

中国若干考古遗址古 DNA 样本的初步探索

张帆¹, 李辉¹, 黄颖^{1,2}, 谭婧泽¹, 张丽萍¹, 徐智¹, 金建中¹, 卢大儒¹, 金力¹

(1. 复旦大学生命科学学院现代人类学研究中心, 上海 200433; 2. 复旦大学文物与博物馆学系, 上海 200433)

摘要: 古代 DNA 的研究方兴未艾, 作为地域和人口大国, 中国在这方面有着得天独厚的优势. 我们利用遗传学手段对中国若干考古遗址进行了初步研究, 并对两类古代 DNA 的提取方法进行了比较, 同时, 也尝试了模拟古代 DNA 条件的全基因组的随机引物预扩增的实验方法. 对中国古代 DNA 研究提出了自己的思路及展望.

关键词: 古代 DNA; 硅胶吸附; PCR; 限制性酶切; 随机引物预扩增法

中图分类号: Q986 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8036(2003)01-0040-05

随着 DNA 测序等分子技术的不断完善, 以 DNA 序列的比对为基础的进化学研究逐步深入. 但是现代人类的序列分析只能间接的反映人类历史, 为了得到更为直接的证据, 人们需要从古代人的遗骸中获取信息. 早在 20 世纪的 80 年代, 人们便开始探索从古代生物遗体 and 遗迹中提取遗传物质——古 DNA, 并取得了成功. PCR 技术的出现和发展进一步推动了古 DNA 研究的迅速发展, 分子古生物学和分子考古学成为了当前研究的热点领域. 1985 年至今, 人们已先后对多种灭绝生物的古 DNA 进行了研究并对其序列进行了分析, 如班驴, 袋狼, 剑齿虎, 恐鸟, 猛犸象, 洞穴熊, 蓝羚羊, 大地獭, 欧洲野牛, 乳齿象, 新泽西野鸭, 尼安德特人等等. 古代人类的 DNA 研究也方兴未艾.

中国幅员辽阔, 具有数不尽的文化遗迹, 用现代分子生物学手段对这些文化遗迹的古代人骨样本进行研究, 对于阐明当时人群的遗传特点, 从而进一步了解古代人类的进化和迁徙具有重要的意义.

在本次研究中我们利用几十个古代人骨和牙齿样本进行了初步的分析. 这些样本分别来自长江三峡地区不同年代的遗址, 长江下游距今 4000 - 6000 年的良渚遗址, 新疆若干地区以及淮河上游距今 7800 - 9000 年的贾湖遗址.

1 古 DNA 样本采集和处理的规范

考古工作者采集古 DNA 研究样本的机会最多, 因此我们的研究样本多数是考古工作者提供的. 为了确保非分子生物学工作者也能采得最佳的研究样本, 必须在采集过程中注意一定的规范.

(1) 采集部位 古代 DNA 的研究资源很丰富: “软组织”、“硬组织”和化石. 只有在特殊和罕见的情况下才会有较好保存下来的软组织, 在一般的考古发掘中所能得到的大多为硬组织, 如骨头、牙齿等. 由于古代尸体的保存状态各异, 不同样品中的 DNA 保存状态也各不相同, 采集时应选取保存完整, 没有裂缝和磨损的样品. 骨骼样品应选择股骨和肱骨中段骨致密部分, 而蜂窝状区域的价值不大. 由于牙齿本质有牙釉质的保护, 相对而言其保存状态较好. 我们的实验中选用了较为白净、体积较大、没有缺损的牙齿作为样品.

(2) 采集步骤 现代 DNA 污染对古 DNA 研究影响最大, 因此在采集样品时要使用一次性无污染的手套和面罩, 取样时使用一次性无污染器具, 如医用类骨科、牙科器具. 样品应保存在无污染的带盖的管

收稿日期: 2002-11-01

作者简介: 张帆(1978 -), 男(汉族), 河南郑州市人, 复旦大学生命科学学院现代人类学研究中心博士研究生.

瓶或样品袋中. 对比较松散的样品可随周围土壤一同采集, 但需做干燥处理.

(3) 保存和运输 样品的保存和运输应尽量在低温、干燥的条件下进行, 并在样品包装袋中加入抗氧化剂, 如有条件可以进行真空处理. 常见的保存温度为 -20°C (1 年) 或 -80°C (长期保存). 尽量避免使用可对 DNA 造成氧化和降解的试剂, 如福尔马林等.

(4) 注意要点 防止污染的方法: 玻璃和塑料器具可用 1% 的盐酸浸泡, 用无菌水洗涤, 紫外线照射 30 分钟以上. 金属器具用 70% 的乙醇清洗并灼烧, 紫外线照射 30 分钟以上. 试剂也需灭菌并经紫外线照射.

相关人员在样品采集和整个实验过程中应穿戴全套实验服, 避免身体有裸露在外的部分.

(5) 样品的预处理 用无水乙醇清洗样品并烘干, 用手术刀等器具刮去样品表面 5 毫米, 再经紫外线照射 30 分钟以上. 处理后的样品用骨科工具破碎成合适的小块, 通过磨具磨成粉末. 我们在实验中采用液氮冷冻研磨机 (SPEX CertiPrep 6750 Freezer/Mill) 粉碎样品, 可以得到极细的颗粒. 过程中防止污染的方法同上.

2 实验技术的探索研究

古代样本中 DNA 的含量很低, 并且不同的样本保存环境也会引起 DNA 含量的差别, 我们利用几种不同的 DNA 抽提方法对这些样本的古代 DNA 进行了尝试性的提取, 并随后进行了 PCR 扩增反应, 对结果进行比较.

实验中对硅胶吸附法和传统的酚-氯仿法进行了比较, 采用良渚和大溪的三例保存良好的牙齿样品. 硅胶吸附法是 Boom 等^[1] 根据在高浓度 GuSCN 条件下核酸能与硅藻或硅颗粒结合并在较高温度下被洗脱释出的特性, 建立起一种简便、快速、可靠的 DNA 分离纯化方法. 传统的酚-氯仿法^[2] 是使用酚-氯仿除去样品中的蛋白质, 回收水相, 用乙醇沉淀得到 DNA.

我们对以上两种方法得到的抽提液进行了线粒体第五非编码区的 9bp 缺失序列位点^[3] 的 PCR 扩增反应, PCR 扩增的产物为 120bp 的 DNA 片段. 通过 3% 的琼脂糖凝胶电泳, 扩增结果的胶图像如图 1 所示. 电泳图像下方淡淡的条带为引物二聚体, 是由于用做模板的 DNA 浓度太小而产生的; 上方的条带就是由长度为 120bp 的扩增产物形成的. 可以看出经硅胶法得到的提取液可以扩增出可见的条带, 而传统的酚氯仿法则不行. 通过比较, 初步认为基于硅胶吸附原理的 DNA 提取方法对于后期的 PCR 反应效率要高于传统的酚-氯仿的方法.



图 1 不同提取方法的 mtDNA 位点扩增比较
(1. 2. 3. 为硅胶吸附法的 9bp 扩增条带; 4. 5. 6 为酚-氯仿法的 9bp 扩增条带;
7 为现代人样本对照结果; 8 为空白对照结果)

我们还对硅胶吸附法进行了进一步的改进:增加样品裂解液中 EDTA 的浓度,改变 SDS 的浓度,增加蛋白酶 K 的浓度和作用时间;改变不同试剂的 pH 值;提高样品孵育温度和时间;采取 QIAquick Mini Columns 进行提纯,除去杂质,以期获得更高的效率。

同时利用 PCR 扩增反应和限制性酶切技术相结合的基因分型工作也在进行当中。限制性酶切技术相结合的基因分型是以限制性酶具有专一的酶切位点为基础,通过不同 DNA 序列在同种限制性酶作用下可以得到大小不同的片段来进行基因分型。我们对扩增后的产物进行了特异的限制性酶切,电泳结果如图 2 所示:长度为 122bp 的扩增产物,通过酶切之后长度减少为 100bp,由此就可以确定样品的不同的基因型。

通过实验结果的积累在今后的工作中还可以进一步验证样本年代、保存状况和南北方的气候、地质等自然条件差异对古代 DNA 的影响。就目前结果来看由于中国西北方干旱少雨,纬度较高,温度较低,样品保存情况较好,样品中 DNA 保存情况较好,如新疆地区样品,而南方的 DNA 保存情况较差,如部分良渚文化样品,但不排除一些高盐及特殊地质构造产生有利于古 DNA 的保存条件。



图 2 古代 DNA 样品的分型结果

(0、11 为 marker;1 为空白对照;2、3、4、7、8、9、10 为未被酶切样品扩增产物;5、6 为被酶切样品扩增产物)

为了提高 PCR 扩增的效率,我们除了在已有的反应条件上测试适合古代 DNA 的退火温度和提高引物设计的特异性以外,同时还尝试了利用随机寡核苷酸引物法进行全基因组的扩增,以期获得更高的模板量。利用随机引物可以在整个基因组范围内(包括核染色体 DNA 和线粒体 DNA)进行扩增,使得整个基因组 80%左右序列的拷贝数增加几十倍,以这一产物为模板进行进一步特定位点的扩增,扩增的效率会大大提高。图 3 为利用现代人基因组 DNA 进行初步的全基因组的随机引物预扩增实验,用于 PCR 的模板 DNA 被稀释成不同浓度进行扩增反应,为了模拟古代 DNA 的损伤较多的特点,又用紫外线照射进行不同的时间长度的 DNA 损伤处理,在模板 DNA 浓度为 0.02ng/ μ l,照射时间为 24 小时的水平上,依旧可以从电泳图上见到由长度不一的全基因组扩增条带组成的亮区,提示了在较低 DNA 模板浓度和较差 DNA 模板状态下进行全基因组随机引物预扩增的可能性,通过进一步的测序工作还可以验证这一方法是否可以维持初始 DNA 的原貌,为进行古代 DNA 的全基因组的随机引物预扩增提供可行性证据。

由于古代 DNA 存在片段小、损伤大的特点,和 PCR 反应中可能出现的跳跃 PCR (Jumping PCR)^[4] 的现象,用随机寡核苷酸引物的方法进行古代 DNA 的全基因组随机引物预扩增的可能性和可重复性的实验还在进行当中。

3 实验结果的验证

对于古代 DNA 来说,首要的问题是确保研究的可靠性,需要从多个角度加以验证。首先,应保证所有的空白对照结果都为阴性,所有的实验结果都应具有可重现性;其次,由于古 DNA 的 PCR 产物片段大

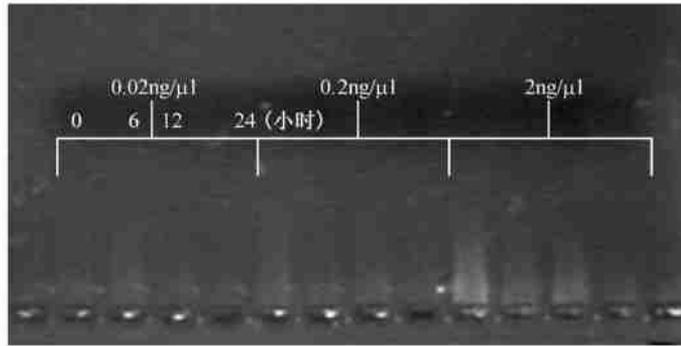


图 3 不同浓度模板全基因组扩增结果

小与扩增效率成强烈的负相关性,扩增得到的片段大小一般为 100 - 150bp,如果 PCR 产物较长,如大于 300bp,同时产量又很大,则可能有现代 DNA 的污染,应对进行重复实验,对实验结果进行进一步检测;再者,所得到的古 DNA 序列都应具有系统发生学上的意义,实验者应该能够对所得到的古 DNA 序列类型进行系统发生学分析,任何来源于 100,000 年以内的样品的 DNA 序列都应该能够归入现代人的系统发生树,如有不符者应对其真实性进行考证 (Cooper et al., 1992);如果有条件,最好能够在另一实验室,对同一样品独立进行相同的分析,以对实验结果进行进一步验证. 本实验室古代样本的性别检测以及扩增产物的测序工作现在正在进行当中,各种结果还需要进一步经不同实验室重复性实验加以验证.

4 可以解决的问题和现阶段进展

近年来,有关古 DNA 的研究报道日益增多,古 DNA 的资料被广泛应用于古人类学、古病理学、分子生物系统学等研究领域,古 DNA 开辟了一个全新的研究视角. 它从分子角度获取有关人类进化、迁移和亲缘关系研究的信息,尤其通过对人体 DNA 中两个特殊部分,mtDNA 和 Y 染色体 DNA 的分型研究,从母系和父系两条线索的综合分析中提取较完整的遗传信息.

由于 mtDNA 比核 DNA 拥有更多的拷贝数,对 mtDNA 的检测比核 DNA 具有更高的灵敏度,这使其更适用于古 DNA 的研究. mtDNA 具有若干与核 DNA 不同之处,使其在进化研究上具有特殊的意义: mtDNA 存在着个体之间的差异,大多数变异主要集中于 mtDNA 非编码区 D-环的两个高变片段; mtDNA 存在着种族群体特征,mtDNA 所具有的母系单倍体遗传特点使其有效群体大小仅为核 DNA 的四分之一,在随机遗传漂变的作用下,产生了较高的地区性群体差异,而 mtDNA 序列的高速演化特点加速了这种群体间的差异. 因此,古代 mtDNA 的分析对人类的起源和进化的研究有着重要的意义. 例如尼安德特人遗骸中线粒体 DNA 的分析为人类起源与进化这一重大的生命科学命题研究中的“非洲起源说”提供了有力的直接证据,因而被 Science 评为 1997 年“十大科学成就”之一^[5].

我国的古代线粒体 DNA 研究才刚刚起步,总体上来说应当利用丰富的中国古代人群线粒体资源,以构建中国线粒体 DNA 序列数据库为主要研究方向,在现代人群线粒体数据库的框架背景下,通过序列分析解决各种历史和进化问题.

由于 Y 染色体的突变率相对较低,可以通过较少的 Y 染色体遗传标记得到较多的信息,对研究较久远的人类进化事件和人群迁移比之线粒体更具优势. 而目前,众多的 Y 染色体分析集中于现代人的样本研究,通过数据库的建立来推测远古的人类事件,这只是一种横向的地域性的比较. 如果将古 DNA 中 Y 染色体信息与现代人的研究结果进行纵向比较,综合分析,构建人群变迁时空框架,将加速人们对人类历史的了解. 不过由于古代样品中 Y 染色体含量较少,研究起来比较困难. 令人欣慰的是我中心通

过考古学和遗传学相结合的方法对江浙和三峡地区古代样品的 Y 染色体研究已经取得了部分的进展^[6-7]。相信在不久的将来古代 Y 染色体信息会被广泛应用。

我国有着丰富的历史资源和遗传资源。通过古代 DNA 研究对不同古代文化群体之间以及同一群体不同时代之间遗传差异进行分析,建立古代遗传信息库,对于加强考古学、人类学、民族学和遗传学等相关学科的合作和交流,解决历史疑难问题有着重要的意义。

本实验中的部分样品由复旦文博系、上海市自然博物馆以及张居中教授提供,特此对他们的鼎力支持和帮助表示衷心感谢!

参考文献:

- [1] BOOM R, SOL C J A, SALIMANS M M M, et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1990, 28: 495 - 503.
- [2] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. 金冬雁,黎孟枫等译. 分子克隆试验指南(第二版) [M]. 北京:科学出版社,1999.
- [3] CANN R L, WILSON A C. Length mutations in human mitochondrial DNA[J]. Genetics, 1983, 104:699 - 711.
- [4] PÄÄBO S, IRWIN D M, WILSON A C. DNA damages promote jumping between template during enzymatic amplification[J]. Biol Chem, 1990, 265:4718 - 4721.
- [5] KRINGS M, STONE A, SCHMITZ R W, et al. Neandertal DNA sequences and the origin of modern human[J]. Cell, 1997, 90: 19 - 30.
- [6] 李辉. 墓葬人骨的遗传基因研究[A]. 宋建. 马桥[C]. 上海:上海书画出版社, 2002.
- [7] 黄颖,李辉,文波,等. 遗传基因技术与三峡考古研究[J]. 东南文化, 2002, 155(3):55 ~ 63.

DNA Analysis of Ancient Specimens: Cautions and Lessons

ZHANG Fan¹, LI Hui¹, HUANG Ying^{1,2}, TAN Jing-ze¹, ZHANG Li-ping¹,
XU zhi¹, JIN Jiang-zhong¹, LU Da-ru¹, JIN Li¹

(1. Center for Anthropological Studies, School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China;

2. Department of Museum, School of the Humanities, Fudan University, Shanghai 200433, China)

Abstract: DNA analysis on ancient specimens collected from several archaeological sites in China has conducted in our laboratory. In particular, efforts have been made to compare different methods for DNA extraction and whole genome amplification. In this note, we present our suggestion and prospects on collecting and analyzing ancient DNA.

Keywords: ancient DNA; silicon based; PCR; restriction enzyme cleave; primer extension preamplification