

รายละเอียดการประดิษฐ์

ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์

กรรมวิธีการเตรียมสารประกอบอนุภาคที่สามารถจับกับเชื้อก่อโรคพิษได้อย่างจำเพาะสำหรับการแยกและตรวจวัดเชื้อก่อโรคพิษเชิงกึ่งปริมาณได้ด้วยตาเปล่า

5 สาขาวิทยาการที่เกี่ยวข้องกับการประดิษฐ์

สาขาเคมี และวิทยาศาสตร์ชีวการแพทย์ที่เกี่ยวข้องกับกรรมวิธีการผลิตสารประกอบอนุภาคที่สามารถจับกับเชื้อก่อโรคพิษได้อย่างจำเพาะสำหรับการแยกและตรวจวัดเชื้อก่อโรคพิษเชิงกึ่งปริมาณได้ด้วยตาเปล่า

ภูมิหลังของศิลปะหรือวิทยาการที่เกี่ยวข้อง

- โรคพิษสุนัขบ้าเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทย ดังจะเห็นได้จากรายงานผลการสำรวจทันตสาธารณสุขแห่งชาติครั้งที่ 7 พ.ศ. 2555 ที่ความชุกของโรคในกลุ่มเด็กก่อนวัยเรียนอายุ 3 และ 5 ปี และในกลุ่มเด็กวัยเรียน และเยาวชนอายุ 12 และ 15 ปีมีมากขึ้นกว่าครึ่งหนึ่งของประชากรที่ถูกสำรวจ ความชุกของโรคพิษสุนัขบ้าในประเทศไทยอยู่ในระดับนี้มาตลอดระยะเวลาเกือบ 10 กว่าปีที่ผ่านมา สาเหตุหนึ่งอาจจะมาจากการให้การรักษา และป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าในคนใช้ทุกคนในระดับเดียวกัน ทั้ง ๆ ที่ความเสี่ยงของการเกิดโรคพิษสุนัขบ้าเป็นเรื่องของแต่ละบุคคล ทำให้กลุ่มที่มีความเสี่ยงสูงได้รับการรักษา และป้องกันไม่เพียงพอที่จะทำให้หยุดการเกิดโรคขึ้นได้
- 10 ประเมินความเสี่ยงในการเกิดโรคพิษสุนัขบ้า เป็นกระบวนการประเมินว่าบุคคลนี้มีความเสี่ยงที่จะเกิดพิษอยู่ในระดับไหน ซึ่งค่าที่ประเมินได้นั้นจะช่วยให้ทันตแพทย์เลือกวิธีการรักษา และป้องกันได้อย่างเหมาะสม ความเสี่ยงของการเกิดโรคพิษสุนัขบ้าประเมินโดยอาศัยหลายปัจจัยด้วยกัน เช่น พฤติกรรมการทานอาหาร การดูแลสุขภาพช่องปาก
- 15 คุณลักษณะของน้ำลาย และปริมาณเชื้อก่อโรคพิษสุนัขบ้า เป็นต้น ปัจจัยที่นำมาประเมินนี้ส่วนใหญ่สามารถทำได้ทันทีข้างเก้าอี้ทำฟัน ยกเว้นการหาปริมาณเชื้อ ถึงแม้จะมีชุดตรวจเชื้อสำเร็จรูปออกมาจำหน่ายทำให้สะดวกมากขึ้น แต่ก็ยังต้องอาศัยเวลาในการอบเลี้ยงเชื้อ และต้องการอุปกรณ์ที่มีขนาดใหญ่เกินพกพา และมีราคาแพง ทำให้ไม่สะดวกที่จะนำมาใช้ในงานระดับชุมชน
- 20

- มีเอกสารการยื่นขอสิทธิบัตรแสดงเครื่องมือตรวจเชื้อแบคทีเรียอย่างรวดเร็ว (rapid bacterial detection tool) โดยอาศัยหลักการอิมมูโนโครมาโทกราฟี และทองคอลลอยด์ (colloidal gold-based immunochromatography) โดยในชุดตรวจนี้ใช้แอนติบอดีที่จำเพาะกับเชื้อสเตปโตคอคคัส มีวแทนส์เป็น
- 25 เครื่องมือในการจับเชื้อ (probe) นำไปติดกับทองคอลลอยด์ (colloidal gold) ทำให้เห็นสีได้ด้วยตาเปล่า (เอกสารการยื่นขอสิทธิบัตรประเทศสหรัฐอเมริกาเลขที่ US 20080240993 A1) มีรายงานการวิจัยถึงประสิทธิภาพของ

เครื่องมือนี้มีความไวในการตรวจหาเชื้อ (sensitivity) อยู่ที่ร้อยละ 97.6 แต่มีความจำเพาะ (specificity) เพียงร้อยละ 90.6 เท่านั้นเมื่อเทียบกับการตรวจด้วยวิธีเรียลไทม์ พีซีอาร์ (real-time PCR) ซึ่งผู้วิจัยใช้เป็นวิธียืนยันจำนวนเชื้อ (Int J Paediatr Dent., Vol 22, p 363-368, 2012) ด้วยเหตุนี้ทำให้เกิดแนวคิดที่จะพัฒนาวิธีการตรวจที่มีความไว และความจำเพาะกับเชื้อมีวแทนส์ สเตรปโตคอคไค ที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น และยังคงเห็นผลได้ด้วยตาเปล่า

เอนไซม์เปปติโดไกลแคน ไฮโดรเลส (peptidoglycan hydrolase) เป็นเอนไซม์ที่พบได้ในแบคทีเรียเกือบทุกชนิด มีหน้าที่ในการย่อยสลายเปปติโดไกลแคนซึ่งเป็นโครงสร้างที่พบได้ในผนังเซลล์ของแบคทีเรียทั่วไป โดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก (Gram positive bacteria) แต่เป็นโครงสร้างที่ไม่พบในเซลล์ของมนุษย์ เอนไซม์นี้มีบทบาทสำคัญต่อการแบ่งตัว และแยกตัวของเซลล์แบคทีเรีย จากรายงานสิทธิบัตร และจากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าเชื้อสเตรปโตคอคคัส มีวแทนส์ (*Streptococcus mutans*) ผลิตเอนไซม์เปปติโดไกลแคน ไฮโดรเลสซึ่งถูกตั้งชื่อว่า ออโตมิวตาโนไลซิน (automutanolysin) หรือเอเอ็มแอล (Aml) ที่มีความจำเพาะในการย่อยสลายเชื้อสเตรปโตคอคคัส มีวแทนส์ (*Streptococcus mutans*) และสเตรปโตคอคคัส ซอบรีนัส (*Streptococcus sobrinus*) ซึ่งอยู่ในกลุ่มเชื้อมีวแทนส์ สเตรปโตคอคไค (mutans streptococci) อันเป็นเชื้อกลุ่มสำคัญกลุ่มหนึ่งต่อการเกิดโรคฟันผุ และเป็นตัวชี้วัดหนึ่งที่ใช้ในการประเมินความเสี่ยงในการเกิดโรคฟันผุ โครงสร้างของเอนไซม์นี้ประกอบขึ้นด้วยกรดอะมิโน 979 ตัว มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 104 กิโลดาลตัน และมีสองโดเมนหลักได้แก่ คาตาไลติกโดเมนอยู่ทางฝั่งปลายด้านหมู่คาร์บอกซิล (C-terminal catalytic domain) ซึ่งมีบทบาทในการย่อยสลายผนังเซลล์ และอีกโดเมนอยู่ฝั่งปลายด้านหมู่อะมิโนทำหน้าที่ในการจับกับผนังเซลล์ (cell wall binding domain) ซึ่งมีความจำเพาะกับเชื้อมีวแทนส์ สเตรปโตคอคไค (Microbiol Immunol., Vol 50, p 729-42, 2006 และสิทธิบัตรประเทศสหรัฐอเมริกาเลขที่ US 7,776,325 B2 และ US 8,852,584 B2) ด้วยความจำเพาะนี้หากทำการตัดต่อยีนโดยเอาส่วนคาตาไลติกโดเมนที่ใช้ในการย่อยสลายเปปติโดไกลแคนออกไป ก็จะสามารถใช้เอนไซม์ดังกล่าวนี้ในการจับกับผนังเซลล์ของเชื้อมีวแทนส์ สเตรปโตคอคไค (probe) เพื่อใช้ในการตรวจวัดปริมาณของเชื้อได้

ในการตรวจวัดปริมาณของเชื้อแบคทีเรียได้มีการพัฒนากรรมวิธีการผลิตของอนุภาคแม่เหล็กนาโนที่สามารถตรวจวัดปริมาณของเชื้อมีวแทนส์ สเตรปโตคอคไคที่สามารถเห็นผลได้ด้วยตาเปล่า ซึ่งทำได้โดยการยัดติดโดเมนจับกับผนังเซลล์ของเอนไซม์เอเอ็มแอลกับอนุภาคแม่เหล็กนาโน (magnetic nanoparticles, MNPs) ที่มีขนาดตั้งแต่ 5 ถึง 500 นาโนเมตร กลายเป็นสารประกอบอนุภาคที่มีความจำเพาะกับเชื้อมีวแทนส์ สเตรปโตคอคไค โดยทั่วไปอนุภาคแม่เหล็กนาโนที่นิยมใช้มักเป็นแบบแมกเนไทต์ (Fe_3O_4) หรือแมกนีไมต์ ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) มีสมบัติที่สามารถตอบสนองต่อสนามแม่เหล็กภายนอกได้อย่างรวดเร็ว ด้วยสมบัติดังกล่าวจึงทำให้อนุภาคแม่เหล็กนาโนสามารถนำมาใช้ในการแยกเชื้อแบคทีเรียโดยการควบคุมผ่านสนามแม่เหล็กภายนอก เชื้อแบคทีเรียที่แยกมาได้จึง

มีความบริสุทธิ์ และง่ายต่อการตรวจวัดยิ่งขึ้น และเมื่อนำไปกรองแบบเลือกผ่าน (selective filtration) สารประกอบอนุภาคที่จับกับเชื้อแบคทีเรียจะติดอยู่บนแผ่นเมมเบรนไม่สามารถผ่านรูพรุนของแผ่นเมมเบรนมาได้ โดยปริมาณของสารประกอบอนุภาคที่จับกับเชื้อแบคทีเรียจะแปรผันตรงกับความเข้มข้นของสียบนแผ่นเมมเบรน จึงสามารถวิเคราะห์หาเชื้อแบคทีเรียเชิงกึ่งปริมาณได้ด้วยตาเปล่า (semi-quantitative analysis)

