เลขที่อนุสิทธิบัตร 23128

อสป/200 - ข

อนุสิทธิบัตร

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

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

สำหรับการประดิษฐ์ตามรายละเอียดการประดิษฐ์ ข้อถือสิทธิ และรูปเขียน (ถ้ามี) ดังที่ปรากฏในอนุสิทธิบัตรนี้

เลขที่คำขอ	2003000037
วันขอรับอนุสิทธิบัตร	2 กุมภาพันธ์ 2562
ผู้ประดิษฐ์	**นางอุไรวรรณ โฆษิตานนท์ และคณะ**
ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์	**ชุดทดสอบแบบรวดเร็วสำหรับการตรวจหาแอนติบอดีต่อโรคเลปโตสไปโรสิส**

ให้ผู้ทรงอนุสิทธิบัตรนี้มีสิทธิและหน้าที่ตามกฎหมายว่าด้วยสิทธิบัตรทุกประการ

ออกให้ ณ วันที่ 2 เดือน กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2567

หมดอายุ ณ วันที่ 1 เดือน กุมภาพันธ์ 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.256701008079988

รายละเอียดการประดิษฐ์

ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์

ชุดทดสอบแบบรวดเร็วสำหรับการตรวจหาแอนติบอดีต่อโรคเลปโตสไปโรสิส

สาขาวิทยาการที่เกี่ยวข้องกับการประดิษฐ์

สาขาการแพทย์และสาธารณสุขด้านเทคโนโลยีชีวภาพ ในส่วนที่เกี่ยวข้องกับชุดทดสอบแบบรวดเร็วสำหรับการตรวจหาแอนติบอดีต่อโรคเลปโตสไปโรสิส

ภูมิหลังของศิลปะหรือวิทยาการที่เกี่ยวข้อง

โรคเลปโตสไปโรสิส หรือโรคไข้ฉี่หนู (Leptospirosis) เป็นโรคติดต่อจากสัตว์สู่คน ซึ่งมีสาเหตุจากการติดเชื้อแบคทีเรียรูปร่างเกลียว สปีชีส์ก่อโรคที่พบบ่อย เลปโตสไปรา อินเทอร์โรแกนส์ (*Leptospira interrogans*) สัตว์ที่รอดชีวิตจากการติดเชื้อจะกลายเป็นพาหะเรื้อรังซึ่งจะเป็นรังโรคของเชื้อต่อไป สัตว์ที่มีการติดเชื้อและเป็นพาหะสามารถปลดปล่อยเชื้อทางปัสสาวะและอุจจาระ ซึ่งจะปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม เชื้อสามารถมีชีวิตอยู่ได้เป็นชั่วโมง หรือหลาย ๆ วันในดิน น้ำ นม โคลน และสิ่งปฏิกูลต่าง ๆ การติดต่อมายังคนโดยการสัมผัสกับสิ่งต่างๆ ที่ปนเปื้อนเชื้อ เชื้อสามารถเข้าทางแผลและเยื่อเมือกได้ โรคเลปโตสไปโรสิสเป็นปัญหาที่สำคัญทางสาธารณสุข พบได้ทั่วภูมิภาคของโลก รวมทั้งประเทศไทย เนื่องจากได้พบผู้ป่วยจำนวนมากและมีอาการรุนแรงมากขึ้น อาการทางคลินิกของโรคเลปโตสไปโรสิสมีอาการตั้งแต่เล็กน้อย อาการรุนแรงจนถึงแก่กรรมได้ และมักจะไม่สามารถวินิจฉัยแยกจากโรคไข้อื่นๆ ในกลุ่มไข้เฉียบพลัน เนื่องจากอาการไข้ในระยะต้นของโรคกลุ่มดังกล่าวจะคล้ายกัน เช่น โรคเลปโตสไปโรสิส โรคสครับไทฟัส โรคเด็งกี่ และไข้หวัดใหญ่ หากวินิจฉัยพลาด อาจเกิดอันตรายต่อผู้ป่วยได้ นอกจากนี้โรคเลปโตสไปโรสิสสามารถรักษาให้หายได้ด้วยยาปฏิชีวนะ หากวินิจฉัยได้อย่างรวดเร็ว ดังนั้นวิธีการวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรสิส อย่างรวดเร็วและถูกต้อง มีความสำคัญเป็นอย่างมาก จึงมีความจำเป็นต้องมีการวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการเพื่อยืนยันการวินิจฉัยอาการทางคลินิก ความต้องการวิธีการวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรสิสได้อย่างรวดเร็วและสะดวกง่ายในการใช้ชุดทดสอบได้ทันที ณ จุดดูแลรักษาผู้ป่วย (Point-of-care, POC) ชุดทดสอบแบบรวดเร็วสำหรับการตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรสิส สามารถนำไปใช้งานได้อย่างสะดวกในห้องปฏิบัติการทั่วไปทุกพื้นที่จึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง

การวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการของโรคเลปโตสไปโรสิส กระทำได้หลายวิธี ได้แก่ การตรวจตัวอย่างตรวจโดยตรง ตรวจหาเชื้อโดยการย้อมสีซึ่งวิธีนี้ไม่เหมาะสมเพราะมีความไวและความจำเพาะต่ำ หรือตรวจหาแอนติเจนของเชื้อด้วยวิธีอิมมูนเรืองแสง การแยกเชื้อ ตัวอย่างตรวจที่เหมาะสม คือ เลือดในระยะมีไข้ภายในสัปดาห์แรกที่เริ่มป่วย วิธีการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปรา และการตรวจหาดีเอนเอของเชื้อเลปโตสไปรา การวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรสิสทางห้องปฏิบัติการในงานบริการทั่วไป นิยมใช้วิธีการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปรา ได้แก่ วิธีตรวจการตกตะกอนภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (microscopic agglutination test, MAT) ซึ่งมีข้อจำกัด

