

副溶血弧菌 *trh* 基因的克隆、表达 及基因缺失株的构建*

赵永刚^{1,2} 唐小千¹ 战文斌¹ ①

(1. 中国海洋大学教育部海水养殖重点实验室 青岛 266003;
2. 中国动物卫生与流行病学中心 青岛 266032)

摘要 利用 PCR 方法从 VP 基因组 DNA 中扩增出 *trh* 溶血素基因, 构建了大肠杆菌原核表达载体, 对 *trh* 进行了表达和纯化, 经溶血活性检测, 复性蛋白具有溶血活性。同时还构建了 *trh* 基因缺失株, 对 *trh* 基因进行了基因敲除研究。结果表明, 单独敲除 *trh* 基因并不能够影响菌株的溶血活性, 说明副溶血弧菌还存在其它溶血素基因。

关键词 VP, TRH, 克隆, 表达, 基因敲除

中图分类号 S945.1

副溶血性弧菌是海水中的天然宿主, 广泛存在于海水和其他咸水环境中 (DePaola *et al.*, 1990; Fabbro *et al.*, 2010)。副溶血弧菌通常被认为是养殖水产动物的重要条件性病原, 能引起大面积的水产动物的患病死亡, 给海水养殖业造成巨大经济损失 (许兵, 1993; 牟海津等, 2000; 毛芝娟等, 2001; Lee *et al.*, 2003)。

除了耐热直接溶血素 (TDH) 外, 神奈川现象阴性菌株产生的相对耐热直接溶血素 (TRH) 也被认为是致病性 VP 的另一个重要毒力因子。TRH 长度与 TDH 相同, 氨基酸序列具有 67% 的同源性 (Bej *et al.*, 1999; McCarthy *et al.*, 1999), 可能是从同一祖先基因通过单碱基突变而来; TRH 与 TDH 抗原决定簇相同, 在免疫学和生物学性质方面很相似, 具有溶血活性、肠毒素活性、细胞毒性和心脏毒性 (李孝权等, 2005); 但 TRH 不耐热, 60℃, 10 min 即可使其失活 (Taniguchi *et al.*, 1985, 1986; Shinoda *et al.*, 1991)。*trh* 基因编码溶血素 TRH, 其基因家族内存在着显著的核苷酸序列差异, *trh1* 和 *trh2* 二者同源性仅为 84% (Bej *et al.*, 1999)。此外, *trh* 基因与尿素酶基因簇紧密连锁, 都位于小染

色体上, 尿素酶活性常用于诊断 *trh* 阳性的副溶血弧菌菌株 (Suthienkul *et al.*, 1996)。

目前对副溶血性弧菌溶血素 TDH 的性质及其致病性已经有了较为系统的研究 (Tang *et al.*, 1997; Fabbri *et al.*, 1999; Raimondi *et al.*, 2000; Takahashi *et al.*, 2000; Wong *et al.*, 2000; DePaola *et al.*, 2003; Lang *et al.*, 2004; Puhr *et al.*, 2006), 然而对溶血素 TRH 的了解较少, 需要更为深入的研究。本研究克隆了副溶血性弧菌临床分离株 *trh* 基因, 构建了表达载体 pET28a-*trh*, 对溶血素进行了表达和纯化, 同时还成功构建了 *trh* 基因缺失株, 旨在为副溶血性弧菌的致泻和溶血的机制、毒素的功能结构域等研究提供基础。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

VP 临床分离株、*E. coli* TOP10、BL-21 菌株、pET28a(+) 原核表达载体、pEGFP-N1 载体由中国动物卫生与流行病学中心国家外来疫病诊断中心保存; pMD18-T simple 和 pMD18-T 克隆载体购自大连宝生物工程有限公司。

* 国家高技术研究发展(863)计划项目: 海水养殖动物疾病高通量诊断技术, 2006AA100306 号和浅海养殖扇贝流行病控制技术, 2006AA100307 号。赵永刚, 博士研究生, E-mail: zhyg929@163.com

