



Francalacci, Paolo (1998) *Analisi del DNA da tessuti antichi: applicazioni e prospettive: [appendice D]*.
Antichità sarde, Vol. 4.3 , p. 148-158.

<http://eprints.uniss.it/5947/>

SEDILO. I MATERIALI ARCHEOLOGICI
TOMO III (SEDILO 6)

LA TOMBA N. 3 DI ILOI

di Maria Grazia Melis

Con contributi di

Paolo Baldaccini, Paolo Mulè, Giovanni Dettori (APPENDICE A)

Giacomo Oggiano, Maria Grazia Melis (APPENDICE B)

Franco Germanà (APPENDICE C)

Paolo Francalacci (APPENDICE D)

Walter Pinna, Marco Zedda (APPENDICE E)

Alessandra Celant (APPENDICE F)

ANTICHITÀ SARDE. Studi e Ricerche

Redazione e amministrazione

DIPARTIMENTO DI SCIENZE UMANISTICHE E DELL'ANTICHITÀ

Piazza Conte di Moriana, 8 - Tel. 079. 229694 - 229698

07100 SASSARI

Comitato scientifico

ANTICHITÀ SARDE

Ercole Contu (Università di Sassari)

Enrico Atzeni (Università di Cagliari)

PROTOSTORIA

Gian Luigi Carancini (Università di Perugia)

PALETNOLOGIA

Alberto Cazzella (Università di Roma "La Sapienza")

PALEONTOLOGIA UMANA

Carlo Tozzi (Università di Pisa), Franco Germanà (Università di Sassari)

PALEOBOTANICA

Maria Follieri (Università di Roma "La Sapienza")

ARTE PREISTORICA

Emanuel Anati (Università di Lecce)

Direttore

Giuseppa Tanda

Comitato di redazione

*Anna Depalmas, Giuseppina Marras, Maria Grazia Melis,
Giovanna Meloni, Maria Raffaella Nieddu, Gianpiero Pianu.*

Segreteria di redazione

Maria Grazia Melis

© Università degli Studi di Sassari - 1998

Coordinamento editoriale

Salvatore Ligios

Realizzazione

Soter editrice, Villanova Monteleone

Stampa

Stampacolor (Muros)

Paolo Francalacci

Dipartimento di Zoologia e Antropologia Biologica
Università degli Studi di Sassari

Analisi del DNA da tessuti antichi: applicazioni e prospettive

Premessa

L'analisi del DNA estratto da resti umani antichi, resa possibile dai recenti sviluppi della biologia molecolare, può fornire dirette informazioni sulla struttura familiare, sulla distribuzione dei sessi, su eventuali stati patologici a determinismo genetico, e per lo studio della successione evolutiva e del flusso genico con le popolazioni circostanti. Naturalmente questo tipo d'analisi presenta delle difficoltà superiori rispetto ad analoghe ricerche condotte su popolazioni moderne, essenzialmente dovute alla degradazione degli acidi nucleici attenuati da tessuti antichi, e la possibilità di ottenere risultati attendibili e riproducibili dipende in ultima analisi dallo stato di conservazione del campione oggetto di studio.

In questo studio sono stati analizzati resti umani appartenenti dalla necropoli di Sedilo, provenienti dall'unità stratigrafica n. 22, associata al contesto della cultura del vaso campaniforme.

I campioni di tessuto osseo sono stati prelevati dagli archeologi responsabili dello scavo direttamente sul campo, secondo le modalità riportate più avanti, e conservate in contenitori sterili al fine di evitare ogni possibile contaminazione da parte di DNA moderno. Il tessuto osseo si presentava piuttosto friabile, denotando una relativa scarsità di collagene, indicativo di una perdita significativa di sostanza organica.

I campioni sono stati trattati con due diversi protocolli di estrazione. Il primo prevede la decalcificazione in un tampone contenente un enzima proteolitico e un agente chelante, al quale fa seguito un trattamento con fenolo e cloroformio ed una precipitazione con etanolo (HAGELBERG *et al.*, 1989), mentre il secondo utilizza l'affinità del DNA con la idrossiapatite, un fosfato di calcio che rappresenta la grande parte della componente minerale dell'osso. Il DNA viene eluito dal tessuto osseo (previa una incubazione con una soluzione simile a quella prevista per il precedente metodo) un tampone fosfato. Gli acidi nucleici, adeguatamente purificati e concentrati, sono poi precipitati con un carrier specifico (spermina) (PERRSON, 1992).

