



论文

古骨可溶性胶原蛋白的提取及其重建古食谱的可行性分析

王宁^{①②}, 胡耀武^{①②*}, 侯亮亮^{①②③}, 杨瑞平^{①②}, 宋国定^{①②}, 王昌燧^{①②}

① 中国科学院古脊椎动物与古人类研究所, 中国科学院脊椎动物演化与人类起源重点实验室, 北京 100044;

② 中国科学院大学人文学院科技史与科技考古系, 北京 100049;

③ 山西大学历史文化学院, 太原 030006

* 联系人, E-mail: yw.hu@ucas.ac.cn

收稿日期: 2013-08-27; 接受日期: 2013-11-15; 网络版发表日期: 2014-07-11

中国科学院-德国马普学会伙伴小组项目(编号: KACX1-YW-0830)、中国科学院知识创新工程方向项目(编号: KZCX2-YW-Q1-04)和中国科学院战略性先导科技专项(编号: XDA05130303 和 XDA05130501)资助

摘要 当前在古食谱研究中, 胶原蛋白(不可溶性)的提取, 主要采用明胶化法。然而, 胶原蛋白的直接降解产物——可溶性胶原蛋白, 常常予以忽视并摒弃。本文通过凝胶层析, 分管提取了古骨的酸提取液, 从中分辨出三个峰, 对各峰提取物的 C 和 N 含量, C/N 摩尔比值及稳定同位素比值进行分析, 并与对应的不可溶胶原蛋白(ISC)进行了比较, 以探讨可溶性胶原蛋白(SC)在古食谱研究中的可行性。三个峰中, 第二峰(保留时间在 17.5~27.5 min)峰形最为平缓, 表明其所含蛋白质的分子量不一致; 其各管提取物, 在 C 和 N 含量, C/N 摩尔比值上与 ISC 最为接近。基于以上发现, 可以看出, 第二峰提取物即为 SC。更为重要的是, 两种蛋白的 $\delta^{13}\text{C}$ 值和 $\delta^{15}\text{N}$ 值均相近。具体而言, C/N 摩尔比值落于正常范围的 SC, 与对应的 ISC 相比, $\delta^{13}\text{C}$ 差异的平均值仅为 $(0.3 \pm 0.2)\text{‰}$ ($N=2$), $\delta^{15}\text{N}$ 值大约相差 $(0.6 \pm 0.1)\text{‰}$ ($N=2$); 而 C/N 摩尔比值稍高于正常范围的 SC, 与对应的 ISC 相比, $\delta^{13}\text{C}$ 差的平均值也仅为 $(0.4 \pm 0.1)\text{‰}$ ($N=2$), $\delta^{15}\text{N}$ 值也约相差 $(0.3 \pm 0)\text{‰}$ ($N=2$)。这些差异, 远低于 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 值在食物链营养级之间的差异($\delta^{13}\text{C}$ 约为 1‰ ~ 1.5‰ , $\delta^{15}\text{N}$ 值约为 3‰ ~ 5‰), 表明 SC 与 ISC 具有相似的性质, 其 C 和 N 稳定同位素分析, 在古食谱研究中极具应用价值。

关键词可溶性胶原蛋白
不可溶性胶原蛋白
凝胶层析
稳定同位素分析

考古遗址出土人或动物骨中的胶原蛋白, 蕴含着其年代、种属、食物结构以及生存环境等丰富的“潜”信息(蔡莲珍和仇士华, 1984; 胡耀武等, 2000, 2008; 张雪莲等, 2003)。其中, 胶原蛋白的 C 和 N 稳定同位素分析, 可直接揭示该个体的食物结构, 了解

其主要食物来源和生存环境(管理等, 2007; Hu 等, 2009; 张国文等, 2010; 郭怡等, 2011; 侯亮亮等, 2012)。而作为稳定同位素分析的研究对象, 即古骨中的胶原蛋白, 对其的提取, 自始至终受到学者们的关注与重视(Hedges, 2002; Trueman 和 Martill, 2002;

中文引用格式: 王宁, 胡耀武, 侯亮亮, 等. 2014. 古骨可溶性胶原蛋白的提取及其重建古食谱的可行性分析. 中国科学: 地球科学, 44: 1854-1862

英文引用格式: Wang N, Hu Y W, Hou L L, et al. 2014. Extraction of soluble collagen and its feasibility in the palaeodietary research. Science China: Earth Sciences, 57: 1039-1047, doi: 10.1007/s11430-013-4776-1

Collins 等, 2002; Jørkov 等, 2007; Schweitzer 等, 2008).

人或动物骨中的胶原蛋白, 占骨中有机质的 90% 以上, 分子量约为 300 kD, 结构十分稳定, 在常温下不易溶于水和稀酸溶液. 然而, 生物体死亡、掩埋之后, 骨中的胶原蛋白, 在水、温度、微生物和土壤 pH 等因素的共同作用下, 将发生不同程度的降解或分解导致骨胶原丧失殆尽(胡耀武, 2002). 在此过程中, 骨中胶原蛋白中的大分子量、长肽链、不可溶性组分将逐渐减少, 而小分子量、短肽链、可溶性组分则相应增加, 使得骨中原有的不可溶性胶原蛋白转变为可溶性胶原蛋白. 目前, 在国际生物考古界, 主要采用明胶化法提取残留于骨中的不可溶性胶原蛋白(Jay 和 Richards, 2006). 即酸液充分脱钙后, 根据胶原蛋白在稀酸高温下溶解的特性, 将不可溶性胶原蛋白转变为酸可溶的明胶, 冷冻干燥获得胶原蛋白. 由上可以看出, 明胶化法的优势, 重在提取出性质相对稳定的不可溶性胶原蛋白. 然而, 在对多个考古遗址中人(动物)骨胶原的提取过程中, 我们发现, 明胶化法常常仅能得到少许胶原蛋白(胡耀武等, 2010), 甚至根本无法获得. 其原因主要是骨骼保存较差骨中的不可溶性胶原蛋白大量或全部转变为可溶性胶原蛋白, 在提取过程中往往随酸液废弃. 显然, 明胶化法对胶原蛋白的提取, 极大地限制了可分析样品的选择范围, 进而严重影响了对骨胶原“潜”信息的全面揭示.

