ژنتیک نوین
دوره دوازدهم، شماره ۱، بهار ۱۳۹۶
صفحه ۱۴۸ - ۱۴۳

بررسی واژگونی اینترون ۲۲ و مارکر *Hin*dIII در اینترون ۱۹ ژن فاکتور VIII انعقادی در بیماران هموفیل A

The study of intron 22 inversion and *Hin*dIII marker in inron 19 of FVIII gene in severe hemophilia A

سید رضا کاظمی‌نژاد*[۱]، هانیه نجفی[۱]، تینا شفاف[۱]، رضا علی‌بخشی[۲]

۱- به‌ترتیب دانشیار، کارشناس ارشد، دانشجوی دکتری، دانشگاه شهید چمران اهواز، دانشکده علوم گروه ژنتیک، اهواز

۲- دانشیار، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، دانشکده پزشکی گروه بیوشیمی بالینی، کرمانشاه

Kazemi Nezhad SR*[1], Najafy H[1], Shaffaf T[1], Alibakhshi R[2]

1- Associate Professor, MSc Student, PhD Student, Department of Genetics, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

2- Associate Professor, Department of Medical Biochemistry, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: kazemi_reza@scu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۵/۳/۲۳ - تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۰/۲۶)

چکیده

هموفیلی A یک بیماری وابسته به X مغلوب است که به‌دلیل نقص در فاکتور انعقادی VIII ایجاد می‌شود. واژگونی اینترون ۲۲ توسط روش‌های سادرن بلات و Long Distance-PCR و اخیراً توسط Inverse Shifting-PCR شناسایی شده‌است. هدف از انجام این مطالعه، بررسی روش جدید IS-PCR به‌منظور شناسایی جهش شایع Inversion-22 و بررسی میزان همراهی پلی‌مورفیسم C/T در اینترون ۱۹ در بیماران هموفیل شدید و افراد کنترل برای شناخت هاپلوتایپ‌ها می‌باشد. به این منظور ۴۰ مرد هموفیل شدید غیر خویشاوند و ۴۰ فرد سالم برای این آزمایش انتخاب شدند. نتایج آزمایش IS-PCR نشان داد که ۱۷ نفر از ۴۰ بیمار هموفیل شدید (۰/۴۲ درصد) دارای واژگونی در اینترون ۲۲ هستند. نتایج به دست آمده از همراهی پلی‌مورفیسم C/T نشان داد که هیچ‌گونه همراهی برای پلی‌مورفیسم C/T بین جمعیت بیمار و کنترل وجود ندارد. اینکه این نتایج می‌تواند به‌عنوان روش‌های تشخیصی استفاده شود یا نه، نیاز به بررسی بیش‌تر و توالی‌یابی قطعه تکثیر شده موتانت، تنظیم شرایط PCR و یا طراحی آغازگرهای جدید دارد. IS-PCR روشی قدرتمند و کم هزینه است که مدت زمان آزمایش را کاهش می‌دهد و می‌تواند جایگزین خوبی برای روش‌های قبلی باشد.

واژه‌های کلیدی

پلی‌مورفیسم
ژن *FVIII*
هموفیلی A
واژگونی در اینترون ۲۲
IS-PCR

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.1.15.5]

