DOI:10.19800/j.cnki.aps.1995.03.001

第34卷 第3期
1995年5月

古生物学报
ACTA PALAEONTOLOGICA SINICA

Vol.34,No.3
May,1995

古生物学领域的新辟园地——分子古生物研究

杨 群
(中国科学院南京地质古生物研究所,南京 210008)

内 容 提 要

分子古生物研究是现代分子生物学、有机地球化学和古生物学等领域相交叉、结合而形成的年轻学科方向,是古生物学领域的一个新兴生长点。与传统古生物学相比,分子古生物研究更依赖于现代化的实验、分析技术,它使古生物研究从宏观(生物形态)深入微观(分子层次)。分子古生物研究应当与传统的形态解剖研究相结合,两者的关系是相互补充的。现提出狭义分子化石和广义分子化石的概念,并指出它们与有机地球化学研究中的生物标志化合物等概念的异同。当今分子古生物学的研究热点——化石脱氧核糖核酸(DNA)对研究生物分类系统、谱系发生、演化速率等主题具有重大意义,其关键技术——多聚酶链式反应(PCR)方法使人们有可能在短时间内分析极微量的DNA。狭义分子古生物学的另一个重要研究方向是化石蛋白氨基酸的研究,特别是氨基酸多肽链以及外消旋的研究;氨基酸的外消旋研究已在第四纪年代学和古温度研究中发挥作用。分子古生物研究作为一个学科领域尚处于发展阶段,并带有强烈的探索性,它将在生物谱系发生、系统分类、演化、古环境以及化石燃料等研究领域发挥重要作用。

关键词 分子古生物学 化石DNA 化石氨基酸 狭义分子化石 广义分子化石 化石有机分子 生物标志化合物 综述

一、概 述

Calvin(1968)首先使用了"分子古生物学"(molecular paleontology)一词,其当时的含义局限于有关生物标志化合物的研究。Runnegar(1986)第一次将分子古生物研究作为古生物学领域的一个新兴学科分支提出,并指出分子古生物学是现代分子生物学、有机地球化学与古生物学相交叉、结合的边缘领域。Runnegar 认为,现代分子生物学的发展为我们提供了探索生命历史的一个新型工具,这一工具对于当今古生物学的意义,犹如比较解剖学在居维叶时代所起的作用。

广义的分子古生物研究可追溯到本世纪50、60年代或者更早(Abelson,1956;Wyckoff,1972),然而,作为一个独立的学科方向,分子古生物学是近年发展起来的(Runnegar,1986;Curry,1987;Smith and Littlewood,1994),尤其是90年代初以来,研究者成功地分离了可直接用作生物谱系及演化研究的、载有生物遗传信息的化石DNA(Golenberg *et al.*,1990;Cano *et al.*,1992,1993;De Salle *et al.*,1992),这一重要突破迅速使分子古生物研究从有机地球化学及分子生物学领域中脱颖而出,成为探索历史生物系统的演化、分类与谱系发生等古生物学主题的重要研究方向。

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

分子古生物学运用生物化学、有机地球化学等分析手段，并依据分子遗传学与分子进化理论，从分子角度探讨古生物有机体及其生态环境和谱系演化规律，因而，在研究方法和研究对象上拓展了传统古生物学领域；后者主要运用生物形态学、解剖学及沉积学等方法，分析、研究保存在地层中的古生物硬体及其残骸（如内外骨骼、鳞片、牙齿等实体化石）和生命活动痕迹（遗迹化石）。分子古生物新园地的开辟标志着古生物学研究正向更深层次发展。如果将以形态解剖学方法研究宏体和微体化石的传统领域统称为宏观古生物学的话，那么，分子古生物研究（以及将来可能诞生的原子古生物学，参见本文第二部分定义）可归入微观古生物学领域。

分子古生物研究作为一个新兴的发展中的学科领域，有待于研究者进行广泛的探索和认识。本文写作过程中，得到了中国科学院南京地质古生物研究所刘德明副研究员和王金权先生在化石氨基酸研究方面、南京大学生物系吴庆余教授和美国约翰霍普金斯大学生物系宋岩博士在DNA研究方面的指导性意见，笔者对此谨表谢意。

二、术语及相关学科

分子古生物学的研究对象——分子化石（molecular fossil）包括取自化石生物体的和散布在地层中的有机分子。

取自化石内部（硬体或特异埋葬下的软体）的分子化石主要包括蛋白氨基酸和核苷酸（化石DNA——脱氧核糖核酸的基本组分）。这类分子化石可称为"狭义分子化石"；提取并研究狭义分子化石的工作可称为"狭义分子古生物学"。这里所谓的"狭义分子古生物学"曾被称作"古生物化学"（paleobiochemistry）（Abelson，1965；Runnegar，1986，p. 4），它主要从生物学或古生物学角度探讨、研究化石有机分子。狭义分子化石通常产于特异保存状态的沉积物（如琥珀化石、冻土或天然沥青质沉积物中）和起保护作用的生物硬体（如无脊椎动物的钙质壳体、脊椎动物的骨骼）；前者通常保存生物软组织，是研究化石DNA的理想材料，后者经常保存化石蛋白氨基酸和DNA。随着生物化学技术的不断发展，人们发现和分离这类化石的能力也在不断提高。有时文献中出现"生物化学化石"（biochemical fossil）一词，系指含有生物谱系信息的分子化石，如氨基酸、DNA等聚合物（Summons，1988），相当于本文的"狭义分子化石"。

