

## ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย

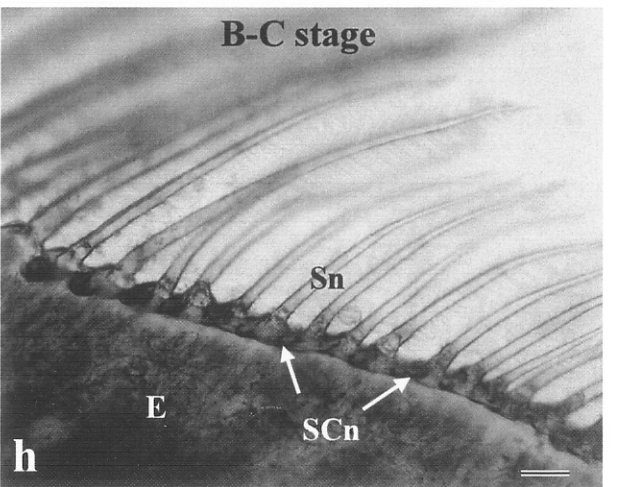
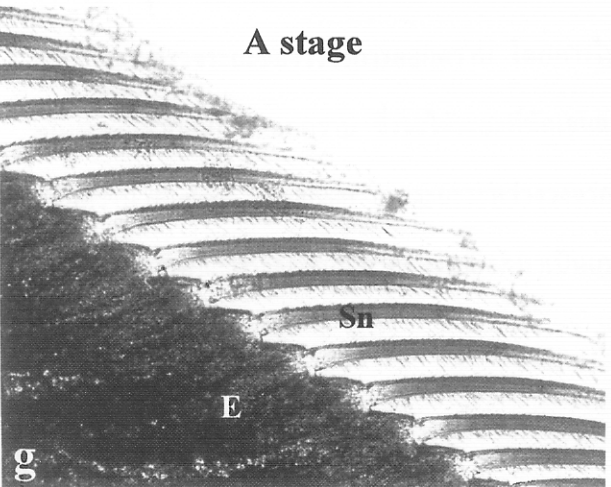
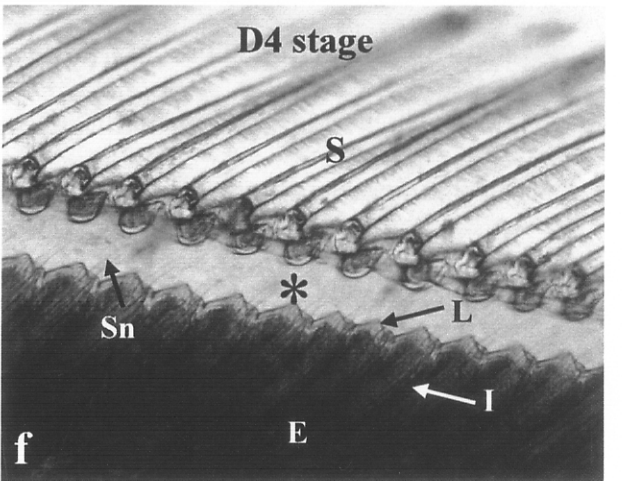
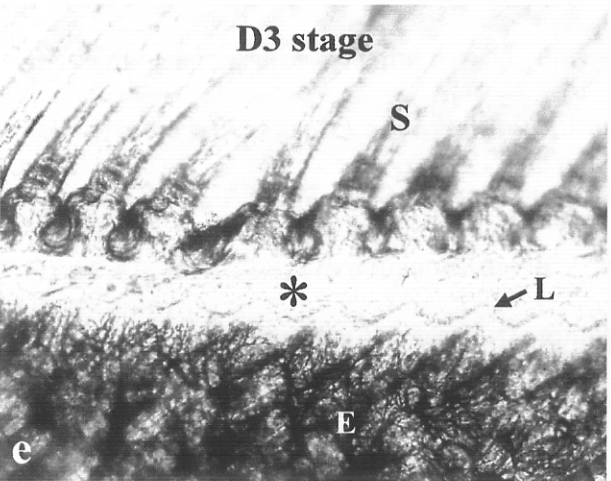
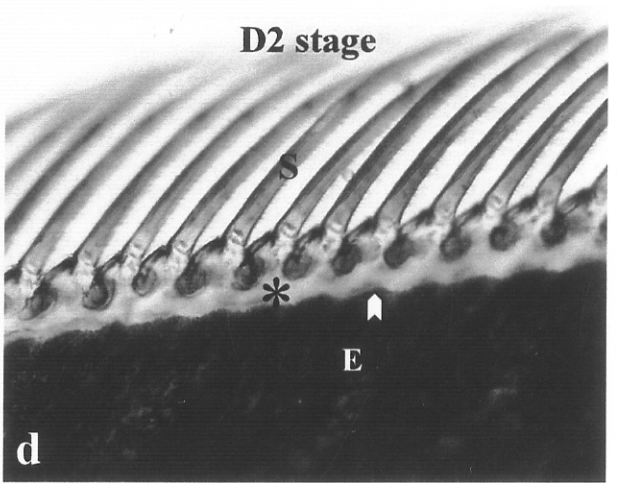
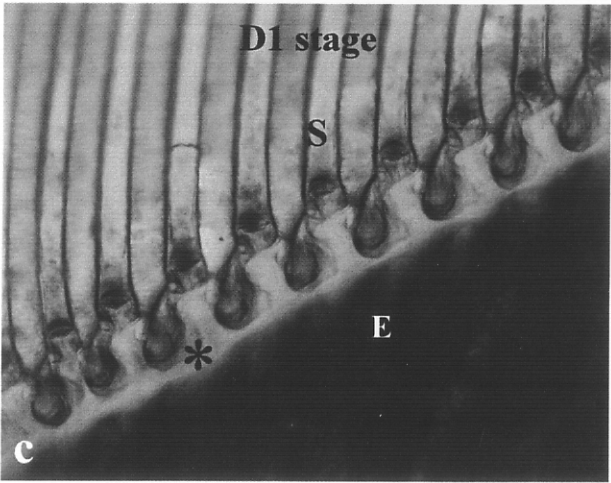
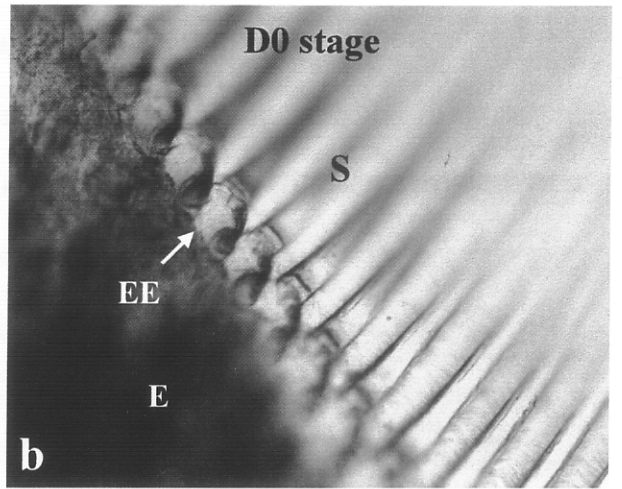
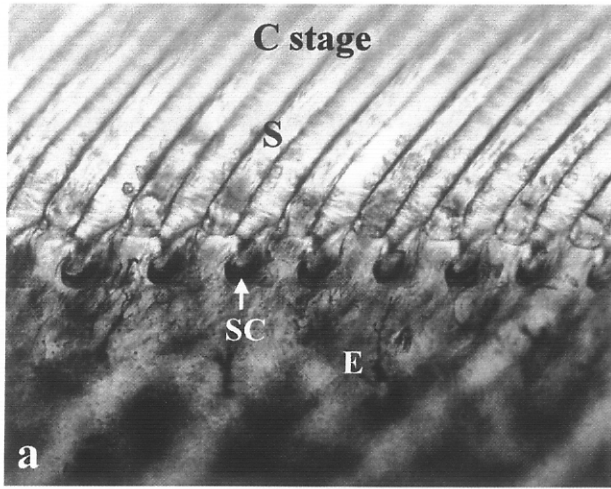
### 1. การศึกษาระยะของวงจรการลอกคราบ และการคัดเลือกระยะเวลาการลอกคราบของกึ่งกุลาคำ

จากการศึกษาระยะของวงจรการลอกคราบ โดยใช้ตาเปล่าสังเกตการเปลี่ยนแปลงลักษณะภายนอกของกึ่งกุลาคำ และใช้กล้อง light microscope กำลังขยายต่ำ ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของแนวขนและเนื้อเยื่อผิวหนังใต้เปลือกบริเวณหาง เพื่อกำหนดระยะของการลอกคราบ พบว่า วงจรการลอกคราบของกึ่งกุลาคำขนาด 10 - 20 กรัม อายุประมาณ 90 วัน ที่นำมาจากบ่อธรรมชาติ อ. ย่านตาขาว จ. ตรัง และ บ่อธรรมชาติ อ. ปากพั้ง จ. นครศรีธรรมราช และนำมาเลี้ยงในบ่อเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ ใช้เวลา 11 - 15 วัน ต่อ 1 วงจรการลอกคราบ โดยมีระยะเวลาระหว่างการลอกคราบ (intermolt) 1-2 วัน ก่อนการลอกคราบ (premolt) 6-7 วัน และ หลังการลอกคราบ (postmolt) 2-3 วัน ดูการแบ่งระยะของการลอกคราบคังรูปที่ 1 และ 3


การคัดเลือกระยะเวลาการลอกคราบของกึ่งกุลาคำในเบื้องต้นอาศัยการสังเกตการเปลี่ยนแปลงของแนวขนและเนื้อเยื่อผิวหนังใต้เปลือกที่แผ่นหาง (รูปที่ 1)

ในระหว่างระหว่างการลอกคราบ (Intermolt, stage C) เป็นระยะที่กึ่งอยู่ระหว่างการลอกคราบครั้งก่อนและครั้งใหม่ ระยะนี้กึ่งมีเปลือกที่แข็งและสมบูรณ์เต็มที่ ลักษณะเด่นของระยะนี้คือตุ่มขน (setal cones) ที่อยู่บริเวณปลายรากขน (setae) มีการเจริญเต็มที่ ระหว่างตุ่มขนไม่ปรากฏช่องว่างและมีการเจริญเติมเต็มด้วยเนื้อเยื่อใต้เปลือก

ระยะก่อนการลอกคราบ (premolt, stage D) แบ่งย่อยได้ 4 ระยะ คือ ระยะ D0, D1, D2, D3 และ D4 ระยะ D0 เป็นระยะที่เนื้อเยื่อใต้เปลือกเริ่มมีการแยกตัวถอยร่นห่างออกจากขอบนอกของเปลือกและตุ่มขน จนสามารถสังเกตเห็นเป็นขอบของเนื้อเยื่อใต้เปลือกอยู่บริเวณโคนของตุ่มขน ระยะ D1 กึ่งเข้าสู่ระยะนี้เมื่อเริ่มสังเกตเห็นแนวช่องว่างสีขาวระหว่างแนวตุ่มขนและเนื้อเยื่อใต้เปลือก และเมื่อสามารถสังเกตเห็นช่องว่างนี้ได้ชัดเจนประกอบด้วยขอบของเนื้อเยื่อใต้เปลือกเริ่มปรากฏรอยหยัก กึ่งจะถูกจัดอยู่ในระยะ D2 เมื่อช่องว่างใต้เปลือกกว้างมากขึ้นพร้อมกับรอยหยักของเนื้อเยื่อใต้เปลือกมีความชันมากขึ้น และบริเวณขอบของเนื้อเยื่อใต้เปลือกไม่สามารถสังเกตเห็นชัดเจนนักเพราะมีชั้นของเนื้อเยื่อสีขาวปกคลุมอยู่ กึ่งจะถูกจัดอยู่ในระยะ D3 และเมื่อชั้นของเนื้อเยื่อสีขาวที่ปกคลุมอยู่บริเวณขอบของเนื้อเยื่อใต้เปลือกเปลี่ยนเป็นสีเหลือง และช่องว่างใต้เปลือกกว้างมากขึ้น กึ่งจะถูกจัดอยู่ในระยะ D4 ซึ่งเป็นระยะสุดท้ายของระยะก่อนลอกคราบ



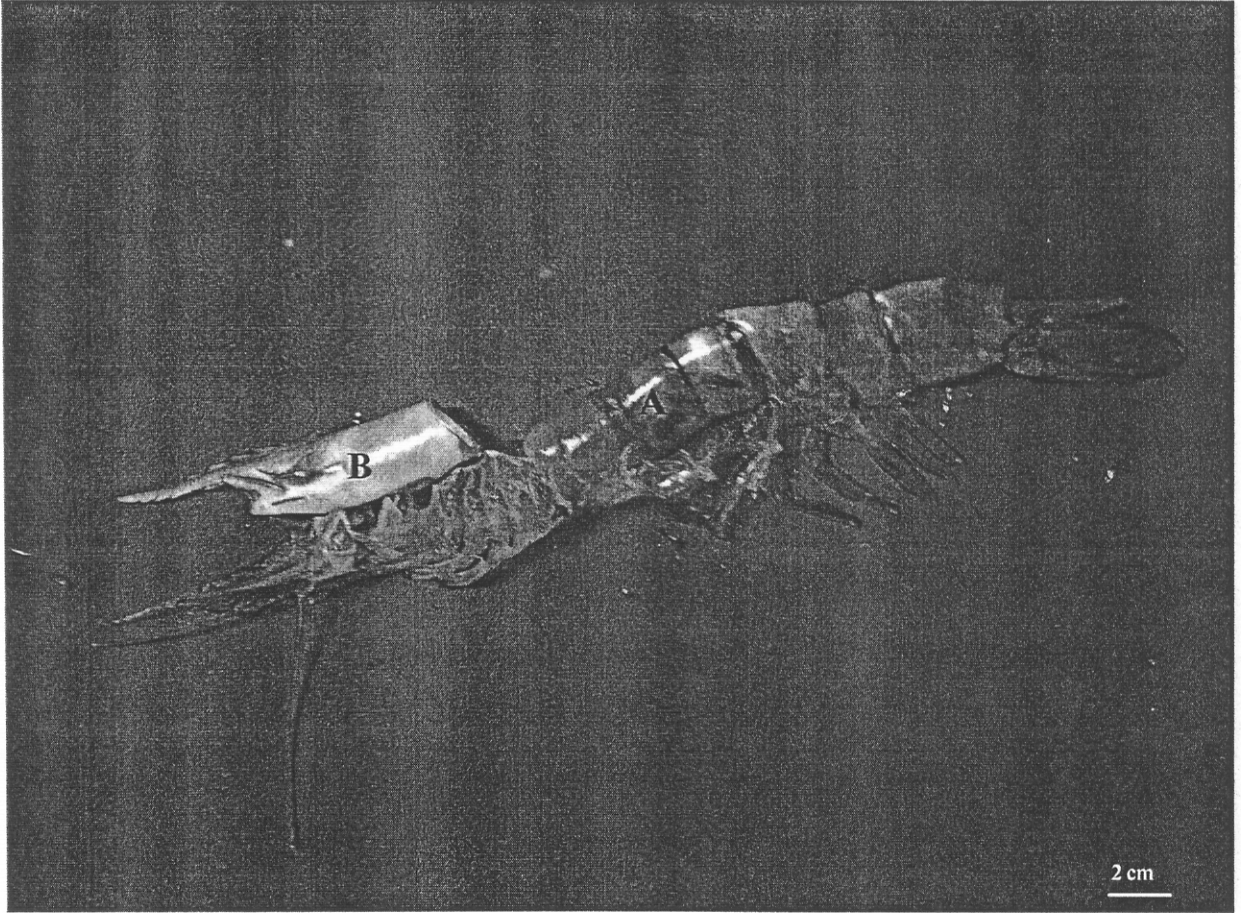
## รูปที่ 1 การคัดเลือกระยะเวลาการลอกคราบของกิ้งกูดาค่าโดยอาศัยลักษณะทางกายภาพ

กิ้งกูดาค่าที่ยังมีชีวิตถูกนำมาศึกษาการเปลี่ยนแปลงของแนวขนและเนื้อเยื่อผิวหนังใต้เปลือกที่ผ่านทาง และถ่ายรูปภายใต้กล้องจุลทรรศน์ รูป a เป็นระยะระหว่างการลอกคราบ (Intermolt) รูป b - f เป็นระยะก่อนการลอกคราบ รูป g - h เป็นระยะหลังการลอกคราบ อักษร E = epidermis; EE = epidermal edge; I = indent pattern of the epidermis; L = white layer at the edge of the epidermis; S = setae; SC = setal cone; SCn = newly-formed setal cones; Sn = newly-formed seta;  = wavy edge of epidermis; \* = ช่องว่างระหว่างเปลือกและเนื้อเยื่อผิวหนัง เส้นอัตราส่วนยาว 50 ไมโครเมตร

ในระยะหลังการลอกคราบ (postmolt) แบ่งได้เป็น 2 ระยะใหญ่ๆ คือ ระยะ A ซึ่งเป็นระยะที่กิ้งกูดากำลังลอกออกจากคราบใหม่ๆ เปลือกใหม่ของกิ้งกูดายังอ่อนนุ่มอยู่ ตุ่มขนใหม่ยังไม่มีการพัฒนาให้เห็น และ ระยะ B ซึ่งเป็นระยะที่เปลือกใหม่ของกิ้งกูดามีความแข็งเพิ่มมากขึ้น และตุ่มขนกำลังมีการพัฒนาเจริญเติบโต และเมื่อตุ่มขนเจริญเต็มที่กิ้งกูดจะเข้าสู่ระยะระหว่างการลอกคราบ (intermolt stage)

เปลือกเก่าของกิ้งกูดาค่าหลังการลอกคราบ (exuviae) แยกออกเป็น 2 ส่วน (รูปที่ 2) คือ ส่วนที่ 1 เป็นส่วนใหญ่ของเปลือกเก่าที่ติดกันเป็นชิ้น เป็นส่วนของหัว และ ลำตัว ซึ่งรวมถึง หาง และ รัยางค์ทั้งหมด คราบส่วนนี้มีรูปร่างลักษณะคล้ายตัวกิ้งกูดสมบูรณ์เป็นอย่างมาก ยกเว้นมีการขาดหายไปของเปลือกบริเวณส่วนหลังของหัวและออกซึ่งคาดว่าตรงส่วนที่ขาดหายไปและเป็นช่องเปิดนี้ เป็นช่องทางที่กิ้งกูดใช้ในการเคลื่อนตัวออกจากเปลือกเก่า บริเวณรอยต่อของเปลือกบริเวณปล้องลำตัวมีลักษณะอ่อน บางใส และมีความยืดหยุ่นมาก คาดว่าส่วนนี้เป็นส่วนสำคัญที่ทำให้ลำตัวของกิ้งกูดเคลื่อนออกจากเปลือกได้โดยง่าย ส่วนที่ 2 เป็นส่วนของด้านหลังของหัวและอก กิริ และ carapace (เป็นส่วนที่ขาดหายไปจากส่วนที่ 1) สมมุติฐานของขั้นตอนการลอกคราบคือ ส่วนที่ 2 มีการหลุดออกจากหัวของกิ้งกูดก่อน หลังจากนั้นกิ้งกูดก็จะเคลื่อนตัวออกจากเปลือกที่ห่อหุ้มตัวกิ้งกูดเกือบทั้งหมดทางด้านหน้า โดยอาศัยความยืดหยุ่นของปล้องลำตัวเป็นส่วนที่เอื้ออำนวยให้การเคลื่อนออกของลำตัวและหางเป็นไปได้โดยสะดวก

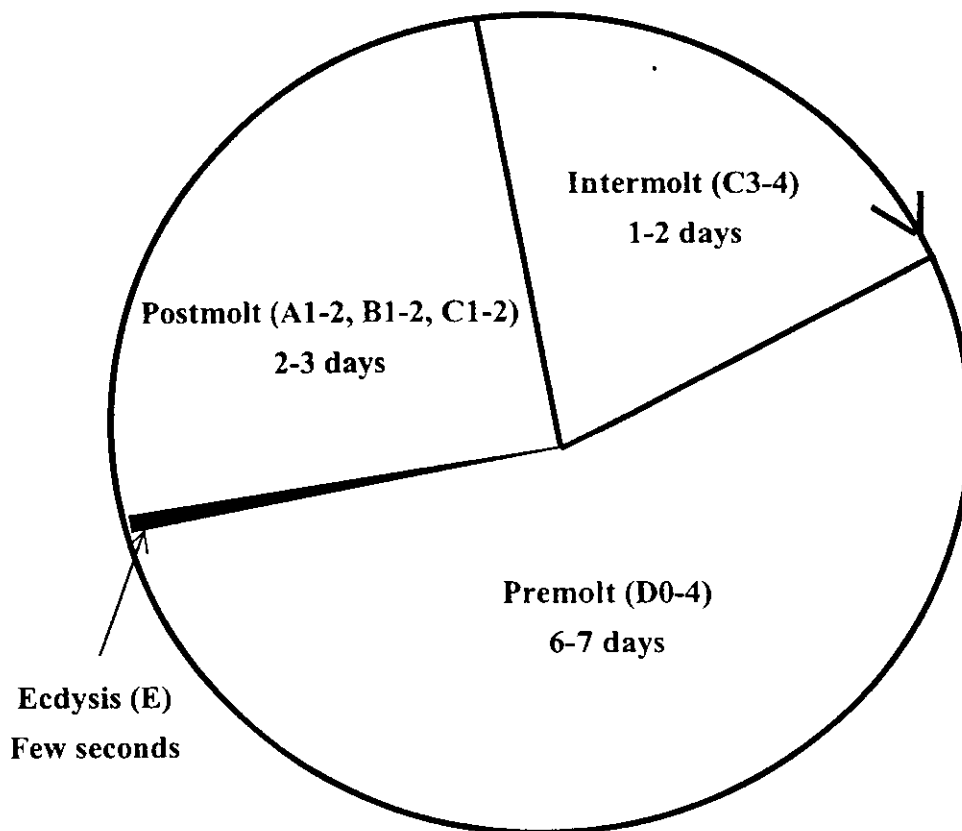
การตรวจระยะของวงจรการลอกคราบ โดยการใช้ลักษณะทางกายภาพนั้นเหมาะสำหรับใช้แยกระยะต่าง ๆ ของช่วงเวลาก่อนการลอกคราบ ซึ่งจะได้ระยะที่ชัดเจนและแน่นอน แต่มีข้อด้อยคือ ไม่สามารถแยกระยะหลังการลอกคราบ (B stage, postmolt) และระยะระหว่างวงจรการลอกคราบ (Intermolt) ออกจากกันได้อย่างชัดเจน จึงจำเป็นต้องใช้ลักษณะทางจุลกายวิภาคของเปลือกมาเป็นเกณฑ์บ่งชี้เพิ่มเติม



รูปที่ 2 คราบกุ้งกุลาดำ

หลังการลอกคราบ คราบกุ้งที่พบประกอบด้วย 2 ส่วน ส่วน A เป็นส่วนหลักของคราบกุ้งประกอบขึ้นจากเปลือกที่ห่อหุ้มลำตัว รยางค์ทั้งหมด และส่วนล่างของหัว และ ส่วน B เป็นเปลือกกุ้งที่อยู่ส่วนบนของหัว (carapace) และ กิริ

## รูปที่ 3



## รูปที่ 3 ระยะเวลาของวงจรการลอกคราบของกิ้งกูดาคำ

เวลาของแต่ละระยะของการลอกคราบของกิ้งที่มีน้ำหนัก 15 - 20 กรัม โดยกิ้งใช้เวลาในระยะก่อนลอกคราบ 6 - 7 วัน เวลาในการลอกคราบ 2 - 3 วินาที เวลาในระยะหลังลอกคราบ 2 - 3 วัน และ เวลาในระยะระหว่างวงจรการลอกคราบ 1 - 2 วัน ซึ่งรวมเวลาทั้งหมด 11 - 15 วัน

เปลือกกุ้งในระยะต่าง ๆ ของวงจรการลอกคราบตามลักษณะทางจุลกายวิภาคหลังการย้อมด้วยสี Periodic Acid Schiff's (PAS) และ Hematoxylin (รูปที่ 4) ประกอบด้วยชั้นต่าง ๆ 4 ชั้น ตามความแตกต่างของการติดสี (เรียงจากนอกเข้าไป) ได้แก่

- ชั้นที่ 1 ชั้น Epicuticle ย้อมติดสีม่วงชมพูเข้ม เป็นชั้นบาง ๆ อยู่นอกสุด
- ชั้นที่ 2 ชั้น Exocuticle ย้อมติดสีน้ำเงิน และมีลักษณะเป็นเส้นใยอย่างหยาบเรียงขนานกัน
- ชั้นที่ 3 ชั้น Endocuticle ย้อมติดสีชมพูอ่อน และมีลักษณะเป็นเส้นใยละเอียดเรียงขนานกัน และ
- ชั้นที่ 4 ชั้น Membranous layer ย้อมติดสีน้ำเงิน-ม่วง และมีลักษณะเป็นเส้นใยละเอียดเรียงขนานกันคล้ายชั้น Endocuticle

