

DOI:10.13350/j.cjpb.220407

· 论著 ·

猪链球菌 2 型硫氧还蛋白还原酶多克隆抗体制备 与亚细胞定位分析*

赖芸, 占冬波, 蒋小武**

(宜春学院医学院, 江西宜春 336000)

【摘要】 目的 制备猪链球菌 2 型(*Streptococcus suis*, SS2)硫氧还蛋白还原酶(SsTrxR)抗体, 分析其在 SS2 中的定位。

方法 对猪链球菌 2 型 *trxR* 基因进行生物信息学分析, PCR 扩增 *TrxR* 基因, 酶切、连接, 构建重组表达载体 pET30a-*trxR*。IPTG 低温诱导表达 SsTrxR 重组蛋白, 镍柱亲和纯化目的蛋白。皮下接种 SsTrxR 至日本大耳白兔, 获取多克隆抗血清。Western blot 分析 SsTrxR 抗血清特异性与在 SS2 中的定位。 **结果** SsTrxR 因子与细菌硫氧还蛋白还原酶的氨基酸序列存在多个保守区域与位点, 同属内其它代表性链球菌硫氧还蛋白还原酶氨基酸序列同源性在 68.5% 以上, 拥有 Cys-Xaa-Xaa-Cys 基序。成功构建 pET30a-*trxR* 表达质粒, SsTrxR 原核蛋白呈可溶性表达, 过镍柱纯化, 获得目的蛋白。Western blot 检测结果显示 SsTrxR 与抗血清反应性好, SsTrxR 因子分布于细菌胞浆内。 **结论** 猪链球菌 2 型存在硫氧还蛋白还原酶 SsTrxR, 制备的兔源 SsTrxR 多克隆抗体特异性好, 且该因子为胞内蛋白, 为开展 TrxR 因子在 SS2 感染与免疫过程中发挥的功能研究奠定了基础。

【关键词】 猪链球菌 2 型; 硫氧还蛋白还原酶; 多克隆抗体; 定位分析

【中图分类号】 R378.12

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)04-0410-05

[Journal of Pathogen Biology. 2022 Apr;17(4):410-414.]

Preparation of polyclonal serum and subcellular localization analysis of thioredoxin reductase in *Streptococcus suis* type 2

LAI Yun, ZHAN Dong-bo, JIANG Xiao-wu (College of Medicine, Yichun University, Yichun 336000, China)

【Abstract】 **Objective** To express and prepare the recombinant thioredoxin reductase protein (SsTrxR) with its rabbit monoclonal antisera of *Streptococcus suis* type 2 (*S. suis* type 2, SS2) and analyze its localization in SS2. **Methods** Bioinformatic analysis was conducted to align and predict the SsTrxR protein homology and subcellular localization. The *trxR* gene was amplified and cloned to the recombinant expression vector pET30a. Then, the plasmid pET30a-*trxR* was transformed into *E. coli* Rosetta (DE3) and prokaryotic expressed by IPTG. The recombinant protein was purified using Ni²⁺ affinity chromatography with 50 mmol/L imidazole cleaning buffer and 400 mmol/L imidazole elution buffer, and subcutaneously immunized to obtain polyclonal antiserum in rabbits. Antiserum specificity and subcellular localization of SsTrxR were further determined by Western blotting. **Results** Multiple conserved amino acid sequences and a Cys-Xaa-Xaa-Cys motif of the SsTrxR were found as compared with the reported bacterial TrxR proteins. Sequence homology of the TrxR was above 68.5% between SS2 and other *Streptococcus* species. The recombinant expression plasmid of pET30a-*trxR* was successfully constructed and the prokaryotic SsTrxR protein was purified. The molecular weight of the purified protein is 36 ku. The SsTrxR had good reactivity with the immunized rabbit antiserum. The SsTrxR factor was confirmed to distribute within the bacterial cytoplasm. **Conclusion** The thioredoxin reductase of SsTrxR is conservatively harbored and intracellular localized within SS2. The prepared rabbit anti-SsTrxR polyclonal antibody showed good reaction and specificity to this factor. All these data would contribute to further study on the biological functions evaluation of the SsTrxR factor in SS2 infection.