Entrambi i metodi hanno dato una resa elevata di acidi nucleici, che sono però risultati degradati in frammenti di basso peso molecolare, mediamente inferiori alle 500 paia di basi. In particolare, il secondo metodo ha fornito acidi nucleici maggiormente purificati ed è risultato quindi preferito.

Sugli estratti sono state condotte reazioni di amplificazione enzimatica per caratterizzare il DNA mitocondriale. Nonostante l'abbondanza di acidi nucleici, il loro stato di conservazione non ha però consentito l'amplificazione di DNA mitocondriale umano e pertanto non è possibile dare una caratterizzazione genetica della popolazione della necropoli di Sedilo. Al momento sono in programma nuove estrazioni con un diverso protocollo sperimentale che, utilizzando diatomiti o sospensioni di silica per legare le molecole di DNA, poi eluite in acqua ad alta temperatura, consente il recupero di frammenti specifici di DNA (in questo caso di DNA mitocondriale) anche se presenti in concentrazioni minime nell'estratto (HOSS e PÄÄBO, 1993).

Nonostante che i risultati dell'analisi sperimentale non siano positivi, si ritiene comunque utile fornire un quadro delle potenzialità di questo tipo di indagine, delle modalità di campionamento e delle difficoltà sperimentali e teoriche dello studio genetico molecolare su reperti di interesse archeologico ed antropologico.

Excursus storico

Fino a pochi anni fa lo studio di popolazioni estinte era necessariamente limitato all'analisi del fenotipo, sia a livello molecolare che morfologico. Infatti, sebbene molecole proteiche, come collagene e albumina (PRAGER *et al.*, 1980; LOWENSTEIN, 1980) o di sostanze gruppo specifiche ABO (vedere PAOLI e BORGOGNINI TARLI, 1982 per una *review*), fossero già state isolate e analizzate da tessuti antichi, nessuna analisi diretta del genotipo risultava possibile. Per questa ragione, l'articolo di HIGUCHI *et al.* (1984) sulla clonazione di un gene mitocondriale di un equide africano simile alla zebra, il quagga, estintosi all'inizio di questo secolo, ebbe un notevole impatto sulla comunità scientifica: era infatti il primo caso in cui i rapporti evolutivi tra una specie estinta e i suoi parenti prossimi ancora esistenti venivano ricostruiti a livello genetico e dopo questo articolo il termine "ancient DNA" (aDNA) è diventato sempre più familiare a tutti i ricercatori interessati allo studio biologico del passato. Per genetisti di popolazione e studiosi di filogenesi si apre la possibilità di aggiungere la dimensione temporale a discipline dove si ricostruiva un processi storico, l'evoluzione, facendo affidamento esclusivamente su dati tratti dalla situazione attuale.

Nel loro primo lavoro HIGUCHI *et al.* (1984) usando un campione relativamente recente (muscolo essiccato da un preparato museale di circa 140 anni) riuscirono a clonare due frammenti di DNA mitocondriale comprendenti 112 paia di basi del gene citocromo ossidasi I. A seguito di questo brillante esperimento, diversi lavori degli anni ottanta estesero i limiti della ricerca in molte direzioni, ottenendo DNA da diversi tessuti, accrescendo il numero dei polimorfismi analizzabili ed estendendo i limiti temporali. In breve tempo, furono analizzati un gran numero di possibili fonti di aDNA: tessuti congelati, come nel caso della muscolatura di un mammut ritrovato in Siberia (HIGUCHI e WILSON, 1984; JOHNSON *et al.*, 1985); resti umani artificialmente mummificati (Pääbo, 1985a; 1985b); preparati anatomici di museo in formalina (GOELZ *et al.*, 1985); tessuti molli, come nel caso di tessuto cerebrale conservato in ambiente di torbiera (DORAN *et al.*, 1986); semi di vari tipi di piante provenienti da scavi archeologici (ROGER e BENDICH, 1985; ROLLO, 1985).

Comunque, tutti questi autori dovettero affrontare considerevoli problemi analitici, a causa delle significative alterazioni nella struttura molecolare del DNA antico che ne limitava le possibilità di un trattamento biochimico adeguato.

