

古代 DNA 研究中污染的控制和识别

杨东亚

(加拿大 Simon Fraser University 考古系)

摘要: 现代分子生物学中 PCR 技术的发展使得直接分析古代动植物和人类材料中的 DNA 成为可能, 这为考古学、人类学和古生物学提供了一种新的研究手段。但由于 PCR 技术的高度敏感性和古代 DNA 含量的极其微量性, 古代 DNA 研究也极易受现代 DNA 污染。如何甄别所获得的 DNA 是真实的古代 DNA 而不是污染的现代 DNA 是所有古代 DNA 研究工作者都要面临的挑战, 污染的控制和识别也因此成为古代 DNA 研究中一个至关重要的问题。本文将着重讨论在古代 DNA 研究的各个步骤中应如何进行有效的污染控制和识别。

关键词: 古代 DNA; PCR; 考古学; 人类学; 污染 DNA; 污染控制; 污染识别

中图分类号: Q987 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3193 (2003) 02-0163-11

古代 DNA (ancient DNA) 研究是近年来由分子生物学和考古学、人类学及古生物学等交叉产生的一个新的研究领域, 它利用现代分子生物学的手段提取和分析存留在古代人类和动植物材料 (remains) 中的 DNA 分子^[1-7]。古代 DNA 研究的独特之处在于它打破了时间的限制, 可以直接地分析古代材料中的遗传信息, 可以开展许多先前用常规方法无法研究的课题, 它的出现受到了国内外生物学家、考古学家和人类学家的欢迎和重视^[8-17]。

但古代 DNA 研究并不是分子生物学和考古学或其它学科的简单叠加和组合。由于经历长年的化学、物理和生物降解 (degradation)^[18], 只有极少量的 DNA 能够保存下来^[19]。Mullis 在 80 年代发明的多聚酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 的扩增技术^[20] 给古代 DNA 研究带来了极大的方便^[21]。但也正是由于 PCR 的高度敏感性 (sensitivity) 和古代 DNA 含量的极其微量性, 古代 DNA 研究极易受现代 DNA 污染^[22-23]。在古代 DNA 研究的早期阶段, 有很多发表在著名学术期刊如 Nature 和 Science 上的研究后来证明多是由于现代 DNA 污染的结果, 因为这些涉及几百万乃至上亿年前的 DNA 研究要么经不起其它实验室的重复实验, 要么经不起对扩增的 DNA 序列的再分析^[24-25], 著名的例子有所谓六七千万年前的恐龙 DNA 研究^[26] 和上亿年前的琥珀中昆虫 DNA 研究^[27]。

越来越多的古代 DNA 工作者开始认识到污染事实上已经成为古代 DNA 研究中的最大问题, 因为它直接关系到古代 DNA 研究结果的可信性^[19, 22-23, 28-29]。在古代 DNA 研究中, 污染多是指与所要研究的古代 DNA 有着非常相似的现代 DNA 序列, 它可以是直接来自现代材料中的基因组 DNA (genomic DNA), 也可以是来自实验室里的 PCR 扩增产物 (PCR products)。污染的控制 (contamination controls) 就是要通过各种各样的方法排除和减少这些现代 DNA 的污染, 而污染的识别 (contamination detection) 则是通过阴性阳性对照和 DNA 序列分析来检测是否发生了污染以及污染的程度。古代 DNA 的甄别则是通过各种分析来证明所得到的 DNA 是真实的古代 DNA, 而不是污染的现代 DNA。在古代 DNA 研究中, 很显然, 只有在排除现代 DNA 污染的可能性后才能考虑古代 DNA 的真实性。本文根据作者自己从事

古代 DNA 研究的经验和教训,结合近年来国内外古代 DNA 研究的进展,重点讨论在古代 DNA 研究的各个步骤中应如何注意进行有效的污染控制和识别。

前 PCR 阶段和后 PCR 阶段

古代 DNA 研究中的前 PCR 阶段和后 PCR 阶段的实验必须在空间上分开进行^[5]。古代 DNA 研究以 PCR 扩增为界限可分为前 PCR 阶段和后 PCR 阶段。前 PCR 阶段(pre-PCR)包括古代材料的选择和去污染(decontamination)、DNA 的提取和 PCR 的加样(PCR-setup)。后 PCR 阶段(post-PCR)则包括古代 DNA 的扩增、电泳分析、直接测序和克隆分析。为了更有效地实施污染控制,前 PCR 阶段的试验必须在专用的古代 DNA 实验室(房间)中进行(此实验室不能进行任何现代 DNA 的工作)^[5,28]。这是因为前 PCR 阶段只是提取“处理”屈指可数的上百或上千个拷贝的极少量 DNA,而后 PCR 阶段则分析“处理”有着亿万个拷贝的大量 DNA,后 PCR 阶段的仪器设备以及实验台上不可避免地会“积累”有很多这类污染的 DNA 分子。如果这样的设备或实验台用于前 PCR 阶段的实验,其结果将是灾难性的污染。

