



# 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 5602—2023

## 豇豆花叶病毒属病毒 RT-PCR 筛查方法

Screening protocols for *Comovirus* by universal RT-PCR

2023-11-01 发布

2024-05-01 实施

中华人民共和国海关总署 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。

本文件由中华人民共和国海关总署提出并归口。

本文件起草单位：中华人民共和国厦门海关技术中心、福建省农业科学院果树研究所、中华人民共和国福州海关、中华人民共和国青岛海关。

本文件主要起草人：廖富荣、谢丽雪、方志鹏、陈青、陈红运、黄蓬英、沈建国、林石明、厉艳。

# 豇豆花叶病毒属病毒 RT-PCR 筛查方法

## 1 范围

本文件描述了豇豆花叶病毒属病毒 RT-PCR 筛查检测方法。

本文件适用于可能携带有豇豆花叶病毒属病毒的植物种子、苗木及其产品的检测。

## 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 28063 菜豆荚斑驳病毒检疫鉴定方法
- GB/T 28064 蚕豆染色病毒检疫鉴定方法
- GB/T 31805 豇豆重花叶病毒检疫鉴定方法
- SN/T 2122 进出境植物及植物产品检疫抽样方法
- SN/T 4178 南瓜花叶病毒检疫鉴定方法

## 3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

## 4 基本信息

中文名称:豇豆花叶病毒属

学 名:*Comovirus*

分类地位:RNA 病毒域(*Riboviria*)、正 RNA 病毒界(*Orthornavirae*)、小 RNA 超群病毒门(*Pisuviricota*)、小 RNA 南方菜豆套式病毒纲(*Pisoniviricetes*)、小 RNA 病毒目(*Picornavirales*)、伴生豇豆病毒科(*Secoviridae*)、豇豆花叶病毒亚科(*Comovirinae*)、豇豆花叶病毒属(*Comovirus*)。

菜豆荚斑驳病毒(*Bean pod mottle virus*, BPMV)、蚕豆染色病毒(*Broad bean stain virus*, BBSV)、豇豆重型花叶病毒(*Cowpea severe mosaic virus*, CPSMV)是我国禁止进境的检疫性有害生物。

有关该病毒属的其他信息见附录 A。

## 5 方法原理

豇豆花叶病毒属的分子生物学特征是制定本筛查方法的主要依据。根据豇豆花叶病毒属病毒基因组序列的保守区域设计合成简并引物,建立该病毒属的通用 RT-PCR 检测方法,并对 PCR 产物进行序列测定,通过序列分析进行病毒种类的鉴定。

## 6 仪器设备与试剂

### 6.1 主要仪器设备与用具

研磨仪、微量天平(感量 0.001 g)、PCR 仪、电泳仪、水平电泳槽、凝胶成像仪、高速冷冻台式离心机、水浴槽或恒温孵育器、pH 计、各种量程的可调移液器(1000  $\mu\text{L}$ 、200  $\mu\text{L}$ 、100  $\mu\text{L}$ 、20  $\mu\text{L}$ 、10  $\mu\text{L}$ 、2  $\mu\text{L}$ )等。

### 6.2 主要试剂

主要试剂见附录 B。

## 7 抽样检查与样品制备

### 7.1 抽样检查

对于有症状的样品选取矮化、畸型、花叶、斑驳等疑似病毒感染症状的组织,无症状的样品按照 SN/T 2122 给出的方法进行抽样、取样。

### 7.2 样品制备

对于豆类、瓜类等相对大粒种子,称取 6 g 种子,对于茄科等相对小粒种子取 3 g 种子,利用研磨仪研磨成粉末。取 0.6 g 种子粉末,加入 3 mL 样品提取缓冲液,涡旋混匀,8 000g 离心 5 min,取 200  $\mu\text{L}$  样品提取液按 B.3 的方法提取总 RNA。

种苗类:对于有症状的植株样品,单独编号,取有症状的叶片进行检测。对于无症状的样品取幼嫩叶片混合检测(如 5 混 1)。取约 0.1 g 的叶片组织研磨,然后按 B.3 的方法提取总 RNA。

