

مروری بر تغییر ساختار شیمیایی و ژئوآرکئولوژی DNA باستانی و فرآیندهای استخراج آن

پرستو عرفان منش^۱؛ فرامرز رستمی چراتی^۲

۱. کارشناس مسئول آزمایشگاه بیولوژی پژوهشگاه میراث فرهنگی و گردشگری، پژوهشکده حفاظت و مرمت آثار تاریخی- فرهنگی، عضو کارگروه

تخصصی زیست فناوری شبکه علوم آزمایشگاهی فناوری های راهبردی

۲. دانشیار شیمی و عضو هیأت علمی پژوهشگاه میراث فرهنگی و گردشگری، پژوهشکده حفاظت و مرمت آثار تاریخی- فرهنگی

چکیده

ارزش‌های فرهنگی به عنوان بخشی جدایی‌ناپذیر از هویت تاریخی ملت‌ها، همواره در صدر اولویتهای مطالعاتی و تحقیقاتی قرار دارد. باستان‌شناسی با تکیه بر روش‌های نوین به ویژه ژنتیک باستانی، گام‌های بلندی در کشف ناگفته‌های تمدن‌های گذشته برداشته است. پیشرفت‌های اخیر در این حوزه، امکان بازخوانی دقیق‌تر صفحات تاریخ بشر را فراهم ساخته است. در این پژوهش، با بررسی مقالات منتشر شده و تکیه بر نتایج تجربی، مکانیسم تخریب ساختار شیمیایی DNA مورد مطالعه قرار گرفته و روش‌های مناسب برای استخراج آن بررسی شده است. هدف اصلی این مطالعه، ارائه راهکارهایی مناسب برای رفع چالش‌های استخراج DNA و بهینه‌سازی روش‌ها به گونه‌ای است که با کمترین مقدار نمونه باستانی، بتوان DNA را با بالاترین کیفیت استخراج و شناسایی نمود. این بررسی‌ها اطلاعات ارزشمندی در حوزه ژنتیک باستانی ارائه می‌دهد که شامل مواردی همچون تبار انسان‌ها، مسیرهای مهاجرت، اختلاط و جدایی اقوام، میزان خویشاوندی میان جوامع انسانی، نسب‌شناسی و تشخیص بیماری‌های ژنتیکی می‌شود. بهبود پروتکل‌های آزمایشگاهی و روش‌های نمونه‌برداری از محوطه‌های باستانی، نقش کلیدی در پیشبرد مطالعات ژنتیک باستانی ایفا می‌کند. تغییرات DNA طی زمان که ناشی از دگرگونی در بازهای آلی، گروه‌های فسفات و قندهاست، منجر به تغییرات ساختاری و فنوتیپی در موجودات زنده می‌شود. در نمونه‌های باستانی مانند استخوان، دندان و رسوبات، DNA معمولاً به مقدار اندک و به صورت تکه‌تکه یافت می‌شود. یکی از روش‌های ویژه، استخراج مبتنی بر پایه سیلیس بوده که قادر است حتی قطعات بسیار کوتاه DNA (تا ۲۵ جفت باز آلی) را نیز بازیابی کنند. در مواردی که DNA هسته‌ای به شدت تخریب شده باشد، تمرکز بر ناحیه D-loop DNA میتوکندریایی ضروری است. همچنین با توجه به وضعیت تخریب استخوان‌های تدفینی، انتخاب درست از نوع استخوان در مراحل تجزیه و تحلیل از اهمیت حیاتی برخوردار است.

کلیدواژگان: ژئوآرکئولوژی، DNA میتوکندری، تبارشناسی، باستان‌شناسی، ساختار شیمیایی DNA

*Corresponding email address : parastoo. erfmanmanesh@yahoo.com , f.rostami@richt.ir,

۱- مقدمه

بررسی بقایای فیزیکی انسان‌های باستانی از جمله مهم‌ترین حوزه‌های مطالعاتی در باستان‌شناسی محسوب می‌شود که عمدتاً بر تحلیل ساختارهای اسکلتی شامل استخوان‌ها و دندان‌ها متمرکز است، چرا که این عناصر در مقایسه با سایر بافت‌های انسانی از ماندگاری بیشتری در طول زمان برخوردار بوده و در اغلب محوطه‌های باستانی یافت می‌شوند.

تحلیل DNA باستانی استخراج‌شده از بقایای اسکلتی انسانی امکان بررسی روابط خویشاوندی در سطوح مختلف، از روابط بین جمعیت‌ها تا ارتباطات فردی در گورستان‌های باستانی را فراهم می‌کند. این روش علاوه بر تعیین دقیق جنسیت اسکلت‌ها، در مطالعات پالئوپاتولوژیک نیز کاربرد داشته و امکان شناسایی بیماری‌های ارثی و عفونی مؤثر بر DNA استخوان‌ها را ممکن می‌سازد (Arzelier et al., 2024). تحلیل DNA باستانی استخراج‌شده از بقایای باستان‌شناسی و دیرینه‌شناسی، امکان بازسازی روابط تکاملی و بررسی ارتباطات ژنتیکی بین گونه‌های منقرض شده و گونه‌های معاصر را فراهم می‌سازد. این روش، دیدگاهی بی‌سابقه درباره فرآیندهای تکاملی و تغییرات توالی DNA در طول زمان ارائه می‌دهد. با این وجود، چالش‌های فنی متعددی در این زمینه وجود دارد که لزوم رعایت استانداردهای دقیق کنترل کیفی، به ویژه در مطالعات بقایای انسانی را ضروری می‌سازد. در حالی که پیشرفت فناوری‌های توالی‌یابی سریع، مقایسه DNA موجودات زنده را متحول ساخته است، این داده‌ها تنها تصویری غیرمستقیم از فرآیندهای تاریخی شکل‌دهنده تنوع ژنتیکی ارائه می‌کنند. در مقابل، DNA باستانی امکان مشاهده مستقیم این تغییرات تکاملی را ممکن می‌سازد. DNA در بقایای اسکلتی و رسوبات باستانی قابل بازیابی است (Mery and Slone et al., 2014). اگرچه تحقیقات گسترده و مستمری توسط متخصصان و پژوهشگران در حال انجام است تا روش‌های استخراج DNA را بهبود بخشند، اما هنوز هیچ پروتکل استاندارد و مشخصی برای استخراج حرفه‌ای DNA از بقایای اسکلتی توسعه نیافته است (Hoss et al., 1993; Epp et al., 2019).

اصول کلی استخراج DNA از پودر استخوان است که معمولاً به‌منظور شکستن ساختار سلولی و شیمیایی در مرحله انکوباسیون در یک محلول بافر با اتصال به نمک بسیار غلیظ در ستون‌های سیلیسی انجام می‌گیرد. بعد آن DNA با حلال اتانول شسته شده تا انتقال بازدارنده‌ها به حداقل برسد، سپس توسط یک بافر با نمک با غلظت پایین مجدد شسته می‌شود. دابنی و همکاران یک روش استخراج مبتنی بر سیلیس را منتشر کردند که با موفقیت قطعات DNA را تا ۳۵ جفت باز آلی بازیابی کرد (Dubney et al., 2013). در مقالات جدیدتر، روش‌های دیگری توصیف شد که امکان بازیابی قطعات DNA حتی کوتاه‌تر (≤ ۲۵ جفت باز) را با استفاده از بافر اتصال اصلاح‌شده فراهم می‌کند (Glock et al., 2017).

