مجله دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی شهید صدوقی یزد
سال دوازدهم، شماره چهارم ، زمستان ۱۳۸۳، ص۳۹

موتاسیون‌های شایع بتا تالاسمی درمنطقه شمالغرب ایران

دکتر محمدعلی حسینپورفیضی[۱]، دکترعباسعلی حسینپورفیضی[۲]، دکتر محمد اصغرزاده[۳]، دکتر محمد امین بخش[٤]، پروین آذرفام[٥]، ناصر پولادی[٦]

چکیده

مقدمه: تالاسمی برای اولین بار توسط توماس کولی در سال ۱۹۲۵ تشریح شد.بتاتالاسمی یک ناهنجاری ارثی اتوزومی است که باعث کاهش یافتن یا ساخته نشدن زنجیره بتاگلوبین می شود. اکثر معایب ژنتیکی رایج در بتاتالاسمی به وسیله موتاسیونهای نقطه‌ای، اضافه شدن و یا دلیسیونهای کوچک در داخل ژن بتاگلوبین رخ می‌دهد.

روش بررسی: در این پژوهش از۱٤۲ بیمار(۷٦مذکر و ٦٦مونث) مبتلا به تالاسمی ماژور (که قبلا بیماری آنها تائید شده بود) مراجعه کننده به بخش خون بیمارستان کودکان تبریز (٦٤ بیمار،٥٥بیمارغیرفامیلی)، شهید قاضی طباطبایی تبریز(۱٥بیمار،۱٤بیمار غیرفامیلی)، مرکز بیماریهای خاص ارومیه و خوی(۱۸بیمار،۱٦بیمارغیرفامیلی) و بیمارستان علی اصغر اردبیل(٤٥ بیمار،۳۲ بیمار غیرفامیلی)، نمونه خون محیطی تهیه گردید سپس با استفاده از روش Boiling و پروتئیناز K - SDS، DNA لنفوسیتهای خون محیطی نمونه‌ها استخراج شدند و DNA ،۱۱۷بیمار غیرفامیلی جهت تشخیص موتاسیونها مورد استفاده قرار گرفتند. در این بررسی، روش ARMS-PCR و پرایمرهای شایع در منطقه مدیترانه بکار برده شد.

نتایج: نتایج حاصل از ۱۱ موتاسیون رایج در منطقه مدیترانه به صورت Frameshift 8/9(+G) با فراوانی ۲۹/۹درصد IVS-I-110(G-A)، IVS-II-1(G-A)، IVS-I-5(G-C)، IVS-I-1(G-A)، Frameshift Codon44(-C)، Codon5(-CT)، IVS-1-6(T-C)، IVS-I-25(-25bp.del) به ترتیب ۲٥/٤۷ درصد، ۱۷/۸۳ درصد، ۷/۰۰ درصد، ٦/۳٦ درصد، ٦/۳٦ درصد، ۳/۸ درصد، ۲/٥ درصد و ۰/٦۳ درصد به دست آمد و برای پرایمرهای Codon39(C-T)، Codon30(G-C) موردی مشاهده نگردید.

نتیجه‌گیری: در این بررسی بیشترین فراوانی جهش ها مربوط به موتاسیون(Frameshift8/9(+G(با فراوان۲۹/۹ درصد) به دست آمد که اختلاف بارزی با کشورهای ترکیه، پاکستان، لبنان و منطقه فارس ایران دارد.

واژه‌های کلیدی: بتا تالاسمی، موتاسیون، PCR

مقدمه

تالاسمی نوعی بیماری شایع ژنتیکی در گلبولهای قرمز است که در اثر موتاسیون در ژن گلوبین ایجاد می‌گردد[(۱)].

تالاسمی ازکاهش سنتز و یا عدم سنتز کامل یکی از دو زنجیره آلفا و یا بتا ناشی می‌شود. بتاتالاسمی نوعی کم خونی ارثی است که به‌صورت صفت اتوزومی مغلوب از والدین به فرزندان منتقل می‌شود[(۲)].