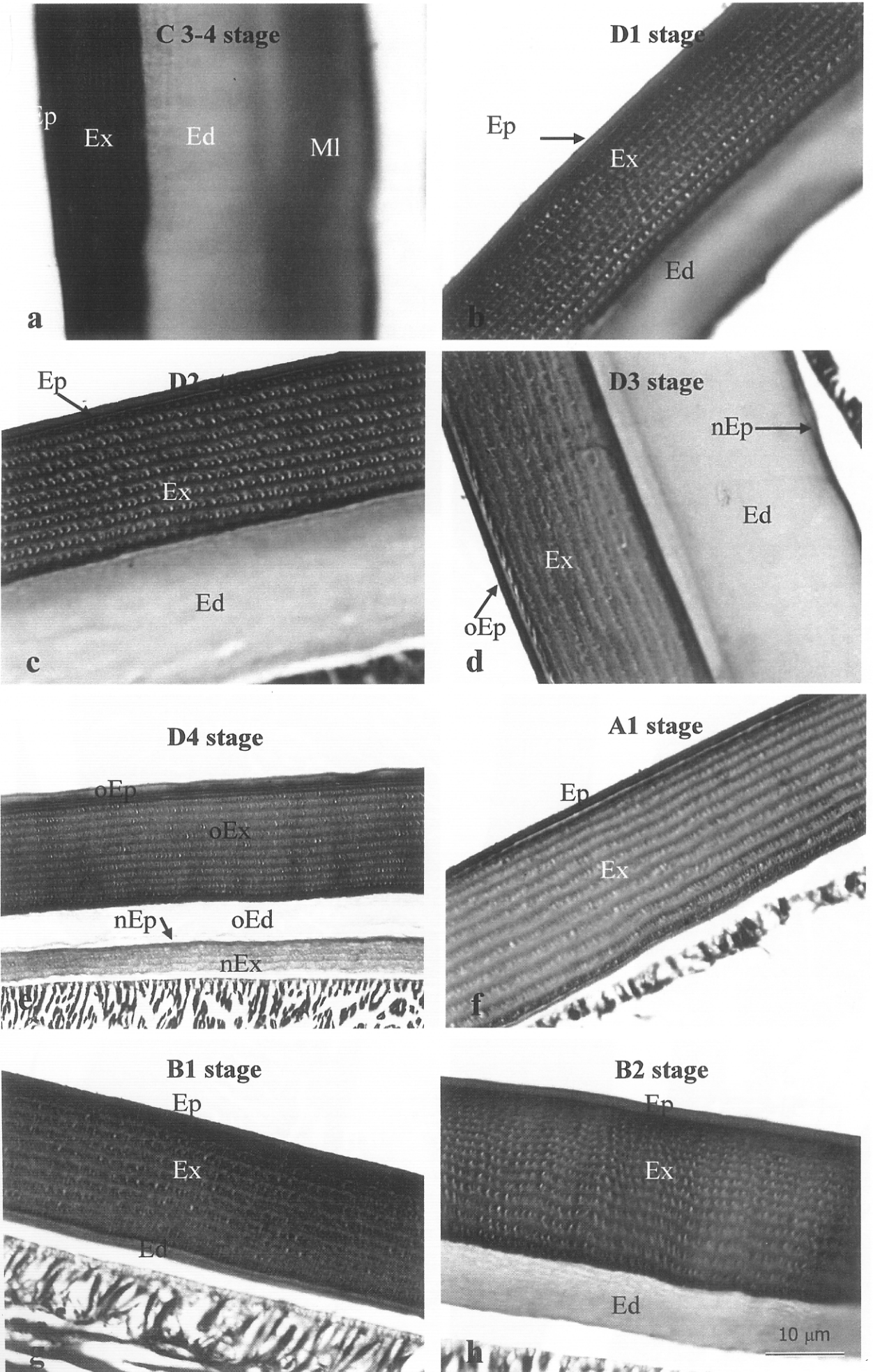
จากความแตกต่างนี้ทำให้สามารถนำมาจำแนกระยะต่าง ๆ ของการลอกคราบได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการแยกระยะหลังการลอกคราบ (postmolt) กับ ระยะระหว่างวงจรการลอกคราบ (intermolt) ออกจากกัน โดยที่การใช้ลักษณะทางกายภาพนั้นทำได้ยาก

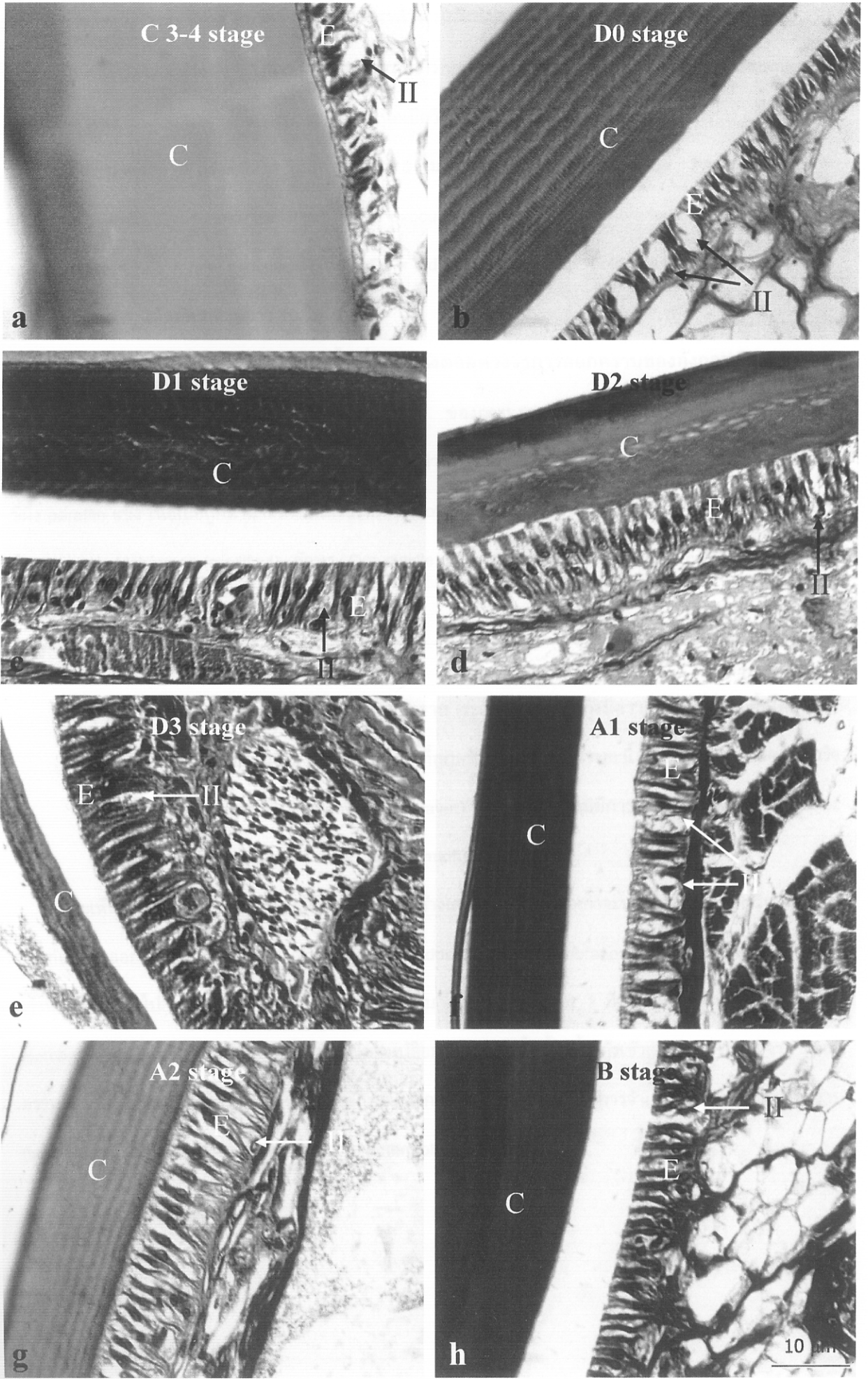
การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางจุลกายวิภาคของเปลือกกุ้งที่อยู่ในระยะก่อนการลอกคราบเป็นดังนี้

1. ระยะต้นถึงกลางของระยะก่อนการลอกคราบ (ระยะ D0, 1, 2) ลักษณะของเปลือกที่สังเกตเห็นได้จะคล้ายกันมาก คือประกอบด้วย ชั้น 1-3 (Epicuticle, Exocuticle และ Endocuticle) ไม่ปรากฏชั้นที่ 4 (Membranous layer)
2. ระยะปลายของระยะก่อนการลอกคราบ (ระยะ D3) เปลือกกุ้งประกอบด้วยชั้นที่ 1-3 และ ปรากฏแถบเล็ก ๆ สีม่วง-ชมพู อยู่ตรงขอบล่างของชั้นที่ 3 (Endocuticle) ซึ่งแถบสีม่วง-ชมพูที่เกิดขึ้นนั้นก็ คือชั้นที่ 1 (Epicuticle) ของเปลือกใหม่ที่เพิ่งสร้างขึ้นมา
3. ระยะสุดท้ายของระยะก่อนลอกคราบ (ระยะ D4) เปลือกกุ้งประกอบด้วยทั้งเปลือกเก่าและเปลือกใหม่วางซ้อนทับกันอยู่ โดยเปลือกเก่ายังคงประกอบด้วยชั้นที่ 1-3 แต่เปลือกใหม่มีความหนามากขึ้น โดยประกอบด้วย ชั้นที่ 1 (Epicuticle) และ ชั้นที่ 2 (Exocuticle)

การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางจุลกายวิภาคของเปลือกกุ้งที่อยู่ในระยะหลังการลอกคราบเป็นดังนี้

1. ระยะต้นของระยะหลังการลอกคราบ (ระยะ A) เป็นระยะหลังการลอกคราบใหม่ ๆ ไม่เกิน 10 ชั่วโมง เปลือกกุ้งมีเพียงแต่เปลือกใหม่ที่ประกอบด้วย ชั้นที่ 1 และ 2 (Epicuticle และ Exocuticle) ที่มีความหนาสมบูรณ์เต็มที่







#### รูปที่ 4 การคัดเลือกระยะเวลาการลอกคราบของกิ้งกูดดำตามลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของเปลือก

เปลือกกิ้งกูดดำในระยะต่าง ๆ ของการลอกคราบถูกนำมารักษาสภาพโดยแช่ในน้ำยา Davidson's fixative เป็นเวลา 72 ชั่วโมงก่อนที่จะนำมาผ่านกระบวนการทางเนื้อเยื่อวิทยา และรักษาเนื้อเยื่อไว้ในซีผึ้ง paraffin แข็ง เนื้อเยื่อถูกนำมาตัดด้วยเครื่องตัด microtome ให้มีความหนา 5 ไมโครเมตร และนำมาย้อมด้วยสี PAS อักษร Ed = endocuticle layer; Ep = epicuticle layer; Ex = exocuticle layer; Ml = membranous layer; nEp = new epicuticle layer; nEx = new exocuticle layer; oEd = old endocuticle; oEp = old epicuticle layer; oEx = old exocuticle layer เส้นอัตราส่วนยาว 10 ไมโครเมตร

#### รูปที่ 5 การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังตลอดวงจรการลอกคราบของกิ้งกูดดำ

เปลือกและเนื้อเยื่อผิวหนังกิ้งกูดดำในระยะต่าง ๆ ของการลอกคราบถูกนำมารักษาสภาพโดยแช่ในน้ำยา Davidson's fixative เป็นเวลา 72 ชั่วโมงก่อนที่จะนำมาผ่านกระบวนการทางเนื้อเยื่อวิทยา และรักษาเนื้อเยื่อไว้ในซีผึ้ง paraffin แข็ง เนื้อเยื่อถูกนำมาตัดด้วยเครื่องตัด microtome ให้มีความหนา 5 ไมโครเมตร และนำมาย้อมด้วยสี Masson's trichromes (modified) อักษร C = cuticle; E = epidermis, II = epidermal cell type II เส้นอัตราส่วนยาว 10 ไมโครเมตร

2. ระยะกลางถึงปลายของระยะหลังการลอกคราบ (ระยะ B) เปลือกกิ้งกูดมีความหนาเพิ่มมากขึ้นโดยมีการเพิ่มความหนาของชั้นที่ 3 (Endocuticle) ที่ถูกสร้างขึ้นมาใหม่ในระยะนี้ และการสร้างเปลือกจะเสร็จสมบูรณ์เต็มที่เมื่อชั้นที่ 4 (Membranous layer) ของเปลือกใหม่มีการสร้างขึ้นมาและเมื่อนั้นกิ้งกูดจะเข้าสู่ระยะระหว่างวงจรการลอกคราบ (intermolt)

จะเห็นว่าเปลือกชั้น epicuticle และ exocuticle สร้างเสร็จก่อนที่เปลือกเก่าจะหลุดลอกออกไป หรือเกิดขึ้นในช่วงก่อนการลอกคราบ (pre-ecdysis) ส่วนเปลือกชั้น endocuticle และ membranous layer สร้างหลังจากที่เปลือกเก่าหลุดลอกออกไป หรือเกิดขึ้นในช่วงหลังการลอกคราบ (post-ecdysis) ที่สำคัญการปรากฏของเปลือกชั้น membranous layer บ่งบอกถึงความสมบูรณ์ของเปลือก การเกิดขึ้นนี้บ่งชี้ว่ากิ้งกูดเข้าสู่ระยะระหว่างวงจรการลอกคราบ (intermolt) แล้ว ดังนั้นจึงนำลักษณะดังกล่าวมาใช้เป็นเกณฑ์ในการจำแนกระยะหลังการลอกคราบ (postmolt) กับ ระยะระหว่างวงจรการลอกคราบ (intermolt) ออกจากกัน

2. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะโครงสร้างของเซลล์ (cell morphology) ของเนื้อเยื่อผิวหนัง (epidermis) ในระยะก่อนการลอกคราบ (pre molt) หลังการลอกคราบ (post molt) และระยะระหว่างวงจรการลอกคราบ (inter molt) ของกิ้งกูดดำ

### 2.1 การเปลี่ยนแปลงลักษณะโครงสร้างของเซลล์เนื้อเยื่อผิวหนัง (Epidermal cell morphology) ในแต่ละระยะของวงจรการลอกคราบ

ลักษณะโครงสร้างของเซลล์เนื้อเยื่อผิวหนัง (Epidermis) ได้รับความศึกษาด้วยกระบวนการทางเนื้อเยื่อวิทยา และย้อมเนื้อเยื่อด้วยสี Masson's trichrome (modified) พบว่า โดยทั่วไปแล้วเนื้อเยื่อผิวหนังประกอบด้วยเซลล์เรียงตัวชั้นเดียว โดยที่รูปร่าง และการจัดระเบียบของเซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังแตกต่างกันไปในแต่ละระยะของวงจรการลอกคราบ เซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังมี 2 ชนิด คือ epidermal cell type I ซึ่งเป็นเซลล์ส่วนใหญ่ และ epidermal cell type II ซึ่งเป็นเซลล์ส่วนน้อย (รูปที่ 5)

ในระยะระหว่างวงจรการลอกคราบ (inter molt) เซลล์เนื้อเยื่อผิวหนัง มีรูปร่างเตี้ย โดยมีความสูงเฉลี่ย 3.12 ไมโครเมตร และมีการเรียงตัวของเซลล์อย่างไม่เป็นระเบียบ เมื่อกิ้งเข้าสู่ช่วงเวลาก่อนการลอกคราบเซลล์ชนิดนี้จะเพิ่มความสูงขึ้น และมีการจัดเรียงเป็นแถวอย่างเป็นระเบียบ ความสูงของเซลล์จะเพิ่มมากขึ้นเรื่อย ๆ จากระยะต้นไปจนถึงระยะปลายของการลอกคราบ (ตั้งแต่ระยะ D0 ไปจนถึง D4) และมีความสูงมากที่สุดในระยะสุดท้ายของระยะก่อนการลอกคราบ (ระยะ D4) ในระยะกลางของระยะก่อนการลอกคราบ (ระยะ D2) เซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังมีความสูงเฉลี่ยเท่ากับ 8.75 ไมโครเมตร ซึ่งมีความสูงมากกว่าเซลล์ในระยะระหว่างการลอกคราบถึง 2.8 เท่า เมื่อกิ้งเข้าสู่ระยะหลังการลอกคราบ (post molt) ความสูงของ epidermal cell type I จะค่อย ๆ ลดลง เริ่มตั้งแต่ระยะต้นไปจนถึงระยะปลายของระยะหลังการลอกคราบ และเซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังมีความสูงน้อยที่สุด เมื่อกิ้งเข้าสู่ระยะระหว่างวงจรการลอกคราบ (inter molt)

การเปลี่ยนแปลงความสูงของเซลล์เนื้อเยื่อผิวหนัง บ่งชี้ถึงกิจกรรมของเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงไปในแต่ละระยะของวงจรการลอกคราบ การค่อย ๆ เพิ่มความสูงของเซลล์เนื้อเยื่อผิวหนัง ในระยะก่อนการลอกคราบบ่งชี้ว่าการทำงานของเซลล์ได้เพิ่มขึ้นตามลำดับ ความสูงของเซลล์ที่เริ่มลดลงในระยะกลางของระยะหลังการลอกคราบบ่งชี้ว่าการทำงานของเซลล์ได้ลดลงตามลำดับ และความสูงของเซลล์ที่น้อยที่สุดในระยะระหว่างวงจรการลอกคราบบ่งชี้ว่ากิจกรรมของเซลล์ในระยะนี้เกิดขึ้นน้อยมาก การทำงานของเซลล์ที่มีการเปลี่ยนแปลงอาจรวมถึง การจำลองสารพันธุกรรม การสร้าง RNA และโปรตีน และ การเคลื่อนย้ายของเกลียวแคลเซียม (Skinner, 1966; McWhinnie and

Mohrherr, 1970; Humphreys and Stevenson, 1973; Wittig and Stevenson, 1975; Dall and Barclay, 1979; Wheatly et al., 2002; Ahearn et al., 2004; Luquet and Marin 2004).

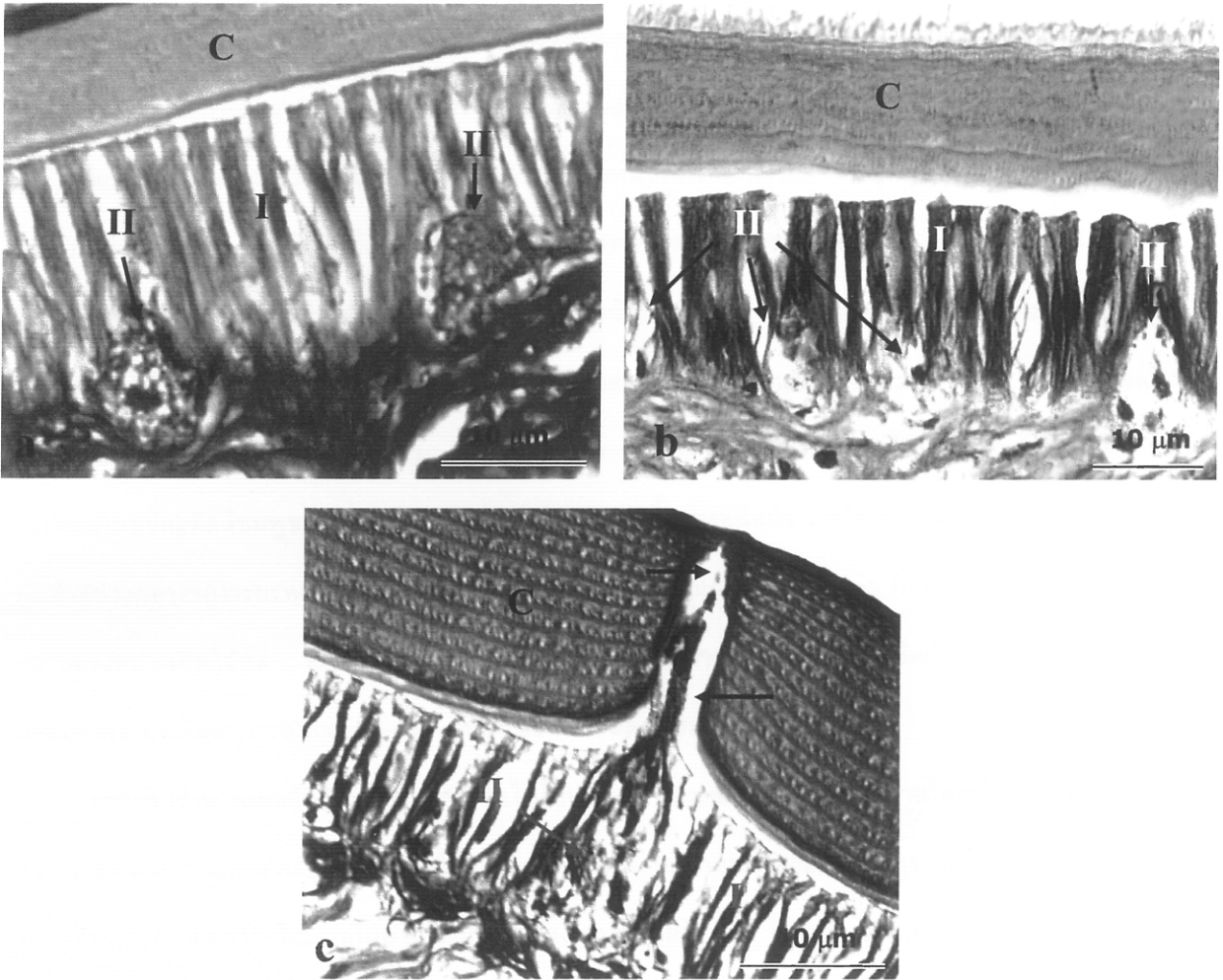
ระหว่าง epidermal cell type I พบ epidermal cell type II แทรกตัวอยู่โดยกระจายตัวกันห่าง ๆ บนแนวเดียวกัน epidermal cell type II เป็นเซลล์ที่ย้อมไม่ติดสีเมื่อย้อมด้วยสี Masson's trichrome และเมื่อย้อมด้วยสี PAS พบว่าเซลล์ชนิดนี้ย้อมติดสีชมพูเข้ม ซึ่งทำให้การสังเกตเห็นเซลล์ชนิดนี้ทำได้ชัดเจนขึ้น จากการย้อมด้วยสี PAS พบว่า epidermal cell type II มีจำนวนเพิ่มมากขึ้น ในระยะกลางของระยะก่อนการลอกคราบ (ระยะ D2) ไปจนถึงระยะกลางของระยะหลังการลอกคราบ (ระยะ B) ส่วนระยะระหว่างวงจรการลอกคราบจนถึงระยะต้นของระยะก่อนการลอกคราบ จะพบเซลล์ได้ในจำนวนที่น้อยลง มีหลักฐานชี้ชัดว่าเซลล์นี้มีการติดต่อผ่านชั้นต่าง ๆ ของเปลือกไปถึงชั้น epicuticle ที่อยู่นอกสุด (รูปที่ 6)

ยังไม่มีการรายงานเกี่ยวกับเซลล์ชนิดนี้ในสัตว์ตระกูลเดียวกันนี้มาก่อน ซึ่งจากการค้นพบครั้งนี้สรุปได้ว่า epidermal cell type II อาจมีความเกี่ยวข้องกับการสร้างและเคลื่อนย้ายคาร์โบไฮเดรตไปยังเปลือกใหม่โดยเฉพาะอย่างยิ่งเปลือกชั้นนอกสุด ซึ่งก็คือชั้น epicuticle

## 2.2 การเปลี่ยนแปลงลักษณะโครงสร้างของเนื้อเยื่อใต้ผิวหนัง (sub-epidermis) ในแต่ละระยะของวงจรการลอกคราบ

เนื้อเยื่อใต้ชั้นผิวหนัง (sub-epidermis) (รูปที่ 7) ประกอบด้วย 1) เซลล์ (sub-epidermal cells) ที่มีรูปร่างรี แต่ละเซลล์มีหนึ่งนิวเคลียส ไซโตพลาสซึมย้อมติดสีชมพู-ม่วง ของ PAS เฉพาะในบางระยะของวงจรการลอกคราบ 2) ต่อม (tegumental gland) ซึ่งมี 2 ชนิด จำแนกตามลักษณะและการติดสี PAS ต่อม tegumental gland type A ย้อมติดสี PAS เป็นสีม่วงเข้ม และเมื่อย้อมด้วยสี toluidine blue จะเห็นเม็ด granules สีน้ำเงินอยู่เต็มภายในไซโตพลาสซึม ยกเว้นบริเวณที่เป็นนิวเคลียส ขอบเขตของเซลล์สังเกตได้ไม่ชัดเจน ต่อม tegumental gland type B ย้อมติดสี PAS เป็นสีม่วงเข้มเช่นกัน แต่มีบางบริเวณย้อมไม่ติดสี และเมื่อย้อมด้วย toluidine blue พบว่าไซโตพลาสซึมย้อมติดสีชมพูแทนที่จะติดสีน้ำเงิน (เรียกว่า metachromasia reaction) และมีบางบริเวณย้อมไม่ติดสี พบนิวเคลียสอยู่บริเวณฐานของเซลล์ ยอดของเซลล์ลู่ออกเข้าหาท่อลำเลียงสารคัดหลั่งที่อยู่ตรงกลาง แต่ละเซลล์ปรากฏขอบเขตค่อนข้างชัดเจน (รูปที่ 7h ปลายครึ่ง)

