



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 AAGAACAAC T GGATCC
 CTTAAG ATTATGAAAG TC 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。

注意事项:

以此载体包装慢病毒应使用 psPAX2、pMD2.G 两个辅助质粒。

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