DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20250804004
引用格式: 李嘉盛, 陈颖禧, 徐梦珂, 等. 游离型与整合型共表达增强毕赤酵母表达抗菌肽的水平研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(1): 137–145.
LI JS, CHEN YX, XU MK, *et al*. Study on the enhancement of antimicrobial peptide expression levels in *Pichia pastoris* by co-expression of episomal and integrative vectors [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(1): 137–145. (in Chinese with English abstract).

游离型与整合型共表达增强毕赤酵母表达抗菌肽的水平研究

李嘉盛[1], 陈颖禧[1], 徐梦珂[1], 张宏刚[2], 蒙海林[1*]
(1. 广州先进技术研究所, 生物工程研究中心, 广州 511458; 2. 广州格拉姆生物科技有限公司, 广州 510530)

摘 要: 目的 建立游离型与整合型载体共表达系统, 提高抗菌肽在毕赤酵母中的表达效率, 解决其因拷贝数限制和表达不稳定性导致的产量不足问题。**方法** 利用乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*)来源的 panARS 自主复制序列, 构建卡那霉素抗性的游离型表达载体 pPICK*α*A-panARS-JS21T 和 pGAPK*α*A-panARS-JS21T, 与整合型载体 pPICZ*α*A-JS21T 共同电转化毕赤酵母 X-33 菌株。通过博来霉素 Zeocin 和遗传霉素 G418 双抗生素平板筛选阳性转化子, 摇瓶发酵 120 h 以上, 每 24 h 补加甲醇诱导表达。采用 Bradford 法测定分泌总蛋白含量, 三羟甲基甘氨酸-十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(trimethylglycine-sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, Tricine-SDS-PAGE)检测目标条带, 琼脂扩散法测定对金黄色葡萄球菌的抑菌活性。**结果** 发酵 120 h 后, 整合型与游离型 pGAPK*α*A-panARS-JS21T 共表达组的上清总蛋白含量达到 107.22 μg/mL, 比单一整合型表达组 70.56 μg/mL 提高了 52%; 抑菌圈分析显示其抑菌活性提升 129% (P<0.05)。整合型与 pPICK*α*A-panARS-JS21T 共表达组也比单一整合型组提升了 15.8%。**结论** 游离型与整合型载体共表达策略可协同提高抗菌肽 JS21T 在毕赤酵母中的表达水平, 其效果优于单一载体系统, 为小分子肽类高效生产提供了新思路。

关键词: 毕赤酵母; 抗菌肽; 游离型表达; 整合型表达; 共表达

Study on the enhancement of antimicrobial peptide expression levels in *Pichia pastoris* by co-expression of episomal and integrative vectors

LI Jia-Sheng[1], CHEN Ying-Xi[1], XU Meng-Ke[1], ZHANG Hong-Gang[2], MENG Hai-Lin[1*]
(1. *Bioengineering Research Center*, *Guangzhou Institute of Advanced Technology*, *Guangzhou* 511458, *China*; 2. *Guangzhou GLAM Biotechnology Co*., *Ltd*., *Guangzhou* 510530, *China*)

ABSTRACT: Objective To establish a co-expression system combining episomal and integrative vectors, enhance

收稿日期: 2025-08-04
基金项目: 广州市科技计划项目(2023B03J1394, 2023B03J1177)
第一作者: 李嘉盛(1992—), 男, 硕士, 主要研究方向为微生物合成生物学。E-mail: Gaxinglee@163.com
***通信作者:** 蒙海林(1980—), 男, 博士, 研究员, 主要研究方向为微生物合成生物学。E-mail: hl.meng@giat.ac.cn

the expression efficiency of antimicrobial peptides in *Pichia pastoris*, and address the issue of insufficient production caused by copy number limitations and expression instability. **Methods** The 2 kanamycin-resistant episomal vectors, pPICK*α*A-panARS-JS21T and pGAPK*α*A-panARS-JS21T, were constructed using the *Kluyveromyces lactis* panARS autonomously replicating sequence. These were co-electroporated with the integrative vector pPICZ*α*A-JS21T into *Pichia pastoris* X-33. Positive transformants were selected on Zeocin plus G418 double-antibiotic plates. Shake-flask cultures were run for more than 120 h with methanol supplementation every 24 h to maintain induction. Secreted total protein was quantified by the Bradford assay, target bands were visualized by trimethylglycine-sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (Tricine-SDS-PAGE), and antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* was measured by agar diffusion. **Results** After 120 h of fermentation, the integrative plus episomal pGAPK*α*A-panARS-JS21T co-expression group yielded 107.22 μg/mL of extracellular total protein, 52% higher than 70.56 μg/mL of the integrative-only control. The corresponding inhibition-zone assay showed a 129% increase in antimicrobial activity (P<0.05). The integrative plus pPICK*α*A-panARS-JS21T group also achieved a 15.8% improvement over the integrative-only group. **Conclusion** A combined episomal/integrative co-expression strategy synergistically elevates JS21T antimicrobial peptide levels in *Pichia pastoris*, outperforming single-vector systems and offering a new route for high-level production of small peptide molecules.

KEY WORDS: *Pichia pastoris*; antimicrobial peptide; episomal expression; integrative expression; co-expression

0 引 言

抗菌肽(antimicrobial peptide, AMP)因其广谱的抗微生物活性、独特的作用机制以及不易引发耐药性的特点, 在临床治疗、食品保鲜、养殖替抗和农业病害防治等领域已成为研发热点[1−3]。然而, 高效、低成本地规模化生产具有高活性的抗菌肽仍然是限制其实际应用的关键瓶颈之一[4]。毕赤酵母(*Pichia pastoris*)作为一种成熟、高效的真核表达宿主系统, 因其具有强诱导型启动子[如醇氧化酶基因 1 (alcohol oxidase 1, AOX1)启动子]、高分泌能力、良好的翻译后修饰能力以及易于高密度培养等优势, 被广泛用于重组蛋白的生产[5−7]。据报道, 目前已有 5000 多种外源蛋白采用该系统进行表达, 其中超过 70 种蛋白产品已投入市场[8]。

尽管毕赤酵母表达系统拥有诸多优点, 但在表达小分子蛋白如抗菌肽时仍面临一些挑战: (1)蛋白酶降解[9]: 小分子抗菌肽在宿主细胞内和分泌过程中易被内源性蛋白酶降解; (2)表达水平受限[6]: 部分抗菌肽可能对宿主细胞具有毒性, 或因其自身的物理化学特性(如疏水性、带电荷性)导致折叠、分泌效率低; (3)表达稳定性与拷贝数控制[6]: 传统上, 毕赤酵母表达系统主要依赖两种载体策略: 游离型表达载体(如基于博来霉素 Zeocin 抗性的 pPICZ 系列质粒)[10]和整合型表达载体(如利用 AOX1 位点进行同源重组整合的质粒)[11]。游离型系统易于快速筛选和高拷贝数表达, 但存在表达不稳定、丢失率高的问题, 尤其在长期培养或高密度发酵过程中。整合型系统则通过将目的基因整合到染色体上, 提供了高度的遗传稳定性, 成为大规模生产的首选, 但其表达水平往往依赖于拷贝数[6,8−10], 而拷贝数的增加通常导致筛选难度加大, 且潜在的位置效应可能影响表达效率的提升[11]。