DNA باستانی اولین بار در عناصر باستانی در سال ۱۹۸۰ گزارش شد (پابلو ۱۹۸۵) و از زمان کشف آن در سال ۱۹۸۹ بر روی مولکول‌های حامل ژنتیکی از بافت استخوانی یا مولکول‌های حفظ‌شده در بافت‌ها، مورد مطالعه قرار گرفته است (براون و براون ۱۹۹۴). آن‌طور که انتظار می‌رفت DNA باستانی تأثیر بالا و زود هنگامی بر باستان‌شناسی نگذاشت. این مسئله شاید به دلیل اقدامات پیشگیرانه‌ی دقیقی بود که باید برای جلوگیری از آلودگی انسانی نمونه‌ها با DNA مدرن صورت می‌گرفت و تا سال ۱۹۹۵ درک درستی از آن صورت نگرفت (هانت و همکاران ۱۹۹۴؛ استونکینگ ۱۹۹۵). بسیاری از گزارش‌های منتشر شده در زمینه ی باستان‌شناسی و دیرینه‌شناسی قبل از این تاریخ (برای مثال آستین و همکاران ۱۹۹۸) با تردید همراه بودند و متأسفانه بسیاری مقالات چاپ‌شده حتی پس از ۱۹۹۵ نیز در این دسته قرار داشتند. دلیل قاطع برای این مشکل، عدم وجود دقت لازم و نیز عدم

آگاهی در جلوگیری از آلودگی قابل ذکر است. اما امروزه با پیشرفت دانش ژنتیک و تکنولوژی لازم در زمینه استخراج DNA، روش‌های مناسب و مطمئنی پایه‌گذاری شده‌اند که اجرای آن سبب می‌شوند تا بررسی باستان‌شناسی بقایای باستانی DNA باستانی به نحو مطلوبی با دقت صورت گیرد (رنفرو ۱۹۹۸). اما چالش بر سر سهولت این روندهاست به نحوی که بتوان آن‌ها را از آزمایشگاه‌های زیست-مولکولی خارج ساخته و در اختیار محققین باستان‌شناس قرارداد.

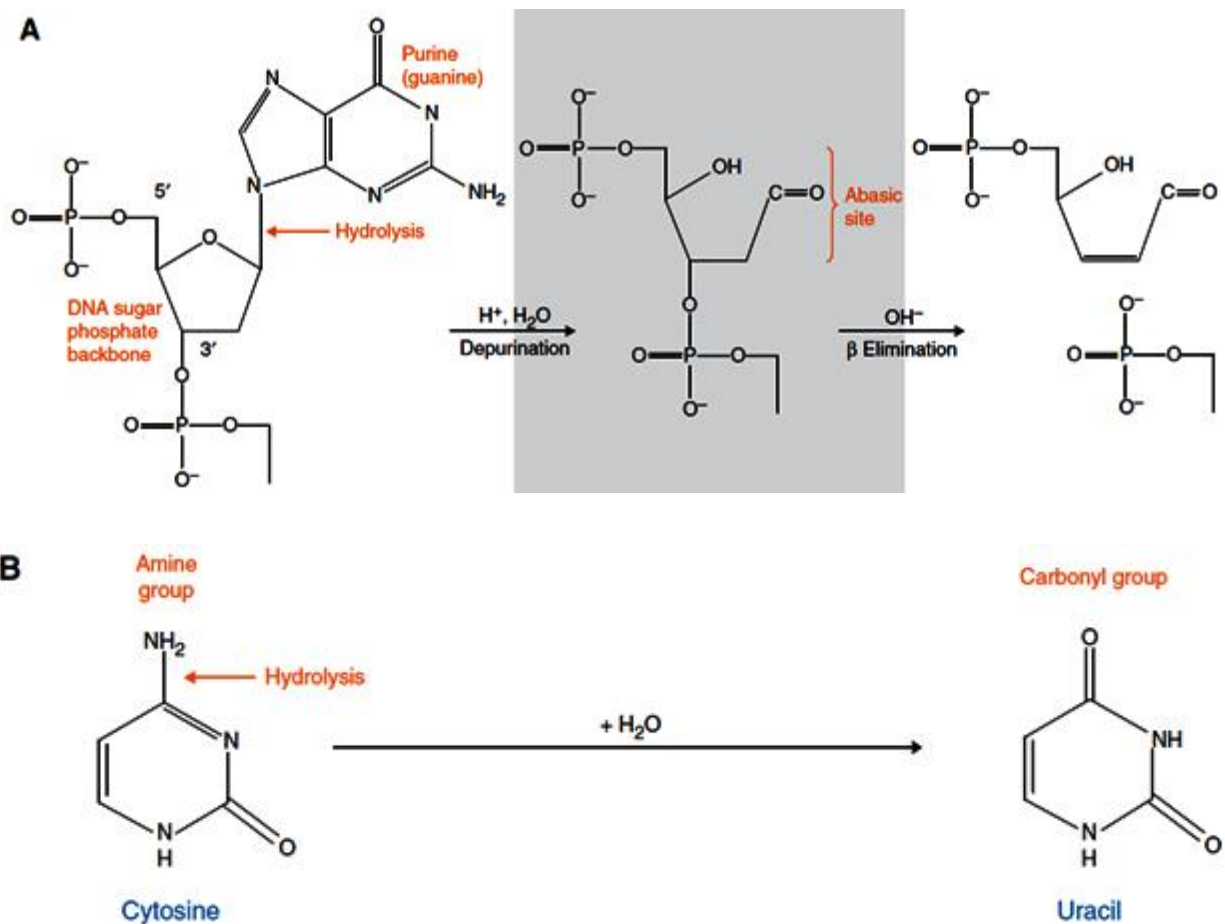
۲- بررسی تغییرات ساختار شیمیایی DNA باستانی و عوامل تخریب آن

۲-۱- بررسی ساختار شیمیایی DNA باستانی و آسیب‌ها

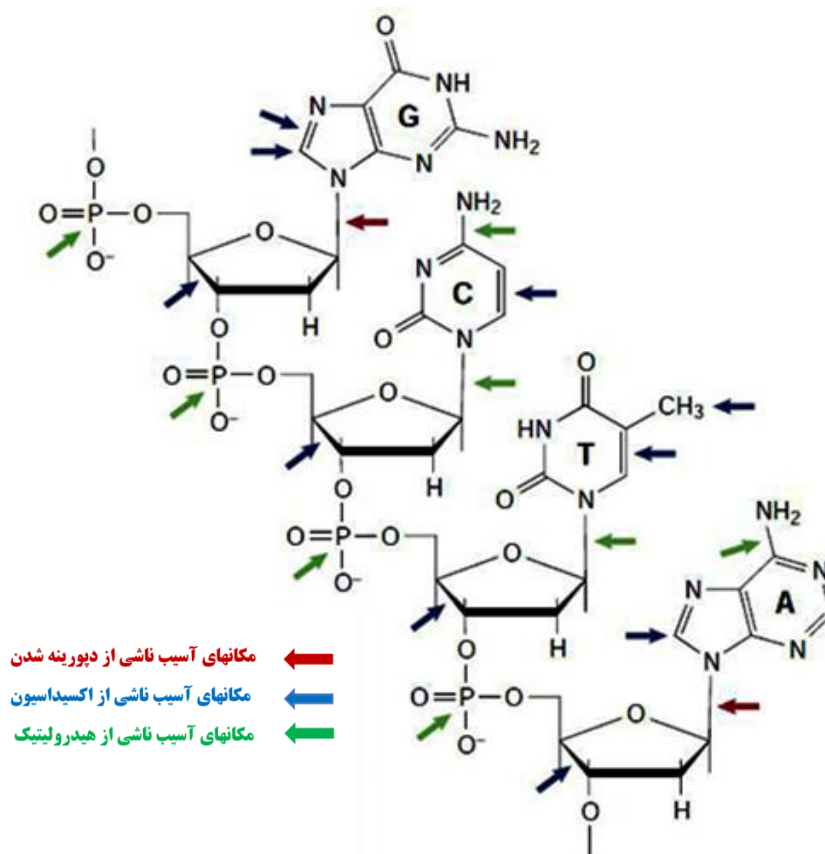
وقتی ارگانیسمی می‌میرد، DNA آن توسط آندونوکلئاز کاهش می‌یابد. در بهترین شرایط نظیر خشک شدن سریع، دمای پایین یا غلظت نمک بالا، نوکلئازها نابود شده و غیر فعال می‌گردند، پیش از آنکه اسید نوکلئیک به مونونوکلئوتیدها تبدیل شوند. اگر چنین اتفاقی بیافتد، فرآیندهای کندتر اما بی‌وقفه بر DNA تأثیر می‌گذارند (Watherston et al., 2024).

