

17S U2 snRNP 中不可或缺的剪接因子 SF3a 的研究进展

林婵婵 (浙江师范大学化学与生命科学学院,浙江金华 321004)

摘要 剪接体由 snRNPs (small nuclear ribonucleoprotein particles) 和非 snRNPs 蛋白质组成,能通过剪接作用对内含子进行精确切除,形成成熟有活性的 mRNA。SF3a 是哺乳动物 U2 型主要剪接体中不可或缺的成分,参与形成有活性的 17S U2 snRNP,由 SF3a60、SF3a66、SF3a120 构成。SF3a120 与 SF3a60 和 SF3a66 互作,但 SF3a60 与 SF3a66 并不互作。文中对 17U2 snRNP 中的剪接因子 SF3a 的研究进展进行了阐述,证明了 SF3a 对于细胞的形态、分化、正常的生长发育具有重要作用。

关键词 RNA 剪接;剪接因子;SF3a;pre-mRNA

中图分类号 S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)15-06604-04

Research Progress of Indispensable Splice Factor SF3a in 17S U2 snRNP

LIN Chan-chan (College of Chemistry and Life Science, Zhejiang Normal University, Jinhua, Zhejiang 321004)

Abstract Spliceosome is composed of snRNPs (small nuclear ribonucleoprotein particles) and non-snRNPs proteins. Spliceosome can excise introns precisely by splicing, forming mature active mRNA. SF3a complex is an important ingredient that forms active 17S U2 snRNP. SF3a is made up of SF3a60, SF3a66 and SF3a120, SF3a120 interacts with SF3a60 and SF3a66, while SF3a60 doesn't interact with SF3a66. The research progress of SF3a of 17S U2 snRNP were elaborated, it was verified that SF3a plays an important role in cell morphology, differentiation, and its normal growth.

Key words RNA splicing; Splicing factor; SF3a; pre-mRNA

真核生物的结构基因转录时,内含子和外显子一同被转录,形成前体 RNA (pre-mRNA),且 pre-mRNA 需经剪接加工,去除内含子除去,将各个外显子连接,从而形成成熟的有功能的 mRNA,其中执行 RNA 剪接的结构复合体称为剪接体 (spliceosome)。

剪接体由 snRNPs (small nuclear ribonucleoprotein particles) 和非 snRNPs 蛋白质组成。U2 型剪接体是哺乳动物的主要剪接体,包括 U1 snRNP、U2 snRNP、U4/U6 snRNP 和 U5 snRNP 等类型。在剪接过程中,U1 snRNP 识别并结合内含子 5'剪接点,然后 U2 辅助因子识别 3'剪接点,从而使 U2 snRNP 与分支点结合,形成剪接前体 (复合体 A),随后 U4/U6 snRNP 和 U5 snRNP 结合到复合体 A 形成复合体 B;之后,U4/U6 snRNP 解离,U2 snRNP 和 U6 snRNP 结合,形成催化中心,随后 U1 snRNP 和 U4 snRNP 离开复合体,U6 snRNP 结合到 5'剪接点,形成复合体 C,即剪接体,进行剪接反应。

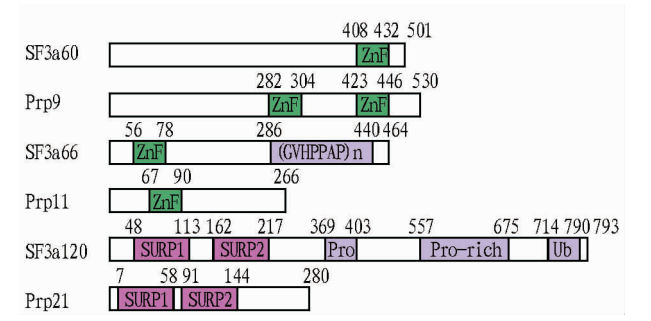
SF3a 和 SF3b 2 种次级结构构成剪接因子 SF3。剪接因子 SF (splicing factor,SF)3 即剪接前体组装所必须的成分^[1]。

1 SF3a 的组成成分及相互作用关系

哺乳动物的 SF3a 由 SF3a60 (SF3a3、SAP61)、SF3a66 (SF3a2、SAP62)、SF3a120 (SF3a1、SAP114) 构成,分别对应于酿酒酵母的 Prp9、Prp11、Prp21^[2-8]。按照化学计量可知,SF3a 3 亚基之间的比例是 1:1:1^[9]。

尽管哺乳动物和酿酒酵母相对应的同源蛋白大小不同但具有一致的不同保守结构域^[10] (图 1)。SF3a60 的 C 端有 1 个保守 U1C 型 Cys₂His₂ (C₂H₂) 的 Zn 指结构域,而 Prp9 有 2 个 Zn 指结构域^[7,11]。Zn 指结构域是蛋白质中最保守的结构域,在 U2snRNP 结构中,Zn 指结构域对于蛋白质间的互作

