

### Сравнение протоколов экстракции ДНК из клещей *Ixodes ricinus*, сохраненных различными методами

Мовилэ А. А., канд. биол. наук, Институт зоологии АН Молдовы, ул. Академией, 1, оф. 322–324, MD-2028, мун. Кишинэу, Республика Молдова

В работе рассматриваются различные методы экстракции ДНК из голодных и напившихся иксодовых клещей *Ixodes ricinus*, сохраненных тремя различными способами. Показано, что выделение ДНК из напившихся иксодид целесообразно проводить коммерческим набором реактивов. В то же время для выделения ДНК из большой партии материала голодных клещей, в целях экономии времени и средств, подходит 0,7М гидроксид аммония.

Известно, что для проведения долгосрочного прогноза развития эпидемиолого-эпизоотологической ситуации по клещевым зооантропонозам необходимо своевременное тестирование на присутствие их возбудителей в организме иксодовых клещей. В настоящее время разработаны различные диагностические методы диагностики клещей на зараженность трансмиссивными микроорганизмами, включающие в себя микроскопические, бактериологические и иммунологические методы исследования. Однако большинство этих тестов часто дают фальш-результат или кросс-реакцию с другими патогенами. В связи с этим, определение патогенов в организме клеща с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) в комбинации с различными другими методами молекулярной биологии является наиболее распространенным способом диагностики. Применение данного метода снижает вероятность ошибки до минимума и позволяет точно диагностировать не только природу возбудителя, но и его мутантные формы.

Максимальная точность ПЦР-результатов возможна благодаря экстракции ДНК из организма клеща, что всегда сопровождается определенными трудностями. Во-первых, известно, что клещи имеют наружный хитиновый экзоскелет, который должен быть разрушен до начала экстракции; во-вторых, по неизвестным причинам, ДНК, экстрагированная из клещей, быстро деградирует; в-третьих, в организме как напившихся кровью, так и голодных клещей часто присутствуют

ингибиторы фермента *Taq*-полимеразы [2]. Эти факторы могут играть существенную роль в снижении точности ПЦР-амплификации и получении фальш-результатов.

В настоящее время имеется большое разнообразие технических приемов экстракции ДНК, например экстракции при помощи различных коммерческих китов (*kits*), используемых в молекулярно-биологической диагностике. Кроме того, существуют более дешевые и не менее эффективные методы экстракции ДНК из иксодид. Известно, что важную роль играет способ сохранения материала для проведения молекулярно-генетического тестирования.

Целью нашей работы было сравнение экстракции ДНК из иксодовых клещей, сохраненных различными методами, с использованием классических методов и коммерческих наборов.

#### Материал и методы

Для эксперимента были использованы голодные и напившиеся клещи лабораторной колонии нимф *Ixodes ricinus*, которые были сохранены тремя разными методами: сухой материал, в 70%-ном этиловом спирте и замороженные при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$ . В качестве контроля были использованы живые клещи.

Экстракция ДНК осуществлялась тремя различными методами: гидроксидом аммония, методом Бума и коммерческим набором ISOQuick DNA extraction kit, ORCA Research, Bothell, WA.

*Экстракция ДНК гидроксидом аммония.*

Цельных иксодовых клещей помещали в 100 мкл 0,7 М раствор гидроксида аммония и оставляли на пять минут при комнатной температуре. Затем пробирки помещали на 15 минут в термостат и выдерживали при температуре в 100°C. После этого пробирки доставали из термостата, центрифугировали и заново помещали в термостат при температуре 100°C на 15 минут. Полученный раствор ДНК сохраняли при температуре -20°C.

*Экстракция ДНК методом Бума.*

1. Предварительно тело клеща разрезали на 6–8 кусочков с использованием одноразового стерильного скальпеля, а затем переносили в стерильную пробирку объемом 1,5 мл, содержащую 250 µl лизирующего буфера (1 М Tris-HCl, 0.5M EDTA, 6M guanidine hydrochloride, 0.5% Triton X-100), 250 µl воды и 50 µl протеиназы К.

2. Полученный раствор инкубировали при температуре 60°C на термошейкере с частотой оборотов 1400 rpm в течение 12 часов. Затем в пробирку добавляли суспензию диатомовой земли объемом 40 µl и инкубировали при 37°C в течение 1 часа на термошейкере с частотой оборотов 1400 rpm.

3. После инкубирования пробирки центрифугировали в течение 20 секунд. Надосадочный раствор сливали. Осадок промывали дважды 900 µl 70%-ного этанола и центрифугировали в течение 20 секунд. Надосадочная жидкость не использовалась.

