

一种实用可靠的古代 DNA 获取方法 *

刘冉冉¹⁾ 袁 靖³⁾ 赵兴波^{1,2)**} 李 宁^{1)**}

⁽¹⁾中国农业大学农业生物技术国家重点实验室, 北京 100193; ⁽²⁾中国农业大学动物科技学院, 北京 100193;

⁽³⁾中国社会科学院考古研究所, 北京 100710)

摘要 古代 DNA 序列信息能够为物种演化研究提供最直接的分子证据, 但获取古代 DNA 的技术仍存在诸多瓶颈, 尤其是扩增中存在受损伤 DNA 模板的干扰、获取成本高和实验周期长等问题. 改进了异丙醇沉淀提取法, 并采用了尿嘧啶糖苷酶(UNG)去除受损伤 DNA 模板后进行扩增的方法, 最终可以高效地获取真实的古代 DNA 序列. 实验利用距今 4 300~3 900 年前的猪牙样本, 将改进的古 DNA 获取方法与常规方法进行比较研究, 结果表明, 改进的异丙醇沉淀法提取结合 UNG 处理后进行 PCR 扩增的方法, 可以在保证古代 DNA 获取成功率并提高获得的 DNA 序列可靠性的前提下, 将经费投入和实验周期都各减少至常规方法的 50% 以下. 这可以为开展大规模古代样本检测提供一种切实可行的 DNA 获取方法.

关键词 古代 DNA, DNA 提取, 受损伤 DNA, PCR

学科分类号 Q751

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00133

获取古代生物遗骸中的 DNA 信息, 能够为物种演化提供最直接的分子证据, 完善我们利用现代生物分子信息推断出的历史认识. 特别在群体遗传学研究中, 古代 DNA 技术具有极大的应用潜力. 已有的对棕熊、企鹅、穴熊及家养动物猪、马、狗和牛的研究, 揭示了大量的史前生物群体演化及迁徙事件^[1~8]. 然而, 由于生物死后核酸酶的降解和埋藏地质环境中氧化水解等作用对 DNA 的极端破坏, 古代 DNA 具有含量少、片段短和受损严重的特点^[9, 10], 所以其获取技术也具有较高难度. 此外, 大规模检测古代样本 DNA 时, 耗时长、成本高^[11].

其中, 古代 DNA 提取方法的变革, 经历了从最早的酚仿抽提法^[12]到硅粒法^[13, 14], 再到硅离心柱法(商业化试剂盒提取)的过程. Yang 等^[15]研究表明, 硅离心柱法相对于酚仿抽提法, 可以有效地去除样本中包含的 PCR 抑制物, 提高古代 DNA 的获取成功率. 但是, 基于生物群体的研究通常需要开展大规模样本检测, 这时利用商业化试剂盒, 需要的成本较高.

在扩增方法上, 瓶颈之处是如何避免受损伤 DNA 模板干扰扩增. DNA 损伤的类型多种多样,

其中碱基缺失^[16]和碱基修饰类的损伤^[16, 17]都会终止 PCR 反应, 而由于碱基脱氨基造成的一类错配损伤, 虽不会终止扩增反应, 却会在扩增中引入错误的碱基, 严重制约着真实古代 DNA 序列的获得^[18, 19].

已有研究表明, 将扩增产物克隆测序后, 比对多克隆序列间的一致性, 可以在一定程度上检测到错配损伤的存在, 即同一扩增产物获得的多克隆序列间存在较多不一致性位点^[19, 20]. Hofreiter 等^[19, 21]提出了两种可以避免受损模板干扰的扩增方法: 第一种是, 两次或多次独立扩增后分别进行克隆测序, 比对多克隆序列, 获得最终的保守序列即为真实的古代 DNA 序列; 第二种是, 用尿嘧啶糖苷酶(UNG)去除 II 型损伤模板后再进行扩增, 以提高扩增准确率, 因为古代 DNA 抽提产物中, II 型错配损伤(C→T/G→A)占绝大部分^[22]. Hofreiter 等^[19]

* 国家重点基础研究发展计划项目(973)(2006CB102100)和国家科技支撑计划课题(2006BAK21B03)资助.

** 通讯联系人.

李宁. Tel: 010-62733323, E-mail: ninglcau@cau.edu.cn

赵兴波. Tel: 010-62733417, E-mail: zhxb@cau.edu.cn

收稿日期: 2009-03-09, 接受日期: 2009-06-29

推荐使用第一种方法,因为他们推断:UNG 选择性地使 DNA 磷酸骨架上的 UTP 降解下来的同时,会在该 DNA 上留下缺口,使其在随后的 PCR 高温反应中极易被破坏,这样便无法获取古代样本中含量极微的 DNA 分子. Willerslev 等^[23]也曾提出,一次扩增产物进行多克隆测序,如存在多克隆序列间不一致现象,再去使用 UNG 处理后进行扩增的方法.

