

NIH-0719 Genotyping Strategies

Reaction Components	Vol (ul)
10X Sigma Buffer	5
25mM MgCl ₂	3.5
10mM dNTPs	2
Primer 20 uM	1.5
Primer 20 uM	1.5
5 U/ul Taq polymerase	0.5
Water	31
Total mix volume	45
Tail lysate (1:20 dilution)	5
Total reaction volume	50

Step	Temp	Time	Note
1	94C	15"	
2	65C	30"	Decrease 1C/cycle
3	72C	40"	Go to 1, 10 cycles
4	94C	15"	
5	55C	30"	
6	72C	40"	Go to 4, 30 cycles

Primer Sequences (5' to 3')	
Mutant PCR: Primer Neo3a and Primer 0719-7, 296 bp	
Recommended Wt PCR: Primer 0719-34 and Primer 0719-35, 298 bp	
Primer Neo3a	GCAGCGCATCGCCTTCTATC
Primer 0719-7	CTAAGATAGGCTCTAGTG
Primer 0719-34	GTTCGGCCAGGTTTGTACC
Primer 0719-35	CAGCTGGTGAGCTCGGTC

Well	Sample	Genotype
1	35	het
2	36	het
3	37	wt
4	38	het
5	ES DNA	het
6	wt lysate	wt
7	water	no amp

Mutant PCR

