บทคัดย่อ

การแยกให้บริสุทธิ์และการศึกษาคุณสมบัติของกลูตาไธโอน เอส-ทราสเฟอเรส ในยุงก้นปล่อง *Anopheles dirus* B

วิธีการแยกสกัดกลูตาไธโอน เอส-ทรานสเฟอเรสจากยุงก้นปล่อง *Anopleles gambiae* ได้ถูกนำมาปรับปรุงและใช้สำหรับยุง *An.dirus* พบว่ามี GST อยู่ 5 isoenzymes ที่แยกได้จาก *An.dirus* ได้แก่ GST-4a GST-4b GST-4c GST-5 และ GST-6 isoenzyme 3 ชนิด แรกจัดอยู่ใน Class I ของ GST ในแมลง ส่วน 2 ชนิดหลังเป็น Class II อัตราส่วนของ CDNB conjugating activity ของแต่ละ isoenzyme คิดเป็นร้อยละ 19.6 1.3 1.2 1.55 และ 2.3 ตามลำดับ ได้ทำการศึกษาคุณสมบัติทางจลน์ศาสตร์ ความจำเพาะต่อสับสะเตรท การมีปฏิกิริยากับตัวยับยั้ง และสารเคมีฆ่าแมลงชนิดต่าง ๆ พบว่า isoenzyme ทุกตัวสามารถใช้ CDNB เป็นสับสะเตรทได้เป็นอย่างดี ในขณะที่กับสับสะเตรทตัวอื่น ๆ ไม่ค่อยดีนัก isoenzyme ทุกตัวยกเว้น GST-5 สามารถเร่งปฏิกิริยา DDT-dehychochloination ได้ในระดับต่าง ๆ กัน โดยรวมแล้ว GST isoenzyme ที่แยกได้จาก *An.dirus* จะมีคุณสมบัติทางการเร่งปฏิกิริยาแตกต่างจาก *An.gambiae* เช่น GST-4a GST-4b GST-4c จาก *An.dirus* สามารถเร่ง DDT-dehychocholrination ได้ในขณะที่ enzyme เหล่านี้ที่สกัดได้จาก *An.gambiae* ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาชนิดนี้ได้ GST-6 ใน *An.dirus* มี DDT ase activity สูงที่สุดในขณะที่ใน *An.gambiae* GST-5 เป็น isoenzyme ที่มี DDT ase activity สูงสุด ผลการศึกษาปฏิกิริยาต่อสารเคมีฆ่าแมลงพบว่า GST ใน *An.dirus* สามารถมีปฏิกิริยากับสารเคมีฆ่าแมลงได้ดีมาก ในการศึกษาครั้งก่อนนั้นใน *An.dirus* ได้มีการแยก GST-4a ให้บริสุทธิ์และนำไปศึกษาคุณสมบัติ (Prapanthadara et. al. Characterization of the major form of glutathione S-transferase in the mosquito *An. dirus*. Insect Biochem. Molec. Biol. 1996, 26: 277-285) ส่วนในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการสกัด GST-4c ให้บริสุทธิ์ isoenzyme นี้ มีค่า V 23.2 umole/min/mg ค่า Km CDNB 0.08 mM และ Km GSH 0.18 mM จากการศึกษา I50 พบว่า GST-4c มีคุณสมบัติเป็น heterozygous ซึ่งอาจจะประกอบด้วยหน่วยย่อยสองหน่วยที่ไม่เหมือนกัน

ABSTRACT

Purification and characterization of glutathione S-transferases from the mosquito *Anopheles dirus* species B

The method for isolation of glutathione S-transferase (GST) isoenzymes from *Anopheles gambiae* was slightly modified and employed for the Thai mosquito, *An. dirus* B. There were 5 isoenzymes fractionated, GST-4a, GST-4b, GST-4c, GST-5 and GST-6. The first three isoenzymes belong to insect class I GST and the last two are class II. The percent constitution of each isoenzyme to the total measured CDNB conjugating activity in this species are 19.6, 1.3, 1.2, 1.55 and 2.3 for GST-4a, GST-4b, GST-4c, GST-5 and GST-6 respectively. All these isoenzymes were partially characterized with substrates, inhibitors and various insecticides. All the isoenzymes prefer CDNB as the electrophilic substrates with very low or no detectable activity with other GST general substrates. All the isoenzymes except GST-5 can metabolize DDT to different extents. The *An. dirus* isoenzymes act differently from the correspondent isoenzymes purified from *An. gambiae*. Class I GSTs, GST-4a, GST-4b and GST-4c from the *An. dirus* catalysed DDT-dehydrochlorination whereas *An. gambiae* isoenzymes did not. The majority of DDTase activity in *An. dirus* present in GST-6 instead of in GST-5 as reported for the *An. gambiae*. Inhibition study of *An. dirus* GSTs demonstrates a stronly interaction with various insecticides. GST-4a had been earlier purified and characterized (Prapanthadara *et al. Insect Biochem. Mol. Biol.* **26:** 3, 277-285, 1996). In this paper the second GST iseonzyme of anopheline speicies, GST-4c, is biochemically purified to homogeneity according to SDS-PAGE. The maximum velocity (V), K_mGSH and K_mCDNB are 23.2 μmole/min/mg, 0.18 mM and 0.08 mM respectively. Simple I_{50} study of the GST-4c suggests the heterozygous properties of the isoenzyme. It is probably compose of the two distinct subunits.