طب‌نظامی
تابستان ۱۳۸٤، شماره ۷ (۲)
صفحات: ۱۱۹-۱۱۳

مطالعه منطقه HV1 از mtDNA جهت کاربرد در تشخیص هویت از طریق نسل مادری

سعید مروتی[۱]* M.D. Ph.D. و مهستی مدرسی[۲]**M.Sc.

*آدرس مکاتبه: * دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...«عج» - پژوهشکده طب رزمی - مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی - تهران - ایران*
*** اداره تشخیص هویت نیروی انتظامی جمهوری اسلامی ایران*

تاریخ اعلام وصول: ۱۳۸٤/۳/۱ تاریخ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۸٤/۵/۱ تاریخ اعلام قبولی مقاله: ۱۳۸٤/۶/۲٤

خلاصه

مقدمه: بررسی توالی DNA میتوکندریایی در منطقه بسیار متغیر نشان می‌دهد که این منطقه می‌تواند به‌عنوان ابزار مؤثری در تعیین هویت مورد استفاده قرار گیرد. تعداد زیاد کپی‌ها، مقاومت بیشتر در برابر تخریب، کوتاه بودن طول ژنوم در مقایسه با ژنوم هسته‌ای و الگوی وراثت مادری باعث گردیده است تا آنالیز mtDNA به‌ویژه در مواردی که به‌دلیل قدیمی بودن یا تخریب شدید نمونه بیولوژیک امکان بررسی ژنوم هسته‌ای مقدور نیست، مفید واقع گردد.

مواد و روش کار: در این مطالعه تجربی به بررسی پلی مورفیسم‌های موجود در ناحیه بسیار متغیر یک (HV1) از منطقه غیر رمز کننده D-loop در سه نسل متوالی مادری از ۱۰ خانواده غیر وابسته (جمعاً ۳۰ نفر) پرداخته شده است.

نتایج: در این ناحیه در خانواده‌های مورد بررسی ۳۲ محل نوکلئوتیدی پلی‌مورفیک یافت شد. توالی DNA و پلی‌مورفیسم‌های یافت شده در منطقه مورد نظر در سه نسل متوالی از هر خانواده کاملاً یکسان بودند. اما به‌طور متوسط در میان افراد از خانواده‌های متفاوت حدود ۵/۲ نوکلئوتید اختلاف وجود داشت.

بحث: در بررسی نمونه‌های بیولوژیک ناشناخته با هدف تشخیص هویت انتظار داریم در این ناحیه میان افراد با منشا یکسان مادری تفاوتی وجود نداشته ولی میان افراد غیر خویشاوند حدود ۵ نوکلئوتید اختلاف وجود داشته باشد. این روش می‌تواند به‌ویژه در تشخیص هویت پیکرهای مطهر شهدای به‌جا مانده از جنگ تحمیلی مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: DNA میتوکندریایی، تشخیص هویت، ناحیه بسیار متغیر یک، D-loop، پلی‌مورفیسم

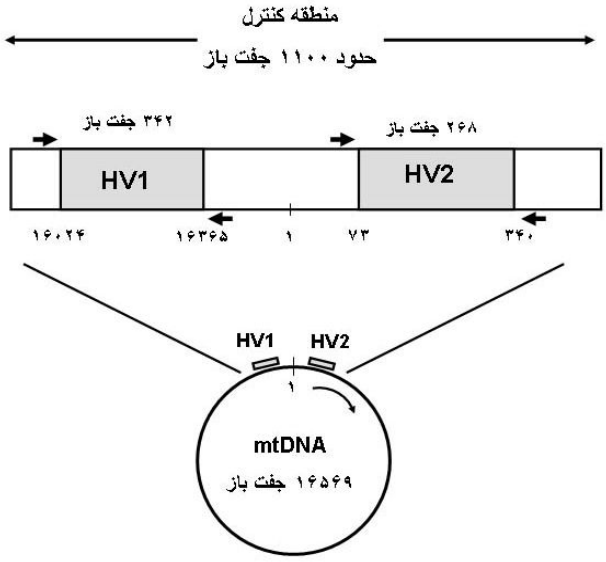
مقدمه

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 به‌طول 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) به‌نام Displacement-loop یا D-loop

