การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *Vibrio vulnificus* และ *Vibrio mimicus*

นางสาวสุทธินี ภู่ศิริฤทธิ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2548

ISBN : 974-14-2161-3

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST *Vibrio vulnificus* AND *Vibrio mimicus*

Miss Suttinee Pusiririt

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2005

ISBN : 974-14-2161-3

481584

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *Vibrio vulnificus* และ *Vibrio mimicus*
โดย	นางสาวสุทธินี ภู่ศิริฤทธิ์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.อมร เพชรสม)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา)

สุทธินี ภู่ศิริฤทธิ์ : การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *Vibrio vulnificus* และ *Vibrio mimicus* (PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST *Vibrio vulnificus* AND *Vibrio mimicus*) อ. ที่ปรึกษา : รศ. ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ 108 หน้า. ISBN : 974-14-2161-3

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *Vibrio vulnificus* (VVC และ VVB) และ *Vibrio mimicus* DMST 15142 (VM) ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อให้เกิดโรคในคนและกุ้งกุลาดำ โดยการปลูกภูมิคุ้มกันให้หนูขาวด้วยเซลล์รูปแบบ heat killed และ SDS-mercaptoethanol treated ของ VVC, VVB และ VM ได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *V. vulnificus* 41 โคลน แบ่งเป็น 12 กลุ่ม ตามความจำเพาะต่อโปรตีนในช่วงประมาณ 3-58 กิโลดาลตัน โมโนโคลนอลแอนติบอดี 4 กลุ่ม มีความจำเพาะต่อ *V. vulnificus* โดยไม่แสดงปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียสกุลวิบริโอและแบคทีเรียสกุลอื่นที่นำมาทดสอบ โคลนที่จับกับแถบโปรตีนช่วงประมาณ 3-14 กิโลดาลตัน มีความไวในการตรวจสอบ *V. vulnificus* ด้วยวิธี Dot blotting ที่ระดับความเข้มข้นประมาณ $1.6x10^5$ CFU/ml (ประมาณ $1.6x10^2$ เซลล์ต่อจุด) นอกจากนี้โมโนโคลนอลแอนติบอดีบางโคลนสามารถตรวจสอบการติดเชื้อ *V. vulnificus* ในเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำด้วยวิธี Immunohistochemistry ได้ ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดีอีก 8 กลุ่ม แสดงปฏิกิริยาข้ามกับสายพันธุ์อื่นๆ ของวิบริโอและแบคทีเรียสกุลอื่นๆ ในวงศ์ Vibrionaceae

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *V. mimicus* DMST 15142 ได้ 12 โคลน แบ่งเป็น 7 กลุ่ม ตามความจำเพาะต่อโปรตีนในช่วงประมาณ 3-55 กิโลดาลตัน โมโนโคลนอลแอนติบอดี 2 กลุ่ม มีความจำเพาะต่อ *V. mimicus* โดยไม่แสดงปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียสกุลวิบริโอและแบคทีเรียสกุลอื่นที่นำมาทดสอบ โคลนที่จับกับแถบโปรตีนช่วงประมาณ 19-32 กิโลดาลตัน มีความไวในการตรวจสอบ *V. mimicus* DMST 15142 ด้วยวิธี Dot blotting ที่ระดับความเข้มข้นประมาณ $3.3x10^4$ CFU/ml (ประมาณ $3.3x10^1$ เซลล์ต่อจุด) ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดีอีก 5 กลุ่ม แสดงปฏิกิริยาข้ามกับสายพันธุ์อื่นๆ ของวิบริโอและแบคทีเรียสกุลอื่นๆ ในวงศ์ Vibrionaceae มีเพียงกลุ่มที่จับกับแถบโปรตีนขนาดประมาณ 41 และ 55 กิโลดาลตันเท่านั้นที่สามารถตรวจสอบการติดเชื้อ *V. mimicus* ในเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำด้วยวิธี Immunohistochemistry

โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เตรียมได้จากการศึกษานี้สามารถนำไปพัฒนาเป็นชุดตรวจเพื่อใช้จำแนกแบคทีเรียบนพื้นฐานทางวิทยาภูมิคุ้มกัน

สาขาวิชา.....เทคโนโลยีชีวภาพ..... ลายมือชื่อนิสิต.....สุทธินี ภู่ศิริฤทธิ์.....

