

# 鼠疫菌全基因组单核苷酸多态性研究进展

王娜(综述),海荣,俞东征(审校)

(中国疾病预防控制中心传染病预防控制所鼠疫室,传染病预防控制国家重点实验室,北京 102206)

**摘要:** 单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNPs)主要是指在基因组水平上由单个核苷酸的变异所引起的DNA序列多态性,包括同义SNPs(synonymous SNPs, sSNPs)和非同义SNPs(non-synonymous SNPs, nSNPs)。随着测序技术的迅速发展,获得了大量细菌全基因组序列,使得通过测序技术及生物信息学方法寻找潜在的SNPs位点成为可能。并且,由于SNPs本身的特性,使其作为一种新的分子标记,在细菌分型与进化、流行病学调查研究中得到广泛应用。该文主要阐述基于全基因组寻找SNPs位点,并建立以SNPs数据为基础的鼠疫菌微进化研究分析的研究进展状况。

**关键词:** 鼠疫菌; 全基因组; 单核苷酸多态性

中图分类号: R378.6<sup>+</sup>1 文献标志码: A 文章编号: 1003-4692(2011)02-0190-04

## Genome-wide single nucleotide polymorphism of *Yersinia pestis*

WANG Na, HAI Rong, YU Dong-zheng

State Key Laboratory for Infectious Disease Prevention and Control, Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

Corresponding author: HAI Rong, Email: hairong@icdc.cn

Supported by the National Key Science and Technology Projects of China (No. 2008ZX10004-008)

**Abstract:** Single nucleotide polymorphisms (SNPs) mainly refer to the polymorphism of DNA sequence caused by a single nucleotide mutation, including the synonymous SNPs and non-synonymous SNPs. With the rapid development of sequencing technology, a large number of bacterial genome sequences are available. So, it's possible to identify potential SNPs sites by sequencing technology and bioinformatics methods. Also, SNPs, because of their own characteristics, have been widely used as a new molecular marker in bacterial genotyping, evolution and epidemiology research. In this paper, advances in the research on the genome-wide search of SNPs sites and analysis of the *Yersinia pestis* microevolution based on SNPs data are reviewed.

**Key words:** *Yersinia pestis*; Whole genome sequence; Single nucleotide polymorphisms

鼠疫耶尔森菌(*Yersinia pestis*, 鼠疫菌)的分类学位置为:原核生物界,化能营养原核生物门,细菌纲,肠杆菌科,耶尔森菌属,鼠疫耶尔森菌。目前,已有11个菌种归于耶尔森菌属,其中3种对人有致病性,它们是鼠疫菌、假结核耶尔森菌(*Yersinia pseudotuberculosis*, 假结核菌)和小肠结肠炎耶尔森菌(*Yersinia enterocolitica*, 小肠结肠炎菌),尤以鼠疫菌对人的致病性最强。据文献报道,鼠疫菌大约是在1500~20 000年前,从假结核菌进化而来<sup>[1-4]</sup>。2001年,英国Sanger Centre公布了第1株鼠疫菌CO92的全基因组序列,到目前为止,GenBank上已经公布14株鼠疫菌的全基因组序列<sup>[5-12]</sup>;鼠疫菌的基因组全长约 $4.65 \times 10^6$ , (G+C)%为47.6%,通常含有3个重要的质粒pFra/pMT1、pPst/pPCP1和pYV1/pCD1。

近年来,随着分子生物学技术的迅速发展,以核酸为基础的细菌基因分型方法迅速发展起来。基因分型是应用比较基因组学方法在细菌核酸分子中找出差异,从而将密切相关的菌株区分开来。目前,鼠疫菌分型研究中应用的基因分型技术很

多,包括差异区段(DFR)分析、可变量目串联重复序列分析(VNTR)、随机扩增多态性DNA技术(RAPD)、扩增片段长度多态性分析(AFLP)、脉冲场凝胶电泳(PFGE)等技术。各种方法在分辨率、重复性、分型性和操作的简便性等方面各有千秋。理论上,鉴定分析2个菌株亲缘关系较为精确的方法是比较它们的基因组序列,通过DNA序列可以得出2个菌株是否完全相同的结论。其他方法则显示两者最具有可能的亲缘关系程度,但是考虑成本等因素,通过比较全基因组序列的方法在现实中是不可行的<sup>[13]</sup>。现就近年来鼠疫菌单核苷酸多态性的研究进展做一介绍。

