เลขที่อนุสิทธิบัตร 20923

อสป/200 - ข

อนุสิทธิบัตร

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

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

สำหรับการประดิษฐ์ตามรายละเอียดการประดิษฐ์ ข้อถือสิทธิ และรูปเขียน (ถ้ามี) ดังที่ปรากฏในอนุสิทธิบัตรนี้

เลขที่คำขอ	2003002355
วันขอรับอนุสิทธิบัตร	21 กันยายน 2563
ผู้ประดิษฐ์	นางสาวผ่องศรี ทองทวี และคณะ
ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์	กรรมวิธีการจำแนกสปีชีส์ของเชื้อวิบริโอ 4 สปีชีส์

ให้ผู้ทรงอนุสิทธิบัตรนี้มีสิทธิและหน้าที่ตามกฎหมายว่าด้วยสิทธิบัตรทุกประการ

ออกให้ ณ วันที่ 10 เดือน กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2566

หมดอายุ ณ วันที่ 20 เดือน กันยายน พ.ศ. 2569

(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.256601010632020

รายละเอียดการประดิษฐ์

ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์

กรรมวิธีการจำแนกสปีชีส์ของเชื้อวิบริโอ 4 สปีชีส์

ลักษณะและความมุ่งหมายของการประดิษฐ์

การประดิษฐ์นี้เป็นการออกแบบไพรเมอร์และพัฒนากรรมวิธีการตรวจจำแนก (identification) เชื้อแบคทีเรียจีนัสวิบริโอ จำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ (1) วิบริโอ พาราฮีโมไลติคัส (2) วิบริโอ อัลจิโนไลติคัส (3) วิบริโอ ฮาวีอาย และ (4) วิบริโอ แคมเบลลิอาย โดยวิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ จุดมุ่งหมายของการประดิษฐ์นี้เพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการจำแนกและการบ่งชี้สายพันธุ์ของเชื้อในกลุ่มวิบริโอที่มีสายพันธุ์ใกล้เคียงกันทั้งสี่สายพันธุ์ดังกล่าวได้อย่างแม่นยำ

สาขาวิทยาการที่เกี่ยวข้องกับการประดิษฐ์

จุลชีววิทยา พันธุวิศวกรรม การแพทย์ ที่เกี่ยวข้องกับกรรมวิธีการจำแนกสปีชีส์ของเชื้อวิบริโอ 4 สปีชีส์

ภูมิหลังของศิลปะหรือวิทยาการที่เกี่ยวข้อง

ปัจจุบันอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเศรษฐกิจได้ขยายตัวอย่างมากโดยเฉพาะอย่างยิ่งการทำฟาร์มกุ้ง ปลาและหอย เพื่อตอบสนองความต้องการของผู้บริโภคที่มีมากขึ้น อย่างไรก็ตามอุปสรรคและปัญหาสำคัญคือการเกิดโรคระบาดในฟาร์มเพาะเลี้ยง ตัวอย่างเช่น โรคตายด่วนในกุ้ง (Shrimp Early Mortality Syndrome: EMS) หรือเรียกอีกชื่อว่ากลุ่มอาการตับและตับอ่อนเสื่อมสภาพอย่างฉับพลัน (Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome: AHPNS) และโรคเรืองแสง (Luminescent vibriosis) เป็นต้น ทำให้เกิดการหยุดชะงักหรือชะลอการขยายตัวของอุตสาหกรรมอาหารทะเลและส่งผลให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจของประเทศเป็นอย่างมาก พบว่าสาเหตุของโรคระบาดที่พบได้บ่อยที่สุดเกิดจากเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มเชื้อวิบริโอ (Vibriosis) (Chatterjee & Haldar, 2012)

เชื้อแบคทีเรียจีนัสวิบริโอเป็นเชื้อแบคทีเรียชนิดกรัมลบ ลักษณะเป็นรูปแท่ง (rod) หรือเป็นแท่งโค้ง (curved rod) พบได้ทั่วโลกในบริเวณปากแม่น้ำและในทะเล เป็นกลุ่มเชื้อแบคทีเรียชนิดหนึ่งที่เป็นสาเหตุสำคัญที่ก่อให้เกิดโรคในคนเช่นโรคกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ (gastroenteritis) บาดแผลติดเชื้อ (wound infection) และการติดเชื้อในกระแสเลือด (Septicemia) (Daniels et al., 2000) และก่อโรคในสัตว์โดยเฉพาะอย่างยิ่งสัตว์จำพวกที่เป็นอาหารทะเลเช่น ปลา กุ้ง และหอย เป็นต้น ซึ่งพบได้ทั้งที่อยู่ในทะเลธรรมชาติและแหล่งที่มีการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ (Aquaculture) เชื้อวิบริโอ สปีชีส์ที่พบเป็นสาเหตุสำคัญที่ก่อให้เกิดโรคระบาดในฟาร์มเพาะเลี้ยงกุ้งได้แก่ เชื้อวิบริโอ ฮาวีอาย เชื้อวิบริโอ พาราฮีโมไลติคัส เชื้อวิบริโอ อัลจิโนไลติคัส และ เชื้อวิบริโอ สปีชีส์อื่นๆ (Chatterjee & Haldar, 2012) **เชื้อวิบริโอ ฮาวีอาย** เป็นสาเหตุของโรคในปลาทะเลเช่นโรคตา (Eye disease) โรคกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ โรคแผลที่ผิวหนัง (Skin ulcer) และยังเป็นเชื้อก่อโรคเรืองแสงในลูกกุ้งทะเล (Penaeid shrimp) (ทบทวนวรรณกรรมโดย Zhang et al., 2020) ซึ่งพบได้ทั้งใน กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* หรือ Giant Tiger Prawn) และกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) นอกจากนี้มีรายงานจากประเทศจีนพบเชื้อวิบริโอ ฮาวีอาย สายพันธุ์ไม่เรืองแสง