以弥漫状态保存在地层中的有机分子常被称作"化石有机分子"或"化石分子"（fossil molecules）或"生物标志化合物"（biological marker compounds，简称"生标"——biomarkers）。另一概念是"化学化石"（chemical 或 geochemical fossil），它泛指保存在地层中的一切有机分子、有机物原子以及有机物中的同位素特征（Summons，1988），即包含分子化石和原子化石（atomic fossils）。还有一个新撰术语——"印迹脂类（signature lipids）（Summons，1988）系指未经改造的生物分子化石，以区别于生标化合物，后者通常包括已经改造的生物有机分子及其衍生物。

生标或化石有机分子是一类传统的分子化石，也可称为"广义分子化石"，它们属于有机地球化学和广义分子古生物学的共同研究范畴，但两者的研究宗旨有所不同。分子古生物研究的主要目的是历史生物的谱系发生、生物系统分类、生物及生命演化规律、古生态和古生物地理区系，而有机地球化学的主要研究目的可能是地质环境、沉积物、沉积矿产（如石油、

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

天然气等)的起源、演化以及有机分子的地质演化历程等问题。此外,分子古生物学主要从生物分类(尤其是科、属、种等级的基础分类)入手研究,而有机地球化学则主要从有机物的环境意义与生物大类(界、门)入手。尽管如此,分子古生物学与有机地球化学是两个关系密切的边缘学科,他们的研究范畴和研究方法是部分重叠的。这与多数边缘学科的情形相仿。应当指出,在以往文献中,分子化石、化石分子、生物标志物、化学化石、化石有机物等术语的用法常常是不加区别、互换使用的,各自含义不够明确。为此,这里提出狭义分子化石和广义分子化石的概念,以便在分子古生物学研究中专门使用。

生标或化石有机分子通常是生物分子经过蚀变、降解、达到稳定状态后的有机分子产物,它们种类多、数量大、分布极广。常见的化石有机分子包括:类脂化合物、芳烃化合物、脂肪酸和噗啉等色素化合物以及含氧、氮、硫杂环化合物(盛国英,1992)。Philp (1985)主张生标研究应集中在各类碳氢化合物(包括链烷烃、异戊间二烯烃、各类支链烃、取代环已烃、二环烃、二萜烷、三萜烷等)。这些有机分子大量蕴藏于各类沉积物之中,尤其大量包含在化石燃料(石油、天然气、煤)中,据估计(Curry,1990),化石有机物在沉积地层中的平均含量为2%,相当于现今全世界生物总量的 1 000 倍。尽管这些有机物中绝大部分由于深度蚀变而被认为不再具备分子古生物学价值,但是,随着分析技术的不断进步,可以相信,它们潜在的古生物学信息将被不断揭示。

分子古生物学与分子生物学是又一对关系密切的边缘学科,两者针对不同的研究对象(前者以分子化石,后者以现生生物分子为研究对象),从不同的角度探索一些共同的目标,如生物谱系发生、分类关系、演化规律等问题。从某种意义上说,分子生物学的发展奠定了分子古生物学的基础,而分子古生物学的兴起将为现代分子系统学理论提供可用作直接检验的历史数据。事实上,狭义分子古生物学与分子生物学的分析方法几乎完全一致,所不同的是,分子化石的提取和污染物检测较现生生物分子的难度更大。应当指出,现代生物分子研究是分子古生物研究的必要基础,每一例分子古生物研究都必需以某个分子生物学结果作为参照系(或初始数据)。例如在化石 DNA 中,研究者必须首先提出这样一个初始假设,即根据所研究的化石生物与已知 DNA 序列的现代物种在形态上的相似性,以此为根据来设计扩增化石 DNA 所必需的引物(primer)。此外,现代生物分子中蕴藏着大量历史信息,分子系统学据此进行系统分类和谱系重建;此外,分子生物学研究者通过测算生物类群之间的基因距离(genetic dis-

