รายงานการวิจัย

การขยายยีนและการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ kdr gene ของ ยุงก้นปล่องพาหะนำเชื้อมาลาเรีย

PCR amplification and sequence analysis of putative kdr gene fragment in *Anopheles* mosquito malaria vector

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการสภาวิจัยแห่งชาติ ผ่าน
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ประจำปีการศึกษา 2546-2548

ผู้วิจัย ละเอียด ประพันธดารา
ปรัชญา สมบูรณ์
วรรณภา สุวรรณเกิด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการสภาวิจัยแห่งชาติ ผ่านมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ประจำปีการศึกษา 2546-2548 ขอขอบคุณผู้อำนวยการสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สุขภาพ ศ.นพ.ธีระ ศิริสันธนะ ที่ได้อนุมัติเงินสมทบการวิจัยเป็นจำนวนเท่ากับ 25 % ของทุนที่ได้ ซึ่งส่วนหนึ่งนำมาจ่ายเป็นค่าจ้างผู้ช่วยนักวิจัย และในการเพิ่มศักยภาพการทำงาน เช่น จัดซื้อคอมพิวเตอร์ ขอบคุณในความร่วมมือของทีมงานกีฏวิทยา สำนักงานควบคุมโรคติดต่อนำโดยแมลงที่ 10 เชียงใหม่ กระทรวงสาธารณะสุข ในการออกสำรวจและเก็บตัวอย่างยุงเพื่อการศึกษาทดลอง ขอขอบคุณภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทย์ศาสตร์ ที่อนุเคราะห์สถานที่เพาะเลี้ยงและทดสอบยุงตัวอย่าง สุดท้ายนี้ขอขอบคุณสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สุขภาพ และเจ้าที่ทุกคนที่เกี่ยวข้องทำให้การดำเนินการวิจัยลุล่วงไปด้วยดี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รายการอักษรย่อ

CDNB	1-chloro-2,4-dinitrobenzene
DDE	1,1-dichloro-2,2-*bis*(*p*-chlorophenyl)ethylene
DDT	1,1-(2,2,2-trichloroethylidene)*bis*-(4-chlorobenzene)
DDTase	DDT dehydrochlorinase
DTT	Dithiotreitol
GSH	reduced glutathione
GST	glutathione S-transferase
LD_{50}	median lethal dose
LT_{50}	median lethal time
Kdr	knockdown resistance
An.	*Anopheles*
Bp	base pair
PCR	polymerase chain reaction
DNA	deoxyribonucleic acid
RNA	ribonucleic acid
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บทคัดย่อภาษาไทย

Sodium channel protein เป็น membrane protein ที่ทำหน้าที่ควบคุมการไหลเข้า-ออกของ sodium ion ระหว่างภายในและภายนอกเซลล์ sodium channel protein มีความเกี่ยวข้องกับการดื้อสารเคมีในแมลงต่าง ๆ รวมทั้งยุงก้นปล่อง โดยที่การเกิดกลายพันธุ์ของ sodium channel gene มีความเกี่ยวข้องกับการดื้อต่อสารเคมีฆ่าแมลง DDT และยากลุ่ม pyretrhroid กลไก การดื้อยาชนิดนี้เรียกว่า knockdown resistance หรือ kdr มีผู้ศึกษาในยุงก้นปล่องชนิด *Anopleles gambiae* ซึ่งดื้อต่อยา permethrin และ DDT พบว่ากรดอะมิโน Leucine ที่ตำแหน่ง 1014 ของ sodium channel gene เปลี่ยนเป็น Phenylalanine การศึกษาในแมลงอื่นๆก็พบมีการกลายพันธุ์เช่นเดียวกัน ผลของการค้นพบเหล่านี้ทำให้สามารถนำวิธีการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ และลำดับกรดอะมิโน มาใช้ทำนายการดื้อยาได้ คณะผู้วิจัยได้ทำการทดลองศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ IIS6 ซึ่งมีความยาวประมาณ 301 เบส ครอบคลุมบริเวณที่มักพบการกลายพันธุเมื่อดื้อยา ซึ่งจะเรียกบริเวณนี้ว่า kdr gene จากยุงก้นปล่องหลากหลายชนิด มีอยู่ 10 ชนิด ที่สามารถขยายยีนบริเวณ kdr โดยใช้ PCR primers ที่ออกแบบตามลำดับ nucleotide base จาก *Anopheles gambiae* การเปรียบเทียบลำดับ nucleotide base ของ cDNA พบว่ากลุ่มยุงก้นปล่องชนิด *An. dirus* ทั้ง 4 ชนิด และยุงก้นปล่องชนิด *An. minimus*, *An. maculatus* เหมือนกัน 100 % เหมือนกับ *An. gambiae* 87 % และเมื่อเปรียบเทียบกับยุงก้นปล่องอื่นๆ มีความเหมือนกันอยู่ในช่วง 87-94 % ในขณะเดียวกันพบว่า deduced amino acids sequence ของยุงทุกชนิดที่ศึกษามีความเหมือนกัน 100 % ผลการศึกษาครั้งนี้สรุปว่า sodium channel protein ในยุงก้นปล่องมีความสำคัญมากต่อการดำรงชีวิต จึงเป็น protein ที่มีการอนุรักษ์สูง อย่างไรก็ตามลำดับ nucleotide base ในยุงก้นปล่องแต่ละชนิดก็ยังคงเป็นลักษณะเฉพาะ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Sodium channel protein is a membrane bound protein that is responsible for controlling influx and efflux of sodium ions across cell membrane of, especially, nerve cells. Mutation of this protein has been found in DDT and pyrethroid resistance. In the mosquito *Anopheles gambiae,* resistant to DDT and permethrin, there was a specific mutation of amino acid Leucine at the position 1,014 to Phenylalanine. Similar mutation was also detected in many other insect species. This phenotype is known as knockdown resistance or kdr. Detection of point mutation on sodium channel could lead to the prediction of kdr in the mosquito vector to diseases. We have tried to use PCR primers designed for putative nucleotide sequence on IIS6 region of *An. gambiae* that is known as kdr gene to amplify the DNA prepare from various species of *Anohpeles* mosquito in Thailand. There are 10 *Anopheles speices* of which the extracted DNA was successfully amplified. Sequence analysis and comparison demonstrated the 100 % homologous sequences among the 4 species complex of *An. dirus, An. minimus* and *An. maculatus*. These sequences were 87% homologous to the sequence from *An. gambiae*. There were about 87-94% homology when compare the sequences with other A*nopheles*. Among the variation of nucleotide sequences between species of *Anopheles* mosquito, the amino acid sequences are very conserved. The results suggest that sodium channel protein is very important for survival the mosquito although nucleotide sequences are species specific.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	1
รายการอักษรย่อ	2
บทคัดย่อภาษาไทย	3
Abstract	4
สารบัญเรื่อง	5
สารบัญรูป	7
สารบัญตาราง	7
1. บทนำ	8
1.1 ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	8
1.2 การทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง (Reviewed Literature)	9
2. วัตถุประสงค์	11
3. อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	12
3.1 ยุง	12
3.2 Polymerase chain reaction amplification of putative kdr region from genomic DNA	12
การแยกสกัด Genomic DNA จากยุงตัวเดียว	12
การเพิ่มขยายปริมาณ DNAในหลอดทดลองโดยวิธี Polymerase chain reaction	13
3.3 Polymerase chain reaction amplification of putative kdr region from cDNA	14
การแยกสกัด Total RNA จากลูกน้ำยุงโดยใช้ RNeasy mini kit (QIAGEN)	14
การสังเคราะห์ first strand cDNA โดยใช้ Superscript ™ III for RT-PCR (Invitrogen)	16
3.4 การหาลำดับเบสจาก PCR Product	16
การทำให้ PCR product บริสุทธิ์ โดย QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN)	17
การเตรียม sequencing reaction	17
การทำให้ Extension product บริสุทธิ์ โดยวิธี Ethanol/EDTA Precipitation	18
4. ผลการทดลอง และวิจารณ์	19
4.1 ผลการเก็บตัวอย่างยุงจากท้องที่ต่างๆ	19
4.2 การหาค่า annealing temperature (Ta) ที่เหมาะสม	19
4.3 Specificity ของ PCR primers	21
4.4 ผลการวิเคราะลำดับ nucleotide จาก DNA ที่ขยายได้	24

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

หน้า

4.5 การศึกษาเปรียบเทียบ ลำดับ nucleotide ในยุงก้นปล่อง *An. annularis* ชนิดที่ดื้อและไม่ดื้อยา 29

5. สรุปผลการทดลอง และสรุปโครงการวิจัย 32

6. เอกสารอ้างอิง 33

7. ภาคผนวก 36

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารบัญรูป

เนื้อหา	หน้า
รูปที่ 1 โครงสร้างจำลองของ Sodium Channel Protein	11
รูปที่ 2 การทดลองการปรับเปลี่ยน annealing temperature (Ta) โดยใช้ตัวอย่างยุง *An.dirus*	20
รูปที่ 3 การทดลองการปรับเปลี่ยน annealing temperature (Ta) โดยใช้ตัวอย่างยุง *An.culicifacies*	20
รูปที่ 4 Agarose gel electrophoresis แสดง PCR products จากตัวอย่างยุง *An. tesselatus* (lane 2, 3), *An. vagus* (lane 4, 5) และ *An. kochi* (lane 6, 7) Lane 8 คือ *An. dirus* B	22
รูปที่ 5 Agarose gel electrophoresis แสดง PCR products จากตัวอย่างยุง *An. annularis*, *An. maculates* และ *An. minimus*	23
รูปที่ 6 แสดงผลการวิเคราะห์ลำดับ nucleotide ของชิ้น cDNA	25
รูปที่ 7 A) แสดงลำดับ nucleotide ของ intron กรอบแลเงาแสดงลำดับที่เหมือนกันทั้งหัวและท้ายของ intron	26
รูปที่ 7 B) แสดง aligment ของ intron ที่มีลำดับคล้ายกัน กรอบแลเงาแสดงลำดับที่เหมือนกันทั้งหัวและท้ายของ intron	26
รูปที่ 8 แสดง deduced amino acid ที่ถอดรหัสตาม cDNA ที่วิเคราะห์ได้	27
รูปที่ 9 Nucleotide sequence แสดงชิ้นส่วน cDNA บริเวณ putative kdr region ของยุงก้นปล่อง *An.gambiae*	29
รูปที่ 10 Alignment of Genomic DNA *An.annularis* DDT-resistance (Re01-05), *An.annularis* DDT-susceptible (Suscep)	30
รูปที่ 11 Alignment of cDNA *An.annularis* DDT-resistance (Re01-05), *An.annularis* DDT-susceptible (Sucep)	3

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารบัญตาราง

เนื้อหา	หน้า
ตารางที่ 1 การวิเคราะห์เทียบเคียงค่าความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ putative kdr region ของ sodium channel gene จากยุงก้นปล่องชนิดต่างๆ	28

การขยายยีนและการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ kdr gene ของ ยุงก้นปล่องพาหะนำเชื้อมาลาเรีย

PCR amplification and sequence analysis of putative kdr gene fragment in *Anopheles* mosquito malaria vector

1. บทนำ

1.1 ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

การใช้ยาฆ่าแมลงในการควบคุมประชากรยุงพาหะนำโรคมาลาเรียในประเทศไทยได้มีมานานกว่า 50 ปี ตามหนังสือที่รวบรวมเขียนโดย วรรณภา สุวรรณเกิด และสมศักดิ์ ประจักษ์วงค์ (1) กล่าวว่า โครงการควบคุมไข้มาลาเรียซึ่งเริ่มต้นในปี พ.ศ. 2494 โดยการฉีดพ่นสารเคมี DDT เพื่อลดจำนวนประชากรยุงก้นปล่อง ทำให้อัตราการตายจากไข้มาลาเรียลดลงจาก 205 คน ต่อประชากร 100,000 คน เหลือ 139 คน ต่อประชากร 100,000 คนทันที และยังลดลงถึง 43 คน ต่อประชากร 100,000 คนในปี พ.ศ. 2500 แต่อย่างไรก็ตามแม้จะได้มีการใช้ DDT ต่อมาอีกเรื่อยๆโดยเฉพาะในท้องที่ที่เป็นป่าเขาและยังคงมียุงพาหะแพร่พันธุ์ได้ ก็ปรากฏว่ายังไม่สามารถกำจัดโรคไข้มาลาเรียออกจากพื้นที่ได้อย่างสมบูรณ์ ปัญหาที่สำคัญที่ทำให้โครงการกำจัดโรคไข้มาลาเรียไม่ได้ผล มีอยู่หลายประการ เช่น การเคลื่อนย้ายประชากรในบริเวณชายแดนซึ่งประเทศเพื่อนบ้านไม่ได้มีโครงการกำจัดไข้มาลาเรียอย่างได้ผล ทำให้ยังมีผู้ป่วย และตราบใดยังมียุงพาหะ การแพร่ระบาดของโรคยังคงมีอยู่

การดื้อยาของเชื้อ *Plasmodium* ในปัจจุบันนี้ก็ยังเป็นอีกส่วนหนึ่งที่สำคัญ ทำให้การรักษาผู้ป่วยไม่ได้ผล จะเห็นได้ว่า 2-3 ปีที่ผ่านมาวารสาร เช่น TDR News (UNDP/WORLD BANK/WHO Special Programme for Reserch and Training in Tropical Diseases) ได้กล่าวถึงการเพิ่มการแพร่ระบาดของไข้มาลาเรีย อันสืบเนื่องมาจากหลายสาเหตุรวมกัน เช่น การดื้อยา การเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศโลกร้อนขึ้น และยุงพาหะดื้อต่อยาฆ่าแมลง