---

۱- استادیار - دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...«عج» - نویسنده مسئول
۲- کارشناس ارشد بیوتکنولوژی مولکولی - اداره تشخیص هویت نیروی انتظامی جمهوری اسلامی ایران

است که پروتئینی کد نکرده و با فرکانس بسیار زیادی حدود ۱۰ برابر DNA هسته‌ای تمایل به جهش دارد. 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 تا این ناحیه در تشخیص هویت مورد توجه دانشمندان علوم نظامی و پزشکی قانونی قرار گیرد [۲]. در اکثر سیستم‌های DNA Typing از ژنوم هسته‌ای استفاده می‌شود، اما در مواردی‌که مقدار DNA استخراج شده از بافت‌هایی نظیر استخوان، دندان یا مو بسیار کم باشد یا در مواردی‌که نمونه بیولوژیک قدیمی و تخریب شده باشد، احتمال DNA Typing توسط mtDNA نسبت به سایر شاخص‌های پلی‌مورفیک هسته‌ای نظیر مارکرهای STR بسیار بیشتر است. از آنجا که تا هزاران نسخه از ژنوم mtDNA در یک سلول منفرد می‌تواند وجود داشته 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 می‌باشد [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 نمونه‌های بیولوژیک بسیار تخریب شده باشند باز هم mtDNA به قدر کافی وجود دارد که بتوان توالی نوکلئوتیدهای آن را به‌دست 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 رسیده 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 اعضا یک خانواده به‌وجود آورد اما مقدار این تفاوت‌ها زیاد نیست. لذا از نظر تئوری mtDNA یک فرد می‌باید 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 نیکلاس دوم روسیه 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، لذا ارزش کاربردی آن در تشخیص هویت در کشور ما مورد مطالعه قرار نگرفته است. در این مطالعه ناحیه بسیار متغیر یک (HV1) از mtDNA را در سه نسل متوالی مادری از ۱۰ خانواده غیر وابسته مورد بررسی قرار داده 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.



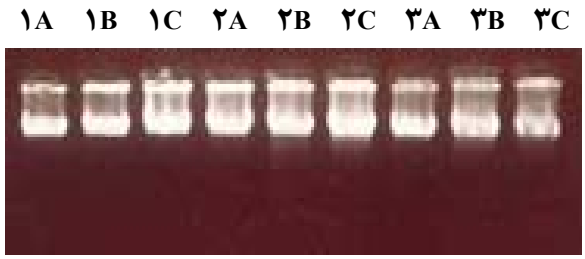
شکل ۱: نواحی HV1 و HV2 در mtDNA

مواد و روش کار

۱– در این تحقیق ناحیه HV1 از ژنوم میتوکندری در سه نسل متوالی مادری از ۱۰ خانواده غیرخویشاوند پس از توضیح روش و اخذ رضایت کتبی مورد بررسی قرار گرفت.

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

۳- DNA نمونه‌های خون مذکور به همراه mtDNA به روش استاندارد فنل کلروفرم [۶، ۷] استخراج شده و سپس وجود آنها بر روی ژل آگارز تأیید گردید.



شکل ۲: تأیید وجود DNA در نمونه‌ها پس از استخراج DNA به روش فنل‌کلروفرم

۴- با استفاده از منابع و اطلاعات موجود پرایمرهای مناسب برای قطعه مورد نظر یعنی قطعه HV1 طراحی، انتخاب و تهیه گردید که سکانس آنها به شرح ذیل می باشد:

F(5'-TTAACTCCACCATTAGCACC-3')

R(5'-CCTGAAGTAGGAACCAGATG-3)

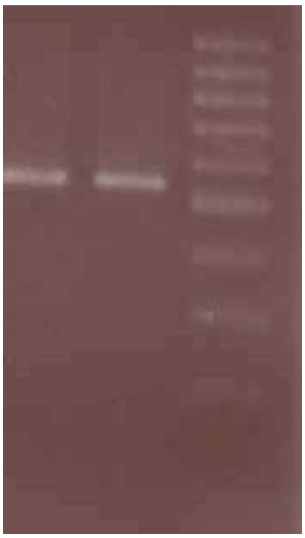
۵- روش PCR برای تکثیر قطعه HV1 اپتی‌مایز شد. در نتیجه PCR با مواد و سیکل حرارتی زیر انجام شد:

Buffer 10X 2.5µl, dNTP 1 µl, primer R1 µl, primer F1 µl, Mgcl2 0.6 µl, Taq polymerase gold 0.3 µl, Sample DNA 2 µl, dH2O 16.6 µl و Total Volume 25 µl

۱- Initiation denaturation-3min-95C°

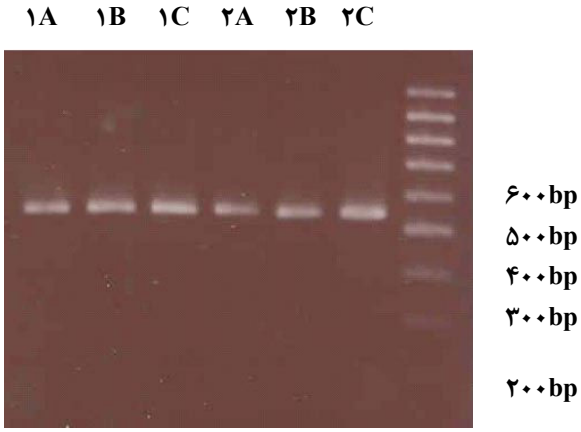
۲- Denaturation-1min-94C°, Annealing-1min-57C°, Extension-1min-72C°, ×30 cycles

۳- Final Extension-10min-72C°



شکل ۳: باندهای ایجاد شده ناحیه HV1 با مواد و سیکل حرارتی فوق‌الذکر

۶- ۳۰ نمونه استخراج شده فوق الذکر به روش اپتی‌مایز شده فوق به وسیله PCR تکثیر شدند.



شکل ۴: باندهای ایجاد شده ناحیه HV1 با روش اپتی‌مایز شده فوق‌الذکر برای خانواده‌های یک و دو

۷- سپس محصول PCR حاصل از قطعه HV1 از ۳۰ نمونه مورد بررسی به روش BigDye ترمیناتور (Applied Biosystems) و با دستگاه سکوئنسر ژنتیکی ABI PRISM مدل 377 تعیین توالی گردید.

نتایج

۱- مقایسه سکانس نمونه‌ها با سکانس مرجع اندرسون:

در ژنـوم میتوکـندری قطعه HV1 دارای طولی حدود ۵۵۰ جفت باز می‌باشد. با مقایسه مناطق HV1 از ۱۰ خانواده مورد بررسی در این مطالعـه در سه نسل متوالی مادری این قطعه در هر خانواده در نقاط ذیـل بـا سکانس مرجع متفاوت بود. این تفاوت‌ها در تمام خانواده‌ها در مـادر بـزرگ، مـادر و نـوه دخـتری یکسـان بودنـد و مـوارد هتروپلاسمیک در آنها دیده نشد [۸، ۹].