Una innovazione nel campo della biologia molecolare, l'introduzione della reazione di polimerizzazione a catena (PCR) (un metodo che permette la rapida amplificazione enzimatica di specifiche sequenze partendo da minime quantità di acidi nucleici) ha aperto nuove possibilità in questo campo, superando in un solo colpo i problemi legati alla scarsità di DNA e al suo cattivo stato di conservazione. Questa tecnica, le cui potenzialità nel campo del DNA antico sono state inizialmente indicate e sfruttate da PÄÄBO (1987), divenne ben presto la tecnica di elezione di questo tipo di studi. Inoltre, la PCR permise di scoprire artefatti introdotti dagli enzimi di riparazione dei batteri in sequenze ottenute precedentemente mediante clonazione (HIGUCHI *et al.*, 1987; PÄÄBO e WILSON, 1988). A partire da questa data, praticamente tutti i lavori inerenti il DNA antico sono basati sulla PCR, una tecnica che ha permesso, tra l'altro, la amplificazione di DNA da tessuti duri, come le ossa (HAGELBERG *et al.*, 1989; HORAI *et al.*, 1989) e i denti (HÄNNI *et al.*, 1990).

L'età della gran parte dei campioni che hanno dato DNA amplificabile va da pochi anni a circa 40.000 anni, coprendo il campo di interesse di molte discipline come l'antropologia, l'archeologia e la genetica delle popolazioni umane (resti umani antichi) (THUESEN e ENGBERG, 1990; KUROSAKI *et al.*, 1992), botanica (semi e foglie) (ROLLO *et al.*, 1991; POINAR *et al.* 1993), tassonomia e filogenesi di specie estinte sia in tempi storici (quagga, tilacino, moa) (HIGUCHI *et al.*, 1984; THOMAS *et al.*, 1989; COOPER *et al.*, 1992) che preistorici (mammut, emione, tigre dai denti a sciabola, megaterio) (HIGUCHI e WILSON, 1984; HOSS e PÄÄBO, 1993; JANCZEWSKI *et al.*, 1992; PÄÄBO, 1989).

Un recente contributo di grande importanza per lo studio dell'evoluzione umana è costituito dall'analisi del DNA mitocondriale estratto da resti ossei di un neanderthaliano (KRINGS *et al.*, 1997). La sequenza recuperata da questo esemplare ha mostrato una diversità media tre volte superiore alla variabilità osservabile nelle sequenze umane moderne, e che nessun gene neanderthaliano è passato nel pool genico europeo. Questo risultato supporta l'ipotesi di una origine africana recente della specie umana, e indica che l'uomo di Neanderthal apparteneva ad una specie distinta da *H. sapiens*.

I risultati sperimentali sopra riportati dimostrano che la disciplina è matura per passare dagli studi pionieristici sulla metodologia alle concrete applicazioni a problemi biologici. Comunque, alcuni aspetti tecnici necessitano di ulteriore attenzione. In particolare, due fattori hanno importanti implicazioni sulla fattibilità e attendibilità di queste analisi: la condizione degli acidi nucleici normalmente ottenibili da tessuti antichi (inclusendo gli effetti di diversi fattori inibenti presenti negli estratti) e la possibilità della presenza di contaminazioni da parte di DNA moderno che può indurre risultati artefatti o questionabili. Entrambi questi punti sono fortemente influenzati dalla delicata fase di trattamento del campione di tessuto per l'estrazione del DNA.

Preparazione del campione

A causa della grande variabilità nello stato di conservazione dei vari reperti, non è disponibile una standardizzazione delle tecniche di estrazione, sebbene alcune procedure generali possono essere delineate. In genere, circa 0.5 grammi di tessuto sono sufficienti per l'estrazione di DNA, anche se in particolari casi (denti, insetti in ambra) il quantitativo occorrente può essere molto più ridotto.

Quando possibile, per mettere in luce eventuali contaminazioni, dovrebbero essere presi almeno due diversi campioni dallo stesso individuo. Pur considerando la variabilità dovuta all'età e alle condizioni, per grammo di tessuto possono essere recuperati in media da 1 a 100 mg (ROGAN e SALVO, 1990; PÄÄBO, 1985a, 1989; DORAN *et al.*, 1986; HAGELBERG e CIEGG, 1991, HAGELBERG *et al.*, 1991), il che rappresenta un quantitativo da 10 a 1000 volte minore di quello ottenibile da tessuti freschi. Ovviamente, solo una frazione del DNA è DNA antico, essendo la maggior parte da mettersi in relazione con la contaminazione batterica e fungina (BROWN e BROWN, 1992b). Vista la specificità della reazione di PCR, la diretta quantificazione del DNA antico non è essenziale e per questo è stata solo sporadicamente misurata. Ragionevoli stime danno da 1 ng (BROWN e BROWN, 1992a) a 200 ng/g (PÄÄBO, 1989).

