



## 植物乳杆菌 PC518 质粒 pLP224 的发现以及 pMV158 家族质粒的保守性和多样性分析

苟秋凤<sup>1</sup> 许晓羽<sup>1</sup> 姚芳<sup>1</sup> 谢拥军<sup>2</sup> 代富英<sup>2</sup> 潘渠<sup>\*2</sup>

1 成都医学院基础医学院 四川 成都 610500

2 成都医学院病原生物学教研室 四川 成都 610500

**摘要:**【背景】植物乳杆菌含有丰富的天然质粒,分析这些质粒的序列特征有利于分析质粒所携带的遗传信息。【目的】分析从植物乳杆菌 PC518 分离的新质粒 pLP224,聚类分析其所属家族质粒的保守性与多样性。【方法】提取植物乳杆菌 PC518 的质粒,酶切后构建质粒 DNA 文库,测序和 BLAST 鉴定文库中的新序列;通过反向 PCR 完成质粒全序列测定,注释新质粒;使用进化树软件 MEGA X 构建质粒的 Rep 蛋白进化树,并分析结合序列的变化。【结果】从植物乳杆菌 PC518 分离出一个质粒 pLP224,大小为 1 766 bp,其中(G+C)mol%含量为 41.39%,与已知质粒的最大序列相似性为 86.85%。推定其复制方式为滚环复制,属于 pMV158 家族成员。17 个 pMV158 家族质粒的 Rep 蛋白分析表明:pMV158 家族质粒的 Rep 蛋白进化距离越近,其 *dso* 位点的结合序列相似性越高,进化距离越远则其序列相似性越低。【结论】pLP224 是 pMV158 家族的新成员。pMV158 家族质粒在 *dso* 位点的切开序列上保守,在结合序列上多样。其 Rep 蛋白随结合序列变化而不同。这种差异有利于 pMV158 家族不同成员在同一宿主的共存,是家族成员持续存在并稳定进化的基础。

**关键词:** 植物乳杆菌,质粒,滚环复制,pMV158 家族,Rep 蛋白,结合序列

## Characterization of plasmid pLP224 from *Lactobacillus plantarum* PC518 and analysis of conservation and diversity of pMV158 plasmid family

GOU Qiu-Feng<sup>1</sup> XU Xiao-Yu<sup>1</sup> YAO Fang<sup>1</sup> XIE Yong-Jun<sup>2</sup> DAI Fu-Ying<sup>2</sup> PAN Qu<sup>\*2</sup>

1 School of Basic Medical Sciences, Chengdu Medical College, Chengdu, Sichuan 610500, China

2 Department of Pathogenic Biology, Chengdu Medical College, Chengdu, Sichuan 610500, China

**Abstract:** [Background] *Lactobacillus plantarum* has a lot of natural plasmids. Analyzing the sequence characteristics of these plasmids was beneficial to research the genetic information of them. [Objective] To identify a new plasmid isolated from *L. plantarum* PC518 and analyze conservation and diversity of plasmids belonging to a family. [Methods] Plasmid DNA was isolated from *L. plantarum* PC518, and two

**Foundation item:** Scientific Research Project of Sichuan Health and Family Planning Commission (17PJ494)

**\*Corresponding author:** E-mail: ppqlove@126.com

**Received:** 07-01-2020; **Accepted:** 14-06-2020; **Published online:** 06-08-2020

**基金项目:** 四川省卫生和计划生育委员会科研课题(17PJ494)

**\*通信作者:** E-mail: ppqlove@126.com

**收稿日期:** 2020-01-07; **接受日期:** 2020-06-14; **网络首发日期:** 2020-08-06

plasmid DNA libraries were constructed after enzyme digestion. New sequences in the libraries were identified by sequencing and BLAST alignment. The whole sequence of the plasmid was completed by reverse PCR. The new plasmid was annotated. The phylogenetic tree of Rep protein was built by MEGA X, and analysis of binding sequence was carried out. **[Results]** Plasmid pLP224 was a 1 766 bp circular molecule with a (G+C)mol% content of 41.39%. The maximum sequence similarity with known plasmids was 86.85%. pLP224 belonged to the pMV158 family of rolling-circle replication. The results of phylogenetic tree based on Rep protein showed that the closer evolution distance was the higher similarity of binding sequence, and the farther evolution distance was the lower similarity of binding sequence. **[Conclusion]** pLP224 was a new member of the pMV158 family. The nick sequences of *dso* site belonging to the pMV158 family were conservative, and the binding sequences belonging to the pMV158 family were diverse. The Rep protein varies with the binding sequence. The difference of Rep protein was conducive to the coexistence in a host, which was the basis for the continuous existence and stable evolution of a family.

