

用于超声造影的微囊藻气囊提取新方法

许瑞^{1,2}, 龙欢¹, 汪迎晖³, 黄开耀¹

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

3 武汉大学中南医院, 湖北 武汉 430072

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. 生物工程学报, 2022, 38(4): 1589-1601.

XU R, LONG H, WANG YH, HUANG KY. A new method for isolating gas vesicles from *Microcystis* for ultrasound contrast. Chin J Biotech, 2022, 38(4): 1589-1601.

摘要: 气囊是一种由蛋白质外壳包裹气体形成的纳米级细胞结构, 常见于蓝藻和嗜盐古菌中。气囊中包含的气体在超声波作用下, 能够散射声波并产生谐波信号而增强信噪比, 具备成为新型超声造影剂的潜质。但目前提取气囊的方法主要是传统的高渗裂解法, 该操作过程烦琐、得率低, 不适用于气囊的大规模提取。针对这些技术瓶颈, 文中建立了一种快速、高效的微囊藻气囊分离方法, 称为 H₂O₂ 法。较传统的高渗裂解法该方法可将气囊的得率提升 3 倍以上, 提取气囊的时间从 24 h 缩短为 7 h。H₂O₂ 法不仅适用于实验室培养的微囊藻中气囊的提取, 同时适用于提取含有胶鞘壁的野外群体微囊藻的气囊。用 H₂O₂ 法提取的气囊表现出良好的超声造影特性。总之, 该技术以其高效性和广谱性展现出较好的工业生产潜力, 为开发气囊作为生物合成的超声造影剂提供了技术支持。

关键词: 气囊; 超声造影剂; 高渗裂解法; H₂O₂ 法

Received: March 30, 2021; Accepted: May 26, 2021; Published online: June 2, 2021

Supported by: National Key Research and Development Program of China (2020YFA0908801)

Corresponding author: HUANG Kaiyao. Tel: +86-27-68780901; E-mail: huangky@ihb.ac.cn

基金项目: 国家重点研发计划 (2020YFA0908801)

A new method for isolating gas vesicles from *Microcystis* for ultrasound contrast

XU Rui^{1,2}, LONG Huan¹, WANG Yinghui³, HUANG Kaiyao¹

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

3 Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430072, Hubei, China

Abstract: Gas vesicles are a unique class of gas-filled protein nanostructures which are commonly found in cyanobacteria and *Halobacterium*. The gas vesicles may scatter sound waves and generate harmonic signals, which enabled them to have the potential to become a novel ultrasound contrast agent. However, the current hypertonic cracking method for isolating gas vesicles contains tedious operational procedures and is of low yield, thus not suitable for large-scale application. To overcome these technical challenges, we developed a rapid and efficient method for isolating gas vesicles from *Microcystis*. The new H₂O₂-based method increased the yield by three times and shortened the operation time from 24 hours to 7 hours. The H₂O₂ method is not only suitable for isolation of gas vesicles from laboratory-cultured *Microcystis*, but also suitable for colonial *Microcystis* covered with gelatinous sheath. The gas vesicles isolated by H₂O₂ method showed good performance in ultrasound contrast imaging. In conclusion, this new method shows great potential for large-scale application due to its high efficiency and wide adaptability, and provides technical support for developing gas vesicles into a biosynthetic ultrasonic contrast agent.

Keywords: gas vesicles; ultrasound contrast agent; hypertonic cracking method; H₂O₂ method

超声成像作为临床诊断和生物研究的常用手段,具有高时空分辨率、深穿透性和低成本等优点^[1-3],特别是超声造影剂的靶向修饰可在分子水平上无创显示血栓、炎症及肿瘤血管,拓宽了传统成像模式的诊断能力和实用性^[4-5]。携带药物的造影剂在受到低强度的超声辐射时,发生爆破并释放药物,发生空化效应,使附近的毛细血管和细胞通透性增高,提高组织对药物的摄取率。因而超声造影剂在脑部、心血管和癌症等重大疾病的检测和治疗中具有较好的应用前景^[6-9]。

目前,临床上使用较多的造影剂是人工合成的由脂质、聚合物或蛋白外壳包裹气体的微

泡,直径为几微米(1-8 μm),体积较大,无法穿过血管壁进入非血管肿瘤部位成像,使其在医学应用中受到了限制^[10],同时还存在生物安全性的问题。

最近研究发现,来源于蓝藻和古菌内的气囊能显著增强超声成像的效果^[11]。气囊蛋白外壳包裹的内部气体和周围介质之间的声阻抗不同使其能够散射声波,产生谐波信号,显著增强含气囊区域的对比度,并提供可区分的超声信号。并由于其纳米级尺寸,使气囊在超声成像中展现出巨大的潜力^[12-13]。

气囊主要存在于蓝藻和古菌中,参与气囊形成的基因有 *gvpA₁A₂A₃CNKJKFGWV*,其中

Gvp A 和 Gvp C 是形成气囊的主要结构蛋白^[14]。Gvp A 具有很强的疏水性,在气囊壁上形成间距为 4.6 nm 的棱纹结构。Gvp C 与 Gvp A 相互作用增强气囊壁的力度^[15]。其他蛋白功能未知。为了将气囊广泛应用于临床研究中,2018 年 Shapiro 团队通过基因工程的方法将表达气囊的基因簇 (ARG1) 在肠道益生菌 ECN (*Escherichia coli* strain Nissle 1917) 中表达,实现了微生物活体超声成像^[16]。另外, Farhadi 等将 mARGs 稳定表达于人体肾脏细胞, HEK-293T 之后将含有气囊的 HEK-293T 注射于免疫缺陷小鼠腹部构建肿瘤模型,在超声成像下,可清晰地勾勒出肿瘤组织的轮廓^[17]。这些研究表明气囊可以作为一种新型的超声造影剂。

除上述在异源细胞中表达气囊基因获得气囊以外,还可以直接从蓝藻或古菌中提取气囊,直接或修饰后进行超声成像^[18-20]。藻类易于培养,且气囊含量丰富,是理想的气囊制备原料。前人通过摸索建立了从铜绿微囊藻提取气囊的方法^[21],这里称为“高渗裂解法”。但该方法操作烦琐、耗时长、得率低,不适用于气囊的大规模提取。

鉴于此,本文建立了一个快速、高效提取微囊藻气囊的方法 (H_2O_2 法),为进一步开发生物合成的超声造影剂提供了技术支撑,展现出较好的工业潜力,同时也为研究气囊的精细结构提供了原材料。

1 材料与方法

1.1 藻种与培养

藻种:微囊藻 FACHB-2329、FACHB-1326、FACHB-928、FACHB-1416、FACHB-930 和珠海微囊藻从国家水生生物种质资源库 (<http://algae.ihb.ac.cn/>) 获得。

