บทที่ 1
บทนำ

ภูมิหลัง

ก้านตาของสัตว์กลุ่มครัสทาเชียน (Crustacean) เช่น กุ้ง ปู เป็นแหล่งที่สร้างฮอร์โมนต่างๆมากมาย ซึ่งฮอร์โมนเหล่านี้มีความสำคัญในการควบคุมกระบวนการทางสรีรวิทยาของสัตว์กลุ่มครัสทาเชียนเช่น ฮอร์โมนที่ควบคุมการรวมตัวของรงควัตถุ (Red Pigment Concentrating Hormone-RPCH) (Fernlund and Josefsson , 1972) ฮอร์โมนที่ควบคุมการกระจายของรงควัตถุในโครมาโตฟอร์ (Pigment Dispersing Hormone - PDH) (Kleinholz *et al.* ,1986 ; Rao and Riehm , 1988) ฮอร์โมนที่ยับยั้งการลอกคราบ (Molt Inhibiting Hormone - MIH) (Chang , Bruce and Nowcomb , 1987 ; Webster , 1991 ; Terauchi *et al.* , 1996) ฮอร์โมนยับยั้งการพัฒนาของรังไข่ (Vitellogenesis Inhibiting Hormone -VIH or Gonad Inhibiting Hormone - GIH) (Soyez *et al.* ,1991 ; Tensen *et al.* , 1991 ; Aguilar *et al.* , 1992 ; Keller , 1992) รวมทั้งฮอร์โมนเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด (Crustacean Hyperglycemic Hormone - CHH) (Kegel *et al.* , 1989 ; Huberman , Aquilar and Brew , 1993 ; Yang , Aida and Nagasawa , 1995)

ฮอร์โมนเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด หรือ CHH เป็นฮอร์โมนที่สำคัญชนิดหนึ่งในกระบวนการเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรตในสัตว์กลุ่มครัสทาเชียน (Santo and Keller , 1993) จากการศึกษาโดยวิธี immunocytochemistry พบว่ากลุ่มของเซลล์ในก้านตาที่สร้าง CHH จะอยู่บริเวณที่เรียกว่า Medulla Terminalis Ganglionic X-Organ (MTGXO) จากนั้นจึงส่ง CHH ที่สร้างไปสะสมในส่วนที่เรียกว่า ต่อมไซนัส (sinus gland) ซึ่งเป็น neurohemal organ ในก้านตา ต่อมไซนัสจึงเป็นแหล่งสะสมและปล่อย CHH ไปยังเนื้อเยื่อเป้าหมาย (target tissue) (Kallen and VanHerp , 1981) หลังจากที่ Abramowitz , Hisaw and Papandrea (1944) พบว่าในสารสกัดจากก้านตาของสัตว์พวกครัสทาเชียนมีปัจจัยควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด (diabetogenic factor) การศึกษาต่อมาพบว่าปัจจัยควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด คือ CHH นั่นเอง ทำให้ในระยะ 50 ปีต่อมามีผู้พยายามแยกสกัดและศึกษาโครงสร้างของ CHH ในสัตว์พวกครัสทาเชียนโดยเฉพาะพวก decapods เช่น กุ้ง ปู crayfish กันอย่างกว้าง

ขวาง (Keller , Jarose and Kelgel , 1985 ; Keller and Sedlmeier , 1988 ; Keller ,1992 ; Huberman *et al.* , 1993 ; Martin , Sorokine and Van Dorsselaer , 1993 ;Smullen and Bentley , 1994 ; Yang *et al.* , 1995) โดยรายงานส่วนใหญ่จะใช้ต่อมไซนัสจากก้านตาเป็นแหล่งศึกษา CHH พบว่าโครงสร้างของ CHH เป็นพวกพอลิเพปไทด์ ซึ่งส่วนใหญ่ประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 72 หน่วย มีซิสเทอีน 6 หน่วยทำให้เกิดพันธะไดซัลไฟด์ 3 พันธะ มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 8,000 -9,000 ดาลตัน ซึ่งขึ้นอยู่กับสัตว์พวกครัสทาเชียนแต่ละชนิด โดยมีความแตกต่างกันในส่วนประกอบและลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโน อาทิเช่นใน *Carcinus maenas* พบว่า CHH มีน้ำหนักโมเลกุล 8,524 ดาลตัน มีลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโนไม่เหมือนกับเพปไทด์หรือโปรตีนตัวอื่นๆที่เคยรู้จักมาก่อน (Kegel *et al.* , 1989) Tensen และคณะ (1991) ศึกษา CHH ใน *Homarus americanus* พบ CHH 2 รูปแบบ หาน้ำหนักโมเลกุลโดยใช้ Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry (FAB-MS) ซึ่งรูปแบบแรกมีน้ำหนักโมเลกุล 8,578 และรูปแบบที่สองมีน้ำหนักโมเลกุล 8,655 $\pm$ 25 ดาลตัน ในปีเดียวกัน Kegel และคณะศึกษา CHH ใน *Orconectes limosus* พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุล 8,400 ดาลตัน นอกจากนี้ยังมีการศึกษาในพวกครัสตาเชียชนิดอื่นๆอีกเช่น ใน *Procambarus bouvieri* (Huberman *et al.* , 1993) *Nephrops norvegicus* (Smullen and Bentley , 1994) และ *Penaeus japonicus* (Yang *et al.* , 1995) เป็นต้น

สำหรับกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) ได้มีการศึกษาการทำให้บริสุทธิ์และลักษณะโครงสร้างของ CHH จากก้านตาของกุ้งก้ามกราม (Sithigorngul *et al.*, 1999) โดยการสกัดก้านตากุ้งก้ามกรามด้วยสารละลายเมทานอล กรดอะซิติก และน้ำ (methanol : acetic acid : H_2O) ในอัตราส่วน 90:1:9) นำสารสกัดที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์โดยผ่าน Reverse Phase High Performane Liquid Chromatography (RP-HPLC) โดยใช้คอลัมน์และระบบตัวทำละลายต่างๆกัน สามารถแยก CHH ได้ 1 รูปแบบ และเมื่อศึกษาลักษณะโครงสร้างของ CHH ที่แยกได้จากก้านตาของกุ้งก้ามกราม (Sithigorngul *et al.* , 1999) โดยวิธี aminoacid analysis พบว่า ประกอบด้วยกรดอะมิโน 71 หน่วย มีซิสเทอีน (cystein) 6 หน่วย ซึ่งสร้างพันธะไดซัลไฟด์ 3 พันธะ ระหว่างตำแหน่งที่ 7-23 , 23-29 และ 26-52 ซึ่งตำแหน่งที่สร้างพันธะไดซัลไฟด์เหมือนกับ CHH ที่พบใน *Carcinus maenus* (Kegel *et al.* , 1989) และ CHH-I จาก *Procambarus bouvieri* (Huberman *et al.* ,1995) และเมื่อนำ CHH ดังกล่าวไปหาน้ำหนักโมเลกุลโดย Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI -TOF MS) พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 8538.1 ดาลตันซึ่งไม่สอดคล้องกับน้ำหนักโมเลกุลที่ได้จากการคำนวณจากลำดับของกรดอะมิโนได้เท่ากับ 8430.8 ดาลตัน ซึ่งชี้ให้เห็นว่า CHH ของกุ้งก้ามกรามน่าจะประกอบด้วยกรดอะมิโน 72 หน่วย จากการเปรียบเทียบลำดับ

