ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอและการประยุกต์ใช้ในงานนิติวิทยาศาสตร์

Mitochondrial DNA and Forensic Application

สุทัศน์ ดวงจิตร *

บทคัดย่อ

การพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลโดยสารพันธุกรรมในทางนิติวิทยาศาสตร์ส่วนใหญ่เกิดจากการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีจากนิวเคลียร์ดีเอ็นเอ แต่ในบางกรณีการตรวจพิสูจน์ด้วยนิวเคลียร์ดีเอ็นเอนั้นยังมีข้อจำกัดบางประการ ในทางปฏิบัติจึงมีการประยุกต์ใช้การตรวจพิสูจน์ทางไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอเพื่อช่วยให้งานการตรวจพิสูจน์เป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ แม้ว่าความชี้จำเพาะบุคคลของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอนั้นมีข้อกำจัด แต่ความสำคัญของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอนั้นอยู่ที่การเสริมข้อด้อยของการตรวจพิสูจน์ทางนิวเคลียร์ดีเอ็นเอ เช่นความสามารถตรวจพิสูจน์ในสิ่งส่งตรวจที่มีการเน่าสลาย หรือในกรณีที่จำนวนหรือปริมาตรของตัวอย่างสิ่งส่งตรวจที่มีน้อยเช่น คราบน้ำลาย คราบเลือด เส้นผม แม้กระทั่งในตัวอย่างที่มีความเก่าแก่เช่น โครงกระดูกโบราณ โดยทั่วไปสิ่งส่งตรวจเหล่านี้จะไม่สามารถตรวจพิสูจน์ทางนิวเคลียร์ดีเอ็นเอได้อย่างสมบูรณ์ แต่ในกรณีดังกล่าวสามารถตรวจพิสูจน์ด้วยไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอได้เพราะคุณลักษณะพิเศษที่สำคัญคือ มีจำนวนมากในแต่ละเซลล์ (high copy number) อีกประการหนึ่งการตรวจพิสูจน์ทางด้านไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอนั้นมีประโยชน์ในการตรวจพิสูจน์ความสัมพันธ์ของบุคคลทางสายเลือดฝ่ายมารดา (maternal inheritance) เช่นกรณีการตรวจพิสูจน์ความเป็นญาติกันระหว่างลูกพี่ลูกน้องที่มียายคนเดียวกัน ในกรณีที่พ่อและแม่ซึ่งเป็นญาติสายตรงได้เสียชีวิตไปแล้วซึ่งในลักษณะเช่นนี้การตรวจพิสูจน์ทางนิวเคลียร์ดีเอ็นเอค่อนข้างทำได้ยากในเรื่องของการแปรผลทางสถิติที่ซับซ้อน ดังนั้นหากจะทำการยืนยันด้วยไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอก็จะทำให้สามารถตรวจพิสูจน์บุคคลในกรณีนี้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ปัจจุบันการประยุกต์ใช้ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอนั้นมุ่งเน้นในส่วนที่มีการแปรผันของลำดับเบสในส่วนที่ไม่มีการถอดรหัสลำดับเบส ที่เรียกว่าส่วน non coding region หรือ D-loop และในปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้งานเพียง 2 ตำแหน่งคือ HVR I และ HVR II ซึ่งเป็นส่วนที่มีความแปรผันของลำดับเบสสูง และนำมาใช้ในการตรวจพิสูจน์บุคคลและความสัมพันธ์ทางเครือญาติในงานนิติวิทยาศาสตร์ แต่หากว่าการใช้เพียง D-loop นั้นมีค่ากำลังการแยกแยะบุคคลต่ำ จึงมีนักวิจัยที่คิดค้นหาตำแหน่งและวิธีการเพื่อเพิ่มความสามารถในการแยกแยะบุคคล เช่น การอ่านลำดับเบสทั้งจีโนม หรือการประยุกต์ใช้ single nucleotide polymorphisms (SNPs) แต่เทคนิคใหม่ที่คิดค้นมาส่วนใหญ่ยังอยู่เฉพาะห้องทดลองและยังไม่ได้รับความนิยมนำมาใช้จริงในงานพื้นฐานของห้องปฏิบัติการทางนิติวิทยาศาสตร์มากนัก

---

* อาจารย์ ศูนย์นิติวิทยาศาสตร์ ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

