

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ



E42104

MOLECULAR STUDY ON SODIUM CHANNEL GENE POINT MUTATION
AND THE ASSOCIATION WITH INSECTICIDE
RESISTANCE IN *Aedes aegypti*

JINTANA YANOLA

DOCTOR OF PHILOSOPHY
IN PARASITOLOGY

THE GRADUATE SCHOOL
CHIANG MAI UNIVERSITY

JULY 2011

600 256158

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ



E42104

**MOLECULAR STUDY ON SODIUM CHANNEL GENE POINT MUTATION
AND THE ASSOCIATION WITH INSECTICIDE
RESISTANCE IN *Aedes aegypti***

JINTANA YANOLA

**A THESIS SUBMITTED TO THE GRADUATE SCHOOL IN
PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS
FOR THE DEGREE OF
DOCTOR OF PHILOSOPHY
IN PARASITOLOGY**



**THE GRADUATE SCHOOL
CHIANG MAI UNIVERSITY**


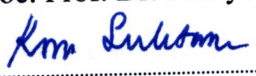

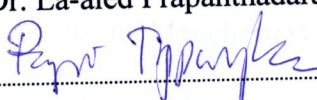
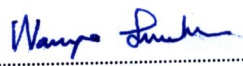
JULY 2011

**MOLECULAR STUDY ON SODIUM CHANNEL GENE POINT MUTATION
AND THE ASSOCIATION WITH INSECTICIDE
RESISTANCE IN *Aedes aegypti***




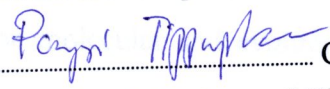
JINTANA YANOLA

THIS THESIS HAS BEEN APPROVED
TO BE A PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS
FOR THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
IN PARASITOLOGY

EXAMINING COMMITTEE

 CHAIRPERSON
Assoc. Prof. Dr. Pradya Somboon
 MEMBER
Assoc. Prof. Dr. Kom Sukontason
 MEMBER
Dr. La-aied Prapanthadara
 MEMBER
Assoc. Prof. Dr. Pongsri Tippawangkosol
 MEMBER
Dr. Wannapa Suwonkerd

THESIS ADVISORY COMMITTEE

 ADVISOR
Assoc. Prof. Dr. Pradya Somboon
 CO-ADVISOR
Assoc. Prof. Dr. Kom Sukontason
 CO-ADVISOR
Dr. La-aied Prapanthadara
 CO-ADVISOR
Assoc. Prof. Dr. Pongsri Tippawangkosol

12 July 2011

ACKNOWLEDGEMENT

I wish to express my sincere gratitude to my thesis advisor, Associated Professor Dr. Pradya Somboon (Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University) and my co-advisor, Dr. La-aied Prapanthadara (Research Institute for Health Sciences, Chiang Mai University) for their kindness, intensive supervision, valuable suggestions and patience in the correction of my dissertation and manuscripts, and all the encouragement throughout the course of my study. I am also grateful to my co-advisors, Associated Professor Dr. Kom Sukontason and Assoc. Prof. Dr. Pongsri Tippawangkosol (Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University) for their kindness and valuable advice.

I wish to express my sincere appreciation to Dr. Catherine Walton (Faculty of Life Sciences, University of Manchester) for her professional suggestions, kindness and support during my work there. I would also like to thank for her valuable discussion and correction of my manuscripts and encouragement during my research. My appreciation is also extended to Dr. Petri Kemppainen (Faculty of Life Sciences, University of Manchester) for his kind advice on molecular and evolution genetic, sharing of valuable experience on lab techniques and generous friendship. I also thank the Walton's lab members for their friendships, kindness and generous help during my work in the University of Manchester.

I wish to thank Dr. Jeerang Wongtrakul and Dr. Nongkran Lumjuan, senior scientists (Research Institute for Health Sciences, Chiang Mai University) for their valuable guidance in solving technical problems and wonderful friendships. Special

thank are extended to Mr. Woottichai Nachaiwieng (Research Institute for Health Sciences, Chiang Mai University) for his kind help on molecular lab work and other lab techniques, moral support and encouragement throughout my thesis project. I appreciate all teachers and officers from the Departments of Parasitology and Research Institute for Health Sciences, and the technicians of the Research and Equipment Center, Faculty of Medicine for their co-operation and assistance in using the equipment throughout my study.