ปีการศึกษา....2548..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

4672522823: BIOTECHNOLOGY

KEY WORDS: MONOCLONAL ANTIBODIES / *Vibrio vulnificus* / *Vibrio mimicus* / DOT BLOTTING / IMMUNOHISTOCHEMISTRY

SUTTINEE PUSIRIRIT: PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST *Vibrio vulnificus* AND *Vibrio mimicus*. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. SIRIRAT RENGPIPAT, Ph.D., 108 pp. ISBN : 974-14-2161-3

Monoclonal antibodies (MAbs) against *V. vulnificus* (VVC and VVB) and *V. mimicus* DMST 15142 (VM) that cause diseases in human and black tiger shrimp, using heat killed and SDS-mercaptoethanol treated form of VVC, VVB and VM for immunizing swiss mice were performed. Fourty-one MAbs against *V. vulnificus* were selected and divided into 12 groups according to their specificities to various proteins range from ~3-58 kDa. Four groups were specific to *V. vulnificus* without cross reactivity to other *Vibrio* spp. and other bacteria. MAbs binding to proteins range from ~3-14 kDa were able to detect *V. vulnificus* by Dot blotting with high sensitivity at ~$1.6x10^5$ CFU/ml (~$1.6x10^2$ cells/spot). In addition, some MAbs were able to recognize *V. vulnificus* in tissues by means of Immunohistochemistry. The remaining groups demonstrated cross reactivity to other *Vibrio* spp. and other genera of family Vibrionaceae.

Twelve MAbs against *V. mimicus* DMST 15142 were selected and divided into 7 groups according to their specificities to various proteins range from ~3-55 kDa. Two groups were specific to *V. mimicus* without cross reactivity to other *Vibrio* spp. and other bacteria. MAbs binding to proteins range from ~19-32 kDa could detect *V. mimicus* DMST 15142 by Dot blotting with high sensitivity at ~$3.3x10^4$ CFU/ml (~$3.3x10^1$cells/spot). The remaining groups demonstrated cross reactivity to other *Vibrio* spp. and other genera of family Vibrionaceae. Only a group of proteins binding to molecular mass of ~41 and 55 kDa recognized the *V. mimicus* in tissue by means of Immunohistochemistry.

MAbs prepared from this study can be used to identify bacteria classification on the basic of immunology.

Field of study.....Biotechnology..... Student's signature.....Suttinee Pusiririt.....

Academic year.....2005..... Advisor's signature.....Siriwat Rengpipat.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดีโดยได้รับความกรุณาจาก รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำ ความช่วยเหลือ ตลอดจนข้อคิดเห็นต่างๆ รวมทั้งได้ช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ไพศาล สิทธิกรกุล อาจารย์ประจำภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำ ความช่วยเหลือ ตลอดจนข้อคิดเห็นต่างๆ แก่ข้าพเจ้า ขอกราบขอบพระคุณและสำนึกในพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ และได้ให้ข้อคิดเห็น คำแนะนำ แก้ไขปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.อมร เพชรสม และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา ที่กรุณารับเป็นกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ และได้ให้ข้อคิดเห็น คำแนะนำ แก้ไขปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ และภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร และเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือ อำนวยความสะดวกในการทำวิทยานิพนธ์ด้วยดีเสมอมา

ขอขอบคุณศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ และบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ทุนอุดหนุนในการทำวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ ดร. ศิวาพร ลงยันต์ นายสมบัติ รักประทานพร เพื่อน และพี่น้องภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตรทุกท่าน ที่ได้ให้ข้อคิดเห็น คำปรึกษา คำแนะนำ และความช่วยเหลือในเรื่องต่างๆ แก่ข้าพเจ้าเสมอมา

ขอขอบคุณเพื่อน และพี่น้อง ภาควิชาจุลชีววิทยา และสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ที่ให้คำปรึกษา และช่วยเหลือในเรื่องต่างๆ

ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา พี่ และครอบครัวของข้าพเจ้า ที่ดูแล ช่วยเหลือ และให้กำลังใจเสมอมา สุดท้ายนี้ขอบคุณสัตว์ทดลองทุกชีวิตในการวิจัยของข้าพเจ้า

