



วิทยานิพนธ์

การสังเคราะห์สารคล้ายฮอร์โมน-เซสควิเทอร์พีนอยด์และไอโคซานอยด์
จากเนื้อเยื่อแม่เพรียงทราย (*Perinereis* sp.)

**BIOSYNTHESIS OF SESQUITERPENOIDS AND
EICOSANOIDS IN TISSUES OF SANDWORM (*Perinereis* sp.)**

นางสาวปิยนุช นุชบุญช่วย

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. ๒๕๕๐



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การประมง)

ปริญญา

วิทยาศาสตร์การประมง

ชีววิทยาประมง

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การสังเคราะห์สารคล้ายฮอร์โมน-เซสควิเทอร์พีนอยด์และไอโคซานอยด์จากเนื้อเยื่อแม่เพรียงทราย (*Perinereis* sp.)

Biosynthesis of Sesquiterpenoids and Eicosanoids in Tissues of Sandworm
(*Perinereis* sp.)

นามผู้วิจัย นางสาวปิยนุช นุชบุญช่วย

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์สังศรี มหาสวัสดิ์, วท.ม.)

กรรมการ

(อาจารย์ชอร์พร หมั่นพล, Ph.D.)

กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์เรืองวิชญ์ ยืนพันธ์, D.Tech.Sc.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์อนงค์ จีรภัทร์, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์วินัย อัจจงหาญ, M.A.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การสังเคราะห์สารคล้ายฮอร์โมน-เซสควิเทอร์พีนอยด์และไอโคซานอยด์จากเนื้อเยื่อแม่เพรียงทราย
(*Perinereis* sp.)

Biosynthesis of Sesquiterpenoids and Eicosanoids in Tissues of Sandworm (*Perinereis* sp.)

โดย

นางสาวปิยนุช นุชบุญช่วย

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตรจารย์การประมง)

พ.ศ. 2550

ปิยนุช นุชบุญช่วย 2550: การสังเคราะห์สารคล้ายฮอร์โมน-เซสควิเทอร์พีนอยด์และไอโคซานอยด์จากเนื้อเยื่อแม่เพรียงทราย (*Perinereis* sp.) ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การประมง) สาขาวิทยาศาสตร์การประมง ภาควิชาชีววิทยาประมง ปรชชานกรรมการที่ปรึกษา: รองศาสตราจารย์สังศรี มหาสวัสดิ์, วท.ม. 60 หน้า

การศึกษานี้ได้ทำการตรวจวัดการสังเคราะห์ฮอร์โมนเซสควิเทอร์พีนอยด์และไอโคซานอยด์จากเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบลของแม่เพรียงทรายด้วยเทคนิค Radiochemical assay โดยบ่มเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบลกับสารตั้งต้นฟาร์นิโซอิก เอซิดที่ติดฉลากรังสีทริเทียม L-[methyl-³H]methionine ที่ระยะเวลาต่าง ๆ (3, 6, 9 และ 12 ชั่วโมง) เปรียบเทียบกับสมอง และกล้ามเนื้อ พบว่าได้สารเซสควิเทอร์พีนอยด์และไอโคซานอยด์สูงสุด (1903.83 ± 464.2 dpm) เมื่อบ่มเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบลนาน 12 ชั่วโมง

จำแนกชนิดของสารผลิตภัณฑ์จากการบ่มเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบลแม่เพรียงทรายด้วยวิธีการ TLC, HPLC, GC และ GC/MS ตามลำดับ พบว่าเมื่อวิเคราะห์ด้วย TLC สารผลิตภัณฑ์มีค่า R_f ตรงกับสารมาตรฐานเมทิลฟาร์นิโซเอท แต่เมื่อวิเคราะห์ด้วย HPLC และ Liquid Scintillation Counter กลับมีค่า Retention time ใกล้เคียงกับอะราคิโดนิก เอซิด เมทิล เอสเทอร์ และ ไอโคซาไตรอีนิก เอซิด เมทิล เอสเทอร์ จึงทดลองเปลี่ยนสารตั้งต้นในการบ่มจากฟาร์นิโซอิก เอซิด เป็นอะราคิโดนิก เอซิด และพบว่าอะราคิโดนิก เอซิด ให้ปริมาณการแผ่รังสีสูงยิ่งกว่าเมื่อใช้ฟาร์นิโซอิก เอซิดเป็นสารตั้งต้น (3322.0 ± 1362.1 dpm) ต่อมาเมื่อทำการจำแนกชนิดและหาโครงสร้างของสารสกัดตัวอย่างด้วย Mass spectrometry พบว่าเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบลของแม่เพรียงทรายสามารถสังเคราะห์สารได้หลายตัว ในลำดับ 1 และ 2 เป็น Unidentified fatty acids ที่มีคาร์บอน 16 ถึง 22 ตัว โดยพบฮอร์โมนเมทิล ฟาร์นิโซเอทเป็นลำดับที่ 3

การศึกษากการสังเคราะห์ฮอร์โมนเซสควิเทอร์พีนอยด์และไอโคซานอยด์ จากการศึกษา Activity ของเอ็นไซม์ Methyl transferase พบการกระจายตัวของเอ็นไซม์นี้ในหลายอวัยวะ เช่น เนื้อเยื่อรอบแมนดิเบล สมอง คอหอย และกล้ามเนื้อ โดยที่เนื้อเยื่อรอบแมนดิเบลแม่เพรียง ยังคงเป็นอวัยวะที่มี Activity ของ Methyl transferase สูงสุด

ลายมือชื่อนิติสด

ลายมือชื่อประธานกรรมการ

Piyanuch Nuchbunchuay 2007: Biosynthesis of Sesquiterpenoids and Eicosanoids in Tissues of Sandworm (*Perinereis* sp.). Master of Science (Fisheries Science), Major Field: Fisheries Science, Department of Fishery Biology. Thesis Advisor: Associate Professor Songsri Mahasawasde, M.Sc. 60 pages.

Radiochemical assay was used to study the synthesis of sesquiterpenoids and eicosanoids in sandworm tissues (*Perinereis* sp.). Different sandworm tissues were incubated with farnesoic as a precursor was incubated and L-[methyl-³H]methionine at different period of time (3, 6, 9, 12 hrs). It was found that tissues surrounding mandibles of sandworm (MO) at 12 hrs incubation produced highest radioactivity over brain and muscle (1903.83±464.2 dpm).

Identity of sandworm MO products was carried out on TLC, HPLC, GC and GC/MS. Originally, the MO products was identical with methyl farnesoate standard by TLC. However, when injected by HPLC, the highest radioactive section was shown not to be methyl farnesoate but more closely to arachidonic acid methyl ester. Moreover, when the substrate was changed from farnesoic acid to arachidonic acid higher radioactivity from the incubation was obtained. GC/MS analysis revealed that the highest amount of the sandworm MO incubation were C16-C22. Methyl farnesoate was appeared to be at the third rank of compound produced from the sandworm MO tissues.

Methyl transferase, an enzyme which was responsible in changing farnesoic acid into methyl farnesoate, was discovered in several sandworm tissues ie. mandibular tissues, muscle, brian and pharynx. The highest activity of such enzyme was presented in mandibular tissues.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

/ /

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติที่ให้ทุนการศึกษาในครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.สงศรี มหาสวัสดิ์ ประธานกรรมการที่ปรึกษา ดร.อรพร หมั่นพล กรรมการที่ปรึกษาวิชาเอก ผศ.ดร.เรืองวิษณุ ชื่นพันธ์ กรรมการที่ปรึกษาวิชาการ และ ผศ.ดร. กังสดาชัย บุญปราบ ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ ข้อคิดเห็นต่าง ๆ อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่ง ตลอดจนตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ และให้ความช่วยเหลือในทุก ๆ ด้าน ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบคุณ คุณประไพพิศ สุปรารภ และเจ้าหน้าที่สำนักงานปรมาณูเพื่อสันติ ดร.กอบกุล เหล่าแท้ง และเจ้าหน้าที่หน่วยปฏิบัติการวิจัยและพัฒนาวิศวกรรมชีวเคมี และโรงงานต้นแบบ มหาวิทยาลัยพระจอมเกล้าธนบุรี วิทยาเขตบางขุนเทียน Prof.S.S.Tobe, Department Cell and System Biology, University of Toronto Canada ที่ให้คำแนะนำ และเอื้อเฟื้อเครื่องมือ รวมทั้งสถานที่ในการทดลอง

กราบขอบพระคุณ ครอบครัวบุญช่วย ที่คอยให้ความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจเสมอมา

ปิยนุช บุญบุญช่วย

สิงหาคม 2550

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	2
การตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีการ	15
อุปกรณ์	15
วิธีการ	17
ผลและวิจารณ์	30
ผล	30
วิจารณ์	44
สรุป	48
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	49
ภาคผนวก	57

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ค่าเฉลี่ย (Mean±SD) การแผ่รังสี L-[methyl- ³ H]methionine เมื่อบ่มเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบดที่ระยะเวลาแตกต่างกัน	31
2	ค่าเฉลี่ย (Mean±SD) การแผ่รังสี L-[methyl- ³ H]methionine ของเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบด สมอง และกล้ามเนื้อของแม่เพียงทราย บ่มที่ 3, 6, 9 และ 12 ชั่วโมง	33
3	ค่าเฉลี่ย (Mean±SD) ปริมาณการแผ่รังสี L-[methyl- ³ H]methionine จากการบ่มเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบดกับสารตั้งต้น Farnesic acid, Arachidonic acid และ Eicosatrienoic	38
4	ค่าเฉลี่ย (Mean±SD) การแผ่รังสี S-Adenosyl-L-[methyl- ³ H]methionine (SAM) จากการบ่มเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบด , สมอง, กล้ามเนื้อ และคอหอยของแม่เพียงทราย	42
ตารางผนวกที่		
1	ปริมาตรของเกลือ (NaCl, KCl, MgSO ₄ .7H ₂ O) ที่เติมลงใน M199	58
2	สารเคมีที่ใช้เตรียม ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ซาลีน	59
3	สารเคมีที่ใช้เตรียม โพรตีเอส อินฮิบิเตอร์	59

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แม่เพรียงทราย (<i>Perinereis</i> sp.) บริเวณชายหาดในจังหวัดชลบุรี	3
2	แสดงลักษณะของคอหอย (Pharynx) หลอดอาหาร (Esophagus) แมนดิเบิล (Mandible) และต่อมพิษ (Venom gland) ภายในโพรงโสตโตเมียม (Prostomium) ของแม่เพรียง	5
3	โครงสร้างของ Farnesoic acid, Methyl farnesoate และ Juvenile hormone III	10
4	Chromatogram และ Mass spectrum ของสารมาตรฐาน Methyl farnesoate	11
5	กระบวนการสังเคราะห์ Juvenile hormone และ Methyl farnesoate ในแมลง และครัสเตเชียน	13
6	แสดงตำแหน่งแมนดิเบิลของแม่เพรียงทราย (<i>Perinereis</i> sp.)	18
7	แสดงตำแหน่งเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิลของแม่เพรียงทราย (<i>Perinereis</i> sp.)	18
8	ขั้นตอนการศึกษาระดับสารสกัดฮอร์โมน Sesquiterpenoida และ Eicosanoids จากอวัยวะต่าง ๆ ของแม่เพรียงทราย	27
9	ขั้นตอนการจำแนกชนิดของสารสกัดจากเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิล ด้วย TLC, HPLC และ GC/MS	28
10	ค่าเฉลี่ย (Mean±SD) การแผ่รังสีของ L-[methyl- ³ H]methionine จากการบ่มเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิลของแม่เพรียงทรายโดยเปลี่ยนน้ำเลี้ยงเซลล์ทุก 3 ชั่วโมง (n=10)	32
11	ค่าเฉลี่ย (Mean±SD) การแผ่รังสีของ L-[methyl- ³ H]methionine จากการบ่มเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิลของแม่เพรียงทราย โดยไม่เปลี่ยนน้ำเลี้ยงเซลล์ (n=10)	32
12	ค่าเฉลี่ย (Mean±SD) การแผ่รังสีของ L-[methyl- ³ H]methionine จากการบ่มเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิล สมอง กล้ามเนื้อของแม่เพรียงทราย (เปลี่ยนน้ำเลี้ยงเซลล์) ที่ 3, 6, 9 และ 12 ชั่วโมง (n=10)	34
13	อัตราการสังเคราะห์สารคล้ายฮอร์โมน Sesquiterpenoids และ Eicosanoids จากเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิล สมอง และกล้ามเนื้อของแม่เพรียงทราย (เปลี่ยนน้ำเลี้ยงเซลล์) ในหนึ่งหน่วยเวลา	34

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
14	Chromatogram ของสารมาตรฐาน Methyl farnesoate จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC	36
15	แสดงแถบสารสีของตัวอย่างที่มี Arachidonic acid และ Farnesoic acid เป็นสารตั้งต้นที่ Co-migrate ตรงกับ Methyl farnesoate บน TLC plate (ด้วยไอระเหยของ เกร็ดไอโอดีน)	38
16	(A) Chromatogram และ (B) Mass spectrum ของสารมาตรฐาน Methyl farnesoate จากการวิเคราะห์ด้วย GC/GC-MS	
17	(A) Chromatogram ของสารสกัดจากเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิลของแม่เพรียงทราย 30 ตัว (B) Chromatogram ของสารสกัดจากเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิล (MO) ของแม่เพรียงทราย 30 ตัว ที่ Spike สารมาตรฐาน Methyl farnesoate และ (C) Mass spectrum ของสารสกัดจากเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิลของแม่เพรียงทราย 30 ตัว เมื่อวิเคราะห์ด้วย GC/GC-MS	40
18	ค่าเฉลี่ย (Mean±SD) การแผ่รังสี S-Adenosyl-L-[methyl- ³ H]methionine (SAM) จากการบ่มเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของแม่เพรียงทราย (n = 10)	41
		43

การสังเคราะห์สารคล้ายฮอร์โมน-เซสควิเทอร์พีนอยด์และไอโคซานอยด์จากเนื้อเยื่อแม่
เพรียงทราย (*Perinereis* sp.)

Biosynthesis of Sesquiterpenoids and Eicosanoids in Tissues of Sandworm
(*Perinereis* sp.)

คำนำ

ปัจจุบันพ่อแม่พันธุ์กุ้งทั่วไปมักจะมีคุณภาพที่ลดลง มีผลให้ได้ลูกกุ้งที่จะนำไปสู่ระบบ
ธุรกิจการเพาะเลี้ยงมีคุณภาพต่ำ ซึ่งการเสริมคุณค่าของอาหารที่ใช้เลี้ยงพ่อแม่พันธุ์กุ้งให้มีการ
พัฒนาระบบสืบพันธุ์ที่สามารถผลิตลูกกุ้งที่มีคุณภาพที่ดีได้ อนึ่งเกษตรกรได้มีการนำแม่เพรียงมา
เป็นอาหารในการเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์กุ้งทะเล ซึ่งจากรายงานการวิจัยของ Middleditch (1979) และ
Lytle *et al.* (1990) พบว่าในตัวแม่เพรียงมีคุณค่าทางโภชนาการ เช่น ปริมาณโปรตีนที่สูง รวมทั้ง
ไขมันและแร่ธาตุ จากงานทดลองของปริญญา (2546) พบว่าแม่เพรียงมีปริมาณโปรตีนสูงถึง
45.35 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้โภชนาการดังกล่าวแล้วยังมีปัจจัยของฮอร์โมนที่มีความสำคัญต่อระบบ
สืบพันธุ์ของพ่อแม่พันธุ์กุ้ง เช่น ฮอร์โมนเมทิลฟาร์นิโซเอท (Methyl farnesoate) (Laufer *et al.*,
1997) ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (Progesterone) (เสาวลักษณ์, 2548) ฮอร์โมนโพรสตาแกลนดิน
อีทู (Prostaglandin E₂) (เอกชัย, 2548) ฮอร์โมนโพรสตาแกลนดิน เอฟ ทู แอลฟา (Prostaglandins
F_{2α}) (Poltana, 2004) ดังนั้นเกษตรกรสามารถนำแม่เพรียงมาเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์กุ้งซึ่งมีผลทางอ้อมต่อ
กุ้งที่จะได้รับปริมาณฮอร์โมนเพิ่มขึ้นมีผลต่อระบบสืบพันธุ์ ซึ่งเป็นเป้าหมายในการวิจัยในครั้งนี้
โดยการสังเคราะห์สารคล้ายฮอร์โมนจากแม่เพรียงทราย เช่น Methyl farnesoate หรือกลุ่มของ
ฮอร์โมนเซสควิเทอร์พีนอยด์ (Sesquiterpenoids) และไอโคซานอยด์ (Eicosanoids) ที่มีผลต่อระบบ
สืบพันธุ์ของพ่อแม่พันธุ์กุ้งหรือไม่ รวมทั้งสร้างมาจากส่วนใดของตัวแม่เพรียงทราย แล้วศึกษา
ระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์สารคล้ายฮอร์โมน Sesquiterpenoids และ Eicosanoids จาก
เนื้อเยื่อรอบแมนดิเบล พร้อมทั้งจำแนกชนิด และศึกษาโครงสร้างที่แท้จริงของสารสังเคราะห์
ดังกล่าว อนึ่งข้อมูลที่ได้จากการวิจัยในครั้งนี้จะเป็นประโยชน์อย่างมากต่อการส่งเสริมธุรกิจการ
เพาะเลี้ยงแม่เพรียงทราย เพื่อเป็นอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์กุ้งต่อไปที่จะมีประโยชน์
ต่อคุณภาพลูกกุ้ง

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาการสังเคราะห์สารคล้ายฮอร์โมนเซสควิเทอร์พีนอยด์ และไอโคซานอยด์ จากอวัยวะต่าง ๆ ของแม่เพรียงทราย
2. การจำแนกชนิด และศึกษาโครงสร้างของสารสกัดจากเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิลของแม่เพรียงทรายด้วย High Performance Liquid Chromatography (HPLC) และ Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS)
3. การวิเคราะห์เอ็นไซม์เมทิลทรานสเฟอเรส (Methyl transferase assay) ที่ใช้สังเคราะห์สารคล้ายฮอร์โมนเซสควิเทอร์พีนอยด์ จากเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของแม่เพรียงทราย เพื่อยืนยันการกระจายตัวของเอ็นไซม์ และแสดงความสามารถในการสร้างสารผลิตภัณฑ์คล้ายฮอร์โมนของเนื้อเยื่อต่างๆ ของแม่เพรียงทรายได้

การตรวจเอกสาร

ชีววิทยาของแม่เพรียงทราย

แม่เพรียงทราย (ภาพที่ 1) เป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง (Day, 1967) สามารถจัดลำดับอนุกรมวิธานได้ดังนี้

Phylum Annelida

Class Polychaeta

Subclass Errantia

Order Phyllodocida

Family Nereidae

Genus *Perinereis*

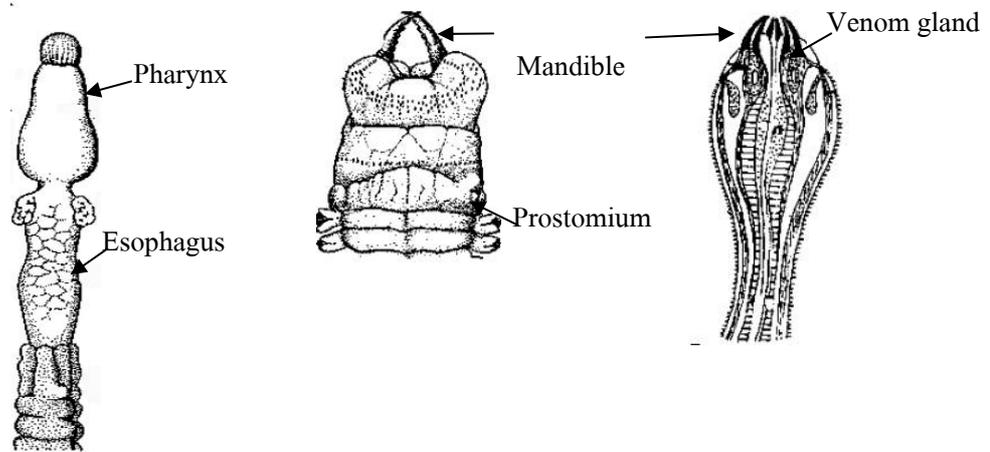


ภาพที่ 1 แม่เพรียงทราย (*Perinereis* sp.) บริเวณชายหาดในจังหวัดชลบุรี

แม่เพรียงอาศัยอยู่บนพื้นทะเลใกล้ฝั่งเขตน้ำท่วมตลอดเวลา พบตามพื้นทราย ใต้ก้อนหิน หรืออาศัยอยู่ในรู ปกติจะฝังตัวลึกอยู่ในทราย และขึ้นมาหาอาหารในเวลาน้ำขึ้น แม่เพรียงเป็นสัตว์กินเนื้อ (Carnivore) (Mettam, 1980) หรือกินสารอินทรีย์ที่ลอยตามน้ำโดยการกรอง สำหรับบางชนิดที่เคลื่อนที่ซำ้มักกินอาหารตามผิวหน้าดิน