ในปัจจุบันนี้การฉีดพ่นสารเคมี DDT ตามผนังบ้านในท้องที่หลายแห่ง แม้ว่าจะยังคงมีผลในการควบคุมการแพร่ระบาดของไข้มาลาเรียได้เป็นอย่างดี แต่ชาวบ้านจำนวนมากได้มีการปฏิเสธการฉีดพ่นเนื่องจากไม่ชอบฝุ่นขาวของสารเคมีซึ่งจะตกค้างอยู่ตามผนังบ้าน ทำให้เป็นที่รำคาญและไม่สวยงาม นอกจากนี้กระแสต่อต้านการใช้ DDT ซึ่งมีการชี้ประเด็นการเป็นสารตกค้างในสิ่งแวดล้อม ทำให้นโยบายอันใกล้นี้ของประเทศไทยเองก็ต้องปรับปรุง ได้มีการเลือกสารเคมีตัวเลือกอื่นๆ โดยเฉพาะสารกลุ่ม pyrethroid เช่นการใช้สาร permethrin ในมุ้งชุบน้ำยา และการใช้สาร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

deltamethrin ในการพ่นละอองฝอย ข้อได้เปรียบของการใช้สารเคมี pyrethroids ได้แก่การมีพิษต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมน้อยกว่าแต่มีฤทธิ์ในการกำจัดแมลงดีกว่า และยังสลายตัวได้เร็วจึงตกค้างในสิ่งแวดล้อมน้อย

ในทางปฏิบัติการจะใช้สารเคมีตัวใดๆ อาจจะคำนึงถึงเพียงให้สามารถฆ่ายุงเป้าหมายได้หมดก็พอ แต่ในทางวิชาการนั้นจะต้องคำนึงถึงผลได้ผลเสียในระยะสั้นและยาว สารเคมี DDT และ pyrethroids ออกฤทธิ์ในการฆ่ายุงคล้าย ๆ กัน คือ มีเป้าหมายที่ Sodium channel protein ซึ่งอยู่บนผนังเซลล์รับส่งสัญญาณประสาท ผลกระทบของการใช้ DDT ในอดีต อาจทำให้มีการคัดเลือกสายพันธุ์ยุงที่มี sodium channel protein ที่ผิดปกติไปจากเดิมสามารถทนต่อสารเคมีดีดีทีได้ และขณะเดียวกันอาจมีผลเลยไปถึงการทนต่อสารเคมีไพรีทรอยด์ด้วย แม้ว่าในระยะที่ผ่านมาถึงปัจจุบันรายงานต่าง ๆ ที่ศึกษาถึงความไวของยุงก้นปล่องพาหะนำเชื้อมาลาเรียในเมืองไทย ซึ่งได้แก่ *Anopheles dirus A, An. dirus D, An. minimus A* และ *An. maculatus* พบว่ายังไม่มีการดื้อต่อ DDT จนเป็นปัญหาการควบคุม ในขณะที่ยุงก้นปล่องชนิดอื่นๆ เช่น *An. annularis* และ *An. culicifacies* พบว่ามีการดื้อต่อ DDT เป็นจำนวนมาก แต่การเตรียมข้อมูลทางวิชาการ จะทำให้สามารถตรวจสอบและแก้ไขปัญหาการดื้อยาที่อาจเกิดขึ้นในอนาคตได้

งานวิจัยที่คณะผู้วิจัยเสนอจะขอทุนดำเนินการครั้งนี้ จะทำการศึกษาลำดับ Gene sequence ของ sodium channel protein ซึ่งมีรายงานว่า point mutation บน sodium channel protein มีความเกี่ยวข้องกับการดื้อสารเคมีในแมลงต่าง ๆ รวมทั้งยุงก้นปล่องสายพันธุ์ *An. gambiae* โดยงานวิจัยนี้จะใช้ยุงชนิด *An. annularis* เป็น model สำหรับเปรียบยุงดื้อยากับยุงที่ไวต่อยา DDT และ pyrethroids นอกจากนี้จะทำการศึกษา gene sequence ของยุงพาหะ คือ *An. diirus* A, *An. minimus* A และ *An. maculatus* ด้วย

1.2 การทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง (Reviewed Literature)

ภาวะการที่แมลงต่าง ๆ ดื้อต่อสาร DDT นั้นเป็นที่ทราบกันมานาน (2) กลไกการดื้ออาจมีอยู่หลายชนิด แต่ที่สำคัญได้แก่การเพิ่มอัตรา metabolism โดยการแบ่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ Glutathione S-transferase (3) และกลไกที่รู้จักกันชื่อ knockdown resistance (kdr) (4, 5) กลไก kdr มีความเกี่ยวเนื่องกับการเปลี่ยนแปลงของอวัยวะเป้าหมาย คือ sodium channel protein บนเซลล์ประสาท เนื่องจากทั้ง DDT และสาร pyrethroid มีฤทธิ์คล้ายกันคือการทำลายที่ sodium channel protein ดั้งนั้นเมื่อมี kdr จึงมักทำให้เกิด cross-resistance ระหว่าง DDT และ pyrethroid (6) นอกจากนี้การดื้อแบบ kdr ยังแตกต่างจากการดื้อเนื่องจากการเพิ่ม metabolism คือเมื่อดื้อแล้วมันมีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมไปยังลูกหลานได้นานกว่า (6) เนื่องจากยีนที่เกี่ยวข้องมีลักษณะด้อย (recessive)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตัวอย่างของ DDT-pyrethroid cross-resistance ในยุงลาย มีรายงานมาตั้งแต่ปี 1977 (7) การศึกษาต่อมาสามารถบอกได้ว่า kdr เป็นกลไกหลักในการดื้อต่อ DDT และ pyrethroids (8) ในยุงก้นปล่อง *An. gambiae* ซึ่งเป็นพาหะสำคัญในทวีปอัฟริกา ได้มีรายงานถึงการดื้อสาร Pyrethroid มาเมื่อ ค.ศ. 1998 และ 1999 (9, 10) การศึกษา gene sequence ของ sodium channel พบ point mutation คล้ายกับแมลงอื่นๆ (11, 12)

Sodium channel protein เป็น membrane protein ที่ทำหน้าที่ควบคุมการไหลเข้า-ออกของ sodium ion ระหว่างภายในและภายนอก cell โครงสร้างของ Voltage-gated sodium channel เขียนเป็น model แสดงไว้ดังรูปที่ 1 ลักษณะโครงสร้างเป็นโปรตีนขนาดใหญ่ (transmembrane protein) ประมาณ 250 – 270 kDal ที่มีทั้งส่วนที่ฝังอยู่ใน memnbrane และส่วนที่อยู่ภายนอก ส่วนที่ยื่นออกมาภายนอก Cell membrane ทางด้านนอกของ Cell มีอยู่ 4 ส่วน (domains) เรียกชื่อเป็น domain I, domain II, domain III และ domain IV ตามลำดับ ยาฆ่าแมลง DDT และสาร pyrethroid มีฤทธิ์คล้ายกันคือการจับกับ sodium channel เป็นอวัยวะเป้าหมายทำให้สูญเสียการทำงาน ในแมลงที่ดื้อยาแบบ kdr มีการกลายพันธ์ (mutation) ของ Sodium channel gene ยุงก้นปล่อง *An. gambiae* ซึ่งเป็นพาหะสำคัญของโรคมาลาเรียในทวีปอัฟริกา ได้มีรายงานถึงการดื้อสาร Pyrethroid มาเมื่อ ค.ศ. 1998 และ 1999 (1, 2) การศึกษา gene sequence ของ sodium channel พบว่ามี point mutation คล้ายกับแมลงอื่นๆ (3, 4) คือมีการกลายพันธุ์ที่กรดอะมิโน Leucine (L) ตัวที่สองบน Domain VI เป็น Phenylalanine (F) จากการศึกษาในหลาย ๆ species พบว่าตัวโปรตีนที่ทำให้เกิดการรวมตัวเป็น sodium channel ที่ทำหน้าที่ได้ในแมลง คือ alpha-subunit จากการศึกษาในแมลงหวี่ Drosophila melanegarter พบว่ามี sodium channel 2 ชนิด คือ DSC (13, 14) และ para (15; 16) ในขณะที่การทำงานของ DSC-sodium channel ยังไม่ทราบแน่ชัด แต่มีการพบแล้วว่า para-sodium channel ทำหน้าที่เป็น voltage-gated สำหรับส่งถ่ายประจุ sodium ในระบบประสาทส่วนกลาง (17) ด้วยเหตุนี้การศึกษาถึงกลไก kdr จึงดำเนินการเฉพาะส่วนของ para-sodium channel

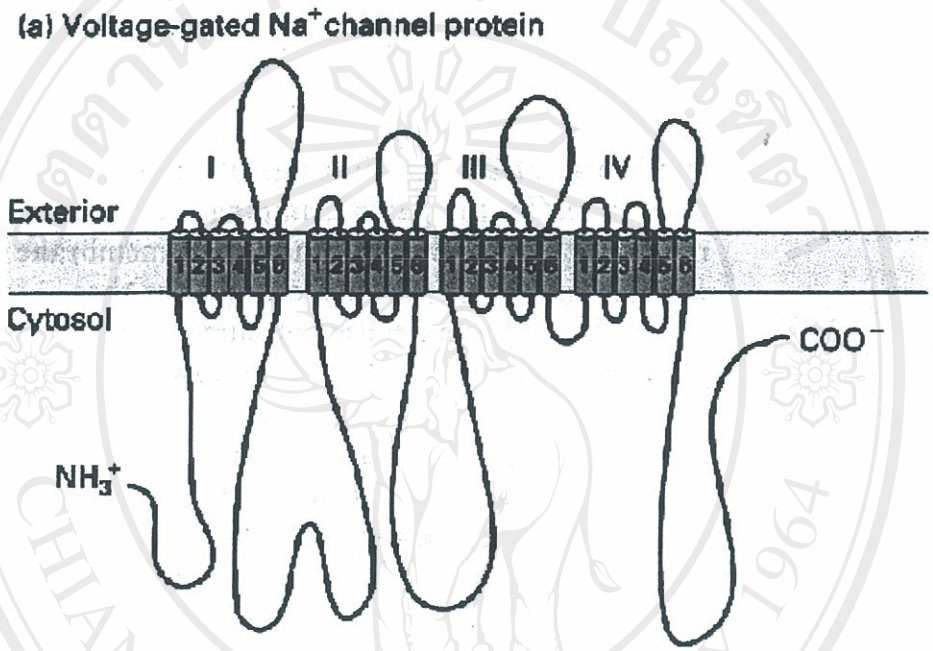
รายงานครั้งแรกที่แสดงถึงความแตกต่างๆของลำดับกรดนิวคลิอิกใน DNA ของ para-sodium channel ระหว่าง kdr และ susceptible strain เป็นการศึกษาในแมลงวัน *Musca domestica* (18) ต่อมา Dong & Scott (1997) (19) จึงได้รายงานการศึกษาในแมลงสาบ *Blattella germaanica* (12) อย่างไรก็ตามความแตกต่างของลำดับกรดนิวคลิอิกระหว่าง kdr และ susceptible strain ที่ตรวจพบในสองการทดลองนี้เป็นความแตกต่างที่ตรวจพบบริเวณยีนที่เป็น intron

มีผู้นำเทคนิค RT-PCR มาศึกษาในส่วนของ DNA ที่กำหนดลำดับกรดอะมิโนจึงได้ทราบความแตกต่างของ kdr และ susceptible sodium channel มากขึ้น ปัจจุบันนี้ ได้มีการศึกษาจำนวนมากได้รายงานถึงการเกิด mutation ของ sodium channel gene ที่เกี่ยวดื้อต่อสาร DDT และ pyretrhroid ตัวอย่าง mutation ที่พบซ้ำๆ ในกลุ่มแมลงต่างๆ คือ ข้องกับการเกิดกลไก kdr ในการการเปลี่ยนจาก Leucine เป็น Phenylalanine ที่บริเวณ IIS6 ที่เป็น transmembrane segment (11,18, 20, 21, 22)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

นอกจากนี้ยังมีการเปลี่ยน Leucine ในตำแหน่งเดียวกันนี้ไปเป็น Histidine ในกรณีของ Heliothis virescons ที่ดื้อต่อ pyrethroid (23) และ Leucine ไปเป็น serine ในยุง *Culex* ที่ดื้อค่อ DDT (24)

การศึกษาครั้งนี้เริ่มต้นจากการออกแบบ primer เลียนแบบลำดับ nucleotide ของ sodium channel gene ใน *An. gambiae* (11) และใช้ เทคนิค RT-PCR มาทำการขยาย และศึกษาชิ้นส่วนของ gene จากยุงที่พบว่ามีการดื้อยา



รูปที่ 1 โครงสร้างจำลองของ Sodium Channel Protein (หนังสือ Molecular Cell Biology โดย James Darnell, Harvey Lodish และ David Baltomore 2nd Edition, 1990 ISBN 0-7167-2078-9)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

2.1 เพื่อวิเคราะห์ลำดับ nucleotide ของ Genomic DNA บริเวณ putative kdr region ของยุงก้นปล่องชนิดต่าง ๆ

2.2 เพื่อวิเคราะห์ว่า ยุงก้นปล่อง *An. annularis* ที่ดื้อต่อยา DDT มีจำนวนหนึ่งที่ดื้อต่อยา Pyrethroid ด้วยหรือไม่ และยุงที่ดื้อยา มีลำดับกรดอะมิโนบริเวณ putative kdr ต่างจากยุงที่ไม่ดื้อยาหรือไม่

3. อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 ยุง

ยุงก้นปล่อง *An. annularis* ที่ใช้ในการทดลองจับมาจาก อำเภอเชียงดาว จังหวัดเชียงใหม่ และอำเภอเมือง จังหวัดแม่ฮ่องสอน ซึ่งผู้วิจัยเคยศึกษาพบว่า มีอัตราการดื้อต่อ DDT มาก (25) การจับยุง Adult ใช้ animal bate โดยการกางมุ้งในโรงวัว- ควาย เมื่อจับมาได้แล้ว นำกลับมายังห้อง Lab ทำการเลี้ยง โดยให้กินเลือดหนูและวางไข่เพื่อเลี้ยงเป็นลูกน้ำต่อไป ยุงตัวแก่ในรุ่น F1 ถูกแบ่งนำไปทดสอบความไวต่อ DDT และ permethrin ตาม WHO discriminating dose เพื่อหาอัตราตาย และคัดเลือกแยกเลี้ยงสายพันธุ์ดื้อยา งานส่วนนี้ ทำโดย ผศ.ดร.ปรัชญา สมบูรณ์ และคณะ ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ยุงก้นปล่องชนิด *An. dirus* B และ *An. minimus* A มีเลี้ยงอยู่ในห้องเลี้ยงแมลง ส่วนยุงก้นปล่องชนิดอื่นๆจับมาจากท้องที่ต่าง ๆ มาเพื่อการทดลองแต่ละครั้ง การจำแนก species และ species complex ของ ยุงใช้วิธีส่องกล้องดู morphology

