

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 بقیه...^ع - پژوهشکده طب رزمی - مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی - تهران - ایران

** اداره تشخیص هویت نیروی انتظامی جمهوری اسلامی ایران

تاریخ اعلام وصول: ۱۳۸۴/۳/۱ تاریخ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۸۴/۵/۱ تاریخ اعلام قبولی مقاله: ۱۳۸۴/۶/۲۴

خلاصه

مقدمه: بررسی توالی DNA میتوکندریایی در منطقه بسیار متغیر نشان می‌دهد که این منطقه می‌تواند به عنوان 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 به دلیل 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 مورفیسیم‌های 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 پلی مورفیک یافت شد. توالی DNA و پلی مورفیسیم‌های 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.

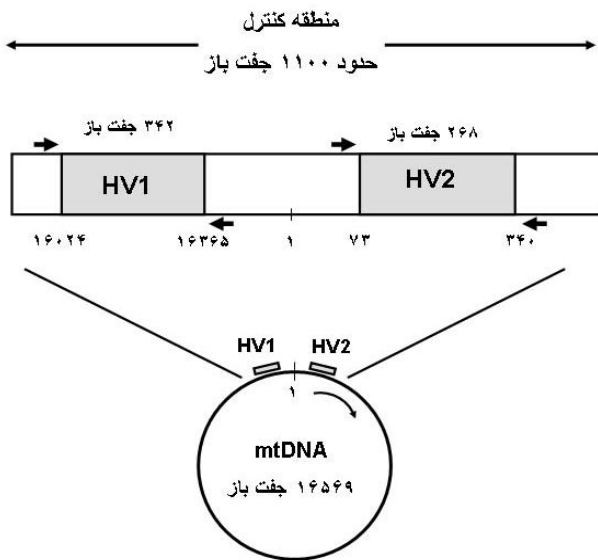
واژه‌های کلیدی: DNA میتوکندریایی، تشخیص هویت، ناحیه بسیار متغیر یک، D-loop، پلی مورفیسیم

مقدمه

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

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

اعضا یک خانواده به وجود 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.

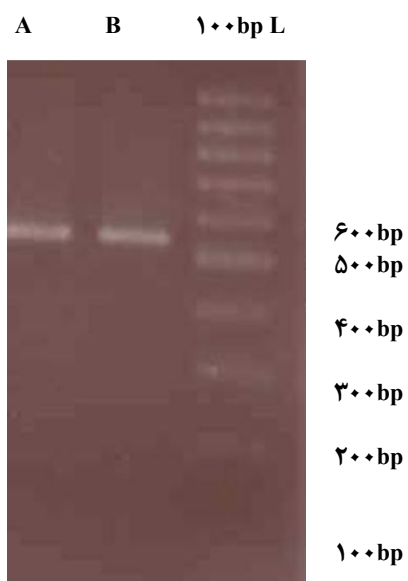


شکل ۱: نواحی HV1 و HV2 در mtDNA

مواد و روش کار

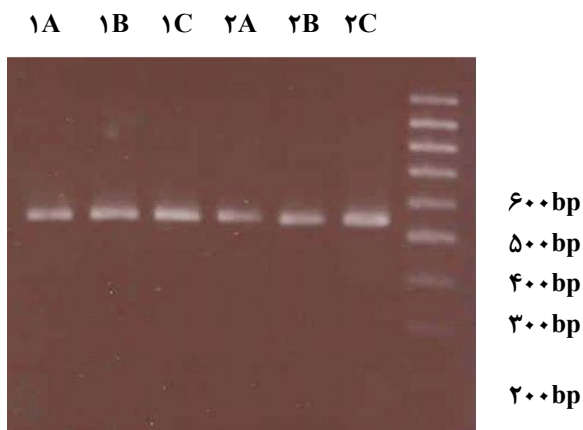
۱- در این تحقیق ناحیه HV1 از ژنوم میتوکندری در سه نسل متوالی مادری از ۱۰ خانواده غیرخویشاوند پس از توضیح روش و اخذ رضایت کتبی مورد بررسی قرار گرفت.

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 مواردی که مقدار DNA استخراج شده از بافت‌هایی نظیر استخوان، دندان 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 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 جزئی می‌باشد [۳]. mtDNA را از سلول‌های مرده تار مو، استخوان‌ها و دندان می‌توان استخراج کرد؛ در حالی که برای انجام DNA Typing هسته‌ای از مو حتماً به ریشه مو نیاز است. ضمن این که 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 به دست آورد. نکته دیگر این که صفات اجدادی پدری را توسط شاخص‌های کروموزوم Y و صفات اجدادی مادری را از طریق توالی mtDNA می‌توان ردیابی کرد. چرا که کروموزوم Y منحصرراً از پدر به پسر منتقل می‌شود و وراثت ژن‌های میتوکندری نیز منحصرراً 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



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

۶- ۳۰ نمونه استخراج شده فوق‌الذکر به روش اِپتی‌مایز شده فوق به وسیله PCR تکثیر شدند.



