



คำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร

- ☐ การประดิษฐ์
☐ การออกแบบผลิตภัณฑ์
☒ อนุสิทธิบัตร

ข้าพเจ้าผู้ลงลายมือชื่อในคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้
ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ตามพระราชบัญญัติสิทธิบัตร พ.ศ. 2522
แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติสิทธิบัตร (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2535
และ พระราชบัญญัติสิทธิบัตร (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2542

สำหรับเจ้าหน้าที่

วันรับคำขอ 4/06/2569
เลขที่คำขอ 2603002418
วันยื่นคำขอ

สัญลักษณ์จำแนกการประดิษฐ์ระหว่างประเทศ

ใช้กับแบบผลิตภัณฑ์

ประเภทผลิตภัณฑ์

วันประกาศโฆษณา

เลขที่ประกาศโฆษณา

วันออกสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร

เลขที่สิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร

ลายมือชื่อเจ้าหน้าที่

1. ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์/การออกแบบผลิตภัณฑ์ กรรมวิธีการแยกและทำบริสุทธิ์นาโนเวสิเคิลจากชีวมวลฝ้า (wolffia globosa) และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกรรมวิธีดังกล่าว

2. คำขอรับสิทธิบัตรการออกแบบผลิตภัณฑ์นี้เป็นคำขอสำหรับแบบผลิตภัณฑ์อย่างเดียวกันและเป็นคำขอลำดับที่
ในจำนวน คำขอ ที่ยื่นในคราวเดียวกัน

3. ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ☐ บุคคลธรรมดา ☐ นิติบุคคล ☒ หน่วยงานรัฐ ☐ มูลนิธิ ☐ อื่นๆ

ชื่อ มหาวิทยาลัยนเรศวร

ที่อยู่ เลขที่ 99 หมู่ 9 ต.ท่าโพธิ์ อ.เมือง จ.พิษณุโลก

ตำบล/แขวง

ท่าโพธิ์

อำเภอ/เขต

เมืองพิษณุโลก

จังหวัด

พิษณุโลก

รหัสไปรษณีย์ 65000

ประเทศ ไทย

อีเมล kanyaratp@nu.ac.th

☐ เลขประจำตัวประชาชน ☐ เลขทะเบียนนิติบุคคล ☒ เลขประจำตัวผู้เสียภาษีอากร

0 9 9 4 0 0 0 4 7 7 8 8 1

☐ เพิ่มเติม (ดังแนบ)

ในกรณีที่กรมาฯ สื่อสารกับท่าน ท่านสะดวกใช้ทาง ☐ อีเมลผู้ขอ ☒ อีเมลตัวแทน

3.1 สัญชาติ ไทย

3.2 โทรศัพท์ 055-968617

3.3 โทรสาร

4. สิทธิในการขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร

☐ ผู้ประดิษฐ์/ผู้ออกแบบ ☒ ผู้รับโอน ☐ ผู้ขอรับสิทธิโดยเหตุอื่น

5. ตัวแทน (ถ้ามี)

ชื่อ นางสาวกัญญารัตน์ ประทุมศิริ

ที่อยู่ กองบริการวิชาการและจัดการทรัพย์สิน มหาวิทยาลัยนเรศวร เลขที่ 99 หมู่ที่ 9 ถนนพิษณุโลก-นครสวรรค์

ตำบล/แขวง

ท่าโพธิ์

อำเภอ/เขต

เมืองพิษณุโลก

จังหวัด

พิษณุโลก

รหัสไปรษณีย์ 65000

ประเทศ ไทย

อีเมล kanyaratp@nu.ac.th

เลขประจำตัวประชาชน

3 6 5 9 9 0 0 6 4 3 7 9 7

☒ เพิ่มเติม (ดังแนบ)

5.1 ตัวแทนเลขที่ 2350

5.2 โทรศัพท์ 086-5128863

5.3 โทรสาร 055-968603

6. ผู้ประดิษฐ์/ผู้ออกแบบผลิตภัณฑ์ ☐ ชื่อและที่อยู่เดียวกันกับผู้ขอ

ชื่อ รองศาสตราจารย์อรุณญา จิระวิริยะกุล

ที่อยู่ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร เลขที่ 99 หมู่ 9

ตำบล/แขวง

ท่าโพธิ์

อำเภอ/เขต

เมืองพิษณุโลก

จังหวัด

พิษณุโลก

รหัสไปรษณีย์ 65000

ประเทศ ไทย

อีเมล

เลขประจำตัวประชาชน

3 4 0 1 6 0 0 0 2 4 4 1 7

☐ เพิ่มเติม (ดังแนบ)

7. คำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้แยกจากหรือเกี่ยวข้องกับคำขอเดิม

ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ขอให้ถือว่าได้ยื่นคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้ ในวันเดียวกับคำขอรับสิทธิบัตร

เลขที่

วันยื่น

เพราะคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้แยกจากหรือเกี่ยวข้องกับคำขอเดิมเพราะ

☐ คำขอเดิมมีการประดิษฐ์หลายอย่าง ☐ ถูกคัดค้านเนื่องจากผู้ขอไม่มีสิทธิ ☐ ขอเปลี่ยนแปลงประเภทของสิทธิ

หมายเหตุ ในกรณีที่ไมอาจระบุรายละเอียดได้ครบถ้วน ให้จัดทำเป็นเอกสารแนบท้ายแบบพิมพ์นี้โดยระบุหมายเลขกำกับข้อและหัวข้อที่แสดงรายละเอียดเพิ่มเติมดังกล่าวด้วย

