جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مجله دانشگاه علوم پزشکی قم
دوره دوم ـ شماره چهارم ـ زمستان۸۷

مزیت تکنیک MLPA برای تشخیص سریع حذف‌های ژنی بتا– گلوبین نسبت به روش‌های تشخیصی قدیمی (REAL-TIME, RFLP, Gap-PCR)

راحله علی‌محمدی*، مرضیه رئیسی**، احمد ابراهیمی***، صادق فلاح***، سوده کیانفر****، محبوبه مسعودی‌فر*****، سمیه جمالی******، صادق باباشاه*******، مرتضی کریمی‌پور********، رضا مهدیان*********، سیروس زینلی**********

*دانشجوی دکترای ژنتیک ملکولی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران.
**کارشناس ارشد ژنتیک، مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی کوثر، تهران، ایران.
***دانشجوی دکترای ژنتیک ملکولی، مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی کوثر، تهران، ایران.
****کارشناس شیمی، مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی کوثر، تهران، ایران.
*****دکترای دامپزشکی، مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی کوثر، تهران، ایران.
******دانشجوی کارشناس ارشد زیست شناسی دریا، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.
*******دانشجوی کارشناسی ارشد زیست سلولی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران.
********استادیار فرآورده‌های بیولوژیک، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.
*********دانشیار ژنتیک پزشکی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.

چکیده

زمینه و هدف

تالاسمی یکی از شایع‌ترین بیماری‌های تک ژنی است که در منطقه مدیترانه، خاورمیانه، شبه قاره هند و آسیای جنوب شرقی شیوع زیادی دارد. یکی از موتاسیون‌هایی که سبب بتا– تالاسمی می‌شود حذف در کلاستر ژن بتا– گلوبین می‌باشد. این حذف‌ها معمولاً سنتز یکی یا چند و یا همگی زنجیره‌های β و δ و γ و ε را تحت تأثیر قرار می‌دهد. تاکنون در حدود۶۰ نوع حذف ژنی در ژن بتا– گلوبین گزارش شده است. برای شناسایی حذف‌ها از تکنیک‌های متعددی استفاده می‌شود که بعضی مستقیم و بعضی غیرمستقیم هستند. با توجه به مشکلاتی که در تشخیص تمام حذف‌ها می‌باشد و هم‌چنین عدم وجود اطلاعات کافی از میزان فراوانی آن‌ها در جمعیت‌های ایرانی، اهمیت روشی که بتواند در یک مرحله، کل کلاستر ژن بتا را از نظر وجود حذف ارزیابی کند دو چندان می‌نماید.

روش بررسی

DNA افراد ناقل با روش نمک اشباع به دست آمد. MLPA با استفاده از دستگاه PCR ساخت شرکت ABI انجام شد. محصول MLPA در دستگاه Genetic Analyser ABI 3130 آنالیز گردید و نتیجه به دست آمده با نرم‌افزارGene Marker مورد ارزیابی قرار گرفت. تأیید نتایج MLPA با دستگاه ABI 3700 به روش Real-Time PCR انجام شد.

یافته‌ها

وجود یا عدم وجود حذف بر روی ۱۷ ناقل واجد حذف و یا مشکوک به داشتن حذف در ژن بتا– گلوبین و احتمالاً خوشه ژنی بتا– گلوبین، انجام شد و حذف‌های ژنی هر کدام از آن‌ها با روش MLPA مشخص گردید. بیشتر این ناقلین دارای حذفی در محدوده حذف Sicilian بوده و نیز حذف‌هایAsian-Indian وTurkish و Lepore را داشتند. البته تعدادی حذف هم تشخیص داده شد که به نظر می‌رسد تا به حال گزارشی از آن‌ها داده نشده است.

نتیجه‌گیری

روش MLPA روشی بسیار کارا برای شناسایی حذف‌های خوشه ژنی ژن بتا– گلوبین می‌باشد.