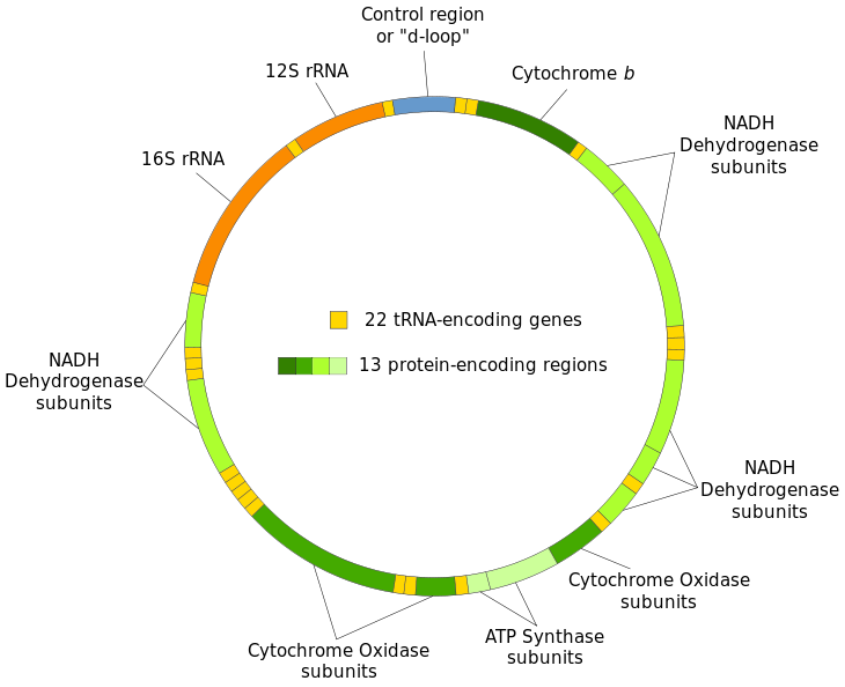
บทนำ

การตรวจพิสูจน์บุคคลโดยการใช้เทคโนโลยีทางพันธุศาสตร์ เริ่มมีการนำมาใช้ในงานทางด้านนิติวิทยาศาสตร์ครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ. 1985 โดยศาสตราจารย์ เซอร์อเล็ก เจฟฟรีย์ ซึ่งเป็นการตรวจพิสูจน์บุคคลในคดีฆาตกรรมข่มขืนในประเทศอังกฤษ และเป็นจุดเริ่มต้นในการพิสูจน์บุคคลโดยใช้ประโยชน์จากคุณสมบัติของรหัสพันธุกรรมที่มีการเรียงตัวของลำดับเบสที่มีการซ้ำกันของลำดับเบส โดยใช้หลักการที่ว่าความแตกต่างหรือความหลากหลายของขนาดความยาวของสายดีเอ็นเอที่เกิดจากการแปรผันของชุดลำดับเบสที่ซ้ำกัน เรียกเทคนิคนี้ว่า VNTR (Variation Number Of Tandem Repeat) สาเหตุที่ทำให้ความยาวของดีเอ็นเอแตกต่างกันในแต่ละบุคคลเกิดจากการที่มีการเรียงลำดับเบสซ้ำกันเป็นชุด ๆ ของลำดับเบสในชิ้นส่วนนั้น ๆ ไม่เท่ากัน โดยอาศัยหลักการดังกล่าวนี้ ทำให้มีการพัฒนาการตรวจวิเคราะห์ของนิวเคลียร์ดีเอ็นเอมาใช้ลักษณะของไมโครแซทเทิลไลท์หรือเรียกเทคนิคนี้ว่า short tandem repeat (STR) โดยในปัจจุบันนี้เทคนิคนี้ถูกนำไปใช้อย่างกว้างขวางในห้องปฏิบัติการทางนิติวิทยาศาสตร์ต่าง ๆ เพื่อใช้ในการตรวจพิสูจน์บุคคลซึ่งทำการพัฒนาการตรวจแบบ STR ไปเป็น multiplex STR ซึ่งเป็นการตรวจ STR มากถึง 16 ตำแหน่ง[20] และถูกนำไปใช้ในการแก้ไขปัญหาน้อยใหญ่ทั้งการพิสูจน์บุคคลในอุบัติภัยหมู่ เช่น การพิสูจน์บุคคลจากการก่อวินาศกรรมที่เวิร์ลเทรดเซ็นเตอร์[7] หรือภัยพิบัติธรรมชาติซึนามิในพื้นที่เอเชียตะวันออกเฉียงใต้เมื่อปี ค.ศ.2004[21] แม้กระทั่งการยืนยันความเป็นบิดามารดาในงานทะเบียนราษฎรทั่วไป

นอกเหนือจากการนำรหัสพันธุกรรมจากส่วนที่อยู่ในนิวเคลียสมาใช้แล้ว มนุษย์ยังมีรหัสพันธุกรรมอีกส่วนหนึ่งที่อยู่นอกนิวเคลียสนั่นก็คือไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ ซึ่งเป็นดีเอ็นเอที่อยู่ภายในไมโตคอนเดรียนั่นเอง แต่การจะใช้ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอมีข้อจำกัดหลายประการเช่น ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอไม่สามารถชี้จำเพาะบุคคลได้และมีค่ากำลังการแยกแยะต่ำ อย่างไรก็ตามถึงแม้มีข้อจำกัดในการใช้งาน แต่ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอยังมีคุณสมบัติที่ถือว่าเป็นข้อเด่นหลายประการ เช่น สามารถใช้แสดงความสัมพันธ์ในเครือญาติฝ่ายมารดา[6] ใช้ในกรณีที่สิ่งส่งตรวจไม่สามารถตรวจด้วยนิวเคลียร์ดีเอ็นเอได้อย่างสมบูรณ์ในหลายกรณี เช่น กรณีสิ่งส่งตรวจเป็นเส้นผม[4,23,29] โครงกระดูกที่มีอายุเก่าหรือมีการเผาไหม้[10,25,29] หรือในสิ่งส่งตรวจที่มีการเน่าสลาย[22] ด้วยเหตุผลต่าง ๆ เหล่านี้ในงานตรวจพิสูจน์บุคคล ปัจจุบันไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอยังเป็นที่ยอมรับและใช้ได้ดี ดังนั้นรายงานฉบับนี้จึงได้รวบรวมคุณสมบัติบางประการที่สำคัญและการประยุกต์ใช้ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอในงานตรวจพิสูจน์ทางนิติวิทยาศาสตร์เพื่อเป็นแนวทางการศึกษาต่อไป

ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ

ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ คือดีเอ็นเอที่อยู่ในไมโตคอนเดรีย ซึ่งไมโตคอนเดรียทำหน้าที่เสมือนเป็นโรงงานผลิตพลังงานสำหรับใช้ภายในเซลล์จากกระบวนการการหายใจระดับเซลล์ (cellular respiration) เชื่อกันว่าไมโตคอนเดรียมีวิวัฒนาการมาจากแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในเซลล์ยูคาริโอต แล้วค่อย ๆ พัฒนามาเป็นส่วนหนึ่งของเซลล์ตามทฤษฎี symbiosis[15] ในเซลล์ของมนุษย์นั้น ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอมีลักษณะเป็นวงกลมสายคู่ โดยเรียกสายที่มีลำดับเบสพิวรีนมากกว่าว่า สายเอช หรือ heavy strand (H- strand) ส่วนอีกสายตรงข้ามที่มีลำดับเบสเป็นไพริมิดีนจำนวนมากนั้นเรียกว่าสายแอล หรือ light strand (L- strand) วงกลมของสายดีเอ็นเอนั้นจะมีจำนวนเบส 16,568 คู่เบส (≈16kb)[2] เท่านั้นหรือประมาณร้อยละ 0.001 ของดีเอ็นเอทั้งหมดในหนึ่งเซลล์ที่มีจำนวนคู่เบสทั้งหมดถึง 3 พันล้านคู่เบส และมีคุณสมบัติแตกต่างจากนิวเคลียร์ดีเอ็นเอหลายประการดังแสดงไว้ในตารางที่ 1 นอกจากนี้ในจำนวน 16 kb ของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอจะมีทั้งบริเวณที่ทำหน้าที่ในการถอดรหัสยีนที่ทำหน้าที่ในกระบวนการหายใจระดับเซลล์ และส่วนที่ไม่ใช้ในการถอดรหัส ที่เรียกว่า D-loop หรือ control region มีความยาวประมาณ 1,100 คู่เบส (≈1.1 kb) ในส่วนของยีนที่ทำหน้าที่ในการถอดรหัสนั้นมาสามรถถอดรหัสได้ทั้งหมด 37 ยีน โดย 28 ยีนมาจากการถอดรหัสจากสายเอช มีเพียง 9 ยีนเท่านั้นที่ถอดรหัสมาจากสายแอล [2,3,24]



รูปที่ 1 แสดงแผนผังของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ (http://en.wikipedia.org/wiki/File:Mitochondrial_DNA_en.svg)

คุณสมบัติสำคัญของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ

ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอนั้นมีคุณสมบัติที่แตกต่างจากนิวเคลียร์ดีเอ็นเอหลายประการ ซึ่งความแตกต่างนั้นส่งผลให้การนำไปใช้มีข้อจำกัดและข้อดีแตกต่างจากนิวเคลียร์ดีเอ็นเอไปด้วย ซึ่งคุณสมบัติที่สำคัญของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอนั้นสรุปได้ดังนี้

คุณสมบัติการถ่ายทอดจากมารดา (maternal inheritance)

ลักษณะพันธุกรรมของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอนั้นได้รับการถ่ายทอดมาจากมารดาเท่านั้น[9,13] ซึ่งคุณสมบัติเหล่านี้ส่งผลให้บุคคลที่มีสายเลือดมารดาหรือยายคนเดียวกันจะมีลักษณะพันธุกรรมไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอเหมือนกันทุกคน คุณสมบัติเด่นนี้ทำให้สามารถพิสูจน์บุคคลในคดีการตรวจพิสูจน์ในครอบครัวได้เป็นอย่างดี กระบวนการการคัดเลือกไมโตคอนเดรียจากกระบวนการการปฏิสนธินั้นเกิดจากขณะที่มีการปฏิสนธินั้นอสุจิจะแทรกเฉพาะส่วนหัวเข้าไปในไข่ที่สุกและทำการปฏิสนธิ ซึ่งขั้นตอนนี้เองเป็นด่านแรกในการป้องกันไม่ให้ไมโตคอนเดรียของเพศชายเข้าไปในไข่ได้ เพราะไมโตคอนเดรียของตัวอสุจิจะสามารถพบได้ในส่วนคอของตัวอสุจิเป็นส่วนใหญ่ แม้ว่าจอาจมีบางส่วนของไมโตคอนเดรียของตัวอสุจิเข้าไปในไข่ได้ไม่ว่ากรณีใดก็ตามก็จะมีกระบวนการที่กำจัดทิ้งหรือทำให้ไม่สามารถทำงานได้ กระบวนการการกำจัดไมโตคอนเดรียของตัวอสุจิที่ผลัดหลงเข้าไปในไข่นั้นจะมีกระบวนการการกำจัดแต่ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดนัก Sutovsky และคณะ[32] รายงานไว้ว่าไมโตคอนเดรียของตัวอสุจิจะมีโปรตีนชนิดหนึ่งที่เรียกว่ายูบิควิติน (ubiquitin) ซึ่งถูกสร้างมาพร้อมกับการสร้างเซลล์อสุจิ เมื่อไมโตคอนเดรียของเพศชายเข้าไปในเซลล์ไข่ของเพศหญิง เซลล์ไข่จะตรวจสอบพบว่าไมโตคอนเดรียจากเซลล์อสุจิที่มียูบิควิติน ซึ่งแสดงถึงความเป็นสิ่งแปลกปลอมที่มาจากนอกเซลล์จึงทำการกำจัดออกโดยวิธีสร้างถุงหุ้ม (lysosome) ล้อมรอบไมโตคอนเดรียของเพศชายแล้วทำการย่อยสลายภายในถุงแล้วขับออกนอกเซลล์ ด้วยสาเหตุนี้ไมโตคอนเดรียของเซลล์อสุจิจึงไม่สามารถทำงานหรือเพิ่มจำนวนในตัวอ่อนได้ แต่ใบบางกรณีก็สามารถพบความแตกต่างจากลักษณะที่ปรกติได้ เช่นในการศึกษาของ Schwartz และ Vissing[31] ได้รายงานไว้ว่า พบจีโนมของไมโตคอนเดรียทั้งของบิดาและมารดา ซึ่งในรายงานระบุว่า คนไข้ชายอายุ 28 ปี มีลักษณะลำดับเบสของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอเหมือนบิดาในเซลล์กล้ามเนื้อ แต่เซลล์ส่วนอื่น ๆ มีลักษณะเหมือนมารดา ในรายงานยังระบุอีกว่าชายคนดังกล่าวมีความผิดปรกติทางด้านกล้ามเนื้อด้วยความบกพร่องในการสร้างเอ็นไซม์ที่ใช้ในกระบวนการการหายใจระดับเซลล์ โดยมีการขาดหายไป (deletion) ของลำดับเบสสองตัวในยีนที่ถอดรหัส ND2 หรือที่เรียกอีกอย่างหนึ่งว่า MTND2 ทำให้เกิดอาการอ่อนแรงของกล้ามเนื้อขึ้น จากเหตุผลดังกล่าวอาจกล่าวได้ว่าบุคคลที่มีความปรกติทางร่างกายจะมีลักษณะของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอเหมือนกับมารดาเท่านั้น และนี่เป็นสาเหตุที่ทำให้มีการใช้ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอมาตรวจพิสูจน์

ความเป็นมารดาและบุตรหรือวงศ์เครือญาติที่มีความสัมพันธ์ทางมารดาหรือยายเดียวกัน ดังกรณีในอดีตเช่น กรณีการตรวจพิสูจน์กระดูกที่สงสัยว่าเป็นของพระราชวงศ์รัสเซีย[14] โดยเปรียบเทียบกันระหว่างจักรพรรดินีอเล็กซานดร้ากับเจ้าชายฟิลิปป์พระสวามีของสมเด็จพระราชินีนาถเอลิซาเบธที่ 2 ที่เป็นพระญาติห่าง ๆ ที่ยังมีพระชนม์ชีพอยู่ หรือกรณีทหารอากาศอเมริกันในสงครามเวียดนามก็มีการตรวจพิสูจน์ซากกระดูกที่เหลืออยู่เทียบกับมารดาของผู้ตายซึ่งทำให้สามารถระบุได้ว่า ซากกระดูกนั้นเป็นของบุตรชายที่ร่วมเข้ารบในสงครามเวียดนาม[16] และกรณีทหารอเมริกาที่ไปรบในสงครามเกาหลีก็ได้รับการตรวจพิสูจน์ด้วยไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอเช่นเดียวกัน

คุณสมบัติด้านจำนวนมากในแต่ละเซลล์ (high copy number)

