

# AFLP 原理和操作步骤

AFLP 是通过限制性内切酶片段的不同长度检测 DNA 多态性的一种 DNA 分子标记技术。

本 AFLP 技术主要特点：分析所需 DNA 量少，仅需 0.5g；可重复性好；多态性强；分辨率高；不需要 Southern 杂交；样品适用性广；稳定的遗传性。在技术特点上，AFLP 实际上是 RAPD 和 RFLP 相结合的一种产物。它既克服了 RFLP 技术复杂、有放射性危害和 RAPD 稳定性差，标记呈现隐性遗传的缺点，同时又兼有二者之长。近几年来，人们不断将这一技术完善、发展，使得 AFLP 迅速成为迄今为止最有效的分子。

## 一、 AFLP 原理

AFLP 也是通过限制性内切酶片段的不同长度检测 DNA 多态性的一种 DNA 分子标记技术。但 AFLP 是通过 PCR 反应先把酶切片段扩增，然后把扩增的酶切片段在高分辨率的顺序分析胶上进行电泳，多态性即以扩增片段的长度不同被检测出来。实验中酶切片段首先与含有与其共同粘末端的人工接头连接，连接后的粘末端顺序和接头顺序就作为以后 PCR 反应的引物结合位点。实验中，根据需要通过选择在末端上分别填加了 1~3 个选择性核苷的不同引物，可以达到选择性扩增的目的。这些选择性核苷酸使得引物能选择性地识别具有特异配对顺序的内切酶片段，进行结合，导致特异性扩增。

## 二、 实验试剂

Taq 酶、EcoRI/ MseI/EcoRI/ MseI 接头、E+A 引物 M+C 引物、T4DNALigaseE 和 M 引物、琼脂、过硫酸胺、丙烯酰胺、尿素、硝酸银、甲酰胺、dNTPs、二甲苯青、冰醋酸、玻璃硅烷、50bpMark

## 三、 操作步骤

### （一）基因组 DNA 提取和纯化

## 参考 DNA 实验方法

DNA 的纯化：用 0.8%琼脂糖凝胶（含 EB0.5 $\mu$ g/ml）电泳检测片段大小，取出其中的 1/3 已提取的基因组 DNA 进行纯化，首先用 TE 缓冲液补满 至总体积 50ul，再等体积苯酚/氯仿/异戊醇（25：24：1）、氯仿/异戊醇（24：1）各抽提一次，离心吸上清液于 Eppendorf 管中，加入 1/10 体积的 NaAC 和二倍体积预冷的无水乙醇，-20 $^{\circ}$ C 放置 2h 以上，10000g 离心 10min，用 70%的乙醇漂洗 DNA 沉淀 2 次，风干后溶于 30 $\mu$ l TE 缓冲液中，UV-2401PC（岛津）紫外分光光度计检测 A260、A280 值并定量，再用 0.8%琼脂糖凝胶（含 EB0.5 $\mu$ g/ml）电泳检测片段大小。

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

### （二）限制性酶切及连接

在 0.2ml 离心管中加入：模板量约为 250ng，2.5 $\mu$ l 10 $\times$ 酶切缓冲液，2.5 $\mu$ l 10 $\times$ T4DNA 连接酶缓冲液，5U EcoR I，5U Mse I，2U T4 连接酶，50pmol Mse I 接头，双蒸水补至 25 $\mu$ l。用 PE 公司 PCR 扩增仪设定 37 $^{\circ}$ C 过夜反应后，于 65 $^{\circ}$ C 20min 灭酶活，-20 $^{\circ}$ C 保存，作为预扩增模板。

### （三）预扩增

取 3 $\mu$ l 酶切连接产物，加入 75ng E+A，75ng M+C 引物，15mmol/L Mg<sup>2+</sup>，25mmol/L dNTPs，1U Tag 酶，3 $\mu$ l 10 $\times$ PCR 缓冲液，加双蒸水补至 30 $\mu$ l。

反应参数为：94 $^{\circ}$ C 90s；94 $^{\circ}$ C 30s，56 $^{\circ}$ C 1min，72 $^{\circ}$ C 1min，30 循环；72 $^{\circ}$ C 10min（PE 公司 PCR 仪）。反应结束后，用 0.8%琼脂糖凝胶（含 EB0.5 $\mu$ g/ml）电泳检测扩增产物，取 3 $\mu$ l 产物释稀 50 倍，用作选择性扩增模板。

### （四）选择性 PCR 扩增

取稀释后的产物 3 $\mu$ l, 加入 EcoR I 选择性引物、Mse I 选择性引物各 75ng, 15mmol/L Mg<sup>2+</sup>, 25mmol/L dNTPs, 1U Tag 酶, 3 $\mu$ l 10 $\times$ PCR 缓冲液, 加双蒸水补至 30 $\mu$ l。

反应参数为: 94 $^{\circ}$ C90s; 94 $^{\circ}$ C30s, 65 $^{\circ}$ C1min, 72 $^{\circ}$ C1min, 13 循环 (每循环降 0.7 $^{\circ}$ C); 94 $^{\circ}$ C30s, 56 $^{\circ}$ C1min, 72 $^{\circ}$ C1min, 25 循环; 72 $^{\circ}$ C5min (PE 公司 PCR 仪), 先用 0.8% 琼脂糖凝胶 (含 EB0.5 $\mu$ g/ml) 电泳检测选择性扩增产物。

#### (五) 凝胶电泳

扩增产物用 6%变性聚丙烯酰胺胶(厚度 0.5mm)和 1 $\times$ TBE 电泳缓冲液电泳分离(BIO-RAD 公司测序电泳仪)。拔出梳子, 140W 恒功率预电泳 30 分钟, 温度达到 47~49 $^{\circ}$ C。务必使每个孔清洗出尿素。选择性扩增产物中加入等体积上样缓冲液 (98%甲酰胺, 10mmol/LEDTA, 0.25% 二甲苯青, 0.25%溴酚蓝) 94 $^{\circ}$ C变性 5min (PE 公司 PCR 仪), 结束后迅速置于冰上直到点样。每个泳道加样 8 $\mu$ l。一开始用 100W 恒功率电泳约 2 分钟, 使样品迅速集中到孔底部, 再调到 60W 恒功率电泳, 温度保持在 43 $^{\circ}$ C左右, 至二甲苯青 FF 至玻璃板 2/3 处, 结束电泳。

#### (六) 银染

固定液:取 100ml 冰醋酸到 900ml 去离子水或双蒸水中。染色液:1g AgNO<sub>3</sub>, 1.5ml 37% 甲醛, 加去离子水至 1L。显色液: 30g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1.5ml 37% 甲醛, 2mg 硫代硫酸钠, 加去离子水至 1L。

- 1、电泳完毕后, 将粘有凝胶的玻璃板置入用于银染的塑料盘中。
- 2、固定: 加入固定液, 在摇床上轻微震荡 30min。固定结束后, 固定液保留。
- 3、加入去离子水漂洗 3 次, 每次 2min。
- 4、染色: 将凝胶放入染色盘中, 倒入染色液 (4 $^{\circ}$ C), 在摇床上轻微震荡 30min。用去离子

水漂洗凝胶 10 秒钟后，置入显色盘中。

5、显色：加入显色液（4℃），在摇床上轻微震荡直至条带数不再增加为止。

6、终止：加入 b 步骤用后的固定液，来回漂几分钟。达到最好效果后，用蒸馏水漂洗几分钟。

7、去除凝胶和玻璃板上的水珠后，放在白光灯箱上用 Nikon 数码相机拍照。