

仰韶文化人类遗骸古DNA的初步研究

赖旭龙¹, 杨淑娟¹, 唐先华¹, 施苏华², 李润权³, 杨洪⁴, 高 强⁵, 李 涛¹, 盛桂莲¹

1. 中国地质大学地球科学学院, 湖北武汉 430074

2. 中山大学生命科学院, 广东广州 510275

3. Department of Anthropology, Harvard University, Cambridge, MA 02138–2019, USA

4. Department of Science and Technology, Bryant College, Smithfield, RI 02917 and Department of Geological Sciences, Brown University, Providence, RI 02912, USA

5. 西安半坡博物馆, 陕西西安 710038

摘要:近20年来,古DNA研究技术和方法已迅猛发展。目前从古人类残骸中获取DNA序列,进而讨论人类的演化、亲缘关系和迁移成为分子人类学的一个重要方向。本研究对采自陕西临潼仰韶文化6000多年前的姜寨遗址第一期和第二期文化层中的古人类残骸进行古DNA提取、扩增和测序,获得了169 bp的线粒体高变控制区I的古DNA片段,与现代西安人同源性序列有2个位点的突变。另外,通过在不同实验室进行重复性实验和系统发育分析等方法详细地论证了所获得的DNA序列的可靠性。在所研究的6个姜寨遗址样品中有3个样品获得古DNA序列,古DNA的提取成功率为50%,高于一般的古DNA研究材料的提取率,说明姜寨遗址的人类残骸是研究古DNA的理想材料,为今后从分子水平上研究姜寨遗址及其他地区仰韶文化遗址的古人类墓葬及中国古人类分子演化关系奠定了基础。

关键词:考古 仰韶文化 姜寨遗址 古DNA 可靠性分析

中图分类号: Q911

文章编号: 1000–2383(2004)01–0015–06

收稿日期: 2003–09–02

Preliminary Study on Ancient Human DNA from Yangshao Culture

LAI Xu-long¹, YANG Shu-juan¹, TANG Xian-hua¹, SHI Su-hua², LEE Yun Kuen³, YANG Hong⁴,
GAO Qiang⁵, LI Tao¹, SHENG Gui-lian¹

1. Faculty of Earth Sciences, China University of Geosciences, Wuhan 430074, China

2. College of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China

3. Department of Anthropology, Harvard University, Cambridge, MA 02138–2019, USA

4. Department of Science and Technology, Bryant College, Smithfield, RI 02917 and Department of Geological Sciences, Brown University, Providence, RI 02912, USA

5. Xi'an Banpo Site Museum, Xi'an 710038, China

Abstract: During recent 20 years, the field of ancient DNA research has experienced a rapid development. Authentic DNA sequences from ancient human remains have provided very important information on human evolution, blood relationship and migration, making ancient DNA research an important field of molecular anthropology. This study illustrates ancient DNA extraction, amplification and sequencing of 6 000-year-B. P. Yangshao Culture ancient human remains collected from first and second phase culture beds at Jiangzhai Site, Lintong, Shaanxi Province. Three 169 bp fragments from the hypervariable region I in the mitochondrial genome have been obtained and authenticated. These ancient DNA sequences carry two point mutations in comparison with homologous sequence of the modern Xi'an people's. Moreover, the authenticity of the ancient DNA sequence was obtained through the

基金项目 国家自然科学基金项目(Nos. 40028201, 40172005).

作者简介 赖旭龙(1964–),男,教授,博士生导师,主要从事微体古生物学和以古DNA为主的分子演化生物学研究, Tel: 027–87436381, E-mail: Xld@cug.edu.cn

replication experiments in two different laboratories in China University of Geosciences and Zhongshan University as well as phylogenetic analysis. Among the 6 samples from the Jiangzhai Site, three of them yielded authenticated ancient DNA sequence. The 50% success ratio is higher than that of general ancient DNA research materials previously reported in the literature, indicating the potential for further ancient DNA studies on human remains of Yangshao Culture for the purpose of blood relationship among different archaeological sites and human evolution.

