

STRAIN: EM10171 MIX A

PRIMER p082 5' CTGCTAAAGCGCATGCTCCAGACTGCC 3'

PRIMER sa5 5' CGTGACTCCTCAGGATGAGGTGCTGTGG 3'

PRIMER p082 15pm / total volume 30ul Tm: 86°C

PRIMER sa5 15pm / total volume 30ul Tm: 90°C

PCR MIX

DNTPS (2mM) 3ul

PCR BUFFER 10x 3ul

PRIMER p082 (0.5pm/ul)

PRIMER sa5 (0.5pm/ul)

H2O

TAQ POLYMERASE (5U/ul) 0.25ul

DNA 2ul

TOTAL 30ul

PCR PROGRAM:

- 1) 95°C x 2'00''
- 2) 95°C x 0'30''
- 3) 68°C x 0'30''
- 4) 72°C x 1'30''
- 5) step 2 to step 5 x 45 repeats
- 6) 72°C x 10'00''
- 7) 4°C forever
- 8) End

MUTATION: 950 bp

STRAIN: EM10171 MIX B

PRIMER e4a 5' AACAGATCACCTGTATTTGAGCGTATCGTCGG 3'

PRIMER e3s 5' CAGTAAGTGATAGCAGACAGTGGGTCAACAGG 3'

PRIMER e4a 15pm / total volume 30ul Tm: 98°C

PRIMER e3s 15pm / total volume 30ul Tm: 96°C

PCR MIX

DNTPS (2mM)	3ul
PCR BUFFER 10x	3ul
PRIMER e4a	(0.5pm/ul)
PRIMER e3s	(0.5pm/ul)
H2O	
TAQ POLYMERASE (5U/ul)	0.25ul
DNA	2ul
TOTAL	30ul

PCR PROGRAM:

- 1) 95°C x 2'00''
- 2) 95°C x 0'30''
- 3) 58°C x 0'30''
- 4) 72°C x 1'00''
- 5) step 2 to step 5 x 45 repeats
- 6) 72°C x 10'00''
- 7) 4°C forever
- 8) End

WILD TYPE: 450 bp