การคัดเลือกยุง *An. annularis* เพื่อเพาะเลี้ยงสายพันธุ์ที่ดื้อต่อ DDT โดยใช้วิธี Single family selection และใช้มาตรฐาน WHO descriminating dose (4% DDT impregnated paper 30 minutes) เป็นเกณฑ์การคัดเลือก

3.2 Polymerase chain reaction amplification of putative kdr region from genomic DNA

นำลูกน้ำยุงระยะที่ 4 แต่ละสายพันธุ์มาทำการแยกสกัด genomic DNA โดยทำครั้งละตัวหลาย ๆ ครั้ง และนำ DNA นั้นมาเป็น template PCR primer และ condition ที่ใช้ในการทำ PCR ทำตามวิธี ของ Martinez-Torres et al. (1998) อาจมีการปรับเปลี่ยนเพื่อให้ condition เหมาะสมยิ่งขึ้น PCR product ถูกส่งไปทำ sequencing ยังหน่วยงานรับวิเคราะห์ BioService Unit ที่กรุงเทพฯ DNA sequence ที่ได้ นำมาศึกษาเปรียบเทียบต่อไป

การแยกสกัด Genomic DNA จากยุงตัวเดียว

1. นำยุงที่ไม่ได้กินเลือดมาใหม่ๆ บดยุง 1 ตัวใน 100 µ 1 grinding buffer
2. จากนั้นนำไป Incubate ที่ 65 °C เป็นเวลา 30 นาที และนำไปปั่นที่อุณหภูมิห้อง 14,000 rpm 10 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. เติม 3 M KOAc, pH 5.2 ปริมาตร 1/10 เท่า ของ สารละลายและนำไปปั่นที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที
4. ดูดส่วน supernatant เก็บใน 1.5 microcentrifuge tube ใหม่
5. เติม freezing cold absolute ethanol ปริมาตร 2 เท่า ของสารละลาย ผสมให้เข้ากัน
6. นำไป incubate ที่ –70 °C เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที, หรือที่ –20 °C overnight
7. นำไปปั่นที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 15 min จากนั้นดูดส่วน supernatant ทิ้งไป
8. เติม 70 % ethanol ปริมาตร 2 เท่าของสารละลาย เพื่อล้าง pellet
9. นำไปปั่น และดูดส่วน supernatant ทิ้งไป
10. เปิดฝาหลอดทิ้งไว้ที่ อุณหภูมิห้องรอจน ethanol ระเหยออกไปให้หมด
11. ละลาย DNA pellet ด้วย 100 µ l TE buffer

<u>สารเคมีประกอบด้วย</u>

1. Grinding buffer : 0.10 M NaCl, 0.02 M Sucrose, 0.01 M EDTA pH 8.0, 0.13 M Tris pH 8.0, 1% SDS
2. 3 M KOAc, pH 5.2
3. Absolute Ethanol
4. 70% Ethanol
5. TE buffer : 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0

การเพิ่มขยายปริมาณ DNAในหลอดทดลองโดยวิธี Polymerase chain reaction (PCR)

<u>สารเคมีประกอบด้วย</u>

1. 10x PCR buffer : containsTris-Cl, KCl, $(NH_4)_2SO_4$, 15 mM $MgCl_2$; pH 8.7 (20 ^{0}C)
2. 2.5 mM dNTP: 2.5 mM dATP, 2.5 mM dTTP, 2.5 mM dCTP, 2.5 mM dGTP
3. HotstarTaq (5 unit/ul)
4. Primer:

   5 uM Aed1 5' atagattccccgaccatg 3'

   5 uM Aed2 5' agacaaggatgatgaacc 3'

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

<u>การเตรียม PCR Reaction mixture</u>

ทำการเตรียม master mix โดยการเตรียมส่วนผสมทั้งหมด ยกเว้น DNA template ตามอัตราส่วนดังตาราง ดูดถ่ายส่วนผสมใส่ PCR tube ครั้งละ 48ul แล้วจึงเติม DNA template 2 ul เป็นขั้นตอนสุดท้าย

Component	volume/1 reaction	Final concentration
• 10x PCR buffer	5 ul	1x PCR buffer
• 2.5 mM dNTP	2 ul	0.1 mM dNTP
• Primer:		
5 uM Agd1	5 ul	0.5 uM Agd1
5 uM Agd2	5 ul	0.5 uM Agd2
• HotstarTaq (5 unit/ul)	0.25 ul	1.25 unit
• Distilled water	30.75 ul	
• DNA template	2 ul	
Total volume	50 ul	

Cycling Program ที่ใช้ในเครื่อง Thermal cycle (MJ Research PTC-200 Peltier Thermo Cycler)

Initial activation step: 95 ^{0}C 15 นาที

3-step cycling:

- Denaturation 95 ^{0}C 30 วินาที
- Annealing 52 ^{0}C 1 นาที
- Extension 72 ^{0}C 30 วินาที

Number of cycles: 35 cycles

Extension: 72 ^{0}C 7 นาที

3.3 Polymerase chain reaction amplification of putative kdr region from cDNA

PCR condition ใช้วิธีเดียวกับการทดลองใน genomic DNA แต่ใช้ first strand DNA เป็น Template

การแยกสกัด Total RNA จากลูกน้ำยุงโดยใช้ RNeasy mini kit (QIAGEN)

วิธีการ

1. ทำความสะอาดโกร่งและตัวบดให้สะอาด แช่ทิ้งไว้ใน 0.1 % DEPC water จากนั้นนำไป autoclave

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. นำ 30 mg ลูกน้ำยุงระยะที่ 4 (L4) มาบดในโกร่ง (แช่โกร่งและตัวบดด้วย liquid nitrogen ก่อน) ที่มี liquid nitrogen บดให้ละเอียดด้วยตัวบด คอยเติม liquid nitrogen ไม่ควรให้ผงบดละลาย
3. นำผงที่บดละเอียดแล้วใส่ลงไปใน 1.5 ml microcentrifuge tube ที่เย็น
4. เติม 600 ul RLT Buffer ทันที โดยต้องเตรียม RLT Buffer ก่อนใช้ ในอัตราส่วน 10 ul β -Mercaptoethanol (β -ME) ต่อ 1 ml RLT Buffer จากนั้นผสมให้เข้ากันโดยใช้ไปเปตดูดขึ้น-ลง
5. นำไปปั่นที่ความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที และเก็บส่วนบนใส่ใน microcentrifuge tube ใหม่
6. เติม 600 ul 70% Ethanol ลงไปและผสมให้เข้ากันด้วยไปเปต
7. เติมตัวอย่างที่เตรียมนี้ ลงไป 700 ul ใน RNeasy mini column ซึ่งมี 2 ml collection tube นำไปปั่นที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 15 วินาที จากนั้นทิ้งส่วนที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์และนำคอลัมน์ใส่ลงใน collection tube เดิม ถ้าตัวอย่างที่เตรียมมีปริมาตรมากกว่า 700 ul สามารถเติมตัวอย่างลงไปได้หลายครั้งในปริมาตรสูงสุด 700 ul โดยนำไปปั่นและทิ้งส่วนที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์
8. เติม 700 ul RW1 buffer ลงใน RNeasy mini column นำไปปั่นที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 15 วินาที และ ทิ้งส่วนที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์และ collection tube
9. นำ RNeasy mini column ใส่ลงใน collection tube ใหม่ และเติม 500 ul RPE buffer ลงใน RNeasy mini column โดยต้องเตรียม RPE Buffer ก่อนใช้ ในอัตราส่วน 4 ml Absolute Ethanol ต่อ 1 ml RPE Buffer จากนั้นนำไปปั่นที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 15 วินาที และ ทิ้งส่วนที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์
10. เติม 500 ul RPE buffer ใน RNeasy mini column อีกครั้ง จากนั้นนำไปปั่นที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที ทิ้งส่วนที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์และ collection tube
11. นำ RNeasy mini column ใส่ลงใน 1.5 ml collection tube ใหม่ ทำการ elute โดยเติม 30 ul RNase-free water โดยแตะลงบน RNeasy silica-gel membrane จากนั้นนำไปปั่นที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เก็บสารละลาย RNA ที่ได้ นำไปวัดหาความเข้มข้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

<u>สารเคมีประกอบด้วย</u>

1. 0.1 % DEPC water
2. liquid nitrogen
3. RLT Buffer:เตรียมก่อนใช้ (10 ul β -Mercaptoethanol (β -ME) ต่อ 1 ml RLT Buffer)
4. 70% Ethanol
5. RW1 buffer

6. RPE buffer: เตรียมก่อนใช้ (4 ml Absolute Ethanol ต่อ 1 ml RPE Buffer)
7. RNase-free water

การสังเคราะห์ first strand cDNA โดยใช้ Superscript ™ III for RT-PCR (Invitrogen)

วิธีการ

ปริมาตรรวมทั้งหมดของปฏิกิริยา 20 ul โดยใช้ความเข้มข้น 10 pg-5 ug ของ total RNA

1. เติมส่วนประกอบต่างๆ ดังนี้ ใน nuclease-free microcentrifuge tube:
   - 1 ul 200-500 ng of oligo$(dT)_{12-18}$
   - 10 pg-5 ug total RNA (ปริมาตรคำนวณกลับจากความเข้มข้นของ RNA)
   - 1 ul 10 mM dNTPs
   - เติมน้ำกลั่นจนครบ14 ul
2. ตั้งทิ้งไว้ที่ 65 ^{0}C เป็นเวลา 5 นาที และเมื่อครบเวลานำมาตั้งบนน้ำแข็งอย่างน้อย 1 นาที
3. จากนั้นนำไปปั่น5-10 วินาที และเติม
   - 4 ul 5X First-Stand Buffer
   - 1 ul 0.1 M DTT
   - 1 ul of superScript™ III RT (200 units/ul)
4. ผสมให้เข้ากันโดยใช้ pipette
5. ตั้งทิ้งไว้ที่ 50 ^{0}Cเป็นเวลา 50 นาที
6. หยุดปฏิกิริยาโดยการตั้งทิ้งไว้ที่ 70 ^{0}C เป็นเวลา 15 min

สารเคมีประกอบด้วย

1. 200-500 ng of oligo$(dT)_{12-18}$
2. 10 mM dNTPs
3. 5X First-Stand Buffer
4. 0.1 M DTT
5. superScript™ III RT (200 units/ul)

3.4 การหาลำดับเบสจาก PCR Product ประกอบด้วย 4 ขั้นตอน ดังนี้

- นำ PCR product ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์โดย QIAquick PCR Purification Kit ของบริษัท QIAGEN และ นำไป run agarose gel electrophoresis โดยจะต้องเห็น band ขนาด 300 bp เพียง band เดียว
- นำ PCR product ที่บริสุทธิ์แล้วมาเตรียม sequencing reaction โดยใช้ ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- นำ Extension product มาทำให้บริสุทธิ์ โดยวิธี Ethanol/EDTA Precipitation
- จัดส่ง sequencing pre-reaction ไปทำการวิเคราะห์ลำดับเบส โดยเครื่อง ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer ที่ Bioservice Unit (BSU) กรุงเทพฯ

การทำให้ PCR product บริสุทธิ์ โดย QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN)

วิธีการ

1. เติม PB buffer ลงไปใน PCR product ในอัตราส่วน PB buffer: PCR product = 5 :1 และผสมให้เข้ากัน
2. นำ QIAquick spin column ใส่ลงใน 2 ml collection tube
3. เติม ส่วนผสมของ PB buffer และ PCR product ลงไปใน QIAquick spin column ปั่นที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที
4. ทิ้งส่วนที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์ และใส่ลงในหลอดเดิม
5. เติม 750 ul PE buffer ลงไปใน QIAquick spin column ปั่นที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที
6. ทิ้งส่วนที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์ และใส่ คอลัมน์ลงในหลอดเดิม จากนั้นปั่นคอลัมน์เปล่า ที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที
7. นำ QIAquick spin column ใส่ใน 1.5 ml microcentrifuge tube
8. เติม 30 ul น้ำกลั่น ลงบริเวณกลาง QIAquick membrane ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที และปั่นที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที

การเตรียม reaction sequencing โดย ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit

Reaction mixtures:

1. Termination Ready Reaction Mix	8.0 ul
2. Primer	3.2 pmol
3. Template	
PCR product DNA : 200 - 500 bp	3 – 10 ng
4. Deionized water	เติมน้ำให้ครบ ปริมาตร 20 ul
total volume	20 ul

Cycle sequencing ที่ใช้เครื่อง Thermal cycler GeneAmp 9700

96 ^{0}C เป็นเวลา 10 วินาที

50 ^{0}C เป็นเวลา 5 วินาที

60 ^{0}C เป็นเวลา 4 นาที

จำนวน 25 รอบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทำให้ Extension product บริสุทธิ์ โดยวิธี Ethanol/EDTA Precipitation

<u>วิธีการ</u>

1. เติม Extension product ลงใน 1.5 ml microcentrifuge tube
2. เติม 5 ul 125 mM EDTA และ 60 ul Absolute ethanol ลงไป จากนั้นปิดฝา และผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที
3. นำไปปั่นที่ 14,000 rpm 15 นาที
4. ดูดส่วนบนทิ้งไป อย่างระมัดระวัง pellet อาจจะมองเห็นหรือมองไม่เห็นก็ได้
5. ล้าง pellet ด้วย 70 % Ethanol ระวัง pellet อาจจะมองเห็นหรือมองไม่เห็นก็ได้
6. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ให้ pellet แห้ง และเก็บไว้ที่ – 20 ^{0}C เพื่อรอจัดส่ง sequencing of pre-reaction ไปทำการอ่านลำดับเบส โดยเครื่อง ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer ที่ Bioservice unit (BSU)