Signed by DIP-CA

นายสุวัจชัย บุญอารี

สามารถก่อโรครุนแรงในกุ้งได้เช่นกันเรียกว่าโรคหางขาว (Bacterial white tail disease, BWTD) ทำให้มีการตายของกุ้งเป็นจำนวนมาก (Mass mortality) (Zhou et al., 2012) อย่างไรก็ตามเชื้อก่อโรคเรืองแสงไม่ได้มีสาเหตุจากเชื้อวิบริโอ ฮาวีอายแต่เพียงอย่างเดียว Wang และคณะ (2015) ได้รายงานการบ่งชี้เชื้อวิบริโอ แคมเบลลิอาย สายพันธุ์ VH1 เป็นเชื้อก่อโรคเรืองแสงในกุ้งขาวทั้งในระยะหลังตัวอ่อน (Postlarvae) ระยะวัยหนุ่มสาวหรือตัวเต็มวัย (Juveniles) สำหรับเชื้อวิบริโอ พาราฮีโมไลติคัส และวิบริโอ อัลจิโนไลติคัส ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคกระเพาะและลำไส้อักเสบ (Gastroenteritis) ในคน (Su & Liu, 2007; Mustapha et al., 2013) พบว่าเป็นเชื้อก่อโรคที่สำคัญที่พบในกุ้งกุลาดำและกุ้งขาวได้เช่นกัน (Liu et al., 2004; Chatterjee & Haldar, 2012) เชื้อวิบริโอ พาราฮีโมไลติคัส เป็นสาเหตุของโรคตับและตับอ่อนเสื่อมสภาพอย่างฉับพลันหรือโรคตายด่วนในกุ้ง (Tran et al., 2013) ซึ่งเป็นโรคที่ทำให้เกิดความสูญเสียประชากรกุ้งเป็นอย่างมาก นอกจากโรคตายด่วนแล้วเชื้อชนิดนี้ยังพบเป็นสาเหตุของโรคกุ้งอื่นๆเช่น โรคตัวแดง (Red disease) (Mastan & Begum, 2016) โรคขี้ขาว (White feces disease, WFD) (Mastan, 2015) เป็นต้น เชื้อวิบริโอ อัลจิโนไลติคัส แม้ว่าจะมีความรุนแรงน้อยกว่าเชื้อวิบริโอพาราฮีโมไลติคัส แต่มักจะตรวจพบร่วมกับเชื้อก่อโรคอื่นๆเช่น วิบริโอ พาราฮีโมไลติคัสและ วิบริโอ ฮาวีอายในกุ้งป่วยหรือแหล่งเลี้ยงเพาะเลี้ยงกุ้ง และจากรายงานของ Mastan (2015) พบว่าเชื้อสำคัญที่มักจะตรวจพบในกุ้งที่ป่วยเป็นโรคขี้ขาวได้แก่ เชื้อวิบริโอ พาราฮีโมไลติคัส และ วิบริโอ อัลจิโนไลติคัส นอกจากนี้โรคที่มักพบได้บ่อยในกุ้งเลี้ยงอีกโรคหนึ่งคือโรคกุ้งตัวหลวม (loose-shell syndrome disease: LSSD) ซึ่งอาการตัวหลวมของกุ้งอาจเกิดได้จากหลายสาเหตุและพบได้ร่วมกับการเกิดโรคอื่นๆได้ แต่แบคทีเรียที่มีอัตราการตรวจพบในกุ้งที่เป็นโรคตัวหลวมมากที่สุดตามลำดับคือเชื้อ วิบริโอ อัลจิโนไลติคัส และ วิบริโอ ฮาวีอาย (Aftabuddin et al., 2018)

