

*Streptovercillium olivovercillatum*에서 분리한 새로운 Type II 제한효소 *SoII*의 특성 연구

황해연 · 임정빈*

서울대학교 자연과학대학 미생물학과, 분자미생물학 연구센터

토양으로부터 분리한 방선균주로부터 새로운 type II 제한효소를 분리하여 그 특성을 연구하였다. 이 균주는 수리분석 결과, *Streptovercillium olivovercillatum*으로 동정되었으며, 정제한 제한효소는 *SoII*이라 명명하였다. *SoII*은 *BamHI*의 isoschizomer로서 여섯개의 염기서열 5'-G↓GATCC-3'을 인지하며 두 개의 G 염기 사이에서 절단하여 4 base가 돌출된 5'말단을 생성한다. 그러나 *BamHI*과는 달리, *dam* methylation 되어 있는 인식 염기서열에는 작용하지 못하였다. Ammonium sulfate 분획 (30~65%)과 heparin-agarose, Affi-gel Blue column chromatography를 거쳐 *SoII*을 부분 정제하였다. *SoII*은 활성을 보이기 위하여 0.2 mM 이상의 MgCl₂를 반드시 필요로 하였으며, 다른 cofactor는 요구하지 않았다. NaCl이 없을 때 가장 높은 활성을 가지며 120 mM 이상의 NaCl이 있으면 활성이 완전히 억제되었다. 이 효소의 반응 최적 온도는 40°C, 최적 pH는 8.6으로 나타났다. Gel filtration chromatography에서의 용출부피 비교로부터 이 효소의 분자량은 약 43,000 Da인 것으로 추정된다.

KEY WORDS □ type II restriction endonuclease, *SoII*, *Streptovercillium olivovercillatum*

세균의 restriction/modification (methylation) 체계의 특이성은 1950년대 초, Luria와 Human에 의해서 T-even phage의 감염에서 처음 관찰된 이래 여러 세균으로부터 널리 발견되고 있다 (10, 14). Type II system에서는 분리된 두 가지 효소가 각각 변형과 절단을 담당하며, 그 구조는 비교적 간단하여 각각의 효소는 한 가지 소단위체로 이루어진다. 이들은 4~8 bp의 비교적 짧은 염기 서열을 인식하고 인식 서열과 절단 부위가 일치한다는 것이 기본적인 특징이다 (14).

Type II 제한효소는 재조합 DNA 기술의 빠른 발전을 가능하게 하였으며, 유전자 지도 작성, 재조합 DNA 제조에서 필수적인 도구로 쓰이고 있다. 지금도 유전자 조작의 다양성과 용이함을 높이기 위하여 새로운 제한효소를 찾으려는 노력은 큰 의미를 가진다. 따라서 본 연구에서는 인식부위의 염기서열이나 반응 조건에서 새로운 특이성을 가지는 제한효소를 발견하고자 하였으며, *Streptovercillium olivovercillatum*으로부터 *SoII*을 분리하고 그 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

시 약

Bacteriophage λ DNA, Adenovirus-2 DNA, heparin-agarose, standard BSA 등은 Sigma Chemical Company에서, Affi-gel Blue는 Bio-Rad에서, Superose-12는 Pharmacia Fine Chemicals에서 구입하였다. Sequenase Version 2.0 kit은 USB에서,

[α-³⁵S] dATP는 Amersham에서 구입하였으며, *BamHI*은 NEB에서, 기타 제한효소들은 NEB, Promega, KOSCO 등에서 구입하였다.

균주 및 배양

제한효소 활성의 탐색은 서울대학교 미생물학과 발효학연구실에서 토양으로부터 분리한 방선균주를 대상으로 하였다. *S. olivovercillatum*은 Bennet 배지에서 단일 colony를 분리하여 계대배양함으로써 보존하였으며, 본 배양시에는 변형된 Bennet 배지 (glucose 50 g/l, casamino acid 3 g/l, beef extract 1 g/l, yeast extract 5 g/l)를 사용하여 30°C에서 30시간 배양하였다. 5l jar가 부착된 발효조에 배지 3l를 넣고, 통기량 0.1 vvm, 교반속도 270 rpm으로 유지하였다.