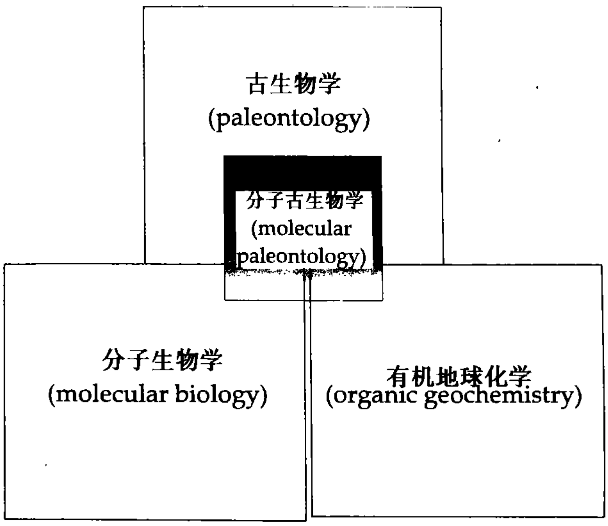

插图 1　分子古生物学及相关领域关系示意图
Molecular palaeontology and related disciplines

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

tance),提出生物"分子钟"的设想(Thorpe,1982)。古生物研究对此可作出的直接贡献是,提供分子演化速率的、直接的时间序列数据以及生物谱系分支的时间值,从而对分子钟进行校准并刻上绝对时间标尺。由此可见,分子生物学研究对于分子古生物研究是至关重要的,现生的和化石的数据是互补的。

三、研究意义

分子古生物研究对于古生物学的一大突破是以全新的研究手段(分子生物学方法)、从全新的认识角度(分子层次)来探索历史生物界及其演化规律。基于现代分子生物学的研究成果,生物分子(特别是带有遗传密码子的 DNA 和蛋白质等聚合分子)是研究生物界系统分类、谱系发生和演化中不可缺少的重要基础数据。分子化石是古生物的一部分,因而分子古生物研究是常规古生物研究的必要补充和发展。由于分子古生物学尚处于其发展的幼年阶段,它的潜在意义和作用还有待于进一步发掘和认识。以下将以现有研究成果为依据,阐述分子古生物研究在几个方面的意义。

1. 分类学和系统学研究

现代分子生物研究已成为生物谱系建造中不可缺少的工具,运用分子生物数据可探讨从门到亚种级的谱系发生(Curry,1990)。分子化石数据尽管目前还不丰富,但其对系统研究的潜在作用是明显的(尤其是化石氨基酸和核苷酸)。它可为解译现代生物谱系的历史分支点提供直接证据,为认识绝灭生物与现存生物间的分类关系提供分子级参数,同时可为选择不同的形态分类方案提供独立于形态解剖学的标准。如同现代分子系统学一样,分子化石数据的积累将为历史生物界的系统研究提供一套与形态学数据平行的、独立的、同时又相互补充的分类数据。诚然,这种分子古生物系统的建立将依赖于分析技术的不断发展,其难度远远大于现代分子系统学。

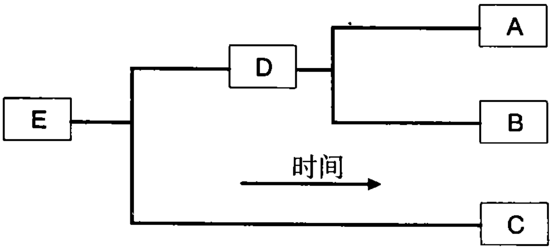

插图 2 从分子系统学推导生物谱系发生问题示意图
(据 Curry,1987 改制)
Diagram showing phylogeny based on genetic distance
(after Curry 1987)
A、B、C 为同一时间面上的 3 个相关的生物类群,在缺乏进一步说明这 3 个类群间系统发生关系的化石数据、从形态上也无法判明其谱系关系的情况下,运用基因距离分析,推测谱系发生

分子系统学(化石的和现生的)研究可揭示一些形态分类无法揭示的生物谱系发生问题。这里首先介绍一个理论模型:有 3 个现存的(或同时的)生物类群 A、B、C,从形态上无法判别它们确切的系统发生关系,也不存在更明确的化石证据,但由于测得 A 与 B 之间的基因距离较小,因而得到如下系统发生模式(插图 2):A、B 的直接祖先是 D,远祖 E 分化出 C 和 D。我们在常规古生物研究中,习惯于相反的思维过程,即从历史记录(化石证据)来阐明类群间的谱系关系。

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

蛋白质中的氨基酸组分已被证明在现生的和化石腕足类中具有分类学意义(Curry,1990)。Jope (1977)的研究表明,腕足类的钙质壳内包含蛋白质和多糖类,这些蛋白质的氨基酸组成反映了由遗传码控制的生物合成作用,因而具有谱系发生和分类学意义。此项研究结果显示,有铰纲和无铰纲的壳体氨基酸组分明显不同,有铰纲的Gly/ala(甘氨酸/丙氨酸)比值(2.1—7.1)明显高于无铰纲(0.8—1.7),而具钙质壳但缺乏铰合构造的*Crania*属的该类比值介于有铰纲和无铰纲之间(2.0—2.3),这与形态解剖数据吻合。Jope指出,腕足类壳质蛋白质分类可用于纲、目甚至有些属。尽管如此,正如Curry (1990)所示,氨基酸分析对于分类和系统学研究的作用一般局限于高级分类单元(超科以上)。

