



## GENESEED® pK25ssAAV-ciR(GFP)

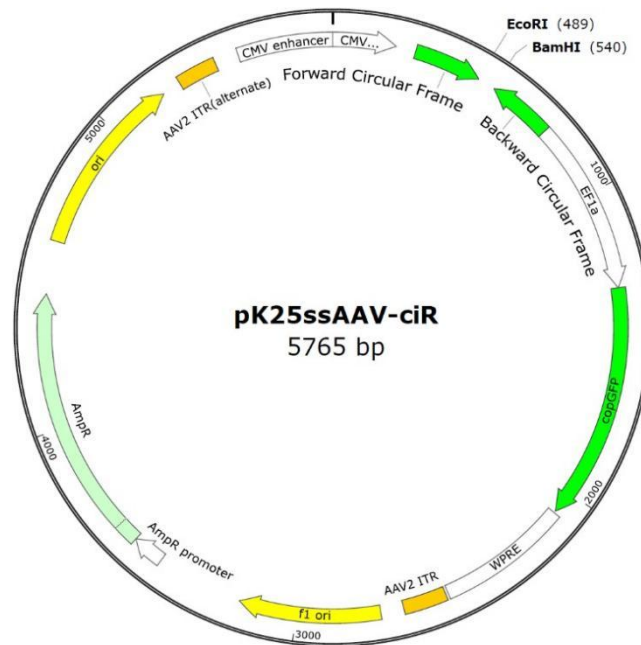
货号	产品名称	规格	运输与保存
GS0110	GENESEED® pK25ssAAV-ciR(GFP)	10μg质粒+200μL菌液	4°C运输, ≤-20°C保存

### 产品介绍:

第五代 circRNA 表达载体 pK25ssAAV-ciR(GFP) 含有吉赛生物专利技术的 circRNA 表达框架, 含有精心改造的 Alu 元件、QKI 等 RBP 的结合位点, 并使用全新设计的环化介导序列, 能保证插入的 circRNA 准确高效率环化。表达框架中间预留 EcoRI 和 BamHI 酶切位点, 可直接通过酶切连接插入目的 circRNA 片段。本载体骨架为腺相关病毒 (Single stranded adeno-associated virus, ssAAV), 能同时表达 GFP, 可以方便地进行筛选, 载体最大容量为 1500 nt。

### 产品特点:

- 过表达效率高: 专利技术的 circRNA 表达框架能使 circRNA 显著过表达 50 倍以上;
- 环化准确性高: 特有的环化介导序列能有效保证目的 circRNA 环化无碱基添加或缺失;
- 过表达稳定性高: 对 200 nt 到 2500 nt 的 circRNA 都能实现准确高效过表达。





## 使用说明:

### 1. 载体准备

载体上 EcoRI 和 BamHI 酶切位点中间加入了一段 45 bp 的 Stuffer，使用前需先以 EcoRI 和 BamHI 对载体双酶切去除 Stuffer 并回收开环空载体，然后与经双酶切的目的 circRNA 片段进行连接。

### 2. 克隆引物设计

按照一般的 PCR 引物设计规则设计扩增 circRNA 线性序列的引物，设计好后需在正向引物 5' 端加入 EcoRI 酶切位点、正向环化介导序列和 AG 受体，反向引物 5' 端加入 BamHI 酶切位点、反向环化介导序列和 GT 供体。

Primer-F: 5' CGGAATTCTAATACTTTCAG+原引物序列 3'

Primer-R: 5' CGGGATCCAGTTGTTCTTAC+原引物序列 3'

PCR 产物结构如下:

GAATTC
TAATACTTTC
AG
Linear sequence of circRNA
GT
AAGAACA
ACT
GGATCC  
CTTAAG
ATTATGAAAG
TC
Linear sequence of circRNA
CA
TTCTTGTTGA
CCTAGG

### 3. 测序鉴定

测序鉴定需在目的 circRNA 片段中部设计两条引物，双向交叉测序，两条引物间隔不短于 90bp。若目的 circRNA 序列小于 700bp，可直接以克隆引物双向测序。

## 常见问题:

<b>克隆效率低</b>	PCR产物纯化后再进行酶切
	PCR产物和空载体酶切产物纯化后进行连接反应
	调整连接体系中插入片段与载体的比例，若使用T4 DNA Ligase, 推荐使用插入片段与载体的摩尔比为1:1到5:1
<b>菌液PCR鉴定无阳性克隆</b>	优化PCR条件
	挑取更多单克隆进行PCR鉴定
	测序鉴定选取的单克隆
	选取的单克隆抽提质粒后进行酶切鉴定