

沙雷氏菌CM01来源硫氧还蛋白的抗铬(VI)能力研究

王梦佳, 吴焰清, 肖雨, 肖虹*

重庆医科大学公共卫生学院, 重庆

收稿日期: 2023年11月26日; 录用日期: 2023年12月28日; 发布日期: 2024年2月2日

摘要

目的: 通过克隆*Serratia sp.* M01中的硫氧还蛋白编码基因E. coli BL21(DE3)中, 探究工程菌的抗铬(VI)能力。方法: 以*Serratia sp.* CM01的DNA作模板, 采用PCR扩增E. coli BL21(DE3)表达以构建工程菌。以测定工程菌的Cr(VI)耐受、生长曲线, 确定工程菌的抗Cr(VI)能力。结果: 利用基因克隆技术, 成功构建出trxA、trxC工程菌。测定两种工程菌的生长情况, 发现在无Cr(VI)条件下, 三种工程菌生长曲线没有差异($P > 0.05$)。在Cr(VI)的胁迫下, 两种工程菌在稳定期的菌量为:*Serratia sp.* CM01 > trxA \approx trxC > Control ($P < 0.05$); 两种工程菌的Cr(VI)耐受能力为*Serratia sp.* CM01 > trxA > trxC > Control ($P < 0.05$)。结论: trxA、trxC基因编码的蛋白均具备的耐受Cr(VI)能力, 工程菌trxA抗Cr(VI)能力强于trxC, 工程菌具有治理实际环境中Cr(VI)污染的潜力。

关键词

硫氧还蛋白, 基因克隆

Analysis of the Chromium (VI) Resistance of the Thioredoxin of *Serratia sp.* CM01

Mengjia Wang, Yanqing Wu, Yu Xiao, Hong Xiao*

School of Public Health, Chongqing Medical University, Chongqing

Received: Nov. 26th, 2023; accepted: Dec. 28th, 2023; published: Feb. 2nd, 2024

Abstract

Objective: The engineered bacteria's chromium (VI) resistance was investigated by cloning the

*通讯作者。

文章引用: 王梦佳, 吴焰清, 肖雨, 肖虹. 沙雷氏菌 CM01 来源硫氧还蛋白的抗铬(VI)能力研究[J]. 生物物理学, 2024, 12(1): 1-8. DOI: 10.12677/biphys.2024.121001

thioredoxin-encoding genes *trxA* and *trxC* from *Serratia sp.* CM01, constructing a prokaryotic expression vector and transforming it into *E. coli* BL21(DE3). **Methods:** The DNA of *Serratia sp.* CM01 was used as a template to amplify the *trxA* and *trxC* genes by PCR, and the expression vectors pET-28a(+)-*trxA* and pET-28a(+)-*trxC* were constructed and transformed into *E. coli* BL21(DE3) for expression to construct the engineering bacteria. The Cr(VI) resistance of the engineered bacteria was determined by measuring the Cr(VI) tolerance and growth curves of the engineered bacteria. **Results:** By using gene cloning technology, *trxA* and *trxC* engineering bacteria were successfully constructed. The growth of the two engineered bacteria showed no difference under Cr(VI)-free circumstances ($P > 0.05$). In Cr(VI) presence, the viable bacterial cell count during the stabilization phase was *Serratia sp.* CM01 > *trxA* \approx *trxC* > Control ($P < 0.05$), and the tolerance rate of Cr(VI) was ranked *Serratia sp.* CM01 > *trxA* > *trxC* > Control ($P < 0.05$). **Conclusion:** Cr(VI)-tolerance of the proteins corresponding to the *trxA* and *trxC* genes. *trxA* has a stronger anti-Cr(VI) ability than *trxC*. It can potentially handle Cr(VI) pollution in the virtual environment.

