รายงานการวิจัย

ความเป็นพาหะต่อเชื้อไข้เลือดออกในยุงลายบ้านที่ติดเชื้อ *Wolbachia* จากเรือด

Vertorial capacity of *Aedes aegypti* mosquito infected with bed bug *Wolbachia* against the dengue virus

โดย

รศ. นพ เผด็จ สิริยะเสถียร

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ดร. อุษาวดี ถาวระ และ ดร. อภิวัฏ ธวัชสิน

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

พ.ศ. 2555

กิตติกรรมประกาศ

(Ackowledgement)

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้โดยได้รับความร่วมมือจากบุคลากรทั้งสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข และ จากภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ความเป็นพาหะต่อเชื้อไข้เลือดออกในยุงลายบ้านที่ติดเชื้อ *Wolbachia* จากเรือด
(Vertorial capacity of *Aedes aegypti* mosquito infected with bed bug *Wolbachia* against the dengue virus) ได้รับการสนับสนุนจากทุนอุดหนุนการวิจัยประจำปีงบประมาณ 2555 จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

คณะผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่าผลงานวิจัยนี้จะก่อให้เกิดประโยชน์ต่อประชาชน และบุคลากรทางการแพทย์

บทคัดย่อ

แบคทีเรีย *Wolbachia* F-supergroup สกัดจากเรือดที่ติดเชื้อ *Wolbachia* ในธรรมชาติ ถูกส่งถ่ายเข้าสู่ยุงลายบ้านโดยวิธีการ microinjection จากยุงลายบ้านเพศเมียที่เพิ่งออกจากระยะตัวโม่งจำนวน 41 ตัวที่ถูกฉีดเชื้อ *Wolbachia* 26 ตัวรอดชีวิตคิดเป็น 63 % และในจำนวนที่รอดชีวิตนั้น มีจำนวน 12 ตัวซึ่งคิดเป็น 46.1% ที่สามารถตรวจพบเชื้อ *Wolbachia* โดยวิธี PCR ประสิทธิภาพในการส่งถ่ายเชื้อ *Wolbachia* ในยุงลายบ้านในแต่ละรุ่นมีความผันผวน ถึงขณะรายงานนี้พบว่าเชื้อสามารถถ่ายทอดไปในแต่ละรุ่นของยุงลายบ้านถึงรุ่นที่ 9 การใช้เทคนิค Fluorescence in situ hybridization สามารถแสดงให้เห็นถึงการพบเชื้อ *Wolbachia*ในรังไข่ อัณฑะ และระยะตัวอ่อน (embryo)ความผันแปรของเบสในยีน *Wolbachia* surface protein (*wsp*) ของเชื้อ *Wolbachia* สามารถพบได้ตั้งแต่รุ่น G_1 นอกจากนี้ยังสามารถพบ Incomplete cytoplasmic incompatibility ในยุงที่ติดเชื้อ *Wolbachia* ด้วย การทำให้ติดเชื้อไวรัสไข้เลือดออก serotype 4 ในยุงลายบ้านที่ติดเชื้อ *Wolbachia* เทียบกับยุงลายบ้านที่ไม่ติดเชื้อ *Wolbachia* ในปริมาณเท่าๆกันพบว่าภายหลังการทำให้ติดเชื้อไข้เลือดออก 24 ชั่วโมงปริมาณเชื้อไข้เลือดออกในยุงลายที่ติดเชื้อ *Wolbachia* มีปริมาณน้อยกว่ายุงลายบ้านที่ไม่มีเชื้อ *Wolbachia* 2 เท่ารายงานนี้แสดงให้เห็นถึงความสำเร็จในการส่งถ่ายเชื้อ *Wolbachia* จากเรือดสู่ยุงลายบ้าน และ *Wolbachia* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อไวรัสไข้เลือดออกในยุงลายบ้านได้ *Wolbachia* จากเลือดน่าจะเป็นเครื่องมือใหม่ในการขับเคลื่อนยีนของยุงดัดแปลงพันธุกรรมเพื่อทดแทนยุงลายพาหะต่อไป

Abstract

Wolbachia F-supergroup from naturally infected Bed bug *Cimex hemipterus* was transfected into female *Aedes aegypti* mosquitoes by microinjection. The total of 41 newly emerged adult females *Ae. aegypti* were injected, 26 (63%) survived and 12 (46.1%) of the survived mosquitoes were positive for *Wolbachia* as detected by PCR. Transmission efficiency fluctuated between generations. At the time of this report, transfected lines of a total of 9 generations post-injection remain infected. Fluorescence in situ hybridization demonstrated the presence of *Wolbachia* in ovaries, testes and embryos of infected mosquitoes. Mutation of the *Wolbachia* surface protein (*wsp*) gene was observed in the G_1 progeny. Incomplete cytoplasmic incompatibility was also demonstrated in the transfected mosquito lines. Mosquitoes transfected with *Wolbachia* when infected with dengue serotype 4 have 2 times less number of dengue virus than untransfected mosquitoes. This is the first report of successful transfection of *Wolbachia* from *C. hemipterus* into *Ae. aegypti*. Bed bug *Wolbachia* has potential for used as a novel tool for a gene-driving system in genetically manipulated mosquitoes by suppression or replacement of vector populations.

KEY WORDS: Cytoplasmic Incompatibility, *Aedes aegypti*, *Cimex hemipterus, Wolbachia*

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	ii
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	iii
บทนำ	1
คำถามงานวิจัย	5
วัตถุประสงค์	5
สมมติฐาน	6
กรอบแนวความคิดในงานวิจัย	6
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	7
วิธีการดำเนินการ	8
ผลการวิจัยและการวิเคราะห์	25
สรุปและอภิปรายผล	41
เอกสารอ้างอิง	51

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันแม้ว่าโรคติดต่อหลายชนิดสามารถควบคุมได้ แต่โรคติดต่อที่มีแมลงเป็นพาหะยังคงเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศ โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคไข้เลือดออกซึ่งมีแนวโน้มการเกิดโรคสูงขึ้น เนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงทางสภาวะสิ่งแวดล้อม ทางเศรษฐกิจและสังคม การอพยพของประชากรเข้าสู่ตัวเมือง การขยายตัวของบริการด้านสาธารณูปโภคไม่ได้สัดส่วนสัมพันธ์กับการขยายตัวของชุมชน และนิสัยความเป็นอยู่ของประชาชนเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งมีส่วนทำให้ยุงพาหะชุกชุมและการแพร่กระจายโรคไปได้อย่างรวดเร็วและกว้างขวางโดยเฉพาะในแหล่งชุมชนที่มีประชากรอาศัยอยู่อย่างหนาแน่น [1] [2]

1.1 ยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*)

ยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) จัดเป็นยุงพาหะนำโรคที่มีความสำคัญทางการแพทย์ชนิดหนึ่ง โดยเฉพาะการเป็นพาหะนำโรคไข้เลือดออก โรคไข้เลือดออก (Dengue Hemorrhagic Fever) เป็นโรคติดเชื้อที่เกิดจาก Dengue virus มีลักษณะโรคที่สำคัญคือ มีไข้ร่วมกับมีอาการเลือดออก อาจเป็นที่ผิวหนังและ/หรืออวัยวะภายใน ตับ ไต และมักมีภาวะช็อคซึ่งทำให้เสียชีวิตได้ ส่วนยุงลายนั้น มีวงจรชีวิต แบ่งออกเป็น 4 ระยะ คือ ไข่ ลูกน้ำ ตัวโม่งและตัวเต็มวัย รวมแต่ละระยะของการเจริญมักจะกินเวลาประมาณ 7-10 วัน ในฤดูฝน และจะยาวนานเป็น 18 – 20 วัน ในฤดูหนาว [1] ยุงมีอายุประมาณ 1 เดือน ตัวผู้ของยุงทุกชนิดไม่ดูดเลือดแต่มีชีวิตอยู่ได้ด้วยการดูดน้ำหวานจากดอกไม้ ส่วนตัวเมียดูดกินเลือดเป็นอาหารเพื่อวางไข่ โดยส่วนใหญ่ยุงจะวางไข่มีลักษณะเป็นกระจายตามพื้นที่ที่มีลักษณะภูมิอากาศแบบร้อนชื้นของโลก ซึ่งยุงลายเป็นยุงบ้านที่อาศัยอยู่ภายในและรอบๆบ้าน ยุงตัวเมียเท่านั้นที่ดูดกินเลือดคนเป็นอาหารเฉพาะเวลากลางวัน เพาะพันธุ์ในน้ำใสในภาชนะ เช่น โอ่งน้ำ ถ้วยรองขาตู้กันมด แจกันดอกไม้ ยางรถยนต์ ปัจจุบันยังขาดวัคซีนหรือมาตรการป้องกันที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมและลดอุบัติการณ์การเกิดไข้เลือดออก ซึ่งในแต่ละปีมีผู้ติดเชื้อไวรัสไข้เลือดออกประมาณ 100 ล้านคน [32]

จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องพัฒนายุทธวิธีใหม่ๆเพื่อเสริมวิธีการควบคุมพาหะที่มีอยู่ให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น หนึ่งในนั้นคือยุทธวิธีการแทนที่ประชากร (Population replacement) ของยุงลายบ้าน *Aedes aegypti* ในธรรมชาติด้วยประชากรยุงลายแปลงสายพันธุ์ให้มีความสามารถต่อต้านการส่งถ่ายเชื้อไวรัสไข้เลือดออก เช่น การใช้เทคโนโลยีของ RNA interference และ Genomic Sequencing เพื่อสร้างยุงลายสายพันธุ์ใหม่ที่มียีนต่อต้านเชื้อก่อโรคและสามารถถ่ายทอดลักษณะดังกล่าวทางพันธุกรรมได้อย่างถาวร [3] [4] [19]

1.2 เชื้อไวรัสไข้เลือดออก (Dengue virus) อาการและอาการแสดงของโรคไข้เลือดออก

ไวรัสไข้เลือดออกเป็น Single-strand positive-polarity RNA virus อยู่ในวงศ์ Flaviviridae แบ่งเป็น 4 ชนิด คือ dengue types 1-4 การระบาดของเชื้อไวรัสเกี่ยวข้องกับการที่ยุงดูดเลือดที่มีเชื้อแล้วไปกัดคนอื่นทำให้เกิดการถ่ายทอดเชื้อได้ หลังจากยุง

ได้รับเชื้อจากการดูดเลือดแล้ว ในระหว่าง 8-10 วัน (extrinsic incubation period) ไวรัสในตัวยุงจะมีการเพิ่มจำนวนใน mononuclear phagocyte [32] และแพร่กระจายไปยังต่อมน้ำลายเพื่อรอถ่ายทอดเชื้ออีกครั้ง นอกจากนี้การดูดเลือดถือเป็นการกระตุ้นให้ยุงเพศเมียวางไข่จึงเป็นโอกาสทำให้ไวรัสสามารถแพร่เชื้อไปยังไข่และติดเชื้อในยุงรุ่นต่อไป และสามารถถ่ายทอดเชื้อผ่านวงจรการดำเนินชีวิตของมนุษย์และวงจรชีวิตของยุงพาหะหรือยุงลายบ้าน *Aedes aegypti* ได้

อาการและอาการแสดงของไข้เลือดออกมี 2 แบบคือ classical dengue fever มีอาการ 3-8 วันหลังจากถูกยุงมีเชื้อกัด อาการที่สำคัญ เช่นว่า อุณหภูมิร่างกายสูงกว่าปกติ ปวดหัว ไข้สูง ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ ปวดตามกระดูกหรือข้อต่อ และอีกแบบคือ dengue hemorrhagic fever (DHF)/ dengue shock syndrome (DSS) คือ เป็นไข้เลือดออกชนิดที่รุนแรงซึ่งเกี่ยวข้องกับพยาธิสภาพทางภูมิคุ้มกัน (immunopathology) และเกิดเฉพาะกับผู้ที่เคยได้รับเชื้อ dengue virus มาก่อนแล้ว อาการ คือ อาการทรุดอย่างรวดเร็ว ทำให้มีอาการปวดท้องร่วมด้วย หงุดหงิด กระสับกระส่าย ระคายเคือง เกล็ดเลือดต่ำ และอาการเลือดออกจากเส้นเลือดฝอย เลือดเข้มข้น และความดันต่ำ ปัจจุบันยังไม่มียารักษาที่มีประสิทธิภาพ ซึ่งวิธีการรักษาเป็นการรักษาแบบประคับประคอง [32]

1.3 การควบคุมพาหะก่อโรค (Vector Control)

สารเคมีกำจัดแมลง (insecticides) ถือเป็นวิธีการเริ่มต้นในการนำมาใช้ควบคุมแมลงพาหะ แต่ยังไม่มีประสิทธิภาพพอ เนื่องจากเกิดการดื้อยาของแมลง และมีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม รวมถึงเกิดปัญหาทางเศรษฐกิจและสังคมของประเทศ และส่งผลสะท้อนถึงการดูแลเอาใจใส่ปัญหาสาธารณสุข ทั้งนี้ยังขาดวิธีการควบคุมที่มีประสิทธิภาพมาใช้ป้องกันและรักษาโรคไข้เลือดออกอีกด้วย ปัจจุบันนี้ยังมีการพัฒนาวิธีการควบคุมยุงพาหะด้วยวิธีการดัดแปลงพันธุกรรมของยุงเพื่อยับยั้งการระบาดของเชื้อก่อโรคในยุงธรรมชาติ อย่างไรก็ตามวิธีการนี้ก็ยังขาดประสิทธิภาพในการขับเคลื่อนยีนให้ถ่ายทอดทางพันธุกรรมไปสู่ลูกหลานได้ วิธีการการดัดแปลงพันธุกรรมของยุงดังกล่าวอาจประสบผลสำเร็จได้ด้วยการนำเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* มาประยุกต์เป็นพาหนะขับเคลื่อนยีนผ่านไซโตพลาสซึมของยุงในธรรมชาติได้ด้วยอัตราที่สูง ด้วยหลักการติดเชื้อของแบคทีเรีย [5] [48]

1.4 การประเมินสมรรถนะของยุงดัดแปลงพันธุ์

การประเมิน Fitness cost หรือสมรรถนะของยุงลายบ้านหลังได้รับเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* นั้นเป็นการศึกษาความสามารถในการอยู่รอดและความสามารถในการสืบพันธุ์ของยุงเป็นหลัก โดยพิจารณาพารามิเตอร์ต่างๆดังต่อไปนี้คือ ความสามารถในการวางไข่ (fecundity) ความสามารถในการมีชีวิตรอดของลูกน้ำจากการฟักตัว (fertility) จำนวนลูกน้ำที่รอดชีวิตกระทั่งหมดระยะลูกน้ำ (larval biomass productivity) อัตราการพัฒนาไปสู่ระยะต่อไป (developmental rate) และการแข่งขันเข้าคู่ผสมพันธุ์ (mating competitiveness) ในอนาคตอาจจะสามารถนำเชื้อ *Wolbachia* มาประยุกต์ใช้เพื่อเพิ่มสมรรถนะ

ของยุงดัดแปลงพันธุกรรม (Transgenic mosquitoes) ด้วยการทำ microinjection ให้มีความสามารถแข่งขันกับยุงตามธรรมชาติได้ [31] ซึ่งยุงที่ได้รับเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* นี้ น่าจะมีความแข็งแรงและมีสมรรถนะที่ดีกว่ายุงที่ไม่ได้รับเชื้อ *Wolbachia*

ทั้งนี้การประเมิน fitness cost ในยุงตัวผู้ประกอบด้วย ประการแรกคือ การนับปริมาณอสุจิเนื่องจากยุงตัวผู้ที่ติดเชื้อ *Wolbachia* ซึ่งอาจมีผลต่อการผลิตปริมาณอสุจิทั้งด้านปริมาณและ/หรือคุณภาพ ประการที่สองคือ การประมาณอายุของยุง เพราะการติดเชื้อในยุงตัวผู้อาจจะมีผลทำให้ยุงมีอายุยืนยาวหรือสั้นลงได้ หากยุงตัวผู้ติดเชื้อแบคทีเรียมีอายุยืน จะทำให้เกิดปรากฏการณ์ Unidirectioal CI ได้มากขึ้น และ/หรืออาจเป็นผลดีหากมีการผสมพันธุ์กับยุงตัวเมียที่ติดเชื้อสายพันธุ์เดียวกันซึ่งลูกยุงจะมีชีวิตรอดและยุงตัวผู้ยังสามารถผสมกับตัวเมียได้หลายครั้ง ประการที่สามวัดขนาดตัวของยุง ด้วยการวัดความยาวของเส้นปีก เนื่องจากแบคทีเรียอาจมีผลต่อขนาดร่างกายของยุงตัวผู้ หากเชื้อแบคทีเรียมีผลกระทบเชิงบวกโดยทำให้ขนาดร่างกายของยุงใหญ่กว่ายุงตามธรรมชาติจะเป็นผลดีต่อการแข่งขันผสมพันธุ์กับตัวเมีย ซึ่งสามารถแพร่กระจายเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ในประชากรของยุงได้ดีกว่า โดยปกติแล้วปริมาณอสุจิที่ผลิตได้ของยุงลายบ้าน *Aedes aegypti* ยังขึ้นอยู่กับอายุ (age) ขนาดของร่างกาย (body size) ชนิดของยุง (strain) และศักยภาพในการขยายพันธุ์ของยุง (potential reproductive fitness) ซึ่งยุงที่มีขนาดใหญ่กว่า (ความยาวเส้นปีก; Winglength) อายุมากกว่าจะมีสมรรถนะและความแข็งแรงต่อการแข่งขันการผสมพันธุ์ที่ดีกว่ายุงที่มีขนาดเล็กเนื่องจากสามารถผลิตอสุจิในอัณฑะ (testes) และถุงน้ำเชื้อ (seminal vesicle) ได้ในปริมาณมากกว่าจึงสามารถผสมพันธุ์กับยุงตัวเมียได้หลายตัวต่อวันและหลายๆวัน การศึกษาชีววิทยาการสืบพันธุ์ของยุงเป็นปัจจัยพื้นฐานสำคัญต่อการควบคุมเชิงพันธุศาสตร์ของยุงลายพาหะได้ในอนาคต [40] ในทางกลับกันยุงลายบ้านสายพันธุ์ Rockefeller (ROCK) อายุ 5 วันสามารถสร้างอสุจิทั้งหมดในปริมาณมากกว่ายุงอายุ 15 วันเนื่องจากยุงที่แก่กว่าจะมีการเก็บอสุจิไว้ในอวัยวะเก็บอสุจิอย่างดีและแน่นจึงยากที่จะหาปริมาณอสุจิได้อย่างถูกต้อง [10] เชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia pipientis* นั้นถือเป็นปัจจัยสำคัญประการหนึ่งในการกำหนดสมรรถนะของแมลงขาปล้อง เช่น มีผลทำให้การผลิตตัวอสุจิลดลงจึงทำให้ประสิทธิภาพในการแข่งขันการผสมพันธุ์ของ *Drosophila simulans* ที่ติดเชื้อลดลงเนื่องจากถูกเหนี่ยวนำจากปรากฏการณ์ความไม่เข้ากันของไซโตพลาสซึม และพบว่าตัวเมียที่ผสมพันธุ์กับตัวผู้ที่ติดเชื้อสามารถผลิตลูกรุ่นต่อมาได้ร้อยละ 71 ซึ่งน้อยกว่าตัวเมียที่ผสมพันธุ์กับตัวผู้ที่ปลอดเชื้อที่สามารถผลิตลูกได้ถึงร้อยละ 82 ซึ่งตรวจสอบการติดเชื้อด้วย Polymerase Chain Reaction (PCR)

ในระหว่างการปฏิสนธิ ตัวอสุจิของ *Nasonia vitripennis* ที่ติดเชื้อมีพฤติกรรมเป็นปกติในเซลล์ไข่ คือนอกจากรูปร่างมีลักษณะเป็นแท่ง (Rod-shaped) แล้วจะเห็นเซ็นโตโซมสองอันหลังจากเข้าไปในเซลล์ คล้ายกับตัวอสุจิที่ปลอดเชื้อแสดงว่าแบคทีเรีย *Wolbachia* ไม่ได้ทำลายเซ็นโตรโซม แต่การเกิด CI นั้นมีการทำลายเยื่อหุ้มโปรนิวเคลียส ในที่สุดจึงเกิดการสูญเสียโครโมโซมทางพ่อในกระบวนการแบ่งนิวเคลียสระยะต้น (First mitosis) แต่ในเซลล์ไข่แบคทีเรีย *Wolbachia* จะยับยั้ง CI ฉะนั้นจึงกล่าวได้ว่าแบคทีเรีย *Wolbachia* เป็นโปรตีนควบคุม (Regulatory protein) วัฏจักรของเซลล์ [51] อีกปัจจัยหนึ่งที่ช่วยให้ *Wolbachia* ขยายพันธุ์ได้อย่างสำเร็จคือการถ่ายทอดเชื้อทางแม่อย่างมีประสิทธิภาพ เพราะมีการกระจายเชื้อที่มีความเข้มข้นสูงในระยะกลางของการสร้างไข่ (oogenesis) บริเวณ anterior ของไข่โดยอาศัย microtubule และ Dynein/Dynactin complex [16]

ส่วนการประเมิน fitness cost ในยุงตัวเมียประกอบด้วย ประการแรกคือ นับจำนวนไข่ที่ยังมีชีวิตและนับจำนวนไข่ที่ตาย (Average egg/cross and % egg mortality) เพราะ *Wolbachia* อาจมีผลต่อปริมาณการสร้างไข่ของยุง หากสร้างได้ปริมาณมากจะเป็นผลดีต่อการแพร่เชื้อของ ประชากรยุงในธรรมชาติ ประการที่สองคือ อัตราส่วนของเพศเมียในแต่ละรุ่น (Sex ratio (Female/total)) เพราะหากยุงรุ่นนั้นๆมีเพศเมียมากและมีการติดเชื้อจำนวนมากจะเป็นผลดีต่อการแพร่เชื้อในประชากรยุงในธรรมชาติและลดการเกิด CI และประการที่สามคือ วัดความสามารถในการอยู่รอด (% Survival; Hatch, Pupation and Eclosion) และอายุของยุง (Longevity) ตั้งแต่ระยะ Larva, Pupa กระทั่ง Adult เพื่อประเมินผลของการติดเชื้อแบคทีเรีย หากเป็นผลเชิงบวกโดยเฉพาะระยะตัวเต็มวัย (adult) จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการกระจายเชื้อแบคทีเรียได้มากขึ้น และตรวจสอบการติดเชื้อด้วย PCR

เทคนิค semi-nested PCR เป็นวิธีการที่สามารถใช้ในการตรวจสอบยืนยันการติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ได้ทั้งในยุงเพศผู้และเพศเมียแต่ละรุ่น ซึ่งเป็นวิธีทดสอบที่มีความจำเพาะต่อเชื้อแคทีเรียซึ่งเป็นวิธีที่ได้รับความน่าเชื่อถือ และ/หรือ การยืนยันอัตราการติดเชื้อด้วยวิธี Fluorescence *in situ* hybridizations (FISH) ในเซลล์ไข่ของยุงลายที่ติดเชื้อได้ อย่างจำเพาะ โดยจะมีปริมาณการติดเชื้อสูงที่บริเวณด้านหน้า (Anterior region) ด้านหลัง (Posterior region) และส่วนเปลือก (Cortical region) ของไข่ แต่ Xi และคณะ พบว่าปริมาณความถี่ของการติดเชื้อขีดเริ่มต้น (Threshold infection frequency) เท่ากับร้อยละ 20 นั้นเหมาะสมต่อการการแพร่เชื้อต่อไปได้จนถึงรุ่นที่ 7 และพบว่าอัตราการติดเชื้อเท่ากับร้อยละ 100 และคงที่ในระดับเดิมนี้จนรุ่นที่ 9 [60] แต่ถ้าอัตราการติดเชื้อเริ่มต้นที่ร้อยละ 2 จะพบว่าไม่มีการแพร่เชื้อไปยังรุ่นลูกหลานได้เพราะความถี่ในการถ่ายทอดเชื้อขึ้นกับขีดจำกัดเริ่มต้นของระดับ CI รวมถึงความจำเพาะของการแพร่เชื้อผ่านทางแม่และสมรรถนะของเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* เอง [22]

1.5 เชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* spp. และการแทนที่ประชากร (Population Replacement)