تحقیقات نشان داده‌اند که ژنهای مربوط به زنجیره گلوبین‌آلفا و غیرآلفا ازیکدیگر جدا هستند. به طوری که زنجیره آلفا دارای دو ژن درهر ژنوم هاپلوئید (جمعاً ٤ ژن)برروی کروموزوم شماره ۱٦

۱- استاد رادیوبیولوژی، دانشکده علوم طبیعی
۲- استادیار هماتولوژی انکولوژی، بیمارستان کودکان
۳- استادیار گروه بیوشیمی و علوم آزمایشگاهی، دانشکده پزشکی
٤- دانشیار ژنتیک، دانشکده علوم طبیعی
٥- مربی فیزیک پزشکی، دانشکده علوم طبیعی
٦- مربی زیست شناسی سلولی مولکولی
۱،٤،٥و٦- دانشگاه تبریز
۲و۳-دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز

www.SID.ir

و ژنهای مربوط به زنجیره های بتا، گاما و دلتا به تعداد پنج ژن بر روی کروموزوم شماره ۱۱ قراردارند که امروزه مشخصات کامل آنها به خوبی شناخته شده است. با این حال هنوز عوامل دخیل در روشن کردن ژن زنجیره بالغ(بتا) به جای ژن زنجیره جنینی(گاما) کاملا شناخته نشده اند[۳].

تاکنون بیش از ۲۰۰ جهش در این ژن در سرتاسر جهان گزارش شده است[٤] که اکثر این جهش‌ها نقطه‌ای بوده و نه تنها نواحی کد کننده اسیدآمینه در زنجیره بتا، بلکه نواحی فاقد رمز و حتی داخل اینترون غیرکد کننده را نیز تحت تاثیر قرار می‌دهند[٥]. برخی جهش‌ها در ژن بتا (به‌طول تقریبی ۲۰۰۰ جفت باز واقع در بازوی کوتاه کروموزوم۱۱) از قبیل حذف (Deletion) چندین نوکلئوتید در اگزونها، یا جهش‌هایی از نوع Fremeshift، جهش‌های تغییر دهنده توالی‌های اتصال (Splice) یا مولد نقاط اتصال جدید، جهش‌های مولد کدون اختتام در درون اگزون‌ها و جهش‌هایی در ناحیه پروموتور ژن بتا منجر به عدم تشخیص و اتصال RNA پلیمراز به ناحیه مزبور و عدم سنتز mRNA و سنتز زنجیره بتاگلوبین می‌شود.آگاهی به انواع موتاسیونهای شایع در هر جمعیتی اطلاعات تشخیص را سرعت، دقت و اطمینان بیشتر و با هزینه کمتر امکان پذیر می‌سازد[٦].

هر سال بیش از ٤ میلیون کودک در جهان با اختلالات ژنتیکی متولد می‌شوند که در این میان هموگلوبینوپاتی‌ها سهم عمده‌ای را به خود اختصاص می‌دهند. در حال حاضر ۵۰ درصد کشورهای دنیا دارای گروههایی با بیش از ٤٪ ناقل هموگلوبینوپاتی هستند و تالاسمی یکی از انواع مهم این گونه اختلال‌ها می‌باشد. بر همین اساس تخمین زده می‌شود که در ایران حدود سه میلیون ناقل ژن تالاسمی در جامعه پراکنده باشند[۷] که با توجه به ویژگیهای نژادی و شرایط اقلیمی ،آگاهی به فراوانی موتاسیونهای هر منطقه از نظر جنبه‌های تشخیصی و درمانی بسیار با ارزش می‌باشد[۸]. از آنجایی که در هرجمعیتی فقط تعداد محدودی ازجهش‌ها عامل ایجاد کننده بیماری می‌باشند[۹] ازاین رو در این پژوهش موتاسیونهای شایع منطقه شمالغرب ایران با استفاده ازروش ARMS-PCR مورد بررسی قرار گرفته است.

