

(19)  กรมทรัพย์สินทางปัญญา
กระทรวงพาณิชย์
เลขที่อนุสิทธิบัตร 17937

(10) เลขที่ประกาศโฆษณา 17937
(43) วันประกาศโฆษณา 25 มิถุนายน 2564
(40) วันออกอนุสิทธิบัตร 25 มิถุนายน 2564

(12) ประกาศโฆษณาการจดทะเบียนการประดิษฐ์และออกอนุสิทธิบัตร

<p>(21) เลขที่คำขอ 1803001302 (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 ที่อยู่ 114 มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ซอยสุขุมวิท 23 แขวงคลองตันเหนือ เขตวัฒนา กรุงเทพมหานคร 10110</p>
<p>(54) ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์</p>	<p>กรรมวิธีการตรวจสอบเบสกลายพันธุ์ของเชื้อวัณโรคคือต่อยาไอโซไนอะซิด (isoniazid) บนยีนไอเอ็นเอชเอ (inhA) ด้วยแถบสีในชั้นตอนเดียว</p>
<p>(57) บทสรุปการประดิษฐ์</p>	<p>กรรมวิธีการตรวจสอบเบสกลายพันธุ์ของเชื้อวัณโรคคือต่อยาไอโซไนอะซิด (isoniazid) บนยีนไอเอ็นเอชเอ (inhA) ด้วยแถบสีในชั้นตอนเดียว เริ่มจากการออกแบบไพรเมอร์ 5 เส้น ที่จำเพาะต่อลำดับเบสของเชื้อวัณโรคคือต่อยาไอโซไนอะซิด (isoniazid) ที่มีเบสกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง โพรโมเตอร์ (promoter) ที่ 15 ซึ่งเบส ซี เปลี่ยนเป็นเบสที (C-15-T) ของยีนไอเอ็นเอชเอ (inhA) ซึ่งโดยให้ไพรเมอร์ 1 เส้นติดฉลากด้วยไบโอติน (biotin) หรือไดกอกซิเจนิน (Digoxigenin) และให้ไพรเมอร์อีก 1 เส้นติดฉลากด้วยสารเรืองแสง (FITC) ในการติดตามปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นบนแผ่นดิพสติก (dipstick) ในระบบนี้ดีเอ็นเอเป้าหมายจะถูกเพิ่มปริมาณภายใต้อุณหภูมิ 61 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ในกล่องให้ความร้อน (heating block) แล้วอ่านผลบนแผ่นดิพสติก (dipstick) เมื่อให้ผลบวก จะปรากฏเส้นทดสอบสีชมพู บริเวณแถบทดสอบ (T) และแถบควบคุม (C) แสดงว่าในตัวอย่างพบเบสกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโพรโมเตอร์ (promoter) ที่ 15 ซึ่งเบส ซี เปลี่ยนเป็นเบสที (C-15-T) ของยีนไอเอ็นเอชเอ (inhA) แต่ถ้าผลลบ จะปรากฏเส้นทดสอบสีชมพู เฉพาะแถบควบคุม (C) เท่านั้น วิธีการนี้เทียบเท่ากับการตรวจสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR) แบบเรียลไทม์ (real time) อีกทั้งยังไม่ต้องใช้เครื่องพีซีอาร์ (PCR) และเครื่องแยกสารพันธุกรรมด้วยกระแสไฟฟ้าในการติดตามผลของปฏิกิริยา</p>