Moreover, I also thank all my colleges from the Departments of Parasitology and Research Institute for Health Sciences for their kind help, moral support, constant encouragement and friendships throughout this thesis project.

I would like to acknowledge the financial support from the Thailand Research Fund through the Royal Golden Jubilee Ph.D. program to La-aied Prapanthadara and Jintana Yanola (Grant number PHD/0095/2548). I also thank the financial support from the Thailand Research Fund through Basic Science (Grant number BRG5080010) and the National Research Council of Thailand to La-aied Prapanthadara.

Finally, I would like to express my appreciation to my beloved parents for their moral support and understanding throughout my study.

Jintana Yanola

Thesis Title	Molecular Study on Sodium Channel Gene Point Mutation and the Association with Insecticide Resistance in <i>Aedes aegypti</i>	
Author	Miss Jintana Yanola	
Degree	Doctor of Philosophy (Parasitology)	
Thesis Advisory Committee		
	Assoc. Prof. Dr. Pradya Somboon	Advisor
	Assoc. Prof. Dr. Kom Sukontason	Co-advisor
	Dr. La-aied Prapanthadara	Co-advisor
	Assoc. Prof. Dr. Pongsri Tippawangkosol	Co-advisor

ABSTRACT

E₄₂₁₀₄

Insecticides have been used for control of mosquito-borne diseases for decades and consequently cause development of resistant mechanisms in mosquito species. One of the important mechanisms is the mutations of voltage-gated sodium channel gene, the primary target of pyrethroids, resulting reduced sensitivity of the target sites known as knockdown resistance (*kdr*). The objectives of this study were 1) determine the point mutation of voltage-gate sodium channel gene in *Aedes aegypti*, PMD-R strain which is resistant to permethrin compared with the susceptible strains by using RT-PCR and DNA sequencing. 2) determine the genetic characteristic of the point mutation by crossing experiments. 3) develop molecular tools for determining the point mutation in *Ae. aegypti* populations in Thailand.

The results revealed that the PMD-R strain has an amino acid substitution phenylalanine (F) to cysteine (C), at an amino acid position 1534 in the IIS6 coding region of sodium channel sequences which had never been reported elsewhere. The genetic study indicated that the permethrin resistance was autosomal and incompletely recessive phenotypes and highly associated with the homozygous mutation (C/C1534). Backcrossing experiment indicated a number of unlinked gene contribute to resistance suggesting the involvement of other resistance mechanisms. Adding an oxidase inhibitor in larval bioassay resulted in a decrease of permethrin resistant level of F1 hybrid close to that of the parents. Therefore, permethrin resistance of PMD-R was mainly due to F1534C mutation of the sodium channel gene and partly oxidase enzymes.

Two monitoring tools for detection of F1534C mutation have been successfully developed; a TaqMan SNP genotyping (TaqMan SNP) and an Allele Specific PCR (AS-PCR) assays. The former was as good as the DNA sequencing where as the latter slightly overestimated the mutant allele frequency by 1.8% in wild-caught samples. The AS-PCR assay using 619 individuals from 20 localities of Thailand show that the mutant C1534 allele was widely distributed throughout Thailand with frequencies varied among populations from 0.20 to 1.00 (overall 0.77). This mutation was very closely associated with the permethrin resistant phenotype. However, 19 permethrin-resistant individuals did not have F1534C mutation but homozygous for V1016G and S989P mutations in domain II were examined by DNA sequencing. The assays can be used for the rapid detection of the F1534C resistance mutation in *Ae. aegypti* populations. The efficacy of pyrethroids for controlling *Ae.*

aegypti may be limited due to the mutation of voltage-gated sodium channels.