用于前 PCR 阶段实验的专用实验室在布置和实验操作上也有一些特殊的要求。专用的前 PCR 实验室应配有独立的经紫外光 HEPA 过滤的进气系统(ventilation)和经过调整的正压气流(positive air),这样可以使得过滤的干净空气单向流动,避免因研究人员在房间里的移动或走动而引起空气“尘埃飞扬”的现象。如有条件,前 PCR 实验室应进一步分成 3 个或更多的小房间,每个小房间的实验台上也应配有带紫外灯的 HEPA Class 100 正压气流的超净台。在前 PCR 阶段,样本的“走动”方向必须是单向的,即只能是从材料选择,到去污染,到提取,然后到 PCR 加样,而每一步都应有专用的设备。这样既有利于污染的控制,也有利于对污染源的识别(如发生污染)。在实验过程中,应使用一次性的“干净”实验用品,如试管试剂;对必须多次使用的实验用品,应选择那些容易去污染的种类;应使用带有滤芯的移液头(filtered tips);应随时更换一次性的手套和随时穿戴一次性的面罩、头发罩、鞋套和实验服;应经常用 10% 的漂白粉溶液擦洗(不能以酒精代替,酒精可杀菌但不能“杀”DNA)和用紫外灯照射实验台^[1]。

古代材料的选择及去污染

在选择古代材料时,需要认真考虑材料已被污染的状况以及去除污染的难易程度。目前保存在博物馆和研究所里的绝大多数古代材料都已受到了不同程度的污染,去污染是一个必不可少的步骤。如有可能,应尽量选择易于去污染的古材料,如保存较好的密质骨或尚未萌出的牙齿。当然,其它的重要因素也需要认真考虑,如应选择那些有利于古代 DNA 保存的材料。尽管 DNA 的保存情况会因埋藏环境的不同而有很大的差别,但一般认为,牙齿优于骨骼,密质骨优于松质骨,骨骼组织优于软组织^[5,30]。

在去除古代材料上已有的污染时,务必要干净彻底。目前有很多方法可供使用^[5],如用一次性干净砂纸、手术刀片或电动打磨工具去除已被污染的材料表面^[5],也可用能破坏 DNA 分子的化学试剂如 10% 的漂白粉溶液处理古代材料^[5]和用紫外光破坏污染 DNA 分子^[31]。目前许多古代 DNA 实验室都用 Crosslinker 进行紫外光照射^[32],但 Crosslinker 必须是新的和专用的,不能和 DNA 杂交实验合用。上述 3 种方法去污染的机制有所不同,对某一具体的古代材料,很难确定那一种方法最有效。为了保证去污染的彻底性,可以多种方法一起使用,如先除去骨骼表面,再用 10% 的漂白粉液处理,最后用紫外光照射。

在粉碎和研磨材料时,应避免样本间的交叉污染。材料经去污染处理后需要粉碎和研

磨,可简单地通过研钵研磨,手动或电动电钻钻取,也可通过家庭用的咖啡粉碎机粉碎,但最有效的是用液氮冷冻粉碎机(liquid nitrogen grinding mill)粉碎^[51]。无论使用哪种方法,粉碎和研磨工具接触材料的部份应该容易清洗和经得起漂白粉或强酸强碱溶液的浸泡。

古代 DNA 的提取

在古代 DNA 的提取过程中,应注意选择最佳的提取方法。目前常用的方法有两大类:苯酚提取法^[33]和硅质提取法,其中后者又包括硅珠(silica beads)或硅粒(silica particles)提取法^[34]和硅质离心管(silica spin column)分离法^[35]等。判断古代 DNA 提取方法好坏的标准应该是看能否尽量多地提取出古代 DNA 模板(templates)以及能否获得杂质较少的古代 DNA 样本。但另一个不容忽视的标准是提取方法涉及到的操作步骤的多寡,很显然,较少的步骤尤其是较少开启试管的次数更有利于污染的控制。单单从这个意义上讲,硅质离心管分离法要优于其它方法^[35]。实际工作中,应综合评估来选择最佳的古代 DNA 提取方法^[30,36]。

在提取过程中,必须设置一个或多个空白提取对照。这些不加入古代材料的提取液经过提取过程而得到的样本可以用于随后的 PCR 扩增来监测提取过程和提取试剂是否受到了污染^[5]。

古代 DNA 的扩增

在扩增古代 DNA 时,需要特别注意扩增片段的短小性。在古代材料中,绝大多数的内源 DNA 已经被彻底破坏^[37],能够保存下来的一般也只是一些几百个碱基对(通常在 300bp 以下)的小片段^[5]。计划扩增的片段越小,古代 DNA 中可以参与扩增的模板就会越多,其扩增效果就会越好,污染 DNA (如存在)的污染影响相对也就会越小。可扩增片段的大小及难易程度也有助于对污染 DNA 的识别和对古代 DNA 的甄别,因为 DNA 的古老性和 PCR 可扩增长度之间似乎存在着一种“反向”关系,即 DNA 越古老其能够扩增的最大片段长度也就越小^[22]。如果扩增到的 DNA 片段长达上千个碱基对,其模板很可能是污染 DNA 而非真正的古代 DNA。

