

# 中国北方古代人群线粒体

# DNA 研究

周 慧 主 编

吉林大学边疆考古研究中心  
东北亚生物演化与环境教育部重点实验室 编  
吉林大学生命科学学院



科学出版社

# 中国北方古代人群 线粒体 DNA 研究

吉林大学边疆考古研究中心  
东北亚生物演化与环境教育部重点实验室 编  
吉林大学生命科学学院

周 慧 主编

科学出版社

北 京

## 内 容 简 介

本书是吉林大学古 DNA 实验室 2006 年以来与北方古代人群 DNA 研究有关的博士论文汇编。书中首先简要介绍了古 DNA 研究的原理、方法与现状,然后重点阐述了本实验室关于新疆塔里木盆地古代人群(山普拉遗址、圆沙遗址和尼雅遗址)、内蒙古中南部古代人群(朱开沟墓地、将军沟墓地、饮牛沟墓地、新店子墓地、城卜子遗址、一棵树墓地和砧子山墓地)、青海—辽宁—山西地区出土古人骨(青海喇家遗址、辽宁喇嘛洞墓地、山西虞弘及夫人墓)、拓跋鲜卑人群(东大井东墓地和七郎山墓地)以及辽代契丹人群(萧和家族墓地、商都辽墓、尖山辽墓、耶律羽之家族墓地、吐尔基辽墓和山嘴子辽墓)的线粒体 DNA 研究内容。对这些地区古代人群的遗传结构、起源、迁徙、基因交流等问题进行了深入的探讨。

本书可供考古学、遗传学、人类学、博物学等专业的相关研究人员及相关院校师生阅读和参考。

### 图书在版编目(CIP)数据

中国北方古代人群线粒体 DNA 研究/吉林大学边疆考古研究中心,东北亚生物演化与环境教育部重点实验室,吉林大学生命科学学院编.  
—北京:科学出版社,2010

ISBN 978-7-03-029713-6

I. ①中… II. ①吉… ②东… ③吉… III. ①古人类学—人类基因—研究—中国 IV. ①Q981

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2010)第 242121 号

责任编辑:宋小军 曹明明 / 责任校对:陈玉凤

责任印制:赵德静 / 封面设计:谭 硕

科学出版社 出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

\*

2010 年 12 月第 一 版 开本: B5 (720 × 1000)

2010 年 12 月第一次印刷 印张: 11 3/4

印数: 1—1 200 字数: 211 000

定价: 98.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

## 主编简介



周慧，1954年2月出生于湖南长沙。1977年毕业于吉林大学化学系，1981年获硕士学位，于当年留吉林大学任教，1989年获博士学位，随后留学英国和澳大利亚。1992年被评为吉林大学生命科学学院教授，1995年荣获“教育部跨世纪优秀人才”称号。1999年与吉林大学考古系合作创建了国内第一个考古DNA实验室，培养了国内第一个古DNA研究的博士。承担并完成了国家一系列研究项目，取得了一定的科研成果，十年来发表相关文章50余篇，其中，在SCI收录的刊物上发表论文20余篇，为中国古DNA研究做出了一定贡献。

《中国北方古代人群线粒体 DNA 研究》

编 委 会

主 编 周 慧

副主编 许 月 高诗珠 谢承志

编 者 付玉芹 王海晶 于长春

# 前 言

在吉林大学考古 DNA 实验室成立十周年际，我们对实验室 2006 年以来与北方古代人群 DNA 研究有关的博士论文进行了归纳总结，以此为基础编写出《中国北方古代人群线粒体 DNA 研究》一书，献给中国田野考古的前辈和同仁，以感谢他们对考古 DNA 实验室的大力支持与帮助。还要特别感谢朱泓教授，在本书的结构、基本观点和具体写作等诸多方面给予了详细指导。

本书的第一章简述了古 DNA 的定义、特征、研究方法和研究历史与现状，这些方法主要包括样本的采集、预处理过程的注意事项；DNA 抽提、PCR 扩增、序列测定；序列真实性验证和数据分析。

第二章为新疆塔里木盆地古代人群线粒体 DNA 分析，由谢承志、高诗珠两位博士的学位论文的部分内容组成。该研究对距今 2200 ~ 2000 年的山普拉遗址、圆沙遗址和尼雅遗址的 33 个个体进行了线粒体 DNA 高可变区测序和编码区 SNP 分型。得到的单倍型类群分布数据表明，塔里木盆地古代人群是一个由已经分化的东西方谱系融合产生的混合人群，其中西部谱系的来源中有来自于近东和伊朗地区的成分；东部谱系的主体成分来自于北亚和东北亚，但同时含有少量东南亚起源成分，表明东部的来源较广，融合过程也较复杂。塔里木盆地古人群的母系遗传结构与现代新疆人群已经十分接近，暗示塔里木盆地古代人群与现代新疆人群在母系上有着一定的遗传连续性。

第三章是内蒙古中南部古代人群线粒体 DNA 分析，由王海晶、付玉芹的博士论文的主要内容组成。选取内蒙古中南部地区青铜时代早期朱开沟墓地，东周时期将军沟墓地、饮牛沟墓地和新店子墓地，金元时期城卜子遗址、一棵树墓地和砧子山墓地的 63 例古人遗骸作为研究样本，采取了线粒体 DNA 高可变一区和编码区相结合的策略详细地对这些古代人群进行了分析。距今 4000 年左右的朱开沟古代居民都属于亚洲特有的单倍型类群（A、C、D、M9、M10），同样，战国后期的饮牛沟古代居民单倍型类群也都是属于亚洲特有的单倍型类群（A、B、C、D、Z）。朱开沟古代居民的三种单倍型（A、C、D）都出现在饮牛沟古代居民中，说明在母系遗传上具有连续性。这些单倍型在现代中国北方少数民族中分布频率很高，说明本地古代人群对现代人群有着重要的基因贡献。而将军沟墓地古代居民在母系遗传上与现代对比人群中的汉遗传距离最近，与内蒙古和韩国的分支也相对较近，推测将军沟的古代人群可能是赵国为巩固边疆统治、防御匈奴

而从中原迁来的移民。距今 2400 年左右的新店子遗址的主要单倍型是 A、C、D，其中，高频率的 C、D 体现出蒙古人种北亚类型的草原游牧民族特征。据此推测蒙古高原和外贝加尔地区的牧民由于东周时期气候急剧变冷而南迁，将游牧文化带到了农耕边缘地带，最后导致了北方长城地带游牧文化带的形成。城卜子汪古遗址的单倍型比较复杂，包含了东亚、西伯利亚（M、B、D、A）和欧洲（N、H）成分，与乌兹别克和维吾尔可能有共同的起源。我们结合一棵树墓地样本的线粒体 DNA 高可变区序列和单倍型（B、D、G、Z）数据，推断该古代人群可能是蒙古族的祖先群体，对后来的达斡尔族有重要的遗传贡献。砧子山墓地（元上都）样本都可归入亚洲（东部欧亚）特异单倍型（A、B、C、D、N9a、Z），这些单倍型均包括在汉族人群的线粒体 DNA 库中，与汉族人群有着密切的遗传关系。有三个个体在体质人类学上表现出欧罗巴人种的成分，但在母系遗传上表现为亚洲特异的单倍型类群，他们也许是欧洲男性向东迁移到此，与由中原向北迁移到此的女性通婚产生的后代。内蒙古中南部古代人群线粒体 DNA 分析结果表明，4000 多年以来这个地区有少量来自西方基因流的影响，重要的是北方少数民族和中原汉族有着频繁的接触和基因交流。

第四章是青海、辽宁、山西地区出土古人骨线粒体 DNA 分析，由高诗珠、王海晶、谢承志的博士论文的相关内容组成。距今 4000 ~ 3800 年的齐家文化晚期的青海喇家遗址是史前洪水灾难遗存，14 个古代个体可以归于 B、C、D、M10 和 M\* 型。单倍型组成和系统发育树都显示喇家遗址古代人群与北方汉人群的亲缘关系很近。距今 1700 ~ 1600 年的辽宁省北票喇嘛洞墓地 24 个样本可以归属于单倍型类群 B、C、D、F、G2a、Z、M 和 J1b1。中国南方人群和北方人群常见的单倍型类群在喇嘛洞人群中都出现了（B、C、D、F），还有一个在现代西伯利亚和东亚人群以及古代匈奴人群中偶然出现的单倍型类群 J。喇嘛洞人群中的一些单倍型类群与匈奴和拓跋鲜卑人群相似，但其频率在三个古代人群中却相差很多。如果喇嘛洞人群可以代表慕容鲜卑的话，那么慕容鲜卑与拓跋鲜卑的母系遗传结构存在着一定差异。山西太原隋代虞弘及其夫人墓主人线粒体 DNA 分析揭示：虞弘是西部欧亚大陆特有的单倍型 U5，而虞弘夫人是东亚人群特有单倍型 G2a。

第五章是拓跋鲜卑人群线粒体 DNA 分析，由于长春的博士论文的内容组成，分析了东汉时期商都东大井东墓地和魏晋时期七郎山墓地的 40 个样本的线粒体 DNA。东大井组和七郎山组在遗传距离、多维度分析图上都表现出其在遗传学上是不可分割的一个群体，合并为一，可作为拓跋鲜卑人群的代表。他们有着极高的 C、D 单倍型类群分布频率（69.56%），这是北亚人群的典型特征。结合单倍型类群分布与突变位点数据，可以推测古代匈奴对拓跋鲜卑有较多的遗传贡献，而现代锡伯族可能是拓跋鲜卑的直系后裔。

