เลขที่อนุสิทธิบัตร 27164 **อสป/200 - ข**

อนุสิทธิบัตร

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

มหาวิทยาลัยนเรศวร

สำหรับการประดิษฐ์ตามรายละเอียดการประดิษฐ์ ข้อถือสิทธิ และรูปเขียน (ถ้ามี) ดังที่ปรากฏในอนุสิทธิบัตรนี้

เลขที่คำขอ	**2203001031**
วันขอรับอนุสิทธิบัตร	**26 เมษายน 2565**
ผู้ประดิษฐ์	**รองศาสตราจารย์อัญชลี ศิษยนเรนทร์ และ รองศาสตราจารย์ดวงกมล ขันธเลิศ**
ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์	**ชุดไพรเมอร์และกรรมวิธีสำหรับการเตรียมยีน NS3 กับ NS5B ของเชื้อไวรัสตับอักเสบซีโดยวิธี ซิงเกิล-สเต็ป มัลติเพลกซ์ เนสเตด พอลิเมอเรส เชน รีแอคชั่น (Single-step Multiplex nested Polymerase Chain Reaction)**

ให้ผู้ทรงอนุสิทธิบัตรนี้มีสิทธิและหน้าที่ตามกฎหมายว่าด้วยสิทธิบัตรทุกประการ

ออกให้ ณ วันที่ **14 เดือน มกราคม พ.ศ. 2569**

หมดอายุ ณ วันที่ **25 เดือน เมษายน พ.ศ. 2571**

(นายวิโรจน์ จงกลวานิชสุข)
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.256901002578733

รายละเอียดการประดิษฐ์

ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์

ชุดไพรเมอร์และกรรมวิธีสำหรับการเตรียมยีน NS3 กับ NS5B ของเชื้อไวรัสตับอักเสบซีโดยวิธี ซิงเกิล-สเต็ป มัลติเพลกซ์ เนสเตด พอลิเมอเรส เชน รีแอคชั่น (Single-step Multiplex nested Polymerase Chain Reaction)

สาขาวิทยาการที่เกี่ยวข้องกับการประดิษฐ์

เทคโนโลยีชีวภาพในส่วนที่เกี่ยวข้องกับชุดไพรเมอร์และกรรมวิธีสำหรับการเตรียมยีน NS3 กับ NS5B ของเชื้อไวรัสตับอักเสบซีโดยวิธี ซิงเกิล-สเต็ป มัลติเพลกซ์ เนสเตด พอลิเมอเรส เชน รีแอคชั่น (Single-step Multiplex nested Polymerase Chain Reaction)

ภูมิหลังของศิลปะหรือวิทยาการที่เกี่ยวข้อง

เชื้อไวรัสตับอักเสบซี (hepatitis C virus) เป็นสาเหตุของโรคไวรัสตับอักเสบชนิดซี โดยอาจก่อให้เกิดโรคตับแข็งและมะเร็งตับ (Tong และคณะ, 1995; Villano และคณะ, 1999) โรคมะเร็งตับพบได้ทั่วโลกรวมทั้งประเทศไทยที่พบอุบัติการณ์ของโรคมะเร็งตับได้สูงในบางภูมิภาคของประเทศ จากการศึกษาพบอัตราความชุกของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซีในประเทศไทยพบอัตราชุกร้อยละ 2.1-2.2 (Louisirirotchanakul และคณะ, 2002; Ishida และคณะ, 2002; Chunlertrith และคณะ, 2000; Jatapai และคณะ, 2010) และคาดว่ามีผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซีเรื้อรังประมาณ 1 ล้านคน

เชื้อไวรัสตับอักเสบซีแบ่งเป็น 7 จีโนไทป์ (genotype) คือ 1-8 (Borgia และคณะ, 2018) และแบ่งย่อยเป็นซับไทป์ (subtype) ที่แตกต่างกัน (Bukh และคณะ, 1995) เชื้อไวรัสตับอักเสบซีมีสารพันธุกรรมชนิดอาร์เอ็นเอ (RNA) สายเดี่ยวแบบสายบวก ประกอบด้วยบริเวณที่ไม่ได้กำหนดการสร้างโปรตีนคือ 5'UTR และ 3'UTR และบริเวณที่กำหนดการสร้างโปรตีนได้แก่ C, E, p7, น็อน-สทรัคเชอะเริล (non-structural; NS) NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A และ NS5B โดยโปรตีนเหล่านี้มีบทบาทในขั้นตอนการเพิ่มจำนวนของไวรัสและบทบาทในปฏิสัมพันธ์กับเซลล์ที่ถูกติดเชื้อ นอกจากนี้ยังมีบทบาทสำคัญซึ่งเป็นเป้าหมายสำหรับการพัฒนายาเพื่อรักษาโรคตับอักเสบชนิดซี

โปรตีน NS3 ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ที่จำเป็นสำหรับขั้นตอนการเพิ่มจำนวนของไวรัส

โปรตีน NS5B ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ที่จำเป็นสำหรับการสร้างสาย อาร์เอ็นเอ (RNA)