ในส่วนของต่อมที่พบ สรุปได้ว่าต่อมในเนื้อเยื่อใต้ผิวหนังเกี่ยวข้องกับการสร้างและสะสมคาร์โบไฮเดรต นอกจากนี้ต่อมชนิด B ยังมีการสร้างและสะสมสารเมือกและสารที่ทำให้เกิด metachromasia reaction เช่น histamine



รูปที่ 6 Epidermal cells

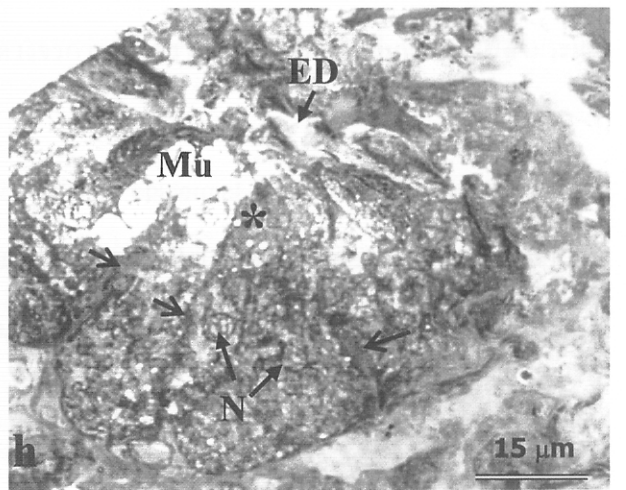
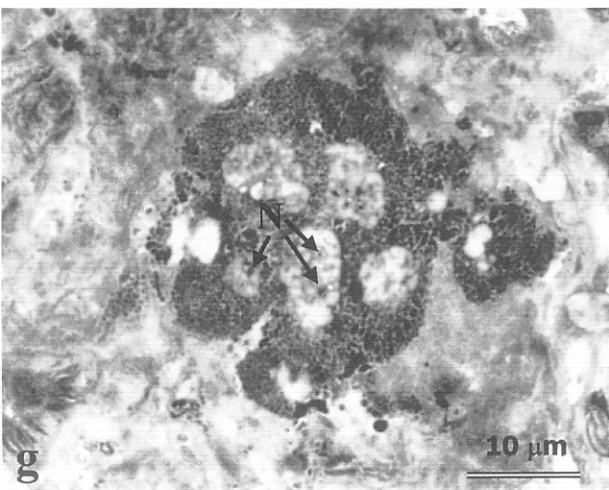
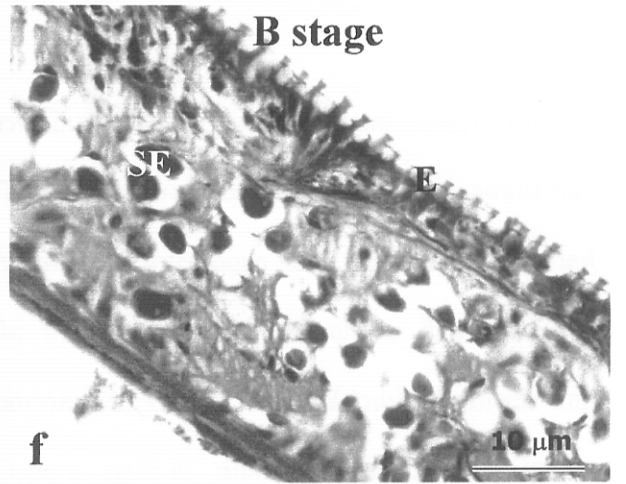
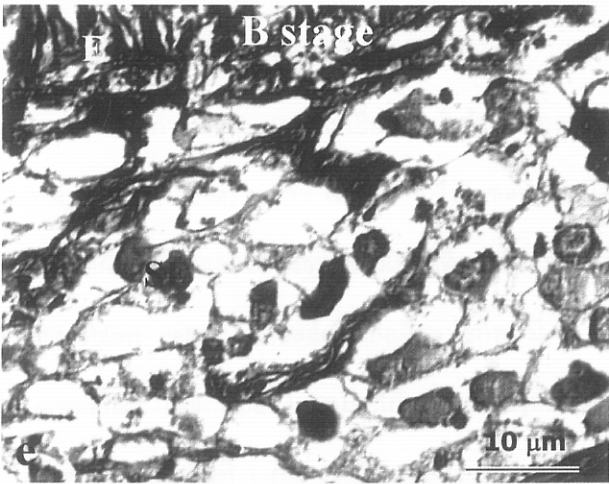
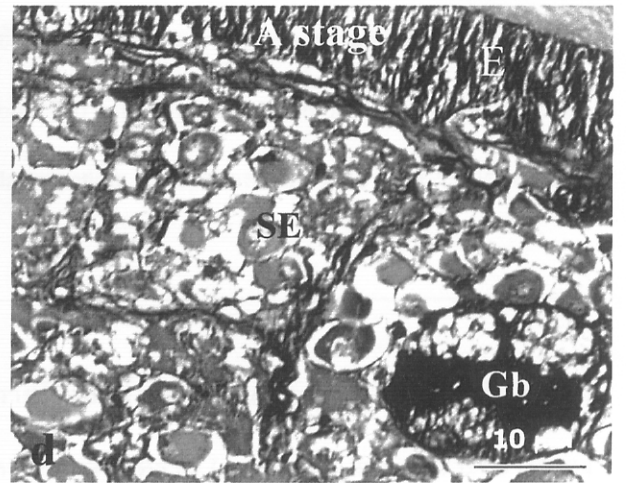
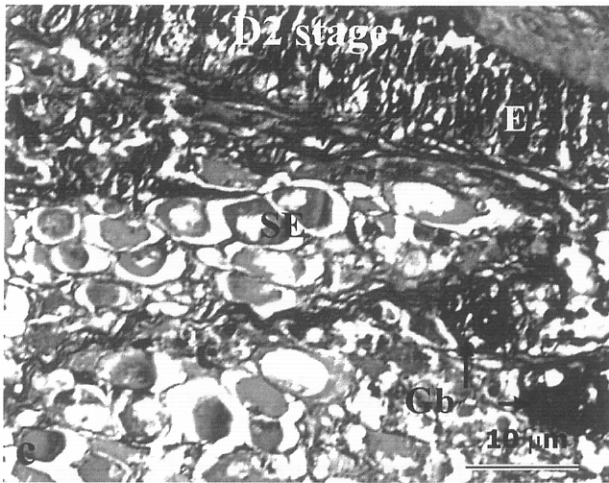
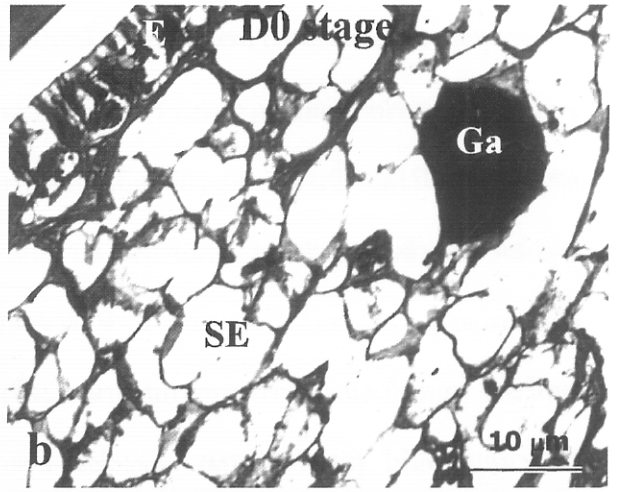
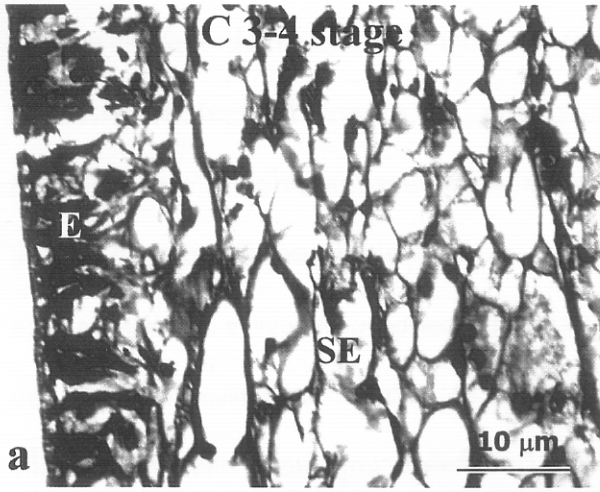
เนื้อเยื่อผิวหนังและเปลือกของกิ้งกูดดำถูกนำมารักษาสภาพโดยแช่ในน้ำยา Davidson's fixative เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ก่อนที่จะนำมาผ่านกระบวนการทางเนื้อเยื่อวิทยา และรักษาเนื้อเยื่อไว้ในซีฟี่ paraffin แข็ง เนื้อเยื่อถูกนำมาตัดด้วย เครื่องตัด microtome ให้มีความหนา 0.5 ไมโครเมตร และนำมาย้อมด้วยสี PAS (a, c) และ Masson's trichrome (b) อักษร C = cuticle, I = epidermal cell type I, II = epidermal cell type II หัวลูกศร ชี้ช่องที่ทอดขวางเปลือกซึ่งมีส่วน ยื่นของ epidermal cell type II บรรจุอยู่ เส้นอัตราส่วนยาว 10 ไมโครเมตร

heparin เป็นต้น มีรายงานในสัตว์สปีชีส์อื่นในตระกูลเดียวกันว่าสารที่พบในต่อมในเนื้อเยื่อไตมีผนังได้แก่ phenoloxidase (Stevenson, 1961), tyrosinase (Stevenson and Schneider, 1962) และ mucopolysaccharides (Dall, 1965; Stevenson and Murphy, 1967; Shyamasundari and Hanumantha, 1978).

และเมื่อศึกษาโครงสร้างของเนื้อเยื่อไตชั้นผิวหนังสัมพันธ์กับวงจรการลอกคราบ พบว่า ในระยะระหว่างวงจรการลอกคราบ (intermolt) ไปจนถึงระยะต้นของระยะก่อนการลอกคราบ (ระยะ D0-1) sub-epidermal cells มีนิวเคลียสขนาดเล็ก ย้อมติดสีน้ำเงินเข้ม และไซโตพลาสซึมย้อมไม่ติดสี tegumental gland ทั้งสองชนิด พบกระจายอยู่ทั่วไปภายในเนื้อเยื่อ ต่อมาในระยะตั้งแต่ระยะกลางของระยะก่อนการลอกคราบ (ระยะ D2) ไปจนถึงระยะต้นของระยะหลังการลอกคราบ (ระยะ A) sub-epidermal cell มีนิวเคลียสขนาดใหญ่ขึ้นและย้อมติดสีจาง แต่ไซโตพลาสซึมย้อมติดสีชมพูของสี PAS tegumental gland ทั้งสองชนิดมีขนาดใหญ่และมีจำนวนมากขึ้น ซึ่งเมื่อกุ้งเข้าสู่ช่วงกลางของระยะหลังการลอกคราบ (ระยะ B) จำนวน sub-epidermal cell ที่ย้อมติดสีชมพูในไซโตพลาสซึม ลดลงอย่างเห็นได้ชัด tegumental gland มีขนาดเล็กและมีจำนวนลดลง และเมื่อกุ้งเข้าสู่ระยะระหว่างวงจรการลอกคราบจะไม่สามารถเห็น sub-epidermal cell ที่ย้อมติดสีชมพูในไซโตพลาสซึม

การเพิ่มจำนวนเซลล์ที่ย้อมติดสี PAS ในไซโตพลาสซึม และเซลล์มีนิวเคลียสขนาดใหญ่ขึ้น ตั้งแต่ระยะกลางของระยะก่อนการลอกคราบ (ระยะ D2) ไปจนถึงระยะต้นของระยะหลังการลอกคราบ (ระยะ A) นั้นบ่งชี้ว่าเซลล์มีการสร้างและสะสมคาร์โบไฮเดรตในปริมาณมากในช่วงเวลาดังกล่าว การสร้างและสะสมนี้จะเริ่มลดลงเมื่อเข้าสู่ระยะกลางของระยะหลังการลอกคราบ (ระยะ B) และสิ้นสุดการสะสมคาร์โบไฮเดรตเมื่อกุ้งเข้าสู่ระยะระหว่างวงจรการลอกคราบ การสะสมคาร์โบไฮเดรตจะเกิดขึ้นอีกครั้งเมื่อกุ้งเข้าสู่ระยะกลางของระยะก่อนการลอกคราบ และการที่ต่อมต่าง ๆ มีขนาดใหญ่และมีจำนวนมากขึ้นในช่วงเวลาเดียวกันกับที่เซลล์มีการสะสมคาร์โบไฮเดรตในปริมาณมาก ทำให้น่าเชื่อได้ว่ามีการสร้างและการสะสมของสารที่เกี่ยวข้องกับการลอกคราบของกุ้งกุลาดำเกิดขึ้นในเนื้อเยื่อชั้นนี้

จะเห็นว่าช่วงเวลาที่มีการสะสมคาร์โบไฮเดรตในเนื้อเยื่อไตมีผนัง และ ช่วงเวลาที่เซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังมีความสูงมากที่สุดนั้นเป็นช่วงเวลาเดียวกัน คือช่วงเวลาตั้งแต่ระยะกลางของระยะก่อนการลอกคราบ (ระยะ D2) ไปจนถึงระยะกลางของระยะหลังการลอกคราบ (ระยะ B) และตรงกับช่วงเวลาที่เปลือกใหม่ของกุ้งมีการสร้างขึ้น ทำให้สามารถเชื่อได้ว่า ช่วงเวลาดังกล่าวเป็นช่วงเวลาเนื้อเยื่อผิวหนังและเนื้อเยื่อไตมีผนังของกุ้งอยู่ในสภาวะที่ทำงานหนักมากที่สุด ซึ่งนั่นก็เพื่อการสร้างเปลือกใหม่และการเจริญเติบโตของตัวกุ้งเอง



รูปที่ 7 การเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อวิทยาของเนื้อเยื่อใต้ผิวหนังตลอดวงจรการลอกคราบของกิ้งกูดำ เนื้อเยื่อใต้ผิวหนังกิ้งกูดำในระยะต่าง ๆ ของการลอกคราบถูกนำมารักษาสภาพโดยแช่ในน้ำยา Davidson's fixative เป็นเวลา 72 ชั่วโมงก่อนที่จะนำมาผ่านกระบวนการทางเนื้อเยื่อวิทยา และรักษาเนื้อเยื่อไว้ในชิ้นฝัง paraffin แข็ง เนื้อเยื่อถูกนำมาตัดด้วยเครื่องตัด microtome ให้มีความหนา 5 ไมโครเมตร และนำมาย้อมด้วยสี PAS (a - e) หรือ Masson's trichromes (modified) (f) หรือ ถูกนำมารักษาสภาพโดยแช่ในน้ำยา 2.5% glutaraldehyde และ 4% paraformaldehyde เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนที่จะนำมาผ่านกระบวนการทางเนื้อเยื่อวิทยา และรักษาเนื้อเยื่อไว้ในพลาสติก เนื้อเยื่อถูกนำมาตัดด้วยเครื่องตัด ultra-microtome (MTXL, RMC) ให้มีความหนา 1-2 ไมโครเมตร และนำมาย้อมด้วยสี toluidine blue (g, h) อักษร E = epidermis; Ga = tegumental gland type A; Gb = tegumental gland type B; SE = sub-epidermal cell; Mu = mucus; N = nucleus; ED = excretory duct; หัวลูกศรชี้ intercellular boundaries, \* = metachromasia reaction เส้นอัตราส่วนยาว 10 หรือ 15 ไมโครเมตร ตามกำหนดในรูป

### 3. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะโครงสร้างภายในเซลล์ (ultra-structures) ของเนื้อเยื่อผิวหนัง (epidermis) ในระยะก่อนการลอกคราบ (premolts) หลังการลอกคราบ (postmolts) และระยะระหว่างวงจรการลอกคราบ (intermolts) ของกิ้งกูดำ

จากการศึกษาเซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscopy, TEM) พบว่า โดยทั่ว ๆ ไป เซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังมีการเรียงตัวเป็นแถวเดี่ยวโดยมีส่วนยอดของเซลล์ชิดติดกับเปลือกและมีส่วนฐานของเซลล์ติดกับแนวของเส้นใยคอลลาเจน (collagen fibers) และเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (fibroblast cells) เซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังที่พบมี 2 ชนิด ชนิดที่ 1 เป็นเซลล์ส่วนใหญ่ที่พบ ซึ่งน่าจะเป็นเซลล์ epidermal cell type I เหมือนกับที่พบภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา และเซลล์ส่วนน้อยที่พบกระจายอยู่ระหว่างเซลล์ชนิดที่ 1 ก็น่าจะเป็นเซลล์ epidermal cell type II (รูปที่ 8) เมื่อศึกษาโครงสร้างภายในของรูปร่างและโครงสร้างภายในของ epidermal cell type I ตลอดวงจรการลอกคราบ พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงไปตามระยะต่าง ๆ ของวงจรการลอกคราบ

ในระยะกลางของระยะก่อนลอกคราบ (ระยะ D2) (รูปที่ 8) epidermal cell type I มีรูปร่างสูงเป็นแท่ง ๆ และมีการจัดเรียงตัวชิดกันอย่างเป็นระเบียบ มีนิวเคลียสยาวรี และเส้นใยโครมาตินกระจายตัวอยู่ตามขอบของนิวเคลียส (euchromatic nucleus) ภายในไซโตพลาสซึมบรรจุด้วย rough endoplasmic reticulum (RER), free

ribosomes, micro-fibers, mitochondria, electron-dense granules และ vesicles จำนวนมาก micro-fibers ที่พบมีการเรียงตัวกันเป็นกลุ่มและทอดตัวตามแนวยาวขนานไปตลอดความยาวของเซลล์ ด้านปลายของกลุ่ม micro-fibers ตรงบริเวณยอดของเซลล์ เห็นเป็นส่วนที่บวมใสเล็ดรอนมากขึ้น และสัมผัสชิดอยู่กับเปลือก และในบางบริเวณส่วนที่บวมใสเล็ดรอนนั้นมีการทอดตัวต่อเนื่องเข้าไปภายในเปลือกและกลายเป็นส่วนหนึ่งของเปลือก (รูปที่ 9)

ในระยะปลายของระยะก่อนการลอกคราบ (ระยะ D3 และ D4) epidermal cell type I ยังคงมีรูปร่างสูงยาวและมี euchromatic nucleus ไซโตพลาสซึมมีความหนาแน่นมากขึ้นเนื่องจากประกอบด้วย RER, free ribosomes และ electron-dense secretory granules และ vesicles นอกจากนี้ยังพบว่า ช่องว่างระหว่างเซลล์ (intercellular space) และช่องว่างระหว่างเซลล์กับเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่อยู่ข้างใต้ (basal space) ปรากฏกว้างขึ้น ซึ่งภายในช่องว่างดังกล่าวพบกลุ่มของ electron-dense granules ที่มีลักษณะกลม (รูปที่ 10a, b) และ กลุ่มของ electron-dense granules นี้ยังพบอยู่ใกล้ ๆ กับ แอ่งเลือดที่ทอดตัวอยู่ข้างใต้ของแถวเซลล์เนื้อเยื่อผิวหนัง (รูปที่ 10b, d) ด้านฐานและด้านข้างของเซลล์มีตุ่มยื่นออกไป (cytoplasmic protusions) เป็นจำนวนมาก โดยยื่นเข้าไปในช่องว่างระหว่างเซลล์ (intercellular space) ทำให้ขอบด้านข้างของเซลล์ดูไม่เรียบ และช่องว่างระหว่างเซลล์ดูคดเคี้ยว (รูปที่ 10a, b, 13c) ในตำแหน่งใกล้เคียง ๆ กับช่องว่าง intercellular space และช่องว่าง basal space พบกลุ่มของ mitochondria วางตัวอยู่ ด้านยอดของเซลล์ยังคงแนบชิดกับเปลือกใหม่ที่หนาตัวเพิ่มขึ้น และพบ electron-dense secretory granules ขนาดเล็ก จำนวนมากเรียงตัวอยู่ชิดกับเปลือก ปรากฏการณ์ที่กลุ่ม micro-fibers แหว่งยื่นเข้าไปในเปลือกพบเห็นได้มากขึ้น (รูปที่ 9c) ต่อมาในระยะสุดท้ายของช่วงก่อนลอกคราบ (ระยะ D4) ปรากฏการณ์ที่กลุ่ม micro-fibers แหว่งเข้าไปในเปลือกได้หายไป แต่พบปลายของ micro-fibers มาหยุดอยู่ด้านใต้และห่างจากเปลือกเล็กน้อย (รูปที่ 10c) secretory vesicles ขนาดเล็กที่เคยพบบริเวณยอดของเซลล์ก็ยังคงมีอยู่แต่มีจำนวนที่ลดลงอย่างเห็นได้ชัด

### รูปที่ 8 โครงสร้างอย่างละเอียดของเซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังของกิ้งก่าดำศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

เนื้อเยื่อผิวหนังกิ้งก่าดำในระยะ D2 ถูกนำมารักษาสภาพโดยแช่ในน้ำยา 2.5% glutaraldehyde และ 4% paraformaldehyde เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนที่จะนำมาผ่านกระบวนการทางเนื้อเยื่อวิทยา และรักษาเนื้อเยื่อไว้ในพลาสติก เนื้อเยื่อถูกนำมาตัดด้วยเครื่องตัด ultra-microtome (MTXL, RMC) ให้มีความหนา 60 - 90 นาโนเมตร



เพื่อนำมาศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Jeol JEM-100 CX II) อักษร C = cuticle; EC I = epidermal cell type I; EC II = epidermal cell type II; หัวลูกศรชี้ micro-fibers เส้นอัตราส่วนยาว 4 ไมโครเมตร

### รูปที่ 9 โครงสร้างอย่างละเอียดของ epidermal cell type I ในระยะ D2-D3

เนื้อเยื่อผิวหนังกึ่งกลาดำในระยะ D2 และ D3 ถูกนำมารักษาสภาพโดยแช่ในน้ำยา 2.5% glutaraldehyde และ 4% paraformaldehyde เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนที่จะนำมาผ่านกระบวนการทางเนื้อเยื่อวิทยา และรักษาเนื้อเยื่อไว้ในพลาสติก เนื้อเยื่อถูกนำมาตัดด้วยเครื่องตัด ultra-microtome (MTXL, RMC) ให้มีความหนา 60 - 90 นาโนเมตร

เพื่อนำมาศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Jeol JEM-100 CX II) อักษร C = cuticle; F = micro-fibers; M = mitochondria; N = nucleus; RER = rough endoplasmic reticulum ความยาวเส้นอัตราส่วนตามกำหนดในแต่ละรูป

### รูปที่ 10 โครงสร้างอย่างละเอียดของ epidermal cell type I ในระยะ D4

เนื้อเยื่อผิวหนังกึ่งกลาดำในระยะ D4 ถูกนำมารักษาสภาพโดยแช่ในน้ำยา 2.5% glutaraldehyde และ 4% paraformaldehyde เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนที่จะนำมาผ่านกระบวนการทางเนื้อเยื่อวิทยา และรักษาเนื้อเยื่อไว้ในพลาสติก เนื้อเยื่อถูกนำมาตัดด้วยเครื่องตัด ultra-microtome (MTXL, RMC) ให้มีความหนา 60 - 90 นาโนเมตร