化石DNA的获取与研究或许是对生物分类学与系统学最有意义的,这是因为DNA分子是生物遗传信息的直接载体。分子生物学家首先尝试在博物馆收藏的动物标本的软组织中获取DNA,并取得成功。第一个成功获取绝灭物种DNA的是Higuchi等(1984),他们研究了上世纪末绝灭的、一种曾生活在非洲南部的马科动物——斑驴(Quagga),标本是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(将DNA引入宿主细胞进行复制的方法)成功地获取了大量存在于细胞核外的线粒体DNA并测得其分子序列。Higuchi等进而将斑驴的DNA序列与其它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,而与其它马科动物的系统关系较疏远。

化石DNA研究在最近10年中取得了较大进展,并引起了全世界古生物学界的关注。人们不仅已从博物馆的兽皮和古埃及干尸的软组织中获取古DNA分子序列(Thomas *et al.*,1989;Pääbo,1985;Pääbo *et al.*,1989),而且还成功地从保存在地层中的动、植物化石内获取DNA分子。首例化石分子DNA是从中新世植物(*Magnolia latahensis*,17—20 Ma)的叶片中获取的(Golenberg *et al.*,1991),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,进而从分子角度塑造了所研究木兰科植物的谱系树形图。对这一发现人们至今存有疑问,因为Golenberg等所研究的中新世湖泊相粘土沉积物中含有大量水。从理论上说,仅仅水的作用(不考虑氧的破坏)便可在50 000年内使DNA分子断裂到无法获取任何信息的地步;况且,研究者在同一地点的重复尝试并没有获取DNA (Pääbo,1993)。然而,Golenberg等(1991)认为,他们之所以能够从中获取DNA,可能有两个因素起了关键作用;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。

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—135 Ma)琥珀中的昆虫(Cano *et al.*,1993)。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,由于琥珀内部的特异封闭环境(干燥、隔氧),因此琥珀化石是获取古老DNA分子的最佳标本。化石DNA的研究正在逐渐兴起,可以预见,这一研究方向将成为本世纪末乃至21世纪古生物领域的重要课题之一。应当指出,化石DNA研究的成功应归因于一项重要的技术成果——PCR技术的发明(Mullis,1990;详见本文第四部分的概述),此项研究技术的发明者、美国科学家Kary B. Mullis由此方法论成果而获得1993年度诺贝尔化学奖。

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

化石DNA的发现为研究生物系统发生及演化开辟了重要途径。然而DNA的易于氧化以及可水解性质要求特异的埋葬、保存条件，这就决定了含DNA化石的珍稀性。此外，研究者至今尚不能确定DNA分子在缺水、缺氧的环境下存在的极限是多久，也就是说，人们是否可能获取中生代早期乃至古生代或更早的DNA这一问题尚未从理论上得到圆满解决。

2. 研究生物演化速率和生物分子钟

分子生物学与古生物学相结合的一个重要领域是研究生物演化速率。生物学研究者已提出分子钟(molecular clock)的假说(Thorpe，1982；Runnegar，1982)，该假说根据一定生物分子序列中观察到的突变数目(如DNA序列中的核苷酸成分、次序的差异，蛋白氨基酸的成分与排列次序的变化)，计算现存物种间的基因距离，然后将分子距离与产生该分子差异量所经历的时间(运用化石资料分析分支点到现在所经历的时间)作比较，由此算出生物分子的演化速率。分子古生物研究者进一步推测(杨洪等，1991)，通过化石DNA研究可以直接比较化石的和现生分子的突变率，从而达到校对生物分子钟的目的。仅靠处于演化末梢的现代生物分子的资料会在研究中遇到许多难以解决的问题。随着化石分子资料的积累，人们有可能了解生物分子进化过程中时间变化序列，从而更准确地掌握各时期生物的演化过程。

“生物分子钟”假说对于生物演化研究显然具有重要意义。然而，研究人员对此仍然存有许多疑虑。首先，我们观察到的生物分子序列中的变异数目，可能不等于从两个物种共同起源点(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)。第二，已经证明(Li and Bousquet，1992)，在不同分子中及在不同生物的同种分子中，分子序列变化的速率是不同的(Curry，1990)。尽管如此，Smith和Littlewood认为，只要分子序列是相对不饱和的，通过最优分析法(parsimony analysis)获得的速率应当接近于实际速率。例如，Smith和Littlewood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(Smith *et al.*，1992)。

3. 氨基酸年代地层学与古温度意义

从钙质化石壳内提取氨基酸并研究其外消旋(racemization)比率已被广泛用于第四纪年代学(Wihmiller，1982)和古温度估算(Bada and Man，1980)。

