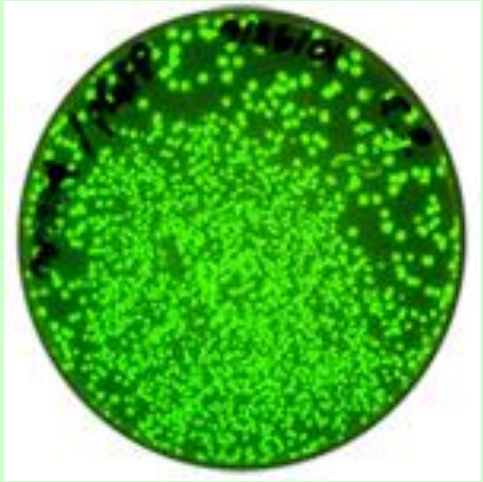
ยุง GM

ยุงดัดแปลงพันธุกรรม (Genetically Modified Mosquito)

รศ. นพ. เผด็จ สิริยะเสถียร
ภาควิชาปรสิตวิทยา
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ยุงดัดแปลงพันธุกรรม (Genetically Modified Mosquito) คืออะไร

สิ่งมีชีวิตดัดแปลงพันธุกรรม (Genetically Modified Organism; GMO)
สิ่งมีชีวิตซึ่งมีส่วนของสารพันธุกรรมถูกเปลี่ยนแปลงโดยใช้เทคนิคพันธุวิศวกรรม
(An Organism whose genetic material has been altered using genetic engineering techniques)



http://summercamps.dnalc.org/info/green.html

http://nutritionwonderland.com/2008/11/purple_tomatoes/

http://glassbox-design.com/2010/geneticall-modified-glofish-neon/

Handlrer and James, 2000

แนวคิดการทำยุงดัดแปลงพันธุกรรม

ปัญหาของการควบคุมโรคที่นำโดยแมลง

- เชื้อดื้อยาที่ใช้รักษา เช่น เชื้อมาลาเรีย
- ยังไม่มีวัคซีนที่มีประสิทธิภาพดีพอ
- ยุงดื้อต่อสารเคมีที่ใช้ควบคุม

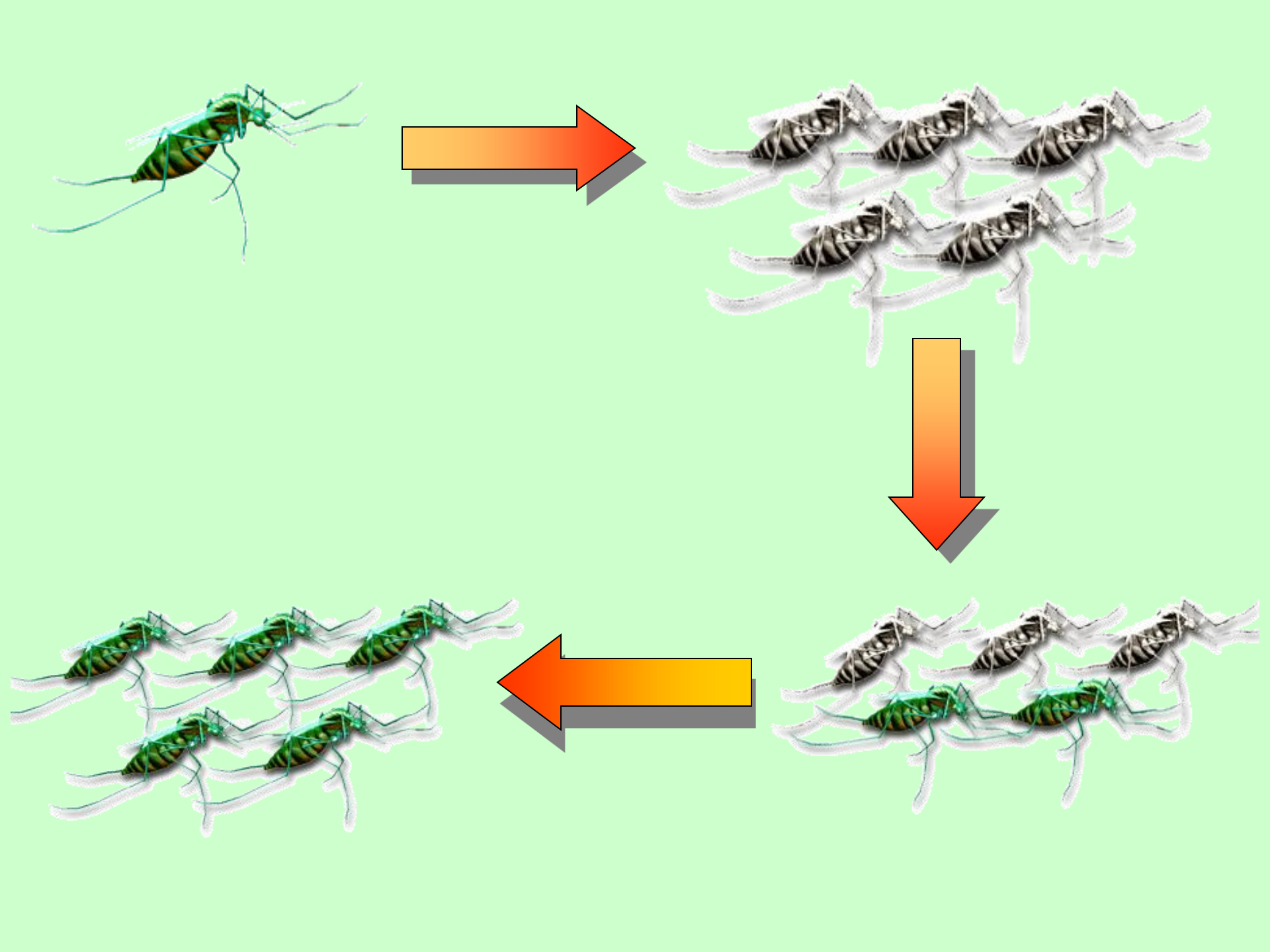
วัตถุประสงค์ในการทำยุง GM

สร้างยุงที่ต้านทานต่อเชื้อโรค (เชื้อโรคไม่สามารถเจริญในยุง)

