*Original Article*

# A Dimerized Synthetic RhD Peptide for Rabbit Immunization: Comparison With the Antigen from Human Red Blood Cell Membranes

*Fatemeh Yari*[1], *Fatemeh Gorzin*[1]

[1]*Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran*

Received: 2026/04/13
Accepted: 2026/05/13

http://dx.doi.org/10.61186/bloodj.21.4.333

**Citation:**
Yari F, Gorzin F. A Dimerized Synthetic RhD Peptide for Rabbit Immunization: Comparison With the Antigen from Human Red Blood Cell Membranes. J Iran Blood Transfus. 2026: 23 (1): 45-52

**Correspondence:** Yari F., Professor of Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine.
P.O.Box: 14665-1157, Tehran, Iran.
Tel: (+9821) 82052237
**E-mail:** *f.yari@tmi.ac.ir*

## ABSTRACT

### *Background and Objectives*

The Rh proteins play a crucial role in blood transfusion. Among the Rh blood group antigens, the D antigen is notable for its high immunogenicity. The aim of this study was to produce specific antibodies against the RhD antigen in rabbits by utilizing a complete and dimeric antigen derived from a synthetic peptide specific to the D antigen. Ultimately, the potential of these antibodies to agglutinate human red blood cells was investigated.

### *Materials and Methods*

In this experimental study, antibodies against RhD were generated in rabbits. Rabbits 1 and 2 were immunized with the complete RhD antigen, which was purified from the membranes of red blood cells by affinity chromatography. Concurrently, Rabbit 3, was immunized with an RhD antigen dipeptide, which was prepared from a selected peptide of RhD using the O-PDM method. IgG molecules were purified from the antisera produced in rabbits. The characteristics of both the purified RhD antigen and the antisera were evaluated using the ELISA method. Additionally, the functional activity of antisera was assessed through the agglutination of human red blood cells.

### *Results*

The characteristic of the purified RhD antigen was demonstrated by ELISA assay using commercial anti-RhD antibody. Antibody formation in the sera of rabbits was also confirmed using the ELISA method. The isolated IgG polyclonal rabbit antibodies against RhD showed agglutination of $O^+$ red blood cells in the presence of a secondary antibody (n=3). Subsequently, the specificity of the produced antisera was similar between rabbits immunized with the purified antigen and those immunized with the dimerized peptide. The antibodies were only able to agglutinate red blood cells through a two-step method. The synthetic peptide related to the amino terminus of RhD antigen, in its dimeric form, exhibited immunogenic characteristic comparable to those of the complete antigen.

### *Conclusions*

These findings indicate that the appropriate dimeric form of a peptide can serve as a substitute for the conjugated peptide and a carrier protein for achieving successful immunization.

***Key words:*** Red Blood Cells, Rh Factor, Peptides, Immunization, Rabbits

Copyright © 2025 Journal of Iranian Blood Transfusion, Published by Blood Transfusion Research Center.
This work is licensed under a Creative Common Attribution-Non Commercial 4.0 International license.

[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-06-10 ]

فصلنامه پژوهشی خون
دوره ۲۳ شماره ۱ بهار ۱۴۰۵ (۵۲-۴۵)

مقاله پژوهشی

# به کارگیری یک پپتید سنتتیک دایمری RhD برای ایمن‌سازی در خرگوش و مقایسه آن با آنتی‌ژن کامل به دست آمده از غشای گلبول قرمز انسان

فاطمه یاری[۱]، فاطمه گرزین[۲]

۱- PhD ایمونولوژی ـ استاد مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۲- کارشناس ارشد ایمونولوژی ـ مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۵/۰۱/۲۴
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۲/۲۳

http://dx.doi.org/10.61186/bloodj.21.4.333

**Citation:**
Yari F, Gorzin F. A Dimerized Synthetic RhD Peptide for Rabbit Immunization: Comparison With the Antigen from Human Red Blood Cell Membranes. J Iran Blood Transfus. 2026: 23 (1):

**نویسنده مسئول:**
دکتر فاطمه یاری. استاد مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
صندوق پستی: ۱۱۵۷-۱۴۶۶۵
**E-mail:** *f.yari@tmi.ac.ir*

**کد اخلاق:**
IR.TMI.REC.1395.016

## چکیده

***سابقه و هدف***

پروتئین‌های **Rh**، از اهمیت بالایی در انتقال خون برخوردار می‌باشند. در میان آنتی‌ژن‌های گروه خونی **Rh**، آنتی‌ژن **D** بسیار ایمونوژن است و تشخیص این آنتی‌ژن به لحاظ بالینی اهمیت دارد. هدف این مطالعه، ایجاد آنتی‌بادی‌های اختصاصی ضد آنتی‌ژن **D** در حیوان خرگوش با به کارگیری آنتی‌ژن کامل و دایمری از یک پپتید سنتتیک ویژه آنتی‌ژن **D** بود. در نهایت، بررسی کارآیی آنتی‌بادی‌های حاصل در آگلوتیناسیون گلبول‌های قرمز انسانی مورد مطالعه قرار گرفت.