สำหรับเจ้าหน้าที่

จำแนกประเภทสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร

☐ กลุ่มวิศวกรรม

สิทธิบัตรการประดิษฐ์ (วิศวกรรม)

สิทธิบัตรการประดิษฐ์ (ไฟฟ้า)

สิทธิบัตรการประดิษฐ์ (ฟิสิกส์)

☐ กลุ่มเคมี

สิทธิบัตรการประดิษฐ์ (เคมีเทคนิค)

สิทธิบัตรการประดิษฐ์ (ปิโตรเคมี)

สิทธิบัตรการประดิษฐ์ (เทคโนโลยีชีวภาพ)

สิทธิบัตรการประดิษฐ์ (เภสัชภัณฑ์)

สิทธิบัตรการออกแบบ

☐ สิทธิบัตรการออกแบบ (ออกแบบผลิตภัณฑ์ 1)

☐ สิทธิบัตรการออกแบบ (ออกแบบผลิตภัณฑ์ 2)

☐ สิทธิบัตรการออกแบบ (ออกแบบผลิตภัณฑ์ 3)

อนุสิทธิบัตร

☐ อนุสิทธิบัตร (วิศวกรรม)

☐ อนุสิทธิบัตร (เคมี)

8. การยื่นคำขออนุญาตนำเข้า ☐ PCT ☐ เพิ่มเติม (ดังแนบ)				
วันยื่นคำขอ	เลขที่คำขอ	ประเทศ	สัญลักษณ์จำแนกการประดิษฐ์ระหว่างประเทศ	สถานะคำขอ
8.1				
8.2				
8.3				
8.4 ☐ ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรขอสิทธิให้ถือว่าได้ยื่นคำขอนี้ในวันที่ได้ยื่นคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรในต่างประเทศเป็นครั้งแรกโดย ☐ ได้ยื่นเอกสารหลักฐานพร้อมคำขอนี้ ☐ ขอยื่นเอกสารหลักฐานหลังจากวันยื่นคำขอนี้				
9. การแสดงการประดิษฐ์หรือการออกแบบผลิตภัณฑ์ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรได้แสดงการประดิษฐ์ที่หน่วยงานของรัฐเป็นผู้จัด วันแสดง _____ วันเปิดงานแสดง _____ ผู้จัด _____				
10. การประดิษฐ์เกี่ยวกับจุลชีพ				
10.1 เลขทะเบียนฝากเก็บ		10.2 วันที่ฝากเก็บ		10.3 สถาบันฝากเก็บ/ประเทศ
11. ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ขอยื่นเอกสารภาษาต่างประเทศก่อนในวันยื่นคำขอนี้ และจะจัดยื่นคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้ที่จัดทำเป็นภาษาไทยภายใน 90 วัน นับจากวันยื่นคำขอนี้ โดยขอเป็นภาษา _____ ☐ อังกฤษ ☐ ฝรั่งเศส ☐ เยอรมัน ☐ ญี่ปุ่น ☐ อื่นๆ _____				
12. ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ขอให้อธิบดีประกาศโฆษณาคำขอรับสิทธิบัตร หรือรับจดทะเบียน และประกาศโฆษณาอนุสิทธิบัตรนี้ หลังจากวันที่ _____ ☐ ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรขอให้ใช้รูปเขียนหมายเลข _____ ในการประกาศโฆษณา				
13. คำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้ประกอบด้วย			14. เอกสารประกอบคำขอ	
ก. แบบพิมพ์คำขอ _____ 3 หน้า			☒ เอกสารแสดงสิทธิในการขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร	
ข. รายละเอียดการประดิษฐ์ หรือคำพรรณนาแบบผลิตภัณฑ์ _____ 4 หน้า			☐ หนังสือรับรองการแสดงการประดิษฐ์/การออกแบบผลิตภัณฑ์	
ค. ข้อถ้อยสิทธิ _____ 1 หน้า			☒ หนังสือมอบอำนาจ	
ง. รูปเขียน _____ 5 รูป _____ 3 หน้า			☐ เอกสารรายละเอียดเกี่ยวกับจุลชีพ	
จ. ภาพแสดงแบบผลิตภัณฑ์ _____ รูป _____ หน้า			☐ เอกสารการขอนับวันยื่นคำขอในต่างประเทศเป็นวันยื่นคำขอในประเทศไทย	
☐ รูปเขียน _____ รูป _____ หน้า			☐ เอกสารขอเปลี่ยนแปลงประเภทของสิทธิ	
☐ ภาพถ่าย _____ รูป _____ หน้า			☐ เอกสารอื่นๆ	
ฉ. บทสรุปการประดิษฐ์ _____ 1 หน้า				
15. ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ☒ การประดิษฐ์นี้ไม่เคยยื่นขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรมาก่อน ☐ การประดิษฐ์นี้ได้พัฒนาปรับปรุงมาจาก _____				
16. ลายมือชื่อ ☐ ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ☒ ตัวแทน (_____ นางสาวกัญญารัตน์ ประทุมศิริ _____)				

หมายเหตุ บุคคลใดยื่นขอรับสิทธิบัตรการประดิษฐ์หรือการออกแบบผลิตภัณฑ์ หรืออนุสิทธิบัตร โดยการแสดงข้อความอันเป็นเท็จแก่พนักงานเจ้าหน้าที่ เพื่อให้ได้ไปซึ่งสิทธิบัตรหรืออนุสิทธิบัตร ต้องระวางโทษจำคุกไม่เกินหกเดือน หรือปรับไม่เกินห้าพันบาท หรือทั้งจำทั้งปรับ