ใส่ยีนที่ต่อต้านการเจริญของเชื้อโรคเข้าไปในยุงแล้วปล่อยยุงสู่ธรรมชาติ

หรือ

ลดปริมาณยุงลง



ยุง GMทำอย่างไร

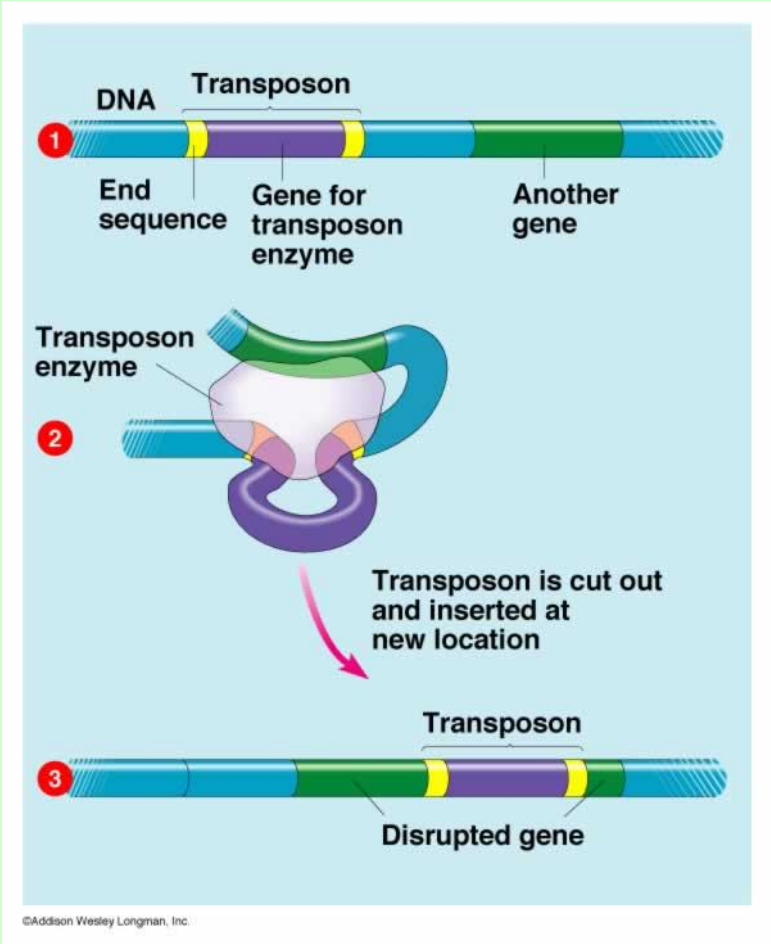
- การส่งถ่ายยีน (DNA delivery)
- ยีนที่ส่งเข้าไปรวมกับโครโมโซมยุง (DNA integration)
- คัดเลือกยุงที่ได้รับการดัดแปลงพันธุกรรม (Selectable markers)
- ยีนที่ใช้ในการขับเคลื่อน (Promoters)
- ยีนที่ใช้ต่อต้านเชื้อโรค (Anti-pathogen genes)

การส่งถ่ายยีน (DNA delivery)

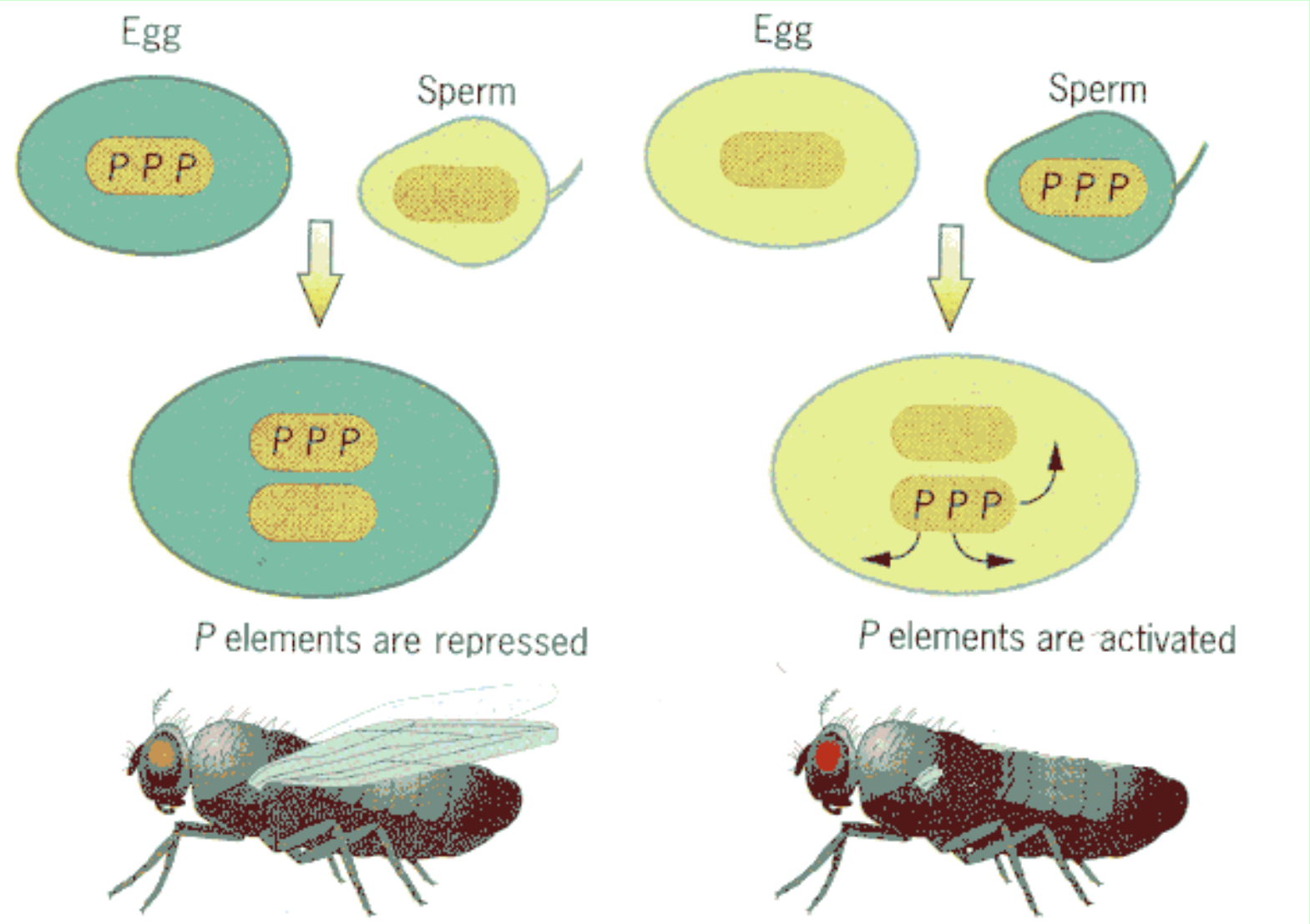
ส่งถ่าย DNA ในช่วงที่เซลล์สืบพันธุ์กำลังเกิดขึ้นโดยใช้เทคนิค micro-injection

