# บทที่ 4

# วิจารณ์ผลการทดลอง

## 4.1 การโคลนฮอร์โมนที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของรังไข่กุ้งแชบ๊วย

จากการทำ cDNA library โดยวิธีของ smart (Clontech, California, USA) ซึ่งโดยหลักการทั่วไปจะใช้ reverse transcriptase (RT) ในการเปลี่ยน mRNA เป็น DNA สายเดี่ยว (single-stranded DNA) แต่ในบางครั้ง RT หยุดทำงานก่อนที่การสร้าง DNA สายเดี่ยวจะสมบูรณ์ ซึ่งมักจะเกิดขึ้นกับ mRNA ที่มีขนาดยาวมาก และในกรณีที่ใช้ oligo (dT) เป็น primer หรือในกรณีที่ mRNA เกิด secondary structure ทำให้ไม่สามารถเพิ่มจำนวนหรือสร้าง DNA สายคู่โดยวิธี PCR ได้อย่างไรก็ตามร้อยละของ DNA เส้นเต็มก็มีมากกว่าการทำ cDNA library โดยวิธีอื่น (Clontech ) cDNA ที่ได้นำมาเตรียมเป็น phage library และหาปริมาณ phage ใน library ได้ $2.5X10^5$ pfu/ml ซึ่งเมื่อนำมาเพิ่มปริมาณ ทำให้ได้ phage เพิ่มเป็น $3.5X\ 10^8$

primer G12 ซึ่งเปลี่ยนเป็นกรดอะมิโนคือ GNRDIY จากรูป 1.7 เปรียบเทียบโปรตีนในกลุ่ม CHH/MIH/GIH จะเห็นได้ว่ามีจุดที่เหมือนกันหลายจุดในโปรตีนกลุ่มนี้และเนื่องจากต้องการ GIH จึงเจาะจงส่วนที่มีในโปรตีนตัวนี้และไม่มีในโปรตีนอื่น พบว่า GNRDIY เป็นส่วนของโปรตีนที่มีใน GIH และ MIH แต่ไม่มีใน CHH เมื่อเลือกโปรตีนดังกล่าวมาทำ PCR โดยใช้ cDNA เป็นต้นแบบ cDNA ที่ได้นำมาเชื่อมกับเวกเตอร์ pGEM-T Easy แล้วเพิ่มจำนวนในเซลล์ *E.coli* ซึ่งเมื่อเลือกเซลล์ที่มีสีขาวมาสกัดพลาสมิดแล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*R I เนื่องจากโคลนที่ได้มีจำนวนมาก และการทำ PCR ด้วย primer G12 กับ oligo (dT) ไม่พบแถบ DNA จำเพาะ (แสดงดังรูป 3.1) ดังนั้นจึงเลือกโคลนที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะดังกล่าวแล้วมีขนาดประมาณ 300 bp มาหาลำดับเบสซึ่งเป็นขนาดที่กำหนด จากการทดลองพบโคลน oli 1

ซึ่งเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*R I มีขนาดประมาณ 250 bp (ดังรูปที่ 3.2) เมื่อนำมาหาลำดับเบส ดังรูปที่ 3.3 พบว่ามีขนาด 245 bp มีลำดับเบสคล้ายกับ GIH ของกุ้ง lobster *H. americanus* (De Kleijn *et al.*, 1994) ถึง 48% (วิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม DNASIS) มีลำดับเบสคล้ายกับ MIH ของกุ้ง *P. japonicus* (Ohira *et al.*,1997) ถึง 51% และมีลำดับเบสคล้ายกับ CHH ของกุ้ง *M. ensis* (Gu and Chan, 1998) ถึง 47% เมื่อเทียบลำดับกรดอะมิโนของโคลน oli 1 กับโปรตีนใน ธนาคารยีน พบว่าส่วนของโคลน oli 1 มีความคล้ายคลึงกับส่วนของโปรตีนในกลุ่ม CHH/MIH/GIH family (แสดงในภาคผนวก ข) คือส่วนของ GNRDIYKKVVRVCED CTNIFRLPGLDGMCR ดังรูปที่ 3.4 แสดงว่าโคลน oli 1 อยู่ในกลุ่มเดียวกับ CHH/MIH/GIH ได้เมื่อนำ DNA oli 1 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*R I แล้วนำมาเตรียมตัวตรวจจับเพื่อใช้ในการค้นหายีนเต็มที่เหมือนกับโคลน oli 1 ใน library โดยการทำ hybridized ครั้งที่ 1 พบจุดที่คาดว่าเป็น DNA เป้าหมาย 2 จุด ดังรูปที่ 3.5 เมื่อนำ plaque ตรงบริเวณที่ตรงกับจุดดำดังกล่าวมาเตรียม plaque แล้วทำการตรวจจับครั้งที่ 2 ปรากฏว่าไม่พบ positive plaque ของ cDNA เป้าหมายดังกล่าว

