

شناسایی دقیق حذف‌های ناشناخته خوشه ژنی بتاگلوبین در ناقلین بتا تالاسمی با استفاده از دو روش Real-time PCR و MLPA

صادق باباشاه^۱، سمیه جمالی^۲، دکتر رضا مهدیان^۳، مینا حیات نوسعید^۴، دکتر مرتضی کریمی پور^۵، دکتر فرشته مریمی^۶، مرضیه رئیسی^۷، راحله علی محمدی^۸، دکتر سیروس زینلی^۹

چکیده

سابقه و هدف

بتا تالاسمی به طور عمده از جهش‌های نقطه‌ای یا حذف‌های کوچک ناشی می‌شود ولی مواردی از وجود حذف‌های بزرگ در خوشه ژنی بتاگلوبین مشاهده شده است. شناسایی حذف‌های شناخته شده مبتنی بر روش Gap PCR می‌باشد در حالی که حذف‌های ناشناخته با این روش شناسایی نمی‌شوند. برای فایق آمدن بر این محدودیت، دو روش کمی Real-time PCR و MLPA برای بررسی کمی خوشه ژنی بتاگلوبین به کار گرفته شد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه که به صورت مورد - شاهدهی انجام شد، به روش سرشماری ۴۰ فرد ناقل مشکوک به حذف در خوشه ژنی بتاگلوبین که دارای شاخص‌های خونی کاهش یافته (MCV < ۸۰ fl ، MCH < ۲۷ pg)، هموگلوبین A₂ نرمال و هموگلوبین F افزایش یافته یا نرمال بودند وارد مطالعه شدند. تعداد نسخه‌های ژنی با به کارگیری روش Real-time PCR و روش مقایسه‌ای چرخه آستانه، مورد بررسی قرار گرفت. هم چنین تعداد نسخه‌های ژنی با روش MLPA نیز ارزیابی شد.

یافته‌ها

نتایج حاصل از Real-time PCR برای ژن‌های HBB ، HBD و HBG2 با استفاده از روش بررسی مقایسه‌ای چرخه آستانه، میزان $2^{-\Delta\Delta Ct}$ را برای افراد سالم، 0.18 ± 0.96 و برای ناقلین حذف در خوشه ژنی بتاگلوبین، 0.04 ± 0.58 نشان داد. هم چنین نتایج حاصل از MLPA، کاهش حدود ۵۰٪ در ارتفاع پیک شناساگرهای تکثیر یافته مرتبط با ژن حذف شده در افراد هتروزیگوت را نشان داد.

نتیجه گیری

نتایج MLPA و بررسی پیک‌های حاصل از تکثیر شناساگر، وجود حذف را در مناطقی که توسط Real-time PCR شناسایی شده بود، تایید کرد. با کمک این دو روش می‌توان حذف‌های شناخته شده و ناشناخته را در ناقلین بتا تالاسمی با دقت زیاد شناسایی نمود.

کلمات کلیدی: بتا تالاسمی، بتاگلوبین، حذف ژنی

تاریخ دریافت: ۸۷/۶/۲۴

تاریخ پذیرش: ۸۷/۱۱/۱۳

- ۱- کارشناس ارشد سلولی و مولکولی - واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی و مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران
- ۲- کارشناس ارشد زیست‌شناسی - مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران
- ۳- PhD بیوتکنولوژی پزشکی - مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران
- ۴- کارشناس ارشد سلولی و مولکولی - مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران
- ۵- پزشک عمومی - مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران
- ۶- PhD بیوتکنولوژی پزشکی - مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران
- ۷- کارشناس ارشد ژنتیک - مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی کوثر
- ۸- کارشناس ارشد ژنتیک - واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی
- ۹- مؤلف مسؤول: PhD ژنتیک پزشکی - مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران و مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی کوثر- صندوق پستی: ۱۳۱۸۵-۱۶۶۷

مقدمه

بتا تالاسمی یکی از شایع‌ترین بیماری‌های تک ژنی بوده که دارای الگوی توارث اتوزومال مغلوب می‌باشد، از این رو ناقلینی که یک نسخه از الیل بتا تالاسمی را به ارث می‌برند، معمولاً از لحاظ بالینی فاقد علامت می‌باشند (۳-۱). بیش از ۲ میلیون ناقل بتا تالاسمی و بیش از ۱۵۰۰۰ فرد مبتلا به بتا تالاسمی ماژور در ایران گزارش شده است، لذا تشخیص پیش از تولد این بیماری از اولویت‌های بهداشتی در ایران می‌باشد (۴). امروزه از پیوند مغز استخوان و ژن درمانی برای درمان این بیماری ژنتیکی نام برده می‌شود، ولی طبیعتاً بهترین راه حل ممکن، شناخت جهش‌های موجود در سطح ایران و تعیین میزان پراکندگی آن‌ها در جهت پیشگیری از تولد این بیماران است (۵). برای رسیدن به این هدف، باید تمام ناقلین این بیماری شناسایی شوند. به عبارت دیگر برای کنترل این بیماری نیاز به شناسایی انواع جهش‌های ژنی مرتبط با بتا تالاسمی از جمله حذف‌های خوشه ژنی بتاگلوبین می‌باشد. تا امروز بیش از ۲۰۰ جهش گوناگون در ژن بتاگلوبین گزارش شده است که از این بین، حداقل ۶۰ مورد مرتبط با حذف‌های مختلف می‌باشند. تعداد قابل ملاحظه‌ای از این حذف‌ها از جمله حذف‌های Chinese، Sicilian، Spanish، Hb Lepore و حذف‌وارونه شدگی‌های Asian، Turkish، Indian با اندازه و موقعیت متغیر، خوشه ژنی بتاگلوبین را درگیر می‌کنند (۶، ۱).