针对上述挑战, 无论是游离型还是整合型的单一载体策略都难以在表达水平和长期稳定性之间达到最优平衡。因此, 探索新的表达策略显得尤为重要。其中一种尝试是在毕赤酵母宿主中, 同时运用游离型表达载体和整合型表达载体进行共表达以增强抗菌肽的生产。本研究以菌丝霉素突变体 JS21T 为例, 采用游离型与整合型共表达的策略, 在整合型 pPICZ*α*A-JS21T 的基础上, 通过游离型载体增加基因拷贝数, 分别导入 pPICK*α*A-panARS-JS21T、pGAPK*α*A-panARS-JS21T, 以期增强抗菌肽在毕赤酵母中的表达, 为小分子肽类高效生产提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

质粒 pPICZ*α*A、质粒 pGAPZ*α*A、质粒 pPIC9K、菌株毕赤酵母 X-33(美国赛默飞世尔科技公司); 菌株大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E.coli*) DH5*α* 为本实验室保藏菌株; 乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*) GG799(英国 New England Biolabs 公司); 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) ATCC6538(广东省微生物菌种保藏中心); 卢里亚-伯特尼(Luria-Bertani, LB)培养基、酵母浸出粉胨葡萄糖(yeast extract peptone dextrose, YPD)培养基、缓冲矿物盐甘油复合(buffered mineral glycerol-complex, BMGY)培养基、缓冲矿物盐甲醇复合酵母(buffered mineral methanol-complex yeast, BMMY)培养基的原料酵母提取物(050090, 广东环凯生物科技有限公司); 蛋白胨(BR250g,

北京奥博星生物技术有限责任公司); 博来霉素[R25001, 英潍捷基(上海)贸易有限公司]; 卡那霉素[生工生物工程(上海)股份有限公司]; 遗传霉素(G418)(A417654, BBI 公司); 限制性快切酶 QuickCut™ Xho I (1635)、限制性快切酶 QuickCut™ XbaI (1634)、快速聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR) 聚合酶 PrimeSTAR® Max DNA Polymerase Ver.2 (R047A)、蛋白检测试剂盒 TaKaRa Bradford Protein Assay Kit (T9310A)[宝日医生物技术(北京)有限公司]; 2×Taq PCR Master Mix(Green) (GR1111, 北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司); 无缝连接试剂盒(C5891, 美国 Clone Smarter 公司); 引物合成(表 1)、基因测序(苏州金唯智公司)。

1.2　仪器与设备

Millipore Simplicity 超纯水系统(美国 Millipore 公司); Biometra Tone 96G PCR 仪(德国 Analytik Jena 公司); DeNovix DS-11 超微量紫外分光光度计(美国 DeNovix 公司); DK-8D 电热恒温水槽(上海一恒科学仪器有限公司); ELx808IU 酶标仪(美国 BioTeK 公司); ZQLY-300N 振荡培养箱(上海知楚仪器有限公司); SPX-150 生化培养箱(中仪国科科技有限公司); 1652100 型 MicroPulser 电穿孔仪、Mini-Protean Tetra Electrophoresis System 小型垂直电泳转印系统、Universal Hood II 凝胶成像仪(美国 BIO-RAD 公司)。

1.3　实验方法

1.3.1　构建卡那霉素抗性的游离型载体

菌种乳酸克鲁维酵母在 YPD 平板划线, 于 30 ℃静置培养 48 h 活化, 挑取单菌落接种于 5 mL 的 YPD 培养基, 于 30 ℃、200 r/min 摇床培养 24 h, 12000 r/min 离心收集菌体。使用玻璃珠法提取乳酸克鲁维酵母的基因组, 以 F1/R1 为引物, 乳酸克鲁维酵母基因组为模板, 扩增其 panARS 序列[12–13]。分别以质粒 pPICZ*α*A、pGAPZ*α*A 为模板, F2/R2 为引物, 扩增得到用于插入 panARS 序列的骨架; 使用无缝连接试剂盒将 panARS 序列分别与两个骨架连接, panARS 序列插入的位置为 CYC1 终止子与 *ori* 序列之间, 得到游离型质粒 pPICZ*α*A-panARS、pGAPZ*α*A-panARS。以质粒 pPIC9K 为模板, F3/R3 为引物, 扩增卡那霉素抗性(*Kan R*) 基因。分别以质粒 pPICZ*α*A-panARS、pGAPZ*α*A-panARS 为模板, F4/R4 为引物, 扩增得到无 *Zeocin R* 基因的骨架。使用无缝连接试剂盒将 *Kan R* 序列分别与无 *Zeocin R* 基因的骨架连接, 得到 *Kan R* 抗性的游离型质粒 pPICK*α*A-panARS 和 pGAPK*α*A-panARS。

1.3.2　构建抗菌肽表达质粒

使用 XhoI/XbaI 双酶切位点将菌丝霉素抗菌肽突变体 *JS21T* 基因分别连接到游离型质粒 pPICK*α*A-panARS 和 pGAPK*α*A-panARS, 并克隆至大肠杆菌 DH5*α*, 随后使用质量浓度为 25 μg/mL kanamycin 的 LB 平板筛选阳性克隆。

1.3.3　游离型质粒转化毕赤酵母 X-33

首先, 将 pPICK*α*A-panARS-JS21T 和 pGAPK*α*A-panARS-JS21T(游离型质粒无需进行线性化处理)分别使用 MicroPulser 电穿孔仪, 1.5 kV 电击转化毕赤酵母 X-33 感受态细胞, 复苏后涂布于含 1000 μg/mL G418 的 YPD 平板进行筛选, 作为对照之一。其次, 将 pPICK*α*A-panARS-JS21T 和 pGAPK*α*A-panARS-JS21T 分别电击转化毕赤酵母 X-33/JS21T 感受态细胞, 复苏后涂布于质量浓度为 100 μg/mL 的 Zeocin 和 1000 μg/mL G418 的 YPD 平板进行双抗性筛选。通过提取转化子的基因组及游离质粒作为模板, 使用引物 F3/R3, 通用引物 5'-AOX1/3'-AOX1、*α*factor/3'-AOX1, PCR 扩增鉴定表达盒是否转入毕赤酵母 X-33。