ในเซลล์ทั่ว ๆ ไปนั้นสามารถพบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอได้ในปริมาณมาก โดยเฉลี่ยแล้วในเซลล์หนึ่ง ๆ จะสามารถพบจำนวนไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอได้ถึงหนึ่งพันถึงสามพันชุด[30] ขึ้นอยู่กับว่าเซลล์นั้นมีความต้องการในการใช้พลังงานปริมาณมากน้อยแค่ไหน และภายในไมโตคอนเดรียหนึ่งอันสามารถพบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอได้สองถึงสามชุด ดังนั้นในหนึ่งเซลล์อาจพบไมโตคอนเดรียได้เป็นหลักร้อยถึงหลักพันขึ้นอยู่กับหน้าที่และการใช้พลังงานของเซลล์เอง คุณสมบัตินี้เองเป็นตัวที่ทำให้ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอถูกนำมาใช้ในกรณีที่นิวเคลียร์ดีเอ็นเอไม่สามารถใช้งานได้อย่างสมบูรณ์ เช่น กรณีที่มีการเน่าสลายของสิ่งส่งตรวจ คราบน้ำลาย นิวเคลียร์ดีเอ็นเอซึ่งพบเพียงชุดเดียวในนิวเคลียสจะถูกย่อยสลายไป แต่โอกาสที่จะพบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอที่ยังคงสภาพเดิมนั้นจะมีมากกว่า หรือแม้แต่ในกรณีการตรวจพิสูจน์วัตถุชีวภาพที่มีอายุเก่าแก่อย่างเช่นโครงกระดูกโบราณ[12,17] ซึ่งจะไม่สามารถตรวจโดยนิวเคลียร์ดีเอ็นเอได้ นอกจากนี้ยังพบว่าสิ่งส่งตรวจที่ไม่มีนิวเคลียร์ดีเอ็นเอก็ยังสามารถตรวจพิสูจน์โดยไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอได้ เช่น เส้นผม แม้ว่าคุณสมบัตินี้เป็นข้อดีของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอแต่ว่าต้องระมัดระวังเรื่องของการปนเปื้อนได้ง่าย หรือแม้กระทั่งกรณีของ heteroplasmy ซึ่งอาจทำให้เข้าใจผิดว่ามีการปนเปื้อนของสิ่งส่งตรวจได้

คุณสมบัติด้านอัตราการกลายพันธุ์ (mutation rate)

สาเหตุของการกลายพันธุ์ของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอนั้นมาจากข้อสันนิษฐานหลายประการ ประการแรกคือ สายดีเอ็นเอของไมโตคอนเรียลดีเอ็นเอนั้นไม่ได้รับการป้องกันจากโปรตีนป้องกัน (protection protein) เช่น ฮีสโตน เหมือนกันกับนิวเคลียร์ดีเอ็นเอจึงทำให้มีการแลกเปลี่ยนหรือสัมผัสกับสิ่งที่จะที่มีผลต่อการกลายพันธุ์ได้ง่าย ประการที่สองเกิดจากการที่ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอมีโอกาสถูกทำให้เสียหายจากอนุมูลอิสระได้ง่าย โดยเฉพาะ ออกซิเจน สปีชีส์ (reactive oxygen species) ซึ่งเป็นผลต่อเนื่องจากกระบวนการหายใจระดับเซลล์ ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีอยู่แล้วว่าไมโตคอนเดรียมีหน้าที่ในการผลิตพลังงานให้กับเซลล์สิ่งมีชีวิต ผลลัพธ์บางอย่างที่ได้ในกระบวนการนี้ได้แก่ อนุมูลอิสระของออกซิเจน ทำให้เกิดความเสียหายกับสารพันธุกรรม ซึ่ง

หลายทฤษฎีสนับสนุนว่าความเสียหายนี้สามารถทำให้เกิดการแก่ของเซลล์ได้ ประการที่สามคือการที่ดีเอ็นเอพอลิเมอเรสของไมโตคอนเดรียนั้นมีประสิทธิภาพการซ่อมแซม (prove reading) ตัวเองต่ำ จึงเป็นผลให้เมื่อเกิดความผิดพลาดในกระบวนการจำลองตัวเองจากดีเอ็นเอต้นแบบจึงส่งผลให้เกิดการส่งต่อรูปแบบสารพันธุกรรมที่ผิดพลาดไปยังเซลล์อื่น ๆ ที่เกิดจากการแบ่งตัว หรืออาจเกิดการส่งทอดพันธุกรรมไปสู่ลูกหลานได้ ส่วนตัวเลขอัตราการการกลายพันธุ์ที่แท้จริงนั้นยังไม่มีการสรุปแน่ชัด แต่เป็นที่ทราบกันว่าหากมองในเชิงการวิวัฒนาการพบว่าในบริเวณ control region นั้นมีอัตราการกลายพันธุ์ค่อนข้างเร็วและเร็วกว่าบริเวณอื่น ๆ ถึง 4-5 เท่าตัว หากจะไม่นับตำแหน่ง control region นั้นพบว่ามีอัตราการกลายพันธุ์ของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเออยู่ที่ 0.017×10^{-6} เบสต่อตำแหน่งต่อปี ซึ่งพบว่าสูงกว่าอัตราการกลายพันธุ์ของนิวเคลียร์ดีเอ็นเออยู่มาก แต่อัตราการกลายพันธุ์ของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอทั้งจีโนมนั้นหากคำนวณเชิงวิวัฒนาการ (phylogenetically based) พบอัตราการกลายพันธุ์อยู่ที่ $0.075\text{-}0.165\times10^{-6}$ เบสต่อตำแหน่งต่อปี[27] อย่างไรก็ตามการที่ตำแหน่ง control region มีอัตราการกลายพันธุ์ที่สูงนี้ส่งผลให้เกิดประโยชน์ในเชิงความหลากหลายทางพันธุกรรมของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ จากการศึกษาของ Barbosa และคณะ[5] พบว่าบริเวณ control region ในตำแหน่ง HVR I และ HVR II นั้นมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงถึง 0.9975 ในกลุ่มประชากรภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศบราซิล ในประเทศไทยนั้นสุทัศน์และคณะ[1] ได้ทำการศึกษาความหลากหลายของทั้งสองตำแหน่งพบว่ามีค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมถึง 0.9871 นอกจากนั้นสุทัศน์และคณะยังได้ศึกษาถึงตำแหน่งที่นอกเหนือจาก HVR I และ HVR II แต่ยังอยู่ในบริเวณของ control region นั่นคือ HVR III พบว่าหากนำทั้งสามตำแหน่งมาคำนวณจะพบค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงเพิ่มขึ้นถึง 0.9875

ตารางที่ 1 แสดงการเปรียบเทียบคุณสมบัติระหว่างไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ และนิวเคลียร์ดีเอ็นเอ

คุณสมบัติ	**ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ**	**นิวเคลียร์ดีเอ็นเอ**
ลักษณะทั่วไป	วงกลมสายคู่	สายเกลียวคู่ เส้นยาว
ขนาด	16,568 คู่เบส	3 พันล้านคู่เบส
การถ่ายทอด	มารดาเท่านั้น	ทั้งบิดาและมารดาคนละครึ่ง
จำนวนชุดต่อเซลล์	100 -3000	1
ความสามารถในการระบุบุคคล	ไม่ชี้จำเพาะ	ชี้จำเพาะ เป็นเอกลักษณ์

