขึ้นและปริมาณการจับจากธรรมชาติก็ลดน้อยลงจนไม่เพียงพอต่อความต้องการ จึงต้องแก้ไขโดยทำการเลี้ยงกุ้งกุลาดำให้มีไข่แก่ในบ่อ โดยใช้การบีบตาหรือตัดตา ซึ่งคุณภาพของลูกกุ้งที่ได้จากการบีบตาจะด้อยกว่าที่ได้จากแม่กุ้งในธรรมชาติและอัตราการรอดตายก็น้อยกว่าลูกกุ้งจากแม่กุ้งธรรมชาติ

สำหรับการศึกษาเกี่ยวกับระบบฮอร์โมนของกุ้งกุลาดำนี้ยังมีอยู่น้อย ดังนั้นการศึกษาระบบฮอร์โมนในกุ้งชนิดนี้จึงเป็นสิ่งจำเป็น และน่าจะเป็นประโยชน์ในการที่จะทราบถึงบทบาทการทำงานของฮอร์โมนที่มีผลทางสรีรวิทยาของระบบต่างๆในกุ้ง เพื่อใช้ในการพัฒนาและเพิ่มผลผลิตกุ้งกุลาดำต่อไปได้ และได้มีรายงานการตรวจพบสารคล้ายนิวโรเปปไทด์ในก้านตาของกุ้งกุลาดำด้วยวิธีอิมมูโนไซโตเคมิสตรี (immunocytochemistry) พบว่ามีสารคล้ายนิวโรเปปไทด์หลายชนิด เช่น Pigment dispersing hormone (PDH), FMRFamide และ Cholecystokinin (CCK)

กระจายอยู่ในบริเวณต่างๆ ซึ่งบทบาทการทำงานของสารคล้ายนิวโรเปปไทด์เหล่านี้ยังไม่ทราบเป็นที่แน่ชัด แต่คาดว่าอาจจะทำหน้าที่เป็น นิวโรฮอร์โมน (neurohormone) หรือ สารสื่อประสาท (neurotransmitter) หรือ นิวโรโมดูเลเตอร์ (neuromodulator) (วีระวรรณ สิทธิกรกุล และคณะ, 2537)

ในการวิจัยครั้งนี้เป็นการแยกสกัดและทำให้บริสุทธิ์ของสารเปปไทด์จากต่อมไซนัสของกุ้งกุลาดำ โดยใช้กระบวนการ Reverse-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) ระบบต่างๆ ประกอบกับใช้วิธี Dot-enzyme linked immunosorbant assay (Dot-ELISA) ในการติดตามสารเปปไทด์ที่มีแอนติบอดีในแฟรคชั่นต่าง ๆ หลังจากผ่านการแยกในแต่ละขั้นตอนและตรวจหาน้ำหนักโมเลกุลของเปปไทด์ที่แยกได้ด้วย Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) ซึ่งคาดว่าจะสามารถทำได้สะดวก รวดเร็ว และมีประสิทธิภาพ เนื่องจากวิธี Dot-ELISA เป็นวิธีที่มีความไว (sensitivity) สูงเทียบเท่ากับ Radioimmunoassay (RIA) แต่ไม่สิ้นเปลืองวัสดุและมีความรวดเร็วกว่า RIA มาก (Sithigorngul, Stretton and Cowden,1991) ข้อดีของการใช้ MALDI ในการวิเคราะห์เปปไทด์คือ มีความไวสูง (ในช่วง attomole ถึง femtomole) จึงสามารถใช้กับสารที่มีปริมาณน้อยได้ดี และการใช้ multisample probe จึงทำให้ MALDI สามารถเตรียมหลาย ๆ ตัวอย่างได้พร้อมกัน ดังนั้นการเตรียมและการวิเคราะห์จึงทำได้อย่างรวดเร็ว (Siuzdak,1996) ความรู้ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้จะเป็นแนวทางสำหรับติดตามฮอร์โมนกลุ่มที่สนใจในระหว่างการทำให้บริสุทธิ์ ซึ่งเมื่อได้ฮอร์โมนที่บริสุทธิ์แล้ว สามารถนำไปศึกษาลักษณะโครงสร้างและองค์ประกอบทางเคมี ตลอดจนบทบาทที่สำคัญในกระบวนการเมตาบอลิสม กลไกการออกฤทธิ์ รวมทั้งการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีเพื่อช่วยให้การแยกและการทำให้บริสุทธิ์ทำได้ง่ายขึ้น เพราะสามารถใช้การทดสอบทางภูมิคุ้มกันมาช่วยในระหว่างการแยกฮอร์โมนด้วย โดยเฉพาะ VIH ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่ยับยั้งการพัฒนาของรังไข่ ถ้ากำจัดฮอร์โมนนี้ได้จะเป็นประโยชน์ต่อการเพาะเลี้ยงกุ้งในแง่การแก้ปัญหาขาดแคลนแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อแยกสกัดสารเปปไทด์จากต่อมไซนัสของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon*

2. เพื่อทำให้บริสุทธิ์สารเปปไทด์รูปแบบต่างๆ จากสารสกัดต่อมไซนัสของกุ้งกุลาดำด้วยกระบวนการ RP-HPLC โดยใช้วิธี Dot-ELISA และ Mass Spectrometry ในการติดตามสารระหว่างการทำให้บริสุทธิ์

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1. แยกสกัดสารเปปไทด์จากต่อมไซนัสของกุ้งกุลาดำ

2. ทำให้เปปไทด์ที่แยกสกัดได้บริสุทธิ์ด้วยกระบวนการ RP-HPLC

3.ใช้วิธี Dot-ELISA ติดตามสารเปปไทด์บางชนิดที่มีแอนติบอดีในระหว่างการทำให้บริสุทธิ์ด้วยกระบวนการ RP-HPLC

4.ตรวจหาน้ำหนักโมเลกุลของสารเปปไทด์ทั้งหมดที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ MALDI-TOF MS

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้สารเปปไทด์บริสุทธิ์ที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล จากต่อมไซนัสของกุ้งกุลาดำ และสามารถจำแนกชนิดของเปปไทด์ตามแอนติบอดีที่ใช้ ได้เป็นสารคล้าย FMRFamide, PDH, PP6 และ CHH รวมทั้งเปปไทด์ตัวอื่นที่ไม่มีแอนติบอดี ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็น VIH หรือ MIH เพื่อนำไปตรวจหาโครงสร้างและลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโนต่อไป ซึ่งจะเป็นแนวทางในการศึกษาบทบาทและการทำงานของนิวโรเปปไทด์ในการดำรงชีวิตของกุ้งกุลาดำต่อไปได้