شکل ۴: باندهای ایجاد شده ناحیه HV1 با روش اِپتی‌مایز 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 سکونسر ژنتیکی ABI PRISM مدل 377 تعیین توالی گردید.

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 ۵: تأیید وجود DNA در نمونه‌ها پس از استخراج DNA به روش فنل کلروفرم

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 می‌باشد:

F(5'-TTAACTCCACCATTAGCACC-3')

R(5'-CCTGAAGTAGGAACCAGATG-3')

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

Buffer 10X 2.5µl, dNTP 1 µl, primer R1 1 µl, primer F1 1 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-95°C

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

۳- Final Extension-10min-72°C

جدول ۱: تغییرات ایجاد شده در منطقه HVI 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
	۱۶۱۳۹	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

نتایج

۱- مقایسه سکانس نمونه‌ها با سکانس مرجع اندرسون:

در ژنوم میتوکندری قطعه HVI دارای طولی حدود ۵۵۰ جفت باز می‌باشد. با مقایسه مناطق HVI از ۱۰ خانواده مورد بررسی در این مطالعه در سه نسل متوالی مادری این قطعه در هر خانواده در نقاط ذیل با سکانس مرجع متفاوت بود. این تفاوت‌ها در تمام خانواده‌ها در مادر بزرگ، مادر و نوه دختری یکسان بودند و موارد 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

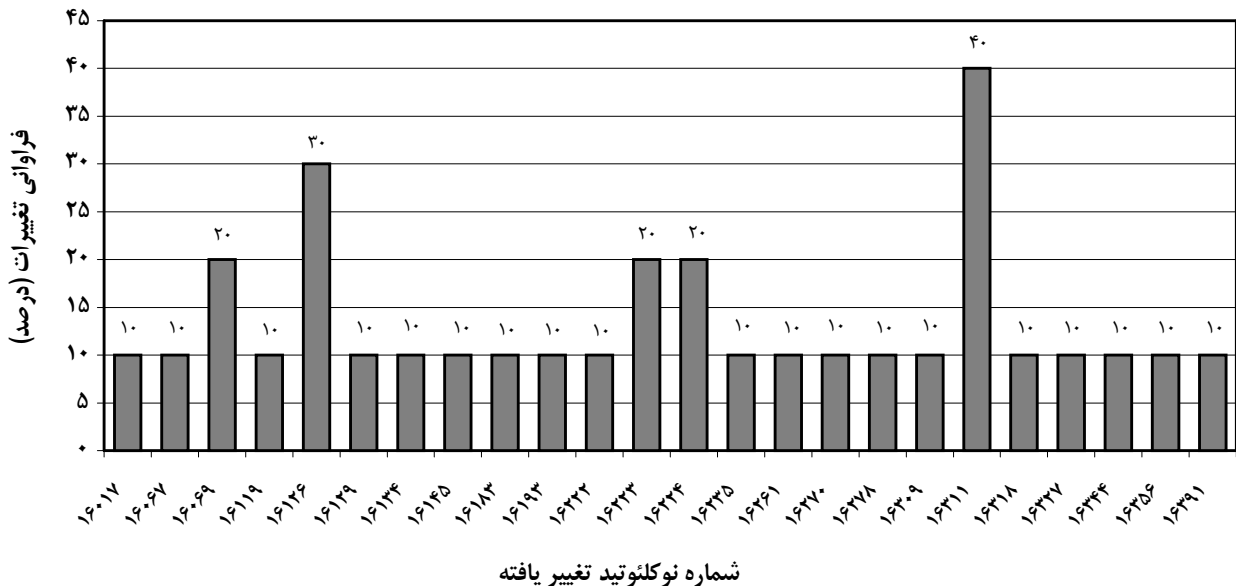
Family 10) T16224C, T16311C

۲- مقایسه نتایج:

در جدول ۱ پلی مورفیسم‌های ایجاد شده در منطقه HVI از ژنوم میتوکندری در ۱۰ خانواده غیرخویشاوند مورد مطالعه، بر حسب شماره نوکلئوتید و تغییرات حاصل در بازهای آلی در سه نسل متوالی مادری نشان داده شده است. بیشترین تغییرات مربوط به خانواده شماره ۹ است که واجد ۷ مورد پلی مورفیسم نسبت به سکانس اندرسون می‌باشد. سپس خانواده شماره ۱ قرار دارد که دارای ۵ مورد پلی مورفیسم می‌باشد. کمترین میزان تغییرات مربوط به خانواده شماره ۴ بوده است که دارای یک پلی مورفیسم نسبت به سکانس اندرسون است.

بیشترین فراوانی بوده و در ۴۰ درصد افراد مورد مطالعه دیده شده است. بعد از این مورد بیشترین فراوانی مربوط به پلی مورفیسم T16126C است.