非常重要^[12]。SF3a66 和 Prp11 的 N 端也都有一个 U1C 型 C₂H₂ 的 Zn 指结构域,且 SF3a66 的 C 端有 22 个七肽重复序列 GVHPPAP,但 Prp11 没有该重复序列^[11,13]。SF3a120 和 Prp12 的 N 端都含有 2 个串联的 SURP 重复功能域,这 2 个结构域又叫 SWAP 结构域,不同的是 SF3a120 的 C 端是脯氨酸和谷氨酰胺富集区,末端序列是类泛素化结构域 (UBL)^[14-15]。

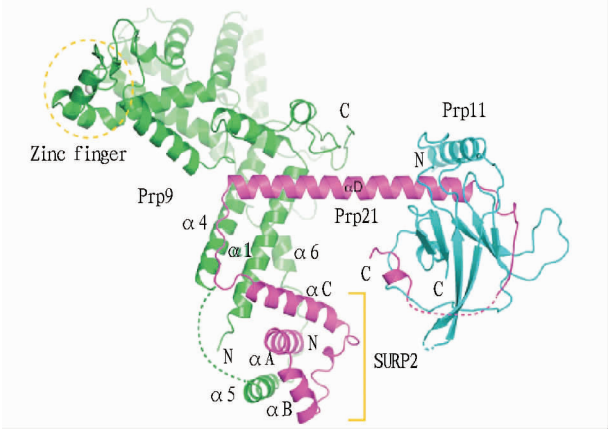


注:颜色标注的方框表示参与形成 SF3a 复合体的中心结构域。
ZnF: 锌指结构; (GVHPPAP)n: 七聚体序列重复; SURP1 或 2: suppressor-of-white-apricot 和 prp21 功能域; Pro 或 Pro-rich: 脯氨酸富集区; Ub: 泛素化结构域; 阿拉伯数字表示氨基酸数目。

图 1 酵母和人的 SF3a 结构域结构

通过对 SF3a 复合体的生化和遗传分析,在这个复合体形成时,SF3a120 起着关键性的作用,SF3a120 不仅与 SF3a60 互作,也和 SF3a66 互作,但 SF3a60 和 SF3a66 不互作^[12,16-17]。SF3a120 的 SURP2 与 SF3a60 的第 35~107 个氨基酸结合。SURP2 有 α 1- α 2-310- α 3 的拓扑结构,SF3a60 形成两性 α 螺旋状物并与 SURP2 α 1 相接触^[18]。而 SF3a60 C 端的 Zn 指结构域不影响 SF3a60 与 SF3a120 互作,且 Zn 指结构域对组装形成 17SU2snRNP 是不可缺少的。SF3a120N 端的 34 个氨基酸能稳定这互作关系^[12]。SF3a66 的 N 端第 1~216 个氨基酸,除 Zn 指结构域外,都与 SF3a120 的 SURP2 相结合^[15]。

另一方面,通过对 SF3a 复合体结构的直接分析也得出同样的结果。Lin 等^[19]通过原核表达酵母的 SF3a 复合体,蛋白经水解酶水解,通过 MALDI-TOP 分析和 N 端测序,得到了蛋白的二级结构图^[19](图 2),其中 Prp9 含 N 端的 1~389 个氨基酸(Prp9 ΔC),Prp11 含第 50~266 个氨基酸(Prp11 ΔN),Prp21 含中间的第 89~237 个氨基酸(Prp21M)。Prp9 和 Prp21 主要含有 α 螺旋,Prp21 主要含有 β 折叠。Prp9 ΔC 和 Prp11 ΔN 在物理结构上并无互作,但它们是靠 Prp21M 的 αD 螺旋架桥连接的,这为 Prp9 和 Prp11 之间没有互作,而是分别与 Prp21 互作提供了直接的证据。



注:Prp9 ΔC 用绿色表示,Prp21M 用洋红色表示,Prp11 ΔN 用青绿色表示;虚线表示无序的片段;虚线的球星表示 Prp9 ΔC 的 Cys2His2 U1C-type 锌指结构;Prp21M 的 SURP2 结构域已标出。

