9 AUG 2002

LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

ISOLATION OF A CYTOCHROME P450 cDNA FROM *ANOPHELES MINIMUS*

NAOWARAT TANOMSING

อภินันทนาการ
จาก
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (BIOCHEMISTRY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2002

ISBN 974-04-1929-1

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

TH
N194i
2002
c.2

Copyright by Mahidol University

4236791 SCBC/M : MAJOR : BIOCHEMISTRY ; M.Sc. (BIOCHEMISTRY)
KEY WORDS : CYTOCHROME P450 MONOOXYGENASE / *ANOPHELES MINIMUS* / SEMI-QUANTITATIVE RT-PCR

NAOWARAT TANOMSING: ISOLATION OF A CYTOCHROME P450 cDNA FROM *ANOPHELES MINIMUS*. THESIS ADVISORS: PORNPIMOL RONGNOPARUT, Ph.D., PRAPON WILAIRAT, Ph.D., MATHUROSE PONGLIKITMONGKOL, Ph.D. 98 P. ISBN 974-04-1929-1

Cytochrome P450 monooxygenases comprise important enzymes which play a role in insecticide resistance in insects. Increased expression of *CYP6* genes is responsible for insecticide resistance in various insects. *Anopheles minimus* is a major malaria vector in Thailand. To control the vector, synthetic pyrethroids have been used. However, pyrethroid resistance is reported in some insects including *Musca domestica* and *Helicoverpa armigera*. Long-term use of pyrethroids could also induce pyrethroid resistance in mosquitoes.

The aim of the thesis was to isolate and to determine whether the isolated *CYP6* was associated with pyrethroid resistance. The complete coding CYP6S2 cDNA was isolated from *An. minimus*. A fragment of *CYP6* genomic DNA was first isolated using degenerated oligonucleotide primers based on amino acid sequences of two conserved regions, DVIGSCAF and ETLR motif of other insect *CYP6* genes. *CYP6* DNA fragment had a size of approximately 600 bp. *CYP6* DNA fragment was cloned, sequenced and translated into deduced amino acids. Alignment of amino acids deduced from the partial *CYP6* fragment with those of other insect *CYP6s* showed homology of similar conserved amino acids. Thus the fragment belonged to family 6 and gene specific oligonucleotide primers which were designed to extend the partial *CYP6* sequence towards 5' upstream and 3' downstream regions using genomic DNA walking and 3' RACE technique, respectively. The extended sequences encompassed the translation start and stop sites. Specific oligonucleotide primers containing sequences encompassing translation start and stop sites were then designed in order to obtain the complete coding CYP6S2 cDNA.

The CYP6S2 cDNA with 1.5 kb in length was obtained and translated into deduced amino acids. Comparison between genomic DNA and cDNA sequences showed one 60 bp intron residing in front of the ETLR motif. Deduced amino acids of CPAN2 were aligned with other insect *CYP6* genes and showed highest percent homology (82%) with an unpublished *CYP6S1* from *An. gambiae*. CPAN2 was subsequently designated *CYP6S2*.

Semi-quantitative RT-PCR was performed in order to compare the expression of *CYP6S2* gene between the pyrethroid resistant (20% resistant) and susceptible strains of *An. minimus*. There was a similar level of CYP6S2 mRNA expressed between the pyrethroid resistant and susceptible strains.

Copyright by Mahidol University

4236791 SCBC/M: สาขาวิชา: ชีวเคมี; วท.ม. (ชีวเคมี)

เนาวรัตน์ ถนอมสิงห์: การแยกและวิเคราะห์ cDNA ของไซโตโครม พี 450 จากยุงก้นปล่อง *ANOPHELES MINIMUS* (ISOLATION OF A CYTOCHROME P450 cDNA FROM *ANOPHELES MINIMUS*). คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: พรพิมล รงค์นพรัตน์, Ph.D., ประพนธ์ วิไลรัตน์, Ph.D., มธุรส พงษ์ลิขิตมงคล, Ph. D. 98 หน้า. ISBN 974-04-1929-1

ไซโตโครม พี450 เป็นกลุ่มของเอ็นไซม์ซึ่งทำหน้าที่ในกระบวนการเมตาบอลิซึมของสารในร่างกายและสารแปลกปลอมภายนอกที่เข้าสู่ร่างกาย เอ็นไซม์ พี 450 ในกลุ่มแฟมิลีที่ 6 นับเป็นกลุ่มสำคัญที่มีรายงานถึงความสัมพันธ์กับการดื้อสารฆ่าแมลงหลายชนิด เช่น การดื้อต่อสารไพรีทรอยด์ที่มีรายงานในแมลงวันบ้าน (*Musca domestica*) และหนอนเจาะสมอฝ้าย (*Helicoverpa armigera*) ปัจจุบันสารไพรีทรอยด์ถูกใช้ในการควบคุมพาหะ ยุงก้นปล่อง (*Anopheles minimus*) แต่การใช้สารไพรีทรอยด์ในระยะยาวอาจกระตุ้นให้ยุงมีการเพิ่มระดับการแสดงออกของยีน พี 450 และพัฒนาสู่การดื้อต่อสารนี้ได้ การศึกษานี้จึงแยก cDNA ของไซโตโครม พี 450 จากยุงก้นปล่องและเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของ mRNA ระหว่างยุงกลุ่มที่ดื้อสารไพรีทรอยด์และยุงที่ไม่เคยได้รับสารนี้มาก่อน

การสกัดไซโตโครม พี 450 แฟมิลีที่ 6 (*CYP6*) จากยุงก้นปล่อง ทำได้โดยแยกชิ้นส่วนของยีน *CYP6* จากยุงก้นปล่องโดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากบริเวณที่มีความเหมือนกัน (Conserved regions) ของยีน *CYP6* ที่มีรายงานในแมลงชนิดอื่น บริเวณที่เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ไพรเมอร์คือ DVIGSCAF และ ETLR motif หลังจากได้ชิ้นส่วนของยีน *CYP6* แล้ว ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับชิ้นส่วนนี้ได้สร้างขึ้นเพื่อขยายบริเวณไปสู่จุดเริ่มต้นและสิ้นสุดของการแปลรหัส และเมื่อได้ชิ้นส่วนครอบคลุมจากจุดเริ่มต้นและสิ้นสุดของ *CYP6* แล้ว ไพรเมอร์จำเพาะในบริเวณส่วนต้นและท้ายได้ออกแบบเพื่อสกัด cDNA ของ *CYP6* ที่ครอบคลุมบริเวณจากจุดเริ่มต้นและสิ้นสุดของการแปลรหัส การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ *CYP6* ที่แยกได้กับ *CYP6* ในแมลงอื่นๆ พบ Conserved regions ซึ่งมีลักษณะเหมือน *CYP6* ทั่วไป และมีความเหมือนกับ *CYP6S1* ของยุงก้นปล่อง *An. gambiae* มากที่สุดคือ 82% เราจึงสามารถตั้งชื่อ cDNA ที่สกัดได้ตามหลักการจัดจำแนกของ พี 450 ว่า *CYP6S2*

การเปรียบเทียบการแสดงออกของ *CYP6S2* ระหว่างยุงที่ดื้อสารไพรีทรอยด์และยุงที่ไม่ได้รับสารไพรีทรอยด์ไม่พบความแตกต่างในระดับ transcription ของยุงทั้ง 2 กลุ่ม โดยสามารถสรุปว่ายีน *CYP6S2* ไม่สามารถถูกเหนี่ยวนำให้เพิ่มการแสดงออกในยุงก้นปล่อง *An. minimus* ด้วยสารไพรีทรอยด์

Copyright by Mahidol University