Key words: archaeology; Yangshao Culture; Jiangzhai Site; ancient DNA; authenticity analysis.

古 DNA (ancient DNA) 是指从考古和古生物化石标本中获取的古代生物 DNA 分子 (Herrmann and Hummel, 1994). 目前人们可以在古 DNA 等古代生物分子的尺度上研究生物的系统分类学、人类的起源和迁移、亲缘关系、动植物的家养和驯化过程、考古材料的动植物残骸的精确鉴定等与古生物学、古人类学和考古学许多重要问题密切相关的课题 (Poinar, 1999; 赖旭龙, 2001).

生物死亡后由于水解和氧化作用, 古 DNA 总是以高度片段化、低分子量的形式存在于古代材料中, 从而增加了古 DNA 提取的难度. 目前一般认为可靠的古 DNA 数据应晚于 10 万年 (Poinar, 1999; Poinar *et al.*, 1996; Lindahl, 1997). 这样 10 万年以来的亚化石, 尤其是考古材料, 是目前古 DNA 研究的重点, 其中大量的古 DNA 研究集中在古人类材料上, 并取得了以欧洲尼安德特人古 DNA 研究为代表的一些重要的研究成果 (Krings *et al.*, 1997; Ovchinnikov *et al.*, 2000). 我国的古 DNA 研究除杨淑娟和赖旭龙 (2003) 报道了华北地区晚更新世猛犸象的古 DNA 研究和林清等 (2002) 报道了从青藏高原多年冻土中获得了古代眼子菜的古 DNA 序列的初步成果外, 其他研究也主要集中在古人类 DNA 方面, 如 Yang *et al.* (1999) 提取了公元前 475—221 年战国时期河北徐水的人类残骸中的线粒体 DNA 的 D 区片段; Wang *et al.* (2000) 从山东临淄地区 2 000 ~ 2 500 年前的古人骨中获得了 3 个不同历史年代人类群体的 DNA, 在此基础上讨论了不同历史时期山东半岛人群的分布及遗传结构与现代人的异同性; 万诚等 (2001) 在内蒙古夏家店 (2 000 ~ 3 000 年前) 和河南郑州西山 (5 000 年前) 4 个古代人骨中获得了长度为 205 bp 的线粒体 DNA 中 MTND4 基因和 121 bp 的线粒体 DNA 中 V 区基因, 揭示了河南郑州西山古人类与内蒙古古人类之间具有高度的分异性; 崔银秋等 (2002) 从距今 2 000 ~ 2 500 年左右的新疆交河古城车师人的古代人骨中获得了 3 个吐鲁番盆地土著民族的 363 bp 的线粒体调控区基因.

本文主要报道笔者首次从陕西西安半坡博物馆馆藏的新石器时代仰韶文化姜寨遗址古人类遗骸中

成功获得的距今约 6 000 多年前的线粒体高变控制区 I DNA 169 bp 的片段, 并论证了其可靠性和可重复性.

1 实验材料

本研究样品采自新石器时代仰韶文化姜寨遗址. 姜寨遗址位于陕西省临潼县骊山北麓临河与渭河交汇处的三角地带 (西安半坡博物馆等, 1988). 1972—1979 年, 西安半坡博物馆会同陕西省考古研究所及临潼县博物馆在姜寨遗址进行了大规模的考古发掘, 揭露一处史前聚落与墓地. 大部分出土文物为半坡博物馆保存. 本次古 DNA 研究的样品来自半坡博物馆库房, 分别从 6 个个体中提取了 6 个样品. 姜寨遗址的史前文化堆积共分 5 层, 3 个样品是从遗址的一期文化层墓葬取得, 另外 3 个样品是从姜寨的二期文化层取得. 考古学家认为姜寨一期属仰韶文化半坡型, 根据姜寨遗址的 3 个 ^{14}C 测定数据, 并经高精度树轮年代校正, 年代应在距今 6 300 ~ 6 900 年之间. 姜寨二期遗存属仰韶文化史家类型, 根据遗址所出的一个 ^{14}C 测定数据, 校正年代约为距今 5 500 ~ 5 800 年 (西安半坡博物馆等, 1988; 中国社会科学院考古所, 1991).

