

(19)  กรมทรัพย์สินทางปัญญา  
กระทรวงพาณิชย์  
เลขที่อนุสิทธิบัตร

(10) เลขที่ประกาศโฆษณา  
(43) วันประกาศโฆษณา  
(40) วันออกอนุสิทธิบัตร

(12) ประกาศโฆษณาการจดทะเบียนการประดิษฐ์และออกอนุสิทธิบัตร

<p>(21) เลขที่คำขอ 1903000859 (22) วันที่ยื่นคำขอ 9 เมษายน 2562</p>	<p>(51) สัญลักษณ์จำแนกการประดิษฐ์ระหว่างประเทศ Int.Cl.10 C12Q 1/68</p>
<p>(31) เลขที่คำขอที่ยื่นครั้งแรก - (32) วันที่ยื่นคำขอครั้งแรก - (33) ประเทศที่ยื่นคำขอครั้งแรก -</p>	<p>(71) ผู้ขอรับสิทธิบัตร มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ (72) ผู้ประดิษฐ์ นายธงชัย แก้วพินิจ และคณะ (74) ตัวแทน นางสาวนิยดา รุ่งเรืองผล 114 มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ซ.สุขุมวิท 23 แขวงคลองตันเหนือ เขตวัฒนา กรุงเทพมหานคร 10110</p>
<p>(54) ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์</p>	<p>กรรมวิธีการตรวจสอบเบสกลายพันธุ์ของเชื้อวัณโรคติดต่อยากานามัยซิน (kanamycin) ด้วยแถบสีขั้นตอนเดียว</p>
<p>(57) บทสรุปการประดิษฐ์</p>	<p>กรรมวิธีการตรวจสอบเบสกลายพันธุ์ของเชื้อวัณโรคติดต่อยากานามัยซิน (kanamycin) ด้วยแถบสีในขั้นตอนเดียว เริ่มจากการออกแบบไพรเมอร์ 5 เส้น ที่จำเพาะต่อลำดับเบสของเชื้อวัณโรคติดต่อยากานามัยซิน (kanamycin) ที่มีเบสกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง 1401 เบสเอเปลี่ยนเป็นเบสจี (A --&gt; G) ของยีนอาร์อาร์เอส (rrs) โดยให้ฟอร์เวิร์ดอินเนอร์ไพรเมอร์ (FIP) ติดฉลากด้วยไบโอติน (biotin) หรือไดกอกซิเจนิน (Digoxigenin) และให้โพรบไพรเมอร์ (probe) ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง (FITC) ในการติดตามปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นบนแผ่นดิพสติก (dipstick) ในระบบนี้ดีเอ็นเอเป้าหมายจะเพิ่มปริมาณภายใต้อุณหภูมิอุณหภูมิ 61 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ในกล่องให้ความร้อน (heating block) แล้วอ่านผลบนแผ่นดิพสติก (dipstick) เมื่อให้ผลบวก จะปรากฏเส้นทดสอบสีชมพู บริเวณแถบทดสอบ (T) และแถบควบคุม (C) แสดงว่า ในตัวอย่างพบเบสกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง 1401 เบสเอเปลี่ยนเป็นเบสจี (A --&gt; G) ของยีนอาร์อาร์เอส (rrs) แต่ถ้าผลลบ จะปรากฏเส้นทดสอบสีชมพู เฉพาะแถบควบคุม (C) เท่านั้น วิธีการนี้เทียบเท่ากับการตรวจสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR) แบบเรียลไทม์ (real time) อีกทั้งยังไม่ต้องใช้เครื่องพีซีอาร์ (PCR) และเครื่องแยกสารพันธุกรรมด้วยกระแสไฟฟ้าในการติดตามผลของปฏิกิริยา</p>

