

APE1 外切酶结构和活性关键位点研究

完成人
左俊军

指导小组成员

甘建华 教授

目 录

摘要	1
Abstract	2
一、前 言	3
二、材料与amp;方法	5
2.1 质粒与载体菌.....	5
2.2 试剂.....	5
2.3 实验方法.....	5
三、研究结果	10
3.1 APE1 野生型及各突变体的蛋白纯化.....	10
3.2 APE1 野生型及各突变体与底物反应的晶体结构.....	13
3.3 APE1 野生型及各突变体外切酶活性测试.....	14
四、讨 论	17
参考文献	19
致谢	21

摘要

碱基外切修复(BER)是生物体中重要的 DNA 修复途径,在其中发挥关键作用的人类无嘌呤/无嘧啶内切酶 1(APE1)是一种多功能酶,其主要功能是识别并剪切无碱基位点(AP 位点)。除了 AP 内切酶活性以外, APE1 还具有 3'-5'外切酶活性,这一活性被认为可能是在 BER 途径中为没有外切活性的 DNA 合成酶 β 进行校读。然而对于 APE1 外切酶活性的研究并不深入,相关机制细节尚未厘清。对此,依据前期研究我们提出了三个可能的外切活性关键位点,并通过突变体的晶体结构与活性实验加以验证。晶体结构显示 Y171、D210 的突变体均保留了一定的外切活性,活性实验则显示三种突变体的活性较野生型均有下降,表明三个位点对于这一功能具有影响,但最为关键的位点仍然需要进一步确认。我们的研究成果将能更好地理解 APE1 的催化机制,并为探索 APE1 与人类健康的关系提供基础。

关键词:

无嘌呤/无嘧啶内切酶 1(APE1), 碱基外切修复, 3'-5'外切

Abstract

Human apurinic/apyrmidine endonuclease 1 (APE1) is a multifunctional enzyme whose main function is to recognize and cleave AP sites in base excision repair (BER), which is an important DNA repair pathway in cells. One of the many other functions is nonspecific 3'-5' exonuclease activity which is considered to proofread for DNA polymerase β . However, the detailed mechanisms of this function are not fully understood. According to previous studies, we proposed three possible residues that may be responsible for the excision function and verify them through crystal structure and activity assays. Crystal structures showed that Y171 and D210 mutants still maintain endonuclease function while activity assays showed that all of the three mutants exhibited decreased exonuclease activity, comparing to wild type. The results indicate that all of the three residues have influence on the function but the most critical one remains more investigation. Considering the importance of APE1, the findings might shed some light on the thorough understanding of how this enzyme functions and how it will influence health.

Keywords,

apurinic/apyrmidine endonuclease 1 (APE1), base excision repair, 3'-5' exonuclease

一、前言

环境中的放射物质、氧化因子等等每时每刻都在造成 DNA 的损伤，而生物体则进化出多样的 DNA 修复方式来保证遗传信息的稳定，碱基切除修复(base excision repair, BER)就是一种广泛存在的重要的碱基修复方式。在哺乳动物中，根据替换碱基数目的不同，碱基切除修复可以分为两类：单碱基切除修复(single nucleotide base excision repair, SNBER)和长补丁切除修复(long patch base excision repair, LPBER)。^[1]这两种途径开始阶段是相同的：首先，糖基化酶(glycosylase)识别损伤位点并切除损伤碱基，形成无碱基位点（即 AP 位点）；接下来无嘌呤/无嘧啶内切酶(AP endonuclease, APE)识别 AP 位点，并切断其 5'端的磷酸二酯键，留下 3'端游离的-OH 基团以及 5'端的脱氧磷酸核糖(dRp)。在 SNBER 中，5' dRp 随即被切除，形成单个碱基缺口，之后 DNA 合成酶与连接酶填补空隙，完成修复；而在 LPBER 中，DNA 合成酶先合成一段较长的新链，游离的 5' dRp 旧链随即被分叉 DNA 单链内切酶 1(flapp endonuclease 1, FEN1)切除，最终由 DNA 连接酶连接空隙，完成修复。^{[2] [3]}然而令人疑惑的是，在 BER 中起重要功能的 DNA 合成酶 β 却并不具有 3'-5'外切校读功能，在合成中具有 1:4000 的犯错几率^[2]，忠诚度较低，并不满足 BER 作为主要修复途径之一的精确要求，因此研究者们将目光投到了 BER 过程中的另一个关键酶——AP 内切酶。

哺乳动物中，承担 BER 中 AP 内切功能的是 APE1^[4]，但 APE1 的功能远不止于此。除了主要的 5'-3'内切功能，APE1 还参与了 RNA 代谢^[5]、作为转录因子参与基因调控^[6]等等细胞活动；在核酸内切修复(nucleotide incision repair, NIR)中，APE1 能够直接在损伤碱基的 5'端内切，并通过非特异性的 3'-5'外切功能将切口扩大为一段空隙^[7]，许多常见的或与疾病相关的 DNA 损伤都可以被 APE1 识别经 NIR 途径修复^{[8] [9] [10]}。在 APE1 众多功能之中，3'-5'外切酶活性是相对容易被忽视的一种；与 5'-3'内切酶活性相比，外切酶的活性低了 2-4 个数量级^{[4] [11]}，直到 Chou 等发现 APE1 可以切除化学上具有非自然 L 构型的抗癌碱基类似物^[12]，研究者才开始关注这一活性的潜在重要作用。多位作者的研究表明，APE1 切除 3'端错配碱基的效率比正配碱基至少高 50 倍^{[13] [14]}；在体外实验中，加入 DNA 合成酶 β 和 APE1 的修复正确率比单用 DNA 合成酶 β 高了 7 倍左右^[15]。另

外，酵母双杂交实验显示了 DNA 合成酶 β 与 APE1 之间可能存在相互作用，在体外实验中 APE1 与 DNA 的结合可以促进 DNA 合成酶 β 与 APE1-DNA 形成三聚体^[16]，意味着在完成 AP 内切功能后 APE1 仍可能保持与 DNA 结合的状态，这使得 APE1 继续行使其他功能提供了可能。而各种酶的底物特异性、浓度等等都会影响 BER 的分步调控^[17]，在去除 5' dRp 后 APE1 的外切活性显著提升^[14]，因此 APE1 很可能在 BER 中担任了校读的功能以保证修复的忠实度。

然而，目前研究对于 3'-5'外切酶活性机制的了解并不深入。目前对于这一活性的研究大多数还处于生化实验的阶段，少有显示外切活性的结构。与家族内其他成员如大肠杆菌内切酶 III(Xth)、Nfo 相比，APE1 虽与它们具有相似的底物特异性，但作用模式却大不相同^[18] ^[19]，参考价值有限。作为 DNA 重要修复途径中潜在的校读功能承担者，APE1 对于生物体的正常生活、遗传信息的精确传递都具有非常重要的作用。在小鼠中敲除 APE1 编码基因（即 APEX 基因）会导致早期胚胎死亡，但并未能阐明究竟是哪一种功能的缺失导致了发育的失败^[20]，这需要我们对于 APE1 各功能的活性位点具有更加深入的了解。

