

DOI:10.13350/j.cjpb.230706

• 论著 •

内蒙古长爪沙鼠鼠疫源地鼠疫菌耐药相关基因检测及生物信息学分析*

王姝懿, 李建云, 刘芳, 冯一兰, 韩冰, 李伟**

(内蒙古自治区综合疾病预防控制中心, 内蒙古呼和浩特 010031)

【摘要】 **目的** 了解内蒙古长爪沙鼠鼠疫源地分离的鼠疫菌携带耐药及耐消毒剂基因情况,同时分析其结构功能和抗原表位,为鼠疫的治疗提供科学依据。 **方法** 对75株分离自内蒙古长爪沙鼠鼠疫自然疫源地的鼠疫菌DNA进行PCR扩增,检测耐磺胺类药物基因(Sul1, Sul2),耐链霉素基因(StrA, StrB),耐β-内酰胺类抗菌药物基因(Tem, CTX-m)和耐季铵盐类消毒剂基因(QacEdelta1)携带情况。同时分析Sul2基因的结构、功能及作为优势抗原的可能性。 **结果** PCR扩增显示,75株鼠疫菌均未检出上述耐药基因和耐消毒剂基因。生物信息学分析Sul2蛋白为不含有跨膜区的疏水性分泌蛋白,且属于外膜蛋白。其二级结构均以α螺旋和无规则卷曲为主,分别45.39%和33.21%。该蛋白含有6个B细胞表位和16个T细胞抗原表位。 **结论** 内蒙古长爪沙鼠鼠疫源地分离的75株鼠疫菌不具有耐药及耐消毒剂的特征。鼠疫菌的Sul2蛋白含有丰富的B、T细胞抗原表位,具有良好的抗原性,可为该疫源地鼠疫诊断和治疗提供参考。

【关键词】 内蒙古;鼠疫菌;消毒剂及耐药基因;生物信息学

【中图分类号】 R378.6

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2023)07-0777-05

[Journal of Pathogen Biology. 2023 Jul;18(7):777-781.]

Detection and bioinformatics analysis of genes related to drug resistance of *Yersinia pestis* in Gerbils plague foci in Inner Mongolia

WANG Shuyi, LI Jianyun, LIU Fang, FENG Yilan, HAN Bing, LI Wei (Inner Mongolia Center for Disease Control and Prevention, Hohhot 010031, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate the genes of the antibiotic resistance-related genes of *Yersinia pestis* in gerbils plague focus of Inner Mongolia, and analyze their structure, function and antigenic epitopes, so as to provide scientific basis for the clinical treatment of plague in this area. **Methods** 75 strains of *Yersinia pestis* DNA isolated from the natural foci of gerbils in Inner Mongolia were amplified by PCR, streptomycin resistance genes (StrA, StrB), β-lactam resistance genes (Tem, CTX-m), Sulfanilamide resistance gene (sull, sul2) and quaternary ammonium salt resistance gene (QacEdelta1) were detected. Meanwhile, the structure and function of Sul2 gene and its potential as a dominant antigen were analyzed. **Results** PCR amplification showed that no amplified bands were found in 75 strains of *Y. pestis*. No strains with streptomycin resistance, sulfonamides resistance, beta-lactam resistance and disinfectants resistance were found in the plague strains isolated from Inner Mongolia during 2019-2022. Bioinformatics analysis showed that Sul2 protein was a hydrophobic secreted protein without transmembrane region and belonged to the outer membrane protein. The protein contains 2 glycosylation sites and 17 phosphorylation sites. αhelix and random coil are the main secondary structures, accounting for 45.39% and 33.21% of the total structure, respectively. Subcellular localization indicates that the protein may be localized to the nucleus and mitochondria. The protein contains 6 B cell epitopes and 16 T cell antigen epitopes. **Conclusion** 75 strains of *Yersinia pestis* isolated from gerbils plague foci in Inner Mongolia did not have the characteristics of drug resistance and disinfectant resistance related genes. Sul2 protein contains more epitopes of B and T cell antigens and has good antigenicity. To provide reference for plague prevention and control in this foci.

