



Paléontologie générale / General Palaeontology

Application de la technique de PCR en temps réel à l'étude de l'ADN ancien

Rym Kefi ^{a,b}, Bertrand Mafart ^b, Jean Louis Spadoni ^{a,b},
Alain Stevanovitch ^a, Éliane Béraud-Colomb ^{a,*}

^a Unité 387, Inserm, hôpital Sainte-Marguerite, BP 29, 13277 Marseille cedex 9, France

^b Laboratoire d'anthropologie, faculté de médecine secteur Nord, UMR 6569, 51, boulevard Pierre-Dramard, 13015 Marseille, France

Reçu le 6 août 2002 ; accepté le 10 février 2003

Présenté par Philippe Taquet

Résumé

L'utilisation de la technique de PCR en temps réel a été testée pour la première fois dans l'étude de l'ADN ancien (aDNA). Les conditions optimales d'amplification déterminées ont permis d'obtenir, en une seule PCR, un produit d'amplification en quantité suffisante pour être directement séquencé. Outre la vérification de l'authenticité de l'ADNa, nous avons comparé deux méthodes de traitement de l'os : le scalpel et l'éthanol. Les spécimens traités à l'éthanol présentaient un meilleur rendement en ADN. Pour la réalisation de ce travail, nous avons analysé la région HVSI de la *D-loop* mitochondriale de cinq squelettes humains, exhumés du site archéologique de Notre-Dame-du-Bourg. **Pour citer cet article : R. Kefi et al., C. R. Palevol 2 (2003) 125–132.**

© 2003 Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS. Tous droits réservés.

Abstract

Real-time Polymerase Chain Reaction (PCR) for the study of ancient DNA. The properties of ancient DNA (aDNA) make difficult the retrieval of DNA sequence. The advantage of Real-Time PCR was exploited, for the first time, in the study of aDNA. We determined the optimal condition to amplify, in one round of PCR, aDNA, which should be directly sequenced. Beside the verification of aDNA authenticity, we compared two cleaning bone methods: scalpel and ethanol. The ethanol specimens showed the best DNA yield. The aDNA was extracted and amplified (mitochondrial hypervariable region I) from five skeletons exhumed from the archaeological site of Notre-Dame-du-Bourg (France), dated from 3rd to 17th century. **To cite this article: R. Kefi et al., C. R. Palevol 2 (2003) 125–132.**

© 2003 Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS. All rights reserved.

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : beraud@marseille.inserm.fr (E. Béraud-Colomb).

Mots clés : ADN ancien ; ADN mitochondrial ; HVSI ; PCR en temps réel ; méthodes de traitement de l'os

Keywords: ancient DNA; mitochondrial DNA; HVSI region; real-time PCR; cleaning bone method

Abridged version

The properties of ancient DNA make difficult the retrieval of ancient DNA sequences. Many authors used double PCR and nested PCR to obtain a PCR product in sufficient quantity to be sequenced. However, recent study showed that multiple PCR induce artefacts in ancient DNA.

We exploited the advantage of the Real-Time PCR in order to amplify, in one round of PCR, ancient DNA that should be directly sequenced.

Five skeletons with a dislocation of hip were exhumed from the archaeological site of Notre-Dame-du-Bourg (Digne, France), dated from 3rd to 17th century. The femur was cleaned with two methods. In the first method, the bone outer surfaces were removed with sterile scalpel. In the second method, scalpel was substituted by 70% ethanol. 0.5 ml of bone powder were incubated in 4 ml of extraction buffer during 48 h with slow rotation. A phenol/dichloromethane extraction was performed on the supernatant, the water phase was purified and the potential DNA concentrated on the centricon.

The amplification of mitochondrial DNA control region (D-loop), hyper variable segment I (HVSI) was performed in the Taq Man ABI prism 7700 sequence detection system. The Taq Man allows carrying out a real time PCR. It detects PCR products as they accumulate using DNA binding dye: Sybr Green I dye. Irradiated with UV light, Sybr green provides fluorescence proportional to accumulated PCR product. The amplification plot is the plot of the fluorescence signal versus the cycle number.

Several amplification tests were carrying out. In each one, we successively modified one of the following parameters: volume of Taq polymerase, volume of DNA extract and number of cycle.

