

(19)  กรมทรัพย์สินทางปัญญา
กระทรวงพาณิชย์
เลขที่อนุสิทธิบัตร 20107

(10) เลขที่ประกาศโฆษณา 20107
(43) วันประกาศโฆษณา 10 สิงหาคม 2565
(40) วันออกอนุสิทธิบัตร 10 สิงหาคม 2565

(12) ประกาศโฆษณาการจดทะเบียนการประดิษฐ์และออกอนุสิทธิบัตร

| | |
|--|--|
| <p>(21) เลขที่คำขอ 1903001740 (22) วันที่ยื่นคำขอ 5 กรกฎาคม 2562</p> | <p>(51) สัญลักษณ์จำแนกการประดิษฐ์ระหว่างประเทศ Int.Cl. C07K 14/47, 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 แขวงคลองเตยเหนือ เขตวัฒนา กรุงเทพมหานคร 10110</p> |
| <p>(54) ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์</p> | <p>กรรมวิธีการตรวจสอบการกลายพันธุ์ของยีนเอพีพี (APP) ความเสี่ยงอัลไซเมอร์แบบขั้นตอนเดียวด้วยแถบสี</p> |
| <p>(57) บทสรุปการประดิษฐ์</p> | <p>กรรมวิธีการตรวจสอบการกลายพันธุ์ของยีนเอพีพี (APP) ความเสี่ยงอัลไซเมอร์แบบขั้นตอนเดียวด้วยแถบสี เริ่มจากการออกแบบไพรเมอร์ 5 เส้น ที่จำเพาะต่อลำดับเบสกลายพันธุ์ตำแหน่งอาร์เอส (rs) 63750264 ของยีนเอพีพี (APP) ที่มีความเสี่ยงอัลไซเมอร์ โดยให้ไพรเมอร์ 1 เส้นติดฉลากด้วยไบโอติน (biotin) หรือไดออกซิเจนิน (Digoxigenin) และให้ไพรเมอร์อีก 1 เส้นติดฉลากด้วยสารเรืองแสง (FITC) ในการติดตามปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นบนแผ่นดิพสติก (dipstick) ในระบบนี้ดีเอ็นเอจะเพิ่มปริมาณภายใต้อุณหภูมิ 61 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ในกล่องให้ความร้อน (heating block) แล้วอ่านผลบนแผ่นดิพสติก (dipstick) เมื่อให้ผลบวก จะปรากฏเส้นทดสอบสีชมพู บริเวณแถบทดสอบ (T) และแถบควบคุม (C) แสดงว่าในตัวอย่างพบเบสกลายพันธุ์ตำแหน่งอาร์เอส (rs) 63750264 ของยีนเอพีพี (APP) ที่มีความเสี่ยงอัลไซเมอร์ แต่ถ้าผลลบ จะปรากฏเส้นทดสอบสีชมพู เฉพาะแถบควบคุม (C) เท่านั้น วิธีการนี้เทียบเท่ากับการตรวจสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR) แบบเรียลไทม์ (real time) อีกทั้งยังไม่ต้องใช้เครื่องพีซีอาร์ (PCR) และเครื่องแยกสารพันธุกรรมด้วยกระแสไฟฟ้าในการติดตามผลของปฏิกิริยา</p> |

ข้อถ้อยสิทธิ

1. กรรมวิธีการตรวจสอบการกลายพันธุ์ของยีนเอพพี (APP) ความเสี่ยงอัลไซเมอร์แบบขั้นตอนเดียวด้วยแถบสี ที่ซึ่งประกอบด้วยการทำปฏิกิริยาแลมพ์ (LAMP) ร่วมกับการประยุกต์ใช้แผ่นดิพสติค (dipstick) การทำปฏิกิริยาแลมพ์ (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 (MgSO₄) 4 มิลลิโมลาร์, เอนไซม์ บีเอสที ดีเอ็นเอ โพลีเมอเรส (BstDNA polymerase) 8 U และสารละลายบัฟเฟอร์ ด้วยการทำปฏิกิริยาแลมพ์ (LAMP) ที่อุณหภูมิ 61 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นคัดสารละลายดังกล่าวจำนวน 5 ไมโครลิตรใส่ในหลอดใหม่ที่มีสารละลายบัฟเฟอร์ 100 ไมโครลิตรที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นจุ่มแผ่นดิพสติค (dipstick) ลงในสารละลาย 5 นาที แล้วอ่านผลบนแผ่นดิพสติค (dipstick) เมื่อไหลผลบวก จะปรากฏเส้นทดสอบสีชมพู บริเวณแถบทดสอบ (T) และแถบควบคุม (C) แสดงว่า ในตัวอย่างพบเบสกลายพันธุ์ตำแหน่งอาร์เอส (rs) 63750264 ของยีนเอพพี (APP) ที่มีความเสี่ยงอัลไซเมอร์ แต่อาจผลลบ จะปรากฏเส้นทดสอบสีชมพู เฉพาะแถบควบคุม (C) เท่านั้น วิธีการนี้ไม่ต้องใช้เครื่องพีซีอาร์ (PCR thermal cycler) และเครื่องแยกสารพันธุกรรมด้วยกระแสไฟฟ้า วิธีนี้เป็นการตรวจสอบหาความคิดปกติของยีนเอพพี (APP) ด้วยแผ่นดิพสติค (dipstick) ในบุคคลที่มีความเสี่ยงอัลไซเมอร์ เพื่อการตรวจวินิจฉัยและป้องกันของโรค กรรมวิธีนี้ออกแบบไพรเมอร์สำหรับเทคนิคแลมพ์ (LAMP) ที่ใช้ในการตรวจหาเบสกลายพันธุ์ตำแหน่งอาร์เอส (rs) 63750264 ของยีนเอพพี (APP) ที่มีความเสี่ยงอัลไซเมอร์ ในปฏิกิริยาแลมพ์ (LAMP) ประกอบด้วยไพรเมอร์ 5 เส้น ที่จำเพาะต่อลำดับเบสกลายพันธุ์ตำแหน่งอาร์เอส (rs) 63750264 ของยีนเอพพี (APP) โดยให้ไพรเมอร์ 4 ดิคลากด้วยไบโอติน (biotin) หรือไดกอกซิเจนิน (Digoxigenin) และให้ไพรเมอร์ 5 ดิคลากด้วยสารเรืองแสง (FITC) ในการติดตามปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นบนแผ่นดิพสติค (dipstick) ดังนี้

ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเบสกลายพันธุ์ตำแหน่งอาร์เอส (rs) 63750264 ดังนี้

ไพรเมอร์ 1 ลำดับเบส (5'-3') ACggAggAgATCTCTgAAg

ไพรเมอร์ 2 ลำดับเบส (5'-3') gAATggATgTgTACTgTTTCT

ไพรเมอร์ 3 ลำดับเบส (5'-3') AgATgTgggTTCAAACAAAggTTTTTAgCATCACCAAggTgATgCT

ไพรเมอร์ 4 ลำดับเบส (5'-3') ไบโอติน (biotin) / ไดกอกซิเจนิน (Digoxigenin; Dig)
TgCAAgaACACCAATTTTTgATgATTTTTgAAgAT ggAT gCAgAATT cc

ไพรเมอร์ 5 ลำดับเบส (5'-3') FITC- T g AACTTCATAT CCT g AgT CAT gTc