

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.20.001

• 基础研究 •

不同大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)个体肠道菌群结构差异研究*邢孟欣^{1,2} 李贵阳³ 侯战辉¹ 曲艳梅¹ 刘斌^{1△}

(1 中国科学院海洋研究所 山东 青岛 266071; 2 中国科学院大学 北京 100049;

3 中国水产科学研究院黄海水产研究所 山东 青岛 266071)

摘要 目的: 肠道微生物能够帮助宿主完成多种生理生化功能,对宿主的健康生长也起到非常重要的作用。大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)是我国北方最重要的海水养殖品种之一。然而,细菌性疾病的频发造成大规模的鱼类死亡。此外,许多大菱鲆致病菌也被证实是人类潜在的致病菌。因此鉴定成年养殖大菱鲆肠道中所包含的核心菌群,并筛选可能与大菱鲆或人类健康密切相关的细菌尤为重要。**方法:** 构建三个大菱鲆个体肠道 16S rRNA 文库,利用限制性片段长度多态性分析(RFLP)及生物信息学技术研究三个大菱鲆个体肠道菌群结构及多样性。**结果:** 共得到 758 个阳性克隆,16 个 OTU 类型。分类分析显示,变形菌门在大菱鲆肠道中占优势地位。进一步将细菌按属来分类显示,弧菌属所占的比例最高,约为 95.3%。韦恩图显示大菱鲆三个个体共有的 OTU 类型数量为 3,分别占三个大菱鲆个体肠道文库中阳性克隆总数的 94.9%、96.7%以及 93.5%。分类结果显示它们分别属于条件致病菌哈氏弧菌、副溶血弧菌和创伤弧菌。**结论:** 大菱鲆的核心肠道菌群为弧菌属,它的主要成员哈氏弧菌、副溶血弧菌和创伤弧菌对大菱鲆及人类的健康起到关键的作用。在水产养殖过程中,通过监控这些弧菌种类的浓度变化能够及时对养殖环境进行评价,并及时调整温度、水质等因素,这为预防大菱鲆细菌性疾病,保证人类健康提供重要的理论依据。

关键词: 大菱鲆; 肠道微生物; 16S rRNA; RFLP**中图分类号:** R378, Q93-331 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)20-3801-05Different Taxonomic Distribution of Gastrointestinal Tract Microbiome of Turbot (*Scophthalmus maximus*) Individuals*XING Meng-xin^{1,2}, LI Gui-yang³, HOU Zhan-hui¹, QU Yan-mei¹, LIU Bin^{1△}

(1 Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, Shandong, 266071, China;

2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100049, China;

3 Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao, Shandong, 266071, China)

ABSTRACT Objective: Microbial community of gastrointestinal tract plays an important role in host physiology and health. Turbot (*Scophthalmus maximus*) is one of the most important farmed species in northern China. However, bacterial diseases have become increasingly prominent which lead to considerable mortality. Moreover, many pathogenic bacteria of turbot were also identified as potential human pathogens. Therefore, it is important to identify the core intestinal microbiota in farmed adult turbot (*Scophthalmus maximus*), and the bacteria which may be associated with turbot or human health. **Methods:** Restriction fragment length polymorphism (RFLP) and bioinformatics were applied to investigate the bacterial composition and diversity of gastrointestinal tract in three individuals. **Results:** A total of 758 positive clones and 16 OTUs were obtained in this study. Taxonomic analysis indicated that Proteobacteria were dominated in the turbot gastrointestinal microbiome. At the genus level, *Vibrio* was the most dominated genus, accounting for 95.3% of all positive clones. Venn diagram showed that the number of OTUs shared between three turbot gastrointestinal libraries was 3, i.e., 94.9%, 96.7% and 93.5% of the positive clones were present in the three turbot gastrointestinal libraries, respectively. Taxonomy showed that the shared OTUs belonged to *V. harveyi*, *V. Parahaemolyticus* and *V. vulnificus*. **Conclusion:** The core intestinal microbiota of farmed adult turbot was *Vibrio*. Within *Vibrio*, the three main species, *V. harveyi*, *V. Parahaemolyticus* and *V. vulnificus* were recognized as potential pathogens which played an important role on turbot and human health. In aquaculture, farming environment can be evaluated and some other factors, such as temperature, water quality could be also regulated timely by monitoring the change of the concentration of *Vibrio* species. This study provided an important foundation for preventing bacterial diseases in turbot and defending human health.