<u>สารเคมีประกอบด้วย</u>

1. 125 mM EDTA
2. Absolute ethanol
3. 70% Ethanol

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. ผลการทดลอง และวิจารณ์

4.1 ผลการเก็บตัวอย่างยุงจากท้องที่ต่างๆ

ในการสำรวจยุงก้นปล่อง *An.annularis* ในท้องที่ต่างๆนั้น ได้ทำการเก็บตัวอย่างยุง *An.annularis* ในท้องที่ตำบลเมืองนะ อ.เชียงดาว บ้านปางไม้แดง ตำบลบ้านช้าง อ.แม่แตง และ บ้านแม่ต้อบ อ.แม่สะเรียง จ.แม่ฮ่องสอน มาทดสอบกับยาฆ่าแมลงDDT และ permethin พบว่า ยุงจากแม่แตงไม่มีการดื้อยา ส่วนยุงจากชียงดาวมีการดื้อ DDT อยู่บ้างบางส่วน แต่ไม่ดื้อต่อ permethrin ยุงก้นปล่อง *An.annularis* ที่มีเปอร์เซ็นการดื้อยาที่ มากกว่า ได้มาจากแม่สะเรียง จึงได้ทำการเพาะเลี้ยงและคัดเลือกความสามารถในการดื้อยา และจะได้นำไปทำการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับ sodium channel gene ต่อไป

สำหรับยุงก้นปล่องชนิดอื่นๆ ทีมวิจัยได้จัดส่งพนักงานกีฏวิทยา ออกไปล่อจับยุงก้นปล่องในท้องที่ต่างๆ ระหว่างเดือน ตุลาคม - ธันวาคม 2546 และพฤษภาคม ถึง ตุลาคม 2547 และ 2548 ได้ยุงก้นปล่องมาทำการทดลองจำนวน 18 ชนิด ดังนี้

An. acronitus	*An. dirus* C	*An. peditaeniatus*
An. annularis	*An. dirus* D	*An. pseudowillmori*
An. barbirostris	*An. kochi*	*An. Sawadiwongporni*
An. culicifacies	*An. maculates*	*An. sundaicus*
An. dirus A	*An. minimus*	*An. tesselatus*
An. dirus B	*An. nivipes*	*An. vagus*

4.2 การหาค่า annealing temperature (Ta) ที่เหมาะสม

การเริ่มต้นทดลองความเหมาะสมของ PCR condition ได้ลองใช้น้ำยาจาก Hotstar Tag และ Ta ที่50°C และลองทำกับตัวอย่างยุง *An. dirus* และ *An. minimus* ที่เลี้ยงไว้ในห้องเลี้ยงแมลง พบว่าสามารถได้ positive product ที่ มีเพียง 1 band เข้มบน agarose gel จากยุง *An. dirus* ส่วนใน *An. minimus* นั้นไม่แน่นอนจึงทำการทดลองปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ในระหว่าง 1- 2 mM (ซึ่งเดิมในน้ำมาตรฐานกำหนด 1.5 mM) พบว่าความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ที่ 1.5 mM ก็ดีอยู่แล้ว จึงทำการปรับเปลี่ยน Ta ตั้งแต่ 45 - 55°C โดยให้ $MgCl_2$ ที่ 1.5 mM **รูปที่ 2** แสดงผลการทดลองการปรับเปลี่ยน Ta โดยใช้ตัวอย่างยุง *An.dirus* ผลการทดลองแสดงว่า Ta 52°C เหมาะสมที่สุด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

<u>รูปที่ 2</u> การทดลองการปรับเปลี่ยน annealing temperature (Ta) โดยใช้ตัวอย่างยุง *An.dirus* 1 = 100 bp DNA ladder, 2 = Ta : 45.0 ^{0}C, 3 = Ta : 46.0 ^{0}C, 4 = Ta : 46.8 ^{0}C, 5 = Ta : 48.1 ^{0}C, 6 = Ta : 49.7 ^{0}C, 7 = Ta : 51.6 ^{0}C, 8 = Ta : 53.1 ^{0}C, 9 = Ta : 54.3 ^{0}C, 10 = Ta : 55.2 ^{0}C, 11 = Ta : 56.0 ^{0}C ลูกศรแสดงตำแหน่ง product 300 basepairs

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

<u>รูปที่ 3</u> การทดลองการปรับเปลี่ยน annealing temperature (Ta) โดยใช้ตัวอย่างยุง *An.culicifacies* 1 = 100 bp DNA ladder, 2 = Ta : 45.0 ^{0}C, 3 = Ta : 46.0 ^{0}C, 4 = Ta : 46.8 ^{0}C, 5 = Ta : 48.1 ^{0}C, 6 = Ta : 49.7 ^{0}C, 7 = Ta : 51.6 ^{0}C, 8 = Ta : 53.1 ^{0}C, 9 = Ta : 54.3 ^{0}C, 10 = Ta : 55.2 ^{0}C, 11 = Ta : 56.0 ^{0}C, 12 = *An. dirus A* control ลูกศรแสดงตำแหน่ง product 300 basepairs

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เนื่องจากการทดลองได้นำเอา sequence ของยุง *An. gambiae* มาใช้สร้าง primers โดยที่ยังไม่มีข้อมูลว่า nucleotide sequence ของ sodium channel ในยุงก้นปล่องแต่ละ species อาจจะเหมือนหรือแตกต่างกันก็ได้ การทดลองในระยะแรกซึ่งบางครั้งได้ product บางครั้งไม่ได้ หรือแม้แต่ในบาง species การไม่ได้ product ก็ไม่อาจสรุปได้ว่า sequence ไม่พอดีกัน (matching) จึงได้ทำการทดลอง gradient PCR โดยการตั้งค่าอุณหภูมิ annealing temperature (Ta) ในระดับต่างๆกัน ใน**รูปที่ 3** แสดงผลการทดลองในยุงก้นปล่อง *An. culicifacies* ผลการทดลอง แสดงว่าการปรับอุณหภูมิ Ta ไม่ได้ทำให้ได้ product ที่ดีขึ้น

4.3 Specificity ของ PCR primers

ได้ทำการทดลองนำ PCR primers (Agd1 : 5' ATAGATTCCCCGACCATG 3' ; Agd2 : 5' AGACAAGGATGATGAACC 3') ซึ่งใช้ในการขยายชิ้นส่วน sodium channel gene บริเวณที่มี point mutation ในยุงก้นปล่องชนิด *An. gambiae* ซึ่งดื้อต่อยาฆ่าแมลงกลุ่มไพรีทรอยด์ (Martinez *et al.* 1998) นำมาทำการทดลองในยุงก้นปล่องซึ่งจับจากท้องที่ต่างๆ ในจังหวัดเชียงใหม่ วัตถุประสงค์ ก็เพื่อดูว่า primer คู่เดียวกันนี้จะสามารถใช้กับยุงก้นปล่องชนิดใดได้บ้าง ซึ่งหากใช้ได้ก็แสดงว่า ลำดับกรดนิวคลิกบนเส้น DNA ของ sodium channel gene มีความคล้ายกันสูงมาก ผลการทดลอง จากการแยกสกัด genomic DNA จากยุงครั้งละตัว และนำมาเป็น DNA template ในจำนวนนี้มีเพียงยุงก้นปล่อง 10 ชนิด ที่สามารถทำ PCR ได้สำเร็จและ ได้ทำการวิเคราะห์ลำดับกรดนิวคลิกในชิ้น DNA ที่สามารถ amplify ได้โดยใช้ primers คู่ดังกล่าวข้างต้น

จากการตรวจสอบ product จาก PCR โดยใช้ agarose gel electrophoresis พบว่า DNA จากยุงตัวอย่าง *An. dirus* A, *An. dirus* B, *An. dirus* C, *An. dirus* D, *An. vagus*, *An. kochi* และ *An. tesselatus* ให้ผล PCR เป็น band เดี่ยวขนาดประมาณ 300 base pair (**รูปที่ 4**) สำหรับยุง *An. annularis*, *An. minimus* และ *An. maculatus* ให้ผล PCR มีหลาย band (**รูปที่ 5**) แสดงถึงความไม่เหมาะสมของ primers ซึ่ง band อื่นๆ ที่ ได้มา เกิดจาก nonspecific priming กับ DNA อื่นๆ แต่อย่างไรก็ตาม ภายหลังตัด band 300 bp มาทำการสกัด และ purify ก็สามารถส่งไปวิเคราะห์ลำดับ nucleotide ได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รูปที่ 4 Agarose gel electrophoresis แสดง PCR products จากตัวอย่างยุง *An. tesselatus* (lane 2, 3), *An. vagus* (lane 4, 5) และ *An. kochi* (lane 6, 7) Lane 8 คือ *An. dirus* B

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รูปที่ 5 Agarose gel electrophoresis แสดง PCR products จากตัวอย่างยุง *An. annularis*, *An. maculates* และ *An. minimus*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

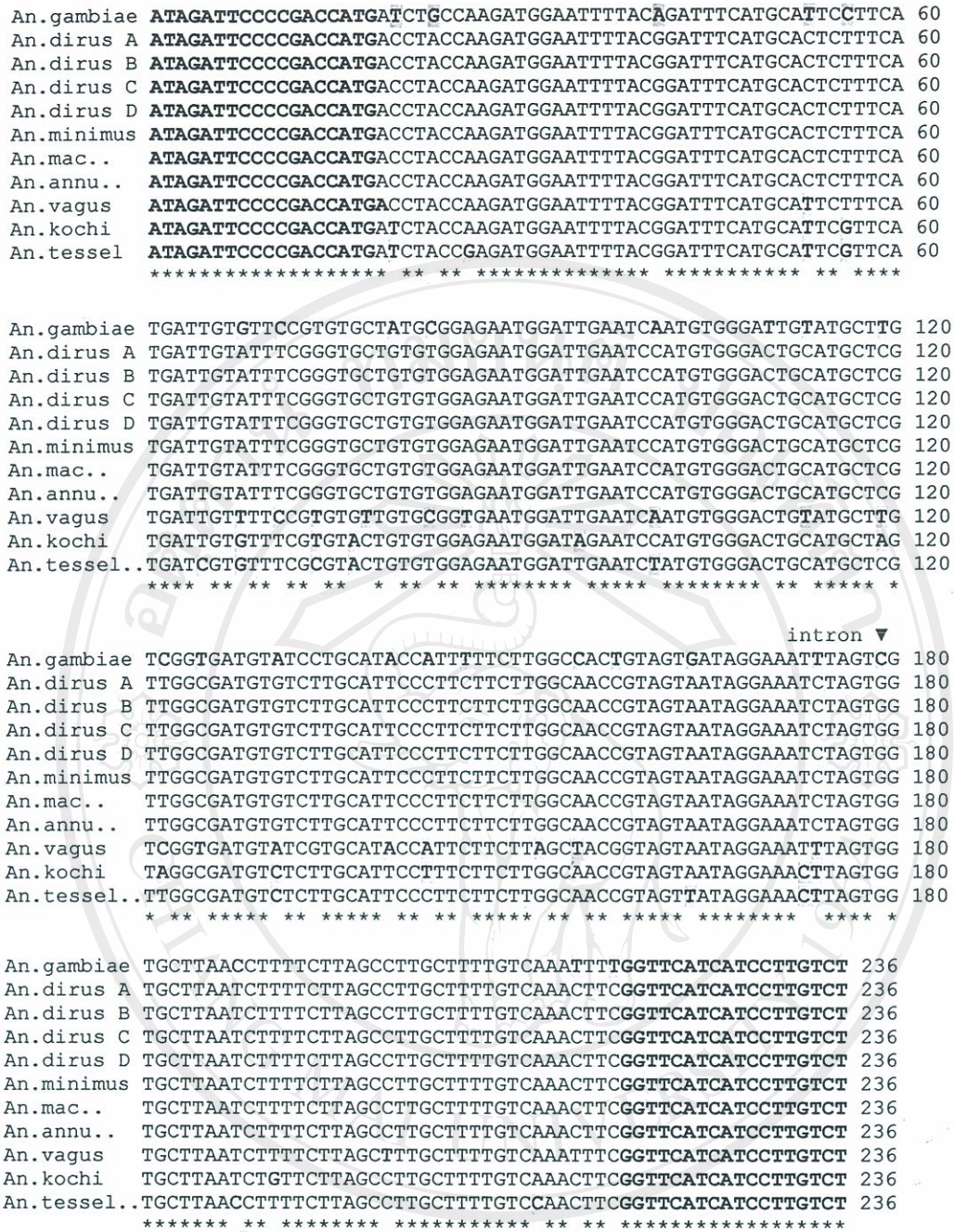
4.4 ผลการวิเคราะลำดับ nucleotide จาก DNA ที่ขยายได้

รูปที่ 6 แสดงผลการวิเคราะห์ลำดับ nucleotide ของชิ้น DNA ที่ขยายได้ โดยการทำ nucleotide sequence alignment ของชิ้น cDNA **รูปที่ 7** แสดง intron sequences และ**รูปที่ 8** แสดงลำดับกรดอะมิโนที่ถอดรหัสจาก cDNA นั้น (deduced amino acids) ผลจากการ ทำ nucleotide sequence analysis โดยใช้ Clustral method แสดงใน **ตารางที่ 1** พบว่า nucleotides มีความเหมือนกันมากกว่า 90 % ซึ่งสามารถถอดรหัสกรดอะมิโนได้เหมือนกันทุกตัว ผลการทดลองแสดงให้เห็นถึงความสำคัญของโครงสร้างพื้นฐานของ sodium channel protein ในส่วนนี้ที่ต้องอนุรักษ์ไว้แม้จะเป็นยุงต่างสายพันธุ์กัน นอกจากส่วนของ exon แล้ว ผลการวิเคราะห์ intron พบว่า กลุ่มยุงก้นปล่องชนิด *dirus* ทั้ง 4 ชนิด และยุงก้นปล่องชนิด *minimus*, *maculatus* และ *annularis* มี cDNA sequences ที่มีการอนุรักษ์สูงสุด 100 % แตกต่างจาก *An. gambiae, An. vagus, An. kochi* และ *An. tessellatus* ข้อมูลเหล่านี้อาจนำไปวิเคราะห์และอ้างอิง ในการศึกษาวิวัฒนาการของยุงก้นปล่องในแต่ละพื้นที่ได้ด้วย

