ห้องปฏิบัติการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี

ความสำคัญและที่มา

ห้องปฏิบัติการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีมีเป้าหมายหลักในการดำเนินงานวิจัย เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีและพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยโดยมุ่งเน้นการใช้ประโยชน์ในด้านการเกษตรและอาหารเป็นหลัก ได้แก่ การพัฒนาแอนติบอดีและวิธีการตรวจวินิจฉัยสำหรับตรวจเชื้อไวรัสและแบคทีเรียก่อโรคพืช, การตรวจเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในอาหาร และการตรวจฮอร์โมนโปรเจสเตอร์โรนในวัว เป็นต้น นอกจากนี้ทางห้องปฏิบัติการฯยังมีการพัฒนาระบบการจัดเก็บไฮบริโดมาโคลนให้ได้มาตรฐาน มีระบบฐานข้อมูลในการจัดเก็บที่มีประสิทธิภาพ สามารถรองรับการบริการในการฝากเก็บไฮบริโดมาโคลนได้ นอกจากงานด้านการวิจัยห้องปฏิบัติการฯยังมีงานบริการในด้านการเพิ่มปริมาณโมโนโคลนอลแอนติบอดีและทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ และมีการดำเนินการเชิงพาณิชย์กับแอนติบอดีและชุดตรวจวินิจฉัยต่อไวรัสและแบคทีเรียก่อโรคพืชที่ห้องปฏิบัติการฯได้พัฒนาขึ้นแล้ว สำหรับในเชิงสาธารณประโยชน์ได้มีการให้ความอนุเคราะห์แอนติบอดีที่ได้พัฒนาขึ้นแก่นักวิจัย อาจารย์ และนักศึกษาจากสถาบันต่างๆเพื่อประโยชน์ในงานวิจัย การตรวจวิเคราะห์ รวมทั้งการพัฒนาชุดตรวจด้วยเทคโนโลยีต่างๆ เพื่อส่งเสริมงานวิจัยและพัฒนาด้านการเกษตรและการตรวจวินิจฉัยของประเทศให้มีความก้าวหน้าและมีศักยภาพที่เข้มแข็งยิ่งขึ้น

งานวิจัยของห้องปฏิบัติการฯ

1. การพัฒนาแอนติบอดีและวิธีการทางอิมมูโนวิทยาเพื่อใช้สำหรับตรวจวินิจฉัยโรคพืช

ห้องปฏิบัติการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี มีศักยภาพในการผลิตแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อไวรัสและแบคทีเรียก่อโรคพืช โดยมีความร่วมมือกับหลายหน่วยงาน ได้แก่ห้องปฏิบัติการวิจัยด้านพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และกรมวิชาการเกษตร ผลงานที่ผ่านมาสามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีและพัฒนาวิธี Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) สำหรับตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคพืชหลายชนิด เช่น ไวรัสในกลุ่มเจมินีไวรัส (whitefly-transmitted geminiviruses และ tomato yellow leaf curl virus) ทอสโพไวรัส (capsicum chlorosis virus, water melon silver mottle virus, tomato necrotic ringspot virus และ melon yellow spot virus) โพทีไวรัส (potyviruses และ watermelon mosaic virus-2) และแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Aac) ทั้งนี้ได้มีการดำเนินการในเชิงพาณิชย์กับแอนติบอดีทุกชนิดที่ได้ผลิตขึ้นแล้ว โดยมีการจำหน่ายให้แก่บริษัทเมล็ดพันธุ์ หน่วยงานภาครัฐ และบริษัทผลิตชุดตรวจวินิจฉัยอย่างต่อเนื่อง ทั้งนี้แอนติบอดีต่อแบคทีเรีย Aac ได้ถูกนำมาพัฒนาต่อเป็นชุดตรวจแบบรวดเร็ว (Immunochromatographic strip test) ซึ่งได้ดำเนินการเชิงพาณิชย์และมีบริษัทเมล็ดพันธุ์ซื้อไปใช้อย่างต่อเนื่องเช่นกัน