นายสุวัจชัย บุญอารี

Signed by DIP-CA

เนื่องจากความหลากหลายของแอนติเจน (antigenic diversity) ของเชื้อแต่ละซีโรวาร์ (serovar) แต่วิธี MAT เป็นวิธีที่ยุ่งยากมากจากการที่ต้องใช้เชื้อมีชีวิตของแต่ละซีโรวาร์อย่างน้อย 24 ซีโรวาร์ และวิธีการเลี้ยงเชื้อเลปโตสไปราก็ยุ่งยากกว่าแบคทีเรียทั่วไป วิธี MAT จึงลดความสำคัญลง จำเป็นต้องมีการพัฒนาวิธีในการวินิจฉัยโดยที่แอนติเจนนั้นต้องมีความเหมือนกันในระดับสูงระหว่างซีโรวาร์ ดังนั้น โปรตีนในเมมเบรนชั้นนอก (outer membrane proteins, OMPs) ของเชื้อเลปโตสไปรา จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับการวิจัย สำหรับ OMPs ประกอบด้วย โปรตีนบางส่วนแทรกอยู่ในเมมเบรนชั้นนอก (transmembrane outer membrane protein) และ ไลโพโปรตีน (lipoproteins, LipL) ในปัจจุบันมีไลโพโปรตีน เพียงสิบกว่าชนิดที่ได้มีการศึกษาคุณลักษณะ และพบว่ามีคุณสมบัติเป็นสารกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกัน (protective immunogens) เช่น LipL21, LipL32, LipL41, LigA และ LigB เป็นต้น ได้มีการนำเทคนิกรีคอมบิแนนท์ มาใช้กับ OMPs เพื่อพัฒนาวิธีการวินิจฉัยทางซีโรโลยี อย่างไรก็ตามแอนติเจนเดิมที่มีอยู่ยังไม่ดีพอสำหรับการวินิจฉัยระยะแรกของโรคเลปโตสไปโรสิสซึ่งไม่เกิน 3-5 วันหลังป่วย สำหรับความไวและความจำเพาะของชุดทดสอบเดิมที่มีอยู่ยังไม่สูงนัก ทำให้ผู้ประดิษฐ์มีความคิดที่ต้องการแก้ไขปัญหาดังกล่าว โดยพัฒนาชุดทดสอบที่สามารถวินิจฉัยระยะแรกของโรคเลปโตสไปโรสิสได้

ลักษณะของการประดิษฐ์เดิมที่มีอยู่ ได้มีการเลือกใช้ OMPs และ ไลโปโปรตีน รวมทั้งสารพวกไลโพพอลิแซ็กคาร์ไรด์ (lipopolysaccharide, LPS) เช่น มีงานวิจัยเกี่ยวกับ LipL32 มากกว่าโปรตีนชนิดอื่น พบปริมาณ LipL32 เป็นจำนวนมาก มีรายงานว่า สามารถใช้เป็นแอนติเจนในการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปราได้ มีค่าการประเมินวิธีตรวจแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปราชนิด IgG ดังนี้ ความไวร้อยละ 100 และความจำเพาะร้อยละ 98.33 ตามลำดับ ค่าการประเมินนี้ได้ผลดีกว่าจากรายงานของ Guerreiro และคณะ พบว่าแอนติบอดีชนิดไอจีจี (IgG) ต่อโปรตีนขนาด 32 กิโลดัลตัน (kilodalton, kDa) ในระยะแรกของโรค (acute phases of illness) และระยะหลังของโรค (convalescent phases of illness) ร้อยละ 36 และร้อยละ 73 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามหลักการของการตอบสนองทางอิมมูนหลังจากการติดเชื้อเลปโตสไปรา แอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปรา ชนิดไอจีเอ็ม (IgM) จะเกิดก่อนชนิดไอจีจี (IgG) ดังนั้นวิธีการตรวจแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปราชนิด IgG ถึงมีความไวร้อยละ 100 ก็ไม่สามารถวินิจฉัยระยะต้นของโรคเลปโตสไปโรสิส (early phase of illness) ทำให้การวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรสิสล่าช้า อย่างไรก็ตามแอนติบอดีโดยวิธี MAT จะเกิดขึ้นช้ากว่าวิธีอื่น ได้มีรายงานว่าวิธี MAT มีความไวร้อยละ 41 ในสัปดาห์แรกหลังป่วย แล้วจะเพิ่มสูงขึ้นเป็นร้อยละ 96 ในสัปดาห์ที่ 4 หลังป่วย อีกหนึ่งรายงานการประเมินวิธีหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปราชนิด IgM โดยวิธี อีไลซา (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) ระยะเวลา 5-9 วันหลังป่วย มีความไวร้อยละ 80 ซึ่งยังต้องมีการพัฒนาต่อ ส่วนใหญ่ค่าการประเมินการตรวจแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปราชนิด IgM ในระยะแรกของโรคและระยะหลังของโรคมีความไวร้อยละ 92 และร้อยละ 73 ตามลำดับ การตรวจแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปราชนิด IgG ใน