【Key words】 *Streptococcus suis* type 2; thioredoxin reductase; polyclonal antibody; subcellular localization

***猪链球菌(*Streptococcus suis*, *S. suis*)是一种重要的人畜共感染、兼性厌氧的革兰阳性球菌, 可诱导猪和人产生败血症、脓毒症、脑膜炎等侵袭性感染^[1-2]。猪链球菌 2 型(*S. suis* type 2, SS2)是从病猪和患者体内分离较多、致病性强的一种致病菌。我国于 1998 年江苏省和 2005 年四川省两地分别暴发了人感染 2 型猪

* **【基金项目】** 国家自然科学基金项目(No. 32060791); 江西省自然科学基金(No. 20202BABL215025)。

** **【通讯作者】** 蒋小武, E-mail: xwjia@zju.edu.cn

【作者简介】 赖芸(1997-), 女, 江西赣州人, 本科, 主要研究方向: 人兽共患病研究。E-mail: 811152848@qq.com

链球菌公共卫生事件,引起 52 人死亡^[3]。

机体遭遇致病菌侵染时,可激活宿主巨噬细胞和中性粒细胞介导呼吸爆发反应产生大量活性氧(ROS)或活性氮(RNS)来抵抗病原体,高浓度的 ROS 和 RNS 可使脂质、蛋白质等生物大分子损伤,产生氧化应激而诱导细胞内氧化还原状态失衡,最终导致细胞凋亡或坏死^[4-5]。硫氧还蛋白系统由硫氧还蛋白(Thioredoxin, Trx)、硫氧还蛋白还原酶(Thioredoxin Reductase, TrxR)、硫氧还蛋白过氧化物酶(Thioredoxin Peroxidase, TrxP)和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)组成,可催化蛋白质二硫键的氧化、还原和异构化,是维持胞内氧化还原平衡状态的蛋白调控系统之一^[5-6]。细菌硫氧还蛋白家族因子通常具有保守的 Cys-Xaa-Xaa-Cys 基序,通过修饰、调控细菌功能蛋白的表达与分泌,清除体内外的氧化应激损伤以促进细菌的生长与繁殖^[7-9],该系统已成为近年来病原菌感染与宿主互作机制研究的热点。

本研究对猪链球菌 2 型 *trxR* 基因进行了生物信息学分析,原核表达、纯化 SsTrxR 蛋白,制备 anti-SsTrxR 多克隆抗体,并检测了 SsTrxR 因子在细菌中的定位。该研究为继续探索猪链球菌 2 型硫氧还蛋白还原酶蛋白(SsTrxR)在 SS2 感染与免疫过程中的生物学效应,提供了基础理论数据。

材料与方 法

1 材 料

1.1 菌株和质粒 猪链球菌 2 型菌株 HA9801 为实验室保存,pET30a 表达载体、*E. coli* DH5 α 与 *E. coli* Rosetta 感受态细胞购于北京全式金公司。

1.2 主要试剂与设备 细菌基因组提取试剂盒购于北京 Transgen 公司;PCR 高保真酶购于北京 Transgen 公司;二抗 HRP conjugated goat anti-rabbit IgG 购于武汉 Proteintech 公司。PCR 扩增仪购于德国 Eppendorf 公司;蛋白电泳与转膜仪购于美国 Biorad 公司;核酸电泳仪购于北京君意公司;凝胶成像仪购于上海培清公司;Nanodrop 2000 核酸蛋白浓度测定仪购于美国热电公司;化学发光成像分析系统购于美国 Thermo 公司。

1.3 实验动物 2 月龄雌性日本大耳白兔,购自湖南斯莱克实验动物有限公司。

2 方 法

2.1 猪链球菌 2 型 *TrxR* 基因生物信息学分析 NCBI 生物信息学数据库 Gene 栏目中检索下载不同细菌硫氧还蛋白还原酶(Thioredoxin Reductase, *trxR*)基因核苷酸序列,BlastN 分析 *trxR* 基因在 SS2 中分布与保守性。Megalign 分析、比对不同细菌 TrxR

