

LIGATION INDEPENDENT CLONING

Ana Borges 50284, Gonçalo Cruz 47724, Maria Ribeiro 45850,
Vitor Andrade 49005

Faculdade de Ci4ncias de Lisboa



LIGATION INDEPENDENT CLONING (LIC)

- Método de clonagem sem utilização de uma ligase.
- É realizado um PCR que insere dCMP na extremidade 5' cadeia DNA.
- Utiliza a atividade 3'-5' T4 DNA polimerase para criar extremidades que serão complementares entre inserto e vetor, ou entre insertos.

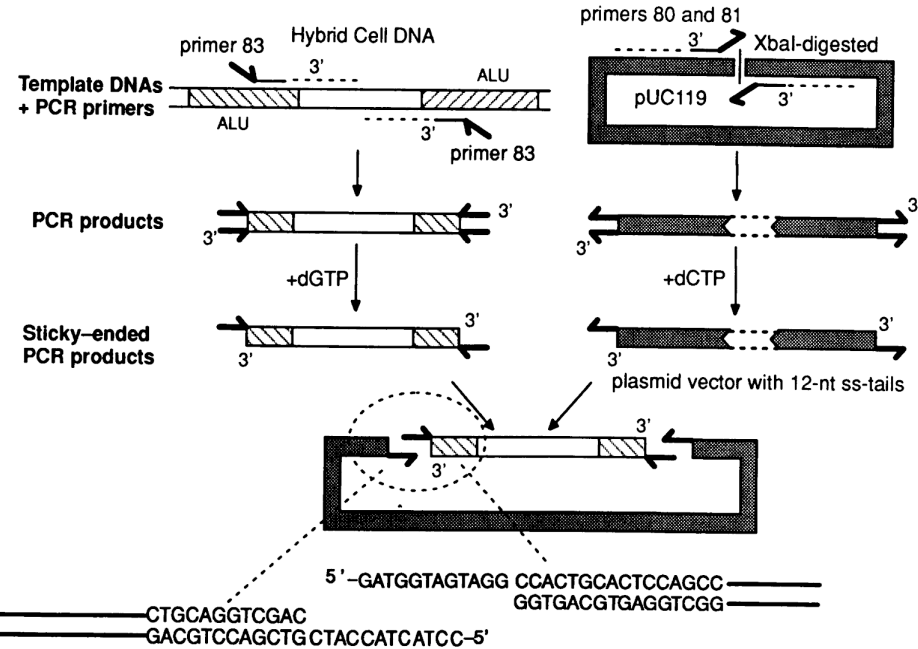
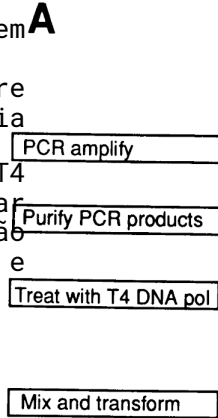


