

ارزیابی استخراج DNA از پالپ دندان به روش تغییر یافته گوانیدینیوم تیوسیانات سیلیکا در اجساد مجهول الهویه ارجاعی به مرکز پزشکی قانونی اصفهان

دکتر علیرضا صبوری* - دکتر آرش قدوسی** - حمیده یادگاری*** - دکتر الهام مشکسار****

* دکترای علوم آزمایشگاهی، اداره کل پزشکی قانونی اصفهان

** متخصص پزشکی قانونی، استادیار دانشگاه آزاد اسلامی (خوراسگان)

*** کارشناس ارشد ژنتیک، اداره کل پزشکی قانونی اصفهان

**** دندانپزشک

چکیده

زمینه و هدف: تعیین هویت اجساد مجهول الهویه از مسایل مهم در پزشکی قانونی است. امروزه استفاده از DNA Typing از اصلی ترین روش های تعیین هویت محسوب می شود که معمولاً DNA مورد نیاز از بافت های مختلف از قبیل خون، عضله، کبد و یا طحال استخراج می گردد. در اجساد که چندین روز تا چند ماه از زمان مرگ آنها گذشته باشد، فساد جسد باعث از بین رفتن بافت های نرم می شود و در نتیجه ملکول DNA توسط آندونوکلئازها تجزیه و نیز واکنش زنجیره ای پلی مرز توسط محصولات ناشی از فساد نعشی مهار می شود. به همین دلیل در این موارد بافت های سخت از قبیل دندان و استخوان منابع مناسب تری برای استخراج DNA در تحقیقات پزشکی قانونی محسوب می گردد. هدف از این پژوهش ارایه یک روش ساده، کاربردی با قابلیت تکرار پذیری و کیفیت بالا در استخراج DNA از دندان به منظور تعیین ژنوتیپ مناطق کوتاه تکرار شونده (STRs) در اجساد مجهول الهویه می باشد.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی کاربردی ملکول DNA از پالپ دندان ۵ جسد مجهول الهویه ارجاعی به تالار تشریح اداره کل پزشکی قانونی استان اصفهان با انجام تغییراتی در روش استاندارد گوانیدین تیوسیانات سیلیکا استخراج گردید و جهت بررسی صحت کار، محصولات PCR نمونه های دندان با نمونه های خون هر جسد در شش منطقه پلی مورفیک کوتاه تکرار شونده به اسمی، VWA F13, CD4, THO1, FES/FPS و TPOX در مقابل شاخص نردبانی (Allelic Ladder) مقایسه گردید.

یافته ها: براساس نتایج حاصله مشخص شد که کمیت و کیفیت DNA حاصل از پالپ دندان با روش استفاده شده برای تکثیر و تعیین لوکوس های پلی مورفیک یاد شده قابل مقایسه با DNA حاصل از خون می باشد و آلهای دندان و خونی هریک از اجساد با یکدیگر مطابقت دارند.

نتیجه گیری: روش تغییر یافته گوانیدینیوم تیوسیانات سیلیکا یک روش ساده، کارآمد و مناسب جهت استخراج DNA و DNA Profiling از پالپ دندان می باشد.

واژگان کلیدی: پالپ دندان، پروفایل DNA، پزشکی قانونی

اصلاح نهایی: ۱۳۸۴/۴/۶

وصول مقاله: ۱۳۸۳/۱۱/۱۴

نویسنده مسئول: اصفهان - فلکه فیض - اداره کل پزشکی قانونی استان اصفهان - صندوق پستی ۸۱۶۵۸-۷۵۷۲۵ Isfahan@LMO.org.ir

مقدمه

گزارش گردیده است (۱، ۲). این در حالی است که در پی فساد نعشی و یا سوختگی های شدید استخراج DNA از بافت های نرم به شکست منتهی می گردد. روکش سخت مینا و عاج، پالپ دندان را از نفوذ جریان هوا و آلودگی محفوظ می دارد و PH پالپ نیز به دلیل قلیایی بودن هیدروکسی آپاتیت موجود در آن، در محدوده ۸-۹ می باشد

دندان بافت سختی است که نسبت به تغییرات محیطی از جمله فساد نعشی و آسیب حرارتی مقاومت بالایی دارد و حتی بعد از قرار گرفتن در حرارت 300°C به مدت دو دقیقه، DNA آن قابل استخراج