姜寨遗址墓葬人骨的编号及采集情况见表 1. 样本收集采用一次性手术刀片将取样部位轻轻刮去 5 mm 的外表层, 然后用 5 mm 直径的钻头钻取内部, 所得粉末立即装入已消毒、灭菌的试管中, 密封, 低温保存.

2 方法

2.1 古 DNA 提取

备样在无菌工作环境中进行, 戴一次性手套, 将样品置入研钵, 加液氮研磨至粉末状. 提取方案参照 1990 年 Thomas 设计的提取方案 (Thomas *et al.*, 1990), 其简单步骤如下: (1) 在装有 0.2 g 左右的 1.5 mL 的微量离心管中加入 1 mL 0.5 mol/L ED-

TA 缓冲液,于 37℃ 恒温振荡以去钙质;(2)离心去

表 1 样本采集及实验结果

Table 1 Sampling description and experimental results

样品编号	编号描述	文化分期	采集部位	备注
26#	26LJZT271M167	姜寨一期	肱骨	获得古 DNA
28#	28LJZ 东 T9M275	姜寨一期	肱骨骨壁	未获得古 DNA
39#	39LJZ 东 T2M186	姜寨一期	椎骨	获得古 DNA
13#	13LJZ 中 T8M112 30	姜寨二期	股骨下端	获得古 DNA
17#	17LJZ T12M198 30	姜寨二期	髌骨	未获得古 DNA
21#	21LJZ 中 T12M238 1	姜寨二期	胫骨	未获得古 DNA

上清,加入 1 mL 提取缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, pH 8. 0, 2 mmol/L EDTA, 10 mmol/L NaCl, 0. 5 mg/mL proteinase K, 10 mg/mL DTT, 1% SDS), 于 50℃ 左右恒温振荡 12 h;(3)离心将上清转移到另外的离心管中,加入等体积的苯酚/氯仿/异戊醇(25: 24: 1)抽提;(4)12000 × g 离心 5 min,将上层液相转移至无菌的离心管中,加入 1/10 体积、3 mol/L NaAc,混匀,再加入两体积的冰冷无水乙醇,冰上放置 5 ~ 6 h;(5)于 4℃,12000 × g 离心 5 min;(6)用 75% 乙醇洗涤沉淀,室温干燥后,用 1 × TE 缓冲液溶解, - 20℃ 保存。

2. 2 PCR 扩增

本实验所用试剂为 Takara 和 Promega 公司产品。所扩增的目标 DNA 为线粒体控制区 I DNA 片段,引物的选用参考 Krings 等对尼安德特人的研究(Krings *et al.*, 1997),由宝生物公司(Takara)合成。所用引物如下:

L16122 5'-CAT TAC TGC CAG CCA CCA TGA ATA-3'

H16271 5'-GTG GGT AGG TTT GTT GGT ATC CTA-3'

50 μL 的 PCR 反应液体体系中含有以下组分: 1 × PCR 缓冲液, 2 mmol/L MgCl₂, 250 μmol/L dNTPs, 0. 5 mmol/L BSA, 0. 5 mmol/L 引物, 2 μL 模板, 2. 5 U Taq DNA 聚合酶。PCR 反应条件为 94℃ 预变性 4 min, 每一个循环包括 94℃ 变性 25 s, 60℃ 复性 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 循环 35 个循环, 最后一个循环后置 72℃ 继续延伸 5 min。

用 0. 5 × TAE 电泳缓冲液配制 2% 的琼脂糖凝胶,于 0. 5 × TAE 电泳缓冲液中, 5 V/cm 电泳检测扩增产物,用 100 bp DNA ladder 作标准对照(图 1)。

2. 3 测序

PCR 产物经 2% 的琼脂糖凝胶电泳分离,溴化乙锭染色,在长波长紫外灯下观察凝胶,用无菌手术刀切下所需胶带,然后用 E. Z. N. A[®] Gel Extraction