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 پلی مورفیسم T16311C دارای



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

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.

در جدول ۲ مناطق HV1 در ۱۰ خانواده مورد مطالعه به صورت 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
۱	-	۹	۷	۶	۶	۷	۷	۸	۱۱	۷
۲	۹	-	۶	۵	۷	۶	۴	۷	۹	۴
۳	۷	۶	-	۳	۵	۴	۴	۶	۷	۴
۴	۶	۵	۳	-	۴	۳	۳	۵	۹	۳
۵	۶	۷	۵	۴	-	۵	۵	۴	۸	۵
۶	۷	۶	۴	۳	۵	-	۴	۶	۹	۴
۷	۷	۴	۴	۳	۵	۴	-	۶	۷	۰
۸	۸	۷	۶	۵	۴	۶	۶	-	۷	۶
۹	۱۱	۹	۹	۸	۹	۷	۷	۷	-	۷
۱۰	۷	۴	۴	۳	۵	۴	۰	۶	۷	-
میانگین کل	۵/۲									

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 به صورت حلقوی و بسته دیده می‌شود در صورتی که 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

منابع یافت نشد. در این مطالعه منطقه HV1 از ژنوم میتوکندری در ۱۰ خانواده غیر خویشاوند ایرانی مورد بررسی و مطالعه قرار گرفت و همان طور که انتظار می‌رفت توالی نوکلئوتیدی در اعضا یک خانواده کاملاً یکسان بود. همچنین توالی نوکلئوتیدی این مناطق به صورت ۲ به ۲ بین خانواده‌های غیرخویشاوند مورد مقایسه و مطالعه قرار گرفت و در نتیجه مشخص گردید که به‌طور متوسط میان هر ۲ خانواده مورد مطالعه غیرخویشاوند در ناحیه HV1، ۵/۲ نوکلئوتید تفاوت وجود دارد.

نتیجه‌گیری

از نتایج حاصل از این مطالعه می‌توان چنین استنتاج کرد که با بررسی این ناحیه انتظار داریم به‌طور متوسط حدود ۵/۲ نوکلئوتید اختلاف میان ۲ فرد غیر خویشاوند ایرانی وجود داشته باشد. بنابراین به نظر می‌رسد که بررسی و تعیین توالی این منطقه از ژنوم میتوکندری جهت تعیین هویت در کشور بسیار مفید و حایز اهمیت می‌باشد. چرا که انتظار می‌رود در زمان بررسی رابطه خویشاوندی، چنانچه ۲ نمونه مجهول مورد نظر غیرخویشاوند باشند، حدود ۵ نوکلئوتید تفاوت در مناطق HV1 آنها مشاهده گردد؛ در حالی که اگر ۲ نمونه مجهول خویشاوند باشند، انتظار داریم به جز موارد نادر موتاسیون و هتروپلاسمی هیچ‌گونه تفاوتی در نوکلئوتیدهای این منطقه آنها مشاهده نگردد.

ایجاد نمی‌شود در نتیجه ردیابی آنها در نسل‌های متوالی ساده‌تر است [۱۱]. mtDNA کوچک بوده و تا هزاران نسخه از آن در هر سلول یافت می‌شود. ثبات کم پلیمرزهای DNA میتوکندری و عدم وجود مکانیزم بازسازی و ترمیم در آن باعث جهش زیاد در ژنوم میتوکندری در مقایسه با ژنوم هسته‌ای می‌شود. به همین دلیل DNA های میتوکندری در برخی از مناطق تا حدود ۱۰ برابر بیش از DNA های هسته‌ای جهش و تغییر نشان داده‌اند. این خصوصیات سبب شده mtDNA در تحقیقات نظامی و قضایی بسیار حایز اهمیت باشد. در مواردی که نیاز است از mtDNA برای تعیین هویت استفاده شود، نواحی استاندارد مورد استفاده در دنیا مناطق HV1 و HV2 می‌باشند؛ زیرا این نواحی دارای بالاترین میزان تغییرات نوکلئوتیدی در افراد مختلف هستند. در بررسی‌های انجام شده مشخص شده است که مثلاً در میان نژاد قفقازی‌های غیرخویشاوند به‌طور متوسط ۸ نوکلئوتید متفاوت در این ناحیه دیده می‌شود. این میزان در ساکنین اروپای مرکزی از جمله آلمان، سوئیس و اتریش حدود ۸/۴۷ [۱۲، ۱۳]، در نژاد آفریقایی در حدود ۱۵ [۱۴] و در میان مردم ژاپن ۷/۶۹ نوکلئوتید [۱۵] گزارش شده است. متوسط تفاوت نوکلئوتیدها در ناحیه HV1 در میان مردم روسیه ۳/۵۹ گزارش گردیده است [۱۶]. در این خصوص گزارشی از تفاوت نوکلئوتیدها در ناحیه HV1 در میان مردم ایران در

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, Merrill 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 phylogenetic 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.