

بررسی وارونگی اینترون ۲۲ نوع I و II ژن فاکتور هشت انعقادی در بیماران هموفیلی A شدید با استفاده از روش IS-PCR

نرگس روزافزای^۱، لیلا کوبی^۲، سیروس زینلی^۳، مرتضی کریمی پور^{۴*}

چکیده

زمینه و هدف: هموفیلی A یک اختلال خونریزی دهنده وابسته به جنس مغلوب است. این بیماری به علت وقوع جهش در ژن فاکتور هشت ایجاد می شود. وارونگی اینترون ۲۲، شایع ترین جهش مسبب ایجاد هموفیلی A شدید بوده که با استفاده از روش های Southern blot و واکنش زنجیره ای پلی مراز، قابل تشخیص است. این مطالعه با هدف تعیین وارونگی اینترون ۲۲ نوع I و نوع II، در بیماران هموفیلی A شدید با استفاده از روش IS-PCR انجام شد.

روش بررسی: این مطالعه روی ۳۰ بیمار هموفیلی A با کمتر از ۱٪ سطح نرمال فعالیت فاکتور هشت انجام شد. بعد از اخذ رضایت نامه از بیماران، استخراج DNA ژنومی از لوکوسیت های خون محیطی صورت گرفت. DNA های استخراج شده پس از حلقوی شدن (هضم شدن توسط BclI، سپس اتصال قطعات حاصل توسط آنزیم لیگاز)، به عنوان الگو برای تکثیر IS-PCR مورد استفاده قرار گرفتند.

یافته ها: در ۳۰ بیمار هموفیلی A شدید، ۴۰٪ بیماران وارونگی اینترون ۲۲ نوع I و ۶/۶٪ بیماران وارونگی اینترون ۲۲ نوع II داشتند.

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه نشان داد نوترکیبی بین اینترون (۱-۲۲h) در ژن فاکتور هشت و کپی های آن (۲-۲۲h، ۳-۲۲h) که در جهتی مخالف با اینترون ۱-۲۲h قرار می گیرند به ترتیب سبب ایجاد وارونگی نوع II و نوع I می شود که وارونگی اینترون ۲۲ نوع I از نوع II شایع تر است. همچنین با استفاده از IS-PCR به عنوان روشی کم هزینه می توان در زمان صرفه جویی و تشخیص مولکولی وارونگی را نیز ارتقا بخشید. این روش در ارزیابی ناقلین، افراد بیمار و تشخیص پیش از تولد در بیماری هموفیلی A نیز کاربرد دارد.

کلید واژه ها: هموفیلی A؛ وارونگی کروموزوم؛ PCR.

^۱کارشناس ارشد بیوشیمی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.

^۲دانشجوی دکتری زیست فن آوری پزشکی، بخش پزشکی مولکولی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.

^۳دانشیار ژنتیک انسانی، بخش پزشکی مولکولی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران و تحقیقات ژنتیک انسانی کوثر، تهران، ایران.

^۴استادیار زیست فناوری پزشکی، بخش پزشکی مولکولی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.

* نویسنده مسئول مکاتبات:

مرتضی کریمی پور، بخش پزشکی مولکولی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:

mortezakarimi@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۱/۶/۵

تاریخ پذیرش: ۹۱/۷/۱۳

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Rouzafzay N, Kokabi L, Zeinali C, Kiarimipour M. A study of intron 22 inversion type i and ii of coagulation factor 8 gene in patients with severe hemophilia a using IS-PCR technique. Qom Univ Med Sci J 2013;7(5):28-34. [Full Text in Persian]

