

# 豌豆细胞中 rRNA 前体剪切位点研究\*

龙 鸿<sup>①②</sup> 曾宪录<sup>①</sup> 焦明大<sup>①</sup> 胡 波<sup>①</sup> 孙海晶<sup>①</sup> 刘振兰<sup>①</sup>  
张立勇<sup>①③</sup> 郝 水<sup>①\*\*</sup>

(①东北师范大学遗传与细胞研究所, 长春 130024; ②南开大学生命科学院, 天津 300071;

③中国医学科学院肿瘤研究所分子肿瘤学国家重点实验室, 北京 100021)

**摘要** 利用 ITS1 探针原位杂交标记和抗核仁纤维蛋白单克隆抗体免疫标记技术, 研究了豌豆(*Pisum sativum*)根端分生细胞中 rRNA 的剪切位点。结果表明, rRNA 前体剪切发生在核仁的致密纤维组分(dense fibrillar component, DFC)和颗粒组分(granular component, GC), 而纤维中心(fibrillar center, FC)没有标记信号。放线菌素 D(actinomycin D, AMD)处理豌豆根端分生组织细胞, 使 rDNA 的转录受到抑制。随着 AMD 处理时间的延长, rRNA 剪切的标记信号逐渐减弱, 说明 rRNA 前体的剪切是一个逐渐的过程。

**关键词** 豌豆 核仁 rRNA 剪切 原位杂交 免疫标记

核仁是真核细胞内生产核糖体的细胞器, 是 rRNA 基因转录和转录产物的剪切场所<sup>[1,2]</sup>。rRNA 基因转录形成的 rRNA 前体要经过一系列复杂的剪切过程才能成熟<sup>[3]</sup>。了解 rRNA 前体在核仁中被剪切的确切位置是认识核仁功能的基础<sup>[4]</sup>。每个 rRNA 基因转录单位都由 RNA 聚合酶 I 转录, 产生相同的初始转录产物 45S rRNA 前体(约 13000 个核苷酸)。这个前体包括一个 5' 外部转录间隔序列(5' external transcribe spacer, 5'ETS), 位于 18S rRNA 序列的上游, 两个内部转录间隔序列(internal transcribe spacer, ITS1, ITS2), 分别位于 5.8S rRNA 序列的两侧, 以及一个较短的 3' 外部转录间隔序列(3' external transcribe spacer, 3'ETS), 位于 28S rRNA 序列的下游。rRNA 剪切通常分为早期事件和晚期事件, 分别有不同的剪切因子参与。前者剪切 5' ETS 和 ITS1 而产生 18S rRNA, 后者剪切 ITS2 而产生 5.8S 和 28S rRNA。核仁超微结构由纤维中心(fibrillar center, FC)、致密纤维组分(dense fibrillar components, DFC)和颗粒组分(granular component, GC)组成。关于 rRNA 前体在核仁内的剪切位点, 不同的研究者采用不同的方法进行了大量的工作。早期的电子显微镜放射自显影研究表明, 当 rRNA 用 H<sup>3</sup>-UTP 短时间(短于 10 min)标记时, 标记信号只出现在 DFC 区域, 而当标记时间加长时, 信号亦出现在 GC 区域<sup>[5~9]</sup>。20 世纪 90 年代以后的原位杂交研究表明, 5'ETS 探针的标记信号在小鼠<sup>[10]</sup>和豌豆<sup>[11]</sup>中出现在 DFC 区域中, 在人类<sup>[12]</sup>中出现在 FC 和 DFC 区域中; ITS1 和 ITS2 探针的标记信号在豌豆<sup>[11]</sup>中出现在 DFC 区域中, 在人类<sup>[12]</sup>中出现在 DFC 和 GC 区域中。因此, 目前对 rRNA 前体在核仁中被剪切的确切位置尚不清楚<sup>[1]</sup>。作为一种重要的 rRNA 剪切因子, 核仁纤维蛋白在 rRNA 前体的剪切过程中起着不可缺少的作用。已有实验表明, 核仁纤维蛋白参与了

2002-02-26 收稿, 2002-05-08 收修改稿

\* 国家重点基础研究发展计划资助项目(批准号: G1999053902)

\*\* 联系人, E-mail: ycs@nenu.edu.cn

rRNA 的剪切<sup>[13]</sup>. 在核仁中定位核仁纤维蛋白可以为 rRNA 的剪切提供间接证据. 然而, 关于核仁纤维蛋白在细胞核仁中的定位尚不清楚<sup>[14,15]</sup>. 鉴于此, 我们利用 ITS1 探针原位杂交结合抗核仁纤维蛋白单克隆抗体免疫标记定位了 rRNA 前体的剪切位点.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

豌豆(*Pisum sativum*)根端分生组织.

