

古 DNA 证据支持曹操的父系遗传类型 属于单倍群 O2

文少卿¹, 王传超¹, 敖雪¹, 韦兰海¹, 佟欣竹¹, 王凌翔¹,
王占峰², 韩昇¹, 李辉^{1*}

1. 复旦大学生命科学学院遗传工程国家重点实验室, 现代人类学教育部重点实验室, 上海 200433;

2. 亳州博物馆, 安徽亳州 236800

摘要: 人类 Y 染色体是研究父系血缘的最佳材料。得益于近年来二代测序技术的发展, 以及本实验室在东亚范围内大规模的遗传调查, 我们获得了大量具有区分力的 Y 染色体新遗传标记, 并构建了约 20 万份含有 Y-STR 和 Y-SNP 信息的遗传数据库, 从而可以根据 Y-STR 单倍型推断出需要测试的样本的单倍群归属。因此, 我们可以有针对性地选择较少的 SNP 组成“微检版”(mini-panel) 去确定样本的真实遗传类型。本次对元宝坑一号墓曹操叔祖父曹鼎古 DNA 实验, 证明曹操及其后人的遗传类型属于 O2-M268+, F1462+, PK4-, 弥补了之前通过现代人家系推测曹操遗传类型和 Y-STR 推测 Y-SNP 的缺陷。这一技术改进将使历史人类学的研究工具更加完善和有效。

关键词: 曹操; 古 DNA; Y 染色体; SNaPshot; 父系遗传谱系

中图分类号: Q987; **文献标识码:** A; **文章编号:** 1000-3193(2016)04-0617-09

Ancient DNA supports Emperor Cao's paternal genetic lineage belonging to haplogroup O2

WEN Shaoqing¹, WANG Chuanchao¹, AO Xue¹, WEI Lanhai¹, TONG Xinzhu¹,
WANG Lingxiang¹, WANG ZhanFeng², HAN Sheng¹, LI Hui¹

1. State Key Laboratory of Genetic Engineering and MOE Key Laboratory of Contemporary Anthropology, School of Life Sciences and Department of History, Fudan University, Shanghai, China. 2. Museum of Bozhou, Bozhou, Anhui, China.

Abstract: With recent advances in next generation sequencing technologies and significant genetic investigations carried out by our team in East Asia for years, we have identified thousands

收稿日期: 2014-11-28; 定稿日期: 2015-03-14

基金项目: 国家自然科学基金委优秀青年基金 (31222030), 国家自然科学基金委 (31071098, 91131002), 上海市启明星计划 (12QA1400300), 教育部重大项目 (311016), 复旦大学文科科研推进计划, 上海市教委科研创新重点项目 (11zz04), 上海人才发展资金 (2010001)

作者简介: 文少卿 (1982-), 男, 博士, 主要从事历史人类学研究。E-mail: wenshaoqing1982@gmail.com

通讯作者: 李辉, E-mail: lihui.fudan@gmail.com

Citation: Wen SQ, Wang CC, Ao X, et al. Ancient DNA supports Emperor Cao's paternal genetic lineage belonging to haplogroup O2[J]. Acta Anthropologica Sinica, 2016, 35(4): 617-625

of new informative markers and constructed a genetic database of about 200,000 individuals containing Y-STR and Y-SNP information. From this detail we can predict the haplogroups samples belong to by using Y-STR haplotypes. So, we can select fewer SNPs to form a mini-panel so as to determine the actual genetic lineage of the subject. Here, we tested the ancient DNA of Emperor CAO Cao's grand uncle (CAO Ding) buried in Yuanbaokeng I, compensating the shortcoming of the genetic lineage of CAO Cao inferred by those of his present descendants and the Y chromosomal haplogroups inferred by Y-STR haplotypes in previous research. The results showed that the paternal genetic lineage of CAO Cao and their descendants is O2-M268+, F1462+, PK4-.