ในการตรวจวิเคราะห์เชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างอาหารทะเลพบว่าในหนึ่งตัวอย่างอาจตรวจพบเชื้อวิบริโอ ได้หลายสปีชีส์ และที่พบได้มากสุดสองอันดับได้แก่ เชื้อวิบริโอ พาราฮีโมไลติคัส และ วิบริโอ อัลจิโนไลติคัส ตามลำดับ (Boonyahong, 2012) และเช่นเดียวกัน จากการสำรวจโรคที่เกิดในฟาร์มเลี้ยงกุ้งและสาเหตุของโรคกุ้งที่เกิดจากเชื้อวิบริโอ (Vibriosis) พบว่าเชื้อวิบริโอที่เป็นสาเหตุหลักได้แก่ เชื้อวิบริโอ ฮาวีอาย เชื้อวิบริโอ พาราฮีโมไลติคัส เชื้อวิบริโอ อัลจิโนไลติคัส และเชื้อวิบริโอ แคมเบลลิอาย (Thompson et al., 2004) ซึ่งเชื้อวิบริโอทั้งสี่สายพันธุ์นี้จัดอยู่ในวิบริโอ ฮาวิอายเคลด (Harveyi clade) (Sawabe et al., 2007) จึงมีคุณลักษณะที่คล้ายคลึงกันมากทั้งในระดับฟีโนทัยด์และจีโนทัยด์ ทำให้การบ่งชี้สปีชีส์ของเชื้อวิบริโอกลุ่มนี้ทำได้ยาก ขาดความแม่นยำ เกิดความผิดพลาดได้เช่น เชื้อวิบริโอ ฮาวีอาย สายพันธุ์ BAA-1116 และ HY01 ถูกบ่งชี้เป็นเชื้อวิบริโอ แคมเบลลิอาย สายพันธุ์ BAA-1116 และ HY01 ตามลำดับ (Lin et al., 2010) และจากการศึกษาของ Hoffmann และคณะ (2012) พบว่าเชื้อวิบริโอ ฮาวีอาย จำนวน 10 สายพันธุ์มีการบ่งชี้สปีชีส์ที่ผิดพลาด ในจำนวนนี้ จำนวนเจ็ดสปีชีส์ควรเป็นเชื้อวิบริโอ แคมเบลลิอาย และจำนวนสามสปีชีส์ควรเป็นเชื้อวิบริโอ คอมมิวนิส (*Vibrio communis*) เนื่องจากความสำคัญของเชื้อวิบริโอทั้งสี่สายพันธุ์ดังได้กล่าวไว้ข้างต้นและปัญหาในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อเหล่านี้ จึงนำมาสู่การออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อวิบริโอแต่ละสายพันธุ์และการพัฒนากรรมวิธี

Signed by DIP-CA

นายสุวัจชัย บุญอารี

มัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ เพื่อการจำแนกเชื้อทั้งสี่สายพันธุ์ในหนึ่งปฏิกิริยาหรือหนึ่งหลอดทดลองเท่านั้น เรียกว่า เทคนิควิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ในหลอดปฏิกิริยาเดียว (Single-tube multiplex PCR) ซึ่งข้อดีของกรรมวิธีนี้คือ มีความไวสูงกว่าวิธีการเพาะเชื้อแบบดั้งเดิม ใช้ตรวจหาเชื้อในตัวอย่างตรวจได้ 1-4 ชนิดในปฏิกิริยาเดียว มีความสะดวก รวดเร็วและประหยัดกว่าวิธีดั้งเดิม

<u>คำอธิบายรูปเขียนโดยย่อ</u>

รูปที่ 1 เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแสดงผลของการทำมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ ซึ่งใช้ชุดไพรเมอร์จำนวน 5 คู่ (ValgF และ ValgR, VharF และ VharR, VparF และ VparR, VcamF และ VcamR และ IAC*-F และ IAC-R) และใช้ดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) ที่แตกต่างกันในแต่ละปฏิกิริยา เลนที่ 1 แสดงแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน เลนที่ 2 ตัวควบคุมภายใน ขนาด 104 คู่เบส เลนที่ 3 เชื้อวิบริโอ อัลจิโนไลติคัส ขนาด 200 คู่เบส เลนที่ 4 เชื้อวิบริโอ ฮาวีอายขนาด 253 คู่เบส เลนที่ 5 เชื้อวิบริโอ พาราฮีโมไลติคัส ขนาด 302 คู่เบส เลนที่ 6 เชื้อวิบริโอ แคมเบลลิอาย ขนาด 421 คู่เบส และเลนที่ 7 รวมเชื้อวิบริโอทั้ง 4 สปีชีส์ (เชื้อวิบริโอ อัลจิโนไลติคัส, เชื้อวิบริโอ ฮาวีอาย, เชื้อวิบริโอ พาราฮีโมไลติคัส และเชื้อวิบริโอ แคมเบลลิอาย)

*IAC: ตัวควบคุมภายใน (Internal amplification control) ใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสดังนี้

IAC-F: 5'- AGCTTATTGGCGGTTTCTGTCGGCTACACCGTCGGCAGTGTGT -3'

IAC-R: 5'- CGCAAGACCAAGAAAAGCCGTCCTAGTGGCGTTTCGGAAAC -3'

และใช้ดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) ซึ่งเป็นพลาสมิดที่มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ (DNA) ขนาด 104 bp ของเชื้อวิบริโอ พาราฮีโมไลติคัส แทรกอยู่ การเตรียมพลาสมิดทำตามวิธีของ Kim และคณะ (2015)

รูปที่ 2 เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแสดงผลของการทดสอบความไวของชุดทดสอบมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ ซึ่งใช้ชุดไพรเมอร์จำนวน 5 คู่ (ValgF และ ValgR, VharF และ VharR, VparF และ VparR, VcamF และ VcamR และ IAC*-F และ IAC-R) และใช้ดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) จากเชื้อวิบริโอ อัลจิโนไลติคัส, เชื้อวิบริโอ ฮาวีอาย, เชื้อวิบริโอ พาราฮีโมไลติคัส และเชื้อวิบริโอ แคมเบลลิอาย ที่ทำให้เจือจางลงครั้งละ 10 เท่า เป็นลำดับ (10-fold serial dilution) ในแต่ละปฏิกิริยา เลนที่ 1 แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน; เลนที่ 2 ดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) ที่ไม่เจือจาง (undiluted, 10^0); เลนที่ 3 เจือจาง 10 เท่า (10^{-1}); เลนที่ 4 เจือจาง 10^{-2}; เลนที่ 5 เจือจาง 10^{-3} ; เลนที่ 6 เจือจาง 10^{-4} ; เลนที่ 7 เจือจาง 10^{-5}; และ เลนที่ 8 เจือจาง 10^{-6}