هموفیلی A(HA: OMIM 306700) یا نقص در فاکتور VIII انعقادی رایج ترین شکل ناهنجاری خونی است که یک در هر ۵۰۰۰ مرد و یک در هر ۱۰۰۰۰ زن رخ می دهد (Hedner et al. 2000). این بیماری یک اختلال وابسته به X مغلوب است که توسط موتاسیون در ژن *فاکتور VIII* (*FVIII*) ایجاد می‌شود (Renault et al. 2007). ژن *FVIII*، تنها ژن مرتبط با هموفیلی A، در انتهای دور بازوی بلند کروموزم X (Xq28) قرار دارد و ۱۸۶کیلو باز از DNA ژنومی را در بر می گیرد (Husain 2009). یکی از مارکرهای رایج در ژن *FVIII* که توسط PCR و برش با آنزیم شناسایی شد، مارکر *Hin*dIII در اینترون ۱۹ (G/A) بود (Graham et al. 1990). کروموزوم X شامل سه کپی از *F8A* است که یکی از آن‌ها در اینترون ۲۲ (int-22h-1) و دوتای دیگر (int-22h-2 و int-22h-3) نزدیک تلومر و با فاصله حدود 500 kb بالادست منطقه شروع رونویسی ژن *FVIII* قرار دارند. (Freije and Schlessinger 1992). جهش واژگونی اینترون ۲۲ در ژن *FVIII*، معمولاً از طریق نوترکیبی درون کروموزومی بین توالی واقع در اینترون ۲۲ (int-22h-1) و یکی از کپی های این توالی (int-22h-2 یا int-22h-3) رخ می‌دهد (Antonarakis et al. 1995). هدف از انجام این مطالعه بررسی روش IS-PCR برای شناسایی جهش شایع واژگونی اینترون ۲۲ و بررسی همراهی مارکر پلی‌مورفیسم C/T در اینترون ۱۹ در جمعیت نرمال و بیمار هموفیل شدید می‌باشد.

نمونه‌گیری از ٤٠ مرد هموفیل شدید غیر خویشاوند و دارای پرونده ثبت شده هموفیلی در بیمارستان محمد کرمانشاهی شهرستان کرمانشاه انجام شد و از ٤٠ نمونه ی DNA افراد مذکر غیر خویشاوند بومی به عنوان کنترل استفاده شد. ۱۰-۵ میلی‌لیتر از خون محیطی بیمار گرفته و در داخل یک فالکون حاوی EDTA ریخته شد. استخراج DNA با روش فنل-کلروفرم صورت گرفت (Miller et al. 1998). برای تجزیه و تحلیل اینترون ۲۲ از روش ذکر شده در تحقیقات Rossetti et al. (2011) استفاده شد. ابتدا DNA ژنومیک به‌صورت حلقوی در آورده شد، سپس IS-PCR روی آن انجام گرفت. هضم آنزیمی توسط کیت (Fermentase Canada) انجام گرفت. برای تهیه DNA حلقوی ۳µg-۰/۵ از DNA ژنومی همراه با ۲۰µL-۱٦ آب دوبار تقطیر و ۲µL-۰/۵ از *Bcl*I در دمای ۵۵°C به‌مدت ۵-٤ ساعت در بن ماری قرار گرفت. سپس قطعات DNA هضم شده توسط آنزیم *Bcl*I با آنزیم T4-DNA Ligase به یکدیگر نزدیک شدند و DNA حلقوی تشکیل شد. در این مرحله از ۵۰ng-۱۰ از DNA خطی، ۵۰µL آب دو بار تقطیر، پنج واحد T_4 DNA ligase و ۵µL از 10X T_4 DNA ligase buffer استفاده شد. محصول روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز و نتایج قابل قبولی مشاهده شد. از DNA حاصل به‌عنوان الگو برای انجام PCR استفاده شد.