- 5 มีสิทธิบัตรรายงานการผลิตอนุภาคแม่เหล็กนาโนตรึงแอนติบอดีมาใช้ในการจับกับเชื้อแบคทีเรีย โดยจากรายงานพบว่าจากกรรมวิธีการผลิตอนุภาคแม่เหล็กนาโนตรึงแอนติบอดีนี้ อนุภาคสามารถจับกับเชื้อแบคทีเรียได้ตามสิทธิบัตรประเทศสหรัฐอเมริกาเลขที่ 8,883,455 และเลขที่ 9,201,066 แต่ยังไม่มีการวิจัยใดที่คิดค้นเกี่ยวกับกรรมวิธีการผลิตอนุภาคแม่เหล็กนาโนที่สามารถตรวจวัดปริมาณเชื้อมีวแทนส์ สเตรปโตคอคโค โดยใช้อนุภาคแม่เหล็กนาโนติดกับโคมินที่จับกับผนังเซลล์ของเอนไซม์เอเอ็มแอล ซึ่งผลของการตรวจวัดปริมาณเชื้อนี้สามารถใช้ประกอบประเมินความเสี่ยงการเกิดโรคฟันผุได้

- มีงานวิจัยที่รายงานการตรวจวัดปริมาณของเชื้อซาลโมเนลลา ไทฟิมูเรียม (*Salmonella typhimurium*) โดยมีกรรมวิธีการผลิตของอนุภาคแม่เหล็กนาโนตรึงด้วยแอนติบอดีที่มีความจำเพาะเจาะจงกับเชื้อ ผ่านการสร้างพันธะระหว่างหมู่คาร์บอกซิลบนพื้นผิวของอนุภาคนาโนแม่เหล็ก และหมู่เอมีนของแอนติบอดี โดยใช้ 1-เอทิล-3-(3-ไดเมทิลลามีนโพรพิล) คาร์โบไดอิมิดไฮโดรคลอไรด์ (1-ethyl-3-(3-dimethylaminepropyl) carbodiimide hydrochloride; EDC) เป็นรีเอเจนต์คู่ควบ อย่างไรก็ตามงานวิจัยดังกล่าวยังประสบปัญหาการตรวจวัดเนื่องจากความเข้มข้นต่ำที่สุดของแบคทีเรียที่สามารถตรวจวัดได้ยังมีค่าสูง ดังนั้นจึงควรมีกรรมวิธีการตรึงพอลิเมอร์ลงบนพื้นผิวของอนุภาคเพื่อให้ได้อนุภาคแม่เหล็กนาโนที่สามารถตรวจวัดเชื้อในปริมาณต่ำได้และสามารถตรวจวัดเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Anal. Chem., Vol 406, p 406-866, 2014)

- 20 นอกจากนี้ยังมีรายงานการนำเอาพอลิเมอร์มาตรึงบนพื้นผิวของอนุภาคแม่เหล็กนาโน เพื่อช่วยทำให้อนุภาคมีความเสถียรมากขึ้น ไม่เกิดการเกาะกลุ่มของอนุภาคและสามารถกระจายตัวอยู่ในสารละลายได้ดียิ่งขึ้น มีงานวิจัยที่เปรียบเทียบสมบัติการกระจายตัว และความเสถียรของอนุภาคแม่เหล็กนาโนที่ตรึง และไม่ได้ตรึงพอลิเมอร์ โดยได้สังเคราะห์อนุภาคแม่เหล็กนาโนตรึงด้วยพอลิอะคริลิกแอซิด (poly(acrylic acid)) หรือพอลิสไตรีน (polystyrene) ลงบนพื้นผิว เริ่มจากนำอนุภาคนาโนแม่เหล็กมาทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (peroxide group) บนพื้นผิว ซึ่งจะทำหน้าที่เป็นสารริเริ่มปฏิกิริยา และใช้ 1-ฟีนิลเอทิลไดไทโอเบนโซเอต (1-phenylethyl dithiobenzoate; PVB) ทำหน้าที่เป็นสารถ่ายโอนโซ่ (chain transfer agent) นำไปทำปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันแบบควบคุม (controlled polymerization) ด้วยกลไกแบบ reversible addition-fragmentation chain transfer (RAFT) จะได้อนุภาคแม่เหล็กนาโนที่ตรึงด้วยพอลิอะคริลิกแอซิดหรือพอลิสไตรีน

ริน แล้วนำไปทดสอบสมบัติการกระจายตัวและความเสถียร พบว่าอนุภาคแม่เหล็กนาโนที่ตรึงพอลิเมอร์ลงบนพื้นผิวสามารถกระจายตัว และมีความเสถียรดีกว่าอนุภาคแม่เหล็กนาโนที่ไม่ได้ตรึงพอลิเมอร์ลงบนพื้นผิว (Macromolecules, Vol 27, p 1665-1669, 2006)

แนวทางหนึ่งที่น่าสนใจในการปรับปรุงพื้นผิวของวัสดุด้วยพอลิเมอร์คือ การเตรียมเป็นพอลิเมอร์บรัช (polymer brushes) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่มีปลายของโซ่ด้านหนึ่งยึดติดบนพื้นผิวด้วยพันธะโควาเลนต์ (covalent bond) ทำให้มีเสถียรภาพในการยึดติดบนพื้นผิวสูงกว่าการดูดซับทางกายภาพ (physical absorption) การเตรียมพอลิเมอร์บรัชนิยมเตรียมด้วยปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันริเริ่มจากพื้นผิว (surface-initiated polymerization) ทั้งนี้ความยาวของโซ่พอลิเมอร์สามารถควบคุมได้หากใช้ปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันแบบควบคุม (controlled polymerization) เช่น atom transfer radical polymerization (ATRP) และ reversible addition-fragmentation chain transfer (RAFT) (Prog. Polym. Sci., Vol 25, p 677-710, 2000 และ Chem. Rev., Vol 109, p 5437-5527, 2009) โดยสมบัติทางเคมีและกายภาพของพอลิเมอร์บรัชขึ้นกับชนิดของมอนอเมอร์ (monomer) ที่เลือกใช้ในการสังเคราะห์

การประดิษฐ์นี้สนใจที่จะตรึงพอลิเมอร์บรัชของพอลิอะคริลิกแอซิด (poly(acrylic acid); PAA) ลงบนพื้นผิวของอนุภาคแม่เหล็กนาโน ผ่านปฏิกิริยา และ reversible addition-fragmentation chain transfer polymerization โดยโครงสร้างของพอลิเมอร์บรัชมีหมู่คาร์บอกซิล (carboxyl group) ซึ่งสามารถยึดติดกับหมู่อะมิโน (amino group) ของโดเมนที่ทำหน้าที่จับกับผนังเซลล์ (cell wall binding domain; CWBD) ผ่านการเกิดพันธะเอไมด์ (amide bond) ได้ จึงสามารถติดโดเมนนี้ได้ปริมาณมาก ส่งผลให้สารประกอบอนุภาคมีประสิทธิภาพในการตรวจวัดเชื้อที่เพิ่มขึ้น

ลักษณะและความมุ่งหมายของการประดิษฐ์

การประดิษฐ์นี้เกี่ยวข้องกับกรรมวิธีการผลิตสารประกอบอนุภาคที่สามารถจับกับเชื้อก่อโรคพิษได้อย่างจำเพาะสำหรับการแยกและตรวจวัดเชื้อก่อโรคพิษเชิงกึ่งปริมาณได้ด้วยตาเปล่า ประกอบรวมด้วยกรรมวิธีการเตรียมโดเมนของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่จับกับผนังเซลล์ของเชื้อก่อโรคพิษอย่างจำเพาะ และกรรมวิธีการผลิตอนุภาคแม่เหล็กนาโน เตรียมโดยการนำโดเมนของเอนไซม์ออโตมิวตะโนไลซินที่ทำหน้าที่จับกับผนังเซลล์ มายึดติดกับอนุภาคแม่เหล็กนาโนตรึงด้วยพอลิเมอร์ที่มีหมู่ฟังก์ชันเป็นหมู่คาร์บอกซิลหรือพอลิอะคริลิกแอซิดผ่านพันธะเอไมด์ เกิดเป็นสารประกอบอนุภาคที่มีความจำเพาะในการจับกับเชื้อมิวแทนส์ สเตรปโตคอคโค โดยโดเมนที่ทำหน้าที่จับกับผนังเซลล์นี้มีความจำเพาะต่อเชื้อมิวแทนส์ สเตรปโตคอคโค จึงสามารถเลือกจับเฉพาะเชื้อนี้ได้

ความมุ่งหมายของการประดิษฐ์นี้เพื่อผลิตสารประกอบอนุภาคที่ตรึงด้วยพอลิเมอร์และยึดติดโดเมนของ
เอนไซม์ออโตมิวตะโนไลซินซึ่งสามารถจับกับเชื้อก่อโรคพืชได้อย่างจำเพาะ โดยกรรมวิธีในการผลิตสารประกอบ
อนุภาคใช้วิธีการตรึงอนุภาคแม่เหล็กนาโนด้วยพอลิเมอร์ที่มีหมู่ฟังก์ชันเป็นหมู่คาร์บอกซิลหรือพอลิอะคริลิกแอซิด
ทำให้สามารถยึดติดโดเมนที่ทำหน้าที่จับกับผนังเซลล์ได้เป็นจำนวนมาก ส่งผลให้เพิ่มประสิทธิภาพในการจับกับ
เชื้อได้ดียิ่งขึ้น

คำอธิบายรูปเขียนโดยย่อ

รูปที่ 1 แสดงพลาสมิดลูกผสมที่มียีนส่วนที่มีความจำเพาะในการจับผนังเซลล์ (cell wall binding domain; CWBD) จากเอนไซม์ออโตมิวตะโนไลซิน เชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pColdIII

การเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

- 10 การประดิษฐ์นี้เกี่ยวข้องกับกรรมวิธีการผลิตสารประกอบอนุภาคที่สามารถจับกับเชื้อก่อโรคพืช
ได้อย่างจำเพาะสำหรับใช้ในการแยกและตรวจวัดเชื้อก่อโรคพืชเชิงปริมาณได้ด้วยตาเปล่า มีขั้นตอน
ประกอบด้วยการนำโดเมนของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่จับกับผนังเซลล์ ซึ่งสามารถจับกับเชื้อก่อโรคพืชในกลุ่ม สเตรป
โตคอคไคได้อย่างจำเพาะมายึดติดผ่านพันธะเอไมด์กับอนุภาคแม่เหล็กนาโนที่ตรึงด้วยพอลิเมอร์ที่มีหมู่ฟังก์ชันเป็น
หมู่คาร์บอกซิล หรือพอลิอะคริลิกแอซิด (poly(acrylic acid)) เกิดเป็นสารประกอบอนุภาคที่มีความจำเพาะใน
15 การจับกับเชื้อก่อโรคพืชในกลุ่มสเตรปโตคอคไค โดยกรรมวิธีดังกล่าวประกอบรวมด้วยขั้นตอนย่อยดังนี้

การเตรียมโดเมนของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่จับกับผนังเซลล์ซึ่งสามารถจับกับเชื้อก่อโรคพืชในกลุ่ม สเตรปโตคอคไค
ได้อย่างจำเพาะ มีขั้นตอนประกอบด้วย

- (1) การสร้างพลาสมิดลูกผสม (recombinant plasmid) ที่มียีนของโดเมนที่ทำหน้าที่จับกับ ผนังเซลล์
20 (cell wall binding domain; CWBD) จากเอนไซม์ออโตมิวตะโนไลซิน โดยเริ่มจากการออกแบบไพรเมอร์ไป
ข้างหน้า และย้อนกลับ (forward and reward primers) จากลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide sequence) ของ
เอนไซม์ออโตมิวตะโนไลซินที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของเจเนแบงก์ รหัส เอบี253514 (GenBank accession
AB253514) โดยดัดแปลงให้ทางปลาย 5' ของไพรเมอร์ไปข้างหน้ามีนิวคลีโอไทด์ซึ่งสามารถตัดได้ด้วยเอนไซม์
XhoI โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้ 5' AAACTCGAGGATGAGCAAAAT3' และดัดแปลงให้ทางปลาย 5'
25 ของไพรเมอร์ย้อนกลับมีนิวคลีโอไทด์ซึ่งสามารถตัดได้ด้วยเอนไซม์ BamHI โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้
5' AAAAGGATCCTGGCAGAGCAACAGC3' จากนั้นเพิ่มจำนวนยีนโดยใช้โครโมโซมจากเชื้อสเตรปโตคอคคัส
มิวแทนส์ เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส (polymerase chain
reaction; PCR) แล้วเชื่อมชิ้นยีนนี้เข้ากับเวกเตอร์ pColdIII ที่ถูกดัดแปลงให้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของฮิสทีดิน

(histidine) อยู่ภายในลำดับดีเอ็นเอ (DNA sequence) เพื่อใช้ในขั้นตอนการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ และมียีนดื้อต่อยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (ampicillin resistant gene) เพื่อใช้ในการคัดเลือกเชื้อที่รับพลาสมิดลูกผสมเข้าไปในเซลล์ได้สำเร็จ (รูปที่ 1) จากนั้นเคลื่อนย้ายพลาสมิดลูกผสมนี้เข้าสู่เชื้อเอสเชอริเชีย โคลิ สายพันธุ์ BL-21 (*Escherichia coli* BL-21) (transformation) คัดเลือกเชื้อที่รับ พลาสมิดลูกผสมนี้เข้าไปได้สำเร็จโดยการเลี้ยง
5 เชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง ลูเรีย-เบอร์ทานิ (Luria Bertani agar) ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (ampicillin)

(2) การผลิตโปรตีนจากเชื้อเอสเชอริเชีย โคลิ (*Escherichia coli*; *E. coli*) ที่รับพลาสมิดลูกผสมเข้าไปได้สำเร็จ และการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ โดยเริ่มจากการเลี้ยงเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ BL-21 ที่มีพลาสมิดลูกผสม (recombinant plasmid) ของยีนของโดเมนที่ทำหน้าที่จับกับผนังเซลล์ (cell wall binding domain; CWBD) จากเอนไซม์ออโตมิวตะโนไลซินในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวลูเรีย-เบอร์ทานิ (Luria Bertani; LB) ที่มียาปฏิชีวนะ
10 แอมพิซิลลิน (ampicillin) นำไปอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน (12-16 ชั่วโมง) ถ่ายไอออนหัวเชื้อที่ได้ในปริมาณที่เหมาะสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน นำไปอบเลี้ยงต่อจนได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร อยู่ในช่วงระยะแบ่งตัวทวีคูณ (log phase; 0.4-0.6) จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-45 นาที แล้วจึงเติมสารละลายไอโซโพรพิล-เบต้า-ดี-ไทโอไกลาคโตไซด์ (isopropyl- β -D-thiogalactoside; IPTG) 0.5-1 มิลลิโมลาร์ เพื่อเหนี่ยวนำการสร้างโปรตีน
15 จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง แล้วทำการเก็บเซลล์ด้วยการปั่นด้วยความเร็วสูง นำเซลล์ที่ได้ละลายในไลซิส บัฟเฟอร์ (lysis buffer) และนำไปทำให้เซลล์แตกโดยใช้เครื่องที่ให้คลื่นความถี่สูง (sonicator) เพื่อที่จะได้นำโปรตีนที่ถูกสร้างภายในเซลล์ไปทำให้บริสุทธิ์ โดยผ่านคอลัมน์ที่แยกสารตามความจำเพาะ (affinity column) ล้างคอลัมน์ด้วยวอช บัฟเฟอร์ (wash buffer) และแยกโปรตีนออกจากคอลัมน์ด้วยอีลูชัน บัฟเฟอร์ (elution buffer) โดยแยกเก็บโปรตีนที่ได้ออกเป็นส่วนๆ
20 (fractions) นำแต่ละส่วนแยกที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส แบบเอสดีเอส-เพจ (polyacrylamide gel electrophoresis; SDS-PAGE) เพื่อเลือกส่วนแยกที่มี ปริมาณโปรตีนมากที่สุด (active fraction) มารวมกัน และนำไปไดอะไลซิส (dialysis) ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน (phosphate buffer saline; PBS) หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของโปรตีนมาตรฐาน

การเตรียมอนุภาคแม่เหล็กนาโนที่ตรึงด้วยพอลิเมอร์ที่มีหมู่ฟังก์ชันเป็นหมู่คาร์บอกซิล หรือพอลิอะคริลิกแอซิดบน
25 พื้นผิว มีขั้นตอนประกอบด้วย

(1) สังเคราะห์อนุภาคแม่เหล็กนาโนด้วยวิธีโซลโวเทอร์มอล (solvothermal) โดยซิงไอรอนคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต (iron chloride hexahydrate) 0.01-0.05 โมลาร์ ละลายในเอทิลีน ไกลคอล (ethylene glycol) ผสมสารละลายให้เข้ากันโดยสารละลายจะเกิดการเปลี่ยนสีเป็นสีน้ำตาลเข้ม จากนั้นเติมโซเดียมอะซิเตต (sodium acetate) ความเข้มข้น 0.3-0.7 โมลาร์ ลงไปในขวดแก้วแล้วคนสารละลายให้เข้ากันเป็นเวลา 30-50 นาที แล้ว

จึงถ่ายสารละลายนี้ลงสู่ถ้วยสเตนเลสที่พื้นผิวเคลือบเทฟลอนเพื่อนำไปอบให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 150-300 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14-18 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงนำไปแยกอนุภาคแม่เหล็กนาโนที่ต้องการออกจากสารละลายโดยใช้สนามแม่เหล็กภายนอก ล้างอนุภาคด้วยเอทานอลแล้วนำไปอบให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 50-80 องศาเซลเซียส จะได้ผงอนุภาคแม่เหล็กนาโนตามที่ต้องการ

5 (2) นำอนุภาคแม่เหล็กนาโนที่สังเคราะห์ได้มาตรึงหมู่อะมิโนซึ่งเป็นหมู่ริเริ่มในการเกิดปฏิกิริยาโดยใส่อนุภาคแม่เหล็กนาโนที่เตรียมได้จาก (1) ในขวดก้นกลมที่บรรจุเอทานอล แล้วเติมด้วย 3-อะมิโนโพรพิลไทรเอทอกซีไซเลน (3-aminopropyltriethoxysilane; APTES) และสารละลายแอมโมเนีย เขย่าสารละลายให้เข้ากันที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10-14 ชั่วโมง จากนั้นนำอนุภาคแม่เหล็กนาโนไปล้างด้วยเอทานอล ได้อนุภาคแม่เหล็กนาโนที่มีหมู่อะมิโนเป็นหมู่ริเริ่มในการเกิดปฏิกิริยาพร้อมจะนำไปใช้ในการติดสารริเริ่ม (initiator) ในขั้นการ
10 สังเคราะห์พอลิเมอร์ต่อไป

(3) ทำการกราฟต์พอลิอะคริลิกแอซิดบนพื้นผิวของอนุภาคแม่เหล็กนาโน โดยละลาย 4,4-บิสไซยาโนวาเลอิก แอซิด (4,4-bis(4-cyanovaleic acid; ACVA) 0.1-0.3 โมลาร์, ไดไซโคลเฮกซิลคาร์บอดีไอไมด์ 0.02-0.05 โมลาร์, (N,N'-dicyclohexylcarbodiimide; DCC) และ 4-ไดเมทิลแอมิโนไพริดีน (4-dimethylamino pyridine; DMAP) 0.01-0.04 โมลาร์ ในไดเมทิลฟอร์มามิด (dimethyl formamide; DMF) คนให้สารละลาย
15 เข้ากันเป็นเวลา 3-6 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้องภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน จากนั้นถ่ายสารละลายนี้ไปยังขวดแก้วที่บรรจุอนุภาคแม่เหล็กนาโนที่มีหมู่อะมิโนที่เตรียมได้จาก (2) ทำการคนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง จากนั้นนำอนุภาคแม่เหล็กนาโนมาล้างด้วยไดเมทิลฟอร์มามิดและเอทานอล ตามลำดับ ซึ่งในขั้นนี้จะได้อนุภาคแม่เหล็กนาโนที่ติดสารริเริ่ม

(4) ละลาย 4,4-บิสไซยาโนวาเลอิก แอซิด (4,4-bis (4-cyanovaleic acid; ACVA) 0.03-0.06 โมลาร์
20 และ 4-ไซยาโน-4-ฟีนิลคาร์โบโนไทโอไทโอเพนทาโนอิก แอซิด (4-cyano-4-phenyl carbonothioylthio) pentanoic acid) ซึ่งทำหน้าที่เป็นสารถ่ายโอนโซ่ (chain transfer agent; CTA) 0.3-0.7 โมลาร์ ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลินที่มีพีเอช 7.4 (PBS buffer) และเติมมอนอเมอร์ที่มีหมู่ฟังก์ชันเป็นหมู่คาร์บอกซิล หรือ อะคริลิกแอซิด 0.05-0.1 โมลาร์ ผสมสารละลายให้เข้ากันก่อนถ่ายโอนสารละลายนี้ไปยังขวดแก้วที่บรรจุอนุภาคแม่เหล็กนาโนที่ติดสารริเริ่มแล้วทำปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชันที่อุณหภูมิ 60-80 องศาเซลเซียส ในอ่างน้ำมันเป็นเวลา 20-24
25 ชั่วโมง นำอนุภาคแม่เหล็กนาโนที่ได้มาล้างด้วยเอทานอล และน้ำ ตามลำดับ ทำอนุภาคแม่เหล็กนาโนให้แห้ง ในขั้นนี้จะได้อนุภาคแม่เหล็กนาโนที่ตรึงด้วยพอลิเมอร์ที่มีหมู่คาร์บอกซิลหรือพอลิอะคริลิกแอซิด เพื่อนำไปใช้ในการติดกับโดเมนที่ทำหน้าที่จับกับผนังเซลล์

