مطالعه منطقه بسیار متغیر ۲ (HV2) از mtDNA جهت کاربرد در تشخیص هویت از طریق نسل مادری

دکتر سعید مروتی *- مهستی مدرسی **- دکتر علی کرمی***

*متخصص ژنتیک انسانی، استادیار مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، پژوهشکده طب رزمی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)

**کارشناس ارشد بیوتکنولوژی مولکولی، اداره تشخیص هویت نیروی انتظامی

*** دکترای بیوتکنولوژی مولکولی، استادیار مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، پژوهشکده طب رزمی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)

چکیده

زمینه و هدف: DNA میتوکندریایی دارای خواصی است که می تواند در تشخیص هویت مخصوصا در مواردی که DNA هسته ای به مقدار کافی وجود ندارد مفید باشد. از جمله این ویژگی‌ها می توان به تعداد زیاد نسخه ها در سلول، مقاومت بیشتر در برابر تخریب و کوتاه بودن طول ژنوم اشاره کرد. در DNA میتوکندریایی منطقه ای به نام ناحیه بسیار متغیر (hypervariable) وجود دارد که خود به دو منطقه بسیار متغیر ۱ و بسیار متغیر ۲ تقسیم بندی می گردد.

روش بررسی: ۱۰ خانواده غیر وابسته در ۳ نسل متوالی (مادربزرگ، مادر، نوه) به طور تصادفی انتخاب شدند. از آنها خونگیری به عمل آمد و DNA میتوکندریایی استخراج گردید. سپس توالی نوکلئوتیدی منطقه بسیار متغیر ۲ تعیین شد.

یافته‌ها: ٤٩ نقطه پلی مرفیک در منطقه بسیار متغیر ۲ شناسایی شد. توالی نوکلئوتیدی منطقه بسیار متغیر ۲ و پلی مرفیسم های ایجاد شده در هر خانواده جز ۵ مورد هتروپلاسمی کاملا شبیه به یکدیگر بود. میانگین تفاوت نوکلئوتیدی در بین خانواده های غیرخویشاوند ۲/۸ نوکلئوتید تعیین شد.

نتیجه گیری: از بررسی توالی نوکلئوتیدی منطقه بسیار متغیر DNA میتوکندریایی می توان به عنوان ابزاری مؤثر جهت تعیین هویت به ویژه در مورد نمونه‌های اندک، شدیدا تخریب شده و قدیمی استفاده نمود.

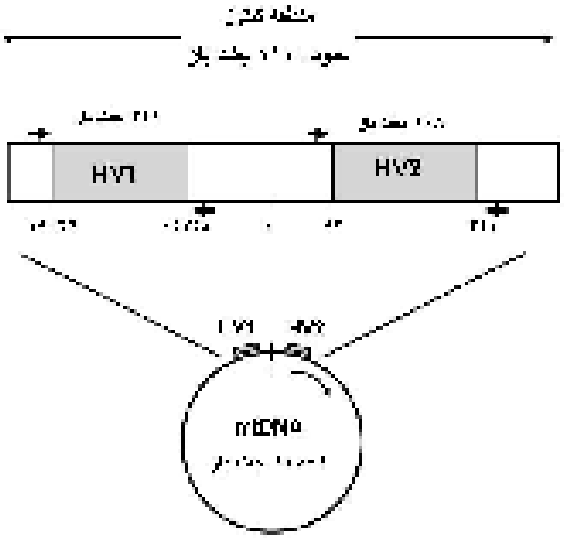
واژگان کلیدی: DNA میتوکندریایی، منطقه بسیار متغیر ۲، پلی مرفیسم، تعیین هویت