**Keywords:** *Lactobacillus plantarum*, Plasmid, Rolling-circle replication, pMV158 family, Rep protein, Binding sequence

质粒是位于细菌染色体外的遗传物质,介导细菌间遗传信息的水平转移,促进细菌对多种环境条件的适应,是细菌种群快速适应环境变化的重要载体,也可随宿主菌株分裂传给子代菌株<sup>[1-3]</sup>。

植物乳杆菌通常含有一个或多个天然质粒,是乳杆菌属甚至乳酸菌中天然质粒最丰富和最多样的菌种<sup>[4]</sup>。这些天然质粒在不增加染色体大小的情况下,可为植物乳杆菌提供多种多样的生理学和生态学表型特征,从而为植物乳杆菌适应生存环境变化提供灵活且必要的遗传物质基础<sup>[5]</sup>。

质粒分 3 种复制方式: Theta 复制、链替换复制、滚环复制(rolling-circle replication, RCR)<sup>[6]</sup>。小的质粒通常是通过 RCR 方式复制的。RCR 是由质粒编码的 Rep 蛋白特异性结合到 *dso* (double-strand origin)位点而启动<sup>[7]</sup>。*dso*位点中的结合序列(binding sequence)是 Rep 蛋白的特异性结合靶位。Rep 蛋白相似的质粒会发生竞争,不能共存于一个宿主,从而阻碍其携带的遗传信息的水平转移。Rep 蛋白的相似程度和结合序列的相似程度成正相关。

植物乳杆菌 PC518 分离自四川泡菜,含有多个质粒,已分析报道了 3 个质粒,分别是质粒 pLP18<sup>[8]</sup>、pLP60<sup>[6]</sup>和 pLP325<sup>[9]</sup>。本研究对从植物乳杆菌 PC518 分离出的另一质粒 pLP224 进行序列分析和注释,且推测其是 RCR 的 pMV158 家族成

员,进一步以 pMV158 家族质粒 Rep 蛋白进行建树分析其与对应 *dso* 位点的结合序列之间的联系。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株

植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*) PC518 菌株分离自四川泡菜<sup>[10]</sup>。大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$  菌株保存于本实验室,载体质粒 pET-22b(+)保存于本实验室。

#### 1.1.2 主要试剂和仪器

质粒提取试剂盒, Omega 公司; 溶菌酶, Biosharp 公司; 葡萄糖, 北京索莱宝科技有限公司; 限制性内切酶和 DNA 连接酶, ThermoFisher Scientific 公司; *LA Taq* 聚合酶, TaKaRa 公司; 引物合成和测序由成都擎科梓熙生物技术有限公司完成。

Thermo-Scientific 1300 系列 A2 生物安全柜、台氏高速冷冻离心机, ThermoFisher Scientific 公司; 凝胶成像系统、PCR 仪、电泳装置和电泳槽, Bio-Rad 公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 菌株培养

植物乳杆菌 PC518 接种于 MRS (man rogosa sharpe, MRS)培养基<sup>[11]</sup>, 37 °C 静置培养 24 h, 11 000 $\times$ g 离心 1 min 收集菌体于无菌 1.5 mL EP 管

内, 大肠杆菌 DH5 $\alpha$  在 LB 培养基中 37 °C、200 r/min 摇床培养过夜。

### 1.2.2 质粒提取

按本实验室改良方法提取质粒<sup>[12]</sup>, 溶菌酶 100 mg/mL, 37 °C、10 min 恒温处理菌体, 11 000 $\times$ g 离心 1 min 去除溶菌酶, 5% (质量体积比) 葡萄糖溶液洗涤菌体 2 次, 然后按质粒提取试剂盒的操作步骤进行。

### 1.2.3 构建质粒 DNA 文库

分别用限制性内切酶 *Hind* III 和 *Nco* I 或 *Sac* I 和 *Nco* I 对植物乳杆菌 PC518 的质粒 DNA 和载体 pET-22b(+) 进行双酶切, 连接酶切片段与载体, 接着电转化到大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 挑选阳性克隆, 提取质粒并做双酶切鉴定, 送出测序<sup>[13]</sup>。

### 1.2.4 反向 PCR

将测序结果提交 GenBank 进行 BLAST 比对, 发现 2 个与已知序列相似性较低的片段, 命名为 *hnct1*、*snep1*。使用 Primer 5 软件(Premier Biosoft International, USA) 设计反向 PCR 的引物, *hnct1* 正向引物序列为: 5'-AGACGATTTGCTGAATGATGTTTGT-3'; 反向引物序列为: 5'-AGTGTGCTTTC

TTGTATTGCTGACC-3'。*snep1* 正向引物序列为: 5'-TTGATGGACTCACTAAGCCAAGACACT-3'; 反向引物序列为: 5'-AGCCTGCAAGACTGAATTAATCACCTT-3'。以植物乳杆菌 PC518 的质粒 DNA 为模板, 通过反向 PCR 扩增<sup>[14]</sup> *hnct1* 和 *snep1* 两侧可能的未知序列。