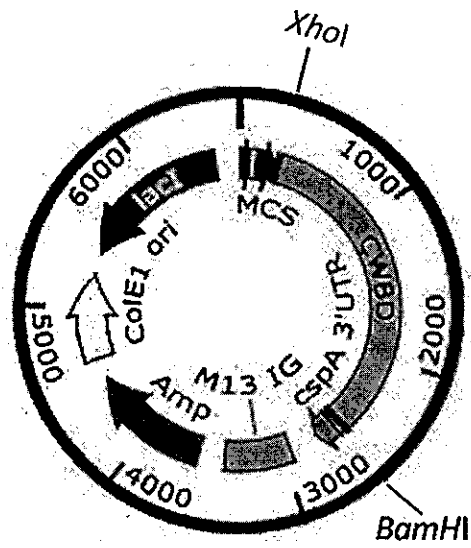
กรรมวิธีการยัดติดโดเมนของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่จับกับผนังเซลล์กับอนุภาคแม่เหล็กนาโนที่ตรึงด้วยพอลิเมอร์ที่มีหมู่ฟังก์ชันเป็นหมู่คาร์บอกซิล หรือพอลิอะคริลิกแอซิดขั้นตอนประกอบด้วย

- (1) ละลาย 1-เอทิล-3-(3-ไดเมทิลเอมีนโพรพิล) คาร์โบไดอิมิดไฮโดรคลอไรด์ (1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide hydrochloride; EDC) ความเข้มข้น 0.1-0.3 โมลาร์ และเอ็นไฮดรอกซีสักซิไมด์ (N-hydroxysuccinimide; NHS) ความเข้มข้น 0.3-0.6 โมลาร์ ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลินที่มีพีเอช 7.4 ตามลำดับ คนสารละลายให้เข้ากัน จากนั้นถ่ายสารละลายนี้ไปยังขวดแก้วที่บรรจุอนุภาคแม่เหล็กนาโนที่ตรึงด้วยพอลิเมอร์ที่มีหมู่คาร์บอกซิล หรือพอลิอะคริลิกแอซิดบนพื้นผิว ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลินที่มีพีเอช 7.4 แล้วคนสารละลายให้เข้ากันที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20-50 นาที
- (2) เติมโดเมนที่ทำหน้าที่จับกับผนังเซลล์ความเข้มข้น 0.1-0.3 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาณ 1-3 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 2 - 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง แล้วนำอนุภาคแม่เหล็กนาโนที่ได้ไปล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลินที่มีพีเอช 7.4 และน้ำ ตามลำดับ ทำอนุภาคแม่เหล็กนาโนให้แห้ง จะได้อนุภาคแม่เหล็กนาโนที่ตรึงด้วยพอลิเมอร์ที่มีหมู่คาร์บอกซิลหรือพอลิอะคริลิกแอซิดที่ยัดติดกับโดเมนที่ทำหน้าที่จับกับผนังเซลล์สำหรับนำไปใช้ในการจับกับเชื้อมิวแทนส์ สเตรปโตคอคโคคต่อไป

วิธีการในการประดิษฐ์ที่ดีที่สุด

- 15 เหมือนกับที่ได้กล่าวไว้แล้วในหัวข้อการเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

หน้า 1 ของจำนวน 1 หน้า



รูปที่ 1

ข้อถ้อยสิทธิ

1. กรรมวิธีการผลิตสารประกอบอนุภาคที่สามารถจับกับเชื้อก่อโรคพิษได้อย่างจำเพาะสำหรับการแยกและตรวจวัดเชื้อก่อโรคพิษเชิงกึ่งปริมาณได้ด้วยตาเปล่า มีขั้นตอนประกอบด้วยการนำโดเมนของเอนไซม์ที่ทำหน้าจับกับผนังเซลล์ซึ่งสามารถจับกับเชื้อก่อโรคพิษในกลุ่มสเตรปโตคอคไคได้อย่างจำเพาะมายึดติดกับอนุภาคแม่เหล็กนาโนตรึงด้วยพอลิเมอร์ที่มีหมู่ฟังก์ชันเป็นหมู่คาร์บอกซิล หรือพอลิอะคริลิกแอซิด เกิดเป็นสารประกอบอนุภาคที่มีความจำเพาะในการจับกับเชื้อก่อโรคพิษในกลุ่มสเตรปโตคอคไค
2. กรรมวิธีการเตรียมสารประกอบอนุภาคที่สามารถจับกับเชื้อก่อโรคพิษได้อย่างจำเพาะสำหรับการแยกและตรวจวัดเชื้อก่อโรคพิษเชิงกึ่งปริมาณได้ด้วยตาเปล่า ตามข้อถ้อยสิทธิ 1 ที่ซึ่งการเตรียมโดเมนของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่จับกับผนังเซลล์ซึ่งสามารถจับกับเชื้อก่อโรคพิษในกลุ่ม สเตรปโตคอคไคได้อย่างจำเพาะ มีขั้นตอนประกอบด้วย

(1) การสร้างพลาสมิดลูกผสม (recombinant plasmid) ที่มียีนของโดเมนที่ทำหน้าที่จับกับผนังเซลล์ (cell wall binding domain; CWBD) จากเอนไซม์ออโตมิวตะโนไลซิน โดยเชื่อมขั้วยีนนี้ เข้ากับเวกเตอร์ pColdIII ที่ถูกดัดแปลงให้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของฮิสทีดิน (histidine) อยู่ภายในลำดับดีเอ็นเอ (DNA sequence) เพื่อใช้ในขั้นตอนการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ และมียีนดื้อต่อยาปฏิชีวนะ (antibiotic resistant gene) เพื่อใช้ในการคัดเลือกเชื้อที่รับพลาสมิดลูกผสมเข้าไปในเซลล์ได้สำเร็จ จากนั้นเคลื่อนย้ายพลาสมิดลูกผสมนี้เข้าสู่เชื้อเอสเชอริเชีย โคไล (*Escherichia coli*) (transformation) หลังจากนั้นทำการคัดเลือกเชื้อที่รับพลาสมิดลูกผสมนี้เข้าไปได้ โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาปฏิชีวนะชนิดเดียวกับที่ในพลาสมิดมียีนดื้อต่อยานี้

(2) การผลิตโปรตีนจากเชื้อเอสเชอริเชีย โคไล (*Escherichia coli*; *E. coli*) ที่รับพลาสมิดลูกผสมเข้าไปได้สำเร็จ และการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ โดยเริ่มจากการเลี้ยงเชื้อเอสเชอริเชีย โคไล ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร อยู่ในช่วงระยะแบ่งตัวทวีคูณ (log phase) จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-45 นาที แล้วจึงเติมสารละลายไอโซโพรพิล-เบต้า-ดี-ไทโอกาแลคโตไซด์ (isopropyl- β -D-thiogalactoside; IPTG) เพื่อเหนี่ยวนำการสร้างโปรตีน จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง แล้วทำการเก็บเซลล์ด้วยการปั่นด้วยความเร็วสูง หลังจากนั้นสกัดโปรตีนภายในเซลล์ โดยการทำให้เซลล์แตก นำโปรตีนที่ได้ ไปทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ที่แยกสารตามความจำเพาะ (affinity column) แยกเก็บโปรตีนที่ได้ออกเป็นส่วนๆ (fractions) นำแต่ละส่วนแยกที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส แบบเอสดีเอส-เพจ (polyacrylamide gel electrophoresis; SDS-PAGE) เพื่อเลือกส่วนแยกที่มีปริมาณโปรตีนมากที่สุด (active fraction) มา

รวมกัน และนำไปไดอะไลซิส (dialysis) ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน (phosphate buffer saline; PBS) หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน เปรียบเทียบกับความเข้มข้นของโปรตีนมาตรฐาน

3. กรรมวิธีการเตรียมสารประกอบอนุภาคที่สามารถจับกับเชื้อก่อโรคพื้นผิได้อย่างจำเพาะสำหรับการแยกและตรวจวัดเชื้อก่อโรคพื้นผิซึ่งปริมาณได้ด้วยตาเปล่า ตามข้อถ้อยสิทธิ 1 ที่ซึ่งการเตรียมอนุภาคแม่เหล็กนาโนที่ตรึงด้วยพอลิเมอร์ที่มีหมู่ฟังก์ชันเป็นหมู่คาร์บอกซิลหรือพอลิอะคริลิกแอซิดมีขั้นตอนประกอบด้วย

(1) เตรียมไฮดรอกซิลโรตเฮกซาไฮเดรต ความเข้มข้น 0.01-0.05 โมลาร์ ในเอทิลีนไกลคอล แล้วเติมโซเดียมอะซิเตตความเข้มข้น 0.3-0.7 โมลาร์ คนสารละลายให้เข้ากันเป็นเวลา 30-50 นาที นำไปอบให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 150-300 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14-18 ชั่วโมง หลังจากนั้นแยกอนุภาคแม่เหล็กนาโนที่ต้องการโดยใช้สนามแม่เหล็กภายนอก ล้างอนุภาคด้วยเอทานอลแล้วนำไปอบให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 50-80 องศาเซลเซียส จะได้ผงอนุภาคแม่เหล็กนาโน

(2) เติมเอทานอล ลงไปในอนุภาคแม่เหล็กนาโนที่เตรียมได้จาก (1) แล้วเติมด้วย 3-อะมิโนโพรพิลไทรเอทอกซีไซเลน (3-aminopropyltriethoxysilane; APTES) และสารละลายแอมโมเนีย เขย่าสารละลายให้เข้ากันที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10-14 ชั่วโมง จากนั้นนำอนุภาคแม่เหล็กนาโนไปล้างด้วย เอทานอล ได้อนุภาคแม่เหล็กนาโนที่มีหมู่อะมิโนเป็นหมู่ริเริ่มในการเกิดปฏิกิริยาพร้อมจะนำไปใช้ในการติดสารริเริ่ม (initiator) ในขั้นตอนสังเคราะห์พอลิเมอร์ต่อไป

(3) ละลาย 4,4-บิส(ไซยาโนวาเลอิกแอซิด) 0.1-0.3 โมลาร์, ไดไซโคลเฮกซิลคาร์โบไดอไซด์ 0.02-0.05 โมลาร์ และ 4-ไดเมทิลแอมิโนไพรีดินในไดเมทิลฟอร์มาไมด์ 0.01-0.04 โมลาร์ คนให้สารละลายเข้ากันเป็นเวลา 3-6 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้องภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน ต่อมาผสมสารละลายกับอนุภาคแม่เหล็กนาโน ทำการคนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง จากนั้นนำอนุภาคแม่เหล็กนาโนมาล้างด้วยไดเมทิลฟอร์มาไมด์และเอทานอล ตามลำดับ ขั้นนี้จะได้อนุภาคแม่เหล็กนาโนที่ติดสารริเริ่ม