กรดอะมิโนของ CHH เชื่อว่ากรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 71 หายไป ซึ่งอาจจะเป็นทรีโอนีน (threonine) ลำดับการเรียงของกรดอะมิโนของ CHH จากกุ้งก้ามกรามแสดงดังรูปที่ 1.1 และเมื่อเปรียบเทียบลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโนที่ซ้ำกันระหว่าง CHH จากกุ้งก้ามกราม กับ CHH จากสัตว์ครัสทาเซียนชนิดอื่นที่ทราบโครงสร้างแล้ว พบว่า CHH จากกุ้งก้ามกรามมีลำดับการเรียงของกรดอะมิโนที่ซ้ำกับ CHH-A และ CHH-B จาก *Homarus americanus* 65% และ 58% (Tensen *et al.*, 1991) ตามลำดับ ซ้ำกับ CHH จาก *Orconectes limosus* 68% (Kegel *et al.*, 1991) ซ้ำกับ CHH จาก *Procambarus bouvierii* 67% (Huberman *et al.*, 1993) ซ้ำกับ CHH จาก *Carcinus maenas* 62.5% (Kegel *et al.*,1989) และซ้ำกับ CHH จาก *Penaeus japonicus* 44.5% (Yang *et al.*, 1995)

สำหรับงานวิจัยนี้เนื่องจากได้ทราบลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโน CHH จากก้านตากุ้งก้ามกรามแล้วว่ากรดอะมิโนตำแหน่งที่ 71 ซึ่งน่าจะเป็น threonine อาจหายไป (Sithigorngul *et al.*,1999) เพื่อเป็นการยืนยันโครงสร้างของ CHH ของกุ้งก้ามกรามที่แน่นอน ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงเป็นการสังเคราะห์เพปไทด์ที่มีลำดับกรดอะมิโนทางปลาย C ของ CHH ที่มีและไม่มีทรีโอนีน คือ YANAVQV-NH_2 (T-) และ YANAVQTV-NH_2 (T+) และนำมาสร้างแอนติบอดีเพื่อใช้พิสูจน์ลำดับกรดอะมิโนทางปลาย C ของ CHH จากกุ้งก้ามกราม โดยอาศัยปฏิกิริยาในการจับกันของแอนติบอดีกับ CHH ในสภาพธรรมชาติที่พบในก้านตา โดยวิธี immunocytochemistry และวิธี dot-ELISA

เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

นับตั้งแต่ Abramuwitz และคณะ (1944) อธิบายว่าในสารสกัดจากก้านตาของสัตว์ครัสทาเซียนมีปัจจัยเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด (diabetogenic factor) ซึ่งการศึกษาต่อมาพบว่าปัจจัยดังกล่าวคือฮอร์โมนเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด (Crustacean Hyperglycemic Hormone-CHH) นั่นเอง ทำให้ตั้งแต่นั้นมาจนถึงปัจจุบันมีผู้สนใจศึกษาเกี่ยวกับการสกัด การแยกให้บริสุทธิ์ และหาลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโนของฮอร์โมนเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดในสัตว์ครัสทาเซียนในหลาย ๆ สปีชีส์ เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้องในระยะ 10 ปี มีดังนี้

ปี 1989 Kegel และคณะ ได้ศึกษาการหาลำดับกรดอะมิโนของ CHH จากปูน้ำเค็ม *Carcinus maenas* โดยการสกัด CHH จากต่อมไซนัส และนำไปทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี HPLC ได้พีคที่แสดงความสามารถในการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด (hyperglycemic activity) 2 พีค จากการนำพีคหลักของ

CHH มาย่อยด้วยเอนไซม์ต่างๆ และหาลำดับกรดอะมิโนโดยใช้ manual microsequencing (DABITC-PITC double-coupling method) และหาน้ำหนักโมเลกุลโดยใช้ FAB MS พบว่า CHH ของ *Carcinus maenas* ประกอบด้วยกรดอะมิโน 72 หน่วย มีน้ำหนักโมเลกุล 8,524 ดาลตัน มีพันธะไดซัลไฟด์ 3 พันธะ ระหว่างตำแหน่งที่ 7-23 , 23-29 และ 26-52 ปลาย N เป็น pyroglutamate และปลาย C เป็นเอไมด์

ในปีเดียวกัน Soyez และคณะ ศึกษาคุณลักษณะของ CHH จากต่อมไซนัสของกุ้งลอบสเตอร์ *Homarus americanas* โดยใช้สารละลายสกัดได้แก่ 10 % กรดอะซิติก กรดไฮโดรคลอริก 1 N ที่ 85 องศาเซลเซียส และกรดอะซิติกที่ 80 องศาเซลเซียส นำสารสกัดที่ได้ผ่าน HPLC ผลปรากฏว่าเมื่อใช้ตัวทำละลายต่างชนิดกันหรือชนิดเดียวกันแต่อุณหภูมิต่างกัน ได้โครมาโทแกรมเหมือนกัน โดยสารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยกรดอะซิติกที่ 85 องศาเซลเซียส ให้ปริมาณ CHH คงที่ จากนั้นนำสารสกัดดังกล่าวผ่านคอลัมน์ Nucleosil C18 ระบบตัวทำละลาย 0.1 % TFA ในน้ำ และ 0.1% TFA ใน n-propanol อัตราการไหล 0.75 มิลลิลิตรต่อนาที และควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 32 องศาเซลเซียส พบว่าแยกเพปไทด์ได้ 3 กลุ่ม แต่ละกลุ่มประกอบด้วยเพปไทด์ย่อย 2 เพปไทด์ ซึ่งมีเพียง 2 กลุ่มที่แสดงความสามารถในการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดใน *Hormorus americanus* กลุ่มแรก มีน้ำหนักโมเลกุล 8,633 ดาลตัน และมีค่า pI เท่ากับ 8.7 ในขณะที่กลุ่มสองมีน้ำหนักโมเลกุล 8,577 ดาลตันและมีค่า pI เท่ากับ 5.0 เมื่อเปรียบเทียบลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโนของเพปไทด์ทั้งสองกลุ่ม พบว่ามีการเรียงตัวของกรดอะมิโนคล้ายกันมาก

Tensen และคณะ (ปี 1991) เปรียบเทียบลักษณะของ CHH ในกุ้งลอบสเตอร์ *Homorus americanus* พบ CHH 2 รูปแบบ ซึ่งสกัดแยกได้จากต่อมไซนัส ด้วย 0.1 นอร์มอล กรดไฮโดรคลอริกที่ 80 องศาเซลเซียส และผ่านขั้นตอนการแยกให้บริสุทธิ์โดย RP-HPLC 2 ขั้นตอน นำเพปไทด์ที่แยกได้ทั้ง2 รูปแบบ หาลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโน โดยวิธี Edman degradation และหาน้ำหนักโมเลกุล โดยวิธี FAB-MS พบว่าเพปไทด์ทั้ง 2 รูปแบบ ประกอบด้วยกรดอะมิโน 72 หน่วย ปลาย N เป็น pyroglutamate มีน้ำหนักโมเลกุล 8,578 ดาลตัน และ 8655 $\pm$ 25 ดาลตัน ตามลำดับ

ในปีเดียวกัน Kegel และคณะ (1991) ศึกษาลำดับกรดอะมิโนของ CHH ที่ได้จากต่อมไซนัสของกุ้ง crayfish *Orconectes limosus* โดยวิธี manual Edman microsequencing พบว่า ฮอร์โมนนี้ประกอบด้วยกรดอะมิโน 72 หน่วย มีน้ำหนักโมเลกุล 8,4 00 ดาลตัน ปลาย N คือ pyroglutamate และปลาย C คือ Val-NH_2 มีซิสเทอีน 6 หน่วย ทำให้เกิดพันธะไดซัลไฟด์ 3 พันธะ ซึ่งเหมือนกับ CHH ใน *Carcinus* และเมื่อเปรียบเทียบการเรียงตัวของกรดอะมิโนกับสัตว์ครัสทาเชียนสปีชีส์อื่น พบว่า ลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโนซ้ำกับ CHH ของ *Carcinus* 61 % และซ้ำกับ MIH ของ *Homorus* 81 %