สำรับการตรวจวินิจฉัยด้านโรคพืช ทางห้องปฏิบัติการฯได้มีการพัฒนาต่อยอดเพื่อให้ได้วิธีตรวจวินิจฉัยที่สามารถตรวจโรคได้หลายๆโรคในคราวเดียวกัน (multiplex detection) ได้แก่การพัฒนาชุดตรวจแบบง่ายในรูปแบบ immunochromatographic strip test ที่สามารถตรวจเชื้อไวรัสและแบคทีเรียก่อโรคพืช 3 ชนิดใน 1 ชุดตรวจ นอกจากนี้ได้ร่วมกับห้องปฏิบัติการไมโครอะเรย์ครบวงจร และ Queen’s University Belfast ในการพัฒนา antibody microarray ในการตรวจเชื้อไวรัสและแบคทีเรียก่อโรคพืชหลายๆชนิดในคราวเดียวกัน ยิ่งไปกว่านั้นทางห้องปฏิบัติการฯยังได้มีความร่วมมือกับภาคเอกชนได้แก่บริษัทเมล็ดพันธุ์ในการพัฒนาแอนติบอดีและวิธีตรวจวินิจฉัยเชื้อก่อโรคพืชเพื่อตอบโจทย์ในภาคอุตสาหกรรมโดยตรงอีกด้วย

2. การพัฒนาแอนติบอดีและวิธีการทางอิมมูโนวิทยาเพื่อใช้สำหรับตรวจวินิจฉัยเชื้อก่อโรคในอาหาร

ทางห้องปฏิบัติการฯมีความร่วมมือกับห้องปฏิบัติการระบบจุลินทรีย์เพื่อผลิตชีวโมเลกุลและสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ในการพัฒนาแอนติบอดีและวิธีการทางอิมมูโนวิทยาเพื่อใช้สำหรับตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Listeria* monocytogenes ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียก่อโรคผ่านทางอาหาร (food-borne pathogen) ทั้งนี้ทางคณะได้ทำการพัฒนาแอนติบอดีที่จำเพาะเจาะจงต่อเชื้อ *Listeria monocytogenes* สำเร็จแล้วและได้ร่วมมือกับศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ ในการนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะเจาะจงต่อเชื้อ *Listeria monocytogenes* ที่ทางคณะผลิตขึ้นไปใช้ในการพัฒนาเทคนิค immunomagnetic separation ร่วมกับเทคนิค real-time PCR เพื่อการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Listeria monocytogenes* ในตัวอย่างอาหารได้อย่างจำเพาะเจาะจง มีความไวสูงและใช้เวลารวดเร็ว นอกจากนี้ทางห้องปฏิบัติการฯกำลังพัฒนาแอนติบอดีต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรคผ่านทางอาหารชนิดอื่นอีกด้วย

3. การพัฒนาแอนติบอดีและวิธีการทางอิมมูโนวิทยาเพื่อใช้สำหรับตรวจวิเคราะห์ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในโคนม

ทางห้องปฏิบัติการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้ร่วมกับห้องปฏิบัติการสรีรวิทยาสัตว์และมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ทำการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะสูงต่อฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน และนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ไปใช้ในการพัฒนาวิธีการตรวจหาปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในซีรั่มและน้ำนมโคด้วยวิธีคอมเพททิทีฟ อิไลซ่า (competitive ELISA) ที่มีประสิทธิภาพดี มีความแม่นยำและความไวในการตรวจสูง และราคาถูก การตรวจวิเคราะห์ระดับของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนมีความสำคัญในหลายด้าน ได้แก่ ใช้ยืนยันการเป็นสัดของแม่โคในวันผสมเทียม ใช้ตรวจสอบการตั้งท้องของแม่โคหลังการผสมเทียม ใช้บ่งชี้การทำงานของรังไข่ รวมทั้งใช้วางแผนการจัดการระบบสืบพันธุ์ในฝูงปศุสัตว์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เป็นต้น

4. การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างของชนิดของเพลี้ยไฟ พืชอาศัย และการเข้าทำลายของเชื้อทอสโพไวรัสในมะเขือเทศ พริก และพืชตระกูลแตงในประเทศไทย

เนื่องจากในปัจจุบันมีการแพร่ระบาดของเชื้อทอสโพไวรัสอย่างรุนแรงในพืชเศรษฐกิจหลายชนิดในประเทศไทย ซึ่งเชื้อนี้มีเพลี้ยไฟเป็นแมลงพาหะ จึงทำให้มีความจำเป็นต้องเร่งศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างทอสโพไวรัสและเพลี้ยไฟพาหะ ซึ่งมีความสำคัญในด้านระบาดวิทยาและการจัดการควบคุมโรค การศึกษาในครั้งนี้ได้ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างเพลี้ยไฟ รวมทั้งตัวอย่างพืชเป็นโรคที่แสดงอาการของทอสโพไวรัสจากแปลงปลูกพืชเศรษฐกิจ เช่น มะเขือเทศ พริก และพืชตระกูลแตงในพื้นที่ต่างๆของประเทศไทย โดยได้ทำการศึกษาจำแนกชนิดของเพลี้ยไฟที่ถ่ายทอดเชื้อทอสโพไวรัสทั้งสี่ชนิด (capsicum chlorosis virus, water melon silver mottle virus, tomato necrotic ringspot virus และ melon yellow spot virus) ที่พบในประเทศไทย รวมทั้งศึกษาประสิทธิภาพในการถ่ายทอดเชื้อทอสโพไวรัสของเพลี้ยไฟแต่ละชนิด และรวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับชนิดของเพลี้ยไฟที่พบในแต่ละแหล่งปลูกของพืชชนิดต่างๆ และเชื่อมโยงข้อมูลกับการติดเชื้อและแพร่กระจายของเชื้อทอสโพไวรัสทั้งที่พบในพืชและแมลงพาหะในแหล่งปลูกนั้นๆ นอกจากความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับทอสโพไวรัสและเพลี้ยไฟที่ได้จากโครงการนี้ โครงการยังได้พัฒนาเทคนิคต่างๆที่มีความสำคัญและจำเป็นในการคัดเลือกพันธุ์พืชต้านทานต่อทอสโพไวรัสอีกด้วย

5. การพัฒนาระบบจัดเก็บไฮบริโดมาโคลนที่เป็นมาตรฐาน

ห้องปฏิบัติการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้จัดเก็บไฮบริโดมาโคลนที่ทางห้องปฏิบัติการฯ ได้พัฒนาขึ้นรวมทั้งยังรับฝากเก็บไฮบริโดมาโคลนที่ผลิตจากโครงการที่ได้รับทุนสนับสนุนจากไบโอเทค เพื่อเป็นแหล่งเก็บสำรองแหล่งที่สองอีกด้วย ปัจจุบันมีการเก็บไฮบริโดมาโคลนในถังเก็บไนโตรเจนเหลว รวมทั้งหมดมากกว่า 400 โคลนซึ่งไฮบริโดมาโคลนเหล่านี้ผลิตแอนติบอดีต่อ ไวรัสและแบคทีเรียโรคพืช, ฮอร์โมนและแอนติเจนที่เกี่ยวกับระบบสืบพันธุ์ของโคนม, แบคทีเรียก่อโรคในอาหาร, อะฟลาท็อกซิน และ ไวรัสไข้หวัดนก ทางห้องปฏิบัติการฯได้ทำการตรวจสอบความอยู่รอดและความสามารถในการผลิตแอนติบอดีของไฮบริโดมาโคลนที่มีความสำคัญที่ได้จัดเก็บไว้ซึ่งวางแผนทำการตรวจสอบทุกปี ในด้านการใช้ประโยชน์จากไฮบริโดมาโคลนที่จัดเก็บไว้ ได้มีการดำเนินการในเชิงพาณิชย์และเชิงสาธารณประโยชน์กับแอนติบอดีที่ผลิตขึ้นอย่างต่อเนื่อง

