

天
净
沙
系
列

CAT#:900903-1600
低温运输, -20℃保存

BINGENE

AFLP 试剂盒 (EcoRI-MseI)

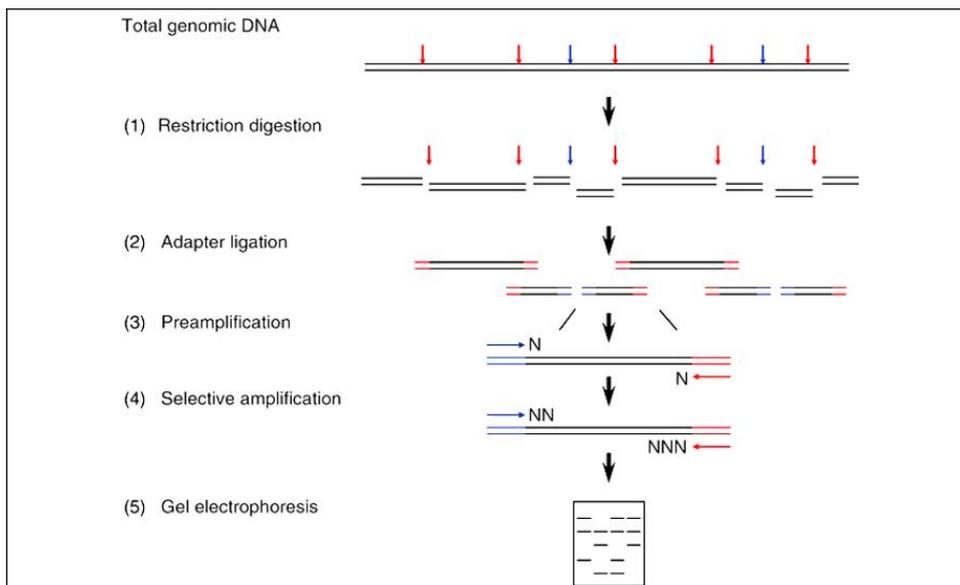
使用手册 V1.0

江苏天净沙基因诊断技术有限公司

网址: www.bingene.com; 电话: 400-6005850; 电邮: order@bingene.com

产品及特点

AFLP (amplified fragment length polymorphism, 扩增片段长度多态性) 原理是一种结合 RFLP 和 PCR 技术特点的、迄今为止最有效分子标记分型技术, 其原理如下:



本产品在传统 AFLP-PCR 的基础上经过精心优化而开发, 它具有下列特点:

1. 一站式, 足够 50 次酶切-连接反应、50 次预扩反应和 1500 次 AFLP PCR (30 uL 体系计算), 但不包括 DNA 纯化和带型分析试剂 (如 PAGE 电泳试剂和银染试剂)。
2. 本产品提供 EcoRI-MseI 组合, 适用于 GC 含量在 50% 以上的基因组。对 GC 含量在 50% 以下的基因组, 需从本公司另外采购 EcoRI-TaqI 组合的 AFLP 试剂盒。
3. 各种参数都经过优化, 一次 PCR 所得 AFLP 片段数一般在 10-100 之间, 可重复性好, 误差小于 0.6%。
4. 本产品适用于基因组在 500 Mb-6000 Mb 的材料 (如动物和植物)。对于基因组在 50-500 Mb 的材料 (如细菌和真菌) 或 50Mb 以下的材料 (如质粒, cosmid, BAC, YAC 和 PAC 等), 需要分别另购+0 型预扩增引物对和+2 型扩增引物。

规格及成分

本产品使用小扁盒包装

| 成份 | 编号 | 规格 | 包装材料 |
|------------------------|----------|-------------|-----------|
| AFLP 酶切-连接 Buffer, 10× | 900903a | 100 uL | 0.5mL 绿盖管 |
| AFLP EcoRI-MseI 酶混合液 | 900903b | 50 uL | 0.5mL 红盖管 |
| AFLP EcoRI-MseI 接头混合物 | 900903c | 1000 uL | 1.5mL 黄盖管 |
| T4 DNA 连接酶 | 120411 | 50 uL | 0.5mL 蓝盖管 |
| PCR MagicMix 3.0 | 90805 | 5 mL×6 | 热封口塑料袋 |
| +1 型 EcoRI-MseI 预扩增引物对 | 900903d | 100 uL (白盖) | 0.5mL 白盖管 |
| +3 型 EcoRI 引物 (8 条) | 900903e | 各 1 OD 干粉 | 十孔盒 1 |
| +3 型 MseI 引物 (8 条) | 900903f | 各 1 OD 干粉 | 十孔盒 2 |
| 使用手册 | 900903sc | 1 份 | 无 |

| 十孔盒 1 成分 | 十孔盒 2 成分 |
|-------------------------------|------------------------------|
| +3 型 EcoRI 引物之 1:E-AAC 引物,1OD | +3 型 MseI 引物之 1:M-CAA 引物,1OD |
| +3 型 EcoRI 引物之 2:E-AAG 引物,1OD | +3 型 MseI 引物之 2:M-CAC 引物,1OD |
| +3 型 EcoRI 引物之 3:E-ACA 引物,1OD | +3 型 MseI 引物之 3:M-CAG 引物,1OD |
| +3 型 EcoRI 引物之 4:E-ACT 引物,1OD | +3 型 MseI 引物之 4:M-CAT 引物,1OD |
| +3 型 EcoRI 引物之 5:E-ACC 引物,1OD | +3 型 MseI 引物之 5:M-CTA 引物,1OD |
| +3 型 EcoRI 引物之 6:E-ACG 引物,1OD | +3 型 MseI 引物之 6:M-CTC 引物,1OD |
| +3 型 EcoRI 引物之 7:E-AGC 引物,1OD | +3 型 MseI 引物之 7:M-CTG 引物,1OD |
| +3 型 EcoRI 引物之 8:E-AGG 引物,1OD | +3 型 MseI 引物之 8:M-CTT 引物,1OD |