1.3.4　转化子的初筛

将 1000 μg/mL G418 的 YPD 平板、100 μg/mL 的 Zeocin+1000 μg/mL G418 的 YPD 平板筛选生长的单菌落转接在含有 1 mL 的 1000 μg/mL G418 的 YPD 培养基、100 μg/mL 的 Zeocin+1000 μg/mL G418 的 YPD 培养基的 48 孔深孔板中, 孔板封口使用一次性强透气封口膜, 30 ℃、200 r/min 培养 48 h, 进行二次筛选。在 48 孔深孔板进行初表达, 按 1%接种量转接至含 2 mL BMGY 培养基的 48 孔深孔板, 30 ℃、200 r/min 培养 48 h, 在室温下 4000 r/min 离心 10 min, 小心倾去上清培养基, 加入 2 mL 无菌水, 涡旋洗涤一次, 在室温下 4000 r/min 离心 10 min, 小心倾去上清, 加入 2 mL BMMY 培养基, 涡旋悬浮菌体, 30 ℃, 200 r/min 诱导培养 120 h, 每隔 24 h 补加 1%甲醇。诱导结束后, 在室温下 4000 r/min 离心 10 min, 取初发酵

表 1　引物列表
Table 1　Primer list

引物 F 端	引物 R 端
F1: 5'-ATTTGCAAGCTGGAGACCATAGTGCTGATTATGATTT-3'	R1: 5'-GGCCTTTTGCTCACATGTTCAACATCTTTGGATAAT-3'
F2: 5'-ACATGTGAGCAAAAGGCCAGCA-3'	R2: 5'-TGGTCTCCAGCTTGCAAAT-3'
F3: 5'-TTAGAAAAACTCATCGAGCATCAAATG-3'	R3: 5'-ATGAGCCATATTCAACGGGA-3'
F4: 5'-TGCTCGATGAGTTTTTCTAACACGTCCGACGGCGGCCC-3'	R4: 5'-TCCCGTTGAATATGGCTCATGGTTTAGTTCCTCACCTTGTCG-3'
F5: 5'-AGGGGTATCTCTCGAGAAAAGA-3'	R5: 5'-CTTCTGAGATGAGTTTTTGTTCTAGATTATTA-3'

液上清 40 μL 与 160 μL 接种含有 1×10^6 CFU/mL 的金黄色葡萄球菌的 LB 培养基混合均匀于 96 孔板，测定初始 OD_{600} 读数，于 37 ℃、100 r/min 培养 24 h，测定终点 OD_{600} 读数，对照组为空载的发酵液上清。选取 OD_{600} 初始与终点读数差值较小的转化子进行摇瓶发酵。同时使用 Bradford 法[14]测定发酵上清的总蛋白浓度。将初筛得到的转化子，接种在含相应抗生素的 YPD 培养基，30 ℃培养 48 h，使用“煮-冻-煮”的方式分别提取基因组[15]，PCR 扩增鉴定表达盒是否转入毕赤酵母 X-33。

1.3.5 摇瓶培养抗菌肽的诱导表达

分别采用常规的补料培养和改良的补料培养方式进行摇瓶培养。常规补料培养：将筛选的转化子接种于 50 mL BMGY 培养基，30 ℃、200 r/min 培养 48 h，4000 r/min 离心收集菌体，弃上清，菌体重悬于 50 mL BMMY 培养基，在 30 ℃、200 r/min 下每 24 h 加入 0.5%的甲醇，诱导培养 144 h。改良补料培养：转化子接种于 25 mL 含甘油 0.5%的 BMGY 培养基培养 24 h 积累生物量，加入 25 mL 含甲醇 0.5%的 BMMY 培养基，此后每 24 h 补加 0.5%甲醇，培养至 144 h，期间抽样检测记录菌体生物量与培养液上清的总蛋白含量。生物量通过 OD 法或者湿重法测定，总蛋白浓度使用 Bradford 法[14]测定。游离型的 pGAP 菌株在培养 24 h 时加入 25 mL 含甘油 0.5%的 BMGY 培养，每 24 h 补加 0.5%甘油。

1.3.6 抗菌肽的活性鉴定及凝胶电泳

抑菌实验使用琼脂扩散法：指示菌金黄色葡萄球菌在 LB 平板上进行划线活化，37 ℃培养 24 h，挑取单菌落转接于 5 mL LB 培养基于 37 ℃培养过夜，测量 OD_{600} 值，在直径 90 mm 培养皿中加入 10 mL 固体培养基，水平移动使培养基水平覆盖培养皿的底部，待凝固后在上面放置直径为 8 mm 铁圈。接着将菌液接种在处于液体状态的 LB 固体培养基，稀释菌体的浓度为 1×10^6 CFU/mL，在放有铁圈的培养皿上灌注 20 mL 带菌液的 LB 培养基，水平移动使培养基均匀分散，待培养基凝固后取出铁圈形成加样孔。在测试样品时于加样孔中加入 200 μL 发酵液上清，以转入空质的粒菌株发酵液作为对照，抑菌测试平板于 37 ℃静置培养 24 h，测量透明圈的直径。抗菌肽的三羟甲基甘氨酸 - 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(trimethylglycine-sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, Tricine-SDS-PAGE)参考 Schagger 的方法[16]。

1.4 数据处理

上述发酵培养、抑菌实验均采取 3 个平行实验，数据处理和作图使用 Excel 2019、GraphPad Prism 6.0 和 Origin Pro 2018 软件进行。

2 结果与分析

2.1 构建 *Kan R* 抗性的游离型载体

整合型质粒 pPICZ*α*A 和 pGAPZ*α*A 均以 *Zeocine R* 基因作为在大肠杆菌与毕赤酵母穿梭载体使用的抗性筛选基因，在质粒整合之后引入游离型载体则需要另一个抗性基因 *Kan R*。为便于筛选阳性转化子，以 *Kan R* 基因替换原来的 *Zeocine R* 基因，质粒重新命名为 pPICK*α*A 和 pGAPK*α*A。来源于乳酸克鲁维酵母的长度为 452 bp 的 panARS 序列[12]，插入在 *ori* 序列与 CYC1 终止子序列之间，最终获得游离型质粒 pPICK*α*A-panARS 和 pGAPK*α*A-panARS(图 1)。

2.2 JS21T 连接游离型载体

本实验室前期从菌丝霉素突变体 NZ2114[17]出发，利用易错 PCR 技术再次突变并筛选到一个新突变体，命名为 JS21T。与 NZ2114 相比，JS21T 仅在第 21 位氨基酸发生了突变(丝氨酸→苏氨酸)，在保留其抗革兰氏阳性菌活性的同时，具有更好的热稳定性。

使用酶切位点 XhoI 与 XbaI，与游离型质粒 pPICK*α*A-panARS、pGAPK*α*A-panARS 的 *α*-factor 作为信号肽的 KR 位点融合连接，最终获得重组质粒 pPICK*α*A-panARS-JS21T 和 pGAPK*α*A-panARS-JS21T，质粒经过苏州金唯智生物科技有限公司测序，结果正确(氨基酸序列：GFGCNG PWNEDDLRCHNHCKTIKGYKGGYCAKGGFVCKCY)。