如前所述, 明胶化提取过程中, 溶解于酸溶液的可溶性胶原蛋白, 通常和废液一起丢弃. 这类蛋白与明胶化提取的胶原蛋白相比, 其化学性质以及 C 和 N 稳定同位素比值究竟有何差异, 其是否也可作为稳定同位素分析的研究对象, 迄今为止, 国内外一直缺乏相应的研究. 为此, 本文尝试利用凝胶层析技术, 对考古遗址出土动物骨骼中酸溶物进行了提取和分离, 并分别测定了各分离物中的 C 和 N 含量及其稳定同位素比值, 从中成功地辨别出可溶性胶原蛋白;

此外, 还比较了可溶性与不可溶性胶原蛋白之间的 C 和 N 含量以及同位素比值, 探讨了可溶性胶原蛋白在古代食谱分析应用中的可行性.

1 材料和方法

1.1 样品概述

样品选自河南郑州小双桥遗址出土的动物骨骼(河南省文物研究所等, 1996, 2012), 2 例猪、1 例羊、1 例狗. 动物的年代为商代中期(距今约 3400 年). 样品的考古信息, 详见表 1.

1.2 实验仪器

蛋白质的明胶化法提取和凝胶层析分离工作, 在中国科学院古脊椎动物演化与人类起源重点实验室完成. 层析系统包括: QuikSep-50D 型双泵梯度中高压层析系统(H&E 公司), QuikSep UV-100D 型全波长紫外分光检测器(H&E 公司), QuikSep 中压层析系统专用色谱工作站(H&E 公司). 层析柱为 Vantage-L 型(Millipore 公司, 500 mm×16 mm), 填料为 Cellufine GCL-2000 型尺寸排阻凝胶(CHISSO 公司), 填充柱高为 360 mm, 直径为 16 mm, 柱温为室温.

提取物的 C 和 N 元素含量及 C 和 N 稳定同位素比值, 在中国农业科学院农业环境稳定同位素实验室(AESIL, CAAS)进行测定. 所用仪器为 Elementar Vario-Isoprime100 型稳定同位素质谱分析仪(Isoprime 100 IRMS coupled with Elementar Vario).

1.3 明胶化法提取不可溶性胶原蛋白

样品的处理程序, 依据 Jay 等(2006)的文章, 略作修改. 机械去除骨样内外表面的污染物后, 称取约 2 g, 4℃下浸于 0.5 mol L⁻¹ HCl, 每隔两天更换酸液, 直至骨样松软, 无明显气泡, 去离子水清洗至中性. 0.125 mol L⁻¹ NaOH 溶液浸泡 20 h, 去离子水洗至中

表 1 小双桥遗址骨样信息及不可溶性胶原蛋白的分析结果

样品编号	考古单位号	种属	部位	C(%)	N(%)	C/N	$\delta^{13}\text{C}(\text{‰})$	$\delta^{15}\text{N}(\text{‰})$	骨胶原得率(%)
Y	T97④层	羊	右胫骨	42.4	15.1	3.3	-15.2	7.2	1.0
G	T41 M20	狗	右肱骨	42.8	15.1	3.3	-15.5	9.2	1.3
Z1	T137③层	猪	左股骨	42.5	15.3	3.2	-10.8	8.2	1.5
Z2	T129 H98	猪	右胫骨	43.9	15.8	3.3	-10.6	8.3	1.1

性, 浸于 0.001 mol L^{-1} HCl 溶液 70°C 下加热 48 h, 趁热过滤, 滤液冷冻干燥得骨胶原固体, 收集并称重, 计算骨胶原得率(表 1)。

1.4 凝胶层析法分离提取可溶性胶原蛋白

依据 Ajle 等(1991)提取古骨中蛋白质的方法, 并稍加修改, 两例猪样品, 各分 3 份, 进行重复实验. 样品的实验室编号, 依次为: Y, G, Z1①, Z1②, Z1③, Z2①, Z2②, Z2③. 机械去除骨样内外表面的污染物, 碾磨称重 1 g, 于 4°C 置于 10 mL 的 20% 甲酸中浸泡 20 h, 3000 rpm 离心 10 min, 收集上清液, 4°C 下保存.

8 例样品的提取液, 分四批进行凝胶层析分离, 每次间隔约 24 h. 第 1 次为样品 Y 和 G, 离心后立刻上柱分离; 第 2 次为样品 Z1①和 Z1②, 上清液放置 24 h 后上柱分离; 第 3 次为样品 Z1③和 Z2①, 上清液放置 48 h 后上柱分离; 第 4 次为样品 Z2②和 Z2③, 上清液放置 72 h 后上柱分离.

20% 甲酸充分平衡层析柱, 取 5 mL 提取液, 上样, 超纯水洗脱(流速为 2 mL min^{-1}), 280 nm 处监测蛋白峰. 每管 5 mL 收集洗脱液, 冷冻干燥. 部分管未收集到任何物质. 各管收集物称重, 结果见表 2.

1.5 C 和 N 元素含量与稳定同位素测试

取少量每管提取物, 精确称重, 并测定其 C 和 N 含量及同位素比值. 测试 C 和 N 含量所用的标准物质为磺胺(Sulfanilamide). C 和 N 稳定同位素比值分别以 USGS 24 标定碳钢瓶气(以 PDB 为基准)和 IEAE-N-1 标定氮钢瓶气(以 AIR 为基准)为标准. 每测试 10 个样品, 中间插入 1 个实验室自制胶原蛋白标样($\delta^{13}\text{C}$ 值为 -14.7‰ , $\delta^{15}\text{N}$ 值为 6.7‰). 分析精度皆为 $\pm 0.2\text{‰}$, 测试结果以 $\delta^{13}\text{C}$ (相对于 PDB)、 $\delta^{15}\text{N}$ (相对于 AIR)表示, 详见表 1 和 2.