通讯作者: 战文斌, E-mail: wbzhan@ouc.edu.cn

收稿日期: 2011-12-31, 收修改稿日期: 2012-02-28

1.2 主要试剂

Ex Taq 聚合酶、限制性内切酶、T₄ DNA 连接酶、碱性磷酸酶(CIAP)等购自 TaKaRa 公司; 胶回收试剂盒、质粒小量提取试剂盒、硫酸新霉素(neo^r)购自上海华舜生物工程有限公司; 二抗 anti-rabbit IgG(Fab)-HRP、低分子量蛋白 Marker 购自 MBI 公司; 其它试剂均为分析纯。

1.3 *trh* 基因的克隆、表达及纯化

参考 GenBank 公布的副溶血弧菌 *trh* 基因序列, 设计 1 对特异引物: *trh*R: 5'-GCGGATCCTCATGAAACTAAACTCTACT-3', *trh*S: 5'-CGGAATTCCTTAATT-TTGTGACATACAT-3', 扩增得到溶血素 *trh* 基因片段。将 *trh* 基因与原核表达载体 pET-28a 相连构建重组表达质粒 pET28a-*trh*, 并对重组蛋白进行了诱导表达及纯化(Fan *et al*, 2007; 孙婧等, 2010)。

1.4 重组 TRH 的复性及溶血性检测

将纯化蛋白稀释至终浓度为 0.1 mg/ml, 置于透析袋中 4℃ 透析 24 h, 各复性液除尿素浓度分别为 6、4、2、1 mol/L 不同外其余各组成成分相同(100 mmol/L NaH₂PO₄; 10 mmol/L Tris-HCl; 100 mmol/L 氧化型谷胱甘肽; 900 mmol/L 还原型谷胱甘肽, pH 8.0), 最后将透析袋放入蔗糖中浓缩。复性蛋白经 DTT 活化后接种在 5% 兔血琼脂平板上, 37℃ 培养约 24 h, 4℃ 放置 24 h 后, 观察其溶血现象。

1.5 骨架质粒 pMD18-T-neo 的构建

根据载体 pEGFP-N1 的全序列, 用 Primer 5.0 软件在 neo^r 的前后设计扩增 neo^r 的上下游引物, 引物序列为:

P1: 5'-GCGGAACCCCTATTTGTTTATT-3'

P2: 5'-GCTTGGTCGGTCATTTTCG-3'

扩增的片段包含 neo^r 表达所需的启动子和终止子, 胶回收扩增的 neo^r 产物, 用 T₄ DNA 连接酶在 16℃ 下与载体 pMD18-T 进行连接反应, 构建骨架质粒 pMD18-T-neo。

1.6 *trh* 基因打靶载体的构建

1.6.1 *trh* 基因打靶载体同源臂的克隆 以 VP 基

因组 DNA 为模板, 利用表 1 所列引物进行 *trh* 基因前、后同源臂的 PCR 扩增, PCR 产物用胶回收试剂盒进行纯化回收, 将所得目的片段插入载体 pMD18-T-simple, 转化 *E. coli* TOP10 感受态细胞, 经 PCR 和双酶切鉴定后由上海生工生物工程有限公司测序。

1.6.2 *trh* 基因打靶载体的构建 将 pMD18-T-neo 质粒用限制性内切酶 *Bam*HI 和 *Sal*I 进行双酶切, 胶回收 neo^r 片段; 将 pMD18-T-neo 质粒用限制性内切酶 *Kpn*I 和 *Pst*I 进行双酶切, 胶回收线性的 pMD18-T; 将回收的大片段 pMD18-T 和小片段 neo^r 与 *trh* 基因前、后同源臂双酶切回收产物进行连接; 连接产物转化入 *E. coli* TOP10 感受态细胞中, 37℃ 培养箱中倒置培养 12—16 h; 然后采用 *Sal*I 和 *Pst*I 与 *Kpn*I 和 *Bam*HI 同时双酶切的方法进行鉴定。

