

网络出版时间:2018-12-04 10:11

DOI:10.13207/j.cnki.jnwfufu.2019.06.014

网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20181204.1010.028.html

缬草内生菌和根际放线菌的分离及 安莎类抗生素的筛选

吴 佳,李晓霞,舒伟学,安晓英,安雪莹,颜 华,贾良辉

(西北农林科技大学 生命科学学院,陕西 杨凌 712100)

【摘 要】【目的】分离缬草内生菌及根际放线菌,筛选其中含安莎霉素类抗生素生物合成基因的菌株,挖掘其活性次级代谢产物资源。【方法】从缬草根、茎、叶及根际土壤中分离内生菌和根际放线菌,检测其对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、核桃溃疡病菌、苹果腐烂病菌、苹果轮纹病菌、油菜菌核病菌、小麦赤霉病菌、棉花枯萎病菌的抑菌效果。设计 2 种简并引物,用 PCR 方法从抑菌效果较好的菌株中筛选含安莎霉素类抗生素基因(AHBA)的菌株。分析目标菌株的最佳发酵培养基和最适发酵时长,对发酵分离物进行 HPLC 和质谱分析,检测其可能的次级代谢产物。【结果】试验共分离到 145 株菌,其中内生菌 27 株,占总菌株数的 18.6%,根际放线菌 118 株,占总菌株数的 81.4%;33 株对病原菌有较好的抑菌效果,占总菌株数的 22.8%。筛选到 1 株含 AHBA 基因的菌株 AJ21,初步鉴定其为链霉菌。菌株 AJ21 最佳发酵培养基为 SPY 培养基,最佳发酵时间为 6 d。菌株 AJ21 发酵液经分离纯化、HPLC 检测和质谱分析,初步确定其含有的安莎霉素类抗生素为放线菌素 D。【结论】药用植物缬草内部及根际蕴含丰富的放线菌资源,具有良好的生物学活性。

【关键词】缬草;内生菌;根际放线菌;安莎霉素

【中图分类号】Q948.12

【文献标志码】A

【文章编号】1671-9387(2019)06-0107-08

Isolation of endophytic and rhizospheric actinomycetes of *Valerian* and screening of ansamycins antibiotics

WU Jia, LI Xiaoxia, SHU Weixue, AN Xiaoying, AN Xueying, YAN Hua, JIA Lianghui

(College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】 This study separated endophytic and rhizospheric actinomycetes of *Valerian*, screened the strains with biosynthesis genes of ansamycin antibiotics, and obtained active secondary metabolites resources. 【Method】 Endophytic and rhizospheric actinomycetes were isolated from roots, stems, leaves and rhizospheric soil of *Valerian*. Their anti-pathogenic effects on *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* ATCC11562, *Walnut ulcer pathogen*, *Valsa mali*, *Physalospora piricola*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium graminearum* and *Fusarium oxysporum* were tested. Two degenerate primers were designed and strains with ansamycin antibiotic gene (AHBA) were screened by PCR from the strains with good anti-pathogenic effect. The optimum fermentation medium and optimum fermentation time of target strain were analyzed. The fermentation isolates were analyzed by HPLC and mass spectrometry, and the possible secondary metabolites were detected. 【Result】 A total of 145 strains of actinomycetes were isolated. Among them, 27 strains were endophytes, accounting for 18.6%, 118 strains were rhizospheric acti-

【收稿日期】 2018-03-28

【基金项目】 中央高校基本科研业务费专项(Z109021426, Z109021432);陕西省农业科技创新与攻关项目(2015NY066)

【作者简介】 吴 佳(1992—),女,山西运城人,在读硕士,主要从事微生物资源与利用研究。

【通信作者】 贾良辉(1977—),男,浙江义乌人,副教授,博士,主要从事微生物代谢工程和化学生物学研究。

E-mail: jialianghui@nwsuaf.edu.cn

nomycetes, accounting for 81.4%, and 33 strains had good inhibitory effect on pathogenic bacteria, accounting for 22.8%. The strain AJ21 containing ansamycin antibiotic biosynthesis gene was identified as *Streptomyces* sp. The best fermentation medium for AJ21 was SPY medium and the best fermentation time was 6 days. The fermentation broth of the strain was isolated and purified. The ansamycin antibiotics contained in the fermentation broth were actinomycin D by HPLC and mass spectrometry. 【Conclusion】 Valerian contains abundant actinomycetes with good biological activity in its interior and rhizosphere.

Key words: Valerian; endophytic; rhizospheric actinomycetes; ansamycins

放线菌是一类 G+C 碱基含量高、结构丰富多样的革兰氏阳性细菌,也是多种生物活性物质如抗生素、免疫抑制剂、植物病原真菌抑制剂、抗肿瘤药物以及消炎药等^[1-2]的重要来源。从传统环境中分离新的放线菌资源以及生物活性物质变得越来越难,因此科学家们开始将目光投向一些新的环境(如海洋、热泉、盐湖等)或特殊生境下的植物或药用植物上^[3-4],并尝试一些新的分离方法^[5]。缬草作为一种重要的药用植物资源,在全世界分布有 250 多种,我国主要有 30 种左右^[6],分布于西南至东北等地区^[7],如陕西、四川、河北、甘肃、青海、山东、湖北等。缬草作为温和的镇静剂在我国有着悠久的历史,具有解挛止痛、镇静安神、抗抑郁、抗肿瘤等功效^[8-9],因而具有极大的开发潜力和研究价值。目前,有关研究主要围绕缬草的生药学展开,其内生和根际微生物的多样性及其生物活性物质的研究尚未见报道。