### 1.2 样品制备

根据 Perry 等人<sup>[16]</sup>和 Fetherston 等人<sup>[17]</sup>报道, 低浓度放线菌素 D (actinomycin D, AMD) 处理可以选择性地抑制 rRNA 前体的合成. 本实验用 0.05 μg/mL 放线菌素 D(购自 Sigma 公司) 处理豌豆根尖分生组织细胞 0.5, 1, 2, 20 h, 对照实验无 AMD 处理. 豌豆根尖分生细胞以 2.5% 戊二醛(0.01 mol/L 磷酸缓冲液配制, pH 7.4) 和 4% 锰酸固定, 乙醇梯度脱水, Lowicryl K4M (购自德国 Chemische Werke Lowi GMBH & Co.) 低温包埋. Reichert-Jung 超薄切片机切片, 厚度 60~80 nm.

### 1.3 ITS1 探针制备

根据 Beven 等人<sup>[11]</sup>报道, 转录间隔序列 ITS1 共 239 bp. 本实验用的转录间隔序列 ITS1 探针为一 PCR 合成的双链 DNA, 经 DNAsis 和 Biopro 软件辅助设计的引物序列如下: Primer 1: 5'-CGATGCCTTATATGC-3'; Primer 2: 5'-GTGCTCAGAGCAAAG-3'.

按改进的 CTAB 法提取豌豆的基因组 DNA 作模板, 进行 PCR 扩增, 经测序并比较得到探针的序列为:

1	CGATGCCTTA	TATGCAGTCC	AACACGTGAA	TTAGTTTGAA
41	CACATGCGGT	GGGCTTGAGG	TGTTTCACAC	CCCAACTTGC
81	ATTGGCATCG	GAGGGGAACG	ACAAAATGCG	TTCTCTTCTG
121	CCAAAACCTCA	AACCCCGACG	CTGAATGCGT	CAAGGAATTA
161	ACTTGCTCT	GAGCAC		

此序列与原序列的被扩增部分一致. 对 PCR 扩增的产物用 Promega 的 PCR 纯化试剂盒进行纯化, 以缺口平移法为此探针标记生物素.

### 1.4 ITS1 探针原位杂交

将杂交液(去离子甲酰胺 25 μL, 50% (w/v)硫酸葡聚糖 10 μL, 20×SSC 5 μL, 10 mg/mL *E. coli* DNA 2 μL, 10 μg/mL ITS1 探针 8 μL)置于 1.5 mL Eppendorf 管中, 放入沸水中 4 min, 以使双链 DNA 变性, 然后放入冰水混合物中 5~10 min. 在载有材料的镍网上滴加 1~2 μL 杂交液, 55°C 温育杂交 3.5 h. 杂交后立即用 PBS 充分洗涤 3 次, 每次 5 min. 探针上偶联的生物素的免疫细胞学检测是用 Extravidin-Gold 在 PBS 中稀释 1/25 完成的. 在室温下杂交 30 min, 杂交后的镍网用 PBS 和双蒸水各洗 3 次, 每次 5 min, 自然干燥后用 5% 醋酸双氧铀染色 10 min, 双蒸水充分洗涤后自然干燥, Hitach-600-B 型透射电子显微镜下观察, 照相, 加速电压 75 kV. 对照实验中以探针稀释液代替杂交液.

### 1.5 免疫胶体金标记

样品以 1% NaIO<sub>4</sub> 处理 20 min, 重蒸水洗 3 次, 每次 5 min, pH 7.4 PBSTG (PBS, 0.2% Tween 20, 15 mmol/L glycine) 洗 3 次, 每次 5 min, 含 1% BSA 的 PBSTG 封闭 15 min. 以抗

fibrillarin 抗体(美国 Georgetown 大学 M. Christensen 教授惠赠)(1:500 稀释)为一抗, 4℃处理 4 h, pH 7.4 和 pH 8.0 的 PBSTG 各处理 3 次, 每次 5 min. 二抗蛋白 A-胶体金(购自 Sigma 公司) 1:25 稀释, 室温下湿盒作用 2 h, pH 8.0 和 pH 7.4 PBS 洗涤各 3 次, 每次 5 min; 双蒸水充分洗涤, 自然干燥, 5% 醋酸双氧铀染色 10 min, 双蒸水充分洗涤后自然干燥. Hitach-600-B 型透射电子显微镜下观察, 照相, 加速电压 75 kV. 对照实验中用抗体稀释液代替抗核仁纤维蛋白抗体.

