

粟酒裂殖酵母 Atp10 在线粒体中的功能研究

谢婉秋, 黄 鹰

(南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210023)

[摘要] 线粒体是真核细胞中的动力工厂, 细胞生命活动所需能量大多来自于线粒体氧化磷酸化. 粟酒裂殖酵母是真核生物研究的模式生物. 本研究借助基因敲除方法获得 *atp10* 基因缺失菌株 $\Delta atp10$, 在以甘油和半乳糖为唯一碳源的非发酵型培养基中, $\Delta atp10$ 的生长出现缺陷. 利用生物信息学分析, Atp10 在 N 端含有 32 个氨基酸残基组成的线粒体定位序列, GFP 绿色荧光观察 Atp10 蛋白定位在线粒体中; Western blotting 检测显示, Atp10 缺失导致线粒体相关蛋白的表达几乎丧失, 影响线粒体呼吸链复合体的组装. 综上所述, Atp10 是一个与线粒体功能密切相关的蛋白, 是线粒体呼吸链正常发挥功能所必须的蛋白.

[关键词] Atp10, 粟酒裂殖酵母, 呼吸链, 线粒体

[中图分类号] 180.6120 [文献标志码] A [文章编号] 1001-4616(2019)02-0109-06

Study on the Function of Atp10 in *Schizosaccharomyces pombe*

Xie Wanqiu, Huang Ying

(School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)

Abstract: Mitochondria are power plants in eukaryotic cells. Most of the energy required for cell life activities comes from oxidative phosphorylation of mitochondria. First, we constructed the strain of *atp10* gene deletion by homologous recombination and observed its growth phenotype in non-fermentation medium with glycerol and galactose as the sole carbon source. Then, bioinformatics analyses revealed that Atp10 contains a 32-amino-acids mitochondrial localization sequence (MTS) at the N-terminus. The green fluorescence confirmed that Atp10 is localized in mitochondria. Western blotting assay showed that the deletion of Atp10 resulted in the decrease of the expression of mitochondrial-related proteins and affected the assembly of mitochondrial respiratory chain complex. In short, Atp10 is a protein closely related to mitochondrial function, which is essential for the normal functioning of mitochondrial respiratory chain.

Key words: Atp10, *Schizosaccharomyces pombe*, respiration chain, mitochondrial

线粒体普遍存在于动、植物细胞内, 是生物体进行氧化磷酸化的场所. 氧化磷酸化是需氧细胞生命活动的主要能量来源, 所以线粒体被称为“细胞的发动机”^[1]. 此外, 线粒体是一种半自主性细胞器, 参与细胞内信息传递、细胞分化、自噬、衰老、凋亡、氨基酸和脂肪酸的氧化及血红素的生物合成等众多生命过程, 还参与调控细胞周期和细胞生长^[2]. 线粒体功能异常可引起多种威胁人类健康的疾病, 如代谢综合征、糖尿病、心脏病、神经退行性疾病^[3-8]等, 大约 40% 左右的疾病与线粒体呼吸功能受损有关^[9-11]. 粟酒裂殖酵母作为一种接近高等真核生物的模式生物, 使其在线粒体研究方面更受关注.

ATP 的合成是由 ATP 合酶复合体催化完成的, 该复合体由两个主要单元构成, 分别是起质子通道作用的 F_0 单元和催化 ATP 合成的 F_1 单元^[12]. ATP 合酶又称为 F_0F_1 -ATP 酶. F_1 单元含有 5 种不同的亚基, 分别为 α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ ^[13]. 然而, 在整个系统发育中, F_1 单元的组成是相当稳定的, 但是 F_0 单元的组成是变化的. 细菌的 F_0 单元仅由 3 个亚单位组成^[14], 酿酒酵母的 F_0 单元中至少含有 6 个不同的亚单位^[15], 粟酒裂殖酵母数据库 Pombase 预测 Atp10 (SPAC4G8.11C) 是线粒体 ATP 合酶的组装蛋白. 在芽殖酵母中 ATP10 参与 F_0 单元的组装. 其中 ATP10 的缺失影响线粒体核糖体亚基 Var1、细胞色素氧化酶亚基 Cox1、

收稿日期: 2019-01-19.

