Archive of SID

بررسی پلی‌مورفیسم DNA میتوکندریایی در قوم آذری به روش PCR-RFLP

پروانه سلحشور[1]، دکتر محمد اصغر زاده[2]، *دکتر محمدعلی حسینپور فیضی[3]

تاریخ دریافت: ۸۴/۵/۹
تاریخ پذیرش: ۸۴/۱۰/۲۲

چکیده

هدف

مطالعه پلی‌مورفیسم ژنتیکی جمعیت‌ها از طریق ژنوم میتوکندری در کشورهای توسعه یافته انجام گرفته است. قوم آذری یکی از اقوام بزرگ ایرانی است که بیشتر در مناطق شمال غرب کشور ساکن می‌باشند. هدف این مطالعه بررسی تنوع ژنتیکی آنها با روش PCR-RFLP می‌باشد.

مواد و روش کار

در این مطالعه ۱۲۰ نمونه خون از افراد ساکن در شهرهای مختلف آذربایجان تهیه و قسمت بافی کوت نمونه‌ها جدا گردید، DNA گلبول‌های سفید استخراج شده، و قطعه D-Loop از mtDNA توسط پرایمرهای ویژه طی PCR تکثیر یافت. در نهایت محصول PCR توسط آنزیم های محدود کننده برش داده شد.

نتایج

به کمک PCR قطعهٔ D-Loop به اندازه ۱۰۲۴ bp تکثیر یافته و طی الکتروفورز به صورت باند قوی روی ژل مشاهده گردید. بر اثر برش با *HaeIII* ، ۶ تنوع مشاهده گردید که یک مورد هتروپلاسمی وجود داشت. همچنین در نتیجه برش با آنزیم *AluI*، دو نوع تنوع که شامل یک مورد هتروپلاسمی است شناسایی شد.

نتیجه گیری

۷ تنوع ژنتیکی در کل ۱۲۰ نمونه مورد مطالعه به دست آمد. این مقدار تنوع در نمونه‌های ما می تواند نتیجه اندازه جمعیت اجدادی کوچکتر و یا تاریخ ژنتیک کوتاه‌تر در قوم آذری باشد.

کلمات کلیدی: PCR-RFLP، mtDNA ، پلی مورفیسم.

۱- کارشناس ارشد زیست شناسی سلولی- مولکولی
۲- استادیار گروه بیوشیمی و آزمایشگاه‌های بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
۳- استاد رادیوبیولوژی گروه زیست جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز
* نویسنده مسئول، تلفن: ۳۳۵۲۲۶۱-۰۴۱۱، نمابر: ۳۳۶۲۲۸۲-۰۴۱۱، info@eastp.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

مطالعه تنوع ژنتیکی جمعیت ها جهت بررسی شجره نامه ها از طریق ژنوم میتوکندری در عمده کشورهای پیشرفته و توسعه یافته صورت گرفته است (۱-۳). در این بررسی مطالعه تنوع ژنتیکی mtDNA در قوم آذری مد نظر است. مولکول mtDNA مولکولی حلقوی بسته با ۱۶۵۶۹ bp می باشد که درون ماتریکس میتوکندری قرار دارد. این مولکول به علت داشتن ویژگی های بی مانندی از جمله هاپلوئید بودن آن، تعداد کپی بالا، نداشتن نوترکیبی، میزان جهش بالا و روش وراثت مادری ابزار مفیدی برای تعیین پیوستگی ژنتیکی جمعیت ها و تکامل انسان محسوب می‌شود (۲، ۴-۶).

برای تعیین تنوع از ناحیه Displacement Loop (D- Loop) در mtDNA استفاده شد که بخش غیر کد دار ژنوم میتوکندری است و دارای بخش‌های تنظیم کننده همانند سازی و رونویسی است. علاوه بر این دارای دو بخش فوق متغیر (هایپرواریبل) بوده و همین طور در این ناحیه درصد بالاتری الحاق، حذف، جهش‌های مختلف نسبت به نقاط دیگر ژنوم میتوکندری اتفاق می افتد (۵، ۷).