ยีนที่ส่งเข้าไปรวมกับโครโมโซมยุง (DNA integration)

อาศัย transposable elements (transposons): DNA fragments that can insert themselves at one or more sites in a genome

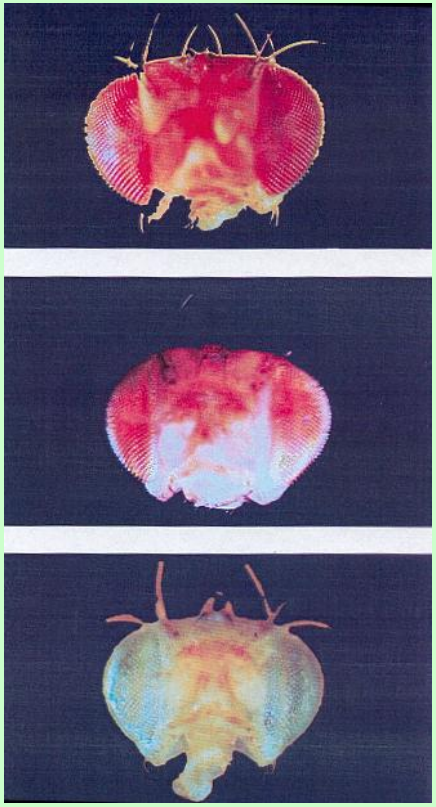


ค้นพบ P elements ในแมลงหวี่



- **คัดเลือกยุงที่ได้รับการดัดแปลงพันธุกรรม (Selectable markers)**

อาศัย selectable markers เช่น ตาสีแดง หรือเรืองแสงสีเขียว



ยีนที่ใช้ในการขับเคลื่อน (Promoters)

มีความจำเพาะต่อตำแหน่ง เพศ และระยะของยุง

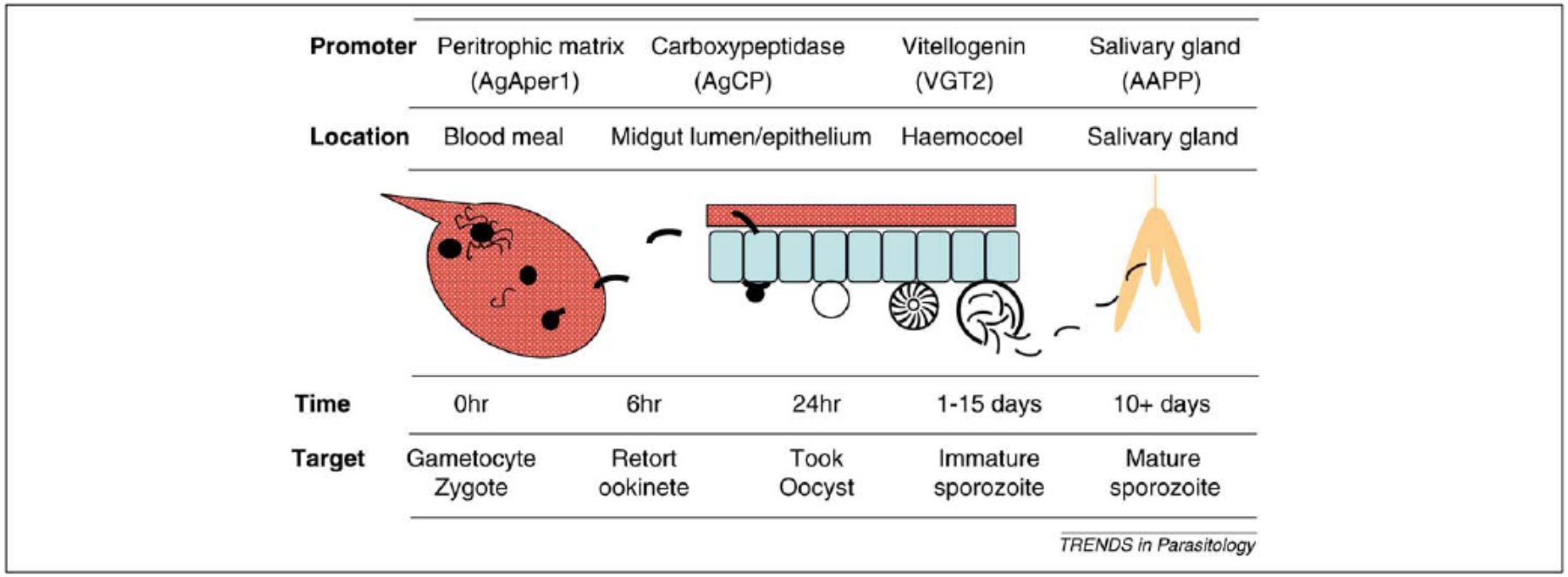


Figure 1. *Plasmodium* targets in genetically modified mosquitoes. Gametocytes ingested with a mosquito blood meal are activated in the midgut and converted into male and female gametes which fuse to form a diploid zygote. Using *An. gambiae* adult peritrophic matrix protein 1 gene (*AgAper1*) regulatory elements, effector molecules can be synthesised and stored in midgut epithelial cells prior to a blood meal to target these stages [13]. The *An. gambiae* carboxypeptidase gene (*AgCP*) promoter could subsequently be used to target the developing ookinete (retort) at 4 to 6 h post blood meal [81]. Ookinetes, transforming ookinetes (tooks), oocysts and immature sporozoites, which are all in contact with mosquito haemolymph, can be targeted using the vitellogenin gene (*VTG2*) promoter following multiple blood meals [10]. Finally, sporozoites invading the salivary glands, awaiting injection during the next blood meal can be targeted in the distal lobes with an anopheline antiplatelet protein gene (*AAPP*) promoter [9].