จากการเตรียม cDNA ขึ้นใหม่โดยวิธี GeneRacer ™ เมื่อนำโคลนทั้งหมดมาทำโคโลนี hybridized พบว่ามี 11 โคลนที่สามารถจับกับตัวตรวจจับ จึงนำโคลนดังกล่าวมาหาลำดับเบสแล้วเปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้กับธนาคารยีนพบว่าทั้ง 11 โคลนไม่อยู่ใน CHH/MIH/GIH family (แสดงผลการเปรียบเทียบในภาคผนวก ข) และเมื่อนำ DNA แต่ละโคลนมาเปรียบเทียบกับ DNA oli 1 พบว่าส่วนใหญ่มีลำดับเบสคล้ายกับ oli 1 ถึง 38-48% ซึ่งความเหมือนที่สูงเช่นนี้ทำให้สามารถจับกับตัวตรวจจับและเกิดเป็น false positive ได้

**4.2 การผลิตแอนติซีรัมต่อ vitellin ของกุ้งแชบ๊วย**

4.2.1 การเตรียมตัวอย่าง vitellin และศึกษาคุณลักษณะของ vitellin

จากการเตรียมตัวอย่างโปรตีนจากไข่กุ้งแชบ๊วยโดยใช้เครื่อง FPLC Column Superose 12 HR 10/30 ซึ่งสามารถแยกโปรตีนจาก 1000-2X10$^6$ (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) เมื่อใช้คอลัมน์นี้แยกโปรตีนไข่กุ้งแชบ๊วย โปรตีนที่แยกได้จะผ่าน UV dtector ที่ความยาวคลื่น 280 nm ซึ่งเมื่อเขียนกราฟระหว่าง $OD_{280}$ และ fraction ได้ดังรูปที่ 3.6 พบว่า fraction ที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุดเป็น fraction 12-15 แต่เมื่อนำโปรตีนของแต่ละ fraction มาหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Lowry's พบว่า fraction ที่ให้ค่าโปรตีนสูงที่สุดเป็น fraction 5-6 ดังภาพที่ 3.6 และเนื่องจาก vitellin เป็นโปรตีนส่วนใหญ่ในรังไข่ ดังนั้น fraction 5-6 อาจเป็นโปรตีน vitellin ซึ่งจากการทดลองของ Tom และคณะ (1987) ในกุ้ง *P. longirostris* ซึ่งพบว่า โปรตีน vitellin ที่แยกได้สามารถย้อมติดสี PAS ซึ่งเป็นสีย้อมน้ำตาล และย้อมติดสี sudan black B ซึ่งเป็นสีย้อมไขมัน โปรตีน vitellin จึงเป็น lipoglycoprotein เพื่อทดสอบว่าโปรตีนดังกล่าวเป็น vitellin จริง จึงนำโปรตีนจาก fraction 5-6 มาทำ Native-PAGE แล้วย้อมโปรตีน, ไขมัน และน้ำตาลโดยมีสารสกัดหยาบของไข่กุ้งแชบ๊วยเป็นตัวเปรียบเทียบดังรูปที่ 3.8 จากรูป โปรตีนจาก fraction 5-6 สามารถย้อมติดทั้งโปรตีน, ไขมัน และน้ำตาลเช่นเดียวกับสารสกัดหยาบจากไข่กุ้งแชบ๊วย ดังนั้น fraction 5-6 จึงเป็นโปรตีน vitellin ของกุ้งแชบ๊วยซึ่งจะนำโปรตีนดังกล่าวมาฉีดเข้ากระต่ายเพื่อผลิตแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อโปรตีน vitellin จากไข่กุ้งแชบ๊วยต่อไป