روش بررسی

در پژوهش به عمل آمده از۱٤۲ بیمار مبتلا به بتاتالاسمی (که نوع تالاسمی آنها توسط آزمایشات قبلی به اثبات رسیده و به طور مستمر فرآورده‌های خونی دریافت می‌کردند)مراجعه کننده به بخش خون بیمارستان کودکان تبریز(٦٤بیمار)، بیمارستان شهید قاضی تبریز (۱۵ بیمار)، مرکز بیماریهای خاص ارومیه وخوی (۱۸ بیمار) و بیمارستان علی اصغر اردبیل(٤۵ بیمار)، ۵۱ میلی لیتر نمونه خون وریدی تهیه و در ظروف حاوی EDTA جهت استخراج DNA به آزمایشگاه منتقل گردیدند.سپس از نمونه‌های مربوط به بیماران غیرفامیلی (۱۱۷بیمار)، ۰/۵ میلی لیتر خون کامل برداشته و DNA نمونه‌ها به روش Boiling[۱۰] استخراج گردید و در صورت کافی نبودن میزان DNA به دست آمده از روش پروتئیناز K- SDS [۱۱] جهت استخراج DNA استفاده شد. DNA های استخراج شده در دمای C °۲٤- نگهداری شدند. جهت تشخیص نوع موتاسیونها و توالی آنها از پرایمرهایی که بیشترین فراوانی را نزد بیماران مبتلا به تالاسمی منطقه مدیترانه داشتند و در جدول(۱) آورده شده است، استفاده گردید.

روش تهیه لیز بافر:

جهت تهیه ۲۵۰ml بافرلیز: ۱/۲۵ml MgCl2 (۱ M)، ۲۵۰µl ساکاروز (۳۲۰mM)، ۲۵ml Tris-Cl(pH=8) (۰/۱M)، ۲/۵ml Triton X100 و ۲۲۱ml آب دیونیزه اضافه کرده و محلول به دست آمده را در دمای C °۳۷ انکوبه می‌کنیم تا تریتون X100 در محلول حل شود. بعد از تهیه لیز بافر محلول در دمای یخچال نگهداری گردید[۱۰].

روش استخراج DNA :

I- روش Boiling: ۰/۵ ml خون حاوی EDTA و ۱ml بافر لیز به میکروتیوپ ۱/۵ ml ریخته و به مدت چند ثانیه تا به‌دست آمدن محلول یکنواخت، ورتکس می‌کنیم. سپس محلول به‌دست آمده توسط میکروفیوژ (Biofuge Pico ساخت شرکت Kendro آلمان) با دور ٦۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ کرده و محلول رویی را دور ریخته و چنانچه محلول قرمز رنگ باقی مانده باشد مرحله فوق را تا شفاف شدن محلول رویی تکرار می‌کنیم. سپس ۱۰۰ µl محلول NaoH (۵۰ میلی مول در لیتر) اضافه و ورتکس می‌کنیم. در این مرحله میکروتیوپها را در داخل

Archive of SID
www.SID.ir

آب جوش به مدت ۲۰ دقیقه می‌جوشانیم سپس ۲۰ µl محلول Tris –HCl(pH=8) (۲۰ میلی مول در لتیر) اضافه کرده و محلول را با دور ٦۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱ دقیقه سانتریفوژ می‌کنیم و محلول رویی را که حاوی DNA است از مواد اضافی ته نشین شده جدا و به میکروتیوپ ۰/۵ml می‌ریزیم[۱۰].

II- روش پروتئیناز K- SDS: ۵ ml خون رابه دو قسمت تقسیم کرده ودر دور ۳۰۰۰ دوردردقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ کرده و پلاسمای خون را دور می‌ریزیم و سپس روی سلولهای ته نشین شده ۵ml آب سرداضافه می‌نمایم و در دور ۳۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۲۵ دقیقه سانتریفوژ می‌کنیم و محلول رویی را دور ریخته وعمل فوق را تا شفاف شدن محلول رویی تکرارمی‌کنیم. بر روی سلولهای ته نشین شده ٤/۵ ml لیز بافر افزوده و به خوبی تکان می‌دهیم. سپس بر روی محلول به‌دست آمده ۲۵۰µl SDS (۱۰٪) و ۱ ml (۲۰۰µg/ml) پروتئیناز K اضافه کرده و به مدت ۳ الی ۲٤ ساعت در دمای ۵۷ درجه انکوبه می‌کنیم. سپس ۱/۷ml نمک طعام اشباع شده ریخته ودر دور ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت نیم ساعت سانتریفوژ می‌کنیم. محلول رویی را به لوله تمیزمنتقل کرده، ٤/۵ml ایزوپروپانول اضافه میکنیم تا DNA منعقد شود. DNA ی منعقد شده را با روش Hook outing ازداخل محلول استخراج و با اتانول ۷۰٪ شسته وبه آن آب مقطرمی‌افزاییم[۱۱].

