

موتاسیون‌های شایع بتا تالاسمی در منطقه شمالغرب ایران

دکتر محمدعلی حسینیورفیضی^۱، دکتر عباسعلی حسینیورفیضی^۲، دکتر محمد اصغرزاده^۳، دکتر محمد امین بخش^۴، پروین آذرفام^۵، ناصر پولادی^۶

چکیده

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

روش بررسی: در این پژوهش از ۱۴۲ بیمار (۷۶ مذکر و ۶۶ مؤنث) مبتلا به تالاسمی ماژور (که قبلاً بیماری آنها تأیید شده بود) مراجعه کننده به بخش خون بیمارستان کودکان تبریز (۶۴ بیمار، ۵۵ بیمار غیرفامیلی)، شهید قاضی طباطبایی تبریز (۱۵ بیمار، ۱۴ بیمار غیرفامیلی)، مرکز بیماریهای خاص ارومیه و خوی (۱۸ بیمار، ۱۶ بیمار غیرفامیلی) و بیمارستان علی اصغر اردبیل (۴۵ بیمار، ۳۲ بیمار غیرفامیلی)، نمونه خون محیطی تهیه گردید سپس با استفاده از روش Boiling و پروتئیناز SDS-K، DNA لئوسیت‌های خون محیطی نمونه‌ها استخراج شدند و DNA، ۱۷ بیمار 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 ۲۹/۹ درصد، Frameshift Codon44(-C)، IVS-I-1(G-A)، IVS-I-5(G-C)، IVS-II-1(G-A)، IVS-I-110(G-A)، IVS-I-25(-25bp.del)، IVS-1-6(T-C)، Codon5(-CT)، ۶/۳۶ درصد، ۶/۳۶ درصد، ۳/۸ درصد، ۲/۵ درصد و ۰/۶۳ درصد به دست آمد و برای پرایمرهای Codon30(G-C)، Codon39(C-T) موردی مشاهده نگردید.

نتیجه گیری: در این بررسی بیشترین فراوانی جهش‌ها مربوط به موتاسیون Frameshift8/9(+G) (با فراوانی ۲۹/۹ 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 گلوبولهای قرمز است که در اثر موتاسیون در ژن گلوبین ایجاد می گردد^(۱).

تالاسمی از کاهش سنتز و یا عدم سنتز کامل یکی از دو زنجیره آلفا و یا بتا ناشی می شود. بتا تالاسمی نوعی کم خونی ارثی است که به صورت صفت اتوزومی مغلوب از والدین به فرزندان منتقل می شود^(۲).

تحقیقات نشان داده اند که ژنهای مربوط به زنجیره گلوبین آلفا و غیر آلفا از یکدیگر جدا هستند. به طوری که زنجیره آلفا دارای دو ژن در هر ژنوم هاپلوئید (جمعاً ۴ ژن) بر روی کروموزوم شماره ۱۶

- ۱- استاد رادیوبیولوژی، دانشکده علوم طبیعی
 - ۲- استادیار هماتولوژی، بیمارستان کودکان
 - ۳- استادیار گروه بیوشیمی و علوم آزمایشگاهی، دانشکده پزشکی
 - ۴- دانشیار ژنتیک، دانشکده علوم طبیعی
 - ۵- مربی فیزیک پزشکی، دانشکده علوم طبیعی
 - ۶- مربی زیست شناسی سلولی مولکولی
- ۴، ۵، ۶- دانشگاه تبریز
۳ و ۲- دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز

روش بررسی

در پژوهش به عمل آمده از ۱۴۲ بیمار مبتلا به بتا تالاسمی (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 (۶۴ بیمار)، بیمارستان شهید قاضی تبریز (۱۵ بیمار)، مرکز بیماریهای خاص ارومیه و خوی (۱۸ بیمار) و بیمارستان علی اصغر اردبیل (۴۵ 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 (۱۷ بیمار)، ۰/۵ میلی لیتر خون کامل برداشته و DNA نمونه‌ها به روش Boiling^(۱۱) استخراج گردید و در صورت کافی نبودن میزان DNA به دست آمده از روش پروتئیناز SDS-K^(۱۱) جهت استخراج DNA استفاده شد. DNA های استخراج شده در دمای ۲۴°C 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 ۲۵۰ ml بافر لیز: ۱/۲۵ ml MgCl₂ (۱ M)، ۲۵۰ μl ساکاروز (۳۲۰ mM)، ۲۵ ml Tris-Cl (pH=8) (۰/۱ M)، ۲/۵ ml Triton X100 و ۲۲۱ ml آب دیونیزه اضافه کرده و محلول به دست آمده را در دمای ۳۷°C 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 ۱ ml بافر لیز به میکروتیوب ۱/۵ ml ریخته و به مدت چند ثانیه تا به دست آمدن محلول یکنواخت، ورتکس می‌کنیم. سپس محلول به دست آمده توسط میکروفیوژ (Biofuge Pico ساخت شرکت Kendro آلمان) با دور ۶۰۰۰ دور در دقیقه ساترفیوژ 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 میکروتیوبها را در داخل

و ژنهای مربوط به زنجیره های بتا، گاما و دلتا به تعداد پنج ژن بر روی کروموزوم شماره ۱۱ قرار دارند 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) کاملاً شناخته نشده اند^(۳).

تاکنون بیش از ۲۰۰ جهش در این ژن در سرتاسر جهان گزارش شده است^(۴) که اکثر این جهشها نقطه‌ای بوده و نه تنها نواحی کد کننده اسید آمینه در زنجیره بتا، بلکه نواحی فاقد رمز و حتی داخل اینترون غیر کد کننده را نیز تحت تاثیر قرار می‌دهند^(۵). برخی جهشها در ژن بتا (به طول تقریبی ۲۰۰۰ جفت باز واقع در بازوی کوتاه کروموزوم ۱۱) از قبیل حذف (Deletion) چندین نوکلئوتید در آگزونها، یا جهش‌هایی از نوع Frameshift، جهش‌های تغییر دهنده توالی‌های اتصال (Splice) یا مولد نقاط اتصال جدید، جهش‌های مولد کدون اختتام در درون آگزونها 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 بتا گلوبین می‌شود. آگاهی به انواع موتاسیونهای شایع در هر جمعیتی اطلاعات تشخیص را سرعت، دقت و اطمینان بیشتر و با هزینه کمتر امکان پذیر می‌سازد^(۶).

هر سال بیش از ۴ 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 ۴٪ 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 هر جمعیتی فقط تعداد محدودی از جهش‌ها عامل ایجاد کننده بیماری می‌باشند^(۹) از این رو در این پژوهش موتاسیونهای شایع منطقه شمالغرب ایران با استفاده از روش ARMS-PCR مورد بررسی قرار گرفته است.

۹۴° C یک دقیقه، اتصال ۶۵° C یک دقیقه و توسعه ۷۲° C (Extension) به مدت ۱/۵ دقیقه سیکل قرار می‌دهیم. تعداد سیکل‌ها ۲۵ سیکل بوده و در سیکل اول مرحله دناتوراسیون به مدت ۳ دقیقه و مرحله توسعه سیکل آخر ۵ دقیقه عمل می‌کنیم^(۱۲).

جدول ۱: نوع و نوالی پرایمرهای مورد استفاده در تشخیص موتاسیونهای شایع بتانالاسمی در منطقه 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 الکتروفورز 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 ۴ml 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 ۱۴۲ بیمار (۷۶ مذکر و ۶۶ مؤنث) 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