在微生物产活性次级代谢产物中,安莎霉素(Ansamycins)类抗生素是以 3-氨基-5-羟基苯甲酸(3-amino-5-hydroxybenzoic acid, AHBA)为起始单元的 I 型聚酮(polyketide, PK)类化合物,其因突出的生理活性引起了科学家们极大的兴趣,目前发现的这类化合物仅 200 余种,其中最具代表性的是用于治疗肿瘤的格尔德霉素^[10-12]和美登木素衍生物^[13-16]、用于治疗结核的利福霉素衍生物^[17-18]。本研究对缬草内生菌及根际放线菌进行了分离,筛选其中含安莎霉素类抗生素生物合成相关基因的菌株,并对筛选菌株的发酵条件进行了研究,对其发酵产物进行了鉴定,以期挖掘新型抗生素提供菌种。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种与质粒 缬草及其根际土壤,采自秦岭太白山山区。指示菌包括细菌大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌及真菌核桃溃疡病菌、苹果腐烂病菌、苹果轮纹病菌、油菜菌核病菌、小麦赤霉病菌、

棉花枯萎病菌,皆由西北农林科技大学生命科学学院放线菌分子生物学实验室保存。质粒 pMD18-T simple vector,含氨苄青霉素(Amp)抗性基因,购于 TaKaRa 公司。

1.1.2 培养基 参照微生物学实验手册^[19]配制常用培养基。细菌培养基为 LB,其中 Amp 和卡那霉素(Kanamycin, Kan)终质量浓度均为 50 μg/mL。放线菌液体培养基为 TSB,固体培养基为高氏一号、GSY、2×CMY、YMS、ISP4 和 MS。放线菌发酵培养基为 SPY、TSB、RP、SP、NL19 和 NL111。真菌抑菌活性筛选培养基为 PDA。

1.1.3 仪器设备及试剂 日本岛津 LC-15C 高效液相色谱仪(日本岛津公司),Waters Nova-Pak C18 (150 mm×3.9 mm)分析色谱柱(Water 公司),LCQ Fleet 质谱仪(Thermo Scientific)。旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂),循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司)。

Ex Taq DNA 聚合酶、10×Ex Taq buffer、dNTP 和 DNA Marker,购于 TaKaRa 公司;DM-SO,购于北京 Solarbio 科技有限公司;2×Taq Master Mix,购于近岸蛋白质科技有限公司;DNA 回收试剂盒、质粒小提试剂盒,购于天根生化科技(北京)有限公司;PCR 引物合成及测序,均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。甲醇(分析纯,色谱纯)、乙酸乙酯、丙酮、放线菌素 D 标准品,均购自陕西杨凌凯瑞生物公司。

1.2 内生菌及根际放线菌的分离

称取剪碎的缬草根、茎、叶新鲜样品及根际土壤各 1 g,用无菌研钵充分研磨后加入 9 mL 无菌水。分别吸取上述样品悬液 1 mL,梯度稀释至 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴后,涂布于高氏一号培养基分离平板。长出的菌落经多次划线分离后保存菌种。

1.3 内生及根际放线菌的抗病原菌活性分析

将分离所获的菌株在高氏培养基上活化,通过打菌饼检测其对不同指示病原菌的抑制活性。细菌抑菌试验:将生长至对数期的 3 种细菌(大肠杆菌、

枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌)与 LB 培养基混合均匀,倒平板,将活化好的上述分离菌株的菌饼放在含有细菌的 LB 培养基上,37 ℃培养过夜,观察抑菌效果。真菌抑菌试验:将活化好的 6 种真菌(核桃溃疡病菌、苹果腐烂病菌、苹果轮纹病菌、油菜菌核病菌、小麦赤霉病菌、棉花枯萎病菌)打成菌饼,置于含有 PDA 培养基的培养皿中央,在距离中央相等的位置放入上述分离菌株的菌饼,于 28 ℃培养 5 d,观测抑菌圈大小。

1.4 含有 AHBA 基因菌株的筛选及鉴定

1.4.1 菌株的筛选 参照文献[20-21]提取抑菌活性较好菌株的基因组,用 2 种简并引物扩增筛选含有 AHBA 基因的目标菌株。引物 1 为 AHBAR (5'-AISYGGAICATIGCCATGTAG-3') 和 AHBAF(5'-CCSGCSTTCACSTTCATCTC-3');引物 2 为 AHBAF (5'-CCSGCCTTCACCTTCATCTC-CTC-3') 和 AHBAR (5'-AYCCGGAACATSGC-CATGTAGTG-3')^[22]。PCR 反应体系(50 μL): ddH₂O 35.25 μL,10×Ex Taq buffer 5 μL,dNTP 4 μL,DMSO 2.5 μL,AHBAF 1 μL,AHBAR 1 μL,DNA 模板 1 μL,Ex Taq 0.25 μL。PCR 扩增条件为:94 ℃ 5 min;94 ℃ 1 min,61 ℃ 45 s,72 ℃ 1 min,33 个循环;72 ℃ 10 min。PCR 产物经胶回收后测序,所获的基因片段通过 NCBI 进行在线比对,构建系统发育树。