انجام PCR:

جهت انجام PCR، ۵ µl DNA استخراج شده را به داخل مسترمیکس که حاوی ۲/۵ µl 10x-PC Buffer (تهیه شده از شرکت سیناژن- تهران)، ۰/۷۵ µl MgCl2(50 mM)، ۰/۵ µl dNTPs (10mM)، ۲/۵ U Taq پلیمراز(ساخت شرکت سینا ژن- تهران)، ۰/۲۵ M پرایمر Common، ۰/۲۵µM پرایمرنرمال یا موتانت اضافه، ۰/۲۵ µM پرایمر Internal ControlA (Cont. A) و ۰/۲۵ µM پرایمر Internal ControlB(Cont. B) افزوده و سپس با استفاده از آب دیونیزه حجم نهایی محلول را به ۲۵µl می‌رسانیم وجهت به دست آوردن محلول همگن به مدت کوتاه سانتریفوژ می‌کنیم. سپس با استفاده ازترمال سایکلر(ساخت شرکت Techne مدل Geneus)، طبق برنامه ذیل، دناتوراسیون ۹٤°C یک دقیقه، اتصال ٦۵°C یک دقیقه و توسعه (Extension) ۷۲°C به مدت ۱/۵ دقیقه سیکل قرار می‌دهیم. تعداد سیکل‌ها ۲۵ سیکل بوده و در سیکل اول مرحله دناتوراسیون به مدت ۳ دقیقه ومرحله توسعه سیکل آخر ۵ دقیقه عمل می‌کنیم[۱۲].

جدول۱: نوع و توالی پرایمرهای مورد استفاده درتشخیص موتاسیونهای شایع بتاتالاسمی درمنطقه شمالغرب ایران[۱۳].

Mutation	Size
IVS-I-1(G-A)	280
IVS-I-5(G-C)	284
IVS-I-6(T-C)	285
IVS-I-110(G-A)	389
IVS-II-1(G-A)	633
Codon 5(-CT)	486
Frameshift Codon 44(-C)	450
Frameshift 8/9(+G)	213
Codon 30(G-C)	279
Codon 39(C-T)	435
IVS-1-25(-25bp del.)	364
Internal Control (Cont.A)	861
Internal Control (Cont.B)	861

انجام الکتروفورز:

جهت انجام الکتروفوز از بافر تانک TBE[۱۳] استفاده شد (به منظور تهیه ۱۰۰ ml محلول بافر تانک ۱۰X: ۱۰/۸g Tris و ۵/۵g اسید بوریک و ٤ml EDTA(pH=۸) (۰/۵ مولار) را به حجم ۱۰۰ml رسانده و در دمای اتاق نگهداری گردید)[۱۱] و برای مطالعه محصولات به دست آمده از انجام PCR، از ژل آگاروز ۲٪ که حاوی ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود و ولتاژ ۸۰ ولت استفاده گردید.

نتایج

در این پژوهش از تعداد ۱٤۲ بیمار(۷٦مذکر و ٦٦مونث) مراجعه کننده به بخش خون بیمارستانهای شمالغرب کشور، ۱۱۷ بیمار غیرفامیلی انتخاب گردید و با استفاده از پرایمرهای جدول(۱) و روش ARMS-PCR ، موتاسیونهای بیماران مورد

Archive of SID
www.SID.ir

بررسی قرار گرفت. جدول (۲)، تعداد نمونه های تهیه شده از مناطق مختلف منطقه شمالغرب ایران را نشان می‌دهد.

همچنین نتایج به‌دست آمده از پرونده‌های تکمیل شده برای بیماران نشان داد که متوسط سنی بیماران ۱۱/۱۱ سال و متوسط زمان خونگیری آنان ۲۵/۷ روز میباشد و والدین ٦٨/٣٪ مبتلایان حاصل ازدواج فامیلی و ۳۱/۷٪ مبتلایان حاصل ازدواج های غیرفامیلی بودند و ۱۸/۱۲٪ مبتلایان دارای فامیل درجه ۲ و یا درجه ۳ مبتلا بودند.