ในสัตว์จำพวก crustacean หลายชนิดพบว่า vitellin เป็น lipoglycoprotein มี MW อยู่ในช่วง 280-500 กิโลดาลตัน (Fyffe and O'Connor, 1974; Meusy, 1980; Zagalsky, 1985; Quinitio *et al.*, 1989, 1990; Chen and Chen, 1993; Tsukimura *et al.*, 2000 อ้างอิงโดย Tsukimura *et al.*, 2000) โดยในกุ้ง *P. monodon* มี MW 496 กิโลดาลตัน (Chang *et al.*, 1993 อ้างอิงโดย Tsukimura *et al.*, 2000) ในกุ้ง *P. vannamei* และ *P. semisulcatus* มี MW 289 และ 283 กิโลดาลตัน ตามลำดับ

322 กิโลดาลตัน (Tsukimura *et al.*, 2000) ซึ่งจากการทดลองแยกโปรตีนโดย FPLC เมื่อนำโปรตีนมาตรฐานฉีดเข้าคอลัมน์แล้วนำมาหาค่า Kav ของโปรตีนมาตรฐานเพื่อนำมาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Kav กับ log MW ดังรูปที่ 3.7 เมื่อเทียบค่า Kav ของ fraction 6 ที่นาทีที่ 19.46 โดยมีค่า Kav = 0.2145 สามารถคำนวณ MW ได้ประมาณ 352±7.4 กิโลดาลตัน ซึ่งอยู่ในช่วงเดียวกับกุ้งตระกูล penaeid อื่นๆ ที่กล่าวมาแล้วข้างต้น

ในสัตว์จำพวก malacostracan crustacean หลายชนิดพบว่า vitellin มีหน่วยย่อย ในช่วง 2-10 หน่วยย่อย (Lui *et al.*, 1974; Lui and O'Connor, 1976; Eastman-Reks and Fingerman, 1985; Tom *et al.*, 1992; Chang *et al.*, 1993 อ้างอิงโดย Tsukimura *et al.*, 2000) เช่น ใน *P. monodon* พบว่าประกอบด้วย 4 หน่วยย่อย ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 168, 104, 83 และ 74 กิโลดาลตัน (Chen and Chen, 1993) ในขณะที่ Quinitio และคณะ (1990) อ้างถึงโดย Chang และคณะ (1993) พบว่าประกอบด้วย 5 หน่วยย่อย คือ 168, 104, 90, 83 และ 74 กิโลดาลตัน ใน *P. longirostris* มี 2 หน่วยย่อย (Tom *et al.*, 1987) ในกุ้ง *S. ingentis* มี 3 หน่วยย่อย (Tsukimura *et al.*, 2000) *P. vannamei* และ *P. semisulcatus* พบว่ามี 2 หน่วยย่อย (Tom *et al.*, 1992 อ้างอิงโดย Tsukimura *et al.*, 2000) เมื่อนำโปรตีนจาก fraction 6 มาทำ electrophoresis บน 10% SDS-PAGE พบว่าโปรตีนจาก fraction 6 สามารถแยกออกเป็นหน่วยย่อยได้ 6 หน่วยย่อย ดังรูปที่ 3.9 ซึ่งแต่ละหน่วยย่อยเมื่อคำนวณน้ำหนักโมเลกุลเมื่อเทียบกับสารมารตรฐานพบว่า มีน้ำหนักโมเลกุล เป็น 101±4.1, 88±3.5, 79±1.6, 61±1.9, 55±4.8และ 47±0.9 กิโลดาลตัน ซึ่งเมื่อรวมน้ำหนักโมเลกุลทั้งหมดได้ 431±12 กิโลดาลตัน จะเห็นได้ว่าน้ำหนักโมเลกุลที่ได้แตกต่างจากที่คำนวณได้จากการทำ FPLC ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากโครงสร้างของโมเลกุลที่ต่างกันและวิธีการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลที่ต่างกัน อย่างไรก็ตาม จำนวนหน่วยย่อยและน้ำหนักโมเลกุลก็อยู่ในช่วงเดียวกับ crustaceans อื่นๆ ที่กล่าวมาข้างต้น