The optimal conditions were determined. The 25 µl PCR reaction mixture consisted of 12.5 µl of buffer (Sybr Green Master mix), 10.2 µl of water, 1 µl of forward amplification primer (300 nM), 1 µl of the reverse amplification primer (300 nM), 1 U of Taq Gold and 0.3 µl of template DNA. PCR was carried out

for 45 cycles using the following conditions: denaturation at 95 °C for 10 min, 15s at 95 °C and annealing-extension step at 60 °C for 1 min.

Many arguments support authenticity of ancient DNA. First, we observed inverse correlation between amplicon length and amplification efficiency. Moreover, for the same specimen (522 for example), DNA extract obtained from ethanol (522 ethanol) and scalpel (522 scalpel) specimen exhibited the same sequence. Finally we signalled that none of mutation located in the specimen's sequences has been observed in the manipulator's sequence.

In order to compare ethanol and scalpel method, we analysed four parameters: the PCR amplification rate, the amplification plot, the density of DNA bound on an agarose gel and the DNA sequence. Those observations showed that the best DNA yield was obtained in specimens cleaned with 70% ethanol.

The five specimens' sequences (153 pb of HVSI) were aligned with Anderson reference sequence. Specimens: 1460 and 542 had the same sequence, with remarkable mutation: 16192 T. The sequences of 534, 522, and 469 were different. These five individuals are females and have the same pathology. It could be interesting to sequence the totality of mitochondrial genome with the aim of finding the specimen's haplogroup and to propose or not a maternal relationship between 1460 and 542.

1. Introduction

Grâce à l'invention de techniques de biologie moléculaire telles que la PCR (pour *Polymerase Chain Reaction* [16, 17]), l'enthousiasme de retrouver et d'analyser les séquences d'ADN ancien (ADNa) a envahi de nombreux domaines de recherche [3], tels que l'archéozoologie, la paléobotanique, la paléopathologie, la médecine légale, l'anthropologie moléculaire et les études génétiques des populations. Cependant, la mauvaise conservation de l'ADNa, son état fragmenté, dégradé et la présence d'inhibiteurs des enzymes utilisées dans les techniques de biologie moléculaire [14] rendent difficile l'obtention de séquen-

Tableau 1
Spécimens étudiés.
Specimens studied.

Numéro du squelette	Datation	Sexe	Âge
1460	XI ^e –XIII ^e siècles	féminin	supérieur à 60 ans
469	XVI ^e –XVII ^e siècles	féminin	16 ans
522	XVI ^e –XVII ^e siècles	non déterminé	14 ans
534	XVI ^e –XVII ^e siècles	féminin	supérieur à 60 ans
542	XVI ^e –XVII ^e siècles	féminin	supérieur à 60 ans

ces d'ADNa. Pour palier les problèmes liés aux propriétés de l'ADNa et pour obtenir des produits de PCR contenant des quantités d'ADN permettant la réaction de séquençage, certains auteurs ont procédé à des PCR successives : double PCR et *nested* PCR [1, 12, 13, 15, 18]. Or, il a été montré récemment que les séquences d'ADN générées par des PCR multiples successives d'ADNa révèlent des mutations artéfactuelles [9].

Dans cet article, nous décrivons l'utilisation, pour la première fois, de la technique de PCR en temps réel [7] dans l'étude de l'ADNa. Notre but est d'essayer, grâce à cette nouvelle technique, d'obtenir, en une seule PCR, un produit d'amplification en quantité suffisante pour être directement séquençé.

2. Spécimens

Les spécimens étudiés ont été exhumés du site archéologique de Notre-Dame-du-Bourg à Digne-les-bains (745 km au sud-est de Paris) [4]. Parmi les 800 squelettes étudiés sur 1400 au total, les anthropologues ont pu identifier cinq individus présentant une luxation congénitale de la hanche. C'est sur ces squelettes (469, 522, 534, 542, 1460) que s'est basée notre étude paléogénétique. Les informations concernant l'âge et le sexe de ces ossements fossiles sont reportées dans le Tableau 1. Les squelettes ont été datés grâce aux données stratigraphiques et aux analyses au carbone 14. Le numéro attribué à chaque squelette correspond au numéro de la tombe de laquelle il a été inhumé. L'extraction de l'ADNa a été réalisée à partir des fragments de fémurs.

3. Méthodes

3.1. Préparations des échantillons osseux, extraction et purification de l'ADNa

Pour la préparation des échantillons osseux, deux méthodes ont été utilisées : la méthode publiée par

Béraud-Colomb et al. [5] utilise un scalpel stérile, avec lequel les surfaces superficielles osseuses sont éliminées ; la deuxième méthode remplace le scalpel par le nettoyage à l'éthanol à 70°.

