



## 稀有放线菌 *Lechevalieria rhizosphaerae* NEAU-A2 的次级代谢产物研究及遗传操作系统的建立

余志银<sup>1,2</sup> 颜一军<sup>1</sup> 刘重喜<sup>1,2</sup> 黄建萍<sup>1</sup> 向文胜<sup>\*2</sup> 黄胜雄<sup>\*1</sup>

1 中国科学院昆明植物研究所 植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室 云南 昆明 650201

2 东北农业大学生命科学学院 黑龙江 哈尔滨 150030

**摘要:**【背景】菌株 *Lechevalieria rhizosphaerae* NEAU-A2 是一株新的稀有放线菌, 其基因组中包含多个与次级代谢产物生物合成相关的基因簇, 具有产生丰富代谢产物的潜力。【目的】对稀有放线菌 *L. rhizosphaerae* NEAU-A2 的次级代谢产物进行研究, 以期发现结构新颖或生物活性独特的化合物, 并建立其遗传操作系统。【方法】应用硅胶柱色谱和高效液相色谱等方法对菌株 NEAU-A2 的次级代谢产物进行分离和纯化, 整合质谱分析、核磁共振等方法进行结构解析。在该菌株全基因组测序的基础上, 以基因组序列中编码杂合的聚酮合酶-非核糖体肽合成酶(Polyketide Synthase-Nonribosomal Peptide Synthetase, PKS-NRPSs)基因 1609 为目标基因, 利用 PCR-Targeting 介导的基因置换技术构建重组质粒, 通过接合转移的方式导入野生菌株。【结果】从菌株 NEAU-A2 中分离鉴定了 2 个新的吲哚二聚化合物(1, 2)和 5 个已知化合物 N-乙酰色胺(3)、4-((2-(1H-Indol-3-Yl)Ethyl)Amino)-4-Oxobutanoic Acid (4)、Brevianamide F (5)、4S,7R-Germacra-1(10)E,5E-Diene-11-Ol (6)、1H-吡咯-2-羧酸(7)。接合子通过培养 2 代即可获得双交换突变菌株, PCR 分析结果显示 PKS-NRPS 基因被成功中断。【结论】从稀有放线菌 *L. rhizosphaerae* NEAU-A2 中分离鉴定出 7 个化合物, 并成功建立了该菌的遗传操作系统。

**关键词:** *Lechevalieria rhizosphaerae* NEAU-A2, 代谢产物, 分离鉴定, PCR-Targeting, 接合转移

## Secondary metabolites and genetic system of the rare actinobacteria *Lechevalieria rhizosphaerae* NEAU-A2

YU Zhiyin<sup>1,2</sup> YAN Yijun<sup>1</sup> LIU Chongxi<sup>1,2</sup> HUANG Jianping<sup>1</sup> XIANG Wensheng<sup>\*2</sup>  
HUANG Shengxiong<sup>\*1</sup>

1 State Key Laboratory of Phytochemistry and Plant Resources in West China, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming, Yunnan 650201, China

2 College of Life Science, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030, China

**Abstract:** [Background] *Lechevalieria rhizosphaerae* NEAU-A2 was identified as a novel rare

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (U1702285); Key Research Program of Frontier Sciences of Chinese Academy of Sciences (QYZDB-SSW-SMC051); Fundamental Research Project of Yunnan Province (2019FJ007, 2019FA034)

**\*Corresponding authors:** E-mail: XIANG Wensheng: xiangwensheng@neau.edu.cn; HUANG Shengxiong: sxhuang@mail.kib.ac.cn

**Received:** 22-02-2021; **Accepted:** 25-03-2021; **Published online:** 07-05-2021

**基金项目:** 国家自然科学基金(U1702285); 中国科学院前沿交叉科学领域重点项目(QYZDB-SSW-SMC051); 云南省基础研究计划项目(2019FJ007, 2019FA034)

**\*通信作者:** E-mail: 向文胜: xiangwensheng@neau.edu.cn; 黄胜雄: sxhuang@mail.kib.ac.cn

**收稿日期:** 2021-02-22; **接受日期:** 2021-03-25; **网络首发日期:** 2021-05-07

actinobacteria, and genomic analysis shows that it contains a variety of biosynthetic gene clusters with the potential to generate multiple natural products. **[Objective]** Study on the secondary metabolites in *L. rhizosphaerae* NEAU-A2 to discover compounds with novel structures or unique biological activities, and further establish the genetic system of the strain. **[Methods]** The secondary metabolites were isolated and purified by using silica gel column chromatography, high performance liquid chromatography and other methods. The structures of compounds were elucidated by analysis of NMR and MS data. The mutant cosmid with the disruption of the gene *1609* (a PKS-NRPS hybrid gene) was constructed using PCR-targeting method. Intergeneric conjugation was conducted for plasmid the transformation into wild type strain. **[Results]** Two new dimeric indole alkaloids (**1–2**), along with five known compounds, N-acetyltryptamine (**3**), 4-((2-(1H-indol-3-yl)ethyl)amino)-4-oxobutanoic acid (**4**), brevianamide F (**5**), 4S,7R-germacra-1(10)E,5E-diene-11-ol (**6**), 1H-pyrrole-2-carboxylic acid (**7**), were isolated and identified from the fermentation broth of *L. rhizosphaerae* NEAU-A2. The double crossover recombinant strains were obtained after culturing two generations, and further verified by polymerase chain reaction (PCR). **[Conclusion]** Seven compounds were isolated and identified from strain NEAU-A2, and the genetic system of this novel rare actinobacteria *L. rhizosphaerae* NEAU-A2 was successfully established.

**Keywords:** *Lechevalieria rhizosphaerae* NEAU-A2, secondary metabolites, isolation and identification, PCR-targeting, conjugation

稀有放线菌(Rare Actinobacteria)一般指除链霉菌属以外的放线菌。目前已报道的有 15 个目 200 多个属, 其中研究较多的主要有小单孢菌(*Micromonospora*)、盐孢菌(*Salinispora*)、拟无枝酸菌(*Amycolatopsis*)、马杜拉放线菌(*Actinomadura*)等<sup>[1]</sup>, 然而列舍瓦列氏菌属(*Lechevalieria*)的研究报道较少。尽管从链霉菌中发现了众多结构新颖的天然产物, 包括目前临床上使用的抗生素有 2/3 来源于链霉菌, 但是近年来有越来越多结构新颖的天然产物从稀有放线菌中被发现, 来源于链霉菌的新颖天然产物呈现下降趋势<sup>[2]</sup>。稀有放线菌比链霉菌生长缓慢, 特殊的生长条件导致了它们独特的生理特性。因此, 对稀有放线菌次级代谢产物的研究也较少, 这使得稀有放线菌成为发现新型抗生素的潜在资源<sup>[3]</sup>。

据统计, 从 2008 年到 2018 年, 对来源于稀有放线菌的次级代谢产物的化学结构和生物活性研究涉及了 20 个属, 共报道了 341 个代谢产物, 占整个微生物来源的代谢产物的 16%<sup>[3]</sup>。张举成等<sup>[4]</sup>总结发现, 自 2006 年 1 月至 2018 年 6 月在陆地土壤、植物、海洋动物、海洋沉积物等来源的稀有放线菌中分离到 515 个天然产物, 涉及聚酮、萜醌、