### 1.2.5 生物信息学分析

利用 BLAST 工具在 GenBank 数据库中比对质粒 pLP224 序列, 检索该序列与已知质粒序列间的同源性。利用 NCBI 网站上的 ORF Finder 寻找质粒的开放阅读框(open reading frame, ORF)。利用 SnapGene Viewer (version 2.3.2) 软件制作质粒图谱并标注重要酶切位点。使用进化树软件 MEGA X (V 10.0.4) 软件构建质粒的 Rep 蛋白系统进化树与结合序列关系图。

## 2 结果与分析

### 2.1 质粒提取与拼接

提取植物乳杆菌 PC518 质粒, 对其进行电泳检测, 结果显示 7 个质粒条带, 目标条带长约 1.7 kb (图 1A)。从构建的两个 DNA 文库中筛选到

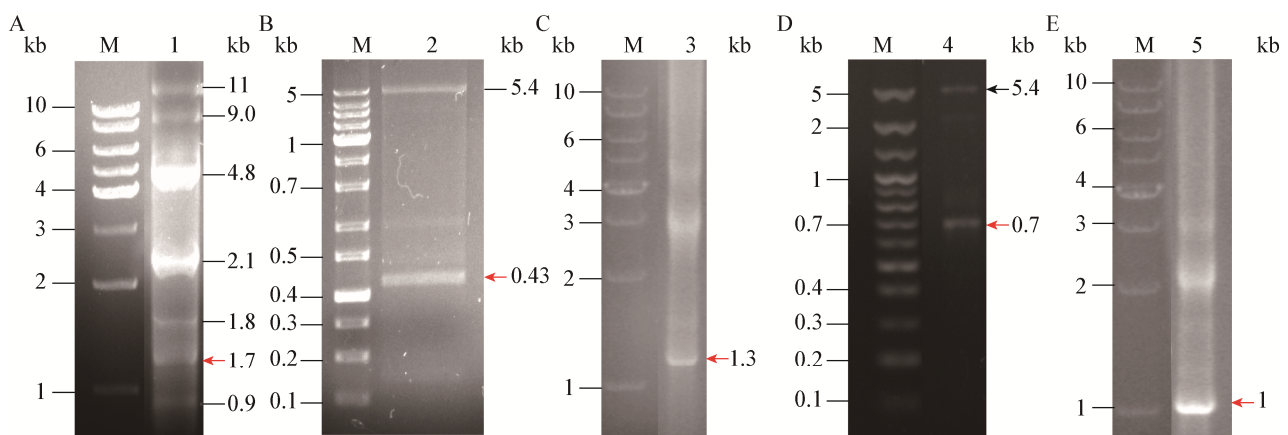


图 1 植物乳杆菌 PC518 的质粒分析图

Figure 1 The analysis of plasmid from *L. plantarum* PC518

注: A: 植物乳杆菌 PC518 质粒电泳图; B: 重组质粒 *hnct1* 的 *Hind* III 和 *Nco* I 的双酶切电泳图; C: *hnct1* 反向 PCR 电泳图; D: 重组质粒 *snep1* 的 *Sac* I 和 *Nco* I 的双酶切电泳图; E: *snep1* 反向 PCR 电泳图。箭头所示为目标条带。M: 1 kb DNA Ladder。

Note: A: The electrophoretogram of plasmid DNA from *L. plantarum* PC518; B: The electrophoretogram of recombinant plasmid *hnct1* after digested by *Hind* III and *Nco* I; C: The electrophoretogram of reverse PCR base on *hnct1*; D: The electrophoretogram of recombinant plasmid *snep1* after digested by *Sac* I and *Nco* I; E: The electrophoretogram of reverse PCR base on *snep1*. The arrow represents the target band. M: 1 kb DNA Ladder.

两个新序列：*hnct1* 和 *snep1*，长度分别为约 0.43 kb (图 1B)和约 0.7 kb (图 1D)，载体条带长 5.4 kb。反向 PCR 结果显示片段 *hnct1* 两侧扩增出的条带长约 1.3 kb (图 1C)，*snep1* 两侧扩增出的条带长约 1.0 kb (图 1E)。拼接出两条完整的质粒序列，两序列的相似性为 100%，应为同一质粒，命名为 pLP224，将该质粒序列提交到 GenBank 数据库，登录号为 MN730093。

## 2.2 pLP224 的序列分析

pLP224 长度为 1 766 bp，其(G+C)mol%含量为 41.39%。BLAST 结果显示，与植物乳杆菌质粒 pLP27 (1 751 bp，GenBank 登录号为 MG944248.1) 最相似，序列相似性为 86.85%，显示其为新质粒。ORF Finder 发现有 4 个超过 150 个核苷酸的 ORF，根据蛋白序列相似性，ORF1 编码一个