สำหรับยาที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วยตับอักเสบชนิดซีในอดีตคือ อินเตอร์เฟียรอน-อัลฟา (interferon-α) และมีการใช้ร่วมกับไรบาวิริน (ribavirin) ต่อมามีการพัฒนา อินเตอร์เฟียรอน-อัลฟา (interferon-α) ทำให้เพิ่มประสิทธิภาพของยา และได้มีการใช้ร่วมกับไรบาวิริน (ribavirin) ซึ่งเป็นยาสูตรมาตรฐานในการรักษา อย่างไรก็ตามสามารถพบอาการข้างเคียงที่เกิดขึ้นจากการใช้ยาสูตรมาตรฐานเช่น การกดการทำงานของไขกระดูก อาการคล้ายไข้หวัดใหญ่ ภาวะซีดที่เกิดจากเซลล์เม็ดเลือดแดงแตก และที่สำคัญคือผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซี ให้อัตราการตอบสนอง (sustained virological response; SVR) ที่ต่ำ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการเกิดการกลายพันธุ์ของไวรัสที่ส่งผลให้เกิดการดื้อยาได้ ต่อมามีการพัฒนายาชนิดใหม่ซึ่งเป็นยาในกลุ่ม ไดเร็ก แอคติ้ง แอนติไวรัล เอเจ็นท์ (direct-acting antiviral agents) (หรือ DAAs) ที่มีกลไกการออกฤทธิ์โดยตรงต่อไวรัสโดยการยับยั้งขั้นตอนการเพิ่มจำนวนของไวรัส ยากลุ่ม DAAs แบ่งเป็นกลุ่มตามเป้าหมายและกลไกการออกฤทธิ์คือ

1. NS3/4A โปรตีนเอส อินฮิบบิเทอะ (protease inhibitors) (PIs) ตัวอย่างได้แก่ ไซมิพรีเวียร์ (simeprevir)

นายสุวัจชัย บุญอารี

2. NS5A อินฮิบบิเทอะ (inhibitors) ตัวอย่างได้แก่ เอลบาสเวียร์ (elbasvir)

3. NS5B นิวคลีโอไทด์ พอลิเมอเรส อินฮิบบิเทอะ (nucleos(t)ide polymerase inhibitors) (NIs) และ NS5B นัน-นิวคลีโอไซด์ พอลิเมอเรส อินฮิบบิเทอะ (non-nucleoside polymerase inhibitors) (NNIs) ตัวอย่างได้แก่ โซฟอสบูเวียร์ (sofosbuvir)

อย่างไรก็ตามกลุ่มยา DAAs มีข้อเสียคือ การเกิดการดื้อยาที่เนื่องมาจากการกลายพันธุ์ของไวรัส การศึกษาการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนบริเวณ NS3 และ NS5b ของเชื้อไวรัสตับอักเสบซี พบว่าเกี่ยวข้องกับการเกิดการดื้อยาบางชนิดในกลุ่ม NS3/4A โปรตีนเอส อินฮิบบิเทอะ (protease inhibitors), NS5B นิวคลีโอไทด์ พอลิเมอเรส อินฮิบบิเทอะ (nucleos(t)ide polymerase inhibitors) และ NS5B นัน-นิวคลีโอไซด์ พอลิเมอเรส อินฮิบบิเทอะ (non-nucleoside polymerase inhibitors) (Sorbo และคณะ, 2018) ยากลุ่ม DAAs มีประสิทธิผลในการรักษาสูงและพบอาการข้างเคียงน้อย เนื่องจากเป็นกลุ่มยาใหม่จึงยังคงมีราคาแพงและปัญหาเชื้อไวรัสกลายพันธุ์ที่อาจมีผลให้การรักษาด้วยยาดังกล่าวไม่ประสบผลสำเร็จ ดังนั้นการพิจารณาตัดสินใจหาทางเลือกก่อนการรักษาที่เหมาะสมโดยการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน NS3 และ NS5B ของเชื้อไวรัสตับอักเสบซี เพื่อความคุ้มค่าทางเศรษฐศาสตร์ของการรักษาไวรัสตับอักเสบซีจึงเป็นสิ่งจำเป็น การตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน NS3 และ NS5B ของเชื้อไวรัสตับอักเสบซีด้วยวิธีการหาลำดับเบสมักเป็นการตรวจหาการกลายพันธุ์ของแต่ละยีนแยกจากกัน โดยมีขั้นตอนคือ

1. การเตรียมยีนจะใช้วิธี เนสเตด พอลิเมอเรส เชน รีแอคชั่น (nested Polymerase Chain Reaction) (เนสเตด พีซีอาร์; Nested PCR) ซึ่งเป็นการเตรียมยีน NS3 และ NS5B แต่ละยีนโดยการทำปฏิกิริยาในหลอดแต่ละหลอดแยกกัน (Neukam และคณะ, 2017; Paolucci และคณะ, 2012; Dietz และคณะ, 2018; Dietz และคณะ, 2015; Brandão และคณะ, 2018)

2. นำยีนแต่ละยีนที่เตรียมได้ไปตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์

