

NIH-0778 Genotyping Strategies

Reaction Components	Vol (ul)
5x Phusion buffer	8
25mM MgCl ₂	3.2
10mM dNTPs	1
Primer 20 uM	1
Primer 20 uM	1
Phusion Enzyme	0.1
Water	20.7
Total mix volume	35
Tail lysate (1:20 dilution)	5
Total reaction volume	40

Step	Temp	Time	Note
1	96C	17"	
2	63C	15"	Decrease 1C/cycle
3	72C	15"	Go to 1, 6 cycles
4	96C	17"	
5	57C	15"	
6	72C	15"	Go to 4, 29 cycles

Primer Sequences (5' to 3'):	
Mutant PCR: Primer Neo3a and Primer 0778-9, 499 bp	
Recommended Wt PCR: Primer 0778-3 and Primer 0778-4, 603 bp	
Primer Neo3a	GCAGCGCATCGCCTTCTATC
Primer 0778-9	CCCAGGTGCCCCTTCATAATG
Primer 0778-3	GCCGGCGCTCACATAGATG
Primer 0778-4	GCCACAGCTGCCTGCGGAAGT

Well	Sample	Genotype
1	116	het
2	117	het
3	118	wt
4	119	het
5	ES DNA	het
6	wt lysate	wt
7	water	no amp

Mutant PCR