## 1.6 免疫标记的统计分析

透射电子显微镜图像的金颗粒统计分析采用德国 IBAS 图像处理系统进行<sup>[18]</sup>.

# 2 结果

## 2.1 ITS1 探针的原位杂交结果

电子显微镜下豌豆细胞核仁中可见到 3 种基本组分(纤维中心、密纤维组分、颗粒组分). 纤维中心为被致密纤维组分环绕的低电子密度区, 致密纤维组分为包围纤维中心的电子密度较高的区域, 颗粒组分为分布在核仁近边缘部位的颗粒区域. 用 ITS1 探针进行的原位杂交结果表明, 无 AMD 处理的实验组, 在 DFC 和 GC 区域中都有很强的标记信号, 在 FC 中没有标记信号(图 1(a)). 在低浓度(0.05 μg/mL)AMD 处理实验组中, 处理时间分别为 0.5, 1, 2 和 20 h. 0.5 h 的处理中, DFC 和 GC 区域金颗粒密度较大, 标记信号很强, FC 中没有标记信号(图 1(b)); 1 h 的处理中, 可见金颗粒分布在 DFC 及其周围的 GC 区域, 但标记信号与 0.5 h 的处理相比要弱一些, 在 FC 中则没有标记信号(图 1(c)); 2 h 的处理中, 金颗粒分布在 DFC 和 GC 区域中, 在 FC 中没有标记信号(图 1(d)), 该处理中, 标记的金颗粒密度明显减小(图 1(d)); 20 h 的处理中, 金颗粒分布在 DFC 和 GC 区域中, 在 FC 中没有标记信号(图 1(e)), 该处理中, 标记的金颗粒密度很小, 标记信号极弱(图 1(e)). 上述处理中, 核仁外区域均未见到金颗粒或只有极少的金颗粒, 说明标记实验具有较好的特异性. 对照实验组中, 核仁中无任何特异性标记信号(图 1(f)), 亦说明标记实验具有较好的特异性. 统计分析结果见表 1. 无 AMD 处理组的胶体金颗粒平均密度为 65.51 个/μm<sup>2</sup>, AMD 处理 0.5, 1, 2, 20 h 的胶体金颗粒平均密度则分别为 48.17, 21.68, 16.86, 5.78 个/μm<sup>2</sup>, 统计结果表明, 以 0.05 μg/mL AMD 处理豌豆细胞, 随着处理时间的逐渐延长(0.5, 1, 2, 20 h), ITS1 探针标记的金颗粒密度逐渐减小.

表 1 AMD 处理不同时间豌豆细胞核仁中 ITS1 探针原位杂交的金颗粒密度(面积: 0.346 μm<sup>2</sup>)

样品	0 h		0.5 h		1 h		2 h		20 h	
	金粒数 /个	密度 /个·μm <sup>-2</sup>	金粒数 /个	密度 /个·μm <sup>-2</sup>						
1	26	75.14	14	40.46	8	23.12	7	20.23	2	5.78
2	22	63.59	19	54.91	7	20.23	8	23.12	3	8.67
3	24	69.36	15	43.35	8	23.12	5	14.45	2	5.78
4	21	60.69	18	52.02	6	17.34	5	14.45	3	8.67
5	21	60.69	14	40.46	7	20.23	4	11.56	1	2.89
6	21	63.59	20	57.80	9	26.01	6	17.34	1	2.89
平均值±标准差	65.51±5.68		48.17±7.68		21.68±3.03		16.86±4.25		5.78±2.58	

