ارزیابی استخراج DNA از پالپ دندان به روش تغییر یافته گوانیدینیوم تیوسیانات سیلیکا در اجساد مجهول‌الهویه 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 اصلی‌ترین روش‌های تعیین هویت محسوب می‌شودکه معمولاً DNA مورد نیاز از بافت های مختلف از قبیل خون، عضله، کبد و یا طحال استخراج می‌گردد. در اجسادی 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 زنجیره‌ای پلی‌مراز توسط محصولات ناشی از فساد نعشی مهار می‌شود. 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 می‌گردد. 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 مجهول‌الهویه می‌باشد.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی کاربردی ملکول DNA از پالپ دندان ۵ جسد مجهول‌الهویه 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 پلی‌مورفیک کوتاه تکرارشونده به اسامی VWA F13, CD4, THO1, FES/FPS, و TPOX در مقابل شاخص نردبانی (Allelic Ladder) مقایسه گردید.

یافته‌ها: براساس نتایج حاصله مشخص شد که کمیت و کیفیت DNA حاصل از پالپ دندان با روش استفاده شده برای تکثیر و تعیین لوکوس‌های پلی‌مورفیک یاد شده قابل مقایسه با DNA حاصل از خون می‌باشد و آللهای دندانی و خونی هریک از اجساد با یکدیگر مطابقت دارند.

نتیجه‌گیری: روش تغییر یافته گوانیدینیوم تیوسیانات سیلیکا یک روش ساده، کارآمد و مناسب جهت استخراج DNA و DNA Profiling از پالپ دندان می‌باشد.

واژگان کلیدی: پالپ دندان، پروفایل DNA، پزشکی قانونی

وصول مقاله : ۱۳۸۳/۱۱/۱۴ اصلاح نهایی : ۱۳۸۴/۴/۶

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

مقدمه

دندان بافت سختی است که نسبت به تغییرات محیطی ازجمله فساد نعشی و آسیب حرارتی مقاومت بالایی دارد و حتی بعد از قرار گرفتن در حرارت ۳۰۰ °C به مدت دو دقیقه، DNA آن قابل استخراج گزارش گردیده است (۲، ۱). این در حالی است که در پی فساد نعشی و یا سوختگی های شدید استخراج DNA از بافت های نرم به شکست منتهی می‌گردد. روکش سخت مینا و عاج، پالپ دندان را از نفوذ جریان هوا و آلودگی محفوظ می‌دارد و PH پالپ نیز به دلیل قلیایی بودن هیدروکسی آپاتیت موجود در آن، در محدوده ۹-۸ می‌باشد

[Downloaded from sjfm.ir on 2025-08-01]

که بهترین PH برای پایداری مولکول DNA اســت (۳). سختی بافت دندان، به همین نســبت، استخراج قســمت زنده دندان (نسوج پالپ و ادنتوبلاســتها) را با اشکال مواجه می‌ســازد. طی دهۀ اخیر روش های مختلفی توســط محققین برای استخراج DNA از بافت های سخت به کار گرفته شــده و نتایج آن منتشــر گردیده است که از مهم ترین آنها می‌توان به روشــهای Chelex 100 (۴)، فنول کلروفرم (۵)، دکستران بلو (۶)، گوانیدین تیوســیانات ســیلیکا (۷) اشاره نمود. در این تحقیق روش گوانیدین تیوســیانات سیلیکا (GUSCN) برای استخراج DNA از دنــدان مورد ارزیابی قرار گرفت که پیــش از این نیز محققین از آن برای اســتخراج DNA از استخوان و دندان اســتفاده نموده بودند (۷) ولی با توجه به شــرایط و امکانات موجود تغییراتی در آن اعمال گردید تا نتایج آن را بهبود بخشد. در این راستا برای ارزیابی روش استخراجی به کار گرفته شــده پس از DNA Profiling نمونه های دندان و خون و آللهای مربوط به خون و دندان یک فرد در شش منطقه ژنی مقایسه شد تا کیفیت محصولات استخراج شده و کارآیی روش مذکور که هدف مطالعه است به اثبات برسد.

روش بررسی

* **مــواد و نمونه‌هــا:** در ایــن مطالعه که یک مطالعــه توصیفی کاربردی است پنج جسد مجهول‌الهویه ارجاع داده شده به تالار تشریح اداره کل پزشــکی قانونی اصفهان که میانگین سنی آنها ۱۸ سال (۲۵-۱۱ ســال) بود انتخاب گردیدند. از هــر یک از آنها ۵ میلی‌لیتر خون از ورید رانی گرفته شــد و در ویال های اســتریل محتوی ۳۰۰ میکرولیتر مــاده ضــد انعقاد EDTA جمع آوری شــد. همزمان از هر جســد نیز دو عدد دندان ســانترال بالا کشــیده و در ظرف استریل قرار داده شد. نمونه‌هــای خون تا زمــان اســتخراج DNA از آن در فریــزر با دمای ۲۰ °C - نگهداری شــد. نمونه‌های 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 اســتریل آب کشــی و سپس خشک گردیدند. آنگاه دندان ها در پلیتهای یک بار مصرف و به مدت ۲۰ دقیقه در زیر اشــعه UV قرار داده شــدند تا از آلودگی های سطحی و باکتریایی کاملاً پاک شوند و پس از چندبار فریز و دفریز نمودن در دمای ۷۰°C - به روش مکانیکی و در شرایط کاملاً استریل پودر گردیدند.

