بررسی جهش های اگزون ۲ و ۴ ژن پژواکین (DFNB59) در ارتباط با ناشنوایی با استفاده از PCR-RFLP در استان چهارمحال و بختیاری

مریم طاهرزاده فرخشهری*، عفت فرخی**، جواد صفاری چالشتری*، سولماز خادمی***، محمد تقی مرادی†، دکتر سید ابوالفتح شیرمردی††، غلامرضا مبینی†††، ندا پروین•، مهدی بنی طالبی••، دکتر رضا حاج حسینی بغداد آبادی•••، دکتر حبیب اله ناظم•••، محسن نوربخش○، دکتر مرتضی هاشم زاده چالشتری○○[1]

*دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی- دانشگاه پیام نور تهران، **کارشناس ارشد بیوشیمی- مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی- دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، ***دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک- دانشگاه شهرکرد. †کارشناس ارشد حشره شناسی پزشکی- مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی- دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، ††پزشک عمومی- سازمان بهزیستی استان چهارمحال و بختیاری، †††کارشناس ارشد ویروس شناسی-مرکزتحقیقات سلولی و مولکولی- دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، •کارشناس ارشد پرستاری- مرکز تحقیقات گیاهان دارویی- دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، ••کارشناس ارشد هماتولوژی-مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی- دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، •••دانشیار گروه بیوشیمی-دانشگاه پیام نور تهران، ○دانشجوی پزشکی -دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، ○○استاد گروه ژنتیک انسانی- مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی- دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد.

تاریخ دریافت:۸۷/۶/۶ تاریخ تایید: ۸۷/۱۰/۱۶

چکیده:

زمینه و هدف: **ناشنوایی اختلالی هتروژن است که به علت های محیطی یا ژنتیکی رخ می دهد. اخیراً ژن پژواکین (DFNB59) عامل ناشنوایی نوع عصبی معرفی شده است. این مطالعه با هدف تعیین فراوانی جهش های اگزون ۲ و٤ ژن DFNB59 در ۱۰۰ دانش آموز ناشنوا استان چهارمحال و بختیاری انجام گرفت.**

روش بررسی: **در این مطالعه توصیفی – آزمایشگاهی، میزان فراوانی جهش های اگزون ۲ و ٤ ژن DFNB59 مورد مطالعه قرار گرفتند. DNA به روش استاندارد فنل کلروفرم استخراج شد و حضور جهش های T54I و R183W با استفاده از روش PCR-RFLP به کمک آنزیم های محدود کننده AF1III و SsiI مورد بررسی قرار گرفت.**

یافته ها: **آنزیم های محدود کننده AF1III و SsiI محل شناسایی مربوطه را در کلیه یکصد نمونه مورد مطالعه هضم نمود. همچنین این اطلاعات نشان داد که جهش های T54I و R183W در ناشنوایان مورد مطالعه وجود ندارد.**

نتیجه گیری: **نتایج مطالعه حاضر و تحقیقات قبلی حاکی از نقش ناچیز جهش های ژن DFNB59 در ایجاد ناشنوایی در استان چهارمحال و بختیاری است. جهت تعیین نقش این ژن در توسعه ناشنوایی نیاز است تا تمامی منطقه رمزکننده و پروموتر ژن مربوطه بر روی تعداد نمونه بیشتر مورد بررسی قرار گیرد.**

واژه های کلیدی: ناشنوایی، پژواکین، واکنش زنجیره ای پلیمراز-چند شکلی طول قطعه محدود.

مقدمه:

ناشنوایی یک اختلال هتروژن است که طبق برآوردهای انجام شده بیش از ۷۰ میلیون نفر در سراسر دنیا از آن رنج می‌برند. این اختلال شایع با فراوانی ۱ در ۱۰۰۰ تولد زنده رخ می‌دهد که قبل از دوره زبان باز کردن (Pre lingual) و یا بعد از آن (Post lingual) شروع شده و ریشه نیمی از این موارد، ژنتیکی است (۳-۱). تقریباً ۳۰ درصد از موارد ناشنوایی ژنتیکی سندرومیک است که شامل صدها سندرومی می شود که ناشنوایی یکی از علایم آنهاست و ۷۰ درصد دیگر شامل ناشنوایی غیر سندرومی است. کاهش شنوایی غیر سندرومیک تقریباً ۸۰ درصد