Signed by DIP-CA

นายสุวัจชัย บุญอารี

ระยะแรกของโรคและระยะหลังของโรค มีความไวร้อยละ 85 และร้อยละ 98 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามซีรัมในช่วงระยะแรกของโรคและระยะหลังของโรค มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 9.0±3.8 และ 35.3±26.8 วัน ตามลำดับ หากต้องการวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรสิสแบบรวดเร็วในช่วงระยะแรกของโรคไม่เกิน 5 วัน มีรายงานที่น่าสนใจว่า แสดงแอนติเจนซึ่งเป็นโปรตีนขนาดโมเลกุลต่ำในช่วงประมาณ 14-25 kDa ของเลปโตสไปรา ที่ให้ผลปฏิกิริยากับแอนติบอดีในซีรัมจากผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรสิส ในช่วงระยะแรกของโรค (1-3 วันหลังป่วย) มากกว่าร้อยละ 85 ต่อมาอุไรวรรณ โฆษิตานนท์ และคณะ ได้สกัดไลโพโปรตีนที่ขนาดโมเลกุลต่ำ 25 kDa ซึ่งเป็นโปรตีนชนิดใหม่ยังไม่มีรายงานมาก่อน โดยให้ทำปฏิกิริยาทางอิมมูนกับแอนติบอดีในซีรัมระยะแรกของโรค จากผู้ป่วยเลปโตสไปโรสิส ทั้งหมด 22 ราย พบว่าโปรตีนขนาดโมเลกุล 25 kDa ให้ปฏิกิริยาทางอิมมูนกับแอนติบอดีชนิด IgM ในทุกซีรัมทดสอบ และไม่พบปฏิกิริยาทางอิมมูนกับแอนติบอดีในซีรัมจากผู้ป่วยโรคอื่นที่ไม่ใช่เลปโตสไปโรสิส 13 ราย และซีรัมจากคนปกติ 10 ราย สำหรับการทำการแยกโปรตีนใน 2 มิติ ด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิส (2 dimensional electrophoresis, 2-DE) ร่วมกับอิมมิวโนบล้อบทิ้ง (immunoblot) กับซีรัมหลายรายรวมกันของระยะแรกของโรคจากผู้ป่วยเลปโตสไปโรสิส พบว่า จุดของโปรตีนที่ให้ปฏิกิริยาทางอิมมูนต่อ IgM แอนติบอดี เป็นจุดโปรตีนที่ขนาดโมเลกุลต่ำ 25 และ 35-37 kDa จากการศึกษาทำให้สามารถจำแนกโปรตีนที่ขนาดโมเลกุลต่ำ 25 kDa ได้ ประกอบกับการวิเคราะห์ด้วยวิธีโปรตีโอโนมิก (Proteonomics analysis) ซึ่งได้ผลตรงกันว่าเป็นอิเล็กตรอน ทรานสเฟอร์ เฟลโวโปรตีน สับยูนิท เบต้า (Electron transfer flavoprotein subunit beta, ETF_beta) กล่าวโดยสรุป คือ โปรตีนที่ขนาดโมเลกุลต่ำ 25 kDa มีศักยภาพที่นำไปพัฒนาเทคนิคเป็นแอนติเจนสำหรับการวินิจฉัยระยะแรกของโรคเลปโตสไปโรสิสได้

<u>ลักษณะและความมุ่งหมายของการประดิษฐ์</u>

<u>ลักษณะทางเทคนิคของการประดิษฐ์ที่ได้คิดขึ้นโดยย่อ</u>

การค้นพบโปรตีนโมเลกุลต่ำขนาด 25 kDa ในเยื่อหุ้มเมมเบรนชั้นนอกซึ่งสกัดจากเชื้อเลปโตสไปรา โดยใช้วิธีด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิส 1 มิติ กับอิมมิวโนบล้อบทิ้ง ประกอบกับการวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธีโปรตีโอโนมิกส์ (Proteonomics analysis) ได้ผลตรงกันว่าเป็นโปรตีนอิเล็กตรอน ทรานสเฟอร์ เฟลโวโปรตีน สับยูนิท เบต้า (Electron transfer flavoprotein subunit beta, ETF_beta) จากนั้นได้เตรียมรีคอมบิแนนท์ โปรตีน (recombinant protein) ชนิดนี้ซึ่งใช้เป็นแอนติเจนให้ปฏิกิริยาทางอิมมูนกับแอนติบอดีชนิด IgM/IgG ในทุกซีรัมของผู้ป่วยเลปโตสไปโรสิส สามารถใช้เป็นชุดทดสอบเพื่อการวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรสิส

<u>วัตถุประสงค์ของการประดิษฐ์</u>

เพื่อประดิษฐ์ผลิตภัณฑ์ต้นแบบเป็นชุดทดสอบแบบรวดเร็วสำหรับการตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรสิส โดยการตรวจหาแอนติบอดีจำเพาะชนิด IgM และ IgG ใช้โปรตีน อิเล็กตรอน ทรานส

NO DRAWING

นายสุวัจชัย บุญอารี

Signed by DIP-CA

เฟอร์ เฟลโวโปรตีน สับยูนิท เบต้า (Electron transfer flavoprotein subunit beta, ETF_beta) ซึ่งเป็นโปรตีนโมเลกุลต่ำขนาด 25 kDa เป็นแอนติเจนในชุดทดสอบ

คำอธิบายรูปเขียนโดยย่อ

รูปที่ 1 แสดงถึงลักษณะโครงสร้างองค์ประกอบและขั้นตอนต่างๆ ของชุดทดสอบแบบรวดเร็วสำหรับการตรวจหาแอนติบอดีต่อโรคเลปโตสไปโรสิส

รูปที่ 2 แสดงถึงการตรวจหาโปรตีนที่ให้ปฏิกิริยาทางอิมมูนกับแอนติบอดีในซีรัมของผู้ป่วย

