Archive of SID

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان/ دوره پانزدهم/ پائیز ۱۳۸۹/۱۹-۱۳

بررسی جهش‌های ژن بتا گلوبین در بیماران تالاسمی با استفاده از روش PCR-SSCP

ناصر پولادی[۱]، محمدعلی حسینپورفیضی[۲]، مهدی حقی[۳]، پروین آذرفام[۴]، عباسعلی حسینپورفیضی[۵]

۱- کارشناس ارشد سلولی و مولکولی ،گروه زیست شناسی دانشکده علوم دانشگاه تربیت معلم آذربایجان، تبریز، ایران

۲-استاد رادیوبیولوژی، گروه زیست شناسی دانشکده علوم طبیعی دانشگاه تبریز، تبریز، ایران (مؤلف مسوول) تلفن: ۰۴۱۱-۳۳۶۲۲۸۰ pourfeizi@eastp.ir

۳- کارشناس ارشد ژنتیک، دانشگاه آزاد اسلامی - واحد اهر، اهر، ایران

۴- کارشناس ارشد فیزیک پزشکی، گروه زیست شناسی دانشکده علوم طبیعی دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

۵- دانشیار هماتولوژی انکولوژی بیمارستان کودکان، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

چکیده

زمینه و هدف: بتا تالاسمی یکی از شایع‌ترین بیماری‌های ژنتیکی در ایران است و بیش از دو میلیون حامل بتا تالاسمی در ایران وجود دارد. شناسایی جهش‌های ژن بتاگلوبین برای برنامه‌های تشخیصی و مدیریتی معین مانند تشخیص پیش از زایمان بیماری بتاتالاسمی ضروری است. در کشور ما روش PCR-ARMS (PCR-amplification refractory mutation system) بطور گسترده برای شناسایی جهش‌های ژن بتا گلوبین استفاده می‌شود.

روش بررسی: در این مطالعه کاربرد روش PCR-SSCP (PCR-single strand conformation polymorphism) در شناسایی جهش‌های بتا تالاسمی توضیح داده می‌شود. در بیمارانی که جهش‌های آنها قبلاً با توالی یابی تایید شده بودند، حدود ۲۸۱ جفت باز حاوی اگزون یک ژن بتا گلوبین با روش PCR تکثیر گردید. ۲/۵ میکرولیتر محصول واکنشPCR را مطابق تکنیک SSCP در ژل اکریل آمید الکتروفورز و باندها با رنگ‌آمیزی نیترات نقره آشکار شدند. هفت جهش و یک پلی‌مورفیسم با این تکنیک بررسی شد.

یافته‌ها: مشخص گردید الگوی حرکت تک رشته‌ای‌ها کاملاً متفاوت با همدیگر و با نمونهٔ کنترل بود.

نتیجه‌گیری: تکنیک PCR-SSCP می‌تواند نیاز ما را برای توالی یابی مستقیم DNA ژنومی کاهش داده و در کشورهای در حال توسعه که بیماریهای هموگلوبینی ژنتیکی بالا و منابع مالی کم است مفید باشد.