第六章是辽代契丹人群线粒体 DNA 分析，是许月的博士论文的内容，对内蒙古中东部包括贵族、平民以及不同时期的辽代墓葬（萧和家族墓地、商都辽墓、尖山辽墓、耶律羽之家族墓地、吐尔基辽墓、山嘴子辽墓）的 27 个样本进行了分析。耶律羽之家族与萧和家族分属于王族和后族，但两个家族的样本之间存在着明显的遗传差异。吐尔基辽墓主人的分析结果表明，其为契丹公主的可能性是存在的。古代鲜卑人群可能是契丹人群的祖先人群；辽灭亡后契丹人有很大一部分融入到当地的蒙古人群之中。

随着分子生物学技术的不断进步以及科研工作者的不断努力，古 DNA 的研究已经发展到一定深度和高度，考古学已经进入一个更高的境界。我们在研究中不仅解决了一些传统考古方法难以解决的重要问题，还培养了具有多学科交叉研究能力的人才。我们相信这是一个新的、有着光辉前景的学科方向。由于编者水平有限，书中可能存在一些错误，敬请广大读者批评指正。



# 目 录

## 前言

第一章 古 DNA 及古 DNA 技术 .....	( 1 )
第一节 古 DNA 及古 DNA 技术概述 .....	( 1 )
一、古 DNA 的特性 .....	( 1 )
二、古 DNA 研究对象 .....	( 3 )
三、古 DNA 技术 .....	( 5 )
四、古 DNA 数据分析 .....	( 10 )
第二节 古 DNA 研究的历史与现状 .....	( 11 )
一、古 DNA 研究历史 .....	( 11 )
二、古 DNA 研究现状 .....	( 12 )
参考文献 .....	( 16 )
第二章 新疆塔里木盆地古代人群线粒体 DNA 分析 .....	( 21 )
第一节 山普拉墓地古代居民线粒体 DNA 分析 .....	( 21 )
一、背景 .....	( 21 )
二、样本 .....	( 22 )
三、结果 .....	( 23 )
四、讨论 .....	( 26 )
第二节 圆沙古城古代居民线粒体 DNA 分析 .....	( 28 )
一、背景 .....	( 28 )
二、样本 .....	( 29 )
三、结果 .....	( 30 )
四、讨论 .....	( 38 )
第三节 尼雅遗址古代居民线粒体 DNA 分析 .....	( 40 )
一、背景 .....	( 40 )
二、样本 .....	( 41 )
三、结果 .....	( 42 )
四、讨论 .....	( 42 )
参考文献 .....	( 44 )
第三章 内蒙古中南部古代人群线粒体 DNA 分析 .....	( 47 )
第一节 朱开沟遗址古代人群线粒体 DNA 分析 .....	( 47 )

---

一、背景 .....	( 47 )
二、样本 .....	( 48 )
三、结果 .....	( 48 )
四、讨论 .....	( 51 )
第二节 将军沟墓地古代人群线粒体 DNA 分析.....	( 52 )
一、背景 .....	( 52 )
二、样本 .....	( 52 )
三、结果 .....	( 53 )
四、讨论 .....	( 55 )
第三节 内蒙古饮牛沟墓地古代人群线粒体 DNA 分析.....	( 56 )
一、背景 .....	( 56 )
二、样本 .....	( 57 )
三、结果 .....	( 57 )
四、讨论 .....	( 60 )
第四节 新店子墓地古代人群线粒体 DNA 分析.....	( 61 )
一、背景 .....	( 61 )
二、样本 .....	( 62 )
三、结果 .....	( 63 )
四、讨论 .....	( 68 )
第五节 城卜子遗址汪古部遗骸线粒体 DNA 分析.....	( 69 )
一、背景 .....	( 69 )
二、样本 .....	( 70 )
三、结果 .....	( 70 )
四、讨论 .....	( 75 )
第六节 一棵树墓地古代人群线粒体 DNA 分析.....	( 76 )
一、背景 .....	( 76 )
二、样本 .....	( 77 )
三、结果 .....	( 77 )
四、讨论 .....	( 80 )
第七节 砧子山墓地古代人群线粒体 DNA 分析.....	( 81 )
一、背景 .....	( 81 )
二、样本 .....	( 81 )
三、结果 .....	( 82 )
四、讨论 .....	( 86 )
参考文献 .....	( 87 )

---

第四章 青海、辽宁、山西地区出土古人骨线粒体 DNA 分析 .....	( 91 )
第一节 青海喇家遗址古代人群线粒体 DNA 分析 .....	( 91 )
一、背景 .....	( 91 )
二、样本 .....	( 92 )
三、结果 .....	( 93 )
四、讨论 .....	( 102 )
第二节 辽宁喇嘛洞墓地古代人群线粒体 DNA 分析 .....	( 104 )
一、背景 .....	( 104 )
二、样本 .....	( 105 )
三、结果 .....	( 105 )
四、讨论 .....	( 111 )
第三节 山西太原虞弘墓主人线粒体 DNA 分析 .....	( 112 )
一、背景 .....	( 112 )
二、样本 .....	( 113 )
三、结果 .....	( 113 )
四、讨论 .....	( 114 )
参考文献 .....	( 115 )
第五章 拓跋鲜卑人群线粒体 DNA 分析 .....	( 118 )
第一节 拓跋鲜卑研究概述 .....	( 118 )
一、拓跋鲜卑发展简史 .....	( 118 )
二、拓跋鲜卑的考古学成就 .....	( 119 )
三、拓跋鲜卑源流的争议 .....	( 120 )
四、研究目的和意义 .....	( 120 )
第二节 拓跋鲜卑样本的采集 .....	( 121 )
第三节 拓跋鲜卑线粒体 DNA 分析 .....	( 123 )
一、遗传多态性 .....	( 123 )
二、单倍型类群分布 .....	( 127 )
三、共享序列分析 .....	( 127 )
四、讨论 .....	( 129 )
第四节 拓跋鲜卑与匈奴亲缘关系的遗传学分析 .....	( 130 )
一、线粒体 DNA 的遗传多态性和单倍型类群分布 .....	( 130 )
二、遗传距离 .....	( 130 )
三、系统发育分析 .....	( 131 )
四、多维度分析 .....	( 131 )
五、讨论 .....	( 132 )

第五节 拓跋鲜卑与锡伯族亲缘关系的遗传学分析 .....	( 134 )
一、锡伯族样本的采集 .....	( 134 )
二、遗传多态性分析 .....	( 134 )
三、突变热点分析 .....	( 136 )
四、遗传距离分析 .....	( 137 )
五、系统发育分析 .....	( 137 )
六、多维度分析 .....	( 138 )
七、讨论 .....	( 138 )
参考文献 .....	( 140 )
<b>第六章 辽代契丹人群线粒体 DNA 分析 .....</b>	<b>( 143 )</b>
第一节 契丹族的历史背景和研究进展 .....	( 143 )
一、契丹族概述 .....	( 143 )
二、契丹贵族概述 .....	( 144 )
三、契丹族人种学研究 .....	( 144 )
四、契丹族起源研究 .....	( 145 )
五、契丹族流向研究 .....	( 146 )
第二节 样本采集 .....	( 147 )
一、萧和家族墓地 .....	( 147 )
二、商都辽墓 .....	( 148 )
三、尖山辽墓 .....	( 149 )
四、耶律羽之家族墓地 .....	( 150 )
五、吐尔基辽墓 .....	( 150 )
六、山嘴子辽墓 .....	( 150 )
第三节 契丹族遗传结构分析 .....	( 151 )
一、契丹个体序列分析 .....	( 151 )
二、契丹群体内部关系分析 .....	( 154 )
三、契丹群体历史动态分析 .....	( 160 )
第四节 契丹贵族遗传结构分析 .....	( 161 )
一、耶律羽之家族与萧和家族比较 .....	( 161 )
二、吐尔基辽墓样本贵族身份分析 .....	( 163 )
第五节 契丹族人种问题分析 .....	( 163 )
第六节 契丹族起源分析 .....	( 165 )
第七节 契丹族流向分析 .....	( 167 )
参考文献 .....	( 169 )
<b>附录 本书的研究成果所发表的文章列表 .....</b>	<b>( 171 )</b>

# 第一章 古 DNA 及古 DNA 技术

## 第一节 古 DNA 及古 DNA 技术概述

古 DNA (ancient DNA) 是指从已经死亡的古代生物的遗体和遗迹中得到的 DNA。古 DNA 技术则是以分子生物学的研究方法和技术为基础, 由分子生物学、考古学、人类学和古生物学等学科交叉产生的一个新的研究领域。1984 年, 英国《自然》杂志上首次报道的 19 世纪末灭绝的斑驴 (Quagga) 标本 DNA 提取的研究报告<sup>[1]</sup>, 可以作为古 DNA 研究兴起的标志。虽然我国科学家王贵海和陆传宗等早在 1981 年就对马王堆汉墓出土的一具古尸进行了核酸的分离与鉴定, 并发表了首篇有关古 DNA 的研究论文<sup>[2]</sup>, 但遗憾的是当时没有明确提出古 DNA 的研究术语, 因而未能引起学术界的广泛重视。