联吡啶类、多烯、大环内酯等结构类型, 其中部分化合物具有显著的抗肿瘤、抗菌等活性。此外, 在过去的 20 年中, 稀有放线菌来源的抗生素占到了已报道抗生素的 20%–30%<sup>[2]</sup>。因此, 稀有放线菌已成为发现新颖活性化合物的重要来源。

菌株 *Lechevalieria rhizosphaerae* NEAU-A2 由本实验室 2017 年从河北省廊坊市采集的小麦(*Triticum aestivum* L.)根际土壤样品中分离获得, 通过多相分类学鉴定为一株新的稀有放线菌<sup>[5]</sup>。近期该菌株的全基因组测序已完成, 总共得到 78 个 Scaffold 序列, 基因组大小约为 10.28 Mb。使用 antiSMASH<sup>[6]</sup>软件预测发现基因组中有 27 个与次级代谢产物生物合成相关的基因簇, 其中涉及 PKS 和 NRPS 的生物合成基因簇有 10 个, 与萜类生物合成相关的基因簇有 6 个, 表明该菌株具有合成丰富次级代谢产物的潜力。因此, 在本研究中, 我们首先对菌株 NEAU-A2 的次级代谢产物进行分析, 从中分离鉴定了 2 个新的吲哚二聚生物碱(**1–2**)和 5 个已知化合物(图 1), 分别为 N-乙酰色胺(**3**)、4-((2-(1H-Indol-3-Yl)Ethyl)Amino)-4-Oxobutanoic Acid (**4**)、Brevianamide F (**5**)、4S,7R-Germacra-1(10)E, 5E-Diene-11-Ol (**6**)、1H-吡咯-2-羧酸(**7**)。同时以

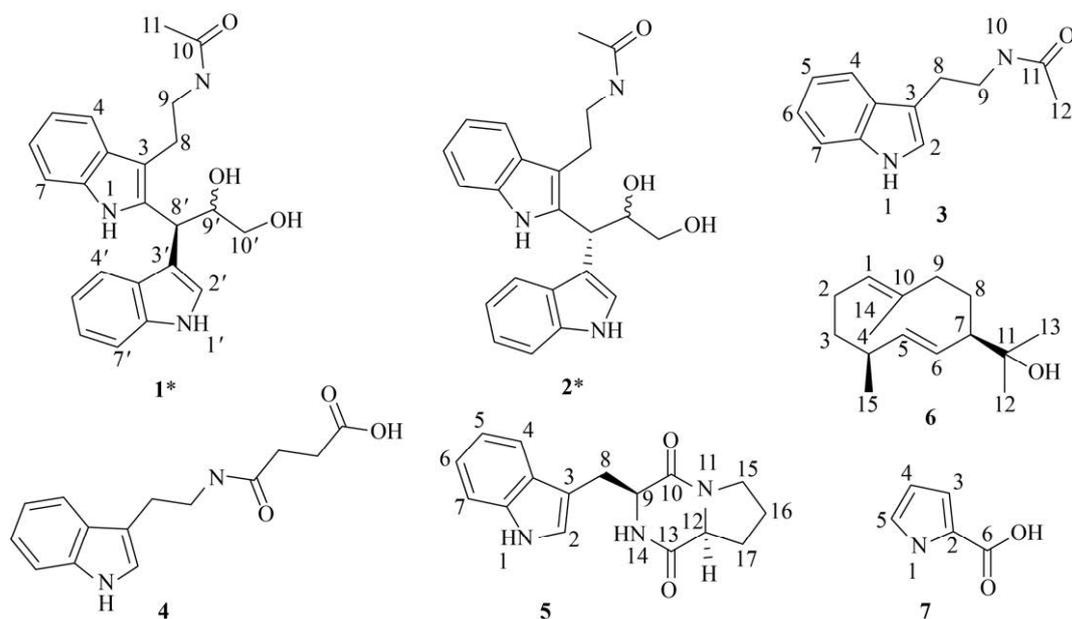


图1 *L. rhizosphaerae* NEAU-A2中分离得到的化合物1-7的化学结构图

Figure 1 Structure of compounds (1-7) isolated from *L. rhizosphaerae* NEAU-A2

注: \*: 新化合物

Note: \*: New compounds

PKS-NRPS 杂合基因 *1609* 为目的基因, 采用 PCR-Targeting 技术<sup>[7-8]</sup>和接合转移的方法, 以期建立稀有放线菌 *L. rhizosphaerae* NEAU-A2 的遗传操作体系, 为后期通过基因挖掘等手段发现结构新颖的活性天然产物奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 培养基

ISP3 固体培养基(g/L): 燕麦 20.0 g 煮沸 30 min, 用 4 层纱布过滤取滤液,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  0.5,  $\text{KNO}_3$  0.5, 琼脂粉 20.0, pH 7.0。

种子培养基: TSB 培养基 30.0 g/L; 其成分(g/L): 大豆蛋白胨 3.0, 胰蛋白胨 17.0, 葡萄糖 2.5,  $\text{NaCl}$  5.0,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  2.5, pH 7.3。

发酵培养基(g/L): 棉籽饼粉 20.0, 酵母提取物 5.0, 葡萄糖 10.0, 玉米淀粉 30.0,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.0, 麦芽糊精 20.0,  $\text{CaCO}_3$  2.0, pH 7.2。

LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0,  $\text{NaCl}$  10.0, 琼脂粉(固体培养基加入) 20.0, pH 7.0。

2×YT 培养基(g/L): 胰蛋白胨 16.0, 酵母提取物 10.0,  $\text{NaCl}$  5.0, pH 7.0。

#### 1.1.2 主要试剂和仪器

研究所用酶购于 TaKaRa 公司或 NEB 公司, 其他试剂为国产分析纯试剂(天津市大茂化学试剂厂、广东环凯微生物科技有限公司)。电穿孔系统、PCR 仪, Bio-Rad 公司; 凝胶成像分析仪, 郑州南北仪器设备有限公司; 核磁共振仪(TMS 作为内标), 布鲁克(北京)科技有限公司; Agilent UPLC/Q-Tof 液质联用仪, 安捷伦科技有限公司; 薄层色谱硅胶板和 200-300 目柱色谱硅胶, 青岛海洋化工有限公司; Sephadex LH-20, AIRTECH 生物化学试剂公司; 高效液相色谱仪, 日立(中国)有限公司; YMC-Triat C18 型液相色谱柱(250 mm×10 mm), YMC 公司。

#### 1.1.3 菌株、质粒和引物

文中所用菌株和质粒见表 1, 所用引物见表 2。

表 1 菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids

Strains/Plasmids	Genotype/Description	References/Source
<i>L. rhizosphaerae</i> NEAU-A2		This study
ET12567/pUZ8002	<i>recE</i> , <i>dcm</i> <sup>-</sup> , <i>dam</i> <sup>-</sup> , <i>hsdS</i> , <i>Cm</i> <sup>r</sup> , <i>Tet</i> <sup>r</sup> , <i>Str</i> <sup>r</sup> , <i>Km</i> <sup>r</sup>	[7-8]
BW25113/pIJ790	$\lambda$ -RED ( <i>gam</i> , <i>bet</i> , <i>exo</i> ), <i>cat</i> , <i>araC</i> , <i>rep101</i> <sup>ts</sup>	[7-8]
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ /pIJ773	<i>aac(3) IV</i> , <i>oriT</i>	[7-8]
pSuperCos I	Kan <sup>r</sup> , used for construction of gene knockout cosmid	Stratagene
XL1-Blue	Construction of gene library	Agilent