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปี 1993 Huberman และคณะ เปรียบเทียบลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโนของ CHH จากสัตว์ครัสทาเซียนชนิดต่างๆ พบว่า CHH ของ *Procambarus bouvieri* มีลำดับกรดอะมิโนซ้ำกับ CHH ของ *Orconectes limosus* , *Carcinus maenas* และ CHH -A , CHH-B ของ *Hormorus americasus* ถึง 98.6% , 61.1% , 83.3% และ 79.2% ตามลำดับ

ปี 1994 Smullen และ Bently ได้ศึกษาการสกัด CHH จากต่อมไซนัสของกุ้งนอร์เวย์ *Nephrops norvegicus* ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 0.1 M และนำไปทำให้บริสุทธิ์โดย RP-HPLC คอลัมน์ Nucleosil C18 พบว่า เมื่อใช้ anti Orconectes CHH antiserum ในการติดตาม CHH ที่แยกได้ ด้วย ELISA พบว่าได้เพปไทด์จาก 2 แฟรคชั่นที่แสดงความสามารถในการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดและมีน้ำหนักโมเลกุล 8,000 ดาลตัน เมื่อเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน

ปี 1995 Huberman และคณะ ศึกษาคุณลักษณะนิวโรเพปไทด์ (CHH, MIH และ GIH) ที่แยกได้จากต่อมไซนัสของ Mexican crayfish , *Procambarus bouvieri* (Ortmaun) พบว่าแยกเพปไทด์ได้ 4 ชนิด คือ GIH MIH CHH I และ CHH II โดยมีคุณลักษณะที่เหมือนกันคือ 1. มีค่า pI ในช่วงเป็นกรด 2. มีคุณสมบัติ hydrophobicity 3. มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 8,300-8,400 ดาลตัน 4. ประกอบด้วยกรดอะมิโน 72 หน่วย 5. ปลาย N และปลาย C ถูกบล็อก 6. มีซีสเทอีน 6 หน่วย 7. ไม่มีฮีสทิดีน เมไทโอนีน ทริปโทเฟน สำหรับ CHH I สามารถหาลำดับกรดอะมิโนได้อย่างสมบูรณ์ โดยมีปลาย N คือ pyroglutamate และ ปลาย C คือ valinamide มีน้ำหนักโมเลกุล 8,373 ดาลตัน ซึ่งสอดคล้องกับลำดับกรดอะมิโนที่หาได้

ปี 1995 Yang และคณะ ศึกษาลำดับกรดอะมิโนของ CHH และเพปไทด์คล้าย CHH จากกุ้งกุลุ่ม่า *Penaeus japonicus* โดยสกัดแยกเพปไทด์จากต่อมไซนัส ด้วยสารละลาย NaCl ใน acetonitrile และนำไปแยกให้บริสุทธิ์ด้วย PR-HPLC (0-50 % acetonitrile ใน 0.05% TFA) พบว่าแยกเพปไทด์ได้ 5 ชนิด และเมื่อนำเพปไทด์ที่ได้ทั้งหมดหาน้ำหนักโมเลกุลและทดสอบทางชีววิทยา (bioassay) พบว่าหนึ่งในเพปไทด์ที่แยกได้ คือ CHH ประกอบด้วยกรดอะมิโน 72 หน่วย มีน้ำหนักโมเลกุล 8,353 ดาลตัน ส่วนเพปไทด์อีก 4 ชนิด มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกับ CHH โดยมีน้ำหนักโมเลกุล 8,368 , 8,487 , 8,328 และ 8,314 ดาลตัน

ปี 1997 Shih และคณะ ศึกษาแหล่งสร้างเพปไทด์กลุ่มของ CHH และ MIH ในก้านตาของ *Penaeus japonicus* โดยการสังเคราะห์เพปไทด์ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโน 7-10 หน่วย ที่สอดคล้องกับปลาย C ของแฟมิลี่ CHH และ MIH คือ AHLHNAHRER-NH_2 (Pej-SGP I) , DEYRLA-NH_2 (Pej-SGP II) , EEHMAAMQTV-NH_2 (Pej-SGP III) , VWISILNAGQ-OH (Pej-SGP IV) และ PSLHEEYQAN-NH_2 (Pej-SGP V) จากนั้นนำเพปไทด์เชื่อมต่อกับ BSA แล้วกระตุ้นให้กระต่ายสร้าง

แอนติบอดี แอนติบอดีที่ได้ต่อเพปไทด์แต่ละตัว นำมาหาตำแหน่งเซลล์ประสาทที่สร้าง CHH และ MIH โดย immunohistochemistry พบเซลล์ประสาทที่สร้าง Pej-SGP I บริเวณ medulla interna ganglionic X organ (MIGXO) และ medulla terminalis ganglionic X organ (MTGXO) พบเซลล์ประสาทที่สร้าง Pej-SGP II บริเวณ MTGX ใกล้กับต่อมไซนัส เซลล์ที่สร้าง Pej-SGP III , Pej-SGP V และ Pej-SGP IV(MIH) บริเวณ MTGX ตรงกันข้ามกับต่อมไซนัส ซึ่งจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เซลล์ประสาทที่สร้างเพปไทด์กลุ่มของ CHH ไม่ได้อยู่บริเวณเดียวกันทั้งหมด

ปี 1999 Sithigorngul และคณะ ศึกษาการทำให้บริสุทธิ์และลำดับกรดอะมิโนของ CHH จากก้านตากุ้งก้ามกราม โดยการสกัด CHH จากก้านตาด้วยสารละลายเมทานอล กรดอะซิติกและน้ำ อัตราส่วน 90 : 1 : 10 ตามลำดับ สารสกัดที่ได้นำไปผ่าน RP-HPLC และติดตาม CHH โดยวิธีทาง biological activity test พบว่าแยก CHH ได้ 1 รูปแบบ ประกอบด้วยกรดอะมิโน 71 หน่วย แต่เมื่อนำไปหาน้ำหนักโมเลกุลโดย MALDI-TOF MS พบว่าน้ำหนักโมเลกุลที่ได้ไม่สอดคล้องกับน้ำหนักโมเลกุลที่ได้จากการคำนวณจากลำดับกรดอะมิโน จึงชี้ให้เห็นว่าน่าจะมีกรดอะมิโนหายไปหนึ่งตัว ซึ่งคาดว่าจะเป็นทรีโอนีนมากกว่าเมทไทโอนีน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

		10		20		30
Mar	AILDQ	SCKGI	FDREL	FKKLD	RVCDD	CYNLY
Prb-I	pEVFDQ	ACKGI	YDRAI	FKKLD	RVCED	CYNLY
Orl	pEVFDQ	ACKGI	YDRAI	FKKLD	RVCED	CYNLY
Hoa-a	pEVFDQ	ACKGV	YDRNL	FKKLD	RVCED	CYNLY
Hoa-b	pEVFDQ	ACKGV	YDRNL	FKKLN	RVCED	CYNLY
Cam	pEIYDT	SCKGV	YDRAL	FNDLE	HVCDD	CYNLY
Pej	SLFDP	ACTGI	YDRQL	LRKLG	RLCDD	CYNVF