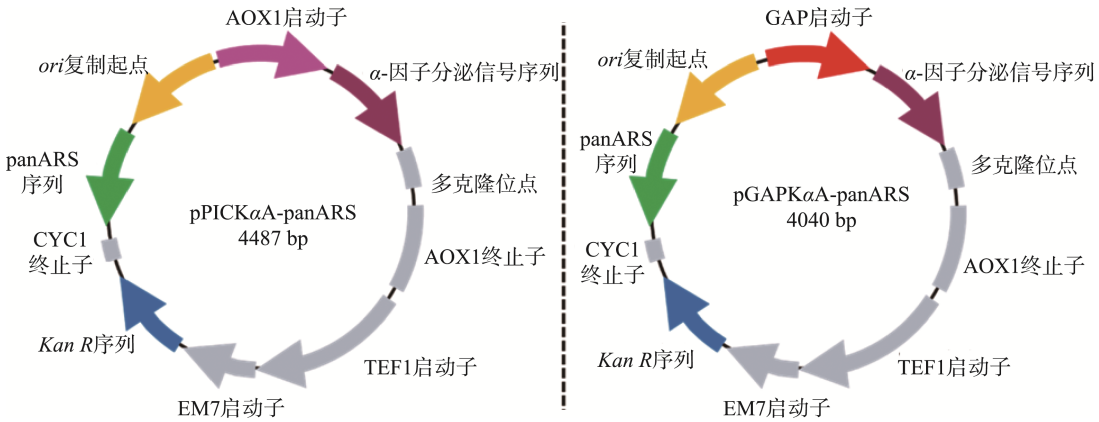


图 1 含 panARS 序列与 *Kan R* 抗性基因的毕赤酵母游离型表达载体

Fig.1 Episomal expression vectors of *Pichia pastoris* containing the panARS sequence and a *Kan R* resistance gene

2.3　游离型载体转化毕赤酵母 X-33

使用引物 F3/R3, 通用引物 5'AOX1/3'AOX1、αfactor/3'AOX1, 分别 PCR 扩增鉴定转化子的游离型重组质粒 pPICKαA-panARS-JS21T、pGAPKαA-panARS-JS21T, 结果表明游离型重组质粒均可稳定在毕赤酵母中自我复制。总共制备获得了 5 种 JS21T 的表达方式: 整合型 pPICZαA-JS21T/X-33、游离型 pPICKαA-panARS-JS21T/X-33、游离型 pGAPKαA-panARS-JS21T/X-33、整合型+游离型的 pPICZαA+pGAPKαA-panARS-JS21T/X-33、整合型+游离型的 pPICZαA+ pPICKαA-panARS-JS21T/X-33。

2.4　转化子活性初筛

通过使用 48 深孔板培养获得转化子初发酵液, 离心取其上清, 加入金黄色葡萄球菌共培养后, 初发酵活性较强的上清能够显著抑制金黄色葡萄球菌的生长。因此, 根据金黄色葡萄球菌的 OD_{600} 起止差值可初筛得到 JS21T 表达量较高的转化子(图 2)。其中, 游离型 pPICKαA-panARS-JS21T/X-33 初筛得到 E4、F9、F10、F11、G8、H2、H6(图 2a); 游离型 pGAPKαA-panARS-JS21T/X-33 初筛得到 A1、A4、A5、A9、B8、B10、C1(图 2b); 整合型+游离型的 pPICZαA+pGAPKαA-panARS-JS21T/X-33 初筛得到 B6、B8、B10、C5、D4、D6、D8、D9、D11(图 2c); 整合型+游离型的 pPICZαA+pPICKαA-panARS-JS21T/X-33 初筛得到 E9、E11、F4、F5、F11、G6、G9、G10、H7、H8、H10(图 2d)。

2.5　摇瓶复筛及蛋白表达水平检测

初筛获得的转化子首先进行一轮常规的摇瓶补料培养, 根据初步结果从中选取了 A4、F10、D8、E9 作为进一步分析的候选菌株。考虑到 pGAP 启动子是组成型(生长偶联)的, 故在评估游离型和整合型表达时采用改良的补料培养方式。从图 3 可以看出, 各组在培养至 48 h 时培养液上清总蛋白浓度均呈现下降, 这是由于补加了 25 mL 培养基, 总体积增大而稀释的。当培养至 120~144 h 时上清总