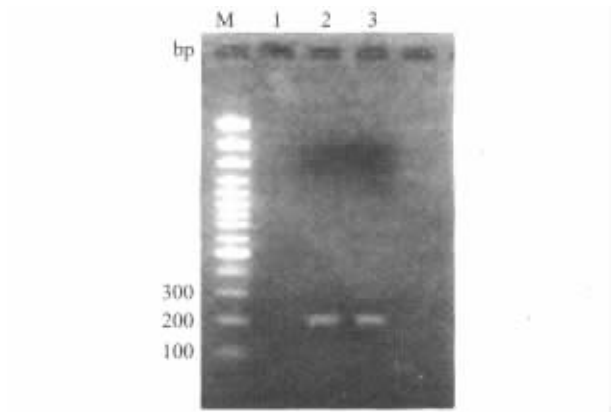


图 1 姜寨人线粒体 D - 环区高变控制区 I PCR 扩增凝胶图像

Fig. 1 Gel electrophoresis image of PCR products of two hypervariable region I segments in mitochondrial D-loop region from the human remains at Jiangzhai Site

M. 100 bp DNA 标记物; 1. 阴性控制样; 2. 13#样品 DNA; 3. 26#样品 DNA

Kit 2000 (Promega) 试剂盒纯化。以纯化 PCR 产物为模板进行测序反应,测序引物为 PCR 扩增引物,所用试剂为 PCR sequencing version 3. 0 Kit (ABI)。将测序反应产物用 70% 乙醇纯化,室温干燥,在自动测序仪 ABI PRFSMTM-3700 上测序。所测试的不同个体样品均获得长度为 169 bp 的序列。

3 序列分析

3. 1 对位排列

测序结果通过 BLAST 查询,与现代人类具有很高的相似性,但未见相同序列。通过 BioEdit 序列分析软件将姜寨人线粒体高变区 I 的 DNA 片段和其相关序列进行排列,所获得的序列与现代西安人有 2 个点位的突变,无碱基插入现象(图 2)。

较老的序列不能够获得重复性实验的支持,因此这些成果的可靠性要打上问号。本研究从以下几点可以证明姜寨人古DNA的可靠性:

(1) 样品采集地点比较干燥、古地温不算太高,这种环境对于古DNA的保存有利(Herrmann and Hummel, 1994; Poinar *et al.*, 1996)。另外,样本保存年限不到7 000年,不存在超过古DNA保存的10万年的理论年限的问题。(2) 在样品采集、备样和实验操作过程中自始至终按古DNA研究的规范执行(Poinar, 2003)。样品准备和DNA提取安排在不同实验室进行,所用器具、器皿及有关试剂都经过高温高压灭菌,且使用一次性耗材,避免了实验室内的污染。(3) PCR扩增的阴性控制样没有出现DNA条带。(4) 用BLAST软件从分子数据库中查询的结果分析,样本的序列不仅是人类线粒体控制区的序列,且具有很高的相似性,同时与现代西安人的同源序列有2个位点发生了突变,说明所得到的序列是古人DNA序列。而且在所构建的系统发育树上,所获得的姜寨人古DNA序列出现在合理的位置上,即姜寨人序列出现在由尼安德特人为外类群的现代人之中。其中的低抽样自检值反映了由短序列所造成的不确定性(杨洪,1995)。(5) 最为重要和最有说服力的是该研究获得了成功的重复性实验的支持。本研究的重复性实验包括:同样样品在同一实验室由唐先华、杨淑娟、盛桂莲等先后操作多次得到相同的结果。相同样品(26#,13#样品)与相同的实验方案在中山大学生命科学院的重复性实验已获得相同的结果。

