

# 生物合成气囊：一种兼具成像与治疗性能的纳米级囊泡

叶植超<sup>1\*</sup>, 邹易<sup>2\*</sup>, 段怡凡<sup>3</sup>, 龙欢<sup>4</sup>, 梁华庚<sup>1#</sup>

<sup>1</sup>华中科技大学同济医学院附属协和医院泌尿外科, 湖北 武汉

<sup>2</sup>华中科技大学同济医学院附属同济医院骨科, 湖北 武汉

<sup>3</sup>华中科技大学同济医学院附属协和医院第一临床学院, 湖北 武汉

<sup>4</sup>中国科学院水生生物研究所藻类生物学重点实验室, 湖北 武汉

收稿日期: 2023年11月27日; 录用日期: 2023年12月21日; 发布日期: 2023年12月28日

## 摘要

气囊是一种存在于蓝藻、古菌等多种原核微生物中的纳米级中空蛋白结构, 其作用是细胞提供浮力, 赋予其在水环境中控制漂浮深度的能力。气囊壁厚约2 nm, 内部疏水、外部亲水, 气体可以自由通过气囊壁进行交换。目前已知的编码气囊的基因约8~20多个, 其中编码气囊壁结构蛋白的基因GvpA和GvpC尤为关键。GvpA基因的表达是气囊合成所必须的, GvpC基因的表达对气囊的合成是非必须的, 但表达GvpC蛋白可增强气囊外壳的抗压能力。通过去除、添加或修饰GvpC, 气囊可以作为一个多功能分子平台实现疫苗研发、靶向治疗以及多模态医学成像等。在本篇综述中, 我们介绍了气囊的结构与基本特性、编码基因及相关基因工程改造的研究进展, 着重分享了气囊在超声成像等领域潜在的临床应用价值, 并讨论了在应用过程中可能面临的问题。

## 关键词

气囊, 医学影像, 靶向治疗, 疫苗

# Biosynthetic Gas Vesicle: A Kind of Nano-Scaled Vesicle with Imaging and Therapeutic Properties

Zhichao Ye<sup>1\*</sup>, Yi Zhou<sup>2\*</sup>, Yifan Duan<sup>3</sup>, Huan Long<sup>4</sup>, Huageng Liang<sup>1#</sup>

<sup>1</sup>Department of Urology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan Hubei

<sup>2</sup>Department of Orthopedics, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and

\*共一作者。

#通讯作者。

文章引用: 叶植超, 邹易, 段怡凡, 龙欢, 梁华庚. 生物合成气囊: 一种兼具成像与治疗性能的纳米级囊泡[J]. 临床医学进展, 2023, 13(12): 20062-20071. DOI: 10.12677/acm.2023.13122825

Technology, Wuhan Hubei

<sup>3</sup>First Clinic School, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan Hubei

<sup>4</sup>Key Laboratory of Algal Biology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan Hubei

Received: Nov. 27<sup>th</sup>, 2023; accepted: Dec. 21<sup>st</sup>, 2023; published: Dec. 28<sup>th</sup>, 2023

## Abstract

Gas vesicles (GVs) are nano-scaled, hollow proteinaceous structures found in numerous prokaryotic microorganisms such as cyanobacteria and archaea. Their function is to provide buoyancy to cells, giving them the ability to control their floating depth in the aqueous environment. The wall of GV is about 2 nm thick, hydrophobic inside and hydrophilic outside, and gas molecules can be freely exchanged through it. Presently, about 8~20 genes encoding GV have been identified, among which GvpA and GvpC genes that encode wall structural proteins are particularly critical. The expression of the GvpA gene is necessary for synthesis, while the expression of the GvpC gene is not, but the expression of the GvpC protein enhances the pressure resistance of the wall. By removing, adding or modifying GvpC, GV can be used as a versatile molecular platform for vaccine research and development, targeted therapy, and multimodal medical imaging. In this review, we introduce the structure and basic features of GV, coding genes and related genetic engineering advances. Potential clinical applications of GV in ultrasound imaging and other fields are shared, and the possible issues that may be faced in the applications are discussed.

## Keywords

Gas Vesicles, Medical Imaging, Targeted Therapy, Vaccine

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

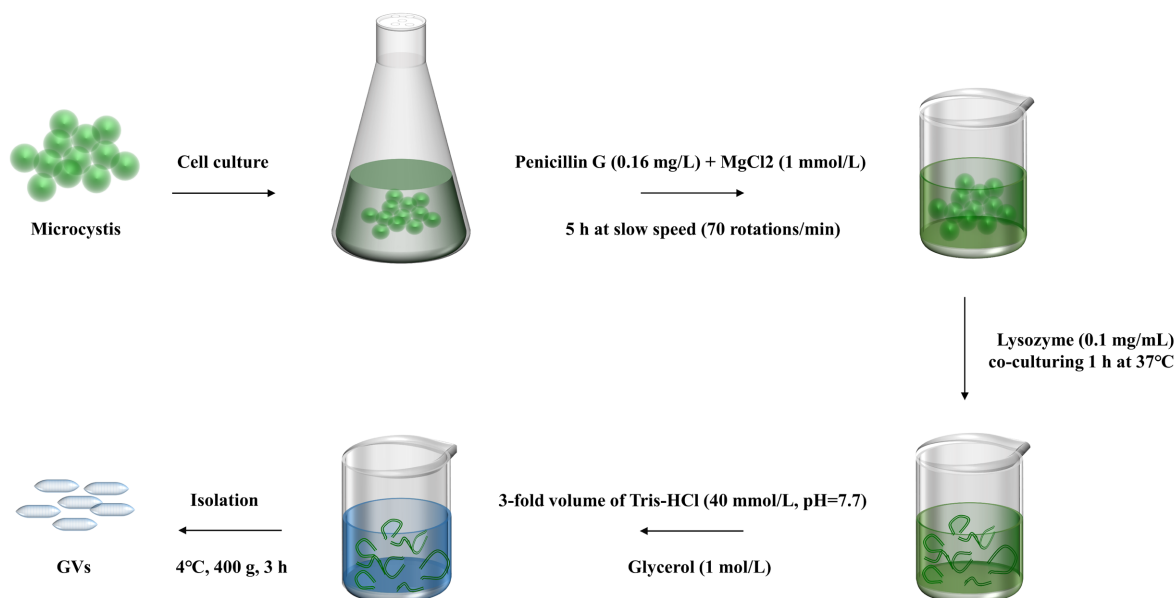
## 1. 引言

气囊(Gas vesicles, GV)是一种由蛋白质外壳包裹气体形成的中空纳米级尺寸的一类细胞器。气囊首先在蓝藻中发现[1],其作用是为细胞提供浮力,通过其在水环境中控制漂浮深度的能力[2],从而选择最适宜进行光合作用的位置;这有利于群体繁殖,获得竞争优势。