1.7 电转化

制备副溶血弧菌感受态细胞, 将构建的基因打靶载体 pMD18-T-neo-*trh* 用 *Kpn*I 和 *ps*I 进行双酶切, 得到约 1.9 kb 的线性转化片段, 与 100 μl 副溶血弧菌感受态细胞混合, 加入预冷的 0.22 μm 的电击杯中, 1.5 kV 的电压电击 15 ms, 将电转化产物涂布于含 100 μg/ml Neo^r TCBS 固体平板上, 37℃ 温箱倒置培养 16—20 h。

1.8 *trh* 基因缺失菌株的筛选及溶血性检测

在 neo^r 抗性平板上挑取单菌落, 提取基因组 DNA, 以转化子基因组 DNA 为模板, 用引物 Rneo (5'-GACCACCAAGCGAAACAT-3')和 RV-out(5'-GCTCTCATATGCTTCGACATTGACG-3')进行 PCR 筛选; 将扩增到的 PCR 产物纯化后送上海生工生物工程有限公司进行测序(刘杰等, 2007; 喻江等, 2010)。筛选到的 *trh* 基因缺失株接种在 5% 兔血琼脂平板上, 37℃ 培养约 24 h, 4℃ 放置 24 h 后, 观察其溶血现象。

2 实验结果

2.1 *trh* 基因的表达及纯化

将阳性重组质粒 pET28a-*trh* 转化 *E. coli* BL21 感

表 1 同源臂 *trh*-front 和 *trh*-back 引物

Tab. 1 Primers of homologous arms *trh*-front and *trh*-back

引物名称	序列	内切酶 ¹⁾
<i>trh</i> -front-up	ATCGG <u>T</u> ACC CTCTACTTTGCTTTTCAG	<i>Kpn</i> I
<i>trh</i> -front-down	TTAGGATCCTTGT <u>T</u> TTTTTCTGATTTTG	<i>Bam</i> HI
<i>trh</i> -back-up	CCTGTCGACCAAAATCAGAAAAAAC	<i>Sal</i> I
<i>trh</i> -back-down	TTACTGCAGT <u>T</u> AATTTTGTGACATACAT	<i>Pst</i> I

1) 引物的酶切位点用下划线标识

受态细胞后, IPTG 诱导培养, 经 SDS-PAGE 电泳发现诱导菌体在约 27 kDa 处出现了一条蛋白带与预期大小相符; Ni^{2+} 亲和树脂纯化的重组蛋白经 SDS-PAGE 电泳后也发现了与诱导表达产物分子量一致的带型(图 1)。

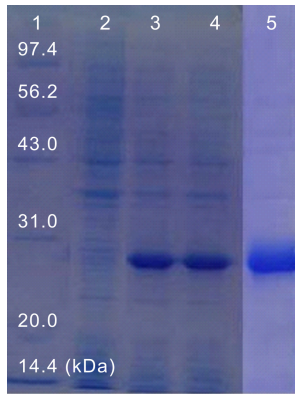


图 1 重组蛋白在 *E. coli* 中的表达

Fig.1 Expression of recombinant protein in *E. coli*

1. 低分子量蛋白 Marker; 2. 未诱导的重组阳性质粒菌;
3. 4. IPTG 诱导的重组阳性质粒菌; 5. 纯化的重组蛋白

2.2 重组 TRH 溶血活性检测

将 TRH 变性蛋白、DTT 活化后的复性蛋白分别加入兔血平板, 37°C 培养 2—3h 后, 可见复性 TRH 孔周围出现溶血现象, 而变性蛋白和阴性对照孔周围无溶血现象(图 2a)。

2.3 *trh* 基因打靶载体的鉴定

以 VP 基因组 DNA 为模板, 以表 1 所示引物扩增 *trh* 基因前、后同源臂, 与预期大小 350 和 200bp 相符; 将克隆的 *trh* 基因前、后臂插入骨架质粒 pMD18-T-neo 中, 构建打靶载体 pMD18-T-neo-*trh*。