6. งานบริการด้านการเพิ่มปริมาณโมโนโคลนอลแอนติบอดีและทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

ทางห้องปฏิบัติการฯ มีการให้บริการในด้านการเพิ่มปริมาณโมโนโคลนอลแอนติบอดีและทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ แก่หน่วยงานภาครัฐและเอกชน

ผลงานเด่น (2555-2556)

1. การพัฒนาวิธี Immunomagnetic separation ร่วมกับวิธี Real time PCR เพื่อตรวจเชื้อ *Listeria monocytogenes* อย่างจำเพาะเจาะ

ในการศึกษาครั้งนี้ได้พัฒนาวิธีการ immunomagnetic separation (IMS) โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะเจาะจงกับเชื้อ *L. monocytogenes* ที่ห้องปฏิบัติการฯผลิตขึ้น (MAb 3C5) ตรึงลงบน magnetic beads แล้วทดสอบความสามารถในการจับเชื้อ *L. monocytogenes* เปรียบเทียบกับการทดสอบโดยใช้ Dynabeads anti-*Listeria* ชนิดสำเร็จรูปทางการค้า พบว่า immunomagnetic beads (IMBs) ที่โครงการพัฒนาขึ้นมีความจำเพาะต่อเฉพาะเชื้อ *L. monocytogenes* ในขณะที่ Dynabeads anti-*Listeria* ชนิดสำเร็จรูปทางการค้านอกจากทำปฏิกิริยากับ *L. monocytogenes* ยังมีปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อ *Listeria* สปีชี่ส์อื่นๆ และ *Staphylococcus saprophyticus* อีกด้วย นอกจากนี้ Dynabeads anti-Listeria สำเร็จรูปทางการค้ายังให้ % capture efficiency ในการจับเชื้อ *L. monocytogenes* ที่ต่ำกว่า IMBs ที่ทางโครงการได้พัฒนาขึ้น เมื่อนำวิธี Immunomagnetic separation มาร่วมกับวิธี Real time PCR โดยใช้ primers ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อ *L. monocytogenes* พบว่าวิธีการนี้มีความจำเพาะกับเชื้อ *L. monocytogenes* และมีความไวที่ 100 CFU/ml ทั้งนี้ได้ทำการทดสอบวิธีการ immunomagnetic separation ร่วมกับวิธี real-time PCR ที่พัฒนาขึ้นในการตรวจเชื้อ *L. monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์นมและเนย ได้แก่ นมดิบ นมพลาสเจอไรซ์และเนยแข็ง ซึ่งพบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นให้ผลการทดสอบเทียบเท่ากับการทดสอบด้วยวิธี ISO 11290-1 ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานแต่มีความไวสูงกว่าวิธีมาตรฐานจึงทำให้สามารถลดระยะเวลาในการรายงานผลลบที่ไม่มีเชื้อปนเปื้อนจาก 4 วันเป็น 28 ชั่วโมงได้

2. การพัฒนาต้นแบบชุดตรวจแบบรวดเร็วในรูปแบบ immunochromatographic strip test เพื่อตรวจเชื้อก่อโรคพืชในกลุ่มแตง 3 ชนิดให้ได้ในคราวเดียวกัน

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาต้นแบบชุดตรวจแบบรวดเร็วในรูปแบบ immunochromatographic strip test เพื่อตรวจเชื้อก่อโรคพืชในกลุ่มแตง 3 ชนิดให้ได้ในคราวเดียวกัน (multiplex detection) ได้แก่ เชื้อ watermelon mosaic virus-2 เชื้อ potyviruses และเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Aac) จากการประเมินประสิทธิภาพของชุดตรวจทั้งในแง่ความจำเพาะเจาะจงและ