气囊的生物发生是从顶端开始生长的,由双圆锥体逐渐成长为两端双锥形或纺锤状、中间圆柱状结构[3][4]。在许多原核微生物内都可以观察到气囊的合成,主要包括:嗜盐古细菌、蓝藻、异养细菌三大类[5]。

根据气囊具有浮力这个特性,可以将其从细菌中分离纯化出来。首先,根据细菌的种类选用抗生素、溶菌酶或高渗溶液使细菌裂解,再通过离心或漂浮的方法,就可以将气囊从裂解后的细菌中分离。以微囊藻的提取为例(见图1),往对数生长期(OD500 = 0.6~1.0)或指数生长期(每毫升  $5 \times 10^7$  个细胞)的细胞中加入  $MgCl_2$  (终浓度: 1 mmol/L)和青霉素 G (终浓度: 0.16 mg/L),慢速(70 转/分钟)培养 5 小时后离心(条件: 4°C, 600 g, 15 分钟)并收集细胞。加入溶菌酶(终浓度: 0.1 mg/mL), 37°C 条件下共同孵育 1 小时。往上述混合物中加入甘油(终浓度: 1 mol/L),混合均匀后迅速加入 3 倍混合物体积的 Tris-HCl 溶液(浓度:

40 mmol/L, pH = 7.7)裂解细胞, 气囊从细胞中释放后通过长时间低速离心(条件: 4°C, 400 g, 3 小时)的方式收集气囊漂浮层[6] [7] [8]。还可以通过过氧化氢法裂解微囊藻细胞, 并进一步低速离心纯化气囊[9]。



**Figure 1.** Extraction of gas vesicles from microcystis  
**图 1.** 微囊藻气囊的提取流程

## 2. 气囊的结构与编码基因

气囊壁由蛋白质构成, 是一个稳定的、惰性的结构, 厚约 2 nm, 其内部疏水、外部亲水, 气体可从外部周围介质中自由通过囊壁进行交换[6] [7]。以目前研究中较常用的为例, 该藻类的气囊由两种主要结构蛋白——气囊蛋白 A (GvpA)和气囊蛋白 C (GvpC), 以及一些次要的蛋白成分构成。GvpA 是一种 7.4 kDa 的疏水性蛋白质, 通过形成垂直于纳米结构长轴的 4.6 nm 宽的骨架而组装到气囊壁的主链中, 从而构成气囊的圆柱壳和锥形端。GvpC 是亲水性蛋白质, 包含 5 个高度保守的 33 个氨基酸重复序列, 具有可预测的  $\alpha$  螺旋结构, 通过结合到 GvpA 的外表面来增强 GV 外壳的韧性[10] [11] [12]。

有关气囊编码基因的研究是从 *Calothrix* sp. PCC 7601 入手的, 最先找到了编码关键结构蛋白的基因 GvpA、GvpC, 现已知气囊的编码基因约 8~20 多个[2] [6]。其中, GvpA 基因的表达是气囊合成所必须的, 而 GvpC 表达的蛋白是非必须的, 其表达可以提高气囊的稳定性及抗压能力[13] [14] [15] [16]。进一步的研究表明, 不同微生物中合成气囊的操纵子及气囊的合成元件多样性强, 具有合成不同大小、抗压能力等属性气囊的潜质, 其中编码气囊壁蛋白的基因 GvpA 保守性较强[17]。例如, 在 *Halobacterium* 属 NRC-1 中, 经测序分析共发现了 14 个 Gvp 基因构成了两个不同的操纵子, 分别为 GvpD、E、F、G、H、I、J、K、L、M 和 GvpA、C、N、O [18] [19]; *Anabaena flos-aquae* 中的气囊操纵子含有 Gvp A、C、F、J、K、L 和 GvpN 基因[20]; 巨大芽孢杆菌的气囊操纵子含 11 个基因编码气囊的表达[21]。

生物合成的气囊在超声下发生屈曲, 表现出非线性的超声特性[22]。利用适当的超声脉冲信号很容易与背景组织产生的线性信号区分开来, 从而达到超声造影成像的效果[23]。LI NING 等将鱼腥藻的 GvpA、GvpC 结合巨大芽孢杆菌的气囊辅助基因组合, 实现了气囊在大肠杆菌中的异源表达[21], 并进一步将气囊基因作为声学报告基因(ARG)进行超声成像, 还可通过对基因加以修饰来满足对成像的特定需求[24]

[25]。Arash Farhadi 等将源自巨大芽孢杆菌的其中 9 个编码气囊的基因导入哺乳动物细胞基因组内, 实现了气囊声学报告基因在哺乳动物中的异源表达, 取得了良好的超声成像效果, 且导入该基因不会对宿主细胞产生显著的毒性[26]。此外, 由于气囊相对于水具有不同的磁化率(气囊内部空气含量的磁化率为 +0.37 ppm, 水的抗磁性为 -9.0 ppm), 生物合成的气囊在磁共振成像(MRI)中可以产生对比度, 定量 MRI 对比显示 T2\* 和 T2 弛豫度分别为  $1.19 \pm 0.23 \text{ nM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  和  $0.67 \pm 0.11 \text{ nM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ , 摩尔磁化率为  $18.53 \pm 0.91 \text{ ppb nM}^{-1}$ , 表明气囊有望成为 MRI 的报告基因[27]。