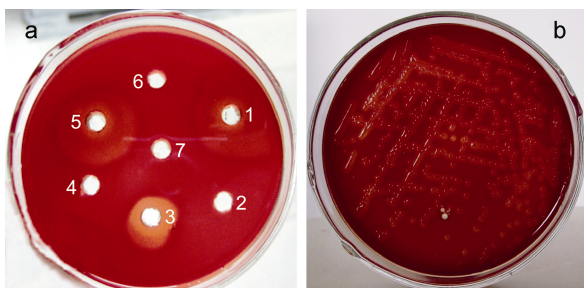


图 2 重组 TRH 溶血活性检测(a)和 *trh* 基因缺失株的溶血活性检测(b)

Fig.2 Hemolysis of the recombinant TRH (a) and *trh* gene deleted mutant (b)

- a 图: 1、3、5. 复性 TRH; 2、4、6. 变性 TRH;
7. 5. mmol/L DTT

为验证基因打靶载体 pMD18-T-neo-*trh* 的可靠性, 对其进行了两组双酶切鉴定, 分别为: (1) 利用 *Pst*I 和 *Sal*I 进行双酶切, 产生大小约为 200 bp 和 4.4 kb 的两个片段; (2) 利用 *Kpn*I 和 *Bam*HI 进行双酶切, 产生大小约为 350 bp 和 4.2 kb 的两个片段(图 3A)。

2.4 *trh* 基因缺失株的筛选

为进一步鉴定重组为发生在 *trh* 基因位点的双交换重组, 即 neo^r 正确插入到 *trh* 之中, 以转化子的基因组 DNA 为模板, 进行 PCR 检测。

如果 1.9 kb 的线性片段与 VP 基因组 DNA 发生同源重组, *trh* 同源序列之间的 54 bp 基因组 DNA 将被 neo^r 表达单元所取代, 因此利用在 neo^r 上设计引物 Rneo 和 *trh* 基因 B 端设计引物 RV-out 进行 PCR 检测, 将得到约 700 bp 的特异片段; 如果 1.9 kb 线性片段随机插入染色体基因组, 则 *trh* 基因没有被破坏, 以 Rneo、RV-out 引物对转化子进行 PCR 检测时就不会有 700 bp 特异片段出现。对 168 个转化子进行 PCR 检测, 发现只有 *trh*157 得到约 700 bp 的特异片段, 其它 167 个转化子无特异性条带, 结果初步表明 *trh*157 为 *trh* 基因缺失株(图 3B)。

为从核苷酸序列水平进一步证明 *trh*157 确实发生了 *trh* 基因的缺失, 将扩增的 PCR 产物用胶回收试剂盒纯化回收并进行测序, 序列测定结果与预期完全一致, 证明 *trh*157 为 *trh* 基因缺失株。

2.5 *trh* 基因缺失株的溶血性检测

将 *trh* 基因缺失株接种在 5% 的兔血琼脂平板上

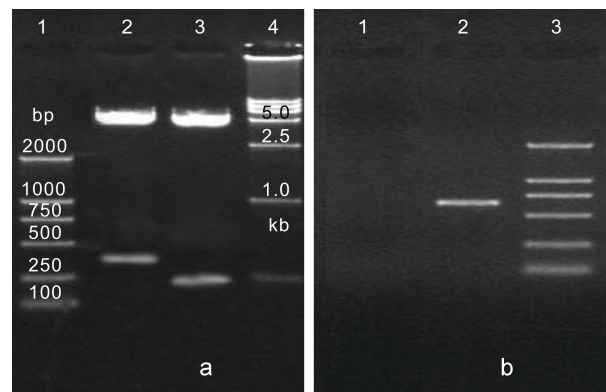


图 3 基因打靶载体 pMD 18-T-neo-*trh* 的酶切鉴定结果(a)和 *trh* 基因缺失株的筛选(b)

