

 คำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ☐ การประดิษฐ์ ☐ การออกแบบผลิตภัณฑ์ ☒ อนุสิทธิบัตร ข้าพเจ้าผู้ลงลายมือชื่อในคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้ ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ตามพระราชบัญญัติสิทธิบัตร พ.ศ.2522 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติสิทธิบัตร(ฉบับที่ 2) พ.ศ.2535 และพระราชบัญญัติสิทธิบัตร (ฉบับที่ 3) พ.ศ.2542		สำหรับเจ้าหน้าที่	
		วันที่รับคำขอ 29/03/2565	เลขที่คำขอ 2203000771
		วันที่ยื่นคำขอ 29/03/2565	
		สัญลักษณ์จำแนกการประดิษฐ์ระหว่างประเทศ	
ใช้กับแบบผลิตภัณฑ์		ประเภทผลิตภัณฑ์	
วันประกาศโฆษณา		เลขที่ประกาศโฆษณา	
วันออกสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร		เลขที่สิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร	
ลายมือชื่อเจ้าหน้าที่			

1. ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์/การออกแบบผลิตภัณฑ์ ดีเอ็นเอลูกผสมสายคุ

2. คำขอรับสิทธิบัตรการออกแบบผลิตภัณฑ์นี้เป็นคำขอสำหรับผลิตภัณฑ์อย่างเดียวกันและเป็นคำขอลำดับที่
ในจำนวน คำขอ ที่ยื่นในคราวเดียวกัน

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

ชื่อ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ที่อยู่ 239 ถนน ห้วยแก้ว

ตำบล/แขวง สุเทพ อำเภอ/เขต เมืองเชียงใหม่ จังหวัด เชียงใหม่ รหัสไปรษณีย์ 50200 ประเทศ ไทย

อีเมล Tloubi.cmu@gmail.com

☐ เลขประจำตัวประชาชน ☐ เลขทะเบียนนิติบุคคล ☒ เลขประจำตัวผู้เสียภาษีอากร

0994000423179

☐ เพิ่มเติม (ดั่งแนบ)

ในกรณีที่กรมา สื่อสารกับท่าน ท่านสะดวกใช้ทาง ☒ อีเมลผู้ขอ ☐ อีเมลตัวแทน

3.1 สัญชาติ ไทย

3.2 โทรศัพท์

3.3 โทรสาร

4. สิทธิบัตรในการขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ☐ ผู้ประดิษฐ์/ผู้ออกแบบ ☒ ผู้รับโอน ☐ ผู้ขอรับสิทธิโดยเหตุอื่น

5. ตัวแทน (ถ้ามี)

ชื่อ นางสาว พันทนา คำเขียว

ที่อยู่ หน่วยจัดการทรัพยากรสัตว์ป่าและถ่ายทอดเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เลขที่ 239 ถนนห้วยแก้ว

ตำบล/แขวง สุเทพ อำเภอ/เขต เมืองเชียงใหม่ จังหวัด เชียงใหม่ รหัสไปรษณีย์ 50200 ประเทศ

อีเมล

เลขประจำตัวประชาชน

1500500072322

☒ เพิ่มเติม (ดั่งแนบ)

5.1 ตัวแทนเลขที่ 2279

5.2 โทรศัพท์

5.3 โทรสาร

6. ผู้ประดิษฐ์/ผู้ออกแบบผลิตภัณฑ์ ☐ ชื่อและที่อยู่เดียวกันกับผู้ขอ

ชื่อ นาย ภิญญาพัชญ์ คำพิคำ

ที่อยู่ 22/1 หมู่ที่ 4

ตำบล/แขวง สันทรายน้อย อำเภอ/เขต สันทราย จังหวัด เชียงใหม่ รหัสไปรษณีย์ 50210 ประเทศ ไทย

อีเมล

เลขประจำตัวประชาชน

1509900968411

☒ เพิ่มเติม (ดั่งแนบ)

7. คำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้แยกจากหรือเกี่ยวข้องกับคำขอเดิม

ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ขอให้ถือว่าได้ยื่นคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้ ในวันเดียวกับคำขอรับสิทธิบัตร

เลขที่ วันยื่น เพราะคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้แยกจากหรือเกี่ยวข้องกับคำขอเดิมเพราะ

☐ คำขอเดิมมีการประดิษฐ์หลายอย่าง ☐ ถูกคัดค้านเนื่องจากผู้ขอไม่มีสิทธิ ☐ ขอเปลี่ยนแปลงประเภทของสิทธิ

หมายเหตุ ในกรณีที่ไม้อาจระบุรายละเอียดได้ครบถ้วน ให้จัดทำเป็นเอกสารแนบท้ายแบบพิมพ์นี้โดยระบุหมายเลขกำกับข้อและหัวข้อที่แสดงรายละเอียด

สำหรับเจ้าหน้าที่			
จำแนกประเภทสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร			
☐ กลุ่มวิศวกรรม	☐ กลุ่มเคมี	สิทธิบัตรการออกแบบ	อนุสิทธิบัตร
สิทธิบัตรการประดิษฐ์ (วิศวกรรม)	สิทธิบัตรการประดิษฐ์ (เคมีเทคนิค)	☐ สิทธิบัตรการออกแบบ (ออกแบบผลิตภัณฑ์ 1)	☐ อนุสิทธิบัตร (วิศวกรรม)
สิทธิบัตรการประดิษฐ์ (ไฟฟ้า)	สิทธิบัตรการประดิษฐ์ (ปิโตรเคมี)	☐ สิทธิบัตรการออกแบบ (ออกแบบผลิตภัณฑ์ 2)	☐ อนุสิทธิบัตร (เคมี)
สิทธิบัตรการประดิษฐ์ (ฟิสิกส์)	สิทธิบัตรการประดิษฐ์ (เทคโนโลยีชีวภาพ)	☐ สิทธิบัตรการออกแบบ (ออกแบบผลิตภัณฑ์ 3)	
	สิทธิบัตรการประดิษฐ์ (เภสัชภัณฑ์)		

Signed by DIP-CA

8. การยื่นคำขออนุญาตนำเข้า ☐ PCT ☐ เพิ่มเติม (ดังแนบ)

วันที่ยื่นคำขอ	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 โดยขอยื่นเป็นภาษา ☐ อังกฤษ ☐ ฝรั่งเศส ☐ เยอรมัน ☐ ญี่ปุ่น ☐ อื่นๆ _____

12. ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรขอให้อธิบดีประกาศโฆษณาคำขอรับสิทธิบัตรหรือรับจดทะเบียนและประกาศโฆษณาอนุสิทธิบัตรนี้ หลังจากวันที่ ☐ ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรขอให้ใช้รูปเขียนหมายเลข _____ ในการประกาศโฆษณา

13. คำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้ประกอบด้วย
ก. แบบพิมพ์คำขอ _____ 4 _____ หน้า
ข. รายละเอียดการประดิษฐ์ หรือคำพรรณนาแบบผลิตภัณฑ์ _____ 9 _____ หน้า
ค. ข้อถ้อยสิทธิ _____ 2 _____ หน้า
ง. รูปเขียน _____ 2 _____ รูป _____ 3 _____ หน้า
จ. ภาพแสดงแบบผลิตภัณฑ์ ☐ รูปเขียน _____ รูป _____ หน้า ☐ รูปถ่าย _____ รูป _____ หน้า
ฉ. บทสรุปการประดิษฐ์ _____ 1 _____ หน้า

14. เอกสารประกอบคำขอ
☒ เอกสารแสดงสิทธิในการขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร
☐ หนังสือรับรองการแสดงการประดิษฐ์/การออกแบบผลิตภัณฑ์
☒ หนังสือมอบอำนาจ
☐ เอกสารรายละเอียดเกี่ยวกับจุลชีพ
☐ เอกสารการxonับวันยื่นคำขอในต่างประเทศเป็นวันยื่นคำขอในประเทศไทย
☐ เอกสารขอเปลี่ยนแปลงประเภทของสิทธิ
☒ เอกสารอื่นๆ

15. ข้าพเจ้าขอรับรองว่า
☒ การประดิษฐ์นี้ไม่เคยยื่นขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรมาก่อน
☐ การประดิษฐ์นี้ได้พัฒนาปรับปรุงมาจาก _____

16. ลายมือชื่อ
☐ ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ☒ ตัวแทน
SN=1500500072322
(นางสาว พันทนา คำเขียว, นาย สรรพวรรธ วิทยาชัย)

