

НОВАЯ ЭНДОНУКЛЕАЗА РЕСТРИКЦИИ AluBI ИЗ *ARTHROBACTER LUTEUS* B – ИЗОШИЗОМЕР AluI, НЕЧУВСТВИТЕЛЬНЫЙ К ПРИСУТСТВИЮ 5-МЕТИЛЦИТОЗИНА В САЙТЕ УЗНАВАНИЯ AGCT

В.А. ЧЕРНУХИН*, А.А. БОЛТЕНГАГЕН, Г.В. ТАРАСОВА, В.С. ДЕДКОВ, С.Х. ДЕГТЯРЕВ

НПО «СибЭнзим», Новосибирск

Описаны свойства новой эндонуклеазы рестрикции, AluBI, узнающей и расщепляющей последовательность AGCT и являющейся изошизомером хорошо известной рестриктазы AluI. Фермент AluBI, в отличие от AluI, расщепляет ДНК в случае, когда цитозиновые основания в сайте узнавания метилированы в положении С5. AluBI также расщепляет последовательность узнавания с одним С5-метилированным и другим N4-метилированным цитозинами, однако не расщепляет ДНК при модификации обоих цитозинов в положении N4.

Ключевые слова: эндонуклеаза рестрикции, чувствительность к метилированию.

Эндонуклеазы рестрикции (рестриктазы, ЭР) являются сайт-специфическими ДНК-эндонуклеазами бактерий и, как правило, входят в состав так называемых систем рестрикции-модификации.

В настоящее время описано более 250 различных сайтов узнавания ЭР второго типа и более 2000 различных изошизомеров рестриктаз, то есть аналогов ранее обнаруженных ферментов, которые, в свою очередь, называются прототипами.

Хотя изошизомеры и прототип имеют одинаковый сайт узнавания, они могут отличаться по способности гидролизовать узнаваемую последовательность ДНК при наличии в ней метилированных оснований. Изошизомеры, отличающиеся по способности гидролизовать модифицированную ДНК, широко применяются при изучении статуса метилирования природных ДНК [1–5, 16]. Однако известно всего несколько примеров таких пар изошизомеров (EcoRII – MvaI [6, 7], HpaII-MspI [8]), используемых в практике исследований.

ЭР AluI из штамма бактерии *Arthrobacter luteus*, узнающая и расщепляющая последовательность AGCT, известна уже более 30 лет [9]. Этот фермент нашел

практическое применение в биотехнологии и молекулярной биологии и стал одной из наиболее используемых эндонуклеаз рестрикции.

Помимо эндонуклеазы рестрикции в систему рестрикции-модификации (РМ-систему) AluI входит ДНК-метилтрансфераза, которая метилирует 5-е положение цитозина в узнаваемой последовательности AGCT [14]. Такая модификация предотвращает гидролиз собственной ДНК *Arthrobacter luteus* эндонуклеазой рестрикции AluI, тогда как чужеродная неметилированная ДНК расщепляется рестриктазой AluI.

В данной работе описаны выделение и свойства новой эндонуклеазы рестрикции AluBI, способной расщеплять как немодифицированную ДНК, так и сайт узнавания AGCT, метилированный по 5-му положению цитозина.

Материалы и методы

В работе использовались реактивы производства «Sigma» (США), Serva (Германия), «ICN» (США) и «Хеликон» (Россия).

Выращивание штамма и выделение фермента. Колонии *Arthrobacter luteus* B выращивали на агаризованной среде ЛБ и затем переносили в колбы, содержащие 300 мл жидкой питательной среды ЛБ, и культивировали на качалках при 30 °С и перемешивании – 150 об/мин. в течение двух суток до достижения стационарной фазы роста. Клетки осаждали в течение 30 минут в роторе JA-

* Автор для переписки:

© 2007 г. Чернухин Валерий Алексеевич

НПО «СибЭнзим»

630117 Новосибирск, ул. Акад. Тимакова, 2/12

Тел./факс: 8-383-333-49-91

E-mail: valera@sibenzyme.ru

6 на центрифуге J2-21 при 5000 об/мин. и температуре 4 °С. Выход биомассы составил 5 г/л среды.