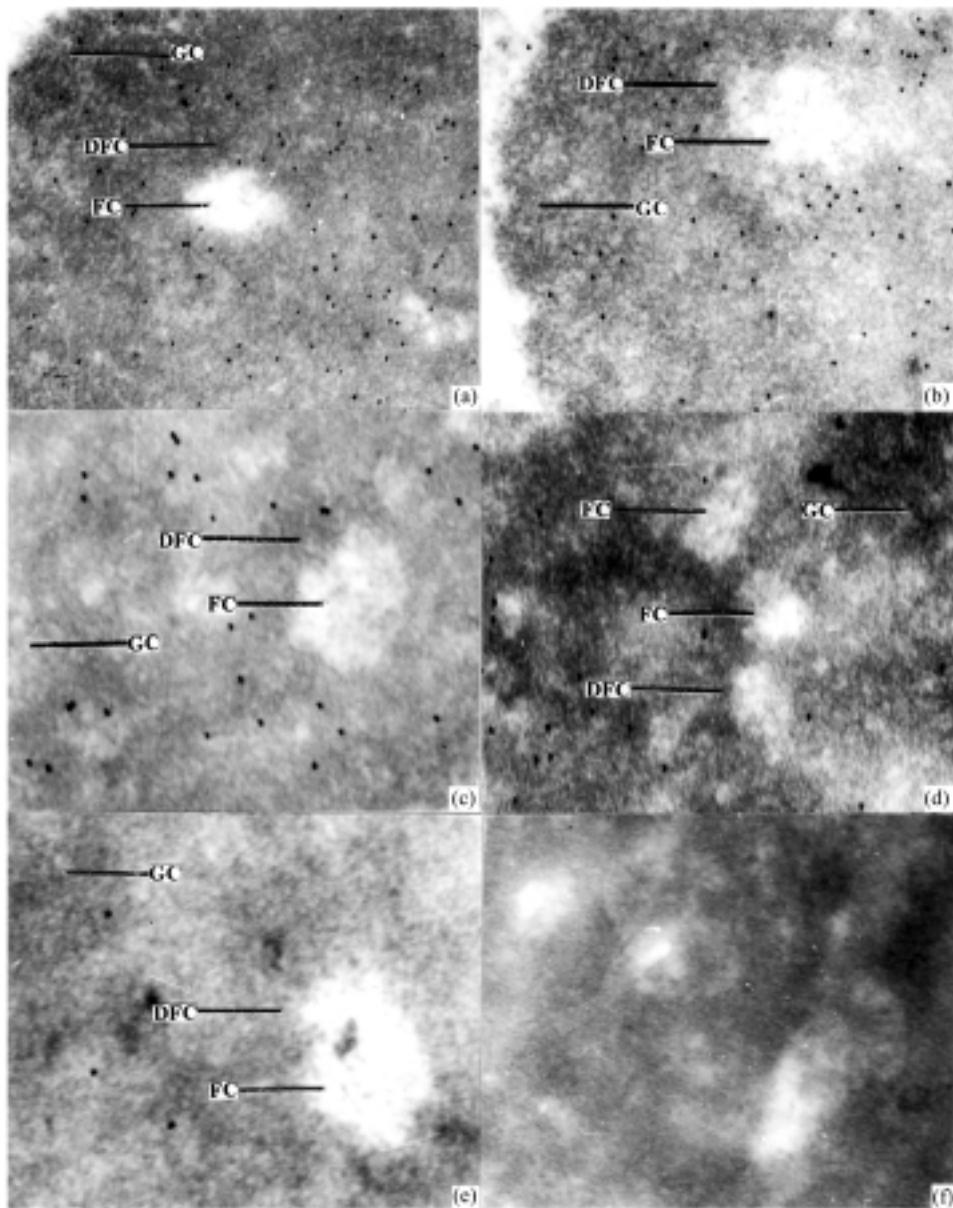


图 1 AMD 处理不同时间的豌豆细胞核仁中 ITS1 探针原位杂交结果

(a) 0 h(无 AMD), 标记的金颗粒分布在 DFC 和 GC 区域, 金颗粒密度极高, FC 区域没有分布( $51000\times$ ); (b) 0.5 h, 金颗粒分布区域同上, 密度降低( $51000\times$ ); (c) 1 h, 金颗粒分布区域同上, 密度更低( $54000\times$ ); (d) 2 h, 金颗粒分布区域同上, 密度明显减小( $54000\times$ ); (e) 20 h, 金颗粒分布区域同上, 密度极低( $54000\times$ ); (f) 对照实验, 核仁中无特异性标记信号( $51000\times$ )