제한효소 생성균주의 동정

방선균의 수리 동정을 위하여 50가지 단위 형질을 조사하고 TAXON program으로 분석하였다 (15, 16, 17).

*SoII*의 활성분석

E. coli GM 119에서 분리한 wild type bacteriophage λ의 unmethylated DNA를 기질로 하였다. 10× 반응 완충 용액 1 μl, DNA 0.5 μg, 효소 용액을 포함한 최종 부피 10 μl의 반응혼합액을 15분간 37°C로 반응시키고, 열음에 옮겨 반응을 종료시켰다. 10× 반응 완충 용액은 500 mM Tris-Cl (pH 7.9), 100 mM MgCl₂, 10 mM DTT로 조성하였다. 반응혼합액에 10× sample loading buffer를 더하여 0.9%

agarose gel에서 전기영동하였다. *SolI* 1 unit은 1 μ g의 lambda DNA를 37°C에서 1시간에 완전히 자를 수 있는 양으로 정의하였다.

단백질 정량

Column chromatography 과정에서는 280 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 그 이외에는 bovine serum albumin을 표준 단백질로 하여 Bradford (1)의 방법을 사용하였다.

조추출액의 제조

배양액을 7,000 rpm에서 15분간 원심분리(Sorvall RC5C)하여 균체를 수거한 후, 50 mM Tris-Cl (pH 7.5) 용액으로 세척하고, -40°C에 사용 전까지 보관하였다. 균체 85 g을 완충 용액 [20 mM Tris-Cl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 5% (v/v) glycerol] 150 ml에 용해시켜 sonication하고 25,000 rpm에서 90분간 원심분리(Beckman L7 Ultracentrifuge, type 28 rotor)하여 상층액을 모았다.

핵산 제거 및 단백질 분획

얻어진 조추출액에 10% (w/v) streptomycin sulfate 용액을 최종 1.5% 되도록 넣고 천천히 저으면서 놓아 둔 후, 12,000 rpm에서 20분간 원심분리하였다. 핵산이 제거된 상층액에 고체 ammonium sulfate를 첨가, 30% 포화되도록 하고, 12,000 rpm에서 원심분리하였다. 다시 상층액을 65% 포화시키고 원심분리하여 단백질 침전물을 얻었다. 이를 최소 부피의 완충 용액에 녹이고, 같은 완충용액에서 3시간씩 2차례 투석하였다.

Column chromatography

투석액을 heparin-agarose column (2.5×18 cm, $V_t=88$ ml)에 얹고 세척한 뒤, 같은 완충용액 (420 ml)에 녹아 있는 NaCl의 일정 농도 기울기(0~0.8 M)로 용출하였다. 활성이 있는 용출액을 모아 NaCl이 없는 완충용액에서 3시간씩 2차례 투석하였다. 이를 Affi-gel Blue column (1.5×16 cm, $V_t=28$ ml)에 얹어, 200 ml의 0~1.2 M NaCl 일정 농도 기울기로 용출시키고, 활성이 있는 부분을 ultrafiltration 방법(Spectrum, Type F, M.W. Cutoff 10 K)으로 농축시켰으며, 이 과정에서 NaCl이 없는 완충용액을 반복 첨가함으로써 용출시 포함된 NaCl을 제거하였다.

인식 염기서열과 절단부위 결정

Plasmid DNA는 polyethylene glycol을 사용하여 정제하였으며 (5), methylated DNA와 unmethylated DNA는 각각 *E. Coli* HB101과 GM48로부터 분리하였다. DNA sequencing은 Sanger의 dideoxy chain termination 방법 (12)을, 제한효소에 의한 절단부위 결정은 Brown과 Smith(2), Gingeras 등 (4)의 방법을 변형시켜 사용하였다. 절단부위 결정은 pBluescript SK(+)의 polycloning site 안에 있는 *SolI* 인식서열을 이용하였다.

