

• 生物技术与方法 •

pH 对生物合成超声分子影像探针气囊充放气的调控

龚钰翔^{1,2}, 龙欢^{1,2*}, 黄开耀^{1,2*}

1 中国科学院水生生物研究所 中国科学院藻类生物学重点实验室, 湖北 武汉 430072

2 中国科学院大学, 北京 100049

龚钰翔, 龙欢, 黄开耀. pH 对生物合成超声分子影像探针气囊充放气的调控[J]. 生物工程学报, 2023, 39(10): 4308-4321.

GONG Yuxiang, LONG Huan, HUANG Kaiyao. Regulation of pH on inflation and deflation of biosynthetic gas vesicles used as ultrasound molecular imaging probes[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(10): 4308-4321.

摘要: 气囊(gas vesicles, GVs)是一种存在于蓝藻及古菌等微生物中调节浮力的类细胞器纳米结构, 由蛋白质外壳包裹气体组成。近年来的研究表明, 气囊具有作为超声分子影像探针的潜力。然而, 气囊的充放气机制并不明确, 限制了生物合成超声分子影像探针的保存和气体更换。本研究发现环境 pH 值是调节气囊充放气的一个重要因素。其不仅可以调节藻细胞内的气囊充放气进而使微囊藻呈现不同的漂浮状态, 还可对提纯的气囊充放气进行体外调节, 且该调节过程可逆。该机制的阐明为生物合成超声分子影像探针的大规模生产和保存, 特别是对气囊中的气体进行更换以满足不同的诊疗需求提供了技术支持, 助力生物合成超声造影剂在疾病诊疗中的应用。

关键词: 气囊; pH 值; 生物合成; 超声分子影像探针

Regulation of pH on inflation and deflation of biosynthetic gas vesicles used as ultrasound molecular imaging probes

GONG Yuxiang^{1,2}, LONG Huan^{1,2*}, HUANG Kaiyao^{1,2*}

1 Key Laboratory of Algal Biology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, Hubei, China

2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: Gas vesicles (GVs) are gas-filled protein nanostructures that can regulate the buoyancy of microorganisms such as cyanobacteria and archaea. Recent studies have shown that

资助项目: 国家重点研发计划(2020YFA0908801)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2020YFA0908801).

*Corresponding authors. E-mail: HUANG Kaiyao, huangky@ihb.ac.cn; LONG Huan, huanlong@ihb.ac.cn

Received: 2023-03-27; Accepted: 2023-06-03

GVs have the potential to be used as ultrasound molecular imaging probes in disease diagnosis and treatment. However, the mechanism of the inflation and deflation of GV s remains unclear, which hampers the preservation of GV s and gas replacement. In the present study, the environmental pH value was found to be an important factor in regulating the inflation and deflation of GV s. It can not only regulate the inflation and deflation of GV s *in vivo* to make *Microcystis* sp. cells present distinct levitation state, but also regulate the inflation and deflation of purified GV s *in vitro*, and the regulation process is reversible. Our results may provide a technical support for the large-scale production and preservation of biosynthetic ultrasound molecular imaging probes, especially for gas replacement to meet different diagnostic and therapeutic needs, and would facilitate the application of biosynthetic ultrasound molecular imaging probes.

Keywords: gas vesicles; pH value; biosynthesis; ultrasound molecular imaging probes

气囊(gas vesicles, GV s)是一种中空的、由蛋白质外壳包裹气体的类似于细胞器的纳米结构^[1]。气囊常见于原核生物,如蓝藻、缺氧光合细菌、嗜冷异养细菌以及嗜盐古菌中,为它们提供浮力,使其获得更好的营养或光照^[2-5]。气囊壁的内表面疏水,外表面亲水^[6]。其主要成分是一种疏水性结构蛋白 GvpA,每一个 GvpA 分子折叠成卷曲- α 螺旋 1- β 折叠- β 折叠- α 螺旋 2-卷曲(coil- α 1- β - β - α 2-coil)的结构,它们以左手螺旋进行延伸形成气囊壁肋骨结构,并以每圈约 92 个单体的排列形式(巨大芽孢杆菌气囊)组装成气囊壁的主框架^[7-8]。气囊壁的另一结构蛋白是具有 33 个氨基酸重复序列的亲水性蛋白 GvpC,其粘附在气囊壁上并起到稳定主框架结构的作用^[9]。不同物种中合成的气囊尺寸和形态有差别,主要包括两端双锥状的圆柱体形(cylinder-shaped)和纺锤形(spindle-shaped)两类^[2]。导致气囊形态不同的主要原因是物种间编码气囊的操纵子存在差异,气囊操纵子由 8-14 个基因组成,除了编码主要结构蛋白的 *gvpA* 和 *gvpC* 外,还有 *gvpD*、*gvpE*、*gvpF*、*gvpG*、*gvpJ*、*gvpK* 和 *gvpN* 等其他气囊基因,其中调节基因 *gvpD*、*gvpE* 可能负责调控气囊基因簇的整体表达水平,*gvpN* 发挥引导双锥形气囊向圆柱体形气囊组装的功能^[10-13],气囊操纵子如

何协调地控制气囊合成的机制目前并不明晰。

近年来的研究发现生物合成的气囊具有应用到超声医学成像方面的潜力^[14-16]。超声造影是临床诊断和生物医学研究中最常用的成像方式之一,其原理是利用气体微泡在超声下散射回声增强,进而提高超声诊断的分辨力和特异性的技术^[17]。蓝藻合成的气囊在超声下可产生谐波信号^[14,18],可在裸鼠血液循环中持续存在 10 h 以上^[19]。纳米级的尺寸使其易于透过血管壁被动靶向在肿瘤区域积累并成像^[19],气囊外壳蛋白上易修饰多种其他探针和靶向药物^[20],优于目前临床上使用的微米级造影剂,有助于实现诊疗一体化。目前通过基因工程手段在大肠杆菌和哺乳动物细胞中成功表达气囊^[21-22],为大规模获得生物合成的超声分子影像探针及其在医学中的应用打下基础。

水不能透过气囊的蛋白外壳,但气体可以自由透过,使内部和外部压力之间保持动态平衡,确保气囊在 4 °C 的中性 pH 环境下可以保存长达数周甚至数月^[8,23];但气囊在受到压力的情况下会发生坍塌并释放内部气体^[24],进而失去超声造影属性。因此,如何保存气囊的完整状态将成为研发生物合成超声分子影像探针的挑战之一;而弄清气囊充放气的分子机制是解决该问题的前提。

本研究发现环境 pH 值可以调控气囊的充放气,不同 pH 的缓冲液处理不仅可以调节微囊藻细胞内的气囊充放气,还可以使分离纯化的气囊在体外发生可逆的放气与充气,该结果为大规模生物合成超声分子影像探针的保存和气体的更换等医学应用提供理论和技术支持。

1 材料与amp;方法

1.1 微囊藻的培养及用不同 pH 处理

本研究所用的微囊藻 FACHB-2329 来自国家水生生物种质资源库(<http://algae.ihb.ac.cn/>)。培养条件:将微囊藻接种至装有 250 mL 无菌 BG11 培养基的 500 mL 锥形瓶中,28 °C、光强为 20–40 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 静置培养。每天手动摇匀 3–5 次。当微囊藻生长 14 d 至对数期后,600 \times g 离心 20 min 浓缩收集上层藻细胞。浓缩后将藻浓度调至 1.5×10^8 个/mL,将其与等体积不同 pH 的无菌 BG11 培养基混匀,置于 7.0 mL 无菌管或 1.5 mL EP 管中静置,不同时间点对其进行拍照观察。