برای تکثیر از روش PCR استفاده شد که به علت دارا بودن ویژگی و حساسیت بالا و سرعت انجام آن، جایگاه ویژه ای در تحقیقات و تشخیص های مولکولی پیدا کرده و نقش کلیدی در بیولوژی مولکولی دارد (۸). در این روش قطعه D-Loop با استفاده از دو پرایمر ویژه و آنزیم DNA پلیمراز مقاوم به حرارت تکثیر یافت.

پرایمرها به یک قسمت اختصاصی مجاور توالی هدف و گاهی خود توالی هدف متصل می شوند و در حضور آنزیم DNA پلیمراز مقاوم به حرارت و نوکلئوتیدها، مکمل رشته DNA هدف سنتز می شود. در ادامه مطالعه، محصول PCR با چند آنزیم محدود کننده برش داده شده تا تنوعات ایجاد شده مورد بررسی قرار گیرد. چون در سرتاسر ژنوم انسان، تغییرات بازی تصادفی درون ژنی، درون قطعات DNA غیر کد دار و خارج ژنی و درون قطعات DNA کد دار ایجاد می شود، در نتیجه این تغییرات می‌تواند سایت های آنزیم محدود کننده جدیدی ایجاد کند که از طریق وراثت به ارث می‌رسند، الگوهای RFLP از محصولات PCR برای یک قطعه خاص از ژنوم در افراد مختلف با هم متفاوت بوده و از آن برای یافتن قرابت و خویشاوندی افراد و تنوع ژنتیکی استفاده می شود (۹).

مواد و روش کار

در این مطالعه تحقیقاتی، نمونه ها (خون) از ۱۲۰ فرد سالم غیر خویشاوند تهیه گردید، افراد مورد مطالعه ساکن مناطق مختلف آذربایجان (اردبیل، تبریز، کلیبر، ورزقان، عجب شیر، ملکان، مراغه و روستاهای نزدیک این مناطق) بودند. افراد تحت مطالعه حداقل تا دو نسل قبل از خود، خانواده شان ساکن این مناطق بوده و ازدواج غیر آذری در فامیل پدر یا مادر نداشته اند .

استخراج DNA: بافی کوت از خون افراد جدا و ۱۵۰µl از آن به میکروتیوپ ۱/۵ ml ریخته شد و به آن ۲۵۰µl بافر TE (Tris – HCl ۱۰ mM ، pH=۸ ، EDTA ۱mM) اضافه گردید، با استفاده از SDS ۱۰٪ ، پروتئیناز K ۲۰ mg/ml ، CTAB ۱۰٪ و کلروفرم / ایزوآمیل الکل (۲۴:۱) DNA جدا و بعد از رسوب با ایزوپروپانول و شستشو با اتانول ۷۰٪ در بافر TE حل شد (۵).

PCR: قطعه D-Loop به اندازه ۱۰۲۴ bp با استفاده از دو پرایمر

L_{15997} : 5´-CAC CAT TAG CAC CCA AAG CT- 3´

H_{408} : 5´-CTG TTA AAA GTG CAT ACC GCC A-3´

تکثیر داده شد (۱۰). به این صورت که DNA استخراج شده به مقدار ۲ µl به مخلوط PCR (حجم نهایی ۱۰۰ µl) اضافه شد که دارای ۵۰۰ nM از پرایمرهای L_{15997} ، H_{408} و $MgCl_2$ ۱/۵ mM ، ۱۰۰ µM از هر کدام از dGTP ، dCTP، dATP ، dTTP و همچنین ۲U Taq DNA پلی مراز نوترکیب (شرکت سیناژن) بود و ۴۰ µl پارافین استریل اضافه شد. واکنش در ترمال سایکلر به صورت زیر انجام شد، سیکل اول ۹۴ °C به مدت ۴ دقیقه، ۳۰ سیکل بعدی ۹۴ °C یک دقیقه، ۶۰°C یک دقیقه، ۷۲ °C یک دقیقه و سیکل آخر به مدت ۶ دقیقه در ۷۲°C انجام شد. در نهایت محصولات PCR در ژل آگاروز ۱ ٪ الکتروفورز گردید و پس از رنگ آمیزی با ۰/۵ µg/ml اتیدیوم بروماید در مقابل نور