که بهترین PH برای پایداری مولکول DNA است (۳). سختی بافت دندان، به همین نسبت، استخراج قسمت زنده دندان (نسوج پالپ و ادنتوبلاستها) را با اشکال مواجه می‌سازد. طی دهه اخیر روش های مختلفی توسط محققین برای استخراج DNA از بافت های سخت به کار گرفته شده و نتایج آن منتشر گردیده است که از مهم ترین آنها می‌توان به روشهای Chelex 100 (۴)، فنول کلروفرم (۵)، دکستران بلو (۶)، گوانیدین تیوسیانات سیلیکا (۷) اشاره نمود. در این تحقیق روش گوانیدین تیوسیانات سیلیکا (GUSCN) برای استخراج DNA از دندان مورد ارزیابی قرار گرفت که پیش از این نیز محققین از آن برای استخراج DNA از استخوان و دندان استفاده نموده بودند (۷) ولی با توجه به شرایط و امکانات موجود تغییراتی در آن اعمال گردید تا نتایج آن را بهبود بخشد. در این راستا برای ارزیابی روش استخراجی به کار گرفته شده پس از DNA Profiling نمونه های دندان و خون و آلهای مربوط به خون و دندان یک فرد در شش منطقه ژنی مقایسه شد تا کیفیت محصولات استخراج شده و کارایی روش مذکور که هدف مطالعه است به اثبات برسد.

روش بررسی

*** مواد و نمونه‌ها:** در این مطالعه که یک مطالعه توصیفی کاربردی است پنج جسد مجهول الهویه ارجاع داده شده به تالار تشریح اداره کل پزشکی قانونی اصفهان که میانگین سنی آنها ۱۸ سال (۲۵-۱۱ سال) بود انتخاب گردیدند. از هر یک از آنها ۵ میلی لیتر خون از ورید رانی گرفته شد و در ویال های استریل محتوی ۳۰۰ میکرولیتر ماده ضد انعقاد EDTA جمع آوری شد. همزمان از هر جسد نیز دو عدد دندان سانترال بالا کشیده و در ظرف استریل قرار داده شد. نمونه های خون تا زمان استخراج DNA از آن در فریزر با دمای °C ۲۰- نگهداری شد. نمونه های دندان ابتدا با آب مقطر و محلول بلیچ شسته و از انساج اضافی عاری شدند سپس دندان ها مجدداً با آب مقطر دو بار تقطیر استریل آب کشی و سپس خشک گردیدند. آنگاه دندان ها در پلیتهای یک بار مصرف و به مدت ۲۰ دقیقه در زیر اشعه UV قرار داده شدند تا از آلودگی های سطحی و باکتریایی کاملاً پاک شوند و پس از چندبار فریز و دفریز نمودن در دمای °C ۷۰- به روش مکانیکی و در شرایط کاملاً استریل پودر گردیدند.

*** جلوگیری از آلودگی:** مهم ترین نکته در فرآیند کار اجتناب از آلودگی محلول ها و لوازم به پارتیکلهای DNA خارجی است که می تواند از راه پوست، عطسه و سرفه به نمونه ها انتقال یابد. لذا کار با دستکش، ماسک دهان و صورت الزامی است. کلیه وسایل و محلول ها نیز اتوکلاو شده و در مواردی که محدودیت برای اتوکلاو وجود داشت تحت تابش اشعه UV قرار داده شدند.

* ساخت محلولها:

- **معرف شماره ۱:** ۰/۳۵ گرم پودر GUSCN (ساخت شرکت

Sigma آمریکا) + سه میلی لیتر آب مقطر دوبار تقطیر + ۲/۲ میلی لیتر از معرف شماره ۴

- **معرف شماره ۲:** ۰/۳۵ گرم پودر GUSCN (ساخت شرکت Sigma آمریکا) + ۰/۶ میلی لیتر استات آمونیوم ۱ مولار (ساخت شرکت Merck آلمان) + ۵/۴ میلی لیتر آب مقطر دوبار تقطیر استریل

- **معرف شماره ۳:** ۰/۱ میلی لیتر Tris ۱ مولار + ۱ میلی لیتر EDTA ۱ مولار + ۰/۵ میلی لیتر SDS ۱۰% + ۸/۴ میلی لیتر آب مقطر استریل دوبار تقطیر

- **معرف شماره ۴:** ۲ میلی لیتر محلول EDTA ۰/۵ مولار + ۰/۵ میلی لیتر Tris ۰/۱ مولار + ۱/۲ میلی لیتر TritonX (ساخت شرکت Amersham اتریش) + ۶/۳ میلی لیتر آب مقطر دوبار تقطیر استریل.