Keywords

Thioredoxin, Gene Cloning

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

近年来, 研究者们通过分离鉴定发现了多种有抗 Cr(VI)能力的细菌, 如 *Serratia sp.* S2 [1]、*Bacillus cereus* [2]、*Bacillus licheniformis* [3]、*Sporosarcina saromensis* [4]等。虽然大部分关于研究都集中在菌株的分离培养上, 但目前针对其中的抗铬基因和蛋白进行的机制研究也在逐步开展。但这些研究缺乏全面性和系统性, 本项目组思考是否能利用现代组学技术, 以基因组学为基础, 结合蛋白组学进行多组学联合分析, 形成“DNA - 蛋白质”关联网, 从而更全面地了解细菌在外源 Cr(VI)胁迫下的分子响应机制。

在前期研究中, 本课题组从重庆市某中小电镀厂聚集地的 Cr(VI)污染区域的淤泥中分离筛选得到对外源性高浓度 Cr(VI)具有一定抗性的 *Serratia sp.* CM01 [5], 且采用 iTRAQ 蛋白定量技术研究了野生菌与高浓度 Cr(VI)驯化菌中 Cr(VI)抗性相关的差异蛋白[6], 发现 CM01 在应对 Cr(VI)胁迫时表现出复杂的生物网络关联性, 可能与能量代谢、氨基酸代谢、应激反应等多通路有关。研究者认为要全面系统进行细菌除 Cr(VI)机制分析, 不能缺乏基因水平的基础支撑。因此本研究利用前期的 *Serratia sp.* CM01 蛋白组和基因组分析结果[7], 筛选出其与 Cr(VI)响应的相关基因, 其中的 *trxA* 基因编码的是 A 型硫氧还蛋白(*trxA*), 而全基因组测序结果显示 *Serratia sp.* CM01 中还存在有与之相似的 C 型硫氧还蛋白(*trxC*)。目前, 硫氧还蛋白中被认为具有维持生物体内氧化还原平衡、调控生物信号传导、DNA 及蛋白质损伤修复、抗逆环境等多种功能[8], 而高浓度 Cr(VI)也可认为是逆环境的一种条件。为探究 *Serratia sp.* CM01 中硫氧还蛋白 *trxA* 和 *trxC* 的抗 Cr(VI)功能, 选取 *trxA*、*trxC* 基因进行克隆并构建工程菌, 并通过工程菌的 Cr(VI)抵抗特性实验进一步验证该基因表达后蛋白的 Cr(VI)抵抗能力, 为后续将微生物实际应用于治理环境中 Cr(VI)污染提供新的思路。

2. 实验材料和方法

2.1. 实验材料

Serratia sp. CM01 来源于本课题组前期在长期被高浓度 Cr(VI)污染的环境中分离筛选出的一株能够

耐受高浓度 Cr(VI) 的野生沙雷氏菌 [5]。E. coli. DH5 α 、E. Coli. BL21 (DE3)、DNA marker 预染蛋白 Marker III (MP204)、DNA PCR 产物纯化试剂盒、DNA 琼脂糖凝胶回收试剂盒、质粒小提试剂盒、2 \times pfu PCR Master Mix (高保真酶), 购自天根生化科技(北京)有限公司。限制性核酸内切酶、T4 DNA 连接酶来源于宝日医生物技术(北京)有限公司。引物合成和 DNA 测序由上海生工生物科技有限公司完成。SDS-PAGE 蛋白凝胶试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天生物技术, 抗 His 标签兔多克隆抗体、羊抗兔 IgG-HRP 购自北京博奥森生物技术有限公司, 超敏 ECL 化学发光试剂盒购自美国 millipore 公司。pET-28a(+) 中作为 ChrA1 和 Srpc 基因的表达载体, 具有 Kana 抗性, 购自 Novagen 公司, 含有 pET-28a(+) 空质粒的 E. coli. BL21 (DE3) 作为对照菌, 由本实验室自行制备。

2.2. 细菌培养

将 *Serratia sp.* CM01 从 -80°C 冰箱取出, 接入 LB 培养基中, 200 rpm, 37°C , 复苏 12 h。用接种环取菌液在 LB 固体培养基上进行分区划线, 37°C 静置过夜培养。次日, 挑取单菌落接入新的 LB 液体培养基中, 200 rpm, 37°C , 过夜培养, 得纯化菌液, 用于 DNA 模板提取。