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (31400032)、江苏省高校自然科学基金项目 (13KJB180010).

通讯联系人: 黄鹰, 教授, 研究方向: 微生物生物化学与分子生物学. E-mail: hy464576900@163.com

Cox2 和 Cox3, ATPase 亚基 Atp6、Atp8 和 Atp9, 细胞色素 c 还原酶的亚基 Cob1 的合成^[16]. 但是到目前为止, 在粟酒裂殖酵母中还没有关于 Atp10 功能的研究. 因此, 本研究旨在探究粟酒裂殖酵母中 Atp10 参与线粒体功能的机制, 为进一步研究粟酒裂殖酵母线粒体蛋白的功能提供一定的理论依据.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒

粟酒裂殖酵母单倍体菌株 yHL6381, 大肠杆菌 *E. coli* Top10, 质粒 pFA6a-kanMX6、pYJ19 为本实验室保存.

1.1.2 培养基

YES 培养基: 0.5% 酵母粉, 3% 葡萄糖, 4 种微量元素: 20 mg 腺嘌呤(adenine), 20 mg 亮氨酸(leucine), 20 mg 尿嘧啶(uracil), 20 mg 组氨酸(histidine); YES+3% 甘油: 将 YES 培养基中的葡萄糖替换成 3% 甘油; YES+2% 半乳糖: 将 YES 培养基中的葡萄糖替换成 2% 半乳糖; YES+氨苄霉素: YES 固体培养基添加氨苄霉素至终浓度为 100 mg·mL⁻¹; EMM-leucine(100 mL): potassium hydrogen phthalate 0.3 g, Na₂HPO₄·12H₂O 0.555 g, NH₄Cl 0.5 g, 1 000×vitamin 1 mL, 10 000×mineral stock 0.01 mL, 50×salt stock 2 mL, 琼脂 2 g, 葡萄糖 2 g; 3 种微量元素: adenine, histidine, uracil, 各 20 mg.

1.1.3 试剂与仪器

PrimeSTAR DNA Polymerase、限制性内切酶、连接酶均购自 Takara 公司; PCR 引物由上海英俊生物有限公司合成; DNA Marker 购自南京百思凯; DNA 纯化试剂盒以及割胶回收试剂盒购自博巧生物科技公司; SDS、HEPES、Sorbitol、Tris、30% 丙烯酰胺购自上海生工, 氨苄霉素购自 Sigma 公司. 台式高速离心机, Odyssey 双色红外激光成像系统, 电泳槽等.

1.2 实验方法

1.2.1 生物信息学分析

粟酒裂殖酵母 *atp10* 基因和蛋白序列来源于酵母基因组数据库 PomBase (*S. pombe*-GeneDB, <http://www.pombase.org/>); 芽殖酵母 *ATP10* 基因和蛋白序列来源于 NCBI 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>); 用 AlignX 对所查到蛋白序列进行 Clustal W 序列比对分析; 线粒体信号肽预测分析采用 MitoProt II (<http://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html>) 网站.

1.2.2 $\Delta atp10$ 突变体点圈实验

分别接种活力较好的 yHL6381、 $\Delta atp10$ 的单菌落于 5 mL 的 YES 液体中, 于 30 °C, 200 r/min 恒温摇床中培养过夜; 再转接到新鲜的 YES 液体至 OD₆₀₀ 为 0.2 左右, 于 30 °C, 200 r/min 恒温摇床中继续培养至 OD₆₀₀ 为 2~3; 收菌, 水洗; 调整起始 OD₆₀₀ ≈ 3, 依次按照 10 倍梯度稀释, 最后取 2.5 μL 点圈于 YES、YES+3%、YES+2% 半乳糖固体培养基中; 30 °C 恒温培养数天, 拍照.

1.2.3 Atp10 荧光定位分析

挑选平板上的目的菌株于 EMM-leucine 液体培养基中培养过夜, 转接至新鲜培养基使起始 OD₆₀₀ ≈ 0.2, 培养至 OD₆₀₀ 为 0.6~0.8, 取 1.5 mL 菌液 PBS 洗细胞一次, 最终悬浮于 200 μL PBS (含浓度为 2 nmol/L 的 MitoTracker Red 染料) 中, 室温染色 5 min, 离心弃上清, 加入 100 μL PBS, 取 2.5 μL 于 Zeiss Axio imager A1 microscope (Zeiss, Jena, Germany) 进行荧光观察.