Fig.3 Restriction enzyme analysis of gene targeting vector pMD18-T-neo-*trh*(a) and PCR detection of *trh* gene deleted mutant (b)

a 图: 1. DL2000 Marker; 2. *Kpn*I 和 *Bam*HI 双酶切结果; 3. *Pst*I 和 *Sal*I 双酶切结果; 4. DL15000 Marker

b 图: 1. 非同源重组转化子的 PCR 检测结果; 2. 同源重组转化子的 PCR 检测结果; 3. DL2000 Marker

进行溶血性检测, 缺失株仍然存在对兔血的溶血性, 从而可以说明单独敲除 *trh* 基因并不影响 VP 菌株的溶血性(图 2B)。

3 讨论

近年来, 随着水产养殖业的迅猛发展, 养殖规模不断扩大, 养殖密度也逐渐增加, 导致养殖水域环境逐年恶化, 疾病发生越来越频繁, 给养殖业造成了巨大的经济损失。而弧菌是引起疾病的主要病原, 这其中又以副溶血弧菌、哈氏弧菌、溶藻弧菌最为严重 (Rodgers *et al*, 1998; 王国良等, 2000; 吴后波等, 2002; 覃映雪等, 2004)。

一般认为, VP 的主要致病作用是其能够产生耐热直接溶血素(TDH)、相对耐热直接溶血素(TRH)和不耐热直接溶血素(TLH)中的一种或数种溶血素 (Nishibuchi *et al*, 1995), TRH⁺的临床分离株在亚洲国家和美国沿海地区均有报道(Wong *et al*, 2000)。Xu 等 (1994)利用基因突变技术, 用单纯 TRH⁺的 VP 菌株构建只含有其后半部分序列的突变菌株 TH3966, 研究发现, TH3966 失去溶血作用, 但仍能引起兔回肠积液, 提示 TRH 的 N 端可能与溶血活性有关, 而 C 端与肠毒性有关, 但在 TH3966 没有发现与 TRH 有交叉免疫反应的产物, 尚不能排除除了 TRH、TH3966 的肠毒性有可能是其它毒力因子所致。本实验利用 PCR 技术从实验室保存的 VP 临床分离株中成功地扩增出 *trh* 基因, 经序列测定和比对, 核苷酸序列与 Genbank 上已发表的序列的同源性为 98.6%, 因此可以确定该菌株为 TRH⁺菌株; 并将克隆到的 *trh* 基因用大肠杆菌原核表达系统进行了表达和纯化, 由于本实验使用的表达载体是 pET-28a(+), 融合蛋白是以不溶性的包涵体形式存在, 作者采取逐步透析、降低蛋白浓度、加入氧化还原剂等复性方法对纯化的蛋白进行了复性, 经检测复性 TRH 具有溶血活性, 说明 *trh* 溶血素基因的表达是准确的。

本实验还对该菌株进行了基因敲除研究, 将筛选到的 *trh* 基因缺失株接种在 5%的兔血琼脂平板上进行溶血性检测, 缺失株仍然可引起兔红细胞的溶血, 说明敲除 *trh* 基因并不影响该菌株的溶血性。经进一步的实验证实该临床分离株还同时含有 *tdh* 和 *tlh* 两个溶血素基因, 因此, 研究溶血素基因的功能和 VP 致病机理的工作还远未结束, 如果在一株菌上同时将这 3 个基因中的任何 2 个基因或将这 3 个基因同时敲除, 必须分别构建 2 种或 3 种带有不同标记基