Après la préparation des spécimens suivant ces deux méthodes, le même protocole d'extraction et de purification a été suivi pour l'ensemble des échantillons. La réduction de l'os en poudre se fait au moyen d'une lame de scie neuve. 0.5 ml de poudre d'os est ajouté à 4 ml d'un tampon dont la composition est décrite par Béraud-Colomb [5]. Cette préparation est incubée pendant 48 h à 42 °C, sous rotation lente. Le surnageant collecté est concentré et purifié sur centricon (fournisseur : Amicon).

Toutes ces manipulations ont été réalisées dans des locaux dénommés « salle blanche », situés dans un bâtiment isolé de tout laboratoire de biologie moléculaire. À l'intérieur de ces locaux, une pièce isolée des autres pièces par un système de sas (sas d'entrée des produits livrés, sas de sortie des aliquotes à tester et à utiliser) contient toutes les solutions utilisées pour l'extraction. Ces solutions sont testées en PCR avant d'être aliquotées. Les pipettes et autres petits matériels sont dédiés à cette pièce. Nous utilisons blouses, charlottes, gants et masques stériles jetables. La paillasse est totalement nettoyée avant le traitement de chaque spécimen.

3.2. Amplification

L'amplification du fragment HVSI de la *D-loop* mitochondriale a été faite par le biais des trois *primers*, sens et anti-sens, profilés comme suit :

16034 sens : 5'GGGAAGCAGATTTGGGTACC 3'-

16093 sens : 5'TTCGTATTACTGCCAGCC 3'-

16170 sens : 5'AATCCACATCAAACCCCT3'-

16223 anti-sens : 5'GGGTTGATTGCTGTACT-TGC 3'-

Tableau 2
Différents essais d'amplification.
Amplification assay.

Test	Primers et longueurs de fragments d'ADN	ADN (volume)	Enzyme (unité)	Nombre de cycles	PCR positives / PCR testées* **
1	16093/16223 (130pb)	1µl	0,625*	40	0/9
2	16093/16223	0,3	0,625	40	1/9 (11%)
3	16093/16223	0,3	1,626	40	6/8 (75%)
4	16093/16223	0,3	0,625	45	7/8 (87%)
5	16170/16427 (257pb)	0,3	1,625	45	2/9 (22%)
6	16170/16340 (170pb)	0,3	1,625	45	6/9 (66%)
7	16034/16223 (189pb)	0,3	1,625	45	5/9 (55%)

Dans les essais 3 et 4, le spécimen 522 éthanol n'a pas été testé à nouveau. *In assays 3 and 4, specimen 522 ethanol has not been retested.*

* C'est la quantité d'enzyme contenue dans le kit et conseillée par le fournisseur pour 25 µl de volume réactionnel. *Amount of Taq polymerase used in the kit for 25 µl PCR reaction mixture.*

** Nombre d'échantillons qui se sont amplifiés par rapport au nombre total d'échantillons. *Number of amplified specimens related to total specimen number.*

16340 anti-sens : 5'TGTGCTATGTACGGTAAA-TGGCT 3'-

16427 anti-sens : 5'GGGATATTGATTTCACG-GAGG 3'.

Les amplifications ont été effectuées sur le Taq Man ABI Prism 7700 Sequence Detection System (fournisseur : Applied Biosystems). Le Taq Man permet de réaliser une PCR quantitative en temps réel. Outre les composants habituels d'une PCR traditionnelle, le mélange contient un fluochrome : le Sybr Green. Le Sybr Green est une molécule fluorescente qui s'intercale dans l'ADN. Excitée par les rayons laser, le Sybr Green dégage une fluorescence proportionnelle à la quantité des produits de PCR formés. La fluorescence détectée par l'ordinateur du Taq Man est représentée sous forme de courbe exprimant ΔRN : fluorescence normalisée en fonction du nombre de cycles. Le maximum de fluorescence correspond à la phase d'élongation. Ces courbes nous permettent de suivre en direct le déroulement de la PCR.

De nombreux essais ont été réalisés dans le but d'optimiser les conditions d'amplification. Dans chacun de ces essais, nous avons modifié successivement un des paramètres suivants : le volume de l'extrait d'ADN puis la quantité de Taq polymérase et en fin le nombre de cycles (Tableau 2).