ใบแนบต่อท้าย สป/สผ/001-ก

5. ตัวแทน (ถ้ามี)

2. ชื่อ นางสาวศุภรัตน์ สงนรินทร์

ที่อยู่ มหาวิทยาลัยนเรศวร 99 หมู่ที่ 9 ถนนนครสวรรค์-พิษณุโลก

ต.ท่าโพธิ์ อ.เมืองพิษณุโลก จ.พิษณุโลก 65000 ประเทศไทย

อีเมล suleeratc@nu.ac.th

เลขประจำตัวประชาชน 3659900490745

ตัวแทนเลขที่ 2517 โทรศัพท์ 081-5342533 โทรสาร

รายละเอียดการประดิษฐ์ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์

กรรมวิธีการแยกและทำบริสุทธิ์นาโนเวสิเคิลจากชีวมวลฝำ (*Wolffia globosa*) และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกรรมวิธีดังกล่าว

5 สาขาวิทยาการที่เกี่ยวข้องกับการประดิษฐ์

เทคโนโลยีชีวภาพ เทคโนโลยีนาโน และวิทยาศาสตร์การแพทย์ในส่วนที่เกี่ยวข้องกับกรรมวิธีการแยกและทำบริสุทธิ์ อนุภาคนาโนจากพืช โดยเฉพาะเอกซ์ตราเซลล์ลูลาร์เวสิเคิลขนาดเล็ก (small extracellular vesicles, sEVs) จากพืช

ภูมิหลังของศิลปะหรือวิทยาการที่เกี่ยวข้อง

10 เอกซ์ตราเซลล์ลูลาร์เวสิเคิล (extracellular vesicles, EVs) เป็นอนุภาคนาโน ที่มีเยื่อหุ้มเซลล์ล้อมรอบ ซึ่งเซลล์หลั่งออกสู่สิ่งแวดล้อมนอกเซลล์ทำหน้าที่เป็นตัวกลางในการสื่อสารระหว่างเซลล์ ในพืช เอกซ์ตราเซลล์ลูลาร์เวสิเคิลสามารถถ่ายทอดสารชีวภาพที่สำคัญ ได้แก่ โปรตีน ไขมัน และกรดนิวคลีอิก (mRNA, microRNA, small interfering RNA) ระหว่างเซลล์และสิ่งมีชีวิต ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการพัฒนาการตอบสนองต่อความเครียด และการป้องกันเชื้อโรค

15 ฝำ หรือ *Wolffia globosa* (วงศ์ Lemnaceae อันดับ Alismatales) เป็นพืชดอกที่เล็กที่สุดในโลก มีขนาดลำต้นเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5–1.5 มิลลิเมตร ฝำมีข้อได้เปรียบหลายประการในฐานะแหล่งของ เอกซ์ตราเซลล์ลูลาร์เวสิเคิล ได้แก่ อัตราการเจริญเติบโตที่รวดเร็วอย่างยิ่ง (ระยะเวลาเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า 24–48 ชั่วโมง) มีฐานวิทยาศาสตร์ที่เรียบง่าย มีคุณค่าทางโภชนาการสูง และการเพาะเลี้ยงในสภาพแวดล้อม ทางน้ำ ช่วยลดการปนเปื้อนจากดิน

20 ลักษณะและความมุ่งหมายของการประดิษฐ์

การประดิษฐ์นี้เกี่ยวข้องกับกรรมวิธีการแยกและทำบริสุทธิ์เอกซ์ตราเซลล์ลูลาร์เวสิเคิลขนาดเล็ก (sEVs) จากพืชฝำ (*Wolffia globosa*) โดยใช้เทคนิคการปั่นเหวี่ยงแบบแยกลำดับรวมกับการทำบริสุทธิ์ด้วยชั้นความหนาแน่นของซูโครส ประกอบด้วยขั้นตอนหลัก ได้แก่ การเตรียมชีวมวลฝำสด การบดพืชทั้งต้นอย่างนุ่มนวล การกรองหยาบ การปั่นเหวี่ยงความเร็วต่ำที่ 2,000 x g และ 10,000 x g การกรองผ่านเมมเบรนขนาดรูพรุน 0.22 ไมครอนเมตร การปั่นเหวี่ยงเพื่อลดคลอโรฟิลล์ การปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องอัลตราเซนทริฟุจที่ 120,000 x g และการทำบริสุทธิ์ด้วยชั้นความหนาแน่นซูโครส (8%, 15%, 30%, 45%, 60% น้ำหนักต่อปริมาตร)

วัตถุประสงค์การประดิษฐ์เพื่อพัฒนากรรมวิธีการแยกและทำบริสุทธิ์เอกซ์ตราเซลล์ลูลาร์เวสิเคิลขนาดเล็ก (sEVs) จากพืชฝำ (*Wolffia globosa*) ที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้หลายด้าน ดังนี้

- 30 1. ด้านชีวการแพทย์และเภสัชกรรมเอกซ์ตราเซลล์ลูลาร์เวสิเคิลจากฝำมีศักยภาพในการเป็นระบบนำส่งยา (drug delivery system) เนื่องจากมีขนาดนาโน มีเยื่อหุ้มไขมันที่เข้ากันได้ทางชีวภาพ มีความเป็นภูมิคุ้มกันต่ำ และสามารถข้ามผ่านอุปสรรคทางชีวภาพได้
2. ด้านเครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์ดูแลผิว สามารถใช้เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง เนื่องจากมีขนาดนาโนที่สามารถซึมผ่านผิวหนังได้ และสามารถบรรจุสารสำคัญที่ช่วยบำรุงผิว
- 35 3. ด้านอาหารเสริมสุขภาพ เนื่องจากฝำเป็นพืชอาหารที่บริโภคได้และมีคุณค่าทางโภชนาการสูง จึงมีศักยภาพในการพัฒนาเป็นอาหารเชิงหน้าที่ (functional food) หรืออาหารเสริมสุขภาพ