1.4.2 菌株的鉴定 PCR 扩增目标菌株的 16S rRNA,对其进行鉴定。试验所用引物为 16S rRNA 通用引物 27F (5'-AGAGTTTGTATCCTGGCT-CAG-3') 和 1542R (5'-AAGGAGGTGATCCAGC-CGCA-3')。PCR 扩增体系参照 2×Taq Master Mix 的说明配制。PCR 扩增条件为:94 ℃ 2 min;94 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 2 min,32 个循环;72 ℃ 10 min。PCR 产物经胶回收后测序,测序结果通过 NCBI 在线比对,进行相关标准菌株的相似性搜索,确定菌株的分类学地位,用 MEGA 5.0 软件构建系统发育树。

1.5 目标菌株最佳发酵条件的确定

将 4 ℃保藏的目标菌株用 GSY 培养基活化后,

转接至种子培养基 TSB 中培养 36 h,再按 1:50 的体积比分别转接到 SPY、TSB、RP、SP、NL19 和 NL111 6 种发酵培养基中,28 ℃、170 r/min 培养 8 d。将发酵液离心(4 000 r/min 离心 8 min),收集上清液备用,菌体沉淀用丙酮浸泡过夜后,超声 20 min,抽滤,将滤液与离心所得上清混合,加入等体积的乙酸乙酯,减压蒸馏萃取,萃取物用甲醇溶解。以枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌为指示菌,检测 6 种培养基发酵液萃取物的抑菌效果,确定目标菌株的最佳发酵培养基。随后在最佳发酵培养基中培养菌株,培养时间分别设为 3,4,5,6,7,8,9,10 d,按上述方法对发酵液处理后测定其对枯草芽孢杆菌的抑菌效果,确定最优发酵时间。在最佳发酵培养条件下培养菌株,按上述方法对发酵液处理后测定其对枯草芽孢杆菌的抑菌效果,同时测定甲醇、萃余相的抑菌效果。

1.6 化合物的分离纯化及鉴定

对目标菌株进行大量发酵,将发酵液离心(4 000 r/min 离心 8 min),收集上清液备用,菌体沉淀用丙酮浸泡过夜后,超声 20 min,抽滤,将滤液与离心所得上清混合,加入等体积的乙酸乙酯,减压蒸馏萃取,萃取物用甲醇溶解。溶解物上 C18 填料柱(SiliaSphere PC C18,50 μm 120A)进行纯化,依次用 2 倍体积的乙酸乙酯和甲醇(二者体积比分别为 10:1,9:1 和 8:1)体系洗脱,分段收集洗脱物,用 0.22 μm 有机滤膜过滤,用 HPLC 分析确认目标化合物所在区段,HPLC 条件:C18 反向柱;流动相为甲醇-双蒸水(V(甲醇):V(ddH₂O)=80:20);流速 0.5 mL/min,进样量 20 μL,检测波长 254 nm。用质谱分析仪对次级代谢产物进行鉴定。

2 结果与分析

2.1 放线菌的抑菌活性

本研究从缬草根、茎、叶和根际土壤中共分离到 145 株菌,其中内生菌 27 株,占总菌株数的 18.6%,根际放线菌 118 株,占总菌株数的 81.4%。对 145 株菌的抑菌活性进行鉴定,其中 33 株对病原菌有较好的抑菌效果(表 1),占总菌株数的 22.8%。

表 1 缬草分离放线菌的抑菌效果

Table 1 Anti-pathogenic activity of separated actinomycetes in Valerian

菌株 Strain	菌类 Type	对指示菌株的抑制程度 Inhibition degree against indicator strains								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
AJ03	E	—	—	—	++	++	++	—	++	++
AJ06	E	—	—	—	++	++	++	++	++	++
AJ07	E	—	—	—	++	++	++	++	++	++

表 1(续) Continued table 1

菌株 Strain	菌类 Type	对指示菌株的抑制程度 Inhibition degree against indicator strains								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
AJ09	E	—	—	—	++	++	++	++	++	++
AJ17	E	—	++	++	—	—	—	—	—	—
AJ21	RA	—	+++	++	++	+++	++	—	+	++
AJ25	E	—	++	—	—	—	—	—	++	—
AJ27	RA	—	+++	+	—	—	—	—	—	—
AJ28	RA	—	—	—	++	++	++	++	++	++
AJ29	RA	—	+++	—	+	—	—	—	—	—
AJ33	RA	—	—	—	—	++	—	++	+	—
AJ34	RA	—	—	—	—	++	++	—	++	+++
AJ37	RA	—	++	++	++	++	++	++	++	++
AJ48	RA	—	+	—	++	+++	++	++	+++	+++
AJ49	RA	—	++	++	+	++	++	—	—	—
AJ55	RA	—	+++	+++	—	—	++	—	—	—
AJ65	RA	—	+	+	—	++	++	—	++	++
AJ66	RA	—	+	—	++	+++	—	++	+++	++
AJ69	RA	—	++	++	—	—	—	++	—	—
AJ75	RA	—	++	—	—	—	—	—	—	—
AJ76	RA	—	—	—	+	—	—	—	—	—
AJ77	RA	—	++	—	—	++	—	—	—	—
AJ82	RA	—	+++	++	—	—	—	—	—	—
AJ83	RA	—	+++	+++	—	—	—	++	+	+
AJ90	RA	—	—	—	++	+++	+++	++	+++	+++
AJ91	RA	—	—	—	—	+	—	—	—	—
AJ94	RA	—	—	—	—	++	—	—	—	++
AJ97	RA	—	—	—	—	—	+	—	—	—
AJ100	RA	—	—	—	—	—	++	—	—	—
AJ111	RA	—	—	—	++	+++	+++	—	+	+++
AJ121	RA	—	—	—	—	—	+	—	—	—
AJ127	RA	++	++	++	++	++	++	++	++	++
AJ132	RA	—	+	—	—	—	—	—	—	—

