

**STRAIN: EM10177      MIX A**

**PRIMER** loxpup    5' GCTATACGAAGTTATTAGGTCCCTCG 3'

**PRIMER** neoend    5' CGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTT 3'

**PRIMER** loxpup    15pm / total volume 30ul            Tm: 76°C

**PRIMER** neoend    15pm / total volume 30ul            Tm: 82°C

**PCR MIX**

DNTPS (2mM)	3ul
PCR BUFFER 10x	3ul
<b>PRIMER</b> loxpup	(0.5pm/ul)
<b>PRIMER</b> neoend	(0.5pm/ul)
H2O	
TAQ POLYMERASE (5U/ul)	0.25ul
DNA	2ul
<b>TOTAL</b>	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

**MUTATION:** 400 bp

**STRAIN: EM10177      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
<b>PRIMER e4a</b>	(0.5pm/ul)
<b>PRIMER e3s</b>	(0.5pm/ul)
H2O	
TAQ POLYMERASE (5U/ul)	0.25ul
DNA	2ul
<b>TOTAL</b>	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**