



GENESEED® pK25ssAAV-ciR(GFP)

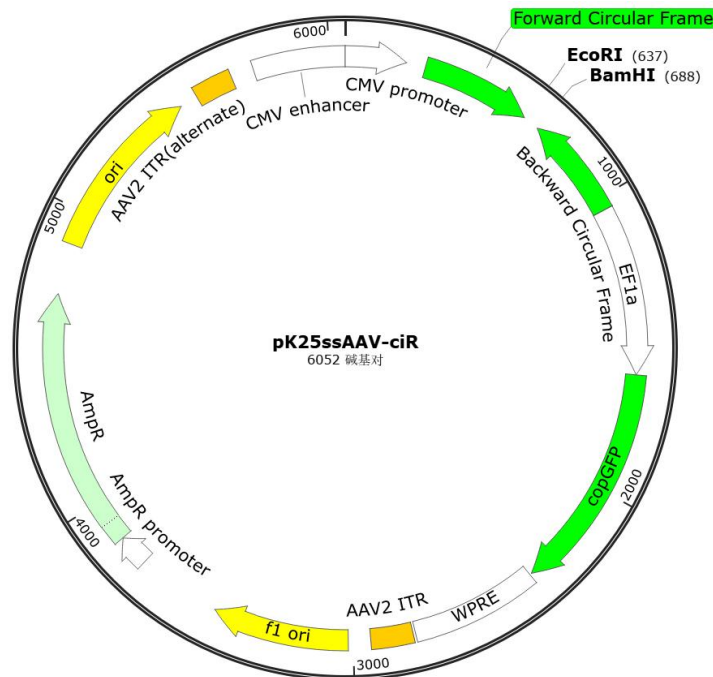
货号	产品名称	规格	运输与保存
GS0110	GENESEED® pK25ssAAV-ciR(GFP)	10μg质粒+200μL菌液	2~8℃运输 ≤-20℃保存

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；
- 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:

克隆效率低	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
菌液PCR鉴定无阳性克隆	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