ลักษณะทั่วไปของแม่เพรียงทราย (Sand worm; Polychaetes) คือ มีลำตัวเป็นข้อปล้อง แต่ละข้อปล้องจะประกอบไปด้วยขาเดิน (Parapodia) และซี่ขน (Setae) ซึ่งจะมีรูปร่างแตกต่างกันออกไปตามแต่ละชนิดของแม่เพรียง แม่เพรียงมีลำตัวค่อนข้างยาวมากกว่าส่วนกว้าง ร่างกายแบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ หัว ลำตัว และหาง ส่วนหัวประกอบด้วยโปรสโตเมียม (Prostomium) และเพอริสโตเมียม (Peristomium) โปรสโตเมียม อยู่ด้านหน้าสุดของลำตัว มีอวัยวะรับความรู้สึกซึ่งประกอบด้วย ตา 2 คู่ หนวด (Tentacle) อย่างน้อย 1 คู่ บริเวณด้านข้างของโปรสโตเมียมค่อนข้างไปทางด้านท้องมีพัลป์ (Palps) 1 คู่ มีลักษณะเป็นแท่งมน ทำหน้าที่รับความรู้สึกด้านเคมี และกินอาหาร เทนทาकुลาร์ เซอรา (Tentacular cirri) 4 คู่ เป็นอวัยวะช่วยในการรวบรวมอาหารเข้าปาก และพาราเนธ (Paragnaths) บริเวณด้านปาก ส่วนถัดมา คือ Peristomium เป็นปล้องที่ไม่มีระยางค์ ต่อจาก Peristomium คือ ส่วนของลำตัวที่ประกอบด้วย ปล้องจำนวนมาก แต่ละปล้องมีระยางค์ข้างตัว (Parapodia) เพื่อช่วยในการเคลื่อนที่ ระยางค์ข้างตัวจะแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ ระยางค์บน (Notopodium) และระยางค์ล่าง (Neuropodium) ปล้องที่อยู่บริเวณปลายสุดของลำตัวคือปล้องหาง (Pygidium) (บพิธ และนันทพร, 2540)

ทางเดินอาหารของแม่เพรียงประกอบด้วย ปาก (Mouth), อู่ปาก (Buccal cavity) และคอหอย (Pharynx) เป็นกระเปาะขนาดใหญ่อยู่บริเวณปล้องที่ 1-4 ของลำตัว ภายในมีเขี้ยว (Jaw, Mandible) ขนาดใหญ่ 1 คู่ ปกติเขี้ยวจะหดตัวอยู่ภายใน เมื่อต้องการกินอาหารจึงจะยื่นออกมาออกช่องปากโดยอาศัยกล้ามเนื้อรอบคอหอย และผนังลำตัว กับแรงดันภายในช่องตัวเป็นตัวควบคุมประสานงาน ผนังของคอหอยมักจะมีหนามสั้น ๆ (Denticle) ติดอยู่โดยรอบ ถัดมา คือ หลอดอาหาร (Esophagus) เป็นท่อสั้น ๆ เชื่อมต่อกับลำไส้ (Intestine) ส่วนสุดท้ายของทางเดินอาหาร คือ ทวารหนัก (บพิธ, 2529) (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 แสดงลักษณะของคอหอย (Pharynx) หลอดอาหาร (Esophagus) แมนดิเบิล (Mandible) และต่อมพิษ (Venom gland) ภายในโพรสโตเมียม (Prostomium) ของแม่เพรียง
ที่มา: Saulnier-Michel (1992) และ Fox (2001)

การสืบพันธุ์

แม่เพรียง มีการสืบพันธุ์ แบบอาศัยเพศ เกิดภายนอกตัว มีเพศผู้ และเพศเมียแยกจากกัน (จิรประภา, 2543) เมื่อถึงฤดูผสมพันธุ์ตัวผู้และตัวเมียจะขึ้นมาว่ายวนไปวนมาบริเวณผิวน้ำในช่วงเช้า เรียกพฤติกรรมนี้ว่า นูปเชียลแดนซ์ (Nuptial dance) ตัวเมียจะปล่อยฟีโรโมน (Pheromone) ออกมาเพื่อกระตุ้นให้ตัวผู้เข้ามาผสมพันธุ์ อาจมีตัวผู้มากกว่าตัวเดียว ตัวเมียปล่อยไข่ก่อนแล้วตัวผู้จึงปล่อยสเปิร์มเข้ามาผสมกับไข่ในน้ำ ซึ่งการผสมพันธุ์เกิดในช่วงระยะเวลาสั้น ๆ เมื่อผสมพันธุ์เสร็จแล้วตัวผู้และตัวเมียจะตายในที่สุด (Elliott, 1952)

ฮอร์โมนในแม่เพรียง

1. เปปไทด์ฮอร์โมน (Peptide hormone) ในแม่เพรียงมี Peptide hormone ด้วยกันหลายกลุ่มซึ่งสามารถแบ่งได้ดังนี้

Peptide hormone ที่มีโครงสร้างเป็นวงไดซัลไฟด์ 2 วง ประกอบด้วยกรดอะมิโน 9 ชนิด ได้แก่ ออกซิโตซิน (Oxytocin) และ วาโซเพรสซิน (Vasopressin) มีหน้าที่เกี่ยวกับการควบคุมความเข้มข้นของสารละลายภายในระบบขับถ่าย (Salzet *et al.*, 1993; Oumi *et al.*, 1996)

นอกจากนั้นยังประกอบด้วย Peptide hormone ที่มีหน้าที่ควบคุมกระบวนการสร้างน้ำเชื้อเพศผู้ (Spermatogenesis) และการพัฒนาเซลล์ไข่ในระยะพรีไวเทิลโลเจนิสซึ่งเป็นการพัฒนาในระยะต้น (Golding, 1983)

Peptide hormone ที่มีโครงสร้างเป็นกลุ่มคาร์บอนิล ได้แก่ RFamide ซึ่งในแม่เพรียง *Nereis virens* สามารถแบ่ง RFamide ได้ 2 แบบ คือ FM(O)RFamide และ FTRFamide (Baratte *et al.*, 1991) ซึ่งทำหน้าที่ในการควบคุมการเต้นของหัวใจในแม่เพรียง *Sabellastarte magnifica* (Diaz-Miranda *et al.*, 1989)

2. ฮอร์โมนระบบสืบพันธุ์ (Reproductive hormone) ฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์ในแม่เพรียงมีด้วยกันหลายชนิดแบ่งออกเป็นกลุ่ม ได้ดังนี้

2.1 ฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับพฤติกรรมการสืบพันธุ์

เมื่อถึงฤดูกาลสืบพันธุ์ของแม่เพรียงสิ่งแวดล้อมภายนอก เช่น อุณหภูมิ ความสั้นยาวของช่วงวัน จะเป็นตัวกระตุ้นก่อให้เกิดการผสมพันธุ์โดยที่ตัวเมียจะมีการปล่อยไข่ออกมา ก่อนแล้วตัวผู้จะปล่อยสเปิร์มออกมาผสมกันภายนอก ในวงศ์ Nereidae จะมีพฤติกรรมการรวมกลุ่มของตัวเมียและตัวผู้บริเวณผิวน้ำเมื่อมีอุณหภูมิต่ำ (Goerke, 1984) ซึ่งเรียกพฤติกรรมที่เกิดขึ้นนี้ว่า สวอมมิ่ง (Swarming) โดยพบว่าการ Swarming และการปล่อยไข่ยังมีความสัมพันธ์กับน้ำขึ้นน้ำลงซึ่งเป็นปรากฏการณ์ทางธรรมชาติที่เกี่ยวข้องกับการโคจรของดวงจันทร์ (จิรประภา, 2543) ปัจจัยทางเคมีเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญเพื่อช่วยส่งสัญญาณ (Zeeck *et al.*, 1990) เมื่อถึงระยะการผสมพันธุ์ เพศผู้และเพศเมียจะว่ายน้ำขึ้นมารวมบริเวณผิวน้ำโดยเพศเมียจะว่ายน้ำเป็นวงกลมช้า ๆ หลังจากนั้นเพศผู้จะเข้ามาจับคู่โดยจะมวนว่ายอยู่รอบ ๆ จนเพศผู้เริ่มปล่อยสเปิร์ม (ปริมาณน้อย) สิวาขุ่น หลังจากนั้นเพศเมียจะเปลี่ยนมวนว่ายอยู่รอบ ๆ เพศผู้เมื่อตัวเมียปล่อยไข่เพศผู้จึงปล่อยสเปิร์มครั้งสุดท้ายเพื่อผสมกับไข่ (Hardege *et al.*, 1997) ช่วงที่มีการจับคู่กันทั้งเพศผู้และเพศเมียจะมีการปล่อยฟีโรโมน ซึ่งจะเป็นสารเคมีที่กระตุ้นเพศตรงข้าม ฟีโรโมนที่เกี่ยวข้องกับพฤติกรรมการสืบพันธุ์ประกอบด้วย

2.1.1 Mate-recognition pheromone เป็นสารเคมีที่ระเหยได้ อยู่ในกลุ่ม คีโตน หรือ อัลเคน (Zeeck *et al.*, 1991) เพศเมียจะปล่อยฮอร์โมนนี้ออกมาเพื่อกระตุ้นให้เพศผู้เข้า

มาจับคู่ผสมพันธุ์ เช่น ฮอร์โมน 5-methyl-3-heptanone ทำหน้าที่เหนี่ยวนำให้เกิดพฤติกรรม
นุปลีเซลล์แดนซ์ ในแม่เพรียง *Platynereis dumerilii* (Zeeck et al., 1988)

2.1.2 Egg-release pheromone ฟีโรโมนตัวนี้จะทำหน้าที่กระตุ้นให้เพศ
เมียปล่อยไข่ ซึ่งเพศผู้จะหลั่งออกมา

2.1.3 Sperm-release pheromone เมื่อถึงระยะสืบพันธุ์แม่เพรียงเพศเมีย
จะปล่อยฟีโรโมนตัวนี้ออกมาเพื่อกระตุ้นการปล่อยสเปิร์มของเพศผู้ เช่น ในแม่เพรียง *Nereis
succinea* (Ram et al., 1999)

2.2 การสร้างไข่ และพัฒนาเซลล์ไข่

ฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของแม่เพรียง คือ
Prostomial maturation hormone สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการเจริญเติบโตของเซลล์ไข่ (Watson
and Bentley, 1997)

เสาวลักษณ์ (2548) ทำการศึกษาผลของสารสกัด Progesterone และ 17 แอลฟา-ไฮดรอกซี
โพรเจสเตอโรน (17 α -hydroxyprogesterone) จากแม่เพรียง (*Perinereis* sp.) ต่อการเจริญของเซลล์
ไข้กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) พบว่าฮอร์โมนดังกล่าวมีความสำคัญต่อการพัฒนาของไข้กุ้ง
กุลาดำ ทำให้เกิดกระบวนการสร้าง และสะสมไข่แดงจนกระทั่งการตกไข่

นอกจากนี้ในรังไข่ของแม่กุ้งกุลาดำมีปริมาณของฮอร์โมน Progesterone และ 17 α -
hydroxyprogesterone สัมพันธ์กับการพัฒนาของรังไข่ โดยฮอร์โมนทั้งสองตัวมีปริมาณเพิ่มมากขึ้น
จากรังไข่ระยะที่ 1 จนมีปริมาณสูงสุดในรังไข่ระยะที่ 4

ฮอร์โมนในครัสเตเชียน

ในครัสเตเชียนประกอบด้วยฮอร์โมนหลายชนิดแต่ละชนิดมีบทบาทหน้าที่แตกต่างกัน
ออกไป ชนิดของฮอร์โมนในครัสเตเชียนสามารถแบ่งตามโครงสร้างได้ดังนี้

1. Polypeptide hormones เป็นฮอร์โมนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน (Amino acid) จำนวน 9-200 โมเลกุลเชื่อมต่อกัน (Charmantier *et al.*, 1997) Polypeptide hormones ที่สำคัญของสัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียน ได้แก่

1.1 Crustacean hyperglycemic hormones (CHH) ประกอบด้วยกรดอะมิโน 72-78 หน่วย โดย Crustacean hyperglycemic hormones ผลิตจากเอ็กซ์-ออร์แกน (X-organ) ในก้านตา มีหน้าที่ควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด ควบคุมกระบวนการเผาผลาญคาร์โบไฮเดรต และไขมัน (Santos *et al.*, 1997)

1.2 Mandibular organ inhibiting hormone (MOIH) สังเคราะห์จาก X-organ sinus gland เป็นกลุ่มเซลล์ประสาทบริเวณก้านตา มีหน้าที่ยับยั้งการสังเคราะห์ฮอร์โมนเมทิลฟาร์นิโซเอท (Methyl farnesoate; MF) ในแมนดิเบิล (Mandible) (Wainwright, 1996)

1.3 Vitellogenesis inhibiting hormone (VIH) ประกอบด้วยกรดอะมิโน 53-55 หน่วย ผลิตจาก X-organ sinus gland ในก้านตา มีหน้าที่ยับยั้งการเจริญของเซลล์สืบพันธุ์ จากการทดลองตัดก้านตาของกุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* พบว่ากุ้งก้ามกรามมีการพัฒนาไข่ และมีการวางไข่ (Okumura and Aida, 2001)

1.4 Vitellogenesis stimulating hormone (VSH) มีโครงสร้างและขนาดใกล้เคียงกับ Vitellogenesis inhibiting hormone นอกจากนี้ยังพบว่า Vitellogenesis stimulating hormone จะทำหน้าที่ตรงข้ามกับ Vitellogenesis inhibiting hormone สร้างมาจากสมอง (Brain) และ ทอราซิก แองเกลีย (Thoracic ganglia) กระตุ้นการพัฒนาของรังไข่ ของ *Potamon* sp. (Gomez , 1965)

1.5 Vitellogenesis stimulating ovarine hormones (VSOH) สังเคราะห์มาจากรังไข่ ทำหน้าที่ในการควบคุมกระบวนการ Vitellogenesis (Teshima and Kanazawa, 1971)

2. Steroid hormones ฮอร์โมนในกลุ่มนี้เป็นกลุ่มของไขมัน (Lipid) ที่มีการสังเคราะห์จากคอเลสเตอรอล (Cholesterol) Steroid hormones ที่สำคัญต่อสัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียน ได้แก่

2.1 Ecdysteroid มีโครงสร้างคล้าย Ecdysone สร้างจาก Y-organ ทำงานร่วมกับฮอร์โมนยับยั้งการลอกคราบ Molt-inhibiting hormone (MIH) ที่ผลิตจาก X-organ sinus gland ซึ่งมีหน้าที่ยับยั้งการลอกคราบ

2.2 Progesterone ประกอบด้วยคาร์บอน 21 อะตอม สร้างจากรังไข่ ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมกระบวนการ Vitellogenin

3. Amino acid derivative hormones ฮอร์โมนในกลุ่มนี้สังเคราะห์มาจากกรดอะมิโน (Amino acid) เช่น เมลาโตนิน (Melatonin)

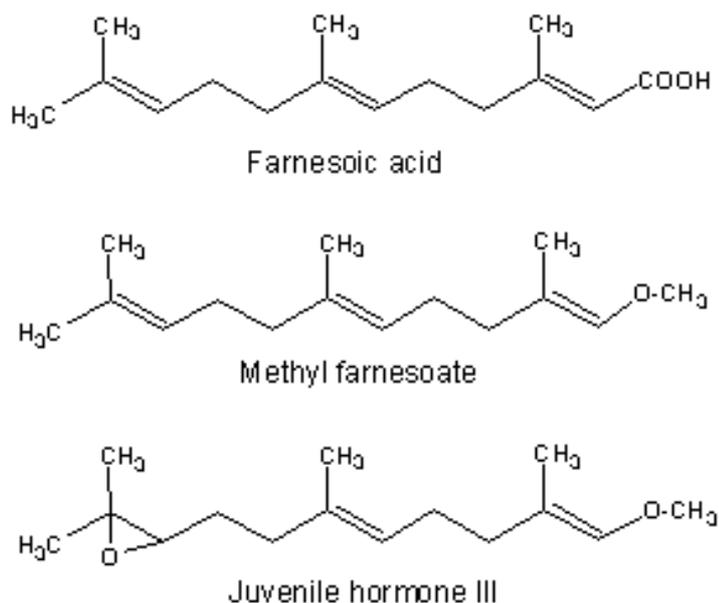
4. Modified fatty acid เช่น ไอโคซานอยด์ (Eicosanoids) สังเคราะห์จาก กรดไขมัน (Fatty acid) ฮอร์โมนในกลุ่มนี้ที่มีความสำคัญต่อสัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียนได้แก่ โพรสตาแกลนดิน (Prostaglandins; PG) มีโครงสร้างเป็นวงแหวน 5 วง ประกอบด้วยคาร์บอน 20 อะตอม สร้างได้ในเซลล์หลายเซลล์ มีอะราคิโดนิก เอซิด (Arachidonic acid; AA), ไอโคซาเพนทาอีนอิก เอซิด (Eicosapentaenoic acid; Eico) และ ไดโคซาเฮกซาอีนอิก เอซิด (Docosahexaenoic acid; DHA) เป็นสารตั้งต้น (Ono *et al.*, 1982; Osada *et al.*, 1989) มีความสำคัญต่อระบบสืบพันธุ์ของครัสเตเชียน ซึ่งมีผลต่อการพัฒนาของไข่แม่อุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) (เอกชัย, 2548) และเสาวลักษณ์ (2548) พบว่าสารสกัด Progesterone และ 17α -hydroxyprogesterone จากแม่เพรียทรา *Perinereis* sp. มีผลต่อการเจริญของเซลล์ไข่อุ้งกุลาดำซึ่งทำให้เกิดกระบวนการสร้างและสะสมไข่แดงจนกระทั่งการตกไข่

Yano (1985) ทดลองเลี้ยงเซลล์ไข่ออกตัวกุ้งด้วยวิธี In vivo โดยฉีดฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (Progesterone; P4) เข้าตัวกุ้งโดยตรงที่ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัม/กรัม น้ำหนักตัวสามารถกระตุ้นการพัฒนาของรังไข่ และเหนี่ยวนำการวางไข่ของกุ้ง greasyback shrimp (*Metapenaeus ensis*) ขวัญเรือน (2533) ทำการทดลองฉีด Progesterone ในกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* พบว่าเมื่อกุ้งได้รับ Progesterone ก่อให้เกิดการพัฒนาของรังไข่เพิ่มมากขึ้น

5. Lipid derivatives คือ ฮอร์โมนที่พัฒนามาจากไขมัน ตัวอย่างเช่น ฮอร์โมนในกลุ่มเทอร์ปีนอยด์ (Terpenoids) เป็น สารประกอบไฮโดรคาร์บอน (Hydrocarbon) ที่เกิดจากการรวมตัวของหมู่ไอโซพรีน (Isoprene) (อะตอมคาร์บอน 5 อะตอมต่อกัน) หลายหน่วย พบในธรรมชาติ และ

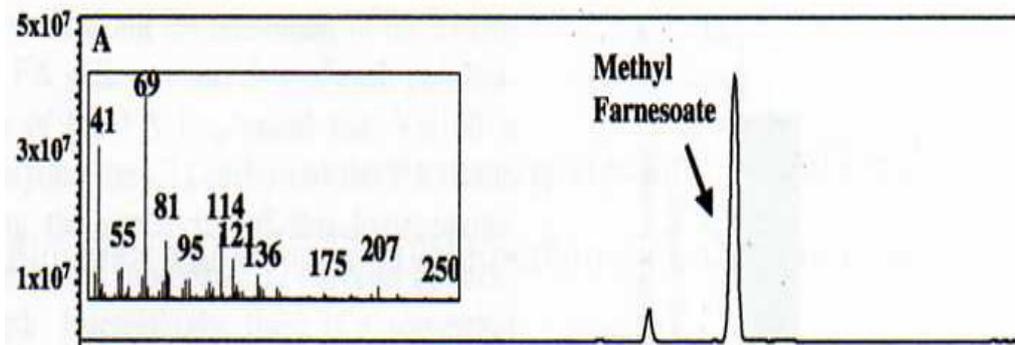
ระบบต่าง ๆ ทางสรีระวิทยาของสัตว์ เช่น แมลง ฮอร์โมนที่สำคัญในกลุ่ม Terpenoids คือ เมทิล ฟาร์นิโซเอท (Methyl farnesoate; MF) ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม เซสควิเทอร์พีนอยด์ (Sesquiterpenoid) ที่ประกอบด้วยคาร์บอน 15 อะตอม (C15) เกิดจากการรวมตัวของ Isoprene 3 หน่วย โดยมีหมู่เมทิลที่เกาะที่คาร์บอนตำแหน่งสุดท้าย (ภาพที่ 3) (Charmantier *et al.*, 1997) จากรายงานของ Yue Yang *et al.* (2006) ที่ศึกษาใน *Arabidopsis thaliana* พบว่า Methyl farnesoate มี Chromatogram และ Mass spectrum (ภาพที่ 4)

