

STRAIN: EM01992 (opn-cd44v10) OPN MIX A

PRIMER OPN-/-:A 5'-TCC-AAT-GAA-AGC-CAT-GAC-C -3'

PRIMER OPN-/-:A 5'-GAA-GAG-TGA-GTG-AAT-CTG-C -3'

PRIMER OPN-/-:A 15pm / total volume 30ul Tm: 56°C

PRIMER OPN-/-:A 15pm / total volume 30ul Tm: 56°C

PCR MIX

DNTPS (2mM) 3ul

PCR BUFFER 10x 3ul

PRIMER OPN-/-:A (0.5pm/ul)

PRIMER OPN-/-:A (0.5pm/ul)

H2O

TAQ POLYMERASE (5U/ul) 0.16ul

DNA 1ul

TOTAL 30ul

PCR PROGRAM:

- 1) 95°C x 2'00''
- 2) 95°C x 0'30''
- 3) 56°C x 0'30''
- 4) 72°C x 1'30''
- 5) step 2 to step 5 x 40 repeats
- 6) 72°C x 10'00''
- 7) 4°C forever
- 8) End

MUTATION: 1450 BP WILD TYPE: 300 BP

STRAIN: EM01992 (opn-cd44v10) OPN MIX B

PRIMER OPN-/-:B 5'-AAT-ATG-CGA-AGT-GGA-CCT-GG-3'

PRIMER OPN-/-:B 5'-GAT-CAA-GCC-ATA-GCC-CTT-CA-3'

PRIMER OPN-/-:B 15pm / total volume 30ul Tm: 60°C

PRIMER OPN-/-:B 15pm / total volume 30ul Tm: 60°C

PCR MIX

DNTPS (2mM) 3ul

PCR BUFFER 10x 3ul

PRIMER OPN-/-:B (0.5pm/ul)

PRIMER OPN-/-:B (0.5pm/ul)

H2O

TAQ POLYMERASE (5U/ul) 0.16ul

DNA 1ul

TOTAL 30ul

PCR PROGRAM:

- 1) 95°C x 2'00''
- 2) 95°C x 0'30''
- 3) 60°C x 0'30''
- 4) 72°C x 1'30''
- 5) step 2 to step 5 x 40 repeats
- 6) 72°C x 10'00''
- 7) 4°C forever
- 8) End

MUTATION: 350 BP

STRAIN: EM01992 (opn-cd44v10) CD44V10

PRIMER CD44v10/-: 5'-CCC-CTT-CCT-CAG-AGG-TAG-ATC-C-3'

PRIMER CD44v10/-: 5'-CCA-ATC-AGT-CCA-CCA-CCA-AGT-AAA-GG-3'

PRIMER CD44v10/-: 15pm / total volume 30ul Tm: 70°C

PRIMER CD44v10/-: 15pm / total volume 30ul Tm: 78°C

PCR MIX

DNTPS (2mM) 3ul

PCR BUFFER 10x 3ul

PRIMER CD44v10/-: (0.5pm/ul)

PRIMER CD44v10/-: (0.5pm/ul)

H2O

TAQ POLYMERASE (5U/ul) 0.3ul

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 2'00''
- 5) step 2 to step 5 x 50 repeats
- 6) 72°C x 10'00''
- 7) 4°C forever
- 8) End

MUTATION: 600 BP **WT:** 100 BP