

《鸡球虫卵囊基因组 DNA 提取方法》

编制说明

一、任务来源（包括目的意义）

鸡球虫病是由艾美耳属球虫寄生于鸡肠道上皮细胞引起的一种急性流行性原虫病，是危害养鸡业最严重的寄生虫病之一。该病广泛分布于世界各地，我国各地均有发生，给养鸡业造成巨大经济损失。据统计，全球每年因鸡球虫病造成的直接经济损失超过 30 亿美元，我国每年损失超过 20 亿元人民币。

鸡球虫病的准确诊断是有效防控的前提。传统的形态学鉴定方法虽然直观，但需要丰富的专业知识和经验，且难以区分形态相似的虫种。分子生物学鉴定方法具有快速、准确、敏感的优点，已成为球虫鉴定的重要手段。然而，球虫卵囊具有坚硬的卵囊壁，常规 DNA 提取方法难以有效破碎卵囊壁，导致 DNA 提取效率低、纯度差，影响后续分子生物学检测的准确性。目前国内外尚无统一、规范的鸡球虫卵囊基因组 DNA 提取方法标准，各实验室采用的方法差异较大，缺乏可比性和重现性。

为解决鸡球虫卵囊 DNA 提取方法不统一、不规范的问题，提高分子生物学鉴定的准确性和可靠性，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于 2025 年 4 月向广东省畜牧兽医学会提出了《鸡球虫卵囊基因组 DNA 提取方法》的团体标准立项申请。广东省畜牧兽医学会组织了对该标准的预研工作，并于 2025 年 10 月 14 日组织专家对立项申请进行了论证审查。经过专家充分的研讨论证，专家组一致认为，该项目所提供的资料基本齐全，论证充分，符合国家产业发展需求，所申报的团体标准满足立项条件，同意该标准立项。目前，本标准研究团队已经完成了标准主要技术参数与指标的试验验证，形成了标准文本初稿。

二、起草工作简要过程（含主要参加单位及工作组成员）

1. 标准起草阶段

为制定本标准，项目组织技术人员查阅了大量国内外文献资料，包括鸡球虫病诊断技术、寄生虫 DNA 提取方法、分子生物学鉴定技术等相关技术专著、学术论文、国家标准、行业标准等，并进行了深入的预研讨论工作。

本项目主要开展了以下研究工作：

- (1) 系统比较了不同样品来源（粪便样品、纯化卵囊、保存卵囊）的前处理方法；
- (2) 优化了卵囊破碎方法，包括玻璃珠处理法和裂解液处理法的参数；
- (3) 比较了酚-氯仿法、DNA 提取试剂盒法、热处理法三种提取方法的效果；
- (4) 验证了各方法提取 DNA 的浓度、纯度和完整性；
- (5) 评估了不同方法的适用范围和优缺点。

本研究使用的试剂均为同批次产品或市售标准品，确保了试验的一致性和可重复性。2025 年 7 月，我们初步完成了标准的起草并送交同行专家审定。

2. 标准参与单位和参与人员

文件起草单位包括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。

本文件主要起草人为蔡海明、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。

文件起草的具体分工如下：

蔡海明：项目负责人，负责标准的立项、整体方案确立及宣贯，负责标准的审阅、项目申报建议及相关技术文件的校订。

孙铭飞：负责标准中方法建立、实验数据分析起草，负责各版本标准稿的讨论和修订工作及征

征求意见后的修改工作。

游锡火、廖申权：负责标准中部分实验室方法的建立、优化及验证。

戚南山、李娟：负责标准中部分方法的起草、验证。

林栩慧、吕敏娜、宋勇乐：负责试剂配制、样品前处理方法的验证。

陈祥杰、朱易斌、张健騄：负责 DNA 提取方法的对比验证及质量检测方法的验证。

何钦义、曾徐浩：负责部分标准方法的验证及推广应用。

三、编写原则和确定标准主要内容的依据

(一) 框架的确定

根据鸡球虫卵囊基因组 DNA 提取方法的技术特点，结合 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》的要求，确定标准的框架为：范围、术语和定义、规范性引用文件、缩略语、操作程序（包括样品前处理与纯化、样品的裂解、基因组 DNA 提取、基因组 DNA 提取质量的检测、基因组 DNA 的保存）及附录 A（规范性附录：试剂及其配制）。

(二) 标准的编写原则

1. 标准引用

本标准在实验室生物安全、分析实验室用水、凭证标本核酸制备等方面引用了已经发布的 GB/T 6682—2008《分析实验室用水规格和试验方法》和行业标准 SN/T 4629—2016《检疫性有害生物凭证标本核酸制备》。