表 2 引物信息

Table 2 PCR primers

Primers name	Primers sequence (5'→3')	Purpose
1609-F	GCGTAGACACCGATCACTTCCTGC	Screening cosmid library
1609-R	CCGCGTCACGTCGATCTACCAG	
$\Delta$ 1609-F	CTCCTGAAAACCCCGACGCACCACGGAGGACTACCAGTGATTCCGGGGATCCGTCGACC	Inframe deletion
$\Delta$ 1609-R	GTACAGGTCTCGATGTTCTTCGCCATCACTGCCTCTCATGTAGCTGGAGCTGCTTC	
1609-check-F	TGAAAACCCCGACGCACCAC	Genotype verification
1609-check-R	TGTTCTTCGCCATCACTGCC	

## 1.2 方法

### 1.2.1 产孢培养

共选择 6 种培养基 ISP2、ISP3、ISP4、ISP5、ISP6、ISP7<sup>[5]</sup>, 分别接种约 10<sup>8</sup> 个甘油管中保存的孢子, 30 °C 培养 4–6 d 后观察孢子产生情况。

### 1.2.2 菌株的培养与发酵

将 ISP3 平板上活化好的菌株 NEAU-A2 接种到 20 只装有 50 mL 种子液的 250 mL 三角瓶中, 置于 30 °C、220 r/min 摇床上培养 36 h。将种子液按 10% (体积分数) 接种量转接到 60 只盛有 250 mL 发酵培养基的 1 L 三角瓶中, 置于 30 °C、220 r/min 摇床上培养 7 d。

### 1.2.3 次级代谢产物的提取与分离

*L. rhizosphaerae* NEAU-A2 在发酵培养基中培养 7 d 后共收集到 15 L 的发酵液, 于 4 000 r/min 转速下离心 20 min 分离菌体和上清液。上清液用等体积的乙酸乙酯萃取 3 次, 乙酸乙酯萃取相减压浓缩后得 10.0 g 油状粗提物。将油状粗提物经正相硅胶柱色谱分离, 干法上样, 石油醚-乙酸乙酯梯度 (10:0、10:2、10:10、0:10, 体积比) 洗脱后, 再用乙酸乙酯-甲醇梯度 (10:1、10:5、0:10, 体积

比) 洗脱, TLC 检测后合并得到 4 个组分 (Frs.A–D)。Frs.A 段用半制备高效液相色谱制备得化合物 **6** (36.8 min, 10 mg), 方法为: 0–23.0 min, 50% 乙腈-水; 23.1–38.0 min, 70% 乙腈-水。Frs.B 段 (石油醚-乙酸乙酯 10:2, 体积比) 用半制备高效液相色谱制备得化合物 **7** (14.0 min, 8 mg), 方法为: 15% 乙腈-水等度洗脱。Frs.D 段 (乙酸乙酯: 甲醇, 10:1, 体积比) 过凝胶色谱 Sephadex LH-20, 甲醇洗脱, TLC、HPLC 分析后, 得到 2 个组分 (Frs.D1 和 Frs.D2)。Frs.D2 段用半制备高效液相色谱制备得到 3 个组分 Frs.D2.1–D2.3, 方法为: 0–12.0 min, 25% 乙腈-水; 12.1–41.0 min, 29% 乙腈-水; 41.1–45.0 min, 100% 乙腈-水; 45.1–49.0 min, 25% 乙腈-水, 富集 13.0 min 的流分得 Frs.D2.1, 富集 20.0 min 的流分得 Frs.D2.2, 富集 26.0 min 的流分得 Frs.D2.3。Frs.D2.1 段用半制备高效液相色谱制备, 方法为: 35% 甲醇-水等度洗脱, 得化合物 **5** (1.0 mg)。Frs.D2.2 段用半制备高效液相色谱制备, 方法为: 22% 乙腈-水等度洗脱得化合物 **3** (2.5 mg) 和 **4** (1.0 mg)。Frs.D2.3 段用半制备高效液相色谱

二次纯化得到化合物 **1** (10.0 mg)和 **2** (5.0 mg), 方法为: 50%甲醇水等度洗脱。

#### 1.2.4 抗生素抗性谱检测

在固体 ISP3 培养基中分别添加不同浓度的卡那霉素(25、50、75、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、硫酸安普霉素(25、50、75、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、硫链丝菌素(25、50、75  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、红霉素(50、75、100、200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、三甲氧苄氨嘧啶(25、50、75、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 然后将新鲜的 *L. rhizosphaerae* NEAU-A2 孢子涂布于平板上, 30  $^{\circ}\text{C}$  培养 4–6 d, 观察生长情况。

#### 1.2.5 基因组文库构建及筛选

根据链霉菌手册的标准操作<sup>[9]</sup>, 提取 *L. rhizosphaerae* NEAU-A2 的基因组, 然后用 *Mbo* I 酶切处理后回收 30–42 kb 大小 DNA 片段, 去磷酸化酶处理后, 连接到处理好的 pSuperCos I 载体上。取适量的包装抽提物 MaxPlax Lambda Packaging Extracts 包装连接产物, 转化到大肠杆菌 XL1-Blue 菌中, 随机挑取 2 000 个单克隆, 保存于–80  $^{\circ}\text{C}$ 。

针对 PKS-NRPS 杂合基因(*1609*)设计一对特异性引物, 从 *L. rhizosphaerae* NEAU-A2 的基因文库中筛选含有 *1609* 基因序列的 Cosmid。

#### 1.2.6 利用 PCR-Targeting 技术构建重组质粒

首先, 根据基因 *1609* 的序列设计一对基因中断引物(表 2,  $\Delta 1609\text{-F}$  和  $\Delta 1609\text{-R}$ )。引物长度为 59 bp, 其 5'端 39 bp 分别与目的序列同源, 而剩余 3'端 20 bp 序列与 pIJ773 的 *Apr* 抗性基因两侧序列相匹配。质粒 pIJ773 经 *Eco*R I 和 *Hind* III 双酶切后, 回收 1.4 kb 片段作为模板, 以  $\Delta 1609\text{-F}$  和  $\Delta 1609\text{-R}$  为引物, 用 DNA 聚合酶进行 PCR 扩增得到约 1.4 kb 的 *aac(3)IV+oriT* 片段。与此同时, 将含有 PKS-NRPS 生物合成基因簇的 S4H1-cosmid 转化大肠杆菌 BW25113/pIJ790。取约 100 ng 的 *aac(3)IV+oriT* 片段, 电击转化 BW25113/pIJ790/S4H1-cosmid 感受态细胞。在 LB+Apr+Kan 抗性平板上筛选阳性转化子, 从中提取质粒, 此为重组含有 *Apr* 抗性片段的 S4H1-cosmid, 将其命名为

S4H1- $\Delta 1609$ -cosmid, 转化大肠杆菌 ET12567/pUZ8002 感受态细胞。

#### 1.2.7 接合转移

将 ET12567/pUZ8002/S4H1- $\Delta 1609$ -cosmid 接种于 5 mL LB 培养基中(Kan、Chl、Apr), 37  $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 摇床上培养过夜。次日按 1:100 转种于 5 mL LB 培养基中(Kan、Chl、Apr), 37  $^{\circ}\text{C}$  培养大约 4 h 至  $OD_{600}$  为 0.4, 4 000 r/min 离心 5 min 收集菌体, 用无抗生素的液体 LB 培养基洗涤 2 次, 重悬于 500  $\mu\text{L}$  无抗生素的液体 LB 培养基中待用。

