

STRAIN: EM01826 (Vps54-BAC-tg) MIX A

PRIMER BAC END 1 5'-TAATACGACTCACTATAGGG -3'

PRIMER BAC END 1 5'-AGAAAATGAAGCAAAGTGTATGTG -3'

PRIMER BAC END 1 15pm / total volume 30ul Tm: 56°C

PRIMER BAC END 1 15pm / total volume 30ul Tm: 64°C

PCR MIX

DNTPS (2mM) 3ul

PCR BUFFER 10x 3ul

PRIMER BAC END 1 (0.5pm/ul)

PRIMER BAC END 1 (0.5pm/ul)

H2O

TAQ POLYMERASE (5U/ul) 0.16ul

DNA 1ul

TOTAL 30ul

PCR PROGRAM:

- 1) 95°C x 2'00''
- 2) 95°C x 0'45''
- 3) 54°C x 0'45''
- 4) 72°C x 1'00''
- 5) step 2 to step 5 x 40 repeats
- 6) 72°C x 10'00''
- 7) 4°C forever
- 8) End

MUTATION: 450 BP

STRAIN: EM01826 (Vps54-BAC-tg) MIX B

PRIMER BAC END 2 5'-CCGTCGACATTTAGGTGACA -3'

PRIMER BAC END 2 5'-TCATTTTCTCCCAGGCAAAC -3'

PRIMER BAC END 2 15pm / total volume 30ul Tm: 60°C

PRIMER BAC END 2 15pm / total volume 30ul Tm: 58°C

PCR MIX

DNTPS (2mM)	3ul
PCR BUFFER 10x	3ul
PRIMER BAC END 2 (0.5pm/ul)	
PRIMER BAC END 2 (0.5pm/ul)	
H2O	
TAQ POLYMERASE (5U/ul)	0.16ul
DNA	1ul
TOTAL	30ul

PCR PROGRAM:

- 1) 95°C x 2'00''
- 2) 95°C x 0'45''
- 3) 56°C x 0'45''
- 4) 72°C x 1'00''
- 5) step 2 to step 5 x 40 repeats
- 6) 72°C x 10'00''
- 7) 4°C forever
- 8) End

MUTATION: 680 BP