สำนักหอสมุด

IDENTIFICATION OF ANOPHELES DIRUS ISOMORPHIC SPECIES BY CHEMILUMINESCENT DNA PROBES

MONGKON AUDTHO

อภินันทนาการ
จาก

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE
OF MASTER OF SCIENCE
(BIOCHEMISTRY)

IN
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
1992

Copyright by Mahidol University

20942

ชื่อวิทยานิพนธ์ การจำแนกยุงที่มีสัณฐานวิทยาเหมือนกันชนิด *Anopheles dirus* โดยใช้ตัวติดตามดีเอ็นเอที่ติดฉลากด้วยสารที่ให้ปฏิกิริยาเรืองแสง

ผู้วิจัย มงคล อุดโท

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

วิชัย บุญแสง, Ph.D.

สกล พันธุ์ยิ้ม, Ph.D.

ประพนธ์ วิไลรัตน์, Ph.D.

วันที่สำเร็จการศึกษา 30 ตุลาคม พ.ศ. 2535

บทคัดย่อ

ยุงก้นปล่องชนิด*Anopheles dirus* เป็นพาหะที่สำคัญของเชื้อมาลาเรียในประเทศไทยและในเขตเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ จากหลักฐานด้านสัณฐานวิทยาและพันธุศาสตร์พบว่า ยุงชนิดนี้ประกอบด้วยชนิดย่อยอย่างน้อย 6 ชนิดคือ ชนิด A, B, C, D, E และ F สำหรับในประเทศไทยนั้นพบว่ามีอยู่ 5 ชนิดย่อยคือ ชนิด A, B, C, D และ F แม้ว่าทั้ง 5 ชนิดนี้จะมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายกันมาก แต่ก็มีความแตกต่างกันหลายด้าน กล่าวคือ แต่ละชนิดมีความชุกชุมในแต่ละพื้นที่ และมีช่วงเวลาหากินในตอนกลางคืน (nocturnal biting cycles) ที่ต่างกัน ดังนั้นการเข้าใจให้ถ่องแท้ถึงลักษณะทางชีววิทยาของยุงกลุ่มนี้จึงสำคัญอย่างยิ่งต่อการศึกษาทางด้านระบาดวิทยาของเชื้อมาลาเรีย

ที่ผ่านมา การจำแนกยุงชนิดนี้ทำได้โดยอาศัยลักษณะความแตกต่างของโครโมโซมและความแตกต่างของรูปแบบไอโซเอนไซม์ (isozyme patterns) การศึกษาลักษณะของโครโมโซมนั้นทำได้โดยการจับยุงจากบริเวณป่าที่ทำการศึกษามาเลี้ยงในห้องทดลอง จนกระทั่งยุงเหล่านั้นให้กำเนิดลูกน้ำแล้วเตรียมโครโมโซมจากลูกน้ำนั้น วิธีนี้จึงช้าและใช้แรงงานมาก สำหรับวิธีที่สองนั้น ต้องใช้ยุงที่จับใหม่ๆ หรือยุงที่เก็บไว้ในที่เย็นจัดเพื่อรักษาสภาพของเอนไซม์ทั้งสองวิธีข้างต้นจึงไม่เหมาะแก่การศึกษาในภาคสนาม

Copyright by Mahidol University

ตัวติดตามดีเอ็นเอ (DNA probe) ที่จำเพาะต่อยุงชนิด A, B, C และ D ได้สร้างขึ้นตั้งแต่ปี 1986 และให้ชื่อว่า pMU-A40.1#5, pMU-B5, pMU-C19.2 และ pMU-D9 ตามลำดับ แต่การตรวจสอบที่ผ่านมา ได้ติดฉลากตัวติดตามเหล่านี้ด้วยสารกัมมันตรังสี จึงทำให้ประสบความยุ่งยาก เพราะมีอายุการใช้งาน (half life) สั้นและไม่ปลอดภัยต่อผู้ปฏิบัติงาน

ในการศึกษาครั้งนี้ ได้เพิ่มจำนวนตัวติดตามโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่ (polymerase chain reaction) แล้วติดฉลากตัวติดตามเหล่านี้กับเอนไซม์ horseradish peroxidase (HRP) ภายหลังจากที่เติมน้ำยาตรวจ (detection reagent) ซึ่งประกอบด้วย luminol, enhancer, H_2O_2 จะเกิดปฏิกิริยาเรืองแสง (chemiluminescence) และตรวจสอบได้ด้วยฟิล์มเอ็กซ์เรย์ แต่ในการตรวจสอบตัวยุงโดยการทำ squash-blot technique นั้นไม่สามารถทำได้เพราะในเนื้อเยื่อของยุงมีสารที่ทำให้น้ำยาตรวจเกิดปฏิกิริยาเรืองแสงได้ ดังนั้นยุงที่จะนำมาตรวจสอบด้วยวิธีนี้จึงต้องผ่านการสกัดด้วยฟีนอล-คลอโรฟอร์มก่อน