Выделение фермента проводили при 4 °С путем колоночной хроматографии.

37 г замороженной биомассы суспендировали в 100 мл буфера А (10 мМ Трис-НСl, рН 7,5, 0,1 мМ ЭДТА, 7 мМ β-меркаптоэтанол), содержащего 0,05 М NaCl, 0,3 мг/мл лизоцим, 0,1 мМ фенилметилсульфонилфторид (PMSF), и инкубировали в течение 1 ч при постоянном перемешивании. Далее клетки разрушали ультразвуком и центрифугировали в течение 30 мин. в роторе JA-20 при 15000 об/мин.

Супернатант пропускали через колонку с фосфоцеллюлозой Р-11 («Whatman», Англия) объемом 45 мл, предварительно уравновешенную буфером А, содержащим 0,05 М NaCl; затем белок элюировали линейным градиентом NaCl (0,05 М–0,6 М) в буфере А объемом 500 мл, собирая фракции по 10 мл.

Фракции, содержащие эндонуклеазу, объединяли, диализовали против 20 объемов буфера А и наносили на колонку с 7 мл гепарин-сефарозы («Bio-Rad», США).

Элюцию проводили линейным градиентом NaCl (0,05 М–0,5 М) в буфере А объемом 120 мл, собирая

фракции по 3 мл. Активные фракции объединяли и наносили на колонку с гидроксипатитом объемом 4 мл, предварительно уравновешенную буфером В (0,01 М K_2HPO_4 , рН 7,2, 7 мМ β-меркаптоэтанол).

Колонку промывали 10 мл буфера В и проводили элюцию линейным градиентом, собирая фракции объемом по 2 мл. Активные фракции объединяли и диализовали против 20 объемов концентрирующего буфера (50% глицерин, мМ Трис-НСl, рН 7,55, 0,1 мМ ЭДТА, 7 мМ β-меркаптоэтанол, 0,05 М NaCl). Препарат хранили при -20 °С.

Выход фермента составил 2,5 мл препарата с концентрацией 5000 ед./мл.

Препараты ферментов. Для экспериментов использовали эндонуклеазы рестрикции AluI (концентрация 3000 ед./мкл), AluB I (концентрация 3000 ед./мкл), T4 полинуклеотидкиназу и буферные растворы производства НПО «Сибэнзим» (Россия).

Определение чувствительности к метилированию сайта узнавания на синтетических олигонуклеотидных дуплексах. Олигодезоксирибонуклеотиды следующего состава, служившие субстратом для эндонуклеаз Alu I и AluB I, были синтезированы в НПО «Сибэнзим» (Россия).

Alu1: 5'-GGT ATA GGA TGA AGCT TTC GCG GGT TAA GG-3'

Alu2: 5'-CC TTA ACC CGC GAA AGCT TCA TCC TAT TCC-3'

Alu3: 5'-GGT ATA GGA TGA (M6A)GCT TTC GCG GGT TAA GG-3'

Alu4: 5'-CC TTA ACC CGC GAA (M6A)GCT TCA TCC TAT TCC-3'

Alu5: 5'-GGT ATA GGA TGA AG(M5C)T TTC GCG GGT TAA GG-3'

Alu6: 5'-CC TTA ACC CGC GAA AG(M5C)T TCA TCC TAT TCC-3'

Alu7: 5'-GGT ATA GGA TGA AG(M4C)T TTC GCG GGT TAA GG-3'

Alu8: 5'-CC TTA ACC CGC GAA AG(M4C)T TCA TCC TAT TCC-3'

Олигонуклеотиды с четным номером комплементарны олигонуклеотидам с нечетным номером. Все олигонуклеотидные дуплексы имеют одинаковую первичную структуру и отличаются друг от друга наличием или отсутствием метилированного основания в последовательности AGCT (сайт AGCT, узнаваемый AluI и AluBI, подчеркнут).