مقدمه

هموفیلی A یک اختلال انعقادی ارثی وابسته به جنس مغلوب است. اختلال در ژن کدکننده فاکتور هشت منجر به ایجاد نقص یا فقدان پروتئین فاکتور هشت انعقادی در پلاسما می‌شود که تشکیل لخته را مشکل ساخته و سبب خونریزی طولانی‌مدت می‌گردد. شیوع هموفیلی A، یک مورد در هر ۵۰۰۰ نوزاد زنده پسر می‌باشد (۷-۱). تشخیص این بیماری با استفاده از علائم بالینی و تست‌های آزمایشگاهی مناسب مانند سنجش فعالیت فاکتور هشت انعقادی، PT (زمان پروترومبین) و aPTT (زمان پروترومبین ترومبوپلاستین فعال) صورت می‌گیرد که در افراد هموفیلی، PT طبیعی و aPTT طولانی‌مدت و سطح فعالیت فاکتور هشت نیز کاهش می‌یابد (۸). براساس سطح فعالیت فاکتور هشت انعقادی در پلاسما سه نوع هموفیلی A وجود دارد، بیماران هموفیلی با کمتر از ۱٪ میزان فعالیت فاکتور هشت دارای هموفیلی شدید بوده که تقریباً ۵۰٪ تمام بیماران را شامل می‌شوند. ۱۰٪ بیماران، میزان فعالیت فاکتور هشت آنها، ۱-۵٪ سطح نرمال است که هموفیلی A متوسط دارند و ۴۰٪ مابقی نیز هموفیلی خفیف داشته که سطح فعالیت فاکتور هشت در پلاسما آنها بین ۳۰-۵٪ سطح نرمال می‌باشد (۹) (۷-۵).

موادی که برای درمان هموفیلی به کار برده می‌شوند شامل: کنستانتره‌های فاکتور هشت، کرایوپرسیپیت‌ها، کنستانتره‌های فاکتورهای انعقادی به دست آمده از پلاسما و فاکتورهای انعقادی نوترکیب است (۱۲-۱۰) (۵،۶). از جمله عوارض درمان در افراد هموفیل می‌توان به انتقال آلودگی ویروسی از راه تزریق فرآورده‌های خونی و ایجاد مهارکننده (آنتی‌بادی) علیه فاکتورهای دریافتی اشاره نمود (۵). ژن فاکتور هشت بر روی انتهای بازوی بلند کروموزوم X (Xq28) قرار دارد. اندازه این ژن ۱۸۶kb بوده و مشتمل بر ۲۶ اگزون است، که mRNA به طول ۹kb را ایجاد می‌کند. بیوستنز فاکتور هشت عمدتاً در کبد اتفاق می‌افتد. پروتئین فاکتور هشت انعقادی ۳۰۰kd وزن و ۲۳۳۲ آمینو اسید دارد و به صورت هتروداپمر که دارای زنجیره سنگین شامل دومین‌های A۱-A۲-B و زنجیره سبک شامل دومین‌های A۳-C۱-C۲ می‌باشد، ترشح می‌شود. ارتباط بین زنجیره‌های سبک و سنگین توسط یون‌های فلزی دوظرفیتی

صورت می‌گیرد (۱۵-۱۳) (۵،۶). اختلالات ژنتیکی که منجر به ایجاد هموفیلی A می‌شوند مشکل از: حذف وارونگی ژنی، جهش‌های نقطه‌ای و جابجایی است.

وارونگی اینترون ۲۲ در ۴۵-۴۰٪ بیماران هموفیلی A شدید می‌تواند علت بیماری باشد. وارونگی اینترون ۲۲ (Inv۲۲)، به‌طور ویژه در میوز مرد در دوران جنینی آغاز می‌شود و در نتیجه نوترکیبی مشابه درون کروموزومی بین یک ناحیه ۹/۵kb درون اینترون ۲۲ فاکتور هشت (۱-۲۲h Int) و کپی‌های به‌صورت معکوس (۲-۲۲h Int، ۳-۲۲h Int)، اتفاق می‌افتد، که نتیجه آن تاخوردن سر کروموزوم است. در اثر وارونگی، اگزون‌های ۲۲-۱ معکوس شده و در جهت مخالف با اگزون‌های ۲۶-۲۳ قرار می‌گیرند. توالی ۲-۲۲h در فاصله ۵۰۰kb و ۳-۲۲h در فاصله ۶۰۰kb از اینترون ۱-۲۲h قرار دارند. بسته به اینکه کدام تکرار اینترون ۱-۲۲h در وارونگی شرکت کند، دو نوع وارونگی Type I (که اینترون ۳-۲۲h در ایجاد نوترکیبی دخالت دارد) و Type II (که اینترون ۲-۲۲h در ایجاد نوترکیبی دخالت دارد) به‌وجود می‌آیند. وارونگی نوع I، ۵ برابر نسبت به نوع II، شایع‌تر است (۲۰-۱۶) (۲،۵).

