การส่งถ่ายเชื้อแบคทีเรีย WOLBACHIA จากเรือด (CIMEX HEMIPTERUS) เข้าสู่ยุงลายบ้าน (AEDES AEGYPTI) ด้วยวิธี MICROINJECTION

เรือเอก เศรษฐพงศ์ ธิมาหาร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2550
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

TRANSINFECTION OF BED BUG (CIMEX HEMIPTERUS) WOLBACHIA INTO DENGUE VECTOR MOSQUITO (AEDES AEGYPTI) BY MICROINJECTION

Lt. Srettapong Thimaharn

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Medical Science

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2007

Copyright of Chulalongkorn University

500874

Thesis Title	TRANSINFECTION OF BED BUG (CIMEX HEMIPTERUS) WOLBACHIA INTO DENGUE VECTOR MOSQUITO (AEDES AEGYPTI) BY MICROINJECTION
By	Lt. Srettapong Thimaharn
Field of Study	Medical Science
Thesis Principal Advisor	Associate Professor Padet Siriyasatien, M.D., Ph.D.

Accepted by the Faculty of Medicine, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

.....Dean of the Faculty of Medicine

(Associate Professor Adisorn Patradul, M.D.)

THESIS COMMITTEE

.....Chairperson

(Associate Professor Vilai Chentanez, M.D.)

.....Thesis Principal Advisor

(Associate Professor Padet Siriyasatien, M.D., Ph.D.)

.....External Member

(Usavadee Thavara, Ph.D.)

.....Member

(Tanittha Chatsuwan, Ph.D.)

เศรษฐพงศ์ ธิมาหาร: การส่งถ่ายเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* จากเรือด (*Cimex hemipterus*) เข้าสู่ยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) ด้วยวิธี Microinjection. (TRANSINFECTION OF BED BUG (*CIMEX HEMIPTERUS*) *WOLBACHIA* INTO DENGUE VECTOR MOSQUITO (*AEDES AEGYPTI*) BY MICROINJECTION) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. นพ. ดร. เผด็จ สิริยะเสถียร, 79 หน้า.

แบคทีเรีย *Wolbachia* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ในกลุ่ม α-proteobacterium ที่จำเป็นต้องอาศัยอยู่ภายในเซลล์ และถ่ายทอดลักษณะผ่านทางแม่เท่านั้น สามารถพบการติดเชื้อชนิดนี้ในสัตว์ขาปล้องและหนอนพยาธิตัวกลมกลุ่มฟิลาเรีย แบคทีเรีย *Wolbachia* สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดความผิดปกติด้านการสืบพันธุ์ได้หลากหลายรูปแบบในสิ่งมีชีวิตที่เป็นโฮสต์ที่มันอาศัยอยู่ รวมถึงการเหนี่ยวนำให้เกิดปรากฏการณ์การไม่เข้ากันของไซโตพลาสซึม การศึกษาครั้งนี้ เป็นการรายงานครั้งแรกของการส่งถ่ายการติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ข้ามสายพันธุ์ โดยใช้แบคทีเรีย *Wolbachia* F-supergroup จากเรือด (*Cimex hemiterus*) ที่พบการติดเชื้อตามธรรมชาติ เข้าสู่ยุงลายบ้าน *Aedes aegypti*. พบประสิทธิภาพการส่งถ่ายการติดเชื้อสูงสุดในรุ่นที่ 1 (G_1) (55.55%, n= 45) ในขณะที่เขียนงานวิจัยนี้ ความสามารถในการส่งถ่ายการติดเชื้อในรุ่นที่ 10 (G_{10}) ยังคงพบการส่งถ่ายการติดเชื้อ จากการสังเกตปรากฏการณ์การเกิดปรากฏการณ์การไม่เข้ากันของไซโตพลาสซึม ในรุ่นที่ 2 (G_2) และ 4 (G_4) พบว่าสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดปรากฏการณ์การไม่เข้ากันของไซโตพลาสซึมในโฮสต์ใหม่อย่างไม่สมบูรณ์ได้ จากความสำเร็จในการสร้างและส่งถ่ายการติดเชื้อข้ามสายพันธุ์นี้ สามารถนำไปใช้เป็นเครื่องมือในการควบคุมจำนวนประชากรและใช้เป็นกลยุทธ์ในการเคลื่อนย้ายหรือเปลี่ยนแปลงลักษณะยีนเพื่อเป็นการควบคุมลักษณะทางพันธุกรรมของประชากรยุงพาหะต่อไป

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ ลายมือชื่อนิสิต.....