2. 实际科研和检测工作经验

标准编写人员多年来一直从事动物寄生虫病的诊断、流行病学研究和疫病防控工作，在鸡球虫病诊断方面具有丰富的实践经验。广东省农业科学院动物卫生研究所是广东省重要的动物疫病诊断和研究机构，拥有完善的实验室设施和技术团队，在寄生虫病分子生物学诊断方面开展了大量研究工作。

项目组在鸡球虫病检测方面具有深厚的技术积累，建立了多种鸡球虫分子生物学鉴定方法，包括常规 PCR、荧光定量 PCR、巢式 PCR 等，并应用于大量临床样品的检测。在实践中发现，DNA 提取质量是影响分子生物学检测结果的关键因素，而卵囊壁的有效破碎是提高 DNA 提取质量的核心环节。

(三) 主要内容及其确定依据

1. 试剂配制

TE 缓冲液、CTAB 溶液、蛋白酶 K 溶液、苯酚-氯仿-异戊醇溶液、氯仿-异戊醇溶液、NaAc 溶液等，均按照附录 A 的要求配制。附录 A 规定的试剂配制方法参考了分子克隆实验手册，确保试剂配制的规范性和一致性。

2. 样品前处理与纯化

2.1 试剂与材料

2.5%重铬酸钾溶液、20%次氯酸钠溶液、PBS 缓冲液（pH 7.4）、饱和 NaCl 溶液，配制用水符合 GB/T 6682—2008 规定的三级水要求。样品保存管、记号笔、纱布、标准筛（100 目、200 目）、离心管等。试剂浓度和用水标准的确定参考了相关国家标准和实验室常规操作规范，确保试剂质量稳定可靠。

2.2 样品类型

样品包括粪便样品、纯化卵囊和保存卵囊。粪便样品主要用于从复杂基质中提取球虫卵囊 DNA；纯化卵囊为实验室纯化保存的鸡球虫孢子化卵囊；保存卵囊为保存于 2.5%重铬酸钾溶液中的鸡球虫卵囊。三种样品类型的设定综合考虑了实际应用场景，既包括临床诊断常见的粪便样品，也包括科研常用的纯化卵囊和保存卵囊，确保标准的广泛适用性。

2.3 前处理方法

粪便样品前处理采用饱和 NaCl 溶液浮选法，使用多层纱布或标准筛（100 目、200 目）过滤去除粗颗粒，清水洗涤 3~5 次去除盐分。纯化及保存卵囊前处理采用 20% 次氯酸钠溶液冰浴处理 30 min，有效去除重铬酸钾并保持卵囊完整性，以 PBS 缓冲液洗涤 3 次备用。前处理方法的确定基于饱和盐溶液浮选是寄生虫卵囊分离的经典方法，次氯酸钠处理可有效去除重铬酸钾而不损伤 DNA，洗涤次数经验证可充分去除杂质且避免卵囊损失。

3. 样品的裂解

3.1 裂解方法

本标准提供玻璃珠处理法和裂解液处理法两种卵囊破碎方法。玻璃珠处理法采用直径 0.8~1 mm 无菌玻璃珠，以漩涡振荡器振荡 5~10 min，显微镜下观察确认卵囊壁破碎率大于 90%。裂解液处理法采用次氯酸钠溶液和饱和 NaCl 溶液分步孵育，通过化学裂解破坏卵囊壁。提供两种方法是考虑到不同实验室的设备条件，玻璃珠法适用于拥有漩涡振荡器的实验室，裂解液法则更适合基础条件实验室。玻璃珠直径 0.8~1 mm 的选择基于比较试验，该规格对卵囊壁的破碎效果最佳，振荡时间 5~10 min 可确保破碎率达标。

3.2 裂解效果确认

裂解后显微镜下观察孢子囊和子孢子释放情况，确保卵囊壁充分破碎，以保证 DNA 的有效释放。破碎率 >90% 的标准是基于 DNA 提取效率的要求，低于此标准会显著影响 DNA 得率和后续检测灵敏度。

4. 基因组 DNA 提取

本标准提供三种 DNA 提取方法，实验室可根据检测目的和实验条件选择：

(1) 酚-氯仿法：采用经典有机溶剂抽提技术，适用于获取高纯度、高分子量 DNA，可用于 PCR、基因组测序及文库构建等。

(2) DNA 提取试剂盒法：采用市售动物组织或粪便样品基因组 DNA 提取试剂盒，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。

