

بررسی جهش های نادر ژن بتاگلوبین در شمال غرب کشور

دکتر محمدعلی حسینیپورفیضی*^۱، دکتر عباسعلی حسینیپورفیضی^۲، ناصر پولادی^۳، مهدی حقی^۴، پروین آذرفام^۵

چکیده

مقدمه: مطالعات اخیر بر روی ژن بتاگلوبین در ایران نشان می دهد که حدود هشت جهش شایع بیشترین فراوانی را در جمعیت بیماران بتاتالاسمی کشور دارند. اما همیشه وجود جهش های نادر و ناشناخته مشکلات زیادی را در برنامه ریزی جهت تشخیص قبل از تولد ایجاد می کنند. در شمال غرب کشور نیز جهش های شایع بررسی و گزارش شده است. بررسی و گزارش جهش های نادر و ناشناخته می تواند در موارد تشخیصی و در طرح برنامه های پیشگیرانه مفید واقع شود

روش بررسی: در این پژوهش، ۵ میلی لیتر نمونه ی خون محیطی از ۲۰ بیمار آذری مبتلا به بتاتالاسمی که جهش آنها در بررسی قبلی شناسایی نشده بود، دریافت و DNA نمونه ها به روش پروتئیناز K- ایزوپروپانل استخراج گردید. سپس در مرحله ی نخست، جهش های Codon22(-AAGTTGG)، Codon36/37(-T)، Codon16(-C)، Codon6(-A)، Codon41/42(-TCTT)، Codon88(-C-A) با روش ARMS-PCR مورد بررسی قرار گرفت و مواردی که جهش های فوق را نشان ندادند جهت تعیین توالی ارسال شد.

نتایج: براساس نتایج این مطالعه، جهش های Codon15(TGG-TGA)، Codon16(-C)، Codon36/37(-T)، Codon25/26(+T)، IVSII-848(C-A)، 28(A-C) و IVSII-745(C-G) شناسایی و به جمع جهش های شناخته شده ی منطقه و کشور اضافه گردیدند. همچنین چهار جایگاه SNP: 5'UTR+20(C-T)، Codon2(CAC-CAT)، IVSII-16(C-G) و IVSII-666(T-C) در ژن بتاگلوبین بیماران مورد مطالعه مشخص گردید.

نتیجه گیری: نتایج این بررسی می تواند در غربالگری و تشخیص قبل از تولد بیماران مبتلا به بتاتالاسمی در آذربایجان، ایران و سایر کشورهای همسایه مفید باشد.

واژه های کلیدی: جهش های نادر، بتاگلوبین، شمال غرب ایران

مقدمه

بتاتالاسمی از شایع ترین اختلالات مغلوب اتوزومی است که توسط بیش از ۲۰۰ نوع جهش در ژن بتاگلوبین ایجاد می شود. اکثر این جهش ها از نوع جهش های نقطه ای، اضافه شدن یا حذف شدگی های کوچک می باشند. برخی جهش ها باعث

کاهش میزان بیان ژن بتاگلوبین شده و β^+ تالاسمی ایجاد می کنند و برخی جهش ها نیز سبب می شوند زنجیره بتاگلوبین کارآمدی تولید نشود و ایجاد β^0 تالاسمی می کنند^(۱). توزیع آلل های بتاتالاسمی در دنیا تصادفی نیست، بلکه هر قوم و جمعیتی طیف جهش های خاص خود را دارند. تعداد کمی از جهش ها، فراوانی بیشتری دارند و بیش از ۸۰٪ جهش ها را شامل شده و جهش های شایع آن منطقه نامیده می شوند. در مقابل تعداد زیادی از جهش ها نیز وجود دارند که فراوانی کمتری دارند و جهش های نادر آن منطقه خوانده می شوند^(۲). بیش از یک دهه است که در ایران، جهش های ژن بتاگلوبین افراد مبتلا به

* نویسنده مسئول: استاد رادیوبیولوژی، گروه زیست شناسی دانشکده علوم طبیعی دانشگاه تبریز، تلفن ۰۴۱۱۳۳۶۲۲۸۰، E-Mail: info@eastp.ir
۱- استادیار هماتولوژی انکولوژی بیمارستان کودکان، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
۲- کارشناس ارشد سلولی و مولکولی، گروه زیست شناسی دانشکده علوم دانشگاه تربیت معلم آذربایجان
۳- کارشناس ارشد ژنتیک، گروه زیست شناسی دانشکده علوم طبیعی - دانشگاه تبریز
۴- کارشناس ارشد فیزیک پزشکی، گروه زیست شناسی دانشکده علوم طبیعی دانشگاه تبریز
تاریخ دریافت: ۱۳۸۵/۴/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۵/۱۲/۱۰

