FISH-AFLP 试剂盒(EcoRI/MseI 型)

50T

产品简介：

适用于测定动、植物、微生物基因组 DNA 多态性。

酶切连接一步完成，有利于用户操作，结果更加可靠。

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

EcoR I/Mse I	100μl	
10×Reaction butfer	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	
EcoR I primers(8 条)	各 200μl	均 5’FAM 标记
Mse I primers(8 条)	各 200μl	

注：

EcoRI Adapter 1：5’>CTC GTA GAC TGC GTA CC <3’
EcoRI Adapter 2：5’>AAT TGG TAC GCA GTC TAC <3
MseI Adapter 1：5’>GAC GAT GAG TCC TGA G<3’
MseI Adapter 2：5’>TAC TCA GGA CTC AT<3’
EcoRI Pre：5’> GAC TGC GTA CCA ATT CA< 3’
MseI Pre：5’> GAT GAG TCC TGA GTA A C<3’

EcoR I primers（5ng/μl）：E-AAC/AAG/ACA/ACT/ACC/ACG/AGC/AGG	各 200μl	均 5’FAM 标记
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 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 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 400 ul 95%乙醇，20ul 3M NaAC，-20 度沉淀 1h。
11) 4 度 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
EcoR I/Mse I	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	2μl
Pre-ampmix	1μl
2×AFLP Mix	12.5μl
AFLP-Water	9.5μl

离心数秒，按下列参数进行 PCR 扩增

预变性	94℃	2min	
变性	94℃	30s	30cycles
退火	56℃	30s	
延伸	72℃	80s	
延伸加时	72℃	5min	

选择性 PCR 扩增

	25ul 体系
预扩增产物（用前需稀释）	2μl
EcoR I 引物	1μl
Mse I 引物(均 5'FAM 标记)	1μl
2×AFLP Mix	12.5μl
AFLP-Water	8.5μl

离心数秒，按下列参数进行 PCR 扩增

预变性	94℃	2min	
变性	94℃	30s	14cycles
退火	65℃	30s	
延伸	72℃	80s	

以上 14 轮，退火温度每轮递减 0.7℃

变性	94℃	30s	23cycles
退火	55℃	30s	
延伸	72℃	80s	
延伸加时	72℃	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的样品，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性引物的筛选。

5、 选择性扩增后的产物可通过聚丙烯酰胺电泳进行检测。