### 3. 气囊的性质和应用潜力

对化学合成的超声分子影像探针的表征主要依赖两种方法, 分别是对比成像技术和破坏 - 补充法[28]。现有的研究证明生物合成的气囊也可用这两种方法来表征。例如, Cherin 等发现嗜盐古菌 (*Halobacterium salinarum*) 的气囊在不同超声机械力(声压频率均高于 550 kPa)的作用下会发生不可逆的坍塌形变, 从而表现出非线性超声特性[22]。将气囊应用于小鼠体内超声成像时, 气囊区域与周围正常组织的超声造影信号存在明显的对比度。声压一旦超过临界压力, 气囊便会发生不可逆转的塌陷。超声下塌陷的气囊的造影信号可基本消除, 从而生成减影图像[29]。

气囊壁蛋白的力学性能和圆柱结构的直径决定气囊的临界塌陷压力[30], 不同微生物合成的气囊具有不同的抗压能力, 在超声造影图像上的对比度也有差异[2] [29]。坍塌压力较低的气囊在超声成像中更易用声压来清除其信号, 坍塌压力较高的气囊相对更易分离提纯[29], 因此在研究和应用中应根据需求选择合成不同属性的气囊。由于 GvpC 对气囊的稳定性和抗压能力有增强作用[31], 通过对该蛋白的编辑或修饰, 可以改变气囊的抗压能力等以满足不同研究和应用的需求[32]。

对来自多种藻类和细菌的 GvpC 序列的分析表明, 不同微生物中该蛋白的保守性较差, 因此 GvpC 具有更高的改造灵活性[12]。在 Elizabeth S. Stuart 等的研究中, 将特定的氨基酸序列插入 GvpC 的序列中, 用重组后的气囊作为疫苗诱导免疫应答[33]。气囊独特的机械、声学、表面和靶向等各项特性, 还可以结合起来, 进行更充分的利用。Lakshmanan 等证明去除、添加或修饰 GvpC 会导致气囊的机械性能发生变化, 从而改变其声学特性, 说明 GvpC 具有用作基于气囊的超声造影剂分子工程的多功能平台的潜质[32]。例如, 通过将特定蛋白酶识别和作用的氨基酸序列与 GvpC 融合, 生物合成出一种特殊的气囊, 能被蛋白酶激活产生高对比度非线性超声, 从而实现以超声检测酶促反应的发生[25]。

### 4. 气囊可能的临床应用价值

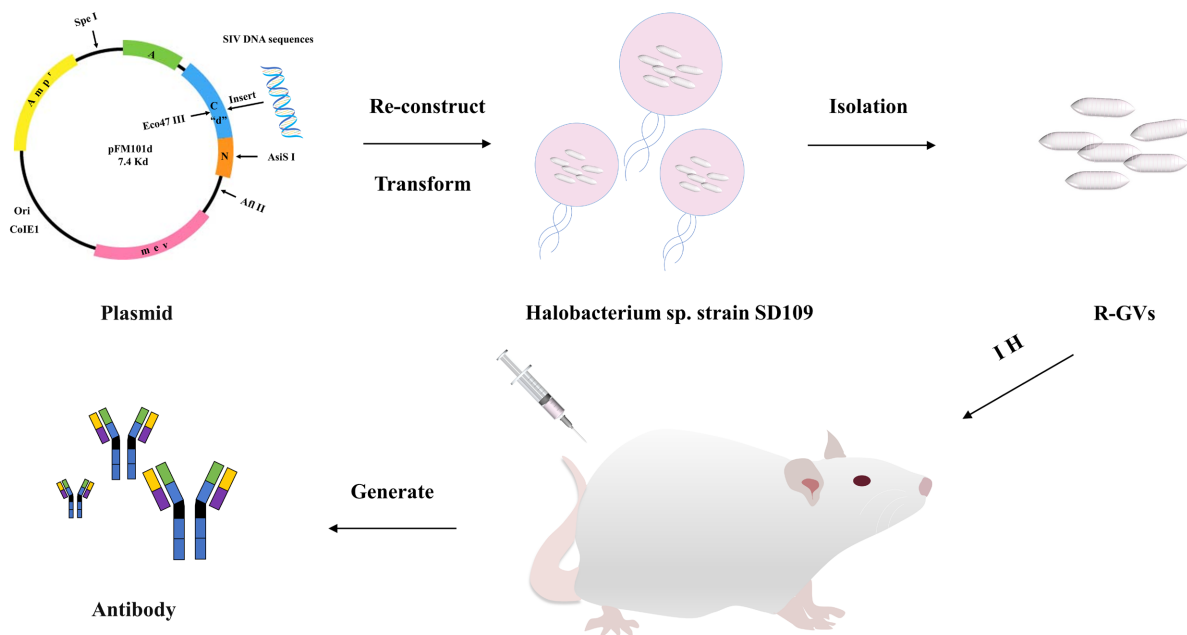
在现有的研究中, 化学合成的纳米囊泡主要用作超声成像剂和药物载体[28] [34]。与化学合成纳米囊泡相比, 生物合成的气囊有其独特的优势: 良好的生物相容性, 纯蛋白结构的囊壁赋予其高度的可修饰性, 可通过合成生物学与基因工程方法来改造和修饰[32] [33] [35]。这使得生物合成气囊在临床医学领域具有更大的应用潜能。目前, 生物合成气囊在临床医学领域的应用研究主要包括疫苗[36]、成像[37] [38] [39] [40]、靶向治疗[41]等方面。

#### 4.1. 疫苗

在气囊蛋白 GvpC 的 C 端区域插入抗原表位相关基因序列, 从而使气囊表面表达插入的序列[33] [42], 这一特性被用于疫苗的研发。气囊在疫苗的制作中起到双重作用。首先, 把抗原与气囊连接后具有免疫原性, 故气囊起着载体的作用。其次, 在没有外源佐剂的情况下, 将气囊悬在 PBS 中接种就可引发强烈的抗体反应, 因此气囊还可起到佐剂的作用[33]。