Wolbachia เป็นแบคทีเรียที่อยู่อาศัยร่วม (endosymbiosis) กับสัตว์ขาปล้องโดยเฉพาะแมลงและ crustacean พบได้ที่บริเวณเนื้อเยื่อของอวัยวะสืบพันธุ์ (reproductive tissues) จากการศึกษาลำดับเบส (sequencing) โดยใช้ยีน 16s rRNA พบว่า *Wolbachia* จัดอยู่ในกลุ่ม alpha-Proteobacteria เป็น subdivision ของ purple bacteria และมีความใกล้ชิดกับ *Escherichia* และ *Rickettsia* ที่เป็นแบคทีเรียที่อาศัยในสัตว์ขาปล้องพาหะนำโรคเช่นกัน [37] จากการศึกษาทาง Phylogeny พบว่า *Wolbachia* กระจายอยู่ทั่วไปในแมลงให้อาศัยหลายชนิดซึ่งน่าจะเป็นการบ่งชี้ว่ามีการถ่ายทอด *Wolbachia* ข้ามสายพันธุ์ (Horizontal transmission) และระหว่างชนิดของแมลงขาปล้องได้ [57] [63] ปัจจุบันยังขาดวัคซีนหรือมาตรการป้องกันที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมและลดอุบัติการณ์การเกิดไข้เลือดออก ในแต่ละปีมีผู้ติดเชื้อไวรัสไข้เลือดออกประมาณ 100 ล้านคน [32] จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องพัฒนายุทธวิธีใหม่ๆเพื่อเสริมวิธีการควบคุมพาหะที่มีอยู่ให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น หนึ่งในนั้นคือยุทธวิธีการแทนที่ประชากร (Population replacement) ของยุงลาย *Aedes aegypti* ในธรรมชาติด้วยประชากรยุงลายดัดแปลงสายพันธุ์ให้มีความสามารถต่อต้านการส่งถ่ายเชื้อไวรัสไข้เลือดออก เช่น การใช้เทคโนโลยีของ RNA interference เพื่อสร้างยุงลายสายพันธุ์

ใหม่ที่มียีนต่อต้านเชื้อก่อโรคให้สามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรมได้ [3] [4] [19] แต่วิธีการที่เกี่ยวข้องกับการดัดแปลงพันธุกรรมยุงนี้กลับประสบความสำเร็จในการถ่ายทอดทางพันธุกรรมไปในประชากรยุงในธรรมชาติในอัตราต่ำ เนื่องจากยุทธวิธีการดังกล่าวนั้นจำเป็นต้องมีพาหนะ (Vehicle) ในการขับเคลื่อนยีนต้านเชื้อก่อโรคที่มีประสิทธิภาพและเหมาะสม เพื่อให้มีการแพร่กระจาย Transgenes (ยีนที่ใส่เข้าไปใหม่ในยุงหรือยีนที่ต้องการให้มีการแสดงออกในยุงเช่นยีนที่ไปยับยั้งการเจริญของเชื้อไวรัส) ไปยังประชากรเป้าหมายในธรรมชาติได้อย่างอัตโนมัติและรวดเร็วกว่าเมื่อเทียบกับการปล่อยให้ถ่ายทอดยีนทางพันธุกรรมตามกฎของเมนเดล (Mendelian inheritance) และมีสมรรถนะ (Fitness cost) ในระบบของการขับเคลื่อนยีนต้านเชื้อไวรัสที่สูง เพื่อให้ระบบดังกล่าวสามารถแทนที่ประชากรยุงในธรรมชาติได้

ดังนั้น ด้วยความสามารถและคุณสมบัติของการแพร่เชื้อของ *Wolbachia* สู่ประชากรแมลงขาปล้องในธรรมชาติด้วยกลไก CI ดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น จึงควรแก่การนำข้อดีนี้มาประยุกต์เป็นส่วนหนึ่งในยุทธวิธีการควบคุมและแทนที่ประชากรของแมลงพาหะของเชื้อก่อโรค (Population replacement and repression) [61] จึงเป็นที่มาของงานวิจัยนี้เพื่อประเมินและศึกษาผลกระทบของเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* สายพันธุ์ F ที่สกัดจากตัวเรือด (Bedbugs; *Cimex hemipterus*) ต่อสมรรถนะของประชากรยุงลายบ้าน *Aedes aegypti* ในธรรมชาติ เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการนำพาและขับเคลื่อนยีนต้านและ/หรือยับยั้งเชื้อก่อโรคที่ถูกเชื่อมกับแบคทีเรีย *Wolbachia* แล้วส่งถ่ายยีนเข้าไปในประชากรของยุงพาหะได้อย่างมีประสิทธิภาพและสมรรถนะที่สูงเพียงพอ

คำถามสำหรับงานวิจัย

<u>คำถามหลัก</u> เชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* F-supergrop จากเรือดเขตร้อน *Cimex hemipterus* มีความสามารถติดเชื้อยุงลายบ้าน *Aedes aegypti* ที่ปลอดเชื้อหรือไม่

<u>คำถามรอง</u> ยุงลายบ้านติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* F-supergrop มีสมรรถนะที่แตกต่างจากยุงปลอดเชื้อหรือไม่

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของการติดเชื้อและการถ่ายเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่สกัดได้จากเรือด (bed bug) ข้ามสายพันธุ์สู่ยุงลายบ้าน *Aedes aegypti* โดยวิธี direct microinjection

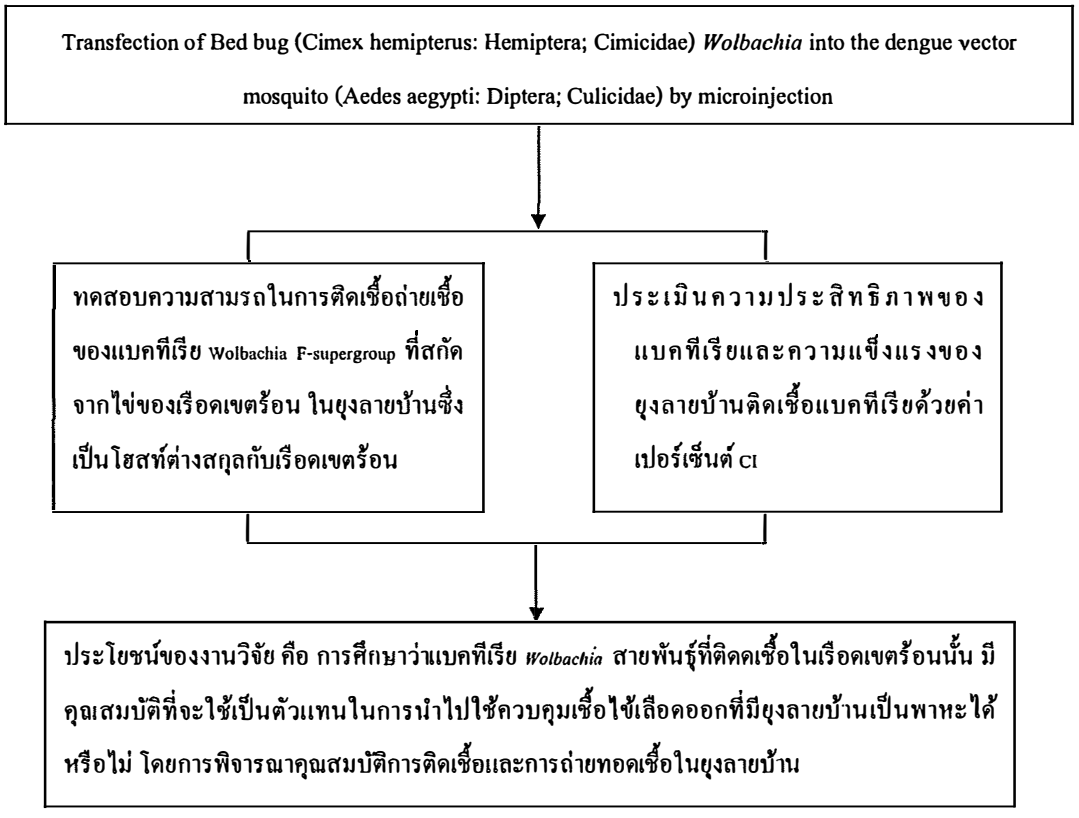
เพื่อประเมินสมรรถนะของยุงลายบ้านติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* F-supergrop ด้วยการพิจารณา การเกิดความไม่เข้ากันของ Cytoplasm (CI expression)

สมมติฐาน (Hypothesis)

ยุงลายบ้าน *Aedes aegypti* ที่ได้รับการส่งถ่ายเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* จากเรือดโดยวิธี direct microinjection จะมีสมรรถนะในการปรับตัวให้มีชีวิตอยู่ในธรรมชาติแตกต่างจากยุงลายบ้านที่ปลอดเชื้อ และถ่ายทอดการติดเชื้อสู่ลูกหลานได้

ค่าเปอร์เซ็นต์ CI ของยุงลายบ้านติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* F-supergrop มีค่าสูงพอที่จะแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพและประโยชน์ต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในอนาคต

กรอบแนวความคิดในงานวิจัย (Conceptual Framework)



คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

CI (Cytoplasmic Incompatibility) คือ ปรากฏการณ์การไม่เข้ากันของ Cytoplasm ที่เกิดจากการผสมพันธุ์ระหว่างแมลงเพศผู้ที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* กับแมลงเพศเมียที่ไม่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ทำให้เกิดความผิดปกติของลูกหลาน เช่น ตัวอ่อนไม่สามารถเจริญเติบโตได้ และตายในที่สุด หรือเกิดความพิการ

Fitness cost คือ ความสามารถในการอยู่รอด (survival) และ/หรือสมรรถนะในการแข่งขันสืบพันธุ์ (reproduction) เพื่อส่งถ่ายยีนไปสู่รุ่นต่อไป ซึ่งจำเป็นต้องปรับเปลี่ยนพฤติกรรมของสิ่งมีชีวิตนั้นเพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาตัวเองให้สามารถมีชีวิตอยู่รอดในธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงได้

Aedes aegypti คือ ยุงลายบ้าน (Mosquitoes) จัดอยู่ใน kingdom Animalia, phylum Arthropoda, class Insecta, order Diptera, family Culicidae และ genus Aedes จัดเป็นยุงพาหะนำโรคที่มีความสำคัญทางการแพทย์ชนิดหนึ่ง โดยเฉพาะโรคไข้เลือดออก มีวงจรชีวิตแบ่งออกเป็น 4 ระยะ คือ ไข่ ลูกน้ำ ตัวโม่งและตัวเต็มวัย รวมแต่ละระยะของการเจริญมักจะกินเวลาประมาณ 7-10 วัน

Cimex hemipterus คือ เรือดเป็นปรสิตภายนอกร่างกายที่ดำรงชีวิตอยู่ได้ด้วยการดูดเลือดของโฮสต์ ดังเช่น นก ค้างคาวและมนุษย์ ซึ่งไม่ถือเป็นพาหะของโรค โดยถูกจัดอยู่ใน family Cimicidae

Wolbachia คือ แบคทีเรียแกรมลบ (gram negative bacillus) ชนิดหนึ่ง ซึ่งดำรงชีวิตโดยจำเป็นต้องอาศัยอยู่ภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น (host) ไม่สามารถเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยทั่วไปได้ และถ่ายทอดลักษณะผ่านทางแม่เท่านั้น พบในสัตว์ขาปล้อง (arthropods) และ filarial nematodes พบครั้งแรกในยุง *Culex pipiens* สามารถทำให้เกิดความแตกต่างด้านการผสมพันธุ์ของ host

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถนำผลการเปรียบเทียบสมรรถนะของยุงลายบ้าน *Aedes aegypti* ที่ได้รับการส่งถ่ายเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* จากเรือดโดยวิธี direct microinjection ไปเป็นข้อมูลมาประยุกต์เป็นยุทธวิธีในการควบคุมและแทนที่ประชากร (Population replacement and repression) ประชากรยุงพาหะเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการป้องกันการเป็นพาหะนำโรคของยุง (disease-blocking transgenes) โดยมี *Wolbachia* เป็นพาหนะ (Vehicle) ในการขับเคลื่อนยีนได้อย่างมีประสิทธิภาพและเหมาะสม

2. เป็นข้อมูลสำหรับโครงการวิจัยอื่นต่อไปในการศึกษาทดลองเปรียบเทียบการแข่งขันความสามารถในการแข่งขันของยุงที่ติดเชื้อกับยุงตามธรรมชาติได้ ในการควบคุมทางพันธุกรรมของยุงลายบ้าน พาหะของ Arbovirus ที่สำคัญในอนาคต

วิธีดำเนินการวิจัย

1 การเลี้ยงยุงลายบ้าน

สายพันธุ์ยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) ได้มาจากฝ่ายชีววิทยาและนิเวศวิทยาสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข หนูขาว (mice) ได้มาจากศูนย์สัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยมหิดล

ทำการฟักไข่ยุงในถาดพลาสติกที่มีขนาดกว้าง 20 เซนติเมตร ยาว 30 เซนติเมตร สูง 10 เซนติ.เมตร เติมน้ำปริมาณ 1 L เพื่อให้ยุงฟักออกจากไข่เป็นลูกน้ำภายในเวลาประมาณ 30 – 60 นาทีหรือแล้วแต่อายุของไข่ หลังจากที่ลูกน้ำถูกฟักออกจากไข้แล้ว ให้อาหารเม็ดที่บดให้ได้ขนาดพอประมาณและเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 28^{0}C จนเป็นตัวเต็มวัย ความชื้น 70-80%

2 การผสมพันธุ์ยุงลายบ้าน เพื่อให้มีการส่งถ่ายเชื้อ

นำยุงที่ได้รับการติดเชื้อ *Wolbachia* จากเรือด มาทำการทดลอง เพื่อทดสอบการส่งถ่ายเชื้อ (Crosses of Transinfected Lines) และสมรรถนะ (Fitness cost) ของยุงที่ติดเชื้อเปรียบเทียบยุงตามธรรมชาติ ดังนี้

2.1) นำไข่ยุง (Eggs) บนกระดาษกรองมาฟักไข่ในกระบะขนาด 6 × 12 นิ้ว ที่มีน้ำสะอาดปริมาตร 1.5 L ที่อุณหภูมิ 28^{0}C ประมาณ 30 นาที - 24 ชั่วโมง เพื่อศึกษาอัตราการฟักไข่โดยการนับปริมาณลูกน้ำทั้งหมดต่อกระดาษกรอง 1 แผ่น

2.2) ให้อาหารลูกน้ำ (Lavae) วันละครั้งนับตั้งแต่ฟักไข่ระยะที่ 1 จนกระทั่งระยะที่ 4 ซึ่งใช้ระยะเวลาประมาณ 5-6 วัน หลังจากฟักไข่ยุงประมาณ 3 วัน ใช้หลอดหยดนับปริมาณลูกน้ำทั้งหมดต่อ 1 กระบะเพื่อศึกษาอัตราการฟักและอัตราการตายของตัวอ่อน

2.3) หลังจากเลี้ยงลูกน้ำจนระยะที่ 4 ลูกน้ำได้พัฒนาเป็นระยะตัวโม่ง (Pupae) แล้วเก็บแยกไว้ในกระป๋องพลาสติกเพื่อแยกเพศของยุง หลังจากนี้จะพัฒนากลายเป็นยุงตัวเต็มวัยโดยใช้เวลาประมาณ 2 วัน ระยะนี้ไม่ต้องให้อาหาร

2.4) หลังจากยุงพัฒนาเป็นตัวเต็มวัยแล้ว เก็บยุงเข้ากรงเลี้ยงที่มีขนาด 9×9×9 นิ้วโดยแยกเพศและกลุ่มดังนี้

กรงที่ 1 คือ ยุงเพศเมียติดเชื้อ *Wolbachia* สายพันธุ์ F

กรงที่ 2 คือ ยุงเพศผู้ติดเชื้อ *Wolbachia* สายพันธุ์ F

กรงที่ 3 คือ ยุงเพศเมียปลอดเชื้อ *Wolbachia* สายพันธุ์ F

สารบัญตาราง หน้า

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบของสารผสมของ PCR 14

ตารางที่ 2 สภาวะอุณหภูมิและเวลาของ PCR 15

ตารางที่ 3 ส่วนประกอบของเชื่อม Insert DNA เข้ากับ pGEM®-T Easy vector 18

ตารางที่ 4 แสดงแสดงปริมาณ copy gene of *16S rDNA* ของ *Wolbachia* จากตัวอย่างยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) 29

ตารางที่ 5 แสดงแสดงปริมาณ copy gene of *RpS17* ของยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti)* 30

ตารางที่ 6 CI model resulting from the establishment of naturally *Wolbachia*-uninfected *Ae. aegypti* and transfected *Ae. aegypti* mosquitoes 45

ตารางที่ 7 ผลของเชื้อแบคทีเรียต่อปริมาณเชื้อไวรัส ซึ่งพบว่าปริมาณเชื้อไวรัสในกลุ่มทดลองน้อยกว่า กลุ่มควบคุมถึงสองเท่าหลังทดลอง 40 ชั่วโมง 48

สารบัญรูปภาพ หน้า

ภาพที่ 1 ภาชนะกระป๋องพลาสติกสำหรับจับยุงผสมพันธุ์เป็นคู่ 9

ภาพที่ 2 ไข่ยุงตากแห้งบนกระดาษกรองที่เตรียมนับจำนวนไข่ด้วยกล้องจุลทรรศน์ 10

ภาพที่ 3 รังไข่หนึ่งข้างของยุงเพศเมียในสารละลาย 1xPBS ที่สกัดบนสไลด์แก้ว 11

ภาพที่ 4 รังไข่ 1 คู่ของยุงเพศเมีย สกัดจากบริเวณสองปล้องสุดท้ายจากส่วนท้องของยุงลง ในสารละลาย 1xPBS ที่สกัดบนสไลด์แก้วภายใต้กล้องจุลทรรศน์ 11

ภาพที่ 5 อัณฑะ 1 คู่ของยุงเพศผู้ สกัดจากบริเวณสองปล้องสุดท้ายจากส่วนท้องของยุงลง ในสารละลาย 1xPBS ที่สกัดบนสไลด์แก้วภายใต้กล้องจุลทรรศน์ 11

ภาพที่ 6 รังไข่ (แถวบน) และอัณฑะ (แถวล่าง) บนสไลด์ super-force one plus 12

ภาพที่ 7 pGEM®-T Easy vector และ ภาพแสดงบริเวณแทรกดีเอ็นเอเป้าหมาย (cloned insert) ที่ต้องการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ 17

ภาพที่ 8 จำนวนไข่ยุงที่ต้องการนับภายใต้กล้องดิจิตอล 24

ภาพที่ 9 PCR ยีน 16S rDNA ของ *Wolbachia* bacteria ขนาด 136 bp 26

ภาพที่ 10 ยีน *RpS17* (Housekeeping gene) ของ *Aedes aegypti* 26

ภาพที่ 11 แสดงโคโลนีสีขาวและสีน้ำเงินในเพลท LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน X-Gal และ IPTG และโคโลนีสีขาวที่ปลายหัวลูกศร 27

ภาพที่12 Demonstrates the extent of 16s rDNA gene fragments of *Wolbachia* bacteria endosymbionts which naturally infected *C. hemipterus* and transfected *Ae. aegypti* (G0-G9) 27

ภาพที่ 13 กราฟแสดงการ amplified ยีน *16S rDNA* ของ *Wolbachia* จากตัวอย่างยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) ด้วย Quantitative SYBR Green based real time PCR 28

หน้า

ภาพที่ 14 กราฟแสดงการ amplified ยีน *RpS17* ของยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*)
ด้วย Quantitative SYBR Green based real time PCR 31

ภาพที่ 15 Demonstration of transformation efficiency of transfected
Ae. aegypti, (n= number of mosquito sample tested) 32

ภาพที่ 16 แสดงภาพถ่ายจากกล้องฟลูออเรสเซ็นต์ 33-34

ภาพที่ 17 แสดงภาพถ่ายจากกล้อกล้องคอนโฟคอลรังไข่ยุง 35

ภาพที่ 18 แสดงภาพถ่ายจากกล้อกล้อฟลูออเรสเซ็นต์ตัวอ่อน 36

ภาพที่ 19 แสดงภาพถ่ายจากกล้อกล้องคอนโฟคอลตัวอ่อน 37-39

ภาพที่ 20 ภาพจากกล้องคอนโฟคอล (อัณฑะ) 40-41

ภาพที่ 21แสดง Melting curve ของเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* จากส่วนท้องของยุงล้ายบ้านกลุ่มทดลอง
และกลุ่มควบคุม 46

ภาพที่ 22 แสดง Melting curve ของเชื้อ Dengue serotype 4 จากส่วนหัวและอกของยุงลายบ้านกลุ่มทดลอง
และกลุ่มควบคุม 47

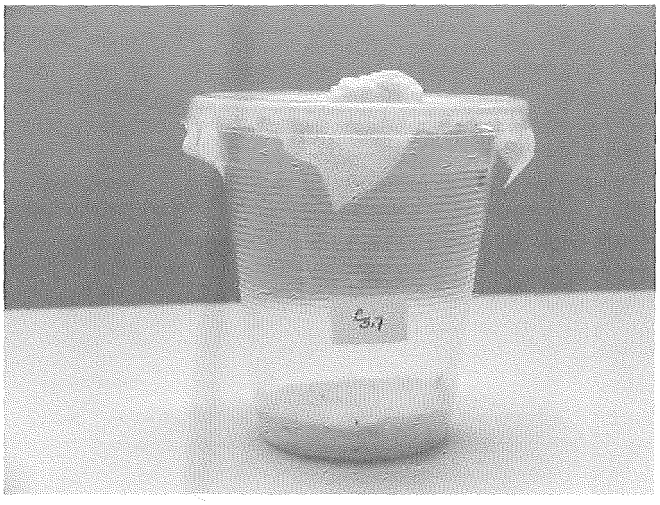
ภาพที่ 23 แสดง Melting curve ของเชื้อ RP17S ของยุงลายบ้านกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม 48

กรงที่ 4 คือ ยุงเพศผู้ปลอดเชื้อ *Wolbachia* สายพันธุ์ F

และให้สำลีชุบน้ำหวาน (10% กลูโคส) เป็นอาหารซึ่งเปลี่ยนสำลีใหม่ทุกวัน ในขั้นตอนนี้ใช้ระยะเวลาประมาณ 3 วัน

2.5) อดอาหารยุงประมาณ 3-5 ชั่วโมง แล้วนำยุงไปกินเลือดหนูขาว (Mice) เพื่อให้ยุงเพศเมียได้รับโปรตีนเพื่อใช้สร้างไข่ที่สมบูรณ์ [4] ใช้เวลาประมาณ 30 นาที ถึง 1 ชั่วโมง

2.6) ดูดยุงออกจากกรงเพื่อให้จับคู่ผสมพันธุ์ยุงในแก้วพลาสติกที่มีกระดาษกรองชุ่มน้ำอยู่ส่วนล่างในแก้ว (ภาพที่ 1) ดังนี้



ภาพที่ 1 ภาชนะกระป๋องพลาสติกสำหรับจับยุงผสมพันธุ์เป็นคู่

กลุ่ม A คือ คู่ผสมพันธุ์ของยุงที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* สายพันธุ์ F ทั้งตัวผู้และตัวเมีย (Infected pair of parent)

กลุ่ม B คือ คู่ผสมพันธุ์ของยุงที่มีตัวเมียติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* สายพันธุ์ F กับยุงเพศผู้ปลอดเชื้อ *Wolbachia* (Infected female)

กลุ่ม C คือ คู่ผสมพันธุ์ของยุงที่มีตัวเมียปลอดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* สายพันธุ์ F กับยุงเพศผู้ติดเชื้อ *Wolbachia* (Infected male)

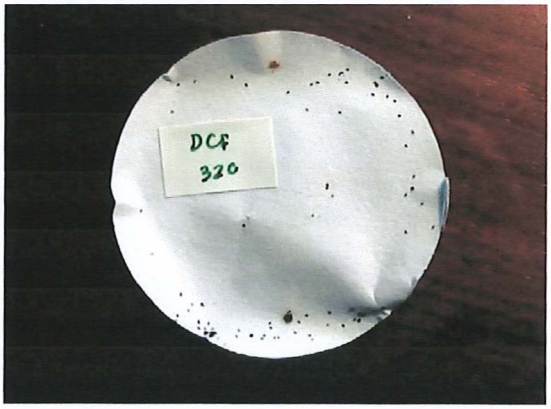
กลุ่ม D คือ คู่ผสมพันธุ์ของยุงที่ไม่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* สายพันธุ์ F ทั้งตัวผู้และตัวเมีย (Control / wild type) เพื่อใช้เป็นกลุ่มควบคุม

งานวิจัยนี้ไม่ได้ทดสอบ CI จากคู่ผสมพันธุ์ของยุงที่มีตัวเมียปลอดเชื้อกับยุงเพศผู้ติดเชื้อ *Wolbachia* (Infected male) เนื่องจากมีรายงานมาแล้วว่าเกิด CI ได้ [43] [55]

และให้อาหารยุงด้วยสำลีชุบน้ำหวาน (10% กลูโคส) ด้านบนแก้วพลาสติกซึ่งต้องเติมน้ำหวานทุกวัน

4.2.7) ยุงสามารถวางไข่ (ภาพที่ 2) หลังจากผสมพันธุ์แล้วประมาณ 3-5 วัน บนกระดาษกรอง จากนั้นเตรียมสิ่งตัวอย่างใช้ศึกษาในขั้นตอนต่อไปดังนี้ คือ นำแก้วพลาสติกไปแช่แข็งที่ -20^{0}C ประมาณ 20-30 นาที เพื่อให้ยุงตาย แล้วคัดแยกยุงออกเป็นกลุ่มดังเช่นเดิม และเก็บแช่แข็งยุงที่-20^{0}C เพื่อรอสกัด DNA และตรวจการติดเชื้อด้วย PCR ในลำดับต่อไป