		40		50		60
Mar	RKPYV	AIDCR	RGCYQ	NLVFR	QCIQD	LQLMD
Prb-I	RKPYV	ATTCR	QNCYA	NSVFR	QCLDD	LLLID
Orl	RKPYV	ATTCR	QNCYA	NSVFR	QCLDD	LLLID
Hoa-a	RKPFV	ATTCR	ENCYS	NWVFR	QCLDD	LLLSD
Hoa-b	RKPFI	VTTCR	ENCYS	NRVFR	QCLDD	LLMID
Cam	RTSYV	ASACR	SNCYS	NLVFR	QCMDD	LLMMD
Pej	REPKV	ATGCR	SNCYH	NLIFK	DCLEY	LIPSH

		70	
Mar	DLDEY	ANAVQ	?V-NH_2
Prb-I	VVDEY	ISGVQ	TV-NH_2
Orl	VLDEY	ISGVQ	TV-NH_2
Hoa-a	VIDEY	VSNVQ	MV-NH_2
Hoa-b	VIDEY	VSNVQ	MV-NH_2
Cam	EFDQY	ARKVQ	MV-NH_2
Pej	LQEEH	MAAMQ	TV-NH_2

Mar *Macrobrachium rosenbergii* (Sithigorngul *et al.*, 1999)
Prb-I *Procambarus bouvieri* (Huberman *et al.*,1993.)
Orl *Orconectes limosus* (Kegel *et al.*,1991)
Hoa-a *Homarus americanus CHH-A* (Tensen *et al.*,1991)
Hoa-b *Homarus americanus CHH-B* (Tensen *et al.*,1991)
Cam *Carcinus maenas* (Weideman *et al.*, 1989)
Pej *Penaeus japonicus* (Yang *et al.*,1995)

รูปที่ 1.1 เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ CHH ในสัตว์ครัสทาเซียนชนิดต่างๆ (กรดอะมิโนที่ขีดเส้นใต้ต่างจากกรดอะมิโนของ CHH จากกุ้งก้ามกราม)

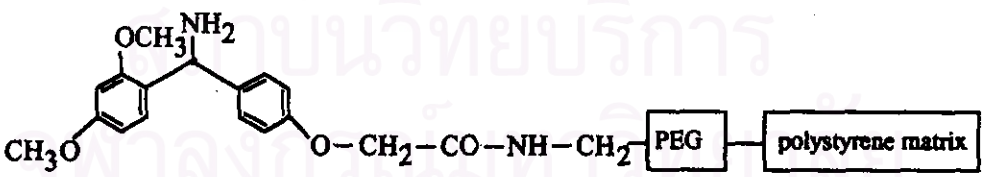
การสังเคราะห์เพปไทด์บนวัฏภาคของแข็ง (Solid Phase Peptide Synthesis , SPPS)

การพัฒนาเกี่ยวกับ SPPS มีมาตั้งแต่ปี 1960 พร้อมๆกับการพัฒนาทางด้าน molecular biology ที่ต้องการจะได้เพปไทด์ที่บริสุทธิ์สำหรับการวิจัยทางวิทยาศาสตร์ชีววิทยา (biologycal science) ในด้านของวิทยาศาสตร์ชีววิทยา ในอดีตพบว่าเพปไทด์ที่สังเคราะห์ขึ้น 75% นำมาใช้เป็นแอนติเจนสำหรับสร้างแอนติบอดีต่อเพปไทด์นั้น ซึ่งจะใช้สำหรับหาโปรตีนที่มีลำดับกรดอะมิโนนั้นอยู่ในโมเลกุล ในปัจจุบันนอกจากเพปไทด์ที่สังเคราะห์ขึ้นจะใช้ในการผลิตแอนติบอดีแล้ว ยังใช้ประโยชน์ในงานวิจัยด้านอื่นๆ อีกเช่น ใช้ในงานทางอิมมูโน , ใช้ในการหาวิเคราะห์โครงสร้างของโปรตีน , ใช้เป็นซับสเตรตของเอนไซม์ เป็นต้น (Hancock, O' Reilly and Evan, 1995)

การสังเคราะห์เพปไทด์ โดยวิธี SPPS กรดอะมิโนจะถูกเรียงต่อกันทีละตัวตามลำดับจากปลาย C ไปปลาย N เกิดเป็นสายเพปไทด์ตามต้องการขึ้นบนวัฏภาคของแข็ง ซึ่งสิ่งที่ต้องพิจารณาในการสังเคราะห์เพปไทด์โดยวิธี SPPS คือ

1. วัสดุรองรับ (solid support)

วัสดุรองรับหรือเรซินที่ใช้ใน SPPS ประกอบด้วยส่วนสำคัญ 2 ส่วน คือ ส่วนพอลิเมอร์ของแข็งซึ่งใช้เป็นตัวค้ำจุน โดยส่วนใหญ่แล้วเป็นพวก พอลิสไตรีน (polystyrene) กับส่วนที่เป็นหมู่เชื่อม (linker) ซึ่งจะทำหน้าที่เชื่อมวัสดุรองรับกับหมู่คาร์บอกซิลของกรดอะมิโนตัวแรก และปกป้องหมู่คาร์บอกซิลไปในตัว ปัจจุบันมีเรซินหลายชนิดที่ใช้สำหรับการทำ SPPS สำหรับงานวิจัยนี้ใช้เรซิน NovaSyn TGR ซึ่งเป็นชื่อทางการค้าของบริษัท Novabiochem โครงสร้างของ NovaSyn TGR แสดงดังรูปที่ 1.2



รูปที่ 1.2 โครงสร้างทางเคมีของเรซิน NovaSyn TGR

เรซินนี้เป็นเรซินที่ไม่เสถียรในภาวะกรด จึงสามารถแยกเพปไทด์ออกจากวัสดุรองรับได้โดยใช้ TFA และเพปไทด์ที่ได้จะอยู่ในรูปเพปไทด์เอไมด์ เนื่องจากเกิดจากการขาดออกของพันธะ C—N เกิดเป็น เมทอกซิเบนซไฮดริลแคทไอออน (Methoybenzhydrye cation) ที่เสถียร

หมู่ polyethyleneglycol (PEG) ในเรซินจะช่วยปรับปรุงสมบัติการการพองตัวของวัสดุรองรับในตัวทำละลายที่มีขั้ว เช่น N,N-Dimethyformamide (DMF) ซึ่งทำให้การสังเคราะห์เพปไทด์มีประสิทธิภาพมากกว่าเดิม

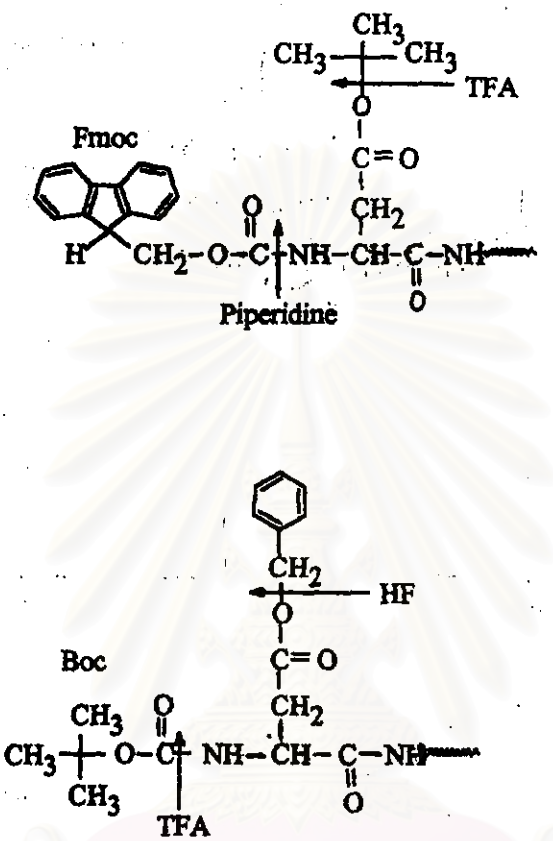
2. การปกป้องหมู่อะมิโนและหมู่แขนงข้างของกรดอะมิโน (N-terminal protection and side chain protection)