รูปที่ 3 แสดงถึงผล MASCOT แสดงโปรตีน อิเล็กตรอน ทรานสเฟอร์ เฟลโวโปรตีน สับยูนิท เบต้า (Electron transfer flavoprotein subunit beta, ETF_beta)

รูปที่ 4 ผลแสดงการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่าง โปรตีนรีคอมบิแนนท์ ETF_beta (recombinant ETF_beta) และยีน *etfB* ของเชื้ออ้างอิง (reference) *L. interrogans* serovar Lai จุด (.) แสดงถึงความเหมือนกัน

รูปที่ 5 ผลแสดงการเปรียบเทียบลำดับกรดอมิโนระหว่าง โปรตีนรีคอมบิแนนท์ ETF_beta (recombinant ETF_beta) และยีน *etfB* ของเชื้ออ้างอิง (reference) *L. interrogans* serovar Lai จุด (.) แสดงถึงความเหมือนกัน

การเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

ชุดทดสอบแบบรวดเร็วสำหรับการตรวจหาแอนติบอดีต่อโรคเลปโตสไปโรสิส ชนิด IgM/IgG ด้วยวิธีอิมมูโนโครมาโตกราฟีชนิดการไหลด้านข้าง ประกอบด้วย

- แผ่นรองรับน้ำยาบัฟเฟอร์ สำหรับหยดน้ำยาบัฟเฟอร์ ทำหน้าที่เคลื่อนที่ไปยังแผ่นคอนจูเกตและแผ่นทดสอบตามลำดับ
- แผ่นคอนจูเกต ซึ่งภายในได้เลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากหนูต่อแอนติบอดีชนิดเอ็ม (IgM) ของมนุษย์ และโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากหนูต่อแอนติบอดีชนิดจี (IgG) ของมนุษย์อย่างใดอย่างหนึ่งหรือรวมกันที่ปิดฉลากไว้กับอนุภาคทอง (colloidal gold)
- แผ่นรองรับตัวอย่างและแผ่นทดสอบ มีลักษณะเป็นเมมเบรน ได้เลือกไนโตรเซลลูโลส เมมเบรน (nitrocellulose membrane) แผ่นรองรับตัวอย่าง สำหรับหยดตัวอย่างที่ต้องการตรวจ ทำหน้าที่รองรับตัวอย่างที่ต้องการตรวจ เมื่อคอนจูเกตเคลื่อนที่จากแผ่นรองรับน้ำยาบัฟเฟอร์ไปพบตัวอย่างตรวจในแผ่นรองรับตัวอย่าง จะสร้างตะกอนอิมมูนซึ่งเคลื่อนที่ต่อไปยังแผ่นทดสอบ
- แผ่นทดสอบ มีเส้นทดสอบ (Test line) ในแผ่นทดสอบ เส้นทดสอบเป็นบริเวณที่ตรึงแอนติเจนของเชื้อเลปโตสไปรา อินเทอร์โรแกนส์ (*Leptospira interrogans*) ประกอบด้วยรีคอมบิแนนท์โปรตีนอิเล็กตรอน ทรานสเฟอร์ เฟลโวโปรตีน สับยูนิท เบต้า (Electron transfer

นายสุวัจชัย บุญอารี

Signed by DIP-CA

flavoprotein subunit beta, ETF_beta) ความเข้มข้นที่ใช้ของแอนติเจน อยู่ที่ 0.5 มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร

- แผ่นทดสอบ มีเส้นควบคุม (Control line) ในแผ่นทดสอบ เส้นควบคุมเป็นบริเวณที่ตรึงแอนติบอดีต่ออิมมูโนโกลบูลินของหนู ที่เตรียมได้จากสัตว์ชนิดอื่นซึ่งไม่ใช่หนู แอนติบอดีนี้สามารถจับกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากหนูในแผ่นคอนจูเกต

- ตัวอย่างที่ต้องการตรวจ เลือกได้จากซีรั่มและพลาสม่า อย่างใดอย่างหนึ่งจากผู้ป่วยที่สงสัยว่าเป็นโรคเลปโตสไปโรสิส

กรรมวิธีในการพัฒนาและคัดเลือกแอนติเจน

1. ขั้นตอนการตรวจหาโปรตีนที่ใช้เตรียมเป็นแอนติเจน

ตามรูปที่ 2 สำหรับการตรวจหาโปรตีนที่ให้ปฏิกิริยาทางอิมมูนกับแอนติบอดีในซีรัมของผู้ป่วย กระทำโดยวิธี 1-DE ร่วมกับการย้อมด้วยซีรัมจากผู้ป่วยเลปโตสไปโรสิสในระยะแรกของโรค พบแอนติเจนซึ่งเป็นโปรตีนที่ขนาดโมเลกุล 25 kDa ที่ให้ปฏิกิริยาทางอิมมูนกับแอนติบอดีชนิด IgM ในทุกซีรัมทดสอบ

ผลของปฏิกิริยาอิมมูนชนิด IgM (IgM immunoreactivity) ในส่วนที่แยกได้จาก OMPs จากเชื้อก่อโรค (pathogenic *Leptospira*) และเชื้อตามธรรมชาติ (saprophytic *Leptospira*) กับซีรัมจากผู้ป่วยเลปโตสไปโรสิส ผู้ป่วยที่ไม่ใช่โรคเลปโตสไปโรสิส และคนปกติ ดังแสดงในตารางที่ 1 พบว่าของปฏิกิริยาอิมมูนชนิด IgM ได้ผลบวก ร้อยละ 100 ในทุกซีรัมที่โปรตีนขนาดโมเลกุลต่ำ 25 kDa

