เลขที่อนุสิทธิบัตร 22537

อสป/200 - ข

อนุสิทธิบัตร

อาศัยอำนาจตามความในพระราชบัญญัติสิทธิบัตร พ.ศ. 2522
ซึ่งแก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติสิทธิบัตร (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2542
อธิบดีกรมทรัพย์สินทางปัญญาออกอนุสิทธิบัตรฉบับนี้ให้แก่

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

สำหรับการประดิษฐ์ตามรายละเอียดการประดิษฐ์ ข้อถือสิทธิ และรูปเขียน (ถ้ามี) ดังที่ปรากฏในอนุสิทธิบัตรนี้

เลขที่คำขอ	1903001722
วันขอรับอนุสิทธิบัตร	3 กรกฎาคม 2562
ผู้ประดิษฐ์	นางสาวรัชนีวรรณ อุ่นแพทย์ และคณะ
ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์	คู่ไพร์เมอร์และสภาวะที่ใช้สำหรับตรวจหาเชื้อเอ็นเทอโรแบคทีเรียซีอี้จากอาหารโดยเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์

ให้ผู้ทรงอนุสิทธิบัตรนี้มีสิทธิและหน้าที่ตามกฎหมายว่าด้วยสิทธิบัตรทุกประการ

ออกให้ ณ วันที่ 25 เดือน กันยายน พ.ศ. 2566

หมดอายุ ณ วันที่ 2 เดือน กรกฎาคม พ.ศ. 2568

(นายกิตติวัฒน์ ปัจฉิมนันท์)
รองอธิบดีกรมทรัพย์สินทางปัญญา ปฏิบัติราชการแทน
อธิบดีกรมทรัพย์สินทางปัญญา
ผู้ออกอนุสิทธิบัตร

พนักงานเจ้าหน้าที่

หมายเหตุ
1. ผู้ทรงอนุสิทธิบัตรต้องชำระค่าธรรมเนียมรายปีเริ่มตั้งแต่ปีที่ 5 ของอายุอนุสิทธิบัตร มิฉะนั้น อนุสิทธิบัตรนี้จะสิ้นอายุ
2. ผู้ทรงอนุสิทธิบัตรจะขอชำระค่าธรรมเนียมรายปีล่วงหน้าโดยชำระทั้งหมดในคราวเดียวได้
3. ภายใน 90 วันก่อนวันสิ้นอายุอนุสิทธิบัตร ผู้ทรงอนุสิทธิบัตรมีสิทธิขอต่ออายุอนุสิทธิบัตรได้ 2 คราว มีกำหนดคราวละ 2 ปี โดยยื่นคำขอต่ออายุ ต่อพนักงานเจ้าหน้าที่
4. การอนุญาตให้ใช้สิทธิตามอนุสิทธิบัตรและการโอนอนุสิทธิบัตรต้องทำเป็นหนังสือและจดทะเบียนต่อพนักงานเจ้าหน้าที่

Ref.256601070655236

รายละเอียดการประดิษฐ์

ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์

คู่ไพร์เมอร์และสภาวะที่ใช้สำหรับตรวจหาเชื้อเอ็นเทอโรแบคทีเรียซีอีจากอาหารโดยเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์

ลักษณะและความมุ่งหมายของการประดิษฐ์

การประดิษฐ์นี้เป็นการใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยามาช่วยในการตรวจหาเชื้อเอนเทอโรแบคทีเรียซีอี (Enterobacteriaceae) 6 ชนิด โดยการใช้ไพรเมอร์ที่ถูกออกแบบให้มีความจำเพาะต่อแบคทีเรียทั้ง 6 ชนิดจำนวน 6 คู่ มาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR) ในสภาวะที่เหมาะสม ทำให้เกิดการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และสามารถตรวจพบเชื้อก่อโรคทั้ง 6 ชนิดที่ต้องการได้โดยใช้หลอดทดลองเพียงหลอดเดียว