### 1 SNP的基本概念

单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNPs),主要是指在基因组水平上由单个核苷酸的变异所引起的DNA序列多态性。它是人类可遗传的变异中最常见的一种。这种变异可由单个碱基的转换(transition)或颠换(transversion)所引起,转换是指同型碱基的置换,一个嘌呤被另一个嘌呤替换或者一个嘧啶被另一个嘧啶替换。颠换是异型碱基的置换,即一个嘌呤被另一个嘧啶替换或者一个嘧啶被另一个嘌呤置换。并且,越是结构相似的碱基越容易被相互替换,在遗传学上,转

基金项目:国家科技重大专项课题(2008ZX10004-008)

作者简介:王娜(1984-),女,在读硕士,主要从事鼠疫菌的分子生物学研究。Email: wangna\_qf@126.com

通讯作者:海荣,Email: hairong@icdc.cn

换发生的频率要比颠换发生的频率高。另外,它也可以是由碱基的插入或缺失所导致。SNPs既有可能在基因序列内,也有可能是在基因以外的非编码序列上。位于编码区内的SNPs(coding SNPs, cSNPs)比较少,因为在外显子内,其变异率仅及周围序列的1/5,但它在遗传性疾病的研究中却具有重要意义。

SNPs又可分为2种:一种是同义SNPs(synonymous SNPs, sSNPs),即SNPs所致的编码序列的改变并不影响其所翻译的蛋白质的氨基酸序列,突变碱基与未突变碱基的密码子含义相同;另一种是非同义SNPs(non-synonymous SNPs, nSNPs),指碱基序列的改变可使以其为模板翻译的蛋白质序列发生改变,从而影响蛋白质的功能。这种改变通常是导致生物性状改变的直接原因。编码序列中的SNPs多为nSNPs。由于nSNPs的高发生率,其可能导致基因致病性突变的获得与扩散,因此,其多与疾病的暴发与流行扩散有关。而由于sSNPs的低突变率,所编码的肽链功能中性突变等原因,使其多作为有效的分子标记用于群体基因学与流行病学的研究<sup>[14]</sup>。

SNPs自身有以下特性:①数量多,分布广泛。②适于快速、规模化筛查。组成DNA的碱基虽然有4种,但SNPs一般只有2种碱基组成,所以它是一种二态的标记,即二等位基因(biallelic),有利于对其进行基因分型。③SNPs等位基因频率容易估计。④易于基因分型。

## 2 SNP的寻找方法与分析

作为DNA序列中单个碱基的置换,理论上任何用于检测单碱基突变或多态性的技术都可用于SNPs的识别或检出,例如,RFLP、等位基因特异的寡核苷酸杂交、寡核苷酸连接分析(OLA)、等位基因特异的PCR(ARMS)、DNA测序等都可分别用于已知或未知SNPs的检测<sup>[15]</sup>。目前,我们常用的是DNA测序法。

2.1 基因组测序法 通过454测序法和MassARRAY system 2种方法寻找SNPs,对于个体SNPs的认定,可依据贝叶斯检验方法和似然比检验方法(LRT),而对于群体则选用模拟模型;并用主成分分析法(principle component analysis, PCA)和STRUCTURE 2种方法对种属结构进行分析<sup>[16]</sup>。

2.2 全基因组比对法 也可以应用Mummer程序对已知全基因组序列的菌株进行比较,寻找潜在的SNPs位点,再根据各项原则及研究目的选择有意义的SNPs位点进行验证分析<sup>[10,17]</sup>。或者将每个基因组中的基因翻译成蛋白质,采用tBlastN比对方法,比较鼠疫菌基因水平上的差异<sup>[18]</sup>。

2.3 核酸探针杂交法 基于已知的细菌全基因组序列,设计突变映像阵列探针,进行DNA杂交,寻找潜在的SNPs位点,并通过相同的方法进行重复测序验证寻找SNPs位点。也可以用发夹引物PCR等方法进一步验证SNPs位点<sup>[19]</sup>。

2.4 SNPs分析常用软件 构建以SNPs数据为基础的进化树常用MEGA2.0/4.0、PUAP、WINCLADA 1.00.08、BioNumerics等生物信息学分析软件。

## 3 SNP在细菌分型研究中的最初应用

由于sSNPs在全基因组的广泛存在及其功能的中立突变,使基于sSNPs的基因分型方法能够很好的、较准确的显示高度同源菌株之间的进化关系,并能较准确地构建基因进化框架

