

a4TA Congenic PCR Protocol

ATPCR

Temp °C RXN Time

1x Reagent Master Mix

6.5µl	Molecular Grade H2O	
12.5µl	GoTaqGreen Master Mix	
2.5µl	a4TAF primer [10µM]	
2.5µl	a4TAR primer [10µM]	

24.0µl : volume per rxn

0.5µl genomic DNA added

24.5µl total volume per rxn

Primers

a4TAF CTGCCGGTCTCGGAGTATC
a4TAR GTGTCAGGGCTGGTGACAG

Taqα1 Restriction Endonuclease Digest 2hr Minimum at 37°C

1x	Reagent	MasterMix
12.5µl	Molecular H2O	
2µl	Buffer 2	
0.5µl	Stu I Restrict Enzyme	

15µl Reagent Volume per rxn

5µl PCR Product Added

Band Sizes

AA 120 bp

TT 250 bp

Het 120 & 250 bp

PCR/Gel Sample Order (96 Well Plate)

1)	9)	17)	25)
2)	10)	18)	26)
3)	11)	19)	27)
4)	12)	20)	28)
5)	13)	21)	29)
6)	14)	22)	30)
7)	15)	23)	31)
8)	16)	24)	32)
33)	41)	49)	57)
34)	42)	50)	58)
35)	43)	51)	59)
36)	44)	52)	60)
37)	45)	53)	61)
38)	46)	54)	62)
39)	47)	55)	63)
40)	48)	56)	64)
65)	73)	81)	89)
66)	74)	82)	90)
67)	75)	83)	91)
68)	76)	84)	92)
69)	77)	85)	93)
70)	78)	86)	94)
71)	79)	87)	95)
72)	80)	88)	96)

95 1:00min
95 :30sec
65 :30sec
72 1:00min
go to 2 rep 1
94 :30sec
63 :30sec
72 1:00min
go to 6 rep 1
94 :30sec
61 :30sec
72 1:00min
go to 10 rep 1
94 :30sec
59 :30sec
72 1:00min
go to 14 rep 1
94 :30sec
57 :30sec
72 1:00min
go to 18 rep 1
94 :30sec
55 :30sec
72 1:00min
go to 22 rep22
72 7min
4 hold ∞