کلید واژه‌ها: بتا– گلوبین؛ بتا– گلوبین– ژنتیک؛ تالاسمی– ژنتیک.

نویسنده مسئول مکاتبات: مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی کوثر، تهران، ایران؛
تلفن:۸۸۹۳۹۱۴-۲۱-۹۸+ آدرس پست الکترونیکی: zeinali@kawsar.ir
تاریخ دریافت: ۸۷/۶/۳ تاریخ پذیرش: ۸۷/۹/۴

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقدمه

تالاسمی شایع‌ترین بیماری تک ژنی در جهان بوده و به عنوان یک گروه هتروژن از اختلالات ارثی در سنتز هموگلوبین که با فقدان و یا کاهش سنتز یک یا چند زنجیره گلوبین همراه هستند، تعریف می‌شود (۱). سندرم‌های تالاسمی در ۶۰ کشور جهان دیده شده که بیشترین فراوانی آن در منطقه مدیترانه، قسمت‌هایی از شمال و شرق آفریقا، شبه قاره هند و آسیای جنوب شرقی است. به مجموع این مناطق در کنار هم کمربند تالاسمی می‌گویند (۲). در بعضی از مناطق، مانند آمریکا، اروپای شمالی، که خارج از محدوده این کمربند بوده و تالاسمی به صورت پراکنده در آن‌جا رویت می‌شود ریشه خانوادگی مبتلایان به تالاسمی به همین منطقه کمربند تالاسمی مربوط می‌شود (۳). حدود ۳٪ از جمعیت جهان (۱۵۰ میلیون نفر) حامل ژن‌های بتا- تالاسمی هستند. تخمین زده می‌شود در حدود ۳۰۰۰۰۰ نوزاد مبتلا به تالاسمی سالانه متولد می‌شود که از این تعداد در حدود۶۰ تا ۷۰ هزار نفر از آن‌ها مبتلایان به تالاسمی بتای ماژور می‌باشند. این افراد بیشتر در منطقه مدیترانه و خاورمیانه ساکن هستند (۵،۴). از این تعداد حدود ۵۰ هزار نفر به علت جدی بودن علایم بیماری و عدم درمان مناسب فوت می‌کنند (۶). ایران نیز از جمله کشورهای قرار گرفته بر روی کمربند تالاسمی در سطح جهان محسوب می‌شود. در حال حاضر حدود ۲۵ هزار بیمار مبتلا به تالاسمی در کشور وجود دارد. تاکنون بیش از ۲۰۰ نوع جهش به عنوان عوامل ایجادکننده بتا- تالاسمی شناسایی شده است (۱). موتاسیون‌هایی که منجر به بتا تالاسمی می‌شوند، شامل موتاسیون‌هایی هستند که سبب کاهش سنتز زنجیره بتا+ (β) و یا فقدان سنتز زنجیره بتا +(β) می‌شوند. در بعضی از موارد موتاسیون‌ها شامل حذف کوچک و بزرگی می‌باشد که در کلاستر ژن بتا- گلوبین است، که سنتز یکی یا چند تا از زنجیره‌های β و δ و γ و ε را تحت تأثیر قرار می‌دهند. با توجه به این‌که تشخیص پیش از تولد اصلی‌ترین راه پیشگیری از بیماری بتا- تالاسمی محسوب می‌گردد شناخت جهش‌های موجود در سطح ایران و تعیین میزان پراکندگی آن‌ها بسیار مهم می‌باشد. در این راه دسترسی به فن‌آوری لازم جهت شناسایی این جهش‌ها در بیماران و یا حاملین و از همه مهم‌تر در جنین‌هایی که پدر و مادر آن‌ها ناقل هستند، می‌تواند کمک شایانی در جهت پیشگیری از تولد نوزادان مبتلا نماید. با مطالعاتی که در دهه گذشته بر روی بیماران بتا- تالاسمی در کشور صورت گرفته است اکثر جهش‌ها در ایران شناسایی شده، اما در اندکی از موارد جهش‌ها به صورت ناشناخته باقی مانده‌اند که مربوط به حذف‌های ژنی می‌باشند. تاکنون در حدود ۶۰ نوع حذف ژنی در خوشه ژنی بتا- گلوبین گزارش شده است که فراوانی آن در جمعیت‌های مختلف با هم فرق دارد (۷). با توجه به مشکل بودن تشخیص تمام حذف‌ها و نداشتن اطلاعات کافی از میزان فراوانی آن‌ها در جمعیت‌های ایرانی، اهمیت روشی که بتواند در یک مرحله، کل خوشه ژن بتا را از نظر وجود حذف ارزیابی کند دو چندان می‌نماید. با استفاده از روش RFLP در سه منطقه ژن بتا و شبه بتا، βAva2 ،Hinf1β ،βψ'3 به طور غیرمستقیم می‌توان به بررسی منطقه حذفی پرداخت. به این معنا که اگر در این سه منطقه گویایی (+/-) وجود داشته باشد به این معنا است، که احتمال حذف در این مناطق خیلی کم می‌باشد. در صورتی‌که در این مناطق گویایی نباشد احتمال حذف بالا می‌رود. در روش دوم با استفاده از تکنیک gap-PCR به بررسی چهار حذف، Turkish, Sicilian, Asian-Indian, Lepore، پرداخته می‌شود (۸). در روش سوم با تکنیک MLPA می‌توان به وجود حذف در هر محلی از خوشه ژنی بتا- گلوبین در محدوده کاوش‌گر (پروب‌های) MLPA پی برد. بررسی منابع نشان می‌دهد که کارایی این روش در تشخیص حذف‌ها بسیار خوب می‌باشد. در روش چهارم با استفاده از تکنیک REAL-TIME می‌توان نتایج به دست آمده از روش MLPA را مورد ارزیابی قرار داد. در این تحقیق تلاش شده که با چهار روش تشخیص حذف، به بررسی حذف‌های خوشه ژنی بتا پرداخته شود.