1.2.4 Western blotting 检测酵母细胞中线粒体编码蛋白的含量

提取 yHL6381、 $\Delta atp10$ 菌株的线粒体, 将样品上样于 10% 聚丙烯酰胺凝胶进行 SDS-PAGE 电泳, 转硝酸纤维素膜, 300 mA, 100 min. 封闭液 (0.137 mol/L NaCl, 0.02 mol/L Tris, 5% 脱脂奶粉, w/v) 封闭 NC 膜 2 h. TBST 缓冲液 (0.02 mol/L Tris, 0.137 mol/L NaCl, 0.1% Tween 20, 调 pH 至 7.6) 振荡清洗, 分别按比例加入一抗 anti-HSP60 (1:2 000)、anti-Cob1 (1:1000)、anti-Cox1 (1:1 000)、anti-Cox2 (1:500)、anti-Atp6 (1:1 000) 4 °C 过夜, TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min, 再加入二抗, 避光孵育 4 h, ODYSSEY 激光扫描显示结果.

2 结果

2.1 粟酒裂殖酵母 Atp10 生物信息学分析

SpAtp10 的同源性及线粒体信号肽分析:通过在 NCBI 和 PomBase 分别得到芽殖酵母 ATP10 和裂殖酵母 Atp10 的氨基酸序列,Atp10 蛋白由 276 个氨基酸残基组成,预测的分子量为 31.38 kDa。由图 1 可知,在比对的氨基酸序列中位点完全一致性为 17.6%,保守性为 30.4%,半保守性为 34.3%。随后通过 MitoProt II 分析发现,Atp10 蛋白有一段线粒体定位序列 MAYNYLKNLVIPRLIVKHQFKLRSFSTKSLND,SpAtp10 定位于线粒体的概率为 79.74%。已有实验证明,对已知定位于线粒体的信号肽预测结果大于 76%^[17],因此预测 Atp10 是一个线粒体蛋白,对于线粒体正常行使其功能十分重要。

Sp-Atp10	1	MAYNYLKNLVIPRLIVKHQFK-----LRSFSTKSLNDTKEKAPSALI	42
		:... 	
Sc-Atp10	1	-----MQGTFKRFRFYHPTLTRMSFLDKFLKPMMATASPKKEY	35
Sp-Atp10	43	PVGLLVKPTMLSEV-QKPTLWEK---LTKPASTSSPEQRQKELLNEMKRS	88
		:.:: .:. ...:	
Sc-Atp10	36	QIKQLVKPIGLTQAPRKSTKYSQGNLSLRDMFDSEKTNHRVKELAVEFSKS	85
Sp-Atp10	89	TIQDFNEVRRFNGKLFYSPRLFKESALWMYNFHGKSLRNQYKELYKDW	138
		:.: ...:..	
Sc-Atp10	86	GLYDVQVFQKTKGKLFIAVSYWKEDKALFFPHLIGTAMDGKQNIEDM	135
Sp-Atp10	139	-QGSPFFAFALFSNAPGENQCRNWIQHLA---PFDY-----LPVRYAN	176
		:: .:.	
Sc-Atp10	136	LRGKTSIVRLFSTASGDKLSSSYFQGIVDDNKKTDYLTADARLSLNDN	185
Sp-Atp10	177	VQ---SNLIKYLQKIFIGKVKRSIPEKCWNEYITAYDNKFSF-----	216
		. :..:..:..:.. ...:..:..	
Sc-Atp10	186	VQIIEVNLVENAVKSALVKTLAR-----WANRVPSWRQPFYFECRQGW	229
Sp-Atp10	217	-----PEIGWNNKLVGNVYLIDDSCKIRWLTGDPNTVEIENLKAIAKFL	261
		
