

(19)  กรมทรัพย์สินทางปัญญา
กระทรวงพาณิชย์
เลขที่อนุสิทธิบัตร 20199

(10) เลขที่ประกาศโฆษณา 20199
(43) วันประกาศโฆษณา 7 กันยายน 2565
(40) วันออกอนุสิทธิบัตร 7 กันยายน 2565

(12) ประกาศโฆษณาการจดทะเบียนการประดิษฐ์และออกอนุสิทธิบัตร

<p>(21) เลขที่คำขอ 1903001741 (22) วันที่ยื่นคำขอ 5 กรกฎาคม 2562</p>	<p>(51) สัญลักษณ์จำแนกการประดิษฐ์ระหว่างประเทศ Int.Cl.10 C07K 14/775, 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 ซอยสุขุมวิท 23 แขวงคลองตันเหนือ เขตวัฒนา กรุงเทพมหานคร 10110</p>
<p>(54) ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์</p>	<p>กรรมวิธีการตรวจสอบการกลายพันธุ์ของยีนอะโพอี (APOE) ความเสี่ยงอัลไซเมอร์แบบขั้นตอนเดียวด้วยแถบสี</p>
<p>(57) บทสรุปการประดิษฐ์</p>	<p>กรรมวิธีการตรวจสอบการกลายพันธุ์ของยีนอะโพอี (APOE) ความเสี่ยงอัลไซเมอร์แบบขั้นตอนเดียวด้วยแถบสี เริ่มจากการออกแบบไพรเมอร์ 10 เส้น ที่จำเพาะต่อลำดับเบสกลายพันธุ์ตำแหน่งอาร์เอส (rs) 7412 และ อาร์เอส (rs) 429358 บนยีนอะโพอี (APOE) ที่มีความเสี่ยงอัลไซเมอร์ โดยความจำเพาะในแต่ละตำแหน่งให้ไพรเมอร์ 1 เส้นติดฉลากด้วยไบโอติน (biotin) หรือไดกอกซิเจนิน (Digoxigenin) และให้ไพรเมอร์อีก 1 เส้นติดฉลากด้วยสารเรืองแสง (FITC) ในการติดตามปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นบนแผ่นดิพสติก (dipstick) ในระบบนี้ดีเอ็นเอจะเพิ่มปริมาณภายใต้อุณหภูมิ 61 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาทีในกล่องให้ความร้อน (heating block) แล้วอ่านผลบนแผ่นดิพสติก (dipstick) เมื่อให้ผลบวก จะปรากฏเส้นทดสอบสีชมพู บริเวณแถบทดสอบ (T) และแถบควบคุม (C) แสดงว่าในตัวอย่างพบเบสกลายพันธุ์ตำแหน่งอาร์เอส (rs) 7412 หรือ อาร์เอส (rs) 429358 บนยีนอะโพอี (APOE) ที่มีความเสี่ยงอัลไซเมอร์ แต่ถ้าผลลบ จะปรากฏเส้นทดสอบสีชมพู เฉพาะแถบควบคุม (C) เท่านั้น วิธีการนี้เทียบเท่ากับการตรวจสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR) แบบเรียลไทม์ (real time) อีกทั้งยังไม่ต้องใช้เครื่องพีซีอาร์ (PCR) และเครื่องแยกสารพันธุกรรมด้วยกระแสไฟฟ้าในการติดตามผลของปฏิกิริยา</p>