4. ด้านเทคโนโลยีชีวภาพและการวิจัย สามารถใช้เป็นเครื่องมือวิจัยสำหรับการศึกษาด้านโปรตีนโอมิกส์ ลิปีโดมิกส์ อาร์เอ็นเอโปรไฟล์ และเมตาโบลอมิกส์
5. ด้านเกษตรกรรม ส่งเสริมการเพาะเลี้ยงผ้าในเชิงพาณิชย์สร้างมูลค่าเพิ่มให้กับผ้าซึ่งเป็นพืชท้องถิ่นของไทย

5 การเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

กรรมวิธีการแยกและทำบริสุทธิ์นาโนเวสิเคิลจากชีวมวลผ้า (*wolffia globosa*) มีขั้นตอนดังนี้

ก. เตรียมชีวมวลผ้าสดโดยการล้างทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่นหรือน้ำปราศจากไอออน

ข. นำผ้าที่ผ่านการล้างแล้ว บดทั้งต้นในน้ำเย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในอัตราส่วนน้ำหนักผ้าต่อปริมาณน้ำตั้งแต่ 1:1 ถึง 1:5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยใช้เครื่องบดแบบพัลส์สั้น 3-5 วินาทีต่อครั้ง จำนวน 3-4 ครั้ง ที่ความเร็วต่ำถึงปานกลาง จนได้สารละลายเนื้อเดียวกัน

ค. กรองหยาบด้วยผ้ากรองหรือผ้าก๊อชปลอดเชื้อจำนวน 4 ชั้น

ง. ปั่นเหวี่ยงครั้งที่ 1 ที่แรงเหวี่ยง $2,000 \times g$ เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนใส

จ. ปั่นเหวี่ยงส่วนใสที่ได้จากขั้นตอน ง. ที่แรงเหวี่ยง $10,000 \times g$ เป็นเวลา 30 - 60 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จำนวน 1 - 2 ครั้ง แล้วเก็บส่วนใส

ฉ. กรองผ่านเมมเบรนปลอดเชื้อขนาดรูพรุน 0.22 ไมโครเมตร ชนิดที่มีการดูดซับโปรตีนต่ำ

ช. ปั่นเหวี่ยงส่วนกรองที่ได้จากขั้นตอน ฉ. ด้วยเครื่องอัลตราเซนทริฟิวจ์ที่แรงเหวี่ยง $120,000 \times g$ เป็นเวลา 90 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยใช้โรเตอร์แบบถังแกว่ง (swinging-bucket rotor) เพื่อรวบรวมตะกอนเอกซ์ตราเซลล์ลูลาร์เวสิเคิลหยาบ (crude sEVs) ในการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องอัลตราเซนทริฟิวจ์อาจกำหนดให้มีการเร่งความเร็วแบบช้า (slow acceleration) และการลดความเร็วแบบช้า (slow deceleration) หรือไม่ใช้เบรก เพื่อลดการเกาะกลุ่มและรักษาความสมบูรณ์ของเอกซ์ตราเซลล์ลูลาร์เวสิเคิล

ซ. ละลายตะกอนเอกซ์ตราเซลล์ลูลาร์เวสิเคิลหยาบในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ชาไลน์ (PBS) ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร แล้วเติมลงบนชั้นความหนาแน่นซูโครสแบบไม่ต่อเนื่อง (discontinuous sucrose gradient) ที่ประกอบด้วยชั้นซูโครสความเข้มข้น 60%, 45%, 30%, 15% และ 8% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ชาไลน์ (PBS)

ณ. ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องอัลตราเซนทริฟิวจ์ที่แรงเหวี่ยง $120,000 \times g$ เป็นเวลา 60 นาที - 16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยใช้โรเตอร์แบบถังแกว่ง ในการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องอัลตราเซนทริฟิวจ์อาจกำหนดให้มีการเร่งความเร็วแบบช้า (slow acceleration) และการลดความเร็วแบบช้า (slow deceleration) หรือไม่ใช้เบรก เพื่อลดการเกาะกลุ่มและรักษาความสมบูรณ์ของเอกซ์ตราเซลล์ลูลาร์เวสิเคิล

ด. เก็บแยกส่วน (fractions) บริเวณรอยต่อระหว่างชั้นซูโครสความเข้มข้น 8-15% และ 15-30% ซึ่งเป็นบริเวณที่มีเอกซ์ตราเซลล์ลูลาร์เวสิเคิลขนาดเล็กสะสมอยู่ โดยในกรณีที่ต้องการนำตัวอย่างไปวิเคราะห์โปรตีน อาจเติมสารยับยั้งโปรตีเอส (protease inhibitor cocktail) ลงในส่วนที่เก็บได้เพื่อป้องกันการสลายตัวของโปรตีน

ฉ. ล้างเอกซ์ตราเซลล์ลูลาร์เวสิเคิลที่ได้จากขั้นตอน ด. ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ชาไลน์ (PBS) แล้วปั่นเหวี่ยงที่ $120,000 \times g$ เป็นเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อกำจัดซูโครสที่เหลืออยู่

