

# 遺傳子工學을 應用한 遺傳子の 切斷과 結合(上)

柳 洲 鉉

〈延世大學校 食品工學 科教授〉

魚 住 武 司

〈東京大學校 農藝化學科 助教授〉

遺傳子 操作에 關하여 처음 報告文을 발표 한 것은 1972年이나 이들이 기술적으로 확립 된 것은 1973年이다. 그러므로 이 歷史는 9년 정도밖에 되지 않는다. 遺傳子工學 혹은 遺傳子の 操作은 시험관 내에서 染色體인 DNA를 정제하여 切斷하거나 連結하거나 하여 遺傳子の 새로운 再結合體(recombinant)를 만들어 形質轉換을 시키는 것이라 정의할 수 있다. 이러한 遺傳子の 再結合은 자연계에서도 임의로 발생하는 것으로 알려져 있다. 이 再結合을 목적으로 하여 交配 등으로 생긴 結果物을 일반적으로 “雜種”, “育種株”라 부른다. 그 操作 도중에 DNA는 切斷되거나 連結되거나 한다. 그러나 이것은 인위적으로 제어를 할 수 없다. 이것을 계획성 있게 실험가능케 하는 조작이 再結合 DNA技術이다.

이와 같이 자연에 맡겨졌던 것을 인위적으로 制御할 수 있게 한 그 자체가 획기적이라 할 수 있고 더 나아가 醱酵工業과 생화학에 새로운 연구방법을 提供하였다. 이러한 유전

자 공학에 관한 연구는 앞으로 최근 수년 내에 基礎生物學에 커다란 進步를 가져올 것이며 그 외에 응용면에 있어서 지금의 遺傳子 操作 연구를 계속 한다면 앞으로 癌 등의 정복, 食糧, energy 資源, Hormone, 農藥 등의 여러 문제에 공헌할 수 있다고 믿는다.

이 논문을 읽을 때 주의할 점은 遺傳記號 및 略號의 문제이다. 그것은 (1) vector의 略號는 F, Col E<sub>1</sub> 등의 記號이고 (2) 制限酵素의 略號는 Eco RI, Bam 등이다. 이들의 語頭に 있는 Eco, Bam 등은 각각 酵素가 분리된 세균의 種을 나타내며, (3) 遺傳記號는 遺傳學의 약속으로 항상 3문자를 사용하여 이태릭체로 기록한다. 예를 들면 lac, trp 등이 있다. 때에 따라 2문자로 적은 것도 있다. 그리고 野生型과 突然變異型이 있다. 野生型은 lac<sup>+</sup>이고, 突然變異型은 lac, 또는 lac<sup>-</sup>로 나타내는 것이 보통이다. 때에 따라서는 lac는 또 lactose 遺傳子の 一般記號로서도 사용된다. 藥劑에 대한 抵抗性(耐性, resistant)에 관

계 있는 遺傳子도 있다. 예를 들면 *Str*, *Pen* 등 원칙적으로는 抵抗性型이 *Str<sup>r</sup>*, 非抵抗性(感受性, sensitive)型이 *Str<sup>s</sup>*, *Pen<sup>s</sup>*이다. 그러나 遺傳子 操作에서는 streptomycin 抵抗性을 *Sm<sup>r</sup>*의 記號로 기록하고 있으며 이태릭체는 사용하지 않는다. 이것은 遺傳子로 하기 보다는 marker로서 사용하는 경우가 많기 때문이다.

시험관에서 서로 다른 2개 이상의 DNA를 再結合하여 competent cell에 形質轉換할 때까지는 다음과 같은 순으로 操作한다. 먼저 각 미생물로부터 plasmid, 染色體 등의 유전자를 분리 정제한다. 이들의 유전자 (DNA)를 切斷한 후 서로 다른 DNA로 再結合시킨다. 다음 再結合된 DNA를 clone化하기 위해 필요한 形質轉換을 시킨다. 이들의 操作法을 예를 들어 가면서 설명하고자 한다.