عمل فوق را تا شفاف شدن محلول رویی تکرار می کنیم . بر روی سلولهای ته نشین شده ۴ ml لیز بافر افزوده و به خوبی تکان می دهیم. سپس بر روی محلول به دست آمده ۲۵۰ μl SDS (۱۰٪) و ۱/۷ ml (۲۰۰ μg/ml) پروتئیناز K اضافه کرده و به مدت ۳ الی ۲۴ ساعت در دمای ۴۷ درجه انکوبه می کنیم. سپس ۱/۷ ml نمک طعام اشباع شده ریخته و با ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت نیم ساعت سانتریفوژ می کنیم. محلول رویی را به لوله تمیز منتقل کرده، ۴ ml ایزوپروپانول اضافه می کنیم تا DNA منعقد شود. DNA منعقد شده را با روش Hook outing از داخل محلول استخراج و با اتانول ۷۰٪ شسته و به آن آب مقطر می افزاییم^(۸).

انجام PCR: ۵ μl DNA استخراج شده را به داخل مسترمیکس که حاوی ۲/۵ μl 10x-PCR Buffer (تهیه شده از شرکت سیناژن-تهران)، ۰/۵ μl MgCl₂ (50 mM)، ۰/۷۵ μl Taq ۲/۵U پلیمرز (ساخت شرکت سیناژن-تهران)، ۰/۲۵ μM پرایمر Common ، ۰/۲۵ μM پرایمر Internal Control A (Cont.A) و ۰/۲۵ μM پرایمر Internal Control B (Cont. B) افزوده و سپس با استفاده از آب دیونیزه حجم نهایی محلول را به ۲۵ μl می رسانیم و جهت به دست آوردن محلول همگن به مدت کوتاه سانتریفوژ می کنیم. سپس با استفاده از ترمال سایکلر (ساخت شرکت Geneus مدل Techne)، برنامه ذیل، دنا تورا سون C ۹۴° یک دقیقه، اتصال C ۶۵° یک دقیقه و توسعه (Extension) C ۷۲° به مدت ۱/۵ دقیقه را مورد استفاده قرار می دهیم. تعداد سیکل ها ۲۵ سیکل بوده و در سیکل اول مرحله دنا تورا سون به مدت ۳ دقیقه و مرحله توسعه سیکل آخر ۵ دقیقه عمل می کنیم^(۹،۱۰).

ARMS-PCR: در این روش برای جهش های شایع و نادر گزارش شده، دو نوع پرایمر، نرمال و جهش یافته طراحی شده است (جدول ۱) و برای هر نمونه ی DNA، این دو پرایمر به طور جداگانه و با یک پرایمر Common، PCR انجام می شود. اگر نمونه فقط به پرایمر نرمال جواب داد، فرد مورد آزمایش در این نقطه نرمال است و اگر فقط به پرایمر موتانت پاسخ داد نوع جهش مشخص می شود. اگر واکنش PCR با هر دو پرایمر کار کرد فرد هتروزایگوت می باشد^(۹،۱۰).

بتا تالاسمی بررسی می شود و نتایج نشان دهنده طیف وسیعی از جهش ها می باشد، جهش های ژن بتاگلوبین در بین اقوام مختلفی که در ایران زندگی می کنند از نظر نوع و فراوانی متفاوت است^(۳،۴،۵). بنابراین لازم است که در هر یک از اقوام، بررسی جهش ها به طور مجزا و با دقت و تمرکز بیشتر انجام گیرد. منطقه شمال غرب کشور از نظر تاریخی قدمت زیادی داشته و به خاطر قرار گرفتن در مسیر جاده ی ابریشم محل تلاقی تمدن های آسیایی و اروپایی بوده است. به همین دلایل و همچنین لشکرکشی های زیادی که در طول تاریخ به ایران و به این منطقه شده است، انتظار طیف وسیعی از جهش ها در این منطقه طبیعی خواهد بود. در منطقه ی آذربایجان نیز مانند سایر مناطق کشور پس از گزارش جهش های شایع بتا تالاسمی با روش ARMS-PCR^(۶)، بررسی جهش های نادر و ناشناخته برای تشخیص قبل از تولد و پیشگیری از تولد فرزندان مبتلا، بسیار ضروری به نظر می رسيد. دانستن نوع جهش هر خانواده حتی با درصد کم، موجب می شود در برنامه پیشگیری از تولد در مورد جهش های نادر نیز موفق عمل کنیم.