หมายเหตุ บุคคลใดยื่นขอรับสิทธิบัตรการประดิษฐ์หรือการออกแบบผลิตภัณฑ์ หรืออนุสิทธิบัตร โดยการแสดงข้อความอันเป็นเท็จแก่พนักงานเจ้าหน้าที่ เพื่อให้ได้ไปซึ่งสิทธิบัตรหรืออนุสิทธิบัตร ต้องระวางโทษ จำคุกไม่เกินหกเดือน หรือปรับไม่เกินห้าพันบาท หรือทั้งจำทั้งปรับ

5. ตัวแทน (ถ้ามี) (ต่อ)

5.2 ชื่อ นาย สรรพวรรธ วิทยาศัย สัญชาติ ไทย

บ้านเลขที่ หน่วยจัดการทรัพยากรสัตว์ป่าและถ่ายทอดเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เลขที่ 239 ตำบล/แขวง สุเทพ อำเภอ/เขต เมืองเชียงใหม่ จังหวัด เชียงใหม่ รหัสไปรษณีย์ 50000

6. ผู้ประดิษฐ์/ผู้ออกแบบผลิตภัณฑ์ (ต่อ)

6.2 ชื่อ นาย สาคร พรประเสริฐ สัญชาติ ไทย
บ้านเลขที่ 5/1 หมู่ที่ 8 ตำบล/แขวง บ้านแม อำเภอ/เขต สันป่าตอง จังหวัด เชียงใหม่ รหัสไปรษณีย์ 50120 ประเทศไทย

หน้า 1 ของจำนวน 9 หน้า

รายละเอียดการประดิษฐ์

ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์

ดีเอ็นเอลูกผสมสายคู่

สาขาวิทยาการที่เกี่ยวข้องกับการประดิษฐ์

- 5 เทคโนโลยีชีวภาพในส่วนที่เกี่ยวข้องกับ ดีเอ็นเอลูกผสมสายคู่ระหว่างอัลฟาธาลัสซีเมียชนิดเซาท์อีสต์เอเชีย (--^{SEA}), ชนิดไทย (--^{THAI}) และ ชนิดเชียงราย (--^{CR}) และอัลลีลปกติของยีน *ACTB* และยีน *HBA2*

ภูมิหลังของศิลปะหรือวิทยาการที่เกี่ยวข้อง

- โพลิเมอร์เชนรีแอคชัน (Polymerase chain reaction) หรือพีซีอาร์ (PCR) เป็นเทคนิคทางอณูชีววิทยามาตรฐานที่นิยมใช้ในการตรวจวินิจฉัยรูปแบบการกลายพันธุ์บนดีเอ็นเอที่ทำให้เกิดโรคธาลัสซีเมีย
- 10 ในปัจจุบัน ทั้งนี้การแปลผลการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธีดังกล่าวจำเป็นต้องใช้ดีเอ็นเอที่ทราบรูปแบบการกลายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคธาลัสซีเมียเป็นกลุ่มควบคุมเชิงบวก (Mutant control หรือ Positive control) หรือดีเอ็นเอที่ไม่มีการกลายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคธาลัสซีเมียเป็นกลุ่มควบคุมเชิงลบ (Wild-type control หรือ Negative control) ซึ่งโดยทั่วไปดีเอ็นเอเหล่านี้จะเตรียมได้จากผู้ที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นพาหะธาลัสซีเมีย, ผู้ป่วยโรคธาลัสซีเมีย, หรือคนปกติที่ไม่ได้เป็นพาหะหรือโรคธาลัสซีเมีย อย่างไรก็ตามการเตรียมชุดดีเอ็นเอ
- 15 ควบคุมด้วยวิธีนี้ยังมีข้อจำกัดอยู่มาก เช่น ดีเอ็นเอที่เตรียมได้จากมนุษย์เป็นสิ่งที่ใช้แล้วหมดไปต้องมีการเตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอใหม่จากผู้บริจาคทดแทนอยู่เสมอ, การกลายพันธุ์บางชนิดที่พบได้น้อยแต่มีความสำคัญทางคลินิกอาจทำให้การหาตัวอย่างดีเอ็นเอจากผู้บริจาคเป็นไปได้ยาก, หรือในบางกรณีก็ไม่สามารถหาผู้บริจาคที่มีรูปแบบการกลายพันธุ์ได้หลากหลายทำให้การตรวจวินิจฉัยชนิดการกลายพันธุ์ไม่ครอบคลุมความถี่ของโรคธาลัสซีเมียในกลุ่มประชากรโดยเฉพาะในพื้นที่ที่โรคธาลัสซีเมียไม่ได้เป็นโรค
- 20 ประจำถิ่น เป็นต้น

- ปัจจุบันมีการออกแบบและประดิษฐ์ชุดดีเอ็นเอสำหรับใช้เป็นดีเอ็นเอควบคุมสำหรับการตรวจวินิจฉัยรูปแบบการกลายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคเบต้าธาลัสซีเมียโดยใช้เทคนิคการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์เฉพาะจุด (Site-directed mutagenesis) เพื่อสร้างพลาสมิดดีเอ็นเอ (Plasmid DNA) ที่มียีนเบต้าโกลบินปกติ 1 ชุด และยีนเบต้าโกลบินกลายพันธุ์ชนิดต่าง ๆ 3 ชุด รวม 10 ชนิดการกลายพันธุ์ แม้ว่าชุดดีเอ็นเอ
- 25 ดังกล่าวจะมีข้อดีคือสามารถใช้ทดแทนดีเอ็นเอจากผู้บริจาคได้และสามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างไม่จำกัด แต่การบรรจุยีนเบต้าโกลบินปกติและยีนเบต้าโกลบินกลายพันธุ์ลงในพลาสมิด 4 ชุดแยกกันก็ถือเป็นอีกข้อจำกัดหนึ่งด้านการใช้งานเนื่องจากหากผู้ใช้งานต้องการเพิ่มจำนวนของพลาสมิดทั้ง 4 ชุด จะต้องทำการเพิ่มจำนวนของพลาสมิดแต่ละชุดแยกกันใน 4 ปฏิภาณซึ่งมีค่าใช้จ่ายมากกว่าการเพิ่มจำนวนของพลาสมิดเพียง 1 ชุดถึง 4 เท่า (เอกสารอ้างอิงเลขที่: DOI: 10.1111/ijlh.13292)

หน้า 2 ของจำนวน 9 หน้า

และโดยเฉพาะอย่างยิ่งเอกสารสิทธิบัตรสาธารณรัฐประชาชนจีนตามเอกสารประกาศโฆษณาเลขที่ CN109112199A ได้ประดิษฐ์ชุดยีนสำหรับตรวจหาอัลฟาธาลัสซีเมียแต่เป็นการผลิตชุดตรวจเฉพาะ ยีนอัลฟาธาลัสซีเมียที่เกิดจากการกลายพันธุ์แบบการกลายพันธุ์เฉพาะจุด (Point mutation) ซึ่งไม่สามารถ นำมาประยุกต์หรือใช้ได้กับการกลายพันธุ์ที่เกิดจากการขาดหายไปของชิ้นยีนขนาดใหญ่ (Large gene deletion)

และแม้ว่าในสาธารณรัฐประชาชนจีนจะมีการใช้เซลล์เม็ดเลือดขาวจากคนปกติที่ไม่เป็นพาหะหรือ โรคธาลัสซีเมีย, ผู้ที่เป็นพาหะธาลัสซีเมีย, และผู้ที่เป็นโรคธาลัสซีเมีย มาผลิตเป็นเซลล์ไลน์ (Cell line) จำนวนทั้งสิ้น 32 เซลล์ไลน์ รวมชนิดการกลายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคอัลฟาธาลัสซีเมียหรือโรคเบต้าธาลัสซีเมียจำนวนทั้งสิ้น 18 ชนิด เพื่อใช้เป็นวัสดุควบคุมสำหรับการตรวจวินิจฉัยรูปแบบการกลายพันธุ์บนดีเอ็นเอ ที่ทำให้เกิดโรคธาลัสซีเมียในชาวจีนได้ แต่ในขั้นตอนการประดิษฐ์นั้นยังมีความซับซ้อนและค่อนข้างยุ่งยาก เนื่องจากต้องใช้ไวรัสในการเหนี่ยวนำให้เกิดเซลล์ไลน์ อีกทั้งก่อนการนำเซลล์ไลน์ดังกล่าวมาใช้งานเป็นชุด ดีเอ็นเอควบคุมสำหรับการตรวจวินิจฉัยรูปแบบการกลายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคธาลัสซีเมียต้องมีขั้นตอนการ สกัด นำเอาดีเอ็นเอออกมาจากเซลล์ไลน์ทั้ง 32 เซลล์ไลน์เสมอ (เอกสารอ้างอิงเลขที่: DOI: 10.1111/tjhl.13213)