NO.....NO

นายสุวัจชัย บุญอารี

Signed by DIP-CA

ตารางที่ 1 ปฏิกิริยาอิมมูนชนิด IgM ของส่วนประกอบเมมเบรนชั้นนอกเชื้อก่อโรคและเชื้อตามธรรมชาติ กับซีรัมจากผู้ป่วยเลปโตสไปโรสิส ผู้ป่วยที่ไม่ใช่โรคเลปโตสไปโรสิส และคนปกติ

แอนติเจนของเชื้อ (kDa)	จำนวนผู้ป่วยที่มีแถบของปฏิกิริยาอิมมูนชนิด IgM			
	เชื้อก่อโรค	เชื้อตามธรรมชาติ	เชื้อก่อโรค	เชื้อก่อโรค
	ผู้ป่วยเลปโตสไปโรสิส (จำนวน = 15)		ผู้ป่วยที่ไม่ใช่โรคเลปโตสไปโรสิส (จำนวน = 6)	คนปกติ (จำนวน = 4)
63	9 (60%)	0	0	0
59	6 (40%)	0	0	0
35-48	9 (60%)	0	0	0
30-32	9 (60%)	0	0	0
25	15 (100%)	0	0	0
20	6 (40%)	0	0	0
18 (แถบเส้นตรง)	6 (40%)	0	0	0
18 (แถบแผ่)	3 (20%)	0	0	0
<17	6 (40%)	6 (40%)	0	0

จากการศึกษาทำให้สามารถจำแนกโปรตีนที่ขนาดโมเลกุลต่ำ 25 kDa ได้ ประกอบกับการวิเคราะห์ด้วยวิธีโปรตีโอโนมิกส์ (Proteonomics analysis) ซึ่งได้ผลตรงกันว่าเป็นโปรตีน อิเล็กตรอนทรานสเฟอร์ เฟลโวโปรตีน สับยูนิท เบต้า (Electron transfer flavoprotein subunit beta, ETF_beta) ดังแสดงในตารางที่ 2 และรูปที่ 3

ตารางที่ 2 โปรตีนชนิดต่าง ๆ จาก Proteomics analysis

Spot	Proteins	Species/serovar/strain	NCBI search		
			ID	Score	% cover
12	Flagellin protein	*L. interrogans* serovar lai str. 56601 / *L. interrogans* serovar copenhageni	gi|45600993	57	36%
13	Endoflagellar core protein	*L. biflexa*	gi|12657818	75	46%
14	Endoflagellar core protein	*L. biflexa*	gi|12657818	72	46%
15	Endoflagellar core protein	*L. biflexa*	gi|12657818	52	36%
16	Endoflagellar core protein	*L. biflexa*	gi|12657818	45	35%
17	Electron transfer flavoprotein beta-subunit	*L. interrogans* serovar lai str. 56601 / *L. interrogans*	gi|24193815	75	48%
18	Electron transfer flavoprotein beta-subunit	*L. interrogans* serovar lai str. 56601 / *L. interrogans*	gi|24193815	78	48%

นายสุวัจชัย บุญอารี

Signed by DIP-CA

2. ขั้นตอนการออกแบบไพร์เมอร์สาหรับการโคลนยีน 25 kDa antigen

ได้การออกแบบไพร์เมอร์ของยีนที่ควบคุมการสร้าง 25 kDa โดยทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 25 kDa จาก *Leptospira sp.* สายพันธุ์ต่างๆ ไพร์เมอร์ที่ออกแบบได้เพิ่ม นิวคลีโอไทด์เพื่อช่วยในการจับกับ template DNA (single line) และนิวคลีโอไทด์ที่มีความจำเพาะต่อการตัดด้วยเอนไซม์ *Nde*I และ *Xho*I (double lines) ไว้ด้วย ดังนี้ 5'CCGCCG CATATG ATGAAAATCATCGTATTAGT-3' และ 5'-CCGCCG CTCGAG TTATATAACCTTAGCTTCTT-3'

3. ขั้นตอนการโคลนและการผลิตโปรตีน

สกัดสารพันธุกรรมดีเอ็นเอ (DNA) ของเชื้อ *Leptospira interrogans* serovar Autumnalis หลังจากนั้นนำสารพันธุกรรมที่สกัดได้มาใช้เป็นต้นแบบเพื่อจำลองยีน 25 kDa ด้วยเทคนิกโพลีเมอร์เรสเชนรีเอกชั่น (Polymerase chain reaction, PCR) หลังจากนั้นนำยีนที่ได้รับการเพิ่มจำนวนด้วยวิธีดังกล่าวไปย่อยด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde*I และ *Xho*I ก่อนนำไปโคลนเข้ากับพลาสมิดที่ได้รับการย่อยด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกัน ทำการเชื่อมต่อชิ้นยีนที่จำลองขึ้นมาเข้ากับพลาสมิด ด้วยไลเกรส หลังจากนั้นนำเข้าสู่เชื้ออีโคไลสายพันธุ์ BL21 (DE3) (*Escherichia coli* BL21(DE3)) เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่มีส่วนผสมของคานามัยซิน หลังจากนั้นทำการคัดเลือกโคลนที่มีชิ้นส่วนของยีน 25 kDa แล้วจึงได้รีคอมบิแนนท์ (recombinant) *E. coli* โคลนต่างๆ ที่มีความสามารถสร้างโปรตีน 25 kDa antigen ของ *Leptospira spp.* โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Leptospira interrogans* serovar Lai (GeneBank accession numbers AE010300) ที่อยู่ใน NCBI database เท่ากับร้อยละ 98 ดังแสดงในรูปที่ 4 เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอมิโนระหว่าง recombinant ETF และ *etfB* gene ของ reference *L. interrogans* serovar Lai มีความเหมือนกันร้อยละ 99 ดังแสดงในรูปที่ 5