图,便于新发病原菌株的快速分型诊断。Gutacker等<sup>[20]</sup>通过对4株结核分枝杆菌的全基因组序列比对,以230个sSNPs的分析与IS6110分型方法对比,较好地解决了IS6110等分子生物分型方法所不能解决的近缘菌株间的进化关系问题。

伤寒沙门菌也是一种基因高度保守的细菌。经典的分子生物学分型方法如PFGE、核糖体分型、IS200、AFLP及随机扩增多态性DNA分析等都不能很好地反映其菌株间的进化关系,而且多位点酶切电泳技术(MLEE)和多位点序列分型技术(MLST)也不能将其很好的分开。2007年,Octavia和Lan<sup>[21]</sup>对2株已知全基因组的菌株CT18和Ty2,用blast进行比对,寻找出携带有SNPs的253个基因片段,选取其中的36个基因(37个SNPs)对73株伤寒沙门菌进行分析。将其分为23个SNPs型,其中有12个SNPs型仅有1株菌,最多的是SNP10型含23株菌。可以较好的显示不同伤寒沙门菌的亲缘关系。

Roumagnac等<sup>[14]</sup>对伤寒沙门菌的进化研究中,用其双等位基因多态位点(biallelic polymorphisna, BiPs)包含的SNPs做单倍体型和最大简约树分析发现,伤寒沙门菌的群体结构很中立,树枝集中,在随后收集的菌株研究中发现,该分析可以很好地解释伤寒沙门菌的某一个单倍体型在某一地区某一时间段能稳定存在。该研究还发现,在其他经典的微生物学方法不能为细菌的长期流行病学调查提供可靠的分子标记时,SNPs分析分型方法却可以让其成为可能。同时,基于SNPs的单倍体分析可以预测致病菌的流行状况,为疾病的暴发提供警报。该研究还证实,基于已知全基因组的SNPs分析,可以降低系统进化树的偏差。

为了更好的分析蛋白质编码基因序列高度保守的志贺毒素大肠埃希菌(STEC)的基因多态性并研究其微进化情况,Zhang等<sup>[19]</sup>根据已知序列的STEC设计突变映像阵列探针对进行DAN杂交,寻找潜在的SNPs位点,根据HP-PCR测定法和ABI 3100基因分析仪验证SNPs位点,并对选出的SNPs位点用MEGA软件构建最大简约进化树。同时,对所选菌株进行PFGE和多位点可变数目串联重复序列分析(MLVA),用BioNumerics软件构建最大简约树,将结果进行比较,发现以SNPs数据为基础的进化树与PFGE结果较为相似,3种分析结果的局部拓扑结构的不同,可能说明了STEC的进化有多种机制和变异率。同时,Zhang等还检测分子生物种假设学说的验证,构建了STEC O157的进化时间框架,综合比较了PFGE、MLVA的实验结果后认为,SNPs更适合于该分析研究。

## 4 SNP在鼠疫菌进化研究中的应用

Achtman等<sup>[22]</sup>通过对36株鼠疫菌、12株小肠结肠炎菌、13株假结核菌的5个管家基因(*thrA*、*trpE*、*glnA*、*tmk*和*dmsA*)和一个脂多糖合成相关基因*manB*,进行测序分析,根据Whittam的同义分子生物钟频率假设学说和Guttman及Dykhuisen的5乘高分子生物钟频率学说估算SNPs的突变率;通过计算sSNPs(%Ds)与nSNPs(%Dn)位点平均百分比的差异来分析等位基因的多样性,并推测鼠疫菌的进化时间。

按照分子生物钟假设学说,如果基因多态性以一定的频率积累,SNPs多态性可以推测不同物种的最后一个共同祖先存在的时间。其实验结果显示,鼠疫菌和假结核菌高度同源,它们

大约在1500~20 000年前有共同的祖先。邻接法进化树分析显示:所有来自鼠疫菌和假结核菌的等位基因都紧密聚在一起,而来自小肠结肠炎菌的所有等位基因位点聚在一起(除*manB*外)。