古 DNA 技术可以打破时间和空间上的限制, 直接分析古代生物遗存中的遗传信息, 因此, 应用古 DNA 技术可以解决学术界许多用常规方法无法解决的重大课题, 包括重建过去的进化历史, 建立灭绝种和现存种的进化关系, 验证物种的迁徙、代替和物种灭绝的原因, 以及重建古环境的主要组成等。在古 DNA 技术诞生之前, 对于已灭绝生物, 生物学家只能得到一些残缺不全的形态信息和历史记录, 很多系统发育和进化理论的研究也只能间接地通过对现有生物的研究进行推测。古 DNA 技术的应用可以为进化学家和系统学家提供从形态学和解剖学中难以获得的生物演化式样和机制方面的信息。目前, 古 DNA 技术已被广泛地应用于考古学、生物学、遗传学、地学、环境科学甚至医学等诸多领域<sup>[3]</sup>。

### 一、古 DNA 的特性

与新鲜样品相比, 古代样品中 DNA 的特性可以概括为高度降解、含量极低和广泛损伤。

一般而言, 生物遗存中的古 DNA 已经降解成短的片段, 一般仅为 100 ~ 500bp, 只有在特殊的环境条件下, 如快速干燥、低温或高盐浓度的情况下, 才有可能使得较大片段的 DNA 得以保存下来<sup>[4]</sup>。

有研究表明, 在保存状态较好的情况下, 每毫克古代样品中约含 2000 个长约 100bp 的 mtDNA 分子; 保存状态一般的样品中, 古 DNA 的含量则更低, 仅为每毫克组织 10 ~ 40 个分子<sup>[5,6]</sup>。

古 DNA 发生损伤的现象也是普遍存在的。在活的有机体内, 损伤的 DNA 分

子可以通过修复机制得到有效修复，DNA 的完整性能够有效地得以维持<sup>[7]</sup>；但生物死亡后，由自发的水解作用和氧化作用而引起的 DNA 损伤会随着时间的推移逐渐积累，最终导致古 DNA 完整性的丧失。总体来说，古 DNA 损伤包括断链损伤、氧化损伤、DNA 交联和水解损伤四个方面。其中，水解损伤和氧化损伤是引起古 DNA 损伤的主要因素，它们可以引起古 DNA 分子含氮碱基发生如脱氨基、脱嘌呤和脱嘧啶等变化，进而造成 DNA 分子的断裂。除了水解损伤和氧化损伤以外，古 DNA 还面临着断链损伤和 DNA 交联。断链损伤是导致古 DNA 片段变短的重要原因<sup>[8]</sup>，DNA 交联在 PCR 扩增过程中也会严重阻碍 *Taq* 酶作用的发挥。其他诸如 UV-照射、烷基化作用和一些细菌等微生物所释放的酶类也对古代样本中的 DNA 有损伤作用。古 DNA 易发生损伤的位点和机制见图 1-1<sup>[9]</sup>。

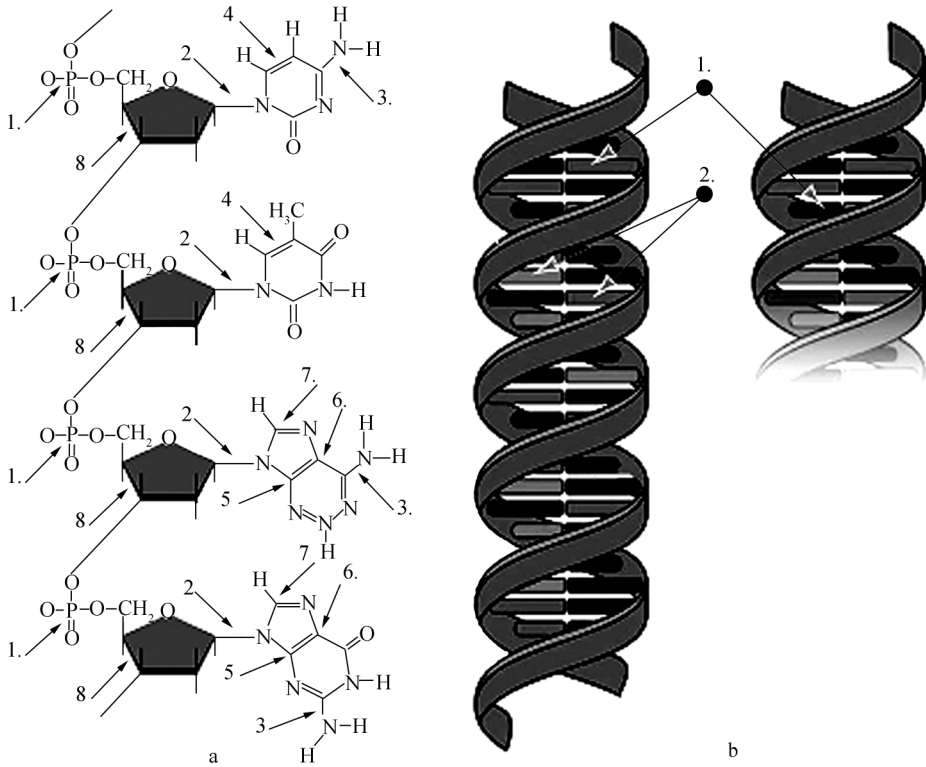


图 1-1 DNA 分子易发生损伤的位点与相关交联<sup>[9]</sup>

- a: 1. 断链水解损伤易发部位；2. 脱碱基易发部位；3. 脱氨基易发部位；4~7. 氧化损伤的碱基破坏部位（攻击碱基的双键，破坏 DNA 分子的完整性）；8. 氧化损伤的糖环上破坏部位
- b: 1. DNA 分子间或 DNA 与蛋白质分子间的交联；2. 两条 DNA 链间的交联

由于古 DNA 样品的种类、时代和所处环境的多样性,古 DNA 的保存状态相差极大。研究表明,恒定低温的环境对古 DNA 的长期保存起着关键作用<sup>[8,10,11,12]</sup>。至 2004 年末,已报道的一些最古老的古 DNA 都是从永冻地带的样本中获得的,包括 5 万年前的猛犸线粒体 DNA<sup>[7]</sup>,6.5 万年前的美洲野牛线粒体 DNA<sup>[13]</sup>,以及 30 万~40 万年前的植物叶绿体 DNA 和 40 万~60 万年前的细菌序列<sup>[14,15]</sup>。Barnes 等<sup>[16]</sup>和 Lambert 等<sup>[17]</sup>的研究证明,从全新世、更新世永冻地带保存的骨骼样本中可以扩增出长度为 900~1000bp 的古 DNA。其他诸如快速干燥、高盐等因素也可以延长古 DNA 的保存时间<sup>[9]</sup>。Poinar 等<sup>[18]</sup>和 Smith 等<sup>[11]</sup>的研究表明,由于水解作用的存在,温带地区的古 DNA (100~500bp)不会保存 1 万年以上;高纬寒冷地区的古 DNA (100~500bp)不会保存 10 万年以上。即使在理想的保存环境下,古 DNA 的保存也不会超过 100 万年<sup>[19]</sup>。

## 二、古 DNA 研究对象

线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA)、叶绿体 DNA (chloroplast DNA, cpDNA)、核糖体 DNA (ribosomal DNA, rDNA) 及其他核 DNA (nuclear DNA, nDNA) 都可以作为古 DNA 研究的对象,其中人类古 DNA 研究主要以线粒体 DNA 和核 DNA 中的 Y 染色体 DNA (Y chromosome DNA, Y-DNA) 为研究对象。

### 1. 线粒体 DNA

如图 1-2 所示,线粒体 DNA 为双链闭合环状分子,由 16 569 个碱基组成,含有 37 个基因。剑桥大学的 Anderson 等于 1981 年完成了对线粒体的全序列测定,并于 1999 年对该序列进行了修订,该序列是目前人类线粒体 DNA 序列多态性比对的标准序列,又被称为 Anderson 序列或剑桥序列<sup>[20]</sup>。

线粒体上的控制区 (control region, CR) 又称 D-环区 (displacement loop region, D-loop),在个体间存在较大差异,有许多单碱基取代和突变,因此又被称为高可变区 (hypervariable region, HVR)。线粒体的碱基多态性主要集中于控制区上的高可变一区 (HVR I, 16 024~16 365) 和高可变二区 (HVR II, 73~340),其中,高可变一区的多态性较好,被普遍用作古 DNA 研究的分子标记。

线粒体 DNA 具有母系遗传、突变率高和多拷贝等特点,因此可以用来反映人群或种族的母系历史,揭示不同种族群体在遗传和演化上的差异,特别是对于人类古 DNA 的研究具有得天独厚的优势。

然而,线粒体 DNA 应用于古 DNA 的研究也存在一些问题:①线粒体 DNA 上的一些突变热点会产生回复突变和再次突变,使突变速率被低估,线粒体 DNA D-环的复制和起始序列上的突变也会降低表面上观察到的突变数;②线粒体 DNA 进化受物种特定的生理因素和生态因素影响,来自不同年龄和不同组织