【Key words】 Inner Mongolia; *Yersinia pestis*; disinfectant and drug resistance genes; bioinformatics***

* **【基金项目】** 内蒙古自治区自然科学基金项目(No. 2021BS08016)。

** **【通讯作者】** 李伟, E-mail: 444913651@qq.com

【作者简介】 王姝懿(1986-),女,内蒙古呼和浩特人,博士,副主任技师。主要研究方向:人兽共患病及其防治。
E-mail: shuyi1986721@sina.com

鼠疫(Plague)是一种由鼠疫耶尔森菌(*Yersinia pestis*)引起的自然疫源性疾病^[1-2]。公认的世界鼠疫大流行有3次,对人类社会造成严重危害^[3]。该病具有起病快、传染性强、传播快的特点,在发现抗生素之前没有治愈鼠疫的方法。随着1929年Feming发现青霉素以及随后其他抗生素的发现和应⤵用,鼠疫的治疗取得了根本性的进展^[4-5]。从20世纪40年代末开始,链霉素成为治疗鼠疫的首选,该药对鼠疫耶尔森菌有很强的杀灭作用。链霉素的应用,使鼠疫的治愈率明显提高,成为治疗鼠疫的首选药物^[6]。但链霉素安全范围窄,毒副作用大,抗生素的广泛使用改变了致病菌的种群结构,耐药和多重耐药逐渐成为全球性问题^[7]。1996年,从马达加斯加一位腺鼠疫患者的淋巴管穿刺液中分离出鼠疫耶尔森菌,并在其中发现耐药质粒,其中含有7个抗生素基因^[8]。因此,鼠疫耶尔森菌的耐药性正日益引起人们的重视。

近几年,全球人间鼠疫疫情呈上升趋势,而我国的内蒙古地区在2019年再次有人感染鼠疫病例报告,2019-2022年共确诊鼠疫9例。全区在长爪沙鼠、布氏田鼠和达乌尔黄鼠疫源地均发生了动物鼠疫疫情,以长爪沙鼠疫源地疫情最为严重,2019、2020年连续两年动物鼠疫大流行后疫情开始逐渐走弱,至2022年疫情有所缓解,但是主要宿主和寄生媒介数量多、分布广,对疫源地区的重点人群仍然构成极大威胁。因此需持续掌握鼠间疫情动态,严防发生人间疫情。本研究对内蒙古长爪沙鼠鼠疫自然疫源地分离的75株鼠疫菌进行耐药及耐消毒剂基因的检测,同时对Sul2基因进行功能和抗原表位预测,以便了解该疫源地是否存在鼠疫菌携带耐药和耐消毒剂基因的状况,旨在为该地区的鼠疫防治提供理论靶点。

材料与方⤵法

1 材料

1.1 实验菌株和耐药基因阳性模板DNA *StrA*、*StrB*、*Sul1*、*Sul2*、*Tem*、*Ctx-m* 耐药基因的阳性模板DNA(A1234)由中国疾控中心馈赠。鼠疫菌共75株,为2019-2022年分离自内蒙古自治区鼠疫疫源地的长爪沙鼠,由内蒙古自治区综合疾病预防控制中心鼠疫专业实验室保存。其中采自锡林郭勒盟的苏尼特左旗8株,苏尼特右旗7株,正镶白旗6株;采自乌兰察布市的四子王旗9株,商都县8株,化德县9株;采自包头市的达茂旗8株,固阳1株;采自呼和浩特市武川县7株;采自鄂尔多斯市的鄂托克前旗4株,鄂托克旗6株;采自乌海市的海南区2株。