191 个氨基酸的复制蛋白 RepB，与质粒 pLS141-1 和 pWCFS102 的 Rep 蛋白相似性分别为 85.86%和 83.77%，将 ORF1 命名为 RepB。ORF2 编码一个 51 个氨基酸的 CopG 家族转录调节因子，与质粒 pWCFS102、pPC892-5、pMF1298-14、pLpB9 的 Cop 蛋白相似性均为 86%，将 ORF2 命名为 Cop。ORF3 为推定蛋白，与质粒 pLP27 的推定蛋白的相似性为 91.67%，ORF4 没有发现相似蛋白(图 2)，pLP224 为一个隐蔽性质粒。

## 2.3 复制方式

pMV158 家族 *dso* 位点包括切开序列(nick site)和结合序列(图 3)，切开序列由完全保守序列(5'-TACTACG/AC-3')、一对反向重复序列(invertedrepeat, IR) (5'-GGGGGG---CCCCC-3')和两个近端重复序列(proximal direct repeats, PDR)构

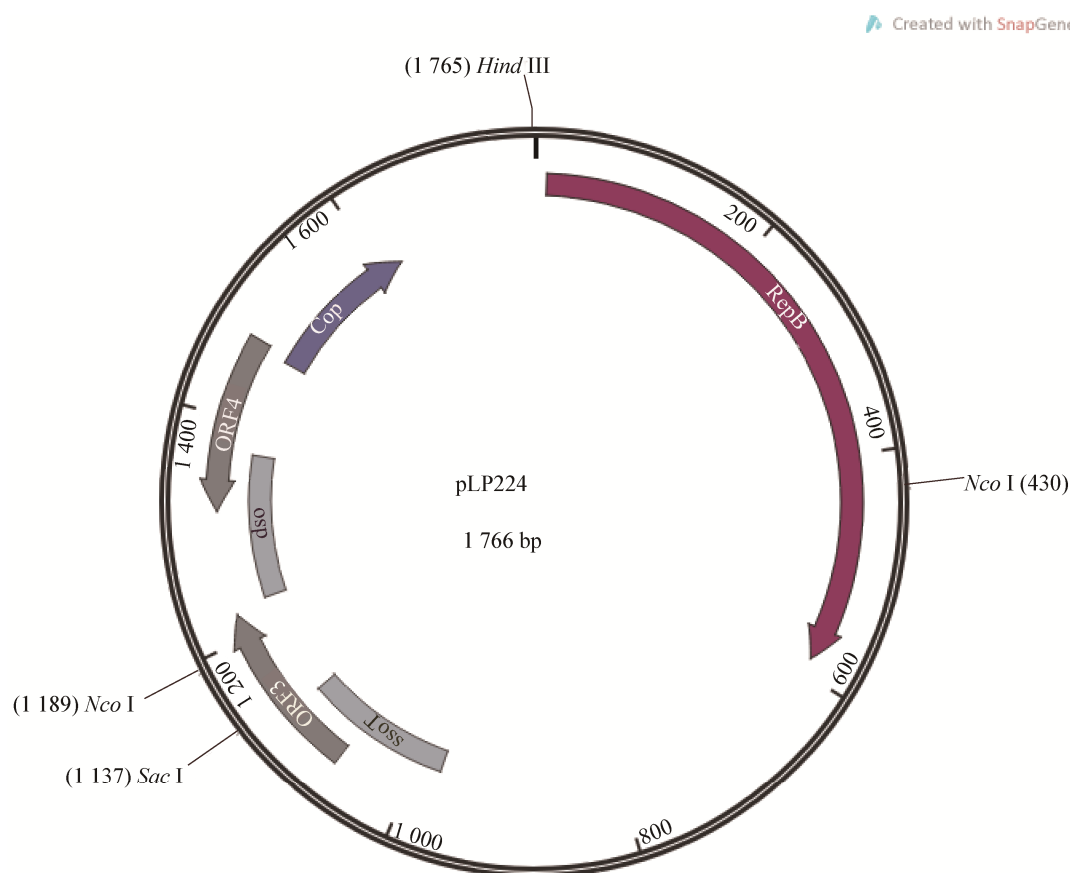


图 2 pLP224 的质粒图谱

Figure 2 The map of plasmid pLP224

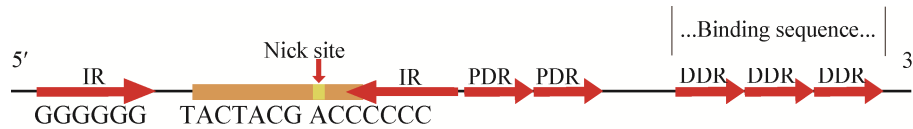


图 3 pMV158 家族质粒的 *dso* 结构图

Figure 3 The map of *dso* structure from pMV158 family

注: IR: 反向重复序列; PDR: 近端重复序列; DDR: 远端重复序列; 垂直红色箭头: 切开位置; 保守序列区已标出碱基序列。

Note: IR: Inverted repeat sequence; PDR: Proximal direct repeats; DDR: Distal direct repeats; An upright red arrowhead indicates the conserved nick site; The conserved nucleotides has been marked.