روش‌های مولکولی رایج برای تشخیص ناقلین حذف‌ها علاوه بر داشتن محدودیت‌هایی نظیر زمان‌بر و پرهزینه بودن، فاقد حساسیت و دقت لازم و کافی برای شناسایی تمام ناقلین حذف‌ها می‌باشند. به طور مثال، روش لکه‌گذاری ساترن به عنوان یک روش زمان‌بر، به هیبرید شدن شناساگرها وابسته بوده و نیازمند مقادیر بالایی از نمونه DNA است و یا روش (Fluorescent In Situ Hybridization) FISH، مستلزم طی کردن مراحل کشت سلولی برای دستیابی به کروموزوم‌های متافازی می‌باشد. ضمن این که این روش از حساسیت لازم و کافی برای شناسایی حذف‌های کوچک برخوردار نمی‌باشد (۷-۹). روش‌های معمولی شناسایی موتاسیون مبتنی بر تکثیر PCR

یک توالی منفرد از DNA ژنومی، توانایی شناسایی حذف را ندارند زیرا همواره الیل نرمالی در کروموزوم همتای دیگر وجود دارد که می‌تواند نتایج PCR فرد ناقل را تغییر داده و پاسخ کاذبی مشاهده گردد. لذا برای شناسایی متداول موتاسیون‌های حذفی، روش مبتنی بر تکثیر DNA با نام Gap PCR به عنوان روشی ساده، سریع و ارزان جایگزین مناسبی برای روش‌های ذکر شده (روش‌های لکه‌گذاری ساترن و FISH) محسوب می‌شود (۱۰). روش Gap PCR برای شناسایی حذف‌های شناخته شده $\delta\beta$ - تالاسمی، هموگلوبین لپور و انواع موتاسیون‌های حذفی تداوم ارثی هموگلوبین جنینی HPFH (Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin) استفاده می‌شود. این روش تنها توانایی شناسایی حذف‌هایی با دامنه مشخص را دارد ولی قادر به شناسایی افراد دارای حذف‌های ناشناخته با دامنه بزرگ و نامشخص نیست (۶، ۲). در این تحقیق بر اساس مطالعه‌ها و بررسی‌های انجام شده، به راه‌اندازی روش Real-time PCR کمی در سطح ژنومی برای بررسی حذف‌های خوشه ژنی بتاگلوبین اقدام شد (۱۲، ۱۱، ۶). سیستم Real-time PCR مبتنی بر سنجش کمی نسخه‌های ژنی در طول فاز تصاعدی از واکنش PCR، از طریق سنجش میزان نشر نور فلورسانس می‌باشد. در این سیستم از یک رنگ فلورسانس ویژه متصل شونده به DNA نظیر SYBR Green I که تنها پس از اتصال به DNA دو رشته‌ای سیگنال فلورسانس قوی منتشر می‌کند، استفاده می‌شود. این رنگ فلورسنت طی واکنش، متناسب با میزان محصولات تولید شده از هر سیکل، نور فلورسنت ساطع کرده و میزان نشر فلورسانس آن توسط نمایانگر دستگاه شناسایی و ثبت می‌شود (۱۵-۱۳). با توجه به حساسیت و قدرت تشخیص بالا، این سیستم به عنوان روشی مناسب برای تشخیص ناقلین حذف‌های بتا تالاسمی انتخاب شد. وجود تنها یک نسخه از ژن سالم مورد مطالعه در افراد ناقل در مقابل وجود دو نسخه از این ژن در افراد سالم منجر به تولید محصول کمتری در ابتدای فاز تصاعدی تکثیر DNA در افراد ناقل می‌شود و این می‌تواند در تمایز این افراد و شناسایی ناقلین حذف‌ها در این روش، مبنای قرار گیرد. داده‌های اولیه حاصل از انجام Real-time PCR می‌تواند

نمک اشباع (Salting Out) استخراج و غلظت و کیفیت آن توسط اسپکتروفتومتر NanoDrop® ND-1000 سنجیده شد (۱۷).

Gap PCR

برای انجام این روش از مخلوط واکنشی به حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲۰۰ نانوگرم DNA ژنومی، ۱۰ پیکومول از هر آغازگر، ۰/۱ واحد از آنزیم DNA پلیمرز Taq و بافر محتوی ۲/۵ میکرولیتر (۱۰ X) buffer، PCR، ۰/۷۵، ۰/۲ میکرولیتر (۵۰ mM)، $MgCl_2$ ، ۰/۲ میکرولیتر (۱۰۰ mM) Mix dNTP و ۰/۰۲۵ میکرولیتر (۱M) Spermidin که همگی از شرکت سیناژن خریداری شدند، با شرایط دمایی ذکر شده در مقاله کریگ و همکاران، در دستگاه ترموسایکلر (Applied Biosystems، 2720) استفاده شد (۶) (جدول ۲). محصولات Gap PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید و با استفاده از اشعه ماوراء بنفش مشاهده شد. باندهای ظاهر شده با سایز مارکر ۱۰۰ جفت بازی سنجیده شدند.

Real-time PCR و مخلوط واکنش

آغازگرهای الیگونوکلوئیدی برای سه ژن از خوشه ژنی بتاگلوبین (HBB، HBD، HB2) و هم چنین ژن CLCN7 به عنوان ژن مرجع با استفاده از نرم افزار (CA، Primer Ver. 3.0 (Applied Biosystems، Foster City Express طراحی شد (جدول ۳).

درون هر چاهک از پلیت های ۹۶ خانه ای (سنگاپور، Applied Biosystems، Microamp) مخلوطی به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر (انگلستان، Applied Biosystems) SYBR Green Master Mix، ۵ پیکومول از هر آغازگر، ۶/۵ میکرولیتر آب و ۵ نانوگرم DNA ژنومی تهیه شد. واکنش های هر نمونه DNA برای هر سه ژن، دو سری و به صورت هم زمان انجام شد و میانگین Ct (چرخه آستانه) های به دست آمده برای هر ژن محاسبه شد. Real-time PCR در دستگاه ABI 7300 Sequence Detection Systems و با برنامه زیر انجام پذیرفت: در ابتدا ۹۵ درجه سانتی گراد واسرشت سازی

با استفاده از روش مقایسه ای چرخه آستانه (Threshold cycle, Ct) مورد بررسی قرار گیرند. چرخه آستانه (Ct)، چرخه ای است که در آن هر نمونه تکثیر تصاعدی خود را شروع کرده، افزایش معنی داری در سنجش سیگنال فلورسانس مشاهده می شود و منحنی PCR در این چرخه، خط آستانه (Threshold Line) را قطع می کند. خط آستانه، خطی است که به صورت خودکار توسط دستگاه رسم شده و مرز بین سیگنال های فلورسانس پس زمینه و سیگنال های فلورسانس معنادار مرتبط با تکثیر را مشخص می نماید (۱۵).

دیدگاه جدیدی که در این زمینه مطرح است، استفاده از روش تکثیر وابسته به اتصال شناساگرهای چندگانه (MLPA= Multiplex Ligation-dependent probe Amplification) است. این روش مبتنی بر اتصال (Ligation) دو نیمه شناساگر روی توالی هدف و یک واکنش تکثیری PCR توسط الیگونوکلوئیدهای هیبرید شونده مجاور با استفاده از تنها یک جفت آغازگر می باشد. از آن جا که میزان محصولات تکثیر شناساگر، متناسب با میزان نسخه های اولیه توالی هدف می باشد، این روش در بررسی تعداد نسخه های ژنی (Gene dosage) قابل استفاده است (۱۰، ۱۶).