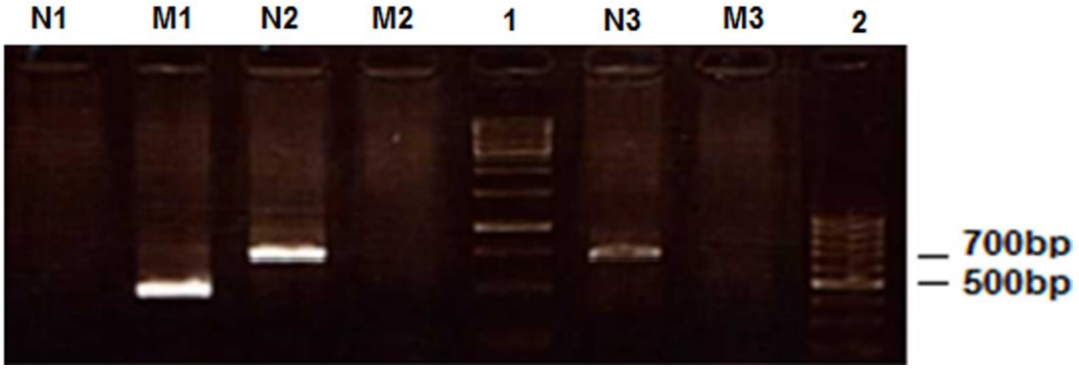
واکنش IS-PCR با استفاده از مواد اولیه طبق پروتکل ارائه شده توسط Roozafzay et al. (2013) با آغازگرهای ID و IU آغازگرهای نرمال، 2U و 3U آغازگرهای موتانت (جدول ۱)، در دستگاه ترموسایکلر گرادیانت مدل applied biosystems (AB) انجام شد. در ادامه، توالی‌های تکثیر شده در IS-PCR توالی‌یابی شدند. مواد وارد شده در واکنش PCR برای بررسی مارکر C/T در اینترون ۱۹ شامل ۲ تا ٤ میکرولیتر DNA ژنومی، یک میکرولیتر از آغازگرهای رفت و برگشت (شرکت Metabion، جدول ۱)، ۲/۵ میکرولیتر مخلوط dNTP (شرکت KBC)، دو میکرولیتر $MgCl_2$، ۲/۵ میکرولیتر بافر 10X و ۰/۲ میکرولیتر آنزیم Taq DNA پلیمراز (سیناژن، ایران)، ۱٦ تا ۱۸ میکرولیتر آب دوبار تقطیر در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر بود. تعیین ژنوتیپ‌های مورد نظر به روش چند شکلی طولی قطعه هضم شده (RFLP) صورت گرفت. به‌منظور تعیین ژنوتیپ‌های مورد نظر، محصول PCR در معرض اثر آنزیم *Hin*dIII قرار گرفت. در این مرحله یک میکرولیتر از آنزیم *Hin*dIII، دو میکرولیتر بافر R، سه میکرولیتر آب دو بار تقطیر استریل و ۲۰ میکرولیتر از محصول PCR استفاده شد. نتیجه حاصل پس از الکتروفورز روی ژل آگارز بر اساس وجود یا عدم وجود توالی اختصاصی برش آنزیم، که منجر به الگوی متفاوت باندها روی ژل می‌شود، برای تعیین ژنوتیپ هر نمونه مورد استفاده قرار گرفت و با استفاده از رگرسیون لجستیک،Odd Ratio و P-value برای هر ژنوتیپ سنجیده شد. در واکنش IS-PCR جهت تجزیه و تحلیل اینترون ۲۲، پس از انجام مراحل برش ژنوم با آنزیم و تهیه DNA حلقوی و در نهایت انجام PCR، قطعات تکثیر شده روی ژل ۱/۵ درصد الکتروفورز بارگذاری شدند (شکل ۱).

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.1.15.5]

جدول ۱- نام و توالی پرایمرهای استفاده شده در واکنش IS-PCR در بررسی اینترون‌های ۱۹ و ۲۲

اینترون ۲۲	آغازگرهای نرمال	ID (F): 5′-ACATACGGTTTAGTCACAAGT-3′ IU (R): 5′-CCTTTCAACTCCATCTCCAT-3′
	آغازگرهای موتانت	2U (R): 5′-ACGTGTCTTTTGGAGAAGTC-3′ 3U (R): 5′-CTCACATTGTGTTCTTGTAGTC-3′
اینترون ۱۹	آغازگر Forward	5′-GAGCATCTACATGCTGGGATG-3′
	آغازگر Reverse	5′-GTCCAGAAGCCATTCCCAG-3′



شکل ۱- الکتروفورز محصولات به‌دست آمده از PCR در روش IS-PCR بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد. N پرایمر نرمال و M پرایمر موتانت برای هر نمونه است (چاهک شماره ۱ مارکر Kb ۱ و چاهک ۲ مارکر bp ۱۰۰).