순수분리한 plasmid (3 μ g)를 9 μ l의 증류수에 녹이고, 2 N NaOH, 20 mM EDTA 용액을 1 μ l 넣어 DNA를 denaturation 시켰다. Na-acetate와 etha-

nol로 침전시킨 뒤, 침전물을 70% ethanol로 씻어 말렸다. 이를 primer와 Sequenase 완충용액에 녹이고 65°C에서 2분간 처리한 다음, 천천히 식혀 primer와 plasmid 사이의 annealing을 유도하였다. [α -³²S] dATP와 다른 세 가지 dNTP를 더하여 Sequenase로 상온에서 5분간 표지 반응하고, 이 혼합액 일부를 termination mix와 반응시켰다. 절단부위 결정시에는 동일한 과정을 거쳐 표지반응시킨 혼합액에 네 가지 dNTP를 첨가하여 합성을 계속한 뒤 ethanol 침전을 시키고 TE 완충용액에 녹였다. 합성된 DNA를 분리한 제한효소로 처리, 절단하고 다시 ethanol 침전시켰다. 8 M urea가 포함된 10% polyacrylamide gel에서 전기영동하였다.

반응조건 및 특성 분석

Affi-gel Blue column chromatography 과정까지 거친 부분정제된 효소 용액을 알맞게 희석하여 사용하였으며, 적절한 10× 반응 완충용액을 넣음으로써 pH, MgCl₂ 농도, NaCl 농도 등을 달리 조절하였다. 열에 대한 안정성을 알아 보기 위해서는 효소 용액 15 μ l를 각각의 온도에서 15분 처리한 후, 효소 활성을 측정하였다.

분자량 측정

표준 단백질과 시료를 150 mM NaCl이 포함된 50 mM potassium phosphate (pH 7.0)에서 Superose-12 gel filtration chromatography (0.7×78 cm, $V_t=30$ ml)를 수행하여 용출 부피를 비교 측정하였다.

결 과

제한효소의 탐색

여러가지 방선균 분리주에 대하여 제한효소의 존재를 탐색한 결과, 한 균주로부터 활성을 발견하고 lambda DNA와 Adenovirus-2 DNA에 대한 절단 양상으로부터 *Bam*HI과 마찬가지로 5'-GGATCC-3' 염기 서열을 인지함을 확인하였다. *Bam*HI (9, 13)의 isoschizomer로는 *Bst*I (3), *Gce*inI (6) 등이 알려져 있다. 그러나 *Bam*HI은 *dam* methylation에 의하여 활성에 영향을 받지 않으므로 (7) *E. coli* HB101에서 분리한 methylated DNA와 GM48 (*dam*⁻, *dcm*⁻)에서 분리한 unmethylated DNA에 모두 작용할 수 있는 반면, 새로이 발견된 제한효소는 unmethylated DNA만을 절단할 수 있었다 (Fig. 1). 즉, 5'-GATC-3'의 adenine N^o 위치에 *dam* methylation이 일어나면 이 효소는 더 이상 5'-GGATCC-3'에 작용하지 못하였다.

제한효소 생성균주의 동정

제한효소 생성 균주를 종 수준까지 동정하기 위하여 단위형질을 조사하고 TAXON program으로 수리 분석한 결과 (15, 16, 17), *Streptovorticillium olivovorticillatum*으로 판명되었으며, 이에 따라 제한효소는 *SolI*이라 명명하였다.

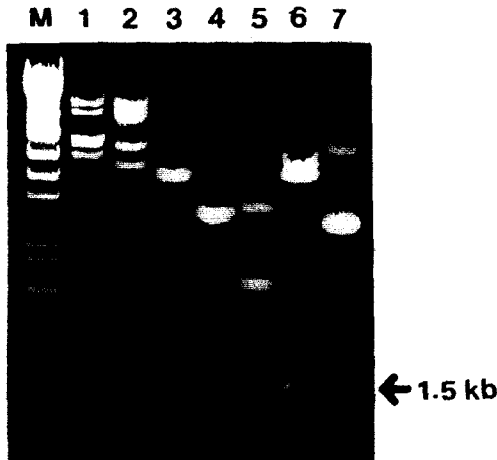


Fig. 1. Digestion patterns of different DNA substrates by *Soll*.

