

(19)  กรมทรัพย์สินทางปัญญา
กระทรวงพาณิชย์
เลขที่อนุสิทธิบัตร 19454

(10) เลขที่ประกาศโฆษณา 19454
(43) วันประกาศโฆษณา 15 มีนาคม 2565
(40) วันออกอนุสิทธิบัตร 15 มีนาคม 2565

(12) ประกาศโฆษณาการจดทะเบียนการประดิษฐ์และออกอนุสิทธิบัตร

<p>(21) เลขที่คำขอ 1903000860 (22) วันที่ยื่นคำขอ 9 เมษายน 2562</p>	<p>(51) สัญลักษณ์จำแนกการประดิษฐ์ระหว่างประเทศ Int.Cl. 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>(57) บทสรุปการประดิษฐ์</p>	<p>กรรมวิธีการตรวจสอบเบสกลายพันธุ์ของเชื้อวัณโรคติดต่อยาฟลูออโรควิโนโลน (fluoroquinolone) ด้วยแถบสีในชั้นตอนเดียว</p> <p>กรรมวิธีการตรวจสอบเบสกลายพันธุ์ของเชื้อวัณโรคติดต่อยาฟลูออโรควิโนโลน (fluoroquinolone) ด้วยแถบสีในชั้นตอนเดียว เริ่มจากการออกแบบไพรเมอร์ 5 เส้น ที่จำเพาะต่อลำดับเบสของเชื้อวัณโรคติดต่อยาฟลูออโรควิโนโลน (fluoroquinolone) ที่มีเบสกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 94 บนยีน <i>gyrA</i> โดยให้ฟอร์เวิร์ดอินเนอร์ไพรเมอร์ (FIP) ติดฉลากด้วยไบโอติน (biotin) หรือไดกอกซิเจนิน (Digoxigenin) และให้ไพรบไพรเมอร์ (probe) ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง (FITC) ในการติดตามปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นบนแผ่นดิพสติก (dipstick) ในระบบนี้ดีเอ็นเอเป้าหมายจะถูกเพิ่มปริมาณภายใต้อุณหภูมิอุณหภูมิ 61 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ในกล่องให้ความร้อน (heating block) แล้วอ่านผลบนแผ่นดิพสติก (dipstick) เมื่อให้ผลบวก จะปรากฏเส้นทดสอบสีชมพู บริเวณแถบทดสอบ (T) และแถบควบคุม (C) แสดงว่า ในตัวอย่างพบเบสกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 94 บนยีน <i>gyrA</i> แต่ถ้าผลลบ จะปรากฏเส้นทดสอบสีชมพู เฉพาะแถบควบคุม (C) เท่านั้น วิธีการนี้เทียบเท่ากับการตรวจสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR) แบบเรียลไทม์ (real time) อีกทั้งยังไม่ต้องใช้เครื่องพีซีอาร์ (PCR) และเครื่องแยกสารพันธุกรรมด้วยกระแสไฟฟ้าในการติดตามผลของปฏิกิริยา</p>

ข้อถ้อยสิทธิ

1. กรรมวิธีการตรวจสอบเบสกลายพันธุ์ของเชื้อวัณโรคติดต่อยาฟลูออโรควิโนโลน (fluoroquinolone) 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 มิลลิโมลาร์ผสมด้วยสารเบตาอิน (betaine) 0.6 โมลาร์, สารแมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) 4 มิลลิโมลาร์, เอนไซม์ บีเอสที ดีเอ็นเอ โพลีเมอเรส (*Bst* DNA polymerase) 8 U และสารละลายบัฟเฟอร์ ด้วยการทำปฏิกิริยาแลมพ์ (LAMP) ที่อุณหภูมิ 61 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นดูดสารละลายดังกล่าวปริมาณ 5 ไมโครลิตรใส่ในหลอดที่มีสารละลายบัฟเฟอร์ 100 ไมโครลิตรที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นจุ่มแผ่นดิพสติก (dipstick) ลงในสารละลาย รอเวลา 5 นาที แล้วอ่านผลบนแผ่นดิพสติก (dipstick) เมื่อให้ผลบวก จะปรากฏเส้นทดสอบสีชมพู บริเวณแถบทดสอบ (T) และแถบควบคุม (C) แสดงว่า ในตัวอย่างพบเบสกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 94 บนยีนไจอาร์เอ (*gyrA*) แต่ถ้าผลลบ จะปรากฏเส้นทดสอบสีชมพู เฉพาะแถบควบคุม (C) เท่านั้น วิธีการนี้ใช้ตรวจสอบเบสกลายพันธุ์ของเชื้อวัณโรคติดต่อยาฟลูออโรควิโนโลน (fluoroquinolone) ด้วยแถบสีในขั้นตอนเดียวในผู้ป่วยที่สงสัยการติดเชืวัณโรคติดต่อยานี้ เพื่อวินิจฉัยและป้องกันการระบาดของโรค โดยไม่ต้องใช้เครื่องพีซีอาร์ (PCR thermal cycler) และเครื่องแยกสารพันธุกรรมด้วยกระแสไฟฟ้า กรรมวิธีนี้มีการออกแบบไพรเมอร์สำหรับเทคนิคแลมพ์ (LAMP) ในการตรวจเชื้อวัณโรคที่มีเบสกลายพันธุ์เพียงหนึ่งเบส ไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาแลมพ์ (LAMP) ประกอบด้วย ไพรเมอร์ 5 เส้นที่จำเพาะต่อลำดับเบสกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 94 บนยีนไจอาร์เอ (*gyrA*) ของเชื้อวัณโรคโดยให้ฟอร์เวิร์ดอินเนอร์ไพรเมอร์ (FIP) ติดฉลากด้วยไบโอติน (biotin) หรือไดกอกซิเจนิน (Digoxigenin) และให้โพรบไพรเมอร์ (probe) ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง (FITC) ในการติดตามปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นบนแผ่นดิพสติก (dipstick) ดังนี้

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

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

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

ATgCACgggCTTgAgCCCgTTTTACATgACTATgCgATgAgC

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

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

TgCgACCAggCTTC

โพรบไพรเมอร์ (probe) ลำดับเบส (5'-3')

FITC- CCGAgACCATgggCAACT