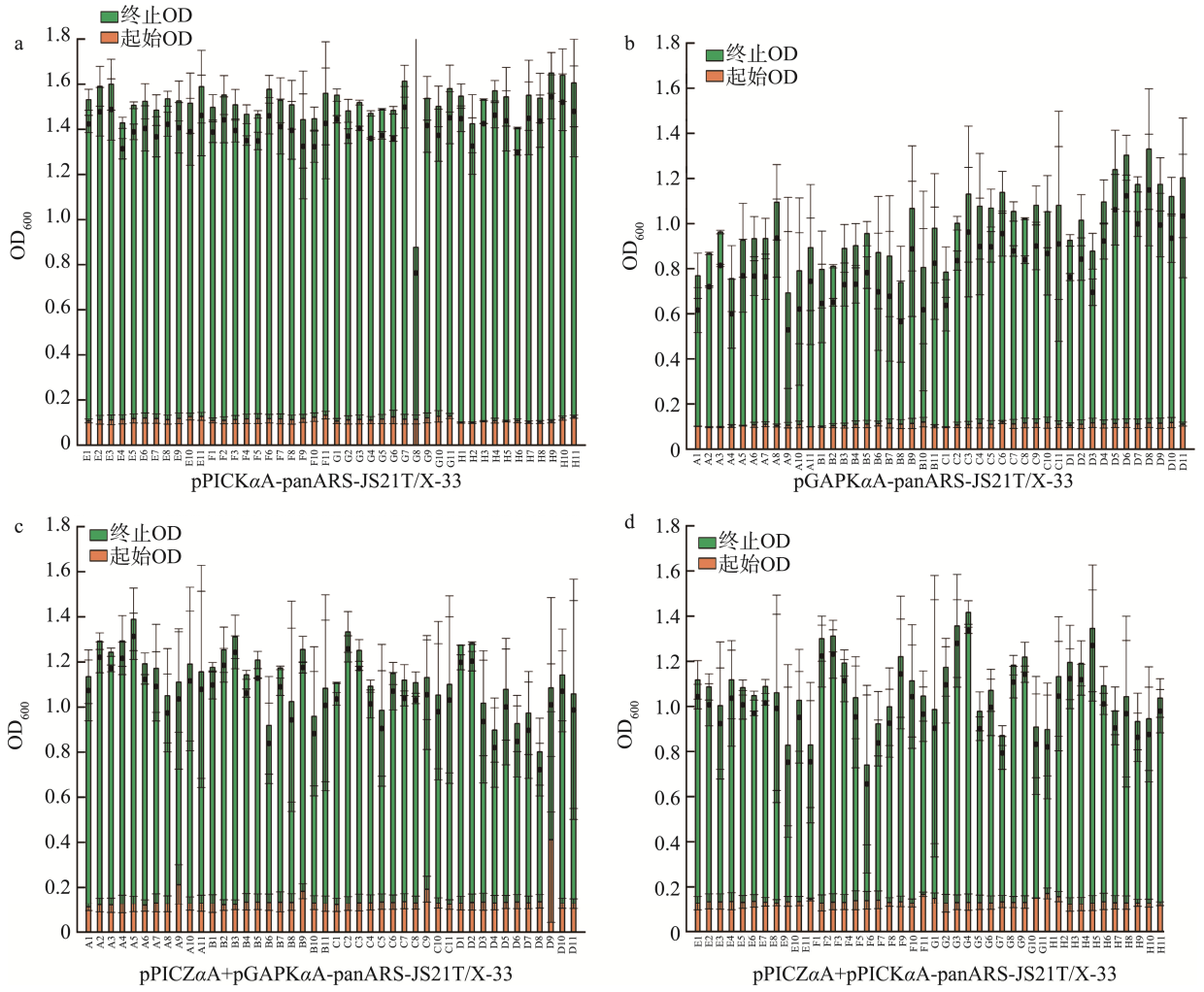
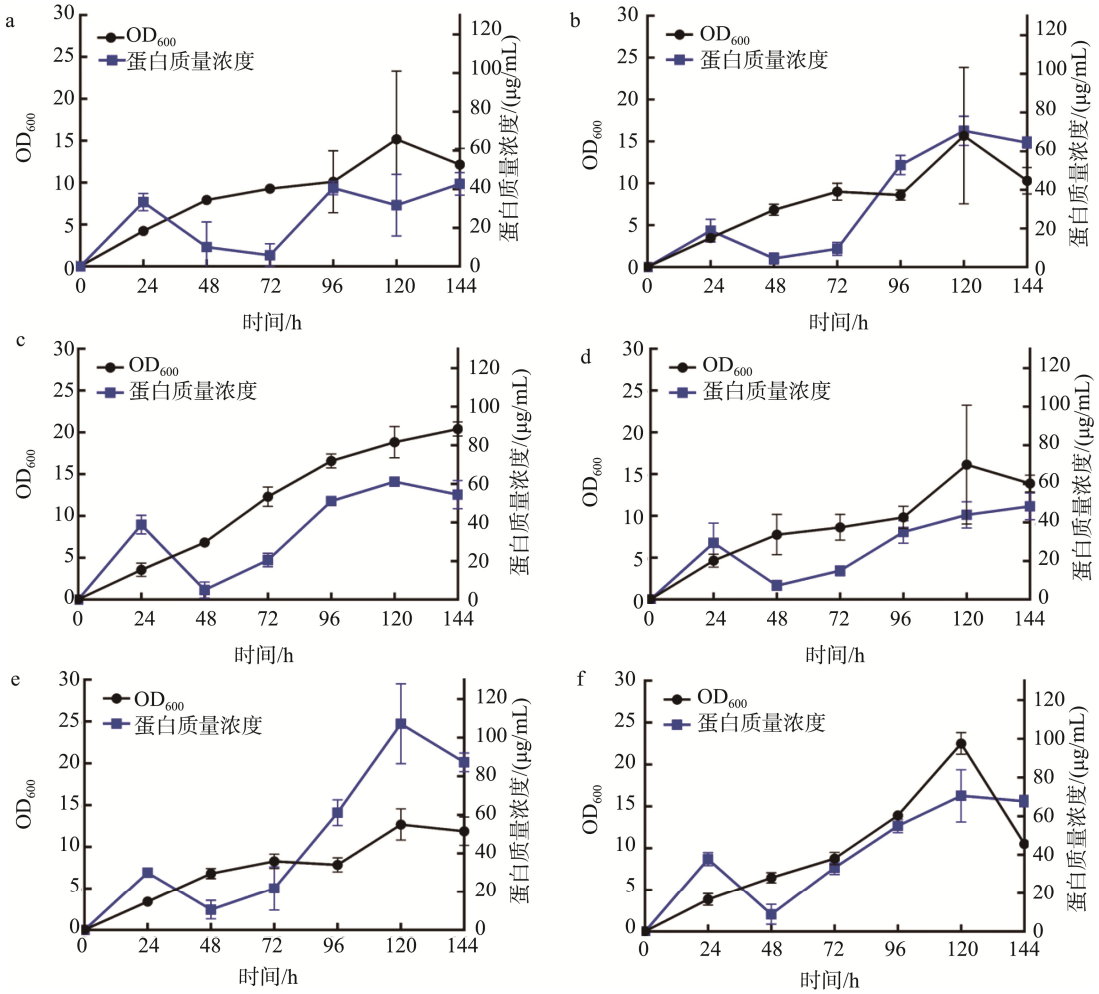


图 2　抑菌培养实验筛选转化子

Fig.2　Screening of transformants by bacteriostatic test



注: a. 含整合型 pPICZ*α*A 质粒的菌株; b. 含整合型 pPICZ*α*A-JS21T 质粒的菌株; c. 含游离型质粒 pGAPK*α*A-JS21T 的菌株; d. 含游离型质粒 pPICK*α*A-JS21T 的菌株; e. 含整合型 pPICZ*α*A-JS21T+游离型质粒 pGAPK*α*A-JS21T 的菌株; f. 含整合型 pPICZ*α*A-JS21T+游离型质粒 pPICK*α*A-JS21T 的菌株。