注: E. 内生菌; RA. 根际放线菌。+ 表示抑菌圈直径为 4~7 mm; ++ 表示抑菌圈直径为 8~12 mm; +++ 表示抑菌圈直径大于 12 mm; — 表示没有抑菌效果。1. 大肠杆菌; 2. 枯草芽孢杆菌; 3. 金黄色葡萄球菌; 4. 小麦赤霉病菌; 5. 苹果腐烂病菌; 6. 苹果轮纹病菌; 7. 棉花枯萎病菌; 8. 油菜菌核病菌; 9. 核桃溃疡病菌。

Note: E. Endophytes; RA. Rhizospheric actinomycetes. +. Zone of inhibition between 4 and 7 mm; ++. Zone of inhibition 8 to 12 mm; +++. Zone of inhibition greater than 12 mm; —. No inhibition. 1. *Escherichia coli*; 2. *Bacillus subtilis* ATCC11562; 3. *Staphylococcus aureus*; 4. *Fusarium graminearum*; 5. *Valsa mali*; 6. *Phylospora piricola*; 7. *Fusarium oxysporum*; 8. *Sclerotinia sclerotiorum*; 9. *Walnut ulcer pathogen*.

2.2 含有 AHBA 基因菌株的筛选及鉴定

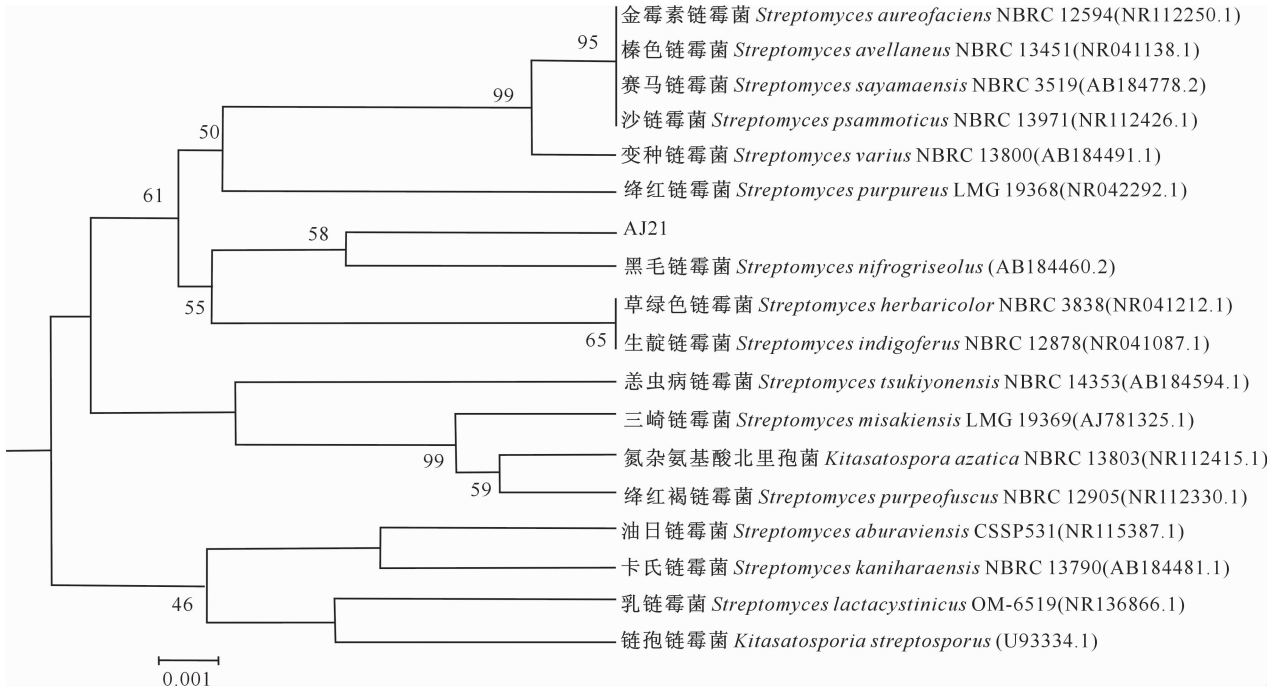
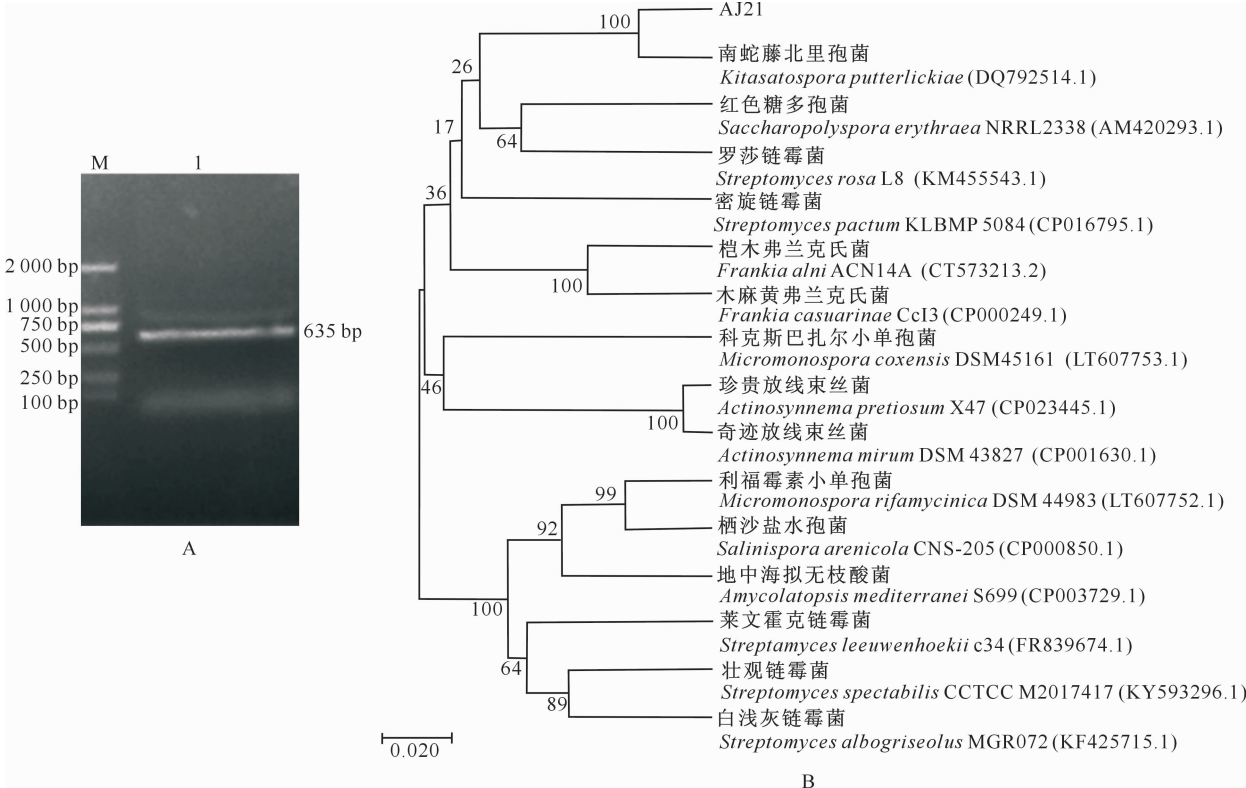
提取 33 株菌的总 DNA,利用简并引物扩增,其中仅菌株 AJ21 在 653 bp 处有目标条带出现(图 1-A),表明其含有 AHBA 基因。