www.SID.ir

Archive of SID

UV حاصل از ترانس لومیناتور مورد بررسی قرار گرفتند و اندازه قطعات حاصل در مقایسه با DNA ladder تعیین شد (۵).

RFLP: محصولات PCR توسط کیت High pure PCR product purification kit شرکت Roche تخلیص گردید و سپس تحت تأثیر آنزیم های محدود کننده *HaeIII* و *AluI* قرار گرفتند. سپس در ژل آگاروز ۱٪ الکتروفورز و با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی گردیدند و تعداد و اندازه قطعات حاصل در مقایسه با DNA Ladder مشخص گردید.

نتایج

تکثیر قطعه mtDNA D-Loop از طریق PCR

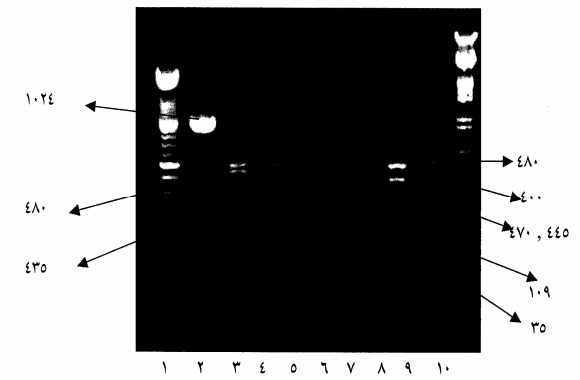
در طی PCR، قطعه D-Loop به اندازه ۱۰۲۴ bp با استفاده از دو پرایمر H_{408} و L_{15997} تکثیر شد. نتایج مطالعه باندهای PCR روی ژل به این صورت است که قطعه D-Loop به اندازه ۱۰۲۴ bp به صورت باند واضحی دیده شد که اندازه باندها از روی سایز مارکر *EcoRI* Digest , *HindIII* / λDNA و سایز مارکر ۱۰۰ bp مشخص شد. این سایز مارکرها دارای قطعات DNA در اندازه‌های استاندارد تعیین شده است، که از روی اندازه قطعات آنها می توان حدود اندازه قطعات DNA خودمان را تشخیص بدهیم.

برش قطعهٔ D-Loop با آنزیم محدود کننده HaeIII

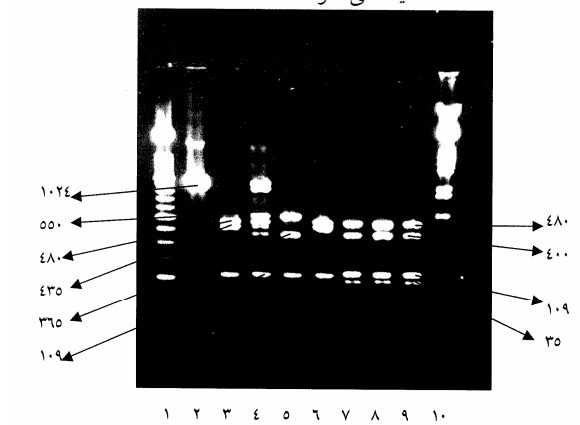
اندازه قطعات حاصل از برش و تعداد نمونه هایی که این قطعات را دارند در جدول (۱) نشان داده شده است و قطعات به دست آمده در شکل (۱) و شکل (۲) مشاهده می گردد.

