



团 体 标 准

T/GDAAV 0212—2025

鸡球虫卵囊基因组 DNA 提取方法

Isolation of Genomic DNA From Avian Coccidia Oocysts

（公开征求意见稿）

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX 实施

广东省畜牧兽医学会 发 布

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由广东省农业科学院动物卫生研究所、广东省畜牧兽医学会提出。

本文件由广东省畜牧兽医学会归口。

本文件起草单位：广东省农业科学院动物卫生研究所、中农华威制药股份有限公司。

本文件主要起草人：蔡海明、孙铭飞、游锡火、廖申权、戚南山、李 娟、林栩慧、吕敏娜、宋勇乐、陈祥杰、朱易斌、张健骅、何钦义、曾徐浩。

鸡球虫卵囊基因组 DNA 提取方法

1 范围

本文件规定了鸡球虫卵囊基因组DNA的提取方法及技术要求。本文件适用于实验室条件下对鸡球虫进行分子生物学鉴定及其他相关基因组分析。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本使用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB 19489—2008 实验室生物安全通用要求

GB/T 6682—2008 分析实验室用水规格和试验方法

SN/T 4629—2016 检疫性有害生物凭证标本核酸制备

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 缩略语

下列缩略语适合本文件。

PBS：磷酸盐缓冲生理盐水（Phosphate buffered saline）

TE：TE缓冲液（TE buffer），由Tris（最常用的pH 缓冲试剂）和EDTA（二价金属离子螯合剂）两种试剂组成

CTAB：十六烷基三甲基溴化铵（Cetyltrimethylammonium bromide）

Tris-HCl：三羟甲基氨基甲烷盐酸盐（Tris hydrochloride）

EDTA：乙二胺四乙酸（Ethylenediaminetetraacetic acid）

NaCl：氯化钠（Sodium chloride）

NaAc：乙酸钠（Sodium acetate）

OD：光密度（Optical density）

5 操作程序

5.1 样品前处理与纯化

5.1.1 粪便样品前处理与纯化

采集新鲜鸡粪样品，加入5~10倍体积的清水或生理盐水，充分振荡混匀。使用多层纱布或标准筛（80目或100目）过滤，去除粪渣和粗颗粒。收集滤液，1500g离心10min，弃上清。用饱和NaCl溶液重

悬沉淀，充分混匀后，以800~1000g离心10min。卵囊会漂浮于液面。仔细收集上层液体，加入5~10倍体积清水，混匀后1500g离心10min，弃上清。重复清水洗涤步骤3~5次，以充分去除饱和盐溶液，收集处理后的卵囊沉淀备用。

5.1.2 纯化及保存卵囊样品前处理

取约 1×10^3 个纯化后或保存于2.5%重铬酸钾溶液的鸡球虫孢子化卵囊，置于1.5mL离心管中，12000g离心5min，弃上清；沉淀以1mL PBS缓冲液洗涤3次，12000g离心5min，弃上清；沉淀以200 μ L 20%次氯酸钠溶液重悬，混匀，冰浴条件下放置30min；沉淀以1mL无菌去离子水洗涤3次，12000g离心5min，弃上清，收集处理后的卵囊备用。

5.2 样品的裂解

5.2.1 玻璃珠处理法

取4.1处理后收集的卵囊沉淀，以200 μ L TE缓冲液（pH8.0）重悬；加入200mg直径0.8~1mm无菌玻璃珠，以漩涡振荡器最大转数，振荡5~10min，显微镜下观察孢子囊和子孢子释放情况，确认卵囊壁破碎率大于90%后，取上清液；加入600 μ L CTAB溶液（pH8.0）、1/40体积的蛋白酶K溶液，65℃水浴作用1h，备用。

5.2.2 裂解液处理法

取4.1处理后收集的卵囊沉淀，以10 μ L次氯酸钠溶液，4℃孵育1.5h；加入35 μ L饱和NaCl溶液，55℃孵育1h，3100g离心10min，取上清，备用。

5.3 基因组 DNA 提取

5.3.1 酚-氯仿法

本方法为经典的基因组DNA提取方法，适用于获取高纯度、高分子量的DNA，可用于PCR、基因组测序及文库构建等后续实验。

取4.2.1处理后的CTAB裂解原液，加入400 μ L无菌去离子水，12000g离心5min，取上清液；加入等体积苯酚，上下颠倒混匀，12000g离心5min，取上清；加入等体积苯酚：氯仿：异戊醇溶液（25：24：1），上下颠倒混匀，12000g离心5min，取上清；加入等体积氯仿：异戊醇溶液（24：1），上下颠倒混匀，12000g离心5min；将上清转移至新的1.5mL离心管中，加入1/10体积的3M NaAc（pH5.2）、2倍体积预冷无水乙醇，混匀，-20℃放置20~30min，12000g离心10min，弃上清；以70%乙醇洗涤DNA沉淀，重复洗涤过程，弃上清；室温干燥后，加入50 μ L无菌去离子水或TE缓冲液（pH8.0）溶解DNA，备用。

5.3.2 DNA 提取试剂盒

本方法适用于快速、批量提取基因组DNA，操作简便，提取的DNA适用于PCR及常规分子生物学检测。

取4.2裂解后的溶液，按动物组织或粪便样品基因组DNA提取试剂盒进行基因组DNA的提取、纯化。

5.3.3 热处理法提取 DNA

本方法为快速简易提取方法，DNA产物纯度较低，但可满足常规PCR检测的需求。

取4.1处理后收集的全部卵囊沉淀，以200 μ L TE缓冲液（pH8.0）重悬；加入200mg直径0.8~1mm无菌玻璃珠，以漩涡振荡器最大转数，振荡5~10min，显微镜下观察孢子囊和子孢子释放情况，大部分卵囊壁破碎后，取上清液；裂解后的溶液转移至新的离心管，99℃孵育5min，5200g离心5min，取上清液，备用。