روش‌های بررسی ژنتیکی هموفیلی A به دو صورت مستقیم و غیرمستقیم انجام می‌شود. روش‌هایی نظیر Southern blot، PCR و تعیین توالی DNA برای بررسی مستقیم موتاسیون‌های ژنی هموفیلی A مورد استفاده قرار می‌گیرد (۵). در روش LD-PCR (Long Distance-PCR) برای بررسی وارونگی، با توجه به اندازه بزرگ قطعه مورد بررسی، تنظیم PCR، مشکل و زمانبر بوده، همچنین نیاز به توانایی بالای کاربر دارد (۱۷). Southern blot روشی دقیق اما سخت و خطرناک است (۱۸). ارزیابی ژن معیوب فاکتور هشت به روش غیرمستقیم (آنالیز پیوستگی) با استفاده از شاخص‌های چند شکلی (پلی‌مورف) هم در درون و هم خارج از ژن فاکتور هشت در بین اعضای فامیل صورت می‌گیرد. به‌طور کلی آنالیز پیوستگی از نظر تکنیکی ساده و برای اکثر خانواده‌ها قابل استفاده است، اما چندین محدودیت برای استفاده از آن وجود دارد (۵). با توجه به اینکه حدود ۴۵٪ موارد هموفیلی A شدید به‌علت وارونگی در اینترون ۲۲ ژن فاکتور هشت رخ می‌دهد، معمولاً در بررسی مولکولی این

شده بود، به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. به طور خلاصه در این روش، ابتدا DNA استخراج شده به صورت حلقوی درآمد، که برای این منظور معادل ۲μg از DNAهای تخلیص شده با ۲۰ واحد آنزیم محدودالایتر BclII (فرمنتاز، کانادا) به مدت ۵-۴ ساعت در دمای ۵۵°C مورد هضم آنزیمی قرار گرفت. سپس قطعات حاصل توسط فنول کلروفرم و رسوب اتانول خالص سازی شده و برای ایجاد DNA حلقوی تحت تأثیر ۳ واحد آنزیم T4 لیگاز (فرمنتاز، کانادا) در حجم نهایی ۴۰۰μl در ۱۵°C به مدت ۱۶-۱۴ ساعت قرار گرفت. خالص سازی قطعات DNA با استفاده از ستون های تخلیص یا فنول کلروفرم و رسوب با اتانول انجام شد. رسوب DNA سپس در ۳۰-۱۵ μl به صورت محلول درآمد و به منظور استفاده برای PCR آماده شد. IS-PCR با استفاده از ۶μl از DNA حلقوی به منظور ارزیابی وارونگی اینترون ۲۲ در حجم نهایی ۲۵μl برای هر واکنش شامل ۰/۶μm از هر پرایمر، ۵U/۱۰ از آنزیم Taq پلیمرز (سیناژن، ایران)، ۲۰۰μm دنوکسی نوکلئوتید تری فسفات (dNTPs)، ۱/۵mM MgCl₂، ۱۰X بافر PCR (۱۰mM KCl، ۶mM Tris-Cl) انجام شد. دو جفت آغازگر برای بررسی وارونگی های اینترون ۲۲ مورد استفاده قرار گرفت. همچنین آغازگرهای IU/ID برای تکثیر الی نرمال اینترون ۲۲ (۴۸۷ جفت باز)، آغازگرهای ۳U/ID برای بررسی وارونگی اینترون ۲۲ نوع I (قطعه ۳۳۳ جفت بازی) و آغازگرهای ۲U/ID، جهت بررسی وارونگی اینترون ۲۲ نوع II (قطعه ۳۸۵ جفت بازی) به کار برده شد. اطلاعات مربوط به آغازگرها در جدول آورده شده است.