นำไข่ยุงมาตากไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 2 วันแล้วนับจำนวนไข่ยุงบนกระดาษกรอง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ Olympus SZ 60 กำลังขยาย 2 เท่า และบันทึกผล



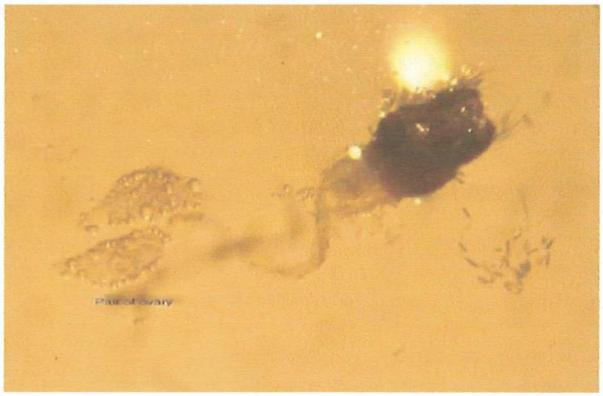
ภาพที่ 2 ไข่ยุงตากแห้งบนกระดาษกรองที่เตรียมนับจำนวนไข่ด้วยกล้องจุลทรรศน์

3 การเตรียมสิ่งตัวอย่าง

3.1) เตรียมสิ่งตัวอย่างสำหรับการทำ Fluorescence in situ hybridization (FISH)

3.1.1) นำยุงเพศเมีย ที่วางไข่บนกระดาษกรองเรียบร้อยแล้ว พร้อมกับยุงเพศผู้ ซึ่งมีอายุ 10 วัน มาสกัดรังไข่และอัณฑะ (ภาพที่ 3, 4 และ 5) ออกมาในสารละลาย 1x PBS บนสไลด์แก้วภายใต้กล้องจุลทรรศน์ Olympus รุ่น SZ60

ภาพที่ 3 รังไข่หนึ่งข้างของยุงเพศเมียในสารละลาย 1xPBS ที่สกัดบนสไลด์แก้ว



ภาพที่ 4 รังไข่ 1 คู่ของยุงเพศเมีย สกัดจากบริเวณสองปล้องสุดท้ายจากส่วนท้องของยุงลงในสารละลาย 1xPBS ที่สกัดบนสไลด์แก้วภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ภาพที่ 5 อัณฑะ 1 คู่ของยุงเพศผู้ สกัดจากบริเวณสองปล้องสุดท้ายจากส่วนท้องของยุงลงในสารละลาย 1xPBS ที่สกัดบนสไลด์แก้วภายใต้กล้องจุลทรรศน์

วางชิ้นรังไข่บนสไลด์ Super-force one plus (ภาพที่ 6) พร้อมทั้งเด็ดปีก 1 ข้างวางลงบนสไลด์แก้วเพื่อใช้ศึกษาขนาดของยุง (Body size) ส่วนอวัยวะยุงที่เหลือเก็บในหลอด Eppendorf ขนาด 1.5 ml ไว้ที่ตู้เย็น –20^{0}C สำหรับตรวจหาการติดเชื้อด้วยวิธีพีซีอาร์ต่อไป

ภาพที่ 6 รังไข่ (แถวบน) และอัณฑะ (แถวล่าง) บนสไลด์ super-force one plus

3.1.2) วางสไลด์ที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมงและอบที่ 37^{0}C เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้มั่นใจว่าไม่มีน้ำบนสไลด์

3.1.3) นำสไลด์มาแช่ 4% Formaldehyde ใน coupling jar เวลา 15 นาที

3.1.4) ล้างสไลด์ด้วย 0.1% tween 20 in 1x PBS (1:1) จำนวน 5 ครั้งๆละ 3 นาทีแล้วเก็บสไลด์ที่ตู้เย็น –20^{0}C เพื่อรักษาสภาพของDNA [60]

3 การสกัดดีเอ็นเอ

เป็นวิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธี Modified salt

3.1) นำยุงที่แช่ในตู้เย็น -20°C ใน 1.5 ml. eppendorf แล้ว homogenize ยุงใน 100 µl extraction buffer [0.1 M NaCl, 0.2 M sucrose, 0.1 M Tris-HCl, 0.05 M EDTA, pH 9.1 และ 0.5% sodium dodecyl sulfate (SDS)]

3.2) จากนั้นนำไปแช่ใน Water bath ที่ 65°C นาน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้น เติม 15 µl 8M KAC (potassium acetate) ผสมให้เข้ากัน (mix by vortex)

3.3) แช่ลงใน ice box นาน 45 นาที แล้วนำไปปั่นเพื่อตกตะกอนเซลล์ ที่ 12000 rpm 4°C นาน 10 นาที แล้วดูดส่วนใสลงใน 1.5 µl eppendorf ที่เตรียมไว้ใหม่

3.4) หลังจากนั้นตกตะกอน DNA ด้วย 250 ml 100% ethanol ผสมกันเบาๆและ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที

3.5) แล้วนำไปปั่นเพื่อตกตะกอนที่ 12000 rpm 4°C นาน 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้ววางหลอด eppendorf คว่ำบนกระดาษทิชชู (dry pellet)

3.6) หลังจากนั้น resuspend ด้วย 10 µl 0.1x SSC (15 mM NaCl, 1.5 mM sodium citrate) และเติมน้ำกลั่นปริมาตร 30 µl แล้วผสมกันเบาๆ [38] แล้วเก็บรักษาสภาพดีเอ็นเอที่ -20^{0}C [29]

4 การตรวจการติดเชื้อด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction

นำ DNA ที่สกัดได้มาเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอแล้วตรวจหา *Wolbachia* ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) เพื่อให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอที่เพียงพอต่อการตรวจวิเคราะห์ และ Quantitative SYBR Green based real time PCR ดังจะกล่าวต่อไป

วิธี Polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ที่จับอย่างจำเพาะกับส่วนของยีน *16S rDNA* ขนาด 136 bp 1) INTF2; 5'-AGT CAT CAT GGC CTT TAT GGA-3' และ 2) INTR2; 5'- TCA TGT ACT CGA ATT GCA GAG T -3' [45] [63] และ *RpS17* สำหรับตรวจเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ตรวจ Housekeeping gene ของยุงลายบ้าน *Aedes aegypti* ตามลำดับ ส่วนผสมของ PCR ประกอบด้วย 10x Taq polymerase buffer ปริมาตร 2.5 µl, 25 mM $MgCl_2$ ปริมาตร 2.5 µl, 2 mM dNTP ปริมาตร 2 µl, forward and reverse primer ปริมาตร 1 µl, เอนไซม์ Taq polymerase 5 U ปริมาตร 0.2 µl, DNA (100 ng/ µl) ปริมาตร 5 µl และเติมน้ำที่ปราศจากเอนไซม์ DNase ให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 25 µl เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเครื่อง thermal cycler (Eppendoft) โดยมีการปรับสภาวะดังนี้ แยกสาย DNA พร้อมทั้งเพิ่มปริมาณด้วยสภาวะดังนี้คือ Initial denature ที่ 95^{0}C เวลา 2 นาที ตามด้วย 35 รอบของ denature ที่ 95^{0}C เวลา 30 วินาที, annealing ที่ 55^{0}C เวลา 30 วินาที และ extension ที่ 72^{0}C เวลา 30 วินาที ตามด้วย final extension ที่ 72^{0}C เวลา 7 นาที หลังจากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาทำ electrophoresis จะปรากฏแถบขนาด 136 bp ของยีน*16S rDNA* 101 bp ของยีน *RpS17* เมื่อเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานบนแผ่นวุ้นอะกาโรสที่เตรียมด้วยความเข้มข้น 2%

โดยปริมาณสารผสม PCR ทั้งหมด 25 µl ประกอบด้วยส่วนประกอบดังนี้

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบของสารผสมของ PCR

Component (Invitrogen)	Volume (µl)
10X PCR buffer	2.5
25 mM $MgCl_2$	2.5
2 mM dNTP	2.5
0.5 µM Primer Forward	1.25
0.5 µM Primer Reverse	1.25
5U/µl *Taq* DNA polymerase	0. 19
DNA template	5
Deionized water	9.81
ปริมาตรสารผสมรวม	25

เพื่อทดสอบการติดเชื้อด้วยเครื่อง ABI thermal cycler (2720 Thermal cycler, Applied Bisystem ภายใต้สภาวะของ PCR ดังนี้

ตารางที่ 2 สภาวะอุณหภูมิและเวลาของ PCR

1. อุณหภูมิ Denaturation เริ่มต้น	:	95^0C, 5 นาที	จำนวน 1 รอบ
2. ส่วนประกอบ PCR จำนวน 40 รอบ			
2.1) Denaturation	:	95^0C, 1 นาที	
2.2) Annealing	:	55^0C, 1 นาที	
2.3) Extension	:	72^0C, 1 นาที	
3. อุณหภูมิ Extension สุดท้าย	:	720C, 5 นาที	จำนวน 1 รอบ

4. สำหรับ PCR product เก็บไว้ที่ 4^0C

แล้วนำ PCR product จากการทำ PCR รอบแรกซึ่งมีขนาด 438 bp ได้จาก Primer คู่ที่ 1 มาเจือจางที่ 200 เท่าด้วย Deionized water แล้วทำ PCR รอบที่สองภายใต้สภาวะอุณหภูมิและเวลาตามตารางที่ 3.2 เหมือนกับรอบแรกแต่เปลี่ยนเป็นใช้ Primer คู่ที่ 2 ปริมาตรของ DNA ต้นแบบจาก 5 µl เป็น 1 µl และเพิ่มปริมาตร Deionized water จาก 9.81 µl เป็น 13.81 µl ซึ่งจะได้ปริมาตรของสารผสม PCR เท่ากับ 25 µl ดังเช่นเดิม สุดท้ายจะได้ PCR product ขนาด 241 bp

จากนั้นนำชิ้นส่วน DNA ขนาด 241 bp มาแยกวิเคราะห์แถบ DNA ด้วย 2% วุ้นอะกาโรส อีเล็คโตรฟอเรซีส แล้วนำแผ่นวุ้นมาย้อมสีด้วย ethidium bromide และตรวจวิเคราะห์แถบ DNA ด้วยแสงยูวี โดยโปรแกรม Gel Photodocumentation System (Bio-rad) และเทียบกับแถบ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp จากนั้นจึงตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequence) เพื่อตรวจยืนยันผลของ PCR ที่จำเพาะต่อยีน 16S rRNA ของเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia*

5 DNA Cloning and Sequencing

5.1 การเตรียม competent cells จาก *E. coli* สำหรับการทำ transformation

วัตถุประสงค์ของการเตรียม Competent cells เพื่อส่งถ่ายพลาสมิด จากนอกเซลล์ของแบคทีเรีย ให้เข้าไปในเซลล์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ DH5-alpha เพื่อเพิ่มจำนวนแบคทีเรียและเพิ่มปริมาณพลาสมิดให้ได้จำนวนมากเพียงพอ competent cells คือเซลล์ของแบคทีเรียที่ถูกทำให้เกิดรูขนาดเล็กด้วยแคลเซียมที่ความเข้มข้นในระดับที่เหมาะสม ดีเอ็นเอที่ต้องการส่งถ่ายเข้า competent cells สามารถเข้าไปในเซลล์ด้วยการ incubate และ แช่ในน้ำแข็ง จากนั้นนำไป heat shock ที่ 42^0C อย่างรวดเร็วเป็นเวลา 45 วินาทีแล้ววางบนน้ำแข็งอีกครั้ง จึงทำให้ competent cells สามารถรับดีเอ็นเอนอกเซลล์ได้ [25]

5.1.1 นำเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ DH5-alpha ที่เก็บไว้ในกลีเซอรอลมาเพาะเชื้อบนเพลท LB-agar แล้วบ่มที่ 37^0C ข้ามคืน

5.1.2 จากนั้น Pick 1 โคโลนีจากเพลท ลงในสารละลาย SOB แล้วนำไปบ่มที่ 37^0C ข้ามคืน เพื่อทำสตาร์ตเตอร์ (starter)

5.1.3 ใช้ปิเปตอัตโนมัติดูดสตาร์ตเตอร์ปริมาตร 5 µl ลงใน flask ขนาด 1 ลิตรที่มีสารละลาย SOB ปริมาตร 250 ml แล้วนำไปเขย่า (shake) ที่อุณหภูมิ 16^0C เพื่อให้ได้เซลล์ที่เติบโตที่ Log phase ระยะเริ่มต้นซึ่งเมื่อนำสารละลายนี้ไปวัด OD_{600} มีค่าอยู่ในช่วง 0.4-0.5 ใช้เวลาประมาณ 24-36 ชั่วโมงโดยประมาณ

5.1.4 เมื่อได้ค่า OD ที่เหมาะสมแล้วนำ Flask ออกจากเครื่องเขย่าแล้ววางบนน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที

5.1.5 นำไปปั่นตกตะกอนเซลล์ ความเร็วรอบ 4000 rpm ที่ 4^0C เป็นเวลา 10 นาที เพื่อคัดเลือกเซลล์แบคทีเรีย

5.1.6 เทส่วนใสทิ้งและเติมสารละลาย TB ที่เย็น ปริมาตร 80 ml ***แล้วผสมกันเบาๆบนน้ำแข็ง*** เพื่อให้ตะกอนเซลล์แยกออกจากกัน แล้ววางบนน้ำแข็ง 10 นาที

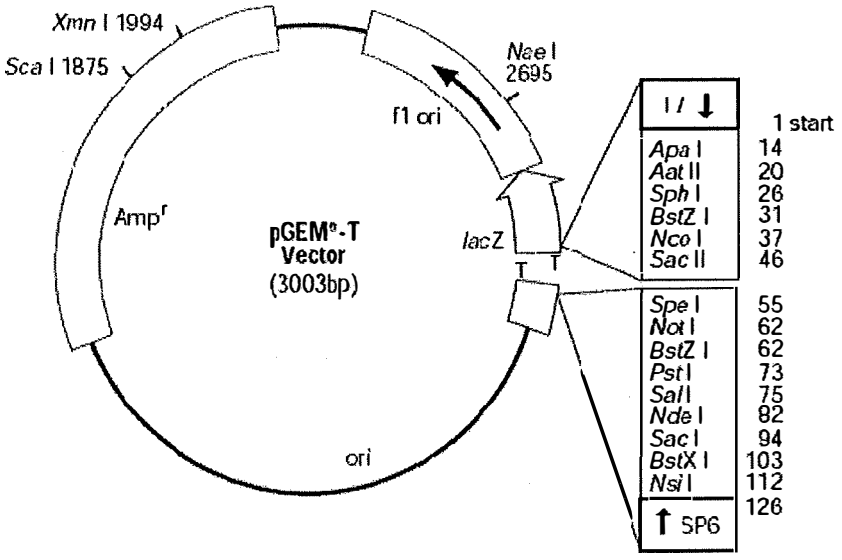
5.1.7 นำมาปั่นตกตะกอนที่ 4000 rpm ที่ 4^0C เป็นเวลา 10 นาที

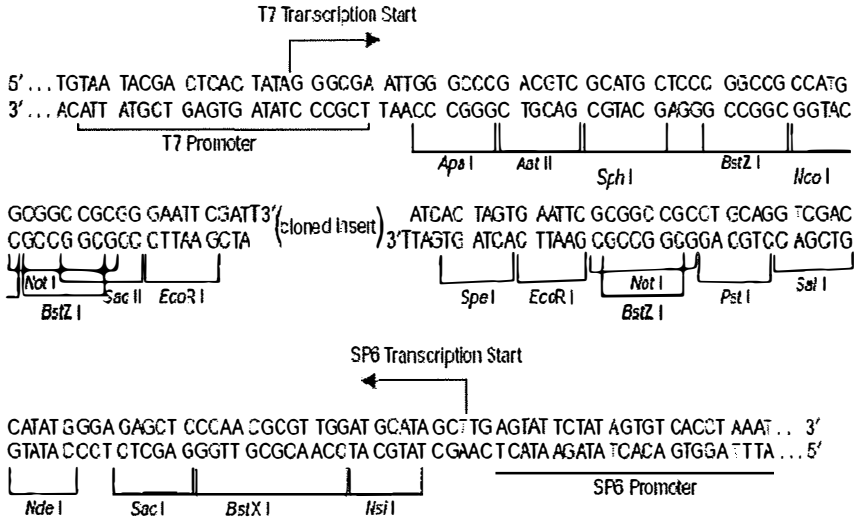
5.1.8 เทส่วนใสทิ้ง แล้วเติมสารละลาย TB ที่เย็น ปริมาตร 20 ml ***แล้วผสมกันอย่างเบาและนุ่มนวลที่สุดบนน้ำแข็ง*** แล้วตามด้วยการเติม สารละลาย DMSO (เก็บที่-20^0C ข้ามคืนก่อนนำมาใช้) ปริมาตร 1.4 ml

5.1.9 แบ่งเซลล์ใส่หลอดเล็กเป็น Aliquot ปริมาตร 200 µl ต่อ 1 หลอด 1.5 ml Eppendorf แล้วนำไปเก็บที่ -70^0C อย่างระมัดระวัง

5.2 pGEM®-T Easy vector

pGEM®-T Easy vector ยี่ห้อ Promega ได้จากบริษัท Madison





ภาพที่ 7 pGEM®-T Easy vector และ ภาพแสดงบริเวณแทรกดีเอ็นเอเป้าหมาย (cloned insert) ที่ต้องการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์

5.3 DNA ligation

ในการทำโคลนนิ่ง PCR product ถูกเชื่อมเข้ากับ pGEM®-T Easy vector (Promega) (ภาพที่ 7) และถูกส่งถ่ายเข้าไปในเซลล์ competent *E. coli* สายพันธุ์ DH5-alpha โดยตรง ดังขั้นตอนต่อไปนี้

5.3.1 นำ PCR product จากขั้นตอนที่ 4.4 มาเชื่อมต่อเข้า 50 ng/µl pGEM®-T Easy vector (Promega) ในหลอดทดลอง Eppendorf ขนาด 0.5 ml ดังที่ได้อธิบายในตารางที่ 3.3

5.3.2 ผสมเบาๆ แล้วเก็บไว้ที่ 4°C ข้ามคืน (Overnight) แล้วนำไปทำการส่งถ่ายเข้ากับเซลล์ competent จาก *E. coli* สายพันธุ์ DH5-alpha ในลำดับต่อไป

ตารางที่ 3 ส่วนประกอบของเชื่อม Insert DNA เข้ากับ pGEM®-T Easy vector

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (µl)
5X Ligation buffer	2
pGEM®-T Easy vector	1
T4 DNA ligase	1
PCR product	5
Deionised water	1
Total reaction mixture	**10**

5.4 การส่งถ่ายพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ Competent

5.4.1 ใช้ปิเปตอัตโนมัติดูดเซลล์ Competent ที่เตรียมได้จากเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5-alpha ปริมาตร 25 µl ลงในหลอดทดลอง Eppendorf ขนาด 1.5 ml

5.4.2 เติมสารผสม ligation reaction ปริมาตร 5 µl จากขั้นตอนที่ 4.5.3 แล้ววางไวในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที

5.4.3 นำไป Heat shock ใน water bath ที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 45 วินาที

5.4.3 เติมอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ลงไป 970 µl ให้ได้ปริมาตรครบ 1 ml

5.4.4 นำไป Incubator shaker ที่อุณหภูมิ 37^{0}C เวลา 1. 30ชั่วโมง

5.4.5 เตรียมเพลท โดย ผสม X-gal, IPTG และ LB-broth ในอัตราส่วน 30:30:40 µl ในหลอด Eppendorf แล้ว spread ลงใน LB-agar ที่มียาแอมพิซิลิน 120 µg/ml ให้แห้งหรือนำไป อบที่ 37^{0}C ประมาณ10 นาทีก่อน

5.4.6 จากนั้นนำออกจาก Incubator shaker แล้วปั่นตกตะกอนที่ 3000 rpm เวลา 3 นาทีแล้วดูดส่วนใสทิ้ง 900 µl ที่เหลือ 100 µl ดูด spread บนเพลทที่เตรียมไว้แล้ว และนำไปอบใน incubator ข้ามคืนที่ 37^{0}C

5.4.7 ตรวจวิเคราะห์โคโลนีของแบคทีเรียที่ได้จากการส่งถ่ายพลาสมิดโดยวิเคราะห์ Blue-white colonies

5.5 การเพิ่มจำนวนแบคทีเรียโดยการทำสตาร์ตเตอร์และการตรวจยืนยันการส่งถ่ายพลาสมิด

เพื่อเป็นการตรวจเช็คว่ามีการเชื่อมกันของพลาสมิดเข้ากับดีเอ็นเอที่สนใจ และเลือกโดยเลี้ยงเชื้อโคโลนีสีขาวบนเพลท เนื่องจากเซลล์ของ *E. coli* ที่รับเอาพลาสมิดที่มีดีเอ็นเอเป้าหมายเข้าไป จะมียีนที่ดื้อต่อยาแอมพิซิลินและพลาสมิดที่เชื่อมดีเอ็นเอเป้าหมายเข้ากับบริเวณยีน *lacZ* ทำให้ไม่สามารถแสดงออก จึงปรากฏโคโลนีสีขาวขึ้นบนเพลท ในขณะที่เซลล์ที่ไม่มีดีเอ็นเอเป้าหมายเชื่อมอยู่กับพลาสมิดที่ถูกส่งถ่ายเข้าไปจะปรากฏโคโลนีสีน้ำเงินปนขาวบนเพลท ดังขั้นตอนต่อไปนี้

5.5.1 เลือกโคโลนีสีขาวจากเพลท 1 โคโลนีลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB-broth 3 ml ในหลอดทดลองขนาด 15 ml ที่มียาแอมพิซิลินความเข้มข้น 120 µg/ml ผสมอยู่ 3 µl

5.5.2 นำไป เขย่าที่ 37^{0}C ข้ามคืน

5.5. 3 ตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยการดูดสารละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 5 µl มาทำ PCR ซึ่งใช้ Primer คู่ที่ 2 โดยสภาวะและเงื่อนไขของการทำ PCR ตามรอบแรกของการทำในขั้นตอนที่ 4.4 จะได้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 241 bp

5.6 การสกัดพลาสมิด (Plasmid mini preparation)

หลังจากตรวจวิเคราะห์ว่าเซลล์แบคทีเรียที่ได้รับการส่งพลาสมิดเข้าเซลล์มีชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายเชื่อมอยู่ จากนั้นนำสารละลายที่มีเชื้อแบคทีเรียส่วนที่เหลือมาสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัด Nucleospin® Plasmid (MN) ดังต่อไปนี้

5.6.1 ดูดสารละลายที่มีเชื้อแบคทีเรียจากขั้นตอน 4.5.5 ลงในหลอด Eppendorf ขนาด 1.5 ml แล้วนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 5,000 rpm เวลา 5 นาทีภายใต้อุณหภูมิห้อง

5.6.2 ดูดส่วนใสทิ้งแล้วเติมสารละลาย A_1 buffer ปริมาตร 250 µl จากนั้นผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixture

5.6.3 เติมสารละลาย A_2 buffer ปริมาตร 250 µl แล้วผสมกันด้วยการกลับหลอดทดลองไปมา 6-8 ครั้ง แล้วตั้งทิ้งไว้ 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง

5.6.4 เติมสารละลาย A_3 buffer ปริมาตร 300 µl แล้วผสมกันด้วยการกลับหลอดทดลองไปมา 6-8 ครั้ง แล้วปั่นตกตะกอนด้วยความเร็วรอบ 13,000 rpm เวลา 10 นาทีภายใต้อุณหภูมิห้อง

5.6.5 ดูดส่วนใสลงใน spin column เพื่อ bind DNAแล้วปั่นตกตะกอนด้วยความเร็วรอบ 13,000 rpm เวลา 1 นาทีภายใต้อุณหภูมิห้อง

5.6.6 เติมสารละลาย A_4 buffer ปริมาตร 600 µl ผสมด้วยการดูดขึ้นลงด้วยปิเปตอัตโนมัติแล้วปั่นตกตะกอนด้วยความเร็วรอบ 13,000 rpm เวลา 1 นาทีภายใต้อุณหภูมิห้อง

5.6.7 ปั่นตกตะกอนด้วยความเร็วรอบ 13,000 rpm เวลา 2 นาทีภายใต้อุณหภูมิห้อง เพื่อให้ Column แห้ง จากนั้นเปลี่ยนหลอดใหม่แล้วเติมสารละลาย AE buffer ปริมาตร 50 µl และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที

5.6.8 ปั่นละลาย DNA จาก column ด้วยความเร็วรอบ 13,000 rpm เวลา 1 นาทีภายใต้อุณหภูมิห้อง

5.6.9 เก็บสารละลายที่มีพลาสมิดที่ -20^0 C

5.7 การตรวจหาลำดับเบส (Sequence analysis)