مواد و روش ها

انتخاب بیماران و استخراج DNA

مطالعه انجام شده از نوع مورد - شاهی بود. از میان افراد مراجعه کننده به آزمایشگاه ژنتیک انستیتو پاستور ایران و مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی کوثر، ۴۰ فرد ناقل مشکوک به حذف در خوشه ژنی بتاگلوبین پس از اخذ رضایت نامه وارد مطالعه شدند. مبنای انتخاب افراد برای ورود در این مطالعه، داشتن شاخص های خونی کاهش یافته (MCV < ۸۰ fl و MCH < ۲۷ pg)، هموگلوبین A_2 نرمال و هموگلوبین F افزایش یافته یا نرمال بود (جدول ۱). هم چنین در این مطالعه از اشخاصی که دارای حذف قطعی بودند، تحت عنوان کنترل مثبت و تعدادی از افراد سالم تحت عنوان کنترل منفی استفاده گردید. DNA مورد نیاز از گلبول های سفید خون محیطی با استفاده از روش

جدول ۱: شاخص‌های خون‌شناسی در ۴۰ فرد بررسی شده

حذف	تعداد	RBC($\times 10^6/\mu\text{l}$)	Hb(g/dl)	MCV(fl)	MCH(pg)	HbA ₂ (%)	HbF(%)
Sicilian ($\delta\beta$)°	۳	۶/۱ ± ۰/۲	۱۰/۴ ± ۱/۸	۶۴ ± ۲/۹	۲۰ ± ۰/۹	۲/۵ ± ۰/۳	۹/۱ ± ۳/۱
Turkish Inversion/Deletion($\delta\beta$)°	۱	۶/۴	۱۱/۶	۶۲/۸	۱۹/۵	۲/۷	۹/۱
Asian-Indian Inversion/Deletion ⁶ γ ($^A\gamma\delta\beta$)°	۶	۵/۹ ± ۰/۱	۱۲/۶ ± ۱/۷	۷۲ ± ۵/۲	۲۲ ± ۳/۳	۳/۷ ± ۱/۷	۱۲/۷ ± ۰/۸
Hb Lepore	۲۲	۵/۶ ± ۰/۴	۱۱/۷ ± ۱/۷	۷۱ ± ۲/۷	۲۰ ± ۱	۳ ± ۱/۱	۲/۴ ± ۱/۳
حذف ناشناخته همراه با HbF افزایش یافته	۵	۵/۵ ± ۰/۷	۱۴/۱ ± ۱/۳	۶۶ ± ۱/۱	۲۱ ± ۰/۸	۲/۴ ± ۰/۲	۱۰/۲ ± ۱/۳
حذف ناشناخته همراه با HbF نرمال	۳	۶/۱ ± ۰/۲	۱۱/۲ ± ۱/۲	۶۱ ± ۱/۲	۱۸ ± ۰/۸	۳ ± ۰/۳	۰/۷ ± ۰/۱

MCV: میانگین حجم گویچه‌ای، MCH: میانگین هموگلوبین گویچه‌ای، HbF: هموگلوبین جنینی ($\alpha 2\gamma 2$)، HbA₂: ($\alpha 2\delta 2$). مقادیر ذکر شده در جدول نمایانگر میانگین $\pm$ انحراف از معیار (mean $\pm$ SD) است.

جدول ۲: توالی آغازگرهای الیگونوکلوئیدی به کار گرفته شده در Gap PCR

حذف	آغازگر	توالی	موقعیت آغازگر بر روی ژن
Hb Lepore	F	5'-GACACACATGACAGAACAGCCAAT-3'	۵۴۵۸۶-۵۴۶۱۰
	F	5'-CGATCTTCAATATGCTTACCAAG-3'	۶۱۸۴۸-۶۱۸۷۰
	R	5'-CATTCGTCTGTTTCCCATTTCTA-3'	۶۲۷۶۳-۶۲۷۴۲
Sicilian	F	5'-TTGGGTTTCTGATAGGCACTG-3'	۵۴۹۷۲-۵۴۹۹۲
	R	5'-GTGTCACCCATTAATGCCTTGTAC-3'	۵۶۵۵۶-۵۶۵۳۳
	R	5'-TAGATCCCTTTGCCATTATG-3'	۶۹۵۰۰-۶۹۴۸۱
Asian-Indian	F	5'-ATGCCATAAAGCACCTGGATG-3'	۳۹۸۲۷-۳۹۸۴۷
	R	5'-GAGCTGAAGAAAATCATGTGTGA-3'	۴۱۰۲۲-۴۱۰۰۰
	F	5'-TAACCATATGCATGTATTGCC-3'	۵۶۱۱۰-۵۶۱۳۲
Turkish	R	5'-TTCCACTATCTTACTTACACAT-3'	۶۶۴۴۰-۶۶۴۱۹
	F	5'-TGCTGAGGATTGTTTTAGGTC-3'	۷۴۹۱۶-۷۴۹۳۶
	R	5'-GAATAGCAGTGGTGAGAGAG-3'	۷۵۶۱۶-۷۵۵۹۷

جدول ۳: توالی آغازگرهای الیگونوکلوئیدی به کار گرفته شده در Real-time PCR

ژن	آغازگر	توالی	موقعیت آغازگر بر روی ژن	طول محصول تکثیر (جفت باز)
HBB	F	5'-GGGCATGTGGAGACAGAGAAGAC-3'	۷۰۷۳۴-۷۰۷۵۶	۱۲۴
HBB	R	5'-ACTCAAAGAACCTCTGGGTCCAAG-3'	۷۰۸۳۴-۷۰۸۵۷	
HBD	F	5'-GACTCCTGAGGAGAAGACTGCTGTC-3'	۶۳۱۹۴-۶۳۲۱۸	۱۳۶
HBD	R	5'-ACATGCCCAGTTTCCATTTGC-3'	۶۳۳۰۹-۶۳۳۲۹	
HBG2	F	5'-ACTGAGCTCACTGCCCATGATG-3'	۴۴۳۳۵-۴۴۳۵۶	۱۰۳
HBG2	R	5'-AGACAACCATGTGTGATCTCTTAGCAG-3'	۴۴۴۱۱-۴۴۴۳۷	
CLCN7	F	5'-CTCTTAGGCCAGGCGTTTGTG-3'	۸۳۰۴-۸۳۲۴	۱۲۹
CLCN7	R	5'-ACCGTGCTCAGCGCTATGC-3'	۸۴۱۴-۸۴۳۲	

با استفاده از کیت SALSA MLPA P102 HBB (هلند) مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده مورد بررسی قرار گرفتند. فرآیند MLPA شامل مراحل واسرشت سازی DNA، هیبریداسیون دو نیمه شناساگر به مناطق مجاور روی ژنوم، اتصال دو نیمه شناساگر به یکدیگر و تکثیر توسط PCR است که در نهایت با جداسازی محصولات تکثیر شده توسط الکتروفورز موئن در دستگاه توالی یابی ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer در مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی کوثر خاتمه یافت (۱۶، ۱۰). آنالیز MLPA با استفاده از نرم افزار Gene Marker® Ver. 1.6 انجام شد.