基于 AHBA 基因序列的 AJ21 菌株系统发育树如图 1-B 所示。从图 1-B 可以看出,AJ21 菌株与南蛇藤北里孢菌(*Kitasatospora putterlickiae*)的亲缘关系较近,相似性为 92%。将菌株 AJ21 的 16S rRNA 序列在 NCBI 数据库中进行比对,构建系统发育树,结果如图 2 所示。从图 2 可以看出,AJ21 菌株与黑门链霉菌的亲缘关系较近,相似性达到

99%,初步鉴定其为链霉菌(*Streptomyces* sp.)。

2.3 菌株 AJ21 最佳发酵条件的确定

以枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌为指示菌,对菌株 AJ21 的 6 种发酵萃取液的抑菌活性进行检测,结果发现 SPY 培养基发酵萃取液的抑菌效果最好(图 3)。将菌株 AJ21 在 SPY 培养基中发酵 3~10 d,以枯草芽孢杆菌为指示菌检测其抑菌效果,结果显示发酵第 6 天的抑菌效果最好(图 4)。图 5 表明,菌株 AJ21 发酵萃取液对枯草芽孢杆菌有抑菌活性,而萃余相及溶剂甲醇均无抑菌活性,表明抑菌效果是由菌株 AJ21 的发酵萃取液引起的。



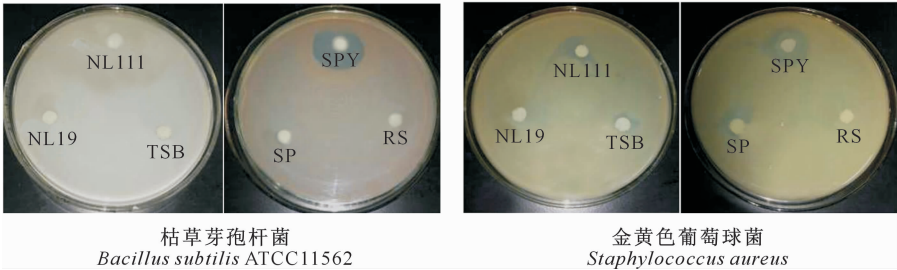


图 3 菌株 AJ21 在 6 种培养基中发酵萃取液的抑菌活性
Fig. 3 Antimicrobial activity of fermentation extract of strain AJ21 in six media