Lane 1, lambda; lane 2, Adenovirus-2; lane 3, pBR322. Sensitivity to *dam* methylation within the recognition sequence is demonstrated in lanes 4~7. Unmethylated (lane 4) versus methylated (lane 5) pGEM-1. Unmethylated (lane 6) versus methylated (lane 7) pGEM-1 SHI, a pGEM-1 derivative containing a 1.5 kb *Bam*HI insert. Lane M, molecular size marker.

*SoI*의 분리정제

Sonication에 의하여 세포를 분쇄한 후, streptomycin sulfate로 핵산을 제거하고 ammonium sulfate 침전에 의하여 단백질을 분획함과 동시에 streptomycin sulfate를 제거하였다(8). 0~30% ammonium sulfate 침전물은 높은 exonuclease 활성을 포함하고 있어서, 제한효소의 정제 과정에서 무엇보다 중요한 비특이적 nuclease들의 제거가 이 단계에서 일차적으로 이루어졌다. Heparin-agarose chromatography에서 *SoI*은 0.2~0.4 M NaCl에서 용출되었는데 (Fig. 2). 다른 nuclease들은 상당 부분 세척 과정에서 제거되거나 0.4 M 이상의 NaCl에서

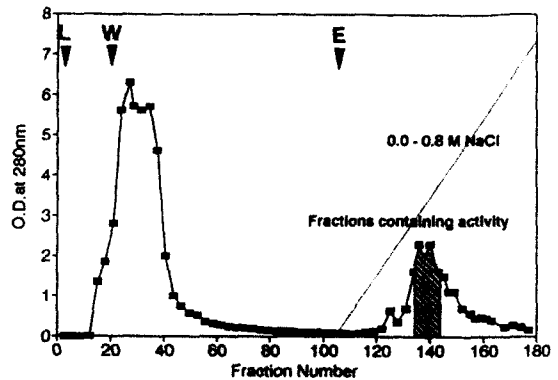


Fig. 2. Chromatography of ammonium sulfate fraction on a column of heparin-agarose.

The ammonium sulfate fractionation (30~65%) was applied onto a column (2.5×18 cm) of heparin-agarose which had been previously equilibrated with the column buffer (20 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, 5% glycerol). The column was washed with the column buffer (300 ml) and eluted with a linear gradient (0~0.8 M) of NaCl (450 ml).

용출됨을 볼 수 있었다. 다시 Affi-gel Blue chromatography를 실행하여 0.5~0.9 M NaCl에서 활성이 용출되었다 (Fig. 3). 이 단계를 거쳐 최종 64 배의 순도와 39%의 수율로 *SoI*을 부분정제하였다 (Table 1).

절단부위 결정

*SoI*이 인식서열 5'-GGATCC-3' 안에서 어떻게 절단을 일으키는 지 결정하기 위하여 pBluescript SK (+)를 주형으로 합성한 DNA를 *SoI*으로 처리하고 sequencing ladder와 함께 전기영동하였다. *SoI*은 *Bam*HI과 마찬가지로 두 가닥의 DNA에서 모두 G와 G 사이의 결합을 절단하여 4 base가 돌출된 5' 말단을 만드는 것으로 나타났다 (Fig. 4).

반응조건 및 특성

pH, 온도, MgCl₂ 농도, NaCl 농도 등의 반응조건

Table 1. The summary of purification of *SoI* from *Streptovorticillium olivovercillatum*.

