

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.26.043

· 专论与综述 ·

古 DNA 提取技术新进展 *

柳天雄 罗 佳 黄菊芳[△] 曾乐平[△]

(中南大学基础医学院人体解剖学与神经生物学系 湖南 长沙 410013)

摘要: 古 DNA 是揭示古代生物生长状态以及生物千百年来进化情况的最重要的信息载体,在治疗人类遗传性的疑难病症及牲畜饲养和粮食作物种植等方面都有重大的贡献。古 DNA 提取技术作为获得该重要的信息载体的最重要手段,长久以来受到了世界各地的考古学家以及医学研究学者们的高度重视。随着科学的发展,古 DNA 提取技术已经形成多种核心方法:Chelex-100 法、酚-氯仿抽提法、二氧化硅(硅粒)法、NaOH 法、硅离心柱法试剂盒、磁珠法试剂盒等方法。本文将根据最新的研究成果对以上提到的几种方法进行分析比较,以期能够为将来古 DNA 提取技术的发展创新提供新的思路与方向。

关键词: 古 DNA; 古 DNA 提取技术; mtDNA 提取

中图分类号: Q91-3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)26-5170-06

Progress in Ancient DNA Extraction Technology*

LIU Tian-xiong, LUO Jia, HUANG Ju-fang[△], ZENG Le-ping[△]

(Department of Anatomy and Neurobiology, School of Basic Medical Science, Central South University,
Hunan, Changsha, 410013, China)

ABSTRACT: Ancient DNA is the information carrier that reveal the ancient organism growing state and the evolutionary status of living creature in millions of years. It brings the great contribution in human hereditary diseases treatment, crop cultivation and so many other filed. Ancient DNA extraction technology, as the most important way to take the information carrier, has attracted the attention of many scientists. With the development of scientific, ancient DNA extraction technology has formed of some conventional techniques: Chelex-100 method, phenol and chloroform method and so on. Based on the latest research results, here we compared and analyzed the above mentioned techniques so as to provide new ideas for the development of ancient DNA extraction technology.

Key words: Ancient DNA; Ancient DNA extraction technology; MtDNA extraction

Chinese Library Classification(LCL): Q91-3 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)26-5170-06

前言

由于科技的发展,DNA 的研究工作变得更加便捷准确。关于现今存活的生物的 DNA 研究已经达到了一个非常发达的水平。但是,古 DNA 作为古生物,尤其是古人类留给当今生命科学、医学等很多其他科学门类的科研工作者们一笔十分宝贵的财富,科研工作者们对这份宝藏的充分挖掘仍然在持续进行着。21 世纪之后,古 DNA 提取以及对其遗传信息的分析研究已经成为生物进化、人类疾病治疗等研究领域最重要的手段之一。古 DNA 具体是指古代生物遗体或遗迹中残存的 DNA 片段,包括古代动植物、微生物和古代人类 DNA。其中古人类 DNA 按来源大体可分为三类:软组织(肌肉、皮肤以及各种内脏等)、硬组织(骨骼以及牙齿等)、化石。在这些来源中,硬组织特别是骨骼以及牙齿能够在长久的岁月中得到有效的保存,因此,硬组织是古 DNA 研究中最常使用的对象。随着科学技术的

发展,古 DNA 研究经历了从个别样品中获取线粒体 DNA 当中的微小片段,到大范围研究古代群体,甚至灭绝生物的线粒体或核基因组全序列,这其中古 DNA 提取技术的发展起到了至关重要的作用。

1 生物死亡后 DNA 的衰退与消亡

当生物体死亡后,其体内的遗传物质经常被内源性核酸酶所分解消化,即使在快速干燥,低温或者高盐环境中 DNA 也会在转变成单核苷酸之前很快消消失活。缓慢却持续的影响,例如氧化作用,背景辐射,水解作用等都会使得 DNA 发生长期的毁灭性变化^[1]。

由于古 DNA 特殊的保存环境,注定了古代的核基因组 DNA 很难得到保留,因此目前的古 DNA 研究对象主要是线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 和 Y 染色体 DNA (Yehromosome DNA, Y-DNA),而常染色体 DNA (autosomal

* 基金项目:国家“十二五”科技支撑计划课题资助项目(2012BAK14B03);湖南省自然科学基金项目(12JJ4023)

作者简介:柳天雄(1988-),男,硕士研究生,主要研究方向:古 DNA 提取, E-mail: dirkltx41@163.com

[△] 通讯作者:黄菊芳,曾乐平,主要从事生物湿尸保护与研究

(收稿日期:2014-02-25 接受日期:2014-03-20)

DNA)一般只能用于现代 DNA 的研究。

mtDNA 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,特别是在人类古 DNA 的研究中其具有得天独厚的优势。mtDNA 是由 16 569 个碱基对组成的闭合双链环状分子,分为编码区和非编码区。非编码区也叫控制区(如图 1 可以看出线粒体 DNA 各片段的分布),是 mtDNA 基因组中进化速率最高、最具多态的区域^[2];从揭示从古至今的生物密码的角度来说,mtDNA 不仅可以在数十万甚至是数百万年间保持稳定,最重要的事它还具有十分远大的研究前景。