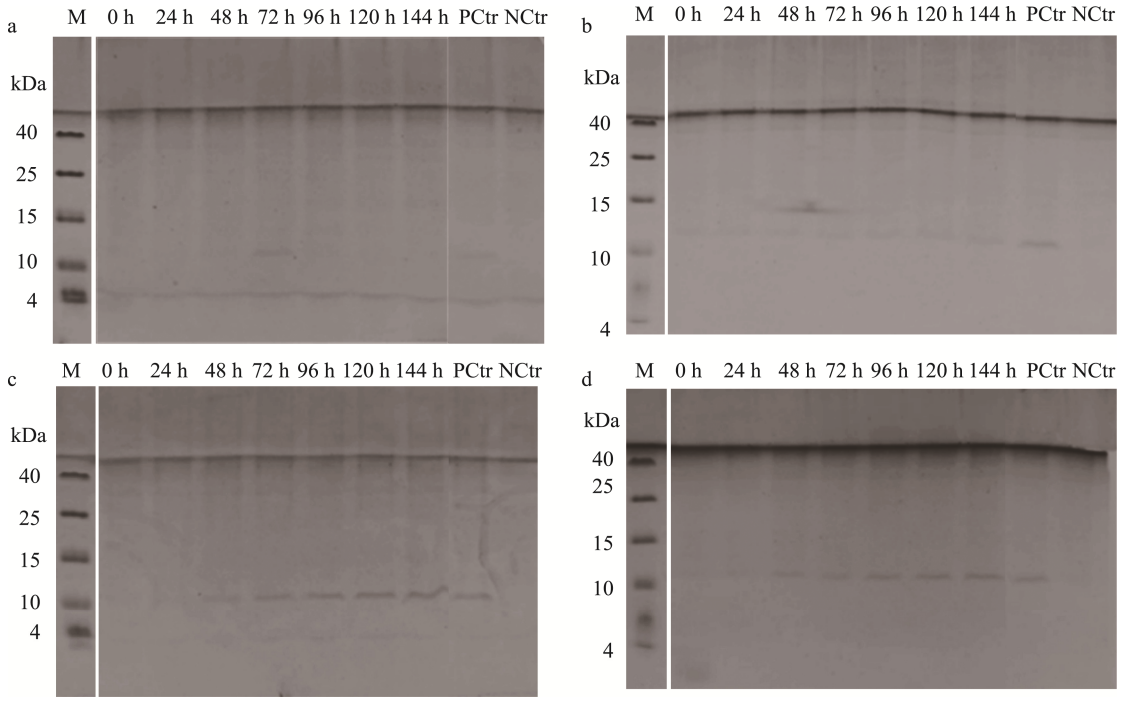
图 3 摇瓶培养表达抗菌肽 JS21T 菌株的生长曲线与培养液上清的总蛋白浓度变化

Fig.3 Growth curves of strain expressing antimicrobial peptide JS21 and total protein concentration changes in the culture supernatant during shake-flask cultivation

蛋白质量浓度达到最大值(图 3b~3f), 对照组的整合型 pPICZ*α*A (整合型 pPIC)、游离型 pGAPK*α*A (游离型 pGAP)、游离型 pPICK*α*A (游离型 pPIC)、游离型 pGAP+整合型 pPIC、游离型 pPIC+整合型 pPIC 的培养液上清总蛋白质量浓度分别为 70.56、61.11、43.89、107.22、70.56 μg/mL。

Tricine-SDS-PAGE 电泳进一步反映了上清液中 JS21T 的表达情况(图 4)。结合电泳结果与培养液上清总蛋白含量变化的结果, 以整合型 pPICZ*α*A-JS21T 菌株为对照, 游离型 pGAP 启动子表盒的菌株虽然培养液上清的总蛋白含量随着培养时间的延长而增长, 但仅在 72 h 检测到 10 kDa 处的蛋白条带(图 4a)。另一游离型 pPIC 启动子表达的菌株, 虽然总蛋白含量低于 pGAP 游离型菌株, 但在 10 kDa 处有明显的蛋白条带(图 4b), 表明抗菌肽 JS21T 一直有表达。整合型 pPIC+游离型 pGAP 的总蛋白增长速率较快, 总蛋白量比对照组整合型 pPIC 提高了 52% (P<0.05), 而且在 10 kDa 处蛋白条带较对照组颜色更深(图 4c), 说明抗菌肽含量较高; 而整合型 pPIC+游离型 pPIC 的抗菌肽表达量在 120 h 后也显著高于对照组整合型 pPIC(图 4d)。

抑菌测试结果显示, 游离型 pGAP 菌株的发酵液上清检测不到抑菌活性(表 2), 且在 Tricine-SDS-PAGE 中也没有观察到蛋白条带(图 4a), 可能是抗菌肽表达含量太低甚至无表达; 而游离型 pPIC 菌株虽然能检测到蛋白条带(图 4b), 但观察不到抑菌活性(表 2), 可能是抗菌肽表达浓度低于金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度。蛋白表达量较高的整合型 pPIC+游离型 pGAP 组的抑菌圈(12.33 mm)相比整合型 pPIC 对照组(10.86 mm), 高出 13.5%; 扣除加样孔直径(8 mm)后, 抑菌环面积增加了 129%, 抑菌活性提升显著(P<0.05)(表 2, 图 5)。而整合型 pPIC+游离型 pPIC 的抑菌环面积相比整合型 pPIC 对照组也提升了 15.8%(表 2, 图 5)。因此, 整合型+游离型的表达方式对抗菌肽表达具有促进作用, 但提升效果因采用组成型或诱导型启动子而有较大差异。



注: a. 含游离型质粒 pGAPK*α*A-JS21T 的菌株培养液上清; b. 含游离型质粒 pPICK*α*A-JS21T 的菌株培养液上清; c. 含整合型 pPICZ*α*A-JS21T+游离型质粒 pGAPK*α*A-JS21T 的菌株的培养液上清; d. 含整合型 pPICZ*α*A-JS21T+游离型质粒 pPICK*α*A-JS21T 的菌株的培养液上清。NCtr: 转入空载体 pPICZ*α*A 的菌株的培养液上清阴性对照; PCtr: 转入 pPICZ*α*A-JS21T 的菌株的培养液上清阳性对照; M: 低分子量预染蛋白质分子量标准。

图 4　JS21T 表达菌株在补料培养过程中的培养液上清的 Tricine-SDS-PAGE 凝胶电泳

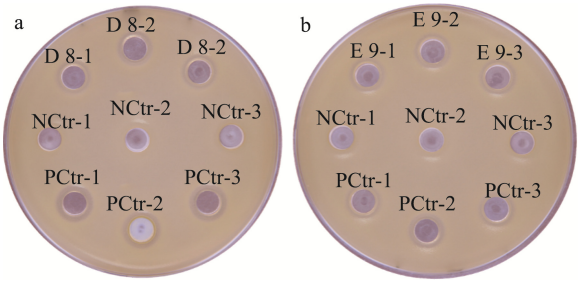
Fig.4　Tricine-SDS-PAGE analysis of culture supernatants from the JS21T expression strain during fed-batch cultivation

表 2　琼脂扩散法测试不同菌株的 120 h 培养液上清抑制金黄色葡萄球菌的能力

Table 2　Agar diffusion assay to evaluate the inhibitory activity of 120-hour culture supernatants from different strains against *Staphylococcus aureus*

类别	整合型 pPIC	游离型 pGAP	游离型 pPIC	整合型 pPIC+游离型 pGAP	整合型 pPIC+游离型 pPIC
透明圈直径/mm	10.86±0.25	8*	8*	12.33±0.29	11.08±0.21
抑菌环面积/mm^2	6.47±1.12	0	0	14.79±1.98	7.49±1.02
抑菌环面积提升率/%	/	/	/	129 (P<0.05)	15.8 (P<0.05)