(4) ละลาย 4,4-บิส(ไซยาโนวาเลอิก แอซิด) 0.03-0.06 โมลาร์ และ 4-ไซยาโน-4-ฟีนิลคาร์โบโนไทโออิลไทโอเพนทาโนอิกแอซิด 0.3-0.7 โมลาร์ ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีนที่มีพีเอช 7.4 และเติมมอนอเมอร์ที่มีหมู่ฟังก์ชันเป็นหมู่คาร์บอกซิลหรืออะคริลิกแอซิด 0.05-0.1 โมลาร์ ผสมสารละลายให้เข้ากันแล้วถ่ายสารละลายนี้ไปผสมกับกับอนุภาคแม่เหล็กนาโนที่ติดสารริเริ่ม โดยทำปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชันที่อุณหภูมิ 60-80 องศาเซลเซียส ในอ่างน้ำมันเป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง นำอนุภาคแม่เหล็กนาโนที่ได้มาล้างด้วยเอทานอลและน้ำ ตามลำดับ ทำอนุภาคนาโนแม่เหล็กให้แห้ง ขั้นนี้จะได้อนุภาคแม่เหล็กนาโนที่ตรึงด้วยพอลิเมอร์ที่มีหมู่ฟังก์ชันเป็นหมู่คาร์บอกซิลหรือพอลิอะคริลิกแอซิด

4. กรรมวิธีการเตรียมสารประกอบอนุภาคที่สามารถจับกับเชื้อก่อโรคฟันผุได้อย่างจำเพาะสำหรับการแยกและตรวจวัดเชื้อก่อโรคฟันผุเชิงกึ่งปริมาณได้ด้วยตาเปล่า ตามข้อถ้อยสิทธิ 1 ที่ซึ่งกรรมวิธีการยัดติดโดเมนของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่จับกับผนังเซลล์กับอนุภาคแม่เหล็กนาโนที่ตรึงด้วยพอลิเมอร์ที่มีหมู่ฟังก์ชันเป็นหมู่คาร์บอกซิล หรือพอลิอะคริลิกแอซิด มีขั้นตอนประกอบด้วย

5 (1) ละลาย 1-เอทิล-3-(3-ไดเมทิลเอมีนโพรพิล) คาร์โบไดอไมด์ไฮโดรคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.1-0.3 โมลาร์ และเอ็นไฮดรอกซีซึกซินิไมด์ ความเข้มข้น 0.3-0.6 โมลาร์ ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลินที่มีพีเอช 7.4 ตามลำดับ จากนั้นถ่ายสารละลายนี้ไปผสมกับอนุภาคแม่เหล็กนาโนที่ตรึงด้วยพอลิเมอร์ที่มีหมู่ฟังก์ชันเป็นหมู่คาร์บอกซิลหรือพอลิอะคริลิกแอซิดบนพื้นผิว ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลินที่มีพีเอช 7.4 แล้วคนสารละลายให้เข้ากันที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20-50 นาที

10 (2) เติมโดเมนที่ทำหน้าที่จับกับผนังเซลล์ที่มีความเข้มข้น 0.1-0.3 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาณ 1-3 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 2-10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง นำอนุภาคแม่เหล็กนาโนที่ได้ไปล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลินที่มีพีเอช 7.4 และน้ำ ตามลำดับ แล้วทำอนุภาคแม่เหล็กนาโนให้แห้ง

บทสรุปการประดิษฐ์

- การประดิษฐ์นี้เกี่ยวข้องกับกรรมวิธีการผลิตสารประกอบอนุภาคที่สามารถจับกับเชื้อก่อโรคพิษณุได้อย่างจำเพาะสำหรับการแยกและตรวจวัดเชื้อก่อโรคพิษณุเชิงปริมาณได้ด้วยตาเปล่า เตรียมโดยการนำโดเมนของเอนไซม์ออโตมิวตะโนไลซินที่ทำหน้าที่จับกับผนังเซลล์ ซึ่งสามารถจับกับเชื้อก่อโรคพิษณุในกลุ่ม สเตรป
- 5 โทคอคโคได้อย่างจำเพาะมายึดติดผ่านพันธะเอไมด์กับอนุภาคแม่เหล็กนาโนที่ทำให้เสถียรด้วยพอลิเมอร์ที่มีหมู่ฟังก์ชันเป็นหมู่คาร์บอกซิลิก หรือพอลิอะคริลิกแอซิด (poly(acrylic acid)) ซึ่งการตรึงพอลิอะคริลิกแอซิดบนพื้นผิวอนุภาคแม่เหล็กนี้ ทำให้สามารถยึดติดโดเมนที่ทำหน้าที่จับกับผนังเซลล์ได้เป็นจำนวนมาก ส่งผลให้เพิ่มประสิทธิภาพในการจับกับเชื้อได้ดียิ่งขึ้น



อนุสิทธิบัตร

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

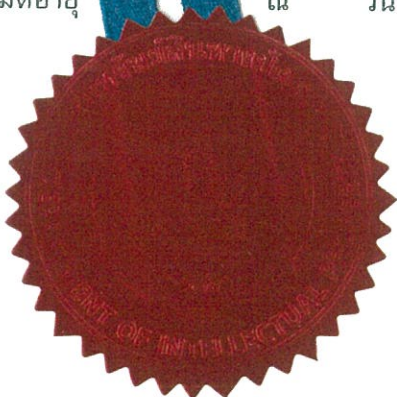
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

สำหรับการประดิษฐ์ตามรายละเอียดการประดิษฐ์ ข้อถือสิทธิ และรูปเขียน (ถ้ามี)
ที่ปรากฏในอนุสิทธิบัตรนี้

เลขที่คำขอ 1603001055
ได้รับอนุสิทธิบัตร 16 มิถุนายน 2559
ประดิษฐ์ นางสาวพนิดา ธีบุญศรีสังข์ และคณะ
ซึ่งแสดงถึงการประดิษฐ์ สารประกอบอนุภาคที่สามารถจับกับเชื้อก่อโรคพิษได้อย่างจำเพาะสำหรับ
ใช้ในการแยกและตรวจวัดเชื้อก่อโรคพิษเชิงปริมาณได้ด้วยตาเปล่า

ให้ผู้ทรงสิทธิได้รับสิทธิและหน้าที่ตามกฎหมายว่าด้วยสิทธิบัตรทุกประการ

ออกให้	ณ	วันที่	1	เดือน	กันยายน	พ.ศ.	2560
หมดอายุ	ณ	วันที่	15	เดือน	มิถุนายน	พ.ศ.	2565



(ลงชื่อ).....

(นายดิเรก บุญแท้)
รองอธิบดีกรมทรัพย์สินทางปัญญา ปฏิบัติราชการแทน
อธิบดีกรมทรัพย์สินทางปัญญา
ผู้ออกอนุสิทธิบัตร



อนันต์ ฤทธิ
พนักงานเจ้าหน้าที่

- หมายเหตุ
1. ผู้ทรงอนุสิทธิบัตรต้องชำระค่าธรรมเนียมรายปีเริ่มตั้งแต่ปีที่ 5 ของอายุสิทธิบัตร มิฉะนั้น อนุสิทธิบัตรจะสิ้นอายุ
 2. ผู้ทรงอนุสิทธิบัตรจะขอชำระค่าธรรมเนียมรายปีล่วงหน้าโดยชำระทั้งหมดในคราวเดียวก็ได้
 3. ภายใน 90 วันก่อนวันสิ้นอายุอนุสิทธิบัตร ผู้ทรงอนุสิทธิบัตรมีสิทธิขอต่ออายุอนุสิทธิบัตรได้ 2 ครั้ง มีกำหนด

รายละเอียดการประดิษฐ์

ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์

สารประกอบอนุภาคที่สามารถจับกับเชื้อก่อโรคพิษผู้ได้อย่างจำเพาะสำหรับการแยกและตรวจวัดเชื้อก่อโรคพิษผู้เชิงกึ่งปริมาณได้ด้วยตาเปล่า

5 สาขาวิทยาการที่เกี่ยวข้องกับการประดิษฐ์

สาขาเคมี และวิทยาศาสตร์ชีวการแพทย์ที่เกี่ยวข้องกับสารประกอบอนุภาคที่สามารถจับกับเชื้อก่อโรคพิษผู้ได้อย่างจำเพาะสำหรับการแยกและตรวจวัดเชื้อก่อโรคพิษผู้เชิงกึ่งปริมาณได้ด้วยตาเปล่า

ภูมิหลังของศิลปะหรือวิทยาการที่เกี่ยวข้อง

- โรคพิษผู้ยังคงเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทย ดังจะเห็นได้จากรายงานผลการสำรวจทันตสาธารณสุขแห่งชาติครั้งที่ 7 พ.ศ. 2555 ที่ความชุกของโรคในกลุ่มเด็กก่อนวัยเรียนอายุ 3 และ 5 ปี และในกลุ่มเด็กวัยเรียน และเยาวชนอายุ 12 และ 15 ปีมีมากเกินกว่าครึ่งหนึ่งของประชากรที่ถูกสำรวจ ความชุกของโรคพิษผู้ในประชากรไทยอยู่ในระดับนี้มาตลอดระยะเวลาเกือบ 10 กว่าปีที่ผ่านมา สาเหตุหนึ่งอาจจะมาจากการให้การรักษา และป้องกันโรคพิษผู้ในคนใช้ทุกคนในระดับเดียวกัน ทั้ง ๆ ที่ความเสี่ยงของการเกิดโรคพิษผู้เป็นเรื่องของแต่ละบุคคล ทำให้กลุ่มที่มีความเสี่ยงสูงได้รับการรักษา และป้องกันไม่เพียงพอที่จะทำให้หยุดการเกิดโรคขึ้นได้
- 10
- 15
- 20
- การประเมินความเสี่ยงในการเกิดโรคพิษผู้ เป็นกระบวนการประเมินว่าบุคคลนี้มีความเสี่ยงที่จะเกิดพิษผู้ในระดับไหน ซึ่งค่าที่ประเมินได้นั้นจะช่วยให้ทันตแพทย์เลือกวิธีการรักษา และป้องกันได้อย่างเหมาะสม ความเสี่ยงของการเกิดโรคพิษผู้ประเมินโดยอาศัยหลายปัจจัยด้วยกัน เช่น พฤติกรรมการทานอาหาร การดูแลสุขภาพช่องปาก คุณลักษณะของน้ำลาย และปริมาณเชื้อก่อโรคพิษผู้ เป็นต้น ปัจจัยที่นำมาประเมินนี้ส่วนใหญ่สามารถทำได้ทันทีข้างเก้าอี้ทำฟัน ยกเว้นการหาปริมาณเชื้อ ถึงแม้จะมีชุดตรวจเชื้อสำเร็จรูปออกมาจำหน่ายทำให้สะดวกมากขึ้น แต่ก็ยังต้องอาศัยเวลาในการอบเลี้ยงเชื้อ และต้องการอุปกรณ์ที่มีขนาดใหญ่เกินพกพา และมีราคาแพง ทำให้ไม่สะดวกที่จะนำมาใช้ในงานระดับชุมชน