蛋白氨基酸序列同源性,ESPrift 软件进行二级结构预测与氨基酸序列比对可视化分析。PSORTb v. 3.0 软件在线进行细菌蛋白的亚细胞定位预测与分析。

2.2 pET30a-*trxR* 重组表达质粒构建 复苏 HA9801 菌株,37 °C 培养过夜,试剂盒法提取 SS2 基因组。设计合成 SS2-*TrxR*-ORF 扩增引物(其中上游引物 F:5'-CCGGAATTCATGTACGATACAGTTGTAATTGGTG-3';下游引物 R:5'-ACGCGTCGACCTATTTCAGCTAGTTCTGTGATGTA-3'),以提取 HA9801 细菌基因组为模板,进行 PCR 扩增。产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测,以离心柱式 PCR 产物纯化试剂盒回收。以 *Bam*H I 与 *Xho* I 双酶切靶基因与 pET30a 表达载体,回收,在 T4 DNA 连接酶作用下常温连接 20 min。连接产物采用 42 °C 热激法转化至 *E. coli* DH5 α 感受态细胞,37 °C 过夜培养。挑取单菌落,进行 PCR 检测验证,阳性克隆由至上海生工公司进行测序鉴定。测序正确后提取 pET30a-*trxR* 重组质粒,转入感受态 *E. coli* Rosetta (DE3) 中。

2.3 SsTrxR 蛋白原核表达与纯化 挑选单克隆重组表达菌,1:50 接种至含卡那抗性(50 μ g/ml)的 LB 液体培养基中,37 °C、130 r/min 恒温振荡培养 8 h,加入诱导剂 IPTG,16 °C 恒温振荡培养过夜。4 °C、6 000 r/min 离心 15 min,弃上清,收集菌体,加入 PBS 洗涤 2 次,重悬细菌。取 1 ml 菌液超声破碎,超声条件为 300 w,4 s 开/4 s 停,持续 30 min。4 °C、6 000 r/min 离心 15 min,收集破碎菌体上清和沉淀,进行 10% SDS-PAGE 蛋白质电泳。考马斯亮蓝染色,分析目的蛋白表达形式。以镍柱亲和层析柱纯化目的蛋白,纯化条件为:取超声破碎物上清过柱 2 次,以含 50 mmol/L 咪唑的 PBS 洗涤 3 次,含 400 mmol/L 的 PBS 洗脱,收集洗脱液进行 10% SDS-PAGE,分析蛋白质纯化效果。

2.4 SsTrxR 多克隆抗体制备 Nanodrop2000 测定纯化的 SsTrxR 重组蛋白浓度,吸取 300 μ g 原核蛋白与等体积的弗氏完全佐剂混合,冰上乳化完全。以此为免疫原,背部皮下多点接种 2~3 月龄日本大耳白兔进行首免。兔子免疫前,耳缘静脉采血,收集血清作为阴性血清。1 d 与 28 d 后,以同样剂量和方式进行第 1、2 次加强免疫,抗原佐剂为弗氏不完全佐剂。心脏采血,37 °C 放置 2 h,转至 4 °C 过夜,低速离心收集血清,-80 °C 分装保存备用。

2.5 Anti-SsTrxR 血清反应性与蛋白亚细胞定位分析 Western blot 技术检测 SsTrxR 多克隆抗体反应性。取 10 μ g SsTrxR 蛋白样品与 Protein loading buffer 混合,煮沸 10 min,12% SDS-PAGE 电泳 2 h,湿转法(4 °C,16 V 12 h)进行蛋白质转印至 PVDF