虽然 mtDNA 的信息提取方法和技术越来越完善,但是也经常得出错误的信息。Herrnstadt 等^[3]所报道的 560 条序列中所出现的大部分颠换(包括绝大部分 G 颠换),经其重新测序后证明都是错误的^[4]。尽管线粒体 DNA 提取过程也无法做到尽善尽美,但是在古 DNA 保存的极端环境中,几乎毫无保护的核基因组根本无法得到保存,早在 1984 年,Higuchi 等^[5]在 Nature 中的报道就显示他们克服了极大困难的前提下仅仅提取到了两个微小的 mtDNA 片段。

2 古 DNA 提取方法研究概述

古 DNA 作为一种特殊的 DNA,其来源一般非常稀少。且得到的标本一般经过几十上百年,有的可以达到几千上万年甚至更加久远。因此一般存在于古标本中的 DNA 等其他大分子物质都会受到程度不等的破坏,要想从稀少且保存不完整的古代标本中提取到令人满意的 DNA 分子片段,就必须将已有的 DNA 方法进行革新,才能满足其特殊的要求。

古 DNA 的提取方法的变革随着生物技术的发展不断创新,经历了传统的 Chelex-100 法、酚仿抽提法、二氧化硅(硅粒)法、NaOH 法到现在的硅离心柱法和磁珠法的商业试剂盒等提取 DNA 的过程^[6]。

2.1 Chelex-100 法

Chelex-100 是一种由苯乙烯、二乙烯苯共聚体组成的化学螯合树脂,含有成对的亚氨基二乙酸盐离子,可螯合多价离子,特别是对高价金属离子有很高的亲和力和螯合作用。在低离子强度、碱性及煮沸的条件下,可以使细胞膜破裂,并使蛋白质变性,通过离心除去 Chelex 颗粒,使其结合的物质与 DNA 分离。用于缓冲液和离子试剂的超纯化。可清除金属污染物而不改变非金属离子的浓度。铁盐形式用于草甘膦浓缩。Chelex-100 能有效除去非核酸有机物,主要用于提取全血或血痕、精液或精斑、混合斑、毛发、培养细胞等。

虽然 Chelex-100 提取法作为最早在古 DNA 研究领域使用的提取方法,但是随着考古、遗传方面研究发展的要求不断提高,Chelex-100 提取法在提取纯度方面的缺陷就开始显现,同时由于各种商业试剂盒的发展也使得 Chelex-100 提取法开始逐渐退出古 DNA 研究的舞台,现在 Chelex-100 提取法主要是结合其他传统方法的基础上在研究一些保存较为完好的古代标本时还是可以在节约成本方面有自己的优势。如郭丽萍等人在他们的研究明代保存情况比较好的古尸时就利用了酚

仿抽提法与 Chelex-100 相结合的提取方法^[7]。

2.2 酚仿抽提法

饱和苯酚-氯仿抽提法,是一种经典的提取 DNA 的方法。由于其成本低廉方法流程简便成熟且提取效果比较理想,所以在很长一段时间内一直被利用作为提取 DNA 的首选方法,基于酚仿抽提法的改进也在世界各地不断出现。酚仿抽提法主要是以苯酚:氯仿:异戊醇=25:24:1 的比例配制的抽提液与样品进行混合后对混合液进行离心处理,以最终得到所需的 DNA 提取物。

A.Farrugia 等人在提取古人类 DNA 时分别在进行了酚仿抽提 DNA 后再利用 CleanMix Kit 和 QIAamp DNA mini® Kit 对所得的 DNA 进行纯化并在加入 QIAamp DNA mini® Kit 前加入了异戊醇对酚仿抽提产物进行了纯化^[8]在对两种处理方法使用后所得到的结果对照中发现在进行后者的改进后所得到的结果明显得到了更好的纯化样品。又如 Maria de Lourdes, Muñoz 等人在无菌环境中获得了墨西哥古人类的骨骼样本后利用苯酚-氯仿抽提法对其骨骼样本中的 DNA 进行提取并进行离心等方法进行再提纯^[9],也是现今科研中运用得十分成熟的技术。Sebastien Calvignac 等人在他们对古熊类的样本研究中采用了经典的酚仿抽提法^[10],利用混合抽提液对所得的样本先后进行三次冲洗,并对提取出来的 DNA 使用了 QIAquick kit 做出了进一步的提纯处理,最终也能得到让人满意的结果。

饱和苯酚-氯仿抽提法作为与 Chelex-100 抽提法同样最早被利用作为古生物 DNA 提取的经典方法有着比后者更好更稳定的提取效果,同时又有着更加简便的处理方法与配置步骤,因此有着比较广泛的应用基础。但是,该方法需要样本的 DNA 含量较高,而古代毛皮的 DNA 在长期埋藏过程中降解严重, DNA 含量普遍低,利用乙醇或异丙醇很难将 DNA 沉淀出;毛皮等样本中含有大量的胶原蛋白和角蛋白,需要苯酚-氯仿反复萃取,操作步骤繁琐,极易产生外源 DNA 污染,而且反复的抽提对 DNA 链的机械剪切机会较多,对 DNA 有伤害;苯酚-氯仿虽然能很好地沉淀蛋白质,但却很难除去毛皮标本中的 PCR 抑制剂,如色素物质等;与此同时苯酚-氯仿对人体的毒性较大^[11]。