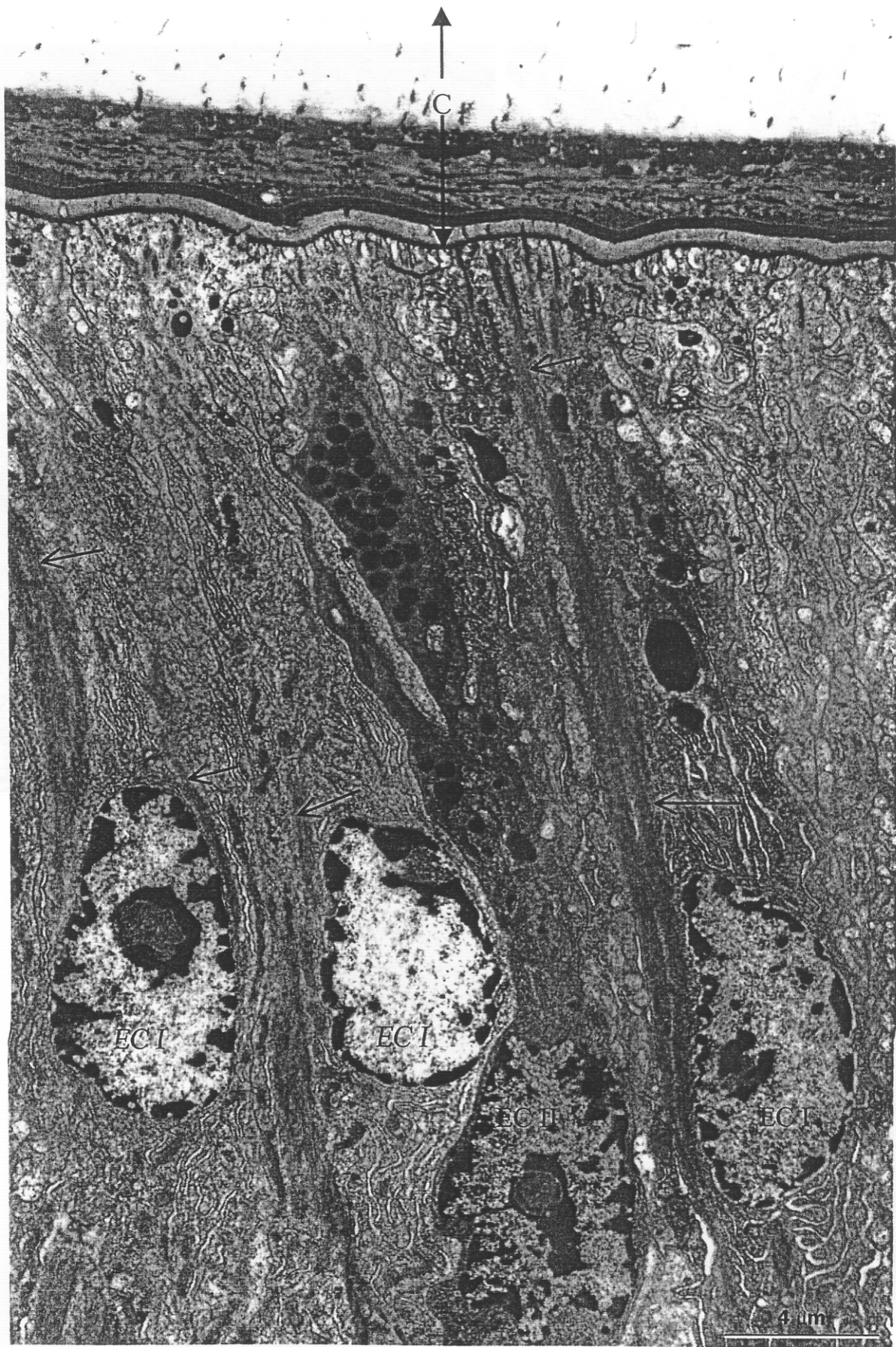
เพื่อนำมาศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Jeol JEM-100 CX II) รูปถ่ายแสดงโครงสร้างภายในของเซลล์ในภาพรวม (a) บริเวณไดนิวเคลียส (b) และ บริเวณยอดของเซลล์ (c) รูป d แสดงกลุ่มเม็ดทึบแสงอิเล็กตรอนที่อยู่ใกล้กับแองเงอเลียด อักษร BS = basal space; C = cuticle; E = epidermis; F = micro-fibers; G = electron-dense granules; H = haemocyte; HS = haemolymphatic space; IS = intercellular space; N = nucleus; RER = rough endoplasmic reticulum, \* = cytoplasmic protusion ความยาวเส้นอัตราส่วนตามกำหนดในแต่ละรูป

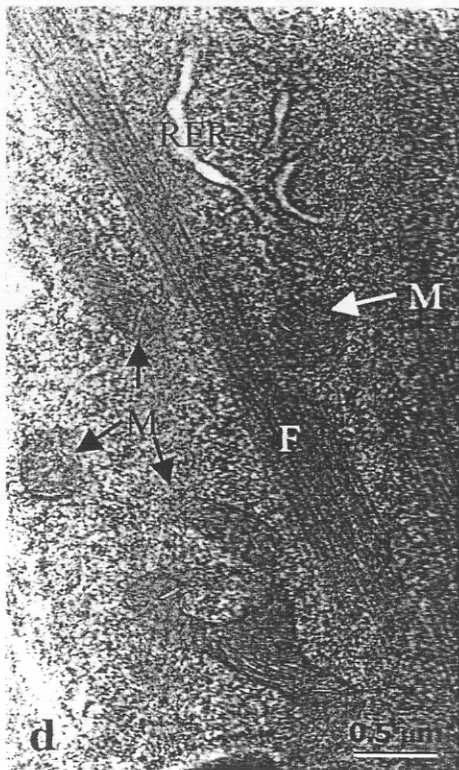
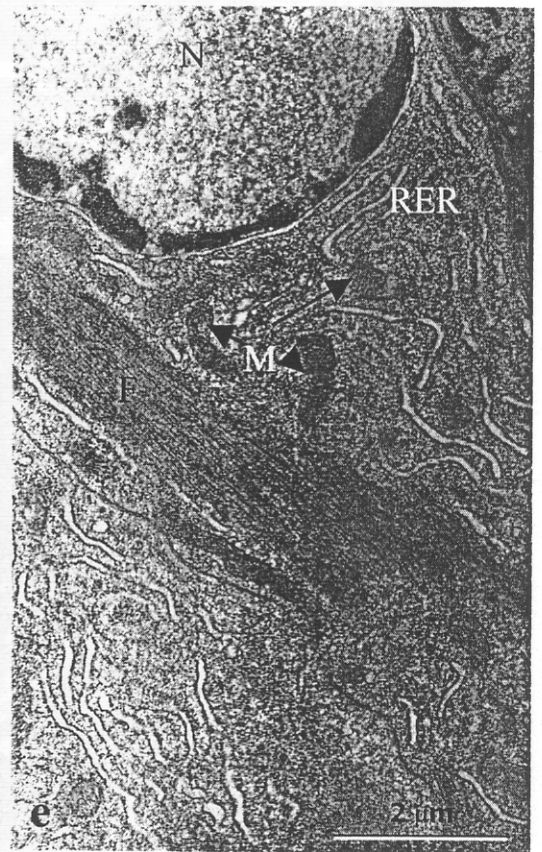
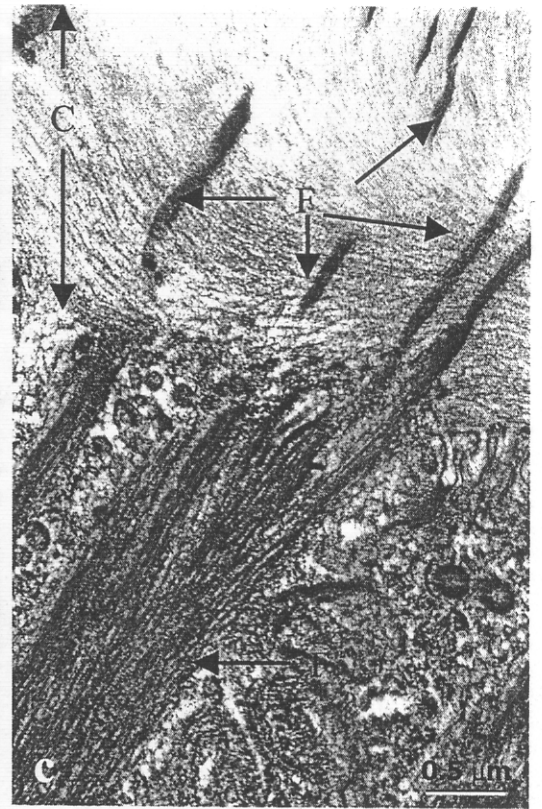
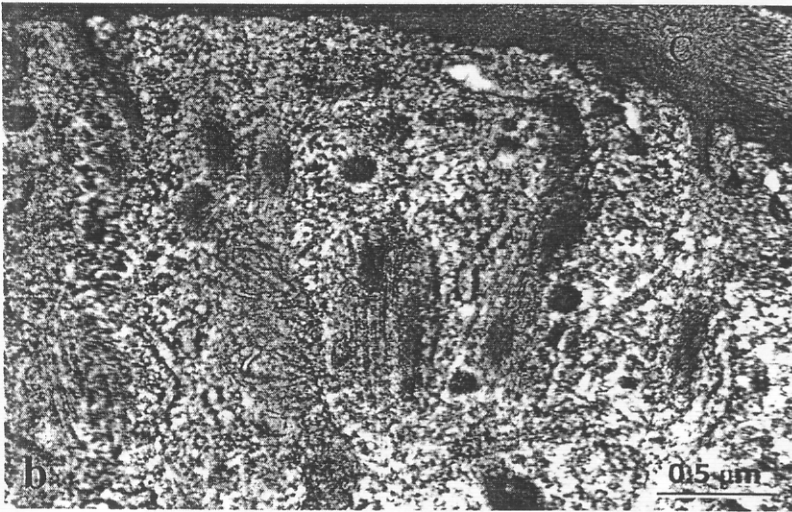
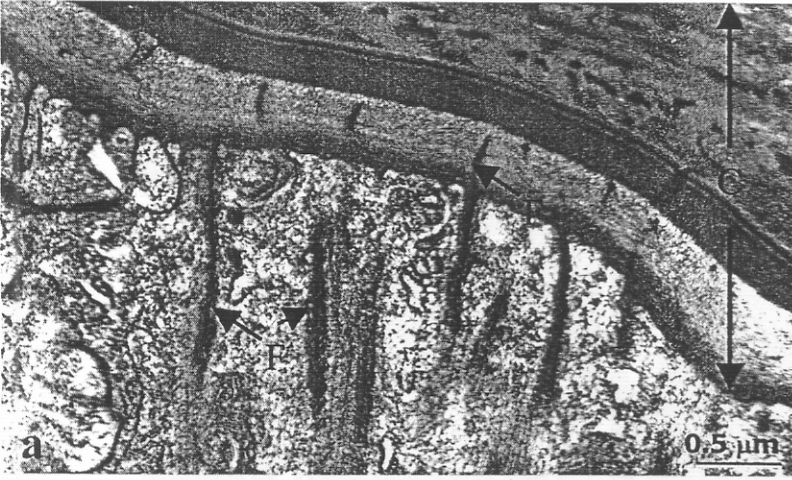
### รูปที่ 11 โครงสร้างอย่างละเอียดของ epidermal cell type I ในระยะ A

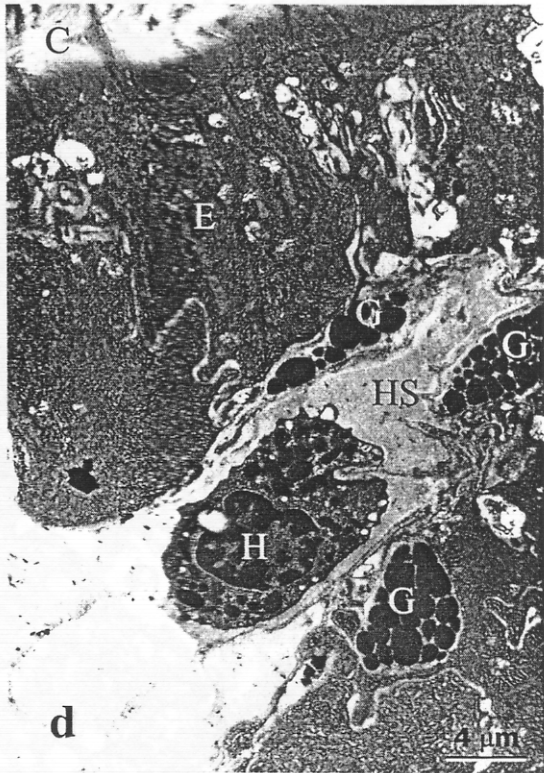
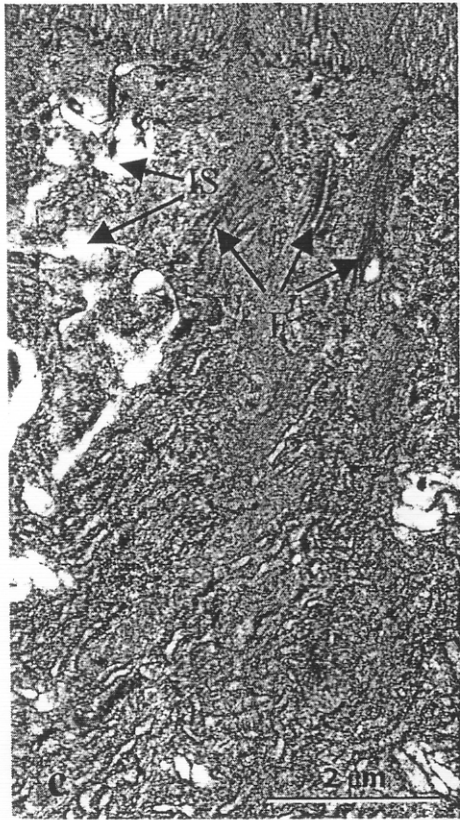
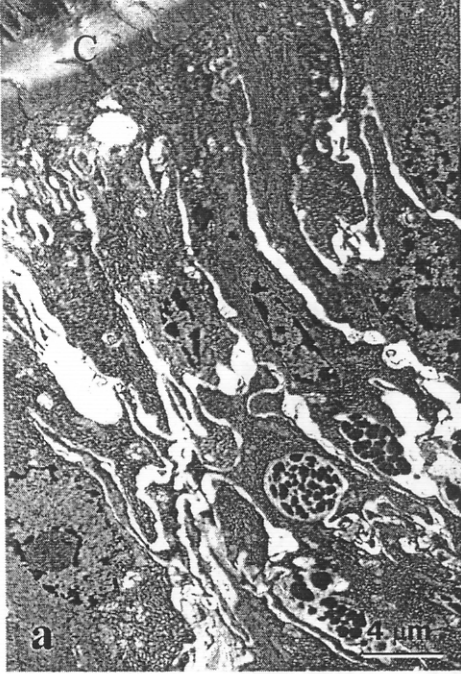
เนื้อเยื่อผิวหนังกึ่งกลาดำในระยะ A ถูกนำมารักษาสภาพโดยแช่ในน้ำยา 2.5% glutaraldehyde และ 4% paraformaldehyde เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนที่จะนำมาผ่านกระบวนการทางเนื้อเยื่อวิทยา และรักษาเนื้อเยื่อไว้ในพลาสติก เนื้อเยื่อถูกนำมาตัดด้วยเครื่องตัด ultra-microtome (MTXL, RMC) ให้มีความหนา 60 - 90 นาโนเมตร

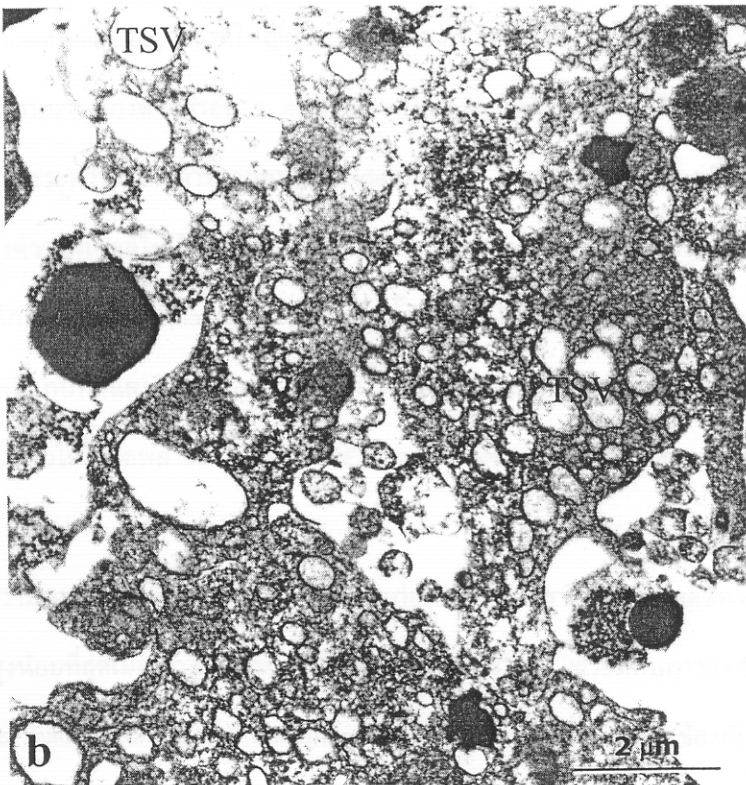
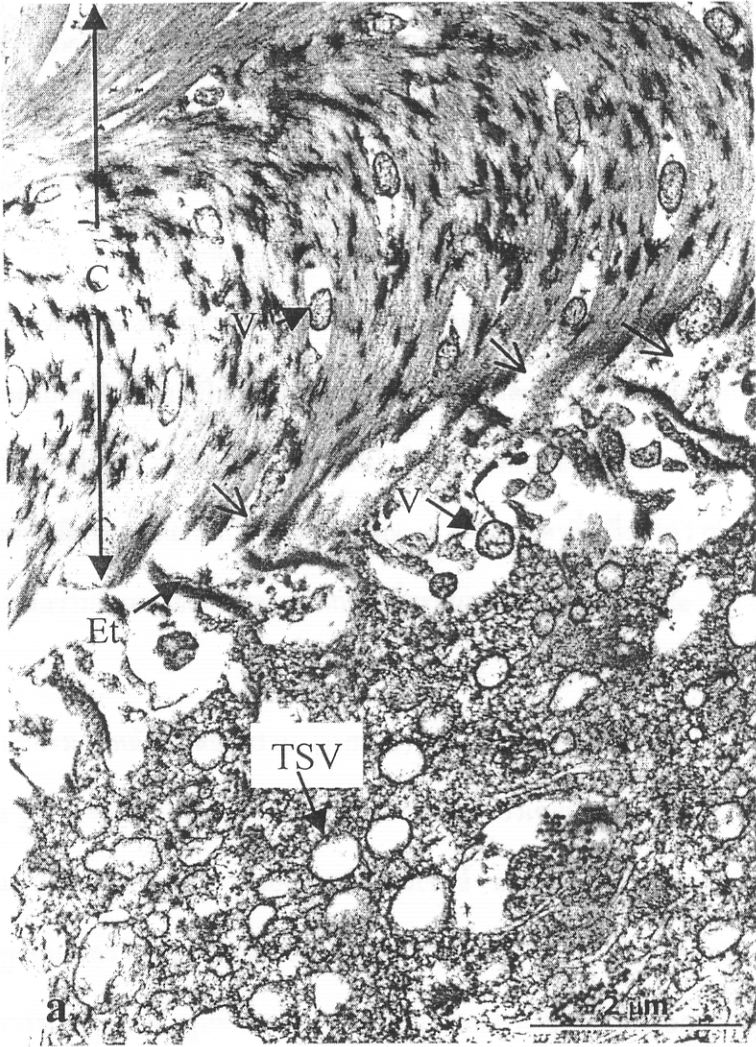
เพื่อนำมาศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Jeol JEM-100 CX II) รูปถ่ายแสดงโครงสร้างภายในของเซลล์บริเวณยอดของเซลล์ (a) และ บริเวณเหนือนิวเคลียส (b) อักษร C = cuticle; Et = cell extension; TSV = electron translucent secretory vesicles; V = secretory vesicle; หัวลูกศรชี้ paths connecting between apical space and cuticle ความยาวเส้นอัตราส่วนตามกำหนดในแต่ละรูป

รูปที่ 8









หลังการลอกคราบใหม่ ๆ (ระยะ A) epidermal cell type I ยังคงมีรูปร่างยาว ภายในไซโตพลาสซึมมี free ribosomes และเม็ด electron-translucent vesicles เป็นจำนวนมาก (รูปที่ 11b) ซึ่งพบมากบริเวณด้านยอดของเซลล์ การพบเม็ด electron-dense vesicles มีจำนวนลดลง ส่วนยอดของเซลล์ มีส่วนที่ยื่นยาวออกไปมีลักษณะคล้ายนิ้วมือ (cytoplasmic extensions) วางตัวอยู่ในช่องว่างที่เกิดขึ้นระหว่างเซลล์กับเปลือกที่สร้างขึ้นมาใหม่ (apical space) (รูปที่ 11a) ซึ่งเป็นลักษณะที่ไม่เคยปรากฏในระยะก่อนการลอกคราบมาก่อน ภายในช่องว่างดังกล่าว พบเม็ด secretory vesicles ที่มีความทึบแสงอิเล็กตรอนปานกลาง ขนาดต่าง ๆ สะสมอยู่เป็นจำนวนมาก ซึ่งยังพบเม็ดที่มีลักษณะคล้ายกันนี้ ผิงตัวอยู่ในเปลือกที่สร้างขึ้นมาใหม่ และเม็ดดังกล่าวยังมีลักษณะคล้ายคลึงกับเม็ดที่พบในไซโตพลาสซึมของเซลล์ด้วย เว้นเสียแต่เม็ดที่พบในไซโตพลาสซึมของเซลล์มีความโปร่งแสงอิเล็กตรอนมากกว่า นอกจากนี้ยังพบช่องเล็กของเปลือกที่เปิดติดต่อกับ apical space (สรชี้) ซึ่งคาดว่าช่องทางนี้เป็นทางที่ เม็ด secretory vesicles ที่มีความทึบแสงอิเล็กตรอนปานกลางที่สะสมอยู่ใน apical space ถูกนำเข้าไปสะสมภายในเปลือก

ในระยะปลายของระยะหลังการลอกคราบ (ระยะ B) รูปร่างของ epidermal cell type I มีลักษณะเป็นหยักๆ และไม่แน่นอน รูปร่างของนิวเคลียส เปลี่ยนแปลงตามรูปร่างของเซลล์ (รูปที่ 12a) ยังคงพบกลุ่ม micro-fibers อยู่เป็นจำนวนมากในไซโตพลาสซึม ช่องว่างระหว่างเซลล์ และช่องว่างระหว่างเซลล์กับเปลือกยังคงกว้าง ช่องว่างระหว่างเซลล์ดูแคบลงกว่าในระยะปลายของระยะก่อนการลอกคราบ มี cytoplasmic extensions จำนวนมากยื่นเข้าไปในช่องว่างระหว่างเซลล์ (รูปที่ 12b) และช่องว่างระหว่างเซลล์กับเปลือก พบเม็ดโปร่งแสงอิเล็กตรอน (electron-translucent vesicles) ขนาดใหญ่บริเวณยอดของเซลล์ใกล้กับช่องว่างทั้งสอง นอกจากนี้ยังพบว่ามีไมโทคอนเดรียเป็นจำนวนมากเรียงตัวอยู่รอบ ๆ electron-translucent vesicles อีกด้วย (รูปที่ 12a, c)

เมื่อเข้าสู่ระยะระหว่างวงจรการลอกคราบ epidermal cell type I มีขนาดเล็ก เตี้ย รูปร่างแปลก ๆ และไม่แน่นอน การจัดเรียงตัวของเซลล์ไม่เป็นระเบียบ (รูปที่ 13b) ช่องว่างระหว่างเซลล์ยังคงกว้างและคดเคี้ยว ด้านยอดของเซลล์ที่เคยมีลักษณะเป็น cytoplasmic extensions นั้นได้หายไป ทำให้เห็นยอดของเซลล์แนบชิดกับเปลือก (รูปที่ 13a) และเกิดมีแถบที่ทึบแสงอิเล็กตรอนวางตัวขนานอยู่ระหว่างเซลล์กับเปลือก (รูปที่ 13b) กลุ่ม micro-fibers ยังคงมีอยู่ทั่วไปภายในไซโตพลาสซึม ปริมาณ RER, mitochondria และ secretory vesicles และ granules ลดลงมาก