Key words: Turbot; Gastrointestinal tract microbiome; 16S rRNA; RFLP**Chinese Library Classification(CLC):** R378, Q93-331 **Document code:** A**Article ID:** 1673-6273(2014)20-3801-05

* 基金项目: 国家高技术研究发展计划(863 计划)(2007AA09Z444)

作者简介: 邢孟欣(1984-), 女, 博士研究生, 从事大菱鲆肠道菌群多样性及功能研究, 电话: 0532-82898857, E-mail: 15865506157@126.com

△ 通讯作者: 刘斌(1960-), 男, 博士, 研究员, E-mail: binliu806@yahoo.cn

(收稿日期: 2014-01-26 接受日期: 2014-02-21)

前言

动物的肠道是一个非常复杂的生态系统。在这个生态系统中,包含着一个多样的、动态的微生物群体。这个群体的组成与活性取决于宿主的遗传信息、生活方式、营养方式以及外界环境^[1,2]。虽然肠道微生物附着在宿主肠道中特定的位置,并依靠着宿主的肠道生活,但它同时也能够帮助宿主完成多种生理生化功能,包括促进食物的消化吸收,维持宿主体内平衡,参与宿主肠道发育,调节宿主免疫系统,抵御致病菌等^[3-5]。有研究表明,保持肠道菌群结构的稳定性是防止动物或人类疾病,尤其是细菌性疾病发生的重要因素^[6]。目前,许多细菌性疾病被证明是由条件致病菌引起的。在正常情况下,这些细菌与宿主之间存在共生关系。一旦受到外界环境的刺激,如温度变化,氧浓度改变,环境污染等,破坏了宿主体内平衡,条件致病菌大量繁殖,最终导致疾病的发生^[7]。除条件致病菌外,在动物或人类的肠道中还包含一个特殊的类群——“益生菌”。有研究表明,益生菌能够在维持肠道微生物正常状态方面发挥重要的作用^[8]。大菱鲆(*Scophthalmus maximus*),源产于欧洲,20世纪90年代初引入中国,由于具有较高的经济价值,目前已成为我国北方最重要的海水养殖品种之一。然而,随着水产养殖业的迅速发展,细菌性疾病的发生率也逐渐增加,造成大规模的鱼类死亡^[9]。此外,许多大菱鲆致病菌也被证实是人类潜在的致病菌,例如弧菌等。且有研究表明,某些细菌虽然能够稳定存在于第一宿主体内,但是,一旦侵入第二宿主,就有可能破坏第二宿主的免疫应答系统,导致疾病的发生^[9]。综上所述,研究肠道菌群结构对大菱鲆以及人类的健康尤为重要。

目前所掌握的大菱鲆相关微生物主要来源于大菱鲆幼体肠道及皮肤表面,且大多是采用传统的培养方法^[10],而对大菱鲆成鱼肠道菌群结构的研究相对较少。在本研究中,通过16S rRNA文库构建及限制性片段长度多态性(RFLP)技术,研究不同大菱鲆个体的肠道菌群结构差异,以鉴定大菱鲆肠道中所包含的核心菌群,并筛选可能与大菱鲆或人类健康密切相关的细菌,为今后水产病害防治、保证水产品安全以及养殖过程中人员的安全防护等提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集

实验所采用的大菱鲆均来自青岛市胶南养殖场。这些大菱鲆养殖在持续充氧并过滤的鱼池当中,鱼池中的水为循环海水。每天喂食大菱鲆两次,分别是上午八点钟和下午三点钟。鱼食的配方主要包含52%的粗蛋白,12%的粗脂肪以及2.5%的氨基酸,且并未添加任何益生菌成分。在本实验中,随机挑选成年健康的(无明显疾病特征,饮食正常)大菱鲆三尾(T1, T2, T3),平均体重约为650 g。在上午喂食六小时后,利用麻醉剂MS-222将其麻醉。在无菌的条件下,利用眼科剪从大菱鲆肛门处将腹部剪开,并将大菱鲆胃肠道分离出来,PBS缓冲液清洗残留血液、脂肪等杂质。慢慢地将胃肠道内含物挤出,随后用眼科剪将胃肠道纵向剪开,使用橡胶刮刀将肠道内壁粘膜慢慢刮下来^[11]。将从每条大菱鲆中分离的内含物和粘膜混合在一起,放入含有PBS缓冲液的50 mL离心管中,混合均匀。4℃条件

