

(19)  กรมทรัพยากรดินทางปัญญา  
กระทรวงพาณิชย์  
เลขที่อนุสิทธิบัตร 20652

(10) เลขที่ประกาศโฆษณา 20652  
(43) วันประกาศโฆษณา 28 ธันวาคม 2565  
(40) วันออกอนุสิทธิบัตร 28 ธันวาคม 2565

(12) ประกาศโฆษณาการจดทะเบียนการประดิษฐ์และออกอนุสิทธิบัตร

<p>(21) เลขที่คำขอ 2003003259 (22) วันที่ยื่นคำขอ 4 ธันวาคม 2563</p>	<p>(51) สัญลักษณ์จำแนกการประดิษฐ์ระหว่างประเทศ Int.Cl.10 C12Q 1/68</p>
<p>(31) เลขที่คำขอที่ยื่นครั้งแรก - (32) วันที่ยื่นคำขอครั้งแรก - (33) ประเทศที่ยื่นคำขอครั้งแรก -</p>	<p>(71) ผู้ขอรับสิทธิบัตร มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ มหาวิทยาลัยนวมินทราธิราช (72) ผู้ประดิษฐ์ นายธงชัย แก้วพินิจ และคณะ (74) ตัวแทน นางสาวนัยดา รุ่งเรืองผล 114 มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ซอยสุขุมวิท 23 แขวงคลองเตยเหนือ เขตวัฒนา กรุงเทพมหานคร 10110</p>
<p>(54) ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์</p>	<p>กรรมวิธีการตรวจสอบยีนของเชื้อซาร์-โควี2 (SAR-CoV2) ที่ก่อโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 ด้วยแถบสีแบบขั้นตอนเดียว</p>
<p>(57) บทสรุปการประดิษฐ์</p>	<p>กรรมวิธีการตรวจสอบยีนของเชื้อซาร์-โควี2 (SAR-CoV2) ที่ก่อโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 ด้วยแถบสีแบบขั้นตอนเดียว เริ่มจากการออกแบบไพรเมอร์ 5 เส้น ที่จำเพาะต่อลำดับเบสของเชื้อซาร์-โควี2 (SAR-CoV2) ก่อโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 บนยีนนิวคลีโอแคปซิด (nucleocapsid ;N) ซึ่งโดยให้ไพรเมอร์ 1 เส้นติดฉลากด้วยไบโอติน (biotin) หรือไดออกซิเจนิน (Digoxigenin) และให้ไพรเมอร์อีก 1 เส้นติดฉลากด้วยสารเรืองแสง (FITC) ในการติดตามปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นบนแผ่นดิพสติก (dipstick) ในระบบนี้ดีเอ็นเอเป้าหมายจะถูกเพิ่มปริมาณภายใต้อุณหภูมิ 61 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที ในกล่องให้ความร้อน (heating block) แล้วอ่านผลบนแผ่นดิพสติก (dipstick) เมื่อให้ผลบวก จะปรากฏเส้นทดสอบสีชมพู บริเวณแถบทดสอบ (T) และแถบควบคุม (C) แสดงว่า ในตัวอย่างพบเชื้อซาร์-โควี2 (SAR-CoV2) แต่ถ้าผลลบ จะปรากฏเส้นทดสอบสีชมพู เฉพาะแถบควบคุม (C) เท่านั้น วิธีการนี้เทียบเท่ากับการตรวจสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR) แบบเรียลไทม์ (real time) อีกทั้งยังไม่ต้องใช้เครื่องพีซีอาร์ (PCR) และเครื่องแยกสารพันธุกรรมด้วยกระแสไฟฟ้าในการติดตามผลของปฏิกิริยา</p>