Key words: Cao Cao; Ancient DNA; Y chromosome; SNaPshot; Paternal genetic lineage

1 引 言

分子人类学是分子生物学和人类学交叉产生的新兴学科,也是人类学内最有前景和迅速发展的领域之一^[1]。分子人类学借助分子生物学、基因组学、分子进化和群体遗传的基本方法,与文化人类学(如语言学、民族学、历史学、考古学、民俗学等)发生学科交叉,具有自然学科和人文学科的多重魅力。分子人类学中的古DNA研究,即从古代样本中直接获取遗传信息,为分子人类学领域最重要的研究方向之一^[2]。近年来,随着实验技术的发展,古DNA的研究取得了一系列突破性成果,为研究人类起源与迁徙、文明传播与对撞、重大历史事件与历史悬案提供了全新的视角与方法。2008年尼安德特人线粒体全序列的公布^[3];2010年尼安德特人^[4]和丹尼索瓦人基因组^[5]草图的问世;2012年以来,基于文库构建技术的改进,高质量丹尼索瓦人^[6]和尼安德特人^[7]基因组的获得,极大地丰富了我们对于现代人与早期智人之间遗传关系的认识。2010年从考斯顿克遗骸中获取了3万年前早期现代人的线粒体全序列^[8];2013年从田园洞遗骸中捕获了4万年前早期现代人的21号染色体序列^[9];2014年三个重要的早期现代人(1.3万年前北美安仔克婴孩^[10]、2.4万年前西伯利亚马尔他男孩^[11]和4.5万年前西伯利亚乌斯伊希姆的一个男性个体^[12])基因组序列的相继发表,以及格陵兰岛遗骸^[13]、美洲土著^[14]、澳洲土著^[15]、埃及木乃伊^[16]和奥茨冰人^[17]的古代序列,极大地帮助我们理解了早期现代人扩散的过程以及各地的史前人口历史。另一方面,2014年Olalde I等测试了一个疑似装有含法国国王路易十六(1754-1793)血样的手帕的葫芦中所含的全基因组,他们发现,根据所获得的数据来推断的祖先和表型与历史记载不符^[18],否定了葫芦内所含血样属于路易十六,该研究为破解历史悬案提供了有力的证据。

Y染色体为男性所特有,95%为非重组区域(MSY),这一性质保证了其能够严格的父子传递。相对于其他标记,Y染色体具有较小的有效群体大小、较稳定的突变速率、较充足的标记个数和人群特异性分布,这些特点使得Y染色体成为研究人类进化和迁徙最有力的工具之一^[19]。近年来随着古DNA技术的进展,获取古代遗骸的Y染色体序列成为了可能,其中安仔克婴孩属于单倍群Q-L54*^[10],马尔他男孩属于单倍群R^[11],西西

伯利亚乌斯伊希姆人属于单倍群 K(xLT)^[12]，古爱斯基摩人属于单倍群 Q1a-MEH2^[13]，中石器时代欧洲人属于单倍群 C6^[20]，瑞典游猎人属于单倍群 I2a1^[21]。另外，成功使用 Y 染色体研究历史家族关系疑案和名人遗传类型归属的案例也颇多，比如美国第三任总统托马斯·杰斐逊私生子的认定^[22]，犹太祭司^[23]、成吉思汗^[24-25]和路易十六^[26-28]遗传类型的推断等。

复旦大学现代人类学教育部重点实验室从 2009 年开始对曹操的遗传类型归属展开了系统地调查，分别从曹操可能存在的后人家系^[29]和曹氏宗族墓群中曹操的叔祖父——曹鼎遗骸^[30]两方面入手，论证曹操的父系 Y 染色体类型极有可能为 O2*-M268。根据曹操后人家系的测试结果，反推单倍群 O2*-M268 为曹操所属类型的可能性是 92.71%；根据古代样本 Y 染色体 12 个 STR 位点的测试结果，利用基于贝叶斯等位基因频率法的数据库，推测曹鼎属于 O2*-M268+, PK4-, M176- 的概率为 60.18%，属于单倍群 C3*-M217 的概率为 13.97%，属于其他单倍群的概率均低于 11%^[30]。基于上述两方面的证据，我们基本可以锁定曹操本人的遗传类型。但是，一方面，根据 Y-STR 数据推测 Y-SNP 类型存在一定偏差，比如单倍群 L 和 O3a2c1、O1a 和 N、O3a1c 和 O3a2b 下存在相似的单倍型，这些相似性会降低预测的准确度^[31]；另一方面，由于本实验室积累和分析了大量现代人 Y 染色体测序数据，共获得了约 3 万个新 SNP 标记^[32-33]。这些 F- 新位点（以复旦大学首字母命名）极大地提高了 Y 染色体谱系的精度，为我们进一步确定曹操属于单倍群 O2*-M268 下的哪一个亚群，进而提高分析的精确度提供了一个绝佳的机会。因此，考虑到课题的完备性和延续性，我们有必要对元宝坑中曹鼎的牙齿样本进行后续的古 DNA 下游分型工作。