在古代 DNA 的扩增中,应避免使用坐巢式(nested)PCR。由于古代 DNA 模板量很少,似乎可以考虑使用这种方法来增加 PCR 反应的效率^[5],但在 PCR 第二次加样时很难进行有效的污染控制。近年来,许多生物公司推出的高效 PCR 聚合酶(在经受 50—60 个循环后仍能保持活性)可以在古代 DNA 的研究中用来增加扩增效率^[38]。

在古代 DNA 的扩增中,必须设置多个阴性和阳性对照^[7]。阴性对照用来监测 DNA 提取和加样过程及所用试剂是否受到了污染,而阳性对照则用来显示 PCR 加样和机器设置是否有误。阴性对照应包括 PCR 阴性对照和提取过程中的空白提取,有研究认为,在古代 DNA 研究中使用多个阴性对照能更有效地对污染进行监测^[7]。笔者发现,扩增古代人类线粒体 DNA 时也应该设置多个阳性对照(不同定量)^[38],一是可以检验 PCR 的设置是否正确;二是可以估计 PCR 每一具体反应的敏感性;三是可以显示污染的水平(如果发生的话);四是可以大致地估计古代 DNA 的模板量。

古代 DNA 模板的定量分析

应对古代 DNA 的模板量进行定量分析,这有助于对污染 DNA 的识别和对古代 DNA 的甄别^[19]。如果能够测知古代 DNA 的量,则可以从另一个侧面来间接地估计污染 DNA 可能对古代 DNA 的影响。古代 DNA 的保存量(或提取量)越大,污染 DNA 的影响就会越小,最终扩增到的 DNA 序列就越可能是古代 DNA。这也就是为什么现代 DNA 的 PCR 反应中污染的

问题不及古代 DNA 中那么严重,因为现代 DNA 的模板量一般会高于污染 DNA 的量。即使没有污染 DNA 的存在,古代 DNA 也需有一定数量的模板来确保扩增的 DNA 序列中不会出现由于 PCR 扩增错误而引起的序列错误^[19]。

可以使用竞争 PCR (competitive PCR) 来间接地估计古代 DNA 模板量^[39]。因古代 DNA 的含量极其微量,目前尚无有效的方法直接测知其含量。如现代法医 DNA 研究中常用的人类 DNA 定量方法^[40]所能测到的最低量一般都高于古代人类 DNA 的保存量,其敏感度对古代 DNA 来讲不够高。直接通过分光光度计测量的值是 DNA 的总量,而总量中绝大部分是现代和古代的微生物 DNA,真正的古代 DNA 的量很可能很少^[41]。如果直接把提取得到的古代 DNA 样本进行电泳分析而观察到的 DNA 的量同样也是总量。有人因此建议使用竞争 PCR 来估计古代 DNA 模板量^[39]以解决敏感度和特异性的问题。但这种方法使用了 PCR 扩增技术,其估计的 DNA 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测量结果。

对非常古老或非常特殊的材料,应进行氨基酸消旋分析来判断古代 DNA 保存的可能性^[42]。此法目前尚不能用来进行精确的古代 DNA 定量分析,但对某些材料如化石,它却能够提供非常有用的信息来决定是否有必要进行古代 DNA 的工作,以及所得到的 DNA 是否可信。在古代材料中, DNA 不是唯一受到破坏的生物大分子,蛋白质同样会受到降解破坏。人们发现氨基酸消旋(amino acid racemization)可以间接地用来了解降解“破坏力”的大小^[42],对某一具体遗址而言,氨基酸和 DNA 受破坏的程度存在着密切的正相关关系。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。氨基酸消旋分析不涉及类似 PCR 的扩增反应,外源性的污染不会成为很大的问题。几百几千年的材料中的氨基酸消旋分析一般都会表示有古代 DNA 的存在,从这个意义上讲,氨基酸消旋分析也许对更古老的材料如上万年的化石有更大的使用价值。

扩增产物的电泳分析,PCR 产物的直接测序和克隆

电泳、测序和克隆这些后 PCR 阶段的试验是获得 DNA 遗传信息的基本实验方法,古代 DNA 研究对此并没有特别的要求,但在分析试验结果时需要考虑污染的识别问题。通过对阴性阳性对照的电泳分析可以迅速发现是否发生了试剂和实验过程污染及是否发生了 PCR 设置错误,而对从 PCR 扩增产物中测出的 DNA 碱基序列的分析有助于古代材料是否出现了污染。测序可以显示扩增获得的是单一的或多重的序列,而线粒体 DNA 中的多重序列可能是由污染引起的。这里所谓的多重序列(multiple sequences)是指在一个 PCR 反应中扩增了多种 DNA 模板。如果多重序列中只是两种序列,而且只在一个位点上有所不同,那测序结果本身就可以确定这两个具体的序列,否则必须通过克隆进行区分,才能确定具体的种类以及每个种类的比例。