膜,取出 PVDF 膜,以含 5%脱脂奶粉的 TBST 稀释液 37 °C 封闭 2 h,以 TBST 反复洗膜 3 次,每次 5 min。以含 0.5%脱脂奶粉的 TBST 分别稀释 Rabbit anti-SsTrxR 多抗(1:400)与免疫前阴性血清(1:400),4 °C 摇床,低速孵育过夜。弃去一抗,以 TBST 洗膜 4 次,每次 5 min,加入 0.5%脱脂奶粉 TBST 稀释的 HRP 标记的羊抗兔 IgG(1:2000),37 °C 孵育 1 h, TBST 洗膜 5 次,每次 5 min。加入 ECL 曝光液,化学发光仪下进行曝光。

参考 Zhang 等^[10]报道的方法,提取猪链球菌 2 型分泌蛋白(Secretion proteins, SecP)、表面蛋白(Surface associated proteins, SAP)及胞内蛋白(Intracellular proteins, ICP)。复苏 HA9801 菌液,离心收集菌体和上清。分泌蛋白 SecP 的提取步骤为:上清中加入 10%三氯醋酸(TCA),混匀、4 °C 孵育 2 h,8 000 r/min 离心 15 min 收集沉淀,10 mmol/L PBS 溶解,加 NaOH 促溶,并调节 pH 至中性。表面蛋白 SAP 及胞内蛋白 ICP 提取步骤为:将离心收集的 HA9801 菌体沉淀以无菌 PBS 洗 2 次,加入表面蛋白提取液(30 mmol/L Tris-HCl pH 7.5,2 mmol/L MgCl₂,25% sucrose,3 mg/ml 溶菌酶,50 mmol/L PMSF),混匀置于 37 °C 孵育 1 h,12 000 r/min 离心,上清液即为 SAP。沉淀加入适量 2 mm 匀浆磁珠,转入匀浆机内,匀浆条件为 6 500 r/min/15 s/次,持续 5 次。12 000 r/min 离心 10 min,收集上清即为胞内蛋白 ICP。蛋白反应性试验,采用 Western blot 检测分析 SsTrxR 在细菌中的定位。

结果

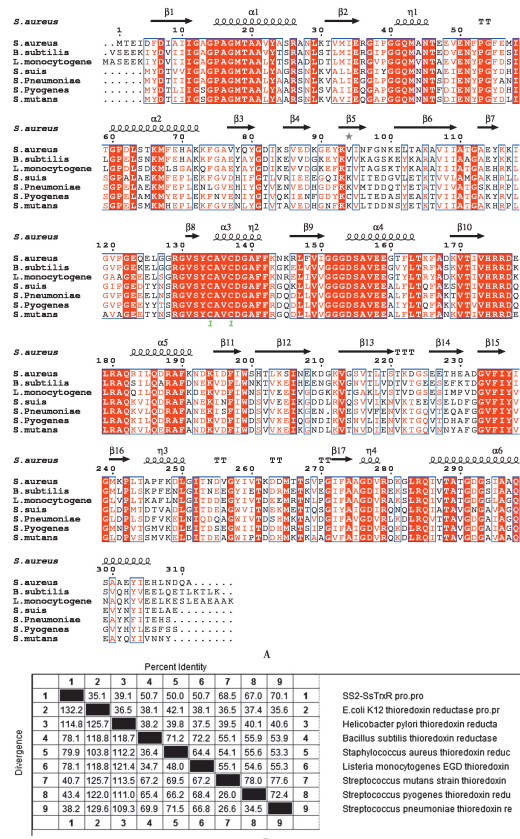
1 猪链球菌 2 型 SsTrxR 存在 Cys-Xaa-Xaa-Cys 基序,与同属其它链球菌 TrxR 因子亲缘关系较近

BlastN 检索发现 TrxR 基因在猪链球菌 2 型分离株中保守存在。氨基酸序列分析发现猪链球菌 2 型 SsTrxR 同细菌 TrxR 存在多个保守结构域或位点,130-133 位氨基酸序列为 CAVC,拥有 Cys-Xaa-Xaa-Cys 硫氧还蛋白家族基序,同属内其它代表性链球菌硫氧还蛋白还原酶氨基酸序列同源性在 68.5%以上(图 1),表明 SsTrxR 在 SS2 致病与感染过程中可能发挥重要作用。