## 8 检测与鉴定

### 8.1 RT-PCR 检测

按附录 B 给出的方法,进行通用 RT-PCR 检测。用已知豇豆花叶病毒属病毒分离物作阳性对照,用健康植物组织作阴性对照,并设置空白对照。

### 8.2 序列测定与分析

按附录 C 给出的方法进行序列测定,把核苷酸序列翻译成氨基酸后进行分析。

## 9 结果判定

9.1 如果 RT-PCR 方法检测结果为阴性,则判定未检出豇豆花叶病毒属病毒。

9.2 如果 RT-PCR 方法检测结果为阳性,则进行序列测定与分析。

a) 如果翻译后氨基酸序列与豇豆花叶病毒属已知病毒序列一致性大于 75%,则判定检出某种豇豆花叶病毒属病毒。如需进一步鉴定,菜豆荚斑驳病毒、蚕豆染色病毒、豇豆重花叶病毒、南瓜花叶病毒可分别按 GB/T 28063、GB/T 28064、GB/T 31805、SN/T 4178 规定的方法进行。

注:如果序列一致性在阈值附近(70%~80%之间),应考虑用更多的序列或其他方法进一步鉴定。

b) 如果翻译后氨基酸序列与豇豆花叶病毒属已知病毒具有最高序列一致性,但小于 75%,则判

定检出某种豇豆花叶病毒属病毒,但具体病毒种类还需采用测定完整的基因组序列等方法进一步鉴定。

注:所检测到的病毒可能属于基因组序列尚未测定的已知病毒或尚未报道的新病毒。

## 10 结果记录

记录样品信息和检测数据,包括样品来源、植物种类、取样时间与地点,以及检测时间、方法、结果和检测人员签字。RT-PCR 检测方法应保存电泳照片,测序结果应保存测序报告图。

## 11 样品保存

检出豇豆花叶病毒属病毒的样品应妥善保存在超低温冰箱中,或冻干后低温保存,并做好登记和标识,以备复核。

附 录 A  
(资料性)  
豇豆花叶病毒属基本信息

### A.1 分类结构

豇豆花叶病毒属(*Comovirus*)所在的伴生豇豆病毒科的分类结构见表 A.1。

表 A.1 伴生豇豆病毒科的分类结构

亚科(Subfamily)	属(Genus)	代表种(Type species)
豇豆花叶病毒亚科 <i>Comovirinae</i>	豇豆花叶病毒属 <i>Comovirus</i>	豇豆花叶病毒 <i>Cowpea mosaic virus</i> (CPMV)
豇豆花叶病毒亚科 <i>Comovirinae</i>	蚕豆病毒属 <i>Fabavirus</i>	蚕豆萎蔫病毒 2 号 <i>Broad bean wilt virus 2</i> (BBWV2)
豇豆花叶病毒亚科 <i>Comovirinae</i>	线虫传多面体病毒属 <i>Nepovirus</i>	烟草环斑病毒 <i>Tobacco ringspot virus</i> (TRSV)
未归亚科 N/A	伴生病毒属 <i>Sequivirus</i>	欧防风黄点病毒 <i>Parsnip yellow fleck virus</i> (PYFV)
未归亚科 N/A	矮化病毒属 <i>Waikavirus</i>	水稻东格鲁球状病毒 <i>Rice tungro spherical virus</i> (RTSV)
未归亚科 N/A	温州蜜柑矮缩病毒属 <i>Sadwavirus</i>	温州蜜柑矮缩病毒 <i>Satsuma dwarf virus</i> (SDV)
未归亚科 N/A	樱桃锉叶病毒属 <i>Cheravirus</i>	樱桃锉叶病毒 <i>Cherry rasp leaf virus</i> (CRLV)
未归亚科 N/A	番茄灼烧病毒属 <i>Torradovirus</i>	番茄灼烧病毒 <i>Tomato torrado virus</i> (ToTV)
未归亚科 N/A	未归属 Unassigned	黑悬钩子坏死病毒 <i>Black raspberry necrosis virus</i> (BRNV)
未归亚科 N/A	未归属 Unassigned	巧克力百合 A 病毒 <i>Chocolate lily virus A</i> (CLVA)
未归亚科 N/A	未归属 Unassigned	草莓潜隐环斑病毒 <i>Strawberry latent ringspot virus</i> (SLRSV)
未归亚科 N/A	未归属 Unassigned	草莓斑驳病毒 <i>Strawberry mottle virus</i> (SMoV)

### A.2 种的划分标准

伴生豇豆病毒科中关于病毒种类的区分标准为：

- CP 氨基酸序列一致性小于 75% (具有 2 个或 3 个 CP 基因的病毒, 应考虑组合的 CP 序列)；
- Pro-Pol 保守区域的氨基酸序列一致性小于 80%；
- 在抗原反应上存在差异；
- 不同的寄主范围；