เนื่องจากดีเอ็นเอเป็นตัวกำหนดข้อมูลในการสร้างโปรตีนโดยผ่านทาง mRNA ทั้งนี้โปรตีนจะเป็นตัวกำหนดลักษณะที่แสดงออกในระดับเซลล์ เนื้อเยื่อ อวัยวะ ตลอดจนสิ่งมีชีวิตทั้งร่างกาย การหาลำดับเบสของยีนที่มีอยู่ร่วมกันในสิ่งที่มีชีวิตต่างชนิดกัน เช่น small subunit ribosome RNA gene นั้นสามารถนำมาเปรียบเทียบความใกล้ชิดและการจัดหมวดหมู่ในเชิงอนุกรมวิธานตลอดจนการศึกษาสายวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตต่างๆได้ดีขึ้น

สำหรับการยืนยันการติดเชื้อของแบคทีเรีย *Wolbachia* ในยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) จากการทดลองมีวิธีการดังต่อไปนี้

5.7.1 เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียจากเพลท 3 โคโลนีเดี่ยวเพื่อให้มั่นใจว่ามีดีเอ็นเอเป้าหมายที่เชื่อมอยู่กับพลาสมิดจากนั้นนำมาเลี้ยงเชื้อเพื่อเพิ่มจำนวนแล้วสกัดบริสุทธ์ ดังเช่นในขั้นตอนที่ 4.5.6

5.7.2 วัดความเข้มข้นของพลาสมิดด้วยค่า OD_{260} เพื่อให้ได้ค่าความเข้มข้น 100 – 500 ng/ul จากนั้นนำส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เบสด้วยเครื่อง ABI 3730 Sequencer (Applied Biosystems) ที่บริษัท First BASE Laboratories Sdn Bhd, Malasia โดยนำส่งผ่านบริษัท Ward Medic Ltd., Part, Thailand

5.7.3 นำข้อมูลมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เบสโดยใช้โปรแกรม NCBI

BLAST (HThttp://www.ncbi.nlm.nhi.gov/BLAST/blastTH) และโปรแกรม Cluster algorithm (CLUSTALX) เพื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์เบสกับ Gen Bank นอกจากนี้ยังใช้โปรแกรม GenDoc MFC application (GENDOC) เพื่อแปลรหัสจาก ลำดับนิวคลีโอไทด์เบสเป็นโปรตีน

การตรวจเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* และเทียบปริมาณการติดเชื้อ *Wolbachia* ต่อเซลล์ของยุงในหนึ่งเซลล์กับปริมาณ Housekeeping gene (*RpS17 gene*) การหาปริมาณ copy number ของยีน ด้วย real time PCR โดยใช้ Primer ที่สามารถแยกชนิดของเชื้อแบคทีเรียซึ่งเทียบกับรอบปฏิกิริยา (Ct) การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของตัวอย่างทั้งสองซ้ำ (duplicates) กับเส้นกราฟมาตรฐาน (standard curve) และวิเคราะห์ความจำเพาะต่อยีน *16S rDNA* เพื่อตรวจเชื้อ *Wolbachia* และยีน *RpS17* ของยุงลายบ้าน *Aedes aegypti* ด้วย Melting curve analysis ส่วนผสมของปฏิกิริยาประกอบด้วย 2X SYBR Green buffer ปริมาตร 10 µl, forward และ primer reverse primer ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.4 µl ต่อปฏิกิริยา และเติมน้ำให้ได้ปริมาตรทั้งหมดเท่ากับ 20 µl เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเครื่อง illumina และวิเคราะห์ผลด้วย Eco™ software

4.6 การแสดงการติดเชื้อด้วยวิธี Fluorescence *in situ* hybridization (FISH)

เทคนิค FISH เป็นเทคนิคทางอณูชีววิทยาที่พัฒนาขึ้นเพื่อศึกษาการแสดงออกของทั้ง DNA และ RNA โดยที่โครงสร้างเซลล์ไม่ถูกทำลายทั้งนี้ยังสะดวก รวดเร็วและปลอดภัยต่อผู้ศึกษาทดลอง หลักการ: ส่วนของ DNA สายเดี่ยวที่ติดฉลาก (labeled single-stranded fragment of DNA) ที่เรียกว่า "labeled probe" มีการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ที่เป็นเบสคู่สมกับ DNA เป้าหมายสามารถจับกับ DNA เป้าหมายนั้นเกิดเป็น "hybrids" ภายใต้ภาวะที่เหมาะสม ดังนั้นจึงได้ใช้วิธีการนี้เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน 16s rDNA (Gene expression) รวมถึงการแสดงออกของโครงสร้างประชากร (Population structure) พลวัตการกระจายเชื้อ (Dynamics) และการเกิดปฏิสัมพันธุ์ระหว่างเซลล์ (cell--cell interaction) ของเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่ติดเชื้อในรังไข่ซึ่งอาจมีผลต่อลักษณะกลไกทางพันธุกรรม สรีระวิทยา วงจรชีวิต และการปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมของยุงลายบ้าน ด้วย Fluorescence in situ DNA-DNA hybridization (FISH) [21] [30]

4.6.1 การคำนวณอุณหภูมิสำหรับ Hybridization และอุณหภูมิสำหรับขั้นตอนการล้าง

การคำนวณอุณหภูมิสำหรับ Hybridization สามารถทำได้ด้วยสูตรดังนี้

Melting Temperature

$$T_m = 81.5 + 16.6 (\log. Na^+) + 0.41(\%GC) - 0.61(\%formamide) - (500/n)$$

Probe แรก

VK-INTF = 81.5 + 16.6 (log 195×10^{-3}M) + 0.41(42.86%) – 0.61(20) – (500/21)

= 51.27^0C

Probe ที่สอง

VK-INTR = 81.5 + 16.6 (log 195×10^{-3}M) + 0.41(45.45%) – 0.61(20) – (500/22)

= 53.24^0C

Hybrydization Temperature

T_{hyb} = Tm – 15

Probe แรก VK-INTF = 51.27 - 15 = 36.27^0C

Probe ที่สอง VK-INTF = 53.42 - 15 = 38.42^0C

ดังนั้นค่าเฉลี่ยของ Hybridization temperature เท่ากับ 37^0C

Washing Temperature ควรเหนือกว่าอุณหภูมิ Hybridization ประมาณ 5 – 20 ^{0}C ฉะนั้นจึงเท่ากับอยู่ในช่วง 42-57^0C

4.6.2 ขั้นตอนของการทำ Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) (Dako denmark A/S)

หลังเตรียมสิ่งตัวอย่างตามหัวข้อที่ 4.3.1 แล้วทดลองดังขั้นตอนต่อไปนี้

1) ตากสไลด์ให้แห้งและมั่นใจว่าไม่มีหยดน้ำเกาะบนสไลด์ที่อุณหภูมิห้อง

2) ล้างสไลด์ด้วย Wash buffer โดยการแช่ในขวดที่มีบัฟเฟอร์ เป็นเวลา 3 นาที 2 ครั้ง

3) วางสไลด์ไว้ใน Moist chamber ย่อยชิ้นเนื้อเยื่อของมดลูกของขุงด้วยเอ็นไซม์เป็ปซินเป็นเวลา 3 นาที (หยดเป็ปซินพอให้ท่วมบริเวณชิ้นเนื้อเยื่อ) ที่อุณหภูมิ 37^0C

4) แล้วแช่สไลด์ใน 10% Formalin เป็นเวลา 1 นาที

5) ล้างสไลด์ด้วย Wash buffer โดยการแช่ในขวดที่มีบัฟเฟอร์ เป็นเวลา 3 นาที 2 ครั้ง

6) แช่สไลด์ใน 70%, 80%, 95% และ 100% เอทธานอลตามลำดับที่ความเข้มข้นละ 1 นาที เพื่อกำจัดน้ำออกจากชิ้นเนื้อเยื่อ แล้วทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

7) เพื่อหยด VK INTF probe (5' fluoro TCC ATA AAG GCC ATG ACT) และ VK INTR probe (5' fluoro TCA TGT ACT CGA ATT GCA GAG T) ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงสีเขียว ความเข้มข้น 200 นาโนกรัม ปริมาณ 5-8 µl ต่อสไลด์ ปิดด้วย Cover slip และ seal ด้วยกาวแล้ววางสไลด์ในที่มืด

8) เตรียมตั้งโปรแกรมของเครื่องไฮบริไดเซอร์ ใช้อุณหภูมิ Denaturation ที่ 94^{0}C เป็นเวลา 5 นาทีและอุณหภูมิ hybridization ที่ 37^{0}C เป็นเวลา 40 ชั่วโมง (Overnight)

9) นำสไลด์ออกจากเครื่อง Hybridizer แล้วแช่ใน stringent wash buffer ที่อุณหภูมิห้อง และเพื่อล้างให้กาวที่ปิดขอบ cover slip หลุด

10) แช่ใน Stringent wash buffer ที่วางในเครื่อง Water bath ที่ 55^{0}C เป็นเวลา 10 นาทีพร้อมปิดฝาเครื่อง Water bath

11) จากนั้นล้างสไลด์ด้วย Wash buffer โดยการแช่ในขวดที่มีบัฟเฟอร์ เป็นเวลา 3 นาที 2 ครั้ง

12) แช่สไลด์ใน 70% แช่สไลด์ใน 70%, 80%, 95% และ 100% เอทธานอลตามลำดับที่ความเข้มข้นละ 1 นาที เพื่อกำจัดน้ำออกจากชิ้นเนื้อเยื่อ แล้วตากสไลด์ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที

13) ปิด Cover slip และปิดขอบสไลด์ด้วยกาว

14) นำไปดูด้วยกล้องฟลูออเรสเซนต์ Olympus รุ่น SZX 9 โดยใช้ฟิวเตอร์ GFP ที่ความยาวคลื่น 488 nm

4.7.3) เปรียบเทียบ อัตราการฟัก

นับจำนวนไข่ของยุง (ภาพที่ 14 และ 15) ที่ติดเชื้อและยุงธรรมชาติทั้งกลุ่ม A, B และ C แล้วหาค่าเฉลี่ยเพื่อเปรียบเทียบกันระหว่างทั้ง 3 กลุ่มดังตารางที่ 3.5

กลุ่ม A คือ คู่ผสมพันธุ์ของยุงที่ติดเชื้อแบคทีเรีย Wolbachia สายพันธุ์ F ทั้งตัวผู้และตัวเมีย (Infected pair of parent)

กลุ่ม B คือ คู่ผสมพันธุ์ของยุงที่มีตัวเมียติดเชื้อแบคทีเรีย Wolbachia สายพันธุ์ F กับยุงเพศผู้ปลอดเชื้อ Wolbachia (Infected female)

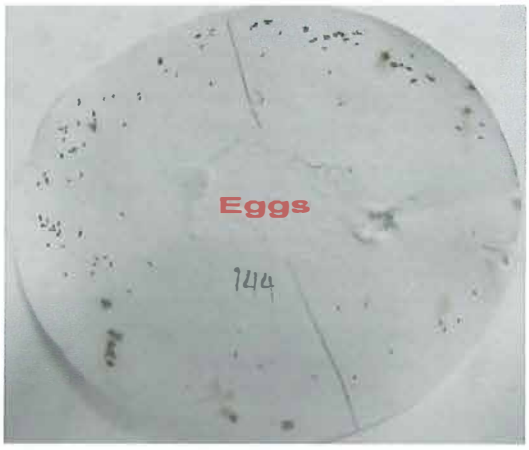
กลุ่ม C คือ คู่ผสมพันธุ์ของยุงที่มีตัวเมียปลอดเชื้อแบคทีเรีย Wolbachia สายพันธุ์ F กับยุงเพศผู้ติดเชื้อ Wolbachia (Infected male)

กลุ่ม D คือ คู่ผสมพันธุ์ของยุงที่ไม่ติดเชื้อแบคทีเรีย Wolbachia สายพันธุ์ F ทั้งตัวผู้และตัวเมีย (Control / wild type) เพื่อใช้เป็นกลุ่มควบคุม

ดังในสูตรต่อไปนี้

อัตราการวางไข่

<u>ผลรวมจำนวนไข่จากแม่ n ตัว</u>	=	ค่าเฉลี่ยการวางของไข่
จำนวนแม่ n ตัว		



ภาพที่ 8 จำนวนไข่ยุงที่ต้องการนับภายใต้กล้องดิจิตอล นับจำนวนไข่ได้ 144 ฟอง

อัตราการฟัก

จำนวนลูกนำยุงจากแม่ n ตัว × 100 = % การฟักไข่ n ตัว

จำนวนไข่จากแม่ n ตัว

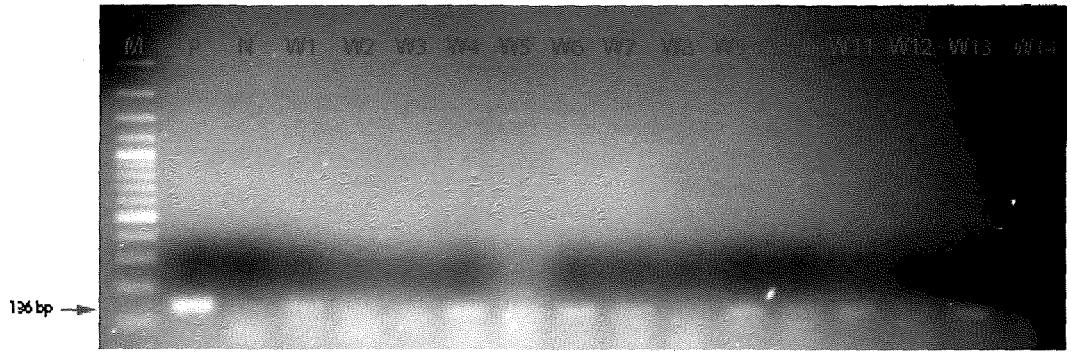
4.8 การวิเคราะห์ทางสถิติ (statistical analysis)

การประเมินสมรรถนะของยุงลายบ้านทุกหัวข้อใช้ค่าทางสถิติ Independent t-test จากโปรแกรม SPSS รุ่นที่ 12

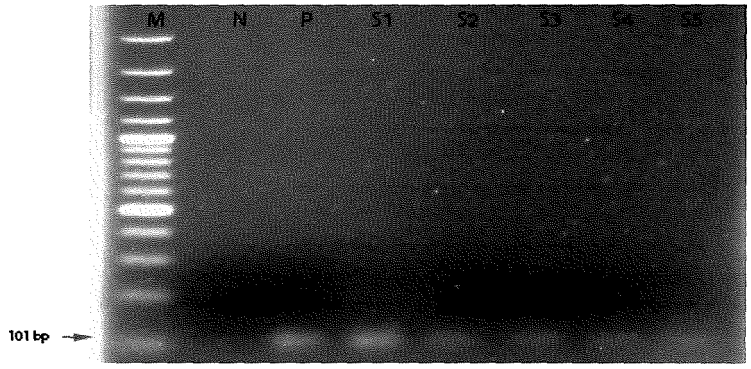
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

1. การฉีดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ในยุงลายบ้าน *Aedes aegypti*

นำไข่ของเรือด (*Cimex hemipterus)* ใหม่ๆ 5 ฟอง มาบดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ปริมาตร 50 µl ในหลอด Eppendorf ขนาด 1.5 ml ด้วย Pestle สำหรับบดยุงแล้วฉีดสารละลายเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ในยุงลายบ้านตัวละประมาณ 0.2 µl ทั้งหมดจำนวน 41 ตัว แล้วหลังจากนั้น 48 ชั่วโมงพบว่าจำนวนยุงรอดชีวิต 26 ตัว คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 63% (26/41) ซึ่งถูกกำหนดเป็นรุ่นที่ G_0 เพื่อให้วางไข่เป็น G_1 จากนั้นนำตัวเรือด ไข่ของเรือดและยุงมาสกัด DNA พร้อมกับตรวจสอบการติดเชื้อจากการส่งถ่ายเชื้อ (*Wolbachia* transinfection) ซึ่งตรวจสอบบริเวณ *16S rRNA* gene ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์INTF2-INTR2 ได้ผลิตภัณฑ์ DNA ขนาด 136 bp ปรากฏว่ายุงลายบ้านเพศเมียรุ่นที่ G_0 ที่รอดชีวิตจากการฉีดเชื้อนั้น ติดเชื้อ 46.1 % ในงานวิจัยนี้ได้นำผลิตภัณฑ์ DNA ที่เพิ่มจำนวนจากเทคนิค PCR ขนาด 136 เบส มาทำการศึกษาการหาลำดับนิวลีโอไทด์ ด้วยการเชื่อมเข้ากับเวคเตอร์ pGEM®-T Easy แล้วส่งถ่ายเชื้อเข้าเซลล์ competence ที่เตรียมจากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5-alpha แล้วลงเพลท LB plate ภาพที่ 11 ที่มียา แอมพิซิลิน พร้อมทั้งผสม X-Gal และ IPTG หลังจากอบที่ 37^0 C จะพบโคโลนีทั้งสีขาวและสีน้ำเงินขึ้นบนเพลท ซึ่งเฉพาะโคโลนีสีขาวเท่านั้นที่ถูกเลือกมาเลี้ยงเชื้อ ในระหว่างนี้จำเป็นต้องตรวจสอบการเชื่อมยีนในพลาสมิดด้วยเทนิควิธี PCR (INTF2-INTR2)



ภาพที่ 9 ยีน 16S rDNA ของ *Wolbachia* bacteria ขนาด 136 bp, M; 100 bp DNA ladder, P; plasmid DNA of 16S rDNA partial gene, N; negative, และ W1-W14; DNA จากตัวอย่างยุงลายบ้านติดเชื้อ *Wolbachia.*



>*RpS17* sequence
ACATCTGATGAAGCGCCTGCGCAATAAGATCGCTGGTTTCGTGATACATCTGATGAAGCGCCTGCACAAC
TACGTGCCGGAAGTGT

ภาพที่ 10 ยีน *RpS17* (Housekeeping gene) ของ *Aedes aegypti* ขนาด 101 bp, M; 100 bp DNA ladder, P; plasmid DNA of *RpS17* partial gene, N; negative, และ S1-S5; DNA จากตัวอย่างยุงลายบ้านติดเชื้อ *Wolbachia* และลำดับเบสของยีนดังกล่าว

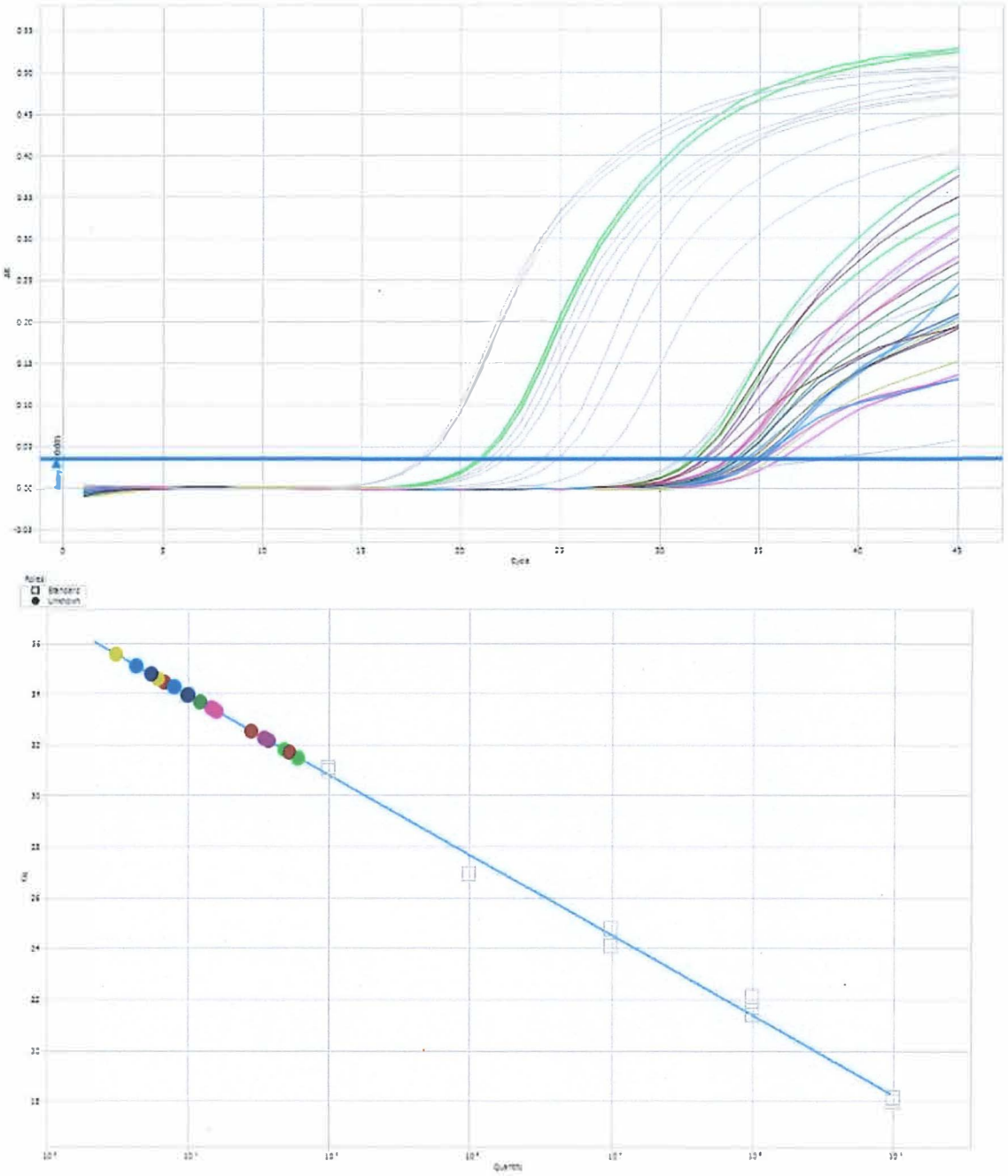
แล้วทำ Gel electrophoresis ด้วยวุ้นความเข้มข้น 2% (Wt/Vol) หลังจากนั้นนำแผ่นวุ้นมาย้อมสีของ Ethidium bromide และตรวจสอบแถบขนาดของ DNA โดยการดูผ่านแสงรังสี UV ด้วยเครื่อง Gel Photodocumentation System (Bio-rad) เทียบกับ DNA มาตรฐาน ซึ่งขนาด DNA ที่แท้จริงมีขนาด 136 bp เนื่องจากโคโลนีสีขาวมีชิ้นส่วน DNA ที่เชื่อมอยู่ พลาสมิดและสกัด พลาสมิดด้วยชุดสกัดแล้วตรวจสอบขนาดของ DNA

ภาพที่ 11 แสดงโคโลนีสีขาวและสีน้ำเงินในเพลท LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน X-Gal และ IPTG และโคโลนีสีขาว

จากนั้นทำการศึกษาลำดับเบส (Sequencing) ของเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* สายพันธุ์ F เพื่อเป็นการยืนยันการติดเชื้อในไข่เรือด โดยนำผลิตภัณฑ์ชิ้น DNA ที่ได้รับการเพิ่มขนาดจากเทคนิค PCR มาเชื่อมเข้ากับพลาสมิดชนิด pGEM®-T Easy vector ซึ่งเป็นเวคเตอร์ที่มีส่วนลำดับเบสของเอนไซม์ SP6 และ เอนไซม์ T7 RNA polymerase แล้วส่งถ่าย พลาสมิดเวคเตอร์นี้เข้ากับเซลล์ competence ที่เตรียมจากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5-alpha เพื่อเพิ่มจำนวน DNA ที่สนใจแล้วนำส่งตรวจหาลำดับเบสต่อไป ซึ่งทำให้ทราบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA ตัวอย่างสามารถเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *16S rRNA* ของเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่ติดเชื้อในเรือดเขตร้อน *Cimex hemipterus* ได้ ผลการหาลำดับเบสพบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์มีความเหมือนกับลำดับเบสจาก GenBank (DQ399344) ถึง 98% identity ซึ่งพบเพียงตำแหน่งที่ 55 ที่มีการแทนที่ จาก Adenine เป็น Guanine ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการปรับของแบคทีเรียให้เหมาะกับสภาวะแวดล้อมในเซลล์ยุงลายบ้าน

ภาพที่ 12 Demonstrates the extent of *16s rDNA* gene fragments of *Wolbachia* bacteria endosymbionts which naturally *infected C. hemipterus* and transfected *Ae. Aegypti* (Generation zero to nine; G0 to G9)

ปริมาณเชื้อ *Wolbachia* ที่ติดในเซลล์ยุง 1 เซลล์ (Copy number of 16S rDNA/ Copy number of *RpS17*) จากการคำนวณโดย Quantitative real time PCR พบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง $9.2x10^{-4}$ ถึง $9.9x10^{-2}$ copy genes ซึ่งคำนวณจากผลในตารางที่ 1 ร่วมกับ ภาพที่ 13 และตารางที่ 2 ร่วมกับ ภาพที่ 13