การประยุกต์ใช้ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอในงานนิติวิทยาศาสตร์

ลำดับเบสอ้างอิงของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ

การใช้ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอในการตรวจพิสูจน์บุคคลทางนิติวิทยาศาสตร์นั้น จำเป็นต้องรายงานผลลำดับเบสที่แตกต่างจากลำดับเบสที่ใช้อ้างอิง เช่น หากตำแหน่งลำดับที่ 16020 ในสิ่งส่งตรวจมีลำดับเบสเป็น C ในขณะที่ลำดับเบสของเบสอ้างอิงเป็น T ก็จะรายงานว่า 16020C นั่นหมายความว่าทุกลำดับเบสอื่น ๆ ทั้งหมดเหมือนลำดับเบสอ้างอิงทุกตัวยกเว้นลำดับที่ 16020 มีลำดับเบสเปลี่ยนไปเป็น C เท่านั้น ลำดับเบสอ้างอิงนั้นเดิมที่มีการใช้ลำดับเบสของ Anderson และคณะ[14] ซึ่งมีการศึกษาลำดับเบสของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ และได้ตีพิมพ์ลำดับเบสของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอลงในวารสาร Nature ในปี ค.ศ. 1981 และต่อมาเป็นที่รู้จักกันในชื่อ Cambridge Reference Sequence (CRS) โดยการรายงานผลที่เปรียบเทียบกับลำดับเบสอ้างอิงนี้จะรายงานเทียบกับลำดับเบสในสายแอล (L-strand) เท่านั้น ต่อมาในปี ค.ศ. 1999 มีการทำการตรวจสอบลำดับเบสอ้างอิงโดยคณะผู้ทำงานเดิม โดยใช้ตัวอย่างจากผู้สืบสายโลหิตของตัวอย่างที่ทำเมื่อปี ค.ศ. 1981 พบว่าลำดับเบสที่ 3106 และ 3107 ที่มีลำดับเบสเป็น CC ในลำดับเบสอ้างอิงเดิม แท้จริงมีเพียงลำดับเบสเดียวคือ C เท่านั้น จึงทำให้ลำดับเบสอ้างอิงมีจำนวนเบสลดลงหนึ่งเบสเหลือเพียง 16,568 จากเดิม 16,569 คู่เบส นอกจากนั้นยังพบอีกว่ามีลำดับเบสอีก 10 ตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงแก้ไขและได้รายงานไว้ดังแสดงไว้ในตารางที่ 2 จากข้อมูลการแก้ไขลำดับเบสจะพบว่าถึงแม้มีการแก้ไขลำดับใหม่ แต่บริเวณของการตรวจพิสูจน์ในงานนิติวิทยาศาสตร์ซึ่งได้แก่ตำแหน่ง HVR I และ HVR II ยังคงมีลำดับเบสเหมือนเดิมจึงไม่ได้รับผลกระทบใด ๆ สาเหตุที่มีการเปลี่ยนแปลงและแก้ไขคือความผิดพลาดในการวิเคราะห์ลำดับเบสในสมัยนั้นเครื่องมือการวิเคราะห์ยังไม่มีความถูกต้องแม่นยำเท่ากับปัจจุบัน จากการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสอ้างอิงทำให้ฐานข้อมูลการอ้างอิงของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอเปลี่ยนไปด้วย และเรียกลำดับเบสอ้างอิงใหม่ว่า The revised Cambridge Reference Sequence (rCRS) หรือ MITOMAP แต่ลำดับเบสของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอที่ใช้ในการอ้างอิงนั้นไม่ได้มีเพียง rCRS เท่านั้น ทางด้าน GenBank ยังได้ทำการถอดรหัสลำดับเบสของชาวแอฟริกันในปี ค.ศ. 2000 โดยทีมผู้วิจัยของ Ingman และคณะ[18] โดยใช้รหัส AF347015 ซึ่งพบลำดับเบสทั้งสิ้น 16,571 คู่เบส ซึ่งงานของ Ingman และคณะส่วนใหญ่จะใช้ในการศึกษาลำดับวิวัฒนาการของมนุษย์ ถึงแม้ว่าลำดับเบสที่ใช้ในการอ้างอิงมีหลายที่ แต่การเลือกใช้ควรดูจุดประสงค์ของการใช้และควรระบุที่มาของลำดับเบสอ้างอิงด้วย อย่างไรก็ตามงานด้านนิติวิทยาศาสตร์ส่วนใหญ่จะใช้ลำดับเบสอ้างอิงของ Anderson และคณะ ซึ่งได้มีการตีพิมพ์ไว้ก่อนตั้งแต่ต้น และเป็นที่ยอมรับกันอยู่แล้ว

ตารางที่ 2 แสดงตำแหน่งของลำดับเบสที่มีการตรวจสอบแก้ไขใหม่ในงาน MITOMAP

ตำแหน่งลำดับเบส	ยีนที่ถอดรหัส	ลำดับเบสของ CRS	ลำดับเบสของ rCRS
3106-3107	16s rRNA	CC	C
3423	ND1	G	T
4985	ND2	G	A
9559	COIII	G	C
11335	ND4	T	C
13702	ND5	G	C
14199	ND6	G	T
14272	ND6	G	C
14365	ND6	G	C
14368	ND6	G	C
14766	cyt b	T	C