2.3. 硫氧还蛋白对应的基因引物设计和克隆

根据 NCBI 中 *Serratia sp.* CM01 的全基因组测序结果 (PRJNA675313), 已知的 *trxA*、*trxC* 基因序列, 利用软件 Primer Premier 5.0 设计特异性 PCR 上下游引物, 并在两端末端引入下游操作所需的特异性限制性核酸内切酶的酶切位点, 碱基序列发送至上海生工合成引物, 具体序列见表 1。

Table 1. Primer pairs sequences

表 1. 引物序列

引物名称	碱基序列(5'-3')	酶切位点
<i>trxA</i> -F	<u>CCCAAGCTT</u> CTAACGCCTGGATGGG	Hind III
<i>trxA</i> -R	CCGGAATTCAAAACACGGGCTGAGT	EcoR I
<i>trxC</i> -F	<u>CCGGAATTC</u> TTGTCGTCGTCACTGC	EcoR I
<i>trxC</i> -R	CCCAAGCTTAAATGGCGGGATACGGC	Hind III

注: 1) 下划波浪线部分为保护碱基。2) 下划直线部分为酶切位点。

2.4. 工程菌构建

将 *Serratia sp.* CM01 在 LB 培养基中培养至平台期, 采用水煮沸模板法获得其基因组 DNA [8]。以提取的 *Serratia sp.* CM01 的 DNA 作为模板, 以 2 \times Pfu Mastertmix (高保真酶) 进行目的基因的扩增, 其中设置 *trxA* 与 *trxC* 的退火温度分别为 58.8°C 与 62°C , 延伸时间均为 30 s。所有扩增产物均采用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 随后用通用型 DNA 纯化回收试剂盒(离心柱型)进行纯化。

采用限制性内切酶对纯化的 PCR 产物和表达载体 pET-28a(+) 进行双酶切处理, 采用通用型 DNA 纯化回收试剂盒将所得产物纯化。将目标 DNA 片段连接到 pET-28a(+), 生成重组质粒 pET-28a(+)-*trxA*、pET-28a(+)-*trxC*。将重组质粒转移到大肠杆菌 BL21 (DE3) 中, 构建 *trxA* 和 *trxC* 工程菌。以空载体 pET-28a(+) 为对照菌株, 采用 LB 固体培养基(含 50 $\mu\text{g/ml}$ 卡那霉素)和基因扩增技术(PCR)筛选含有目的基因的细菌, 通过 DNA 测序验证工程菌中目的基因的碱基序列。

2.5. 工程菌目的蛋白的表达及鉴定

在含有 50 $\mu\text{g/ml}$ 卡那霉素的 LB 液体培养基中分别接入两种工程菌, 培养至对数期 ($\text{OD} \approx 0.6$), 加

入诱导剂 IPTG, 30°C 培养 6 h, 同时诱导含空 pET-28a(+)质粒的 BL21(DE3)作为阴性对照。采用水煮法提取工程菌中蛋白, 采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒(增强型)测定蛋白浓度。对提取的蛋白进行 10% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和 Western Blotting 免疫印记实验, 测定蛋白的大小和表达水平[10]。

2.6. 工程菌的抗铬能力及机制研究

2.6.1. 工程菌的生长曲线

在含有 50 $\mu\text{g/ml}$ 卡那霉素的 LB 液体培养基中分别接入两种工程菌, 37°C 过夜培养。将菌液调制 0.5 麦氏浊度, 按 1:100 的比例分别接入不含 Cr(VI)和含 5 mg/L Cr(VI)的 LB 液体培养基中, 同时以含有 pET-28a(+)空质粒的 BL21(DE3)作为对照组, 使用 BIOSCREEN 全自动生长曲线分析仪测定其 24 h 的生长曲线。

2.6.2. 工程菌的铬(VI)耐受能力

在 LB 液体培养基中分别接入两种工程菌、野生菌株 CM01 和对照株 BL21 (DE3), 37°C 过夜培养。将 4 种菌液稀释至 0.5 麦氏浊度, 按 1:100 分别接入含 Cr₂O₇²⁻(0, 5, 10, 15, 20 mg/L)的 LB 液体培养基中, 37°C 培养 24 h, 用紫外分光光度计测定 OD₆₀₀。