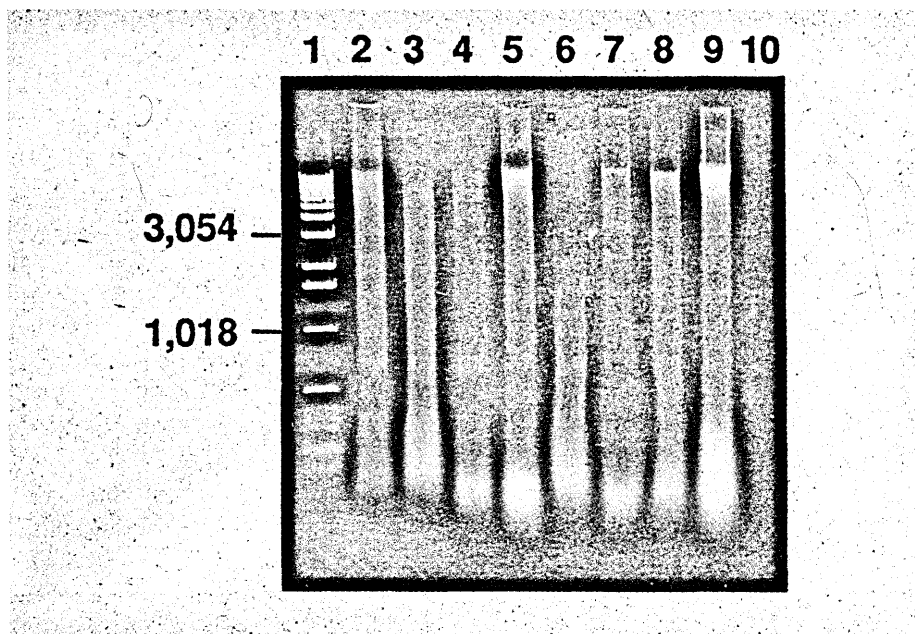


Figura 1. DNA estratto da campioni antichi: corsa elettroforetica. Corsia 1: marcatore di peso molecolare. Corsie 2-9: DNA antico estrato da ossa umane; Corsia 10: controllo negativo.

Il frazionamento in base al peso molecolare del DNA mostra una successione continua di molecole da oltre 10 kilobasi a frammenti molto piccoli, di 50-100 basi, con una concentrazione media di frammenti attorno alle 200-500 coppie di basi (fig.1). Occorre notare che la presenza di DNA ad alto peso molecolare non significa necessariamente la persistenza di acidi nucleici antichi in buono stato, visto che questa frazione è probabilmente da riferirsi a DNA di microrganismi oppure a frammenti corti legati insieme da cross links (PÄÄBO, 1989). Infatti, estrazioni da tessuti solitamente ben conservati, come i denti, nei quali la dentina è protetta da infiltrazioni batteriche grazie allo strato di smalto, spesso danno DNA di basso peso molecolare.

Le molecole antiche sono non solo degradate in frammenti corti, ma anche mostrano danni nella struttura molecolare, dovuti all'azione combinata delle nucleasi endogene e dei fattori ambientali. Inoltre, l'integrità della doppia elica è danneggiata dalla presenza di legami incrociati tra molecole.

Contaminazioni

Il maggior vantaggio della reazione di polimerizzazione a catena, la capacità di amplificare minimi quantitativi di DNA bersaglio (perfino una singola copia), nel caso di analisi di DNA antico rappresenta il maggiore pericolo per l'attendibilità dei risultati. Questo paradosso è dovuto alla possibile presenza negli estratti di tessuti antichi di tracce di DNA esogeno, che possono causare dei risultati falsi positivi: un problema letteralmente amplificato dalla alta sensibilità della PCR.