เชื้อเอนเทอโรแบคทีเรียซีอี (Enterobacteriaceae) เป็นเชื้อก่อโรคในระบบทางเดินอาหารที่มีการระบาดอย่างมากในประเทศไทย ดังนั้นการคิดค้นพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อโดยใช้เทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ (multiplex PCR) มาช่วยทำให้สามารถตรวจพบแบคทีเรีย 6 ชนิดจากตัวอย่างอาหารหรือสิ่งส่งตรวจได้ในคราวเดียว ทำให้การตรวจหาเป็นไปอย่างรวดเร็ว มีความแม่นยำ และเป็นเทคโนโลยีที่ทุกห้องปฏิบัติการสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้

สาขาวิทยาการที่เกี่ยวข้องกับการประดิษฐ์

เทคโนโลยีชีวภาพด้านอณูชีววิทยาในส่วนที่เกี่ยวข้องกับคู่ไพร์เมอร์ที่ใช้สำหรับตรวจหาเชื้อเอนเทอโรแบคทีเรียซีอี (Enterobacteriaceae) 6 ชนิดจากอาหารโดยเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์

ภูมิหลังของศิลปะหรือวิทยาการที่เกี่ยวข้อง

แบคทีเรียในวงศ์เอนเทอโรแบคทีเรียซีอี (Enterobacteriaceae) เป็นแบคทีเรียแกรมลบก่อโรคในระบบทางเดินอาหารที่ระบาดเป็นอย่างมากในประเทศไทยและทั่วโลก เมื่อเกิดการระบาดและไม่ได้รับการวินิจฉัยอย่างทันท่วงที ทำให้เกิดการสูญเสียอย่างมาก โดยเชื้อแบคทีเรียในวงศ์นี้ที่มีความสำคัญได้แก่ เอสเชอริเชีย โคไล (*Eschericia coli*), เคล็บซิลลา (*Klebsiella* spp.), ซัลโมเนลลา (*Salmonella* spp.), ชิเจลล่า (*Shigella* spp.) และเยอซิเนีย (*Yersinia* spp.) โดยปกติแล้วเชื้อเหล่านี้จะถูกตรวจหาด้วยวิธีมาตรฐานคือการเพาะเลี้ยงเชื้อ (Bacterial culture) แต่ด้วยข้อจำกัดคือใช้เวลานานและวินิจฉัยผิดพลาดได้ง่าย ถึงแม้ว่าจะมีวิธีทางอณูชีววิทยาคือพีซีอาร์ (PCR) ในการตรวจหา แต่ไม่มีการตรวจหาเชื้อในวงศ์เอนเทอโรแบคทีเรียซีอี (Enterobacteriaceae) พร้อมกันถึง 6 เชื้อในครั้งเดียว โดยคู่ไพร์เมอร์ที่ได้มีการรายงานแล้วนั้นได้แก่ คู่ไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีนของเชื้อ 5 ชนิด ได้แก่ เอสเชอริเชีย โคไล โอ157เอช7 (*Escherichia coli* O157:H7), เอสเชอริเชีย โคไล (*Escherichia coli*), ซัลโมเนลลา (*Salmonella* spp.), ชิเจลล่า (*Shigella* spp.) และเยอซิเนีย (*Yersinia* spp.) ซึ่งมาจากงานวิจัย 5 ผลงาน ยังไม่มีสภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อโดยใช้เทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ (multiplex PCR) และในการประดิษฐ์นี้ได้ดำเนินการออกแบบไพร์เมอร์ใหม่จำนวน 1 คู่ คือ ไพร์เมอร์สำหรับตรวจหาเคล็บซิลลา (*Klebsiella* spp.) ซึ่งมีความจำเพาะต่อเคล็บซิลลา (*Klebsiella* spp.) และยังไม่เคยมีการรายงานมาก่อน นอกจากนี้แล้ว ในการประดิษฐ์นี้ยังได้ดำเนินการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจหาเชื้อเอนเทอโรแบคทีเรียซีอี (Enterobacteriaceae) 6 ชนิดจากอาหารโดยเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ (multiplex PCR) ซึ่งปัญหาของเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ (multiplex PCR) คือ การหาสภาวะที่เหมาะสมที่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอทั้ง 6 ชิ้นได้ในปฏิกิริยาเดียว โดยส่วนใหญ่แล้ว เทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ (multiplex PCR) สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้เพียง 3-4 ชิ้นในปฏิกิริยาเดียว แต่ในการประดิษฐ์นี้สามารถออกแบบไพร์เมอร์ใหม่จำนวน 1 คู่ ที่สามารถนำมาทำ

