Thai J. Genet. 2013, S(1): 378-382

การพัฒนาเครื่องหมาย allele-specific PCR เพื่อจำแนกชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มซับซ้อน *Anopheles dirus*

Development of Allele-specific PCR for Species Identification of the *Anopheles dirus* complex

อุมารินทร์ บุญเกื้อ และ อุไรวรรณ อรัญวาสน์*

Umarin Boonkue and Uraiwan Arunyawat*

ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพ 10900

Department of Genetics, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900

**Corresponding author: uraiwan.a@ku.ac.th*

บทคัดย่อ

ยุงก้นปล่องชนิดซับซ้อนกลุ่ม *Anopheles dirus* เป็นพาหะนำโรคมาลาเรียหลักที่พบการกระจายตัวในประเทศไทยและภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยยุงกลุ่มชนิดซับซ้อนดังกล่าวจะมีลักษณะสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกันมาก ทำให้เกิดความผิดพลาดในการจำแนกชนิด ซึ่งมีผลต่อการควบคุมการแพร่กระจายของยุงพาหะที่เหมาะสม การวิจัยนี้จึงได้มีการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอด้วยวิธี allele-specific PCR เพื่อจำแนกชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มซับซ้อน Dirus จำนวน 3 ชนิด ที่พบในประเทศไทย โดยออกแบบไพรเมอร์จำเพาะจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน cytochrome oxidase subunit I ในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ ผลการทดสอบพบว่าไพรเมอร์จำเพาะดังกล่าว สามารถจำแนกชนิดยุงก้นปล่องชนิด *Anopheles cracens An. scanloni* และ *An. nemophilous* ด้วยความแตกต่างของชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 236 338 และ 527 คู่เบส ตามลำดับ ซึ่งผลการวิจัยในเบื้องต้นแสดงให้เห็นว่าเครื่องหมาย allele-specific PCR สามารถจำแนกชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มซับซ้อน Dirus ได้แม่นยำและมีประสิทธิภาพ

ABSTRACT

Anopheles dirus complex is widely distributed as primary malaria vectors in Thailand and Southeast Asia region. Morphological identification is very problematic for the Dirus complex species because of their similar morphologies among the sibling species, which usually lead to species misidentification. In this research, allele-specific PCR was developed to identify the three species within *Anopheles dirus* complex group in Thailand. The allele-specific primers were designed based on the nucleotide polymorphisms in mitochondrial *cytochrome oxidase subunit I* sequences. The results showed that these primers clearly amplified *Anopheles cracens, An. scanloni* and *An. nemophilous* for different PCR products size of 236, 338 and 527 base pair, respectively. This preliminary result suggested that the allele-specific PCR could be correctly and effectively identified member of the Dirus species complex.

คำสำคัญ: เครื่องหมายดีเอ็นเอ, การจำแนกชนิด, พาหะนำโรคมาลาเรีย, ยุงก้นปล่องกลุ่มซับซ้อนไดรัส

Keywords: DNA marker, species identification, malaria vector, *Anopheles dirus* complex