5.4 基因组 DNA 提取质量的检测

5.4.1 基因组 DNA 浓度检测

以紫外分光光度法检测DNA浓度。以溶解DNA的溶液为参比，测定DNA样品在260 nm的吸光值。当OD₂₆₀值为1.0时，相当于50 μg/mL的双链DNA，要求提取基因组DNA浓度大于20ng/μL。若未达到要求的浓度，可浓缩DNA样品；若OD₂₆₀值>1.0时，需对高浓度DNA样品进行稀释。

5.4.2 基因组 DNA 纯度评价

以紫外分光光度法检测DNA纯度。以溶解DNA的溶液为参比，分别测定DNA样品在260 nm、280nm、230 nm的吸光值，计算OD₂₆₀/OD₂₈₀、OD₂₆₀/OD₂₃₀的值。同时满足OD₂₆₀/OD₂₈₀为1.8~2.0，OD₂₆₀/OD₂₃₀为2.0~2.2，DNA样品纯度良好。

5.5 基因组 DNA 的保存

DNA样品测定核酸浓度后，短期保存可置于4℃冰箱，时间不宜超过14 d；长期保存置于-20℃冰箱，按照SN/T 4629—2016的要求进行操作。

附 录 A
(规范性)
试剂及其配制

A.1 2.5%重铬酸钾溶液

A.1.1 成分

重铬酸钾 ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$)	25 g
--	------

A.1.2 制法

取A.1.1中成分，溶于适量符合GB/T 6682—2008规定的三级水中，并定容至1000 mL。0.22 μm 滤膜过滤，避光保存。

A.2 PBS缓冲液 (pH 7.4)

A.2.1 成分

磷酸二氢钾 (KH_2PO_4)	0.27 g
磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	1.42 g
氯化钠 (NaCl)	8.0 g
氯化钾 (KCl)	0.2 g

A.2.2 制法

取A.2.1中各成分，溶于约800 mL符合GB/T 6682—2008规定的三级水中，调节pH至7.4，用三级水定容至1000 mL。121℃高压灭菌15min。

A.3 20%次氯酸钠溶液

A.3.1 成分

次氯酸钠 (NaOCl ，活性氯含量 $\geq 7.5\%$)	20 mL
---	-------

A.3.2 制法

取A.3.1中成分，加入适量符合GB/T 6682—2008规定的三级水中，并定容至100 mL。避光保存。

A.4 TE缓冲液 (pH 8.0)

A.4.1 成分

Tris碱 (Tris base)	1.21 g
EDTA二钠盐 ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.37 g

A.4.2 制法

取A.4.1中各成分，溶于适量符合GB/T 6682—2008规定的三级水中，调节pH至8.0，用三级水定容至1000 mL。121℃高压灭菌15 min。

A. 5 CTAB溶液 (pH 8.0)

A. 5.1 成分

CTAB (C ₁₉ H ₄₂ BrN)	20 g
氯化钠 (NaCl)	81.89 g
β 巯基乙醇 (C ₂ H ₆ OS)	2 mL
EDTA (C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ ·2H ₂ O)	7.44 g
Tris碱 (Tris base)	12.11 g

A. 5.2 制法

取A.5.1中各成分，溶于适量符合GB/T 6682—2008规定的三级水中，调节pH至8.0，用三级水定容至1000 mL。0.22 μm滤膜过滤。

A. 6 蛋白酶K溶液

A. 6.1 成分

蛋白酶K	10 g
Tris碱 (Tris base)	0.61 g
乙酸钙 (C ₄ H ₆ CaO ₄ ·H ₂ O)	0.028 g

A. 6.2 制法

取A.6.1中各成分，溶于适量符合GB/T 6682—2008规定的三级水中，调节pH至8.0，用三级水定容至100 mL。0.22 μm滤膜过滤，分装，-20℃储存。

A. 7 饱和NaCl溶液

A. 7.1 成分

NaCl	40 g
------	------

A. 7.2 制法

取A.7.1中成分，加入100 mL符合GB/T 6682—2008规定的三级水中，加热至50℃以加速溶解，直至有未溶解NaCl沉淀出现，再让溶液冷却至室温。

A. 8 苯酚：氯仿：异戊醇溶液

A. 8.1 成分

苯酚 (C ₆ H ₅ OH)	25 mL
氯仿 (CHCl ₃)	24 mL
异戊醇 (C ₅ H ₁₂ O)	1 mL

A. 8.2 制法

取A.8.1中各成分，按比例混合，搅拌均匀，避光保存。

A. 9 氯仿：异戊醇溶液

A. 9. 1 成分

氯仿 (CHCl_3)	24 mL
异戊醇 ($\text{C}_5\text{H}_{12}\text{O}$)	1 mL

A. 9. 2 制法

取A.9.1中各成分，按比例混合，搅拌均匀，避光保存。

A. 10 NaAc溶液

A. 10. 1 成分

三水合乙酸钠 ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)	408.30 g
--	----------

A. 10. 2 制法

取A.10.1中成分，溶于适量符合GB/T 6682—2008规定的三级水中，以冰醋酸调节pH至5.2，用三级水定容至1000 mL。121℃高压灭菌15 min。