图 2 Prp9-Prp21-Prp11 复合体的中间结构域

2 SF3a 参与形成 17S U2 snRNP 的机理

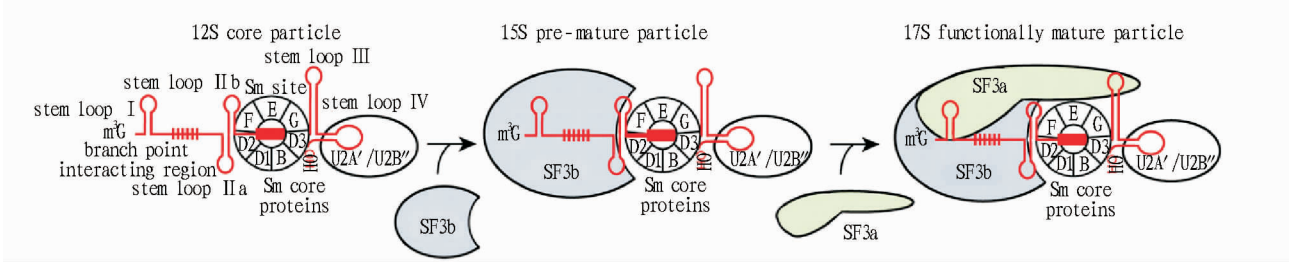
17S U2 snRNP 位于细胞核内,是 U2 snRNP 的活性形

式,它在剪接体组装中,结合至 pre-mRNA 的分支点上。成熟的 17S U2 snRNP,包括 12S U2 snRNP(U2 snRNA、Sm、U2A' 和 U2B'')^[20-24],还有 2 个剪接因子 SF3a、SF3b^[6,25-27]。17S U2 snRNP 形成过程的第 1 步是七聚体 Sm 蛋白质复合体及 U2A'-U2B''异质二聚体分别结合到 Sm 位点及 U2 snRNA 的 stem-loop IV,形成 12S U2^[23,28],第 2 步是 SF3b 结合 12S U2 形成 15S U2 snRNP,再结合 SF3a 形成有功能的 17S U2 snRNP(图 3)^[6,29-30]。人和酵母的 U2 snRNP 的组成和功能均是高度保守的,尽管酵母的 U2 snRNA 长度是人的 6 倍,酵母 U2 snRNA 中间有 950 个不保守的核酸^[31-32](图 4),但在体内,人的 U2 snRNA 可代替酵母基因用于剪接^[33]。

核酸保护研究表明 SF3b 与 U2 snRNA 的 5'作用,SF3a 与 U2 snRNP 的 3'部分结合,SF3a 的结合增大了 12S U2 snRNP 分子量大小,也可能会引起 SF3b 结构域结构改变,并且与 SF3a 直接互作的是 SF3b 其中的一个亚基 SF3b2^[30]。生化分析表明 SF3a 结合至哺乳动物 17S U2 snRNP 上的 stem-loops I 和 III 上^[34],而在酵母中,SF3a 结合到 stem-loop IIa 和其邻近的序列^[35-37]。17S U2 snRNP 在结合到 premRNA 过程中,SF3a 的 3 个亚基都会与分支点上游 25 个核苷酸结合,并且是成功组装剪接体的必要条件^[26]。

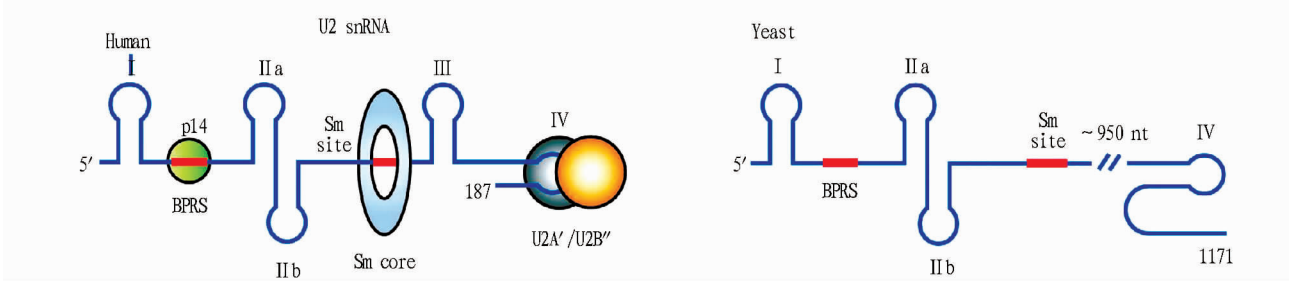
SF3a 在细胞质中形成,然后独立于 U2 snRNP 和 SF3b,定位到了核内,接着又进入 Cajal bodies(CBs)中,紧接着与 U2 snRNP 组装,一旦形成成熟的结构,U2 snRNP 就会迅速离开 CBs^[10]。正因如此,在进行免疫荧光分析,易误判在静态时,内源的 SF3a 在 Cajal bodies(CBs)中未能检测到,并认为 CBs 中的 U2 snRNP 是不成熟和没有活性的^[38]。

因此,SF3a 复合体是形成有活性的 17S U2 snRNP 的重要组成部分。



注:红色线表示 U2 snRNA。

图 3 U2 snRNP 的成熟过程



注:罗马数字表示 RNA stem-loop 的名称。Sm 和 BPRS(分支点识别序列)都用红色粗线条表示。人的 U2 snRNA 结合蛋白包括 p14、Sm 和 U2A'/U2B''复合体,并标示在适当的位置上(绿色环:p14;灰色和棕色环:U2A'/U2B'';蓝色环:Sm)。

图 4 人和酵母的 U2 snRNA

3 SF3a 复合体内外剪接的重要性

SF3a 复合体是哺乳动物形成活性 17S U2 snRNP 的重要成分。体外虫类和酵母试验表明, SF3a120 不仅与 SF3a60 互作, 也与 SF3a66 互作, 但 SF3a60 和 SF3a66 不互作, 单个的 SF3a 亚基可与 15S U2 snRNP 结合, 但 17S U2 snRNP 的形成需每个 SF3a 亚基参与, 而且 SF3a 的 3 个亚基都对剪接前体的组装是必须的^[12,39-41]。