นายสุวัจชัย บุญอารี

Signed by DIP-CA

ปฏิกิริยามัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ (multiplex PCR) กับไพร์เมอร์เดิมจำนวน 5 คู่ได้อย่างมีประสิทธิภาพภายใต้สภาวะจำเพาะที่ได้พัฒนาขึ้น

ดังนั้นการประดิษฐ์นี้จึงได้พัฒนาวิธีตรวจหาเชื้อเอนเทอโรแบคทีเรียซีอี (Enterobacteriaceae) 6 ชนิด จากอาหารด้วยเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ (multiplex PCR) ซึ่งมีความรวดเร็วแม่นยำและจำเพาะสูงกว่าเทคนิคทางชีวเคมีหรือเทคนิคอื่นๆที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ เพื่อลดช่วยการแพร่กระจายของเชื้อ ลดผลกระทบทางเศรษฐกิจ อาหารและการสาธารณสุข

<u>คำอธิบายรูปเขียนโดยย่อ</u>

รูปที่ 1 แสดงผลการตรวจหาเชื้อเอนเทอโรแบคทีเรียซีอี (Enterobacteriaceae) 6 ชนิด

ตามรูปที่ 1 กำหนด M คือ เครื่องหมายบอกขนาดดีเอ็นเอ (Molecular Marker; 100 คู่เบส (bp) DNA ladder), P คือลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อวงศ์เอนเทอโรแบคทีเรียซีอี (Enterobacteriaceae) ทั้งหมด 5 จีนัส 6 ชนิด ซึ่งทดสอบด้วยวิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ (multiplex PCR) ได้แก่ เคล็บซิลลา นิวโมเนีย เอทีซีซี 27736 (*Klebsiella pneumoniae* ATCC 27736) ขนาด 734 คู่เบส (base pair), เอสเชอริเชีย โคไล เอทีซีซี 25922 (*Escherichia coli* ATCC 25922) ขนาด 600 คู่เบส (base pair), เอสเชอริเชีย โคไล โอ157เอช7 (*Escherichia coli* O157:H7) ขนาด 390 คู่เบส (base pair), ซัลโมเนลลา ไทซิมูเรียม เอทีซีซี 13311 (*Salmonella* Typhimurium ATCC 13311) ขนาด 240 คู่เบส (base pair), เยอซิเนีย (*Yersinia* spp.) ขนาด 185 คู่เบส (base pair), และชิเจลล่า ไดเซนเทอเรีย ดีเอ็มเอชที 15111 (*Shigella dysenteriae* DMST 15111) ขนาด 159 คู่เบส (base pair), N คือน้ำกลั่นบริสุทธิ์ เป็นตัวควบคุมผลลบ (Negative control), (1)-(6) เป็นขนาดของผลิตภัณฑ์แต่ละชนิดเมื่อทดสอบด้วยวิธีพีซีอาร์ ซึ่งใช้เป็นตัวเปรียบเทียบกับขนาดของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทดสอบด้วยวิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ (1) คือ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเคล็บซิลลา นิวโมเนีย เอทีซีซี 27736 (*Klebsiella pneumoniae* ATCC 27736) ทดสอบด้วยไพร์เมอร์ Kleb2F และ Kleb2R ให้ขนาดผลิตภัณฑ์ 734 คู่เบส, (2) คือ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเอสเชอริเชีย โคไล เอทีซีซี 25922 (*Escherichia coli* ATCC 25922) ทดสอบด้วยไพร์เมอร์ Ecol5F และ Ecol5R ให้ขนาดผลิตภัณฑ์ 600 คู่เบส, (3) คือ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเอสเชอริเชีย โคไล โอ157เอช7 (*Escherichia coli* O157:H7) ทดสอบด้วยไพร์เมอร์ Ecol3F และ Ecol3R ให้ขนาดผลิตภัณฑ์ 390 คู่เบส, (4) คือ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของซัลโมเนลลา ไทซิมูเรียม เอทีซีซี 13311 (*Salmonella* Typhimurium ATCC 13311) ทดสอบด้วยไพร์เมอร์ Sal2F และ Sal2R ให้ขนาดผลิตภัณฑ์ 240 คู่เบส, (5) คือ เยอซิเนีย (*Yersinia* spp.) ทดสอบด้วยไพร์เมอร์ Yer1F และ Yer1R ให้ขนาดผลิตภัณฑ์185 คู่เบส และ (6) คือ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของชิเจลล่า ไดเซนเทอเรีย ดีเอ็มเอชที 15111 (*Shigella dysenteriae* DMST 15111) ทดสอบด้วยไพร์เมอร์ Shi2F และ Shi2R ให้ขนาดผลิตภัณฑ์ 159 คู่เบส