通过克隆分析而获得的多重序列可以帮助识别污染 DNA (详见下文),也可以帮助复原原始的古 DNA 序列^[43]。PCR 扩增技术本身并不是完美无缺的,其多聚酶有可能把一个错误的核苷酸引入到 DNA 合成中^[19]。由于这些误差是随机发生的,许多模板在同一位置同时出现同样的 PCR 扩增误差的概率非常小,因此这类 PCR 误差一般不会出现在最后的测序结果中。但如果扩增开始时的模板量很少,而且这类 PCR 扩增错误出现在刚开始的几个循环中,其错误就可能在最终的产物中表现出来^[44],而导致随机的多重 DNA 序列。在古代 DNA 的扩增中,还有可能会出现另外一类由于古代 DNA 模板的化学损伤所引起的扩增错误,不

过这类错误似乎有一定的规律可寻,如有研究发现,由于去氨基(deamination)的损伤,古代 DNA 序列中 C 会被扩增成 T 而 A 会变成 G^[43]。其它的扩增错误还有,由于“跳跃”(jumping) PCR 而产生的“嵌合”(chimeric)DNA 序列^[44]。但所有的这些误差错误可以通过克隆分析、序列分析和重复实验来识别,也可以通过增加古代 DNA 模板数量来减少。

DNA 序列分析和污染 DNA 的识别

序列分析在识别污染 DNA 的过程中起着非常重要的作用,它不仅能发现是否发生了污染,而且能识别发生了什么样的污染及“追踪”污染的来源。污染一旦发生,很可能使获得的所谓古代 DNA 不再符合系统进化的常识^[19]或遗传学规律。简单的序列比较和分析有时便能识别出某些“显而易见”的现代 DNA 污染:从恐龙化石中提取得到的 DNA 不像爬行类而更像人类或植物 DNA:从不同年代和遗址中的不相关的多个个体中获得了同样的线粒体 DNA 序列;一个个体中出现了超过两个常染色体等位 DNA 片段(染色体变异除外)或出现了多位点变异的多重线粒体 DNA 序列。对最后一种情况,只能通过克隆分析来观察发生了什么样的污染,如同样的线粒体 DNA 序列也同时出现在其它样本中(单一或多重的形式),这个序列则很可能是污染 DNA 的序列。对污染 DNA 的序列进行数据库如公共的 GenBank 和实验室自己的数据库检索,有时可以很容易地揭示出它们的来源和类别。因此,在古代人类线粒体 DNA 的研究中,所有研究人员(包括野外考古学家和人类学家)的 DNA 序列以及先前同一实验室研究过的所有古代 DNA 序列应用来进行对比分析来排除和识别污染。需要注意的是,某些特殊情况,如核线粒体 DNA^[45]和线粒体 DNA 的异质性(heteroplasmy)^[46],可能会影响到 DNA 序列分析在甄别古代 DNA 和识别污染 DNA 上的能力^[47]。线粒体 DNA 在生物进化过程中会镶嵌到核基因组(nuclear genome)中,并遵循核基因组的遗传方式进行“变异和进化”,其突变率相对就会慢许多,使得同一个体中核线粒体 DNA 和细胞质线粒体 DNA 的序列有很大的不同,这些核线粒体在古代 DNA 研究中很有可能会被误认为是很“古老”或很“特异”的线粒体 DNA^[39]。因为细胞质中的线粒体 DNA 拷贝数占优势,核线粒体 DNA 一般不会影响到正常细胞质线粒体 DNA 的扩增和识别,但如果细胞质线粒体 DNA 发生突变,用来扩增的引物(primer)的 3' 末端不能识别其相应的突变序列,而核线粒体 DNA 中仍含有未突变的片段,在这种情况下,PCR 很有可能会扩增核线粒体 DNA 而非所要的细胞质线粒体 DNA^[19]。识别核线粒体 DNA 的办法之一是另外再设计一套引物(3' 末端有所不同),如果第一套引物扩增的是核线粒体 DNA,新的一套引物则不大可能还是扩增核线粒体 DNA^[45]。另外一种识别方法是相同或非常相似的核线粒体 DNA 会在亲缘关系相近的物种中出现,因为核线粒体 DNA 的进化速率很慢^[45]。

线粒体 DNA 的异质性是指在一个个体中含有多于一种线粒体 DNA 序列的现象^[48-49]。越来越多的研究表明,线粒体 DNA 的异质性的比原来估计的要普遍的多^[50]。很显然,在古代 DNA 研究中,如在一个个体的 DNA 样本中发现多重 DNA 序列可能会被认为是污染的结果,但如果多次的重复试验都得到同样的结果,那线粒体 DNA 的异质性则应该是另外一个需要考虑的可能性。

古代 DNA 实验的重复和古代 DNA 的甄别

任何古代 DNA 研究都必须有不同程度的重复以证明其获得的 DNA 是真实的古代 DNA^[47]。重复是古代 DNA 研究中的最后一步,却也是最重要的一步,它是古代 DNA 研究中不可缺少的重要组成部分,在识别污染 DNA 的过程中起着非常关键的作用^[43]。尽管各种对