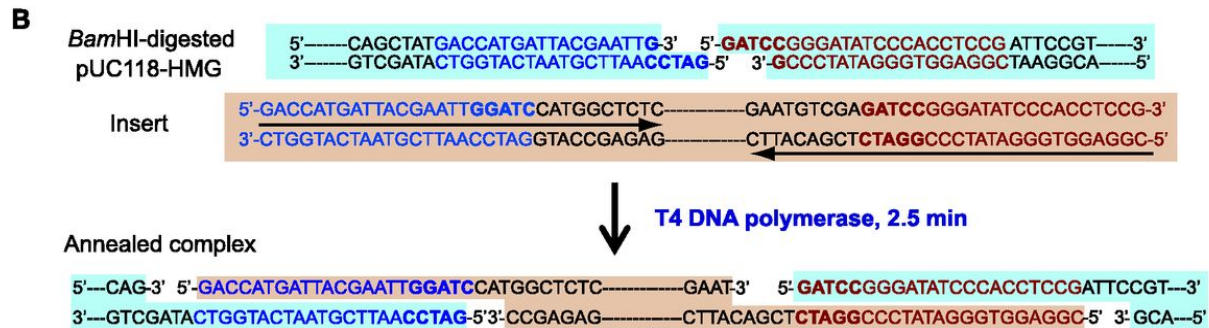
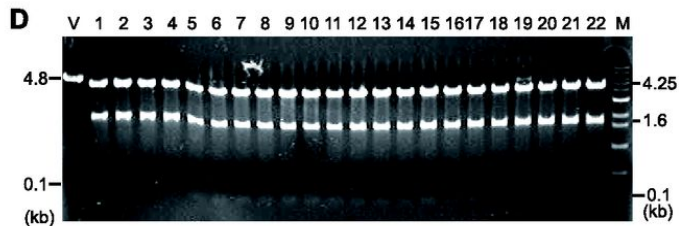
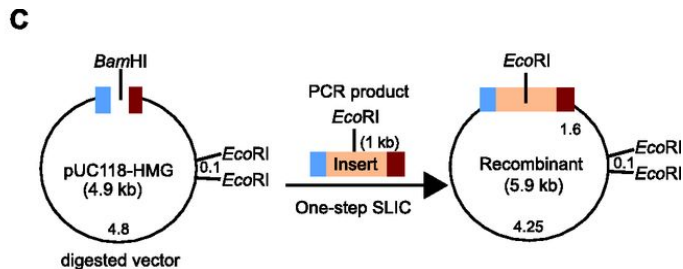
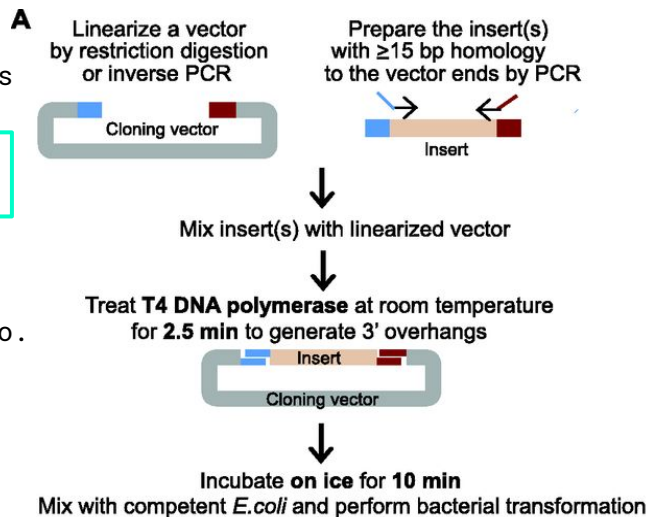
Fig. 1. Generation of defined single stranded ends on PCR products. Inter-ALU sequences are amplified from the human genome using primer PDJ83 partly homologous to the consensus ALU sequence (12). Vector pUC119 is amplified with primers PDJ80 and 81 homologous at the 3'-end to the multiple-cloning sequence. The PCR products are digested with the (3'→5') exonuclease associated with T4 DNA polymerase in the presence of dGTP (inter-ALU's) or dCTP (pUC119) to create 12-nt single-stranded ends. The 5'-overhanging ends from vector and ALU-PCR products are complementary (panel B) and allow dimeric circles to be formed without requiring DNA ligase.

SEQUENCE LIGATION INDEPENDENT CLONING (SLIC)

Nesta variação, não são inseridos dNTPS na reação inicial.

T4 DNA Polimerase

O inserto e vector são inseridos em *E.coli* que irá reparar o plasmídeo e realizar recombinação.



VANTAGENS E DESVANTAGENS

- Custo reduzido
- Permite a utilização de vários vectores
- Permite a assemblagem de vários fragmentos sem a necessidade de locais de corte específicos (SLIC)
- Método demorado
- Fragmentos de DNA tem que se encontrar em cadeia simples
- É dependente de determinados nucleotídeos presentes na sequência molde.(Sequence-dependent)
- Baixo sucesso de assemblagem, devido ao passo de annealing.