下4,000 rpm离心20分钟。倒掉上清,剩余的沉淀样品即为所需大菱鲆肠道微生物。

1.2 基因组DNA提取及16S rRNA文库构建

1.2.1 基因组DNA提取 利用Qiagen基因组DNA提取试剂盒(Qiagen, Germany)分别提取三条大菱鲆肠道微生物基因组DNA。每个样品提取两次,TE缓冲液溶解后,-20℃保存。

1.2.2 16S rRNA文库构建 以提取的基因组DNA为模版,使用16S rRNA扩增引物(27F:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 1492R:5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')进行PCR扩增反应,扩增产物长度约为1.5 kb。每个样品同时进行5管PCR反应,PCR反应体系(25 μL)包括:10× PCR buffer 2.5 μL, 10 mM dNTP 0.5 μL, 5 U/μL Taq polymerase 0.2 μL, 10 μM引物各0.5 μL, DNA模版1 μL。反应条件为:预变性94℃, 5 min; 34个循环包括94℃, 30 s, 55℃, 45 s, 72℃, 90 s; 延伸72℃, 10 min。将每个样品的5管PCR产物混合并纯化,之后分别与PMD18-T载体(Takara, Japan)相连接并转化感受态Trans5α(Tiangen, China)。用灭菌牙签随机挑取200-300个阳性克隆,利用M13通用引物进行菌液PCR扩增反应,检测转化效率。设置重复实验以保证结果的准确性。

1.3 限制性片段长度多态性(RFLP)与测序分析

利用BsuRI和HindⅢ内切酶对上述阳性PCR产物进行酶切,酶切位点分别为GG/CC和G/CGC。通过分析酶切结果,将酶切带型相同的归为一个操作分类单元(OTU)。在每个OTU类型中,随机挑选三个阳性克隆进行质粒提取以及双端测序。测序平台为ABI 3730XL测序仪,测序使用的引物为通用引物M13。测序得到的序列利用DNAStar软件进行拼接组装。之后利用PhredPhrap软件去掉载体及质量较差的序列。利用Bellerophon软件以及Greengenes网站(<http://greengenes.lbl.gov>)清除含有嵌合体的序列^[12]。经过质量筛选后的16S rRNA基因序列用于后续分析。将每个代表不同操作分类单元(Operational Taxonomic Unit, OTU)OTU类型的16S rRNA基因序列提交到GenBank数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>)并取得相应的序列号。

1.4 数据分析

将16S rRNA序列提交到RDP与GenBank数据库中,进行细菌分类比对分析(分类最小阈值为80%),如果16S rRNA序列(OTUs)与数据库中的任何序列的相似性小于95%,则认为该序列是新菌种^[13];根据公式 $[1-(n/N)] \times 100$ 计算每个16S rRNA文库的覆盖率(Good, 1953)。其中n代表含有单个克隆的OTU数,N代表OTU总数;利用DOTUR软件对每个文库的多样性进行分析,设定的阈值为97%。用于检测文库丰度的系数包括Chao1、the abundance-based coverage (ACE)以及interpolated jackknife。用于检测文库多样性的系数包括Shannon-Weaver diversity index和Simpson reciprocal diversity。

2 结果

2.1 16S rRNA文库构建及RFLP分析结果

利用菌液PCR扩增反应检测三个文库的转化效率,结果显示,1.7 kb处的电泳条带单一、清晰,证明连接及转化实验效果较好(图1)。进一步分析可知,从三个16S rRNA文库中共得