体内对 SF3a 的研究主要是通过对 HeLa 细胞 SF3a 中的 3 个亚基进行 RNAi 使其亚基缺失^[42]。利用 RT-PCR 技术分析 SF3a 单个亚基缺失的 HeLa 细胞内总 RNA 发现 SF3a 的减少会引起内源 pre-mRNA 的积累和相应的 mRNA 减少或 mRNA 完全缺失。在 SF3a 缺陷的 HeLa 细胞中, 共转染报告质粒转录得到的 β 球蛋白 pre-mRNA 积累, 并且没有 mRNA 产生, 但没有内含子的组蛋白 H3 mRNA 水平并未受影响, 除了没有特异性影响 mRNA 的稳定性。Western Blot 表明在 SF3a 缺陷的 HeLa 细胞中, 其他蛋白的量也会减少。SF3a 的减少也会引起核颗粒的增大, 核颗粒代表着由剪接复合体占据的核结构^[43]。总之, SF3a 是用于剪接很多内含子的重要组成型剪接因子, 而作为 U2 snRNP 相关的蛋白, 剪接受到抑制, 就会相应的带来基因转录和翻译的抑制。能与 SF3a 在剪接中的作用相提并论的另一个作用是在 SF3a 缺陷的 HeLa 细胞中, 通过 siRNA 转染 78 h 后的细胞稳定性下降了 20%。

Tanackovic 等^[42]报道 SF3a 是重要的剪接因子, 但对于 SF3a 每个亚基在剪接中的具体作用却未进行清楚的阐述。SF3a 所有的亚基都与剪接前体分支点的上游 pre-mRNA 交联, 与 SF3b-pre-mRNA 互作的结合就需要依赖 U2 snRNP 来瞄准 pre-mRNA^[26,44]。SF3a 和 SF3b 结合至 pre-mRNA 上能够稳定 U2 snRNA-分支点互作直至催化作用。这些 SF3a 有参与的功能是否仅因为 SF3a 在剪接中起的作用还有待于分析。

另外, SF3a66 在神经元中可作为微管蛋白^[45], SF3a120 在转录沉默中是作为核受体共抑制复合物的一份子^[46], SF3a120 还与转录因子 Sp1 互作^[47], 这些蛋白的功能与 SF3a 剪接的功能又是怎样相关的, 这还需继续分析。

4 SF3a 3 个亚基的作用

4.1 SF3a60 的作用 果蝇 NOISSETTE (NOI) 与 SF3a60 和 Prp9p 同源, NOI 蛋白存在于果蝇所有生长阶段的细胞核中, 在雄性性腺和雌性性腺的体细胞和生殖细胞中也存在。如果 NOI 功能完全丢失, 胚胎最后会死亡, 但不会有明显的形态缺陷。亚效等位基因表明 NOI 对于雄性生殖细胞的生存和分化、雌性生殖细胞的分化及一些成熟结构的发育都有作用^[48]。CAR (constitutive androstane receptor) 和 SF3a60 互作, CAR 对肝脏中外源物的降解具有重要的作用, SF3a60 则是作为一个 CAR 转录的辅阻遏剂起作用^[49]。拟南芥 ATO 与 SF3a60 同源, 对胚囊配子细胞的正常发育起重要作用^[50]。

4.2 SF3a66 的作用 SF3a66 除与 SF3a120 互作外, 还会通过锌指结构与 15S U2 snRNP 结合, SF3a66 的 C 端比酵母的 Prp11 多了重复序列 GVHPPAP^[12,51], 说明 SF3a66 除与 U2 snRNP 结合功能之外, 还有另外的一些功能。最近有研究发

现 SF3a66 的 C 端与细胞外信号蛋白的成纤维细胞生长因子 2 (FGF-2) 的 2 个中间结构 FGF-2(18) 和 FGF-2(23) 互作, 互作的结构域包括 23 个重复序列, 并且 SF3a66 会增强神经生长因子介导的神经元的生长^[52]。

最近, SF3a66 作为微管蛋白这个新的角色, 也陆续被证明, 说明 SF3a66 不仅仅是作为 RNA 剪接过程中不可或缺的角色。

2004 年, Takenaka 等^[45]用成神经细胞瘤 NIE115 中 SF3a 亚基的异位表达试验表明, SF3a66 在细胞形态的调节中起作用, 它能诱导神经突的扩张。原因是 SF3a66 是新的 MAP (微管相关蛋白), 能高亲和结合 β 微管蛋白, 也结合微管。在 *C. elegans* 的研究中发现, 与 SF3a66 同源的 or430ts 突变会使得受精卵中微管缺失, 并且细胞的极性发生了前后的逆转^[53]。