จนถึงปัจจุบันยังไม่มีวิธีการรักษาสำหรับโรคธาลัสซีเมียชนิดดังกล่าว ดังนั้นการตรวจวินิจฉัย รูปแบบการกลายพันธุ์ชนิด --^{SEA}, --^{THAI}, และ --^{CR} ซึ่งถือได้ว่าเป็นการกลายพันธุ์ที่เกิดจากการขาดหายไปของ ชิ้นยีนขนาดใหญ่ (Large gene deletion) ที่พบได้บ่อยในกลุ่มประชากรไทยและชาวเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ในคู่สมรสก่อนการตั้งครรภ์จึงถือเป็นวิธีการป้องกันการเกิดโรคอัลฟาธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงได้อย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุด

ลักษณะและความมุ่งหมายของการประดิษฐ์

การประดิษฐ์นี้มีความมุ่งหมายในการออกแบบและสร้างดีเอ็นเอลูกผสมสายคู่ระหว่างอัลฟาธาลัสซีเมียชนิดเซาท์อีสต์เอเชีย (--^{SEA}), ชนิดไทย (--^{THAI}) และ ชนิดเขียงราย (--^{CR}) และอัลลีลปกติของยีน *ACTB* และยีน *HBA2* ซึ่งยีนดังกล่าวถูกออกแบบและสร้างให้อยู่บนดีเอ็นเอเส้นเดียวกันทั้งหมดด้วยเทคนิคโอเวอร์แลปเอ็กซ์เทนชันพีซีอาร์ร่วมกับไพรเมอร์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้อนทับ (Overlap extension PCR with overlap primers)

อีกหนึ่งความมุ่งหมายของการประดิษฐ์นี้ได้แก่การพัฒนาชุดดีเอ็นเอสำหรับควบคุมการตรวจวินิจฉัยรูปแบบการกลายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคอัลฟาธาลัสซีเมีย โดยสามารถใช้ดีเอ็นเอดังกล่าวเพียง 1 ชิ้น เป็นชุดดีเอ็นเอควบคุมสำหรับการตรวจวินิจฉัยยีนอัลฟาโกลบินปกติและยีนอัลฟาโกลบินกลายพันธุ์ทั้ง 3 ชนิดที่พบได้บ่อยในประชากรไทยและชาวเอเชียตะวันออกเฉียงใต้

หน้า 3 ของจำนวน 9 หน้า

ความมุ่งหมายถัดไปของการประดิษฐ์นี้ได้แก่การสร้างดีเอ็นเอลูกผสมที่ซึ่งสามารถนำไปบรรจุลงในพลาสมิดดีเอ็นเอ เพื่อการใช้งานหรือเพื่อการเพิ่มปริมาณอย่างไม่จำกัดและสามารถใช้ทดแทนดีเอ็นเอจากมนุษย์ได้

5 และในการเปิดเผยนี้ผู้ประดิษฐ์ยังคงมุ่งหมายในการใช้งานดีเอ็นเอลูกผสมดังกล่าว ทั้งในรูปแบบของดีเอ็นเอลูกผสมที่ประดิษฐ์ขึ้นมาโดยตรง, โดยดัดแปลง, และผลิตภัณฑ์ชีววัตถุที่สร้างขึ้นมาโดยมีส่วนประกอบของดีเอ็นเอลูกผสมที่ผู้ประดิษฐ์ออกแบบและประดิษฐ์ขึ้น เป็นชุดดีเอ็นเอควบคุมสำหรับการตรวจวินิจฉัยรูปแบบการกลายพันธุ์ชนิด --^{SEA}, --^{THAI}, และ --^{CR} ในมนุษย์ด้วยวิธีการทางอนุชีววิทยาอันมีเทคนิคพีซีอาร์เป็นพื้นฐาน

10 ลักษณะของการประดิษฐ์ตามที่ได้เปิดเผยนี้เป็นการออกแบบและประดิษฐ์ดีเอ็นเอลูกผสมสายคู่ระหว่างอัลฟาธาลัสซีเมียชนิดเซาท์อีสต์เอเชีย (--^{SEA}), ชนิดไทย (--^{THAI}) และ ชนิดเชียงราย (--^{CR}) และอัลลีลปกติของยีน *ACTB* และยีน *HBA2* โดยใช้เทคนิคโอเวอร์แลปเอ็กซ์เทนชันพีซีอาร์ร่วมกับไพรเมอร์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้อนทับ (Overlap extension PCR with overlap primers) ซึ่งเป็นการรวมเอายีนอัลฟาการกลายพันธุ์ชนิด --^{SEA}, --^{THAI}, --^{CR}, ยีนอัลฟาปกติ และยีนเบต้าแอกตินปกติ มารวมไว้ด้วยกันเป็นดีเอ็นเอสายคู่ 1 ชิ้น

15 ลักษณะดังกล่าวไม่พบในธรรมชาติและยังไม่เคยมีปรากฏการออกแบบหรือประดิษฐ์ในลักษณะดังกล่าวมาก่อน

ในอีกรูปลักษณะหนึ่งของการออกแบบและประดิษฐ์นี้จะครอบคลุมการนำผลิตภัณฑ์ไปใช้เป็นชุดดีเอ็นเอควบคุมสำหรับการตรวจวินิจฉัยรูปแบบการกลายพันธุ์บนดีเอ็นเอที่ทำให้เกิดโรคอัลฟาธาลัสซีเมียเพียง 3 ชนิด ซึ่งครอบคลุมการใช้เป็นสารควบคุมในการตรวจวินิจฉัยการกลายพันธุ์ชนิดที่พบได้บ่อยบนยีนอัลฟาโกลบินซึ่งทำให้เกิดโรคอัลฟาธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงในประชากรไทยและชาวเอเชียตะวันออก

20 เพียงได้ได้โดยใช้ดีเอ็นเอที่ผู้ประดิษฐ์ออกแบบและประดิษฐ์ขึ้นเพียง 1 ชิ้นเท่านั้น อนึ่งโรคอัลฟาธาลัสซีเมียอันเกิดจากการกลายพันธุ์ชนิด --^{SEA}, --^{THAI}, และ --^{CR} ที่มีรูปแบบการถ่ายทอดพันธุกรรมแบบโฮโมไซกัส (Homozygous) และคอมพาวเฮเทอโรไซกัส (Compound heterozygous) ถือเป็นโรคธาลัสซีเมียที่มีความรุนแรงมากที่สุดในโลก เนื่องจากทำให้ทารกในครรภ์มีภาวะบวมน้ำจากฮีโมโกลบินบาร์ทส (Hemoglobin Bart's hydrops fetalis) ซึ่งทารกทั้งหมดจะเสียชีวิตตั้งแต่อยู่ในครรภ์มารดาหรือเสียชีวิตไม่กี่วันหลังจาก

25 คลอด อีกทั้งมารดาที่อาจจะมีอันตรายถึงชีวิตอันเนื่องมาจากภาวะครรภ์เป็นพิษ (Preeclampsia)

คำอธิบายรูปเขียนโดยย่อ

รูปที่ 1 คือ ขั้นตอนการสร้างดีเอ็นเอลูกผสมสายคู่ระหว่างอัลฟาธาลัสซีเมียชนิดเซาท์อีสต์เอเชีย (--^{SEA}) ขนาดความยาว 239 คู่เบส, ชนิดไทย (--^{THAI}) ขนาดความยาว 405 คู่เบส และ ชนิดเชียงราย (--^{CR}) ขนาดความยาว 335 คู่เบส และอัลลีลปกติของยีน *ACTB* ขนาดความยาว 125 คู่เบส และยีน *HBA2* ขนาดความยาว 175 คู่เบส

รูปที่ 2 คือ ผลลำดับดีเอ็นเอ (DNA sequencing) แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอลูกผสมสายคู่

การเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

ผู้ประดิษฐ์ออกแบบและประดิษฐ์ดีเอ็นเอลูกผสมสายคู่ระหว่างอัลฟาธาลัสซีเมียชนิดเซาท์อีสต์เอเชีย (--^{SEA}), ชนิดไทย (--^{THAI}) และ ชนิดเชียงราย (--^{CR}) และอัลลีลปกติของยีน *ACTB* และยีน *HBA2* ด้วยเทคนิคโอเวอร์แลปเอ็กซ์เทนชันพีซีอาร์ร่วมกับไพรเมอร์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้อนทับ (Overlap extension PCR with overlap primers) เพื่อให้ชิ้นดีเอ็นเอทั้ง 5 มาเชื่อมสนิทกันเป็นดีเอ็นเอสายคู่เส้นเดียว โดยมีลำดับชิ้นดีเอ็นเอจากปลาย 5' ถึง 3' คือ ยีนอัลฟาธาลัสซีเมียชนิดเซาท์อีสต์เอเชีย (--^{SEA}) ขนาดความยาว 239 คู่เบส, ยีนอัลฟาธาลัสซีเมียชนิดไทย (--^{THAI}) ขนาดความยาว 405 คู่เบส, ยีนอัลฟาธาลัสซีเมียชนิดเชียงราย (--^{CR}) ขนาดความยาว 335 คู่เบส, ยีน *ACTB* ขนาดความยาว 125 คู่เบส, และยีน *HBA2* ขนาดความยาว 175 คู่เบส ตามลำดับ รวมแล้วจะได้ดีเอ็นเอลูกผสมสายคู่ระหว่างอัลฟาธาลัสซีเมียชนิดเซาท์อีสต์เอเชีย (--^{SEA}), ชนิดไทย (--^{THAI}) และ ชนิดเชียงราย (--^{CR}) และอัลลีลปกติของยีน *ACTB* และยีน *HBA2* ขนาดความยาว 1,279 คู่เบส