روش بررسی

در این تحقیق از ۳۶ نمونه اولیه که کاندیدای داشتن حذف ژن بتا- گلوبین بودند به علت اندکس‌های خونی مرتبط به داشتن حذف (HBF بالا و MCV پایین) فقط ۱۷ نمونه خون به دست ما رسید. این نمونه‌ها در طی چندین سال از سراسر ایران به دست آمده و از افراد مراجعه‌کننده به آزمایشگاه ژنتیک پزشکی دکتر زینلی و انستیتو پاستور ایران، به منظور تشخیص پیش از تولد با کسب رضایت، اخذ شده بود. DNA از خون‌های حاوی EDTA استخراج شد. DNA مورد نیاز از گلبول‌های سفید خون محیطی توسط روش نمک اشباع پس از لیز و شستشوی گلبول‌های قرمز استخراج گردید (۹) و در دمای۲۰- درجه سانتی‌گراد در فریزر نگهداری شد. کیت MLPA از شرکت MRC-Holland خریداری، و برای انجام MLPA ۵ میکروگرم DNA استفاده گردید. نمونه‌ها با کیت بعد از اضافه کردن محتویات مربوط به کیت طبق سفارش شرکت سازنده در دستگاه PCR ABI قرار گرفت. واسرشت به مدت ۵ دقیقه، اتصال ۱۵ ساعت، اتصال لیگازی ۱۵ دقیقه انجام گرفت و سپس نمونه‌ها برای انجام CRP استفاده شد. حجم نهایی مواد قرار گرفته در دستگاه PCR ۲۵ میکرولیتر بود.