## 2.2 抗核仁纤维蛋白抗体的免疫标记结果

抗核仁纤维蛋白抗体免疫标记结果与 ITS1 探针原位杂交结果相似。在无 AMD 处理的实验(图 2(a))、低浓度( $0.05\mu\text{g/mL}$ )AMD 处理 0.5(图 2(b)), 1(图 2(c)), 2(图 2(d))和 20 h(图 2(e))的实验中, 标记信号亦只出现在 DFC 和 GC 区域中, 而在 FC 区域没有标记信号。随着 AMD 处理时间的延长, 标记信号密度逐渐减小。对照实验组中, 核仁中无任何特异性标记信号。

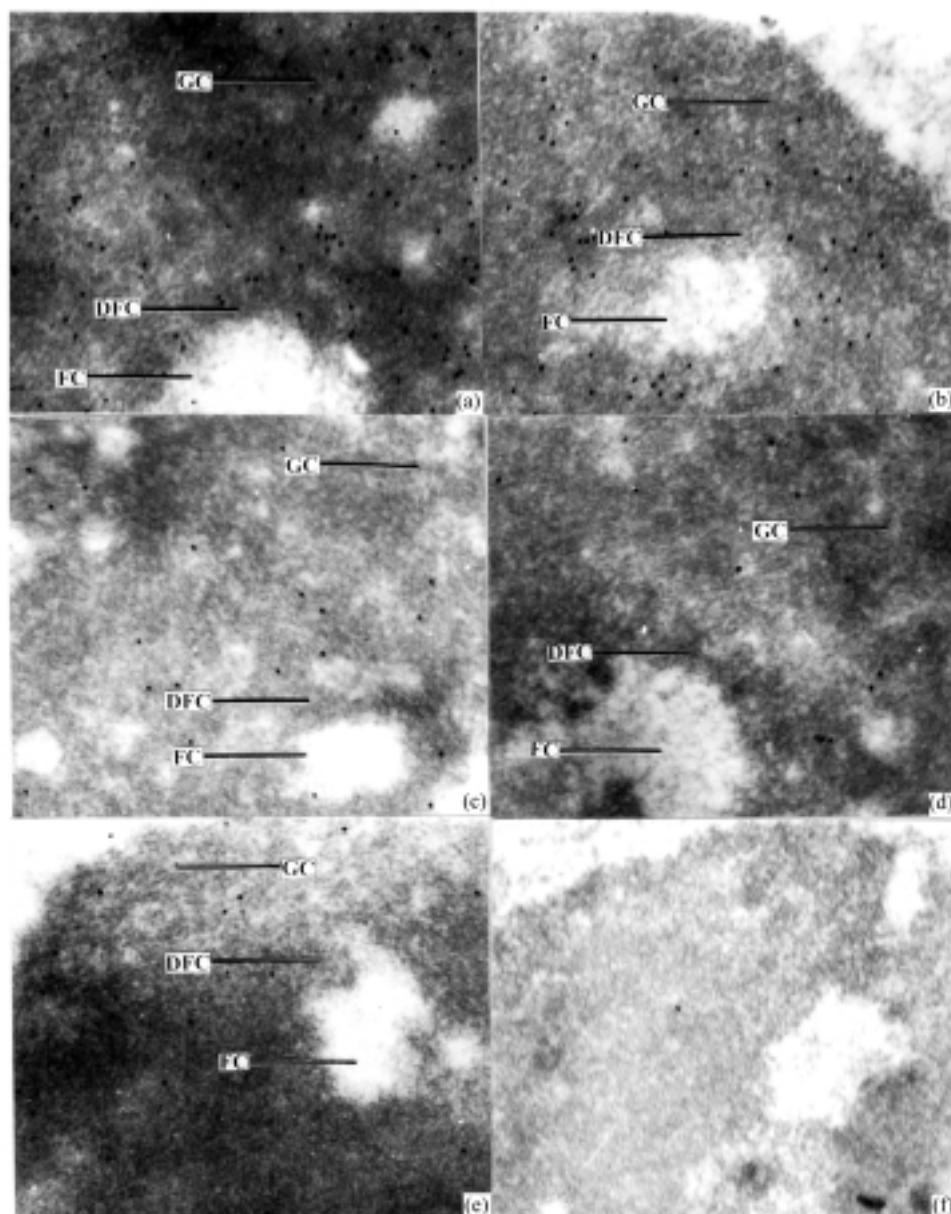


图 2 AMD 处理不同时间的豌豆细胞核仁中 fibrillarin 免疫标记结果

(a) 0 h(无 AMD), 标记的金颗粒分布在 DFC 和 GC 区域, 金颗粒密度极高, FC 区域没有分布; (b) 0.5 h, 金颗粒分布区域同上, 密度降低; (c) 1 h, 金颗粒分布区域同上, 密度更低; (d) 2 h, 金颗粒分布区域同上, 密度明显减小; (e) 20 h, 金颗粒分布区域同上, 密度极低; (f) 对照实验, 核仁中无特异性标记信号. 均为 51000 ×