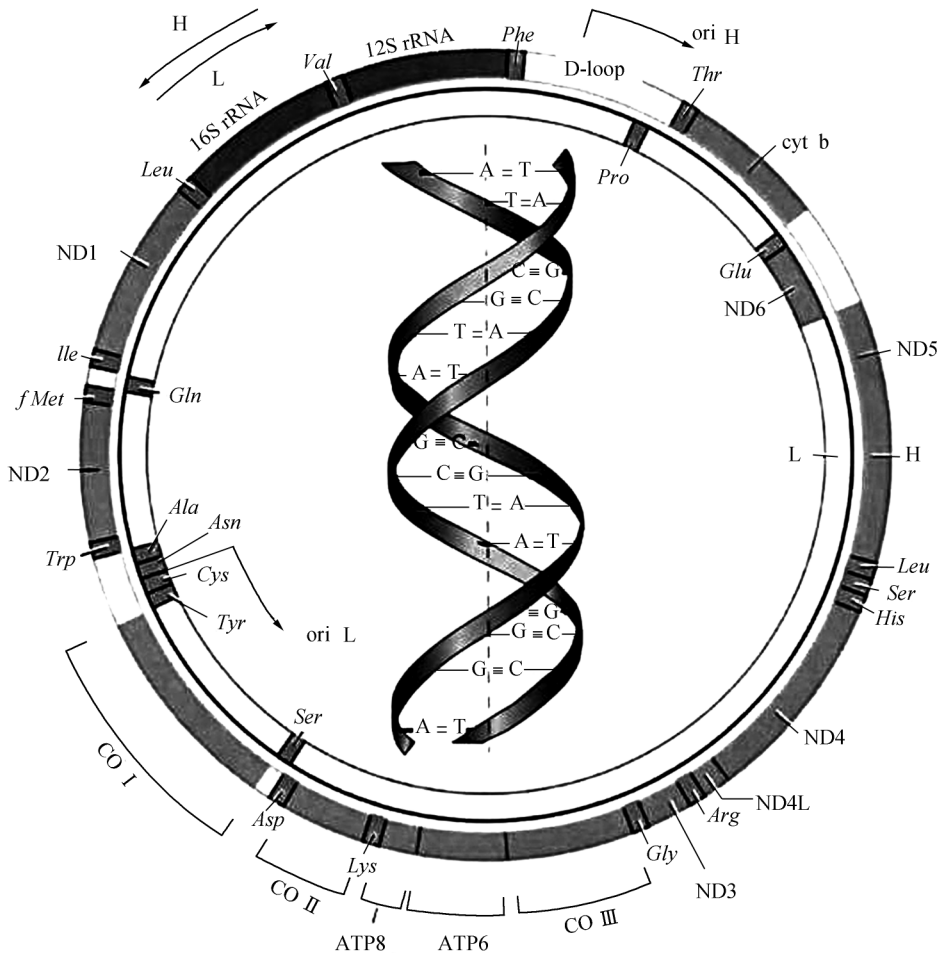


图 1-2 线粒体结构示意图

的线粒体 DNA 存在差异，因此实验取材应尽量一致；③近年来一些数据分析的结果表明，线粒体 DNA 存在重组<sup>[21-23]</sup>，这就给利用线粒体 DNA 进行系统发育分析和群体遗传研究打上了问号。尽管如此，线粒体 DNA 在人类群体遗传研究中仍然不失为一个好的标记，在目前的古 DNA 研究中也仍然是最具优势的。

## 2. Y 染色体 DNA

如图 1-3 所示，Y 染色体由长臂 (Yq) 和短臂 (Yp) 组成，长度约为 60Mb，是线粒体 DNA 的 4000 倍。根据遗传方式不同，Y 染色体分两个区：一个是位于 Y 染色体两端的拟常染色质区 (pseudoautosomal region, PAR)；另一个是占 Y 染色体大部分的 Y 特异区 (Y-encoded)。Y 特异区携带性别决定因子 (sex



determining region Y, SRY), 在减数分裂时不与 X 染色体重组, 只能由父亲传给儿子, 呈稳定的父系遗传。研究群体中 Y 特异区 DNA 的多态性可以追溯过去发生的男性迁移, 重构父系进化史<sup>[24]</sup>。

过去古 DNA 和人类群体遗传研究很少采用 Y 染色体遗传标记, Y 染色体特异性短串连重复序列 (STR) 的发现改变了人们认为其缺乏多态性的观点, 为研究人类近期进化事件提供了新的可能性。由于许多单核苷酸多态性位点 (SNP) 和许多其他新遗传标记的引入, 这种状况已经彻底地改变了<sup>[25]</sup>。SNP 多态性可反映人类历史上的单一突变事件, 且可鉴别 Y 染色体较久远的谱系关系; 而 STR 多态性则表现为更快的突变率, 产生高信息量标记以研究最近的进化事件。利用它们进化率的不同, 可将 Y 染色体非重组区的这两种标记相结合, 研究不同地域和时间范围内的人类进化。Kayser 等关于澳大利亚和美拉尼西亚人群起源的研究<sup>[26]</sup>, 以及 Redd 等关于印第安和澳大利亚人群相关性的研究<sup>[27]</sup>, 均体现了 Y-SNP 和 Y-STR 联合使用在人类学研究中的重要作用。

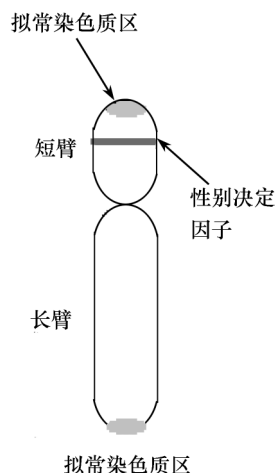


图 1-3 Y 染色体结构示意图

### 三、古 DNA 技术

古 DNA 技术流程主要包括样本采集、样本评估、样本处理、DNA 提取、PCR 扩增、PCR 产物检测、PCR 产物纯化、测序等步骤。以 PCR 扩增过程为界限, 上述步骤可划分为前 PCR 阶段 (pre-PCR) 和后 PCR 阶段 (post-PCR)。此外, 在古 DNA 研究过程中要注意污染的控制, 最终还要对研究结果进行真实性验证。

#### 1. 样本采集

可供古 DNA 研究的资源是比较丰富的, 其中, 大多数为骨骼、牙齿等硬组织, 这些材料来源广泛, 种类和数量较多, 是古 DNA 研究最常见的材料, 也是古 DNA 研究的主要对象。此外, 在特定环境下 (永冻地带或干燥的沙漠) 得以较好保存的肌肉、皮肤、脑、内脏等软组织也是古 DNA 研究中难得的材料, 如埃及的木乃伊、在德国和法国边界发现的距今 5000 多年的“雪人”、博物馆馆藏标本等。一般认为, 古 DNA 的保存状态是: 牙齿优于骨骼、密质骨优于松质骨、骨骼组织优于软组织<sup>[28, 29]</sup>。近年来, 还发现头发中古 DNA 保存污染的可能性比牙齿和骨骼小一些, Gilbert 认为在古 DNA 研究中头发是更好的选择<sup>[30]</sup>。



图 1-4 发掘现场采集样本

在采集过程中，样本采集人员应严格按照防污染标准操作，如图 1-4 所示，必须使用一次性无污染的头套、口罩、手套和器具，骨骼和牙齿样本应选择保存完整、没有任何裂痕的，注意不要用水冲洗，取样后立即用保鲜膜严密包裹，并标明考古编号，然后放入冰柜在  $-20^{\circ}\text{C}$  保存。

## 2. 样本评估

一般说来，一个古代样本能否作为古 DNA 研究的材料，有经验的研究者根据样本的保存年代、保存条件、样本的外观就可以初步确定，但是对样本的保存质量进行定量鉴定还是十分必要的。

由于古 DNA 的含量极微，因此，目前尚无有效的方法直接测定其含量。使用竞争 PCR (competitive PCR) 或实时定量 PCR (real-time quantitative PCR) 能够间接地估计古 DNA 模板的含量<sup>[31, 32]</sup>。但这种方法使用了 PCR 扩增技术，其 DNA 的估计量也可能包括污染的 DNA，因此只有在排除污染的可能性后，才能接受其测量结果。

氨基酸外消旋方法也可以用于样本的质量评估。有机体死亡后，L-氨基酸外消旋变为 D-氨基酸，直到体内的 L-氨基酸和 D-氨基酸达到平衡为止，理论上能够通过对外消旋程度 (D/L) 的检测来评估 DNA 的降解程度，消旋率越高，意味着 DNA 降解的程度越高，DNA 存在的可能性也就越小。不同的氨基酸，其消旋发生的速率是不同的，天冬氨酸 (Asp) 是消旋速率最快的氨基酸，可用于评估 DNA 降解程度。一般认为，天冬氨酸 D/L 值大于 0.08 的古代样本是不能扩增出古 DNA 的。

此外，形态学和组织学相结合的扫描方法、气相色谱/质谱法 (gas chromatography and mass spectrometry, GC/MS) 以及激光切割技术 (laser based microdissection) 等也被尝试用于古 DNA 保存状态的评估。