Family 1) T16017C, G16129A, C16223T, C16270T, G16391A

Family 2) C16067T, A16183G, T16311C, C16327A

Family 3) C16134T, T16356C

Family 4) A16119G

Family 5) T16126C, C16223T, C16344T

Family 6) A16309G, A16318T

Family 7) T16311C, T16224C

Family 8) C16069T, T16126C, C16193T, C16278T

Family 9) C16069T, T16126C, G16145A, C16222T, A16235G, C16261T, T16311C

Family 10) T16224C, T16311C

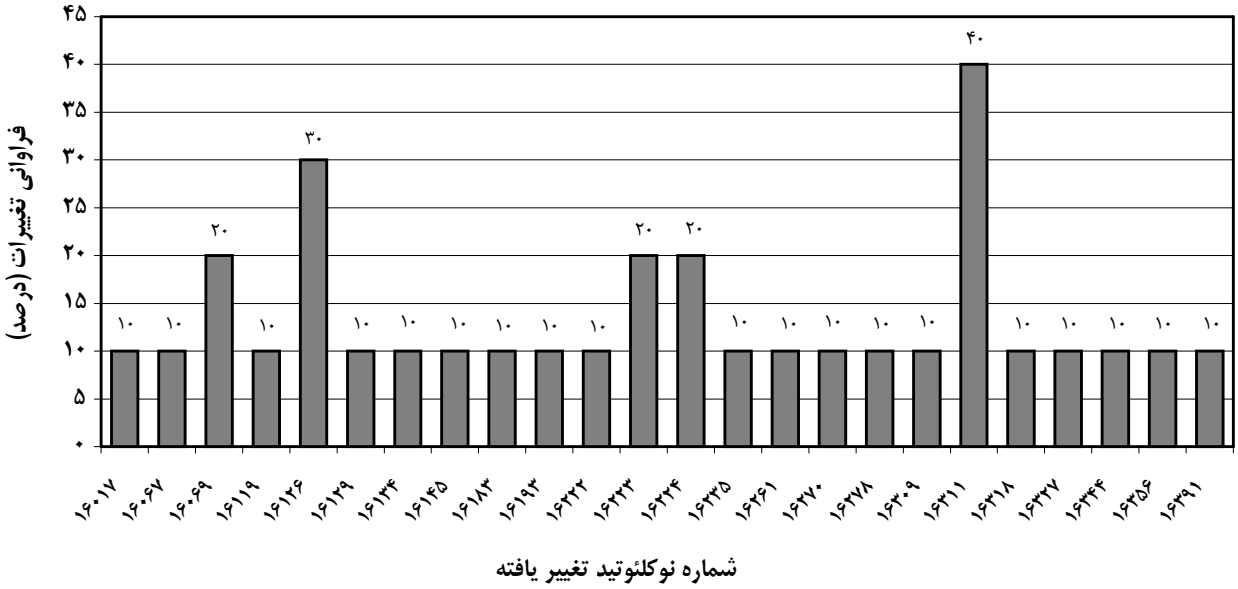
۲- مقایسه نتایج:

در جـدول ۱ پلـی‌مورفیسم‌های ایجاد شده در منطقه HV1 از ژنوم متیوکـندری در ۱۰ خـانواده غیرخویشـاوند مـورد مطالعـه، بر حسب شـماره نوکلئوتـید و تغیـیرات حاصـل در بازهـای آلـی در سه نسل متوالـی مـادری نشـان داده شـده است. بیشترین تغییرات مربوط به خـانواده شـماره ۹ اسـت کـه واجـد ۷ مـورد پلی‌مورفیسم نسبت به سـکانس اندرسـون مـی‌باشـد. سپس خانواده شماره ۱ قرار دارد که دارای ۵ مـورد پلی‌مورفیسم می‌باشد. کمترین میزان تغییرات مربوط به خانواده شماره ۴ بوده است که دارای یک پلی‌مورفیسم نسبت به سکانس اندرسون است.

جـدول ۱: تغیـیرات ایجاد شده در منطقه HV1 در ۱۰ خانواده غیرخویشاوند بر حسب شماره نوکلئوتید در سه نسل متوالی مادری

شماره خانواده	شماره نوکلئوتید	مرجع	نسل ۱	نسل ۲	نسل ۳
۱	۱۶۰۱۷	T	C	C	C
	۱۶۱۲۹	G	A	A	A
	۱۶۲۲۳	C	T	T	T
	۱۶۲۷۰	C	T	T	T
	۱۶۳۹۱	G	A	A	A
۲	۱۶۰۶۷	C	T	T	T
	۱۶۱۸۳	A	G	G	G
	۱۶۳۱۱	T	C	C	C
	۱۶۳۲۷	C	A	A	A
۳	۱۶۱۳۴	C	T	T	T
	۱۶۳۵۶	T	C	C	C
۴	۱۶۱۱۹	A	G	G	G
۵	۱۶۱۲۶	T	C	C	C
	۱۶۲۲۳	C	T	T	T
	۱۶۳۴۴	C	T	T	T
۶	۱۶۳۰۹	A	G	G	G
	۱۶۳۱۸	A	T	T	T
۷	۱۶۲۲۴	T	C	C	C
	۱۶۳۱۱	T	C	C	C
۸	۱۶۰۶۹	C	T	T	T
	۱۶۱۲۶	T	C	C	C
	۱۶۱۹۳	C	T	T	T
	۱۶۲۷۸	C	T	T	T
۹	۱۶۰۶۹	C	T	T	T
	۱۶۱۲۶	T	C	C	C
	۱۶۱۴۵	G	A	A	A
	۱۶۲۲۲	C	T	T	T
	۱۶۲۳۵	A	G	G	G
	۱۶۲۶۱	C	T	T	T
	۱۶۳۱۱	T	C	C	C
۱۰	۱۶۲۲۴	T	C	C	C
	۱۶۳۱۱	T	C	C	C

در شکل شماره ۵ فراوانی نسبی هر یک از تغییرات HV1 در کل جمعیت مورد مطالعه نشان داده شده است. این نمودار نشان می‌دهد که در جمعیت مورد مطالعه پلی‌مورفیسم T16311C دارای بیشترین فراوانی بوده و در ۴۰ درصد افراد مورد مطالعه دیده شده است. بعد از این مورد بیشترین فراوانی مربوط به پلی‌مورفیسم T16126C است.



شکل ۵: فراوانی نسبی تکرار تغییرات HV1 در جمعیت مورد مطالعه

در جدول ۲ مناطق HV1 در ۱۰ خانواده مورد مطالعه به‌صورت دو به دو با یکدیگر مقایسه شده و تعداد نوکلئوتیدهای متفاوت در این مناطق در آنها تعیین گردیده است.

جدول ۲: مقایسه منطقه HV1 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	–	۹	۷	۶	۶	۷	۷	۸	۱۱	۷	۶/۸
۲	۹	–	۶	۵	۷	۶	۴	۷	۹	۴	۵/۷
۳	۷	۶	–	۳	۵	۴	۴	۶	۹	۴	۴/۸
۴	۶	۵	۳	–	۴	۳	۳	۵	۸	۳	۴
۵	۶	۷	۵	۴	–	۵	۵	۴	۸	۵	۴/۹
۶	۷	۶	۴	۳	۵	–	۴	۶	۹	۴	۴/۸
۷	۷	۴	۴	۳	۵	۴	–	۶	۷	۰	۴
۸	۸	۷	۶	۵	۴	۶	۶	–	۷	۶	۵/۵
۹	۱۱	۹	۹	۸	۸	۹	۷	۷	–	۷	۷/۵
۱۰	۷	۴	۴	۳	۵	۴	۰	۶	۷	–	۴
میانگین کل											۵/۲

این بررسی نشان می‌دهد که میانگین تفاوت نوکلئوتیدی در منطقه HV1 در این ۱۰ خانواده ۵/۲ نوکلئوتید است. لذا در بررسی رابطه خویشاوندی میان دو نمونه مجهول از طریق بررسی مناطق HV1 چنانچه دو نمونه مورد نظر غیرخویشاوند باشند می‌توان انتظار داشت که حدود ۵/۲ نوکلئوتید تفاوت در سکانس آن دو وجود داشته باشد.

بحث

میتوکندری‌ها در خارج از هسته یعنی در سیتوپلاسم قرار دارند که خود دارای DNA ای متمایز از DNA هسته‌ای می‌باشند. وجه تمایز DNA میتوکندری با DNA هسته‌ای در موارد ذیل می‌باشد: mtDNA به‌صورت حلقوی و بسته دیده می‌شود درصورتی که DNA هسته‌ای به‌صورت 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