برای مثال اکسیداسیون و همچنین تابش مستقیم و غیرمستقیم اطراف باعث تغییر ستون‌های DNA بر اساس بازهای آلی نیتروژن دار، آدنین، گوانین، سیتوزین و تیمین و قندهای پیوند شده به گروه‌های فسفات می‌شوند. بعلاوه واکنش‌های شیمیایی آمین زدایی (شکل ۱)، دپورینه شدن (شکل ۲) و دیگر فرآیندهای هیدرولیتیکی باعث بی‌ثباتی و شکست مولکول‌های DNA می‌شوند. تمامی این فرآیندها مشکلاتی را برای بازیابی توالی DNA های باستانی به وجود می‌آورند. البته فرآیند گذشت زمان و نیز اندک بودن مقدار DNA های باستانی در نمونه‌های باستانی از دیگر مشکلات پیش رو است (Jones AS, et al, 1968).

علاوه بر آن، مشکلات بزرگ‌تری به هنگام مطالعه بقایای انسانی به وجود می‌آیند. این بدان دلیل است که DNA انسان در محیط آزمایشگاه‌ها و موزه‌ها شایع می‌باشد و به‌سادگی نمی‌توان آن را از بقایای DNA باستانی متمایز کرد. مطالعه‌ی حیوانات باستانی با مشکلات کمتری روبروست چراکه در صورت انقراض شاهی بر صحت خود هستند و با وجود مجزایی از گونه‌های موجود در همان طبقه و رده می‌باشند. اطلاعات ژنتیکی که از DNA استخوان‌های انسانی به دست می‌آیند می‌توانند به مطالعه ارتباطات موجود بین اقوام و در ابعاد کوچک‌تر گروه‌ها و افراد مدفون در یک گورستان کمک کنند به‌علاوه می‌تواند در تعیین جنسیت اسکلت‌ها مفید باشد. در مطالعه پالئوپاتولوژی بر روی نمونه‌های استخوانی می‌توان به بیماری‌های ارثی و همچنین بیماری‌های عفونی که سبب آلودگی DNA موجود در استخوان‌ها شده‌اند پی برد (Kraus et al., 2010).



شکل ۱. تکه‌تکه شدن و دآمیناسیون مولکول DNA. (A) یکی از دلایل احتمالی تکه‌تکه شدن در DNA باستانی دپورینه شدن است که در آن پیوند N-گلیکوزیل بین یک قند و یک باقیمانده آدنین یا گوانین شکسته می‌شود. سپس رشته DNA از طریق حذف β تکه‌تکه می‌شود و انتهای ۳'-aldehydic و ۵'-phosphate باقی می‌ماند. (B) دآمیناسیون سیتوزین به اوراسیل مکانیسم اصلی است که منجر به ضایعات کدگذاری نادرست در DNA باستانی می‌شود. (Jones AS, et al, 1968)



شکل ۲. انواع آسیبی که احتمالاً بر روی مولکول DNA باستانی مؤثر می‌باشد نشان داده شده است. بخش کوتاهی از یک رشته از مارپیچ دوگانه DNA با چهار پایه مشترک نشان داده شده است. محل‌های اصلی آسیبی که با فلش‌های قرمز نشان داده شده است مربوط به مکان‌های مستعد دپورینه شدن، حمله هیدرولیتیک با فلش‌های سبز و آن‌هایی که در معرض آسیب اکسیداتیو هستند با فلش‌های آبی نشان داده می‌شوند. G، گوانین؛ C، سیتوزین؛ تی، تیمین؛ الف، آدنین. Pääbo, S., (1991; Lindahl, T. 1993).

۲-۲- تفاوت میان DNA باستانی و مدرن

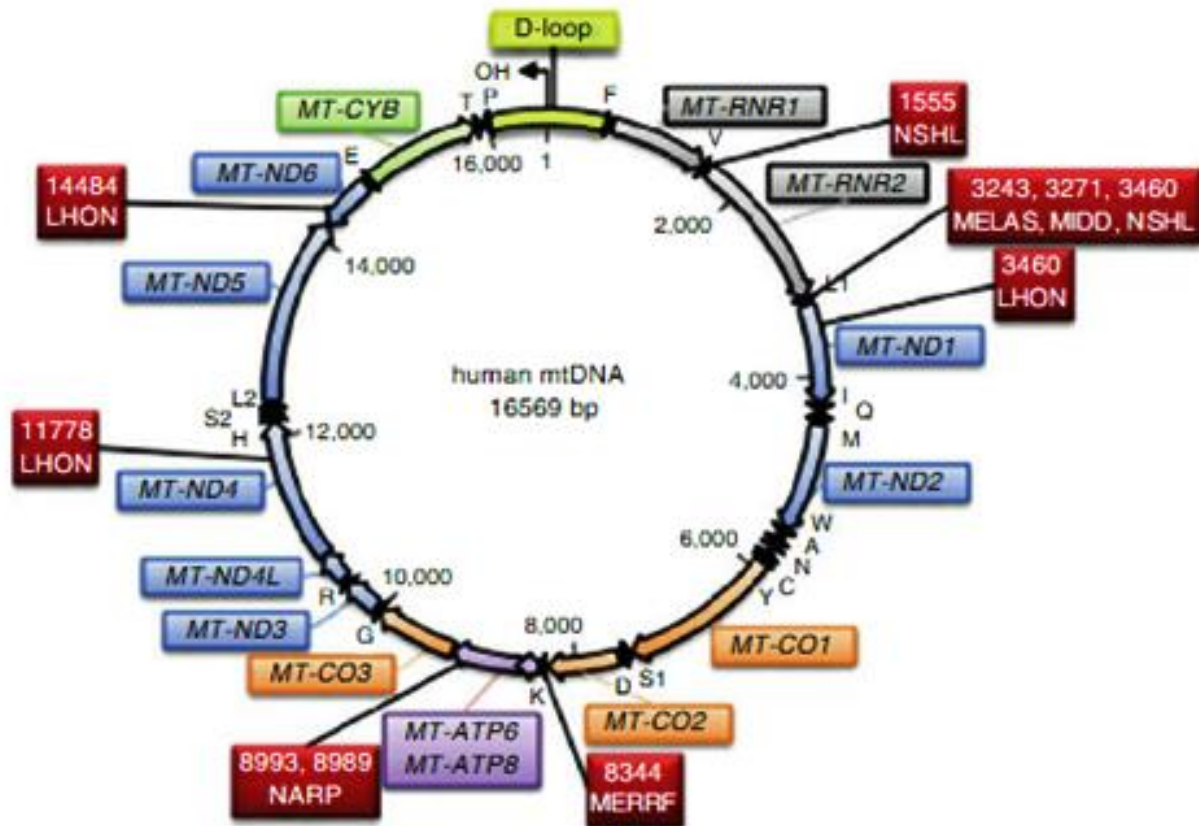
DNA مولکولی ناپایدار است و اگر سلول‌ها فاقد سیستم ترمیم مولکول‌های آسیب‌دیده DNA توسط عوامل شیمیایی و فیزیکی بودند، حیات غیرممکن می‌شد. گرما به عنوان یکی از مخرب‌ترین عوامل فیزیکی، با تحریک مولکول‌های آب متصل به DNA، موجب شکست پیوندهای کووالانسی بین نوکلئوتیدها می‌شود (Wright et al., 2024). این فرآیند منجر به ناپایداری و تخریب DNA شده و در نهایت به شکستن رشته DNA در نقاط آسیب‌دیده می‌انجامد. در سلول‌های زنده انسان، روزانه حدود ۱۰۰۰۰ مورد از این آسیب‌ها رخ می‌دهد که ۹۹/۹٪ آنها قبل از ایجاد شکست در رشته DNA ترمیم می‌شوند. پس از مرگ، با توقف سیستم‌های ترمیمی، تخریب DNA به صورت کنترل‌نشده ادامه می‌یابد. مطالعات نشان می‌دهند که سرعت تخریب DNA در نمونه‌های مرطوب به مراتب بیشتر از نمونه‌های خشک است (White et al., 1997) اما حتی در نمونه‌های خشک مانند بقایای گیاهی کشف‌شده در بیابان قصر Ibrim مصر علیا نیز تخریب گسترده DNA مشاهده شده است (O'Donoghue et al. 1996; Deakin et al., 1998).