注: *由于加样孔直径为 8 mm, 此处 8 表示无观察到透明圈。



注: a. D8-1、D8-2、D8-3 为含整合型 pPICZ*α*A-JS21T+游离型质粒 pGAPK*α*A-JS21T 的菌株培养液上清; b. E9-1、E9-2、E9-3 为含整合型 pPICZ*α*A-JS21T+游离型质粒 pPICK*α*A-JS21T 的菌株的培养液上清。NCtr1~NCtr-3: 转入空载体 pPICZ*α*A 的菌株的培养液上清阴性对照; PCtr-1~PCtr-3: 转入 pPICZ*α*A-JS21T 的菌株的培养液上清阳性对照。

图 5　琼脂扩散法测试不同菌株 120 h 培养液上清的抑菌能力(指示菌: 金黄色葡萄球菌)

Fig.5　Agar diffusion assay to assess the antibacterial activity of 120 h culture supernatants from different strains (indicator organism: *Staphylococcus aureus*)

3　讨　论

本研究通过将游离型表达载体与整合型载体共表达的策略, 显著提升了毕赤酵母中抗菌肽 JS21T 的产量。实验结果揭示, 利用乳酸克鲁维酵母来源的 panARS 序列构建的游离型载体(pGAPK*α*A-panARS)与染色体整合型载体(pPICZ*α*A)协同作用时, 可产生基因拷贝数的叠加效应和启动子功能的互补优势。这种协同机制突破了传统单一载体系统的局限: 游离载体通过自主复制快速增加基因剂量, 而整合载体提供遗传稳定性; 同时, pGAP 启动子的组成型表达避免了甲醇诱导型 pPIC 启动子的代谢切换负担, 使总蛋白产量提升 52%, 抑菌活性增强 129%。值得注意的是, 该策略对小分子抗菌肽的表达具有普适意义, 尤其适用于易被蛋白酶降解或表达阈值较高的活性多肽。

然而，当单独使用游离型载体时，pGAPKαA-panARS 组未能检测到抑菌活性，而 pPICKαA-panARS 组虽检测到目标蛋白条带却无抗菌效果，表明游离质粒可能存在表达不稳定或拷贝数不足的问题[18]。这些现象暗示着关键限制因素：(1)游离载体在连续传代中可能丢失[19]，导致表达一致性下降；(2)缺乏质粒动态拷贝数的定量数据，难以精准优化基因剂量平衡[20–21]；(3)短期(120 h)实验难以评估长期发酵中的遗传稳定性[22]。此外，pPICKαA 共表达组提升效果有限，进一步说明启动子特性(诱导型 *vs* 组成型)对共表达效率存在决定性影响[23]，这提示需更深入解析宿主代谢负荷与表达时序的调控关系。

为解决毕赤酵母在表达抗菌肽等小分子蛋白时的低表达水平等问题，研究者开发了多种方法来优化其表达体系，其中最有效的策略之一是增加基因的拷贝数[24–25]。例如针对整合型表达，可根据抗生素浓度与抗性基因间的剂量对应关系，通过提升抗生素筛选压力而获得高拷贝菌株[26]，但其整合次数有限。而游离型质粒则是一种显著增加外源基因的拷贝数的方法。自复制序列(autonomously replicating sequence, ARS)是能在酵母细胞内自主复制的一段 DNA 序列，含有该序列的游离型质粒能够高效转化酵母并独立于宿主染色体而存在[27]。毕赤酵母缺乏稳定的游离型质粒[28]，因此目前商业化质粒主要是整合型载体。近年来有研究者利用乳酸克鲁维酵母来源的 panARS 序列构建毕赤酵母的游离型载体[29]，用于 CRISPR/Cas9 基因编辑系统，方便基因编辑完成后丢弃质粒。也有用于外源蛋白的表达，如潘阳等[13]将利用非甲醇碳源的毕赤酵母应用在食品行业中的 KM71/pGAPZaA-PARS 表达木聚糖酶，酶活达 343 U/mL，较整合型提高 45.9%；刘晓宇等[30]构建 X-33/pPICZaA-pARS 表达人溶菌酶，酶活达 340 U/mL。

与先前研究相比，本研究首次将游离型+整合型双表达策略应用于抗菌肽表达领域。与潘阳等[13]利用单一游离载体表达木聚糖酶或刘晓宇等[30]构建游离型溶菌酶系统相比，本研究通过整合-游离双系统的协同作用实现了更显著的提升幅度。传统高拷贝整合菌株筛选虽耗时却可能获得更稳定的表达株系，而本策略在操作便捷性与表达强度间提供了新的平衡点。这种“稳定整合+灵活游离”的组合模式，为需要快速优化表达的工业化场景提供了独特价值。

从应用前景看，该双表达系统具备多领域适配性。在生物制药领域，可为抗耐药菌肽类药物提供低成本量产方案；在农业与食品工业中，pGAP 启动子的非甲醇依赖性符合安全生产规范[31]，适用于饲用抗菌肽或天然食品防腐剂生产。更重要的是，该体系可扩展至其他高值小分子多肽(如细胞因子、毒素蛋白)的表达优化，为微生物细胞工厂设计提供新思路。

未来的工作可聚焦在 3 个方向：(1)增强游离载体的稳定性，例如引入着丝粒元件或开发温度敏感型载体；(2)建立动态调控系统，利用甲醇/甘油双开关启动子精确控制共表达时序以减轻代谢压力；(3)推进工艺放大验证，在 5 L 以上发酵罐中评估高密度培养的经济性，并通过转录组学解析宿主应答机制。这些探索将有助于释放双表达体系在工业生物技术中的全部潜力。

4 结 论

本研究成功构建了基于 panARS 的毕赤酵母游离-整合双载体共表达系统。实验表明，整合型 pPICZαA-JS21T 与游离型 pGAPKαA-panARS-JS21T 共表达可显著提升抗菌肽 JS21T 的产量和抑菌活性。这一结果证实了基因拷贝数叠加与启动子功能互补的协同效应，为小分子抗菌肽的高效表达提供了新策略。后续研究拟着力解决游离载体稳定性问题，并推动该技术向工业化应用转化。

参考文献

[1] PEI H, BAO K, HAN T, *et al*. Comprehensive insights into microbial-derived antimicrobial peptides (AMPs): Classification, mechanisms, applications, and purification strategies [J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2025: 1-28. DOI: 10.1080/07388551.2025.2518308

[2] GARCÍA-BELTRÁN JM, ARIZCUN M, CHAVES-POZO E. Antimicrobial peptides from photosynthetic marine organisms with potential application in aquaculture [J]. Marine Drugs, 2023, 21(5): 290.

[3] SINGH S, JHA B, TIWARI P, *et al*. Recent approaches in the application of antimicrobial peptides in food preservation [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2024, 40(10): 315.