Purification Step	Volume (ml)	Total Protein (mg)	Total Activity (unit*×10 ⁻⁵)	Specific Activity (unit/mg protein×10 ⁻²)	Purification Fold	Yield (%)
Crude Extract	270	2,543	10.8	4.25	1.0	100
30~65%(NH ₄) ₂ SO ₄	60	1,339	8.6	6.42	1.5	79.6
Heparin-Agarose	65	97	5.8	59.8	14.0	53.7
Affi-Gel Blue	120	15.7	4.2	268.0	63.8	38.9

* One unit is defined as the amount of the enzyme required for complete digestion of 1 μg of lambda DNA in 1 hr at 37°C.

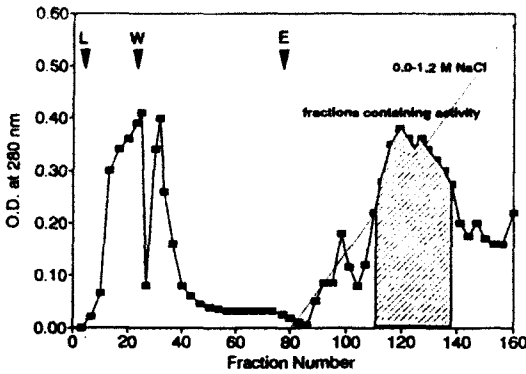
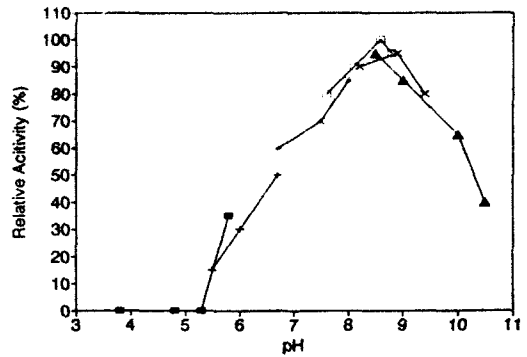


Fig. 3. Chromatography on a column of Affi-gel Blue. The active fractions from the heparin-agarose chromatography was applied on a column (1.5 × 16 cm) of Affi-gel Blue and developed sequentially with the column buffer (150 ml) followed by a linear gradient (0~1.2 M) of NaCl (200 ml).



■ Acetate + Mes — Hepes
 + Tris + TAPS — Glycine

Fig. 5. Dependence of *Soll* activity on the pH of reaction mixture.

All the buffers were added to a final concentration of 50 mM. The other components were the same as the standard reaction mixture described in the Materials and Methods.

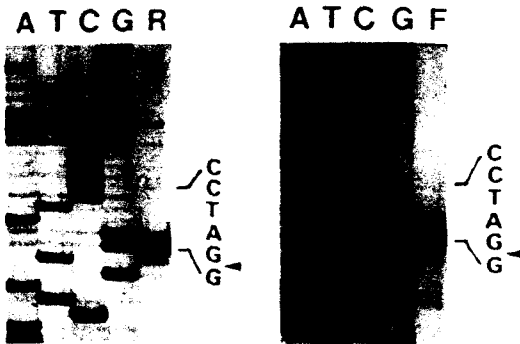


Fig. 4. Determination of cleavage site.

Lanes A, T, C and G are the sequencing ladders around the *Soll* recognition sequence obtained by Sanger's method. Lanes R and F are the *Soll* digested products of the primer-syntheses made from reverse(R) and forward(F) primers, respectively. From the migration of these products, it could be determined that the enzyme cleaves after the first G present in the recognition sequence.

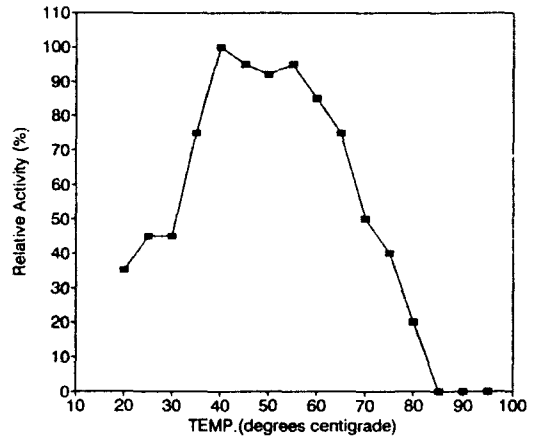


Fig. 6. Dependence of *Soll* activity upon the temperature of incubation.