培养:将藻置于 500 mL 锥形瓶 (200 mL 培养基) 培养,温度为 28 °C,光照强度为 20 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$,光暗比为 14 h : 10 h,接种量为 4×10^5 个/mL,待藻生长到对数期进行后续实验。

BG11 培养基:1 L 去离子水中含有 1.5 g 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 2.86 g H_3BO_3 、1.86 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 $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、0.39 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 和 0.049 g $\text{Co}(\text{NO}_3)_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 。最终使用 1 mol/L NaOH 将培养基 pH 调整到 9.5。

1.2 建立新型提取微囊藻气囊的方法

Drábková 等研究显示 H_2O_2 能有效抑制大部分蓝藻类群的生长^[22],且 H_2O_2 能分解为水和氧气,满足了气囊作为造影剂的无毒性要求。所以选用 H_2O_2 作为主要试剂,建立了一个简便、高效提取微囊藻气囊的方法。

1.2.1 确定最佳藻细胞浓度

在 6 个 50 mL 锥形瓶中分别加入 10 mL 的藻液,分别将对数期的细胞稀释或浓缩至 0.5×10^7 个/mL、 1.0×10^7 个/mL、 2×10^7 个/mL、 3×10^7 个/mL、 4×10^7 个/mL 和 8×10^7 个/mL,各加入终浓度 0.02 mol/L 的 H_2O_2 ,置于摇床上,转速为 65 r/min,过夜处理。以上做 3 组生物学重复。

1.2.2 确定过氧化氢的最佳终浓度

取一瓶生长到对数期的藻,将细胞浓度调整为 3×10^7 个/mL。分别加入终浓度为 0.002 mol/L、0.01 mol/L、0.02 mol/L、0.05 mol/L、1 mol/L、3.5 mol/L 和 7 mol/L 的 H_2O_2 溶液;置于摇床上,设置转速为 65 r/min,过夜处理。以上做 3 组生物学重复。

1.2.3 确定最佳处理时间

取一瓶对数期的藻,将细胞浓度调整为 3×10^7 个/mL,加入终浓度为1 mol/L的 H_2O_2 溶液。置于摇床上,以65 r/min的转速,分别处理5 min、10 min、30 min、60 min、120 min和240 min。以上做3组重复实验。

1.2.4 收获气囊

藻液经 H_2O_2 溶液处理之后,分装于15 mL的离心管,置于离心机(AVANTI J-E, Beckman)中,在4 °C、 $400 \times g$ 离心2 h(重复操作至离心管上层不再有白色乳状物);用注射器将上层的白色乳状物吸取到1.5 mL EP管中,与0.01 mol/L PBS溶液(pH 7.4)以1:1混匀, $400 \times g$ 离心(4 °C, 1 h),收集上层白色乳状物。重复3次。白色雾状物即为气囊。

1.2.5 各实验组提取气囊的量的比较

统计各实验组提取到的气囊溶液的体积 v ;使用氨基黑定量法定量,计算出气囊溶液中的蛋白浓度 c ;得到气囊溶液中总蛋白的量 $n=v \times c$ 。

1.2.6 藻细胞全蛋白、藻渣残留蛋白及其气囊蛋白样品制备

藻细胞全蛋白及藻渣残留蛋白样品:6 000 r/min离心5 min,收集藻细胞或提取过气囊的藻渣;用1 mL的细胞裂解液(20 mmol/L Tris-HCl(pH 7.5)、150 mmol/L NaCl、1% DDM(十二烷基-beta-D-麦芽糖苷)、1 mmol/L PMSF(苯甲基磺酰氟))重悬藻细胞或藻渣;以20%的振幅,冰水浴超声10 min,超声时间5 s,间隔9 s(仪器:美国BRANSON Sonifier 250D/450D);冰上孵育1 h;4 °C、12 000 r/min离心10 min,取上清,即为可溶性蛋白质溶液。加入5×样品缓冲液(0.225 mol/L Tris-HCl(pH 6.8),50%甘油,5% SDS(十二烷基硫酸钠),0.25 mol/L β -巯基乙醇,0.05%溴酚蓝),95 °C水浴煮10 min;利用

氨基黑进行蛋白定量。

气囊蛋白样品:将气囊溶液的 OD_{500} 调整到1.5左右,加入含有10% SDS的2×样品缓冲液(0.09 mol/L Tris-HCl(pH 6.8),20%甘油,10% SDS,0.1 mol/L β -巯基乙醇,0.02%溴酚蓝)中^[23],95 °C水浴10 min;利用氨基黑进行蛋白定量。

1.2.7 Western blotting 检测 Gvp C 蛋白的含量

对蛋白样品定量之后,藻细胞全蛋白和藻渣残留蛋白上样5 μ g,气囊蛋白上样1 μ g;经15% SDS-PAGE胶分离之后,分别进行考马斯亮蓝染色定量和转膜;转膜后通过用兔IgG特异性的碱性磷酸酶标记山羊抗体Gvp C孵育^[24],然后显影和扫描。

1.2.8 气囊负染制样

将200目的铜网倒扣在 $OD_{500}=0.5$ 左右气囊液滴上,静置5 min;用滤纸吸取多余溶液;黑暗条件下,用磷钨酸染色铜网5 min;室温晾干15 min,置于透射电子显微镜(Hitachi HT-7700)下观察。

1.2.9 统计气囊的体积分布

使用Image J软件打开气囊的电镜照片,统计每个气囊的长度 L (nm)和直径 D (nm)。计算各个气囊的体积 $V(\text{nm}^3)=\pi \cdot (D/2)^2 \cdot L$,统计气囊的数量 $n=500$;将数据导入到Graph Prism中作图。

1.3 气囊的体外造影

称量1 g琼脂糖置入100 mL的去离子水中,放入微波炉加热至琼脂糖完全融化,取出摇匀;冷却到60 °C左右,倒入90 mm×50 mm的一次性细胞培养皿中;完全凝固后,使用一次性吸管在平皿中央等距离打4个孔;将PBS溶液和 OD_{500} 值为2.4的微囊藻FACHB-2329、FACHB-1326和FACHB-930的气囊溶液分别与60 °C的琼脂糖溶液以1:1体积混合,冷却。调整超声仪器(型号:GE公司LOGIQ E9)各参数:AO(输出功率)为100%、D(深度)为3.5、Gn

(增益) 为 8、MI (机械指数) 为 1.2; 选取超声造影实时双幅对照模式, 并将超声耦合剂挤在超声仪器的 9 L 探头上, 注意不要产生气泡; 将 9 L 探头放置于培养皿中央, 保证在样品的正上方, 保持稳定之后, 发射声波直到不再有造影信号。

使用超声仪器 (LOGIQ E9) 的功能—超声造影定量分析 (ultrasonic contrast quantitative analysis) 测定随时间变化不同藻的气囊造影信号的变化情况。