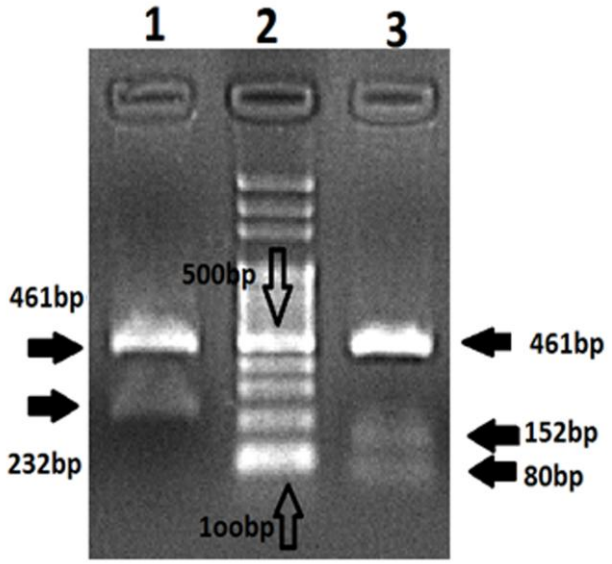
طول قطعات تکثیر شده با آغازگرهای نرمال (ID ,IU) حدود ۷۰۰bp و طول قطعه تکثیر شده با آغازگرهای موتانت (ID ,2U 3U) حدود bp ٤٥٠ مشاهده شد. قطعه ی دارای bp ۷۰۰ طول در سایت NCBI همتراز شد و مشاهده شد که توالی تکثیر شده ی bp ۷۰۰ با توالی تکثیر شده برای آغازگرهای ID وIU مطابقت داشت، اما قطعه bp ۷۰۰ حدود ۲۰۰ نوکلئوتید بزرگتر از توالی مورد انتظار به‌دست آمد. پس از بررسی در اطراف توالی تکثیر شده مشخص شد که برش ژنوم توسط *Bcl*I و اتصال قطعات برش خورده با آنزیم T4-DNA Ligase به درستی صورت گرفته و در نتیجه، محصولات به‌دست آمده از لحاظ صحت تکثیر توالی مورد نظر مشکلی نداشته و تنها دارای bp ۲۰۰ اضافه برای اتصال قطعه صحیح می‌باشد. میان بیماران هموفیل شدید مورد مطالعه، ۱۷ بیمار (۰/٤۲ درصد) واژگونی اینترون ۲۲ را نشان دادند. واکنش PCR برای بررسی پلی‌مورفیسم C/T در اینترون ۱۹ انجام گرفت. محصول تکثیر شده با آغازگرهای رفت و برگشت برای این پلی‌مورفیسم، bp ٦۹۳ طول داشت.

پس از هضم محصول PCR با آنزیم *Hin*dIII برای تعیین ژنوتیپ هر نمونه و با توجه به توالی جایگاه شناسایی آنزیم ژنوتیپ هر نمونه تعیین شد (شکل ۲). محصول PCR با طول bp ٦۹۳ دارای دو جایگاه برش بود، جایگاه برش اول در ژنوم همه ی افراد وجود داشت اما جایگاه برش دوم به صورت پلی‌مورفیسم C/T بود (AAGYTT). با هضم محصول PCR، قطعه bp ٤٦۱ در همه نمونه‌ها دیده شد. برای افرادی که فقط همین جایگاه برش را داشتند قطعه‌های bp ٤٦۱ و bp ۲۳۲ حاصل شد اما افرادی که دارای نوکلئوتید C بودند، جایگاه برش دوم برای آنزیم را نیز فراهم کرده و قطعه bp ۲۳۲ به دو قطعه bp ۱۵۲ و bp ۸۰ برش خورد.

