

جداسازی و شناسایی آنتی ژن RhD از غشای گلبول قرمز به روش رسوب ایمنی

آرزو اودی*، راحله حلییان**، مهشید محمدی پور***، دکتر ناصر امیری زاده****، مریم امانی*****

ناصر مسروری*****، دکتر احمد قره باغیان*****، دکتر مهریار حبیبی رودکنار*****

نویسنده مسئول: تهران، مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران Roudkenar@ibto.ir

پذیرش: ۸۶/۱۲/۱۱

دریافت: ۸۶/۱۰/۳

چکیده

سابقه و هدف: سیستم گروه خونی Rh یکی از پیچیده ترین سیستم های گروه خونی انسانی می باشد که نقش بسیار مهمی در طب انتقال خون دارد. در این مطالعه سعی بر این است که آنتی ژن RhD را با حفظ ساختار اولیه از غشای گلبول های قرمز Rh مثبت به دست آوریم. **روش بررسی:** مطالعه ای انجام شده از نوع تجربی بود. از روش رسوب ایمنی و با استفاده از آنتی D پلی کلونال انسانی جهت جداسازی آنتی ژن D از نمونه ی خون تازه ی گروه های خونی Rh مثبت استفاده شد. پروتئین به دست آمده با روش SDS-PAGE و وسترن بلات مورد بررسی قرار گرفت، خصوصیات آنتی ژنی RhD حاصل از Ghost با استفاده از آنتی بادی پلی کلونال Anti RhD انسانی و آنتی بادی ثانویه پلی کلونال (Goat anti-human) با روش الیزا مورد بررسی قرار گرفت. **یافته ها:** در این مطالعه با استفاده از روش رسوب ایمنی، RhD با موفقیت از غشای گلبول قرمز جدا شد و پروتئین با سایز مورد نظر در روش وسترن بلات تأیید شد. RhD حاصل از Ghost در روش الیزا با آنتی D پلی کلونال نیز واکنش داد اما با آنتی بادی مونوکلونال در وسترن بلات واکنشی نشان نداد.

نتیجه گیری: در این مطالعه آنتی ژن RhD به صورت دست نخورده و با حفظ ساختار طبیعی به دست آمد که می تواند در مطالعات آتی جهت تولید آنتی بادی در مدل حیوانی و بررسی های ساختار ملکولی پروتئین کاربرد داشته باشد. لازم به ذکر است که این مطالعه گزارش اولیه از تخلیص نسبی RhD می باشد و نیاز به مطالعات تکمیلی دارد.

واژگان کلیدی: RhD، گلبول قرمز، رسوب ایمنی

* کارشناس ارشد هماتولوژی، مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران

** کارشناس ارشد بیولوژی سلولی _ ملکولی، مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران

*** کارشناس ارشد ژنتیک، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات

**** دکترای هماتولوژی و بانک خون، استادیار مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران

***** کارشناس ارشد هماتولوژی، مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران

***** کارشناس ارشد ژنتیک، مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران

***** دکترای ایمونوهماتولوژی بالینی، استادیار مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران

***** دکترای بیوتکنولوژی، استادیار مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران

مقدمه

سیستم گروه خونی Rh یکی از پیچیده‌ترین سیستم‌های گروه خونی انسانی می‌باشد که به دلیل ایجاد واکنش‌های آلوایمیون حاصل از انتقال خون، بیماری همولیتیک نوزادان، آنمی همولیتیک اتوایمیون نقش بسیار مهمی در طب انتقال خون دارد (۱، ۲). افراد فاقد آنتی ژن‌های Rh که به عنوان گروه خونی نادر Rh null شناخته شده‌اند، به واسطه‌ی اشکال در فرم طبیعی گلبول قرمز، نقل و انتقالات کاتیونی غشا و سازماندهی فسفولیپیدهای غشا از یک سندرم آنمی همولیتیک غیرایمیون رنج می‌برند (۳، ۴). در بیماری همولیتیک نوزادان، آنتی ژن‌های RhD واقع بر روی گلبول‌های قرمز نوزاد در مادر Rh منفی ایجاد حساسیت نموده و سپس آنتی‌بادی‌های ایجاد شده از کلاس IgG₃ و IgG₁ از جفت عبور کرده و موجب تخریب گلبول‌های قرمز نوزاد می‌شود که به منظور جلوگیری از ایجاد حساسیت در مادر Rh منفی، آنتی RhD پلی‌کلونال انسانی در زمان‌های مشخص به مادر تجویز می‌شود. امروزه استفاده از آنتی‌بادی منوکلونال تولید شده به روش هیبریدوما که قادر به پاکسازی سریع گلبول‌های قرمز RhD مثبت در بدن مادر می‌باشد، مورد توجه روزافزون واقع شده است (۵، ۶). لذا شناسایی ساختار و خواص آنتی‌ژنی پروتئین‌های سیستم گروه خونی Rh به عنوان پلی‌مورفیک‌ترین و ایمنوژن‌ترین سیستم گروه خونی انسانی با بیش از ۴۵ آنتی ژن تعریف شده از نظر سرولوژیکی، از اهمیت بالایی جهت تولید آنتی‌بادی‌های منوکلونال برخوردار است (۱). جداسازی RhD از غشای گلبول قرمز مستلزم جداسازی غشا آن (Ghost) است اما در اثر تیمار با مواد مختلف آنتی ژن D دستخوش تغییر شده و ممکن است خاصیت آنتی ژنی خود را از دست بدهد. در این مطالعه سعی بر این بود که با استفاده از رسوب ایمنی، تا حد ممکن آنتی ژن RhD را به صورت دست‌نخورده و با حفظ ساختار طبیعی و شکل آنتی ژنی اولیه از غشای گلبول‌های

قرمز Rh مثبت به دست آوریم و این روش را با روش جداسازی RhD از Ghost مقایسه کنیم. RhD به عنوان یک آنتی ژن خالص و مجزا از سایر پروتئین‌های سیستم Rh می‌تواند در تولید آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال و منوکلونال آنتی D در حیوانات مناسب، به صورت یک نمونه‌ی کنترل مثبت در تولید آنتی ژن نو ترکیب RhD و هم چنین مطالعات ساختار آنتی ژن پروتئینی غشای گلبول قرمز کاربرد داشته باشد.

روش بررسی

مطالعه‌ی انجام شده از نوع تجربی بود. جداسازی غشای گلبول قرمز: به منظور جدا کردن غشا گلبول قرمز، ۵ میلی‌لیتر از نمونه‌ی خون کامل حاوی EDTA از افراد سالم با گروه‌های خونی Rh⁺ و گروه خونی Rh⁻ جهت نمونه‌ی کنترل تهیه و در عرض ۶ ساعت غشای گلبول قرمز (Ghost) طی انجام مراحل زیر جدا شد: ابتدا نمونه‌ی خون به مدت ۵ دقیقه در دور ۲۰۰۰ سانتریفوژ شده، پلاسما و لایه بافی‌کوت آن جدا شد و گلبول قرمز آن با بافر ایزوتون PBS (pH=۷/۴، ۲۰ میلی‌مول) در ۳ مرحله و با ۱۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳ دقیقه سانتریفوژ و شسته شد. سپس گلبول قرمز شسته شده توسط آب مقطر سرد لیز و به شدت ورتکس شد، سپس در دمای ۳۵- درجه‌ی سانتی‌گراد منجمد و در دمای اتاق ذوب شد و بعد از هر بار ذوب شدن به شدت ورتکس گردید. سپس به مدت ۲۰ دقیقه با ۱۴۰۰ دور در دقیقه و دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد سانتریفوژ گردید و رسوب به دست آمده چندین بار با آب مقطر سرد شسته شد تا زمانی که مایع رویی شفاف شد و رسوب به دست آمده در EDTA/PBS یک میلی‌مول/تری‌تون X-۱۰۰ (سیگما-آمریکا) حل شد.