(图 2(f)), 统计分析结果见表 2. 无 AMD 处理组的胶体金颗粒平均密度为  $72.53 \text{ 个}/\mu\text{m}^2$ , AMD 处理 0.5, 1, 2, 20 h 的胶体金颗粒平均密度则分别为  $49.61, 18.30, 10.12, 7.71 \text{ 个}/\mu\text{m}^2$ , 统计结果表明, 以  $0.05 \mu\text{g/mL}$  AMD 处理豌豆细胞, 随着处理时间的逐渐延长(0.5, 1, 2, 20 h), 抗核仁纤维蛋白抗体标记的金颗粒密度逐渐减小.

表 2 AMD 处理不同时间豌豆细胞核仁中抗 fibrillarin 抗体免疫标记的金颗粒密度(面积: 0.346  $\mu\text{m}^2$ )

样品	0 h		0.5 h		1 h		2 h		20 h	
	金粒数 /个	密度 /个· $\mu\text{m}^{-2}$	金粒数 /个	密度 /个· $\mu\text{m}^{-2}$						
1	24	69.36	13	37.57	6	17.34	3	8.67	3	8.67
2	21	60.69	20	57.80	5	14.45	4	11.56	2	5.78
3	28	80.92	17	49.13	6	17.34	5	14.45	2	5.78
4	26	75.14	18	52.02	7	20.23	3	8.67	2	5.78
5	53	85.48	15	43.35	6	17.34	2	5.78	3	8.67
6	22	63.59	20	57.80	8	23.12	4	11.56	4	11.56
平均值±标准差	72.53±9.75		49.61±8.05		18.30±2.98		10.12±3.03		7.71±2.36	

### 3 讨论

核仁的活动包括有 rDNA 的转录、rRNA 前体的剪切加工及 60S 和 40S 大小核糖体亚基的组装等。这些活动在核仁超微结构中的哪一部分发生，存在许多争议。

早期的脉冲示踪实验显示，rRNA 剪切的中间产物在核仁的各个组分之间转运<sup>[19,20]</sup>。后来的电子显微镜免疫细胞化学研究表明，FC 中具有 rDNA 和 RNA 聚合酶 I<sup>[21]</sup>，但多数人的实验认为，具有转录活性的 rDNA 位于 FC 和 DFC 的交界处<sup>[22~24]</sup>。5'ETS 探针原位杂交信号分布于 FC<sup>[25]</sup>和 DFC<sup>[12,26,27]</sup>而只有极少的信号在 GC<sup>[26]</sup>的结果支持上述观点。Puvion-Dutilleul 等人<sup>[26]</sup>以 ITS1 和 ITS2 探针进行原位杂交，杂交信号分布于 DFC 和 GC，AMD 阻止 rRNA 合成后，标记信号先后从 DFC 和 GC 中消失。Beven 等人<sup>[11]</sup>利用共聚焦显微镜术研究了豌豆细胞中 ITS1 在核仁中的分布。他们的结果表明，ITS1 在核仁中的分布相当于 DFC 和 GC 区域，但激光共聚焦显微镜术是在光镜水平上的研究，难以进行精确定位。为了进一步了解核仁中 ITS1 的分布，我们进行了高分辨率的电子显微镜水平上的原位杂交。

核仁纤维蛋白是核仁中相对分子量(Mr) 34~38 kD 的一类蛋白，在进化中相当保守<sup>[28]</sup>，其特点是具有一个富含甘氨酸和二甲基精氨酸的序列(GAR)，以及一个 RNA 识别序列(RRM)<sup>[29]</sup>。通过这些序列，核仁纤维蛋白可以与其他蛋白质相结合，也可以与一些核仁小分子 RNA(如 U3, U8, U13, U14, U15 等)上的特定位点(如 boxC(UGAUGA)和 boxD(CUGA))相结合<sup>[30]</sup>。这些蛋白质和 RNA 共同组成剪切复合体，在 rRNA 前体的剪切中发挥着重要作用。已有实验表明核仁纤维蛋白参与了 5' ETS 和 18S rRNA 的剪切<sup>[31~34]</sup>。关于核仁纤维蛋白在核仁内的定位，Ochs 等人<sup>[35]</sup>通过人类自身免疫血清法鉴定表明，该蛋白分布于 FC 和 DFC 区域，而也有人将其定位于 DFC 中<sup>[36,37]</sup>。