3. การพัฒนาเทคโนโลยี High-throughput RT-PCR-ELISA เพื่อการตรวจจำแนกชนิดทอสโพไวรัส

ได้พัฒนาเทคโนโลยี High throughput RT-PCR-ELISA เพื่อใช้ในการตรวจจำแนกชนิดทอสโพไวรัสที่พบระบาดในประเทศไทยได้แก่ Watermelon silver mottle virus (WSMoV) Melon yellow spot virus (MYSV) Capsicum chlorosis virus (CaCV) และ Tomato necrotic ring spot virus (TNRV) โดยผลจากการศึกษาในตัวอย่างตรวจพืชที่ติดเชื้อทอสโพไวรัสพบว่า วิธี RT-PCR-ELISA ที่พัฒนาขึ้น สามารถใช้ตรวจจำแนกชนิดของทอสโพไวรัสทั้ง 4 ชนิดในตัวอย่างตรวจพืชได้จริง โดยมีข้อดีเมื่อเปรียบเทียบกับวิธี standard RT-PCR ที่ใช้อยู่ปัจจุบันในห้องปฏิบัติการคือ 1) มีความไวในการตรวจพบเชื้อสูงขึ้นประมาณ 10 ถึง 1,000 เท่า 2) ให้ความจำเพาะเจาะจงในการตรวจจำแนกชนิดทอสโพไวรัสที่สูงกว่าวิธี standard RT-PCR เนื่องจากเป็นการวิเคราะห์ผลโดยอาศัยลำดับเบสของ PCR product โดยที่ PCR product ที่มีลำดับเบสที่จำเพาะกับ specific probe ของทอสโพไวรัสแต่ละชนิดเท่านั้นจึงจะถูก capture บน microtiter plate และตรวจสอบโดยวิธี ELISA ซึ่งต่างจากวิธีเดิมที่เป็นการแปลผลโดยดูตามขนาดของ PCR product บน agarose gel เท่านั้น 3) มีความเป็น high-throughput assay การใช้ ELISA-based detection format ช่วยให้สามารถทำการวิเคราะห์ PCR product ได้ถึง 96 ตัวอย่างภายใน plate เดียวกัน นอกจากนี้ขั้นตอนในการทำ ELISA ยังมีลักษณะเป็น semi-automate ซึ่งให้ความสะดวกและรวดเร็วกับการวิเคราะห์ตัวอย่างตรวจจำนวนมาก นอกจากนี้วิธีที่พัฒนาขึ้นยังช่วยลดขั้นตอนที่ต้องเกี่ยวข้องกับการใช้สารก่อมะเร็งอาทิเช่น ethidium bromide อีกด้วย ซึ่ง high throughput RT-PCR-ELISA ที่พัฒนาได้นี้ นอกจากจะนำไปใช้ประโยชน์ตรวจจำแนกชนิดของเชื้อทอสโพไวรัสที่พบในประเทศไทยแล้ว ยังสามารถนำไปต่อยอดใช้ในการตรวจหาทอสโพไวรัสชนิดอื่นๆที่มีการรายงานการระบาดทั่วโลก แต่ยังไม่พบการแพร่ระบาดในประเทศไทยเพื่อเป็นการเฝ้าระวังได้อีกด้วย

Monoclonal Antibody Production Laboratory

Overview

Monoclonal Antibody Production Laboratory has set our goals to specialize in monoclonal antibodies (MAbs) production and immunological assay development for diagnostic purposes. Our main researches emphasize on diagnosis for agricultural relevance. Moreover, we have established the systematic hybridoma collection program. Currently, more than 400 hybridoma clones developed by our laboratory and other institutes have been stored in our laboratory. From our large collections, several MAbs are available commercially. For instance, MAbs specific to plant pathogens are now sold to governmental sectors, seed companies and diagnostic companies. We also provide services in scaling up and purification of MAbs for governmental and private sectors.