因此，依据现有 APE1 的晶体结构和前人的研究成果，我们选定 Y171、D210 和 H309 作为外切酶活性可能的关键位点进行研究。文献报道在这三个位点的突变均会对 APE1 的内切活性产生较大的影响，在 Y171 的突变体使得内切活性降低了 5,000 倍，D210A 与 D210N 则可以高达 25,000 倍；这一位点也被认为是可能的质子供体^[21]，晶体结构则显示 D210 与 D308 参与固定金属离子、保持构型稳定^[22]。在另一篇文献中 H309 突变体所造成的活性降低最为剧烈，暗示其与催化功能相关^[23]。故我们设计了 Y171F、D210N、H309A 三种突变体，通过蛋白纯化结晶，获取相应蛋白与 DNA 底物反应的晶体结构；并通过变性 PAGE 胶对不同突变体与不同底物的反应结果和反应效率进行对比，研究这三个位点中是否有外切活性的关键位点，并更好地理解反应机理。我们的研究结果将为进一步研究 APE1 外切功能提供基础，加深对 DNA 修复途径的理解；考虑到这一功能在保持基因组稳定并与一些疾病（如神经退行性疾病、艾滋病等）相关^[10]，我们的研究能为这些复杂疾病的理解提供新的视角和思路。

二、材料与amp;方法

2.1. 载体与宿主菌

- 1) 载体: pSumo
- 2) 宿主菌: BL21(DE3)、Rosetta

2.2. 试剂

1) LB 培养基

组成	LB 液体培养基 (1 L)	LB 固体培养基 (1 L)
Tryptone	10 g	10 g
Yeast Extract	5 g	5 g
NaCl	10 g	10 g
Agar	—	15 g
加水定容至	1000 mL	1000 mL

灭菌条件: 121°C, 高压湿热, 20 min。

2) 缓冲液

缓冲液	Tris	NaCl	咪唑	其他
Buffer 1	20 mM (pH 8.0)	500 mM	25 mM	
Buffer 2	20 mM (pH 8.0)	500 mM	500 mM	
Buffer A	20 mM (pH 8.0)	100 mM	\	
Buffer B	20 mM (pH 8.0)	1 M	\	
Buffer S	20 mM (pH 8.0)	500 mM	\	
Gel Filtration Buffer	20 mM (pH 8.0)	300 mM		2 mM DTT
活性实验 Buffer	20 mM (pH 7.0)	100 mM	\	
5x Buffer	100 mM (pH 8.0)	250 mM	\	

0.20 μm 滤膜过滤

3) 5x TBE

组成	Tris Base	硼酸	EDTA	NaOH
	54.765 g	27.8 g	3.7 g	0.4 g

(将 pH 调至 8.0, 先溶于 100mL 左右水中)

定容至 1 L, 0.20 μm 滤膜过滤

2.3. 实验方法

2.3.1. 转化与大肠杆菌培养

- 1) 转化：取保存于-80℃的 BL21(DE3)或 Rosetta 感受态置于冰上复苏。加入质粒 1 μL，冰上静置 30 min。42℃热激 45s，冰上静置 5 min。加入 950 μL LB 培养基，37℃摇床培养至浑浊。离心浓缩至 100-200μL，涂板培养过夜。
- 2) 培养：挑取分布均匀、大小适中的菌落于 5 mL LB 培养基(50mg/ml Kana⁺ 5ul)中, 37℃摇床培养至浑浊。接入 1 L LB 培养基(50mg/ml Kana⁺ 1ml), 37℃ 220 rpm/min 摇床培养至 O.D.值在 0.6-0.8 之间, 200 μL IPTG (1 M) 诱导, 18℃ 220 rpm/min 摇床培养 18h。
- 3) 收菌：菌液经过 6000 rpm 离心 15 min 后, 倒去上清, 20 mL 1xPBS 吹打重悬菌体。菌液再次 4000 rpm 离心 25 min, 倒去上清, -20℃储藏。

2.3.2. 蛋白纯化

◆ 野生型 APE1 以及 Y171F、D210N 突变体

- 1) 破菌：用四倍体积 Buffer 1 重悬菌体，并通过 0.1 mm 针头保证无大块、絮状聚集。用 JN-02C 低温超高压连续流细胞破碎机破菌 3-5 遍，至出样清亮。
- 2) 17,000 rpm 离心 1-1.5 h(Thermo Lynx 6000 离心机)，取上清。
- 3) Ni 亲和层析柱(GE, His Trap HP)Buffer 1 平衡 4 个体积以上，上样。
- 4) 将 Ni 柱连接至 AKTA 系统(GE AKTA purifier)，A 泵头放入 Buffer 1，B 泵头放入 Buffer 2。设置连续洗脱 15 min 内 0% →100% B。2 mL/管收集流出液(GE Frac-920)。控制软件 Unicorn 5.31。
- 5) 15% SDS-PAGE 鉴定。
- 6) 选取目标蛋白较为集中、杂蛋白较少的几管置于 3.5 kD 透析袋 (Spectra/Por 3 Dialysis Membrane Standard RC Tubing)中，加入 ULP 酶，密封后置于 Buffer S，4℃层析柜中酶切透析过夜。
- 7) 取透析完成的蛋白溶液，补咪唑至 25 mM，过 Ni 柱，收集流穿。用 Buffer 1 冲洗 Ni 柱至 Bradford 检测不变蓝，停止收集。
- 8) 15% SDS-PAGE 鉴定。

9) 若纯度达到要求, 则用 30 kD 超滤管(Amicon Ultra – 15 Centrifugal Filters) 离心替换为 Gel Filtration Buffer 并浓缩至较高浓度, 液氮速冻后-80℃保存。

◆ APE1 H309 突变体

1、2 同前

3) 将 Ni 柱连接至 AKTA 系统, A 泵头放入 Buffer 1, B 泵头放入 Buffer 2。
设置梯度洗脱: 30% B 至出峰完全; 100% B 至出峰完全。2 mL/管收集。

4-8 同前

9) 取目标蛋白纯度较高的几管, 溶液降盐至 100 mM NaCl, 过离子柱(GE, HiTrap Q/SP HP)。

10) 将 S 柱连接至 AKTA 系统, A 泵头放入 Buffer A, B 泵头放入 Buffer B。
设置梯度洗脱: 20% B 至出峰完全; 10 min 内 20% →100% B。2 mL/管收集。

11) SDS-PAGE 鉴定。

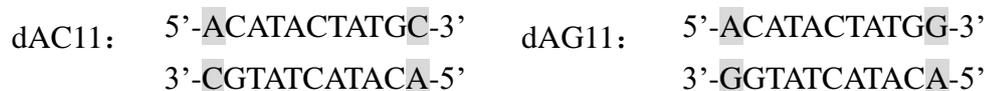
12) 取目标蛋白纯度较高的几管, 超滤管浓缩至 5 mL 以内, 过 Superdex 200(GE)分子筛, 设置自动程序收集。

13) SDS-PAGE 鉴定。

14) 取目标蛋白纯度较高的几管, 若纯度达到要求, 则用 30 kD 超滤管离心替换 Gel Filtration Buffer 并浓缩至较高浓度, 液氮速冻后-80℃保存。