برنامه PCR برای افزایش کاوش‌گرهای (پروب‌های) اتصال یافته به شرح زیر بود:

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

60 °C	hold	
35 cycles:		
–	95 °C	30 seconds
–	60 °C	30 seconds
–	72 °C	60 seconds
72 °C	20 minutes	
4 °C	hold	

یک میکرولیتر از محصول PCR برداشته و در دستگاه Genetic Analyser قرار گرفت و دستگاه به صورت اتوماتیک نمونه‌ها را الکترفورز موبین کرده و نتایج در صفحه کامپیوتر ظاهر می‌شد. پس از خواندن نمونه‌ها با برنامه Gene Marker اطلاعات به صورت فایل‌های fsa با همین برنامه آنالیز شدند. در ضمن نمونه‌ها برای دقت بیشتر با چشم و هم‌چنین برنامه Coffalyser مورد ارزیابی قرار گرفتند.

با مقایسه پیک‌های فرد مشکوک به داشتن حذف با فرد نرمال، وجود حذف‌ها تشخیص داده شد.

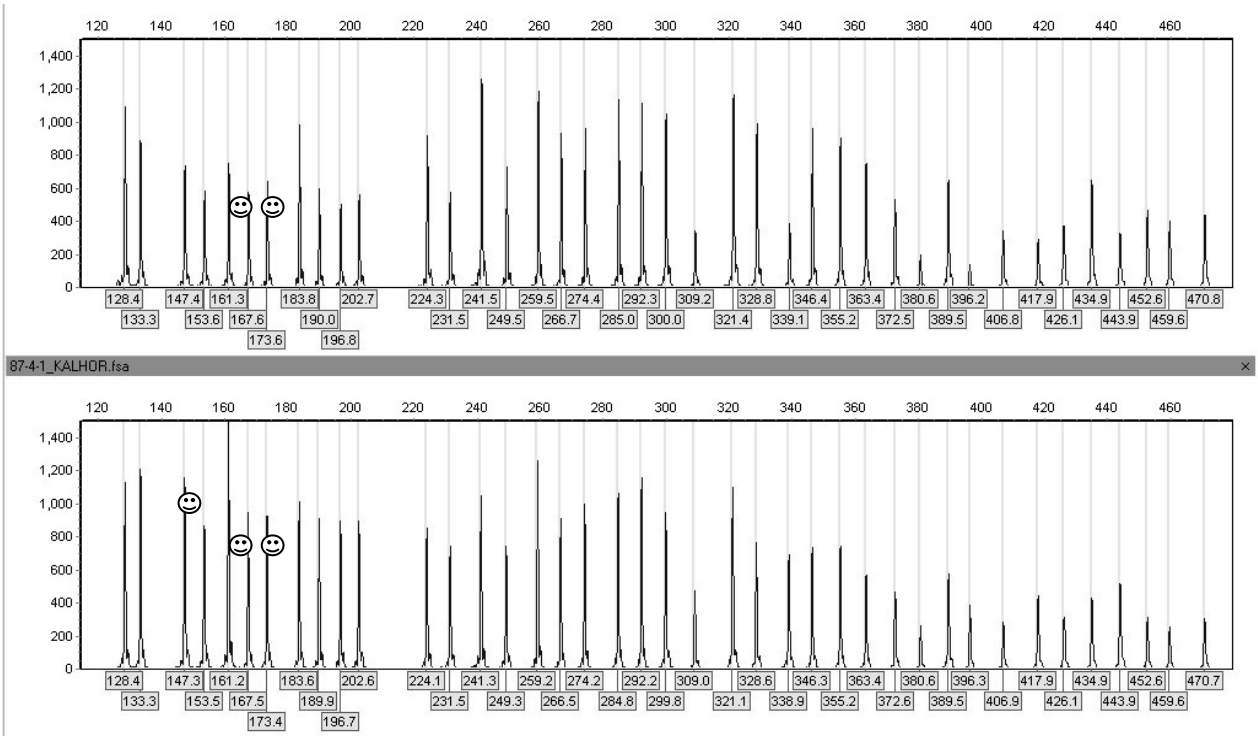
یافته‌ها

از میان تعداد زیادی نمونه افراد ناقل تالاسمی مراجعه‌کننده به آزمایشگاه‌های ژنتیک پزشکی دکتر زینلی و انستیتو پاستور فقط از ۱۷ مورد DNA دریافت شد. کلیه DNAهای افراد مشکوک به داشتن حذف بتا برای قابلیت انجام PCRمورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج خون‌شناسی این افراد قبل از شروع آزمایشات مورد بررسی قرار گرفتند. در مراجعات قبلی این نمونه‌ها, وجود و یا احتمال