با مطالعات تجربی بر روی DNA در محلول‌های آبی، الگوهای تخریب و تکه‌تکه شدن مولکول‌های DNA را پیش‌بینی کرده‌اند (Paabo و Wilson، 1991). با این حال، تأثیر شرایط محیطی حفاظت‌شده که ممکن است در طول زمان تغییر کند، هنوز به طور کامل بررسی نشده است. حتی این موضوع که آیا فرآیند تخریب DNA با نرخ ثابتی انجام می‌شود یا بلافاصله پس از مرگ (همان‌طور که برخی مشاهدات اولیه نشان داده‌اند (Paabo, 1989) با سرعت بیشتری رخ می‌دهد، هنوز به وضوح مشخص نیست. آنچه مسلم است، مولکول‌های DNA باستانی به طور قابل توجهی کوتاه‌تر از نمونه‌های مدرن هستند. با این وجود، این کوتاهی طول مولکولی مانع جدی محسوب نمی‌شود، چرا که حتی توالی‌های ۱۰۰ تا ۱۵۰ جفت بازی (بازهای آلی) نیز معمولاً حاوی اطلاعات کافی برای تعیین ویژگی‌های زیستی مانند جنسیت و بررسی روابط خویشاوندی هستند. اگرچه تعداد این مولکول‌های کوتاه در نمونه‌های باستانی محدود است، اما با استفاده از روش PCR می‌توان آنها را تکثیر و مطالعه کرد. این تکنیک امکان تولید نسخه‌های متعدد از ناحیه‌ای خاص از ژنوم را فراهم می‌سازد. پیشرفت فناوری‌های توالی‌یابی سریع، مقایسه توالی‌های DNA موجودات زنده را تسهیل کرده است. یکی از این روش‌های نوین، بارکدگذاری DNA است (Hebert و همکاران، ۲۰۰۱) که کاربرد گسترده‌ای در مطالعات تکاملی پیدا کرده است.

۳-۲- mt-DNA

DNA میتوکندری (mtDNA) با ساختاری حلقوی و ۱۶،۵۶۹ جفت باز، حاوی حدود ۶۲ ژن شناخته‌شده است. این DNA دارای مزایای متعددی برای مطالعات تشخیص گونه‌ها و روابط فیلوژنتیکی است، از جمله: تراکم بالا در هر سلول (حدود ۱۰۰۰ کپی یا بیشتر)، اندازه کوچک‌تر نسبت به DNA هسته‌ای، ساختار دو رشته‌ای پایدار (Thomas, 1989) و ماهیت هاپلوئیدی و وراثت مادری (Kim et al., 2004). به دلیل مقاومت بیشتر در برابر تخریب نسبت به DNA هسته‌ای، mtDNA گزینه‌ای ایده‌آل برای پژوهش‌های باستان‌شناسی محسوب می‌شود. این مولکول دارای نواحی حفاظت‌شده و همچنین ناحیه کنترل D-Loop است که به دلیل نرخ تکاملی بالا (نسبت به DNA هسته‌ای) برای مطالعات تکاملی گونه‌ها کاربرد دارد (Kim et al., 2004). از ویژگی‌های منحصر به فرد mtDNA: می‌توان به ساختار حلقوی بدون هیستون، سازمان‌یابی ژنی مشابه پروکاریوت‌ها، امکان بررسی تنوع نوکلئوتیدی و هاپلوتایپی از طریق توالی‌یابی قابل ذکر می‌باشد. این ویژگی‌ها امکان ترسیم روابط فیلوژنتیکی و فیلوژئوگرافی گونه‌ها را فراهم می‌کند. ترکیب این روش با داده‌های بانک‌های ژنی، تشخیص گونه‌ها و مطالعه فرآیند اهلی‌سازی را ممکن می‌سازد (Kim et al., 2004). همچنین، ماهیت هاپلوئیدی و عدم انجام میوز در mtDNA، آن را به ابزاری ارزشمند برای مطالعات فیلوژنتیکی تبدیل کرده است.

DNA میتوکندری (mtDNA) از نظر ساختاری شباهت زیادی به DNA پروکاریوت‌ها دارد و از نظر ترکیب بازهای آلی، غنی از سیتوزین (C) و گوانین (G) است. نسبت بازهای G/C در mtDNA در مقایسه با DNA هسته‌ای بیشتر است که این ویژگی باعث افزایش چگالی و وزن مولکولی آن می‌شود.



شکل ۳. نقشه فیزیکی mtDNA در انسان (آلاخاندرا، ۲۰۱۷)

از دیگر ویژگی‌های ممتاز mtDNA می‌توان به مواردی چون پایداری حرارتی بالا؛ مقاومت بیشتر در برابر دمای بالا و توانایی سریع‌تر برای بازگشت به حالت طبیعی پس از قرار گرفتن در معرض حرارت، و عملکرد محدود در سنتز پروتئین: اگرچه mtDNA در ساخت برخی پروتئین‌های میتوکندری نقش دارد، اما قادر به کد کردن تمام پروتئین‌های مورد نیاز میتوکندری نیست (Figueiro, 2024) اشاره کرد. از نظر ساختاری، نامتقارن بوده بنحوی که دو رشته mtDNA از نظر ترکیب بازها نامتقارن هستند و در آن رشته سنگین (H): غنی از بازهای پورین و رشته سبک (L): غنی از بازهای پیریمیدین می‌باشد و این نام‌گذاری بر اساس رفتار تفکیکی این رشته‌ها در شیب غلظتی کلرید سزیم صورت گرفته است (شکل ۳) (Kim et al., 2004).

۳- بررسی روش‌های مطالعه ژنتیکی و آنالیز DNA

در اواسط قرن نوزدهم، گریگور مندل با انجام آزمایش‌های خود بر روی گیاه نخود، اصول بنیادین وراثت صفات را کشف و فرمول‌بندی کرد. پایه‌ای‌ترین مفروضه این قوانین بیان می‌کند که هر صفت وراثتی در موجودات زنده توسط عامل مشخصی به نام ژن کنترل می‌شود. با توجه به اینکه درک مفاهیم پایه‌ای ژنتیک، پیش‌نیاز ضروری برای مطالعات ژنتیک باستان‌شناسی محسوب می‌شود، در ادامه به تشریح مفاهیم کلیدی مورد استفاده در پژوهش‌های ژئوآرکئولوژی خواهیم پرداخت.

۳-۱- روش‌های مبتنی بر DNA یا نشانگرهای ژنتیکی

نشانگرهای ژنتیکی عموماً به جایگاه‌های خاصی روی کروموزوم‌ها اشاره دارند که به عنوان علائم تشخیصی برای تمایز بین جوامع مختلف به کار می‌روند. این تمایز از طریق بررسی حضور، غیبت یا فراوانی این نشانگرها در جمعیت‌های مختلف انجام می‌شود. در واقع، تفاوت‌های موجود در توالی DNA کروموزومی بین افراد یک جامعه یا نژاد که به نسل‌های بعد منتقل می‌شوند، می‌توانند به عنوان نشانگرهای ژنتیکی عمل کنند. این نشانگرها که قادر به توصیف ژنوتیپ موجودات هستند، به دو دسته اصلی روش‌های مبتنی بر هیبریداسیون (غیر PCR) و روش‌های مبتنی بر PCR تقسیم می‌شوند. در مطالعات باستانی، اگرچه تکنیک PCR از رایج‌ترین روش‌هاست، اما با توجه به نوع نمونه‌های باستانی کشف‌شده، سایر روش‌های ژنتیکی نیز کاربرد دارند (عرفان‌منش و جهان‌داری، ۲۰۲۲). یک نشانگر مولکولی ایده‌آل باید دارای وراثت مندلی باشد، سطح بالایی از چندشکلی (پلی‌مورفیسم) را نشان دهد، قادر به تمایز هتروزیگوت‌ها از هموزیگوت‌ها باشد (هم‌بارزی)، تحت تأثیر سایر لوکوس‌ها قرار نگیرد، تکرارپذیری بالا داشته باشد، در ژنوم به میزان کافی پراکنده باشد، از عوامل محیطی تأثیر نپذیرد، نماینده کل ژنوم باشد (مگر در موارد نشانگرهای لوکوس خاص)، خنثی بوده و تمام آلل‌های آن ارزش سازشی یکسانی داشته باشند، و در نهایت از نظر اقتصادی مقرون‌به‌صرفه و از نظر اجرایی سریع و کاربردی باشد.