کلید واژه‌ها: تالاسمی،SSCP، ژن بتا گلوبین

وصول مقاله: ۸۹/۳/۲۲ اصلاحیه مقاله: ۸۹/۸/۳ پذیرش مقاله: ۸۹/۸/۲۰

مقدمه

بتا تالاسمی یکی از شایع‌ترین اختلالات ژنتیکی در انسان می‌باشد که موجب کاهش یا عدم تولید زنجیرهٔ بتا گلوبین در بدن می‌شود (۱). بتاگلوبین توسط ژن ساختاری بیان می‌شود که در بازوی کوتاه کروموزوم ۱۱ (11p,15.4) قرار دارد. توالی ژن شامل حدود ۱۶۰۰bp است که ۱۴۶ اسید آمینه را کد می‌کند و شامل ۳ اگزون است که توسط دو اینترون از هم جدا شده‌اند. بیش از ۹۵٪ کل جهش‌های بتاتالاسمی در جهان از نوع جهش‌های نقطه‌ای در ژن بتاگلوبین و درصد کمی نیز از نوع حذف ژنی می‌باشند. جهش‌های نقطه‌ای شامل جابه جایی تک نوکلئوتیدی، اضافه شدگی یا حذف شدگی کوچک در حد چند نوکلئوتید است که روی بیان ژن در مراحل نسخه‌برداری، پردازش RNA و یا ترجمه RNA تأثیر می‌گذارد. تاکنون بیش از ۲۰۰ نوع جهش مؤثر بر ژن بتا گلوبین شناسایی شده که موجب بروز فنوتیپ بتا تالاسمی می‌شوند. شناسایی جهش‌های ژن بتاگلوبین برای برنامه‌های تشخیصی و مدیریتی معین مانند تشخیص

www.SID.ir

Archive of SID

پیش از زایمان (PND) بیماری بتاتالاسمی ضروری است (۱). برای شناسایی جهش‌ها، روشهای مختلفی در طول دو دهۀ اخیر توسط دانشمندان بکار رفته است (۱). مانند هیبریداسیون ریورس دات بلات یا RDB (Reverse Dot Blot)که برای شناسایی جهش‌های شناخته شدۀ ژن بتاگلوبین کاربرد دارد (۳ و ۲). با این تکنیک تنها هفده نوع جهش شایع پوشش داده می شود و جهش‌های نادر و ناشناخته مخفی باقی می‌مانند (۱). با توجه به بررسی‌های مختلف در ایران بیش از ۶۰ نوع جهش مختلف در ژن بتاگلوبین شناخته شده است (۴) که تشخیص تک تک آنها در یک آزمایش کاری بس دشوار خواهد بود. اگزون یک ژن بتا گلوبین به همراه مناطق بالادست (upstream) آن یکی از جهش پذیرترین مناطق تأثیرگذار در بیماری بتا تالاسمی می‌باشد. محققان کشورمان تاکنون حداقل ۲۶ نوع جهش را در این منطقه گزارش کرده‌اند (۴). روش دوم روش PCR-ARMS(PCR-amplification refractory mutation system) است که کاربرد وسیعی در شناسایی جهش‌های شایع و شناخته شده دارد (۸-۵)، اما مثل روش RDB بیشتر برای جهش‌های شناخته شده بکار می‌رود و بدلیل متکی بودن آزمایش به تغییر تک نوکلئوتیدی در آغازگرها می‌تواند منجر به پاسخ‌های مثبت یا منفی کاذب شود (۱). اگر چه توالی‌یابی مستقیم جهش‌های ناشناخته را به راحتی شناسایی می‌کند، در کشورهای در حال توسعه بدلیل هزینه بر بودن و نیاز این روش به زمان بیشتر، در مواقع ضروری می‌تواند مشکل ساز باشد (۱). قبل از توالی‌یابی می‌توان از چندین تکنیک غربالگری جهش‌ها استفاده کرد. مانند DGGE(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)، CCM یا شکست شیمیایی ناجوربازی (Chemical Cleavage Mismatched)، انگشت نگاری دی داکسی یا ddf (Di Deoxy Fingerprinting) و الکتروفورز ژل با شیب دمایی یا TGGE(Temperature Gradient Gel Electrophoresis) و در نهایت پلی مورفیسم فضایی تک رشته‌ای (SSCP) (۱۲-۹ و۱). در این مقاله به بررسی کاربرد تکنیک PCR-SSCP در شناسایی جهش‌های ژن بتاگلوبین پرداخته می‌شود.