Come già accennato, la componente principale del DNA ottenibile da campioni antichi è di origine batterica o fungina. Questo fatto, sebbene non desiderabile, è inevitabile e comunque non interferisce con la reazione di PCR a causa della sua specificità. Al contrario, perfino poche copie di DNA umano moderno accidentalmente presenti nell'estratto, per la loro migliore condizione, possono essere amplificate con una cinetica più veloce, mascherando la sequenza antica originale. Queste contaminazioni possono facilmente essere individuate quando si studiano campioni non umani, visto che le sequenze umane possono essere in genere facilmente distinte da quelle di animali o di piante. Sfortunatamente, il criterio filogenetico non è più valido se l'oggetto e il soggetto dello studio appartengono alla stessa specie, ovvero la specie umana. Ovviamente, le contaminazioni devono essere evitate in ogni caso, ma una particolare attenzione deve essere posta nel caso di studi di tipo archeologico o antropologico, visto che un risultato di falsa positività è difficilmente identificabile e può portare ad interpretazioni errate. Le possibili fonti di contaminazione di DNA umano sono diverse nel tempo e conseguentemente la qualità del DNA esogeno varia grandemente. Appropriati controlli devono essere messi in atto ad ogni passo (fig. 2).

Una prima contaminazione può avvenire appena dopo la morte o nelle prime fasi del processo tafonomico. Il sangue o altri liquidi organici di altri individui possono cadere sul cadavere prima della deposizione o direttamente nella tomba, specialmente nel caso di sepolture multiple. Naturalmente non c'è modo di prevenire que-

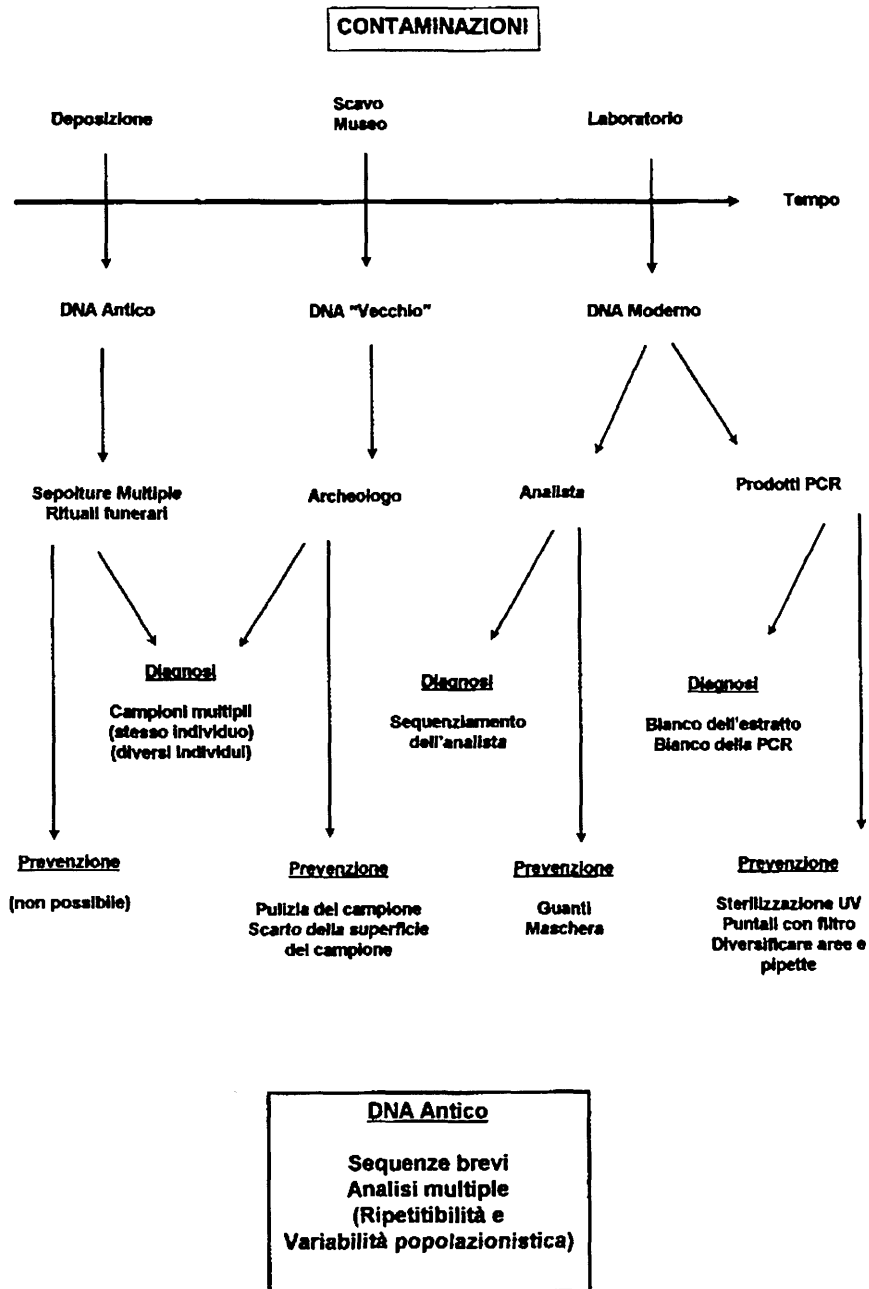


Figura 2. Possibili fonti di contaminazioni da DNA esogeno in campioni antichi.