1.6 数据处理

运用 Origin8.0 和 SPSS15.0 软件对所测数据进行处理.

2 讨论与实验结果

2.1 凝胶层析图谱

图 1 为不同批次样品甲酸提取液的凝胶层析图谱. 为简单起见, 每批次仅以一个样品作为代表.

Cellufine GCL-2000 凝胶对分子量范围 3~3000 kD 内的高分子量蛋白质复合体具有较好的分离效果. 由图 1(a)可见, 经 Cellufine GCL-2000 凝胶层析后, 滤液出现三个紫外吸收峰, 其第一个吸收峰的保留时间介于 1~17 min, 最高峰出现于约 15 min 处; 相比于第一和第三峰, 第二个吸收峰不太明显, 较为平缓, 其保留时间介于 17~27 min; 第三个吸收峰强度极大, 其保留时间介于 27~50 min, 最高峰位于约 36 min 处. 而图 1(b)中, 前两个峰基本不见, 仅剩第三峰.

需要指出的是, 除处理时间有所不同外, 每次提取骨样中蛋白质的其余条件, 皆完全相同. 从图 1 不难看出, 样品在酸液中放置的时间越长, 提取的蛋白质含量和种类将越少. 显然, 这应与酸液提取物中蛋白质的不稳定密切相关. 因此, 确定适当的提取时间并及时上柱分离, 当是提取可溶性蛋白质的关键因素之一.

2.2 提取物的化学性质

为确定每个吸收峰的化学性质, 测定了每管固体样品的 C 和 N 元素含量、C/N 摩尔比值以及 C 和 N 稳定同位素值, 分别作图 2~4. 其中, X 轴为每管洗脱的保留时间, Y 轴则代表不同的测试值.

在图 2 中, 不同保留时间内分离出的物质, 显现出迥异的 C 和 N 含量. 在提取过程中, 分离物的 C 和 N 含量均呈现先逐渐升高、后急剧降低的规律, 即: 保留时间在 15~17.5 min(第 7 管)的第一峰提取物中, C 含量约为 25%, N 含量普遍低于 8.5%; 保留时间在 17.5~27.5 min(第 8~11 管)的第二峰提取物中, C 含量升高至 30%~40%左右, N 含量升高到 9%~14%左右; 而在保留时间在 27.5 min(第 12 管)以后的第三峰提取物中, C 和 N 含量均急剧降低, 分别低于 10%和 1%.

由图 3 还可以看出, 三个峰的 C/N 摩尔比值, 也存在极大的差异. 具体来说, 第一峰提取物中, C/N 摩尔比值平均约为 4 左右, 第二峰提取物的 C/N 摩尔比值略低, 而第三峰提取物的 C/N 摩尔比值则急剧升高, 达到数十甚至百倍以上.

另一方面, 根据不同峰提取物的 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 值, 还可进一步看出其性质之差异. 由图 4 可见, 其前两个峰(保留时间在 15~27.5 min)提取物的 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 值较为稳定; 第三峰(保留时间在 27.5 min 之后)提取物的 $\delta^{13}\text{C}$ 值, 均显著降低, $\delta^{15}\text{N}$ 值呈现不规则波动. 在部分管内甚至为负值, 这明显与样品的性质(动物)

表 2 凝胶层析法分离提取物的分析结果^{a)}

样品编号	管号	C(%)	N(%)	C/N	$\delta^{13}\text{C}(\text{‰})$	$\delta^{15}\text{N}(\text{‰})$	重量(mg)
Y	7	25.6	8.4	3.5	-16.1	7.3	3.7
	8	36.8	13	3.3	-15.6	8	1.5
	11	36.1	11.9	3.5	-15.8	7.6	3.8
	12	11	2.2	5.7	-17.4	6.8	10.5
	13	7.1	0.2	54.9	-21.7	4.6	208.3
	14	8.9	0.1	73.8	-21	-0.4	231.9
	15	9.7	0.1	94.3	-21.4	3.2	135.4
	16	8.7	0.4	23.1	-20.7	3.4	11.2
G	8	36.3	12.9	3.3	-15.6	9.8	3.2
	9	39.7	14.1	3.3	-15.6	9.9	3.3
	12	9.5	0.8	14.5	-20	9	27.8
	14	10.4	0.1	121.6	-21.3	8	100.3
	15	10.9	0.2	63.4	-21.2	4.4	31
Z1①	7	24.4	6.4	4.5	-12.8	8.2	5
	8	30.3	9.4	3.8	-11.6	8.3	3.8
	10	32.5	10.4	3.7	-10.7	8.6	4.8
	11	29.3	8.6	4	-11.6	8.6	4.6
	12	7.6	0.8	11.7	-17.6	7.3	32.7
	13	8.9	0.2	61.2	-21.3	3.1	198.5
	14	9.2	0.2	71.9	-20.3	4.2	181
	15	9.5	0.1	79.2	-22.1	0.5	123.5
	16	10.5	0.4	32.2	-20.8	4	5.1
Z1②	7	25.8	6.6	4.6	-12.7	8.3	4.2
	10	35.9	11.7	3.6	-10.4	8.4	4.3
	11	35.7	11.2	3.7	-10.5	8.7	4.2
	14	11.1	0.1	108.2	-21.5	8.5	261.7
	15	9.9	0.1	116	-21.7	2.3	197
	16	9.2	0.1	97.5	-21	2.7	45.1
Z1③	13	4.4	0.1	56.4	-21.6	5	115.5
	14	8.9	0.1	94.7	-22.1	5.2	204
	15	7.7	0.1	111.7	-21.2	-0.5	101.9
	16	10.1	0.1	90.6	-21.5	1.7	46.5
	17	8	0.3	37.2	-21.3	-2.3	5.3
Z2①	13	6.6	0.1	59.3	-20.8	2.2	47.3
	14	9.7	0.1	113.4	-21.2	0	118.2
	15	9.8	0.1	114.3	-21	-0.5	88.8
	16	8.3	0.1	74.3	-20.8	-2.5	29.4
Z2②	13	6.6	0.1	55	-20.9	2.7	81.1
	14	9.5	0.1	157.8	-22.2	2.8	228.1
	15	9.9	0.1	105.4	-21.4	6.4	152.1
	16	10.5	0.1	94.5	-21.6	1.1	44.1
Z2③	12	9.9	1.4	8.3	-15.5	7.8	7.9
	13	8	0.1	66.3	-20.2	3.3	113.6
	14	9.2	0.1	97.7	-21.8	-0.2	228.1
	15	10	0.1	116.9	-21.6	1.6	139.3
	16	8.4	0.2	65.6	-21.2	-2.4	19.1