2.3 二氧化硅(硅粒)法

利用二氧化硅特异地吸附核酸的特性,建立了从琼脂糖凝胶中回收 DNA 的方法。该方法简单、快捷、经济、适用,二氧化硅纯化系统极其廉价、制备容易、操作简单更适用于实验室常规使用,通过对回收 DNA 的酶切、连接等实验证实了所回收的 DNA 片段能够满足进一步的实验要求^[12]。

Daniel Vanek 在他们的研究中利用了二氧化硅法,并在该法原来的步骤的基础上在提取的最后一步将得到的 DNA 样品加入到离心柱中进行再纯化^[13],也就是先后进行两次二氧化硅法提取,结果显示在此种处理的基础上得到了更加理想的纯化样品。Maria de Lourdes Muñoz 等人在无菌环境中获得了墨西哥古人类的骨骼样本后利用 QIAquick (Qiagen)的硅粒试剂盒进行 DNA 的抽提并在稍后对硅粒柱体进行反复的提取液再清洗,以此得到更好的效果^[9]。

二氧化硅法利用了其材质的特殊优越性,同时在性价比上以及操作简便性上都具有很好的效果,现在以硅材质制成的商业试剂盒也正在不断的蓬勃发展着。二氧化硅法作为一种传统的 DNA 提取方法在古 DNA 样本的提取方面仍需提高提取精度以及对污染物的排除能力。

2.4 NaOH 法

NaOH 法主要是利用碱对核酸物质的析出作用从样本中提取 DNA,但是由于 NaOH 法本身比较粗糙,除了有时短、方法简单的优点外,缺点也很明显:常有 DNA 样品扩增不出 PCR 产物的情况^[14]。因此他们采用了以 CTAB(十六烷基三乙基溴化铵)与酚仿法相结合作为主要手段,并在保证提取效果的前提下尽量简化了提取步骤,最终得到了较为理想的提取效果。

Živko Jovanovic 等人在提取古人类 DNA 时提到了他们使用改进的 CTAB 法,在加入了 1mL CTAB(比经典方法提高了 CTAB 的使用量)后再对样本进行 NaOH 法提取,并在纯化过程中加入 PVPP^[15]。在这个过程中 Živko Jovanovic 等人在将此法与 Illustra GenomiPhi HY DNA Amplification Kit(Amersham, GE Healthcare, UK)以及 DNAeasy kit(QIAGEN)相比较后发现了在提取试剂过程中商用试剂盒还是体现出了较好的优势。

NaOH 法作为一种传统的碱法提取 DNA 方法由于提取过程比较粗糙,所以无法在古 DNA 提取中单独使用,现在的文献报道的一般是将该方法作为其他方法的一种有益补充以提高提取效率,作为一种简便的辅助手段,NaOH 法还是具有一定的优势。

2.5 硅离心柱法试剂盒

特殊的硅基质离心柱是一种独特的吸附材料,它能够特异性吸附 DNA,而 RNA 与蛋白质穿过。在正常情况下,核酸表面覆盖了一层由水分子组成的亲水薄膜,以维持其水溶性。高浓度盐离子的加入破坏了核酸表面亲水薄膜的相对有序排列,形成了疏水环境。在此环境中,核酸与硅胶膜能有效结合,而蛋白质、代谢产物和其他污染物则不能结合。而一般情况下市售的试剂盒中都会采用碱变性抽提的原理:是在 pH 高于 12.6 的碱性条件下,染色体 DNA 的氢键断裂,破坏了碱基配对,导致双螺旋结构解开而变性,但闭环的质粒 DNA 链由于处于拓扑缠绕状态而不能彼此分开。当 pH 调至中性时,质粒 DNA 链迅速恢复到原来构型,仍保存于溶液中。而变性的染色体 DNA 不能再复性,通过离心,随不稳定的大分子 RNA、蛋白质-SDS 复合物等一起沉淀下来,使两者得以分离。由于现今市面上该试剂盒的存在比较普遍,且方法简便,因此是一种应用比较广泛的古 DNA 提取方法。

在 Krithivasan Sankaranarayanan 等人对岩石中古微生物的研究中,他们先后采用了 12 种不同的 DNA 提取方法,结果显示在利用超高速离心机以及硅离心柱试剂盒相结合的方法时得到了最好的结果^[16]。盛桂莲等人在研究古 DNA 实验体系与技术的过程中,提出了要对相关的古 DNA 的研究方法进行规范与定义,他们在总结古 DNA 的提取方法的时候提到了使用基于硅粒的 GuSCN-玻璃珠法^[17],现在的一些主要试剂盒也都