(3) 热处理法：采用快速简易提取方法，DNA 产物纯度较低，但可满足常规 PCR 检测的需求，适用于应急检测和初步筛查。

提供三种方法的依据是满足不同应用场景的需求：酚-氯仿法虽操作复杂但 DNA 质量最高，适合高质量要求的研究；试剂盒法标准化程度高、适合常规批量检测；热处理法快速简便、适合基层实验室应急筛查。经验证，三种方法提取的 DNA 均能满足各自应用场景的要求。

5. 基因组 DNA 提取质量的检测

5.1 DNA 浓度检测

采用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 20 ng/μL。浓度 ≥ 20 ng/μL 的标准是基于常规 PCR 反应对模板 DNA 量的需求，该浓度可满足大多数分子生物学检测的要求。

5.2 DNA 纯度评价

采用紫外分光光度法检测 DNA 纯度。分别测定 DNA 样品在 260 nm、280 nm、230 nm 的吸光值，计算 OD₂₆₀/OD₂₈₀、OD₂₆₀/OD₂₃₀ 的值。DNA 样品纯度良好的标准为：OD₂₆₀/OD₂₈₀ 为 1.8~2.0，OD₂₆₀/OD₂₃₀ 为 2.0~2.2。这两个指标是国际通用的 DNA 纯度评价标准，OD₂₆₀/OD₂₈₀ 反映蛋白质污染程度，OD₂₆₀/OD₂₃₀ 反映盐离子和有机溶剂残留情况，符合此标准的 DNA 可确保后续分子生物学检测的准确性和稳定性。

6. 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。保存条件的确定参考了 SN/T 4629-2016《检疫性有害

生物凭证标本核酸制备》的相关规定,4℃短期保存可防止DNA降解,-20℃长期保存可确保DNA长期稳定,14天的短期保存时限是基于DNA在4℃条件下的稳定性研究结果。

四、技术经济分析论证和预期的经济效益

本标准建立的鸡球虫卵囊基因组DNA提取方法,为鸡球虫病的分子生物学诊断提供了统一、规范的技术标准,具有重要的技术经济价值。通过规范化的DNA提取流程,确保DNA质量稳定可靠,显著提高了PCR、测序等分子生物学方法的准确性和重现性,减少了假阴性和假阳性结果,为鸡球虫病的精准诊断提供了技术保障。本标准提供了三种不同成本的提取方法,实验室可根据实际需求选择:酚-氯仿法试剂成本约5元/样,适合高质量要求的研究项目;试剂盒法试剂成本约15元/样,适合常规批量检测;热处理法试剂成本约2元/样,适合大规模筛查。相比于非标准化方法,本标准可减少因DNA质量不佳导致的重复提取和检测,降低整体检测成本约20~30%。规范化的操作流程减少了方法摸索和优化的时间,新手可快速掌握操作技能;试剂盒法和热处理法大幅缩短了提取时间,提高了检测效率,预计可将DNA提取时间从4~6小时缩短至1~2小时,效率提升50%以上。本标准的发布实施将为鸡球虫病诊断试剂盒、疫苗研发、药物筛选等相关产业提供标准化的技术支撑,促进养禽业健康发展。据估算,通过提高鸡球虫病诊断和防控水平,可减少我国养鸡业因球虫病造成的损失10~15%,年经济效益约2~3亿元。同时,本标准为鸡球虫分子流行病学调查、虫种鉴定、耐药性研究、疫苗株筛选等科研工作提供了标准化的技术方法,有助于提高研究数据的可比性和可靠性,促进科研成果的产出和转化。

五、采用国际标准和国外先进标准情况及水平对比

本标准所建立的鸡球虫卵囊基因组DNA提取方法为国内首创,系统规范了从样品采集到DNA保存的完整技术流程,具有创新性和实用性,未采用国际标准。目前国际上尚无专门针对鸡球虫卵囊DNA提取的标准化方法,世界动物卫生组织(WOAH)《陆生动物诊断试验和疫苗手册》(第12版,2023)中关于球虫病的诊断章节主要介绍了形态学鉴定和免疫学方法,对分子生物学方法仅作简要介绍,未规定具体的DNA提取方法。国外文献报道的球虫DNA提取方法主要包括商业化DNA提取试剂盒(如QIAGEN DNeasy Kit)、有机溶剂抽提法和快速裂解法等,但这些方法大多针对一般生物样品设计,未充分考虑球虫卵囊壁坚硬、难以破碎的特点,提取效率和重复性存在不足。本标准具有以下创新点:一是针对性强,专门针对鸡球虫卵囊的结构特点,优化了卵囊破碎方法(玻璃珠法和裂解液法),确保卵囊壁破碎率>90%,显著提高DNA提取效率;二是系统完整,涵盖了粪便样品、纯化卵囊、保存卵囊三种样品类型的处理方法,适用范围广;三是方法多样,提供了三种不同应用场景的提取方法(酚-氯仿法、试剂盒法、热处理法),满足不同需求;四是质量可控,明确规定了DNA浓度($\geq 20\text{ ng}/\mu\text{L}$)和纯度($\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280} = 1.8\text{--}2.0$, $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{230} = 2.0\text{--}2.2$)标准,确保DNA质量稳定可靠;五是可操作性强,操作步骤详细、参数明确,易于推广应用。