1.2 主要仪器和试剂 Tone 96 PCR 扩增仪,德国耶拿公司生产;GenoSens2200 凝胶成像系统,购于上海

勤翔科学仪器有限公司;DYY-6D 型电泳仪为北京六一仪器厂生产;Scientific NanoDrop 超微量核酸蛋白测定仪为美国 Thermo 公司生产;DL-2000 Marker, TaqDNA MIX 及琼脂糖均购自山西德泰兴业科贸有限公司。

2 方法

2.1 引物设计与合成 参照 NCBI 在线数据库查询,获得耐氨基糖苷类药物基因(*StrA*、*StrB*),耐磺胺类药物基因(*Sul1*、*Sul2*),耐β-内酰胺类药物基因(*Tem*、*Ctx-m*),耐季铵盐类消毒剂基因(*QacEdelta1*)共7个基因序列,分别设计引物,由华大基因(北京)有限公司合成(表1)。

表1 引物序列及长度
Table 1 Primer sequence and length

基因名称 Gene name	引物序列(5'-3') Primer sequence	序列长度 Length(bp)
氨基糖苷类相关耐药基因		
<i>Sul1StrA</i>	F:CTCAAAGTCTGAGGTGTGGC R:GGCATGCAGGGATCACCA	392
<i>Sul2StrB</i>	F:AGACATTGCTGATGAACTG R:CGTGGACGTAGTCAGTTT	314
磺胺类相关耐药基因		
<i>Sul1</i>	F:ATCAGACGTCGTGGATGTGCG R:GTGCGGGGCTCAAGAAA	437
<i>Sul2</i>	F:TCAATGATATTCGCGGTTT R:ATTCATCGAACCGGCCAG	285
β-内酰胺类相关耐药基因		
<i>Ctx-m</i>	F:AGTCGGGAGGCAGACTG R:AGCCTGAATGCTCGTGCA	551
<i>Tem</i>	F:ATCACCACCGACTATTTGCA R:GATCTGTCTATTTGTTCA	1080
耐季铵盐类消毒剂基因		
<i>QacEdelta1</i>	F:TAGCGAGGGCTTTACTAAGC R:ATTCAGAATGCCGAACACCG	307

2.2 鼠疫菌 DNA 提取 按照 TIAN-amp Bacteria DNA Kit 说明书方法提取鼠疫菌染色体 DNA。用超微量核酸蛋白测定仪测定 DNA 的含量并稀释至 2 ng/μL。

2.3 耐药基因检测 以鼠疫菌 DNA 为模板,分别用7对引物对耐药基因进行 PCR 扩增^[9],同时设置阴性和阳性对照。PCR 反应体系:10×buffer 5.0 μL, Taq DNA 聚合酶 0.5 μL, 10 mmol/L dNTP 0.2 μL, 上游引物(2 μmol/L) 1.0 μL, 下游引物(2 μmol/L) 1.0 μL, 模板 DNA(2 ng/μl) 5.0 μL, 用超纯水补足至 25 μL。PCR 扩增条件:95℃预变性 4 min;95℃变性 40 s, 56℃退火 40 s, 72℃延伸 40 s, 30 个循环;72℃终延伸 5 min。由于 Tem 引物的产物长度较长,增加延伸时间为 70 s,其他条件不变。扩增完成后取 7.5 μL PCR 产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳检测(电压:80~100 V;电泳时间:15~30 min),利用凝胶成像系统拍

照并记录结果。

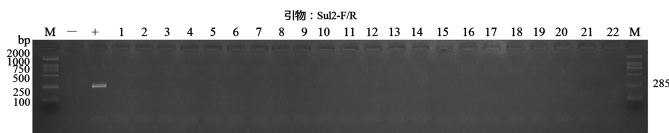
2.4 耐药基因序列的获取 从NCBI在线数据库查询,获得鼠疫磺胺类相关耐药基因 Sul2 的序列信息,其登陆号ID为:78117916。