是基于二氧化硅能够吸附核酸的特性制成的。Nadin Rohland 等人在研究古猛犸的过程中采用了传统的硅离心柱试剂盒与硫氰酸胍盐结合的方法^[18]进行了古 DNA 提取,随后盛桂莲^[19]等人也依照他们的方法对古斑鬣狗化石的古 DNA 进行了提取。在于慧鑫等人研究内蒙古地区古山羊的过程中采用了 Modified QIA quick Method^[20],这种方法便是在利用硅离心柱试剂盒的基础上进行的一种 DNA 提取与纯化技术。此外韩璐等人^[21]以及蔡大伟^[22]等人也利用了硅离心柱试剂盒分别对内蒙古地区春秋及东周时期的绵羊的 DNA 以及距今 4000 多年的新疆小河古墓中出土的黄牛毛皮中的 DNA^[23]进行了提取,这是由于在该领域有应用成熟且效果上佳的试剂盒可以使用。

在现在主要的商业试剂盒生产中,有绝大部分的厂商利用了二氧化硅法的原理,基于该方法的成本的低廉,操作的简便以及应用的广泛相关商业试剂盒的开发发生了飞速的发展,现今在进行精确严格的古 DNA 实验室提取过程中该类商业试剂盒应用已经十分普遍,并且得到了研究者们的认可。

2.6 磁珠法试剂盒

磁珠法试剂盒是生物科学和纳米材料科学二者合一的高新技术产品,是我国 DNA 提取技术和纯化技术的一次大的突破,彻底的解决了我国 DNA 的提取与纯化长期依赖进口的局面,其价格只有进口产品的 1/3。磁珠法试剂盒是纳米技术、分子生物学技术、生物医学技术和法医学技术等相互交叉综合所产生的广泛应用于分子生物学、医学、法医学、考古学、大中小学的生物试验等许多领域的 DNA 提取方法它有着传统方法所无法比拟的优势:含有独特的裂解液/蛋白酶 K 迅速裂解细胞并灭活细胞内核酸酶,使得基因组 DNA 能够选择性的吸附于磁珠。不使用有毒的苯酚等试剂,也不需要乙醇沉淀等步骤,而且省去了离心步骤。快速简捷,不用多次漂洗磁珠也可确保高纯度。长度可达 20 kb-50kb,洗脱液可以用双蒸水代替,并且不影响接下来的反应。

樊龙江等人在研究河姆渡古稻的过程中利用了磁珠分离和纯化 DNA 的技术^[24]并对该方法进行了相应的改进,在 DNA 分离的过程中使用非离子、阳离子清洁剂以保护古 DNA 序列,减少相关杂质的影响。

磁珠法作为一种新兴的 DNA 提取技术,由于其综合了纳米技术、分子生物学技术、生物医学技术等多项高新技术的优势,所以就其提取效果来说在古 DNA 提取领域具有十分明显的优势。但是考虑到该方法现在比较经常使用的商业试剂盒成本比较高,因此为了秉承经济节约的实验室准则,一般在实验室应用领域的覆盖性比较窄,在某些大型课题中且对提取结果有十分严格的要求的古 DNA 提取实验中才有机会得到使用。

2.7 其他方法

除了,以上被利用得较多的方法外,有一些科研学者在研究古 DNA 过程中根据自己的经验提出了一些联合方法如 Nadin Rohland 等人在他们的研究古 DNA 过程中就使用了一种联合批处理方法^[25]。在 M. de Bruyn 等人的研究中,他们也提到了他们使用了一种新型试剂盒(QIAamp DNA micro kit)用来提取并修复他们研究样本中的微小的 DNA 片段^[26]。值得提出

的是刘冉冉等人在利用古代猪骨研究古 DNA 的提取方法效率时就建立了用改进的异丙醇沉淀法与传统的二氧化硅试剂盒法提取 DNA 效果的对照^[27],并最终用实验结果证明了由于异丙醇沉淀法对古 DNA 提取过程中能够有效的去除 PCR 抑制物,因此可以提高对古 DNA 的提取效率,同时还可以大大的节约由于使用试剂盒所带来的高成本。

现在的研究学者们并不局限于某些经典成熟的古 DNA 提取方法,而是大胆的对已有方法进行改进甚至创造性的提出了一些新的方法,这无疑是对古 DNA 提取领域的有益补充。从以上例子看来,在提取技术方面的创新主要是将多种方法的合理结合或者是在已有方法中添加某些有助于提取的试剂。

3 古 DNA 的提取效果分析

当通过以上的各种方法成功的提取到一定纯度的古 DNA 样品之后,必须将古 DNA 样品通过 PCR、电泳检测等手段对获得的古 DNA 样品的纯度进行检测,以确定得到的古 DNA 样品提取过程是否出现了失误或是通过对不同方法提取的古 DNA 进行检测来优选出一种更加合适的古 DNA 提取方法同时方便对已有的方法进行相应的改进。关于古 DNA 提取样本的分析主要涉及 PCR 技术以及 DNA 测序以及相关的检测 DNA 纯度及质量的电泳技术等。