照和序列分析可以帮助识别污染 DNA,但有时仍显不够,污染仍有可能“逃脱”这些对照和序列分析。如在古代人类 DNA 的研究中,实验所用的试管在生产过程中发生了污染,对照分析未能识别出此污染,而最后得到的是单一的人类 DNA 序列。而污染 DNA 一般很难“逃脱”重复实验,古代 DNA 和污染 DNA 之间的不同在于它们在重复实验中有着不同的“行为”。如果古代 DNA 在古代材料中确实存在,即使是不同的研究人员,在不同的实验室,使用不同的试验方法,对来自同一个体的不同部位的材料进行提取、扩增、测序或克隆,其结果都应该是相同的。而污染 DNA 的污染程度及污染 DNA 的序列则有可能因研究人员不同,实验室的不同,提取材料的不同,试验方法的不同而出现不同的结果。古代 DNA 研究中的重复就是利用这些“相同”和“不同”的现象来识别污染 DNA 和甄别古代 DNA。为了保证重复实验,在提取材料的选择和预备阶段,应预留足够的古代材料以备将来同一实验室或其它实验室进行重复实验所需。因实验室条件的好坏和研究人员经验多寡的不同,有时不同的实验室可能会得出不同的结果或一个实验室不能重复另一个实验室的结果。如发生这种情况,两个实验室都应在自己的实验室再次进行重复试验以发现产生这种不同的原因。

重复实验的要求清楚地表明, DNA 必须经过一系列的检验后才能确定为古代 DNA^[51],这是古代 DNA 研究和现代 DNA 研究重要不同之处。专用的古代 DNA 实验室,严格的污染控制,认真的实验操作只能表示已有做好古代 DNA 研究的条件,但并不能自然而然地保证每一个具体研究中获得的都是古代 DNA。化学分析也许可以发现古代材料中是否含有损伤的核苷酸,但无法明确地显示这些损伤核苷酸是否仍组成有一定的长度而且可以进行扩增,因此 DNA 化学物理特性本身无法直接地表明它们是否为古代 DNA。古代 DNA 的降解过程也受“太多”无法确定的因素影响^[52],因此无法根据 DNA 分子的完整或破损来判断其年代,或根据材料的年代来准确地估计古代 DNA 的破坏程度。在实际工作中,我们只能使用排除法来间接地甄别古代 DNA,即在考虑古代 DNA 的真实性之前,首先排除污染 DNA 存在的可能性。各种阴性阳性对照、DNA 测序、克隆、序列分析及重复都有能力“显现”污染,很显然,污染识别步骤设置得越多越细,其识别和排除污染 DNA 的能力也就越强。

古代 DNA 研究无疑是一个既充满挑战又充满希望的新领域。为了获取真实的古代 DNA,人们需要花费更多的时间和精力用于污染的控制和识别。但这些额外的时间和精力是值得的,因为一个成功的古代 DNA 研究能够提供其它研究方法无法提供的信息,在考古学、人类学及进化生物学的研究中能够起到非常重要的作用。

致谢: 本文中的许多观点得益于与国内外体质人类学、考古学和古代 DNA 研究同行的讨论和交流。本文作者的古代 DNA 研究受到了加拿大国家 SSHRC 基金, SFU 校长研究基金和 SFU-SSHRC Small 基金的资助。

参考文献:

- [1] Pääbo S, Higuchi RG, Wilson AC. Ancient DNA and the polymerase chain reaction. The emerging field of molecular archaeology[J]. J Biol Chem, 1989, 264: 9709—9712.
- [2] Pääbo S. Amplifying ancient DNA[A]. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, et al. eds. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications[C]. San Diego: Academic Press, Inc., 1990.
- [3] Hagelberg E. Ancient DNA studies[J]. Evol Anthropol, 1993, 2: 199—207.
- [4] Pääbo S. Ancient DNA[J]. Sci Am, 1993, 269: 86—92.