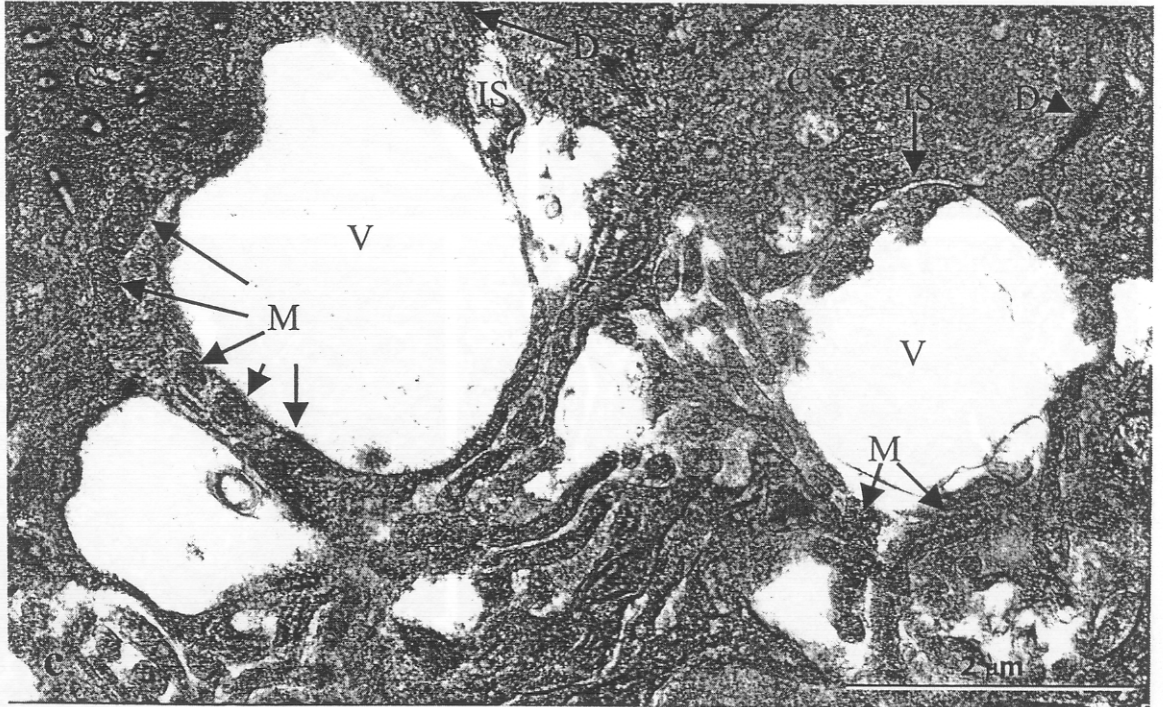
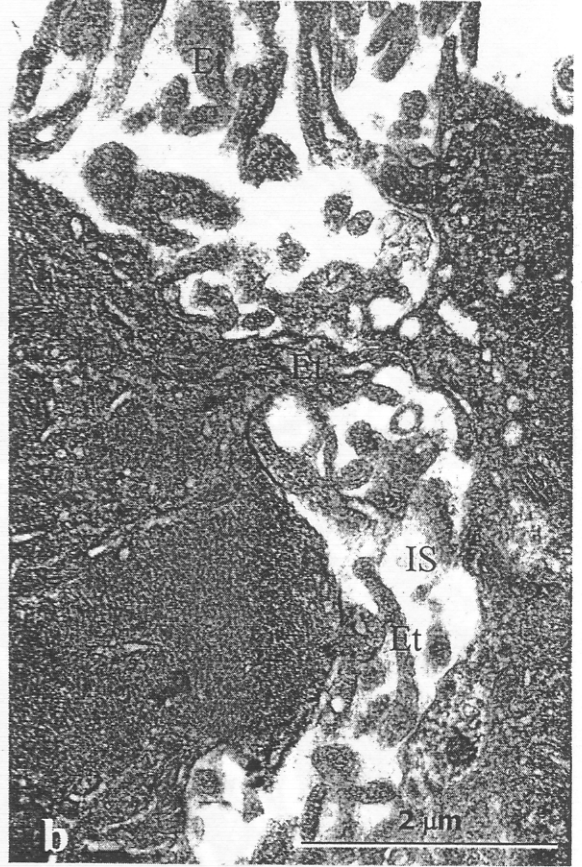
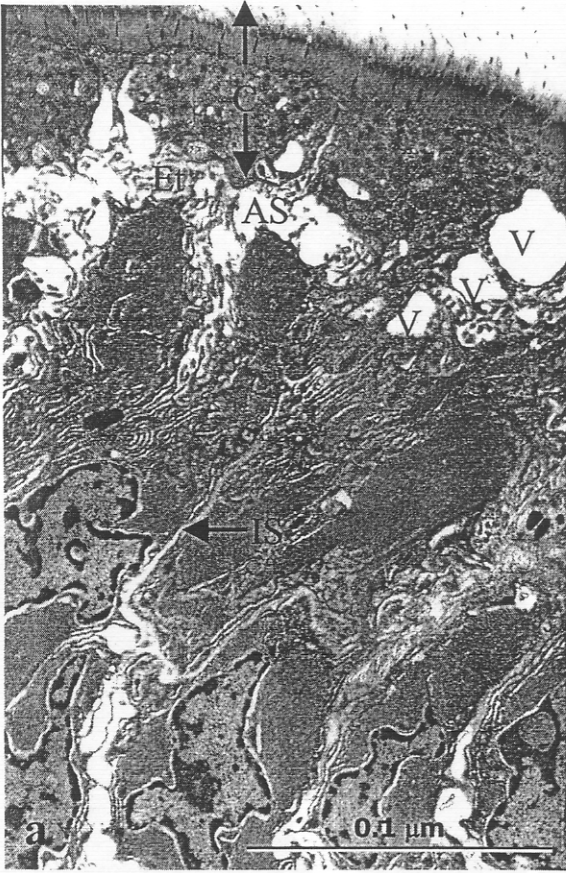
การที่เซลล์มีความสูงมากที่สุดในระยะปลายของระยะก่อนการลอกคราบ มีการลดความสูงลงหลังการลอกคราบ และมีความสูงน้อยที่สุดเมื่อเข้าสู่ระยะระหว่างวงจรการลอกคราบ พร้อมกับการลดจำนวนลงของ free ribosomes, RER และ mitochondria บ่งชี้ว่า epidermal cell type I มีหน้าที่หลักเกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีนและ

พลังงานตลอดการดำเนินไปของวงจรการลอกคราบ การสร้างโปรตีนและพลังงานเกิดขึ้นมากที่สุดในช่วงกลางของระยะก่อนการลอกคราบไปจนถึงช่วงหลังการลอกคราบใหม่ ๆ และเกิดขึ้นน้อยที่สุดเมื่อเปลือกมีการสร้างเสร็จสมบูรณ์ การปรากฏของเส้นใย micro-fibers และ secretory vesicles และ granules เป็นจำนวนมากในไซโตพลาสซึม ทำให้ยิ่งเชื่อได้ว่าเป็นผลผลิตโปรตีนที่สร้างจาก epidermal cell type I และพลังงานที่ได้จาก mitochondria จะช่วยในการขับเคลื่อน เส้นใย micro-fibers และ secretory vesicles และ granules เหล่านี้

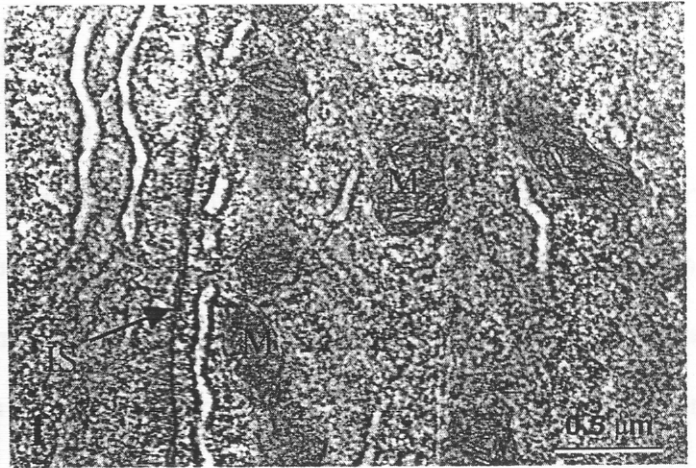
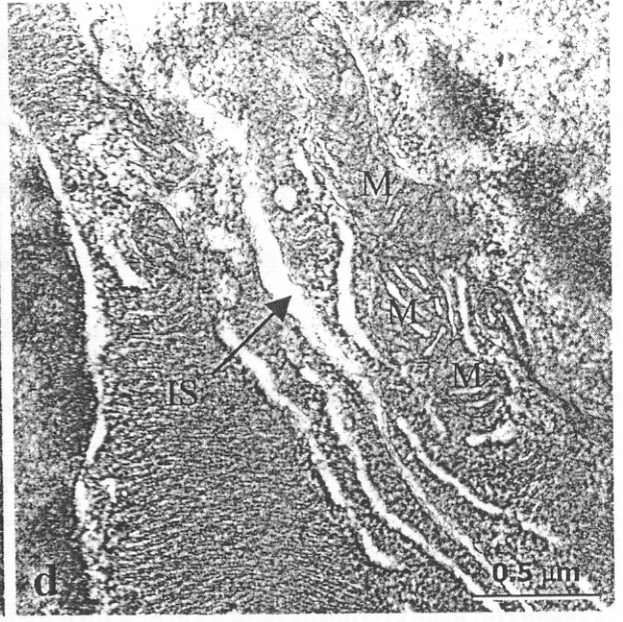
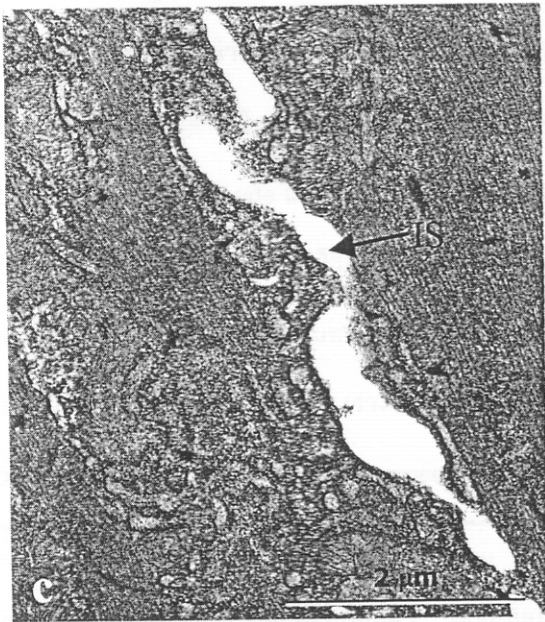
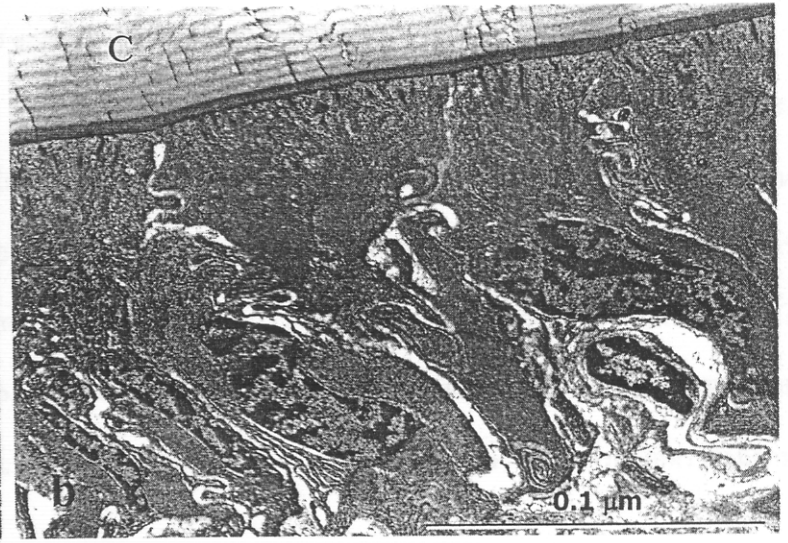
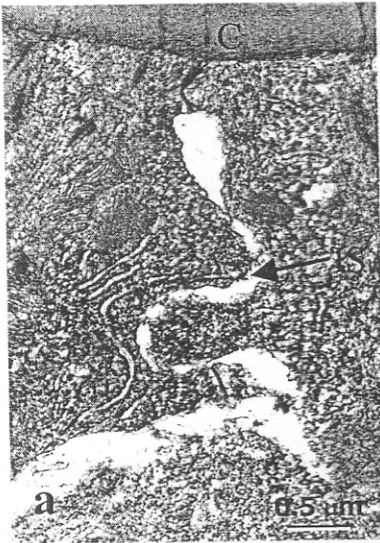
การปรากฏของ euchromatic nucleus ในทุกระยะของวงจรการลอกคราบบ่งบอกว่า epidermal cell type I มีการทำงานตลอดเวลาไม่เว้นแม้ในระยะเวลาว่างวงจรการลอกคราบ ซึ่งอาจเป็นช่วงเวลาเซลล์มีการเตรียมตัวเพื่อการเข้าสู่การลอกคราบครั้งต่อไป

วิธีการสร้างเปลือกก่อนการลอกคราบ (pre-ecdysial cuticle) และ เปลือกหลังการลอกคราบ (post-ecdysial cuticle) มีความแตกต่างกัน เปลือกที่สร้างก่อนการลอกคราบ (pre-ecdysial cuticle) นั้นสร้างจากเส้นใย micro-fibers ที่ทอดตัวจากไซโตพลาสซึมของเซลล์ผ่านเข้าไปในเปลือกโดยตรง และ electron-dense vesicles ที่เกิดจากการ exocytosis เข้าไปในเปลือก ส่วนเปลือกที่สร้างหลังการลอกคราบ (post-ecdysial cuticle) นั้น สร้างจาก electron-translucent vesicles ที่สร้างโดยเซลล์และเกิดการ exocytosis ผ่านส่วนยอดของเซลล์และ cytoplasmic extensions เข้าไปสะสมในช่องว่างระหว่างเซลล์และเปลือก ซึ่งในระหว่างที่อยู่ในช่องว่างนี้ electron-translucent vesicles อาจได้รับการผสมกับสารชนิดอื่นที่สะสมอยู่ในช่องว่างนี้อยู่แล้ว เช่น กลีโคแคลเซียม จึงทำให้อัตลักษณ์ของ vesicles มีความทึบแสงอิเล็กตรอนมากขึ้นก่อนที่จะค่อย ๆ กลายเป็นส่วนหนึ่งของเปลือก โดยมีทางเข้าเป็นช่องทางเล็ก ๆ บริเวณขอบล่างของเปลือกที่สร้างขึ้นใหม่ การเกิด cytoplasmic extensions ในระยะนี้ทำให้เชื่อได้ว่าเซลล์มีการหลั่ง secretory vesicles เป็นจำนวนมากศาลจึงจำเป็นต้องมีการเพิ่มพื้นที่ผิวให้เพียงพอ

ลักษณะการเกิดช่องว่างและการยื่นส่วนของเซลล์เข้าไปในช่องว่างคล้าย ๆ กันนี้ได้เคยพบในเนื้อเยื่อบุผิวที่พบใน anterior sternum ของ terrestrial isopod *Porcellio scaber* (Ziegler, 1996) ซึ่งคาดว่าน่าจะเกี่ยวข้องกับ การแลกเปลี่ยนสารอินทรีย์ เช่น แคลเซียมคาร์บอเนต และ สารอินทรีย์ ระหว่างเปลือกและเซลล์เนื้อเยื่อบุผิว (Roer and Dillaman, 1984; Machado et al., 1990; Compere et al., 1993; Ziegler, 1996; Hagedorn and Ziegler, 2002; Pratoomchat et al., 2002a) การเคลื่อนย้ายของสารเหล่านี้ อาจเกิดได้โดยการแทรกผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์บุผิว และ/หรือ การซึมผ่านเซลล์เนื้อเยื่อบุผิว (Ziegler, 1996; Wheatly et al., 2002; Ahearn et al., 2004; Luquet and Marin 2004) เพื่อผ่านไปยังแองเงอเลอิตที่อยู่ข้างใต้ชั้นของเซลล์เนื้อเยื่อบุผิว ได้มีการค้นพบเพิ่มเติมว่า โปรตีนที่ชื่อว่า orchestin ซึ่งเป็นฟอสโฟโปรตีนที่มีคุณสมบัติในการจับกับแคลเซียม มีการกระจายอยู่ภายใน







## รูปที่ 12 โครงสร้างอย่างละเอียดของ epidermal cell type I ในระยะ B

เนื้อเยื่อผิวหนังกึ่งกลาดำในระยะ B ถูกนำมารักษาสภาพโดยแช่ในน้ำยา 2.5% glutaraldehyde และ 4% paraformaldehyde เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนที่จะนำมาผ่านกระบวนการทางเนื้อเยื่อวิทยา และรักษาเนื้อเยื่อไว้ในพลาสติก เนื้อเยื่อถูกนำมาตัดด้วยเครื่องตัด ultra-microtome (MTXL, RMC) ให้มีความหนา 60 - 90 นาโนเมตร เพื่อนำมาศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Jeol JEM-100 CX II) รูปถ่ายแสดงโครงสร้างภายในของเซลล์ทั้งเซลล์ (a) และ บริเวณยอดของเซลล์ (b, c) อักษร AS = apical space; C = cuticle; D = desmosome; Et = cell extension; IS = intercellular space; M = mitochondria; V = secretory vesicle ความยาวเส้นอัตราส่วนตามกำหนดในแต่ละรูป

## รูปที่ 13 โครงสร้างอย่างละเอียดของช่องว่างระหว่างเซลล์ผิวหนังในระยะต่าง ๆ ของการลอกคราบ

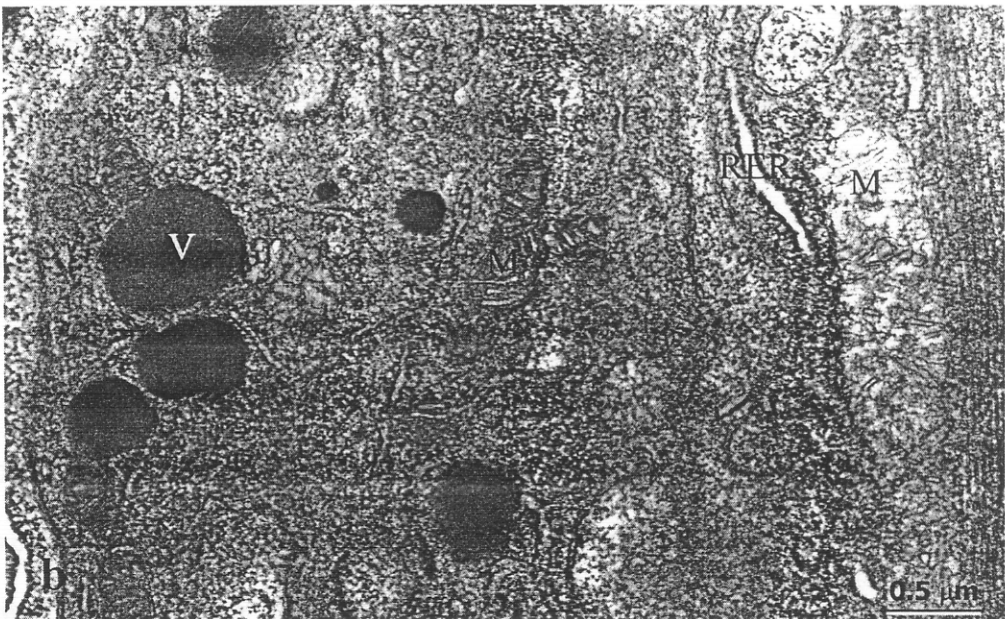
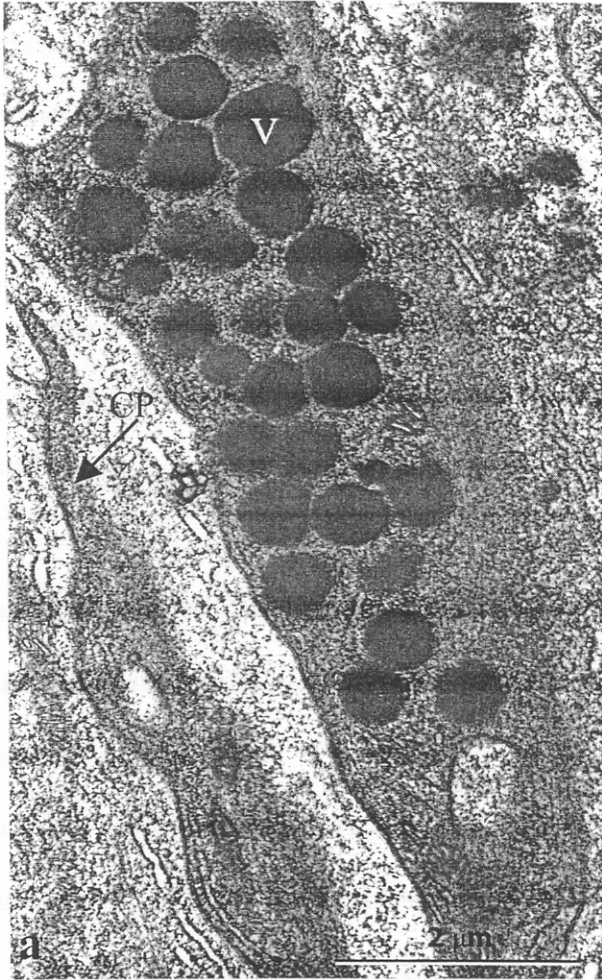
เนื้อเยื่อผิวหนังกึ่งกลาดำในระยะ intermolt (a, b) D4 (c) B (d) และ D2 (e, f) ถูกนำมารักษาสภาพโดยแช่ในน้ำยา 2.5% glutaraldehyde และ 4% paraformaldehyde เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนที่จะนำมาผ่านกระบวนการทางเนื้อเยื่อวิทยา และรักษาเนื้อเยื่อไว้ในพลาสติก เนื้อเยื่อถูกนำมาตัดด้วยเครื่องตัด ultra-microtome (MTXL, RMC) ให้มีความหนา 60 - 90 นาโนเมตร เพื่อนำมาศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Jeol JEM-100 CX II) รูปถ่ายเปรียบเทียบโครงสร้างของช่องว่างระหว่างเซลล์ผิวหนังในระยะต่าง ๆ ของการลอกคราบ อักษร C = cuticle; D = desmosome; IS = intercellular space; M = mitochondria ความยาวเส้นอัตราส่วนตามกำหนดในแต่ละรูป

เซลล์และในช่องว่างระหว่างเซลล์เยื่อผิวหนัง ซึ่งข้อมูลนี้ยังทำให้น่าเชื่อได้ว่า แคลเซียมมีการขนส่งผ่านเซลล์และช่องว่างระหว่างเซลล์เยื่อผิวหนังจริงโดย orchestin มีส่วนเกี่ยวข้องในการจับกับแคลเซียม (Hecker et al., 2004)

นอกจากนี้ในการทดลองกับกึ่งกลาดำยังพบกลุ่มของเม็ดทึบแสงอิเล็กตรอนบรรจุอยู่ในช่องว่างระหว่างเซลล์ในระยะปลายของระยะก่อนการลอกคราบ ขณะนี้ยังไม่ทราบแน่ชัดว่ากลุ่มของเม็ดทึบแสงอิเล็กตรอนดังกล่าวคืออะไร และมีส่วนสัมพันธ์กับวงจรการลอกคราบอย่างไร แต่สามารถสันนิษฐานได้ว่ากลุ่มของเม็ดทึบแสงอิเล็กตรอนนี้อาจเป็นเม็ดสี สารอินทรีย์ หรือ สารอินโด ที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับแองเจลิค นอกจากนี้ยังมีการเกิดช่องว่างอื่น ๆ รอบเซลล์เนื้อเยื่อผิวหนัง โดยพบว่า ช่องว่างระหว่างเซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังกว้างขึ้น ตั้งแต่ระยะปลายของระยะก่อนการลอกคราบ หลังการลอกคราบ ไปจนถึงระยะระหว่างวงจรการลอกคราบ และช่องว่างใต้เซลล์ผิวหนังกว้างขึ้นในระยะปลายของระยะก่อนการลอกคราบ ซึ่งการเกิดช่องว่างเหล่านี้ น่าจะเกี่ยวข้องกับการแลกเปลี่ยนสารอินทรีย์ และ สารอินทรีย์ระหว่างเปลือกและเซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังด้วยเช่นกัน

ในการทดลองนี้ไม่ได้ทำการศึกษาลักษณะของ epidermal cell type II สัมพันธ์กับวงจรการลอกคราบ เนื่องจากว่าไม่สามารถพบ epidermal cell type II ได้ในตัวอย่างทุกชิ้น แต่อย่างไรก็ตามเราพบว่าในระยะต้นของระยะก่อนการลอกคราบ epidermal cell type II มีรูปร่างสูงยาวคล้ายกับ epidermal cell type I แต่มีโครงสร้างภายในเซลล์ที่แตกต่างจาก epidermal cell type I epidermal cell type II มีนิวเคลียสทรงรีและโปร่งแสงอิเล็กตรอน มีเส้นใยโครมาตินกระจายตามขอบของนิวเคลียส ภายในไซโทพลาสซึมมีความหนาแน่นมากกว่า type I เนื่องจากมี free ribosomes เป็นจำนวนมาก (รูปที่ 14b) เซลล์นี้มีลักษณะพิเศษคือมีเม็ดทึบแสงอิเล็กตรอน (electron dense vesicles) ขนาดใหญ่ บรรจุอยู่เกือบเต็มเซลล์โดยเฉพาะบริเวณยอดของเซลล์ ด้านยอดของเซลล์(ด้านที่ติดกับเปลือก) ปรากฏเป็นส่วนของเซลล์ยื่นออกไปคล้ายขาชง (cytoplasmic processes) (รูปที่ 8, 14a) จากลักษณะที่ปรากฏนี้สามารถคาดเดาว่า เซลล์นี้น่าจะมีหน้าที่หลักคือการผลิตโปรตีน ซึ่งปรากฏอยู่ในรูปของเม็ดทึบแสงอิเล็กตรอนขนาดต่าง ๆ และส่วนของ cytoplasmic processes น่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องในการลำเลียงโปรตีนเหล่านี้ออกจากเซลล์ และเป็นส่วนที่ยื่นสอดแทรกเข้าไปภายในเปลือกกึ่งดงที่ปรากฏในภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา (รูปที่ 6c) ภายในเซลล์ชนิดนี้ไม่พบเส้นใย micro-fibers ซึ่งน่าจะเป็นสาเหตุทำให้เซลล์นี้ไม่สามารถย้อมติดสีของ Masson' trichrome ได้ หากประมวลลักษณะที่พบทั้งจากกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนเข้าด้วยกัน สามารถสรุปได้ว่า epidermal cell type II เป็นเซลล์ที่ผลิตทั้งคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนเพื่อการนำไปสร้างเปลือกใหม่ คาร์โบไฮเดรตและโปรตีนที่ผลิตขึ้นอาจจะอยู่ในรูปไกลโคโปรตีนดังพบในเปลือกชั้น epicuticle ที่ย้อมติดสีทั้งโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต

สามารถสรุปผลการศึกษาได้ว่า การเปลี่ยนแปลงของ โครงสร้างในไซโทพลาสซึม วิธีการหลั่งสาร ความกว้างของช่องว่างระหว่างเซลล์ และส่วนยื่นของเซลล์ ในระยะก่อนและหลังการลอกคราบ บ่งชี้ว่า epidermal cells type I มีการเปลี่ยนแปลงการทำงานไปตามระยะต่าง ๆ ของวงจรการลอกคราบ ซึ่งมีผลทำให้เปลือกก่อนและหลังการลอกคราบมีคุณสมบัติที่ต่างกันไป ส่วน epidermal cell type II นั้นแม้ว่าขณะนี้จะยังไม่สามารถยืนยันได้ว่ามีส่วนสัมพันธ์กับการลอกคราบหรือไม่ แต่ก็น่าเชื่อว่าเป็นเซลล์ที่ผลิตคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนเพื่อเป็นส่วนหนึ่งของเปลือกใหม่



## รูปที่ 14 โครงสร้างอย่างละเอียดของ epidermal cell type II

เนื้อเยื่อผิวหนังกุ้งกุลาดำในระยะ D2 ถูกนำมารักษาสภาพโดยแช่ในน้ำยา 2.5% glutaraldehyde และ 4% paraformaldehyde เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนที่จะนำมาผ่านกระบวนการทางเนื้อเยื่อวิทยา และรักษาเนื้อเยื่อไว้ในพลาสติก เนื้อเยื่อถูกนำมาตัดด้วยเครื่องตัด ultra-microtome (MTXL, RMC) ให้มีความหนา 60 - 90 นาโนเมตร เพื่อนำมาศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Jeol JEM-100 CX II) รูปถ่ายแสดงโครงสร้างภายในของ epidermal cell type II บริเวณยอดของเซลล์ (a) และ บริเวณเหนือนิวเคลียส (b) อักษร CP = cytoplasmic process; M = mitochondria; RER = rough endoplasmic reticulum; V = secretory vesicles ความยาวเส้นอัตราส่วนตามกำหนดในแต่ละรูป

### 4. การศึกษาการแสดงออกของโปรตีนในภาพรวม (overview of protein expression) ของเนื้อเยื่อผิวหนัง (epidermis) ในระยะก่อนการลอกคราบ (pre molt) หลังการลอกคราบ (post molt) และระยะระหว่างวงจรการลอกคราบ (inter molt) ของกุ้งกุลาดำ

หลังจากที่ระยะของวงจรการลอกคราบได้รับการตรวจอย่างแน่ใจ โดยการใช้ลักษณะทางกายภาพ และลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาแล้ว เนื้อเยื่อผิวหนังจากบริเวณหัวของกุ้ง (carapace) ในระยะกลางของระยะก่อนการลอกคราบ (ระยะ D2) ระยะหลังการลอกคราบใหม่ๆ (ระยะ A) และระยะระหว่างวงจรการลอกคราบ (inter molt) ถูกนำมาสกัดให้ได้โปรตีนและนำมาแยกเป็นโปรตีนเดี่ยวด้วยระบบการแยกด้วยแผ่นวุ้นสองมิติ (two dimension electrophoresis, 2-DE) เพื่อให้ได้ภาพการแสดงออกของโปรตีนทั้งหมดที่มีอยู่ในเนื้อเยื่อผิวหนัง

#### 4.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยกโปรตีนด้วยแผ่นวุ้นสองมิติ

เป็นการทดลองเพื่อสร้างมาตรฐานของการแยกโปรตีนด้วยแผ่นวุ้นสองมิติ ซึ่งประกอบด้วยสองปัจจัยหลักคือ ระเบียบวิธีวิจัยที่เหมาะสม และ ปริมาณโปรตีนที่เหมาะสม การทดลองนี้ได้เริ่มทำในแผ่นวุ้นขนาดเล็ก (mini 2D SDS-PAGE) โดยใช้แผ่นวุ้นมิติที่หนึ่งขนาด 0.5 x 7 เซนติเมตร และแผ่นวุ้นมิติที่สองขนาด 9 x 10 เซนติเมตร โดยได้ทดลองใช้โปรตีนที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อผิวหนังของกุ้งกุลาดำในปริมาณ 30 40 และ 50 ไมโครกรัม แยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าในช่วง pH 3-10 ก่อนที่จะนำมาแยกอีกครั้งตามขนาดโมเลกุลและย้อมสีโปรตีนด้วยซิลเวอร์ไนเตรท (silver nitrate) ซึ่งภาพรวมของโปรตีน (protein map) ที่ได้ นั้น พบว่าแผ่นวุ้นที่ได้จากโปรตีนตั้งต้นปริมาณ 40 ไมโครกรัม จะให้ภาพรวมของโปรตีนที่ดีที่สุด แผ่นวุ้นที่ได้จากโปรตีนตั้งต้นปริมาณ 30 ไมโครกรัม ให้

ภาพเม็ดโปรตีนที่มีขนาดเล็กเกินไป และโปรตีนบางเม็ดขาดหายไป แม้ว่าพื้นหลังจะใสกว่า และแผ่นวันที่ได้จากโปรตีนตั้งต้นปริมาณ 50 ไมโครกรัม ให้ภาพเม็ดโปรตีนที่ใหญ่และหนาเกินไป และพื้นหลังก็ทึบจนบางตำแหน่งรบกวนเม็ดโปรตีน (รูปที่ 15)

การใช้โปรตีนตั้งต้นในปริมาณ 40 ไมโครกรัม จะได้ภาพรวมของโปรตีนที่ดีที่สุด ดังนั้นจึงใช้เป็นมาตรฐานในการตรวจสอบภาพรวมของโปรตีนในระยะต่างๆ ของวงจรการลอกคราบ

**4.2 การเปรียบเทียบภาพรวมของโปรตีนในเนื้อเยื่อผิวหนังของกิ้งกูดำในระยะก่อนการลอกคราบ (pre molt) หลังการลอกคราบ (post molt) และระยะระหว่างวงจรการลอกคราบ (inter molt) ของกิ้งกูดำ**

โปรตีนในปริมาณ 40 ไมโครกรัม ที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อผิวหนังจากบริเวณหัวของกิ้ง (carapace) ในระยะกลางของระยะก่อนการลอกคราบ (ระยะ D2) ระยะหลังการลอกคราบใหม่ๆ (ระยะ A) และระยะระหว่างวงจรการลอกคราบ (inter molt) ถูกนำมาแยกให้เป็นเม็ดโปรตีนเดี่ยวด้วยระบบ mini 2D SDS-PAGE แล้วนำภาพโปรตีนที่ได้มาเปรียบเทียบกัน เพื่อตรวจสอบความแตกต่างของการแสดงออกของภาพรวมของโปรตีนทั้งหมดที่มีอยู่ในเนื้อเยื่อผิวหนัง (รูปที่ 16) พบว่า โดยภาพรวมแล้ว ภาพของเม็ดโปรตีนของทั้ง 3 ระยะมีส่วนคล้ายคลึงกัน แต่เมื่อตรวจสอบให้ละเอียดมากขึ้นพบว่า โปรตีนหลายตำแหน่งมีความแตกต่างในการแสดงออกในทั้ง 3 ระยะ ตามที่กำหนดด้วยหมายเลข 1 - 6 ยกตัวอย่างเช่น เม็ดโปรตีนที่ 1 มีปริมาณการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นในระยะหลังการลอกคราบใหม่ๆ แต่มีปริมาณลดลงในช่วงระหว่างวงจรการลอกคราบ และก่อนการลอกคราบ

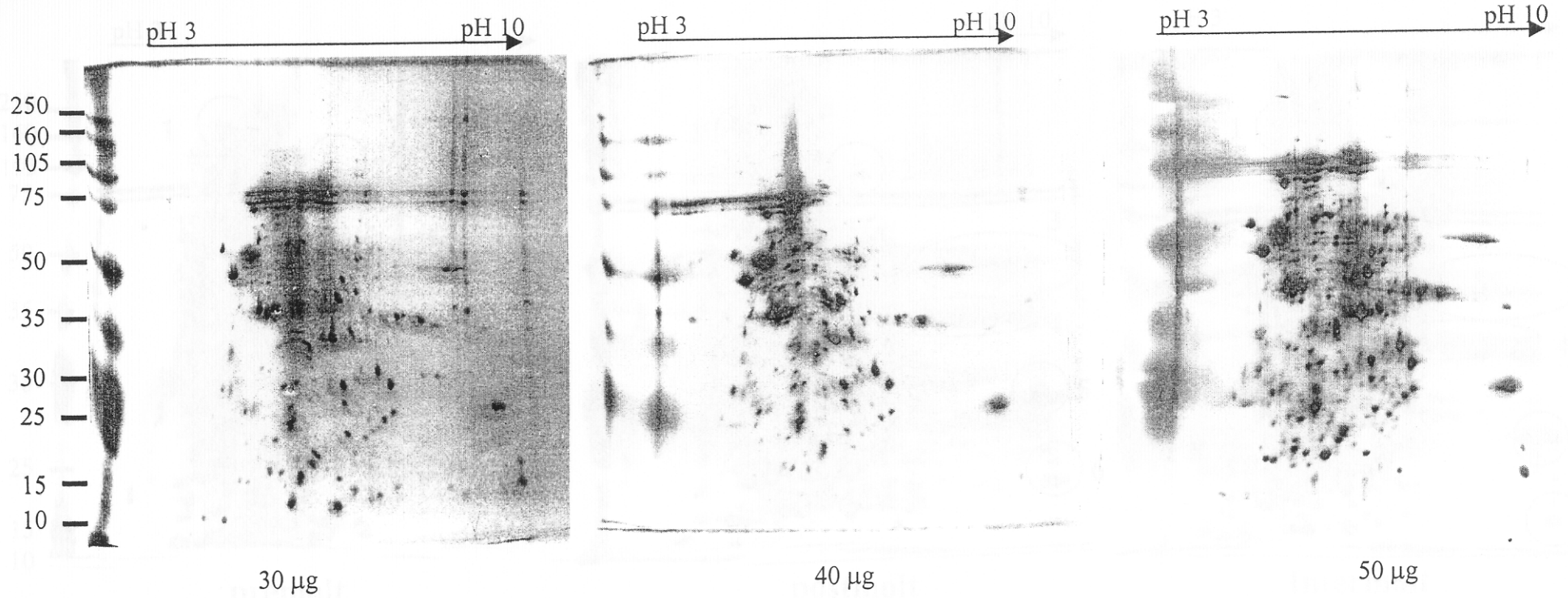
และเพื่อให้ทราบว่าเม็ดโปรตีนที่ 1 - 6 นั้นเป็นโปรตีนอะไร ดังนั้น จึงต้องนำเม็ดโปรตีนที่ 1 - 6 ไปวิเคราะห์หาคุณสมบัติของโปรตีนในขั้นตอนต่อไป

**5. การศึกษาคุณสมบัติของโปรตีน (identification of the proteins) ในเนื้อเยื่อผิวหนัง (epidermis) ที่มีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกตลอดการลอกคราบของกิ้งกูดำ**

### 5.1 การหา peptide mass fingerprints ของโปรตีน

เม็ดโปรตีนที่ 1 - 6 ที่ปรากฏบนแผ่นวันที่ ได้ถูกตัดออกมาแล้วส่งไปวิเคราะห์หา peptide mass fingerprints (PMF) ด้วยเครื่อง Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight Mass

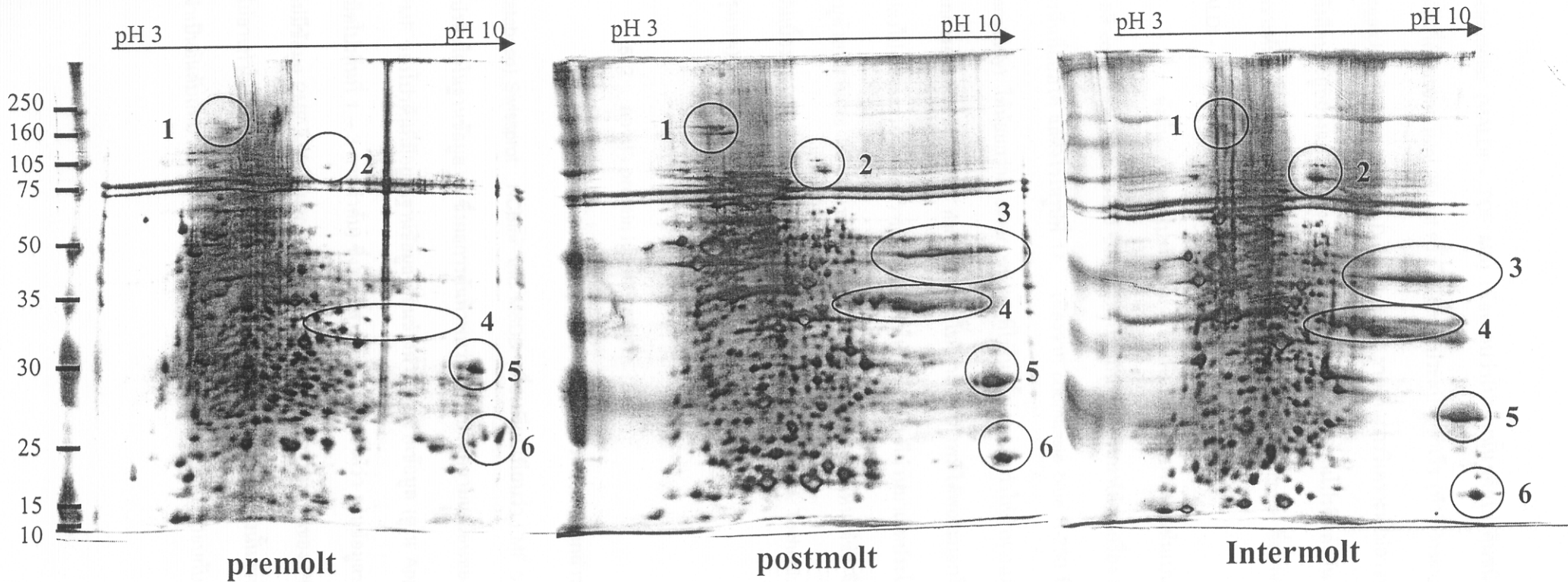
## รูปที่ 15



รูปที่ 15 ภาพเม็ดโปรตีนของเนื้อเยื่อผิวหนังโดยใช้ปริมาณตั้งต้นต่าง ๆ กัน และแยกบนแผ่นวุ้นขนาด 9 x 10 เซนติเมตร

โปรตีนในเนื้อเยื่อผิวหนังของกิ้งกูดดำ ในปริมาณ 30 40 และ 50 ไมโครกรัม ถูกนำมาแยกด้วยแผ่นวุ้นสองมิติ (2D SDS-PAGE) โดยที่แผ่นวุ้นมิติที่หนึ่งมีขนาด 0.5 x 7 เซนติเมตร และแผ่นวุ้นมิติที่สองมีขนาด 9 x 10 เซนติเมตร ก่อนที่โปรตีนจะถูกย้อมด้วย silver nitrate เม็ดโปรตีนที่ปรากฏมี pI อยู่ในช่วง 3 – 10 ด้านซ้ายของภาพเป็นแถบบอกขนาดของมวลโมเลกุล หน่วยเป็น กิโลดาลตัน (kD)

รูปที่ 16



รูปที่ 16 ภาพเม็ดโปรตีนของเนื้อเยื่อผิวหนังในระยต่าง ๆ ของวงจรการลอกคราบบนแผ่นวุ้นขนาด 9 x 10 เซนติเมตร ย้อมด้วย silver nitrate

โปรตีนในปริมาณ 40 ไมโครกรัม จากเนื้อเยื่อผิวหนังของกึ่งกุลาคำในระยะก่อนลอก (premolt) หลังลอก (postmolt) และ ระหว่างวงจรการลอกคราบ (intermolt) ถูกนำมาแยกด้วยแผ่นวุ้นสองมิติ (2D SDS-PAGE) โดยแผ่นวุ้นมิติที่หนึ่งมีขนาด 0.5 x 7 เซนติเมตร และแผ่นวุ้นมิติที่สองมีขนาด 9 x 10 เซนติเมตร ก่อนที่โปรตีนจะถูกย้อมด้วย silver nitrate เม็ดโปรตีนที่ปรากฏมี pI อยู่ในช่วง 3 - 10 ด้านซ้ายของภาพเป็นแถบบอกขนาดของมวลโมเลกุล หน่วยเป็น กิโลดาลตัน (kD) เม็ดโปรตีนที่วงกลมและระบุด้วยหมายเลข 1 - 6 เป็นเม็ดโปรตีนที่มีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกในทั้งสามระยะจากการสังเกตด้วยสายตา



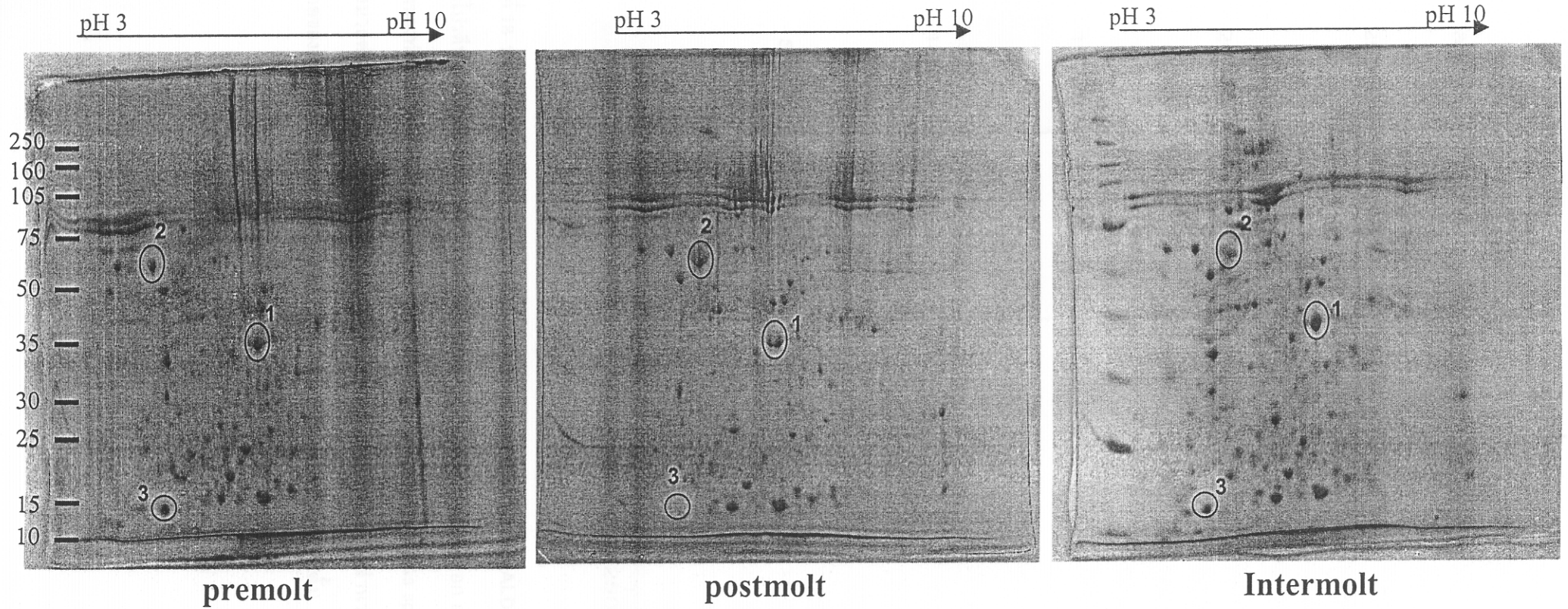
spectrometer (MALDI - TOF MS) เพื่อทราบว่าโปรตีนนั้นๆคือโปรตีนชนิดใด ผลการวิเคราะห์ PMF ของเม็ดโปรตีนที่ตัดมาจาก mini 2D gel ครั้งที่ 1 นั้นไม่ประสบผลสำเร็จ (ทำที่ Institute of Biomolecular and Biomedical Research, University College Dublin, Ireland) รายงานการวิเคราะห์นี้ไม่อาจทำให้เชื่อได้ว่าเป็น PMF ของโปรตีนที่กำลังศึกษาอยู่อย่างแท้จริง ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจาก 1) ปริมาณโปรตีนตั้งต้น (40 ไมโครกรัม) ไม่เพียงพอต่อการวิเคราะห์หา PMF และ 2) เม็ดโปรตีนถูกย้อมด้วย silver nitrate ซึ่งอาจทำให้เกิดการรบกวนการวิเคราะห์ของ MALDI - TOF MS ได้

ดังนั้นจึงได้แยกโปรตีนใหม่ โดยเพิ่มปริมาณโปรตีนตั้งต้นเป็น 100 ไมโครกรัม และย้อมเม็ดโปรตีนด้วยสี coomassie blue R-250 ซึ่งคาดว่าสามารถนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง MALDI - TOF MS ได้ดีกว่า ภาพเม็ดโปรตีนที่ย้อมได้ แสดงไว้ในรูปที่ 17 เนื่องจาก coomassie blue R-250 มีความสามารถในการย้อมสีเม็ดโปรตีน (sensitivity) ได้น้อยกว่าสี silver nitrate ที่ใช้ในครั้งแรก จึงทำให้จำนวนเม็ดโปรตีนที่ย้อมได้ลดลงกว่าภาพที่เกิดจากการย้อมด้วยสี silver nitrate อย่างไรก็ตามจากภาพที่ได้พอจะบอกได้ว่ามีเม็ดโปรตีนใดบ้างเกิดการเปลี่ยนแปลงไปตามวงจรการลอกคราบ และเพื่อทำให้การทำงานที่ผ่านมาเกิดประโยชน์สูงสุด ดังนั้นเม็ดโปรตีน 3 เม็ด ดังระบุด้วยหมายเลข 1 - 3 ในรูปที่ 17 ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงอย่างเห็นได้ชัด จึงถูกเลือกนำไปวิเคราะห์หา PMF ก่อนเป็นเบื้องต้น (ทำที่ Bioservice Unit, National Science and Technology Development Agency, NSTDA กรุงเทพฯ) และได้ผลการวิเคราะห์ดังรูปที่ 18 - 20 และ ตารางที่ 1