2.5 Sul2 蛋白的生物信息学分析 根据程序 ProtScale 推导氨基酸残基的亲疏水性^[10];应用 SignalP 3.0 Server 分析该蛋白的信号肽;利用 TM-HMM Server^[10] 进行跨膜区分析;采用 NetPhos3.0 Server^[10] 工具分析磷酸化位点;使用在线软件 SOPMA 对 Sul2 蛋白的二级结构进行预测和分析;利用 IEDB 表位预测软件预测 Sul2 蛋白的 B 细胞表位;使用在线 SYFPEITHI 服务器分析该蛋白的 T 细胞抗原表位。

结果

1 耐药基因及耐消毒剂基因的 PCR 扩增

为了保证 PCR 扩增结果的准确性,每个耐药基因的扩增均设立阳性和阴性对照。结果显示,75 株鼠疫菌均未检出氨基糖苷类链霉素(StrA、StrB)耐药相关基因、磺胺类(Sul1、Sul2)耐药相关基因、β-内酰胺类(Tem、Ct-m)耐药相关基因及耐季铵盐类消毒剂(QacEdelta)基因。部分鼠疫菌株磺胺类耐药相关 Sul2 基因扩增结果见图 1。



M DNA 标志物 1-22 22 株鼠疫菌的 Sul2 基因扩增 - 阴性对照 + 阳性对照

图 1 22 株鼠疫菌 Sul2 基因 PCR 扩增

M DNA marker 1-22 Amplification results of partial strains
- Negative control + Positive control

Fig. 1 The PCR amplification results of partial *Y. pestis* strains

2 Sul2 蛋白的生物信息学分析

2.1 亲、疏水性 采用 ProtScale 在线预测 Sul2 蛋白的亲、疏水性,结果显示该蛋白在 557 位氨基酸位点亲水分数较大,为 1.944,疏水性较强;在 536 位点亲水分数较小,为 -0.600,亲水性较强(图 2)。Sul2 蛋白多肽链疏水区域均多于亲水区域,大部分区域分值为正值,表明该蛋白为疏水性蛋白,与 Port-Param 预测结果一致。

2.2 信号肽 采用 SignalP 程序软件预测 Sul2 蛋白的信号肽在 1-19 氨基酸位点,且 Cmax 在 50 位, Smax 在 4 位, Ymax 在 20 位氨基酸位点(图 3)。运用 SecretomeP 2.0 软件预测 Sul2 蛋白的非典型分泌性,得出的 NN 值为 0.85。当 NN-Score 大于 0.5 时,蛋白判定为非典型分泌蛋白,所以该蛋白属于分泌蛋