收集 *L. rhizosphaerae* NEAU-A2 在固体 ISP3 培养基上培养大约 4 d 的新鲜孢子, 用无菌水洗下孢子转移至 50 mL 的离心管中, 振荡混匀后, 用脱脂棉过滤在干净的离心管中, 3 500 r/min 离心 10 min, 去上清后加入 500 mL 的 2 $\times$ YT 培养基轻轻混匀, 50  $^{\circ}\text{C}$  分别热激 5、8、10 min, 分析热激时间对接合转移的影响。冷却至室温后, 30  $^{\circ}\text{C}$  分别温浴 0、0.5、1、2 h, 探究孢子预萌发时间对接合转移效率的影响。

分别取 500  $\mu\text{L}$  的大肠杆菌 ET12567/pUZ8002/S4H1- $\Delta 1609$ -cosmid 菌液和 500  $\mu\text{L}$  的孢子液混匀, 均匀涂布到含有 10 mmol/L  $\text{MgCl}_2$  的 ISP3 平板上, 于 30  $^{\circ}\text{C}$  培养 16–18 h。用含 25  $\mu\text{L}$  Apr (储存浓度 50 mg/mL)和 30  $\mu\text{L}$  三甲氧苄氨嘧啶(储存浓度 50 mg/mL)的 1 mL 无菌水均匀覆盖平板, 表面吸收后于 30  $^{\circ}\text{C}$  培养 3–5 d。将长出的阳性菌落在含有 *Apr* 抗性(若有细菌可加入三甲氧苄氨嘧啶)的 ISP3 固体平板上继续培养 3–5 d。待长出单菌落后进行单双交换筛选。挑取单菌落同时接种于只含有 *Apr* 抗性和同时含有 *Apr* 和 Kan 抗性的平板上, 30  $^{\circ}\text{C}$  培养 3–5 d。选择只能在含有 *Apr* 抗性的平板上生长而不能在同时含有 *Apr* 和 Kan 抗性的平板上生长的菌落(双交换突变株), 划线培养获得纯种单菌落。用对应的验证引物(表 2, *1609-check-F/1609-check-R*)通过 PCR 鉴定双交换菌株基因组, 验证正确后得到对应基因的敲除突变株。

## 2 结果与分析

### 2.1 化合物结构鉴定

化合物 **1**, 黄色粉末, 通过高分辨质谱 HRESIMS (Found 414.180 2 [M+Na]<sup>+</sup>, Calcd 414.178 8) 确定其分子式为 C<sub>23</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>, 不饱和度为 13。<sup>1</sup>H-NMR 谱显示(表 3)含有 1 个单峰甲基信号: δ<sub>H</sub> 1.60 (s, 3H); 低场区 9 个芳香质子信号, 展示了一个特征的吲哚信号: 7.54 (1H, d, *J*=8.0 Hz, H-4'), 7.31 (1H, d, *J*=8.1 Hz, H-7'), 6.94 (1H, m, H-5'), 7.04 (1H, ddd, *J*=8.0, 7.2, 1.0 Hz, H-6'), 7.43 (1H, s, H-2') 和一个 1,2 位取代的苯环信号[δ<sub>H</sub> 7.48 (1H, d, *J*=7.8 Hz, H-4), 7.29 (1H, d, *J*=8.0 Hz, H-7),

7.01 (1H, ddd, *J*=8.1, 7.0, 1.1 Hz, H-6), 6.94 (1H, m, H-5)]。<sup>13</sup>C NMR 谱数据显示共有 23 个碳, 包含 16 个芳香碳信号, 并呈现了成对信号, 推测可能是吲哚二聚衍生物。仔细分析 <sup>13</sup>C NMR 和 HSQC 谱, 23 个碳信号分别为 9 个 sp<sup>2</sup> 杂化的次甲基碳(δ<sub>C</sub> 111.8、112.2、119.0、119.6、119.7、119.8、121.8、122.3、124.4), 7 个 sp<sup>2</sup> 杂化的季碳(δ<sub>C</sub> 108.8、114.6、129.0、129.4、137.3、137.7、138.2), 1 个羰基碳(δ<sub>C</sub> 173.3), 3 个 sp<sup>3</sup> 杂化的亚甲基碳(δ<sub>C</sub> 25.3、41.3、65.9), 2 个 sp<sup>3</sup> 杂化的次甲基碳(δ<sub>C</sub> 37.9、76.1), 1 个甲基碳(δ<sub>C</sub> 22.4)。以上数据与化合物 3-(3-(2-Hydroxyethyl)-1H-Indol-2-Yl)-3-(1H-Indol-3-Yl) Propane-1,2-Diol 的核磁数据显示了相似性<sup>[10-11]</sup>。

表 3 化合物 **1** 和 **2** 的 <sup>1</sup>H (600 MHz) 和 <sup>13</sup>C (150 MHz) NMR 核磁数据(MeOD)

Table 3 <sup>1</sup>H (600 MHz) and <sup>13</sup>C (150 MHz) NMR data of compounds **1** and **2** (MeOD)

No.	<b>2</b>		<b>1</b>	
	δ <sub>H</sub>	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub>	δ <sub>C</sub>
2		137.4		137.3
3		110.0		108.8
3a		129.2		129.4
4	7.48 (d, <i>J</i> =7.8 Hz, 1H)	118.8	7.48 (d, <i>J</i> =7.8 Hz, 1H)	119.0
5	6.96 (m, 1H)	119.5	6.94 (m, 1H)	119.7
6	7.03 (m, 1H)	121.8	7.01 (ddd, <i>J</i> =8.1, 7.0, 1.1 Hz, 1H)	121.8
7	7.32 (overlapped)	111.8	7.29 (d, <i>J</i> =8.0 Hz, 1H)	111.8
7a		137.4		137.7
8	3.01 (t, <i>J</i> =7.0 Hz, 2H)	25.1	3.03 (m, 2H)	25.3
9	3.38 (m, 2H)	41.4	3.38 (m, 2H)	41.4
10		173.4		173.3
11	1.60 (s, 3H)	22.3	1.68 (s, 3H)	22.4
2'	7.23 (s, 1H)	124.1	7.43 (s, 1H)	124.4
3'		116.3		114.6
3'a		128.0		129.0
4'	7.61 (d, <i>J</i> =8.0 Hz, 1H)	119.4	7.54 (d, <i>J</i> =8.0 Hz, 1H)	119.6
5'	7.00 (m, 1H)	119.9	6.94 (m, 1H)	119.8
6'	7.07 (m, 1H)	122.5	7.04 (ddd, <i>J</i> =8.0, 7.2, 1.0 Hz, 1H)	122.3
7'	7.32 (overlapped)	112.3	7.31 (d, <i>J</i> =8.1 Hz, 1H)	112.2
7'a		137.9		138.2
8'	4.75 (d, <i>J</i> =5.9 Hz, 1H)	37.4	4.77 (d, <i>J</i> =6.3 Hz, 1H)	37.9
9'	4.46 (m, 1H)	75.5	4.39 (td, <i>J</i> =6.5, 4.2 Hz, 1H)	76.1
10'	3.50 (dd, <i>J</i> =11.0, 6.7 Hz, 1H)	66.1	3.43 (dd, <i>J</i> =11.1, 6.7 Hz, 1H)	65.9
	3.54 (dd, <i>J</i> =11.0, 5.0 Hz, 1H)		3.59 (dd, <i>J</i> =11.1, 4.2 Hz, 1H)	

