

In-Fusion Technique - Clontech

In-Fusion® é uma **tecnologia de clonagem recombinante**, bastante eficiente (95%), que usa uma enzima (In-Fusion enzyme) para fundir fragmentos gerados por PCR com vetores linearizados. Esta tecnologia garante uma clonagem fácil e direcionada, realizável numa só reação. Permite clonar qualquer inserto para qualquer região dentro de um vector, mesmo que não exista nenhum local de clonagem conveniente.

A In-Fusion enzyme utilizada nesta técnica, a **DNA polimerase do vírus da Vaccinia [1]**, possui uma **atividade de exonuclease 3'-5'** que é capaz de remover nucleótidos da extremidade de qualquer cadeia dupla de DNA [1] [2]. Esta reconhece sobreposições de 15 pares de bases no vetor e no inserto, gerando **zonas de cadeia simples nas sequências homólogas** que vão emparelhar por complementaridade. Deste modo, 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 [1] [3]**.

Para além de permitir a clonagem de qualquer inserto numa localização dentro de qualquer vector à escolha, esta tecnologia apresenta outras vantagens, tais como: a clonagem eficaz de múltiplos fragmentos de DNA, de diferentes tamanhos, para qualquer vector numa única reação. Isto permite minimizar o uso de enzimas de restrição, de tratamentos com fosfatase e de ligases e eliminar a construção de clones com pares de base extras que não eram desejados. Este método é bastante conveniente quando não é possível modificar o vetor desejado [4], mas exige o conhecimento prévio da sequência do mesmo.

Aplicabilidade da tecnologia In-Fusion:

Rapid Construction of Stable Infectious Full-Length cDNA Clone of Papaya Leaf Distortion Mosaic Virus Using In-Fusion Cloning: Decai Tuo, Wentao Shen, Pu Yan, Xiaoying Li & Peng Zhou - 2015.

A tecnologia In-Fusion Cloning Kit, foi usada para construir **clones** com ou sem intrões do **cDNA de um isolado do vírus PLDMV** (Papaya leaf distortion mosaic virus). Este vírus é uma ameaça tanto à papaia tradicional como à papaia transgénica.

Neste estudo, a construção de um clone de cDNA infeccioso, estável e "full-length" de PLDMV foi inserido num vetor plasmídico em *E.coli*.

A presença de pares de bases não virais nas extremidades, que podem ser introduzidas com o uso de endonucleases de restrição e DNA-ligase, poderia afetar os transcritos virais e perturbar a sua atividade biológica infecciosa. Desta forma, utilizou-se o método In-fusion que permitiu a ampliação por PCR de dois fragmentos de DNA com sobreposição em 15 pb e a sua montagem num vetor plasmídico (pGEM-T). Para tal, utilizou-se ao kit In-Fusion HD PCR Cloning Kit (Clontech) sendo realizada a reação 3'-5'-exonuclease para gerar **sequências de cadeia simples e complementares ao vetor no DNA do inserto**, in vitro.

Depois de testado o carácter infeccioso dos dois tipos de clones (com e sem a presença de intrões) em sementes de *Carica papaya* L., concluiu-se que os clones que não possuíam intrões não apresentavam atividade infecciosa, ao contrário dos que o possuíam. Este facto deve-se muito provavelmente à instabilidade do cDNA viral nos clones sem intrões, o que pode ter causado mutações non-sense ou deleções na sequência genómica de PLDMV, inativando a sua ação infecciosa [5].

REFERÊNCIAS

- [1] Irwin, C. R., Farmer, A., Willer, D. O., & Evans, D. H. (2012). In-fusion® cloning with vaccinia virus DNA polymerase. *Methods in Molecular Biology*, 890, 23–35;
- [2] Park, J., Throop, A. L., LaBaer, J., Recombinational Cloning Using Gateway and In-Fusion Cloning Schemes in *Current protocols in Molecular Biology*; April 2015; Volume 110, Issue 1;
- [3] In-Fusion™ Advantage PCR Cloning Kit User Manual; (2010); Clontech Laboratories, Inc. A Takara Bio Company 1290 Terra Bella Ave. Mountain View, CA 94043;
- [4] Park, J., Throop, A. L., & LaBaer, J. (2015). Site-specific recombinational cloning using gateway and in-fusion cloning schemes. *Current Protocols in Molecular Biology*, 2015, 3.20.1-3.20.23;
- [5] Tuo, D., Shen, W., Yan, P., Li, X., & Zhou, P. (2015). Rapid Construction of Stable Infectious Full-Length cDNA Clone of Papaya Leaf Distortion Mosaic Virus Using In-Fusion Cloning. *Viruses*, 7(12), 6241–6250.