ste contaminazioni *ab antiquo*, ma è importante riconoscerle, analizzando almeno due campioni dello stesso individuo (che devono dare sequenze identiche) e più di un individuo della stessa popolazione (che deve riflettere la variabilità biologica). E comunque improbabile che questa contaminazione riesca ad affiorare, in quanto il DNA esogeno è esso stesso DNA antico, e quindi soggetto alle stesse condizioni di quello originale, ma presumibilmente molto meno abbondante e quindi statisticamente svantaggiato.

Il tempo che va dallo scavo all'analisi di laboratorio rappresenta la seconda fase cruciale riguardo al rischio di contaminazioni. Cellule di desquamazione della pelle, sudore, capelli, aerosol salivare sono buone fonti di acidi nucleici. Dunque non è improbabile che il campione venga contaminato da DNA di coloro che hanno toccato i reperti, come gli archeologi e i curatori di museo, specialmente se gli scavi e la esposizione in museo sono stati condotti senza prospettare analisi genetiche e quindi senza particolari precauzioni. Questo DNA "vecchio" è probabilmente più danneggiato di quello che si può ottenere da tessuti freschi, visto che può essere stato depositato da pochi giorni a pochi anni prima dell'analisi, ma sarà probabilmente meno degradato di quello proveniente dal reperto in studio, sicuramente molto più antico. PÄÄBO (1989) riporta un grafico HPLC di DNA da un campione di carne essicata di circa 4 anni che è indistinguibile da quello derivante da tessuto fresco. Per questa ragione la polimerasi termostabile potrebbe amplificare preferenzialmente questo DNA invece dei frammenti originali. Gli stessi controlli descritti al punto precedente (campionamento multiplo e molti individui analizzati) sono necessari per attestare l'autenticità dei risultati. Per evitare questo tipo di contaminazioni è necessario indossare guanti usa e getta e mascherina facciale al momento dello scavo e usare lame sterili per campionare e provette sterili per la raccolta. Se questa procedura non è possibile, come nel caso di campioni precedentemente raccolti e manipolati, è consigliabile campionare le parti del corpo meno esposte e di scartare le parti superficiali dei reperti.

Il trattamento del campione in laboratorio rappresenta l'ultima fase critica e le contaminazioni a questo livello possono essere dovute a due cause ben distinte: DNA genomico completo dovuto a vetreria o reagenti non perfettamente puliti, o direttamente da cellule del ricercatore, e il cosiddetto "carryover da amplicons". La prima causa può essere circoscritta da uno stretto controllo dell'ambiente di laboratorio, con un uso costante di guanti, maschere facciali, l'uso preferenziale di contenitori, pipette e provette di plastica monouso e l'intensivo uso di cappa aspirante e di camere sterili a raggi UV a corta lunghezza d'onda. Per scoprire questo tipo di contaminazioni è essenziale disporre di controlli dell'estratto, ovvero effettuare, in parallelo agli estratti di tessuto, uno o più bianchi nei quali tutti i reagenti usati vengono sottoposti agli stessi trattamenti che prevede il protocollo per il campione. La tipizzazione del ricercatore è anche raccomandabile, per comparazione con i risultati ottenuti dal campione antico.

Il secondo punto merita una particolare attenzione. Visto che la PCR in una singola reazione produce miliardi di copie (generalmente chiamate "amplicons") della spe-

cifica sequenza bersaglio, perfino le microscopiche particelle di aerosol che si possono generare al momento della apertura delle provette contengono un numero di molecole sufficiente per produrre amplificazione. Il trasferimento accidentale di prodotti PCR a provette pronte per la amplificazione enzimatica è chiamato "carryover". La possibilità di carryover cresce in proporzione con l'aumentare del numero delle reazioni in laboratorio, a meno che venga adottato un protocollo di PCR molto stringente e che vengano prese adeguate precauzioni. Per evidenziare questo tipo di contaminazioni occorre effettuare di routine un controllo negativo della reazione di PCR (da non confondere con il controllo dell'estratto). La reazione nella quale sono aggiunti tutti i reagenti meno il DNA non deve dare alcun prodotto.