Selection of appropriate insecticide and other control methods is necessary.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การศึกษาระดับโมเลกุลของการกลายพันธุ์เฉพาะตำแหน่งที่ โซเดียมแชนเนลยีน และความสัมพันธ์กับการดื้อต่อสารเคมีฆ่า แมลงในยุงลาย <i>Aedes aegypti</i>	
ผู้เขียน	นางสาวจินตนา ขาโนละ	
ปริญญา	วิทยาศาสตร์สุขภาพบัณฑิต (ปรสตีวิทยา)	
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์		
	รศ. ดร. ปรัชญา สมบูรณ์	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
	รศ. ดร. นพ. กม สุคนธสรณ์	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
	ดร. ละเอียด ประพันธ์คารา	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
	รศ. ดร. ผ่องศรี ทิพวง โกลส	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

E₁42104

สารเคมีฆ่าแมลงถูกนำมาใช้ในการควบคุมโรคที่มียุงเป็นพาหะมาหลายสิบปี ทำให้ยุงสร้างกลไกการต่อต้านสารเคมีฆ่าแมลงในรูปแบบต่างๆ ที่สำคัญประการหนึ่งคือ การกลายพันธุ์ของยีนช่องจับโซเดียม (voltage-gated sodium channel gene) ซึ่งเป็นตำแหน่งเป้าหมายในการออกฤทธิ์ที่สำคัญของสารไพรีทรอยด์ มีผลทำให้ความไวของระบบประสาทต่อการรับสารไพรีทรอยด์ลดลง หรือที่เรียกว่าการต่อต้านทานฤทธิ์เฉียบพลัน (knockdown resistance, *kdr*) การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ คือ 1) ค้นหาการกลายพันธุ์ของยีนช่องจับโซเดียมในยุงลาย *Aedes aegypti* สายพันธุ์พีเอ็มดี-อาร์ (PMD-R) ที่ดื้อต่อสารเพอร์เมทริน เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ที่ไวต่อสารเคมี โดยใช้วิธีปฏิกิริยาลูกโซ่แบบย้อนกลับ (RT-PCR) และการตรวจหาลำดับเบส (DNA sequencing) 2) ทราบลักษณะทางพันธุกรรมของยีนกลายพันธุ์โดยวิธีการผสมข้ามสายพันธุ์ (cross-mating) 3) พัฒนาวิธีการตรวจหาการกลายพันธุ์ด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา สำหรับตรวจหาการกระจายตัวของการกลายพันธุ์ในประชากรยุงลาย *Ae. aegypti* ในประเทศไทย

ผลการศึกษาพบว่ายุงลายสายพันธุ์พีเอ็มดี-อาร์ มีการกลายพันธุ์ของยีนช่องจับโซเดียม ที่ตำแหน่งกรดอะมิโน 1534 บริเวณโดเมนสามส่วนที่หก (HIS6) ของยีนช่องจับโซเดียม โดยมีการเปลี่ยนกรดอะมิโนฟีนิลอลานีน (F) ไปเป็นซิสเตอีน (C) ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน การศึกษาการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของ อัลลีลคั้งเคิม (F1534) และกลายพันธุ์ (C1534) พบว่าการดื้อสาร

เพอร์เมทรินมีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมแบบด้อยไม่สมบูรณ์ (autosomal incompletely recessive) โดยมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับการกลายพันธุ์แบบโฮโมไซกัส (C/C1534) และผลการผสมพันธุ์กลับ (backcross) พบมีกลไกการติดต่อสารเคมีอื่นร่วมด้วย โดยพบว่าการเพิ่มสารที่ยังยั้งการทำงานของ เอนไซม์ออกซิเดสลงในชุดทดสอบความไวต่อสารเพอร์เมทริน ทำให้ระดับการติดต่อสารเพอร์เมทรินของยุงลายลูกผสมรุ่นที่ 1 ลดลงใกล้เคียงกับยุงลายรุ่นพ่อแม่ที่ไวต่อสารเคมี ดังนั้นการติดต่อสารเพอร์เมทรินของยุงลายพีเอ็มดี-อาร์ มีสาเหตุส่วนใหญ่จากการกลายพันธุ์ F1534C ของยีนช่องขับโซเดียม และบางส่วนจากเอนไซม์ออกซิเดส

