

بررسی فراوانی پلی مورفیسم جایگاه SspI در اینترون II ژن بتا گلوبین در استان مازندران

هاله اخوان نیای (Ph.D.)⁺*

سیامک شفیق زاده (M.D.)^{**}

بهشته اصغری (B.Sc.)^{***}

علی بنی هاشمی (B.Sc.)^{***}

ماندانا عزیزی (B.Sc.)^{***}

چکیده

سابقه و هدف: با توجه به میزان تولد سالانه تالاسمی ماژور در کشور، پیشگیری از این بیماری از طریق تشخیص پیش از تولد از اولویت‌های بهداشتی است. در ایران در ۲۰-۱۰ درصد افراد ناقل تالاسمی، جهش ژنی ناشناخته باقی می‌ماند. در چنین مواردی بررسی پیوستگی ژنی با استفاده از جایگاه‌های چند شکلی داخل یا نزدیک ژن برای ردیابی کروموزوم حامل جهش یا طبیعی، جهت تشخیص پیش از تولد، قابل انجام است. جایگاه SspI که برای اولین بار در ایران مورد بررسی قرار می‌گیرد، داخل اینترون II ژن بتا گلوبین قرار دارد. هدف این مطالعه تعیین فراوانی چند شکلی این جایگاه در جمعیت استان مازندران می‌باشد.

مواد و روش‌ها: خون محیطی ۲۱۱ فرد ناقل تالاسمی ساکن استان مازندران تهیه شد. پس از استخراج DNA و تکثیر ناحیه ژنی بتا گلوبین حاوی جایگاه چند شکلی SspI با استفاده از روش واکنش زنجیره پلی مرز (PCR)، اثر آنزیم SspI با استفاده از ژل آگاروز ارزیابی شد.

یافته‌ها: از ۴۲۲ کروموزوم بررسی شده، ۲۰/۶ درصد برای جایگاه SspI منفی بود. جایگاه‌های منفی تقریباً به میزان برابر با آلل‌های سالم و جهش یافته همراه بودند (۱۱/۹ درصد و ۱۴/۳ درصد).

استنتاج: از بررسی جایگاه SspI برای ردیابی کروموزوم‌های حاوی آلل سالم و جهش یافته ژن بتا گلوبین می‌توان استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: تالاسمی، بتا گلوبین، پلی مورفیسم، SspI، مازندران

مقدمه

تالاسمی در اثر کاهش ساخت یکی از زنجیره‌های گلوبین ایجاد می‌شود. بررسی انواع جهش‌ها در ژن‌های گلوبین و تنوع ترکیب هموگلوبین اجازه تقسیم‌بندی تالاسمی‌ها را به دو گروه اصلی آلفا (α) و بتا (β) داده

تالاسمی شایع‌ترین اختلال تک‌ژنی در دنیا می‌باشد به طوری که حدود ۷ درصد جمعیت جهان و در ایران به طور متوسط ۵ درصد (حدود ۳ میلیون نفر) ناقل این بیماری هستند (۱-۳).

* متخصص بیولوژی سلولی و ژنتیک، عضو هیأت علمی (استادیار) دانشگاه علوم پزشکی بابل
✉ مؤلف مسئول: بابل-امیر کلا، آزمایشگاه ژنتیک بیمارستان کودکان امیر کلا
** پزشک عمومی، *** کارشناس ژنتیک بیمارستان کودکان امیر کلا بابل

تاریخ دریافت: ۸۵/۵/۲۴ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۸۵/۸/۲۷ تاریخ تصویب: ۸۶/۲/۱۲

روش های متداول آزمایشگاهی مانند چند شکلی ساختار فضایی تک رشته ای SSCP^۳ یا الکتروفورز ژل با تغییر ماهیت گرادیان DGGE^۴ یا بررسی پیوستگی ژنی با استفاده از چند شکلی یک جایگاه خاص نزدیک یا داخل آن ژن در فرد ناقل و افراد خانواده وی استفاده می شود (۱۴-۱۰).