Dans ce travail, nous n'avons pas utilisé la technique du clonage recommandée par certains auteurs pour mieux identifier les erreurs de la Taq polymérase [10, 11]. Le séquençage a été effectué directement à partir de produit de la PCR. En fait, selon les travaux de Cooper et al. [6], la Taq polymérase ne commet pas plus d'erreurs lorsqu'elle sert à amplifier l'ADN que

l'ADN actuel. Nous avons, cependant, vérifié la reproductibilité des séquences obtenues en amplifiant de petits fragments d'ADN qui se chevauchent et en comparant des séquences générées par des PCR indépendantes.

4. Résultats

Les différents essais d'amplification ont concerné les neuf échantillons suivants : 522, 534, 469, 1460 scalpel et éthanol, ainsi que l'échantillon 542 éthanol. Le tube 542 scalpel a été endommagé au cours d'une centrifugation.

Pour suivre l'effet de chaque modification sur le déroulement de la PCR, nous avons analysé les résultats visualisés sur les courbes d'amplification (ΔRN en fonction du nombre de cycles) et les bandes d'ADN visualisées sur gel d'agarose.

Au cours de la première PCR, les conditions standards appliquées (Tableau 2, essai 1) n'ont abouti à aucune amplification. La modification de la quantité d'ADN, au cours du deuxième essai, a permis l'amplification d'un seul échantillon: le 522 éthanol.

Cinq échantillons (scalpel : 522, 534 et éthanol : 469, 534, 542) sur huit testés (522 éthanol n'a pas été testé à nouveau ; il s'est déjà amplifié lors de l'essai 2) ont donné une amplification positive à la suite de l'addition d'une unité supplémentaire de la Taq polymérase (voir Tableau 2, essai 3). Les échantillons qui présentaient une bande d'ADN sur gel avaient des ΔRN de 3 à 3,5 (Fig. 1). Les échantillons caractérisés par des ΔRN de 1,5 et 2 ne montraient pas de bande d'ADN sur gel d'agarose.