BG11 培养基:1 L 去离子水中含有 1 500 mg NaNO_3 、40 mg K_2HPO_4 、75 mg $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、36 mg $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、6 mg 柠檬酸、6 mg 柠檬酸铁、1 mg Na_2EDTA 、20 mg Na_2CO_3 、1 mL A5 (trace mental solution);其中 A5 组成为 1 L 去离子水中含有 2.860 g H_3BO_3 、1.860 g $\text{MnCl}_2\cdot \text{H}_2\text{O}$ 、0.222 g $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.079 g $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、0.390 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 和 0.049 g $\text{Co}(\text{NO}_3)_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 。

1.2 气囊分离纯化

气囊依照优化后的高渗裂解法进行提取^[19]。首先,向培养的微囊藻中加入青霉素 G 和氯化镁溶液,使其终浓度分别为 0.16 mg/L 和 1 mmol/L。将培养物置于光照培养箱中,摇床培养 5 h (60–70 r/min)。随后将藻细胞在 4 °C、600 \times g 条件下离心 20 min,离心后用 10 mL 注射器将漂浮藻层吸入新的离心管中,弃掉中层培养基并

重悬底部藻沉淀。浓缩完毕后,在细胞悬液中加入终浓度为 0.1 mg/mL 的溶菌酶,37 °C 孵育 1 h。孵育后向裂解液中加入终浓度为 1 mol/L 的甘油,混合均匀。然后,快速加入 3 倍体积的 40 mmol/L Tris-HCl (pH 7.7),将混合液置于 4 °C 冰箱中过夜。次日将混合液在 4 °C、400 \times g 离心 3 h,用 5 mL 注射器收集离心后顶部白色悬浮层,即为气囊,重复离心收集气囊层。将气囊用 1 \times 磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffered saline, PBS)洗涤,4 °C、400 \times g 离心 1 h,重复 3 次。清洗后的气囊保存于 4 °C。

1.3 负染制样和透射电镜观察

本研究所用电子显微镜(HT-7700, Hitachi)为中国科学院水生生物研究所分析测试中心平台仪器。负染样品制备:用镊子夹住含碳支撑膜的铜网,将 10 μL 样品滴在铜网上,室温放置 3–5 min,用滤纸吸走铜网上剩余液体,室温干燥 3–5 min。将 10 μL 3%的磷钨酸滴到铜网上,室温染色 3–5 min,用滤纸吸走染液。铜网干燥 3–5 min 后用透射电子显微镜观察拍照。

1.4 过氧化氢(H_2O_2)或十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)体外处理气囊

配制 30% (9.8 mol/L)的 H_2O_2 母液和 8%的 SDS 母液。利用酶标仪(MOLECULAR DEVICES)测量纯化气囊的 OD_{500} 值,通过离心浓缩或是 1 \times PBS 稀释,将气囊 OD_{500} 值调整为 1.0。向 96 孔板每孔内各加入 40 μL 纯化的 $OD_{500}=1.0$ 的气囊,将母液与气囊以不同比例混合,使各实验组 H_2O_2 终浓度分别为 8、5、1 mol/L;SDS 终浓度分别为 4.0%、1.0%和 0.5%。同时每组用 1 \times PBS 补齐至相同体积,于不同时间点测定 OD_{500} 值并绘制曲线。

1.5 盐酸(HCl)或氢氧化钠(NaOH)体外处理气囊

配制 7.5 mol/L 的 HCl 或 NaOH 母液。利

用酶标仪测量纯化气囊的 OD_{500} 值, 通过离心浓缩或是 $1\times$ PBS 稀释, 将气囊 OD_{500} 值调整为 1.0。向 96 孔板每孔内各加入 40 μ L 纯化的 $OD_{500}=1.0$ 的气囊, 将母液与气囊以不同比例混合, 使各实验组 HCl 终浓度分别为 5.0、1.5、0.5 mol/L; NaOH 终浓度分别为 5.0、1.5、0.5 mol/L。同时每组用 $1\times$ PBS 补齐至相同体积, 于不同时间点测定 OD_{500} 值并绘制曲线。

1.6 不同 pH 处理纯化的气囊

配制不同 pH 的 0.5 mol/L Tris-HCl 缓冲液母液, 使其与在 $1\times$ PBS 中储存的气囊以 2:1 比例混合后, pH 分别为 1.0、2.5、6.0、7.0、9.0、11.0、13.0。利用酶标仪测量气囊的 OD_{500} 值, 通过离心浓缩或是 $1\times$ PBS 稀释, 将气囊 OD 调整为 1.8。向 96 孔板内加入 40 μ L $OD_{500}=1.8$ 的气囊, 从左至右为 Control、1.0、2.5、6.0、7.0、9.0、11.0 和 13.0 组, 分别加入 80 μ L $1\times$ PBS 和配制的不同 pH 0.5 mol/L Tris-HCl 缓冲液母液并混匀。间隔不同时间测定 OD_{500} 值, 并于黑色背景下对 96 孔板拍照记录不同时间点气囊的变化情况。

1.7 酸处理气囊后调节 pH 至中性或碱性

配制不同 pH 的含 2%青/链霉素双抗(BL505A, biosharp)的 0.5 mol/L Tris-HCl 缓冲液母液, 使得其与 pH 2.5 的在 $1\times$ PBS 中储存的气囊以 2:1 比例进行稀释后, pH 值分别为 6.0、7.0、9.0 和 11.0。利用酶标仪测量纯化气囊的 OD_{500} 值, 通过离心浓缩或是 $1\times$ PBS 稀释, 将气囊 OD 调整为 1.8, 并向其中加入 2%青/链霉素双抗。向 96 孔板内加入 40 μ L 上述气囊, 随后向其中加入 2.2 μ L 0.25 mol/L 的 HCl 并混匀, 将 pH 调至 2.5, 每隔 15 min 观察拍照。酸处理 60 min 后, 向每孔加入 80 μ L 配制好的不同 pH 值 0.5 mol/L Tris-HCl 缓冲液母液并混匀, 将 96 孔板置于 28 $^{\circ}$ C 环境下静置, 间隔不同时间测定 OD_{500} 值

并拍照记录。

1.8 碱处理气囊并调节 pH 至中性或酸性

配制不同 pH 的含 2%青/链霉素双抗(BL505A, biosharp)的 0.5 mol/L Tris-HCl 缓冲液母液, 使得其与 pH 13.0 的在 $1\times$ PBS 中储存的气囊以 2:1 比例进行稀释后, pH 值分别为 4.0、6.0、7.0、9.0、11.0、12.0。利用酶标仪测量纯化气囊的 OD_{500} 值, 通过离心浓缩或者 $1\times$ PBS 稀释, 将气囊 OD 调整为 1.8, 并向其中加入 2%青/链霉素双抗。向 96 孔板内加入 40 μ L 上述气囊, 随后向其中加入 9.0 μ L 2.0 mol/L 的 NaOH, 调整 pH 至 13.0, 每隔 15 min 进行拍照。碱处理 60 min 后, 向每孔加入 80 μ L 配制好的不同 pH 值 0.5 mol/L Tris-HCl 缓冲液母液并混匀, 将 96 孔板置于 28 $^{\circ}$ C 环境下静置, 间隔不同时间测定 OD_{500} 值并拍照记录。