<u>การเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์</u>

1. ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดสอบ

ไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจหาชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อเชื้อ (1) วิบริโอ พาราฮีโมไลติคัส (2) วิบริโอ อัลจิโนไลติคัส (3) วิบริโอ ฮาวีอาย และ (4) วิบริโอ แคมเบลลิอาย เป็นโอลิโกนิวคลีโอทัยด์ที่สังเคราะห์ให้มีลำดับเบสจำเพาะกับยีนท็อกซ์อาร์ (*toxR*) ซึ่งเป็นยีนเป้าหมายของแต่ละสปีชีส์ ไพรเมอร์ที่ออกแบบและคัดเลือกมามีลำดับเบสดังนี้

ลำดับเบสที่ 1 ValgF: 5′ ACG CTT GAG CCC ATT TTC TA 3′

Signed by DIP-CA

นายสุวัจชัย บุญอารี

ลำดับเบสที่ 2 ValgR: 5′ GTA GCC AGT TAA TCG TGT TAG ATG 3′

ลำดับเบสที่ 3 VharF: 5′ TAC GAA GTC GCC TGA ATT TGT A 3′

ลำดับเบสที่ 4 VharR: 5′ TGT GTT CTT TTG TGC AGG TGC A 3′

ลำดับเบสที่ 5 VparF: 5′ GTG GCT TCT GCT GTG AAT CCT 3′

ลำดับเบสที่ 6 VparR: 5′ TTG CTG TCA TGA ATG TAG TTC AA 3′

ลำดับเบสที่ 7 VcamF: 5′ AGA GAC CTA ACG AAG TGA TAA CA 3′

ลำดับเบสที่ 8 VcamR: 5′ GGC AGC AGC AAA GCA ACG AC 3′

ไพรเมอร์ลำดับเบสที่ 1 และ 2 ใช้สำหรับการเพิ่มจำนวนยีนท็อกซ์อาร์ ที่จำเพาะต่อเชื้อวิบริโอ อัลจิโนไลติคัส มีขนาด 200 คู่เบส (base pairs)

ไพรเมอร์ลำดับเบสที่ 3 และ 4 ใช้สำหรับการเพิ่มจำนวนยีนท็อกซ์อาร์ ที่จำเพาะต่อเชื้อวิบริโอ ฮาวีอาย มีขนาด 253 คู่เบส (base pairs)

ไพรเมอร์ลำดับเบสที่ 5 และ 6 ใช้สำหรับการเพิ่มจำนวนยีนท็อกซ์อาร์ ที่จำเพาะต่อเชื้อวิบริโอ พาราฮีโมไลติคัส มีขนาด 302 คู่เบส (base pairs)

ไพรเมอร์ลำดับเบสที่ 7 และ 8 ใช้สำหรับการเพิ่มจำนวนยีนท็อกซ์อาร์ ที่จำเพาะต่อเชื้อวิบริโอ แคมเบล ลิอาย มีขนาด 421 คู่เบส (base pairs)

2. การเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template)

เขี่ยเชื้อที่เพาะขึ้นจากตัวอย่างตรวจบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งจำนวนหนึ่งโคโลนีใส่ในหลอดทดลองชนิดก้นแหลมละลายในน้ำกลั่น 100 ไมโครลิตร (µl) และเติม 20% chelex-100 ปริมาตร 25 µl (ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 5%) นำส่วนผสมไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นตกตะกอนที่ 17,000 xg เป็นเวลา 10 นาที เก็บแยกส่วนใสใส่ลงในหลอดทดลองใหม่ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ สำหรับการทดสอบพีซีอาร์

3. กรรมวิธีการทำมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์

3.1 ส่วนผสม

สารประกอบในหนึ่งหลอดทดลองของปฏิกิริยามัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ (single tube mPCR) ปริมาตรทั้งหมด 25 µl ประกอบด้วย:

Taq buffer + KCl	1X
$MgCl_2$	1.5-2.0 mM
dNTPs	0.2 mM
Taq DNA Polymerese	0.5 unit

Signed by DIP-CA

นายสุวัจชัย บุญอารี

ไพรเมอร์ (Primers) จำนวน 4 คู่ (ซึ่งมีลำดับเบสตามที่แสดงไว้ในข้อที่ 1) ได้แก่

- ValgF และ ValgR	0.20 – 0.3 µM
- VharF และ VharR	0.20 – 0.3 µM
- VparF และ VparR	0.15 -0.25 µM
- VcamF และ VcamR	0.15 -0.25 µM
ดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template)	1 µl x 4 (ในกรณีที่มีเชื้อที่ต้องการทดสอบทั้ง 4 สายพันธุ์ ใช้ 1 µl จากแต่ละสายพันธุ์)
น้ำกลั่น เติมให้ครบปริมาตร 25 µl	