a) 冷冻干燥后, 部分管内未收集到任何物质, 故未列于表中

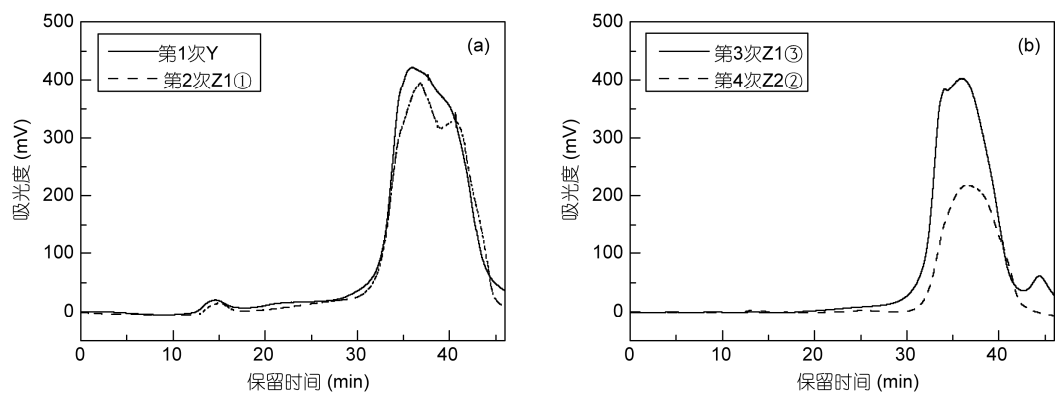


图 1 Cellulose GCL-2000 凝胶层析图谱

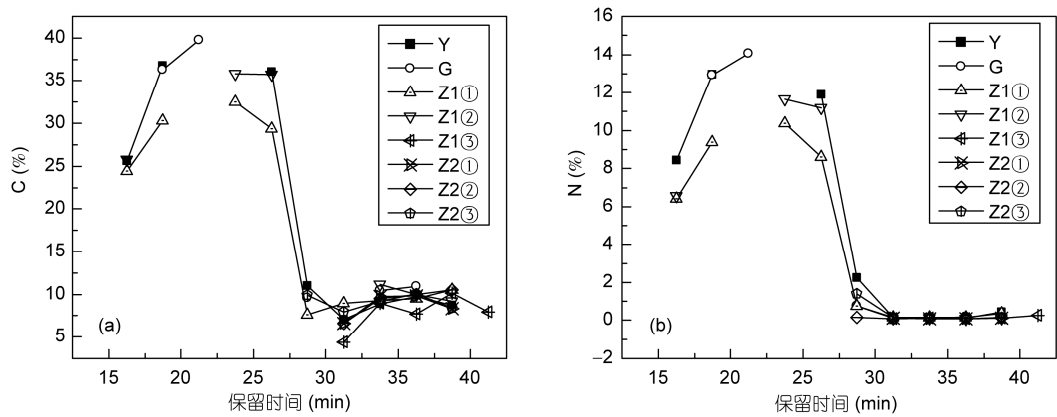


图 2 凝胶层析法提取物的 C 和 N 元素含量变化图

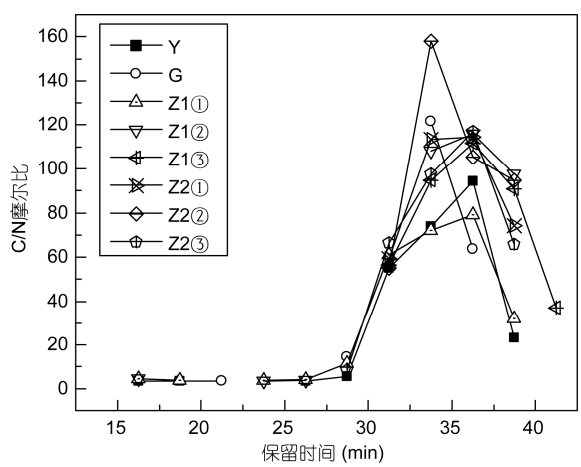


图 3 凝胶层析法提取物的 C/N 摩尔比变化图

不符, 推测为 N 含量过低, 致使同位素质谱仪测试误差太大, 超出了正常的测试范围。

综上所述, 通过凝胶层析分离所得的三种物质,

无论在 C 和 N 元素含量和 C/N 摩尔比值, 抑或 C 和 N 稳定同位素值, 均存在明显的差异, 说明其归属于不同的物质。

2.3 可溶性胶原蛋白峰的鉴别

由前言可知, 可溶性胶原蛋白的前身, 为骨中原有的不可溶性胶原蛋白。显然, 溶于酸溶液中、性质相对较为稳定的可溶性胶原蛋白, 其化学性质理应与不可溶性胶原蛋白相似。三个峰的提取物与各自明胶化法提取的不可溶性胶原蛋白的 C 和 N 含量、C/N 摩尔比值以及稳定同位素比值, 如表 3 所示。