Methyl farnesoate เป็นฮอร์โมนที่มีความสำคัญต่อระบบสืบพันธุ์ของสัตว์กลุ่มครัสเตเชียน ผลิตโดย แมนดิบูลาร์ออร์แกน (Mandibular organ; MO) และเป็นสารตั้งต้นของจูวีไนล์ฮอร์โมน (Juvenile hormone; JH) ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่พบในฮีโมลิมพ์ (Hemolymph) ของแมลง (Charmantier *et al.*, 1997)



ภาพที่ 3 โครงสร้างของ Farnesoic acid Methyl farnesoate และ Juvenile hormone III

ที่มา: www.cyberlipid.org/images/pict367.gif 12 August, 2007



ภาพที่ 4 Chromatogram และ Mass spectrum ของสารมาตรฐาน Methyl farnesoate (Yue Yang *et al.*, 2006)

ที่มา: Yue Yang *et al.* (2006)

บทบาทหน้าที่ของ Juvenile hormone (JH III) ในแมลง

ในแมลงฮอร์โมน Methyl farnesoate สังเคราะห์มาจาก Corpora allate ฮอร์โมน Methyl farnesoate ในแมลงจะถูกเปลี่ยนให้เป็น Juvenile hormone โดยอวัยวะเอ็นไซม์ Epoxidase ซึ่ง Juvenile hormone ทำหน้าที่เช่นเดียวกับฮอร์โมน Methyl farnesoate ในครัสเตเชียน โดยทำหน้าที่เกี่ยวกับการควบคุมกระบวนการเผาผลาญของโปรตีน การควบคุมสมดุลของสารภายในร่างกาย ควบคุมระบบสืบพันธุ์ และการลอกคราบ

บทบาทหน้าที่ของ Methyl farnesoate ในครัสเตเชียน

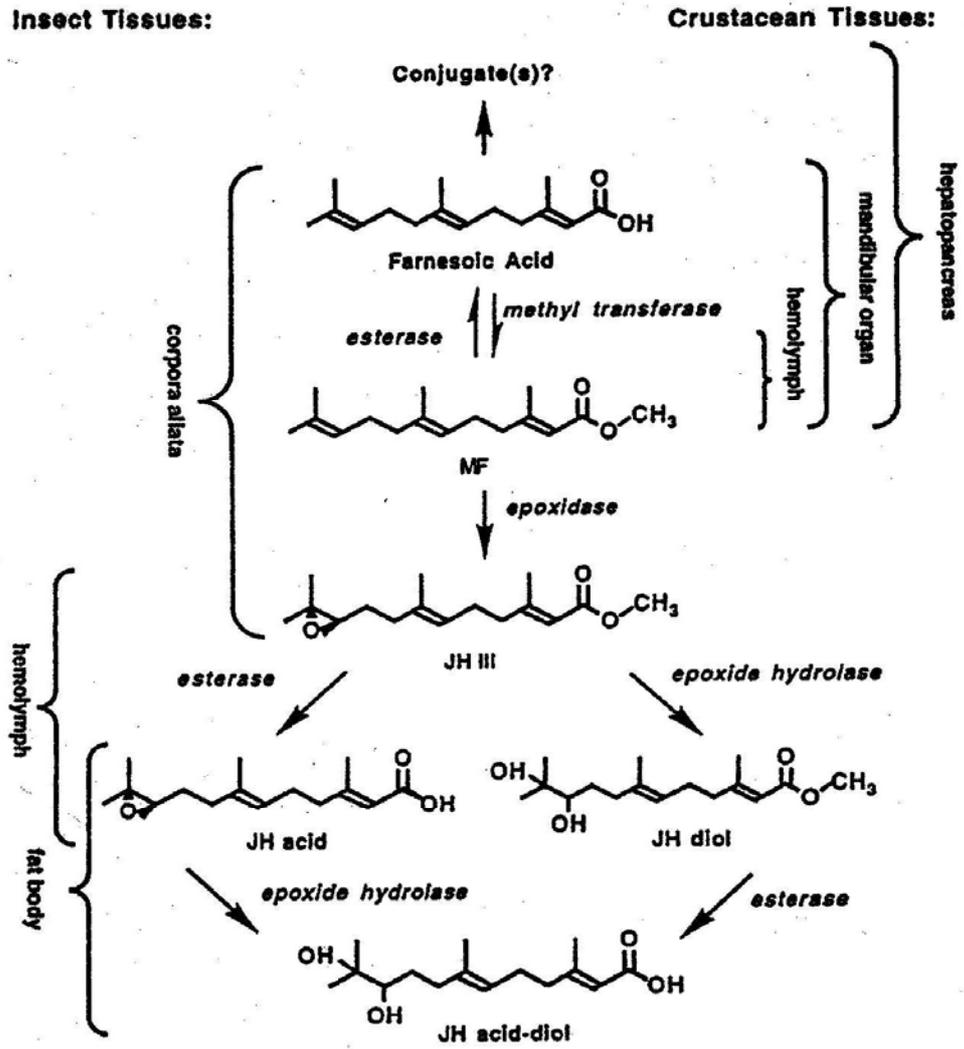
ในครัสเตเชียน ฮอร์โมน Methyl farnesoate มีบทบาทสำคัญต่อการส่งเสริมการเจริญของระบบสืบพันธุ์ การลอกคราบ กระบวนการเผาผลาญโปรตีน การควบคุมสมดุลของสารภายในร่างกาย และการเปลี่ยนตัวอ่อนเป็นตัวเต็มวัย จากการศึกษาในห้องทดลอง พบว่า ฮอร์โมน Methyl farnesoate มีผลต่อการเจริญของระบบสืบพันธุ์ของ กุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) (Sagi *et al.*, 1991), กุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) (Tsukimura and Kamemoto, 1991), Spider crab (*Libinia emarginata*) (Rotllant *et al.*, 2000), Lobster (*Nephros norvegicus*) (Rotllant *et al.*, 2001) และยังพบว่าระดับของฮอร์โมน Methyl farnesoate มีความสัมพันธ์กับการเจริญพันธุ์ โดยสัตว์ที่เจริญพันธุ์แล้วมีระดับของ Methyl farnesoate สูงกว่าในสัตว์ที่ยังไม่เจริญพันธุ์ (Laufer *et al.*, 1987; Sagi *et al.*, 1993)

ฮอร์โมนยับยั้งการผลิต Methyl farnesoate คือ แมนดิบูลาร์ ออร์แกน อินฮิบิติง ฮอร์โมน (Mandibular Organ Inhibiting hormone; MOIH) สร้างจาก X-organ ในก้านตาของคริสต์เตเซียน (Chang, 1997)

กระบวนการสังเคราะห์ Juvenile hormone และ Methyl farnesoate ในแมลง และคริสต์เตเซียน

ฟาร์นิโซอิก เอซิด (Farnesoic acid; FA) เป็นสารตั้งต้นของ Juvenile hormone และ Methyl farnesoate ในแมลง (Tobe and Stay, 1985) โดย Farnesoic acid จะถูกเปลี่ยนให้เป็น Methyl farnesoate โดยเอนไซม์ Methyl transferase (ภาพที่ 5) ในกลุ่มคริสต์เตเซียน Methyl farnesoate ผลิตมาจาก Mandibular organ ซึ่งควบคุมโดย Mandibular organ-inhibiting hormone (MO-IH) สร้างจาก X-organ ในก้านตาของคริสต์เตเซียน (Chang, 1997) ฮอร์โมน Methyl farnesoate เป็นสารประกอบที่มีความคล้ายคลึงกับ Juvenile hormone ในแมลง (Borst *et al.*, 1987; Laufer *et al.*, 1987) ระดับของ Methyl farnesoate จะเพิ่มขึ้นในฮีโมลิมฟ์ และระหว่างกระบวนการ Vitellogenesis ซึ่งจะมีคุณสมบัติคล้ายคลึงกับ Juvenile hormone ในแมลง (Subramoniam, 2000) ในแมลงฮอร์โมน Methyl farnesoate จะถูก Epoxidase จนกลายเป็น Juvenile hormone ในที่สุด (Homala and Chang, 1997)

ในกระบวนการสังเคราะห์ฮอร์โมน Methyl farnesoate ในคริสต์เตเซียน เอนไซม์เมทิลทรานเฟอร์เรส (Methyl transferase) มีหน้าที่ขนส่งหมู่เมทิลให้แก่สารตั้งต้น Farnesoic acid กลายเป็น Methyl farnesoate ในที่สุด เอนไซม์ที่ทำหน้าที่เปลี่ยน Farnesoic acid เป็น Methyl farnesoate มีชื่อเฉพาะ คือ ฟาร์นิโซอิก เอซิด โอ-เมทิลทรานเฟอร์เรส (Farnesoic acid O-methyltransferase; FAMeT) (Wainwright *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1994) ในกระบวนการสังเคราะห์ฮอร์โมน Methyl farnesoate นอกจากเอนไซม์ Farnesoic acid O-methyltransferase แล้ว ยังมี เอส อะดีโนซิล แอล เมทไทโอนีน (S-adenosyl-L-methionine) ซึ่งเป็นตัวที่ทำงานร่วม (Cofactor) กับเอนไซม์ Farnesoic acid O-methyltransferase (Wainwright *et al.*, 1998)



ภาพที่ 5 กระบวนการสังเคราะห์ Juvenile hormone และ Methyl farnesoate ในแมลง และครัสเตเชียน

ที่มา: Homola and Chang (1997)

Radiochemical assay (RCA)

Radiochemical assay (RCA) เป็นวิธีการตรวจวัดปริมาณของฮอร์โมนซึ่งเป็นเทคโนโลยีขั้นสูง โดยใช้สารรังสีเป็นตัวติดตามการสังเคราะห์ฮอร์โมนจากต่อมสร้างฮอร์โมน ซึ่งเป็นวิธีการที่มีความไว แม่นยำ และมีความละเอียดสูง สามารถตรวจวัดฮอร์โมนที่หลั่งออกมาจากต่อมสร้างฮอร์โมน ณ หนึ่งหน่วยเวลา การศึกษาในแม่เพียงได้พัฒนาตามวิธีการของ Pratt and Tobe (1974) มีการทดลองตรวจวัดปริมาณฮอร์โมน Methyl farnesoate ที่สังเคราะห์จาก Mandibular organ ของ Mud Crab (*Scylla serrata*) โดยวิธี Radiochemical assay (RCA) (Tobe *et al.*, 1989) โดยใช้สารรังสี (Methyl - ^3H)-methionine ติดฉลากกับสารตั้งต้น แล้วทำการตรวจนับปริมาณการแผ่ของรังสีที่รวมตัวอยู่กับสารผลิตภัณฑ์นั้นซึ่งเป็นปริมาณฮอร์โมน Methyl farnesoate ที่หลั่งออกมาจาก Mandibular organ ในหนึ่งหน่วยเวลา

ตัวอย่างการตรวจวัดปริมาณของฮอร์โมนต่าง ๆ ด้วย Radiochemical assay ในสัตว์อื่น ได้แก่ การสังเคราะห์ Juvenile hormone ที่ผลิตจาก Corpora allata (CA) ในแมลงหลายชนิด (Yagi and Tobe, 2001) และ Tobe and Feyereisen (1983) ทำการศึกษาใน Cockroach (*Diploptera punctata*)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. สัตว์ทดลอง แม่เพรียงทราย (*Perinereis* sp.) จากธรรมชาติบริเวณชายหาดในจังหวัดชลบุรี ความยาวลำตัวเฉลี่ย 10.3-18.1 ซม น้ำหนักเฉลี่ย 0.5-3.0 กรัม จำนวน 10 กก.
2. ชุดเครื่องมือผ่าตัด
3. กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง (Light microscope) (OLYMPUS; Japan)
4. เครื่องผสมสาร (Vortex)
5. ไมโครปิเปต
6. หลอดยูวี (UV light lamp)
7. เครื่องเหวี่ยงตกตะกอน (Centrifuge)
8. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
9. แท่งบดเนื้อเยื่อ (Tissue grinder)
10. เครื่องเขย่าสาร
11. กระบอกฉีดยา (Syringe)
12. Thin-Layer Chromatography separation (TLC) (Plastic-backed silica 20x20 ซม. gel 60 F254, Macherey-Nagel; Germany)
13. เครื่องตรวจวัดปริมาณสารรังสี Liquid Scintillation Counter (LSC) (Winspectral รุ่น 1414; Netherlands)
14. Pico pro vial-10 ml, Glass (Perkin Elmer; Netherlands)
15. ปุ่มสุญญากาศ
16. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)
17. Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS) (Thermo Finnigan Trace 2000, AS2000 Liquid autosampler, Supelco OMEGAWAX™ 250; Pennsylvania)
18. อุปกรณ์เครื่องแก้วต่าง ๆ
19. Glass balls, Undrilled, 3 mm (Ajax chemicals; Australia)

สารเคมี

1. 8, 11, 14-Eicosatrienoic acid และ 8, 11, 14-Eicosatrienoic acid methyl ester (Sigma; USA.)
2. Arachidonic acid, Farnesoic acid, Methylfarnesoate และ Methyl arachidonate (Sigma; USA)
3. กรดไขมันในกลุ่ม C16-C22 (Palmitic acid, Stearic acid, Arachidic acid, Nonadecanoic acid, Heptadecanoic acid, Erucic acid, Oleic, Linoleic, Behenic)(Sigma; USA)
4. L- methionine (Sigma; USA)
5. L-[methyl- ³H]methionine (Amersham; UK)
6. S-Adenosyl-L- [methyl-³H]methionine (SAM) (Amersham; UK)
7. Disodium ethylenediamine tetra acetate (Na₂EDTA) (Sigma; USA)
8. อาหารเลี้ยงเซลล์ (M199) (Difco, Becton Dickinson and Company; USA)
9. Sodium sulphate (Na₂SO₄) (Scharlau; Europe an Union)
10. L- mercaptoethanol (Sigma; USA)
11. S-adenosyl-methionine (Sigma; USA)
12. S- (5'- Adenosyl) – L- methionine p- toluene sulfonate salt (Sigma; USA)
13. Optiphase hisafe (Perkin elmer; England)
14. Toluene
15. Ethyl acetate
16. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)
17. โพแทสเซียม ไฮโดรเจน ฟอสเฟต (KH₂PO₄)
18. แมกนีเซียมซัลเฟต (Mg₂SO₄)
19. โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)
20. โซเดียม ไฮโดรเจน ฟอสเฟต (Na₂HPO₄)
21. เมทานอล
22. คลอโรฟอร์ม
23. ก๊าซไนโตรเจน

วิธีการ

1. การศึกษาการสังเคราะห์ฮอร์โมน Sesquiterpenoids และ Eicosanoids จากอวัยวะต่าง ๆ ของแม่เพรียงทราย โดยใช้วิธีการของ Pratt and Tobe (1974)

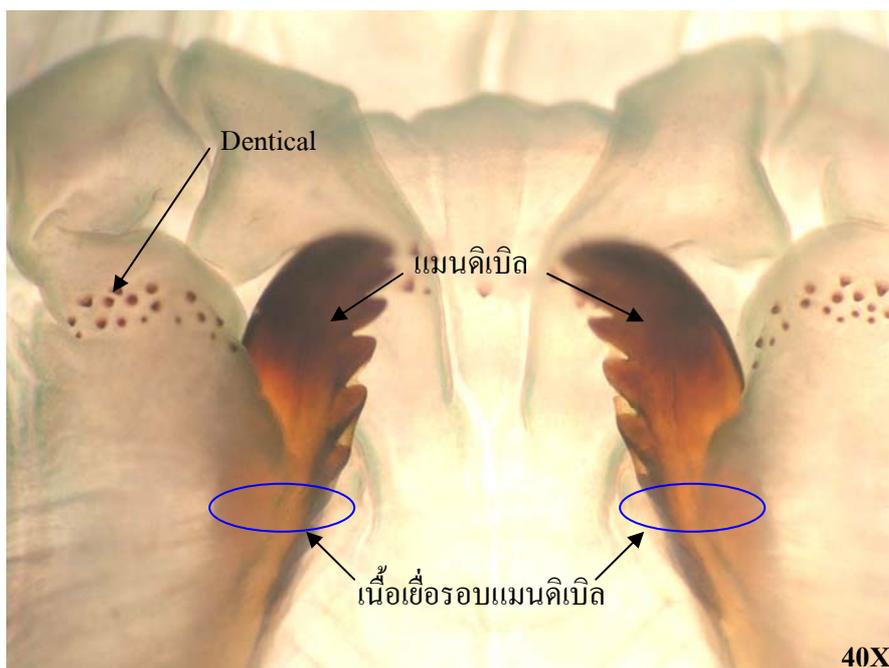
การเตรียมตัวอย่างแม่เพรียงทราย

นำแม่เพรียงทราย (*Perinereis* sp.) จากธรรมชาติบริเวณชายหาดในจังหวัดชลบุรี ขนส่งมาเลี้ยงต่อยังศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เลี้ยงปรับสภาพแม่เพรียงทรายก่อนการทดลอง โดยนำมาเลี้ยงในถังไฟเบอร์ขนาด 10 ลิตร ที่ระดับความเค็ม 30-35 ส่วนในพัน ใส่ทรายละเอียด และใส่น้ำทะเลให้มีระดับน้ำเหนือทรายประมาณ 10 เซนติเมตร การให้อาหาร ให้อาหารป่นสำเร็จรูปสำหรับลูกกุ้งกุลาดำ จำนวน 1 มื้อต่อวัน ให้อากาศตลอดเวลา และทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ทุกวัน

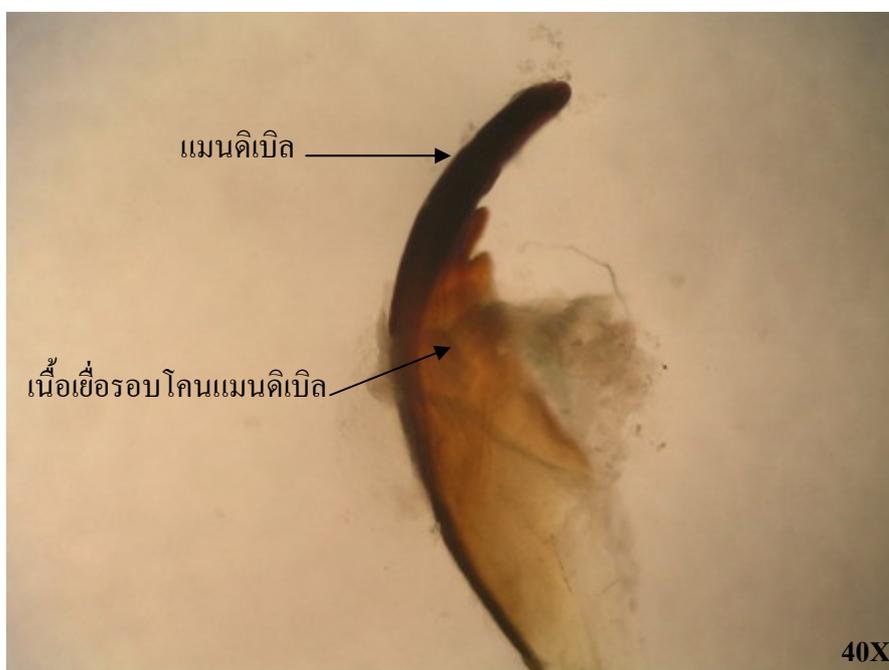
1.1 ศึกษาอวัยวะสังเคราะห์สารคล้ายฮอร์โมน Sesquiterpenoids และ Eicosanoids ของแม่เพรียงทราย

1.1.1 เนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิล

นำแม่เพรียงทรายมีชีวิตโตเต็มวัยที่มีความยาวลำตัวเฉลี่ย 10.3-18.1 เซนติเมตร น้ำหนักตัวเฉลี่ย 0.5-3.0 กรัม จำนวนข้อปล้อง 130-170 ปล้องต่อตัว ผ่าตัดบริเวณส่วนหัวด้วยกรรไกร บนจานแก้วที่มี ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ซาลิน (Phosphate Buffered Saline; PBS; NaCl, KCl, Na₂HPO₄) (ตารางผนวกที่ 1) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่างที่กำลังขยาย 40 เท่า (Light microscope) (OLYMPUS; Japan) เพื่อหาดำแหน่งของแมนดิเบิล และเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิล ดังภาพที่ 6 และ 7 ใช้กรรไกร Optical scissors (Vannas scissors; WPI; Germany) ตัดให้เหลือแต่ส่วนของเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิล เก็บเนื้อเยื่อในขวดแก้วที่เติม PBS โดยวางขวดแก้วบนน้ำแข็งเพื่อรักษาอุณหภูมิ และสภาพของเนื้อเยื่อก่อนนำไปทดลอง Radiochemical assay (RCA)



ภาพที่ 6 แสดงตำแหน่งแมนดิเบิลของแม่เพรียงทราย (*Perinereis* sp.)