روش بررسی

این پژوهش که در آزمایشگاه رادیوبیولوژی دانشکده علوم طبیعی دانشگاه تبریز انجام شده است، از ۲۰ بیمار مبتلا به بتا تالاسمی جمعیت آذری زبان شمال غرب کشور که جهش آنها قبلاً در بررسی جهش های شایع شمال غرب کشور شناسایی نشده بود^(۶) نمونه خون محیطی تهیه و DNA نمونه ها به روش پروتئیناز K استخراج گردید. سپس جهش های Codon16(-C)، Codon36/37(-T)، Codon22(-AAGTTGG)، Codon6(-A)، Codon41/42(-TCTT)، Codon88(-C-A) که در موارد محدودی در ایران گزارش شده اند^(۷)، با روش ARMS-PCR مورد بررسی قرار گرفت. سپس مواردی که جهش های فوق را نشان ندادند جهت تعیین توالی ارسال گردید.

استخراج DNA

روش پروتئیناز K-SDS: ۵ ml خون را به دو قسمت تقسیم کرده و با ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ کرده و پلاسمای خون را دور میریزیم و سپس روی سلولهای ته نشین شده ۵ ml آب سرد اضافه می نمایم و با ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۵ دقیقه سانتریفوژ می کنیم و محلول رویی را دور ریخته و

جدول (۱): نوع و توالی پرایمرهای مورد استفاده در تشخیص جهش های نادر بتاتالاسمی در منطقه شمال غرب ایران.

توالی پرایمر 3'→5'	جهش
GTGGGGCAAGGTGAACGTGGATGAAGTGAG	Codon 22 (Reverse)
GTGGGGCAAGGTGAACGTGGATGTGGTTGG	Normal (Reverse)
ACCTCACCTGTGGAGCCAC	Common C (Forward)
TCACTTAGACCTCACCTGTGGAGCCTCAT	-88M (Forward)
TCACTTAGACCTCACCTGTGGAGCCTCAC	Normal (Forward)
GGGCCTATGATAGGGTAAT	Common E (Reverse)
GAGTGGACAGATCCCCAAAGGACTCAACCT	Codon 41-42 (Reverse)
GAGTGGACAGATCCCCAAAGGACTCAAAGA	Normal (Reverse)
ACCTCACCTGTGGAGCCAC	Common C (Forward)
TCACCACCAACTTCATCCACGTTACGTTT	Codon 16 (Reverse)
TCACCACCAACTTCATCCACGTTACGTTG	Normal (Reverse)
ACCTCACCTGTGGAGCCAC	Common C (Forward)
GGTAAGGACTCAAAGAACCTATGGGTCCAG	Codon 36-37 (Forward)
GGTAAGGACTCAAAGAACCTATGGGTCCAA	Normal (Forward)
GGGCCTATGATAGGGTAAT	Common E (Reverse)
CCCACAGGGCAGTAACGGCAGACTTCTGCC	Codon 6 (Reverse)
CCCACAGGGCAGTAACGGCAGACTTCTGCT	Normal (Reverse)
ACCTCACCTGTGGAGCCAC	Common C (Forward)

تعیین توالی :

کروموزوم، جهش IVSII-848(C-A) با ۴ کروموزوم، جهش - 28(A-C) با دو کروموزوم، جهش Codon 25/26(+T) با دو کروموزوم و جهش IVSII-745(C-G) با دو کروموزوم جزء جهش های ژن بتاگلوبین در منطقه می باشند. بنابراین در این بررسی هفت جهش دیگر شناسایی و به جمع جهش های شناخته شده ی منطقه و کشور اضافه گردید. در ۱۴ کروموزوم جهشی در ناحیه تعیین توالی شده مشاهده نگردید که جهش این افراد ممکن است در نواحی خارج از ژن بتاگلوبین باشد که موجب بتاتالاسمی می گردند. همچنین چهار جایگاه SNP: 5'UTR+20(C-T)، Codon 2(CAC-CAT)، IVSII-16 (C- G) و IVSII- 666 (T-C) در ژن بتاگلوبین بیماران مورد مطالعه مشخص گردید. شکل (۱) جهش Codon 15(TGG-TGA) را که با تعیین توالی مشخص شده است را نشان می دهد. درصد هر یک از جهش های نادر شناخته شده در این بررسی که از مجموع ۲۰۰ کروموزومی که مورد بررسی هم جهش های شایع و هم نادر قرار گرفته اند در جدول (۲) آورده شده است.