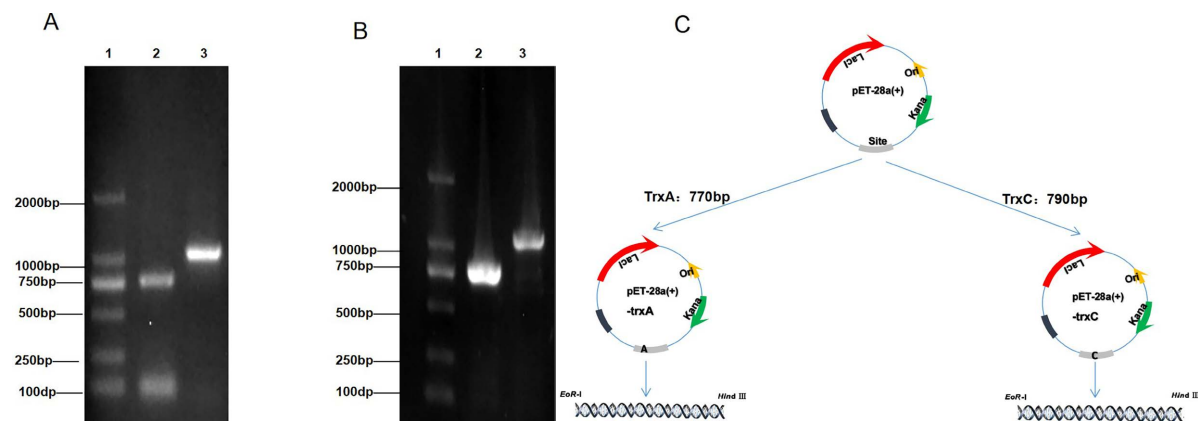
2.7. 统计学分析

所有实验组都设置 3 个平行对照。采用统计软件 SPSS19.0 进行统计分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3. 结果与分析

3.1. 成功构建工程菌 *trxA* 和 *trxC*

如图 1 所示, *trxA*、*trxC* 工程菌中分别扩增出, *trxA*、*trxC* 基因, 其特异性引物对应的电泳条带大小与预期相符合(*trxA* 基因: 770 bp; *trxC* 基因: 790 bp)。T7/T7 TER 通用引物对扩增出来片段由于含有 pET-28a(+)的部分基因和 T7 启动子下游的多克隆位点及 His 编码序列等基因, 因此条带大小理论上应大于特异性引物对扩增出的条带约 230 bp, 工程菌中 *trxA* 和 *trxC* 基因的通用引物对条带大小大概在 1000 bp 处, 符合预期结果, 说明 *trxA*、*trxC* 工程菌构建成功(图 1A 和图 1B), 重组质粒的建立过程如图 1(C)所示。



