

Ana Barbosa (49206), Inês Baía (49270), Leonor Torcato (49007), Lúcia Albano (49237), Melissa Gonçalves (51771)

## Ligation Independent Cloning (LIC)

Ligation Independent Cloning (LIC) é uma técnica de clonagem molecular em que os vetores recombinantes, assim como o vetor plasmídico, são gerados a partir de produtos amplificados por PCR. Este procedimento não requer enzimas de restrição, T4 DNA ligase ou fosfatase alcalina.

### Descrição

As extremidades 5' dos primers usados para gerar fragmentos de PCR clonáveis possuem uma sequência adicional de, por exemplo, 12 nucleótidos (mais de 10, por norma) que não contenha (por exemplo) dCMP. Consequentemente, os produtos de amplificação também possuirão uma sequência de 12 nucleótidos, sem dGMP, na sua extremidade 3'. Essa extremidade 3' pode posteriormente ser removida pela ação (3' → 5') exonucleolítica da T4 DNA polimerase na presença de dGTP – a presença de dGTP vai levar à pausa da polimerase na primeira posição em que esteja presente um dCMP (na cadeia 5'). Esta posição deverá ser imediatamente anterior à sequência adicional de 12 nucleótidos, resultando num fragmento com uma cauda 5' de cadeia simples, com sequência e tamanho determinados.

Por outro lado, a totalidade do vetor plasmídico é amplificada através de primers homólogos a sequências do polylinker, que possuem caudas de 12 nucleótidos adicionais, complementares às caudas dos fragmentos de amplificação, possibilitando a formação de cadeias simples nas extremidades pela ação da T4 DNA polimerase na presença de dCTP.

A circularização pode então ocorrer entre os vetores e os fragmentos de PCR, através das extremidades de 12 nucleótidos coesivas. Contudo, não pode ocorrer em soluções que não contenham fragmentos do inserto.

A transformação eficiente em bactérias não necessita de uma etapa de ligação *in vitro*.

### Vantagens e Desvantagens

Vantagens desta técnica incluem o facto de este procedimento não requerer o uso de quaisquer enzimas de restrição, nem T4 DNA ligase, e das extremidades coesivas dos vetores serem não complementares, reduzindo a probabilidade de se autoligarem e, consequentemente, de haver circularização dos mesmos. Além disso, possui uma elevada eficiência de clonagem.

Uma desvantagem é o facto de nem todas as sequências serem passíveis de sofrerem modificações.

### Protocolo geral

- Design de primers para PCR com sequência LIC
- Amplificação por PCR da sequência
- Purificação dos produtos de amplificação por PCR
- Criação de extensões a 5'
- Incubação do vetor e do produto de PCR para se ligarem
- Transformação

### Exemplo de Utilização

Recentemente, a técnica tem evoluído para incluir uma panóplia de variações úteis. Um exemplo é SLIC (Sequence and Ligation Independent Cloning) em que todos os dNTPs são inicialmente excluídos da reação, de modo a permitir a atividade exonuclease da T4 DNA Polymerase a continuar e gerar as secções sobrepostas complementares entre o inserto e o vetor. Além disso, a técnica LIC pode ter várias importantes aplicações, sendo, por exemplo, incorporada em protocolos para clonagem high-throughput de proteínas target e análise da sua expressão. Com essa aplicação em mente, um grupo de investigadores gerou um vetor-LIC, com elevada eficiência de clonagem e forte expressão de proteínas, que contém a sequência de reconhecimento da protease do vírus do mosaico do tabaco, permitindo que reações de clivagem ocorram num largo espectro de condições (devido ao modo de ação dessa protease). Desta forma, é possível gerar material suficiente para purificação e cristalização de proteínas.

## Referências Bibliográficas

Aslanidis C., de Jong P.J. “Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR)”. *Nucleic Acids Res.* 18(20): 6069-74 (1990).

European Molecular Biology Laboratory, 2019. Cloning Methods – Ligation Independent Cloning (LIC). <https://www.embl.de>, acessado em 28.03.2019

New England Biolabs, 2019. Ligation Independent Cloning (LIC). <https://international.neb.com>, acessado em 28.03.2019

Stols L., Gu M., Dieckman L., Raffin R., Collart F. R. and Donnelly M. I. “A New Vector for High-Throughput, Ligation-Independent Cloning Encoding a Tobacco Etch Virus Protease Cleavage Site”. *Protein Expression and Purification.* 25: 8–15 (2002).