1.9 气囊体外超声成像

将实验组和稀释成不同浓度梯度的气囊各 200 μ L 装于 1.5 mL EP 管中, 将 EP 管置于装有纯水的烧杯内部, 保证 EP 管内液面位于纯水液面之下。成像使用临床超声机(飞依诺)和探头(发射频率: 7 MHz)。超声探头直接对准 EP 管内液体, 以输出功率为 100%, 机械指数 MI 为 1.116, 深度 D 为 2.3 cm 进行超声谐波成像。采用 Image J 软件对造影信号强度进行分析。

2 结果与分析

2.1 气囊放气因素的摸索

气囊壁内外压力差达到一定值时, 气囊会发生坍塌并释放气体^[1,25-26]。而本节旨在通过摸索使气囊放气的化学条件, 研究气囊充放气的机制。首先尝试用 4 种化学试剂对纯化的气囊进行处理。用 H_2O_2 、SDS、HCl 及 NaOH 处理后气囊 OD 值变化如图 1 所示, 菱形虚线为 Control 组(存于 pH 7.3 的 $1\times$ PBS 中的气囊), 圆

形、方形和倒三角形实线分别为浓度从高至低的实验组。8 mol/L H_2O_2 处理气囊后其 OD_{500} 值明显下降,降低至处理前的 58% (图 1A)。不同浓度 SDS 处理气囊后, OD_{500} 均下降,分别降低至处理前的 64% (4% SDS)、75% (1% SDS) 和 77% (0.5% SDS) (图 1B)。不同浓度 HCl 处理气囊后,各组 OD_{500} 均大幅下降,其中 1.5 mol/L HCl 组下降最多,降至处理前的 31% (图 1C)。不同浓度 NaOH 处理气囊后,发现 5.0 mol/L 的 NaOH 处理气囊会产生一些絮状物,其可能是气囊蛋白发生变性导致的,进而影响了 5.0 mol/L NaOH 组的吸光度;而其他浓度处理组 OD 值则与对照组相比无显著差异。

对处理后的样品进行负染制样,并用透射电镜(transmission electron microscopy, TEM)观察(图 1E)。发现 8 mol/L H_2O_2 、4% SDS、1.5 mol/L HCl 和 5.0 mol/L NaOH 处理后气囊形态发生改变。其中 1.5 mol/L HCl 和 5.0 mol/L NaOH 处理后的气囊和压力坍塌的气囊形态类似,呈现为透明矩形或圆柱状;而 8 mol/L H_2O_2 、4% SDS 处理后的气囊多为无规则蜷曲状,推测环境 pH 的变化可能调控气囊的放气。

2.2 环境 pH 的变化改变微囊藻的漂浮状态

气囊是调节微囊藻浮力的关键亚细胞结构,胞内气囊含量高的微囊藻漂浮性更好,气囊含量低的漂浮性差。为了观察环境 pH 是否会直接影响微囊藻细胞内气囊的变化,本研究将生长至对数期的微囊藻 FACHB-2329 浓缩后加入不同 pH 值的 BG11 培养基中,并于不同时间点观察其漂浮状况(图 2)。结果显示将微囊藻置于强酸或强碱环境中时(pH 1.0 或 pH 13.0),培养液颜色立即发生改变,分别呈现出褐色和黄绿色。推测在强酸或强碱环境下微囊藻细胞发生裂解,释放其内部色素。静置 1 h 后,pH 2.5

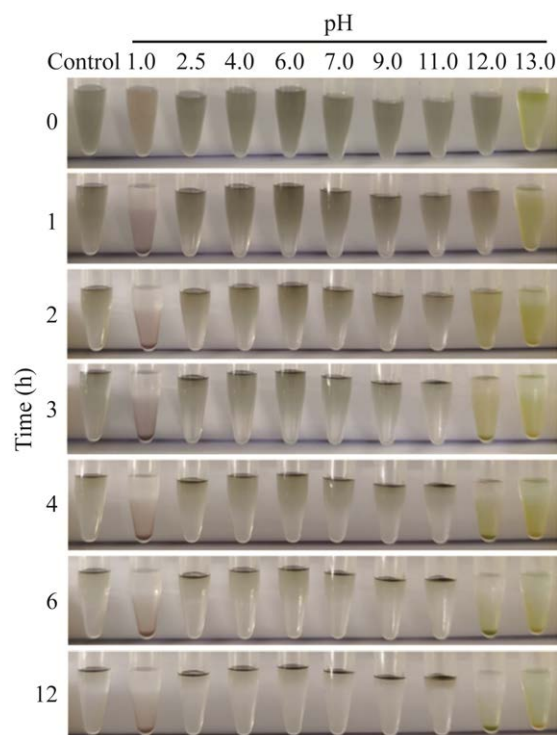


图 2 微囊藻 FACHB-2329 在不同 pH 环境中呈现不同的漂浮状态

Figure 2 *Microcystis* sp. FACHB-2329 showed different levitation states at different environmental pH. The environmental pH of BG11 medium is marked above the EP tubes, where the control group was cultured with sterile BG11 (pH 7.8) and the other groups were cultured with sterile BG11 with adjusted starting pH. From top to bottom are the vertical distribution states of *Microcystis* sp. FACHB-2329 from 0 to 12 h.

至 pH 12.0 组出现较薄的漂浮层。静置 2 h 时,pH 12.0 组微囊藻细胞也发生裂解释放色素,呈现和 pH 13.0 组类似的黄绿色,且此 2 组在静置 3 h 后出现明显沉淀。静置 4 h 后,除 pH 1.0、pH 12.0 和 pH 13.0 以外各组均出现明显漂浮层,但仍有大部分藻悬浮在管中部。静置 12 h 后,各组漂浮状态维持稳定,pH 7.0 和 pH 9.0 组细胞全在漂浮层,未见悬浮在管中部的细胞。该结果证明,环境 pH 值的变化会直接影响微囊藻细胞的漂浮状态,在 pH 7.0–9.0 区间,微囊

藻 FACHB-2329 漂浮性能最好,胞内的充气气囊含量最高。

2.3 强酸碱环境使体外纯化的气囊放气

前述研究表明,培养基中 pH 的变化会影响微囊藻的漂浮性能,本节将研究 pH 的变化是否会导致纯化的气囊发生坍塌并放气。气囊对光有散射作用,故纯化的气囊在 $1\times$ PBS 中呈乳白色,而坍塌后的气囊无法散射光,溶液呈无色透明^[27]。将纯化的气囊添加到不同 pH 值的缓冲液中 1 h 后, pH 1.0、pH 2.5 和 pH 13.0 组中气囊由乳白色变得澄清; OD_{500} 值下降至处理前的 30%、37%和 71% (图 3A、3B),说明在强酸或强碱环境下,纯化的气囊部分发生了坍塌放气;其他组与对照组相比无显著性差异。负染透射电镜结果显示, OD_{500} 值下降最明显的 pH 1.0、pH 2.5 组内大部分(大于 80%)为坍塌状态的气囊; pH 13.0 组内 58%气囊发生坍塌;而其他组仅有少部分气囊坍塌(图 3C、3D)。统计结果表明各 pH 环境下气囊有不同的坍塌率,其中 pH 2.5 组坍塌率为 92.5%; pH 1.0 和 pH 13.0 组分别为 82.2%和 58.0%; pH 7.0 坍塌率最低,仅为 11.7%。