نویسنده مسئول: شهرکرد- دانشگاه علوم پزشکی-رحمتیه –مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی-تلفن: ۰۳۸۱-۳۳٤٦٦۹۲، E-mail:mchalesh@yahoo.com

www.SID.ir

اتوزوم مغلوب (DFNB)، ۲۰ درصد اتوزوم غالب (DFNA) و ۱ درصد وابسته به X (DFN) می باشد (۷-۳). متاسفانه آمار دقیقی از میزان ناشنوایی و سهم علل مختلف در کشور ما موجود نیست و ظاهراً رتبه دوم را بعد از عقب ماندگی ذهنی دارد. بر طبق برآوردها، در مدارس استثنایی ایران، بالغ بر ۱۷۰۲۶ دانش آموز ناشنوا وجود دارد (۸) که این آمار تنها بخشی از ناشنوایان کشور را پوشش می دهد به همین جهت اهمیت کار تحقیقاتی بر روی این بیماری کاملاً مشهود است.

پیشرفت های بسیاری توسط دانشمندان در سراسر جهان برای شناسایی تعداد زیادی از ژنهایی که مسئول کاهش شنوایی ارثی می باشند صورت گرفته است. یکی از این موفقیت ها که اخیراً بدست آمده، شناسایی ژن جدیدی با نام DFNB59 (MIM: 610219) است که رمز کننده پروتئین پژواکین بوده و بر روی بازوی بلند کروموزوم دو (2q31.2) مستقر است. این ژن پلی پپتیدی مشتمل بر ۳۵۲ اسید آمینه راکد می کند. ژن DFNB59 دارای ۷ اگزون بوده که اگزون اول آن غیر رمزگذار است و در کل ۹/۸ kb از توالی ژنومی را اشغال کرده است (۹).

جهش هـــای این ژن که برای اولین بـار توسط Delmaghani و همکاران شناسایی شد، بعنوان عامل ناشنوایی نوع عصبی در ۴ خانواده ایرانی با ناشنوایی اتوزومی مغلوب معرفی شده بطوری که علت ناشنوایی در یک خانواده جهش T54I و در سه خانواده دیگر R183W گزارش شد (۹).

Collin و همکاران، ۶۸ ناشنوای اتوزومی مغلوب غیر سندرومی مورد مطالعه قرار دادند و یک مورد جهش R167T و یک مورد نیز جهش R183W را پیدا کردند. این محققین ۸۳ ناشنوای اتوزومی مغلوب غیر سندرومی هلندی را نیز برای جهش های ژن پژواکین مورد بررسی قرار دادند که در نهایت ۳ تغییر ژنی پیدا کردند. این تغییرات ژنی شامل 509-512del، CACT، 731T> G و 874G>A بود که بیماریزایی آنها نامشخص است و نیاز به مطالعات بیشتری دارد. این محققین نتیجه گیری کردند که جهش های ژن پژواکین علت عمـده ایجاد ناشنوایی در جامعه مورد مطالعه آنها نبوده است (۱۰).

در مطالعه Ebermann و همکاران که یک خانواده مراکشی با ناشنوایی اتوزوم مغلوب مادرزادی پیشرونده همراه با دژنراسیون شبکیه برای وجود جهش های ژن پژواکین مورد بررسی قرار گرفت، جهش 113-114insT از این خانواده گزارش شد. این محققین اظهار داشتند که این جهش از نوع عصبی نبوده بلکه نقص سلول های مویی در گوش را ایجاد می کند (۱۱).

در مطالعه دیگری که توسط Hashemzadeh و همکاران روی ۳۰ خانواده خویشاوند ایرانی انجام شد، منجر به شناسایی دو جهش جدید 726delT و 988delG در ژن مزبور گردیـــد (۱۲). بر خلاف Delmaghani و همکاران که جهش های ژن DFNB59 را بعنوان عامل ناشنوایی نوع عصبی معرفی نمودند، Hashemzadeh و همکاران نشان دادند که جهش های مختلف ممکن است بروز ناشنوایی های متفاوتی را در پی داشته باشد (۹).

مطالعه ای توسط Schwander و همکاران روی موش های آزمایشگاهی انجام گرفت و اعلام شد که گرچه مطالعات قبلی گرفتاری اعصاب شنوایی بر اثر جهش های ژن DFNB59 را تایید می کند، اما یافته های آنان بر متاثر ساختن سلول های مویی بیرونی دلالت داشته و بعنوان نتیجه کلی بر متنوع بودن مکانیزم هـــای بیماریزایی مربوط به جهش های ژن پژواکین تاکید نموده است (۱۳).