Enzyme activity was determined at the indicated temperature under the standard reaction condition.

변화에 따른 최적 반응조건을 결정하였다.

반응 혼합액의 pH에 따른 활성을 비교해 본 결과, pH 7.0~10.0 범위에 걸쳐 큰 차이 없는 높은 활성을 보였으며 최적 반응 pH는 8.6이고, 같은 pH에서는 완충 용액의 조성에 의해 그다지 영향을 받지 않았다(Fig. 5). 최적 반응 온도는 40°C이고 40~55°C에서 높은 활성을 나타내었다(Fig. 6). 또한 60°C에서 15분간 열 처리하여도 활성을 대부분 유지하였으

나, 85°C 이상으로 처리하면 완전히 불활성화되었다(Fig. 7). *Bam*HI는 45°C 이상에서 활성을 잃으며(13), *Bst*I는 65°C에서 10시간 처리해도 안정하지만 75°C에서는 급격히 활성을 잃는 것으로 보고되어 있다(3).

*Soll*은 활성을 가지기 위해 0.2 mM 이상의 $MgCl_2$ 를 반드시 필요로 하였다(자료 미제시). Cofa-

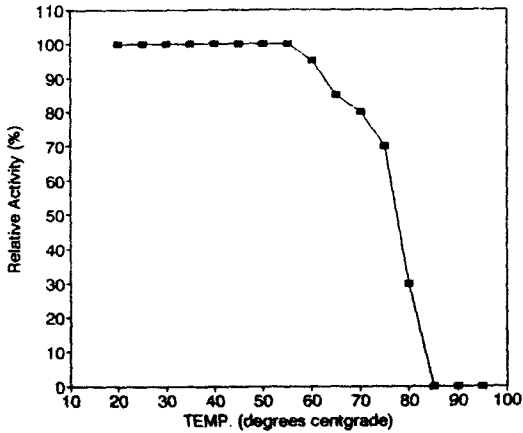


Fig. 7. Effect of temperature on the stability of *Soll*. Partially purified enzyme (15 μ l) was heated for 15 min at the indicated temperature. The remaining activity was determined using an 1 μ l aliquot of the preheated enzyme.

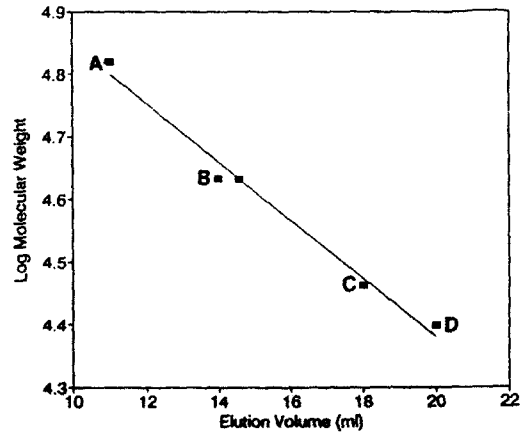


Fig. 9. The estimation of molecular weight of *Soll*. The molecular weight of *Soll* was determined by gel filtration chromatography on a column (0.7 \times 78 cm) of Superose-12. Molecular weight markers used to calibrate the column were as follows: A, BSA 66,000 Da; B, ovalbumin 43,000 Da; C, carbonic anhydrase 29,000 Da; D, chymotrypsinogen 25,000 Da.

