



AFLP 试剂盒(HindIII/MseI 型)

一、简介

●适用于测定动、植物、微生物基因组 DNA 多态性。

- 1、组成：DNA 快速提取系统（国外试剂盒不配），AFLP 核心试剂，AFLP 引物。
- 2、试剂盒自带 2000u Taq 酶（国外试剂盒不带），使用过程中如 Taq 酶不够，用户须自己购买。
- 3、AFLP 对 DNA 质量要求高，本试剂盒赠 DNA 提取系统，所提 DNA 质量符合 AFLP 要求。
- 4、酶切连接一步完成（本公司独有），有利于用户操作，结果更加可靠。
- 5、比国外同类产品价格低二分之一，性能优于国外同类产品。

本公司另有其它 AFLP 试剂盒：PstI/MseI 型,EcoR I/MseI 型,PstI 型

本公司有 AFLP 电泳所需的测序电泳槽，分大中小三种。

本公司另有制胶所需的亲和硅烷和剥离硅烷，系本公司自行开发产品，主要原料均系进口试剂，经本公司实验室长期应用，效果甚佳。

本公司经销 RAPD 引物及配套试剂。

二、试剂盒组成：

一) 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)

二) AFLP 核心试剂

Hind III/Mse I (4u/μl 每种)	100μl	10×Reaction butfer 10mM ATP	150μl 150μl
adapter	50μl	T4 DNA Ligase (3u/μl)	50μl
genomic DNA (50ng/μl)	20μl	Pre-amp primer	50μl
dNTPs	2.0ml		
AFLP-Water	10ml		
AFLP-TE	10ml		
10×PCR buffer	10ml		
Taq 酶 (2u/μl)	2000u		

三) AFLP 引物

Hind III primers (5ng/μl)

Primer H-AAC	200μl
Primer H-AAG	200μl
Primer H-ACA	200μl
Primer H-ACT	200μl
Primer H-ACC	200μl
Primer H-ACG	200μl
Primer H-AGC	200μl
Primer H-AGG	200μl

Mse I primers (30ng/μl)

Primer M-CAA	200μl
Primer M-CAC	200μl
Primer M-CAG	200μl
Primer M-CAT	200μl
Primer M-CTA	200μl
Primer M-CTC	200μl
Primer M-CTG	200μl
Primer M-CTT	200μl

三、操作步骤

免费电话：800-810-5636

北京市海淀区学院南路 32 号鼎国生物

电话：010-62219305 62254636 62273262 62237635

E-mail: master@dingguo.com

邮政编码：100088

传真：010-62267347

<http://www.dingguo.com>



一) 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 50 mg 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 50 mg (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 度预热 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 15min。
- 6) 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)
- 7) 放置 20—30min, 12000rpm 离心 15min
- 8) 将沉淀晾干溶于 200ul TE-buffer (溶解)
- 9) 加入 400 ul 95%乙醇, 20ul 3M NaAC, -20 度沉淀 1h
- 10) 4 度 12000rpm 离心 15min
- 11) 500ul 75%乙醇洗, 12000rpm 离心 10min
- 12) 加入 30-50ul TE buffer 或灭菌双蒸水溶 DNA
- 13) 琼脂糖电泳检测

用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测, 电泳缓冲液 0.5×TBE

注: 0.1-0.2g 组织可用 100μl 溶液 F 溶, 0.5g 组织, 溶液 F 可增加至 300μl, 此时 DNA 浓度大约为 50ng/μl。

二) 限制性酶切及连接

在 0.5ml 离心管中加入(20ul 体系)

	对照	样品
对照模板 DNA	4 (50ng/μl)	
DNA 模板(浓度:1μl 电泳可见即可,或 50ng/μl)		4μl
Adapter	1μl	1μl
Hind III /Mse I	2μl	2μl
10XReaction buffer	2.5μl	2.5μl
10mM ATP	2.5μl	2.5μl
T4 Ligase	1μl	1μl
AFLP-Water	7μl	7μl
混匀离心数秒 37℃保温 5hr, 8℃保温 4hr, 4℃过夜。		

三) 预扩增

1、在 0.5ml 或 0.2ml 离心管中按下列方式加入:

	体积(25μl 体系)
模板 DNA	2μl
Pre-ampmix	1μl
dNTPs	0.5μl
10XPCR buffer	2.5μl
Taq DNA polymease	0.5μl



AFLP-Water 18.5 μ l

离心数秒，按下列参数进行 PCR 扩增

- 1).94 $^{\circ}$ C 2min
- 2).94 $^{\circ}$ C 30S , 56 $^{\circ}$ C 30S , 72 $^{\circ}$ C 80S(循环 30 轮)
- 3).72 $^{\circ}$ C 5min

四) 选择性 PCR 扩增

- 1、按需要选择引物对。
- 2、用 AFLP-TE 将预扩增产物按 1:20 稀释,作为选扩模板.
- 3、在 0.5ml 或 0.2ml 离心管中，按下列方式加入：

	体积(25 μ l 体系)
预扩增稀释样品	2 μ l
10XPCR buffer	2.5 μ l
dNTPs	0.5 μ l
Hind III 引物	1 μ l (共 8 种，按需要挑选一种)
Mse I 引物	1 μ l (共 8 种，按需要挑选一种)
Taq 酶	0.5 μ l
AFLP-Water	17.5 μ l

以上混匀，离心数秒，按下列参数 PCR 循环。

- 1) .预变性 94 $^{\circ}$ C 2min
- 2) .第一轮扩增参数：94 $^{\circ}$ C 30S , 65 $^{\circ}$ C 30S , 72 $^{\circ}$ C 80S
- 3) .以后每轮循环退火温度递减 0.7 或 1 $^{\circ}$ C，扩增 12 或 10 轮。
注：递减 0.7 $^{\circ}$ C，则扩增 12 轮，递减 10 $^{\circ}$ C则扩增 10 轮。
- 4) .接着按下列参数扩增 23 轮
94 $^{\circ}$ C 30S , 55 $^{\circ}$ C 30S , 72 $^{\circ}$ C 80S
- 5) .延伸加时 72 $^{\circ}$ C 5min

五) 凝胶分析

- 1、本步骤试剂均须自备
- 2、PCR 扩增产物：甲酰胺上样液（98%甲酰胺，10mmEDTA，0.25%溴酚兰）8:3 混合，95 $^{\circ}$ C 变性 8min，然后立即冰浴。
- 3、制备 5%或 6%变性胶，变性胶厚度为 0.4mm（方便银染）。
- 4、预电泳恒功率 80-90W,约 30min。
- 5、上样 5-7 μ l 样品。
- 6、恒功率 40-50W,电泳至溴酚兰至接近胶底后，停止电泳。
- 7、银染胶，观察结果。
- 8、银染方法推荐(见本公司银染试剂盒)
 - 1) 10%醋酸固定 20-30min，可过夜。
 - 2) 蒸馏漂洗 2-3 次。
 - 3) 0.1%硝酸银，0.56%甲醛，染色 30min，蒸馏水轻微漂洗数秒。
 - 4) 0.28M 碳酸钠，0.56%甲醛，200 μ l 硫代硫酸钠(10mg/ml),低温显色 5-10min。
 - 5) 当条带与背景对比度最清楚时，用 10%醋酸终止显色。
 - 6) 用蒸馏水漂洗 2min。