2 材料和方法

2.1 样本来源与 DNA 提取

位于安徽省亳州市的曹氏宗族墓群是一个规模宏大的属于曹操家族的墓群，主要包括元宝坑汉墓、董园汉墓、马园汉墓、袁牌坊汉墓、曹四孤堆、刘园孤堆、观音山孤堆等。其中元宝坑一号墓出土了许多铭文字砖，我们依据这些铭砖材料和牙齿的磨损度^[34]，推断其墓主最可能是曹腾之弟、曹操叔祖曹鼎。因此，我们选取其中一枚牙齿进行了后续的古 DNA 实验（见图 1A）。本次实验严格按照古 DNA 研究的操作规范^[35]对样本进行处理：①去污染预处理，②样品的钻孔取粉，③ DNA 抽提沿用本实验室之前成熟运用的硅胶吸附法^[36,37]。

2.2 Y-SNP 挑选策略和 mini-panel 设计

国际遗传谱系学会 (<http://isogg.org>) 和 ftDNA (<http://ytree.ftdna.com/>) 的最新 O2 谱系树均缺乏对 O2*-M268 具有分辨力的标记。因此，我们参考了东亚现代人 O2 单倍群下的个体^[32]和曹操后人家系的 Y 染色体测序数据，确定 F1462+ 为曹操后人所共有的突变。考虑到之前的研究^[38]，我们所推断的曹操后代中长沙以及舒城的少数几例 O2*-M268 曹姓为 O2a*-PK4+，因此 PK4 位点也被选择在内。由此，我们根据 O2*-M268 的拓扑关系，

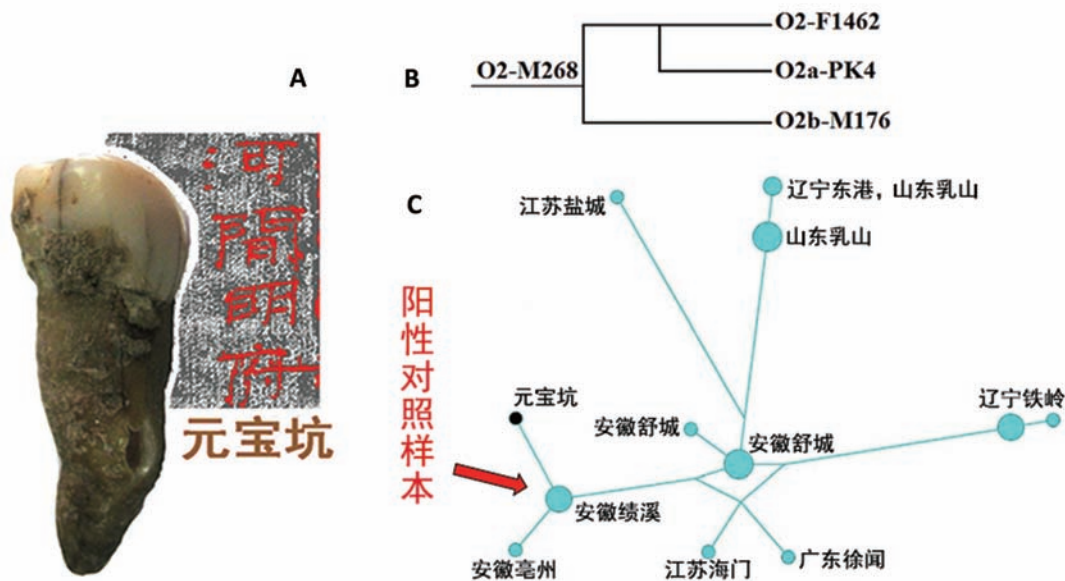


图 1 实验材料和 O2 谱系树的基本信息
Fig.1 Information on the samples and phylogeny of haplogroup O2

挑选了 M268、F1462、M176 和 PK4 四个位点，见图 1B。

SNaPshot 技术通过多重 PCR 反应，可以实现一次检测多个位点，又由于运用了微测序原理，其分型准确度也较高。SNaPshot Panel 已经被本实验室成功运用于东亚多个现代族群的研究课题中^[39-41]，通过各 Panel 之间的挑选和组合对人群样本 DNA 进行分型测试已成为最常用的分型方法。基于本实验自主开发的含有 20 万东亚现代人 Y 染色体遗传数据库，我们能够通过古 DNA 的 Y-STR 数据大致预测该样本的 Y-SNP 归属。因此，只需要从各个 panel 中挑选少数个位点组成 mini-panel，就可以达到分型目的。我们先通过 Primer Premier 5 软件分别设计 4 个位点的 PCR 引物，再用 AutoDimer 软件进行重新分析以避免潜在的二级结构。4 条延伸引物亦被 AutoDimer 软件设计，且通过增加 Poly(dT) 控制引物长度。本次实验含有 4 个位点的 mini-panel 的多重 PCR 引物和单碱基延伸引物的信息（表 1）。

