



Clonagem

In-Fusion®

Catarina Neves nº49252; João Henrique Sousa nº49227;
Madalena Parrado nº49351; Mário Gil Oliveira nº49269; Sofia Diogo nº49655

How does it work?

- In-Fusion enzyme - **DNA polimerase do vírus da Vaccinia**
 - **Exonuclease 3' - 5'**
- Reconhece sobreposições 15 pares de bases no vetor e no inserto → **zonas de cadeia simples nas sequências homólogas que vão emparelhar por complementaridade.**
- Os primers para PCR do inserto são previamente construídos com uma **extensão de 15 pb nas suas extremidades**, permitindo que sejam homólogos às sequências das **extremidades do vetor linearizado.**

Vantagens In-Fusion

- Clonagem eficaz de múltiplos fragmentos para **qualquer vetor**;
- Reação única - InFusion enzyme;
- 95% eficiência;
- Clonagem direcionada.

minimização de



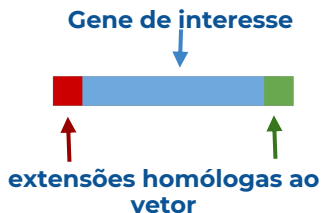
- Uso de enzimas de restrição;
- Tratamentos com fosfatases e ligases;
- Eliminação da construção de clones com pares de base não desejados.

O que é necessário?

Vetor linearizado



Produto de PCR com sequência conhecida



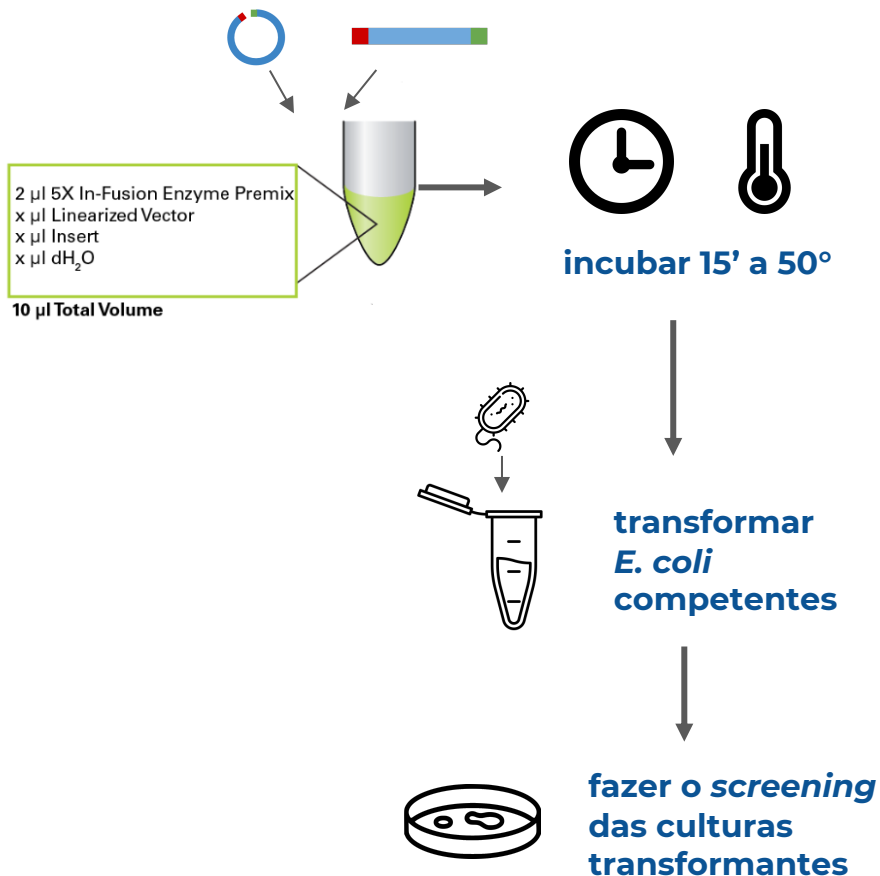
In-Fusion® Enzyme Premix



E. coli competentes



Procedimento



PLDMV (Papaya leaf distortion mosaic virus)



- **Objetivo:** construir um clone de cDNA sem intrões e outro clone de cDNA com intrões que foi inserido num vetor plasmídico em *E.coli*.
- Esta estratégia permite:
 - Clonagem simultânea e direcional de múltiplos fragmentos virais
 - Fragmentos de intrão convenientemente inseridos na posição desejada da sequência viral sem causar instabilidade do clone infeccioso na bactéria.
- Concluiu-se que a clonagem **In-Fusion**:
 - Encurtou o tempo de construção.
 - É um método rápido, flexível e eficiente comparativamente com o procedimento tradicional com enzimas de restrição.