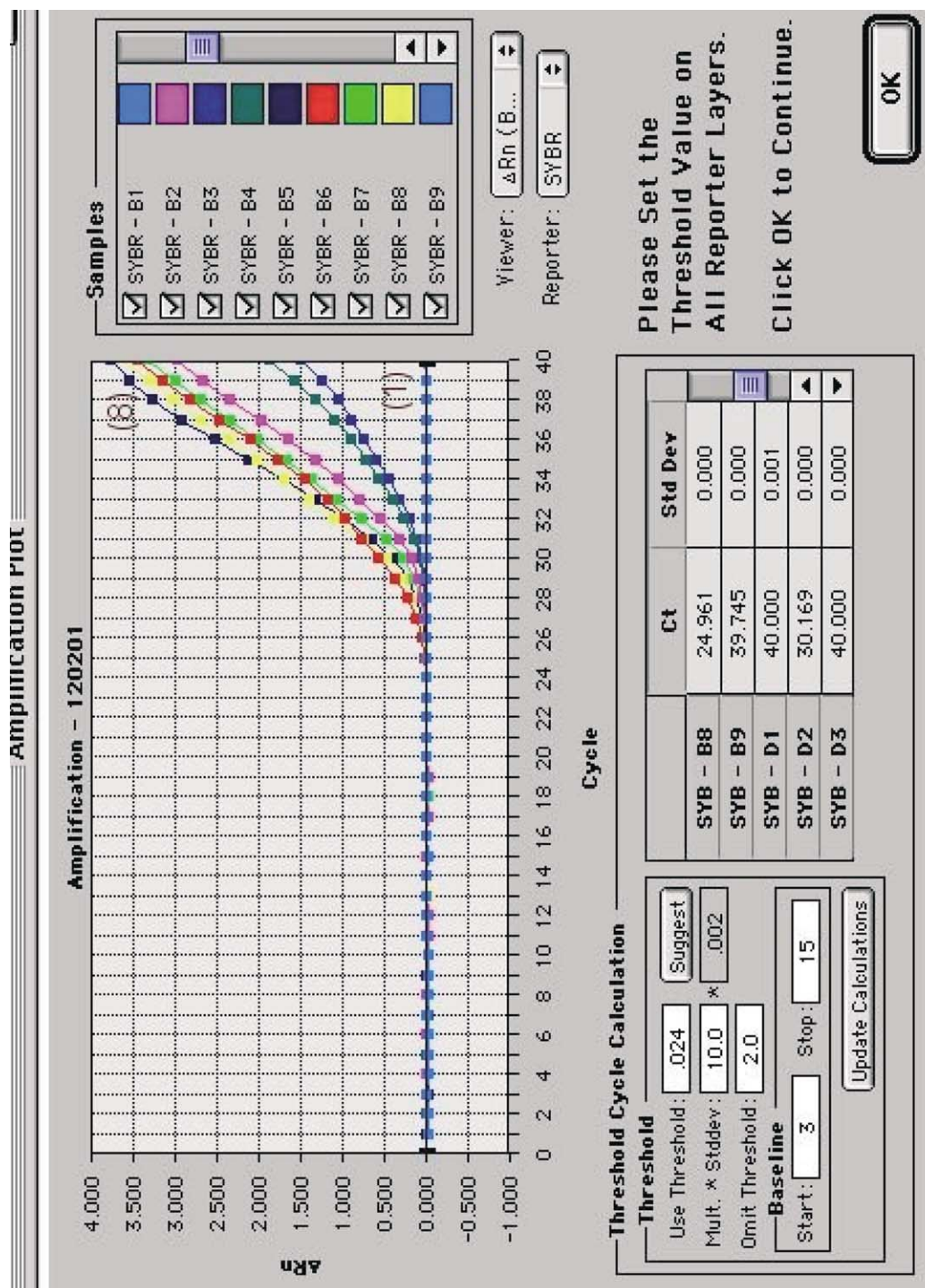


Fig. 1. Courbe d'amplification correspondant à l'essai n° 3 du Tableau 2. La lecture des courbes se fait de bas en haut (de 1 à 8).

- (1) 1460 éthanol : $\Delta RN = 0$
- (2) 469 scalpel, (3) 1460 scalpel, $1,5 < \Delta RN < 2$
- (4) 534 scalpel, (5) 534 éthanol, (6) 542 éthanol, (7) 469 éthanol, (8) 522 scalpel, $3 < \Delta RN < 4$

Fig. 1. Amplification curve of assay No. 3 in Table 2. Read curves from bottom to top (from 1 to 8).

Tableau 3
Résultats des amplifications.
Amplification results.

Échantillons		Primers			
		16093/16223 (130 pb)	16170/16340 (170 pb)	16034/16223 (189 pb)	16170/16427 (257 pb)
Scalpel	534	+	+	+	–
	469	+	–	–	–
	1460	+	–	–	–
	522	+	+	+	+
Éthanol	542	+	+	+	–
	534	+	+	+	–
	469	+	+	+	+
	1460	–	–	–	–
	522	+	+	+	–

+ : amplification positive / *positive amplification*.

– : absence d'amplification / *no amplification*.

Scalpel : os traité au scalpel / *bone treated with scalpel*.

Éthanol : os nettoyé à l'éthanol / *bone cleaned with ethanol*.

Le passage de 40 à 45 cycles (quatrième essai) a permis l'amplification de tous les échantillons testés, sauf du 1460 éthanol.

Les conditions optimales d'amplification ont été obtenues, pour une PCR avec Sybr Green et pour un volume réactionnel de 25 µl, avec 12,5 µl du tampon : Sybr Green Master Mix (Applied Biosystems), 14,8 µl d'eau, 1 µl de *primer* sens (300 nM), 1 µl de *primer* anti-sens (300 nM), addition d'une unité de Taq Gold et de 0,3 µl d'extrait d'ADN. Après une première étape de dénaturation de 10 min à 95 °C, 45 cycles ont été

réalisés comme suit : 15 s à 95 °C, suivis d'une minute à 60 °C. Ces conditions optimales ont été conservées pour amplifier le fragment HVSI avec différents *primers* (voir Tableau 2, essais 5 à 7). Dans chacun de ces essais, les spécimens traités à l'éthanol se sont mieux amplifiés que ceux traités au scalpel.

Nous avons réussi à amplifier, pour les cinq spécimens étudiés, les fragments d'ADNa dont la taille est comprise entre 130 et 189 pb. En revanche, seuls deux spécimens ont été amplifiés pour le fragment d'ADN de 257 pb (Tableau 3).

Tableau 4
Alignement des séquences.
Sequence alignment.