وصول مقاله: ۱۳۸۴/۸/۸ پذیرش مقاله : ۱۳۸۵/۳/۱۷

نویسنده مسئول: تهران، صندوق پستی ۱۹۹۴۵/۵۸۱ morovvati@bmsu.ac.ir

مقدمه

میتوکندری اندامکی سیتوپلاسمی است که در سیتوپلاسم همه سلول‌های یوکاریوتی وجود دارد. این اندامک که قادر به تولید انرژی برای سلول است دارای DNA حلقوی اختصاصی و مستقل از DNA هسته‌ای به طول ۱۶۵۶۹ جفت باز و ۳۷ ژن است که محصولاتی را در فرآیند فسفریلاسیون اکسیداتیو کد می‌کند. به حسب سن و نوع سلول، هر میتوکندری واجد یک یا چند مولکول DNA حلقوی است (۱). DNA میتوکندری (mtDNA)؛ شبیه مولکول DNA در پروکاریوت‌ها، غنی از سیتوزین و گوانین است و پایداری زیادی در برابر گرما دارد. mtDNA حاوی ناحیه بسیار متغیر (Hypervariable) به نام Displacement-loop یا D-loop است که پروتئینی کد نکرده است و با فرکانس بسیار زیادی حدود ۱۰ برابر DNA هسته‌ای تمایل به جهش دارد (شکل ۱). بر اساس تخمین محققین تفاوت نوکلئوتیدها در mtDNA در بین افراد غیر خویشاوند حدود ۱ تا ۲ نوکلئوتید به ازای هر ۱۰۰ نوکلئوتید است. میزان بالای جهش و وجود تفاوت در افراد مختلف در این ناحیه سبب شده است تا این ناحیه در تشخیص هویت مورد توجه دانشمندان علوم نظامی و پزشکی قانونی قرار گیرد (۲). در اکثر سیستم‌های DNA Typing از ژنوم هسته-ای استفاده می‌شود اما در مواردی‌که مقدار DNA استخراج شده از بافت‌هایی نظیر استخوان، دندان و یا مو بسیار کم باشد یا در مواردی-که نمونه بیولوژیک قدیمی و تخریب شده باشد، احتمال DNA Typing توسط mtDNA نسبت به سایر شاخص‌های پلی مورفیک هسته‌ای نظیر مارکرهای STR بسیار بیشتر است. از آنجا که تا هزاران نسخه از ژنوم mtDNA در یک سلول منفرد می‌تواند وجود داشته



شکل ۱- نواحی HV۱ و HV۲ در mtDNA

باشد، mtDNA به علت فراوانی و اندازه نسبتاً کوچکش در مقایسه با DNA هسته‌ای، آخرین DNA باقیمانده قابل type کردن در نمونه‌های تخریب شده، قدیمی و نمونه‌های جزیی به شمار می‌رود (۳). mtDNA را از سلول‌های مرده تار مو، استخوان‌ها و دندان می‌توان استخراج کرد. در حالیکه برای انجام DNA Typing هسته‌ای از مو حتماً به ریشه مو نیاز است. ضمن اینکه استخوان‌های قدیمی، غلاف مو و ناخن‌های چیده شده معمولاً برای DNA Typing هسته‌ای، نمونه‌های قابل اطمینانی نیستند. به علت فراوان بودن میتوکندری در درون سلول‌ها اگر نمونه های بیولوژیک بسیار تخریب شده باشند باز هم mtDNA به قدر کافی وجود دارد که بتوان توالی نوکلئوتیدهای آن را بدست آورد. نکته دیگر اینکه صفات اجدادی پدری را توسط شاخص‌های کروموزوم Y و صفات اجدادی مادری را از طریق توالی mtDNA می‌توان ردیابی کرد. چرا که کروموزوم Y منحصراً از پدر به پسر منتقل می‌شود و وراثت ژن‌های میتوکندری نیز منحصراً از طریق مادر صورت می‌گیرد. این خصوصیت mtDNA که در طول نسل‌های متمادی کم و بیش دست نخورده به ارث می‌رسد و نوترکیبی ژنتیکی سبب تنوع جدید در آن نمی‌شود، در ردیابی خانواده‌ها و نسل‌های خویشاوند مفید است. اگرچه جهش در mtDNA می‌تواند اختلافات جدیدی را در میان اعضای یک خانواده بوجود آورد اما مقدار این تفاوت‌ها زیاد نیست. لذا از نظر تئوری mtDNA یک فرد باید با مادر و خویشاوندان مادری‌اش یکسان باشد. از این روش پیش از این در شناسایی استخوان‌های بسیار قدیمی سربازان گمنام جنگ ویتنام (۴) و نیز در شناسایی بقایای جسد تزار روسیه نیکلاس دوم استفاده شده است. از آنجا که در این خصوص در کشور ما مطالعه‌ای صورت نپذیرفته و میزان تفاوت‌های احتمالی در توالی mtDNA در افراد خویشاوند و غیرخویشاوند بررسی نگردیده است، ارزش کاربردی آن در تشخیص هویت در کشور ما چندان روشن نیست. در این مطالعه ناحیه بسیار متغیر دو (HV۲) از mtDNA را در سه نسل متوالی مادری از ۱۰ خانواده غیر وابسته مورد بررسی قرار داده‌ایم و به مقایسه آن با رفرنس آندرسون (۵) و دیگر مطالعات انجام شده در این زمینه در سایر کشورها پرداخته‌ایم تا در صورت دارا بودن ارزش کاربردی در تشخیص هویت از این تکنیک در کنار مارکرهای STR برای تعیین هویت استفاده شود.