ภาพที่ 7 แสดงตำแหน่งเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิลของแม่เพรียงทราย (*Perinereis* sp.)

ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการสังเคราะห์สารคล้ายฮอร์โมน Sesquiterpenoids และ Eicosanoids จากเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิลของแม่เพรียงทราย การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาว่าเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิลของแม่เพรียงทรายมีความสามารถในการสังเคราะห์สารคล้ายฮอร์โมน Sesquiterpenoids และ Eicosanoids หรือไม่ และศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการสังเคราะห์สารคล้ายฮอร์โมน Sesquiterpenoids และ Eicosanoids โดยตัดเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิลของแม่เพรียงทราย จำนวน 1 ตัวบ่ม (Incubation) ในน้ำเลี้ยงเซลล์ (50 ไมโครลิตร) กับสารตั้งต้น Farnesoic acid, สารรังสีทริเทียม (L-[methyl-³H]methionine) และ Methionine เปลี่ยนน้ำเลี้ยงเซลล์ (ทุก ๆ 3 ชั่วโมง จนครบ 12 ชั่วโมง) รวบรวมน้ำเลี้ยงเซลล์มาสกัดฮอร์โมนด้วยคอลโรฟอร์มตามขั้นตอนการสกัดฮอร์โมน และเปรียบเทียบระหว่างการเปลี่ยนน้ำเลี้ยงเซลล์ และไม่เปลี่ยนน้ำเลี้ยงเซลล์ ซึ่งแบ่งการทดลองออกเป็น 5 ชุดการทดลอง ๆ ละ 10 ซ้ำ วางแผนการทดลองได้ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 ชุดควบคุม (ไม่มีเนื้อเยื่อ)

ชุดการทดลองที่ 2 บ่มเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิลที่ 3 ชั่วโมง

ชุดการทดลองที่ 3 บ่มเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิลที่ 6 ชั่วโมง

ชุดการทดลองที่ 4 บ่มเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิลที่ 9 ชั่วโมง

ชุดการทดลองที่ 5 บ่มเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิลที่ 12 ชั่วโมง

1.1.2 สมอง และกล้ามเนื้อ

เปรียบเทียบความสามารถในการสังเคราะห์สารคล้ายฮอร์โมน Sesquiterpenoids และ Eicosanoids จากเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิล กับ สมอง และกล้ามเนื้อ ของแม่เพรียงทราย การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาว่ามีอวัยวะใดบ้างของแม่เพรียงทรายที่มีความสามารถในการสังเคราะห์สารคล้ายฮอร์โมน Sesquiterpenoids และ Eicosanoids โดยตัดเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิล, สมอง และกล้ามเนื้อของแม่เพรียงทรายในตัวเดียวกัน โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 4 ชุดการทดลอง ๆ ละ 10 ซ้ำ วางแผนการทดลองเปรียบเทียบความสามารถในการสังเคราะห์สารคล้ายฮอร์โมน Sesquiterpenoid และ Eicosanoids ดังต่อไปนี้

- ชุดการทดลองที่ 1 ชุดควบคุม (ไม่มีเนื้อเยื่อ) (3, 6, 9 และ 12 ชั่วโมง)
 ชุดการทดลองที่ 2 เนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิล+น้ำเลี้ยงเซลล์ (3, 6, 9 และ 12 ชั่วโมง)
 ชุดการทดลองที่ 3 สมอง+น้ำเลี้ยงเซลล์ (3, 6, 9 และ 12 ชั่วโมง)
 ชุดการทดลองที่ 4 กล้ามเนื้อ+น้ำเลี้ยงเซลล์ (3, 6, 9 และ 12 ชั่วโมง)

อนึ่งการทดลองระยะเวลานี้ได้ทดลองเปรียบเทียบระหว่างการเปลี่ยนน้ำเลี้ยงเซลล์ทุก ๆ 3 ชั่วโมง จนครบ 12 ชั่วโมง และไม่เปลี่ยนน้ำเลี้ยงเซลล์เลยตามระยะเวลา 3, 6, 9 และ 12 ชั่วโมง ตามลำดับ เพื่อเปรียบเทียบปริมาณของสารที่สังเคราะห์ได้

จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเซลล์จากข้อ 1.1.1 และ 1.1.2 นำมาสกัดสารคล้ายฮอร์โมน Sesquiterpenoids และ Eicosanoids ตามขั้นตอน โดยใช้วิธีของ Pratt and Tobe (1974)

ได้ทำการทดลองที่หน่วยผลิตไอโซโทป สำนักงานปรมาณูเพื่อสันติ โดยเตรียม Assay buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย สารรังสีทริเทียม (L-[methyl-³H]methionine) (10% Assay buffer) (Amersham Biosciences; UK) แอล-เมทไทโอนีน (L- methionine) (10% Assay buffer) และสารตั้งต้น Farnesoic acid ลงใน Eppendorf tube เป่าส่วนผสมให้แห้งด้วยก๊าซไนโตรเจน แล้วเติมน้ำเลี้ยงเซลล์ M199 (Difco, Becton Dickinson and Company; USA) ผสมเกลือ (โซเดียมคลอไรด์ (NaCl), แมกนีเซียมซัลเฟต (Mg_2SO_4), โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)) 50 ไมโครลิตร ผสมสารด้วยเครื่องผสมสาร (Vortex) ประมาณ 1-2 นาที จากนั้นนำเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิลใส่ลงไปในบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 3, 6, 9 และ 12 ชั่วโมง เขย่าในแนวตั้งลงตลอดการทดลอง

หยุดปฏิกิริยาด้วยเมทานอลปริมาตร 200 ไมโครลิตร, 1% ไดโซเดียม เอททีลิน ไดเอมีน เตตรา อะซิเตท (1% Na_2EDTA) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ Farnesoic acid 20 ไมโครลิตร สกัดฮอร์โมน Sesquiterpenoids และ Eicosanoids โดยเติมคลอโรฟอร์ม 1 มิลลิตร ผสมสารด้วยเครื่องผสมสารประมาณ 1-2 นาที นำไปเข้าเครื่องเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 10000 g เป็นเวลา 10 นาที เมื่อสารตัวอย่างแยกชั้น จึงเก็บส่วนใสชั้นล่าง (ชั้นของคลอโรฟอร์ม) ด้วยปิเปตแก้วปลายแหลม นำมากรองผ่านโซเดียมซัลเฟตเพื่อคูดน้ำออก (ใส่ลูกแก้ว 1 ลูกลงในปิเปตแก้วขนาด 3 มิลลิเมตร (Ajax chemicals; Australia) ใส่โซเดียมซัลเฟต (Scharlau; Europe an Union) สูงประมาณ 2-3 เซนติเมตร)

สกัดฮอร์โมน Sesquiterpenoids และ Eicosanoids อีกครั้งด้วยคลอโรฟอร์ม 0.5 มิลลิลิตร เก็บส่วนใสชั้นล่างกรองผ่าน โซเดียมซัลเฟตที่ใส่ในปิเปตแก้วอันเดิม นำสารสกัดฮอร์โมนเป่าแห้งด้วยก๊าซไนโตรเจน Spot สารตัวอย่างบน TLC plate (Plastic silica 20x20 ซม.; Polygram SIL G/UV254; Macherey-Nagel; Germany) ที่ทำความสะอาดด้วยเมทานอล 2 ครั้ง นำตัวอย่างสารสกัดที่เป่าแห้งมาเติม Diethyl ether ปริมาตร 100 ไมโครลิตร Spot บน TLC plate ที่ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เติม Diethyl ether อีกครั้งปริมาตร 50 ไมโครลิตร Spot ซ้ำ นำสารมาตรฐาน Methyl farnesoate มา Spot ลงบน TLC plate ในช่องถัดมา ปล่อยให้สารตัวอย่างแห้ง แล้วจึงนำ TLC plate มา Run ในสารละลาย Toluene 85 มิลลิลิตร: Ethyl acetate 15 มิลลิลิตร: Acetic acid 4 หยด ส่งดูการแยกตัวของสารตัวอย่างได้แสงยูวี (UV light lamp) ที่ความยาวคลื่น 256 นาโนเมตร จากนั้นตัดแถบสารสีจากตัวอย่างที่ปรากฏบริเวณเดียวกับสารมาตรฐาน Methyl farnesoate ใส่ในขวดแก้วขนาด 20 มิลลิลิตร เติม Optiphase hisafe (Perkin Elmer; England) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เช็ดขวดแก้วให้สะอาด นำขวดแก้วใส่ใน Rack เพื่อนับปริมาณการแผ่รังสีด้วยเครื่อง Liquid Scintillation Counter (LSC, Winspectral รุ่น 1414; Netherlands) ซึ่งเป็นการวัดปริมาณการแผ่ของรังสีในหนึ่งนาที มีหน่วยเป็น Disintegration per minute (dpm)

ซึ่งสามารถสรุปขั้นตอนการสังเคราะห์สารคล้ายฮอร์โมน Sesquiterpenoids และ Eicosanoids ดังภาพที่ 8

2. การจำแนกชนิด และศึกษาโครงสร้างของสารสกัดจากเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิลของแม่เพรียงทราย ด้วย High Performance Liquid Chromatography (HPLC) และ Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS)

2.1 การจำแนกชนิดของสารสกัดจากเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิลด้วย High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (Wilder *et al.*, 1995) ใช้สารรังสี โดยทำการทดลองที่ University of Toronto Canada ภายใต้ความดูแลของ Prof. Stephen tobe ใช้ในการจำแนกชนิดของสารสังเคราะห์ที่มีปริมาณน้อย โดยเป็นวิธีการวัดปริมาณการแผ่สารรังสีทริเทียม (L-[methyl-³H]methionine) ผ่าตัดเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิลบ่มกับสารตั้งต้น Farnesoic acid พร้อมด้วยสารรังสีทริเทียม (L-[methyl-³H]methionine) และ Methionine เป็นเวลา 12 ชั่วโมง (จากผลการทดลองในข้อ 1) โดยไม่เปลี่ยนน้ำเลี้ยงเซลล์ สกัดฮอร์โมน Sesquiterpenoids และ Eicosanoids ด้วยคลอโรฟอร์มตามขั้นตอนในวิธีการสกัดข้างต้นแล้ว เป่าแห้งด้วยก๊าซไนโตรเจน ละลายสารกลับโดยนำมาเติมเอทิล

อีเทอร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร Spot บน Glass backed TLC silica plate จุดแถบตัวอย่างที่ปรากฏตรงกับสารมาตรฐาน Methyl farnesoate สกัดด้วยเอทิล อีเทอร์สองครั้ง เป่าแห้ง แล้วนำมาเติม ไดเอทิล อีเทอร์ลงไปละลาย นิดสารตัวอย่างที่ติดฉลากของสารรังสีเข้าเครื่อง HPLC มี Condition คือ Micro pack silica HPLC column (30 ซม. x 4 มม.) มีบัฟเฟอร์ คือ 5% ไดเอทิล อีเทอร์ (Water saturated) ในเฮกเซน ที่อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที เก็บ Fraction ทุก ๆ ครึ่งนาที จนครบ 13 นาที นำไปวัดค่าการแผ่รังสีด้วยเครื่อง Liquid Scintillation Counter

แต่เนื่องจากการทดลองในข้อ 2.1 ได้ใช้สารตั้งต้น Farnesoic acid ในการจำแนกชนิดของ สารสังเคราะห์ Sesquiterpenoids และ Eicosanoids ที่สกัดจากเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิลของแม่เพรียงทราย พบว่าสารสังเคราะห์แม้จะ Co-migrate กับสารมาตรฐาน Methyl farnesoate บน TLC แต่เมื่อนำมาแยกด้วย HPLC กลับพบว่าสารสังเคราะห์ Sesquiterpenoids และ Eicosanoids ที่สกัดจากเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิลมีค่า Retention time ไม่ตรงกับสารมาตรฐาน Methyl farnesoate ดังนั้นวัตถุประสงค์ในการศึกษานี้เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ของการสังเคราะห์ Sesquiterpenoids และ Eicosanoids จากเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิลของแม่เพรียงทรายกับสารตั้งต้นอื่น ๆ ที่ไม่ใช่ Farnesoic acid (FA) เช่น Arachidonic acid (AA) และ 8,11,4-Eicosatrienoic acid (Eico) เพื่อหาสารตั้งต้นที่สามารถสังเคราะห์สาร Sesquiterpenoids และ Eicosanoids ได้อีก โดยทดลองตัดเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิลของแม่เพรียงทราย จำนวน 1 ตัวบ่ม ในน้ำเลี้ยงเซลล์กับสารตั้งต้นต่าง ๆ กัน ได้แก่ Farnesoic acid, Arachidonic acid และ 8,11,4-Eicosatrienoic acid ซึ่งแบ่งการทดลองออกเป็น 3 ชุด การทดลอง ๆ ละ 10 ชั่วโมง วางแผนการทดลองได้ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 บ่มเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิลกับสารตั้งต้น Farnesoic acid

ชุดการทดลองที่ 2 บ่มเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิลกับสารตั้งต้น Arachidonic acid

ชุดการทดลองที่ 3 บ่มเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิลกับสารตั้งต้น 8,11,4-Eicosatrienoic

acid

2.2 การจำแนกชนิด และศึกษาโครงสร้างของสารสกัดจากเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิลของแม่เพรียงทรายด้วย Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS) โดยใช้สารรังสี โดยทำการทดลองที่หน่วยปฏิบัติการวิจัยและพัฒนาวิศวกรรมชีวเคมีและโรงงานต้นแบบ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี วิทยาเขตบางขุนเทียน ภายใต้การดูแลของ ดร.กอบกุล เหล่าแห่ง

ซึ่งเป้าหมายในการศึกษาเพื่อพิสูจน์ว่าสารผลิตภัณฑ์จากเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิลของแม่เพรียงทราย คือ Methyl farnesoate หรือไม่ โดยการเปรียบเทียบ Retention time ของสารผลิตภัณฑ์กับสารมาตรฐาน Methyl farnesoate, Farnesoic acid, สารมาตรฐาน Arachidonic acid และกรดไขมันในกลุ่ม C16-C22 โดยฉีดสารผลิตภัณฑ์จากเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิล และนำมาเปรียบเทียบ Retention time กับสารมาตรฐาน สารที่วิเคราะห์ด้วย GC และ GC/MS ได้แก่

- ชุดควบคุม 1 - Farnesoic acid
- ชุดควบคุม 2 - Farnesoic acid+เนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิลของแม่เพรียงทราย
- สารมาตรฐาน Methyl farnesoate
- สารมาตรฐาน Arachidonic acid
- สารมาตรฐาน 8,11,4-Eicosatrienoic acid
- สารมาตรฐาน กรดไขมันในกลุ่ม C16-C22 (Stearic acid (C18), Nonadecanoic acid (C19), Arachidic acid (C20), Palmitic acid (C16), Heptadecanoic acid (C17), Erucic acid (C22), Oleic acid (C16), Linoleic acid (C18), Behenic acid (C22))
- สารสกัดตัวอย่างจากเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิลของแม่เพรียงทราย
- สารสกัดตัวอย่างจากเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิลของแม่เพรียงทราย Spike ด้วยสารมาตรฐาน Methyl farnesoate

ขั้นตอนการนำชุดควบคุม และสารมาตรฐานทั้งหมดมาทำ Transmethylation โดยใช้วิธีการของ Lapage and Roy (1986)

นำชุดควบคุมที่ 1 (Farnesoic acid), ชุดควบคุมที่ 2 (Farnesoic acid+เนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิลของแม่เพรียงทราย), สารมาตรฐาน Methyl farnesoate, สารมาตรฐาน Arachidonic acid, 8,11,4-Eicosatrienoic acid, สารมาตรฐาน กรดไขมันในกลุ่ม C16-C22 (Stearic acid (C18), Nonadecanoic acid (C19), Arachidic acid (C20), Palmitic acid (C16), Heptadecanoic acid (C17), Erucic acid (C22), Oleic acid (C16), Linoleic acid (C18), Behenic acid (C22)) และสารสกัดจากเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิลของแม่เพรียงทราย (ไม่มีสารรังสี) จำนวน 30 ตัวที่เป้าแห้ง ทำละลายด้วยเฮกเซน นำตัวอย่างทั้งหมดมา Transmethylation (Lapage and Roy, 1986) โดยเติม 5% HCl ใน เมธานอล 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันบน Magnetic stirrer ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.30 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นเติม 0.01% BHT ในเฮกเซนปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไป

เหยียงแยกชั้นด้วยเครื่องเหยียงตกตะกอน สารจะแยกเป็นสองชั้น ใช้ปิเปตแก้วปลายแหลมเก็บสารด้านบน กรองผ่านโซเดียมซัลเฟต เป่าสารละลายที่ได้ให้แห้งด้วยก๊าซไนโตรเจน เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อด้วยเครื่อง GC และ GC/MS

การวิเคราะห์ด้วย GC และ GC/MS

นำสารสกัดจากเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิลของแม่เพรียงทราย ที่ทำ Transmethylation แล้วมาละลายด้วยเฮกเซนปริมาตร 20 ไมโครลิตร ฉีดสารผลิตภัณฑ์ปริมาตร 1 ไมโครลิตรเข้าเครื่อง GC ที่มี Condition คือ Silica capillary column หลังจากนั้นนำตัวอย่างดังกล่าวมาวิเคราะห์ต่อด้วย GC/MS (Thermo Finnigan Trace 2000, AS2000 Liquid autosampler, Supelco OMEGAWAX™ 250; Pennsylvania) โดยมี Condition คือ Silica capillary column (30 มม. X 0.25 มม. X 0.25 ไมโครเมตร) Oven temperature เริ่มต้น 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที อุณหภูมิปรับเปลี่ยนขึ้น 4 องศาเซลเซียส/นาที จนมีอุณหภูมิสูงถึง 205 องศาเซลเซียส คงไว้ 10 นาที หลังจากนั้นอุณหภูมิปรับเปลี่ยนขึ้น 4 องศาเซลเซียส/นาที จนอุณหภูมิสูงถึง 240 องศาเซลเซียส คงไว้ 2 นาที อัตราการไหลของก๊าซฮีเลียม 1.0 มิลลิตร/นาที ฉีดตัวอย่างเข้มข้น 1 ไมโครลิตร ฉีดสารต่าง ๆ ที่กล่าวไว้ในข้างต้น เปรียบเทียบ Retention time ของสารสกัดจากเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิลของแม่เพรียงทรายกับสารมาตรฐานต่าง ๆ

ซึ่งสามารถสรุปขั้นตอนการจำแนกชนิด และโครงสร้างของสารสกัดจากเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิล ดังภาพที่ 9

3. การวิเคราะห์เอ็นไซม์เมทิลทรานสเฟอเรส (Methyl transferase assay) ที่ใช้สังเคราะห์สารคล้ายเทอร์พีน Sesquiterpenoid จากเนื้อเยื่อต่าง ๆ (เนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิล, สมอง, กล้ามเนื้อ และคอกอย) ของแม่เพรียงทราย

ขั้นตอน Methyl transferase assay คัดแปลงจากวิธีการของ Tobe *et al.* (1989)

โดยนำแม่เพรียงทรายจำนวน 1 ตัว ล้างทำความสะอาด ตัดเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิล, สมอง, กล้ามเนื้อ และคอกอย จากในแม่เพรียงทรายตัวเดียวกัน (ผ่าตัดเนื้อเยื่อต่าง ๆ ในน้ำเกลือ PBS ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง เก็บเนื้อเยื่อต่าง ๆ ในขวดแก้วขนาด 10 มิลลิตร ที่เติม PBS รักษา

อุณหภูมิ โดยวางขวดแก้วบนน้ำแข็ง ทำการเก็บตัวอย่างดังกล่าวนี้จากแม่เพียงทราย 10 ตัวมาศึกษาตามขั้นตอนดังนี้

นำเนื้อเยื่อต่าง ๆ มาบด (Homogenis) ด้วยแท่งบดเนื้อเยื่อ (Tissue grinder) ใน 100 mM PBS ที่มี 1 mM Na_2EDTA , 1 mM 2-mercaptoethaol และ 1% BSA ปริมาตร 50 ไมโครลิตร (ตารางผนวกที่ 2) ล้างแท่งบดเนื้อเยื่อด้วย 100 mM PBS ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จะได้สารละลายที่บดเนื้อเยื่อทั้งหมดปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปเข้าเครื่องเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 10,000 g เป็นเวลา 30 นาที