جدول: مشخصات آغازگرهای مورد استفاده برای بررسی وارونگی اینترون ۲۲

نام آغازگر	توالی آغازگر	NC_00009/23
ID	ACATACGGTTTAGTCACAAGT	۱۵۳۷۵۸۵۸۷-۶۰۸
۳U	CTCACATTGTGTTCTTGTAGTC	۱۵۴۳۳۴۲۶-۴۸
IU	CCTTTCAACTCCATCTCCAT	۱۵۳۷۹۷۳۰-۵۰
۲U	ACGTGTCTTTTGGAGAAGTC	۱۵۴۲۷۰۷۷۵-۹۵

برنامه دمایی جهت انجام IS-PCR از این قرار بود:

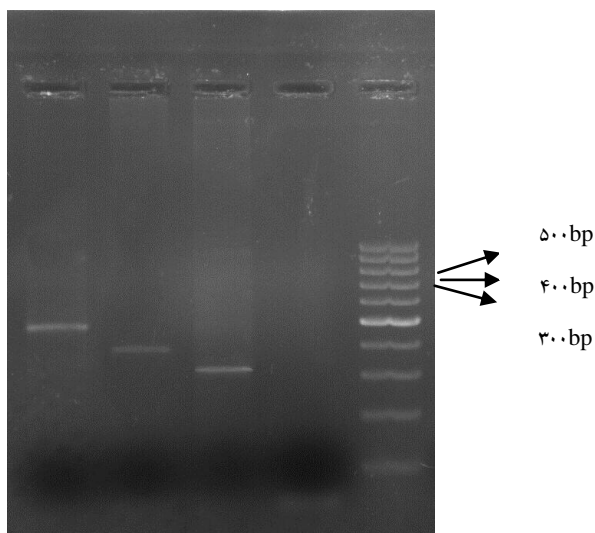
۹۴°C به مدت ۲ دقیقه، تکرار ۳۲ چرخه دمایی ۹۴°C به مدت ۳۰

ثانیه، ۶۰°C به مدت ۱ دقیقه، در ۷۲°C به مدت ۱/۳۰ دقیقه.

بیماری ابتدا این وارونگی بایستی مورد ارزیابی قرار گیرد. Rossetti و همکاران (سال ۲۰۰۵) با استفاده از روش I-PCR وارونگی اینترون ۲۲ را مورد ارزیابی قرار دادند، که در نتیجه مطالعه آنها، روشی سریع برای تعیین ژنوتایپ وارونگی اینترون ۲۲h معرفی شد (۱۸). همچنین در سال ۲۰۰۸ همین گروه در مطالعه ای دیگر از روش IS-PCR برای تعیین ژنوتایپ افراد هموفیلی استفاده کردند. بدین منظور سه گروه مورد ارزیابی قرار گرفت و بررسی وارونگی اینترون ۲۲ در آنها با این روش انجام شد. IS-PCR برای ارتقای تشخیص مولکولی وارونگی اینترون ۲۲ و تمایز سریع الگوهای وارونگی نوع I و نوع II و حذف های مرتبط با اینترون ۲۲h، مضاعف شدگی اینترون ۲۲ طراحی شده است. این روش همچنین قادر به ارزیابی افراد ناقل بیماری نیز می باشد (۱۷). این مطالعه با هدف تعیین وارونگی نوع I و نوع II اینترون ۲۲ ژن فاکتور هشت انعقادی با استفاده از روش IS-PCR، به منظور ارتقای تشخیص مولکولی این موتاسیون در بیماران هموفیلی A شدید در ایران انجام شد.

روش بررسی

در این مطالعه آزمایشی، متعاقب هماهنگی با بخش هموفیلی بیمارستان سیدالشهداء (ع) در اصفهان، پس از اخذ رضایت نامه، از ۳۰ بیمار مبتلا به هموفیلی A شدید با درصد فعالیت فاکتور هشت زیر ۱٪ سطح نرمال، ۵-۱۰cc خون محیطی گرفته شد. نمونه های دریافتی در لوله های حاوی مقدار مناسب EDTA (ماده ضد انعقاد)، جمع آوری شدند. همزمان با این کار، پرسشنامه ویژه ای، به منظور بررسی وضعیت بیماران که دربرگیرنده سؤالاتی در ارتباط با تست های انعقادی بیماری بود، برای هریک از افراد مورد مطالعه تکمیل شد. سپس استخراج DNA از نمونه های خون با استفاده از روش اشباع نمکی (Salting out) انجام گرفت (۲۱). سنجش کیفیت و غلظت DNA با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج های ۲۶۰ و ۲۸۰nm و نیز با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز صورت گرفت. به منظور بررسی وارونگی اینترون ۲۲ در بیماران، از تکنیک IS-PCR برای تکثیر نواحی مربوطه استفاده شد (۱۸)، و نمونه های دارای وارونگی اینترون ۲۲ که با روش Southern blot در کشور انگلستان تأیید