Trends in Parasitology Vol.26 No.12

ยีนที่ใช้ต่อต้านเชื้อโรค (Anti-pathogen genes)

Table 1. Summary of peptides with activity against sporogonic stages of *Plasmodium*

AMP (and source)	*Plasmodium* spp.	Mosquito	Parasite stage	Effect	Ref.
AdDLP (*Anaeromyxobacter dehalogenans*)	*P. berghei*	N/A	Ookinetes	>50% inhibition of ookinetes at 20 μM *in vitro*	[76]
Angiotensin II (vertebrate liver) VC5 (related synthetic)	*P. gallinaceum*	*Ae. aegypti*	Sporozoites	88% reduction in salivary gland infection intensity, 50% reduction in infectivity at 5 to 60 μM. 76% reduction in salivary gland infectivity for VC5	[64]
Cecropin A (*Anopheles*)	*P. berghei*	*An. gambiae*	Ookinetes	60% reduction in oocyst numbers when cecA expressed under *Ae. aegypti* carboxypeptidase promoter	[50]
Cecropin B (*Anopheles*)	*P. cymonolgi*, *P. knowlewsi* and *P. falciparum* (NF54 & 3D7)	*An. gambiae* *An. dirus*	Oocyst	92, 94, 85 & 81% aborted oocysts, respectively, when injected at 0.5 μg/μl in *An. gambiae*	[63]
CEL-III (sea cucumber)	*P. berghei* *P. falciparum* (3D7)	*An. stephensi*	Ookinetes and oocysts	IC_{50} for *P. berghei* ookinetes at 15 nM. Moderate inhibition against *P. falciparum*	[3]
Defensin (dragon fly, flesh fly)	*P. gallinaceum*	*Ae. aegypti*	All mosquito stages	No effect at 250 μM on gametocytes to ookinetes. 200 to 400 μM reduced oocyst viability not intensity, injected after 4 days	[77]
Drosomycin (fruit fly)	*P. berghei*	N/A	Ookinetes	Significant reduction of ookinetes at 10 and 20 μM	[78]
Gambicin (*An. gambiae*)	*P. berghei*	N/A	Ookinetes	54 to 65% lethality to ookinetes from 10 to 100 μM	[51]
Gomesin (spider)	*P. berghei* *P. falciparum* (W2, 3D7-GFP)	*An. stephensi*	All mosquito stages	*P. berghei*, 53% reduction in oocysts at 50 μM (86% at 100 μM). *P. falciparum*, 56% reduction at 50 μM (100% at 100 μM).	[57]
Magainin II (*Xenpous laevis*)	*P. cymonolgi*, *P. knowlewsi* and *P. falciparum* (NF54 & 3D7)	*An. gambiae*	Oocyst	94, 95, 82 and 86% aborted oocysts respectively when injected at 0.5 μg/μl	[63]
Scorpine (scorpion venom)	*P. berghei*	N/A	Gametocytes	98% inhibition at 15 μM when added with infected feed, suggesting activity against gamete formation and fertilisation	[60]
Shiva-1 + anti-Pbs21 (synthetic cecropin-like linked to parasite surface protein)	*P. berghei*	*An. stephensi*	Ookinetes	90% inhibition of ookinete development at 10 μM of 13.1 scFv-Shiva-1 (100% at 100 μM). Mosquitoes fed *E. coli* expressing 13.1 scFv-Shiva-1 reduced oocysts by 96%	[79]
Shiva 3 (synthetic cecropin-like)	*P. berghei*	*An. albimanus*	Gametocytes to ookinetes	Complete inhibition at 100 μM when added within 8 h. Effective after exposure to parasite for 50 s	[80]
TP10 (wasp venom)	*P. falciparum* (3D7)	*An. gambiae*	Gametocytes, zygotes, ookinetes	35 to 45% reduction in oocyst prevalence at 30 μM	[62]
Vida 1–3 (synthetic)	*P. berghei P. yoelii nigeriensis*	*An. gambiae*	Early sporogonic stages	All tested at 50 μM. Vida 1, 65% mortality at 10 h; Vida 2, 60 to 70% at 14 to 24 h; and Vida 3, >60% mortality over first 24 h against *P. berghei*. Vida 3, 80% mortality with *P. yoelii nigeriensis*	[58]

N/A, not available

Trends in Parasitology Vol.26 No.12

Engineering RNA interference-based resistance to dengue virus type 2 in genetically modified *Aedes aegypti*

Alexander W. E. Franz*†, Irma Sanchez-Vargas*†, Zach N. Adelman‡, Carol D. Blair*, Barry J. Beaty*§, Anthony A. James¶‖, and Ken E. Olson*§

*Arthropod-Borne and Infectious Diseases Laboratory, Department of Microbiology, Immunology, and Pathology, Colorado State University, Fort Collins, CO 80523; ‡Department of Entomology, 320 Price Hall, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, VA 24061; and Departments of ¶Molecular Biology and Biochemistry and ‖Microbiology and Molecular Genetics, University of California, Irvine, CA 92697