Sc-Atp10	230	PFSVREELFCN-----	240
Sp-Atp10	262	VNKNVG	267
Sc-Atp10	241	-----	240

“|”表示参与比对的序列在该位点是完全一致的;“:”表示在该序列可以观察到保守的替换;“.”表示在该序列可以观察到半保守的替换。

图 1 芽殖酵母 ATP10 和裂殖酵母 Atp10 的蛋白序列比对

Fig. 1 Sequence alignment of ATP10 from budding yeast and Atp10 from *S. pombe*

2.2 $\Delta atp10$ 突变体表型研究

为了研究 Atp10 在粟酒裂殖酵母中的基本功能,分别把野生型 yHL6381 和 $\Delta atp10$ 突变体以一系列的稀释倍数点在含有不同碳源的 YES、YES+3%甘油、YES+2%半乳糖培养基中,培养 4 d~5 d 后,进行拍照观察如图 2 所示,发现以葡萄糖为唯一碳源的 YES 培养基中 yHL6381 和 $\Delta atp10$ 生长状况几乎一致,而在以甘油和半乳糖为唯一碳源的培养基中 $\Delta atp10$ 生长明显受到抑制。 $\Delta atp10$ 在非发酵型培养基上不能正常生长说明 Atp10 的缺失导致突变体的有氧呼吸不能正常进行,线粒体呼吸链受到了损伤。

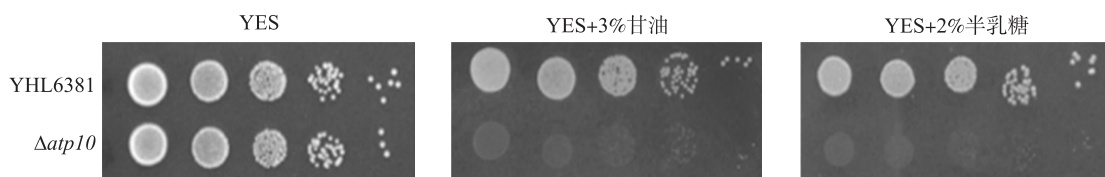


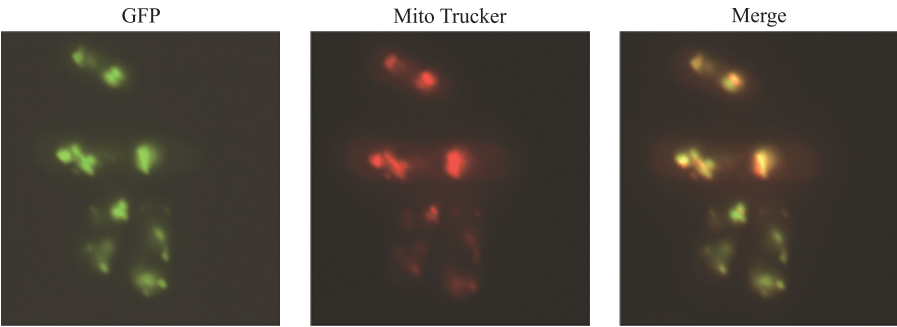
图 2 yHL6381 菌株和 $\Delta atp10$ 菌株在不同碳源培养基上的生长情况

Fig. 2 Deletion of *atp10* results in rapid loss of cell viability on YES+3% Gly or YES+2% Gal

2.3 荧光显微镜观察 Atp10-GFP 定位于线粒体

从生物信息学分析,Atp10 的 N 端含有 32 个氨基酸残基组成的线粒体定位序列,由点圈实验可知,

Atp10 的缺失导致线粒体呼吸链受损,阻碍线粒体功能的正常发挥. 为进一步确定 Atp10 的定位,构建 PYJ19-Atp10-GFP 菌株,利用线粒体染料标出胞内线粒体的位置,Mito Tracker Red 是一种用于染活细胞线粒体的染料,在荧光显微镜 Red 通道下发出红色荧光. Atp10-GFP 能够呈现绿色荧光. 如图 3 所示,在同一视野下红色荧光和绿色荧光可相互重叠呈现黄色荧光,即说明 Atp10 定位在线粒体,进一步证明 Atp10 在线粒体中发挥一定功能.