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ฌ

สารบัญรูป..... ฎ

สัญลักษณ์และคำย่อ..... ฐ

บทที่

1 บทนำ..... 1

2 การตรวจเอกสาร..... 4

2.1 กุ้งกุลาดำ..... 4

2.2 โรควิบริโอซิส..... 6

2.3 *Vibrio vulnificus*..... 6

2.4 โรคเสี้ยนดำ..... 17

2.5 *Vibrio mimicus*..... 18

2.6 การตรวจสอบ *Vibrio vulnificus* และ *Vibrio mimicus*..... 21

2.7 โมโนโคลนอลแอนติบอดี..... 21

3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย..... 28

3.1 อุปกรณ์ที่สำคัญ..... 28

3.2 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในงานวิจัย..... 29

3.3 วิธีดำเนินการวิจัย..... 30

4 ผลการทดลอง..... 48

4.1 สมบัติทางสัณฐานวิทยาของ *V. vulnificus* VVC, VVB และ *V. mimicus*... 48

4.2 การผลิตโมโนโคลนอลจำเพาะต่อ *V. vulnificus* VVC..... 50

4.3 การผลิตโมโนโคลนอลจำเพาะต่อ *V. vulnificus* VVB..... 58

4.4 การผลิตโมโนโคลนอลจำเพาะต่อ *V. mimicus* DMST 15142 (VM)..... 68

5 วิจารณ์ผลการทดลอง..... 75

หน้า

6 สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ..... 80
รายการอ้างอิง..... 82
ภาคผนวก..... 91
ภาคผนวก ก 92
ภาคผนวก ข..... 94
ภาคผนวก ค..... 95
ภาคผนวก ง..... 97
ภาคผนวก จ..... 101
ภาคผนวก ฉ..... 102
ภาคผนวก ช..... 103
ภาคผนวก ซ..... 104
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 108

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ลักษณะทางกายภาพและชีวเคมีของ *V. vulnificus*.....	8
2.2	อาการที่สัมพันธ์กับการติดเชื้อทางบาดแผลของ *V. vulnificus*.....	11
2.3	การเปรียบเทียบลักษณะทางชีวเคมีของ *V. vulnificus* แต่ละไบโอไทป์.....	12
2.4	ลักษณะทางกายภาพและชีวเคมีของ *V. mimicus* และ *V. cholerae*.....	19
3.1	แบคทีเรียที่ใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ จำเพาะต่อ *V. vulnificus* และ *V. mimicus*.....	32
3.2	การอ่านผลการวิเคราะห์สมบัติทางชีวเคมีด้วยชุดทดสอบ API 20E.....	34
3.3	การเติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีผสมสำหรับการวิเคราะห์อิพิโทป.....	47
4.1	สมบัติทางสัณฐานวิทยาของ *V. vulnificus* VVC, VVB และ *V. mimicus*.....	48
4.2	สมบัติทางชีวภาพของ *V. vulnificus* VVC, VVB และ *V. mimicus* โดยชุดทดสอบ API 20E.....	49
4.3	โมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อ *V. vulnificus* VVC.....	57
4.4	การวิเคราะห์อิพิโทปของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อ VVC ด้วยวิธี indirect ELISA.....	57
4.5	โมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อ *V. vulnificus* VVB.....	66
4.6	การวิเคราะห์อีพิโทปของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อ VVB ด้วยวิธี indirect ELISA.....	67
4.7	โมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อ *V. mimicus* (VM).....	74
4.8	การวิเคราะห์อีพิโทปของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อ VM ด้วยวิธี indirect ELISA.....	74
1ง	การเตรียม separating gel และ stacking gel.....	99
1ช	การวิเคราะห์อิพิโทปของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ VVC กลุ่มที่ 1.....	104
2ช	การวิเคราะห์อิพิโทปของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ VVC กลุ่มที่ 2.....	104
3ช	การวิเคราะห์อิพิโทปของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ VVC กลุ่มที่ 3.....	104
4ช	การวิเคราะห์อิพิโทปของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ VVB กลุ่มที่ 1.....	105
5ช	การวิเคราะห์อิพิโทปของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ VVB กลุ่มที่ 3.....	105
6ช	การวิเคราะห์อิพิโทปของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ VVB กลุ่มที่ 4.....	105
7ช	การวิเคราะห์อิพิโทปของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ VVB กลุ่มที่ 5.....	106