در هر حال مطالعات اندکی در ارتباط با تعیین نقش جهش های ژن پژواکین در ایجاد ناشنوایی در کشورهای مختلف و از جمله ایران انجام شده است. هر چند تحقیقات انجام شده به نقش ناچیز جهش های این ژن در ایجاد ناشنوایی تاکید دارند، بررسی های بیشتر می تواند ارتباط این ژن را با انواع ناشنوایی روشن تر کند. لذا این مطالعه با هدف بررسی جهش های اگزون ۲ و ۴ ژن پژواکین (DFNB59) در ۱۰۰ دانش آموز ناشنوای استان چهارمحال و بختیاری انجام شد.

روش بررسی:

در این مطالعـه توصیفی-آزمایشگاهی، تعـداد

Archive of SID
www.SID.ir

یکصد نفر از دانش آموزان ناشنوا از مدارس استثنایی شهرکرد شامل ۵۷ پسر و ۴۳ دختر با میانگین سنی ۱۵ سال و دامنه سنی ۱۷-۱۳ سال با روش نمونه گیری آسان وارد مطالعه شدند. از شرایط ورود به مطالعه داشتن ناشنوایی ژنتیکی و غیر سندرومیک بوده و کلیه دانش آموزان ناشنوا با علل سندرومیک، غیر ژنتیکی، ناشناخته و دارای جهش های GJB2 از مطالعه حذف شدند.

پس از اخذ رضایت نامه کتبی از والدین کلیه بیماران، اطلاعات دموگرافیک و بالینی آنها از طریق پرسشنامه جمع آوری و سپس از هر بیمار به میزان ۵ میلی لیتر خون جهت انجام آزمایشات مولکولی در لوله حاوی ماده ضد انعقاد EDTA ۰/۵ مولار گرفته شد. DNA نمونه های خون با روش استاندارد فنل کلروفرم استخراج (۱۴) و میزان DNA حاصله با استفاده از اسپکتروفتومتر (Unico 2100 USA) اندازه گیری گردید. با استفاده از توالی ژن DFNB59 با رمز دسترسی (NM-001042702) و نرم افزار Primer 3، پرایمرها طراحی شدند. پرایمرهای طراحی شده برای اگزون ۲ و ۴ به ترتیب شامل:

2F: 5'ATG GAT TTA TCT GGG GGT TGC 3'
2R: 5'ATC TTT CAG TGT AAA ACG TGT 3'
4F: 5'TAC TAT TAG GTG AAC TAT GAA TG3'
4R: 5'AGT TAG TAA GAG AAC CCA AC 3'

هر نمونه واکنش PCR شامل:

1µl از پرایمر 2F (50PM) و 1µl از پرایمر 2R (50PM) و یا 1µl از پرایمر 4F (50PM) و 1µl از پرایمر 4R (50PM) به اضافه 0.5µl از Taq DNA Polymerase (5U/µl)، 0.5µl از Mix dNTP (10mM)، 2.5µl از (10X)Taq DNA buffer، 2.5µl MgCl2 (50mM) و 1µl از DNA (100ng) که با ddH2O به حجم 25µl رسانده شد. سپس میکروتیوب های محتوی واکنش های PCR تحت شرایط دمایی زیر در دستگاه PCR (ASTEC PC818-Japan) تکثیر گردیدند.

شرایط تکثیر اگزون ۲ شامل: واسرشت اولیه (Pre denaturation) در ۹۶ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه و سپس ۳۵ سیکل، واسرشت شدن (Denaturation) در ۹۶ درجه سانتی گراد، چسبیدن (Annealing) در ۵۳ درجه سانتی گراد و طویل شدن (Extension) در ۷۲ درجه سانتی گراد هر کدام به مدت ۳۰ ثانیه و طویل شدن نهایی (Terminal extension) در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه بود.

شرایط تکثیر اگزون ۴ شامل واسرشت اولیه (Pre denaturation) در ۹۶ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه و سپس ۳۵ سیکل واسرشت شدن (Denaturation) در ۹۶ درجه سانتی گراد، چسبیدن (Annealing) در ۵۶ درجه سانتی گراد و طویل شدن (Extension) در ۷۲ درجه سانتی گراد هر کدام به مدت ۱ دقیقه و طویل شدن نهایی (Terminal extension) در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه بود.