4. В пробирку вносили 900 µl ацетона и просушивали в термошкафу в течение 20 минут при температуре в 50°C.

5. После сушки в пробирку вносили 90 µl TE буфера и инкубировали при 60°C на термошейкере в течение 20 минут при частоте оборотов в 1000 rpm.

6. Полученный раствор переносили в чистую пробирку и сохраняли при температуре -20°C.

*Экстракция коммерческим набором реактивов ISOQUICK kit (ORCA Inc.).*

Индивидуальных иксодовых клещей помещали в стерильные 1,5-миллиметровые пробирки Eppendorf и проводили экстракцию согласно рекомендациям производителя.

*Оценка успеха экстракции.* Успех экстракции ДНК тестировался методом ПЦР с использова-

нием митохондриального маркера 12S рРНК для иксодовых клещей [1].

**Результаты и обсуждение**

Как и ожидалось, высокий процент выхода ДНК дает коммерческий набор реактивов (Таблица 1). Однако данный метод является дорогостоящим и его использование оправдывает себя только в том случае, если экстракция осуществляется из долго хранящегося или особо ценного материала.

ДНК из фиксированных в спирту голодных клещей хорошо выделялась с использованием гидроксида аммония. Однако данный способ был слабо эффективен для иксодид, содержащих кровь в организме (Таблица 1). Технически эта процедура не очень сложна и не требует наличия особого оборудования, а также не нуждается в больших финансовых затратах. Важно отметить, что нами была отмечена быстрая деградация ДНК после экстракции гидроксидом аммония, поэтому полученный экстракт необходимо тестировать как можно скорее.

Метод Бума, основанный на очистке ДНК кремнеземом, представляет особый интерес для экстракции нуклеиновой кислоты из клещей, содержащих в своем организме кровь позвоночного хозяина (Таблица 1). Полученный экстракт хорошо амплифицировался, однако, только из материала, сохраненного в 70%-ном спирте. Важно отметить, что из-за большого количества промежуточных этапов, метод не безопасен в связи с вероятностью контаминации ДНК, что следует учитывать при выборе этого технического протокола.

Обобщая полученные результаты, можно заключить, что идеальной технологией сохранения материала для молекулярно-генетических исследований является использование 70%-ного этилового спирта. В случае необходимости экстракции ДНК из большого количества материала, целесообразно использовать метод выделения гидроксидом аммония. Однако экстрагированные нуклеиновые кислоты подвергаются быстрой деградации.

**Список использованной литературы**

1. Movila A., Rolain J.M., Podavalenko A., Toderas I., Tkachenco L., Naglov V., Raoult D. Detection of spotted fever group rickettsiae and

## Сравнительная характеристика методов экстракции ДНК из клещей *Ixodes ricinus*, сохраненных различными способами

Метод экстракции	Метод сохранения	Результаты эксперимента			
		Всего исследовано		Положительная амплификация, % (p < 0.05)	
		голодные	напитавшиеся	голодные	напитавшиеся
Гидроксид аммония	живые клещи (контроль)	50	50	100%	3%
	70%-ный этанол	50	50	100%	2,4%
	замороженные	50	50	100%	2,4%
	сухие	50	50	20%	0%
Метод Бума	живые клещи (контроль)	50	50	100%	85%
	70%-ный этанол	50	50	100%	74%
	замороженные	50	50	100%	85%
	сухие	50	50	62%	4%
Коммерческий набор ISOQuick	живые клещи (контроль)	50	50	100%	86%
	70%-ный этанол	50	50	100%	86%
	замороженные	50	50	100%	86%
	сухие	50	50	100%	86%

family Anaplasmataceae in *Ixodes ricinus* ticks from Republic of Moldova and Eastern Ukraine // Clinical microbiology and Infection, 2009, vol. 15, suppl 2, p. 32–33.

**2. Schwartz I., Varde S., Nadelman R.B., Wormser G.P., Fish D.** Inhibition of efficient polymerase chain reaction amplification of *Borrelia burgdorferi* DNA in blood-fed ticks // The American journal of tropical medicine and hygiene, 1997, vol. 56, no. 3, p. 339–342.

of received data, we can conclude that commercial extraction kit is useful for DNA extraction from all kind of research. However, in case of large amount of DNA extraction from questing ticks, the cheap DNA extraction by 0.7 M hydroxide ammonium is useful.

### Comparison of DNA extraction protocols from variously preserved *Ixodes ricinus* ticks

*Movila A. A. PhD, Institute of zoology, Moldova Academy of Sciences*

In the present study 3 DNA extraction methods from variously conserved questing and engorged *Ixodes ricinus* ticks have been compared. On the basis