پلی مورفیسم (Polymorphism) به تفاوت های موجود در توالی های ژنوم افراد جمعیت اطلاق می شود. به طور متوسط ۲ نوکلئوتید از هر ۱۰۰۰ نوکلئوتید در ژنوم دو نفر با یکدیگر فرق دارند. اگر نقطه چند شکلی توسط آنزیم محدود کننده خاصی قابل شناسایی و برش باشد می توان با تکثیر بخشی از DNA که حاوی توالی قابل شناسایی توسط آن آنزیم باشد و اثر دادن آنزیم مربوطه بر روی آن، وجود یا عدم وجود این جایگاه چند شکلی را نشان داد. به دست آمدن قطعات DNA با طول های متفاوت به دنبال اثر یک آنزیم محدود کننده به خصوص بر روی چند شکلی یک توالی را پلی مورفیسم طول قطعات محدود کننده یا RFLP^۵ گویند.

در اطراف ژن بتا گلوبین تا کنون حداقل ۱۸ RFLP متفاوت شناسایی شده است (۱۷-۱۵). اکثر این جایگاه ها هم در جمعیت ایرانی از پلی مورفیسم کمی برخوردارند و هم از ژن بتا گلوبین فاصله دارند. با توجه به وجود یک نقطه گرم برای وقوع نوترکیبی (hot spot for recombination) در نزدیکی انتهای ۵' ژن بتا گلوبین (۱۹،۱۸) احتمال نوترکیبی و اشتباه در تشخیص آلل جهش یافته با بررسی پیوستگی ژنی وجود دارد (۲۰). احتمال خطا با استفاده از نشانه های داخل ژن بتا گلوبین در صورت چند شکلی بودن آن ها کم تر خواهد بود. اما تا کنون تنها یک جایگاه با چند شکلی قابل توجه در داخل ژن بتا گلوبین در جمعیت ایرانی گزارش

است. ژن های α و β به ترتیب بر روی اتوزوم های ۱۶ و ۱۱ واقع شده اند و از نظر ژنتیکی ساختمانی بسیار مشابه دارند. همه این ژن ها دارای ۳ اگزون و ۲ اینترون می باشند.

با توجه به این که تولد یک فرزند مبتلا به تالاسمی ماژور سبب مشکلات جسمی و روحی برای فرد مبتلا و خانواده او و همچنین هزینه های درمانی بسیار و عوارض اقتصادی و اجتماعی خواهد شد، پیشگیری از تولد یک نوزاد مبتلا می تواند بهترین روش جلوگیری از وقوع این مشکلات باشد. در حال حاضر ۱۰ درصد جمعیت شمال کشور ناقل تالاسمی بوده و در صورت عدم پیشگیری از تولد نوزاد تالاسمی ماژور انتظار می رود سالانه ۱۵۰ مورد تولد جدید تالاسمی ماژور در استان مازندران اتفاق افتد. این در حالی است که تنها راه های پیشگیری از تالاسمی ماژور انصراف زوج های ناقل از ازدواج با یکدیگر و یا در صورت ازدواج، تشخیص پیش از تولد با استفاده از روش های مولکولی و سقط جنین مبتلا به این بیماری می باشد.

با وجود این که بر اساس آزمایش های مولکولی ۲۰۰ جهش متفاوت به ژن بتا گلوبین نسبت داده شده است، در اکثر مناطق جهان، ۱۰-۶ جهش بیش از ۹۵ درصد آلل های جهش یافته را شامل می شود (۴).

در کشور ایران به دلیل گوناگونی جمعیت ناشی از مهاجرت ها و سلطه اقوام متفاوت در طول تاریخ، جهش های زیادی گزارش گردیده است. طبق بررسی های به عمل آمده بیش از ۴۰ جهش متفاوت در ژن بتا گلوبین در جمعیت ایران، گزارش شده است (۹-۳، ۵). اما هنوز در برخی از مناطق ایران جهش در ۲۰-۱۰ درصد افراد تالاسمی مینور ناشناخته باقی مانده و در نتیجه تشخیص مولکولی با روش معمول آزمایشگاهی مانند روش سیستم تکثیر حساس به جهش ARMS^۱ یا لکه نقطه ای معکوس RDB^۲ میسر نمی باشد در چنین مواردی از

3. Single Strand Conformation Polymorphism
4. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
5. Restriction Fragment Length Polymorphism

1. Amplification Refractory Mutation System
2. Reverse Dot Blot

بتا تالاسمی به کار رود. در این مطالعه خون محیطی ۲۱۱ فرد ناقل تالاسمی ساکن استان مازندران تهیه شد. برای هر نمونه خون پس از استخراج DNA ناحیه ژنی بتا گلوبین که حاوی جایگاه چندشکلی SspI می باشد ابتدا تکثیر شد و سپس تحت تاثیر آنزیم SspI قرار گرفت، و نتیجه اثر آنزیم پس از انجام الکتروفورز بر روی ژل آگارز ارزیابی گردید.