در جمعیت کنترل فراوانی C=29% و T=11% و در جمعیت بیمار فراوانی C=27% و T=13% محاسبه شد. فراوانی مورد انتظار تحت فرض استقلال با فراوانی مشاهده شده، تفاوت چندانی نداشت، بنابراین پذیرش فرض استقلال فرضی منطقی

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.1.15.5]

است. برای تایید این نتیجه مقدار آماره کای دو محاسبه شد و این فرض را در سطح پنج درصد مورد آزمون قرار داد.



شکل ۲- الکتروفورز محصولات PCR پلی‌مورفیسم اینترون ۱۹ پس از هضم با آنزیم *Hin*dIII بر روی ژل آگاروز سه درصد؛ چاهک ۱، مرد همی زیگوت C (negative)؛ چاهک ۳، مرد همی زیگوت T (positive)؛ چاهک ۲، 100 bp ladder.

مشاهده شد که مقدار آماره کای دو کم (۰/۲۳۸) بوده و مقدار p-value بیشتر از ۰/۰۵ است (۰/٦۲٦). بنابراین فرض استقلال دو متغیر در سطح پنج درصد پذیرفته می‌شود. در ادامه نسبت ORها و فاصله اطمینان برای آن‌ها (CI) به‌منظور تایید نتایج بخش قبلی محاسبه شد که مقدار OR برابر با ۱/۲۷، و میزان CI برابر ۱/۱۹۷ و ۰/۷۲۰- به دست آمدند. رگرسیون لجستیک با استفاده از نرم‌افزار SPSS محاسبه شد که نتایج معنی‌داری حاصل نشدند (p-value=0.633) در مطالعه حاضر ۱۷ نفر از ٤۰ بیمار هموفیل شدید مورد بررسی (۰/٤۲ درصد) دارای واژگونی اینترون ۲۲ بودند که این میزان در مطابقت با مطالعات انجام شده قبلی می‌باشد (Bagnall et al. 2005; Bagnall et al. Chorba et al. 2001 2005). در مصر میزان واژگونی اینترون ۲۲ با استفاده از IS-PCR روی ۳۰ بیمار هموفیل بررسی شده که هفت نفر از ۱۳ نفر هموفیل شدید (۲۳ درصد) دارای واژگونی اینترون ۲۲ بودند. مطالعه حاضر نشان داد درصد بالاتری از افراد هموفیل شدید مورد مطالعه (۰/٤۲ درصد) از جمعیت ایرانی نسبت به جمعیت مصری دارای واژگونی اینترون ۲۲ هستند (Abou-Elew et al. 2011). در ایران در سال ۲۰۱۱ روش IS–PCR و LD-PCR بر روی ۲۰ فرد هموفیل شدید و برای شناسایی واژگونی اینترون ۲۲ انجام گرفت. ١٤ نفر از ۲۰ نفر (٦۳ درصد) دارای Inv22 بودند که نشان دهنده شیوع بالای جهش Inv22 در بین ایرانیان می‌باشد (Mousavi et al. 2011). هم‌چنین ۳۰ فرد هموفیلی شدید از اصفهان برای شناسایی واژگونی اینترون ۲۲ و ۱ با استفاده از روش IS-PCR مورد آزمایش قرار گرفتند که ۱۲ نفر دارای واژگونی نوع یک در اینترون ۲۲ و ۲ نفر دارای واژگونی در اینترون یک بوده‌اند (Roozafzay et al. 2013). درصد واژگونی اینترون ۲۲ در بیماران هموفیل شدید از جمعیت کرمانشاه در مطالعه حاضر (۰/٤۲ درصد)، با اختلاف پنج درصد تایید کننده نتایج حاصل از بررسی بیماران هموفیل شدید در اصفهان (۰/٤۷ درصد) می‌باشد، ولی با توجه به بررسی انجام شده در کل کشور و قومیت‌های مختلف، اختلافی به میزان ۲۱ درصد بین نتایج حاصل دیده می‌شود که می توان آن را به اختلاف های ژنتیکی اقوام و نژادهای مختلف در سرتاسر ایران نسبت داد. با افزایش تعداد بیماران هموفیل شدید مورد مطالعه در آزمایش‌های بعدی می‌توان این اختلاف را دقیق‌تر مطالعه کرد.