تعیین خصوصیات غشای گلبول قرمز: جهت تفکیک و شناسایی پروتئین‌های غشای گلبول قرمز، نسبت مساوی از

نمونه‌های آنتی‌ژنی تهیه شده با بافر نمونه به روش SDS-PAGE در سیستم ناپیوسته (Laemeli) تحت شرایط احیا در ژل ۱۲ درصد پلی‌آکریل‌آمید الکتروفورز شد (۶).

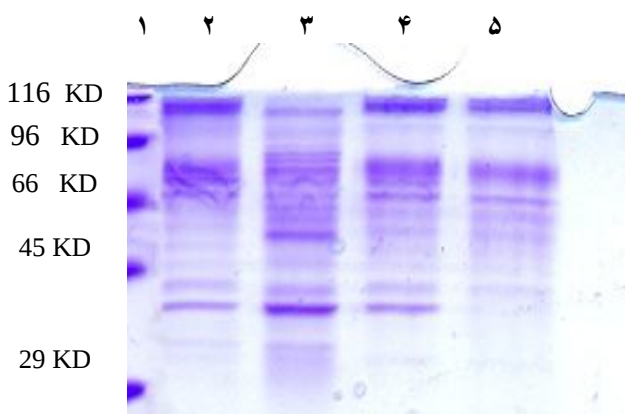
وسترن بلات: برای انجام وسترن بلات، باندهای جدا شده روی ژل پلی‌آکریل‌آمید به غشای PVDF (روش _ آلمان) منتقل شد و با استفاده از آنتی‌بادی‌های اختصاصی بررسی شد، به این منظور ابتدا غشای PVDF هم اندازه‌ی ژل برش داده شد و به مدت ۳۰ ثانیه در متانل خالص، ۲ دقیقه در آب مقطر و ۵ دقیقه در ترانسفر بافر، $pH=8/3$ (۱۰۰ میلی‌لیتر متانول + ۳۳۳ میلی‌لیتر آب + ۷ گرم گلیسین + ۵۱/۱ گرم تریس) قرار داده شد. ۶ لایه‌ی کاغذ صافی آغشته به ترانسفر بافر زیر ژل روی صفحه‌ی الکتروود دستگاه Semi-Dry-Electroblotter (کره‌ی جنوبی - PeQLab) قرار داده شد و زیر ژل، غشای آماده شده PVDF و روی آن ۶ لایه کاغذ صافی دیگر گذاشته شد و با برقراری جریان الکتریکی $3-8 \text{ mAm/cm}^2 \text{ gel}$ ، عمل ترانسفرینگ انجام شد. بعد از اتمام عمل ترانسفرینگ غشای PVDF را با رنگ پونسواس رنگ کرده تا از انتقال باندها به غشا اطمینان حاصل شود. سپس رنگ را شسته و غشا به مدت ۱۸ ساعت در محلول بلاکینگ (۵/۰ درصد توین ۲۰ + ۱۰۰ میلی‌لیتر PBS + ۵ گرم اسکیم میلک) قرار داده شد. سپس غشا را ۳ بار با محلول PBST شستشو داده و در هر بار شستشو به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به آرامی مخلوط شد. سپس آنتی‌بادی Rh منوکلونال (Mouse Ab- Santa cruz) با غلظت ۰/۴ میکروگرم در هر میلی‌لیتر به آن اضافه شد و به مدت ۲ ساعت در ۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به آرامی مخلوط شد و بعد از ۴ بار شستشو با محلول (۵/۰ درصد توین ۲۰ + PBS) PBST آنتی‌بادی ثانویه (Anti Rabbit Anti IgG Mouse-Abcam) پلی‌کلونال متصل به HRP با رقت ۲ میکروگرم در هر میلی‌لیتر به آن اضافه شد و به مدت ۱ ساعت در ۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به