2.3 SNaPshot 分型测试

具体实验步骤为：

1) PCR 扩增：10μl 的 PCR 体系包括 4.05μl dd H₂O，1.5μl 10× Buffer 含 Mg²⁺ (Roche)，1.5μl dNTP，0.8 μl 扩增引物混合液，0.15μl Fast Tag (Roche) 和 2μl DNA 抽提液。PCR 程序：95℃ 预变性 15min，11 个循环 (94℃ 30sec，66℃ (-0.5℃) 50sec，72℃ 45sec)，34 个循环 (94℃ 30sec，61℃ 50sec，72℃ 45sec)，72℃ 延伸 10min，5μl 的 PCR 产物在 2% 琼脂糖凝胶上电泳。

2) 产物纯化：在 PCR 扩增产物中加入 0.4μl 外切酶 (Exonuclease I, 5U/μl) 和 2μl

表 1 单倍群 O2 微检版的基本信息

Tab.1 Information on SNP markers included in the mini-panel of haplogroup O2

SNP	物理位置 (hg19)	突变	PCR引物	延伸引物
M268	22739301	A->G	FOR ATCTCCAAAACACGTCGGATTGT REV TCATTCCCCTTCTATTGTGATACCA	TTTTTTCATGCCTAGCCTCATTCCTCTA- AAAT
F1462	8910408	T->C	FOR TCCATAATGCTGTCTTGAAACCTG REV GGGTTACCTCAGTACTTATGGGTG	GTTGTTATATTTGTATAGTGGATGGTAT
M176	2655180	G->A	FOR GCGGTAAGTGGCCTAGCTGGTGC REV TGCTGCCGAAGAATTGCAGTTTGC	TTTTTTTTGTACAACCTGTTGCCAGTTG- CACTTC
PK4	21285962	A->T	FOR CCAGAGCCTGAGGCTGGAAAGAAA REV ATACCACAAAGCACTCCAACAAAAGG	TTTTTCCATAGTAACCTGTTGATGAAACC