2 成功构建 pET30a-trxR 重组表达质粒

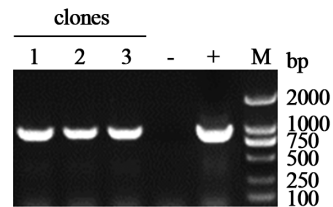
PCR 扩增 SS2-trxR 基因,经 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测,产物与目的基因大小 918 bp,与预期大小一致。PCR 产物经双酶切反应,与 pET30a 载体连接,再转化进入 E. coli DH5 α 感受态细胞。SS2-trxR 特异性引物进行 PCR 鉴定,获得阳性克隆(图 2)。将测序正确、构建成功的 pET30a-trxR 重组表达质粒转化

进入 E. coli Rosetta (DE3)细胞中,备用表达。



A 氨基酸序列比对 B 氨基酸序列同源性
图 1 猪链球菌 2 型 SsTrxR 氨基酸序列分析
A Alignment of TrxR amino acid sequences B Sequence distance of TrxR amino acid

Fig. 1 Amino acid sequence analysis of SsTrxR of S. suis type 2



M 核酸 maker 2K 1~3 转化后随机挑取的三个克隆 阳性对照(SS2-TrxR 基因扩增产物) - 阴性对照(无菌水)
图 2 猪链球菌 2 型 pET30a-trxR 重组质粒转化克隆鉴定
M Maker 2K 1-3 three randomly bacterial clones after transformation + Positive control (trxR gene amplification product) - Negative control(sterile water)

Fig. 2 Agarose gel detection of PCR product from clones of pET30a-TrxR transformed to DH5 α

3 获得 SsTrxR 原核表达蛋白纯化物

1 mmol/L IPTG、16 °C 持续诱导、培养表达菌 12 h,收集细菌菌体,超声破碎,10% SDS-PAGE 电泳结果显示:SsTrxR 蛋白在细胞上清与沉淀中均有分布,呈可溶性表达。取上清液过镍柱纯化,含 50 mmol/L 咪唑的 PBS 洗涤,以 400 mmol/L 咪唑洗脱获得 SsTrxR 原核表达蛋白纯化物,蛋白分子质量大小 36 ku,与预期基本相符(图 3)。

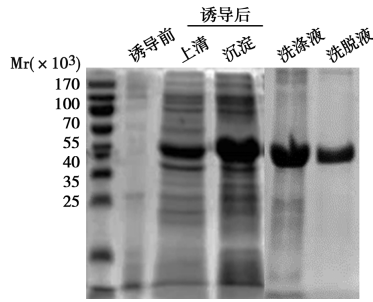
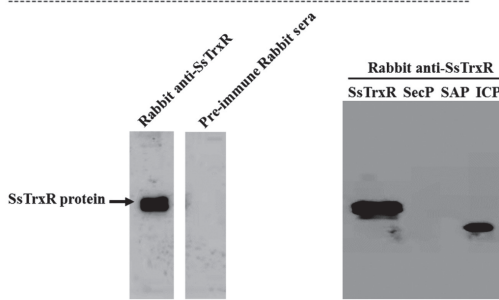
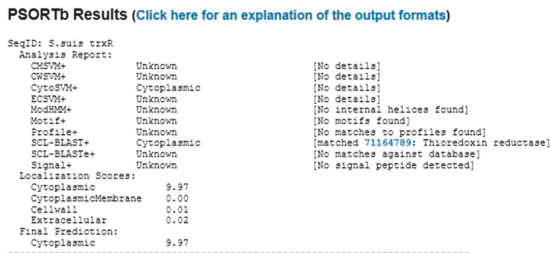