- [5] Herrmann B, Hummel S eds. Ancient DNA: Recovery and Analysis of Genetic Material from Paleontological, Archaeological, Museum, Medical and Forensic Specimens[C]. New York: Springer Verlag, 1994.
- [6] Hagelberg E. Ancient and modern mitochondrial DNA sequences and the colonization of the Pacific[J]. Electrophoresis, 1997, 18: 1529—1533.
- [7] O'Rourke DH, Hayes MG, Carlyle SW. Ancient DNA studies in physical anthropology[J]. Annu Rev Anthropol, 2000, 29: 217—242.
- [8] Brown TA, Brown KA. Ancient DNA: using molecular biology to explore the past[J]. Bioessays, 1994, 16: 719—726.
- [9] 杨洪. 古代 DNA 序列的分析与甄别——兼评恐龙 DNA 研究[J]. 古生物学报, 1995, 34: 657—673.
- [10] 杨洪, Smiley CJ, 洪光. 化石 DNA 的发现及其地质背景和进化意义[J]. 大自然探索, 1991, 10: 41—48.
- [11] 赵凌霄, Hummel S, Lassen C, 等. 新石器时代人骨遗骸中古代 DNA 的提取及 X-Y 染色体同源基因片段的 PCR 扩增[J]. 人类学学报, 1996, 15: 200—209.
- [12] 万诚, 周慧, 崔银秋, 等. 河北原阳县姜家梁遗址新石器时代人骨 DNA 的研究[J]. 考古, 2001, 74: 81.
- [13] 王槐春. 河南省西峡恐龙蛋化石 DNA 序列数据的再分析[J]. 遗传学报, 1996, 23: 183—189.
- [14] 周慧, 万成, 朱泓. 古人骨 DNA 的提取、扩增、测序与研究[J]. 北方文物, 2001, (67): 8—11.
- [15] 刘武, 叶健. DNA 与人类起源和演化——现代分子生物学技术在人类学中的应用[J]. 人类学学报, 1995, 14(3): 266—281.
- [16] 王沥. 古 DNA: 用分子生物学手段探知过去[J]. 中国科学院院刊, 2001, 263—265.
- [17] 蔡胜和, 杨焕明. 方兴未艾的古代 DNA 研究[J]. 遗传, 2000, 22: 41—46.
- [18] Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA[J]. Nature, 1993, 362: 709—715.
- [19] Handt O, Krings M, Ward RH *et al.* The retrieval of ancient human DNA sequences[J]. Am J Hum Genet, 1996, 59: 368—376.
- [20] Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA *in Vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction[J]. Meth Enzymol, 1987, 155: 335—350.
- [21] Pääbo S, Gifford JA, Wilson AC. Mitochondrial DNA sequences from a 7000-year old brain[J]. Nucleic Acids Res, 1988, 16: 9775—9787.
- [22] Handt O, Hoss M, Krings M *et al.* Ancient DNA: methodological challenges[J]. Experientia, 1994, 50: 524—529.
- [23] Cooper A, Poinar HN. Ancient DNA: do it right or not at all[J]. Science, 2000, 289: 1139.
- [24] Hedges SB, Schweitzer MH. Detecting dinosaur DNA[J]. Science, 1995, 268: 1191—1192.
- [25] Austin JJ, Smith AB, Thomas RH. Palaeontology in a molecular world: the search for authentic ancient DNA[J]. Tren Ecol & Evol, 1997, 12: 303—306.
- [26] Woodward SR, Weyand NJ, Bunnell M. DNA sequence from Cretaceous period bone fragments[J]. Science, 1994, 266: 1229—1232.
- [27] Cano RJ, Poinar HN, Pieniazek J *et al.* Amplification and sequencing of DNA from a 120—135-million-year-old Weevil[J]. Nature, 1993, 363: 536—538.
- [28] Wayne RK, Leonard JA, Cooper A. Full of sound and fury: The recent history of ancient DNA[J]. Annu Rev Ecol Systemat, 1999, 30: 457—477.
- [29] Richards MB, Sykes B, Hedges R. Authenticating DNA extracted from ancient skeletal remains[J]. J Arch Sci, 1995, 22: 291—299.
- [30] MacHugh DE, Edwards CJ, Bailey JF *et al.* The extraction and analysis of ancient DNA from bone and teeth: a survey of current methodologies[J]. Ancient Biomolecules, 2000, 3: 81—103.
- [31] Tofanelli S, Nencioni L. Recovering ancient DNA by streptavidin-coated magnetic beads and biotinylated oligonucleotides[J]. Ancient Biomolecules, 1999, 2: 307—320.
- [32] Merriwether DA, Rothhammer F, Ferrell RE. Genetic variation in the New World: ancient teeth, bone and tissue as sources of DNA[J]. Experientia, 1994, 50: 592—601.
- [33] Hagelberg E, Bell LS, Allen T *et al.* Analysis of ancient bone DNA: techniques and applications[J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 1991, 333: 399—407.
- [34] Hoss M, Pääbo S. DNA extraction from Pleistocene bones by a silica-based purification method[J]. Nucl Acids Res, 1993, 21: 3913—3914.
- [35] Yang DY, Eng B, Wayne JS *et al.* Improved DNA extraction from ancient bones using silica-based spin columns[J]. Am J Phys