สร้างยุงสายพันธุ์ใหม่ปราบเชื้อมาลาเรีย

คณะนักวิจัยของมหาวิทยาลัยในสหรัฐ พบวิธีทำให้ยุงปลอดเชื้อมาลาเรีย โดยการดัดแปลงยีนสร้างยุงสายพันธุ์ใหม่ แต่ยังอยู่ในขั้นทดลอง

สำนักข่าวต่างประเทศรายงานว่า นักพันธุวิศวกรรมนำโดยนายมาร์เซโล จาคอบส์ ลอเรนา แห่งมหาวิทยาลัยแคสท์ เวสเทิร์น รีเสิร์ช ในสหรัฐอเมริกาได้ค้นพบวิธีการปราบเชื้อมาลาเรีย โดยการดัดแปลงยีนยุง เพื่อทำให้ยุงปลอดจากเชื้อปรสิต พลาสโมเดียม ต้นเหตุของโรคมาลาเรีย วิธีการดังกล่าวนี้อาจใช้เป็นอาวุธใหม่ แทนการใช้ยาและยาฆ่าแมลงในการต่อสู้มาลาเรีย

เชื้อมาลาเรีย เกิดจากยุงรับเชื้อปรสิตจากการดูดเลือดจากคนที่ติดเชื้อ จากนั้นเชื้อปรสิตก็จะเข้าไปแอบแฝงอยู่ในลำไส้ยุง พัฒนากลายเป็นตัวที่มีลักษณะคล้ายหนอน เรียกว่า สโปโรซอยต์ จากนั้นจะเข้าไปอยู่ในต่อมน้ำลายของยุง เมื่อยุงกัดคนก็จะปล่อยน้ำลายออกมา ทำให้เกิดการติดเชื้อในคนต่อไป

คณะนักวิจัยได้สร้างยุงสายพันธุ์ใหม่ที่มียีนควบคุมเปปไทด์ หรือกรดอะมิโนชนิดหนึ่งที่สามารถป้องกันสโปโรซอยต์ ย้ายตัวเองออกจากลำไส้ยุงเข้าไปอยู่ในต่อมน้ำลาย ซึ่งเท่ากับเป็นการตัดกระบวนการส่งผ่านเชื้อไปสู่เหยื่อรายต่อไป จากการทดลอง โดยให้ยุงดัดแปลงยีนไปกัดหนูที่มีเชื้อปรสิต ต้นเหตุเชื้อมาลาเรีย ปรากฏว่า มีการแพร่เชื้อลดลงถึงร้อยละ 80 เมื่อเทียบกับยุงที่ไม่ได้ผ่านกระบวนการดัดแปลงยีน

อย่างไรก็ตาม งานวิจัยชิ้นนี้ยังมีข้อบกพร่องหลายอย่าง ต้องทดลองกับคนและยุงในป่า แทนยุงที่ได้รับการเพาะพันธุ์ในห้องทดลอง ด้านนักวิจัยในเยอรมนีบอกว่า งานวิจัยชิ้นนี้เป็นอีกก้าวหนึ่งของการค้นคว้าทดลองเกี่ยวกับเชื้อมาลาเรีย และควรศึกษาถึงผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมด้วย.