2 结果与分析

2.1 建立提取微囊藻气囊的方法

因高渗裂解法操作烦琐, 无法高效率地提取气囊, 据报道, 当藻细胞受到氧化胁迫时, 细胞膜脂质损伤, 破坏了细胞膜结构^[25]。我们根据上述原理利用过氧化氢处理细胞, 建立了新型提取微囊藻气囊的方法 (图 1A)。通过预实验, 我们选用微囊藻 FACHB-2329 开展气囊提取实验。我们主要通过摸索以下 3 个条件建立提取气囊的新方法: 1) 过氧化氢处理的最适细胞浓度; 2) 过氧化氢的最适终浓度; 3) 最适处理时间。

2.1.1 过氧化氢处理下最适藻细胞浓度的优化

为了有效提取出气囊, 结合文献中过氧化氢对铜绿微囊藻的抑制生长浓度 (0.002 8–0.045 mmol/L)^[26]以及预实验, 本实验初步选用 0.02 mol/L 过氧化氢处理藻细胞。如图 1B 所示, 当藻细胞浓度为 3×10^7 个/mL 时, 收获的气囊的质量最多, 为 109.17 μg 蛋白。因此, 随后的其他条件的优化, 均以藻细胞浓度为 3×10^7 个/mL 来进行。

2.1.2 过氧化氢终浓度的优化

在一定细胞浓度下, 过低的过氧化氢终浓度只能在一定时间内抑制藻细胞的生长, 不能

使藻细胞释放气囊; 若使用浓度过高, 后续 PBS 溶液洗涤气囊溶液并不能完全去除残留的过氧化氢, 后期去除成本较高。因此我们比较了不同过氧化氢终浓度对收获气囊的质量关系 (图 1C)。在相同的藻细胞下, 过氧化氢终浓度从 0.002 mol/L 增加到 0.02 mol/L 时, 气囊产量明显增加, 在 1 mol/L 时收获的气囊的质量最多, 约 174.30 μg 蛋白。当增加至 3.5 mol/L 时, 气囊的产量明显降低。上述结果显示 1 mol/L 为最适提取微囊藻气囊的过氧化氢终浓度。

2.1.3 处理时间的优化

要将 H_2O_2 法应用于工业生产, 要尽量降低时间成本。因此, 适当的处理时间至关重要。我们比较了不用处理时间下对收获气囊产量的影响, 在使用 1 mol/L 的 H_2O_2 处理浓度为 3×10^7 个/mL 的藻液时, 当处理时间为 60 min 时, 收获的气囊的量最多, 为 132.57 μg 蛋白 (图 1D)。因此, 当藻液浓度为 3×10^7 个/mL 时, 使用终浓度为 1 mol/L 的过氧化氢处理 60 min 为最佳的纯化微囊藻气囊的条件。

2.1.4 气囊蛋白的 Western blotting 检测

经 H_2O_2 法纯化的气囊呈现出乳白色 (如图 1E), 利用含有 10% SDS 2 \times 样品缓冲液将其溶解后, 进行 SDS-PAGE 并使用 Gvp C 抗体进行检测。结果显示纯化的气囊条带在 25 kDa 左右, 与预测的分子量一致 (图 1F)。综上所述, 我们成功地建立了新型的提取微囊藻气囊方法, 并命名为 H_2O_2 法。

2.2 H_2O_2 法优于传统的高渗裂解法

为了排除 H_2O_2 会影响气囊的结构, 我们将 H_2O_2 法提纯的气囊与使用高渗裂解法提纯的气囊的结构进行了比较。首先, 我们将两种该方法提取纯化的气囊 (图 2A) 在电镜下观察, 对比二者的形态。结果显示二者都呈现完整的圆柱状结构 (图 2B–C)。高渗裂解法提纯的气囊的长

度为 (690 ± 209) nm, 直径为 (81 ± 17) nm。利用 H_2O_2 法提取的气囊长度为 (691 ± 201) nm, 直径为 (85 ± 15) nm。这些结果证明了, 使用 1 mol/L 过氧化氢处理藻细胞不会对气囊结构造成损伤, 能满足后续解析气囊结构以及造影实验的

要求。

为了比较这两种方法分离气囊的效率, 我们同时使用高渗裂解法和 H_2O_2 法对 20 mL (3×10^7 个/mL) 的藻液进行处理, 将气囊分离纯化后, 根据气囊体积和蛋白浓度, 计算气囊