2.3.3. 结晶和结构解析

1) DNA 底物序列



2) 筛晶体: Air Robins Instruments, Gryphon 1.4.5.3

蛋白	底物	Xtal Condition	Cryo
APE1	5'-GCATA CTATGC-3'	Index H7 0.15 M DL-Malic acid pH 7.0 20% w/v Polyethylene glycol 3,350 JACG+ H8	25% Glycerol
APE1 D210N	dAG11	0.2 M Sodium Chloride 0.1 M bis-TRIS pH 5.5 25 %w/v PEG 3350	25% Glycerol

- 3) 晶体优化
- 4) X 射线衍射
- 5) 数据分析: Coot, PyMOL

2.3.4. 活性测试

2.3.4.1. DNA 底物序列 (Generay Biotech)

- 1) 带 FAM 标记

FAM-A: 5'-^{FAM}CTAAAGGGCGGA-3' FAM-T: 5'-^{FAM}CTAAAGGGCGGT-3'

FAM-G: 5'-^{FAM}CTAAAGGGCGGG-3' FAM-C: 5'-^{FAM}CTAAAGGGCGGC-3'

- 2) 不带 FAM 标记

5A: 5'-ACCGCCCTTTAG-3' 5T: 5'-TCCGCCCTTTAG-3'

5G: 5'-GCCGCCCTTTAG-3' 5C: 5'-CCCGCCCTTTAG-3'

- 3) 按订购单稀释至 500 μM

- 4) 底物退火

10 μL FAM-M*

10 μL N*

5 μL 5x Annealing Buffer

} 95°C 加热 5 min 后缓慢降温至 20°C。

*M, N 为 A, T, G 或 C; 四种单链 DNA 两两配对, 共形成 16 种双链 DNA 底物, 其中正配 4 种, 错配 12 种。

- 5) 避光保存

2.3.4.2. 反应体系与条件

- 1) 将蛋白与 DNA 底物分别用活性实验 Buffer 和 ddH₂O 稀释至 10 μM

- 2) 配制反应体系 (终浓度)

组成	FAM-M+N*(1 μM)	蛋白样品(1 μM)	5x Buffer	ddH ₂ O	Total
对照组	1 μL	\	2 μL	7 μL	10 μL
实验组	1 μL	1 μL	2 μL	7 μL	10 μL

*M, N 为 A, T, G 或 C。

- 3) 于 37°C 培养箱反应 20 min

- 4) 终止反应: 加入 2 μL EDTA(100mM), 10 μL Formamide Deionized

- 5) 95°C 煮样 5 min, 加入 2 μL 6x Loading Buffer

2.3.4.3. 20% 变性胶电泳

1) 胶的配制

组成	尿素	40%丙烯酰胺	5x TBE	10% APS	TEMED
	30 g	35 mL	14 mL	238 μ L	70 μ L
(60°C加热至完全溶解)					
终体积约 70 mL, 可制成两块胶					

- 2) 设置功率恒定为 15 w, 预跑 30 min。
- 3) 每孔上样 6 μ L。设置功率恒定为 15 w, 电泳 80 min。
- 4) 扫胶(GE Typhoon Fla 9000)

三、研究结果

3.1. APE1 野生型及各突变体的蛋白纯化

1) APE1 野生型

见图 1，从图 1B 就可以看出野生型蛋白表达量很高，图 1C 显示酶切后目的蛋白仍保持着较高的浓度，相对来说杂蛋白量较少可忽略，故可以直接浓缩保存。

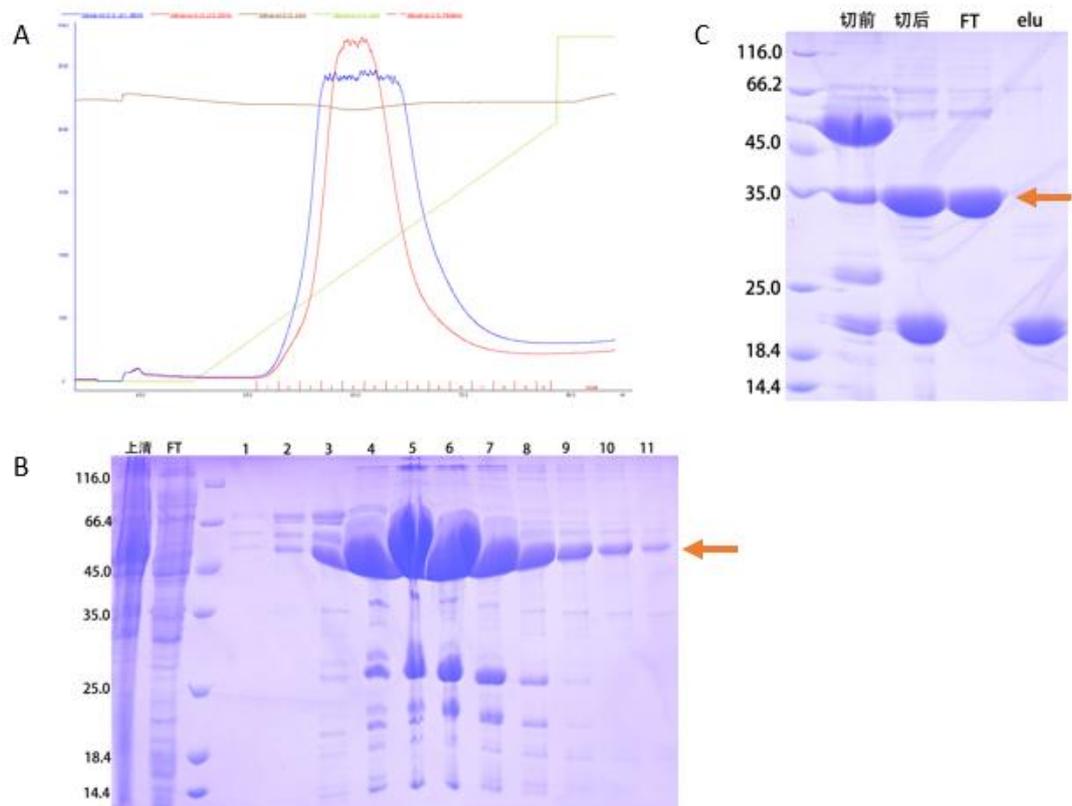


图 1. APE1 野生型蛋白的纯化。A, Ni 柱 Akta 洗脱曲线; B, Akta 洗脱后 SDS-PAGE 鉴定; C, 二次 Ni 后 SDS-PAGE 鉴定。各泳道标识如图, 蛋白 Marker 单位为 kD, 红色箭头标识目的蛋白条带。