* **جلوگیــری از آلودگی:** مهم ترین نکته در فرآیند کار اجتناب از آلودگــی محلول ها و لوازم به پارتیکلهای DNA خارجی اســت که می‌تواند از راه پوســت، عطسه و سرفه به نمونه‌ها انتقال یابد. لذا کار با دستکش، ماسک دهان و صورت الزامی است. کلیه وسایل و محلول ها نیز اتوکلاو شــده و در مواردی که محدودیت برای اتوکلاو وجود داشت تحت تابش اشعه UV قرار داده شدند.

* **ساخت محلولها:**

– **معرف شــماره ۱:** ۰/۳۵ گرم پودر GUSCN (ســاخت شرکت Sigma آمریکا) + سه میلی‌لیتر آب مقطر دوبار تقطیر + ۲/۲ میلی‌لیتر از معرف شماره ۴

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

– **معرف شــماره ۳:** ۰/۱ میلی‌لیتــر Tris ۱ مولار+ ۱ میلی لیتر EDTA۱ مــولار + ۰/۵ میلی‌لیتــر SDS ۱۰% + ۸/۴ میلی‌لیتــر آب مقطر استریل دوبار تقطیر

– **معرف شماره ۴:** ۲ میلی‌لیتر محلول EDTA ۰/۵ مولار + ۰/۵ میلی‌لیتر Tris ۰/۰۱ مولار + ۱/۲ میلی‌لیتر TritonX (ساخت شرکت Amersham اتریش) +۶/۳ میلی‌لیتر آب مقطر دوبار تقطیر استریل.

– **سوسپانسیون سیلیکا Silica:** ۱۰ گرم سیلیکون دی‌اکسید (ســاخت شــرکت Sigma آمریکا) در آب مقطر دوبار تقطیر و در یک استوانه مدرج ۱۰۰ میلی‌لیتری به حالت سوسپانسیون قرار گرفت و به مدت ۲۴ ســاعت 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 ســاکن باقی ماند. بعد از ۲۴ ســاعت دوباره فاز رویی دور ریخته شد و این بار به ته‌نشــین ۱۰ تا ۱۵ میلی‌لیتر اســید کلریدریک ۵۰ ٪ اضافه شــد (PH = ۱/۹) به نحوی که چهار لوله هر یک محتوی ۵ میلی‌لیتر ســیلیکا تهیه شود. آنگاه این لوله‌ها به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو و سپس در حرارت اتاق و در تاریکی نگهداری شدند.

* **روش استخراج:**

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

۲ - نیــم میلی‌گرم پــودر پروتئینــاز K (USB Company) در هزار میکرولیتر از معرف شــماره ۳ حل شد و به هر میکروتیوب، ۵۰۰ میکرولیتــر از آن اضافــه گردید. نمونه‌هــا به مدت یک شــبانه‌روز در بن‌ماری شــیکردار ۳۷ °C قرار داده شــدند. ســپس میکروتیوب ها به مدت ۵ دقیقه در ۶۰۰۰ r.p.m ســانتریفیوژ شدند، سپس فاز رویی به میکروتیوب های جدید منتقل شد.

۳ - به هر یک از لوله‌ها یک میلی‌لیتر از معرف شــماره 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 بــه مدت ۱۵ دقیقه در حرارت اتاق به آرامی روتاتور شــدند (در این مرحله DNA جذب دانه‌های سیلیکا می‌گردد) سپس فاز رویی (بعد از ته‌نشــین شدن ذرات سیلیکا در دور ۲۰۰۰ r.p.m به مدت یک دقیقه) دور ریخته شد.

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

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

[Downloaded from sjfm.ir on 2025-08-01]

میکرولیتـر اتانـول 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 - قـرار داده شـد. آنـگاه با خالی کردن فاز رویـی 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 میکروتیوب ها به مدت ۵ دقیقه در بن‌ماری ۵۵ °C قرار داده شـدند تا کاملاً خشک شوند.

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

۹ - کمیـت مقدار DNA تخلیص شـده از نمونه‌های فوق و نیز نمونه‌های خون که قبلاً به روش boiling (۸) اسـتخراج گردیده بودند بـا دسـتگاه Specgene (England, Techne) اندازه‌گیری و برآورد غلظت شد (جدول ۱).