六、与现行法律、法规、政策及相关标准的协调性

本标准与现行法律法规、强制性标准等上位标准没有冲突,与相关标准协调一致。本标准符合《中华人民共和国动物防疫法》《中华人民共和国标准化法》《实验室生物安全条例》等法律法规的要求。目前,国内外虽已发布部分与鸡球虫病诊断和核酸提取相关的技术标准,但尚无专门针对鸡球虫卵囊基因组DNA提取的规范性文件。世界动物卫生组织(WOAH)发布的《陆生动物诊断试验和疫苗手册》(第12版,2023)中虽提供了球虫病诊断指南,但主要侧重于形态学鉴定和免疫学方法,未涉及卵囊DNA提取的具体技术要求。国家标准GB/T 18647-2020《动物球虫病诊断技术》规定了球虫病的诊断方法,包括病原学检查、病理学检查等,但未规定用于分子生物学鉴定的DNA提取方法;GB/T 6682-2008《分析实验室用水规格和试验方法》对实验用水提出了基本要求,本标准在试剂配制和实验操作过程中引用了这些标准的相关规定。行业标准方面,NY/T 541-2016《兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范》对寄生虫学检查样品提出了采集和保存的基本要求,本标准参考了其中关于粪便样品采集的相关内容;SN/T 4629-2016《检疫性有害生物凭证标本核酸制备》规定了凭证

标本 DNA 样品的制备、保存和管理要求，本标准引用了其中关于 DNA 样品保存条件和时间的规定。经查询，目前国内尚无专门针对鸡球虫卵囊 DNA 提取的团体标准或地方标准。现有标准主要规定了球虫病诊断、样品采集、实验室用水、生物安全等通用要求，但均未对鸡球虫卵囊这种具有坚硬卵囊壁特征的特殊样品的 DNA 提取方法作出具体规定，无法满足分子生物学鉴定对高质量 DNA 的需求。

本标准系统规范了鸡球虫卵囊从样品前处理、卵囊破碎、DNA 提取到质量检测的完整技术流程，填补了这一技术空白，与现有标准形成互补，共同构建完善的鸡球虫病诊断技术标准体系。本标准在实验室生物安全要求、实验用水规格、样品采集和保存、DNA 样品保存等方面均与相关国家标准和行业标准保持协调，确保了标准的科学性、规范性和可操作性。

七、征求意见的采纳情况

本次标准征求意见工作共收到来自南京农业大学、华南农业大学、河南农业大学、广州海关技术中心、广东省动物疫病预防控制中心、佛山大学等 10 家单位的反馈意见，共计 32 条。经标准编制组认真研究与核查，意见处理结果如下：采纳 28 条，部分采纳 1 条，不采纳 3 条。

采纳情况：主要修正了文中格式不统一（如全/半角波浪号、单位空格、字体一致性）及章节引用编号错误（如将文中的 4.x 修正为 5.x）的问题；规范了化学试剂名称及分子式书写（如 Tris-HCl、NaClO）；同时采纳了关于细化实验步骤（如明确纱布层数、稀释倍数）及增加关键步骤质量控制要求（如卵囊破碎率、DNA 浓度质控）的建议。

部分采纳情况：针对“范围”章节的表述建议，起草组保留了原表述中更符合标准体例的简洁概括，仅对适用范围进行了必要的限定修饰。

不采纳情况：对于“增加仪器清单”、“重构核心章节标题（5.1—5.3）”以及“补充全自动核酸提取仪说明”的建议，因考虑到标准编写格式规范要求、需保持“纯化—裂解—提取”的技术逻辑严谨性以及现有试剂盒定义已涵盖相关内容，故未予采纳。

目前，编制组已根据上述采纳意见对标准文本完成了修改与完善。

八、贯彻实施标准的措施和建议

本标准发布后，可通过相关部门组织宣贯、推荐给有相应检测设施和检测项目的实验室使用，也可以委托项目起草单位或其他相关单位组织技术培训的方式推广应用本检测标准。

九、其它应予说明的事项

无。