图3 猪链球菌2型 SsTrxR 蛋白表达、纯化
Fig.3 Prokaryotic expression and purification of SsTrxR

4 SsTrxR 抗血清反应性好, SsTrxR 因子定位于 SS2 胞浆中

PSORTb v. 3.0 生物信息学分析预测 SsTrxR 因子不含信号肽与跨膜结构域,属于胞浆蛋白,定位于细菌胞内(图 4A)。Western blot 检测发现制备的兔抗 SsTrxR 多克隆抗体能有效识别猪链球菌 2 型硫氧还蛋白还原酶 SsTrxR,且特异性较好(图 4B)。进一步提取 SS2 不同组分蛋白(分泌蛋白 SecP、表面蛋白 SAP 及胞内蛋白 ICP),进行 Western blot 分析发现 SsTrxR 确实为胞内因子,分布于 SS2 胞浆内。



A SsTrxR 细菌定位预测 B SsTrxR 血清反应性 C SsTrxR 蛋白定位分析

图4 猪链球菌2型 SsTrxR 血清反应性与 SsTrxR 蛋白定位分析

A Subcellular localization prediction of SsTrxR protein by PSORTb v3.0 online B Reactivity of rabbit antisera with SsTrxR protein C Subcellular location of SsTrxR protein by western blotting SecP Secretion proteins SAP Surface associated proteins ICP Intracellular proteins.

Fig.4 Western blot analysis of rabbit anti-SsTrxR reactivity and protein localization of SsTrxR in SS2 cells

讨论

细菌的存活在较大程度上依赖于 Trx 系统。硫

氧还蛋白还原系统的中心环节是硫氧还蛋白(Trx),可以减少蛋白质中的二硫键形成^[5,11-12]。Trx 通过 NADPH 和 TrxR 共同维持蛋白质的还原状态。TrxR 通过其抗氧化,蛋白质还原和信号转导活性等参与氧化还原信号的调节,调控细菌细胞分裂、生长与凋亡、能量转导、生物被膜形成与耐药性等生物学过程,对维持细菌氧化还原平衡至关重要^[6,13]。关于硫氧还蛋白还原酶的介导的生物学功能与抗氧化应激机制在真核生物中研究备受关注,在大肠埃希菌、沙门氏菌、肉毒梭菌、单增李斯特菌、化脓性链球菌等原核生物中也有相关报道^[5,14-15]。TrxR 参与清除细菌中的 ROS,可保护金黄色葡萄球菌免受活性氧或二硫键的损伤,是其生长繁殖所必需,trxR 缺失或失活会引起胞内氧化型硫氧还蛋白积累,抑制细菌生长^[16]。绿茶提取物活性成分表没食子儿茶素 EGCG 可通过靶向拮抗 TrxR 的抗氧化活性,发挥杀灭大肠埃希菌与金黄色葡萄球菌的效应^[17]。金黄色葡萄球菌 TrxR 关键位点突变,引发还原酶活性变化,导致细菌对金诺芬等药物敏感性下降^[18]。TrxR 参与调节 Trx 还原态,而 Trx 可通过介导分泌系统等毒性效应因子的表达,影响细菌在应激环境、巨噬细胞以及小鼠体内的繁殖与存活,进而参与细菌的感染与致病效应^[19-22]。Trx 因子对肺炎链球菌等链球菌属细菌抵抗胞内氧化应激至关重要,该因子可协同细菌表面甲硫氨酸硫氧化物还原酶(methionine sulfoxide reductase,MSR)系统共同参与细菌体内外氧化还原态的平衡,介导细菌抗应激反应、感染致病作用以及脑膜炎的形成^[23-26]。研究发现幽门螺杆菌中硫氧还蛋白的高水平表达与胃癌的发生、发展密切相关,硫氧还蛋白系统在其中可能扮演重要作用^[27-29]。2 型猪链球菌作为重要的人兽共患病原菌,目前,关于 2 型猪链球菌硫氧还蛋白还原系统在氧化应激中扮演的作用、硫氧还蛋白还原酶(SsTrxR)参与的抗氧化应激机制研究尚不清楚。