## ข้อถ้อยสิทธิ

1. กรรมวิธีการตรวจสอบเบสกลายพันธุ์ของเชื้อวัณโรคคือต่อยากานามัยซิน (kanamycin) ด้วยแถบสีในขั้นตอนเดียวที่ซึ่งประกอบด้วยการทำปฏิกิริยาแลมพ์ (LAMP) ร่วมกับการประยุกต์ใช้แผ่นดิพสติก (dipstick) การทำปฏิกิริยาแลมพ์ (LAMP) 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วยฟอร์เวิร์ดอินเนอร์ไพรเมอร์ (FIP) และแบคเวิร์ดอินเนอร์ไพรเมอร์ (BIP) อย่างละ 50 พิโคโมล, ฟอร์เวิร์ดเอาเทอร์ไพรเมอร์ (F3), แบคเวิร์ดเอาเทอร์ไพรเมอร์ (B3) และโพรบไพรเมอร์ (probe) อย่างละ 5 พิโคโมล, ดีเอ็นทีพี (dNTP) 0.8 มิลลิโมลาร์ผสมด้วยสารเบตาอีน (betaine) 0.6 โมลาร์, สารแมกนีเซียมซัลเฟต (MgSO<sub>4</sub>) 4 มิลลิโมลาร์, เอนไซม์ บีเอสที ดีเอ็นเอ โพลีเมอเรส (*Bst* DNA polymerase) 8 U และสารละลายบัฟเฟอร์ ด้วยการทำปฏิกิริยาแลมพ์ (LAMP) ที่อุณหภูมิ 61 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมงจากนั้นดูดสารละลายดังกล่าวปริมาณ 5 ไมโครลิตรใส่ในหลอดที่มีสารละลายบัฟเฟอร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นจุ่มแผ่นดิพสติก (dipstick) ลงในสารละลาย รอเวลา 5 นาที แล้วอ่านผลบนแผ่นดิพสติก (dipstick) เมื่อให้ผลบวกจะปรากฏเส้นทดสอบสีชมพู บริเวณแถบทดสอบ (T) และแถบควบคุม (C) แสดงว่า ในตัวอย่างพบเบสกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง 1401 เบสเอเปลี่ยนเป็นเบสจี (A --> G) ของยีนอาร์อาร์เอส (*rrs*) แต่ถ้าผลลบ จะปรากฏเส้นทดสอบสีชมพู เฉพาะแถบควบคุม (C) เท่านั้น วิธีการนี้ใช้ตรวจสอบเบสกลายพันธุ์ของเชื้อวัณโรคคือต่อยากานามัยซิน (kanamycin) ด้วยแถบสีในขั้นตอนเดียวในผู้ป่วยที่สงสัยการติดเชื้อวัณโรคคือต่อยานี้ เพื่อการตรวจวินิจฉัยและป้องกันการระบาดของโรค โดยไม่ต้องใช้เครื่องพีซีอาร์ (PCR thermal cycler) และเครื่องแยกสารพันธุกรรมด้วยกระแสไฟฟ้า กรรมวิธีนี้มีการออกแบบไพรเมอร์สำหรับเทคนิคแลมพ์ (LAMP) ในการตรวจเชื้อวัณโรคที่มีเบสกลายพันธุ์เพียงหนึ่งเบส ไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาแลมพ์ (LAMP) ประกอบด้วยไพรเมอร์ 5 เส้นที่จำเพาะต่อลำดับเบสกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง 1401 เบสเอเปลี่ยนเป็นเบสจี (A --> G) ของยีนอาร์อาร์เอส (*rrs*) ของเชื้อวัณโรคโดยให้ฟอร์เวิร์ดอินเนอร์ไพรเมอร์ (FIP) ติดฉลากด้วยไบโอติน (biotin) หรือไดกอกซิเจนิน (Digoxigenin) และให้โพรบไพรเมอร์ (probe) ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง (FITC) ในการติดตามปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นบนแผ่นดิพสติก (dipstick) ดังนี้

ฟอร์เวิร์ดเอาเทอร์ไพรเมอร์ (F3) ลำดับเบส (5'-3') ACAATggCCggTACAAAgg

แบคเวิร์ดเอาเทอร์ไพรเมอร์ (B3) ลำดับเบส (5'-3') ACCTTCgACAgCTCCCTC

แบคเวิร์ดอินเนอร์ไพรเมอร์ (BIP) ลำดับเบส (5'-3')

TTgCAGACCCgATCCgAACTTTTgATgCCgCgAggTTAAgC

ฟอร์เวิร์ดอินเนอร์ไพรเมอร์ (FIP) ลำดับเบส (5'-3')

ไบโอติน (biotin) / ไดกอกซิเจนิน (Digoxigenin; Dig) TgAAgTCggAgTCgCTAgTATTTTTgTTAC

CgACTTTCATgACTC

โพรบไพรเมอร์ (probe) ลำดับเบส (5'-3')

FITC-gTTCCCgggCCTTgTACACAC