ปีการศึกษา 2550 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

497 47845 30: MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEY WORD: CYTOPLASMIC INCOMPATIBILITY / *AEDES AEGYPTI* / *CIMEX HEMITERUS* / *WOLBACHIA* /

SRETTAPONG THIMAHARN: TRANSINFECTION OF BED BUG (*CIMEX HEMIPTERUS*) *WOLBACHIA* INTO DENGUE VECTOR MOSQUITO (*AEDES AEGYPTI*) BY MICROINJECTION. THESIS PRINCIPAL ADVISOR: ASSOC. PROF. PADET SIRIYASATIEN, M.D., Ph.D. 79 pp.

Wolbachia symbionts are gram negative obligated intracellular α-proteobacterium that infect diverse of arthropod species and some filarial nematodes. They are capable to induce a variety of reproductive abnormalities in their hosts including cytoplasmic incompatibility (CI). This is the first report of *Wolbachia* transinfection across the insect Order. *Wolbachia* F-supergroup from naturally infected bed bug (*Cimex hemipterus*) was microinjected into *Aedes aegypti* mosquito. The maximum transmission efficiency of *Wolbachia* was found in the first generation (G_1) (55.55%, n= 45). At the time of this report, transinfected lines of total 10 generations post-injection are stably infected. Incomplete CI expression was found in G_2 and G_4 of transinfected mosquitoes. It is conclude that transinfection of *Wolbachia* from *Cimex hemipterus* into *Aedes aegypti* could be used as a novel tool for gene-driving system in genetically manipulated mosquitoes by suppression or replacement of vector populations.

Field of study Medical Science Student's signature .....

Academic year 2007 Principal Advisor's signature.....Padet Siriyasatien

ACKNOWLEDGMENTS

I would like to express my sincere gratitude and deep appreciation to Associate Professor Dr. Padet Siriyasatien, M.D. my advisor for his guidance, invaluable advice, understanding and encouragement throughout this work, which enable me to fulfill my study.

I would like to thanks Dr. Usavadee Thavara and Dr. Apiwat Tawatsin, Department of Medical Sciences, National Institute of Health, Nonthaburi, Thailand, for providing beg bug.

I would also like to thanks to all staff from Associate Professor Doctor Padej Siriyasatien's laboratory, Assistant Professor Wanla Kulwichit's laboratory, Chula Medical Research Center (Chula MRC), Department of Parasitology and Experimental animals unit, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand, for their helpful, kindness and thanks to the Somdejprapinkloa Hospital for the provides run study times.

Finally, great thanks to my family, especially my brother for their affection, kindness and giving precedence in my study.

CONTENTS

Page

ABSTRACT (THAI).....iv
ABSTRACT (ENGLISH).....v
ACKNOWLEDGMENTS.....vi
CONTENTS.....vii
LIST OF TABLES.....ix
LIST OF FIGURES.....x
LIST OF ABBREVIATIONS.....xii

CHAPTER

I INTRODUCTION

- Background and Rationale.....1
- Research Questions.....6
- Objectives.....7
- Hypothesis.....7
- Conceptual Framework.....8
- Key Words.....9
- Operational Definitions.....9
- Obstacles.....9
- Expect Benefits and Application.....9

II REVIEW OF RELATED LITERATURES

- *Ae. aegypti* mosquitoes.....11
- *Wolbachia* spp.....16
- Bed bugs (*Cimex hemipterus*).....18
- *Wolbachia* transformation (transinfection).....18

CHAPTER Page

III MATERIALS AND METHODS

- Bed bugs and Mosquitoes....21
- Materials....21
- Chemicals (Appendix)....22
- Methods....23

IV RESULTS

- *Wolbachia* DNA extraction....42
- Establishment of *Wolbachia* infected *Ae. aegypti*....44
- Establishment of Isofemale lines....44
- Demonstration of the *Wolbachia* establishment 46
- *Ae. aegypti* DNA....53
- CI Expression in Transinfected *Ae. aegypti*.... 56
- The *Wolbachia* Density of Transinfected *Ae. aegypti*....57