我们的结果表明，在无 AMD 处理的实验组中，ITS1 探针和抗核仁纤维蛋白抗体的标记信号位于 DFC 和 GC 区域，标记信号较强，说明 ITS1 的剪切和与核仁纤维蛋白相关的 5'ETS 和 18S rRNA 的剪切发生在这些区域，而 FC 区域则没有标记信号，说明该区域与剪切活动无关。在低浓度(0.05  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )AMD 处理 0.5, 1, 2, 20 h 的细胞中，标记信号的分布区域没有改变。我们还发现，随着 AMD 处理时间的延长(0.5, 1, 2, 20 h)，标记的金颗粒密度逐渐下降，这表明低浓度 AMD 处理选择性地抑制了 rRNA 前体的生成，已形成的 rRNA 前体发生降解。另外，随着 AMD 处理时间的延长，标记信号逐渐减弱，这表明 rRNA 前体发生剪切。实验结果证实，豌豆细胞中 rRNA 剪切的早期事件(5' ETS, 18S rRNA, ITS1 的产生)发生在 DFC 和 GC 区域，而不

是在 FC 区域.

## 参 考 文 献

- 1 Shaw P J, Jordan G E. The nucleolus. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1995, 11: 93~121
- 2 郝 水. 核仁的结构与功能研究进展. 见: 郑国锠, 翟中和. 细胞生物学进展. 第 3 卷. 北京: 北京师范大学出版社, 1995. 177~186
- 3 Eichler D C, Craig N C. Processing of eukaryotic ribosomal RNA. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 1994, 49:197~239
- 4 Melese T, Xue Z. The nucleolus: an organelle formed by the act of building a ribosome. *Curr Opin Cell Biol*, 1995, 7: 319~324
- 5 Granboulan N, Granboulan P. Cytochimie ultrastructurale du nucleole. *Exp Cell Res*, 1965, 38: 604~619
- 6 Goessens G. High resolution autoradiographic studies of Ehrlich tumor cell nuclei. *Exp Cell Res*, 1976, 100: 88~94
- 7 Goessens G. Nucleolar structure. *Int Rev Cytol*, 1984, 87: 107~158
- 8 Fakan S. High resolution autoradiographic studies on chromatin functions. *Cell Nucleus*, 1978, 5: 3~53
- 9 Puvion E, Moyne G. *In situ* localization of RNA structures. *Cell Nucleus*, 1981, 8: 59~115
- 10 Fischer D, Weisenberger D, Scheer U. Assigning functions to nucleolar structures. *Chromosoma*, 1991, 101: 133~140
- 11 Beven A F, Lee R, Razaz M, et al. The organization of ribosomal RNA processing correlates with the distribution of nucleolar snRNAs. *J Cell Sci*, 1996, 109: 1241~1251
- 12 Puvion-Dutilleul F, Bachellerie J P, Puvion E. Nucleolar organization of Hela cells as studied by *in situ* hybridization. *Chromosoma*, 1991, 100: 395~409
- 13 Antonio Cerdido, Francisco Javier Medina. Subnucleolar location of fibrillarin and variation in its levels during the cell cycle and during differentiation of plant cells. *Chromosoma*, 1995, 103: 625~634
- 14 Lazdins I B, Delannoy M, Sollner-Webb B. Analysis of nucleolar transcription and processing domains and pre-rRNA movements by *in situ* hybridization. *Chromosoma*, 1997, 105: 481~495
- 15 Puvion-Dutilleul F, Mazan S, Nicoloso M, et al. Localization of U3 RNA molecules in nucleoli of HeLa and mouse 3T3 cells by high resolution *in situ* hybridization. *Eur J Cell Biol*, 1991, 56: 149~162
- 16 Perry, R P, Kelley D E. Inhibition of RNA synthesis by actinomycin D: characteristic dose-response of different RNA species. *J Cell Physiol*, 1970, 76: 127~139
- 17 Fetheson J, Werner E, Patterson R. Processing of the external transcribed spacer of murine rRNA and site of actinomycin D. *Nucleic Acids Res*, 1984, 12: 7187~7198
- 18 胡 波, 邢 苗. 类胀泡结构是合成核糖核酸多聚酶转录产物的核内结构. *植物学报*, 1998, 40: 395~400
- 19 Geuskens M, Bernhard W. Cytochimie ultrastructurale denucl é ole. *Exp Cell Res*, 1966, 44: 579~598
- 20 Royal A, Simard R. RNA synthesis in the ultrastructural and biochemical components of the nucleolus of Chinese hamster ovary cells. *J Cell Biol*, 1975, 66: 577~585
- 21 Gerbi S A, Savino R, Stebbins-Boaz B, et al. A role for U3 small nuclear ribonucleoprotein in the nucleolus? In: Hill W E, Dahlberg A, Garrett R A, et al. eds. *The Ribosome-Structure, Function and Evolution*. Washington DC: American Society for Microbiology, 1990. 452~469
- 22 Stahl A, Wachtler F, Hartung M, et al. Nucleoli, nucleolar chromosomes and ribosomal gene in the human spermatocyte. *Chromosoma*, 1991, 101: 231~244
- 23 陶 伟, 何孟元, 郝 水. 洋葱细胞中活跃基因转录的超微定位与分析. *科学通报*, 2000, 45(22): 2403~2408
- 24 Susan A G, Anton B. U3 snoRNA may recycle through different compartments of the nucleolus. *Chromosoma*, 1997, 105: 401~406
- 25 Thiry M, Thiry-Blaise L. Locating transcribed and non-transcribed rDNA spacer sequences within the nucleolus by *in situ* hybridization and immunoelectron microscopy. *Nuclei Acids Res*, 1991, 19: 11~15
- 26 Puvion-Dutilleul F, Mazan S, Nicoloso M, et al. Alterations of nucleolar ultrastructure and ribosome biogenesis by