钙质生物壳内的蛋白质主要由20种不同的氨基酸组成，这些氨基酸均为L-构型。随着时间的推移，这些L-型氨基酸逐渐转化为D-构型。L-型氨基酸和D-型氨基酸是对映体(enantiomers)，即两者的分子构型互为镜面映像。由L-型转化为D-型氨基酸的过程称为外消旋反应。少数含有多于一个不对称碳原子的氨基酸(如L-异亮氨酸)的转化产物不是对映体而是非对映体(diastereoisomers)，这种变化称为差向异构反应(epimerization)。蛋白质在沉积物中逐渐水解为肽(peptides)及氨基酸，并发生氨基酸外消旋或差向异构作用。氨基酸在地层中发生外消旋的速率与蛋白质水解速率有关(McCoy，1987)。氨基酸外消旋率(D/L比值)受两个主要因素的控制——温度和时间。这是氨基酸外消旋研究用于年代地层学和古温度研究的理论基础。

钙质生物壳体中蕴藏的氨基酸是分子古生物研究的一个重要资源。研究表明(Curry，

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1990），生物有机质在介壳中似一种生物“液态包裹体”，不仅可延缓分解、蚀变，而且还能免于外来污染。对侏罗纪以后扇贝类壳体有机质的研究表明，氨基酸的残存量自白垩纪以来保持稳定递减速率（插图 3）。

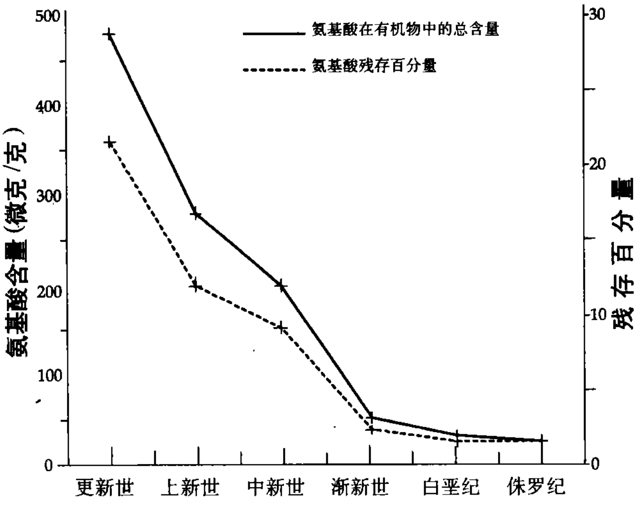

插图 3　侏罗纪以来扇贝类（双壳类）壳体有机物中的氨基酸含量及其残存百分量变化示意图（根据 Curry，1990 改制）

Decay of amino acid with time (after Curry 1990)

由于氨基酸的分解作用，更新世至白垩纪的氨基酸残存量随时间逐渐递减；白垩纪以前的氨基酸残存量约为原始含量的 1%—2%

刘德明等（1987）研究并测定了我国福建沿海全新世沉积物中 *Anadara* 属（双壳类）壳体氨基酸及其对映体组分，并探讨了氨基酸外消旋的年代学意义，他们结合碳同位素年代数据，证明了氨基酸外消旋的年代学意义及其在第四纪地层测年中的应用。

化石氨基酸已被广泛发现于包括无脊椎动物钙质壳体、脊椎动物骨骼和植物等化石以及第四纪沉积物中（Hare *et al.*，1980）。在地质历史中，已发现的氨基酸可追溯到前寒武纪（Runnegar，1986）。在对化石氨基酸研究中，不仅可进行其种类和构型的分析，而且还可进行氨基酸序列测定（Hare *et al.*，1980），后者可应用于生物演化方面的研究。

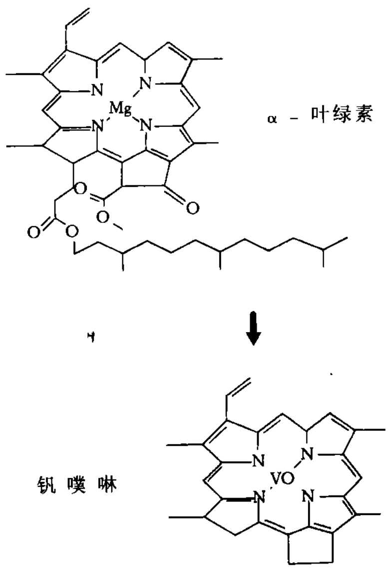

插图 4　分子化石的经典例子——来自 α-叶绿素的钒卟啉

Example of molecular fossil——vanadyl porphyrin derived from chlorophyll α

在地质过程中，α-叶绿素的镁离子被钒离子取代并失去侧链后演化为钒卟啉（原油、生油岩和一些煤的重要组分）

4. 化石燃料的研究

化石燃料（石油、煤、天然气）中蕴藏着大量化石有机分子，这些有机分子的研究一直是有机地球化学领域的主要课题之一。从分子古生物学角度探讨这些广义分子化石，又是古生物学的一个重要课题。所谓的生标化合物是一类在石油研究中很有意义的化石有机分子（Philp，1985）。