یافته ها

از تعداد بیش از ۶۰۰۰ نفر فرد ناقل بتا تالاسمی مراجعه کننده به آزمایشگاه ژنتیک انستیتو پاستور ایران و مرکز تحقیقات ژنتیک کوثر، تعداد ۴۰ نفر واجد حذف در خوشه ژنی بتاگلوبین و یا مشکوک به وجود حذف، شناسایی شدند. ملاک وجود حذف، داشتن هموگلوبین A₂ نرمال و هموگلوبین F افزایش یافته یا نرمال، عدم شناسایی موتاسیون های نقطه ای، کوتاه بودن محصول PCR در منطقه ژنی بتاگلوبین و نیز عدم مشخص شدن موتاسیون نقطه ای در فرد ناقل بتا تالاسمی با استفاده از روش توالی یابی بود.

برای انجام روش Gap PCR از دو آغازگر طراحی شده برای دو ناحیه بالا دست و پایین دست محدوده هر حذف شناخته شده استفاده شد. به عنوان کنترل برای ال سالم، از یک آغازگر که توانایی اتصال به توالی در داخل ناحیه حذفی در ال سالم را دارد استفاده شد که تولید یک محصول اضافی با یکی از آغازگرهای کناره ناحیه حذف می کند. از ۴۰ نمونه انتخاب شده برای بررسی وجود حذف در خوشه ژنی بتاگلوبین با شاخص های خونی ارایه شده در جدول ۱، حذف های شناخته شده Lepore، Asian/Indian، Turkish و Sicilian در ۳۲ فرد توسط Gap PCR مشخص گردید. هم چنین وجود حذف شناخته شده در همگی افراد کنترل مثبت تایید شد. نتایج الکتروفورز محصولات Gap PCR روی ژل آگارز یک باند مشخص را برای فرد نرمال، دو باند مشخص را برای فرد هتروزیگوت

DNA الگو در مدت زمان ۱۰ دقیقه در چرخه اول و سپس دو برنامه دمایی زیر در ۴۰ چرخه تکرار شد: ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ ثانیه و ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه. هر مرحله تکثیری کامل، توسط یک مرحله تفکیک (dissociation) که شامل: ۹۵ درجه سانتی گراد برای مدت ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی گراد برای مدت ۳۰ ثانیه، ۹۰ درجه سانتی گراد برای مدت ۱۵ ثانیه بود، به منظور تجزیه و تحلیل منحنی ذوب ادامه یافت.

روش مقایسه ای چرخه آستانه

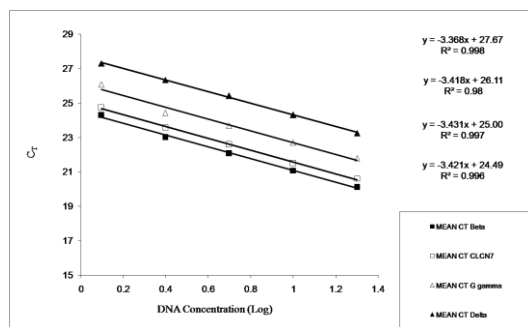
با پایان انجام واکنش PCR، نرم افزار دستگاه به طور اتوماتیک خط آستانه را رسم می کند. تحلیل اطلاعات با استفاده از نرم افزار ABI 7300 sequence Detection system و نرم افزار SDS Ver. 1.2.3 (Applied Biosystems، انگلستان) و با روش مقایسه ای چرخه آستانه انجام پذیرفت. داده های خام اولیه با استفاده از نرم افزار Excel (Microsoft corp.) 2007 تحت تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. به این ترتیب که با تفاضل میانگین Ct ژن هدف برای هر دو نمونه نرمال و آزمایش از میانگین Ct ژن مرجع، شاخص ΔCt در نمونه نرمال و نمونه آزمایش محاسبه شد و از تفاضل دو ΔCt مربوط به نمونه نرمال و نمونه آزمایش، فاکتوری تحت عنوان $\Delta\Delta Ct$ به دست آمد. در نهایت تعداد نسخه ژن هدف (Delta، Beta، Gamma) با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ مشخص شد (۱۴).

هم چنین به منظور تعیین کارایی تکثیر ژن های هدف و ژن مرجع CLCN7، لازم بود در ابتدا به صورت هم زمان رقت های متوالی از DNA نرمال تهیه و پس از انجام Real-time PCR، نمودار استاندارد برای هر قطعه ژنی ترسیم شود. با توجه به شیب (Slope) نمودار استاندارد مرتبط با تکثیر ژن های β ، δ ، γ و همین طور ژن مرجع CLCN7، کارایی PCR برای تمامی این ژن ها مطابق فرمول زیر محاسبه شد (۱۱): $Efficiency = [10^{(-1/Slope)}] - 1$ (کارایی)

تکثیر وابسته به اتصال شناساگرهای چندگانه (MLPA)

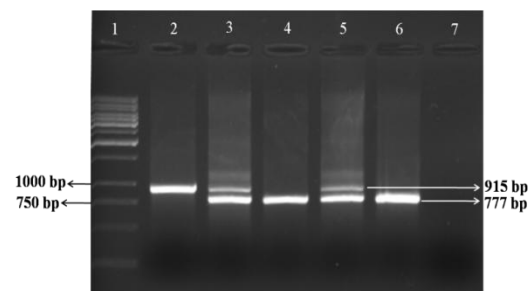
همه افراد مشکوک به داشتن حذف در خوشه ژنی بتاگلوبین و هم چنین افراد کنترل مثبت و کنترل منفی

به ژن‌های β ، δ و γ^G و ژن مرجع CLCN7 تایید نمود که کارایی PCR برای این ژن‌ها تقریباً برابر بوده و بنابراین استفاده از روش مقایسه‌ای چرخه آستانه، از اعتبار لازم برخوردار می‌باشد (شکل ۲). پس از آن، انجام Real-time PCR وجود حذف در ژن β را در تمامی ناقلین دارای حذف شناخته شده و هم چنین افراد کنترل مثبت اثبات نمود. هم چنین انجام Real-time PCR برای ژن‌های β ، δ و γ^G در ۸ نمونه باقیمانده، وجود حذف بزرگ را در ۵ نمونه بدون هیچ اطلاعی از سرحدات دقیق حذف مشخص نمود. منحنی‌های مرتبط با تکثیر ژن‌های β و δ در فرد ناقل حذف در مقایسه با فرد نرمال، دیرتر وارد فاز تصاعدی شدند (شکل ۳). بدیهی است که در فرد دارای حذف، به علت فقدان یک نسخه از ژن هدف، منحنی تکثیر یک چرخه دیرتر از منحنی متناظر در فرد سالم به آستانه می‌رسد. با تجزیه و تحلیل این داده‌های اولیه با استفاده از روش مقایسه‌ای چرخه آستانه (Ct) و محاسبه نسبت $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ، نسبت 0.18 ± 0.96 برای افراد سالم و نسبت 0.04 ± 0.58 برای افراد ناقل حذف در خوشه ژنی بتاگلوبین به دست آمد.