Sequence ของ cDNA ดังในรูปที่ 6 ได้ส่งไปจัดเก็บเพื่อเผยแพร่ใน GenBank accession number มีหมายเลขดังนี้ (รายละเอียดแสดงไว้ในภาคผนวก)

An. dirus A	GenBank accession number	DQ026439
An. dirus B	GenBank accession number	DQ026440
An. dirus C	GenBank accession number	DQ026441
An. dirus D	GenBank accession number	DQ026442
An. minmus A	GenBank accession number	DQ026444
An. maculatus	GenBank accession number	DQ026445
An. annularis	GenBank accession number	DQ026443
An. vagus	GenBank accession number	DQ026447
An. kochi	GenBank accession number	DQ026446
An. tesselatus	GenBank accession number	DQ075250

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



<u>รูปที่ 6</u> แสดงผลการวิเคราะห์ลำดับ nucleotide ของชิ้น cDNA ที่ขยายได้ ตัวอักษรตัวหนาบริเวณหัวและท้าย คือลำดับ primers ตัวอักษรแลเงาแสดงให้เห็น nucleotide ที่แตกต่างจากพวก เครื่องหมายสามเหลี่ยมชี้ถึงตำแหน่ง intron

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

A)

```
gambiae GTAAGTAATGCAAATTAACATGGACCAAGATCGTTTTTACATGACATTGTTTTGCAG 57
dirus A GTACGTATGCGGTTAGCTTCCACCGTCGGTAGATCAACCATTAATGGTGGGCTTTTCTGTTGCAG 65
dirus B GTACGTATGCGATTAGCTTCCACCGTCGGAAGATCAATCATTAATGGTGGGTTTTCTGTTGCAG 64
dirus C GTACGTATGCGGTTAGCTTCCACCGTCGGTAGATCAACCATTAATGGTGGGCTTTTCTGTTGCAG 65
dirus D GTACGTATGCGGTTAGCCTCCACCGTCGGAAGATCAACCATTAATGGTGGGCTTTTCTGTTGCAG 65
minimus GTACGTATGCGATTAGCTTCCACCGTCGGAAGATCAATCATTAATGGTGGGTTTTCTGTTGCAG 64
mac...  GTACGTATGCGATTAGCTTCCACCGTCGGAAGATCAATCATTAATGGTGGGTTTTCTGTTGCAG 64
annu... GTACGTATGCGATTAGCTTCCACCGTCGGAAGATCAATCATTAATGGTGGGTTTTCTGTTGCAG 64
vagus   GTATGTATCAATGAAGAAACAACATGGATATGGACAAACGAGAATCTCACGGGCAGATGTTTTGCAG 66
kochi   GTACGTACGCAGATAGTTTCCAACAACGTGCAGGTCGTCATCAATCGTTGGGTTTCTCTC GCAG 64
tes GTACGTACACGGACGCCATCCAGCAGGTCCAGCAGGCAAGCCGTTCACTAACATTTGGGTTTCTCTCGCAG 70
```

B)

```
An.dirus A  GTACGTATGCGGTTAGCTTCCACCGTCGGTAGATCAACCATTAATGGTGGGCTTTTCTGTTGCAG 65
An.dirus B  GTACGTATGCGATTAGCTTCCACCGTCGGAAGATCAATCATTAATGGTGGGTTTTCTGTTGCAG 64
An.dirus C  GTACGTATGCGGTTAGCTTCCACCGTCGGTAGATCAACCATTAATGGTGGGCTTTTCTGTTGCAG 65
An.dirus D  GTACGTATGCGGTTAGCGTCCACCGTCGGAAGATCAACCATTAATGGTGGGCTTTTCTGTTGCAG 65
An.minimus  GTACGTATGCGATTAGCTTCCACCGTCGGAAGATCAATCATTAATGGTGGG-TTTTCTGTTGCAG 64
An.mac..    GTACGTATGCGATTAGCTTCCACCGTCGGAAGATCAATCATTAATGGTGGG-TTTTCTGTTGCAG 64
An.annu..   GTACGTATGCGATTAGCTTCCACCGTCGGAAGATCAATCATTAATGGTGGG-TTTTCTGTTGCAG 64
            *********** ***** ********** ******* ************* *************
```

รูปที่ 7 A) แสดงลำดับ nucleotide ของ intron B) แสดง aligment ของ intron ที่มีลำดับคล้ายกัน กรอบแลเงาแสดงลำดับที่เหมือนกันทั้งหัวและท้ายของ intron

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

```
An.gambiae  RFPDHDLPRWNFTDFMHSFMIVFRVLCGEWIESMWDCMLVGDVSCIPFFLATVVIGNLVV 60
An.dirus A  RFPDHDLPRWNFTDFMHSFMIVFRVLCGEWIESMWDCMLVGDVSCIPFFLATVVIGNLVV 60
An.dirus B  RFPDHDLPRWNFTDFMHSFMIVFRVLCGEWIESMWDCMLVGDVSCIPFFLATVVIGNLVV 60
An.dirus C  RFPDHDLPRWNFTDFMHSFMIVFRVLCGEWIESMWDCMLVGDVSCIPFFLATVVIGNLVV 60
An.dirus D  RFPDHDLPRWNFTDFMHSFMIVFRVLCGEWIESMWDCMLVGDVSCIPFFLATVVIGNLVV 60
An.minimus  RFPDHDLPRWNFTDFMHSFMIVFRVLCGEWIESMWDCMLVGDVSCIPFFLATVVIGNLVV 60
An.mac..    RFPDHDLPRWNFTDFMHSFMIVFRVLCGEWIESMWDCMLVGDVSCIPFFLATVVIGNLVV 60
An.annu..   RFPDHDLPRWNFTDFMHSFMIVFRVLCGEWIESMWDCMLVGDVSCIPFFLATVVIGNLVV 60
An.vagus    RFPDHDLPRWNFTDFMHSFMIVFRVLCGEWIESMWDCMLVGDVSCIPFFLATVVIGNLVV 60
An.kochi    RFPDHDLPRWNFTDFMHSFMIVFRVLCGEWIESMWDCMLVGDVSCIPFFLATVVIGNLVV 60
An.tessel.. RFPDHDLPRWNFTDFMHSFMIVFRVLCGEWIESMWDCMLVGDVSCIPFFLATVVIGNLVV 60
            ************************************************************

An.gambiae      LNLFLALLLSNFGSSSLS 78
An.dirus A      LNLFLALLLSNFGSSSLS 78
An.dirus B      LNLFLALLLSNFGSSSLS 78
An.dirus C      LNLFLALLLSNFGSSSLS 78
An.dirus D      LNLFLALLLSNFGSSSLS 78
An.minimus      LNLFLALLLSNFGSSSLS 78
An.mac..        LNLFLALLLSNFGSSSLS 78
An.annu..       LNLFLALLLSNFGSSSLS 78
An.vagus        LNLFLALLLSNFGSSSLS 78
An.kochi        LNLFLALLLSNFGSSSLS 78
An.tessel..     LNLFLALLLSNFGSSSLS 78
                ******************
```

รูปที่ 8 แสดง deduced amino acid ที่ถอดรหัสตาม cDNA ที่วิเคราะห์ได้

ตารางที่ 1 การวิเคราะห์เทียบเคียงค่าความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ putative kdr region ของ sodium channel gene จากยุงก้นปล่องชนิดต่างๆ

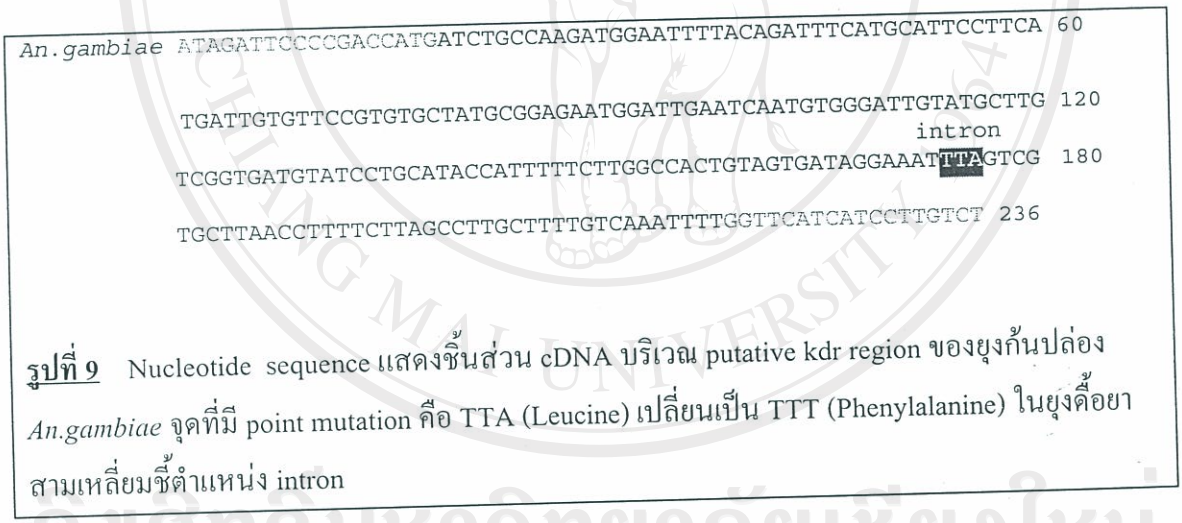
	An.gambiae	An.dirus A	An.dirus B	An.dirus C	An.dirus D	An.min…	An.mac…	An.annu…	An.vagus	An.kochi	An.tessel…
An.gambiae	87	87	87	87	87	87	87	91	88	87	
An.dirus A		100	100	100	100	100	100	90	94	93	
An.dirus B			100	100	100	100	100	90	94	93	
An.dirus C				100	100	100	100	90	94	93	
An.dirus D					100	100	100	90	94	93	
An.min…						100	100	90	94	93	
An.mac…							100	90	94	93	
An.annu…								90	94	93	
An.vagus									89	87	
An.kochi										94	
An.tessel…											

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

+4.5 การศึกษาเปรียบเทียบ ลำดับ nucleotide ในยุงก้นปล่อง *An. annularis* ชนิดที่ดื้อและไม่ดื้อยา

ตามวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ คือการศึกษาลำดับ gene sequence และ กรดอะมิโน ในยุงก้นปล่อง ***An. annularis*** ณ บริเวณที่มีรายงานว่ามี point mutation ที่เกี่ยวเนื่องกับลักษณะการดื้อต่อสารเคมีฆ่าแมลง จากการทดลองพบว่า แม้ลำดับกรดอะมิโนจะเหมือนกัน แต่ nucleotide ไม่เหมือนกันทั้งหมด การที่จะพยายามคิดค้น universal primers สำหรับการตรวจหาลักษณะการดื้อยาดังที่มีผู้เสนอทฤษฎีไว้ อาจทำไม่ได้

บริเวณที่มี point mutation (putative kdr region) ของยุงก้นปล่อง *An.gambiae* แสดงดัง **รูปที่ 9** (Martinez *et al.* 1998) คือ nucleotide sequences TTA ซึ่งถอดได้ Leucine (L) เปลี่ยนเป็น TTT ซึ่งถอดได้ Phenylalanine(F) ผลการศึกษาในยุงก้นปล่อง *An. annularis* ครั้งนี้ ไม่พบการเปลี่ยนแปลงดังกล่าว ผลการทดลองนี้อาจอธิบายได้ 2 กรณี อย่างแรกการไม่พบ mutation ดังเช่น *An. gambiae* เป็นเพราะว่า การดื้อยาในยุง *An. annularis* ครั้งนี้ เป็นการดื้อ DDT เท่านั้น แสดงว่า กลไก kdr ในยุงก้นปล่องเกิดขึ้นเฉพาะกรณีดื้อต่อยากลุ่ม pyrethroid เท่านั้น อย่างที่สอง point mutation อาจไม่เกิดในบริเวณดังกล่าว แต่อาจเกิดบริเวณอื่นๆ



รูปที่ 9 Nucleotide sequence แสดงชิ้นส่วน cDNA บริเวณ putative kdr region ของยุงก้นปล่อง *An.gambiae* จุดที่มี point mutation คือ TTA (Leucine) เปลี่ยนเป็น TTT (Phenylalanine) ในยุงดื้อยา สามเหลี่ยมชี้ตำแหน่ง intron

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รูปที่ 10 Alignment of Genomic DNA *An.annularis* DDT-resistance (Re01-05), *An.annularis* DDT-susceptible (Suscep)

บริเวณตัวหนาแสดงตำแหน่ง intron

```
SeqA Name          Len(nt)  SeqB Name          Len(nt)  Score
=============================================================
1    Re01-05   303      2    Suscep      300      83
=============================================================

Re01-05     ATAGATTCCCCGACCATGACCTACCAAGATGGAATTTTACGGATTTCATGCATTCTTTCA 60
Suscep      ATAGATTCCCCGACCATGACCTACCAAGATGGAATTTTACGGATTTCATGCACTCTTTCA 60
            ************************************************** *******

Re01-05     TGATTGTTTTCCGTGTGTTGTGCGGTGAATGGATTGAATCAATGTGGGACTGTATGCTTG 120
Suscep      TGATTGTATTTCGGGTGCTGTGTGGAGAATGGATTGAATCCATGTGGGACTGCATGCTCG 120
            ******* ** ** *** **** ** ************** *********** ***** *

Re01-05     TCGGTGATGTATCGTGCATACCATTCTTCTTAGCTACGGTAGTAATAGGAAATTTAGTGG 180
Suscep      TTGGCGATGTGTCTTGCATTCCCTTCTTCTTGGCAACCGTAGTAATAGGAAATCTAGTGG 180
            * ** ***** ** ***** ** ******** ** ** ************** ******

Re01-05     TATGTAT-CAATGAAGAAATAACATGGATATGGACAAACGAGAATTTCACTTGCTGTTGT 239
Suscep      TACGTATGCGATTAGCTTCCACCGTCGG-AAGATCAATCATTAAT---GGTGGGTTTTCT 236
            ** **** * ** *     * * * *  * *  *** *   ***     * * * ** *

Re01-05     TTTGCAGGTGCTTAATCTTTTCTTAGCTTTGCTTTTGTCAAATTTCGGTTCATCATCCTT 299
Suscep      GTTGCAGGTGCTTAATCTTTTCTTAGCCTTGCTTTTGTCAAACTTCGGTTCATCATCCTT 296
            ************************** ************** ****************

Re01-05     GTCT 303
Suscep      GTCT 300
            ****
```