综上所述,现在广泛应用的古代 DNA 提取和扩增方法分别为:依赖于商业化试剂盒的硅离心柱提取法和一次或多次扩增后进行多克隆测序的方法. 这些方法可以一定程度上保证古代 DNA 获取的成功率和可靠性,但是,试剂盒的应用和大量的扩增和测序反应都需要较高成本,同时也延长了研究的周期. 本研究旨在综合已有方法的优缺点,确立一套节约成本、省时、保证成功率和可靠性的古代动物线粒体 DNA 序列获取方法. 我们通过改进和评估异丙醇沉淀提取法和实验评估 UNG 处理后扩增法来达到此目的.

1 材料和方法

1.1 实验材料

古代猪骨样本由中国社会科学院考古研究所何努研究员提供,采集自位于山西省襄汾县的陶寺遗址. 所用 10 个古代猪牙样本分别源于 10 个不同的个体. 实验编号为 TS1~TS10. ¹⁴C 测年表明该遗址年代为距今 4 300~3 900 年前.

1.2 环境去污染和古代样本去污染

所有的 PCR 前过程都在独立的中国农业大学古代 DNA 实验室进行,该实验室绝不允许现代生物 DNA 或扩增后的 DNA 样本进入. 实验中所用的水均为二次过滤超纯水,一次经超纯水仪(Millipore 公司,美国)过滤,二次经 0.22 μm 的注射器用滤器过滤(Millipore 公司,美国),实验用溶液均用该超纯水配制. 古代猪牙样本的去污染过程为:去污染表层后,用 10% 次氯酸钠浸洗 2 min,之后超纯水反复冲洗. 取出已去污染的牙齿约 500 mg 两份,一份用于改进异丙醇沉淀法提取,另一份用 QIAquick PCR 产物纯化试剂盒法提取(以下简称试剂盒法),即硅离心柱法提取.

1.3 改进的异丙醇沉淀法提取

异丙醇代替乙醇沉淀 DNA 的方法已经被证明,可以在古代 DNA 提取中有效地去除 PCR 的抑制剂^[24],所以本研究对该方法加以改进后利用. 具

体程序为: a. 将 1.2 节中准备的 500 mg 去污染的牙齿放入 1 ml 裂解缓冲液(100 mmol/L Tris•HCl、100 mmol/L NaCl、100 mmol/L EDTA pH 8.0、0.5% SDS)中,用组织研磨器(Tissuelyser, Qiagen 公司)打磨成匀浆状,后将样品在 55℃ 震荡摇床上作用 2 h,5 000 r/min 离心 5 min; b. 取离心后上清液,加入缓冲液(5 mol/L 醋酸钾,6 mol/L 氯化锂),冰上作用 30 min 后,12 000 r/min 离心 15 min; c. 取离心后上清液 1 ml,加入等体积的异丙醇,-20℃ 静置 2 h 后,13 000 r/min 离心 30 min; d. 除去上清液后加入 1 ml 70% 乙醇,13 000 r/min 离心 30 min; 最后加入适量的超纯水溶解沉淀物,每个样品均得到约 100 μl DNA 提取液用于下一步的 PCR 扩增. 每次提取实验均设置 2 个空白对照,用于检测操作环境中污染物的存在.

1.4 试剂盒提取法

具体程序为: a. 将 1.2 节中准备的 500 mg 去污染的牙齿放入 1 ml 缓冲液(0.5 mol/L EDTA, 0.5% SDS)中,用组织研磨器打磨成匀浆状,加入 0.1 g/L 蛋白酶 K,55℃ 震荡摇床孵育 24 h; b. 1 000 r/min 离心 8 min,取上清液,加入 5 倍的试剂盒(QIAquick PCR purification Kit, QIAGEN 公司)缓冲液 PB; c. 取 750 μl 混合液加入到 QIAquick 硅离心柱中,13 000 r/min 离心 1 min,弃过滤液,重复 2 次,直至混合液被完全过滤; d. 用 750 μl 缓冲液 PE 洗涤一遍,13 000 r/min 离心 1 min,弃过滤液; e. 加入 100 μl 缓冲液 EB 室温孵育 10 min,13 000 r/min 离心 1 min,收集过滤液,即 DNA 提取液,用于下一步 PCR 扩增.

1.5 PCR 引物设计及 PCR 扩增

参考 GenBank 猪线粒体序列 AF276927 和 AF486871 分别设计引物用于扩增控制区(D-loop 区)179 bp 片段及细胞色素 b 基因(Cytb 基因)142 bp 片段,序列及引物信息见表 1.

Table 1 Primers for PCR amplification

mtDNA site	Primer ¹⁾	Primer sequence	Fragment length/bp
Cytb gene	L468	5' cggaacagacctcgtagaatg	142
	R609	5' ggtttcgtgcaggaatagga	
D-loop region	L181	5' tgctagtccccatcatataa	179
	R358	5' cctgccaagcgggttctgg	

¹⁾L: Upstream primer; R: Downstream primer.

