

杨玲焰,王立鹏,荣荣. 恒河猴和食蟹猴 ABO 血型竞争性等位基因 PCR (KASP) 检测方法的建立[J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(8): 31-36.

Yang LY, Wang LP, Rong R. Establishment of an ABO blood group detection method in *Macaca fascicularis* and *Macaca mulatta* using competitive allele specific PCR (KASP) [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(8): 31-36.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019.08.005

# 恒河猴和食蟹猴 ABO 血型竞争性等位基因 PCR(KASP)检测方法的建立

杨玲焰<sup>1</sup>,王立鹏<sup>1</sup>,荣荣<sup>2\*</sup>

(1.苏州西山生物技术有限公司,苏州 215123; 2.西交利物浦大学,苏州 215123)

**【摘要】** 目的 人的 ABO 血型常规免疫学检测方法不适用于实验猴猕猴血型检测,而实验猴血型鉴定在器官移植等研究中必不可少。本研究目的是建立一个快速、可靠的恒河猴与食蟹猴 ABO 血型核酸鉴定方法。方法 本室建立了一种新的 ABO 血型的分子学检测方法,利用竞争性等位基因 PCR(KASP)技术,通过识别与血型密切相关功能基因的 2 个 SNP 位点上的碱基,对恒河猴与食蟹猴血型进行分型,并通过设计 2 个 SNP 位点外圈的普通 PCR 引物,对 KASP 方法鉴定出的血型样本进行 Sanger 测序鉴定。结果 比对了 15 份用 Taqman PCR 方法已确定血型的食蟹猴全血核酸样本,新建立的 KASP 分型结果与原血型结果完全一致,为了保证 KASP 方法鉴定结果的准确性,实验人员用新建的普通 PCR 方法通过 Sanger 测序验证了 KASP 方法与测序结果完全一致。为了对新建的 KASP 方法重复性进行验证,选取了已知血型的 6 份实验猴全血,每份血样做 5 个重复,结果显示该方法有极好的重复性。进一步用新建的 KASP 方法检测了 51 份临床样本,其中食蟹猴样本 38 份,恒河猴样本 13 份,同一样本的 2 个位点的血型结果完全一致,其中 A 型血 9 份(17.6%),B 型血 19 份(37.3%),AB 型血 23 份(45.1%),未检出 O 型血。同时从 A 型、B 型、AB 型的临床样本中,各型分别选了 5 个样本,进行普通 PCR 扩增及测序分析,证明 2 个 SNP 位点上的序列与 KASP 分型结果一致。结论 新建的 KASP 血型鉴定方法准确性高,可用于实验恒河猴与食蟹猴的 ABO 血型的快速检测。该方法相较于传统的血清学或测序方法,简单快捷,经济可靠,结果易于判读,同时对样本的要求比传统的血清学方法低,新鲜或存放较久的全血、唾液或核酸等都可以用于检测。

**【关键词】** 食蟹猴;恒河猴;ABO 血型;竞争性等位基因 PCR

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 08-0031-06

## Establishment of an ABO blood group detection method in *Macaca fascicularis* and *Macaca mulatta* using competitive allele specific PCR (KASP)

YANG Lingyan<sup>1</sup>, WANG Lipeng<sup>1</sup>, RONG Rong<sup>2\*</sup>

(1. Suzhou Xishan Biotechnology Inc., Suzhou 215123, China.