气囊的坍塌率与超声造影信号呈负相关(图 3E、3G),因此对不同 pH 条件下处理后的气囊超声造影属性进行检测(D860lab, 7 MHz)。如图 3G 所示,气囊经 pH 1.0、pH 2.5、pH 11.0 和 pH 13.0 的强酸碱处理后,其超声造影信号变弱,而在 pH 7.0 环境中的气囊超声造影强度最佳(图 3F、3H)。综上所述,强酸(pH 2.5)和强碱(pH 13.0)可以使体外纯化的气囊发生坍塌释放气体,进而削弱了气囊的超声造影能力;后续实验将 pH 2.5 和 pH 13.0 作为使气囊放气的处理参数。

2.4 强酸诱导的气囊放气现象是可逆的

气囊壁是气体透过性的^[28],为了探究坍塌气囊能否再次充气,先用强酸(pH 2.5)处理气囊 1 h, OD_{500} 值降低至处理前的 29% (图 4B)。然

后将环境 pH 调至 6.0、7.0、9.0 和 11.0,测定不同时间点的 OD_{500} 值是否会逐渐恢复。pH 恢复至 6.0 和 7.0 组在孵育至 48–72 h 时 OD_{500} 回升,分别至对照组的 78.5%和 109.4%;其他组 OD_{500} 并无显著变化。对 96 孔板的拍照结果显示, pH 6.0 和 7.0 组在 48 h 后从透明变成乳白色(如红框所示),也证实了坍塌气囊再次充气(图 4C)。

负染透射电镜结果显示 OD_{500} 值回升的 pH 6.0 和 pH 7.0 组出现充气状态的气囊,而 OD_{500} 变化不显著的 pH 9.0 和 pH 11.0 组几乎观察不到充气状态的气囊。统计表明, pH 6.0 和 pH 7.0 组坍塌率明显下降,为 70.7%和 67.9%,显著低于负对照的 92.6% (图 4F)。进一步对样品进行超声成像, pH 6.0 和 pH 7.0 组由于有恢复充气的气囊,因此可检测到超声造影信号,其中 pH 7.0 组造影信号最强;其他组信号对比负对照无明显差异(图 4E、4G)。综上,酸性环境下坍塌并释放气体的气囊可在环境 pH 变为中性(pH 7.0)后,部分恢复充气状态,并重新获得超声造影属性。

2.5 强碱诱导的气囊放气现象是不可逆的

用不同 pH 处理气囊的实验结果显示,强碱性环境(pH 13.0)也可以使气囊部分坍塌(图 3A、3B)。本节旨在研究强碱诱导的气囊放气过程是否可逆。用 pH 13.0 处理气囊 1 h 使 OD_{500} 值降低至处理前的 65% (图 5B),随后将环境 pH 调至 4.0、6.0、7.0、9.0、11.0 和 12.0,测定不同时间点的 OD_{500} 值是否会逐渐恢复。无论将气囊置于哪个 pH 环境,都无法观察到 OD_{500} 值回升的现象(图 5A)。96 孔板的拍照结果也与之一致(图 5C)。对处理组利用负染透射电镜观察,发现了如红圈所示的过度卷曲和一端开口的气囊(图 5D)。证明强碱性(pH 13.0)环境对气囊产生的破坏是不可逆的,即使调至中性 pH 环境也无法使坍塌放气的气囊恢复充气。