优化的扩增体系(25 μ l)中包括: 1 单位(U) Ampli Taq Gold 酶(Applied Biosystems 公司, 美国)、2.5 μ l 酶自带的 1 $\times$ 缓冲液、3 mmol/L Mg^{2+} 、400 μ mol/L dNTPs、2 g/L 牛血清白蛋白(Promega 公司, 美国)、0.5 μ mol/L 上下游引物、3 μ l DNA 提取液。优化的降落 PCR 程序依次为: 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min; 进入 95 $^{\circ}$ C 变性 45 s、61 $^{\circ}$ C 退火 30 s 和 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s 的 10 个循环; 之后进入 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s、58 $^{\circ}$ C 退火 30 s 和 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s 的 40 个循环; 最后, 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min、降温到 4 $^{\circ}$ C。UNG 处理的扩增程序为: 37 $^{\circ}$ C 作用 5 min 使 UNG 去除 DNA 中的受损伤模板, 之后 95 $^{\circ}$ C 作用 10 min, 目的是变性 UNG 的同时启动 AmpliTaq Gold 酶, 后面的程序同前降落 PCR 扩增。扩增反应均在 PTC-200(BIO-RAD 公司, 美国)热循环仪上进行。取 3 μ l 扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶检测。

将扩增所得目的 DNA 片段进行切胶回收, 并与 PMD19(Takara 公司, 日本)载体进行连接后克隆。每一扩增产物克隆后进行至少 8 个克隆的测序。使用 ABI PRISM[®] 3730 测序仪(Applied Biosystems 公司, 美国), 通过 ABI BigDye 3.1 试剂盒进行测序反应。

选取获得成功扩增的 2 个样本(TS2, TS6)送吉林大学古代 DNA 实验室进行独立的重复实验, 重复实验采取盲测的策略, 从提取到扩增测序均完全独立完成。

1.6 多序列比对和数据分析

测序结果图谱均用 Chromas 2.22 (www.technelysium.com.au)软件进行碱基人工核查, 将没有模糊碱基的序列使用 ClustalX^[25]进行同一扩增产物的不同克隆序列比对, 以及与重复实验获得序列间的比对, 比对后的最终序列在 GenBank 中进行 blastn 比对。

2 结 果

2.1 古代 DNA 提取方法的改进和评估

本研究依据前人对核酸提取方法的研究成果^[11, 26], 对 Hanni 等^[24]推荐的利用异丙醇沉淀提取古代 DNA 的方法进行了改进。其中省略了酚仿抽提步骤, 加入适当浓度的氯化锂和醋酸钾来减少多余杂质与核酸的共沉淀, 以促进古代样本中核酸的抽提。此外, 根据古代样本中 DNA 含量少、片段化的特点, 延长离心沉淀 DNA 的时间至 30 min, 以达到使 DNA 富集最大化的目的。

评估研究中, 我们分别利用本方法和试剂盒法提取 10 个古代猪牙齿样本中的 DNA, 之后分别进行 UNG 处理后扩增和常规扩增。结果表明, 改进的异丙醇沉淀法提取的产物, 经两种方式扩增后, 均可以获得 5 个个体(TS2、TS3、TS6、TS7 和 TS9)的 Cytb 基因片段和 4 个个体(TS1、TS2、TS6 和 TS7)的 D-loop 区片段, 提取成功率为 60%。试剂盒法提取的产物, 经两种方式扩增后, 均可以获得 5 个个体(TS2、TS3、TS6、TS7 和 TS9)的 Cytb 基因片段和 5 个个体(TS1、TS2、TS3、TS6 和 TS7)的 D-loop 区片段, 提取成功率也为 60%。利用琼脂糖凝胶电泳法检测 3 μ l 成功扩增出的产物, 结果如图 1, 样本 TS1 和 TS2 经改进的异丙醇沉淀法提取、UNG 处理后进行扩增, 其条带较清晰, 片段大小正常无误, 提取空白对照和 PCR 空白对照都为零产物。其余 4 个样本(TS4、TS5、TS8 和 TS10)的 Cytb 基因和 D-loop 区片段的扩增产物进行同样的检测, 均无目的条带。

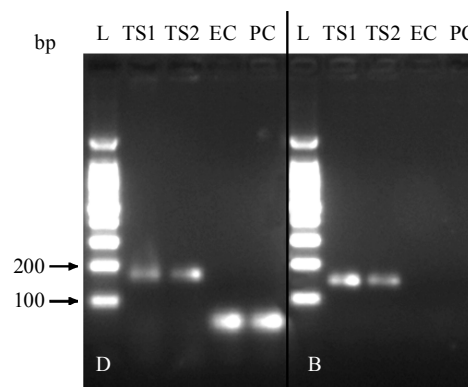


Fig. 1 Agarose electrophoresis of ancient DNA amplified
Methods used were the extraction method of improved isopropanol precipitation and the amplification method of PCR after UNG treatment. L: 100 bp DNA ladder; TS1, TS2: Ancient sample code; EC: Mock extraction; PC: Mock PCR. The part-D (left) shows the products amplified with primers for 179 bp D-loop region and the part-B (right) shows the products of 142 bp Cytb gene.