分析二维核磁数据,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY 和 HSQC 谱揭示了 4 个耦合系统(图 2), 2 个 1、2 位取代的芳香环(C4-C5-C6-C7, C-4'-C-5'-C-6'-C-7'), 1 个 1、2 位被氧化的丙基链(C-8'-C-9'-C-10')和一个乙基链(C-8-C-9)。根据 HMBC 谱中 H-8 与 C-2/C-3/C-3a 相关, H-9 与 C-10/C-3 相关, H-11 与 C-10 相关(图 2), 可知乙基侧链连接在吲哚环的 C-3 位, 乙酰胺基连接在 C-9 位。H-8'与 C-3'/C-2'/C-3'a、H-2'与 C-8'/C-9'存在 HMBC 远程相关, 可以确定 1、2 位被氧化的丙基侧链通过 C-3'位与第 2 个吲哚环连接。基于 HMBC 谱中 H-8'与 C-2/C-3 的远程相关, 最终确定 2 个吲哚环通过 C-8'位相连。至此, 确定了化合物 **1** 的平面结构。

通过与已报道的化合物 3-(3-(2-Hydroxyethyl)-1H-Indol-2-Yl)-3-(1H-Indol-3-Yl)Propane-1,2-Diol<sup>[10-11]</sup> 的 CD 谱比较, 发现化合物 **1** 在 210 nm 和 228 nm 处有相同的 Cotton 效应(图 2), 因此, 确定化合物 **1** 的 C-8'位绝对构型为 S。

化合物 **2**, 黄色粉末, 通过高分辨质谱 HRESIMS (Found 414.179 5 [M+Na]<sup>+</sup>, Calcd 414.178 8) 确定其分子式为  $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_3$ , 不饱和度为 13。化合物 **2** 与化合物 **1** 具有相同的分子式,  $^1\text{H}$  NMR 和  $^{13}\text{C}$  NMR 谱数据也显示了高度的一致性(表 3)。对化合物 **2** 的  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY、HSQC、HMBC 谱数据进行详细分析, 发现化合物 **2** 与化合物 **1** 具有相同

的平面结构。此外, 化合物 **2** 的 CD 谱在 211 nm 和 228 nm 显示了与化合物 **1** 相反的 Cotton 效应(图 3)。因此, 化合物 **2** 的 C-8'位的绝对构型确定为 R。

化合物 **3**: 分子式  $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, MeOD)  $\delta_{\text{H}}$  7.54 (1H, d,  $J=7.9$  Hz, H-4), 7.32 (1H, d,  $J=8.1$  Hz, H-7), 7.07 (2H, m, H-2, 6), 6.99 (1H, t,  $J=7.4$  Hz, H-5), 3.46 (2H, t,  $J=7.3$  Hz, H-9), 2.93 (2H, t,  $J=7.3$  Hz, H-8), 1.91 (3H, s, H-12)。以上数据与文献[12]报道一致, 因此被鉴定为 N-乙酰色胺(**3**)。

化合物 **4**: 分子式  $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3$ ;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{H}}$  7.56 (1H, d,  $J=7.8$  Hz, H-4), 7.32 (1H, d,  $J=8.1$  Hz, H-7), 7.07 (1H, t,  $J=7.2$  Hz, H-6), 7.07 (1H, Overlapped, H-2), 6.99 (1H, t,  $J=7.3$  Hz, H-5), 3.47 (2H, t,  $J=7.3$  Hz, H-9), 2.93 (2H, dd,  $J=14.8, 7.6$  Hz, H-8), 2.57 (2H, t,  $J=6.8$  Hz, H-13), 2.44 (2H, t,  $J=6.9$  Hz, H-12);  $^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz, MeOD)  $\delta_{\text{C}}$  176.3(C, C-14), 174.5 (C, C-11), 138.2 (C, C-7a), 128.8 (C, C-3a), 123.4 (CH, C-2), 122.3 (CH, C-6), 119.6 (CH, C-5), 119.3 (CH, C-4), 113.3 (C, C-3), 112.2 (CH, C-7), 41.5 ( $\text{CH}_2$ , C-9), 31.6 ( $\text{CH}_2$ , C-12), 30.3 ( $\text{CH}_2$ , C-13), 26.3 ( $\text{CH}_2$ , C-8)。以上数据与文献[13]报道一致, 因此被鉴定为 4-((2-(1H-Indol-3-Yl)Ethyl)Amino)-4-Oxobutanoic Acid (**4**)。

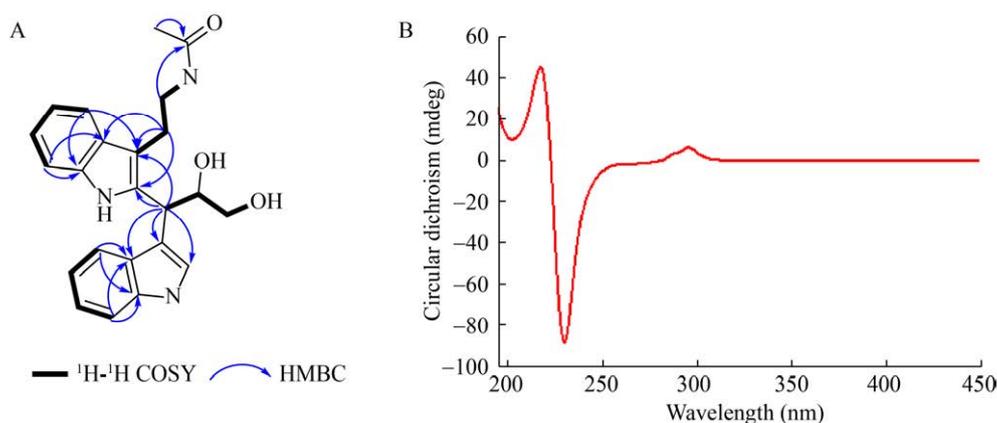


图 2 化合物 **1** 的二维相关信号(A)和 CD 谱(B)  
Figure 2 Key 2D NMR correlations (A) and CD (B) of compound **1**

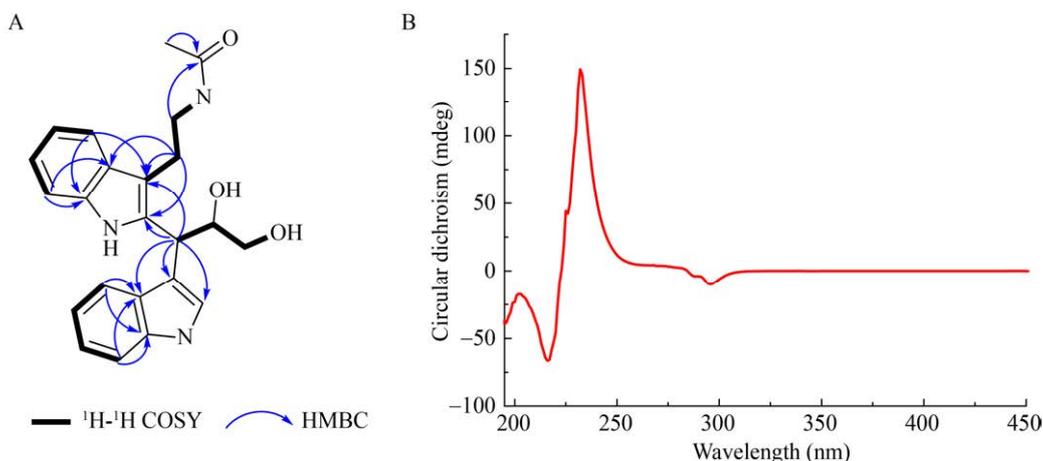


图3 化合物2的二维相关信号(A)和CD谱(B)  
Figure 3 Key 2D NMR correlations (A) and CD (B) of compound 2