محصولات PCR حاصله سپس بر روی ژل پلی اکریل آمید ۸ درصد (Merck Germany) تحت جریان ۵۰ میلی آمپر به مدت ۱ ساعت الکتروفورز شده و سپس توسط رنگ آمیزی نیترات نقره رؤیت شدند. جهت انجام PCR-RFLP محصولات PCR اگزون ۲ با آنزیم محدود کننده AF1III (Fermentas Canada) و محصولات PCR اگزون ۴ با آنزیم محدود کننده SsiI (Fermentas Canada) هضم شدند. به این منظور میزان 10 µl از محصولات PCR را با 1 µl آنزیم محدود کننده (5U/ µl) و 2µl بافر و 7µl آب مقطر مخلوط نموده و برای مدت ۱۲ ساعت (Over night) در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده، سپس محصولات PCR-RFLP را روی ژل پلی اکریل آمید ۸ درصد و جریان ۴۰ میلی آمپر به مدت ۴۰ دقیقه الکتروفورز نموده و پس از اتمام الکتروفورز ژل مربوطه با نیترات نقره رنگ آمیزی و نتایج مورد تجزیه تحلیل قرار گرفت.

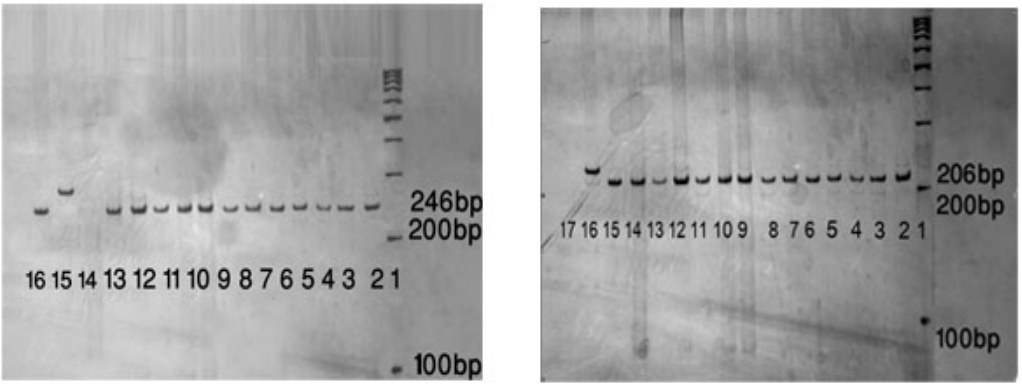
Archive of SID

www.SID.ir

یافته ها:

محصولات PCR اگزون ۲ ژن DFNB59 به شکل باندهایی به اندازه ۲۲۵ جفت باز بر روی ژل پلی اکریل آمید مشاهده شد. پس از انجام PCR-RFLP توالی جهش T54I که در محل شناسایی آنزیم محدود کننده AF1III (5'A C R Y G T 3') قرار دارد توسط آنزیم مزبور در کلیه یکصد نمونه محصول PCR نمونه های بیمار بریده شده و باندهای ۱۹ و ۲۰۶ جفت بازی روی ژل پلی اکریل آمید ایجاد نمود که بیانگر عدم وجود جهش در محل شناسایی آنزیم فوق الذکر است.

از طرفی محصولات PCR اگزون ۴ ژن DFNB59 به اندازه ۲۸۱ جفت باز بر روی ژل پلی اکریل آمید مشاهده شد. در اینجا نیز توالی جهش R183W که در محل شناسایی آنزیم محدود کننده SsiI (5'C C G C 3') قرار گرفته است، توسط آنزیم مزبور در کلیه یکصد محصول PCR نمونه بیماران بریده شد و باندهای ۳۵ و ۲۴۶ جفت بازی روی ژل پلی اکریل آمید ایجاد نمود که نشان دهنده عدم وجود جهش در محل شناسایی آنزیم فوق الذکر است. لازم به ذکر است که قطعات ۱۹ و ۳۵ جفت بازی، بعلت اندازه کوچک از ژل خارج می شوند (تصویر شماره ۱).