جدول ۱: قطعات حاصل از برش با *Hae III*.

تعداد نمونه ها	اندازه قطعات
۵۳	۱۰۹، ۴۳۵، ۴۸۰
۲۳	۱۰۹، ۳۶۵، ۵۵۰
۱۰	۱۰۹، ۴۰۵، ۵۱۰
۸	۱۰۹، ۴۴۵، ۴۷۰
۲۵	۳۵، ۱۰۹، ۴۰۰، ۴۸۰
یک مورد هتروپلاسمی	۱۰۹، ۳۶۵، ۴۳۵، ۴۸۰، ۵۵۰
جمع کل ۱۲۰ نمونه	



شکل ۱: در این تصویر، باندهای متعدد حاصل از اثر آنزیم *HaeIII* روی محصول PCR دیده می شود.
Lane۱: سایز مارکر ۱۰۰ bp و Lane ۲ محصول PCR (۱۰۲۴ bp) و Lane ۳، ۶، ۹ قطعاتی در حدود اندازه ۱۰۹، ۴۳۵، ۴۸۰ و Lane ۵، ۸، ۴ قطعاتی در حدود اندازه ۳۵، ۱۰۹، ۴۰۰، ۴۸۰ و Lane ۷ قطعاتی در حدود اندازه ۱۰۹، ۴۴۵، ۴۷۰ و Lane ۱۰ سایز مارکر *EcoRI* Digest و λDNA/*HindIII* دیده می شود.



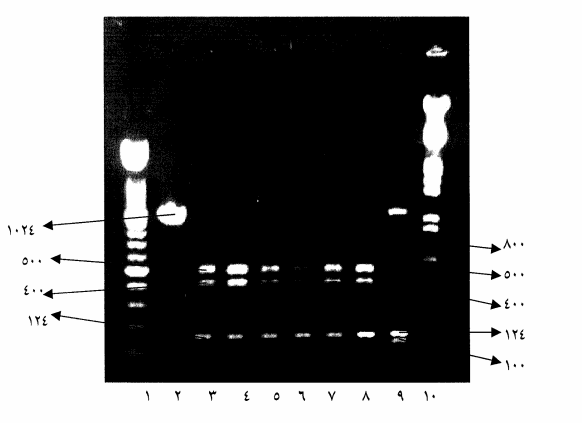
شکل ۲: در این تصویر، باندهای متعدد حاصل از اثر آنزیم *HaeIII* روی محصول PCR دیده می شود.
Lane۱: سایز مارکر ۱۰۰ bp و Lane ۲ محصول PCR (۱۰۲۴ bp) و Lane ۳، ۶ قطعات ۱۰۹، ۴۳۵، ۴۸۰ و Lane ۴ هتروپلاسمی با قطعات ۱۰۹، ۳۶۵، ۴۳۵، ۴۸۰، ۵۵۰ و Lane ۵ قطعات ۱۰۹، ۳۶۵، ۵۵۰ و Lane ۷، ۸، ۹ قطعات ۳۵، ۱۰۹، ۴۰۰، ۴۸۰ و Lane ۱۰ سایز مارکر Lambda DNA / *HindIII*, *EcoRI* Digest دیده می شود.