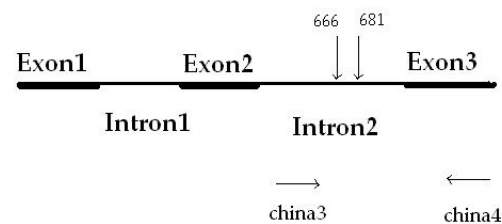
مواد و روش ها

۱- نمونه های DNA: بعد از جمع آوری نمونه خون ۲۱۱ فرد ناقل تالاسمی که طی سه نسل متمادی در استان مازندران متولد شده اند، و اعضای خانواده آنها در صورت وجود، DNA به روش تخریب قلیایی (Alkaline Lysis) استخراج گردید.

۲- تکثیر DNA به روش واکنش زنجیره ای پلی مرارز (PCR): بخشی از اگزون ۳ و اینترون ۲ ژن بتا گلوبین توسط پرایمرهای China 3 و China 4

China 3: 5' GT GTACA CATATT GAC CAAA 3'
China 4: 5' TT GCA CGA CCA GAC ACA CGA 3'
(جایگاه پرایمرهای China 3 و China 4 در اینترون ۲ و اگزون ۳ ژن بتا گلوبین در شکل شماره ۱ نشان داده شده است.) با استفاده از دستگاه حرارتی Techgene از کمپانی انگلستان تکثیر شد. شرایط تکثیر DNA بدین شرح است: ۹۵ درجه سانتیگراد ۴ دقیقه، ۹۵ درجه سانتیگراد ۲ دقیقه، ۵۴ درجه سانتیگراد ۳ دقیقه و ۷۲ درجه سانتیگراد ۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه در دو بار سپس ۳۷ بار ۹۵ درجه سانتیگراد یک دقیقه، ۵۴ درجه سانتیگراد یک دقیقه، ۷۲ درجه سانتیگراد یک دقیقه و ۳۰ ثانیه و نهایتاً ۷۲ درجه سانتیگراد ۱۰ دقیقه. صحت تکثیر DNA به طول ۴۲۲ جفت باز بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد کنترل گردید.

گردیده است (جایگاه AvaII در اینترون II ژن بتا گلوبین). بررسی های اولیه انجام شده در جمعیت مدیترانه ای و آفریقایی نشان می دهد که یک جایگاه چند شکلی در نوکلئوتید ۶۶۶ در اینترون II ژن بتا گلوبین وجود دارد که توسط آنزیم محدود کننده SspI قابل تشخیص است (۲۱،۱۲) (شکل شماره ۱). در نتیجه در صورت چند شکلی بودن این جایگاه در جمعیت استان مازندران، می توان از این جایگاه برای تشخیص قبل از تولد تالاسمی با بررسی پیوستگی ژنی استفاده کرد.



شکل شماره ۱: موقعیت جایگاه SspI در اینترون II ژن بتا گلوبین و جایگاه پرایمرهای China3 و China4

آنزیم SspI توالی AAT[^]ATT را شناسایی می کند. در صورت وجود این توالی و برش، آن را با علامت + و در صورت فقدان آن و تبدیل توالی مخصوص SspI به توالی AAT GTT به دلیل جهش در نوکلئوتید ۶۶۶، آنرا با علامت - نشان می دهند.

هدف از انجام این مطالعه که برای اولین بار در ایران انجام شده است، تعیین فراوانی چند شکلی جایگاه مخصوص آنزیم SspI در استان مازندران بوده است تا در صورتی که فراوانی این چند شکلی بالاتر از ۱۰ درصد باشد، به عنوان یک روش مناسب در بررسی پیوستگی ژنی جهت پیشگیری قبل از تولد بیماری

این نتایج نشان می‌دهد که ۲۰ آلل طبیعی (۱۱/۹ درصد) و ۲۴ آلل جهش یافته (۱۴/۳ درصد) دارای جایگاه SspI- هستند.