روش بررسی

در یک مطالعه آزمایشگاهی- تشخیصی، نمونه‌های DNA انسانی استخراج شده از خون بیماران بتاتالاسمی دارای جهش‌های شایع و نادر (codon5(-CT)، codon16(-C)، codon15(G-A)، Frs8(-AA)، Frs8/9(+G)، -28(A-C)، Codon25/26(+T) و پلی‌مورفیسم Codon2(C/T) واقع در اگزون یک ژن بتاگلوبین که قبلاً جهش‌های آنها با روش توالی یابی تایید شده بود، برای بررسی نحوۀ عملکرد تکنیک SSCP انتخاب شدند. با استفاده از آغازگر رفت CommonC و برگشت IVS-I-1N قطعه‌ای بطول ۲۸۱ جفت باز و در حجم ۲۵ میکرولیتر (با دستگاه ترمال سایکلر Techne مدل Genuse) تکثیر گردید. واکنش‌های تکثیر در ۳۰ چرخه و در دمای اتصال ۶۶ درجه سانتیگراد انجام شد. سپس ۴µ از محصول PCR را در ژل آگارز دو درصد الکتروفورز کرده و پس از اطمینان از باند تکثیر شده، ۲/۵µ از محصول با ۵µ بافر بارگذاری SSCP (۰/۰۵ درصد برومونفل بلو، ۰/۰۵ درصد گزیلن سیانول در ۹۵ درصد فرمامید) مخلوط گردید. مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۴ درجه نگه داشته شده و سریعا به ظرف حاوی یخ- الکل منتقل

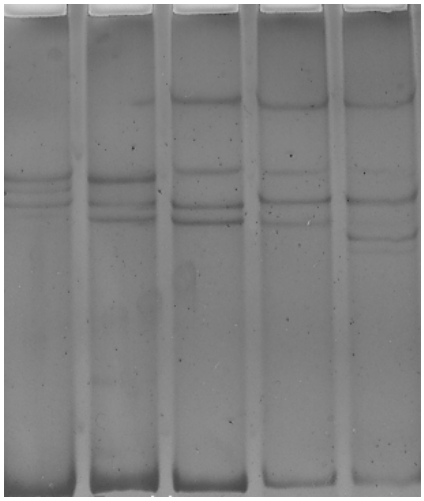
www.SID.ir

Archive of SID

گردید. نمونه‌ها سریعاً در ژل اکریل آمید ۱۰ درصد و در دمای چهار درجه الکتروفورز شدند. پس از حدود ۱۶ ساعت با روش نیترات نقره رنگ‌آمیزی و الگوی حرکت باندها مورد بررسی قرار گرفت. این بررسی در آزمایشگاه رادیوبیولوژی و بیولوژی مولکولی گروه زیست شناسی جانوری دانشگاه تبریز انجام گرفته است. تحلیل داده‌ها از طریق مشاهده تصاویر انجام شد.

یافته‌ها

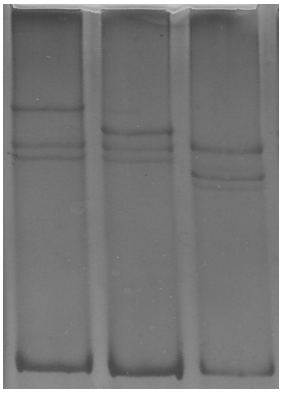
در این بررسی قطعهٔ ۲۸۱ جفت بازی حاوی پروموتر،5'UTR و اگزون یک با استفاده از آغازگرهای استاندارد طراحی شده برای ARMS-PCR: CommonC و IVS-I-1N تکثیر شده و روی ژل اکریل آمید ۱۰ درصد مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۱). با توجه به شکل در مقایسه با نمونهٔ نرمال تمام نمونه‌های جهش یافته قابل تمییز می‌باشند. شکل به خوبی تمایز بین جهش‌های codon5(-CT)، codon16(-C)، codon15(G-A) هموزیگوت را با هم و با نمونهٔ نرمال را نشان می‌دهد. پلی‌مورفیسم Codon2، Frs8(-AA) Frs8/9(+G) و28(A-C)- نیز در این ناحیه قرار دارند و الگوی SSCP متفاوتی را نشان می‌دهد (شکل‌های ۱ و ۲).