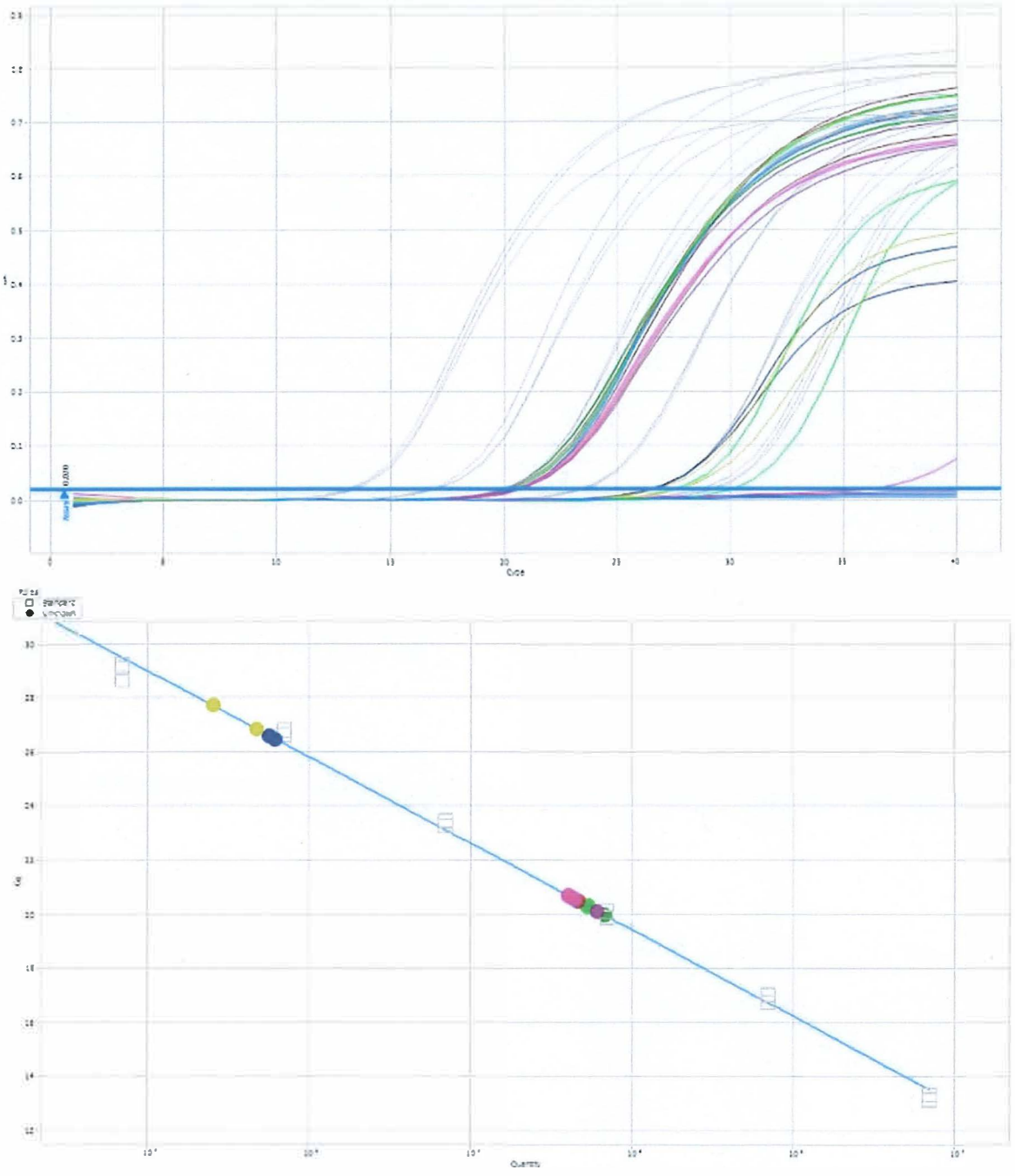
ภาพที่ 13 กราฟแสดงการ amplified ยีน *16S rDNA* ของ *Wolbachia* จากตัวอย่างยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) ด้วย Quantitative SYBR Green based real time PCR, สีเทา คือ เส้น STD นอกเหนือจากสีเทาคือสิ่งตัวอย่าง (ซ้าย) และกราฟแสดงการเปรียบเทียบปริมาณยีน*16S rDNA* กับเส้นกราฟมาตรฐาน (ขวา) Slope:-3.14507699 (-2.8 to -3.6); R^2: 0.995; Efficiency %: 107.95 (90-110%)

Sample Name	Assay Name	Assay Role	Cq	Cq Mean	Std. Dev. Cq	Quantity	Mean Qty.	Std. Dev. Quantity	Tm1
	Assay 1	Standard	33.97	33.97	N/A	9.78	9.78	0	81.1
wBB	Assay 1	Positive	20.87	20.96	0.14	1.46e+05	136230.8	13833.03	81.1
wBB	Assay 1	Positive	21.06	20.96	0.14	1.26e+05	136230.8	13833.03	81.1
wCih Ae 09	Assay 1	Unknown	32.17	32.21	0.07	37.27	36	1.79	81.1
wCih Ae 09	Assay 1	Unknown	32.26	32.21	0.07	34.74	36	1.79	81.1
	Assay 1	Standard	31.13	31.06	0.09	97.8	97.8	0	81.1
	Assay 1	Standard	31	31.06	0.09	97.8	97.8	0	81.1
wCih Ae 01	Assay 1	Unknown	34.48	33.94	0.77	6.86	11.03	5.89	81.1
wCih Ae 01	Assay 1	Unknown	33.39	33.94	0.77	15.19	11.03	5.89	81.1
wCih Ae 010	Assay 1	Unknown	34.27	34.7	0.6	7.98	6.12	2.62	77.8
wCih Ae 010	Assay 1	Unknown	35.13	34.7	0.6	4.27	6.12	2.62	81.1
	Assay 1	Standard	26.96	26.96	N/A	978	978	0	81.1
wCih Ae 04	Assay 1	Unknown	33.45	33.39	0.09	14.54	15.25	1.01	80.8
wCih Ae 04	Assay 1	Unknown	33.32	33.39	0.09	15.97	15.25	1.01	80.8
wCih Ae 011	Assay 1	Unknown	31.82	31.66	0.22	48.06	54.21	8.71	80.8
wCih Ae 011	Assay 1	Unknown	31.51	31.66	0.22	60.37	54.21	8.71	80.8
	Assay 1	Standard	24.81	24.46	0.51	9780	9780	0	80.8
	Assay 1	Standard	24.1	24.46	0.51	9780	9780	0	80.8
wCih Ae 05	Assay 1	Unknown	34.62	35.1	0.68	6.17	4.62	2.2	80.8
wCih Ae 05	Assay 1	Unknown	35.58	35.1	0.68	3.07	4.62	2.2	80.8
wCih Ae 013	Assay 1	Unknown	31.71	32.13	0.61	52.25	40.08	17.21	80.8
wCih Ae 013	Assay 1	Unknown	32.56	32.13	0.61	27.91	40.08	17.21	80.8
	Assay 1	Standard	21.41	21.76	0.37	97800	97800	0	80.8
	Assay 1	Standard	22.14	21.76	0.37	97800	97800	0	80.8
	Assay 1	Standard	21.74	21.76	0.37	97800	97800	0	80.8
wCih Ae 06	Assay 1	Unknown	33.68	33.83	0.21	12.26	11.06	1.7	80.8
wCih Ae 06	Assay 1	Unknown	33.98	33.83	0.21	9.86	11.06	1.7	80.8
uninfected Ae DN...	Assay 1	Negative	35.17	35.62	0.63	4.12	3.13	1.4	72.7
uninfected Ae DN...	Assay 1	Negative	36.07	35.62	0.63	2.14	3.13	1.4	72.4
	Assay 1	Standard	18.17	18.1	0.09	978000	978000	0	81.1
	Assay 1	Standard	18.14	18.1	0.09	978000	978000	0	81.1
	Assay 1	Standard	18	18.1	0.09	978000	978000	0	81.1
wCih Ae 07	Assay 1	Unknown	34.78	34.37	0.58	5.49	7.74	3.18	81.1
wCih Ae 07	Assay 1	Unknown	33.97	34.37	0.58	9.98	7.74	3.18	81.1
water	Assay 1	NTC	34.92	34.92	N/A	N/A	N/A	N/A	72.4
	Assay 1	NTC	38.13	38.13	N/A	N/A	N/A	N/A	71.8

ตารางที่ 4 แสดงแสดงปริมาณ copy gene of *16S rDNA* ของ *Wolbachia* จากตัวอย่างยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) ใน Mean Qty. (red column) ด้วย Quantitative SYBR Green based real time PCR

Sample Name	Assay Name	Assay Role	Cq	Cq Mean	Std. Dev. Cq	Quantity	Mean Qty.	Std. Dev. Quantity	Tm1
	Assay 1	Standard	29.24	29.01	0.31	69.7	69.7	0	83.2
	Assay 1	Standard	29.12	29.01	0.31	69.7	69.7	0	83.2
	Assay 1	Standard	28.66	29.01	0.31	69.7	69.7	0	83.2
wCh-Ae01	Assay 1	Unknown	20.31	20.31	0	53019.94	53096.99	108.96	82.9
wCh-Ae01	Assay 1	Unknown	20.3	20.31	0	53174.04	53096.99	108.96	82.9
wCh-Ae010	Assay 1	Unknown	20.28	20.3	0.03	54208.14	53297.03	1288.51	82.9
wCh-Ae010	Assay 1	Unknown	20.33	20.3	0.03	52385.91	53297.03	1288.51	82.9
	Assay 1	Standard	26.78	26.67	0.09	697	697	0	82.9
	Assay 1	Standard	26.6	26.67	0.09	697	697	0	82.9
	Assay 1	Standard	26.63	26.67	0.09	697	697	0	82.9
wCh-Ae04	Assay 1	Unknown	19.96	19.97	0.01	68007.8	67761.32	348.58	82.9
wCh-Ae04	Assay 1	Unknown	19.97	19.97	0.01	67514.83	67761.32	348.58	82.9
wCh-Ae011	Assay 1	Unknown	20.53	20.52	0.02	45110.55	45555.62	629.42	82.9
wCh-Ae011	Assay 1	Unknown	20.51	20.52	0.02	46000.69	45555.62	629.42	82.9
	Assay 1	Standard	23.43	23.39	0.11	6970	6970	0	82.9
	Assay 1	Standard	23.47	23.39	0.11	6970	6970	0	82.9
	Assay 1	Standard	23.26	23.39	0.11	6970	6970	0	82.6
wCh-Ae05	Assay 1	Unknown	26.58	26.53	0.08	572.8	597.21	34.52	82.9
wCh-Ae05	Assay 1	Unknown	26.47	26.53	0.08	621.62	597.21	34.52	82.6
wCh-Ae013	Assay 1	Unknown	20.69	20.59	0.14	40404.64	43483.08	4353.57	82.6
wCh-Ae013	Assay 1	Unknown	20.49	20.59	0.14	46561.52	43483.08	4353.57	82.9
	Assay 1	Standard	19.87	19.96	0.14	69700	69700	0	82.9
	Assay 1	Standard	20.12	19.96	0.14	69700	69700	0	82.9
	Assay 1	Standard	19.89	19.96	0.14	69700	69700	0	82.6
wCh-Ae06	Assay 1	Unknown	20.62	20.37	0.35	42284.84	51505.19	13039.54	82.9
wCh-Ae06	Assay 1	Unknown	20.12	20.37	0.35	60725.54	51505.19	13039.54	82.6
Bedbug	Assay 1	Negative	36.14	36.14	N/A	0.58	0.58	N/A	80.2
Bedbug	Assay 1	Negative	N/A	36.14	N/A	N/A	0.58	N/A	N/A
	Assay 1	Standard	16.75	16.92	0.15	697000	697000	0	82.9
	Assay 1	Standard	17.03	16.92	0.15	697000	697000	0	82.9
	Assay 1	Standard	16.98	16.92	0.15	697000	697000	0	82.9
wCh-Ae07	Assay 1	Unknown	20.56	20.62	0.08	44121.81	42326.95	2538.32	82.9
wCh-Ae07	Assay 1	Unknown	20.68	20.62	0.08	40532.09	42326.95	2538.32	82.9
water	Assay 1	NTC	27.53	28.81	1.81	N/A	N/A	N/A	76.3
water	Assay 1	NTC	30.09	28.81	1.81	N/A	N/A	N/A	76
	Assay 1	Standard	13.34	13.21	0.11	6970000	6970000	0	82.9
	Assay 1	Standard	13.12	13.21	0.11	6970000	6970000	0	82.9
	Assay 1	Standard	13.17	13.21	0.11	6970000	6970000	0	82.9
wCh-Ae09	Assay 1	Unknown	26.85	27.27	0.6	472.96	364.2	153.82	76.6
wCh-Ae09	Assay 1	Unknown	27.7	27.27	0.6	255.43	364.2	153.82	76.6
no water	Assay 1	NTC	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
no water	Assay 1	NTC	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	82.9

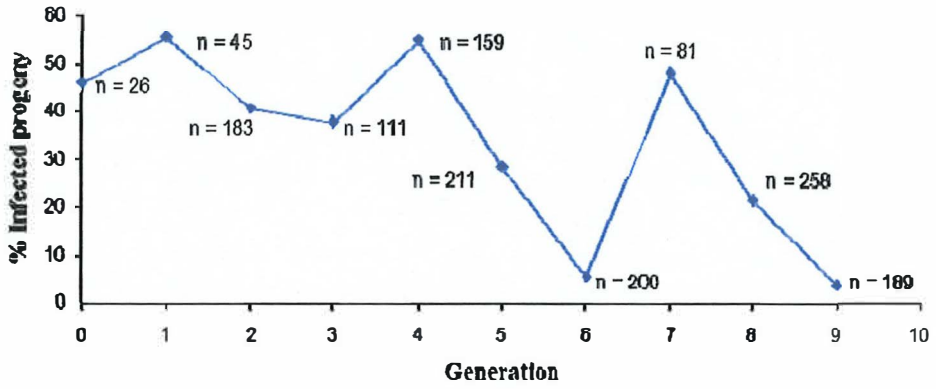
ตารางที่ 5 แสดงแสดงปริมาณ copy gene of *RpS17* ของยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) (red column) ด้วย Quantitative SYBR Green based real time PCR



ภาพที่ 14 กราฟแสดงการ amplified ยีน *RpS17* ของยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) ด้วย Quantitative SYBR Green based real time PCR สีเทา คือ เส้น STD นอกเหนือจากสีเทาคือสิ่งตัวอย่าง (ซ้าย) และกราฟแสดงการเปรียบเทียบปริมาณยีน *RpS17* กับเส้นกราฟมาตรฐาน (ขวา), Slope: 3.19 (-2.8 to -3.6); R^2: 0.996; Efficiency %: 105.80 (90-110%)

2. การศึกษาการติดเชื้อ *Wolbachia* ในยุงลายบ้านเพื่อศึกษาการถ่ายทอดเชื้อแบคทีเรียจากแม่สู่ลูก

การตรวจยืนยันการติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* สายพันธุ์ F ในยุงลายบ้าน *Aedes aegypti* ได้นำ DNA ของยุงในรุ่นที่ 0 ถึงรุ่นที่ 9 มาศึกษาเพิ่มจำนวนด้วย PCR พบว่ามีการถ่ายทอดเชื้อในระดับคงที่กระทั่งรุ่นที่เก้า ดังภาพที่ 15 และมีระดับการถ่ายทอดเชื้อที่ไม่คงที่ถึงรุ่นที่เก้า



ภาพที่ 15 Demonstration of transformation efficiency of transfected *Ae. Aegypti*, (n= number of mosquito sample tested)

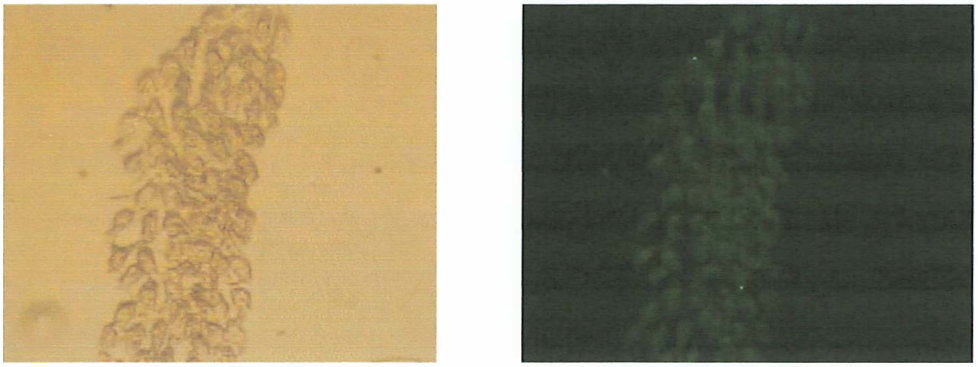
3. การตรวจสอบการติดเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Fluorescence *in situ* Hybridization

เทคนิค FISH (Fluorescence *in situ* Hybridization) เป็นเทคนิคทางอณูชีววิทยาที่พัฒนาขึ้นเพื่อศึกษาการแสดงออกของทั้ง DNA และ RNA ของยีนที่สนใจ งานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้สนใจศึกษาการแสดงออกของยีน 16S rRNA ของเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ด้วย DNA สายเดี่ยวที่ติดฉลาก (labeled single-stranded fragment of DNA) ที่เรียกว่า "labeled probe" ที่มีการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ที่เป็นคู่สมกับ DNA เป้าหมายและสามารถจับกับ DNA เป้าหมายนั้นเกิดเป็น "hybrids" ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ต่อยีน 16S rRNA ของ *Wolbachia* ที่ติดเชื้อในรังไข่ ตัวอ่อน และอัณฑะ ของยุงลายบ้าน ด้วยโพรบ 1 คู่ คือ VK INTF probe (5' fluoro TCC ATA AAG GCC ATG ACT) และ VK INTR probe (5' fluoro TCA TGT ACT CGA ATT GCA GAG T) ติดฉลากด้วยสารฟลูออเรซีนที่มีสีเขียว แล้วตรวจสอบการ Hybridize ของโพรบต่อยีนเป้าหมายซึ่งจะเปล่งแสงสีเขียวด้วยกล้องฟลูออเรสเซนต์ และหรือกล้องคอนโฟคอล

ภาพที่ 16 ภาพจากกล้องฟลูออเรสเซนต์ (รังไข่)

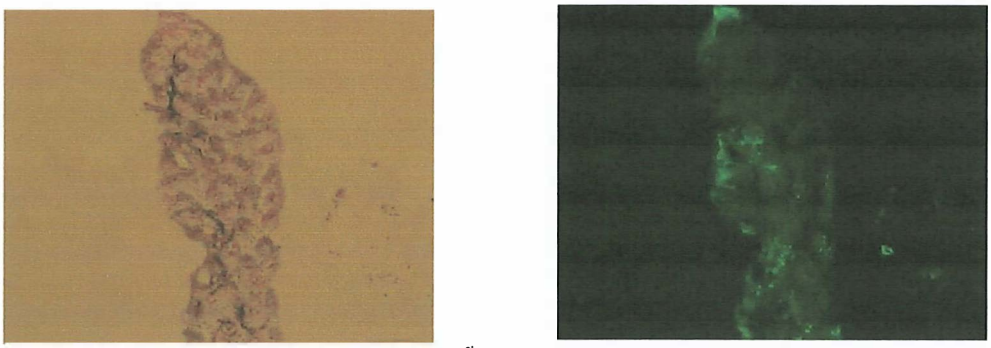
a. รังไข่ไม่ติดเชื้อ (Uninfected ovaries)

a1 a2



b. รังไข่ยุงที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* (Infected ovaries)

b1 b2

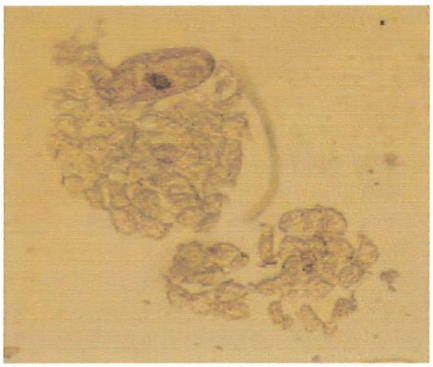


ภาพที่ 16a1 และ 16a2 คือ ภาพของรังไข่ที่ไม่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ส่วนภาพที่ 16b1 นั่นคือเป็นภาพเดียวกันกับ ภาพที่ 16b2 คือ ภาพของรังไข่ที่ติดเชื้อแบคทีเรีย*Wolbachia* แสดงให้เห็นเป็นจุดสีเขียว (*ลูกศรชี้*)

โดยภาพที่ 16a1 เป็นภาพที่ถ่ายจากฟิลเตอร์ของแสง Light ส่วนภาพที่ 16a2 เป็นที่ถ่ายจากฟิลเตอร์ GFP ของรังไข่ที่ไม่ติดเชื้อจึงมองไม่เห็นจุดสีเขียวของสสารฟลูออเรสเซนต์ ส่วนภาพที่ 16b2 คือ ภาพรังไข่ที่ติดเชื้อที่ถ่ายจากฟิลเตอร์ GFP เช่นเดียวกับภาพที่ 16a2 จึงทำให้มองเห็นการสะท้อนแสงสีเขียว (*ลูกศรชี้*) จากสารฟลูออเรสเซ็นต์ที่ถูกติดฉลากที่โพรบซึ่งจำเพาะต่อชิ้นส่วนยีน *16S rRNA* ของแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่ตำแหน่งเดียวกับรังไข่ในภาพที่ 16b1 ซึ่งเป็นภาพรังไข่ที่ถ่ายจากฟิลเตอร์แสง Light

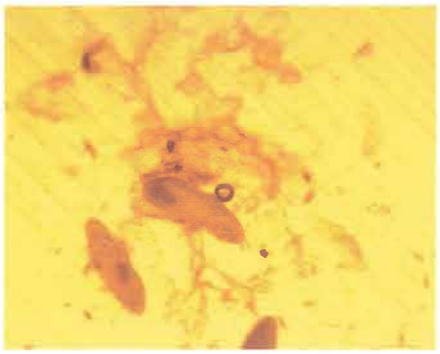
c. ตัวอ่อนอยู่ในเนื้อเยื่อของรังไข่ที่ไม่ติดเชื้อ (Uninfected ovaries and embryo)

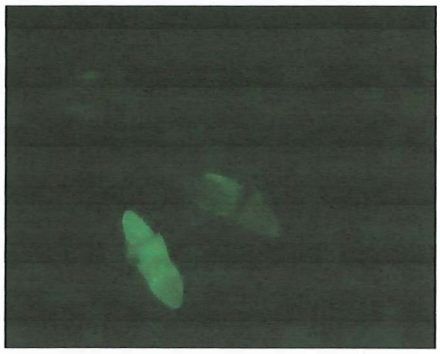
c1 c2



d. ตัวอ่อนอยู่ในเนื้อเยื่อของรังไข่ที่ไม่ติดเชื้อ (embryo in infected ovary)

d1 d2



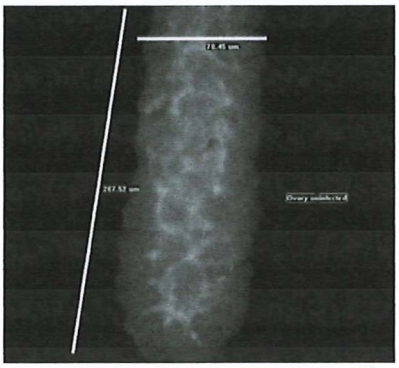


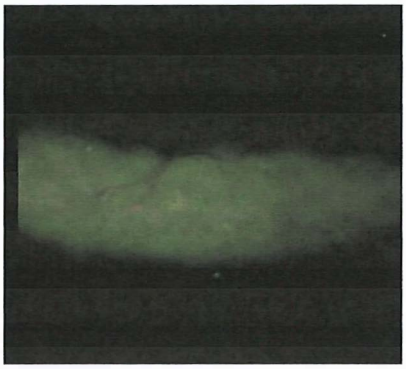
ภาพที่ 16c1 และ 16c2 เป็นภาพเดียวกันของตัวอ่อนที่อยู่ในเนื้อเยื่อของรังไข่ซึ่งไม่ติดเชื้อ *Wolbachia* ส่วนภาพที่ 16d1 และ 16d2 เป็นภาพของตัวอ่อนในเนื้อเยื่อของรังไข่ที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* จึงสามารถมองเห็นแสงสีเขียวของสารฟลูออเรสเซนต์ได้ (ลูกศรสีขาวชี้)

ภาพที่ 17 ภาพจากกล้องคอนโฟคอล (รังไข่)

a. รังไข่ที่ไม่ติดเชื้อ (Uninfected ovaries)