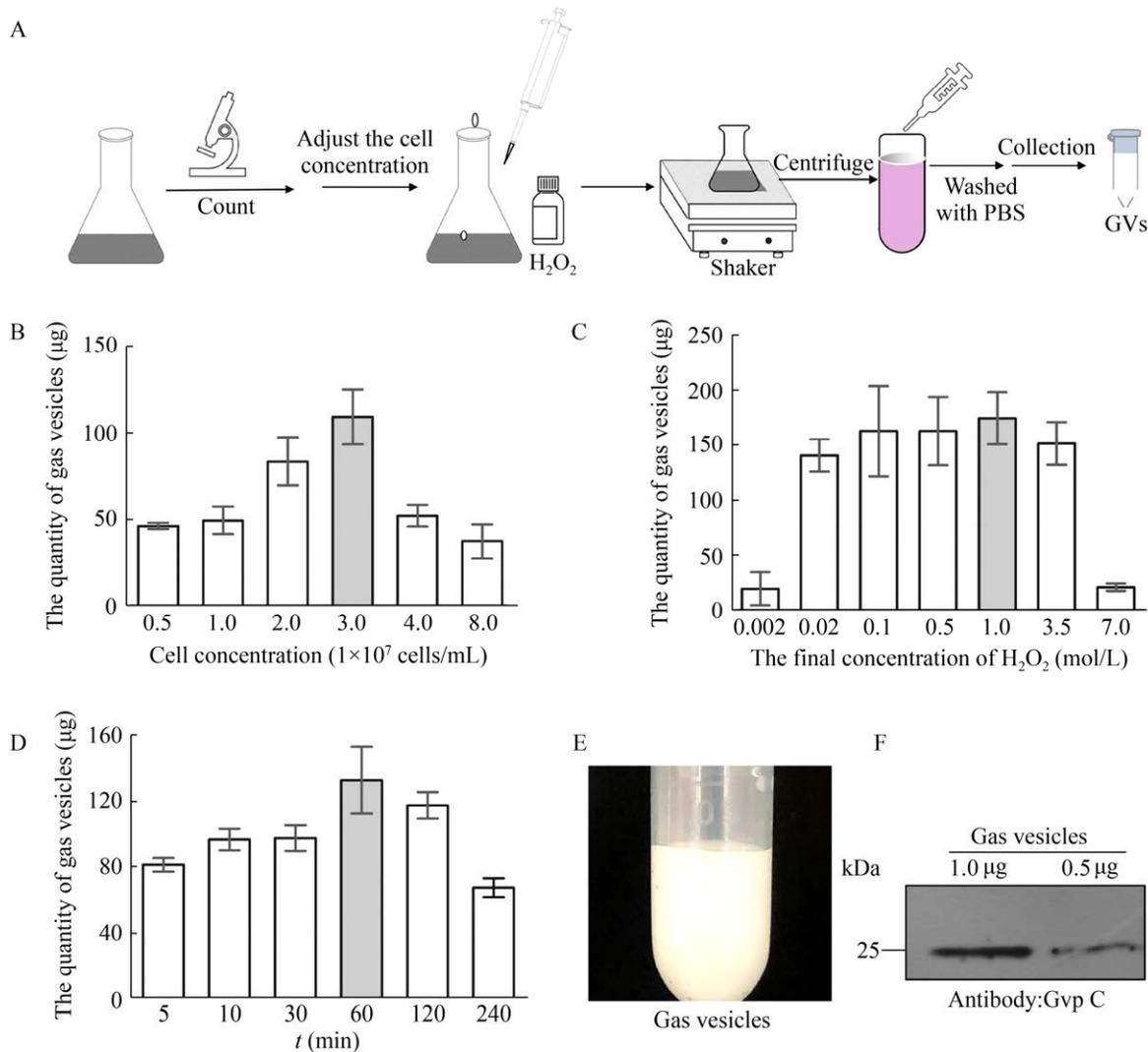


图 1 H_2O_2 法提取微囊藻气囊方法的建立

Figure 1 Development of an H_2O_2 method for isolation of gas vesicles from *Microcystis*. (A) The flowchart of H_2O_2 method for gas vesicles isolation. Firstly, adjusting the cells' concentration, then keeping cells on the shaker after adding H_2O_2 . Finally, harvesting gas vesicles using centrifugation. (B) Comparison of the quantity of isolated gas vesicles when different amount of cells were used. (C) Effect of the concentrations of H_2O_2 on the quantity of gas vesicles. (D) Comparison of the quantity of harvested gas vesicles along different time. (E) Purified milk-like gas vesicles isolated by H_2O_2 method from *Microcystis aeruginosa* (FACHB-2329). (F) Immunoblot analysis of gas vesicles using the antibody against GvpC, which is about 25 kDa. The error bars in B, C, D represent standard deviations of three biological replicates.

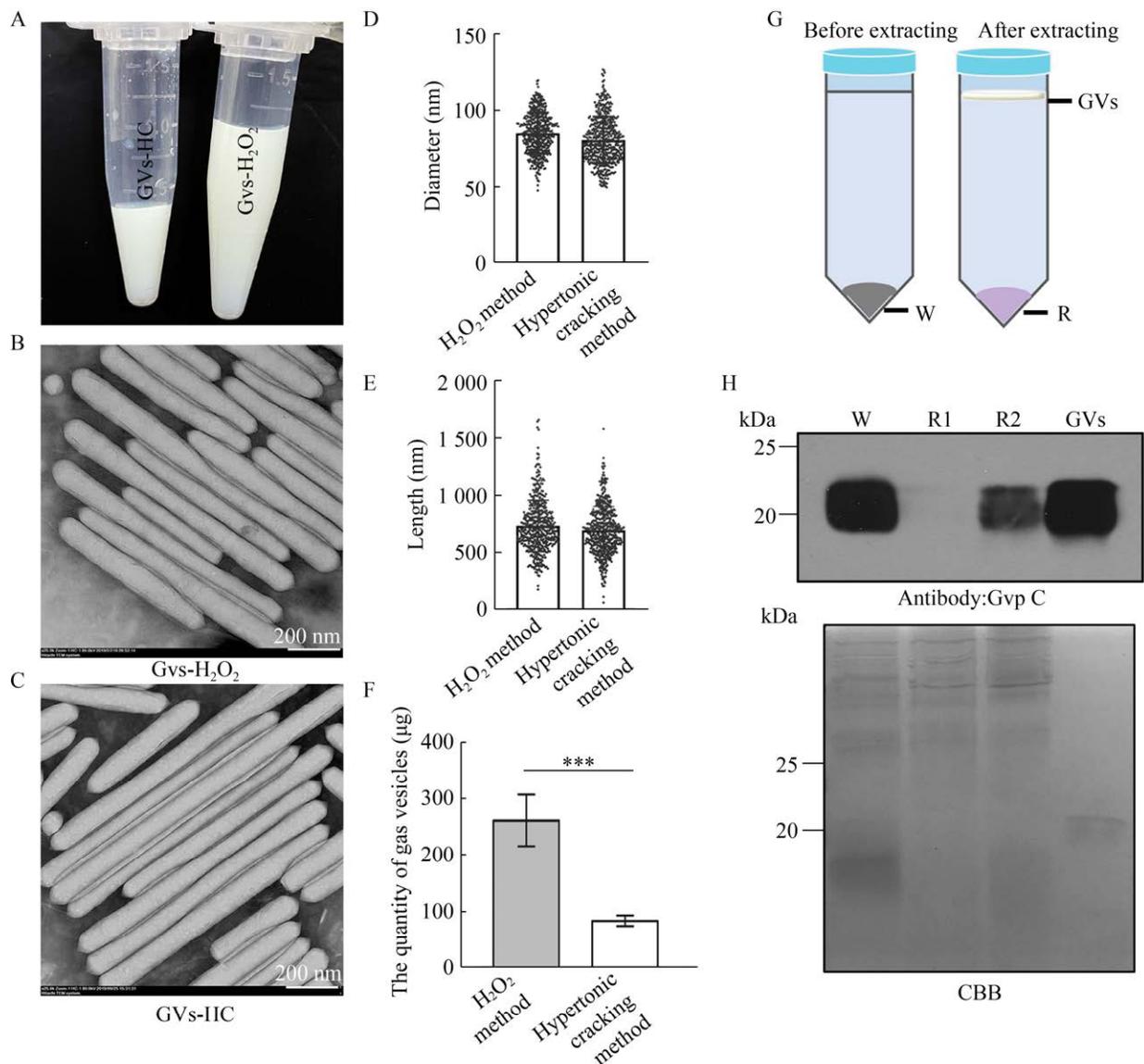


图2 H_2O_2 法与高渗裂解法的比较

Figure 2 Comparison of H_2O_2 method versus hypertonic cracking method. (A) Comparison of the color of gas vesicles purified by H_2O_2 method (GVs- H_2O_2) versus hypertonic cracking method (GVs-HC). (B) The transmission electron micrograph (TEM) of gas vesicles purified by H_2O_2 method. Gas vesicles are rod-shaped under TEM. (C) The TEM of gas vesicles purified using hypertonic cracking method. Comparison of the diameter (D) and length (E) of gas vesicles and the isolation efficiency (F) using H_2O_2 method and hypertonic cracking method. (G) Schematic diagram of each samples used for immunoblot in (H). W: whole cells; R: remnant; GVs: gas vesicles. (H) Immunoblot analysis of gas vesicles protein in the cell remnant (R1, R2) using antibody against Gvp C. R1 and R2 represents the remnant from cells whose gas vesicles had been isolated by H_2O_2 method or hypertonic cracking method, respectively. The total proteins were visualized by Coomassie blue staining.