در این بررسی با استفاده از پرایمرهای جدول(۱)، موتاسیون ۱۵۷کروموزوم مورد شناسایی قرار گرفت که بیشترین میزان موتاسیون مربوط به موتاسیون Frameshift 8/9(+G) با ۲۹/۹ درصد به‌دست آمد. ازمیان ۱۵۷ کروموزوم شناسایی شده، در ٥٦ بیمار(۱۱۲کروموزوم) جهش از نوع جهش هموزیگوت و در ۳۰ بیمار از نوع هتروزیگوت ترکیبی بودند که در ۱۵ بیمار هر دو الل و در ۱۵ بیمار فقط یک الل(جمعا ٤٥ کروموزوم) شناسایی گردید.

جدول۲: نمونه‌های خونی تهیه شده از افراد مناطق مختلف در شمالغرب ایران

نام مرکز	تعدادکل نمونه	نمونه‌های غیرفامیلی
بیمارستان کودکان تبریز	٦٤	٥٥
بیمارستان شهید قاضی طباطبایی تبریز	۱٥	۱٤
مرکز حمایت از بیماریهای خاص ارومیه	۱۸	۱٦
بیمارستان علی اصغر اردبیل	٤٥	۳۲
جمع	۱٤۲	۱۱۷

جدول٤: تعداد و درصد موتاسیونهای شایع مبتلایان بتاتالاسمی منطقه شمالغرب ایران

نام موتاسیون	تعداد هموزیگوت	تعداد هتروزیگوت	تعداد کروموزوم	درصد
Frameshift 8/9(+G)	۱۸	۱۱	٤۷	۲۹/۹
IVS-I-110(G-A)	۱۳	۱٤	٤۰	۲٥/٤۷
IVS-II-I(G-A)	۱۱	٦	۲۸	۱۷/۸۳
IVS-I-5(G-C)	٤	۳	۱۱	۷/۰۰
IVS-I-1(G-A)	۳	٤	۱۰	٦/۳٦
Frameshift Codon 44(-C)	٤	۲	۱۰	٦/۳٦
Codon5(-CT)	۲	۲	۷	۳/۸
IVS-I-6(T-C)	۱	۲	٤	۲/٥
IVS-I-25(-25 bp del)	–	۱	۱	۰/٦۳
جمع	۱۱۲	٤٥	۱٥۷	۱۰۰

بحث

بیماری تالاسمی ضایعات روحی فراوان داشته و چون هزینه‌های بسیار بالایی برخانواده و اجتماع وارد می کند، دارای اهمیت است[۷]. ژنهای بتاتالاسمی در بعضی مناطق دنیا مانند حوزه مدیترانه، آسیای جنوب غربی، هند، افریقا و اندونزی دارای فراوانی بیشتری هستند و در نواحی دیگر مانند اروپای شرقی، کره شمالی، چین و ژاپن فراوانی بسیار کمی دارند[۲]. مشکل عمده در درمان بیماران مبتلا به تالاسمی علاوه بر هزینه‌های سرسام آور، مطلوب نبودن نتایج درمانی و صدمات جبران ناپذیر روحی و روانی و اجتماعی برای خانواده‌های بیماران و جامعه می‌باشد. براساس گزارش استان فارس در سال ۱۳۷٦، در طی ۳/٥سال مطالعه، جمعا" ٦۷٦ زوج ناقل شناسایی شدند و از این عده ۳۲۹ زوج از ازدواج با یکدیگر منصرف گردیدند. در واقع با انصراف این عده و احتساب قانون احتمالات از تولد ۸۲ کودک بیمار تالاسمیک جلوگیری به عمل آمده است که در مقایسه هزینه اولیه جهت پیشگیری ۲۱۰۱٦٦٥۰۰ ریال، هزینه ۲۰ سال درمان این کودکان ۷۷۷٦۰٦٦۰۰۰ ریال و هزینه صرفه‌جویی شده ٦۹٥٥۸۹۹٥۰۰ ریال می‌باشد. به بیانی دیگر سرمایه گذاری در بخش پیشگیری از این بیماری ۳٤ برابر بازدهی و صرفه اقتصادی به همراه دارد[۷].