- 不同的介体特异性；
- 不会交互保护；
- 对于具有 2 条基因组序列的病毒，无 RNA-1 和 RNA-2 间的重组。

通常，种的划分并不需要同时满足以上所有条件。当 Pro-Pol 和 CP 序列一致性远低于推荐阈值时，可依据序列信息区分病毒种类。但不能只分析基因组中的 1 个区域，应同时考虑 Pro-Pol 和 CP 区。如果 1 个或 2 个序列一致性的百分比在推荐阈值附近（例如，Pro-Pol 区在 75% 和 85% 之间，或 CP 区在 70% 和 80% 之间），应考虑病毒的生物学特征（寄主范围、介体特异性、RNA 间的重组可能性）等其他标准。例如，甜菜环斑病毒(BRSV)和番茄黑环病毒(TBRV)的 Pro-Pol 区序列密切相关(89% 序列一致性)，但 CP 序列存在很大区别(62% 序列一致性)。它们在抗原反应上不同，在线虫传播特异性上也不同(BRSV 由 *Longidorus elongatus* 传播的效率更高，而 TBRV 由 *Longidorus atenuatus* 传播的效率更高)。

### A.3 豇豆花叶病毒成员

根据 2019 年国际病毒分类委员会(ICTV)第 10 次病毒分类报告，豇豆花叶病毒属含有 15 个正式种及 1 个暂定种(见表 A.2)。近年来发现的病毒种类有辣椒轻花叶病毒(Pepper mild mosaic virus, PepMMV)、菜豆重花叶病毒(*Phaseolus vulgaris* severe mosaic virus, PvSMV)等。我国已报道的有豇豆花叶病毒、蚕豆真花叶病毒、蚕豆染色病毒、南瓜花叶病毒。

表 A.2 豇豆花叶病毒属的病毒成员

中文名	学名	缩写	GenBank 登录号 <sup>a</sup>
安第斯马铃薯斑驳病毒	<i>Andean potato mottle virus</i>	APMoV	KJ746645;L16239
菜豆荚斑驳病毒	<i>Bean pod mottle virus</i>	BPMV	KJ746647;AF394607;AF394609; GQ996947;GQ996950;GQ996949; GU562880;AJ269536;AY744933; M62738
菜豆粗缩花叶病毒	<i>Bean rugose mosaic virus</i>	BRMV	AF263548;KP404603
蚕豆染色病毒	<i>Broad bean stain virus</i>	BBSV	FJ028650
蚕豆真花叶病毒	<i>Broad bean true mosaic virus</i>	BBTMV	KJ746646;GU810904
豇豆花叶病毒	<i>Cowpea mosaic virus</i>	CPMV	X00729;KJ746650;KJ746649
豇豆重型花叶病毒	<i>Cowpea severe mosaic virus</i>	CPSMV	KJ746651;JF513203;AF263549; HM450147;GQ229416;HM450148; HM448424;HM448426
大豆属花叶病毒	<i>Glycine mosaic virus</i>	GMV	—
豌豆绿斑驳病毒	<i>Pea green mottle virus</i>	PGMV	—
豌豆轻型花叶病毒	<i>Pea mild mosaic virus</i>	PMiMV	—
鹌豌豆花叶病毒	<i>Quail pea mosaic virus</i>	QPMV	—
萝卜花叶病毒	<i>Radish mosaic virus</i>	RaMV	FJ442946;AB295644;HM032711; AB456532;EU450838;EF486526
红三叶草斑驳病毒	<i>Red clover mottle virus</i>	RCMV	M14913;FJ442940

表 A.2 豇豆花叶病毒属的病毒成员 (续)

中文名	学名	缩写	GenBank 登录号 <sup>a</sup>
南瓜花叶病毒	<i>Squash mosaic virus</i>	SqMV	KJ746653;EU421060;DQ868881; AF059532;JF922966;AF059533; KP223324;AB054689;M96148
块根落葵 C 病毒	<i>Ullucus virus C</i>	UCV	—
萝卜环斑病毒 <sup>b</sup>	Turnip ringspot virus	TuRSV	KJ746652;FJ516746;GQ222382; FJ442944;GQ222382;GU968733
<sup>a</sup> 为完整或部分的 RNA2 基因组序列;—为无可利用的序列。 <sup>b</sup> 为暂定种。			

