天净沙系列

CAT#:900904

低温运输，-20℃保存

AFLP 试剂盒（EcoRI-TaqI）

AFLP Kit（EcoRI-TaqI）

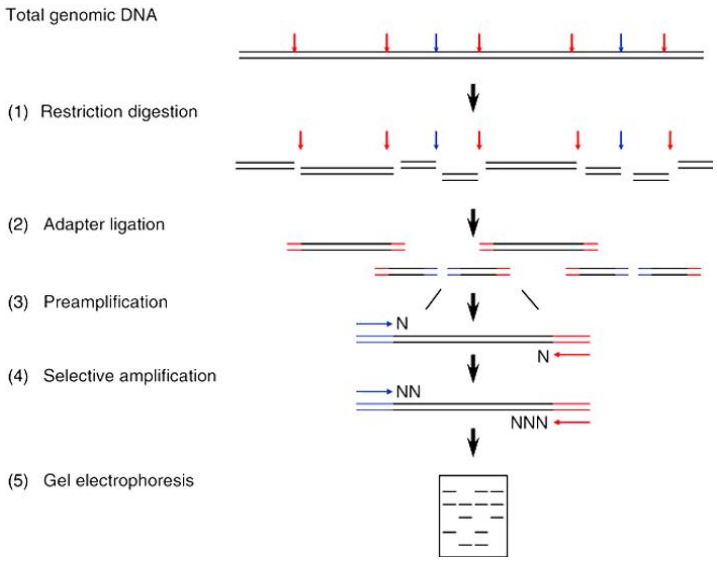
使用手册 V0.5

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

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 技术特点的一种分子标记分型技术，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 μL 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-TaqI 组合，适用于 GC 含量在 50%以下的基因组。对 GC 含量在 50%以上的基因组，需从本公司另外采购 EcoRI-MseI 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 50-500 Mb 的材料（如细菌和真菌）或 50 Mb 以下的材料（如质粒，cosmid，BAC，YAC 和 PAC 等）。对于基因组在 500 Mb-6000 Mb 的材料（如动物和植物），需要分别另购+0 型预扩增引物对和+2 型扩增引物。
5. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品采用小扁盒包装

成份	编号	规格	包装
AFLP 酶切-连接-预扩增相关成分	900904pt1	50 次	十孔盒
AFLP +3 型 EcoRI 引物系列	900904pt2	8 条	十孔盒
AFLP +3 型 TaqI 引物系列	900904pt3	8 条	十孔盒
AFLP PCR 成分	900904pt4	5 mL×6	热封塑料袋

使用手册	900904sc	1 份	无

上述成分详情见下列表格

第一个十孔盒成分编号为：900904pt1，名称为：AFLP 酶切-连接-预扩增相关成分

成份	编号	规格	包装
AFLP 酶切-连接 Buffer，10×	900904a	100 μL	0.5 mL 绿盖管
AFLP EcoRI-TaqI 酶混合液	900904b	50 μL	0.5 mL 红盖管
AFLP EcoRI-TaqI 接头干粉	900904c1	50 次	1.5 mL 紫盖管
AFLP EcoRI-TaqI 接头溶解液	900904c2	1 mL	1.5 mL 黄盖管
+1 型 EcoRI-TaqI 预扩增引物干粉	900904d	40 次	0.5 mL 白盖管×4
T4 DNA 连接酶，5 U/μL	120411	50 μL	0.5 mL 蓝盖管

第二个十孔盒成分编号为：900904pt2，名称为：AFLP +3 型 EcoRI 引物系列

成份	编号	规格	包装
E-AAC 引物干粉	900904pt2-1	1 OD	1.5 mL 本色压盖管
E-AAG 引物干粉	900904pt2-2	1 OD	1.5 mL 本色压盖管
E-ACA 引物干粉	900904pt2-3	1 OD	1.5 mL 本色压盖管
E-ACT 引物干粉	900904pt2-4	1 OD	1.5 mL 本色压盖管
E-ACC 引物干粉	900904pt2-5	1 OD	1.5 mL 本色压盖管
E-ACG 引物干粉	900904pt2-6	1 OD	1.5 mL 本色压盖管
E-AGC 引物干粉	900904pt2-7	1 OD	1.5 mL 本色压盖管
E-AGG 引物干粉	900904pt2-8	1 OD	1.5 mL 本色压盖管