บทนำ

ยุงก้นปล่อง *Anopheles dirus* complex เป็นพาหะหลักนำโรคมาลาเรียที่สำคัญในประเทศไทยและหลายประเทศในเขตร้อน จากรายงานในประเทศไทยพบยุงก้นปล่องกลุ่มซับซ้อน Dirus ประมาณ 5 ชนิด โดยพบว่าความสามารถในการเป็นพาหะนำโรคมาลาเรียของยุงแต่ละชนิดภายในกลุ่มซับซ้อน มีความแตกต่างกัน เช่น ยุงก้นปล่องกลุ่ม Dirus ชนิด *Anopheles dirus* และ *An. scanloni* มีบทบาทสำคัญในการเป็นพาหะนำเชื้อ *Plasmodium* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคมาลาเรีย ส่วนยุงชนิดอื่นในกลุ่มดังกล่าว เช่น *An. cracens* และ *An. nemophilous* ไม่ได้เป็นพาหะนำเชื้อมาลาเรีย ซึ่งปัญหาสำคัญในการควบคุมการแพร่กระจายของยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อนซึ่งเป็นพาหะนำโรคมาลาเรีย คือการที่ไม่สามารถจำแนกได้ชัดเจนโดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาได้ เนื่องจากยุงในกลุ่มซับซ้อนแต่ละชนิดมีลักษณะภายนอกที่คล้ายคลึงกันมาก (sibling species) จึงพบความผิดพลาดสูงมากในการจำแนกชนิดโดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยา ทั้งนี้การจำแนกชนิดยุงพาหะที่ไม่ถูกต้องมีผลกระทบอย่างมากต่อการควบคุมการแพร่กระจายของพาหะดังกล่าว เนื่องจากความสามารถในการเป็นพาหะนำโรคของยุงแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันคือ ยุงบางชนิดเป็นพาหะนำโรคสำคัญ แต่บางชนิดในกลุ่มซับซ้อนเดียวกันไม่ได้เป็นพาหะนำโรค ดังนั้นการจำแนกชนิดยุงผิดจะทำให้ใช้วิธีการในการควบคุมจัดการที่ไม่ถูกต้องและไม่ได้ประสิทธิภาพ ดังนั้นเพื่อแก้ปัญหาดังกล่าวจำเป็นต้องใช้เครื่องหมายโมเลกุลในระดับ DNA ในการจำแนกชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน ซึ่งเป็นวิธีการที่เหมาะสมที่สุดทั้งด้านความแม่นยำ ความสะดวกและถูกต้องในการจำแนกชนิดของยุงที่ไม่สามารถแยกได้โดยใช้ความแตกต่างทางสัณฐานวิทยา ถึงแม้ว่าจะมีการพัฒนาเทคนิคเครื่องหมายดีเอ็นเอในการจำแนกยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus มาบ้างแล้ว (Walton *et al*., 1999) แต่พบว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอดังกล่าว ยังมีปัญหาในด้านประสิทธิภาพและความไม่เสถียรในการจำแนกชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มชนิดซับซ้อน Dirus ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้จึงต้องการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Allele specific PCR (AS-PCR) เพื่อให้ได้ไพรเมอร์ในการจำแนกชนิดของยุงก้นปล่องกลุ่มซับซ้อน Dirus จำนวน 3 ชนิด ได้แม่นยำและมีประสิทธิภาพมากขึ้น เพื่อประโยชน์ในการวางแผนควบคุมการแพร่กระจายของโรคมาลาเรียต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างยุงก้นปล่อง

ยุงก้นปล่องเพศเมียชนิดซับซ้อนกลุ่ม Dirus จำนวน 3 ชนิดได้แก่ *An. scanloni* *An. cracens* และ *An. nemophilous* จากพื้นที่กระจายตัว 3 แหล่ง ได้แก่ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล และอำเภอละอุ่น จังหวัดระนอง ในช่วงเดือนสิงหาคม 2555 ถึง มกราคม 2556 โดยจำแนกตัวอย่างยุงจำตามลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของ Rattanarithikul *et al*. (2006)

2. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี PCR และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างยุงก้นปล่องเพศเมียทั้ง 3 ชนิด โดยชุดสกัด Genomic DNA Minikit (Geneaid) และออกแบบคู่ไพรเมอร์ (COIF 5'CAACACTTATTCTGATTTTT3' และ COIR 5'AAAAAGTATAAAATAGCAAAT3') สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากบริเวณยีน *COI* ของไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ โดยส่วน ประกอบและขั้นตอนของปฏิกิริยา PCR ดัดแปลงมาจาก Dousfour *et al*. (2007) จากนั้นนำชิ้นส่วนยีนดังกล่าวไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์

3. การออกแบบ allele specific primer ที่จำเพาะต่อยีน *COI*

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI* ของไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ ความยาว 717 คู่เบส จากการส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์และบางส่วนจากฐานข้อมูล รวมทั้งหมด 119 ตัวอย่าง จากยุงก้นปล่องที่ศึกษาทั้ง 3 ชนิด มาทำ alignment ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ จากนั้นออกแบบ allele specific primer จากลำดับนิวคลีไทด์ของยีน *COI* โดยให้ตำแหน่ง polymorphic site ที่มีความจำเพาะในแต่ละชนิดอยู่ทางด้านปลาย 3' ของ reverse primer และกำหนดให้นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่สองถัดจากปลายดังกล่าวเป็นตำแหน่งที่เป็น mismatch เพื่อเพิ่มความจำเพาะต่อยุงแต่ละชนิดมากขึ้น ส่วนของ forward primer เลือกบริเวณที่อนุรักษ์สำหรับยุงทั้ง 3 ชนิดที่ศึกษา