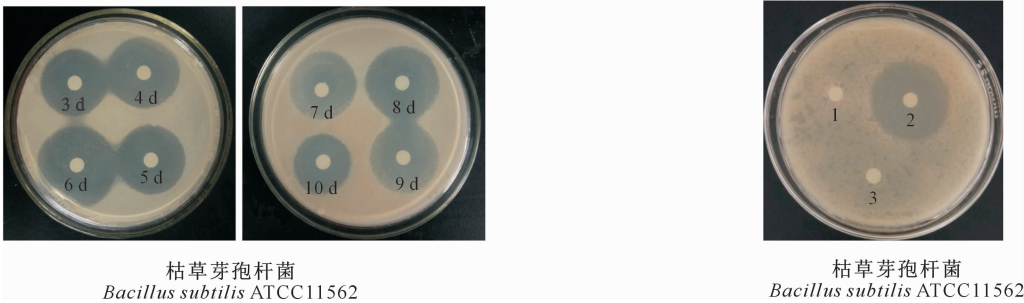


图 4 菌株 AJ21 在 SPY 培养基中发酵 3~10 d 的抑菌活性
Fig. 4 Antimicrobial activity of strain AJ21 fermented in SPY media for 3-10 d

1. 甲醇;2. 菌株 AJ21 的发酵萃取液;3. 萃余相
1. Methyl alcohol;2. Fermentative extraction phase of strain AJ21;3. Raffinate
图 5 菌株 AJ21 在 SPY 培养基中发酵第 6 天的抑菌活性
Fig. 5 Antibacterial activity of strain AJ21 in SPY media at the 6th day

2. 4 目标化合物的分离纯化及鉴定

将菌株 AJ21 发酵萃取物纯化后进行 HPLC 检测,综合分析 HPLC 图谱,推断 AJ21 发酵的次级代谢产物可能为放线菌素 D。分别对放线菌素 D 标准品和菌株 AJ21 的发酵产物进行 HPLC 分析和质谱分析,结果显示,放线菌素 D 标准品在保留时间为 11.032 min 处有目标峰,AJ21 发酵产物在 10.852

min 处出现目标峰(图 6)。质谱分析结果显示,放线菌素 D 标准品的相对分子质量 $[M+H]^+$ 为 1 255.10, $[M+Na]^+$ 为 1 277.24,菌株 AJ21 发酵产物的相对分子质量 $[M+H]^+$ 为 1 255.14, $[M+Na]^+$ 为 1 277.28(图 7),二者数据接近,因此确定菌株 AJ21 产生的安莎霉素类抗生素为放线菌素 D。

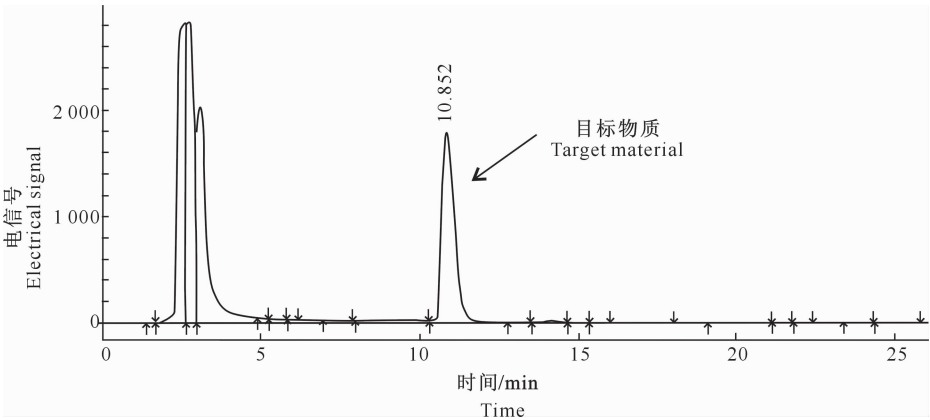


图 6 菌株 AJ21 发酵产物的 HPLC 图谱
Fig. 6 HPLC chromatograms of the fermentation broth from strain AJ21

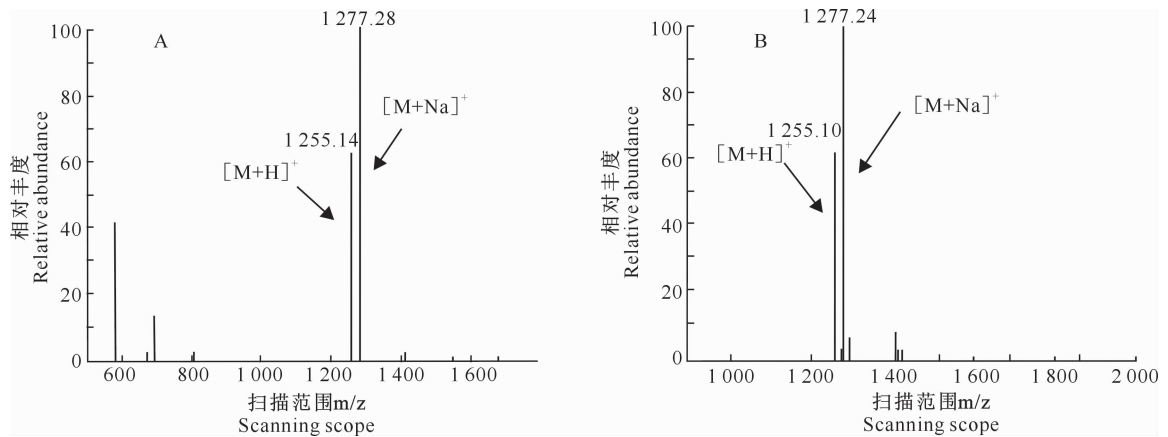


图 7 菌株 AJ21 目标化合物(A)和放线菌素 D 标准品(B)的质谱分析

Fig. 7 Analysis of target compounds of strain AJ21(A) and actinomycin D(B) by mass spectrometry