蛋白的总量 (μg), 进而比较两种方法提取气囊的效率。利用高渗裂解法得到气囊 $83 \mu\text{g}$, 利用 H_2O_2 法得到气囊为 $260 \mu\text{g}$ (图 2F)。上述结果表明, H_2O_2 法提取气囊的效率是高渗裂解法的 3 倍以上。另外, 我们利用 Gvp C 抗体, 检测经两种方法提取气囊的藻细胞沉淀中气囊蛋白的含量, 进一步证明 H_2O_2 法的高效性。我们发现, 经 H_2O_2 法提取过气囊的藻细胞沉淀中基本检测不到 Gvp C 蛋白 (图 2H)。这说明了, H_2O_2 法不仅具有高效性, 而且还能将藻细胞的气囊提取得更加完全, 可以满足后续将气囊应用为超声造影剂的工业生产要求。

综上, H_2O_2 法可以将气囊完整地从小藻细胞中提取出来, 对气囊结构无影响; 同时具有高效性, 将气囊得率提升了 3 倍以上, 且藻细胞沉淀中基本不含有气囊蛋白, 降低了损耗, 而且实验时间由 24 h 缩短为 7 h。

2.3 H_2O_2 法可提取出其他蓝藻的气囊

在蓝藻水华中, 较为常见的蓝藻种类有: 微囊藻属、束丝藻属和鱼腥藻属等, 这些蓝藻形成水华时都有气囊的分布^[27-29]。为了验证 H_2O_2 法是否能提取出其他蓝藻的气囊, 获得不同特性的造影剂, 我们使用 H_2O_2 法尝试对不同蓝藻藻株的气囊进行提取。结果发现, 此方法不仅可提取出经藻种库纯化的藻 (图 3A, 铜绿微囊藻 FACHB-928; 图 3B, 铜绿微囊藻 FACHB-1326; 图 3C, 束丝藻 FACHB-1416; 图 3D, 珠海微囊藻) 的气囊; 也可提取出采样于野外的水华微囊藻的气囊 (图 3E, 武汉官桥; 图 3F, 江苏太湖)。这说明, H_2O_2 法具有广谱性, 可适用于提取多种蓝藻的气囊。

我们进一步对纯化出的气囊长度和直径进行分析, 束丝藻 (*Aphanizomenon* sp.) FACHB-1416 的气囊相对较长, 平均长度为

(729.3 ± 224.3) nm, 有的甚至长达 1 500 nm, 平均直径为 (82.3 ± 17.4) nm; 采样自江苏太湖的野生微囊藻的气囊长度较短, 平均长度为 (577 ± 154) nm, 最长的为 1 011 nm, 平均直径为 (101.6 ± 12.6) nm; 采样自武汉官桥的野生微囊藻的气囊平均直径略大, 为 (115.3 ± 19.7) nm, 平均长度为 (612.7 ± 156.6) nm; 铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*) FACHB-1326 和铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*) FACHB-928 气囊的平均长度分别是 (666.1 ± 236.8) nm 和 (660.0 ± 204.7) nm, 平均直径为 (98.3 ± 14.0) nm 和 (89.0 ± 15.8) nm; 来自 FACHB 的珠海微囊藻的气囊平均长度为 (686.2 ± 179.6) nm, 平均直径为 (111.3 ± 12.4) nm (图 3G-H)。以上结果说明我们建立的 H_2O_2 法可以广泛应用于从蓝藻中提取气囊。

2.4 气囊的体外造影

我们通过 H_2O_2 法实现了从多种蓝藻细胞中高效率提取出高纯度的气囊, 为了检测其是否具有造影特性以及信号持续性的强弱, 将来源于不同蓝藻的气囊在超声系统下进行体外造影。

我们选取微囊藻 FACHB-2329、FACHB-1326 和 FACHB-930 为目的藻株, 利用 H_2O_2 法纯化其气囊, 并在超声 9 L 探头下进行体外造影 (图 4A), 发现这 3 株藻的气囊都具有造影信号 (图 4B)。随后通过超声造影定量分析测量随时间变化不同气囊造影信号的变化情况。结果显示, 微囊藻 FACHB-1326 的气囊表现出较优的造影特性, 在超声持续作用 15 s 后, 气囊才完全坍塌, 不再具有造影信号, 而微囊藻 FACHB-2329 和微囊藻 FACHB-930 的气囊仅在 6 s 时, 就已坍塌完全 (图 4C)。这可能与不同藻株气囊的稳定性相关, 该特性对后续测量不同气囊的抗压力实验具有一定的参考意义。