### 1) Plasmid의 調製法

대장균 plasmid의 調製는 bacteria 중에서도 가장 간단하고, Guerry<sup>1)</sup> 등과 Tanaka<sup>2)</sup> 등의 方法으로 쉽게 調製할 수 있는데 이것들을 기초로 하여 Uozumi 등이 실험한 方法은 다음과 같다. plasmid를 가지고 있는 대장균 [예를 들면 *E. coli* C600 (pSC 101) ; pSC 101은 tetracycline resistant plasmid]을 resistant antibiotics(이 경우 tetracycline 10 $\mu$ /ml)을 함유하는 enriched medium (pepton 5g, yeast extract 5g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1g, glucose 2g, water 1l pH7.2) 80ml에 접종하여 37°C에서 하룻밤동안 진탕배양한 후 다시 全量을 [M9+2% casamino acid] 배지(NH<sub>4</sub>Cl 1g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3g, NaCl 5g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1g, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 15mg, glucose 2g, casamino

acid 20g, H<sub>2</sub>O 1l, pH7.0) 800ml에 접종하여 37°C에서 5l의 flask를 사용하여 5時間동안 진탕배양한다. 菌體를 5,000rpm에서 5分間 원심 분리하여, 菌體를 모아 50mM Tris-HCl buffer (pH8.0)에 현탁시켜서 원심분리법으로 2번 세척한다.

여기에서 균체 약 4g이 얻어진다. 菌體 2~4g를 [25%(W/V) sucrose-50mM Tris-HCl, pH8.0] 10ml에 현탁하고 [egg white lysozyme 5mg/ml, 0.25M Tris-HCl pH8.0용액] 2ml를 加하여 0°C에서 5分間 反應시킨 다음 0.25M EDTA-Na(pH8.0) 4ml를 加하여 0°C에서 5分間 방치 후 5M NaCl 5ml를 혼합하고 10% SDS (sodium dodecyl sulfate) 2ml를 加하여 室温에서 溶菌시키고 0°C에서 1시간~하룻밤 保存한다. 이것을 14,000rpm (17,000 $\times$ g)~24,000rpm (48,000 $\times$ g)에서 30分間 원심분리하면 plasmid는 上澄液에 存在하고 chromosome의 大部分은 균체 잔사와 함께 침전된다.

원심분리 條件은 분자량 10 $\times$ 10<sup>6</sup>(10mega dalton, md)이하의 적은 plasmid는 고속원심분리가 좋고, 수십 md 이상의 큰 plasmid의 경우에는 고속원심분리를 하면 chromosome과 함께 엉겨 침전하는 경우가 있기 때문에 가능한 한 저속원심분리(10,000rpm, 60分)를 한다. 상등액 10ml당 CsCl 8.42g을 가하여 용해시키고 ethidium bromide 6mg을 60 $\mu$ l의 dimethylsulfoxide에 용해시킨 것을 첨가한다. 이 용액을 100 $\mu$ l의 micropipette에 취하여 重量을 정밀하게 測定하고 같은 方法으로 측정한 증류수의 重量과 비교하여 密度를 계산한다.

측정은 室温에서 행하며 일반적으로 밀도가 1.570~1.580g/ml의 범위에 있으면 좋다. 밀도가 차이가 날 경우에는 CsCl의 결정 혹은 말

균수를 가하여 밀도를 調整한다. 즉 밀도가 큰 경우에는 물 0.2ml 가함에 따라 밀도가 약 0.01 감소하고 밀도가 작은 경우에는 CsCl 0.22g 가함에 따라 밀도가 약 0.01 증가하게 된다. 이 DNA 溶液을 polyallomer 원심관에 9~10ml 씩 넣고 윗 부분을 유동 paraffin으로 채운다. 음 aluminium cap으로 봉하여 15~20°C에서 40,000r.p.m.으로 48~60시간 원심분리한다. 원심 후 tube를 살며시 꺼내어 暗室에서 자외선 (長波長 365 $\mu$ m 혹은 短波長 254 $\mu$ m)을 照射 하면 DNA는 2개의 붉은색 band로 나타난다.