现代胶原蛋白的 C 和 N 含量分别为 41% 和 15% 左右(Ambrose, 1990), C/N 摩尔比在 2.9~3.6 范围之内(DeNiro, 1985)。而古代骨中提取的不溶性胶原蛋白, 即便其 C 和 N 含量略有偏离, 但只要 C/N 摩尔比落在上述范围内, 仍然可视为保存较好的骨胶原, 可同样开展稳定同位素分析。基于这一原理, 由表 1 可以看出,

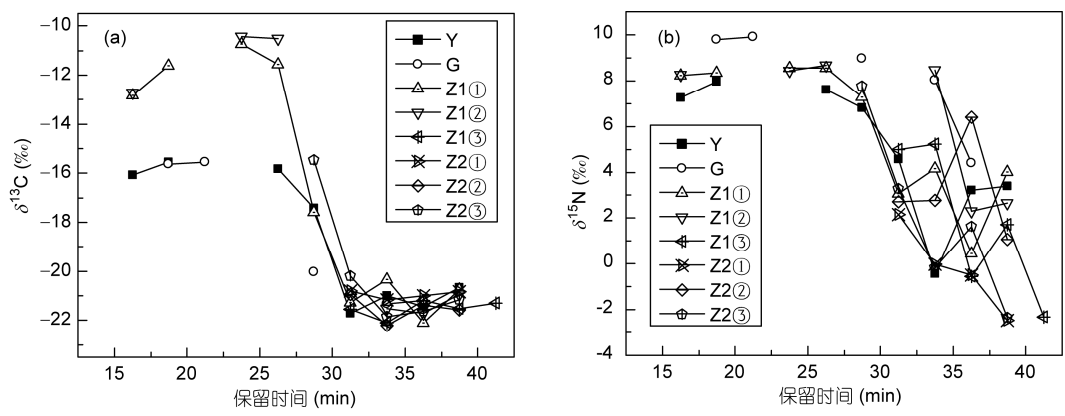


图 4 样品提取物 C 和 N 稳定同位素值变化图

所有 4 个动物样品经明胶化法提取的不可溶性胶原蛋白, 其 C 和 N 含量及 C/N 摩尔比值, 皆落于可接受的范围内, 应属未污染样品, 可用于稳定同位素分析。

在表 3 中, 相较于同一样品的不可溶性胶原蛋白, 所有样品第一峰提取物的 C 和 N 含量, 均明显偏低; 除 Y 样品外, 其余样品的 C/N 摩尔比值, 皆明显高于 3.6。此外, 两者之间的 $\delta^{13}\text{C}$ 值和 $\delta^{15}\text{N}$ 值, 平均差异分别为 1.6‰和 0.1‰($N=4$)。由以上数据可以看出, 第一峰提取物与不可溶性蛋白, 在化学性质上既存在一定的相似性, 但又不完全相同。此提取物的保留时间最短, 表明其分子量最大。根据其较低的 C 和 N 含量以及偏高的 C/N 摩尔比值, 推测该物质应主要为易溶于酸、高分子量的蛋白, 可能来源于土壤中混杂的各种杂蛋白以及少量的可溶性胶原蛋白。

在所有提取物中, 只有第二峰的提取物, 其 C 和 N 含量最高, 且最接近于同一样品的不可溶性胶原蛋

白。在 C/N 摩尔比值上, 第一批样品(Y 和 G), 完全落于未污染胶原蛋白的范围内(2.9~3.6), 第二批样品(Z1①和 Z1②), 也仅比正常范围值稍高。此外, 同一样品提取的不可溶性胶原蛋白与该提取物的 $\delta^{13}\text{C}$ 值和 $\delta^{15}\text{N}$ 值, 平均差异也仅为 $(0.3\pm 0.2)\text{‰}$ 和 $(0.5\pm 0.2)\text{‰}$ ($N=4$)。由此可以看出, 该提取物与不可溶性蛋白最为近似。另一方面, 该提取物具有较平缓的洗脱峰, 暗示该物质的分子量具有较大的变异区间, 表明其组成部分主要为长短不一的肽链, 也非常符合可溶性胶原蛋白的特点。据此我们推断, 第二峰的提取物, 即为可溶性胶原蛋白。此外, 我们还进一步测定了此峰的氨基酸组成(另撰文阐述), 也完全符合胶原蛋白的特征。

第三峰提取物的 C 和 N 含量, 均显著低于不可溶性胶原蛋白, 而且其 C/N 摩尔比, 也远远高于不可溶性胶原蛋白, 表现出明显的异常。该提取物的 $\delta^{13}\text{C}$

表 3 不同吸收峰提取物与不可溶性胶原蛋白的对比分析^{a)}

样品 编号	C(%)				N(%)				C/N 摩尔比值				$\delta^{13}\text{C}(\text{‰})$				$\delta^{15}\text{N}(\text{‰})$			
	吸收峰			不可溶 蛋白	吸收峰			不可溶 蛋白	吸收峰		不可溶 蛋白		吸收峰			不可溶 蛋白	吸收峰			不可溶 蛋白
	一	二	三		一	二	三		一	二	三		一	二	三		一	二	三	
Y	25.6	36.4	9.1	42.4	8.4	12.4	0.6	15.1	3.5	3.4	50.4	3.3	-16.1	-15.7	-20.4	-15.2	7.3	7.8	3.5	7.2
G		38.0	10.3	42.8		13.5	0.4	15.1		3.3	66.5	3.3		-15.6	-20.9	-15.5		9.8	7.1	9.2
Z1①	24.4	30.7	9.2	42.5	6.4	9.4	0.3	15.3	4.5	3.8	51.2	3.2	-12.8	-11.3	-20.4	-10.8	8.2	8.5	3.8	8.2
Z1②	25.8	35.8	10.1	42.5	6.6	11.4	0.1	15.3	4.6	3.7	107.2	3.2	-12.7	-10.5	-21.4	-10.8	8.3	8.5	4.5	8.2
Z1③			7.8	42.5			0.1	15.3			78.1	3.2			-21.5	-10.8			1.8	8.2
Z2①			8.6	43.9			0.1	15.8			90.3	3.3			-20.9	-10.6			-0.2	8.3
Z2②			9.1	43.9			0.1	15.8			103.2	3.3			-21.5	-10.6			3.2	8.3
Z2③			9.1	43.9			0.4	15.8			70.9	3.3			-20.1	-10.6			2.0	8.3