4. ขั้นตอนการสร้างโปรตีน 25 kDa antigen

นำ recombinant *E. coli* ที่มีความสามารถสร้างโปรตีน 25 kDa antigen ของ *Leptospira sp.* มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว ทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการเติมสารไอพีทีจี (IPTG) เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 มิลลิโมลาร์ (mM) แล้วทำการเลี้ยงต่อเนื่องไปอีก 3 ชั่วโมง ทำการเก็บเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยวิธีการปั่นเหวี่ยง หลังจากนั้นทำการล้างเซลล์ที่ได้ด้วยฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ซาไลน์ (Phosphate buffer saline, PBS)

5. การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์

ทำการแตกผนังเซลล์ด้วยคลื่นเสียง ทำการล้างตะกอนโปรตีนที่ได้ด้วย PBS แล้วนำตะกอนที่ได้ไปละลายจนกระทั่งตะกอนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน นำสารละลายที่ได้ไปใส่ในคอลัมภ์นิกเกิล เรซิน โดยทำการเก็บสารละลายที่ได้จากการชะครั้งสุดท้ายไป (ประกอบด้วยโปรตีน 25 kDa ที่บริสุทธิ์แล้ว) ทำการเปลี่ยนให้อยู่ในสารละลาย PBS พีเอช 7.4 (pH7.4)

นายสุวัจชัย บุญอารี

Signed by DIP-CA

วิธีการในการประดิษฐ์ที่ดีที่สุด

เหมือนกับที่ได้กล่าวไว้แล้วในหัวข้อการเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

NO. ..... NO.

นายสุวัจชัย บุญอารี

Signed by DIP-CA

ข้อถือสิทธิ

1. ชุดทดสอบแบบรวดเร็วสำหรับการตรวจหาแอนติบอดีต่อโรคเลปโตสไปโรสิส ชนิด IgM/IgG ด้วยวิธีอิมมูโนโครมาโตกราฟีชนิดการไหลด้านข้าง ประกอบด้วย

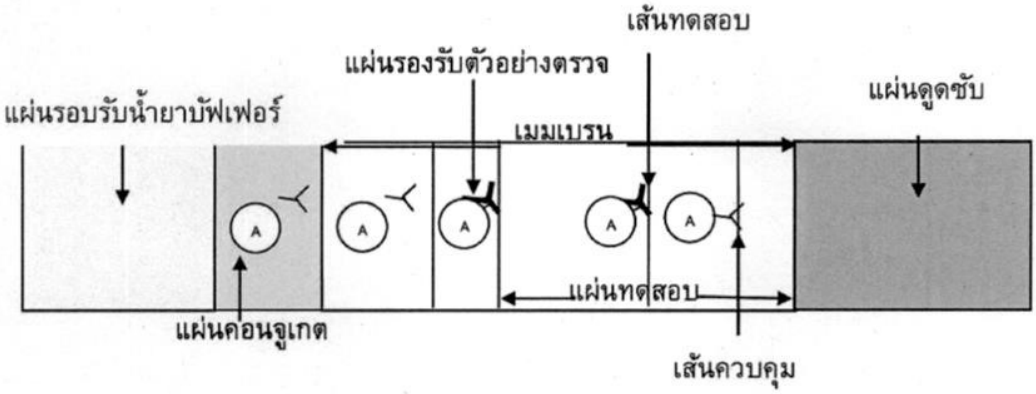
- แผ่นรองรับน้ำยาบัฟเฟอร์ สำหรับหยดน้ำยาบัฟเฟอร์ ทำหน้าที่เคลื่อนที่ไปยังแผ่นคอนจูเกตและแผ่นทดสอบตามลำดับ
- แผ่นคอนจูเกต ซึ่งภายในได้เลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากหนูต่อแอนติบอดีชนิดเอ็ม (IgM) ของมนุษย์ และโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากหนูต่อแอนติบอดีชนิดจี (IgG) ของมนุษย์อย่างใดอย่างหนึ่งหรือรวมกันที่ปิดฉลากไว้กับอนุภาคทอง (colloidal gold)
- แผ่นรองรับตัวอย่างและแผ่นทดสอบ มีลักษณะเป็นเมมเบรน ได้เลือกไนโตรเซลลูโลส เมมเบรน (nitrocellulose membrane) แผ่นรองรับตัวอย่าง สำหรับหยดตัวอย่างที่ต้องการตรวจ ทำหน้าที่รองรับตัวอย่างที่ต้องการตรวจ เมื่อคอนจูเกตเคลื่อนที่จากแผ่นรองรับน้ำยาบัฟเฟอร์ไปพบตัวอย่างตรวจในแผ่นรองรับตัวอย่าง จะสร้างตะกอนอิมมูนซึ่งเคลื่อนที่ต่อไปยังแผ่นทดสอบ
- แผ่นทดสอบ มีเส้นทดสอบ (Test line) ในแผ่นทดสอบ เส้นทดสอบเป็นบริเวณที่ตรึงแอนติเจนของเชื้อเลปโตสไปรา อินเทอร์โรแกนส์ (*Leptospira interrogans*) ประกอบด้วยรีคอมบิแนนท์โปรตีนอิเล็กตรอน ทรานสเฟอร์ เฟลโวโปรตีน สับยูนิท เบต้า (Electron transfer flavoprotein subunit beta, ETF_beta) ความเข้มข้นที่ใช้ของแอนติเจน อยู่ที่ 0.5 มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร
- แผ่นทดสอบ มีเส้นควบคุม (Control line) ในแผ่นทดสอบ เส้นควบคุมเป็นบริเวณที่ตรึงแอนติบอดีต่ออิมมูโนโกลบูลินของหนู ที่เตรียมได้จากสัตว์ชนิดอื่นซึ่งไม่ใช่หนู แอนติบอดีนี้สามารถจับกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากหนูในแผ่นคอนจูเกต
- ตัวอย่างที่ต้องการตรวจ เลือกได้จากซีรั่มและพลาสม่า อย่างใดอย่างหนึ่งจากผู้ป่วยที่สงสัยว่าเป็นโรคเลปโตสไปโรสิส