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

* **تکثیرمناطق:** شش منطقه کوتاه تکرار شونده به اسامی VWA F13, CD4, FES/FPS, TPOX, و THO1 با استفاده از ترموسایکلر PCR (England , Gradiant : Touchgen) شدند. پرایمرهای مورد اسـتفاده از شرکت Roche آلمان تهیه و توالی سکانسهای آنها مطابق جدول۲ بودند. تکثیر هر یک از شـش لوکوس یاد شده برای نمونه‌های دندان در حجم ۳۰ میکرولیتر و در بافری متشـکل 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 µnits Taq DNA Polymerase
- 1 microgram template DNA

جداسازی قطعات تکثیر داده شده برروی ژل پلی‌اکریل آمید ۱۰٪ در طول ۳۵ سـانتی‌متر و ضخامت ۰/۸ میلیمتر با سیسـتم الکتروفورز (مـدل France, Gibco Bril) در مـدت زمـان یک شـبانه روز و در کنار سایز مارکر 1Kb DNA Ladder (ساخت شرکت Roche آلمان) و همچنین Allelic Ladder هر لوکوس (سـاخت آزمایشـگاه DNA سازمان پزشکی قانونی کشور) انجام و حاصل کار با رنگ‌آمیزی نیترات نقره نمایان گردید.

یافته‌ها

نتایـج حاصل از این مطالعه که یـک مطالعه توصیفی و کاربردی اسـت نشـان می دهد که کمیت و کیفیت DNA حاصل از این روش اسـتخراجی از پالـپ دندان بـرای تکثیـر و PCR و DNA Typing شـش منطقه پلی مورفیک به اسـامی VWA , CD4 , F13, THO1 FES/FPS و TPOX کافی و مناسـب اسـت (جـدول ۲). همچنین الگوهای ژنومیک بدست آمده از شش منطقه فوق از نمونه های خون و پالپ دندان یک فرد با یکدیگر یکسان می باشد (تصاویر۵-۱).

بحث

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

الف) تشـخیص 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).

امـا جدیدتریـن و قطعی‌ترین روش در این خصوص اسـتفاده از DNA Profiling می باشـد، به ویـژه زمانی که بافت های نرم از بین رفته باشند. سخت بودن مینا و عاج و محافظت آنها از پالپ و در نتیجه ورود کمتر میکروارگانیسـم‌ها به داخل آن باعث شده که دندان یکی از با ارزش ترین منابع DNA به شمار آید. DNA دندان نسبت به DNA اسـتخوان در واکنش PCR بهتر و آسان تر جواب می‌دهد زیرا غلظت

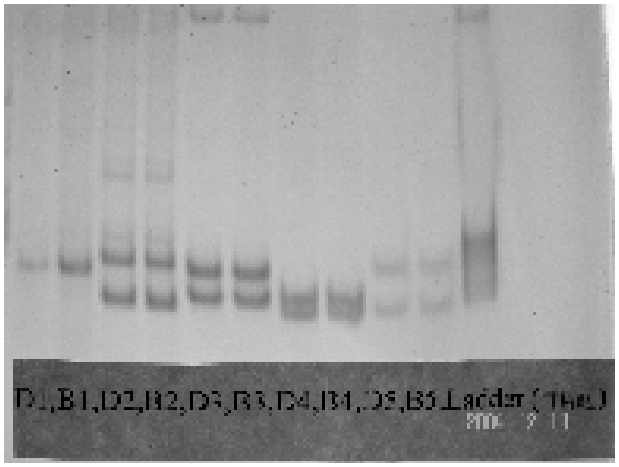
جدول ۱ : برآورد تعیین غلظت DNA در نمونه‌های خون و دندان استخراج شده اجساد

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	۰/۳۲	۰/۰۳	۱/۰۶	۱/۲
خون ۲	۰/۰۵	۰/۰۵	۰/۹۵	۰/۳۷
دندان ۳	۰/۲۰	۰/۲۱	۰/۶۵	۰/۹
خون ۳	۰/۰۵	۰/۰۵	۰/۹۲	۰/۳۷
دندان ۴	۰/۱۳	۰/۱۲	۱/۰۲	۰/۹
خون ۴	۰/۱۵	۰/۱۴	۱/۰۴	۱/۱
دندان ۵	۰/۳۲	۰/۳۲	۰/۹۷	۱
خون ۵	۰/۰۵	۰/۰۵	۰/۹۲	۰/۳۸

[Downloaded from sjfm.ir on 2025-08-01]