การวิจัยก่อนการปล่อยยุงสู่ธรรมชาติ

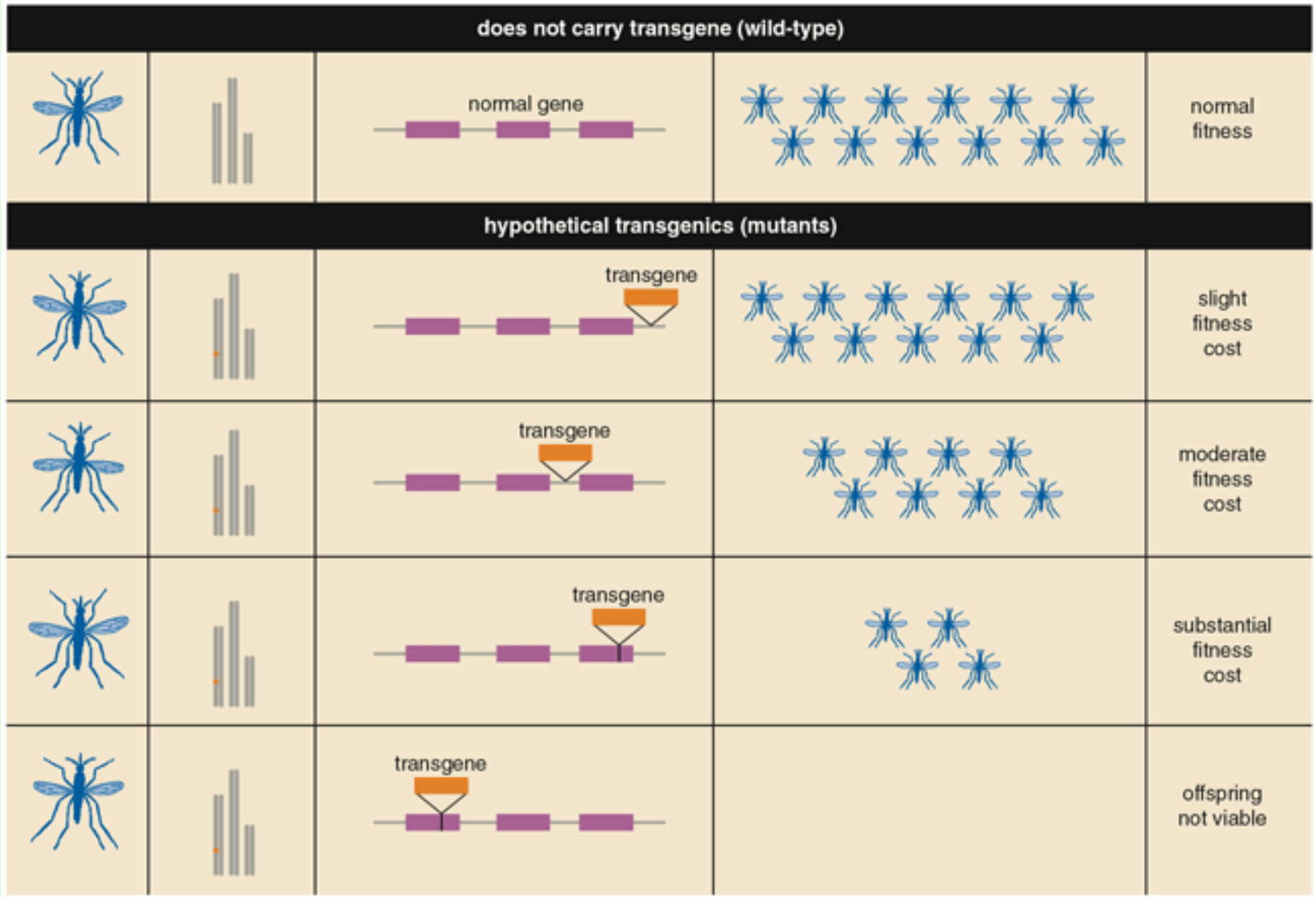
ความคงอยู่ของยีนและสมรรถนะของยุง GM

ความปลอดภัย

การทดสอบในภาคสนามและผลกระทบต่อระบบนิเวศน์

การยอมรับของประชาชน

สมรรถนะของยุงGM (Fitness cost of transgenic mosquitoes)



การทดลองยุง GM ของประเทศมาเลเซีย

Opinion TRENDS in Parasitology Vol.19 No.8 August 2003

The first releases of transgenic mosquitoes: an argument for the sterile insect technique

Mark Q. Benedict and Alan S. Robinson

Entomology Unit, Food and Agriculture Organization/International Atomic Energy Agency Agriculture and Biotechnology Laboratory, Agency's Laboratories Seibersdorf, A-1400 Vienna, Austria

First transgenics released must be sterile

The logical first step toward possible future release of fertile transgenic mosquitoes is to release material that is genetically sterile, so that the effects of the release could be reversed simply by termination. This approach would prevent vertical transmission of the transgene while enabling important parameters related to transgene behaviour to be assessed, thereby greatly reducing risk concerns. While it is possible that horizontal transmission of transgenes could occur by an unidentified mechanism, even when sexually sterile insects are

ยุงที่จะทดลองปล่อยในภาคสนามต้องเป็นหมันหรือไม่สามารถขยายพันธ์ได้

Sterile mosquitoes near take-off

Malaysia is looking to battle dengue fever by releasing mosquitoes that have been genetically engineered to be sterile. Although these efforts have stirred public concern, the country's Academy of Sciences is likely to recommend the strategy to the government within a month.

In April, the Institute for Medical Research in Kuala Lumpur indicated that it might release millions of male *Aedes aegypti* mosquitoes that have been genetically modified to produce offspring that die in the larval stage. The release of enough of the sterile males would theoretically swamp fertile wild-type competitors and crash the population.

This 'sterile insect technique' has been successful in the past, for example in eliminating the medfly from California and the parasitic screw worm from the United States and much of central America. But those insects were sterilized using radiation, which doesn't work as well on mosquitoes. Irradiated mosquitoes are unable to compete with wild-type males to mate with females.

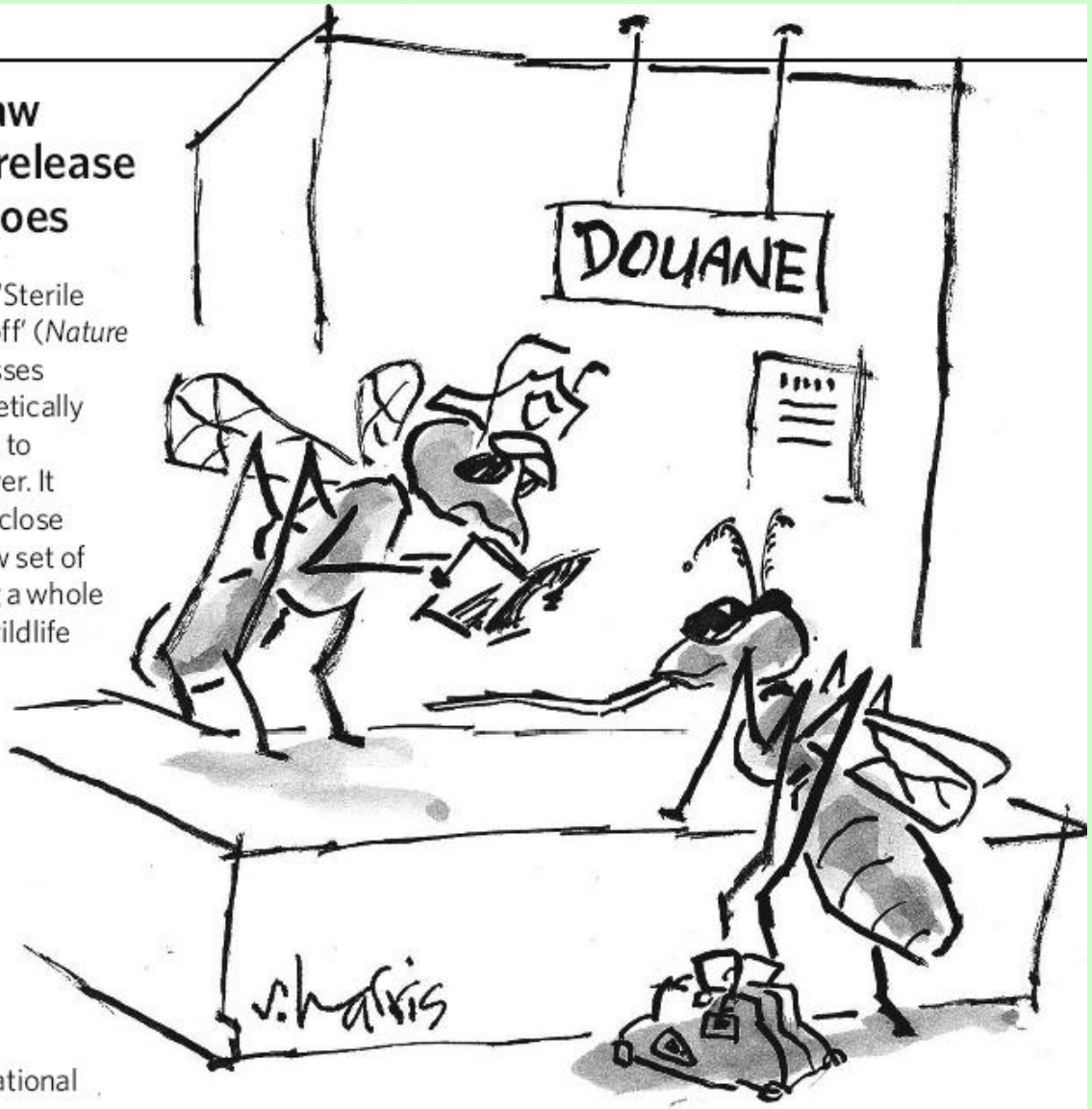
"Any risks related to genetically modified organisms must be balanced against the potential benefits."