การพัฒนาวิธีเพื่อใช้ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ F1534C ประสบความสำเร็จ ได้แก่ วิธี TaqMan SNP genotyping (TaqMan SNP) และวิธี Allele Specific PCR (AS-PCR) โดยวิธีแรกให้ผลดีพอๆ กับวิธีตรวจหาลำดับเบส (DNA sequencing) ส่วนวิธีที่สองให้ผลอัลลีลกลายพันธุ์เกินจริงเพียง 1.8% ของยุงลายภาคสนาม เมื่อนำเทคนิค AS-PCR นี้ไปตรวจหาความถี่ของการกลายพันธุ์ F1534C ในยุงลายทั้ง 619 ตัวจากพื้นที่ต่างๆ ของประเทศไทย 20 พื้นที่ พบว่า อัลลีลกลายพันธุ์มีการกระจายทั่วประเทศ โดยมีความถี่อยู่ระหว่าง 0.2 ถึง 1.0 (รวม 0.77) และมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดอย่างมากต่อการดื้อเพอร์เมทริน อย่างไรก็ตามพบยุงลายติดต่อสารเพอร์เมทรินจำนวน 19 ตัวซึ่งไม่มีการกลายพันธุ์ F1534C แต่การตรวจหาลำดับเบสพบการกลายพันธุ์แบบโฮโมไซกัสบริเวณ โดเมนสองที่ตำแหน่ง V1016G และ S989P จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่า วิธีที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถนำไปใช้ตรวจหาการกลายพันธุ์ F1534C ในประชากรยุงลาย *Ae. aegypti* ได้อย่างสะดวกและรวดเร็ว การใช้สารไพรีทรอยด์ในการควบคุมยุงลายที่มีการกลายพันธุ์ของช่องขับโซเดียมอาจไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอ จำเป็นต้องเลือกหาสารกำจัดแมลงและวิธีการอื่นๆ ที่เหมาะสม

TABLE OF CONTENTS

	Page
ACKNOWLEDGEMENT	iii
ABSTRACT (IN ENGLISH)	v
ABSTRACT (IN THAI)	viii
TABLE OF CONTENTS	x
LIST OF TABLES	xiv
LIST OF FIGURES	xvi
ABBREVIATIONS	xxi
 CHAPTER I INTRODUCTION	 1
1. Problems and research rationale	1
2. Literature review	5
2.1 Insecticide resistance mechanisms	5
2.2 Mammalian voltage-gated sodium channels	6
2.3 Insect voltage-gated sodium channels	14
2.4 Insect sodium channel gene and knockdown resistance	17
2.5 The simplified high throughput methods	24
3. Purposes of this study	27
4. Significant of the research	28

TABLE OF CONTENTS (continued)

	Page
CHAPTER II MATERIALS AND METHODS	29
1. Mosquito strains	29
2. Mosquito rearing	29
3. Insecticide susceptibility test	30
3.1 Insecticide susceptibility test for larvae	30
3.2 Insecticide susceptibility test for adult mosquitoes	31
4. Genetic inheritance of the F1534 and C1534 alleles in permethrin susceptible and resistant <i>Ae. aegypti</i>	31
5. Bioassay data analysis	32
6. Isolation of total RNA and genomic DNA from mosquito	34
6.1 Total RNA extraction	34
6.2 Genomic DNA extraction from single mosquito	34
7. Amplification of the <i>Ae. aegypti</i> voltage-gated sodium channel gene	35
7.1 Amplification of the <i>Ae. aegypti</i> voltage-gated sodium channel gene using cDNA templates	35
7.2 Amplification of the <i>Ae. aegypti</i> voltage-gated sodium channel gene using Genomic DNA templates	39
8. Direct sequencing and sequence analysis	42
9. Development of TaqMan SNP genotyping (TaqMan SNP) and AS-PCR assays for detection of the F1534C mutation in <i>Ae.</i> <i>aegypti</i>	42

TABLE OF CONTENTS (continued)