Приготовление γ-[32P]АТР-меченных олигонуклеотидных дуплексов. Одну из цепей олигонуклеотидного дуплекса модифицировали по 5'-концу с помощью T4-полинуклеотидкиназы и γ-[32P]АТР. После очистки олигонуклеотида от побочных продуктов реакции к нему добавляли комплементарный

немеченный олигонуклеотид и пробирку прогревали 2 минуты при 65 °С с последующим охлаждением до комнатной температуры на рабочем столе.

Гидролиз олигонуклеотидных дуплексов эндонуклеазами Alu I и AluB I. Реакцию гидролиза проводили добавлением 1 мкл препарата фермента AluI или AluBI, содержащего 3 единицы активности, в 20 мкл реакционной смеси, содержащей SE-буфер «Y» (33 мМ Tris ацетат рН 7.9 (при температуре 25 °С), 10 мМ $Mg(CH_3COO)_2$, 66 мМ KCH_3COO , 1 мМ DTT) и олигонуклеотидный дуплекс в концентрации 66,7 нМ при температура 37 °С в течение 50 минут.

Результаты и обсуждение

Описание штамма. Штамм *Arthrobacter luteus* В был выделен из природных изолятов в ходе поиска продуцентов рестриктаз, как описано ранее [10].

Штамм *Arthrobacter luteus* В характеризуется следующими признаками:

Культурально-морфологические признаки. На среде Лурия — Бертрани он образует белые, гладкие, блестящие, непрозрачные, выпуклые, круглые колонии 4 мм в диаметре. Клетки кокковидные, одиночные, в парах или в коротких цепочках.

Физиолого-биохимические признаки. Таксономическая принадлежность штамма-продуцента рестриктазы *AluBI* определялась по его морфологическим и биохимическим свойствам, как описано ранее [11]. Клетки бактерии грамположительны. Не способны к анаэробному росту, каталазоположительны, оксидазоотрицательны. Растут при температуре 10–40 °С. Содержание гуанина и цитозина в ДНК штамма, установленное с помощью ранее предложенного метода [12], составляет 73–77%.

На основании анализа морфологических и биохимических свойств штамм идентифицировали как вид бактерии *Arthrobacter luteus* В, а продуцируемую им эндонуклеазу рестрикции назвали *AluBI* согласно общепринятой номенклатуре [13].

Определение специфичности эндонуклеазы рестрикции *AluI*. Специфичность фермента определяли по картинам расщепления различных ДНК (рис. 1).

В качестве субстратов для выявления специфичности расщепления использовали ДНК фагов λ и Т7. После инкубации в оптимальных условиях (37 °С, SE-буфер «У» — 33 мМ Tris-ацетат, рН 7,9, 10 мМ $MgCl_2$, 66 мМ калия ацетат, 1 мМ DTT) в течение 60 мин. при концентрации плазмидной ДНК 0,02 мг/мл продукты реакции разделяли путем электрофореза в 1% агарозном геле.

На рисунке 1 представлена электрофореграмма продуктов расщепления ДНК фагов λ и Т7 эндонуклеазами рестрикции *AluI* и *AluBI*. Видно, что при обработке ДНК фагов λ и Т7 эндонуклеазами рестрикции *AluI* и *AluBI* образуются фрагменты одинаковой длины. Эти результаты говорят о том, что *AluI* и *AluBI* узнают и расщепляют одну и ту же последовательность ДНК.