3.2 สภาวะที่เหมาะสม (Optimal condition) สำหรับปฏิกิริยามัลติเพล็กซ์พีซีอาร์

ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ สภาวะของการทำปฏิกิริยาได้ถูกทดสอบและได้เลือกสภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของยีน *toxR* ซึ่งเป็นยีนเป้าหมายสำหรับเชื้อทั้งสี่สายพันธุ์ให้ได้ผลที่ชัดเจน และสภาวะที่ใช้ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 ขั้นตอนการเริ่มต้นการคลายเกลียวของดีเอ็นเอเส้นคู่ (Initial denaturation) 90 - 100°C เป็นเวลา 5 นาที

ขั้นตอนที่ 2 ปฏิกิริยาจำนวน 20-40 รอบ ซึ่งแต่ละรอบ ประกอบด้วย

การคลายเกลียวของดีเอ็นเอเส้นคู่ (Denaturation)	80-100°C เป็นเวลา 30-60 วินาที
การเข้าจับของไพรเมอร์บนสายดีเอ็นเอต้นแบบ (Annealing)	54-62°C เป็นเวลา 30-60 วินาที
การขยายสายดีเอ็นเอ (Extension)	68-72°C เป็นเวลา 3 -60 วินาที

ขั้นตอนที่ 3 การคงไว้ที่อุณหภูมิสุดท้าย (Hold) 10°C

4. การตรวจวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอโดยการทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (Gel electrophoresis)

นำดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยามัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ (PCR product) มาตรวจแยกขนาดของแถบดีเอ็นเอโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส เตรียม 2% อะกาโรสเจล (agarose gel) ใน 0.5X ทีบีอี บัฟเฟอร์ (TBE buffer) ตั้งค่าความต่างศักย์คงที่ที่ 100 โวลท์ เป็นเวลา 90 นาที ดีเอ็นเอจะถูกแยกออกเป็นแถบตามขนาด นำเจลไปย้อมด้วยสารเอธิเดียมโบรไมด์ (Ethidium bromide) แล้วตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลท (Ultraviolet, UV) การเห็นมีแถบดีเอ็นเอแสดงถึงการมีอยู่ของชิ้นส่วนของยีนท็อกซ์อาร์ของเชื้อวิบริโอ แต่จะเป็นสปีชีส์ใดนั้นขึ้นอยู่กับว่าแถบดีเอ็นเอนั้นปรากฏที่ตำแหน่งของขนาดของดีเอ็นเอโดยดูเปรียบเทียบกับขนาดมาตรฐานกล่าวคือ หากเป็นแถบดีเอ็นเอยีนท็อกซ์อาร์ของเชื้อวิบริโอ อัลจิโนไลติคัส เชื้อวิบริโอ ฮาวีอาย เชื้อวิบริโอ พาราฮีโมไลติคัสและเชื้อวิบริโอ แคมเบลลิอาย จะมีขนาดเท่ากับ 200, 253, 302, และ 421 คู่เบสตามลำดับ ดังแสดงตัวอย่างไว้ในรูปที่ 1

5. การทดสอบความจำเพาะ (Specificity test)

Signed by DIP-CA

นายสุวัจชัย บุญอารี

ตามกรรมวิธีการทำมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ที่ได้พัฒนาไว้แล้วในข้อที่ 3 นำไปทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียที่หลากหลายสายพันธุ์ ทั้งที่เป็นแบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* และ non-*Vibrio* สปีชีส์ เพื่อทดสอบความจำเพาะ หากผลการทดสอบจาก multiplex PCR ให้ผลเป็นลบหรือให้ผลไม่ตรงกับเชื้อที่ใช้ทดสอบต้องมีการทดสอบยืนยันด้วย การทำพีซีอาร์เดี่ยว (single PCR) และ/หรือวิธีอื่นๆ

ผลการทดสอบ: เชื้อแบคทีเรียจำนวนทั้งหมด 148 สายพันธุ์ให้ผลถูกต้องคือให้ผลเป็นบวกเฉพาะเชื้อวิบริโอ อัลจิโนไลติคัส เชื้อวิบริโอ ฮาวีอาย เชื้อวิบริโอ พาราฮีโมไลติคัสและเชื้อวิบริโอ แคมเบลลิอาย เท่านั้น ซึ่งมีขนาดเท่ากับ 200, 253, 302, และ 421 คู่เบสตามลำดับ เชื้อที่นำมาทดสอบแบ่งออกเป็นกลุ่มเชื้อดังนี้

(1) เชื้อแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอ สปีชีส์ จำนวน 110 สายพันธุ์

- *V. parahaemolyticus* จำนวน 49 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์อ้างอิง (1) จากผู้ป่วย (16) และจากอาหารทะเล (32)
- *V. alginolyticus* จำนวน 20 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์อ้างอิง (1) จากผู้ป่วย (4) และจากอาหารทะเล (15)
- *V. harveyi* จำนวน 1 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์อ้างอิง (1)
- *V. cambellii* จำนวน 1 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์อ้างอิง (1)
- *V. vulnificus* จำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์อ้างอิง (1) และจากอาหารทะเล (3)
- *V. cholerae* จำนวน 9 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์อ้างอิง (1) จากผู้ป่วย (4) และจากอาหารทะเล (4)
- *V. fluvialis* จำนวน 10 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์อ้างอิง (1) จากผู้ป่วย (4) และจากอาหารทะเล (5)
- *V. furnissii* จำนวน 9 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์อ้างอิง (1) จากผู้ป่วย (4) และจากอาหารทะเล (4)
- *V. mimicus* จำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ จากอาหารทะเล (2)
- *Photobacterium damselae* จำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ จากอาหารทะเล (4)
- *Grimontia hollisae* จำนวน 1 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์อ้างอิง (1)