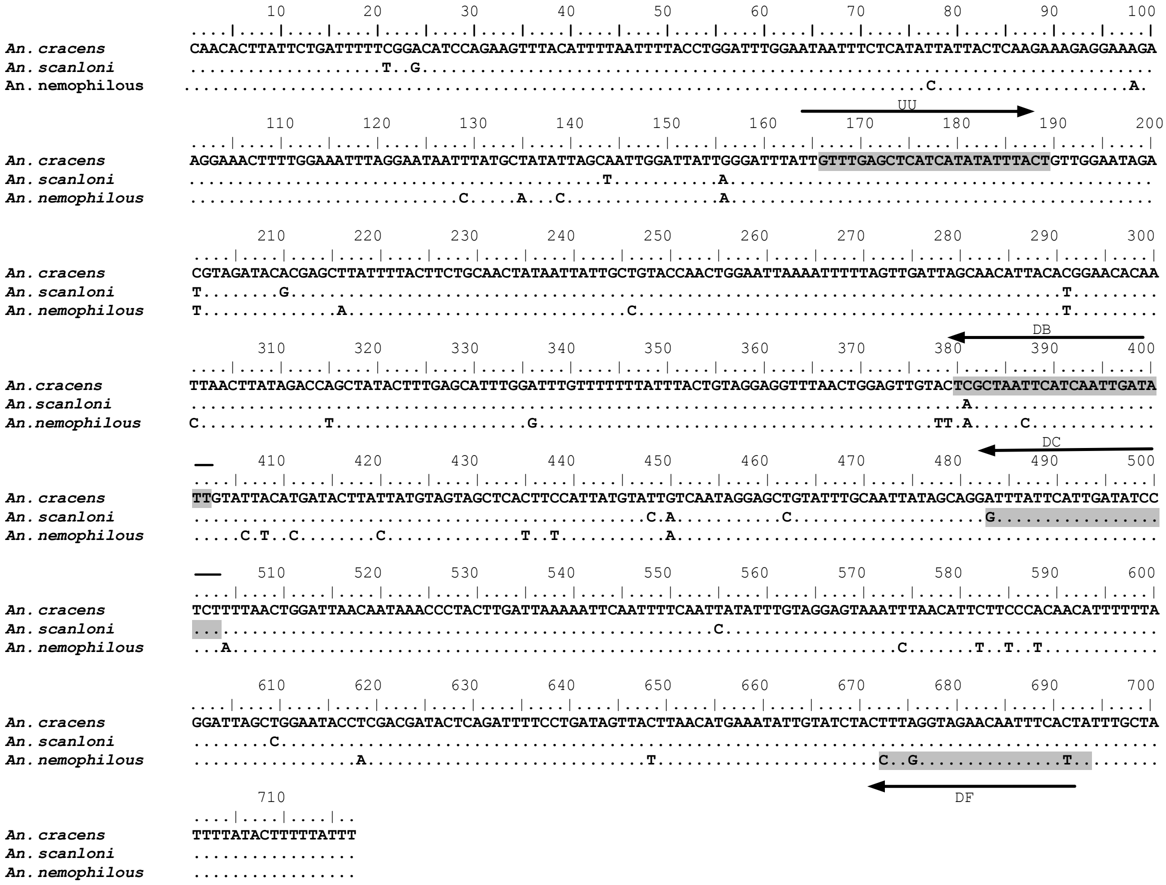
4. **การจำแนกยุงก้นปล่องชนิดซับซ้อน Dirus โดยวิธี Multiplex PCR**

ใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบมาทดสอบการจำแนกชนิดของยุงก้นปล่องชนิดซับซ้อนกลุ่ม Dirus ด้วยเทคนิค Multiplex PCR ประกอบด้วย genomic DNA 20-30 ng, 1X PCR reaction buffer, 0.5 mM dNTPs, 1.25 mM $MgCl_2$, 0.3 uM ของแต่ละไพรเมอร์, *Taq* DNA polymerase (Vivantis) 1 unit ขั้นตอนปฏิกิริยา PCR เริ่มจาก pre-denaturation ที่ 94 °C เป็นเวลา 5 นาที ตามด้วย 3 ขั้นตอน คือ denaturation ที่ 94 °C เป็นเวลา 30 วินาที annealing ที่ 48 °C เป็นเวลา 30 วินาที และ extension ที่ 72 °C เป็นเวลา 30 วินาที โดยทำซ้ำทั้ง 3 ขั้นตอน 35 รอบ และสิ้นสุดด้วย final extension ที่ 72 °C 10 นาที จากนั้นตรวจสอบการแยกขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis โดยใช้ความเข้มข้นอะกาโรส 1.5%

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. **การออกแบบไพรเมอร์**

ออกแบบ allele-specific primer คือ UU, DB, DC และ DF สำหรับจำแนกชนิดยุงก้นปล่องชนิดซับซ้อนกลุ่ม Dirus จำนวน 3 ชนิด โดยไพรเมอร์ UU เป็น forward universal primer และ DB, DC และ DF เป็น reverse specific primer สำหรับยุงก้นปล่องชนิดซับซ้อนกลุ่ม Dirus ชนิด *An. scanloni An. cracens* และ *An. nemophilous* (รูปที่ 1) โดยชิ้นส่วน allele specific PCR มีขนาด 236 338 และ 527 คู่เบส ตามลำดับ และข้อมูลของไพรเมอร์ดังกล่าวแสดงในตารางที่ 1