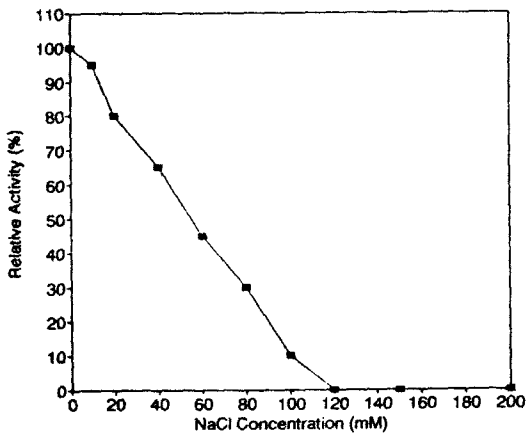


Fig. 8. Dependence of *Soll* activity on the concentration of NaCl. The enzyme activity was assayed with varying concentration of NaCl added in the reaction mixture.

ctor로서 Mg^{++} 이온을 요구하는 것이 type II 제한효소의 일반적인 특성이다 (14). *EcoRI*과 *EcoRV*를 대상으로 한 구조연구 결과, 제한효소와 결합할 때 DNA가 변형됨으로써 반응성을 가진 인산기가 활성 부위에 위치하도록 하고 동시에 Mg^{++} 이온에 대한 결합 부위를 형성한다고 보고되었다 (18). Mn^{++} 등의 다른 양이온이 Mg^{++} 이온을 대체할 수도 있다고 알려져 있으나 (18), 이 효소에 대해서는 시험해 본 어떠한 양이온도 Mg^{++} 이온을 대체하지 못하였다

(자료 미제시).

*Soll*은 반응 혼합액에 NaCl이 없을 때 가장 높은 활성을 보였으며, NaCl 증가에 따라 활성이 급격하게 감소하여 120 mM 이상의 NaCl이 있으면 활성이 완전히 억제되었다 (Fig. 8). DTT와 같은 환원제를 전혀 필요로 하지 않으며, 단백질 농도가 낮을 때는 BSA에 의해 안정화되었다 (자료 미제시).

시험해 본 모든 반응 조건에서 인식 염기서열은 변화하지 않고 lambda DNA에 대하여 똑같은 절단 양상을 유지하였다. 반응 조건에 따라 염기서열에 대한 특이성이 변화 또는 완화된 예가 많이 알려져 있지만 (14), 이 경우에는 이러한 조건이 발견되지 않았다.

분자량 결정

*Soll*의 분자량은 약 43,000 Da인 것으로 나타났다 (Fig. 9). 많은 제한효소들의 경우, 소단위체의 분자량이 20,000 Da 가량이고 (14) dimer로 존재한다 (11)는 것을 고려하면 *Soll* 또한 dimer로 존재하리라는 추측이 가능하다.

고찰

*Soll*은 인식, 절단 작용의 특이성에서는 *BamHI*과 동일하지만, 인식 서열 내의 *dam* methylation에 대한 sensitivity와 반응 조건에서 *BamHI*과 구별되는 특성을 보이므로 *BamHI*과 병용될 수 있는 가능성을

가진다. 또한 *SoII*의 물리화학적 성질과 반응 기작을 연구하여 *BamHI*과 비교 분석한다면 의미 있는 결과를 얻게 될 것으로 기대된다.

앞으로 *SoII*을 높은 수율과 순도로 분리할 수 있는 방법을 개발하여야 할 것이며, *SoII* restriction-methylation system 유전자를 cloning하여 다량의 효소 정제를 가능하게끔 하고자 한다. 아울러 cloning을 통하여 효소의 반응 기작과 세포 내에서의 기능, isoschizomer와의 비교 연구 등이 용이하게 될 뿐 아니라, 유전자 분석을 통한 연구도 가능해질 것이다.