4.2.2 การศึกษาความจำเพาะของแอนติซีรัมต่อโปรตีน vitellin

เมื่อนำ fraction 5-6 ซึ่งเป็น vitellin มาฉีดเข้ากระต่ายเพื่อผลิตแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อโปรตีนดังกล่าว แอนติซีรัมที่ได้จากเลือดกระต่าย ที่ระดับการเจือจาง 1:8 นำมาทำ ELISA เพื่อหาปริมาณโปรตีน vitellin พบว่าสามารถวัดระดับความเข้มข้นของโปรตีนดังกล่าวได้ ในช่วง 62.5-500 ng/ml ดังกราฟที่ 3.11 ในขณะที่การทดลองของวิมล สุขตั้งมั่น และคณะ (2539) ซึ่งทดลองผลิตแอนติซีรัมต่อไวเทลลินในกุ้งก้ามกราม (*M. rosenbergii)* สามารถวัดระดับความเข้มข้นของโปรตีนดังกล่าวได้ ในช่วง 0.1-100 µg/ml ในกุ้ง *P. vannamei* สามารถวัดระดับความเข้มข้นของโปรตีนดังกล่าวได้ในช่วง 1-10 µg/ml (Mendoza *et al.*, 1993 อ้างอิงโดย Tsukimura *et al.*, 2000) เมื่อนำแอนติซีรัมที่ได้มาทดสอบโปรตีน vitellin จากเนื้อเยื่อแหล่งอื่นโดยนำโปรตีนจากไข่กุ้งแชบ๊วย, โปรตีนจาก hepatopancreas และโปรตีนจาก fraction 6 อย่างละ 5 µg มาทำ Native-PAGE แล้วย้ายโปรตีนลงบนไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน แล้วทำ immunoblotting แสดงผลการทดลองดังรูปที่ 3.12 จากรูปพบว่าแอนติซีรัมสามารถจับกับโปรตีน vitellin ในไข่กุ้งแชบ๊วยได้จึงสามารถนำแอนติซีรัมนี้มาใช้ในการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวภาพของโปรตีนที่แยกจากก้านตาต่อการสร้างโปรตีนไข่ได้ และจากรูปพบว่าโปรตีนจาก hepatopancreas ไม่เกิดปฏิกิริยาทางอิมมูนกับแอนติซีรัมจาก vitellin เช่นเดียวกับการทดลองของ Yano และ Chinzei (1987) ซึ่งศึกษาการสร้าง vitellogenin ในกุ้ง *P. japonicus* โดยใช้แอนติซีรัมต่อ vitellin พบว่าเฉพาะ ovary เท่านั้นที่ผลิตโปรตีน vitellin แต่จากการทดลองของ Quackenbush (1989) ซึ่งใช้เฉพาะหน่วยย่อยที่ 97 kDa ในการผลิตแอนติซีรัม พบว่าในกุ้ง *P. japonicus* ทั้ง ovary และ hepatopancreas สามารถผลิตโปรตีน vitellin ซึ่งอาจเป็นได้ว่าแอนติซีรัมที่ผลิตขึ้นในการทดลองของ Yano และ Chinzei (1987) มีความจำเพาะกับเฉพาะโปรตีนใน ovary หรืออาจเป็นไปได้ว่าในกุ้งต่างชนิดกันมีการผลิตโปรตีน vitellin ต่างกัน บางชนิดอาจผลิตที่รังไข่อย่างเดียวและบางชนิดอาจผลิตทั้งในรังไข่ และ hepatopancreas และจากการทดลองของ Fainzilber และคณะ (1992) พบว่ามีการสร้างโปรตีน vitellin ที่ hepatopancreas มีน้อยกว่า 15 % ของโปรตีนที่สร้างใหม่ทั้งหมด ในขณะที่ในรังไข่มี

