

Ligation independent cloning

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

A ligation independent cloning, ou LIC, diferencia-se das restantes técnicas de clonagem por não ser necessário a utilização de uma ligase. Na técnica original é realizado um PCR no inserto onde são adicionados primers 5' que contém 12 bases de nucleótidos sem dCMP. Como resultado desta amplificação serão adicionadas por complementaridade 12 bases de nucleótido sem dGMP em 3'. A extremidade 3' é depois removida pela T4 DNA Polimerase devido a sua atividade exonucleotídica 3'-5' na presença de dGTP, formando assim extremidades coesivas em 5' (1). O vector é linearizado por uma enzima de restrição, e é depois realizado um PCR com primers de 12 nucleótidos complementares com as extremidades projectadas do inserto. Posteriormente é adicionada a T4 DNA polimerase que remove a extremidade 3' na presença de dCTP. Assim poderá ocorrer circularização recombinante entre o inserto e o vector sem a necessidade de uma ligase. A ligation independent cloning poderá ser utilizada por exemplo na síntese de genes efetores das proteínas TAL (transcription activator-like) (2).

Variações sobre esta técnica incluem SLIC (sequence and ligation independent cloning)(5).

Na variação SLIC todos os dNTP se encontram excluídos da reação inicialmente, permitindo assim a formação de extremidades complementares entre o inserto e o vector, por acção da T4 DNA Polimerase que apenas actua durante um tempo determinado.

SLIC supera algumas das limitações da LIC e permite a assemblagem de vários fragmentos simultaneamente (3). Na técnica SLIC o inserto e o vetor são misturados com E.coli que irá reparar o plasmídeo, gerando assim DNA recombinante. Assim nesta variação de LIC, poderão ser admitidos pequenos erros nos passos de PCR e de exonuclease da T4 DNA polimerase, desde que haja suficientes segmentos homólogos (20-60pb).

Uma das vantagens da LIC em relação a outros métodos de clonagem é o facto de ter um custo reduzido. Esta técnica permite também a utilização de muitos vetores, pois permite a sua fácil adaptação, de forma a poder inserir os insertos desejados, sem ter de utilizar enzimas específicas. Ou mesmo se não houvessem enzimas para fazer os cortes desejados, este método facilita a ter as extremidades desejadas. Na utilização do LIC há também uma boa estabilidade na ligação vetor-inserto, pois cria 10-12 bp de ligação entre eles.

Por outro lado, a LIC têm a desvantagem de ser um método demorado e existirem tipos de modificações em sequências que não são possíveis de ser realizadas com o método.

Referências

- 1- Aslanidis, C., & de Jong, P. J. (1990). Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR). *Nucleic acids research*, 18(20), 6069-74.
- 2- Schmid-Burgk, J. L., Schmidt, T., Kaiser, V., Höning, K., & Hornung, V. (2012). A ligation-independent cloning technique for high-throughput assembly of transcription activator-like effector genes. *Nature Biotechnology*, 31(1), 76–81. doi:10.1038/nbt.2460
- 3- Jeong, Jae-Yeon & Yim, Hyung-Soon & Ryu, Ji-Young & Lee, Hyun Sook & Lee, Jung-Hyun & Seen, Dong-Seung & Gyun Kang, Sung. (2012). One-Step Sequence- and Ligation-Independent Cloning as a Rapid and Versatile Cloning Method for Functional Genomics Studies. *Applied and environmental microbiology*. 78. 5440-3. 10.1128/AEM.00844-12.
- 4- Yang, Jie & Zhang, Zhihong & A Zhang, Xin & Luo, Qingming. (2010). A ligation-independent cloning method using nicking DNA endonuclease. *BioTechniques*. 49. 817-21. 10.2144/000113520.
- 5- Li, M. Z., & Elledge, S. J. (2007). Harnessing homologous recombination in vitro to generate recombinant DNA via SLIC. *Nature Methods*, 4(3), 251–256. doi:10.1038/nmeth1010