因的敲除载体来进行敲除, 这还将需要大量的工作。

参 考 文 献

- 王国良, 金 珊, 薛良义等, 2000. 海水网箱鲈鱼皮肤溃烂病及其病原菌的研究. 黄渤海海洋, 18(3): 85—89
- 毛芝娟, 卓华龙, 杨季芳等, 2001. 锯缘青蟹细菌性传染病的病原菌研究. 台湾海峡, 20(2): 187—192
- 刘 杰, 房春红, 李 琬等, 2007. 同源重组法构建枯草芽孢杆菌 224 *yugS* 基因缺失突变株. 生物技术通报, 4: 148—151
- 许 兵, 纪伟尚, 徐怀恕, 1993. 中国对虾病原菌及其致病机理的研究. 海洋学报, 15(1): 98—106
- 孙 婧, 孙铂光, 贾爱荣等, 2010. 坎氏弧菌热不稳定溶血素基因的克隆表达、蛋白纯化及其活性. 中国水产科学, 17(4): 745—752
- 牟海洋, 李 筠, 包振民等, 2000. 副溶血弧菌胞外产物对中国对虾的致病性分析. 海洋与湖沼, 31(3): 273—280
- 李孝权, 刘衡川, 柴巧学等, 2005. 副溶血性弧菌食源性疾病分离株的 RAPD 分子分型研究. 现代预防医学, 32(7): 726—728
- 吴后波, 潘金培, 2002. 海水养殖真鲷弧菌病原菌外毒素的分离纯化及生物学活性. 海洋与湖沼, 33(1): 83—89
- 覃映雪, 池信才, 苏永全等, 2004. 网箱养殖青石斑鱼的溃疡病病原. 水产学报, 28(3): 297—302
- 喻 江, 范国权, 李 璐等, 2010. 枯草芽孢杆菌 224 *ypIQ* 基因敲除及其对溶血性的影响. 东北农业大学学报, 41(7): 74—78
- Bej A K, Patterson D P, Brasher C W *et al*, 1999. Detection of total and hemolysin-Producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tlh*, *tdh* and *trh*. J Microbiol Methods, 36(21): 215—225
- DePaola A, Hopkins L H, Peeler J T *et al*, 1990. Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* in US coastal waters and oysters. Appl Environ Microbiol, 56(8): 2299—2302
- Depaola A, Ulaszek J, Kaysner C A *et al*, 2003. Molecular, serological, and virulence characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from environmental, food, and clinical Sources in North America and Asia. Appl Environ Microbiol, 69(7): 3999—4005
- Fabbri A, Falzano L, Frank C *et al*, 1999. *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin modulates cytoskeletal organization and calcium homeostasis in intestinal cultured cells. Infect Immun, 67: 1139—1148
- Fabbro C, Cataletto B, Negro P D, 2010. Detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* through biochemical and molecular-based methodologies in coastal waters of the Gulf of Trieste (NorthAdriatic Sea). FEMS Microbiol Lett, 307: 158—164
- Fan C X, Zhang S C, Liu Z H *et al*, 2007. Identification and expression of a novel class of glutathione-S-transferase from amphioxus *Branchiostoma belcheri* with implications to the