Researches

1. Diagnosis of plant pathogens

In collaboration between BIOTEC, Kasetsart University and Khon Kaen University, we have successfully produced a catalog of mouse monoclonal antibodies and rabbit polyclonal antibodies for detection of plant pathogens that cause serious plant diseases such as tomato yellow leaf curl virus, whitefly-transmitted geminiviruses, capsicum chlorosis virus, water melon silver mottle virus, tomato necrotic ringspot virus, melon yellow spot virus, watermelon mosaic virus-2, potyviruses and *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. These available antibodies were used to develop enzyme-linked immunosorbent assays for an efficient detection of the plant diseases. Moreover, in collaboration with the Department of Agriculture, immunochromatographic strip test was successfully developed for rapid detection of seed-borne bacterium *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. All of these antibodies and the immunochromatographic strip test are commercially available and currently being used by the governmental sector, seed companies and diagnostic companies. In order to reduce cost of the diagnostics further, multiplex detection formats of plant pathogens using an immunochromatographic strip test and antibody microarray have been developed. In addition, to answer the actual need of commercial sector, we also collaborate with seed companies to produce antibodies specific to their requirements as well as to develop the efficient detection systems.

2. Diagnosis of foodborne pathogens

We have started to produce antibodies and develop diagnosis methods targeting harmful bacteria that contaminate food. In collaboration with the Department of Medical Science, we produced highly specific monoclonal antibodies to *Listeria monocytogenes*. In collaboration with the Department of Medical Science and NANOTEC, immunomagnetic separation using specific monoclonal antibodies in combination with real time PCR was successfully developed for a specific and rapid detection of *L. monocytogenes* in food samples. Production of monoclonal antibodies to other foodborne pathogens is also under investigation.

3. Diagnosis of progesterone hormone

In collaboration with Chiang Mai University, we successfully developed competitive ELISA for progesterone detection in bovine milk and serum using

specific monoclonal antibodies. This diagnostic tool facilitates hormone monitoring, identification of estrus before insemination and pregnancy exclusion diagnosis.

4. **Relationship between types of thrips, host plants and tospovirus infection in tomato, pepper and cucurbit production fields**

The ultimate goal of this project is to identify the thrips species that are responsible in transmission of the four tospoviruses (watermelon silver mottle virus, capsicum chlorosis virus, melon yellow spot virus and tomato necrotic ringspot virus) found in Thailand. To determine the primary thrips species that are the vector of these tospoviruses, a survey to identify thrips species and plant-infecting tospoviruses in tomato, pepper and cucurbit production fields was conducted in seven provinces of Thailand. The capability of the identified thrips as vectors of the four tospoviruses found in Thailand is now under investigation. The transmission efficiency of each thrips species is being evaluated using leaf discs assay combined with ELISA. The information regarding the relationship between types of thrips, host plants and tospovirus infection in both plants and thrips will be obtained from this study. Besides the basic knowledge, this project also provides several useful methods for tospovirus resistance screening in breeding program.

5. **Hybridoma collection**

Our laboratory has established the systematic hybridoma collection program with an effective database management system. Currently, more than 400 hybridoma clones are stored at our Lab. These hybridoma clones were results of the research projects involved in monoclonal antibody productions both from our Lab and other institutes whose research funds were supported by BIOTEC. The specification of the secreted antibodies covers a wide range of antigens including plant viruses and bacteria, bovine progesterone, food pathogens, aflatoxin and avian flu virus. The candidate hybridoma clones are annually tested for viability and ability to produce specific antibodies to their corresponding antigens. From our large collections, several monoclonal antibodies are commercializable. For public uses, we have provided some monoclonal antibodies to students and researchers for non-profit purposes.

6. **Services**

We also provide services in scaling up and purification of MAbs for governmental and private sectors.