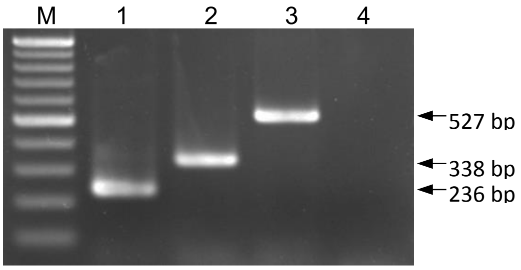
รูปที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีน *COI* ของยุงก้นปล่อง *An. cracens An. scanloni* และ *An. nemophilous* และตำแหน่งของฟอร์เวิรสไพรเมอร์ (UU) และรีเวิรสไพรเมอร์ (DB, DC, DF)

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการจำแนกชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มซับซ้อน Dirus จำนวน 3 ชนิด

ไพรเมอร์	ชนิดยุงก้นปล่อง	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5´- 3´)	อุณหภูมิ Tm(°C)	ขนาด (คู่เบส)
UU	-	GTTTGAGCTCATCATATATTTACT	50.76	
DB	*An. cracens*	AATATCAATTGATGAATTAGAGA	48.90	236
DC	*An. scanloni*	AGAGGATATCAATGAATAAAC	50.70	338
DF	*An. nemophilous*	TAATGAAATTGTTCTACCCAAG	52.29	527

2. **การทดสอบผลการจำแนกชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มซับซ้อน** Dirus

เมื่อนำตัวอย่างยุงก้นปล่องทั้ง 3 ชนิด มาทดสอบวิธีการจำแนกชนิด ด้วยวิธี multiplex PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าสามารถจำแนกความแตกต่างของยุงก้นปล่องชนิดซับซ้อนกลุ่ม Dirus ที่ศึกษาได้อย่างชัดเจน โดยพบแถบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะกับยุงก้นปล่องชนิด *An. cracens* มีขนาด 236 คู่เบส สำหรับ *An. scanloni* และ *An. nemophilous* มีขนาด 338 และ 527 คู่เบสตามลำดับ (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 ผล multiplex PCR ในการจำแนกยุงก้นปล่องชนิดซับซ้อนกลุ่ม Dirus: ช่อง M คือ 100 bp DNA Ladder, ช่อง 1 คือ *An. cracens*, ช่อง 2 คือ *An. scanloni*, ช่อง 3 คือ *An. nemophilous* และช่อง 4 คือ negative control

สรุปผลการทดลอง

ผลการวิจัยเบื้องต้นของการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อจำแนกชนิดยุงก้นปล่องทั้ง 3 ชนิด โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะที่ออกแบบจากส่วนของยีน *COI* ที่ทำการศึกษาครั้งนี้ พบว่าสามารถจำแนกชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มซับซ้อน Dirus ชนิด *An. cracens An. scanloni* และ *An. nemophilous* ตามขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้อย่างจำเพาะและชัดเจน ซึ่งในขั้นตอนต่อไปผู้วิจัยจะเพิ่มจำนวนและแหล่งกระจายตัวของยุงกลุ่มที่ศึกษามาทดสอบการจำแนกชนิด เพื่อตรวจสอบและยืนยันความเสถียรและประสิทธิภาพของ allele specific primer ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ศ.ดร.ธีรภาพ เจริญวิริยะภาพ ศ.ดร.เวช ชูโชติ และอาจารย์วิรัช วงศ์หิรัญรัชต์ สำหรับตัวอย่างยุง และทุนสนับสนุนการวิจัยจากสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารอ้างอิง

Dusfour I, Blondeau J, Harbach R, Vythilingham I, Baimai V, Trung H, Sochanta T, Bangs M,Manguin S. Polymerase Chain Reaction Identification of Three Members of the Anopheles sundaicusThe Anopheles sundaicus (Diptera: Culicidae) Complex, Malaria Vectors in Southeast Asia . Jounal of Medical Entomology. 2007;44(5):723-731.

Rattanarithikul R, Panthusiri P,Harrison BA, Harbach RE, Coleman RE. Illustrated keys to the mosquitoes of Thailand IV.*Anopheles*. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Puplic Health. 2006;37(suppl.2):1-128.

Walton C, Handley J, Kuvangkadilok C, Collins FH, Harbach RE, Baimai V, Bullin R. Identificationof five species of the *Anopheles dirus* complex from Thailand, of the allele specific polymerase chain reaction. Medical and Veterinary Entomology. 1999;13:24-32.