با توجه به محدودیت‌های روش‌های تعیین مستقیم نواقص مولکولی در بیماران هموفیل و امکانات آزمایشگاه‌های ژنتیک سطح کشور استفاده از روش PCR-RFLP به صرفه و عملی می‌باشد و استفاده از مارکرهای چند شکلی *Hin*dIII برای بررسی احتمال ناقل بودن در خانواده‌های هموفیل توصیه می‌شود (Hashemi et al. 2010). یکی از اهداف این مطالعه بررسی همراهی بین چندشکلی C/T در افراد بیمار هموفیلی و جامعه سالم با روش PCR-RFLP بود که از آن می‌توان برای تشکیل هاپلوتایپ جمعیتی استفاده کرد. مطالعات مشابه تا کنون در جایی ثبت نشده‌اند (Kogan et al. 1987). در مطالعه‌ای که در ایران انجام شده فراوانی‌های به دست آمده متفاوت با یافته‌های این مطالعه بودند (C=0.48 و T=0.52) در واقع فراوانی آللی چندشکلی T بیش‌تر از C بوده است. درصد هتروزیگوسیتی مورد انتظار حدود ۵۰ درصد است. به دلیل این‌که جمعیت ایران از نژادهای مختلف با زمینه ژنتیکی متنوع تشکیل شده‌است، بنابراین

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.1.15.5]

به‌دست آوردن اطلاعات کافی راجع به واریانت‌های ژنتیکی در مناطق مختلف برای به حصول به تشخیص ناقلین هموفیلی و انجام اقدامات پیشگیرانه قبل از تولد ارزشمند است (Azimifar et al. 2006). این مطالعه در راستای شناسایی روش‌های ممکن برای شناسایی ناقلین هموفیلی و انجام تشخیص‌های قبل از تولد پایه گذاری شده‌است. این که نتایج حاضر می‌توانند به‌عنوان روش‌های تشخیصی استفاده شوند، نیاز به بررسی بیش‌تر برای توالی‌یابی قطعه تکثیر شده موتانت و تنظیم شرایط PCR و یا طراحی آغازگرهای جدید دارد. هم‌چنین با توجه به درصد هتروزیگوسیتی مورد انتظار در جمعیت می‌توان از مارکر *Hin*dIII در مطالعات پیوستگی برای شناسایی افراد ناقل در خانواده‌های دارای سابقه هموفیلی بهره برد که شرط اولیه برای استفاده از این مارکرها وجود مادر هتروزیگوت برای ردیابی آلل معیوب می‌باشد.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز و دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه و سایر همکاران و عزیزان یاری دهنده در انجام این پروژه، نهایت سپاس و امتنان را دارند.

منابع

Abou-Elew H, Ahmed H, Raslan H, Abdelwahab M, Hammoud R, Mokhtar D, Arnaout H (2011) Genotyping of intron 22-related rearrangements of F8 by inverse-shifting PCR in Egyptian hemophilia A patients. Annals of hematology 90:579-84.

Antonarakis SE, Rossiter JP, Young M, Horst J, De Moerloose P, Sommer SS, Ketterling RP, Kazazian HJ, Negrier C, Vinciguerra C (1995) Factor VIII gene inversions in severe hemophilia A: results of an international consortium study. Blood 86:2206-12.

Azimifar SB, Seyedna SY, Zeinali (2006) Allele frequencies of three factor VIII gene polymorphisms in Iranian populations and their application in hemophilia A carrier detection. American journal of hematology 81:335-9.

