

## \* 学术论文 \*

## 陶家寨墓地 M5 号墓主线粒体 DNA 片段分析\*

李胜男<sup>1</sup> 赵永斌<sup>1</sup> 高诗珠<sup>1,2</sup> 周 慧<sup>1,3\*\*</sup>

1. 吉林大学生命科学学院, 长春 130023; 2. 吉林大学药学院, 长春 130021; 3. 吉林大学边疆考古研究中心考古 DNA 实验室, 长春 130012

**摘要** 以青海省西宁市陶家寨墓地 M5 号墓中的 14 个个体的牙齿样本为研究对象进行线粒体 DNA 研究. 考古学研究表明该墓葬年代为东汉—魏晋时期(距今 2000 a 左右), 并可能为家族墓地. 通过对该墓地的 14 个个体的高可变一区(HVRI), 高可变二区(HVRII)测序及扩增片段长度多态性(APLP)分型, 共检出 8 个单倍型, 分属于 A, B, D, F1c, Z 和 M, 6 个单倍型类群. 与周边地区的古代人群相比较, 实验样本与同一地区距今约 4000 a 前的喇家古人群在遗传结构上具有一定的连续性. 而与现代人群比较发现, 实验样本与羌族人群有较近的亲缘关系.

**关键词** 古线粒体 DNA 西宁陶家寨墓地 中国青海

青海省, 位于中国西北部, 毗邻新疆维吾尔自治区、西藏自治区、四川省、甘肃省, 是古丝绸之路的必经之地. 据史料记载, 青海地区在秦汉以前是古代羌人活动、栖息之地. 羌族是我国最古老的民族之一, 仰韶文化末期(约公元前 3000 a 左右), 古羌族部落中的一支迁入黄河中游地区, 形成炎帝部落, 在后来的战争中, 炎帝部落大部分与黄帝部落互相融合, 成为华夏族(今汉族的先民), 另一部分则西行或南下, 与当地土著居民融合, 成为汉藏语系汉族、羌族以外的其他民族的先民, 如藏族、彝族等等. 公元前 221a, 秦王嬴政建立了我国历史上第一个中央集权的封建国家, 并且颁布法令不准对西边的羌戎部落用兵. 直至汉武帝时期, 西汉政府开始向河湟地区迁徙汉人, 开置公田, 青海东部地区开始逐步纳入中央王朝的统治范围<sup>[1,2]</sup>.

陶家寨汉墓群位于西宁市北郊廿里铺乡陶家寨西, 东邻北川河, 西依西山(大野山)(图 1). 考古学鉴定该墓葬属于东汉—魏晋时期, 且具有较浓的家族性质. 同一墓葬内通常埋葬多个个体, 例如陶家寨汉墓群中的 M5 号墓共埋藏 15 个个体, 出土 14 个颅骨, 是该墓

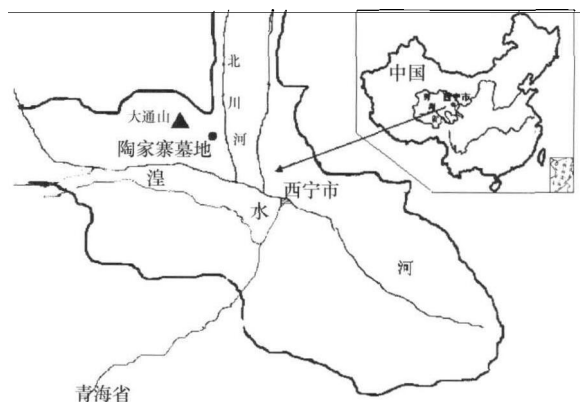


图 1 陶家寨墓地的地理位置图

群中埋葬个体最多的一座砖室墓<sup>[3]</sup>. 本文样本即取自 M5 号墓葬. 由于东汉—魏晋时期是汉人与古羌人发生融合时期, 因此对该时期青海地区的古代人群进行研究可以直观地了解汉羌融合的演化情况, 陶家寨汉墓人群为研究这一人群演化过程提供了良好的样本. 而古 DNA 技术能够使人们跨越时间构建和复原古代人群的遗传结构, 分析相关人群之间的亲缘关系, 从而为揭示人类的起源、迁徙与进化提供一定的线索, 因此