آب جوش به مدت ۲۰ دقیقه می‌جوشانیم سپس ۲۰ µl محلول Tris -HCl (pH=8) (۲۰ میلی مول در لیتر) اضافه کرده و محلول را با دور ۶۰۰۰ 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 را به دو قسمت تقسیم کرده و در دور ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ کرده و پلاسماهای خون را دور می‌ریزیم و سپس روی سلولهای ته نشین شده ۵ml آب سرد اضافه می‌نمایم و در دور ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۵ دقیقه سانتریفوژ می‌کنیم و محلول رویی را دور ریخته و عمل فوق را تا شفاف شدن محلول رویی تکرار می‌کنیم. بر روی سلولهای ته نشین شده ۴/۵ ml لیز بافر افزوده و به خوبی تکان می‌دهیم. سپس بر روی محلول به دست آمده ۲۵۰ µl SDS (۱۰٪) و ۱ ml (۲۰۰ µg/ml) پروتئیناز K اضافه کرده و به مدت ۳ الی ۲۴ ساعت در دمای ۵۷ درجه انکوبه می‌کنیم. سپس ۱/۷ml نمک طعام اشباع شده ریخته و در دور ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت نیم ساعت سانتریفوژ می‌کنیم. محلول رویی را به لوله تمیز منتقل کرده، ۴/۵ml ایزوپروپانول اضافه می‌کنیم 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 می‌افزاییم^(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 Taq (10mM)، ۲/۵ U پلیمرز (ساخت شرکت سیناژن-تهران)، ۰/۲۵ M پرایمر، ۰/۲۵ µM، Common پرایمرنرمال یا موتانت اضافه، ۰/۲۵ µM پرایمر (Cont. A) Internal Control 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 می‌رسانیم و جهت به دست آوردن محلول همگن به مدت کوتاه سانتریفوژ می‌کنیم. سپس با استفاده از ترمال سایکلر (ساخت شرکت Geneus مدل Techne)، طبق برنامه ذیل، دناتوراسیون

بحث

بیماری تالاسمی ضایعات روحی فراوان داشته و چون هزینه‌های بسیار بالایی برخانواده و اجتماع وارد می‌کند، 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 ۱۳۷۶، در طی ۳/۵ سال مطالعه، جمعا ۶۷۶ 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 ۲۱۰۱۶۶۵۰۰ ریال، هزینه ۲۰ سال درمان این کودکان ۷۷۷۶۰۶۶۰۰ ریال و هزینه صرفه جویی شده ۶۹۵۵۸۹۹۵۰۰ ریال می‌باشد. به بیانی دیگر سرمایه گذاری در بخش پیشگیری از این بیماری ۳۴ 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 گردید که در ۵۳/۴۸ درصد از بیماران جهش هموزیگوت و در ۴۶/۵۲ درصد جهش از نوع هتروزیگوت ترکیبی (هتروآلل) بودند. از افراد هتروزیگوت تعداد ۲۰ نفر فقط یک الل شناسایی گردید.

نتایج بدست آمده از پرونده‌های تکمیل شده برای مبتلایان نشان داد که از تعداد ۱۴۲ مبتلای تحت مطالعه ۲۵ مورد فامیل درجه یک (خواهر و یا برادر هم بودند) داشتند و والدین ۹۷ مبتلا (۶۸/۳٪) ازدواج فامیلی داشته و ۱۸/۱۲٪ مبتلایان دارای فامیل درجه ۲ و یا درجه ۳ مبتلا هستند که در مورد اکثر ازدواجهای فامیلی موتاسیون از نوع هموزیگوت بوده و شدت بیماری نسبت به بیمارانی که هتروزیگوت ترکیبی (هترو آلل) بودند بیشتر بود.

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

همچنین نتایج به دست 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 ۶۸/۳٪ 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 ۱۵۷ کروموزوم مورد شناسایی قرار گرفت که بیشترین میزان موتاسیون مربوط به موتاسیون Frameshift 8/9(+G) با ۲۹/۹ درصد به دست آمد. از میان ۱۵۷ کروموزوم شناسایی شده، در ۵۶ بیمار (۱۱۲ کروموزوم) 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 ۴۵ کروموزوم) شناسایی گردید.

جدول ۲: نمونه‌های خونی تهیه شده از افراد مناطق مختلف در شمالغرب ایران

نمونه‌های غیر فامیلی	تعداد کل نمونه	نام مرکز
۵۵	۶۴	بیمارستان کودکان تبریز
۱۴	۱۵	بیمارستان شهید قاضی طباطبایی تبریز
۱۶	۱۸	مرکز حمایت از بیماریهای خاص ارومیه
۳۲	۴۵	بیمارستان علی اصغر اردبیل
۱۱۷	۱۴۲	جمع