คุณสมบัติของเอกซ์ตราเซลล์เวสิเคิลขนาดเล็กที่ได้

ตาราง 2 คุณสมบัติของ sEVs ที่ทำบริสุทธิ์ด้วยชั้นความหนาแน่นซูโครสจากผ้า

คุณสมบัติ	ค่าที่วัดได้	หน่วย
ขนาดอนุภาคเฉลี่ย (mean diameter)	114.5 ± 2.8	นาโนเมตร
ขนาดอนุภาคนิยม (modal size)	98.6	นาโนเมตร
ความเข้มข้นอนุภาค	$4.97 \times 10^{10} \pm 2.25 \times 10^9$	อนุภาค/มิลลิลิตร
อัตราส่วนอนุภาคต่อโปรตีน	7.61×10^9	อนุภาค/ไมโครกรัมโปรตีน
ผลผลิตเฉลี่ย	2.04×10^9	อนุภาค/กรัมน้ำหนักสด
ความเข้มข้นโปรตีน	12.33	ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
สัมประสิทธิ์การแปรผัน (CV) ของ NTA	8.4	%
ช่วงความหนาแน่นลอยตัว	1.08–1.15	กรัม/มิลลิลิตร

ตัวอย่างการทดลอง

ตัวอย่างที่ 1: การแยกและทำบริสุทธิ์ sEVs จากผ้า

5 นำผ้าสดน้ำหนัก 50–100 กรัม ล้างทำความสะอาด แล้วบดในน้ำเย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสในอัตราส่วน 1:1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) จากนั้นกรองหยาบผ่านผ้าก๊อซปลอดเชื้อจำนวน 4 ชั้น และปั่นเหวี่ยงที่ $2,000 \times g$ เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นปั่นที่ $10,000 \times g$ เป็นเวลา 30–60 นาที จำนวน 1–2 ครั้ง แล้วกรองผ่านเมมเบรน 0.22 ไมโครเมตร ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องอัลตราเซนทริฟิวจ์ที่ $120,000 \times g$ เป็นเวลา 90 นาที ละลายตะกอนใน PBS 2.0 มิลลิลิตร เติมน้ำซูโครส (60%, 45%, 30%, 15%, 10
8%) ปั่นเหวี่ยงที่ $120,000 \times g$ เป็นเวลา 60 นาที เก็บส่วนรอยต่อระหว่างชั้นซูโครสความเข้มข้น 8–15% และ 15–30% ล้างด้วย PBS เจือจาง 1:5 แล้วปั่นเหวี่ยงที่ $120,000 \times g$ เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นละลายตะกอนสุดท้ายใน PBS 50–100 ไมโครลิตร

ผลการวิเคราะห์ด้วย NTA พบว่าเอกซ์ตราเซลล์เวสิเคิลขนาดเล็ก (sEVs) หยาดมีขนาดเฉลี่ย 180.8 นาโนเมตร มีการกระจายขนาดกว้าง ส่วน sEVs ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยชั้นความหนาแน่นซูโครสมี
15 ขนาดเฉลี่ย 105.3 นาโนเมตรมีการกระจายขนาดแคบ และมีความสม่ำเสมอสูงขึ้น

ตัวอย่างที่ 2: การตรวจสอบคุณภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (TEM)

นำ sEVs ที่ทำบริสุทธิ์แล้วมาตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่งผ่าน พบเวสิเคิลที่มีเยื่อหุ้มสมบูรณ์ รูปร่างทรงกลมถึงรูปกล้วย ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 50–200 นาโนเมตร และมีพื้นหลังสะอาด
ยืนยันว่ากรรมวิธีดังกล่าวสามารถกำจัดสารปนเปื้อนที่ไม่ใช่เวสิเคิลได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังแสดงในรูปที่ 2–5

20 ตัวอย่างที่ 3: การวิเคราะห์ปริมาณผลผลิตและความบริสุทธิ์

จากการทดลองแยก 2 ครั้ง ครั้งที่ 1 ให้ผลผลิต 6.51×10^8 อนุภาคต่อกรัมน้ำหนักสด และครั้งที่ 2 ให้ผลผลิต 3.43×10^9 อนุภาคต่อกรัมน้ำหนักสด คิดเป็นผลผลิตเฉลี่ย 2.04×10^9 อนุภาคต่อกรัม ค่าความบริสุทธิ์วัดจากอัตราส่วนอนุภาคต่อโปรตีน ได้ 7.61×10^9 อนุภาคต่อไมโครกรัมโปรตีน

คำอธิบายรูปเขียนโดยย่อ

รูปที่ 1 แสดงกราฟผลการวิเคราะห์ NTA ของ sEVs ที่ทำบริสุทธิ์ด้วยชั้นความหนาแน่นซูโครส โดยที่ (ก) กราฟความเข้มข้น/ขนาดจากการวิเคราะห์การติดตามอนุภาค และ (ข) กราฟความเข้มข้น/ขนาดเฉลี่ยจากการวิเคราะห์การติดตามอนุภาคด้วยการเรืองแสง

- 5 รูปที่ 2 แสดงภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่งผ่าน (TEM) กำลังขยาย $\times 10,000$ แสดงภาพรวมประชากร sEVs จากผ้าที่กระจายตัวบนตะแกรง TEM อนุภาคมีขนาดในช่วง 50–200 นาโนเมตร พื้นหลังสะอาด ไม่พบสารปนเปื้อนขนาดใหญ่ (แถบสเกล = 500 นาโนเมตร)