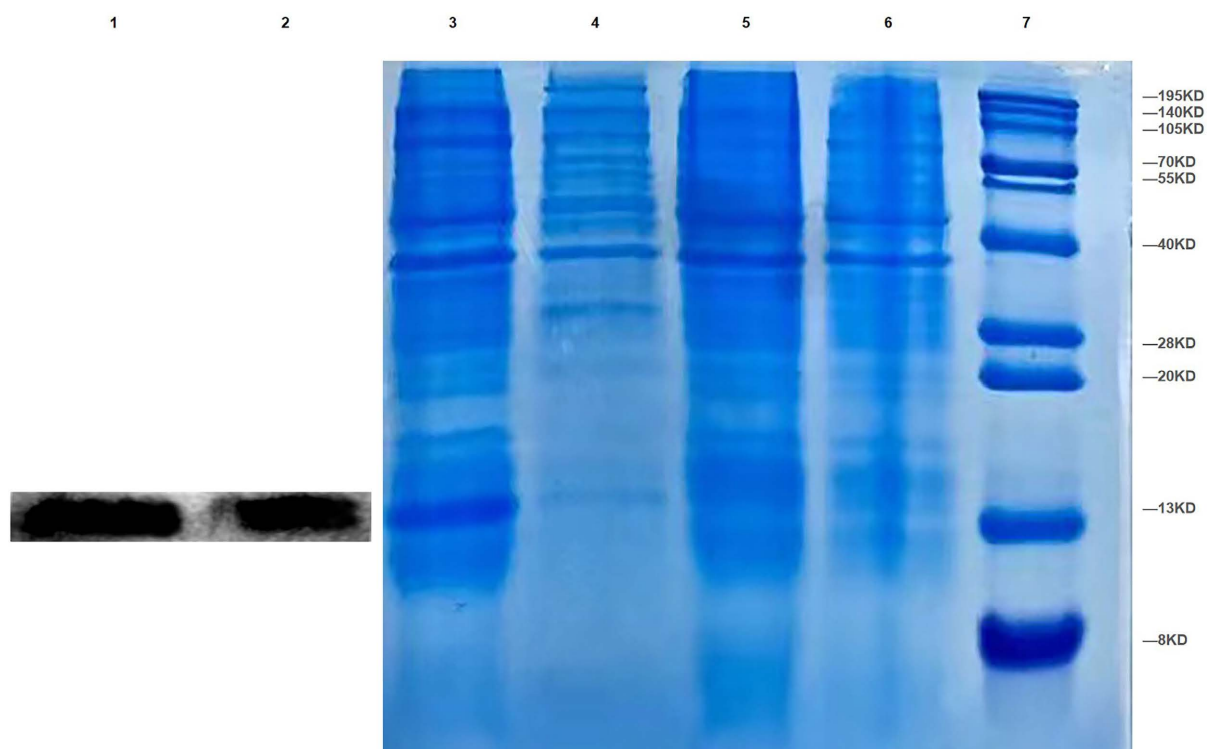
注: 1: DNA Marker(2000); 2: *trxA*/*trxC* 条带 - 特异性引物对; 3: *trxA*/*trxC* 条带-T7 通用引物对

Figure 1. PCR identification of pET-28a(+)-*trxA*/*trxC* engineering strains

图 1. 重组表达质粒 pET-28a(+)-*trxA*、*trxC* 的 PCR 鉴定

3.2. 工程菌蛋白的表达及鉴定

两种工程菌中的蛋白表达情况如图 2 所示。由于工程菌蛋白进行表达时会融合一段 pET-28a 序列本身所编码的肽段, 因此目的蛋白条带大小比预测值略大(预测值: trxA 蛋白 11.77 KDa, trxC 蛋白 14.15 KDa), trxA 蛋白实际表达大小约为 13 KDa (3 泳道), trxC 蛋白实际表达约为 16 KDa (5 泳道)。说明工程菌中 trxA、trxC 蛋白表达成功。



注: 1: trxA 工程菌-Western Blotting; 2: trxC 工程菌-Western Blotting; 3: trxA 工程菌(诱导后)-SDS-PAGE; 4: trxA 工程菌(诱导前)-SDS-PAGE; 5: trxC 工程菌(诱导后)-SDS-PAGE; 6: trxC 工程菌(诱导前)-SDS-PAGE; 7: Protein Marker

Figure 2. SDS-PAGE and Western blotting analysis of trxA/trxC protein in two engineered strains

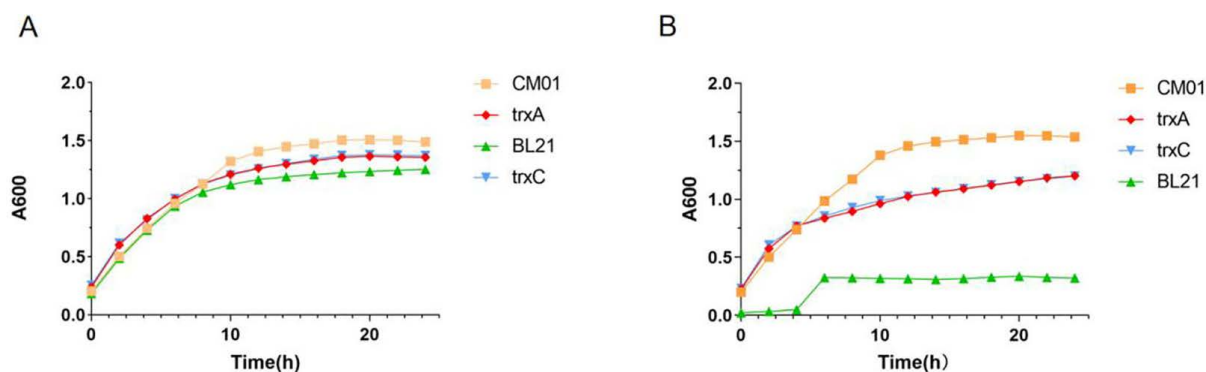
图 2. 两种工程菌中 trxA/trxC 蛋白的 SDS-PAGE 电泳图及 Western blotting 分析