- **سوسپانسیون سیلیکا Silica:** ۱۰ گرم سیلیکون دی اکسید (ساخت شرکت Sigma آمریکا) در آب مقطر دوبار تقطیر و در یک استوانه مدرج ۱۰۰ میلی لیتری به حالت سوسپانسیون قرار گرفت و به مدت ۲۴ ساعت در حرارت اتاق باقی ماند. سپس فاز رویی دور ریخته شد و به تهنشین آن آب مقطر افزوده شد و تا ۲۴ ساعت دیگر به حالت ساکن باقی ماند. بعد از ۲۴ ساعت دوباره فاز رویی دور ریخته شد و این بار به تهنشین ۱۰ تا ۱۵ میلی لیتر اسید کلریدریک ۵۰٪ اضافه شد (PH = ۱/۹) به نحوی که چهار لوله هر یک محتوی ۵ میلی لیتر سیلیکا تهیه شود. آنگاه این لوله ها به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو و سپس در حرارت اتاق و در تاریکی نگهداری شدند.

* روش استخراج:

۱- در دو میکروتیوب جداگانه حدود ۵۰ میلی گرم از پودر دندان ریخته و یک بار با کلروفرم و یک بار دیگر هم با آب سرد شستشو داده شدند؛ آنگاه لوله ها در زیر هود لامینر قرار داده شدند تا خشک شوند.

۲- نیم میلی گرم پودر پروتئیناز K (USB Company) در هزار میکرولیتر از معرف شماره ۳ حل شد و به هر میکروتیوب، ۵۰۰ میکرولیتر از آن اضافه گردید. نمونه ها به مدت یک شبانه روز در بن ماری شیکردار °C ۳۷ قرار داده شدند. سپس میکروتیوب ها به مدت ۵ دقیقه در ۶۰۰۰ r.p.m سانتریفیوژ شدند، سپس فاز رویی به میکروتیوب های جدید منتقل شد.

۳- به هر یک از لوله ها یک میلی لیتر از معرف شماره ۱ افزوده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق روی روتاتور قرار گرفت.

۴- سپس به هر لوله ۴۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سیلیکا اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در حرارت اتاق به آرامی روتاتور شدند (در این مرحله DNA جذب دانه های سیلیکا می گردد) سپس فاز رویی (بعد از تهنشین شدن ذرات سیلیکا در دور ۲۰۰۰ r.p.m به مدت یک دقیقه) دور ریخته شد.

۵- رسوب ذرات سیلیکا در سه نوبت و هر بار با ۳۰۰ میکرولیتر از معرف شماره ۲ در ۲۰۰۰ r.p.m و به مدت ۳ دقیقه شستشو داده شدند (در پایان هر مرحله فاز رویی دور ریخته شد).

۶- رسوب مجدداً به حالت سوسپانسیون در آورده شد و با ۴۰۰

یافته‌ها

نتایج حاصل از این مطالعه که یک مطالعه توصیفی و کاربردی است نشان می‌دهد که کمیت و کیفیت DNA حاصل از این روش استخراجی از پالپ دندان برای تکثیر و PCR و DNA Typing VWA, CD4, F13, THO1 به اسامی FES/FPS و TPOX کافی و مناسب است (جدول ۲). همچنین الگوهای ژنومیک بدست آمده از شش منطقه فوق از نمونه‌های خون و پالپ دندان یک فرد با یکدیگر یکسان می‌باشد (تصاویر ۱-۵).

بحث

در دندانپزشکی قانونی از طرق مختلف می‌توان به هویت فرد پی برد:

الف) تشخیص هویت کلی که در آن فرد ناشناس از نظر جنس، سن و نژاد تقسیم‌بندی می‌شود.

ب) تعیین هویت مقایسه‌ای مقایسه قالبهای دندانی و گرافی‌های شخص قبل و بعد از مرگ (۹).

