



Palaeoworld

This is a not-for-profit service that helps scholars, researchers, and students discover, use, and build upon a wide range of content in a trusted digital archive. We use information technology and tools to increase productivity and facilitate new forms of scholarship.

PALAEOWORLD Editorial Office

State Key Laboratory of Palaeobiology and Stratigraphy

Nanjing Institute of Geology and Palaeontology, Chinese Academy of Sciences

Beijingdonglu 39, 210008 Nanjing, PR China

e-mail: palaeoworld@nigpas.ac.cn

PALAEOWORLD online submission:

<http://ees.elsevier.com/palwor/>

PALAEOWORLD full-text (Volume 15 –) available at:

<http://www.sciencedirect.com/science/journal/1871174X>

分子古生物学进展:化石 DNA 的研究

杨群 尚庆华

(中国科学院南京地质古生物研究所)

分子古生物学是运用分子生物学、有机地球化学等分析手段、以地层中残存的生物分子(分子化石)为研究对象、探讨历史生物界的谱系发生、分类、演化及生态环境等古生物学主题的学科领域。尽管有关生物有机分子的研究可追溯到较早时期,但是作为一个独立的学科领域,分子古生物学是在八十年代后期才迅速发展起来的(Runnegar, 1986; Curry, 1990; Smith and Littlewood, 1994)。尤其是在九十年代初,化石 DNA 的分析成功(Golenberg et al., 1990)大大强化了人们对于从分子水平研究古生物系统的信心。国际上一些重要的古生物学研究机构(如英国大英博物馆、美国 Smithsonian 研究院、美国自然历史博物馆),纷纷建立以化石 DNA 为核心的分子古生物学实验室,充分显示出这一重要研究方向的发展势头。

DNA 是生物遗传信息的直接载体,对于研究生物系统发生具有重要意义。但是这类生物聚合物在自然条件下极不稳定,易于水解、氧化。因此,科学家长期认为,DNA 分子一般在生物死后很短时间内被完全破坏,而很难想象 DNA 分子能保存上千或上万年,更不用说能在数万以至数十万年以上的、经历成岩作用和地质变化的地层中保存下来。然而近十年的研究实践表明,DNA 不仅可从数百到数千年的博物馆标本中提取出来,而且还存在于古老地层的化石内部。研究资料表明,化石 DNA 分子已在下述化石类型中发现:特异保存的植物标本、脊椎动物骨骼、西伯利亚冻土中的动物组织和骨骼、琥珀包裹的动植物化石(Pääbo, 1993; Hoss et al., 1994)。

化石 DNA 研究的成功与快速发展应归因于一项重要的分子生物学成果——多聚酶链式反应,简称 PCR 技术(polymerase chain reaction)。这是一种在试管内进行的、由多聚酶催化、引物启动的 DNA 扩增和复制方法(Pääbo, 1993)。PCR 技术的发明者,美国分子生物学者 Kary B. Mullis (Mullis, 1990)以此方法论成果而获得 1990 年度诺贝尔化学奖。

在 PCR 技术发明之前,研究者曾尝试用传统的分子克隆方法,即将 DNA 导入宿主细胞进行复制的方法,来获取保存在博物馆中的动物软组织以及古代干尸中的 DNA 分子。Higuchi 等(1984)首次报道了已绝灭动物的 DNA 研究成果。他们研究了一种上世纪末绝灭的、曾生活在非洲南部的马科动物——斑驴(*Quagga*),其标本取自 140 年前收藏在博物馆中的斑驴的皮肤。Higuchi 等运用分子克隆法成功地获取了大量存在于细胞核外的线粒体 DNA 分子并测得其碱基对序列。他们进而将斑驴的 DNA 序列与其他马科动物的序列作了比较,证明斑驴与斑马有密切的亲缘关系,而与其他马科动物的系统关系较疏远。Pääbo (1985)同样用分子克隆法获取了距今 2 300 多年的木乃伊组织中的 DNA。然而,那些研究古老 DNA 的尝试存在一个共同的问题——测序结果无法验证。由于传统的克隆技术的效率极低,所以实际上

无法通过重复实验来验证测试结果。而且,传统分子克隆技术的测序结果仅代表提取物中从一个分子获取的信息,可能出错的机会较大(Hoss et al., 1994)。Pääbo 和 Wilson (1988)事后证实,原来 Higuchi 等(1984)测得的斑驴 DNA 序列中的特殊基因段是人为引入的。因此,在 PCR 出现之前,人们对于古 DNA 测试结果的科学性持有较多疑问。