GFP:绿色荧光;Mito Tracker Red:红色荧光;Merge:GFP 和 Mito Tracker Red 融合

图 3 Atp10-GFP 荧光显微镜观察

Fig. 3 Sequence alignment microscopic observation of Atp10-GFP

2.4 Atp10 的缺失导致线粒体相关蛋白的表
达量下降

真核生物的电子传递链和氧化磷酸化都是在线粒体中发生作用,Atp10 与 ATP 合酶的组装有关,缺失 Atp10 的菌株不能在非发酵型培养基中正常生长. 因此,为进一步研究 Atp10 与线粒体呼吸链的关系,在实验室已有的条件下检测线粒体呼吸链复合体相关蛋白的含量. Cox1、Cox2 参与组成呼吸链复合体 IV,Atp6 参与组成复合体 V,Cob1 参与组成复合体 III,这些都属 于线粒体基因组自身编码的蛋白. 如图 4 所示,以线粒体蛋白 Hsp60 作为蛋白内参. 与野生型菌株 yHL6381 相比, $\Delta atp10$ 菌株中 Cox1、Cox2、Atp6、Cob1 的表达量几乎丧失. 这就意味着线粒体呼吸链上的复合体,不能正常组装. 因此,Atp10 参与线粒体呼吸链复合体亚基的组成,这对线粒体呼吸链功能的正常发挥至关重要.

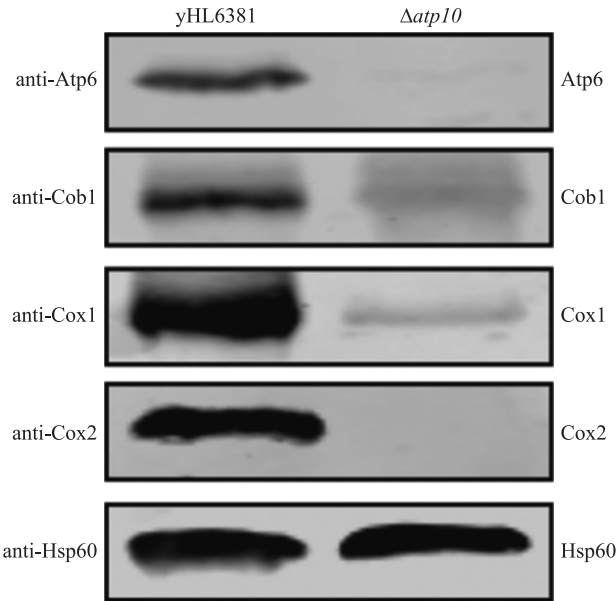


图 4 Western blotting 检测 $\Delta atp10$ 线粒体蛋白的含量

Fig. 4 Deletion of *atp10* reduced some mitochondrial proteins

3 讨论

酵母作为一种人们熟悉的生物,广泛应用于科研领域,根据生殖方式的不同分为芽殖酵母和裂殖酵母. 在 2002 年,粟酒裂殖酵母的基因组测序已经完成,粟酒裂殖酵母含有 4 824 个编码蛋白质的基因,是已知真核生物中最少的,为人类基因组的研究提供借鉴,而且能构建更加适合真核生物基因的表达系统^[18]. 基因敲除是利用一段已知的外源性 DNA 与受体细胞基因组中的特定序列发生同源重组,整合受体细胞并得以稳定表达,令特定基因功能丧失,进而研究该基因的生物学功能^[19]. 本文通过基因敲除技术获得 $\Delta atp10$ 突变体,再进一步研究其功能.

早期研究报道,芽殖酵母 ATP10 编码线粒体 ATPase 中 F₀ 亚基的相关蛋白,主要参与 F₀ 单元中亚基 6 的组装^[20]. 裂殖酵母 Atp10 是芽殖酵母 ATP10 的同源蛋白,通过 PomBase 网站得知 *atp10* 基因大小为 804 bp,共编码 267 个氨基酸. 从生物信息学分析,Atp10 含有 32 个氨基酸残基组成的线粒体定位序列,与