到 758 个阳性克隆。每个文库中的阳性克隆数量为 245-262(表 1), 所占比例约为 85%-91%。经 *Bsu*RI 和 *Hin*6I 酶切后, 电泳检测均产生条带清晰的酶切条带(图 2、图 3)。进一步分析酶切带型, 共得到 16 个无重复的 OTU 类型 (GenBank 序列号为 KF303714-KF303729)。每个 16S rRNA 文库中所包含的 OTU 类型为 7-10, 覆盖率为 85.7%-90%, 上述结果符合 16S rRNA 文库构建标准, 能够较准确的反应每个文库中的菌群结构特征。利用 DOTUR 软件对各个文库的丰度及多样性进行计算, 结果显示三个大菱鲆个体肠道文库的多样性特征基本相似。16S rRNA 文库的详细信息见表 1。

2.2 不同大菱鲆个体肠道菌群结构差异分析

将 RFLP 分析所得到的 OTU 类型进行分类分析, 结果显示 16 个 OTU 类型一共可归为 4 个细菌门类, 分别为变形菌门、厚壁菌门、柔膜菌门以及蓝藻细菌。其中, 变形菌门在大菱鲆三个个体(T1、T2、T3)肠道中均占优势地位, 分别约占阳性克隆总数的 99.2%、98.8%以及 98.5%。此外, 大菱鲆 T1 肠道中还包含蓝藻细菌, 所占比例约为 0.8%; 大菱鲆 T2 肠道中还包含厚壁菌门和柔膜菌门, 所占比例分别约为 0.38%和 0.82%; 大菱鲆 T3 肠道中还包含厚壁菌门, 所占比例约为 1.5%。进一步将所得到的肠道菌按属分类可知, 在大菱鲆三个个体(T1、T2、

T3)肠道中, 弧菌所占的比例最大, 分别占三个肠道文库中阳性克隆总数的 96%、96.7%以及 94.7%(图 3)。

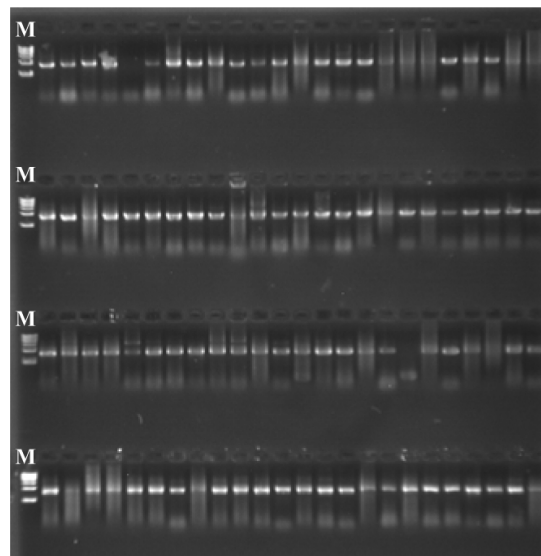


图 1 16S rRNA 文库阳性克隆检测图

Fig.1 The PCR amplification for positive clones from 16S rRNA clone library

M: 1kb Marker(1kb, 2 kb, 3 kb, 4 kb, 5 kb, 6 kb, 7 kb, 8 kb, 9 kb, 10 kb)

表 1 三个 16S rRNA 文库的覆盖率及多样性分析

Table 1 Clone library coverage and bacterial diversity indices for the 16S rRNA gene clone library constructed from three samples

	No. OTUs	No. clones	Coverage %	Chao1	ACE	Jackknife	Shannon	Simpson
T1	9	253	88.9	8	8.5	9	1.03	0.46
T2	7	245	85.7	6	6.6	7	0.78	0.53
T3	10	262	90	9	10.4	10	1.04	0.45