ب) الف)

***تصویر شماره ۱*: محصولات PCR- RFLP اگزون های ۲ و ٤ ژن پژواکین بر روی ژل پلی اکریل آمید ۸٪.**

الف: ژل پلی اکریل آمید محصول PCR-RFLP اگزون ۲ . شماره ۱: مارکر/ شماره های ۲-۱۵: نمونه های مورد بررسی/ شماره ۱٦: نمونه کنترل مثبت (محصول PCR بدون آنزیم AF1 III) شماره ۱۷ : نمونه کنترل منفی (شامل کلیه ترکیبات RFLP به جز محصول PCR). ب: ژل پلی اکریل آمید محصول PCR-RFLP، اگزون ٤/ شماره ۱: مارکر/ شماره های ۱۳- ۲ و ۱٦: نمونه های مورد بررسی/ شماره ۱٤: نمونه کنترل منفی (شامل کلیه ترکیبات RFLP به جز محصول PCR). شماره ۱۵: نمونه کنترل مثبت (محصول PCR بدون آنزیم SsiI).

بحث:

این مطالعه با هدف بررسی ارتباط بین جهش های اگزون ۲ و ۴ ژن پژواکین با ناشنوایی در استان چهارمحال و بختیاری انجام شد. نتایج نشان داد جهش های ژن T54I و R183W در ناشنوایان مورد مطالعه وجود ندارد. مطالعاتی که در ارتباط با جهش های ژن پژواکین و نقش بیماریزایی آنها در کشور انجام شده محدود می شود به تعداد دو جهش T54I و R183W که توسط Delmaghani و همکاران در ۴ خانواده ایرانی گزارش شد (۹) و جهش های 726delT و 988delG که توسط Hashemzadeh و همکاران در دو خانواده ایرانی بدست آمد (۱۲). Delmaghani و همکاران فراوانی جهش های مزبور را

www.SID.ir

اعلام نکرده اند (۹). ولی Hashemzadeh و همکاران فراوانی جهش‌های پیدا شده را به میزان ۶/۷ درصد اعلام کردند (۱۲). جهش 726delT در یک خانواده ناشنوا با الگوی اتوزومی مغلوب از استان گیلان (۱۲) و جهش 988delG نیز از یک خانواده ناشنوای اتوزومی مغلوب از استان چهارمحال و بختیاری گزارش شده است (۱۲).

اخیراً هم در مطالعه‌ای توسط بزاززادگان و همکاران بر روی ۵۰ خانواده ایرانی با ناشنوایی اتوزومی مغلوب انجام و جهش ژن (122delA) مربوط به ژن DFNB59 به میزان ۴ درصد گزارش شده است (۱۵). هر چند مطالعات انجام شده بسیار اندک است ولی به نظر می رسد که نقش جهش های این ژن در ایجاد ناشنوایی در کشور چشمگیر نباشد.

مطالعاتی که در نقاط مختلف جهان انجام شده نیز بیانگر آن است که جهش های ژن پژواکین نقش زیادی در ایجاد ناشنوایی ندارند. به عنوان مثال در تحقیقاتی که Collin و همکاران در کشور ترکیه انجام دادند، از ۶۸ خانواده ترک مورد بررسی، فقط در دو خانواده جهش ژن مذکور مشاهده شد. در غربالگری ۸۳ بیمار هلندی، هیچ جهشی از این ژن پیدا نشد (۱۰). در مطالعه ای که Ebermann و همکاران بر روی خانواده ای بزرگ با اختلال شنوایی انجام دادند، یک مورد جهش 113-114insT را یافتند (۱۱). با این اوصاف تاکنون تعداد معدودی جهش در ژن DFNB59 بیماران ناشنوا گزارش شده است که شامل: ۳ نوع جهش بد معنی (T54I، R183W و R167T) و ۴ جهش تغییر قالب (726delT، 113-114insT، 122delA و 988delG) می باشد (۱۵،۱۲،۱۱،۹).

در این بررسی، همه نمونه های مورد آزمایش در اثر آنزیم محدود کننده برش خورده که عدم وجود جهش در ۱۰۰ نمونه مورد بررسی را نشان می دهد. همانطور که قبلاً اشاره شد، نتایج بدست آمده از نقاط مختلف دنیا و از جمله این تحقیق، حاکی از نقش کمرنگ جهش های ژن DFNB59 در ایجاد ناشنوایی است. با این حال پیشنهاد می شود مطالعات بیشتری انجام تا اقوام و جمعیت های مختلف ایرانی از نظر میزان پراکندگی جهش های این ژن و ارتباطشان با ناشنوایی و حتی نوع ناشنوایی بررسی دقیق تری شوند تا اطلاعات مورد نیاز جهت پیشگیری و مدیریت اختلال شنوایی وابسته به این ژن تامین گردد.