2. Department of Biological Sciences, Xi'an Jiaotong-Liverpool University, Suzhou 215123)

**【Abstract】 Objective** Traditional serological method for detecting the ABO blood group in humans are unsuitable for macaques. Detecting the ABO blood group in macaques is important for transplantation and research. This study aimed to establish a rapid and reliable nucleic acid-based method for identifying the ABO blood group in *Macaca fascicularis* and *Macaca mulatta*. **Methods** A new molecular method for ABO blood group detection was established, using competitive

[作者简介] 杨玲焰(1984—),女,中级,硕士,研究方向:实验动物病原微生物及遗传检测。E-mail: lingyan.yang@vrlasia.cn

[通信作者] 荣荣(1967—),女,副教授,博士生导师,研究方向:病毒感染性疾病的机制及控制。E-mail: Rong.Rong@xjtlu.edu.cn

allele-specific PCR (KASP) to identify the *Macaca fascicularis* and *Macaca mulatta*' blood group by identifying the bases at 2 single nucleotide polymorphism (SNP) loci that are closely related to the blood-type functional gene. The blood samples identified via the KASP method were identified by Sanger sequencing by designing PCR primers around the two SNP loci. **Results** Fifteen whole-blood nucleic acid samples from *Macaca fascicularis* and *Macaca mulatta* were determined by TaqMan PCR and compared. The newly established KASP typing result were consistent with the original blood type result. To ensure the accuracy of the KASP method identification result, we used the newly established PCR method verified by Sanger sequencing, showing that the KASP method was consistent with the sequencing results. To verify the repeatability of the new KASP method, six blood samples with known blood groups were selected, and five replicates were taken per blood sample. The results showed that the method had excellent repeatability. In addition, 51 clinical samples were detected using the new KASP method, including 38 samples from cynomolgus monkeys and 13 from rhesus monkeys. The blood type results for two sites from the same sample were consistent, of which, 9 were type A (17.6%), 19 were type B (37.3%), 23 were type AB (45.1%), and none was type O. From the clinical samples with types A, B, and AB, five of each were selected for PCR amplification and sequencing analysis, which confirmed that the sequences at the two SNP loci were consistent with those of the KASP typing. **Conclusions** The new detection method using KASP is highly accurate and can be used to rapidly detect the ABO blood types in macaques. Compared with traditional serology and sequencing method, this method is simple, rapid, economical and reliable, and the results are easily interpreted. Furthermore, the sample requirements are lower than those of traditional serological method, and fresh or long-stored whole blood, saliva or nucleic acid can be used.

**【Keywords】** *Macaca mulatta*; *Macaca fascicularis*; ABO; competitive allele specific PCR

由于猕猴属 (*Macaques*) 动物与人类拥有共同祖先, 他们的基因相似率大于 93%, 且在神经学、生理学、代谢类疾病及对微生物的敏感性方面表现的都非常相似, 所以猕猴属动物尤其是食蟹猴 (*Macaca fascicularis*, Cynomolgus monkeys) 和恒河猴 (*Macaca mulatta*, Rhesus monkeys) 作为非人灵长类实验动物模型, 被广泛用于生物医药研究中, 近几年, 生物医药研究领域的投入不断加大, 干细胞和移植研究也得到飞速发展, 而对用于这方面研究的供体和受体动物的血型要准确的掌握, ABO 血型是最重要的血型系统, 所以当实验猴被用于研究时就需要明确知道它的 ABO 血型, 才能防止在移植中出现严重的排斥反应, 导致实验的失败及资源的浪费。

目前应用于人 ABO 血型鉴定的常规技术仍是基于抗原抗体反应的血凝实验和微柱凝胶实验, 但用于人血型检测的商业试剂并不适用于实验猴的血型鉴定。随着测序技术的发展, ABO 血型相关的糖基转移酶基因序列都已确定, 使血型研究进入分子生物学时代。事实上血型差异主要是与基因突变有关, ABO 血型基因上存在丰富的单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 位点, 通过分子生物学方法检测 ABO 血型基因的 SNP 位点, 可以确定 A、B 或 AB 表型。目前检测 SNP 的方法很多, 主要有 Taqman PCR、普通 PCR 结合 Sanger 测序的方法、下一代测序 (next generation sequencing,