宋亚军和杨瑞馥<sup>[18]</sup>在进行鼠疫菌91001的基因组测序时发现,CO92、KIM和91001三者的基因组有90%以上的基因完全相同,其编码蛋白质序列完全一致,10%左右基因高度相似,只存在点突变,还有少数基因在不同基因组中存在缺失现象。在CO92预测的4011个编码基因(含假基因)中,有3762个在KIM中完全一样,209个存在点突变;有3597个在91001菌株中完全一样,有358个存在点突变;而在CO92预测的3874个编码基因(不含假基因)中,有3657个在KIM中完全一样,179个存在点突变;有3508个在91001菌株中完全一样,有313个存在点突变。这说明东方型的CO92菌株和中世纪型的KIM菌株的相似性更大,而同为中世纪型的91001菌株和KIM菌株之间的距离要大于KIM菌株与CO92菌株之间的距离,91001菌株可能处于鼠疫菌进化过程中的另一个分支上。综合考虑生化酵解特性、宿主、地理环境等因素,周冬生等<sup>[23]</sup>提出91001可能是从中世纪型分化出的另一支古老变种——田鼠型。

2004年,Achtman等<sup>[17]</sup>通过生物信息学方法,对已公布全基因组序列3株鼠疫菌(CO92、KIM、91001)的3250个直系同源基因(orthologous coding sequence, CDSs)及假结核菌IP32953进行比对分析,以假结核菌相对应的核苷酸为基准,筛选出76个sSNPs,进行鼠疫菌的进化分析。PCR技术结合变性高效液相色谱法技术对105株菌的SNPs进行分析,筛选出44个sSNPs,位于38个CDS内,对其进行进化分析,可以很好的构建进化树,且可以很好的标记Branch0(91001)、Branch1(CO92)或Branch2(KIM)3个分支。说明SNPs不仅可以用于流行病学研究和法医学,也可以很好的标记鼠疫菌内的某个型别。

2006年,Chain等<sup>[6]</sup>测定2株古典变种菌株Antiqua和Nepal516,并用生物信息学方法,Mummer3程序,将其与已公布的测序东方变种菌株CO92、中世纪变种菌株KIM、田鼠型菌株91001全基因组相比较,发现存在453个SNPs位点,包括同义突变SNPs和非同义突变SNPs,部分分布在蛋白质编码序列内。根据SNPs的菌株特异性,可以推断91001较先分化成独立的一支,CO92和Antiqua亲缘关系较近,KIM和Nepal516关系较近。与Achtman的结果相符,说明SNPs可以很好的用于鼠疫菌的微进化研究。

在Achtman等的研究基础上,李艳君<sup>[24]</sup>、崔玉军<sup>[25]</sup>在来自中国18个疫源地及亚疫源地、涵盖4种生物型的121株鼠疫菌中,对该38个基因片段、45个sSNPs进行扩增,构建基于SNPs分析的鼠疫菌的遗传关系框架,为应用其他遗传标记对鼠疫菌进行分型和适应性进化研究提供可靠参考。构建01数据矩阵,导入BioNumerics软件进行分析,绘制聚类图和最小扩展树,将国内121株鼠疫菌分成12个型,3个分支,其中东方型菌株、中世纪型菌株和田鼠型菌株分别属于Branch1、Branch2和Branch0,而古典型菌株则分散在3个分支内,说明古典型菌株的高度多态性。结合地理位置,因此推测Branch0是进化年代上比较老的菌株,新疆地区是我国鼠疫菌的起源;Branch2包括所有的中世纪型菌株和与中世纪关系密切的2.ANT的古典型菌株。推测

该分支的进化方向是位于东北部的松辽平原的2.ANT的古典型菌株向西南传播逐渐演化成2.MED.a的中世纪型菌株,继续向西传播至东昆仑山,形成2.MED.b型菌株,与丝绸之路惊人的相似。Branch1分支包括了所有的东方型菌株和与之密切相关的1.ANT古典型菌株,推测1.ORL.a的东方型菌株可能是由青藏高原或滇西纵谷疫源地的古典型菌株进化而来。

2007年,Touchman等<sup>[26]</sup>利用Mummer程序将FV-1菌株的基因组与已公布全基因组序列的CO92对比寻找SNPs位点,用REPuter程序验证SNPs的唯一性;筛选出32个可能的SNPs位点,其中19个位点可以在2株菌中得到验证,在这19个位点中,有14个SNPs位点位于CDS内,包括11个错义突变、2个同义突变和1个无义突变位点。将所得到的SNPs位点在CO92、FV-1、北美的20株菌及1株假结核菌和分离自肯尼亚的鼠疫菌中扩增,以分析北美鼠疫菌的群体结构,得到7个基因型,但是由于验证样本少,SNPs的筛选存在偏差,进化树呈线状。

