

(19)  กรมทรัพย์สินทางปัญญา
กระทรวงพาณิชย์
เลขที่อนุสิทธิบัตร 17936

(10) เลขที่ประกาศโฆษณา 17936
(43) วันประกาศโฆษณา 25 มิถุนายน 2564
(40) วันออกอนุสิทธิบัตร 25 มิถุนายน 2564

(12) ประกาศโฆษณาการจดทะเบียนการประดิษฐ์และออกอนุสิทธิบัตร

<p>(21) เลขที่คำขอ 1803001300 (22) วันที่ยื่นคำขอ 7 มิถุนายน 2561</p>	<p>(51) สัญลักษณ์จำแนกการประดิษฐ์ระหว่างประเทศ Int.Cl.10 C12Q 1/68, G01N 33/00</p>
<p>(31) เลขที่คำขอที่ยื่นครั้งแรก - (32) วันที่ยื่นคำขอครั้งแรก - (33) ประเทศที่ยื่นคำขอครั้งแรก -</p>	<p>(71) ผู้ขอรับสิทธิบัตร มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ (72) ผู้ประดิษฐ์ นายธงชัย แก้วพินิจ และคณะ (74) ตัวแทน นางสาวนิยดา รุ่งเรืองผล เลขที่ 114 มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ซอยสุขุมวิท 23 แขวงคลองเตยเหนือ เขตวัฒนา กรุงเทพมหานคร 10110</p>
<p>(54) ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์</p>	<p>กรรมวิธีการตรวจสอบยีนกลายพันธุ์ของเชื้อสแตฟิโลค็อกคัส ออเรียส (Staphylococcus aureus) ที่ดื้อยามิทธิซิลิน (methicillin) ด้วยแถบสี</p>
<p>(57) บทสรุปการประดิษฐ์</p>	<p>กรรมวิธีการตรวจสอบยีนกลายพันธุ์ของเชื้อสแตฟิโลค็อกคัส ออเรียส (Staphylococcus aureus) ที่ดื้อยามิทธิซิลิน (methicillin) ด้วยแถบสี เริ่มจากการออกแบบไพรเมอร์ 5 เส้น ที่จำเพาะต่อลำดับเบสของเชื้อสแตฟิโลค็อกคัส ออเรียส (Staphylococcus aureus) ที่ดื้อยามิทธิซิลิน (methicillin) บนยีนเมคเอ (mecA) ซึ่งโดยให้ไพรเมอร์ 1 เส้นติดฉลากด้วยไบโอติน (biotin) หรือไดกอกซิเจนิน (Digoxigenin) และให้ไพรเมอร์อีก 1 เส้นติดฉลากด้วยสารเรืองแสง (FITC) ในการติดตามปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นบนแผ่นดิพสติก (dipstick) ในระบบนี้ดีเอ็นเอเป้าหมายจะถูกเพิ่มปริมาณภายใต้อุณหภูมิอุณหภูมิ 61 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที ในกล่องให้ความร้อน (heating block) แล้วอ่านผลบนแผ่นดิพสติก (dipstick) เมื่อให้ผลบวก จะปรากฏเส้นทดสอบสีชมพู บริเวณแถบทดสอบ (T) และแถบควบคุม (C) แสดงว่า ในตัวอย่างพบเชื้อสแตฟิโลค็อกคัส ออเรียส (Staphylococcus aureus) ที่ดื้อยามิทธิซิลิน (methicillin) แต่ถ้าผลลบ จะปรากฏเส้นทดสอบสีชมพู เฉพาะแถบควบคุม (C) เท่านั้น วิธีการนี้เทียบเท่ากับการตรวจสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR) แบบเรียลไทม์ (real time) อีกทั้งยังไม่ต้องใช้เครื่องพีซีอาร์ (PCR) และเครื่องแยกสารพันธุกรรมด้วยกระแสไฟฟ้าในการติดตามผลของปฏิกิริยา</p>