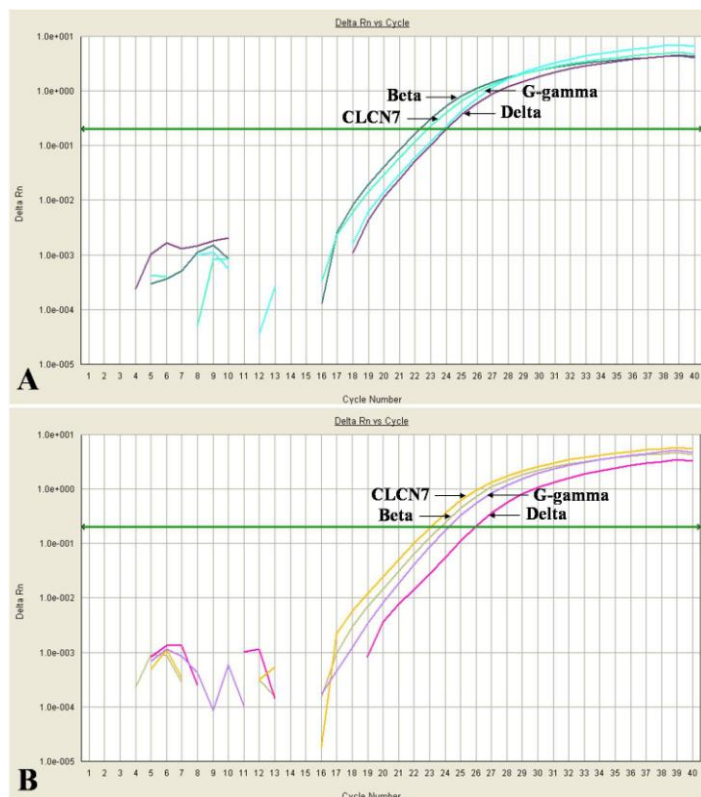
شکل ۲: رسم منحنی استاندارد بر پایه سری رقت‌ها از نمونه DNA نرمال برای ژن‌های β ، δ ، γ^G و ژن مرجع CLCN7 به منظور محاسبه کارایی. شیب به دست آمده برای منحنی‌های تکثیر ژن‌های β ، δ ، γ^G و CLCN7 به ترتیب -3.42 ، -3.43 ، -3.41 و -3.37 می‌باشد، لذا می‌توان کارایی PCR را برای هر سه ژن تقریباً برابر دانست و از روش مقایسه‌ای چرخه آستانه استفاده کرد. منفی بودن شیب‌ها به علت وجود رابطه معکوس بین غلظت DNA و رسیدن به چرخه آستانه (Ct) می‌باشد. همچنین ضریب همبستگی (Correlation coefficient) برای ژن‌های β ، δ و CLCN7 معادل 0.99 و برای ژن γ^G معادل 0.98 می‌باشد که نشانه وجود هماهنگی بین تغییرات غلظت DNA و اختلاف Ct ها است.

و یک باند مشخص با دامنه حرکتی بیشتر از تک باند مرتبط با فرد نرمال را برای فرد هموزیگوت حذف نشان می‌دهد (شکل ۱). انجام Gap PCR برای حذف‌های شناخته شده در ۸ نمونه دیگر، حذفی را مشخص نکرد. روش مقایسه‌ای چرخه آستانه در Real-time PCR مبتنی بر تغییرات چرخه آستانه نمونه آزمایش در مقایسه با نمونه کنترل است که با کمک آن نسبت تعداد نسخه نمونه اولیه قابل اندازه‌گیری می‌باشد. در این آزمایش، ژن کانال کلری ۷ (CLCN7) به عنوان ژن مرجع (reference gene) انتخاب شد. این ژن به عنوان یک ژن سالم روی کروموزوم ۱۶ قرار دارد. یکی از سه ژن (β ، δ ، γ^G) نیز به عنوان ژن هدف در نظر گرفته شد.



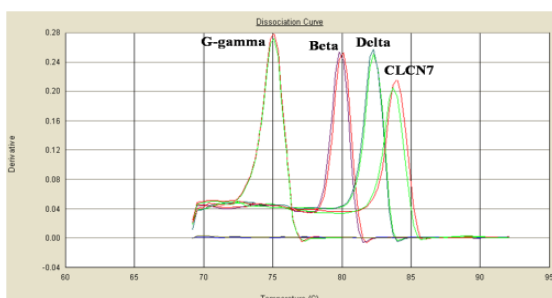
شکل ۱: غربالگری برای حذف Lepore توسط Gap PCR. چاهک ۱ سایز مارکر، چاهک ۲ نمونه فرد سالم (کنترل منفی) با یک باند مشخص، چاهک ۳ نمونه فرد هتروزیگوت قطعی (کنترل مثبت حذف هتروزیگوت) با دو باند مشخص، چاهک ۴ نمونه فرد هموزیگوت قطعی (کنترل مثبت حذف هموزیگوت) با یک باند مشخص، چاهک ۵ نمونه فرد هتروزیگوت با دو باند مشخص، چاهک ۶ نمونه فرد هموزیگوت با یک باند مشخص را نشان می‌دهد. چاهک ۷ فاقد DNA الگو می‌باشد.