- 10 รูปที่ 3 แสดงภาพถ่าย TEM กำลังขยาย $\times 20,000$ แสดง sEVs ที่มีโครงสร้างเยื่อหุ้มชัดเจน ประกอบด้วยอนุภาครูปทรงกลม (spherical) และรูปถ้วย (cup-shaped) ที่มี lipid bilayer สมบูรณ์ ลักษณะรูปถ้วยเป็นสัณฐานวิทยาเฉพาะของ exosomes ภายใต้อุปกรณ์ TEM (แถบสเกล = 200 นาโนเมตร)

รูปที่ 4 แสดงภาพถ่าย TEM กำลังขยาย $\times 50,000$ แสดง sEV เดี่ยวที่มีสัณฐานวิทยารูปถ้วยชัดเจน (cup-shaped morphology) โครงสร้าง lipid bilayer สองชั้นมองเห็นได้ชัดเจนรอบเวสิเคิล เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 100–120 นาโนเมตร (แถบสเกล = 100 นาโนเมตร)

- 15 รูปที่ 5 แสดงภาพถ่าย TEM กำลังขยาย $\times 50,000$ แสดงกลุ่ม sEVs หลายอนุภาคที่มีสัณฐานวิทยาสม่ำเสมอ รูปร่างทรงกลมถึงรูปถ้วย (round to cup-shaped morphology) เยื่อหุ้มสมบูรณ์ พื้นหลังสะอาด ยืนยันความบริสุทธิ์สูงของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกรรมวิธีนี้ (แถบสเกล = 100 นาโนเมตร)

วิธีการในการประดิษฐ์ที่ดีที่สุด

เหมือนกับที่กล่าวไว้แล้วในหัวข้อการเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

ข้อถ้อยสัญญา

1. กรรมวิธีการแยกและทำบริสุทธิ์นาโนเวสิเคิลจากชีวมวลผ้า (*Wolffia globosa*) มีขั้นตอนดังนี้

ก. เตรียมชีวมวลผ้าสดโดยการล้างทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่นหรือน้ำปราศจากไอออน

ข. นำผ้าที่ผ่านการล้างแล้ว บดทั้งต้นในน้ำเย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในอัตราส่วนน้ำหนักผ้าต่อปริมาตรน้ำตั้งแต่ 1:1 ถึง 1:5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยใช้เครื่องบดแบบพัลส์สั้น 3-5 วินาทีต่อครั้ง

ค. กรองหยาบด้วยผ้ากรองหรือผ้าก๊อชปลอดเชื้อจำนวน 4 ชั้น

ง. ปั่นเหวี่ยงครั้งที่ 1 ที่แรงเหวี่ยง 2,000 x g เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนใส

จ. ปั่นเหวี่ยงส่วนใสที่ได้จากขั้นตอน ง. ที่แรงเหวี่ยง 10,000 x g เป็นเวลา 30 - 60 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จำนวน 1 - 2 ครั้ง แล้วเก็บส่วนใส

ฉ. กรองผ่านเมมเบรนปลอดเชื้อขนาดรูพรุน 0.22 ไมโครเมตร ชนิดที่มีการดูดซับโปรตีนต่ำ

ช. ปั่นเหวี่ยงส่วนกรองที่ได้จากขั้นตอน ฉ. ด้วยเครื่องอัลตราเซนทริฟิวจ์ที่แรงเหวี่ยง 120,000 x g เป็นเวลา 90 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยใช้โรเตอร์แบบถังแกว่ง (swinging-bucket rotor) เพื่อรวบรวมตะกอนเอกซ์ตราเซลล์ลูลาร์เวสิเคิลหยาบ (crude sEVs)

ซ. ละลายตะกอนเอกซ์ตราเซลล์ลูลาร์เวสิเคิลหยาบในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ชาโลน (PBS) ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร แล้วเติมลงบนชั้นความหนาแน่นซูโครสแบบไม่ต่อเนื่อง (discontinuous sucrose gradient) ที่ประกอบด้วยชั้นซูโครสความเข้มข้น 60%, 45%, 30%, 15% และ 8% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ชาโลน (PBS)

ด. ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องอัลตราเซนทริฟิวจ์ที่แรงเหวี่ยง 120,000 x g เป็นเวลา 60 นาที - 16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยใช้โรเตอร์แบบถังแกว่ง

ณ. เก็บแยกส่วน (fractions) บริเวณรอยต่อระหว่างชั้นซูโครสความเข้มข้น 8-15% และ 15-30% ซึ่งเป็นบริเวณที่มีเอกซ์ตราเซลล์ลูลาร์เวสิเคิลขนาดเล็กสะสมอยู่

ญ. ล้างเอกซ์ตราเซลล์ลูลาร์เวสิเคิลที่ได้จากขั้นตอน ณ. ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ชาโลน (PBS) แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 120,000 x g เป็นเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อกำจัดซูโครสที่เหลืออยู่