2009-04-03 收稿, 2009-06-23 收修改稿

\* 国家基础学科人才培养基金资助项目(批准号: J0530184)

\*\* 通信作者, E-mail: zhouhui@mail.jlu.edu.cn

本文通过对陶家寨墓地 M5 号墓葬人群的线粒体 DNA 进行研究,旨在探讨该墓葬中埋葬个体之间的母系亲缘关系,并通过与古代及现代人群的比较,探讨本实验样本的遗传结构及其与相关人群的遗传关系,从而为研究青海省各民族的融合及现代汉族的形成提供线索。

## 1 材料和方法

### 1.1 样本采集

本实验 14 个牙齿样本取自青海西宁陶家寨汉墓群中 M5 号墓葬,该墓葬是一座多室砖室墓,共埋藏 15 个个体,出土 14 个颅骨,取样情况详见表 1。

表 1 实验样本编号及取样情况

样本编号	发掘编号	性别/年龄(体质人类学)	取样部位
XN1	2002XTM5-1	男/35-40	牙齿
XN2	2002XTM5-2	男/25±2	牙齿
XN3	2002XTM5-3	女/25±2	牙齿
XN4	2002XTM5-4	男/35-40	牙齿
XN5	2002XTM5-5	? /7±2	牙齿
XN6	2002XTM5-6	女/17-19	牙齿
XN7	2002XTM5-7	? /11±2.5	牙齿
XN8	2002XTM5-8	女/50-55	牙齿
XN9	2002XTM5-9	男/45-50	牙齿
XN10	2002XTM5-10	女/25±2	牙齿
XN11	2002XTM5-11	女/45±2	牙齿
XN12	2002XTM5-12	? /15±2	牙齿
XN13	2002XTM5-13	男/25-30	牙齿
XN14	2002XTM5-15	? /4±1	牙齿

### 1.2 样本处理

牙齿样本用 3%—5% 次氯酸浸泡 15 min 后,分别用超纯水和无水乙醇清洗,然后把牙齿的每个侧面在紫外光下照射 30 min,最后用 6750 冷冻研磨机 (Metuchen, USA) 研磨成粉<sup>[4]</sup>。

### 1.3 古 DNA 的提取与扩增

古 DNA 的提取按照 QIAamp<sup>®</sup> DNA Mini Kit 试剂盒的标准操作进行,使用 3 对套叠引物扩增线粒体 HVR I 区 长度共 360 bp (16050—16409) 的片段。为了对样本所属的线粒体单倍型类群做出准确分析,选取 5 组引物扩增线粒体 DNA 的编码区相关片段进行 APLP 分析,并对部分样本的 HVR II 区的共 158 bp 长 (48—205) 的片段进行测序,分型位点的选取参照 Tanaka<sup>[5]</sup>,所用引物见表 2。

PCR 反应体系为 12.5  $\mu$ L,包括 3  $\mu$ L 古 DNA 抽提液,1 U<sup>Taq</sup> 聚合酶 (Promega, USA), 50 mmol/L KCl, 2.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mmol/L dNTP Mix (Sangon, China), 2 mmol/L BSA (Takara, Japan) 和 2  $\mu$ mol/L 引物。扩增程序如下: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 92 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 52—55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 50 s, 36 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