4.3 SF3a120 的作用 SF3a120 是一个组成型剪接因子, 并参与选择性剪接中。SF3a120 的消减会大幅减少 SF1 mRNA 和蛋白表达水平。SF3a120 或 SF1 的敲除都会影响 HeLa 细胞内源的 PDE3A mRNA 和 the asparagine-linked glycosylation 8 homolog (ALG8) mRNA 的表达量, 且 SF3a120 影响更大一些^[54]。2002 年, Bosetti 等^[55]用氯化锂处理小鼠 6 周, 使小鼠大脑锂浓度达治疗两极紊乱的效果, 原因是锂可使细胞 SF3a120 和 eIF-2B 的 mRNA 水平减少 2 倍。SF3a120 可增加人源核内雌激素受体 α (hER α) 介导的 RNA 剪接作用, 特别是 SF3a120 依赖 Ser-118 磷酸化 hER 的 RNA 剪接作用会增强^[56]。

2012 年, Korneta 等^[57]报道大量的泛素化相关结构域在剪接后期非常活跃, U2 snRNP 仅有的具有泛素化结构 SF3a120 与其他具有相同结构的结构域一起参与到剪接后期, 说明剪接的后期肯定是在一个比早期更加严格的泛素化基础上进行剪接作用的, 而且这可能与后期需要亚基间精确的重排有关。而在酵母中 Prp21 没有泛素化结构, 这与 SF3a66 含有 GVHPPAP 重复序列一样, 是一个不必要的结构。这说明人细胞中的剪接作用比酵母中的更加精密。

因此, SF3a 对于细胞的形态、分化、正常的发育生长均具有重要作用。

5 展望

SF3a 是 U2 snRNP 中不可缺少的一部分, 参与到 pre-mRNA 的剪接过程中, 而细胞可通过调节剪接的质量和数量, 及剪接的方式来调节基因表达。SF3a 对于细胞的形态、分化、正常的发育生长具有重要作用。但在剪接体中 SF3a 和 U2 snRNP 的组装分子机理还需进一步研究, SF3a 核定位序列目前还在研究当中。SF3a 3 个亚基的功能与 SF3a 剪接的功能又是怎样相关的, 还需继续分析。

参考文献

- [1] 袁丽华, 罗小洋, 张吉翔. 剪接因子——SF3b[J]. 生命的化学, 2009 (5): 746-749.
- [2] CHANG T H, CLARK M W, LUSTIG A G, et al. RNA11 protein is associated with the yeast spliceosome and is localized in the periphery of the cell nucleus[J]. Molecular and Cellular Biology, 1988, 8(6): 2379-2393.
- [3] ABOVICH N, LEGRAIN P, ROSBASH M. The yeast PRP6 gene encodes a