成, 结合序列包括 2-3 次远端重复序列(distal direct repeats, DDR), 其长度从 5 bp 到 21 bp 不等, PDR 和 DDR 之间既可以彼此相邻, 也可以被高达 100 bp 的间隔区隔开<sup>[7]</sup>。分析 pLP224 序列, 发现了与图 3 一致的 pMV158 家族 *dso* 序列特征, 推定 pLP224 属于 RCR 的 pMV158 家族。*sso* 是宿主 RNA 聚合酶识别并在 ssDNA (single-stranded DNA) 中间合成后随链的位点, 是 RCR 的必需元件。根据序列和结构相似性, *sso* 可分为 4 种类型: *ssoA*、*ssoT*、*ssoU* 和 *ssoW*<sup>[15]</sup>。pLP224 的 *sso* 位点包含 3 个 *ssoT* 的 Motif, 推定为 *ssoT* 型, 类似于质粒 pXY3<sup>[4]</sup> (GenBank 登录号为 GU363552.1)。

#### 2.4 pMV158 家族质粒的多样性分析

pMV158 家族的质粒以切开序列作为保守序列, 但结合序列没有显示出共同的保守性。结合序列的重复是多样的, 有些是二重复, 有些是三重复, 重复序列之间可以连续也可以间隔。通过 GenBank 查找出 16 个只有一个 Rep 蛋白的 pMV158 家族质粒, 分别是质粒 pM411<sup>[16]</sup>、pLP18<sup>[8]</sup>、pPSC22<sup>[16]</sup>、pMA67<sup>[17]</sup>、pG271<sup>[18]</sup>、pA852<sup>[18]</sup>、pFX2<sup>[19]</sup>、pLF24<sup>[4]</sup>、pPSU1<sup>[20]</sup>、pSMQ172<sup>[21]</sup>、pER13<sup>[22]</sup>、pLS55<sup>[23]</sup>、pCPS49<sup>[23]</sup>、pRW35<sup>[23]</sup>、pGB2002<sup>[23]</sup>、pCL2.1<sup>[23]</sup>。对这些质粒的 Rep 蛋白和结合序列分析发现, Rep 蛋白聚类和结合序列有对应性关系(图 4)。当 Rep 蛋白在进化树上显示为同一簇时, 它们对应的结合序列相对保守, 如同一簇的 pSMQ172 和 pER13 的结合序列都重复了 2 次且重复序列相同(TTTGGCGAGTT), 同一簇的 pRW35 和 pGB2002 的结合序列也重复了 2 次且重

复序列相同(AAATTCG); 同一簇的 pMA67 和 pLS55 的结合序列重复了 3 次且重复序列相同(GCGACTTTT), 同一簇的 pPSC22 和 pFX2 的结合序列也重复了 3 次且重复序列相同(CGCCAACG)。同一簇的 pLP224 (CGGCGACATTT) 和 pLF24 (GAGCGACATTT) 的结合序列都重复了 2 次, 它们之间有 2 个碱基不同; 同一簇的 pG271 (GCGAGTTTT) 和 pA852 (GCGACTTTT) 都重复了 3 次, 9 个碱基中只有 1 个碱基不同。在进化距离越近的 Rep 蛋白之间, 它们在结合序列相似性越高, 距离越远则序列相似性越低。如 pPSU1 的三重复序列(GGCGACA)与相邻一簇的 pMA67 和 pLS55 的三重复(GCGACTTTT)相似性比较高; pLP18 (GACCGCCGTTT)与相邻一簇的 pPSC22 和 pFX2 (CGCCAACG)的三重复序列之间较相似, pCPS49 的三重复(CGCGACTTTT)也类似于相邻一簇的 pPSC22 和 pFX2 的三重复(CGCCAACG)。pCL2.1 的 Rep 蛋白与其余质粒的 Rep 蛋白进化距离较远, 其结合序列不同于其余质粒的结合序列。pLP224 和 pLP18 共存于植物乳杆菌 PC518 中, 它们的 Rep 蛋白进化距离较远, 差异较大; 其结合序列一个是二重复, 一个是三重复, 重复序列也不同, 这种差异是它们共存的基础。随着 Rep 蛋白的差异变化, 结合序列显示出相应的变化。不管 Rep 蛋白的差异性多大, 切开序列是完全保守的, 不会随之而变。*dso* 位点在切开序列上的保守性是家族分类的界限, 该家族成员之间的多样性体现在结合序列上。