[4] LOU M, JI S, WU R, *et al*. Microbial production systems and optimization strategies of antimicrobial peptides: A review [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2025, 41(2): 66.

[5] ESKANDARI A, NEZHAD NG, LEOW TC, *et al*. Current achievements, strategies, obstacles, and overcoming the challenges of the protein engineering in *Pichia pastoris* expression system [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2023, 40(1): 39.

[6] GU Z, NIU F, YU Z, *et al*. High-efficiency expression of alginate lyase in *Pichia pastoris* facilitated by *Vitreoscilla* hemoglobin [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 282(Pt 2): 137027.

[7] 赵明玉, 李妍, 朱文烨, 等. 过敏原肌质钙结合蛋白在毕赤酵母中的表达、优化及免疫反应性研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(5): 51–61.
ZHAO MY, LI Y, ZHU WY, *et al*. Expression, optimization, and immunoreactivity of an allergen sarcoplasmic calcium binding protein in *Pichia pastoris* [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2024, 15(5): 51–61.

[8] 钱芷兰, 宋丽丽, 刘启, 等. 非常规酵母天然产物合成[J]. 生物工程学报, 2023, 39(6): 2284–2312.
QIAN ZL, SONG LL, LIU Q, *et al*. Biosynthesis of natural products by non-conventional yeasts [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(6): 2284–2312.

[9] XU K, MA C, WU C, *et al*. The molecular modification, expression, and the antibacterial effects studies of human lysozyme [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2024, 88(5): 546–554.

[10] MAJIDI S, AGHAIYPOUR-KOLYANI K, AKRAMI M, *et al*. An

engineered SARS-CoV-2 S1 glycoprotein produced in *Pichia pastoris* as a candidate vaccine antigen [J]. Molecular Biotechnology, 2025. doi.org/10.1007/s12033-025-01409-5

[11] PEDEZZI R, EVANGELISTA DE, DAROSA-GARZON NG, *et al*. Biochemical and biophysical properties of a recombinant serine peptidase from *Purpureocillium lilacinum* [J]. Biophysical Chemistry, 2023, 296: 106978.

[12] CAMATTARI A, GOH A, YIP LY, *et al*. Characterization of a panARS-based episomal vector in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* for recombinant protein production and synthetic biology applications [J]. Microbial Cell Factories, 2016, 15. https://link.springer.com/article/10.1186/s12934-016-0540-5

[13] 潘阳, 吴丹, 吴敬. 利用游离型表达质粒强化毕赤酵母表达木聚糖酶[J]. 生物工程学报, 2018, 34(5): 712–721.
PAN Y, WU D, WU J. Improving the expression of recombinant xylanase in *Pichia pastoris* with episomal expression plasmid [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2018, 34(5): 712–721.

[14] KRUGER NJ. The bradford method for protein quantitation. In: Walker JM, editor. The protein protocols handbook [M]. Totowa, NJ: Humana Press, 2009.

[15] 剧海, 梁东春, 郭刚, 等. 用于 PCR 实验的毕赤酵母基因组 DNA 制备方法的比较[J]. 天津医药, 2003, 31(5): 270–272.
JU H, LIANG DC, GUO G, *et al*. Comparison of four methods to prepare *Pichia* genomic DNA for PCR [J]. Tianjin Medical Journal, 2003, 31(5): 270–272.

[16] SCHAGGER H. Tricine-SDS-PAGE [J]. Nature Protocols, 2006, 1(1): 16–22.

[17] HUANG Y, YANG N, TENG D, *et al*. Antibacterial peptide NZ2114-loaded hydrogel accelerates *Staphylococcus aureus*-infected wound healing [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2022, 106(9-10): 3639–3656.

[18] CHEN Y, PARTOW S, SCALCINATI G, *et al*. Enhancing the copy number of episomal plasmids in *Saccharomyces cerevisiae* for improved protein production [J]. FEMS Yeast Research, 2012, 12(5): 598–607.

[19] KYMÄLÄINEN H, APPELT JU, GIORDANO FA, *et al*. Long-term episomal transgene expression from mitotically stable integration-deficient lentiviral vectors [J]. Human Gene Therapy, 2014, 25(5): 428–442.

[20] RAMIRO-MARTÍNEZ P, DE-QUINTO I, LANZA VF, *et al*. Universal rules govern plasmid copy number [J]. Nature Communications, 2025, 16(1): 6022.

[21] PISERA A', LIU CC. The role of plasmid copy number and mutation rate in evolutionary outcomes [J]. Nature Ecology & Evolution, 2025, 9(9): 1694–1704.

[22] DUPERRAY M, DELVENNE M, FRANÇOIS JM, *et al*. Genomic and metabolic instability during long-term fermentation of an industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain engineered for C5 sugar utilization [J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2024, 12: 1357671.

[23] DUONG T, MILLER MJ, BARRANGOU R, *et al*. Construction of vectors for inducible and constitutive gene expression in *Lactobacillus* [J]. Microbial Biotechnology, 2011, 4(3): 357–367.

[24] CLARE JJ, RAYMENT FB, BALLANTINE SP, *et al*. High-level expression of tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris* strains containing multiple tandem integrations of the gene [J]. Biotechnology (N Y), 1991, 9(5): 455–460.

[25] TANG YC, AMON A. Gene copy-number alterations: A cost-benefit analysis [J]. Cell, 2013, 152(3): 394–405.

[26] YANG J, NIE L, CHEN B, *et al*. Hygromycin-resistance vectors for gene expression in *Pichia pastoris* [J]. Yeast, 2014, 31(4): 115–125.

[27] STRUHL K, STINCHCOMB DT, SCHERER S, *et al*. High-frequency transformation of yeast: Autonomous replication of hybrid DNA molecules [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1979, 76(3): 1035–1039.

[28] GAO J, JIANG L, LIAN J. Development of synthetic biology tools to engineer *Pichia pastoris* as a chassis for the production of natural products [J]. Synthetic and Systems Biotechnology, 2021, 6(2): 110–119.

[29] GU Y, GAO J, CAO M, *et al*. Construction of a series of episomal plasmids and their application in the development of an efficient CRISPR/Cas9 system in *Pichia pastoris* [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2019, 35(6): 79.

[30] 刘晓宇, 李晋, 温赛. 游离型质粒在毕赤酵母中表达人溶菌酶的研究[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(22): 70–75.
LIU XY, LI J, WEN S. Expression of human lysozyme by episomal plasmid in *Pichia pastoris* [J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(22): 70–75.

[31] GARRIGÓS-MARTÍNEZ J, VUORISTO K, NIETO-TAYPE MA, *et al*. Bioprocess performance analysis of novel methanol-independent promoters for recombinant protein production with *Pichia pastoris* [J]. Microbial Cell Factories, 2021, 20(1): 74.

(责任编辑: 韩晓红　于梦娇)