(2) เชื้อแบคทีเรียที่ไม่ใช่กลุ่มวิบริโอ (Non-*Vibrio*) สปีชีส์ จำนวน 38 สายพันธุ์ ได้แก่ *Escherichia coli* (8) *Shigella* spp. (8) *Salmonella* spp. (4) *Klebsiella* spp. (3) *Proteus* spp. (3) *Enterobacter* spp. (2) *Pseudomonas aeruginosa* (2) *Citrobacter freundii* (1) *Aeromonas hydrophila* (1) *Edwardsiella tarda* (1) *Serratia marcescens* (1)

Signed by DIP-CA

นายสุวัจชัย บุญอารี

Plesiomonas shigelloides (1) *Hafnia alvei* (1) *Morganella* spp. (1) และ *Acinetobacter baumannii* (1)

6. การทดสอบความไว (Sensitivity test)

การทดสอบนี้เพื่อตรวจหาจำนวนเชื้อที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจพบได้โดยใช้ชุดทดสอบมัลติเพ็กซ์พีซีอาร์ ตามกรรมวิธีที่ได้บรรยายไว้ในข้อ 3 โดยใช้ส่วนผสมเหมือนกันยกเว้นในขั้นตอนการใส่ดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA templates) การทดสอบนี้มีการเจือจางต้นแบบ (template) ครั้งละ 10 เท่าเป็นลำดับ (10-fold serial dilution) จากเริ่มต้นไม่เจือจาง (undiluted หรือ 10^0), เจือจาง 10 เท่า (10^{-1}), 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, และ 10^{-6} ตามลำดับ

ผลการทดสอบ: ในกรณีที่ใช้ดีเอ็นเอต้นแบบ ที่เตรียมจากโคโลนี ดังแสดงในรูปที่ 2 พบว่าสามารถเจือจางไปได้จนถึงหลอดทดลองที่ 10^{-5} หรือ เจือจาง 100,000 เท่า และยังคงเห็นผลบวก ซึ่งเท่ากับปริมาณของเชื้อ 100 เซลล์ (CFU) นั่นคือจำนวนเซลล์ที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจพบได้โดยใช้ไพรเมอร์และกรรมวิธีมัลติเพ็กซ์พีซีอาร์ ตามที่ได้แสดงไว้ในข้อที่ 1 และข้อที่ 3 ตามลำดับ

การทดสอบความไวโดยใช้วิธีพีซีอาร์เดี่ยว (single PCR) เป็นการทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์แต่ละคู่ที่ได้ออกแบบไว้ว่าสามารถตรวจหาเชื้อวิบริโอที่จำเพาะได้จำนวนน้อยที่สุดเท่าใด วิธีการทดสอบทำตามกรรมวิธีที่ได้บรรยายไว้ในข้อ 3 โดยใช้ส่วนผสมเหมือนกันยกเว้นใช้ไพรเมอร์เพียง 1 คู่ ร่วมกับการใช้ดีเอ็นเอต้นแบบที่จำเพาะต่อไพรเมอร์คู่นั้นๆ และมีการเจือจางต้นแบบ (template) ครั้งละ 10 เท่าเป็นลำดับจากไม่เจือจาง (undiluted หรือ 10^0), เจือจาง 10 เท่า (10^{-1}), เจือจาง 10^{-2}, เจือจาง 10^{-3}, เจือจาง 10^{-4}, เจือจาง 10^{-5}, และ เจือจาง 10^{-6} ตามลำดับ

ผลการทดสอบ: จำนวนเซลล์ที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจพบได้โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะโดยวิธีพีซีอาร์เดี่ยว สำหรับเชื้อวิบริโอ อัลจิโนไลติคัส และเชื้อวิบริโอ แคมเบลลิอาย เท่ากับ 100 เซลล์ สำหรับเชื้อวิบริโอ ฮาวีอาย และเชื้อวิบริโอ พาราฮีโมไลติคัส เท่ากับ 1,000 เซลล์

<u>วิธีการในการประดิษฐ์ที่ดีที่สุด</u>

ได้กล่าวไว้แล้วในหัวข้อการเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

Signed by DIP-CA

นายสุวัจชัย บุญอารี

ข้อถือสิทธิ

1. กรรมวิธีการจำแนกสปีชีส์ของเชื้อวิบริโอ 4 สปีชีส์ได้แก่ (1) วิบริโอ พาราฮีโมไลติคัส (*Vibrio parahaemolyticus*) (2) วิบริโอ อัลจิโนไลติคัส (*V. alginolyticus*) (3) วิบริโอ ฮาวีอาย (*V. harveyi*) และ (4) วิบริโอ แคมเบลลิอาย (*V. campbelli*) โดยวิธีมัลติเพ็กซ์พีซีอาร์ (Multiplex Polymerase Chain Reaction, mPCR) ซึ่งประกอบด้วย ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อวิบริโอ พาราฮีโมไลติคัส เชื้อวิบริโอ อัลจิโนไลติคัส เชื้อวิบริโอ ฮาวีอาย และ เชื้อวิบริโอ แคมเบลลิอาย ตามลำดับ การเตรียมดีเอ็นเอจากโคโลนีของเชื้อที่แยกได้จากสิ่งตรวจ การทำพีซีอาร์ (PCR) โดยใช้เทคนิควิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ในหลอดปฏิกิริยาเดี่ยว (Single-tube multiplex PCR) และการตรวจวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอโดยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (gel electrophoresis)