a) 样品 G 和 Z1③、Z2①、Z2②、Z2③的某些峰提取物因含量太低, 故未列于表中

值和 $\delta^{15}\text{N}$ 值,也与不可溶性胶原蛋白迥异.这些现象,均暗示其不可能为可溶性胶原蛋白.此外,该峰具有的最长保留时间,表明分子量在所有提取物中最小.该峰在280 nm的最强吸收,当缘自提取物所含嘌呤、嘧啶及核酸等物质的强烈干扰(王镜岩等, 2002).据此,我们认为,第三峰应为溶解于酸液、小分子量的混杂物,包括嘌呤、嘧啶及核酸等物质.

2.4 可溶性与不可溶性胶原蛋白的提取率比较

骨骼在埋藏过程中,受到湿度、温度及微生物等因素的影响,胶原蛋白会逐渐发生降解,致使采用明胶化法提取的不可溶性胶原蛋白的提取率常常较低,远低于现代蛋白(20%)(胡耀武等, 2005, 2010).为进一步比较可溶性与不可溶性胶原蛋白的提取率,作图5.

由图5可以明显看出,可溶性胶原蛋白的提取率,

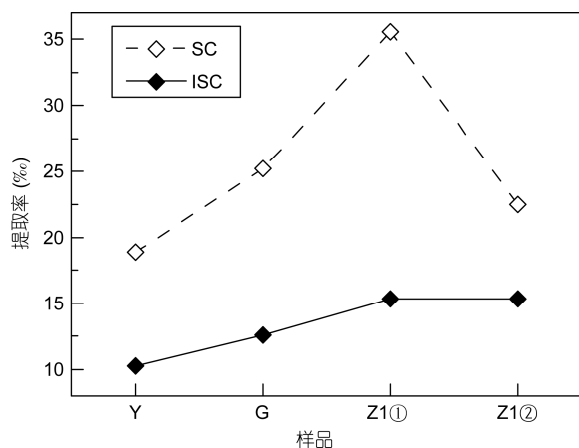
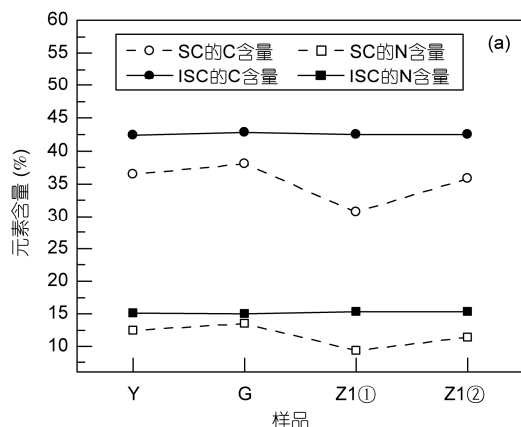


图5 可溶性与不可溶性胶原蛋白提取率对比图



皆高于相应的不可溶胶原蛋白.具体而言,明胶化法提取的不可溶性胶原蛋白,提取率在1.0%~1.5%,平均值为1.2%;而采用凝胶层析提取的可溶性胶原蛋白,其提取率在1.9%~3.6%,平均值为2.6%.显然,历经长期的埋藏过程,骨骼中原有的胶原蛋白大部分已经发生降解,由不可溶转变为可溶.因此,积极探索可溶性胶原蛋白作为古食谱研究对象的可能性,将具有非常重要的科学意义.另外,需要指出的是,同一样品Z1两次提取率的变化较大,可能与Z1②提取液放置时间较长导致可溶性蛋白更多降解有关.

2.5 可溶性与不可溶性胶原蛋白的C和N含量及稳定同位素比值比较分析

凝胶层析提取的可溶性胶原蛋白与明胶法提取的不可溶胶原蛋白,其C和N含量及稳定同位素比值之间究竟存在怎样的差异,是探索可溶性胶原蛋白能否得以应用的关键所在.

图6为两种胶原蛋白C和N含量及C/N摩尔比值的折线图.由图6(a)可见,不可溶胶原蛋白的C和N含量,皆高于可溶性胶原蛋白,显示出可溶性胶原蛋白不够稳定的特性.图6(b)中,第一批次样品(Y和G)中提得的可溶性胶原蛋白,其C/N摩尔比值,与不可溶胶原蛋白相近,皆满足未污染胶原蛋白的条件,即2.9~3.6范围之内.然而,随着提取时间的延长,第二批次样品(Z1①和Z1②)中可溶性胶原蛋白的C/N摩尔比值,则明显升高,且超出未污染胶原蛋白的范围.由上可以看出,可溶性胶原蛋白,在甲酸提取液的时间越长越容易降解,其中的N较之C更易流失.