NGS) 技术等。国际上已有多篇报道, 用多重普通 PCR 方法或实时定量 PCR 进行实验猴的 ABO 血型分析<sup>[1-6]</sup>。竞争性等位基因特异性 PCR (competitive allele specific PCR, KASP) 是在等位基因特异性 PCR (allele specific PCR, AS-PCR) 基础上, 在 PCR 试剂中加入通用的荧光探针, 通过引物 3' 末端碱基与 SNP 位点上的碱基特异互补, 然后通过直接识别荧光信号来对 SNP 分型以及检测序列的插入和缺失, 目前该技术在植物育种方面应用较多, 本文首次将 KASP 方法应用于实验猴 ABO 血型检测, 所选的 2 个 SNP 位点, 是实验猴表达 A 和 B 转移酶所必需的, 第一个 SNP 位点是检测 A 或 B 表型基因区域内负责编码第 266 位氨基酸的突变; 第二个 SNP 位点是检测第 268 位氨基酸的突变<sup>[5,7]</sup>。

目前尚无文献报道用 KASP 方法进行实验猴 ABO 血型检测。本文建立的 KASP 方法相较于普通 PCR 方法, 节省了大量的时间; 相较于 Taqman 探针法, 节约了合成探针的费用; 本文同时还建立了普通 PCR 结合 Sanger 测序法用于血型检测, 适合没有实时定量 PCR 仪的实验室开展 ABO 血型分析。

## 1 材料和方法

### 1.1 样本

#### 1.1.1 已知样本

15 份已确定 ABO 血型的食蟹猴核酸样本由美

国 VRL 实验室提供,干冰运输至本公司,−20℃ 存放。

1.1.2 重复性验证样本

5 份食蟹猴外周血样本(EDTA.K<sub>2</sub> 抗凝),来自于昆明某实验猴养殖单位;1 份恒河猴外周血,来自四川某实验猴养殖单位,共计 6 份样本冷藏快递运输至本公司,4℃ 存放。

1.1.3 临床样本

实验猴外周血样本(EDTA.K<sub>2</sub> 抗凝),分别来自于广州、广西、四川、海南 4 个实验猴饲养场,共计 51 份样本,其中食蟹猴全血 38 份,恒河猴全血 13 份,样本冷藏快递运输至本公司,4℃ 存放。

1.2 主要试剂与仪器

血液基因组 DNA 提取试剂盒(天根生化科技有限公司,DP318),KASP 试剂(LGC,KBS-1016-001),rTaq DNA 聚合酶(5 U/μL)(TaKaRa,R001WZ),dNTP Mix(2.5 mmol/L)(Takara,4030),琼脂糖(天根生化,RT101),GelRed(博美达,41003-0.5 mL),特异引物用 Primer 3 软件设计,由苏州泓迅生物科技股份有限公司合成。PCR 产物测序由苏州泓迅生物科技股份有限公司完成。荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad,CFX96),普通 PCR 仪(杭州博日科技有限公司,TC-96/G/H(b)A),紫外分光光度计(GE,Nanovue plu),紫外凝胶成像系统(上海勤翔,Genosens1560)。

1.3 实验方法

1.3.1 DNA 提取

(一)重复性验证样本

每个样本取 500 μL 抗凝全血,做 5 个重复,参照血液基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取核酸,用紫外分光光度计测定核酸浓度,稀释样本使其核酸浓度调整为 10 ng/μL 左右。

(二)临床样本

每个样本取 500 μL 抗凝全血,参照血液基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取核酸,用紫外分光光度计测定核酸浓度,稀释样本使其核酸浓度调整为 10 ng/μL 左右。

1.3.2 SNP 位点的选取及引物设计

针对 Premasuthan 等<sup>[5]</sup>发布的位于 15 号染色体上 7 号外显子的编码区功能性突变位点的序列,用 Primer 3 在线引物设计软件设计 3 组引物组,引物序列见表 1。A 组和 B 组引物组,为 KASP 方法所用的引物,可特异性识别这 2 个 SNP 位点上的碱基。C 组引物是在这 2 个 SNP 位点的外围设计的 1 对引物,用于 Sanger 测序验证。