芽殖酵母 ATP10 的同源性高达 79.74%。芽殖酵母 ATP10 的功能已经研究透彻。粟酒裂殖酵母 Atp10 是否有相似的功能?为进一步证明 Atp10 定位在线粒体且与线粒体氧化磷酸化相关,借助 nmt1 启动子调控下的 Atp10 蛋白 C 端 GFP 绿色荧光标签,检测 Atp10 在细胞中的亚定位。线粒体呼吸链主要由蛋白质复合体组成,如 NADH 脱氢酶、琥珀酸氧化还原酶、细胞色素还原酶、细胞色素氧化酶和 ATP 合成酶。细胞色素还原酶编码 Cob1,细胞色素氧化酶编码 Cox1、Cox2,而 Atp6 则由 ATP 合成酶编码。线粒体呼吸链复合体经过一系列的氧化还原反应最终形成 ATP,为细胞生命活动提供能量。线粒体呼吸链酶复合体如果不能正常合成,将会引起线粒体功能紊乱,从而引发线粒体相关疾病。ATP 的形成主要通过两条途径:一条是由葡萄糖彻底氧化为 CO₂ 和水,另一条是在没有氧分子参加的条件下,经糖酵解途径产生。本研究利用两种不同的培养基即以葡萄糖为碳源的发酵型培养基和以甘油、半乳糖为唯一碳源的非发酵型培养基的功能差异。发酵型培养基不需要呼吸作用,非发酵型培养基与呼吸作用有关依赖于线粒体功能的正常发挥^[21]。因此从线粒体相关功能出发,探索 Atp10 与线粒体之间的内在联系。

本文主要研究芽殖酵母 ATP10 的同源蛋白 Atp10。敲除 Atp10 构建突变体菌株,发现在以甘油和半乳糖为唯一碳源的培养基中表现呼吸缺陷生长。通过荧光定位实验得出 Atp10 定位在线粒体,进一步说明 Atp10 在线粒体中发挥功能。Western blotting 分析发现,Δ*atp10* 线粒体基因组编码的蛋白 Atp6、Cox1、Cox2、Cob1 的表达量几乎丧失,而这些蛋白是构成线粒体呼吸链复合体的重要组份,这些蛋白的降解直接使得线粒体呼吸链复合体不能正常组装,影响细胞的氧化磷酸化。这也解释了 Atp10 为什么在非发酵培养中不能正常生长。

[参考文献]

- [1] VO T D, PALSSON B O. Building the power house: recent advances in mitochondrial studies through proteomics and systems biology[J]. American journal of physiology-cell physiology, 2007, 292(1): 164–177.
- [2] LURIN C I, ANDRÉS C, AUBOURG S, et al. Genome-wide analysis of Arabidopsis pentatricopeptide repeat proteins reveals their essential role in organelle biogenesis[J]. Plant cell, 2004, 16(8): 2089–2103.
- [3] PAPA S, SCACCO S, SCHLIEBS M, et al. Mitochondrial diseases and aging[J]. Molecular aspects of medicine, 1996, 17(6): 513–563.
- [4] RAULE N, SEVINI F, SANTORO A, et al. Association studies on human mitochondrial DNA: methodological aspects and results in the most common age-related diseases[J]. Mitochondrion, 2007, 7(1/2): 29–38.
- [5] DOWLING D K. Evolutionary perspectives on the links between mitochondrial genotype and disease phenotype.[J]. Biochimica Et Biophysica Acta, 2014, 1840(4): 1393–1403.
- [6] SCHON E A, DIMAURO S, HIRANO M. Human mitochondrial DNA: roles of inherited and somatic mutations[J]. Nature reviews genetics, 2012, 13(12): 878–890.
- [7] NEWSHOLME P, GAUDEL C, KRAUSE M. Mitochondria and diabetes: an intriguing pathogenetic role[J]. Advances in experimental medicine and biology, 2012(942): 235–247.
- [8] JAMES A M, COLLINS Y, LOGAN A, et al. Mitochondrial oxidative stress and the metabolic syndrome[J]. Trends in endocrinology and metabolism, 2012, 23(9): 429–434.
- [9] HATAKEYAMA H, GOTO Y I. Respiratory chain complex disorganization impairs mitochondrial and cellular integrity: phenotypic variation in cytochrome c oxidase deficiency[J]. American journal of pathology, 2017, 187(1): 110–121.
- [10] MAYR J A, HAACK T B, FREISINGER P, et al. Spectrum of combined respiratory chain defects[J]. Journal of inherited metabolic disease, 2015, 38(4): 629–640.
- [11] ROLOFF G A, HENRY M F. Mam33 promotes cytochrome c oxidase subunit I translation in *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria[J]. Molecular biology of the cell, 2015, 26(16): 2885–2894.
- [12] CROSS R L. The mechanism and regulation of ATP synthesis by F₁-ATPases[J]. Annu Rev Biochem, 1981, 50: 681–714.
- [13] WALKER J E, FEARNLEY I M, GAY N J, et al. Primary structure and subunit stoichiometry of F₁-ATPase from bovine mitochondria[J]. Journal of molecular biology, 1985, 184(4): 677–701.
- [14] FUTAI M, KANAZAWA H. Structure and function of proton-translocating adenosine triphosphatase (F₀F₁): biochemical and molecular biological approaches[J]. Microbiological reviews, 1983, 47(3): 285–312.