#### A.4 病毒粒子形态

豇豆花叶病毒粒子为等轴对称 20 面体(T=1),直径约 28 nm,无包膜。病毒纯化时分为 3 种组分,顶部组分(T)为空壳粒子,不含核酸,中部组分(M)含有 RNA 2,底部组分(B)含有 RNA 1,在电镜下可同时看到 3 种粒子。

#### A.5 病毒的基因组结构与功能

二分体基因组,为线形正义 ssRNA,RNA 1 和 RNA 2 由不同的病毒粒子包裹,RNA 1 包裹在沉降组分 B 的粒子中,RNA 2 包裹在沉降组分 M 的粒子中。RNA 1 长 5.9~7.2 kb,RNA 2 长 3.5~4.5 kb。RNA 的 3'端为 Poly(A),5'端为 VPg 结构,VPg 通过丝氨酸与 RNA 共价结合。RNA 1 和 RNA 2 的翻译产物均为多聚蛋白,并经过一系列的加工切割产生功能蛋白。豇豆花叶病毒 RNA 1 翻译的多聚蛋白为 200 kDa,切割产生 5 个多肽,分别为 32 kDa 的蛋白酶、58 kDa 的 NTP 结合域、4 kDa 的 VPg、24 kDa 的蛋白酶及 87 kDa 的复制酶;RNA 2 翻译成 2 个羧基化共末端多聚蛋白,分别为 105 或 95 kDa,切割产生 4 个功能肽,分别为与病毒移动有关的 58 kDa 和 48 kDa 蛋白(其中 48 kDa 蛋白源于 58 kDa)及 37 kDa 和 23 kDa 的外壳蛋白。RNA 1 和 RNA 2 单独均不能侵染植物,但 RNA 1 可在原生质体中复制。

#### A.6 寄主范围

寄主范围相对较窄,其中 BPMV、BRMV、BBSV、BBTMV、CPMV、CPSMV、GMV、PGMV、PMiMV、QPMV、RCMV,只侵染豆科植物。APMoV 侵染茄科、RaMV 侵染十字花科、SqMV 侵染葫芦科、UCV 侵染落葵科植物。

#### A.7 传播途径

在自然条件下,由甲虫传播,主要为金花虫科(Chrysomelidae)的成员。甲虫具有保持数天或数周的传播能力,可以通过种子传播,被证实的种类包括 BPMV、BBSV、BBTMV、CPMV、CPSMV、PMiMV、SqMV 等。

#### A.8 症状特征

典型症状是叶片出现花叶和斑驳症状。



**附 录 B**  
(规范性)  
**RT-PCR 检测**

**B.1 主要试剂及配制****B.1.1 RNA 提取试剂**

TRIzol 试剂、三氯甲烷、异丙醇、75%乙醇、DEPC 处理超纯水。

**B.1.2 RT-PCR 试剂**

5×RT 缓冲液、dNTP 混合液(各 10 mmol/L)、M-MuLV 反转录酶(200 U/μL)、RNA 酶抑制剂(40 U/μL)、10×PCR 缓冲液(含 20 mmol/L 的 Mg<sup>2+</sup>)、Taq DNA 聚合酶(2.5 U/μL)。

**B.1.3 50×TAE 缓冲液**

称取 Tris 108.0 g、Na<sub>4</sub>EDTA 9.3 g,加入约 800 mL 的纯水,充分搅拌溶解。然后加入 57.1 mL 的醋酸,充分搅拌。

加纯水定容到 1 L,室温保存。

**B.1.4 溴化乙锭(10 mg/mL)**

称取 1 g 溴化乙锭,加入 100 mL 纯水充分搅拌溶解,移入棕色瓶中,室温下避光保存。

溴化乙锭的工作浓度:0.5 μg/μL。

**B.1.5 琼脂糖凝胶**

称取一定量的琼脂糖,按比例加入 1×TAE 缓冲液,加热溶解后,倒入制胶盘中,冷却凝固后即可使用。通常使用 1.5%~2%琼脂糖凝胶。

**B.2 引物序列与合成**

根据豇豆花叶病毒属病毒外壳蛋白( Coat protein, CP)基因保守区域设计引物(见表 B.1),由生物公司合成。

**表 B.1 豇豆花叶病毒属病毒简并引物序列**

引物名称	引物序列 <sup>a</sup>	产物大小 <sup>b</sup>
ComoV-2-F2-M4	<u>GTTTTCCAGTCACGACGATGGBTGYCCHYAYYTRTRYGC</u>	约 600 bp 或约 640 bp
ComoV-2-R1-M1	<u>AGTCACGACGTTGTASSHMWWYT CRAADCCVBYRTTNGGHCC</u>	
M13-M4	GTTTTCCAGTCACGAC	
M13-M1	AGTCACGACGTTGTA	
注: M13-M4 和 M13-M1 为非互补的测序引物序列。		
<sup>a</sup> R=A/G, Y=C/T, D=G/A/T, B=G/T/C, H=A/T/C, W=A/T, S=G/C, M=A/C, V=A/G/C, N=A/G/T/C。		
<sup>b</sup> 多数病毒的扩增长度约为 600 bp,但 APMoV 约为 640 bp。		