ตารางที่ หน้า

8ซ การวิเคราะห์อิพิโทปของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ VVB กลุ่มที่ 6..... 106
9ซ การวิเคราะห์อิพิโทปของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ VVB กลุ่มที่ 7..... 106
10ซ การวิเคราะห์อิพิโทปของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ VM กลุ่มที่ 1..... 107
11ซ การวิเคราะห์อิพิโทปของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ VM กลุ่มที่ 3..... 107

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*, Fabricius, 1798).....	5
2.2	การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี somatic hybridization.....	23
2.3	แนวทางการสังเคราะห์ดีเอนเอ และการยับยั้งของ aminopterin ในการสังเคราะห์ดีเอนเอ ในวิถี de novo.....	24
3.1	แผนภาพการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี.....	36
3.2	แผนผังการคัดเลือกขั้นที่ 1 ด้วยวิธี dot blotting.....	39
3.3	แผนผังการคัดเลือกขั้นที่ 2 ด้วยการวิเคราะห์ Western blotting ปฏิกิริยาข้ามด้วย dot blotting และ immunohistochemistry ในเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำ.....	40
3.4	แผนผังการเตรียมเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำสำหรับการวิเคราะห์ immunohistochemistry (IHC).....	41
3.5	แผนผังการเตรียม IHC ในเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำ.....	42
3.6	แผนผังการวิเคราะห์อิพิโทปของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA.....	46
4.1	การวิเคราะห์ปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ VVC ด้วยวิธี dot blotting.....	52
4.2	การวิเคราะห์ปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ VVC ด้วยวิธี Western blotting.....	53
4.3	การวิเคราะห์ความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ VVC ด้วยวิธี Western blotting.....	54
4.4	การวิเคราะห์ความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ VVC กลุ่มที่ 1 (VVC 23) ด้วยวิธี immunohistochemistry.....	55
4.5	การวิเคราะห์ความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ VVC ด้วยวิธี dot blotting.....	56
4.6	การวิเคราะห์ปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ VVB ด้วยวิธี dot blotting.....	60
4.7	การวิเคราะห์ปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ VVB ด้วยวิธี Western blotting.....	62

รูปที่ หน้า

4.8 การวิเคราะห์ความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ VVB ด้วยวิธี Western blotting..... 63

4.9 การวิเคราะห์ความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ VVB กลุ่มที่ 2 (VVB 158) ด้วยวิธี immunohistochemistry..... 64

4.10 การวิเคราะห์ความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ VVB ด้วยวิธี dot blotting..... 65

4.11 การวิเคราะห์ปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ VM ด้วยวิธี dot blotting..... 70

4.12 การวิเคราะห์ปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ VM ด้วยวิธี Western blotting..... 71

4.13 การวิเคราะห์ความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ VM ด้วยวิธี Western blotting..... 72

4.14 การวิเคราะห์ความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ VM ด้วยวิธี dot blotting..... 73

สัญลักษณ์และคำย่อ

ชม.	=	ชั่วโมง
°ซ	=	องศาเซลเซียส
มก.	=	มิลลิกรัม
มล.	=	มิลลิลิตร
CFU/ml	=	โคโลนีต่อมิลลิลิตร
DAB	=	3,3-ไดอะมิโนเบนซิดีนเททราไฮโดรคลอไรด์
DMSO	=	ไดเมทิลซัลฟอกไซด์
ELISA	=	Enzyme-linked immunosorbent assay
FCS	=	Fetal calf serum
g	=	กรัม
GAM-HRP	=	goat anti-mouse IgG heavy and light chain horseradish peroxidase conjugate
GAR-HRP	=	goat anti-rabbit IgG heavy and light chain horseradish peroxidase conjugate
IHC	=	Immunohistochemistry
kDa	=	กิโลดาลตัน
MAb	=	โมโนโคลนอลแอนติบอดี
µl	=	ไมโครลิตร
OPD	=	o-phenylenediamine dihydrochloride
PAGE	=	พอลิอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโทรฟอเรซิส
PAb	=	พอลิโคลนอลแอนติบอดี
PBS	=	Phosphate buffer saline
RAM-IgG	=	Rabbit anti mouse-IgG
SDS	=	Sodium dodecyl sulphate
TCBS	=	Thiosulfate citrate bile salt
TSA	=	Tryptic soy agar
VM	=	*Vibrio mimicus*
VVB	=	*Vibrio vulnificus* Burapha
VVC	=	*Vibrio vulnificus* Chulalongkorn