## 5.2 การหา protein identification

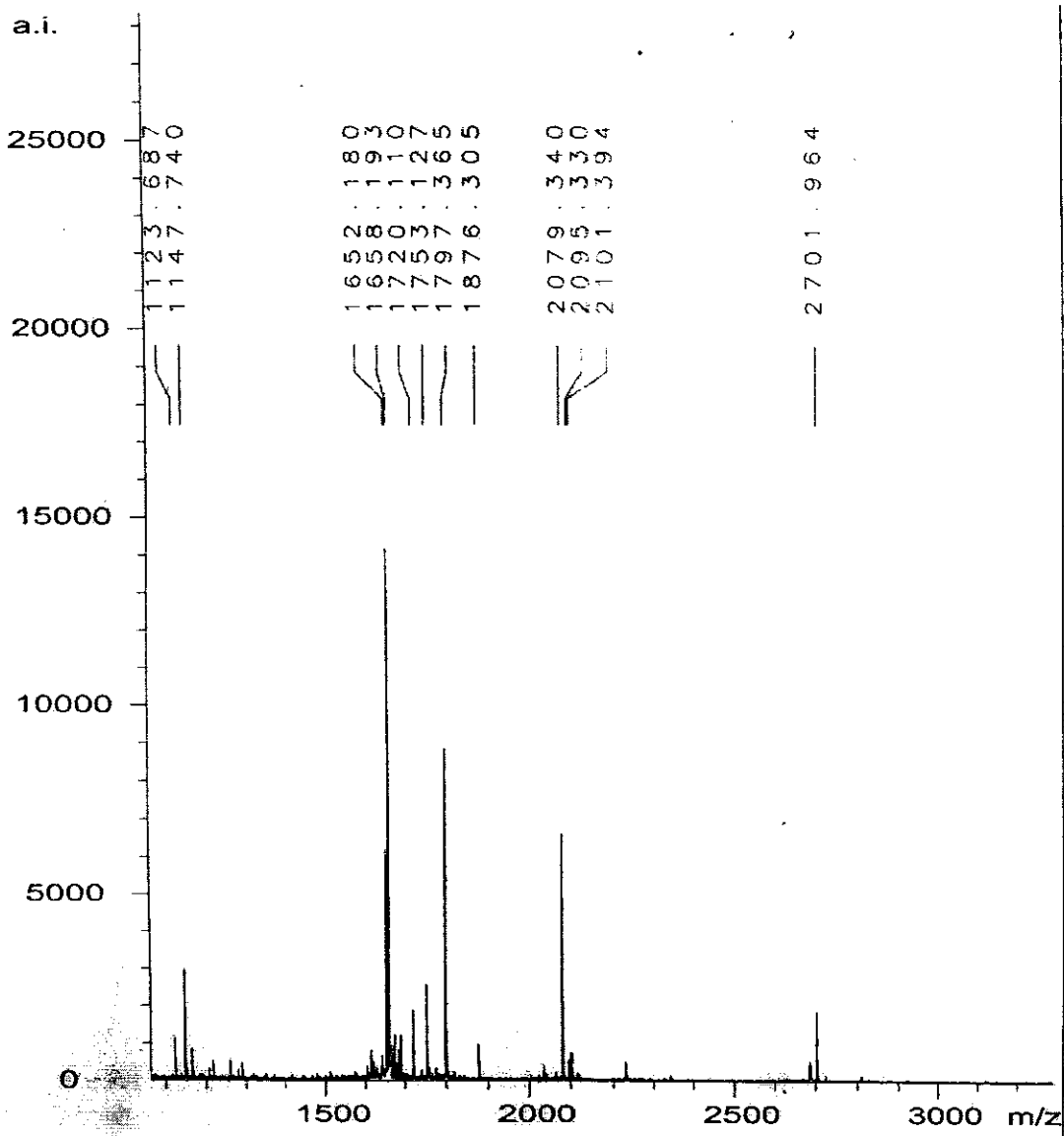
เมื่อทราบ PMF ของโปรตีนทั้ง 3 ชนิดแล้ว ตัวเลขดังกล่าวได้ถูกนำไปค้นหาในฐานข้อมูล (global database) Swissprot NCBI nr และ MSDB เพื่อเปรียบเทียบว่า PMF ของโปรตีนทั้ง 3 ชนิด ตรงกับ PMF ของโปรตีนใดในฐานข้อมูล ซึ่งผลการค้นหาพบว่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของ PMF ของโปรตีนทั้ง 3 ชนิดกับข้อมูล PMF ของโปรตีนที่มีอยู่ในฐานข้อมูล ก่อนข้างต่ำในทุกฐานข้อมูล (ดูใน Appendix I II และ III) สำหรับข้อมูลของเม็ดโปรตีนที่ 1 - 3 ตามลำดับ) ซึ่งตรงนี้สามารถวิเคราะห์ได้ว่า ฐานข้อมูลของกึ่งกุลาค่าที่มีอยู่ใน global database ไม่มีข้อมูล PMF จึงทำให้ผลการรายงานที่ได้มีเปอร์เซ็นต์การตรงกันของ PMF ต่ำ ซึ่งชื่อโปรตีนที่ได้รับจากรายงานไม่อาจทำให้มั่นใจได้ว่าเป็นโปรตีนที่กำลังสืบค้นอยู่อย่างแท้จริง ดังนั้นการทราบลำดับของกรดอะมิโนจึงเป็นความจำเป็นอันดับถัดมาในการหา protein identification เพื่อนำมาประกอบกับข้อมูล PMF

## รูปที่ 17



รูปที่ 17 ภาพเม็ดโปรตีนของเนื้อเยื่อผิวหนังในระยะต่าง ๆ ของวงจรการลอกคราบบนแผ่นวันขนาด 9 x 10 เซนติเมตร ย้อมด้วย coomassie blue R-250

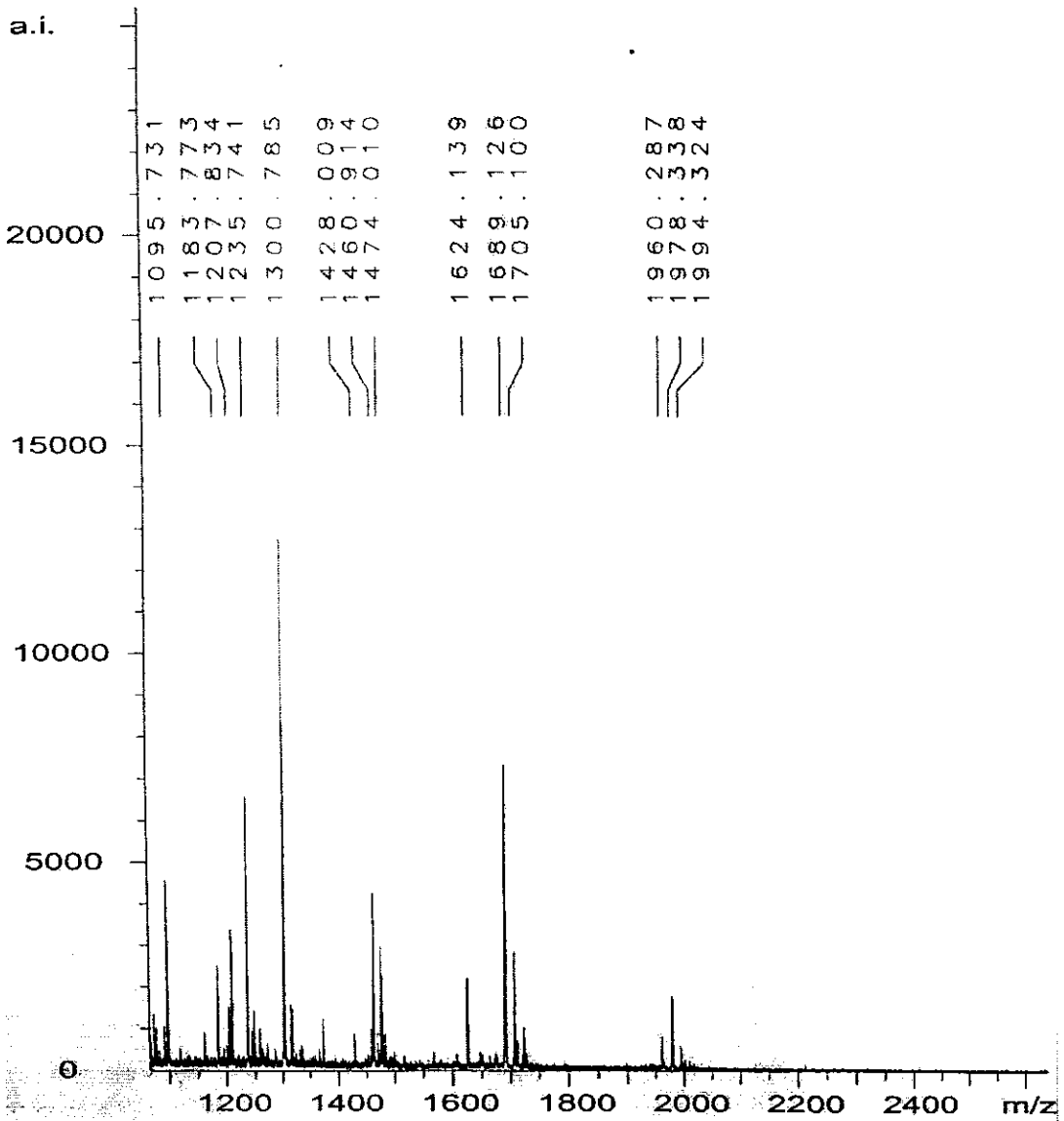
โปรตีนในปริมาณ 100 ไมโครกรัม จากเนื้อเยื่อผิวหนังของกิ้งก่าดำในระยะก่อนลอก (premolt) หลังลอก (postmolt) และ ระหว่างวงจรการลอกคราบ (intermolt) ถูกนำมาแยกด้วยแผ่นวันสองมิติ (2D SDS-PAGE) โดยแผ่นวันมิติที่หนึ่งมีขนาด 0.5 x 7 เซนติเมตร และแผ่นวันมิติที่สองมีขนาด 9 x 10 เซนติเมตร ก่อนที่โปรตีนจะถูกย้อมด้วย coomassie blue R-250 เม็ดโปรตีนที่ปรากฏมี pI อยู่ในช่วง 3 – 10 ด้านซ้ายของภาพเป็นแถบบอกขนาดของมวลโมเลกุล หน่วยเป็น กิโลดาลตัน (kD) เม็ดโปรตีนที่วงกลมและระบุด้วยหมายเลข 1 – 3 เป็นเม็ดโปรตีนที่มีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกในทั้งสามระยะจากการสังเกตด้วยสายตา



รูปที่ 18 ขนาดของท่อนเปปไทด์จากเมดโปรตีนที่ 1 วิเคราะห์โดยใช้ MALDI - TOF Mass Spectrometer

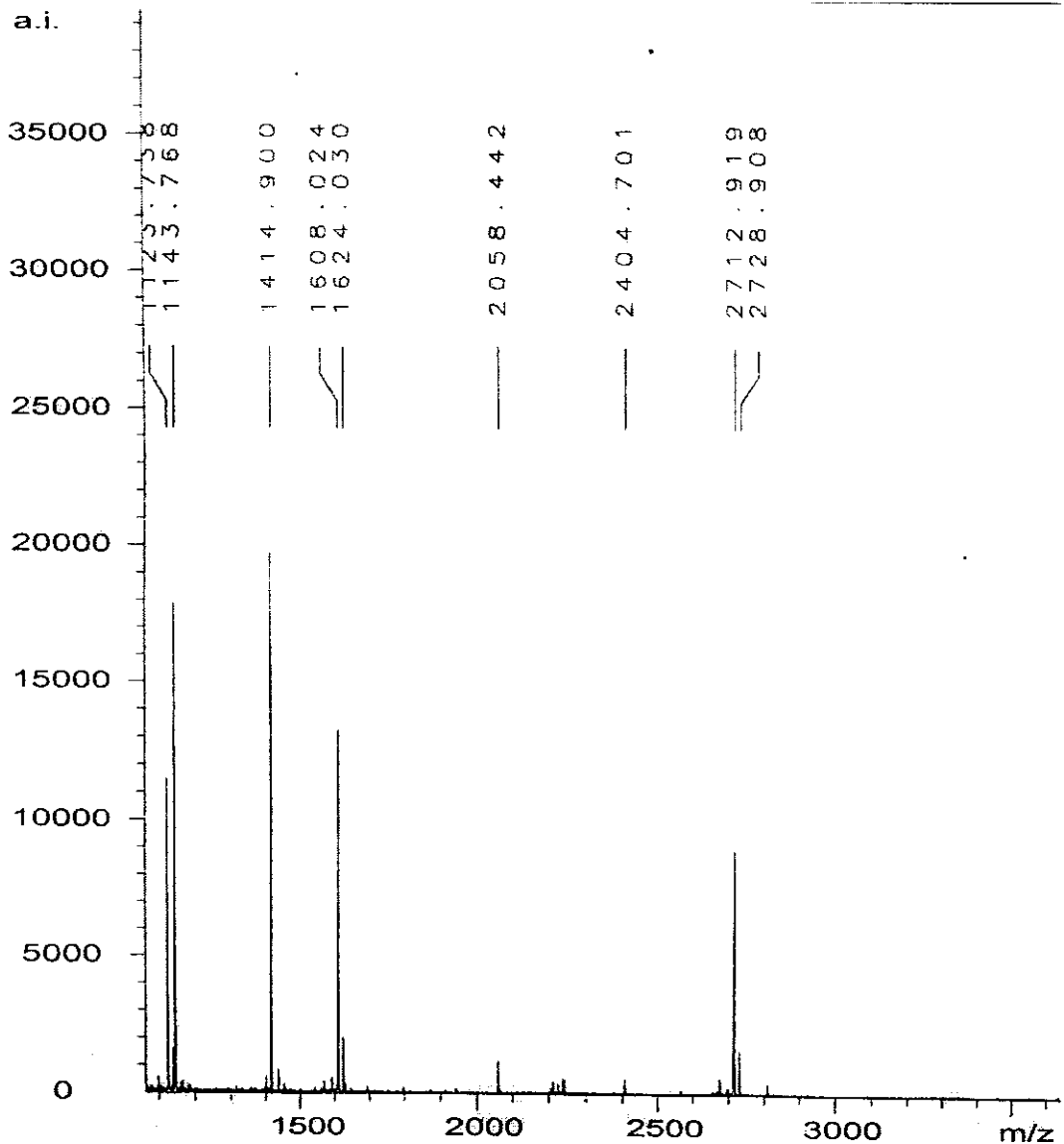
เมดโปรตีนที่ 1 ดังแสดงในรูปที่ 17 ถูกตัดออกมาจากแผ่นรีนและล้างเอาสีออก ก่อนที่จะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน มวลของท่อนของเปปไทด์ที่ได้ถูกนำมาอ่านค่าด้วยเครื่อง MALDI-TOF Mass spectrometry แกน X แทน อัตราส่วนของมวลต่อประจุของท่อนเปปไทด์ (mass/charge ratio) แกน Y แทน จำนวนซ้ำของท่อนเปปไทด์ ตัวเลขบอกขนาดของมวลของท่อนเปปไทด์ถูกแสดงไว้ส่วนบนของกราฟ (ตัวเลขในแนวตั้ง)

## รูปที่ 19



รูปที่ 19 ขนาดของท่อนเปปไทด์จากเมดโปรตีนที่ 2 วิเคราะห์โดยใช้ MALDI - TOF Mass Spectrometer เมดโปรตีนที่ 2 ดังแสดงในรูปที่ 17 ถูกตัดออกมาจากแผ่นวุ้นและล้างเอาสีออก ก่อนที่จะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน มวลของท่อนของเปปไทด์ที่ได้ถูกนำมาอ่านค่าด้วยเครื่อง MALDI-TOF Mass spectrometry แกน X แทน อัตราส่วนของมวลต่อประจุของท่อนเปปไทด์ (mass/charge ratio) แกน Y แทน จำนวนซ้ำของท่อนเปปไทด์ ตัวเลขบอกขนาดของมวลของท่อนเปปไทด์ถูกแสดงไว้ส่วนบนของกราฟ (ตัวเลขในแนวตั้ง)

## รูปที่ 20



รูปที่ 20 ขนาดของท่อนเปปไทด์จากเม็คโปรตีนที่ 3 วิเคราะห์โดยใช้ MALDI - TOF Mass Spectrometer เม็คโปรตีนที่ 3 ดังแสดงในรูปที่ 17 ถูกตัดออกมาจากแผ่นวุ้นและล้างเอาสีออก ก่อนที่จะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน มวลของท่อนของเปปไทด์ที่ได้ถูกนำมาอ่านค่าด้วยเครื่อง MALDI-TOF Mass spectrometry แกน X แทน อัตราส่วนของมวลต่อประจุของท่อนเปปไทด์ (mass/charge ratio) แกน Y แทน จำนวนซ้ำของท่อนเปปไทด์ ตัวเลขบอกขนาดของมวลของท่อนเปปไทด์ถูกแสดงไว้ส่วนบนของกราฟ (ตัวเลขในแนวตั้ง)

## ตารางที่ 1

Spot 1 (app. MW 38, pl 6)	Spot 2 (app. MW 55, pl 5)	Spot 3 (app. MW 14, pl 4)
1123.687	1095.731	1123.738
1147.74	1183.773	1143.768
1652.18	1207.834	1414.9
1658.193	1235.741	1608.024
1720.11	1300.785	1624.03
1753.127	1428.009	2058.442
1797.365	1460.914	2404.701
1876.305	1474.01	2712.919
2079.34	1624.139	2728.908
2095.33	1689.126	
2101.394	1705.1	
2701.964	1960.287	
	1978.338	
	1994.324	

ตารางที่ 1 มวลของท่อนเปปไทด์ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซินจากเม็ดโปรตีนที่แยกได้บน 2D gels

เม็ดโปรตีนที่ 1 มีมวลโมเลกุล 38 กิโลดาลตัน และ pl 6.0 (โดยประมาณ) ดังแสดงในคอลัมน์ที่ 1

เม็ดโปรตีนที่ 2 มีมวลโมเลกุล 55 กิโลดาลตัน และ pl 5.0 (โดยประมาณ) ดังแสดงในคอลัมน์ที่ 2 และ

เม็ดโปรตีนที่ 3 มีมวลโมเลกุล 14 กิโลดาลตัน และ pl 4.0 (โดยประมาณ) ดังแสดงในคอลัมน์ที่ 3

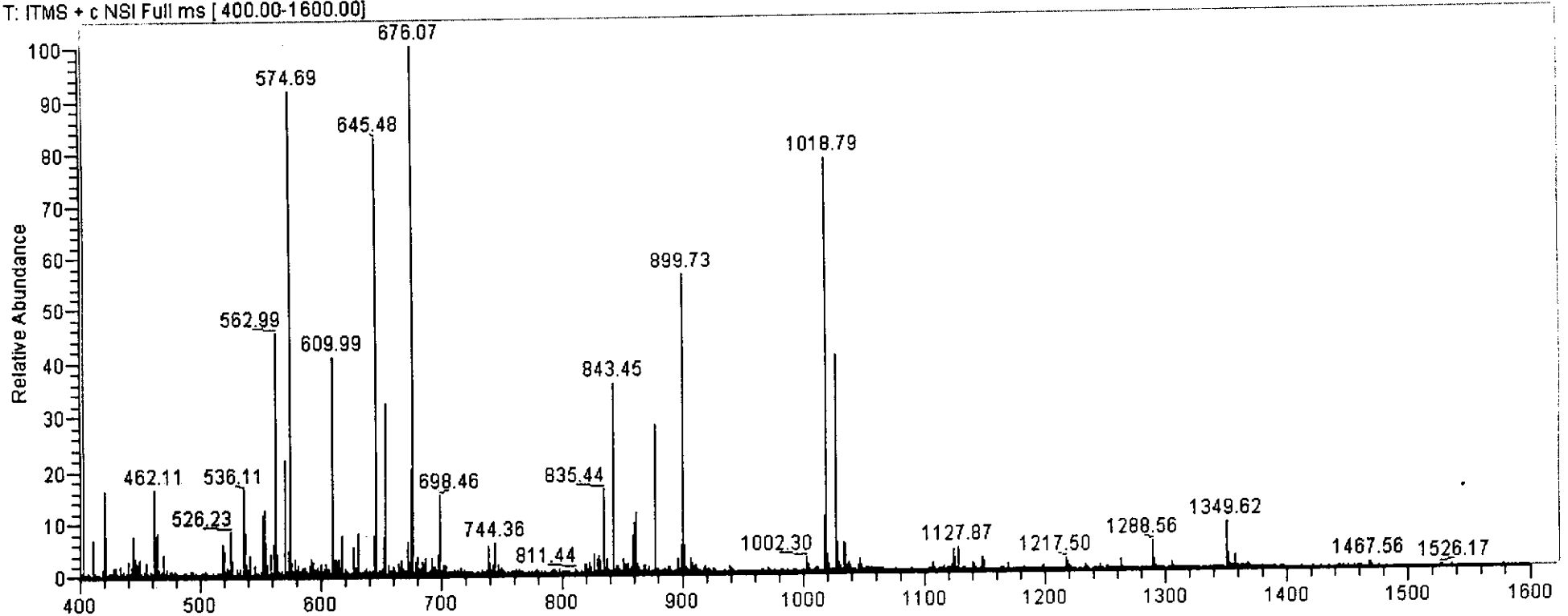
ดังนั้นการวิเคราะห์ลำดับของกรดอะมิโนจากท่อนเปปไทด์ด้วยเครื่อง Liquid Chromatography Mass Spectrometer (LC-MS/MS) จึงถูกเลือกทำเป็นอันดับต่อมา ซึ่งผลที่จะได้คือการทราบลำดับของกรดอะมิโนบางส่วน (partial peptide sequence) จากท่อนเปปไทด์ ดังนั้นจึงทำการแยกโปรตีนด้วย 2D SDS-PAGE อีกครั้งหนึ่ง และตัดเอาเม็ดโปรตีนทั้งสามไปวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS (ทำที่ Bioservice Unit, National Science and Technology Development Agency, NSTDA กรุงเทพฯ)

หลังการวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS และ การทำ database matching ในฐานข้อมูล NCBI nr พบว่า เม็ดโปรตีนที่ 1 ที่มีมวลโมเลกุล 38 กิโลดาลตัน โดยประมาณ และ pI 6 โดยประมาณ ซึ่งแยกได้บนแผ่นวันสองมิติ (2D gel) มีลำดับของกรดอะมิโนบางส่วน (partial peptide sequence) ตรงกับลำดับของกรดอะมิโนของโปรตีนของกุงกุลาดำใน database ที่ชื่อว่า allergen Pen m 2 ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีมวลโมเลกุลประมาณ 40 กิโลดาลตัน และมี isoelectric point (pI) 6.05 จะเห็นว่าทั้งมวลโมเลกุล และ pI ใกล้เคียงกับของเม็ดโปรตีนที่ 1 ดังแสดงในรูปที่ 21 - 22 ตารางที่ 1 และ Appendix IV เม็ดโปรตีนที่ 2 ที่มีมวลโมเลกุล 55 กิโลดาลตัน โดยประมาณ และ pI 5 โดยประมาณ ซึ่งแยกได้บน 2D gel มีลำดับของกรดอะมิโนบางส่วน (partial peptide sequence) ตรงกับโปรตีนของกุงกุลาดำที่ชื่อว่า actin 2 ซึ่งมีมวลโมเลกุล 41.8 กิโลดาลตัน และ pI 5.11 จะเห็นว่ามวลโมเลกุลของ actin 2 ก่อนข้างต่างจากมวลโมเลกุลของเม็ดโปรตีนที่ 2 แต่ pI ใกล้เคียงกัน ดังแสดงในรูปที่ 23 - 24 และ ตารางที่ 1 และเม็ดโปรตีนที่ 3 ที่มีมวลโมเลกุล 14 กิโลดาลตัน โดยประมาณ และ pI 4 โดยประมาณ ซึ่งแยกได้บน 2D gel มีลำดับของกรดอะมิโนบางส่วน (partial peptide sequence) ตรงกับโปรตีนของกุงกุลาดำที่ชื่อว่า allergen Pen m 2 ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 40 กิโลดาลตัน และ pI 6.05 จะเห็นว่าทั้งมวลโมเลกุล และ pI ต่างจากของเม็ดโปรตีนที่ 3 ดังแสดงในรูปที่ 25 และ ตารางที่ 1

จากผลที่ได้สามารถสรุปได้ว่า มีความเป็นไปได้สูงว่าเม็ดโปรตีนที่ 1 คือ allergen Pen m 2 เพราะมีมีลำดับของกรดอะมิโนบางส่วน (partial peptide sequence) มวลโมเลกุล และ pI ใกล้เคียงกันมาก ส่วนเม็ดโปรตีนที่ 2 นั้นยังไม่อาจมั่นใจได้ว่าเป็น actin 2 เพราะแม้จะมีลำดับของกรดอะมิโนบางส่วน (partial peptide sequence) และ pI ใกล้เคียงกันมาก แต่มวลโมเลกุลยังก่อนข้างมีความแตกต่าง และเม็ดโปรตีนที่ 3 นั้นไม่สามารถเชื่อได้ว่าเป็น allergen Pen m 2 เพราะมีมวลโมเลกุล และ pI ต่างกันค่อนข้างมาก ดังนั้น protein identification ของ เม็ดโปรตีนที่ 2 และ 3 นั้น ยังต้องการการศึกษาค้นคว้าเพิ่มเติมต่อไป

# รูปที่ 21

45\_S002\_Ana\_050623092407 #1083-1644 RT: 12.62-18.12 AV: 281 NL: 4.33E5  
T: ITMS + c NSI Full ms [ 400.00-1600.00]