ดังแสดงในรูปที่ 1 แสดงขั้นตอนการสร้างดีเอ็นเอลูกผสมสายคู่ระหว่างอัลฟาธาลัสซีเมียชนิดเซาท์อีสต์เอเชีย (--^{SEA}) ขนาดความยาว 239 คู่เบส, ชนิดไทย (--^{THAI}) ขนาดความยาว 405 คู่เบส และ ชนิดเชียงราย (--^{CR}) ขนาดความยาว 335 คู่เบส และอัลลีลปกติของยีน *ACTB* ขนาดความยาว 125 คู่เบส และยีน *HBA2* ขนาดความยาว 175 คู่เบส ด้วยเทคนิคโอเวอร์แลปเอ็กซ์เทนชันพีซีอาร์ร่วมกับไพรเมอร์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้อนทับ (Overlap extension PCR with overlap primers) โดย A คือ ชิ้นดีเอ็นเอสายคู่ของอัลฟาธาลัสซีเมียชนิดเซาท์อีสต์เอเชีย (--^{SEA}) ขนาดความยาว 239 คู่เบส, B คือ ชิ้นดีเอ็นเอสายคู่ของอัลฟาธาลัสซีเมียชนิดไทย (--^{THAI}) ขนาดความยาว 405 คู่เบส, C คือ ชิ้นดีเอ็นเอสายคู่ของอัลฟาธาลัสซีเมียชนิดเชียงราย (--^{CR}) ขนาดความยาว 335 คู่เบส, D คือ ชิ้นดีเอ็นเอสายคู่ของอัลลีลปกติของยีน *ACTB* ขนาดความยาว 125 คู่เบส, E คือ ชิ้นดีเอ็นเอสายคู่ของอัลลีลปกติของยีน *HBA2* ขนาดความยาว 175 คู่เบส, A' คือ ชิ้นดีเอ็นเอสายคู่ของอัลฟาธาลัสซีเมียชนิดเซาท์อีสต์เอเชีย (--^{SEA}) ขนาดความยาว 239 คู่เบสที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาดความยาว 10 คู่เบสซ้อนทับกับชิ้นดีเอ็นเอสายคู่ของอัลฟาธาลัสซีเมียชนิดไทย (--^{THAI}), B' คือ ชิ้นดีเอ็นเอสายคู่ของอัลฟาธาลัสซีเมียชนิดไทย (--^{THAI}) ขนาดความยาว 405 คู่เบสที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาดความยาว 10 คู่เบสซ้อนทับกับชิ้นดีเอ็นเอสายคู่ของอัลฟาธาลัสซีเมียชนิดเชียงราย (--^{CR}), C' คือ ชิ้นดีเอ็นเอสายคู่

หน้า 5 ของจำนวน 9 หน้า

ของอัลฟาธาลัสซีเมียชนิดเชิงร่าย (--^{CR}) ขนาดความยาว 335 คู่เบสที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาดความยาว 14 คู่เบสซ้อนทับกับจีนดีเอ็นเอสายคู่ของอัลลีลปกติของยีน *ACTB*, E' คือ จีนดีเอ็นเอสายคู่ของอัลลีลปกติของยีน *HBA2* ขนาดความยาว 175 คู่เบสที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาดความยาว 16 คู่เบสซ้อนทับกับจีนดีเอ็นเอสายคู่ของอัลลีลปกติของยีน *ACTB*

- 5
- ผู้ประดิษฐ์ออกแบบและใช้ดีเอ็นเอไพรเมอร์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้อนทับจำนวนทั้งสิ้น 10 เส้น ในการเพิ่มจำนวนจีนยีนอัลฟาธาลัสซีเมียชนิดเซาท์อีสต์เอเชีย (--^{SEA}) ขนาดความยาว 239 คู่เบส, จีนยีนอัลฟาธาลัสซีเมียชนิดไทย (--^{THAI}) ขนาดความยาว 405 คู่เบส, จีนยีนอัลฟาธาลัสซีเมียชนิดเชิงร่าย (--^{CR}) ขนาดความยาว 335 คู่เบส, จีนยีน *ACTB* ขนาดความยาว 125 คู่เบส, และจีนยีน *HBA2* ขนาดความยาว 175 คู่เบส จากผู้ที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นพาหะอัลฟาธาลัสซีเมียชนิดเซาท์อีสต์เอเชีย (--^{SEA}) จำนวน 1 ราย, ผู้ที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นพาหะอัลฟาธาลัสซีเมียชนิดชนิดไทย (--^{THAI}) จำนวน 1 ราย, ผู้ที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นพาหะอัลฟาธาลัสซีเมียชนิดชนิดเชิงร่าย (--^{CR}) จำนวน 1 ราย, และผู้ที่ไม่เป็นพาหะหรือโรคธาลัสซีเมียจำนวน 1 ราย ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยมีรายละเอียดดังตารางที่ 1
- 10

ตารางที่ 1 แสดงรายละเอียดดีเอ็นเอไพรเมอร์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้อนทับที่ผู้ประดิษฐ์ออกแบบและใช้ในการประดิษฐ์ครั้งนี้

15	จีนยีนที่ ต้องการ เพิ่ม จำนวน ด้วย เทคนิค พีซีอาร์	ดีเอ็นเอที่ใช้ เป็นต้นแบบ	ไพรเมอร์ที่ใช้ (แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์จาก 5' ไป 3')	ขนาดจีน ยีนที่ได้ หลังจาก ปฏิกิริยา พีซีอาร์ (คู่เบส)	ตำแหน่งบน ฐานข้อมูลจีโนม มนุษย์
20					
25	เซาท์ อีสต์ เอเชีย (-- ^{SEA})	ดีเอ็นเอจากผู้ ที่ได้รับการ วินิจฉัยว่า เป็น พาหะอัลฟา ธาลัสซีเมีย ชนิดเซาท์ อีสต์เอเชีย (--SEA)	aF: 5' -GATCTGGGCTCTGTGTTCTCA-3' aR': 5' - <u>CTGTCAGGAGCTTGCTTTGTCA</u> CCCATGC-3' aR: 5' -CTTGCTTTGTCACCCATGC-3'	- 249 239	NG_000006.1: g.26121_26259: 45564_45663

หน้า 6 ของจำนวน 9 หน้า

5	ไทย (-- ^{THAI})	ดีเอ็นเอจากผู้ ที่ได้รับการ วินิจฉัยว่า เป็น พาหะอัลฟา ธาลัสซีเมีย ชนิด ไทย (-- ^{THAI})	bF: 5'-CTCCTGACAGGGGAAAACA-3' bR': 5'- <u>CTCCAGGCTAAATTC</u> CCCTGGACTTGAGTG-3' bR: 5'-AATTCCCCTGGACTTGAGTG-3'	- 415 405	NG_000006.1: g.10446_10725: 44176_44300
10	เชียงราย (-- ^{CR})	ดีเอ็นเอจากผู้ ที่ได้รับการ วินิจฉัยว่า เป็น พาหะอัลฟา ธาลัสซีเมีย ชนิด เชียงราย (-- ^{CR})	cF: 5'-TAGCCTGGAGGACAGAGTAAG-3' cR': 5'- <u>GCCTTCATACATCTC</u> GGGTCATGTTGAGTAGG-3' cR: 5'-CGGGTCATGTTGAGTAGG-3'	- 349 335	NG_000006.1: g.4937_5077: 49705_49898
20	เบต้า แอกติน (<i>ACTB</i>)	ดีเอ็นเอจากผู้ ที่ไม่เป็น พาหะหรือ โรคธาลัสซี เมีย	dF: 5'-AGATGTATGAAGGCTTTTGGTCTC-3' dR: 5'-ACAAAGTCACACTTGGCCTCATT-3'	- 125	NC_000007.14: g.5527130_5527 254
25	อัลฟา ทูไกล บิน (<i>HBA2</i>)	ดีเอ็นเอจากผู้ ที่ไม่เป็น พาหะหรือ โรคธาลัสซี เมีย	eR: 5'-ACAGGTAAACACCTCCATTGTTG-3' eF': 5'- <u>CCAAGTGTGACTTTGT</u> TAAGCTGGAGCCTCGG-3' eF: 5'-TAAGCTGGAGCCTCGG-3'	- 191 175	NG_000006.1: g.34461_34635