روش بررسی

در این تحقیق سه نسل متوالی مادری از ۱۰ خانواده غیر خویشاوند به طور تصادفی انتخاب شدند و پس از توضیح اهداف تحقیق و اخذ رضایت کتبی از آنها در مطالعه وارد گردیدند.

از هر یک از افراد انتخاب شده (مادربزرگ، مادر و نوه) دو میلی‌لیتر خون وریدی محیطی گرفته شد و درون میکروتیوب‌های حاوی پنج میلی‌گرم EDTA ریخته شد. به همین ترتیب از هر یک از ۱۰ خانواده انتخاب شده، سه نسل مادری متوالی انتخاب شد و نمونه گیری از ۳۰ نمونه مذکور صورت پذیرفت.

DNA نمونه های خون مذکور به روش استاندارد فنل کلروفرم (۶، ۷) استخراج شد و سپس وجود آنها بر روی ژل آگارز تایید و غلظت و خلوص آن توسط روش اسپکتروفتومتری تعیین گردید.

با استفاده از منابع و اطلاعات موجود، پرایمرهای مناسب برای قطعه مورد نظر یعنی قطعه HV۲ طراحی، انتخاب و تهیه گردید که سکانس آنها به شرح ذیل می باشد:

F 8-29 (5'-GGTCTATCACCCTATTAACCAC-3')

and

R 429-408(CTGTTAAAAGTGCATACCGCCA)

روش PCR برای تکثیر قطعه HV۲ اپتیمایز شد. در نتیجه PCR با مواد و سیکل حرارتی زیر انجام شد و قطعاتی به طول ۴۲۰ نوکلئوتید تکثیر گردیدند:

Buffer 10X 2.5µl، dNTP 1 µl، primer R µl، primer F µl، Mgcl2 0.6 µl،

Taq polymerase gold 0.3 µl، Sample DNA 2 µl، dH2O 16.6 µl، و µl Total Volume 25

الف) Initiation denaturation-3min-95c

ب) Denaturation-1min-94c, Annealing-1min-57c, Extension-1min-72c, ×30 cycles

ج) Final Extension-10min-72c

۳۰ نمونه استخراج شده فوق الذکر به روش اپتیمایز شده فوق بوسیله PCR تکثیر شدند.

سپس محصول PCR حاصل از قطعه HV۲ از ۳۰ نمونه مورد بررسی به روش BigDye ترمیناتور (Applied Biosystems) و با دستگاه سکوئنسر ژنتیکی ABI PRISM مدل۳۷۷ تعیین توالی گردید.