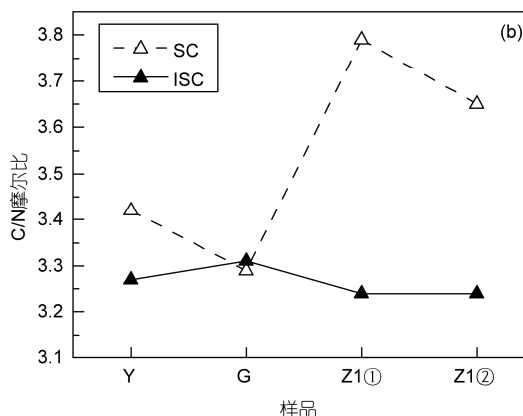


图6 可溶性与不可溶性胶原蛋白元素含量对比图

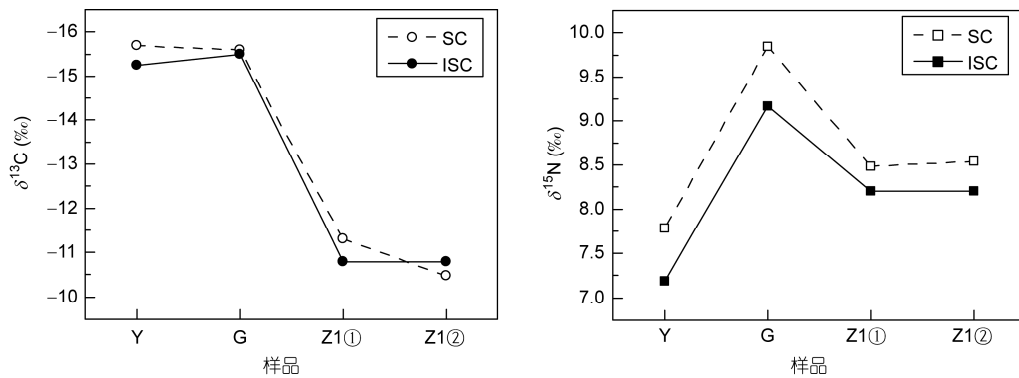


图 7 可溶性与非可溶性胶原蛋白 C 和 N 稳定同位素值对比图

图 7 为两种胶原蛋白 $\delta^{13}\text{C}$ 值和 $\delta^{15}\text{N}$ 值的比较折线图. 由图 7(a)可以看出, 第一批样品(Y 和 G), 两种胶原蛋白的 $\delta^{13}\text{C}$ 值非常相似, $\delta^{13}\text{C}$ 差的平均值仅为 $(0.3 \pm 0.2)\text{‰}$ ($N=2$); 尽管第二批样品(Z1①和 Z1②)提取的可溶性胶原蛋白不符合未污染样品的标准(具有稍高的 C/N 摩尔比值), 但 $\delta^{13}\text{C}$ 值仍与相应的不可溶性胶原蛋白相近. 在图 7b 中, 可溶性胶原蛋白的 $\delta^{15}\text{N}$ 值, 均略高于不可溶性胶原蛋白. 其中, 在第一批样品(Y 和 G), 两种胶原蛋白的 $\delta^{15}\text{N}$ 值, 大约相差 $(0.6 \pm 0.1)\text{‰}$ ($N=2$); 第二批样品的两种胶原蛋白, 约相差 $(0.3 \pm 0)\text{‰}$ ($N=2$).

本次实验表明, 无论样品 Y 和 G, 抑或样品 Z1①和 Z1②, 从中提取的两种胶原蛋白 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 值之间的差异, 仅略高于仪器的测量精度($\pm 0.2\text{‰}$), 而远低于同位素在食物链营养级之间的差异程度($\delta^{13}\text{C}$ 约为 $1\text{‰} \sim 1.5\text{‰}$, $\delta^{15}\text{N}$ 值约为 $2\text{‰} \sim 3\text{‰}$) (DeNiro, 1985; Ambrose, 1990). 这表明, 以可溶性胶原蛋白为研究对象, 开展稳定同位素分析, 原则上确实可行.

若进一步细究两种胶原蛋白在 C 和 N 稳定同位素之间的细微差异, 我们推测, 可能源于以下原因: (1). 可溶性胶原蛋白为不可溶胶原蛋白的降解产物, 含有多条肽链, 其氨基酸种类以及 C 和 N 含量与不可溶胶原蛋白之间存在一定差异(Hare 等, 1991; O'Connell 和 Hedges, 2001; Buckley 等, 2008); (2). 可溶性胶原蛋白中可能还混杂了分子量相近的其他蛋白. 为探明差异的具体原因, 我们已经开展了两种蛋白的氨基酸组成分析, 研究结果将另撰文进行讨论(王宁等, 2014).

2.6 可溶性胶原蛋白在古食谱研究中的应用前景

人类和动物的骨骼在长期的埋藏过程中, 常受

外界环境的影响而导致大部分的胶原蛋白降解或分解, 致使明胶化法往往难以提得可靠、足量的胶原蛋白(胡耀武等, 2010), 从而严重地限制了古食谱的研究范围, 未能充分发掘蕴含于骨骼中的“潜”信息.

本文的研究结果证明, 采用凝胶层析法提取出的可溶性胶原蛋白, 其 C 和 N 含量及 C/N 摩尔比值, 皆满足未受污染样品的判断标准. 更重要的是, 可溶性胶原蛋白的 $\delta^{13}\text{C}$ 值和 $\delta^{15}\text{N}$ 值, 与不可溶性胶原蛋白相近. 这表明, 在样品保存较差导致不可溶性胶原蛋白不易获得的情况下, 还可望通过可溶性胶原蛋白的提取和 C 和 N 稳定同位素分析, 开展古食谱研究. 显然, 大力加强可溶性胶原蛋白的研究与分析, 将对拓展分析样品的选择范围、推动古食谱研究工作的深入开展具有极其重要的理论和实际意义.

3 结论

本文分别利用凝胶层析法和明胶化法, 提取了古代动物骨中的可溶性和不可溶性胶原蛋白, 并分析比较了两者的 C 和 N 含量以及 C 和 N 稳定同位素值, 其结果表明:

(1) 凝胶层析可将古骨的酸提取液分为 3 个峰, 其中第二个峰的提取物为可溶性胶原蛋白.

(2) 可溶性胶原蛋白的 C 和 N 元素含量, 略低于不可溶性胶原蛋白, 而 C/N 摩尔比略高于不可溶性胶原蛋白.

(3) 可溶性与不可溶性胶原蛋白的 $\delta^{13}\text{C}$ 值和 $\delta^{15}\text{N}$ 值, 非常相近, 暗示: 可溶性胶原蛋白, 同样可望应用于古食谱分析.