شکل شماره ۲: نمونه‌های دارای وارونگی اینترون ۲۲h نوع II
تست تشخیص وارونگی اینترون ۲۲h نوع II: ۱: باند نرمال، ۲: وارونگی
اینترون ۲۲h نوع II، ۳: وارونگی اینترون ۲۲ نوع I، ۴: blank، ۵: مارکر
۱۰۰ جفت بازی را نشان می‌دهد.

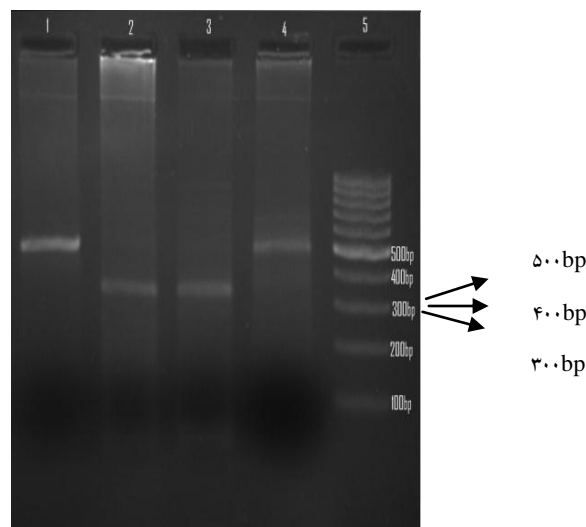
بحث

هموفیلی A یک اختلال انعقادی مادام‌العمر وابسته به کروموزوم X است، که به علت فراوانی بالای هموفیلی A، افراد مبتلا به این بیماری برای تعیین وجود جهش وارونگی، در این مطالعه بررسی شدند. در ایران حدود ۵۰۰۰ بیمار هموفیل A و حدود ۱۰۰۰ بیمار هموفیل B وجود دارد. علت انتخاب نوع شدید بیماری، شیوع بالای آن (۵۰٪) نسبت به نوع متوسط و ضعیف و نیز اهمیت بالینی آن از نظر خونریزی‌های خود به خودی بوده است (۶، ۷). همچنین به دلیل مشکلات روحی، جسمی و مالی که از اثرات خونریزی‌های مکرر می‌باشد، بررسی موتاسیون در بیماران مبتلا به نوع شدید هموفیلی A حایز اهمیت است. شناسایی موتاسیون در تشخیص ناقلین و تشخیص پیش از تولد نیز نقش مهمی در جلوگیری از گسترش بیماری دارد (۲۲). از موارد دیگری که باید مدنظر قرار گیرد، ایجاد آنتی‌بادی‌های مهارکننده علیه فاکتور هشت انعقادی پس از تزریق فاکتور هشت به‌عنوان درمان در بیماران مبتلا به هموفیلی A شدید است. مهارکننده‌ها عمده‌ترین مشکل در درمان بیماران هموفیلی A بوده که در پاسخ به تزریق کنستانت‌های فاکتور ۸ تولید شده و مانع از فعالیت فاکتور هشت انعقادی می‌شوند (۵، ۶، ۲۳). ۴۰-۲۰٪ بیماران هموفیل A شدید علیه فاکتور هشت دریافتی، آنتی‌بادی تولید می‌کنند (۲۴).

در آخر، سنتز نهایی در 72°C به مدت ۵ دقیقه انجام شد. برای مشاهده محصولات PCR از الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵٪ حاوی اتیدیوم بروماید به منظور رنگ‌آمیزی ژل و مشخص شدن باندها زیر دستگاه Gel Doc (ویلبر، فرانسه) استفاده شد. در این مطالعه با استفاده از روش IS-PCR، فرکانس وارونگی اینترون ۲۲ نوع I و نوع II براساس ژنوتایپ به دست آمده از بیماران هموفیلی A شدید بررسی شده، محاسبه گردید.