การสร้างโปรตีน vitellin ประมาณ 38% (อ้างถึง Browdy *et al.*, 1990) ซึ่งจากรูป 3.12 พบว่าโปรตีนจาก hepatopancreas ไม่เกิดปฏิกิริยาทางอิมมูนกับแอนติซีรัมจาก vitellin อาจเป็นได้ว่าแอนติซีรัมไม่จำเพาะกับโปรตีน vitellin ที่สร้างขึ้นที่ hepatopancreas หรือปริมาณโปรตีน vitellin ใน heptopancreas ที่จำเพาะกับแอนติซีรัมมีการผลิตที่น้อยเกินความสามารถของแอนติซีรัมที่จะจับได้

### 4.3 การทดสอบปฏิกิริยาทางชีวภาพของ GIH ในรังไข่

จากการทดลองแยกสารสกัดจากก้านตากุ้งแชบ๊วยโดย RP-HPLC คอลัมน์ μBondapak-Phenyl (วรวิทย์ ฉิมเพ็ชร ข้อมูลเตรียมวิทยานิพนธ์) ดังรูปที่ 3.13 จากรูปพบว่ามีกลุ่มของ peak ที่น่าสนใจมี 8 peak ซึ่ง Peak ที่ 3, 5, 6 มีลักษณะของการแยกคล้ายกับการทดลองของ Aguilar และคณะ (1992) และการทดลองของ Huberman และคณะ (1995) ซึ่งทั้งสองใช้ RP-HPLC คอลัมน์ μBondapak-Phenyl เช่นเดียวกัน ดังนั้น peak ที่ 3 peak ที่ 5 และ peak ที่ 6 น่าจะเป็นโปรตีนในกลุ่ม CHH/MIH/GIH family เมื่อนำ peak ที่ 3 peak ที่ 5 peak ที่ 6 และสารสกัดจากก้านตามาทดสอบปฏิกิริยาทางชีวภาพของฮอร์โมน GIH พบว่าสารสกัดจากก้านตาสามารถยับยั้งการสร้างโปรตีนในรังไข่กุ้งแชบ๊วยโดยให้ค่าเฉลี่ยการยับยั้งการสร้างโปรตีนซึ่งมีหน่วยเป็น dpm/mg protein แตกต่างจากตัวควบคุม (ลบ) ซึ่งใช้ PBS แทนที่สารตัวอย่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ดังผลการทดลองในตารางที่ 3.1 และตารางที่ 3.3 ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Yano (1984) ซึ่งพบว่าการตัดก้านตากุ้ง *P. japonicus* เพียงข้างเดียว ทำให้อัตราการวางไข่ของกุ้งเพิ่มขึ้น 50 % ในทางกลับกัน Quackenbush (1989) พบว่าสารสกัดจากก้านตามีผลยับยั้งการสร้างโปรตีนไข่ในหลอดทดลอง

จากผลการทดลองพบว่า peak ที่ 3 มี การนำ $^{14}$C-Leucine เข้าสร้างโปรตีนลดลงเช่นเดียวกับ สารสกัดจากก้านตา แสดงว่า peak นี้มีผลยับยั้งการสร้างโปรตีนในรังไข่ แต่เมื่อวัดเฉพาะการสร้างโปรตีน vitellin พบว่า peak ที่ 3 มีการนำ $^{14}$C-Leucine เข้าสร้างโปรตีน vitellin เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับ ตัวอย่างควบคุมถึง 116.5 % ดังตารางที่ 3.4

จากการทดลองของ Quackenbush (1992) ซึ่งนำสารสกัดจากก้านตาของ *P. bouvieri* ของ Huberman และ คณะ (1989) ที่แยกโดยคอลัมน์ μBondapak-Phenyl มาทดสอบเพื่อหาร้อยละการสร้างโปรตีน และร้อยละการสร้างโปรตีน vitellin พบว่าโปรตีนที่ให้ชื่อว่า H2 ซึ่งนอกจากมีปฏิกิริยาของ MIH มี ร้อยละการสร้างโปรตีนทั้งหมดและร้อยละการสร้างโปรตีน vitellin เป็น 107 และ 370 ตามลำดับ ซึ่งหมายความว่ามีการกระตุ้นการสร้างโปรตีนไข่ถึงร้อยละ 370 แต่มีผลต่อการกระตุ้นการสร้างโปรตีนทั้งหมดเพียงเล็กน้อย ในขณะที่การทดลองในกุ้งแชบ๊วย ให้ผลร้อยละการสร้างโปรตีนทั้งหมดเป็น 68.2 และผลร้อยละการกระตุ้นการสร้างโปรตีน vitellin เป็น 116.5 ทั้งนี้ผลที่ต่างกันอาจเนื่องจากกุ้งต่างชนิดกัน ดังนั้นจากการทดลอง peak 3 น่าจะมีปฏิกิริยาของ GSH ซึ่งมีฤทธิ์ในการเร่งการสร้างโปรตีนไข่