5 结论

(1) 通过对6 000多年前的姜寨遗址古人类残骸的古DNA提取初步结果和实验结果的可重复性实验等方面的论证,说明从仰韶文化遗址的古人类中获取古代人类的遗传信息是可能的。(2) 本研究所提取的6个姜寨人样品中有3个样品获得了古DNA,古DNA的提取成功率为50%,高于一般的古DNA研究材料的提取率,说明姜寨人是古DNA研究较为理想的材料。高强和李润权曾经利用仰韶遗骨的颅骨面相测量讨论墓葬死者的血缘关系(Gao and Lee, 1993),相信今后通过对姜寨人残骸中古DNA的提取能够把这类研究提升到分子水平。另外,通过分析古人类X、Y染色体的特定的DNA序列的研究,可以用分子生物学的方法对古人类的性别进行分子鉴定,从而与体质人类学的性别鉴定方

法相互印证对比。(3) 古人类DNA研究的一个重要的方向就是进行人类的分子演化研究。尽管从本文中的有限系统发育树暗示现代西安人和现代蒙古人之间的相似性高于现代西安人和姜寨人之间的相似性等初步结论,但笔者认为这方面的工作还有待进一步深入。今后将通过不同引物的设计,获取姜寨人和仰韶文化其他遗址的古人类的更长的古DNA片段,并加强其与已报道的中国古代人和现代人DNA的对比分析,从而可在分子水平上进一步讨论人类学问题。

References

- Cui, Y. Q., Duan, R. H., Ji, C. N., et al., 2002. Analysis of mitochondrial DNA from ancient ruins of Jiaohu. *Chemical Journal of Chinese Universities*, 8: 1510 - 1514 (in Chinese with English abstract).
- Gao, Q., Lee, Y. K., 1993. A biological perspective on Yangshao Kinship. *Journal of Anthropological Archaeology*, 12 (3): 226 - 298.
- Goldberg, T. L., Ruvolo, M., 1997. Molecular phylogenetics and historical biogeography of East African chimpanzees pan troglodytes schweinfurthii. *Biol. J. Linn. Soc. Lond.*, 61 (3): 301 - 324.
- Herrmann, B., Hummel, S., 1994. Ancient DNA. Springer-Verlag, New York.
- Höss, M., Jaruga, P., Zastawnij, T. H., et al., 1996. DNA damage and DNA sequence retrieval from ancient tissues. *Nucleic Acids Research*, 24: 1304 - 1307.
- Institute of Archaeology, 1991. $\delta^{14}\text{C}$ dating data (1965—1991) of Chinese archaeology. Wenwu Press, Beijing, 262 - 263 (in Chinese).
- Kolman, C. J., Sambuughin, N., Bermingham, E., 1996. Mitochondrial DNA analysis of Mongolian populations and implications for the origin of New World founders. *Genetics*, 142 (4): 1321 - 1334.
- Krings, M., Stone, A., Schmitz, R. W., et al., 1997. Neanderthal DNA sequences and the origin of modern humans. *Cell*, 90 (1): 19 - 30.
- Lai, X. L., 2001. Ancient biomolecules and molecular archaeology—A review. *Advance in Earth Sciences*, 16 (2): 163 - 171 (in Chinese with English abstract).
- Lin, Q., Shi, S. H., Peng, P. A., et al., 2002. DNA extracted from plant materials buried in perennial frozen sediments. *Journal of Glaciology and Geocryology*, 24 (1): 28 - 31 (in Chinese with English abstract).
- Lindahl, T., 1997. Facts and artifacts of ancient DNA. *Cell*, 90: 1 - 3.
- Macaulay, V., Richards, M., Hickey, E., et al., 1999. The e-