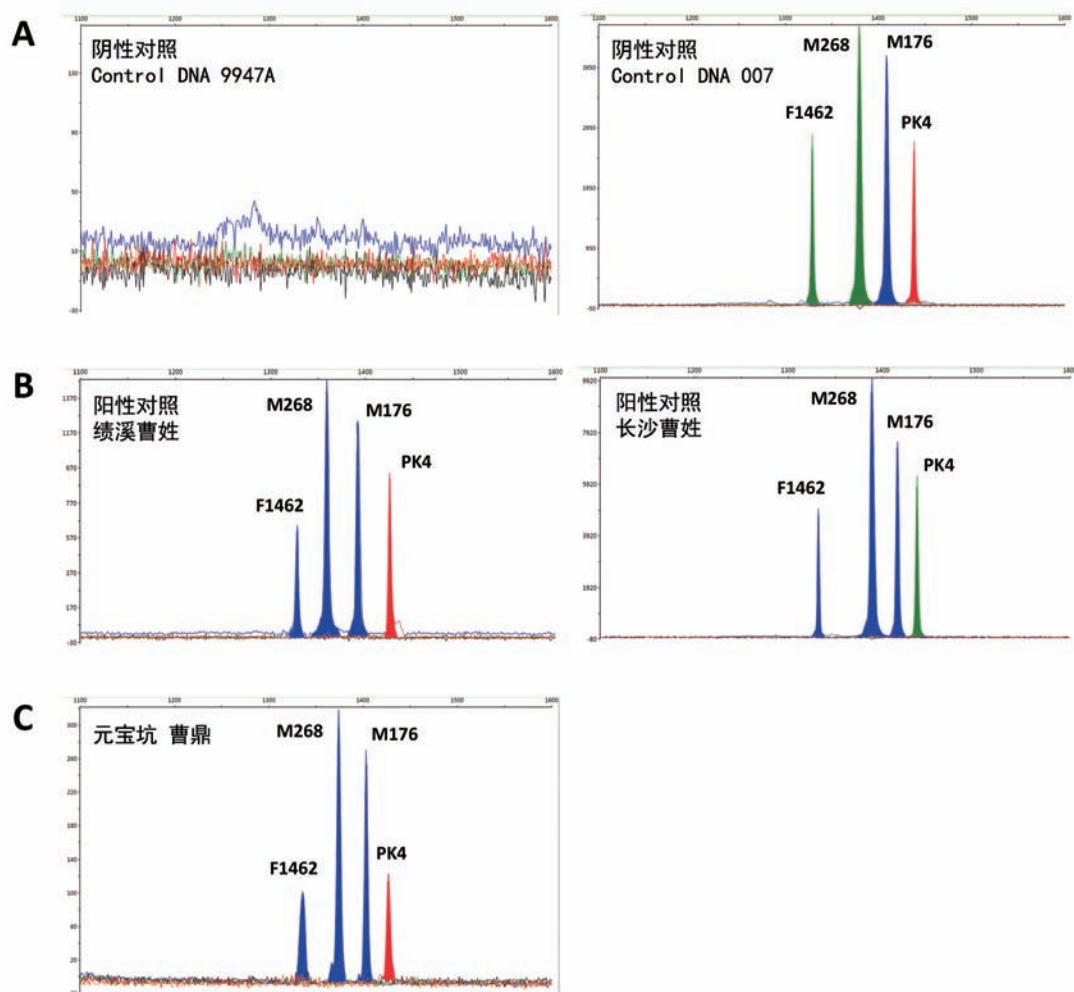


图 2 曹鼎牙齿样本和不同对照组的 SNaPshot 分型结果

Fig.2 Results from a Snapshot assay of CAO Ding's teeth sample and control groups

虾碱酶 (phosphatase alkaline shrimp, 1U/ μ l, Roche), 反应体系混匀后, 37 $^{\circ}$ C 60min, 85 $^{\circ}$ C 15min, 4 $^{\circ}$ C 保存。

3) 单碱基延伸反应: 6.5 μ l 的 PCR 体系包括 2.4 μ l dd H₂O, 1 μ l SNaPshot MutiPlex(ABI), 1.2 μ l 5 \times 测序缓冲液, 0.4 μ l 延伸引物混合物和 1 μ l 多重 PCR 纯化产物。延伸反应程序: 96 $^{\circ}$ C 预变性 1min, 28 个循环 (96 $^{\circ}$ C 10sec, 52 $^{\circ}$ C 5sec, 60 $^{\circ}$ C 30sec)。单碱基延伸后的产物中加入 1 μ l SAP 纯化, 37 $^{\circ}$ C 60min, 85 $^{\circ}$ C 15min, 结束后 4 $^{\circ}$ C 保存。

4) 毛细管电泳检测: 取 1 μ l 纯化的延伸反应产物, 加入 0.2 μ l GeneScan-120 Liz Size Standard (ABI) 和 8.8 μ l DNA 甲酰胺 (Hi-Di Formamide), 总体积 10 μ l/ 孔, 混匀后将变性产物在 ABI3730XL 测序仪上上样, 进行基因分型, 运行 GeneScan V4.0 分析实验结果。

2.4 SNaPshot 分型体系防污染策略

为了确保实验的准确性和防止污染, 除了常规的空白对照, 我们设立了阴性和阳性对照, 阳性对照的 SNaPshot 分型测试在现代 DNA 实验室 (与古 DNA 实验室隔离) 中进行。其中的阳性对照为一个长沙曹姓男性 O2-M268+, F1462+, PK4+ 样本, 一个绩溪曹姓男性 O2-M268+, F1462+, PK4- 样本 (与曹鼎遗传关系极近, 见图 1C), 阴性对照为 AmpFISTR Yfiler PCR 扩增试剂盒 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) 中的 AmpFISTR[®] Control DNA 007 对照, 因为我们已知其为 R1b, 属于 M268-, F1462-, PK4-, M176-, 另外, 取 AmpFISTR[®] Control DNA 9947A (女性) 为阴性对照。

3 结 果

根据图 2 的 SNaPshot 分型结果, 我们可以发现阴性对照组 (图 2A) 中, Control DNA 9947A 无峰值, Control DNA 007 为 M268-, F1462-, PK4-, M176-; 阳性对照 (图 2B) 中, 长沙曹姓男性 O2-M268+, F1462+, PK4+, M176- 样本和绩溪曹姓男性 O2-M268+, F1462+, PK4-, M176- 样本的分型结果与预期的一致。说明 SNaPshot 分型体系非常准确。另外, 空白对照中也没有发现污染, 经过三次重复实验得出 (图 2C) 元宝坑 1 号墓曹鼎的遗传类型为 **O2-M268+, F1462+, PK4-**。