جدول شماره ۱: فراوانی جایگاه های + و - SspI در افراد ناقل بتا تالاسمی ساکن استان مازندران

جایگاه	تعداد (درصد)
+	۳۳۵ (۷۹/۴)
-	۸۷ (۲۰/۶)
جمع	۴۲۲ (۱۰۰)

جدول شماره ۲: توزیع جایگاه های + و - SspI در میان آلل های سالم و جهش یافته در افراد ناقل بتا تالاسمی در استان مازندران

جایگاه	تعداد (درصد)	
	آلل سالم	آلل جهش یافته
+	۱۴۸ (۸۸/۱)	۱۴۴ (۸۶/۷)
-	۲۰ (۱۱/۹)	۲۴ (۱۴/۳)
جمع	۱۶۸ (۱۰۰)	۱۶۸ (۱۰۰)

بحث

این مطالعه اولین گزارش از فراوانی چند شکلی جایگاه SspI در جمعیت ایرانی و به طور خاص در استان تالاسمی خیز مازندران است. نتایج بر روی ۴۲۲ کروموزوم (۲۱۱ کروموزوم طبیعی و ۲۱۱ کروموزوم دارای جهش در ژن بتا گلوبین) نشان می‌دهد که فراوانی چند شکلی جایگاه SspI ۲۰/۶ درصد است. توزیع جایگاه های + و - میان آلل های سالم و جهش یافته حاکی از این امر است که جایگاه منفی تقریباً به میزان مشابهی با آلل های سالم و جهش یافته همراه است. به ترتیب ۱۱/۹ درصد و ۱۴/۳ درصد. در تنها مطالعه‌ای که توسط براون (Braun) و همکارانش (۱۹۹۵) بر روی جمعیت های آفریقایی و مدیترانه‌ای انجام گرفت فراوانی چند شکلی در جایگاه SspI حدود ۱۴ درصد گزارش

۳- اثر آنزیم: DNA تکثیر شده به روش PCR تحت تاثیر ۱۰ واحد آنزیم SspI در حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفت و پس از ۲۴ ساعت نتیجه اثر آنزیم بر روی ژل آگاروز ۳ درصد بررسی شد. موقعیت جایگاه SspI در اینترون II ژن بتا گلوبین در شکل شماره ۱ نشان داده شده است.

در صورت برش جایگاه پلی مورفیک توسط آنزیم SspI طول قطعات مورد انتظار ۲۰۰، ۱۶، ۲۰۶ جفت باز خواهد بود و در صورت عدم برش آن جایگاه توسط آنزیم، طول قطعات حاصله ۲۱۶ و ۲۰۶ جفت باز خواهد بود.

یافته ها

۱) فراوانی چند شکلی:

۴۲۲ کروموزوم متعلق به ۲۱۱ ناقل بتا تالاسمی ساکن استان مازندران بررسی شد. ۱۲۷ نفر (۲۵۴ کروموزوم در جایگاه SspI) ژنوتیپ +/، ۸۱ نفر (۱۶۲ کروموزوم) ژنوتیپ +/- و ۳ نفر (۶ کروموزوم) ژنوتیپ -/- داشتند. جدول شماره ۱ فراوانی جایگاه های + و - SspI را نشان می‌دهد. نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که فراوانی جایگاه های + و - SspI به ترتیب ۷۹/۴ درصد و ۲۰/۶ درصد در جمعیت مورد مطالعه می‌باشد.