การปกป้องหมู่อะมิโนและหมู่แขนงข้างของกรดอะมิโน เป็นการลดความไวของการเกิดปฏิกิริยาในขณะที่ยังไม่ต้องการให้เกิดปฏิกิริยาของหมู่ดังกล่าว และหมู่ปกป้องที่ดีจะต้องสามารถเอาออกได้ง่ายในสภาวะที่เหมาะสม

การปกป้องหมู่อะมิโนของกรดอะมิโน ในปัจจุบันที่นิยมใช้คือ การปกป้องด้วยหมู่ Fmoc ซึ่งไม่เสถียรในภาวะที่เป็นเบส และหมู่ Boc ซึ่งไม่เสถียรในภาวะที่เป็นกรด ดังนั้นจึงสามารถกำจัดออกได้ง่ายโดยใช้ piperidin หรือ TFA ตามลำดับ เพื่อให้ได้หมู่อะมิโนอิสระของกรดอะมิโนนั้นสำหรับสร้างพันธะเพปไทด์กับกรดอะมิโนตัวถัดไป

การปกป้องหมู่แขนงข้าง (side chain) ของกรดอะมิโนซึ่งประกอบด้วยหมู่ฟังก์ชั่นที่ว่องไวต่อปฏิกิริยาเคมีต้องได้รับการปกป้องจนกระทั่งขั้นตอนสุดท้ายของการสังเคราะห์เพปไทด์ นั่นคือขั้นตอนการแยกเพปไทด์ออกจากเรซิน ดังนั้นหมู่ปกป้องแขนงข้างต้องสามารถทนต่อสภาวะในการกำจัดหมู่ปกป้องหมู่อะมิโนของกรดอะมิโนได้ ในกรณีที่ใช้ Fmoc เป็นหมู่ปกป้องหมู่อะมิโน หมู่ปกป้องแขนงข้างที่นิยมจะเป็นพวกที่ไม่เสถียรในภาวะที่เป็นกรดเช่น หมู่ Trityl หมู่ t-Butyl เป็นต้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



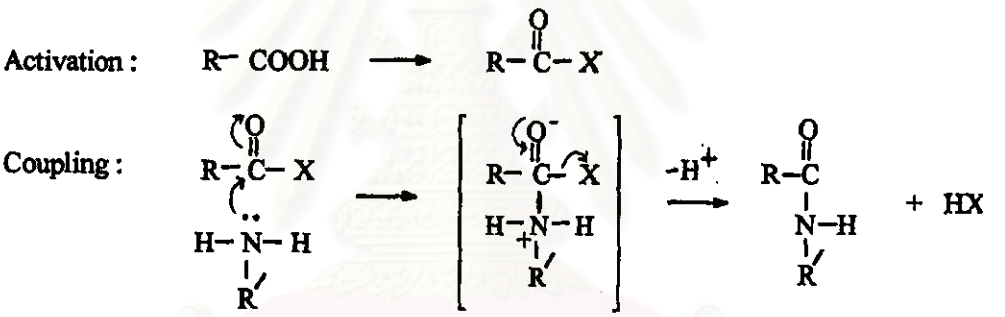
รูปที่ 1.3 หมู่ปกป้องหมู่อะมิโน ที่ใช้ใน SPPS

Trityl (Trt) t-Butyl (tBu)

รูปที่ 1.4 ตัวอย่างหมู่ปกป้องหมู่แขนงข้างสำหรับกรดอะมิโนที่หมู่อะมิโนถูกป้องกันโดยหมู่ Fmoc

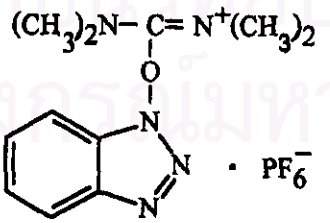
3. การกระตุ้นหมู่คาร์บอกซิลของกรดอะมิโนและการคู่ควบ (C-terminal activation and coupling)

เนื่องจากหมู่คาร์บอกซิลิกไม่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยาในขณะที่หมู่อะมิโนของกรดอะมิโนไวต่อการเกิดปฏิกิริยาอยู่แล้ว ดังนั้นต้องมีการกระตุ้นหมู่คาร์บอกซิลิกของกรดอะมิโนให้ไวต่อการเกิดปฏิกิริยากับหมู่อะมิโนของกรดอะมิโนอีกตัวหนึ่ง เพื่อให้เกิดเป็นเพปไทด์ได้รวดเร็วขึ้น ซึ่งวิธีการกระตุ้นหมู่คาร์บอกซิลิกมีหลายวิธี เช่น การใช้ carbodiimide reagent, active ester , symmetrical anhydride หรือ HBTU เป็นต้น ในการสังเคราะห์นี้เลือกใช้ HBTU ซึ่งเป็นรีเอเจนต์ที่มีประสิทธิภาพสูง ใช้งานง่ายและไม่ทำให้เกิดการราซีไมเซชั่น (racemization) ของกรดอะมิโนในขณะที่ทำปฏิกิริยาคู่ควบ



X : leaving group

รูปที่ 1.5 กลไกการกระตุ้นหมู่คาร์บอกซิลิกและการคู่ควบกับหมู่อะมิโนอิสระเกิดพันธะเพปไทด์



รูปที่ 1.6 โครงสร้างทางเคมีของ HBTU

ขั้นตอนการสังเคราะห์เพปไทด์บนวัฏภาคของแข็ง (รูปที่ 1.7)

1. การต่อเชื่อมกรดอะมิโนตัวแรกเข้ากับวัฏภาคของแข็ง (attachment of the first residue)

กรดอะมิโนตัวแรกจะเชื่อมกับหมู่ linker บนเรซิน ซึ่งจะทำหน้าที่เป็นทั้งวัสดุรองรับและหมู่ป้องกันสำหรับหมู่คาร์บอกซิลิกของเพปไทด์ที่ทำการสังเคราะห์ขึ้น ขั้นตอนนี้ถือว่าเป็นขั้นตอนที่สำคัญของการสังเคราะห์

2. การกำจัดหมู่ปกป้องของปลาย N (N-terminal deprotection)

เป็นขั้นตอนในการกำจัดหมู่ปกป้องหมู่อะมิโนของกรดอะมิโนออก เพื่อให้เหลือหมู่อะมิโนอิสระ สำหรับทำปฏิกิริยากับหมู่คาร์บอกซิลของกรดอะมิโนตัวถัดไป