3.3. 工程菌的生长曲线

采用全自动生长曲线分析仪测定两种工程菌、*Serratia sp.* CM01 和 Control strain (BL21(DE3)) 的生长曲线(图 3), 发现 Cr(VI) 对菌株生长有显著胁迫作用。在没有 Cr(VI) 胁迫下(图 3A), 两种菌的生长曲线与对照组 BL21 (DE3) 的生长曲线没有明显差异($P > 0.05$)。在 Cr(VI) 胁迫的条件下(图 3B), 工程菌与对照组 BL21 (DE3) 表现出不同的生长趋势, 并且 trxA 和 trxC 到达稳定期时间基本相同, 稳定期菌量为 $CM01 > trxA \approx trxC > BL21 (DE3)$ ($P < 0.05$), 说明工程菌内存在的 trxA、trxC 蛋白可帮助其适应 Cr(VI) 胁迫环境。

3.4. 工程菌铬耐受能力

根据两种工程菌、*Serratia sp.* CM01 和对照株 BL21 (DE3) 菌株在不同浓度 Cr(VI) 的 LB 培养基中存活 24 h 后的 A600 值, 可以看出各菌株对 Cr(VI) 的耐受能力有所不同。结果如图 4 所示, 各菌对 Cr(VI) 的耐受能力依次为: *Serratia sp.* CM01 $>$ trxA $>$ trxC $>$ BL21 (DE3) ($P < 0.05$)。即工程菌 trxA、trxC 对 Cr(VI) 的抗性强于对照菌株 BL21 (DE3)。在 5 mg/L 和 10 mg/L Cr(VI) 浓度下, 对照菌株 BL21 (DE3) 几乎无法生



注: (A) 两种工程菌在没有 Cr(VI)胁迫下的生长曲线。(B) 两种工程菌在 Cr(VI)胁迫下的生长曲线。

Figure 3. Growth curves of two engineered bacteria

图 3. 两种工程菌的生长曲线

长, 不具备在含 Cr(VI)环境中生存的能力, 而通过基因重组构建得到的 trxA、trxC 工程菌生长情况较好, 表明 trxA、trxC 蛋白赋予工程菌一定程度的耐 Cr(VI)能力, 且 trxA 蛋白赋予工程菌的抗 Cr(VI)能力强于 trxC 蛋白。

