ICS
点击此处添加中国标准文献分类号

团　　体　　标　　准

T/CVMA XXXXX—XXXX

鸡球虫种类 ITS1-PCR 鉴定技术

ITS1-PCR identification technique of chicken coccidia species

征求意见稿

中国兽医协会
CVMA

XXXX - XX - XX 发布　　XXXX - XX - XX 实施

中国兽医协会　　发布

中国兽医协会
CVMA

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。

本文件由中国兽医协会兽医寄生虫病防治分会提出。

本文件由中国兽医协会归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

中国兽医协会
CVMA

鸡球虫种类 ITS1-PCR 鉴定技术

1 范围

本文件规范了公认的7种鸡球虫种类ITS1-PCR鉴定技术。

本文件适用于鸡球虫病的临床诊断、防控监测、流行病学调查、疫苗生产及鸡球虫相关科研工作等。

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适用于本文件；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/T 6682-2008, 分析实验室用水规格和试验方法.

3 术语与定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 符号与缩略词

下列符号和缩略语适用于本文件。

PCR：聚合酶链式反应（Polymerase chain reaction）

ITS：内转录间隔区（Internal Transcribed Spacer）

DNA：脱氧核糖核酸（Deoxyribonucleic acid）

TAE：三羟甲基氨基甲烷-乙酸-乙二胺四乙酸（Tris-acetate-EDTA）

bp：碱基对（Base pair）

5 仪器设备和主要试剂

5.1 仪器

PCR仪、4 ℃高速低温离心机、电泳槽，微量移液器、凝胶成像系统

5.2 主要试剂

异硫氰酸胍、苯酚、氯仿、异戊醇、无水乙醇、70 %酒精DNA Marker DL-2000、2×*Taq* DNA聚合酶Mix、琼脂糖、饱和食盐水（1000 ml沸水中加入食盐380 g，比重约1.18 g/cm^3）

6 操作步骤

6.1 卵囊 DNA 的提取

取2000个左右待检鸡球虫孢子化卵囊置于2 mL离心管中，加入直径为1 mm的玻璃微珠0.2 g, 加入600 μL 5 mol/L异硫氰酸胍，涡旋振荡5 min，显微镜下观察卵囊壁破碎情况，当大部分卵囊壁被破碎后，

中国兽医协会 CVMA

将其置于37 ℃水浴摇床上作用30 min；加入等体积的饱和酚溶液600 μL，振荡混匀20 s, 12000 g离心5 min；将上清液转移至另外一个2 mL离心管中，向离心管中加入等量的苯酚：氯仿：异戊醇（25 ：24 ：1）的混合溶液，振荡混匀20 s，12000 g离心5 min，取上清液；向上清液中再加入等量的氯仿：异戊醇（24 : 1 ），振荡混匀20 s, 12000 g离心5 min，取上清液；最后加入两倍体积预冷的无水乙醇，上下颠倒混匀，12000 g离心10 min，弃上清；向沉淀加入70 %酒精，对DNA进行洗涤，并重复洗涤过程，弃上清；室温干燥后，加入50 μL双蒸水溶解沉淀，即得DNA模板，测定核酸浓度后-20 ℃贮存备用。

鸡球虫的阳性对照样品和阴性对照样品与待检样品同步、相同方法处理，进行DNA抽提。另外，DNA提取也可采用市售的商品化DNA抽提试剂盒进行。

6.2 ITS1-PCR 检测

以提取的球虫基因组DNA为模板，按照附录A表1所示的7种球虫ITS1特异性引物和对应退火温度，进行PCR反应。反应体系如下：2×*Taq* DNA聚合酶Mix 12.5μL，上、下游引物50 pmol·μL^{-1}各0.5 μL，提取的DNA模板2.5 μL（0.5 ng-0.5 μg），添加双蒸水至25 μL。PCR反应程序为94 ℃预变性3 min；循环反应：94 ℃ 45 s，相应的退火温度（附录A表1）45 s，72 ℃延伸45 s，30个循环；最后72 ℃延伸10 min。每次试验均需设立阴性对照、阳性对照。

6.3 琼脂糖凝胶电泳

用1×TAE缓冲液配制1.2 %琼脂糖凝胶，取10 μL PCR反应产物与1 μL的上样缓冲液混合均匀，用微量移液器将产物加入到琼脂糖凝胶的加样孔中，同时加入Marker、阴性对照和阳性对照，进行琼脂糖凝胶电泳，电泳程序为恒压120 V，时间30 min，电泳结束后将凝胶置于凝胶成像系统下成像，观察结果并保存图片。

7 结果判定

7.1 阳性对照出现附录 A 表 1 所示 7 种鸡球虫对应大小的条带，同时阴性对照无扩增条带时，实验成立。

7.2 在实验成立的前提下，被检样品出现××种球虫的目的条带，判为鸡球虫××种阳性。

7.3 在实验成立的前提下，被检样品未出现××种球虫的目的条带，判为鸡球虫××种阴性。

中国兽医协会 CVMA

附　录　A

（规范性）

表1　7种鸡球虫ITS1基因特异性引物序列

球虫种类	ITS1引物	引物序列（5'–3'）	退火温度（℃）	PCR产物长度（bp）
Eimeria acervulina	上游[a]	GGCTTGGATGATGTTTGCTG	72	321
	下游[a]	CGAACGCAATAACACACGCT		
Eimeria brunetti	上游[a]	GATCAGTTTGAGCAAACCTTCG	73	311
	下游[a]	TGGTCTTCCGTACGTCGGAT		
Eimeria maxima	上游[a]	CGTTGTGAGAAGACTGAAAGGG	70	145
	下游[a]	GCGGTTTCATCATCCATCATCG		
Eimeria mitis	上游[bc]	GTTTATTTCCTGTCGTCGTCTCGC	55	330
	下游[bc]	GTATGCAAGAGAGAATCGGGATTCC		
Eimeria necatrix	上游[a]	TACATCCCAATCTTTGAATCG	61	383
	下游[a]	GGCATACTAGCTTCGAGCAAC		
Eimeria praecox	上游	CATCATCGGAATGGCTTTTTGA	55	368
	下游	AATAAATAGCGCAAAATTAAGCA		
Eimeria tenella	上游[a]	AATTTAGTCCATCGCAACCCT	65	278
	下游[a]	CGAGCGCTCTGCATACGACA		

[a] 参考文献[4]
[b] 参考文献[5]
[c] 参考文献[3]

中国兽医协会 CVMA

参考文献

[1] 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.

[2] GB/T 6682-2008, 分析实验室用水规格和试验方法.

[3] SN/T4881—2017, 鸡球虫病检疫技术规范.

[4] Lew A E, Anderson G R, Minchin C M, et al. Inter- and intra-strain variation and PCR detection of the internal transcribed spacer 1 (ITS-1) sequences of Australian isolates of *Eimeria* species from chickens[J]. Vet. Parasitol. 2003, 112(1-2):33-50.

[5] Haug A, Thebo P, Mattsson J G. A simplified protocol for molecular identification of *Eimeria* species in field samples. Vet. Parasitol. 2007, 146(1-2):35-45.

中国兽医协会
CVMA