第三个十孔盒成分编号为：900904pt3，名称为：AFLP +3 型 TaqI 引物系列

成份	编号	规格	包装
T-CAA 引物干粉	900904pt3-1	1 OD	1.5 mL 本色压盖管
T-CAC 引物干粉	900904pt3-2	1 OD	1.5 mL 本色压盖管
T-CAG 引物干粉	900904pt3-3	1 OD	1.5 mL 本色压盖管
T-CAT 引物干粉	900904pt3-4	1 OD	1.5 mL 本色压盖管
T-CTA 引物干粉	900904pt3-5	1 OD	1.5 mL 本色压盖管
T-CTC 引物干粉	900904pt3-6	1 OD	1.5 mL 本色压盖管

T-CTG 引物干粉	900904pt3-7	1 OD	1.5 mL 本色压盖管
T-CTT 引物干粉	900904pt3-8	1 OD	1.5 mL 本色压盖管

热封塑料袋成分编号为：900904pt4，名称为：AFLP PCR 成分

成份	编号	规格	包装
2×PCR MasterMix （含示踪剂）	990805	5 mL × 6	5 mL 本色瓶

运输及保存

低温运输、-20℃保存，有效期一年。

自备物品

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）

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

二、限制性内切酶酶切和 DNA-接头连接反应（本试剂盒足够 50 次 20μL 体系的酶切-连接反应）

2. 在 0.2 mL 离心管中设置 20 μL 的限制性内切酶酶切反应：

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

3. 轻柔混匀并短暂离心后，65℃保温 2 小时酶切（若 PCR 仪器不带热盖，则必须加 50 μL 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。
4. 在体系中加入 20 μL AFLP EcoRI-TaqI 接头混合物和 1 μL T4 DNA 连接酶，5 U/μL，轻柔混匀并短暂离心，20℃保温 3 小时让接头跟酶切 DNA 片段连接。第一次使用本试剂盒时，需要把本试剂盒提供的 1 mL AFLP EcoRI-TaqI 接头溶解液加入到 AFLP EcoRI-TaqI 接头干粉管，涡旋震荡半分钟，短暂离心，然后再取用。没有用完的需要放-20℃保存。
5. 反应结束后直接在 40 μL 的连接反应体系中加入自备 360 μL 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 30 μL 体系的预扩增反应）

6. 在 0.2 mL 离心管中设置 30 μL 的预扩 PCR 体系。首次使用本试剂盒时，需要在本试剂盒提供的+1 型 EcoRI-TaqI 预扩增引物干粉管中加入 100 μL 自备超纯水，涡旋震荡半分钟混匀，短暂离心后直接取用。没有用完的部分，需要放-20℃保存：

成分	体积
连接液 10 倍稀释液（来于第 4 步）	5 μL
+1 型 EcoRI-TaqI 预扩增引物	10 μL
2× PCR MasterMix	15 μL

7. 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℃ 30 S，56℃ 60 S，72℃ 60 S）
8. 取 10 μL 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 2× PCR MasterMix 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 50 bp 的 DNA 片段。
9. 在剩下的 20 μL 预扩增反应液中加入 980 μL 自备超纯水，相当于稀释 50 倍，所得 50 倍 PCR 模板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

10. 制备引物：在本试剂盒提供的 8 只+3 型 EcoRI 引物干粉和 8 只+3 型 TaqI 引物干粉中，每管分别加入 1100 μL 自备超纯水，震荡混匀得 16 管引物母液。每管取 66μL 引物母液与 1034 μL 超纯水在 1.5 mL 离心管中混合得 1100 μL 每个引物的相应工作液，共 16 管引物工作液。
11. 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。若已知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 Taq I 引物组合为例：

成分	体积
50 倍 PCR 模板稀释液	5 μL
AFLP+3 型 EcoR I 引物工作液（八种之一）	5 μL
AFLP+3 型 Taq I 引物工作液（八种之一）	5 μL
2× PCR MasterMix	15 μL

12. 轻柔混匀后离心数秒，按下列参数进行 PCR：

	温度	时间
PCR	94℃	30 秒

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

五、尿素-PAGE 电泳和银染（需另购试剂并按相关手册进行）

13. 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-MseI）