分子化石的一个经典例子——钒岩卟啉（vanadal deoxyphylloeryrhroetioporphyrin，简称 DPEP）是原油和生油层的重要成分，它的晶体结构研究（Ekstrom *et al.*，1983）表明，这种

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

分子化石来源于α-叶绿素(chlorophill A),其中的钒离子替代了原来的镁离子(插图 4)。刘洛夫、胡爱梅(1994)指出,噗啉化合物可应用于油源对比、油气运移、沉积环境和有机成熟度等领域的研究中。与石油有关的另一类重要生物有机分子称为藿烷(hopanoids),Ourisson 等(1984)指出,这些分子是细菌类细胞膜组分的衍生物;这就表明,石油的相当一部分来源于细菌。藿烷也是一些煤的重要组分。

四、研究方法

从分子古生物学的发展过程可以看出，这一学科领域基本上是随着研究手段的进步而进步的。分子古生物研究的技术手段在不断更新和发展，这个领域的研究者仍在不断地探索、寻找各种适用于分子古生物研究的分子生物学、有机地球化学等领域的研究方法。

1. PCR 方法用于化石 DNA 研究

DNA 是生物遗传信息的直接载体,因而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,易于水解和氧化。即使在特异环境下(如无脊椎动物的外壳和脊椎动物的骨骼内部、天然沥青、琥珀等),得以残存的 DNA 的含量通常非常微小,因而难以进行测序分析。PCR(多聚酶链式反应)(Mullis and Faloona,1987;Mullis,1990)技术的发明解决了这一难题,它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)。

PCR 方法实质上就是在试管中繁殖一个特定的 DNA 片段的反应过程,此 DNA 片段通过两个很短的 DNA 小片(引物)限定,而引物又是根据所要研究的 DNA 的序列设计、合成。在多聚酶的作用下,引物在试管中扩增。此过程是连续循环进行的,每次循环将所需 DNA 分子序列复制一次(数量增加一倍)。PCR 反应过程的第一步是样品中具双链结构的 DNA 分子模板热解为单链,紧接着一个引物便与其中一链结合,另一引物与对应的 DNA 分子链结合。然后,多聚酶开始将样品提取物中的碱基一一添加到引物的末端,从而延伸由引物启动的双螺旋链。在这个反应过程中,因为每个单链产生一个新的双螺旋分子,所以每次循环的结果是该特定序列的 DNA 分子个数增加一倍(Pääbo,1993)。

PCR 过程所要求的样品可以是单个 DNA 片断,也可以是复杂的混合物。而且,PCR 反应过程不受残余破损分子的干扰,PCR 的复制、扩增过程可以任意重复(Hoss *et al.*,1994),这就使本来难度很大的 DNA 分析成为一种常规分析手段。在 PCR 技术发明之前,人们曾尝试用传统的 DNA 分子克隆技术分析古代 DNA 标本,虽然在上百年的博物馆标本上获得成功(Higuchi *et al.*,1984),然而,由于传统的克隆技术的效率极低,因此实际上无法通过重复实验来验证测试结果(Hoss *et al.*,1994)。而且,传统分子克隆用于古老 DNA 研究时,产生的误差较大。运用 PCR 方法,Pääbo 和 Wilson (1988)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。

PCR 技术已成为现代分子生物学实验室的常规研究手段,它的意义不仅在于高效率的复制、扩增及其可任意重复性,更重要的是它的可靠性。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,而 PCR 直接扩增、测序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)。

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

用 PCR 方法扩增古老 DNA 的局限性是，它通常只能直接扩增较短的 DNA 分子片段（最多 100 至 150 个碱基对），这是由于多数化石 DNA 分子的结构已经化学变化，这些结构变异点致使进一步扩增不可能继续进行。更长的 DNA 分子序列需要将所获取的较短的片段进行叠置建造。这一过程技术性很强，而且易出差错（Hoss *et al.*，1994，p. 259）。

2. 免疫法测定分子化石

免疫技术引入分子古生物研究领域是在蛋白质分子化石研究方面的一个突破。运用免疫技术测定分子化石的原理是，由于免疫系统的主要特性——抗体可通过检测被追踪分子上的一个很小特征部位（定子——determinant）而识别该分子，因此，在分子古生物研究中，可为某种特定分子制作抗体，只要化石样品中存在该分子或含有该分子定子的碎片，就可用此抗体进行检测。由于抗体定子的体积比整个分子小得多，因此，据估计，定子至少可在地层中保存 70Ma（Lowenstein，1986）。运用免疫法分析分子化石的优点是，抗体的专业性很强，可进行大量不同分子化石的检测。免疫方法具有潜在的系统分类学意义。比如，研究现生双壳类的实验表明，适用于一个物种的抗体对于同一科种的其它物种不起任何反应（Muyzer *et al.*，1984）。研究者认为，免疫法至少可判别科、属级分类单元（Lowenstein，1986）。尽管如此，抗体的制作过程复杂，技术性较强（Curry，1990）。