- merging tree of West Eurasian mtDNAs :A synthesis of control-region sequences and RFLPs. *Am. J. Hum. Genet.*, 64 (1) :232 – 249.
- Oota, H., Kitano, T., Jin, F., et al., 2002. Extreme mtDNA homogeneity in continental Asian populations. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 118 (2) :146 – 153.
- Ovchinnikov, I. V., Götherström, A., Romanova, G. P., 2000. Molecular analysis of Neandertal DNA from the northern Caucasus. *Nature*, 404 :490 – 493.
- Poinar, H. N., 1999. DNA from fossils :The past and the future. *Acta Paediatrica*, 88 :133 – 140.
- Poinar, H. N., 2003. The top 10 list :Criteria of authenticity for DNA from ancient and forensic samples. *International Congress Series*, 1239 :575 – 579.
- Poinar, H. N., Höss, M., Bada, J. L., et al., 1996. Amino acid racemization and the preservation of ancient DNA. *Science*, 272 :864 – 866.
- Thomas, W. K., Pääbo, S., Villablanca, F. X., et al., 1990. Spatial and temporal continuity of kangaroo rat populations shown by sequencing mitochondrial DNA from museum specimens. *J. Mol. Evol.*, 31 :101 – 112.
- Wan, C., Cui, Y. Q., Duan, R. H., et al., 2001. Extraction, amplification and sequence analysis of Xiajiadian ancient human bone DNA. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 17 (5) :636 – 641 (in Chinese with English abstract).
- Wang, L., Oota, H., Saitou, N., et al., 2000. Genetic structure of a 2 500-year-old human population in China and its spatiotemporal changes. *Mol. Biol. Evol.*, 17 (9) :1396 – 1400.
- Watson, E., Bauer, K., Aman, R., et al., 1996. mtDNA sequence diversity in Africa. *Am. J. Hum. Genet.*, 59 (2) :437 – 444.
- Wayne, R. K., Leonard, J. A., Cooper, A., 1999. Full of sound and fury :The recent history of ancient DNA. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 30 :457 – 477.
- Xi'an Banpo Site Museum, Shaanxi Provincial Archaeology Institute, Lintong County Museum, 1988. Excavation report of Jiangzhai—A Neolithic archaeological site. Wenwu Press, Beijing (in Chinese).
- Yang, H., 1995. Authentication of ancient DNA sequence—A reassessment of 18S rDNA sequence from fossil dinosaur egg. *Acta Palaeontologica Sinica*, 34 (6) :657 – 673 (in Chinese with English abstract).
- Yang, H., Golenberg, E. M., Shoshani, J. A., 1997. Blind testing design for authenticating ancient DNA sequence. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 7 :261 – 265.
- Yang, Q., Ozawa, T., Hayashi, S., et al., 1999. Extraction, PCR amplification and cloning of aDNA from human remains of the warring states (475B. C – 221B. C). *Palaeoworld*, 12 :12 – 24.
- Yang, S. J., Lai, X. L., 2003. The first case of Mammoth ancient DNA in China. *Earth Science—Journal of China University of Geosciences*, 28 (2) :136, 142 (in Chinese with English abstract).

附中文参考文献

- 崔银秋, 段然慧, 季朝能, 等, 2002. 交河故城车师人的线粒体 DNA 分析. 高等学校化学学报, 8 :1510 – 1514.
- 中国社会科学院考古所, 1991. 中国考古学中碳十四年代数据 1965—1991. 北京 :文物出版社, 262 – 263.
- 赖旭龙, 2001. 古代生物分子与分子考古学. 地球科学进展, 16 (2) :163 – 171.
- 林清, 施苏华, 彭平安, 等, 2002. 青藏高原多年冻土沉积物中埋藏植物 DNA 特征的初步分析. 冰川冻土, 24 (1) :28 – 31.
- 万诚, 崔银秋, 段然慧, 等, 2001. 夏家店等古人骨 DNA 的提取、扩增及序列分析. 中国生物化学与分子生物学报, 17 (5) :636 – 641.
- 西安半坡博物馆, 陕西省考古研究所, 临潼县博物馆, 1988. 姜寨—新石器时代遗址发掘报告. 北京 :文物出版社.
- 杨洪, 1995. 古代 DNA 序列的分析与甄别——兼评恐龙 DNA 研究. 古生物学报, 34 (6) :657 – 673.
- 杨淑娟, 赖旭龙, 2003. 中国第一例猛犸象古 DNA 研究. 地球科学——中国地质大学学报, 28 (2) :136, 142.