1.3.3 KASP 法

A 组和 B 组引物组分别在 2 个体系中扩增。反应体系:2×PCR 试剂预混液 5 μL;A 组或 B 组引物混合液(F/H/R 引物浓度为 12/12/15 μmol/L)0.14 μL。每个体系均设立 A 型,B 型,AB 型阳性对照,以及不加核酸的空白对照。反应条件:94℃ 预变性 15 min,94℃ 20 s,退火温度 61℃ 开始每个循环降 0.6℃,1 min,10 个循环;94℃ 20 s,退火温度 55℃ 1 min,26 个循环;94℃ 20 s,退火温度 57℃ 1 min,12 个循环;30℃ 30 s,读取 FAM 和 HEX 荧光信号,采用 Bio-Rad CFX Manager 3.1 软件分析结果。

1.3.4 普通 PCR 及测序

反应体系:10× PCR buffer (Mg<sup>2+</sup>) 2.5 μL,dNTP Mix (2.5 mmol/L) 2.0 μL,C 组引物等量混合液 F/R (10 μmol/L) 1 μL,水 14.3 μL,DNA 模板 5 μL,rTaq DNA 聚合酶(5 U/μL) 0.2 μL。每个体系均设立阳性对照,以及不加核酸的空白对照。反应条件:95℃ 预变性 10 min,95℃ 45 s,退火温度 58℃ 30 s,72℃ 30 s,45 个循环,72℃ 延伸 5 min。电泳确认:取 5 μL PCR 产物在 2% 琼脂糖凝胶电泳后,成像系统拍照。测序及序列分析:将 PCR 产物

表 1 ABO 血型鉴定引物  
Table 1 Primers for the ABO genotyping

| 引物名称<br>Primer names | 引物序列<br>Primer sequences                   |
|----------------------|--------------------------------------------|
| A 组 F                | GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGACGAGGGTGATTCTACTACT |
| A 组 H                | GAAGGTGCGAGTCAACGGATTGACGAGGGTGATTCTACTACA |
| A 组 R                | ACCTCCTGCACCGACC                           |
| B 组 F                | GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGACCCCCGAAGAACC       |
| B 组 H                | GAAGGTGCGAGTCAACGGATTGACCCCCGAAGAACC       |
| B 组 R                | CAAGGACGAGGGTGATTCT                        |
| C 组 F                | GTCGGTGCTTGGGGTG                           |
| C 组 R                | GCCTGGTGTTCTTGG                            |

测序后用 DNASTAR 7.1 软件分析序列中对应 SNP 位点的碱基序列。

2 结果

2.1 已知样本的方法确认

2.1.1 KASP 法结果

用 KASP 分型方法共检测 15 份已知血型样本,通过 qPCR 仪对产物中荧光信号的识别,可以很好地区分 ABO 血型。图 1 是 A 引物组的 KASP 分型结果,蓝色正方形聚集点为 HEX 荧光信号,识别的是 A 型第 266 位氨基酸对应的 SNP 突变位点的 T 碱基;橙色圆形聚集点为 FAM 荧光信号,识别的是 SNP 突变位点的 A 碱基;绿色三角形聚集点为同时有 FAM 和 HEX 荧光信号,同时识别到 A 和 T 碱基,这些样本在该位点是杂合型的;黑色正方形点是空白对照,无荧光信号未识别到 T 或 A 碱基。15 份已知样本中 KASP 分型得到 A 型、B 型和 AB 型各 5 份,与美国 VRL 公司用 Taqman PCR 方法分型结果完全一致。