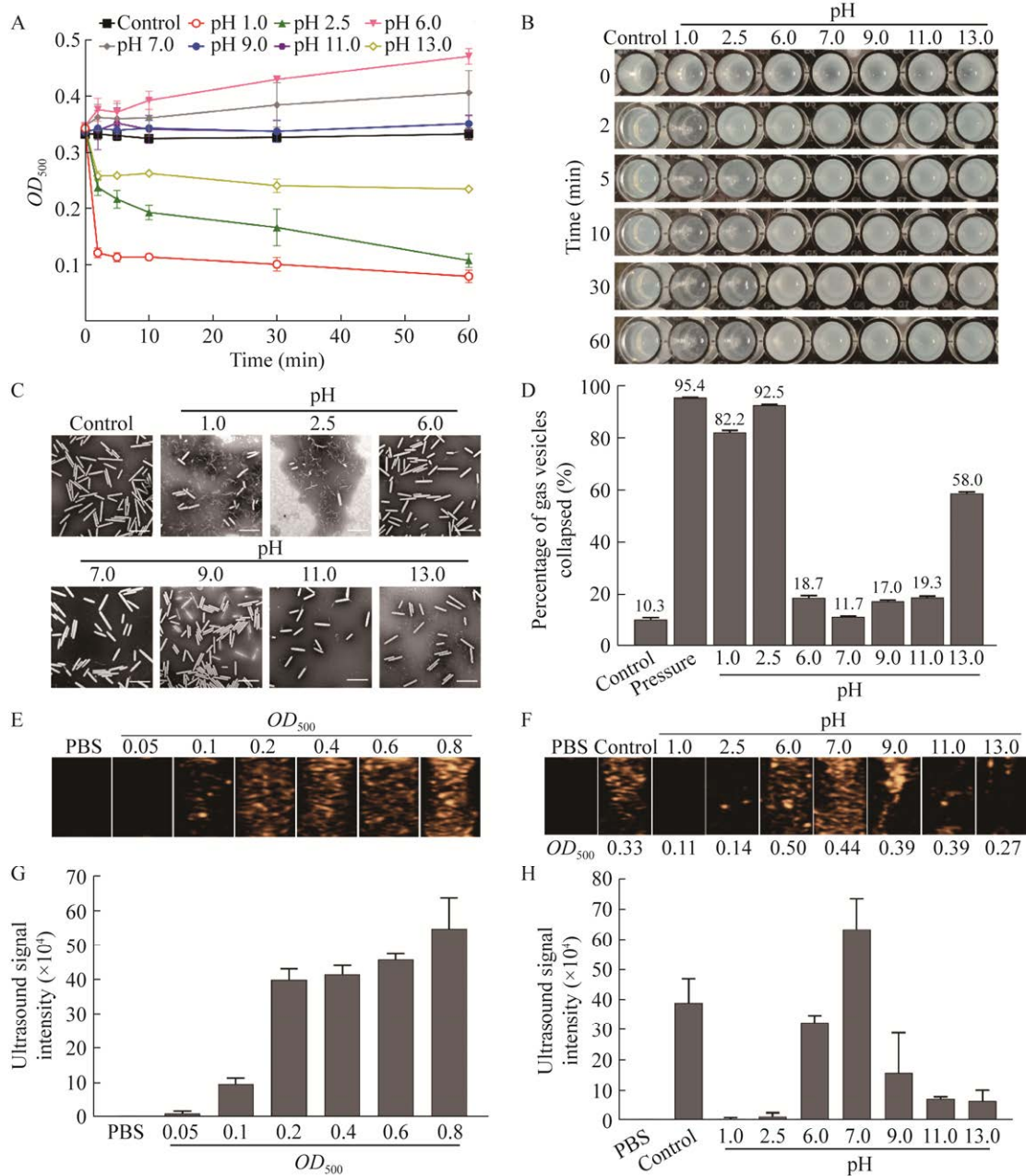


图 3 不同的 pH 处理改变了纯化气囊的充气状态

Figure 3 Changes in the environmental pH caused changes in the inflation status of isolated GVs. A: The concentration of GVs extracted from *Microcystis* sp. FACHB-2329 changed (represented by OD_{500} values) when placed in different environmental pH. B: The photographs were taken at each time point. The environmental pH values are labeled on the top of the 96-well plate, and the time points of the experiments are labeled on the left. C: Representative negative-staining TEM images of the pH-treated experimental groups in A and the control group (gas vesicles preserved in pH 7.3 1×PBS environment). Scale bar=1.0 μ m. D: Statistics of the TEM images, with the vertical axis indicates the proportion of collapsed gas vesicles to the total number, and the mean of the statistics is shown above the bar graph. E: Ultrasound images of purified gas vesicles isolated from *Microcystis* sp. FACHB-2329 at different OD_{500} values. F: Ultrasound images of the experimental and control groups in A after 1 h of treatment. G: Statistics of ultrasound intensity for each group in E. H: Statistics of ultrasound intensity for each group in F. Each experiment was repeated three times with similar results.

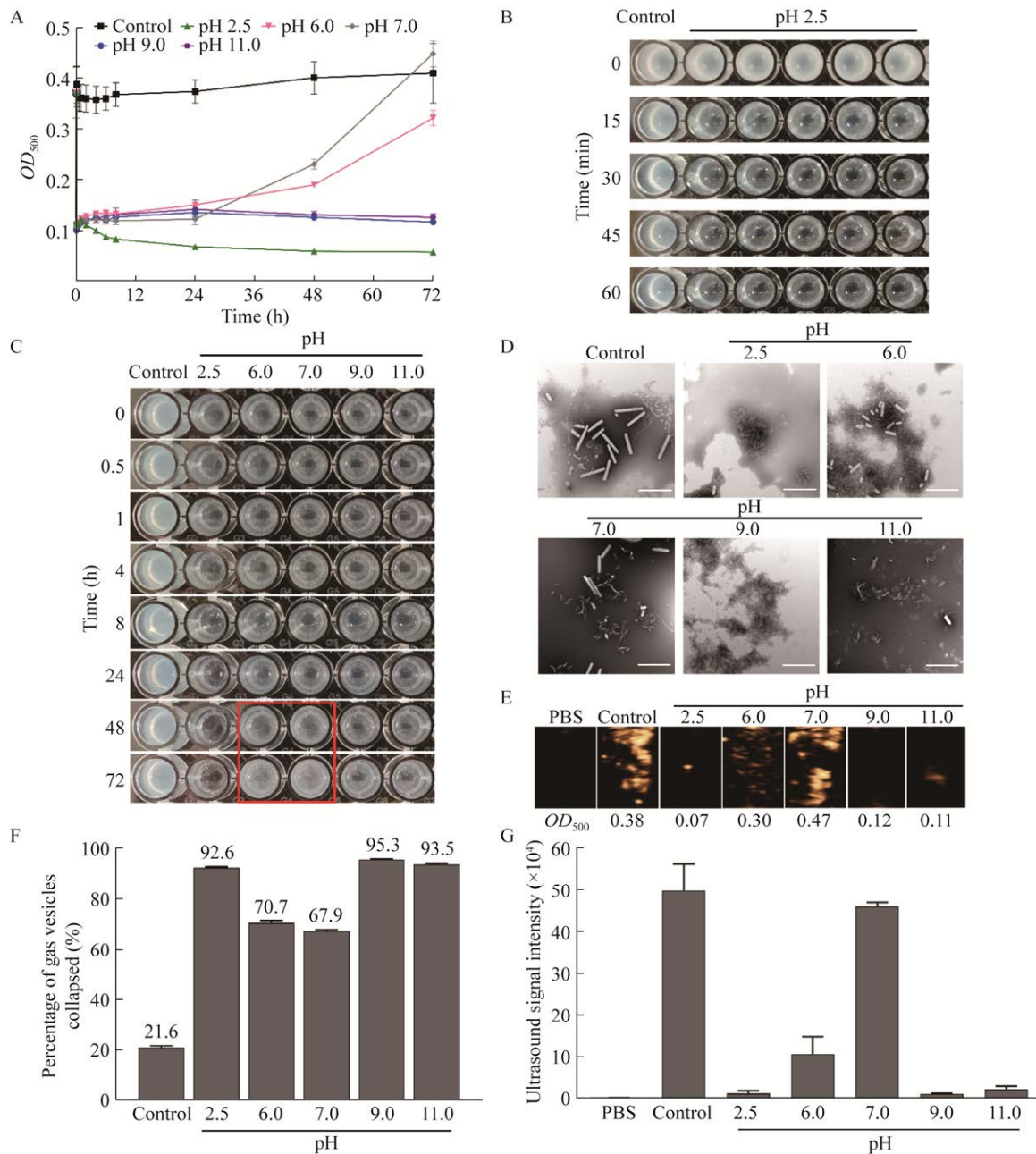


图 4 酸性环境下坍塌的气囊在中性环境下恢复充气

Figure 4 GV which collapsed in acidic environment were restored to their inflation state in neutral environment. A and C: The GV extracted from *Microcystis* sp. FACHB-2329 were treated in pH 2.5 for 1 h and collapsed. Then the pH was adjusted to neutral or alkaline environment and incubated at 28 °C. The changes in GV concentration (represented to by OD_{500} value) and the photographs were taken at each time point. B: Photographic results of GV in a treated with pH 2.5 for 1 h. The environmental pH values are labeled on the top of the 96-well plate, and the time points of the experiments are labeled on the left. D: Representative negative-staining TEM images of each pH-adjusted experimental group and positive/negative control groups in A. Scale bar=1.0 μm . E: Ultrasound images of each pH-adjusted experimental group and positive/negative control groups in A. F: Statistics of TEM images, with the vertical axis indicates the proportion of collapsed GV to the total number, and the mean of the statistics is shown above the bar graph. G: Statistics of ultrasound intensity for each group in E. Each experiment was repeated three times with similar results.