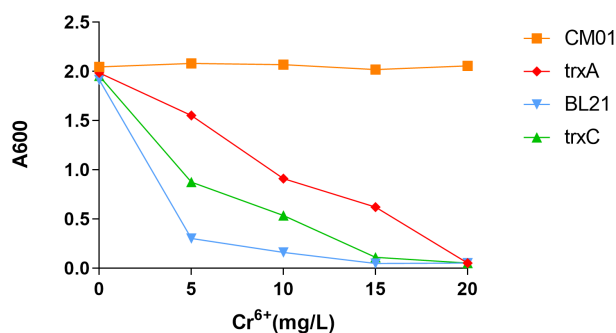


Figure 4. Chromium tolerance of strains under different Cr(VI) concentration

图 4. 不同 Cr(VI)浓度下各菌株的铬耐受能力

4. 讨论

微生物法具有经济效益高、环保等优点, 被认为是修复 Cr(VI)环境污染的主流方法之一[11]。但由于野生型菌株存在的 Cr(VI)还原效率低, 对 Cr(VI)耐受能力差, 以及会对人体健康造成危害等问题, 阻碍了其在实际生活中的应用。本文基于对以前从铬(VI)污染的环境中分离出的耐铬 *Serratia sp.* CM01 菌株进行的蛋白组和全基因组分析结果[7], 筛选出了抗 Cr(VI)相关基因 trxA、trxC。该基因对应的硫氧还蛋白是一类广泛存在于原核和真核生物体内的蛋白质[8]。迄今, 已有对多个物种的硫氧还蛋白结构进行了解析和功能的初步研究。通过比对发现, 在不同的物种中发现的硫氧还蛋白在进化上高度保守, 其分子量约为 12 kDa 左右, 为小分子蛋白质且具有 -Cys-Gly-Pro-Cys-(-CGPC-)的功能活性中心位点[12]。目前, 已有的研究发现的硫氧还蛋白的类型主要可以分为 A 型硫氧还蛋白(trxA)、C 型硫氧还蛋白(trxC)、F 型硫氧还蛋白(trxF)、H 型硫氧还蛋白(trxH)等多个类型[13]-[18]。其分型的主要依据是氨基酸的序列及蛋白结构的不同。不同类型硫氧还蛋白具有不同的生物功能, 在生物中的分布也不同。由硫氧还蛋白(Thioredoxin, trx)、硫氧还蛋白还原酶(Thioredoxin reductase, trxR)、还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)构成的硫氧还蛋白系统在生物体中能催化一系列生理生化反应和功能维持, 参与众多生理过程, 发挥着重要的

生物学功能[19], 但与其相关的调控机制尚未明确, 仍待更深入的探索。

本研究选取了 *Serratia sp.* CM01 中的硫氧还蛋白 *trxA*、*trxC* 为研究对象, 利用基因工程技术, 构建了两种基因工程菌, 并通过相关蛋白的异源表达使菌株具有抗铬能力, 但工程菌的铬耐受能力弱于 *Serratia sp.* CM01, 表明 *Serratia sp.* CM01 的抗 Cr(VI) 过程不仅依赖于硫氧还蛋白系统, 还依赖于全基因组中与铬代谢相关的其他基因共同作用。与野生菌株相比, 工程菌的 Cr(VI) 抗性没有那么强, 但解决了野生型菌株不可控性和可能存在的人体危害作用, 因此不可否认工程菌具有处理 Cr(VI) 污染的潜力, 可通过进一步研究应用于实际环境中进行铬污染治理。