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ

จากคุณสมบัติของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอที่มีอัตราการกลายพันธุ์ในตำแหน่งของ D-loop สูงนั้นทำให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมในแต่ละบุคคลซึ่งในปัจจุบันนี้มีการนำตำแหน่ง D-loop มาใช้ในการตรวจพิสูจน์บุคคลทางนิติวิทยาศาสตร์อยู่สองบริเวณ บริเวณแรกเรียกว่า hypervariable region I (HVRI, HVI, HV1 หรือ HVS1) ซึ่งตั้งอยู่ตำแหน่งที่ 16,024-16,365 ซึ่งมีความยาว 342 คู่เบส บริเวณที่สองเรียกว่า hypervariable region II (HVRII, HVII, HV2หรือ HVS2) ตั้งอยู่ตำแหน่งลำดับเบสที่ 73- 340 มีความยาวทั้งสิ้น 268 คู่เบส โดยทั่วไปจะพบความหลากหลายในตำแหน่ง HVRI มากกว่า HVRII แต่อย่างไรก็ตามการตรวจพิสูจน์หรือตรวจเปรียบเทียบในงานการพิสูจน์บุคคลของนิติเวชศาสตร์นั้นนิยมใช้ทั้งสองตำแหน่งมาตรวจร่วมกัน โดยการรายงานจะรายงานเฉพาะลำดับเบสที่แตกต่างจากลำดับเบสอ้างอิงดังที่ได้กล่าวไปแล้ว ในการแปลผลการตรวจพิสูจน์นั้น ผลของสิ่งส่งตรวจต้องมีลำดับเบสที่ตรงกันกับเบสที่นำมาเปรียบเทียบ หรือมีจุดที่แตกต่างจากลำดับเบสที่ใช้อ้างอิงตรงกันทุกประการจึงจะถือว่าเป็นบุคคลร่วมสายเลือดมารดาหรือยายเดียวกัน แต่ไม่สามารถระบุความเป็นเอกลักษณ์หรือบอกถึงความสัมพันธ์ในลักษณะ บิดา มารดา บุตร ได้ดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น จากการศึกษาในกลุ่มประชากรต่างๆพบว่าการใช้ลำดับเบสทั้งสองตำแหน่งมีค่าทางสถิติในแต่ละกลุ่มประชากรแตกต่างกันเช่น ในกลุ่มประชากรชาวญี่ปุ่น[33]พบว่าโอกาสที่คนสองคนที่ไม่มีความสัมพันธ์กันทางสายเลือดทางมารดาจะมีความเหมือนของรูปแบบทางพันธุกรรมหากตรวจพิสูจน์ทางไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอทั้งสองตำแหน่งมีประมาณร้อยละ1.10 ในขณะที่ชาวฝรั่งเศสมีร้อยละ 1.30 ชาวออสเตรเลียนร้อยละ1.28[8] ในขณะที่ชาวไทยในกลุ่มประชากรภาคกลางมีประมาณร้อยละ 1.28[1] จากการเปรียบเทียบข้อมูลจะพบว่าในการตรวจเปรียบเทียบคน

เพียงสองคนที่ไม่มีความสัมพันธ์ทางสายเลือดมารดา หรือการตรวจเปรียบเทียบมารดากับบุตรจะพบว่ามีโอกาสน้อยมากที่จะพบคนสองคนที่มีลำดับเบสของรหัสพันธุกรรมในไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอเหมือนกัน แต่ในกรณีของภัยพิบัติหมู่ที่มีคนเสียชีวิตจำนวนมากจากข้อมูลประชากรไทยจะพบว่าหากมีผู้เสียชีวิตหนึ่งพันคนโอกาสที่จะพบคนที่มีลำดับรหัสพันธุกรรมของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอเหมือนกันมีประมาณ 12.8 คน ซึ่งถือว่าเป็นจำนวนค่อนข้างมากเมื่อเปรียบเทียบกับการตรวจพิสูจน์ด้วยเทคโนโลยีการตรวจพิสูจน์ของนิวเคลียร์ดีเอ็นเอ หรือ multiplex STR ที่พบว่า ค่าสถิติของโอกาสความน่าจะเป็นที่จะมีคนมีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนกันหากตรวจด้วย STR จำนวน 16 ตำแหน่งในประชาชนชาวอเมริกาคือ 5.01×10^{-18} ซึ่งถือว่าแทบจะไม่มีโอกาสเป็นไปได้เลยในประชากรโลกในปัจจุบัน แต่เนื่องจากการตรวจทางไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอก็มีความจำเป็น และมีคุณค่าแม้มีข้อจำกัดบางประการดังที่กล่าวไปแล้ว ในระยะต่อมาจึงมีนักวิจัยที่คิดค้นเพื่อหาวิธีเพิ่มขีดความสามารถของกำลังการแยกแยะ (discrimination power) ในการประยุกต์ใช้ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ โดยการหาตำแหน่งที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมมาเพิ่ม จากการวิจัยที่ผ่านมาพบว่าการนำ hypervariable region III (HVRIII) ที่มีลำดับเบสอยู่ระหว่างลำดับที่ 438-574 มาช่วยเพิ่มขีดความสามารถในการตรวจพิสูจน์ทางไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ เช่นในกลุ่มตัวอย่างที่ไม่มีความสัมพันธ์กันทางสายเลือดมารดาพบว่ามีความเหมือนกันของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอในตำแหน่ง HVRI และ HVR II ทุกประการ แต่เมื่อทำการตรวจวิเคราะห์เพิ่มเติมด้วย HVRIII สามารถแยกบุคคลออกจากกันได้ ในประเทศไทยก็มีคนศึกษาการนำ HVRIII มาใช้พบว่าหากตรวจร่วมกับตำแหน่ง HVRI และ HVR II พบว่าโอกาสที่คนสองคนที่ไม่มีความสัมพันธ์กันทางสายเลือดมารดาจะมีความเหมือนของรูปแบบทางพันธุกรรมในไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอเพียงร้อยละ 1.25[1] อย่างไรก็ตามแม้ว่าการนำ HVRIII มาเพิ่มความสามารถในการตรวจพิสูจน์แต่ขีดความสามารถของ HVRIII ยังมีน้อยและจะถูกเลือกใช้ในกรณีที่ต้องการเพิ่มกำลังการวิเคราะห์ด้วย HVRI และ HVR II เท่านั้นและงานวิจัยในปัจจุบันที่เกี่ยวกับการตรวจพิสูจน์ทางไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอยังก็ยังหารูปแบบและวิธีการเพิ่มศักยภาพการตรวจพิสูจน์ทางไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ รูปแบบการตรวจที่นักวิจัยในปัจจุบันได้คิดแนวทางไว้คือการตรวจทั้งจีโนมของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ ปัญหาของการตรวจทั้งจีโนมที่ต้องระวัง คือการแปลผลและการวิเคราะห์ผลที่ผิดพลาด แต่ปัญหาเหล่านี้ได้รับการแก้ไขจากนักวิจัยที่คิดค้นการใช้โปรแกรม MitoAnalyzer ซึ่งสามารถอ่านและวิเคราะห์ลำดับเบสทั้งจีโนมของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอได้อย่างถูกต้องแม่นยำขึ้น แต่เนื่องจากว่าการวิเคราะห์ทั้งจีโนมมีค่าใช้จ่ายมากไม่เหมาะสมกับงานด้านนิติวิทยาศาสตร์ จึงมีการคิดค้นและการพัฒนาการวิเคราะห์อีกวิธี กล่าวคือแทนที่จะอ่านลำดับเบสทั้งหมด กลับอ่านเฉพาะเบสที่มีการเปลี่ยนแปลงเป็นตำแหน่ง ๆ เรียกเทคนิคนี้ว่า multiplex SNP ซึ่งสามารถลดค่าใช้จ่ายและเวลาในการวิเคราะห์จากการอ่านลำดับเบสทั้งหมดของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ ในปัจจุบันมีการทดลองใช้ SNP มาทำการตรวจวิเคราะห์เพื่อเพิ่มกำลังการแยกแยะของการตรวจในตำแหน่ง HVRI และ HVR II พบว่าทั้งการตรวจ SNP ในบริเวณ coding region[19,28] ที่