Определение позиций расщепления ДНК сайт-специфической эндонуклеазой *AluBI*. Определение позиций расщепления ДНК сайт-специфической эндонуклеазой *AluBI* осуществляли путем сравнения

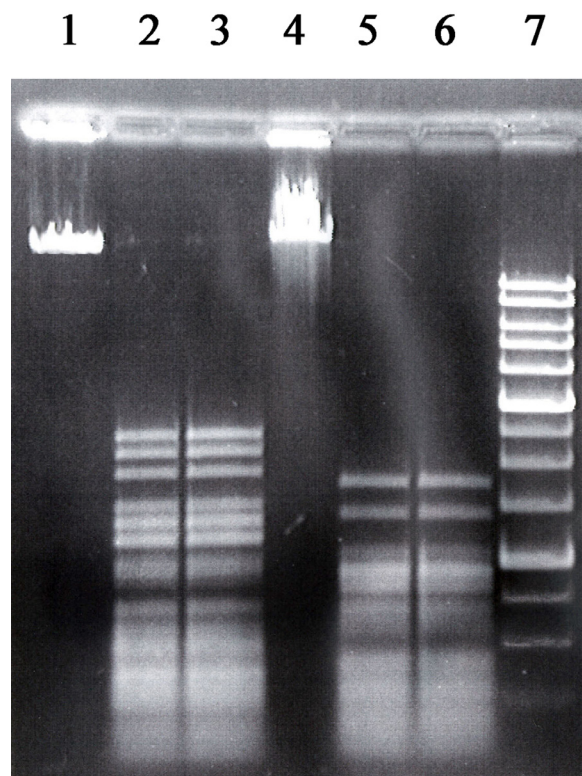


Рис. 1. Гидролиз ДНК фагов лямбда и Т7 эндонуклеазами рестрикции *AluI* и *AluBI*. Дорожки:

- 1 — ДНК фага λ ;
- 2 — ДНК фага λ , ЭР *AluI*;
- 3 — ДНК фага λ , ЭР *AluBI*;
- 4 — ДНК фага Т7;
- 5 — ДНК фага Т7, ЭР *AluI*;
- 6 — ДНК фага Т7, ЭР *AluBI*;
- 7 — маркер молекулярной массы ДНК 1 kb (производство НПО «СибЭнзим»)

длин фрагментов, образуемых при расщеплении олигонуклеотидных дуплексов *Alu1** / *Alu2* и *Alu2** / *Alu1* (меченая цепь помечена символом «*»), имеющих неметилированную последовательность узнавания AGCT, эндонуклеазами рестрикции *AluI* и *AluBI*.

В качестве маркера длин фрагментов использовали продукты частичного расщепления этих же дуплексов экзонуклеазой *EcoIII*. Результаты расщепления данных олигонуклеотидных дуплексов приведены на рисунке 2.

Как видно из рисунка 2, длины фрагментов, образованных при гидролизе олигонуклеотидных дуплексов *Alu1** / *Alu2* и *Alu2** / *Alu1* обоими ферментами, одинаковы.

Таким образом, эндонуклеаза рестрикции *AluBI* расщепляет сайт узнавания в той же позиции, что и *AluI*, то есть после гуанина.

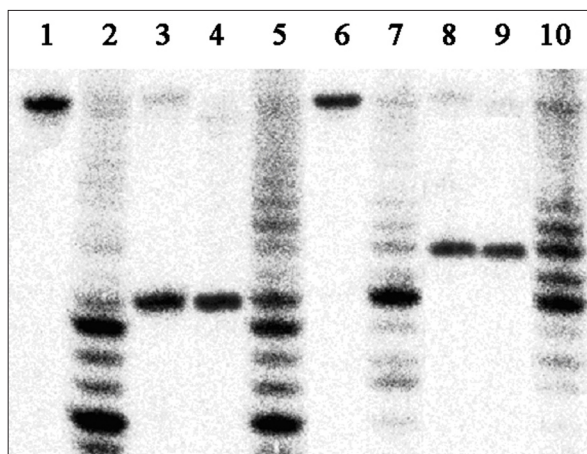


Рис. 2. Определение места расщепления ДНК эндонуклеазой рестрикции AluBI.