	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
Spécimens	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	7	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
	0	1	6	6	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	
Anderson	A	...	T	A	T	T	G	T	A	C	G	...	T	C	C	C	...	C
1460	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
542	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
534 Éthanol	–	–	–	–	–	–	–	C	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
534 Scalpel	–	–	–	–	–	–	–	C	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
469	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	A	–	–	–	–	–	–	–
522 Éthanol	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
522 Scalpel	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Manipulateur	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

– : même nucléotide que la séquence de référence Anderson / Same nucleotide as Anderson reference sequence.

Les séquences (153 pb) des cinq individus ont été alignées entre elles et avec la séquence de référence Anderson [2] (voir Tableau 4). Les individus 542 et 1460 possédaient la même séquence, avec une mutation caractéristique 16192T. Les individus 469, 534 et 522 présentaient des séquences différentes les unes des autres. La même séquence a été observée pour différents échantillons issus d'un même individu. C'est le cas par exemple des échantillons 534 scalpel et 534 éthanol, qui possédaient la même séquence, avec une mutation spécifique 16126C.

Aucune des mutations repérées sur les séquences des échantillons étudiés n'a été trouvée dans la séquence du manipulateur.

5. Discussion

Outre les précautions prises lors des manipulations (utilisation d'un matériel stérile, séparation des postes pré et post PCR, présence des témoins négatifs à toutes les étapes des manipulations), nous avons vérifié l'authenticité de l'ADNa, afin de valider les résultats obtenus et d'éliminer toute hypothèse en faveur d'une contamination exogène.

Premièrement, nous avons remarqué que le nombre de PCR réussies est inversement proportionnel à la taille du fragment d'ADN à amplifier. En effet, les pourcentages de PCR positives étaient respectivement de 99 %, 66 %, 55 % et 22 % pour des fragments d'ADN de 130,170,189 pb. Il s'agit d'une caractéristique de l'ADN ancien.

Ensuite, l'analyse bioinformatique des séquences d'ADN des différents échantillons a montré que ces séquences correspondaient bien à de l'ADN mitochondrial humain. L'hypothèse d'une contamination avec l'ADN actuel a été éliminée grâce aux observations suivantes : d'une part, l'alignement des séquences des différents individus avec la séquence de référence Anderson a permis de repérer des mutations qui ne figuraient pas sur la séquence du manipulateur ; d'autre part, trois individus parmi les cinq étudiés présentaient des séquences différentes les unes des autres ; enfin et surtout, les séquences issues d'un même individu mais provenant d'extractions indépendantes, effectuées selon des méthodes différentes, présentaient les mêmes haplotypes.

Afin de comparer le rendement des spécimens traités à l'éthanol et de ceux traités au scalpel, nous avons

analysé les quatre paramètres suivants : la fréquence des amplifications, les courbes d'amplification, l'intensité des bandes d'ADN sur gel et les séquences.

Nous avons constaté que les spécimens traités à l'éthanol s'amplifiaient mieux que ceux traités au scalpel. Trois hypothèses peuvent expliquer ce résultat :

1. Les spécimens éthanol contiendraient davantage d'ADN. Contrairement au traitement de l'os au scalpel, le nettoyage à l'éthanol évite la perte de matériel osseux compact. Nos résultats seraient en accord avec des publications précédentes [8, 12] montrant que l'os compact ancien contient plus d'ADN que le périoste ou la moelle osseuse.
2. Les spécimens éthanol contiendraient moins d'inhibiteurs de la réaction de PCR. Les inhibiteurs seraient plus concentrés à l'intérieur de l'os. Ceci reste à démontrer.
3. La bonne amplification des spécimens éthanol serait due à une contamination. Cependant, nous avons observé la même séquence entre les échantillons éthanol et scalpel issus d'un même individu.

Au cours de ce travail, nous avons abordé une technique novatrice, qui est l'application de la technique de la PCR en temps réel à l'étude de l'ADNa. Cette technique nous a permis de suivre le déroulement de la PCR, de mieux orienter les modifications de paramètres d'amplification, dans le but d'éviter les PCR successives et d'obtenir, après une seule PCR, un produit d'amplification en quantité suffisante pour être séquencé directement.

Les individus traités dans cet article sont de sexe féminin et ils étaient les seuls, parmi les 800 squelettes étudiés de la nécropole, à présenter une luxation congénitale de hanche. Il serait intéressant de séquencer la totalité du génome mitochondrial de ces individus afin de déterminer leurs haplogroupes et, peut-être, de proposer un lien de parenté maternel entre 1460 et 542, qui présentaient la même séquence sur 153 pb. Les individus 469, 534 et 522 présentaient des séquences différentes, ce qui exclut tout lien de parenté selon la lignée maternelle.