یافته ها

همانطور که در جدول ۱ آمده است پلی‌مرفیسم‌های ایجاد شده در منطقه HV۲ از ژنوم میتوکندری در ۱۰ خانواده غیر خویشاوند مورد مطالعه، بر حسب شماره نوکلئوتید و تغییرات حاصل در بازهای آلی در سه نسل متوالی مادری نشان داده شده است. بیشترین تغییرات در خانواده های شماره ۱و ۸ مشهود است که ۷ مورد پلی‌مرفیسم در آنها مشاهده گردید و کمترین میزان تغییرات در خانواده‌های شماره ۱۰ و ۲ به چشم می‌خورد که دارای ۳ مورد پلی‌مرفیسم می‌باشند (شکل ۲، پلی‌مرفیسم مشاهده شده در مادر بزرگ خانواده شماره ۱ و نوه در خانواده شماره ۳ را نشان می‌دهد).

بدیهی است هرچه بار تغییرات و تعداد پلی‌مرفیسم‌های ایجاد شده در یک خانواده نسبت به سکانس اندرسون بیشتر باشد بهتر می‌توان به شناسایی و ارتباط توارث مادری از این طریق پی برد.

نکته حائز اهمیت در توزیع فراوانی تغییرات در قطعه HV۲ در این جامعه آماری این بود که در منطقه HV۲ در خانواده‌های شماره ۶ و ۸ پدیده هتروپلاسمی مشاهده گردید. بدین مفهوم که تعیین توالی منطقه HV۲ در خانواده ۶ نشان داد که در مادربزرگ در نوکلئوتید شماره ۱۴۶ تغییر تیمین به سیتوزین صورت گرفته است ولی این تغییر به میزانی بوده است که هر دو باز آلی تیمین و سیتوزین مشاهده می‌شود ولی در مادر و نوه مشاهده نمی‌شود.

همینطور در نوکلئوتید شماره ۱۵۱ بازآلی تیمین به سیتوزین تغییر کرده است ولی این تغییر در مادربزرگ به صورت هتروپلاسمی دیده می‌شود و در مادر و نوه فقط تغییر تیمین به سیتوزین دیده می‌شود.

در مورد خانواده هشتم نیز هتروپلاسمی در نوکلئوتیدهای شماره ۱۴۶ و ۱۵۲ و ۲۹۵ در نوه دیده شد ولی در مادربزرگ و مادر هتروپلاسمی در نوکلئوتیدهای فوق الذکر به وضوح قابل مشاهده نیست.

این مطلب می‌تواند ناشی از موتاسیون جدید در نوه باشد و یا هتروپلاسمی در درصدهای بسیار پایینی در مادربزرگ و مادر وجود داشته، تصادفاً به نوه انتقال یافته و در درصدهای بالاتری قابل مشاهده شده باشد(۹ ،۸).

در جدول ۲ مناطق HV۲ در ده خانواده مورد مطالعه بصورت دو به دو با یکدیگر مقایسه شده و تعداد نوکلئوتیدهای متفاوت در این مناطق در آنها تعیین گردیده است. این بررسی نشان می‌دهد که میانگین تفاوت نوکلئوتیدی در منطقه HV۲ در این ۱۰ خانواده ۲/۸ نوکلئوتید است. لذا در بررسی رابطه خویشاوندی میان دو نمونه مجهول ازطریق بررسی مناطق HV۲ چنانچه این دو فرد غیر خویشاوند باشند می‌توان انتظار داشت که حدود ۲/۸ نوکلئوتید تفاوت در سکانس دو فرد مورد نظر وجود داشته باشد.