alarm to media reports last month that the strain would be released on Pulau Ketam, an island fishing village a few dozen kilometres from Kuala Lumpur. The next day, the government issued a press release saying, "Such a release will never be carried out without the proper clearance of the relevant authorities." Researchers from the Institute for Medical Research did not respond to requests for comment.

Gurmit Singh, an environmentalist and chairman of the non-profit Centre for Environment, Technology and Development in Petaling Jaya, says the main problem is that the government never made public details of the long-term potential for ecological disturbance. "How are the mosquitoes produced, and what's the possibility that the mutation could spread?" Singh asks.

Burt notes that people shouldn't be worried because the mosquitoes are designed to die out rather than spread. In his unrelated work, Burt is trying to modify genes to make it difficult for mosquitoes to pass malaria to humans. Unlike Oxitec's mosquitoes, Burt's would

International law should govern release of GM mosquitoes



SIR — Your News story 'Sterile mosquitoes near take-off' (*Nature* **453,** 435; 2008) discusses the likely release of genetically engineered mosquitoes to help contain dengue fever. It demonstrates just how close we are to a radically new set of strategies for managing a whole range of diseases and wildlife using genetically modified organisms (GMOs). But after assessing the risks and benefits, nations may reach different conclusions about their use. And that's quite a problem, considering that genetically modified bugs won't recognize national borders.

Malaysia may successfully avoid spreading the sterile mosquitoes across the border, and even if they do cross, any transgression will be limited to

politics, and appropriately so. The potential for conflict over self-dispersing GMOs demands the attention of international law.

Unfortunately, that law is

Biological Station, CSIC, Apdo. 153, 41080 Sevilla, Spain
Ben Gilna Department of Geography, University of Hull, Hull HU6 7RX, UK

Aedes aegypti OX513A « Oxitec - Windows Internet Explorer

http://www.oxitec.com/our-products/lead-aedes-strain/

File Edit View Favorites Tools Help

Aedes aegypti OX513A « Oxitec

OXITEC business news research targets products search

Home
Our business
Our news
Our research
Our targets
Our products

- Aedes aegypti OX513A
- Aedes aegypti OX3604C
- Aedes albopictus OX3688
- Pink bollworm OX1138
- Pink bollworm OX3402
- Medfly OX3647
- Mexfly OX3713Q
- Olive fly OX3713A

Aedes aegypti OX513A

Product profile

OX513A is a bisex RIDL strain. Males are released to mate with wild females. The progeny of such matings die as late larvae or pupae. Continual releases of sufficient numbers of RIDL males will reduce the target population to below the level needed to transmit disease. The late lethality means that RIDL larvae compete with wild type larvae for resources, adding to the overall effectiveness of control. Before release, male and female pupae are separated mechanically, exploiting the fact that they are naturally significantly different in size. The strain contains the DsRed marker which is clearly visible in larvae, a useful tool for quality control in production and effective monitoring in the field. OX513A is available in Asian and Latin American genetic backgrounds.

Status

OX513A has regulatory approvals for import and contained testing in Brazil, Cayman Islands, France, India, Malaysia, Singapore, Thailand, USA and Vietnam. Contained trials have been completed in Malaysia.

Research → Product Optimisation → Contained trials → Open field trials → Commercial Pilot

Internet 100%

Late-acting dominant lethal genetic systems and mosquito control

Hoang Kim Phuc[1], Morten H Andreasen[1], Rosemary S Burton[1], Céline Vass[1], Matthew J Epton[1], Gavin Pape[1], Guoliang Fu[2], Kirsty C Condon[1,2], Sarah Scaife[2], Christl A Donnelly[3], Paul G Coleman[3,4], Helen White-Cooper[1] and Luke Alphey*[1,2]