اما جدیدترین و قطعی‌ترین روش در این خصوص استفاده از DNA Profiling می‌باشد، به ویژه زمانی که بافت‌های نرم از بین رفته باشند. سخت بودن مینا و عاج و محافظت آنها از پالپ و در نتیجه ورود کمتر میکروارگانیسم‌ها به داخل آن باعث شده که دندان یکی از ارزش‌ترین منابع DNA به شمار آید. DNA دندان نسبت به DNA استخوان در واکنش PCR بهتر و آسان‌تر جواب می‌دهد زیرا غلظت

جدول ۱: برآورد تعیین غلظت DNA در نمونه‌های خون و دندان استخراج شده اجساد

نوع نمونه	OD ₂₆₀	OD ₂₈₀	Index	µg/Ml
دندان ۱	۰/۰۱۵	۰/۰۱۳	۱/۱۵	۰/۹
خون ۱	۰/۰۴۸	۰/۰۳۷	۱/۲۹	۰/۳۷
دندان ۲	۰/۰۳۲	۰/۰۳	۱/۰۶	۱/۲
خون ۲	۰/۰۵	۰/۰۵	۰/۹۵	۰/۳۷
دندان ۳	۰/۰۲۰	۰/۰۲۱	۰/۶۵	۰/۹
خون ۳	۰/۰۵	۰/۰۵	۰/۹۲	۰/۳۷
دندان ۴	۰/۰۱۳	۰/۰۱۲	۱/۰۲	۰/۹
خون ۴	۰/۰۱۵	۰/۰۱۴	۱/۰۴	۱/۱
دندان ۵	۰/۰۳۲	۰/۰۳۲	۰/۹۷	۱
خون ۵	۰/۰۵	۰/۰۵	۰/۹۲	۰/۳۸

میکرولیتتر اتانول ۷۰ درجه در ۴ نوبت و در ۲۰۰۰ r.p.m و هر بار به مدت ۴ دقیقه شستشو داده شد. پس از آخرین مرحله مجدداً به رسوب ۴۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درجه اضافه و به مدت یک ساعت در دمای ۲۰ °C - قرار داده شد. آنگاه با خالی کردن فاز رویی و قرار دادن لوله‌ها در زیر هود لامینر به مدت ۳۰ دقیقه اجازه داده شد تا اتانول از محیط خارج گردد.

۷ - پس از شستشو با اتانول، یک بار هم شستشو با ۴۰۰ میلی‌لیتر استون ادامه یافت. بعد از سانتریفوژ، استون از محیط عمل خارج گردید و میکروتیوب‌ها به مدت ۵ دقیقه در بن‌ماری ۵۵ °C قرار داده شدند تا کاملاً خشک شوند.

۸ - سپس به هر لوله ۵۰ میکرولیتر از محلول HCL ۱۰ mM Tris با PH=۸ اضافه و مخلوط شد و به مدت ۱۰ دقیقه در بن‌ماری ۶۰ °C قرار داده شد. سپس لوله‌ها به مدت ۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ r.p.m سانتریفوژ و فاز رویی آنها در یک لوله دیگر جهت PCR جمع‌آوری شد.

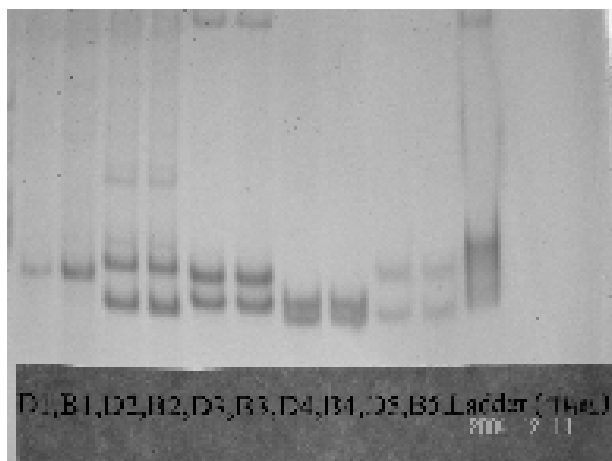
۹ - کمیت مقدار DNA تخلیص شده از نمونه‌های فوق و نیز نمونه‌های خون که قبلاً به روش boiling (۸) استخراج گردیده بودند با دستگاه Specgene (England, Techne) اندازه‌گیری و برآورد غلظت شد (جدول ۱).