2007年,Auerbach等<sup>[27]</sup>比对CO92、FV-1与CA88的基因组序列,发现20个SNPs位点,包括15个非同义突变和5个同义突变。其中5个是之前在CO92和FV-1基因组<sup>[26]</sup>中找到的,并且已在北美鼠疫菌中得到验证;有15个位点在CA88和FV-1中一致,结合基因片段的插入、缺失及重排等情况,可以认为CO92与CA88亲缘关系较近,大概在125年前,它们拥有一个共同的祖先。

## 5 展望

为了更好、更便捷的进行细菌全球流行病学研究及其进化研究,急需一种廉价的、简单的、有辨别力的且重复性好的分型方法,而SNPs则刚好满足这些条件,其在炭疽芽孢杆菌<sup>[28]</sup>、鼠疫菌<sup>[17]</sup>、结核分枝杆菌<sup>[20]</sup>及大肠埃希菌O157:H7<sup>[19]</sup>中的应用已经证明了它的实用性。

由于SNPs本身的特性,及其广泛存在于生物基因组内,可操作性、可重复性及易受选择压力、环境等因素的影响等特征,以及适于研究亲缘关系较近物种内的微进化等特性,使其在细菌的全球性流行病学调查研究、分子分型等研究中得到更加广泛的应用<sup>[17]</sup>。但是,SNPs不适合非同源进化物种的进化研究。

尽管由于SNPs寻找过程中误差存在等因素的影响,有时所做的进化树不够理想,但是在尽量减低SNPs偏差后,仍有可能得到较好的结果。例如,Pearson等<sup>[28]</sup>在VNTR分析(MLVA)的基础上,选择5株炭疽芽孢杆菌进行全基因组测序,对其中的1株OUT26基因组进行组装,并以其为参考菌株,与其他4株菌相比较,寻找潜在的SNPs位点。尽量减低偏差后,对筛选出的SNPs位点做进化分析,应用PAUP4.0做MLVA的无根进化树,WINCLADA 1.00.08和MEGA 2.1的邻接法构建和验证以SNPs为基础的进化树,二者相比基本一致。而且,多个全基因组的比较及重复测序验证可以减低SNPs寻找过程中的偏差。

由于细菌的进化并没有一个明确的单一的进化模式,并且各种分子分型方法都存在一定的缺陷,所以单一依靠一种分型方法很难准确的说明细菌的进化过程,因此,SNPs可以与MLVA、PFGE、IS100等分子分型方法形成优势互补,综合说明细菌的进化与分型状况,能更准确地反映出细菌基因组内包含的信息,为我们以后的研究及警示疾病的暴发流行提供线索<sup>[17,19]</sup>。

随着测序技术的日益成熟,高通量测序技术的迅速发展,使得细菌基因组测序越来越容易,测序结果也更精确,考虑成本等因素,或许所有细菌做全基因组测序代价太高,周期太长,但在现有的技术条件下,获得细菌基因某一片段的测序序列不再困难<sup>[16]</sup>。因此,快速验证某些SNPs位点成为可能。同时,生物信息技术的快速发展及生物分析软件的不断完善,为基于细菌全基因组的分型研究提供了有力保障和技术支持。总之,作为一种新型分子标记的SNPs,由于其本身的特性,在细菌分型与进化研究、流行病学调查研究及高通量快速检测技术研究中将得到更广泛的应用。