## 3. 样本处理

骨骼和牙齿是最常见的古 DNA 研究材料，它们长期埋藏在地下，表面会受

到腐蚀以及外源 DNA 的污染，因此首先要除去样本表面损坏和受污染的表层。常用的方法是用电动打磨工具去除骨骼表层 2 ~ 3mm，然后用次氯酸浸泡，最后用液氮冷冻粉碎机将样本粉碎成骨粉备用；牙齿样本不必打磨，直接用次氯酸浸泡，然后粉碎成骨粉即可。

#### 4. DNA 提取

DNA 提取的第一步是破裂细胞，使 DNA 释放出来，然后除去蛋白质和其他可能会干扰 PCR 扩增的化合物。古 DNA 提取的成功与否取决于被提取 DNA 的质量和数量以及 PCR 抑制物是否被完全去除。古 DNA 提取的实验方法主要是参考现代核酸的提取技术获得的，只是在提取缓冲液上做了一些修改，以适应古 DNA 材料的特点和防止污染的要求。

目前普遍用于古 DNA 提取的方法有两大类：苯酚提取法和硅质提取法。苯酚提取法首先用蛋白酶 K 消化标本，在消化过程中加入还原剂巯基乙醇或二硫苏糖醇提高 DNA 得率，随后用酚、氯仿去除蛋白质，最后用乙醇沉淀 DNA 或用透析法浓缩 DNA。然而，有学者认为用这种方法提取 DNA，PCR 抑制剂会与 DNA 一起被抽提出来，影响后面的 PCR 反应。硅质提取法是应用核酸可吸附在硅胶颗粒上的特性，利用硅胶将 DNA 分子从细胞裂解液中纯化出来。此法适用于各种古材料，并已有商业化的试剂盒，优点是可以去除已知或未知的 PCR 抑制物，但缺点是古 DNA 收率较低。实际工作中，应综合评估来选择最佳的古 DNA 提取方法。

对现代 DNA 而言，提取物得到后，一般可以使用电泳或者紫外检验法评估 DNA 质量。但对古 DNA 而言，用这些方法是不行的，其主要原因是：①提取的古 DNA 量太低，无法直接定量；②与古 DNA 一起提取出来的真菌、细菌等外源性 DNA 会干扰结果；③提取物中的褐菌素等化合物也有紫外吸收，会干扰结果。因此一些研究者在提取古 DNA 后跳过定量步骤，直接进行 PCR 扩增。

#### 5. PCR 扩增

古 DNA 的广泛研究得益于聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 技术的发明。PCR 反应的试剂包括热稳定 DNA 聚合酶 (如 *Taq* 酶)、引物、DNA 模板、脱氧核糖核酸三磷酸 (dNTP) 和反应缓冲液；PCR 反应的热循环条件一般包括变性、退火、延伸的循环。

PCR 技术之所以成为古 DNA 研究的理想工具，是因为该技术具有如下优点：①高敏感性，即使在只有一个模板的情况下也能够得到足够的拷贝；②高选择性，使得 PCR 能够在多种 DNA 分子混杂的背景下选择性扩增靶基因序列，从而使研究者能够选择一段具有合适的变异率、适于进化分析的基因进行研究；③高速度，在 PCR 仪上，40 个循环的 PCR 反应程序在 1h 内就可以完成。

## 6. PCR 产物检测

PCR 扩增成功与否需要进行检测, 目前最常采用的方法是将少量的 PCR 扩增产物用琼脂糖凝胶电泳进行检测。对于古 DNA 研究来说, 2% 的琼脂糖凝胶是最合适的。最后使用凝胶成像仪进行观察、分析、记录, 以检测 PCR 扩增情况。

## 7. PCR 产物纯化

PCR 扩增成功后, PCR 反应体系中不仅含有大量的目标 DNA 片段, 而且还存在着一些未完全反应的引物、二聚体、金属离子等杂质, 因此必须对 PCR 产物进行纯化, 去除这些杂质。可采用琼脂糖凝胶电泳的方法将目标 DNA 片段与杂质分离, 然后在紫外灯下切取含目标 DNA 的条带进行下一步回收。

从琼脂糖凝胶中回收 DNA 的方法很多, 如透析袋电洗脱凝胶块法、DEAE-纤维素膜转移法、低熔点琼脂糖凝胶回收法、乙酸铵溶液浸出法、冷冻挤压法等, 此外, 许多生物科技公司开发出了多种回收试剂盒。目前大多数古 DNA 实验室都采用 Qiagen 公司生产的 QIAEX II 琼脂糖凝胶回收试剂盒, 该试剂盒采用硅胶吸附 DNA 片段, 可有效地去除各种杂质, 操作简单、快速, 而且回收质量和效率高, 非常适合于微量、小片段的古 DNA 回收。

## 8. 测序

古 DNA 片段在 PCR 扩增后可以对 PCR 产物进行直接测序, 也可将其克隆到细菌载体中再进行测序。DNA 直接测序的方法主要有化学法 (Gilbert 法) 和链终止法 (Sanger 法), Sanger 法因其迅速、简便而成为目前最常用的方法, 目前普遍采用的 DNA 测序仪也是基于 Sanger 法的原理。DNA 克隆测序可以识别外源 DNA 污染和检查 DNA 损伤, 当测序结果显示多个明显不同的序列时, 表明古代材料受到了外源污染, 如果多个序列仅在个别位点上存在不同, 表明古代材料受到了碱基损伤。但是, 克隆测序的载体细胞自身复制过程可能会改变插入序列, 而且实验步骤也比较繁琐, 得到结果较慢。因此, 目前古 DNA 测序的策略主要采用正反双向直接测序, 同时随机选取若干序列进行克隆测序, 检测直接测序的准确性。

## 9. 污染控制

外源 DNA 的污染问题是古 DNA 研究面临的最大挑战。PCR 的高度敏感性和古 DNA 含量的极其微量性, 导致古 DNA 的研究极易受到现代 DNA 污染。很多早期阶段的古 DNA 数据, 后来证明多是现代 DNA 污染后得到的结果, 其中典型的例子是恐龙 DNA<sup>[33]</sup> 和琥珀中昆虫 DNA<sup>[34]</sup> 的研究报告。

外源 DNA 的污染按时间先后可分为埋葬污染、发掘污染和实验室污染。埋葬污染是在个体埋葬过程中，遗骸沾染了其他个体的血液、尿液等导致的污染，特别是在多人合葬和二次重葬的情况下，极易发生个体间的相互污染。而发掘污染主要是指在发掘、运输和保存过程中，考古学家、发掘者、博物馆工作人员脱落的表皮细胞、头屑、汗液、毛发和唾液气溶胶中的 DNA 对样本的污染，这也是古 DNA 样本所面临的主要污染之一。实验室污染可分为两种情况：一种是由实验者和不洁的实验用具、试剂造成的 DNA 污染；另一种是由 PCR 扩增产物气溶胶造成的交叉污染，在实验过程中比较剧烈地摇动微量离心管、开盖、反复吸样等都可以形成气溶胶，而一个气溶胶颗粒可含 48 000 个 DNA 拷贝，PCR 产物气溶胶若偶然转移到含有 DNA 样品、正准备进行扩增的微量离心管中，就会经过大量扩增而造成严重污染，扩增反应次数越多，交叉污染的可能性就越大，因而由其造成的污染是一个特别值得重视的问题。对于埋葬污染目前并无好的解决方案，我们只能通过分析在埋葬时发生了什么，从而推测最终得到的 DNA 的可信性，不过幸好这种污染现象极少发生。对于发掘污染和实验室污染，如果防护得当是可以避免的。

在发掘过程中，样本采集人员应严格按照防污染标准操作，必须使用一次性无污染的头套、口罩、手套和器具，骨骼和牙齿样本应选择保存完整、没有任何裂痕的，注意不要用水冲洗，取样后立即用保鲜膜严密包裹，然后放入冰柜在  $-20^{\circ}\text{C}$  保存，并尽快进行古 DNA 实验。

对古 DNA 实验室也有特殊的要求。一定要与现代分子生物学实验室分离，防止现代 DNA 的污染。古 DNA 研究的前 PCR 阶段和后 PCR 阶段也必须在空间上分开进行，避免后 PCR 阶段的大量 DNA 污染前 PCR 阶段的极少量 DNA。有条件的最好根据古 DNA 的实验流程把实验室进一步分隔成不同的房间，并保证人员和样品流动的方向是单向的，每个房间都配备独立的紫外线消毒、正压空气过滤系统和配有紫外灯的正压气流超净台。

在实验过程中要采取严格的防污染措施。例如，实验操作者应穿戴一次性无污染的头套、口罩、手套、鞋套，身穿经紫外灭菌的实验服，实验中随时更换手套；实验操作台应经过紫外灯照射，并随时用次氯酸擦拭；样本材料要经过表面打磨、紫外照射或次氯酸浸泡之后方能用于实验；各实验阶段的设备不能混用；实验所用耗材应为一次性并经过高温高压灭菌，需多次使用的器材也要选择容易去污染的种类；实验试剂要保证不含外源 DNA。

## 10. 古 DNA 的真实性

1994 年以后，越来越多的研究表明，许多原来报道的古 DNA 数据其实是 DNA 污染的结果，古 DNA 的真实性问题逐渐受到科学家们的重视。经过多年的

研究和完善,现在已经建立了古 DNA 研究污染检测与数据真实性的判别标准:

(1) 专门的古 DNA 实验室:有与分子生物学实验室物理上隔离的专门的古 DNA 实验室,而且前 PCR 阶段与后 PCR 阶段的工作区也应该是分开的。操作者工作路线应该是前 PCR 工作区→后 PCR 工作区。

(2) 空白对照:DNA 抽提和 PCR 扩增均要设置一个或多个空白对照。

(3) 序列的长度标准:扩增 DNA 片段长度与扩增效率呈反比,古 DNA 的 PCR 产物不能超过 1000bp。

(4) 模板 DNA 分子定量:应用实时定量 PCR 检测初始模板的数量,当模板数小于 1000 时,不能忽视污染的可能性和 PCR 扩增中的碱基错配现象。

(5) 多次抽提和 PCR 扩增:同一样本必须进行多次抽提和 PCR 扩增,且均获得相同的古 DNA 序列。

(6) 克隆测序:通过克隆分析而获得的多种序列可以帮助评价损伤、检测污染与核插入。

(7) 独立重复实验:古 DNA 实验应在不同的实验室独立进行,由不同的实验者操作,实验结果一致才是真实可靠的。

(8) 生化保存状态:应用各种不同的方法(如氨基酸外消旋法、组织切片、显微观察等)判别样本保存状态的好坏。

(9) 相关遗骸古 DNA 分析:与人类遗骸一同出土的动物遗骸可以提供有关 DNA 幸存的证据,提供样本保存环境方面的支持,而且可以作为人类 PCR 反应的阴性空白对照。

(10) 系统发育分析:所获得的古 DNA 序列应与其关系密切的现代生物的同源 DNA 序列相似但又不完全相同,并在重建的系统树上具有系统学意义和较高的再抽样自检值。

## 四、古 DNA 数据分析

通过测序可以获得 DNA 一级结构的信息,但 A、C、T、G 四种碱基的排列次序本身并不能说明有关个体之间、种群之间的遗传关系,因此必须对所得序列进行数据分析。现今,有多种数据分析方法被应用于古 DNA 的研究中,这些方法主要包括系统发育分析、多维度分析、主成分分析等。

### 1. 系统发育分析

系统发育分析可以从分子水平上探讨群体进化规律,并可将这些规律以直观、形象的系统发育树形式呈现出来。对古 DNA 序列进行系统发育分析,可以用来检测过去根据形态学和免疫学资料所建立的谱系假说;将古代人群数据和丰富的现代人群数据相结合进行分析,可以校正仅通过现代人群 DNA 序列所建立

的生物谱系的拓扑结构。

系统发育分析的方法有距离法、最大简约法、最大似然法，其中，距离法又包括 UPGMA 法、最小二乘法、最小进化法与邻接法。

## 2. 多维度分析

多维度分析是以图形表示对象在多维空间中的关系，从而直观形象地推断出群体间遗传关系的远近。

当人群的亲缘关系很近时，不同的构树方法所得的系统发育树在分支上总是或多或少存在差别，但是在理论上却无法判定哪种系统发育树更为合理可信。利用多维度分析可以克服系统发育树构树方法中的许多问题，既可以验证所构建的系统发育树的准确性，也可以弥补构树方法的不足。两种方法相互验证，以此得出更为准确的实验结论。

## 3. 主成分分析

主成分分析是通过降维技术把多个变量化为少数几个主成分（即综合变量），对主成分作散点图，能从直观上反映出样品的绝大部分信息，在探索性数据分析中非常有用。

在多数实际问题中，当我们对同一个体进行多项观察时，必定涉及多个随机变量，由于指标较多及指标间有一定的相关性，势必增加分析问题的复杂性，这时就需要借助主成分分析来概括诸多信息的主要方面。主成分分析的实质就是将样本的多个指标化为少数几个指标的一种多元统计方法。

上述不同的分析方法获得的结果不尽相同，目前还没有一种方法可以适合于所有的数据和条件，然而多种方法联合使用可以消除使用单一方法带来的误差，因此对古 DNA 数据进行分析时普遍采用几种方法同时分析。

# 第二节 古 DNA 研究的历史与现状

## 一、古 DNA 研究历史

自 1984 年 Higuchi 等创立古 DNA 研究技术至今，古 DNA 的研究历史大致可以划分为三个阶段。

### 1. 1984 ~ 1989 年

有关古 DNA 的研究工作最早可追溯到 1980 年，我国科学家从长沙马王堆汉墓出土的古尸中成功分离并鉴定出核酸分子。然而真正里程碑式的工作应首推 1984 年 Higuchi 等对斑驴的研究，他们从博物馆中距今约 150 多年的斑驴的皮肤

上, 提取出了少量的线粒体 DNA, 将两段线粒体 DNA 序列与马、驴和斑马的相关序列进行比较, 发现斑驴与斑马的亲缘关系最近, 而与马或驴的亲缘关系较远<sup>[1]</sup>。这一研究成果在 *Nature* 上一经发表, 就引起了极大的轰动, 这充分证明了古 DNA 研究的可行性和重要性。1985 年, Paabo 运用分子克隆技术从距今 2400 多年的 23 具埃及木乃伊中成功获得了古 DNA<sup>[35]</sup>, 进一步证明了生物遗骸中古 DNA 存在的可能性, 开创了古 DNA 研究的崭新领域。

## 2. 1989 ~ 1994 年

1986 年, 美国科学家 Mullis 等发现并创立了划时代的 PCR 技术, 它能够灵敏、高效、特异性扩增上百万的目的 DNA 片段, 使古代材料中微量的 DNA 在很短的时间内得以大量扩增, 这一技术为古 DNA 的研究带来了革命性的进展。1989 年, Paabo 等率先采用 PCR 技术代替常规克隆技术进行古 DNA 的研究<sup>[36]</sup>, 此后古 DNA 研究在世界范围内掀起了热潮, 许多研究成果陆续完成。

## 3. 1994 年至今

1994 年以后, 越来越多的研究表明, 先前报道的一些古 DNA 序列其实是 DNA 污染的结果, 这使得科学家们不得不开始考虑古 DNA 的真实性问题, 甚至有人认为所有得到的古 DNA 都有可能是一些污染的 PCR 产物<sup>[37]</sup>。此后在 1997 年和 2000 年, 先后对两例尼安德特人线粒体 DNA 进行了研究<sup>[38, 39]</sup>, 结果表明, 两例尼安德特人的遗传关系十分接近, 并在分支树上明显地与现代人分开, 因此其不太可能是现代人 DNA 的污染。特别是 2000 年对第二例尼安德特人的研究, 分别在苏格兰格拉斯哥大学和瑞典斯德哥尔摩大学同时进行, 得到了相同的结果, 这更加证明了其古 DNA 存在的可靠性。但是为了防止外源 DNA 污染, 保证古 DNA 序列的真实可靠, 科学家们正在建立并完善一系列古 DNA 序列真实性的甄别标准。

# 二、古 DNA 研究现状

古 DNA 技术从诞生之日起就被广泛用于人类学、考古学、古生态学、群体遗传学、动物系统学、植物系统学、保护生物学和法医学等领域<sup>[40~42]</sup>。下面主要从人类资源古 DNA 和非人类资源古 DNA 两方面阐述考古学、人类学方面的古 DNA 研究现状。

## 1. 人类资源古 DNA 研究现状

### 1) 个体水平研究

古 DNA 技术在个体水平上主要应用于性别鉴定、遗传疾病分析和个体确认



三个方面。

首先，X 染色体和 Y 染色体上的遗传标记可以帮助考古学家、人类学家对古代遗存进行性别鉴定，尤其是那些用形态学方法不好确定的个体，比如婴儿或残缺不全的古代遗存<sup>[43]</sup>。例如，1997 年在以色列南部古阿什卡隆（Ashkalon）的一个墓地发掘出一个浴室，在这个浴室的后面，考古学家发现 100 多具婴儿的残骸。起先考古学家解释这些残骸可能是被抛弃的女婴，因为在古阿什卡隆普遍存在这种现象，但是他们无法解释后来发现的一些有色情画的灯和招牌。Faerman 等对其中 19 例婴儿遗存进行性别鉴定表明，这 100 多具婴儿遗存中有很多是男婴，于是推测这里实际上是个妓院，这些婴儿很有可能是那些妓女的孩子<sup>[44]</sup>，古阿什卡隆浴室之谜终于真相大白。Lassen 等对 Aegerton 墓地 121 例婴儿遗存所进行的性别鉴定<sup>[45]</sup>，也是古 DNA 技术在这方面应用的典型例子。

其次，古 DNA 技术也可用于古代样本遗传疾病的检测与分析。具有遗传疾病的古代遗存个体，其相应的 DNA 可以用古 DNA 技术提取并扩增出来，进而分析 DNA 突变特征与相应遗传疾病的关系<sup>[46, 47]</sup>，但这方面的研究需要注意有关伦理方面的一些问题。

最后，通过与其后代 DNA 进行比较，古 DNA 技术还可用于古代遗存的个体确认。这方面的研究很多，比如 Jehaes 等对“路易十七”身份的确认<sup>[48]</sup>就是这方面研究的典型案例。