사 사

본 연구는 1991년 3월부터 1993년 2월까지 한국 과학재단 우수연구센터 분자미생물학연구센터의 지원을 받아 수행되었습니다. 방선균 분리주를 사용할 수 있도록 해주신 서울대학교 미생물학과 이재준 교수님께 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal. Chem.* **72**, 248-254.
- Brown, N.L. and M. Smith, 1980. A general method for defining restriction enzyme cleavage and recognition sites. *Methods Enzymol.* **65**, 391-340.
- Catterall, J.F. and N.E. Welker, 1977. Isolation and properties of a thermo-stable restriction endonuclease (Endo R. Bst 1503). *J. Bacteriol.* **129**, 1110-1120.
- Gingeras, T.R., L. Greenough, I. Schildkraut, and R.J. Roberts, 1981. Two restriction endonucleases from *Proteus vulgaris*. *Nucl. Acids Res.* **9**, 4545-4534.
- Maniatis, T., E.F. Fritsch, and J. Sambrook, 1989. *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.
- Murakami, M., H. Mizuno, and Y. Yamada, 1990. The restriction endonuclease *GceinI* of *Gluconobacter cerinus* IFO 3260, an isoschizomer of *BamHI*, has a monomeric structure. *Agric. Biol. Chem.* **54**, 2747-2749.
- Nelson, M., E. Raschke, and M. McClelland, 1993. Effect of site-specific methylation on restriction endonucleases and DNA modification methyltransferases. *Nucl. Acids Res.* **21**, 3139-3154.
- Pirrotta, V. and T.A. Bickle, 1980. General purification scheme for restriction endonucleases. *Methods Enzymol.* **65**, 89-95.
- Roberts, R.J., G.A. Wilson, and F.E. Young, 1977. Recognition sequence of specific endonuclease *BamHI* from *Bacillus amyloliquefaciens* H. *Nature* **265**, 82-84.
- Roberts, R.J. and D. Macelis, 1993. REBASE-Restriction enzymes and methylases. *Nucl. Acids Res.* **21**, 3125-3137.
- Rosenberg, J.M., 1991. Structure and function of restriction endonucleases. *Curr. Opin. Struc. Biol.* **1**, 104-113.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- Smith, L.A. and J.G. Chirikjian, 1979. Purification and characterization of the sequence-specific endonuclease *BamHI*. *J. Biol. Chem.* **254**, 1003-1006.
- Wells, R.D., R.D. Klein, and C.K. Singleton, 1980. Type II restriction enzymes. *The enzymes* **14**, 157-191.
- Wilcox, W.B., S.P. Lapage, S. Bascomb, and M.A. Curtis, 1973. Identification of bacteria by computer: Theory and programming. *J. Gen. Microbiol.* **77**, 317-330.
- Williams, S.T., M. Goodfellow, E.M.H. Welligton, J.C. Vickers, G. Alderson, P.H.A. Sneath, M. Sackin, and A.M. Mortimer, 1983. A probability matrix for the identification of some streptomycetes. *J. Gen. Microbiol.* **129**, 1815-1830.
- Williams, S.T., M. Goodfellow, G. Alderson, E.M. H. Welligton, P.H.A. Sneath, and M. Sackin, 1983. Numerical classification of streptomycetes and related genera. *J. Gen. Microbiol.* **129**, 1743-1813.
- Winkler, F.K., 1992. Structure and function of restriction endonucleases. *Curr. Opin. Struc. Biol.* **2**, 93-99.

(Received February 18, 1994)

(Accepted March 31, 1994)

ABSTRACT: Characterization of a New Type II Restriction Endonuclease Isolated from *Streptovorticillium olivovorticillatum*

Hwang, Hye-Yeon and Jeongbin Yim* (Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea)

We screened many species from a wide variety of bacterial genera for a new type II restriction endonuclease. The purification and characterization of *SolI* from a soil isolate, *Streptovorticillium olivovorticillatum* are described here. The enzyme turned out to be an isoschizomer of *BamHI*. It recognized the hexanucleotide sequence of 5'-G↓GATCC-3' and cleaved as indicated by the arrow, generating a 4 base 5' extension. Unlike its isoschizomer, *BamHI*, the activity was sensitive to *dam* methylation within the recognition sequence. Following ammonium sulfate fractionation of the crude extract, heparin-agarose and Affi-gel Blue column chromatography were employed to purify the enzyme. *SolI* required at least 0.2 mM of MgCl₂ for the cleavage to occur. The enzyme exhibited its maximal activity in the absence of NaCl, but was inhibited completely in the presence of 120 mM NaCl. The pH and temperature optima for activity were pH 8.6 and 40°C, respectively. The molecular weight of *SolI* was estimated to be 43,000 Da by Superose-12 gel filtration chromatography.