古 DNA 提取样品常用的 PCR 技术是在模板 DNA、引物和四种核苷酸存在的条件下,在热稳定性较高的 DNA 聚合酶作用下的酶促反应技术,已经有越来越多的古 DNA 提取领域的研究者们应用了这一技术。现在 PCR 技术在不同研究过程中都出现了不同的变种如乳化 PCR (em-PCR)^[28]、巢式 PCR (NESTPCR)^[29]、多重 PCR 等方法^[30]等 PCR 技术。在完成了古 DNA 样本的 PCR 工作之后,就需要对 PCR 后的样本进行 DNA 测序工作以完成对相关古生物或是古代样本的生物信息的获取。现在在学界比较流行与成熟的测序方法主要包括焦磷酸测序法^[31]、Solexa 合成测序法^[32]、SOLiD 测序法^[33]等技术。除此之外,检测被提取的古 DNA 的纯度及质量也是评估提取方法特别重要的一个环节,现在用于检测 DNA 提取纯度及质量的方法主要就是依赖于各种电泳技术,例如,在黎东华等人提取芝麻高纯度线粒体 DNA 过程中用于检测 DNA 纯度的 1.0% 琼脂糖凝胶电泳^[34]技术,以及比较经典的紫外分光光度计测定 mtDNA 在 OD260nm、OD280nm 和 OD230nm 的值^[35],计算 mtDNA 溶液的浓度和纯度。或者是在提取后的样品中加入限制性内切酶进行酶切^[36],然后用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳技术来观察酶切效果。除了以上比较传统经典的 DNA 检测方法外,还有许多其他改进的方法也被各个国家的研究者们提及,这里不再一一赘述。作为古 DNA 提取结果的检测环节,各种新型的检测技术也确实值得我们各个研究古 DNA 的研究者们持续关注。

4 古 DNA 提取问题讨论

由于古 DNA 保存环境的特殊性以及来源的稀有性,因此古 DNA 将面临以下问题:1.一是由于埋藏环境的影响,古生物

遗存并得以保留的 DNA 含量极其微弱且多已分解成片断。2.污染问题,古 DNA 研究的整个过程包括样品采集、DNA 抽提、PCR 扩增和克隆等都可能引入污染^[37-39]。所以在研究 DNA 提取技术时要特别注意以上问题的存在,在实验方案设计以及实验执行过程中都要区别于一般实验标本的 DNA 提取,从而使得古 DNA 提取技术越发的成熟与稳定。

许多古样本包含有外源 DNA。例如,从来自欧洲不同地点 24 个古代尼安得特人残骸的 DNA 提取以及检测研究中,仅发现 4 个样本包含了尼安得特人的 DNA。利用当代人类 DNA 的扩增引物以及当代洞穴熊的 DNA 引物来对从古代尼安得特人标本中提取的 DNA 以及同一洞穴的洞穴熊的 DNA 样本进行扩增检测对比发现,洞穴熊的 DNA 占据了所得到的 DNA 大部分成分^[40]。因此,这导致古 DNA 研究发展步伐受到了极大挑战且必须进行更多的重复研究以排除假阳性结果。

5 前景展望

目前,人们运用现有的 DNA 提取技术已经能够从各种古代动植物体组织中获得珍贵的基因组第一手材料有的甚至能够从非有机体中提取的数千年前的古代生物 DNA。例如,在对 2400 年前的希腊古沉船遗迹的古 DNA 检测研究中^[41],研究者们就通过一系列的提取步骤,成功的在古陶壶碎片中提取到了类似古代藻类的 DNA。这就揭示了在古 DNA 提取方法的研究上可以由单纯的从动植物组织中转向到从非有机体中提取古代 DNA,为古 DNA 研究提供了更多的标本来源。现在,更加简单的提取步骤以及新的提取试剂已经被逐渐的开发出来,例如在研究者们在对芬兰发掘的铁器时代的古代羊的 DNA 进行提取中^[42],就采取了向骨骼粉末中添加一定量的尿素、EDTA 以及蛋白酶 K 并在不断搅拌中过夜的方法,也取得了较好的结果。总而言之,我们大胆推测进一步的古 DNA 研究的进展将具有以下鲜明特征,即利用简单方便并且经济的手段从更广阔范围内的古 DNA 标本中有效的提取完整的 DNA 片段。此外,对所提取古 DNA 的检测方法的精确度将会有进一步的飞越。

参考文献(References)

- [1] Hofreiter M, Serre D, Poinar HN, et al. Ancient DNA [J]. Nat Rev Genet, 2001, 2(5): 353-359
- [2] Vigilant L, Pennington R, Harpending H, et al. Mitochondrial DNA sequences in single hairs from a southern African population [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989, 86(23): 9350-9354
- [3] Herrnstadt C, Elson JL, Fahy E, et al. Reduced-median-network analysis of complete mitochondrial DNA coding-region sequences for the major African, Asian, and European haplogroups [J]. Am J Hum Genet, 2002, 70(5): 1152-1171
- [4] Herrnstadt C, Preston G, Howell N. Errors, Phantoms and otherwise, in human mtDNA sequences[J]. Am J Hum Genet, 2003, 72(6): 1585- 586
- [5] Higuchi R, Bowman B, Freiberger M, et al. DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family [J]. Nature, 1984, 312 (5991): 282-284
- [6] 申万祥,姚默. 生物考古中的 DNA 分析技术概况[J]. 畜牧与饲料科