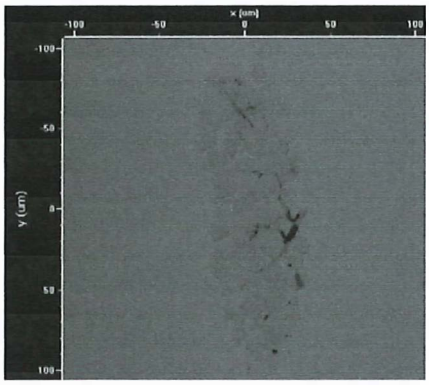
a1 a2

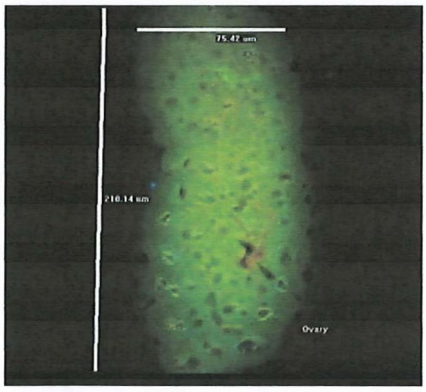




b. รังไข่ที่ติดเชื้อ (Infected ovaries)

b1 b2



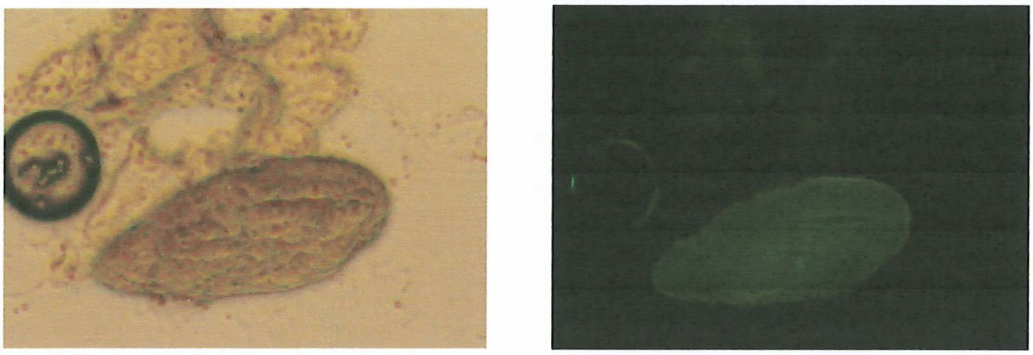


ภาพที่ 17a1 และ 17a2 เป็นภาพเดียวกันของตัวอ่อนที่ติดอยู่ในเนื้อเยื่อของรังไข่ซึ่งไม่ติดเชื้อ*Wolbachia* ภาพที่ 17a1 และ 17b2 เป็นภาพของตัวอ่อนในเนื้อเยื่อของรังไข่ที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* จึงสามารถมองเห็นแสงสีเขียวของสารฟลูออเรสเซนต์ได้ ซึ่งถ่ายจากกล้องคอนโฟคอล

ภาพที่ 18 ภาพจากกล้องฟลูออเรสเซนต์ (ตัวอ่อน)

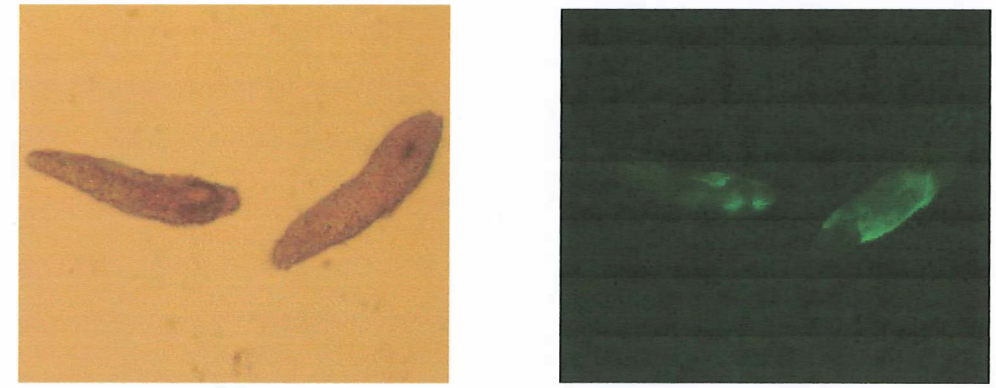
a. ตัวอ่อนไม่ติดเชื้อ (Uninfected embryo)

a1 a2

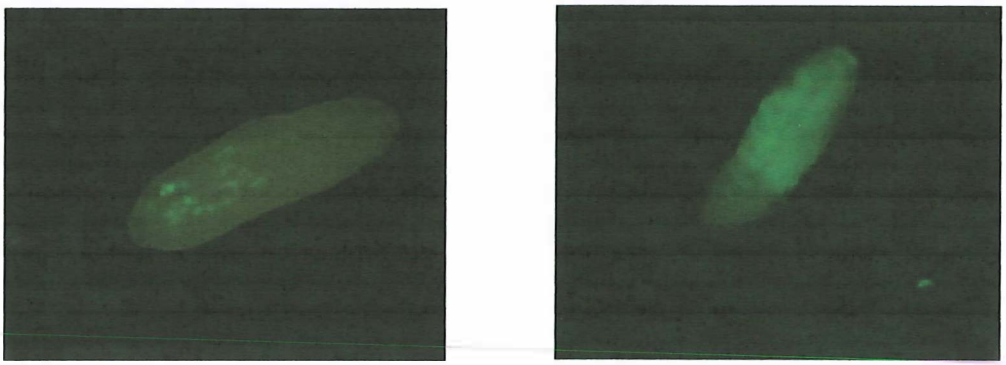


b. ตัวอ่อนติดเชื้อ (Infected embryo)

b1 b2



b3 b4

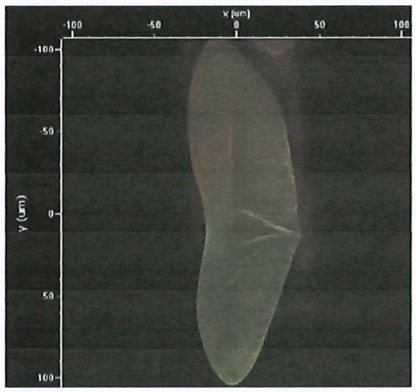


ภาพที่ 18a1 และ 18a2 เป็นภาพของตัวอ่อนที่ไม่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ใช้ฟิลเตอร์ของแสง Light ส่วนภาพที่ 18b2, 18b3 และ 18b4 เป็นที่ตัวอ่อนติดเชื้อ ถ่ายจากฟิลเตอร์ GFP ของกล้องฟลูออเรสเซนต์ จึงทำให้มองเห็นการสะท้อนแสงสีเขียวจากสารฟลูออเรสเซ็นต์ที่ ถูกติดฉลากที่โพรบซึ่งจเพาะต่อชิ้นส่วนยีน *16S rRNA* ของแบคทีเรีย *Wolbachia* ส่วนภาพที่ 18b1 คือภาพรังไข่ที่ถ่ายจากฟิลเตอร์แสง Light ซึ่งเป็นภาพเดียวกันกับภาพที่ 18b2

ภาพที่ 19 ภาพจากกล้องคอนโฟคอล (ตัวอ่อน)

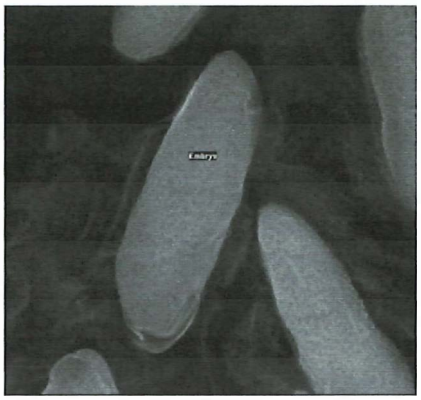
a. ตัวอ่อนไม่ติดเชื้อ (Uninfected embryo)

a1



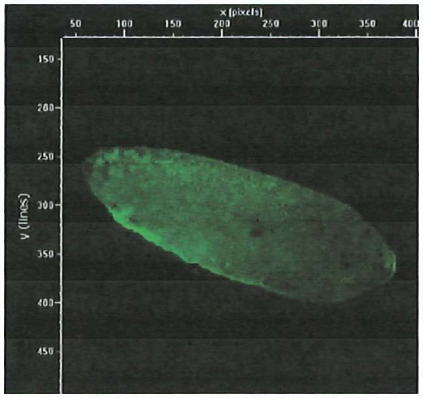
b. ตัวอ่อนติดเชื้อ (Infected embryo)

b1

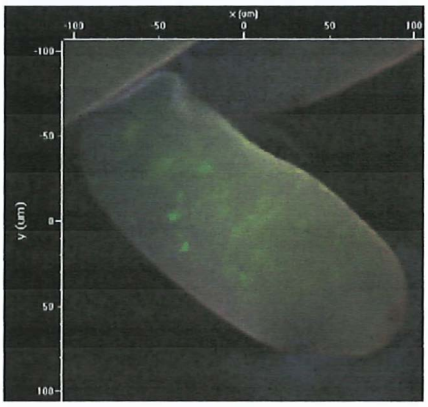


b2

b 3

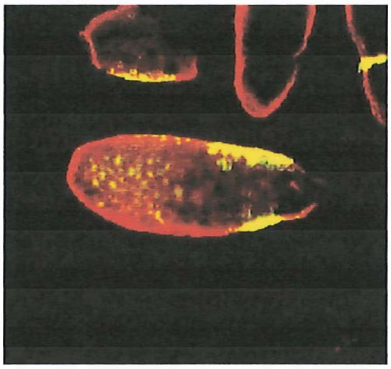


b4

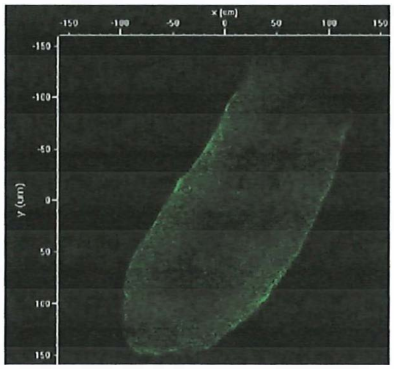


76

b 5



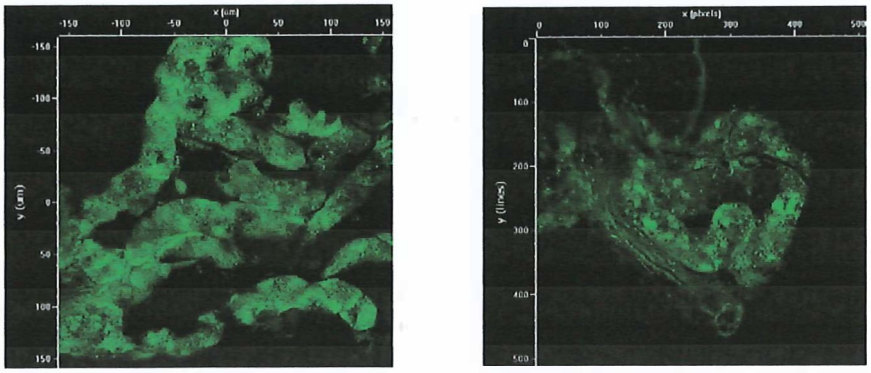
b6



ภาพที่ 19a1 เป็นภาพของตัวอ่อนที่ไม่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ซึ่งใช้ฟิลเตอร์ของแสง GFP ส่วนภาพที่ 19b2, 19b3 และ 19b6 (*ลูกศรชี้*) เป็นตัวอ่อนที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ด้านข้าง ส่วนหัว (Anterior pole) และส่วนท้าย (Posterior pole) ของตัวอ่อน ส่วนภาพที่ 19b4 สังเกตจากจุดสีเขียวของโพรบที่ปลายลูกศร และ ภาพที่ 19b5 เป็นภาพของตัวอ่อนที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* สังเกตเห็นจุดสีเหลืองในไข่หรือที่ปลายลูกศร โดยมีสีพื้นหลังเป็นสีแดงทโดยถ่ายภาพจากฟิลเตอร์ GFP ของกล้องคอนโฟคอล จึงทำให้มองเห็นการสะท้อนแสงสีเขียวจากสารฟลูออเรสเซ็นต์ที่ถูกติดฉลากที่โพรบซึ่งจำเพาะต่อชิ้นส่วนยีน 16S rRNA ของแบคทีเรีย *Wolbachia* ส่วนภาพที่ 19b1 คือ ภาพรังไข่ที่ถ่ายจากฟิลเตอร์แสง Light ซึ่งเป็นภาพเดียวกันกับภาพที่ 19b2

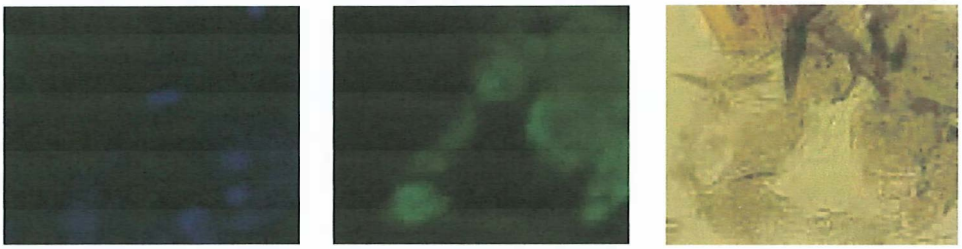
c. ระบบท่อ Mulphigian tubule

c1 c2



ภาพที่ 19c1 และ 19c2 เป็นภาพของท่อต่างๆในทางเดินหายใจติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ใช้ฟิลเตอร์ GFP ของกล้องคอนโฟคอล จึงทำให้มองเห็นจุดของแสงสีเขียวจากสารฟลูออเรสเซ็นต์ที่ถูกติดฉลากที่โพรบซึ่งจำเพาะต่อชิ้นส่วนยีน 16S rRNA ของแบคทีเรีย *Wolbachia* ในภาพที่ 19c2 สามารถสังเกตเห็นลักษณะของท่อชัดเจน (*ปลายลูกศรชี้*)

c 3 c4 c5



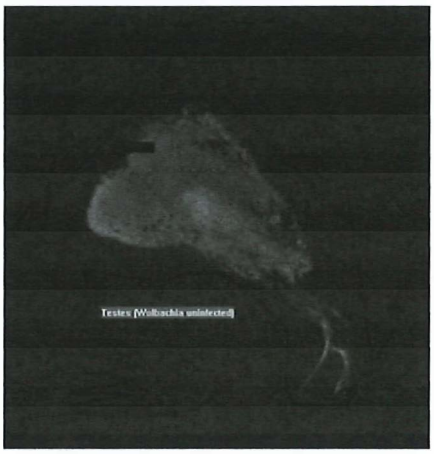
ภาพที่ 19c3 เป็นภาพของท่อต่างๆในระบบสืบพันธุ์ย้อมสี DAPI เทียบกับภาพภาพที่ hybrids ด้วยโพรบ และภาพถ่ายจากฟิลเตอร์แสง light โดยได้ สกัดจากสองปล้องท้ายของส่วนท้องของยุงลายบ้านที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia*

เมื่อใช้ฟิลเตอร์ GFP ของกล้องฟลูออเรสเซ็นต์ จึงทำให้มองเห็นจุดของแสงสีเขียวจากสารฟลูออเรสเซ็นต์ที่ถูกติดฉลากที่โพรบซึ่งจำเพาะต่อชิ้นส่วนยีน 16S rRNA ของแบคทีเรีย *Wolbachia* ดังในภาพที่ 14c3 (เป็นภาพถ่ายจากบริเวณเดียวกับภาพที่ 19c4) สามารถสังเกตเห็นจุดสีน้ำเงิน (*ปลายลูกศรชี้*) โดยถ่ายภาพจากฟิลเตอร์ DAPI ที่ถูก Stains ด้วยสารละลาย DAPI ที่บริเวณนิวเคลียสของเซลล์ เทียบกับ 4.19c4 (hybridize) และภาพที่ 19c5 ที่แสดงให้โครงสร้างของระบบสืบพันธุ์โดยใช้ฟิลเตอร์ของแสง light จึงแสดงให้เห็นว่าวิธีตรวจการติดเชื้อแบคทีเรียด้วย FISH สามารถรักษาสภาพโครงสร้างของเซลล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

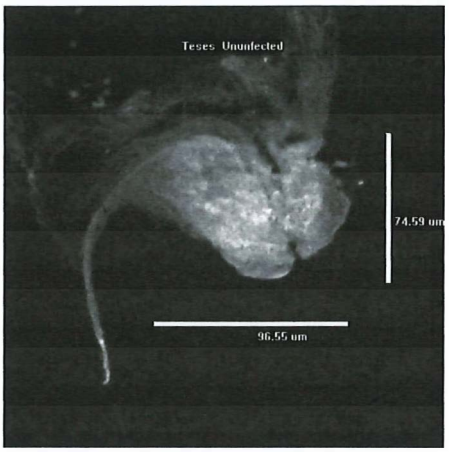
ภาพที่ 20 ภาพจากกล้องคอนโฟคอล (อัณฑะ)

a. อัณฑะยุงไม่ติดเชื้อ (Uninfected testes)

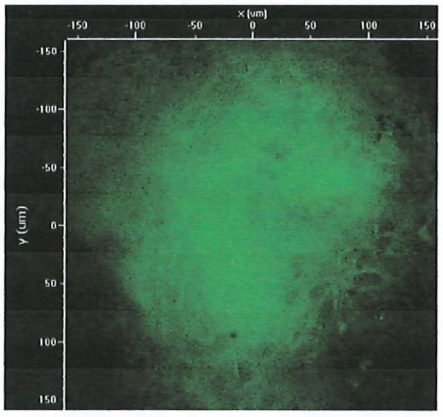
a1



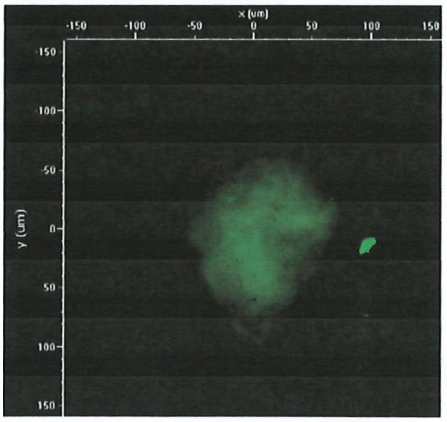
a2



a 3



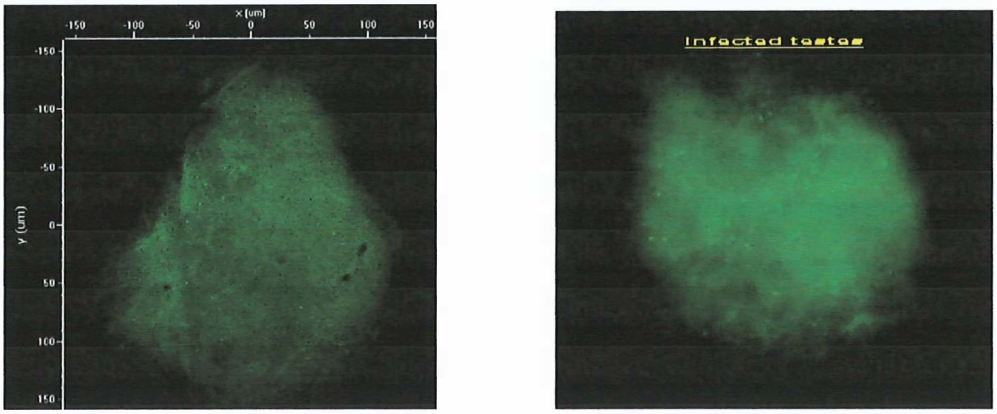
a4



ภาพที่ 20a3 (200x) และ 20a4 (100x) เป็นภาพเนื้อเยื่อของอัณฑะของยุงลายบ้านเพศผู้ที่ไม่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* (เช่นเดียวภาพที่ 20a1, 2 ถ่ายภาพจากฟิลเตอร์ light) ซึ่งถ่ายภาพโดยใช้ฟิลเตอร์ GFP ของกล้องคอนโฟคอล จึงทำให้มองไม่เห็นจุดของแสงสีเขียวจากสารฟลูออเรสเซ็นต์ที่ถูกติดฉลากที่โพรบซึ่งจเพาะต่อชิ้นส่วนยีน *16S rRNA* ของแบคทีเรีย *Wolbachia* ส่วนสีเขียวที่มองเห็นนั่นคือสีของพื้นหลังของภาพเท่านั้น

b. อัณฑะยุงติดเชื้อ (Infected testes)

b1 b2



ภาพที่ 20b1 (200x) และ 20b2 (100x) เป็นภาพเนื้อเยื่อของอัณฑะของยุงลายบ้านเพศผู้ที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ใช้ฟิลเตอร์ GFP ของกล้องคอนโฟคอล จึงทำให้มองเห็นจุดของแสงสีเขียวจำนวนมาก จากสารฟลูออเรสเซ็นต์ที่ถูกติดฉลากที่โพรบซึ่งจำเพาะต่อชิ้นส่วนยีน *16S rRNA* ของแบคทีเรีย *Wolbachia* โดยเฉพาะภาพ 20b2 (100x)

อภิปรายผลการวิจัย

1. เชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ในเรือดและการถ่ายทอดเชื้อในยุงลายบ้าน

ผลการทดลองของงานวิจัยนี้คือสามารถเพิ่มจำนวนชิ้นส่วน DNA ของยีน *16S rRNA* ของแบคทีเรีย *Wolbachia* สายพันธุ์ F เพื่อตรวจสอบหาการติดเชื้อ *Wolbachia* โดยเทคนิค PCR ด้วยคู่ไพรเมอร์ INTF2-INTR2 [37] ขนาด 136 bp ภายใต้สภาวะโปรแกรมของ PCR ดังนี้ อุณหภูมิเริ่มต้นแยกสาย DNA คือ 95^{0}C เวลา 5 นาที แล้วตามด้วยอุณหภูมิ 95^{0}C, 55^{0}C และ 72^{0}C อุณหภูมิละ 1 นาที จำนวน 40 รอบ และอุณหภูมิการต่อสายดีเอ็นเอช่วงสุดท้ายที่ 72^{0}C เวลา 5 นาที [45] ซึ่งสุดท้ายได้ชิ้นส่วน DNA ขนาด 136 bp สอดคล้องกับงานวิจัยที่ได้รายงานมาก่อนแล้ว [46] ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA ตัวอย่างของชิ้นส่วนยีน *16S rRNA* ของเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่ติดเชื้อในเรือดเขตร้อน *Cimex hemipterus* ดังกล่าวไม่มีรายงานฐานข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาด 136 bp ใน GenBank

ผู้วิจัยได้ทดสอบการติดเชื้อแบคทีเรียนี้ต่อยุงลายบ้านด้วยวิธีการฉีดสารละลายเชื้อ *Wolbachia* สายพันธุ์ F ที่สกัดจากไข่ของเรือด *Cimex hemipterus* ด้วยเทคนิควิธี microinjection เข้าไปในยุงลายบ้านเพศเมียตัวเต็มวัยอายุ 3 วัน ทั้งหมด 60 ตัว เพื่อนำข้อมูลมาเป็นแนวทางในการประเมินความแข็งแรงและ/หรือสมรรถนะของยุงลายบ้านพาหะของไวรัสไข้เลือดออก ไวรัสไข้เหลือง และเชื้อฟิลาเรีย หลังจากฉีดเชื้อและได้รับสารอาหารประมาณ 24 ชั่วโมง แล้วนับจำนวนรอดชีวิตผลปรากฏว่ารอด 11