نمونه هایی که جهش آنها به وسیله سیستم ARMS-PCR مشخص نشدند با پرایمرهای طراحی شده (تهیه شده از شرکت فزاپژوه تهران) ، PCR شد و محصول PCR توسط شرکت فزاپژوه تهران برای تعیین توالی ارسال گردید. نتایج تعیین توالی برای نوکلئوتید و ترجمه به پروتئین با NCBI مقایسه (BLAST) شد.

نتایج

از ۴۰ کروموزوم مربوط به ۲۰ نفر، تعداد ۴ کروموزوم با پرایمر Codon36/37(-T)، ۴ کروموزوم با پرایمر Codon16(-C) جواب مثبت دادند. با پرایمرهای Codon22(-AAGTTGG) ، Codon6(-A)، -88(C-A)، Codon41/42(-TCTT) ، افراد مورد بررسی شناسایی نشد. در مرحله ی بعد ۳۲ کروموزوم باقیمانده مربوط به ۱۶ نفر که با روش ARMS ، جهشی در آنها شناسایی نشد برای تعیین توالی فرستاده شدند. نتایج حاصل از تعیین توالی نشان داد که جهش Codon 15(TGG-TGA) با ۸

جایگاه SNP: 5'UTR+20(C-T), Codon2(CAC-CAT), Codon15(TGG-TGA) ، که اولین بار در منطقه شمال غرب کشور مشاهده شده است، یکی از جهش های شایع در پرتغال می باشد^(۱۲) که موجب می شود کدون TGG که مربوط به اسید آمینه تریپتوفان است به کدون TGA که کدون پایان است تبدیل و پروتئین ناقص تولید شود. جهش Codon15(TGG-TAG) متفاوت از جهش Codon15(TGG-TAG) شایع در کشورهای آسیایی می باشد^(۱۳). بنابراین جهش در Codon15 در منطقه شمال غرب کشور مشابه جهش شایع در پرتغال می باشد.

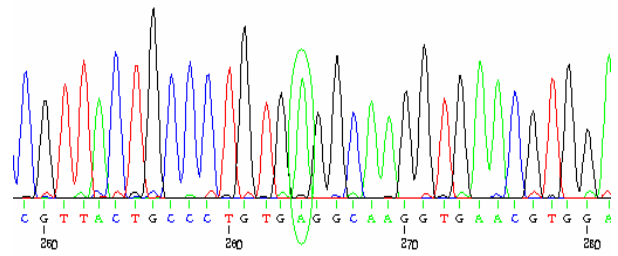
جهش Codon16(-C) یک جهش β هندی- آسیایی می باشد^(۱۳) و جهش Codon36/37(-T) اولین بار در جمعیت کردها پیدا شده است^(۱۳،۱۴). جهش Codon 36/37(-T) که در یک جمعیت محدود و انتخابی در کشور توسط امیری زاده و همکاران^(۷) گزارش شده است، یک مورد نیز در این بررسی مشاهده می شود در حالیکه کیانی و همکاران این جهش را با ۳۳/۸۴ درصد شایع ترین جهش در استان لرستان گزارش می کنند^(۱۵). در استان چهارمحال بختیاری نیز این جهش به عنوان شایع ترین جهش گزارش می شود^(۱۶).

جهش IVSII-848(C-A) که در آمریکا و مصر و ایران گزارش شده است^(۳،۱۳) و ما نیز این جهش را در دو نمونه، گزارش می کنیم که در یک نمونه SNP خاصی مشاهده نشد ولی در نمونه دیگر این جهش را همراه با SNP های Codon2 (C-T), IVSII-16 (C-G), IVSII-666(T-C) گزارش می کنیم. که می تواند نشان دهنده دو منشأ متفاوت این جهش در منطقه باشد.