وجود حذف بررسی شده بود. یکی از این روش‌ها استفاده از RFLP است که در افراد واجد حذف‌های نسبتاً بزرگ انتظار می‌رود که گویایی وجود نداشته باشد (–/– و +/+) (جدول شماره ۱). در پنج نمونه قبلاً با روش Gap-PCR وجود حذف مشخص شده بود (جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱: نتایج مربوط به بررسی تمام حذف‌ها با استفاده از چهار روش، REAL-TIME, MLPA, Gap-PCR RFLP، آورده شده است که در سه ستون اول از راست نتایج گویایی و یا عدم گویایی نمونه‌ها و در چهار ستون بعدی نتایج مربوط به چهار حذف نامبرد با روش Gap-PCR ستون آخر نتایجMLPA, می‌باشد.

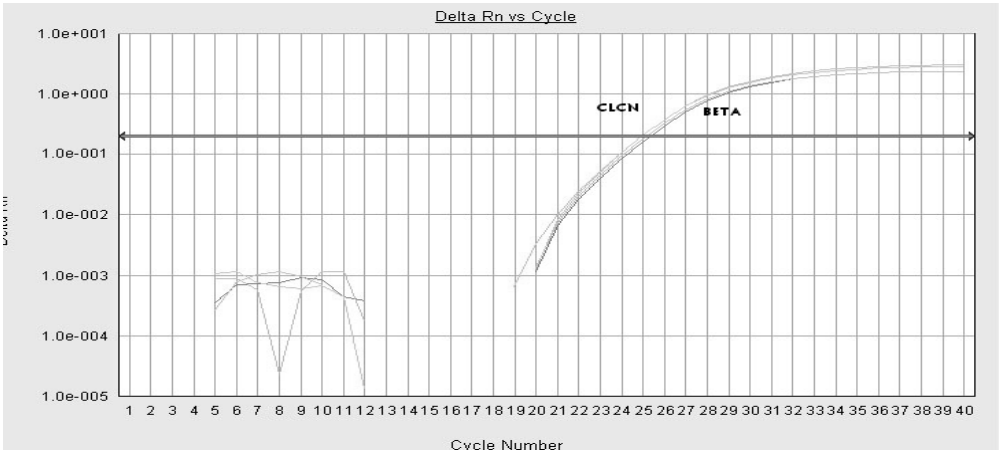
MLPA	Real-TIME	Lepore	Sicilian	Turkish	Asian-Indian	Ava2 β	Hinf1β	βψ'3	شماره
√	√	√	–	–	–	+/+	+/–	+/–	۱
√	√	–	–	–	–	+/+	–/–	+/–	۲
√	√	–	–	–	√	+/+	+/+	+/–	۳
√	√	–	–	–	–	+/+	–+/	+/–	۴
√	√	–	–	–	–	+/+	+/+	+/–	۵
√	√	–	–	–	–	+/+	–/–	+/–	۶
√	√	–	–	√	–	+/+	+/+	–/–	۷
√	√	√	–	–	–	+/+	–/–	–/–	۸
√	√	√	–	–	–	+/+	+/+	–/–	۹
√	√	–	–	–	–	+/+	+/+	+/–	۱۰
√	√	–	–	√	–	+/+	+/+	–/+	۱۱
√	√	–	–	√	–	–/–	+/+	–/–	۱۲
√	√	√	–	–	–	+/+	+/–	+/+	۱۳
√	√	–	–	–	–	+/+	+/+	+/+	۱۴
√	√	–	–	–	–	+/+	+/+	–/–	۱۵
√	√	–	–	–	–	+/+	+/+	–/–	۱۶
√	√	–	–	–	–	+/+	+/+	–/–	۱۷