化合物5: 黄色粉末; 分子式  $C_{16}H_{17}N_3O_2$ ;  $^1H$  NMR (400 MHz, MeOD)  $\delta_H$  7.58 (1H, d,  $J=7.9$  Hz, H-4), 7.33 (1H, d,  $J=8.1$  Hz, H-7), 7.10 (2H, Overlapped, H-2, 6), 7.01 (1H, t,  $J=7.2$  Hz, H-5), 4.42 (1H, t,  $J=4.2$  Hz, H-9), 4.00 (1H, ddd,  $J=10.5, 6.2, 1.1$  Hz, H-12), 3.47 (1H, dt,  $J=11.7, 8.2$  Hz, H-15a), 3.27 (2H, m, H-8) 3.26 (1H, m, H-15b), 1.99 (1H, m, H-17a), 1.69 (1H, m, H-16b) 1.48 (1H, m, H-16a), 0.96 (1H, ddd,  $J=22.8, 10.9, 8.5$  Hz, H-17b);  $^{13}C$  NMR (150 MHz, MeOD)  $\delta_C$  170.8 (C, C-13), 167.5 (C, C-10), 138.0 (C, C-7a), 128.7 (C, C-3a), 125.6 (CH, C-2), 122.6 (CH, C-6), 120.0 (CH, C-5), 119.8 (CH, C-4), 112.3 (CH, C-7), 109.6 (C, C-3), 60.1 (CH, C-12), 57.3 (CH, C-9), 46.0 (CH<sub>2</sub>, C-15), 29.2 (CH<sub>2</sub>, C-17), 29.2 (CH<sub>2</sub>, C-8), 22.6 (CH<sub>2</sub>, C-16)。以上数据与文献[14]报道一致, 因此被鉴定为 Brevianamide F (5)。

化合物6: 分子式  $C_{15}H_{26}O$ ;  $^1H$  NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_H$  5.62 (1H, dd,  $J=16.0, 3.2$  Hz, H-5), 5.00 (1H, d,  $J=11.4$  Hz, H-1), 4.93 (1H, dd,  $J=16.0, 9.9$  Hz, H-6), 2.39 (2H, m, H-4, 2b), 2.21 (3H, m, H-7, H-9), 1.87 (1H, d,  $J=13.9$  Hz, H-2a), 1.67 (1H, m, H-3a), 1.51 (3H, s, H-14), 1.45 (1H, m, H-3b), 1.24 (2H, m, H-8), 1.07 (3H, d,  $J=6.9$  Hz,

H-15), 1.04 (3H, s, H-12), 1.12 (3H, s, H-13);  $^{13}C$  NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_C$  143.0 (CH, C-5), 131.2 (C, C-10), 130.6 (CH, C-1), 123.8 (CH, C-6), 72.0 (C, C-11), 58.9 (CH, C-7), 41.4 (CH<sub>2</sub>, C-9), 33.9 (CH, C-4), 32.9 (CH<sub>2</sub>, C-3), 26.7 (CH<sub>3</sub>, C-13), 26.5 (CH<sub>3</sub>, C-12), 23.8 (CH<sub>2</sub>, C-8), 22.0 (CH<sub>2</sub>, C-2), 16.8 (CH<sub>3</sub>, C-14), 14.8 (CH<sub>3</sub>, C-15)。以上数据与文献[15]报道一致, 因此鉴定为 4S, 7R-Germacra-1(10)E,5E-Diene-11-Ol (6)。

化合物7: 分子式  $C_5H_5NO_2$ ;  $^1H$  NMR (400 MHz, MeOD)  $\delta_H$  6.94 (1H, brs, H-5), 6.85 (1H, dd,  $J=3.6, 1.2$  Hz, H-3), 6.18 (1H, m, H-4);  $^{13}C$  NMR (100 MHz, MeOD)  $\delta_C$  163.3 (C, C-6), 122.9 (CH, C-5), 122.7 (C, C-2), 115.1 (CH, C-3), 109.2 (CH, C-4)。以上数据与文献[16]报道一致, 因此鉴定为 1H-吡咯-2-羧酸(7)。

## 2.2 产孢培养基的选择

接合转移培养基需要同时满足供体菌和受体菌的生长需求。根据前期的研究选择6种培养基(ISP2、ISP3、ISP4、ISP5、ISP6、ISP7)<sup>[5]</sup>对 *L. rhizosphaerae* NEAU-A2 的产孢情况进行了研究。结果显示, NEAU-A2 在 ISP5 培养基上生长不好, 产孢较少; 在 ISP2、ISP3、ISP4、ISP6、ISP7 培养基上都能较好生长, 尤其在 ISP3 培养基

上生长较快、产孢较多。因此,选择 ISP3 作为接合转移的培养基。

### 2.3 对不同抗生素的敏感试验

建立成熟的遗传操作体系是后期对 *L. rhizosphaerae* NEAU-A2 中结构新颖且活性较好的次级代谢产物开展生物合成研究的重要基础。在遗传操作中,首先需要选用合适的抗生素抗性基因作为筛选标记,所以本研究对菌株的抗性谱进行了测定。选择实验室常用的多种抗生素进行测试(表 4),结果发现该菌株对硫酸安普霉素(Apr)、卡那霉素(Kan)、硫链丝菌素(Thio)、红霉素(Ery)较敏感,对三甲氧苄氨嘧啶不敏感(Tmp)。因此,选择常用的 Apr、Kan 作为 *L. rhizosphaerae* NEAU-A2 突变株的抗性筛选标记,选择 Tmp 作为接合转移中大肠杆菌的抑制剂。

### 2.4 基因组文库构建

获得大片段的基因组( $\geq 30$  kb)是构建基因组文库的首要条件,基因组提取过程中每一步操作都要温和,以防止基因组发生断裂。在对 *L. rhizosphaerae* NEAU-A2 基因组进行去磷酸化实验时(牛小肠碱性磷酸酶 CIAP),发现其基因组容易降解,这一特征与常规的链霉菌基因组并不相同,给基因文库的成功构建带来了挑战。我们尝试多次实验,全过程操作在低温环境下均不能避免基因组的降解。仔细分析发现 *L. rhizosphaerae* NEAU-A2 的基因组在用 *Mbo* I 酶切后并未发生降

解,仅在用牛小肠碱性磷酸酶(CIAP)处理后发生降解,因此推测该类去磷酸化酶及其缓冲盐体系导致基因组不稳定。所以,我们重新选择 NEB 公司的另外一种去磷酸化酶——虾碱性磷酸酶(rSAP)。用 rSAP 酶处理后, *L. rhizosphaerae* NEAU-A2 的基因组降解现象显著改善,最终成功构建了 *L. rhizosphaerae* NEAU-A2 的基因组文库。