หมายเหตุ : ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ถูกขีดเส้นใต้แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้อนทับที่ใช้ในขั้นตอนการผลิตดีเอ็นเอลูกผสมด้วยเทคนิคโอเวอร์แลปเอ็กซ์เทนชันพีซีอาร์ร่วมกับไพรเมอร์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้อนทับ

หน้า 7 ของจำนวน 9 หน้า

หลังจากกระบวนการพีซีอาร์รอบที่ 1 เสร็จสิ้นจะได้ชิ้นยืนทั้งชิ้นจำนวน 5 ชิ้นที่มีขนาดแตกต่างกัน ดังตารางที่ 1 และรูปที่ 1 จากนั้นผู้ประดิษฐ์นำชิ้นยืน A', ชิ้นยืน B', ไพโรมอร์ aF ร่วมกับ ไพโรมอร์ bR' และ ชิ้นยืน C', ชิ้น D, ไพโรมอร์ cF ร่วมกับ ไพโรมอร์ dR ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์รอบที่ 2 หลังจากกระบวนการพีซีอาร์รอบที่ 2 เสร็จสิ้นจะได้ชิ้นยืนทั้งชิ้นจำนวน 2 ชิ้น คือชิ้น AB' ขนาด 654 คู่เบส และชิ้น CD ขนาด 460 คู่เบส ตามลำดับ จากนั้นผู้ประดิษฐ์นำชิ้นยืน CD, ชิ้นยืน E', ไพโรมอร์ cF ร่วมกับ ไพโรมอร์ eR ทำปฏิกิริยา

5 พีซีอาร์รอบที่ 3 หลังจากกระบวนการพีซีอาร์รอบที่ 3 เสร็จสิ้นจะได้ชิ้นยืน CDE ขนาด 635 คู่เบส จากนั้นผู้ประดิษฐ์นำชิ้นยืน AB' ขนาด 654 คู่เบส, ชิ้นยืน CDE ขนาด 635 คู่เบส, ไพโรมอร์ aF ร่วมกับ ไพโรมอร์ eR ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์รอบที่ 4 หลังจากกระบวนการพีซีอาร์รอบที่ 4 เสร็จสิ้นจะได้ชิ้นยืน ABCDE ขนาด 1,279 คู่เบส

10 เมื่อได้ชิ้นยืนขนาด 1,279 คู่เบส หลังจากปฏิกิริยาพีซีอาร์รอบสุดท้ายแล้ว ผู้ประดิษฐ์ยืนยันความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคนิคดีเอ็นเอซีควนซิ่ง (DNA sequencing) โดยใช้ไพโรมอร์ cF และ cR ทั้งนี้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอลูกผสมที่ถูกประดิษฐ์ขึ้นประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ยีนอัลฟาธาลัสซีเมียชนิดเซาท์อีสต์เอเชีย (--^{SEA}) ขนาดความยาว 239 คู่เบส, ยีนอัลฟาธาลัสซีเมียชนิดไทย (--^{THAI}) ขนาดความยาว 405 คู่เบส, ยีนอัลฟาธาลัสซีเมียชนิดเชียงราย (--^{CR}) ขนาดความยาว 335 คู่เบส,

15 ยีน *ACTB* ขนาดความยาว 125 คู่เบส, และยีน *HBA2* ขนาดความยาว 175 คู่เบส ในทิศทาง 5' ไป 3' รวมทั้งเส้นได้ดีเอ็นเอลูกผสมสายคู่ระหว่างอัลฟาธาลัสซีเมียชนิดเซาท์อีสต์เอเชีย (--^{SEA}), ชนิดไทย (--^{THAI}) และ ชนิดเชียงราย (--^{CR}) และอัลลีลปกติของยีน *ACTB* และยีน *HBA2* ขนาด 1,279 คู่เบส เมื่ออ้างอิงลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอลูกผสมสายคู่ที่ถูกประดิษฐ์ขึ้นกับฐานข้อมูลจีโนมของมนุษย์ พบว่าถูกต้องตรงกันกับลำดับนิวคลีโอไทด์ ณ ตำแหน่ง NG_000006.1:g.26121_26259::45564_45663::10446_10725::44176_

20 44300::4937_5077::49705_49898::NC_000007.14:g.5527130_5527254::NG_000006.1:g.34461_34635 โดยรูปแบบและลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอลูกผสมสายคู่ระหว่างอัลฟาธาลัสซีเมียชนิดเซาท์อีสต์เอเชีย (--^{SEA}), ชนิดไทย (--^{THAI}) และ ชนิด เชียงราย (--^{CR}) และอัลลีลปกติของยีน *ACTB* และยีน *HBA2* แสดงดังต่อไปนี้

5' GATCTGGGCTCTGTGTTCTCAGTATTGGAGGGAAGGAGGGGAGAAGCTGAGTGATGGGTCCGGGGGCT

25 3' CTAGACCCGAGACACAAGAGTCATAACCTCCCTTCCTCCCTCTTCGACTCACTACCCAGGCCCCCGA

TCGCAGGAACCTCGGTCGTCCCCACTGTCGTCGCGGCCTGGGGTTCACTTGGGGGGCGCCTTGGGGAGGTT

AGCGTCCTTGAGCCAGCAGGGGTGACAGCAGCGCCGACCCCAAGTGAACCCCCCGCGGAACCCCTCCAA

CACTTGGAGGCTGGGGCAGGAGGATCACTTAAGTCCAGGAGTTCAAGGCTGCAGTAAGCCATGACTACAA

GTGAACCTCCGACCCCGTCCTCCTAGTGAATTCAGGTCTCAAGTTCCGACGTCATTCGGTACTGATGTT

30 CACTGCACTCCAGCATGGGTGACAAAGCAAGCTCCTGACAGGGGAAAACAAAACAAAACAACTTCTCCT

GTGACGTGAGGTGCTACCCACTGTTTCGTTTCGAGGACTGTCCCTTTTGTGTTTGTGTTTGAAGAGGA

หน้า 8 ของจำนวน 9 หน้า

TAAAGAAAACATTTGCCTTTGACTGCATCATAATTCCAGCAGGATTTTGTGCAGATAACTCTTTGGCTAA
ATTTCTTTTGTAAACGGAACTGACGTAGTATTAAGGTCGTCTAAACACGTCTATTGAGAAACCGATT

CTCTAAAATTAATACAGAAAGGTAAAGAAATTAGAATAGCCAAAGAAATTTTGAAAAGGAAGAATAAAGC
GAGATTTTAATTATGTCTTTCCATTTCTTTAATCTTATCGGTTTCTTTAAACTTTTCTTCTTATTTTCG

5 GAGAGGAATCACATTCCTCAATTTTTAACAGCTCTATTGAGATAAAATTCACATACCATAACGGTTCACCC
CTCTCCTTAGTGTAAGGAGTTAAAAATTGTGCGAGATAACTCTATTTTAAGTGTATGGTATGCCAAGTGGG

ATTTAAAGTGTATAATTCAGGCCGGGCGCGGCTCAAGGGCTCAGCCCACTTGGTACAGAACCTACCCAGA
TAAATTTACATATTAAGTCCGGCCCGCGCCGAGTCCCCGAGTCGGGTGAACCATGTCTTGGATGGGTCT

GGTGCAGATCCAAGGGAGCAGGGGGAGCAGCTGTGGGCCCTCCACACTGTTGGGGAGACTCATGCCCACT
10 CCACGTCTAGGTTCCCTCGTCCCCCTCGTCGACACCCGGGAGGTGTGACAACCCCTCTGAGTACGGGTGA

CAAGTCCAGGGGAATTTAGCCTGGAGGACAGAGTAAGAAGACCCTGTAACAAAACAAAACATAACAAAAC
GTTTCAGGTCCCCTTAAATCGGACCTCCTGTCTCATTCTTCTGGGACATTGTTTTGTTTTGTATTGTTTTG

AAACAAACAAAAACCCAACTAATGACAATAAAATAAACCCCTCCCTCACAGGGTGGTTGTGAGGATAAAG
TTTGTTTTGTTTTTTGGGTTGATTACTGTTATTTTATTTGGGAGGGAGTGTCCCACCAACACTCCTATTTTC