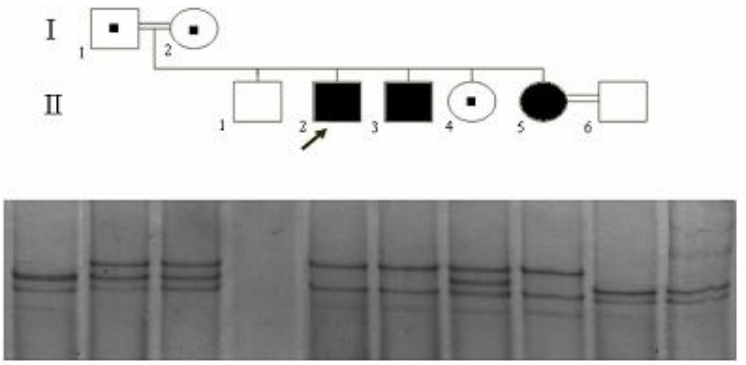
شکل ۱: از چپ به راست: الگوی SSCP جهش codon5(-CT)، فرد نرمال codon16(-C)، codon15(G-A) (هموزیگوت)، codon15(G-A)(هتروزیگوت)

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲: از چپ به راست الگوی Codon25/26(+T) SSCP ، فرد نرمال و پلی مورفیسمCodon2



شکل ۳: شجره نامه و الگوی SSCP خانواده ی پروباند(II-2): I-1 پدر I-2 مادر(هردو هتروزیگوت)، II-1 در آزمایش شرکت نکرده، II-3 و II-5 جهش بصورت هموزیگوس ، II-4 ناقل وII-6 سالم می باشند.

الگوی SSCP برای Codon25/26 که بسیار نادر بوده و در بررسی‌های قبلی ما شناسایی و گزارش شده است، از نمونه‌های نرمال کاملاً قابل تشخیص است. ما این روش را برای غربالگری خانوادهٔ این پروباند استفاده کردیم، که شکل ۳ الگوی باندها را در خانوادهٔ این بیمار نشان می‌دهد. افراد I-1 و I-2 پدر و مادر و ناقل جهش Codon25/26 می‌باشند و دختر II-4 مثل پدر و مادر هتروزیگوت است. افرادII-2 ،II-3 وII-5 جهش را بصورت هموزیگوس دریافت کرده‌اند. II-1 در آزمایش ما شرکت نکرده و II-6 سالم می‌باشد. ستون اول و آخر ژل مربوط به فرد نرمال است.

بحث

جهش‌های ژن بتاگلوبین انسانی بطور گسترده مورد بررسی قرار گرفته است. تنها درجمعیت مناطق جغرافیایی منزوی و کوچک، یک یا چند جهش شایع می‌باشند، در حالیکه در بسیاری ازمناطق که جمعیت پویا بوده و از نظر قومی- ژنتیکی ناهمگون (هتروژنوس) هستند، علاوه بر جهش‌های شایع تعداد زیادی جهش نادر و ناشناخته نیز وجود دارد. بنا به بررسی‌های ما در شمال غرب کشور ایران، حدود ۱۷ نوع جهش در این ژن مسؤول بتا تالاسمی می‌باشند (۵). در کل ایران بیش از ۶۰ نوع جهش در این ژن گزارش شده است (۶ و۴).