นอกจากนี้ยังได้ติดฉลากตัวติดตามดีเอ็นเอด้วย fluorescein โดยใช้วิธี primer extension reaction และ 3'-end labeling reaction อาศัยเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase และ terminal deoxynucleotidyl transferase ตามลำดับ หลังจากการทำไฮบริไดเซชันแล้วก็ตรวจหาfluorescein โดยใช้เอนไซม์ HRP ที่เชื่อมติดกับแอนติบอดีต่อ fluorescein (Anti-fluorescein antibody-HRP conjugates) ตัวติดตามดีเอ็นเอที่ติดฉลากด้วยทั้ง 3 วิธีนี้มีความไว (sensitivity) ในการตรวจสอบดีเอ็นเอของยุงได้ถึง 1-5 นาโนกรัม และยังตรวจสอบได้ถึง 1/200 - 1/400 ของปริมาตรที่สกัดได้จากยุง 1 ตัว

ยุงที่เก็บจาก 4 แหล่งในประเทศไทย ได้ถูกจำแนกโดยใช้ตัวติดตามที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ HRP ผลของการจำแนกยุง 182 ตัวด้วยวิธีนี้สอดคล้องกับผลของการจำแนกโดยใช้ลักษณะของโครโมโซมและรูปแบบไอโซเอนไซม์ นอกจากนี้ ยุงอีก 75 ตัวที่ไม่สามารถจำแนกด้วยวิธีการใด ยังถูกจำแนกด้วยตัวติดตามชนิดนี้ได้ผลอย่างชัดเจน

Copyright by Mahidol University

Thesis Title Identification of *Anopheles dirus* Isomorphic Species by Chemiluminescent DNA Probes.

Name Mongkon Audtho

Degree Master of Science (Biochemistry)

Thesis Supervisory Committee

Vichai Boonsaeng, Ph.D.

Sakol Panyim, Ph.D.

Prapon Wilairat, Ph.D.

Date of Graduation 30 October B.E. 2535 (1992)

ABSTRACT

Anopheles dirus is a major vector of malaria in Thailand and Southeast Asia. It was shown by cytogenetic and morphological studies to be a complex of at least six isomorphic species, provisionally designated species A, B, C, D, E and F on the Southeast Asian mainland. The five species found in Thailand (A-D, and F) exhibit distinct geographic distributions, seasonal variation in relative abundance and different nocturnal biting cycles. These biological characteristics of this group of mosquitoes may have implication for understanding the epidemiology of malaria in Southeast Asia.

Identification of wild-caught female depends on rearing families from them and examination of larval chromosomes which is complicated, slow and laborious. Another identification method is using isozyme analysis which requires fresh or frozen stored specimens that is impractical for epidemiological studies.

Species specific fragments, pMU-A40.1#5, pMU-B5, pMU-C19.2 and pMU-D9 which had been constructed since 1986, could be used as DNA probes for identification of species A, B, C and D respectively. But the disadvantages of

© Copyright by Mahidol University

the commonly used radio-isotopic DNA detection technique leads to its impractical use in the field conditions.

Chemiluminescent DNA detection technique is another option for identification of vector sibling species by nonradioactive means. In this study, DNA probes were amplified by PCR, and then directly labeled with hoseradish peroxidase (HRP). The signal generating technique was done by adding detection reagent, luminol, enhancer and H_2O_2 which are substrates for HRP. However, the normally squash-blot technique could not be used for this detection system because substances in mosquito tissue generated strong chemiluminescent signal with detection reagent. The signal from tissue could be eliminated by a phenol-chloroform extraction step before hybridization process.

In addition to direct labeling with HRP, the mosquito probes were labeled with fluorescein using both *Taq* DNA polymerase in PCR and terminal deoxynucleotidyl transferase. The fluorescein moieties were then detected by incubation with anti-fluorescein antibody-HRP conjugates. Both fluorescein labeling techniques have sensitivity comparable to direct labeling techniques; 1-5 ng purified DNA of *An. dirus* could be detected aftrer an exposure time of 30 minutes.

Field-caught specimens were collected from 4 localities in Thailand and identified. The results of identification of 182 mosquitoes were corresponding to cytogenetic and isozyme analysis studies. Moreover, 75 mosquitoes which were not identified by non DNA methods, were clearly detected by this chemiluminescent technique.

Copyright by Mahidol University