白。

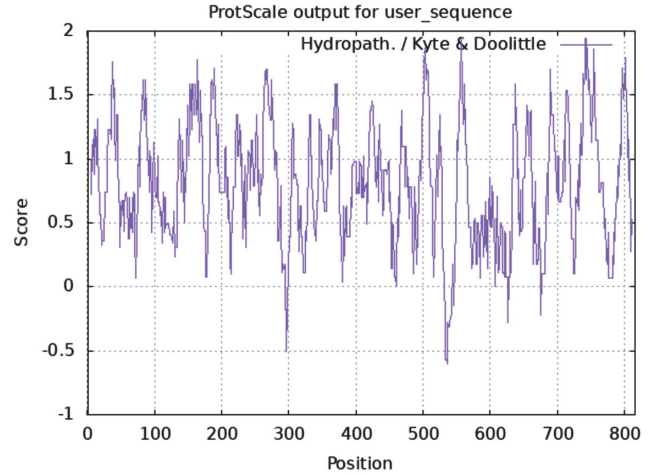


图 2 Sul2 蛋白亲、疏水性预测

Fig. 2 Prediction of hydrophilic/hydrophobic of Sul2 Protein

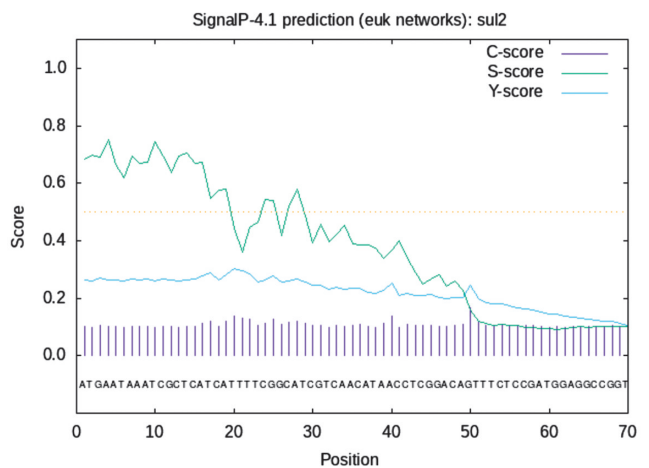


图 3 Sul2 信号肽预测

Fig. 3 The result of signal peptide sequence of Sul2

2.3 跨膜结构 利用 TMHMM2.0 Server 在线程序分析 Sul2 蛋白跨膜结构域,结果如图 4。氨基酸期望值大于 18 的蛋白存在跨膜区。Sul2 蛋白氨基酸期望值为 0.00612,故不存在跨膜区。其蛋白综合图形和输出文本显示整个蛋白在膜外发挥作用,为外膜蛋白(图 4)。

2.4 糖基化和磷酸化位点 分别采用 NetNGlyc 1.0 和 NetPhos 3.1 程序分析 Sul2 的糖基化和磷酸化位点。结果显示,当磷酸化潜在位点以 0.5 为阈值时,该蛋白含有 2 个糖基化位点(图 5)。磷酸化位点较为活跃且超过阈值的磷酸化位点有 17 个,其中丝氨酸(Ser)位点 13 个,苏氨酸(Thr)位点 3 个,酪氨酸(Tyr)位点 1 个(图 6)。

2.5 二级结构 采用 SOPMA 程序分析 Sul2 蛋白的二级结构,结果如图 7。该蛋白参与 α 螺旋(Alpha helix)结构有 123 个氨基酸,占二级结构总数的

45.39%；参与无规则卷曲(Random coil)结构为 90 个氨基酸,占 33.21%；参与β转角(Beta turn)结构有 22 个氨基酸,占 8.12%；参与延伸链(Extend strand)结构有 36 个氨基酸,占 13.28%。