3. นำลำดับนิวคลีโอไทด์ตรวจสอบตำแหน่งของการกลายพันธุ์

อย่างไรก็ตามขั้นตอนการเตรียมยีนโดยวิธีนี้มีข้อจำกัดที่สำคัญหลายประการคือ

1. การปนเปื้อนดีเอ็นเอ (DNA) หรือผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product) จากการทำปฏิกิริยา

2. สิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย

3. ใช้เวลาในการทำปฏิกิริยานานเนื่องจากต้องเตรียมยีน NS3 และ NS5B แต่ละยีนแยกกันในแต่ละหลอด

ดังนั้นเพื่อให้ปฏิบัติได้ง่าย รวดเร็วขึ้น ประหยัดค่าใช้จ่ายและที่สำคัญที่สุดคือ การลดการปนเปื้อนจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่เกิดจากการเตรียมยีนแต่ละยีน ดังนั้นเทคนิค ซิงเกิล-สเต็ป มัลติเพลกซ์ เนสเตด พอลิเมอเรส เชน รีแอคชั่น (Single-step Multiplex nested Polymerase Chain Reaction) (มัลติเพลกซ์ เนสเตด พีซีอาร์; Multiplex nested PCR) ซึ่งสามารถเพิ่มขยายยีนหลายเป้าหมายด้วยไพรเมอร์ หลายคู่พร้อมกันในปฏิกิริยาเดียวกันที่สามารถเตรียมได้ทั้งยีน NS3 กับ NS5B ของเชื้อไวรัสตับอักเสบซีโดยการทำปฏิกิริยาในหลอดเดียวกัน จึงเป็นวิธีที่ดีและเหมาะสม

ลักษณะและความมุ่งหมายของการประดิษฐ์

ชุดไพรเมอร์และกรรมวิธีสำหรับการเตรียมยีน NS3 กับ NS5B ของเชื้อไวรัสตับอักเสบซีโดยวิธีซิงเกิล-สเต็ป มัลติเพลกซ์ เนสเตด พอลิเมอเรส เชน รีแอคชั่น (Single-step Multiplex nested Polymerase Chain Reaction) ซึ่งประกอบด้วยไพรเมอร์ (primers) ที่ใช้สำหรับการเตรียมยีน NS3 กับ NS5B ของเชื้อไวรัสตับอักเสบซีจำนวน 8 เส้นที่มีลำดับเบสดังนี้

นายสุวัจชัย บุญอารี

ฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ (forward primer)สำหรับยีน NS3 ส่วนนอก คือ 5'-gatgaytatcgggagatgggttggc-3'
รีเวิร์สไพรเมอร์ (reverse primer) สำหรับยีน NS3 ส่วนนอก คือ 5'-ctgtggracrgcaggaggagttgaat-3'
ฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ (forward primer) สำหรับยีนNS5B ส่วนนอกคือ 5'-tatgayacccgctgytttgactc-3'
รีเวิร์สไพรเมอร์ (reverse primer) สำหรับยีน NS5B ส่วนนอก คือ 5'-gcngartayctvgtcatagcctc-3'
ฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ (forward primer) สำหรับยีน NS3 ส่วนใน คือ 5'-gcccagcaaacyagrggcctt-3'
รีเวิร์สไพรเมอร์ (reverse primer) สำหรับยีน NS3 ส่วนใน คือ 5'-ggagttgaattgtcagagaargatggaga-3'
ฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ (forward primer) สำหรับยีน NS5B ส่วนใน คือ 5'-tatgayacccgctgytttgactc-3'
รีเวิร์สไพรเมอร์ (reverse primer) สำหรับยีน NS5B ส่วนใน คือ 5'-gctagtcatagcctccgt-3'

การประดิษฐ์นี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาชุดไพรเมอร์และกรรมวิธีสำหรับการเตรียมยีน NS3 กับ NS5B ของเชื้อไวรัสตับอักเสบซีโดยวิธี ซิงเกิล-สเต็ป มัลติเพลกซ์ เนสเตด พอลิเมอเรส เชน รีแอคชั่น (Single-step Multiplex nested Polymerase Chain Reaction) ซึ่งช่วยให้ง่าย รวดเร็วขึ้น ประหยัดค่าใช้จ่ายและที่สำคัญที่สุดคือ การลดการปนเปื้อนจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR) ที่เกิดจากการเตรียมยีนแต่ละยีน และสามารถเพิ่มขยายยีนหลายเป้าหมายด้วยไพรเมอร์หลายคู่พร้อมกันในปฏิกิริยาเดียวกันที่สามารถเตรียมได้ทั้งยีน NS3 กับ NS5B ของเชื้อไวรัสตับอักเสบซีโดยการทำปฏิกิริยาในหลอดเดียวกัน จึงเป็นวิธีที่ดีและเหมาะสมกว่า สำหรับนำยีนแต่ละยีน (NS3 และ NS5B) ที่เตรียมได้ไปตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อตรวจสอบการกลายพันธุ์ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการเลือกสูตรยาที่เหมาะสมสำหรับการรักษาผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซี

การเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

1.ชุดไพรเมอร์สำหรับการเตรียมยีน NS3 กับ NS5B ของเชื้อไวรัสตับอักเสบซีโดยวิธี ซิงเกิล-สเต็ป มัลติเพลกซ์ เนสเตด พอลิเมอเรส เชน รีแอคชั่น (Single-step Multiplex nested Polymerase Chain Reaction) ซึ่งประกอบด้วยไพรเมอร์ (primers) ที่ใช้สำหรับการเตรียมยีน NS3 กับ NS5B ของเชื้อไวรัสตับอักเสบซีจำนวน 8 เส้นที่มีลำดับเบสดังนี้

ฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ (forward primer) สำหรับยีน NS3 ส่วนนอก คือ 5'-gatgaytatcgggagatgggttggc-3'
รีเวิร์สไพรเมอร์ (reverse primer) สำหรับยีน NS3 ส่วนนอก คือ 5'-ctgtggracrgcaggaggagttgaat-3'
ฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ (forward primer) สำหรับยีน NS5B ส่วนนอก คือ 5'-tatgayacccgctgytttgactc-3'
รีเวิร์สไพรเมอร์ (reverse primer) สำหรับยีน NS5B ส่วนนอก คือ 5'-gcngartayctvgtcatagcctc-3'
ฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ (forward primer) สำหรับยีน NS3 ส่วนใน คือ 5'-gcccagcaaacyagrggcctt-3'
เวิร์สไพรเมอร์ (reverse primer) สำหรับยีน NS3 ส่วนใน คือ 5'-ggagttgaattgtcagagaargatggaga-3'
ฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ (forward primer) สำหรับยีน NS5B ส่วนใน คือ 5'-tatgayacccgctgytttgactc-3'
รีเวิร์สไพรเมอร์ (reverse primer) สำหรับยีน NS5B ส่วนใน คือ 5'-gctagtcatagcctccgt-3'

2.กรรมวิธีในการเตรียมยีน NS3 กับ NS5B โดยวิธี ซิงเกิล-สเต็ป มัลติเพลกซ์ เนสเตด พอลิเมอเรส เชน รีแอคชั่น (Single-step Multiplex nested Polymerase Chain Reaction) มีขั้นตอนคือ

2.1 การสกัดกรดนิวคลีอิก (RNA) ของไวรัสจากตัวอย่างซีรั่มที่ตรวจพบการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซี

2.2 นำตัวอย่างอาร์เอ็นเอ (RNA) ของเชื้อไวรัสตับอักเสบซีมาสังเคราะห์คอมพลีเมินทารี ดีเอ็นเอ (complementary DNA; cDNA) โดยวิธีรีเวิร์ส ทรานสคริปชั่น(reverse transcription) (หรือ RT)

2.3 การเตรียมยีน NS3 กับ NS5B ของเชื้อไวรัสตับอักเสบซีโดยวิธี ซิงเกิล-สเต็ป มัลติเพลกซ์ เนสเตด พอลิเมอเรส เชน รีแอคชั่น (Single-step Multiplex nested Polymerase Chain Reaction) มีเงื่อนไขของสภาวะปฏิกิริยาและโปรแกรมอุณหภูมิเพื่อเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมสำหรับชุดไพรเมอร์ ดังนี้

นายสุวัจชัย บุญอารี

2.3.1 กรรมวิธีสำหรับการเตรียมยีน NS3 กับ NS5B ส่วนนอกโดยการทำในรอบแรก(first round PCR) คือ เตรียมพีซีอาร์ รีแอคชั่น มิกซ์ (PCR reaction mix) ที่ประกอบด้วย 1x พีซีอาร์บัฟเฟอร์ (PCR buffer), 100-400 ไมโครโมลาร์ ดีเอ็นทีพี (dNTPs) ทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ dATP, dCTP, dGTP และ dTTP และเอนไซม์ (enzyme) แท็ก ดีเอ็นเอ พอลิเมอเรส (*Taq* DNA polymerase) ความเข้มข้น 0.5-2.5 ยูนิต (U) เติมไพรเมอร์สำหรับการเตรียมยีน NS3 กับ NS5B ส่วนนอก โดยให้แต่ละไพรเมอร์มีความเข้มข้นสุดท้าย คือ 0.2-1 ไมโครโมลาร์ เติมตัวอย่างดีเอ็นเอปริมาตร 1-5 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่นบริสุทธิ์โดยปรับให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 25 ไมโครลิตร แล้วนำเข้าเครื่องพีซีอาร์ (Thermal cycle) โดยตั้งโปรแกรมอุณหภูมิดังนี้

ขั้นที่ 1 โปรแกรมพรี อินคูเบชั่น (pre incubation) ใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที

ขั้นที่ 2 โปรแกรมแอมพลิฟิเคชั่น (amplification) ที่ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนคือ ขั้นตอนดีแนทเจอเรชั่น (Denaturation) ใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 10 วินาที ขั้นตอนแอนเนียลลิง (Annealing) ใช้อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และขั้นตอนเอ็กเทนชั่น (Extension) ใช้อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส นาน 40 วินาที ทำซ้ำทั้งหมด 40 รอบ (cycles)

ขั้นที่ 3 โปรแกรมไฟนอล เอ็กเทนชั่น (final extension) ใช้อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที

2.3.2 กรรมวิธีสำหรับการเตรียมยีน NS3 กับ NS5B ส่วนในโดยการทำในรอบสอง(Second round PCR) คือ เตรียมพีซีอาร์ รีแอคชั่น มิกซ์ (PCR reaction mix) ที่ประกอบด้วย 1x พีซีอาร์บัฟเฟอร์ (PCR buffer), 100-400 ไมโครโมลาร์ ดีเอ็นทีพี (dNTPs) ทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ dATP, dCTP, dGTP และ dTTP และเอนไซม์ (enzyme) แท็ก ดีเอ็นเอ พอลิเมอเรส (*Taq* DNA polymerase) ความเข้มข้น 0.5-2.5 ยูนิต (U) เติมไพรเมอร์สำหรับการเตรียมยีน NS3 กับ NS5B ส่วนใน โดยให้แต่ละไพรเมอร์มีความเข้มข้นสุดท้าย คือ 0.2-1 ไมโครโมลาร์ เติมผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product) ปริมาตร 0.2-5 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่นบริสุทธิ์โดยปรับให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 25 ไมโครลิตร แล้วนำเข้าเครื่อง พีซีอาร์ (Thermal cycle) โดยตั้งโปรแกรมอุณหภูมิดังนี้

ขั้นที่ 1 โปรแกรมพรี อินคูเบชั่น (pre incubation) ใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที

ขั้นที่ 2 โปรแกรมแอมพลิฟิเคชั่น (amplification) ที่ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนคือ ขั้นตอนดีแนทเจอเรชั่น (Denaturation) ใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที ขั้นตอนแอนเนียลลิง (Annealing) ใช้อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และขั้นตอนเอ็กเทนชั่น (Extension) ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 40 วินาที ทำซ้ำทั้งหมด 40 รอบ (cycles)

ขั้นที่ 3 โปรแกรมไฟนอล เอ็กเทนชั่น (final extension) ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที

2.4 หลังจากเพิ่มปริมาณยีนแล้ว นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product) ปริมาตร 5-7 ไมโครลิตร ผสมกับสีนอฟเวิล จูซ (Novel juice) 1-5 ไมโครลิตร นำมาแยกขนาดดีเอ็นเอโดยการทำ 1.5% อะกาโรส เจล อิเล็กโตรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) ที่กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที ถึง 1 ชั่วโมง นำเจลไปตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเครื่องบลู ไลท์ (Blue light) และทำการถ่ายภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอเป้าหมาย

2.5 การตรวจยืนยันลำดับเบสของยีน NS3 และ NS5B ที่เตรียมได้โดยการทำนิวคลีโอไทด์ ซีคเว็นซิ่ง (nucleotide sequencing)

2.6 ผลการตรวจสอบการเตรียมยีน NS3 กับ NS5B โดยวิธี ซิงเกิล-สเต็ป มัลติเพลกซ์ เนสเตด พอลิเมอเรส เชน รีแอคชั่น (Single-step Multiplex nested Polymerase Chain Reaction) ดังแสดงในรูปที่ 1 ที่ตรวจพบยีน NS3 กับ NS5B และผลจากการตรวจสอบลำดับเบส ได้ยืนยันลำดับเบสของยีน NS3

นายสุวัจชัย บุญอารี

กับ NS5B ที่เตรียมได้ ถึงแม้ว่าการเตรียมยีน NS3 กับ NS5B จะพบ น็อน-สเปคซิฟิค พีซีอาร์ โปรดักส์ (non-specific PCR product) ได้บ้าง แต่อย่างไรก็ตามวัตถุประสงค์หลักคือการตัดสเปคซิฟิค พีซีอาร์ โปรดักส์ (specific PCR product) เพื่อการนำไปตรวจสอบลำดับเบส ซึ่งจากผลการทดลองดังกล่าวจะไม่มีผลรบกวนการต่อขั้นตอนในลำดับถัดไป ดังนั้นแสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์สามารถใช้ในการเตรียมยีน NS3 กับ NS5B ของไวรัสตับอักเสบซีได้

คำอธิบายรูปเขียนโดยย่อ

รูปที่ 1 แสดงถึงรายละเอียดลายพิมพ์ดีเอ็นเอของยีน NS3 กับ NS5B โดยวิธี ซิงเกิล-สเต็ป มัลติเพลกซ์ เนสเตด พอลิเมอเรส เชน รีแอคชั่น (Single-step Multiplex nested Polymerase Chain Reaction) โดย

ช่องที่ 1 คือแถบดีเอ็นเอมาตราฐาน (100BP DNA LADDER)

ช่องที่ 2 ใช้ไพรเมอร์สำหรับการเตรียมยีน NS3 กับ NS5B พบว่าได้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 550 คู่เบส (bp) ของยีน NS3 และแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 380 คู่เบส(bp)ของยีน NS5B

วิธีการในการประดิษฐ์ที่ดีที่สุด

ดังได้บรรยายไว้แล้วในหัวข้อการเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

เอกสารอ้างอิง

1. Tong CY, Gilmore IT, Hart CA. HCV-associated liver cancer. Lancet. 1995 Apr 22;345(8956):1058-9. doi: 10.1016/s0140-6736(95)90804-8.