2. กรรมวิธีการจำแนกสปีชีส์ของเชื้อวิบริโอ 4 สปีชีส์ ตามข้อถือสิทธิข้อที่ 1 ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อวิบริโอแต่ละสปีชีส์ สังเคราะห์จากยีนท็อกซ์อาร์ (*toxR*) ซึ่งเป็นยีนเป้าหมาย ซึ่งมีลำดับเบสดังนี้

ลำดับเบสที่ 1 ValgF: 5′ ACG CTT GAG CCC ATT TTC TA 3′

ลำดับเบสที่ 2 ValgR: 5′ GTA GCC AGT TAA TCG TGT TAG ATG 3′

ลำดับเบสที่ 3 VharF: 5′ TAC GAA GTC GCC TGA ATT TGT A 3′

ลำดับเบสที่ 4 VharR: 5′ TGT GTT CTT TTG TGC AGG TGC A 3′

ลำดับเบสที่ 5 VparF: 5′ GTG GCT TCT GCT GTG AAT CCT 3′

ลำดับเบสที่ 6 VparR: 5′ TTG CTG TCA TGA ATG TAG TTC AA 3′

ลำดับเบสที่ 7 VcamF: 5′ AGA GAC CTA ACG AAG TGA TAA CA 3′

ลำดับเบสที่ 8 VcamR: 5′ GGC AGC AGC AAA GCA ACG AC 3′

ไพรเมอร์ลำดับเบสที่ 1 และ 2 ใช้สำหรับการเพิ่มจำนวนยีนท็อกซ์อาร์ ที่จำเพาะต่อเชื้อวิบริโอ อัลจิโนไลติคัส มีขนาด 200 คู่เบส (base pairs)

ไพรเมอร์ลำดับเบสที่ 3 และ 4 ใช้สำหรับการเพิ่มจำนวนยีนท็อกซ์อาร์ ที่จำเพาะต่อเชื้อวิบริโอ ฮาวีอาย มีขนาด 253 คู่เบส (base pairs)

ไพรเมอร์ลำดับเบสที่ 5 และ 6 ใช้สำหรับการเพิ่มจำนวนยีนท็อกซ์อาร์ ที่จำเพาะต่อเชื้อวิบริโอ พาราฮีโมไลติคัส มีขนาด 302 คู่เบส (base pairs)

ไพรเมอร์ลำดับเบสที่ 7 และ 8 ใช้สำหรับการเพิ่มจำนวนยีนท็อกซ์อาร์ ที่จำเพาะต่อเชื้อวิบริโอ แคมเบลลิอาย มีขนาด 421 คู่เบส (base pairs)

3. กรรมวิธีการจำแนกสปีชีส์ของเชื้อวิบริโอ 4 สปีชีส์ ตามข้อถือสิทธิข้อที่ 1 มีวิธีการเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบจากโคโลนีที่เพาะแยกได้จากสิ่งส่งตรวจ โดยใช้ 1 โคโลนีละลายในน้ำกลั่น 100 ไมโครลิตร (µl) และ

Signed by DIP-CA

นายสุวัจชัย บุญอารี

เติม 20% chelex-100 ปริมาตร 25 µl (ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 5%) นำส่วนผสมไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ปั่นตกตะกอน เก็บส่วนใสซึ่งมีดีเอ็นเอเพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ

4. กรรมวิธีการจำแนกสปีชีส์ของเชื้อวิบริโอ 4 สปีชีส์ ตามข้อถือสิทธิข้อที่ 1 โดยใช้เทคนิควิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ในหลอดปฏิกิริยาเดียว (Single-tube multiplex PCR) ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อวิบริโอ ตามข้อถือสิทธิข้อที่ 2 ซึ่งส่วนผสมในปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR) ปริมาตร 25 µl ประกอบด้วย

Taq buffer + KCl	1X
$MgCl_2$	1.5-2.0 mM
dNTPs	0.2 mM
Taq DNA Polymerese	0.5 unit

ไพรเมอร์ (Primers) จำนวน 4 คู่ (ซึ่งมีลำดับเบสตามที่แสดงไว้ในข้อถือสิทธิข้อที่ 2) ได้แก่

- ValgF และ ValgR	0.20 – 0.3 µM
- VharF และ VharR	0.20 – 0.3 µM
- VparF และ VparR	0.15 -0.25 µM
- VcamF และ VcamR	0.15 -0.25 µM

5. กรรมวิธีการจำแนกสปีชีส์ของเชื้อวิบริโอ 4 สปีชีส์ ตามข้อถือสิทธิข้อที่ 1 โดยใช้เทคนิควิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ในหลอดปฏิกิริยาเดียว (Single-tube multiplex PCR) ในปฏิกิริยามีส่วนประกอบของสารตามที่กำหนดในข้อถือสิทธิข้อที่ 4 ร่วมกับการใช้โปรแกรมการเพิ่มจำนวนยีนด้วยเครื่องทำพีซีอาร์ (PCR) ซึ่งมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