该结果说明: 改进的异丙醇沉淀法与试剂盒法比较, 提取成功率没有显著差异, 而实验中仅需要投入常规化学药品的费用, 约是商业化试剂盒费用的 1/10; 改进的方法还可以比试剂盒法缩短一半的实验周期(表 2)。此外, 本研究未见 UNG 处理对古代 DNA 获取成功率有不利影响, 所以不支持 Hofreiter 等^[19]提出的 UNG 的使用不利于古代 DNA 获取的推断。

Table 2 Characteristics of two extraction methods and two amplification methods studied

Method	Item	Fidelity	Time	Cost
Improved method	Extraction with improved	-	t	c
	isopropanol precipitation method			
	PCR after UNG treatment	100%	tp	cp
Current method	and one-time clone sequencing			
	Extraction with QIAquick PCR	-	2t	≥ 10c
	purification kit			
	One-time PCR and one-time clone	66%	tp	cp
	sequencing			
	Multiple times PCR and multiple clone	≤ 88%	≥ 2tp	≥ 2cp
	sequencing			

“-” Represents item dismissed. “t” Represents the time consumed by DNA extraction with improved method and “tp” Represents the time consumed by PCR and one-time clone sequencing. “c” Represents the cost of one-time DNA extraction with improved method and “cp” Represents the cost of one-time PCR and clone sequencing.

2.2 扩增方法的选择和评估

用改进的异丙醇沉淀法提取出的 DNA, 对 2 种可以排除 DNA 损伤干扰的扩增方法进行了对照实验, 即 UNG 处理去除受损伤的模板后进行扩增的方法和一次或多次扩增后分别进行克隆测序比对的方法. 以下将依据 Hansen 等^[20]研究结果, 根据多克隆序列比对后结果进行损伤类型的鉴别. 3 种类型的错配损伤的表现分别为: a. 一致性的碱基取代型损伤, 即多克隆序列中, 所有克隆序列在某位点都表现为扩增后的损伤碱基, 而完全掩盖了序列自身的碱基; b. 部分一致性碱基取代型损伤, 即多克隆序列中, 部分克隆序列表现为序列自身碱基, 而另一部分克隆序列表现为扩增后的损伤碱基; c. 零星的碱基取代型损伤, 即碱基取代没有多克隆序列间的一致性.

2.2.1 对 UNG 处理后扩增的产物进行克隆测序, 获得的多克隆序列比对的结果. 对 UNG 处理后得以成功扩增的 9 个 DNA 片段分别进行一次克隆测序, 每个片段获得 8 个左右克隆的序列, 结果共 78 个克隆序列中, 只出现了 3 个零星的碱基取代型损伤位点. 且该法获得的源自个体 TS2 和 TS6 4 个片段的最终序列, 与吉林大学古 DNA 实验室重复实验获得的序列一致. blastn 比对表明 9 个片段序列均为猪源的目标序列. 我们判断 UNG 处理后扩增获得的序列为真实的古代 DNA 序列. 获得的 D-loop 区和 Cytb 基因相应序列的 GenBank 收录号分别为 FJ601540-FJ601543 和 FJ804769-FJ804773.

2.2.2 常规扩增产物测序得到的多克隆序列比对及

与真实的古代 DNA 序列比对的结果.

对 9 个 DNA 片段进行一次或多次的常规扩增后分别进行多克隆测序, 结果表明, 源于 4 个个体 (TS1、TS2、TS6 和 TS7) 的 5 个片段 (Cytb 基因或 D-loop 区) 扩增后获得的多克隆序列, 均扩增于受损伤的模板 (图 2). 其中 TS7 的 Cytb 基因片段常规扩增 3 次后获得的多克隆序列中: 第一次的结果表现为 p553(C→T) 位置上的 II 型一致性碱基取代型损伤; 第二次与真实序列一致; 第三次扩增又出现 p553(C→T) 位置上的一致性碱基取代型损伤 (图 2a). TS2 的 Cytb 基因片段获得的多克隆序列中, 虽然两次扩增后分别进行多克隆测序获得的 16 个克隆序列的一致性为 100%, 但与真实序列比较发现, 存在 4 个 II 型一致性碱基取代型损伤位点, 位于 p508 (G→A)、p511 (G→A)、p517 (G→A) 和 p580 (G→A) (图 2b).

所以, 对 TS7 和 TS2 Cytb 基因片段的多次独立扩增后测序的结果表明: 一致性碱基取代型损伤会在某一位点上重复出现; 即使两次扩增产物得到的所有多克隆序列一致性都为 100%, 也并非真实序列; 而三次扩增后可能依旧无法判断出真实的古代 DNA 序列.