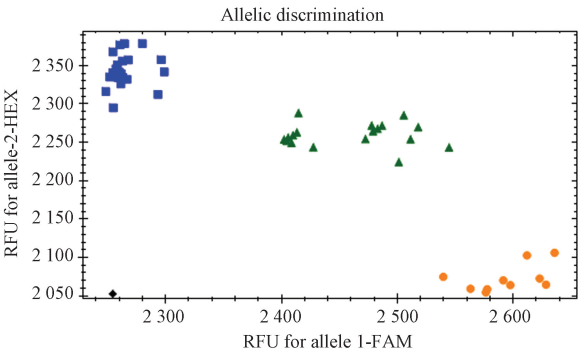


图 1 KASP 法鉴定 ABO 血型分型聚类图

Figure 1 ABO genotyping results by KASP

2.1.2 普通 PCR 结合 Sanger 测序方法验证结果

对这 15 个已知样本进行 PCR 扩增,产物测序后片段分析,最终得到 A 型、B 型、AB 型各 5 份,与 KASP 分型结果及美国 VRL 公司用 Taqman PCR 方法的分型结果完全一致,在 2 个 SNP 位点上的碱基与 KASP 分型结果一致。其中 A 型、B 型、AB 型 3 份样本的测序结果见图 2,红框中为对应的 2 个位点的测序结果,图最上面的数值为测序后核酸序列中各碱基的排序号。

2.2 KASP 方法的重复性验证结果

KASP 方法检测了 2 份 A 型血,3 份 AB 型血,1 份 B 型血,每个样从核酸提取到 KASP 检测做了 5 次重复,每个血样 5 次重复提取后的分型结果完全一致,针对 2 个 SNP 位点的 KASP 体系,血型结果也是完全符合(见图 3)。

2.3 临床样本检测

2.3.1 KASP 法结果

共检测实验猴全血样本 51 份,包括食蟹猴样本 38 份,恒河猴样本 13 份,表 2 为来自不同猴场血样的血型结果,其中 A 型血 9 份(17.6%),B 型血 19 份(37.3%),AB 型血 23 份(45.1%),4 个实验猴养殖场均存在 A 型、B 型、AB 型动物,但未检出 O 型血动物。

2.3.2 普通 PCR 结合 Sanger 测序法结果

选择 KASP 方法鉴定出的 A 型、B 型、AB 型临床样本各 5 份,用普通 PCR 扩增并测序后分析,所得的 2 个 SNP 位点上的碱基与 KASP 分型结果完全一致。

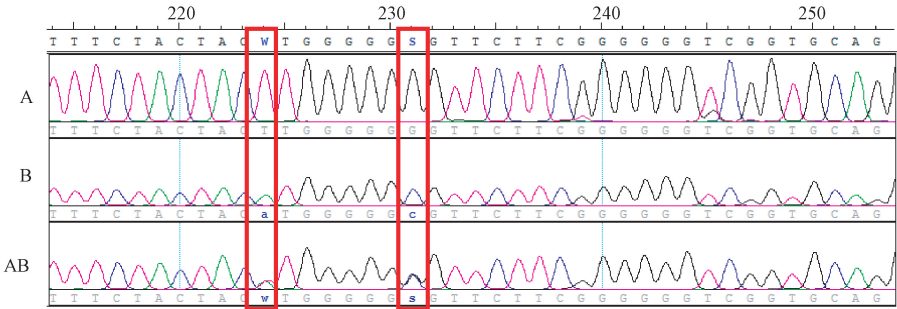


图 2 A 型、B 型、AB 型样本普通 PCR 序列比对图

Figure 2 Type A, B and AB sequence alignment from the PCR products

表 2 不同猴场样本 ABO 血型鉴定结果  
Table 2 ABO genotyping results of the monkeys from different breeding farms

| 来源<br>Origin                          | A 型<br>Type A | B 型<br>Type B | AB 型<br>Type AB |
|---------------------------------------|---------------|---------------|-----------------|
| 四川(恒河猴)Sichuan (Rhesus monkeys)       | 3             | 6             | 4               |
| 海南(食蟹猴)Hainan (Cynomolgus monkeys)    | 1             | 3             | 9               |
| 广西(食蟹猴)Guangxi (Cynomolgus monkeys)   | 2             | 1             | 2               |
| 广州(食蟹猴)Guangzhou (Cynomolgus monkeys) | 3             | 9             | 8               |
| 食蟹猴 Cynomolgus monkeys                | 6             | 13            | 19              |
| 实验猴 Laboratory monkeys                | 9             | 19            | 23              |