برش قطعه D-Loop با آنزیم محدود کننده *AluI*

طبق برش قطعه D-Loop با آنزیم محدود کننده *AluI*، ۱۱۹ نمونه سه قطعه با اندازه‌های حدود ۱۲۴ bp، ۴۰۰، ۵۰۰ و یک مورد هتروپلاسمی با اندازه قطعات حدود ۱۰۰ bp، ۱۲۴، ۱۲۴، ۴۰۰، ۵۰۰، ۸۰۰ مشاهده گردید (شکل ۳). نتایج بررسی ها روی ۱۲۰ نمونه که با آندونوکلئازهای *AluI*، *HaeIII* برش خورده اند، نشان دهنده ۷ نوع تنوع مختلف می‌باشد. تنوع های به دست آمده در جدول ۲ آورده شده است.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳: در این تصویر، باندهای متعدد حاصل از اثر آنزیم *AluI* روی محصول PCR دیده می شود.
Lane ۱: سایز مارکر bp ۱۰۰ و Lane ۲ محصول PCR (۱۰۲٤ bp) و Lane ۳، ٤، ۵، ٦، ۷، ۸ قطعاتی در حدود اندازه ۱۲٤ , ٤۰۰ , ۵۰۰ و Lane ۹ هتروپلاسمی با قطعات در حدود ۱۰۰ , ۱۲٤ , ٤۰۰ , ۵۰۰ , ۸۰۰ و Lane ۱۰ سایز مارکر *EcoRI* Digest و lambda DNA/ *HindIII* دیده می شود.

جدول۲: تنوع به دست آمده از ۱۲۰ نمونه با مشخصات هر یک از ۷ تنوع.

تنوع	اندازه قطعات در اثر *HaeIII*	اندازه قطعات در اثر *AlUI*
۱	۱۰۹، ٤۳۵، ٤۸۰	۱۲٤، ٤۰۰، ۵۰۰
۲	۱۰۹، ۳٦۵، ۵۵۰	۱۲٤، ٤۰۰، ۵۰۰
۳	۱۰۹، ٤٤۵، ٤۷۰	۱۲٤، ٤۰۰، ۵۰۰
٤	۱۰۹، ٤۰۵، ۵۱۰	۱۲٤، ٤۰۰، ۵۰۰
۵	۳۵، ۱۰۹، ٤۰۰، ٤۸۰	۱۲٤، ٤۰۰، ۵۰۰
٦	۱۰۹، ۳٦۵، ٤۳۵، ٤۸۰، ۵۵۰	۱۲٤، ٤۰۰، ۵۰۰
۷	۱۰۹، ٤۳۵، ٤۸۰	۱۰۰، ۱۲٤، ۱۲٤، ٤۰۰، ۵۰۰، ۸۰۰