جدول ۴: تعداد و درصد موتاسیونهای شایع مبتلایان بتا تالاسمی منطقه شمالغرب ایران

نام موتاسیون	تعداد هموزیگوت هتروزیگوت	تعداد کروموزوم	درصد
Frameshift 8/9(+G)	۱۸	۴۷	۲۹/۹
IVS-I-110(G-A)	۱۳	۴۰	۲۵/۴۷
IVS-II-I(G-A)	۱۱	۲۸	۱۷/۸۳
IVS-I-5(G-C)	۴	۱۱	۷/۰۰
IVS-I-I(G-A)	۳	۱۰	۶/۳۶
Frameshift Codon 44(-C)	۴	۱۰	۶/۳۶
Codon5(-CT)	۲	۷	۳/۸
IVS-I-6(T-C)	۱	۴	۲/۵
IVS-I-25(-25 bp del)	-	۱	۰/۶۳
جمع	۱۱۲	۱۵۷	۱۰۰

موتاسیون IVS-I-5(G-C) (بافراوانی ۳۷ درصد) گزارش شده است. فراوانی جهش IVS-I-5(G-C) در بررسی حاضر ۷٪ و گزارش مربوط به مبتلایان ترکیه^(۱۵) ۱/۱ درصد گزارش 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 ایرامی بخاطر همکاری در تهیه نمونه از بیمارستانهای تبریز و اردبیل و جناب آقای حسن اشتری مدیر عامل سازمان حمایت از بیمارهای خاص ارومیه و کارکنان بیمارستانهای کودکان، شهید قاضی طباطبایی تبریز، سازمان حمایت از بیمارهای 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 می‌نمایم.

همچنین مقایسه جدول گروه خونی بیماران و درصد گروههای خونی در استان آذربایجان شرقی نشان داد که 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 در اصفهان ۱۹ درصد، کرمان ۱۵/۹ درصد، خوزستان ۱۷/۳ درصد، در تهران ۱۰/۶ درصد و در بوشهر ۸/۱۷ درصد و جنوب آسیا و خاورمیانه ۱۸ درصد، گزارش شده است. فراوانی موتاسیون IVS I-110(G-A) در این بررسی ۲۵/۴۷ درصد به دست آمد که در لبنان ۴۰ درصد، در سیسیل ۲۴/۱۱ درصد، الجزایر ۲۵/۴ درصد، خوزستان ۱۶/۸ درصد، تهران ۷/۸ درصد، سیستان و بلوچستان ۱۱/۱۱ درصد، خراسان ۸/۷۷ درصد، اصفهان ۸ درصد، بوشهر ۵/۷۷ درصد و آذربایجان غربی ۵/۳ درصد گزارش شده است^(۳،۱۶). در حالی که بیشترین فراوانی جهش‌ها در منطقه فارس ایران^(۱۲) و پاکستان^(۱۴) مربوط به

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.
3. عمرانی میر داود. جهش های شایع در بیماران مبتلا به بتاتالاسمی در سطح استان آذربایجان غربی با روش ARMS/PCR. مجله علوم پزشکی ارومیه، تابستان ۱۳۸۲، سال چهاردهم، شماره دوم، ص: ۱۲۶-۱۱۷.
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.

ع. دلمقانی و همکاران، تعیین موتاسیونهای بتاگلوبین در بیماران تالاسمی و تشخیص قبل از تولد بر اساس تکنیک ARMS و RFLP، کنگره بازآموزی خون بیمارهای مرتبط، سازمان انتقال خون، ۵ الی ۷ مهرماه ۱۳۷۳.

۷. معاونت امور بهداشتی، اداره کل پیشگیری و مراقبت بیمارهای، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، "طرح پیشگیری از بروز موارد جدید و شناسایی ناقلین تالاسمی" دی ماه ۱۳۷۴.

۸. پور نقشبند زهرا، قانعی مصطفی و همکاران "بررسی موتاسیونهای شایع بتا تالاسمی در استان اصفهان" نخستین همایش بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران- تهران، ۳-۵ 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: Weatherall DJ, ed. Method in haematology*, 1982; vol 6. The thalassaemias. Edinburgh: churchill Livingstone: 74-102..
۱۰. پولادی ناصر. بررسی جهش در *اگزونهای پنج و هشت ژن P53* در مبتلایان سرطان پستان با روش *PCR-SSCP* پایان نامه کارشناسی ارشد رشته علوم سلولی و مولکولی دانشگاه 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 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 نظر، توزیع نسبی کانسرها بین گروههای خونی بیماران ارجاعی به مرکز انکولوژی شهید قاضی طباطبایی تبریز، پایان‌نامه، دانشکده داروسازی دانشگاه تبریز سال ۷۶-۱۳۷۵.