此外, 一致性碱基取代类型损伤的位点, 还在 TS1 和 TS2 经一次扩增后获得的多克隆序列间存在, 位置分别在 D-loop 区 p235(C→T) 和 p278(C→T) (图 2c 和 2d). TS6 一次扩增产物的多克隆序列间, 出现了两个零星取代型和一个部分碱基取代型损伤位点, 分别位于 Cytb 基因 p529(C→T)、p560 (C→T) 和 p572(C→T) (图 2e).

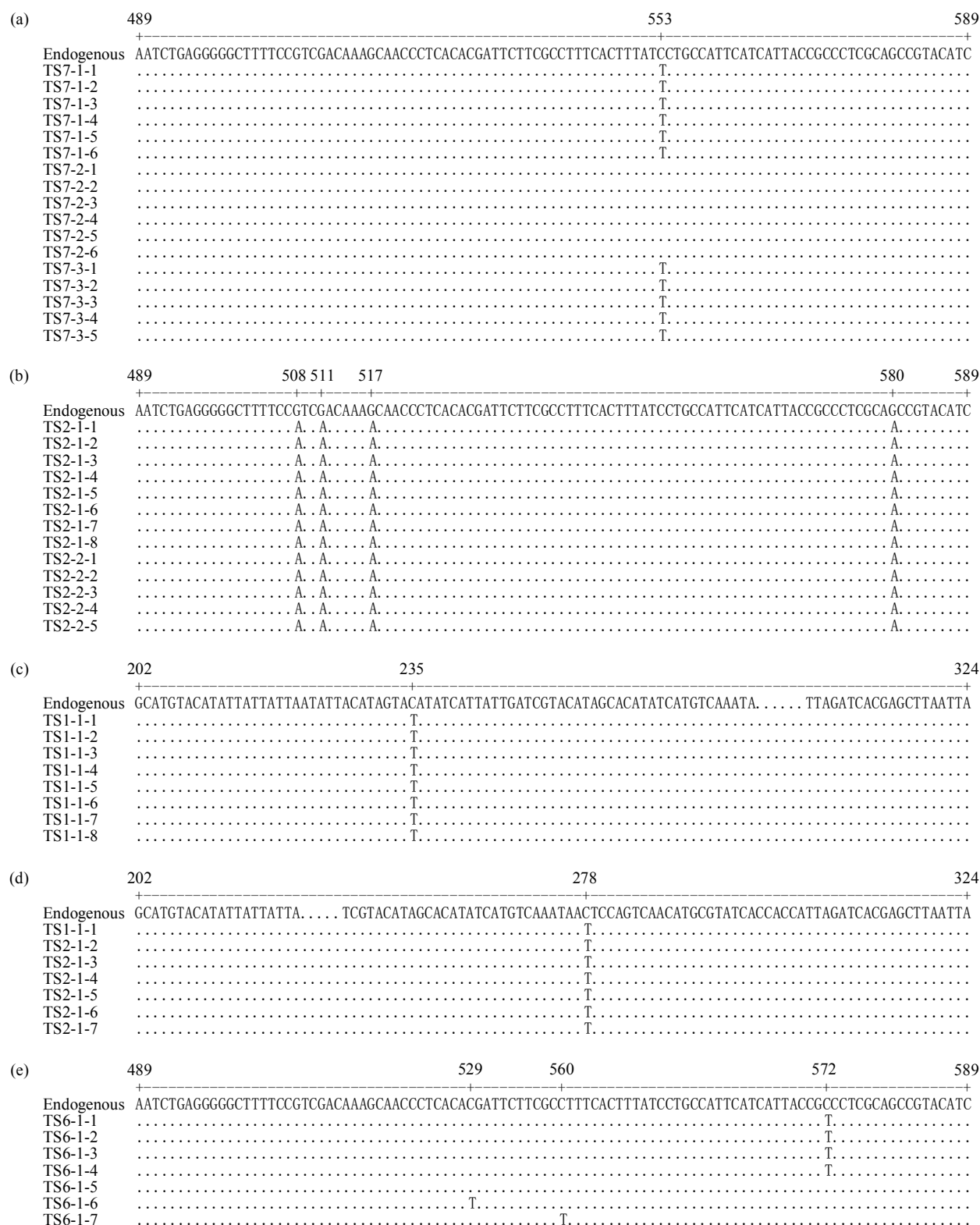


Fig. 2 Alignment of 52 clones sequenced from ancient DNA extracted by improved isopropanol method and amplified without UNG treatment

Clones are identified by recombination of 1 code and 2 numbers: the first code indicates the sample code (TS1, TS2, TS6, TS7); the first number indicates the amplification; the second number indicates the clone. The “Endogenous” sequence determined by the results of amplification after UNG treatment. The numbering of nucleotide position was based on two reference sequences in GenBank: AF486871 for fragment in Cytb gene and AF276927 for fragment in control region, respectively. Sequences in figure (a), (b), (e) are from Cytb genes and (c), (d) are from control regions. Nucleotides identical to the endogenous sequence are indicated by dots. Dots within the endogenous sequences indicate nucleotides omitted.