对猪链球菌 2 型 TrxR 基因进行生物信息学分析,表明 SsTrxR 因子与已报道的属内其它链球菌 TrxR 氨基酸序列存在多个保守区域或位点,同源性在 68.5% 以上,存在 Cys-Xaa-Xaa-Cys 基序,是潜在的硫氧还蛋白家族因子。通过原核表达技术,获得可溶性重组蛋白 SsTrxR,镍柱纯化效果较好。采用经典弗氏佐剂配伍 SsTrxR 原核蛋白,共同免疫日本大耳白兔,获得抗 SsTrxR 多克隆抗体。Western blot 分析显示该兔源多抗可特异性识别 SsTrxR 因子,表明 SsTrxR 定位于细菌胞浆内,与 PSORTb 生物信息学预测及其它细菌中该因子定位的报道结果一致。Western blot 检测结果显示 SsTrxR 分子量略低于原核表达重组蛋白分子量,这可能与该因子存在一定的

修饰或剪切,形成成熟的 SsTrxR 分子有关,类似的结果在猪链球菌 2 型肽酰辅氨酰折叠酶 PrsA 因子的体内外表达差异也有发现^[30]。本研究表达了猪链球菌 2 型 TrxR 因子,并制备了相应多抗血清,确定了 SsTrxR 定位于细菌胞内,为探索 SsTrxR 蛋白在 SS2 繁殖与感染中介导的氧化应激效应,在细菌感染和免疫过程发挥的功能及其分子机制提供理论基础。

