

NOM DE LA LIGNEE:
iValpha Vbeta6 RAG CD45.1
REACTIFS ET SOLUTIONS:

- Tampon pour Taq polymérase 10X (1,5 mM MgCl₂) (MP QBiogene)
- dNTP (MPQ Biogene)
- Primers (Invitrogen)
- Taq polymérase (MPQBiogene)
- huile minérale (EUROBIO)

MELANGES REACTIONNELS:

iValpha19	Vbeta6	RAG	CD45.1
- Tampon Taq 1X	- Tampon Taq 1X	- Tampon Taq 1X	- Tampon Taq 1X
- dNTP (0,4 mM total)	- dNTP (0,4 mM total)	- dNTP (0,4 mM total)	- dNTP (0,4 mM total)
- primer Ia2b4 (0,24μM)	- primer Lb2b4bis (0,24μM)	- primer Rag2 a (0,18μM)	- primer Ly5for (0,24 μM)
- primer Sa19up (0,24μM)	- primer Sbmaup (0,24μM)	- primer Rag2 b (0,18 μM)	- primer Ly5rev (0,24 μM)
- Taq polymérase (40U/ml)	- Taq polymérase (40U/ml)	- primer Néo55 a (0,18μM)	- Taq polymérase 40U/ml-
- ADN	- ADN	- primer Néo55 b (0,18 μM)	ADN
		- Taq polymérase 40U/ml	
		- ADN	

PROGRAMME:

5 min	94°C	
30 sec	94°C	
30 sec	60°C	35cycles
1 min	72°C	
5 min	72°C	

MIGRATION : Faire migrer les échantillons sur un gel d'agarose à 1.5%

REACTIFS ET SOLUTIONS RESTRICTION CD45 :

- Tampon Mw1 (Fermentas)
- Enzyme Dde I (Fermentas)

MELANGE REACTIONNEL RESTRICTION CD45 :

- Produit de PCR
- Tampon 1X
- XhoI (100u/ml)

Incubation à 37°C pendant 4 heures

MIGRATION :

Faire migrer les échantillons sur un gel d'agarose à 4%

SEQUENCE DES PRIMERS

- Primer Ia2b4	5' GCAGAGGAACCTGGGAGCTGT 3'	- Primer RAG2b	5' GCCTTTGTATGAGCAAGTAGC 3'
- Primer Sa19up	5' ACTGTACCCATTCGAGCGGCT3'	- Primer Neo55a	5' CCTGCCGAGAAAAGTATCCA 3'
- Primer Lb2b4bis	5' ACTTTGTCTCCTGGGTGCAA 3'	- Primer Neo55b	5' ACCGTAAAGCACGAGGAAG 3'
- Primer Sbmaup	5' CCTTTCCCTGAATCCTGTCTCGG 3'	- Primer Ly5for	5' ACAAGTGCGCAGAATACTGG 3'
- Primer RAG2a	5' ATGTCCCTGCAGATGGTAACA 3'	- Primer Ly5 rev	5' GTGCAACGTTTCAGCTTCTGA 3'

BANDES ATTENDUES

iValpha : Transgène : 450 pb
Vbeta6 : Transgène : 260 pb

RAG2 : allèle KO : 411 pb allèle WT 246 pb
CD45: allèle a : 83 + 39 pb allèle b : 122 pb