جهش IVSII-745(C-G) که منشأ مدیترانه ای دارد^(۱۳) کمابیش در مناطق مختلف کشور گزارش شده است^(۵). در این بررسی جهش IVSII-745(C-G) با SNP های زیر همراه بود:

IVSII-16 (C-G), Codon 2 (C-T), +20 UTR (C-T), IVSII-666(T-C)

همراهی جهش IVSII-745(C-G) با +20 UTR (C-T) در منطقه مدیترانه^(۱۷) و هرمزگان نیز گزارش شده است^(۵) که



شکل (۱): توالی قطعه ای از ژن بتاگلوبین با جهش Codon 15(TGG-TGA)

جدول (۲): فراوانی جهش های نادر مبتلایان بتا تالاسمی منطقه شمال غرب ایران

جهش	تعداد کروموزوم	درصد
Codon15(TGG-TGA) Codon16(-C)	۸	۴
Codon 36/37(-T)	۴	۲
IVSII-848(C-A)	۴	۲
IVSII-745(C-G)	۴	۲
-28(A-C)	۲	۱
Codon25/26(+T)	۲	۱
	۲	۱

بحث

بتا تالاسمی شایع ترین بیماری ژنتیکی در ایران می باشد که در شمال و شمال غرب کشور نیز گسترش فراوانی دارد^(۳). اکثر جهش های شایع کشور شناسایی و گزارش شده است. اما وجود جهش های نادر و ناشناخته در بیماران بتا تالاسمی مشکلات زیادی را در برنامه ریزی جهت پیشگیری و کنترل این بیماری ایجاد می کند. به همین خاطر تحقیقات وسیعی برای شناسایی این جهش ها انجام شده یا در حال انجام است. در دهمین کنفرانس بین المللی تالاسمی و هموگلوبینوپاتی جهش های نادر متعددی توسط محققان کشور گزارش گردید که در شاخص ترین گزارش ارایه شده ۲۱ جهش نادر متمایز در جمعیت ایران دیده می شود^(۱۱).

در این مطالعه جهش های Codon15(TGG-TGA)، Codon16(-C)، Codon 36/37(-T)، TGA، Codon25/26(+T)، -28(A-C)، IVSII-848(C-A) و IVSII-745(C-G) توسط روش های ARMS-PCR و تعیین توالی مشخص و به جمع جهش های شناخته شده ی منطقه و کشور اضافه گردید. همچنین چهار

تیمین بین کدون ۲۵ و ۲۶ موجب می شود تا کدون ۲۶ به کدون پایان تبدیل شود در نتیجه بتاگلوبین ناقصی تولید شده و β^0 تالاسمی ایجاد گردد^(۱۳).

نتیجه گیری

با احتساب جهش های شایع گزارش شده در منطقه^(۶)، طیف نسبتا وسیعی از جهش ها را شاهد هستیم که می تواند نشانگر تنوع قومی و تلاقی جمعیت ها در منطقه و ایران باشد. به دلیل شیوع بالا و تنوع بسیار زیاد جهش های بتاتالاسمی در ایران، بررسی جهش های این بیماری از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است. این قبیل مطالعات می تواند در مشاوره ژنتیکی و تشخیص پیش از تولد بسیار مفید واقع شود..

می تواند از نظر ردیابی منشا این جهش در منطقه، مهم و ارزشمند باشد. Codon 2(C-T) با آنزیم HgiA1 و IVSII-16 با آنزیم RFLP، AvaII دارند^(۱۸) که می توان در آنالیز پیوستگی و تشخیص پیش از تولد مورد استفاده قرار گیرند.

جهش 28(A-C)- که برای اولین بار در جمعیت کردها مشاهده شده است^(۱۹) بر روی پروموتور ژن بتاگلوبین قرار دارد. این جهش موجب کاهش اتصال عوامل رونویسی ژن بتاگلوبین به این ناحیه می شود و در نهایت میزان بیان ژن بتاگلوبین کاهش یافته و β^+ تالاسمی ایجاد می کند^(۱۳).

Codon25/26(+T) جهش بسیار نادری است که برای اولین بار در یک خانواده تونسسی گزارش شده است^(۲۰). اضافه شدن باز