<u>การเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์</u>

คู่ไพร์เมอร์และสภาวะที่ใช้สำหรับตรวจหาเชื้อเอ็นเทอโรแบคทีเรียซีอี้ จากอาหารโดยเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์

1. สร้างไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อเอนเทอโรแบคทีเรียซีอี (Enterobacteriaceae) ทั้ง 6 ชนิด การออกแบบไพร์เมอร์จำนวน 1 คู่ คือ ไพร์เมอร์สำหรับตรวจหาเคล็บซิลลา (*Klebsiella* spp.) และจาก

นายสุวัจชัย บุญอารี

Signed by DIP-CA

การทบทวนวรรณกรรมทำให้ได้ไพร์เมอร์อีก 5 คู่ที่มีความจำเพาะต่อยีนของเชื้อ ได้แก่ เอสเชอริเชีย โคไล โอ157 เอช7 (*Escherichia coli* O157:H7), เอสเชอริเชีย โคไล (*Escherichia coli*), ซัลโมเนลลา (*Salmonella* spp.), ชิเจลล่า (*Shigella* spp.) และเยอซิเนีย (*Yersinia* spp.) รายละเอียดของไพร์เมอร์ทั้งหมดแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อเอนเทอโรแบคทีเรียซีอี (Enterobacteriaceae) 6 ชนิด

แบคทีเรียเป้าหมาย	ยีนเป้าหมาย	ลำดับเบสของไพร์เมอร์ (5'⟶3')	ขนาดของผลิตภัณฑ์ (คู่เบส)	อ้างอิง
เอสเชอริเชีย โคไล โอ157เอช7 (*Escherichia coli* O157:H7)	*fliC*	Ecol3F: ATTCAGCAGGTAATATCAC Ecol3R: TATCATCCACATAAGACTTC	390	Feng, Hu et al. 2016
เอสเชอริเชีย โคไล (*Escherichia coli*)	*uidA*	Ecol5F: CTGGTATCAGCGCGAAGTCT Ecol5R: AGCGGGTAGATATCACACTC	556	Anbazhagan, Mui et al. 2011
ซัลโมเนลลา (*Salmonella* spp.)	*invA*	Sal2F: ACAGTGCTCGTTTACGACCTGAAT Sal2R: AGACGACTGGTACTGATCGATAAT	244	Nair, Balasaravanan et al. 2015
ชิเจลล่า (*Shigella* spp.)	Putative integrase	Shi1F: TCCGTCATGCTGGATGAACGATGT Shi1R: ACAGTTCAGGATTGCCCGAGACACA	159	Radhika, Saugata et al. 2014
เคล็บซิลลา นิวโมเนีย (*Klebsiella pneumoniae*)	*ntrA*	Kleb2F: TTGGCGACGATGAAATCGGA Kleb2R: GGTGTTCACATGGCTGGAGA	734	การประดิษฐ์นี้
เยอซิเนีย (*Yersinia* spp.)	*ail*	Yer1F: GCAT(T/C)AACGA(A/G)TATGTTAGC Yer1R: ATCGAGTTTGGAGTATTCAT	185	Wiemer, Loderstaedt et al. 2011