- 学, 2012, 33(2): 11-13
- Sheng Wan-xiang, Yao Mo. The survey of DNA analysis technics in bioarchaeology [J]. Animal Husbandry and Feed Science, 2012, 33(2): 11-13
- [7] 郭丽萍, 刘建兴, 李桢, 等. 复合扩增云南明朝古尸 DNA 分析[J]. 昆明医学院学报, 2009: 9-11
- Guo Li-ping, Liu Jian-xing, Li Zhen, et al. DNA Analysis of an Ancient Corpse of Ming Dynasty Found in Yunnan [J]. Journal of Kunming Medical University, 2009: 9-11
- [8] A Farrugia, C Keyser, B Ludes. Efficiency evaluation of a DNA extraction and purification protocol on archival formalin-fixed and paraffin-embedded tissue [J]. Forensic Science International, 2010, 194: 25-28
- [9] Maria de Lourdes, Muñoz. Extraction and Electrophoresis of DNA from the Remains of Mexican Ancient Populations [J]. Gel Electrophoresis-Advanced Techniques, 2012, 24(4): 479-500
- [10] Sebastien Calvignac. Ancient DNA evidence for the loss of a highly divergent brown bear clade during historical times [J]. Molecular Ecology, 2008, 17: 1962-1970
- [11] 蔡大伟, 赵欣, 周慧, 等. 一种简便高效的古代动物毛皮 DNA 提取方法[J]. 吉林大学学报(理学版), 2010, 48(4): 599-693
- Cai Da-wei, Zhao Xin, Zhou Hui, et al. A Simple and Efficient Method for DNA Extraction from Ancient Animal Dried Skin [J]. Journal of Jilin University (Science Edition), 2010, 48(4): 599-693
- [12] 郭仁峰, 马洪滨, 程云. 二氧化硅法纯化琼脂糖凝胶中的 DNA [J]. 基础医学与临床, 1998: 238-239
- Guo Ren-feng, Ma Hong-bin, Cheng Yun. Recovery of DNA Fragments from Agarose Gels by Silica Purification [J]. Basic Medical Sciences And Clinics, 1998: 238-239
- [13] Daniel Vanek. Kinship and Y-Chromosome Analysis of 7th Century Human Remains: Novel DNA Extraction and Typing Procedure for Ancient Material [J]. Forensic Science, 2009, 50: 286-295
- [14] 田再民, 龔学臣, 季伟. 小麦 DNA 提取方法的比较[J]. 湖北农业科学, 2009, 48(7): 1537-1539
- Tian Zai-min, Gong Xue-chen, Ji Wei. Comparison of Several Kinds of Wheat DNA Extraction Methods [J]. Hubei Agricultural Sciences, 2009, 48(7): 1537-1539
- [15] Živko Jovanovic, Nemanja Stanisavljevic, Aleksandra Nikolic, et al. Extraction of the Ancient DNA from Charred Seeds from the site of Hissar in South Serbia Ratar. Povrt[J]. Field Veg, 2011, 48: 227-232
- [16] Krithivasan Sankaranarayanan, Rita Spathis.J, Koji Lum, et al. Ancient Microbes from Halite Fluid Inclusions: Optimized Surface Sterilization and DNA Extraction[J]. PLoS ONE, 2011, 6: 1-8
- [17] 盛桂莲, 赖旭龙, 侯新东. 古 DNA 实验体系及技术[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2009, 25(2): 116-125
- Sheng Gui-lian, Lai Xu-long, Hou Xin-dong. Standard Experimental System and New Technologies on Ancient DNA Research [J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2009, 25(2): 116-125
- [18] Nadin Rohland, Heike Siedel, Michael Hofreiter. A rapid column-based ancient DNA extraction method for increased sample throughput[J]. Molecular Ecology Resources, 2010, 10: 677-683
- [19] 盛桂莲, 袁俊霞, 伊剑, 等. 河北秦皇岛灵仙洞斑鬣狗化石的古 DNA 初步分析 [J]. 地球科学: 中国地质大学学报, 2009, 34(6): 878-883
- Sheng Gui-lian, Yuan Jun-xia, Yi Jian, et al. Ancient DNA Analyses of the Spotted Hyena from Lingxian Cave, Qinhuangdao, Hebei Province [J]. Earth Science-Journal of China University of Geosciences, 2009, 34(6): 878-883
- [20] 于慧鑫, 周慧. 内蒙古板城和双古城遗址古山羊线粒体 DNA 分析 [D]. 吉林大学, 2009
- Yu Hui-xin, Zhou Hui. Inner Mongolia Bancheng and Twin city cites ancient mitochondria DNA analysis[D]. Jilin University, 2009
- [21] 韩璐, 周慧. 内蒙古东周时期绵羊和山羊的线粒体 DNA 研究[D]. 吉林大学. 2012
- Han Lu, Zhou Hui. The Eastern Zhou Dynasty Inner Mongolia sheep and goat mitochondria DNA research[D]. Jilin University, 2012
- [22] 蔡大伟, 朱泓, 韩璐, 等. 内蒙古春秋战国时期古绵羊线粒体 DNA 分析[J]. 自然科学进展, 2009, 19(10): 1049-1055
- Cai Da-wei, Zhu Hong, Han Lu, et al. Ancient sheep mtDNA analysis in Inner Mongolia during Spring and Autumn Period [J]. Progress in Natural Science, 2009, 19(10): 1049-1055
- [23] 蔡大伟, 于慧鑫, 赵欣, 等. 一种简便高效的古代动物毛皮 DNA 提取方法[J]. 吉林大学学报(理学版), 2010, 7(48): 659-693
- Cai Da-wei, Yu Hui-xin, Zhao Xin, et al. A Simple and Efficient Method for DNA Extraction from Ancient Animal Dried Skin [J]. Journal of Jilin University(Science Edition), 2010, 7(48): 659-693
- [24] 樊龙江, 桂毅杰, 王煜, 等. 河姆渡古稻 DNA 提取及其序列分析 [J]. 科学通报, 2011, 56(28-29): 2398-2403
- Fan Long-jiang, Gui Yi-jie, Wang Yu, et al. The ancient Oryza sativa Oryza sativa DNA extraction and sequence analysis [J]. Chinese Science Bulletin, 2011, 56(28-29): 2398-2403
- [25] Nadin Rohland, Anna-Sapfo Malaspinas, Joshua L. Pollack, et al. Proboscidean Mitogenomics: Chronology and Mode of Elephant Evolution Using Mastodon as Outgroup[J]. PLoS Biology, 2007, 5(8): 1663-1671
- [26] M. de Bruyn, L. R. Parenti, G. R. Carvalho. Successful extraction of DNA from archived alcohol-fixed white-eye fish specimens using an ancient DNA protocol[J]. Journal of Fish Biology, 2011, 78: 2074-2079
- [27] 刘冉冉, 袁靖, 赵兴波, 等. 一种实用可靠的古代 DNA 获取方法 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2009, 36(11): 1495-1502
- Liu Ran-ran, Yuan Jing, Zhao Xing-bo, et al. A Practical and Efficient Method for The Retrieval of Ancient DNA Sequence [J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2009, 36(11): 1495-1502
- [28] 刘艳. 新型 PCR 技术检测土壤中的典型病原菌 [D]. 南京: 南京师范大学, 2010
- Liu Yan. New type PCR technology detected Typical pathogen in soil [D]. Nanjing: Nanjing Normal University, 2010
- [29] 申卫收, 尹睿, 林先贵, 等. 埤墩山遗址古水稻土细菌与古菌群落的 PCR-DGGE 分析[J]. 生态学报, 2008, 28(6): 2916-2926
- Shen Wei-shou, Yi Rui, Lin Xian-gui, et al. PCR-DGGE analyses of