运输及保存 低温运输、-20℃保存，有效期一年。

自备试剂 超纯水、Southern 级 DNA 纯化试剂，尿素-PAGE 电泳套装，银染试剂盒。

使用方法

一、 DNA 提取（本试剂盒不提供相关试剂）

用户需要自备 50-500ng Southern 级别的基因组 DNA，DNA 酶切彻底是 AFLP 的关键，所以最好预实验以确保 DNA 能够被 EcoRI 和 MseI 内切酶彻底切开。

二、 限制性酶切和接头连接反应（本试剂盒足够 50 次 20uL 体系的酶切-连接反应）

1. 在 0.2 mL 离心管中设置 20 uL 的限制性内切酶酶切体系：

| 成分 | 用量 |
|------------------------|-------------------------------------|
| AFLP 酶切-连接 Buffer, 10× | 2 uL |
| 样品 DNA | 50 ng (对小基因组材料) 500 ng (对大基因组材料) |
| AFLP EcoR I-Mse I 酶混合液 | 1 uL |
| 自备超纯水 | 加水到 20 uL |

2. 轻柔混匀并短暂离心后，37℃保温 2 小时酶切（若 PCR 仪器不带热盖，则必须加 50uL 自备石蜡油，否则水分会蒸发影响反应。下同）。反应结束后 70℃保温 15 分钟灭活酶。

3. 在体系中加入 20 uL EcoRI-MseI 接头混合物和 1 uL T4 DNA 连接酶，轻柔混匀并短暂离心，20℃保温 2-3 小时让接头跟酶切 DNA 片段相连。

4. 反应结束后在 40uL 的连接反应体系中加入自备 360uL 超纯水，得到连接液 10 倍稀释液，直接作为模板用于下步的预扩增或放-20℃保存待用。

三、 预扩增（本试剂盒足够 40 次 30uL 体系的预扩增反应）

5. 在 0.2 mL 离心管中设置 30 uL 的预扩 PCR 体系：

| 成分 | 体积 |
|------------------------|-------|
| 连接液 10 倍稀释液（来于第 4 步） | 5 uL |
| +1 型 EcoRI-MseI 预扩增引物对 | 10 uL |

| |
|------------------|
| PCR MagicMix 3.0 |
|------------------|

| |
|-------|
| 15 uL |
|-------|

- 离心数秒，按下列参数进行 PCR 预扩增 (**注意：第一步是预合成，跟常规 PCR 不同**)：
预合成 72℃ 2 分钟，PCR 循环 20 次 (94℃30S, 56℃60S, 72℃60S)
- 取 10 uL PCR 产物在 1.5%琼脂糖胶上电泳检测，产物应为大小在 100-1500 bp 的模糊条带。本试剂盒的 PCR mix 含上样液和示踪染料，故不需要额外加 Loading Buffer。示踪染料的泳动速度相当于 50bp 的 DNA 片段。
- 在剩下的 20uL 预扩增反应液中加入 980uL 自备超纯水，相当于稀释 50 倍，所得 50 倍 PCR 稀释液将直接作为模板用于下步扩增或放-20℃保存待用。

四、选择性 PCR 扩增

- 制备引物：在十孔盒 1 和十孔盒 2 的共 16 管引物干粉中分别加入 1100uL 自备超纯水，震荡混匀得 16 管引物母液。每管取 66uL 引物母液与 1034uL 超纯水在 1.5mL 离心管中混合得 1100uL 此引物的工作液，共 16 管引物工作液。
- 在 0.2 mL PCR 管中，加入下列成分 (第一次 PCR 时需要测试所有 8×8=64 种引物组合，需设置 64 个 PCR 反应。若已经知道哪个一种或几种引物组合适合，则可以直接使用选中的引物)，下面以一种 3 型 EcoR I 引物和+3 型 Mse I 引物组合为例：

| 成分 | 体积 |
|------------------------------|-------|
| 50 倍 PCR 稀释液 | 5 uL |
| AFLP+3 型 EcoR I 引物工作液 (八种之一) | 5 uL |
| AFLP+3 型 Mse I 引物工作液 (八种之一) | 5 uL |
| PCR MagicMix 3.0 | 15 uL |

- 轻柔混匀后离心数秒，按下列参数进行 PCR：

| | 温度 | 时间 |
|------------|-----|--------------------|
| PCR (13 次) | 94℃ | 30 秒 |
| | 65℃ | 30 秒 (每次循环递减 0.7℃) |
| | 72℃ | 60 秒 |
| PCR (23 次) | 94℃ | 30 秒 |
| | 55℃ | 30 秒 |
| | 72℃ | 60 秒 |
| 延伸 | 72℃ | 5 分钟 |

四、尿素-PAGE 电泳和银染 (需另购试剂并按相关手册进行)

- PCR 结束后进行尿素-PAGE 电泳和银染分析，本试剂盒不含相关试剂。

关联产品

AFLP 试剂盒 (EcoRI-TaqI)