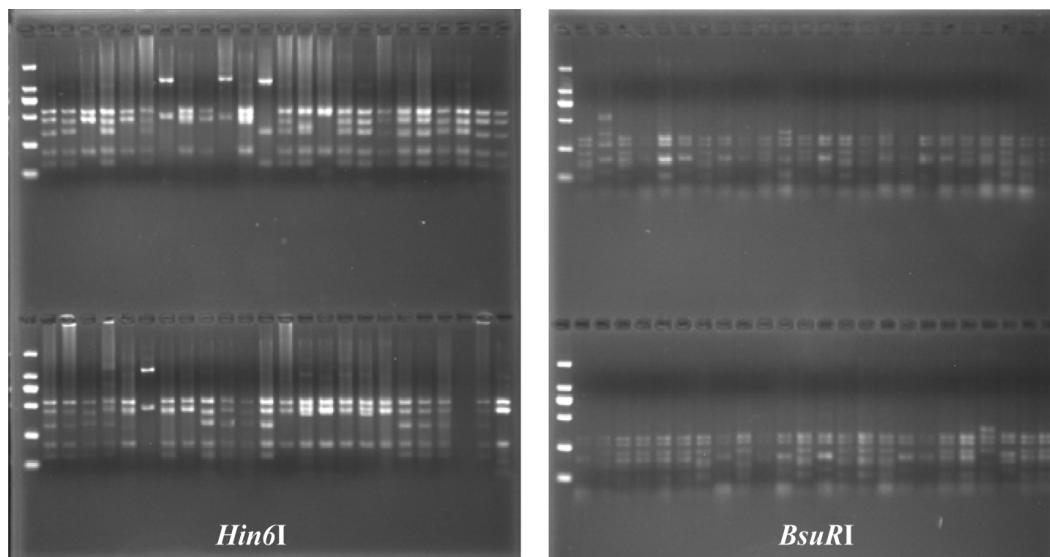


图 2 *Hin*6I、*Bsu*RI 酶切检测图

Fig.2 The detection for *Hin*6I and *Bsu*RI digestion reaction

利用韦恩图(Venn diagram)进一步研究不同大菱鲆个体肠道菌群结构关系。结果显示, 三个大菱鲆个体肠道文库中共有的 OTU 类型数量为 3, 分别占三个大菱鲆个体肠道文库中阳性克隆总数的 94.9%、96.7%以及 93.5%(图 4、表 2)。对这些共有的 OTU 进行分类分析可知, 它们均属于弧菌属, 分别为副溶

血弧菌、哈氏弧菌以及创伤弧菌。此外, 大菱鲆 T1 与 T2 肠道中均含有大菱鲆弧菌; 大菱鲆 T2 与 T3 肠道中均含有溶血不动杆菌; 大菱鲆 T1 与 T3 肠道中均含有灿烂弧菌和沃当弧菌。三个大菱鲆个体肠道文库中均包含其特有的 OTU 类型 (图 4), 但它们在文库中所占的比例均较低。

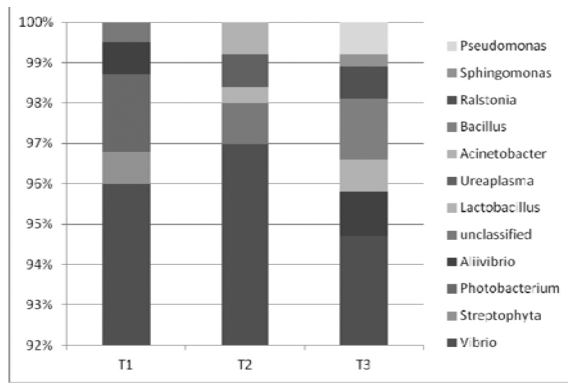


图 3 大菱鲆不同个体肠道菌群结构(按属划分)

Fig.3 Bacterial composition of the different gut communities of turbot (at the genus level)

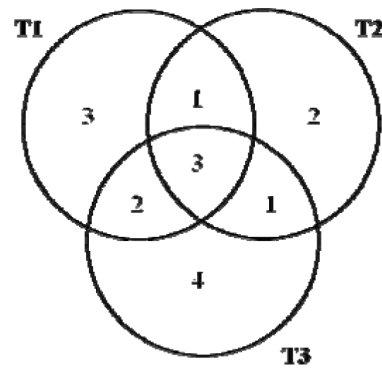


图 4 三个大菱鲆肠道文库中共有及特有的 OTUs 分析图

Fig.4 Venn diagram showing the unique and shared OTUs in the three turbot gut libraries