www.SID.ir

Archive of SID

روش‌های مختلفی برای شناسایی و غربالگری جهش‌های ژن بتاگلوبین مورد استفاده قرار می‌گیرد که طبق شبکهٔ اروپایی کیفیت مولکولی (EMQN) هرکدام از این روشها محاسن و معایبی دارند (۱۰). روش RDB از نظر اقتصادی با صرفه نمی‌باشد و در آزمایشگاه‌های محدودی قابل انجام است و همچنین تنها برای شناسایی چند جهش شناخته شده ویژگی دارد (۳ و۲). روش دیگر روش ARMS-PCR است که با استفاده از آغازگرهای استاندارد طراحی شده در آزمایشگاه‌های معمولی مولکولی نیز قابل انجام است، اما می‌تواند مشکلاتی را در پی داشته باشد از جمله پاسخ‌های مثبت و منفی کاذب. متکی بودن آزمایش به تغییر تک نوکلئوتیدی در آغازگرها، شناسایی جهش‌های شایع و مخفی ماندن بعضی جهش‌ها از معایب این روش می‌باشند (۱). بنا به مقاله چاپ شدهٔ ما، استفاده از آغازگر جهش یافتهٔ Fr8/9(+G) بیماران داری جهش Fr8(-AA) نیز به اشتباه جهش Fr8/9(+G) شناسایی می‌شوند (۷). اکنون روش توالی یابی مستقیم ژن بتاگلوبین برای شناسایی جهش‌ها در دسترس است اما در ایران و بسیاری از کشورهای در حال توسعه هنوز متکی به ارسال نمونه‌ها به خارج از کشور می‌باشد، که هم زمان بر بوده و هم هزینهٔ بالایی را در پی دارد. همچنین ارسال نمونه‌ها به خارج از کشور می‌تواند احتمال خطای انسانی را در نتیجهٔ آزمایش افزایش دهد و در مواردی که نیاز به تکرار آزمایش باشد اتلاف زمان می‌تواند به ضرر آزمایش دهنده باشد. بنابراین، استفاده از تکنیک‌هایی برای افزایش توان پاسخ‌گویی در آزمایشگاههای معمولی مولکولی می‌تواند در این موارد راه گشا باشد.

تکنیک‌های غربالگری متعددی با شناسایی منطقهٔ حاوی جهش، باعث کاهش هزینه‌ها و افزایش کارایی آزمایشگاه‌ها در پاسخ به بیمار می‌شوند. تکنیک DGGE ، CCM، DDF، TGGE و SSCP از تکنیک‌های غربالگری می‌باشند اما در این روشها با معایبی روبرو هستیم. راه اندازی تکنیک DGGE نیاز به مشقت زیادی دارد و هزینه‌های بیشتری می‌طلبد. در CCM چند مادهٔ مضر شیمیایی که در تمام مراحل آزمایش مورد نیاز هستند استفاده می‌شوند. اگرچه روش DDF بسیار حساس است اما به مواد رادیو اکتیو و تکنیک‌های ماهرانه نیاز دارد. بنابراین استفاده از این روشها به سهولت امکان‌پذیر نیست (۱۲-۹ و۱).

در این مطالعه، روش PCR-SSCP بعنوان یک روش آسان، ارزان، و مطمئن(غیررادیواکتیو) مورد بررسی و تایید قرار می‌گیرد که با تغییراتی در نحوهٔ انجام الکتروفورز و رنگ‌آمیزی نیترات نقره می‌توان فرآیند غربالگری را پیش برد. این روش برای اولین بار توسط Orita (۱۳) و Hongyo (۱۴) بسط داده شد و امروزه در بیشتر آزمایشگاه‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. چندین فاکتور در کارایی بهتر روش PCR-SSCP دخیل هستند، در کنار طبیعت غیرقابل کنترل ترتیب نوکلئوتیدها، فاکتورهای دیگر مانند نسبت اکریل امید به بیس اکریل امید، افزودنی‌ها به ژل (مانند گلیسرول) دما و زمان الکتروفورز و شرایط بافر قابل تغییر می‌باشند. طراحی یا انتخاب پرایمر طوری صورت می‌گیرد که محصول PCR کمتر از ۳۰۰ جفت باز باشد، چون در این روش حساسیت غربالگری با افزایش طول قطعه پایین می‌آید. دوم نسبت اکریل آمید به بیس آکریل آمید است که در این آزمایش ۱/۵: ۳۸/۵ (۴۰ درصد) استفاده شد و از گلیسرول نیز برای افزایش حساسیت و تمییز بهتر