นอกเหนือจากตำแหน่ง HVRI และ HVR II และการตรวจ SNP ทั้งจีโนมของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ[10] ก็สามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพกำลังการแยกแยะของการตรวจ HVRI และ HVR II ได้เป็นอย่างดี แต่ยังไม่มีการนำมาใช้มากนักในห้องปฏิบัติการทางนิติวิทยาศาสตร์

ถึงแม้ว่าการตรวจวิเคราะห์ทางไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอจะมีข้อจำกัดพื้นฐานคือไม่สามารถพิสูจน์ความเป็นเอกลักษณ์ หากแต่คุณสมบัติการถ่ายทอดมาจากมารดาและจำนวนที่มากในแต่ละเซลล์นั้น ทำให้ไม่สามารถละเลยการคิดค้นและพัฒนาเพื่อนำมาประยุกต์ใช้แทนนิวเคลียร์ดีเอ็นเอที่มีข้อจำกัดในบางประการดังที่กล่าวมาแล้วได้อย่างเหมาะสมและใช้การได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด

ปัญหาในการประยุกต์ใช้ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอในการตรวจพิสูจน์บุคคล

ปัญหาในการตรวจวิเคราะห์ของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอนั้น หากไม่รวมถึงขั้นตอนและเทคนิคในระหว่างการวิเคราะห์ที่ต้องใช้เวลาและทักษะของผู้วิเคราะห์ที่ต้องมีความชำนาญ ยังมีปัญหาขั้นต้นที่ต้องระวังและดูแลเป็นพิเศษคือการปนเปื้อนของสิ่งส่งตรวจ ซึ่งปัญหานี้มักพบได้บ่อยกับตัวอย่างส่งตรวจตามห้องปฏิบัติการทางนิติวิทยาศาสตร์ ซึ่งจะทำให้การวิเคราะห์ทางไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอนั้นไม่สามารถทำได้เลย ฉะนั้นรูปแบบการแก้ปัญหาคงต้องเป็นรูปแบบในเชิงป้องกันโดยการเก็บสิ่งส่งตรวจและการเก็บรักษาให้ถูกต้องตามหลักของการเก็บวัตถุพยานตามหลักสากล นอกจากปัญหาการปนเปื้อนแล้ว ยังมีรูปแบบที่อาจทำให้เกิดความเข้าใจผิดว่ามีการปนเปื้อนได้คือ ลักษณะของการเกิด heteroplasmy ซึ่งสามารถเกิดจากการที่ดีเอ็นเอมีรูปแบบหรือลำดับเบสที่ต่างกันได้หลายแบบในบุคคลเดียวกัน ซึ่งอาจเข้าใจว่ามีการปนเปื้อนได้ แต่เมื่อ หากพิจารณาแล้วจะพบเพียงบางตำแหน่งของตำแหน่งเบสเท่านั้นที่ไม่สามารถระบุลำดับเบสได้อย่างชัดเจนก็จะทำให้เราทราบว่ามีการเกิด heteroplasmy อัตราการเกิด heteroplasmy นั้นมักพบในสิ่งส่งตรวจที่เป็นเส้นผมมากกว่าเลือด อาจเนื่องมาจากการที่เส้นผมสัมผัสกับแสงแดดหรือสารเคมีภายนอก จึงเกิดความเสียหายของดีเอ็นเอได้ Paneto และคณะ[26]ได้ศึกษาการเกิด heteroplasmy ในเส้นผมของกลุ่มประชากรประเทศบราซิลในตำแหน่งของ HVR I และ HVR II พบว่ามีการเกิด heteroplasmy ในลำดับเบสถึงร้อยละ 10.5 ฉะนั้นแนวทางการแก้ปัญหาหากสามารถเลือกที่เก็บวัตถุพยานได้ ควรเลือกวัตถุพยานที่เป็นเลือดจะมีประสิทธิภาพในการวิเคราะห์และแปลผลมากกว่า

นอกจากนี้การตรวจพิสูจน์บุคคลด้วยไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอยังสามารถพบการเกิด length heteroplasmy ได้ ซึ่งจะทำให้เกิดความยุ่งยากในการแปลผลจึงต้องระมัดระวังในการแปลผลเป็นอย่างยิ่งแม้ในการศึกษาในประชากรไทยในตำแหน่ง HVR III ก็สามารถพบ length heteroplasmy ในตำแหน่งดังกล่าวได้[1]แต่ปัญหานี้ยังสามรถแก้ไขได้ด้วยวิธีการเดียวกันกับการเกิด heteroplasmy ทั่วไปได้ ปัญหาอีกอย่างเกี่ยวกับการ

วิเคราะห์ผลของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอคือการเกิด C-stretch ในลำดับเบสในบริเวณ HVR I และ HVR II ซึ่งสามารถพบตำแหน่งที่มี C-stretch จากทั้งสองตำแหน่งบริเวณลำดับเบสที่16184 ถึง 16193 แล 303 ถึง 315 ตามลำดับ ซึ่งการเกิด C-stretch นี้ทำให้เกิดความยุ่งยากในการอ่านลำดับเบส เพราะเมื่อเกิด C-stretch แล้วในบางกรณีจะทำให้ไม่สามารถอ่านลำดับเบสต่อไปได้ การแก้ไขปัญหานี้เบื้องต้นคือการหาลำดับเบสแบบย้อนกลับอีกสายของดีเอ็นเอก็พอจะแก้ไขปัญหาได้บ้างในบางกรณี ซึ่งปัญหาต่างๆเหล่านี้อาจเกิดขึ้นในระหว่างการทำงานได้จำเป็นต้องได้รับการแก้ไขเบื้องต้นจะสังเกตเห็นได้ว่าในบางกรณีอาจแก้ไขไม่ได้เลย เช่น กรณีของการปนเปื้อนและ heteroplasmy หากทางห้องปฏิบัติการมีสิ่งส่งตรวจที่จำกัดและชนิดเดียว แต่ในบางกรณีอาจใช้เทคนิคบางอย่างเข้ามาช่วยในการแก้ไปปัญหาได้