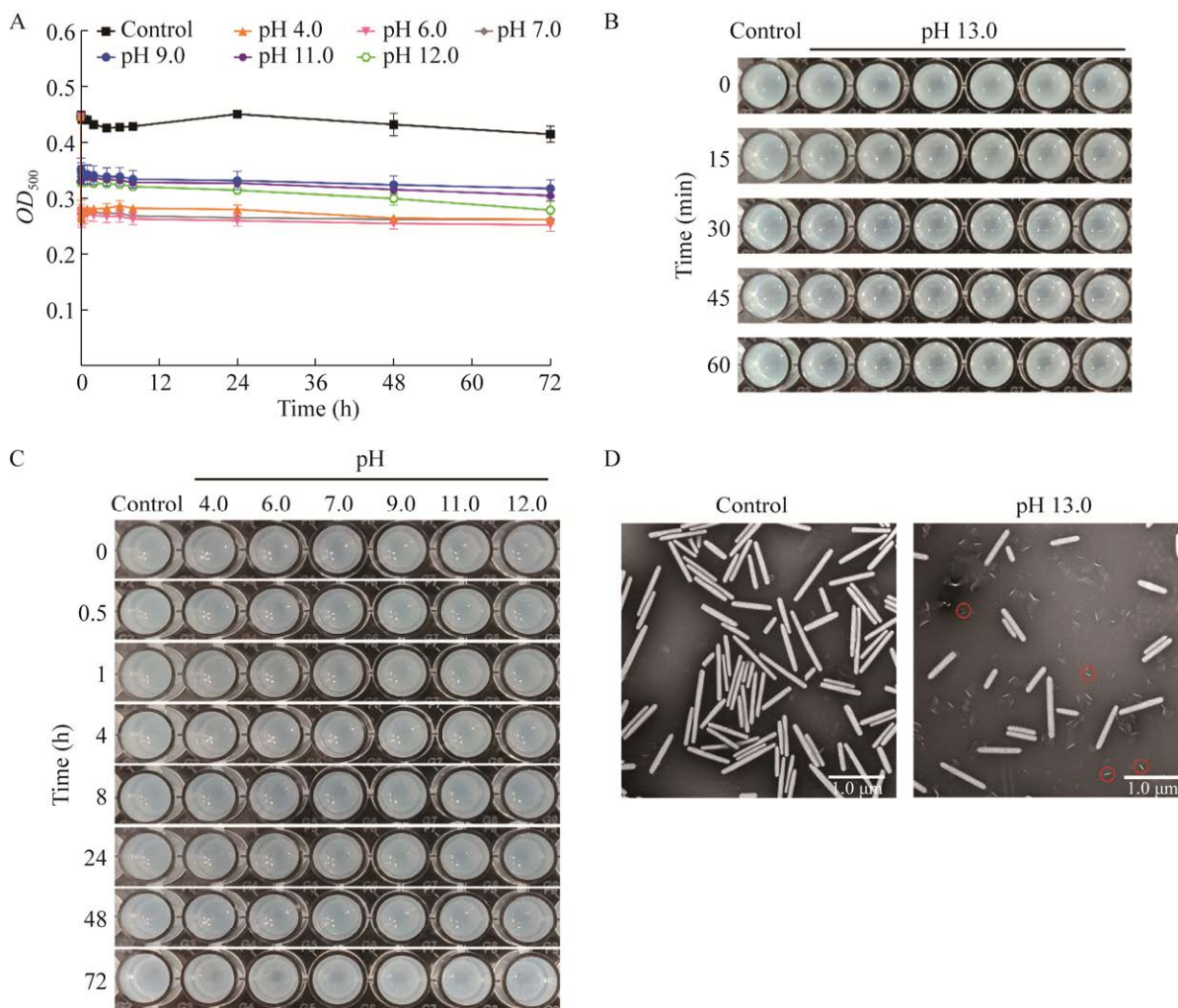


图 5 碱性环境下坍塌的气囊无法通过调节环境 pH 值恢复原本状态

Figure 5 GV which collapsed in alkaline environment could not be restored to their original state by adjusting the environmental pH. A and C: The GVs extracted from *Microcystis* sp. FACHB-2329 were treated with pH 13.0 for 1 h and collapsed. Then the pH was adjusted to different values and incubated at 28 °C. The changes in GVs concentration (represented to by OD₅₀₀ values) and the photographs were taken at each time point. B: Photographic results of GVs in A treated with pH 13.0 for 1 h. The environmental pH values are labeled on the top of the 96-well plate, and the time points of the experiments are labeled on the left. D: Representative negative-staining TEM images of gas vesicles treated with pH 13.0 for 72 h. Red circles indicate GVs that are excessively curled or open at one end. Each experiment was repeated three times with similar results.

3 讨论与结论

生物合成定制属性的超声造影剂是超声影像学发展的新方向，具有巨大潜力^[14,21-22,29-30]。微囊藻作为最常见的富含气囊的原核生物^[1,31]，其内部合成气囊的过程和调控气囊充放气的机

制尚不明确^[32]。本研究揭示改变环境 pH 可调节微囊藻气囊充放气。pH 的改变不仅直接影响微囊藻 FACHB-2329 的漂浮性能(图 6A)，还可使纯化的气囊发生可逆的放气与充气(图 6B)。气囊在酸处理下会放气，调回中性环境后会充气；碱处理后也会放气，但调回中性环境后不