รูปที่ 11 Alignment of cDNA *An.annularis* DDT-resistance (Re01-05), *An.annularis* DDT-susceptible (Sucep)

```
SeqA Name      Len(nt)  SeqB Name      Len(nt)  Score
================================================
1    Re01-05   236      2    Suscep    236      90
================================================

Re01-05         ATAGATTCCCCGACCATGACCTACCAAGATGGAATTTTACGGATTTCATGCATTCTTTCA 60
Suscep          ATAGATTCCCCGACCATGACCTACCAAGATGGAATTTTACGGATTTCATGCACTCTTTCA 60
                ************************************************** *******

Re01-05         TGATTGTTTTCCGTGTGTTGTGCGGTGAATGGATTGAATCAATGTGGGACTGTATGCTTG 120
Suscep          TGATTGTATTTCGGGTGCTGTGTGGAGAATGGATTGAATCCATGTGGGACTGCATGCTCG 120
                ******* ** ** *** **** ** ************** *********** ***** *

Re01-05         TCGGTGATGTATCGTGCATACCATTCTTCTTAGCTACGGTAGTAATAGGAAATTTAGTGG 180
Suscep          TTGGCGATGTGTCTTGCATTCCCTTCTTCTTGGCAACCGTAGTAATAGGAAATCTAGTGG 180
                * ** ***** ** ***** ** ******** ** ** *************** ******

Re01-05         TGCTTAATCTTTTCTTAGCTTTGCTTTTGTCAAATTTCGGTTCATCATCCTTGTCT 236
Suscep          TGCTTAATCTTTTCTTAGCCTTGCTTTTGTCAAACTTCGGTTCATCATCCTTGTCT 236
                ****************** ************** ********************

Re01-05    RFPDHDLPRWNFTDFMHSFMIVFRVLCGEWIESMWDCMLVGDVSCIPFFLATVVIGNLVVLNLFLALLLSNFGSSSLS 78
Suscep     RFPDHDLPRWNFTDFMHSFMIVFRVLCGEWIESMWDCMLVGDVSCIPFFLATVVIGNLVVLNLFLALLLSNFGSSSLS 78
           ******************************************************************************
```

รูปที่ 10 (หน้าก่อนนี้) แสดงการเปรียบเทียบ ลำดับ nucleotide ชิ้นส่วน genomic DNA ที่ขยายได้ **รูปที่ 11** แสดงลำดับ deduced amino acids ที่ถอดรหัสได้ *An.annularis* DDT-resistance (Re01-05) เป็นยุงที่จับได้จากแม่ฮ่องสอน และไม่ตายเมื่อนำมากักขังให้สัมผัสกับยา DDT ตามขนาดที่องค์การอนามัยโลกกำหนด *An.annularis* DDT-susceptible (Suscep) เป็นยุงที่จับได้จากตำบลเมืองนะ อำเภอเชียงดาว จังหวัดเชียงใหม่ ผลที่ได้ ลำดับกรดอะมิโนเหมือนกันทุกประการ แต่ลำดับ nucleotide แสดงถึงการมีลักษณะ polymorphic ของยุงจาก 2 ท้องที่ ผลการทำ sequence aligment ได้คะแนนความเหมือนกันเพียง 83 % โดยเฉพาะบริเวณ intron ซึ่งแตกต่างกันมาก บริเวณ putative point mutation ของยุง *An. gambiae* รหัส DNA (codon) TTA/TTT ที่ตำแหน่ง nucleotide 174-176 ของ cDNA **(รูปที่ 11)** กลายเป็น TTA/CTA ใน *An. annularis* Re01-05 และ Suscep ตามลำดับ ซึ่งถอดรหัสได้ Leucine เหมือนกัน

ลักษณะ polymorphism บน sodium channel gene หรือแม้แต่ใน gene อื่นๆ ในยุง *An. annularis* ที่พบครั้งนี้ ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อนหน้า แต่ก็มีผู้ศึกษาและพบ ลักษณะ polymorphic ใน kdr gene ในยุง *An. gambiae* เหมือนกัน (Weill *et al.* 2000) ดังนั้นผลการทดลองส่วนนี้ จะยังต้องรอการค้นคว้าเพิ่มเติม เพื่อจะดูว่า ยุงก้นปล่อง *An. annularis* จากแต่ละท้องที่จะมีลักษณะ Polymorphic และอาจนำไปสู่การจัดทำรายชื่อเป็น species complex ดังเช่น species อื่นๆ

5. สรุปผลการทดลอง และสรุปโครงการวิจัย

ในงานวิจัยครั้งนี้ ต้องการศึกษาค้นคว้าว่า ผลจากการใช้ยาฆ่าแมลง DDT ในการกำจัดและควบคุมประชากรยุงก้นปล่อง มานานกว่า 40 ปี มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมของประชากรยุงในด้านลักษณะการดื้อยาชนิด kdr (knockdown resistance) หรือไม่ ซึ่งลักษณะดังกล่าวได้มีการรายงานว่าพบในยุงชนิด *An. gambiae* จากอัฟริกา การตรวจพบ kdr ใน *An. gambiae* ทำได้โดยตรวจสอบ gene sequence ในบริเวณ domain II Segment ที่ 6 ของ sodium channel gene พบมี specific point mutation ที่ทำให้กรดอะมิโน Leucine เปลี่ยนเป็น Phenylalnine ซึ่งนิยามว่า putative kdr region เนื่องจากผลการสำรวจก่อนหน้านี้ ยุงก้นปล่องพาหะนำโรคมาลาเรียในประเทศไทย ไม่ปรากฏว่ามีการดื้อยา ยกเว้นในพาหะรองคือ *An. annularis* ดังนั้น การทดลองจึงทำใน 2 ด้าน คือ ด้านแรกทำการศึกษา gene sequence บริเวณ putative kdr region ในยุงก้นปล่องชนิดต่างๆ เพื่อดูว่า gene sequence บริเวณนี้ conserve ในระดับใด อีกด้านหนึ่งคือการทดลองตรวจหา point mutation ในยุง *An. annularis* ที่ดื้อยา

1. ผลจากการใช้ primers ที่ออกแบบตาม sequence ของ *An. gambiae* ในการขยายชิ้นส่วน DNA บริเวณ putative kdr region แล้วทำการวิเคราะห์ พบว่าการเรียงลำดับ nucleotide ของ cDNA มีความแตกต่างกันตั้งแต่ 9 – 13 % แต่ในขณะเดียวกัน deduced amino acid sequence ก็เหมือนกันทุกประการ ซึ่งตรงนี้สรุปได้ว่า peptide sequence ในส่วนนี้มีความสำคัญมากต่อยุงก้นปล่องต่างๆ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. ในการศึกษาเปรียบเทียบ DDT-resistance และ DDT-susceptible *An. annularis* ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน เหมือนอย่างใน *An. gambiae* แต่พบว่า nucleotide sequence มีลักษณะ polymorphic

6. เอกสารอ้างอิง

1. วรรณภา สุวรรณเกิด และสมศักดิ์ ประจักษ์วงศ์ (2538) ท้องที่ศึกษาความไวของยุงก้นปล่องต่อสารเคมีดีดีที ในภาคเหนือของประเทศไทย พิมพ์ที่ ส. ทรัพย์การพิมพ์ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่
2. Georgiou GP, Saito T (1983) Pest resistance to pesticides. Plenum Press, New York.
3. Prapanthadara L, Hemingway J and Ketterman AJ (1995) DDT-resistance in *Anopheles gambiae* Giles from Zanzibar, Tanzania, based on increased DDT-dehydrochlorinase activity of glutathione S-transferases. *Bull Ent. Res.* **85**: 267-274.
4. Salgado VL, Irving SN, Miller TA (1983) Depolarization of motor nerve terminals by pyrethroids in susceptible and kdr-resistant houseflies. *Pesticide Biochem. Physiol.* **20**: 100-114.
5. Williamson MS, Denholm I, Bell CA, Devonshire AL (1993) Knockdown resistance (kdr) to DDT and pyrethroid insecticides maps to a sodium channel gene locus in the housefly, *Musca domestica. Mol. Gen. Genet.* ***240***: 17-22.
6. Brown AWA (1986) Insecticide resistance in mosquito: A pragmatic review. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **2**: 123-140.
7. Chadwick PR, Slatter R, Bowron MJ (1977) Cross-reistanct to pyrethroids aand other insecticides in *Aedes aegypti. Pesstic.Sci.* **15**: 112-120.
8. Hemingway J, Boddinngton RG and Harris J (1989) Mechanisms of insecticide resistance in *Aedes aegypti* (L) from Puerto Rico. *Bull. Ent. Res.* **79**: 123-130.
9. Curtis CF, Miller JE, Hodjati HM, Kolaczinski JH, Kasumba I (1998) Can anything be done to maintain the effectiveness of pyrethroid-impregnated bednets against malaria control? *Philos Trans. R. Soc. Lond. Biol.* **353**: 1769-1775.
10. Chandre F, Damier F, Manga L, Akogbeto M, Faye O, Mouchet J, Jillet P (1999) Status of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae sensu lato. Buu. WHO* **77**: 230-234.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

11. Matinez-Torres D, Chandre F, Williamson MS, Darriet F., Berge JB, Devonshire AL, Guillet P, Pasteur N, Pauron D. (1998). Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae s.s. Insect Biochem. Mol. Biol.* **7**: 179-184.

12. Ranson H, Jensen B, Vulule JM, Wang X, Hemingway J, Collins FH (2000) Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Kenyan *Anophles gambiae* associated with resistance to DDT and pyrethroids. *Insect Mol. Biol.* **9** (5): 491-497.

13. Salkoff L, Butler A, Scavarda N, Wei A (1987a) Nucleotide sequence of the putative sodium channel gene from *Drosophila*: The fout homologous domains. *Nucleic Acids Res.* **15**: 8569-8572.

14. Salkoff L, Butler A, Wei A, Scavarda N,Giffen K, Ifune C, Goodman R, Nandel G (1987b) Genomic organization and deduced amino acid sequence of a putative sodium channel gene in *Drosophila. Science* **237**: 744-749.

15. Loughney K, Dreber R, Ganetzky B (1989). Molecular analysis of the *para* locus, a sodium channel gene in *Drosophila. Cell 58*: 1143-1154.

16. Ramaswami M, Tanouye MA (1989) Two sodium-channel genes in *Drosophila*: Implication for channel diverssty. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**: 2079-2082.

17. Stern M, Kreber R, Kanetzky B (1990) Dosage effects of a *Drosophila* sodium channel on behaviour and exonal excitability. *Genetics* **124**: 133-143.

18. Williamson MS, Martinez-Torres D, Hick CA, Devonshire AL (1996) Identification of mutations in the housefly para-type sodium channel gene associated with knockdown resistance (kdr) to pyrethroid insecticides. *Mol. Gen. Genet.* **252**: 51-60.

19. Dong K, Scott JG (1994) Linkage of kdr-type resistance and the para-homologous sodium channel gene in German cockroaches (*Blattella germanica*). *Insect Biochem. Molec. Biol.* **24**: 647-654.

20. Dong K (1997) A single amino acid change in the para sodium channel protein is associated with knockdown resistance (kdr) to pyrethroid insecticides in German cockroach. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **27**: 93-100.

21. Jamroz RC, Gerrero FD, Kammlah DM, Kunz SE (1998) Role of the kdr and super-kdr sodium channel mutations in pyrethroid resistance : correlation of allelic frequency to resistance level in wild and laboratory populations of horn flies (*Haematobia irritans). Insect Biochem. Mol. Biol.* **28**: 1031-1037.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

22. Matinez-Torres D, Foster SP, Field LM, Devonshire AL, Williamson MS (1999b) A sodium channel point mutation is associated with resistance to DDT and pyrethroid insecticides in the peach-potato aphid, *Myzus persicae*. *Insect Mol. Biol.* **8**: 39-46.

23. Park Y, Taylor MFG (1997) A novel mutation L1029H in sodium channel gene *hscp* associated with pyrethroid resistance for *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). *Insect Biiochem. Mol. Biol.* **27**: 9-13.

24. Matinez-Torres D, Chevillon C, Brun-Barale A, Berge JB, Pasteur N, Pauron D. (1999a) Voltage- dependent Na+ channels in pyrethroid-resistant *Culex pipiens* L. Mosquitoes. *Pestic. Sci.* **55**: 1012-1020.

25. Prapanthadara L, Koottatep S, Promtet N, Suwonkerd W, Ketterman AJ, Somboon P (2000) Correlation of glutathione S-transferase and DDT dehydrochlorinase activities with DDT susceptibility in *Anopheles* and *Culex* mosquitos from Northern Thailand. SouthEast Asian J Trop Med Public Health. **31** (Suppl 1), 111-117.

26. Walton C, Handley JM, Kuvangkadilok C, Collins FH, Harbach RC, Baimai V Butlin RK (1999) Identification of five species of the *Anopheles dirus* complex from Thailand using allele-specific polymerase chain reaction. *Med. Vet. Entomol.* **13**: 24-32.