위의 band는 chromosome 및 open circular 型의 plasmid이다(그림 1). 사진 촬영을 할 때에는 Kodak TriX film 또는 polaroid film (ASA 3,000)을 使用한다. 자외선(UV)을 차단시키기 위하여 camera lens의 바깥 쪽에

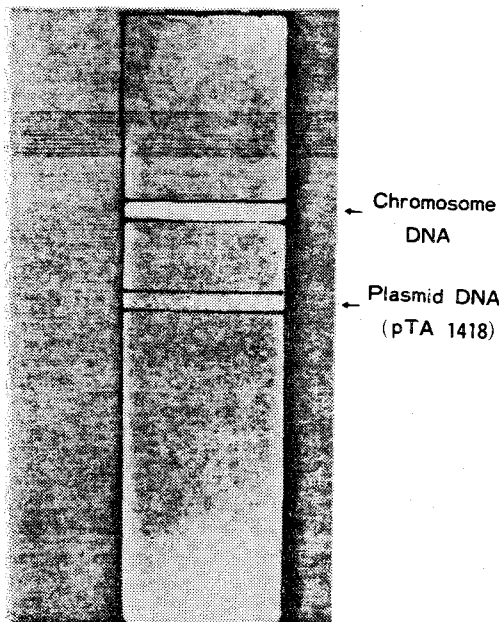


그림 1. CsCl-ethidium bromide 超遠心에 의한 plasmid의 調製

orange filter를 사용하고, 그 바깥 쪽에 UV filter를 부착시킨다(orange filter만을 사용하면 強力한 UV는 직접 orange filter를 통과하여 형광을 발생하기 때문에 사진의 contrast가 나쁘게 된다). 노출 시간은 U.V. 光源의 강도에 따라 다르나 약한 광원인 경우 F4에서 1~2分間이 좋고 Ultraviolet社의 Black ray lamp 혹은 Transilluminator(장파장) 등 강력한 광원일 경우에는 1/8~1초 정도로서 촬영이 가능하다.

DNA를 분리하는 경우는 원심관의 마개를 열고 모세관을 이용하여 윗 부분부터 살며시 plasmid band가 있는 곳까지 넣어 peristaltic pump를 사용하여 천천히 빨아 낸다. UV 조사에 의해 DNA가 절단되기 때문에 DNA를 분리하는 동안에 가능한 한 약한 자외선을 이용하여 빠른 시간내에 조작을 하여야 한다. 특히 큰 plasmid는 더욱 절단이 잘되기 때문에 주의 를 하여야 한다. 분리된 DNA용액에 대하여 3배의 isoamylalcohol을 가하여 경사지게 하고 회전교반하여 ethidium bromide를 추출한다. isoamylalcohol로 3~4회 추출하면 무색이 되는데 한번 더 추출한다. 이 DNA용액을 적당한 TEN buffer(0.02M Tris-HCl, pH8.0, 1mM EDTA·Na, pH8.0, 0.02M NaCl)로 2회(수 시간~하룻밤) 투석한다. DNA용액이 얼어지면 같은 양의 chloroform을 가하여 0~4°C에서 保存한다. chloroform이 충분히 存在하면 pSC101 혹은 Col E1 등 작은 plasmid는 1년이상 安定하다. 그러나 보존중에 chloroform이 증발하여 없어진다면(대부분 미생물의 번식에 의해) DNA가 분해된다.

ColE1, pBR 322 등 chloramphenicol에 의해 增幅되는 plasmid를 調整하는 경우 균을

본 배양할 때 종균배양한 액을 10% 접종하여 90~120분간 배양하고 균 농도가 full growth 의 20~40%에 달한 때 최종농도 170~200 $\mu$ g/ml의 chloramphenicol을 첨가하여 계속 8시간 정도 배양하면 균체와 chromosome은 증식하지 않고 plasmid만이 증식하기 때문에 많은 양의 plasmid를 얻을 수 있다. 4g의 균체로부터 얻어지는 plasmid의량은 pSC 101 경우에는 50 $\mu$ g정도, Col E1을 증폭한 경우에는 500 $\mu$ g 정도이다. 용균액을 만들 때 균농도를 높이면 cleared lysate(상등액) 중의 plasmid 농도가 높아지지만 조작중의 shearing에 의해 절단되어 상등액으로移行하는 chromosome DNA 단편의 양은 증가하지 않고 오히려 감소하는 경향이 있으므로 균농도는 가능한 한 높이는 것이 유리하다. 경우에 따라 cleared lysate 중의 plasmid 농도가 낮은 경우에는 cleared lysate에 polyethylene glycol을 가하여 plasmid DNA를 침전시켜 회수하는 Humphreys 등의 方法에<sup>3)</sup> 의해 plasmid를 농축시킬 수도 있다. 이 방법은 cleared lysate에 대하여 polyethylene glycol 6,000을 최종농도 10%로 하여 가하여 0°C 2시간 방치시킨 후 2,000rpm에서 2분간 저속원심하면 plasmid는 침전된다. 침전물에 [0.05M Tris-HCl pH8.0, 5mM EDTA-Na pH8.0-0.05MNaCl]을 가하여 용해시키고 CsCl과 ethidium bromide를 가하여 밀도를 1.610~1.615로 조절하여 초원심분리를 한다.