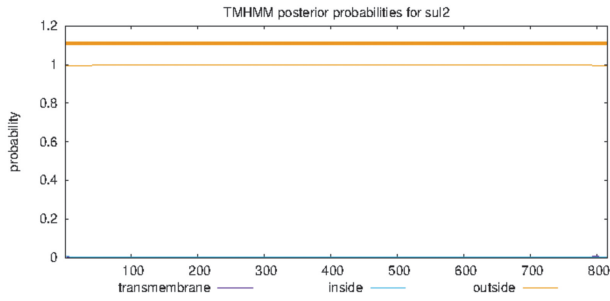


图 4 Sul2 蛋白跨膜区预测

Fig. 4 Prediction of the transmembrane protein of Sul2 protein

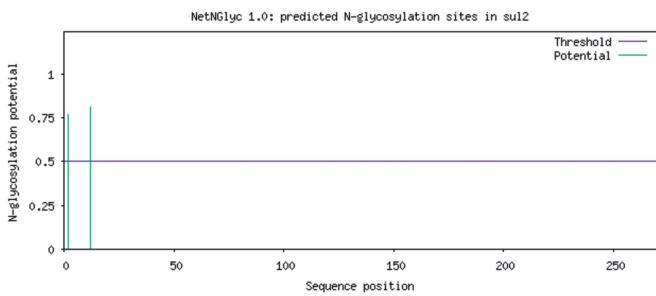


图 5 Sul2 糖基化位点预测

Fig. 5 Prediction of N-glycosylation site in Sul2

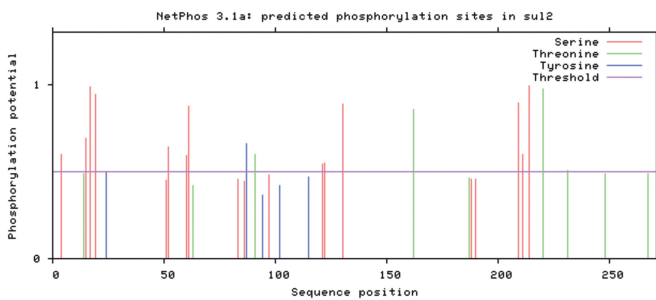


图 6 Sul2 磷酸化位点预测

Fig. 6 Prediction of Sul2 Phosphorylation site

2.6 亚细胞定位 亚细胞定位可分析出某种蛋白或其表达的产物在细胞中最可能存在的位置。根据 WoLF PSORT 程序预测 Sul2 蛋白的亚细胞定位,结果显示该蛋白 nucl 为 6, mito 为 5, cyto 为 2, extr 为 1,表明其可能定位于细胞核(nucleus)和线粒体(mitochondrion)。

2.7 B 细胞表位 采用 IEDB 程序分析 Sul2 蛋白的 B 细胞抗原表位。其越有利于与抗体结合,表明柔韧性越强(图 8)。其柔韧性参数的标准以基线 0.5 为临界参考值,当高于 0.5 时,其氨基酸区段更灵活,且更容易形成抗原表位的区域。结果显示 Sul2 蛋白有 6 个 B 细胞抗原表位,主要位于 16-29, 53-63, 109-112,

131-145, 180-186, 219-225 位氨基酸残基或其附近,表明该蛋白有潜在优势 B 抗原表位存在。

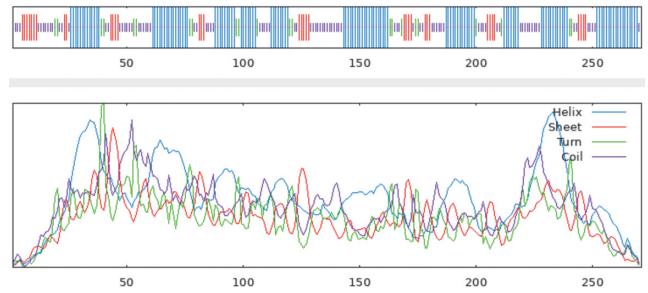


图 7 Sul 蛋白二级结构预测

Fig. 7 Prediction of the secondary structure of Sul2 protein

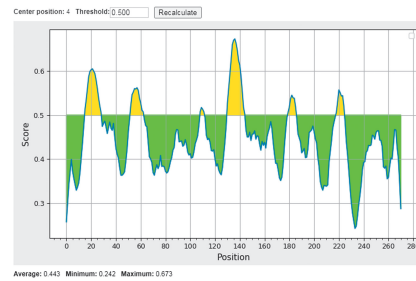


图 8 Sul 蛋白 B 细胞抗原表位预测趋势

Fig. 8 Trend prediction of B cell epitope of Sul2 protein

2.8 T 细胞表位 T 细胞表位主要包括细胞毒性 T 细胞(CTL)抗原表位及辅助 T 细胞(Th)抗原表位。利用 SYFPEITHI 工具分析 Sul2 蛋白存在 16 个 T 细胞抗原表位,即 HLA-A*02:01 限制性 CTL 细胞表位,主要位于 95-103、5-13、67-75、117-125、253-261、36-44、37-45、199-207、231-239、6-14、24-32、202-210、228-236、74-82、76-84、183-191 位的氨基酸残基或其附近。