15 CACCCAGAATGAAGAGTGACAGGAAGTGCCCTGCCATCTACTGGATGCCAGAAGACAAGACGTGACCCAC
GTGGGTCTTACTTCTCACTGTCTTCACGGGACGGTAGATGACCTACGGTCTTCTGTCTGCACTGGGTG

GAGTAAGTCACGGTTTCTGTGAGGTGCTGGTGGCACTGGCACAGGGTCACAGTGAAAAGCCTCTACGCAG
CTCATTCAAGTGCCAAAGACACTCCACGACCACCGTGACCGTGTCCAGTGTCACCTTTTCGGAGATGCGTC

AGGACAGCAGAAACCCCCCGCAGCCTCAGGAGGCAGCATCAGATTTATTTATTTCTACTCAACATGACCC
20 TCCTGTCGTCTTTGGGGGGCGTCGGAGTCCTCCGTCGTAGTCTAAATAAATAAGGATGAGTTGTACTGGG

GAGATGTATGAAGGCTTTTGGTCTCCCTGGGAGTGGGTGGAGGCAGCCAGGGCTTACCTGTACACTGACT
CTCTACATACTTCCGAAAACAGAGGGACCTCACCCACCTCCGTCGGTCCCGAATGGACATGTGACTGA

TGAGACCAGTTGAATAAAAGTGACACCTTAAAAATGAGGCCAAGTGTGACTTTGTTAAGCTGGAGCCTC
ACTCTGGTCAACTTATTTTCACGTGTGGAATTTTACTCCGGTTCACACTGAAACAATTCGACCTCGGAG

25 GG TAGCCGTTCTCTGCCCCGCTGGGCCTCCCAACGGGCCCTCCTCCCTCCTTGACCCGGCCCTTCCTG
CCATCGGCAAGGAGGACGGGCGACCCGGAGGGTTGCCCCGGGAGGAGGGGAGGAACGTGGCCGGGAAGGAC

GTCTTTGAATAAAGTCTGAGTGGGCGGCAGCCTGTGTGTGCCTGTGTTCTCTCTGTCCCGGAATGTGCCA
CAGAACTTATTTTCAGACTCACCCGCCGTCGGACACACACGGACACAAGAGAGACAGGGCCTTACACGGT

ACAATGGAGGTGTTTACCTGT3'
30 TGTTACCTCCACAAATGGACA5'

หน้า 9 ของจำนวน 9 หน้า

- ดีเอ็นเอลูกผสมสายคู่ที่ผู้ประดิษฐ์ออกแบบและประดิษฐ์ขึ้นมาถือเป็นการรวมเอาฮีนอัลฟาธาลัสซีเมียชนิดเซาท์อีสต์เอเชีย (--^{SEA}), ฮีนอัลฟาธาลัสซีเมียชนิดไทย (--^{THAI}), ฮีนอัลฟาธาลัสซีเมียชนิดเชียงราย (--^{CR}), ยีน *ACTB*, และยีน *HBA2* เข้าไว้ด้วยกันเป็นเส้นเดียวครั้งแรกและฮีนดีเอ็นเอดังกล่าวไม่สามารถพบได้ในธรรมชาติและสิ่งมีชีวิตใด ๆ จึงสามารถกล่าวได้ว่าผลงานการประดิษฐ์ขึ้นนี้มีความใหม่และยังไม่มีใครผู้ใดประดิษฐ์ขึ้นมาก่อน ทั้งนี้ฮีนดีเอ็นเอที่ถูกประดิษฐ์ขึ้นทั้งในรูปแบบของดีเอ็นเอลูกผสมที่ประดิษฐ์ขึ้นมาโดยตรง, โดยดัดแปลง, และผลิตภัณฑ์ชีววัตถุอื่นใดที่สร้างขึ้นมาโดยมีส่วนประกอบของดีเอ็นเอลูกผสมที่ผู้ประดิษฐ์ออกแบบและประดิษฐ์ขึ้น สามารถนำไปใช้เป็นชุดดีเอ็นเอควบคุมสำหรับการตรวจวินิจฉัยรูปแบบการกลายพันธุ์ชนิด --^{SEA}, --^{THAI}, และ --^{CR} ในมนุษย์ด้วยวิธีการทางอณูชีววิทยาอันมีเทคนิคพีซีอาร์เป็นพื้นฐานโดยใช้เพียงดีเอ็นเอลูกผสมเพียงแค่ชิ้นเดียว สามารถเพิ่มจำนวนฮีนดีเอ็นเอได้อย่างไม่จำกัดเมื่อใช้ร่วมกับเทคนิคพีซีอาร์, เทคนิคการโคลนนิ่ง, หรือเทคนิคอื่นใดที่เกี่ยวข้องทางอณูชีววิทยา และที่สำคัญที่สุดคือสามารถใช้ทดแทนดีเอ็นเอที่สกัดได้จากมนุษย์อย่างมีประสิทธิภาพ

วิธีการในการประดิษฐ์ที่ดีที่สุด

เช่นเดียวกับที่เปิดเผยไว้แล้วในหัวข้อการเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

หน้า 1 ของจำนวน 2 หน้า

ข้อถ้อยสิทธิ

1. ดีเอ็นเอลูกผสมสายคู่ที่ซึ่งประกอบด้วยยีนอัลฟาธาลัสซีเมียชนิดเซาท์อีสต์เอเชีย (--^{SEA}) ขนาดความยาว 239 คู่เบส, ยีนอัลฟาธาลัสซีเมียชนิดไทย (--^{THAI}) ขนาดความยาว 405 คู่เบส, ยีนอัลฟาธาลัสซีเมียชนิดเจียงราย (--^{CR}) ขนาดความยาว 335 คู่เบส, ยีน *ACTB* ขนาดความยาว 125 คู่เบส, และยีน *HBA2* ขนาดความยาว 175 คู่เบส ตามลำดับ ดังนี้

5' GATCTGGGCTCTGTGTTCTCAGTATTGGAGGGAAGGAGGGGAGAAGCTGAGTGATGGGTCCGGGGGCT
3' CTAGACCCGAGACACAAGAGTCATAACCTCCCTTCCCTCCCTCTTCGACTCACTACCCAGGCCCCCGA

TCGCAGGAACCTCGGTCGTCCCCACTGTCGTCGCGGCCTGGGGTTCACTTGGGGGGCGCCTTGGGGAGGTT
AGCGTCCTTGAGCCAGCAGGGGTGACAGCAGCGCCGACCCCAAGTGAACCCCCCGCGGAACCCCTCCAA

CACTTGGAGGCTGGGGCAGGAGGATCACTTAAGTCCAGGAGTTCAAGGCTGCAGTAAGCCATGACTACAA
GTGAACCTCCGACCCCGTCCTCCTAGTGAATTCAAGTCCGACGTCATTGGGTACTGATGTT

CACTGCACTCCAGCATGGGTGACAAAGCAAGCTCCTGACAGGGGAAAACAAAACAAAACAACTTCTCCT
GTGACGTGAGGTCGTACCCACTGTTTCGTTTCGAGGACTGTCCCCTTTTGTGTTTGTGTTTGAAGAGGA

TAAAGAAAACATTTGCCTTTGACTGCATCATAATTCCAGCAGGATTTTGTGCAGATAACTCTTTGGCTAA
ATTTCTTTTGTAAACGGAACTGACGTAGTATTAAGGTCGTCTAAACACGTCTATTGAGAAACCGATT

CTCTAAAATTAATACAGAAAGGTAAAGAAATTAGAATAGCCAAAGAAATTTGAAAAGGAAGAATAAAGC
GAGATTTTAATTATGTCTTTCCATTTCTTTAATCTTATCGGTTTCTTTAAACTTTTCTTCTTATTTTCG

GAGAGGAATCACATTCTCAATTTTTAACAGCTCTATTGAGATAAAATTCACATACCATACGGTTCACCC
CTCTCCTTAGTGTAAGGAGTTAAAAATTGTGAGATAACTCTATTTTAAGTGTATGGTATGCCAAGTGGG

ATTTAAAGTGTATAATTCAGGCCGGGCGCGGCTCAAGGGCTCAGCCCACTTGGTACAGAACCTACCCAGA
TAAATTTACATATTAAGTCCGGCCCGCGCCGAGTTCCCGAGTCGGGTGAACCATGTCTTGATGGGTCT

GGTGCAGATCCAAGGGAGCAGGGGGAGCAGCTGTGGGCCCTCCACACTGTTGGGGAGACTCATGCCCACT
CCACGTCTAGGTTCCCTCGTCCCCCTCGTCGACACCCGGGAGGTGTGACAACCCCTCTGAGTACGGGTGA

CAAGTCCAGGGGAATTTAGCCTGGAGGACAGAGTAAGAAGACCCTGTAACAAAACAAAACATAACAAAAC
GTTTCAGGTCCCCTTAAATCGGACCTCCTGTCTCATTCTTCTGGGACATTGTTTTGTTTGTATTGTTTTG