انجام مراحل بهینه‌سازی Real-time PCR و انجام آزمایش بر روی رقت‌های متوالی از نمونه DNA نرمال و رسم نمودار استاندارد، خطوطی با شیب‌های منفی و مشابه برای هر چهار ژن β ، δ ، γ^G و CLCN7 را ایجاد نمود. از آن جایی که بین غلظت‌های مختلف DNA و رسیدن به چرخه آستانه (Ct) در نمودار استاندارد، رابطه معکوس وجود دارد، نمودار استاندارد مرتبط با هر ژن دارای شیبی منفی می‌باشد. شیب‌های مشابه در نمودار استاندارد مربوط



شکل ۳: منحنی تکثیر DNA برای ژن‌های β ، δ ، γ و ژن مرجع CLCN7 در دو فرد سالم و ناقل. شکل A: منحنی تکثیر DNA مربوط به فرد سالم. ژن β در چرخه ۲۲/۱۹، ژن δ در چرخه ۲۳/۹۸، ژن γ در چرخه ۲۳/۷۷ و ژن مرجع CLCN7 در چرخه ۲۲/۶۷ وارد فاز تصاعدی تکثیر شده و به آستانه رسیده‌اند. شکل B: منحنی تکثیر DNA مربوط به فرد ناقل حذف در ژن‌های β و δ . ژن β در چرخه ۲۳/۵۴، ژن δ در چرخه ۲۵/۸۶، ژن γ در چرخه ۲۴/۱۶ و ژن مرجع CLCN7 در چرخه ۲۳/۰۱ وارد فاز تصاعدی تکثیر شده‌اند.

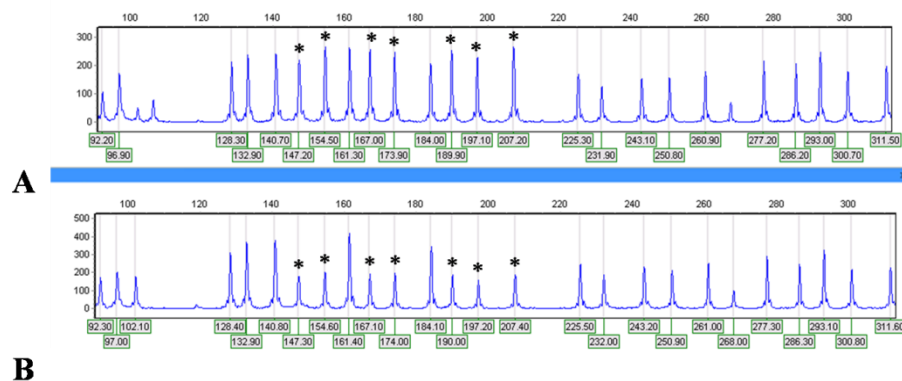
شناسایی حذف‌های کوچک و بزرگ مورد بررسی قرار گرفت. نتایج MLPA وجود حذف را در تمامی ۳۲ ناقل حذف شناخته شده و هم چنین ۵ ناقل با حذف ناشناخته مشخص نمود. پیک‌های مرتبط با ناحیه حذف در فرد ناقل دارای طول کوتاه‌تری از پیک‌های متناظر در فرد سالم (کنترل منفی) بودند (شکل ۵).



شکل ۴: آنالیز منحنی ذوب برای ژن‌های β ، δ ، γ و ژن مرجع CLCN7

از آن جایی که رنگ SYBR Green I برای شناسایی محصول PCR استفاده می‌شود، به هر نوع DNA دو رشته‌ای متصل شده و توانایی تشخیص محصول اختصاصی از غیر اختصاصی را ندارد، لذا وجود مواردی چون آغازگر دایمر یا محصول غیر اختصاصی نیز سبب افزایش سیگنال نور فلورسانس می‌شوند (۱۸، ۱۹). از این رو به منظور تایید صحت قطعه تکثیر شده و اطمینان از عدم وجود محصول غیر اختصاصی آغازگر دایمر و آلودگی، از نمودار ذوب (Melting curve) استفاده شد. در این نمودار با توجه به وجود تنها پیک مشاهده شده برای هر جفت آغازگر در دمای ذوب منحصر به خودش، اختصاصی بودن محصول PCR مشخص گردید (شکل ۴).

با استفاده از روش MLPA و به کارگیری شناساگرهای اختصاصی، چندین محل در خوشه ژنی بتاگلوبین به منظور



شکل ۵: پیک‌های به دست آمده از الکتروفورز موئین محصولات تکثیر شده مربوط به ژن بتاگلوبین. پیک‌های مرتبط با ناحیه حذف با ستاره مشخص شده‌اند. شکل A الگوی تیپیک یک فرد سالم را نشان می‌دهد. شکل B مربوط به یک فرد ناقل دارای حذف در ژن بتاگلوبین می‌باشد. کاهش تقریباً ۵۰٪ در ارتفاع پیک‌های مرتبط با ژن بتاگلوبین در فرد ناقل، نشانه وجود حذف در این ژن است.

بحث

بتا تالاسمی شایع‌ترین بیماری تک ژنی در ایران می‌باشد. از آن جایی که موتاسیون‌های نقطه‌ای عوامل اصلی ایجاد این بیماری را تشکیل می‌دهند، بیشترین مطالعه‌ها در مورد بتا تالاسمی در زمینه شناسایی موتاسیون‌های نقطه‌ای انجام پذیرفته است و روش‌های مبتنی بر PCR از جمله PCR ARMS و RFLP برای شناسایی موتاسیون‌های شایع در ژن بتاگلوبین استفاده می‌شوند. با این وجود، مواردی از حذف در خوشه ژنی بتاگلوبین دیده می‌شود که علت دسته‌ای دیگر از بتا تالاسمی‌ها است (۱۲، ۴). تحقیقات گذشته در زمینه شناسایی حذف‌ها در خوشه ژنی بتاگلوبین در ایران و جهان بسیار اندک بوده است به طوری که تاکنون هیچ یک از روش‌های آزمایشگاهی از جمله Gap PCR، توانایی تشخیص تمامی ناقلین دارای حذف را نداشته‌اند. هم چنین روش‌های لکه‌گذاری ساترن و FISH نیز به علت نیاز به صرف زمان طولانی و هم چنین فقدان دقت و حساسیت کافی، چندان مطلوب نمی‌باشند (۷-۹). در این جا دو روش سریع و کارآمد نسبت به روش‌های رایج گذشته، مبتنی بر استفاده از سیستم Real-time PCR و تکثیر وابسته به اتصال شناساگرهای چندگانه (MLPA) برای شناسایی سریع و دقیق انواع حذف‌های شناخته شده و ناشناخته در خوشه ژنی بتاگلوبین شرح داده شده است.