جدول ۲ : مناطق مولکولی DNA و پرایمرهای مورد استفاده

STR-Name	
VWA	F: GGA,CAG,ATG,ATA,AAT,ACA,TAG,GAT,GGA,TGG R: CCC,TAG,TGG,ATG,ATA,AGA,ATA,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,CTA,GCG R: CCA,GGA,AGT,TGA,GGC,TGC,AGT,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,ACA,GGT R: ACT,GGC,ACA,GAA,CAG,GCA,CTT,AGG
THO1	F: GTG,GGC,TGA,AAA,GCT,CCC,GAT,TAT R: ATT,CAA,AGG,GTA,TCT,GGG,TCT,TGG

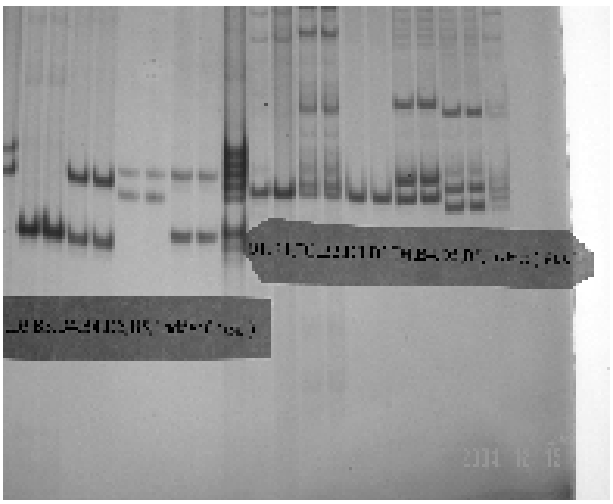


عکس ۲ : نتایج تکثیر منطقه ملکولی THO۱ خون(B) و دندان(D)

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

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



عکس ۱ : نتایج تکثیر مناطق ملکولی CD٤ و FES خون(B) و دندان(D)

[Downloaded from sjfm.ir on 2025-08-01]

به ۲/۵ مولار کاهش دادیم.

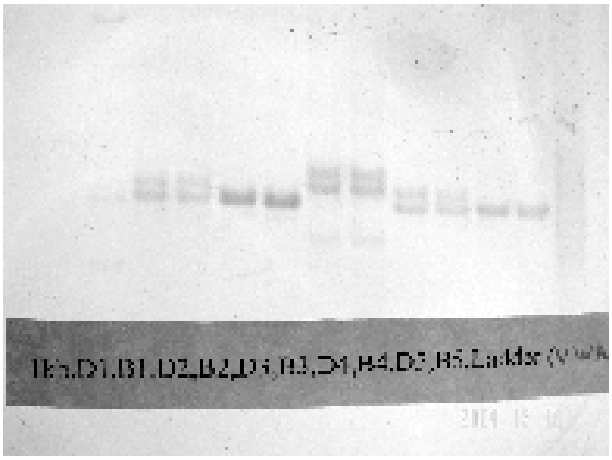
۲ - افزایش تعداد و مدت زمان مراحل شستشو با اتانول از سه مرحله به پنج مرحله به منظور حذف کامل GUSCN از محیط عمل (GUSCN یک ممانعت کننده قوی Taq DNA پلی مراز بوده و درصورت باقیماندن مقادیر حتی اندک آن در پایان کار واکنش PCR را مختل می نماید).

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).

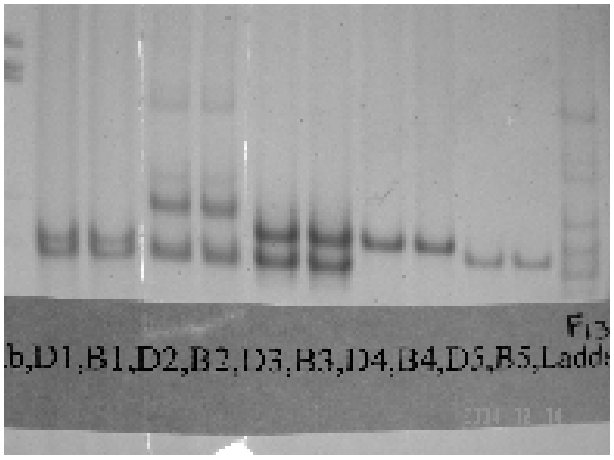
۴ - استفاده از Tris Hcl ۱ مولار PH=8 به جای PH=6/5 به منظور جدا شدن مولکول DNA از ذرات سیلیکا (۱۲).

۵ - افزایش غلظت آنزیم Taq DNA Polymerase و سیکل‌های 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 ٤ : نتایج تکثیر منطقه ملکولی VWA خون(B) و دندان(D)



عکس ٥ : 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 نمونه‌های بعدی قابل اتوکلاو بود.

نتیجه‌گیری

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 آزمایشگاه‌های 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.

[Downloaded from sjfm.ir on 2025-08-01]

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 Genetics1992; 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.

[Downloaded from sjfm.ir on 2025-08-01]