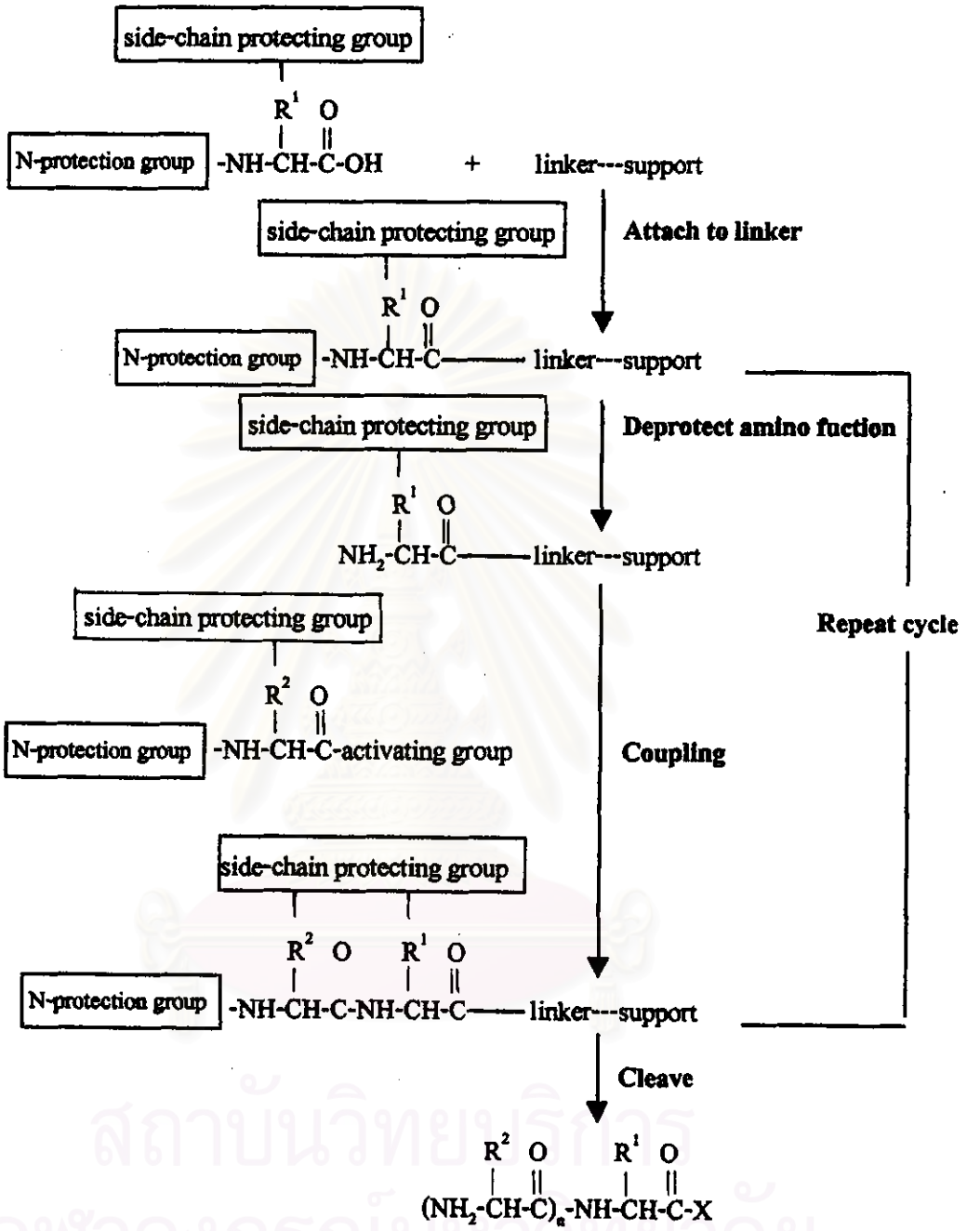
3. การกระตุ้นและการคู่ควบ (Activating and Coupling)

ในทางปฏิบัติการกระตุ้นหมู่คาร์บอกซิลิกของกรดอะมิโนและการ coupling ทำโดยผสมกรดอะมิโนที่หมู่อะมิโนถูกปกป้อง กับ coupling reagent ในตัวทำละลายที่เหมาะสม ในปริมาณที่มากเกินพอ (2-10 equivalent (eq.) โดยสารละลายกรดอะมิโนเข้มข้นสุดท้ายประมาณ 0.1 โมลาร์) เขย่ากับเรซินเป็นเวลา 30 นาที ถึง 2 ชั่วโมง จะช่วยให้เกิดปฏิกิริยาได้เร็วขึ้น กรดอะมิโนที่มากเกินพอจะถูกล้างทิ้งด้วยตัวทำละลาย

4. การกำจัดหมู่ปกป้องครั้งสุดท้ายและการแยกผลิตภัณฑ์ออกจากวัฏภาคของแข็ง (final deprotect and cleavage)

หลังจากได้เพปไทด์ที่มีกรดอะมิโนเรียงตามลำดับตามต้องการบนเรซิน กำจัดหมู่ป้องกันหมู่อะมิโนเป็นครั้งสุดท้าย ทำการแยกเพปไทด์ออกจากเรซินในสภาวะที่เหมาะสม ซึ่งขึ้นกับกรดอะมิโนที่ใช้ ประเภทของเรซินและหมู่ linker และสภาวะดังกล่าวจะต้องสามารถกำจัดหมู่ปกป้องของหมู่แขนงข้างของกรดอะมิโนออกได้ด้วย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



โดยที่ X = OH , NH_2 ซึ่งขึ้นกับชนิดของหมู่ linker และวิธีการ cleave

รูปที่ 1.7 ขั้นตอนการสังเคราะห์เพปไทด์บนวัฏภาคของแข็ง

Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

เป็นวิธีตรวจหาแอนติบอดีหรือแอนติเจน โดยติดฉลากแอนติบอดีหรือแอนติเจนด้วยเอนไซม์ โดยแอนติบอดีหรือแอนติเจนจะถูกตรึงติดกับผิวของวัสดุของแข็ง เช่นผิวพลาสติก ผิวหลอดแก้ว จึงเรียกวิธีการนี้ว่า **Enzyme Linked Immunosorbent Assay - ELISA** ตัวอย่างเอนไซม์ที่ใช้ในการติดฉลาก เช่น alkaline phosphatase , horseradish peroxidase , p-nitrophenyl phosphatase เมื่อให้ซับสเตรตของเอนไซม์ เอนไซม์จะเปลี่ยนซับสเตรตที่ไม่มีสีเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีสี ดังนั้นจึงสามารถวิเคราะห์ผลได้ง่ายโดยดูจากสีที่เกิดขึ้น ด้วยเครื่อง spectrophotometer หรือเครื่องอ่านฉาก ELISA (microplate reader)

วิธีการ ELISA แบ่งได้เป็น 3 ประเภท ดังนี้

1. Indirect ELISA

เป็นวิธีการที่ใช้สำหรับหาปริมาณแอนติบอดี โดยการตรึงแอนติเจนบนผิวของวัสดุของแข็ง จากนั้นเติมแอนติบอดีตัวแรก (primary antibody) ที่จำเพาะต่อแอนติเจน บ่มทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี ล้างแอนติบอดีตัวแรกที่ไม่จับแอนติเจนออก เติมแอนติบอดีตัวที่สอง (secondary antibody) ซึ่งติดฉลากด้วยเอนไซม์ไปจับกับแอนติบอดีตัวแรก บ่มทิ้งไว้ ล้างแอนติบอดีตัวที่สองที่ไม่จับกับแอนติบอดีตัวแรกออก จากนั้นเติมซับสเตรต ปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับซับสเตรต จะให้ผลิตภัณฑ์ที่มีสีขึ้น โดยสีที่เกิดขึ้นจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณแอนติบอดีในตัวอย่างที่ต้องการหา นั่นคือถ้าสีมีความเข้มมาก ปริมาณแอนติบอดีในตัวอย่างก็มาก ในทางกลับกันถ้าสีมีความเข้มน้อยหรือจาง ปริมาณแอนติบอดีในตัวอย่างก็จะน้อย (รูปที่ 1.8-1)