در مطالعه حاضر با استفاده از روش ARMS-PCR موتاسیونهای شایع ژن بتاگلوبین بر روی ۱۱۷ بیمار غیرفامیلی ساکن در منطقه شمالغرب ایران مورد بررسی قرار گرفته است. در این بررسی تعداد ۸ نوع موتاسیون در بیماران مشاهده گردیدکه در ٥۳/٤۸درصد از بیماران جهش هموزیگوت و در ٤٦/٥۲ درصد جهش از نوع هتروزیگوت ترکیبی (هتروآلل) بودند. از افراد هتروزیگوت تعداد ۲۰ نفر فقط یک الل شناسایی گردید .

نتایج بدست آمده ازپرونده‌های تکمیل شده برای مبتلایان نشان داد که ازتعداد ۱٤۲ مبتلای تحت مطالعه ۲٥ مورد فامیل درجه‌یک (خواهر و یا برادر هم بودند) داشتند و والدین ۹۷ مبتلا (٦٨/۳٪) ازدواج فامیلی داشته و ۱۸/۱۲٪ مبتلایان دارای فامیل درجه ۲ و یا درجه ۳ مبتلا هستندکه در مورد اکثر ازدواجهای فامیلی موتاسیون ازنوع هموزیگوت بوده و شدت بیماری نسبت به بیمارانی که هتروزیگوت ترکیبی (هترو آلل) بودند بیشتر بود.

Archive of SID
www.SID.ir

همچنین مقایسه جدول گروه خونی بیماران و درصد گروههای خونی در استان آذربایجان شرقی نشان دادکه درصد ابتلا به بیماری بتاتالاسمی مستقل از گروه خونی بوده و هیچ گروه خونی حساسیت بیشتری نسبت به گروههای خونی دیگر ندارد[۱۷].

در این بررسی بیشترین فراوانی جهش‌ها مربوط به موتاسیون Frameshift8/9(+G) (با فراوانی ۲۹/۹ درصد) به دست آمد که فراوانی آن دراصفهان ۱۹درصد، کرمان ۱۵/۹ درصد، خوزستان ۱۷/۳ درصد، در تهران ۱۰/٦ درصد و در بوشهر۸/۱۷ درصد و جنوب آسیا و خاورمیانه ۱۸ درصد، گزارش شده است. فراوانی موتاسیون IVS I-110(G-A) در این بررسی ۲۵/٤۷ درصد به دست آمد که در لبنان ٤۰ درصد، در سیسیل ۲٤/۱۱ درصد، الجزایر ۲۵/٤ درصد، خوزستان ۱٦/۸ درصد، تهران ۷/۸ درصد، سیستان و بلوچستان ۱۱/۱۱ درصد، خراسان ۸/۷۷ درصد، اصفهان ۸ درصد، بوشهر۵/۷۷ درصد و آذربایجان غربی ۵/۳ درصد گزارش شده است[۳،۱٦]. در حالی که بیشترین فراوانی جهش‌ها در منطقه فارس ایران[۱۲] و پاکستان[۱٤] مربوط به موتاسیون IVS-I-5(G-C) (بافراوانی ۳۷ درصد) گزارش شده است. فراوانی جهش IVS-I-5(G-C) در بررسی حاضر۷٪ و گزارش مربوط به مبتلایان ترکیه[۱۵] ۱/۱ در صدگزارش شده است و درصد موتاسیونهای رایج در منطقه شمالغرب تفاوت بارزی نسبت به سایر مناطق دارد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از زحمات بیدریغ خانم‌ها حوریه خانی و شهلا بایرامی بخاطر همکاری در تهیه نمونه ازبیمارستانهای تبریز و اردبیل و جناب آقای حسن اشتری مدیر عامل سازمان حمایت از بیماریهای خاص ارومیه و کارکنان بیمارستانهای کودکان، شهید قاضی طباطبایی تبریز، سازمان حمایت از بیماریهای خاص ارومیه، بیمارستان علی اصغر اردبیل و کارکنان گروه زیست شناسی جانوری دانشگاه تبریز و کلیه عزیزانی که ما را در اجرای تحقیق یاری نموده‌اند تقدیر و تشکر می‌نماییم.