Дорожки:

- 1 — дуплекс Alu1*/ Alu2;
- 2, 5 — дуплекс Alu1*/ Alu2, экзонуклеаза III из *E. coli*;
- 3 — дуплекс Alu1*/ Alu2, ЭР AluI;
- 4 — дуплекс Alu1*/ Alu2, ЭР AluBI;
- 6 — дуплекс Alu2*/ Alu1;
- 7, 10 — дуплекс Alu2*/ Alu1, экзонуклеаза III из *E. coli*;
- 8 — дуплекс Alu2*/ Alu1, ЭР AluI;
- 9 — дуплекс Alu2*/ Alu1, ЭР AluBI

Определение и сравнение чувствительности к метилированию сайта узнавания AluI и AluBI.

Результаты расщепления метилированных и неметилированных синтетических олигонуклеотидных дуплексов приведены на рисунках 3–5.

На рисунке 3 приведена электрофореграмма продуктов расщепления ферментами AluI и AluBI олигонуклеотидных дуплексов, содержащих сайт узнавания этих ферментов либо без метилированных оснований, либо только с одним метилированным основанием (полуметилированный сайт). Как видно, AluI и AluBI, расщепляют олигонуклеотидный дуплекс, содержащий неметилированный сайт узнавания (дорожки 2, 3). Однако оба фермента не способны расщеплять ДНК, если в сайте узнавания в комплементарной цепи метилирован аденозин (дорожки 4, 5). При наличии в комплементарной цепи метилированного в 4-е или 5-е положение цитозина, AluBI расщепляет немодифицированную цепь (дорожки 7, 9), тогда как AluI не расщепляет (дорожки 6, 8).

На рисунках 4 и 5 приведены электрофореграммы продуктов расщепления ферментами AluI и AluBI олигонуклеотидных дуплексов, гидролизуемая цепь которых

содержит 5-метилцитозин (рис. 4) или N4-метилцитозин (рис. 5) в сайте узнавания.

Как видно из рисунка 4, AluBI расщепляет цепь с 5-метилцитозином, если комплементарная цепь немодифицирована (дорожка 3) или содержит 5-метилцитозин в сайте узнавания (дорожка 5); при этом AluI такую метилированную ДНК не расщепляет (дорожки 2, 4). Следовательно, AluBI, в отличие от AluI, гидролизует обе цепи ДНК в сайте узнавания при наличии в нем одного или двух 5-метилцитозиновых оснований. Однако цепь с 5-метилцитозином не гидролизуется AluI и AluBI, если комплементарная цепь ДНК содержит в сайте узнавания N6-метиладенин (дорожки 6, 7). И, наконец, AluBI, в отличие от AluI, расщепляет цепь с 5-метилцитозином при наличии N4-метилцитозина в комплементарной цепи (дорожки 8, 9).

Как видно из рисунка 5, AluBI, в отличие от AluI, гидролизует цепь с N4-метилцитозином в сайте узнавания, если комплементарная цепь не модифицирована (дорожки 2 и 3). Однако как AluI, так и AluBI не расщепляют олигонуклеотид, если он содержит два N4-метилцитозина в сайте узнавания (дорожки 4, 5).

Это свидетельствует о том, что AluBI, в отличие от AluI, способен расщеплять ДНК, если узнаваемая последовательность содержит только один N4-метилцитозин. Цепь с N4-метилцитозином также гидролизуется

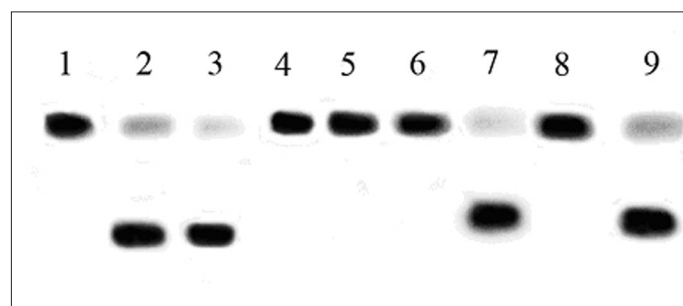


Рис. 3. Определение чувствительности ферментов AluI и AluBI к метилированным основаниям в сайте узнавания