讨论

抗生素在细菌性疾病的防治中发挥着重要作用,但随着抗生素的广泛使用,其耐药性已成为一个危及公共卫生的全球性问题。细菌耐药不仅会改变药物作用的靶点或降低细菌对药物的敏感性,还会通过质粒或染色体介导引起不同菌株之间的流行感染^[11-12],从而给细菌性疾病的防治带来新的挑战。目前,细菌耐药已经从抗生素扩展到消毒剂,随着消毒剂的广泛使用,耐药问题日益严重^[13]。

研究表明,细菌通过获得携带 qac 家族基因^[14]的质粒产生抗毒素抗性。目前已发现 10 种 qac 基因家族,包括 qac A、qac B、qac C、qac D、qac E、qac EΔ1 (QacEdelta1)、qac F、qac G、qac H、qac J。其中 qacΔE1 基因编码一种跨膜蛋白,该基因位于 I 类整合子的保守序列,其编码蛋白对季胺盐类消毒剂具有抗

性^[15]。Sul1 和 Sul2 基因均编码抗磺胺类的二氢叶酸合成酶, Sul1 基因也位于 I 类整合子 3' 端保守序列^[15]。自 20 世纪 50 年代以来,鼠疫耶尔森菌生物安全实验室和鼠疫暴发应急处理使用的消毒剂为酚类消毒剂甲酚皂液(来索尔),以及含氯消毒剂(84 消毒剂)和 75% 酒精。近年来,季铵盐(苯扎溴化铵)和双胍(洗必泰)消毒剂已被列入鼠疫防护用品,并被普遍采用。细菌耐药性是世界性难题,1995 年 Galimand 等^[16-17]首次报道第一株多重耐药鼠疫菌 17/95,该菌株含有自转移质粒 pIP1202,大小约 150 kb,属 Inc6-C 群,pIP1202 所携带的耐药基因有 SHV1、Str A、Str B、Aad A、Aph A、Tet RA、Cat、QacEdelta、Sul1、Sul2,其耐药表型为氨基苄西林、氯霉素、链霉素、磺胺类药物、四环素、壮观霉素和卡那霉素。

本实验对内蒙古长爪沙鼠鼠疫自然疫源地内分离的 75 株鼠疫菌进行携带磺胺类(Sul1、Sul2)耐药相关基因、氨基糖苷类链霉素(StrA、StrB)耐药相关基因、 β -内酰胺类(Tem、Ct-m)耐药相关基因及耐季铵盐类消毒剂(QacEdelta)基因检测,结果均为阴性。生物信息学分析表明,Sul2 蛋白是一个不含跨膜区域的疏水分泌性蛋白,主要在膜外发挥生物学作用。Sul2 定位于细胞核和线粒体,在细胞核和线粒体内发挥其功能。蛋白质的二级结构的基础是抗原表位,而其构成抗原的重要因素是无规则卷曲和转角。Sul2 蛋白的主要结构元件是 α 螺旋和无规则卷曲,其次是延伸链和 β 转角,对于与抗体嵌合有很大益处。无规则卷曲是蛋白质肽链中受体与配体结合的区域,其空间构象变化容易受到侧链的影响,也是蛋白质功能的重要组成部分,因此可能含有较多的抗原表位^[18]。蛋白质抗原的二级结构和 B 细胞表位关系密不可分。采用 IEDB 工具分析 Sul2 蛋白含有 6 个 B 细胞表位,表明该蛋白抗原性良好。应用 SYFPEITHI 在线程序预测 Sul2 蛋白含有 16 个 T 细胞表位,发现存在优势抗原表位。

目前,该疫源地尚未报道有鼠疫菌耐药鼠株,但随着鼠疫耶尔森菌抗菌药物的不断开发和应用,以及质粒很容易被整合到鼠疫基因组染色体中^[19],并且已有研究显示鼠疫菌在自然条件下能获得携带耐药基因的质粒,因此鼠疫菌耐药性的出现也成为必然现象,且很可能向具有多重抗药性发展。细菌耐药性监测不是遏制细菌耐药性产生和蔓延的手段,但监测可给遏制耐药性蔓延的控制措施的制定提供重要信息,并且可以通过监测来评价这些措施的有效性。因此应将耐消毒剂及耐药鼠疫菌株的检测纳入鼠疫常规监测工作中,为鼠疫的治疗提供参考,为制定精细化的鼠疫防控措施提供科学依据。