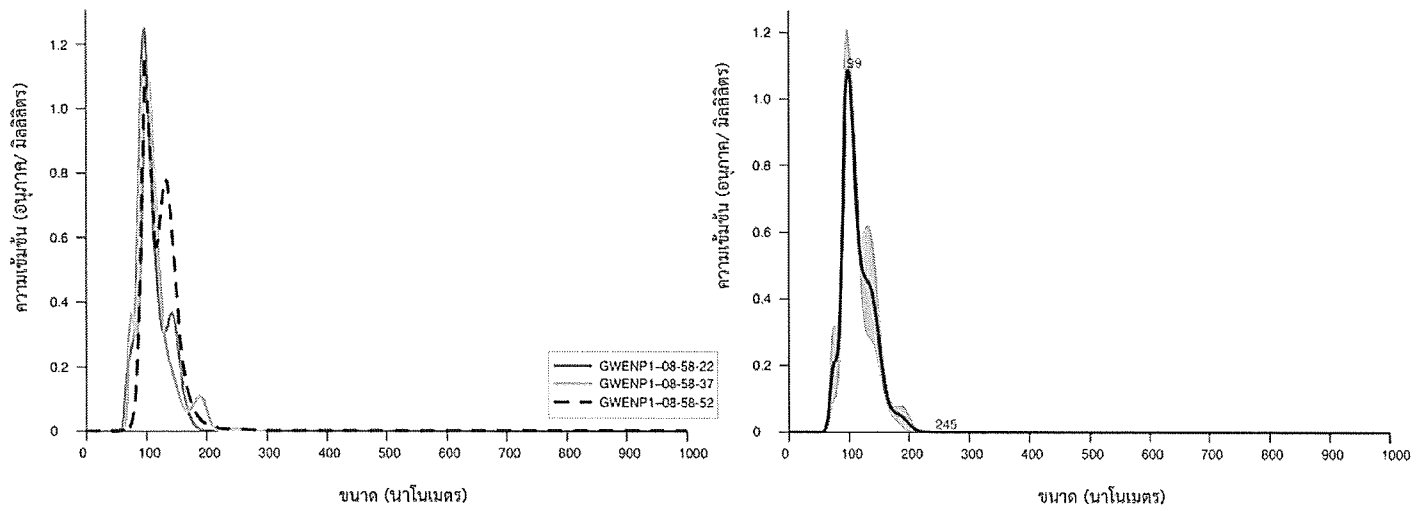
2. กรรมวิธีตามข้อถ้อยสัญญาที่ 1 ที่ซึ่ง ชีวมวลผ้าสดในขั้นตอน ก. มีน้ำหนักตั้งแต่ 50 - 500 กรัม

3. กรรมวิธีตามข้อถ้อยสัญญาที่ 1 ที่ซึ่ง ในขั้นตอน ข. อัตราส่วนน้ำหนักผ้าต่อปริมาตรน้ำที่เหมาะสมคือ 1:1 (น้ำหนักต่อปริมาตร)

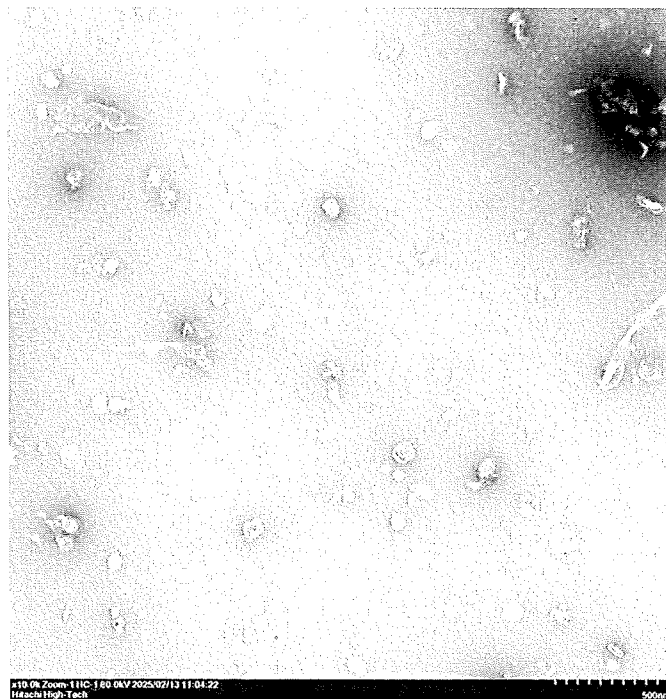
4. กรรมวิธีตามข้อถ้อยสัญญาที่ 1 ที่ซึ่ง ในขั้นตอน ช. และ ฉ. ใช้การเร่งความเร็วแบบช้า (slow acceleration) และการลดความเร็วแบบช้า (slow deceleration) หรือไม่ใช้เบรกเพื่อลดการเกาะกลุ่มของเอกซ์ตราเซลล์ลูลาร์เวสิเคิล

5. กรรมวิธีตามข้อถ้อยสัญญาที่ 1 ที่ซึ่ง มีการเติมสารยับยั้งโปรตีเอส (protease inhibitor cocktail) ลงในส่วนที่เก็บได้จากชั้นความหนาแน่นซูโครสในขั้นตอน ณ. ก่อนนำไปวิเคราะห์โปรตีน