La détermination du protocole d'extraction de meilleur rendement et la mise au point des conditions optimales d'amplification sur le Taq Man devraient être très déterminantes pour aborder de nouvelles études ayant pour support l'ADN ancien.

Références

- [1] G. Adcock, E.S. Dennis, S. Easteal, G. Huttley, L. Jermin, J. Peacock, A. Thorne, Mitochondrial DNA sequences in ancient Australians: implications for modern human origins, *PNAS* 98 (2) (2001) 537–542.
- [2] S. Anderson, A.T. Bankier, B.G. Barrel, M.H.L. De Bruijn, A.R. Coulson, J. Drouin, I.C. Eperon, B.A. Nierlich, F. Sanger, P.H. Schreier, A. Smith, R. Staden, I. Young, Sequence and organization of the human mitochondrial genome, *Nature* 290 (1989) 457–469.
- [3] S. Audic, E. Béraud-Colomb, Ancient DNA is thirteen years old, *Nat. Biotechnol* 15 (1997) 855–888.
- [4] G. Berad, Les Alpes-de-Haute-Provence, pré-inventaire archéologique, fondation « Maison des sciences de l’Homme », 1997.
- [5] E. Béraud-Colomb, R. Roubin, J. Martin, N. Maroc, A. Gardeisen, G. Trabuchet, M. Coossens, Human B globin gene polymorphisms characterized in DNA extracted from ancient bones 12000 years old, *Am. J. Hum. Genet.* 57 (6) (1995) 1267–1274.
- [6] A. Cooper, C. Fox, S. Anderson, A. Rambaut, J. Austin, R. Ward, Complete mitochondrial genome sequences of two extinct moas clarify evolution, *Nature* 409 (2001) 704–707.
- [7] D.S. Grove, Quantitative Real-Time polymerase chain reaction for the core facility using Taq Man and the Perkin-Elmer/Applied Bio systems Division 7700 sequence detector, *J. Biomol. Tech.* 10 (1) (1999).
- [8] A. Hassanin, A. Seveau, H. Thomas, H. Bocherens, Billiou, B.Y. Nguyen, Evidence from DNA that the mysterious ‘lith duong’ (*Pseudonovibos spiralis*) is not a new bovid, *C. R. Acad. Sci. Paris, Ser. III* 324 (2001) 71–80.
- [9] M. Hofreiter, V. Jaenicke, D. Serre, A. Haesseler, S. Pääbo, DNA sequences from multiple amplifications reveal artefacts induced by cytosine deamination in ancient DNA, *Nucleic Acids Res* 29 (23) (2001) 4793–4799.
- [10] M. Hofreiter, D. Serre, H. Poinar, M. Kuch, S. Pääbo, Ancient DNA, *Nature Rev.* 2 (2001) 353–359.
- [11] C.J. Kolman, N. Tuross, Ancient DNA analysis of human populations, *Am. J. Phys. Anthropol.* 111 (2000) 5–23.
- [12] M. Krings, A. Stone, R.W. Schmitz, H. Krainitzki, M. Stoneking, S. Pääbo, Neandertal DNA sequences and the origin of Modern Humans, *Cell* 90 (1997) 19–30.
- [13] D.A. Lawlor, C.D. Dickel, W.W. Hauswirth, P. Partham, Ancient HLA genes from 7500-year-old archaeological remains, *Nature* 349 (1991) 785–788.
- [14] T. Lindahl, Instability and decay of the primary structure of DNA, *Nature* 362 (1993) 709–715.
- [15] R. Montiel, A. Malgosa, P. Francalacci, D.N.A. Authenticating Ancient Human Mitochondrial, *Hum. Biol.* 73 (5) (2001) 689–713.
- [16] K. Mullis, F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, H. Erlich, Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 51 (Pt 1) (1986) 263–273.
- [17] S. Pääbo, A.C. Wilson, Polymerase chain reaction reveals cloning artefacts, *Nature* 334 (1988) 387–388.
- [18] S. Pääbo, J.A. Gifford, A.C. Wilson, Mitochondrial DNA sequences from a 7000-year-old brain, *Nucleic Acids Res* 16 (1988) 9775–9786.