2. Villano SA, Vlahov D, Nelson KE, Cohn S, Thomas DL. Persistence of viremia and the importance of long-term follow-up after acute hepatitis C infection. Hepatology. 1999 Mar;29(3):908-14. doi: 10.1002/hep.510290311.

3. Louisirirotchanakul S, Myint KS, Srimee B, Kanoksinsombat C, Khamboonruang C, Kunstadter P, Wasi C. The prevalence of viral hepatitis among the Hmong people of northern Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2002 Dec;33(4):837-44.

4. Ishida T, Takao S, Settheetham-Ishida W, Tiwawech D. Prevalence of hepatitis B and C virus infection in rural ethnic populations of Northern Thailand. J Clin Virol. 2002 Feb;24 (1-2):31-5. doi: 10.1016/s1386-6532(01)00222-0.

5. Chunlertrith K, Sukeepaisarnjaroen W, Mairiang P, Urwijitaroon Y, Takase K, Yamauchi T, Yoshimura H, Tameda Y. Clinico-epidemiology of hepatitis C viral infection in northeastern Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2000 Jun;31(2):273-6.

6. Jatapai A, Nelson KE, Chuenchitra T, Kana K, Eiumtrakul S, Sunantarod E, Rangsin R. Prevalence and risk factors for hepatitis C virus infection among young Thai men. Am J Trop Med Hyg. 2010 Aug;83(2):433-9. doi: 10.4269/ajtmh.2010.09-0749.

7. Borgia SM, Hedskog C, Parhy B, Hyland RH, Stamm LM, Brainard DM, Subramanian MG, McHutchison JG, Mo H, Svarovskaia E, Shafran SD. Identification of a Novel Hepatitis C Virus Genotype From Punjab, India: Expanding Classification of Hepatitis C Virus Into 8 Genotypes. J Infect Dis. 2018 Oct 20;218(11):1722-1729. doi: 10.1093/infdis/jiy401.

8. Bukh J, Miller RH, Purcell RH. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. Semin Liver Dis. 1995 Feb;15(1):41-63. doi: 10.1055/s-2007-1007262.

นายสุวัจชัย บุญอารี

9. Sorbo MC, Cento V, Di Maio VC, Howe AYM, Garcia F, Perno CF, Ceccherini-Silberstein F. Hepatitis C virus drug resistance associated substitutions and their clinical relevance: Update 2018. Drug Resist Updat. 2018 Mar;37:17-39. doi: 10.1016/j.drup.2018.01.004. Epub 2018 Feb 21. Erratum in: Drug Resist Updat. 2018 Sep;40:40-41. doi: 10.1016/j.drup.2018.04.001.

10. Neukam K, Martinez AP, Culasso ACA, Ridruejo E, Garcia G, Di Lello FA. NS3 genomic sequencing and phylogenetic analysis as alternative to a commercially available assay to reliably determine hepatitis C virus subtypes 1a and 1b. PLoS One. 2017 Jul 28;12(7):e0182193. doi: 10.1371/journal.pone.0182193.

11. Paolucci S, Fiorina L, Piralla A, Gulminetti R, Novati S, Barbarini G, Sacchi P, Gatti M, Dossena L, Baldanti F. Naturally occurring mutations to HCV protease inhibitors in treatment-naïve patients. Virol J. 2012 Oct 24;9:245. doi: 10.1186/1743-422X-9-245.

12. Dietz J, Susser S, Vermehren J, Peiffer KH, Grammatikos G, Berger A, Ferenci P, Buti M, Müllhaupt B, Hunyady B, Hinrichsen H, Mauss S, Petersen J, Buggisch P, Felten G, Hüppe D, Knecht G, Lutz T, Schott E, Berg C, Spengler U, von Hahn T, Berg T, Zeuzem S, Sarrazin C; European HCV Resistance Study Group. Patterns of Resistance-Associated Substitutions in Patients With Chronic HCV Infection Following Treatment With Direct-Acting Antivirals. Gastroenterology. 2018 Mar;154(4):976-988.e4. doi: 10.1053/j.gastro.2017.11.007.

13. Brandão R, Marcelino R, Gonçalves F, Diogo I, Carvalho A, Cabanas J, Costa I, Brogueira P, Ventura F, Miranda A, Mansinho K, Gomes P. Characterization of NS5A and NS5B Resistance-Associated Substitutions from Genotype 1 Hepatitis C Virus Infected Patients in a Portuguese Cohort. Viruses. 2018 Apr 26;10(5):223. doi: 10.3390/v10050223.

14. Dietz J, Susser S, Berkowski C, Perner D, Zeuzem S, Sarrazin C. Consideration of Viral Resistance for Optimization of Direct Antiviral Therapy of Hepatitis C Virus Genotype 1-Infected Patients. PLoS One. 2015 Aug 28;10(8):e0134395. doi: 10.1371/journal.pone.0134395.

