

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาโครงสร้างและหน้าที่ของฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตและการวางไข่ในกึ่งกุลาดำ ได้แก่ crustacean hyperglycemic hormone (CHH) และ molt-inhibiting hormone (MIH) โดยได้ทำการแสดงออกของ cDNA ที่สร้าง CHH สามชนิด ของกึ่งกุลาดำ (Pem-CHH1, Pem-CHH2 และ Pem-CHH3) ในยีสต์ *Pichia pastoris* โดยให้มีการหลั่งของฮอร์โมนที่สร้างจาก cDNA ออกมานอกเซลล์ จากนั้นทำการแยกบริสุทธิ์โปรตีน Pem-CHH ทั้งสามชนิดด้วยวิธี reverse-phase HPLC หรือ gel filtration พบว่าทั้งสองวิธีสามารถแยกโปรตีนที่ปนเปื้อนออกจาก Pem-CHH ได้ การทดสอบหน้าที่ของ Pem-CHH ทั้งสามชนิด โดยดูความสามารถในการเพิ่มระดับน้ำตาลกลูโคสใน haemolymph พบว่ากึ่งกุลาดำที่ได้รับการฉีดด้วย Pem-CHH1, 2 และ 3 มีระดับกลูโคสเพิ่มขึ้น 3.5, 3.58 และ 3.05 มิลลิกรัม/เดซิลิตร ตามลำดับ แสดงถึงความสามารถในการทำหน้าที่เป็น CHH ของฮอร์โมนทั้งสามชนิด ในส่วนของ MIH ได้ทำการโคลนชิ้น cDNA ที่สร้าง Pem-MIH จากลำดับกรดอะมิโนอนุรักษ์ระหว่าง MIH ของกึ่งสองชนิด พบว่า Pem-MIH มีความคล้ายคลึงกับ MIH ของ *Penaeus japonicus* ถึง 97% ได้ทำการแสดงออกของ Pem-MIH ใน *P. pastoris* และแยกบริสุทธิ์โดยใช้หลักการเดียวกับ Pem-CHH การศึกษาหน้าที่ในกึ่งกุลาดำ พบว่า Pem-MIH สามารถเพิ่มระยะเวลาระหว่างการลอกคราบ (molt duration) ของกึ่งอย่างมีนัยสำคัญ (จาก 11.8 วัน เป็น 16.3 วัน) การศึกษาการแสดงออกของ CHH และ MIH ในส่วนต่างๆของกึ่งกุลาดำโดยใช้เทคนิค RT-PCR พบว่า CHH มีการแสดงออกในก้านตา หัวใจ และเหงือก ส่วน MIH มีการแสดงออกในก้านตา และ thoracic ganglia นอกจากนี้ได้ทำการสร้าง antibody โดยการกระตุ้นด้วย Pem-CHH1 ในหนู พบว่า anti-Pem-CHH1 antibody สามารถจับกับ Pem-CHH ได้ทั้งสามชนิด แต่ไม่จับกับ molt-inhibiting hormone ซึ่งเป็นฮอร์โมนในกลุ่มเดียวกัน เมื่อ incubate กับสารสกัดจากก้านตา antibody สามารถยับยั้งความสามารถในการเพิ่มระดับกลูโคสของ CHH ในสารสกัดก้านตาได้ประมาณ 45% และเมื่อฉีด antibody เข้าไปในกึ่งโดยตรง พบว่ากึ่งมีระดับกลูโคสใน haemolymph ลดลง ประมาณ 15-20% ผลที่ได้จากงานวิจัยนี้ช่วยให้เข้าใจถึงหน้าที่ของฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตและการวางไข่ในกึ่งกุลาดำ ข้อมูลเบื้องต้นในการยับยั้งการทำงานของ CHH โดยใช้ antibody จากงานวิจัยนี้ ยังเป็นแนวทางที่จะนำไปสู่การพัฒนาวิธีการควบคุมการเจริญเติบโต รวมถึงการวางไข่ของกึ่งเพื่อทดแทนการเร่งการวางไข่โดยวิธีตัดก้านตาของแม่พันธุ์กึ่ง ซึ่งจะมีประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกึ่งในอนาคต

This project is aimed at molecular as well as biological functional study of the hormones that play roles in growth and gonad maturation in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. Three types of *P. monodon*'s crustacean hyperglycemic hormone (Pem-CHH1, Pem-CHH2 and Pem-CHH3) were expressed from their cDNA in yeast expression system using *Pichia pastoris* as the host strain. The recombinant Pem-CHHs were secreted from *P. pastoris* cells by the use of α -factor secretion signal of *Saccharomyces cerevisiae*. The proteins were further purified either by reverse-phase HPLC or by gel filtration. The purified recombinant Pem-CHH1, 2 and 3 were able to elevate the glucose level in the haemolymph of *P. monodon* to 3.5, 3.58 and 3.05 mg/dl, respectively. This demonstrated hyperglycemic function of all three Pem-CHHs in *P. monodon*. A cDNA encoding another hormone, molt-inhibiting hormone (MIH), was successfully cloned by the use of RACE technique from the primer designed from the conserved amino acids between MIH of two shrimp species. The cloned cDNA encoded MIH peptide that was 97% identical to MIH of *P. japonicus*. The Pem-MIH was expressed in *P. pastoris* and purified by the same strategy as Pem-CHH. The purified Pem-MIH could extend the molt duration of *P. monodon* from 11.8 days to 16.3 days, and thus demonstrated the property of molt-inhibiting hormone. RT-PCR with specific primers showed that Pem-CHH expressed in the eyestalk, heart and gill whereas Pem-MIH expressed in the eyestalk and thoracic ganglia. Moreover, polyclonal antibody was raised against Pem-CHH1. This antibody recognized all types of Pem-CHHs but did not cross-react with Pem-MIH. When incubated with anti-Pem-CHH1 antibody, the hyperglycemic activity of the eyestalk extract was depleted by 45% whereas the shrimp injected with the antibody showed 15-20% reduction in the glucose level. These studies clearly demonstrated molecular structure and biological functions of two neuropeptide hormones that are involved in growth and gonad maturation of *P. monodon*. The inhibitory effect of anti-Pem-CHH antibody on CHH activity *in vivo* provides a promising implication to the modulation of growth and reproduction of economically important species such as *P. monodon* in the future.