PCR 方法能使研究者在很短时间内、从极其微量的样品中扩增、复制出无数个特定基因段(Pääbo, 1993)。这一技术的突破性意义体现在 3 个方面:1)高效率。只要求样品中存在 1-2 个残余分子,就可任意复制、扩增;2)可靠性较高。分子克隆法获得的结果仅代表从单个分子中提取的信息,而 PCR 直接扩增、复制的结果代表来自提取物中一系列古老分子模板的综合信息(Hoss et al., 1994);3)可重复检验。PCR 反应不仅可在同一个提取物样品中反复循环,而且可制备几个提取物重复进行 PCR 过程,因而可对测试结果进行反复检验。PCR 技术不仅使古 DNA 研究成为现实,更重要的是它赋予这一研究领域更强的科学性。PCR 技术诞生以后,研究者可轻而易举地获取和研究博物馆收藏的标本和考古发掘所得标本中的 DNA,从而兴起了一股“分子考古学”的热潮(Handt et al., 1994)。

首例化石 DNA (Golenberg et al., 1990)来自美国爱达荷州北部中新世湖泊相沉积物中保存完好的木兰(*Magnolia latahensis*)植物的叶片中。研究者将所获取的 DNA 的特定基因序列(叶绿体基因 *rbcL*)与木兰科的一些现生物种(*Mognolia macrophylla*, *Nicotiana tabacum*, *Zea mays*, *Persea americana*, *Platanus racemosa* 等 16 种)的相同基因序列进行对比研究,进而从分子水平塑造了所研究的木兰科植物的谱系树形图。对这一发现,人们还没有从理论上加以论证,原因是 Golenberg 等所研究的中新世湖泊相粘土沉积物中含有大量水分;从理论上推断,仅仅水的作用,即使不考虑氧的破坏,便可在五万年内使 DNA 分子断裂到无法获取任何信息的地步(Pääbo, 1993)。然而, Golenberg 等(1990)认为,他们之所以能够从中获取 DNA,有两个因素可能起了关键作用。第一,叶绿体基因组大量存在于植物细胞中,因而提高了可获取大量原始分子的概率;第二,所研究的叶片标本的保存状态极好,这些叶片是直接掉入湖中的,因而几乎未造成任何磨损。

继 Golenberg 等的开创性工作之后,被认为更有希望的化石 DNA 研究对象是琥珀化石。从琥珀化石中获取 DNA 分子已被多例研究证实(Cano et al., 1992; De Salle et al., 1992; Poiner et al., 1993)。一般认为,由于琥珀内部干燥、隔氧的特异封闭环境,这类化石是获取古 DNA 分子的最佳标本。迄今为止,人类已获取的最古老的 DNA 来自黎巴嫩早白垩世(120-135Ma)琥珀中的昆虫(Cano et al., 1993)。

动物骨骼可能是保存 DNA 的良好场所。Cooper 等(1992)成功地从新西兰一种不会飞的鸟——恐鸟(maos)的骨骼中提取有用的 DNA。由于人类的猎杀,恐鸟大约于 1 000 年前绝迹,其研究标本来自洞穴和沼泽地。从他们获取的 4 个属的 DNA 序列分析,这些绝灭恐鸟属之间的关系比较密切,而它们与新西兰现生的无翼鸟(kiwis)的亲缘关系疏远;但是,新西兰无翼鸟与澳大利亚的鸸鹋(emu)和食火鸡(cassowary)之间的关系密切。这一发现说明,现生的无翼鸟可能较晚来到新西兰。Hoss 和 Pääbo (1994)报道了从更新世(25 000 年前)的马科动物(*Equus hemionus*)骨骼中提取的 DNA 序列。更古老的骨骼 DNA 来自西伯利亚猛犸象(Nature, August, 1994, p. 333-334)。

DNA 研究除直接用于分析生物谱系发生以外,还可用于探讨生物分子的演化速率。根据现代分子生物学中的分子钟(Runnegar, 1982)假说,将两个物种间的基因距离(DNA 分子中的变异点数目)与产生该距离所经历的时间(运用化石资料分析分支点到现在所经历的时间)

作比较,可计算出生物分子的演化速率。Smith 和 Littlewood (1994)研究了海胆的 28S rRNA (核糖体核糖核酸)序列,他们综合不同海胆类群的基因距离、形态分类、化石的地层分布及其地质年代数据,推导出了古生代以来的主要海胆类群的谱系关系及主要海胆类群的分子演化速率。这一研究结果表明,不同海胆支系的分子演化速率存在明显的差异。应当指出,研究人员对生物分子钟的假说仍然存有一些疑虑。首先,人们观察到的生物分子序列中的变异点数目可能不等于从两个物种共同起源点或分支点开始至今实际发生的变异数,这是因为一系列变异可以发生在同一分子序位上(Smith and Littlewood, 1994)。此外,在不同分子中及不同生物的同种分子中,分子突变的速率是不同的(Curry, 1990)。分子古生物学研究应当与传统的生物形态学研究相结合,分子的和形态的数据是互为补充的(Smith and Littlewood, 1994)。