เตรียม Eppendorf tube โดยเติม 1 mM ของ Farnesoic acid ปริมาตร 3 ไมโครลิตร เป่าให้แห้ง แล้วเติม 100 mM PBS ปริมาตร 48 ไมโครลิตร, 36.3 μM S-Adenosyl-L-[methyl- ^3H] methionine ปริมาตร 1 ไมโครลิตร (Amersham Biosciences; UK), 100 mM S-Adenosyl-Methionine (Cold-SAM) (Sigma; USA) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร นำสารที่เหวี่ยงตกตะกอนแล้วมาเก็บส่วนใสด้านบนด้วยปิเปตแก้วปลายแหลม ใส่ใน Eppendorf tube ที่เตรียมไว้ โดยวาง Eppendorf tubes บนน้ำแข็งตลอดการทดลอง บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิห้องบนเครื่องเขย่าแนวขึ้นลงเป็นเวลา 9 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยา และนำมาสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม ตามขั้นตอนการสกัดข้างต้น แยกบริสุทธิ์ตัวอย่างสารบน TLC plate นำแถบ TLC ที่ปรากฏแถบสีตรงกับสารมาตรฐาน Methyl farnesoate มานับปริมาณการแผ่รังสีด้วยเครื่อง LSC

การวิเคราะห์เอ็นไซม์สังเคราะห์ฮอร์โมน Sesquiterpenoids (Methyl transferase assay) เป็นวิธีการศึกษาทางอ้อมวิธีหนึ่ง โดยดูปริมาณของเอ็นไซม์ Methyl transferase ที่ใช้ในการเปลี่ยนสารตั้งต้น (Farnesoic acid) ไปเป็นฮอร์โมน Methyl farnesoate ซึ่งมีสมมุติฐานว่าถ้าเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิลของแม่เพียงทรายเป็นอวัยวะที่สังเคราะห์ฮอร์โมน Methyl farnesoate บริเวณดังกล่าวควรมีเอ็นไซม์ Methyl transferase อยู่ในปริมาณมากเมื่อเทียบกับอวัยวะต่าง ๆ ของแม่เพียงทราย ซึ่งเอ็นไซม์ดังกล่าวทำหน้าที่ในการเปลี่ยนสารตั้งต้น Farnesoic acid เป็นฮอร์โมน Methyl farnesoate ซึ่งวางแผนการทดลองออกเป็น 5 ชุดการทดลอง ๆ ละ 10 ซ้ำดังนี้

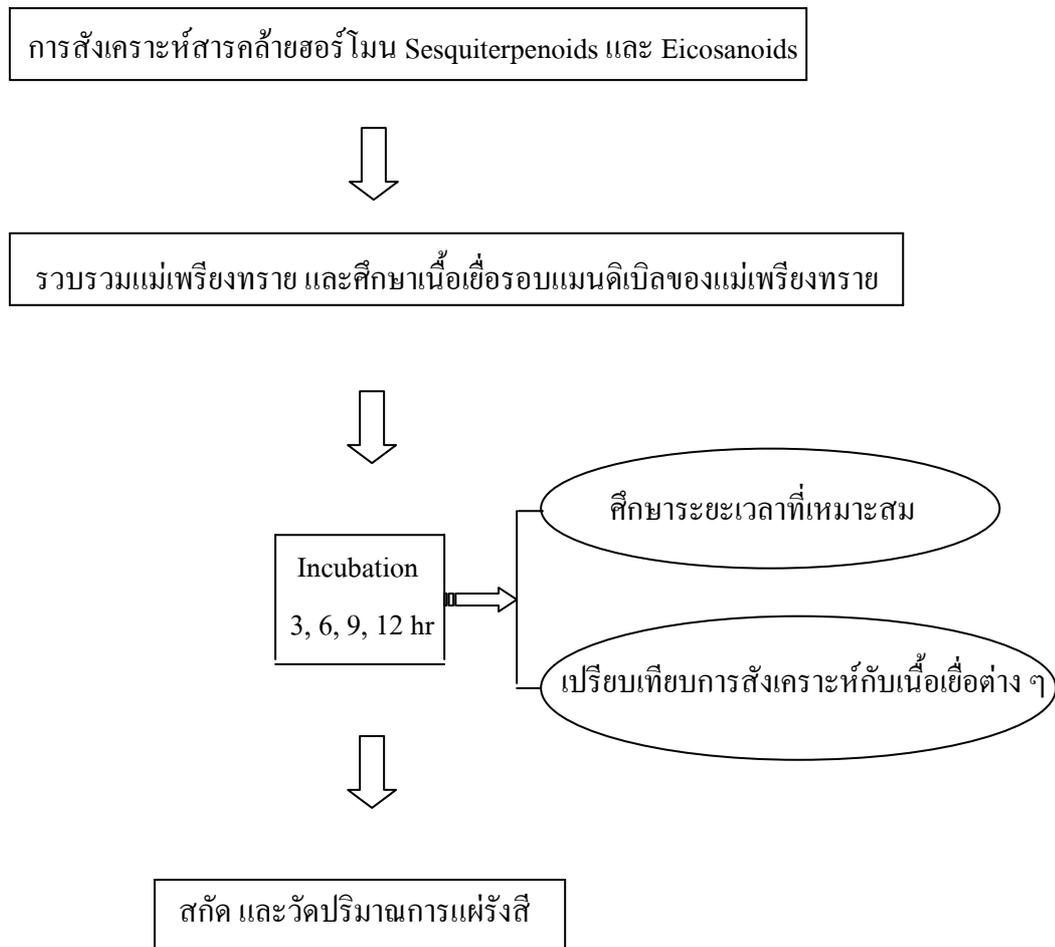
ชุดการทดลองที่ 1 ชุดควบคุม (ไม่มีเนื้อเชื้อ)

ชุดการทดลองที่ 2 เนื้อเชื้อรอบแมนดิเบล

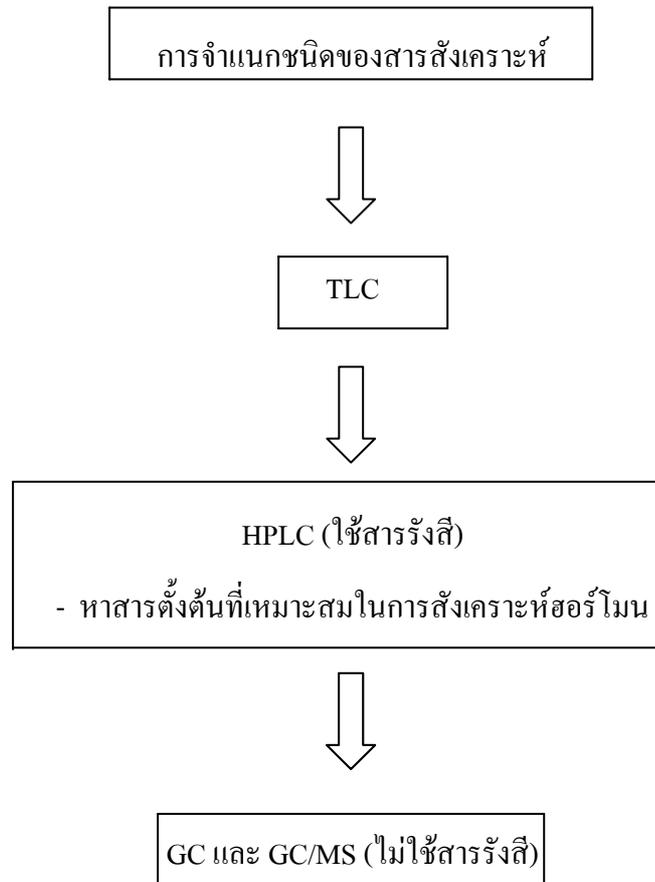
ชุดการทดลองที่ 3 สมอง

ชุดการทดลองที่ 4 กล้ามเนื้อ

ชุดการทดลองที่ 5 กอหอย



ภาพที่ 8 ขั้นตอนการศึกษาการสังเคราะห์สอร์โมน Sesquiterpenoids และ Eicosanoids จากอวัยวะต่าง ๆ ของแม่เพรียงทราย



ภาพที่ 9 ขั้นตอนการจำแนกชนิดของสารสกัดจากเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิล ด้วย TLC, HPLC และ GC/MS

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย ด้วยวิธี T-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

สถานที่ทำการวิจัย

- ภาควิชาชีววิทยาประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- หน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย
- หน่วยผลิตไอโซโทป สำนักงานปรมาณูเพื่อสันติ
- หน่วยปฏิบัติการวิจัยและพัฒนาวิศวกรรมชีวเคมี และโรงงานต้นแบบ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี วิทยาเขตบางขุนเทียน
- Department Cell and System Biology University of Toronto Canada

ระยะเวลาที่ทำการวิจัย

เริ่มการทดลอง : มกราคม 2548
สิ้นสุดการทดลอง : เมษายน 2550

แหล่งเงินทุนสนับสนุน

ศูนย์พันธุวิศวกรรม และเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

ผลและวิจารณ์

ผล

1. ผลการศึกษาการสังเคราะห์ฮอร์โมน Sesquiterpenoids และ Eicosanoids จากอวัยวะต่าง ๆ (เนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิล, ตมอ และ กล้ามเนื้อ) ของแม่เพรียงทรายในระยะเวลาที่เหมาะสม (3, 6, 9 และ 12 ชั่วโมง) ดังนี้

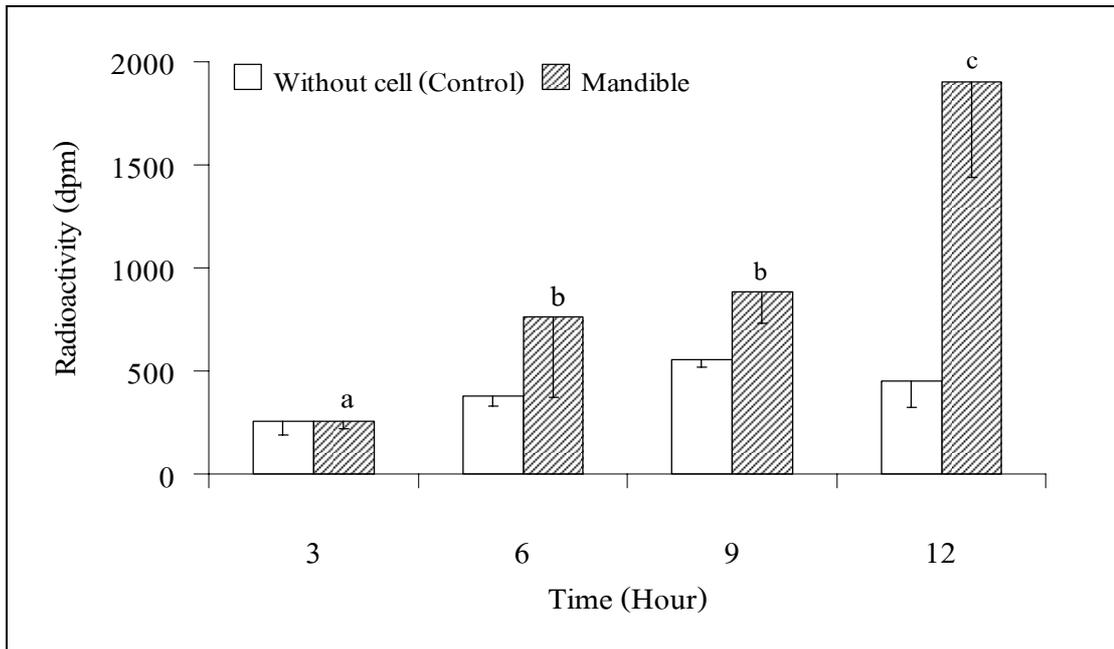
1.1 ผลการศึกษาเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิล ที่ระยะเวลาต่าง ๆ โดยการเปรียบเทียบระหว่างการเปลี่ยนน้ำเลี้ยงเซลล์ และไม่เปลี่ยนน้ำเลี้ยงเซลล์ (ดังตารางที่ 1, ภาพที่ 10 และ 11) พบว่าเมื่อเปลี่ยนน้ำเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิลที่ 12 ชั่วโมง มีปริมาณการแผ่รังสี L-[methyl-³H]methionine มากที่สุด (1903.83 ± 464.23 dpm) และสูงกว่าการบ่มที่เวลาต่าง ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับ 3, 6 และ 9 ชั่วโมง (255.95 ± 34.45 , 764.64 ± 391.56 , 885.76 ± 153.48 dpm ตามลำดับ) (ดังตารางที่ 1 และภาพที่ 10) และเมื่อไม่เปลี่ยนน้ำเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิลที่ 12 ชั่วโมง มีปริมาณการแผ่รังสี L-[methyl-³H]methionine มากที่สุด (6709.57 ± 456.30 dpm) และสูงกว่าการบ่มที่เวลาต่าง ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับ 3, 6 และ 9 ชั่วโมง (179.90 ± 37.51 , 2140.33 ± 369.37 , 3220.83 ± 253.63 dpm ตามลำดับ)

แสดงว่า การบ่มเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิลที่ไม่เปลี่ยนน้ำเลี้ยงเซลล์ จะได้ผลดีกว่าเปลี่ยนน้ำเลี้ยงเซลล์ทุก 3 ชั่วโมง

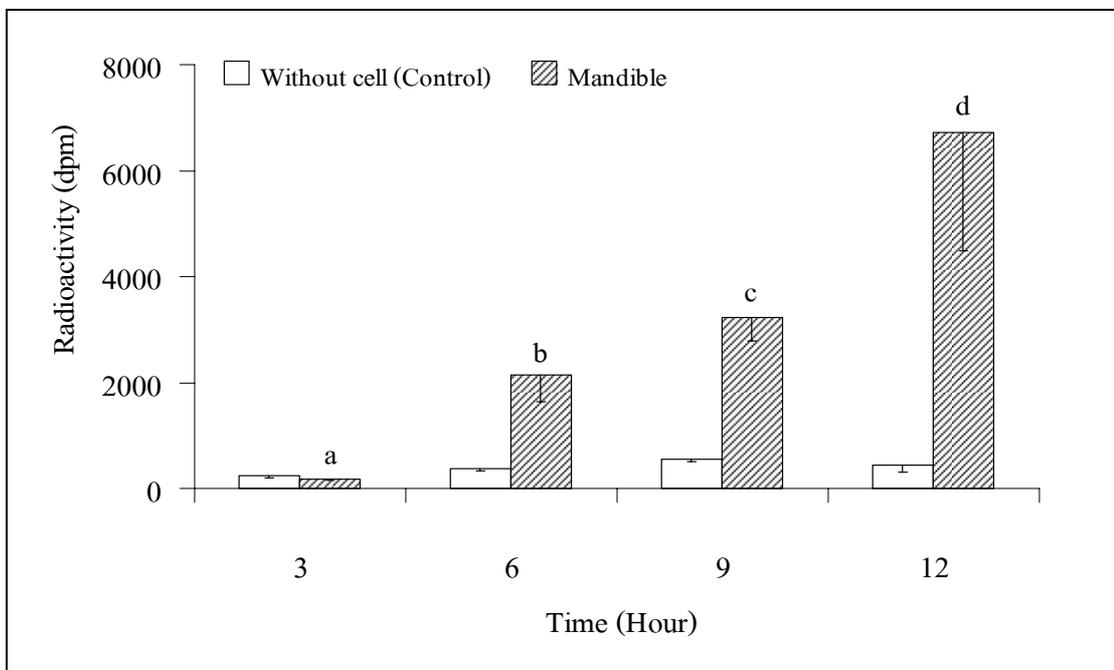
ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ย (Mean±SD) การแผ่รังสี L-[methyl-³H]methionine เมื่อป้อนเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิล ที่ระยะเวลาแตกต่างกัน

ระยะเวลาการ ป้อนเนื้อเยื่อ (ชม.)	ค่าเฉลี่ยการแผ่รังสี (dpm)	
	เปลี่ยนน้ำเลี้ยงเซลล์	ไม่เปลี่ยนน้ำเลี้ยงเซลล์
3	255.95±34.45 ^a	179.90±28.93 ^a
6	764.64±391.56 ^b	2140.33±515.31 ^b
9	885.76±153.48 ^b	3223.83±428.42 ^c
12	1903.83±464.23 ^c	6709.57±2221.65 ^d
P-value	0.00	0.004

หมายเหตุ ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)



ภาพที่ 10 ค่าเฉลี่ย (Mean±SD) การแผ่รังสีของ L-[methyl-³H] methionine จากการบ่มเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิลของแม่เพรียงทรายโดยเปลี่ยนน้ำเลี้ยงเซลล์ทุก 3 ชั่วโมง (n = 10)



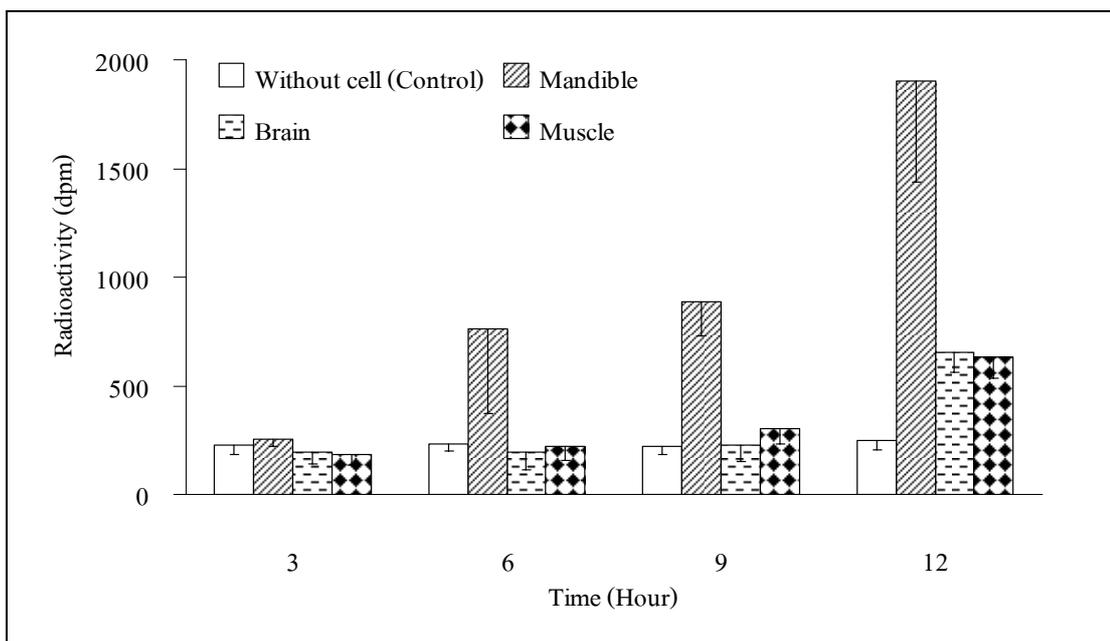
ภาพที่ 11 ค่าเฉลี่ย (Mean±SD) การแผ่รังสีของ L-[methyl-³H] methionine จากการบ่มเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิลของแม่เพรียงทรายโดยไม่เปลี่ยนน้ำเลี้ยงเซลล์ (n = 10)

1.2 ผลการศึกษาการสังเคราะห์สารคล้ายฮอร์โมน Sesquiterpenoids และ Eicosanoids โดยการเปรียบเทียบอวัยวะต่าง ๆ (เนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิล กับ สมอง และกล้ามเนื้อ) ของแม่เพรียงทราย (ตารางที่ 2, ภาพที่ 12 และ 13) พบว่าเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิลที่ 12 ชั่วโมง มีปริมาณการสังเคราะห์สารคล้ายฮอร์โมนต่อหนึ่งหน่วยเวลามากที่สุด (1903.83 ± 464.2 dpm) และสูงกว่าอวัยวะอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับ สมอง (654.78 ± 90.54 dpm) และ กล้ามเนื้อ (633.84 ± 96.12 dpm)

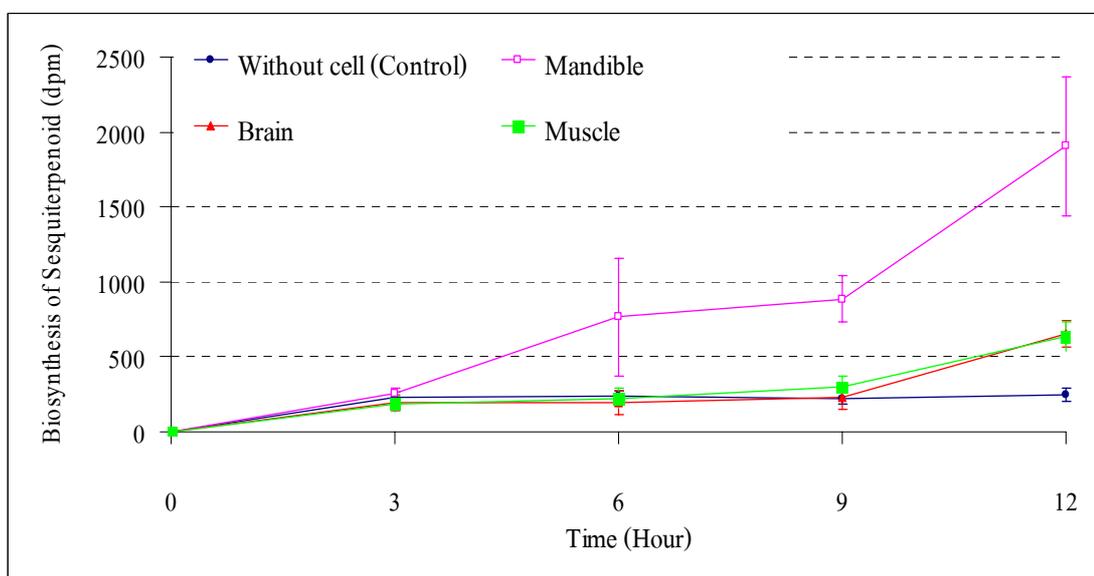
ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ย (Mean \pm SD) การแผ่รังสี L-[methyl- 3 H]methionine ของเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิล สมอง และกล้ามเนื้อของแม่เพรียงทราย บ่มที่ 3, 6, 9 และ 12 ชั่วโมง