روش Real-time PCR مبتنی بر استفاده از رنگ SYBR

Green I به عنوان روشی ساده و نسبتاً ارزان برای شناسایی کمی حذف یا مضاعف‌شدگی در ژنوم و به طور ویژه و برای اولین بار در خوشه ژنی بتاگلوبین پیشنهاد شده است. البته گزارش‌های فراوانی مبنی بر بهره‌گیری از این روش در شناسایی انواع بازآرایی‌های ژنی در سایر بیماری‌های ژنتیکی از جمله آلفا تالاسمی، هایپر کلسترولمیی خانوادگی، سندرم آنجلمن و بسیاری از بیماری‌های ژنتیکی دیگر ارایه شده است (۲۱، ۲۰، ۷). در تمام این مطالعه‌ها، سنجش کمی نسخه‌های ژنی در طول فاز تصاعدی از واکنش PCR بر اساس سنجش میزان نشر نور فلورسانس اساس سیستم Real-time PCR را تشکیل می‌دهد. این سیگنال متناسب با میزان محصول PCR در واکنش افزایش می‌یابد. با ثبت میزان تابش در هر چرخه می‌توان واکنش را در طول فاز تصاعدی ثبت کرد و آن را با مقدار نمونه الگوی اولیه مطابقت داد. هر چه مقدار نسخه‌های اولیه DNA بیشتر باشد، افزایش میزان نور فلورسانس و ورود به فاز تصاعدی زودتر اتفاق می‌افتد (۱۳). البته باید گفت با وجود این که این روش امکان شناسایی هم زمان با تکثیر توالی‌های ژنی را مهیا می‌کند، استفاده از آن در یک سنجش چندگانه (Multiplex) به شدت به علت تداخل طیف رنگ‌های فلورسانس محدود می‌شود. لذا حضور زوج آغازگرهای متعدد در یک واکنش چندگانه، سبب کاهش در توانایی PCR و اعتبار نتایج آن خواهد شد (۲۰، ۱۹). تاکنون در زمینه تشخیص تعداد نسخ ژنی در خوشه

نمی‌شدند، فراهم آمد و در ادامه تجزیه و تحلیل نتایج حاصل از MLPA، وجود حذف را در مناطقی که توسط روش Real-time PCR شناسایی شده بود، تایید نمود. به عقیده ما، استفاده از ترکیب دو روش Real-time PCR و MLPA برای شناسایی حذف‌های خوشه ژنی بتاگلوبین ایده‌آل محسوب می‌شود.

نتیجه‌گیری

روش MLPA با به کارگیری چندین شناساگر، به عنوان یک روش نیمه کمی برای شناسایی دامنه حذف‌ها بدون تعیین دقیق محدوده حذف مطرح می‌باشد.

Real-time PCR دارای توانایی در شناسایی کمی حذف‌ها در مناطق مورد نظر از ژنوم با استفاده از روش مقایسه‌ای چرخه آستانه بین ژن هدف و ژن مرجع می‌باشد لذا روش Real-time PCR مبتنی بر استفاده از رنگ SYBR Green I می‌تواند به عنوان یک روش غربالگری دقیق و سریع برای شناسایی حذف‌های خوشه ژنی بتاگلوبین در ناقلین بتا تالاسمی به کار رود. اهمیت این روش به ویژه در مورد شناسایی حذف‌های ناشناخته با دامنه نامشخص که امکان شناسایی با روش‌های رایج مبتنی بر PCR معمولی را ندارند، خاطر نشان می‌شود. نتایج حاصل از روش MLPA، حضور حذف‌های مشابه که توسط روش Real-time PCR شناسایی شده بودند را تایید کرد. آن چه در مورد استفاده از روش‌های کمی در شناسایی حذف‌ها و مضاعف شدگی‌های ژنی مطرح است، انجام آزمایش‌های بهینه‌سازی نظیر تعیین کارایی آغازگرها، استفاده از غلظت بهینه از DNA و آغازگر و افزایش دقت و توانایی دستگاه‌ها برای دستیابی به نتایج معتبرتر می‌باشد.

تشکر و قدردانی

در این طرح از مساعدت و همکاری کلیه بیماران و خانواده‌های محترم آن‌ها و هم چنین از پشتیبانی و همیاری تمامی همکاران بخش پزشکی مولکولی انستیتو پاستور ایران و آزمایشگاه ژنتیک پزشکی دکتر زینلی تشکر و قدردانی می‌گردد.

ژنی بتاگلوبین با استفاده از سیستم Real-time PCR و رنگ فلورسانس SYBR Green I گزارشی ارایه نگردیده است. با این حال لیو و همکارانش در سال ۲۰۰۶ روشی مولکولی بر مبنای ارتفاع پیک‌های منحنی‌های ذوب مرتبط با ژن‌های تکثیر یافته از طریق Real-time PCR برای تشخیص حذف‌های موجود در آلفا تالاسمی ارایه دادند (۲۰). این در حالی است که در مطالعه حاضر بررسی پیک‌های منحنی ذوب تنها به منظور تایید اختصاصیت محصولات تکثیر یافته صورت پذیرفت. در مطالعه حاضر وجود حذف در تمامی ۳۲ فرد دارای حذف شناخته شده که وجود حذف در آن‌ها از طریق Gap PCR شناسایی شده بود، توسط روش Real-time PCR تشخیص داده شد که این دلیلی بر صحت و دقت در نتایج Real-time PCR در شناسایی تغییرات نسخه‌های ژنی می‌باشد.

روش MLPA که اخیراً از کاربرد گسترده‌ای در زمینه تشخیص بازآرایی‌های ژنی برخوردار می‌باشد، مبتنی بر ترکیب یک واکنش اتصال (Ligation) و یک PCR استاندارد است که در نهایت به جداسازی محصولات تکثیر شده توسط الکتروفورز موئین خاتمه می‌یابد. بررسی‌ها نشان داده است که استفاده از این روش برای بررسی تعداد نسخه‌های ژنی آلفا و بتاگلوبین و دیگر ژن‌ها عملی است (۱۶). با این وجود هنوز یک ارتباط مستقیم میان تعداد نسخه‌های ژنی و مقدار محصول واکنش اثبات نشده است. بنابراین استفاده از کیت تجاری MLPA تنها می‌تواند به عنوان یک روش نیمه کمی مطرح باشد و نمی‌توان از آن به عنوان یک جایگزین برای روش‌های مبتنی بر Real-time PCR نام برد (۲۲). هم چنین جداسازی محصولات تکثیر شده توسط الکتروفورز موئین به کمک دستگاه توالی‌یابی و صرف زمان و هزینه زیاد و دقت کمتر نسبت به آن چه که در آنالیز Real-time PCR وجود دارد، از نقاط ضعف روش MLPA محسوب می‌شود.