### B.3 总 RNA 的提取

采用 TRIzol 试剂提取总 RNA,具体操作如下。

- 取约 0.1 g 的病叶放入研钵中,加入 1 mL 的 TRIzol 试剂充分研磨;或在 200  $\mu\text{L}$  的样品提取液中加 800  $\mu\text{L}$  的 TRIzol 试剂,然后在 15  $^{\circ}\text{C}$ ~30  $^{\circ}\text{C}$  下静置 5 min。
- 在 2  $^{\circ}\text{C}$ ~8  $^{\circ}\text{C}$  下 12 000g 离心 10 min。
- 把上清液转移到一新管中,并加入 0.2 mL 三氯甲烷,盖好管盖,剧烈振荡 15 s,15  $^{\circ}\text{C}$ ~30  $^{\circ}\text{C}$  下静置 3 min。
- 在 2  $^{\circ}\text{C}$ ~8  $^{\circ}\text{C}$  下 12 000g 离心 15 min,取上层无色水相(约 600  $\mu\text{L}$ )转移到新管中。
- 在得到的水相溶液中加入等体积异丙醇,混匀,15  $^{\circ}\text{C}$ ~30  $^{\circ}\text{C}$  下静置 10 min。
- 在 2  $^{\circ}\text{C}$ ~8  $^{\circ}\text{C}$  下 12 000g 离心 10 min,弃上清液。
- 加入 1 mL 75%乙醇洗涤沉淀。
- 在 2  $^{\circ}\text{C}$ ~8  $^{\circ}\text{C}$  下 7 500g 离心 3 min,弃上清液。
- 瞬离,用移液器吸走残留液体。
- 室温放置晾干,待乙醇挥发完毕,加入 100  $\mu\text{L}$  DEPC 处理超纯水,并充分溶解,置于-20  $^{\circ}\text{C}$  保存备用。

注:在能够保证总 RNA 质量的情况下,也可以采用其他植物总 RNA 提取方法。

### B.4 反转录(cDNA 合成)

以提取的样品总 RNA 为模板,以 oligo d(T)<sub>18</sub> 作为反转录引物合成 cDNA。

在 0.6 mL 反应管中,加入 2  $\mu\text{L}$  的 oligo d(T)<sub>18</sub> (10  $\mu\text{mol/L}$ )、4  $\mu\text{L}$  总 RNA、8  $\mu\text{L}$  DEPC 处理超纯水,于 95  $^{\circ}\text{C}$  水浴 10 min 后,迅速置于冰上 5 min。瞬离,继续加入 4  $\mu\text{L}$  的 5 $\times$ M-MLV buffer、1  $\mu\text{L}$  的 dNTPs(10 mmol/L)、0.5  $\mu\text{L}$  的 M-MLV 反转录酶(200 U/ $\mu\text{L}$ )、0.5  $\mu\text{L}$  的 RNA 酶抑制剂(40 U/ $\mu\text{L}$ )、于 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴 1 h 后,70  $^{\circ}\text{C}$  水浴 15 min,合成 cDNA,置于-20  $^{\circ}\text{C}$  的冰箱中保存。

注:在保证 cDNA 合成质量的情况下,也可以采用其他反转录试剂或试剂盒。

### B.5 PCR 扩增

可采用以下的 2 种反应体系之一进行 PCR 扩增。

2 对引物反应体系(25  $\mu\text{L}$ ):2.5  $\mu\text{L}$  10 $\times$ EasyTaq Buffer(Mg<sup>2+</sup> plus),0.5  $\mu\text{L}$  dNTPs(10 mmol/L),0.3  $\mu\text{L}$  EasyTaq DNA 聚合酶,1.0  $\mu\text{L}$  引物 ComoV-2-F2-M4(1  $\mu\text{mol/L}$ ),1.0  $\mu\text{L}$  引物 ComoV-2-R2-M1(1  $\mu\text{mol/L}$ ),1.0  $\mu\text{L}$  引物 M13-M4(10  $\mu\text{mol/L}$ ),1.0  $\mu\text{L}$  引物 M13-M1(10  $\mu\text{mol/L}$ ),3.0  $\mu\text{L}$  cDNA 模板,DEPC 处理超纯水补足至 25  $\mu\text{L}$ 。