www.SID.ir

Archive of SID

باندهای تک رشته‌ای استفاده گردید (۱۲ و ۱۱ و۱). احتمالا گلیسرول کمک می‌کند تا ساختار تک رشته‌ای‌های مولکول DNA حفظ شده و تفاوت بار در آنها افزایش یابد. گلیسرول را می‌توان به بافر مورد استفاده نیز اضافه کرد که PH بافر را کاهش داده حساسیت SSCP را افزایش دهد. دمای پایین‌تر از ۶ درجه، حساسیت SSCP را بالا می‌برد. در این بررسی از اتاق سرد با دمای ۴ درجه استفاده گردید. دمای بالا در طی الکتروفورز سبب ناپایداری پیوندهای هیدروژنی شده و حساسیت SSCP را کاهش می‌دهد. لازم به ذکر است که در بعضی گزارشها اعلام شده که جهشی که در دمای اتاق قابل مشاهده بوده در دمای ۶ درجه مشاهده نکرده‌اند. این مساله نیاز به اپتیمایز کردن این روش برای توالی‌های مختلف مورد بررسی را می‌رساند (۱۲ و ۱۱ و ۷ و ۱). امروزه تکنیک‌های مختلفی به منظور کمک به افزایش حساسیت و کارایی روش SSCP معرفی می‌شوند مانند Snapback-SSCP (۱۰) وDSSCP (Deaminated-SSCP) که مثال دوم توسط محققان ایرانی در مارس ۲۰۰۹ گسترش یافته است (۱۳).

اگزون یک ژن بتا گلوبین به همراه مناطق بالادست (upstream) آن یکی از جهش پذیرترین مناطق تأثیرگذار در بیماری بتا تالاسمی می‌باشد. محققان در ایران تاکنون حداقل ۲۶ نوع جهش را در این منطقه گزارش کرده‌اند (۴). از جمله این جهش‌ها می‌توان به جهش‌های شایع و نادر codon16(- ،codon5(-CT) ،codon15(G-A)،C) -)، Frs8/9(+G) ،Frs8(-AA) ، 28(A-C Codon25/26(+T) و پلی‌مورفیسم Codon2(C/T) اشاره کرد. در این بررسی الگوی متفاوت این جهش‌ها به کمک روش SSCP نشان داده شده است. شناسایی پلی مورفیسم Codon2(C/T) با روش SSCP می‌تواند درصد این پلی مورفیسم را در جمعیت نشان دهد اما ارتباط این پلی موفیسم و جهش‌های بتاتالاسمی نیاز به مطالعات بیشتری دارد. درآزمایشگاه ما ابتدا الگوی متفاوتی از حرکت تک رشته‌ای‌ها در یکی از بیماران بوسیلهٔ روش SSCP مشخص گردید و سپس با توالی یابی مستقیم Codon25/26(+T) شناسایی شد (۸).

نتیجه گیری

ما از الگوی SSCP این جهش بسیار نادر برای غربالگری جهش در خانوادهٔ پروباند استفاده کردیم و نشان دادیم که با این روش در عرض ۲۴ ساعت می‌توان وضعیت خانواده بیمار را از نظر این جهش مشخص کرد و نیاز به توالی یابی مستقیم و صرف هزینه و اتلاف زمان نیست. مطمئناً در موارد تشخیص جهش در جنین، زمان بسیار مهم می‌باشد و روش SSCP می‌تواند کمک بسیار مؤثری را به ما بکند. بیش از دو میلیون حامل بتا تالاسمی در ایران وجود دارد که با بسط این تکنیک می‌توان فرآیند غربالگری را در سطح جامعه با هزینه‌های کمتر پیش برد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از تمام بیماران و خانواده‌های آنان که با تیم پژوهشی گروه زیست‌شناسی دانشگاه تبریز همکاری داشته و دارند کمال سپاسگزاری را می‌نمایند.

www.SID.ir

Archive of SID

References

1. Chinchang W, Viprakasit V, Pung-Amritt P, Tanphaichitr VS, Yenchitsomanus PT Clin biochem Molecular analysis of unknown beta-globin gene mutations using polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) technique and its application in Thai families with beta-thalassemias and beta-globin variants. Clinical Biochemistry 2005; 38: 987-96.