2) APE1 D210N

见图 2，杂蛋白多，但二次 Ni 的纯化效果尚可，与野生型情况类似。

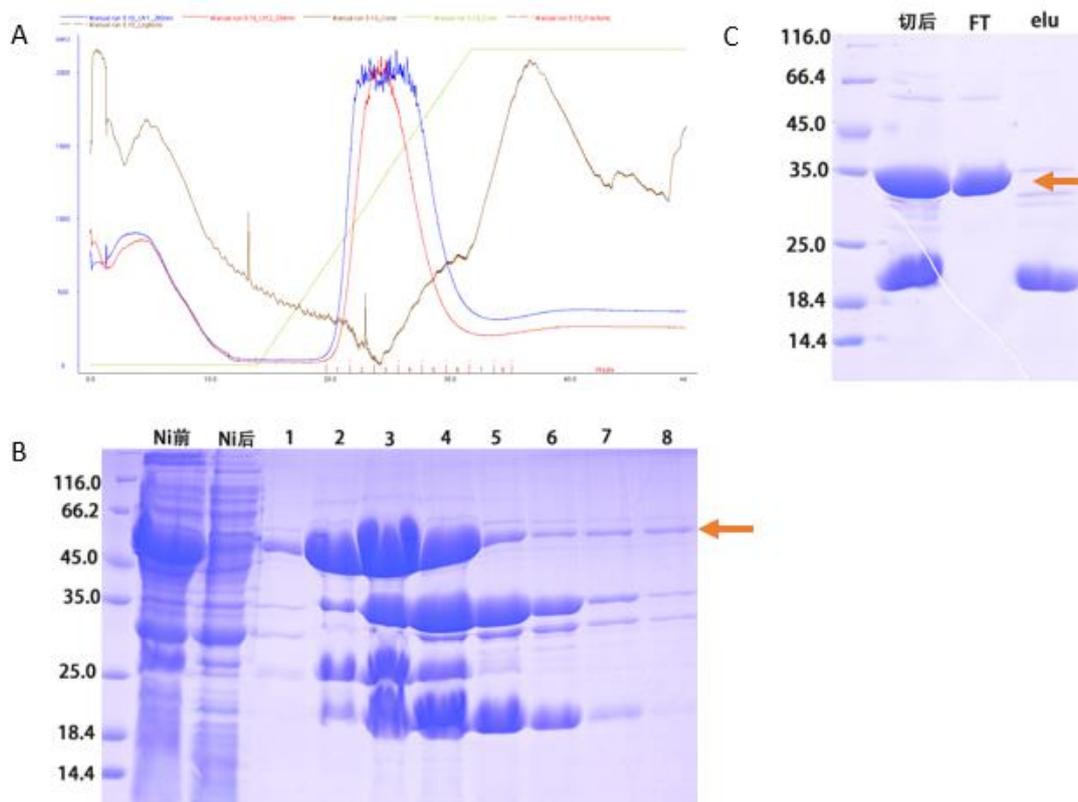


图 2. APE1 D210N 突变体蛋白的纯化。A, Ni 柱 Akta 洗脱曲线；B, Akta 洗脱后 SDS-PAGE 鉴定；C, 二次 Ni 后 SDS-PAGE 鉴定。各泳道标识如图，蛋白 Marker 单位为 kD，红色箭头标识目的蛋白条带。

3) APE1 H309A:

情况与其他蛋白不同，由图 3B 可见，蛋白表达量整体大幅下降，目的蛋白明显减少；由图 3C 可见二次 Ni 并不能有效去除 60kD 左右的杂蛋白，此时因为目的蛋白量少，整体样品的纯度是很低的，因此需要进一步的纯化。

图 4 展示了在二次 Ni 后使用离子柱的结果。由图 4C 可见，目的蛋白与 Q、S 柱均有足够的亲和力，但杂蛋白倾向于结合 Q 柱且在洗脱时难以分开，因此选用 S 柱，洗脱后可以获得纯度较高的目的蛋白，但浓度仍非常低，为了尽可能减少损失不再继续过分子筛。

图 5 展示了在二次 Ni 后使用分子筛 Superdex 200 的结果。可以看到由于主要的杂蛋白与目的蛋白的大小相差并不大，两个洗脱峰会有重合，不能完全将两者分开，但取前几管能够获得纯度较高的目的蛋白。

不管是选用哪种方法，最终的浓度都非常低，所以需要多次试验以达到结晶实验的要求。

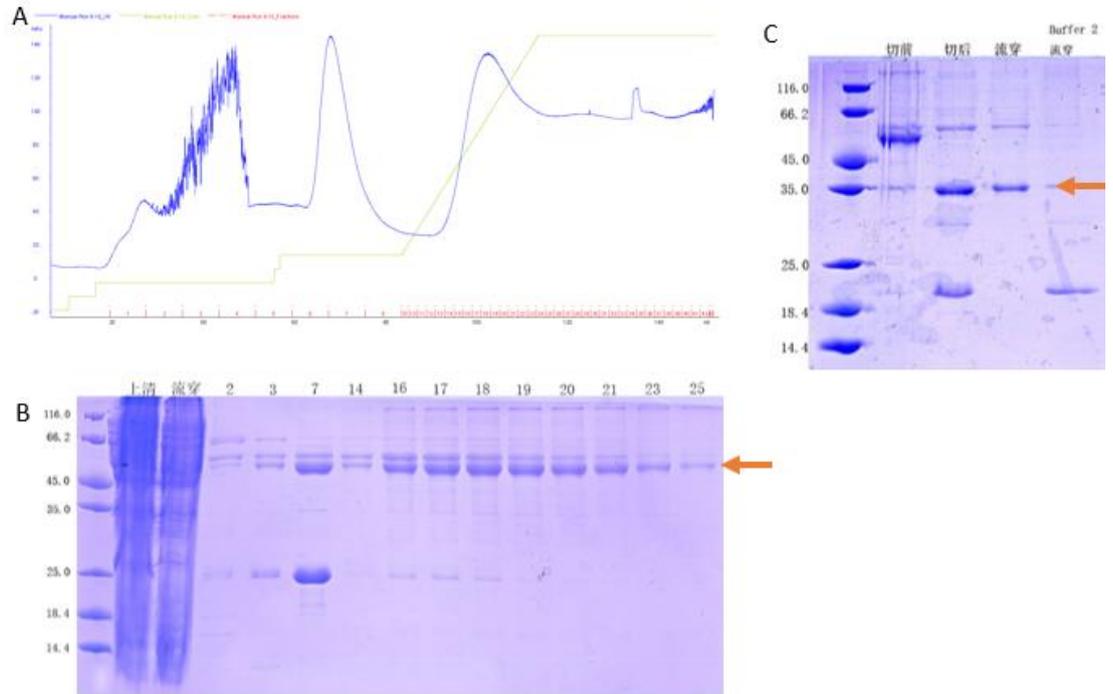


图 3. APE1 H309A 突变体蛋白的纯化。A, Ni 柱 Akta 洗脱曲线; B, Akta 洗脱后 SDS-PAGE 鉴定; C, 二次 Ni 后 SDS-PAGE 鉴定。各泳道标识如图, 蛋白 Marker 单位为 kD, 红色箭头标识目的蛋白条带。