2. ชุดทดสอบแบบรวดเร็วสำหรับการตรวจหาแอนติบอดีต่อโรคเลปโตสไปโรสิส ตามข้อถือสิทธิที่ 1 ในเส้นทดสอบได้เลือกแอนติเจนใช้โปรตีนอิเล็กตรอน ทรานสเฟอร์ เฟลโวโปรตีน สับยูนิท เบต้า (Electron transfer flavoprotein subunit beta, ETF_beta)

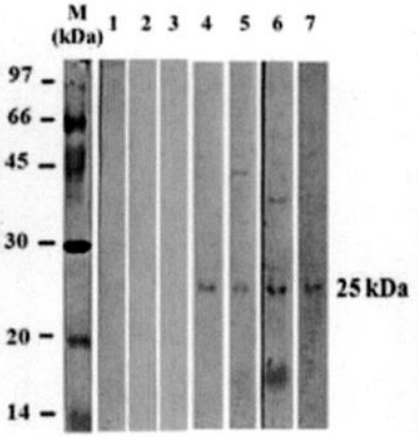
NO.....NO

นายสุวัจชัย บุญอารี

Signed by DIP-CA



รูปที่ 1



รูปที่ 2

23128

นายสุวัจชัย บุญอารี

MATRIX SCIENCE MASCOT Search Results

Protein View: gi|514354863

putative electron transfer flavoprotein subunit beta [Leptospira wolffii]

Database:	NCBInr
Score:	110
Nominal mass (M_r):	27103
Calculated pI:	5.34
Taxonomy:	Leptospira wolffii

This protein sequence matches the following other entries:

- gi|514175575 from Leptospira wolffii serovar Khorat str. Khorat-H2

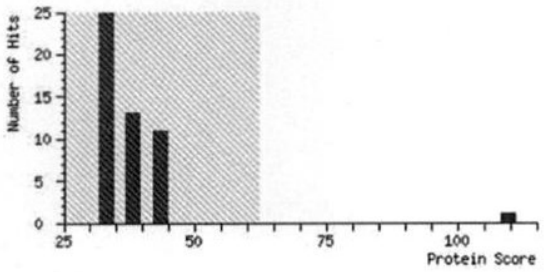
Sequence similarity is available as an NCBI BLAST search of gi|514354863 against nr.

Search parameters

MS data file:	570124_LP1_D1_01_1941.mgf
Enzyme:	Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.
Fixed modifications:	Carbamidomethyl (C)
Variable modifications:	Oxidation (M)

Mascot Score Histogram

Ions score is -10*Log(P), where P is the probability that the observed match is a random event.
Individual ions scores > 62 indicate identity or extensive homology (p<0.05).
Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.