ข้อถ้อยสิทธิ

1. กรรมวิธีการตรวจสอบยีนกลายพันธุ์ของเชื้อสแตฟิโลค็อกคัส ออเรียส (*Staphylococcus aureus*) ที่ดื้อยาเมทิซิลลิน (methicillin) ด้วยแถบสี ที่ซึ่งประกอบด้วยการทำปฏิกิริยาแลมป์ (LAMP) ร่วมกับการประยุกต์ใช้แผ่นดิพสติก (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, สารแมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) 4 มิลลิโมลาร์, เอนไซม์ บีเอสที ดีเอ็นเอ โพลีเมอเรส (*Bst* DNA polymerase) 8 U และสารละลายบัฟเฟอร์ ด้วยการทำปฏิกิริยาแลมป์ (LAMP) ที่อุณหภูมิ 61 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที จากนั้นดูดสารละลายดังกล่าวจำนวน 5 ไมโครลิตรใส่ในหลอดใหม่ที่มีสารละลายบัฟเฟอร์ 100 ไมโครลิตรที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นจุ่มแผ่นดิพสติก (dipstick) ลงในสารละลาย 5 นาที แล้วอ่านผลบนแผ่นดิพสติก (dipstick) เมื่อให้ผลบวก จะปรากฏเส้นทดสอบสีชมพู บริเวณแถบทดสอบ (T) และแถบควบคุม (C) แสดงว่า ในตัวอย่างพบเชื้อสแตฟิโลค็อกคัส ออเรียส (*Staphylococcus aureus*) ที่ดื้อยาเมทิซิลลิน (methicillin) แต่ถ้าผลลบ จะปรากฏเส้นทดสอบสีชมพู เฉพาะแถบควบคุม (C) เท่านั้น วิธีการนี้ไม่ต้องใช้เครื่องพีซีอาร์ (PCR thermal cycler) และเครื่องแยกสารพันธุกรรมด้วยกระแสไฟฟ้า และเป็น การตรวจสอบหาเชื้อสแตฟิโลค็อกคัส ออเรียส (*Staphylococcus aureus*) ที่ดื้อยาเมทิซิลลิน (methicillin) ด้วยแผ่นดิพสติก (dipstick) ในผู้ป่วยที่สงสัยการติดเชื้อนี้ เพื่อการตรวจวินิจฉัยและป้องกันการระบาดของโรค กรรมวิธีนี้ออกแบบไพรเมอร์สำหรับเทคนิคแลมป์ (LAMP) ที่ใช้ในการตรวจเชื้อสแตฟิโลค็อกคัส ออเรียส (*Staphylococcus aureus*) ที่ดื้อยาเมทิซิลลิน (methicillin) ในปฏิกิริยาแลมป์ (LAMP) ประกอบด้วยไพรเมอร์ 5 เส้น ที่จำเพาะต่อลำดับเบสของเชื้อสแตฟิโลค็อกคัส ออเรียส (*Staphylococcus aureus*) ที่ดื้อยาเมทิซิลลิน (methicillin) บนยีน *mecA* โดยให้ไพรเมอร์ 4 ติดฉลากด้วยไบโอติน (biotin) หรือไดกอกซิเจนิน (Digoxigenin) และให้ไพรเมอร์ 5 ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง (FITC) ในการติดตามปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นบนแผ่นดิพสติก (dipstick) ดังนี้

ไพรเมอร์ 1 ลำดับเบส (5'-3') CATTgATCgCAACgTTCgAA

ไพรเมอร์ 2 ลำดับเบส (5'-3') AgATACATTCTTTgAACgATg

ไพรเมอร์ 3 ลำดับเบส (5'-3')

TgCATTCTgAATAATgACgCTTTTgTTAAAgAAgATgTgTgAAg

ไพรเมอร์ 4 ลำดับเบส (5'-3')

ไบโอติน (biotin)/ไดกอกซิเจนิน (Digoxigenin)

CAGAACgTgTAAATTTAgACCgTTTTCTAATCTCATATgTgTTCCTgTA

ไพรเมอร์ 5 ลำดับเบส (5'-3')

FITC- AAACAATgTgAATTgCCA