2. ปิเปตดีเอ็นเอที่สกัดแล้วของเชื้อวงศ์เอนเทอโรแบคทีเรียซีอี (Enterobacteriaceae) แต่ละจีนัส (genus) ลงในหลอดเดียวกัน ได้แก่

เอสเชอริเชีย โคไล เอทีซีซี 25922 (*Escherichia coli* ATCC 25922) 10 นาโนกรัม

เอสเชอริเชีย โคไล โอ157เอช7 (*Escherichia coli* O157:H7) 10 นาโนกรัม

เคล็บซิลลา นิวโมเนีย เอทีซีซี 27736 (*Klebsiella pneumoniae* ATCC 27736) 50 นาโนกรัม

ซัลโมเนลลา ไทซิมูเรียม เอทีซีซี 13311 (*Salmonella* Typhimurium ATCC 13311) 2.5 นาโนกรัม

นายสุวัจชัย บุญอารี

Signed by DIP-CA

ชิเจลล่า ไดเซนเทอเรีย ดีเอ็มเอชที 15111 (*Shigella dysenteriae* DMST 15111) 2.5 นาโนกรัม

ชิ้นส่วนดีเอ็นเอสังเคราะห์ที่สร้างให้มีลำดับยีน ail 700 คู่เบสเหมือนกับในเชื้อเยอซิเนีย (*Yersinia* spp.) ที่มีความเข้มข้น 2.5 นาโนกรัม

สำหรับตัวควบคุมผลลบ (Negative control) ใช้น้ำกลั่นบริสุทธิ์แทนดีเอ็นเอ

3. เตรียมสารพีซีอาร์ผสม (PCR master mixture) โดยมีส่วนประกอบดังนี้

0.5 ไมโครโมล่าร์ของไพร์เมอร์ทั้ง 6 คู่

1X PCR mastermix kit ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์ฮอตสตาร์ทดีเอ็นเอาแทคโพลีเมอเรส (Hot Start Taq DNA Polymerase) และดีออกซีไรโบนิวเคลีโอไทด์ (Deoxyribonucleotide)

จากนั้นเติมสารพีซีอาร์ผสม (PCR master mixture) ลงไปในหลอดโดยให้มีปริมาตรรวมเป็น 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการปั่นระยะสั้น (Flash spin down)

4. นำไปทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR) โดยสภาวะที่ใช้คือ

4.1 95 องศาเซลเซียส	2	นาที
4.2 95 องศาเซลเซียส	30	วินาที
4.3 57 องศาเซลเซียส	45	วินาที
4.4 72 องศาเซลเซียส	45	วินาที
4.5 ทำซ้ำ 4.2-4.4 จำนวน 29 รอบ (cycle)		
4.6 72 องศาเซลเซียส	5	นาที

5. ตรวจขนาดผลผลิตพีซีอาร์ (PCR product)

นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาทำการตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Gel electrophoresis) โดยใช้ 2% อะกาโรสเจล (agarose gel) รันด้วย 1X ทีบีอีบัฟเฟอร์ (TBE buffer) โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์