برای کلیه نمونه‌ها تکنیک MLPA استفاده گردید. نتایج MLPA به صورت نرم‌افزاری و چشمی مورد ارزیابی قرار گرفت. در بررسی با تکنیک MLPA وReal-Time هرکدام از نمونه‌های مشکوک با یک نمونه سالم به صورت کنترل سالم آنالیز می‌شد (شکل شماره ۱).



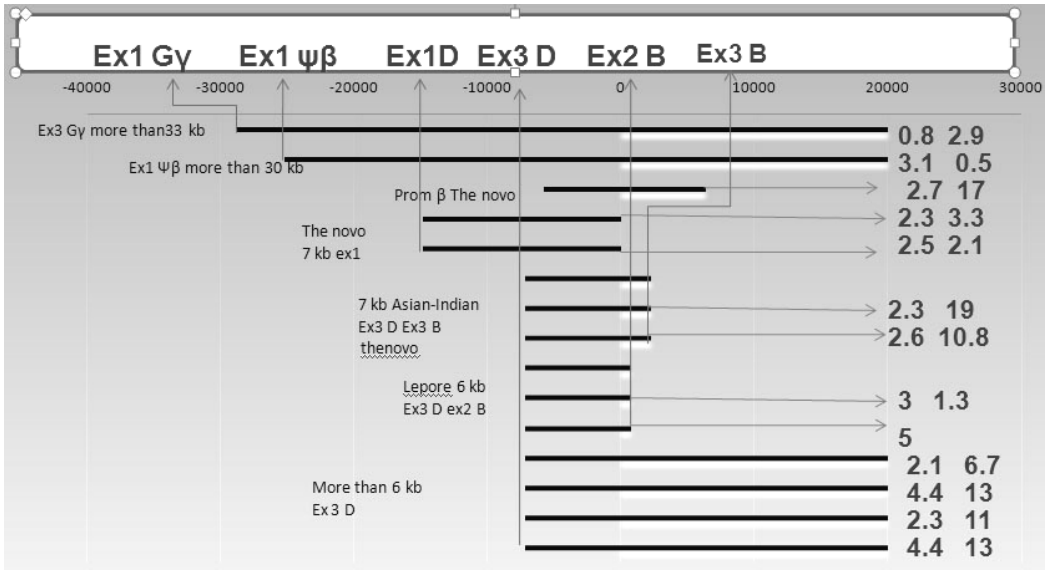
شکل شماره ۱: پیک‌های پایین مربوط به فرد نرمال و پیک‌های بالا مربوط به فردی می‌باشد که حذف را در منطقه ژن بتا نشان می‌دهد. این ☺ علامت مناطق پروب‌های حذف شده را نشان می‌دهد که در فرد بالایی که حذف دارد کاهش حذف به صورت کاهش ارتفاع پیک به خوبی مشهود است.

در شکل شماره ۱ آستانه کاهش آستانه قطعات (۲۰۲ و ۱۹۶و چندین کاوش‌گر دیگر) به خوبی دیده می‌شود که گواه بر وجود حذف می‌باشد. تک تک نتایج MLPA بررسی گردید و در صورت ابهام بارها تکرار شد. برای تأیید کار MLPA روش Real-Time مورد استفاده قرار گرفت که به بررسی سه منطقه ژنی در محدوده ژن‌های بتا، دلتا و G گاما پرداخت (شکل شماره ۲).



شکل شماره ۲: نتیجه بررسی یکی از نمونه‌های واجد حذف به دست آمده از MLPA در این شکل نشان داده شده است که نمونه واجد حذف یک سیکل از نمونه نرمال دیرتر رشد را شروع کرده است. ژن بتا یک سیکل از ژن مرجع ما عقب‌تر می‌باشد و وجود حذف تأیید می‌شود. ژن مرجع ماCLCN می‌باشد.