Marinko Sremac 等将 SIV 基因组插入 GvpC 基因中, 再用重组的气囊免疫小鼠后, 小鼠的抗血清测试显示出显著的抗体滴度(见图 2)。该研究还指出由于气囊化学性质呈惰性, 可以在细胞内缓慢降解, 导

致抗原缓慢释放, 从而使升高的抗原特异性抗体持续时间更长[43]。



**Figure 2.** Recombinant gas vesicles as pathogen peptide delivery vehicle [43]

**图 2.** 重组气囊作为病原体肽载体[43]

## 4.2. 医学影像

生物合成气囊特有的机械和声学特性, 满足对超声分子造影剂信号定量的需求, 在超声脉冲刺激下, 屈曲的气囊产生的非线性信号很容易和背景组织产生的线性信号相区分, 因此有开发作为超声造影剂 (Ultrasound contrast agent, UCA) 应用于临床的潜力, 在 Mikhail G. Shapiro 等的研究中已经得到了很好的阐释和验证[29]。

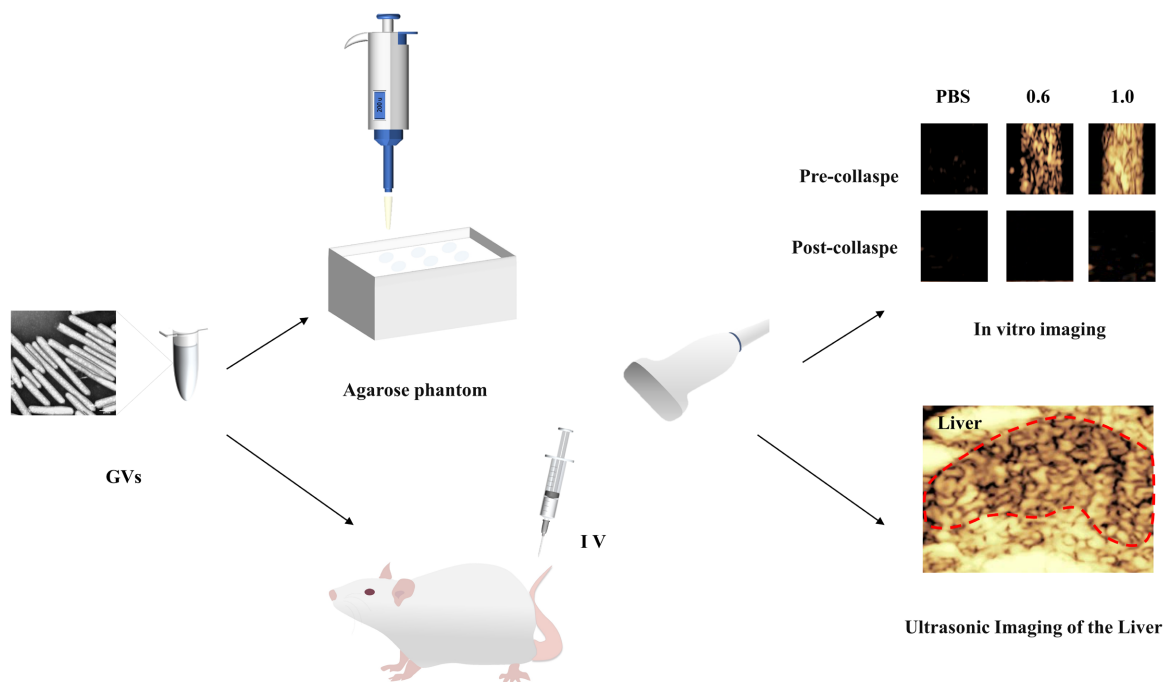
此外作为纳米级材料, 气囊具有通过 ERP 效应(高通透性和滞留效应)进入血管外靶标的潜力, 可以借助 ERP 效应在肿瘤组织内的靶向聚集[44], 从而进行肿瘤成像。本研究团队将从微囊藻中分离得到的气囊进行体内、外成像, 结果显示气囊具有良好的成像效果, 且超声对比增强信号强度与浓度呈正相关(见图 3)。此外, 通过尾静脉注射气囊到裸鼠体内, 其在肝脏中的超声造影信号可持续 10 小时以上[8], 表明生物合成的气囊在血液循环系统中具有较强的稳定性。

编码气囊声学报告基因(ARG)有望在临床影像检查中得到应用。Raymond W. Bourdeau 等将表达 ARG 的大肠杆菌引入麻醉小鼠结肠, 实现活体动物体内的转基因细菌超声下可视化。该发现有助于进一步开发微生物在诊断和治疗方面的潜力[24]。Arash Farhadi 等将巨大芽孢杆菌的气囊基因插入 HEK293T 细胞的基因组中, 然后接种在免疫缺陷的小鼠中形成肿瘤, 在超声下观察可见肿瘤组织有明显对比度。这说明该技术能够用于监测生物体内细胞的位置和功能, 有望用于开发新的基于细胞的超声诊断和治疗方法。Arash Farhadi 等提出如果能通过病毒载体将 ARG 导入内源性细胞, 将会进一步提高该技术的价值[26]。考虑到第一代 ARG 用于监测基因表达方面的效用有限, Robert C. Hurt 等通过基因组挖掘及基因工程对 ARG 进行筛选及优化, 最终获得两个新的 ARGs——源自 *Serratia* sp. 39006 (bARG<sub>Ser</sub>) 的细菌 ARG 以及 *A. flos-aquae* (mARG<sub>Ana</sub>) 的哺乳动物 ARG, 两者产生的非线性对比度分别是第一代 ARG 的 9 倍和 38 倍[45]。在该研究中, 将哺乳动物 ARG 在人类乳腺癌细胞中表达, 可以实现肿瘤原位微尺度成像, 长期监