以上结果表明, 古代样本 DNA 一次扩增后测序, 得到的多克隆序列间出现一致性碱基取代型损伤的概率高达 44%(9 个成功扩增出的片段中, 4 个片段存在一致性碱基取代型损伤), 即一次常规扩增后多克隆测序获得真实古代 DNA 序列的概率为 66%. 利用 2~3 次独立扩增分别克隆测序, 获得真实古代 DNA 序列的概率也不高于 88%. 而 9 个扩增成功的目的片段中, 5 个扩增于受损伤的模板, 如采用多于 3 次的独立扩增法, 会将研究成本和实验周期增加和延长一倍以上(表 2).

2.2.3 试剂盒法提取出的古代 DNA 进行常规扩增后测序, 获得的多克隆序列比对结果. 为了排除受

损伤模板的存在和异丙醇沉淀提取方法的直接关联, 我们将试剂盒提取、常规一次扩增、克隆测序得到的 TS2 和 TS7 的 Cytb 基因片段的多克隆序列进行比对. TS2 的 Cytb 基因片段多克隆序列比对结果如图 3a, 在 p534(C→T)位置出现一致性碱基取代型损伤. TS7 的 Cytb 基因片段多克隆比对如图 3b, 在 p501(C→T)位置存在一个部分一致型碱基取代损伤, 和 p553(C→T)位置存在一个零星碱基取代损伤. 这表明, 与异丙醇沉淀法相同, 试剂盒提取法获得 DNA 经常规扩增也很容易扩增到受损伤 DNA 模板, 即受损伤模板的存在与改进的异丙醇沉淀提取方法本身没有直接联系.

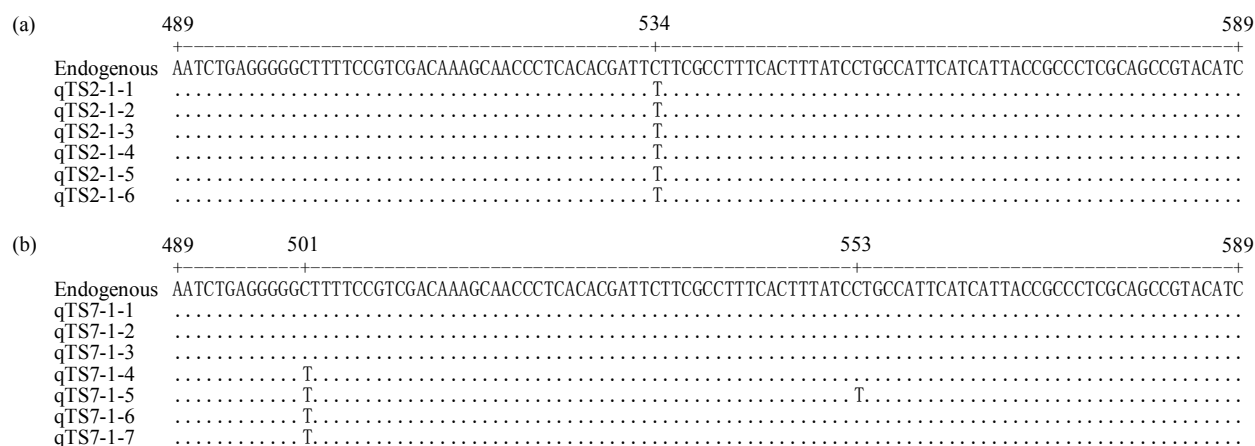


Fig. 3 Alignment of 13 clones sequenced from ancient DNA extracted with QIAquick PCR purification kit and amplified without UNG treatment

Clones are identified by recombination of 1 code and 2 numbers: the first code indicates the sample code with addition of “q” (qTS2 & qTS7); the first number indicates the amplification; the second number indicates the clone. The “endogenous” sequence determined by the results of amplification after UNG treatment. The numbering of nucleotide position was based on the reference sequence in GenBank: AF486871. These two sequences are all from Cytb genes. Nucleotides identical to the endogenous sequence are indicated by dots.

3 讨 论

获得古代 DNA 的真实性是讨论所有问题的基础, 根据国际常用标准^[23], 本研究中获得古代 DNA 序列的真实性可以由以下几点证明: a. 所有扩增前操作均在古代 DNA 专用实验室进行, 避免了现代 DNA 或扩增后的多拷贝 DNA 的污染; b. 提取和扩增过程均设有空白对照, 对照组得到的结果均为阴性; c. 部分样本经吉林大学古代 DNA 实验室进行独立重复性实验, 结果与我们用 UNG 处理后扩增得到的序列一致; d. 常规扩增产物进行多克隆测序可以部分检测到受损伤模板 DNA 的存在, 这也侧面说明我们获得的是古代 DNA 序

列, 而非现代 DNA 污染的序列.