نـتایج مربوط بـه کـل بیــماران و محــدوده حـذف و مقـدار HbF, HbA2 آن‌ها در شـکل شـماره ۳ نــشان داده شــده است. در ۳ نفر حذف در محدوده Lepore بـود کـه بـا روش Gap-PCR نیز تشخیص داده شده بود. ۳ نفر در محدوده حذف Asian-Indian بودند ولی فقط یک نفر این حذف را بـا روش Gap-PCR نشان داد. در ۴ نفر حذف در محـدوده انتهـای ژن بتا به سمت انتهای خوشه بود که حداقل ۶ کیلو باز حذف شـده داشت (شکل شماره ۳).



شکل شماره ۳: تصویر مربوط به حذف‌های مورد بررسی را نشان می‌دهد که محدوده حذف‌ها نشان داده شده است هم‌چنین مقدار HbF و HbA2 به ترتیب از راست به چپ در مقابل آن‌ها آورده شده است. نمونه‌هایی که حذف تا بعد از Ex3B ادامه پیدا کرده است محدوده' ۳ آن‌ها مشخص نیست. خط‌های مشکی محدوده حذف شده را نشان می‌دهد. Ex اگزون ژن مربوطه را نشان می‌دهد.

بحث

انتظار می‌رود که افراد دارای حذف در محدوده ژن دلتا- گلوبین واجد A2 طبیعی (کمتـر از ۳/۵) نیـز باشـند. در ضـمن انتظـار می‌رود، افرادی‌که واجد حذف در منطقه G گامـا بـه سـمت' ۳ هستند واجد HbF طبیعی هم باشند. در ایـن بـین چنـد نمونـه نتایج متفاوتی از حد انتظار را نشان می‌دهند مثلاً نمونـه دوم در شکل ۴ واجد HbF حدود ۰/۵است که قابل توجیه نمـی‌باشـد. اگر خطای آزمایشگاهی را در نظر نگیریم حـدس زده مـی‌شـود که در این نمونه و نمونه ۴ و ۵ و ۱۰ به ترتیب از بالا مقدار کم HbF به علت حذف منـاطقی کـه نقـش تنظیمـی در عملکـرد ژن‌هـای HbF را داشـته‌انـد. در خـصوص بـالا بـودن مقـدار HbA2در نمونــه‌هــای ۱۳ و ۱۴ بــه احتمــال زیــاد خطــای آزمایشگاهی باعث شده است چنین اعدادی در نتیجـه آزمـایش خون این افراد نوشته شـده باشـد. البتـه تجربـه چنـدین سـال فعالیت تشخیص این ادعا را ثابت می‌کند. مثلاً بارها ثابت شـده است که آزمایشگاهی با تجربـه کـم بـه دلیـل کـاهش شـدید MCV, MCH مانند الفا- تالاسمی شدید مقدار A2 را خیلـی بیشتر از حد واقعی می‌نویسند زیرا فکر می‌کنند فرد مزبور ناقـل بتا- تالاسمی می‌باشد. هر نمونه حداقل دو بار MLPA شد. در بعضی موارد متوجه شدیم که بـا اسـتفاده از آنـزیم Taq تولیـد داخل نتایج بهتری می‌گیریم. همان‌گونه که در شکل شـماره ۳ می‌بینید حذف‌هـای متعـددی مـشاهده شـد کـه نـشان‌دهنـده هتروژن بودن حذف‌هـا در کـشور مـی‌باشـد و لازم اسـت کـه این‌گونه مطالعات ادامه یابد تا حـذف‌هـای احتمـالی دیگـر نیـز شناخته شود. با توجه به درصد کم حذف در محـدوده ژن بتـا- گلوبین تاکنون هیچ گزارشـی از بررسـی حـذف‌هـای ژن بتـا- گلوبین با تکنیک MLPA در ایـران دیـده نـشده اسـت. تنهـا بررسی انجام شده با این روش با ساخت یک کیت MLPA بـا دو رنگ فلورسـانس توسـط Hartveld و همکـارانش صـورت گرفته، که بررسی هم بر روی حذف‌های الفا و هم بتا- گلـوبین انجام شده است. که در این تحقیـق توانـستند ۹ حـذف جدیـد گزارش کنند (۷).