AAACAAACAAAAAACCAACTAATGACAATAAAATAAACCCCTCCCTCACAGGGTGGTTGTGAGGATAAAG
TTTGTTTGTGTTTTTGGGTTGATTACTGTTATTTTATTTGGGAGGGAGTGTCCACCAACACTCCTATTTT

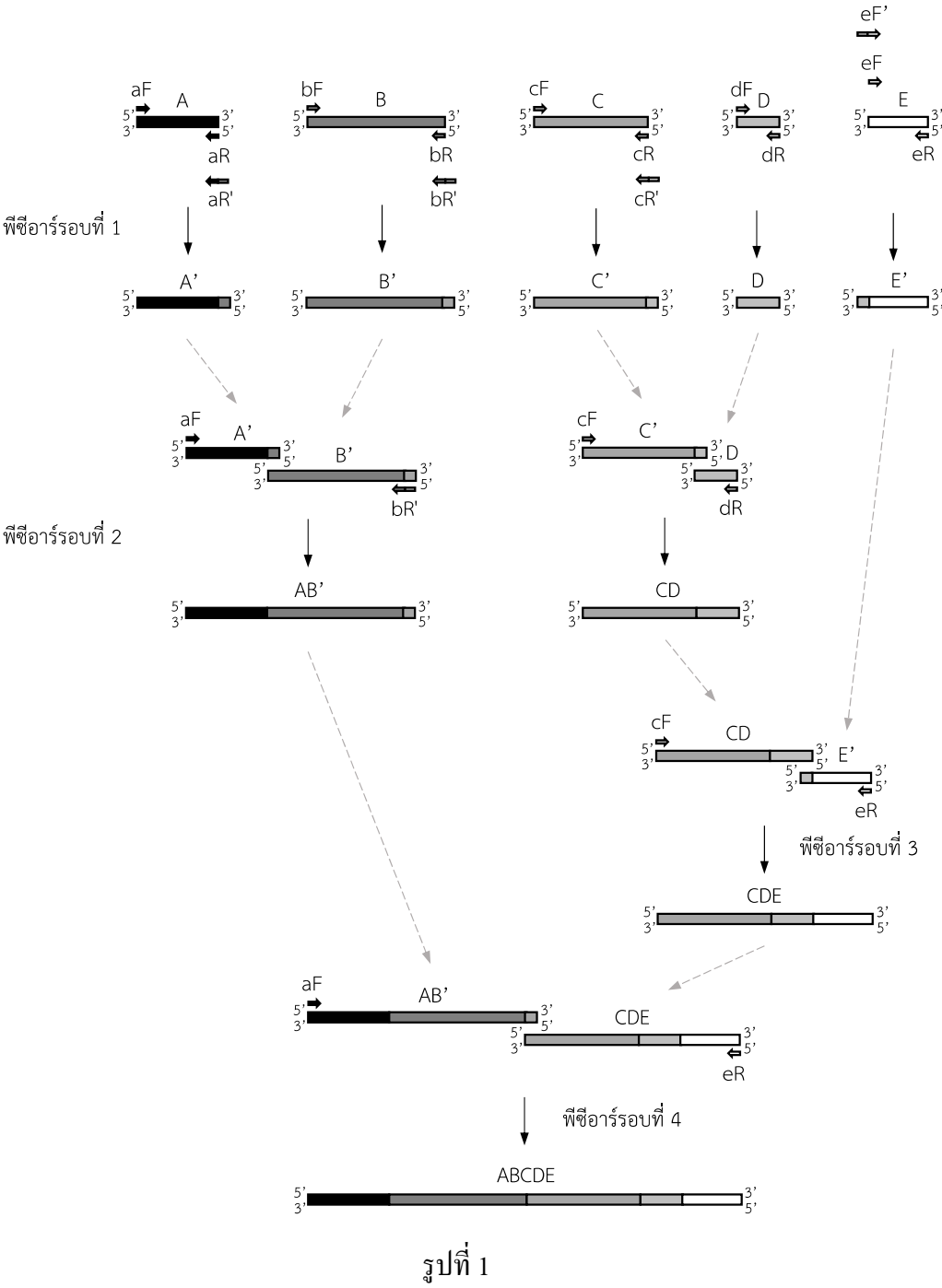
CACCCAGAATGAAGAGTGACAGGAAGTGCCCTGCCATCTACTGGATGCCAGAAGACAAGACGTGACCCAC
GTGGGTCTTACTTCTCACTGTCTTCACGGGACGGTAGATGACCTACGGTCTTCTGTTCTGCACTGGGTG