بحث و نتیجه گیری

برای تکثیر قطعه D-Loop از دو پرایمر L_{15997} و H_{408} استفاده شد. پرایمر L_{15997} با ناحیه فوق متغیر I (هایپرواریبل I) هیبرید شده و الگوهای پلی مورفیک بیشتری را ایجاد می کند زیرا تحقیقات محققان بسیاری از جمله Ginther و همکاران مشخص کردند که ناحیه فوق متغیر I قطعه D-Loop متغیرتر از ناحیه فوق متغیر II (هایپرواریبل II) می باشد (۱۱). پس برای مطالعه پلی مورفیسم در قطعه D-Loop تکثیر ناحیه متغیر I از اهمیت بیشتری برخوردار است. بنابراین می توان به جای تکثیر کامل قطعه D-Loop ، قطعات فوق متغیر I و II را جداگانه تکثیر نموده و آنالیز های لازم را روی این قطعات انجام داد (۵، ۱۲، ۱۳)، و یا فقط از قطعه فوق متغیر I برای بررسی تنوع در جمعیت استفاده نمود (۵). همانطوری که در قسمت نتایج ذکر شده در اثر برش با آنزیم محدود کننده *HaeIII*، ۶ نوع تنوع که یک مورد هتروپلاسمی است در نمونه‌ها مشاهده شد. در اثر برش با آنزیم محدود کننده *AluI* هم دو نوع تنوع که یک مورد آن هتروپلاسمی است مشخص گردید. هتروپلاسمی همزیستی دو یا چند نوع mtDNA در یک میتوکندری، سلول یا فرد منفرد می باشد. طرز تشخیص هتروپلاسمی به این صورت است که در نمونه خاصی که هتروپلاسمی در آن دیده می شود تعداد باندهای DNA بیشتر از معمول می باشد و مجموع حدود اندازه های این باندها به جای اینکه در حدود bp ۱۰۲۴ باشد در حدود ۲۰۴۸ می‌باشد که نشان دهنده وجود دو نوع mtDNA در نمونه مورد نظر است. بیشتر نمونه‌ها در اثر برش با *HaeIII*، قطعاتی در حدود ۱۰۹، ۴۳۵، ۴۸۰ را ایجاد می کنند. ولی در ۴ نوع دیگر، اندازه قطعات متفاوت بوده است. دلیل این تفاوت در اندازه قطعات به علت تغییر سایت برشی آنزیم محدود کننده *HaeIII* می‌باشد. بر اثر برش نمونه‌ها با آنزیم *AluI* نیز، دو نوع تنوع شامل یک مورد هتروپلاسمی مشاهده شد و در مجموع از کل ۱۲۰ نمونه بررسی شده ۷ تنوع مختلف به دست آمد. جهش هایی که باعث این تغییرات در اندازه قطعات شده اند، شاید خاص قوم آذری باشند. مطالعات محققان نشان داده است که بیشتر جهش هایی که در mtDNA رخ می دهد، جانشین‌های نوکلئوتیدی از نوع transition می‌باشد (۱۳،۱۲). در transition یک پورین با پورین دیگر و یا یک پریمیدین با پریمیدین دیگر تعویض می‌شود که این تعویض ها می تواند محلی را که سایت برشی یک آنزیم محدود کننده بوده است، تغییر دهد و در نتیجه این سایت برشی از قطعه مورد نظر حذف شده و یا چندین نوکلئوتید فرا دست یا فرودست آن نقطه، جهش دیگری باعث ایجاد سایت برشی جدید نماید. با بررسی‌هایی که روی قطعات انجام شد، می توان گفت که بیشتر تغییرات در طول قطعات برشی مربوط به ناحیه فوق متغیر I D-Loop می باشد. هتروپلاسمی که در نمونه های ما مشاهده شد، نشان دهنده وجود بیش از یک نوع mtDNA (نرمال و موتان) می باشند.

www.SID.ir

Archive of SID

میزان بروز هتروپلاسمی در نمونه های ما ۱/۶۶٪ می باشد که درصد پایینی را نشان می دهد که احتمالاً به خاطر جوان بودن افرادی است که از آنها نمونه اخذ شده است. ایجاد هتروپلاسمی شاید در همه اشخاص وجود داشته باشد، اما به علت سطح پایین هتروپلاسمی قابل کشف نباشد، البته در بعضی از مطالعات محققان میزان هتروپلاسمی در نمونه های آنها تا ۲۰٪ هم گزارش شده است (۱۰). لازمه هتروپلاسمی ایجاد موتان ها در mtDNA می باشد که موتان ها هم می‌توانند از طریق وراثت مادری به ارث برسند و هم موتان های سوماتیک در طول حیات در شخص تجمع می‌یابند. ایجاد این موتان ها با سن افراد (۱۴) و عوامل محیطی متعدد (۱۵) ارتباط دارد. تحقیقات نشان داده است که حالت هتروپلاسمی با بعضی از بیماری های وراثتی وابسته به میتوکندری ارتباط دارند (۱۶، ۱۷، ۱۸). مطالعه تنوع ژنتیکی میتوکندری و هتروپلاسمی در جمعیت‌های مختلف انسانی باعث تشخیص هاپلو گروه های متفاوت در جمعیت‌ها می‌شود که انواع هاپلوگروه‌ها و توزیع آنها با چگونگی منشا فیلوژنتیکی انسان و تکامل و طول عمر افراد ارتباط مستقیم دارد (۱۹، ۲۰، ۲۱).