البته با سایر تکنیک‌های تشخیصی (Gap-PCR, RFLP) در ایران گزارشاتی از فراوانی حذف‌ها وجود دارد که این آزمایشات

نتیجه کار این تحقیق را که هتروژنی برای حذف در ژن بتا-گلوبین در جمعیت ایرانی است تأیید می‌کند (۱۰).

نتیجه‌گیری

با توجه به Multiplex بودن، ارزانی، قابلیت تـکرارپذیری و حساسیت بالای روش MLPA این تکنیک روش بسیار مناسبی برای تشخیص حذف‌های ژن بتا می‌باشد.

تشکر و قدردانی

در این طرح از مساعدت و همکاری کلیه بیماران و خانواده‌های محترم آن‌ها جهت در اختیار گذاشتن نمونه و هم‌چنین از پشتیبانی و هم‌یاری تمامی همکاران آزمایشگاه ژنتیک پزشکی دکتر زینلی و همکاران گروه بیوتکنولوژی انستیتو پاستور تشکر و قدردانی می‌گردد.

References:

1. Craig JE, Efremov GD, Fisher C, Thein SL. Macedonian (db)0 Thalassemia Has the Same Molecular Basis as Turkish Inversion-Deletion (db)0 Thalassemia. Blood 1995;85:1146.
2. Weatherall DJ, Clegg JB. The Thalassaemia Syndromes. UK: Black Well Science; 2001.
3. Lorey FW, Arnopp J, Cunningham GC. Distribution of Hemoglobinopathy Variants by Ethnicity in a Multiethnic State. Genet Epidemiol 1996;13(5):501-1.
4. Angastiniotis M, Modell B, Englezos P, et al. Prevention and Control of Haemoglobinopathies. Bull World Health Organ 1995;73:375–386.
5. Galanello R, Eleftheriou A, Traeger-Synodinos J, et al. Prevention of Thalassemias and Other Haemoglobin Disorders. Cyprus Thalassemia International Federation Publications; 2003.
6. Abolghasemi H, Amid WAli, Zeinali Sirous, Mohammad Z, et al. Thalassemia in Iran Epidemiology, Prevention, and Management. J Pediatr Hematol Oncol 2007 April;29(4). [Full Text in Persian]
7. Harteveld CL, Voskamp A, Phylipsen M, Akkermans N, Dunnen JT den, White SJ, Giordano PC. Nine Unknown Rearrangements in 16 p13.3 and 11p15.4 Causing a-and b-Thalassaemia Characterised by High Resolution Multiplex Ligationdependent Probe Amplification. J Med Genet 2005;42:922-931.
8. Harteveld CL, Voskamp A, Phylipsen M, Akkermans N, Dunnen JT den, White SJ, Giordano PC. Nine Unknown Rearrangements in 16 p13.3 and 11p15.4 Causing a-and b-Thalassaemia Characterised by High Resolution Multiplex Ligationdependent Probe Amplification. J Med Genet 2005;42:922–931.
9. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF, A Simple Salting out for Extracting DNA from Huma Nucleated Cell Nucleic Acids Research 1988;16(3):1215.
10. Esteghamat F, Imanian H, Azarkeivan A, Pourfarzad F, Almadani N, Najmabadi. Screening of Iranian Thalassemic Families for the Most Common Deletions of the Beta-Globin Gene Cluster. Hemoglobin 2007;31(4):463-9.