بحث

میتوکندری‌ها در خارج از هسته یعنی در سیتوپلاسم قرار دارند که خود دارای DNA ای متمایز از DNA هسته‌ای می باشند. وجه تمایز DNA میتوکندری با DNA هسته‌ای در موارد ذیل می‌باشد: mtDNA به صورت حلقوی و بسته دیده می‌شود درصورتی‌که DNA هسته‌ای به صورت خطی است. mtDNA از طریق مادر به ارث می‌رسد و به جز موارد موتاسیون و تغییرات هتروپلاسمی، ترتیب و توالی DNA میتوکندری در هر فرد مشابه توالی DNA میتوکندری اقوام مادری او می‌باشد (۱۰). در mtDNA نوترکیبی ایجاد نمی‌شود در نتیجه ردیابی آنها در نسل‌های متوالی ساده‌تر است (۱۱). mtDNA کوچک بوده، تا هزاران نسخه از آن در هر سلول یافت می‌شود. ثبات کم پلی‌مرازهای DNA میتوکندری و عدم وجود مکانیسم بازسازی و ترمیم در آن باعث جهش زیاد در ژنوم میتوکندری در مقایسه با ژنوم هسته‌ای می‌شود. به همین دلیل DNA میتوکندری در برخی از مناطق تا حدود ۱۰ برابر بیش از DNA هسته‌ای جهش و تغییر نشان می‌دهد. این خصوصیات سبب شده mtDNA در تحقیقات جنایی و قضایی بسیار حائز اهمیت باشد. در مواردی که نیاز است از mtDNA برای تعیین هویت استفاده شود نواحی استاندارد مورد استفاده در دنیا مناطق HV۱ و HV۲ می‌باشند زیرا این نواحی دارای بالاترین میزان تغییرات نوکلئوتیدی در افراد مختلف هستند. در بررسی های انجام شده مشخص شده است که مثلاً در میان نژاد قفقازی‌های غیر خویشاوند، به طور متوسط ۸ نوکلئوتید متفاوت در این ناحیه دیده می‌شود (۱۲)، این میزان در ساکنین اروپای مرکزی از جمله آلمان، سوییس و اتریش حدود ۸/۴۷ (۱۴، ۱۳)، در نژاد آفریقایی در حدود ۱۵ (۱۵) و در میان مردم ژاپن ۷/۶۹ نوکلئوتید (۱۶) گزارش شده است. در این خصوص گزارشی از تفاوت نوکلئوتیدها در ناحیه HV۲ در میان مردم ایران در منابع یافت نشد.

نتیجه گیری

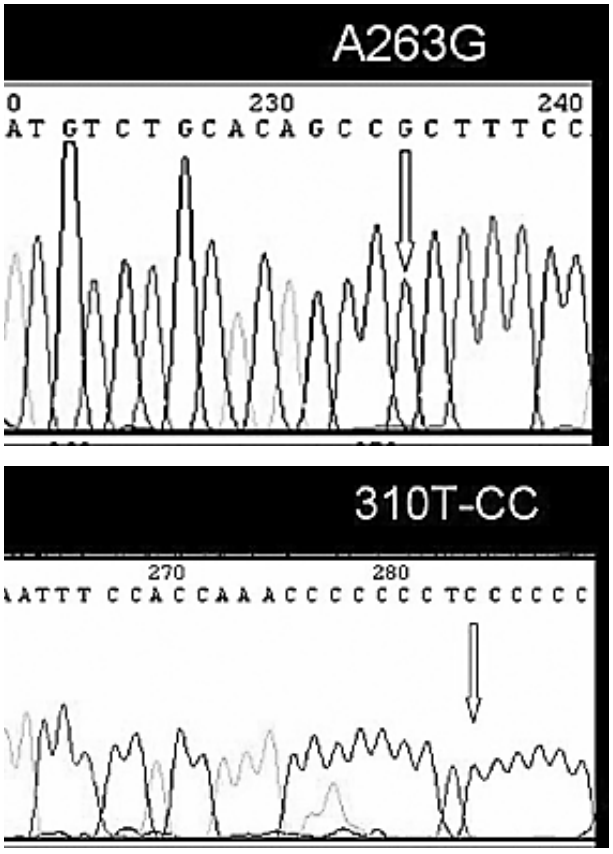
در این مطالعه منطقه HV۲ از ژنوم میتوکندری در ۱۰ خانواده غیرخویشاوند مورد بررسی و مطالعه قرار گرفت و همانطور که انتظار می‌رفت توالی نوکلئوتیدی در اعضای یک خانواده کاملا یکسان بودند. همچنین توالی نوکلئوتیدی این مناطق به صورت ۲ به ۲ بین خانواده‌های غیر خویشاوند مورد مقایسه و مطالعه قرار گرفت و مشخص گردید که به طور متوسط میان هر ۲ خانواده مورد مطالعه غیر خویشاوند در ناحیه HV۲، ۲/۸ نوکلئوتید تفاوت وجود دارد. از نتایج حاصل از این مطالعه می‌توان چنین استنتاج کرد که با بررسی این ناحیه انتظار می‌رود به طور متوسط حدود ۲/۸ نوکلئوتید اختلاف میان ۲ فرد غیر خویشاوند ایرانی وجود داشته باشد. این نتیجه بسیار نزدیک به