3 讨 论

放线菌产生的抗生素种类繁多,结构丰富多样,生理活性广泛,占目前已市场化的天然产物来源抗生素的 2/3^[23]。安莎霉素类抗生素作为一类结构独特的 I 型聚酮,与其他类型的 I 型聚酮如大环内酯、多烯类化合物相比,数量虽然不多,但是生理活性较广,成药率较高,因此引起了人们的极大关注^[24]。

本研究对从缬草及其根际土壤分离得到的 145 株菌株进行了抑菌活性检测,结果显示,有 22.8% 的菌株至少对 1 种病原菌有抑菌效果,其中菌株 AJ21 对 7 种病原菌均有抑制效果。据报道,药用植物内生菌及根际放线菌具有显著的抑菌活性,本研究分离的 77.2% 的菌株没有显示出抑菌活性,可能是由于培养基没能提供足够的营养成分和最适的生长环境,从而使一些具有生物活性化合物的生物合成途径沉默;另一种可能是这些菌株的代谢产物具有抗细菌、抗真菌之外的活性,本试验中选用的指示菌并不合适。

由于 AHBA 基因具有较高的保守性和特异性,因此很早就被用来作为探针筛选安莎霉素的生物合成基因簇^[25-26],基于 AHBA 基因设计的 PCR 引物能够快速检测某菌株是否具有产生 AHBA 的潜力^[26-27]。本研究通过设计 2 种简并引物扩增 AHBA 基因片段,结果显示菌株 AJ21 含有该类基因片段,且其对 7 种病原菌都有较强的抑菌活性,因此选其进行了后续试验。通过 HPLC 和质谱分析,发现 AJ21 菌株的次级代谢产物中的活性成分为放线菌素 D,其对肾母细胞瘤、横纹肌肉瘤、神经母细胞瘤、霍奇金病及绒毛膜癌等有一定的疗效^[28-30]。本研究虽然从分离菌株中未发现新的次级代谢产物,但这

些菌株对多种病原菌都有较好的抑制效果,值得进一步研究。

[参考文献]

- [1] 田新朋,张 ,李文均. 海洋放线菌研究进展 [J]. 微生物学报,2011,51(2):161-169.
Tian X P,Zhang S,Li W J. Advance in marine actinobacterial researcha review [J]. Acta Microbiologica Sinica,2011,51(2): 161-169.
- [2] 洪 葵. 红树林放线菌及其天然产物研究进展 [J]. 微生物学报,2013,53(11):1131-1141.
Hong K. Actinomycetes from mangrove and their secondary metabolites [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2013, 53 (11): 1131-1141.
- [3] Cragg G M,Newman D J. Natural product drug discovery in the next millennium [J]. Pharmaceutical Biology, 2001, 39 (S1):8-17.
- [4] Qin S,Xing K,Jiang J H,et al. Biodiversity,bioactive natural products and biotechnological potential of plant-associated endophytic actinobacteria [J]. Applied Microbiology and Biotechnology,2011,89(3):457-473.
- [5] 肖 炜,李铭刚,崔晓龙,等. 几种选择性分离稀有放线菌的方法 [J]. 微生物学通报,2006,33(1):133-137.
Xiao W,Li M G,Cui X L,et al. Some approaches for the selective isolation of rare actinomycetes [J]. Microbiology China, 2006,33(1):133-137.
- [6] 黄宝康,郑汉臣,秦路平,等. 国产缬草属药用植物资源调查 [J]. 中药材,2004,27(9):632-634.
Huang B K,Zheng H C,Qin L P,et al. Investigation on medicinal plant resources of *Valeriana* in China [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials,2004,27(9):632-634.
- [7] 薛存宽,蒋 鹏,沈 凯,等. 缬草挥发油成分分析及其含量影响因素探讨 [J]. 中草药,2003,34(9):779-781.
Xue C K,Jiang P,Shen K,et al. Analysis of volatile oil from *Valeriana officinalis* and its influencing factors [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs,2003,34(9):779-781.