致 谢

本项目所使用的大型仪器设备均由重庆医科大学公共卫生学院提供。

基金项目

本研究由国家自然科学基金(项目编号: cstc2020jcyj-msxmX0540)和重庆医科大学学生科研创新项目(项目编号: SIEP202142)提供资助。

参考文献

- [1] Dong, L., Zhou, S., He, Y., Jia, Y., Bai, Q., Deng, P., Gao, J., Li, Y. and Xiao, H. (2018) Analysis of the Genome and Chromium Metabolism-Related Genes of *Serratia sp.* S2. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **185**, 140-152. <https://doi.org/10.1007/s12010-017-2639-5>
- [2] Hossain, M., Tasnim, S., Safa, A., Rayhan, A.B.H., Khan, M.T.I.A., Bulbul, N., Sadique, A., Ahsan, G.U. and Jime, J.S. (2020) Draft Genome Sequence of *Bacillus Cereus* TN10, a Chromium-Resistant and -Reducing Strain Isolated from Tannery Effluent. *Microbiology Resource Announcements*, **9**, e00603-20. <https://doi.org/10.1128/MRA.00603-20>
- [3] Banerjee, S., Misra, A., Chaudhury, S. and Dam, B. (2019) A *Bacillus* Strain TCL Isolated from Jharia Coalmine with Remarkable Stress Responses, Chromium Reduction Capability and Bioremediation Potential. *Journal of Hazardous Materials*, **367**, 215-223. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.12.038>
- [4] Li, J., Tang, C., Zhang, M., Fan, C., Guo, D., An, Q., Wang, G., Xu, H., Li, Y., Zhang, W., Chen, X. and Zhao, R. (2021) Exploring the Cr(VI) Removal Mechanism of *Sporosarcina Saromensis* M52 from a Genomic Perspective. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **225**, Article 112767. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112767>
- [5] 刘媛, 白群华, 何劲, 等. 耐铬(VI)粘质沙雷氏菌 CM01 的筛选鉴定及其铬(VI)代谢特性研究[J]. 现代预防医学, 2020, 47(17): 3212-3216.
- [6] 刘媛, 顾芮嘉, 邱衍伦, 等. 基于同位素标记相对和绝对定量技术研究耐铬(VI)菌株 CM01 的蛋白定量组学[J]. 微生物学通报, 2020, 47(10): 3183-3195.
- [7] 李星龙. 耐铬沙雷氏菌 CM01 基因组测序分析及关键基因对铬代谢的影响研究[D]: [硕士学位论文]. 重庆: 重庆医科大学, 2022. <https://doi.org/10.27674/d.cnki.gcyku.2022.001159>
- [8] Lu, J. and Holmgren, A. (2014) The Thioredoxin Antioxidant System. *Free Radical Biology & Medicine*, **66**, 75-87. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.036>
- [9] 谭小庆, 白群华, 韩令力, 等. 耐铬沙雷氏菌 CQMUS2 FMN_{red} 基因片段的克隆与序列分析[J]. 生物技术, 2013, 23(5): 8-11.
- [10] Decorosi, F., Tatti, E., Mini, A., Giovannetti, L. and Viti, C. (2009) Characterization of Two Genes Involved in Chromate Resistance in a Cr(VI)-Hyper-Resistant Bacterium. *Extremophiles: Life under Extreme Conditions*, **13**, 917-923. <https://doi.org/10.1007/s00792-009-0279-6>
- [11] 莫槟华, 黄慧敏, 刘素婷, 王磊. 微生物治理铬污染的研究进展[J]. 广东化工, 2021, 48(7): 140-141.
- [12] Kim, K.P., Hahm, B.K. and Bhunia, A.K. (2007) The 2-Cys Peroxiredoxin-Deficient *Listeria Monocytogenes* Displays Impaired Growth and Survival in the Presence of Hydrogen Peroxide *in Vitro* but Not in Mouse Organs. *Current Microbiology*, **54**, 382-387. <https://doi.org/10.1007/s00284-006-0487-6>
- [13] 许莲蓉, 乔振华. 硫氧还蛋白与人类疾病相关性的研究进展[J]. 国际儿科学杂志, 2004, 31(4): 218-220.
- [14] Kuhns, L.G., Wang, G. and Maier, R.J. (2015) Comparative Roles of the Two *Helicobacter Pylori* Thioredoxins in

- Preventing Macromolecule Damage. *Infection and Immunity*, **83**, 2935-2943. <https://doi.org/10.1128/IAI.00232-15>
- [15] Zhang, H., Cheng, D., Liu, H. and Zheng, H. (2018) Differential Responses of a Thioredoxin-Like Protein Gene to *Vibrio Parahaemolyticus* Challenge in the Noble Scallop *Chlamys Nobilis* with Different Total Carotenoids Content. *Fish & Shellfish Immunology*, **72**, 377-382. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.11.020>
- [16] Peng, M., Cascio, D. and Egea, P.F. (2015) Crystal Structure and Solution Characterization of the Thioredoxin-2 from *Plasmodium Falciparum*, a Constituent of an Essential Parasitic Protein Export Complex. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **456**, 403-409. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.11.096>
- [17] Naranjo, B., Diaz-Espejo, A., Lindahl, M. and Cejudo, F.J. (2016) Type-*f* Thioredoxins Have a Role in the Short-Term Activation of Carbon Metabolism and Their Loss Affects Growth under Short-Day Conditions in *Arabidopsis Thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, **67**, 1951-1964. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw017>
- [18] Marchand, C.H., Vanacker, H., Collin, V., Issakidis-Bourguet, E., Maréchal, P.L. and Decottignies, P. (2010) Thioredoxin Targets in *Arabidopsis* Roots. *Proteomics*, **10**, 2418-2428. <https://doi.org/10.1002/pmic.200900835>
- [19] 占冬波, 刘海发, 龙如意, 等. 猪链球菌 2 型硫氧还蛋白还原酶介导细菌应激与致病作用[J/OL]. 微生物学通报, 1-9. <https://doi.org/10.13344/j.microbiol.china.230530>, 2023-11-20.