آرامی مخلوط شد. بعد از ۴ بار شستشوی مجدد با PBST، سوپسترای HRP، α کلرونتول (سیگما-آمریکا) به آن افزوده شد و برای مدت ۳ ساعت در تاریکی قرار داده شد. بعد از این مرحله نتیجه قرائت شد. **الیزا (ELISA):** ابتدا به ۵۰ میکرولیتر از غشا به دست آمده از گلبول قرمز از گروه‌های خونی Rh^+ و Rh^- ۵۰ میکرولیتر بافر رقیق‌کننده (کیت الیزا R&D، آمریکا)، از هر نمونه در سه چاهک از پلیت الیزا، اضافه شد و به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق انکوبه گردید تا آنتی‌ژن‌ها به کف چاهک بچسبند، سپس هر چاهک را ۳ بار با PBS شسته تا آنتی‌ژن‌های کوت نشده خارج شوند. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از محلول PBSTM (اسکیم میلک ۵ درصد + توین ۲۰، ۵/۰ درصد + PBS) به هر چاهک اضافه شد و بعد از یک ساعت انکوبه شدن در دمای اتاق PBSTM خارج شده و چاهک‌ها ۳ بار با PBST شسته شد. در مرحله‌ی بعد ۵۰ میکرولیتر Anti D (Poly clonal-IgG, CE-Immunodiagnostika) در رقت‌های ۱:۲ و ۱:۱۰ اضافه شده و دو ساعت در دمای اتاق انکوبه گردید. سپس آنتی‌بادی‌ها را خارج کرده و چاهک‌ها ۳ بار با PBST شسته شدند. در مرحله‌ی بعد ۵۰ میکرولیتر از آنتی‌بادی ثانویه (Goat anti-human IgG, IgM, IgA - Abcam, UK) پلی‌کلونال متصل به HRP با غلظت ۱/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به هر چاهک اضافه و یک ساعت در ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس به منظور خارج شدن آنتی‌بادی‌های آزاد، چاهک‌ها ۳ بار با PBS شسته شدند. سپس محلول‌های A (پایدارکننده‌ی پراکسید هیدروژن) و B (تترامیتیل بنزیدین یا پایدارکننده‌ی کروموژن) از کیت الیزا به میزان مساوی مخلوط گردید و ۱۰۰ میکرولیتر از آن به هر چاهک اضافه شد و ۳۰ دقیقه در دمای اتاق در تاریکی انکوبه شد. در آخرین مرحله ۵۰ میکرولیتر از محلول متوقف‌کننده‌ی واکنش کیت الیزا (اسید سولفوریک ۲N) به محلول فوق اضافه

از هر دو نمونه Rh^+ و Rh^- در کنار شاخص وزن ملکولی روی ژل ۱۲ درصد SDS-PAGE الکتروفورز شد.

یافته‌ها

مشاهده‌ی باندهای پروتئینی جدا شده از غشای گلبول قرمز روی ژل SDS-PAGE؛ غشای گلبول قرمز از گروه‌های خونی Rh^+ و گروه خونی Rh^- جدا شده که در تریتون X-۱۰۰ حل شده بود روی ژل پلی‌اکریلامید ۱۲ درصد الکتروفورز شد و باندهای مربوط به پروتئین‌های غشای گلبول قرمز شامل پروتئین‌های باند ۳، باند ۴، باند ۴/۱ به طور یکسان در گروه‌های خونی مثبت و منفی مشاهده شد ولی باند پروتئینی مجزا مربوط به پروتئین Rh در گروه خونی Rh^+ در مقایسه با گروه خونی Rh^- مشاهده نشد (شکل ۱).