جدول ۱- تغییرات ایجاد شده در منطقه HV۲ در ۱۰ خانواده غیر خویشاوند بر حسب شماره نوکلئوتید در سه نسل متوالی مادری

خانواده	نسل ۱			نسل ۲			نسل۳		
	شماره نوکلئوتید	مرجع	تغییر	شماره نوکلئوتید	مرجع	تغییر	شماره نوکلئوتید	مرجع	تغییر
۱	۷۳	A	G	۷۳	A	G	۷۳	A	G
	۱۹۹	T	C	۱۹۹	T	C	۱۹۹	T	C
	۲۰۴	T	C	۲۰۴	T	C	۲۰۴	T	C
	۲۵۰	T	C	۲۵۰	T	C	۲۵۰	T	C
	۲۶۳	A	G	۲۶۳	A	G	۲۶۳	A	G
	۳۰۹	C	CC-T	۳۰۹	C	CC-T	۳۰۹	C	CC-T
	۳۱۰	T	T-CC	۳۱۰	T	T-CC	۳۱۰	T	T-CC
۲	۲۶۳	A	G	۲۶۳	A	G	۲۶۳	A	G
	۳۰۹	C	CC-T	۳۰۹	C	CC-T	۳۰۹	C	CC-T
	۳۱۰	T	T-CC	۳۱۰	T	T-CC	۳۱۰	T	T-CC
۳	۷۳	A	G	۷۳	A	G	۷۳	A	G
	۱۹۵	T	C	۱۹۵	T	C	۱۹۵	T	C
	۲۳۴	A	G	۲۳۴	A	G	۲۳۴	A	G
	۲۶۳	A	G	۲۶۳	A	G	۲۶۳	A	G
	۳۱۰	T	T-CC	۳۱۰	T	T-CC	۳۱۰	T	T-CC
۴	۷۳	A	G	۷۳	A	G	۷۳	A	G
	۱۹۵	T	C	۱۹۵	T	C	۱۹۵	T	C
	۲۶۳	A	G	۲۶۳	A	G	۲۶۳	A	G
	۳۰۹	C	CC-T	۳۰۹	C	CC-T	۳۰۹	C	CC-T
	۳۱۰	T	T-CC	۳۱۰	T	T-CC	۳۱۰	T	T-CC
۵	۷۳	A	G	۷۳	A	G	۷۳	A	G
	۲۶۳	A	G	۲۶۳	A	G	۲۶۳	A	G
	۱۶۱	-	G-ins	۱۶۱	-	G-ins	۱۶۱	-	G-ins
	۳۱۰	T	T-CC	۳۱۰	T	T-CC	۳۱۰	T	T-CC
۶	۷۳	A	G	۷۳	A	G	۷۳	A	G
	۱۴۶	T	T/C	۱۴۶	T	T	۱۴۶	T	T
	۱۵۱	T	T/C	۱۵۱	T	C	۱۵۱	T	C
	۱۵۲	T	C	۱۵۲	T	C	۱۵۲	T	C
	۲۶۳	A	G	۲۶۳	A	G	۲۶۳	A	G
	۳۰۹	C	CC-T	۳۰۹	C	CC-T	۳۰۹	C	CC-T
	۳۱۰	T	T-CC	۳۱۰	T	T-CC	۳۱۰	T	T-CC
۷	۷۳	A	G	۷۳	A	G	۷۳	A	G
	۲۶۳	A	G	۲۶۳	A	G	۲۶۳	A	G
	۳۰۹	C	CC-T	۳۰۹	C	CC-T	۳۰۹	C	CC-T
	۳۱۰	T	T-CC	۳۱۰	T	T-CC	۳۱۰	T	T-CC
۸	۷۳	A	G	۷۳	A	G	۷۳	A	G
	۱۴۶	T	C	۱۴۶	T	C	۱۴۶	T	T/C
	۱۵۲	T	C	۱۵۲	T	C	۱۵۲	T	T/C
	۲۶۳	A	G	۲۶۳	A	G	۲۶۳	A	G
	۲۹۵	C	T	۲۹۵	C	T	۲۹۵	C	T/C
	۳۰۹	C	CC-T	۳۰۹	C	CC-T	۳۰۹	C	CC-T
	۳۱۰	T	T-CC	۳۱۰	T	T-CC	۳۱۰	T	T-CC
۹	۷۳	A	G	۷۳	A	G	۷۳	A	G
	۲۶۳	A	G	۲۶۳	A	G	۲۶۳	A	G
	۲۹۵	C	T	۲۹۵	C	T	۲۹۵	C	T
	۳۰۹	C	CC-T	۳۰۹	C	CC-T	۳۰۹	C	CC-T
	۳۱۰	T	T-CC	۳۱۰	T	T-CC	۳۱۰	T	T-CC
۱۰	۷۳	A	G	۷۳	A	G	۷۳	A	G
	۲۶۳	A	G	۲۶۳	A	G	۲۶۳	A	G
	۳۱۰	T	T-CC	۳۱۰	T	T-CC	۳۱۰	T	T-CC