	Page
9.1 TaqMan SNP Genotyping Assay	42
9.2 Allele specific PCR	49
10. Genotyping of the F1534C mutation in wild caught <i>Ae. aegypti</i> by AS-PCR	53
CHAPTER III RESULTS	56
1. Partial cDNA sequencing of the <i>Ae. aegypti</i> voltage-gated sodium channel gene	56
2. Sequence analyses of the <i>Ae. aegypti</i> voltage-gated sodium channel gene	64
3. Genetic inheritance of the F1534 and C1534 alleles in <i>Ae. aegypti</i>	73
4. Development of TaqMan SNP genotyping assay	80
5. Development of Allele Specific PCR (AS-PCR)	84
6. Comparison of DNA sequencing with the TaqMan SNP and AS-PCR assays	86
7. Distribution of the F1534C mutation in <i>Ae. aegypti</i> populations	88
8. Molecular variation of the IIP-IIS6 region of the <i>Ae. aegypti</i> voltage-gated sodium channel gene	92

TABLE OF CONTENTS (continued)

	Page
CHAPTER IV DISCUSSION	97
CHAPTER V CONCLUSION	104
REFERENCES	107
APPENDICES	124
Appendix A The RNA codons	125
Appendix B Amino acid abbreviations	126
Appendix C Chromatogram of nucleotide sequence	127
Appendix D Publications	140
CURRICULUM VITAE	156

LIST OF TABLES

Table		Page
1.1	Neurotoxin that target the voltage-gated sodium channel and their corresponding receptor sites	13
1.2	Sodium channel amino acid sequence polymorphisms associated with knockdown resistance	20
2.1	Sequences of primers for amplifying the <i>Ae. aegypti</i> voltage-gated sodium channel gene by using cDNA as template	37
2.2	Sequences of primers for amplifying the <i>Ae. aegypti</i> voltage-gated sodium channel gene by using genomic DNA as template	41
2.3	Sequences of TaqMan primers and probes for TaqMan SNP Genotyping Assay	48
2.4	Sequences of oligonucleotides used for Allele Specific PCR	50
2.5	Collection sites of <i>Ae. aegypti</i> in Thailand	54
3.1	Responses of the <i>Ae. aegypti</i> adults to 0.75% permethrin for the parental strains, their reciprocal crosses and backcrosses	75

LIST OF TABLES (continued)

Table		Page
3.2	Responses of the <i>Ae. aegypti</i> larvae to permethrin for the parental strains, their reciprocal crosses and backcrosses	77
3.3	Comparison of genotype results for the F1534C mutation obtained from the TaqMan SNP and AS-PCR assays with DNA sequencing	87
3.4	Frequency of the F1534C mutation in the <i>Ae. aegypti</i> voltage-gated sodium channel gene within dead and survivor mosquitoes from 14 localities of Thailand determined using the AS-PCR method	90
3.5	Molecular variation of IIP-IIS6 region of sodium channel gene and the correlation with the F1534C mutation in the <i>Ae. aegypti</i> permethin resistance from Thailand	94

LIST OF FIGURES

Figure	Page
1.1 Schematic representation of the subunit structure of the voltage-gated sodium channel.	8
1.2 The transmembrane topology of the voltage-gated sodium channel	9
1.3 Generation of an action potential	12
2.1 A schematic diagram of the extended transmembrane structure of voltage-gated sodium channel α subunits	38
2.2 The principle of allelic discrimination using TaqMan SNP Genotyping Assay	44
2.3 Schematic of the TaqMan SNP Genotyping for detection of the F1534C mutation	47
2.4 Schematic of the Allele Specific PCR assays for detection of the F1534Cmutation	51
3.1 Amplification of the <i>Ae. aegypti</i> voltage-gated sodium channel gene from PMD-R (A) and PMD (B) strains	57
3.2 The cDNA sequences of the IS4 - IS6 domains of the <i>Ae. aegypti</i> voltage-gated sodium channel gene from PMD-R and its deduced amino acid sequences	58

LIST OF FIGURES (continued)