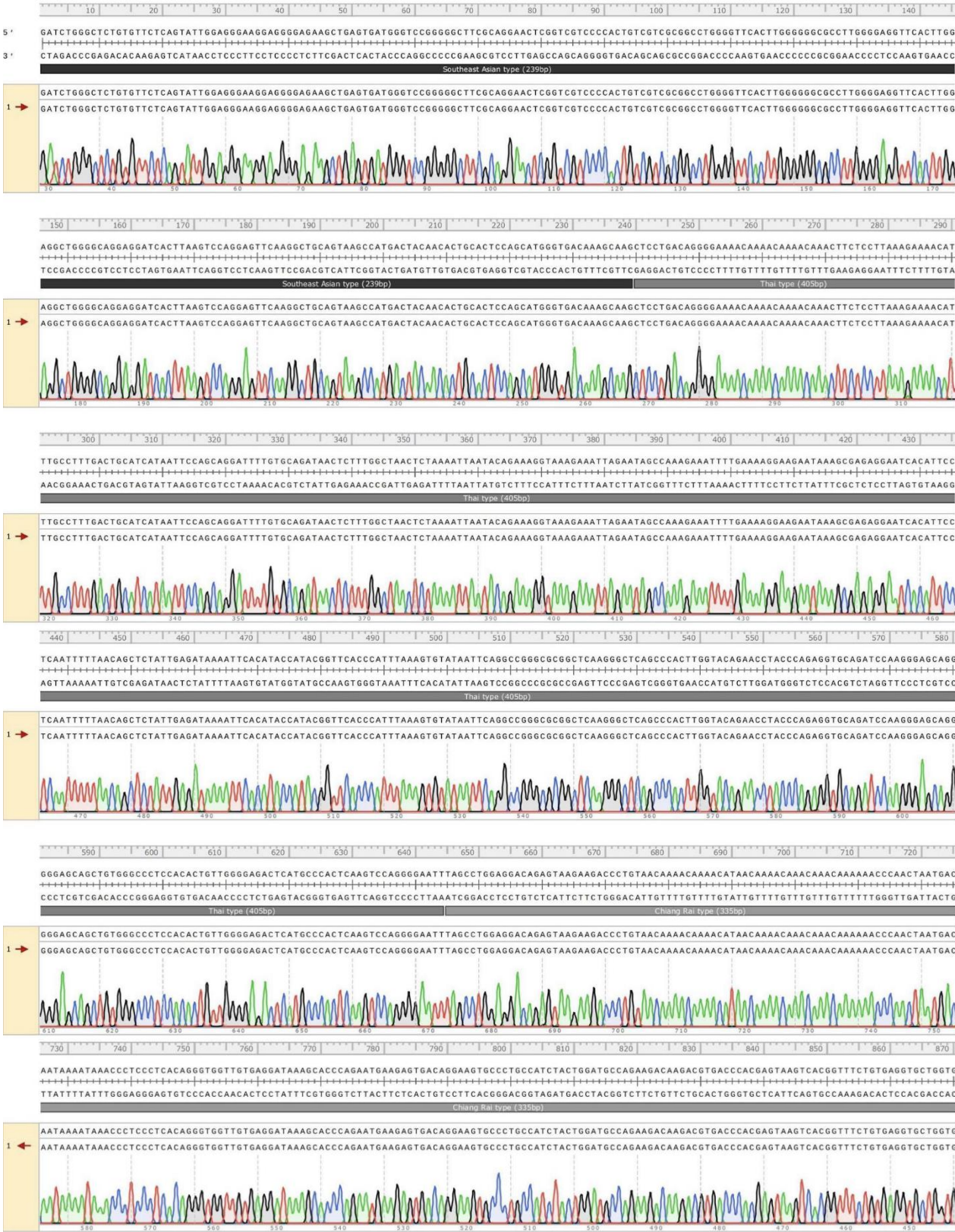
หน้า 2 ของจำนวน 2 หน้า

GAGTAAGTCACGGTTTCTGTGAGGTGCTGGTGGCACTGGCACAGGGTCACAGTGAAAAGCCTCTACGCAG
CTCATTTCAGTGCCAAAGACACTCCACGACCACCGTGACCGTGTCCCAGTGTCACTTTTCGGAGATGCGTC
AGGACAGCAGAAACCCCCGAGCCTCAGGAGGCAGCATCAGATTTATTTATTCCTACTCAACATGACCC
TCCTGTCTGCTTTGGGGGGCGTCGGAGTCCTCCGTCGTAGTCTAAATAAATAAGGATGAGTTGTACTGGG
5 GAGATGTATGAAGGCTTTTGGTCTCCCTGGGAGTGGGTGGAGGCAGCCAGGGCTTACCTGTACACTGACT
CTCTACATACTTCCGAAAACCAGAGGGACCTCACCCACCTCCGTCGGTCCCGAATGGACATGTGACTGA
TGAGACCAGTTGAATAAAAGTGCACACCTTAAAAATGAGGCCAAGTGTGACTTTGTTAAGCTGGAGCCTC
ACTCTGGTCAACTTATTTTCACGTGTGGAATTTTACTCCGGTTCACACTGAAACAATTCGACCTCGGAG
GGTAGCCGTTTCTCCTGCCCCGCTGGGCCTCCCAACGGGGCCCTCCTCCCCCTCCTTGACCCGGCCCTTCCTG
10 CCATCGGCAAGGAGGACGGGCGACCCGGAGGGTTGCCCGGGAGGAGGGGAGGAACGTGGCCGGGAAGGAC
GTCTTTGAATAAAGTCTGAGTGGGCGGCAGCCTGTGTGTGCCTGTGTTCTCTCTGTCCCGGAATGTGCCA
CAGAACTTATTTTCAGACTCACCCGCCGTCGGACACACACGGACACAAGAGAGACAGGGCCTTACACGGT
ACAATGGAGGTGTTTACCTGT3'
TGTTACCTCCACAAATGGACA5'

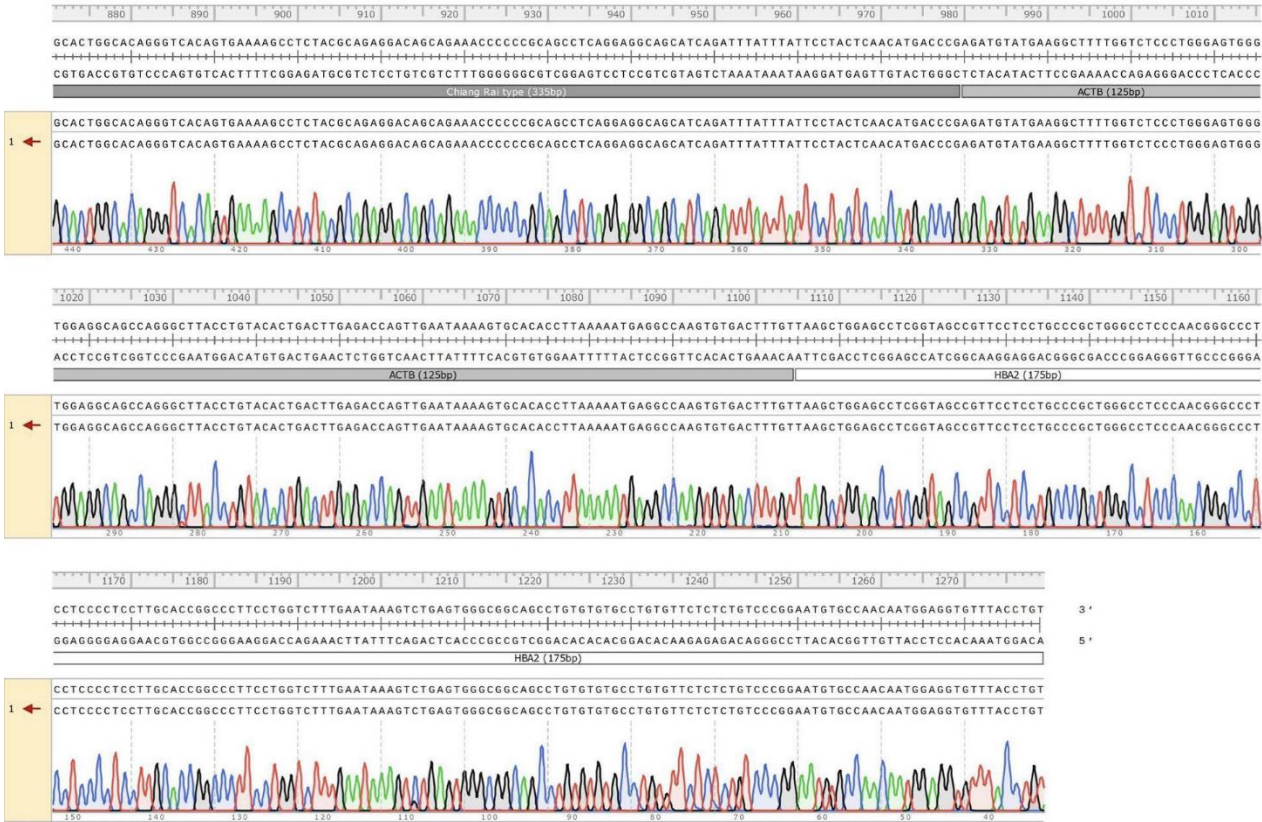
- 15 2. ไพรเมอร์สำหรับการเพิ่มปริมาณชิ้นยีนอัลฟาธาลัสซีเมียชนิดเซาท์อีสต์เอเชีย (--^{SEA}) ที่ซึ่งประกอบด้วย ลำดับนิวคลีโอไทด์จาก 5' ไป 3' ดังนี้
- aF: 5'-GATCTGGGCTCTGTGTTCTCA-3'
aR': 5'-CTGTCAGGAGCTTGCTTTGTCACCCATGC-3'
aR: 5'-CTTGCTTTGTCACCCATGC-3'
- 20 3. ไพรเมอร์สำหรับการเพิ่มปริมาณชิ้นยีนอัลฟาธาลัสซีเมียชนิดชนิดไทย (--^{THAI}) ที่ซึ่งประกอบด้วย ลำดับ นิวคลีโอไทด์จาก 5' ไป 3' ดังนี้
- bF: 5'-CTCCTGACAGGGGAAAACA-3'
bR': 5'-CTCCAGGCTAAATTCCCCTGGACTTGAGTG-3'
- 25 4. ไพรเมอร์สำหรับการเพิ่มปริมาณชิ้นยีน *HBA2* ที่ซึ่งประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์จาก 5' ไป 3' ดังนี้
- eR: 5'-ACAGGTAAACACCTCCATTGTTG-3'
eF': 5'-CCAAGTGTGACTTTGTTAAGCTGGAGCCTCGG-3'
eF: 5'-TAAGCTGGAGCCTCGG-3'

หน้า 1 ของจำนวน 3 หน้า





หน้า 3 ของจำนวน 3 หน้า



รูปที่ 2

หน้า 1 ของจำนวน 1 หน้า

บทสรุปการประดิษฐ์

ดีเอ็นเอลูกผสมสายคู่ตามการประดิษฐ์นี้ประกอบด้วยยีนอัลฟาธาลัสซีเมียชนิดเซาท์อีสต์เอเชีย (--^{SEA}) ขนาดความยาว 239 คู่เบส, ยีนอัลฟาธาลัสซีเมียชนิดไทย (--^{THAI}) ขนาดความยาว 405 คู่เบส, ยีนอัลฟาธาลัสซีเมียชนิดเชียงราย (--^{CR}) ขนาดความยาว 335 คู่เบส, ยีน *ACTB* ขนาดความยาว 125 คู่เบส, และยีน *HBA2* ขนาดความยาว 175 คู่เบส รวมทั้งสิ้นขนาดความยาว 1,279 คู่เบส เข้าไว้ด้วยกันเป็นเส้นเดียว โดยชั้นดีเอ็นเอดังกล่าวไม่สามารถพบได้ในธรรมชาติหรือสิ่งมีชีวิตใด ๆ ข้อดีของดีเอ็นเอลูกผสมที่ถูกประดิษฐ์ขึ้นมาในครั้งนี้ คือ สามารถนำไปใช้เป็นวัสดุดีเอ็นเอควบคุมสำหรับการตรวจวินิจฉัยยีนอัลฟา โกลบินปกติและยีนอัลฟาโกลบินกลายพันธุ์ทั้ง 3 ชนิดที่พบได้บ่อยในประชากรไทยและชาวเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ได้โดยใช้ดีเอ็นเอลูกผสมดังกล่าวเพียง 1 ชิ้นเท่านั้น อีกทั้งยังสามารถนำไปดัดแปลงเพื่อการใช้งานที่เหมาะสมหรือเพื่อการเพิ่มปริมาณอย่างไม่จำกัด