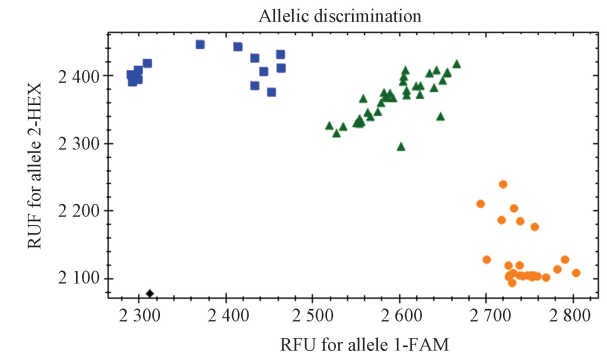


图 3 KASP 法鉴定 ABO 血型重复性验证结果分型聚类图  
Figure 3 Repeatability verification of the ABO genotyping results by KASP

3 讨论

灵长类动物的 ABO 血型存在跨物种多态性<sup>[8]</sup>。ABO 血型系统为三复等位基因,有 I<sup>A</sup>、I<sup>B</sup> 和 i 三个基因,I<sup>A</sup> 负责编码 N-乙酰氨基半乳糖胺转移酶,I<sup>B</sup> 编码 D-型半乳糖糖基转移酶,对抗原前体 H 进行不同的修饰后,进而得到了 A 抗原或 B 抗原,而 i 基因则不能编码任何糖基转移酶,故抗原前体 H 保持不变<sup>[9]</sup>。ABO 血型的决定基因位于 15 号染色体上的 9q34.1-9q34.2,包含 7 个外显子和 6 个内含子,而第 6 和 7 外显子上占了其多数的编码序列,这些序列负责编码 ABO 糖基转移酶的催化结构域,其中外显子 7 共编码 344 个氨基酸,占总 ABO 蛋白的催化域 65%,血型差异主要是与基因突变有关,A 抗原第 266 位氨基酸为亮氨酸和第 268 位为甘氨酸,而 B 抗原第 266 位为甲硫氨酸和第 268 位为丙氨酸<sup>[10]</sup>。因此可通过第 266 和 268 位密码子碱基的改变来区分 A 和 B 糖基转移酶。

基于抗原抗体反应的人 ABO 血型检测常规方法一般都不适用于实验猴,主要原因有以下三点:一是实验猴红细胞表面的类人 ABO 抗原分子与人类的抗原分子结构不一定完全相同;二是实验猴的 ABO 抗原分子抗原性极其微弱,在实验猴的红细胞

表面 ABH 抗原未找到;三是人源性的 ABO 抗血清用于实验猴检测,存在种属抗体的干扰<sup>[11]</sup>。之前有研究者用反定型和唾液抑制实验检测实验猴血型,也有用流式方法检测实验猴体内血型抗体水平<sup>[12-14]</sup>,但是对样本要求比较高,需要获取动物的新鲜血液或足够量的唾液样本,而且由于方法的局限性,得到结果的可靠性不高。市面上可获得的用于人血型检测的商业免疫试剂,用于实验猴血型检测一般均得不到可靠结果,且血清学结果有时也比较难判定。也有学者研究制备出实验猴专用 ABO 抗血清和改良吸收放散技术,但该方法耗时长,也会有不确定的结果出现<sup>[11,15]</sup>。

随着分子生物学方法在人类 ABO 血型中的应用,研究人员通过对实验猴基因序列进行分析,通过识别 SNP 位点碱基差异,对实验猴进行 ABO 血型分型。AS-PCR 方法有快速、经济、准确等优点,在医学领域中被广泛应用,如疾病 SNP 监测,血型分析等。Muro 等<sup>[2]</sup>用 AS-PCR 结合定量 PCR 方法成功进行人 ABO 血型的检测。本文所用的 KASP 方法是基于 AS-PCR 原理,在 PCR 试剂中增加了通用的荧光探针,可通过直接识别荧光信号实现 SNP 快速分型。

