

OPTIMIZATION OF A METHOD FOR GENOMIC DNA EXTRACTION FROM IXODIDAE TICKS

OPTIMIZAREA UNEI METODE DE EXTRACȚIE A ADN GENOMIC DE LA UNELE CĂPUȘI IXODIDE

MARIANA IONI¹, I.L. MITREA¹, O. ONOFREI²,
DOINI A ISPAS³, LENU A DASCALU⁴

¹Facultatea de Medicină Veterinară București
²D.S.V.S.A. Suceava, ³Bio-Rad Laboratories, ⁴IDS București
ionitamary@yahoo.com

Key words: ticks, extraction, genomic DNA

Cuvinte cheie: ixodide, extracție, ADN genomic

SUMMARY

A method for DNA extraction from ticks (*Acari: Ixodidae*) was optimized for molecular detection of some tick-borne pathogens. Two different methods for DNA extraction from *Ixodes ricinus* were evaluated, using *AquaPure Genomic DNA Tissue Kit* (Bio-Rad Laboratories). In the first method, the samples were mechanically crushed, and in the second method the samples were treated with 0.7M ammonium hydroxide; afterwards, in both methods, the protocol included: lysis and enzymatic digestion by proteinase K, treatment with *Chelex resin*, and then with Rnase, followed by protein precipitation, and DNA precipitation with isopropanol. The most efficient DNA extraction was obtained with the first method, the mechanical destruction of the polysaccharide chains of the chitin of the ticks exoskeleton, assuring a good genomic DNA extraction. The efficacy of DNA extraction and the DNA quality were evaluated by Polymerase Chain Reaction amplification of the tick mitochondrial 16S rDNA gene, using tick-specific primers. The validity of the results and the specificity of the primers were confirmed.

REZUMAT

În scopul realizării unor studii de detecție moleculară a unor agenți patogeni transmiși de unele artropode hematofage, s-a optimizat o metodă de extracție a ADN genomic de la unele ixodide - *Ixodes ricinus*. A fost evaluată eficacitatea extracției ADN genomic prin două metode: prelucrare mecanică prealabilă a artropodelor, respectiv tratare inițială cu soluție de hidroxid de amoniu, la ambele variante aplicându-se ulterior un protocol comun de extracție ADN - protocolul AquaPure modificat (liză și digestie enzimatică cu proteinază K, tratare cu *Chelex100 resin*, urmat de precipitare proteică și, în final, precipitarea ADN cu isopropanol). Eficacitatea extracției și calitatea ADN-ului obținut au fost evaluate prin amplificarea prin PCR a unui alicot din ADN extras utilizând primeri specifici pentru căpușe. Analiza produselor de amplificare a confirmat eficiența foarte bună a metodei de extracție a ADN genomic bazată pe prelucrarea mecanică a probelor înainte de digestia enzimatică, în combinație cu o etapă de purificare cu Chelex 100. Lipsa reacțiilor nespecifice și calitatea semnalelor obținute confirmă calitatea ADN extras (liber de inhibitori de Taq polimerază) și garantează totodată atât utilizarea acestuia în studiile ulterioare de detecție moleculară specifică a unor agenți patogeni transmiși de ixodide, cât și candidatura la calitatea de control intern de amplificare în studiile menționate.