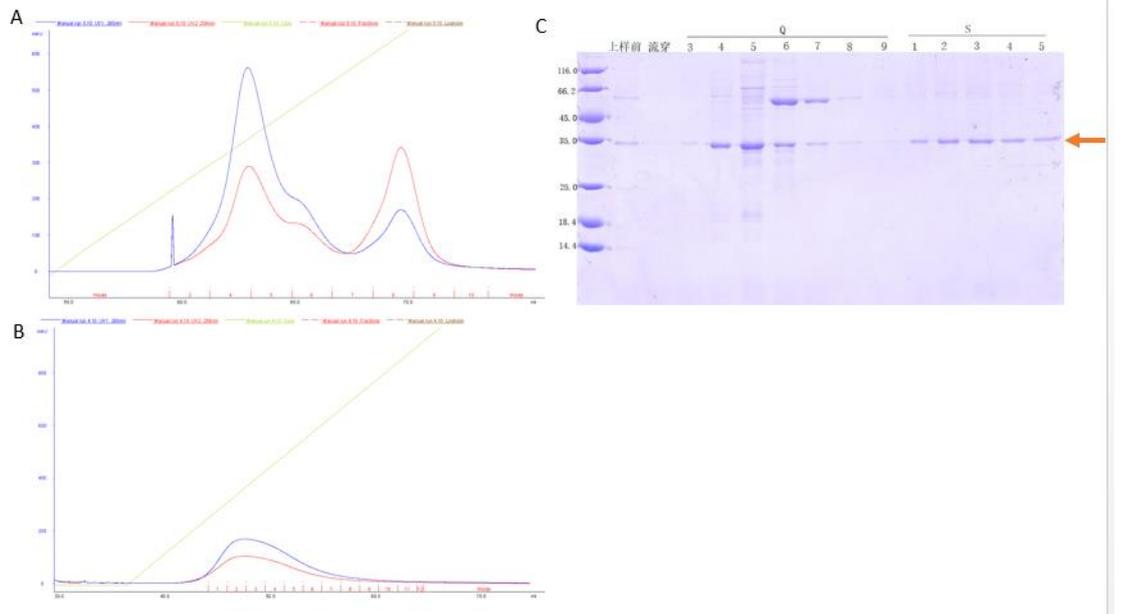


图 4. APE1 H309A 突变体蛋白的纯化 (离子柱)。A, Q 柱 Akta 洗脱曲线; B, S 柱 Akta 洗脱曲线; C, SDS-PAGE 鉴定。各泳道标识如图, 蛋白 Marker 单位为 kD, 红色箭头标识目的蛋白条带。

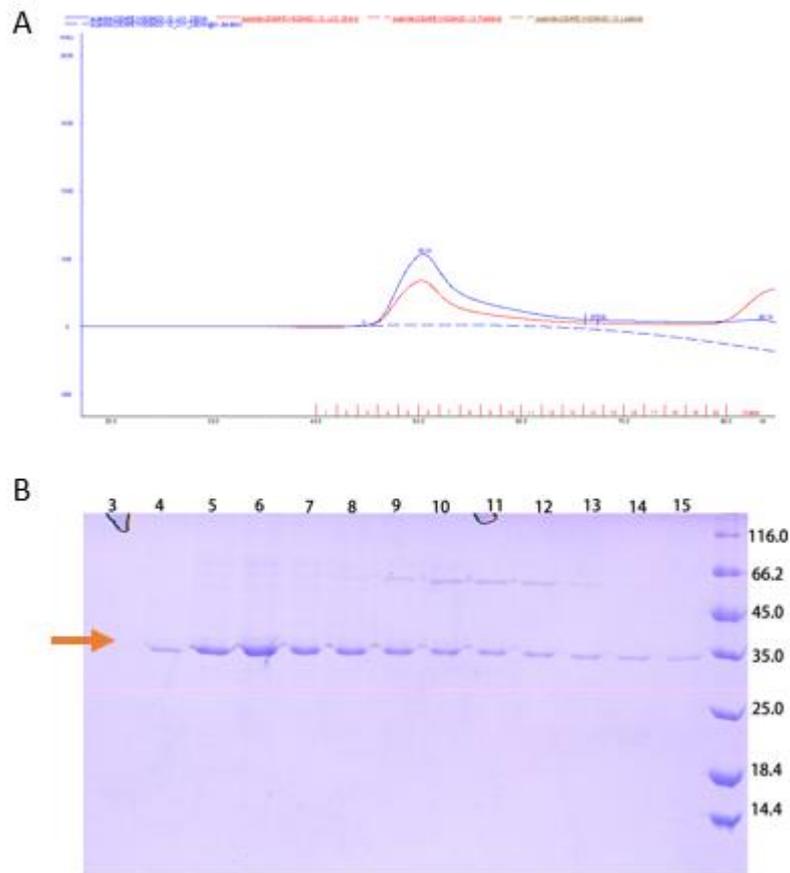


图 4. APE1 H309A 突变体蛋白的纯化（分子筛）。A，离子柱 Akta 洗脱曲线；B，SDS-PAGE 鉴定。各泳道标识如图，蛋白 Marker 单位为 kD，红色箭头标识目的蛋白条带。

3.2. APE1 野生型及各突变体与底物反应的晶体结构

1) APE1 WT + dAC11

见图 5，不同于 AP 内切酶时酶结合在链中间的 AP 位点处，DNA 底物两端各结合了一个 APE1，且 3' 末端均被切去一个碱基。

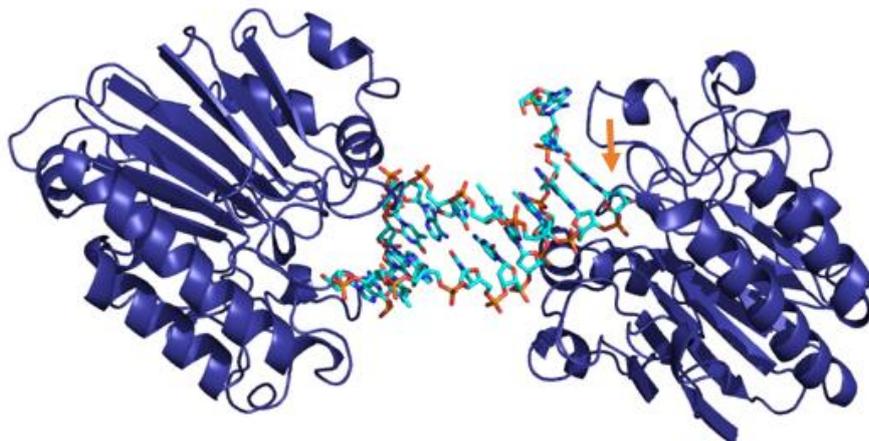


图 5. 野生型 APE1 与底物反应的晶体结构，箭头标识被切去一个碱基的 3' 末端。作图软件 PyMOL。

2) APE1 D210N + dAG11

见图 6，APE1 同样结合于 DNA 底物两个末端，但 3'-G 未被切除。从各个角度可以看到，虽然磷酸骨架被“握住”，但碱基 G 并没能进入 APE1 的“口袋”，即未能进入活性中心。

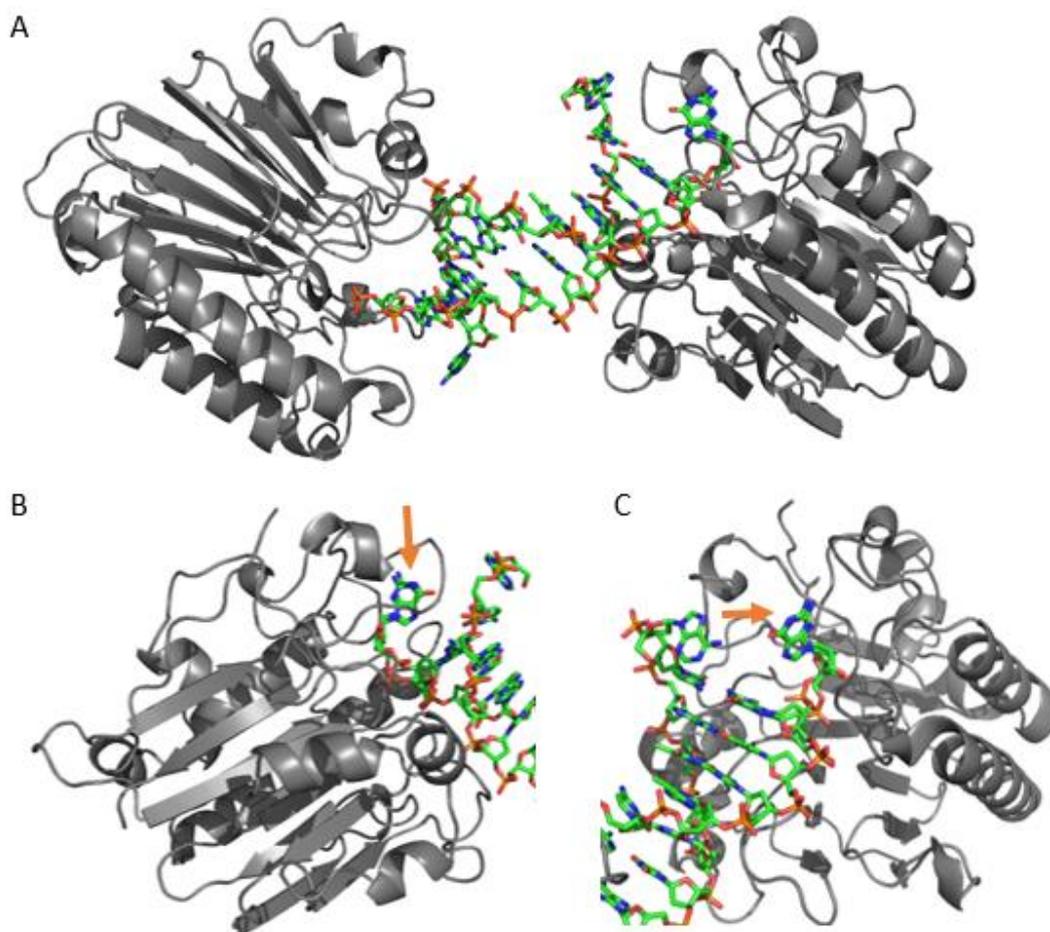


图 6. APE1 D210N 突变体与底物反应的晶体结构。A，可见右端 DNA 的 3'-G 没有被切除；B、C，箭头标识未被切去的 G。作图软件 PyMOL。

3.3. APE1 野生型及各突变体外切酶活性测试

3) APE1 野生型

由图 7 可见，反应 20 min 后大部分 DNA 底物都会在 3' 末端被切去一个碱基，并且末端错配的底物剪切程度显著比正配底物高（如 $\text{FAM}^{\text{T}}\text{-A}$ 明显比 $\text{FAM}^{\text{T}}\text{-T}$ 、 $\text{FAM}^{\text{T}}\text{-G}$ 、 $\text{FAM}^{\text{T}}\text{-C}$ 剪切效率低）。而不同底物之间的外切情况也有很大差别，酶对 $\text{FAM}^{\text{T}}\text{-X}$ 和 $\text{FAM}^{\text{C}}\text{-X}$ （X 为 A、T、G 或 C）的效果比 $\text{FAM}^{\text{A}}\text{-X}$ 、 $\text{FAM}^{\text{G}}\text{-X}$ 更强，尤其是 $\text{FAM}^{\text{G}}\text{-X}$ ，剪切效果非常弱，仅有

$\text{FAM}^{\text{G-A}}$ 和 $\text{FAM}^{\text{G-T}}$ 有较弱的外切作用，尽管 $\text{FAM}^{\text{G-G}}$ 是错配但几乎还是没有发生外切作用。