- U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein particle (snRNP) protein, and the PRP9 gene encodes a protein required for U2 snRNP binding[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1990, 10(12): 6417–6425.
- [4] ARENAS J E, ABELSON J N. The *Saccharomyces cerevisiae* PRP21 gene product is an integral component of the prespliceosome[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1993, 90(14): 6771–6775.
 - [5] LEGRAIN P, CHAPON C. Interaction between PRP11 and SPP91 yeast splicing factors and characterization of a PRP9-PRP11-SPP91 complex[J]. *Science*, 1993, 262(5130): 108–110.
 - [6] BROSI R, GRÖNING K, BEHRENS S E, et al. Interaction of mammalian splicing factor SF3a with U2 snRNP and relation of its 60-kD subunit to yeast PRP9[J]. *Science*, 1993, 262(5130): 102–105.
 - [7] CHIARA M D, CHAMPION-ARNAUD P, BUVOLI M, et al. Specific protein-protein interactions between the essential mammalian spliceosome-associated proteins SAP 61 and SAP 114[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1994, 91(14): 6403–6407.
 - [8] KRAMER A, LEGRAIN P, MULHAUSER F, et al. Splicing factor SF3a60 is the mammalian homologue of PRP9 of *S. cerevisiae*; the conserved zinc finger-like motif is functionally exchangeable in vivo[J]. *Nucleic Acids Research*, 1994, 22(24): 5223–5228.
 - [9] BROSI R, HAURI H P, KRAMER A. Separation of splicing factor SF3 into two components and purification of SF3a activity[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1993, 268(23): 17640–17646.
 - [10] KRAMER A, FERFOGLIA F, HUANG C J, et al. Structure-function analysis of the U2 snRNP-associated splicing factor SF3a[J]. *Biochemical Society Transactions*, 2005, 33(3): 439.
 - [11] LEGRAIN P, CHOULIKA A. The molecular characterization of PRP6 and PRP9 yeast genes reveals a new cysteine/histidine motif common to several splicing factors[J]. *The EMBO Journal*, 1990, 9(9): 2775.
 - [12] NESIC D, KRAMER A. Domains in human splicing factors SF3a60 and SF3a66 required for binding to SF3a120, assembly of the 17S U2 snRNP, and prespliceosome formation[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2001, 21(19): 6406–6417.
 - [13] BENNETT M, REED R. Correspondence between a mammalian spliceosome component and an essential yeast splicing factor[J]. *Science*, 1993, 262(5130): 105–108.
 - [14] SPIKES D A, KRAMER J, BINGHAM P M, et al. SWAP pre-mRNA splicing regulators are a novel, ancient protein family sharing a highly conserved sequence motif with the prp21 family of constitutive splicing proteins[J]. *Nucleic Acids Research*, 1994, 22(21): 4510–4519.
 - [15] KRAMER A, MULHAUSER F, WERSIG C, et al. Mammalian splicing factor SF3a120 represents a new member of the SURP family of proteins and is homologous to the essential splicing factor PRP21p of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *RNA*, 1995, 1(3): 260.
 - [16] RAIN J C, TARTAKOFF A M, KRÄMER A, et al. Essential domains of the PRP21 splicing factor are implicated in the binding to PRP9 and PRP11 proteins and are conserved through evolution[J]. *RNA*, 1996, 2(6): 535.
 - [17] HUANG C J, FERFOGLIA F, RALEFF F, et al. Interaction domains and nuclear targeting signals in subunits of the U2 small nuclear ribonucleoprotein particle-associated splicing factor SF3a[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(15): 13106–13114.
 - [18] KUWASAKO K, HE F, INOUE M, et al. Solution structures of the SURP domains and the subunit-assembly mechanism within the splicing factor SF3a complex in 17S U2 snRNP[J]. *Structure*, 2006, 14(11): 1677–1689.
 - [19] LIN P, XU R. Structure and assembly of the SF3a splicing factor complex of U2 snRNP[J]. *The EMBO Journal*, 2012, 31(6): 1579–1590.
 - [20] LAHRMANN R, KASTNER B, BACH M. Structure of spliceosomal snRNPs and their role in pre-mRNA splicing[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1990, 1087(3): 265–292.
 - [21] PRICE S R, EVANS P R, NAGAI K. Crystal structure of the spliceosomal U2B⁺-U2A⁺ protein complex bound to a fragment of U2 small nuclear RNA[J]. *Nature*, 1998, 394(6694): 645–650.
 - [22] RAKER V A, PLESSSEL G, LAHRMANN R. The snRNP core assembly pathway: identification of stable core protein heteromeric complexes and an snRNP subcore particle in vitro[J]. *The EMBO Journal*, 1996, 15(9): 2256.
 - [23] SCHERLY D, BOELEN S W, DATHAN N A, et al. Major determinants of the specificity of interaction between small nuclear ribonucleoproteins U1A and U2B[J]. *Nature*, 1990, 345: 502–506.
 - [24] TANG J, ABOVICH N, ROSBASH M. Identification and characterization of a yeast gene encoding the U2 small nuclear ribonucleoprotein particle B⁺ protein[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1996, 16(6): 2787–2795.
 - [25] DAS B K, XIA L, PALANDJIAN L, et al. Characterization of a protein complex containing spliceosomal proteins SAPs 49, 130, 145, and 155[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1999, 19(10): 6796–6802.
 - [26] GOZANI O, FELD R, REED R. Evidence that sequence-independent binding of highly conserved U2 snRNP proteins upstream of the branch site is required for assembly of spliceosomal complex A[J]. *Genes & Development*, 1996, 10(2): 233–243.
 - [27] WILL C L, URLAUB H, ACHSEL T, et al. Characterization of novel SF3b and 17S U2 snRNP proteins, including a human Prp5p homologue and an SF3b DEAD-box protein[J]. *The EMBO Journal*, 2002, 21(18): 4978–4988.
 - [28] BOELEN S W, SCHERLY D, BEIJER R P, et al. A weak interaction between the U2A⁺ protein and U2 snRNA helps to stabilize their complex with the U2B⁺ protein[J]. *Nucleic Acids Research*, 1991, 19(3): 455–460.
 - [29] BEHRENS S E, GALISSON F, LEGRAIN P, et al. Small nuclear ribonucleoprotein (RNP) U2 contains numerous additional proteins and has a bipartite RNP structure under splicing conditions[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1993, 13(1): 307–319.
 - [30] KRAMER A, GRÜTER P, GRÖNING K, et al. Combined biochemical and electron microscopic analyses reveal the architecture of the mammalian U2 snRNP[J]. *The Journal of Cell Biology*, 1999, 145(7): 1355–1368.
 - [31] IGEL A H, ARES M. Internal sequences that distinguish yeast from metazoan U2 snRNA are unnecessary for pre-mRNA splicing[J]. *Nature*, 1988, 334(6181): 450–453.
 - [32] SHUSTER E O, GUTHRIE C. Two conserved domains of yeast U2 snRNA are separated by 945 nonessential nucleotides[J]. *Cell*, 1988, 55(1): 41–48.
 - [33] SHUSTER E O, GUTHRIE C. Human U2 snRNA can function in pre-mRNA splicing in yeast[J]. *Nature*, 1990, 345: 270–273.
 - [34] DYBKOV O, WILL C L, DECKERT J, et al. U2 snRNA-protein contacts in purified human 17S U2 snRNPs and in spliceosomal A and B complexes[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2006, 26(7): 2803–2816.
 - [35] RUBY S W, CHANG T H, ABELSON J. Four yeast spliceosomal proteins (PRP5, PRP9, PRP11, and PRP21) interact to promote U2 snRNP binding to pre-Mma[J]. *Genes & Development*, 1993, 7(10): 1909–1925.
 - [36] WELLS S E, ARES M. Interactions between highly conserved U2 small nuclear RNA structures and Prp5p, Prp9p, Prp11p, and Prp21p proteins are required to ensure integrity of the U2 small nuclear ribonucleoprotein in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1994, 14(9): 6337–6349.
 - [37] YAN D, ARES M. Invariant U2 RNA sequences bordering the branchpoint recognition region are essential for interaction with yeast SF3a and SF3b subunits[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1996, 16(3): 818–828.
 - [38] NESIC D, TANACKOVIC G, KRAMER A. A role for Cajal bodies in the final steps of U2 snRNP biogenesis[J]. *Journal of Cell Science*, 2004, 117(19): 4423–4433.
 - [39] DZIEMBOWSKI A, VENTURA A P, RUTZ B, et al. Proteomic analysis identifies a new complex required for nuclear pre-mRNA retention and splicing[J]. *The EMBO Journal*, 2004, 23(24): 4847–4856.
 - [40] LEGRAIN P, CHAPON C. Interaction between PRP11 and SPP91 yeast splicing factors and characterization of a PRP9-PRP11-SPP91 complex[J]. *Science*, 1993, 262(5130): 108–110.
 - [41] WIEST DK, ODAY C L, ABELSON J. In vitro studies of the Prp9 • Prp11 • Prp21 complex indicate a pathway for U2 small nuclear ribonucleoprotein activation[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271(52): 33268–33276.
 - [42] TANACKOVIC G, KRAMER A. Human splicing factor SF3a, but not SF1, is essential for pre-mRNA splicing in vivo[J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2005, 16(3): 1366–1377.
 - [43] LAMOND A I, SPECTOR D L. Nuclear speckles: a model for nuclear organelles[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2003, 4(8): 605–612.
 - [44] GOZANI O, POTASHKIN J, REED R. A potential role for U2AF-SAP 155 interactions in recruiting U2 snRNP to the branch site[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1998, 18(8): 4752–4760.