【参考文献】

- [1] Segura M. *Streptococcus suis* Research: Progress and Challenges [J]. Pathogens, 2020, 9(9): 707.
- [2] Segura M, Fittipaldi N, Calzas C, et al. Critical *Streptococcus suis* virulence factors: are they all really critical? [J]. Trends Microbiol, 2017, 25(7): 585-599.
- [3] Xia X, Qin W, Zhu H, et al. How *Streptococcus suis* serotype 2 attempts to avoid attack by host immune defenses [J]. J Microbiol Immun Infect, 2019, 52(4): 516-525.
- [4] Staerck C, Gastebois A, Vandeputte P, et al. Microbial antioxidant defense enzymes [J]. Microbial Pathogenesis, 2017(110): 56-65.
- [5] Ezraty B, Gennaris A, Barras F, et al. Oxidative stress, protein damage and repair in bacteria [J]. Nat Rev Microbiol, 2017, 15(7): 385-396.
- [6] Zeller T, Klug G. Thioredoxins in bacteria: functions in oxidative stress response and regulation of thioredoxin genes [J]. Naturwissenschaften, 2006, 93(6): 259-266.
- [7] Susanti D, Loganathan U, Compton A, et al. A reexamination of thioredoxin reductase from thermoplasma acidophilum, a thermoacidophilic euryarchaeon, identifies it as an NADH-Dependent enzyme [J]. ACS Omega, 2017, 2(8): 4180-4187.
- [8] 马宇光, 杨帆, 杨卫军. 硫氧还蛋白的结构及在生物抗氧化中的功能 [J]. 生命的化学, 2011, 31(3): 429-433.
- [9] Yang X, Ma K. Characterization of a thioredoxin-thioredoxin reductase system from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* [J]. J Bacteriol, 2010, 192(5): 1370-1376.
- [10] Zhang X, Jiang X, Yang L, et al. DnaJ of *Streptococcus suis* type 2 contributes to cell adhesion and thermotolerance [J]. J Microbiol Biotechnol, 2015, 25(6): 771-781.
- [11] Lu J, Holmgren A. The thioredoxin antioxidant system [J]. Free Radic Biol Med, 2014(66): 75-87.
- [12] Reardon-Robinson ME, Ton-That H. Disulfide-bond-forming pathways in gram-positive bacteria [J]. J Bacteriol, 2015, 198(5): 746-754.
- [13] Felix L, Mylonakis E, Fuchs BB. Thioredoxin reductase is a valid target for antimicrobial therapeutic development against Gram-Positive bacteria [J]. Front Microbiol, 2021(12): 663481.
- [14] Mahmood DF, Abderrazak A, El Hadri K, et al. The thioredoxin system as a therapeutic target in human health and disease [J]. Antioxid Redox Signal, 2013, 19(11): 1266-1303.
- [15] Becker K, Gromer S, Schirmer RH, et al. Thioredoxin reductase as a pathophysiological factor and drug target [J]. Europ J Biochem, 2000, 267(20): 6118-6125.
- [16] Uziel O, Borovok I, Schreiber R, et al. Transcriptional regulation of the *Staphylococcus aureus* thioredoxin and thioredoxin reductase genes in response to oxygen and disulfide stress [J]. J Bacteriol, 2004, 186(2): 326-334.
- [17] Liang W, Fernandes AP, Holmgren A, et al. Bacterial thioredoxin and thioredoxin reductase as mediators for epigallocatechin 3-gallate-induced antimicrobial action [J]. FEBS J, 2016, 283(3): 446-458.
- [18] Chen H, Liu Y, Liu Z, et al. Mutation in *trx*B leads to auranofin resistance in *Staphylococcus aureus* [J]. J Glob Antimicrob Resist, 2020(22): 135-136.
- [19] Negrea A, Bjur E, Puiaic S, et al. Thioredoxin 1 participates in the activity of the *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* pathogenicity island 2 type III secretion system [J]. J Bacteriol, 2009, 191(22): 6918-6927.
- [20] Cheng C, Dong Z, Han X, et al. Thioredoxin is essential for motility and contributes to host infection of *Listeria monocytogenes* via redox interactions [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2017(7): 287.
- [21] Bjur E, Eriksson-Ygberg S, Aslund F, et al. Thioredoxin 1 promotes intracellular replication and virulence of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* [J]. Infect Immun, 2006, 74(9): 5140-5151.
- [22] Sem X, Rhen M. Pathogenicity of *Salmonella enterica* in *Caenorhabditis elegans* relies on disseminated oxidative stress in the infected host [J]. PLoS One, 2012, 7(9): e45417.
- [23] Yesilkaya H, Andisi VF, Andrew PW, et al. *Streptococcus pneumoniae* and reactive oxygen species: an unusual approach to living with radicals [J]. Trends Microbiol, 2013, 21(4): 187-195.
- [24] Saleh M, Bartual SG, Abdullah MR, et al. Molecular architecture of *Streptococcus pneumoniae* surface thioredoxin-fold lipoproteins crucial for extracellular oxidative stress resistance and maintenance of virulence [J]. EMBO Mol Med, 2013, 5(12): 1852-1870.
- [25] Marco S, Rullo R, Albino A, et al. The thioredoxin system in the dental caries pathogen *Streptococcus mutans* and the food-industry bacterium *Streptococcus thermophilus* [J]. Biochimie, 2013, 95(11): 2145-2156.
- [26] Ribes S, Abdullah MR, Saleh M, et al. Thioredoxins and methionine sulfoxide reductases in the pathophysiology of pneumococcal meningitis [J]. J Infect Dis, 2016, 214(6): 953.
- [27] Liu LN, Ding SG, Shi YY, et al. *Helicobacter pylori* with high thioredoxin-1 expression promotes stomach carcinogenesis in Mongolian gerbils [J]. Clin Res Hepatol Gastroenterol, 2016, 40(4): 480-486.
- [28] Comtois SL, Gidley MD, Kelly DJ. Role of the thioredoxin system and the thiol-peroxidases Tpx and Bcp in mediating resistance to oxidative and nitrosative stress in *Helicobacter pylori* [J]. Microbiology (Reading), 2003, 149(Pt 1): 121-129.
- [29] Shi YY, Zhang J, Zhang T, et al. Cellular stress and redox activity proteins are involved in gastric carcinogenesis associated with *Helicobacter pylori* infection expressing high levels of thioredoxin-1 [J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2018, 19(10): 750-763.
- [30] Jiang X, Yang Y, Zhou J, et al. Roles of the putative type iv-like secretion system key component *virD4* and *prsa* in pathogenesis of *Streptococcus suis* type 2 [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2016(6): 172.