นายสุวัจชัย บุญอารี

ข้อถือสิทธิ

1. ชุดไพรเมอร์สำหรับการเตรียมยีน NS3 กับ NS5B ของเชื้อไวรัสตับอักเสบซีโดยวิธี ซิงเกิล-สเต็ป มัลติเพลกซ์ เนสเตด พอลิเมอเรส เชน รีแอคชั่น (Single-step Multiplex nested Polymerase Chain Reaction) ซึ่งประกอบด้วยไพรเมอร์ (primers) ที่ใช้สำหรับการเตรียมยีน NS3 กับ NS5B ของเชื้อไวรัสตับอักเสบซีจำนวน 8 เส้น ที่มีลำดับเบสดังนี้

ฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ (forward primer) สำหรับยีน NS3 ส่วนนอก คือ 5'-gatgaytatcgggagatgggttggc-3'

รีเวิร์สไพรเมอร์ (reverse primer) สำหรับยีน NS3 ส่วนนอก คือ 5'-ctgtggracrgcaggaggagttgaat-3'

ฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ (forward primer) สำหรับยีน NS5B ส่วนนอก คือ 5'-tatgayacccgctgytttgactc-3'

รีเวิร์สไพรเมอร์ (reverse primer) สำหรับยีน NS5B ส่วนนอก คือ 5'-gcngartayctvgtcatagcctc-3'

ฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ (forward primer) สำหรับยีน NS3 ส่วนใน คือ 5'-gcccagcaaacyagrggcctt-3'

รีเวิร์สไพรเมอร์ (reverse primer) สำหรับยีน NS3 ส่วนใน คือ 5'-ggagttgaattgtcagagaargatggaga-3'

ฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ (forward primer) สำหรับยีน NS5B ส่วนใน คือ 5'-tatgayacccgctgytttgactc-3'

รีเวิร์สไพรเมอร์ (reverse primer) สำหรับยีน NS5B ส่วนใน คือ 5'-gctagtcatagcctccgt-3'

2. กรรมวิธีสำหรับการเตรียมยีน NS3 กับ NS5B ของเชื้อไวรัสตับอักเสบซีโดยวิธี ซิงเกิล-สเต็ป มัลติเพลกซ์ เนสเตด พอลิเมอเรส เชน รีแอคชั่น (Single-step Multiplex nested Polymerase Chain Reaction) โดยใช้ชุดไพรเมอร์ตามข้อถือสิทธิ 1 ที่ซึ่ง มีขั้นตอนดังนี้

ก. สกัดกรดนิวคลีอิก (RNA) ของไวรัสจากตัวอย่างซีรั่มที่ตรวจพบการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซี

ข. นำตัวอย่าง RNA ของเชื้อไวรัสตับอักเสบซีมาสังเคราะห์ cDNA โดยวิธีรีเวิร์ส ทรานสคริปชั่น (reverse transcription)

ค. เตรียมยีน NS3 กับ NS5B ของเชื้อไวรัสตับอักเสบซีโดยวิธี ซิงเกิล-สเต็ป มัลติเพลกซ์ เนสเตด พอลิเมอเรส เชน รีแอคชั่น (Single-step Multiplex nested Polymerase Chain Reaction) โดยใช้ชุดไพรเมอร์สำหรับยีน NS3 กับ NS5B ส่วนนอก และมีสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมยีน NS3 กับ NS5B ส่วนนอก โดยการทำในรอบแรก (first round PCR) คือ เตรียมพีซีอาร์ รีแอคชั่น มิกซ์ (PCR reaction mix) ที่ประกอบด้วย 1x พีซีอาร์บัฟเฟอร์ (PCR buffer), 100-400 ไมโครโมลาร์ ดีเอ็นทีพี (dNTPs) ทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ dATP, dCTP, dGTP และ dTTP และเอนไซม์ (enzyme) แท็ก ดีเอ็นเอ พอลิเมอเรส (*Taq* DNA polymerase) ความเข้มข้น 0.5-2.5 ยูนิต (U) เติมไพรเมอร์สำหรับการเตรียมยีน NS3 กับ NS5B ส่วนนอก โดยให้แต่ละไพรเมอร์มีความเข้มข้นสุดท้าย คือ 0.2-1 ไมโครโมลาร์ เติมตัวอย่างดีเอ็นเอปริมาตร 1-5 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่นบริสุทธิ์โดยปรับให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 25 ไมโครลิตร แล้วนำเข้าเครื่องพีซีอาร์ (Thermal cycle) โดยตั้งโปรแกรมอุณหภูมิ ดังนี้

ขั้นที่ 1 โปรแกรมพรี อินคูเบชั่น (pre incubation) ใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที

ขั้นที่ 2 โปรแกรมแอมพลิฟิเคชั่น (amplification) ที่ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนคือ ขั้นตอนดีแนทเจอเรชั่น (Denaturation) ใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 10 วินาที ขั้นตอนแอนเนียลลิง (Annealing) ใช้อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และขั้นตอนเอ็กเทนชั่น (Extension) ใช้อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส นาน 40 วินาที ทำซ้ำทั้งหมด 40 รอบ (cycles)

27/2/17

นายสุวัจชัย บุญอารี

ขั้นที่ 3 โปรแกรมไฟนอล เอ็กเทนชั่น (final extension) ใช้อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที

ง. เตรียมยีน NS3 กับ NS5B ของเชื้อไวรัสตับอักเสบซีโดยวิธี ซิงเกิล-สเต็ป มัลติเพลกซ์ เนสเตด พอลิเมอเรส เชน รีแอคชั่น (Single-step Multiplex nested Polymerase Chain Reaction) โดยใช้ชุดไพรเมอร์สำหรับยีน NS3 กับ NS5B ส่วนใน และมีสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมยีน NS3 กับ NS5B ส่วนใน โดยการทำในรอบสอง (Second round PCR) คือ เตรียมพีซีอาร์ รีแอกชั่น มิกซ์ (PCR reaction mix) ที่ประกอบด้วย 1x พีซีอาร์บัฟเฟอร์ (PCR buffer), 100-400 ไมโครโมลาร์ ดีเอ็นทีพี (dNTPs) ทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ dATP, dCTP, dGTP และ dTTP และเอนไซม์ (enzyme) แท็ก ดีเอ็นเอ พอลิเมอเรส (*Taq* DNA polymerase) ความเข้มข้น 0.5-2.5 ยูนิต (U) เติมไพรเมอร์สำหรับการเตรียมยีน NS3 กับ NS5B ส่วนใน โดยให้แต่ละไพรเมอร์มีความเข้มข้นสุดท้าย คือ 0.2-1 ไมโครโมลาร์ เติมผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product) ปริมาตร 0.2-5 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่นบริสุทธิ์โดยปรับให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 25 ไมโครลิตร แล้วนำเข้าเครื่องพีซีอาร์ (Thermal cycle) โดยตั้งโปรแกรมอุณหภูมิดังนี้

ขั้นที่ 1 โปรแกรมพรี อินคูเบชั่น (pre incubation) ใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที

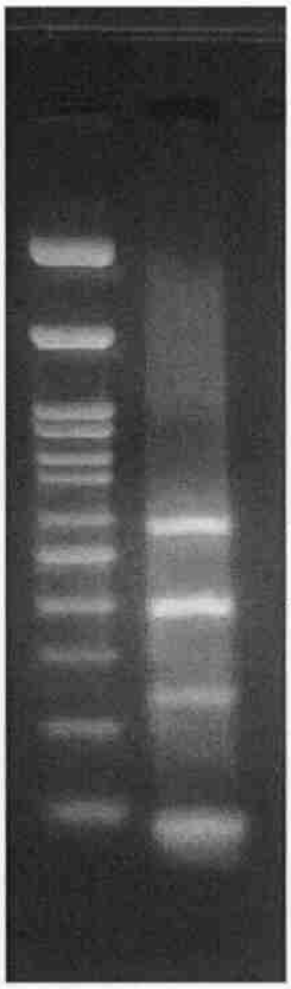
ขั้นที่ 2 โปรแกรมแอมพลิฟิเคชั่น (amplification) ที่ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนคือ ขั้นตอนดีแนทเจอเรชั่น (Denaturation) ใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที ขั้นตอนแอนเนียลลิง (Annealing) ใช้อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และขั้นตอนเอ็กเทนชั่น (Extension) ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 40 วินาที ทำซ้ำทั้งหมด 40 รอบ (cycles)

ขั้นที่ 3 โปรแกรมไฟนอล เอ็กเทนชั่น (final extension) ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที

จ. นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product) ที่ได้ มาแยกขนาด DNA โดยการทำ 1.5% อะกาโรส เจล อิเล็กโตรโฟรีซิส ซึ่งจะได้แถบ DNA ที่มีขนาด 550 คู่เบสของยีน NS3 และแถบ DNA ที่มีขนาด 380 คู่เบสของยีน NS5B

27164

นายสุวัจชัย บุญอารี



รูปที่ 1

27164

นายสุวัจชัย บุญอารี

บทสรุปการประดิษฐ์

ชุดไพรเมอร์สำหรับการเตรียมยีน NS3 กับ NS5B ของเชื้อไวรัสตับอักเสบซีโดยวิธีซิงเกิล-สเต็ป มัลติเพลกซ์ เนสเตด พอลิเมอเรส เชน รีแอคชั่น (Single-step Multiplex nested Polymerase Chain Reaction) ซึ่งประกอบด้วยไพร์เมอร์ (primers) ที่ใช้สำหรับการเตรียมยีน NS3 กับ NS5B ของเชื้อไวรัสตับอักเสบซีจำนวน 8 เส้น แล้วทำการเพิ่ม ขยายปริมาณสารพันธุกรรมด้วยโดยใช้วิธี ซิงเกิล-สเต็ป มัลติเพลกซ์ เนสเตด พอลิเมอเรส เชน รีแอคชั่น (Single-step Multiplex nested Polymerase Chain Reaction) ซึ่งสามารถเพิ่มขยายยีนหลายเป้าหมายด้วยไพรเมอร์หลายคู่พร้อมกันในปฏิกิริยาเดียวกันที่สามารถเตรียมได้ทั้งยีน NS3 กับ NS5B ของเชื้อไวรัสตับอักเสบซีโดยการทำปฏิกิริยาในหลอดเดียวกัน จึงเป็นวิธีที่ดีและเหมาะสมกว่า

ก.ค. 17

นายสุวัจชัย บุญอารี