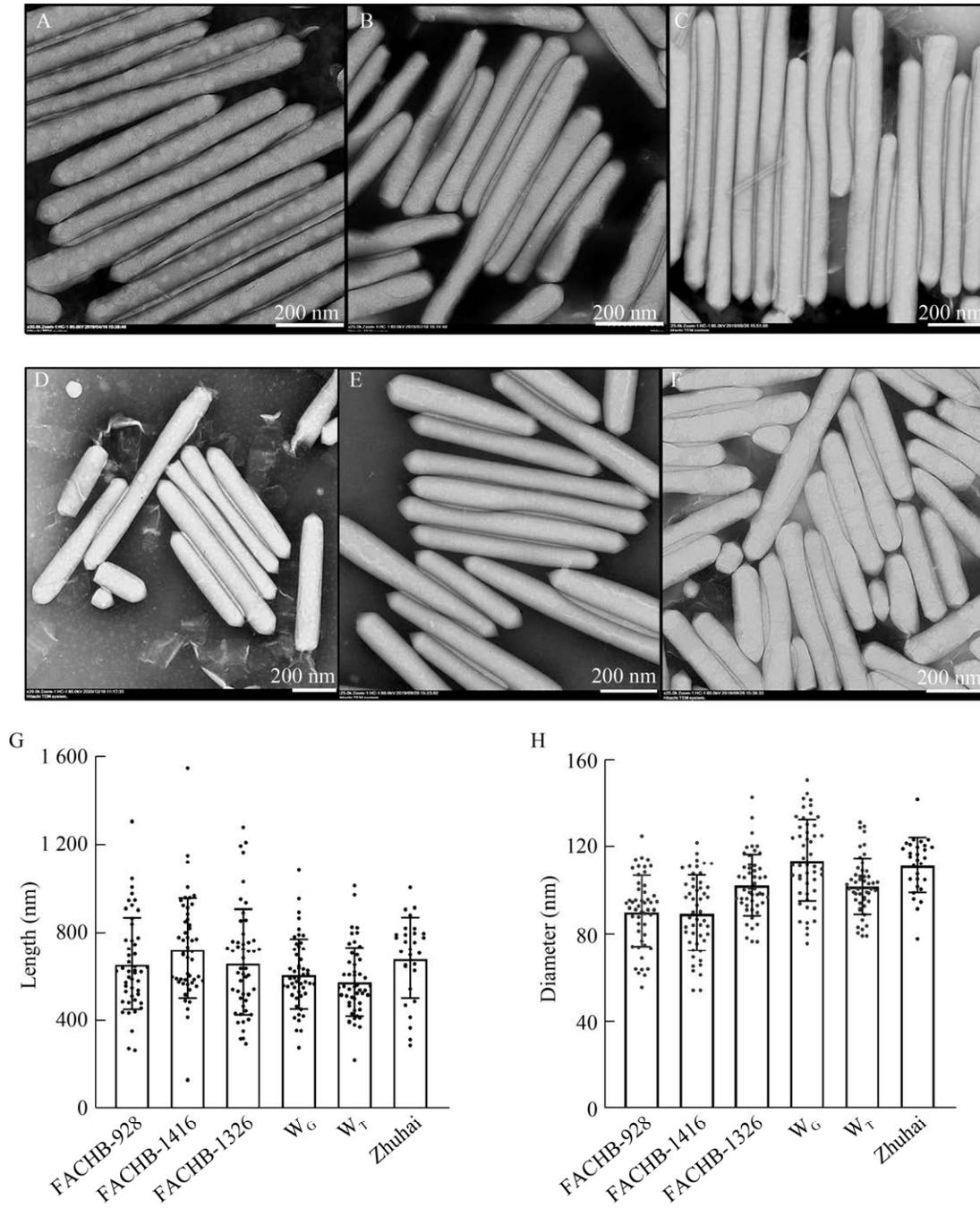


图3 H_2O_2 法可用于提取其他蓝藻的气囊

Figure 3 The gas vesicles isolated from other cyanobacteria using H_2O_2 method. (A–F) TEM photograph of gas vesicles isolated from different cyanobacteria. (A) *Microcystis aeruginosa* FACHB-928. (B) *Microcystis aeruginosa* FACHB-1326. (C) *Aphanizomenon* sp. FACHB-1416. (D) Zhuhai *Microcystis* which purified and cultivated from FACHB. (E) Field *Microcystis* sample from Wuhan Guanqiao. (F) Field *Microcystis* sample from Tai lake in Jiangsu province. (G) Measurement of the length of gas vesicles. W_G: purified gas vesicles from Wuhan Guanqiao; W_T: purified gas vesicles from Tai lake in Jiangsu province. Zhuhai: purified gas vesicles from Zhuhai *Microcystis*. (H) Measurement of the diameter of gas vesicles.

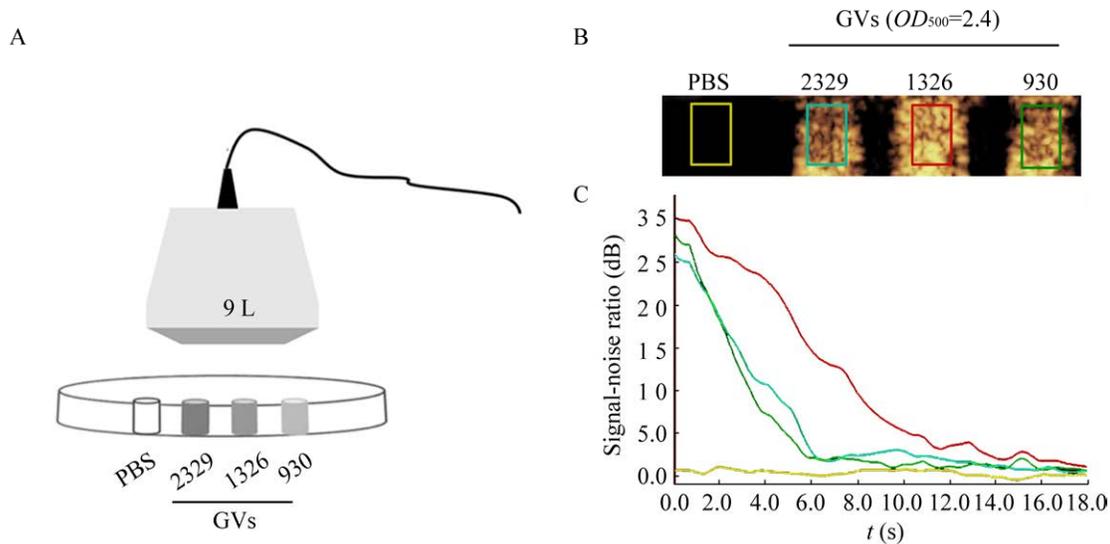


图4 气囊的超声成像

Figure 4 Ultrasound contrast imaging of gas vesicles. (A) The diagram of ultrasound imaging model for gas vesicles. (B) Comparison of contrast ultrasound signals of gas vesicles from different *Microcystis* cells at the same optical densities. (C) The change of contrast signals of gas vesicles from different *Microcystis* cells. Yellow: PBS; blue: FACHB-2329; red: FACHB-1326; green: FACHB-930.

3 讨论

在本研究中,以微囊藻制备纳米级超声造影剂为目的,我们建立了一种快速、高效提取微囊藻气囊的方法,并命名为 H_2O_2 法。

与高渗裂解法相比, H_2O_2 法具有以下优点:第一,时间成本低。本方法使用过氧化氢处理微囊藻悬液1 h,便可分离纯化气囊。而高渗裂解法分离气囊前要耗费18 h,体现在向生长到对数期的藻细胞悬液中加入 Mg^{2+} 和青霉素(0.16 mg/L)摇床处理5 h后,离心浓缩耗费0.5 h,溶菌酶处理至少1 h,加入甘油混匀15 min,过夜处理至少12 h。因此 H_2O_2 法将提取气囊的时间从24 h缩短为7 h,降低了时间成本,有利于后期工业生产。第二,提取效率高,气囊的得率提高了3倍以上。使用 H_2O_2 法提取气囊之后,藻细胞沉淀中基本不含有气囊的残留,降低了损耗,大大提高了气囊纯化的效率。