شکل ۱: الکتروفورز SDS-PAGE

۱- شاخص وزن ملکولی (MWM)

۲ و ۳- غشای گلبول قرمز گروه‌های خونی Rh^+

۴- غشای گلبول قرمز گروه‌های خونی Rh^- روی ژل پلی‌اکریلامید ۱۲ درصد پروتئین‌های مربوط β_i غشای گلبول قرمز شامل پروتئین‌های باند ۳، باند ۴ و باند ۴/۱

به منظور تأیید وجود آنتی ژن RhD در غشای جدا شده از گلبول قرمز با گروه‌های خونی Rh مثبت، از روش الیزا با استفاده از آنتی‌بادی پلی‌کلونال Anti D استفاده شد. در این

کرده و رنگ به دست آمده در فاصله‌ی ۳۰ دقیقه در طول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت گردید. نتایج الیزا به صورت تکرار سه‌تایی (میانگین $\pm$ انحراف معیار) ارایه شد. تفاوت بین گروه‌ها با استفاده از آزمون آماری Student t-test مورد مطالعه قرار گرفت و P-value کم‌تر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

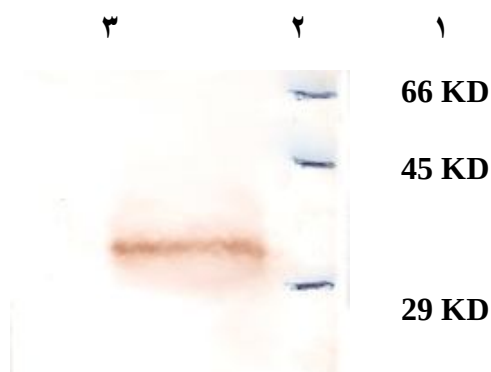
رسوب ایمنی (Immunoprecipitation): ابتدا گلبول قرمز جدا شده از نمونه خون‌های تازه حاوی EDTA با گروه‌های خونی Rh^+ و Rh^- ۵ بار با PBS شسته شد، سپس به ۵۰۰ میکرولیتر از سلول شسته شده ۵۰۰ میکرولیتر Anti D با تیتراژ ۱:۱۲۸ اضافه شد و به مدت ۹۰ دقیقه در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس سلول‌ها ۳ بار با PBS شسته شده و در هر بار شستشو ۵ دقیقه با ۱۵۰۰ دور در دقیقه در ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد سانتریفوژ شدند، در این مرحله غشای RBC متصل به آنتی‌بادی با استفاده از آب مقطر سرد و ۲۰ دقیقه سانتریفوژ در دور بالا جدا شد و رسوب به دست آمده در EDTA/PBS یک میلی‌مول / تریتون X-۱۰۰ حل شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد و بعد از ۳۰ دقیقه سانتریفوژ با ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه در ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد، محلول رویی آن که حاوی کمپلکس آنتی‌ژن-آنتی‌بادی می‌باشد جدا شد. سپس به آن میزان ۲۰۰ میکرولیتر Sepharose Bead (سیگما-آمریکا) متصل به پروتئین G اضافه شد و ۴ ساعت در دمای ۲ تا ۸ درجه‌ی سانتی‌گراد به آرامی مخلوط شد و بعد از اتمام زمان انکوباسیون ۳ بار با PBS و دو بار با آب مقطر سرد شسته شد و در نهایت محلول رویی دور ریخته شد، سپس ۱۵۰ میکرولیتر، بافر 2x Loading به آن اضافه شد و بعد به منظور دناتوره شدن پروتئین‌ها و جدا شدن پروتئین G و بیدها به مدت ۵ دقیقه در ۹۶ درجه‌ی سانتی‌گراد جوشانده شد، سپس با ۷۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد و ۲۵ میکرولیتر از محلول رویی که حاوی کمپلکس آنتی‌ژن-آنتی‌بادی می‌باشد

پلی پپتید RhD به دست آمده از غشای گلبول قرمز با گروه خونی Rh مثبت جذب نوری $0/186 \pm 0/162$ را داشته که در مقایسه با پلی پپتید RhD به دست آمده از غشای گلبول قرمز با گروه خونی Rh منفی با جذب نوری $0/021 \pm 0/015$ نتیجه‌ی مثبت را نشان می‌دهد ($P < 0/001$) جدول (۱).