4 讨 论

4.1 曹操的遗传类型为 O2-M268+, F1462+, PK4-

本次元宝坑曹鼎遗骸的古 DNA 分型结果为 O2-M268+, F1462+, PK4-, 支持了之前根据曹操可能后人的家系^[29]和 Y-STR 推测^[30]的结果。另外, 我们根据曹氏后代的二代测序结果, 在古 DNA 层面证实了曹鼎的亚单倍群所属, 即 F1462 为曹操及其后人所共有的突变。长沙以及舒城的少数几例 O2-M268+, F1462+, PK4+ 的曹氏后人与曹操无遗传关系。

4.2 基于 Y 染色体 STR 单倍型推测 SNP 的可行性

由于利用 Y-STR 单倍型推断 SNP 归属经济有效，吸引了不少学者的关注，如 Vadim Urasin 开发的 YPredictor (<http://predictor.ydna.ru/>)，Whit Athey 推出的 haplogroup predictor (<http://www.hprg.com/hapest5/>)^[42]，以及亚利桑那大学的 haplogroup classifier^[43]，这些单倍型预测单倍群的方法也被广泛用于大规模人群分型测试的质量控制中^[44]。但是，由于上述数据库供于比对的遗传信息均为欧洲人群，因而在预测东亚人群单倍群时效力较低。本实验室自主开发的数据库克服了这些方法的不足。本次古 DNA 实验证实了通过 Y-STR 单倍型预测古代人 Y 染色体遗传类型归属也是可行的。

4.3 微检版 (mini-panel) 的应用

SNaPshot 技术在本实验室对现代人群的大规模分型测试中业已成熟，积累了大量的有明确 Y-STR 和 Y-SNP 信息的 DNA 样本。基于这些遗传样本，一旦我们测试出古 DNA 的 Y-STR 样本就可以比对出该古 DNA 样本的 Y 染色体单倍群大致所属，从而可以选择性的组合出微检版做验证性实验，这一过程的优势是较少的测试位点可以减少引物之间的干扰，大大缩短了优化 panel 的时间，节省了实验样本，使测试的目标更为明确。另外，这些有着明确单倍群分型信息的现代人 DNA 样本，也是我们用于检测古 DNA SNaPshot 体系严密性的绝好的阳性对照。但是使用阳性对照时务必注意现代人 DNA 和古 DNA 实验环境要绝对隔离，本实验采取的策略是古 DNA 和现代人 DNA 在专门的实验室由不同实验人员分别进行测试，且在古 DNA 实验室的操作人员为女性。

SNaPshot 技术又名微测序，基于荧光标记单碱基延伸原理。但是 SNaPshot 技术确实存在测序通量的问题，虽然理论上可以同时测试至 40 个位点，但古 DNA 实际应用时发现，在超过 10 个位点时，可能受引物之间、DNA 损伤和抑制剂的影响而效果不佳，所以我们设计一个古 DNA 检验版时位点数控制在 10 个左右。

虽然持有测序取代分型的观点的研究者日益增多，但是在研究群体水平的大规模样本时，我们认为 SNaPshot 分型技术还是有着一定的价值，比如可以粗筛出属于我们感兴趣的单倍群的样本以便进一步的高通量测序实验。

4.4 展望

本次对于曹操祖先和曹姓家族 Y 染色体调查是分子人类学与历史学深层次合作研究的一次尝试，探索以分子生物学为主要工具研究历史学的一些具体问题。一方面，本次研究的研究成果调动了大众对于人类学研究的关注和热情，这对于人类学在我国的发展是有积极意义的；另一方面，改变了历史学界对于人类学的认识，也许今后会有更多的历史研究者希望利用分子人类学的方法去解决重大的历史疑案：如秦始皇是不是吕不韦的私生子，乾隆是否从海宁陈家抱养而来等。另外，随着研究 Y 染色体遗传谱系精度的需求，人类父系遗传的调查对象必然会发生从民族向家庭的转变。通过在现代人家系水平和古 DNA 水平厘清这些历史名人和重要历史事件参与者的遗传谱系，对于我们理解本民族写在“基因里的历史”至关重要。