【参考文献】

- [1] Yan D, Zhang YW, Su XM, et al. Progress of the application of spatial epidemiology in prevention and control of plague in China [J]. Chin J Vector Biol Control, 2016, 27(2): 202-205.
- [2] Hanjoo VM, Ng ASB, Tan JSK, et al. The clavicular notch as an alternate anatomical landmark for internal jugular vein cannulation in infants and children: A descriptive study [J]. Indian J Anaesth, 2013, 2(3): 112.
- [3] Madariya M, Makwana H, Thakor A. A comparative study of internal jugular vein catheterization in critical care patients: Ultrasound guided versus conventional method [J]. Indian J App Basic Med Sci, 2015, 17(24): 80-92.
- [4] Susat J, Lubke H, Immel A, et al. A 5 000-year-old hunter-gatherer already plagued by *Yersinia pestis* [J]. Cell Rep, 2021, 35: 109278.
- [5] Dai R, He J, Zha X, et al. A novel mechanism of streptomycin resistance in *Yersinia pestis*: Mutation in the rpsL gene [J]. PloS Negl Trop Dis, 2021, 15(4): e0009324.
- [6] Galimand M, Carniel E, Courvalin P. Resistance of *Yersinia pestis* to antimicrobial agents [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2006, 50(10): 3233-3236.
- [7] Anisimov AP, Amoako KK. Treatment of plague: promising alternatives to antibiotics [J]. J Med Microbiol, 2006, 55(11): 1461-1475.
- [8] Welch TJ, Fricke WF, McDermott PF, et al. Multiple antimicrobial resistance in plague: an emerging public health risk [J]. PLoS One, 2007, 2(3): e309.
- [9] Hozbor D, Mooi F, Flores D, et al. Pertussis epidemiology in Argentina: trends over 2004-2007 [J]. Infect, 2009, 59(4): 225-231.
- [10] 李胜, 何健. 海南州鼠疫自然疫源地鼠疫菌耐消毒剂及耐药相关基因的检测 [J]. 中国病原生物学杂志, 2018, 13(3): 230-238.
- [11] Littmann M, Hulbe C, Riffelmann M, et al. Long-term immunogenicity of a single dose of acellular pertussis vaccine in paediatric health-care workers [J]. Vaccine, 2008, 26(19): 2344-2349.
- [12] Murphy JF. Pertussis has re-emerged [J]. Ir Med J, 2012, 105(8): 260.
- [13] Prince HE, Lieberman JM, Cherry JD. Age-related differences in patterns of increased *Bordetella pertussis* antibodies [J]. Clin Vaccine Immunol, 2012, 19(4): 545-550.
- [14] CDC. Pertussis Epidemic—Washington, 2012 [J]. MMWR, 2012, 61(28): 517-522.
- [15] Walsh C. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance [J]. Nature, 2000, 406(6797): 775-781.
- [16] Zhong G. Chlamydial plasmid-dependent pathogenicity [J]. Trend Microbiol, 2017, 25(2): 141-152.
- [17] Galimand M, Guioyole A, Gerbaud G, et al. Multidrug resistance in *Yersinia pestis* mediated by a transferable plasmid [J]. N Engl J Med, 1997, 337(10): 677-680.
- [18] Chen C, Huang H, Wu CH. Protein bioinformatics databases and resources [J]. Methods Mol Biol, 2017, 1558: 3-39.
- [19] De la Maza LM, Zhong G, Brunham RC. Update on *Chlamydia trachomatis* vaccinology [J]. Clin Vaccine Immunol, 2017, 24(4): e00543-16.