测肿瘤发展过程中异源基因的表达, 并实现肿瘤细胞的遗传定义亚群进行超声引导活检。

目前的研究表明, 由于气囊相对于水具有不同的磁化率, 可以在亚纳摩尔浓度下在磁共振成像(MRI)中产生较强的对比度, 并且这种对比度可以使用原位超声消除, 以实现无背景成像, 因此气囊也有开发为 MRI 造影剂的潜力。除了传统的质子 MRI, 气囊还能用作超极化  $^{129}\text{Xe}$  的造影剂[46] [47]。

此外, George J. Lu 等发现气囊相对于周围的水组织的微分折射率及其纳米尺度的运动, 使气囊可被静态和动态的光学相干断层扫描(optical coherence tomography, OCT)检测到。同样, 气囊的 OCT 对比度可以被超声选择性地原位擦除, 因而可以明确地辨识它们的位置[48]。



备注: ① 所用气囊源自微囊藻 FACHB-1326; ② 0.6、1.0 为气囊在 500 nm 波长处的光密度。

**Figure 3.** Gas vesicles using for ultrasound imaging

**图 3.** 气囊用于超声成像

### 4.3. 靶向治疗

由于气囊表面的 GvpC 易被去除或改造[32], 利用这一点可以在气囊表面添加特定的蛋白, 赋予其对不同细胞的靶向能力。Avinoam Bar-Zion 等提出低频超声可以将气囊分子转换为微米级空化气泡。该研究中, 制作了靶向细胞表面受体的气囊, 通过超声远程引爆, 可以用于杀伤特定细胞。基因重组后表达气囊的细菌也可以通过低频超声使其裂解, 释放细胞内有效载荷, 发挥治疗作用[49]。

除此以外, 利用干细胞的“归巢效应”, 将气囊与干细胞相结合并迁移至目标组织同样可作为靶向治疗的新思路。以往研究表明, 间充质干细胞(MSCs)可通过多种机制减轻病理性免疫, 并被用作治疗自身免疫性疾病工具[50]。鉴此, Zheli Gong 等构建了气囊标记的 GV@MSCs, 并与甲氨蝶呤协同治疗类风湿性关节炎(RA)。结果显示, GV@MSCs 从 RA 小鼠的关节皮下层迁移、归巢至关节腔的过程可通过超声成像直视, 治疗后小鼠的关节炎症状得到缓解[51]。

气囊壁蛋白排列紧密, 具有不透水, 但允许气体扩散的性质[2]。Lin Song 等尝试将脂质覆盖的气囊开发为一种氧气输送载体, 从小鼠尾静脉注射后, 借助 ERP 效应向肿瘤靶向聚集, 提高体内低氧肿瘤中

的氧合水平, 证明其可以安全地提高了肿瘤 PDT 的疗效[52]。

## 5. 气囊的应用将会面临的问题

Le Floc'h, J 等用放射性 Tc-99m 标记气囊后通过静脉注射小鼠, 分别行小鼠体内 SPECT 定量生物分布研究和处死后的离体组织计数, 发现绝大多数 Tc-99m 标记气囊会快速被网状内皮系统(RES)的摄取, 信号主要分布在胆, 肝, 肺, 小肠, 脾和膀胱, 部分器官两小时后仍可检测到信号。而 Tc-99m 标记气囊在血液中的存在时间相对较短, 注射 Tc-99m 标记气囊 2 分钟后, 血液中就几乎检测不到 Tc-99m 标记气囊残留。这说明 Tc-99m 标记气囊在肿瘤成像中的应用价值有限, 因为其不能在循环中稳定存在足够长的时间以渗入靶组织[53]。

以现阶段已经走向临床的化学合成纳米囊泡为例, 使用例如聚乙二醇、聚山梨酯 80 等表面修饰, 会增加其在循环中的停留时间[54] [55]。生物合成气囊加以修饰后其相较天然气囊获得更强的目标组织靶向性和免疫逃逸能力[56]。Judy Yan 等用 2-, 5-或 10-kDa 聚乙二醇(PEG)包被气囊可以显著延长其在肿瘤组织内的停留时间[57]。Wang 等将聚乙二醇(PEG)和透明质酸(HA)整合到气囊壁中(PH-GV), 在注入小鼠静脉后的 6 到 48 小时内, 可以检测到 PH-GV 在肿瘤部位的细胞核周围持续存在, 证明了 PH-GV 具有作为靶向 UCA 的潜力[58]。

目前, 气囊无论是与哺乳动物细胞共同孵育, 或 directly 对小鼠静脉注射进行毒性实验, 均未发现其具有急性细胞毒性, 或对小鼠造成急性毒性或不良反应[29] [53] [58]。将声学报告基因 ARG 直接导入细菌或哺乳动物细胞基因进行表达, 并施加声压使气囊在细胞内坍塌, 均未造成细胞形态的改变[24] [26]。但是, 现有对于气囊在超声成像方面的应用的研究还集中在对其应用潜力和价值的探索, 关注点还未到达气囊对细胞或动物内环境的改变及可能的长期影响等(例如引起机体怎样的免疫应答)。对于气囊在体内代谢过程的研究也停留在以健康小鼠或荷瘤鼠为研究对象, 其在健康人体、以及临床中患有不同疾病的患者中的代谢过程如何, 会对机体造成怎样的影响, 目前的研究还未涉及。

此外, 未来的研究中有待开发适应不同超声成像频率的气囊, 以适应不同超声诊疗的需求。18MHz 的高频超声是目前研究生物合成气囊在动物体内成像效果的常用频率。例如, Mikhail G. Shapiro 等由小鼠静脉注射 Halo 气体囊泡检验超声成像效果[29]、Wang 等在实验中用到的经修饰的 PH-GV [58]、Arash Farhadi 等将声学报告基因导入 HEK 细胞基因组进行表达, 都是靠 18 MHz 的高频超声来识别的[26]。Mikhail G. Shapiro 等在小鼠皮下注射 150  $\mu$ L Halo 气囊, 在超声频率为 6 MHz 下的二次谐波成像可以观察到增强的信号。但 6 MHz 的超声频率下, Ana 气囊却未产生谐波信号[29]。临床上使用二次谐波来完成人体脏器成像, 常用的超声频率在 2~10 MHz。由于大规模地更新或替换临床的超声设备较难实现, 因此, 贴合临床设备的要求, 开发能够在更低的超声频率下显示清晰的信号的气囊是生物合成气囊作为 UCA 被广泛应用的前提。