ระยะเวลาการบ่ม เนื้อเยื่อ(ชม.)	ค่าเฉลี่ยการแผ่รังสี (dpm)			
	ไม่ใส่เนื้อเยื่อ	แมนดิเบิล	สมอง	กล้ามเนื้อ
3	227.36 \pm 41.43 ^a	255.95 \pm 34.45 ^b	194.4 \pm 54.21 ^a	186.20 \pm 51.95 ^a
6	235.11 \pm 35.41 ^a	764.64 \pm 391.56 ^b	194.59 \pm 81.34 ^a	224.25 \pm 67.08 ^a
9	222.56 \pm 38.79 ^a	885.76 \pm 153.48 ^b	229.11 \pm 77.86 ^a	302.97 \pm 72.13 ^c
12	246.60 \pm 40.95 ^a	1903.83 \pm 464.23 ^b	654.78 \pm 90.54 ^c	633.84 \pm 96.12 ^c

หมายเหตุ ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวนอนแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



ภาพที่ 12 ค่าเฉลี่ย (Mean±SD) การแผ่รังสีของ L-[methyl- ^3H] methionine จากการบ่มเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิล สมอง กล้ามเนื้อของแม่เพรียงทราย (เปลี่ยนน้ำเลี้ยงเซลล์) ที่ 3, 6, 9 และ 12 ชั่วโมง (n = 10)

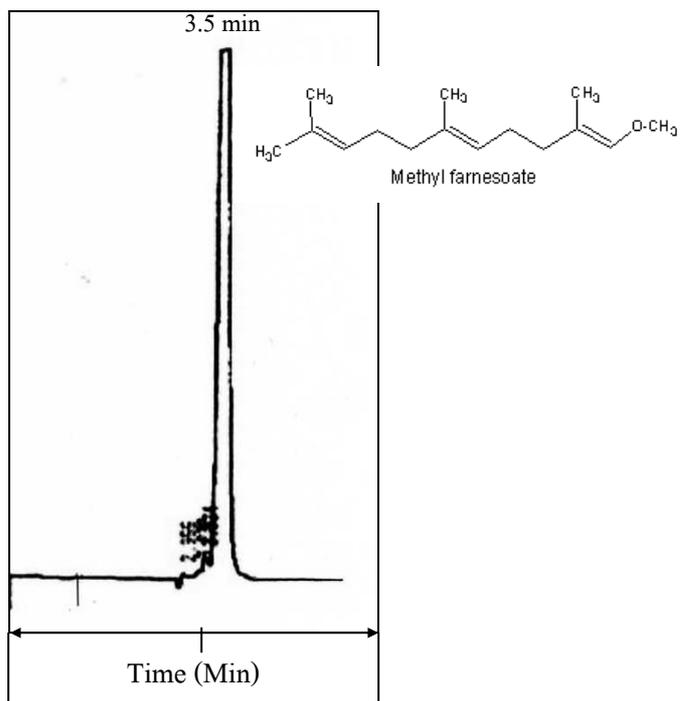


ภาพที่ 13 อัตราการสังเคราะห์สารคล้ายฮอร์โมน Sesquiterpenoids และ Eicosanoids จากเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิล (เปลี่ยนน้ำเลี้ยงเซลล์) สมอง และกล้ามเนื้อของแม่เพรียงทรายในหนึ่งหน่วยเวลา

2. ผลการจำแนกชนิด และศึกษาโครงสร้างของสารสกัดจากเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิลของแม่เพรียง ทรายด้วย High Performance Liquid Chromatography (HPLC) และ Gas Chromatography/ Mass Spectrometry (GC/MS)

2.1 ผลการจำแนกชนิดของสารสกัดจากเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิล ด้วย High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

พบว่า สารผลิตภัณฑ์มีค่า Retention time ต่างจากสารมาตรฐาน Methyl farnesoate (3.5 นาที) (ดังภาพที่ 14) แต่กลับมีค่า Retention time ใกล้เคียงกับสาร Eicosanoids ตัวอื่น ได้แก่ Arachidonic acid methyl ester (5.5 นาที) และ 8,11,14-Eicosatrienoic acid methyl ester (5.3 นาที) จึงมีความเป็นไปได้ของการสังเคราะห์ Sesquiterpenoids และ Eicosanoids จากเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิลกับสารตั้งต้นอื่น ๆ ที่ไม่ใช่ Farnesoic acid



ภาพที่ 14 Chromatogram ของ สารมาตรฐาน Methyl farnesoate จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC

Condition ที่ใช้สำหรับฉีดสารละลายมาตรฐานของ Methyl farnesoate สำหรับเครื่อง HPLC
(Micro pack silica column, 5 เปอร์เซ็นต์ Ether-water saturated in hexane, UV-detector
ณ ความยาวคลื่น 219 นาโนเมตร, Flow rate 1.0 ml/min)

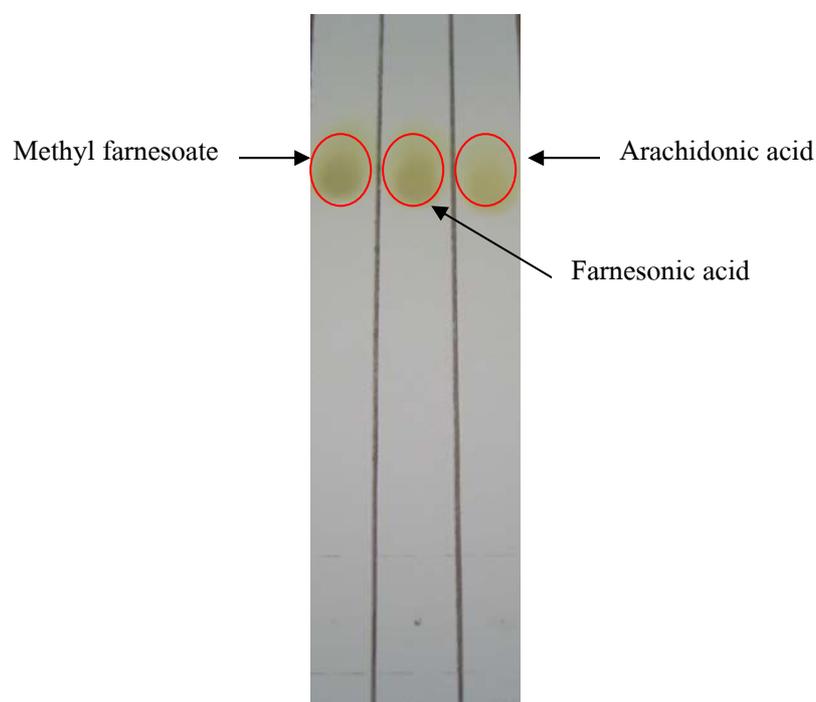
เนื่องจากผลของ HPLC ในข้อ 2.1 สารผลิตภัณฑ์มี Retention time ไม่ตรงกับ Methyl farnesoate แต่มีค่าใกล้เคียงกับ Arachidonic acid และ Eicosatrienoic acid ซึ่งมีความเป็นไปได้ของการสังเคราะห์ Sesquiterpenoids และ Eicosanoids จากเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิลกับสารตั้งต้นอื่นๆ ที่ไม่ใช่ Farnesoic acid แต่สามารถเมตาบอไลซ์ได้ในลักษณะคล้ายคลึงกับ Farnesoic acid เช่น Arachidonic acid และ Eicosatrienoic acid และจากการวิเคราะห์ด้วย TLC พบว่าแถบของ Arachidonic acid methyl ester Co-migrate พร้อมกับ Methyl farnesoate ส่วนแถบของ 8,11,14-Eicosatrienoic มีการกระจายกว้าง หรือแถบไม่ Migrate กับ Methyl farnesoate บน TLC plate (ภายใต้ UV light)

จากการศึกษาใช้ Arachidonic acid และ Farnesoic acid เป็นสารตั้งต้น พบว่า Co-migrate พร้อมกับ Methyl farnesoate บน TLC plate ด้วยไอระเหยของเกลือไอโอดีน (ภาพที่ 14) เมื่อตัดแถบที่ตรงกันไปวัดค่าการแผ่รังสี พบว่าการบ่มเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิลของแม่เพรียงทรายที่มี Arachidonic acid เป็นสารตั้งต้น ให้สารผลิตภัณฑ์ที่มีการแผ่รังสีสูงกว่าการบ่มเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิลที่มี Farnesoic acid เป็นสารตั้งต้น ส่วนตัวอย่างที่มี 8,11,14-Eicosatrienoic เป็นสารตั้งต้น ไม่ Migrate กับ Methyl farnesoate พบว่าการบ่มเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิลกับสารตั้งต้น Arachidonic acid มีค่าเฉลี่ยการแผ่รังสีของ L-[methyl- H^3] methionine สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับสารตั้งต้น Farnesoic acid ซึ่งมีค่าเฉลี่ยการแผ่รังสีของ Arachidonic acid และ Farnesoic acid เท่ากับ 3322.0 ± 1362.1 และ 1505.92 ± 395.57 dpm ตามลำดับ ส่วน 8,11,14-Eicosatrienoic เนื่องจากไม่ Migrate กับ Methyl farnesoate จึงไม่มีการตัดแถบรังสีดังกล่าวไปวัดปริมาณการแผ่รังสี (ดังตารางที่ 3 และ ภาพที่ 15)

ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ย (Mean±SD) ปริมาณการแผ่รังสีของ L-[methyl- ^3H] methionine จากการปั๊มเนื้อเยื่อรอบเมนดิเบิลกับสารตั้งต้น Farnesoic acid, Arachidonic acid และ Eicosatrienoic

ระยะเวลาการปั๊มเนื้อเยื่อ(ชม.)	ค่าเฉลี่ยการแผ่รังสี (dpm)			P-value
	Farnesoic acid	Arachidonic acid	Eicosatrienoic	
12	1505.92±395.57 ^a	3322.00±1201.27 ^b	-	0.0003

หมายเหตุ ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวนอนแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

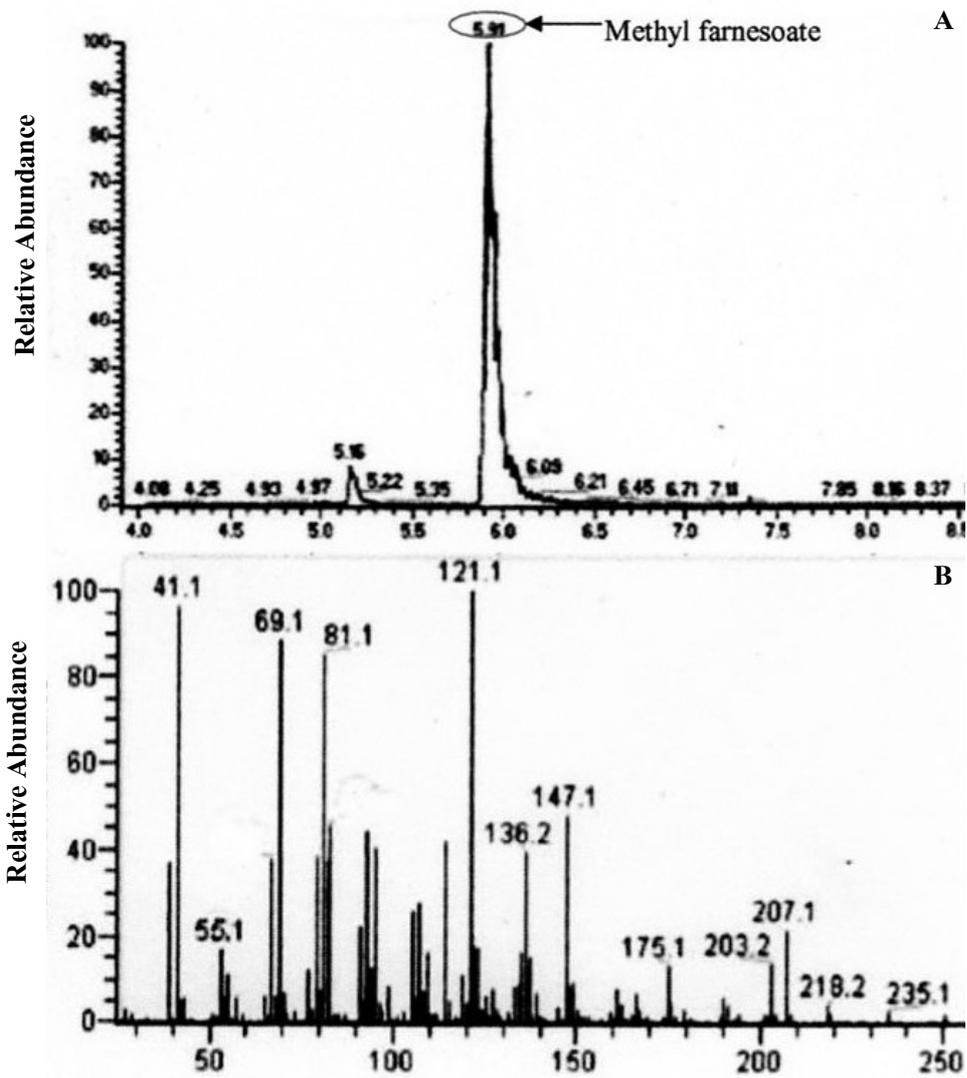


ภาพที่ 15 แสดงแถบสารสีของตัวอย่างที่มี Arachidonic acid และ Farnesoic acid เป็นสารตั้งต้นที่ Co-migrate ตรงกับ Methyl farnesoate บน TLC plate (ด้วยไอระเหยของกรดไอโอดีน)

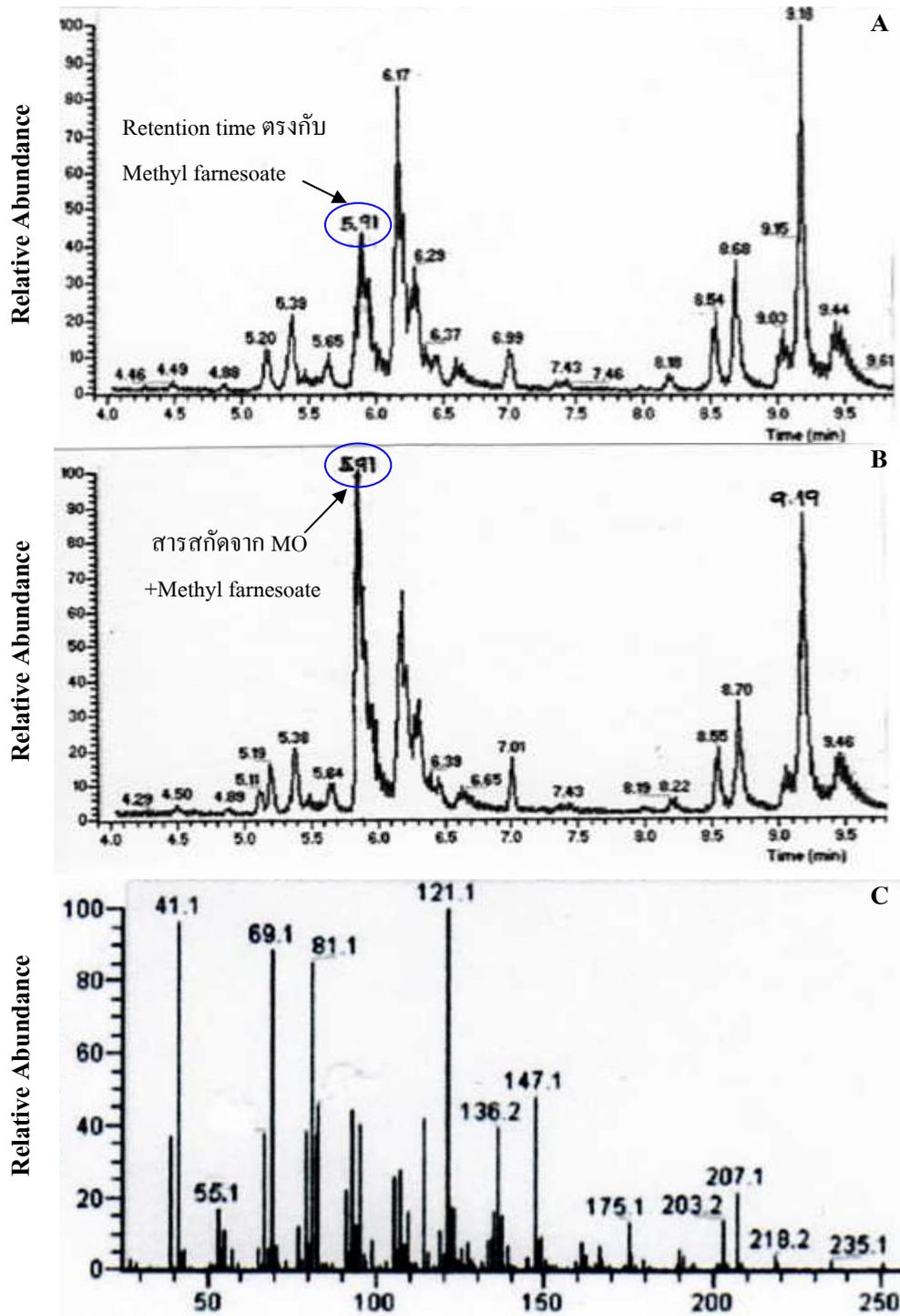
2.2 ผลการจำแนกชนิดและศึกษาโครงสร้างของสารสังเคราะห์ด้วย Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS) ไม่ใช้สารรังสี

จากการวิเคราะห์ด้วย GC เพื่อเปรียบเทียบ Retention time ของสารมาตรฐานต่าง ๆ ได้แก่ Methyl farnesoate, Arachidonic acid, 8,11,14-Eicosatrienoic acid และกรดไขมันในกลุ่มคาร์บอน C16-C22 (Stearic acid (C18), Nonadecanoic acid (C19), Arachidic acid (C20), Palmitic acid (C16), Heptadecanoic acid (C17), Erucic acid (C22), Oleic acid (C18), Linoleic acid (C18), Behenic acid (C22)) พบว่ามี Retention time เท่ากับ 25.7, 40.07, 35.14, 31.51, 34.34, 37.31, 25.57, 28.54, 43.19, 32.16, 33.33 และ 42.98 นาทีตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบสารมาตรฐานต่างๆ ดังกล่าวกับสารสกัดจากเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิลของแม่เพรียงทราย (สารผลิตภัณฑ์) พบว่ามี Peak ของสารผลิตภัณฑ์มีค่า Retention time ใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน Methyl farnesoate มีค่าเท่ากับ 25.7 นาที

จากการศึกษาโครงสร้างที่แท้จริง และยืนยันชนิดของผลิตภัณฑ์โดยการวิเคราะห์ด้วย GC/MS จากสารสกัดตัวอย่างจากแม่เพรียงทรายจำนวน 30 ตัว ฉีดเข้าเครื่อง GC/MS พบว่าจาก Peak ของสารผลิตภัณฑ์จำนวนมากสารผลิตภัณฑ์มี Retention time (ภาพที่ 17A) ตรงกับสารมาตรฐาน Methyl farnesoate (ภาพที่ 16A) ที่ 5.91 นาที และเมื่อเปรียบเทียบ Mass spectrum ของสารมาตรฐาน Methyl farnesoate (ภาพที่ 16B) กับสารสกัดจากเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิล ที่ Retention time 5.91 นาที (ภาพที่ 17C) พบว่ามีรูปแบบของ Mass spectrum เหมือนกัน และผลการ Spike สารมาตรฐาน Methyl farnesoate เข้าไปในสารสกัดจากเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิลของแม่เพรียงทราย พบว่ามี Peak เพิ่มสูงขึ้นที่ Retention time 5.91 นาที (ภาพที่ 17B) ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าหนึ่งชนิดของสารผลิตภัณฑ์ที่ถูกสกัดออกมาเป็นฮอร์โมน Methyl farnesoate เนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิลของแม่เพรียงทรายมีการสังเคราะห์ฮอร์โมน Methyl farnesoate ซึ่งมีปริมาณสูงเป็นลำดับที่ 3 ของปริมาณสารสกัดทั้งหมด ส่วนสารที่มีปริมาณสูงเป็นลำดับที่ 1 และ 2 นั้น Peak มี Retention time อยู่ในกลุ่มของสารมาตรฐานที่มีจำนวนคาร์บอนระหว่าง 16-22 อะตอม จึงคาดว่าจะเป็นสารกลุ่มคาร์บอนระหว่าง 16-22 อะตอม (ภาพที่ 17A)