۲) توزیع جایگاه های + و - در میان آلل های سالم و جهش یافته:

به دلیل در دست نداشتن نمونه خون افراد همه خانواده‌ها، تنها در ۱۶۸ نفر از ۲۱۱ فرد مطالعه شده، اختصاص جایگاه + یا - به آلل جهش یافته یا سالم با بررسی پیوستگی ژنی در خانواده امکان پذیر بود. نتایج بررسی پیوستگی ژنی بین آلل سالم یا جهش یافته در جایگاه SspI در جدول شماره ۲ مشخص گردیده،

خواهد بود. پلی مورفیسم حدود ۱۰ درصد یا بیش تر، از ارزش مناسبی جهت بررسی و ردیابی یک آلل به خصوص برخوردار است. مسأله دیگر در انتخاب چند شکلی یک جایگاه در بررسی پیوستگی ژنی برای تشخیص بیماری‌ها، محل آن جایگاه است. زیرا هر چه جایگاه مورد نظر از محل جهش، فاصله بیش تری داشته باشد، احتمال نوترکیبی هنگام تقسیم میوز و انتقال آن جایگاه به روی کروموزوم همتای خود و در نتیجه اشتباه در تجزیه و تحلیل داده‌ها افزایش خواهد یافت (۲۰). از آنجا که اکثر جایگاه‌های چند شکلی خانواده ژنی بتاگلوبین خارج از ژن بتا گلوبین واقع شده‌اند و در نتیجه احتمال نوترکیبی وجود دارد و نیز برخی از آن‌ها از فراوانی کمی برخوردارند (۲۴، ۲۵)، شناسایی و استفاده از جایگاه‌های داخل ژنی با افزایش چند شکلی در ژنوم افراد یک جمعیت خاص، ایده‌آل خواهد بود.

با توجه به این که تا کنون تنها یک جایگاه با چند شکلی قابل توجه در داخل ژن بتا گلوبین در جمعیت ایرانی مورد توجه و بررسی قرار گرفته است (جایگاه AvaII در اینترون III)، بررسی و تعیین فراوانی چند شکلی دیگر جایگاه‌های داخل ژنی مانند SspI ضروری به نظر می‌رسید. به علاوه هزینه بالای آنزیم محدود کننده AvaII در مقایسه با سایر آنزیم‌های محدود کننده معمول در بررسی پیوستگی ژنی، عملاً استفاده از جایگاه AvaII را محدود نموده است. با توجه به فراوانی پلی مورفیسم ۲۰ درصدی و هزینه کم تر آنزیم (SspI نصف هزینه آنزیم AvaII)، چند شکلی جایگاه SspI واقع در اینترون II ژن بتا گلوبین، جایگاه مناسبی برای بررسی ژنوتیپ در روش غیر مستقیم (RFLP) است. همچنین از آنجا که فراوانی جایگاه SspI منفی در جمعیت ساکنان استان مازندران در هر دو نوع آلل: طبیعی و بتا تالاسمی، بیش از ۱۰ درصد است، جایگاه SspI منفی نشانه مناسبی برای تعقیب هر دو نوع آلل

شده است (۲۱) اما در این مطالعه به دلیل نداشتن نمونه ژنوم سایر افراد خانواده، اختصاص جایگاه‌های SspI مثبت و SspI منفی به آلل سالم یا جهش یافته انجام نگرفت. در خصوص فراوانی این چند شکلی در جمعیت هندی یا آسیایی هیچ اطلاعی وجود ندارد. با توجه به شیوع تالاسمی در ایران و جهان و این که تولد یک فرزند مبتلا به تالاسمی مازور سبب مشکلات جسمی و روحی برای فرد مبتلا و خانواده او می‌شود و همچنین هزینه‌های درمانی سنگینی را بر کل جامعه وارد می‌آورد، پیشگیری از تولد یک نوزاد مبتلا می‌تواند بهترین روش برای جلوگیری از بروز این گونه مشکلات می‌باشد (۲۲).

کم هزینه‌ترین و آسان‌ترین راه پیشگیری از تولد فرد تالاسمی مازور انصراف زوج‌های ناقل تالاسمی از ازدواج با یکدیگر است. اما با توجه به شیوع بالای افراد تالاسمی مینور در استان مازندران (۱۰ درصد جمعیت) و کاهش انصراف از ازدواج در میان زوج‌های ناقل به دلیل افزایش امکانات شبکه آزمایشگاهی کشوری تشخیص پیش از تولد تالاسمی (۲۳)، لازم است امکانات و روش‌های تشخیص جهش در زوج‌های ناقل تالاسمی و فرزندان آینده آنان افزایش یابد. از آنجا که طبق بررسی‌های انجام شده، تشخیص مستقیم جهش ژنی بین ۲۰-۱۰ درصد موارد در کشور امکان‌پذیر نمی‌باشد (۳، ۶، ۷)، باید علاوه بر روش مستقیم تشخیص جهش از روش‌های غیر مستقیم مانند بررسی پیوستگی ژنی با استفاده از چند شکلی طول قطعات محدود کننده (RFLP) نیز سود جست. لازمه استفاده از این روش، شناخت قبلی چند شکلی جایگاه‌های داخل یا نزدیک ژن مورد مطالعه و گویا بودن آن جایگاه برای خانواده درگیر بیماری است. مسلماً هرچه فراوانی چند شکلی یک جایگاه در جمعیتی بیش تر باشد (حداکثر ۵۰ درصد)، احتمال قابل استفاده بودن آن جایگاه در مطالعه پیوستگی ژنی در یک خانواده درگیر بیماری بیش تر