ข้อถ้อยสิทธิ

1. กรรมวิธีการตรวจสอบการกลายพันธุ์ของยีนอะโพอี (APOE) ความเสี่ยงอัลไซเมอร์แบบขั้นตอนเดียว ด้วยแถบสี ที่ซึ่งประกอบด้วยการทำปฏิกิริยาแลมป์ (LAMP) ร่วมกับการประยุกต์ใช้แผ่นดิพสติก (dipstick) การทำปฏิกิริยาแลมป์ (LAMP) 25 ไมโครลิตร ในแต่ละตำแหน่งที่มีเบสกลายพันธุ์ประกอบด้วยไพรเมอร์ 3 และไพรเมอร์ 4 อย่างละ 50 พิโคโมล, ไพรเมอร์ 1 ไพรเมอร์ 2 และไพรเมอร์ 5 อย่างละ 5 พิโคโมล, ดีเอ็นทีพี (dNTP) 0.8 มิลลิโมลาร์ผสมด้วยสารเบตาอีน (betaine) 0.6 โมลาร์, สารแมกนีเซียมซัลเฟต (MgSO₄) 4 มิลลิโมลาร์, เอนไซม์ *บีเอสที ดีเอ็นเอ โพลีเมอเรส (Bst DNA polymerase)* 8 U และสารละลายบัฟเฟอร์ ด้วยการทำปฏิกิริยาแลมป์ (LAMP) ที่อุณหภูมิ 61 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นดูดสารละลายดังกล่าวจำนวน 5 ไมโครลิตรใส่ในหลอดใหม่ที่มีสารละลายบัฟเฟอร์ 100 ไมโครลิตรที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นจุ่มแผ่นดิพสติก (dipstick) ลงในสารละลาย 5 นาที แล้วอ่านผลบนแผ่นดิพสติก (dipstick) เมื่อให้ผลบวก จะปรากฏเส้นทดสอบสีชมพู บริเวณแถบทดสอบ (T) และแถบควบคุม (C) แสดงว่า ในตัวอย่างพบเบสกลายพันธุ์ตำแหน่งอาร์เอส (rs) 7412 หรือ อาร์เอส (rs) 429358 บนยีนอะโพอี (APOE) ที่มีความเสี่ยงอัลไซเมอร์ แต่ถ้าผลลบ จะปรากฏเส้นทดสอบสีชมพู เฉพาะแถบควบคุม (C) เท่านั้น วิธีการนี้ไม่ต้องใช้เครื่องพีซีอาร์ (PCR thermal cycler) และเครื่องแยกสารพันธุกรรมด้วยกระแสไฟฟ้า วิธีนี้เป็นการตรวจสอบหาความผิดปกติของยีนอะโพอี (APOE) ด้วยแผ่นดิพสติก (dipstick) ในบุคคลที่มีสงสัยความเสี่ยงอัลไซเมอร์ เพื่อการตรวจวินิจฉัยและป้องกันของโรค กรรมวิธีนี้ออกแบบไพรเมอร์สำหรับเทคนิคแลมป์ (LAMP) ที่ใช้ในการตรวจหาเบสกลายพันธุ์ตำแหน่งอาร์เอส (rs) 7412 หรือ อาร์เอส (rs) 429358 บนยีนอะโพอี (APOE) ที่มีความเสี่ยงอัลไซเมอร์ ในปฏิกิริยาแลมป์ (LAMP) แต่ละชุดประกอบด้วยไพรเมอร์ 5 เส้น ที่จำเพาะต่อลำดับเบสกลายพันธุ์ตำแหน่งอาร์เอส (rs) 7412 หรือ อาร์เอส (rs) 429358 บนยีนอะโพอี (APOE) โดยให้ไพรเมอร์ 4 ติดฉลากด้วยไบโอติน (biotin) หรือไดออกซิเจนิน (Digoxigenin) และให้ไพรเมอร์ 5 ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง (FITC) ในการติดตามปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นบนแผ่นดิพสติก (dipstick) ดังนี้

ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเบสกลายพันธุ์ตำแหน่งอาร์เอส (rs) 429358 ดังนี้

ไพรเมอร์ 1 ลำดับเบส (5'-3') gGACgAgACCATgAAggAgT

ไพรเมอร์ 2 ลำดับเบส (5'-3') gCTTgCgCAgggTgggA

ไพรเมอร์ 3 ลำดับเบส (5'-3')

CgCggACATggAggACgTTTTCTgCACCAgggCggCgTg

ไพรเมอร์ 4 ลำดับเบส (5'-3')

ไบโอติน (biotin) / ไดออกซิเจนิน (digoxigenin) – TCCTTggACAgCCgTgCCCTTTggCCTA

CAAATCggAACTgg

ไพรเมอร์ 5 ลำดับเบส (5'-3')

FITC- ACCggggTCAgTTgTTCCT

ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเบสกลายพันธุ์ตำแหน่งอาร์เอส (rs) 7412 ดังนี้

ไพรเมอร์ 1 ลำดับเบส (5'-3') gAggTgCAggCCATgCTC

ไพรเมอร์ 2 ลำดับเบส (5'-3') CTCgCggATggCgCTgAg

ไพรเมอร์ 3 ลำดับเบส (5'-3')

ATgCCgATgACCTgCAgAATTTTCCTggTACACTgCCAggTA

ไพรเมอร์ 4 ลำดับเบส (5'-3')

ไบโอติน (biotin) / ไดออกซิเจนิน (digoxigenin) – gggAggAgcCCgCTTACgCATTTTgCC

AgAgCACCCgAggA

ไพรมเมอร์ 5 ลำดับเบส (5'-3')

FITC- gCTTgCgCAggTgggAg