近几年的发展趋势表明,化石 DNA 研究已成为当今国际古生物学界的一个热点,正如 Pääbo (1993)所说,“毫无疑问,这一领域在未来数年中将充满活力”。这一研究方向代表分子生物学、遗传学和古生物学相交叉、结合的一个边缘领域。由于 DNA 直接反应生物的遗传信息,因此,化石 DNA 的研究可使古生物学工作者有希望获取更可靠的生物演化和系统数据。应当指出,化石 DNA 研究仍然是一个年轻的、发展中的学科领域,它一方面要求现代分子生物学的技术和理论,一方面需要古生物研究者在化石领域中不断开拓与探索。

我国拥有包括琥珀、保存良好的脊椎动物骨骼、特异埋葬的动植物群等大量各类化石资源。在我国积极开展分子古生物学研究已成为我国古生物学界的一项紧要任务。我国古生物学工作者应联合国内外分子古生物学和分子生物学等领域的专家,引进必要的实验设备,选择适当的化石材料,开展以化石 DNA 研究为核心的分子古生物研究工作,推动分子古生物学这一新兴学科迅速发展。

引用文献

- 杨 洪、C. J. Smiley、洪 光,1991,化石 DNA 的发现及其背景和进化意义. 大自然探索, **10**(35): 41-47.
- Cano, R. J., Poinar, H. N. and Poinar, G. O., 1992, Isolation and partial characterization of DNA from the bee *Proplebeia dominicana* (Apidae: Hymenoptera) in 25-40 million year old amber. *Medical Science Research*, **20**: 249-251.
- Cano, R. J., Poinar, H. N., Pieniazek, N. J., Acra, A. and Poinar, G. O., 1993, Amplification and sequencing of DNA from a 120-135 million-year-old weevil. *Nature*, **363**: 536-538.
- Cooper, A., Mourer-Chauviere, C., Chamber, G. K., von Haesellar, A., Wilson, A. C., and Pääbo, S., 1992, Independent origins of New Zealand moas and kiwis. *Proc. National Academy of Science USA*, **89**: 8741-8744.
- Curry, G. B., 1990, Molecular Palaeontology. In: D. E. G. Briggs and P. R. Crowth (Eds.), *Palaeobiology: a synthesis*, pp. 95-100.
- DeSalle, R., Gatesy, J., Wheeler, W. and Grimaldi, D., 1992, DNA sequences from a fossil termite in oligo-Miocene amber and their phylogenetic implications. *Science*, **257**: 1933-1936.
- Golenberg, E. M., Giannassi, D. E., Clegg, M. T., Smiley, C. J., Durbin, M., Henderson, D. and Zurawski, G., 1990, Chloroplast DNA sequence from a Miocene *Magnolia* species. *Nature*, **344**: 656-658.
- Handt, O., Höss, M., Krings, M. and Pääbo, S., 1994, Ancient DNA: methodological challenge. *Experientia*, **50**: 524-529.
- Higuchi, R., Bowman, B., Freiberger, M., Ryder, O. A. and Wilson, A. C., 1984, DNA sequences from the Quagga, an extinct member of the horse family. *Nature*, **312**: 282-284.
- Höss, M., Handt, O. and Pääbo, S., 1994, Recreating the past by PCR. In: K. B. Mullis et al. (eds.), *The Polymerase Chain Reaction*. pp. 257-264.
- Mullis, K. B., 1990, The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*, **262**(4): 56-65.

- Pääbo, S., 1985, Molecular cloning of ancient Egyptian mummy DNA. *Nature*, **314**: 644 - 645.
- Pääbo, S., 1993. Ancient DNA. *Scientific American*, **269**(5): 60 - 66.
- Pääbo, S. and Wilson, A. C., 1988. Polymerase chain reaction reveals cloning artefacts. *Nature*, **344**: 387 - 388.
- Poinar, H. N., Cano, R. J. and Poinar, G. O., 1993, DNA from an extinct plant. *Nature*, **363**: 677.
- Runnegar, B., 1982, A molecular-clock date for the origin of the animal phyla. *Lethaia*, **15**(3): 199 - 205.
- Runnegar, B., 1986, Molecular Paleontology. *Palaeontology*, **29**: 1 - 24.
- Smith, A. B., and Littlewood, D. T. J., 1994, Paleontological data and molecular phylogenetic analysis. *Paleobiology*, **20**(3): 259 - 273.