表 2 三个大菱鲆肠道文库中共有的细菌种类

Table 2 Shared species among the three gut libraries

Species	No. Shared clones		
	T1	T2	T3
<i>V. parahaemolyticus</i>	155	161	156
<i>V. harveyi</i>	68	73	82
<i>V. vulnificus</i>	17	3	7
Shared clones/Total clones (%)	94.9	96.7	93.5

3 讨论

有研究表明,每一物种的肠道中包含着特有的微生物群体,即“肠道核心菌群”。目前该群体已经在很多物种中被证实^[13,14]。其中,Wu 等证明草鱼的“肠道核心菌群”包括变形菌门、厚壁菌门以及放线菌门^[7]。在本实验中,利用 16S rRNA 文库构建及 RFLP 分析技术研究成年养殖大菱鲆“肠道核心菌群”。结果显示,三个成年养殖大菱鲆个体肠道中,变形菌门占优势地位。其中,弧菌属所占的比例最大,分别为 96%、96.7%以及 94.7%。之前许多国内外学者利用培养及分子生物学方法证明,弧菌属是海水鱼肠道微生物中的主要组成部分,它的许多成员与鱼类的健康密切相关^[3,15,16]。此外,本实验中三个大菱鲆个体肠道文库中共有的 OTU 类型数量为 3,分别占三个大菱鲆个体肠道文库中阳性克隆总数的 94.9%、96.7%以及 93.5%。分类分析显示,这三个共有的 OTU 类型均属于弧菌,且占大菱鲆肠道文库阳性克隆总数的 95.3%。综上所述,弧菌属构成了成年养殖大菱鲆的“肠道核心菌群”。

鱼类的肠道被认为是条件致病菌的“储藏基地”^[7]。弧菌属中的许多成员被认为是条件致病菌,能够引起许多水产养殖品种以及人类致病死亡。到目前为止,从大菱鲆中分离得到的弧菌种类主要来源于大菱鲆皮肤、大菱鲆幼鱼肠道以及养殖大菱鲆的海水环境,包括灿烂弧菌、鳃弧菌,大菱鲆弧菌,副溶血弧菌,鲍内脏弧菌,费氏弧菌,以及鱼肠道弧菌等^[10]。在本实验中,养殖大菱鲆肠道中弧菌属的主要成员包括创伤弧菌、副溶血弧菌和哈氏弧菌。他们均是水产养殖动物的重要的条件致病菌,这些细菌的大量繁殖能够破坏宿主自身免疫系统,导致鱼、虾、蟹在水产养殖中大量死亡,该现象大多发生在动物幼年时期且

发生迅速。其中,哈氏弧菌的致病性还与噬菌体的存在密切相关^[17]。此外,创伤弧菌和副溶血弧菌还是人类重要的致病菌。创伤弧菌主要通过两种途径感染人类致病。第一,食用生的或未煮熟的海鲜产品易导致败血症的发生;第二,将开放性创伤暴露在含有高浓度创伤弧菌的温海水中,导致创伤感染甚至组织坏死^[18]。患有免疫缺陷病的患者和由于遗传缺陷体内含有高浓度血清铁的患者是上述感染症状的高发人群^[17]。副溶血弧菌与创伤弧菌感染人类的途径基本相似,但感染副溶血弧菌除了会导致伤口感染、败血症以外,更常见的病症是导致严重的肠胃炎^[19,20]。因此,在养殖大菱鲆过程中,养殖人员要做好防护措施,避免直接与大菱鲆或养殖海水接触。定时清理鱼池,检测大菱鲆生长情况及海水中弧菌浓度,及时处理死鱼、病鱼。人们日常宰杀、处理大菱鲆时,也应注意防护,避免接触伤口。

大菱鲆是重要的经济海水鱼类。本实验中,利用 16S rRNA 文库构建、限制性片段长度多态性(RFLP)技术和生物信息技术对不同大菱鲆个体肠道菌群结构差异进行研究。结果显示,大菱鲆肠道中的核心菌群为弧菌属,它主要包括鱼类条件致病菌哈氏弧菌、副溶血弧菌和创伤弧菌。其中后两者还是重要的人类致病菌。在水产养殖过程中,监控这些弧菌种类的浓度变化是保证大菱鲆,甚至人类健康的重要措施。通过本课题的研究,为今后大菱鲆细菌疾病防治、保证水产品安全以及养殖过程中人员的安全防护等提供理论依据