۳-۲- روش PCR

در روش‌های مبتنی بر هیبریداسیون، از قطعات DNA نشان‌دار شده برای انجام فرآیند هیبریداسیون استفاده می‌شود. در این روش، ابتدا DNA با آنزیم‌های محدودکننده هضم شده و سپس قطعات حاصل از طریق الکتروفورز در ژل پلی‌آکریل آمید از یکدیگر جدا می‌شوند. در مرحله بعد، با استفاده از تکنیک لکه‌گذاری ساترن و هیبریداسیون، قطعات DNA مورد نظر شناسایی و آشکارسازی می‌شوند. کاوشگرهای مورد استفاده در این فرآیند می‌توانند از نوع رادیواکتیو یا غیررادیواکتیو باشند که پس از برش DNA توسط آنزیم‌های محدودکننده و تفکیک با الکتروفورز، با یک یا چند قطعه DNA هیبرید می‌شوند (عرفان‌منش و جهان‌داری، ۲۰۲۲). در مقابل، روش‌های مبتنی بر PCR با استفاده از یک یا دو پرایمر کار می‌کنند و به دلیل سرعت بالا و کارایی مناسب، روز به روز گسترش بیشتری یافته و شامل طیف وسیعی از نشانگرهای ژنتیکی می‌شوند. این روش‌ها به دلیل سهولت اجرا و دقت بالا، در مطالعات ژنتیکی کاربرد فراوانی دارند.

۳-۳- نشانگرهای ماده وراثتی میتوکندریایی

DNA میتوکندری (mtDNA) به عنوان یکی از نواحی غیرکدکننده ژنوم انسان، ساختاری حلقوی و دو رشته‌ای با منشأ احتمالی باکتریایی دارد که در خارج از هسته سلول قرار گرفته و نقش کلیدی در تولید انرژی ایفا می‌کند. این مولکول که به صورت انحصاری از مادر به فرزندان به ارث می‌رسد، در هر سلول بین صدها تا هزاران کپی وجود دارد و به دلیل این فراوانی و همچنین پایداری ساختاری (به ویژه غنی بودن از بازهای سیتوزین و گوانین)، در مطالعات DNA باستانی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. mtDNA با طول حدود ۱۶۵۶۹ جفت باز، شامل یک ناحیه کدکننده حاوی ۳۷ ژن و دو ناحیه بسیار متغیر غیرکدکننده به نام D-loop می‌باشد که نرخ جهش در آن حدود ۱۰ برابر DNA هسته‌ای است. میزان تفاوت نوکلئوتیدی در mtDNA بین افراد

غیرخویشاوند حدود ۱-۲ درصد برآورد شده است. این ویژگی‌ها به همراه نرخ جهش بالا (تقریباً ۱۰ برابر سریع‌تر از DNA هسته‌ای به دلیل عدم وجود سیستم‌های ترمیم کارآمد) و عدم نوترکیبی، mtDNA را به ابزاری ارزشمند در مطالعات تکاملی، تشخیص هویت و بررسی تاریخچه جمعیت‌ها تبدیل کرده است. در مواردی که نمونه‌های بیولوژیکی (مانند استخوان، دندان یا مو) بسیار تخریب شده یا کم‌مقدار باشند، احتمال موفقیت در تعیین هویت از طریق mtDNA به دلیل فراوانی بالا (تا هزار کپی در هر سلول) بسیار بیشتر از نشانگرهای هسته‌ای مانند STRهاست. مناطق هایپروناible (HV1 و HV2) در D-loop به دلیل نرخ جهش بسیار بالا، برای بررسی تنوع درون هاپلوگروپ‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند، اگرچه به دلیل وقوع جهش‌های مکرر، الگوی وراثت یکسانی ندارند. سرعت تکاملی mtDNA در پستانداران حدود ۵-۱۰ برابر DNA هسته‌ای (معادل ۲٪ تغییر در هر میلیون سال) است که منجر به ایجاد هاپلوگروپ‌های متمایز و پایدار می‌شود و امکان ردیابی روابط تکاملی در بازه‌های زمانی مختلف (از ده‌ها تا هزاران سال) را فراهم می‌سازد (عرفان‌منش، ۱۴۰۰، ص ۲۱).

۴- مروری بر روش آزمایشگاهی استخراج DNA از استخوان‌های باستانی

۴-۱- جلوگیری از آلودگی نمونه‌های باستانی برای استخراج

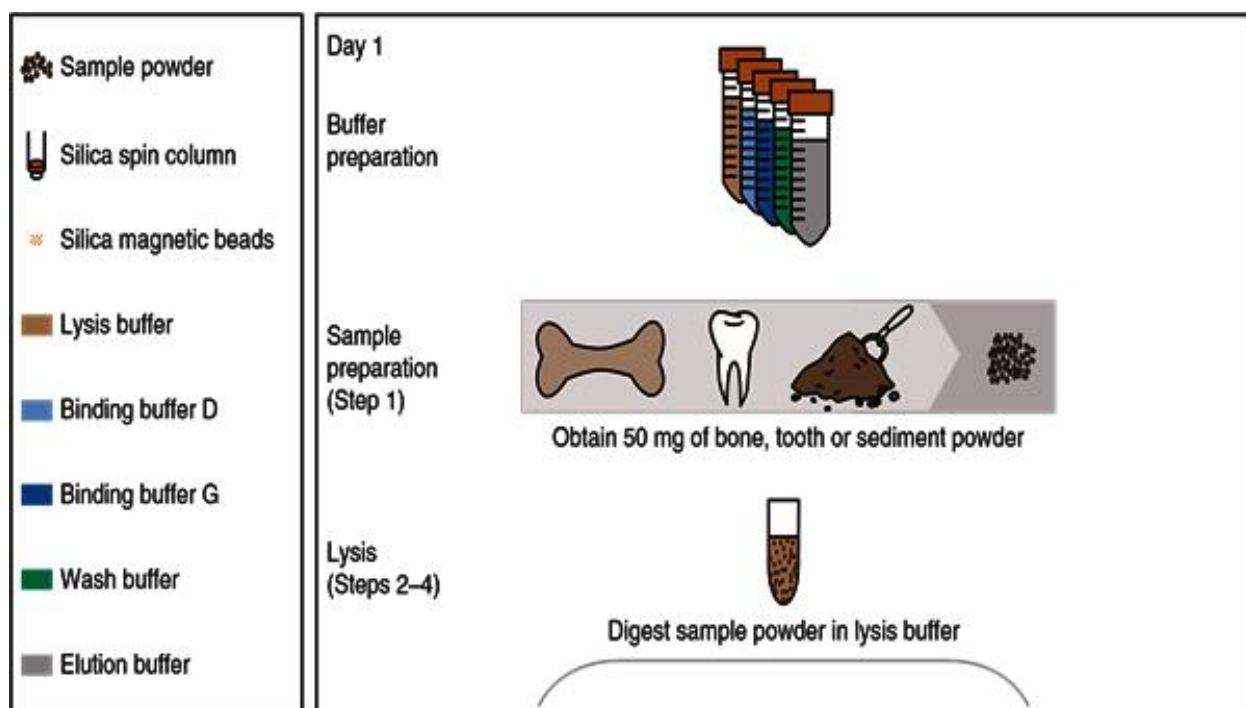
برای جلوگیری از هرگونه آلودگی احتمالی، تمامی مراحل آزمایش در شرایط کاملاً استریل انجام می‌شود که شامل استفاده از دستکش لاتکس، ماسک دهان و ماسک محافظ پلکسی گلاس می‌باشد. کلیه وسایل، ظروف و سطوح کاری شامل هود جریان هوای آرام و محفظه PCR به دقت ضدعفونی شده و حداقل به مدت ۶۰ دقیقه تحت تابش نور UV-C با شدت 1.0 J/cm^2 قرار می‌گیرند. محلول‌های مورد استفاده شامل بافر استخراج (فاقد پروتئیناز K)، محلول دکستران بلو، استات آمونیوم و آب مقطر دیونیزه نیز به مدت ۳۰ دقیقه تحت تابش UV قرار داده می‌شوند. به منظور حداکثر کنترل کیفی، هر یک از مراحل اصلی کار شامل برش استخوان، برداشت سطح، پودر کردن نمونه، استخراج DNA و تقویت آن در محیط‌های فیزیکی جداگانه انجام می‌پذیرد. در تمامی مراحل انتقال مایعات، از نوک پیپت فوق میکرو استریل شده استفاده می‌شود تا احتمال هرگونه آلودگی متقاطع به حداقل برسد. این پروتکل سختگیرانه تضمین می‌کند که نتایج آزمایش عاری از هرگونه آلودگی خارجی باشد.