表 6 不同氨基酸比例复合肥对烤烟内在质量的影响 %

处理	总氮	总 K ₂ O	烟碱	总糖	还原糖	Cl
①	1.97	2.16	2.68	22.21	20.64	0.29
②	1.66	1.89	2.51	27.21	21.80	0.31
③	2.46	2.19	2.78	21.10	20.46	0.34
CK	1.85	1.83	2.54	22.39	20.87	0.32

2.7 不同氨基酸比例复合肥对烤烟内在质量协调性的影响

云南省优质烟叶糖碱比范围为 6~10,氮碱比范围为 0.5~0.9,施木克值范围为 2~2.5,钾氯比≥4,蛋白质为 8%~12%,两糖差范围为 2.5%~5%。由表 7 可知,处理①、③、对照糖碱比都在优质烟叶范围内;4 个处理氮碱比范围为 0.66~0.88,都处于优质烟叶范围内。对照的施木克值为 2.72,比其他 3 个处理更接近优质烟叶范围;处理①钾氯比最高,对照最低,均属优质烟叶范围;处理①蛋白质含量不在优质烟叶范围,其他 3 个处理均处于优质烟叶范围。4 个处理中两糖差都不在优质烟叶范围。

表 7 不同氨基酸比例复合肥对烤烟内在质量协调性的影响

处理	糖碱比	氮碱比	施木克值	钾氯比	蛋白质//%	两糖差//%
①	8.28	0.67	2.92	7.45	7.59	1.57
②	10.84	0.66	3.17	6.09	8.58	5.41
③	8.66	0.88	5.64	6.44	9.12	0.64
CK	8.81	0.72	2.72	5.72	8.23	1.52

3 结论与讨论

从红花大金元整个生长发育的过程来看,不同氨基酸含量的复合肥对烤烟的大田长势影响不大。不论是团棵期、旺长期、现蕾期、打顶后各处理间烟株的整体生长趋势差异不是很明显,比较而言处理③的烟株长势要稍好于其他处理。从经济性状来看,各处理烤后烟叶产量差异不显著,但 3 个处理的烟叶(除对照)上等烟比例随氨基酸施用量增加而增加,致使其产值出现明显差异。处理③产值明显高于对照和

处理②,与处理①接近。对照云南省优质烟叶所要求的内在化学成分含量指标,发现各处理初烤后的烟叶化学成分指标虽有差异,但都基本处于优质烟所要求的范围,烟叶所含化学成分比较适中,各成分比较协调。红花大金元的农艺性状、经济形状和化学成分分析最终结果表明,N-P₂O₅-K₂O 8-8-20,含硼砂 0.5%,NO₃⁻-N≥40%,氨基酸含量为 10%的复合肥更有利于促进大理主栽烤烟品种红花大金元的生长发育,改善其品质。由于该试验过程中栽培管理措施比较得当,各处理烟株发病率均较低,且由于各种原因后期烟叶没有进行呼吸,该研究结论在大理所栽培的烤烟品种上是否能够验证,施用多少氨基酸才最有利于提高烟株的抗病抗逆性,增加烟叶的香气值、香气量等问题还有待进一步的研究。