ภาพที่ 16 (A) Chromatogram และ (B) Mass spectrum ของสารมาตรฐาน Methyl farnesoate จากการวิเคราะห์ด้วย GC/GC-MS



ภาพที่ 17 (A) Chromatogram ของสารสกัดจากเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิลของแม่เพรียงทราย 30 ตัว (B) Chromatogram ของสารสกัดจากเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิล (MO) ของแม่เพรียงทราย 30 ตัว ที่ Spike สารมาตรฐาน Methyl farnesoate และ (C) Mass spectrum ของสารสกัดจากเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิลของแม่เพรียงทราย 30 ตัว เมื่อวิเคราะห์ด้วย GC/GC-MS

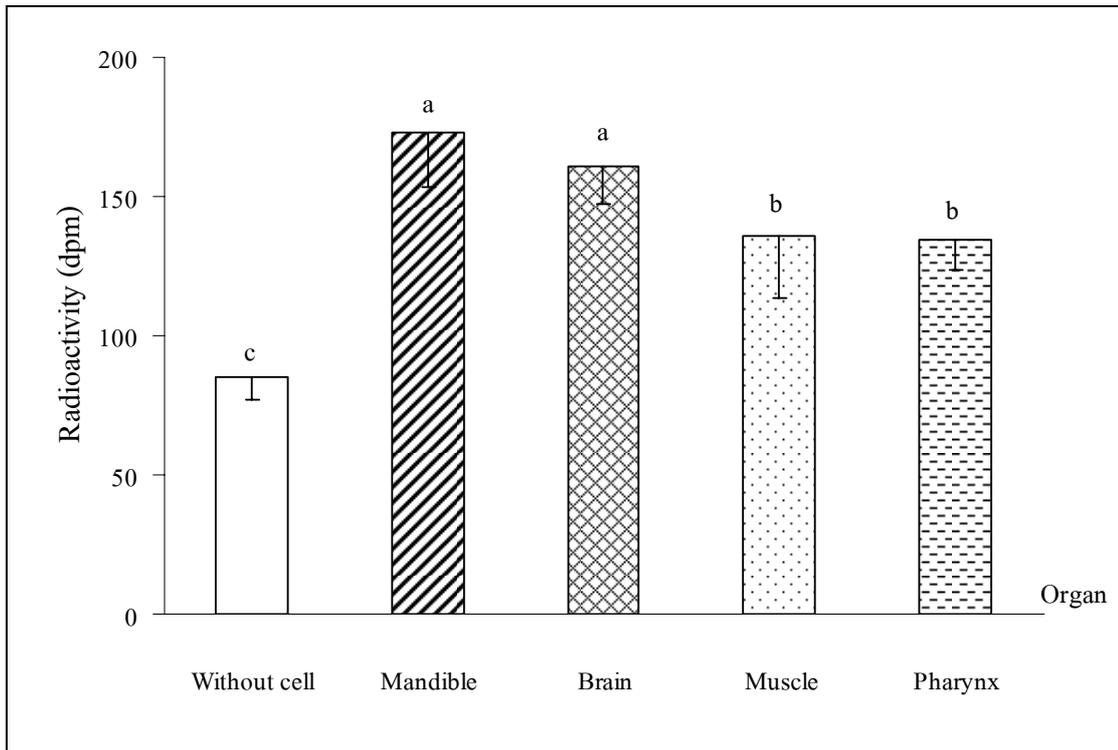
3. ผลการวิเคราะห์เอ็นไซม์เมทิลทรานเฟอร์ส (Methyl transferase assay) ที่ใช้สังเคราะห์สารคล้ายฮอร์โมน Sesquiterpenoid จากเนื้อเยื่อต่าง ๆ (เนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิล, สมอง, กล้ามเนื้อ และคอกออย) ของแม่เพรียงทราย

ปริมาณเอ็นไซม์ Methyl transferase ของเนื้อเยื่อต่าง ๆ ในแม่เพรียงทราย พบว่ามีค่าเฉลี่ยการแผ่รังสี S-Adenosyl-L- [methyl-³H]methionine (SAM) ในแต่ละชุดการทดลองเรียงลำดับจากน้อยไปหามากดังนี้ ชุดการทดลองที่ 1(ไม่ใช่เนื้อเยื่อ), ชุดการทดลองที่ 5 (คอกออย), ชุดการทดลองที่ 3 (กล้ามเนื้อ) ชุดการทดลองที่ 4 (สมอง) และชุดการทดลองที่ 2 (เนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิล) มีค่าการแผ่รังสี S-Adenosyl-L- [methyl-³H]methionine (SAM) เท่ากับ 172.87 ± 19.17 dpm, 160.92 ± 22.75 dpm, 136.07 ± 13.81 dpm, 134.14 ± 10.39 dpm และ 85.34 ± 8.09 dpm ตามลำดับ จากการทดลองเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิล และสมอง มีปริมาณการแผ่รังสีสูงกว่าทุกชุดการทดลอง ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับชุดควบคุม, กล้ามเนื้อ และคอกออย (ดังตารางที่ 4 และ ภาพที่ 18)

ตารางที่ 4 ค่าเฉลี่ย (Mean \pm SD) การแผ่รังสี S-Adenosyl-L- [methyl-³H]methionine (SAM)จากการบ่มเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิล สมอง กล้ามเนื้อ และคอกออย ของแม่เพรียงทราย

ระยะเวลาการบ่มเนื้อเยื่อ(ชม.)	ค่าเฉลี่ยการแผ่รังสี (dpm)				
	ไม่ใช่เนื้อเยื่อ	เนื้อเยื่อแมนดิเบิล	สมอง	กล้ามเนื้อ	คอกออย
9	85.34 ± 8.09^c	172.87 ± 19.17^a	136.07 ± 13.81^b	160.92 ± 22.75^a	134.14 ± 10.39^b

หมายเหตุ ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวนอนแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



ภาพที่ 18 ค่าเฉลี่ย (Mean±SD) การแผ่รังสี S-Adenosyl-L-[methyl-³H]methionine (SAM) จากการ
ป้อนเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของแม่เพรียงทราย (n = 10)

วิจารณ์

1. ผลจากการศึกษาทดลองในครั้งนี้ พบว่า เนื้อเยื่อรอบแมนดิเบลของแม่เพรียงทรายสามารถสังเคราะห์ฮอร์โมน Methyl farnesoate ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่มีความสำคัญต่อการพัฒนาระบบสืบพันธุ์พ่อแม่พันธุ์กุ้ง นับเป็นอวัยวะที่สำคัญในการผลิตฮอร์โมนชนิดนี้ ซึ่งจากรายงานที่เคยค้นพบว่าแม่เพรียงประกอบด้วย ฮอร์โมนสืบพันธุ์หลายตัวที่คล้ายคลึงกับคริสเตเซียน เช่น ฮอร์โมน Progesterone (เสาวลักษณ์, 2548) ฮอร์โมน Prostaglandin E_2 (เอกชัย, 2548) และ ฮอร์โมน Prostaglandins $F_{2\alpha}$ (Poltana, 2004) มีผลต่อระบบสืบพันธุ์ของกุ้งเช่นเดียวกัน แต่การตรวจพบฮอร์โมนดังกล่าวได้จากการนำแม่เพรียงทรายทั้งตัวมาบด สกัด และตรวจวัดปริมาณของฮอร์โมนที่สะสมอยู่ในอวัยวะ หรือในตัวของแม่เพรียง ซึ่งไม่ได้ทำให้ทราบว่าฮอร์โมนดังกล่าวสังเคราะห์มาจากอวัยวะใด

เนื่องจากแมลง และคริสเตเซียนมีวิวัฒนาการมาจากสัตว์ในกลุ่ม Polychaeta (Meyer, 2006) จึงมีลักษณะบางอย่างคล้ายคลึงกัน เช่น การมี Mandible ในการจับอาหาร ซึ่งแม่เพรียงทรายอาจมีอวัยวะบริเวณรอบแมนดิเบลที่สามารถสังเคราะห์ Methyl farnesoate เช่นเดียวกับการที่คริสเตเซียนมี Mandibular organ บริเวณแมนดิเบลที่สามารถสังเคราะห์ Methyl farnesoate ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้จึงนำเอาเทคนิค Radiochemical Assay (RCA) ที่มีความไว และแม่นยำสูงมาใช้ศึกษาการสังเคราะห์ฮอร์โมน (Biosynthesis) เพื่อพิสูจน์ว่าเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบลของแม่เพรียงทรายสังเคราะห์ฮอร์โมน Methyl farnesoate หรือฮอร์โมนใดในกลุ่มของ Sesquiterpenoids และ Eicosanoids โดยการดัดแปลงเทคนิคของ Pratt and Tobe (1974) ที่ได้ศึกษาการสังเคราะห์ Juvenile hormone III จากสมอง (Corpus allatum) ของแมลงและ Methyl farnesoate ในสัตว์พวกแมลง และ ในปู (*Scylla serrata*) (Tobe *et al.*, 1989) ซึ่งเป็นวิธีศึกษาทางตรง โดยการใช้การติดตามของรังสีถึงความสามารถในการสังเคราะห์ฮอร์โมนของเนื้อเยื่อต่าง ๆ ขณะมีชีวิตอยู่แตกต่างจากการนำอวัยวะ หรือแม่เพรียงทั้งตัวมาสกัด แล้วตรวจวัดปริมาณของฮอร์โมนที่สะสมอยู่ในอวัยวะ หรือในตัวของแม่เพรียง โดยจะไม่สามารถระบุได้ว่าการสังเคราะห์ฮอร์โมนมาจากอวัยวะใด ซึ่งจากการทดลองในครั้งนี้สามารถระบุได้ว่าการสังเคราะห์ฮอร์โมน Methyl farnesoate จากเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบลของแม่เพรียงทราย

อนึ่งการสังเคราะห์สารคล้ายฮอร์โมน Sesquiterpenoids และ Eicosanoids จากอวัยวะต่าง ๆ (เนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิล, สมอ และกล้ามเนื้อ) ในระยะเวลาต่าง ๆ (3, 6, 9 และ 12 ชั่วโมง) โดยเปรียบเทียบระหว่างการเปลี่ยน และไม่เปลี่ยนน้ำเลี้ยงเซลล์ ปรากฏว่า เนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิลมีความสามารถในการสังเคราะห์ Sesquiterpenoids และ Eicosanoids ที่ระยะเวลา 12 ชั่วโมง ดีที่สุดเมื่อเทียบกับสมอ และกล้ามเนื้อ ซึ่งการบ่มเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิลที่ไม่เปลี่ยนน้ำเลี้ยงเซลล์จะมีปริมาณการแผ่รังสีสะสมสูงกว่าการเปลี่ยนน้ำเลี้ยงเซลล์ ซึ่งการเปลี่ยนน้ำเลี้ยงเซลล์นั้นจะสูญเสียปริมาณสารสังเคราะห์ที่ได้จากการเก็บทุก ๆ 3 ชั่วโมง และสารตั้งต้นที่เติมลงไปในการทดลองที่ไม่มีการเปลี่ยนน้ำเลี้ยงเซลล์นั้นเป็นปริมาณที่เพียงพอต่อการสังเคราะห์สารคล้ายฮอร์โมน Sesquiterpenoids และ Eicosanoids จากเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิลของแม่เพรียงทราย ถึงแม้การเปลี่ยนน้ำเลี้ยงเซลล์จะเป็นการเพิ่มสารตั้งต้นให้แก่เนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิลก็ตาม ซึ่งความสามารถในการใช้สารตั้งต้นของเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิลของแม่เพรียงทรายก็ไม่ได้เพิ่มขึ้น และเมื่อทำการทดลองบ่มเนื้อเยื่อที่ยาวนานมากกว่า 12 ชั่วโมง เซลล์เริ่มตาย มีแบคทีเรียเกิดขึ้น น้ำเลี้ยงเซลล์เปลี่ยนสีจากสีชมพู (Base) เป็นสีเหลือง (Acid) ซึ่ง pH จะเป็น Indicator ที่สำคัญโดยสภาพที่เป็น Acid นั้นสิ่งมีชีวิตจะหยุดกลไกต่าง ๆ และเนื้อเยื่อหรือเซลล์เริ่มตาย เป็นสถานะที่ไม่เหมาะสมต่อการการสังเคราะห์สาร ซึ่งปริมาณการแผ่รังสีที่ตรวจวัดได้อาจจะไม่ใช่ค่าที่ถูกต้อง แต่อาจจะเกิดจากปฏิกิริยาอื่น ๆ ร่วมด้วย เช่น ปฏิกิริยาของแบคทีเรีย เป็นต้น

2. ผลจากการศึกษาผลการจำแนกชนิด ปรากฏว่าสารสังเคราะห์จากเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิลมีค่าปริมาณการแผ่รังสีที่เก็บ fraction โดยใช้เทคนิค HPLC ต่างจากสารมาตรฐาน Methyl farnesoate แสดงว่าสารสังเคราะห์ไม่ใช่ Methyl farnesoate แต่กลับพบว่ามีความปริมาณการแผ่รังสีใกล้เคียงกับสาร Sesquiterpenoids และ Eicosanoids ตัวอื่น ได้แก่ Arachidonic acid methyl ester และ 8,11,14-Eicosatrienoic acid methyl ester จึงทำการทดลองเปลี่ยนสารตั้งต้นจาก Farnesoic acid เป็น Arachidonic acid และ 8,11,14-Eicosatrienoic acid ผลการศึกษา พบว่าเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิลมีความสามารถใช้สารตั้งต้นในการสังเคราะห์ Sesquiterpenoids และ Eicosanoids ได้มากกว่าหนึ่งชนิด ซึ่งสารตั้งต้น Arachidonic acid จะให้สารสังเคราะห์สูงที่สุด จากรายงานการศึกษาของเอกชัย (2548) พบว่าแม่เพรียงทรายมีปริมาณ Arachidonic acid ซึ่งเป็นสารตั้งต้นหลักของ Prostaglandin ในระดับสูง นอกจากนั้นยังพบว่าแม่เพรียงทรายจากธรรมชาติมีฮอร์โมน Prostaglandin สูงกว่าแม่เพรียงทรายจากการเพาะเลี้ยง เป็นที่ทราบกันดีว่าคุณค่าทางโภชนาการของแม่เพรียงขึ้นอยู่กับอาหารที่แม่เพรียงได้รับ แม่เพรียงทรายธรรมชาติได้รับอาหารที่หลากหลาย และมีองค์ประกอบของ Arachidonic acid อยู่สูง จึงทำให้มีฮอร์โมน Prostaglandin ในปริมาณที่

มากกว่าแม่เพรียงทรายจากการเพาะเลี้ยงที่เลี้ยงด้วยอาหารเม็ดสำหรับลูกกุ้งเท่านั้น จากการทดลองนี้ใช้แม่เพรียงธรรมชาติซึ่งตัวแม่เพรียงเองจะมีองค์ประกอบของ Arachidonic acid อยู่ในระดับสูง แม่เพรียงมีการใช้ Arachidonic acid เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ฮอร์โมนต่าง ๆ ได้ดี ซึ่งรวมถึงฮอร์โมนในกลุ่มของ Sesquiterpenoids และ Eicosanoids ดังนั้นในการทดลองเมื่อมีการใช้ Arachidonic acid สังเคราะห์เป็นสารตั้งต้นจึงทำให้มีการสังเคราะห์ Sesquiterpenoids และ Eicosanoids ดีกว่าสารตั้งต้นชนิดอื่น เช่น Farnesoic acid และ 8,11,14-Eicosatrienoic acid

จากการศึกษาการจำแนกชนิด และศึกษาโครงสร้างที่แท้จริงของสารสังเคราะห์ด้วย GC/MS พบว่าสารสังเคราะห์จากเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิลของแม่เพรียงทรายให้สารผลิตภัณฑ์หลายชนิดด้วยกัน ซึ่งพบว่ามีฮอร์โมน Methyl farnesoate เป็นลำดับ 3 ของสารสังเคราะห์ และไม่ใช่สารผลิตภัณฑ์หลักที่ได้จากการสังเคราะห์จากเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิลของแม่เพรียงทราย

จากการศึกษาโครงสร้างด้วย GC/MS เมื่อเปรียบเทียบ Mass spectrum สารมาตรฐาน Methyl farnesoate และสารสังเคราะห์จากเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิลของแม่เพรียงทรายที่พบมากเป็นลำดับที่ 3 (Retention time 5.91 นาที) พบว่ามีรูปแบบ Mass spectrum เหมือนกัน ส่วน Peak ที่พบจากการวิเคราะห์ด้วย HPLC อาจจะเป็นสารผลิตภัณฑ์หลักในลำดับที่ 1 และ 2 ซึ่งมี Retention time ใกล้เคียงกับสารมาตรฐานที่มีจำนวนคาร์บอนระหว่าง 16-22 อะตอม จึงคาดว่าจะเป็นสารกลุ่มคาร์บอนระหว่าง 16-22 อะตอม (จากผลของการวิเคราะห์ด้วย GC/GC-MS ในการศึกษาข้อ 2.2)

ผลการทดลองในครั้งนี้ก็ได้พบฮอร์โมน Methyl farnesoate ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของ Juvenile hormone ที่พบในแมลง จัดอยู่ในกลุ่ม Sesquiterpenoids และ Eicosanoids (Charmantier *et al.*, 1997) มีบทบาทหน้าที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของระบบสืบพันธุ์ของพ่อแม่พันธุ์กุ้ง นอกจากนี้ Methyl farnesoate ยังทำหน้าที่อื่น ๆ อีก เช่น ควบคุมขบวนการเผาผลาญโปรตีน การลอกคราบ ควบคุมสมดุลของสารภายในร่างกาย และการเปลี่ยนตัวอ่อนเป็นตัวเต็มวัย จากการรายงาน พบว่าฮอร์โมน Methyl farnesoate มีผลต่อการเจริญของระบบสืบพันธุ์ของกุ้ง เช่น ผลของฮอร์โมน Methyl farnesoate สังเคราะห์ต่อแม่กุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) (Sagi *et al.*, 1991), กุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) (Tsukimura and Kamemoto, 1991), Spider crab (*Libinia emarginata*) (Rotllant *et al.*, 2000), Lobster (*Nephros norvegicus*) (Rotllant *et al.*, 2001), Crayfish (*Cherax quadricanatus*) (Abdu *et al.*, 2001) และ Swamp crayfish (*Procambarus clarkia*) (Rodriguez *et al.*, 2002) พบว่าระดับของฮอร์โมน Methyl farnesoate ยังมีความสัมพันธ์กับการ

เจริญพันธุ์ โดยสัตว์ที่เจริญพันธุ์แล้วมีระดับของ ฮอร์โมน Methyl farnesoate สูงกว่าในสัตว์ที่ยังไม่เจริญพันธุ์ (Laufer *et al.*, 1987; Sagi *et al.*, 1993)

ดังนั้นพ่อแม่พันธุ์กึ่งที่กินแม่เพียงทรายเป็นอาหารแล้วทำให้มีพัฒนาของระบบสืบพันธุ์กึ่งดีกว่ากินอาหารมีชีวิตชนิดอื่น ๆ เช่น ปลาหมึก หอย นั้นน่าจะมาจากปัจจัยของฮอร์โมน Methyl farnesoate ที่แม่เพียงสามารถสังเคราะห์ได้จากเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิล เช่นเดียวกับแมนดิบูลาร์ออร์แกน (Mandibular organ) ของสัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียน

3. ผลการศึกษา Methyl transferase จากเนื้อเยื่อต่าง ๆ (เนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิล สมอ กล้ามเนื้อ และคอหอย) ของแม่เพียงทรายอาจมีความสัมพันธ์กับปริมาณของฮอร์โมนที่สังเคราะห์ได้ ซึ่งคาดว่าน่าจะพบเอ็นไซม์ Methyl transferase สูงที่บริเวณเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิล ผลการทดลองที่ได้ พบเอ็นไซม์ Methyl transferase ในสมอ และเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิลของแม่เพียงทรายสูงในปริมาณที่ไม่แตกต่างกัน และยังพบเอ็นไซม์ดังกล่าวที่อวัยวะอื่น ๆ ด้วย เช่น กล้ามเนื้อ คอหอย แต่พบในปริมาณเล็กน้อย ซึ่งเอ็นไซม์ Methyl transferase นี้จะพบว่ามีกระจายตัวอยู่ทั่ว ๆ ไปในทุก ๆ อวัยวะของแม่เพียงทราย พบปริมาณสูงสุดในเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิล ซึ่งไม่แตกต่างกับสมอโดยมีปริมาณที่แตกต่างกันเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ซึ่งจากรายงานของ Silva Gunawardene *et al.* (2001) มีการพบเอ็นไซม์ Methyl transferase กระจายตัวอยู่ทุก ๆ อวัยวะของสัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียน ซึ่งมีการพบเอ็นไซม์ Methyl transferase ที่บริเวณ Ventral nerve cord, หัวใจ, ก้านตา และกล้ามเนื้อของกึ่ง (*Metapeanus ensis*) และมีการพบเอ็นไซม์ Methyl transferase สูงที่สุดที่บริเวณหัวใจของกึ่งโดยปริมาณของเอ็นไซม์ Methyl transferase ไม่มีความสัมพันธ์กับปริมาณของฮอร์โมน หรือบริเวณอวัยวะที่เป็นแหล่งสังเคราะห์ฮอร์โมน