۱۰ - نمونه‌ها تا زمان PCR در دمای ۲۰ °C - قرار داده شدند (لازم است PCR هرچه زودتر روی نمونه‌ها انجام شود).

* **تکثیر مناطق:** شش منطقه کوتاه تکرار شونده به اسامی VWA, CD4, F13, THO1, FES/FPS, TPOX با استفاده از ترموسایکلر PCR (England, Gradient : Touchgen) شدند. پرایمرهای مورد استفاده از شرکت Roche آلمان تهیه و توالی سکانسهای آنها مطابق جدول ۲ بودند. تکثیر هر یک از شش لوکوس یاد شده برای نمونه‌های دندان در حجم ۳۰ میکرولیتر و در بافری متشکل از مواد با غلظتهای زیر و پرایمر اختصاصی هر محل در ۳۵ سیکل انجام گرفت.

- 10 µM Tris Hcl (PH=8.3)
- 50 µM Kcl
- 1.5 µM Mgcl2
- 200 µM each dNTP
- 0.25 µM each Primer
- 1.5 µunits Taq DNA Polymerase
- 1 microgram template DNA

جداسازی قطعات تکثیر داده شده بر روی ژل پلی‌اکریل آمید ۱۰٪ در طول ۳۵ سانتی‌متر و ضخامت ۰/۸ میلی‌متر با سیستم الکتروفورز (مدل France, Gibco Bril) در مدت زمان یک شبانه روز و در کنار سایز مارکر 1Kb DNA Ladder (ساخت شرکت Roche آلمان) و همچنین Allelic Ladder هر لوکوس (ساخت آزمایشگاه DNA سازمان پزشکی قانونی کشور) انجام و حاصل کار با رنگ‌آمیزی نیترا نقره نمایان گردید.



عکس ۲: نتایج تکثیر منطقه ملکولی THO1 خون (B) و دندان (D)

بالای هیدروکسی آپاتیت در آن و اتصال آن به مولکول DNA بهتر آن را نگهداری نموده و از قطعه قطعه شدن DNA می‌کاهد (۱۰). در روش به کار گرفته شده GUSCN تغییراتی نسبت به روش اصلی (۷) اعمال گردید که نتایج حاصل از آن برای ما مطلوبتر و رضایت بخش بود. این تغییرات شامل موارد زیر می‌گردد:

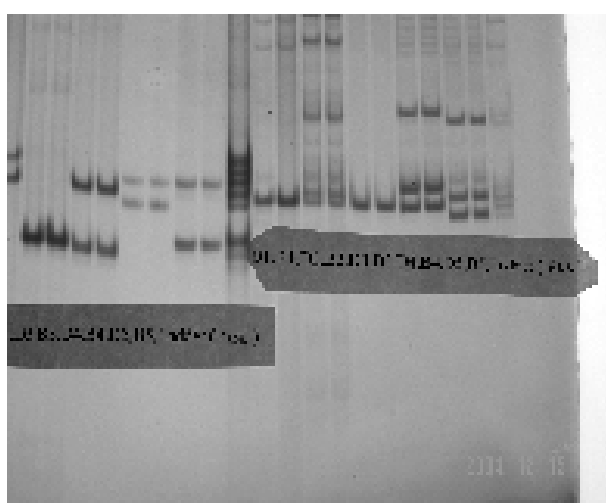
۱ - کاستن از غلظت GUSCN: اگرچه در روش اصلی، Höss (۱۹۹۵) از غلظت ۱۰ مولار GUSCN استفاده کرده بود ولی به دلیل خوب حل نشدن این ماده و جامد باقی ماندن آن که باعث ایجاد دشواری در پی‌پت کردن آن در حین کار می‌شد و نیز مشکلاتی که حذف آن در مراحل پایانی پروتکل وجود داشت ما غلظت GUSCN را