จากการทดลองจะเห็นได้ว่า peak ที่ 5 มีการยับยั้งการสร้างโปรตีนทั้งโปรตีนอื่นๆ ที่ไม่ใช่ vitellin และโปรตีน vitellin ดังนั้น peak 5 อาจเป็นฮอร์โมน GIH ซึ่งฮอร์โมนดังกล่าวผลิตที่ X-organ แล้วนำมาสะสมไว้ที่ sinus gland บริเวณก้านตา ถูกพบครั้งแรกโดย Panouse ในปี 1943, 1944 (อ้างอิงโดย Huberman, 2000) จากการทดลองของ Huberman และคณะ (1995) ซึ่งแยกสารสกัดจาก sinus gland บริเวณก้านตาของกุ้ง *P. bouvieri* โดยใช้ RP-HPLC พบ peptide 4 ชนิด หนึ่งในนั้นเป็น GIH และ Quackenbush (1992) ได้นำ GIH ที่ได้ดังกล่าวมาทดลองหา ร้อยละการสร้างโปรตีนทั้งหมดใน ovary และร้อยละการสร้างโปรตีน vitellin พบว่าให้ผลร้อยละการสร้างโปรตีนทุกชนิดลดลง ซึ่งการทดลองในกุ้งแชบ๊วยก็ให้ผลเช่นเดียวกันแสดงดังตารางที่ 3.4 อย่างไรก็ตามจากการทดลองของ Khayat และคณะ (1998) พบว่า CHH จาก *P. japonicus* มีผลยับยั้งทั้งการสร้างโปรตีน และการสังเคราะห์ mRNA ใน *P. semisulcatus* และการทดลองของ Webster (1993 อ้างอิงโดย Huberman, 2000) พบ CHH receptor ในหลายเนื้อเยื่อ ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่า peak 5 เป็น GIH หรือ peak 5 เป็น CHH ซึ่งมีปฏิกิริยาของ GIH ดังนั้นในอนาคตจึงควรจะนำ peak 5 มาทดสอบปฏิกิริยาของ CHH ด้วย

จากการทดลอง peak ที่ 6 พบว่าให้ผลการยับยั้งการสร้างโปรตีน vitellin แต่การยับยั้งการสร้างโปรตีนทั้งหมดจากรังไข่ไม่มีความแตกต่างจาก control (ลบ) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % และเมื่อเปรียบเทียบ ร้อยละการสร้างโปรตีนทั้งหมดและ ร้อยละการสร้างโปรตีน vitellin พบว่ามีค่าใกล้เคียงกันดังตารางที่ 3.5 แสดงว่า peak ที่ 6 มีผลโดยตรงต่อเนื้อเยื่อไข่ ในการยับยั้งการสร้างโปรตีนไข่

จากการทดลองจะเห็นได้ว่าโปรตีนที่แยกจากก้านตามีมากกว่า 1 ชนิดที่ให้ผลยับยั้งการสร้างโปรตีนไข่จากการทดลองของ Khayat และคณะ (1998) พบว่า CHH จาก *P. japonicus* ซึ่งมี 7 ชนิดมีผลยับยั้งทั้งการสร้างโปรตีน และการสังเคราะห์ mRNA ใน *P. semisulcatus* ดังนั้น peak ที่ 6 อาจเป็นหนึ่งใน CHH ของกุ้งแชบ๊วยซึ่งมีปฏิกิริยาโดยตรงในการยับยั้งการสร้างโปรตีน vitellin ดังนั้นในอนาคตจึงควรจะนำ peak 6 มาทดสอบปฏิกิริยาของ CHH ด้วย