- Anthropol,1998,105:539—543.
- [36] Brown KA. The future is bright—directions for future research with ancient DNA in forensic archaeology [J]. *Ancient Biomolecules*,2001,3:159—166.
- [37] Poinar HN. DNA from fossils:the past and the future[J]. *Acta Paediatr*,1999,Suppl,88:133—140.
- [38] Yang DY,Savore C,Waye JS *et al.* AmpliTag Gold(TM) and ancient DNA samples[J]. *Am J Phys ANthropol*,2000,Suupl,328—329.
- [39] Krings M,Stone A,Schmitz RW *et al.* Neandertal DNA sequences and the origin of modern humans[J]. *Cell*,1997,90:19—30.
- [40] Inman K,Rudin N. *An Introduction to Forensic DNA Analysis*[M]. Boca Raton:CRC Press,1997.
- [41] Rollo F,Ubaldi M,Marota I *et al.* DNA diagenesis:effect of environment and time on human bone[J]. *Ancient Biomolecules*,2002,4:1—7.
- [42] Poinar HN,Höss M,Bada JL *et al.* Amino acid racemization and the preservation of ancient DNA[J]. *Science*,1996,272:864—866.
- [43] Hofreiter M,Jaenicke V,Serre D *et al.* DNA sequences from multiple amplifications reveal artifacts induced by cytosine deamination in ancient DNA[J]. *Nucleic Acids Res*,2001,29:4793—4799.
- [44] Pääbo S,Irwin DM,Wilson AC. DNA damage promotes jumping between templates during enzymatic amplification[J]. *J Bio Chem*,1990,265:4718—4721.
- [45] van der Kuyf AC,Kuijken CL,Dekker JT *et al.* Nuclear counterparts of the cytoplasmic mitochondrial 12S rRNA gene:a problem of ancient DNA and molecular phylogenies[J]. *J Mol Evol*,1995,40:652—657.
- [46] Gil P,Ivanov PI,Kimpton C *et al.* Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis[J]. *Nat Genet*,1994,6:130—135.
- [47] Hofreiter M,Poinar HN,Spaulding WG *et al.* A molecular analysis of ground sloth diet through the last glaciation[J]. *Mol Ecol*,2000,9:1975—1984.
- [48] Relethford JH. Ancient DNA and the origin of modern humans[J]. *Proc Natl Acad Sci U. S. A*,2001,98:390—391.
- [49] Gibbons A. Europeans trace ancestry to Paleolithic people[J]. *Science*,2000,290:1080—1081.
- [50] Holland MM,Parsons TJ. Mitochondrial DNA sequence analysis—validation and use for forensic casework[J]. *Forensic Sci Rev*,11,21—50. 1999.
- [51] Hofreiter M,Serre D,Poinar HN *et al.* Ancient DNA[J]. *Nat Rev Genet*,2001,2:353—359.
- [52] Briggs DEG. Molecular taphonomy of animal and plant cuticles:selective preservation and diagenesis[J]. *Philos Trans R. Soc Lond B Biol Sci*,1999,354:7—16.

CONTAMINATION CONTROLS AND DETECTION IN ANCIENT DNA STUDIES

YANG Dong-ya

(*Department of Archaeology, Simon Fraser University, Burnaby, BC V5A 1S6, Canada*)

Abstract: With the advent of the PCR technique in molecular biology^[20], DNA can now be extracted and analyzed from ancient remains^[1,51]. Ancient DNA studies hold great potential for anthropologists and archaeologists to address many important issues that cannot be well dealt with in conventional ways^[5,9—14,16—17]. However, the field is still full of technical and interpretive challenges^[28]. The most difficult is proving that amplified DNA is authentic ancient DNA. The high risk of contamination is due to the fact that ancient DNA is highly degraded and only minute amounts are preserved, while the PCR

technique is extremely sensitive and can easily pick up tiny amounts of contaminant DNA^[7]. Contamination controls and detection therefore become extremely important in ancient DNA studies. This paper will discuss some practical guidelines that can be used to carry out effective contamination controls and detection in order to obtain authentic ancient DNA.

Dedicated Laboratory for Ancient DNA Studies

A dedicated laboratory is required for ancient DNA extraction and other pre-PCR work^[28]. It is crucial to physically separate pre-PCR and post-PCR work^[5]. The laboratory and all equipment should be dedicated to ancient DNA work. No modern DNA work should ever be carried out in the dedicated ancient DNA laboratory. Ideally, the pre-PCR laboratory should have UV-filtered ventilation system and positive pressure airflow. Sterile disposables and filtered tips should be used. Gloves, masks, boots and lab coats should be worn. 10% bleach and UV light should be used to clean and irradiate the surfaces of benches and equipment to destroy contaminant DNA.

Selection and Decontamination of Ancient Remains for DNA Studies

When selecting specimens for ancient DNA extraction, besides other criteria, the ease of decontaminating remains must be considered carefully since most remains excavated in the past had been contaminated by subsequent handling and analysis. There are several methods currently available for specimen decontamination^[5,30]. Physical methods remove the contaminated surface using sandpaper or electronic drills. Chemical decontamination uses chemicals such as 10% bleach to damage and destroy surface contaminant DNA. Ultraviolet (UV) irradiation is another effective method for decontaminating specimens, reagents and other supplies^[31]. UV can cause DNA to crosslink and preclude it from use in PCR amplification^[7].

DNA Extraction from Ancient Remains

Selection of optimal DNA extraction methods and setup of blank extractions should be carried out in this step. Blank extraction should be used to monitor possible contamination of extraction reagents, commercial kits and the entire extraction process. Experiments that involve less steps or less human involvement should be considered advantageous.