۴-۲- روش استخراج DNA

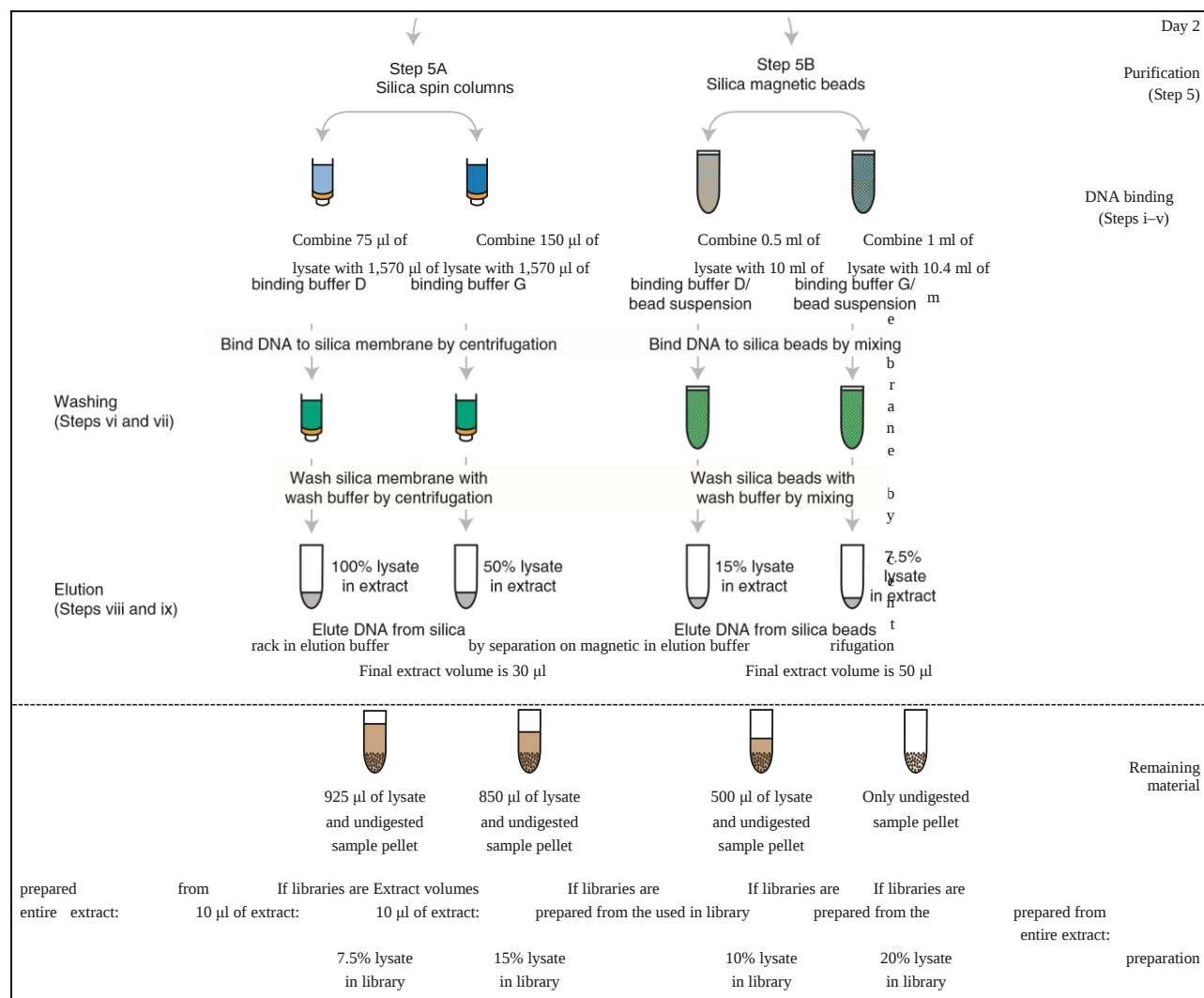
پروتکل استخراج DNA از بقایای استخوانی به شرح زیر انجام می‌شود: ابتدا مواد سطحی استخوان‌ها با شستشو توسط سفیدکننده رقیق و آب مقطر حذف می‌شوند. از هر نمونه استخوانی، قطعه‌ای به ابعاد 2×5 سانتی‌متر برش داده شده و سطوح آن تا عمق ۲-۳ میلی‌متر با دیسک شنی تراشیده می‌شود تا از حذف آلودگی‌های DNA مدرن اطمینان حاصل شود. نمونه‌های تمیز شده سپس به مدت ۳۰ دقیقه تحت تابش نور UV با شدت 1.0 J/cm^2 قرار می‌گیرند. در مرحله بعد، ۷۵۰ میلی‌گرم از استخوان پودر شده با $1/6$ میلی‌لیتر بافر استخراج حاوی 0.1 M EDTA، $0.5\% \text{ N-laurylsarcosine-Na}$ و 100 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر پروتئیناز K مخلوط شده و به مدت یک شب در دمای 37°C درجه سانتی‌گراد با چرخش مداوم انکوبه می‌شوند. پس از سانتریفیوژ در $12000 \times g$ دور بر دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه، 250 میکرولیتر از مایع رویی به لوله اپندورف منتقل شده و با افزودن $3/5$ میکرولیتر دکستران بلو (۱ میکروگرم بر میکرولیتر)، 250 میکرولیتر استات آمونیوم 4 M و 500 میکرولیتر اتانول 96% تکمیل می‌شود. دکستران بلو با

وزن مولکولی بالا (> ۲ میلیون دالتون) به رسوبدهی موثر DNA حتی در غلظت‌های پایین کمک می‌کند، اگرچه غلظت‌های بالای ۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌تواند PCR را مهار کند.

DNA استخراج شده پس از رسوبدهی در ۷۰- درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه و سانتریفیوژ در ۱۴۰۰۰ دور بر دقیقه، در ۲۰-۳۰ میکرولیتر آب دیونیزه حل شده و در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شود. پروتکل‌های استخراج DNA بسته به نوع نمونه و قدمت آن متفاوت هستند، اما عموماً شامل مراحل اصلی انکوباسیون در بافر لیز (حاوی EDTA برای دمینرالیزاسیون و پروتئیناز K برای هضم پروتئین‌ها)، اتصال DNA به ماتریکس سیلیکا در شرایط نمکی بالا، شستشو با اتانول و بازیابی در بافر کم نمک می‌شوند. پیشرفت‌های اخیر شامل بهینه‌سازی نسبت حجمی بافرها، استفاده از ستون‌های سیلیکایی پیش‌ساخته یا ذرات مغناطیسی سیلیکایی، و افزودن مواد شوینده برای کاهش تلفات DNA بوده است. این اصلاحات امکان بازیابی موثرتر مولکول‌های DNA کوتاه‌تر را فراهم می‌سازد که برای نمونه‌های باستانی بسیار حائز اهمیت است. مطالعات اخیر نشان داده‌اند که اگرچه DNA می‌تواند در بقایای اسکلتی و رسوبات تا صدها هزار سال حفظ شود، اما هنوز پروتکل استاندارد جهانی برای استخراج آن تعریف نشده است و روش‌ها بر اساس تجربیات آزمایشگاهی و ویژگی‌های نمونه‌ها بهینه‌سازی می‌شوند (Rohland et al, 2007).