یافته‌ها

از ۳۰ بیمار هموفیل A شدید مورد بررسی، ۱۲ نفر دارای وارونگی اینترون ۲۲ نوع I و ۲ نفر وارونگی اینترون ۲۲ نوع II داشتند (شکل شماره ۱ و ۲). قطعه مربوط به وارونگی اینترون ۲۲h نوع II دارای ۳۸۵ جفت باز و قطعه مربوط به وارونگی اینترون ۲۲h نوع I دارای ۳۳۳ جفت باز می‌باشد. در افراد نرمال، قطعه ایجاد شده، ۴۸۷ جفت باز دارد.



شکل شماره ۱: نمونه‌های دارای وارونگی اینترون ۲۲h نوع I
نتایج ژل الکتروفورز محصولات IS-PCR، و تست تشخیص وارونگی
اینترون ۲۲h نوع I: ۱ و ۴: باند نرمال، ۲ و ۳: وارونگی اینترون ۲۲ نوع I،
۵: مارکر ۱۰۰
جفت بازی را نشان می‌دهد.

در مطالعه حاضر به منظور تأیید تشخیص وارونگی اینترون ۲۲ (در بیماران) که با این روش بررسی می‌شوند، افرادی که قبلاً توسط روش Southern Blot آنالیز شده بودند به وسیله روش IS-PCR برای یافتن وارونگی اینترون ۲۲ مورد ارزیابی قرار گرفتند، که تطابق کامل در نتایج به دست آمده برای تمامی بیماران وجود داشت (۱۷). روش IS-PCR می‌تواند تمام بازآرایی‌های مرتبط با اینترون ۲۲h مانند وارونگی، حذف بزرگ، مضاعف‌شدگی، واردشدگی و جابجایی را مورد ارزیابی قرار دهد. این روش کم‌هزینه بوده و آنالیز دقیق بیماران مبتلا به هموفیلی و ناقلین این بیماری با این روش انجام‌پذیر است. از آنجایی که روش‌های ارزیابی وارونگی زمانبر بوده و نیاز به مهارت‌های تکنیکی بالایی دارد، لذا این روش جایگزینی مناسب برای ارزیابی وارونگی‌های ژن فاکتور هشت می‌باشد و بایستی به‌عنوان اولین انتخاب برای آنالیز این جهش در نظر گرفته شود.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه بیماران مبتلا به هموفیلی A شدید با استفاده از روش IS-PCR، که روشی نوین در تشخیص مولکولی وارونگی است، مورد ارزیابی قرار گرفتند. پیشتر از روش‌های LD-PCR و Southern blot برای ارزیابی وارونگی اینترون ۲۲ در بیماران هموفیلی A شدید استفاده می‌شد، که هرکدام مشکلات خاص خود را داشتند. در این مطالعه با کمک روش کم‌هزینه IS-PCR، تشخیص سریع و دقیق جهش وارونگی در بیماران هموفیلی A شدید صورت گرفت و همان‌گونه که انتظار می‌رفت وارونگی اینترون ۲۲ نوع I نسبت به نوع II فراوانی بیشتری را نشان داد. طبق نتایج این پژوهش، ارزیابی ناقلین این بیماری و جلوگیری از تولد نوزادان مبتلا می‌تواند مفید واقع شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از تمامی افرادی که در انجام این پژوهش ما را یاری رساندند، همکاران بخش پزشکی مولکولی انستیتو پاستور ایران و بیمارستان سیدالشهداء (ع) اصفهان، سپاسگزاری می‌نمایند.