PCR Amplification of Ancient DNA

The great difficulty in the amplification of ancient DNA is due to physical and chemical degradation of DNA templates^[22,51]. Ancient DNA can only be extracted in minute amounts, with small fragments and is often associated with PCR inhibitors, therefore, protocols for ancient DNA amplification must be optimized accordingly. Shorter target DNA fragments should be sought since extracted DNA is usually less than 300 bp. The shorter the target fragment, the more templates will be potentially available for amplification. Obviously, with older remains, the difficulty to amplify longer fragments increases^[22]. This fact can be used in the authentication of ancient DNA. Both negative and positive controls should be setup along with ancient DNA samples for PCR amplification^[38]. Positive controls can be used to indicate whether PCR conditions are set up correctly and negative controls including blank extracts will show amplification products if contamination occurs. Multiple negative controls should be setup in order to more effectively monitor contamination^[7]. For ancient human mtDNA, we have found that multiple quantified positive controls should also be used to indicate the

sensitivity of individual PCR amplification and the level of contamination if it occurs^[38].

Quantification of Ancient DNA Templates

Accurate estimation of the number of ancient DNA templates is of great assistance in determining whether amplified DNA is from authentic ancient DNA since greater numbers of ancient DNA templates result in a diminished likelihood of contamination^[19,43]. Competitive PCR can be used for the quantification of ancient DNA^[39], but the estimated amount of templates may also include contaminant DNA.

Another method has been proposed to examine the preservation state of ancient DNA through amino acid racemization analysis^[42]. Although the analysis cannot produce any accurate estimation of ancient DNA templates, the preservation state can clearly indicate the possibility of extracting DNA from very ancient remains such as fossils.

Electrophoresis, Sequencing and cloning PCR Products and Sequence Analysis

Once ancient DNA is amplified, it can be treated as any modern DNA sample would be and no special laboratory or equipment requirements are needed. Electrophoresis of multiple positive and negative controls should be used to quickly examine whether contamination occurs and the level of contamination if it occurs. Sequencing results can be of assistance in detecting contamination. For example, a DNA sample from one individual usually only contains one mtDNA sequence. A good indication of possible contamination is the presence of more than one type of mtDNA sequence or if the same type of mtDNA sequence is detected from many unrelated individuals.

PCR products can be cloned to determine the number and percentage of different types of sequences present in PCR products. For more ancient remains such as fossils, cloning should be carried out since it is not only good for detecting contamination but also very useful in reconstructing an authentic ancient DNA sequence. When the number of DNA templates is extremely low and DNA itself is highly degraded, incorrect nucleotides may be incorporated into the synthesis of new DNA molecules and generate incorrect DNA sequences^[43], or prematurely terminated DNA fragments may jump from one template to another and produce chimeric DNA sequences (jumping PCR)^[44]. These amplification errors are generally random and can be detected through cloning and repeat experiments.

Obtained ancient DNA sequences must make a phylogenetic sense^[19] and/or at very least should not contradict genetic rules and patterns. Otherwise, contamination should be suspected. For example, dinosaur DNA should be more similar to reptilian DNA than to mammalian DNA. In humans, one individual should only have two copies of nuclear DNA fragments. Special attention should also be given to the presence and detection of nuclear mtDNA amplification^[45] and mtDNA's heteroplasmy^[46]. When these occur, they may complicate the detection of contaminant sequences.

Reproducibility Test and Ancient DNA Authentication

The reproducibility test is an integral part of ancient DNA research^[43]. Replication of the entire ancient DNA processes should be undertaken to examine whether the same results can be obtained and is a requirement for the authentication of ancient DNA. Authentic ancient DNA and contaminant modern DNA have different "behavioral patterns" in the test. If DNA is authentic, the same DNA should be extracted, amplified and sequenced from different bones of the same individuals, in different

laboratories and by different groups of researchers. Thus, it should be expected that different repeats generate the same DNA sequence. However, due to its random nature, contaminant DNA generally fails in reproducibility tests.

The purpose of ancient DNA authentication is the analysis of all contamination controls, laboratory procedure's and amplified DNA sequences to demonstrate that extracted and amplified DNA is authentic ancient DNA and not contaminant modern DNA^[51]. Strict contamination controls are required but they cannot guarantee contamination-free results. There are also no absolute physical, chemical and biological criteria one can use to determine DNA's antiquity. Thus, there is no way to directly authenticate ancient DNA based only on the DNA itself.

Though we cannot directly determine whether amplified DNA is authentic or contaminant, logically, we can exclude one source and indirectly prove the other. Compared to the scarcity of ancient DNA templates, contaminant DNA is much more plentiful, making contamination with modern DNA an inevitable reality in ancient DNA studies. Therefore, one must analyze the possibility of contaminant DNA first before one can accept the result as authentic ancient DNA. Negative, positive controls and DNA sequence analyses are all capable of indicating contamination. Each individual control may not have a strong power in excluding contamination. When all controls and analyses do not indicate any contamination, statistically, there is likely no contamination.

Key words: Ancient DNA; Archaeology; Anthropology; Ancient remains; PCR; Contamination; Contamination controls and detection; Authentication