شکل ۴. الگوی نمونه‌برداری نمونه استخوان یا دندان باستانی و انواع بافرها و محلول‌های مورد نیاز برای فرآیند استخراج (Rohland et al, 2007)



شکل ۵. مراحل استخراج DNA و محلول‌ها، بافرها و افزودنی‌ها لازم در مراحل مختلف برای بهینه کردن فرایند و رسیدن به بازدهی بالا (Rohland et al, 2007)

باین‌حال، در چند سال گذشته، برخی از آزمایشگاه‌های پزشکی قانونی شروع به استفاده از روش‌های جایگزین استخراج و تایپ برای نمونه‌های بسیار آسیب‌دیده کرده‌اند، جایی که روش‌های تقویت مبتنی بر PCR موفق به ارائه نتایج نشده‌اند (Eduardoff و همکاران ۲۰۱۷، Marshall و همکاران ۲۰۱۷). پروتکل دابنی که در اصل برای DNA باستانی طراحی شده بود، نتایج امیدوارکننده‌ای در استخراج DNA از بقایای اسکلتی در محیط پزشکی قانونی (داده‌های منتشرنشده) نشان داد.

نویسندگان پروتکل Dabney را به‌عنوان جایگزینی مناسب برای بازیابی پروفایل‌های STR کامل یا جزئی از نمونه‌های در معرض دمای ۵۵ درجه سانتیگراد و بالاتر معرفی کردند، درحالی‌که گزارش‌ها نشان داد پروتکل Loreille در نمونه‌های با وضعیت حفاظتی بهتر مؤثرتر عمل می‌کند. یکی از مزایای پروتکل Loreille امکان استفاده از مقادیر بیشتر پودر استخوان (۵۰۰ میلی‌گرم تا چند گرم) است که منجر به بازده بالاتر DNA می‌شود، درحالی‌که پروتکل Dabney برای مقادیر کمتر بافت (۵۰ تا ۵۰۰ میلی‌گرم) مناسب‌تر است.

۴-۳- مزایای استخراج با روش سیلیس نسبت به سایر روش‌ها برای استخراج DNA باستانی

روش‌های متعددی برای استخراج DNA باستانی وجود دارد، از جمله رسوب‌دهی با حلال‌های اتانول یا ایزوپروپانول (Haenni et al., 1995; Kalmar, 2000) و استخراج مبتنی بر غشا یا اتصال DNA به سیلیس. در میان این روش‌ها، روش سیلیس به‌عنوان بهینه‌ترین گزینه شناخته می‌شود که مزایای قابل توجهی دارد: (۱) سرعت و سهولت، این روش نسبتاً سریع است و امکان استخراج DNA باستانی را در مدت دو روز فراهم می‌کند؛ (۲) مقیاس‌پذیری، پروتکل آن به راحتی با مقادیر مختلف پودر استخوان (از ۵۰ میلی‌گرم در ۱ میلی‌لیتر محلول تا ۲ گرم در ۱۰ میلی‌لیتر) قابل تطبیق است؛ (۳) اجرای ساده، تنها به تجهیزات استاندارد آزمایشگاهی و مواد شیمیایی محدود نیاز دارد و در دمای اتاق (۲۰-۲۳ درجه سانتی‌گراد) انجام می‌شود؛ و (۴) حذف مؤثر مهارکننده‌های PCR، که یکی از چالش‌های اصلی در مطالعات DNA باستانی محسوب می‌شود. این روش به‌ویژه برای نمونه‌های بارزش مانند نئاندرتال‌ها که امکان آزمایش روش‌های متعدد را ندارند، امیدوارکننده است (Caramelli et al., 2006). علاوه بر این، بازده بالای آن، موفقیت در تحلیل حجم زیادی از نمونه‌ها را افزایش می‌دهد و گزینه‌ای ایده‌آل برای تحقیقات گسترده محسوب می‌شود.

۵- نتیجه‌گیری

روش‌های مختلفی برای استخراج و شناسایی DNA باستانی در مقالات پیشنهاد شده است، اما این فرایند با محدودیت‌هایی روبه‌روست. یکی از مهم‌ترین محدودیت‌ها، مقدار بسیار کم DNA قابل‌استخراج از نمونه‌های باستانی تدفینی است. همچنین، در نمونه‌های انسانی باستانی، خطاهایی ناشی از آلودگی در محیط آزمایشگاه ممکن است رخ دهد که اغلب به دلیل شباهت بین DNA باستانی و DNA معاصر ایجاد می‌شود. معمولاً DNA باستانی از عصاره میتوکندریایی نمونه‌های تدفینی به دست می‌آید. درک ما از آسیب‌های پس از مرگ DNA هنوز محدود است. برای مثال، دپوریناسیون به‌عنوان یک مکانیسم شناخته‌شده تخریب DNA شناخته می‌شود، اما شواهد غیرمستقیم نشان می‌دهد که تنها ۱۰ تا ۴۰ درصد از تکه‌تکه شدن DNA باستانی به این فرآیند مربوط است (Sawyer et al., 2012). علاوه بر این، میزان شیوع ضایعات مسدودکننده در DNA باستانی همچنان نامشخص است. خوشبختانه، فناوری‌های جدیدی در حال توسعه هستند که امکان شناسایی مستقیم تغییرات و ضایعات نوکلئوتیدی را بدون نیاز به تقویت یا تغییرات آنزیمی فراهم می‌کنند (Branton et al., 2008). درک عمیق‌تر از آسیب‌های DNA باستانی می‌تواند به توسعه استراتژی‌های ترمیمی جدید منجر شود که تعداد توالی‌های DNA قابل‌بازیابی از بقایای باستانی را به‌طور قابل توجهی افزایش دهد.