*Bacillus*의 plasmid도 대장균과 동일한 방법으로 분리할 수 있다. 용균이 어렵기 때문에 lysozyme의 작용은 37°C 30분간 행할 필요가 있다. *Staphylococcus*의 용균<sup>5)</sup>에는 자기소화 효소인 lysostaphin이<sup>4)</sup> 이용되고 있고 *Achromobacter*가 생산하는 용균효소를 이용해도 pl-

asmid를 조제할 수 있다.<sup>6)</sup> *Pseudomonas* plasmid를 만들 경우는 약간 어려운 점이 있으나 Hansen등<sup>8,9)</sup>은 고농도 (4%) SDS, 55°C熱 pulse처리와 alkali처리에 의해 좋은 결과를 얻었다고 한다. 방선균의 plasmid를 만드는 데도 어려운 점이 있으나 몇가지의 예가 보고되고 있다.<sup>10-13)</sup>

Plasmid를 만들 때 주의할 점은 DNase의 혼입을 방지해야 한다. endonuclease에 의한 CCC DNA의 nicking은 민감한 반응이기 때문에 DNA분자의 한 군데라도 nick가 생기면 CCC plasmid는 OC형이 되어 CsCl-ethidium bromide 원심분리에 의해 분리할 수가 없다. 따라서 이 때 사용되는 기구류는 전열살균 또는 가압증기살균하여 사용하고 증류수, 완충액 그의 약품류도 가능한 한 가압증기살균한다. lysozyme, CsCl, ethidium bromide, dimethylsulfoxide, isoamylalcohol, chloroform은 가압증기살균할 필요가 없다. 투석 tube는 1mM EDTA-Na pH8.0에서 가압증기살균하여 사용한다. 또 투석 tube 등 DNA와 직접 접촉되는 것의 취급은 고무장갑을 끼고 행하여서 손가락으로 부터의 DNase 혼입을 방지한다. 저농도의 DNA는 심한 혼합이나 pipet 조작에 의해 절단된다. 특히 수십 md 이상의 커다란 분자는 절단이 잘되기 때문에 주의하여 실험해야 한다.

## ② DNA의 切斷과 再結合法

DNA의 再結合에 利用되고 있는 方法에는 ① 制限酵素와 DNA ligase 이용법, ② Terminal transferase法, ③ 화학합성 Linker法으로 나눌 수 있다.