Highlight Researches (2012-2013)

1. **Immunomagnetic separation in combination with real-time PCR for a specific detection of *Listeria monocytogenes***

We have successfully developed immunomagnetic separation (IMS) in combination with real-time PCR to detect *L. monocytogenes*. Our established IMS system using MAb 3C5-coated magnetic beads was able to specifically detect *L. monocytogenes* without cross reactivity to *L. ivanovii*, *L. innocua*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus saprophyticus*. On the other hand, commercial anti-*Listeria* Dynabeads could not distinct between *L. monocytogenes*

from other *Listeria* spp. Moreover, the commercial anti-*Listeria* Dynabeads also cross reacted with *S. saprophyticus*. The better specificity of our IMS system was the result of the high specificity of MAb 3C5 to *L. monocytogenes*. The limit of detection for *L. monocytogenes* in our IMS system in combination with real-time PCR was determined to be 100 cells. This method was used to detect *L. monocytogenes* in raw milk, pasteurized milk or cheese samples after 24 h pre-enrichment in Half Fraser broth. The results of from *L. monocytogenes* detection in these food samples using our newly established method were identical to those obtained from the standard method (ISO 11290-1/1996. Amd.1:2004). However, the advantage of our system is the higher sensitivity allowing *L. monocytogenes* to be detected in artificially contaminated food samples after only 24 h pre-enrichment in Half Fraser broth and be able to report the negative result within 28 h compared to 96 h using the ISO 11290-1:1996 standard method.

2. Immunochromatographic strip test for multiplex detection of three plant pathogens in cucurbits

Immunochromatographic strip test for multiplex detection of three plant pathogens in cucurbits including watermelon mosaic virus-2, potyviruses and *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Aac) were developed. The newly developed immunochromatographic strip test could specifically detect watermelon mosaic virus-2, potyviruses and Aac without cross-reaction among themselves or cross-reaction to other bacterial and viral plant pathogens, including *Delftia acidovorans*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, fluorescent *Pseudomonas*, *Pantoea ananas*, tomato yellow leaf curl virus, whitefly-transmitted geminivirus, melon yellow spot virus and capsicum chlorosis virus. In term of sensitivity, immunochromatographic strip test could detect Aac at the level of 3 x 10^5 CFU/ml and could detect watermelon mosaic virus-2 and potyviruses in serially diluted plant sap samples at the dilution of 1:32. In summary, our results show that the newly developed immunochromatographic strip test is specific and sensitive enough for simultaneous screening of watermelon mosaic virus-2, potyviruses and Aac in cucurbits within only five minutes.

3. Development of high-throughput RT-PCR-ELISA for tospovirus identification

A specific, sensitive and high-throughput RT-PCR-ELISA assay was developed for the detection and identification of four tospovirus species found in Thailand, including Capsicum chlorosis virus (CaCV), Melon yellow spot virus (MYSV), Tomato necrotic ring spot virus (TNRV), and Watermelon silver mottle virus (WSMoV). Based on our results, the newly developed RT-PCR-ELISA assay was able to detect and identify these four tospoviruses in single- and mixed-tospovirus infected plants with the improvements in sensitivity, specificity and throughput as compared to the standard RT-PCR. The results showed that RT-PCR-ELISA was approximately 10 to 1,000 folds more sensitive than the reference standard RT-PCR. In term of specificity, with RT-PCR-ELISA system, the sequence identity of PCR products was verified by the use of oligonucleotide probes complementary to the inner region of each tospovirus N gene. On the other hand, the specificity obtained by gel-based detection system relied only on the size of PCR products. In term of throughput, the ELISA format allowed simultaneous analyses of up to 96 amplicons per run making the assay very time-

efficient and potentially automatable. Moreover, no hazardous reagents such as ethidium bromide are involved in this detection method. In summary, RT-PCR-ELISA developed in this study could be used as a specific, sensitive and high-throughput alternative method to standard RT-PCR for the detection and identification of four tospovirus species found in Thailand. With appropriate primer and probe design, the developed assay could also be applied for the detection and identification of other tospoviruses currently reported worldwide but have not yet been identified in Thailand.