27. Sharpe RG, Hims HM, Harbach RE, Butlin RK (1999) Identification of species of the *Anopheles minimus* group : allele specific amplification and single strand conformation polymorphism. *Med. Vet. Entomol.* **13**: 265-273.

28. Ranson H, Jensen B, Vulule JM, Wang X, Hemingway J, Collins FH (2000) Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Kenyan *Anopheles gambiae* associated with resistance to DDT and pyrethroids. *Insect Mol. Biol.* **9(5) :** 491-497.

29. Weill M, Chandre F, Brengues C, Manguin S, Agodbeto M, Pasteur N, Guillet P, Raymond M (2000) The *kdr* mutation occurs in the Mopti form of *Anopheles gambiae* s.s. through introgression. *Insect Mol. Biol.* **9(5) :** 451-455.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

7. ภาคผนวก

รายการลำดับ nucleotide sequences ที่ลงบันทึก GenBank

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

NCBI Nucleotide My NCBI [Sign In] [Register]
PubMed Nucleotide Protein Genome Structure PMC Taxonomy OMIM Books
Search Nucleotide for Go Clear
Limits Preview/Index History Clipboard Details
Display GenBank Show 5 Send to
Range: from begin to end Reverse complemented strand Features: SNP CDD MGC
1: DQ026439. Reports Anopheles dirus A...[gi:66276986] Links

```
LOCUS       DQ026439                236 bp    mRNA    linear   INV 24-MAY-2005
DEFINITION  Anopheles dirus A sodium channel protein mRNA, partial cds.
ACCESSION   DQ026439
VERSION     DQ026439.1  GI:66276986
KEYWORDS    .
SOURCE      Anopheles dirus A
  ORGANISM  Anopheles dirus A
            Eukaryota; Metazoa; Arthropoda; Hexapoda; Insecta; Pterygota;
            Neoptera; Endopterygota; Diptera; Nematocera; Culicoidea;
            Culicidae; Anophelinae; Anopheles.
REFERENCE   1  (bases 1 to 236)
  AUTHORS   Prapanthadara,L.-A., Somboon,P., Suwonkerd,W., Ruenkum,W., Suwan,W.
            and Yanola,J.
  TITLE     Analysis of putative kdr region of sodium channel protein in
            Anopheles mosquitoes
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 236)
  AUTHORS   Prapanthadara,L.-A., Somboon,P., Suwonkerd,W., Ruenkum,W., Suwan,W.
            and Yanola,J.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (26-APR-2005) Research Institute for Health Sciences,
            Chiang Mai University, Muang, Chiang Mai 50200, Thailand
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..236
                     /organism="Anopheles dirus A"
                     /mol_type="mRNA"
                     /db_xref="taxon:48724"
     CDS             <1..>236
                     /note="IIS4-IIS6 region"
                     /codon_start=3
                     /product="sodium channel protein"
                     /protein_id="AAY44402.1"
                     /db_xref="GI:66276987"
                     /translation="RFPDHDLPRWNFTDFMHSFMIVFRVLCGEWIESMWDCMLVGDVS
                     CIPFFLATVVIGNLVVLNLFLALLLSNFGSSSLS"
ORIGIN
        1 atagattccc cgaccatgac ctaccaagat ggaattttac ggatttcatg cactctttca
       61 tgattgtatt tcgggtgctg tgtggagaat ggattgaatc catgtgggac tgcatgctcg
      121 ttggcgatgt gtcttgcatt cccttcttct tggcaaccgt agtaatagga aatctagtgg
      181 tgcttaatct tttcttagcc ttgcttttgt caaacttcgg ttcatcatcc ttgtct
//
```

Disclaimer | Write to the Help Desk
NCBI | NLM | NIH

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

NCBI Nucleotide My NCBI [Sign In] [Register]
PubMed Nucleotide Protein Genome Structure PMC Taxonomy OMIM Books
Search Nucleotide for Go Clear
Limits Preview/Index History Clipboard Details
Display GenBank Show 5 Send to
Range: from begin to end Reverse complemented strand Features: SNP CDD MGC
Links

1: DQ026440. Reports Anopheles dirus B...[gi:66276988]

```
LOCUS       DQ026440                236 bp    mRNA    linear   INV 24-MAY-2005
DEFINITION  Anopheles dirus B sodium channel protein mRNA, partial cds.
ACCESSION   DQ026440
VERSION     DQ026440.1  GI:66276988
KEYWORDS    .
SOURCE      Anopheles dirus B
  ORGANISM  Anopheles dirus B
            Eukaryota; Metazoa; Arthropoda; Hexapoda; Insecta; Pterygota;
            Neoptera; Endopterygota; Diptera; Nematocera; Culicoidea;
            Culicidae; Anophelinae; Anopheles.
REFERENCE   1  (bases 1 to 236)
  AUTHORS   Prapanthadara,L.-A., Somboon,P., Suwonkerd,W., Ruenkum,W., Suwan,W.
            and Yanola,J.
  TITLE     Analysis of putative kdr region of sodium channel protein in
            Anopheles mosquitoes
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 236)
  AUTHORS   Prapanthadara,L.-A., Somboon,P., Suwonkerd,W., Ruenkum,W., Suwan,W.
            and Yanola,J.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (27-APR-2005) Research Institute for Health Sciences,
            Chiang Mai University, Muang, Chiang Mai 50200, Thailand
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..236
                     /organism="Anopheles dirus B"
                     /mol_type="mRNA"
                     /db_xref="taxon:123217"
     CDS             <1..>236
                     /note="IIS4-IIS6 region"
                     /codon_start=3
                     /product="sodium channel protein"
                     /protein_id="AAY44403.1"
                     /db_xref="GI:66276989"
                     /translation="RFPDHDLPRWNFTDFMHSFMIVFRVLCGEWIESMWDCMLVGDVS
                     CIPFFLATVVIGNLVVLNLFLALLLSNFGSSSLS"
ORIGIN
        1 atagattccc cgaccatgac ctaccaagat ggaattttac ggatttcatg cactctttca
       61 tgattgtatt tcgggtgctg tgtggagaat ggattgaatc catgtgggac tgcatgctcg
      121 ttggcgatgt gtcttgcatt cccttcttct tggcaaccgt agtaatagga aatctagtgg
      181 tgcttaatct tttcttagcc ttgcttttgt caaacttcgg ttcatcatcc ttgtct
//
```

Disclaimer | Write to the Help Desk
NCBI | NLM | NIH

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

NCBI Nucleotide My NCBI [Sign In] [Register]
PubMed Nucleotide Protein Genome Structure PMC Taxonomy OMIM Books
Search Nucleotide for Go Clear
Limits Preview/Index History Clipboard Details
Display GenBank Show 5 Send to
Range: from begin to end Reverse complemented strand Features: SNP CDD MGC
1: DQ026441. Reports Anopheles dirus C...[gi:66276990] Links

```
LOCUS       DQ026441                 236 bp    mRNA    linear   INV 24-MAY-2005
DEFINITION  Anopheles dirus C sodium channel protein mRNA, partial cds.
ACCESSION   DQ026441
VERSION     DQ026441.1  GI:66276990
KEYWORDS    .
SOURCE      Anopheles dirus C
  ORGANISM  Anopheles dirus C
            Eukaryota; Metazoa; Arthropoda; Hexapoda; Insecta; Pterygota;
            Neoptera; Endopterygota; Diptera; Nematocera; Culicoidea;
            Culicidae; Anophelinae; Anopheles.
REFERENCE   1  (bases 1 to 236)
  AUTHORS   Prapanthadara,L.-A., Somboon,P., Suwonkerd,W., Ruenkum,W., Suwan,W.
            and Yanola,J.
  TITLE     Analysis of putative kdr region of sodium channel protein in
            Anopheles mosquitoes
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 236)
  AUTHORS   Prapanthadara,L.-A., Somboon,P., Suwonkerd,W., Ruenkum,W., Suwan,W.
            and Yanola,J.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (27-APR-2005) Research Institute for Health Sciences,
            Chiang Mai University, Muang, Chiang Mai 50200, Thailand
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..236
                     /organism="Anopheles dirus C"
                     /mol_type="mRNA"
                     /db_xref="taxon:114091"
     CDS             <1..>236
                     /note="IIS4-IIS6 region"
                     /codon_start=3
                     /product="sodium channel protein"
                     /protein_id="AAY44404.1"
                     /db_xref="GI:66276991"
                     /translation="RFPDHDLPRWNFTDFMHSFMIVFRVLCGEWIESMWDCMLVGDVS
                     CIPFFLATVVIGNLVVLNLFLALLLSNFGSSSLS"
ORIGIN
        1 atagattccc cgaccatgac ctaccaagat ggaattttac ggatttcatg cactctttca
       61 tgattgtatt tcgggtgctg tgtggagaat ggattgaatc catgtgggac tgcatgctcg
      121 ttggcgatgt gtcttgcatt cccttcttct tggcaaccgt agtaatagga aatctagtgg
      181 tgcttaatct tttcttagcc ttgcttttgt caaacttcgg ttcatcatcc ttgtct
//
```

Disclaimer | Write to the Help Desk
NCBI | NLM | NIH

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

NCBI Nucleotide My NCBI [Sign In] [Register]
PubMed Nucleotide Protein Genome Structure PMC Taxonomy OMIM Books
Search Nucleotide for Go Clear
Limits Preview/Index History Clipboard Details
Display GenBank Show 5 Send to
Range: from begin to end Reverse complemented strand Features: SNP CDD MGC
Links

1: DQ026442. Reports Anopheles dirus D...[gi:66276992]

```
LOCUS       DQ026442                236 bp    mRNA    linear   INV 24-MAY-2005
DEFINITION  Anopheles dirus D sodium channel protein mRNA, partial cds.
ACCESSION   DQ026442
VERSION     DQ026442.1  GI:66276992
KEYWORDS    .
SOURCE      Anopheles dirus D
  ORGANISM  Anopheles dirus D
            Eukaryota; Metazoa; Arthropoda; Hexapoda; Insecta; Pterygota;
            Neoptera; Endopterygota; Diptera; Nematocera; Culicoidea;
            Culicidae; Anophelinae; Anopheles.
REFERENCE   1  (bases 1 to 236)
  AUTHORS   Prapanthadara,L.-A., Somboon,P., Suwonkerd,W., Ruenkum,W., Suwan,W.
            and Yanola,J.
  TITLE     Analysis of putative kdr region of sodium channel protein in
            Anopheles mosquitoes
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 236)
  AUTHORS   Prapanthadara,L.-A., Somboon,P., Suwonkerd,W., Ruenkum,W., Suwan,W.
            and Yanola,J.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (28-APR-2005) Research Institute for Health Sciences,
            Chiang Mai University, Muang, Chiang Mai 50200, Thailand
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..236
                     /organism="Anopheles dirus D"
                     /mol_type="mRNA"
                     /db_xref="taxon:48725"
     CDS             <1..>236
                     /note="IIS4-IIS6 region"
                     /codon_start=3
                     /product="sodium channel protein"
                     /protein_id="AAY44405.1"
                     /db_xref="GI:66276993"
                     /translation="RFPDHDLPRWNFTDFMHSFMIVFRVLCGEWIESMWDCMLVGDVS
                     CIPFFLATVVIGNLVVLNLFLALLLSNFGSSSLS"
ORIGIN
        1 atagattccc cgaccatgac ctaccaagat ggaattttac ggatttcatg cactctttca
       61 tgattgtatt tcgggtgctg tgtggagaat ggattgaatc catgtgggac tgcatgctcg
      121 ttggcgatgt gtcttgcatt cccttcttct tggcaaccgt agtaatagga aatctagtgg
      181 tgcttaatct tttcttagcc ttgcttttgt caaacttcgg ttcatcatcc ttgtct
//
```

Disclaimer | Write to the Help Desk
NCBI | NLM | NIH

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

NCBI Nucleotide My NCBI [Sign In] [Register]
PubMed Nucleotide Protein Genome Structure PMC Taxonomy OMIM Books
Search Nucleotide for Go Clear
Limits Preview/Index History Clipboard Details
Display GenBank Show 5 Send to
Range: from begin to end Reverse complemented strand Features: SNP CDD MGC
Links

1: DQ026444. Reports Anopheles minimus...[gi:66276996]

```
LOCUS       DQ026444                 236 bp    mRNA    linear   INV 24-MAY-2005
DEFINITION  Anopheles minimus sodium channel protein mRNA, partial cds.
ACCESSION   DQ026444
VERSION     DQ026444.1  GI:66276996
KEYWORDS    .
SOURCE      Anopheles minimus
  ORGANISM  Anopheles minimus
            Eukaryota; Metazoa; Arthropoda; Hexapoda; Insecta; Pterygota;
            Neoptera; Endopterygota; Diptera; Nematocera; Culicoidea;
            Culicidae; Anophelinae; Anopheles.
REFERENCE   1  (bases 1 to 236)
  AUTHORS   Prapanthadara,L.-A., Somboon,P., Suwonkerd,W., Ruenkum,W., Suwan,W.
            and Yanola,J.
  TITLE     Analysis of putative kdr region of sodium channel protein in
            Anopheles mosquitoes
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 236)
  AUTHORS   Prapanthadara,L.-A., Somboon,P., Suwonkerd,W., Ruenkum,W., Suwan,W.
            and Yanola,J.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (28-APR-2005) Research Institute for Health Sciences,
            Chiang Mai University, Muang, Chiang Mai 50200, Thailand
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..236
                     /organism="Anopheles minimus"
                     /mol_type="mRNA"
                     /db_xref="taxon:112268"
     CDS             <1..>236
                     /note="IIS4-IIS6 region"
                     /codon_start=3
                     /product="sodium channel protein"
                     /protein_id="AAY44407.1"
                     /db_xref="GI:66276997"
                     /translation="RFPDHDLPRWNFTDFMHSFMIVFRVLCGEWIESMWDCMLVGDVS
                     CIPFFLATVVIGNLVVLNLFLALLLSNFGSSSLS"
ORIGIN
        1 atagattccc cgaccatgac ctaccaagat ggaattttac ggatttcatg cactctttca
       61 tgattgtatt tcgggtgctg tgtggagaat ggattgaatc catgtgggac tgcatgctcg
      121 ttggcgatgt gtcttgcatt cccttcttct tggcaaccgt agtaatagga aatctagtgg
      181 tgcttaatct tttcttagcc ttgcttttgt caaacttcgg ttcatcatcc ttgtct
//
```