## ข้อถ้อยสัญญา

1. กรรมวิธีการตรวจสอบยีนของเชื้อซาร์-โควี2 (SAR-CoV2) ที่ก่อโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 ด้วยแถบสีแบบขั้นตอนเดียวที่ซึ่งประกอบด้วยการทำปฏิกิริยาแลมป์ (LAMP) ร่วมกับการประยุกต์ใช้แผ่นดิฟสติค (dipstick) การทำปฏิกิริยาแลมป์ (LAMP) 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ฟอร์เวิร์ดอินเนอร์ไพรเมอร์ (FIP) และแบคเวิร์ดอินเนอร์ไพรเมอร์ (BIP) อย่างละ 50 พิโคโมล, ฟอร์เวิร์ดเอาเทอร์ไพรเมอร์ (F3), แบคเวิร์ดเอาเทอร์ไพรเมอร์ (B3) และโพรบไพรเมอร์ (probe) อย่างละ 5 พิโคโมล, ดีเอ็นทีพี (dNTP) 0.8 มิลลิโมลาร์ผสมด้วยสารเบตาอิน (betaine) 0.6 โมลาร์, สารแมกนีเซียมซัลเฟต (MgSO<sub>4</sub>) 4 มิลลิโมลาร์, เอนไซม์ *บีเอสที* ดีเอ็นเอ โพลีเมอเรส (*Bst* DNA polymerase) 8 U เอนไซม์รีเวิร์สทรานสคริปเตส (reverse transcriptase) 2.5 U และสารละลายบัฟเฟอร์ ด้วยการทำปฏิกิริยาแลมป์ (LAMP) ที่อุณหภูมิ 61 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที จากนั้นดูสารละลายดังกล่าวจำนวน 5 ไมโครลิตรใส่ในหลอดใหม่ที่มีสารละลายบัฟเฟอร์ 100 ไมโครลิตรที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นจุ่มแผ่นดิฟสติค (dipstick) ลงในสารละลาย 5 นาที แล้วอ่านผลบนแผ่นดิฟสติค (dipstick) เมื่อให้ผลบวก จะปรากฏเส้นทดสอบสีชมพู บริเวณแถบทดสอบ (T) และแถบควบคุม (C) แสดงว่า ในตัวอย่างพบเชื้อซาร์-โควี2 (SAR-CoV2) แต่ถ้าผลลบ จะปรากฏเส้นทดสอบสีชมพู เฉพาะแถบควบคุม (C) เท่านั้น และเป็นการตรวจสอบหาเชื้อซาร์-โควี2 (SAR-CoV2) ด้วยแผ่นดิฟสติค (dipstick) ในผู้ป่วยที่สงสัยการติดเชื้อนี้ เพื่อการตรวจวินิจฉัยและป้องกันการระบาดของโรค กรรมวิธีนี้ออกแบบไพรเมอร์สำหรับเทคนิคแลมป์ (LAMP) ที่ใช้ในการตรวจเชื้อซาร์-โควี2 (SAR-CoV2) ในปฏิกิริยาแลมป์ (LAMP) ประกอบด้วยไพรเมอร์ 5 เส้น ที่จำเพาะต่อลำดับเบสของเชื้อซาร์-โควี2 (SAR-CoV2) ก่อโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 บนยีนนิวคลีโอแคปซิด (*nucleocapsid ;N*) โดยให้ฟอร์เวิร์ดอินเนอร์ไพรเมอร์ (FIP) ติดฉลากด้วยไบโอติน (biotin) หรือไดกอกซิเจนิน (Digoxigenin) และให้โพรบไพรเมอร์ (probe) ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง (FITC) ในการติดตามปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นบนแผ่นดิฟสติค (dipstick) ดังนี้

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

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

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

CCACTGCGTTCTCCATTCTGGTTTTAAATGCACCCCGCATTACG

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

biotin/Dig-CGCGATCAAACAACGTCGGCTTTTCCTTGCCATGTTGAGTGAGA

โพรบไพรเมอร์ (probe) ลำดับเบส (5'-3')

FITC-GTTTACCAATAATACTGCGTCTTG

Dig = ไดกอกซิเจนิน (Digoxigenin)