Il secondo approccio, da affiancare alle cauzioni sopra riportate, consiste nella distruzione attiva di DNA contaminante eventualmente presenti nel mix di reazione. Gli ultravioletti producono legami incrociati nella doppia elica in grado di bloccare la polimerizzazione. Prima dell'aggiunta del template, una esposizione del mix di PCR ai raggi UV a 254 nanometri inattiva gli acidi nucleici precedentemente presenti (SARKAR e SOMMER, 1990).

Conclusioni e prospettive

Dal punto di vista tecnico, l'estrazione e la caratterizzazione di DNA da materiale antico può essere eseguita in qualunque moderno laboratorio di biologia molecolare, visto che non è richiesto nessun equipaggiamento speciale e che i protocolli impiegati sono direttamente derivati da quelli comunemente utilizzati nelle analisi da campioni freschi. Comunque, le peculiarità dei campioni oggetto di studio (acidi nucleici in cattivo stato di conservazione e in minima quantità), obbligano i ricercatori in questo campo a speciali attenzioni e le tecniche devono essere adattate a template danneggiati. Le reazioni di amplificazione devono essere condotte in condizioni particolarmente spinte, aumentando la concentrazione dell'enzima, estendendo il numero di cicli, ripetendo le amplificazioni con una seconda reazione di PCR ecc. Tutte queste procedure implicano la moltiplicazione dei rischi di risultati falsi positivi. Per questa ragione, è necessaria una esperienza addizionale nel trattare campioni antichi. In generale, le peculiarità dei campioni antichi, in particolare la enorme variabilità nello stato di conservazione del DNA, impedisce la standardizzazione delle tecniche di studio, che sono, necessariamente, caso specifiche.

Nonostante queste difficoltà, l'analisi del DNA antico rappresenta una valida fonte di dati molecolari in molti campi come l'antropologia, la archeologia, la genetica di popolazione, la sistematica zoologica e botanica, la medicina legale. Naturalmente, le potenzialità di questa analisi possono essere pienamente sfruttate solo quando risultati positivi potranno essere ottenuti con regolarità per la maggior parte dei campioni e gli esperimenti risultino riproducibili.

BIBLIOGRAFIA

BROWN K.A 1992a

Amount of human DNA in old bones. Ancient DNA Newsletter, 1, 18-19.

BROWN T.A. 1992b

Ancient DNA and the Archaeologist, Antiquity, 66, pp. 1-23.

COOPER A., MOURER-CHAUVIRÉ C., CHAMBERS G. K., VON HAESLER A.,

WILSON A. C., PÄÄBO S. 1992

Independent origin of New Zealand moas and kiwis, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 89, pp. 8741-8744.

DORAN H. G., DICKEL D. N., BALLINGER W. E., AGEE O. F., LAIPIS P. J., HAUSWIRTH W.W. 1986

Anatomical, cellular and molecular analysis of a 8,000-yr-old human brain tissue from the Windover archaeological site, Nature, 323, pp. 803-806.

GOELZ S. E., HAMILTON S. R., VOGELSTEIN B. 1985

Purification of DNA from formaldehyde fixed and paraffin embedded human tissue, Bioch. Biophys. Res. Com., 130, pp. 118-126.

HAGELBERG E., SYKES B., HEDGES R. 1989

Ancient bone DNA amplified, Nature, 342, p. 485.

HAGELBERG E., CLEGG J. B 1991

Isolation and characterization of DNA from archaeological bone, Proc. R. Soc. London B, 244, pp. 45-50.

HAGELBERG E., GRAY I. C., JEFFREYS A. J. 1991

Identification of the skeletal remains of a murder victim by DNA analysis, Nature, 352, pp. 427-429.

HÄNNI C., LAUDET V., SAKKA M., BÈGNE A., STÉHELIN D. 1990

Amplification de fragments d'ADN mitochondrial à partir de dents e d'os humains anciens, C.R.Acad. Sci. Paris, 310, pp. 365-370.

HIGUCHI R., BOWMAN B., FREIBERGER M., RYDER O. A., WILSON A. C. 1984

DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family, Nature, 312, pp. 282-284.