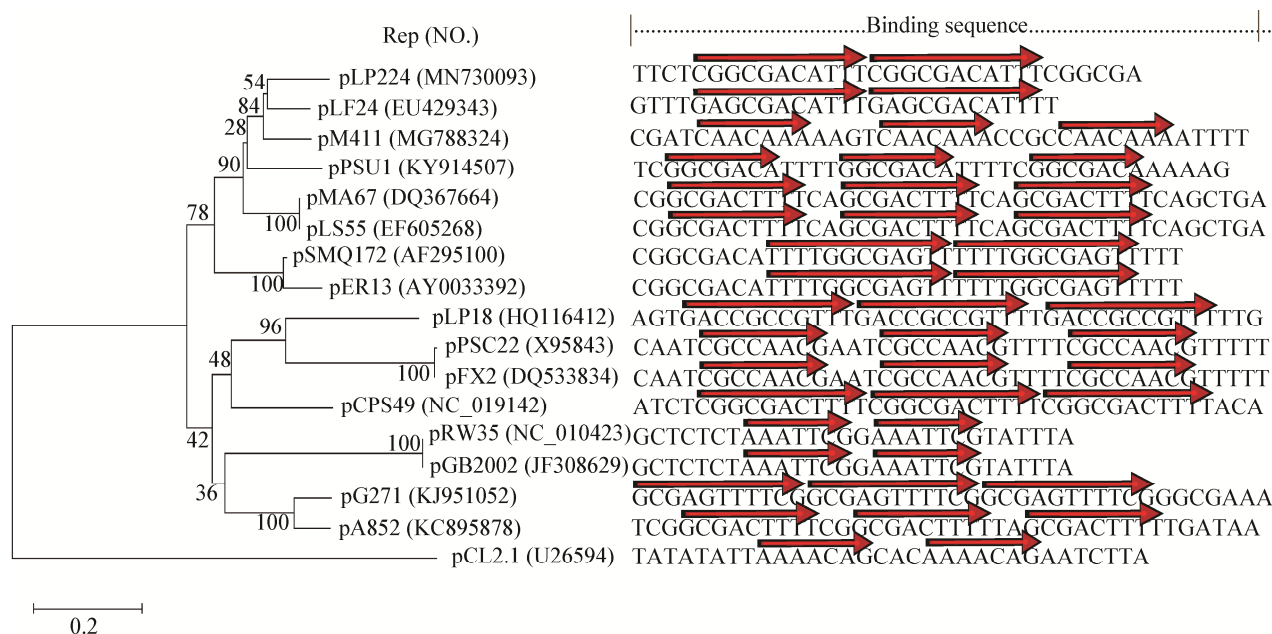


图4 pMV158 家族质粒的 Rep 蛋白进化树与结合序列关系结构图

Figure 4 The phylogenetic tree of Rep protein from pMV158 family plasmid and the structure of binding sequences

注：采用邻接法构建系统发育树，进行了 1 000 次计算，在分支的旁边标注出 Bootstrap 值，括号内代表质粒的 GenBank 序列号，标尺长度表示 20% 的氨基酸序列差异；右侧为对应质粒的结合序列分析，红色箭头代表远端重复序列 DDR。

Note: The phylogenetic tree was constructed by neighbor-joining model. The percentages of the bootstrap consensus tree which was inferred from 1 000 replicates were marked out next to the branches. The numbers in parentheses are GenBank accession number of the plasmid. The ruler length represents a 20% amino acid sequence difference. The corresponding binding sequence analysis is shown on the right, and the red arrow represents DDR.

### 3 讨论

植物乳杆菌通常带有多个质粒，其质粒在分离纯化上存在困难，应用构建文库和反向 PCR 联合技术，可以分离纯化各质粒而确定其所携带质粒的序列，这种方法可广泛用于分析携带多个质粒的细菌。现在的全基因组测序技术通常可以测出携带质粒的序列，在 GenBank 中已有很多质粒是通过全基因组测序技术得来的。全基因组测序的样本在凝胶电泳图中显示的是基因组条带，看不到质粒条带，但我们的方法是通过提取菌株的质粒来构建文库，并联合反向 PCR 技术，质粒电泳图可显示出明确的质粒条带。因此，其具有客观的实验证据。

RCR 质粒根据 Rep 蛋白和 *dso* 的同源性被分为 pMV158、pC194、pT181 等家族<sup>[15]</sup>。这 3 个家族的切开序列分别是 5'-TACTACG/AC-3'、5'-TATCTTG/