2. Sandwich ELISA

เป็นวิธีการใช้สำหรับตรวจหาแอนติเจน ในกรณีนี้แอนติบอดีจะถูกตรึงบนผิวของวัสดุของแข็ง เติมตัวอย่างที่มีแอนติเจน บ่มทิ้งไว้ให้ปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี เติมแอนติบอดีตัวที่สองซึ่งติดฉลากด้วยเอนไซม์ ที่มีความจำเพาะต่ออิพีโทป (epitope) ของแอนติเจนต่างจากแอนติบอดีตัวแรก จากนั้นเติมซับสเตรต วัดความเข้มของสีที่เกิดขึ้น สีที่เกิดขึ้นจะเป็นไปตามปริมาณของแอนติเจนที่มีในตัวอย่าง ความเข้มสีมากเมื่อแอนติเจนมาก และความเข้มของสีจะน้อยลงไปตามปริมาณแอนติเจนที่ลดลง ในทุกขั้นตอนล้างส่วนที่ไม่ต้องการหรือไม่เกิดปฏิกิริยาทิ้งไป (รูปที่ 1.8-2)

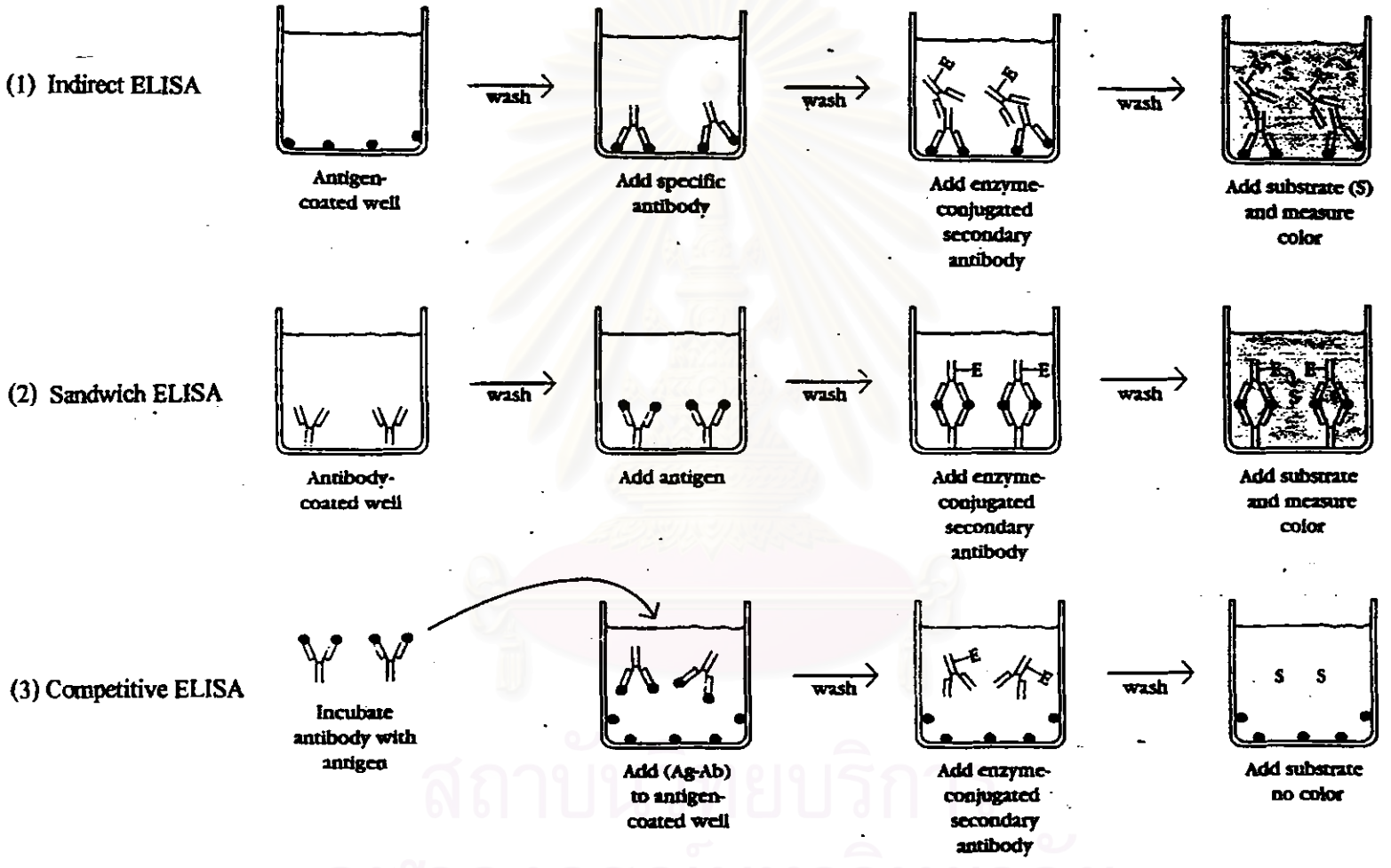
3. Competitive ELISA

เป็นวิธีการที่ใช้สำหรับการหาแอนติเจน หลักการคือ ตรึงแอนติเจนกับผิวของวัสดุของแข็ง และให้แอนติเจนที่ต้องการหาปริมาณแย่งจับกับแอนติเจนนี้ ในการปฏิบัติเริ่มต้นให้แอนติบอดีทำปฏิกิริยากับแอนติเจนในตัวอย่าง ซึ่งจะทำให้แอนติบอดีหมดไปหรือเหลือจำนวนน้อยที่จะมาจับกับแอนติเจนที่ตรึงอยู่บนผิว ดังนั้นเมื่อเติมแอนติบอดีตัวที่สองที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ไม่สามารถจับกับแอนติบอดีตัวแรกได้หรือจับได้น้อย ความเข้มของสีไม่มีหรือจางมากเมื่อเติมซับสเตรต ดังนั้นถ้าปริมาณแอนติเจนในตัวอย่างมีมาก ความเข้มของสีที่เกิดขึ้นจะไม่มีหรือจางมาก แต่ถ้าปริมาณแอนติเจนมีน้อย สีจะเข้มมาก นั่นคือความเข้มของสีที่เกิดขึ้นจะเป็นปฏิภาคส่วนกลับกับปริมาณแอนติเจนที่มีอยู่ในตัวอย่าง (รูปที่ 1.8-3)

Dot-ELISA มีหลักการเช่นเดียวกับการทำ ELISA แต่จะหยดแอนติเจนหรือแอนติบอดีลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส

ไตเตอร์ ในการทดสอบหาระดับของแอนติเจนหรือแอนติบอดีในตัวอย่างที่ต้องการตรวจ โดยใช้การทดสอบที่อาศัยการทำปฏิกิริยาอย่างจำเพาะระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีนั้น วิธีการอย่างหนึ่งที่นิยมคือ การหาความเจือจางสูงสุดของตัวอย่างที่ตรวจที่ยังคงให้ผลบวกในการทดสอบนั้น และอ่านระดับความเจือจางนั้นเป็น ไตเตอร์ (titer) ของแอนติเจนหรือแอนติบอดีที่ต้องการตรวจ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 1.8 วิธีการทาง ELISA (1) Indirect ELISA (2) Sandwich ELISA (3) Competitive ELISA (Kuby, 1994)

IMMUNOCYTOCHEMISTRY

เป็นวิธีการตรวจหาแอนติเจนด้วยแอนติบอดีบนตัวอย่างที่เป็นเนื้อเยื่อ โดยอาศัยหลักการเช่นเดียวกับ ELISA ต่างกันที่แอนติเจนที่ต้องการตรวจหาอยู่บนเนื้อเยื่อ และสีที่ใช้ในการย้อมเนื้อเยื่อจะต้องเป็นสีชนิดที่หลังเกิดปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับซับสเตรตแล้วไม่ละลายน้ำหรือเป็นสีที่ตกตะกอนนั่นเอง ในทางปฏิบัติตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ต้องการนำมาหาแอนติเจนจะต้องผ่านการเตรียมเนื้อเยื่อ

ขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อในพาราฟิน (Paraffin Section)

1. การทำให้คงรูป (Fixation) และการล้าง (Washing) การทำให้คงรูปเป็นวิธีการให้เซลล์และเนื้อเยื่อมีสภาพเหมือนเดิมมากที่สุด สารละลายที่ใช้เป็นน้ำยาที่ทำให้คงรูป เช่น ฟอร์มาลดีไฮด์ กลูตาราลดีไฮด์ สารละลาย Bouin's เป็นต้น หลังจากนั้นจึงล้างน้ำยาที่ทำให้คงรูปออกด้วยน้ำหรือสารละลายที่เหมาะสมสำหรับน้ำยาที่ทำให้คงรูป นั้น

2. การเอาน้ำออก (Dehydration) เป็นวิธีการเอาน้ำออกจากตัวอย่าง โดยใช้สารเคมีที่มีหน้าที่ดูดน้ำ ทั้งนี้เพื่อเตรียมตัวอย่างให้พร้อมที่จะยอมให้พาราฟินซึมผ่านเข้าไปได้ สารเคมีที่ใช้ในการเอาน้ำออกเรียกว่า Dehydrant ได้แก่ เอทิลแอลกอฮอล์ เมทิลแอลกอฮอล์ ไอโซโพพิลแอลกอฮอล์ แอซิโทน เป็นต้น โดยทั่วไปนิยมใช้เอทิลแอลกอฮอล์

3. Clearing เป็นการนำสารเคมีตัวใหม่เข้ามาแทนที่ dehydant และสารเคมีตัวนี้จะเป็นตัวกลางยอมให้พาราฟินแทรกซึมเข้าสู่เซลล์และเนื้อเยื่อได้ ดังนั้นคุณสมบัติของ clearing agent จะต้องเข้าได้กับ dehydrant และพาราฟิน โดยทำหน้าที่เป็นตัวเชื่อม ไซลีน (Xylene) เป็น clearing agent ที่นิยมใช้

4. Infiltration คือการเอา clearing agent ออกจากตัวอย่างแล้วแทนที่ด้วยพาราฟิน ซึ่งพาราฟินเป็นสารที่ช่วยทำให้เซลล์และเนื้อเยื่อตลอดจนโครงสร้างภายในของเซลล์และเนื้อเยื่อคงรูป และแข็งพอที่จะตัดเป็นเซคชัน (section) ติดบนสไลด์ได้

5. Embedding คือการเอาตัวอย่างที่ผ่านกระบวนการต่างๆ ข้างต้น มาฝังในพาราฟินที่เหลวและหล่อให้เป็นบล็อกด้วยแม่พิมพ์ เมื่อทำให้อุณหภูมิของพาราฟินลดลง บล็อกที่ได้จะมีความแข็งพอที่จะไปตัดเป็นเซคชัน (section) ได้ด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อ (microtome)

6. Sectioning เป็นขั้นตอนในการตัดตัวอย่างให้เป็นแผ่นบางด้วยเครื่องตัดชิ้นเนื้อเยื่อ ชิ้นเนื้อเยื่อที่ตัดได้เรียกว่า เซคชัน จากนั้นนำเอาเซคชันที่ได้ไปวางไว้บนกระจกสไลด์ ทิ้งไว้ให้แห้งสนิทแล้ว จึงนำไปย้อมได้

หลังจากนำตัวอย่างผ่านขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อเรียบร้อยแล้ว นำเนื้อเยื่อมาผ่านขั้นตอนการนำน้ำเข้าอีกครั้งหนึ่งจึงจะนำเนื้อเยื่อที่ได้ไปหาตำแหน่งของแอนติเจนในเนื้อเยื่อดังกล่าวเช่นเดียวกับ indirect ELISA นั่นคือ หยดแอนติบอดีบนเซคชัน บ่มทิ้งไว้ หยดแอนติบอดีตัวที่สองซึ่งติดฉลากด้วยเอนไซม์ เติมซับสเตรตให้เอนไซม์ การวิเคราะห์ผลโดยดูจากบริเวณใดที่มีการติดสี แสดงว่าบริเวณนั้นเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

มูลเหตุจูงใจ

กุ้งก้ามกรามเป็นกุ้งน้ำจืดขนาดใหญ่ เป็นสัตว์เศรษฐกิจชนิดหนึ่งของประเทศ การศึกษาและพัฒนาเกี่ยวกับกุ้งก้ามกรามเน้นทางด้านการเพาะเลี้ยงเป็นส่วนใหญ่ เพื่อช่วยให้การเลี้ยงกุ้งมีประสิทธิภาพมากขึ้น แต่การศึกษาทางด้านฮอร์โมนที่เกี่ยวกับกระบวนการสรีรวิทยาเช่น CHH MIH และ GIH มีค่อนข้างน้อย โดยแหล่งที่พบฮอร์โมนเหล่านี้อยู่บริเวณก้านตา

เนื่องจาก CHH จากก้านตากุ้งก้ามกรามได้มีการศึกษาการทำให้บริสุทธิ์และหาลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโนแล้ว แต่ยังไม่สมบูรณ์ โดยคาดว่ากรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 71 ซึ่งน่าจะเป็นทรีโอนีนอาจหายไป ดังนั้นงานวิจัยจึงสังเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนทางปลาย C ของ CHH ที่มีและไม่มี ทรีโอนีนคือ YANAVQV-NH_2 และ YANAVQTV-NH_2 และนำมาสร้างแอนติบอดีเพื่อพิสูจน์ลำดับกรดอะมิโนทางปลาย C ของ CHH จากกุ้งก้ามกราม โดยอาศัยปฏิกิริยาทางอิมมูโนและตรวจหาแหล่งที่พบ CHH ในก้านตากุ้งก้ามกรามต่อไป

ขอบเขตของงานวิจัย

1. สังเคราะห์เพปไทด์จากลำดับกรดอะมิโนทางปลาย C ของ CHH จากก้านตากุ้งก้ามกรามที่มีและไม่ทรีโอนีน คือเพปไทด์ YANAVQV-NH_2 (T-) และ YANAVQTV-NH_2 (T+) โดยวิธี Solid Phase Peptide Synthesis
2. การผลิตแอนติบอดีต่อแพปไทด์ T- และ T+ในหนูขาว
3. การทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อเพปไทด์ที่สังเคราะห์ขึ้น
    3.1 การตรวจหาไตเตอร์ของแอนติบอดีต่อเพปไทด์ T- และเพปไทด์ T+ โดยวิธี indirect immunoperoxidase ELISA
    3.2 การทดสอบความความสามารถของแอนติบอดีต่อเพปไทด์ T- และ T+ ในการจับเพปไทด์ที่สังเคราะห์ขึ้นและการตรวจปฏิกิริยาข้ามของแอนติบอดีทั้งสองโดยวิธี dot-ELISA
4. การทดสอบความสามารถของแอนติบอดีต่อเพปไทด์ T- และ T+ ในการจับกับเพปไทด์ในสภาพธรรมชาติโดยวิธี immunocytochemistry และ dot-ELISA
5. เปรียบเทียบการตรวจหา CHH ในสารสกัดจากก้านตากุ้งก้ามกรามโดยวิธี dot-ELASA กับ วิธี biological activity test