در مطالعه حاضر وجود حذف‌های شناخته شده که توسط روش Gap PCR تشخیص داده شده بودند، به کمک روش Real-time PCR با موفقیت شناسایی گردیدند. هم چنین با استفاده از این روش امکان تشخیص حذف‌های ناشناخته که توسط روش‌های رایج مولکولی شناسایی

References :

- 1- Thein SL. Genetic modifiers of the beta-haemoglobinopathies. *Br J Haematol* 2008; 141(3): 357-66.
- 2- Trent RJ. Diagnosis of the haemoglobinopathies. *Clin Biochem Rev* 2006; 27(1): 27-38.
- 3- Thein SL. Genetic modifiers of beta-thalassemia. *Haematologica*. 2005; 90(5): 649-60.
- 4- Abolghasemi H, Amid A, Zeinali S, Radfar MH, Eshghi P, Rahiminejad MS, *et al.* Thalassemia in Iran: epidemiology, prevention, and management. *J Pediatr Hematol Oncol* 2007; 29(4): 233-8.
- 5- Dover GJ, Valle D. Therapy for beta-thalassemia--a paradigm for the treatment of genetic disorders. *N Engl J Med* 1994; 1: 331(9): 609-10.
- 6- Craig JE, Barnetson RA, Prior J, Raven JL, Thein SL. Rapid detection of deletions causing delta beta thalassemia and hereditary persistence of fetal hemoglobin by enzymatic amplification. *Blood* 1994; 83(6): 1673-82.
- 7- Damgaard D, Nissen PH, Jensen LG, Nielsen GG, Stenderup A, Larsen ML, *et al.* Detection of large deletions in the LDL receptor gene with quantitative PCR methods. *BMC Med Genet* 2005; 6: 15.
- 8- White SJ, Sterrenburg E, van Ommen GJ, den Dunnen JT, Breuning MH. An alternative to FISH: detecting deletion and duplication carriers within 24 hours. *J Med Genet* 2003; 40(10): 113.
- 9- White SJ, Vink GR, Kriek M, Wuyts W, Schouten J, Bakker B, *et al.* Two-color multiplex ligation-dependent probe amplification: detecting genomic rearrangements in hereditary multiple exostoses. *Hum Mutat* 2004; 24(1): 86-92.
- 10- Hartevelde CL, Voskamp A, Phylipsen M, Akkermans N, den Dunnen JT, White SJ, *et al.* Nine unknown rearrangements in 16p13.3 and 11p15.4 causing alpha- and beta-thalassaemia characterised by high resolution multiplex ligation-dependent probe amplification. *J Med Genet* 2005; 42(12): 922-31.
- 11- Barragan E, Bolufer P, Perez ML, Prieto F, Sanz MA. Molecular detection of Spanish deltabeta-thalassemia associated with beta-thalassemia identified during prenatal diagnosis. *Clin Chim Acta* 2006; 368 (1-2): 195-8.
- 12- Clark BE, Thein SL. Molecular diagnosis of haemoglobin disorders. *Clin Lab Haematol* 2004 ; 26 (3) : 159-76.
- 13- Ruiz-Ponte C, Carracedo A, Barros F. Duplication and deletion analysis by fluorescent real-time PCR-based genotyping. *Clin Chim Acta* 2006; 363(1-2): 138-46.
- 14- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25(4): 402-8.
- 15- Vaerman JL, Saussoy P, Ingargiola I. Evaluation of real-time PCR data. *J Biol Regul Homeost Agents* 2004; 18(2): 212-4.
- 16- Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 2002; 30(12): 57.
- 17- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16(3): 1215.
- 18- Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques* 2005; 39(1): 75-85.
- 19- Ponchel F, Toomes C, Bransfield K, Leong FT, Douglas SH, Field SL, *et al.* Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: an alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnol* 2003; 3: 18.
- 20- Liu J, Yan M, Wang Z, Wang L, Zhou Y, Xiao B. Molecular diagnosis of alpha-thalassemia by combining real-time PCR with SYBR Green1 and dissociation curve analysis. *Transl Res* 2006; 148(1): 6-12.
- 21- Raca G, Buiting K, Das S. Deletion analysis of the imprinting center region in patients with Angelman syndrome and Prader-Willi syndrome by real-time quantitative PCR. *Genet Test* 2004; 8(4): 387-94.
- 22- Shadrina MI, Semenova EV, Slominsky PA, Bagyeva GH, Illarioskin SN, Ivanova S. Effective quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of the parkin gene (PARK2) exon 1-12 dosage. *BMC Med Genet* 2007; 8: 6.

Accurate detection of unknown deletions in beta-Globin gene cluster in beta thalassemia carriers using Real-time PCR and MLPA

Babashah S.^{1,2}(MS), Jamali S.²(MS), Mahdian R.²(PhD), Hayat Nosaeid M.²(MS), Karimipoor M.²(MD), Maryami F.²(PhD), Raeisi M.³(MS), Alimohammadi R.^{1,3}(MS), Zeinali S.^{2,3}(PhD)

¹Department of Biology, Faculty of Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

²Department of Molecular Medicine, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute, Tehran, Iran

³Kawsar Human Genetic Research Center, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives

Although beta thalassemia is mainly caused by mutations involving single base substitutions and small deletions, there have been reports showing deletions of large regions of beta- globin genes play a similar causing role. The strategy to identify beta thalassemia carriers with known deletions is based on PCR techniques such as Gap PCR. There are however some unknown deletions that can not be detected by the above methods. To overcome this limitation, Real-time PCR and MLPA were developed as two quantitative assays for analysis of beta-globin gene cluster.

Materials and Methods

The subjects were evaluated in a case-control study. Among individuals referred to genetic laboratories of Pasteur Institute of Iran and Kawsar Genetic Research Center, 40 were suspected of having a large deletion in β -globin gene cluster. The including criteria were hematological findings such as low blood indices (MCV <80 fl and MCH <27 pg), normal HbA2 and raised or normal HbF. Genomic DNA was extracted from peripheral blood. A Real-time PCR assay was developed using comparative threshold cycle (Ct) method for analysis of gene copy number. In addition, gene dosage was analyzed using MLPA method.

Results

Real-time PCR results for quantitative analysis of Beta, Delta, G-gamma genes showed the ratio ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) of 0.96 ± 0.18 for normal individuals and 0.58 ± 0.04 for carriers of deletions in beta globin gene cluster. MLPA results showed nearly 50% reduction in the height of the peaks corresponding to regions of deletions.

Conclusions

MLPA results confirmed the presence of the same deletions detected by Real-time PCR in all of the carrier individuals. It would be ideal to combine these quantitative assays to confirm corresponding results for accurate diagnosis of known and unknown deletions in beta thalassemia carriers.

Key words: beta-Thalassemia, beta-Globins, Gene Deletion
SJIBTO 2009; 5(4): 225-235

Received: 14 Sep 2008

Accepted: 1 Feb 2009

Correspondence: Zeinali S., Department of Molecular Medicine, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute. P.O.Box: 13185-1667, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 66480780; Fax : (+9821) 66480780
E-mail: siruszeinali@yahoo.com