- bacterial and archaeal community diversities in ancient paddy soils discovered in Chuodun shan Site, Suzhou, China [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2008, 28(6): 2916-2926
- [30] Krause J, Dear P H, Pollack J L, et al. Multiplexed amplification of the mammoth mitochondrial genome and the evolution of Elephantidae[J]. *Nature*, 2006, 439(7077): 724-727
- [31] 徐保红, 李秀娟, 杨芳, 等. PCR- 焦磷酸测序法快速鉴定副溶血性弧菌[J]. *预防医学情报杂志*, 2011, 27(1): 78-80
- Xu Bao-hong, Li Xiu-juan, Yang Fang, et al. Detection of *Vibrio parahaemolyticus* by PCR and Pyrosequencing[J]. *J Prev Med Inf Jan*, 2011, 27(1): 78-80
- [32] 包华. 新一代测序技术下的软件开发和转录组学研究 [D]. 广州: 中山大学, 2009
- Bao Hua. Software development for next-generation sequencing and transcriptome study using next-generation sequencing[D]. Guangzhou: Sun Yat-Sen University, 2009
- [33] 于聘飞, 王英, 葛芹玉. 高通量 DNA 测序技术及其应用进展[J]. *南京晓庄学院学报*, 2010: 1-5
- Yu Pin-fei, Wang Ying, Ge Qin-yu. High-fluxed DNA Sequencing Technology and Its Application Development [J]. *Journal of Nanjing Xiaozhuang University*, 2010: 1-5
- [34] 黎冬华, 王林海, 张艳欣, 等. 芝麻高纯度线粒体 DNA 提取技术研究[J]. *华北农学报*, 2011, 26(3): 90-94
- Li Dong-hua, Wang Lin-hai, Zhang Yan-xin, et al. The Study on the Extraction Technology for Pure Mitochondrial DNA from Sesame [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2011, 26(3): 90-94
- [35] 龙绛雪, 曹福祥, 王志文. 油菜线粒体 DNA 提取纯化方法研究[J]. *中南林业科技大学学报*, 2009, 29(3): 106-110
- Long Jiang-xue, Gao Fu-xiang, Wang Zhi-wen. Isolation and Purification of Mitochondrial DNA from Cole [J]. *Journal of Central South University of Forestry & Technology*, 2009, 29(3): 106-110
- [36] 裴得胜, 蔡平钟, 李名扬, 等. 提取水稻线粒体 DNA 的一种简易方法[J]. *四川大学学报*, 2002, 39(2): 18-20
- Pei De-sheng, Cai Ping-zhong, Li Ming-yang, et al. A Simple Method For Isolation of Rice Mitochondrial DNA [J]. *Journal of Sichuan University(Natural Science Edition)*, 2002, 39(2): 18-20
- [37] 崔娅铭. 化石中的生命密码——晚更新世人类化石的 DNA 研究进展[J]. *化石*, 2011(2): 2-7
- Cui Ya-ming. Life in the fossil password-The DNA research progress of fossil man in Epipleistocene [J]. *Fossil*, 2011(2): 2-7
- [38] Wilbur A K, Bouwman A S, Stone A C, et al. Deficiencies and challenges in the study of ancient tuberculosis DNA [J]. *Journal of Archaeological Science*, 2009, 36 (9): 1990-1997
- [39] 徐智, 谭婧泽, 李士林, 等. 古 DNA 及其考古学意义[C]. 第十届中国古脊椎动物学学术年会论文集. 北京: 海洋出版社, 2006: 143-153
- Xu Zhi, Tan Jing-ze, Li Shi-lin, et al. Ancient DNAs and Their Archaeological Significance [C]. *Proceedings of the Tenth Annual Meeting of the Chinese Society of Vertebrate Paleontology*. Beijing: China Occan Press, 2006: 143-153
- [40] Serre D, Langaney A, Chech M, et al. No evidence of Neandertal mtDNA contribution to early modern humans [J]. *PLoS Biol*, 2004, 2: 313-317
- [41] Maria C. Hansson, Brendan P. Foley. Ancient DNA fragments inside Classical Greek amphoras reveal cargo of 2400-year-old shipwreck [J]. *Journal of Archaeological Science*, 2008, 35: 1169-1176
- [42] Marianna Niemi, Auli Bluer, Terhi Iso-Touru, et al. Mitochondrial DNA and Y-chromosomal diversity in ancient populations of domestic sheep (Ovisaries) in Finland: comparison with contemporary sheep breeds [J]. *Genetics Selection Evolution*, 2013, 45: 2