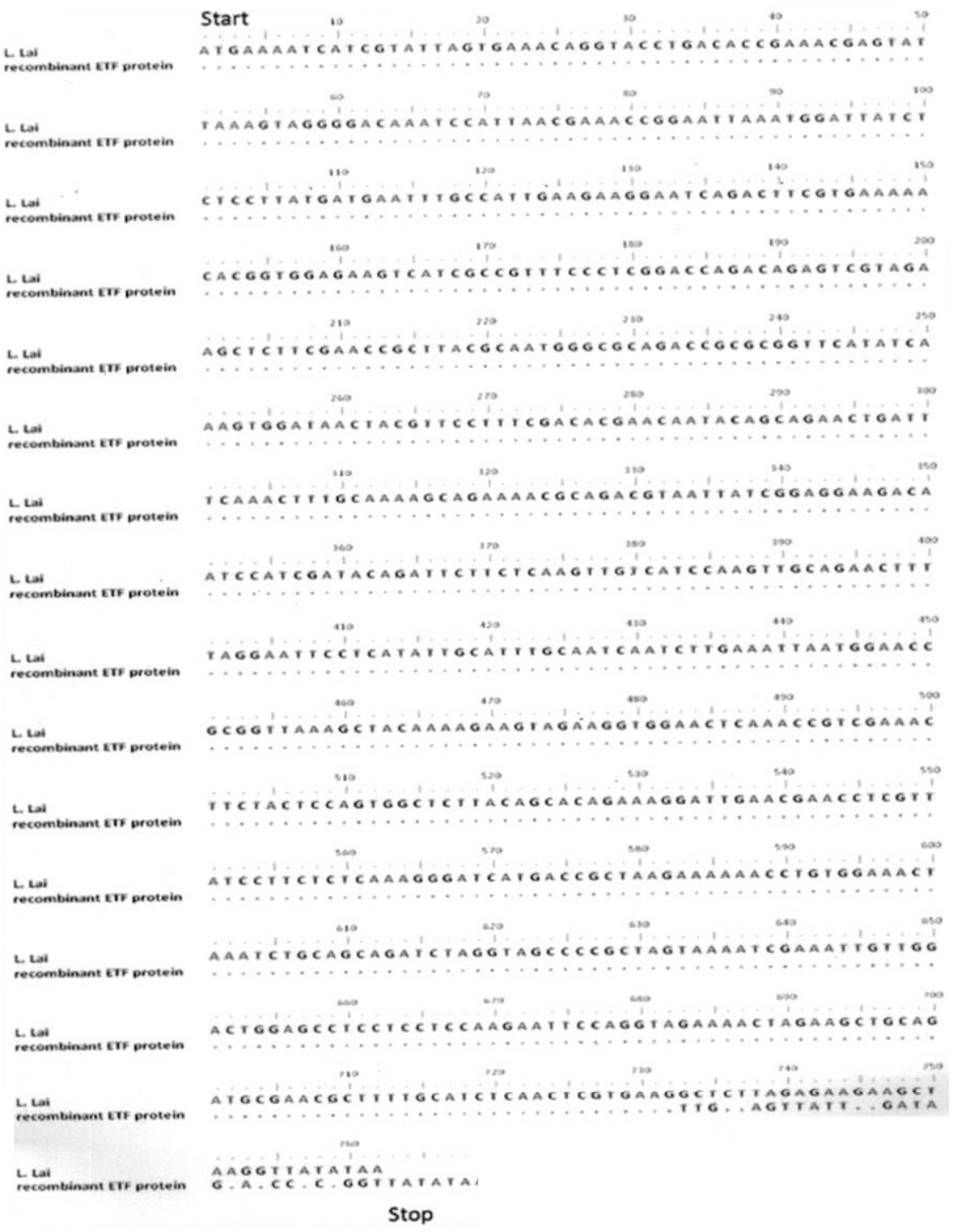


Peptide Summary Report

Format As: Peptide Summary			Help
	Significance threshold p< 0.05	Max. number of hits 50	
	Standard scoring / MudPIT scoring	Ions score or expect cut-off 0	Show sub-sets 0
	Show pop-ups / Suppress pop-ups	Sort unassigned: Decreasing Score	Require bold red
	Preferred taxonomy: All entries		

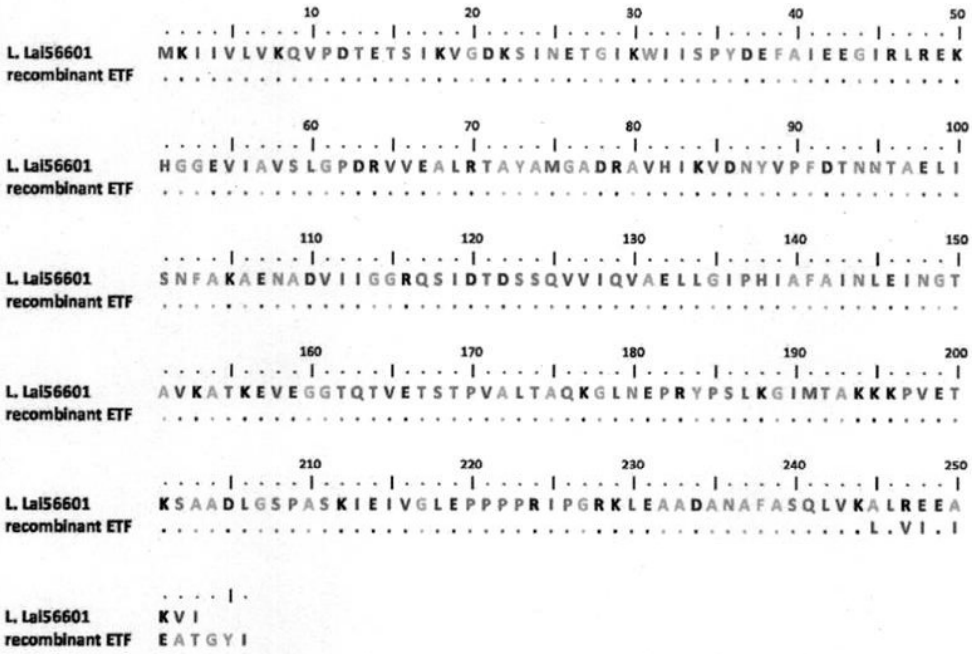
รูปที่ 3

นายสุวัจชัย บุญอารี



รูปที่ 4

นายสุวัจชัย บุญอารี



รูปที่ 5

23/03/2023

นายสุวัจชัย บุญอารี

บทสรุปการประดิษฐ์

ชุดทดสอบแบบรวดเร็วสำหรับการตรวจหาแอนติบอดีต่อโรคเลปโตสไปโรสิส ตามการประดิษฐ์นี้ เป็นชุดทดสอบการตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรสิส ด้วยวิธี แถบทดสอบ โดยการตรวจหาแอนติบอดีจำเพาะชนิด IgM และ IgG ต่อเชื้อเลปโตสไปรา ในตัวอย่างตรวจซีรัมหรือ พลาสม่า ชุดทดสอบนี้ใช้แอนติเจนที่เตรียมจาก รีคอมบิแนนท์ โปรตีน ซึ่งได้คิดค้นโดยการสกัดไลโปโปรตีนขนาดโมเลกุลต่ำ 25 kDa ประกอบกับการวิเคราะห์ด้วยวิธีโปรตีโอโนมิกส์ ได้ผลตรงกันว่าเป็นโปรตีนอิเล็กตรอน ทรานสเฟอร์ เฟลโวโปรตีน สับยูนิท เบต้า (Electron transfer flavoprotein subunit beta, ETF_beta) ซึ่งเป็นโปรตีนชนิดใหม่ที่ยังไม่มีรายงานมาก่อน

NO. ..... DATE

นายสุวัจชัย บุญอารี

Signed by DIP-CA