

Abstract

Project Code: BRG43-8-0011

Project Title: Isolation and characterization of Cytochrome P450 genes involved in pyrethroid resistance in the malaria vector, *Anopheles minimus*, in Thailand.

Investigators: Pornpimol Rongnoparut, Ph.D., Principal Investigator
Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University
E-mail: scprn@mahidol.ac.th

Theeraphap Chareonviriyaphap, Ph.D.
Department of Entomology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University
E-mail: faasthc@ku.ac.th

Mathurose Ponglikitmongkol, Ph.D.
Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University
E-mail: scmpl@mahidol.ac.th

Michael Bangs, Ph.D.
Medical Entomology Dept., Naval Medical Research, Jakarta, Indonesia
E-mail: bangsmj@namru2.med.navy.mil

Project Period: 3 years (August 2000-July 2003)

Abstract:

The elevated activities of the cytochrome P450 monooxygenases (P450, CYP) of insects have been implicated in many cases of insect resistance to insecticides, including DDT and pyrethroids. The goal of this study is firstly to establish a colony of *Anopheles minimus*, a malaria vector in Thailand, selected with pyrethroid as a resistant mosquito model. Second, the resistant colony is used for cloning and characterization of cytochrome P450 (P450) genes in the family 6 (*CYP6*) that are overexpressed at mRNA level.

We report the establishment of an *Anopheles minimus* mosquito colony acquiring deltamethrin resistance, by exposing subsequent mosquito generations to LD₅₀ and LT₅₀ values of deltamethrin. The resistant colony also presents cross-resistance to DDT during the course of deltamethrin resistance. Biochemical assays of the resistant colony indicated that cytochrome P450 acts as a primary route of insecticide detoxification in *An. minimus*.

We have primarily isolated nine isoforms of partial cDNA fragments from susceptible and resistant colonies. Among these cDNAs, five *CYP6* genes with full coding sequences were isolated from *An. minimus* using Genomic Walking and RACE methods. Two cDNA clones, CYP6AA2 and AN10, showed elevated transcription in the resistant colony upon measurement of their mRNA level, using semi-quantitative RT-PCR. The fold of mRNA increase of CYP6AA2 and AN10 are correlated with the increasing level of resistance, during the course of insecticide selection, in *An. minimus*. The studies suggest that both CYP6AA2 and AN10 could play and/or share role in specific resistance and/or cross-resistance against deltamethrin and DDT. Such role could further be supported by explore of the metabolic function of each gene towards insecticide substrates, including pyrethroids and DDT, using cDNA-expressed enzymes in the heterologous system. Metabolic resistance to insecticides can then be studied in this mosquito.

Keywords: Insecticide resistance, Cytochrome P450, *Anopheles minimus*, pyrethroid

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: BRG43-8-0011

ชื่อโครงการ: การวิเคราะห์และจำแนกยีน Cytochrome P450 ที่แสดงความต้านทานต่อสารฆ่าแมลงชนิดไพรีทรอยด์ในยุงก้นปล่อง *Anopheles minimus* ในประเทศไทย

ชื่อนักวิจัย

นางสาว พรพิมล รงศ์นพรัตน์	ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
นาย ชีรภาพ เจริญวิริยภาพ	ภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
นางสาว มธุรส พงษ์ลิขิตมงคล	ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
Dr. Michael Bangs	Medical Entomology Department, Naval Medical Research, Jakarta, Indonesia

ระยะเวลาโครงการ

การเพิ่มขึ้นของระดับการทำงานของเอนไซม์ cytochrome P450 monooxygenase (P450, CYP) ในแมลงเป็นสิ่งบ่งชี้ถึงสภาวะความต้านทานต่อสารฆ่าแมลงเช่น DDT และ pyrethroid ในแมลงเกือบทุกชนิด วัตถุประสงค์ในงานวิจัยนี้มุ่งเน้นที่ 1) การเลี้ยงยุงก้นปล่อง *Anopheles minimus* ให้เป็นกลุ่มยุงต้นแบบที่มีความต้านทานสารฆ่าแมลงไพรีทรอยด์ 2) ยุงกลุ่มที่ถูกสร้างนี้ ใช้จำลอง (cloning) และศึกษาลักษณะจำเพาะของยีน cytochrome P450 (P450) family 6 (CYP6) ที่มีการเพิ่มขึ้นของระดับ mRNA ได้

เรารายงานถึงการเลี้ยงยุง *Anopheles minimus* ให้มีความต้านทานสารฆ่าแมลงเดลต้าเมทริน (deltamethrin) โดยการให้ยุงสัมผัสสารเดลต้าเมทริน จนในที่สุดได้ยุงรุ่นที่มีค่า LD₅₀ และ LT₅₀ ต่odelต้าเมทริน และพบว่ายุงกลุ่มนี้สามารถเกิด cross-resistance กับ ดีดีที (DDT) ในขณะที่มีความต้านทานต่อเดลต้าเมทริน อีกด้วย ผลการศึกษาทางชีวเคมีในยุงกลุ่มนี้พบว่า cytochrome P450 ทำหน้าที่เป็นเสมือนด่านแรกที่จะกำจัดสารฆ่าแมลงในยุง *An. minimus*

ในเบื้องต้น เราสามารถแยกชิ้นส่วนของ CYP6 cDNAs และจัดได้เป็น 9 กลุ่ม (isoforms) จากยุงกลุ่มที่มีความไวและกลุ่มที่มีความต้านทานต่อเดลต้าเมทริน ต่อมาในจำนวน cDNAs ที่แยกได้นี้ สามารถแยกยีน CYP6 ในลักษณะที่เป็น full coding sequence ได้ห้ายีน โดยใช้วิธี Genome Walking และ RACE และพบว่ามี cDNA สองโคลน ได้แก่ CYP6AA2 และ AN10 ซึ่งมีระดับ transcription เพิ่มขึ้นในยุงกลุ่มที่มีความต้านทานสารฆ่าแมลง โดยการวัดระดับ mRNA ที่เพิ่มขึ้นด้วยวิธี semi-quantitative RT-PCR การเพิ่มขึ้นของระดับ mRNA ของทั้ง CYP6AA2 และ AN10 สอดคล้องกับระดับความต้านทานต่อสารฆ่าแมลงที่เพิ่มขึ้นในระหว่างการคัดเลือกยุงด้วยเดลต้าเมทริน จากผลการทดลองนี้น่าจะบอกได้ว่าทั้ง CYP6AA2 และ AN10 อาจจะมีหน้าที่ (ร่วมกัน) ในการต้านทานอย่างจำเพาะ และ/หรือ cross-resistance ต่อเดลต้าเมทรินและดีดีที อย่างไรก็ตาม ในการที่จะสรุปถึงบทบาทของยีนทั้งสองนั้น ควรจะมีข้อมูลสนับสนุนเพิ่มเติมเกี่ยวกับบทบาทของยีนแต่ละตัวที่มีต่อการสลายสารฆ่าแมลง เช่น pyrethroid และ DDT โดยการศึกษาการแสดงออกของเอนไซม์จาก cDNA ใน heterologous system และจะสามารถศึกษาถึงกลไกการเกิดสภาวะการต่อต้านสารฆ่าแมลงในยุงกลุ่มนี้ ในงานวิจัยต่อไป

คำหลัก ความต้านทานต่อสารฆ่าแมลง ไซโตโครม พี450 ยุงก้นปล่อง *Anopheles minimus* ไพรีทรอยด์