- actinomycin D. Implications for U3 snRNP function. *Eur J Cell Biol*, 1992, 58: 149~162
- 27 Shaw P J, Highett M I, Beven A F, et al. The nucleolar architecture of polymerase I transcription and processing. *EMBO J*, 1995, 14: 2896~2906
- 28 Antonio Cerdido, Francisco Javier Medina. Subnucleolar location of fibrillarin and variation in its levels during the cell cycle and during differentiation of plant cells. *Chromosoma*, 1995, 103: 625~634
- 29 Giard J P, Lechtenen H, Caizergues-Ferrer M, et al. GAR1 is an essential small nucleolar RNP protein required for pre-rRNA processing in yeast. *EMBO J*, 1992, 11: 673~682
- 30 Tyc K, Steitz J A. U3, U8 and U13 comprise a new class of mammalian snRNP localized in the cell nucleolus. *EMBO J*, 1989, 8: 3113~3119
- 31 Baserga S J, Yang X D W, Steitz J A. An intact box C sequence in the U3 snoRNA is required for binding of fibrillarin, the protein common to the major family of nucleolar snRNPs. *EMBO J*, 1991, 9: 2645~2651
- 32 Schimmang T, Tollervey D, Kern H, et al. A yeast nucleolar protein related to mammalian fibrillarin is associated with small nucleolar RNA and is essential for viability. *EMBO J*, 1989, 8: 4015~4024
- 33 Tollervey D, Lehtonen H, Carmo-Fonseca M, et al. The small nucleolar RNP protein NOP1(fibrillarin) is required for pre-rRNA processing in yeast. *EMBO J*, 1991, 10: 573~583
- 34 Tollervey D, Lehtonen H, Jansen R, et al. Temperature-sensitive mutations demonstrate roles for yeast fibrillarin in pre-rRNA methylation, and ribosome assembly. *Cell*, 1993, 72: 443~457
- 35 Ochs R L, Lischwe M A, Spohn W H, et al. Fibrillarin: a new protein of the nucleolus identified by autoimmune sera. *Biol Cell*, 1985, 54: 123~134
- 36 Puvion-Dutilleul F, Mazan S, Nicoloso M, et al. Localization of U3 RNA molecules in nucleoli of HeLa and mouse 3T3 cells by high resolution *in situ* hybridization. *Eur J Cell Biol*, 1991, 56: 149~162
- 37 Testillano P S, Sanchez-Pina M A, Lopez-Iglesias C, et al. Distribution of B-36 nucleolar protein in relation to transcriptional activity in plant cells. *Chromosoma*, 1992, 102: 41~49