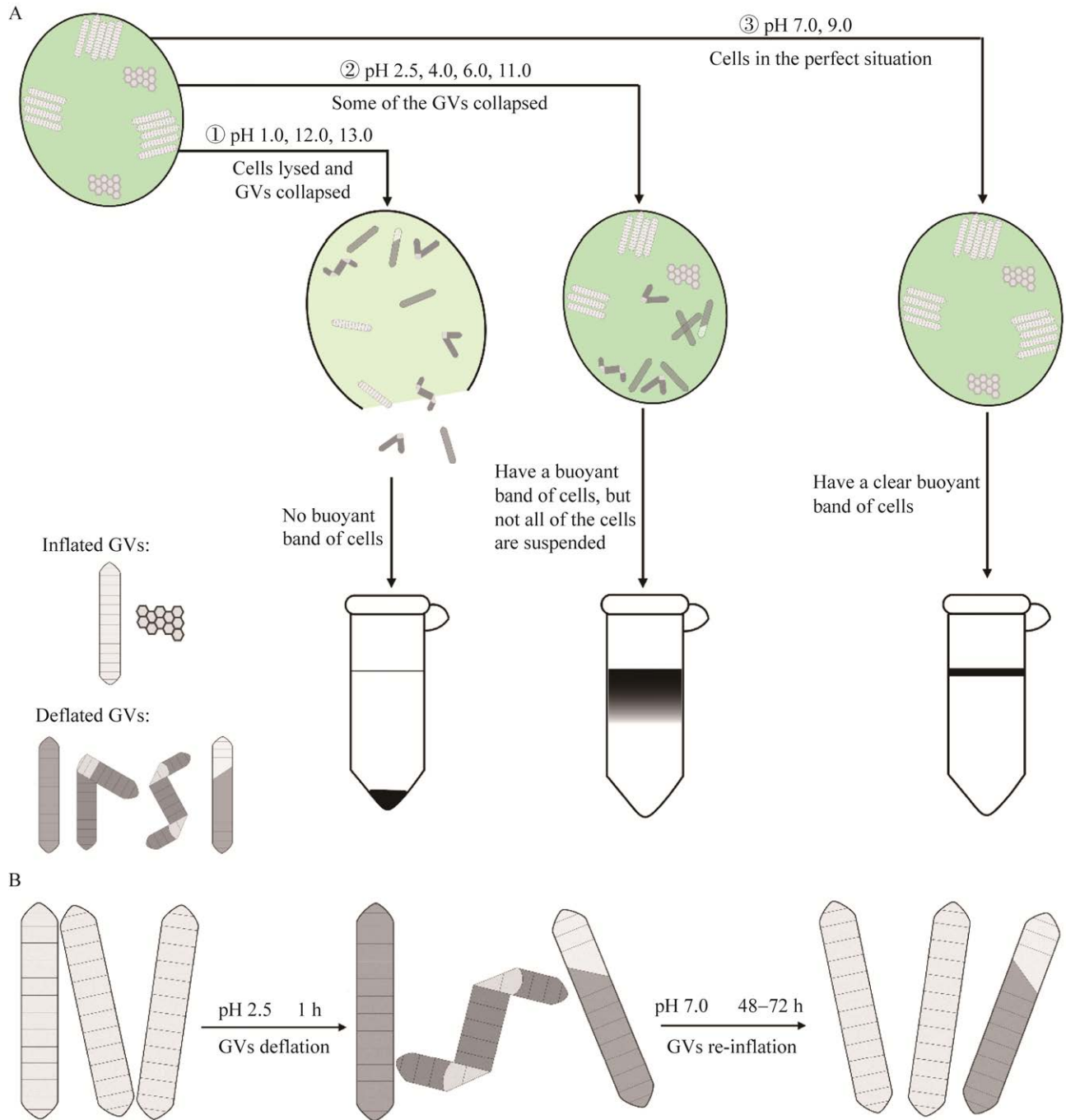


图 6 环境 pH 值在体内和体外调节气囊充气状态变化示意图

Figure 6 Schematic diagram showing how environmental pH regulate the inflation states of GVs *in vivo* and *in vitro*. A: Schematic diagram of *Microcystis* sp. FACHB-2329 showing different levitation states under different environmental pH. The GVs in the inflated state appear as white cylinders or multiple GVs gathered together to form a honeycomb-like structure. The collapsed and deflated GVs appear as dark gray cylinders with low contrast, or bent and folded in some positions. ①②③ are the *Microcystis* sp. in different pH environments and levitation states, respectively. B: Schematic diagram of GVs collapsed in acidic environment and restored to original structure after incubation.

能可逆充气。推测可能由于 GvpA 在 pH 值降低的过程中,离子键和氢键的含量逐渐减少^[33-34]。而 α -螺旋结构的稳定性依赖于羰基氧(C=O)和氨基氢(NH-)之间的肽链上的氢键^[35]。随着 pH 的降低,蛋白质的二级结构发生了破坏。推测气囊随 pH 变化的坍塌和放气是由于气囊壁肋骨处的蛋白间作用降低^[7-8,36],使得气囊朝着某一方向或多个方向发生折叠。而在 pH 恢复至中性环境后,蛋白氢键含量部分恢复,使得一部分气囊的折叠消失。由于气囊壁的气体透过性^[8,26,28,37],恢复原本结构的气囊再次充气(图 6B)。

前人研究也曾发现环境 pH 值可影响微囊藻的悬浮状态^[38]。2016 年,徐旭东团队将微囊藻 FACHB-928 和 930 静置于不同 pH 值的 BG11 培养基中。在静置培养 6 d 后,细胞在 pH 8.0 以下会沉底,pH 9.0 时漂浮到水体表面。这与本研究有一定差异,本研究中使用的 FACHB-2329 取自以色列 Kinneret 湖,而该研究所用的 FACHB-930 取自中国云南滇池;同时其实验中静置处理时间(6 d)远大于本实验(12 h),可能是 pH 处理时间不同导致微囊藻在悬浮现象上有所差异。还有研究发现光照强度也可影响气囊的形成^[39]。对压力处理使内部气囊坍塌的微囊藻进行不同强度的光照后发现,光照强度在 20–50 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 范围内培养的细胞中有大量气囊形成^[39]。在后续研究中,可能可对坍塌气囊恢复充气时的光照等其他相关参数做进一步优化以提高充气率。

本研究证明,改变 pH 可以使气囊在体外完成充放气的过程,该机制可助力生物合成超声造影分子影像探针诊疗一体化的研究。例如下一步可向气囊中有针对性地装载治疗性气体^[40-42],在对肿瘤病灶进行成像的同时达到治疗的效果。还可基于此摸索生物合成超声分子影像探针的

储存和运输条件,例如尝试在放气的情况下进行储存和运输,使用前再进行充气。

综上所述,本研究结果为生物合成超声造影剂充放气机制的阐明、气囊的保存、气囊体外装载不同类型的治疗性气体等多方面研究提供理论支撑,助力生物合成超声分子影像探针产业的发展。

致谢

感谢中国科学院水生生物研究所的肖媛和邢振飞老师在电子显微镜实验中提供的技术支持。

REFERENCES

- [1] WALSBY AE. Gas vesicles[J]. Annual Review of Plant Physiology, 1975, 26: 427-439.
- [2] PFEIFER F. Distribution, formation and regulation of gas vesicles[J]. Nature Reviews Microbiology, 2012, 10(10): 705-715.
- [3] LEWIS OLIVER R. Floating and sinking in gas-vacuolate cyanobacteria[J]. Journal of Phycology, 1994, 30(2): 161-173.
- [4] JUNG DO, ACHENBACH LA, KARR EA, TAKAICHI S, MADIGAN MT. A gas vesiculate planktonic strain of the purple non-sulfur bacterium *Rhodospirillum rubrum* isolated from Lake Fryxell, Dry Valleys, Antarctica[J]. Archives of Microbiology, 2004, 182(2): 236-243.
- [5] PFEIFER F, ENGLERT C. Function and biosynthesis of gas vesicles in halophilic archaea[J]. Journal of Bioenergetics and Biomembranes, 1992, 24(6): 577-585.
- [6] WEATHERS PJ, JOST M, LAMPORT DT. The gas vacuole membrane of *Microcystis aeruginosa*. A partial amino acid sequence[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1977, 178(1): 226-244.
- [7] STRUNK T, HAMACHER K, HOFFGAARD F, ENGELHARDT H, ZILLIG MD, FAIST K, WENZEL W, PFEIFER F. Structural model of the gas vesicle protein GvpA and analysis of GvpA mutants *in vivo*[J]. Molecular Microbiology, 2011, 81(1): 56-68.
- [8] HUBERST, TERWIEL D, EVERS WH, MARESCA D,