图 7. APE1 野生型的外切酶活性测试。-, 对照组; +, 实验组。各泳道标识如图, 红框内为底物正配的实验组。

4) APE1 Y171F

见图 8, APE1 的外切酶活性被大幅减弱, 几乎没有被外切。

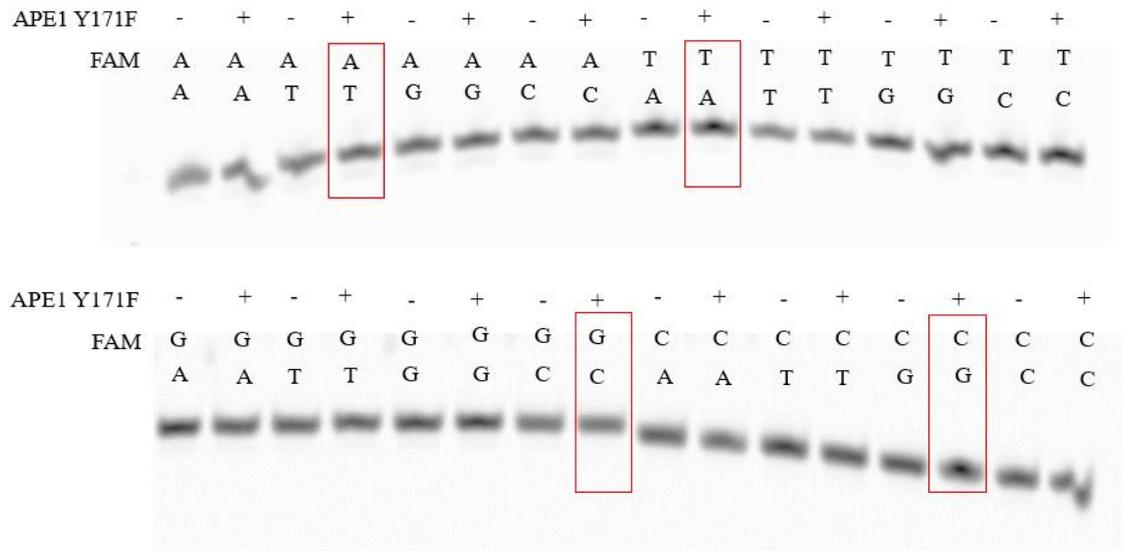


图 8. APE1 Y171F 的外切酶活性测试。-, 对照组; +, 实验组。各泳道标识如图, 红框内为底物正配的实验组。

5) APE1 D210N

见图 9, 与 Y171F 类似, 除了 $\text{FAM}^{\text{T-X}}$ 少部分, 其余底物几乎没有被外切。

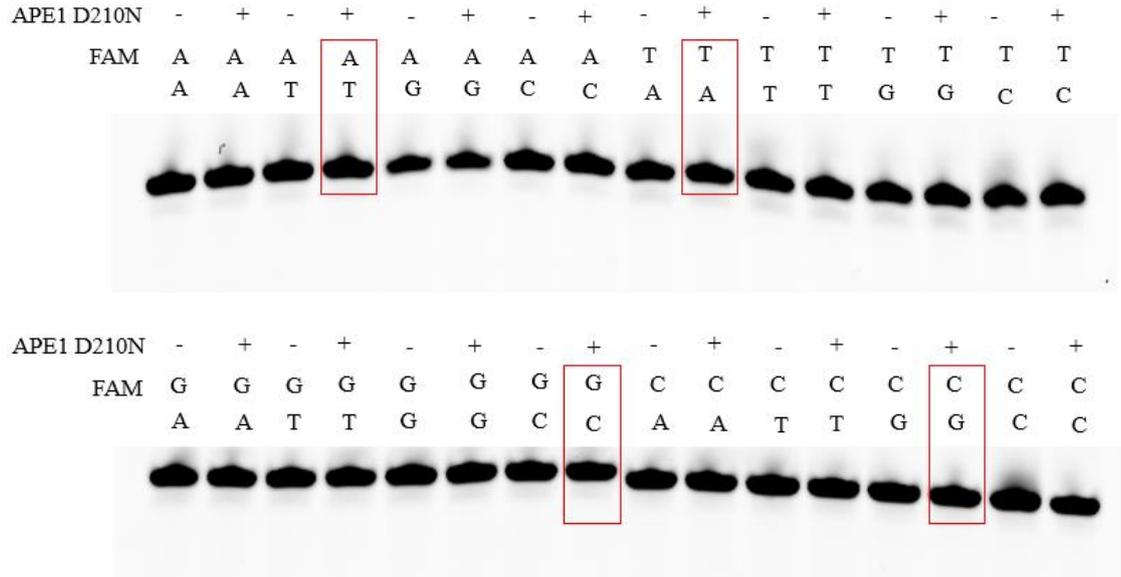


图 9. APE1 D210N 的外切酶活性测试。-, 对照组; +, 实验组。各泳道标识如图, 红框内为底物正配的实验组。

6) APE1 H309A

见图 10, 与前两种突变体情况类似, 其余底物几乎没有被外切, 外切酶活性大幅减弱。

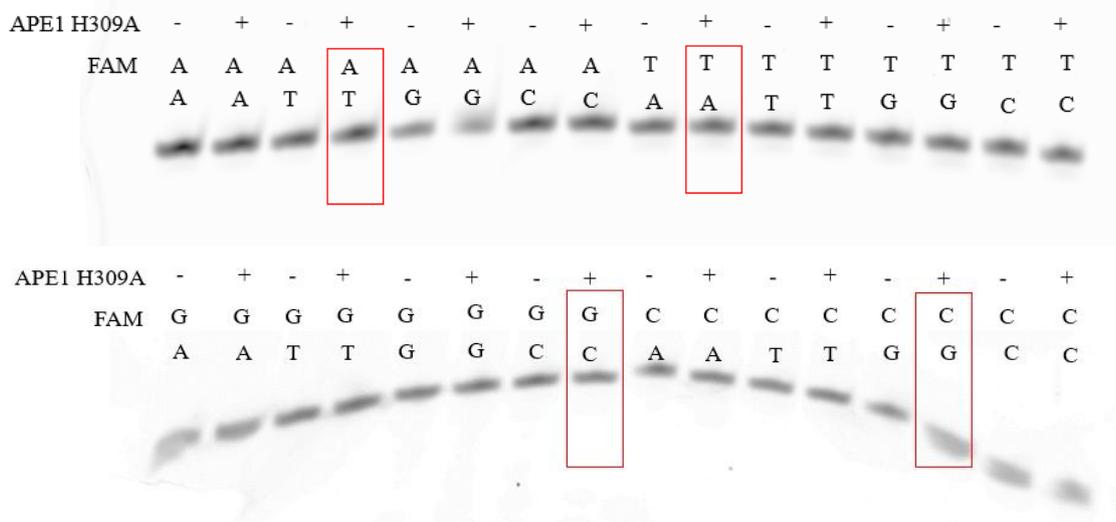


图 10. APE1 H309A 的外切酶活性测试。-, 对照组; +, 实验组。各泳道标识如图, 红框内为底物正配的实验组。

四、讨论

在本次课题中，我们希望通过蛋白纯化结晶获得晶体结构，并通过生化试验来找到 APE1 外切酶活性的关键位点。在包含野生型的四种蛋白中，APE1 野生型、Y171F、D210N 的纯化都非常顺利：蛋白表达量极高，二次 Ni 后绝大部分杂蛋白即能得到去除；获得浓度较高的目的蛋白后，结晶实验也非常顺利，均成功获得可用的晶体。相比之下，H309 突变体的纯化结晶则经历了非常艰辛的过程。最初我们设计的是 H309Q 突变体，但因为表达量较低且蛋白极易降解，后尝试换为 H309A 突变体。H309A 的情况稍有好转，但仍存在表达量低、杂蛋白多且难以去除的情况，因此我们后来将感受态从 BL21(DE3) 换为 Rosetta 并改进纯化流程，通过多次试验获取到了足够量的蛋白；即使如此，多番尝试后仍没有成功获得晶体，此为遗憾。而 H309 突变体反常的表现十分引人注目：在文献中此位点的突变曾引起最为剧烈的活性降低，并被推断与催化功能相关^[23]，结构则显示在 AP 内切功能中这一位点与 DNA 的磷酸骨架相互作用^[19]，我们的实验结果也许在暗示这一位点的关键地位，这里的突变似乎对细胞的整体生活也会产生不利的影响，背后的原理值得深究。

目前得到的晶体结构展示了野生型 APE1 对 3' 末端错配底物具有外切酶的活性。但对于 APE1 D210N 突变体，底物 3' 末端的 A-G 错配却被保留了。从结构上看，鸟嘌呤并没能进入活性中心，可能是由于其相对较大的碱基平面阻止它进入“口袋”，从而使得外切失败。另外，这也可能说明 D210N 突变体的外切活性在一定程度上被削弱了，致使难以剪切较大的碱基。

活性实验中，相比于对照组，加入 APE1 野生型都发生了明显的外切反应，并且在同一系列中对于错配底物的活性显著高于正配底物。而不同底物系列之间的外切情况也有很大不同：^{FAM}T-X 与 ^{FAM}C-X 的外切效应最为显著，而 ^{FAM}G-X 系列则最难外切，只有 ^{FAM}G-A、^{FAM}G-T 有较弱的外切反应，^{FAM}G-G 几乎没有被切——这也与结构显示的结果相一致：APE1 外切的活性位点可以较难接纳较大的碱基。

而在同样的反应条件和时间下，用突变体反应的结果就是几乎所有底物都没有被明显外切，这证明了几个位点不仅在 AP 内切酶活性中具有关键作用，在外

切活性中也有不可忽略的意义。接下来我们需要对反应做一些调整，例如延长反应时间来检测是否这三个位点之间还有活性上的区别，由此推测各个位点的功能与地位。另外，我们需要检测 Mg^{2+} 对反应的影响。根据文献报道，在低浓度的 Mg^{2+} (≤ 1 mM) 下，APE1 主要发挥 3'-5' 外切酶的活性，当浓度超过 5 mM 时，AP 内切的活性则更为显著^[24]。检测 Mg^{2+} 对不同位点的突变体外切活性的影响有助于我们更好地理解这些位点在反应中的作用和地位。