本研究建立了 KASP 血型鉴定方法并与美国 VRL 实验室用的 Taqman PCR 方法进行了比较,15 份已知样本的分型结果完全一致。同时新建立的 KASP 方法也与新建的普通 PCR 方法进行了比较,结果完全一致。本文用建立的 KASP 方法检测了国内 4 家猴场的血液样本 51 份,检测到 A 型血占 18%;B 型血占 37%;AB 型血占 45%;Premasuthan 等<sup>[4]</sup>用多重 PCR 筛查 78 头恒河猴,其中 B 型血的动物占了 51%,其次为 AB 型占 28%,A 型 21%,与本实验恒河猴中血型分布相似,B 型血占比为 46%;Premasuthan 等<sup>[5]</sup>于 2012 年又发表一篇文章,通过实时定量 PCR 方法,增加了 89 头食蟹猴的筛选,其 A、B、AB 型分布为 20%,48%,32%,而本实验食蟹

猴中 AB 型血占比最高为 50%, 其次为 B 型 34%, A 型 16%。Kanthaswamy 等<sup>[6]</sup>扩大了样本量用荧光定量 PCR 方法筛查了 1256 只恒河猴, 1113 只食蟹猴, 恒河猴中 B 型血占比达 90%, A 型占 2%, AB 型占 8%; 食蟹猴中 A、B、AB 型分别占 39%、33%、28%。

本文所建立的 ABO 基因分型技术, 是首次将 KASP 方法应用于实验猴 ABO 血型检测, 是在分子基因水平上的一种快速、可靠、敏感、低成本的检测方法。本文新建的普通 PCR 方法结合 Sanger 测序同样可对实验猴进行 ABO 血型分型, 对于没有定量 PCR 仪的实验室同样适用。该方法对样本类型及新鲜程度都要求不高, 血液样品也可用滤纸片承载运输, 可用于实验猴的 ABO 血型分型, 为器官移植特别是干细胞移植非人灵长类动物模型研究提供有效的保证, 目前本实验人员用该方法进行临床样本检测尚未检出 O 型血, 这与其他研究者的结果也相符<sup>[4-6]</sup>。当然不同血型占比与样本量和动物的来源都密切相关, 本实验的数据还需进一步扩大样本量进行统计后给出血型分布的结论。人类的 15 号染色体的第 6 外显子上存在 O 型血表型相关的突变位点, 有文献报道在实验猴中找到同样的位点<sup>[16]</sup>, 但有多篇文献报道, 对实验猴的第 6 和第 7 外显子基因序列测序分析, 均未发现有突变与 O 型血表型有关<sup>[4,7,17]</sup>。当然也有文献报道通过血清学方法检出有实验猴是 O 型血<sup>[18-19]</sup>, 但是考虑到血清学方法的弊端, 对此结果仍然存在争议; 也有学者提出假设在编码区外有可以识别 O 型等位基因的存在<sup>[5]</sup>; 近期 Choi 等<sup>[3]</sup>报道 O 型血的存在, 作者通过针对第 7 外显子区域设计引物, 用 PCR 方法筛查了 66 只恒河猴, 有 8% 的动物为 O 型血, 相关人员正在对这些与 O 型血表型相关的位点进行验证中。实验猴是否存在 O 型血表型目前还是比较争议的, 下一步计划就是找到这个或多个位点。