ขั้นตอนที่ 1 ขั้นตอนการเริ่มต้นการคลายเกลียวของดีเอ็นเอเส้นคู่ (Initial denaturation) 90 - 100°C เป็นเวลา 5 นาที

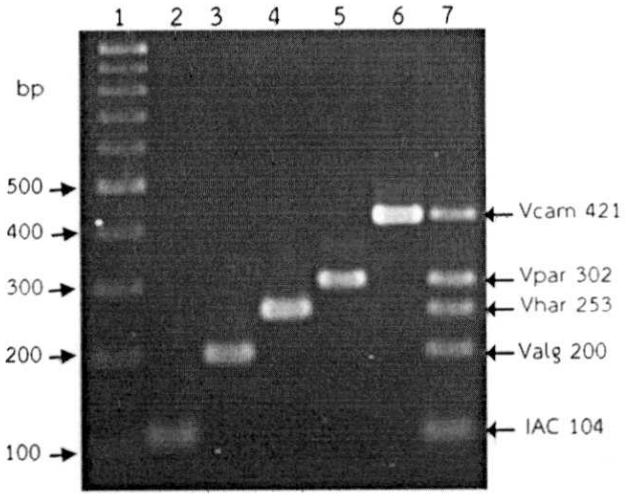
ขั้นตอนที่ 2 ปฏิกิริยาจำนวน 20-40 รอบ ซึ่งแต่ละรอบ ประกอบด้วย

การคลายเกลียวของดีเอ็นเอเส้นคู่ (Denaturation)	80-100°C เป็นเวลา 30-60 วินาที
การเข้าจับของไพรเมอร์บนสายดีเอ็นเอต้นแบบ (Annealing)	54-62°C เป็นเวลา 30-60 วินาที
การขยายสายดีเอ็นเอ (Extension)	68-72°C เป็นเวลา 3 -60 วินาที

ขั้นตอนที่ 3 การคงไว้ที่อุณหภูมิสุดท้าย (Hold) 10°C

Signed by DIP-CA

นายสุวัจชัย บุญอารี

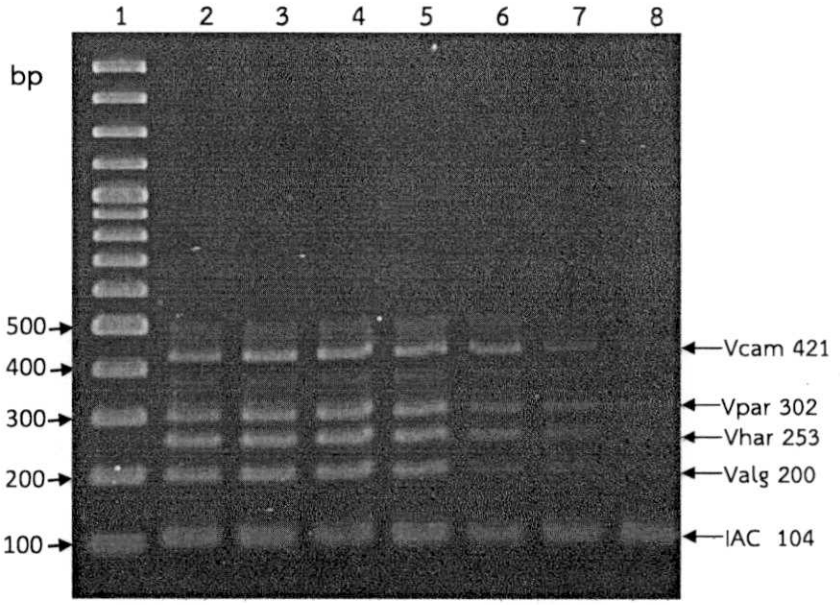


รูปที่ 1

23 ก.ย. 2563

Signed by DIP-CA

นายสุวัจชัย บุญอารี



รูปที่ 2

2 ก.ย. 2023

Signed by DIP-CA

นายสุวัจชัย บุญอารี

บทสรุปการประดิษฐ์

การประดิษฐ์นี้เป็นการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อวิบริโอ จำนวน 4 สปีชีส์ได้แก่ ได้แก่ (1) วิบริโอ พาราฮีโมไลติคัส (2) วิบริโอ อัลจิโนไลติคัส (3) วิบริโอ ฮาวีอาย และ (4) วิบริโอ แคมเบลลิอาย และพัฒนากรรมวิธีการทำมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ เพื่อเพิ่มจำนวนยีนของเชื้อทั้งสี่สปีชีส์นี้ในหลอดทดลองเดียวกัน หรือภายในปฏิกิริยาเดียวกัน ความไวของกรรมวิธีนี้สามารถตรวจพบเชื้อได้จำนวนมากกว่าหรือเท่ากับ 100 เซลล์ ผลงานการประดิษฐ์นี้สามารถนำไปใช้เป็นเครื่องมือในการจำแนกและการบ่งชี้สายพันธุ์ของเชื้อในกลุ่มวิบริโอที่มีสายพันธุ์ใกล้เคียงกันทั้งสี่สายพันธุ์ดังกล่าวได้อย่างแม่นยำ มีความรวดเร็วและมีต้นทุนต่ำ

2023

Signed by DIP-CA

นายสุวัจชัย บุญอารี