研究改进的异丙醇沉淀提取古代 DNA 的方法, 相比较于当前应用比较广泛的商业化试剂盒提供的硅离心柱提取法, 只需要常规的化学药品, 所以可以节约经费投入并方便实验的开展. 同时改进的异丙醇沉淀提取法, 可缩短实验周期, 也有利于大规模样本检测相关研究的开展.

对能够排除受损伤 DNA 模板干扰的两种扩增方法进行评估, 结果表明, 常规一次扩增后进行多克隆测序, 一致性碱基取代型损伤现象出现概率高达 44%, 所以 Willerslev 等^[23]提出的即当一次扩增产物得到的多克隆序列间存在不一致现象后, 再去使用 UNG 处理后进行扩增的方法存在一定的风

险. 本研究结果表明, 二次或多次扩增后仍不能完全排除受损伤模板序列的干扰, 所以, 多次扩增后克隆测序鉴别真实古代 DNA 序列的方法, 即使可以避免古代样本中微量 DNA 模板的损失^[9], 但也不保证获取序列真实性, 还需要较多研究经费投入和较长的实验周期. 相比较而言, 利用 UNG 处理后进行扩增的方法, 可以在不影响获取成功率的前提下, 更有效地去除受损伤模板的干扰, 避免错误序列结果的获得, 同时将经费投入和实验周期都各减少至常规方法的 50% 以下.

此外, 本研究推荐的方法由于能够节约成本、缩短研究周期并获得可靠的古代 DNA 序列而适合大规模古代 DNA 的获取和检测分析, 即大样本量的检测, 但对于需要进行古代样本 DNA 的全基因组测序意义上的大规模检测, 则需要采用高通量的测序方法^[27, 28].

致谢 感谢中国农业大学动物科技学院吴常信教授帮助建立古代 DNA 实验室; 感谢中国社会科学院考古研究所何努研究员提供考古出土样品; 感谢吉林大学考古研究中心的周慧教授课题组为本研究提供重复验证实验结果; 感谢武汉大学历史系罗运兵博士、中国社会科学院研究生院博士研究生吕鹏对考古样本收集和整理工作所提供的帮助.

参 考 文 献

- Leonard J A, Wayne R K, Wheeler J, *et al.* Ancient DNA evidence for Old World origin of New World dogs. *Science*, 2002, **298**(5598): 1613~1616
- Loreille O, Orlando L, Patou-Mathis M, *et al.* Ancient DNA analysis reveals divergence of the cave bear, *Ursus spelaeus*, and brown bear, *Ursus arctos*, lineages. *Curr Biol*, 2001, **11**(3): 200~203
- Vila C, Leonard J A, Gotherstrom A, *et al.* Widespread origins of domestic horse lineages. *Science*, 2001, **291**(5503): 474~477
- Barnes I, Matheus P, Shapiro B, *et al.* Dynamics of Pleistocene population extinctions in Beringian brown bears. *Science*, 2002, **295**(5563): 2267~2270
- Hofreiter M, Capelli C, Krings M, *et al.* Ancient DNA analyses reveal high mitochondrial DNA sequence diversity and parallel morphological evolution of late pleistocene cave bears. *Mol Biol Evol*, 2002, **19**(8): 1244~1250
- Larson G, Cucchi T, Fujita M, *et al.* Phylogeny and ancient DNA of *Sus* provides insights into neolithic expansion in Island Southeast Asia and Oceania. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, **104**(12): 4834~4839
- Ritchie P A, Millar C D, Gibb G C, *et al.* Ancient DNA enables timing of the pleistocene origin and holocene expansion of two adelic penguin lineages in antarctica. *Mol Biol Evol*, 2004, **21**(2): 240~248
- Shapiro Beth, Drummond A J, Rambaut A, *et al.* Rise and fall of the Beringian steppe bison. *Science*, 2004, **306**: 1561~1565
- Paabo S. Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, **86**(6): 1939~1943
- Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, 1993, **362**(6422): 709~715
- De MacHugh C J E, Bailey J F, Bancroft D R, *et al.* The extraction and analysis of ancient DNA from bone and teeth: a survey of current methodologies. *Ancient Biomolecules*, 2000, **3**: 81~102
- Hagelberg E, Bell L S, Allen T, *et al.* Analysis of ancient bone DNA: techniques and applications. *Philos Trans R Soc Lond B*, 1991, **333**(1268): 399~407
- Boom R, Sol C J, Salimans M M, *et al.* Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol*, 1990, **28**(3): 495~503
- Hoss M, Paabo S. DNA extraction from Pleistocene bones by a silica-based purification method. *Nucleic Acids Res*, 1993, **21**(16): 3913~3914
- Yang D Y, Eng B, Wayne J S, *et al.* Technical note: improved DNA extraction from ancient bones using silica-based spin columns. *Am J Phys Anthropol*, 1998, **105**(4): 539~543
- Wallace S S. Biological consequences of free radical-damaged DNA bases. *Free Radic Biol Med*, 2002, **33**(1): 1~14
- Hoss M, Jaruga P, Zastawny T H, *et al.* DNA damage and DNA sequence retrieval from ancient tissues. *Nucleic Acids Res*, 1996, **24**(7): 1304~1307
- Paabo S, Poinar H, Serre D, *et al.* Genetic analyses from ancient DNA. *Annu Rev Genet*, 2004, **38**: 645~679
- Hofreiter M, Jaenicke V, Serre D, *et al.* DNA sequences from multiple amplifications reveal artifacts induced by cytosine deamination in ancient DNA. *Nucleic Acids Res*, 2001, **29**(23): 4793~4799
- Hansen A, Willerslev E, Wiuf C, *et al.* Statistical evidence for miscoding lesions in ancient DNA templates. *Mol Biol Evol*, 2001, **18**(2): 262~265
- Hofreiter M, Serre D, Poinar H N, *et al.* Ancient DNA. *Nat Rev Genet*, 2001, **2**(5): 353~359
- Brotherton P, Endicott P, Sanchez J J, *et al.* Novel high-resolution characterization of ancient DNA reveals C > U-type base modification events as the sole cause of post mortem miscoding lesions. *Nucleic Acids Res*, 2007, **35**(17): 5717~5728
- Willerslev E, Cooper A. Ancient DNA. *Proc Biol Sci*, 2005, **272**(1558): 3~16
- Hanni C, Brousseau T, Laudet V, *et al.* Isopropanol precipitation removes PCR inhibitors from ancient bone extracts. *Nucleic Acids Res*, 1995, **23**(5): 881~882
- Larkin M A, Blackshields G, Brown N P, *et al.* Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 2007, **23**(21): 2947~2948
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T, *et al.* *Molecular Cloning: A laboratory manual*. 3rd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002