<u>วิธีการในการประดิษฐ์ที่ดีที่สุด</u>

ได้กล่าวไว้แล้วในหัวข้อการเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

นายสุวัจชัย บุญอารี

Signed by DIP-CA

ข้อถือสิทธิ

1. คู่ไพร์เมอร์และสภาวะที่ใช้สำหรับตรวจหาเชื้อเอ็นเทอโรแบคทีเรียซีอี้ จากอาหารโดยเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ คือ คู่ไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีนเอ็นทีอาร์เอ (ntrA) ของเคล็บซิลลานิวโมเนีย เอทีซีซี 27736 (*Klebsiella pneumoniae* ATCC 27736)

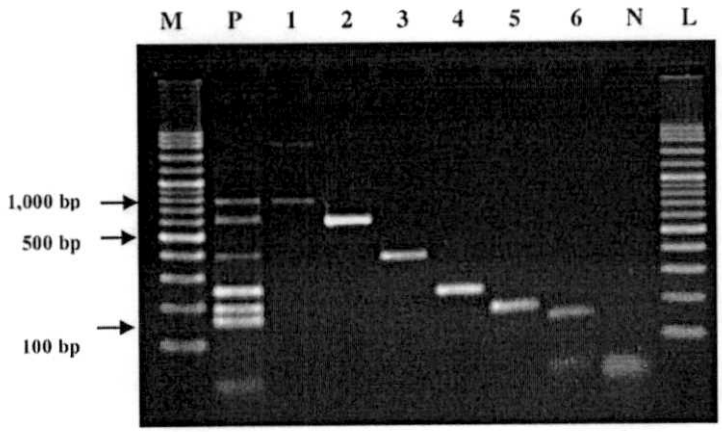
ฟอร์เวิร์ดไพร์เมอร์ (forward primer) ชื่อ Kleb2F (5'⟶3') : TTGGCGACGATGAAATCGGA

รีเวิร์สไพร์เมอร์ (reverse primer) ชื่อ Kleb2R (5'⟶3') : GGTGTTCACATGGCTGGAGA

2. คู่ไพร์เมอร์และสภาวะที่ใช้สำหรับตรวจหาเชื้อเอ็นเทอโรแบคทีเรียซีอี้ จากอาหารโดยเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ ตามข้อถือสิทธิ 1 ที่ซึ่งสภาวะที่ใช้สำหรับการตรวจหาเชื้อเอนเทอโรแบคทีเรียซีอี (Enterobacteriaceae) คือ สภาวะพรีฮีท (pre-heat) 95 องศาเซลเซียส 2 นาที และกำหนดพีซีอาร์ไซเคิล (PCR cycle) จำนวน 30 รอบ ได้แก่ 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที ดีเนเจอเรชั่น (Denaturation) , 57 องศาเซลเซียส 45 วินาที แอนเนลลิ่ง (Annealing) และ 72 องศาเซลเซียส 45 วินาที เอ๊กซ์เทนชั่น (Extension) จากนั้นขั้นตอนสุดท้าย ที่ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที ไฟนอล เอ็กซ์เทนชั่น (Final Extension)

นายสุวัจชัย บุญอารี

Signed by DIP-CA



รูปที่ 1

1903001722

นายสุวัจชัย บุญอารี

Signed by DIP-CA

บทสรุปการประดิษฐ์

คู่ไพร์เมอร์และสภาวะที่ใช้สำหรับตรวจหาเชื้อเอ็นเทอโรแบคทีเรียซีอี้ จากอาหารโดยเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ คือ คู่ไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีนเอ็นทีอาร์เอ (ntrA) ของเคล็บซิลลา นิวโมเนียเอทีซีซี 27736 (*Klebsiella pneumoniae* ATCC 27736) ฟอร์เวิร์ดไพร์เมอร์ (forward primer) ชื่อ Kleb2F (5'⟶3') : TTGGCGACGATGAAATCGGA รีเวิร์สไพร์เมอร์ (reverse primer) ชื่อ Kleb2R (5'⟶3') : GGTGTTCACATGGCTGGAGA

NOT SIGNED

นายสุวัจชัย บุญอารี

Signed by DIP-CA