ข้อถ้อยสิทธิ

1. กรรมวิธีการตรวจสอบเบสกลายพันธุ์ของเชื้อวัณโรคคือต่อยาไอโซไนอะซิด (isoniazid) บนยีน *ไอเอ็นเอชเอ* (*inhA*) ด้วยแถบสีในขั้นตอนเดียวที่ซึ่งประกอบด้วยการทำปฏิกิริยาแลมป์ (LAMP) ร่วมกับการประยุกต์ใช้แผ่นดิพสติก (dipstick) ในการทำปฏิกิริยาแลมป์ (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 โดยการทำปฏิกิริยาแลมป์ (LAMP) ทำที่อุณหภูมิ 61 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นดูดสารละลายดังกล่าวจำนวน 5 ไมโครลิตรใส่ในหลอดที่มีสารละลายบัฟเฟอร์ 100 ไมโครลิตรที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นจุ่มแผ่นดิพสติก (dipstick) ลงในสารละลาย 5 นาที แล้วอ่านผลบนแผ่นดิพสติก (dipstick) เมื่อให้ผลบวก จะปรากฏเส้นทดสอบสีชมพู บริเวณแถบทดสอบ (T) และแถบควบคุม (C) แสดงว่า ในตัวอย่างเบสกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโพรโมเตอร์ (promoter) ที่ 15 ซึ่งเบส ซี เปลี่ยนเป็นเบส ที (C-15-T) ของยีน *ไอเอ็นเอชเอ* (*inhA*) แต่ถ้าผลลบ จะปรากฏเส้นทดสอบสีชมพู เฉพาะแถบควบคุม (C) เท่านั้น วิธีการนี้ใช้ในการตรวจสอบเบสกลายพันธุ์ของเชื้อวัณโรคคือต่อยาไอโซไนอะซิด (isoniazid) ในยีน *ไอเอ็นเอชเอ* (*inhA*) ด้วยแถบสีในขั้นตอนเดียว ในผู้ป่วยที่สงสัยการติดเชื้อนี้ เพื่อการตรวจวินิจฉัยและป้องกันการระบาดของวัณโรคคือต่อยาไอโซไนอะซิด (isoniazid) โดยไม่ต้องใช้เครื่องพีซีอาร์ (PCR thermal cycler) และเครื่องแยกสารพันธุกรรมด้วยกระแสไฟฟ้า กรรมวิธีนี้มีการออกแบบไพรเมอร์สำหรับเทคนิคแลมป์ (LAMP) ในการตรวจเชื้อวัณโรคที่มีเบสกลายพันธุ์เพียงหนึ่งเบส ไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาแลมป์ (LAMP) ประกอบด้วยไพรเมอร์ 5 เส้น ที่จำเพาะต่อลำดับเบสกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโพรโมเตอร์ (promoter) ที่ 15 ซึ่งเบส ซี เปลี่ยนเป็นเบส ที (C-15-T) ของยีน *ไอเอ็นเอชเอ* (*inhA*) ของเชื้อวัณโรคโดยให้ไพรเมอร์ 4 ติดฉลากด้วยไบโอติน (biotin) หรือไดกอกซิเจนิน (Digoxigenin) โดยกำหนดให้เบสตัวสุดท้ายของปลาย 3' ในไพรเมอร์ 4 ตรงกับตำแหน่งเบสกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโพรโมเตอร์ (promoter) ที่ 15 ซึ่งเบส ซี เปลี่ยนเป็นเบส ที (C-15-T) ของยีน *ไอเอ็นเอชเอ* (*inhA*) และให้ไพรเมอร์ 5 ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง (FITC) ในการติดตามปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นบนแผ่นดิพสติก (dipstick) ดังนี้

ไพรเมอร์ 1 ลำดับเบส (5'-3') gCTgAgTCACACCgACAAAC

ไพรเมอร์ 2 ลำดับเบส (5'-3') CCggTTTCCTCCggTAACC

ไพรเมอร์ 3 ลำดับเบส (5'-3')

CCACgAgCgTAACgTggCTgCTTTTgTCACgAgCgTAACCCCA

ไพรเมอร์ 4 ลำดับเบส (5'-3')

ไบโอติน (biotin)/ไดกอกซิเจนิน (Digoxigenin)

ATCgCAgCCACgTTACgCTCTTTTgTCACCCgACAACCTATTT

ไพรเมอร์ 5 ลำดับเบส (5'-3') FITC-TggACATACCgATTCgCgCCC