Bagnall RD, Ayres KL, Green PM, Giannelli F (2005) Gene conversion and evolution of Xq28 duplicons involved in recurring inversions causing severe hemophilia A. Genome research 15: 214-23.

Bagnall RD, Giannelli F, Green PM (2006) Int22hrelated inversions causing hemophilia A: a novel insight into their origin and a new more discriminant PCR test for their detection. Journal of Thrombosis and Haemostasis 4: 591-8.

Chorba TL, Holman RC, Clarke MJ, Evatt BL (2001) Effects of HIV infection on age and cause of death for persons with hemophilia A in the United States. American journal of hematology 66: 229-40.

Freije D, Schlessinger D (1992) A 1.6-Mb contig of yeast artificial chromosomes around the human factor VIII gene reveals three regions homologous to probes for the DXS115 locus and two for the DXYS64 locus. American journal of human genetics 51:66.

Graham JB, Kunkel GR, Fowlkes DM, Lord ST (1990) The utility of a HindIII polymorphism of factor VIII examined by rapid DNA analysis. British journal of haematology 76:75-9.

Hashemi SS, Hosseini KZ, Bagherian RM, Mohseni R, Siami E, ‘valizadeh F, Zakizadeh R (2010) Evaluation of hemophilia A families to detect carriers using gene linkage in Mazandaran province, Journal of Babol university of medical sciences 53:64-70.

Hedner U, Ginsburg D, Lusher JM, High KA (2000) Congenital hemorrhagic disorders: new insights into the pathophysiology and treatment of hemophilia. ASH Education Program Book 2000:241-65.

Husain N (2009) Carrier analysis for hemophilia A: ideal versus acceptable. Expert review of molecular diagnostics 9:203-7.

Jenkins PV, Collins PW, Goldman E, McCraw A, Riddell A, Lee CA, Pasi KJ (1994) Analysis of intron 22 inversions of the factor VIII gene in severe hemophilia A: implications for genetic counseling. Blood 84:2197-201.

Kogan SC, Doherty M, Gitschier J (1987) An improved method for prenatal diagnosis of genetic diseases by analysis of amplified DNA sequences. New England Journal of Medicine 317:985-90.

Lakich D, Kazazian HH, Antonarakis SE, Gitschier J (1993) Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A. Nature genetics 5:236-41.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic acids research 16:1215.

Mousavi SH, Namin SA, Ala F (2011) Application of new molecular methods in detection of Intron 22 inversion mutation of factor VIII gene in patients with Hemophilia A. Clinical Biochemistry 44:S97.

Renault NK, Dyack S, Dobson MJ, Costa T, Lam WL, Greer WL (2007) Heritable skewed X-chromosome inactivation leads to haemophilia A expression in heterozygous females. European Journal of Human Genetics 15:628-37.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.1.15.5]

Rossetti LC, Radic CP, Larripa IB, De Brasi CD (2008) Developing a new generation of tests for genotyping hemophilia-causative rearrangements involving int22h and int1h hotspots in the factor VIII gene. Journal of Thrombosis and Haemostasis 6:830-6.
Van-de-Water NS, Ridgway D, Ockelford PA (1991) Restriction fragment length polymorphisms associated with the factor VIII and factor IX genes in Polynesians. Journal of medical genetics 28:171-6.
Roozafzay N, Kokabee L, Zeinali S, Karimipoor M (2013) Evaluation of intron 22 and intron 1 inversions of the factor 8 gene using an inverse shifting PCR method in severe haemophilia A patients. Science Asia 39:174-8.
Rossetti LC, Radic CP, Abelleyro MM, Larripa IB, De Brasi CD (2011) Eighteen years of molecular genotyping the hemophilia inversion hotspot: from southern blot to inverse shifting-PCR. International journal of molecular sciences 12:7271-85.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.1.15.5]