بررسی نمونه‌ی مربوط به پلی پپتید RhD به دست آمده از غشای گلبول قرمز با گروه خونی Rh مثبت در طول موج ۴۵۰ نانومتر در رقت ۱:۲ جذب نوری $0/152 \pm 0/316$ داشته که در مقایسه با پلی پپتید RhD به دست آمده از غشای گلبول قرمز با گروه خونی Rh منفی با جذب نوری $0/091 \pm 0/023$ نتیجه‌ی مثبت را نشان داده ($P < 0/001$) و وجود پروتئین Rh را تأیید می‌کند. همچنین در رقت ۱:۱۰ آنتی بادی

جدول ۱: نتایج الیزا با استفاده از آنتی بادی پلی کلونال انسانی Anti RhD علیه پلی پپتید RhD استخراج شده از غشای گلبول‌های قرمز (طول موج ۴۵۰ نانومتر)

پلی پپتید RhD به دست آمده از غشای گلبول قرمز با گروه خونی Rh مثبت (مقادیر به دست آمده در طول موج ۴۵۰ نانومتر)	غشای استخراج شده از گلبول قرمز Rh ⁺ (مقادیر به دست آمده در طول موج ۴۵۰ نانومتر)	Anti - RhD پلی کلونال انسانی (رقت)
$0/152 \pm 0/316$	$0/091 \pm 0/023$	۱:۲
$0/186 \pm 0/162$	$0/015 \pm 0/021$	۱:۱۰



شکل ۲: وسترن بلات

۱ - شاخص وزن ملکولی (MWM)

۲ - با استفاده از آنتی بادی منوکلونال RhD در روش وسترن بلات و با استفاده از آنتی بادی ثانویه (Anti Rabbit Anti IgG Mouse) پلی کلونال متصل به HRP و سوبسترای α کلروفتول تک باند اختصاصی ۳۲ کیلودالتون مربوط به آنتی ژن Rh از نمونه‌ی مربوط به رسوب ایمنی به دست آمده از گلبول قرمز Rh مثبت مشاهده شده است.

۳ - نمونه‌ی مربوط به رسوب ایمنی به دست آمده از گلبول قرمز Rh منفی، که با استفاده از آنتی بادی‌های فوق در روش وسترن بلات هیچ باندی مشاهده نشد.

در مرحله‌ی بعد با استفاده از آنتی D منوکلونال وسترن بلات انجام گردید ولی باندی مشاهده نشد که بیانگر این نکته است که در طی جداسازی Ghost برخی از اپی توپ‌های RhD از دست رفته است.

جداسازی و تخلیص پروتئین RhD از غشای گلبول قرمز با روش رسوب ایمنی:

به منظور مشاهده‌ی پروتئین RhD در غشای گلبول قرمز با گروه‌های خونی Rh مثبت، قبل از تهیه و جداسازی غشا، ابتدا آنتی بادی پلی کلونال Anti RhD روی گلبول قرمز ثابت شد و سپس RhD با روش رسوب ایمنی جدا و وجود اپی توپ RhD با آنتی بادی منوکلونال (تک باند اختصاصی ۳۲ کیلودالتون در مقایسه با گروه خونی Rh منفی) مورد تأیید قرار گرفت. به نظر می‌رسد باند مذکور کمی بالاتر از ۳۲ کیلودالتون است و احتمال ناخالصی با پروتئین‌های دیگر می‌تواند دلیل این امر باشد (شکل ۲).

