

# Deletion of floxed target gene by tamoxifen treatment

20200217 Daun

## ➤ Materials

- Tamoxifen diet (in vivo)
  1. Diet: EEGJ30060; Cargill. Agri Purina, Seongnam, Korea
  2. Tamoxifen (sigma/ T5648): 10mg/ml stock (5000x stock; 흰색 냉동고 제일 윗 칸 소량 분주, 디프리저에 다량 분주해둠)
  3. Tamoxifen mg per kg diet: 400mg tamoxifen/ 1kg diet
  4. tamoxifen premixed with 5% sucrose as a palatability enhancer
  5. Tamoxifen diet manufacturer: Dybiotech (Korea)
- 4-Hydroxytamoxifen (sigma ,H6278)

## ➤ Process

### **tamoxifen diet**

- 사료는 냉장보관 (어두운 곳) 해야하며 사료를 한 번에 많이 주면 tamoxifen 약물의 효과가 날아갈 수 있기 때문에 이틀에 한 번 씩 사료를 교체해줄 정도로만 준다 (초기에는 4~5알, 잘먹을 때는 8알 정도의 사료를 주었었음)
- Tamoxifen 사료 적응 시 tamoxifen 100mg/kg 로 1주일 (잘 먹기 때문에 4~5일 주어도 괜찮다), 200mg/kg 로 1주일 순차적으로 적응시킨 후 400mg/kg 로 2~3주 적응시켜야 한다.
- Tamoxifen 사료 급이 전에 체중을 측정해두어야 한다. Tamoxifen 사료 적응 초기에 체중에 빠졌다가 적응 완료 후 체중이 90% 정도로 회복되었을 때 실험에 들어가면 된다.

### **In vitro tamoxifen treatment**

- BMDM Day 3, Day5 일차 배지 교체 시 4-OH tamoxifen 2ug/ml 농도로( stock 5000x) 넣어서 교체해 줌.
- 7일차에 세포 사용

### **KO confirmation**

- In vivo에서는 마우스 꼬리 또는 귀 조각에서 DNA isolation, in vitro 에서는 세포에서 DNA 를 분리하여 PCR 을 진행 함.

Name	sequence
EP4floxF_	tctgtgaagcgagtccttagct
EP4floxF_R_	gtagatggggggaggggacaact

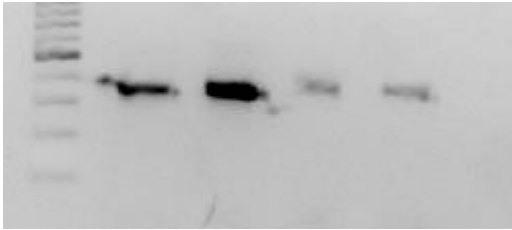
### **PCR condition**

94°C 2min  
↓  
98°C 10sec  
65°C 30sec

68°C 1min X 35~38cycles

↓

4°C



**EP4 flox**

Mutant = ~340 bp

Heterozygote = ~340 bp and 250 bp

Wild type = 250 bp