(上接第 5179 页)

- Qin Shi-zhen, Xiang Qiu-lu, Yu Qi-fu, et al. Effects of heats, noise and combined factors on Ca^{2+} , Mg^{2+} content of cerebral mitochondria in rats[J]. *Space Medicine & Medical Engineering*, 1995, 8(2): 106-108
- [30] 任兆生, 欧阳骅, 李伟, 等. 高温、噪声、振动复合应激时人体体温调节的改变[J]. *中华航空医学杂志*, 1995, 6(4): 205-208
- Ren Zhao-sheng, Ouyang hua, Li Wei, et al. Changes of human thermoregulation during combined heat, noise and vibration stress[J]. *Chinese Journal of Aviation Medicine*, 1995, 6(4): 205-208
- [31] 苏先明. 噪声、振动和高温联合作用对海员交感神经——肾上腺系统的影响[J]. *工业卫生与职业病*, 1984, 10(3): 190
- Su Xiang-ming. Effects of combined vibration stress, noise and high temperature on seafarers' sympathetic nervous system and adrenal system [J]. *Industrial Health and Occupational Diseases*, 1984, 10(3): 190
- [32] Witterseh T, Wyon DP, Clausen G. The effects of moderate heat stress and open-plan office noise distraction on SBS symptoms and on the performance of office work[J]. *Indoor Air*, 2004, 14 (Suppl 8): 30-40
- [33] Kaoukis A, Deftereos S, Raisakis K, et al. The role of endothelin system in cardiovascular disease and the potential therapeutic perspectives of its inhibition [J]. *Curr Top Med Chem*, 2013, 13(2): 95-114
- [34] 秦世贞, 俞启福, 李庆棣, 等. 高温、噪声及其复合对大鼠血浆和肺组织中内皮素含量的影响[J]. *中华航海医学杂志*, 1997, 4(2): 72-74
- Qin Shi-zhen, Yu Qi-fu, Li Qing-di, et al. Effect of heats, noise and their combination on endothelin (ET) in plasma and lung of rats[J]. *Chinese Journal of Nautical Medicine*, 1997, 4(2): 72-74
- [35] Cary R, Clarke S, Delic J. Effects of combined exposure to noise and toxic substances—critical review of the literature [J]. *Ann Occup Hyg*, 1997, 41(4): 455-465