بحث

پروتئین RhD یک پروتئین غیرگلیکوزیله بین غشایی با وزن ملکولی ۳۲ کیلودالتون، حاوی ۱۲ حوزهی غشای گذر، شش حلقه‌ی خارج سلولی و اسیدهای آمینه هیدروفوب فراوان در بین غشای دو لایه‌ی فسفولیپیدی گلوبول قرمز قرار گرفته است (۹-۷) به طوری که این شکل خاص فضایی نقش بسیار مهمی در ماهیت آنتی ژنی و خواص ایمنوهماتولوژیک این پروتئین ایفا می‌کند (۱۰). لذا جداسازی و تخلیص آنتی ژن RhD بدون بروز تغییر در ماهیت آنتی ژنی آن امری دشوار و پیچیده است. در این مطالعه هدف به دست آوردن آنتی ژن RhD با حفظ ساختار طبیعی و شکل فضایی اولیه آن با استفاده از روش رسوب ایمنی بود. با وجود آن که آنتی ژن جدا شده از Ghost با آنتی بادی پلی کلونال در الیزا واکنش نشان داد اما با آنتی بادی مونوکلونال واکنشی نشان نداد در حالی که با استفاده از روش رسوب ایمنی تک باند ۳۲ کیلودالتونی در وسترن بلات مشاهده شد و بیان گر این است که در مرحله‌ی تهیه‌ی Ghost برخی از اپی توپ‌های آنتی ژن از دست می‌رود اما در روش رسوب ایمنی حفظ می‌شود. سویانا و گولدستین با استفاده از حجم بالایی از گلوبول قرمز (۱۰۰ میلی لیتر) و آنتی بادی پلی کلونال با تیترا بالا مطالعه‌ی مشابهی را انجام دادند و باند اختصاصی در ناحیه‌ی ۳۲ کیلودالتون را با به کارگیری روش وسترن بلات مشاهده نمودند، در این مطالعه از گلوبول‌های قرمز Rh null نیز به عنوان کنترل منفی استفاده شد (۱۱). در صورتی که در مطالعه‌ی حاضر با استفاده از حجم کم تر گلوبول قرمز

منابع

- 1- Arce MA, Thompson ES, wagner S, et al. Molecular cloning of RhD cDNA derived from a gene present in RhD-Positive, but not RhD-Negative Individuals. *Blood*. 1993; 82(2): 651-5.
- 2- Moore S, Woodrow CF, McClelland DBL. Isolation of membrane components associated with human red cell antigens Rh (D), (c), (E) and Fya. *Nature*. 1982; 295(5849): 529- 1.
- 3- Mouro-Chanteloup I, D'Ambrosio AM, Gane P, et al. Cell-surface expression of RhD blood group polypeptide is posttranscriptionally regulated by the RhA G glycoprotein. *Blood*. 2002; 100(3): 1038 -47.

(۵/۰ میلی گرم) و آنتی بادی با تیترا پایین پروتئین RhD جدا شد. تجویز Anti-D ایمنوگلوبین به مادران RhD منفی در زمان بارداری و بعد از بارداری روش بسیار مؤثری در جلوگیری از ایجاد حساسیت آنتی ژن D به واسطه‌ی گلوبول‌های قرمز RhD مثبت جنین و در نهایت ایجاد بیماری همولیتیک جنین و نوزاد می‌باشد (۱۲). در حال حاضر Anti-D ایمنوگلوبین از طریق پلاسمافرز اهداکنندگان دارای تیترا بالای آنتی D که بیشتر آن‌ها را خانم‌هایی که در اثر حاملگی حساس شده‌اند تشکیل می‌دهد، به دست می‌آید. این روش ضمن در برداشتن خطر عفونت‌های ناشی از انتقال خون، پیچیدگی‌ها و مشکلات متعدد کلینیکی و قانونی را به همراه دارد (۳). لذا امروزه استفاده از Anti-D مونوکلونال تولید شده به روش هیبریدوما که به صورت مؤثری قادر به حذف گلوبول‌های قرمز RhD مثبت در خون مادر می‌باشند مورد توجه روزافزون قرار گرفته است (۱۳).