BMC Biology 2007, **5**:11

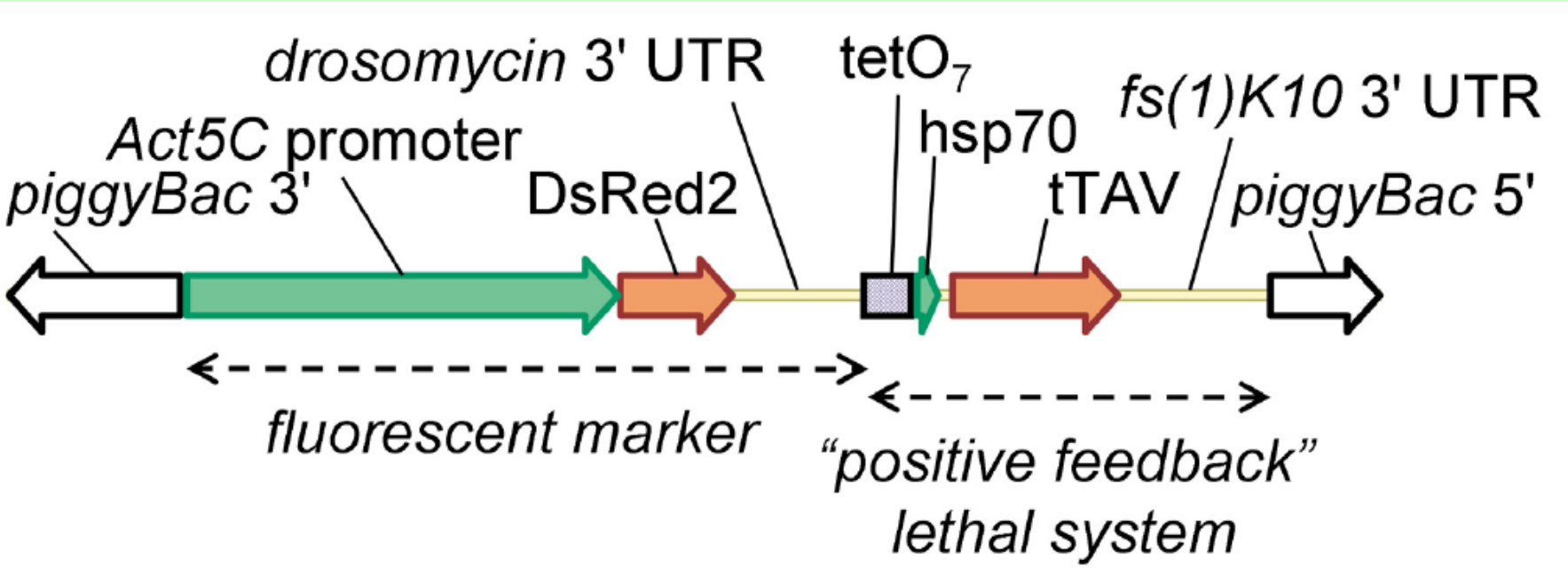


Figure 2

The structure and function of transposon LA513. LA513 is a non-autonomous *piggyBac*-based transposon of 8.4 kb. Transgenics are readily identified by red fluorescence due to expression of DsRed2. tTAV is a tetracycline-repressible transcriptional activator [28, 48]. Here, tTAV is under the control of its own binding site, tetO, a minimal promoter from *Drosophila* hsp70, and a 3' UTR sequence from *Drosophila fs(1)K10* [49]. In the absence of tetracycline, tTAV binds to tetO and drives expression of more tTAV, in a positive feedback loop. In the presence of tetracycline, tTAV binds tetracycline; this tetracycline-bound form does not bind tetO and so does not lead to expression of more tTAV. Consequently, this construct gives very high levels of expression of tTAV in the absence of tetracycline, but only low, basal expression in the presence of tetracycline. High level expression of tTAV is toxic, possibly due to the interaction of the VP16 domain with key transcription factors, so this construct provides a tetracycline-repressible lethal system [28]. Construct LA882 is very similar to LA513; the principal difference is the use of the IE-2 promoter from the baculovirus *Op*NPV to drive expression of the DsRed2 marker, in place of *Act5C*.

According to Alphey's ASTMH presentation, results from the large release showed up to an 80% reduction in the numbers of wild mosquitoes ~11 weeks after the release. This reduction in the population was sustained for a further ~7 weeks until the end of the trial. It is possible that the approach could be even more effective in suppressing wild mosquitoes because in this case the study site was not isolated and surrounding areas contained high densities of wild mosquitoes.

Oxitec is continuing talks with the Malaysian government, which is considering releasing transgenic mosquitoes to address its local dengue problem. By comparison, Oxitec has "been good about publicizing the work they're doing in Malaysia," says Andow. "They essentially leapfrogged that [step] in the Cayman Islands." Now, Knols says, the Malaysian government may insist that Oxitec finish its trials in the Cayman Islands before beginning in Malaysia.

Nature Biotechnology;2011(29);9–11

Genetics-Based Field Studies Prioritize Safety

M. ENSERINK'S NEWS OF THE WEEK STORY ON the open release trials of genetically modified mosquitoes in the Cayman Islands ("GM mosquito trial alarms opponents, strains ties in Gates-funded project," 19 November 2010, p. 1030) highlights the growing pains associated with bringing new technologies out of the laboratory into the field. Unlike for vaccines, drugs, and insecticides, no industry-wide standards are yet in place to guide either public or private efforts in the development of these technologies. However, it is important for the public to know that the scientists working on these new technologies are aggressively supporting the formulation of best practices for their safe, efficient, ethical, and regulated application, and are reaching out to experts from a range of relevant disciplines for advice and counsel. A series of publications document the evolution of this process (*1*–*5*). Indeed, efforts are currently under way to develop a guidance framework for quality standards to assess safety and efficacy and to address regulatory, legal, social, and cultural issues, as recommended by an international consultation held at the World

Biosafety Concerns Involving Genetically Modified Mosquitoes to Combat Malaria and Dengue in Developing Countries

Graciela R. Ostera, PhD

Lawrence O. Gostin, JD

Author Affiliations: Department of Microbiology and Immunology (Dr Ostera) and O'Neill Institute for National and Global Health Law (Mr Gostin), Georgetown University, Washington, DC.
Corresponding Author: Lawrence O. Gostin, JD, Georgetown University Law Center, 600 New Jersey Ave NW, Washington, DC 20001 (gostin@law.georgetown.edu).

JAMA, March 2, 2011—Vol 305, No. 9

OGM
PROTOCOLE SUR LA
BIOSÉCURITÉ
MIEUX VAUT PRÉVENIR
QUE GUÉRIR
PRINCIPE - PRÉCAUTION
?
YES
STOP
STOP GMOS

ทางเลือกอื่น (Para-transgenesis)

Viral Vectors

Sindbis RNA virus

Retroviruses

Symbiont Vectors

Wolbachia

Bacteria

การควบคุมยุงโดยวิธีการอื่นๆ

การจัดการสิ่งแวดล้อม (ทำลายแหล่งเพาะพันธุ์ยุง)

การใช้แสง ความร้อน

การใช้ชีววิธี (ปลาหางนกยูง)

การใช้สารเคมี

ใช้หลายวิธีร่วมกัน

ป้องกันยุงกัด

สารไล่แมลง

DEET

ขมิ้นชัน (Turmeric)

ยูคาลิปตัส

ตะไคร้หอม (Citronella grass)

ขอบคุณครับ