نتیجه گیری:

نتایج مطالعه حاضر و تحقیقات قبلی حاکی از نقش ناچیز جهش های ژن DFNB59 در ایجاد ناشنوایی در استان چهارمحال و بختیاری است. جهت تعیین نقش این ژن در توسعه ناشنوایی نیاز است تا تمامی منطقه رمزکننده و پروموتر ژن مربوطه بر روی تعداد نمونه بیشتر مورد بررسی قرار گیرد.

تشکر و قدردانی:

از اداره آموزش و پرورش و مدارس استثنایی استان چهارمحال و بختیاری و از کلیه دانش آموزان و والدین آنها بخاطر همکاری صمیمانه با این تحقیق قدردانی می شود. این تحقیق از نظر مالی توسط معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد- دانشگاه پیام نور تهران و سازمان بهزیستی استان چهارمحال و بختیاری تامین (گرانت شماره ۵۳۵) شده است

منابع:

1. Marazita ML, Ploughman LM, Rawlings B, Remington E, Arnos KS, Nance WE. Genetic epidemiology studies of early-onset deafness in the U.S. school-age population. Am J Med Genet. 1993 Jun; 46(5): 486-91.

2. Morton NE. Genetic epidemiology of hearing impairment. Ann N Y Acad Sci. 1991; 630: 16-31.

Archive of SID
www.SID.ir

3.Smith RJH, Green GE, Van Camp. Deafness and hereditary hearing loss overvie. Retrieved February 24, 2005, from http/www.geneclinics.

4.Martini A, Mazzoli M, Kimberling W. An introduction to the genetics of normal and defective hearing. Ann N Y Acad Sci. 1997 Dec; 830: 361-74.

5.Wilson J. Deafness in developing countries. Approaches to a global program of prevention. Arch Otolaryngol. 1985 Jan; 111(1): 2-9.

6.Nadol JB Jr, Merchant SN. Histopathology and molecular genetics of hearing loss in the human. J Pediatr Otorhinolaryngol. 2001 Oct; 61(1): 1-15.

7.Ciesla CJ, Lee KJ. Audiology. In: Lee KJ (ed). Essential otolaryngology. 6th ed. Connecticut: Appleton & Lange; 1995. p: 45.

8.Sadeghi AR, Sanati MH, Alasti F, Hashem Zadeh Chaleshtori M. [Accessing genetic and environmental factors of hearing loss in 354 families in Qom and Markazi provinces. Journal of Rehabilitaion. 2005; 21(6): 10-7.]Persian

9.Delmaghani S, del Castillo FJ, Michel V, Leibovici M, Aghaie A, Ron U, et al. Mutations in the gene encoding pejvakin, a newly identified protein of the afferent auditory pathway, cause DFNB59 auditory neuropathy. Nat Genet. 2006 Jul; 38(7): 770-8.

10. Collin RW, Kalay E, Oostrik J, Caylan R, Wollnik B, Arslan S, et al. Involvement of DFNB59 mutations in autosomal recessive nonsyndromic hearing impairment. Hum Mutat. 2007 Jul; 28(7): 718-23.

11. Ebermann I, Walger M, Scholl HP, Charbel Issa P, Luke C, Nurnberg G, et al. Truncating mutation of the DFNB59 gene causes cochlear hearing impairment and central vestibular dysfunction. Hum Mutat. 2007 Jun; 28(6): 571-7.

12. Hashemzadeh Chaleshtori M, Simpson MA, Farrokhi E, Dolati M, Hoghooghi Rad L, Amani Geshnigani S, et al. Novel mutations in the pejvakin gene are associated with autosomal recessive non-syndromic hearing loss in Iranian families. Clin Genet. 2007 Sep; 72(3): 261-3.

13. Schwander M, Sczaniecka A, Grillet N, Bailey JS, Avenarius M, Najmabadi H, et al. A forward genetics screen in mice identifies recessive deafness traits and reveals that pejvakin is essential for outer hair cell function. J Neurosis. 2007 Feb; 27(9): 2163-75.

14. Dale JW, Schantz MV. Purification and separation of nucleic acid In: Dale JW, Schantz MV. From Genes to genomes. Chichester: John Wiley; 2002. p: 31-3.

15. Bazazzadegan N, Meyer N, Kahrizi K, Khosh aien A, Mohseni M, Nikzad N, et al. Linkage analysis of DFNB59 locus in 50 Iranian families autosomal recessive non syndromic hearing loss. Iran genetic congress 10th, Center of Razi congress, Tehran, Iran. 2008 May 21-23; 38-9.

Archive of SID

www.SID.ir