(19) **กรมทรัพย์สินทางปัญญา**
กระทรวงพาณิชย์
เลขที่อนุสิทธิบัตร 13931

(11) **เลขที่ประกาศโฆษณา** 13931
(43) **วันประกาศโฆษณา** 7 มิถุนายน 2561
(40) **วันออกอนุสิทธิบัตร** 7 มิถุนายน 2561

(12) ประกาศโฆษณาการจดทะเบียนการประดิษฐ์และออกอนุสิทธิบัตร

(21) **เลขที่คำขอ** 1503001076
(22) **วันที่ยื่นคำขอ** 15 กรกฎาคม 2558

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

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

(71) **ผู้ขอรับสิทธิบัตร**
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
(72) **ผู้ประดิษฐ์**
นายธงชัย แก้วพินิจ และคณะ
(74) **ตัวแทน**
-

(54) **ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์** กรรมวิธีการตรวจสอบเบสกลายพันธุ์ของเชื้อวัณโรคดื้อต่อยาไอโซไนอะซิด (isoniazid) ด้วยอนุภาคทองคำ

(57) **บทสรุปการประดิษฐ์**

กรรมวิธีการตรวจสอบเบสกลายพันธุ์ของเชื้อวัณโรคดื้อต่อยาไอโซไนอะซิด (isoniazid) ด้วยอนุภาคทองคำ โดยเริ่มจากการออกแบบไพรเมอร์ 6 เส้น ที่จำเพาะต่อลำดับเบสกลายพันธุ์ของเชื้อวัณโรคดื้อต่อยาไอโซไนอะซิด (isoniazid) ที่ตำแหน่ง 315 (G→C) ของยีน*แคทจี* (*katG*) ซึ่งในระบบนี้ดีเอ็นเอเป้าหมายจะถูกเพิ่มปริมาณภายใต้อุณหภูมิ 61 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ด้วยปฏิกิริยาแลมป์ (LAMP) หลังจากนั้นเติมตัวตรวจจับที่ติดฉลากไทอัล (thiol) ที่ปลายด้าน 5′ ลงไป แล้วปล่อยไว้ที่อุณหภูมิเดิมเป็นเวลาอีก 5 นาที เมื่อนำไปตรวจสอบกับผลผลิตแลมป์ (LAMP) ตัวตรวจสอบดีเอ็นเอจะเข้าไปจับบริเวณที่จำเพาะเจาะจงต่อผลผลิตของแลมป์ (LAMP) ที่เกิดขึ้น เมื่อมีการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) หรือแมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) ลงไปในปริมาณที่เหมาะสม จะทำให้ผลผลิตของแลมป์ (LAMP) ดังกล่าวทำให้เชื้อวัณโรคดื้อต่อยาไอโซไนอะซิด (isoniazid) ที่มีเบสกลายพันธุ์ตำแหน่ง 315 (G→C) จะเห็นอนุภาคทองคำเป็นสีชมพูแดงอยู่ในสารละลาย ในขณะที่ถ้าไม่มีลำดับเบสกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง 315 (G→C) จะทำให้เห็นอนุภาคทองคำเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีม่วง

(11) เลขที่ประกาศโฆษณา 13931

ข้อถือสิทธิ

1. กรรมวิธีการตรวจสอบเบสกลายพันธุ์ของเชื้อวัณโรคดื้อต่อยาไอโซไนอะซิด (isoniazid) ด้วยอนุภาคทองคำ ประกอบด้วยการทำปฏิกิริยาแลมป์ (LAMP) ร่วมกับการประยุกต์ใช้อนุภาคทองคำ ภายในปฏิกิริยาแลมป์ (LAMP) 25 ไมโครลิตร มีการใช้ไพรเมอร์ 2 ชุดด้วยการทำปฏิกิริยาครั้งเดียว ชุด 1 ประกอบด้วยไพรเมอร์ 3 และไพรเมอร์ 4 อย่างละ 2 ไมโครโมลาร์, ไพรเมอร์ 1 และไพรเมอร์ 2 อย่างละ 0.2 ไมโครโมลาร์, ดีเอ็นทีพี (dNTP) 1.6 มิลลิโมลาร์ ผสมด้วยสารเบตาอีน (betaine) 0.6 โมลาร์, สารแมกนีเซียมซัลเฟส ($MgSO_4$) 4 มิลลิโมลาร์, เอนไซม์*บีเอสที* 2.0 วอร์ม สตาร์ท ดีเอ็นเอ โพลีเมอเรส (*Bst* 2.0 warm start DNA polymerase) 2.5U และสารละลายบัฟเฟอร์ (supplied buffer 1x) และชุด 2 ประกอบด้วยไพรเมอร์ 5 และไพรเมอร์ 6 อย่างละ 2 ไมโครโมลาร์, ไพรเมอร์ 1 และไพรเมอร์ 2 อย่างละ 0.2 ไมโครโมลาร์, ดีเอ็นทีพี (dNTP) 1.6 มิลลิโมลาร์ ผสมด้วยสารเบตาอีน (betaine) 0.6 โมลาร์, สารแมกนีเซียมซัลเฟส ($MgSO_4$) 4.8 มิลลิโมลาร์, เอนไซม์*บีเอสที* 2.0 วอร์ม สตาร์ท ดีเอ็นเอ โพลีเมอเรส (*Bst* 2.0 warm start DNA polymerase) 3.5-5.0 U และสารละลายบัฟเฟอร์ (supplied buffer 1x) สำหรับการตรวจสอบเบสกลายพันธุ์ของเชื้อวัณโรคดื้อต่อยาไอโซไนอะซิด (isoniazid) ตำแหน่ง 315 (G→C) ของยีน*แคทจี* (*KatG*) ของเชื้อวัณโรค การออกแบบไพรเมอร์สำหรับเทคนิคแลมป์ (LAMP) ในการตรวจเชื้อวัณโรคดื้อต่อยาไอโซไนอะซิด (isoniazid) ที่มีเบสกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง 315 (G→C) ของยีน*แคทจี* (*katG*) ไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาแลมป์ (LAMP) ประกอบด้วยไพรเมอร์ 6 เส้น ที่จำเพาะต่อลำดับเบสกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง 315 (G→C) ของยีน*แคทจี* (*katG*) ของเชื้อวัณโรค โดยกำหนดให้เบสตัวที่ 2 ของปลาย 5′ ไพรเมอร์ 4 เปลี่ยนเป็นเบสที (T) หรือเบสเอ (A) และ ไพรเมอร์ 6 ไม่มีการเปลี่ยนเบส ดังนี้

ไพรเมอร์ 1 ลำดับเบส (5′-3′) gAAACAgCggCgCTgATC

ไพรเมอร์ 2 ลำดับเบส (5′-3′) CgAggAAACTgTTgTCCCAT

ไพรเมอร์ 3 ลำดับเบส (5′-3′)

gTggTgATCgCgTCCTTACCTTTTAgAgCTCgTATggCACCggAA

ไพรเมอร์ 4 ลำดับเบส (5′-3′)

CIggCATCgAggTCgTATTTTTTCgTCggggTgTTCgTCC

ไพรเมอร์ 5 ลำดับเบส (5′-3′)

CAAgCCCATCTgCTCCAgCggTTTTTTCggTAAgACCCATggCg

ไพรเมอร์ 6 ลำดับเบส (5′-3′)

CCggCATCgAggTCgTATTTTTTCgTCggggTgTTCgTCC

(ข้อถือสิทธิ 6 ข้อ, รูปเขียน 2 รูป)