- JAKOBI AJ. Cryo-EM structure of gas vesicles for buoyancy-controlled motility[J]. *Cell*, 2023, 186(5): 975-986.e13.
- [9] WALSBY AE, HAYES PK. The minor cyanobacterial gas vesicle protein, GVPc, is attached to the outer surface of the gas vesicle[J]. *Microbiology*, 1988, 134(10): 2647-2657.
- [10] VÖLKNER K, JOST A, PFEIFER F. Accessory gvp proteins form a complex during gas vesicle formation of haloarchaea[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 610179.
- [11] DUNTON PG, MAWBY WJ, SHAW VA, WALSBY AE. Analysis of tryptic digests indicates regions of GvpC that bind to gas vesicles of *Anabaena flos-aquae*[J]. *Microbiology*, 2006, 152(6): 1661-1669.
- [12] TASHIRO Y, MONSON RE, RAMSAY JP, SALMOND GPC. Molecular genetic and physical analysis of gas vesicles in buoyant enterobacteria[J]. *Environmental Microbiology*, 2016, 18(4): 1264-1276.
- [13] BEARD SJ, HAYES PK, PFEIFER F, WALSBY AE. The sequence of the major gas vesicle protein, GvpA, influences the width and strength of halobacterial gas vesicles[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2002, 213(2): 149-157.
- [14] SHAPIRO MG, GOODWILL PW, NEOGY A, YIN M, STUART FOSTER F, SCHAFFER DV, CONOLLY SM. Biogenic gas nanostructures as ultrasonic molecular reporters[J]. *Nature Nanotechnology*, 2014, 9(4): 311-316.
- [15] 许瑞, 龙欢, 汪迎晖, 黄开耀. 用于超声造影的微囊藻气囊提取新方法[J]. *生物工程学报*, 2022, 38(4): 1589-1601.
- XU R, LONG H, WANG Y, HUANG K. A new method for isolating gas vesicles from *Microcystis* for ultrasound contrast[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2022, 38(4): 1589-1601 (in Chinese).
- [16] PIEDRA M, ALLROGGEN A, LINDNER JR. Molecular imaging with targeted contrast ultrasound[J]. *Cerebrovascular Diseases*, 2009, 27(suppl. 2): 66-74.
- [17] DONDELINGER R. Diagnostic ultrasound[J]. *Biomedical Instrumentation & Technology*, 2006, 40(1): 39-44.
- [18] de JONG N, EMMER M, van WAMEL A, VERSLUIS M. Ultrasonic characterization of ultrasound contrast agents[J]. *Medical & Biological Engineering & Computing*, 2009, 47(8): 861-873.
- [19] LONG H, QIN XJ, XU R, MEI CL, XIONG ZY, DENG X, HUANG KY, LIANG HG. Non-modified ultrasound-responsive gas vesicles from *Microcystis* with targeted tumor accumulation[J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2021, 16: 8405-8416.
- [20] SONG L, WANGGH, HOU XD, KALA S, QIU ZH, WONG KF, CAO F, SUN L. Biogenic nanobubbles for effective oxygen delivery and enhanced photodynamic therapy of cancer[J]. *Acta Biomaterialia*, 2020, 108: 313-325.
- [21] BOURDEAU RW, LEE-GOSSELIN A, LAKSHMANAN A, FARHADI A, KUMAR SR, NETY SP, SHAPIRO MG. Acoustic reporter genes for noninvasive imaging of microorganisms in mammalian hosts[J]. *Nature*, 2018, 553(7686): 86-90.
- [22] FARHADI A, HO GH, SAWYER DP, BOURDEAU RW, SHAPIRO MG. Ultrasound imaging of gene expression in mammalian cells[J]. *Science*, 2019, 365(6460): 1469-1475.
- [23] YANG YH, QIU ZH, HOU XD, and SUN L. Ultrasonic characteristics and cellular properties of *Anabaena* gas vesicles[J]. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 2017, 43(12): 2862-2870.
- [24] BUCKLAND B, WALSBY AE. A study of the strength and stability of gas vesicles isolated from a blue-green alga[J]. *Archiv Für Mikrobiologie*, 1971, 79(4): 327-337.
- [25] WALSBY AE. The pressure relationships of gas vacuoles[J]. *Proceedings of the Royal Society of London Series B Biological Sciences*, 1971, 178(1052): 301-326.
- [26] WALSBY AE. The permeability of blue-green algal gas-vacuole membranes to gas[J]. *Proceedings of the Royal Society of London Series B Biological Sciences*, 1969, 173(1031): 235-255.
- [27] WALSBY AE. The mechanical properties of the *Microcystis* gas vesicle[J]. *Journal of General Microbiology*, 1991, 137(10): 2401-2408.
- [28] WALSBY AE, REVSBECH NP, GRIFFEL DH. The gas permeability coefficient of the cyanobacterial gas vesicle wall[J]. *Journal of General Microbiology*, 1992, 138(4): 837-845.
- [29] FARHADI A, SIGMUND F, WESTMEYER GG, SHAPIRO MG. Genetically encodable materials for non-invasive biological imaging[J]. *Nature Materials*, 2021, 20(5): 585-592.
- [30] MARESCA D, LAKSHMANAN A, ABEDI M, BAR-ZION A, FARHADI A, LU GJ, SZABLOWSKI JO, WU D, YOO S, SHAPIRO MG. Biomolecular ultrasound and sonogenetics[J]. *Annual Review of*

- Chemical and Biomolecular Engineering, 2018, 9: 229-252.
- [31] BOWEN CC, JENSEN TE. Blue-green algae: fine structure of the gas vacuoles[J]. Science, 1965, 147(3664): 1460-1462.
- [32] MLOUKA A, COMTE K, CASTETS AM, BOUCHIER C, TANDEAU de MARSAC N. The gas vesicle gene cluster from *Microcystis aeruginosa* and DNA rearrangements that lead to loss of cell buoyancy[J]. Journal of Bacteriology, 2004, 186(8): 2355-2365.
- [33] TAN MT, DING ZY, MEI J, XIE J. Effect of cellobiose on the myofibrillar protein denaturation induced by pH changes during freeze-thaw cycles[J]. Food Chemistry, 2022, 373: 131511.
- [34] NIKOLAIDIS A, ANDREADIS M, MOSCHAKIS T. Effect of heat, pH, ultrasonication and ethanol on the denaturation of whey protein isolate using a newly developed approach in the analysis of difference-UV spectra[J]. Food Chemistry, 2017, 232: 425-433.
- [35] ZHANG MC, LI FF, DIAO XP, KONG BH. Moisture migration, microstructure damage and protein structure changes in porcine longissimus muscle as influenced by multiple freeze-thaw cycles[J]. Meat Science, 2017, 133: 10-18.
- [36] DUTKA P, ANN METSKAS L, HURT RC, SALAHSHOOR H, WANG TY, MALOUNDA D, LU G, CHOU TF, SHAPIRO MG, JENSEN GJ. Structure of *Anabaena flos-aquae* gas vesicles revealed by cryo-ET[J]. Biophysical Journal, 2023, 122(3): 40a.
- [37] WALSBY AE. Permeability of gas vesicles to perfluorocyclobutane[J]. Microbiology, 1982, 128(8): 1679-1684.
- [38] GAO H, ZHU T, XU M, WANG S, XU XD, KONG RQ. pH-dependent gas vesicle formation in *Microcystis*[J]. FEBS Letters, 2016, 590(18): 3195-3201.
- [39] DEACON C, WALSBY AE. Gas vesicle formation in the dark, and in light of different irradiances, by the cyanobacterium *Microcystis* sp.[J]. British Phycological Journal, 1990, 25(2): 133-139.
- [40] XU KC, CHEN JB, KONG XF, LV YY, QIN SC, SUN XJ, MU F, LU TY. "Real world survey" of hydrogen-controlled cancer: a follow-up report of 82 advanced cancer patients[J]. Medical Gas Research, 2019, 9(3): 115.
- [41] CHEN LC, ZHOU SF, SU LC, SONG JB. Gas-mediated cancer bioimaging and therapy[J]. ACS Nano, 2019, 13(10): 10887-10917.
- [42] ZHANG H, XIE MY, CHEN HH, BAVI S, SOHAIL M, BAVI R. Gas-mediated cancer therapy[J]. Environmental Chemistry Letters, 2021, 19(1): 149-166.

(本文责编 郝丽芳)