#### 参考文献

- [1] 丛显斌,殷文武. 鼠疫防控应急手册[M]. 北京:北京大学医学出版社,2009:1-14.
- [2] 谷爱娣,樊振亚. 3种对人致病性耶尔森氏菌生物学特性及流行病学意义[J]. 中国地方病学杂志,2001,16(4):218-222.
- [3] 纪树立. 鼠疫[M]. 北京:人民卫生出版社,1988:1-4.
- [4] 俞东征. 人兽共患传染病学[M]. 北京:科学出版社,2009:464-466.
- [5] Parkhill J, Wren BW, Thomson NR, et al. Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague [J]. Nature, 2001, 413 (4) : 523-527.
- [6] Chain PSG, Hu P, Malfatti SA, et al. Complete genome sequence of *Yersinia pestis* strains Antiqua and Nepal516: Evidence of gene reduction in an emerging pathogen [J]. J Bacteriol, 2006, 188 (12) : 4453-4463.
- [7] Song Y, Tong Z, Wang J, et al. Complete genome sequence of *Yersinia pestis* strain 91001, an isolate avirulent to humans [J]. DNA Res, 2004, 11 (3) : 179-197.
- [8] Deng W, Burland V, Plunkett G, et al. Genome sequence of *Yersinia pestis* KIM [J]. J Bacteriol, 2002, 184 (16) : 4601-4611.
- [9] Garcia E, Worsham P, Bearden S, et al. Pestoides F, an atypical *Yersinia pestis* strain from the former Soviet Union [J]. Adv Exp Med Biol, 2007, 603 : 17-22.
- [10] Eppinger M, Worsham PL, Nikolich MP, et al. Genome sequence of the Deep-Rooted *Yersinia pestis* strain angola reveals new insights into the evolution and pangenome of the plague bacterium [J]. J Bacteriol, 2010, 192(6) : 1685-1699.
- [11] Eppinger M, Guo ZB, Sebastian Y, et al. Draft genome sequences of *Yersinia pestis* isolates from natural foci of endemic plague in China [J]. J Bacteriol, 2009, 191(24) : 7628-7629.
- [12] Shen X, Wang Q, Xia L, et al. Complete genome sequences of *Yersinia pestis* from natural foci in China [J]. J Bacteriol, 2010, 192 (13) : 3351-3352.
- [13] 刘金华,贺丹,杨艳秋,等. 多位点测序分型技术在病原微生物分型鉴定中的应用[J]. 微生物学通报, 2007, 34(6) : 1188-1191.
- [14] Roumagnac P, Weill FX, Dolecek C, et al. Evolutionary history of *Salmonella typhi* [J]. Science, 2006, 314 (5803) : 1301-1304.
- [15] 张思仲. 人类基因组的单核苷酸多态性及其医学应用[J]. 中华医学遗传学杂志, 1999, 16(2) : 119-122.
- [16] Williams LM, Ma X, Boyko AR, et al. SNP identification, verification, and utility for population genetics in a non-model genus [J]. BMC Genetics, 2010, 11 : 32.
- [17] Achtman M, Morelli G, Zhu P, et al. Microevolution and history of the plague bacillus, *Yersinia pestis* [J]. J Bacteriol, 2004, 101 (51) : 17837-17842.
- [18] 宋亚军,杨瑞馥. 鼠疫耶尔森氏菌布氏田鼠疫源地菌株91001全基因组序列测定及初步分析[D]. 北京:中国人民解放军军事医学科学院,2003:33-70.
- [19] Zhang W, Qi W, Albert TJ, et al. Probing genomic diversity and evolution of *Escherichia coli* O157 by single nucleotide polymorphisms [J]. Genome Res, 2006, 16(6) : 757-767.
- [20] Gutacker MM, Smoot JC, Migliaccio CAL, et al. Genome-Wide analysis of synonymous single nucleotide polymorphisms in mycobacterium tuberculosis complex organisms: resolution of genetic relationships among closely related microbial strains [J]. Genetics, 2002, 162(4) : 1533-1543.
- [21] Octavia S, Lan R. Single-Nucleotide-Polymorphism typing and genetic relationships of *Salmonella enterica* serovar typhi isolates [J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(11) : 3795-3801.
- [22] Achtman M, Zurth K, Morelli G, et al. *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis* [J]. PNAS, 1999, 11(23) : 14043-14048.
- [23] 周冬生,童宗中,宋亚军,等. 鼠疫耶尔森菌生物型变异遗传基础的研究和生物型:田鼠型的提出[J]. 解放军医学杂志, 2004, 29(3) : 211-215.
- [24] 李艳君. 鼠疫耶尔森氏菌基因组多态性研究及快速鉴定溯源系统的建立[D]. 北京:中国人民解放军军事医学科学院, 2009: 14-24.
- [25] 崔玉军. 鼠疫耶尔森氏菌基因组多态性数据库及快速鉴定溯源系统的研究[D]. 北京:中国人民解放军军事医学科学院, 2008: 7-58.
- [26] Touchman JW, Wagner DM, Hao J, et al. A North American *Yersinia pestis* draft genome sequence: SNPs and phylogenetic analysis [J]. PLoS ONE, 2007, 2(2) : e220.
- [27] Auerbach RK, Tuanyok A, Probert WS, et al. *Yersinia pestis* evolution on a small timescale: comparison of whole genome sequences from North America [J]. PLoS ONE, 2007, 2(8) : e770.
- [28] Pearson T, Busch JD, Ravel J, et al. Phylogenetic discovery bias in *Bacillus anthracis* using single-nucleotide polymorphisms from whole-genome sequencing [J]. PNAS, 2004, 101(37) : 13536-13541.

收稿日期:2010-10-22