### 2.5 热激条件的选择

适宜的热激有助于接合转移的顺利进行,在控制孢子量的前提下观察了 3 个热激时间:50 °C 分别热激 5、8 和 10 min,结果均有接合子长出,热激 8 min 和 10 min 的效率相似且均高于 5 min。接下来观察分析了孢子温浴时间对接合转移效率的影响,结果显示,温浴 0、0.5、1、2 h 后接合效率无显著差异。因此,最终选择 50 °C 热激 8 min 后冷却至室温与供体菌混合。

### 2.6 利用 PCR-Targeting 技术进行基因的敲除

利用 PCR-Targeting 技术成功获得了敲除 PKS-NRPS 基因的突变菌株 ET12567/pUZ8002/S4H1- $\Delta$ 1609-cosmid,使用验证引物(表 2)可以得到 1 431 bp 的 Apr 抗性基因片段。以 ET12567/pUZ8002/pCSG2104 作为供体菌,以 *L. rhizosphaerae* NEAU-A2 菌株的孢子作为受体菌,按照上述优化后的实验条件进行接合转移。培养 4–6 d,菌落几乎长满了平板,说明接合转移效率较高。然后挑取 3 个单菌落在含有 Apr 抗生素的 ISP3 平板上培养 3–5 d 后,再挑取 32 个单菌落接合子进行抗性筛选,结果表型均为 Apr 抗性,为双交换重组子。随机挑取其中几个接合子,分别在 TSB 种子培养基中培养 36 h 后收集菌体提取基因组,用验证引物 1609-check-F 和 1609-check-R 进行 PCR 验证,以野生型基因作为对照。S4H1- $\Delta$ 1609-cosmid 的双交换突变株有一条 1 431 bp 的条带,而对应的野生型条带是 7 272 bp(图 4),表明在双交换突变株中 *aac(3)IV+oriT* 成功置换了 1609 基因。

表 4 *L. rhizosphaerae* NEAU-A2 对不同抗生素的敏感性  
Table 4 The sensitivity of *L. rhizosphaerae* NEAU-A2 to various antibiotics

抗生素种类 Antibiotics	浓度 Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )				
	25	50	75	100	200
硫酸安普霉 Apr	-	-	-	-	nt
卡那霉 Kan	-	-	-	-	nt
硫链丝菌素 Thio	-	-	-	nt	nt
红霉素 Ery	nt	-	-	-	-
三甲氧苄氨嘧啶 Tmp	+	+	+	-+	nt

注: -: 不生长; +: 生长; -+: 抑制生长; nt: 未测定

Note: -: No growth; +: Growth; -+: Poor growth; nt: Not tested

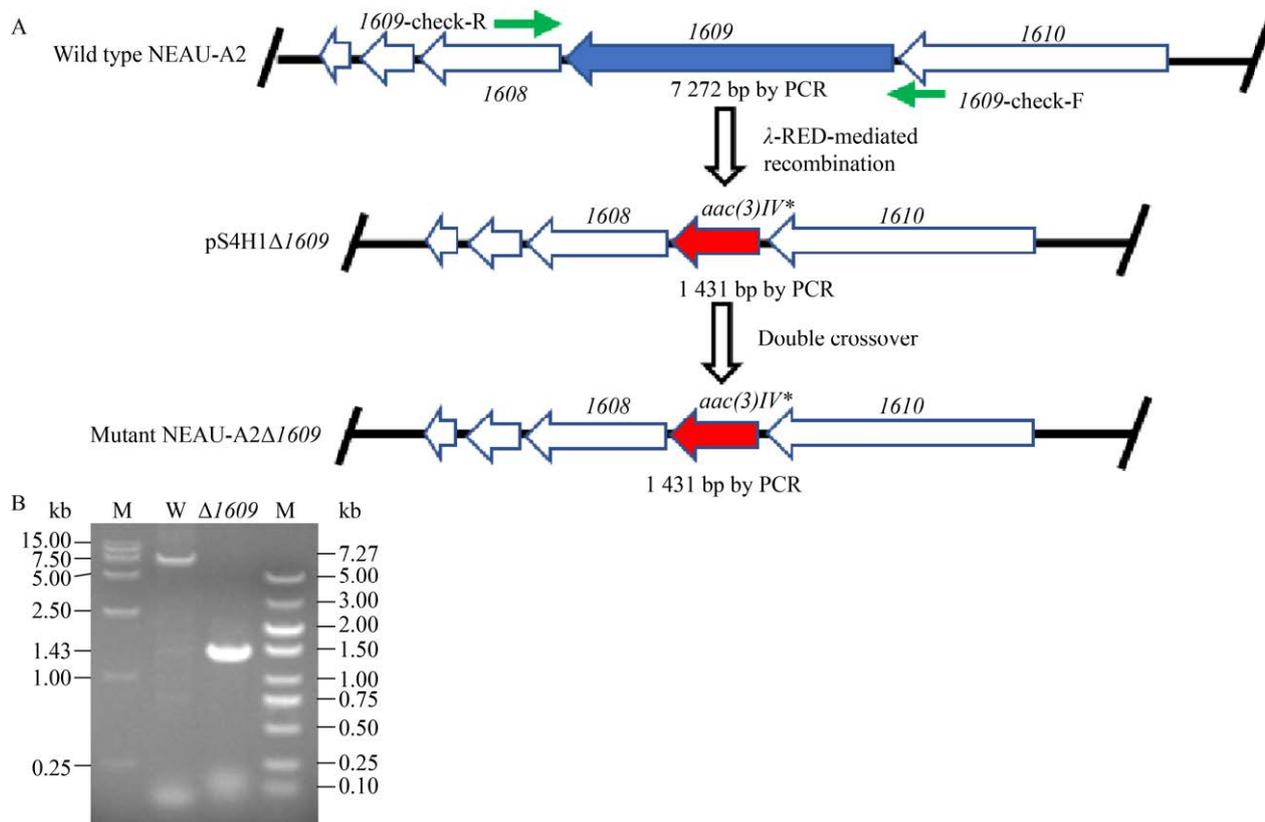


图 4 PKS-NRPS 基因失活突变株构建(A)和双交换突变株电泳检测图(B)

Figure 4 Construction of PKS-NRPS inactive mutant (A) and gel electrophoresis analyses of the gene 1609 double exchanged mutant strain (B)

注: “*aac(3)IV\**”: 同时引入抗性基因和 *oriT*; M: DNA Marker; W: 野生型

Note: “*aac(3)IV\**”: Resistance gene and *oriT* were inserted; M: DNA Marker; W: Wild type

### 3 讨论与结论

本文从稀有放线菌 *L. rhizosphaerae* NEAU-A2 中分离鉴定了 2 个新的吡啶二聚体, 据文献报道该类化合物显示了广泛的生物活性, 如抗乙酰胆碱酯酶活性<sup>[10,17]</sup>、抗衣原体活性<sup>[11]</sup>、抗肿瘤活性<sup>[18]</sup>等。从生源途径分析, 吡啶二聚类化合物是由 2 分子的颜色氨基酸缩合, 再通过一系列的氧化形成<sup>[11]</sup>。2 个新的吡啶生物碱的发现进一步丰富了天然产物中吡啶二聚体结构的多样性, 将为广泛的生物活性筛选提供先导化合物。