ตัว และผลการทดสอบการติดเชื้อด้วยเทคนิคทาง PCR เช่นเดียวกับที่ได้ทดสอบในเรือดพบว่ามีการติดเชื้อ 26 ตัว จากจำนวนที่รอดชีวิต (63%) คิดเป็น 46.1% ในรุ่น G_0 แสดงให้เห็นว่าการทำให้ยุงติดเชื้อด้วยเทคนิคการทำ Microinjection กับยุงตัวเต็มวัยเข้าบริเวณระหว่าง Posterior pronotum และ sternoplueron [43] เป็นเทคนิควิธีการที่มีประสิทธิภาพและเหมาะสมต่อการศึกษาวิจัยนี้และงานวิจัยในอนาคตต่อไป ทั้งนี้งานวิจัยนี้ยังแสดงให้เห็นว่าสามารถสร้างติดเชื้อ *Wolbachia* ระหว่าง Order ของแมลงแบบแนวราบ (horizontal transmission) ได้ นอกเหนือจากการถ่ายทอดเชื้อแบบแนวดิ่งทางระบบสืบพันธุ์ [56] ยุงลายบ้านที่ได้รับการฉีดเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ F นี้จะรอดชีวิตใกล้เคียงกับ embryo microinjection คือการฉีดเชื้อเข้าตัวอ่อนของแมลงหวี่และหนอนตัวกลม [13] [20] อย่างไรก็ตาม adult microinjection ก็มีข้อจำกัด อาจเนื่องมาจากความไม่เหมาะสมของวัสดุอุปกรณ์บางชนิด เช่น 1) ขนาดและลักษณะของปลายเข็มที่ใช้ฉีด นั้น เป็นอีกปัจจัยที่สำคัญต่อการเกิดขนาดและลักษณะบาดแผลบนตัวของยุง อาจมีผลต่อการรอดชีวิตของยุงมากที่สุด ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้ทำเข็มสำหรับฉีดเองแต่คุณสมบัติอาจไม่ดีพอ ดังนั้นควรมีเข็มที่มีคุณสมบัติเหมาะสมต่อการทดลอง 2) ทักษะของผู้วิจัย ต้องมีความเชี่ยวชาญในการฉีด ที่สำคัญคือมุมของเข็มที่สัมผัสกับผิวบริเวณอกของยุงมีผลต่อการเกิดขนาดแผลจากเข็มและสะท้อนถึงการรอดชีวิตของยุงที่นำมาทดลองอย่างมาก 3) ระยะเวลาที่ยุงสลบบนน้ำแข็งที่เหมาะสมก่อนฉีด ควรฉีดยุงทันทีที่ยุงสลบจะทำให้ยุงรอดชีวิตได้มาก และ 4) ปริมาตรปริมาณ คุณภาพและความเข้มข้นของสารละลายเชื้อแบคทีเรียที่ต้องใช้ฉีด สำหรับงานวิจัยนี้ใช้ปริมาตรประมาณ 0.2 µl ซึ่งเชื้อแบคทีเรียสามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกได้แสดงให้เห็นว่าปริมาตรที่ใช้ฉีดเชื้อ *Wolbachia* นี้ เหมาะสมต่อการศึกษา อีกทั้งแบคทีเรีย *Wolbachia* สามารถติดเชื้อได้ในหลายอวัยวะของร่างกายแมลงประกอบด้วย เนื้อเยื่ออวัยวะสืบพันธุ์ เช่น รังไข่และอัณฑะ ทั้งนี้ยังมีรายงานการติดเชื้อใน ท่อลม ทางเดินอาหารส่วนกลาง กล้ามเนื้อส่วนอก ส่วนหัว และส่วน Spermatocyst [43] แต่อัตราการติดเชื้อของงานวิจัยนี้เกิดขึ้นไม่สมบูรณ์และไม่คงที่อาจเป็นเพราะแบคทีเรียต้องเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมบางชนิดใหม่เพื่อปรับตัวให้เข้ากับการเปลี่ยนแปลงสิ่งแวดล้อมของไซโตพลาสซึมจากเซลล์เรือดเป็นไซโตพลาสซึมของเซลล์ยุงลายซึ่งเป็นแมลงต่าง Order กัน ในการนี้อาจต้องใช้ระยะเวลายาวนานต่อการวิวัฒนาการในการอยู่ร่วมกันของสิ่งมีชีวิตทั้งสองชนิดเพื่อให้สามารถดำรงชีวิตด้วยการพึ่งพากันอาศัยกันอย่างถาวรตลอดกาล ส่วนกรณียุงลายกลุ่มที่ไม่ติดเชื้อจากการฉีดอาจเป็นเพราะเชื้อแบคทีเรียไม่สามารถปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมใหม่ได้ หรืออาจเกิดจากการตายของเชื้อแบคทีเรียในระหว่างการสกัดหรือรอเตรียมฉีดเข้าในยุง ซึ่งช่วงเวลานี้แบคทีเรียอยู่นอกเซลล์ถึงแม้จะเตรียมเชื้อไว้ในสารละลายบัฟเฟอร์ก็ตามที

จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ยืนยันการติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* และศึกษาการเปลี่ยนแปลงเบสบางชนิดเพื่อให้อยู่รอดในเซลล์ของยุงนั้น เมื่อเปรียบเทียบลำดับ นิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียที่ติดเชื้อในยุงลายบ้านกับเชื้อแบคทีเรียในไข่เรือดเขตร้อน พบว่าลำดับ นิวคลีโอไทด์มีความแตกต่างกัน ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียจากยุงลายบ้านมีการเปลี่ยนแปลงในตำแหน่งเดียวกันที่แตกต่างกันจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Wolbachia* ในไข่เรือดและยุงติดเชื้อ G_0 ซึ่งเป็นตำแหน่งที่มีเบสเปลี่ยนแปลงแบบแทนที่ ดังนี้มีตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงแบบแทนที่ในตำแหน่งที่55 คือ เปลี่ยนแปลงจากเบส A เป็นเบส G ส่วนลำดับ

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงแทนที่ของลำดับนิวคลีโอไทด์และความแตกต่างของลำดับกรดอะมิโนระหว่างเชื้อแบคทีเรีย Wolbachia (F-supergroup) ที่ติดเชื้อในเรือดและติดเชื้อในยุงลายบ้านทั้งเพศผู้และเพศเมียซึ่งส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของในยุงที่แตกต่างจากในเรือดอาจเป็นเพราะว่า เชื้อแบคทีเรียจำเป็นต้องมีการเปลี่ยนแปลงเพื่อปรับตัวให้สามารถดำรงชีวิตในเซลล์ของยุงได้ อย่างไรก็ตามสำหรับกรณีที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงทั้งลำดับ นิวคลีโอไทด์และ/หรือลำดับกรดอะมิโนแสดงว่าแบคทีเรียสามารถทนต่อสภาวะแวดล้อมใหม่และสามารถดำรงชีวิตต่อไปในเซลล์ยุงดังกล่าวได้ หากศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ยาวกว่านี้หรือศึกษานิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของยีน *16s rRNA* น่าจะพบลักษณะของการเปลี่ยนแปลงแทนที่ของลำดับ นิวคลีโอไทด์และ/หรือการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนในหลายๆตำแหน่งมากขึ้น ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาต่อไปในอนาคต เพื่อให้สามารถนำผลการทดลองมาประยุกต์ใช้ได้จริงและแบคทีเรีย Wolbachia สายพันธุ์ F อาจเป็นแบคทีเรียอีกหนึ่งสายพันธุ์ที่สามารถเป็นอีกแนวทางเลือกในการนำมาสร้างเวคเตอร์เพื่อขนถ่ายยีนต้านเชื้อก่อโรคเข้าสู่ประชากรของแมลงพาหะนำเชื้อโรค เพื่อแทนที่ และยับยั้งประชากร (population suppress and replacement) แมลงที่ไม่สามารถต้านเชื้อก่อโรคได้ [20]

2. การสาธิตการติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ในอวัยวะสืบพันธุ์ของยุง

ส่วนของ DNA สายเดี่ยว 2 เส้น ที่ติดฉลากด้วยสาร fluorescence คือ VK INTF probe (5' fluoro TCC ATA AAG GCC ATG ACT) และ VK INTR probe (5' fluoro TCA TGT ACT CGA ATT GCA GAG T) ที่เรียกว่า "labeled probe" ซึ่งมีการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ที่เป็นคู่สมกับ DNA เป้าหมาย สามารถจับกับ DNA เป้าหมายนั้นเกิดเป็น "hybrids" ภายใต้ภาวะที่เหมาะสม คือหลักการการสาธิตให้เห็นตำแหน่งบริเวณที่มีการติดเชื้อแบคทีเรีย Wolbachia ด้วยเทคนิคที่เรียกว่า Fluorescence in Situ Hybridization (FISH) ปัจจุบันถือว่าเป็นเทคนิคทางอณูชีววิทยาที่พัฒนาขึ้นเพื่อศึกษาการแสดงออกของ DNA ของยีนเป้าหมายโดยที่โครงสร้างเซลล์ไม่ถูกทำลาย ยืนยันได้โดยการย้อมด้วย DAPI ในระหว่างกระบวนการ Hybridization ของโอลิโก นิวคลีโอไทด์โพรบ (labeled single-stranded fragment of DNA) ซึ่งจะย้อมสีที่บริเวณนิวเคลียสของเซลล์และตรวจสอบการย้อมสีด้วยฟิลเตอร์เฉพาะสำหรับแสงสีน้ำเงินจากกล้องฟลูออเรสเซนต์ ทั้งนี้เทคนิคนี้ยังสะดวก รวดเร็วและปลอดภัยต่อผู้ศึกษาทดลอง ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ใช้วิธีการนี้เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน *16S rRNA* (Gene expression) รวมถึงการแสดงออกของโครงสร้างประชากร (Population structure) พลวัตการกระจายเชื้อ (Dynamics) ของเชื้อแบคทีเรีย Wolbachia ที่ติดเชื้อในอวัยวะสืบพันธุ์ของตัวอย่างเป็นสำคัญ วิธีการ Fluorescence in situ DNA-DNA hybridization (FISH) นี้อาจจะสามารถศึกษาได้ถึงลักษณะกลไกทางพันธุกรรม สรีระวิทยา วงจรชีวิต และการปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมในยุงลายบ้านได้ด้วย พร้อมกันนี้อาจใช้ศึกษาการสร้างสารเมทาบอไลต์ของแบคทีเรียในเซลล์ตัวอ่อน (Germ cell) ของยุงและการเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์แบคทีเรียและเซลล์ของโฮสต์ [21] [30] ได้

จากการทดลองศึกษาการกระจายตัวของเชื้อแบคทีเรียในเนื้อเยื่อของระบบสืบพันธุ์เนื่องจากเป็นบริเวณที่ติดเชื้ออย่างหนาแน่น [21] และอวัยวะที่ใกล้เคียงดังกล่าวพบว่า มีการแสดงออกของเชื้อแบคทีเรียได้ดังนี้

1) อัณฑะของยุงลายบ้านเพศผู้ พบการกระจายของเชื้อแบคทีเรียจะมีลักษณะเป็นจุดสีเขียวทั่วทั้งพูของอัณฑะซึ่งต้องใช้กำลังขยายมากกว่าการศึกษาในตัวอ่อนและรังไข่ จากผลการศึกษาแสดงให้ทราบว่าเชื้อแบคทีเรีย Wolbachia สามารถดำรงชีพในเซลล์อัณฑะของยุงได้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Veneti และคณะ ที่รายงานว่ามีการติดเชื้อ Wolbachia ได้ในซีสต์ (Cyst) ภายในอัณฑะของแมลงหวี่และเชื้อจะทำหน้าที่ดัดแปลงพันธุกรรมของเซลล์สืบพันธุ์ (mod+) ได้ [53] แต่ในทางตรงกันข้ามจะไม่พบเชื้อแบคทีเรียในตัวอสุจิของยุงเนื่องจากเชื้อมีบทบาทต่อการดัดแปลงสารพันธุกรรมของเซลล์เพศเท่านั้นและเคลื่อนที่ออกจากตัวอสุจิก่อนที่อสุจิจะมีพัฒนาการเป็นระยะตัวเต็มวัยที่พร้อมผสมพันธุ์กับเซลล์ไข่ของเพศเมีย [48] ในการนี้เนื่องจากอสุจิของยุงมีขนาดเล็กจึงยากต่อการเตรียมตัวอย่างและยากต่อการทดลองสาธิตให้เห็นการติดเชื้อด้วยเทคนิคการ hybrid ด้วยโพรบ ดังนั้นอาจจะต้องศึกษาการติดเชื้อของแบคทีเรีย Wolbachia ในตัวอสุจิหรือ Spermatocyst ของยุงได้ด้วยเทคนิคทางกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน เพราะเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่สามารถแสดงให้เห็นถึงระดับออแกเนลของเซลล์อย่างชัดเจนจึงอาจจะสาธิตเห็นการติดเชื้อได้

2) ตัวอ่อน พบการกระจุกของสีเขียวของสารฟลูออเรสเซนต์ของโพรบที่จำเพาะต่อยีนของเชื้อ Wolbachia เกือบทุกบริเวณของเซลล์ตัวอ่อนโดยเฉพาะบริเวณขอบ (cortical region) และส่วนหัว (anterior side) และท้าย (posterior side) สอดคล้องกับงานวิจัยที่เคยรายงานมาแล้วของ Xi และ คณะ แสดงให้เห็นว่าเชื้อสามารถถ่ายทอดไปสู่ยุงในรุ่นลูกได้ทางระบบสืบพันธุ์ของเพศเมีย [60] [61]

3) รังไข่ ภาพที่ศึกษาจากกล้องฟลูออเรสเซนต์สามารถแสดงให้เห็นการติดเชื้อของแบคทีเรียได้อย่างแตกต่างเมื่อเทียบกับรังไข่ที่ไม่มีการติดเชื้อ ส่วนภาพที่ได้จากกล้องจุลทรรศน์คอนโฟคอลนั้น รังไข่ที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อแยกออกจากกันได้ไม่ชัดเจนอาจเนื่องมาจากมีอัตราการติดเชื้อค่อนข้างต่ำ [60] ในตัวอย่างที่ศึกษา แต่ผลของ Semi-nested PCR สามารถยืนยันได้ว่ามีการติดเชื้อจริง ดังนั้นผู้วิจัยควรต้องมีทักษะในการศึกษาตัวอย่างจากกล้องคอนโฟ คอลพอสมควรจึงจะสามารถศึกษาเปรียบเทียบตัวอย่างได้อย่างถูกต้อง หรืออาจต้องปรับปรุงเทคนิคและวัสดุอุปกรณ์บางอย่างในระหว่างการดำเนินการทดลองให้ได้มาตรฐานและเหมาะสม

และ 4) ระบบท่อทางเดินหายใจ พบว่ามีการติดเชื้ออย่างสูงที่เนื้อเยื่อบริเวณนี้สังเกตได้จากจุดสีเขียวชัดเจนจำนวนมากตามทางยาวของระบบท่อต่างๆ ทั้งภาพจากกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์และกล้องจุลทรรศน์คอนโฟคอล

3. สมรรถนะของยุงลายบ้านหลังติดเชื้อแบคทีเรีย Wolbachia

การประเมินสมรรถนะหรือความแข็งแรงของยุงที่ติดเชื้อ *Wolbachia* เป็นอีกปัจจัยที่จำเป็นต้องศึกษาเนื่องจากเป็นสิ่งที่แสดงให้เห็นถึงผลกระทบของการเกิดปฏิกิริยาของเชื้อแบคทีเรียต่อเซลล์ของโฮสต์ในเชิงการแพร่เชื้อ รวมถึงการส่งถ่ายไปยังรุ่นลูกในหลายต่อหลายรุ่น ความสามารถในการอยู่รอดของแบคทีเรียและความสามารถในการสืบพันธุ์ [31] ของยุงลายบ้านที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ด้วยพารามิเตอร์ของการประเมินสมรรถนะซึ่งประกอบด้วย การวัดระยะเวลาของวงจรชีวิต การวางไข่ การฟักไข่ การถ่ายทอดเชื้อจากแม่สู่ลูก ขนาดร่างกาย ความสามารถในการแข่งขันการแย่งอาหาร การแย่งเข้าคู่ผสมพันธุ์ของทั้ง

เพศผู้และเพศเมีย ปริมาณและคุณภาพของเชื้ออสุจิของยุงที่อายุยังน้อย เพราะ Crespigny และ Wedell กล่าวว่าหากยุงที่มีอายุมากอาจจะมีการเก็บอสุจิไว้ในอวัยวะเก็บอสุจิอย่างดีและแน่นจึงยากที่จะหาปริมาณอสุจิได้อย่างถูกต้อง [10] ฉะนั้น พารามิเตอร์เหล่านี้เป็นสิ่งจำเป็นต้องดำเนินการศึกษาเพื่อสร้างความน่าเชื่อถือ ความเชื่อมั่นและมีความปลอดภัยก่อนตัดสินใจเลือก *Wolbachia* สายพันธุ์ดังกล่าวมาประยุกต์เป็นเวคเตอร์เพื่อใช้เป็นพาหนะขับเคลื่อนยีนที่สนใจเข้าไปแทนที่ประชากรยุงพาหะที่ไม่สามารถต่อต้านการส่งถ่ายเชื้อก่อโรคได้ ซึ่งจำเป็นต้องศึกษาในห้องทดลองก่อนนำไปประยุกต์ใช้นอกห้องทดลองหรือในธรรมชาติต่อไป

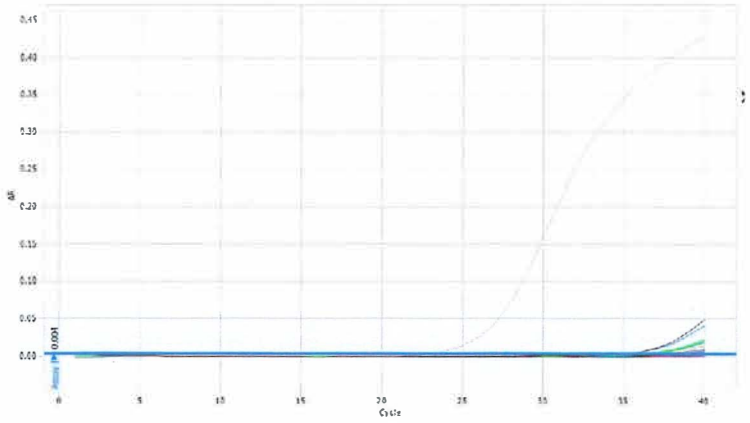
Cross (female x male)	Number of egg laid (G_2)	Number of eggs hatch (%)	*P* value	Number of egg laid (G_4)	Number of eggs hatch (%)	*P* value
a.Transfected x Transfected	375	290 (77.33)		405	290(77.30)	
b.Transfected x Uninfected	454	369 (81.20)		535	423 (79.00)	
c.Uninfected x Transfected	485	91 (18.86)		490	91(30.60)	
d.Uninfected x Uninfected	725	561 (77.37)		837	733 (87.57)	

ตารางที่ 6 CI model resulting from the establishment of naturally *Wolbachia*-uninfected *Ae. aegypti* and transfected *Ae. aegypti* mosquitoes via direct injection. Percent of hatching and statistical difference calculated from cross replicated is demonstrated for each of four groups.

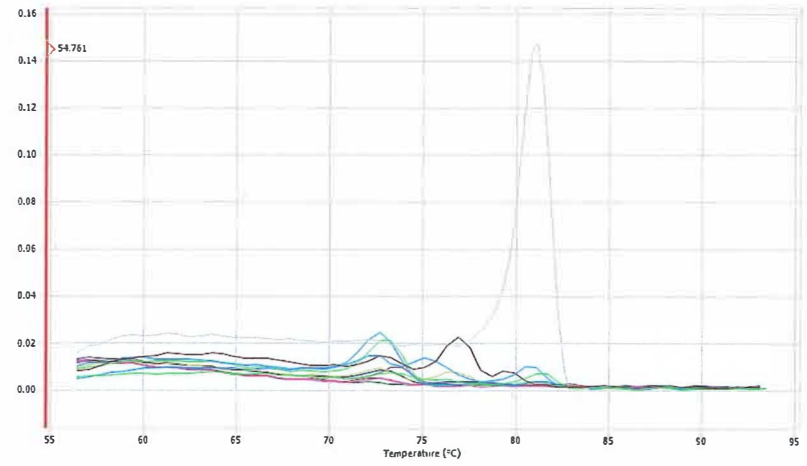
เมื่อเปรียบเทียบร้อยละการฟักไข่ยุงรุ่นที่ 2 และ 4 ระหว่างกลุ่มที่ติดเชื้อทั้งคู่หรือ Transfected×Transfected (77.33 และ 77.30 %) กับกลุ่มควบคุมหรือ Uninfected×Uninfected (77.37 และ 87.57%) และ Transinfected×Uninfeted (81.20 และ 79.00%) มีค่าแตกต่างกับกลุ่มควบคุม Uninfected×Transinfected (18.86 และ 30%) อย่างมีนัยสำคัญที่ p-value < .05 สอดคล้องกับงานวิจัยที่เคยรายงานมาแล้วของ Ruang-areerate and Kittiyapong แต่ Dobson และคณะ รายงานว่า *Aedes albopictus* ที่ติดเชื้อแบคทีเรียแบบ Superinfection มีอัตราการฟักไข่มากกว่ายุงไม่ติดเชื้ออย่างมีนัยสำคัญ [14] แต่ถึงกระนั้นก็ตามจากข้อมูลผลการทดลองงานวิจัยนี้สามารถสรุปได้ว่าเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* อาจไม่มีผลกระทบต่อการฟักไข่ของยุง อาจเพราะว่าเชื้อแบคทีเรียมีบทบาทในการเป็น endosymbionts ที่จำเป็นต้องพึ่งพาอาศัยในเซลล์ของโฮสต์เท่านั้นแต่ไม่มีบทบาทต่อพฤติกรรมการดำรงชีวิตของโฮสต์ดังเช่นยุงลายบ้าน *Aedes aegypti* เพศเมีย ดังนั้นเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* สายพันธุ์ F จากเรือดจึงน่าจะมีคุณค่าและมีคุณสมบัติที่เพียงพอต่อการนำมาประยุกต์เป็นเวคเตอร์เพื่อเชื่อมยีนต่อต้านเชื้อก่อโรคที่มียุงลายเป็นพาหะดังเช่นเชื้อไวรัสเดงกีได้อย่างปลอดภัยและสามารถส่งผลให้ยีนต้านเชื้อก่อโรคมีการแสดงออกในยุงลายบ้านที่ได้รับการถ่ายทอดเชื้อแบคทีเรียนี้ได้ในอนาคต

4. ผลของเชื้อแบคทีเรียต่อเชื้อไวรัสไข้เลือดออก

การทดลองผลของเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ต่อการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสไข้เลือดออกชนิดที่ 4 ในยุงลายบ้าน ด้วยวิธี microinjection ในยุงลายบ้าน โดยเทียบกับกลุ่มควบคุม คือ กลุ่มที่ติดเชื้อแบคทีเรียและกลุ่มที่ติดเชื้อไวรัสไข้เลือดออกเพียงอย่างเดียว หลังจากนั้น 40 ชั่วโมง ทำ Anesthetize ยุงทุกกลุ่มแล้วนำไปสกัด DNA เพื่อตรวจวัดปริมาณ Copy number genes of 16S rDNA gene ของเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* จากส่วนท้องด้วย Quantitative Real Time PCR

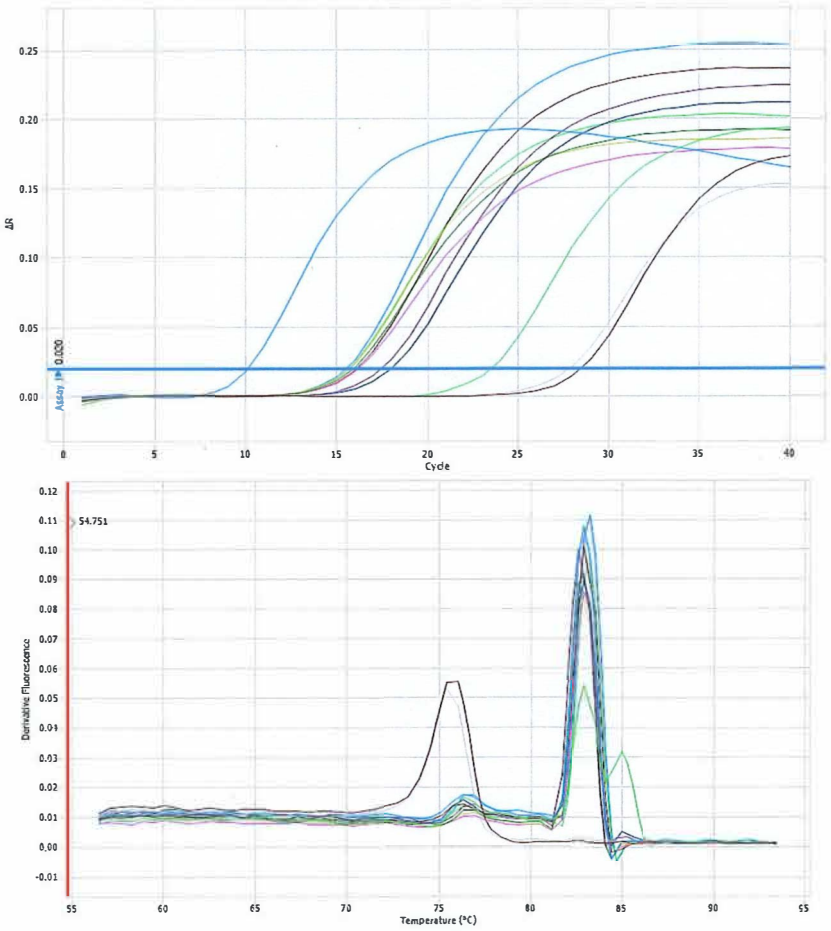


Amplified *Wolbachia* from Experiment & Control (*Wolbachia*-infection) groups



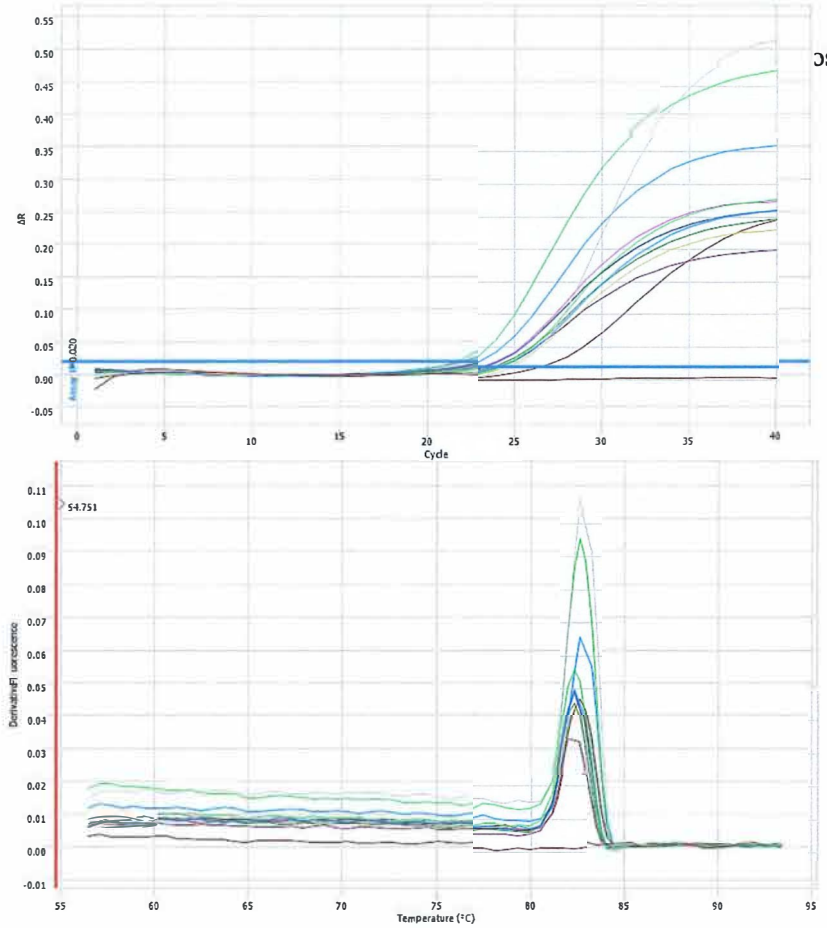
ภาพที่ 21 แสดง Melting curve ของเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* จากส่วนท้องของยุงล้ายบ้านกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม (Tm = 81°C) ในขณะที่กลุ่มควบคุมไม่มีเชื้อจะไม่ใช่ curve เดียวกันกับ Positive