جدول ۲- مقایسه منطقه HV۲ در ۱۰ خانواده مورد مطالعه به صورت ۲ به ۲ و تعیین تعداد نوکلئوتیدهای متفاوت در آنها

خانواده	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	میانگین
۱	–	۴	۶	۴	۵	۵	۳	۶	۴	۳	۴
۲	۴	–	۴	۲	۳	۳	۱	۴	۲	۱	۲/۴
۳	۶	۴	–	۲	۳	۵	۳	۶	۴	۲	۳/۵
۴	۴	۲	۲	–	۳	۳	۱	۴	۱	۲	۲/۲
۵	۵	۳	۳	۳	–	۴	۲	۵	۳	۱	۲/۹
۶	۵	۳	۵	۳	۴	–	۲	۳	۳	۳	۳/۱
۷	۳	۱	۳	۱	۲	۲	–	۳	۱	۱	۱/۷
۸	۶	۴	۶	۴	۵	۳	۳	–	۲	۴	۳/۷
۹	۴	۲	۴	۱	۳	۳	۱	۲	–	۲	۲/۲
۱۰	۳	۱	۲	۲	۱	۳	۱	۴	۲	–	۱/۹
میانگین کل											۲/۸



شکل ۲- دو نمونه از پلی مرفیسم‌های مشاهده شده درخانواده شماره ۱ و خانواده شماره ۳

نتایج حاصل از مطالعه بر روی نژاد قفقازی‌ها می‌باشد. بنابر این به نظر می‌رسد که بررسی و تعیین توالی این منطقه از ژنوم میتوکندری جهت تعیین هویت در کشـــور بسیار مفید و حائز اهمیت باشد. چرا که انتظار می‌رود در زمان بررســـی رابطه خویشـــاوندی، چنانچه ۲ نمونه مجهول مورد نظر غیر خویشـــاوند باشند حدود ۲/۸ نوکلئوتید تفاوت در مناطق HV۲ آنها مشـــاهده گردد، در حالیکه اگر ۲ نمونه مجهول خویشاوند باشند انتظار داریم به جز موارد نادر موتاسیون و هتروپلاسمی هیچگونه تفاوتی در نوکلئوتیدهای این منطقه آنها مشاهده نگردد.

