



ISSN 1005-8036  
CN 11-3499/N

# 中央民族大学学报

JOURNAL OF THE CENTRAL UNIVERSITY FOR NATIONALITIES

(自然科学版)

- 高寒草甸地区陆面过程耦合模式与辐射研究
- 两种藏药雪莲花的元素测定
- 恩施悬棺人骨mtDNA初步分析
- 通过直接寻找路路分解的方法求图的自同构群及其Maple实现

2

ZHONGYANG MINZU DAXUE XUEBAO

2005 VOL. 14 NO. 2

**Title on the Cover:**

Xu Zhi, Zhang Fan, **Li Hui**, Wang Xiaoning, Jin Jianzhong, Jin Li (2005) Primary Research on mtDNA from Enshi Cliff Coffin. *Journal of the Central University for Nationalities* 14(2):124-129.

# 恩施悬棺人骨 mtDNA 初步分析

徐智<sup>1</sup>, 张帆<sup>1</sup>, 李辉<sup>1</sup>, 王晓宁<sup>2</sup>, 金建中<sup>1</sup>, 金力<sup>1</sup>

(1. 复旦大学生命科学学院现代人类学研究中心, 上海 200433;

2. 湖北省恩施土家族苗族自治州博物馆, 湖北 恩施 445000)

**摘要:** 本文以恩施宋代悬棺的骨骼或牙齿样品为对象, 经过一系列的处理, 获得并扩增了 mtDNA 的 HVSI 区的部分序列, 通过几个实验初步认定是古 DNA。同时通过与部分现代人 mtDNA 数据的比较参照, 对所研究样品单倍群归属进行了初步确定, 发现他们主要属于南方类型, 但也可能有北方成分。

**关键词:** 线粒体 DNA(mtDNA); 高变区 I(HVSI); 悬棺; 古 DNA; 聚合酶链式反应(PCR); 测序; 单倍群

**中图分类号:** Q986 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8036(2005)02-0124-06

## 1 引言

在进化的研究领域中, 人类自身的进化远比其他物种的进化更吸引人们。“Trapping the past”一直是分子进化学家和分子人类学家所努力想描述的, 也是古人类学家每天在做的事情。随着 DNA 测序等分子技术的不断完善, 以 DNA 序列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地反映人类历史, 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, 主要就是遗传物质——古 DNA (ancient DNA, aDNA)。1980 年, 中国湖南医学院发表的, 从马王堆汉代古墓女古尸的肋骨软骨中获取古 DNA, 被认为是首次提取的古 DNA<sup>[1]</sup>; 随后, 两项重要的发现使研究古 DNA 成为可能并取得了成功: 1983 年, Mullis 发明的聚合酶链式反应<sup>[2]</sup> (polymerase chain reaction), 即 PCR, 为研究古 DNA 提供了一个很有效的手段; 1986 年 Pääbo 发现古代生物遗骸中存在核酸, 并且能被重新获得, 用以研究<sup>[3]</sup>, 更为古 DNA 研究开辟了广阔的前景。

古 DNA 序列, 不仅能提供现代 DNA 序列所不能提供的信息, 而且可作为合适的外类群用以鉴别和确定祖先特征, 增加谱系的精度, 故古 DNA 序列在分子生物系统研究中可弥补单独应用现代 DNA 序列的不足。目前, 在人类起源、种群迁移、疾病遗传和传播、埋葬习俗、作物和动物的家庭驯养的速度和路径等诸多领域中, 古 DNA 研究都在发挥其独特的作用。用现代分子生物学手段对这些文化遗迹的古代人样本进行研究, 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。

目前, 很多古 DNA 的研究以 mtDNA 为对象。mtDNA 比核 DNA 拥有更多的拷贝数 (每个细胞有 100 ~ 1000 线粒体拷贝), 因此对 mtDNA 的检测比核 DNA 具有更高的灵敏度, 这使 mtDNA 更适用于古 DNA 的研究。此外, mtDNA 具有若干与核 DNA 不同特征, 使其在进化研究上具有特殊的意义: (1) mtDNA 很少会发生重组<sup>[4]</sup>; (2) 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 HVSI、HVSII; (3) mtDNA 存在着种族群体特征, 所具有的母系单倍体遗传特点<sup>[5]</sup>, 能完整地记录母系遗传史; (4) 有效群体大小 (Effective Population Size) 仅为核 DNA 的四分之一, 突变率在核 DNA 的 10 倍以上 (常染色体及 Y 染色体  $1.9 \times 10^{-9} \sim 5.4 \times 10^{-9}$  /位点/年, mtDNA  $3.5 \times 10^{-8}$  /位点/年), 这两个特

收稿日期: 2004-12-29

作者简介: 徐智 (1980 - ), 男 (汉族), 浙江宁波人, 复旦大学现代人类学研究中心人类生物学博士研究生。

点,一方面使 mtDNA 能在较短时间内积累比较多的突变;另一方面,在随机遗传漂变的作用下,产生了高度的地区性群体差异,提高了 mtDNA 在进化研究中的信息量和分辨率。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 1987 年, Cann 等人在 Nature 上发表的文章对来自世界各地的 147 例个体的 mtDNA 进行高分辨率 RFLP 分析,提出了人类起源与进化这一重大的生命科学命题研究中著名的“非洲夏娃”学说<sup>[6]</sup>;1997 年,对尼安德特人遗骸中线粒体 DNA 的分析,则为这个学说提供了有力的直接证据<sup>[7]</sup>,因而被 Science 评为 1997 年“十大科学成就”之一。

悬棺葬是我国古代一种葬俗,主要分布在长江流域和南部十几个省区,上下延续几千年,一直被视为“千古之谜”。本文所研究的悬棺位于湖北恩施箱子岩,在七里区茅坝乡与三岔区交界的寨沟自然山洞中,其洞距地高约百米。《恩施县志》载:“寨沟在城东四十八里,上有古洞,高数十丈。里人缚木为架数层,探攀而上。入见桑木桶四,铁斗四周,内藏骷髅,具有茶米。邑令任往验,封其洞。葬具有木槽式、木匣式、小屋式和船棺式。根据葬具形制判断,该处崖葬属宋代,距今约 1000 年<sup>[8]</sup>。”

## 2 材料与方法

### 2.1 研究对象

由湖北省恩施土家族苗族自治州博物馆提供的恩施箱子岩悬棺 2 个男性骨骼、3 个男性完整牙齿、1 个女性骨骼、4 个女性完整牙齿以及 2 个性别不明的完整牙齿,共 12 个样品。原骨骼存于恩施州三岔区文化站。

### 2.2 材料

(1) 引物 L16016 ~ H16403

L16016: 5'-ATTCTCTGTCTTTCATGGG-3'

H16403: 5'-ATTGATTTCACGGAGGATGG-3'

(2) 试剂及配方 Extracting Buffer [10mM Tris-HCl, 0.5M EDTA, 10mg/ml DTT, 0.5mg/ml 蛋白酶 K, 0.2% SDS (pH 7.0 ~ 7.5)], Lysis Buffer [8M GuSCN, 20mM EDTA, 10mM Tris-HCl (pH 6.5), 40g/l Triton X-100], Washing Buffer [6M GuSCN, 10 mM Tris-HCl (pH 6.5)], 70% 乙醇, 丙酮, 无菌水 (Milli Q 级), 硅胶, 琼脂糖, 0.5 × TBE [45mmol/L Tris 碱, 45mmol/L 硼酸, 1mmol/L EDTA], PCR 产物电泳上样缓冲液 [0.25% (w/v) 溴酚蓝, 30% (v/v) 甘油, 70% (v/v) ddH<sub>2</sub>O], DL2000, DNA 100, PCR 体系 (Takara) (dNTP 2mM, 引物 10mM, 酶 5 U/μl, 10 × PCR buffer, MgCl<sub>2</sub> 25mM), Microcon YM30 filter (Millipore), Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen)。

(3) 主要仪器 PCR2700 (Applied Biosystems); DGW-99 型台式高速离心机; SCR-300 电泳仪; FR-200 紫外与可见分析装置 (上海复日科技); SPEX CertiPrep 6750 Freezer/Mill; Centrifuge 5415 D 离心机 (Eppendorf); ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)。

### 2.3 方法

(1) 用无水乙醇清洗样品,用手术刀等器具刮去样品表面 2 ~ 5 mm,再经紫外线照射 30min 以上。处理后的样品用液氮冷冻研磨机 (SPEX CertiPrep 6750 Freezer/Mill) 粉碎样品,得到极细的颗粒。

(2) DNA 提取主要有酚-氯仿法和硅胶吸附法。传统的酚-氯仿法是使用酚-氯仿除去样品中的蛋白质,回收水相,用乙醇沉淀得到 DNA;硅胶吸附法是 Boom 等<sup>[9]</sup>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。张帆等<sup>[10]</sup>对两者的比较实验初步证明: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-氯仿法。

本次实验参照 Yang 等提出的方法<sup>[11]</sup>并进行了改进:取 1.5g 样品粉末,加入 3.5ml 裂解液,56℃ 摇床 16h; 8000rpm 离心 5min; 取上清,加 2 倍体积 Lysis Buffer,摇匀;加入 80ul 硅胶,室温静置 1hr; 12000rpm

离心 2min;弃上清,沉淀加 600ul Washing Buffer,重悬浮;12000rpm 离心 2min;弃上清,沉淀加 600ul 70% 乙醇,重悬浮;12000rpm 离心 2min;重复用乙醇洗涤一次;弃上清,沉淀加 600ul 丙酮,重悬浮;12000rpm 离心 2min;弃上清,沉淀 65OC 烘干;沉淀加 400ul Elution Buffer,65OC 溶解 1hr;12000rpm 离心;取上清,得到的 DNA 液用 Microcon YM30 filter (Millipore) 浓缩,然后用 Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen) 纯化。

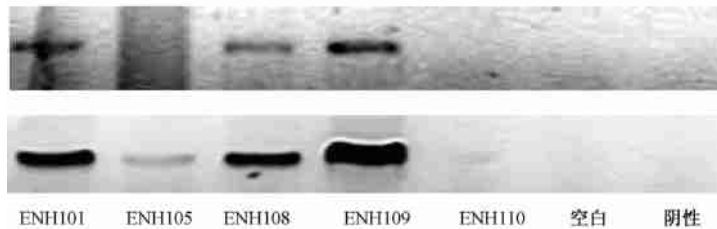
(3) DNA 聚合酶链式反应(PCR) 本论文在实验过程中,先对线粒体高变区 I(HVSI)进行扩增,然后以第一次扩增产物为模板,进行第二次扩增.引物见 2.2.

表 1 两次 PCR 反应体系  
Tab.1 Prescription of two PCRs

试剂	Ex Taq Buffer	dNTPs	MgCl <sub>2</sub>	primer	Ex Taq polymerase	template	ddH <sub>2</sub> O	Total
浓度	10 ×	2mM	25mM	10uM	5U/ul	5 ~ 20ng/ul	MilliQ	-
第一次反应体积 (ul)	2.5	2.5	1.6	1	0.2	4	13.2	25
第二次反应体积 (ul)	5	5	2	1	0.4	4	32.1	50

循环条件:94 ×3min (94 ×30sec 55 ×50sec 72 ×50sec) ×40cycles 72 ×5min

#### (4) 琼脂糖凝胶电泳检测



ENH101 ENH105 ENH108 ENH109 ENH110 空白 阴性

图 1 部分恩施悬棺样品 2% 凝胶电泳

Fig.1 2% Electrophoretic photo of several Enshi Cliff Coffin samples

上下两排分别为第一次和第二次 PCR 扩增产物的凝胶电泳图.空白为抽提的对照,阴性为 PCR 对照.通过空白和阴性对照来检测抽提和 PCR 过程有没有引入污染,图中显示两步扩增过程对照均未出现阳性结果.

#### (5) 测序

### 2.4 数据处理和分析

得到的序列用 Bioedit 软件做对比分析,然后用 Network 软件作网络结构图.

## 3 结 果

### 3.1 序列

共计 5 个样品成功测序.相关序列如下:

以上为 5 个样品的线粒体 DNA HVSI 16036 ~ 16383 区段的序列.带框的表示与 rCRS(修正剑桥序列)<sup>[12]</sup>对比有差异的位点.“-”代表碱基缺失,一部分是因为测序的漏读,一部分是因为前半区段的 DNA 很难扩增或本身样品中已经降解,如 ENH338 和 ENH105 只得到了 HVSI 后半段的序列结果.

### 3.2 单倍群

根据测序都到的高变 1 区突变格局,初步判定这几个样品所属的线粒体单倍群.

rCRS:	16036	GAAGCAGATT	TGGGTACCAC	CCAAGTATTG	ACTCACCCAT	CAACAACCGC	TATGTATTTC
ENH108:		GAAGCAGATT	TGGGTACCAC	CCAAGTATTG	ACTCACCCAT	CAACAACCGC	TATGTATTTC
ENH212:		-----	-GGGTACCAC	CCAAGTATTG	ACTCACCCAT	CAACAACCGC	TATGTATTTC
ENH301:		GAAGCAGATT	TGGGTACCAC	CCAAGTATTG	ACTCACCCAT	CAACAACCGC	TATGTATTTC
ENH338:		-----	-----	-----	-----	-----	-----
ENH105:		-----	-----	-----	-----	-----	-----
	16096	GTACATTACT	GCCAGCCACC	ATGAATATTG	TACGGTACCA	TAAATACTTG	ACCACCTGTA
		GTACATTACT	GCCAGCCACC	ATGAATATTG	TACGGTACCA	TAAATACTTG	ACCACCTGTA
		GTACATTACT	GCCAGCCACC	ATGAATATTG	TACGGTACCA	TAAATACTTG	ACCACCTGTA
		GTACATTACT	GCCAGCCACC	ATGAATATTG	□ACGGTACCA	TAAATACTTG	ACCACCTGTA
		-----	-----	-----	-----	-----	-----
	16156	GTACATAAAA	ACCCAATCCA	CATCAAAAAC	CCCCTCCCCT	GTTTACAAGC	AAGTACAGCA
		GTACATAAAA	ACCCAATCCA	CATCAAAAAC	CCCTCCCCT	GTTTACAAGC	AAGTACAGCA
		GTACATAAAA	ACCCAATCCA	CATCAAAAAC	CCCTCCCCT	GTTTACAAGC	AAGTACAGCA
		GTACATAAAA	ACCCAATCCA	CATCAAAAAC	CCCTCCCCT	GTTTACAAGC	AAGTACAGCA
		-----	-----	-----	-----	-----	-----
	16216	ATCAACCCCTC	AACTATCACA	CATCAACTGC	AACTCCAAG	CCACCCCTCA	CCCCTAGGA
		ATCAACCCCTC	AACTATCACA	CATCAACTGC	AACTCCAAG	CCACCCCTCA	CCCA□TAGGA
		ATCAACCC□TC	AACTATCACA	CATCAACTGC	AACTCCAAG	CCACCCCTCA	CCCCTAGGA
		ATCAACCC□TC	AACTATCACA	CATCAACTGC	AACTCCAAG	CCACCCCTCA	CCCCTAGGA
		---AACCCCT-	AACTATCACA	CATCAACTGC	AACTCCAAG	CCACCCCTCA	□CCCCTAGGA
		--CAACCC□TC	AACTATCACA	CATCAACTGC	AACTCCAAG	CCACCCCTCA	CCCCTAGGA
	16276	TACCAACAAA	CCTACCCACC	CTTAACAGTA	CATAGTACAT	AAAGCCATTT	ACCGTACATA
		TACCAACAAA	CCTACCCACC	CTTAACAGTA	CATAGTACAT	AAAGCCATTT	ACCGTACATA
		TACCAACAAA	CCTACCCACC	CT□AACAGTA	CATAGTACAT	AAAGCCATTT	ACCGTACATA
		TACCAACAAA	CCTACCCACC	CT□AACAGTA	CATAGTACAT	AAAGCCATTT	A□CGTACATA
		T□CAACAAA	CCTACCCACC	CTTAACAGTA	CATAGTACAT	AAAGCCATTT	ACCGTACATA
		TACCAACAAA	CCTACCCACC	CTTAACAGTA	CATAGTACAT	AAAGCCATTT	ACCGTACATA
	16336	GCACATTACA	GTCAAATCCC	TTCTCGTCCC	CATGGATGAC	CCCCCTCA	
		GCACATTACA	GTCAAATCCC	TTCTCGTCCC	CATGGATGAC	CCCCCTCA	
		GCACATTACA	GTCAAATCCC	TTCTCGTCCC	CATGGATGAC	CCCCCTCA	
		GCACATTACA	GTCAAATCCC	TTCTCGTCCC	CATGGATGAC	CCCCCTCA	
		GCACATTACA	GTCAAATCCC	TTCTCGTCCC	CATGGATGAC	CCCCCTCA	

表 2 恩施悬棺样品所属的单倍群

Tab. 2 Haplogroups of Enshi Cliff Coffin samples

样品编号	Haplogroup	HVSI Motif (+ 16000)	距今年代(年)
ENH301	C	126 223 298 327	1000
ENH338	G/D	NA 266A 278	1000
ENH105	M *	NA 223	1000
ENH212	M8 *	223 298	1000
ENH108	未知	270	1000

通过与 rCRS 序列比较得到 HVSI Motif, 然后与已有单倍群归属的现代人线粒体 DNA 的 HVSI Motif (未发表) 进行比较, 可以得出该样品的单倍群归属. “NA”代表信息未知. G/D 代表单倍群可能属于 G 或 D, 具体分类还要经过进一步分析, 或 RFLP 或收集更多的多态信息. ENH108 由于突变位点信息太少, 难以确定其单倍群归属.

### 3.3 网络结构图

用 NETWORK 软件制作的 C 单倍群网络结构图如图 2, 采用 Median-joining 算法; 所用的样品为 ENH301 以及部分 C 单倍群现代人; Out 代表外类群, 其他字母代表样品所属的民族或者来源地, 线上的数字代表线粒体 HVSI 的突变位点. YN-云南; GD-广东; WH 武汉.

## 4 讨 论

### 4.1 古代 DNA 的质量控制

外源 DNA 的污染是研究人类遗骸的工作者比较关心的事情<sup>[13-14]</sup>,是不容低估的。在古代 DNA 分析结果发表之前,需要一些标准<sup>[13,15]</sup>来验证。尽管不是所有标准都被实现,但是我们可以认为本次研究的结果来自外源污染的可能性不大,主要原因如下:(1)重复实验(包括抽提 DNA、PCR、测序)都得到相同的结果;(2)在整个实验过程中,无论是抽提,还是 PCR,都有对照,只有抽提空白和 PCR 阴性都无扩增产物时,才可以初步认为得到的 PCR 扩增产物不是污染;(3)扩增产物测序后,将序列结果与实验者的序列进行对比,如存在较多差异,并且几个样品之间也不一致,那么就可以排除实验者和实验仪器、试剂的污染,也没有交叉污染,或者说,污染极少,小于实验所能检测的最低浓度。

#### 4.2 对恩施宋代悬棺的族属分析

ENH108 的 HVSI 只有 16270 一个位点的

突变,与 CRS 很相似,但不能确认该样品来源于欧洲,理由如下:(1)东亚人群中含有 16270 突变的样品很多,其单倍群的归属也是多种多样;(2)可能存在回复突变,掩盖了部分突变位点;(3)古代 DNA 必然存在序列的损伤,有存在序列错误的可能。然而,也不排除 ENH108 来源于西北的可能性。姚永刚等<sup>[16]</sup>认为对同一个样品同时进行控制区和编码区的序列分析,比仅仅依据 HVSI 的序列信息进行 mtDNA 单倍群归属的划分更可靠,所以,ENH108 的单倍群归属,需要获取更多信息。中国历史发展到了宋代,从西北地区不断有高加索的成分进入中原,融入中华民族的大家庭,这些成分也很有可能飘落到中南部的少数民族中,我们在悬棺的材料中找到类似高加索成分的序列也是有可能的,但是这不代表悬棺民族的原初成分。

ENH338 和 ENH105 只有后半部分序列,得到的信息虽不够充分,但可以大致看出样品的单倍群归属。参照姚永刚等分析的线粒体单倍群在汉族人群中分布的频率<sup>[17]</sup>,M\* 主要出现在广东,频率达到 23.3%,但这一类型比较原始,不排除 ENH105 与广东人有共同的祖先。C、G、D 和 M8\* 在全国各地都有分布。而通过 C 型网络结构图,可以看到最原始的类型在苗族中,土家族和壮族也是较为原始的,所以这一系列的起源最有可能在湖广一代。ENH301 与维吾尔族样品的 HVSI 区突变一致,和朝鲜族样品处于同一支系上,并且与广东汉族、傣族、武汉汉族、壮族和土家族距离比较远,所以可以怀疑 ENH301 的母亲处于 C 型向北方发展的起点上,北方的 C 型个体最可能来源于此。

恩施位于湖北西部,与四川相邻,从地理位置上看,可能是民族混居或者少数民族聚居的地方。王晓宁的研究表明<sup>[8]</sup>,鄂西悬棺葬之族是巴人及其后代土家人。我们的结果表明,这些恩施悬棺个体的母系遗传特征以南方类型为主,又具有一定北方成分,这可能同历史上一些由北向南的人口事件有关,提示这些湖北少数民族在当时或更早的时间里同北方民族之间存在着一定的联系或基因交流。这一假设有待于进一步扩大样本,获取更多的遗传信息,以确定最后结果。

本次研究的恩施悬棺样品只有 1000 年左右的时间,属于宋代,相比其他 3000 年左右,诸如四川宜昌樊人、江西龙虎山等地的悬棺,年代就晚多了,而且 3000 年前,悬棺葬就已经在中国各地普遍存在了。所以,要真正认识悬棺葬,有必要选择年代更久远的、更有代表性的样品。

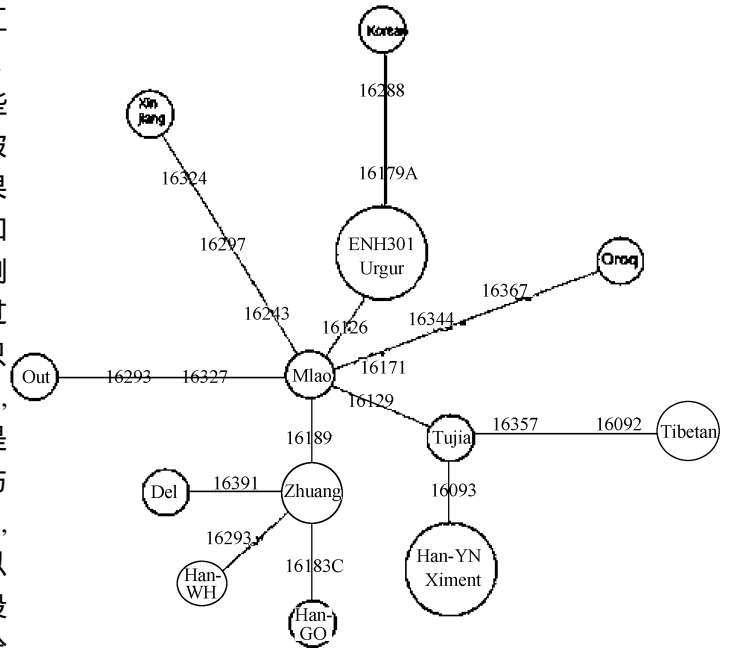


图 2 C 单倍群的网络结构图

Fig. 2 Network of C Haplogroup

## 参考文献:

- [ 1 ] HUNAN MEDICAL COLLEGE. Study of an ancient cadaver in Mawangtui tomb No. 1 of the Han Dynasty in Changsha[M] . New York : Ancient Memorial Press , 1981. 184 - 187.
- [ 2 ] MULLIS K B , F A FALOONA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction[J] . Methods Enzymol. , 1987 , 155 : 335 - 350.
- [ 3 ] PÄÄBO S. Molecular genetic investigations of ancient human remains[J] . Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. , 1986 , 51 : 441 - 446.
- [ 4 ] OLIVO P D , M J VAN DE WALLE , P. J. LAIPIS , W. W. HOUSEWIRTH. Nucleotide sequence evidence for rapid genotypic shifts in the bovine mitochondrial DNA D-loop[J] . Nature , 1983 , 306 : 400 - 402.
- [ 5 ] GILES R E , H BLANC , H M CANN , D C WALLACE. Nuclear DNA sequences from late Pleistocene megafauna[J] . Mol. Biol. Evol. , 1999 , 16 : 1466 - 73.
- [ 6 ] CANN R L , STONEKING M , WILSON A C. Mitochondrial DNA and human evolution[J] . Nature , 1987 , 323 : 31 - 36.
- [ 7 ] KRINGS M , A. STONE , R W SCHMITZ , H KRAINITZKI , M STONEKING , S PÄÄBO. Neandertal DNA sequences and the origin of modern humans[J] . Cell , 1997 , 90 : 19 - 30.
- [ 8 ] 王晓宁. 鄂西的悬棺葬[J] . 湖北民族学院学报(社会科学版) , 1998 , 16(2) : 47 - 53.
- [ 9 ] BOOM R , SOL C J A , SALIMANS M M M , JANSEN C L , WERTHEIN VAN DILLEN P M E , VAN DERNOORDAA J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids [J] . Journal of Clinical Microbiology , 1990 , 28 : 495 - 503.
- [ 10 ] 张帆,李辉,黄颖,谭婧泽,张丽苹,徐智,金建中,卢大儒,金力. 中国若干考古遗址古 DNA 样本的初步探索[J] . 中央民族大学学报(自然科学版) , 2003 , 12(1) : 40 - 44.
- [ 11 ] YANG D Y , ENGB , WAYE J S , DUDAR J C , SAUNDERS S R. Technical note : improved DNA extraction from ancient bones using silica-based spin columns[J] . Am. J. Phys. Anthropol , 1998 , 105 : 539 - 543.
- [ 12 ] ANDREWS R M , KUBACKA I , CHINNERY P F , LIGHTOWLERS R N , TURRNBULL D M , HOWELL N. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA[J] . Nat. Genet , 1999 , 23 : 147.
- [ 13 ] HANDT O , HOSS M , *et al.* Ancient DNA : methodological challenges[J] . Experientia , 1994 , 50 : 524 - 529.
- [ 14 ] KOLMAN C J , TUROSS N. Ancient DNA analysis of human populations[J] . Am J Phys Anthropol , 2000 , 111 : 5 - 23.
- [ 15 ] COOPER A , POINAR H N. Ancient DNA : do it right or not at all[J] . Science , 2000 , 289 : 1139.
- [ 16 ] 姚永刚,张亚平. 古老人群 mtDNA 研究中存在的问题和对策[J] . 科学通报 , 2003 , 6(48) : 632 - 636.
- [ 17 ] YONG GANG YAO , QING PENG KONG , HANS-JÜRGEN BANDELT , TOOMAS KIVISILD , YA-PING ZHANG. Phylogeographic Differentiation of Mitochondrial DNA in Han Chinese[J] . Am. J. Hum. Genet , 2002 , 70 : 635 - 651.

## Primary Research on mtDNA from Enshi Cliff Coffin

XU Zhi<sup>1</sup> , ZHANG Fan<sup>1</sup> , LI Hui<sup>1</sup> , WANG Xiao-ning<sup>2</sup> , JIN Jian-zhong<sup>1</sup> , JIN Li<sup>1</sup>

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

2. Museum of Enshi Tujia & Miao Autonomous Prefecture , Enshi 445000 , China)

**Abstract :** The materials in this article is skeleton or tooth samples from Enshi Cliff Coffin. After a series of treatments , a part of HVSI sequences on mtDNA came to hand and had been amplified. And a few experiments were used for ensuring that they were ancient DNAs. Then their elementary haplogroups were verified ,referring to part of modern human mtDNA data base. Most of the samples show they belong to south pattern while some North patterns are also found.

**Key words :** mitochondrion DNA (mtDNA) ; hypervariable sequence I (HVSI) ; Cliff Coffin ; ancient DNA ; polymerase chain reaction (PCR) ; sequencing ; haplogroup

[责任编辑:白玲]