## 2) 家庭或家族水平研究

人类学研究中，通过对家系内母系血缘、父系血缘世系的确立以及特殊家庭之间关系的了解，可以分析当时的社会结构、婚嫁模式乃至史前社会的丧葬习俗等人类学问题。血缘关系可以通过丧葬模式或形态相似性进行分析，但若有古 DNA 数据的支持，则可以直接建立其血缘关系<sup>[49]</sup>。Shinoda 等对日本 Jomon 时代 Nakazuma 墓地中 29 个个体的牙齿进行了线粒体 DNA 研究，得到了 9 个不同序列，其中 17 个个体共享一个序列，表明这一墓地基本上是一个母系墓地<sup>[50]</sup>，这一结果对 Jomon 时代的考古学研究很有意义；同时，他们又将这些序列与现代日本人的序列进行了比较，发现古 DNA 序列的多样性与现代人相同，系统发育分析表明，Jomon 时代古 DNA 序列分散于现代人之中，未形成特殊束，说明在 Nakazuma 的 Jomon 时代的人群就已不是一个同源的群体，从遗传上反驳了日本人的双起源学说。Gerstenberger 等对发掘于德国 St. Margareth 教堂墓地的 Konigsfeld 伯爵家庭谱系的确定<sup>[51]</sup>，也进一步显示了古 DNA 技术在家系确认上的优势。

## 3) 人群水平研究

一个人群的遗传学变化是从其祖先人群继承下来的，因此，现代人群与其祖先人群具有相似的遗传标记频率。此外，某些遗传标记在不同人群间是有特征性分布的，这样的遗传标记可作为两个人群间亲缘关系的指示性标记。在能大量获

得古人类个体的前提下，史前的人口迁徙情况、人群的连续性发展和人群代替问题，均可以用古 DNA 技术分析说明<sup>[41]</sup>。首先，在一个较小而确定的地域范围内，古 DNA 技术可以分析人群连续性和人群替代等问题；其次，在较为广泛的地域范围里，用古 DNA 技术可以研究在大洲范围内的人群迁徙。

语言学、考古学方面的证据都表明，美洲现在的一些人群是史前迁入美洲的<sup>[52, 53]</sup>，远古时期的古印第安人（美洲的第一批印第安居民）和现代的土著美洲人在形态学上的区别是很明显的<sup>[54]</sup>，因此一些学者认为美洲大陆上的这些原始拓荒者不是现在的土著美洲印第安人的祖先<sup>[55]</sup>。然而，对大多数古代个体线粒体 DNA 的初步分析表明：古印第安人线粒体 DNA 单倍型组类型在当代土著美洲人群中有着广泛的分布<sup>[56]</sup>。这暗示尽管存在形态学上的差异，美洲大陆的远古拓荒者与现代土著美洲人群之间在演化上也一定是连续的。

过去考古学、语言学和遗传学的证据似乎都证明：太平洋美拉尼西亚（Melanesia）岛上的人种可能起源于东南亚岛屿（可能为中国的台湾省），并称之为通往波尼西亚（Polynesia）的“特快列车”。但是，Hagelberg 从美拉尼西亚岛与当地文化有关的古代埋藏品中提取出了线粒体 DNA，在古 DNA 中没有发现原来所说的 9bp 线粒体 DNA 的缺失，如果这一发现是正确的，可能表明古美拉尼西亚人不是“特快列车”上的乘客，而只是先前存在的古美拉尼西亚人种的积累<sup>[57]</sup>。

在人类起源和进化方面，古 DNA 技术的最主要的成就是对尼安德特人进化地位的阐明。尼安德特人是距今 12 万 ~ 3 万年末次冰川期居住在欧洲和西亚的原始人种，简称尼人。最早发现的尼人化石是 1848 年出自直布罗陀的一个颅骨，但当时并未引起重视。1856 年 8 月，又在德国尼安德特河谷（Neander valley）的一个山洞里发现了一个成年男性的颅顶骨和一些四肢骨骼的化石，尼安德特人因此得名。在这以后，尼人的化石开始在西起西班牙和法国，东到伊朗北部和乌兹别克斯坦，南到巴勒斯坦，北到北纬 53 度线的广大地区被大量地发现。起初许多学者怀疑尼安德特人是化石人类，以致把他们当作现代人的病态类型、最低能的人或者是古代野蛮种族，因而尼安德特人在进化中的地位未得到肯定。此外，对于尼安德特人和我们现代人的祖先是否有过接触也展开了激烈的争论，并持续了很长时间。

Krings 等成功地从德国出土的尼安德特人骨骼化石中提取出 DNA，通过对短的 DNA 片段进行重叠扩增和序列克隆测定后，得到了一条迄今为止在现代人中未见报道的线粒体 DNA 序列。与现代人线粒体 DNA 序列进行比较分析和系统发育分析表明，尼安德特人与现代人序列差异极大。在 378 个碱基片段中，尼安德特人同现代人的差异是 27 个（现代人与现代人的平均差异是 8 个，现代人同大猩猩的差异是 55 个），这说明尼安德特人与现代人的祖先相距甚远，是介于现代人和黑猩猩之间的过渡类型。他们认为在 50 万 ~ 60 万年前尼安德特人的祖先就

与人类的祖先在系统演化树上分离, 因此推测尼安德特人不是现代人的祖先, 并支持现代人非洲起源假说<sup>[38]</sup>。该项研究成果在 1997 年被评为世界十大科技进步奖。之后, Krings 等<sup>[58]</sup>又成功地从该化石中得到了线粒体 DNA 高可变二区序列, 结合他们前期报道的线粒体 DNA 高可变一区序列的分析, 结果表明尼安德特人在现代人类起源之前就很可能绝灭了, 因而没有对现代人类的线粒体 DNA 基因库作出贡献。对从北高加索出土的距今约 29 000 年的另一个尼安德特人化石 DNA 的分析表明: 该尼安德特人的线粒体 DNA 与 Krings 等报道的尼安德特人的类似, 而与现代人类的线粒体 DNA 不同<sup>[39]</sup>。这一发现进一步支持尼安德特人在消亡之前并没有对现代人类线粒体 DNA 基因库有贡献的观点。此后, 研究人员又陆续进行了更多有关尼安德特人的研究<sup>[59~73]</sup>。近来, Green 等通过高通量测序技术, 从 0.3g 38 000 年前的尼安德特人骨骼中获得全部 mtDNA 序列, 并进一步将现代人与尼安德特人的 mtDNA 谱系分化时间推断为  $660\ 000 \pm 140\ 000$  年<sup>[74]</sup>。此后, 该研究小组又对 5 个尼安德特人的全线粒体序列进行测定, 发现生活在 38 000 ~ 70 000 年前的尼安德特人的遗传多样性是同时期现代人的三分之一<sup>[75]</sup>, 为揭示尼安德特人的历史及其与现代人的关系提供了重要依据。

## 2. 非人类资源古 DNA 研究现状

对远古人类生活环境的重建是史前历史学家研究的课题之一。通过对史前人们居住的生态系统的重建, 可以了解当时古人的文化适应情况, 包括食物获取行为、季节性迁徙行为和动植物的驯养行为等。过去主要用确认动植物群落、动物区系遗存的方法进行环境重建, 用某些物种优选的栖息地推断局部环境的生态状况, 因此, 对动植物遗存进行准确的确认在环境重建方面是至关重要的。然而, 对考古学遗存进行动植物物种的确认经常是不准确的<sup>[76]</sup>。此外, 遗传学上有密切联系但形态学上明显不同的物种, 其生存环境往往也是不同的。在这种情况下, 用古 DNA 技术对考古学遗存进行物种的准确分类, 对重建局部生态环境是必不可少的。Barnes 等利用古 DNA 技术对 Lincolnshire 两个考古地点的 6 个鹅种进行了物种确认, 结果表明, 当时的盎格鲁撒克逊人 (7 ~ 12 世纪) 既从事猎禽活动, 也从事野生鸟的驯化管理<sup>[77]</sup>。

有关捕猎动物物种的鉴定、动植物的驯化过程等方面的研究很多, 史前人类进行动植物驯化或通过迁徙把某地的动植物带到其他地域是不争的历史事实, 因此, 通过对考古学发现的动物区系内遗存的 DNA 进行分析, 可以追踪史前人类的迁徙情况。Matisoo-Smith 和 Allen 的研究表明, 太平洋老鼠 (*Rattus exulans*) 是由第一批来太平洋岛屿的拓荒者带来的<sup>[78]</sup>。通过分析这种横跨太平洋岛屿与人类共生物种的分子多态性, 他们阐明了首批拓荒者的迁徙路径和史前太平洋岛屿上玻利尼西亚人的相互作用模式。

通过对古代样本微生物的调查, 人类学家、考古学家可以推断某些物种灭绝的原因。极地永冻地带发现的某些种类的大型哺乳动物样本为开创这方面的研究创造了条件; 古代埃及木乃伊不但可以用来分析新石器时代以来的埃及人群的基因频率多态性, 也可以用来研究同时代的 DNA 病毒的进化。古代微生物 DNA 的确定为古代传染病及其传播方式、影响范围以及病原体与宿主之间的相互作用的研究开创了一条新途径。