References

1. Clayton MA, ***Protective Vaccination with a recombinant fragment of C.botulimn Neurotoxin Serotype a Expressed from a Synthetic Gene in Ecoli***. Infection and Immunity , 63(7): 2738-42.
2. Haij H, Kazazizan. ***Prenatal Diagnosis of β thalassaemia"*** , Seminars in Perinatology, 1991, supp2(Jane), Vol 15, No.3.
۳. عمرانی میر داود. ***جهش های شایع در بیماران مبتلا به بتاتالاسمی در سطح استان اذربایجان غربی با روش ARMS/PCR***. مجله علوم پزشکی ارومیه،تابستان ۱۳۸۲، سال چهاردهم، شماره دوم ، ص:۱۲٦-۱۱۷.
4. Lacy DB, Stevens R C. ***Recombinant expression and purification of the boutulimuni neurotoxin type A translocation domain – protein expression and Purification***, 1997, 11: 195-200.
5. Turkey t.pcr.htm,"welcome to β - Thalassaemia page.
٦. دیلمقانی و همکاران ، ***تعیین موتاسیونهای بتاگلوبین در بیماران تالاسمی و تشخیص قبل از تولد بر اساس تکنیک ARMS و RFLP***، کنگره بازآموزی خون بیماریهای مرتبط، سازمان انتقال خون، ۵ الی ۷ مهرماه ۱۳۷۳.
۷. معاونت امور بهداشتی ،اداره کل پیشگیری و مراقبت بیماریها، وزارت بهداشت ، درمان و آموزش پزشکی ، "***طرح پیشگیری از بروز موارد جدید و شناسائی ناقلین تالاسمی " دی ماه ۱۳۷٤***.
۸. پور نقشبند زهرا، قانعی مصطفی و همکاران "***بررسی موتاسیونهای شایع بتا تالاسمی در استان اصفهان*** " نخستین همایش بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران- تهران، ۵-۳ اسفند ۱۳۷۸.
9. John Mold. ***Antenntal diagnosis***, Baillier's Clinical Haematology, 1991; April,Vol. 4,No.2.
10. Old JM, Higgs DR. ***Gene analysis In:***

Archive of SID
www.SID.ir

Saleem. ***Molecular genetics of β- thalassaemia Pakistan: a basis for prenatal diagnosis,*** British Journal of Haematology, 1996; 94, 476-482.

13. Tadmouri G O, Tuzmen S et al ***Molecular and Population Genetic Analyses of β- thalassaemia in Turkey*** American Journal of Hematology ,1998; 57:215-220.

14. Chehab FF , Der Kaloustian V, et al ***The molecular basis of β- thalassaemia in Lebanon: Application to prenatal diagnosis***, Blood 1987; 69:1141.

۱۵. احمدی نظـر، ***توزیـع نسـبی کانسـرها بیـن گروهـهای خونـی بیماران ارجاعی به مرکز انکولوژی شهید قاضی طباطبـایی تـبریز،*** پایان‌نامه، دانشکده داروسازی دانشگاه تبریز سال ۷۶-۱۳۷۵.

Weatherall DJ,ed. Method in haematology, 1982; vol 6. The thalassaemias. Edinburgh: churchill Livingstone: 74-102..

۱۰. پولادی ناصر. ***بررسی جـهش در اگزونـهای پنـج و هشـت ژن P53 در مبتلایان سرطان پستان با روش PCR-SSCP*** پایـان نامـه کارشناسی ارشد رشته علوم سلولی و مولکولی دانشـــگاه تهران، بهمن ۱۳۸۰.

10. Mahboudi F, Zeinali S, et al. ***The Molecular basis of β- thalassaemia mutations in Fars province***. Iran, Iranian Journal of Medical Science, December 1998, vol.21 , Nos.3-4.

11. Roche Molecular Biochemicals. ***Lab FAQS Find a Quick Solution*** . 2001:101.

12. Suhaib Ahmed, Mary Petron and Mohammad

Archive of SID

www.SID.ir