(19) กรมทรัพย์สินทางปัญญา
กระทรวงพาณิชย์
เลขที่อนุสิทธิบัตร 17935

(10) เลขที่ประกาศโฆษณา 17935
(43) วันประกาศโฆษณา 25 มิถุนายน 2564
(40) วันออกอนุสิทธิบัตร 25 มิถุนายน 2564

(12) ประกาศโฆษณาการจดทะเบียนการประดิษฐ์และออกอนุสิทธิบัตร

(21) เลขที่คำขอ 1803001299
(22) วันที่ยื่นคำขอ 7 มิถุนายน 2561

(51) สัญลักษณ์จำแนกการประดิษฐ์ระหว่างประเทศ Int.Cl.10
C12Q 1/68

(31) เลขที่คำขอที่ยื่นครั้งแรก
-
(32) วันที่ยื่นคำขอครั้งแรก
-
(33) ประเทศที่ยื่นคำขอครั้งแรก
-

(71) ผู้ขอรับสิทธิบัตร
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
(72) ผู้ประดิษฐ์
นายธงชัย แก้วพินิจ และคณะ
(74) ตัวแทน
นางสาวนิยดา รุ่งเรืองผล
ที่อยู่ 114 มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ซอยสุขุมวิท 23
แขวงคลองเตยเหนือ เขตวัฒนา กรุงเทพมหานคร 10110

(54) ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์ กรรมวิธีการตรวจสอบเบสกลายพันธุ์ของเชื้อวัณโรคดื้อต่อยาไรแฟมพิซิน (Rifampicin) ด้วยแถบสีในขั้นตอนเดียว

(57) บทสรุปการประดิษฐ์

กรรมวิธีการตรวจสอบเบสกลายพันธุ์ของเชื้อวัณโรคดื้อต่อยาไรแฟมพิซิน (Rifampicin) ด้วยแถบสีในขั้นตอนเดียว เริ่มจากการออกแบบไพรเมอร์ 5 เส้น ที่จำเพาะต่อลำดับเบสของเชื้อวัณโรคดื้อต่อยาไรแฟมพิซิน (Rifampicin) ที่มีเบสกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง 531 ของยีน*อาร์โพบี* (*rpoB*) ซึ่งโดยให้ไพรเมอร์ 1 เส้นติดฉลากด้วยไบโอติน (biotin) หรือไดกอกซิเจนิน (Digoxigenin) และให้ไพรเมอร์อีก 1 เส้นติดฉลากด้วยสารเรืองแสง (FITC) ในการติดตามปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นบนแผ่นดิพสติค (dipstick) ในระบบนี้ดีเอ็นเอเป้าหมายจะถูกเพิ่มปริมาณภายใต้อุณหภูมิอุณหภูมิ 61 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ในกล่องให้ความร้อน (heating block) แล้วอ่านผลบนแผ่นดิพสติค (dipstick) เมื่อให้ผลบวก จะปรากฏเส้นทดสอบสีชมพู บริเวณแถบทดสอบ (T) และแถบควบคุม (C) แสดงว่า ในตัวอย่างพบเบสกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง 531 ของยีน*อาร์โพบี* (*rpoB*) แต่ถ้าผลลบ จะปรากฏเส้นทดสอบสีชมพู เฉพาะแถบควบคุม (C) เท่านั้น วิธีการนี้เทียบเท่ากับการตรวจสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR) แบบเรียลไทม์ (real time) อีกทั้งยังไม่ต้องใช้เครื่องพีซีอาร์ (PCR) และเครื่องแยกสารพันธุกรรมด้วยกระแสไฟฟ้าในการติดตามผลของปฏิกิริยา