표 1. 制限酵素의 種類와 切斷하는 鹽基配列

Bacterial source of the enzyme	Abbreviation	Target nucleotide sequence 5'—3'
<i>Anabaena subcylindrica</i>	<i>Asu</i> I	G↓G-N-C-C'
<i>A. variabilis</i>	<i>Ava</i> I	C-Y-C-G-R-G
	<i>Ava</i> II	G↓A-/T-C-C
<i>Arthrobacter luteus</i>	<i>Alu</i> I	A-G↓C-T
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H	<i>Bam</i> HI	G↓G-A-T-C-C
<i>B. stearothermophilus</i> 1503-4R	<i>Bst</i> I	
<i>B. brevis</i> S	<i>Bbv</i> S	G-C-(A/T)-G-C
<i>B. globigii</i>	<i>Bgl</i> III	A↓G-A-T-C-T
<i>B. subtilis</i> R	<i>Bsu</i> R	G-G↓C-C
<i>Brevibacterium luteum</i>	<i>Blu</i> II	
<i>Haemophilus aegyptius</i>	<i>Hae</i> III	
<i>H. haemoglobinophilus</i>	<i>Hha</i> I	
<i>Providencia alcalifaciens</i>	<i>Pa</i> II	
<i>Streptococcus faecalis</i>	<i>Sfa</i> I	
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	<i>Bbr</i> I	A↓A-G-C-T-T
<i>Corynebacterium humiferum</i>	<i>Chu</i> I	
<i>H. influenzae, d, b</i>	<i>Hind</i> III, <i>Hinb</i> III	
<i>H. suis</i>	<i>Hsu</i> I	
<i>Brevibacterium albidum</i>	<i>Bal</i> I	T-G-G-C↓C-A
<i>B. umbra</i>	<i>Bum</i> I	C-A-G-C-T-G
<i>Corynebacterium humiferum</i>	<i>Chu</i> II	G-T-Y↓R-A-C
<i>Haemophilus influenzae d, c</i>	<i>Hind</i> II, <i>Hinc</i> II	
<i>Diplococcus pneumoniae</i>	<i>Dpn</i> I, II	↓G-A-T-C
<i>Moraxella bovis</i>	<i>Mbo</i> I	
<i>M. osloensis</i>	<i>Mos</i> I	
<i>Escherichia coli</i> /RI	<i>Eco</i> RI	G↓A-A-T-T-C
	<i>Eco</i> RI'	R-R-A↓T-Y-Y
	<i>Eco</i> RI''	↓A-A-T-T
<i>E. coli</i> /R245	<i>Eco</i> RII	↓C-C-(A/T)-G-G
<i>E. coli</i> /PI	<i>Eco</i> PI	A-G-A-T-C-T <sup>b</sup>
<i>H. aegyptius</i>	<i>Hae</i> I	(A/T)-G-G↓C-C-(A/T)
	<i>Hae</i> II	R-G-CC-G-C↓Y
<i>H. influenzae</i> H1	<i>Hinh</i>	
<i>Neisseria gonorrhoea</i>	<i>Ngol</i>	
<i>H. aphrophilus</i>	<i>Hap</i> II	C↓C-G-G
<i>H. parainfluenzae</i>	<i>Hpa</i> II	
<i>Moraxella nonliquefaciens</i>	<i>Mno</i> I	
<i>H. gallinarum</i>	<i>Hga</i> I	G-A-C-G-C 5/10 base pairs
<i>H. haemolyticus</i>	<i>Hha</i> I	G-C-G-C
<i>H. influenzae f</i>	<i>Hinf</i>	G-A-N-T-C
<i>H. parahaemolyticus</i>	<i>Hph</i> I	G-G-T-G-A 8/7 base pairs
<i>H. parainfluenzae</i>	<i>Hpa</i> I	G-T-T-A-A-C
<i>Moraxella bovis</i>	<i>Mbo</i> II	G-A-A-G-A 8/7 base pairs
<i>M. nonliquefaciens</i>	<i>Mnl</i> II	C-C-T-C 5/10 base pairs
<i>Providencia stuarti</i> 164	<i>Pst</i> I	C-T-G-C-A-G
<i>Serratia marcescens</i>	<i>Sma</i> I	C-C-C-G-G-G
<i>Streptomyces albus</i>	<i>Sal</i> I	G-T-C-G-A-C
<i>Thermus aquaticus</i>	<i>Taq</i> I	T-C-G-A
<i>Xanthomonas badrii</i>	<i>Xba</i> I	T-C-T-A-G-A
<i>X. holcicola</i>	<i>Xho</i> I	C-T-C-G-A-G
<i>X. papavericola</i>	<i>Xpa</i> I	

(1) 制限酵素—DNA ligase법

이 방법으로 시험관 내에서 재결합하는 것은 쉽기 때문에 많은 실험예가 있다. 제한효소는 각각 特定된 염기배열을 절단하기 때문에 목적에 따라 적당한 효소를 선택하는 것이 가능하다(표 1). *Eco* RI, *Hind* III, *Bam* HI 등은 절단점에 cohesive end가 생기기 때문에 두 종류의 DNA를 동일한 제한효소로 절단하여 兩者를 혼합하면 cohesive end가 서로 annealing 한다. 이에 대하여 대장균의 DNA polymerase 혹은 T<sub>4</sub> phage의 DNA polymerase를 작용시키면 절단된 곳이 연결된다(그림 2). Uozumi