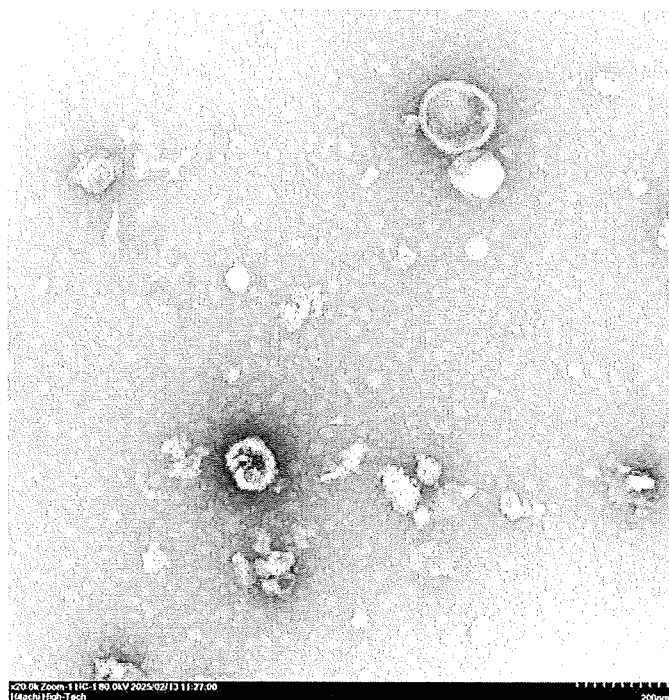
6. ผลิตภัณฑ์เอกซ์ตราเซลล์ลูลาร์เวสิเคิลขนาดเล็กจากผ้าที่เตรียมได้จากกรรมวิธีตามข้อถ้อยสัญญาที่ 1 ถึง 5 ข้อใดข้อหนึ่งที่ซึ่ง มีขนาดอนุภาค 100 -130 นาโนเมตร มีความเข้มข้นระดับ 10^9 อนุภาคต่อมิลลิลิตร และมีโครงสร้างเยื่อหุ้มเวสิเคิลทรงกลมหรือรูปถ้วย



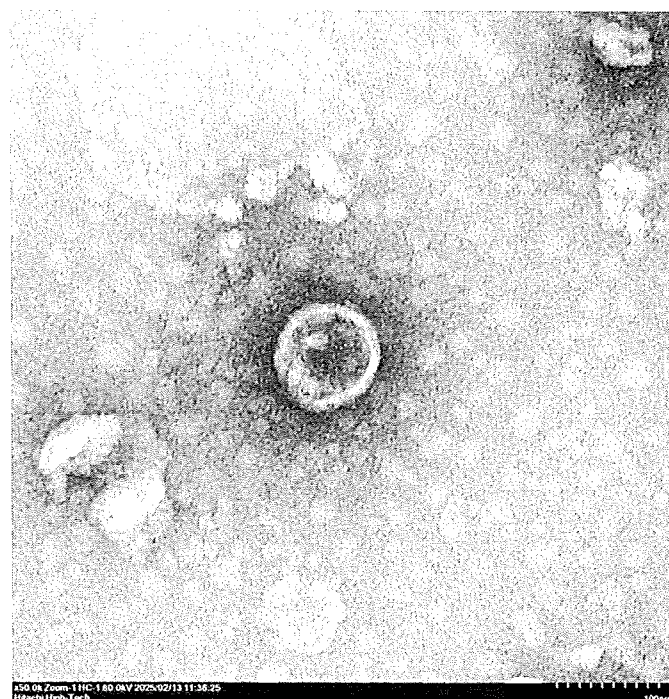
รูปที่ 1



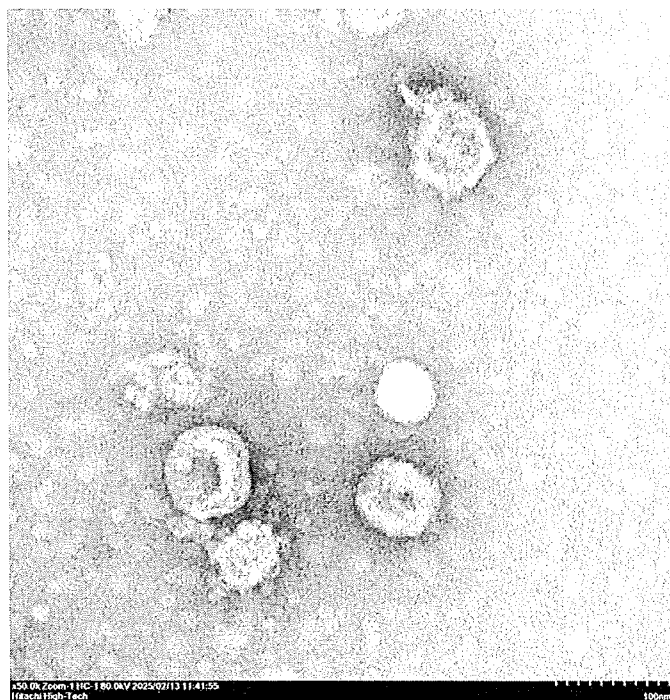
รูปที่ 2



รูปที่ 3



รูปที่ 4



รูปที่ 5

บทสรุปการประดิษฐ์

- 5 กรรมวิธีการแยกและทำบริสุทธิ์นาโนเวสิเคิลจากชีวมวลผ้า (*Wolffia globosa*) โดยใช้เทคนิคการปั่นเหวี่ยงแบบแยกลำดับ (differential ultracentrifugation) ร่วมกับการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นความหนาแน่นของซูโครส (sucrose density gradient ultracentrifugation) ประกอบด้วย การบดพืชผ้าทั้งต้นในน้ำเย็น การกรองหยาบ การปั่นเหวี่ยงความเร็วต่ำ การกรองปลอดเชื้อ การปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง และการทำบริสุทธิ์ด้วยชั้นความหนาแน่นซูโครส เพื่อให้ได้อนุภาคเวสิเคิลขนาดเล็กที่มีขนาดอนุภาค 100 -130 นาโนเมตร มีความเข้มข้นระดับ 10^9 อนุภาคต่อมิลลิลิตร และมีโครงสร้างเยื่อหุ้มเวสิเคิลทรงกลมหรือรูปถ้วยมีความบริสุทธิ์สูง และเหมาะสมสำหรับการนำไปประยุกต์ ใช้ทางชีวการแพทย์ เทคโนโลยีชีวภาพ และอุตสาหกรรมอาหารเสริมสุขภาพ