- มีเอกสารการยื่นขอสิทธิบัตรแสดงเครื่องมือตรวจเชื้อแบคทีเรียอย่างรวดเร็ว (rapid bacterial detection tool) โดยอาศัยหลักการอิมมูโนโครมาโทกราฟี และทองคำคอลลอยด์ (colloidal gold-based immunochromatography) โดยในชุดตรวจนี้ใช้แอนติบอดีที่จำเพาะกับเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์เป็นเครื่องมือในการจับเชื้อ (probe) นำไปติดกับทองคำคอลลอยด์ (colloidal gold) ทำให้เห็นสีได้ด้วยตาเปล่า (เอกสารการยื่นขอสิทธิบัตรประเทศสหรัฐอเมริกาเลขที่ US 20080240993 A1) มีรายงานการวิจัยถึงประสิทธิภาพของ
- 25

เครื่องมือนี้มีความไวในการตรวจหาเชื้อ (sensitivity) อยู่ที่ร้อยละ 97.6 แต่มีความจำเพาะ (specificity) เพียงร้อยละ 90.6 เท่านั้นเมื่อเทียบกับการตรวจด้วยวิธีเรียลไทม์ พีซีอาร์ (real-time PCR) ซึ่งผู้วิจัยใช้เป็นวิธียืนยันจำนวนเชื้อ (Int J Paediatr Dent., Vol 22, p 363-368, 2012) ด้วยเหตุนี้ทำให้เกิดแนวคิดที่จะพัฒนาวิธีการตรวจที่มีความไว และความจำเพาะกับเชื้อมิวแทนส์ สเตรปโตคอคคัส ที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น และยังคงเห็นผลได้ด้วยตาเปล่า

เอนไซม์เปปติโดไกลแคน ไฮโดรเลส (peptidoglycan hydrolase) เป็นเอนไซม์ที่พบได้ในแบคทีเรียเกือบทุกชนิด มีหน้าที่ในการย่อยสลายเปปติโดไกลแคนซึ่งเป็นโครงสร้างที่พบได้ในผนังเซลล์ของแบคทีเรียทั่วไป โดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก (Gram positive bacteria) แต่เป็นโครงสร้างที่ไม่พบในเซลล์ของมนุษย์ เอนไซม์นี้มีบทบาทสำคัญต่อการแบ่งตัว และแยกตัวของเซลล์แบคทีเรีย จากรายงานสิทธิบัตร และจากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ (*Streptococcus mutans*) ผลิตเอนไซม์เปปติโดไกลแคน ไฮโดรเลสซึ่งถูกตั้งชื่อว่า ออโตมิวตาโนไลซิน (automutanolysin) หรือเอเอ็มแอล (AmI) ที่มีความจำเพาะในการย่อยสลายเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ (*Streptococcus mutans*) และสเตรปโตคอคคัส ซอบรีนัส (*Streptococcus sobrinus*) ซึ่งอยู่ในกลุ่มเชื้อมิวแทนส์ สเตรปโตคอคคัส (mutans streptococci) อันเป็นเชื้อกลุ่มสำคัญกลุ่มหนึ่งต่อการเกิดโรคฟันผุ และเป็นตัวชี้วัดหนึ่งที่ใช้ในการประเมินความเสี่ยงในการเกิดโรคฟันผุ โครงสร้างของเอนไซม์นี้ประกอบขึ้นด้วยกรดอะมิโน 979 ตัว มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 104 กิโลดาลตัน และมีสองโดเมนหลักได้แก่ คาตาไลติกโดเมนอยู่ทางฝั่งปลายด้านหมู่คาร์บอกซิล (C-terminal catalytic domain) ซึ่งมีบทบาทในการย่อยสลายผนังเซลล์ และอีกโดเมนอยู่ฝั่งปลายด้านหมู่อะมิโนทำหน้าที่ในการจับกับผนังเซลล์ (cell wall binding domain) ซึ่งมีความจำเพาะกับเชื้อมิวแทนส์ สเตรปโตคอคคัส (Microbiol Immunol., Vol 50, p 729-42, 2006 และสิทธิบัตรประเทศสหรัฐอเมริกาเลขที่ US 7,776,325 B2 และ US 8,852,584 B2) ด้วยความจำเพาะนี้หากทำการตัดต่อยีนโดยเอาส่วนคาตาไลติกโดเมนที่ใช้ในการย่อยสลายเปปติโดไกลแคนออกไป ก็จะสามารถใช้เอนไซม์ดังกล่าวนี้ในการจับกับผนังเซลล์ของเชื้อมิวแทนส์ สเตรปโตคอคคัส (probe) เพื่อใช้ในการตรวจวัดปริมาณของเชื้อได้

ในการพัฒนาวิธีการตรวจวัดปริมาณของเชื้อมิวแทนส์ สเตรปโตคอคคัสที่สามารถเห็นผลได้ด้วยตาเปล่านี้ นอกจากการนำโดเมนที่ทำหน้าที่จับกับผนังเซลล์มาใช้ในการตรวจจับเชื้อที่ต้องการแล้ว การแยกเชื้อออกจากเชื้ออื่น หรือสารเจือปนอื่นๆ และการนำเชื้อที่คัดแยกแล้วมาตรวจวัดปริมาณ และแสดงผลให้เห็นได้ด้วยตาเปล่านั้นทำได้โดยการยัดติดโดเมนดังกล่าวกับอนุภาคแม่เหล็กนาโน (magnetic nanoparticles, MNPs) ซึ่งมีขนาดตั้งแต่ 5 ถึง 500 นาโนเมตร กลายเป็นสารประกอบอนุภาคที่มีความจำเพาะกับเชื้อมิวแทนส์ สเตรปโตคอคคัส โดยทั่วไปอนุภาคแม่เหล็กนาโนที่นิยมใช้มักเป็นแบบแมกเนไทต์ (Fe_3O_4) หรือแมกนีไทต์ ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) มีสมบัติที่สามารถตอบสนองต่อสนามแม่เหล็กภายนอกได้อย่างรวดเร็ว ด้วยสมบัติดังกล่าวจึงทำให้อนุภาคแม่เหล็กนาโนสามารถ

นำมาใช้ในการแยกเชื้อแบคทีเรียโดยการควบคุมผ่านสนามแม่เหล็กภายนอก เชื้อแบคทีเรียที่แยกมาได้จึงมีความบริสุทธิ์ และง่ายต่อการตรวจวัดยิ่งขึ้น และเมื่อนำไปกรองแบบเลือกผ่าน (selective filtration) สารประกอบอนุภาคที่จับกับเชื้อแบคทีเรียจะติดอยู่บนแผ่นเมมเบรนไม่สามารถผ่านรูพรุนของแผ่นเมมเบรนมาได้ โดยปริมาณของสารประกอบอนุภาคที่จับกับเชื้อแบคทีเรียจะแปรผันตรงกับความเข้มข้นของสปีบนแผ่นเมมเบรน จึงสามารถวิเคราะห์หาเชื้อแบคทีเรียเชิงกึ่งปริมาณได้ด้วยตาเปล่า (semi-quantitative analysis).

- มีสิทธิบัตรรายงานการนำอนุภาคแม่เหล็กนาโนตรึงแอนติบอดีมาใช้ในการจับกับเชื้อแบคทีเรีย และแยกเชื้อออกจากสารละลายโดยอาศัยสนามแม่เหล็กภายนอก แล้วนำมาตรวจวัดปริมาณของเชื้อแบคทีเรีย โดยจากรายงานพบว่าอนุภาคแม่เหล็กนาโนตรึงแอนติบอดีนี้สามารถจับกับเชื้อแบคทีเรีย และแยกเชื้อออกจากสารละลายโดยอาศัยสนามแม่เหล็กภายนอกได้จริง และสามารถตรวจวัดปริมาณเชื้อได้ตามสิทธิบัตรประเทศสหรัฐอเมริกาเลขที่ 8,883,455 และเลขที่ 9,201,066 แต่ยังไม่มีการวิจัยใดที่คิดค้นเกี่ยวกับการแยก และตรวจวัดปริมาณเชื้อมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค โดยใช้อนุภาคแม่เหล็กนาโนติดกับโดเมนที่จับกับผนังเซลล์ของเอนไซม์เอเอ็มแอล ซึ่งผลของการตรวจวัดปริมาณเชื้อนี้สามารถใช้ในการประกอบการประเมินความเสี่ยงการเกิดโรคพิษได้

- มีการวิจัยที่รายงานการตรวจวัดปริมาณของเชื้อซาลโมเนลลา ไทฟิมูเรียม (*Salmonella typhimurium*) โดยใช้อนุภาคแม่เหล็กนาโนตรึงด้วยแอนติบอดีที่มีความจำเพาะเจาะจงกับเชื้อ ผ่านการสร้างพันธะระหว่างหมู่คาร์บอกซิลบนพื้นผิวของอนุภาคนาโนแม่เหล็ก และหมู่อะมิโนของแอนติบอดี โดยใช้ 1-เอทิล-3-(3-ไดเมทิลลามีนโพรพิล) คาร์โบไดอิมิดไฮโดรคลอไรด์ (1-ethyl-3-(3-dimethylaminepropyl) carbodiimide hydrochloride; EDC) เป็นรีเอเจนต์คู่ควบ จากนั้นจึงแยกแบคทีเรียที่ต้องการตรวจวัดออกจากสารเจือปนอื่นๆ โดยอาศัยสนามแม่เหล็กภายนอก ตามด้วยการกรองด้วยกระดาษกรองแบบเลือกผ่านโดยใช้เมมเบรนเซลลูโลสแอซิเตต (cellulose acetate membrane) ที่รูพรุนมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8 ไมโครเมตร เพื่อแยกเชื้อที่ถูกจับด้วยอนุภาค และวิเคราะห์ปริมาณของเชื้อจากความเข้มข้นที่ปรากฏบนแผ่นเมมเบรน โดยพบว่าความเข้มข้นของสปีบนแผ่นเมมเบรนแปรผันตรงกับปริมาณเชื้อ ทั้งนี้สามารถตรวจวัดปริมาณแบคทีเรียได้ความเข้มข้นต่ำสุด (Limit of detection; LOD) ที่ 2×10^1 โคโลนีต่อมิลลิลิตร อย่างไรก็ตามงานวิจัยดังกล่าวยังประสบปัญหาการตรวจวัดเนื่องจากความเข้มข้นต่ำที่สุดของแบคทีเรียที่สามารถตรวจวัดได้ยังมีค่าสูง ทำให้ไม่สามารถตรวจวัดเชื้อในปริมาณที่ต่ำได้ (Anal. Chem., Vol 406, p 406-866, 2014)