表 2 实验中 PCR 扩增中所用引物

HVI/单倍型类群	引物及序列	检测方法	长度/bp	
HVRI	L16017	5' TTCTCTGTTCTTTCATGGGGA 3'	测序	235
	H16251	5' GGAGTTCAGTTGATGTGTGA 3'		
HVRI	L16201	5' CAAGCAAGTACAGCAATCAAC 3'	测序	209
	H16409	5' AGGATGGTGGTCAAGGGA 3'		
HVRI	L16165	5' AACCCAATCCACATCAAAAC 3'	测序	193
	H16357	5' AAGGGATTGACTGTAATGTGC 3'		
HVR II	L48	5' CATTGGTATTTTCGTCTGGG 3'	测序	158
	H205	5' CGCTTGGTAAGTATGTTCGC 3'		
M/N	10400T	5' TAATTATACAAAAAGGATTAGACTGTGCT 3'	APLP	149(M)
	10400C	5' TACAAAAAGGATTAGACAGAACC 3'		
	10400R	5' GAAGTGAGATGGTAAATGCTAG 3'		
D	5178A	5' TGATCAACGCACCTGAAACAAGA 3'	APLP	107(D)
	5178C	5' GTCGCACCTGAAGCAAGC 3'		
	5178R	5' CCCATTTGAGCAAAAAGCC 3'		
F	3970T	5' taaaaTGTATTCGGCTATGAAGATAA 3'	APLP	70(F)
	3970C	5' GTGTATTCGGCTATGAAGATAG 3'		
	3970R	5' AGTCTCAGGCTTCAACATCG 3'		
A	L587	5' TTACCTCCTCAAAGCAATACA 3'	测序	175
	H761	5' CTTGATGCTTGTCCCTTTT		
B	L8215	5' ACAGTTTCATGCCCATCGTC 3'	聚丙烯酰胺凝胶电泳	121(B)
	H8297	5' ATGCTAAGTTAGCTTTACAG 3'		

### 1.4 古DNA的测序

扩增产物使用2%琼脂糖(Biowest, German)检测, 所得DNA片段用QIAEX® II GEL Extraction Kit(QIAGEN, Germany)纯化. 测序反应使用ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit 3.1试剂盒(Applied Biosystems, USA). 测序反应程序为96℃变性10s, 50℃退火5s, 60℃延伸4min, 共25个循环. 测序引物与PCR扩增引物相同. 测序反应产物在ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer(Applied Biosystems, USA)上使用ABI Prism Sequencing Analysis™ 3.0软件(Applied Biosystems, USA)收集序列信息.

### 1.5 防污染措施

实验中严格按照Cooper和Poinar等提出的古DNA操作规范进行<sup>[6,7]</sup>. 本研究在一个专门的古DNA实验室中进行, 实验区域完全独立于其他现代分子生物学实验区域, 并有正压的空气过滤系统, 紫外光(254nm)照射, 实验器材都经过高温蒸汽灭菌, 并用15%次氯酸溶液处理不能灭菌的仪器表面. 每次PCR都有抽提空白和PCR空白, 来判断是否有外源污染. 实验室所有人员的线粒体DNA高可变一区的序列全部获得, 并与古代样本序列结果比对, 以排除实验室人员污染的可能. 实验中所有样本都至少抽提2次以上, 部分样本经实验室其他人员重复抽提测序, 不同次抽提产物的结果相同才被确定为可靠序列.

## 2 结果

本实验得到了全部14个真实可靠的线粒体DNA高可变一区360bp的序列, 通过与剑桥标准序列进行比对, 共检出20个变异位点, 8个单倍型(表3). 所得序列中未发现与实验室人员相同序列, 其中XN3, XN5, XN6, XN9, XN13由实验室其他人员验证, 并得到了一致的结果. 其他样本采取对不同牙齿分别抽提测序的方法进行验证, 而对同一样本不同牙齿的序列测定结果完全相同, 从而证明了结果的真实可靠性.

根据14个古代个体的mtDNA高可变一区的变异情况, 结合APLP分析或者mtDNA高可变二区及编码区测序将这些样本归属为6个单倍型类群.

其中4个为F型, 4个为A型, 2个为Z型, 2个为B型, 1个为D型, 由于所选择的限制性位点有限, 样本XN1只分到了M型.(分型情况见表3).