برای بررسی تنوع ژنتیکی در جمعیت های انسانی محققانی همچون Torroni (۲، ۲۰) و Wallace (۲۱) و محققان دیگر در سراسر دنیا آنالیزهایی توسط آنزیم‌های محدود کننده روی mtDNA انجام داده و بخش های فوق متغیر I و II قطعه D-Loop mtDNA را توالی یابی کردند. این مطالعات که بر روی مردم اروپا، آمریکا، آسیا و آفریقا انجام شده است نشان می دهد که در مردم اروپایی ده هاپلو گروه H ، I ، J ، K ، M ، T ، U ، V ، W و X دیده می شود که هاپلو گروه های H ، I ، J ، K توزیع وسیعی در جمعیت های اروپایی دارد. چهار هاپلو گروه A ، B ، C ، D در میان بومیان آمریکایی (Amerinds) دیده شده که جزو هاپلو گروه های آسیایی است که می تواند دلیل قرابت و خویشاوندی بومیان آمریکایی با آسیایی ها باشد. در میان آسیایی ها هم هاپلو گروه های A ، B ، C ، D ، E ، F ، G ، M دیده می شود (۲، ۱۳، ۲۰، ۲۱).

مطالعات RFLP روی کل mtDNA می تواند تعیین کننده گروه های بزرگ در جمعیت یعنی هاپلوگروه ها باشد، سپس با توالی یابی قطعات به دست آمده و همین طور توالی یابی قطعات فوق متغیر I و II و یا فقط قطعه I، می توان هاپلو تیپ‌های هر هاپلو گروه را تعیین کرد. چون تحقیق ما در مراحل اولیه بررسی تنوع ژنتیکی قرار دارد با توجه به امکانات اولیه که داشتیم در فاز اول، بررسی RFLP را روی قطعه D-Loop انجام دادیم که با ادامه تحقیق و بررسی های دیگر شاید بتوانیم هاپلوگروه ها را در نمونه ها تعیین کنیم.

مطالعه قطعات حاصل از آنزیم های محدود کننده نشان دهنده تنوع پایین در نمونه‌های مورد مطالعه است. تنوع کم می تواند نتیجه اندازه جمعیت اجدادی کوچکتر و یا تاریخ ژنتیک کوتاه تر باشد. به این معنی که جمعیت اجدادی که در زمان های گذشته به این مناطق مهاجرت کرده اند کوچک بوده و در اثر زاد و ولدهایی که در آنها صورت گرفته است، تشابه ژنتیکی بین فرزندان آنها وجود دارد. همین طور از زمان ورود اجداد اولیه قوم آذری تا کنون زمان طولانی نمی گذرد و تغییرات به حدی نیست که تنوع زیادی ایجاد کند و در ضمن اگر برش با آنزیم های محدود کننده بیشتری صورت گیرد و یا نواحی دیگر میتوکندریایی در طی PCR تکثیر گردد، احتمالا تنوع از این بیشتر شود.

References

1. Starikovskaya Y. B, Sukernik R. I., Schurr T. G., Kogelnik A. M ., Wallace D. C., 1998, MtDNA diversity in chukchi and Siberian Eskimos: Implications for the genetic history of ancient Bering and the peopling of the new world, Am. J. Hum. Genet., 63, 1473-1491.
2. Torroni A., Huoponen K., Francalacci P., Petrozzi. M., Morelli L., Scozzari R., Obinu D., Savontae M. L., 1996, Classification of European mtDNAs from an analysis of three European populations, Genetics, 144, 1835 - 1850.
3. Van Holst pellekaan S. M., Frommer M., Sved J. A ., Boettcher B., 1998, Mitochondrial control - region sequence variation in aboriginal Australians, Am. J. Hum. Genet, 62, 435-449.

