



AFLP 试剂盒(PstI/MseI 型) 50T

产品简介:

- 1、适用于测定动、植物、微生物基因组 DNA 多态性。
- 2、酶切连接一步完成，有利于用户操作，结果更加可靠。
- 3、PCR 系统已经优化成为即用型 PCR 预混液，只需在制品溶液中加入模板和引物便可进行 PCR 反应，大大简化了操作过程，进一步减少了 PCR 操作过程中的污染。

简单步骤:

基因组 DNA 提取→限制性酶切连接→预扩增→选择性扩增

试剂盒组成:

DNA 提取系统

溶液 A	45ml	2×CTAB 提取缓冲液
溶液 B	50ml	1×CTAB 沉淀液
溶液 C	2 ml	3M NaAC
溶液 D	500μl	RNaseA (10mg/ml)

注: 常用试剂需自备

AFLP 核心试剂

PstI/MseI	100μl
10×Reaction buffer	150μl
10mM ATP	150μl
Adapter	50μl
T4 DNA Ligase (3u/μl)	50μl
genomic DNA (50ng/μl)	20μl
Pre-amp primer	50μl
AFLP-Water	10ml
AFLP-TE	10ml
2×AFLP Mix	1ml×10 支
PstI primers(8 条)	各 200μl
MseI primers(8 条)	各 200μl

注:

PstI Adapter 1: 5'> CTCGTAGACTGCGTACATGCA<3'

PstI Adapter 2: 5'>TGTACGCAGTCTAC<3'

MseI Adapter 1: 5'>GACGATGAGTCCTGAG<3'

MseI Adapter 2: 5'>TACTCAGGACTCAT<3'

PstI Pre: 5'>GACTGCGTACATGCAG<3'

MseI Pre: 5'>GATGAGTCCTGAGTAAC<3'

PstI primers (5ng/μl): P-GAA/GAC/GAG/GAT/GTA/GTC/GTG/GTT 各 200μl

Mse I primers (30ng/μl): M-CAA/CAC/CAG/CAT/CTA/CTC/CTG/CTT 各 200μl



具体操作:

基因组 DNA 提取

- 1) 组织要新鲜, 尽可能嫩, 长期保存样品需液氮或-70℃以下冰箱。
- 2) 本方法 0.2g 组织可提取约 20μg 纯 DNA, 因此组织最好在 0.05-0.1g 左右即可。
- 3) 取植物新鲜组织 50mg 或者干粉样品 30mg, 加入液氮充分研磨成粉末状。样品量不应超过 50mg (干粉样品 30mg), 过多的样品使得裂解不充分, 最终会导致基因组 DNA 提取量减少且纯度低。
- 4) 将粉末放到装有 800ul 2×CTAB 提取缓冲液的 2ml 离心管, 60℃ 预热 30min, 其间混匀二至三次取出样品于室温放置。(如需消化 RNA, 可在此步骤加入 10μl RNaseA, 室温放置 10min)
- 5) 待样品冷却到室温加入 800ul 氯仿: 异戊醇 (24: 1), 振荡混匀, 12000rpm 离心 10-15min。
- 6) 重复步骤 5。
- 7) 取上清到一新 2ml EP 管中加入 1.5 倍体积 1×CTAB 沉淀液 (1ml 左右)。
- 8) 放置 20—30min, 12000rpm 离心 15min。
- 9) 将沉淀晾干溶于 200ul TE-buffer (溶解)。
- 10) 加入 400ul 95%乙醇, 20ul 3M NaAC, -20 度沉淀 1h。
- 11) 4℃ 12000rpm 离心 15min。
- 12) 500ul 75%乙醇洗, 12000rpm 离心 10min。
- 13) 加入 30-50ul TE buffer 或灭菌双蒸水溶 DNA。
- 14) 琼脂糖电泳检测: 建议使用 0.8%琼脂糖凝胶。
- 15) 注: 0.1-0.2g 组织可用 100μl 溶液 F 溶解, 0.5g 组织, 溶液 F 可增加至 300μl, 此时 DNA 浓度大约为 50ng/μl。

限制性酶切连接

	20ul 体系
对照模板 DNA/样品 DNA	4μl
Adapter	1μl
PstI/MseI	2μl
10×Reaction buffer	2.5μl
10mM ATP	2.5μl
T4 DNA Ligase	1μl
AFLP-Water	7μl

混匀离心数秒



37℃ 保温 5 小时



8℃ 保温 4 小时



4℃ 过夜



预扩增

	25ul 体系
酶切链接产物	2 μ l
Pre-ampmix	1 μ l
2 \times AFLP Mix	12.5 μ l
AFLP-Water	9.5 μ l

离心数秒，按下列参数进行 PCR 扩增

预变性	94 $^{\circ}$ C	2min	} 30cycles
变性	94 $^{\circ}$ C	30s	
退火	56 $^{\circ}$ C	30s	
延伸	72 $^{\circ}$ C	80s	
延伸加时	72 $^{\circ}$ C	5min	

选择性 PCR 扩增

	25ul 体系
预扩增产物（用前需稀释）	2 μ l
PstI 引物	1 μ l
MseI 引物	1 μ l
2 \times AFLP Mix	12.5 μ l
AFLP-Water	8.5 μ l

离心数秒，按下列参数进行 PCR 扩增

预变性	94 $^{\circ}$ C	2min	} 14cycles
变性	94 $^{\circ}$ C	30s	
退火	65 $^{\circ}$ C	30s	
延伸	72 $^{\circ}$ C	80s	
以上 14 轮，退火温度每轮递减 0.7 $^{\circ}$ C			
变性	94 $^{\circ}$ C	30s	} 23cycles
退火	55 $^{\circ}$ C	30s	
延伸	72 $^{\circ}$ C	80s	
延伸加时	72 $^{\circ}$ C	5min	

特别说明：

- 1、DNA 提取系统可提取 50 个样品（50-100mg/样品），本试剂盒适用于绝大多数样品的 DNA 提取，对于多糖、多酚等含有特殊成分样品，客户需根据具体情况进行调整。
- 2、核心试剂提供酶切链接反应 50T、预扩增反应 50T、选择性扩增 800T。
- 3、预扩增产物一般情况按 1:20 稀释后直接用做选扩模板，如条带较弱应减少稀释比例。可根据具体 1:10 或 1:15 稀释备用。
- 4、建议使用 2 个典型样品进行选择引物的筛选。
- 5、选择性扩增后的产物可通过聚丙烯酰胺电泳进行检测。