总之, 古 DNA 技术从诞生之日起就在人类学的研究领域发挥着重大作用, 解决了很多用传统人类学研究手段所无法解决的重大问题。今后, 古 DNA 的研究还要致力于在方法技术上取得突破, 以便能够研究年代更为久远的古代样品, 并从中获得更为丰富的信息。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Higuchi R, Bowman B, Freiberger M, et al. DNA Sequences from the Quagga, an Extinct Member of the Horse Family. *Nature*, 1984, 312: 282 - 284.
- [ 2 ] 王贵海, 陆传宗. 长沙汉墓古尸肝脏中核酸的分离与鉴定. *生物化学与生物物理进展*, 1981, 39: 70 - 75.
- [ 3 ] 俞国琴, 郑云飞, 石春海, 等. 古 DNA 及其在生物系统与进化研究中的应用. *植物学通报*, 2005, 22 (3): 267 - 275.
- [ 4 ] Marota I, Rollo F. Molecular paleontology. *Cell Mol Life Sci*, 2002, 59: 97 - 111.
- [ 5 ] Wayne R K, Leonard J A, Cooper A. Full of sound and fury: the recent history of ancient DNA. *Annu Rev Ecol Systemat*, 1999, 30: 457 - 477.
- [ 6 ] Paabo S, Irwin D M, Wilson A C. DNA damage promotes jumping between templates during enzymatic amplification. *J Bio Chem*, 1990, 265: 4718 - 4721.
- [ 7 ] Hoss M, Paabo S, Vereshchagin N K. Mammoth DNA sequences. *Nature*, 1994, 370: 333.
- [ 8 ] Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, 1993, 362: 709 - 715.
- [ 9 ] Hebsgaard M B, Phillips M J, Willerslev E. Geologically ancient DNA: fact or artefact? *Trends microbial*, 2005, 13 (5): 212 - 220.
- [ 10 ] Hofreiter M, Serre D, Poinar H N, et al. Ancient DNA. *Nature Rev Genet*, 2001, 2: 353 - 360.
- [ 11 ] Smith C I, Chamberlain A T, Riley M S, et al. Neanderthal DNA: not just old but old and cold? *Nature*, 2001, 10: 771, 772.
- [ 12 ] Willerslev E, Hansen A J, Poinar H N. Isolation of nucleic acids and cultures from ice and permafrost. *Trends Ecol Evol*, 2004, 19: 141 - 147.
- [ 13 ] Gilbert M T, Wilson A S, Bunce M, et al. Ancient mitochondrial DNA from hair. *Curr Biol*, 2004, 14: 463, 464.
- [ 14 ] Willerslev E, Hansen A J, Brand T B, et al. Diverse plant and animal DNA from Holocene

- and Pleistocene sedimentary records. *Science*, 2003, 300: 792 – 795.
- [15] Willerslev E, Hansen A J, Brand T B, et al. Long-term persistence of bacterial DNA. *Curr Biol*, 2004, 14: 9, 10.
- [16] Barnes I, Matheus P, Shapiro B, et al. Dynamics of Pleistocene population extinctions in Beringian brown bears. *Science*, 2002, 295: 2267 – 2270.
- [17] Lambert D M, Ritchie P A, Millar C D, et al. Rates of evolution in ancient DNA from Adélie penguins. *Science*, 2001, 295: 2270 – 2273.
- [18] Poinar H N, Hoss M, Bada J L, et al. Amino acid racemization and the preservation of ancient DNA. *Science*, 1996, 272 (5263): 864 – 866.
- [19] Willerslev E, Cooper A. Ancient DNA. *Proc Biol Sci*, 2005, 272 (1558): 3 – 16.
- [20] Anderson S, Bankier A T, Barrell B G, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 1981, 290: 457 – 465.
- [21] Awadalla P, Eyre-Walker A, Smith J M. Linkage disequilibrium and recombination in hominid mitochondrial DNA. *Science*, 1999, 286: 2524, 2525.
- [22] Eyre-Walker A, Smith N H, Smith J M. How clonal are human mitochondrial. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 1999, 266 (1418): 477 – 483.
- [23] Hagelberg E, Goldman N, Lio P, et al. Evidence for mitochondrial DNA recombination in a human population of island Melanesia. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 1999, 266 (1418): 485 – 492.
- [24] Foster E A, Jobling M A, Tayler P G, et al. Jefferson fathered slave's last child. *Nature*, 1998, 396: 27, 28.
- [25] Kayser M, Krawczak M, Excoffier L, et al. An extensive analysis of Y-chromosomal microsatellite haplotypes in globally dispersed human populations. *Am J Hum Genet*, 2001, 68 (4): 990 – 1018.
- [26] Kayser M, Brauer S, Weiss G, et al. Independent histories of human Y chromosome from Melanesia and Australia. *Am J Hum Genet*, 2001, 68: 173 – 190.
- [27] Redd A J, Roberts-Thomson J, Karafet T, et al. Gene flow from the Indian subcontinent to Australia: evidence from the Y chromosome. *Curr Biol*, 2002, 12: 673 – 677.
- [28] Herrmann B, Hummel S. *Ancient DNA: Recovery and Analysis of Genetic Material from Paleontological, Archaeological, Museum, Medical and Forensic Specimens*. New York: Springer Verlag, 1994: 15 – 28.
- [29] MacHugh D E, Edwards C J, Bailey J F, et al. The extraction and analysis of ancient DNA from bone and teeth: a survey of current methodologies. *Ancient Biomolecules*, 2000, 3: 81 – 103.
- [30] Handt O, Krings M, Ward R H, et al. The retrieval of ancient human DNA sequences. *Am J Hum Genet*, 1996, 59: 368 – 376.
- [31] Handt O, Richards M, Trommsdorff M, et al. Molecular genetic analyses of the Tyrolean Ice Man. *Science*, 1994, 264: 1775 – 1778.
- [32] Handt O, Krings M, Ward R H, et al. The retrieval of ancient human DNA sequences. *Am J*

- Hum Genet, 1996, 59: 368 – 376.
- [33] Woodward S R, Weyand N J, Bunnell M. DNA sequence from Cretaceous period bone fragments. *Science*, 1994, 266: 1229 – 1232.
- [34] Cano R J, Poinar H N, Pieniazek J, et al. Amplification and sequencing of DNA from a 120-135-million-year-old Weevil. *Nature*, 1993, 363: 536 – 538.
- [35] Paabo S. Molecular cloning of ancient Egyptian mummy DNA. *Nature*, 1985, 314: 644, 645
- [36] Paabo S, Higuchi R G, Wilson A C. Ancient DNA and the polymerase chain reaction. *Journal of Biological Chemistry*, 1989, 264: 9706 – 8712.
- [37] Rollo F, Asci S A, Marota L, et al. Molecular ecology of a Neolithic meadow: the DNA of the grass remains from the archeological site of the Tyrolean iceman. *Experientia*, 1994, 50: 576 – 584.
- [38] Krings M, Stone A, Schmitz R W, et al. Neandertal DNA sequences and the origin of modern humans. *Cell*, 1997, 90: 19 – 30.
- [39] Ovchinnikov I V. Molecular analysis of Neanderthal DNA from the northern Caucasus. *Nature*, 2000, 404: 490 – 493.
- [40] Chelomina G N. Ancient DNA. *Genetika*, 2006, 42: 293 – 309.
- [41] Kaestle F A, Horsburgh K A. Ancient DNA in anthropology: methods, applications, and ethics. *Am J Phys Anthropol*, 2002, 35: 92 – 130.
- [42] Briggs D E G. Molecular taphonomy of animal and plant cuticles: selective preservation and diagenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 1999, 354: 7 – 16.
- [43] Schutkowski H. Sex determination of infant and juvenile skeletons: I. morphognostic features. *Am J Phys Anthropol*, 1993, 90: 199 – 205.
- [44] Faerman M, Bar-Gal G K, Filon D, et al. Determining the sex of infanticide victims from the late Roman era through ancient DNA analysis. *J Archaeol Sci*, 1998, 25: 861 – 865.
- [45] Lassen C, Hummel S, Herrmann B. Molecular sex identification of stillborn and neonate individuals ( “Traufkinder” ) from the burial site. *Aegerten Anthropol Anz*, 2000, 58: 1 – 8.
- [46] McKusick V A. Lincoln, Abraham and Marfan-syndrome. *Nature*, 1991, 352: 280.
- [47] Reilly P R. Abraham Lincoln’s DNA and Other Adventures in Genetics. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000: 13 – 15.
- [48] Jehaes E, Decorte R, Peneau A, et al. Mitochondrial DNA analysis on remains of a putative son of Louis XVI, King of France and Marie-Antoinette. *Eur J Hum Genet*, 1998, 6: 383 – 395.
- [49] Stoneking M. Ancient DNA: how do you know when you have it and what can you do with it? *Am J Hum Genet*, 1995, 57: 1259 – 1262.
- [50] Shinoda K, Satoru K. Intracemetery genetic analysis at the Nakazuma Jomon Site in Japan by mitochondrial DNA sequencing. *Anthropological Science*, 1999, 107 (2): 129 – 140.
- [51] Gerstenberger J, Hummel S, Schultes T, et al. Reconstruction of a historical genealogy by means of STR analysis and Y-haplotyping of ancient DNA. *Eur J Hum Genet*, 1999, 7: 469 – 477.