جدول ۲: مناطق مولکولی DNA و پرایمرهای مورد استفاده

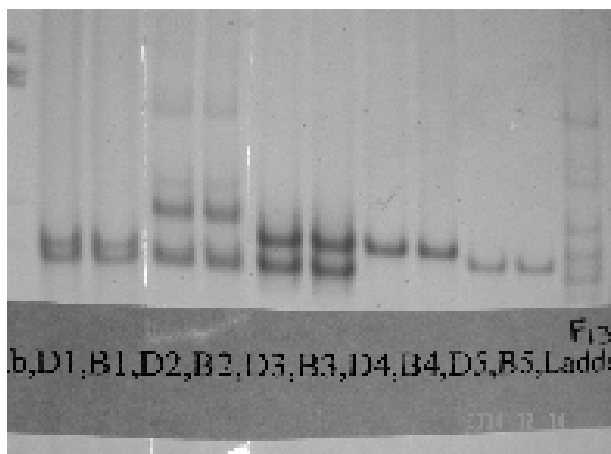
STR-Name	
VWA	F: GGA,CAG,ATG,ATA,AAT,ACA,TA G,GAT,GGA,TGG R: CCC,TAG,TGG,ATG,ATA,AGA,AT A,ATC
F13	F: GAG,GTT,GCA,CTC,CAG,CTT,TT R: ATG,CCA,TGC,AGA,TTA,GAA,A
CD4	F: TTG,GAG,TCG,CAA,GCT,GAA,CT A,GCG R: CCA,GGA,AGT,TGA,GGC,TGC,AG T,GAA
FES/FPS	F: GGA,AGA,TGG,AGT,GGC,TGT,TA R: CTC,CAG,CCT,GGC,GAA,AGA,AT
TPOX	F: GGA,GGA,ACT,GGG,AAC,CAC,AC A,GGT R: ACT,GGC,ACA,GAA,CAG,GCA,CT T,AGG
THO1	F: GTG,GGC,TGA,AAA,GCT,CCC,GA T,TAT R: ATT,CAA,AGG,GTA,TCT,GGG,TCT ,TGG



عکس ۳: نتایج تکثیر منطقه ملکولی TPOX خون (B) و دندان (D)



عکس ۱: نتایج تکثیر مناطق ملکولی CD4 و FES خون (B) و دندان (D)



عکس ۵: نتایج تکثیر منطقه ملکولی F۱۳ خون (B) و دندان (D)

به دلیل عدم دسترسی ما به این دستگاه ها و قیمت بسیار زیاد آنها و نیز مقرون به صرفه نبودن خرید آن برای تمامی آزمایشگاه ها در کشورهای رو به توسعه، ما از روش دستی استفاده نمودیم و ابزارآلاتی را به این منظور مورد استفاده قرار دادیم که تماماً از جنس استیل بود و به راحتی برای نمونه های بعدی قابل اتوکلاو بود.

نتیجه گیری

با اتوکلاو نمودن و در معرض اشعه UV قرار دادن موارد فوق و نیز لحاظ نمودن سایر مراقبت های ایمنی در محیط کار، نتایج کار حاکی از عدم وجود آلودگی خارجی در کار ما بود. توصیه ما به همکاران در تالار تشریح این است که در موارد نیاز، دندان های ترمیم نشده و بدون پوسیدگی را که از پالپ وسیع تری برخوردارند به آزمایشگاه های DNA ارسال نمایند.

تقدیر و تشکر

در پایان لازم است از همکاری های آقای دکتر رضا علاءالدینی متخصص پزشکی قانونی و دانشجوی PHD بیولوژی قانونی استرالیا، آقای دکتر امین شیروانی دندانپزشک محترم قانونی، آقای مهندس جواد دهقانی کارشناس آمار و کامپیوتر و نیز رئیس و پرسنل محترم تالار تشریح پزشکی قانونی اصفهان که ما را در این تحقیق یاری نمودند سپاسگزاری نماییم.

به ۲/۵ مولار کاهش دادیم.

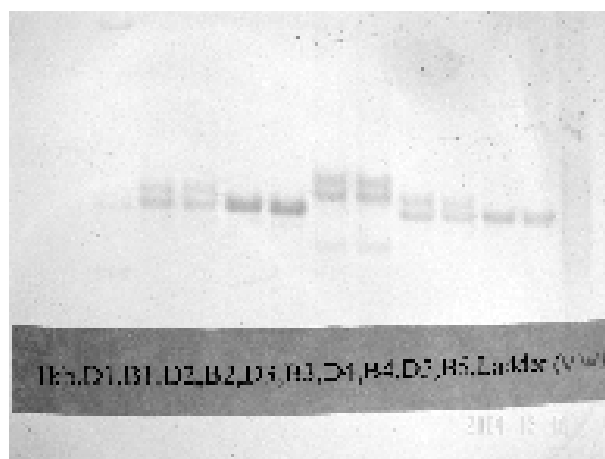
۲ - افزایش تعداد و مدت زمان مراحل شستشو با اتانول از سه مرحله به پنج مرحله به منظور حذف کامل GUSCN از محیط عمل (GUSCN یک ممانعت کننده قوی Taq DNA پلی مرز بوده و در صورت باقیماندن مقادیر حتی اندک آن در پایان کار واکنش PCR را مختل می نماید).