AT-3'<sup>[9]</sup>和 5'-CTACTCT/AA-3'<sup>[24]</sup>。由此来看，RCR 质粒的家族分类可能是以切开序列为依据。但发现 pMV158 家族个别质粒的切开序列不完全保守，比如质粒 pLFE1<sup>[25]</sup>、pF03-1<sup>[26]</sup>、pCD034-2<sup>[27]</sup>的切开序列 5'-CACTACGAC-3'有 1 个碱基的差异，更显著的是质粒 pBM02<sup>[28]</sup>的切开序列 5'-TGTTGTAGT-3'，其 9 个碱基中 7 个都不同于典型的 pMV158 家族质粒的切开序列。这些质粒的发现可能对质粒的分类产生新的影响。有些质粒有 2 个复制起点，如质粒 pMRI 5.2<sup>[29]</sup>有 2 个家族的 *dso* 位点，分别属于 pC194 家族和 pMV158 家族，该质粒相应也编码 2 个不同的 Rep 蛋白。

RCR 质粒家族内的多样性表现在 Rep 蛋白的结合序列上，pC194 家族的结合序列是以一对反向重复序列为特征，结合序列位置不固定，可位于切开序列上游或下游，但序列不保守<sup>[9]</sup>。pT181 家

族的结合序列是 3 对反向重复序列, 分别是 IRI、IRII 和 IRIII, 其中 IRII 和 IRIII 是关键的反向重复序列, 但序列不保守<sup>[24]</sup>。pMV158 家族的结合序列总是二重复或三重复, 可连续重复也可间隔。结合序列随 Rep 蛋白的变化而变化, 这样的差异有利于该家族不同成员在同一宿主的共存。正因为它们在结合序列的不同, 可以使其 Rep 蛋白结合于各自成员的 *dso* 而不产生竞争, 这种共存是该家族质粒持续进化且稳定存在的基础。

#### 4 结论

本研究通过构建文库和反向 PCR 联合使用发现了一个新的 pMV158 家族质粒 pLP224。pMV158 家族的多样性表现在结合序列上, 其 Rep 蛋白表现出与结合序列的对应性关系。随着 pMV158 家族成员的增加, 家族特征将越来越明确, 可明确哪些成员不能共存于一个细菌, 从而对质粒进行更精细的分类, 精确的质粒分类有利于对质粒所携带可水平转移遗传信息的研究。

#### REFERENCES

- [1] San Millan A, MacLean RC. Fitness costs of plasmids: a limit to plasmid transmission[J]. *Microbiology Spectrum*, 2017, 5(5): 1-12
- [2] Smalla K, Jechalke S, Top EM. Plasmid detection, characterization, and ecology[J]. *Microbiology Spectrum*, 2015, 3(1): 1-21
- [3] Zhu LX, Wang HB, Shi QM, et al. Progress on elimination of bacterial resistance plasmids[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2019, 40(5): 90-93 (in Chinese)  
朱利霞, 王洪彬, 史秋梅, 等. 细菌耐药质粒消除方法研究进展[J]. *动物医学进展*, 2019, 40(5): 90-93
- [4] Zhou H, Hao YL, Xie Y, et al. Characterization of a rolling-circle replication plasmid pXY3 from *Lactobacillus plantarum* XY3[J]. *Plasmid*, 2010, 64(1): 36-40
- [5] Sun DQ, Li HF, Yang J, et al. Phylogenetic evolution and origin of natural plasmids of *Lactobacillus plantarum*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2017, 57(12): 1908-1923 (in Chinese)  
孙大庆, 李洪飞, 杨健, 等. 植物乳杆菌天然质粒系统进化和起源[J]. *微生物学报*, 2017, 57(12): 1908-1923
- [6] Yao F, Xu XY, Du X, et al. Detection and characterization of a theta-replicating plasmid pLP60 from *Lactobacillus plantarum* PC518 by inverse PCR[J]. *Heliyon*, 2019, 5(8): e02164
- [7] del Solar G, Moscoso M, Espinosa M. *In vivo* definition of the functional origin of replication (*ori*(+)) of the promiscuous plasmid pLS1[J]. *Molecular and General Genetics MGG*, 1993, 237(1/2): 65-72
- [8] Pan Q, Zhang L, Li JC, et al. Characterization of pLP18, a novel cryptic plasmid of *Lactobacillus plantarum* PC518 isolated from Chinese pickle[J]. *Plasmid*, 2011, 65(3): 204-209
- [9] Xu XY, Yao F, Gou QF, et al. Sequence analysis and classification of a new plasmid from *Lactobacillus botulis*[J]. *Biotechnology*, 2019, 29(1): 51-56 (in Chinese)  
许晓羽, 姚芳, 苟秋凤, 等. 一个植物乳杆菌新质粒的序列分析与归类[J]. *生物技术*, 2019, 29(1): 51-56
- [10] Yang SJ, Wang Y, Li YT, et al. Rapid detection of *Lactobacillus* and a preliminary investigation of *Lactobacillus* plasmids of pickle[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2013, 32(6): 639-644 (in Chinese)  
杨四佳, 王颖, 李宇婷, 等. 泡菜中乳杆菌的快速检出和乳杆菌质粒资源的初步调查[J]. *食品与生物技术学报*, 2013, 32(6): 639-644
- [11] Pan Q, Cong YG, Hou R, et al. Purification and characterization of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Lactobacillus acidophilus*[J]. *Immunological Journal*, 2009, 25(4): 461-464 (in Chinese)  
潘渠, 丛延广, 侯瑞, 等. 嗜酸乳杆菌 3-磷酸甘油醛脱氢酶的分离纯化[J]. *免疫学杂志*, 2009, 25(4): 461-464
- [12] Yao F, Xu XY, Pan Q. A modified method for plasmid extraction from *Lactobacillus plantarum* contained lysozyme removal step[J]. *Analytical Biochemistry*, 2019, 566: 37-39
- [13] Wang HJ, Dai YK, Su SS, et al. Complete DNA sequence and analysis of a cryptic plasmid isolated from *Lactobacillus plantarum*[J]. *Biotechnology*, 2016, 26(2): 158-162 (in Chinese)  
王海娟, 戴雨珂, 苏森森, 等. 一个植物乳杆菌隐蔽质粒的序列分析[J]. *生物技术*, 2016, 26(2): 158-162
- [14] Yao F. A modified method for plasmid extraction from gram-positive bacteria and sequence analysis of plasmid pLP60[D]. Chengdu: Master's Thesis of Chengdu Medical College, 2019 (in Chinese)  
姚芳. 革兰阳性菌质粒提取方法的改良和质粒 pLP60 的序列分析[D]. 成都: 成都医学院硕士学位论文, 2019
- [15] Khan SA. Plasmid rolling-circle replication: highlights of two decades of research[J]. *Plasmid*, 2005, 53(2): 126-136
- [16] Ma X, Li JH, Xiong Y, et al. Characterization of a rolling-circle replication plasmid pM411 from *Lactobacillus plantarum* 1-3[J]. *Current Microbiology*, 2016, 73(6): 820-826
- [17] Murray KD, Aronstein KA, de León JH. Analysis of