รูปที่ 21 มวลของท่อนเปปไทด์จากเม็ดโปรตีนที่ 1 วิเคราะห์โดย LC-MS/MS

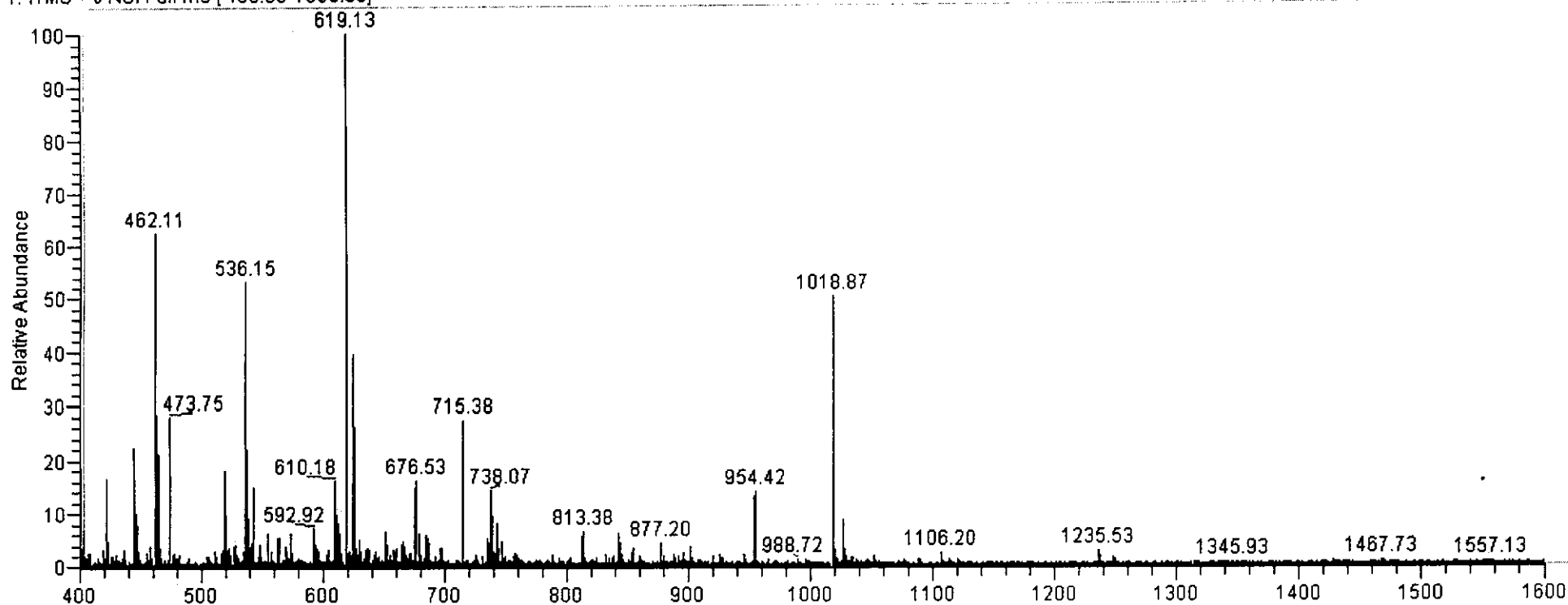
เม็ดโปรตีนที่ 1 ดังแสดงในรูปที่ 17 ถูกตัดออกมาจากแผ่นวุ้นและล้างเอาสีออก ก่อนที่จะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน มวลของท่อนของเปปไทด์ที่ได้ถูกนำมาอ่านค่าด้วยเครื่อง LC-MS/Mass spectrometer แกน X แทน อัตราส่วนของมวลต่อประจุของท่อนเปปไทด์ (mass/charge ratio) แกน Y แทน จำนวนซ้ำของท่อนเปปไทด์ ตัวเลขบอกขนาดของมวลของท่อนเปปไทด์ถูกแสดงไว้ส่วนบนของกราฟ





# รูปที่ 23

spot2\_S002\_Ana #1346-1383 RT: 15.24-15.60 AV: 19 NL: 1.27E5  
T: ITMS + c NSI Full ms [ 400.00-1600.00]



รูปที่ 23 มวลของท่อนเปปไทด์จากเม็ดโปรตีนที่ 2 วิเคราะห์โดย LC-MS/MS

เม็ดโปรตีนที่ 2 ดังแสดงในรูปที่ 17 ถูกตัดออกมาจากแผ่นวันและล้างเอาสีออก ก่อนที่จะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน มวลของท่อนของเปปไทด์ที่ได้ถูกนำมาอ่านค่าด้วยเครื่อง LC-MS/Mass spectrometer แกน X แทน อัตราส่วนของมวลต่อประจุของท่อนเปปไทด์ (mass/charge ratio) แกน Y แทน จำนวนซ้ำของท่อนเปปไทด์ ตัวเลขบอกขนาดของมวลของท่อนเปปไทด์ถูกแสดงไว้ส่วนบนของกราฟ

# รูปที่ 24

Reference: |gi|3907622|gb|AAC78682.1| actin 2 [Penaeus monodon]

Database: shrimp.fasta

Monoisotopic Mass: 41822.8

Number of Amino Acids: 377

pl: 5.11

	1-10	11-20	21-30	31-40	41-50	51-60	61-70	71-80	81-90	91-100
1	MCDDDELTA	VVDNGSGLCK	AGFAGDDAPR	AVFPSIVGRA	RHQGVMVGMG	OKDAYVGD	QSKRGILTLK	YPIEHGIITN	WDDMEKIWYH	TFYNELRVAP
101	EESPTLLTEA	PLNPKANREK	MTQIMFESFN	VPATYITIQ	VLSLYASGRT	TGEVCDSGDG	VTHFVPVYEG	FALPHAILRL	DLAGRDLTHY	LMKIMTERGY
201	SFTTTAEREI	VRDIKEKLCY	IALDFESEMNV	VAAASSSLDK	SYELPDGQVI	TIGNERFRCA	EALFQPSFLG	MESAGIQETV	HSSIMRCDID	IRKDLFANIV
301	MSGGTTMYPG	IADRMQKEIT	ALAPSTIKIK	IIAPPERKYS	VWIGGSILSS	LSTFQSMWIT	KDEYEESSPG	IVHRKCF		

Protein Coverage:

	Sequence	MH+	% by Mass	Position	% by AA's
<input checked="" type="checkbox"/>	AVFPSIVGR	945.55	2.26	31 - 39	2.39
<input type="checkbox"/>	HQGVMVGMGQK	1171.57	2.80	42 - 52	2.92
<input type="checkbox"/>	VAPEESPTLLTEAPLNPKANR	2247.20	5.37	98 - 118	5.57
<input checked="" type="checkbox"/>	GYSFTTTAER	1132.53	2.71	199 - 208	2.65
<input type="checkbox"/>	LCYIALDFESEMNVAAASSSLDK	2477.16	5.92	218 - 240	6.10
<input type="checkbox"/>	SYELPDGQVITIGNER	1790.89	4.28	241 - 256	4.24
<input type="checkbox"/>	DLFANIVMSGGTTMYPGIADRMQK	2616.26	6.26	294 - 317	6.37
<input type="checkbox"/>	MQKEITALAPSTIK	1530.86	3.66	315 - 328	3.71
<input checked="" type="checkbox"/>	EITALAPSTIK	1143.66	2.73	318 - 328	2.92

Protein Coverage Totals

by Mass:	3183.7
% by Mass:	7.61
by Position:	30
% by AA's:	7.96

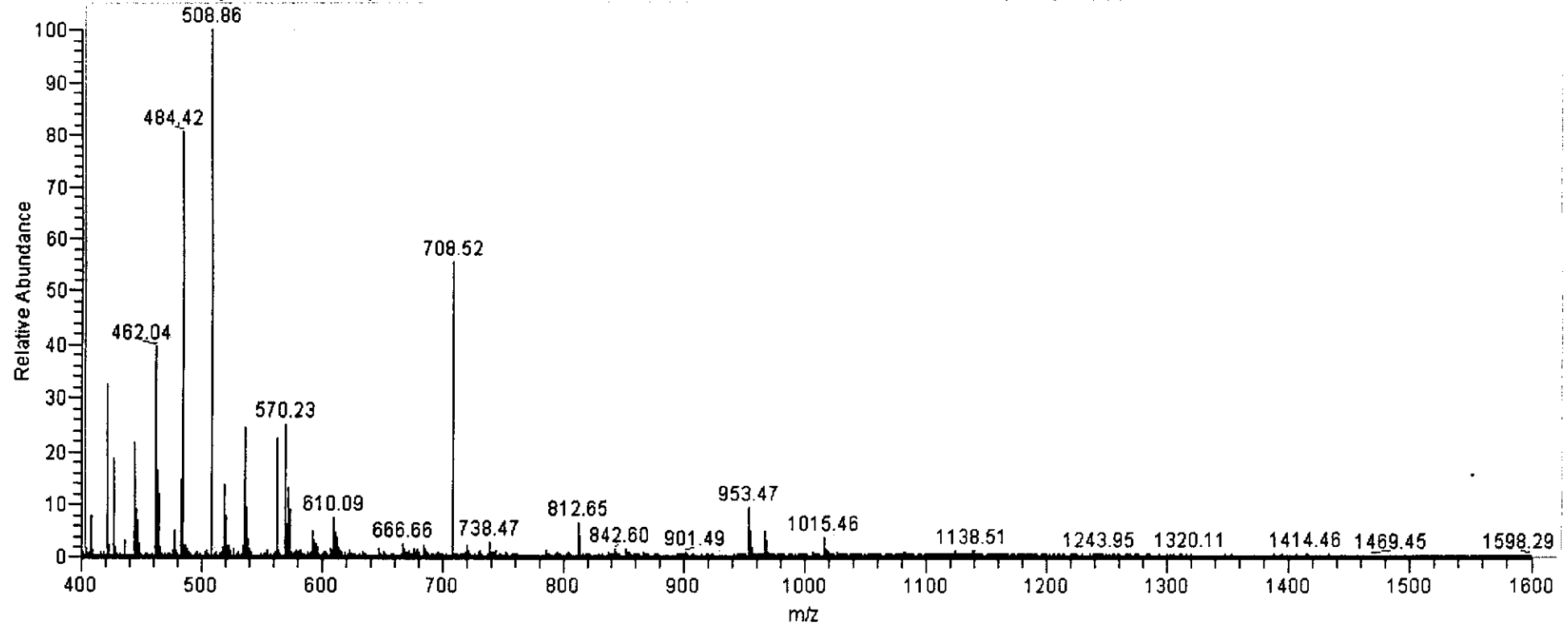
Update

รูปที่ 24 ลำดับของกรดอะมิโนจากเม็ตโปรตีนที่ 2 ซึ่งได้จากการวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS

ก่อนแปลไทป์ของเม็ตโปรตีนที่ 2 ดังรูปที่ 21 ถูกตัดภายในเครื่อง LC-MS/Mass spectrometer ให้ผลเป็นมวลของกรดอะมิโน (MH+) ซึ่งสามารถวิเคราะห์ต่อไปได้เป็นลำดับของ amino acids และนำไปเปรียบเทียบกับลำดับของกรดอะมิโนที่มีอยู่ในฐานข้อมูล NCBI nr และแสดงให้เห็นลำดับของกรดอะมิโนทั้งหมดของโปรตีน actin 2 ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล โดยที่โปรตีน actin 2 มีขนาดโมเลกุล 41.8 กิโลดาลตัน และ pl 5.11 ซึ่งขนาดโมเลกุลยังไม่ตรงกับของเม็ตโปรตีนที่ 2 ดังปรากฏบน 2D gel (รูปที่ 17)

# รูปที่ 25

spot3\_S004\_Ana #1122-1370 RT: 12.98-15.56 AV: 124 NL: 2.04E5  
T: ITMS + c NSI Full ms [ 400.00-1600.00]



รูปที่ 25 มวลของท่อนเปปไทด์จากเม็ตโปรตีนที่ 2 วิเคราะห์โดย LC-MS/MS

เม็ตโปรตีนที่ 3 ดังแสดงในรูปที่ 17 ถูกตัดออกมาจากแผ่นวุ้นและล้างเอาสีออก ก่อนที่จะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน มวลของท่อนของเปปไทด์ที่ได้ถูกนำมาอ่านค่าด้วยเครื่อง LC-MS/Mass spectrometer แกน X แทน อัตราส่วนของมวลต่อประจุของท่อนเปปไทด์ (mass/charge ratio) แกน Y แทน จำนวนซ้ำของท่อนเปปไทด์ ตัวเลขบอกขนาดของมวลของท่อนเปปไทด์ถูกแสดงไว้ส่วนบนของกราฟ

## 6. การศึกษาที่ต้องทำต่อ

### 6.1 ศึกษา protein identification ของ เม็ดโปรตีนที่ 2 และ 3 เพิ่มเติม

### 6.2 ศึกษาโปรตีนอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการลอกคราบเพิ่มเติม

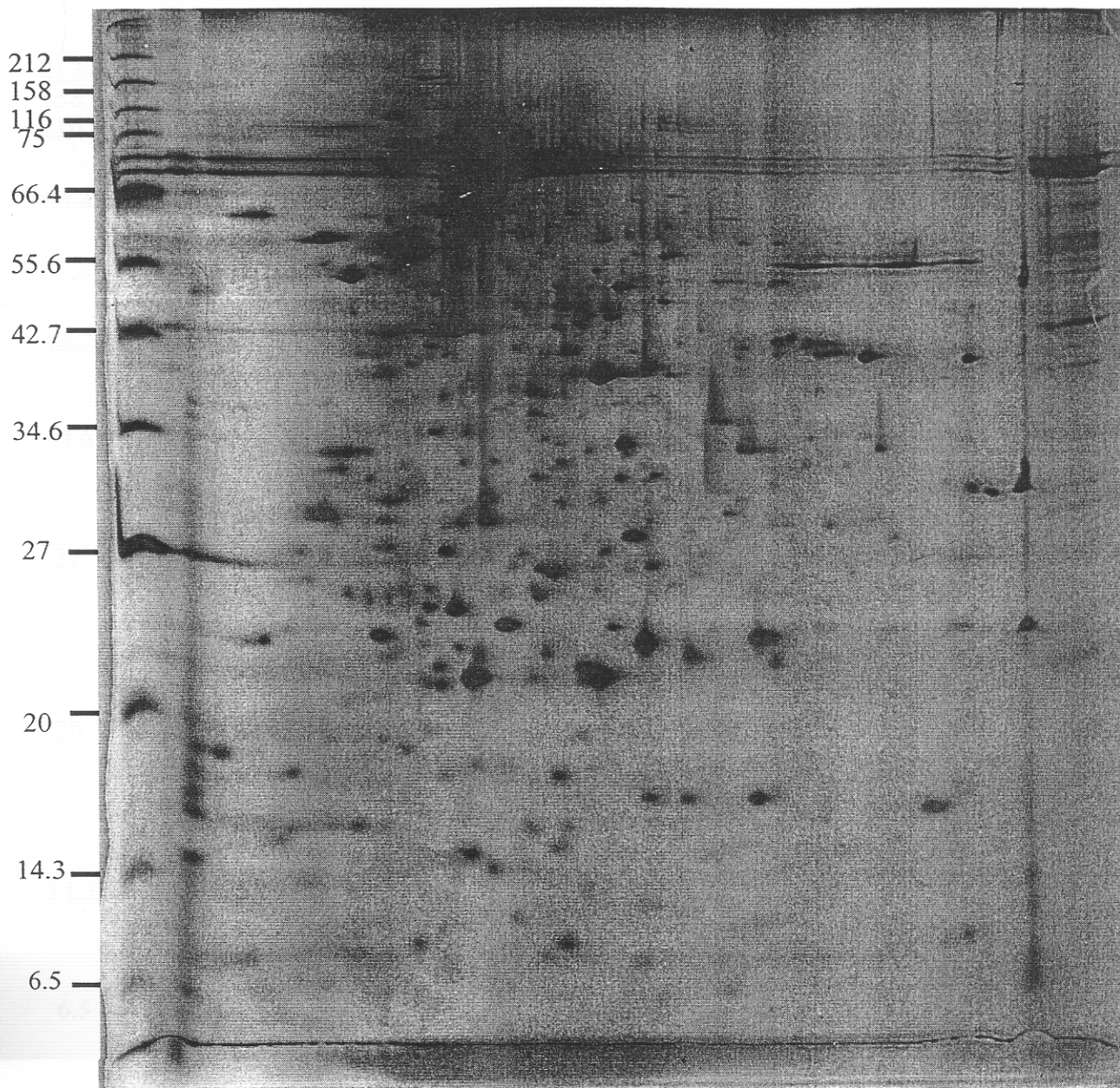
ในการแยกโปรตีนด้วยระบบ mini 2D SDS-PAGE นั้นถือเป็นเพียงการเริ่มต้นการศึกษาโปรตีนโอมิกซ์เท่านั้น mini 2D SDS-PAGE สามารถใช้กับโปรตีนตั้งต้นได้เพียง 100 ไมโครกรัม ซึ่งเมื่อย้อมแผ่นวุ้นด้วย coomassie blue R-250 แล้วทำให้ได้เม็ดโปรตีนในจำนวนที่น้อย และได้โปรตีนที่อยู่ในความสนใจเพียง 3 เม็ด แต่ในความเป็นจริงแล้วในตัวอย่างเดียวกันนี้ยังมีเม็ดโปรตีนอื่นที่น่าสนใจอีกมาก ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับว่าสามารถทำให้มองเห็นและนำไปวิเคราะห์ได้อย่างไร

ในการที่จะทำให้เม็ดโปรตีนมองเห็นได้ในจำนวนที่มากกว่านั้นนั้นจะต้องใช้โปรตีนตั้งต้นที่มากขึ้น แต่ด้วยระบบ mini 2D SDS-PAGE แล้วไม่สามารถทำได้เนื่องจากเป็น gel ขนาดเล็กจึงรองรับโปรตีนตั้งต้นได้ในปริมาณน้อย การใช้ระบบ 2D SDS-PAGE ที่มีขนาดใหญ่ขึ้นจะทำให้เพิ่มปริมาณโปรตีนตั้งต้นได้มากขึ้น ซึ่งก็จะทำให้สามารถมองเห็นเม็ดโปรตีนได้ในจำนวนที่มากขึ้นและนำไปสู่การค้นพบโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการลอกคราบของกิ้งก่าดำมากขึ้น ซึ่งขณะนี้ผู้วิจัยได้เริ่มทำการทดลองกับระบบ 2D SDS-PAGE ที่มีขนาดใหญ่ขึ้น โดยใช้แผ่นวุ้นมิติที่หนึ่งที่มีขนาด 0.5 x 13 เซนติเมตร และแผ่นวุ้นมิติที่สองขนาด 15 x 17 เซนติเมตร ใช้ได้กับปริมาณโปรตีนตั้งต้นเท่ากับ 100 ไมโครกรัม (เพิ่มขึ้นกว่าเดิมมากกว่า 2 เท่า) และย้อมสีโปรตีนด้วยสี silver nitrate จะได้ภาพโปรตีน ดังรูปที่ 26 - 28 ซึ่งภาพโปรตีนที่ได้มีขนาดขยายจากเดิมประมาณ 2 เท่า มีความคมชัดกว่าภาพโปรตีนที่แยกได้ในแผ่นวุ้นขนาดเล็ก และมีความสามารถในการแยกโปรตีนที่อยู่ชิดกันดังปรากฏใน mini gel ได้ดีกว่า โดยเฉพาะอย่างยิ่งโปรตีนที่มีมวลโมเลกุลอยู่ระหว่าง 15 – 75 กิโลดาลตัน ทำให้มองเห็นเม็ดโปรตีนเดี่ยวได้ดีขึ้น ขั้นตอนต่อไปคือการนำระเบียบวิธีทำ 2D SDS-PAGE ที่ได้ไปใช้ในการเตรียมโปรตีนตั้งต้นในปริมาณ 250 ไมโครกรัม เพื่อย้อมด้วยสี coomassie blue R-250 และเลือกโปรตีนอื่นที่น่าสนใจไปวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS เพื่อหา peptide sequence และ protein identification ของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการลอกคราบของกิ้งก่าดำเพิ่มเติมอีกเป็นลำดับต่อไป

## รูปที่ 26

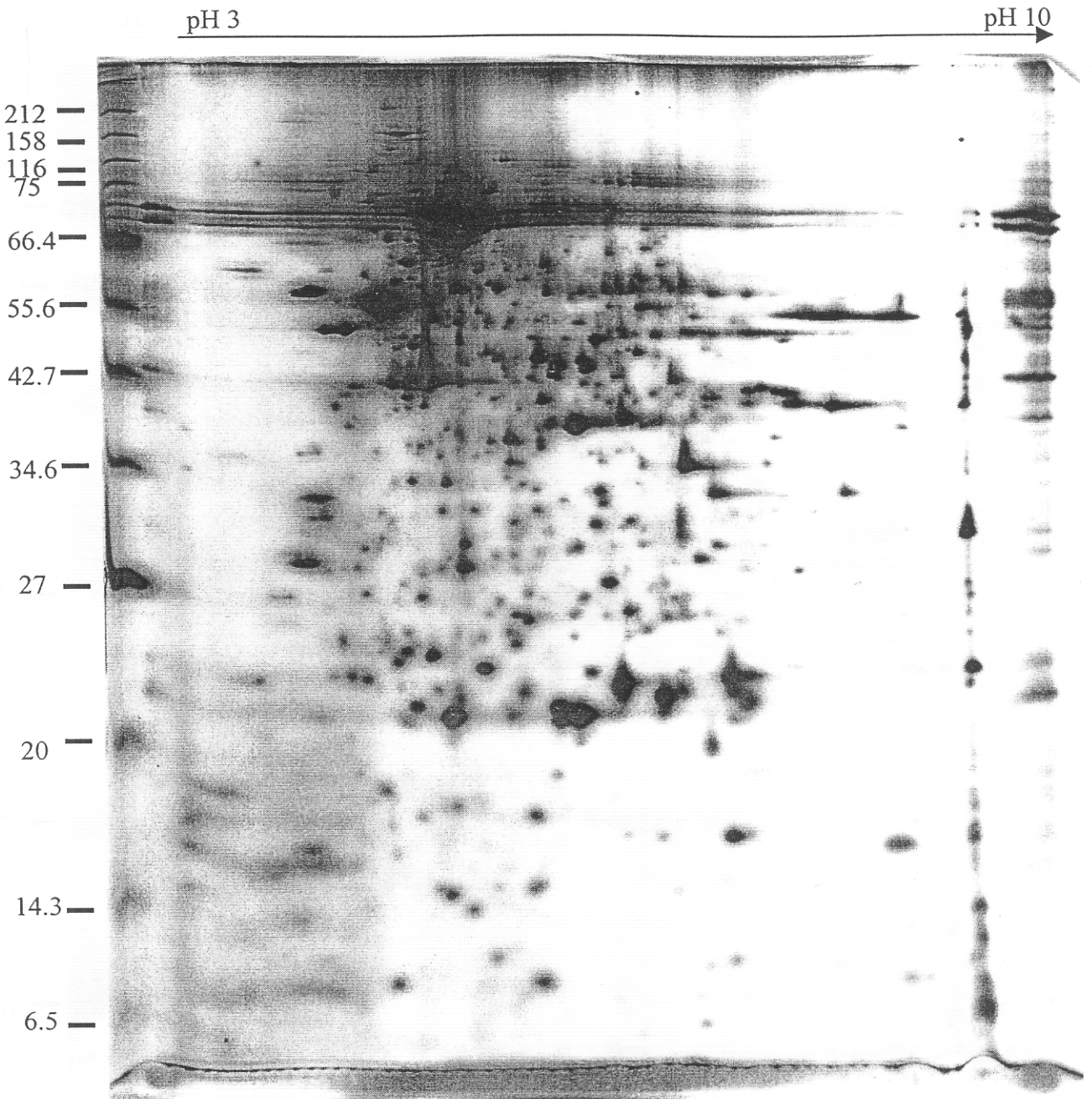
pH 3

pH 10



รูปที่ 26 ภาพเม็ดโปรตีนของเนื้อเยื่อผิวหนังในระยะก่อนการลอกคราบบนแผ่นวุ้นขนาด 15 x 17 เซนติเมตร โปรตีนในเนื้อเยื่อผิวหนังของกิ้งกูดดำในระยะก่อนการลอกคราบถูกนำมาแยกด้วยแผ่นวุ้นสองมิติ (2D SDS-PAGE) โดยแผ่นวุ้นมิติที่หนึ่งมีขนาด 0.5 x 13 เซนติเมตร และแผ่นวุ้นมิติที่สองมีขนาด 15 x 17 เซนติเมตร ก่อนที่โปรตีนจะถูกย้อมด้วย silver nitrate เม็ดโปรตีนที่ปรากฏมี pI อยู่ในช่วง 3 - 10 ด้านซ้ายของภาพเป็นแถบบอกขนาดของมวลโมเลกุล หน่วยเป็นกิโลดาลตัน (kD)

## รูปที่ 27



รูปที่ 27 ภาพเม็ดโปรตีนของเนื้อเยื่อผิวหนังในระยะหลังการลอกคราบบนแผ่นวัสดุขนาด 15 x 17 เซนติเมตร โปรตีนในเนื้อเยื่อผิวหนังของกิ้งกูดดำในระยะหลังการลอกคราบใหม่ ๆ (ระยะ A) ถูกนำมาแยกด้วยแผ่นวัสดุสองมิติ (2D SDS-PAGE) โดยแผ่นวัสดุมิติที่หนึ่งมีขนาด 0.5 x 13 เซนติเมตร และแผ่นวัสดุมิติที่สองมีขนาด 15 x 17 เซนติเมตร ก่อนที่โปรตีนจะถูกย้อมด้วย silver nitrate เม็ดโปรตีนที่ปรากฏมี pI อยู่ในช่วง 3 - 10 ด้านซ้ายของภาพเป็น แถบบอกขนาดของมวลโมเลกุล หน่วยเป็นกิโลดาลตัน (kD)