- origin of vertebrate liver. *Int J Biochem Cell Biol*, 39: 450—461
- Lang P A, Kaiser S, Myssina S *et al*, 2004. Effect of *Vibrio parahaemolyticus* haemolysin on human erythrocytes. *Cell Microbiol*, 6: 391—400
- Lee J H, Ahn S H, Lee E M *et al*, 2003. Characterization of the enzyme activity of an extracellular metalloprotease (VMC) from *Vibrio mimicus* and its C-terminal deletions. *FEMS Microbiol Lett*, 223(2): 293—300
- McCarthy S A, DePaola A, Cook D W *et al*, 1999. Evaluation of alkaline phosphatase and digoxigenin labeled probes for detection of the thermolabile hemolysin (tlh) gene of *Vibrio parahaemolyticus*. *Lett Appl Microbiol*, 28: 66—70
- Nishibuchi M, Kaper J B, 1995. Thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus*: a virulence gene acquired by a marine bacterium. *Infect Immun*, 63: 2093—2099
- Puhr Yu P N, Bopp C, Gerner-Smidt P *et al*, 2006. *Vibrio parahaemolyticus* hemolysins associated with decreased hospitalization from shellfish-borne illness. Presented at the 2006 Intl. Conference on Emerging Infectious Diseases, Atlanta, Ga, March 19—22. Abstract 475
- Raimondi F, Kao J P, Fiorentini C *et al*, 2000. Enterotoxicity and cytotoxicity of *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin in vitro systems. *Infect Immun*, 68: 3180—3185
- Rodgers C J, Furones M D, 1998. Disease problems in cultured marine fish in Mediterranean. *Fish Pathology*, 33(4): 157—164
- Shinoda S, Matsuoka H, Tsuchie T *et al*, 1991. Purification and characterization of a lecithin-dependent haemolysin from *Escherichia coli* transformed by a *Vibrio parahaemolyticus* gene. *J Gen Microbiol*, 137: 2705—2711
- Suthienkul O, Iida T, Park K S *et al*, 1996. Restriction fragment length polymorphism of the *tdh* and *trh* genes in clinical *Vibrio parahaemolyticus* strains. *J Clin Microbiol*, 34: 1293—1295
- Tang G, Iida T, Yamamoto K *et al*, 1997. Analysis of functional domains of *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin using monoclonal antibodies. *FEMS Microbiol Lett*, 150: 289—296
- Takahashi A, Sato Y, Shiomi Y *et al*, 2000. Mechanisms of chloride secretion induced by thermostable direct haemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* in human colonic tissue and a human intestinal epithelial cell line. *J Med Microbiol*, 49: 801—810
- Taniguchi H, Hirano H, Kubomura S *et al*, 1986. Comparison of the nucleotide sequences of the genes for the thermostable direct hemolysin and the thermolabile hemolysin from *Vibrio parahaemolyticus*. *Microb Pathog*, 1: 425—432
- Taniguchi H, Ohta H, Ogawa M *et al*, 1985. Cloning and expression of *Escherichia coli* of *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin and thermolabile hemolysin genes. *J Bacteriol*, 162: 510—515
- Wong H C, Liu S H, Ku L W *et al*, 2000. Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolates obtained from foodborne illness outbreaks during 1992 through 1995 in Taiwan. *J Food Prot*, 63: 900—906
- Xu M, Yamamoto K, Honda T, 1994. Construction and characterization of an isogenic mutant of *Vibrio parahaemolyticus* having a deletion in the thermostable direct hemolysin-related hemolysin gene (*trh*). *J Bacteriol*, 176(15): 4757—4760

CLONING, EXPRESSING AND CONSTRUCTION OF GENE DELETED MUTANT OF TRH OF VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS

ZHAO Yong-Gang^{1,2}, TANG Xiao-Qian¹, ZHAN Wen-Bin¹

(1. Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao, 266003;

2. China Animal Health and Epidemiology Center, Qingdao, 266032)

Abstract *Vibrio parahaemolyticus* (VP) is a Gram-negative, facultative anaerobic marine bacteria, which is an important pathogen in aquaculture. TRH (TDH-related hemolysin) is one of major virulence factors produced by VP. The biological function and nosogenesis of *trh* gene remains completely unknown. In this study, we cloned *trh* gene from the genome DNA of VP by polymerase chain reaction (PCR). The PCR product was purified and inserted into prokaryotic expression vector pET-28a(+). The recombinant TRH was successfully expressed in *E. coli* strain BL21(DE3) and purified by Ni-IDA affinity chromatography. The recombinant TRH was activated and showed the hemolytic activity after renaturation. Targeting vector of *trh* gene was constructed by homologous recombination and gene deletion mutant was identified by PCR. Hemolysis was identified on 5% rabbit blood agar plate, The gene deleted mutant could induce hemolysis. It indicated that knockout of single gene had no influence on hemolysis of VP. In summary, the results have laid a good foundation for further exploration of the pathogenicity of VP from sea food isolates.

Key words *Vibrio parahaemolyticus*, TRH, Cloning, Expression, Gene knockout