ایجـاد نمـی‌شـود در نتـیجه ردیابـی آنهـا در نسـل‌هـای متوالـی سـاده‌تـر اسـت [۱۱]. mtDNA کوچـک بوده و تا هزاران نسخه از آن در هـر سـلول یافـت مـی‌شـود. ثـبات کـم پلـیمرازهای DNA میتوکـندری و عـدم وجـود مکانـیزم بازسـازی و ترمـیم در آن باعـث جهـش زیـاد در ژنـوم میتوکـندری در مقایسـه بـا ژنـوم هسـته‌ای مـی‌شـود. بـه همیـن دلـیل DNA هـای میتوکندری در برخـی از مـناطق تـا حـدود ۱۰ برابر بیش از DNA های هسته‌ای جهـش و تغیـیر نشان داده‌اند. این خصوصیات سبب شده mtDNA در تحقـیقات نظامـی و قضایی بسیار حایز اهمیت باشد. در مواردی کـه نـیاز است از mtDNA برای تعیین هویت استفاده شود، نواحی استاندارد مورد استفاده در دنیا مناطق HV1 و HV2 می‌باشند؛ زیرا ایـن نواحـی دارای بالاتریـن مـیزان تغیـیرات نوکلئوتـیدی در افراد مخـتلف هسـتند. در بررسی‌های انجام شده مشخص شده است که مـثلاً در مـیان نـژاد قفقـازی‌هـای غیرخویشـاوند بـه‌طـور متوسـط ۸ نوکلئوتـید مـتفاوت در ایـن ناحـیه دیـده مـی‌شود. این میزان در سـاکنین اروپـای مرکـزی از جملـه آلمـان، سـوئیس و اتـریش حـدود ۸/۴۷ [۱۲، ۱۳]، در نـژاد آفریقایـی در حـدود ۱۵ [۱۴] و در مـیان مـردم ژاپـن ۷/۶۹ نوکلئوتـید [۱۵] گـزارش شـده اسـت. متوسـط تفـاوت نوکلئوتـیدها در ناحـیه HV1 در مـیان مـردم روسیه ۳/۵۹ گزارش گردیده است [۱۶]. در این خصوص گزارشی از تفـاوت نوکلئوتـیدها در ناحـیه HV1 در مـیان مـردم ایـران در مـنابع یافـت نشـد. در این مطالعه منطقه HV1 از ژنوم میتوکندری در ۱۰ خـانواده غـیر خویشـاوند ایرانـی مـورد بررسـی و مطالعـه قـرار گرفـت و همـان طـور کـه انـتظار می‌رفت توالی نوکلئوتیدی در اعضـا یک خانواده کاملاً یکسان بود. همچنین توالی نوکلئوتیدی ایـن مـناطق بـه صـورت ۲ بـه ۲ بیـن خـانواده‌هـای غیرخویشاوند مـورد مقایسـه و مطالعـه قـرار گرفـت و در نتـیجه مشخص گردید کـه بـه‌طـور متوسـط میان هر ۲ خانواده مورد مطالعه غیرخویشاوند در ناحیه HV1، ۵/۲ نوکلئوتید تفاوت وجود دارد.

نتیجه‌گیری

از نـتایج حاصـل از ایـن مطالعـه مـی‌توان چنین استنتاج کرد که با بررسـی ایـن ناحیه انتظار داریم به‌طور متوسط حدود ۵/۲ نوکلئوتید اختلاف میان ۲ فرد غیر خویشاوند ایرانی وجود داشته باشد. بنابراین بـه نظـر مـی‌رسـد کـه بررسـی و تعییـن توالـی این منطقه از ژنوم میتوکـندری جهـت تعییـن هویـت در کشـور بسـیار مفـید و حایـز اهمیـت مـی‌باشـد. چـرا کـه انـتظار مـی‌رود در زمـان بررسـی رابطه خویشاوندی، چنانچه ۲ نمونه مجهول مورد نظر غیرخویشاوند باشـند، حـدود ۵ نوکلئوتـید تفـاوت درمـناطق HV1 آنهـا مشاهده گـردد؛ در حالـی کـه اگـر ۲ نمونـه مجهـول خویشـاوند باشـند، انـتظار داریـم بـه جـز مـوارد نـادر موتاسـیون و هتروپلاسـمی هیچ‌گونه تفاوتی در نوکلئوتیدهای این منطقه آنها مشاهده نگردد.

منابع

1- Rousslet F and 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 and 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 and 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):542-553.

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 and 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 and 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 and 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- 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.

13- 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.

14- 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.

15- Imaizumi K, Parson TJ, Yoshino M and 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.

17- Belyaeva O, Bermisheva M, Khrunin A, Slominsky P, Bebyakova N, Khusnutdinova E et al. mtDNA variations in Russian and Belorussian populations. Human Biology 2003;75-5:647-660.

16- Melton T, Dimick G, Higgins B, Lindstrom L and Nelson K. Forensic mitochondrial DNA analysis of 691 casework hairs. J Forensic Sci 2005;50(1):1-8.