目前, 国内外抗生素产生菌的基因克隆技术大部分仍局限于链霉菌属, 关于链霉菌次级代谢的分子生物学研究取得了系列进展, 并且出版了相关分子生物学技术的实验手册<sup>[19]</sup>, 但有关稀有

放线菌的遗传操作报道较少。列舍瓦列氏菌属 (*Lechevalieria*) 是一类并不常见的稀有放线菌, 截至目前未见对该属遗传操作体系的报道。对 *L. rhizosphaerae* NEAU-A2 进行全基因组分析发现, 该菌株有着合成丰富的次级代谢产物的潜力, 因此, 我们对其遗传操作体系进行研究, 以期开展生物合成机制研究奠定基础。

在基因组文库构建时, 我们发现该菌株的 DNA 在用牛小肠碱性磷酸酶(CIAP)处理后容易发生降解, 与常规链霉菌 DNA 的性质并不相同。这对构建基因文库造成了巨大障碍, 因为构建基因文库需要一定大小片段的 DNA (30–42 kb)。后续我们尝试多次及全过程操作, 在低温条件下均不能避免 DNA 的降解。对这一结果分析探讨后, 发

现未用去磷酸化酶处理前基因组是稳定的, 仅在处理后将降解为小片段的 DNA。推测是该类去磷酸化酶及其缓冲盐体系导致 DNA 不稳定。因此我们重新选择虾碱性磷酸酶(rSAP)进行去磷酸化处理, 结果发现基因组降解显著减少, 最终成功构建了 *L. rhizosphaerae* NEAU-A2 的基因文库。该菌株遗传操作体系的成功建立, 将为该属中其他菌株遗传操作体系的建立提供参考, 也为该菌株中相关次级代谢产物生物合成基因簇的异源表达、诱导激活等遗传学操作奠定基础。

## REFERENCES

- [1] Zhang K. Discovery of juanlimycin-like compounds and genome mining of two rare actinomycetes[D]. Jinan: Master's Thesis of Shandong University, 2019 (in Chinese) 张坤. Juanlimycin 类化合物的发现与两株稀有放线菌的基因组挖掘[D]. 济南: 山东大学硕士学位论文, 2019
- [2] Tiwari K, Gupta RK. Rare actinomycetes: a potential storehouse for novel antibiotics[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2012, 32(2): 108-132
- [3] Ding T, Yang LJ, Zhang WD, Shen YH. The secondary metabolites of rare actinomycetes: chemistry and bioactivity[J]. *RSC Advances*, 2019, 9(38): 21964-21988
- [4] Zhang JC, Yang XQ, Zhou H, Yang YB, Ding ZT. New natural products of rare actinomycetes from 2006 to 2018[J]. *Chinese Journal of Organic Chemistry*, 2019, 39(4): 982-1012 (in Chinese) 张举成, 杨雪琼, 周皓, 杨亚滨, 丁中涛. 2006-2018 年稀有放线菌中的新天然产物[J]. *有机化学*, 2019, 39(4): 982-1012
- [5] Zhao JW, Li WC, Shi LL, Wang H, Wang Y, Zhao Y, Xiang WS, Wang XJ. *Lechevalieria rhizosphaerae* sp. nov., a novel actinomycete isolated from rhizosphere soil of wheat (*Triticum aestivum* L.) and emended description of the genus *Lechevalieria*[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2017, 67(11): 4655-4659
- [6] Blin K, Shaw S, Steinke K, Villebro R, Ziemert N, Lee SY, Medema MH, Weber T. antiSMASH 5.0: updates to the secondary metabolite genome mining pipeline[J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(W1): W81-W87
- [7] Gust B, Challis GL, Fowler K, Kieser T, Chater KF. PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(4): 1541-1546
- [8] Gust B, Chandra G, Jakimowicz D, Tian YQ, Bruton CJ, Chater KF.  $\lambda$  red-mediated genetic manipulation of antibiotic-producing *Streptomyces*[J]. 2004, 54: 107-128
- [9] Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, Chater KF, Hopwood DA. *Practical Streptomyces Genetics*[M]. Norwich: John Innes Foundation, 2002
- [10] Li JL, Huang L, Liu J, Song Y, Gao J, Jung JH, Liu YH, Chen GT. Acetylcholinesterase inhibitory dimeric indole derivatives from the marine actinomycetes *Rubrobacter radiotolerans*[J]. *Fitoterapia*, 2015, 102: 203-207
- [11] Li J, Chen DD, Huang L, Ni M, Zhao Y, Fan HZ, Bao XF. Antichlamydial dimeric indole derivatives from marine actinomycete *Rubrobacter radiotolerans*[J]. *Planta Medica*, 2017, 83(9): 805-811
- [12] Maeda U, Hara N, Fujimoto Y, Srivastava A, Gupra YK, Sahai M. N-fatty acyl tryptamines from *Annona reticulata*[J]. *Phytochemistry*, 1993, 34(6): 1633-1635
- [13] Soriano-Agatón F, Lagoutte D, Poupon E, Roblot F, Fournet A, Gantier JC, Hocquemiller R. Extraction, hemisynthesis, and synthesis of canthin-6-one analogues. Evaluation of their antifungal activities[J]. *Journal of Natural Products*, 2005, 68(11): 1581-1587
- [14] Asiri IAM, Badr JM, Youssef DTA. Penicillinivacine, antimigratory diketopiperazine alkaloid from the marine-derived fungus *Penicillium vinaceum*[J]. *Phytochemistry Letters*, 2015, 13: 53-58
- [15] Ganßer D, Pollak FC, Berger RG. A sesquiterpene alcohol from *Streptomyces citreus* CBS 109.60[J]. *Journal of Natural Products*, 1995, 58(11): 1790-1793
- [16] Guan YQ, Luo Y, Shi LL, Gulinar S, Chen G, Guo XF, Luo DQ. Isolation of secondary metabolites from *Streptomyces roseofulvus* M63 by OSMAC methods and their anti-tumor activity[J]. *Natural Product Research and Development*, 2016, 28(12): 1864-1869,1914 (in Chinese) 关永强, 罗影, 石磊岭, 古丽娜·沙比尔, 陈刚, 郭雄飞, 罗都强. 采用 OSMAC 法对 *Streptomyces roseofulvus* M63 次级代谢产物及其抗肿瘤成分的研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2016, 28(12): 1864-1869,1914
- [17] Queiroz MMF, Queiroz EF, Zeraik ML, Ebrahimi SN, Marcourt L, Cuendet M, Castro-Gamboa I, Hamburger M, Da Silva Bolzani V, Wolfender JL. Chemical composition of the bark of *Tetrapterys mucronata* and identification of acetylcholinesterase inhibitory constituents[J]. *Journal of Natural Products*, 2014, 77(3): 650-656
- [18] Yang X, Liu JW, Huo ZQ, Yuwen HS, Li Y, Zhang Y. Fluevirines E and F, two new alkaloids from *Flueggea virosa*[J]. *Natural Product Research*, 2020, 34(14): 2001-2006
- [19] Huan MH, Chen F, Wu HY, Guan YL, Wang Z, Cheng YT. Construction and initial screening of gene library of the *Streptomyces ahygroscopicus*[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2009(1): 134-137 (in Chinese) 桓明辉, 陈飞, 吴红艳, 关艳丽, 王志, 程永涛. 不吸水链霉菌基因文库的构建及初步筛选[J]. *生物技术通报*, 2009(1): 134-137