نتیجه‌گیری

رسوب ایمنی می‌تواند به عنوان یکی از روش‌های مؤثر در جداسازی نسبی آنتی ژن D با حفظ ساختار طبیعی و شکل آنتی ژنی اولیه آن از غشا گلوبول‌های قرمز در نظر گرفته شود. RhD جدا شده می‌تواند کاربردهای مختلفی داشته باشد که از جمله‌ی آن‌ها می‌توان به مطالعات ساختار آنتی ژن پروتئینی غشای گلوبول و تولید آنتی بادی‌های پلی و مونوکلونال اشاره کرد.

- 4- Mouro I, Colin Y, Cherif-Zahar B, Cartron JP, Le van Kim C. Molecular genetic basis of the human Rhesus blood group system. *Nat Genet.* 1993; 5(1): 62-5.
- 5- Nielsen LK, Norderhaug L, Sandlie I, Dziegiel MH. *In vitro* functional test of two subclasses of an anti-RhD antibody produced by transient expression in COS cells. *APMIS.* 2006; 114: 345-51.
- 6- Laemi UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227(5259): 680-5.
- 7- Le Van Kim C, Colin Y, Pierre Cartro J. Rh proteins: key structural and functional components of the red cell membrane. *Blood Reviews.* 2006; 20(2): 93-110.
- 8- ColinY, Cherif-Zahar B, Le van Kim C, Raynal V, Van Huffel V, Cartron JP. Genetic basis of the RhD-positive and RhD-negative blood group polymorphism as determined by Southern analysis. *Blood.* 1991; 78(10): 2747- 52.
- 9- Cartron JP, Bailly P, Le Van Kim C, et al. Insights into the structure and function of membrane polypeptides carrying blood group antigens. *Vox Sang.* 1998; 74: 29-64.
- 10- Scott ML, Voak D, Jones JW, et al. A structural model for 30 Rh D epitopes based on serological and DNA sequence data from partial D phenotypes. *Transfus Clin Biol.* 1996; 3(6): 1- 396.
- 11- Suyama K, Goldstein J. Antibody produced against isolated Rh(D) polypeptide reacts with other Rh-related antigens. *Blood.* 1988; 72(5): 1622-6.
- 12- Bowman J. Thirty –five years of Rh prophylaxis. *Transfusion.* 2003; 43: 1661-6.
- 13- Kumpel BM. Efficacy of RhD monoclonal antibodies in clinical trials as replacement therapy for prophylactic anti-D immunoglobulin: more questions than answers. *Vox Sanguinis.* 2007; 93(2): 99-111.

Isolation and Detection of RhD Antigen from Red Blood Cell (RBC) Membrane by Immuno-Precipitation Method

Oodi A, Halabian R, Mohammadipour M, Amirizadeh N, Amani M, Masroori N, Gharehbaghian A,
Habibi Roudkenar M

Corresponding Author's Address: Research Center of Iranian Blood Transfusion Organization, Tehran, Iran.

Email: Roudkenar@ibto.ir

Background and Objective: Rh (Rhesus) is a highly complex blood group system in man which plays an important role in transfusion medicine. The aim of this study was the isolation of RhD protein from the membrane of RBCs.

Materials and Methods: In this experimental study immunoprecipitation method with human anti-RhD polyclonal antibody was utilized for the isolation of RhD antigen from Rh⁺ human blood samples. Proteins of RBCs were characterized by SDS-PAGE and Western blot analysis. Antigenicity of the RhD protein was assessed by ELISA using commercially available human anti-RhD polyclonal antibody with peroxidase conjugated goat anti-human as a secondary antibody.

Results: The results show that RhD protein has successfully been isolated by immunoprecipitation method. The expected size of RhD protein was confirmed by Western blot analysis. RhD antibody reacted with RhD antigen prepared from ghost with polyclonal antibody in ELISA, but no reaction was observed in Western blot analysis with monoclonal antibody. It is necessary to mention that this is the primary report of relative purification of RhD and further studies are recommended.

Conclusion: The RhD may be helpful to further investigate the molecular basis of RhD protein and could be applicable for production of anti- D antibody in an animal model.

Key words: Red blood cell, RhD antigen, Immunoprecipitate