表3 样本测序及分型情况<sup>a)</sup>

样本	HVS-I	HVS-II 编码区	Haplogroups
1 XN1	223 269 362	5178C	M
2 XN2 XN4 XN10 XN12	111 129 266 304	3970T	F
3 XN3 XN6 XN9	092 223 290 319 362	663G	A
4 XN11	223 290 319 362	663G	A
5 XN5	140 183 189 243 355	9 bp del	B
6 XN13	182 183 189 265	9 bp del	B
7 XN7 XN8	185 223 260 298	103 152	Z
8 XN14	223 362	5178A	D

a) 注:高可变一区突变位点均省略16000(如:223=16 223).

为了研究本样本的单倍型在现代人群中的分布, 我们在GenBank中搜索了相应的共享序列. 其中的单倍型2, 4, 7, 8在现代人群中均有发现, 而单倍型1, 3, 5, 6则未发现完全共享序列(见表4). 其共享人群大部分分布在东亚, 在中国的汉族人群中分布较为广泛, 并且在藏缅语系的人群中也有分布.

表4 陶家寨墓地人群单倍型类群在现代人群中的共享分布

单倍型	样本	共享人群
2	XN2 XN4 XN10 XN12	中国:新疆汉族,内蒙古汉族,云南汉族,湖北汉族,山东汉族,壮族
4	XN11	中国:新疆汉族,内蒙古汉族,湖北汉族,山东汉族,台湾,壮族,土族,白族,傣族 日本,俄罗斯,美国
7	XN7 XN8	中国:新疆汉族,内蒙古汉族,云南汉族,山东汉族,辽宁汉族,土族,怒族,傈僳族 越南,日本,俄罗斯
8	XN14	中国:新疆汉族,内蒙古汉族,云南汉族,山东汉族,辽宁汉族,台湾 日本,俄罗斯

根据共享情况, 我们选取了青海喇家古代人群<sup>[8]</sup>及5个现代人群: 青海汉族<sup>[9]</sup>, 青海藏族<sup>[10]</sup>, 辽宁汉族<sup>[11]</sup>, 广东汉族<sup>[11]</sup>, 四川羌族(数据未发表)作为比较人群来研究陶家寨M5号墓葬人群与青海人群及与其他现代人群的遗传关系. 运用 net-