生物合成气囊的大规模生产也是一个需要考虑的问题。化学合成纳米囊泡的制备技术已经较为成熟, 主要包括溶剂蒸发法, 二次乳化法, 自发乳化/溶剂扩散和纳米沉淀等, 可以用于批量生产[59]。而现有的研究中用到的生物合成气囊都是研究者将培养的藻类或细菌裂解, 提取气囊, 再经过反复低速离心纯化获得[6] [7]。虽然生物合成气囊并未投入大规模生产, 但在技术上是是可以实现的, 因为盐杆菌所需培养条件简单且不易被污染, 利用气囊浮力来分离提纯经济且简便, 因此 Elizabeth S. Stuart 等对气囊的生产成本问题持乐观态度[33]。关于气囊的储存与运输, 气囊可在 5 $^{\circ}$ C 的水悬浮液中储存一年或更长时间而不发生破裂[6], 但 Walsby 等发现, Ana 的 GV 如此长期储存, 会导致气囊的 GvpC 分解消失[12]。如上文所述, GvpC 的改变是会影响气囊的机械、声学等性质的, 这会对其应用价值产生影响。我们的前期研究中发现, 改变环境 pH 值可使气囊发生可逆的充放气, 该机制的阐明对气囊的储存和运输提供了参考依

据[60]。

## 6. 结论

综上所述,生物合成气囊在超声成像、核磁共振、靶向治疗、疫苗研发等方面具有广阔的应用前景。生物合成气囊具有生物相容性好、稳定性强、易于通过合成生物学和基因工程的方法对其进行改造和修饰的优势;但也面临成像频率与临床超声设备不兼容、目前还未实现大规模生产等瓶颈;气囊生物合成的分子机理也有待进一步更深入的研究。

## 致 谢

本文得到国家重点研发计划(2020YFA0908800)的资助。

## 参考文献

- [1] Bowen, C.C. and Jensen, T.E. (1965) Blue-Green Algae: Fine Structure of the Gas Vacuoles. *Science*, **147**, 1460-1462. <https://doi.org/10.1126/science.147.3664.1460>
- [2] Walsby, A.E. (1994) Gas Vesicles. *Microbiological Reviews*, **58**, 94-144. <https://doi.org/10.1128/mr.58.1.94-144.1994>
- [3] Waaland, J.R. and Branton, D. (1969) Gas Vacuole Development in a Blue-Green Alga. *Science*, **163**, 1339-1341. <https://doi.org/10.1126/science.163.3873.1339>
- [4] Dutka, P., et al. (2021) Measuring Gas Vesicle Dimensions by Electron Microscopy. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, **30**, 1081-1086. <https://doi.org/10.1002/pro.4056>
- [5] Pfeifer, F. (2012) Distribution, Formation and Regulation of Gas Vesicles. *Nature Reviews Microbiology*, **10**, 705-715. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2834>
- [6] Walsby, A.E. (1974) The Isolation of Gas Vesicles from Blue-Green Algae. *Methods in Enzymology*, **31**, 678-686. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(74\)31073-7](https://doi.org/10.1016/0076-6879(74)31073-7)
- [7] Jones, D.D. and Jost, M. (1970) Isolation and Chemical Characterization of Gas-Vacuole Membranes from *Microcystis aeruginosa* Kuetz. emend. Elenkin. *Archives of Microbiology*, **70**, 43-64. <https://doi.org/10.1007/BF00691059>
- [8] Long, H., et al. (2021) Non-Modified Ultrasound-Responsive Gas Vesicles from *Microcystis* with Targeted Tumor Accumulation. *International Journal of Nanomedicine*, **16**, 8405-8416. <https://doi.org/10.2147/IJN.S342614>
- [9] 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. <https://doi.org/10.13345/j.cjb.210265>
- [10] Hayes, P.K., Lazarus, C.M., Bees, A., Walker, J.E. and Walsby, A.E. (1988) The Protein Encoded by gvpC Is a Minor Component of Gas Vesicles Isolated from the Cyanobacteria *Anabaena flos-aquae* and *Microcystis* sp. *Molecular Microbiology*, **2**, 545-552. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1988.tb00062.x>
- [11] Hayes, P.K. (1986) The Inverse Correlation between Width and Strength of Gas Vesicles in Cyanobacteria. *British Phycological Journal*, **21**, 191-197. <https://doi.org/10.1080/00071618600650221>
- [12] Walsby, A.E. and Hayes, P.K. (1989) Gas Vesicle Proteins. *Biochemical Journal*, **264**, 313-322. <https://doi.org/10.1042/bj2640313>
- [13] Blaurock, A.E. and Walsby, A.E. (1976) Crystalline Structure of the Gas Vesicle Wall from *Anabaena flos-aquae*. *Journal of Molecular Biology*, **105**, 183-199. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(76\)90106-6](https://doi.org/10.1016/0022-2836(76)90106-6)
- [14] Damerval, T., Castets, A.M., Guglielmi, G., Houmard, J. and Tandeau de Marsac, N. (1989) Occurrence and Distribution of Gas Vesicle Genes among Cyanobacteria. *Journal of Bacteriology*, **171**, 1445-1452. <https://doi.org/10.1128/jb.171.3.1445-1452.1989>
- [15] Damerval, T., Houmard, J., Guglielmi, G., Csiszar, K. and Tandeau de Marsac, N. (1987) A Developmentally Regulated gvpABC Operon Is Involved in the Formation of Gas Vesicles in the Cyanobacterium *Calothrix* 7601. *Gene*, **54**, 83-92. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(87\)90350-7](https://doi.org/10.1016/0378-1119(87)90350-7)
- [16] Tandeau de Marsac, N., Mazel, D., Bryant, D.A. and Houmard, J. (1985) Molecular Cloning and Nucleotide Sequence of a Developmentally Regulated Gene from the Cyanobacterium *Calothrix* PCC 7601: A Gas Vesicle Protein Gene. *Nucleic Acids Research*, **13**, 7223-7236. <https://doi.org/10.1093/nar/13.20.7223>
- [17] Griffiths, A.E., Walsby, A.E. and Hayes, P.K. (1992) The Homologies of Gas Vesicle Proteins. *The Journal of General Microbiology*, **138**, 1243-1250. <https://doi.org/10.1099/00221287-138-6-1243>
- [18] Ng, W.L., Kothakota, S. and DasSarma, S. (1991) Structure of the Gas Vesicle Plasmid in *Halobacterium halobium*:



- Inversion Isomers, Inverted Repeats, and Insertion Sequences. *Journal of Bacteriology*, **173**, 1958-1964. <https://doi.org/10.1128/jb.173.6.1958-1964.1991>
- [19] Offner, S., Ziese, U., Wanner, G., Typke, D. and Pfeifer, F. (1998) Structural Characteristics of Halobacterial Gas Vesicles. *Microbiology (Reading)*, **144**, 1331-1342. <https://doi.org/10.1099/00221287-144-5-1331>
- [20] Kinsman, R. and Hayes, P.K. (1997) Genes Encoding Proteins Homologous to Halobacterial Gvps N, J, K, F and L Are Located Downstream of gvpC in the Cyanobacterium *Anabaena flos-aquae*. *DNA Sequencing*, **7**, 97-106. <https://doi.org/10.3109/10425179709020156>
- [21] Li, N. and Cannon, M.C. (1998) Gas Vesicle Genes Identified in *Bacillus megaterium* and Functional Expression in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, **180**, 2450-2458. <https://doi.org/10.1128/JB.180.9.2450-2458.1998>
- [22] Cherin, E., et al. (2017) Acoustic Behavior of *Halobacterium salinarum* Gas Vesicles in the High-Frequency Range: Experiments and Modeling. *Ultrasound in Medicine and Biology*, **43**, 1016-1030. <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2016.12.020>
- [23] Maresca, D., et al. (2017) Nonlinear Ultrasound Imaging of Nanoscale Acoustic Biomolecules. *Applied Physics Letters*, **110**, Article ID: 073704. <https://doi.org/10.1063/1.4976105>
- [24] Bourdeau, R.W., et al. (2018) Acoustic Reporter Genes for Noninvasive Imaging of Microorganisms in Mammalian Hosts. *Nature*, **553**, 86-90. <https://doi.org/10.1038/nature25021>
- [25] Lakshmanan, A., et al. (2020) Acoustic Biosensors for Ultrasound Imaging of Enzyme Activity. *Nature Chemical Biology*, **16**, 988-996. <https://doi.org/10.1038/s41589-020-0591-0>
- [26] Farhadi, A., Ho, G.H., Sawyer, D.P., Bourdeau, R.W. and Shapiro, M.G. (2019) Ultrasound Imaging of Gene Expression in Mammalian Cells. *Science*, **365**, 1469-1475. <https://doi.org/10.1126/science.aax4804>
- [27] Lu, G.J., et al. (2018) Acoustically Modulated Magnetic Resonance Imaging of Gas-Filled Protein Nanostructures. *Nature Materials*, **17**, 456-463. <https://doi.org/10.1038/s41563-018-0023-7>
- [28] Abou-Elkacem, L., Bachawal, S.V. and Willmann, J.K. (2015) Ultrasound Molecular Imaging: Moving toward Clinical Translation. *European Journal of Radiology*, **84**, 1685-1693. <https://doi.org/10.1016/j.ejrad.2015.03.016>
- [29] Shapiro, M.G., et al. (2014) Biogenic Gas Nanostructures as Ultrasonic Molecular Reporters. *Nature Nanotechnology*, **9**, 311-316. <https://doi.org/10.1038/nnano.2014.32>
- [30] Dunton, P.G. and Walsby, A.E. (2005) The Diameter and Critical Collapse Pressure of Gas Vesicles in *Microcystis* Are Correlated with GvpCs of Different Length. *FEMS Microbiology Letters*, **247**, 37-43. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.04.026>
- [31] Hayes, P.K., Buchholz, B. and Walsby, A.E. (1992) Gas Vesicles Are Strengthened by the Outer-Surface Protein, GvpC. *Archives of Microbiology*, **157**, 229-234. <https://doi.org/10.1007/BF00245155>
- [32] Lakshmanan, A., et al. (2016) Molecular Engineering of Acoustic Protein Nanostructures. *ACS Nano*, **10**, 7314-7322. <https://doi.org/10.1021/acs.nano.6b03364>
- [33] Stuart, E.S., Morshed, F., Sremac, M. and DasSarma, S. (2001) Antigen Presentation Using Novel Particulate Organelles from Halophilic Archaea. *Journal of Biotechnology*, **88**, 119-128. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00267-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00267-X)
- [34] Kothamasu, P., et al. (2012) Nanocapsules: The Weapons for Novel Drug Delivery Systems. *Bioimpacts*, **2**, 71-81.
- [35] Sawyer, D.P., et al. (2021) Ultrasensitive Ultrasound Imaging of Gene Expression with Signal Unmixing. *Nature Methods*, **18**, 945-952. <https://doi.org/10.1038/s41592-021-01229-w>
- [36] DasSarma, S. and DasSarma, P. (2015) Gas Vesicle Nanoparticles for Antigen Display. *Vaccines*, **3**, 686-702. <https://doi.org/10.3390/vaccines3030686>
- [37] Ling, B., et al. (2020) Biomolecular Ultrasound Imaging of Phagolysosomal Function. *ACS Nano*, **14**, 12210-12221. <https://doi.org/10.1021/acs.nano.0c05912>
- [38] Jiang, Y., Hou, X., Zhao, X., Jing, J. and Sun, L. (2023) Tracking Adoptive Natural Killer Cells via Ultrasound Imaging Assisted with Nanobubbles. *Acta Biomaterialia*, **169**, 542-555. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2023.07.058>
- [39] Feng, Y., et al. (2023) Ultrasound Molecular Imaging of Bladder Cancer via Extradomain B Fibronectin-Targeted Biosynthetic GVs. *International Journal of Nanomedicine*, **18**, 4871-4884. <https://doi.org/10.2147/IJN.S412422>
- [40] Kim, W.S., et al. (2023) Magneto-Acoustic Protein Nanostructures for Non-Invasive Imaging of Tissue Mechanics *in Vivo*. *Nature Materials*. <https://doi.org/10.1038/s41563-023-01688-w>
- [41] Song, L., et al. (2021) Gas-Filled Protein Nanostructures as Cavitation Nuclei for Molecule-Specific Sonodynamic Therapy. *Acta Biomaterialia*, **136**, 533-545. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.09.010>
- [42] Stuart, E.S., Morshed, F., Sremac, M. and DasSarma, S. (2004) Cassette-Based Presentation of SIV Epitopes with Recombinant Gas Vesicles from Halophilic Archaea. *Journal of Biotechnology*, **114**, 225-237.