3. 化石有机物常规分析技术

分子化石有机物常规分析手段是现代化有机地球化学实验室的一些技术，由于这方面的资料较多（Swain，1970；傅家谟，1982，1989），这里仅作简单说明。分子化石与现代生物有机物相比，有一个突出的难点：含化石有机物的标本通常是已经历不同程度化学变化的复杂混合物。目前常用的测试设备主要有：气相色谱仪、紫外分光光度计、高效液相色谱仪；研究生标化合物的关键仪器是气相色谱-质谱-计算机联用仪（GC-MS-COM），分析精度可达毫微克，即 10^{-9} 克数量级；研究单个化合物碳同位素比值的显微光度计、有机元素分析仪、生油岩评价仪、顺磁共振仪、核磁共振仪、阴极发光射线仪及 x-衍射仪等（盛国英，1992）。

五、展　望

分子古生物学作为一个新兴的学科分支，近年在国际上发展比较迅速，一些重要的古生物研究机构（如英国大英博物馆、美国 Smithsonian 研究院、美国自然历史博物馆、日本名古屋大学地球与行星科学系）相继建立以化石 DNA 研究为前沿阵地的分子古生物学实验室。我国古生物学界在此领域已经落后，尤其是化石 DNA 研究这一当前国际前沿和热点在我国还属空白，仅见一篇综述性文章（杨洪等，1991）。在化石蛋白氨基酸的研究方面，我国研究者已开展一些尝试（刘德明等，1987，王将克等，1991），尤其在氨基酸的地层分布和外消旋等方面的研究已取得一定成果，但缺乏化石氨基酸聚合物的测序研究资料。由于分子古生物研究对系统分类、谱系发生、生物演化、古生态及化石燃料研究等领域的重要意义，分子古生物数据将成为古生物学不可缺少的基础信息，从目前的发展趋势来看，分子古生物研究很有可能成为 21 世纪古生物学领域的一个重要方向。

我国分子化石资源（包括化石 DNA 和蛋白氨基酸）十分丰富，目前急需的是，古生物研究者应积极联合分子生物学和有机地球化学领域的专家，联合国内外同行，引入必要的研究

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

方法和设备,建立切实可行的分子古生物(尤其是狭义分子古生物学)研究项目,并应在此实践中积极跟踪国际前沿。不可忽视的是,分子古生物研究要求复杂的有机化学和生物化学分析技术以及现代分子生物学知识。这就要求:1)从传统古生物学专业毕业的研究人员要加强有关知识的培训;2)引入分子生物学专业的毕业生或专家。从另一方面看,许多现代化的分析、测试设备已高度自动化,便于引入不同的研究领域。

值得指出,分子古生物研究(尤其是化石 DNA 和氨基酸测序等前沿课题)既富有极其重要的古生物学意义,同时又具有高度的探索性。比如化石 DNA 测序中的可靠性检验问题(Hoss *et al.*,1994)、DNA 分子的可能存在时限问题(Pääbo,1993)、化石氨基酸序列与同源关系问题(Curry,1988),都是有待于进一步探讨的实际问题和理论问题。可以相信,随着研究技术的不断改进和突破,分子古生物学研究中的一些不定因素将不断被识别,难点将逐渐被克服。

Curry (1990)指出,将分子古生物研究中的一系列复杂而陌生的技术与原理引入传统的地学领域并加以消化吸收,这必然是一个缓慢的过程。然而,分子古生物研究这一新兴学科方向将导致古生物学向新的更深层次发展,由于分子古生物学依据现代分子生物学的坚实的理论和实验基础,因此,它将有良好的发展前景。

参 考 文 献

王将克、陈水挟、钟月明、罗红红(主编),1991: 氨基酸生物地球化学。科学出版社。

刘德明、蓝琇、王金权,1987: 福建沿海全新世贝壳沉积物的氨基酸外消旋年代测定。古生物学报,**26**(3):345—353。

刘洛夫、胡爱梅,1994: 噗啉的研究现状及其应用。地球科学进展,**9**(2):51—58。

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。

盛国英,1992: 有机地球化学。地球科学进展,**7**(3):91—93。

傅家谟,1989: 我国有机地球化学研究进展及其在油气勘探中的应用。石油天然气地质,**10**(3):216—221。

Abelson, P. H., 1956: Paleobiochemistry. Sci. Amer., **195**(1):2—7.

Bada, J. L. and Man, E. H., 1980: Amino acid diagenesis in deep sea drilling project cores: kinetics and mechanisms of some reactions and heat flow determinations. Earth-Science Reviews, **16**:21—55.

Briggs, D., 1990: Biomolecular palaeontology. Natural Environmental Research Council News, July, **1990**:11—14.

Calvin, M., 1968: Molecular paleontology. Trans. Leicester Literary Phil. Soc., **62**:45—69.