第三,该方法具有广谱性。不仅适用于实验室培养的微囊中气囊的提取,同时适用于提取含有胶鞘壁的人群体微囊藻的气囊。这都是高渗裂解法中无法实现的。第四,易于放大,大规模制备气囊。将为研究不同藻类气囊的理化性质及应用带来极大的便利。

本方法使用的过氧化氢是一种活性氧(reactive oxygen species, ROS)物质,能抑制藻细胞生长或直接杀死藻细胞,通常用于控制蓝藻水华^[30-31]。2005年,毕永红团队在培养微囊藻时加入不同浓度的过氧化氢,其结果显示过氧化氢对细胞生长有显著抑制作用,当使用 $60 \mu\text{mol/L}$ 过氧化氢处理时,延迟了细胞的对数生长期,而使用 $150 \mu\text{mol/L}$ 、 $240 \mu\text{mol/L}$ 或 $300 \mu\text{mol/L}$ 过氧化氢处理时,细胞的生长速率为负值^[32]。有研究表明, H_2O_2 对蓝藻的生长抑制依赖于其对光系统II(PS II)中的关键组成部分D1蛋白的损伤^[33-34]。细胞在正常生长情况

下,因机体内具有防御活性氧和去除自由基毒害的机制,活性氧的产生和清除处于一个动态的平衡状态^[35]。而在 H₂O₂ 法中,终浓度为 1 mol/L 的 H₂O₂ 可能使细胞膜脂质发生了过氧化作用,藻细胞本身对活性氧的产生和清除平衡被打破,过量的 ROS 对细胞造成损伤从而使气囊释放^[36]。

利用 H₂O₂ 法提取的 3 株藻的气囊在超声下成像,均表现出良好的造影特性。对气囊的体外造影技术,便于根据对不同气囊的造影特性制备不同特质的超声造影剂。为了促进气囊作为造影剂的适用性,我们后续仍需要更多的实验来验证其在生物学上的应用,包括通过静脉注射气囊来评估小鼠的肝脏健康,以及在注射气囊后,建立小鼠的耐受性和免疫原性。

在超声作用下不同藻株的气囊造影特性不同。随着时间的增长,微囊藻 FACHB-1326 气囊的造影信号持续能力明显强于 FACHB-2329 和 FACHB-930,信号持续性与气囊稳定性息息相关。有研究表明,气囊的稳定性与 Gvp C 蛋白和气囊的直径有关^[14,37-38]。气囊的 Gvp C 蛋白具有增强气囊壁强度从而稳定气囊结构的功能,气囊直径越大,临界压力越小。而微囊藻 FACHB-1326 的气囊直径稍大于 FACHB-2329 和 FACHB-930。因此我们猜测微囊藻 FACHB-1326 的气囊特有的造影信号持续能力可能是由于 *gvpC* 基因的拷贝数和 Gvp C 蛋白在气囊壁上的组成不同带来的。具体调节机制仍需要更多的实验来证明,本文中建立的 H₂O₂ 法和气囊体外造影实验,为后续揭示 Gvp C 蛋白与气囊的稳定性、造影特性之间的关系提供了实验基础。

综上所述,气囊在医学方面显示了巨大的应用前景。本文所建立的 H₂O₂ 法可用于大规模提取新型的超声造影剂。利用这些材料对气囊

形成机制、结构以及分子生物学方面的深入研究,将充分发掘气囊的潜在超声成像用途,加速其在临床上的应用。

致谢:感谢中国科学院水生生物研究所的宋立荣研究员实验室的李林和贾云路副研究员提供采自武汉官桥和江苏太湖的野外微囊藻样品;感谢中国科学院水生生物研究所的徐旭东研究员实验室提供 Gvp C 抗体;感谢协和肿瘤医院超声科覃晓娟老师对超声实验的指导和帮助。感谢中科院水生所藻类细胞生物学学科组徐南南、赵丽娟博士对文章修改提出的意见。

REFERENCES

- [1] Cosgrove D, Harvey C. Clinical uses of microbubbles in diagnosis and treatment. *Med Biol Eng Comput*, 2009, 47(8): 813-826.
- [2] de Leon A, Perera R, Nittayacharn P, et al. Ultrasound contrast agents and delivery systems in cancer detection and therapy. *Adv Cancer Res*, 2018, 139: 57-84.
- [3] Ye J, Fu GF, Yan XH, et al. Noninvasive magnetic resonance/photoacoustic imaging for photothermal therapy response monitoring. *Nanoscale*, 2018, 10(13): 5864-5868.
- [4] Sennoga CA, Kanbar E, Auboire L, et al. Microbubble-mediated ultrasound drug-delivery and therapeutic monitoring. *Expert Opin Drug Deliv*, 2017, 14(9): 1031-1043.
- [5] 张欣, 红华. 纳米级超声造影剂研究进展. *中国介入影像与治疗学*, 2021, 18(2): 118-121.
Zhang X, Hong H. Research advancements of nanoscale ultrasound contrast agents. *Chin J Interv Imaging Ther*, 2021, 18(2): 118-121 (in Chinese).
- [6] Jang KW, Seol D, Ding L, et al. Ultrasound-mediated microbubble destruction suppresses melanoma tumor growth. *Ultrasound Med Biol*, 2018, 44(4): 831-839.
- [7] Lee, Moon, Han, et al. Antitumor effects of intra-arterial delivery of albumin-doxorubicin nanoparticle conjugated microbubbles combined with ultrasound-targeted microbubble activation on VX2 rabbit liver tumors. *Cancers*, 2019, 11(4): 581.
- [8] Wang LY, Zheng SS. Advances in low-frequency ultrasound combined with microbubbles in targeted tumor therapy. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2019, 20(4): 291-299.