- นอกจากนี้ยังมีรายงานการนำเอาพอลิเมอร์มาตรึงบนพื้นผิวของอนุภาคแม่เหล็กนาโน เพื่อช่วยทำให้อนุภาคมีความเสถียรมากขึ้น และสามารถกระจายตัวอยู่ในสารละลายได้ดียิ่งขึ้น มีการวิจัยที่เปรียบเทียบสมบัติการกระจายตัว และความเสถียรของอนุภาคแม่เหล็กนาโนที่ตรึง และไม่ตรึงพอลิเมอร์ โดยได้สังเคราะห์อนุภาคแม่เหล็กนาโนตรึงด้วยพอลิอะคริลิกแอซิด (poly(acrylic acid)) หรือพอลิสไตรีน (polystyrene) ลงบนพื้นผิว เริ่ม

จากนาอนุภาคนาโนแม่เหล็กมาทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (peroxide group) บนพื้นผิว ซึ่งจะทำให้หน้าที่เป็นสารริเริ่มปฏิกิริยา และใช้ 1-ฟีนีลเอทิลไดไทโอเบนโซเอต (1-phenylethyl dithiobenzoate; PVB) ทำหน้าที่เป็นสารถ่ายโอนโซ่ (chain transfer agent) นำไปทำปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันแบบควบคุม (controlled polymerization) ด้วยกลไกแบบ reversible addition-fragmentation chain transfer (RAFT) จะได้อนุภาคนาโนแม่เหล็กนาโนที่ตรึงด้วยพอลิอะคริลิกแอซิดหรือพอลิสไตรีน แล้วนำไปทดสอบสมบัติการกระจายตัวและความเสถียร พบว่าอนุภาคนาโนแม่เหล็กนาโนที่ตรึงพอลิเมอร์ลงบนพื้นผิวสามารถกระจายตัว และมีความเสถียรดีกว่าอนุภาคนาโนแม่เหล็กนาโนที่ไม่ได้ตรึงพอลิเมอร์ลงบนพื้นผิว (Macromolecules, Vol 27, p 1665-1669, 2006)

แนวทางหนึ่งที่น่าสนใจในการปรับปรุงพื้นผิวของวัสดุด้วยพอลิเมอร์คือ การเตรียมเป็นพอลิเมอร์บรัช (polymer brushes) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่มีปลายของโซ่ด้านหนึ่งยึดติดบนพื้นผิวด้วยพันธะโควาเลนต์ (covalent bond) ทำให้มีเสถียรภาพในการยึดติดบนพื้นผิวสูงกว่าการดูดซับทางกายภาพ (physical absorption) การเตรียมพอลิเมอร์บรัชนิยมเตรียมด้วยปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันริเริ่มจากพื้นผิว (surface-initiated polymerization) ทั้งนี้ความยาวของโซ่พอลิเมอร์สามารถควบคุมได้หากใช้ปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันแบบควบคุม (controlled polymerization) เช่น atom transfer radical polymerization (ATRP) และ reversible addition-fragmentation chain transfer (RAFT) (Prog. Polym. Sci., Vol 25, p 677-710, 2000 และ Chem. Rev., Vol 109, p 5437-5527, 2009) โดยสมบัติทางเคมีและกายภาพของพอลิเมอร์บรัชขึ้นกับชนิดของมอนอเมอร์ (monomer) ที่เลือกใช้ในการสังเคราะห์

การประดิษฐ์นี้สนใจที่จะนำสารประกอบอนุภาคนาโนแม่เหล็กนาโนที่ตรึงด้วยพอลิเมอร์ที่มีหมู่ฟังก์ชันเป็นหมู่คาร์บอกซิล หรือพอลิอะคริลิกแอซิด และยึดติดโคโมโนเมอร์ของเฮกซะเมทิลเบนซีนไดออลซึ่งสามารถจับกับเชื้อ ก่อโรคฟันผุได้อย่างจำเพาะ มาใช้ในการแยก และตรวจวัดเชื้อก่อโรคฟันผุเชิงปริมาณได้ด้วยตาเปล่า

โดยอนุภาคนาโนแม่เหล็กนาโนนอกจากจะทำหน้าที่ในการแยกเชื้อออกจากสารละลายโดยอาศัยสนามแม่เหล็กภายนอกแล้ว ยังสามารถทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการเกิดสีของซัสเตรทเททราเมทิลเบนซิดีน (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine; TMB) และยูเรียไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (urea-hydrogen peroxide; H_2O_2) ได้มีประสิทธิภาพทัดเทียมกับเอนไซม์ฮอร์เรดิชเพอร์ออกซิเดส (horseradish peroxidase; HRP) ดังตัวอย่างงานวิจัยของ Woo และคณะ ที่นำเอาอนุภาคนาโนแม่เหล็กนาโนมาใช้ในการหาปริมาณเชื้อไวรัสเอชไอวี หรือเชื้อรีโทรไวรัส (retroviruses) และเซลล์มะเร็งเต้านม (breast cancer cells) โดยนำอนุภาคนาโนแม่เหล็กนาโนที่ตรึงด้วยแอนติบอดีที่มีความจำเพาะเจาะจงกับเชื้อ แล้วใส่ลงไปในสารละลายที่มีเชื้อรีโทรไวรัส หรือเซลล์มะเร็งเต้านม วิเคราะห์ปริมาณของเชื้อไวรัสหรือเซลล์มะเร็งเต้านมที่พบได้โดยพิจารณาการเปลี่ยนสีของซัสเตรทเททราเมทิลเบนซิดีน และยูเรียไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ซึ่งใช้อนุภาคนาโนแม่เหล็กนาโนในการทำหน้าที่เป็นตัวเร่งการเกิดปฏิกิริยา

การเปลี่ยนสี จากการศึกษาพบว่าสีของสารละลายที่ปรากฏมีความเสถียรมากกว่าสีของสารละลายที่เกิดจากการใช้
 สอร์สเรดิซเปอร์ออกซิเดสเอนไซม์ในการขยายสัญญาณ และสามารถสังเกตเห็นผลได้ด้วยตาเปล่าเช่นกัน แต่จาก
 งานวิจัยที่ผ่านมายังไม่พบงานวิจัยใดที่ทำการขยายสัญญาณบนแผ่นเมมเบรนจากปฏิกิริยาการเกิดสีของซีสเตรพ
 เททราเมทิลเบนซิดีน และยูเรียไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งใช้อนุภาคแม่เหล็กนาโนบนแผ่นเมมเบรนเป็นตัวเร่ง
 5 ปฏิกิริยาแทนสอร์สเรดิซเปอร์ออกซิเดส (Int J Mol Sci., Vol 14, p 9999-10014, 2013)

ลักษณะและความมุ่งหมายของการประดิษฐ์

การประดิษฐ์นี้เกี่ยวข้องกับสารประกอบอนุภาคที่สามารถจับกับเชื้อก่อโรคพิษได้อย่างจำเพาะสำหรับใช้
 ในการแยกและตรวจวัดเชื้อก่อโรคพิษเชิงกึ่งปริมาณได้ด้วยตาเปล่า ประกอบด้วย อนุภาคแม่เหล็กนาโน และ
 โดเมนของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่จับกับผนังเซลล์ของเชื้อก่อโรคพิษอย่างจำเพาะ เตรียมโดยการนำโดเมนของ
 10 เอนไซม์ออโตมิวตะโนไลซินที่ทำหน้าที่จับกับผนังเซลล์ มายึดติดกับอนุภาคแม่เหล็กนาโนตรึงด้วยพอลิเมอร์ที่มีหมู่
 ฟังก์ชันเป็นหมู่คาร์บอกซิล หรือพอลิอะคริลิกแอซิดผ่านพันธะเอไมด์ เกิดเป็นสารประกอบอนุภาคที่มีความจำเพาะ
 ในการจับกับเชื้อมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค โดยโดเมนที่ทำหน้าที่จับกับผนังเซลล์นี้มีความจำเพาะต่อเชื้อมิวแทนส์
 สเตรปโตคอคไค จึงสามารถเลือกจับเฉพาะเชื้อนี้ ในขณะที่อนุภาคแม่เหล็กนาโนตรึงด้วยพอลิเมอร์ที่มีหมู่ฟังก์ชัน
 15 เป็นหมู่คาร์บอกซิล หรือพอลิอะคริลิกแอซิดที่ยึดติดกับโดเมนของเอนไซม์ข้างต้นก็จะทำหน้าที่แยกเชื้อที่ถูกจับอยู่
 กับโดเมนให้ออกมาจากสารละลายโดยอาศัยสนามแม่เหล็กภายนอก และยังสามารถวิเคราะห์ปริมาณของเชื้อที่
 แยกออกมาได้ โดยทำการกรองแบบเลือกผ่าน (selective filtration) ผ่านแผ่นเมมเบรนเพื่อแยกสารประกอบ
 อนุภาคที่จับเชื้อมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค ออกจากสารประกอบอนุภาคที่ไม่จับกับเชื้อ ซึ่งสามารถวิเคราะห์
 จำนวนเชื้อเชิงกึ่งปริมาณ (semi-quantitative analysis) ได้ โดยพิจารณาจากความเข้มสีของสารประกอบ
 อนุภาคที่ค้างอยู่บนแผ่นเมมเบรน นอกจากนี้เมื่อเติมเททราเมทิลเบนซิดีน และยูเรียไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลงบน
 20 เมมเบรน สามารถขยายสัญญาณจากปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีโดยมีอนุภาคแม่เหล็กนาโนเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ช่วยเพิ่ม
 ประสิทธิภาพในการตรวจวัดทั้งในแง่ของความไว (sensitivity) และขีดจำกัด (detection limit)

ความมุ่งหมายของการประดิษฐ์นี้เพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในการแยกและตรวจวัดเชื้อก่อโรคพิษเชิงกึ่ง
 ปริมาณได้ด้วยตาเปล่า โดยอาศัยการทำงานของสารประกอบอนุภาคแม่เหล็กนาโนที่ตรึงด้วยพอลิเมอร์ที่มีหมู่
 ฟังก์ชันเป็นหมู่คาร์บอกซิล หรือพอลิอะคริลิกแอซิด และยึดติดกับโดเมนของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่จับกับผนังเซลล์
 25 ของเชื้อก่อโรคพิษอย่างจำเพาะ ซึ่งผลิตภัณฑ์นี้สามารถทำได้ข้างเก้าอี้คนใช้ โดยไม่ต้องใช้เครื่องมือที่มีความ
 ยุ่งยากซับซ้อน และประหยัดเวลา

การเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

การประดิษฐ์นี้เกี่ยวข้องกับสารประกอบอนุภาคที่สามารถจับกับเชื้อก่อโรคพิษได้อย่างจำเพาะสำหรับใช้ในการแยกและตรวจวัดเชื้อก่อโรคพิษจนถึงปริมาณได้ด้วยตาเปล่า ประกอบด้วย อนุภาคแม่เหล็กนาโน และ โดเมนของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่จับกับผนังเซลล์ของเชื้อก่อโรคพิษอย่างจำเพาะ เตรียมโดยการนำโดเมนของ

5 เอนไซม์ออโตมิวติโนไลซินที่ทำหน้าที่จับกับผนังเซลล์ ซึ่งสามารถจับกับเชื้อก่อโรคพิษในกลุ่ม สเตรปโตคอคไคได้อย่างจำเพาะมายึดติดผ่านพันธะเอไมด์กับอนุภาคแม่เหล็กนาโนที่ทำให้เสถียรด้วยพอลิเมอร์ที่มีหมู่ฟังก์ชันเป็นหมู่คาร์บอกซิล หรือพอลิอะคริลิกแอซิด (poly(acrylic acid)) เกิดเป็นสารประกอบอนุภาคที่มีความจำเพาะในการจับกับเชื้อก่อโรคพิษในกลุ่มสเตรปโตคอคไค

โดเมนที่ทำหน้าที่จับกับผนังเซลล์นี้มีความจำเพาะต่อเชื้อมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค จึงสามารถเลือกจับ

10 เฉพาะเชื้อนี้ ในขณะที่อนุภาคแม่เหล็กนาโนตรึงด้วยพอลิเมอร์ที่มีหมู่ฟังก์ชันเป็นหมู่คาร์บอกซิล หรือพอลิอะคริลิกแอซิด ก็จะสามารถแยกเชื้อที่จับกับสารประกอบอนุภาคนี้ออกมาจากสารละลายโดยอาศัยสนามแม่เหล็กภายนอก และยังสามารถวิเคราะห์ปริมาณของเชื้อที่แยกออกมาได้

การแยกและตรวจวัดปริมาณเชื้อมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไคเบื้องต้นแบ่งเป็น 3 ส่วน ดังนี้

(1) นำเอาสารประกอบอนุภาคที่มีความจำเพาะในการจับกับเชื้อมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค ใส่ลงไปในหลอดทดลองที่บรรจุเชื้อมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไคที่มีความเข้มข้นของเชื้อตามต้องการ ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา

15 20-50 นาทีที่อุณหภูมิห้อง แล้วแยกสารประกอบอนุภาคที่มีความจำเพาะในการจับกับเชื้อมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไคนี้ ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ (culture media) โดยใช้สนามแม่เหล็กภายนอกเป็นเวลา 5-20 นาที ใช้หลอดดูดทำการดูดอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้ง แล้วนำสารประกอบอนุภาคที่แยกออกมาไปวิเคราะห์ปริมาณเชื้อมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไคที่พบ

(2) เตรียมสารประกอบอนุภาคที่แยกได้จาก (1) ความเข้มข้น 0.15 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลินที่มีพีเอช 7.4 จากนั้นใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายนี้ เพื่อนำไปกรองแบบสุญญากาศผ่านแผ่น

20 เมมเบรนเซลลูโลสอะซิเตดที่มีรูพรุนขนาดขนาด 0.8-1.0 ไมครอน โดยสารประกอบอนุภาคที่จับกับเชื้อมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไคได้จะมีขนาดใหญ่กว่าขนาดรูพรุนของแผ่นเมมเบรน ทำให้สารประกอบอนุภาควางอยู่บนแผ่นเมมเบรน ส่วนสารประกอบอนุภาคที่ไม่ได้จับกับเชื้อมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไคจะมีขนาดเล็กกว่ารูพรุนของเมมเบรน จึงผ่านรูพรุนไปได้ ในขั้นนี้สามารถแยกสารประกอบอนุภาคที่จับกับเชื้อมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไคออกมา

25 วิเคราะห์เชื้อเชิงปริมาณได้โดยพิจารณาจากความเข้มสีที่ปรากฏบนแผ่นเมมเบรน

(3) การขยายสัญญาณการตรวจวัดปริมาณเชื้อมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค ได้โดยการหยดเทรามาทิลเบนซิดีน, ยูเรียไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และบัฟเฟอร์โซเดียมอะซิเตดที่มีพีเอช 4-6 (sodium acetate; NaAc)

หน้า 7 ของจำนวน 7 หน้า

ความเข้มข้น 0.1-0.3 โมลาร์ ตามลำดับ ลงบนแผ่นเมมเบรน ที่งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20-60 วินาที แผ่นเมมเบรนจะเกิดการเปลี่ยนจากสีน้ำตาลเป็นสีฟ้า ทำให้เห็นสีได้ชัดเจนขึ้น

วิธีการในการประดิษฐ์ที่ดีที่สุด

เหมือนกับที่ได้กล่าวไว้แล้วในหัวข้อการเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

แบบสรุปปิดโครงการวิจัย (จัดทำแยกต่างหากจากรายงานฉบับสมบูรณ์)

สัญญาเลขที่ TRG5780043 ชื่อโครงการ การตรวจหาเชื้อมีวแทนส์ สเตربتโคคโคได้อย่างรวดเร็วโดยอาศัยความจำเพาะต่อการจับ
ซับสเตรตของเอนไซม์ออโตมิวติโนไลซิน หัวหน้าโครงการ พนิดา ธัญญศรีสังข์ หน่วยงาน คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์
มหาวิทยาลัย โทรศัพท์ และ โทรสาร 02-218-8680 อีเมล panida.t@g.chula.edu
สถานะผลงาน ☐ ปกปิด ☐ ไม่ปกปิด

ความสำคัญ / ความเป็นมา

Caries risk assessment (CRA) is a method that evaluates the risk of caries development in an individual. This method allows dental professionals to be more efficient and to provide successful prevention and treatment. CRA assesses an individual's risk based on several factors such as past caries experience, dietary habits, socioeconomic status, and laboratory tests (bacterial caries activity tests, salivary flow rate and buffer capacity). For microbiological caries activity test, bacterial culture is necessary. Since this process requires specific laboratory supplies and time to grow bacteria, it is not practical for rural areas. Currently, a rapid detection kit based on antigen-antibody reaction is available in markets. Gao and colleagues reported that this kit could determine the number of *S. mutans* in saliva samples more accurately than the culture-based method. However, the classification of caries risk is still based on the salivary MS levels obtained from the culture-based method.

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. To develop a probe specific to mutans streptococci for rapid detection assay using a genetically engineered CWBD of Aml linked to HRP.
2. To develop a probe specific to mutans streptococci for rapid detection assay using CWBD of Aml conjugated with PAA-grafted MNPs.
3. To evaluate the specific affinity of CWBD-conjugated MNPs to mutans streptococci.
4. To examine the quantitative ability of the chromogenic assay in the detection of mutans streptococci.

ผลการวิจัย (สั้น ๆ ที่บ่งชี้ประเด็นข้อค้นพบ กระบวนการ ผลผลิต และการเรียนรู้)

The colorimetric assay using CWBD-conjugated MNPs has an efficiency to bind to mutans streptococci (MS), which are one of major dental caries pathogens and can distinguish MS from the other two predominant streptococcal species in oral cavity. Moreover, the color intensity of CWBD-conjugated MNPs can represent the semi-quantitative number of bacteria in range using in caries risk assessment (CRA). Therefore, it could be developed into a visual MS detection tool for CRA. However, to develop this method for clinical applications, we need to perform the experiment using saliva, which is more complex than single species culture.

คำสืบค้น (Keywords)

Rapid detection, *Streptococcus mutans*, mutans streptococci, magnetic nanoparticles and peptidoglycan hydrolase.

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ (ดูคำจำกัดความ และตัวอย่างด้านหลังแบบฟอร์ม)

☐ ด้านนโยบาย โดยใคร (กรุณาให้ข้อมูลเจาะจง).....

มีการนำไปใช้อย่างไร

.....

☐ ด้านสาธารณะ โดยใคร (กรุณาให้ข้อมูลเจาะจง)

มีการนำไปใช้อย่างไร

.....

☐ ด้านชุมชนและพื้นที่ โดยใคร (กรุณาให้ข้อมูลเจาะจง)

มีการนำไปใช้อย่างไร

.....

☐ ด้านพาณิชย์ โดยใคร (กรุณาให้ข้อมูลเจาะจง)

มีการนำไปใช้อย่างไร

.....

☐ ด้านวิชาการ โดยใคร (กรุณาให้ข้อมูลเจาะจง)

มีการนำไปใช้อย่างไร (กรุณาให้ข้อมูลเจาะจง)

.....

☒ ยังไม่มีการนำไปใช้ (โปรดกรอกในกรอบถัดไป)

(กรณีที่ยังไม่มีการใช้ประโยชน์) ผลงานวิจัยมีศักยภาพในการนำไปใช้ประโยชน์

☐ ด้านนโยบาย ☐ ด้านสาธารณะ ☒ ด้านชุมชนและพื้นที่ ☐ ด้านพาณิชย์ ☐ ด้านวิชาการ

ข้อเสนอแนะเพื่อให้ผลงานถูกนำไปใช้ประโยชน์

เนื่องจากผลงานที่ได้ยังอยู่ในขั้นต้นแบบ ยังต้องมีการพัฒนารูปแบบให้ใช้ได้จริงในทางคลินิก ยังต้องทดสอบกับตัวอย่าง
น้ำลายจากคนไข้ รวมถึงต้องตรวจสอบ sensitivity and specificity อีกด้วย

การเผยแพร่/ประชาสัมพันธ์ (กรุณาให้รายละเอียด พร้อมแนบหลักฐาน)

1. สิ่งพิมพ์ หรือสื่อทั่วไป

☐ หนังสือพิมพ์ ☐ วารสาร ☐ โทรศัพท์ ☐ วิทยุ ☐ เว็บไซต์ ☐ คู่มือ/แผ่นพับ ☐ จัดประชุม/อบรม ☐ อื่น ๆ

.....

2. สิ่งพิมพ์ทางวิชาการ (วารสาร, การประชุม ให้ระบุรายละเอียดแบบการเขียนเอกสารอ้างอิง เพื่อการค้นหาซึ่งควรประกอบด้วย
ชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง แหล่งพิมพ์ ปี พ.ศ. (ค.ศ.) ฉบับที่ หน้า)

Analytical Methods, 2018, DOI: 10.1039/C8AY00114F