Figure		Page
3.3	The cDNA sequences of the IS4 - IS6 domains of the <i>Ae. aegypti</i> voltage-gated sodium channel gene from PMD and its deduced amino acid sequences	59
3.4	The cDNA sequences of the IIS1-IIS6 domains of the <i>Ae. aegypti</i> voltage-gated sodium channel gene from PMD-R strains and its deduced amino acid sequences	60
3.5	The cDNA sequences of the IIS1-IIS6 domains of the <i>Ae. aegypti</i> voltage-gated sodium channel gene from PMD strains and its deduced amino acid sequences	61
3.6	The cDNA sequences of the IIIS4-IVS2 domains of the <i>Ae. aegypti</i> voltage-gated sodium channel gene from PMD-R strains and its deduced amino acid sequences	62
3.7	The cDNA sequences of the IIIS4-IVS2 domains of the <i>Ae. aegypti</i> voltage-gated sodium channel gene from PMD strains and its deduced amino acid sequences	63
3.8	Alignment of the amino acid sequences of the <i>Ae. aegypti</i> voltage-gated sodium channel protein, IS4 - IS6 domains, of PMD-R strain with that of the susceptible strains, PMD, Liverpool and China strains	66

LIST OF FIGURES (continued)

Figure		Page
3.9	Alignment of the amino acid sequences of the <i>Ae. aegypti</i> voltage-gated sodium channel protein, IIS1-IIS6 domains, of PMD-R strain with that of the susceptible strains, PMD, Liverpool and China strains	67
3.10	Alignment of the amino acid sequences of the <i>Ae. aegypti</i> voltage-gated sodium channel protein, IIS4-IVS2 domains, of PMD-R strain with that of the susceptible strains, PMD, Liverpool and China strains	68
3.11	Alignment of the sodium channel amino acid sequence of the <i>Ae. aegypti</i> Liverpool strain with that of <i>M. domestica</i> housefly <i>Vssc1</i>	69
3.12	Alignment of voltage-gated sodium channel sequences from <i>Ae. aegypti</i> PMD-R strain with that from the other arthropods and non-arthropods in the region of IIS6 domain	72
3.13	The log time- probit mortality line of the parental strains, the F ₁ hybrids and the F ₂ backcrosses after exposure to 0.75% permethrin paper	74

LIST OF FIGURES (continued)

Figure		Page
3.14	The log concentration-probit mortality lines (A) and log concentration-mortality response curves (B) of the parental, F1 hybrids and backcrossed individuals after exposure to permethrin	76
3.15	The log concentration-probit mortality lines of the parental strains, F1 progeny after exposure to permethrin compare to those of the F1 hybrids after exposure to permethrin with the PBO synergist	79
3.16	Detection of the F1534C genotyping using TaqMan SNP genotyping assay	81
3.17	Scatter plot of end point fluorescence intensities using the TaqMan SNP genotyping assay	82
3.18	Effect of sample dilution on fluorescence intensity	83
3.19	Characteristic agarose gel and sensitivity test for the AS-PCR assay for the detection of the F1534C mutation	85
3.20	Estimated frequency distributions of the homozygous wild type (F/F1534), heterozygous (F/C1534) and homozygous mutant (C/C1534) genotypes in <i>Ae. aegypti</i> in Thailand	91

LIST OF FIGURES (continued)

Figure		Page
3.21	Sequences alignment of the IIP-IIS6 region of the <i>Ae. aegypti</i> sodium channel gene	95

ABBREVIATIONS

AS-PCR	Allele Specific PCR
ADH	Alcohol dehydrogenase
ALDH	Aldehyde dehydrogenase
bp	base pair
BNPP	(Bis (4-nitrophenyl)-phosphate)
cDNA	Complementary DNA
CI	Confidence interval
DDT	Dichlorodiphenyltrichloroethane
DHF	Dengue heamorhagic fever
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTPs	Deoxynucleotide triphosphates
<i>DSC1</i>	<i>Drosophila</i> sodium channel 1
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
GST	Glutathione-S-transferase
GABA	Gamma-Aminobutyric
HOLA	Hot oligonucleotide ligation assay
HRM	High resolution melts analysis
kDa	Kilodalton
<i>kdr</i>	Knockdown resistance
LC	Lethal concentration
LT	Lethal time