- pMA67, a predicted rolling-circle replicating, mobilizable, tetracycline-resistance plasmid from the honey bee pathogen, *Paenibacillus larvae*[J]. *Plasmid*, 2007, 58(2): 89-100
- [18] Bergmann R, Nitsche-Schmitz DP. Small plasmids in *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* isolated from human infections in southern India and sequence analysis of two novel plasmids[J]. *International Journal of Medical Microbiology*, 2015, 305(3): 365-369
- [19] van Kranenburg R, Golic N, Bongers R, et al. Functional analysis of three plasmids from *Lactobacillus plantarum*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(3): 1223-1230
- [20] Takamatsu D, Osaki M, Sekizaki T. Sequence analysis of a small cryptic plasmid isolated from *Streptococcus suis* serotype 2[J]. *Current Microbiology*, 2000, 40(1): 61-66
- [21] Turgeon N, Moineau S. Isolation and characterization of a *Streptococcus thermophilus* plasmid closely related to the pMV158 family[J]. *Plasmid*, 2001, 45(3): 171-183
- [22] Somkuti GA, Steinberg DH. Molecular organization of plasmid pER13 in *Streptococcus thermophilus*[J]. *Biotechnology Letters*, 2007, 29(12): 1991-1999
- [23] López-Aguilar C, Ruiz-Masó JA, Rubio-Lepe TS, et al. Translation initiation of the replication initiator *repB* gene of promiscuous plasmid pMV158 is led by an extended non-SD sequence[J]. *Plasmid*, 2013, 70(1): 69-77
- [24] Khan SA. DNA-protein interactions during the initiation and termination of plasmid pT181 rolling-circle replication[J]. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 2003, 75: 113-137
- [25] Feld L, Bielak E, Hammer K, et al. Characterization of a small erythromycin resistance plasmid pLFE1 from the food-isolate *Lactobacillus plantarum* M345[J]. *Plasmid*, 2009, 61(3): 159-170
- [26] Kung LS, Yang MT, Lin JS. Sequence analysis of five endogenous plasmids isolated from *Lactobacillus pentosus* F03[J]. *Plasmid*, 2016, 84-85: 1-10
- [27] Heini S, Spath K, Egger E, et al. Sequence analysis and characterization of two cryptic plasmids derived from *Lactobacillus buchneri* CD034[J]. *Plasmid*, 2011, 66(3): 159-168
- [28] Sánchez C, Mayo B. Sequence and analysis of pBM02, a novel RCR cryptic plasmid from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* P8-2-47[J]. *Plasmid*, 2003, 49(2): 118-129
- [29] Cho GS, Huch M, Mathara JM, et al. Characterization of pMRI 5.2, a rolling-circle-type plasmid from *Lactobacillus plantarum* BFE 5092 which harbours two different replication initiation genes[J]. *Plasmid*, 2013, 69(2): 160-171