

Abstract

Project Code : BRG/17/2544

Project Title : Comparative study on biochemical and molecular characteristic involved with enhance activity of glutathione S-transferases and knockdown resistant in *Aedes aegypti* resistance to DDT and permethrin

Investigator : Dr. La-aied Prapanthadara

E-mail Address : inhso001@chiangmai.ac.th

Project Period : June 2001 - December 2004

Two strains of *Aedes aegypti*, one resistant to DDT but susceptible to permethrin(RS) and the other resistant to both DDT and permethrin (RR), were established from mosquitoes collected in Chiang Mai Province, northern Thailand. Comparisons with a susceptible reference strain indicated that DDT resistance in both RS and RR strains was mainly due to an increase in DDTase activity. No evidence of metabolic base for the pyrethroid resistance in the RR strain suggests that nerve insensitivity may be present in this strain. The two mutations at residues reported to produce *kdr* resistance in other insects were not present, but some individuals from the permethrin resistant strain had an amino acid mutation involving a valine to glycine mutation in the same segment 6 of domain II of the para sodium-channel gene, which may confer *kdr*-like resistance. However, in the different selected line of RR, such mutation was removed and seem to be replaced by the increased DDTase activity. GST based-DDTase activity was investigated via biochemical purification and characterization of the GST isoenzymes. GST isoenzymes in this species were separated into 2 classes, GST-1 and GST-2. While GST-1 contains isoenzymes those possess different rank of DDTase activity, GST-2 was found lacking of DDTase activity. There was also no over expression of GST-2 in the RR strain when study both by Q-Sepharose column and Northern-Blot analysis. GST-1unBPc is the isoenzyme possess the majority of DDTase activity and therefore contribute mostly on DDT resistance. Gene searching and experiments from the database of expressed sequence tags (ESTs) in complementary with the biochemical study on the gene expression, suggested that the GST Epsilon class, GST-e2, is a member in GST-1unBPc. This was indicated by the same behavior on S-hexylglutathione agarose column and the ability to metabolize DDT. Western blot analysis suggested that GST-e2 is over expressed in RR strain.

Keywords : Glutathione S-transferase, knockdown resistance, *kdr*, *Aedes aegypti*, DDT resistance, permethrin resistance

รหัสโครงการ BRG/17/2544

ชื่อโครงการ การศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติทางชีวเคมีและอนุชีวภาพของเอนไซม์กลูตาไธโอน เอส-ทรานสเฟอเรส และยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อแบบ Knockdown resistance ในยุงลายชนิด *Aedes aegypti* ที่ดื้อต่อสารดีดีที และเพอร์เมธริน

ชื่อนักวิจัย ดร.ละอียด ประพันธ์ดารา

E-mail address inhso001@chiangmai.ac.th

ระยะเวลาโครงการ มิถุนายน 2541-ธันวาคม 2547

ได้ทำการคัดเลือกยุงลายชนิด *Aedes aegypti* สองสายพันธุ์ ที่ได้จากพื้นที่อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ สายพันธุ์ RS เป็นสายพันธุ์ที่ดื้อต่อสารเคมีดีดีที สายพันธุ์ RR ดื้อต่อสารเคมีดีดีทีและเพอร์เมธริน การศึกษาเบื้องต้นในเชิงเปรียบเทียบพบว่าการดื้อยาต่อดีดีที ในยุงทั้งสองสายพันธุ์ เกิดจากสาเหตุหลักคือการมีค่า DDTase activity เพิ่มขึ้นมากกว่ายุงลายสายพันธุ์ที่ไม่ดื้อ นอกจากนี้การดื้อต่อสารเพอร์เมธรินในสายพันธุ์ RR ไม่ได้เกิดจากสาเหตุของการมีค่า metabolism ของการสลายสารเคมีสูงขึ้นจากเดิม หากแต่ น่าจะเกิดจากการดื้อแบบ nerve insensitivity การศึกษาโดยการตรวจสอบการเกิดกลายพันธุ์ของ sodium channel ตามที่พบในแมลงชนิดอื่นๆ ไม่พบลักษณะการกลายพันธุ์ แต่ในยุงบางตัวของสายพันธุ์ RR พบว่าการกลายพันธุ์ที่มีการเปลี่ยนแปลง Valine → Glycine บน segment 6 domain II ของ parasodium channel gene อย่างไรก็ตามในสายพันธุ์ RR ที่คัดเลือกมาต่างกลุ่มกันก็ไม่ได้มีการตรวจพบการกลายพันธุ์ดังกล่าว

การศึกษาเอนไซม์ DDTase ซึ่งก็คือ GST activity ในอีกรูปแบบหนึ่ง ได้ทำการศึกษาผ่านทาง การแยก กลูตาไธโอน เอส-ทรานสเฟอเรส (GST) ให้บริสุทธิ์ พบว่า GST ในยุงลายแยกออกเป็น 2 กลุ่มหลักๆ คือ GST-1 และ GST-2 GST-1 ประกอบด้วย isoenzymes ต่างๆ ที่มีค่า DDTase activity มากน้อย แตกต่างกันไป โดยที่ GST-1unBPc มีค่า DDTase สูงที่สุด และมีความสำคัญสูงสุดในการดื้อต่อสารดีดีที GST-2 ซึ่งเคยมีผู้รายงานว่ามีความสำคัญและเกี่ยวข้องกับการดื้อต่อดีดีที กลับไม่มีคุณสมบัติเป็น DDTase เลยแม้แต่น้อย นอกจากนี้การศึกษาทั้งโดยการแยกด้วย column chromatography และ Western blot analysis ไม่พบว่า GST-2 มีการเกิด over-express ในสายพันธุ์ RR การศึกษาโดยการค้นคว้าจาก database of expressed sequence tags (ESTs) สามารถแยกได้ GST gene และจัดกลุ่มตาม GST ในยุงกันปล่อง *An. gambiae* และแมลงอื่นๆ ได้นำเอา GST ซึ่งจัดอยู่ใน Epsilon class มาทำการศึกษา พบว่า GST-e2 สามารถมี DDTase activity ในอัตราสูง และพบว่ามี over-expression ในสายพันธุ์ RR นอกจากนี้มีคุณสมบัติคือไม่สามารถ bind ได้บน S-hexylglutathione agarose column จากคุณสมบัตินี้จึงสรุปว่า GST-e2 เป็นหนึ่งใน isoenzyme กลุ่ม GST-1unBPc และมีความสำคัญต่อการดื้อต่อสารดีดีที

คำหลัก : กลูตาไธโอน เอส-ทรานสเฟอเรส knockdown resistance, kdr, ยุงลาย, การดื้อต่อสารเคมี
ดีดีที, การดื้อต่อสารเคมีเพอร์เมทริน