- [9] Luo W, Wen G, Yang L, et al. Dual-targeted and pH-sensitive doxorubicin prodrug-microbubble complex with ultrasound for tumor treatment. *Theranostics*, 2017, 7(2): 452-465.
- [10] Cao WJ, Matkar PN, Chen HH, et al. Microbubbles and ultrasound: therapeutic applications in diabetic nephropathy. *Adv Exp Med Biol*, 2016, 880: 309-330.
- [11] Kaufmann BA, Lindner JR. Molecular imaging with targeted contrast ultrasound. *Curr Opin Biotechnol*, 2007, 18(1): 11-16.
- [12] Lakshmanan A, Lu GJ, Farhadi A, et al. Preparation of biogenic gas vesicle nanostructures for use as contrast agents for ultrasound and MRI. *Nat Protoc*, 2017, 12(10): 2050-2080.
- [13] Maresca D, Lakshmanan A, Abedi M, et al. Biomolecular ultrasound and sonogenetics. *Annu Rev Chem Biomol Eng*, 2018, 9(1): 229-252.
- [14] Walsby AE. Gas vesicles. *Microbiol Rev*, 1994, 58(1): 94-144.
- [15] Englert C, Pfeifer F. Analysis of gas vesicle gene expression in *Haloferox mediterranei* reveals that GvpA and GvpC are both gas vesicle structural proteins. *J Biol Chem*, 1993, 268(13): 9329-9336.
- [16] Bourdeau RW, Lee-Gosselin A, Lakshmanan A, et al. Acoustic reporter genes for noninvasive imaging of microorganisms in mammalian hosts. *Nature*, 2018, 553(7686): 86-90.
- [17] Farhadi A, Ho GH, Sawyer DP, et al. Ultrasound imaging of gene expression in mammalian cells. *Science*, 2019, 365(6460): 1469-1475.
- [18] Song L, Wang G, Hou X, et al. Biogenic nanobubbles for effective oxygen delivery and enhanced photodynamic therapy of cancer. *Acta Biomater*, 2020, 108: 313-325.
- [19] Wang G, Song L, Hou X, et al. Surface-modified GVs as nanosized contrast agents for molecular ultrasound imaging of tumor. *Biomaterials*, 2020, 236: 119803.
- [20] Yang Y, Qiu Z, Hou X, et al. Ultrasonic characteristics and cellular properties of *Anabaena* gas vesicles. *Ultrasound Med Biol*, 2017, 43(12): 2862-2870.
- [21] 许柏英, 苗娅. 一种水华蓝藻气囊的分离纯化及气囊结构蛋白的鉴定. *微生物学通报*, 2017, 44(8): 1802-1807.
- Xu BY, Miao Y. Isolation and structural proteins determination of gas vesicles from a bloom-forming cyanobacterium. *Microbiol China*, 2017, 44(8): 1802-1807 (in Chinese).
- [22] Drábková M, Admiraal W, Maršálek B. Combined exposure to hydrogen peroxide and light selective effects on cyanobacteria, green algae, and diatoms. *Environ Sci Technol*, 2007, 41(1): 309-314.
- [23] Walker JE, Walsby AE. Molecular weight of gas-vesicle protein from the planktonic cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* and implications for structure of the vesicle. *Biochem J*, 1983, 209(3): 809-815.
- [24] 许敏. 微囊藻伪空胞基因丛的研究[D]. 武汉: 中国科学院(水生生物研究所), 2006.
- Xu M. Studies on the gas vesicle gene cluster in *Microcystis* sp.[D]. Wuhan: Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, 2006 (in Chinese).
- [25] 李娟, 王应军, 高鹏. 过氧化氢对铜绿微囊藻的损伤效应研究. *环境科学学报*, 2015, 35(4): 1183-1189.
- Li J, Wang YJ, Gao P. Damaging effects of hydrogen peroxide on *Microcystis aeruginosa*. *Acta Sci Circumstantiae*, 2015, 35(4): 1183-1189 (in Chinese).
- [26] 邱昌恩, 王卫东. 过氧化氢对铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*) 生长及生理特性的影响. *湖北师范大学学报(自然科学版)*, 2017, 37(4): 1-5.
- Qiu CE, Wang WD. The effects of H₂O₂ on the growth and physiological characteristics of *Microcystis aeruginosa*. *J Hubei Norm Univ (Nat Sci Ed)*, 2017, 37(4): 1-5 (in Chinese).
- [27] 方群. 铜绿微囊藻氮磷代谢及微囊藻水华综合评价[D]. 北京: 北京工商大学, 2009.
- Fang Q. Nutrients metabolism of *Microcystis aeruginosa* and general evaluation of *Microcystis* algal[D]. Beijing: Beijing Technology and Business University, 2009 (in Chinese).
- [28] 贾晓会, 施定基, 史绵红, 等. 巢湖蓝藻水华形成原因探索及“优势种光合假说”. *生态学报*, 2011, 31(11): 2968-2977.
- Jia XH, Shi DJ, Shi MH, et al. Formation of cyanobacterial blooms in Lake Chaohu and the photosynthesis of dominant species hypothesis. *Acta Ecol Sin*, 2011, 31(11): 2968-2977 (in Chinese).
- [29] 刘永梅, 刘永定, 李敦海, 等. 氮磷对水华束丝藻生长及生理特性的影响. *水生生物学报*, 2007, 31(6): 774-779.
- Liu YM, Liu YD, Li DH, et al. Effects of nitrate and phosphorus on growth and physiological characteristics of *Aphanizomenon flos-aquae* from Dianchi. *Acta Hydrobiol Sin*, 2007, 31(6): 774-779 (in Chinese).
- [30] Barrington DJ, Ghadouani A. Application of hydrogen peroxide for the removal of toxic cyanobacteria and

- other phytoplankton from wastewater. *Environ Sci Technol*, 2008, 42(23): 8916-8921.
- [31] Qian H, Yu S, Sun Z, et al. Effects of copper sulfate, hydrogen peroxide and N-phenyl-2-naphthylamine on oxidative stress and the expression of genes involved in photosynthesis and microcystin disposition in *Microcystis aeruginosa*. *Aquat Toxicol*, 2010, 99(3): 405-412.
- [32] Wang B, Wang X, Hu Y, et al. The combined effects of UV-C radiation and H₂O₂ on *Microcystis aeruginosa*, a bloom-forming cyanobacterium. *Chemosphere*, 2015, 141: 34-43.
- [33] Lupinková L, Komenda J. Oxidative modifications of the photosystem II D1 protein by reactive oxygen species: from isolated protein to cyanobacterial cells. *Photochem Photobiol*, 2004, 79(2): 152-162.
- [34] Nishiyama Y, Allakhverdiev SI, Murata N. A new paradigm for the action of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1757(7): 742-749.
- [35] 李信书, 唐学玺. 亚心形扁藻超氧化物歧化酶活性对镉和铜的应答. *海洋湖沼通报*, 2007, 3: 75-80.
- Li XS, Tang XX. Response of superoxide dismutase activity to cadmium and copper in *Platymonas subcordiformis*. *CSOL*, 2007, 3: 75-80 (in Chinese).
- [36] Taylor ER, Hurrell F, Shannon RJ. Reversible glutathionylation of complex I increases mitochondrial superoxide formation. *J Bio Chem*, 2003, 278(22): 19603-19610.
- [37] 许敏, 徐旭东. 微囊藻气囊尺寸与 gvpA/gvpC 基因的关系. *水生生物学报*, 2010, 34(6): 1228-1230.
- Xu M, Xu XD. Correlation between sizes of gas vesicles and *gvpA/gvpC* in *Microcystis*. *Acta Hydrobiol Sin*, 2010, 34(6): 1228-1230 (in Chinese).
- [38] Dunton PG, Walsby AE. The diameter and critical collapse pressure of gas vesicles in *Microcystis* are correlated with GvpCs of different length. *FEMS Microbiol Lett*, 2005, 247(1): 37-43.

(本文责编 陈宏宇)