- <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.01.005>
- [43] Sremac, M. and Stuart, E.S. (2008) Recombinant Gas Vesicles from *Halobacterium* sp. Displaying SIV Peptides Demonstrate Biotechnology Potential as a Pathogen Peptide Delivery Vehicle. *BMC Biotechnology*, **8**, Article No. 9. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-8-9>
- [44] Maeda, H., Nakamura, H. and Fang, J. (2013) The EPR Effect for Macromolecular Drug Delivery to Solid Tumors: Improvement of Tumor Uptake, Lowering of Systemic Toxicity, and Distinct Tumor Imaging *in Vivo*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **65**, 71-79. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.10.002>
- [45] Hurt, R.C., *et al.* (2023) Genomically Mined Acoustic Reporter Genes for Real-Time *in Vivo* Monitoring of Tumors and Tumor-Homing Bacteria. *Nature Biotechnology*, **41**, 919-931. <https://doi.org/10.1038/s41587-022-01581-y>
- [46] Shapiro, M.G., *et al.* (2014) Genetically Encoded Reporters for Hyperpolarized Xenon Magnetic Resonance Imaging. *Nature Chemistry*, **6**, 629-634. <https://doi.org/10.1038/nchem.1934>
- [47] Mizushima, R., *et al.* (2020) Multiplexed (129) Xe HyperCEST MRI Detection of Genetically Reconstituted Bacterial Protein Nanoparticles in Human Cancer Cells. *Contrast Media and Molecular Imaging*, **2020**, Article ID: 5425934. <https://doi.org/10.1155/2020/5425934>
- [48] Lu, G.J., *et al.* (2020) Genetically Encodable Contrast Agents for Optical Coherence Tomography. *ACS Nano*, **14**, 7823-7831. <https://doi.org/10.1021/acsnano.9b08432>
- [49] Bar-Zion, A.E.A. (2019) Acoustically Detonated Biomolecules for Genetically Encodable Inertial Cavitation. <https://doi.org/10.1101/620567>
- [50] Sun, Y., *et al.* (2020) 3D Bioprinting Dual-Factor Releasing and Gradient-Structured Constructs Ready to Implant for Anisotropic Cartilage Regeneration. *Science Advances*, **6**, eaay1422. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aay1422>
- [51] Gong, Z., *et al.* (2022) Ultrasound Imaging Tracking of Mesenchymal Stem Cells Intracellularly Labeled with Biosynthetic Gas Vesicles for Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Theranostics*, **12**, 2370-2382. <https://doi.org/10.7150/thno.66905>
- [52] Song, L., *et al.* (2020) Biogenic Nanobubbles for Effective Oxygen Delivery and Enhanced Photodynamic Therapy of Cancer. *Acta Biomaterialia*, **108**, 313-325. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.03.034>
- [53] Le Floc'h, J., *et al.* (2018) *In Vivo* Biodistribution of Radiolabeled Acoustic Protein Nanostructures. *Molecular Imaging and Biology*, **20**, 230-239. <https://doi.org/10.1007/s11307-017-1122-6>
- [54] Bender, E.A., *et al.* (2012) Hemocompatibility of Poly( $\epsilon$ -caprolactone) Lipid-Core Nanocapsules Stabilized with Polysorbate 80-Lecithin and Uncoated or Coated with Chitosan. *International Journal of Pharmaceutics*, **426**, 271-279. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.01.051>
- [55] Prego, C., *et al.* (2006) Chitosan-PEG Nanocapsules as New Carriers for Oral Peptide Delivery. Effect of Chitosan Pegylation Degree. *Journal of Controlled Release*, **111**, 299-308. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.12.015>
- [56] Wang, Y., *et al.* (2023) Modification of PEG Reduces the Immunogenicity of Biosynthetic Gas Vesicles. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, **11**, Article ID: 1128268. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1128268>
- [57] Yan, J., Yin, M., Foster, F.S. and Démoré, C.E.M. (2020) Tumor Contrast Imaging with Gas Vesicles by Circumventing the Reticuloendothelial System. *Ultrasound in Medicine and Biology*, **46**, 359-368. <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2019.09.009>
- [58] Wang, G., *et al.* (2020) Surface-Modified GV's as Nanosized Contrast Agents for Molecular Ultrasound Imaging of Tumor. *Biomaterials*, **236**, Article ID: 119803. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.119803>
- [59] Musyanovych, A. and Landfester, K. (2014) Polymer Micro- and Nanocapsules as Biological Carriers with Multifunctional Properties. *Macromolecular Bioscience*, **14**, 458-477. <https://doi.org/10.1002/mabi.201300551>
- [60] 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. <https://doi.org/10.13345/j.cjb.230228>