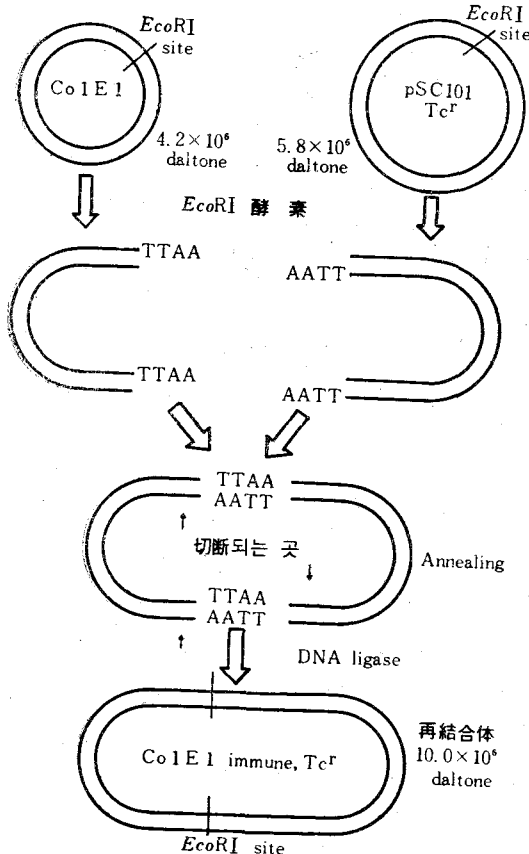


그림 2 制限酵素와 DNA ligase에 의한 再結合體의 形成

등의 실험 예를 보면 pSC 101 DNA 9 $\mu$ g과 Col E1 DNA 38 $\mu$ g을 混合하여 反應液 [Tris-HCl 85mM, EDTA 1mM, MgCl<sub>2</sub> 12mM, mercaptoethanol 1mM, NaCl 44mM, glycerol 7%, Triton X 100 0.022%, pH7.4] 540 $\mu$ l 중에서 *Eco* RI을 37°C 40분간 작용시켜 두개의 plasmid를 절단한다. 반응액 20 $\mu$ l를 취하여 agarose gel 전기영동(3mA/tube 3시간)으로 절단된 것을 확인한다. 직선상의 두개의 plasmid DNA를 함유한 반응액에 대장균 DNA ligase와 NAD 등을 가하여 반응액 [pSC101 8.7 $\mu$ g, Col E1 36.6 $\mu$ g, Tris-HCl 75mM, EDTA 1.3mM, MgCl<sub>2</sub> 13mM, mercapto ethanol 0.6mM, Triton $\times$ 100 0.013%, NaCl 41mM, glycerol 9.5%, glycine 20mM, bovine serum albumin 60 $\mu$ g/ml, NAD 100 $\mu$ M) 870 $\mu$ l로 하고 pH7.8, 11°C에서 40시간 ligase 반응을 시키면 *Eco* RI으로 절단된 끝이 연결이 되어 두개 plasmid 再結合體가 形成된다.

그림 3에서 보는 바와 같이 원래 2종류 DNA band보다도 高分子則에 3개 이상의 band가 나타난다. 이것은 2종류의 DNA가 그림 2에 나타낸 것과 같이 環狀으로 연결된 것, 그리고 3개 이상으로 연결된 것, 2개 이상이 불완전하게 連結되어 직선상으로 된 것, 같은 종류의 DNA가 2개 이상 연결된 것 등 여러 종류의 혼합물이고 그의 각각의 분자 자신이 再環狀化된 것도 함유되어 있다.

이 반응액의 DNA를 CaCl<sub>2</sub> 처리한 *E. coli*에 형질전환을 시켜 tetracycline耐性(Tc<sup>r</sup>)의 性質을 갖고 있는 菌을 선택한 결과 ligase 반응액 2 $\mu$ l(pSC 101 DNA 0.02 $\mu$ g+Col E1 DNA 0.08 $\mu$ g)로부터 120개의 Tc<sup>r</sup> 형질전환 菌株가 얻어지고 그 가운데 7균주는 pSC 101과 Col E1이