参考文献

- [1] Stoneking M. The human genome project and molecular anthropology[J]. *Genome Res*, 1997, 7(2): 87-91
- [2] Destro-Bisol G, Jobling MA, Rocha J, et al., Molecular anthropology in the genomic era[J]. *J Anthropol Sci*. 2010, 88: 93-112
- [3] Green RE, Malaspina AS, Krause J, et al., A complete Neandertal mitochondrial genome sequence determined by high-throughput sequencing[J]. *Cell*, 2008, 134(3): 416-426
- [4] Green RE, Krause J, Briggs AW, et al., A draft sequence of the Neandertal genome[J]. *Science*, 2010, 328(5979): 710-722
- [5] Reich D, Green RE, Kircher M, et al., Genetic history of an archaic hominin group from Denisova Cave in Siberia[J]. *Nature*, 2010, 468(7327): 1053-1060
- [6] Meyer M, Kircher M, Gansauge MT, et al., A high-coverage genome sequence from an archaic Denisovan individual[J]. *Science*, 2012, 338(6104): 222-226
- [7] Prüfer K, Racimo F, Patterson N, et al., The complete genome sequence of a Neanderthal from the Altai mountains[J]. *Nature*, 2014, 505(7481): 43-49.
- [8] Krause J, Briggs AW, Kircher M, et al., A complete mtDNA genome of an early modern human from Kostenki, Russia[J]. *Curr Biol*, 2010, 20(3): 231-236
- [9] Fu Q, Meyer M, Gao X, et al., DNA analysis of an early modern human from Tianyuan Cave, China[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(6): 2223-2227
- [10] Rasmussen M, Anzick SL, Waters MR, et al., The genome of a Late Pleistocene human from a Clovis burial site in western Montana[J]. *Nature*, 2014, 506(7487): 225-229
- [11] Raghavan M, Skoglund P, Graf KE, et al., Upper Palaeolithic Siberian genome reveals dual ancestry of Native Americans[J]. *Nature*, 2014, 505(7481): 87-91
- [12] Fu Q, Li H, Moorjani P, et al., Genome sequence of a 45,000-year-old modern human from western Siberia[J]. *Nature*, 2014, 514(7523): 445-449
- [13] Rasmussen M, Li Y, Lindgreen S, et al., Ancient human genome sequence of an extinct Palaeo-Eskimo[J]. *Nature*, 2010, 463(7282): 757-762
- [14] Gilbert MT, Jenkins DL, Götherstrom A, et al., DNA from pre-Clovis human coprolites in Oregon, North America[J]. *Science*, 2008, 320(5877): 786-789
- [15] Rasmussen M, Guo X, Wang Y, et al., An aboriginal Australian genome reveals separate human dispersals into Asia[J]. *Science*, 2011, 334(6052): 94-98
- [16] Khairat R, Ball M, Chang CC, et al., First insights into the metagenome of Egyptian mummies using next-generation sequencing[J]. *J Appl Genet*, 2013, 54(3): 309-325
- [17] Keller A, Graefen A, Ball M, et al., New insights into the Tyrolean Iceman's origin and phenotype as inferred by whole-genome sequencing[J]. *Nat Commun*, 2012, 3: 698
- [18] Olalde I, Sánchez-Quinto F, Datta D, et al., Genomic analysis of the blood attributed to Louis XVI (1754-1793), king of France[J]. *Sci Rep*, 2014, 4: 4666
- [19] Wang CC, Li H. Inferring human history in East Asia from Y chromosomes[J]. *Investig Genet*. 2013, 4(1): 11
- [20] Olalde I, Allentoft ME, Sánchez-Quinto F, et al., Derived immune and ancestral pigmentation alleles in a 7,000-year-old Mesolithic European[J]. *Nature*, 2014, 507(7491): 225-228
- [21] Skoglund P, Malmström H, Omrak A, et al., Genomic diversity and admixture differs for Stone-Age Scandinavian foragers and farmers[J]. *Science*, 2014, 344(6185): 747-750
- [22] Foster EA, Jobling MA, Taylor PG, et al., Jefferson fathered slave's last child[J]. *Nature*, 1998, 396(6706): 27-28
- [23] Skorecki K, Selig S, Blazer S, et al., Y chromosomes of Jewish priests[J]. *Nature*, 1997, 385(6611): 32
- [24] Zerjal T, Xue Y, Bertorelle G, et al., The genetic legacy of the Mongols[J]. *Am J Hum Genet*. 2003, 72(3): 717-721.
- [25] Abilev S, Malyarchuk B, Derenko M, et al., The Y-chromosome C3* star-cluster attributed to Genghis Khan's descendants is present at high frequency in the Kerey clan from Kazakhstan[J]. *Hum Biol*, 2012, 84(1): 79-89
- [26] Lalueza-Fox C, Gigli E, Bini C, et al., Genetic analysis of the presumptive blood from Louis XVI, King of France[J]. *Forensic Sci Int Genet*, 2011, 5(5): 459-463