- 27 Noonan J P, Hofreiter M, Smith D, *et al.* Genomic sequencing of Pleistocene cave bears. *Science*, 2005, **309**(5734): 597~599
- 28 Poinar H N, Schwarz C, Qi J, *et al.* Metagenomics to paleogenomics: large-scale sequencing of mammoth DNA. *Science*, 2006, **311**(5759): 392~394

A Practical and Efficient Method for The Retrieval of Ancient DNA Sequence*

LIU Ran-Ran¹⁾, YUAN Jing³⁾, ZHAO Xing-Bo^{1,2)**}, LI Ning^{1)**}

¹⁾State Key Laboratory for Agrobiotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China;

²⁾College of Animal Science and Technology, China Agricultural University, Beijing 100193, China;

³⁾Institute of Archaeology, Chinese Academy of Social Sciences, Beijing 100710, China)

Abstract Retrieval of ancient DNA (aDNA) sequences from organism remains provide direct view of their evolutionary history. However, researches on aDNA have suffered from lots of technical problems. Specifically, discredited sequences were generated from damaged aDNA templates, and expensive and time-consuming methods were employed. Here, a method which could recover the endogenous aDNA as well as to reduce the cost and research period is described. This is achieved by improving the ancient DNA extraction method of isopropanol precipitation, and reevaluating the method of PCR after N-glycosylase (UNG) treatment, which could remove the damaged DNA from the aDNA extract. The efficiency of these methods were tested by comparing with traditional methods using ancient specimens of pig teeth aged between 4 300 years before present (BP) and 3 900 BP. The results showed that: firstly, the extraction efficiency of the improved method of isopropanol precipitation and current method with silica-based spin column were all 60%. Furthermore, the research period at least could be reduced by half with the application of the improved methods and the cost to 1/10 of the current method. Secondly, sequences obtained through the method of PCR after UNG treatment were 100% authentic. In contrast, 66%~88% sequences were authentic based on the results obtained with the method of multiple PCRs without UNG treatment. And the research cost and period needed by the method with UNG treatment were only half of the later one. These results demonstrate that the improved extraction method of isopropanol precipitation combined with the method of PCR after UNG treatment could increase the success rate of authentic DNA amplified and at least reduce the research cost and period by half. Therefore, this method can be applied in the large-scale detection of ancient specimens.

Key words ancient DNA, DNA extraction, damaged DNA, PCR

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00133

*This work was supported by grants from National Basic Research Program of China (2006CB102100) and The National Key Technology R&D Program of China (2006BAK21B03).

**Corresponding author.

LI Ning. Tel:86-10-62733323, E-mail: ninglcau@cau.edu.cn

ZHAO Xing-Bo. Tel: 86-10-62733417, E-mail: zhxb@cau.edu.cn

Received: March 9, 2009 Accepted: June 29, 2009