2. Sutcharitchan P, Saiki R, Fucharoen S, Winichagoon P, Erlich H, Embury SH. Reverse dot-blot detection of Thai beta- thalassemia mutations. Br J Haematol 1995; 90: 809-16.

3. Winichagoon P, Saechan V, Sripanich R, Nopparatana C, Kanokpongsakdi S, Maggio A and et al. Prenatal diagnosis of beta-thalassaemia by reverse dot-blot hybridization. Prenat Diagn1999; 19: 428-35.

4. Haghi M, Pouladi N, Hosseinpour Feizi MA, Hosseinpour Feizi AA. Beta-thalassemias in Iran. Journal of Shaheed Sadoughi University of Medical Sciences 2010; 18: 127-133.

5. Hosseinpour Feizi MA, Hosseinpour Feizi AA, Pouladi N, Haghi M, Azarfam P. Molecular spectrum of β-thalassemia mutations in Northwestern Iran. Hemoglobin 2008; 32: 255-61.

6. Haghi M, Khorshidi Sh, Hosseinpour Feizi MA, Pouladi N, Hosseinpour Feizi AA. Thalassemia mutations in the Iranian Kurdish population of Kurdistan and West Azerbaijan provinces. Hemoglobin 2009; 33: 109-14.

7. Haghi M, Hosseinpour Feizi AA, Hosseinpour Feizi MA, Pouladi N, Basak NA. Is the Frameshift Codon 8/9 (+G) [FSC8/9 (+G)] β-thalassemia mutation detected by polymerase Chain Reaction-amplification refractory mutation system*, really FSC8/9 (+G)?* Hemoglobin 2009; 33: 279-282

8. Haghi M, Hosseinpour Feizi AA, Hosseinpour Feizi MA, Harteveld CL, Pouladi N, Detection of a rare β°- thalassemia mutation [FSC 25/26 (+T)] in an Iranian family. Hemoglobin 2009;33:75-80.

9. Aida Omar, Elham Abdel Karim, Wessam EL Gendy, Iman Marzouk, Mona Wagdy. Molcqular basis of B-thalassemia in Alexandria. The Egyptian Journal Of Immunology 2005; 12: 15-24.

10.Wei Li, Feng Gao, Weizhong Tang, Xuerong Zhang, Haitian Zhang. Detection of known thalassemia point mutations by snapback single-strand conformation polymorphism: The feasibility analysis. Clinical Biochemistry 2006; 39: 833-842.

11. Kakavas VK, Plageras P, Vlachos TA, Papaioannou A, Noulas VA. PCR-SSCP: a method for the molecular analysis of genetic diseases. Mol Biotechnol 2008; 38: 155-63.

12. Kakavas KV, Noulas AV, Kanakis I, Bonanou S, Karamanos NK. Identification of the commonest cystic fibrosis transmembrane regulator gene DeltaF508 mutation: evaluation of PCR--single-strand conformational polymorphism and polyacrylamide gel electrophoresis. Biomed Chromatogr 2006; 20: 1120-5.

13. Orita M, H Iwahana, H Kanazawa, K Hayashi, and T Sekiya. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. Proc Natl Acad Sci 1989; 86: 2766-2770.

14. Tadashi Hongyo, Gregory S Buzard, Richard J, Calvert and Christopher M Weghorst**.** Cold SSCP**:** a simple, rapid and non-radioactive method for optimized single-strand: conformation polymorphism analyses. Nucleic Acids Research 1993; 21: 3637-3642.

15. Sadeq Vallian and Isar Nassiri. Development of a sensitive deaminated single-strand conformation polymorphism (DSSCP). Applied Biochemistry and Biotechnology 2010; 160: 8-11.

www.SID.ir