work 软件构建中介网络图, 考察本实验样本与比较人群的亲缘关系(图 2)。

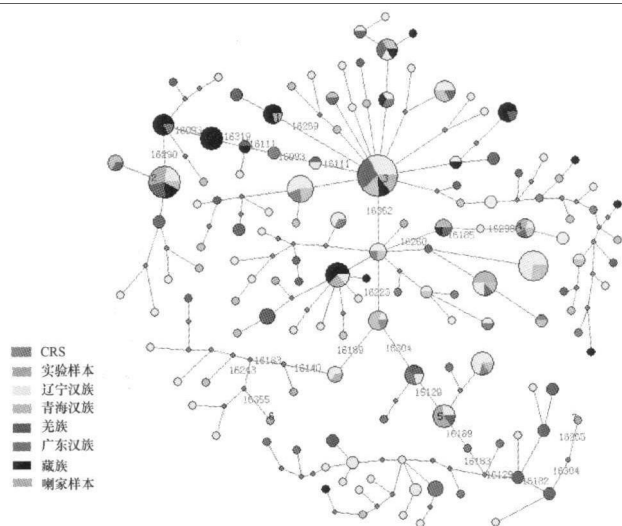


图 2 中介网络图

### 3 讨论

#### 3.1 陶家寨墓地 M5 号墓葬人群内部关系分析

本实验样本取自陶家寨墓群中的 M5 号墓, 这个墓中埋藏了多达 15 个个体, 为该墓群中埋藏个体数最多的一座砖室墓, 考古学研究可能是一座家族墓地. 本实验通过对 M5 号墓中 14 个个体的线粒体 DNA 进行分析, 只得到 8 种单倍型, 其中有 3 个单倍型被多个个体分享(单倍型 2: XN2 XN4 XN10 XN12; 单倍型 3: XN3 XN6 XN9; 单倍型 7: XN7 XN8), 体现出 3 种主要的母系来源. 由于东汉末期青海地区早已进入父系社会, 家族的传承是以父系遗传这种方式进行, 所以同一家族其母系来源可以有多种. 而单倍型共享情况在陶家寨人群中所占比例很大, 因此陶家寨墓地个体间可能具有较近的母系亲缘关系. 但若确定该墓地中 14 个个体的亲缘关系, 还需进一步对 Y 染色体进行研究.

#### 3.2 陶家寨墓地 M5 墓葬人群与现代人群的关系

在本实验所得到的 6 种单倍型类群中, 单倍型 1 由于选取的 APLP 分型位点有限, 只分到了 M 型. 单倍型 2 为 F1c 型, F 型样本主要分布在中国南方地区, 在广东汉族中 F 型的分布频率达到了 25.3%. 单倍型 3 和 4 为 A 型. A 型在中国的分布主要在北方地区, 在青海的汉族, 藏族人群中均有

较高比例的分布, 而在南方汉族中分布频率较低. 单倍型 5 和 6 为 B 型, B 型在中国的分布呈现出由南向北递减的趋势, 在广东汉族中达到 26.3%, 在青海的汉族, 藏族中也有分布. 单倍型 7 为 Z 型, Z 型在中国北方较为常见, 在中国南方分布频率较低. 单倍型 8 为 D4 型, D4 型在中国汉族中分布十分广泛, 且呈现出由北向南递减的趋势, 在青海省的汉族人群中分布达到 18.2%<sup>[8]</sup>. 总的看来, M5 号墓葬人群所属单倍型类群既有主要分布在中国北方的 A, Z 和 D 又有主要分布于中国南方的 F 和 B, 从单倍型共享情况来看, 共享单倍型主要分布在新疆、内蒙古和山东的汉族人群中, 此外云南、辽宁的汉族, 壮族, 土族, 白族, 傣族, 怒族, 傈僳族, 台湾以及日本和俄罗斯也有分布(表 4). 由此看出, M5 墓葬人群与现代中国北方汉族及南方藏缅语系的民族均表现出较近的亲缘关系.

中介网络图分析表明, 本实验样本分布在 7 个节点中, 在图中分别编号 1—7. 其中, 节点 1 中样本为 XN1, 与之亲缘关系最近的比较人群为青海藏族, 其次为羌族; 节点 2 中样本为 XN3, XN6, XN9, XN11, 与之亲缘关系最近的比较人群为羌族, 辽宁汉族, 藏族, 青海汉族; 节点 3 中样本为 XN14, 与之亲缘关系最近的比较人群为羌族, 辽宁汉族, 藏族, 青海汉族; 节点 4 中的样本为 XN7, XN8, 与之亲缘关系最近的比较人群为羌族, 辽宁汉族, 青海汉族; 节点 5 中的样本为 XN2, XN4, XN10, XN12, 与之亲缘关系最近的比较人群为羌族, 辽宁汉族; 节点 6 中的样本为 XN5, 与之亲缘关系最近的比较人群为辽宁汉族; 节点 7 中的样本为 XN13, 与之亲缘关系最近的比较人群为羌族. 综上所述本实验样本与羌族的亲缘关系最接近, 其次为辽宁汉族. 青海地区在秦汉以前是古代羌人活动、栖息之地. 后来的战争中, 炎帝部落大部分与黄帝部落互相融合, 成为汉族的先民—华夏族, 另一部分则西行或南下, 与当地土著居民融合, 成为藏族、彝族等其他民族的先民, 而本实验结果正与这一历史相符合.