แม้ว่าคุณสมบัติที่ไม่สามารถชี้จำเพาะบุคคลได้อย่างแน่ชัดของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอทำให้เกิดข้อจำกัดในการนำไปใช้ในการตรวจพิสูจน์บุคคล แต่หากว่าไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอมีคุณสมบัติอื่นๆหลายประการที่ทำเกิดประโยชน์ในการนำไปประยุกต์ใช้ในทางนิติวิทยาศาสตร์ เช่น ความสามรถในการวิเคราะห์ดีเอ็นเอในสิ่งส่งตรวจที่เน่าสลายหรือมีปริมาณน้อยๆ หรือแม้กระทั่งการตรวจความเป็นมารดาและบุตร ด้วยคุณลักษณะดังกล่าวจึงทำให้เกิดการประยุกต์ใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทางผู้เรียบเรียงจึงเห็นว่ามีความคุ้มค่าที่จะมีการคิดค้นและพัฒนารูปแบบการวิเคราะห์และแปลผลของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอเพื่อการนำไปใช้ต่อไปเพื่อให้งานการตรวจพิสูจน์ทางนิติวิทยาศาสตร์สามารถเพิ่มขีดความสามารถในการประยุกต์ใช้ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุดต่อไป

References

1. สุทัศน์ ดวงจิตร, วรวีย์ ไวยวุฒิ, วิโรจน์ ไวยวุฒิ และคณะ (2552). การศึกษา เอชวีอาร์-3 ในประชากรไทยและการประยุกต์ใช้ในงานนิติวิทยาศาสตร์. การประชุมทางวิชาการนเรศวรวิจัย ครั้งที่ 5. หน้าที่ 47

2. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, et al. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290: 457-465.

3. Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, et al. (1999). Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet.* 23: 147.

4. Baker LE, McCormick WF, Matteson KJ. (2001). A silica-based mitochondrial DNA extraction method applied to forensic hair shafts and teeth. *J Forensic Sci.* 46: 126–130.

5. Barbosa AB, da Silva LA, Azevedo DA, et al. (2008). Mitochondrial DNA control region polymorphism in the population of Alagoas state, north-eastern Brazil. *J Forensic Sci.* 53 (1): 142-6.

6. Bender K, Schneider PM, Rittner C. (2000). Application of mtDNA sequence analysis in forensic casework for the identification of human remains. *Forensic Sci Int.* 113: 103-107.

7. Budimlija ZM, Prinz MK, Zelson-Mundorff A, et al. (2003). World Trade Center human identification project: experiences with individual body identification cases. *Croat Med J*. 44: 259–263.

8. Budowle B, Wilson MR, DiZinno JA, et al. (1999). Mitochondrial DNA regions HVI and HVII population data. *Forensic Sci Int.* 103: 23-35.

9. Cummins JM. (2002). The role of maternal mitochondria during oogenesis, fertilization and embryogenesis. *Reprod Biomed Online.* 4: 176–182.

10. Coble MD, Just RS, O'Callaghan JE, et al. (2004). Single nucleotide polymorphisms over the entire mtDNA genome that increase the power of forensic testing in Caucasians. *Int J Legal Med*. 118 (3): 137-46

11. Fanton L, Jdeed K, Tilhet-Coartet S, et al. (2006). Criminal burning. *Forensic Sci Int.* 158: 87–93.

12. Fu Y, Xie C, Xu X, et al. (2009). Ancient DNA analysis of human remains from the Upper Capital City of Kublai Khan. *Am J Phys Anthropo.* 1: 23-29.

13. Giles RE, Blanc H, Cann HM, et al. (1980). Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 77: 6715–6719.

14. Gill P, Ivanov PL, Kimpton C, et al. (1994). Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis. *Nat Genet*. 6: 130–135

15. Gray M, Burger G, Lang B. (2001). The origin and early evolution of mitochondria. *Gen Bio.* 2: 1018.1-1018.5.

16. Holland MM, Fisher DL, Mitchell LG, et al. (1993). Mitochondrial DNA sequence analysis of human skeletal remains: identification of remains from the Vietnam War. *J Forensic Sci*. 38: 542–553.

17. Igawa K, Manabe Y, Oyamada J,et al. (2009). Mitochondrial DNA analysis of Yayoi period human skeletal remains from the Doigahama site. *J Hum Genet*. 10: 581-588

18. Ingman M, Kaessmann H, Pääbo S, et al. (2000). Mitochondrial genome variation and the origin of modern humans. *Nature.* 408: 708-713

19. Köhnemann S, Sibbing U, Pfeiffer H, et al. (2008). A rapid mtDNA assay of 22 SNPs in one multiplex reaction increases the power of forensic testing in European Caucasians. *Int J Legal Med.* 122 (6): 517-23

20. Krenke BE, Tereba A, Anderson SJ. et al., (2002). Validation of a 16-Locus fluorescent multiplex system, *J. Forensic Sci.* 47: 773–785.

21. Ladika S. (2005). South Asia tsunami. DNA helps identify missing in the tsunami zone. *Science*. 307: 504.

22. Lee HY, Kim NY, Park MJ, et al. (2008). A modified mini-primer set for analyzing mitochondrial DNA control region sequences from highly degraded forensic samples. *BioTechniques*. 44: 555–558.

23. Melton T, Dimick G, Higgins B, et al. (2005). Forensic mitochondrial DNA analysis of 691 casework hairs. *J Forensic Sci*. 50: 73-80.

24. Michael W, Burger G, Lang B. (1999). Mitochodrial evolution. *Science*. 238: 1476-1481.

25. Nelson K, Melton T. (2007). Forensic mitochondrial DNA analysis of 116 casework skeletal samples. *J Forensic Sci*. 52: 557-561.

26. Paneto GG, Martins AJ, Longo V L, et al. (2007). Heteroplasmy in hair: differences among hair and blood from the same individuals are still a matter of debate. *Forensic Sci Int.* 173 (2-3): 117-21

27. Pakendorf B, Stoneking M. (2005). Mitochondrial DNA and human Evolution. *Annu.Rev.Genomic Hum.* 6: 165-83.

28. Quintáns B, Alvarez-Iglesias V, Salas A,et al. (2004). Typing of mitochondrial DNA coding region SNPs of forensic and anthropological interest using SNaPshot minisequencing. *Forensic Sci Int*. 10; 140 (2-3): 251-7

29. Rodiguez-Mongr A, Montesio M, Prieto L, et al. (2003). MtDNA control region polymorphism: sequence database and forensic application. *International Congress Series.* 1239: 521-524.

30. Shadel GS, Clayton DA. (1997). Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates. *Annu Rev Biochem.* 66: 409-435.

31. Schwartz M, Vissing J. (2002). Paternal inheritance of mitochondrial DNA. *N Eng J Med.* 348: 576-80.

32. Sutovsky P, Moreno R, Ramalho-Santos J, et al. (1999). Ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Nature*. 402: 371-372.

33. Yasuhisa S, Beate SB, Christian R, et al. (1998). Sequence polymorphism of mitochondrial DNA control region in Japanese. *Forensic Sci. Int.*97: 155-64.