由于整个生育期降雨偏多,生长前期降雨多,土壤湿度大,则土壤通气透水性差,土温低,影响烟根生长发育和吸收能力。部分烟株长势迟缓,植株矮小,烟叶组织疏松,干物质积累少,叶片薄,单叶重轻,不利于芳香物质的形成。烟叶成熟期的水分较多,烟叶返青,难以落黄,成熟度降低,部分烟叶不易烘烤,产量、产值降低,且烤后烟叶味淡油分少,弹性差,缺乏香气,品质差。

参考文献

[1] 杨德廉,王树声.烟草中氨基酸变化规律及其与烟叶品质关系研究进展[J].中国烟草科学,1998(3):11-13.
[2] 蔡文江.烟草专用肥及其开发[J].技术开发与引进,1993(4):20-21.
[3] 王瑞新,韩富根,卢红.烟草化学[M].北京:中国农业出版社,2003:46-64.
[4] 郭亚东.烟草中无机元素及氨基酸分析[J].昆明医学院学报,1997(1):54-56.
[5] 章平,陈树琳.氨基酸和还原糖类反应的研究[J].贵州工学院学报,1996(4):90-93.
[6] 王树声,王宝华,李雪震,等.烤烟烟叶中游离氨基酸与内在质量关系的研究[J].中国烟草科学,2002(4):4-7.
[7] 吴松.两种氨基酸的梅拉德反应中低分子致香成分的研究[J].贵州工业大学学报,2001(6):7-10.

(上接第 6607 页)

[45] TAKENAKA K, NAKAGAWA H, MIYAMOTO S, et al. The pre-mRNA-splicing factor SF3a66 functions as a microtubule-binding and-bundling protein[J]. Biochemical Journal, 2004, 382(1): 223.
[46] UNDERHILL C, QUTOB M S, YEE S P, et al. A novel nuclear receptor corepressor complex, N-CoR, contains components of the mammalian SWI/SNF complex and the corepressor KAP-1[J]. Journal of Biological Chemistry, 2000, 275(51): 40463-40470.
[47] GUNTHER M, LAITHIER M, BRISON O. A set of proteins interacting with transcription factor Sp1 identified in a two-hybrid screening[J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 2000, 210(1/2): 131-142.
[48] MEYER V, OLIVER B, PAULI D. Multiple developmental requirements of Noisette, the Drosophila homolog of the U2 snRNP-associated polypeptide SF3a60[J]. Molecular and Cellular Biology, 1998, 18(4): 1835-1843.
[49] YUN H J, KWON J, SEOL W. Specific inhibition of transcriptional activity of the constitutive androstane receptor (CAR) by the splicing factor SF3a3[J]. Biological Chemistry, 2008, 389(10): 1313-1318.
[50] MOLL C, VON LYNCKER L, ZIMMERMANN S, et al. CLO/GFA1 and ATO are novel regulators of gametic cell fate in plants[J]. The Plant Journal, 2008, 56(6): 913-921.
[51] BENNETT M, REED R. Correspondence between a mammalian spliceosome component and an essential yeast splicing factor[J]. Science, 1993,

262(5130):105-108.
[52] GRINGEL S, VAN BERGEIJK J, HAASTERT K, et al. Nuclear fibroblast growth factor-2 interacts specifically with splicing factor SF3a66[J]. Biological Chemistry, 2004, 385(12): 1203-1208.
[53] KEIKHAAEE R, NASH B, YOCHEM J, et al. A Dominant Mutation in a C. elegans Splicing Factor Results in Reversed AP Polarity in the Early Embryo[C]//C. elegans Development, Cell Biology, & Gene Expression Meeting. Madison, WI: University of Wisconsin-Madison, 2012: 225.
[54] CORIONI M, ANTIH N, TANACKOVIC G, et al. Analysis of in situ pre-mRNA targets of human splicing factor SF1 reveals a function in alternative splicing[J]. Nucleic Acids Research, 2011, 39(5): 1868-1879.
[55] BOSETTI F, SEEMANN R, RAPOPORT S I. Chronic lithium chloride administration to rats decreases brain protein level of epsilon subunit of eukaryotic initiation factor-2B[J]. Neuroscience Letters, 2002, 327(1): 71-73.
[56] MASUHIRO Y, MEZAKI Y, SAKARI M, et al. Splicing potentiation by growth factor signals via estrogen receptor phosphorylation[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102(23): 8126-8131.
[57] KORNETA I, MAGNUS M, BUJNICKI J M. Structural bioinformatics of the human spliceosomal proteome[J]. Nucleic Acids Research, 2012, 40(15): 7046-7065.