สรุป

สรุปการศึกษาในครั้งนี้ ปรากฏว่าแม่เพียงทรายประกอบไปด้วยฮอร์โมนในกลุ่ม Sesquiterpenoids และ Eicosanoids คือ Methyl farnesoate ที่สังเคราะห์จากเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิลของแม่เพียงทราย ฮอร์โมนดังกล่าวมีความสำคัญต่อการพัฒนาของระบบสืบพันธุ์ของพ่อแม่พันธุ์กึ่งทะเล อย่างไรก็ตามถึงแม้ฮอร์โมนในแม่เพียงทรายแม้ว่าจะมีปริมาณน้อย และปริมาณไม่แน่นอน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับภาวะเลี้ยงแม่เพียงทรายเป็นธุรกิจที่จะต้องมีการให้อาหารที่เลี้ยงแม่เพียงให้มีคุณภาพ เพื่อมีผลทางอ้อมต่อการพัฒนาอาหารสำหรับพ่อแม่พันธุ์กึ่ง หรือนำฮอร์โมนดังกล่าวมาเป็นส่วนผสมในอาหาร หรือฉีดเข้าตัวกึ่งเพื่อกระตุ้นการเจริญของระบบสืบพันธุ์ซึ่งเป็นอีกทางเลือกหนึ่งโดยไม่ต้องตัดก้านตากุ้ง

การจำแนกชนิด และศึกษาโครงสร้างของสารสกัดจากเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิลของแม่เพียงทรายจำนวน 30 ตัว ด้วย Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS) ไม่ใช้สารรังสี พบว่าเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิลของแม่เพียงทรายมีความสามารถในการสังเคราะห์สารผลิตภัณฑ์มากกว่า 1 ชนิด โดยพบสารผลิตภัณฑ์หลัก ๆ ทั้งหมด 5 ชนิด ซึ่งมี Methyl farnesoate มากเป็นลำดับ 3 ของสารผลิตภัณฑ์

นอกจากการตรวจวัดสารสังเคราะห์ด้วยการตรวจวัดปริมาณการแผ่รังสีที่คิดผลเท่ากับสารตั้งต้น การศึกษา Methyl transferase ยังเป็นการตรวจวัดทางอ้อมอีกทางหนึ่ง ซึ่งพบเอ็นไซม์ Methyl transferase ที่อวัยวะต่างๆ ที่ศึกษา ซึ่งพบมากในเนื้อเยื่อรอบแมนดิเบิล และสมองของแม่เพียงทราย

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- ขวัญเรือน ศรีภิรมย์. 2533. ผลของสเตอรอยด์ฮอร์โมนต่อการเจริญของรังไข่และการลอกคราบของกิ้งกูดำ (*Penaeus monodon* Fabricius). วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- จิรประภา บริรักษ์. 2543. นิเวศวิทยาและอนุกรมวิธานของไส้เดือนทะเล บริเวณป่าชายเลนจังหวัดระนอง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- บพิช จารุพันธุ์. 2529. ปฏิบัติการสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง II. ภาควิชาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- บพิช จารุพันธุ์ และนันทพร จารุพันธุ์. 2540. สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง II. ภาควิชาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ปริญญา ลีพหามนท์. 2546. การพัฒนาอาหารเม็ดที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง เพื่อความสมบูรณ์พันธุ์ของกิ้งกูดำ *Penaeus monodon* เพศเมีย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- เสาวลักษณ์ เอี่ยมไผ่. 2548. ผลของสารสกัดโพรงเจสเทอโรน และ 17 แอลฟา-ไฮดรอกซีโพรงเจสเทอโรนจากแม่เพรียงทราย *Perinereis* sp. ต่อการเจริญของเซลล์ไข่กิ้งกูดำ *Penaeus monodon*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- เอกชัย ดวงใจ. 2548. การสกัดฮอร์โมนโพรงสตาแกลนดินจากแม่เพรียงทรายและผลของการสกัดฮอร์โมนต่อการพัฒนาของไข่แม่กิ้งกูดำ. วิทยานิพนธ์ ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

- Abdu, U., A. Barki, I. Karplus, S. Barel, P. Takac, G. Yehezkel, H. Laufer, A. Sagi. 2001. Physiological effects of methyl farnesoate and pyriproxyfen on wintering female crayfish *Cherax quadricarinatus*. **Aquaculture**. 202: 163-175.
- Baratte, B., H. Gras-Masse, G. Ricart, P. Bulet and N. Dhainaut-Courtois. 1991. Isolation and characterization of authentic Phe-Met-Arg-Phe-NH₂ and the novel Phe-Thr-Arg-Phe-NH₂ peptide from *Nereis diversicolor*. **Eur. J. Biochem**. 198: 627-633.
- Borst, D.W., H. Laufer, M. Landau and E.S. Chang. 1987. Methyl farnesoate and its role in crustacean reproduction and development. **Insect Biochem**. 17(7): 1123-1127.
- Chang, E.S. 1997. Chemistry of crustacean hormones that regulate growth and reproduction. **Recent Advances in Marine Biotechnology**. 1: 163-178.
- Charmantier, G., M. Charmantier-Daures, D.E. Aiken. 1997. Metamorphosis in the lobster *Homarus* (Decapods). **A review. J. Crust. Biol.** 11: 481-494.
- Day, J. H. 1967. **A monograph on the polychaete of Southern Africa Part I**. Professor of Zoology University of Cape Town.
- Diaz-Miranda, L., G. Escalona de Motta and J.E. Garcia-Arraras. 1989. Pharmacological effects of serotonin and FMRFamide on the longitudinal muscle of the polychaete *Sabellastarte magnifica*. **Am. Zool.** 29: 51.
- Elliott, A.M. 1952. **Zoology**. Applton Century Crofts, New York. 746 p.
- Fox, R. 2001. **Invertebrate Anatomy online *Nereis vireis*, Ragworm**. Available Source: http://www.lander.edu/rsfox/310nereis_Lab.html, August 12, 2007.

- Goerke, H. 1984. Temperature dependence of swarming in North Sea nereidae. **Fortschr. Zool.** 29: 39-44.
- Golding, D.W. 1983. Endocrine programmed development and reproduction in *Nereis*. **Gen. Comp. Endocrinol.** 52: 456-466.
- Gomez, R. and Nayer. 1965. Acceleration of development of gonads by implantation of brain in the crab, *Paratelphusa hydroaromus*. **Naturwissenschaften.** 52: 207-216.
- Hardege, J.D., C. Muller and M. Beckmann. 1997. A water borne female sex pheromone in the ragworm *Nereis succinea* (Annelida, Polychaeta). **Polychaete Res.** 17: 18-21.
- Homola, E. and E.S. Change. 1997. Methyl farnesoate: crustacean juvenile hormone in search of functions. **Comp. Biochem. Physiol.** 117B(3): 347-356.
- Lapage G. and CC. Roy. 1986. Direct transesterification of all classes of lipids in one step reaction. **J. Lipid Res.** 27: 114-120.
- Laufer, H., D. Borst, F.C. Baker, C. Carrasco, M. Sinkus, C.C. Reutter, L.W. Tsai and D.A. Schooley. 1987. The identification of a juvenile hormone-like compound in a crustacean. **Science.** 235: 202-205.
- Laufer, H., P. Takac, J.S.B. Ahl and M.R. Laufer. 1997. Methyl farnesoate and the effect of eyestalk ablation on the morphogenesis of the juvenile female spider crab *Libinia emarginata*. **Invertebrate. Reprod. Devel.** 31(1-3): 63-68.
- Lytle, J.S., T.F. Lytle and J.T. Ogle. 1990. Polyunsaturated fatty acid profiles as a comparative tool in assessing maturation diets of *Panaeus vannamei*. **Aquaculture.** 89: 287-299.

- Mettam, C. 1980. On the feeding habits of *Aphrodita aculeate* and commensal polynoids. **J. Mar. Biol. Ass. U. K.** 60: 883.
- Meyer, G. 2006. Origin and differentiation of nephridia in Onychophora provide no support for the Articulata. **Zoomorphology.** 125 : 1-12.
- Michel, E. C. 1889. Cyberlipid center. Available Source:
<http://www.cyberlipid.org/images/pict367.gif>, August 12, 2007.
- Middleditch, B.S., S.R. Missler, D.R. Ward, J.B. McVey, A. Brown and A.L. Lawrence. 1979. Maturation of penaeid shrimp: diterpene fatty acids. **Proc. World Maricult. Soc.** 10: 472-476.
- Okumura, T. and K. Aida. 2001. Effects of bilateral eyestalk ablation on molting and ovarian development in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. **Fish. Sci.** 67: 1125-1135.
- Ono, K., M. Osada, T. Matsutani, K. Mori and T. Nomura. 1982. Gonadal prostaglandin F_{2α} profile during sexual maturation in the oyster, *Crassostrea gigas*. **Mar. Biol. Lett.** 3: 223-230.
- Osada, M., M. Nishikawa and T. Nomura. 1989. Involvement of prostaglandins in the spawning of the scallop, *Patinopecten yessoensis*. **Comp. Biochem. Physiol.** 94 (C): 171-173.
- Oumi, T., K. Ukena, O. Matsushima, T. Ikeda, T. Fujita, H. Minakata and K. Nomoto. 1996. Annetocin an annelid oxytocin-related peptide, induces egg-laying behavior in the earthworm, *Eisenia foetida*. **J. Exp. Zool.** 276: 151-156.
- Pratt, G.E., and S.S. Tobe. 1974. Juvenile hormones radiobiosynthesized by corpora allata of adult Female locusts in vitro. **Life. Sci.** 14: 575-586.

- Poltana, P. 2004. **Development of the Polychaete *Perinereis nuntia* brevicirrus and its prostaglandin F2 alpha content in the atokous stage.** 10th International congress on invertebrate of reproduction and development. 18th july 2004 23rd July 2004, Newcastle upon Tyne, United Kingdom.
- Ram, J.L., C.T. Muller, M. Beckmann and J.D. Hardedge. 1999. The spawning pheromone cysteine-glutathione disulfide (nereithionine) arouses a multicomponent nuptial behavior and electrophysiological activity in *Nereis succinea* males. **FASEB.** 13: 945-952.
- Rodriguez, E.M., L.S. Lopez Greco, D.A. Medesani, H. Laufer and M. Fingerman. 2002. Effect of Methyl farnesoate, Alone and in Combination with Other Hormones, on Ovarian Growth of the Red Swamp Crayfish, *Procambarus clarkia*, during Vitellogenesis. **Gen. Comp. Endocrinol.** 125 (1): 34-40.
- Rotllant, G., N. Pascual, F. Sarda, P. Takac and H. Laufer. 2001. Identification of methyl farnesoate in the hemolymph of the Mediterranean deep-sea species Norway lobster, *Nephrops norvegicus*. **J. Crustacean Biol.** 21 (2): 328-333.
- Rotllant, G., T. Peter, L. Lei, L. Grant Scott and H. Laufer. 2000. Role of ecdysteroids and methyl farnesoate in morphogenesis and terminal moult in polymorphic males of the spider crab *Libinia emarginata*. **Aquaculture.** 190: 103-118.
- Sagi, A., E. Homola and H. Laufer. 1993. Distinct reproductive types of male spider crab *Libinia emarginata* differ in circulation and synthesizing methyl farnesoate. **Biol. Bull.** 185: 168-173.
- Sagi, A., E. Homola and H. Laufer. 1991. Methyl farnesoate in the prawn *Macrobrachium rosenbergii*: synthesis by the mandibular organ in vitro, and titers in the hemolymph. **Comp. Biochem. Physiol.** 99: 879-882.

- Salzet, M., P. Bulet, A. Van Dosselaer and J. Malecha. 1993. Isolation structural of characterization and biological function of a lysine-conopressin in the central nervous system the pharyngobdellid leech *Erpobdella octoculata*. **Eur. J. Biochem.** 217: 897-903.
- Santos, E.A., L.E.M. Nery, R. Keller and A.A. Goncalves. 1997. Evidence for the involvement of the crustacean hyperglycemic hormone in the regulation of lipid metabolism. **Physiol. Zool.** 70: 415-420.
- Saulnier-Michel, C. 1992. Polychaete: Digestive System. pp 53-69. *In* Harrison, F.W. and Gardiner, S.L. (eds). **Microscopic Anatomy of Invertebrates**. Vol 7. Annelida. Wiley-Liss, New York. 418 p.
- Silva Gunawardene, Y.I.N., B.K.C. Chow, J.G. He and S.M. Chan. 2001. The shrimp FAMet cDNA is encoded for a putative enzyme involved in the methylfarnesoate (MF) biosynthetic pathway and is temporally expressed in the eyestalk of different sexes. **Insect Biochem. Mol. Biol.** 31: 1115-1124.
- Subramoniam, T. 2000. Crustacean ecdysteroids in reproduction and embryogenesis. **Comp. Biochem. Physiol.** 125C: 135-156.
- Teshima, S.I. and A. Kanazawa. 1971. Bioconversion of progesterone by ovaries of crab, *Portunus trituberculatus*. **Gen. Comp. Endocrine.** 17: 152-157.
- Tsukimura, B. and F.I. Kamemoto. 1991. In vitro stimulation of oocytes by presumptive mandibular secretions in the shrimp *Penaeus vannamei*. **Aquaculture.** 92: 59-66.
- Tobe, S.S. and R. Feyereisen. 1983. **Juvenile hormone biosynthesis: regulation and assay.** **In: Downer RGH, Laufer H (eds). Endocrinology of insect.** Liss, New York. 161-178.

- Tobe, S.S. and B. Stay. 1985. Structure and regulation of the corpus allatum. **Advances in Insect Physiology**. 18: 305-432.
- Tobe, S.S., D.A. Young and H.W. Khoo. 1989. Production of methyl farnesoate by the mandibular organs of the mud crab, *Scylla serrata*: validation of a radiochemical assay. **Gen. Comp. Endocrinol.** 73: 342-353.
- Wainwright, G., S.G. Webster and H.H. Rees. 1998. Neuropeptide regulation of biosynthesis of the juvenoid, methyl farnesoate, in the edible crab, *Cancer pagurus*. **Biochem. J.** 334: 651-657.
- Wainwright, G., S.G. Webster, M.C. Wilkinson, J.S. Chung and H.H. Rees. 1996. Structure and significance of mandibular organ-inhibiting hormone in the crab, *Cancer pagurus* involvement in multi-hormonal regulation of growth and reproduction. **J. Biol. Chem.** 271: 12749-12754.
- Wang, Z., Q. Ding, K.J. Yagi and S.S. Tobe. 1994. Terminal stages in juvenile hormone biosynthesis in Corpora Allata of *Diptera punctata*: development changes in enzyme activity and regulation by allatostatins. **J. Insect Physiol.** 40: 217-223.
- Watson, G.J. and M.G. Bentley. 1997. Evidence for a coelomic maturation factor controlling oocyte maturation in the polychaete *Arenicola marina* (L.). **Invertebr. Reprod. Dev.** 31: 297-306.
- Wilder, M.N., S. Okada, N. Fusetani and K. Aida. 1995. Hemolymph profiles of juvenoid Substances in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* in relation to reproduction and molting. **Fish. Sci.** 61: 175-176.
- Zeeck, E., H.D. Bartels-Hardege, J.D. Hardege and G. Wesselmann. 1988. Sex pheromone in a marine polychaete: determination of the chemical structure. **J. Exp. Zool.** 246: 285-292.

- Zeeck, E., J.D. Hardege and H.D. Bartels-Hardege. 1990. Sex pheromones and reproductive isolation in two Nereid species *Nereis succinea* and *Platynereis dumerilii*. **Mar. Ecol. Prog. Ser.** 67: 183-188.
- Zeeck, E., J.D. Hardege, H.D. Bartels-Hardege, A. Willig and G. Wesselmann. 1991. Sex pheromones in a marine polychaete: biologically active compounds from female *Platynereis dumerilii*. **J. Exp. Zool.** 260: 93-98.
- Yagi, K.J. and S. S. Tobe. 2001. The radiochemical assay for juvenile hormone biosynthesis on insects: problems and solutions. **J. Insect Physiol.** 47: 1227-1234.
- Yano, I. 1985. Induced ovarian maturation and spawning in greasyback shrimp, *Metapenaeus ensis*, by progesterone. **Aquaculture.** 47: 223-229.
- Yue Yang, J. S. Y., J. Ross, P. Joseph. Noel, P. Eran and C. Feng. 2006. An *Arabidopsis thaliana* methyltransferase capable of methylating farnesoic acid. **Archives of Biochemistry and Biophysics.** 448: 123-132.

ภาคผนวก

Radiochemical assay (Pratt and Tobe, 1974)

สารเคมีสำหรับการทดลอง Radiochemical assay

1. M199 (น้ำเลี้ยงเซลล์)

9.5 g ในน้ำกลั่น 1,000 ml

นำ M199 มาเติมเกลือ (NaCl, KCl, MgSO₄·7H₂O)

ตารางผนวกที่ 1 ปริมาตรของเกลือ (NaCl, KCl, MgSO₄·7H₂O) ที่เติมลงใน M199

M199	10 ml	100 ml	500 ml
NaCl	0.23 g	2.3 g	11.5 g
KCl	0.006 g	0.06 g	0.3 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.216 g	0.216 g	1.08 g

2. M199 (NaCl, KCl, MgSO₄·7H₂O) + Ficoll (2%) + 1.3 mM Ca²⁺

ละลายใน Medium แล้วกรองผ่านกระดาษกรอง (0.22 μm)

3. Farnesic acid Stocking Concentration = 1 mM Working concentration = 40 μM

4. L- methionine Stocking Concentration = 650 μM Working concentration = 65 μM

5. L-[methyl- ³H]methionine

MW = 149 Specific activity = 2.89 TBq/mmol, 78.0 Ci/mmol,

18.7 GBq/mg, 506 mCi/mg

Radioactive concentration = 185 MBq/ml, 5.0 mCi/ml

Methyltransferase assay (Tobe *et al.*, 1989)

สารเคมีสำหรับการทดลอง Methyltransferase assay

1. 100 mM Phosphate buffered saline (pH 7.4)

ตารางผนวกที่ 2 สารเคมีที่ใช้เตรียม ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ซาลีน (Phosphate buffered saline)

100 mM PBS	MW	10 x Concentrated PBS stock (10 x 100 mM PBS)
		100 ml
136.9 mM NaCl	58.44	8.0 g
2.7 mM KCl	74.35	0.2 g
10.1 mM Na ₂ HPO ₄	142	1.43 g
1.8 mM KH ₂ PO ₄	136.1	0.245 g

เตรียมสารละลายในน้ำกลั่น และเก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. Protease inhibitors (เตรียมใน 100 mM PBS และเตรียมในวันที่ทำการทดลอง)

ตารางผนวกที่ 3 สารเคมีที่ใช้เตรียม โปรตีเอส อินฮิบิเตอร์ (Protease inhibitors)

100 mM PBS	MW	10 x Concentrated PBS stock (10 x 100 mM PBS)
		50 ml PBS
1 mM EDTA	372	18.6 mg
1 mM 2-mercaptoethanol	78.3 (density = 1.114)	3.5 µl
1 % BSA		0.5 g

3. 100 mM Unlabeled S-Adenosyl-methionine (Cold SAM)

SAM: MW = 399.4, Purity = 88 % ไม่เสถียรที่อุณหภูมิห้อง มีความไวต่อแสง
เตรียม Stock 100 mM SAM ใน Acid solvent

- Acid water (น้ำกลั่น 5 ml + H₂SO₄ 4 หยด)
- 10 mM SAM = 45.4 μg (39.94/0.88)

ชั่ง 4.514 mg SAM ละลายใน 100 ul Acid water

4. Farnesoic acid

MW = 236 Density = 0.8871 g/ml Purity = 95 %

5. S-Adenosyl-L- [methyl-³H]methionine (SAM)

MW = 399 Specific activity = 18.5 GBq/mmol, 500 mCi/mmol,
46.3 MBq/mg, 1.25 mCi/mg

Radioactive concentration = 18.5 MBq/ml, 0.5 mCi/ml