www.SID.ir

Archive of SID

4. Ballinger S. W., Schurr Th. C., Torroni A., Gan Y. Y., Hodge J. A., Hassan K., Chen K. H., Wallace D. C., 1992, Southeast Asian mitochondrial DNA analysis reveals genetic continuity of ancient mongoloid migrations, Genetics, 130, 139-152.
5. Barreto G., Vago A. R., Ginther C., Simpson A. J. G., Pena S. D. J., 1996, Mitochondrial D-Loop signature produced by low - stringency single specific primer PCR constitute a simple comparative human identity test, Am. J. Hum. Genet., 58, 609-616.
6. Ingman M., Kaessmann H., Gyllensten U., 2000, Mitochondrial genome variation and the origin of modern humans, Nature, 408, 708- 712.
7. Anderson S., Bankier A. T., Barrell B. G., de Bruijn M. H. L., Coulson A. R., Drouin J., Eperon I. C., Nierlich D. P., Poe B. A., Sanger F., Schreier P. H., Smith A. J. H., Standen R., Young I. G., 1981, Sequence and organization of the human mitochondrial genome, Nature, 290, 457-464.
۸. اصغر زاده محمد، PCR: اهمیت و کاربرد آن. ماهنامه پزشک و آزمایشگاه، شماره ۵ ، ۱۳۸۲، ۳۴-۳۰.
9. Repley R., Walker J. M., Molecular Biomethods Handbook, University of hertford shire hotfield, Uk, 1998, Chapter 25 , 305 – 325, 271 - 285.
10. Salas A., Lareu M.V., Carracedo A., 2001, Heteroplasmy in mtDNA and the weight of evidence in forensic mtDNA analysis: Acase report, Int. J. Leaal. Med., 114, 186-190.
11. Ginther C., Issel - Tarver., King M. C., 1992, Identifying individuals by sequencing mitochondrial DNA from teeth, Nat. Genet., 2, 135-138.
12. Stoneking M., Hedgecock D., Higuchi R. G., Vigilant L., Erlich H. A., 1991, Population variation of human mtDNA control region sequences detected by enzymatic amplification and sequence – specific oligonucleotide probes, Am. J. Hum. Genet., 48, 370 -382.
13. Vigilant L., Pennington R., Harpeding H., Kocher T. D., Wilson A. C., 1989, Mitochondrial DNA sequences in single hairs from a southern African Population, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 9350-9354.
14. Niemi A. K., Hervonen A., Hurme M., Karhunen P. J., Jylhä M., Majanaa K., 2003, Mitochondrial DNA polymorphisms associated with longevity in a finnish population, Hum. Genet., 112, 29 -33.
15. Sawyer D. E., Van Houten B., 1999, Repair of DNA damage in mitochondrial, Mut. Res., 434, 161-179.
16. Chen X., Prosser R., Simonetti S., Sadlock J., Jagiello G., Schon E. A., 1995, Rearranged mitochondrial genomes are present in human oocytes, Am. J. Hum. Genet., 57, 239-247.
17. Lee H. C., Yin P. H., YU T. N., Chang Y. D., Hsu W. C., Kao S. Y., Chi C. W., Liu T. Y., Wei Y. H., 2001, Accumulation of mitochondrial DNA deletions in human oral tissues – effects of betel quid chewing and oral cancer, Mut. Res., 493, 67-74.
18. Lightowlers R. N., Chinnery P. F., Turnbull D. M., Howell N., 1997, Mammalian mitochondrial genetics: Heredity, heteroplasmy and disease, Trends Genet., 13, 450-455.
19. Ballard J. W. O., Dean M. D., 2001, The mitochondrial genome Mutation, Selection and recombination, Curr. Opin. Genet. Dev., 11, 667-672.
20. Torroni A., 2000, MtDNA haplogroups in human populations and disease studies, J. Cult. Heritage, 1, sup. 33- sup. 34.
21. Wallace D. C., 1995, 1994 William Allan award address. Mitochondrial DNA variation in human evolution, degenerative disease and aging, Am. J. Hum. Genet., 57, 201- 223.

www.SID.ir