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.

Curry, G. B., 1987: Molecular Palaeontology. Geology Today, **1987**(1/2):12—16.

Curry, G. B., 1988: Amino acids and proteins from fossils. In: Molecular evolution and the fossil record (short courses in paleontology), **1**:20—33.

Curry, G. B., 1990: Molecular Palaeontology. In: D. E. G. Briggs and P. R. Crowth (eds.), Palaeobiology: a synthesis, pp. 95—100.

De Salle, R., Gatesy, J., Wheeler, W. and Grimaldi, D., 1992: DNA sequences from a fossil termite in Oligo-Miocene amber and their phylogenetic implications. Science, **527**:1933—1936.

Ekstrom, A., Fookes, C. J. R., Hambley, T., Loeh, H. J., Miller, S. A. and Taylor, J. C., 1983: Determination of the

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

crystal structure of a petroporphyrin isolated from oil shale. Nature, **306**: 173—174.

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.

Hare, P. E., Hoering, T. C. and King, K., 1980: Biochemistry of amino acid. John Wiley and Sons. 558 pp.

Henderson, D. and Zurawski, G., 1990: Chloroplast DNA sequence from a Miocene Magnolia species. Nature, **344**: 656—658.

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.

Hoss, 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.

Jope, M., 1977: Brachiopod shell proteins: their function and taxonomic significance. Amer. Zool., **17**: 133—140.

Li, P. and Bousquet, J., 1992: Relative-rate test for nucleotide substitutions between two lineages. Molecular Biology and Evolution, **9**: 1185—1189.

Lowenstein, J. M., 1986: Molecular phylogenetics. Annual Review of Earth and Planetary Sciences, **14**: 71—83.

McCoy, W. D., 1987: The precision of amino acid geochronology and paleotemperature. Quaternary Sci. Rev., **6**: 43—54.

Mullis, K. B., 1990: The unusual origin of the polymerase chain reaction. Scientific American, **262**(4): 56—65.

Mullis, K. B. and Faloona, F. A., 1987: Specific synthesis of DNA in vitrovia a polymerase chain reaction. Methods in Enzymology, **155**(pt. F): 335—350.

Muyzer, G., De Jong, E. W., Brunning, J. W. and Wehmiller, J. F., 1984: Immunology and organic geochemistry. Organic Geochemistry, **6**: 847—855.

Pääbo, S., 1985: Molecular cloning of ancient Egyptian mummy DNA. Nature, **314**: 644—645.

Pääbo, S., 1989: Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning and enzymatic amplification. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **86**: 1939—1943.

Pääbo, S., 1993: Ancient DNA. Scientific American, **269**(5): 60—66.

Pääbo, S., Gifford, J. A. and Wilson, A. C., 1991. Mitochondrial DNA sequences from a 7000-year-old brain. Nucleic Acids Research, **16**: 9775—9787.

Philp, P. R., 1985: Fossil Fuel Biomarkers (Methods in geochemistry and geophysics, 23). Elsevier. 294 pp.

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., Lafay, B. and Christen, R., 1992: Comparison of morphological and molecular rates of evolution: 28S ribosomal RNA in echinoids. Philosophical Transactions of the Ryoal Society (London) B, **338**: 365—382.

Smith, A. B. and Littlewood, D. T. J., 1994: Paleontological data and molecular phylogenetic analysis. Paleobiology, **20**(3): 259—273.

Summons, R. E., 1988: Biomarkers: molecular fossils. In: Molecular evolution and the fossil record (short courses in paleontology, **1**: 98—113.

Swain, F. M., 1970: Non-Marine Organic Geochemistry. [陆相有机地球化学](钱吉盛等翻译, 1979)。科学出版社。

Thomas, R. H., Schaffner, W., Wilson, A. C. and Pääbo, S., 1989: DNA phylogeny of the extinct marsupial wolf. Nature, **340**: 466—467.

Thorpe, J., 1982: The molecular clock hypothesis: biochemical evolution, genetic differentiation and systematics. Annual Review of Ecology and Systematics, **13**: 139—168.

Wihmiller, J. F., 1982: A review of amino acid racemization studies in Quaternary molluscs: stratigraphic and chronologic applications in coastal and interglacial sites, Pacific and Atlantic coasts, United States, United Kingdom, Baffin

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

Island, and tropical islands. Quaternary Science Reviews, **1**: 83—120.
Wyckoff, R. W. G., 1972: The biochemstry of animal fossils. Scientechnica, Bristol,

[1995年1月27日收到]

A FRONTAL AREA IN PALAEONTOLOGY ——MOLECULAR FOSSIL STUDIES

Yang Qun
(*Nanjing Institute of Geology and Palaeontology, Academia Sinica, Nanjing* 210008)

Key words molecular paleontology, amino acid, DNA, biomarkers, molecular fossil *sensu stricto*, molecular fossil *sensu lato*, synthesis

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net