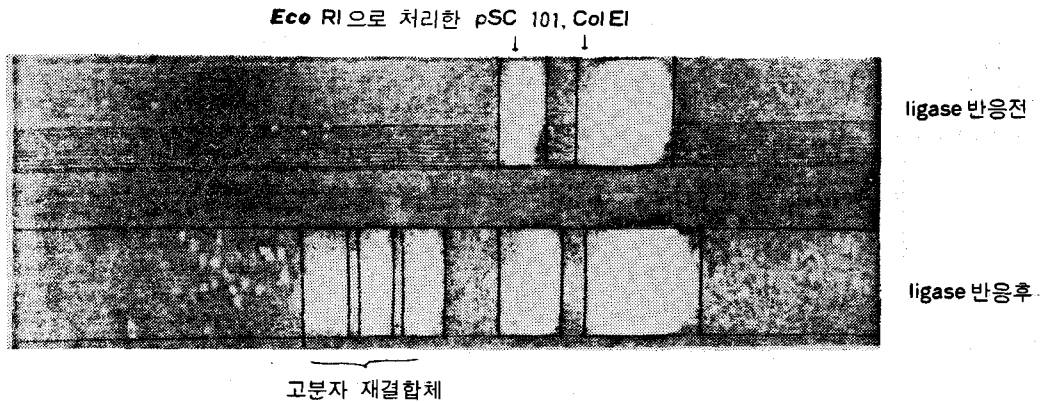


그림 3. *Eco*RI-DNA ligase에 의한 DNA의 再結合體의 形成

연결된 再結合體 plasmid를 가지고 있었다. 재결합 DNA는 gel 전기영동에서 고분자로 되는 것과 *Eco* RI의 작용으로 원상태의 2종류의 plasmid DNA로 된다는 것과 또 전자현미경을 이용한 분자량과 hetero duplex의 관찰에 의해 확인되었다.

위의 같은 방법으로 *Bacillus*의 plasmid를 대장균 plasmid RSF 2124 (Col EI-ampicillin 저항성)에 연결하여 대장균 내에 넣어 clone화가 가능하였다.<sup>14,15)</sup> 이러한 경우 再結合體 검출빈도를 높이기 위하여 ligase 반응액을 gel 전기영동하여 gel상의 고분자층에 再結合體 DNA를 추출하여 형질전환을 행하였다. gel로부터 DNA 추출은 gel의 동결融解에 의한 방법을 사용하면 20% 정도의 수율밖에 얻지 못하지만 N.Blin 등<sup>33)</sup>은 DNA를 함유한 agarose gel을 포화 KI 용액중에 용해시켜 밀도 평형 초원심분리에 의해 DNA band를 회수하여 좋은 결과를 얻을 수 있다고 한다. 또한 gel을 용해한 후 hydroxyl apatite의 소형 column에 의해 DNA를 흡착 회수하는 방법도 있다.

DNA의 연결 조작에 있어서는 사용하는 완

충액, 약품 등을 가능한 한 살균하여 DNase 및 미생물의 혼입을 방지할 필요가 있다. 반응액 중에는  $Mg^{++}$ 이 함유되어 있고 반응시간이 길기 때문에 혼입된 DNase에 의해 DNA가 분해되기 쉽다. 위에서 사용한 DNA ligase와 *Eco* RI 효소는 Uozumi 등<sup>2,16)</sup>에 따라 *E. coli* N 1625 (ligase 과잉 생산주)와 *E. coli* B-RY13 (*Eco* RI 생산주)로부터 정제한 것이다. 이 효소에는 DNase, phosphatase 등이 혼입되면 DNA를 연결할 수 없기 때문에 충분히 정제할 필요가 있다. DNA의 연결에 사용되는 ligase를 얻는 방법은 문헌의 정제법이나 조제용 disc 전기영동에 의한 정제를 더 할 필요가 있다. 최근에는 각종의 제한효소와 DNA ligase가 시판되고 있어서 이것들을 이용하면 가능하다.

*Hae* III, *Sma* I 등과 같이 절단된 점이 DNA의 兩鎖에 일치하여 cohesive end가 되지 않는 경우가 있다. 이와 같은 경우에도 *T*<sub>4</sub> phage DNA ligase를 이용하면 2종류의 DNA를 연결할 수 있다. 이 경우에는 NAD 대신 ATP를 첨가하여 반응시킨다.

(다음호에 계속)