และสกัด RNA เพื่อตรวจวัดปริมาณเชื้อไวรัสจากส่วนหัวและอกในหน่วย PFU/ml ด้วย Quantitative One-Step Real Time PCR



ภาพที่ 22 แสดง Melting curve ของเชื้อ Dengue serotype 4 จากส่วนหัวและอกของยุงลายบ้านกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม (Tm = 82.9°C) ในขณะที่กลุ่มควบคุมไม่มีเชื้อจะไม่ใช่ curve เดียวกันกับ Positive ปริมาณไวรัสจาก Stock เท่ากับ 7.55 x 10^5 PFU/ml

ซึ่งทั้งปริมาณของเชื้อแบคทีเรียได้ถูกวัดปริมาณต่อเซลล์ของยุงด้วยการ Normalize ด้วยปริมาณ Housekeeping gene หรือ RP17S gene ของยุงลายบ้าน และเมื่อเทียบปริมาณเชื้อไวรัสระหว่างกลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุม พบว่า ปริมาณเชื้อไวรัสต่อเซลล์ของยุงกลุ่มทดลอง (0.807 PFU/Cell) มีค่าน้อยกว่าปริมาณเชื้อไวรัสในกลุ่มควบคุม (1.67 PFU/Cell) ถึง 2 เท่า หลังทำการทดลองแล้ว 40 ชั่วโมง (ตารางที่ 4)



ภาพที่ 23 แสดง Melting curve ของเชื้อ RP17S ของยุงลายบ้านกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม (Tm = 82.3^{0}C) เทียบกับ Positive และ Negative controls

Samples	Mean quantity of *Wolbachia* (Copy)	Mean quantity of DEN4 (PFU)	Mean quantity of *Wolbachia* per cell	Mean quantity of DEN4 per cell
Wolbachia and dengue4 infection	6.64 x 10^{-2}	2.94 x 10^4	**2.26 x 10^{-6}**	**0.807**
Wolbachia infection	8.43 x 10^{-2}	-	**8.61 x 10^{-6}**	-
Dengue 4 infection	-	1.88 x 10^4	-	**1.67**

ตารางที่ 7 ผลของเชื้อแบคทีเรียต่อปริมาณเชื้อไวรัส ซึ่งพบว่าปริมาณเชื้อไวรัสในกลุ่มทดลองน้อยกว่ากลุ่มควบคุมถึงสองเท่าหลังทดลอง 40 ชั่วโมง

สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยฉบับนี้ได้ทดลองและศึกษาประเมินสมรรถนะของยุงลายบ้าน *Aedes aegypti* หลังได้รับการถ่ายทอดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* สายพันธุ์ F ณ ที่นี้ได้ศึกษา *Wolbachia* ที่สกัดจากเรือดที่พบในประเทศไทยและงานวิจัยนี้ยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อน เชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* สายพันธุ์ F จัดอยู่ในกลุ่ม alpha-proteobacteria แบคทีเรียนี้จำเป็นต้องอาศัยภายในเซลล์ของโฮสต์ของแมลงสัตว์ขาปล้อง ซึ่งเคยมีรายงานการอุบัติการณ์การติดเชื้อพบว่าติดเชื้อในแมลงถึง 16-22% [20][28] ทั้งนี้นักวิจัยจึงได้สาธิตให้เห็นถึงบริเวณที่มีการติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* สายพันธุ์ F ที่อวัยวะสืบพันธุ์ในยุงลายบ้านพร้อมกันด้วย เชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่ใช้ในงานวิจัยเป็นแบคทีเรียที่ติดเชื้อในเรือด *Cimex hemipterus* อยู่แล้วตามธรรมชาติและหาได้ง่ายในประเทศเขตร้อนดังเช่นประเทศไทย จึงเป็นที่สนใจและได้นำมาสกัดเชื้อเพื่อนำมาทำการทดลอง โดยบดไข่ของเรือดในสารละลายบัฟเฟอร์ แล้วฉีดเข้าบริเวณอกของยุงลายบ้านตัวเต็มวัย อายุ 3 วัน ที่บริเวณระหว่าง Posterior pronotum และ Sternopleuron เพื่อดัดแปลงพันธุกรรม ผลการทดลองของงานวิจัยนี้สามารถนำมาประยุกต์เพื่อแทนที่ประชากรยุงที่เป็นพาหะของเชื้อก่อโรคและลดความเป็นพาหะรวมถึงลดการแพร่กระจายเชื้อก่อโรคได้

ข้อเสนอแนะและงานศึกษาวิจัยต่อในอนาคต

การประเมินสมรรถนะของยุงลายบ้านติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ถือเป็นสิ่งจำเป็นพื้นฐานที่ต้องศึกษา หลังจากการทดลองศึกษาความสามารถในการติดเชื้อและการถ่ายทอดเชื้อในโฮสต์ใหม่ [43] ดังเช่น *Wolbachia* สายพันธุ์ F จากเรือดเขตร้อนนี้ เพื่อสร้างความเชื่อมั่นในการนำเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ในอนาคต งานวิจัยนี้ได้ทดลองความสามารถของการติดเชื้อโดยสามารถสาธิตให้เห็นตำแหน่งที่ติดเชื้อในเนื้อเยื่อระบบสืบพันธุ์ของยุงลายบ้านที่ติดเชื้อทั้งเพศเมียและเพศผู้ รวมถึงได้ทดสอบและประเมินพารามิเตอร์ที่จำเป็นต่อความสามารถในการส่งถ่ายเชื้อแบคทีเรียผ่านไปสู่รุ่นลูกหลานอย่างมีประสิทธิภาพ อันได้แก่ 1. การวัดประเมินขนาดของร่างกายโดยวัดความยาวเส้นปีก 2. การนับปริมาณเชื้ออสุจิของยุงลายบ้านเพศผู้เพียงอย่างเดียว ซึ่งได้ผลที่ไม่แตกต่างกันระหว่างยุงติดเชื้อกับยุงไม่ติดเชื้ออาจเป็นเพราะอสุจิถูกสร้างแทนที่ได้อย่างรวดเร็ว แต่แบคทีเรีย *Wolbachia* อาจมีผลต่อปริมาณการสร้างซีสต์ได้ในปริมาณแตกต่างกัน หรือขนาดของซีสต์อาจแตกต่างกันได้ ฉะนั้นในอนาคตอาจจำเป็นต้องศึกษาการสร้างซิสต์ในอัณฑะของยุงเพิ่มเติมเพื่อศึกษาว่ายุงที่ติดเชื้ออาจมีการสร้างจำนวนซีสต์มากกว่าปกติ เพราะซีสต์เป็นอวัยวะที่สร้างอสุจิขึ้นใหม่และทดแทนจำนวนที่ใช้ไปในระหว่างการเข้าคู่ผสมในแต่ละครั้งได้ตลอดเวลาและรวดเร็ว จึงน่าจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการส่งถ่ายเชื้อ *Wolbachia* ในอัตราสูงๆหรืออาจเกิด CI ได้อย่างสมบูรณ์ และ 3. การศึกษาอัตราการฟักไข่ของยุงที่ติดเชื้อแบคทีเรียเทียบกับยุงที่ไม่ติดเชื้อ แต่พารามิเตอร์ในการประเมินสมรรถนะของยุงดังกล่าวเป็นเพียงแค่บางส่วนของพารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับสมรรถนะด้านการสืบพันธุ์เท่านั้น ฉะนั้น จึงควรศึกษาประเมินพารามิเตอร์ที่เกี่ยวกับการรอดชีวิตของยุงที่ติดเชื้อด้วยจึงจะถือว่าศึกษาพารามิเตอร์ทั้งหมด [46] และในการฟักไข่ของยุงลายบ้าน ควรนำแผ่นไข่มาฟักใหม่ในน้ำหลายๆครั้งเพื่อเป็นการกระตุ้นการฟักและจะทำให้ได้อัตราการฟักเพิ่มสูงขึ้น แต่ผลการทดลองดังกล่าวก็มีความน่าเชื่อถือได้ว่า เชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* สายพันธุ์ F จากเรือดนั้นไม่สร้างผลกระทบด้านลบต่อ

ยุงลายบ้านเพศเมียแต่อย่างใด *Wolbachia* เป็นเพียงแค่แบคทีเรียที่จำเป็นต้องอาศัยในเซลล์โฮสต์เท่านั้น ซึ่ง อาจมีผลกระทบเชิงบวกต่อโฮสต์ได้เช่นกัน จากคุณสมบัติทั้งหมดดังกล่าวแสดงว่าเชื้อแบคทีเรียนี้มีประสิทธิภาพต่อการนำไปประยุกต์เป็นเวคเตอร์นำยีนต้านโรคที่มียุงลายเป็นพาหะได้ เพื่อแทนที่ประชากรยุงที่ติดเชื้อก่อโรคในธรรมชาติได้ [11] [60] [61]

แต่ทั้งนี้และทั้งนั้นจากการศึกษาในห้องทดลองพบว่าอัตราการถ่ายทอดเชื้อแบคทีเรียไม่คงที่ ฉะนั้นควรศึกษาปริมาณสารละลายเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นที่เหมาะสมสำหรับฉีดยุงลายเพื่อให้มีอัตราการถ่ายเชื้ออย่างคงที่และถาวรเพื่อให้ได้เวคเตอร์ที่สามารถนำพายีนต้านเชื้อก่อโรคไปสู่รุ่นลูกได้ในอัตราคงที่ตลอดไป นอกจากนี้ควรจะศึกษาความสามารถของการติดเชื้อและประเมินสมรรถนะของเชื้อแบคทีเรียหลายๆสายพันธุ์หรือควรศึกษาผลกระทบต่อกันระหว่างเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* สายพันธุ์ที่สนใจต่อถ่ายทอดเชื้อไวรัสโดยตรงด้วย ดังเช่น ไวรัสเดงกี เพราะเชื้อแบคทีเรียอาจมีปฏิกิริยาต่อจำนวนไวรัสได้โดยตรง เพื่อเป็นอีกแนวทางเลือกหนึ่งต่อการนำมาเป็นเวคเตอร์ที่ดีที่สุดต่อสิ่งแวดล้อมและประชากรมนุษย์บนโลก

เอกสารอ้างอิง

[1] กนกทิพย์ ทิพยรัตน์. (2549). รายงานเฝ้าระวังทางระบาดวิทยา ปี 2549.ใน สถานการณ์การระบาดของโรคไข้เลือดออกในศูนย์พักพิงชั่วคราวบ้านแม่หละ จังหวัดตาก. หน้า 9-10. นนทบุรี: สำนักระบาดวิทยา.

[2] ควบคุมโรค, กรม. (2546). รายงานการเฝ้าระวังทางระบาดวิทยา ปี 2545.ใน สถานการณ์การเกิดโรคที่สำคัญประจำสัปดาห์ที่ 52.หน้า 685-689.นนทบุรี : สำนักระบาดวิทยา,

[3] Adelman, Z. N., Jasinkiene, N. and James, A. A. (2002). Development and application of trangenesis in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. Permanent loss of male fecundity following sperm depletion in *Aedes aegypti* (L.). Molecular and Biochemical Parasitology.121:1-10.

[4] Atkinson, P. W. and Michel, K. (2002). What's buzzing? Mosquito genomics and transgenesis mosquitoes. Genetic. 32:42-48.

[5] Beard, C. B., Durvasula, R. V. and Richard, F. F. (1998). Bacterial symbiosis in arthropods and the control of disease transmission. Emerging Infectious Diseases. 4(4): 581-591.

[6] Beaty, B. J., and Marquart, W. C. 1996. Molecular systematics in vector biology. The Biology of Disease Vectors, pp.438-470. Colorado : University Press of Colorado.

[7] Braig, H. R., Guzman, H., Tresh, R.B., and O'Neil, S. L. (1994). Replacement of the natural *Wolbachia* symbiont of *Drosophila simulans* with mosquito counterpart. Nature. 367: 453-455.

[8] Catteruccia, F., Nolan, T., Loukeris, T.G., Blass, C., Savakis, C., KafTOS, f.C., and Crisanti, A. (2002). Stable germline transformation of the malaria mosquito *Anopheles stephensi*. Nature. 405: 959-962.

[9] Crampton, J.M., Stowell, S., Karras, M., Sinden, R. E. (1998). Towards livestock disease diagnosis and control in the 21st century: proceeding of an international symposium on diagnosis and control of livestock diseases using nuclear and related, techniques, Vienna, Australia. International atomic energy agency. 23: 231-243.

[10] Crespigny and Wedell, N. (2006). *Wolachia* infectioin reduces sperm competitive ability in an insect. Proc. R. Soc. B. 273: 1455-1458.

[11] Dobson, S. L. (2003). Reversing *Wolbachia*-bassed population replacement. Trend in parasitology. 19(3): 128-132.

[12] Dobson S L. (2004). Evolution of *Wolbachia* cytoplasmic incompatibility types. Evolution. 58(10): 2156-2166.

[13] Dobson, S. L. (2007). Current Protocols in Microbiology. Kentucky : Willy Inter Science,

[14] Dobson, S. L., Rattanadechakul, W., and Marsland, E. J. (2004). Fitness advantage and cytoplasmic incompatibility in *Wolbachia* single- and superinfected Aedes albopictus. Heredity. 93: 135–142.

[15] Eldrige, B.F. and Edman, J.D. 2000. Medical Entomology: A Textbook on Public Health and Problems Caused by Arthropods. vol 28. 2nd. Kluwer Academic Publishers,

[16] Ferree, P. M., Frydman, H. M., Li, J. M., Cao J., Wieschaus, E. and Sullivan, W. *Wolbachia* utilizes host microtubule and dynein for anterior localization in the *Drossophila* oocyte. Plos Pathog. 1(2) (2005): e14.

[17] Fry, A. J., Palmer, M. R., and Rand, D. M. (2004). Variable finess effects of *Wolbachia* infection in *Drosophila melanogaster*. Heredity. 93: 379-389.

[18] Goldie. 2009. The yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. BG-Sentinel Mosquito Trap **[online]. Available from** : www.bg-sentinel.com/en/aedes_aegypti.html [2009, January 11].

[19] Gould, F., And Schliekelmann, P. (2004). Population genetics of autocidal control and strain replacement. Annu Rev Entomol 49: 193-217.

[20] Harshmann, N., Stuckas, H., LuciusBleib, W., Theuring, F. and Kalinna, B. H. (2003). Trans-species transfer of *Wolbachia*: microinjectionn of *Wolbachia* from *litomosoides sigmodontis* into *Acanthocheilonema viteae*. Parasitology. 126: 503-511

[21] Heddi, A., Anne-Marie Grenier., Khatchadourian, C., Charles, H., and Nardon, P. (1999). Four intracellular genomes direct weevil biology: Nuclear, mitochondrial, principal endosymbiont, and *Wolbachia*. Proc Natl Acad Sci USA. 96: 6814-6819.

[22] Hoffmann, A. A.., Turelli, M., and Harshman, L. G. (1990). Factor affecting the distribution of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans*. Genetic. 126: 933-948.

[23] Homeland Defense Corp. 2007. Life cycle & Breeding of A Mosquito: Automated mosquito Misting Systems [Online]. Available from: http://www.homelanddefensecorp.com/facts2php[2007, December 18].

[24] Hurd, H., Talor, P. J., Adams, D., Underhill, A., and Eggleston, P. (2005). Evaluating the costs of mosquito

resistance to malaria parasites. Evolution Int J Evolution. 59(12):2560-2572.

[25] Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. Gene. 96: 23-28

[26] Jasinskiene, N., Coates, C.J., Benedict, M.Q., Cornel, A.J., Salazar Raferty, C., James A.A. and Collins, F.H. (1998) Stable transposon-mediated transformation of yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*, using the *Hermes* element from the house fly. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95: 3743-3747.

[27] Jones, J. C. (1967). Spermatocysts in *Aedes aegypti* (Linnaeus). Biol Bull. 132: 23-33.

[28] Kang L., Ma X., Cai L., Liao S., Sun L., Zhu H., Chen X., Shen D., Zhao S and Li C. (2003). Superinfection of *Laodelphax striatellus* with *Wolbachia* from *Drosophila simulans*. Heredity. 90: 71-76.

[29] Kent, J. and Norris, D. E. (2005). Identification of mammalian blood meals in mosquitoes by a multiplexed polymerase chain reaction targeting cytochrome B. Am J Trop Med Hyg. 73: 336-342.

[30] Lee, N., Nielsen, P. H., Andreasen, K. H., Juretschko, S., Nielsen, J. L., Schleifer, K. H., and Michael, W. (1999). Combonation of fluorescent in situ hybridization and microautoradiography- a new tool for structure-function analyses in microbial ecology. Appl Environ Microbiol. 65(3): 1289-1297.

[31] Marreli, M. T., Moreira, C. K., Kelly, D., Alphey, L. and Jacobs-lorena M. (2006). Mosquito transgenesis: What is the fitness cost?. Trends Parasitol. 22(5): 197-202.

[32] Monath, T. P. (1994). Dengue: The risk to developed and developing countries. Proc Natl Acad Sci. 91: 2395-2400.

[33] Morris, A. C., Eggleston, P. and Crampton, J. M. (1989). Genetic transformation of mosquitoes *Aedes aegypti* by micro-injection of DNA. MED Vet Ent. 3: 1-7.

[34] Mortimer, R., and Janeiro, R. D. 2007. *Aedes aegypti and Dengue fever* [online]. Available from: http://www.microcopy-uk.org.uk/mag/art98/aedrol.html[2007, October 12].

[35] Nathan, L., Casiraghi, M., Salati E., Bazzocchi, C., and Bandi, C. (2002). How many Wolbachia supergroups exist?. Molecular Biology and Evolution. 19(3): 3341-346.

[36] **NSW. (2009). Arbovirus Surveillance & Vector Monitoring Program.** *Toxorhynchites speciosus* **[online]. Available from:** http://www.arbovirus.health.nsw.gov.au/areas/arbovirus/mosquit/photos/mosquitophotos.htm#toxo [2009, January 11].

[37] O'Neill, S., Giordano, R., Colbert, A. M. E.., Karr, T. L., and Robertson, H. M. (1992). 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacteria endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insect. Proc Natl Acad Sci. 89: 2699-2702.

[38] Panaram, K. and Marshall JL. (2006). F supergroup Wolbachia in bush crickets: what do patterns of sequence variation reveal about this supergroup and horizontal transfer between nematodes and arthropods?. Springer. 130: 53-60.

[39] Poisonous Plants. 2009. Pyrethrum (Tanacetum (Chrysanthemum) cinerariifolium) **[online]. Available from:** www.btinternet.com/~micka.wffps/poisonous.html [2009, January 11].

[40] Ponlawat, A. and. Harrington, L. C. (2007). Age and body size influence male sperm capacity of dengue vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). J Med Entomol. 44(3): 422-426.

[41] Price, C. S. (1997). Conspecific sperm precedence in drosophila. Nature. 388: 663-666.

[42] Public Health Image Library. **2009. Yellow fever Mosquito** ***Aedes aegypti*** **(Linnaeus, 1762)[online]. Available from:** http://phil.cdc.gov/phil/home.asp[2009, January 11].

[43] Ruang-areerate, T., and Kittiyapong, P. (2006). Wolbachia transinfection in Aedes aegytpti: A potential gene driver of dengue vectors. Pnas. 103(33): 12534-12539.

[44] Rubin, G. M. and Spradling, A. C. (1982). Genetic Transformation of *Drosophila* with Transposable element vectors. Science. 218: 348-353.

[45] Sakamoto, J. M., Feinsteinj, J., and Rasgon, J. L. (2006). *Wolbachia* infections in the Cimicidae: Museum Specimens as Untrapped Resource for Endosymbiont Surveys. Appli. Environ. Microbil. 72(5): 3161-3167.

[46] Sakamoto, J. M. and Rasgon, J. L. (2006). Geographic distribution of *Wolbachia* infection in *Cimex*

lectularious (Heteroptera: Cimicidae). J Med Entomol. 43(4): 408-418.

[47] Scott, T. W., Naksathit, A., Day, J. F., Kittiyapong, P. and Edman, J. D. (1997). A fitness advantage for *Aedes aegypti* and the viruses it transmits when females feed only on human blood. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 57(2): 235-239.

[48] Sinkins, S .P.., Braig, H. R. and O'Neill, S. R. (1995). *Wolbachia pipientis*: Bacterial density and unidirectional cytoplasmic incompatibility between infected populations of *Aedes aibopictus*. Experimental Parasitology. 81: 284-291.

[49] Sinkins, S. P., Braig, H. R., and O'Neil S. R. (1995). *Wolbachia* superinfections and the expression of cytoplasmic incompatibility. Proc R Soc Lond B. 261: 325-330.

[50] Siriyasatein, P. 2007. An assessment of hepatitis B vaccine delivery by transgenic *Aedes aegypti* mosquitoes. Thesis submitted in accordance with the requirements of the University of Liverpool for the degree of Doctor in Philosophy.

[51] Siriyasatein, P. 2007. Morphology growth and development [online]. Availablefrom: http:/cai.md.chula.ac.th/lession/lession4905/html/04.html [2007, November 20].

[52] Tram, U. and Sullivan, W. (2002). Role of delayed nuclear envelope breakdown and mitosis in *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility. Science. 296: 1124-1126.

[53] Veneti, Z., Clark, M. E., Zabalou, S., Karr, T. L., Savakis, C., and Bourtzis, K. (2003). Cytoplasmic incompatibility and sperm cyst infection in different *Drosophila-Wolbachia* association. Genetic. 164: 545-552.

[54] Werren, J. H. (1997) Biology of *Wolbachia*. Annual Review of Entomology. 42: 587-609.

[55] Werren, J. H. and Windsor, D.M. (2000). *Wolbachia* infection frequencies in insects: evidenc of a global equilibrium? Proc R Lond B. 267: 1277-1285.

[56] Werren, J. H., Zhang and Gou, L. R. (1995). Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: reproductive parasite of arthropods. Proc R Soc Lond B. 261: 55-71.

[57] West, S. A., Cook, J. M., Werren, J. H. and Godfray, H. C. J. (1998). *Wolbachia* in two insect host-

parasitoid communities. Molecular ecology. 7: 1457-1465.

[58] Who. 2008. Chapter 5 vector surveillance and control [online]. Available from: http://www.who.int/csr/resources/publications/dengue/048-59.pdf[2008, May 1]

[59] Woolfit, M., Iturbe-Ormaetxe, I., McGraw, E. A., and O'Neill, S. L. (2009). An Ancient Horizontal Gene Transfer between Mosquito and the Endosymbiotic Bacterium

Wolbachia pipientis. Molecular Biology and Evolution. 26(2):367-374.

[60] Xi, Z., Dean, J. L., Khoo, C. C. H., and Dobson, S. L. (2005). Generation of a novel *Wolbachia* infection in *Aedes albopictus* (Asian tiger mosquito) via embryonic microinjetion. Insect Biochem Mol Biol. 35(8): 903-910.

[61] Xi, Z. and Dobson, S. L. (2005). Characterization of *Wolbachia* transfection efficiency by using microinjection of embryonic cytoplasm and embyo homogenate. Applied and environmental microbiology. 71(6): 3199-3204.

[62] Zabalou, S., Riegler, M., Theodorakopoulou, M., Stuffer, C., Savalus, C. and Bourtzis, K. (2004). *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility as a means for insect pest population control. Pnas. 101(42): 15042-15045.

[63] Zhou, W., Rousset, F. and O'Neill. (1998). Phylogeny and PCR-bassed classification of *Wolbachia* strain using wsp gene sequence. Proc R Lond B. 265: 509-515.