Дорожки:

- 1 — дуплекс Alu1*/ Alu2;
- 2 — дуплекс Alu1*/ Alu2, ЭР AluI;
- 3 — дуплекс Alu1*/ Alu2, ЭР AluBI;
- 4 — дуплекс Alu1*/ Alu4, ЭР AluI;
- 5 — дуплекс Alu1*/ Alu4, ЭР AluBI;
- 6 — дуплекс Alu1*/ Alu6, ЭР AluI;
- 7 — дуплекс Alu1*/ Alu6, ЭР AluBI;
- 8 — дуплекс Alu1*/ Alu8, ЭР AluI;
- 9 — дуплекс Alu1*/ Alu8, ЭР AluBI

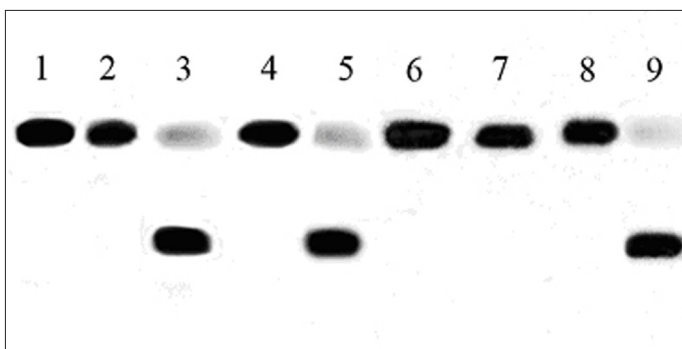


Рис. 4. Определение чувствительности ферментов AluI и AluBI к метилированным основаниям в сайте узнавания

Дорожки:

- 1 — дуплекс Alu5*/ Alu2;
- 2 — дуплекс Alu5*/ Alu2, ЭР AluI;
- 3 — дуплекс Alu5*/ Alu2, ЭР AluBI;
- 4 — дуплекс Alu5*/ Alu6, ЭР AluI;
- 5 — дуплекс Alu5*/ Alu6, ЭР AluBI;
- 6 — дуплекс Alu5*/ Alu4 ЭР AluBI;
- 7 — дуплекс Alu5*/ Alu4, ЭР AluI;
- 8 — дуплекс Alu5*/ Alu8, ЭР AluI;
- 9 — дуплекс Alu5*/ Alu8, ЭР AluBI

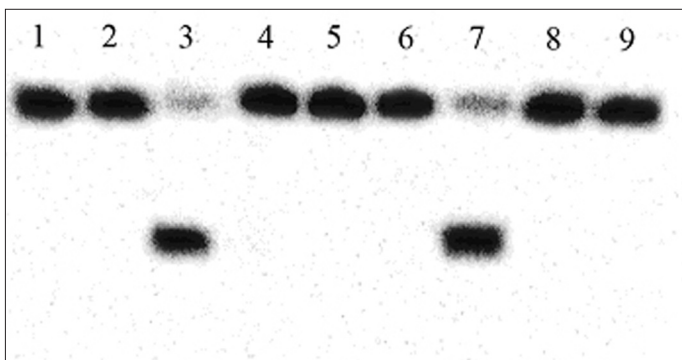


Рис. 5. Определение чувствительности ферментов AluI и AluBI к метилированным основаниям в сайте узнавания

Дорожки:

- 1 — дуплекс Alu7*/ Alu2;
- 2 — дуплекс Alu7*/ Alu2, ЭР AluI;
- 3 — дуплекс Alu7*/ Alu2, ЭР AluBI;
- 4 — дуплекс Alu7*/ Alu8, ЭР AluI;
- 5 — дуплекс Alu7*/ Alu8, ЭР AluBI;
- 6 — дуплекс Alu7*/ Alu6, ЭР AluI;
- 7 — дуплекс Alu7*/ Alu6, ЭР AluBI;
- 8 — дуплекс Alu7*/ Alu4, ЭР AluI;
- 9 — дуплекс Alu7*/ Alu4, ЭР AluBI

ферментом AluBI, но не AluI, если комплементарная цепь узнаваемой последовательности содержит 5-метилцитозин

(дорожки 6 и 7). При этом, как и следовало ожидать, олигонуклеотид не расщепляется обоими ферментами, если в состав его сайта узнавания входит N6-метиладенин (дорожки 8 и 9).