References

1- Rousslet F, mangin P. mtDNA polymorphisms: a study of 50 French Caucasian individuals and application to forensic casework. Int J Legal Med. 1998; 111:292-8.

2- Lutz S, Weisser HJ, Heizmann J, Pollak S. Location and frequency of polymorphic positions in the mtDNA control region of individuals from Germany. Int J Legal Med. 1998; 111:67-77.

3- Pfeiffer H, Steighner R, Fisher R, Mornstad H, Yoon CL, Holland MM. mtDNA extraction and typing from isolated dentin-experimental evaluation in a Korean population. Int J Legal Med. 1998; 111:309-13.

4- Holland MM, Fisher DL, Mitchell LG, Rodriquez WC, Canik JJ, Merril CR, et al. mtDNA sequence analysis of human skeletal remains: Identification of remains from the Vietnam war. Journal of Forensic Sciences. 1993; 38(3): 542-53.

5- Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. Nature. 1981; 290:457-64.

6- Kochl S, Niederstatter H, Parson W. DNA extraction and quantitation of forensic samples using the phenol-chloroform method and real-time PCR. Methods Mol Biol. 2005; 297:13-30.

7- Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. J Clin Microbiol. 1990; 28(3):495-503.

8- Behar DM, Hammer MF, Garrigan D, Villems R, Bonne-Tamir B, Richards M, et al. mtDNA evidence for a genetic bottleneck in the early history of the Ashkenazi Jewish population. Eur J Hum Genet. 2004; 12(5):355-64.

9-Marchington DR, Hartshorne GM, Barlow D, Poulton J. Homopolymeric tract heteroplasmy in mtDNA from tissues and single oocytes: support for a genetic bottleneck. Am J Hum Genet. 1997; 60(2):408-16.

10-Holland MM, Parson TJ. Mitochondrial DNA sequences analysis-validation and use for forensic casework. Forensic Sci Rev. 1999; 11:21-49.

11-Koyama H, Iwasa M, Ohtani S, Ohira H, Tsuchimochi T, Maeno Y, et al. Personal identification from human remains by mitochondrial DNA sequencing. Am J Forensic Med. 2002; 23(3):272-6.

12-Carracedo A, Bar W, Linclon PJ, Gill P, Mayr W, Morling N, et al. Guidelines for mitochondrial DNA typing.Forensic Sci Int. 110(2000);79-85.

13-Wittig H, Augustin C, Baasner A, Bulnheim U, Dimo-Simonin N, Edelmann J, et al. mtDNA in the central European population: Human identification with the help of the forensic mtDNA D-Loop base database. Forensic Science International. 2000; 113: 113-118.

14-Pfeiffer H, Brinkmann B, Huhne J, Rolf B, Morris AA, Steighner R, et al. Expanding the forensic German mitochondrial DNA control region database:genetic diversity as a function of sample size and microgeography. Int J Legal Med. 1999; 112:291-8.

15-Brandstatter A, Peterson CT, Irwin JA, Mpoke S, Koech DK, Parson W, et al. Mitochondrial DNA control region sequences from Nairobi (Kenya): inferring phylogenic parameters for the establishment of a forensic database. Int J Legal Med. 2004; 118:294-306.

16-Imaizumi K, Parson TJ, Yoshino M, Holland MM. A new database of mitochondrial DNA hypervariable region I and II sequences from 162 Japanese individuals. Int J Legal Med. 2002; 116:68-73.