HIGUCHI R. G., WILSON A. C 1984

Recovery of DNA from extinct species, Fedn. Proc., 43, pp. 15-57.

HIGUCHI R. G., WRISCHNIK L. A., OAKES E., GEORGE M., TONG B.,

WILSON A. C. 1987

Mitochondrial DNA of the extinct quagga: relatedness and extent of postmortem changes, J. Mol. Ev., 25, pp. 283-287.

HORAI S., HAYASAKA K., MURAYAMA K., WATE N., KOIKE H., NAKAI N. 1989

DNA amplification from ancient human skeletal remains and their sequence analysis, Proc. Jap. Acad., 65, pp. 229-233.

HOSS M., PÄÄBO S. 1993

DNA extraction from Pleistocene bones by a silica-based purification method, Nuc. Ac. Res., 21, pp. 3913-3914.

- JANCZEWSKY D. N., YUHKI N., GILBERT G. A., JEFFERSON G. T., OBRIEN S. J. 1992
Molecular phylogenetic inference from sabertoothed cat fossil of Rancho La Brea, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 89, pp. 9769-9773.
- JOHNSON P. H., OLSON C. B., GOODMAN M. 1995
Prospect for the molecular biological reconstruction of the wholly mammoth's evolutionary history: isolation and characterization of deoxyribonucleic acid from the tissue of Mammuth primagenius, Acta Zool. Fennica, 170, pp. 225-231.
- KRINGS M., STONE A., SCHMITZ R. W., KRAINITZKI H., STONEKING M., PÄÄBO S. 1997
Neandertal DNA sequences and the origin of modern humans, Cell, 90, pp. 19-30.
- KUROSAKI K., MATSUSHITA T., UEDA S. 1993
Individual DNA identification from ancient human remains, Am. J. Hum. Gen., 53, pp. 638-643.
- LOWENSTEIN J. M. 1980
Specie-specific proteins in fossils, Naturwissenschaften, 67, pp. 343-346.
- PÄÄBO S. 1985a
Preservation of DNA in ancient Egyptian mummies, J. Arch. Sci., 12, pp. 411-417.
- PÄÄBO S. 1985b
Molecular cloning of ancient Egyptian mummy, Nature, 314, pp. 644-645.
- PÄÄBO S. 1987
Molecular genetic methods in archaeology, A prospect. Anthropol. Anz., 45, pp. 9-17.
- PÄÄBO S. 1989
Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning and enzymatic amplification, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 86, pp. 1939-1943.
- PÄÄBO S., WILSON A. C. 1988
Polymerase Chain Reaction reveals cloning artefacts, Nature, 334, pp. 644-645.
- PAOLI G., BORGOGNINI TARLI S. M. 1982
Survey on paleoserological studies, Homo, 33, pp. 69-89.
- PERRSON P. 1992
A method to recover DNA from ancient bones, Ancient DNA Newsletter, 1, pp. 25-27.
- POINAR H. N., CANO R. J., POINAR JR G. O. 1993
DNA from an extinct plant, Nature, 363, p. 677.
- PRAGER E. M., WILSON A. C., LOWENSTEIN J. M., SARICH V. M. 1980
Mammoth albumin, Science, 209, pp. 287-289.

- ROGAN P.K., SALVO J.J. 1990
Molecular genetics of pre-Columbian South American mummies, UCLA Symp. Mol. Cell. Biol., 122, pp. 223-234.
- ROGERS S. O., BENDICH A. J., 1985
Extraction of DNA from milligram amounts of fresh herbarium and mummified plant tissues, Plant Mol. Biol., 5, pp. 69-76.
- ROLLO F., AMICIA., SALVI R., GARBUGLIA A. 1988
Short but faithful pieces of ancient DNA, Nature, 335, p. 774.
- ROLLO F. 1985
Characterization by molecular hybridization of DNA fragments isolated from ancient (1400 BC) seeds, Theor. Appl. Gen., 71, pp. 330-333.
- SARKAR G., SOMMER S. S. 1990
Shedding light on PCR contamination, Nature, 343, p. 27.
- THOMAS R. H., SCHAFFNER W., WILSON A. C., PÄÄBO S. 1989
DNA phylogeny of the extinct marsupial wolf, Nature, 340, pp. 465-467.
- THUESEN I., ENGBERG J. 1990
Recovery and analysis of human genetic material from mummified tissue and bone, J. Arch. Sci., 17, pp. 679-689.