References

- 1- Weatherall DJ, Clegg JB, Higgs DR . *The hemoglobinopathies*. In: Ch.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly et al. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease 8 th ed* Mc Graw-Hill, New York 2001: 4571-4636.
- 2- Kazazian HH, Boehm CD. *Molecular basis and prenatal diagnosis of β -thalassemia*. Blood 1988; 72: 1107-1116.
- 3- Merat A, Haghshenas M, Mostafavi Pour Z, Plonczynski MW, Harrell AN, Coleman MB, Steinberg MH. *β - thalassaemia in southwestern Iran*. Hemoglobin 1993; 17:427-437.
- 4- Najmabadi H, Karimi-Nejad R, Sahebjam S, Pourfarzad F, Teimourian S, Sahebjam F, Amirzadeh N, Karimi-Nejad MH. *The β - thalassaemia mutation spectrum in the Iranian population*. Hemoglobin 2005; 25: 285 - 296.
- 5- Yavarian M, Harteveld CL, Batelaan D, Bernini LF, Giordano PC. *Molecular spectrum of beta-thalassaemia in the Iranian Province of Hormozgan*. Hemoglobin. 2001; 25:35-34
- ۶- حسینیورفیضی محمدعلی، حسینیورفیضی عباسعلی، آذرفام پروین، پولادی ناصر، موتاسیونهای شایع بتاتالاسمی منطقه شمال غرب ایران. مجله علمی و پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد، سال ۱۲، شماره چهارم، زمستان ۱۳۸۳.
- ۷- امیری زاده، ناصر- نجم آبادی، حسن - پورفتح الله، علی اکبر - شفقتهی، یوسف و همکاران. بررسی شش جهش نادر ژن بتا گلوبین در بیماران و ناقلین بتا تالاسمی ایران. نخستین همایش بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران- تهران، ۳-۵ اسفند ۱۳۷۸.
- 8- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. *A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cell*. Nucleic Acids Res 1988; 16: 1215-1216.
- 9- Mahboudi. F, Zeinali.S et al . *The Molecular*

- basis of β - thalassaemia mutations in Fars province, Iran* . Iranian Journal of Medical Science 1998; 21: 99-104.
- ۱۰- عمرانی ، میر داود. جهش های شایع در بیماران مبتلا به بتا تالاسمی در سطح استان اذربایجان غربی با روش ARMS/PCR. مجله علوم پزشکی ارومیه ، سال چهاردهم ، شماره دوم ، ص:۱۲۶-۱۱۷، تابستان ۱۳۸۲.
- 11- Azimifar B . *Rare beta-globin gene mutations detected in 1256 prenatal diagnosis cases in Iran*. 10th international conference on Thalassemia & Hemoglobinopathies; Dubai 7-10 January.
- 12- Tamagnini GP, Goncalves P, Ribeiro ML, Kaeda J, Kutlar F, Baysal E, Huisman TH. *Beta-thalassaemia mutations in the Portuguese; high frequencies of two alleles in restricted populations*. Hemoglobin 1993;17: 31-40.
- 13- Globin Gene Server. Pennsylvania State University. <http://www.globin.cse.psu.edu/>
- 14- Rund D, Cohen T, Filon D, Dowling CE, Warren TC, Barak I, Rachmilewitz E, KazazianHH, Oppenheim A. *Evolution of a genetic disease in an ethnic isolate: beta-thalassaemia in the Jews of Kurdistan*. Proc Natl Acad Sci USA. 1991; 88: 310-314.
- 15- Kiani.A.A . *The molecular analysis of β -thalassaemia mutations in lorestan province, Iran*"9th Iranian genetic congress Millad Hospital Halls Center, Tehran - Iran : May 2006: 267.
- 16- Hashemzadeh.M, Kheirollahi.M: *The β -thalassaemia mutation spectrum in the Iranian province of Chaharmahal- Bakhtiari: 9th Iranian genetic congress* Millad Hospital Halls Center, Tehran - Iran : May 2006:303.
- 17- Orkin SH, Kazazian HH, Antonarakis SE, Goff SC, Boehm CD, Sexton JP, Waber PG, Giardina PV. *Linkage of β - thalassaemia mutation and β -globin gene polymorphisms with DNA polymorphisms in human β -globin gene cluster*. Nature 1982; 296:627-631.
- 18- Lee Y, Park S, Kim J, Cho H. *RFLP Haplotypes of β - globin gene complex of β - thalassaemic chromosomes in Koreans*. J. Korean Med. Sci. 2002;17:475-478
- 19- Poncz M, Ballantine M, Solowiejczyk D, Barak I, Schwartz E, Surrey S. *Beta-Thalassaemia in a Kurdish Jew. Single base changes in the T-A-T-A box*. J. Biol. Chem. 1982; 257: 5994-5996.
- 20- S. Fattoum F, Guemira C, Oner R, Oner HW, Kutlar L F., Huisman TH. *Beta-thalassaemia, HB S-beta-thalassaemia and sickle cell anemia among Tunisians*. Hemoglobin 1991; 15: 11-21.