Таким образом, в отличие от AluI, ЭР AluBI способна расщеплять ДНК, если в сайте узнавания метилированы один или два цитозина в положении C5 или один цитозин в положении N4.

Возможности использования ЭР AluI и AluBI для определения статуса метилирования хромосомных ДНК и для избирательного гидролиза C5-метилированных ДНК.

Благодаря различной чувствительности ферментов AluI и AluBI к сайтам узнавания, содержащим 5-метилцитозин, эта пара эндонуклеаз рестрикции может использоваться для определения модифицированных оснований в последовательности 5'-AGCT-3' в хромосомных ДНК.

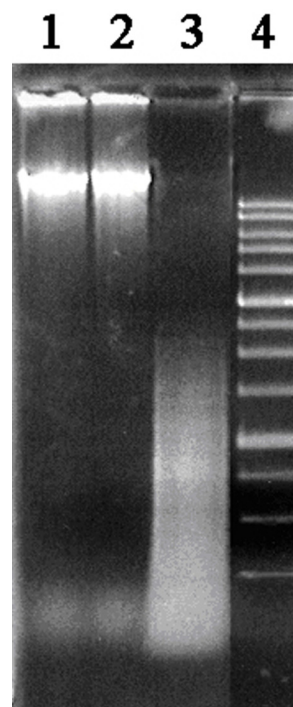


Рис. 6. Расщепление хромосомной ДНК *Arthrobacter luteus* эндонуклеазами рестрикции AluI и AluBI.

Дорожки:

- 1 — хромосомная ДНК *Arthrobacter luteus*;
- 2 — хромосомная ДНК *Arthrobacter luteus*, ЭР AluI;
- 3 — хромосомная ДНК *Arthrobacter luteus*, ЭР AluBI;
- 4 — маркер молекулярной массы ДНК 1 kb (производство НПО «СибЭнзим»)

Известно [14], что хромосомная ДНК штамма *Arthrobacter luteus* — продуцента AluI — содержит 5-метилцитозин в сайте 5'-AGCT-3'.

В соответствии с описанными выше свойствами ферментов AluI и AluBI, хромосомная ДНК *Arthrobacter luteus* — продуцента AluI — не гидролизруется рестриктазой AluI, но эффективно расщепляется рестриктазой AluBI (рис. 6).

Анализ статуса метилирования ДНК с помощью пары AluI и AluBI возможен также и для эукариотических геномов. Для некоторых из них показано образование 5-метилцитозина в результате метилирования последовательностей ДНК CNG [15] и CT [16].

В этом случае при перекрытии этих сайтов метилирования с последовательностью AGCT AluBI будет расщеплять модифицированную последовательность узнавания, тогда как AluI — нет.

Патент по данной работе находится в стадии оформления.