می‌توان با بررسی چند شکلی جایگاه SspI در ۲۰ درصد موارد ژنوتیپ جنین را مشخص نمود و هم در مواقعی که نوع جهش والدین مشخص گردیده، می‌توان از بررسی چند شکلی جایگاه SspI به عنوان یک روش تکمیلی برای تایید ژنوتیپ جنین استفاده کرد.

می‌باشد. به علاوه نظر به اهمیت دقت تشخیص در آزمایش‌های تشخیص پیش از تولد و حدود ۳ در هزار احتمال بروز خطای انسانی یا آزمایشگاهی (۲۰،۲۶) توصیه می‌شود ترجیحا از دو روش متفاوت در تعیین ژنوتیپ جنین استفاده شود. لذا هم در مواقعی که تعیین جهش ژن بتا گلوبین با روش‌های معمول قابل شناسایی نیست

فهرست منابع

- 1- Forget B.G, Higgs D.R, Steinberg M, Nagel R.L. *Disorders of Hemoglobin: Genetics, Pathophysiology and Clinical Management*. Cambridge, Cambridge University Press, 2001.
- 2- Weatherall DJ, Clegg JB. *The thalassaemia syndromes*. Oxford: Blackwell Science, 2001.
- 3- Najmabadi H, Karimi-Nejad R, Sahebjam S, Pourfarzad F, Teimourian S, Sahebjam F, Amirizadeh N, Karimi-Nejad MH. The beta-thalassaemia mutation spectrum in the Iranian population. *Hemoglobin*. 2001; 25(3): 285-96.
- 4- Hardison R.C, Chui D.H, Giardine B, Riemer C, Patrinos G.P, Anagnou N, Miller W, Wajcman H. HbVar: A relational database of human hemoglobin variants and thalassaemia mutations at the globin gene server. *Hum. Mutat*, 2002; 19: 225-233.
- 5- Noori-Dalooi MR, Moazami N, Farhangi S, Atalay A, Geren IN, Akar L, Atalay EO, Cirakoglu B, Bermek E. Beta-thalassaemia in Iran: a high incidence of the nonsense codon 39 mutation on the island of Queshm. *Hemoglobin*. 1994; 18(6): 449-53.
- 6- Merat A, Haghshenas M, Pour ZM, Plonczynski MW, Harrell AN, Coleman MB, Steinberg MH. Beta-thalassaemia in southwestern Iran. *Hemoglobin*. 1993; 17(5): 427-37.
- 7- Nozari G, Rahbar S, Golshaiyzan A, Rahmanzadeh S. Molecular analyses of beta-thalassaemia in Iran. *Hemoglobin*. 1995; 19(6): 425-31.
- 8- Yavarian M, Hartevelde CL, Batelaan D, Bernini LF, Giordano PC. Molecular spectrum of beta-thalassaemia in the Iranian Province of Hormozgan. *Hemoglobin*. 2001; 25(1): 35-43.
- 9- Najmabadi H, Pourfathollah AA, Neishabury M, Sahebjam F, Krugluger W, Oberkanins C. Rare and unexpected mutations among Iranian beta-thalassaemia patients and prenatal samples discovered by reverse-hybridization and DNA sequencing. *Haematologica*. 2002; 87(10): 1113-4.
- 10- Kakavas KV, Noulas A, Chalkias C, Hadjichristodoulou C, Georgiou I,