V DISCUSSION AND CONCLUSION

- Bed bug (*C. hemipterus*) *Wolbachia*....63
- *Wolbachia* transinfected....63
- DNA sequencing....64
- CI expression....65
- Future prospect....65

REFERENCES....67

APPENDICES....72

BIOGRAPHY....79

LIST OF TABLES

Table Page

3.1 Normal PCR reaction mixture consists.....30

3.2 Ligation reaction of insert DNA into pGEM®-T Easy vector.....32

3.3 The LightCycler® Instrument program for analyzed *Wolbachia* copy number 37

3.4 The Real-time PCR reaction.....38

3.5 The LightCycler® Instrument program for *Ae. aegypti* copy number of hosts cell.....40

4.1 Transmission efficiency of transinfected *Ae. aegypti* mosquitoes.....45

4.2 *Wolbachia* bacteria induced cytoplasmic incompatibility of the transinfected *Ae. aegypti* mosquitoes.....56, 57

4.3 The *Wolbachia* density of the host cell in each generation.....61

LIST OF FIGURES

Figure Page

2.1 Life-cycle of *Ae. aegypti* Mosquito.....11

2.2 Sexual dimorphism in the morphology of antennae. Adult male has dense hairs antennae, whereas adult female has sparse hairs.....15

2.3 Unidirectional CI.....17

2.4 Bidirectional CI.....17

3.1 Instrument for Microinjection.....24

3.2 Region between the posterior pronotum and the sternopleuron of the mosquito were microinjected directly through a glass needle using a microinjector.....24

3.3 Transinfected female mosquito was reared individually in a clear plastic drinking cup with a piece of the moisture cotton wool and white paper 25

3.4 Eggs on the white paper were removed from the clear plastic drinking cup and allow air dried at room temperature and then were stored in a sealed plastic container.....26

3.5 The DNA ligation (Modified from Promega. 2007). The vector is 3015 bp and carries the f1 origins of replication, the *amp* and *lacZ* markers and the SP6 and T7 promoter sequences.....33

4.1 Agarose gel electrophoresis of PCR amplifications from *Wolbachia* infected *C. hemipterus*.....42

4.2 Nucleotide bases of *Wolbachia* endosymbiont of *C. hemipterus* 43

4.3 Nucleotides sequences of the 16S rDNA gene from bed bug (*C. hemipterus*) used in this experiment compared with nucleotides sequences of the 16S rDNA gene from bed bug (*C. hemipterus*) reported in GenBank.....44

4.4 Graph demonstrates transmission efficiency of transinfected *Ae. aegypti*.....46

4.5 Colony screening from LB plate using ampicillin plus X-Gal and IPTG. The white colonies were selected for purified and sequenced.....47

4.6 PCR of 16S rDNA of *Wolbachia* DNA from cloned plasmids inserted with the 16S rDNA gene amplified from transinfected mosquitoes 48

4.7 Sequences of the 16S rDNA of *Wolbachia* infected mosquitoes.....49, 50

4.8 Comparison of the nucleotide bases from each generation with the nucleotide bases from transinfected 51

4.9 Comparison of the amino acid from each generation with the amino acid from *C. hemipterus* and bed bug from initially microinjection 52

4.10 PCR of the Def-A gene of *Ae. aegypti* mosquito, the expected PCR products were approximately 302 bp 53

4.11 Nucleotide bases of the Def A gene of *Ae. aegypti* mosquito used in this study.....54, 55

4.12 Nucleotide bases of the Def A of *Ae. aegypti* used in this study compared with the Def A of *Ae. aegypti* reported in the GenBank.....55

4.13 Standard curve of *Wolbachia* density.....58

4.14 Standard curve of *Aedes aegypti* density.....60

4.15 Correlation of the *Wolbachia* copy number in each generation.....62

LIST OF ABBREVIATIONS

min	=	minute
sec	=	second
hr	=	hour
ml	=	milliliter
ul	=	microliter
ng	=	nanogram
mM	=	milli mole
fg	=	femtogram
%	=	percent
rpm	=	revolution per minute
bp	=	base pair
wt	=	weight
vol	=	volume
ϕ	=	diameter
no.	=	number
et al.	=	*et alii*