Литература

- McClelland M. The effect of sequence specific DNA methylation on restriction endonuclease cleavage // *Nucleic Acids Res.* — 1981. — Vol. 9 — P. 5859–5866.
- McClelland M. and Nelson M. The effect of site specific methylation on restriction endonuclease digestion // *Nucleic Acids Res.* — 1985. — Vol.13 (Suppl.). — P. 201–207.
- McClelland M. et al. Effect of site-specific modification on restriction endonucleases and DNA modification methyltransferases // *Nucleic Acids Res.* — 1994. — Vol. 22. — P. 3640–3659.
- Cooper D.N., Taggart M.H., Buildings K., Bird A.P. Unmethylated domains in vertebrate DNA // *Nucleic Acid Res.* — 1983. — Vol.11. — P. 647–658.
- Bird A., Taggart M., Frommer M., Miller O.J., Macleod D. A fraction of the mouse genome that is derived from islands of nonmethylated, CpG-rich DNA // *Cell.* — 1985. — Vol. 40. — P. 91–99.
- Buryanov Ya.I. et al. Site specificity and chromatographic properties of *E. coli* K12 and EcoRII DNA-cytosine methylases // *FEBS Letters.* — 1978. — Vol. 88. — P. 251–254.
- Butkus V. et al. Investigation of restriction-modification enzymes from *M. varians* RFL19 with a new type of specificity toward modification of substrate // *Nucleic Acids Res.* — 1985. — Vol.13. — P. 5727–5746.
- Waalwijk C., Flavell R.A. MspI, an isochizomer of HpaII which cleaves both unmethylated and methylated HpaII sites // *Nucleic Acids Res.* — 1978. — Vol. 5. — P. 3231–3236.
- Roberts R.J., Myers P.A., Morrison A., Murray K. A specific endonuclease from *Arthrobacter luteus* // *J. Mol. Biol.* — 1976. — Vol. 102. — P. 157–165.
- Белавин П.А., Дедков В.С., Десятков С.Х. Метод определения эндонуклеаз рестрикции в колониях бактерий // *Прикладная биохимия и микробиология.* — 1988. — Т. 24. — № 1. — С. 50–51.
- Определитель бактерий Берджи / Под ред. Дж. Холта и др.: 9-е изд. в 2 томах: Пер. с англ. под ред. акад. РАН Г.А. Заварзина. — М., 1997.
- Дедков В.С. Определение содержания G+C в ДНК бактерий при помощи эндонуклеаз рестрикции // *Биотехнология.* — 2004. — № 4. — С. 77–82.
- Smith H.O., Nathans D. A suggested nomenclature for bacterial host modification and restriction systems and their enzymes // *J. Mol. Biol.* — 1973. — Vol. 81. — P. 419–423.
- Zhang B., Tao T., Wilson G.G., Blumenthal R.M. The M.AluI DNA-(cytosine C5)-methyltransferase has an unusually large, partially dispensable, variable region // *Nucleic Acids Res.* — 1993. — Vol. 25. — P. 905–911.
- Naveh-Mani T. and Cedar H. Topographical distribution of 5-methylcytosine in animal and plant DNA // *Mol. Cell. Biol.* — 1982. — Vol. 2. — P. 758–762.
- Oakeley E.J. and Jost J.-P. Non-symmetrical cytosine methylation in tobacco pollen DNA // *Plant Molecular Biology.* — 1996. — Vol.31. — P. 927–930.

Список сокращений

ЭР — эндонуклеаза рестрикции;

Трис — трис-(оксиметил)-аминометан;

ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота.

**NEW RESTRICTION ENDONUCLEASE AluBI
FROM ARTHROBACTER LUTEUS B – AluI ISOSHIZOMER,
NONSENSITIVE TO PRESENCE OF 5-METHYLCYTOSINE
IN THE RECOGNITION SEQUENCE AGCT**

V.A. CHERNUKHIN*, A.A. BOLTENGAGEN, G.V. TARASOVA,
V.S. DEDKOV, S.Kh. DEGTYAREV

SibEnzyme Ltd., Novosibirsk

A new restriction endonuclease AluBI has been discovered and characterized. AluBI is an isoshizomer of well known restriction endonuclease AluI, which recognizes DNA sequence AGCT. Unlike AluI, enzyme AluBI is able to cleave DNA when recognition sequence contains 5-methylcytosines. AluBI also cleaves recognition sequence with two methylated cytosines, one modified at N4 and other at C5 positions. However, new enzyme doesn't cleave DNA with two N4-methylcytosines in the recognition site.

Keywords: restriction endonuclease, sensitivity to methylation.