- [27] Charlier P, Olalde I, Solé N, et al., Genetic comparison of the head of Henri IV and the presumptive blood from Louis XVI (both Kings of France)[J]. *Forensic Sci Int*, 2013, 226(1-3): 38-40
- [28] Larmuseau MH, Delorme P, Germain P, et al., Genetic genealogy reveals true Y haplogroup of House of Bourbon contradicting recent identification of the presumed remains of two French Kings[J]. *Eur J Hum Genet*, 2014, 22(5): 681-687
- [29] Wang C, Yan S, Hou Z, et al., Present Y chromosomes reveal the ancestry of Emperor CAO Cao of 1800 years ago[J]. *J Hum Genet*, 2012, 57(3): 216-218
- [30] Wang CC, Yan S, Yao C, et al., Ancient DNA of Emperor CAO Cao's granduncle matches those of his present descendants: a commentary on present Y chromosomes reveal the ancestry of Emperor CAO Cao of 1800 years ago[J]. *J Hum Genet*, 2013, 58(4): 238-239
- [31] Wang Chuan-Chao, Wang Ling-Xiang, Shrestha Rukesh, et al, Convergence of Y chromosome STR haplotypes from different SNP haplogroups compromises accuracy of haplogroup prediction[J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2015, 42:403-407
- [32] Yan S, Wang CC, Zheng HX, et al., Y chromosomes of 40% Chinese descend from three Neolithic super-grandfathers[J]. *PLoS One*, 2014, 9(8): e105691
- [33] Chuan-Chao Wang, Hui Li. Discovery of Phylogenetic Relevant Y-chromosome Variants in 1000 Genomes Project Data[J]. *arXiv preprint*, 2013, arXiv: 1310.6590
- [34] 李淑元, 李辉. 从牙齿磨损度推断安徽亳州元宝坑一号墓墓主身份 [J]. *现代人类学通讯*, 2010, 4: 53-56
- [35] Pääbo S, Poinar H, Serre D, et al., Genetic analyses from ancient DNA[J]. *Annu Rev Genet*. 2004, 38: 645-679
- [36] Xu Z, Zhang F, Xu B, et al., Mitochondrial DNA evidence for a diversified origin of workers building first emperor of China[J]. *PLoS One*, 2008, 3(10): e3275
- [37] Zhang F, Xu Z, Tan J, et al., Prehistorical east-west admixture of maternal lineages in a 2,500-year-old population in Xinjiang[J]. *Am J Phys Anthropol*, 2010, 142(2): 314-320
- [38] Yan S, Wang CC, Li H, et al., An updated tree of Y-chromosome haplogroup O and revised phylogenetic positions of mutations P164 and PK4[J]. *Eur J Hum Genet*, 2011, 19(9): 1013-1015
- [39] Cai X, Qin Z, Wen B, et al., Human migration through bottlenecks from southeast Asia into East Asia during last glacial maximum revealed by Y chromosomes[J]. *PLoS One*, 2011, 6(8): e24282
- [40] Wang CC, Yan S, Qin Z, et al., Late Neolithic expansion of ancient Chinese revealed by Y chromosome haplogroup O3a1c-002611[J]. *J Syst Evol*, 2013, 51(3): 280-286
- [41] Wang CC, Wang LX, Shrestha R, et al., Genetic structure of Qiangic populations residing in the western Sichuan corridor[J]. *PLoS One*, 2014, 9(8): e103772
- [42] Athey WT. Haplogroup prediction from Y-STR values using a Bayesian-allele-frequency approach[J]. *J Genet Geneal*, 2006, 2: 34-39
- [43] Schlecht J, Kaplan ME, Barnard K, et al., Machine-learning approaches for classifying haplogroup from Y chromosome STR data[J]. *PLoS Comput Biol*, 2008 Jun 13, 4(6): e1000093
- [44] Balanovsky O, Dibirova K, Dybo A, et al., Parallel evolution of genes and languages in the Caucasus region[J]. *Mol Biol Evol*, 2011, 28(10): 2905-2920