۳ - کاستن از دور سانتریفوژ در جاهایی که سیلیکا حضور داشت از ۶۰۰۰ r.p.m به ۲۰۰۰ r.p.m به منظور جلوگیری از تخریب DNA (۱۱).

۴ - استفاده از ۱ مولار Tris Hcl به PH=8 به جای PH=6/5 به منظور جدا شدن مولکول DNA از ذرات سیلیکا (۱۲).

۵ - افزایش غلظت آنزیم Taq DNA Polymerase و سیکل های PCR تا ۳۵ سیکل به منظور کاهش اثر مواد متوقف کننده بر فعالیت آنزیم مذکور.

شایان ذکر است که در ابتدا با استفاده از غلظت های به کار گرفته شده سایر محققین با وجود اضافه کردن مراحل شستشو، واکنش PCR در لوکوس های مختلف جواب نداد و حتی با استفاده از تکنیک PCR از محصولات PCR نیز نتیجه مطلوب حاصل نشد. اما با اعمال تغییرات فوق توانستیم به نتایج مطلوبی برسیم به نحوی که عدم حضور باندهای غیراختصاصی در نتایج کار ما قابل توجه و خیره کننده بود. از نکات قابل توجه دیگر روش مورد استفاده در تحقیق حاضر در پودر کردن دندان است. اگرچه سایر محققین از روش های اتوماتیک و دستگاه های مخصوص nucleic acids extractors استفاده کرده بودند اما



عکس ۶: نتایج تکثیر منطقه ملکولی VWA خون (B) و دندان (D)

References

- 1- Good Year PD, Mac Laughlin BS, Mason IJ. A reliable method for the removal of Co-purifying PCR inhibitors from ancient DNA. *Bio Techniques* 1994;16(2): 232-35.
- 2- Alvarez Garcia A, Munoz I, Pestonic C. Effect of environmental factors on PCR-DNA analysis from dental pulp. *Int J Legal Med* 1996; 109(3): 125-9.
- 3- De Leo D, Turrina S, Marigo M. Effects Of Individual Dental Factors on genomic DNA analysis. *Am J forensic and Pathol* 2000; 21(4): 411-5.
- 4- Tsuchimochi T, Iwasa M, Maeno Y. Chelating resin-based extraction of DNA from dental pulp. *Am J Forensic Med Pathol* 2002; 23(3): 268-271.
- 5- Paabo S. Ancient DNA: Extraction, characterization, molecular cloning. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:1939-43.
- 6- Tibor K, Csanad Z, Bachrati, Antonia M and Istvan R. A simple and efficient method for PCR amplifiable DNA extraction from ancient bones. *Nucleic Acids Research* 2000; vol, 28 (12): 671-771.
- 7- Hoss M, Paabo S. DNA extraction from Pleistocene bones by a silica based purification method. *Nucleic Acids Res* 1993; 21: 3913-3914.
- 8- Sam brook, Fritsch, Maiatis. *Molecular cloning a laboratory manual*. 2nd Edition. CSH: 1989; p.134-135.
- 9- Nevilles BW, Damnd D, Allev CM, Bovquot JE. *Oral and maxillofacial pathology*. 2nd Edition. Philadelphia: W.B Saunder Company: 2003; p.763-83.
- 10- Ginther C, Tarver L, King M-C. Identifying individuals by sequencing mitochondrial DNA from teeth. *Nature Genetics* 1992; 2: 135-138.
- 11- Hummel S. *Ancient DNA Typing*. Berlin: Springer; 2003.p. 57-63.
- 12- Gotherstrom A, Liden K. A modified extration method for bones and teeth. *Laborative Arkeologi* 1996; 9:53-56.