- [8] 石晋丽. 国产缬草属药用植物资源的研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2004.
Shi J L. Study on medicinal plant resources of *Valeriana* in China [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2004.
- [9] Nam S M, Choi J H, Yoo D Y, et al. *Valeriana officinalis*, extract and its main component, valerenic acid, ameliorate d-galactose-induced reductions in memory, cell proliferation, and neuroblast differentiation by reducing corticosterone levels and lipid peroxidation [J]. *Experimental Gerontology*, 2013, 48 (11): 1369-1377.
- [10] Nowakowski G S, Mccollum A K, Ames M M, et al. A phase I trial of twice-weekly 17-allylamino-demethoxy-geldanamycin in patients with advanced cancer [J]. *Clinical Cancer Research an Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 2006, 12(1): 6087.
- [11] Panarsky R, Reichert F, Benishay Z. Effectiveness of 17DMAG, a geldanamycin derivative, in murine acute myeloid leukemia [J]. *Acta Haematologica*, 2009, 121(1): 32-36.
- [12] Georgakis G V, Li Y, Rassidakis G Z, et al. Inhibition of heat shock protein 90 function by 17-allylamino-17-demethoxy-geldanamycin in Hodgkin's lymphoma cells down-regulates Akt kinase, dephosphorylates extracellular signal-regulated kinase, and induces cell cycle arrest and cell death [J]. *Clinical Cancer Research an Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 2006, 12(2): 584-590.
- [13] Lewis P G D, Li G, Dugger D L, et al. Targeting HER2-positive breast cancer with trastuzumab-DM1, an antibody-cytotoxic drug conjugate [J]. *Cancer Research*, 2008, 68 (22): 9280-9290.
- [14] Ostermann E, Garinchesa P, Heider K H, et al. Effective immunoconjugate therapy in cancer models targeting a serine protease of tumor fibroblasts [J]. *Clinical Cancer Research*, 2008, 14(14): 4584-4592.
- [15] Rodon J, Garrison M, Hammond L A, et al. Cantuzumab mertansine in a three-times a week schedule: a phase I and pharmacokinetic study [J]. *Cancer Chemotherapy & Pharmacology*, 2008, 62(5): 911-919.
- [16] Ikeda H, Hideshima T, Lutz R J, et al. The monoclonal antibody nBT062 conjugated to maytansinoids has potent and selective cytotoxicity against CD138 positive multiple myeloma cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Clinical Cancer Research*, 2009, 15(12): 4028-4037.
- [17] Goldberg S V, Hanson D, Peloquin C A. Rifamycin treatment of tuberculosis in a patient receiving atenolol: less interaction with Rifabutin than with Rifampin [J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2003, 37(4): 607-608.
- [18] Howard D C M D. Clinical studies with a new rifamycin derivative [J]. *Journal of Clinical Pharmacology & the Journal of New Drugs*, 1969, 9(2): 118-125.
- [19] 周德庆. 微生物学实验手册 [M]. 上海: 上海科技出版社, 1986.
Zhou D Q. Microbiology laboratory manual [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Publishing House, 1986.
- [20] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual [J]. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2001, 49(2): 411.
- [21] Kieser T. Practical streptomyces genetics [J]. *International Microbiology*, 2000.
- [22] Wu Y, Kang Q, Shen Y, et al. Cloning and functional analysis of the naphthomycin biosynthetic gene cluster in *Streptomyces* sp. CS [J]. *Molecular Biosystems*, 2011, 7(8): 2459-2469.
- [23] Bentley S D, Chater K F, Cerdeño-Tárraga A M, et al. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2) [J]. *Nature*, 2002, 417(6885): 141-147.
- [24] 葛玲. 具有安莎产生潜能放线菌的筛选及小单孢菌中安莎基因簇的克隆 [D]. 厦门: 厦门大学, 2011.
Ge L. Screening of ansamycins actinomycetes and cloning of ansamycins gene cluster in *Micromonospora* [D]. Xiamen: Xiamen University, 2011.
- [25] Yu T W, Bai L, Hoffmann D, et al. The biosynthetic gene cluster of the maytansinoid antitumor agent ansamitocin from *Actinosynnema pretiosum* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(12): 7968-7973.
- [26] Rascher A, Hu Z, Viswanathan N, et al. Cloning and characterization of a gene cluster for geldanamycin production in *Streptomyces hygroscopicus* NRRL 3602 [J]. *Fems Microbiology Letters*, 2003, 218(2): 223-230.
- [27] Huitu Z, Linzhuan W, Aiming L, et al. PCR screening of 3-amino-5-hydroxybenzoic acid synthase gene leads to identification of ansamycins and AHBA-related antibiotic producers in actinomycetes [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2009, 106 (3): 755-763.
- [28] 范辰辰, 冯凤芝, 向阳, 等. 放线菌素 D 单目冲击疗法治疗低危妊娠滋养细胞肿瘤 [J]. *协和医学杂志*, 2017, 8(1): 25-29.
Fan C C, Feng F Z, Xiang Y, et al. Pulsed actinomycin D for the treatment of low-risk gestational trophoblastic neoplasia [J]. *Medical Journal of Peking Union Medical College Hospital*, 2017, 8(1): 25-29.
- [29] 康海利, 赵群, 杨淑丽, 等. 放线菌素 D 联合甲氨蝶呤及甲氨蝶呤单药治疗低危妊娠滋养细胞肿瘤的前瞻性研究 [J]. *北京医学*, 2017, 39(11): 1125-1128.
Kang H L, Zhao Q, Yang S L, et al. A prospective study of actinomycin D combined with methotrexate and methotrexate only in the treatment of low-risk gestational trophoblastic tumor [J]. *Beijing Medical Journal*, 2017, 39(11): 1125-1128.
- [30] 冯沛仙. 易变链霉菌 TRM45540 产放线菌素 D 研究 [D]. 新疆塔里木: 塔里木大学, 2016.
Feng P X. Studies on actinomycin D production by *Streptomyces mutans* TRM45540 [D]. Tarim, Xinjiang: Tarim University, 2016.