- [15] TZAGOLOFF A, MEAGHER P. Assembly of the mitochondrial membrane system. V. properties of a dispersed preparation of the rutamycin-sensitive adenosine triphosphatase of yeast mitochondria[J]. The journal of biological chemistry, 1971, 246(23): 7328-7336.
- [16] ALEXANDER T, ANTONI B, WALTER N, et al. Atp10p assists assembly of Atp6p into the Fo unit of the yeast mitochondrial ATPase[J]. The journal of biological chemistry, 2004, 279(19): 19775-19780.
- [17] CLAROS M G, VINCENS P. Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences[J]. European journal of biochemistry, 1996, 241(3): 779-786.
- [18] 岳强, 周惠. 粟酒裂殖酵母——一种良好的真核模式生物[J]. 韶关学院学报, 2003, 24(3): 100-102.
- [19] 黄敏. 基因敲除技术及其应用[J]. 广东轻工职业技术学院学报, 2009, 8(4): 12-14.
- [20] PAUL M F, BARRIENTOS A, TZAGOLOFF A. A single amino acid change in subunit 6 of the yeast mitochondrial ATPase suppresses a null mutation in ATP10[J]. The journal of biological chemistry, 2000, 275(38): 29238-29243.
- [21] DE J P, VAN DIJKEN J P, PRONK J T. Metabolic fluxes in chemostat cultures of *Schizosaccharomyces pombe* grown on mixtures of glucose and ethanol[J]. Microbiology, 1996, 142(6): 1399-1407.

[责任编辑: 黄 敏]

(上接第108页)

- [5] 张庆庆, 金鑫强, 陈剑翔, 等. 发酵液中 γ -聚谷氨酸含量快速测定方法研究[J]. 食品工业科技, 2012, 19: 294-296.
- [6] ING-LUNG S, YI-TSONG V. The production of poly-(γ -glutamic acid) from microorganisms and its various applications[J]. Bioresource technology, 2001, 79(3): 207-225.
- [7] 朱凡, 吕忠良, 杨叶东, 等. 高黏发酵液中 γ -聚谷氨酸的分离纯化工艺[J]. 化学工程, 2013, 41(12): 9-11.
- [8] EZZELL J W, WELKOS S L. The capsule of *Bacillus anthracis*, a review[J]. J Appl Microbiol, 1999, 87(2): 250.
- [9] 李德衡, 赵兰坤, 李树标. γ -聚谷氨酸的生物合成及应用研究进展[J]. 发酵科技通讯, 2012, 41(3): 12-16.
- [10] 李江涛, 郑涛. 介孔碳材料对亚甲基蓝的吸附特性研究[J]. 西安文理学院学报(自然科学版), 2010, 13(1): 48-53.
- [11] 肖敏, 李丽, 钟龙飞, 等. 活性炭吸附法处理印染废水的研究[J]. 辽宁化工, 2009, 38(8): 537-539.
- [12] 王静心, 李政, 张秋亚, 等. 亚甲基蓝染液的 γ -PGA水凝胶脱色处理[J]. 印染, 2013, 24: 1-5.
- [13] MEHMET D, MAHIR A, AYDM T, et al. Kinetics and mechanism of removal of methylene blue by adsorption onto perlite[J]. Journal of hazardous materials, 2004, 109: 141-148.

[责任编辑: 黄 敏]