- Arzelier, A., De Belvalet, H., Pemonge, M. H., Garberi, P., Binder, D., Duday, H., Deguilloux, M. F., & Pruvost, M. (2024). Ancient DNA sheds light on the funerary practices of late Neolithic collective burial in southern France. *Proceedings of the Royal Society B*, 291(2029), rsrb-2024. [https://doi.org/\[DOI-if-available\]](https://doi.org/[DOI-if-available])
- Branton, D., Deamer, D. W., Marziali, A., Bayley, H., Benner, S. A., Butler, T., Di Ventra, M., Garaj, S., Hibbs, A., Huang, X., et al. (2008). The potential and challenges of nanopore sequencing. *Nature Biotechnology*, 26, 1146–1153. <https://doi.org/10.1038/nbt.1495>
- Caramelli, D., et al. (2006). A highly divergent mtDNA sequence in a Neanderthal individual from Italy. *Current Biology*, 16(16), R630–R632. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.07.043>
- Dabney, J., Knapp, M., Glocke, I., Gansauge, M. T., Weihmann, A., Nickel, B., Valdiosera, C., García, N., Pääbo, S., & Arsuaga, J. L. (2013). Complete mitochondrial genome sequence of a Middle Pleistocene cave bear reconstructed from ultrashort DNA fragments. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(39), 15758–15763. <https://doi.org/10.1073/pnas.1314445110>
- Eduardoff, M., Xavier, C., Strobl, C., Casas-Vargas, A., & Parson, W. (2017). Optimized mtDNA control region primer extension capture analysis for forensically relevant samples and highly compromised mtDNA of different age and origin. *Genes*, 8(9), 237. <https://doi.org/10.3390/genes8090237>
- Epp, L. S., Zimmermann, H. H., & Stoof-Leichsenring, K. R. (2019). Sampling and extraction of ancient DNA from sediments. *Methods in Molecular Biology*, 1963, 31–44. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9176-1_5
- Erfanmanesh, P., & Jahandari, S. (2022). Investigation of mtDNA in sequences and genetic laboratory methods used in genetic studies of Yastan, Iran. *Laboratory Science Quarterly*, 16, 17–21. [in Persian]
- Figueiro, G. (2024). Simulating the effects of kinship and postmarital residence patterns on mitochondrial DNA diversity in mortuary contexts. *American Journal of Biological Anthropology*, e24910. [https://doi.org/\[DOI-if-available\]](https://doi.org/[DOI-if-available])
- Glocke, I., & Meyer, M. (2017). Extending the spectrum of DNA sequences retrieved from ancient bones and teeth. *Genome Research*, 27(7), 1230–1237. <https://doi.org/10.1101/gr.219675.116>
- Hänni, C., Brousseau, T., Laudet, V., & Stehelin, D. (1995). Isopropanol precipitation removes PCR inhibitors from ancient bone extracts. *Nucleic Acids Research*, 23(5), 881–882. <https://doi.org/10.1093/nar/23.5.881>
- Hirano, M., Rakwal, R., Shibato, J., Agrawal, G. K., Jwa, N. S., Iwahashi, H., & Masuo, Y. (2006). New protein extraction/solubilization protocol for gel-based proteomics of rat (female) whole brain and brain regions. *Molecules and Cells*, 22 (1), 119–125.
- Hofreiter, M., Serre, D., Poinar, H. N., Kuch, M., & Pääbo, S. (2001). Ancient DNA. *Nature Reviews Genetics*, 2(5), 353–359. <https://doi.org/10.1038/35072071>
- Höss, M., & Pääbo, S. (1993). DNA extraction from Pleistocene bones by a silica-based purification method. *Nucleic Acids Research*, 21(16), 3913–3914. <https://doi.org/10.1093/nar/21.16.3913>
- Kalmar, T., Bachrati, C. Z., Marcsik, A., & Rasko, I. (2000). A simple and efficient method for PCR amplifiable DNA extraction from ancient bones. *Nucleic Acids Research*, 28(12), e67. <https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e67>
- Kim, S., Soltis, D. E., Soltis, P. S., & Sue, Y. (2004). DNA sequences from Miocene fossils: An *ndhF* sequence of *Magnolia latahensis* (Magnoliaceae) and an *rbcl* sequence of *Persea pseudocarolinensis* (Lauraceae). *American Journal of Botany*, 91(4), 615–620. <https://doi.org/10.3732/ajb.91.4.615>
- Lindahl, T. (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, 362(6422), 709–715. <https://doi.org/10.1038/362709a0>
- Marshall, C., Sturk-Andreaggi, K., Daniels-Higginbotham, J., Oliver, R. S., Barritt-Ross, S., & McMahon, T. P. (2017). Performance evaluation of a mitogenome capture and Illumina sequencing protocol using non-probative, case-type skeletal samples: Implications for the use of a positive control in a next-

- generation sequencing procedure. *Forensic Science International: Genetics*, 31, 198–206. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2017.09.010>
- Meyer, M., Fu, Q., Aximu-Petri, A., Glocke, I., Nickel, B., Arsuaga, J. L., Martínez, I., Gracia, A., de Castro, J. M. B., & Carbonell, E. (2014). A mitochondrial genome sequence of a hominin from Sima de los Huesos. *Nature*, 505(7483), 403–406. <https://doi.org/10.1038/nature12788>
- Pääbo, S., & Wilson, A. C. (1991). Miocene DNA sequences a dream come true? *Current Biology*, 1(1), 45–46. [https://doi.org/10.1016/0960-9822\(91\)90123-7](https://doi.org/10.1016/0960-9822(91)90123-7)
- Rohland, N., Glocke, I., Aximu-Petri, A., & Meyer, M. (2007). Extraction of highly degraded DNA from ancient bones, teeth and sediments for high-throughput sequencing. *Nature Protocols*, 2(7), 1756–1762. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.247>
- Sawyer, S., Krause, J., Guschanski, K., Savolainen, V., & Pääbo, S. (2012). Temporal patterns of nucleotide misincorporations and DNA fragmentation in ancient DNA. *PLoS ONE*, 7(3), e34131. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034131>
- Slon, V., Hopfe, C., Weiß, C. L., Mafessoni, F., de la Rasilla, M., Lalueza-Fox, C., Rosas, A., Soressi, M., Knul, M. V., & Miller, R. (2017). Neandertal and Denisovan DNA from Pleistocene sediments. *Science*, 356(6338), 605–608. <https://doi.org/10.1126/science.aam9695>
- Thomas, R. H., Schaffner, W., Wilson, A. C., & Pääbo, S. (1989). DNA phylogeny of the extinct marsupial wolf. *Nature*, 340(6233), 465–467. <https://doi.org/10.1038/340465a0>
- Watherston, J., & McNevin, D. (2024). Skull and long bones—Forensic DNA techniques for historic shipwreck human remains. *Australian Journal of Forensic Sciences*, 56(4), 367–391. [https://doi.org/\[DOI-if-available\]](https://doi.org/[DOI-if-available])
- Wright, S. L., Rayfield, K. M., Singleton, R. R., Hughes, K., Soficaru, A., Crețu, C., Huang, L., Wu, S., Reinberger, K. L., Rabinowitz, A., & Hofman, C. A. (2024). Ancient DNA and paleoproteomic analysis on Roman Imperial-era individuals from Histria, Romania. *Journal of Archaeological Science: Reports*, 56, 104510. <https://doi.org/10.1016/j.jasrep.2024.104510>

Books & Protocols:

- Fermentas. (n.d.). PCR protocol for Pfu DNA polymerase. Retrieved from <http://www.fermentas.com/techinfo/pcr/pcrprotocolpfu.htm>
- Matysiak-Scholze, U., Dimmeler, S., & Nehls, M. (1996). Technical Tips Online, T40011.
- Mishra, A. (2017). Mitochondrial DNA. [Publisher details if available]

A Review of Chemical Structural Changes and Geoarchaeology of Ancient DNA with Emphasis on Extraction Methodologies

Parastoo Erfanmanesh¹ and Faramarz Rostami Charati²

1. Head of the Biology Laboratory of the Research Institute for Protection and Restoration of Historical-Cultural Monuments Research Institute of Cultural Heritage and Tourism, Member of the specialized biotechnology working group of the Strategic Technologies Laboratory Sciences Network

2. Associate prof. of Chemistry, Research Center for Conservation of Culture Relics (RCCCR), Research Institute of Cultural Heritage & Tourism, Tehran, Iran. Tel; 00982166736584, Fax; 00982166736585"

Corresponding email address : parastoo. erfmanmanesh@yahoo.com, f.rostami@richt.ir

Abstract

Cultural values, as an inseparable part of a nation's historical identity, must always remain a top priority in research and academic studies. Archaeology, leveraging modern methods particularly ancient DNA studies has made significant strides in uncovering the untold stories of past civilizations. Recent advancements in this field have enabled more precise reconstruction of human history. This study examines published articles and experimental results to investigate the chemical degradation mechanisms of DNA and evaluates appropriate extraction methods. The primary objective is to develop optimized approaches to overcome DNA extraction challenges, enabling high-quality retrieval and identification of ancient DNA from minimal samples. The findings provide valuable insights into ancient genetics, including human ancestry, migration patterns, population admixture and divergence, kinship relations, genealogy, and genetic disease diagnosis.

Enhancing laboratory protocols and sampling techniques from archaeological sites plays a pivotal role in advancing ancient DNA research. Over time, DNA undergoes structural and phenotypic changes due to alterations in organic bases, phosphate groups, and sugars. In ancient samples such as bones, teeth, and sediments DNA is typically found in fragmented and trace amounts. Silica-based extraction methods can recover even extremely short DNA fragments (as small as 25 organic base pairs). When nuclear DNA is severely degraded, focusing on the mitochondrial D-loop region becomes essential. Additionally, careful selection of bone types, considering their preservation state, is crucial for accurate analysis.

Keywords: Geoarchaeology, Mitochondrial DNA, Genealogy, Archaeology, Chemical Structure of DNA