#### 3.3 陶家寨墓地 M5 墓葬人群与喇家人群的关系

喇家遗址距今约 3800—4000 a, 隶属青海省民和县官亭镇下喇家村, 地处黄河上游的民和县官亭

盆地,与陶家寨遗址相距约100 km.将喇家古代遗址样本与本实验样本进行单倍型类群比较,喇家遗址的14个个体分属于B, C, D, M\*和M10, 5种单倍型类群,其中的D型与本实验样本中的D型为共享单倍型, B型与本实验样本中的B型共享16140, 16189突变位点.在喇家遗址中出现频率较高的16223突变(14个样本中有12个样本有此突变)在本实验样本中也较为常见(14个样本中有7个样本有此突变)<sup>[8]</sup>.这一现象说明,虽然本实验样本与喇家样本在年代上相距约2000 a之久,但在遗传结构上仍体现出一定的连续性.

本实验样本所处的年代为西汉政府开始向河湟地区迁徙汉人的特殊时期,汉人的大量迁入势必会给当地的土著居民带来一定的影响.体质人类学分析认为,“陶家寨古代居民不仅显示了与中原汉族体系具有一定的关联,同时还表现出了很强的土著特征,这或许就是汉、羌融合的一种表现”<sup>[2]</sup>.本实验通过分子生物学分析表明,陶家寨M5号墓地人群与喇家古代居民具有一定的遗传连续性,且在现代各组比较人群中与羌族及辽宁汉族亲缘关系最为接近.由此可以看出,对陶家寨墓地古人群的研究可能为青海地区汉羌融合问题提供线索.因此随着对陶家寨汉墓群更深入的研究,陶家寨汉墓群古代人群对青海地区的民族融合,对现代青海人群的影响以及对汉族的起源、南方汉族和北方汉族形成的影响必将被更加清晰的阐明.

**致谢** 研究所用样本由吉林大学边疆考古中心提供.本文在研究的过程中吉林大学边疆考古中心张敬雷博士在样本形态学分析及背景方面给予了很

多帮助,复旦大学生命科学学院金力教授为我们提供了现代羌族数据.对于他们给予的无私的帮助,作者在此致谢忱.

## 参 考 文 献

- 1 崔永红,张得祖,杜常顺.《青海通史》.西宁:青海人民出版社,1999
- 2 张敬雷.吉林大学博士学位论文.长春,2008
- 3 青海省文物考古研究所.青海省西宁市陶家寨汉墓2002年发掘简报,《东亚考古》B卷,南京师范大学文博系编,北京:文物出版社,2007,311—350
- 4 王海晶,刘伟强,付玉芹,等.内蒙古和林格尔县将军沟墓地古人骨分子生物学研究.自然科学进展,2006,16(7):894—898
- 5 Tanaka M, Cabrera VM, González AM, et al. Mitochondrial genome variation in eastern Asia and the peopling of Japan. *Genome Research*, 2004, 14: 1832—1850
- 6 Cooper A, Poinar HN. Ancient DNA: Do it right or not at all. *Science*, 2000, 289: 1139
- 7 Poinar HN. *Criteria For Authenticity in Ancient DNA Work*. New York: Taylor and Francis Group, 2004, 115—116
- 8 Gao SZ, Yang YD, Xu Y, et al. Tracing the genetic history of the Chinese people: Mitochondrial DNA analysis of a neolithic population from the Lajia Site. *American Journal of Physical Anthropology*, 2007, 133: 1128—1136
- 9 Wen B, Li H, Lu D, et al. Genetic evidence supports demic diffusion of Han culture. *Nature*, 2004, 431: 302—305
- 10 Wen B, Xie XH, Gao S, et al. Analyses of genetic structure of Tibeto-Burman populations reveals sex-biased admixture in Southern Tibeto-Burmans. *Am J Hum Genet*, 2004, 74: 856—865
- 11 Yao YG, Kong QP, Bandelt HJ, et al. Phylogeographic differentiation of mitochondrial DNA in Han Chinese. *Am J Hum Genet*, 2002, 70: 635—651