همچنین در بیش از ۳۰٪ بیماران هموفیل A که دارای حذف و یا وارونگی در ژن فاکتور هشت انعقادی هستند، احتمال ایجاد مهارکننده وجود دارد (۵). نکته دیگر، شیوع بالای وارونگی اینترون ۲۲ در بیماران هموفیل A شدید (۵۰-۴۰٪ گستره جهانی)، به‌عنوان علت ایجاد هموفیل A شدید می‌باشد (۲۵، ۲۶)، که موارد ذکرشده لزوم بررسی این موتاسیون را در بیماران هموفیل A شدید نشان می‌دهد. در این مطالعه از ۳۰ بیمار مورد بررسی، ۱۴ بیمار دارای وارونگی اینترون ۲۲ (۱۲ بیمار نوع I و ۲ بیمار نوع II) بودند که بیانگر شیوع بالای وارونگی اینترون ۲۲ نوع I نسبت به نوع II می‌باشد (۲۰، ۱۹). در مطالعه‌ای که توسط Polakova و همکاران (سال ۱۹۹۸) انجام شد در ۵۰٪ بیماران با هموفیلی A شدید، وارونگی مشاهده گردید که وارونگی نوع I (۸۲/۶٪)، فراوانی بیشتری نسبت به نوع II (۱۷/۴٪) داشت (۲۶)، نتایج به دست آمده تأییدکننده شیوع بالای وارونگی اینترون ۲۲ نوع I نسبت به نوع II بود. همچنین در مطالعه‌ای که توسط Bagnall و همکاران (سال ۲۰۰۲) بر روی ۲۰۹ بیمار غیروابسته مبتلا به هموفیلی A شدید صورت گرفت، ۴۵٪ بیماران دارای وارونگی اینترون ۲۲ بودند (۲۷).

وارونگی اینترون ۲۲ توسط روش‌های Southern blot و یا LD-PCR قابل ارزیابی است (۱۸). Southern blot قادر به ارزیابی ناقلین بوده و می‌تواند وارونگی اینترون ۲۲ را مشخص کند، اما این روش سریع نبوده و انجام آن سخت و به‌علت کار با مواد رادیواکتیو خطرناک است، همچنین در این روش به مقدار بیشتری DNA نسبت به آنالیز PCR نیاز است، که کاربرد آن را در تشخیص قبل از تولد با مشکل مواجه می‌سازد (۲۸، ۱۸، ۵). LD-PCR تکثیر توالی‌های بلند DNA را ممکن می‌سازد، همچنین این روش قادر به بررسی وارونگی، حذف و جابجایی در ژنوم است، اما به کیفیت DNA الگو حساس بوده، ولی چنین حساسیتی در روش IS-PCR وجود ندارد. همچنین زمان مورد نیاز برای انجام عمل تکثیر DNA در LD-PCR طولانی بوده و الکتروفورز نیز آهسته انجام می‌شود، درحالی که IS-PCR مانع از تکثیر DNA در طول توالی‌های طولانی و غنی از GC مرتبط با اینترون‌های ۲۲h می‌شود (۲۸، ۱۸، ۱۷).

References:

1. Perez-Luz S, Abdulrazzak H, Grillot-Curvallin C, Huxley C. Factor VIII mRNA expression from a bac carrying the intact locus made by homologous recombination. *Genomics* 2007;90(5):610-9.
2. Ranjan R, Biswas A, Meena A, Akhter MS, Yadav BK, Ahmed RH, et al. Importance of investigating somatic and germline mutations in hemophilia A: A preliminary study from all India institute of medical sciences, India. *Clin Chim Acta* 2008;398(1-2):103-8.
3. Ahmed R, Kannan M, Biswas A, Ranjan R, Choudhry VP, Saxena R. Use of intron 1 and 22 inversions and linkage analysis in carrier detection of hemophilic a in Indians. *Clin Chim Acta* 2006;365:109-112.
4. Shen WB, Spiegel PC, Chang CH, Huh JW, Lee JS, Kim J, et al. The tertiary structure and domain organization of coagulation factor viii. *Blood* 2008;1(111):1240-7.
5. Pruthi RK. Hemophilia: A practical approach to genetic testing. *Mayo Clin Proc* 2005;80(11):1485-99.
6. Oldenburg J, Ivaskeviciusa V, Rosta S, Fregin A, White K, Holinski-Feder E, et al. Evaluation of DHPLC in the analysis of hemophilia A. *J Biochem Biophys Methods* 2001;47(1-2):39-51.
7. Wang W, Merchlinsky M, Inman J, Golding B. Identification of a novel immunodominant cytotoxic t lymphocyte epitope derived from human factor VIII in a murine model of hemophilia A. *Thromb Res* 2005;116(4):335-44.
8. Franchini M, Targher G, Montagnana M, Lippi G. Laboratory clinical and therapeutic aspects of acquired hemophilia A. *Clin Chim Acta* 2008 Sep; 395(1-2):14-8.
9. Lacroix-Desmazes S, Misra N, Bayry J, Villard S, Kazatchkine MD, Kaveri SV. Antibodies with hydrolytic activity towards factor VIII in patients with hemophilia A. *J Immunol Methods* 2002;269(1-2):251-6.
10. Singleton T, Kruse-Jarres R, Leissinger C. Emergency department care for patients with hemophilia and von wille brand disease. *J Emerg Med* 2010;39(2):158-65.
11. Chorba TL, Holman RC, Clarke MJ, Evatt BL. Effects of HIV infection on age and cause of death for persons with hemophilia A in the united states. *A M J Hematol* 2001;66:229-40.
12. Soukharev S, Hammond D, Ananyeva NM, Anderson JAM, Hauser CAE, Pipe S, et al. Expression of factor VIII in recombinant and transgenic systems. *Blood Cells Mol Dis* 2002;28(2):234-48.
13. Fang H, Wang L, Wang H. The protein structure and effect of factor VIII. *Thromb Res* 2007;119(1):1-13.
14. Miclea RD, Varma PR, Peng A, Balu-Iyer SV. Development and characterization of lipidic cochleate containing recombinant factor VIII. *Biochim Biophys Acta* 2007;1768(11):2890-8.
15. Herlitschka SE, Schlokot U, Falkner FG, Dorner F. High expression of a b-domain deleted factor viii gene in a human hepatic cell line. *J Biotechnol* 1998;61(3):165-73.
16. Nair PS, Shetty S, Kulkarni B, Ghosh K. Molecular pathology of haemophilia A in Indian patients: Identification of 11 novel mutations. *Clin Chim Acta* 2010;411(23-24):2004-8.
17. Rossetti LC, Radic CP, Larripa IB, De Brasi CD. Developing a new generation of tests for genotyping hemophilia-causative rearrangements involving int 22h and int1h hotspots in the factor viii gene. *J Thromb Haemost* 2008;6(5):830-6.
18. Rossetti LC, Radic CP, Larripa IB, De Brasi CD. Genotyping the hemophilia inversion hotspot by use of inverse PCR. *Clin Chem* 2005;51(7):154-8.

19. Bagnall RD, Giannelli F, Green PM. Int 22h-related inversions causing hemophilia A: A novel insight into their origin and a new more discriminant pcr test for their detection. *J Thromb Haemost* 2006;4(3):591-8.
20. Bagnall RD, Ayres KL, Green PM. Gene conversion and evolution of xq28 duplicons involved in recurring inversions causing severe hemophilia A. *Genome Res* 2005;15(2):214-23.
21. 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.
22. Collins P, Faradji A, Morfini M, Enriquez MM, Schwartz L. Efficacy and safety of secondary prophylactic vs. on-demand sucrose-formulated recombinant factor VIII treatment in adults with severe hemophilia A: Results from a 13-month crossover study. *J Thromb Haemost* 2010;8(1):83-9.
23. Kulkarni R, Aledort ML, Berntorp E, Brackman HH, Brown D, Cohen RA, et al. Therapeutic choices for patients with hemophilia and high-titer inhibitors. *Am J Hematol* 2001;67(4):240-6.
24. McCarthy J, Mathew P. Treatment of hemophilia whit inhibitors: An advance in options for pediatric patients. *J Emerg Nurs* 2011;37:474-6.
25. Zhang YZ, Liua JX, Shao HZ, Chi ZW, Wang HL, Chen SJ, et al. Characterization of genetic defects of hemophilia A in Mainland China. *Genet Anal-Bio Mol Eng* 1999;15(6):205-7.
26. Polakova H, Kadasi L, Filova A. Factor VIII gene inversions in haemophilia A patients of Slovakia. *Hum Hered* 1998;48(1):34-7.
27. Bagnall RD, Waseem N, Green PM, Giannelli F. Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene is a frequent cause of severe hemophilia A. *Blood* 2002;99(1):168-74.
28. Liu Q, Nozari G, Sommer SS. Single-tube polymerase chain reaction for rapid diagnosis of the inversion hotspot of mutation in hemophilia A. *Blood* 1998;92(4):1458-9.