# 参考文献:

- [ 1 ] Taki T, Kibayashi K. A simple ABO genotyping by PCR using sequence-specific primers with mismatched nucleotides [J]. Leg Med(Tokyo), 2014, 16(3): 168-172.
- [ 2 ] Muro T, Fujihara J, Imamura S, et al. Determination of ABO genotypes by real-time PCR using allele-specific primers [J]. Leg Med(Tokyo), 2012, 14(1): 47-50.
- [ 3 ] Choi YJ, Ryu RH, Park HJ, et al. Comparison of a PCR assay using novel selective primers with current methods in terms of ABO blood phenotyping in rhesus macaques [J]. Sci Rep,

- 2018, 8(1): 1957.
- [ 4 ] Premasuthan A, Kanthaswamy S, Satkoski J, et al. A simple multiplex polymerase chain reaction to determine ABO blood types of rhesus macaques (*Macaca mulatta*) [J]. Tissue Antigens, 2011, 77(6): 584-588.
- [ 5 ] Premasuthan A, Ng J, Kanthaswamy S, et al. Molecular ABO phenotyping in cynomolgus macaques using real-time quantitative PCR [J]. Tissue Antigens, 2012, 80(4): 363-367.
- [ 6 ] Kanthaswamy S, Ng J, Oldt RF, et al. ABO blood group phenotype frequency estimation using molecular phenotyping in rhesus and cynomolgus macaques [J]. HLA, 2017, 90(5): 295-299.
- [ 7 ] Kermarrec N, Roubinet F, Apoil PA, et al. Comparison of allele O sequences of the human and non-human primate ABO system [J]. Immunogenetics, 1999, 49(6): 517-526.
- [ 8 ] 兰炯采, 周华友, 曹琼, 等. 实验猴的类人 ABO 血型检测研究 [J]. 动物医学进展, 2004, 25(5): 114-115.
- [ 9 ] 胡建, 周逸人, 丁佳琳, 等. ABO 血型综合实验基因分型技术简化及其群体遗传分析拓展 [J]. 遗传, 2017, 39(5): 423-429.
- [ 10 ] Evanovich EBS, Harada ML. Primate ABO gene is under weak positive selection [J]. Notulae Sci Biol, 2012, 4(2): 7-12.
- [ 11 ] Wang X, Chen S, Chen G. ABO typing in experimental cynomolgus monkeys using non-invasive methods [J]. Sci Rep, 2017, 7: 41274.
- [ 12 ] Ségurel L, Thompson EE, Flutre T, et al. The ABO blood group is a trans-species polymorphism in primates [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(45): 18493-18498.
- [ 13 ] 张弛, 王筱啸, 王璐, 等. 应用改良流式法检测实验猴和食蟹猴体内血型抗体水平的分布情况 [J]. 动物学研究, 2011, 32(1): 56-61.
- [ 14 ] 宋怀燕, 刘雅诚, 高富愿, 等. 恒河猴(*Macaca mulatta*)血型的研究 [J]. 中国比较医学杂志, 1995, 5(2): 98-102.
- [ 15 ] 周琼, 周华友, 刘泽澎, 等. 华南实验猴红细胞 ABO 血型研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2003, 13(2): 93-95.
- [ 16 ] Yamamoto F, Clausen H, White T, et al. Molecular genetic basis of the histo-blood group ABO system [J]. Nature, 1990, 345(6272): 229-233.
- [ 17 ] Doxiadis GG, Otting N, Antunes SG, et al. Characterization of the ABO blood group genes in macaques: evidence for convergent evolution [J]. Tissue Antigens, 1998, 51(4 Pt 1): 321-326.
- [ 18 ] Malavijitnong S, Sae-Low W, Hamada Y. The human-ABO blood groups of free-ranging long-tailed macaques (*Macaca fascicularis*) and parapatric rhesus macaques (*M. mulatta*) in Thailand [J]. J Med Primatol, 2008, 37(1): 31-37.
- [ 19 ] Busch J, Specht S, Ezzelarab M, et al. Buccal mucosal cell immunohistochemistry: a simple method of determining the ABH phenotype of baboon, monkeys, and pigs [J]. Xenotransplantation, 2006, 13(1): 63-68.