Disclaimer | Write to the Help Desk
NCBI | NLM | NIH

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

NCBI Nucleotide

My NCBI
[Sign In] [Register]

PubMed Nucleotide Protein Genome Structure PMC Taxonomy OMIM Books

Search Nucleotide for Go Clear

Limits Preview/Index History Clipboard Details

Display GenBank Show 5 Send to

Range: from begin to end Reverse complemented strand Features: SNP CDD MGC

Links

1: DQ026445. Reports Anopheles maculat...[gi:66276998]

```
LOCUS       DQ026445                236 bp    mRNA    linear   INV 24-MAY-2005
DEFINITION  Anopheles maculatus sodium channel protein mRNA, partial cds.
ACCESSION   DQ026445
VERSION     DQ026445.1  GI:66276998
KEYWORDS    .
SOURCE      Anopheles maculatus
  ORGANISM  Anopheles maculatus
            Eukaryota; Metazoa; Arthropoda; Hexapoda; Insecta; Pterygota;
            Neoptera; Endopterygota; Diptera; Nematocera; Culicoidea;
            Culicidae; Anophelinae; Anopheles; maculatus species complex.
REFERENCE   1  (bases 1 to 236)
  AUTHORS   Prapanthadara,L.-A., Somboon,P., Suwonkerd,W., Ruenkum,W., Suwan,W.
            and Yanola,J.
  TITLE     Analysis of putative kdr region of sodium channel protein in
            Anopheles mosquitoes
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 236)
  AUTHORS   Prapanthadara,L.-A., Somboon,P., Suwonkerd,W., Ruenkum,W., Suwan,W.
            and Yanola,J.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (28-APR-2005) Research Institute for Health Sciences,
            Chiang Mai University, Muang, Chiang Mai 50200, Thailand
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..236
                     /organism="Anopheles maculatus"
                     /mol_type="mRNA"
                     /db_xref="taxon:74869"
     CDS             <1..>236
                     /note="IIS4-IIS6 region"
                     /codon_start=3
                     /product="sodium channel protein"
                     /protein_id="AAY44408.1"
                     /db_xref="GI:66276999"
                     /translation="RFPDHDLPRWNFTDFMHSFMIVFRVLCGEWIESMWDCMLVGDVS
                     CIPFFLATVVIGNLVVLNLFLALLLSNFGSSSLS"
ORIGIN
        1 atagattccc cgaccatgac ctaccaagat ggaattttac ggatttcatg cactctttca
       61 tgattgtatt tcgggtgctg tgtggagaat ggattgaatc catgtgggac tgcatgctcg
      121 ttggcgatgt gtcttgcatt cccttcttct tggcaaccgt agtaatagga aatctagtgg
      181 tgcttaatct tttcttagcc ttgcttttgt caaacttcgg ttcatcatcc ttgtct
//
```

Disclaimer | Write to the Help Desk
NCBI | NLM | NIH

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

NCBI Nucleotide My NCBI [Sign In] [Register]
PubMed Nucleotide Protein Genome Structure PMC Taxonomy OMIM Books
Search Nucleotide for Go Clear
Limits Preview/Index History Clipboard Details
Display GenBank Show 5 Send to
Range: from begin to end Reverse complemented strand Features: SNP CDD MGC
1: DQ026443. Reports Anopheles annular...[gi:66276994] Links

```
LOCUS       DQ026443                 236 bp    mRNA    linear   INV 24-MAY-2005
DEFINITION  Anopheles annularis sodium channel protein mRNA, partial cds.
ACCESSION   DQ026443
VERSION     DQ026443.1  GI:66276994
KEYWORDS    .
SOURCE      Anopheles annularis
  ORGANISM  Anopheles annularis
            Eukaryota; Metazoa; Arthropoda; Hexapoda; Insecta; Pterygota;
            Neoptera; Endopterygota; Diptera; Nematocera; Culicoidea;
            Culicidae; Anophelinae; Anopheles; annularis species complex.
REFERENCE   1  (bases 1 to 236)
  AUTHORS   Prapanthadara,L.-A., Somboon,P., Suwonkerd,W., Ruenkum,W., Suwan,W.
            and Yanola,J.
  TITLE     Analysis of putative kdr region of sodium channel protein in
            Anopheles mosquitoes
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 236)
  AUTHORS   Prapanthadara,L.-A., Somboon,P., Suwonkerd,W., Ruenkum,W., Suwan,W.
            and Yanola,J.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (28-APR-2005) Research Institute for Health Sciences,
            Chiang Mai University, Muang, Chiang Mai 50200, Thailand
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..236
                     /organism="Anopheles annularis"
                     /mol_type="mRNA"
                     /db_xref="taxon:59163"
     CDS             <1..>236
                     /note="IIS4-IIS6 region"
                     /codon_start=3
                     /product="sodium channel protein"
                     /protein_id="AAY44406.1"
                     /db_xref="GI:66276995"
                     /translation="RFPDHDLPRWNFTDFMHSFMIVFRVLCGEWIESMWDCMLVGDVS
                     CIPFFLATVVIGNLVVLNLFLALLLSNFGSSSLS"
ORIGIN
        1 atagattccc cgaccatgac ctaccaagat ggaattttac ggatttcatg cactctttca
       61 tgattgtatt tcgggtgctg tgtggagaat ggattgaatc catgtgggac tgcatgctcg
      121 ttggcgatgt gtcttgcatt cccttcttct tggcaaccgt agtaatagga aatctagtgg
      181 tgcttaatct tttcttagcc ttgcttttgt caaacttcgg ttcatcatcc ttgtct
//
```

Disclaimer | Write to the Help Desk
NCBI | NLM | NIH

NCBI Nucleotide My NCBI [Sign In] [Register]
PubMed Nucleotide Protein Genome Structure PMC Taxonomy OMIM Books
Search Nucleotide for Go Clear
Limits Preview/Index History Clipboard Details
Display GenBank Show 5 Send to
Range: from begin to end Reverse complemented strand Features: SNP CDD MGC
1: DQ026447. Reports Anopheles vagus s...[gi:66277002] Links

```
LOCUS       DQ026447                236 bp    mRNA    linear   INV 24-MAY-2005
DEFINITION  Anopheles vagus sodium channel protein mRNA, partial cds.
ACCESSION   DQ026447
VERSION     DQ026447.1  GI:66277002
KEYWORDS    .
SOURCE      Anopheles vagus
  ORGANISM  Anopheles vagus
            Eukaryota; Metazoa; Arthropoda; Hexapoda; Insecta; Pterygota;
            Neoptera; Endopterygota; Diptera; Nematocera; Culicoidea;
            Culicidae; Anophelinae; Anopheles.
REFERENCE   1  (bases 1 to 236)
  AUTHORS   Prapanthadara,L.-A., Somboon,P., Suwonkerd,W., Ruenkum,W., Suwan,W.
            and Yanola,J.
  TITLE     Analysis of putative kdr region of sodium channel protein in
            Anopheles mosquitoes
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 236)
  AUTHORS   Prapanthadara,L.-A., Somboon,P., Suwonkerd,W., Ruenkum,W., Suwan,W.
            and Yanola,J.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (29-APR-2005) Research Institute for Health Sciences,
            Chiang Mai University, Muang, Chiang Mai 50200, Thailand
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..236
                     /organism="Anopheles vagus"
                     /mol_type="mRNA"
                     /db_xref="taxon:142887"
     CDS             <1..>236
                     /note="IIS4-IIS6 region"
                     /codon_start=3
                     /product="sodium channel protein"
                     /protein_id="AAY44410.1"
                     /db_xref="GI:66277003"
                     /translation="RFPDHDLPRWNFTDFMHSFMIVFRVLCGEWIESMWDCMLVGDVS
                     CIPFFLATVVIGNLVVLNLFLALLLSNFGSSSLS"
ORIGIN
        1 atagattccc cgaccatgac ctaccaagat ggaattttac ggatttcatg cattctttca
       61 tgattgtttt ccgtgtgttg tgcggtgaat ggattgaatc aatgtgggac tgtatgcttg
      121 tcggtgatgt atcgtgcata ccattcttct tagctacggt agtaatagga aatttagtgg
      181 tgcttaatct tttcttagct ttgcttttgt caaatttcgg ttcatcatcc ttgtct
//
```

Disclaimer | Write to the Help Desk
NCBI | NLM | NIH

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

NCBI Nucleotide My NCBI [Sign In] [Register]
PubMed Nucleotide Protein Genome Structure PMC Taxonomy OMIM Books
Search Nucleotide for Go Clear
Limits Preview/Index History Clipboard Details
Display GenBank Show 5 Send to
Range: from begin to end Reverse complemented strand Features: SNP CDD MGC Links

1: DQ026446. Reports Anopheles kochi s...[gi:66277000]

```
LOCUS       DQ026446                236 bp    mRNA    linear   INV 24-MAY-2005
DEFINITION  Anopheles kochi sodium channel protein mRNA, partial cds.
ACCESSION   DQ026446
VERSION     DQ026446.1  GI:66277000
KEYWORDS    .
SOURCE      Anopheles kochi
  ORGANISM  Anopheles kochi
            Eukaryota; Metazoa; Arthropoda; Hexapoda; Insecta; Pterygota;
            Neoptera; Endopterygota; Diptera; Nematocera; Culicoidea;
            Culicidae; Anophelinae; Anopheles.
REFERENCE   1  (bases 1 to 236)
  AUTHORS   Prapanthadara,L.-A., Somboon,P., Suwonkerd,W., Ruenkum,W., Suwan,W.
            and Yanola,J.
  TITLE     Analysis of putative kdr region of sodium channel protein in
            Anopheles mosquitoes
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 236)
  AUTHORS   Prapanthadara,L.-A., Somboon,P., Suwonkerd,W., Ruenkum,W., Suwan,W.
            and Yanola,J.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (29-APR-2005) Research Institute for Health Sciences,
            Chiang Mai University, Muang, Chiang Mai 50200, Thailand
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..236
                     /organism="Anopheles kochi"
                     /mol_type="mRNA"
                     /db_xref="taxon:59150"
     CDS             <1..>236
                     /note="IIS4-IIS6 region"
                     /codon_start=3
                     /product="sodium channel protein"
                     /protein_id="AAY44409.1"
                     /db_xref="GI:66277001"
                     /translation="RFPDHDLPRWNFTDFMHSFMIVFRVLCGEWIESMWDCMLVGDVS
                     CIPFFLATVVIGNLVVLNLFLALLLSNFGSSSLS"
ORIGIN
        1 atagattccc cgaccatgat ctaccaagat ggaattttac ggatttcatg cattcgttca
       61 tgattgtgtt tcgtgtactg tgtggagaat ggatagaatc catgtgggac tgcatgctag
      121 taggcgatgt ctcttgcatt cctttcttct tggcaaccgt agtaatagga aacttagtgg
      181 tgcttaatct gttcttagcc ttgcttttgt caaacttcgg ttcatcatcc ttgtct
//
```

Disclaimer | Write to the Help Desk
NCBI | NLM | NIH

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

NCBI Nucleotide My NCBI [Sign In] [Register]
PubMed Nucleotide Protein Genome Structure PMC Taxonomy OMIM Books
Search Nucleotide for Go Clear
Limits Preview/Index History Clipboard Details
Display GenBank Show 5 Send to
Range: from begin to end Reverse complemented strand Features: SNP CDD MGC
Links

1: DQ075250. Reports Anopheles tessell...[gi:68160335]

```
LOCUS       DQ075250                236 bp    mRNA    linear   INV 28-JUN-2005
DEFINITION  Anopheles tessellatus voltage-gated sodium channel mRNA, partial
            cds.
ACCESSION   DQ075250
VERSION     DQ075250.1  GI:68160335
KEYWORDS    .
SOURCE      Anopheles tessellatus
  ORGANISM  Anopheles tessellatus
            Eukaryota; Metazoa; Arthropoda; Hexapoda; Insecta; Pterygota;
            Neoptera; Endopterygota; Diptera; Nematocera; Culicoidea;
            Culicidae; Anophelinae; Anopheles.
REFERENCE   1  (bases 1 to 236)
  AUTHORS   Prapanthadara,L.-A., Somboon,P., Suwonkerd,W., Ruenkum,W., Suwan,W.
            and Yanola,J.
  TITLE     Analysis of putative kdr region of sodium channel protein in
            Anopheles mosquitoes
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 236)
  AUTHORS   Prapanthadara,L.-A., Somboon,P., Suwonkerd,W., Ruenkum,W., Suwan,W.
            and Yanola,J.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (26-MAY-2005) Research Institute For Health Sciences,
            Chiang Mai University, Muang, Chiang Mai 50200, Thailand
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..236
                     /organism="Anopheles tessellatus"
                     /mol_type="mRNA"
                     /db_xref="taxon:59161"
     CDS             <1..>236
                     /note="IIS4-IIS6 region"
                     /codon_start=3
                     /product="voltage-gated sodium channel"
                     /protein_id="AAY86758.1"
                     /db_xref="GI:68160336"
                     /translation="RFPDHDLPRWNFTDFMHSFMIVFRVLCGEWIESMWDCMLVGDVS
                     CIPFFLATVVIGNLVVLNLFLALLLSNFGSSSLS"
ORIGIN
        1 atagattccc cgaccatgat ctaccgagat ggaattttac ggatttcatg cattcgttca
       61 tgatcgtgtt tcgcgtactg tgtggagaat ggattgaatc tatgtgggac tgcatgctcg
      121 ttggcgatgt ctcttgcatt cccttcttct tggcaaccgt agttatagga aacttagtgg
      181 tgcttaacct tttcttagcc ttgcttttgt ccaacttcgg ttcatcatcc ttgtct
//
```

Disclaimer | Write to the Help Desk
NCBI | NLM | NIH

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved