



Three Revolutionary Changes in the Development of Ancient DNA Analysis Techniques

WANG Chuanchao, LI Hui

MOE Key Laboratory of Contemporary Anthropology, School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China

Abstract: Ancient DNA (aDNA) is the DNA recovered from *post mortem* archaeological or historical specimens. With the widespread adoption of molecular biological techniques over the past two decades, the study of aDNA has evolved from the retrieval of small fragments of mitochondrial DNA of extinct species to entire genome sequencing of Neanderthals. These techniques, including molecular cloning, polymerase chain reaction (PCR), next generation DNA sequencing techniques, primer extension capture (PEC), and array hybridization capture, have solved numerous cases that had been mysteries for thousands of years.

Keywords: Ancient DNA, Molecular cloning, Polymerase chain reaction (PCR), Next generation DNA sequencing techniques, Primer extension capture (PEC), Array hybridization capture (AHC).

古DNA分析技术发展的三次革命

王传超, 李辉

复旦大学现代人类学教育部重点实验室, 上海 200433

摘要: 古DNA研究以分子生物学技术为基础, 以古生物的DNA为研究对象, 是一个新兴领域。20余年来, 古DNA实验技术不断发展。分子克隆、PCR、下一代测序技术、引物延伸捕获和芯片杂交捕获等扩增和测序技术的不断涌现, 分别引领了古DNA研究的三次革命, 极大推动古DNA研究发展、成熟。从229bp斑驴的mtDNA到尼安德特人基因组草图, 古DNA研究取得一系列的突出成果, 解开了众多千万年来的谜题。

关键词: 古DNA; 分子克隆; 聚合酶链式反应(PCR); 下一代测序技术; 引物延伸捕获(PEC); 芯片杂交捕获(AHC)

古DNA(ancient DNA)是指从考古遗迹和古生物化石标本中获取的古生物的遗传物质[1]。古DNA研究是以分子生物学技术为基础发展起来的一个新兴领域, 通过古DNA研究能够分析古代生物的谱系、分子演化理论、人类的起源和迁移、动植物的家养和驯化过程等[2]。自上个世纪80年代开始古DNA研究以来, 研究者们一直在为探索古DNA实验技术和建立古DNA研究标准而努力[3]。近年来, 随着新的古DNA扩增和测序技术出现及不断成熟, 古DNA研究已逐渐成为一个用途广泛、极有发展前景的领域。

古DNA研究的第一次革命

早在1980年, 湖南医科大学就从马王堆汉墓的女尸中提取出了DNA和RNA, 这是世界上最早的古DNA研究[4]。古DNA研究的真正起步是利用了分子克隆这一技术, 即将提取出的古DNA构建入测序载体, 在宿主菌中增殖后进行测序(图1)。

1984年, Higuchi等[5]从保存约140年的斑驴(*Equus quagga quagga*, 已于1883年灭绝)的皮肤中得到了229bp的线粒体DNA (mitochondrial DNA, mtDNA)序列, 并通过与其近亲——马、驴、斑马的相关mtDNA序列进行比对, 得出斑驴与斑马的亲缘关系最近, 而与马或驴的较远。1985年, Pääbo等[6]对23具埃及木乃伊进行了分析, 从一具2400年前的木乃伊孩童上克隆得到3.4kb的DNA片段。分子克隆方法在以上两项目中的成功运用, 充分证明了古DNA研究的可行性和重要性, 开创了古DNA研究的先河。

但随着研究的不断深入, 分子克隆方法的缺陷也逐渐暴露: 分子克隆需要的古DNA量较大, 而多数古生物材料数量较少并与其他研究价值。且古生物样品中古DNA的含量极低, Handt等[7-9]的研究表明, 在保存状态较好的情况下, 每毫克古代样品中约含2,000个mtDNA分子, 比新鲜组织中的含量至少低六个数量级; 而保存状态一般的样品中的古

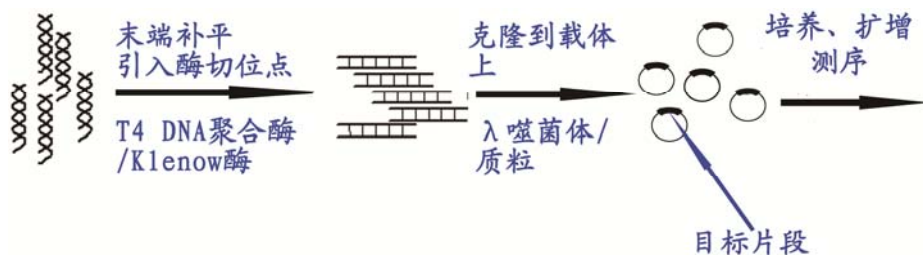


图1 古DNA的分子克隆 Fig.1. Molecular Cloning of Ancient DNA

DNA含量更低，仅为每毫克10-40个mtDNA分子。保存下的古DNA又由于漫长年代中水解作用、氧化作用及环境微生物降解作用等的存在而已被严重破坏[10]，其mtDNA片段长度短于400bp，核DNA片段则还不超过150bp[11]，残存的这些片段内部还广泛存在着单链缺口、碱基转换、碱基脱落或分子交联等各种各样的损伤[12,13]。古DNA含量极低且损伤严重导致克隆效率低，克隆后的分子在宿主内也可能会受到某些修饰而无法完全真实地反映古代生物的遗传信息。能否成功解决这些问题成为了古DNA研究能否持续发展的关键。

PCR 技术掀起古 DNA 研究的第二次革命

1983年，聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)问世[14,15]，研究人员可以用少量甚至单分子DNA模板，通过体外扩增的方式，获得大量的目标DNA拷贝。它给生命科学的各个领域带来了革命性的突破，极大地促进了分子生物学的发展。此后，这一突破性技术被广泛应用于古DNA研究，PCR技术使微量的古DNA在短时间内大量扩增成为现实，使古DNA研究摆脱了较为繁琐的重组及克隆实验过程而真正迅速开展起来。

PCR技术的原理是：DNA聚合酶以单链DNA为模板，借助一小段双链DNA来启动合成，通过一个或两个人工合成的寡核苷酸引物与单链DNA模板中的一段互补序列结合，形成部分双链。在适宜的温度和环境下，DNA聚合酶将脱氧单核苷酸(dNTP)加到引物3'-OH末端，并以此为起始点，沿模板5'→3'方向延伸，合成一条新的DNA互补链。PCR反应的基本成分包括：模板DNA、引物、dNTP、DNA聚合酶和适宜的缓冲液。PCR反

应中，通过双链DNA的高温变性(denaturation)、引物与模板的低温退火(annealing)和适温延伸(extension)这三步反应反复循环。每一循环中所合成的新链，又都可作为下一循环中的模板。PCR合成的特定的DNA序列产量随着循环次数呈指数增加，从而达到迅速大量扩增的目的。

1988年，Pääbo等[16]首先将PCR技术运用到古DNA研究中，从距今约7000年的人颅脑中提取出92bp的mtDNA。Golenberg等[17]从距今1700万年前的木兰属(*Magnolia*)植物化石中获取到叶绿体DNA的*rbcL*序列，Woodward等[18]从距今约1亿2千万年前的恐龙骨骼中提取出DNA，Desalle等从琥珀中提取DNA[19,20]等。

而PCR技术并不是万能的，尽管用PCR理论上可以扩增单分子的DNA，但是很多古代材料中的DNA常常无法通过PCR被检测到[21-23]。究其原因，主要是从很多古生物样本中抽提到的DNA含量太低。相比于现代生物材料产生的DNA量，尤其是PCR所产生的指数增长的目标片段DNA分子，古代样品产生的DNA在数量上是没有竞争力的。而PCR过程，是DNA分子和聚合酶碰撞的热力学过程，数量上的劣势会导致古代DNA分子在PCR时被扩增的概率降低甚至于不被扩增[24]。所以PCR技术扩增极低含量的古DNA分子片段同时也会将环境中的污染DNA放大，如Gutierrez等[25]就证明了Cano[26]于1993报道的取自琥珀中的象鼻虫的226bp的*ITS*序列是真菌污染。

面对以上问题，研究者们不断改进PCR技术，创立了乳化PCR、多重PCR等方法，使之更适用于古DNA研究。

乳化PCR

乳化PCR(emulsion-PCR, emPCR)技术[27,28]是指将PCR体系分散在有机相中乳

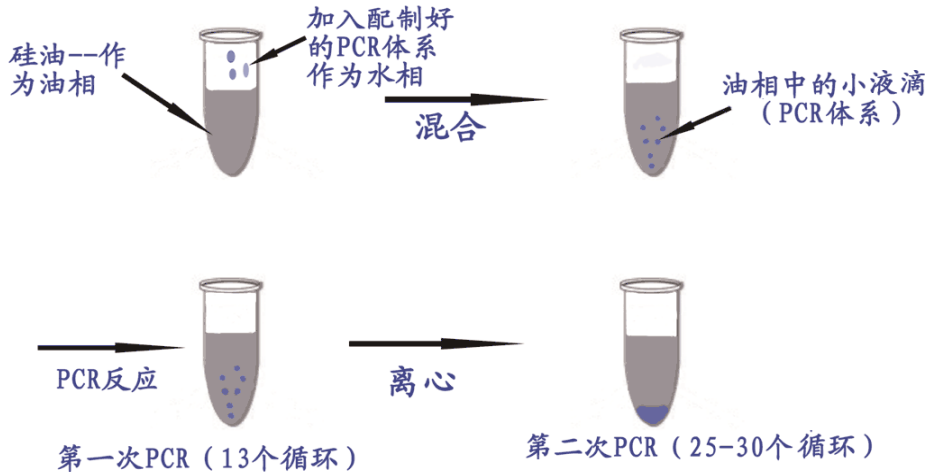


图2 乳化PCR Fig.2. Emulsion-PCR

化，以达到单分子扩增的目的。乳化PCR分两步，首先把包含模板DNA的反应混合物加入硅(氧烷)油(silicone oil)中进行乳化，接下来进行PCR反应，这样每个液滴中或者扩增一个分子的DNA，或者因没有DNA模板而无法反应。第一步结束时，包含模板DNA的液滴中的PCR底物被耗尽。然后，对第一步产物进行离心处理，使小液滴混合为一体，使得第一步中没有模板的小液滴中的PCR底物继续进行第二次PCR (图2)。

多重PCR与微测序技术

保存条件相对理想的古DNA实验材料一般都来之不易，如何从有限的材料中得到大量的遗传信息以用于后续研究，也一直是研究者颇为关注的问题。古DNA分子的长度一般不会超过500bp，要得到古生物完整的基因或基因组，需要设计合成大量特异性引物对，将扩增所得序列进行拼接。该如何解决较多的模板需求与有限的材料供给之间的矛盾？Hofreiter等在2006年提出了古DNA的分步扩增方法(图3)[29]，先在第一步PCR反应中加入多对引物对古DNA模板进行多重扩增(multiplex amplification)，然后在第二步PCR反应中再用第一步反应的引物或者巢式引物(nested primer)对目标片段进行30 - 40个循环的单一扩增(simplic amplification)。相比于普通的PCR，分步扩增法省时，节约模板DNA，且灵敏度和通量上都有很大提高。Krause等设计了46对引物采用多重PCR扩增技术成功地从200mg猛犸象(*Mammuthus primigenius*)骨粉的抽提液中扩增出16,700bp的mtDNA基

因组全序列[30]。

与多重PCR紧密联系的是微测序技术。微测序是指首先扩增出含有SNP位点的一段DNA，然后在PCR扩增产物中加入一检测引物进行微测序反应。微测序引物3'末端碱基紧挨于多态性碱基，加入DNA聚合酶及荧光标记的ddNTP后，只进行一个碱基的延伸反应，延伸的这个碱基就是多态性碱基，最后经毛细管电泳检测荧光信号，通过不同的荧光检测结果达到对SNP位点的分析。

Endicott等将多重PCR和微测序技术用于古DNA研究，实现对20个mtDNA编码区的信息位点同时进行检测，弄清了安达曼人mtDNA单倍群的起源[31]。

下一代测序技术引领古DNA研究的第三次革命

PCR技术将古DNA研究推向巅峰，在巨大的成功面前，一些学者却指出现有的古DNA技术是难以获得灭绝生物的核基因组全序列的，尽管多重PCR可以快速获得mtDNA全序列，但对核基因组来说却完全是另外一回事，古DNA研究或许就此止步[30,32]。而下一代测序技术的兴起却让人们看到了希望。在这之前，古DNA测序使用传统方法先通过克隆或PCR来达到一定的模板数量。然后这些模板被逐一测序，并通过毛细管电泳将测序产物分离。新的测序方法不是通过毛细管电泳来测序，而是通过序列的合成过程来进行测序，主要有454焦磷酸测序法(454 pyrosequencing)、Solexa合成测序法(Solexa SBS

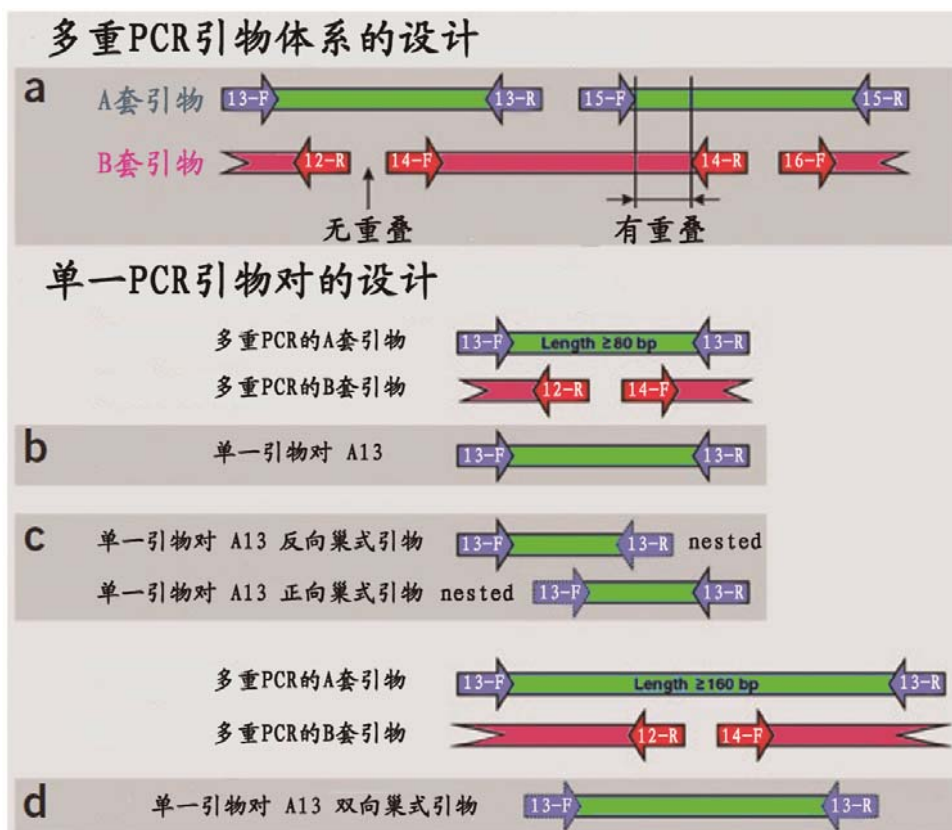


图3 多重PCR的引物设计原则

Fig.3. Primer design strategy for multiplex amplification of ancient DNA.

(a)多重PCR的第一步需要两套引物, 这里分别称为A和B, 这两套引物可覆盖我们想要的序列。由单独一套引物扩增出的产物片段不会重叠, 而在两套引物之间的PCR片段则会出现重叠。(b-d)第二步单一PCR是将第一步多引物PCR产物片段单独进行再次扩增。图b所示是用与多引物扩增中相同的单一引物对, 图c表示仅在所得PCR片段的一端用巢式引物, b和c的方法均可以用于大于80bp的PCR产物的再扩增。图d表示在PCR产物的两端均使用巢式引物, 这种方法仅在PCR产物大于160bp时才可使用。

sequencing)、寡核苷酸聚合酶群落测序法 (SOLiD polony sequencing)和单分子测序法 (Single Molecule Sequencing)。

454 焦磷酸测序法 [33] 首先是将待测 DNA 处理成小于 500bp 的片段并制备成单链 DNA 文库, 使相同长度和碱基组成的 DNA 连上相同的接头, 再用含配对接头的吸附珠吸附特定 DNA 分子后进行乳化 PCR, 洗去乳胶物质并使双链 DNA 变性成单链后转入多微孔板中, 再开始由四种酶催化的同一反应体系中的酶级联反应, 四种酶分别为: DNA 聚合酶、ATP 硫酸化酶、荧光素酶和双磷酸酶, 反应底物为腺苷酰硫酸 (APS)、荧光素。向反应体系中只加入一种 dNTP, 若其能与 DNA 模板的下 1 个碱基配对, 则会在 DNA 聚合酶的作用下, 添加到测序引物的 3' 末端, 同时释

放出 1 分子的焦磷酸 (PPi); 在 ATP 硫酸化酶的作用下, 生成的焦磷酸可以和 APS 结合形成 ATP; 在荧光素酶的催化下, 生成的 ATP 又可以和荧光素结合形成氧化荧光素, 同时产生可被光学系统所检测的可见光而获得一个特异的检测峰; 每个峰值的高度与反应中掺入的核苷酸数目成正比。反应体系中剩余的 dNTP 和残留的少量 ATP 在双磷酸酶的作用下发生降解。然后加入下一种 dNTP, 继续 DNA 链的合成, 因而是边合成边测序 (sequencing by synthesis)。

Solexa 测序法 [34] 首先需要将待测 DNA 片段分别接上接头, DNA 片段通过接头与芯片上引物序列的碱基互补锚定到芯片上的特定位置, 继而进行桥联扩增 (bridge amplification) 形成数百万的单分子阵列。测

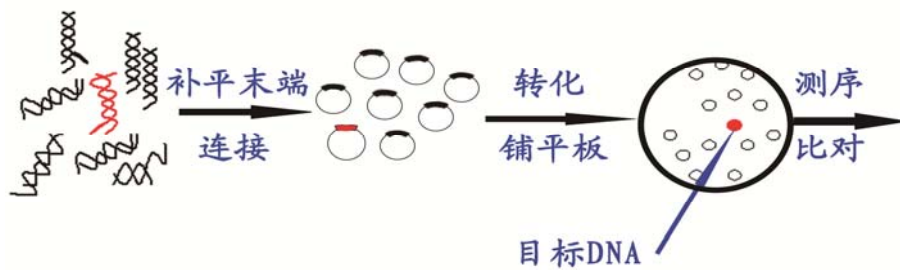


图4 宏基因组文库的构建和分析

Fig.4. Cloning strategy for constructing and analyzing metagenomic libraries

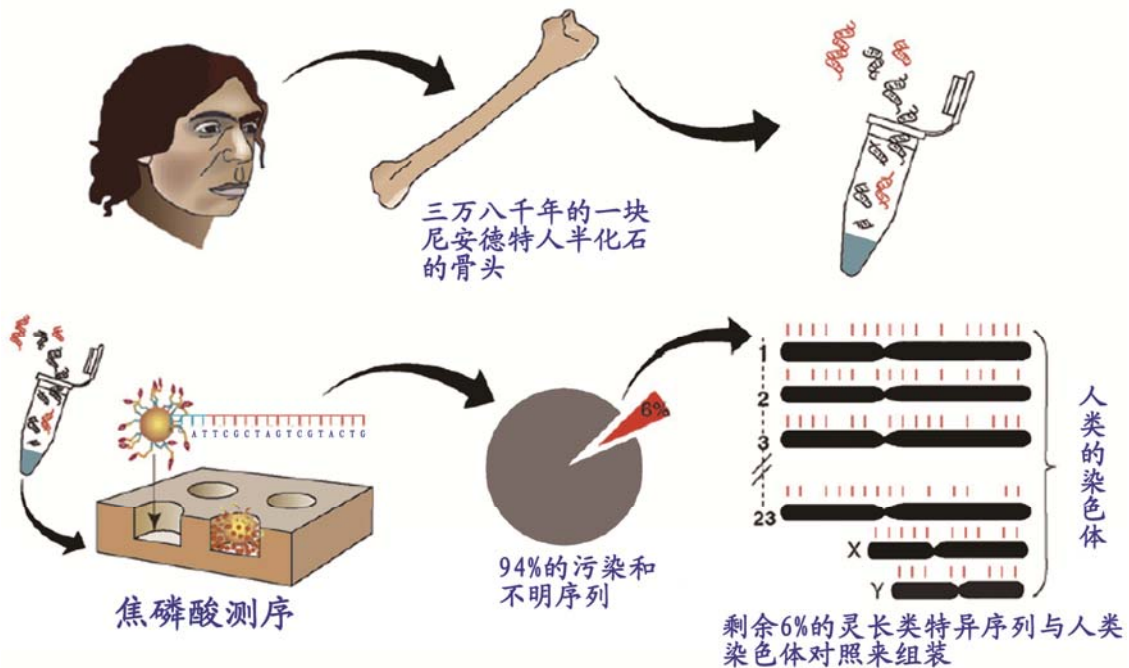


图5 使用焦磷酸测序法对尼安德特人核DNA和线粒体DNA测序

Fig.5. Using pyrosequencing technology to sequence Neanderthal nuclear and mitochondrial DNA

序时向芯片上加入4种被不同可逆终止化合物标记的碱基，其中能与芯片上各单分子阵列中单链DNA的第一个碱基配对的核苷被加到引物的3'端，其自身的3'端被保护以阻止下一个核苷的加入，多余的核苷被移走。同阵列中新加入的核苷释放出一致的荧光信号，该信号被图像采集系统采集后，荧光基团从新加入的核苷碱基上脱落，同时其3'端去保护成游离状态为下一个核苷的连接做准备。以上步骤可以重复几十个循环，得到的大量短片段用相关软件程序进行拼接和处理。Solexa合成测序法除了高效快速，主要优势在于大大降低了测序成本。

SOLiD测序法[35]是在测序反应前将随

机打断的单个DNA分子与含不同标签序列的片段通过A-T互补连接，得到含配对的特异标签的DNA文库，然后用内含聚合酶阵列的吸附珠吸附DNA分子并进行乳化PCR扩增，离心去除未发生扩增反应的吸附珠后将含数百万个相同DNA分子拷贝的单层吸附珠密集排在固体介质表面，测序仪根据介质表面不同位点所发出的不同荧光信号来确定不同的碱基。

单分子测序法[36]也是一种合成测序法，但是不需要模板的预先扩增。这种技术利用高清晰度的光学设备检测测序反应中单链DNA或RNA模板中单个碱基的加入，避免PCR所造成的偏向性，可用于定量。但该方

法的错误率较高, 尚不实用[37]。

这些高通量的测序技术在古DNA中的应用, 突破了以前的古DNA研究主要基于细菌中随机的分子克隆或者目的DNA片段PCR扩增的低通量的技术瓶颈。Noonan等[39,40]首先尝试了不经PCR扩增而是通过构建古DNA宏基因组文库(metagenomic library)来直接克隆古DNA。宏基因组[38]是特定环境全部生物遗传物质的总和, 宏基因组研究是以生态环境中全部DNA作为对象, 通过克隆、异源表达来筛选相关基因, 研究其功能和彼此之间的相互作用等, 而基因组文库(library)是指包含特定DNA片段的重组子集合。Noonan采用末端补平-平末端连接-克隆的方法(图4)构建宏基因组文库(metagenomic library), 成功获得了洞熊(*Ursus spelaeus*)的全基因组序列。

2006年, Grenn等[41]在宏基因组法的基础上结合乳化PCR和焦磷酸测序得到并分析了一个3.8万年前的尼安德特人的全基因组序列中的1M碱基对(图5)。Poinar等[42]用同样方法进行西伯利亚猛犸象下颚骨的核DNA和mtDNA宏基因组文库构建和大规模测序, 共获得28M碱基对, 其中13M (45.4%)是属于猛犸象的, 剩余部分DNA则是污染或者环境DNA。

2008年, Blow等[43]采用接头介导的emPCR, 结合Solexa测序技术, 对4.5万年和6.9万年前的古哺乳动物样品进行全基因组测序, 共获得1亿碱基对, 也证实高通量法研究核DNA的可行性。之后, 针对全基因组的古DNA研究不断开展起来[44-49]。

在这个过程中, 古DNA扩增和测序技术又不断被优化。2009年, Briggs等[50]创立了引物延伸捕获法(primer extension capture-PEC), PEC方法是简单、快速且特异性好, 非常适合捕获小目标片段(图6)。

Briggs等用该方法重建了来自不同地理区域的5个尼安德特人的mtDNA全序列, 分析出晚期的尼安德特人mtDNA的遗传多态性比现代人约低3倍, 且尼安德特人的有效群体比现代人和现存的大猩猩都要小。Krause等[51]用同样方法从出土于西伯利亚Denisova洞穴的一块指骨化石中提取出mtDNA全序列, 进

一步分析发现这一mtDNA序列同任何已知的古人种的都不一样。这一人种(丹人)约在100万年前走出非洲, 行至西伯利亚后逐渐消失。

PEC法获取mtDNA这样的小片段的能力毋庸置疑, 但它难以实现对较大的目标片段, 诸如外显子、大的染色体区域或者低覆盖的鸟枪法基因组中的目的片段等的抓取。Burbano等将Hodges创立的芯片捕获外显子的方法(图7)[52,53]用于古DNA研究成功解决了这个难题。

Burbano等[54]将AHC方法来分析发现于西班牙的一块距今49,000年的尼安德特人的遗骨。他们将目光聚焦在14,000个蛋白编码区, 通过与现代人、黑猩猩、红猩猩等的对

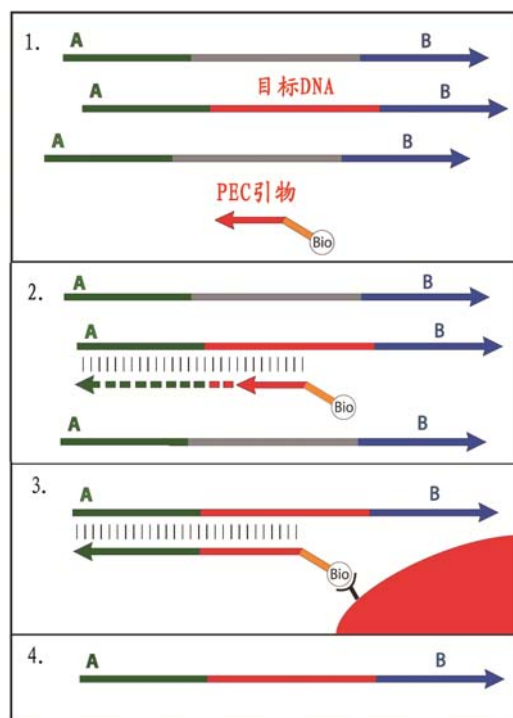


图6 引物延伸捕获技术

Fig.6. Primer extension capture (PEC)

(1)将5'端带有生物素的寡核苷酸引物加入到454文库中(接头分子A和B中带有特殊的标签), 退火时引物可与他们各自的目标序列结合。

(2) *Taq* DNA聚合酶介导的单向延伸反应使得引物和带有5'端接头的目标序列结合成双链。

(3)纯化, 去除多余的PEC引物。生物素标记的引物与目标序列被带有链霉亲和素的磁珠捕获。在PEC引物的变性温度下用洗脱液洗涤磁珠来保证发生延伸反应的模板DNA优先与引物结合。

(4)从珠子上洗脱下捕获的目标DNA并在其接头位点处进行扩增。扩增产物能被用于第二轮的捕获, 或者直接用于单分子乳化PCR以供454测序。

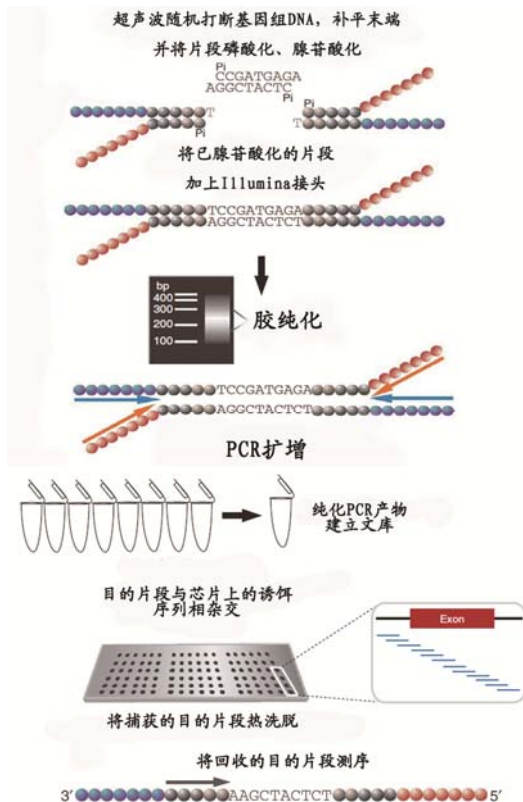


图7 芯片杂交捕获方法简图

Fig.7. Schematic diagram of the array hybridization capture (AHC) protocol

比, 发现了88个在现代人与尼安德特人分开之后才产生的替代氨基酸。这为研究基因的进化和多样性提供了极其重要的线索。

同一期的Science杂志上又刊出下一代测序技术在古DNA领域的运用取得的最引人注目的成就, Pääbo领导的研究组以454焦磷酸测序和Solexa测序技术从3个女性尼安德特人骨骼中获得了40亿碱基, 做出了尼安德特人的基因组草图, 他们将测序结果与来自世界5个地区的现代人基因组进行比较后发现现代人有约1-4%的DNA源自尼安德特人, 既就是说现代人与尼安德特人非常可能在小范围内发生过基因交流, 时间是现代人走出非洲后在中东遇到尼安德特人之时[55]。尼安德特人基因组序列首个版本的获得, 揭开了尼人与现代人是否有基因交流的千古谜题, 完成了人们一个长期以来的梦想。

从1984年的229bp斑驴的mtDNA到2010年的尼安德特人基因组草图, 分子克隆、PCR、下一代测序技术、PEC、AHC等引领古DNA研究蓬勃发展, 许多以前因技术问题而

无法解决的谜题将被一一揭开。随着标准的不断细化, 技术的不断发展, 古DNA研究在古病理学、进化速率估计、已灭绝生物进化谱系、群体历史、动植物驯化、人类历史和迁徙等研究领域必将发挥更大的作用。

参考文献

- Poinar HN (1999) DNA from fossils : The past and the future. *Acta Paediatrica* 88 :133-140.
- Hofreiter M, Serre D, Poinar HN, Kuch M, Pääbo S (2001) Ancient DNA. *Nat Rev Genet* 2:353-359.
- Willerslev E, Cooper A (2005) Ancient DNA. *Proc Biol Sci* 272:3-16.
- Hunan Medical College (1981) Study of an ancient cadaver in Mawangtui tomb No. 1 of the Han Dynasty in Changsha. New York : Ancient Memorial Press.184-187.
- Higuchi R, Bowman B, Freiberger M, Ryder OA, Wilson AC (1984) DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family. *Nature* 312:282-284.
- Pääbo S (1985) Molecular cloning of Ancient Egyptian mummy DNA. *Nature* 314:644-645.
- Handt O, Richards M, Trommsdorff M, Kilger C, Simanainen J, Georgiev O, Bauer K, Stone A, Hedges R, Schaffner W (1994) Molecular genetic analyses of the Tyrolean Ice Man. *Science* 264:1775-1778.
- Handt O, Krings M, Ward RH, Pääbo S (1996) The retrieval of ancient human DNA sequences. *Am J Hum Genet* 59:368-376.
- Graziano P, Cecilia S (2001) A Novel method for estimating substitution rate variation among sites in a large dataset of homologous DNA sequences. *Genetics* 157:859-865.
- Wandeler P, Smith S, Morin PA, Pettifor RA, Funk SM (2003) Patterns of nuclear DNA Degeneration over time-a case study in historic teeth samples. *Mol Ecol* 12:1087-1093.
- Pääbo S, Higuchi RG, Wilson AC (1989) Ancient DNA and the polymerase chain reaction. The emerging field of molecular archaeology. *J Biol Chem* 264:9709-9712.
- Greer S, Zamenhof S (1962) Studies on depurination of DNA by heat. *J Mol Biol* 4:123-141.
- Poinar HN (2002) The genetic secrets some fossils hold. *Acc Chem Res* 35:676-684.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350-1354.
- Mullis KB, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155:335-350.
- Pääbo S, John A, Gifford, Allan C (1988) Wilson Mitochondrial DNA sequences from a 7000-year old brain. *Nucleic Acids Res* 16: 9775-9787.
- Golenberg EM, Giannasi DE, Clegg MT, Smiley CJ, Durbin M (1990) Chloroplast DNA sequence from a miocene *Magnolia* species. *Nature* 344:656-658.
- Woodward SR, Weyand NJ, Bunnell M (1994) DNA sequence from Cretaceous period Bone fragments. *Science* 266: 1229-1232.
- Desalle R, Gatesy J, Wheeler W, Grimaldi D (1992) DNA sequences from a fossil termite in Oligo-Miocene amber and their phylogenetic implications. *Science* 257:1933-1936.
- Desalle R, Bareia M, Wray C (1993) PCR jumping in clones of 30-million-year-old DNA fragments from amber preserved termites (*Mastotermes electrodominicus*). *Experientia* 49:906-909.
- Handt O, Höss M, Krings M, Pääbo S (1994) Ancient DNA: methodological challenges. *Experientia* 50:524-529.
- Poinar HN, Höss M, Bada JL, Pääbo S (1996) Amino acid

- racemization and the preservation of ancient DNA. *Science* 272:864-866.
23. Kumar SS, Nasidze I, Walimbe SR, Stoneking M (2000) Brief communication: discouraging prospects for ancient DNA from India. *Am J Phys Anthropol* 113:129-133.
 24. 徐智(2008)中国西北地区古代人群的 DNA 研究. 人类生物学博士毕业论文. 复旦大学.
 25. Gutierrez G, Marin A (1998) The most ancient DNA recovered from an amber-preserved specimen may not be as ancient as it seems. *Mol Biol Evol* 15:926-929.
 26. Cano RJ, Poinar HN, Pieniazek NJ, Acra A, Poinar GO (1993) Amplification and sequencing of DNA from a 120-135-million-year-old weevil. *Nature* 363:536-538.
 27. Ohuchi S, Nakano H, Yamane T (1998) In vitro method for the generation of protein libraries using PCR amplification of a single DNA molecule and coupled transcription/translation. *Nucleic Acids Res* 26(19):4339-434.
 28. Nakano M, Komatsu J, Matsuura S, Takashima K, Katsura S, Akira Mizuno (2003) Single-Molecule PCR using water-in-oil emulsion. *J Biotechnol* 102:117-124.
 29. Römpler H, Dear PH, Krause J, Meyer M, Rohland N, Schöneberg T, Spriggs H, Stiller M, Hofreiter M (2006) Multiplex amplification of ancient DNA. *Nat Protoc* 1: 720-728.
 30. Krause J, Dear PH, Pollack JL, Slatkin M, Spriggs H, Barnes I, Lister AM, Ebersberger I, Pääbo S, Hofreiter M (2006) Multiplexed amplification of the mammoth mitochondrial genome and the evolution of Elephantidae. *Nature* 439:724-727.
 31. Endicott P, Metspalu M, Stringer C, Macaulay V, Cooper A, Sanchez J (2006) Multiplexed SNP typing of ancient DNA clarifies the origin of andaman mtDNA haplogroups amongst South Asian tribal populations. *PLoS ONE* 1:e81.
 32. Cooper A (2006) The year of the mammoth. *PLoS Biol.* 4:e78.
 33. Margulies M, Egholm M, Altman WE (2005) Genome sequencing in microfabricated high density picolitre reactors. *Nature* 437: 376-380.
 34. Ju J, Kim DH, Bi L, Meng QL, Bai XP, Li ZM, Li XX, Marma MS, Shi S, Wu J, Edwards JR, Romu A, Turro NJ (2006) Four-color DNA sequencing by synthesis using cleavable fluorescent nucleotide reversible terminators. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:19635-19640.
 35. Shendure J, Porreca GJ, Reppas NB, Lin XX, McCutcheon JP, Rosenbaum AM, Wang MD, Zhang K, Mitra RD, Church GM (2005) Accurate multiplex polony sequencing of an evolved bacterial genome. *Science* 309:1728-1732.
 36. Mitchelson KR (2007) New high throughput technologies for DNA sequencing and genomics. Capitalbio Corporation Beijing China:1-20.
 37. Koralch J, Marks PJ, Cicero RL, Gray JJ, Murphy DL, Roitman DB, Pham TT, Otto GA, Foquet M, Turner SW (2008) Selective aluminum passivation for targeted immobilization of single DNA polymerase molecules in zero mode waveguide nanostructures. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 1176-1181.
 38. Handelsman J, Rondon MR, Brady SF, Clardy J, Goodman RM (1998) Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chem Biol* 5(10):245-249.
 39. Hoelzel AR (2005) Ancient genomes. *Genome Biol* 6:239.
 40. Noonan JP, Hofreiter M, Smith D, Priest JR, Rohland N (2005) Genomic sequencing of Pleistocene cave bears. *Science* 309:597-599.
 41. Green RE, Krause J, Ptak SE, Briggs AW, Ronan MT, Simons JF, Du L, Egholm M, Rothberg JM, Paunovic M, Pääbo S (2006) Analysis of one million base pairs of Neanderthal DNA. *Nature* 444:330-336.
 42. Poinar HN, Schwarz C, Qi J, Shapiro B, Macphee RD, Buigues B, Tikhonov A, Huson DH, Tomsho LP, Auch A, Rampp M, Miller W, Schuster SC (2006) Metagenomics to paleogenomics: large-scale sequencing of mammoth DNA. *Science* 311:392-394.
 43. Blow MJ, Zhang T, Woyke T, Spelle CF, Krivoschapkin A, Yang DY, Derevianko A, Rubin EM (2008) Identification of the source of ancient remains through genomic sequencing. *Genome Res* 18: 1347-1353.
 44. Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, Smith GP, Milton J (2008) Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature* 456:53-59.
 45. Green RE, Malaspina AS, Krause J, Briggs AW, Johnson PL, Uhler C, Meyer M, Good JM, Maricic T, Stenzel U, Prüfer K, Siebauer M, Burbano HA, Ronan M, Rothberg JM, Egholm M, Rudan P, Brajković D, Kučan Ž, Gušić I, Wikström M, Laakkonen L, Kelso J, Slatkin M, Pääbo S (2008) A complete Neandertal mitochondrial genome sequence determined by high-throughput sequencing. *Cell* 134:416-426.
 46. Gilbert MT, Drautz DI, Lesk AM, Ho SY, Qi J (2008) Intraspecific phylogenetic analysis of Siberian woolly mammoths using complete mitochondrial genomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:8327-8332.
 47. Mardis ER (2008) Next-generation DNA sequencing methods. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 9:387-402.
 48. Millar CD, Huynen L, Subramanian S, Mohandesan E, Lambert DM (2008) New developments in ancient genomics. *Trends Ecol Evol* 23:386-93.
 49. Rasmussen M, Li YR, Lindgreen S, Pedersen JS, Albrechtsen A, Moltke I, Metspalu M, Metspalu E, Kivisild T, Gupta R, Bertalan M, Nielsen K, Gilbert MTP, Wang Y, Raghavan M, Campos PF, Kamp HM, Wilson AS, Gledhill A, Tridico S, Bunce M, Lorenzen ED, Binladen J, Guo XS, Zhao J, Zhang XQ, Zhang H, Li Z, Chen MF, Orlando L, Kristiansen K, Bak M, Tommerup N, Bendixen C, Pierre TL, Grønnow B, Meldgaard M, Andreasen C, Fedorova SA, Osipova LP, Higham TFG, Ramsey CB, Hansen TO, Nielsen FC, Crawford MH, Brunak S, Sicheritz-Ponten T, Villemes R, Nielsen R, Krogh A, Wang J, Willerslev E (2010) Ancient human genome sequence of an extinct Palaeo-Eskimo. *Nature* 463:757-762.
 50. Briggs AW, Good JM, Green RE, Krause J, Maricic T, Stenzel U, Lalueza-Fox C, Rudan P, Brajković D, Kučan Ž, Gušić I, Schmitz R, Doronichev VB, Golovanova LV, Rasilla M, Forcia J, Rosas A, Pääbo S (2009) Targeted Retrieval and Analysis of Five Neandertal mtDNA Genomes. *Science* 325:318-321.
 51. Krause J, Fu Q, Good JM, Viola B, Shunkov MV, Derevianko AP, Pääbo S (2010) The complete mitochondrial DNA genome of an unknown hominin from southern Siberia. *Nature* 464:894-897.
 52. Hodges E, Xuan ZY, Balija V, Kramer M, Molla MN, Smith SW, Middle CM, Rodesch MJ, Albert TJ, Hannon GJ, McCombie WR (2007) Genome-wide in situ exon capture for selective resequencing. *Nat Genet* 39:1522-1527.
 53. Hodges E, Rooks M, Xuan ZY, Bhattacharjee A, Gordon DB, Brizuela L, McCombie WR, Hannon GJ (2009) Hybrid selection of discrete genomic intervals on custom-designed microarrays for massively parallel sequencing. *Nat Protoc* 4:960-974.
 54. Burbano HA, Hodges E, Green RE, Briggs AW, Krause J, Meyer M, Good JM, Maricic T, Johnson PLF, Xuan ZY, Rooks M, Bhattacharjee A, Brizuela L, Albert FW, Rasilla de la M, Forcia J, Rosas A, Lachmann M, Hannon GJ, Pääbo S (2010) Targeted Investigation of the Neandertal Genome by Array-Based Sequence Capture. *Science* 328:723-725.
 55. Green RE, Krause J, Briggs AW, Maricic T, Stenzel U, Kircher M, Patterson N, Li H, Zhai WW, Fritz MHY, Hansen NF, Durand EY, Malaspina AS, Jensen JD, Marques-Bonet T, Alkan C, Prüfer Kay, Meyer M, Burbano HA, Good JM, Schultz R, Aximu-Petri A, Butthof A, Höber B, Höffner B, Siegemund M, Weihmann A, Nusbaum C, Lander ES, Russ C, Novod N, Affourtit J, Egholm M, Verna C, Rudan P, Brajković D, Kučan Ž, Gušić I, Doronichev VB, Golovanova LV, Lalueza-Fox C, Rasilla M, Forcia J, Rosas A, Schmitz RW, Johnson PLF, Eichler EE, Falush D, Birney E, Mullikin JC, Slatkin M, Nielsen R, Kelso J, Lachmann M, Reich D, Pääbo S (2010) A draft sequence of the Neandertal genome. *Science* 328:710-72.