(11) เลขที่ประกาศโฆษณา 17935

ข้อถือสิทธิ

1. กรรมวิธีการตรวจสอบเบสกลายพันธุ์ของเชื้อวัณโรคดื้อต่อยาไรแฟมพิซิน (Rifampicin) ด้วยแถบสีในขั้นตอนเดียวที่ซึ่งประกอบด้วยการทำปฏิกิริยาแลมป์ (LAMP) ร่วมกับการประยุกต์ใช้แผ่นดิพสติค (dipstick) การทำปฏิกิริยาแลมป์ (LAMP) 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วยไพรเมอร์ 3 และไพรเมอร์ 4 อย่างละ 50 พิโคโมล, ไพรเมอร์ 1 ไพรเมอร์ 2 และไพรเมอร์ 5 อย่างละ 5 พิโคโมล, ดีเอ็นทีพี (dNTP) 0.8 มิลลิโมลาร์ผสมด้วยสารเบตาอีน (betaine) 0.6 โมลาร์, สารแมกนีเซียมซัลเฟส ($MgSO_4$) 4 มิลลิโมลาร์, เอนไซม์ *บีเอสที* ดีเอ็นเอ โพลีเมอเรส (*Bst* DNA polymerase) 8 U และสารละลายบัฟเฟอร์ ด้วยการทำปฏิกิริยาแลมป์ (LAMP) ที่อุณหภูมิ 61 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นดูดสารละลายดังกล่าวจำนวน 5 ไมโครลิตรใส่ในหลอดที่มีสารละลายบัฟเฟอร์ 100 ไมโครลิตรที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นจุ่มแผ่นดิพสติค (dipstick) ลงในสารละลาย 5 นาที แล้วอ่านผลบนแผ่นดิพสติค (dipstick) เมื่อให้ผลบวก จะปรากฏเส้นทดสอบสีชมพู บริเวณแถบทดสอบ (T) และแถบควบคุม (C) แสดงว่า ในตัวอย่างพบเบสกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง 531 ของยีน*อาร์โพบี* (*rpoB*) แต่ถ้าผลลบ จะปรากฏเส้นทดสอบสีชมพู เฉพาะแถบควบคุม (C) เท่านั้น วิธีการนี้ใช้ตรวจสอบเบสกลายพันธุ์ของเชื้อวัณโรคดื้อต่อยาไรแฟมพิซิน (Rifampicin) ด้วยแถบสีในขั้นตอนเดียวในผู้ป่วยที่สงสัยการติดเชื้อวัณโรคดื้อยานี้ เพื่อการตรวจวินิจฉัยและป้องกันการระบาดของโรค โดยไม่ต้องใช้เครื่องพีซีอาร์ (PCR thermal cycler) และเครื่องแยกสารพันธุกรรมด้วยกระแสไฟฟ้า กรรมวิธีนี้มีการออกแบบไพรเมอร์สำหรับเทคนิคแลมป์ (LAMP) ในการตรวจเชื้อวัณโรคที่มีเบสกลายพันธุ์เพียงหนึ่งเบส ไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาแลมป์ (LAMP) ประกอบด้วยไพรเมอร์ 5 เส้น ที่จำเพาะต่อลำดับเบสกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง 531 ของยีน*อาร์โพบี* (*rpoB*) ของเชื้อวัณโรคโดยให้ไพรเมอร์ 4 ติดฉลากด้วยไบโอติน (biotin) หรือไดกอกซิเจนิน (Digoxigenin) และให้ไพรเมอร์ 5 ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง (FITC) ในการติดตามปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นบนแผ่นดิพสติค (dipstick) ดังนี้

ไพรเมอร์ 1 ลำดับเบส (5'-3') gCATgTCgCggATggAg

ไพรเมอร์ 2 ลำดับเบส (5'-3') ACgCTCACgTgACAgACC

ไพรเมอร์ 3 ลำดับเบส (5'-3')

ACCggCCggATgTTgATCAACgTTTTgTCCgggAgCggATgA

ไพรเมอร์ 4 ลำดับเบส (5'-3')

ไบโอติน (biotin)/ไดกอกซิเจนิน (Digoxigenin)

AAggAgTTCTTCggCACCAgCCTTTTCCgggCCCCAgCgCAA

ไพรเมอร์ 5 ลำดับเบส (5'-3')

FITC-AgCCAATTCATggACCAgAA

(ข้อถือสิทธิ 1 ข้อ, รูปเขียน 2 รูป)