- Georgatsou E, Bonanou S. Identification of the four most common beta-thalassemic patients and carriers by PCR-SSCP: advantages and limitations of the method. *J. Clin. Lab. Anal.* 2006; 20(1): 1-7.
- 11-Garewal G, Das R, Jaur J, Marwaha RK, Gupta I. Establishment of prenatal diagnosis for beta-thalassaemia: a step towards its control in a developing country. *Ann. Hum. Biol.* 2005; 32(2): 138-44.
- 12-Ghanem N, Girodon E, Vidaud M, Martin J, Fanen P, Plassa F, Goossens M. A comprehensive scanning method for rapid detection of beta-globin gene mutations and polymorphisms. *Hum. Mutat.* 1992; 1(3): 229-39.
- 13--Talmaci R, Traeger-Synodinos J, Kanavakis E, Coriu D, Colita D, Gavrila L. Scanning of beta-globin gene for identification of beta-thalassaemia mutation in Romanian population. *J. Cell. Mol. Med.* 2004; 8(2): 232-40.
- 14-Prmoonjago P, Harahap A, Taufani RA, Setianingsih I, Marzuki S, Harahap A. Rapid screening for the most common beta thalassaemia mutations in south east Asia by PCR based restriction fragment length polymorphism analysis(PCR-RFLP). *J. Med. Genet.* 1999; 36(12): 937-8.
- 15-Orkin SH, Kazazian HH Jr, Antonarakis SE, Goff SC, Boehm CD, Sexton JP, Waber PG, Giardina PJ. Linkage of beta-thalassaemia mutations and beta-globin gene polymorphisms with DNA polymorphisms in human beta-globin gene cluster. *Nature.* 1982; 296(5858): 627-31.
- 16-Muralitharan S, Krishnamoorthy R, Nagel RL. Beta-lobin-like gene cluster haplotypes in hemoglobinopathies. *Methods Mol Med.* 2003; 82: 195-211.
- 17-Labie D, Elion J. Sequence polymorphisms of potential functional relevance in the beta-globin gene locus. *Hemoglobin.* 1996; 20(2): 85-101.
- 18-Old JM, Heath C, Fitches A, Thein SL, Jeffreys AJ, Petrou M, Modell B, Weatherall DJ. Meiotic recombination between two polymorphic restriction sites within the β globin gene cluster. *J. Med. Genet.* 1986; 23(1): 14- 18.
- 19-Smith RA, HO PJ, Clegg JB, Kidd JR, Thein SL. Recombination breakpoints in the human β -globin gene cluster. *Blood.* 1992; 92(11): 4415-4421.
- 20-Hall GW, Sampietro M, Barnetson R, Fitzgerald J, McCann S, Thein SL. Meiotic recombination in an Irish family with beta-thalassaemia. *Hum. Genet.* 1993; 92(1): 28-32.
- 21-Braun A, Ambach H, Bichlmaier R, Kammerer S, Roscher AA. Population study of a sequence polymorphism in intron 2 of the human beta-globin gene. *Hum. Genet.* 1995; 95(3): 352-352.
- 22-Abolghassemi H, Amid A, Zeinali S, Radfar MH, Eshghi P, Rahiminejad MS,

- Ehsani MA, Najmabadi H, Akbari MT, Afrasiabi A, Akhavan-Niaki H, Hoorfar H. Thalassemia in Iran : Epidemiology, Prevention and Management, *J. Ped. Hemat. Onc.* 2007; 29(4): 233-238.
- 23--Samavat A, Modell B. Iranian national thalassaemia screening programme, *BMJ.* 2004; 329(7475): 1134-1137.
- 24-Fullerton SM, Harding RM, Boyce AJ, Clegg JB. Molecular and population genetic analysis of allelic sequence diversity at the human beta-globin locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1994; 91(5): 1805-9.
- 25-Bibi A, Messaoud T, Fattoum S. Haplotypes linked to three rare beta-thalassemia mutations, originally reported in Tunisia. *Hemoglobin.* 2006; 30(2): 175-81.
- 26--Old J, Petrou M, Varnavides L, Layton M, Modell B. Accuracy of prenatal diagnosis for haemoglobin disorders in the UK: 25 years' experience. *Prenat. Diagn.* 2000; 20(12): 986-91.