1 对引物反应体系(25  $\mu\text{L}$ ):2.5  $\mu\text{L}$  10 $\times$ EasyTaq Buffer(plus Mg<sup>2+</sup>),0.5  $\mu\text{L}$  dNTP(10 mmol/L),0.3  $\mu\text{L}$  EasyTaq(5 U/ $\mu\text{L}$ ),2  $\mu\text{L}$  引物 ComoV-2-F2-M4(10  $\mu\text{mol/L}$ ),2  $\mu\text{L}$  ComoV-2-R1-M1(10  $\mu\text{mol/L}$ ),3  $\mu\text{L}$  cDNA 模板,DEPC 处理超纯水补足至 25  $\mu\text{L}$ 。

PCR 反应程序:95  $^{\circ}\text{C}$  变性 3 min;94  $^{\circ}\text{C}$  变性 45 s,42  $^{\circ}\text{C}$  复性 45 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 60 s,5 个循环;94  $^{\circ}\text{C}$  变性 45 s,45  $^{\circ}\text{C}$  复性 45 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 60 s,30 个循环;最后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 7 min,-4  $^{\circ}\text{C}$  保存。

### B.6 琼脂糖凝胶电泳

取 5  $\mu\text{L}$  的 RT-PCR 产物与 1  $\mu\text{L}$  的 6 $\times$ 上样缓冲液混合均匀,并加到置于 1 $\times$ TAE 缓冲液的 2% 琼脂糖凝胶的加样孔中,然后在一定电压下(如 120 V)电泳。电泳结束后,放入装有 0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  的溴化乙锭(EB)溶液的容器中染色,然后在清水中清洗后,在凝胶成像系统中观察,拍照,并保存照片。

注:也可以采用其他染料染色。

## B.7 结果判定

在阳性对照产生预期大小条带(约 600 bp 或 640 bp)、阴性对照和空白对照未产生预期大小条带情况下:

- 如果检测样品产生约 600 bp 或 640 bp 大小的条带,RT-PCR 检测结果为阳性;
- 如果检测样品未产生约 600 bp 或 640 bp 大小的条带,RT-PCR 检测结果为阴性。

**附 录 C**  
**(规范性)**  
**序列测定与分析**

**C.1 序列测定**

**C.1.1 直接测序**

PCR 产物经回收后,用引物 ComoV-2-F2-M4 和 ComoV-2-R1-M1 或引物 M13-M4 和 M13-M1 进行正反向测序,然后进行序列拼接并去除引物位置序列。

注:当直接测序出现杂峰、套峰时,需进一步进行克隆测序。

**C.1.2 克隆测序**

PCR 产物经回收后,连接到载体上,转化到感受态细胞中,挑取阳性克隆子进行测序。

每个样品至少测 5 个阳性克隆子。

**C.2 序列分析**

利用在线软件基本局部比对搜索工具(Basic Local Alignment Search Tool,BLAST)的 blastx 进行序列比对分析,计算与已知病毒序列的一致性。

网址参见 [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastx&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastx&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)。

### 参 考 文 献

- [1] Thompson J R, Dasgupta I, Fuchs M, et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Secoviridae. *Journal of General Virology*, 2017, 98:529-531.
- [2] 洪健, 李德葆, 周雪平. 植物病毒分类图谱. 北京: 科学出版社, 2001:87-92.
- [3] 廖富荣, 方志鹏, 林振基, 等. 一种豇豆花叶病毒属病毒广谱检测试剂盒及其检测方法: ZL201410478602.8[P]. 2016-04-20.
- [4] Alcalá-Briseño, Lotrakul P, Valverde R A. Genome sequence and phylogenetic analysis of a novel comovirus from tabasco pepper (*Capsicum frutescens*)[J]. *Virus Genes*, 2019, 55:854-858.
- [5] Chiquito-Almanza E, Zamora-Aboytes J M, Medi Na H R, et al. Complete genome sequence of a novel comovirus infecting common bean[J]. *Archives of Virology*, 2020, 165:1505-1509.
-