近年来对于 APE1 的研究早已不再仅限于其最基础的 AP 内切酶活性，更多的研究者将目光投向它在更广阔领域中的角色。随着 APE1 的身影在越来越多的生物过程中出现，对于其自身结构与反应机理的研究也就愈发重要。本课题的最终目标是找到外切酶活性的关键位点，进而厘清反应机制，希望能为维持基因组稳定和相关疾病方面的研究提供帮助。

参考文献

1. Frosina, G., et al. Two Pathways for Base Excision Repair in Mammalian Cells. *J Biol Chem J* (1996): 9573-8.
2. Chen, D. S., T. Herman, and B. Demple. Two Distinct Human DNA Diesterases That Hydrolyze 3'-Blocking Deoxyribose Fragments from Oxidized DNA. *Nucleic Acids Res J* (1991): 5907-14.
3. Frosina, Guido, et al. Two Pathways for Base Excision Repair in Mammalian Cells. *Journal of Biological Chemistry J* (1996): 9573-78.
4. Demple, B., T. Herman, and D. S. Chen. Cloning and Expression of Ape, the Cdna Encoding the Major Human Apurinic Endonuclease: Definition of a Family of DNA Repair Enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A J* (1991): 11450-4.
5. Barnes, T., et al. Identification of Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease 1 (Ape1) as the Endoribonuclease That Cleaves C-Myc Mrna. *Nucleic Acids Res J* (2009): 3946-58.
6. Okazaki, T., et al. A Redox Factor Protein, Ref1, Is Involved in Negative Gene Regulation by Extracellular Calcium. *J Biol Chem J* (1994): 27855-62.
7. Daviet, S., et al. Major Oxidative Products of Cytosine Are Substrates for the Nucleotide Incision Repair Pathway. *DNA Repair (Amst) J* (2007): 8-18.
8. Mazouzi, A., et al. Insight into Mechanisms of 3'-5' Exonuclease Activity and Removal of Bulky 8,5'-Cyclopurine Adducts by Apurinic/Apyrimidinic Endonucleases. *Proc Natl Acad Sci U S A J* (2013): E3071-80.
9. Prorok, P., et al. Uracil in Duplex DNA Is a Substrate for the Nucleotide Incision Repair Pathway in Human Cells. *Proc Natl Acad Sci U S A J* (2013): E3695-703.
10. Beaver, J. M., et al. Ap Endonuclease 1 Prevents Trinucleotide Repeat Expansion Via a Novel Mechanism During Base Excision Repair. *Nucleic Acids Res J* (2015): 5948-60.
11. Robson, C. N., et al. Isolation of Cdna Clones Encoding an Enzyme from Bovine Cells That Repairs Oxidative DNA Damage in Vitro: Homology with Bacterial Repair Enzymes. *Nucleic Acids Res J* (1991): 1087-92.
12. Chou, K. M., M. Kukhanova, and Y. C. Cheng. A Novel Action of Human Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease: Excision of L-Configuration Deoxyribonucleoside Analogs from the 3' Termini of DNA. *J Biol Chem J* (2000): 31009-15.
13. Chou, K. M., and Y. C. Cheng. An Exonucleolytic Activity of Human Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease on 3' Mismatched DNA. *Nature J* (2002): 655-9.
14. Wong, D., M. S. DeMott, and B. Demple. Modulation of the 3'-->5'-Exonuclease Activity of Human Apurinic Endonuclease (Ape1) by Its 5'-Incised Abasic DNA Product. *J Biol Chem J* (2003): 36242-9.

15. Matsuda, T., et al. The Base Substitution Fidelity of DNA Polymerase Beta-Dependent Single Nucleotide Base Excision Repair. *J Biol Chem J* (2003): 25947-51.
16. Bennett, R. A., et al. Interaction of Human Apurinic Endonuclease and DNA Polymerase Beta in the Base Excision Repair Pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A J* (1997): 7166-9.
17. Liu, Y., et al. Coordination of Steps in Single-Nucleotide Base Excision Repair Mediated by Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease 1 and DNA Polymerase Beta. *J Biol Chem J* (2007): 13532-41.
18. Wilson, D. M., 3rd, and D. Barsky. The Major Human Abasic Endonuclease: Formation, Consequences and Repair of Abasic Lesions in DNA. *Mutat Res J* (2001): 283-307.
19. Mol, C. D., et al. DNA-Bound Structures and Mutants Reveal Abasic DNA Binding by Ape1 and DNA Repair Coordination [Corrected]. *Nature J* (2000): 451-6.
20. Fan, Z., et al. Cleaving the Oxidative Repair Protein Ape1 Enhances Cell Death Mediated by Granzyme A. *Nat Immunol J* (2003): 145-53.
21. Erzberger, J. P., and D. M. Wilson, 3rd. The Role of Mg²⁺ and Specific Amino Acid Residues in the Catalytic Reaction of the Major Human Abasic Endonuclease: New Insights from Edta-Resistant Incision of Acyclic Abasic Site Analogs and Site-Directed Mutagenesis. *J Mol Biol J* (1999): 447-57.
22. Gorman, M. A., et al. The Crystal Structure of the Human DNA Repair Endonuclease Hap1 Suggests the Recognition of Extra-Helical Deoxyribose at DNA Abasic Sites. *Embo j J* (1997): 6548-58.
23. Lucas, J. A., et al. Single-Turnover Analysis of Mutant Human Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease. *Biochemistry J* (1999): 4958-64.
24. Chou, K. M., and Y. C. Cheng. The Exonuclease Activity of Human Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease (Ape1). Biochemical Properties and Inhibition by the Natural Dinucleotide Gp4g. *J Biol Chem J* (2003): 18289-96.

致谢

毕业论文的完成也意味着四年本科生活即将结束。在人生的漫漫长河中四年不过是白驹过隙，但我很高兴能在这最为朝气蓬勃、最富于力量的年华与那么多人相遇，这些都将成为今后道路上宝贵的回忆，鼓励我继续前进。

首先，我要感谢甘建华教授接纳我进入他的课题组，让一个只会看书上课的我能够接触到真正的前沿科研；也感谢他平时对我学习和学术方面的教导，并且为我参与各种项目提供了很大的支持与帮助。我还要感谢于翔学姐，手把手地把我从菜鸟带入门；以及张静学姐，帮助我完成了 APE1 Y171F 突变体的纯化以及多项结晶实验，感谢她们的耐心与鼓励。还有甘建华老师组与麻锦彪老师组的各位师兄师姐，感谢他们在我遇到问题时的热心解答与帮助，这是一个非常有爱的小集体。

我还要感谢我的家人，感谢他们对我的选择的尊重和理解，还能时刻为我准备着一个温暖的港湾。感谢我的室友们，感谢她们听我的牢骚、陪我玩耍还要时常给我带饭。感谢各位同学与朋友，令我的大学生活如此丰富多彩。感谢潘导与生科院的各位老师，他们或风趣，或严谨，但都令人起敬。感谢复旦，感谢她给我自由的空间，感谢她给我专业内外的视野，感谢她的一切，让我从不后悔这四年青春。

今当远行，临表涕零，不知所言。