(19) กรมทรัพย์สินทางปัญญา
กระทรวงพาณิชย์
เลขที่อนุสิทธิบัตร 13932

(11) เลขที่ประกาศโฆษณา 13932
(43) วันประกาศโฆษณา 7 มิถุนายน 2561
(40) วันออกอนุสิทธิบัตร 7 มิถุนายน 2561

(12) ประกาศโฆษณาการจดทะเบียนการประดิษฐ์และออกอนุสิทธิบัตร

(21) เลขที่คำขอ 1503001077 **(22) วันที่ยื่นคำขอ** 15 กรกฎาคม 2558	**(51) สัญลักษณ์จำแนกการประดิษฐ์ระหว่างประเทศ Int.Cl.10** C12Q 1/68
(31) เลขที่คำขอที่ยื่นครั้งแรก - **(32) วันที่ยื่นคำขอครั้งแรก** - **(33) ประเทศที่ยื่นคำขอครั้งแรก** -	**(71) ผู้ขอรับสิทธิบัตร** มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ **(72) ผู้ประดิษฐ์** นายธงชัย แก้วพินิจ และคณะ **(74) ตัวแทน** -

(54) ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์ กรรมวิธีการตรวจสอบเบสกลายพันธุ์ของเชื้อวัณโรคดื้อต่อยาไรแฟมพิซิน (Rifampicin) ด้วยอนุภาคทองคำ

(57) บทสรุปการประดิษฐ์

กรรมวิธีการตรวจสอบเบสกลายพันธุ์ของเชื้อวัณโรคดื้อต่อยาไรแฟมพิซิน (Rifampicin) ด้วยอนุภาคทองคำ โดยเริ่มจากการออกแบบไพรเมอร์ 5 เส้น ที่จำเพาะต่อลำดับเบสกลายพันธุ์ของเชื้อวัณโรคดื้อต่อยาไรแฟมพิซิน (rifampicin) ซึ่งในระบบนี้ดีเอ็นเอเป้าหมายจะถูกเพิ่มปริมาณภายใต้อุณหภูมิ 61 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ด้วยปฏิกิริยาแลมป์ (LAMP) หลังจากนั้นเติมตัวตรวจจับที่ติดฉลากไทอัล (thiol) ที่ปลายด้าน 5′ ลงไปแล้วปล่อยไว้ที่อุณหภูมิเดิมเป็นเวลาอีก 5 นาที จากนั้นเมื่อมีการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) หรือแมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) ลงไปในปริมาณที่เหมาะสม จะทำให้ผลผลิตของแลมป์ (LAMP) ดังกล่าวทำให้เชื้อวัณโรคดื้อต่อยาไรแฟมพิซิน (Rifampicin) ที่มีเบสกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง 531 และ 526 ของยีน*อาร์โพบี* (*rpoB*) ของเชื้อวัณโรคจะเห็นอนุภาคทองคำเป็นสีชมพูแดงอยู่ในสารละลาย ในขณะที่ถ้าไม่มีลำดับเบสกลายพันธุ์นั้นจะทำให้เห็นอนุภาคทองคำเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีม่วง

ข้อถือสิทธิ

1. กรรมวิธีการตรวจสอบเบสกลายพันธุ์ของเชื้อวัณโรคดื้อต่อยาไรแฟมพิซิน (Rifampicin) ด้วยอนุภาคทองคำ ที่ซึ่งประกอบด้วยการทำปฏิกิริยาแลมป์ (LAMP) ร่วมกับการประยุกต์ใช้ด้วยอนุภาคทองคำ ภายในปฏิกิริยาแลมป์ (LAMP) 25 ไมโครลิตร มีการใช้ไพรเมอร์ 2 ชุดด้วยการทำปฏิกิริยา 2 ครั้ง ชุดที่ 1 ประกอบด้วยไพรเมอร์ 3 และไพรเมอร์ 4 อย่างละ 2 ไมโครโมลาร์, ไพรเมอร์ 1 และไพรเมอร์ 2 อย่างละ 0.2 ไมโครโมลาร์, ดีเอ็นทีพี (dNTP) 1.6 มิลลิโมลาร์ผสมด้วยสารเบตาอีน (betaine) 0.6 โมลาร์, สารแมกนีเซียมซัลเฟส ($MgSO_4$) 4 มิลลิโมลาร์, เอนไซม์ *บีเอสที* 2.0 วอร์ม สตาร์ท ดีเอ็นเอ โพลีเมอเรส (*Bst* 2.0 warm start DNA polymerase) 2.5U และสารละลายบัฟเฟอร์ ใช้ในการตรวจลำดับเบสกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง 531 ของยีน*อาร์โพบี* (*rpoB*) ของเชื้อวัณโรค ชุดที่ 2 ประกอบด้วยไพรเมอร์ 3 และไพรเมอร์ 5 อย่างละ 2 ไมโครโมลาร์, ไพรเมอร์ 1 และไพรเมอร์ 2 อย่างละ 0.2 ไมโครโมลาร์, ดีเอ็นทีพี (dNTP) 1.6 มิลลิโมลาร์ ผสมด้วยสารเบตาอีน (betaine) 0.6 โมลาร์, สารแมกนีเซียมซัลเฟส ($MgSO_4$) 4 มิลลิโมลาร์, เอนไซม์ *บีเอสที* 2.0 วอร์ม สตาร์ท ดีเอ็นเอ โพลีเมอเรส (*Bst* 2.0 warm start DNA polymerase) 2.5 U และสารละลายบัฟเฟอร์ สำหรับการตรวจลำดับเบสกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง 526 ของยีน*อาร์โพบี* (*rpoB*) ของเชื้อวัณโรค การออกแบบไพรเมอร์สำหรับเทคนิคแลมป์ (LAMP) ในการตรวจเชื้อที่มีเบสกลายพันธุ์เพียงหนึ่งเบส ไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาแลมป์ (LAMP) ประกอบด้วยไพรเมอร์ 5 เส้น ที่จำเพาะต่อลำดับเบสกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง 531 และ 526 ของยีน*อาร์โพบี* (*rpoB*) ของเชื้อวัณโรค ดังนี้

ไพรเมอร์ 1 ลำดับเบส (5′-3′) CCgCAgACgTTgATCAACAT

ไพรเมอร์ 2 ลำดับเบส (5′-3′) CAggggTTTCgATTgggC

ไพรเมอร์ 3 ลำดับเบส (5′-3′)

ggTgCTgAAgAACTCCTTgATTTTgCCggTggTCgCCgCg

ไพรเมอร์ 4 ลำดับเบส (5′-3′)

AgCgCTTggggCCCgTTTTAgTgCgACgggTgCA

ไพรเมอร์ 5 ลำดับเบส (5′-3′)

HACAAgCgCCgACTgTCTTTTAgTgCgACgggTgCA

H = A/C/T

(ข้อถือสิทธิ 6 ข้อ, รูปเขียน 2 รูป)