尽管可溶性胶原蛋白具有很大的应用潜力, 但

不可否认的是,与不可溶性胶原蛋白相比,其性质不够稳定. 我们的研究表明,酸处理时间过长,将会显著降低胶原蛋白的含量,导致 N 的大量流失. 由此,针对不同样品的保持状况,确定适当的酸浓度、提取

时间并及时上柱分离可溶性胶原蛋白,将是今后研究的重点. 此外,可溶性与不可溶性胶原蛋白之间更多化学性质的差异,如单体氨基酸同位素、H 和 O 同位素等,仍需今后进一步研究.

致谢 中国科学院大学人文学院科技史与科技考古系老师和同学在论文写作过程中给予指导,中国社会科学院考古研究所吕鹏在动物骨骼鉴定过程给予帮助,中国科学院脊椎动物演化与人类起源重点实验室工作人员在实验过程中提供大力支持,评审专家提出宝贵意见,在此一并表示感谢.

参考文献

- 蔡莲珍,仇士华. 1984. 碳十三测定和古代食谱研究. 考古, 10: 949-955
- 管理,胡耀武,汤卓炜,等. 2007. 通化万发拨子遗址猪骨的 C、N 稳定同位素分析. 科学通报, 52: 1678-1680
- 郭怡,胡耀武,朱俊英,等. 2011. 青龙泉遗址人和猪骨的 C、N 稳定同位素分析. 中国科学: 地球科学, 41: 52-60
- 河南省文物考古研究所,郑州大学文博学院考古系,南开大学历史系博物馆学专业. 1996. 1995 年郑州小双桥遗址发掘报告. 华夏考古, (3): 1-23
- 河南省文物考古研究所. 2012. 郑州小双桥: 1990-2000 年考古发掘报告. 北京: 科学出版社
- 侯亮亮,王宁,吕鹏,等. 2012. 申明铺遗址战国至两汉先民食物结构和农业经济的转变. 中国科学: 地球科学, 42: 1018-1025
- 胡耀武, Richards M P, 刘武,等. 2008. 骨化学分析在古人类食物结构演化研究中的应用. 地球科学进展, 23: 228-235
- 胡耀武,何德亮,董豫,等. 2005. 山东滕州西公桥遗址人骨的稳定同位素分析. 第四纪研究, 25: 561-567
- 胡耀武,李法军,王昌燧,等. 2010. 广东湛江鲤鱼墩遗址人骨的 C、N 稳定同位素分析: 华南新石器时代先民生活方式初探. 人类学学报, 29: 264-269
- 胡耀武,杨学明,王昌燧. 2000. 古代人类食谱研究现状. 见: 王昌燧,左键,主编. 科技考古论丛(第 2 辑). 合肥: 中国科学技术大学出版社. 51-58
- 胡耀武. 2002. 古代人类食谱及相关研究. 博士学位论文. 合肥: 中国科学技术大学, 15-16
- 王镜岩,朱圣庚,徐长法. 2002. 生物化学(第 3 版). 北京: 高等教育出版社. 507-508
- 王宁,胡耀武,宋国定,等. 2014. 古骨中可溶性、不可溶性胶原蛋白的氨基酸组成和 C、N 稳定同位素比较分析. 第四纪研究, 34: 204-211
- 张国文,胡耀武,裴德明,等. 2010. 大同南郊北魏墓群人骨的稳定同位素分析. 南方文物, 1: 127-131
- 张雪莲,王金霞,冼自强,等. 2003. 古人类食物结构研究. 考古, 2: 62-75
- Ajle H O, Hauschka P V, Kaplan I R, et al. 1991. Comparison of bone collagen and osteocalcin for determination of radiocarbon ages and paleodietary reconstruction. Earth Planet Sci Lett, 107: 380-388
- Ambrose S H. 1990. Preparation and characterization of bone and tooth collagen for isotopic analysis. J Archaeol Sci, 17: 431-451
- Buckley M, Anderung C, Penkman K, et al. 2008. Comparing the survival of osteocalcin and mtDNA in archaeological bone from four European sites. J Archaeol Sci, 35: 1756-1764
- Collins M J, Nielsen-Marsh C M, Hiller J, et al. 2002. The survival of organic matter in bone: A review. Archaeometry, 44: 383-394
- DeNiro M J. 1985. Post-mortem preservation of alteration of in vivo bone collagen isotope ratios in relation to paleodietary reconstruction. Nature, 317: 806-809
- Hare P E, Fogel M L, Stafford J T W, et al. 1991. The isotopic composition of carbon and nitrogen in individual amino acids isolated from modern and fossil proteins. J Archaeol Sci, 18: 277-292
- Hedges R E M. 2002. Bone diagenesis: An overview of processes. Archaeometry, 44: 319-328
- Hu Y W, Shang H, Tong H W, et al. 2009. Stable isotope dietary analysis of the Tianyuan 1 early modern human. Proc Natl Acad Sci USA, 106: 10971-10974
- Jay M, Richards M P. 2006. Diet in the Iron Age cemetery population at Wetwang Slack, East Yorkshire, UK: carbon and nitrogen stable isotope evidence. J Archaeol Sci, 33: 653-662
- Jørkov M L S, Heinemeier J, Lynnerup N, et al. 2007. Evaluating bone collagen extraction methods for stable isotope analysis in dietary studies. J Archaeol Sci, 34: 1824-1829
- O'Connell T C, Hedges R E M. 2001. Isolation and isotopic analysis of individual amino acids from archaeological bone collagen: A new method using RP-HPLC. Archaeometry, 43: 421-438
- Schweitzer M H, Avci R, Collier T, et al. 2008. Microscopic, chemical and molecular methods for examining fossil preservation. C R Palevol, 7: 159-184
- Trueman C N, Martill D M. 2002. The long-term survival of bone: The role of bioerosion. Archaeometry, 44: 371-382