参考文献(References)

- [1] Nicholson JK, Holmes E, Kinross J, et al. Host-gut microbiota metabolic interactions[J]. Science, 2012, 336(6086): 1262-1267
- [2] Li X, Yu Y, Feng W, et al. Host species as a strong determinant of the intestinal microbiota of fish larvae[J]. J Microbiol, 2012, 50(1): 29-37

- [3] Pérez T, Balcázar JL, Ruiz-Zarzuela I, et al. Host - microbiota interactions within the fish intestinal ecosystem [J]. Mucosal Immunol, 2010, 3(4): 355-360
- [4] Karasov WH, Martínez del Río C, Caviedes-Vidal E. Ecological physiology of diet and digestive systems[J]. Annu Rev Physiol, 2011, 73: 69-93
- [5] Forsythe P, Bienenstock J. Immunomodulation by commensal and probiotic bacteria[J]. Immunol Invest, 2013, 39(4-5): 429-448
- [6] Ringø E, Olsen RE, Mayhew TM, et al. Electron microscopy of the intestinal microflora of fish[J]. Aquaculture, 2003, 227(1-4): 395-415
- [7] Wu S, Wang G, Angert ER, et al. Composition, diversity, and origin of the bacterial community in grass carp intestine [J]. PLoS One, 2012, 7(2): e30440
- [8] 樊瑞锋, 王印庚, 梁友, 等. 一株广温性大菱鲆肠道益生菌的筛选与鉴定[J]. 渔业科学进展, 2011, 32(1): 40-45
Fan Rui-feng, Wang Yin-geng, Liang You, et al. Screening and identification of a eurythermal probiotic bacterium in the intestine of cultured *Scophthalmus maximus*[J]. Progress in Fishery Sciences, 2011, 32(1): 40-45
- [9] Qu A, Brulc JM, Wilson MK, et al. Comparative metagenomics reveals host specific meravirulomes and horizontal gene transfer elements in the chicken cecum microbiome[J]. PLoS One, 2008, 3(8): e2945
- [10] Montes M, Farto R, Pérez MJ, et al. Characterization of *Vibrio* strains isolated from turbot (*Scophthalmus maximus*) culture by phenotypic analysis[J]. J Appl Microbiol, 2003, 95(4): 693-703
- [11] Pérez-Sánchez T, Balcázar JL, García Y, et al. Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), with inhibitory activity against *Lactococcus garvieae*[J]. J Fish Dis, 2011, 34(7): 499-507
- [12] Zhu L, Wu Q, Dai J, et al. Evidence of cellulose metabolism by the giant panda gut microbiome[J]. PNAS, 2011, 108(43): 17714-17719
- [13] Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins[J]. Nature, 2009, 457(7228): 480-484
- [14] Qin J, Li R, Raes J, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing [J]. Nature, 2010, 464(7285): 59-65
- [15] Blanch AR, Hispano C, Bultó P, et al. Comparison of *Vibrio* spp. Populations found in seawater in exhibition aquaria, in fish intestine and in fish feed[J]. Journal of Applied Microbiology, 2009, 106(1): 57-65
- [16] Ward NL, Steven B, Penn K, et al. Characterization of the intestinal microbiota of two Antarctic notothenioid fish species [J]. Extremophiles, 2009, 13(4): 679-685
- [17] Thompson PL, Iida T, Swings J. Biodiversity of *Vibrios*[J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2004, 68(3): 403-431
- [18] Bross MH, Soch K, Morales R, et al. *Vibrio vulnificus* infection: diagnosis and treatment[J]. Am Fam Physician, 2007, 76(4): 539-544
- [19] Broberg CA, Calder TJ, Orth K. *Vibrio parahaemolyticus* cell biology and pathogenicity determinants[J]. Microbes Infect, 2011, 13(12-13): 992-1001
- [20] Ham H, Orth K. The role of type III secretion system 2 in *Vibrio parahaemolyticus* pathogenicity[J]. J Microbiol, 2012, 50: 719-725