***مواد و روش‌ها***

در این مطالعه تجربی، آنتی‌بادی ضد **RhD** در حیوانات خرگوش ایجاد شد. خرگوش‌های ۱ و ۲، آنتی‌ژن کامل **RhD** را دریافت نمودند که از غشای گلبول‌های قرمز به روش کروماتوگرافی تمایلی خالص گردیده بود. به موازات، خرگوش ۳ با یک پپتید اختصاصی که با روش **O-PDM** دایمر شده بود ایمونیزه شد. مولکول‌های **IgG** از آنتی‌سرم‌های خرگوشی خالص شدند. ویژگی آنتی‌ژن خالص شده **RhD** و هم‌چنین آنتی‌سرم‌های ایجاد شده در خرگوش‌ها با روش **ELISA** ارزیابی شد. به علاوه عملکرد آنتی‌سرم‌ها از طریق آگلوتیناسیون گلبول‌های قرمز انسانی مورد مطالعه قرار گرفت.

***یافته‌ها***

ویژگی آنتی‌ژن **RhD** خالص شده با به کارگیری یک آنتی‌بادی تجاری به وسیله روش **ELISA** نشان داده شد. تشکیل آنتی‌بادی‌های ضد **RhD** در سرم حیوانات خرگوش پس از اتمام مراحل تزریق، با به کارگیری روش **ELISA** تایید گردید. آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال به دست آمده از حیوانات ایمیون، توانایی آگلوتیناسیون گلبول های قرمز $O^+$ را در روش دو مرحله‌ای و حضور یک آنتی‌بادی ثانویه دارا بودند (**n=۳**). در این رابطه، آنتی‌سرم‌های مربوط به تزریق آنتی‌ژن کامل و پپتید دایمر نتایج مشابهی نشان دادند. آنتی‌بادی‌های به دست آمده تنها قادر به آگلوتیناسیون گلبول‌های قرمز $O^+$ از طریق روش دو مرحله‌ای بودند. استفاده از پپتید سنتتیک مرتبط با انتهای آمینو آنتی‌ژن **RhD**، در شکل دایمر آن ویژگی ایمونولوژیک مشابهی را در مقایسه با آنتی‌ژن کامل نشان داد.

***نتیجه گیری***

بر اساس یافته‌های این مطالعه، آنتی‌سرم حاصل از تزریق پپتید سنتتیک دایمری، از نظر قدرت ایمنی‌زایی، نتایج مشابهی با آنتی‌ژن کامل **RhD** در تست آگلوتیناسیون گلبول‌های قرمز واجد **RhD** نشان داد. بنابراین، به نظر می‌رسد برای ایمن‌سازی مؤثر با یک پپتید، می‌توان از فرم دایمری مناسب آن پپتید به عنوان جایگزینی برای پپتید کونژوگه و پروتئین حامل استفاده کرد.

***کلمات کلیدی:*** گلبول‌های قرمز، فاکتور **Rh** ، پپتیدها، ایمونیزاسیون، خرگوش‌ها



[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-06-10 ]

## مقدمه

اهمیت گروه خونی Rh با این حقیقت در ارتباط است که آنتی‌ژن‌های Rh بسیار ایمونوژن می‌باشند. در مورد آنتی‌ژن D، افرادی که آن را تولید نمی‌کنند، چنانچه در معرض این آنتی‌ژن بر روی گلبول‌های قرمز تزریق شده قرار گیرند، آنتیD را تولید خواهند کرد که می‌تواند سبب یک واکنش انتقال خون همولیتیک شده و یا بر روی گلبول‌های قرمز جنینی سبب بیماری همولیتیک نوزادان گردد (۲، ۱).

در حال حاضر تعیین آنتی‌ژن گروه خونی RhD به صورت معمول جهت اهداکنندگان خون، گیرندگان خون و در افرادی که قصد بارداری دارند صورت می‌گیرد. با توجه به این که مجموعه آنتی‌ژن‌های سیستم Rh به وسیله آنتی‌بادی‌هایی با ویژگی متفاوت شناسایی می‌شوند، چنانچه این آنتی‌بادی‌ها از کلاس IgG باشند، در آگلوتیناسیون گلبول‌های قرمز خون، نیاز به آنتی‌بادی لایه دوم (آنتی‌هیومن گلوبولین) خواهد بود.

آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال ضد آنتی‌ژن D ایجاد شده در حیوان خرگوش اغلب از کلاس IgG بوده و جهت روش آگلوتیناسیون و ارزیابی آنتی‌ژن D بر روی غشای گلبول‌های قرمز توصیه نمی‌شوند بلکه جهت روش‌های ELISA و western blot معرفی شده‌اند. علت این امر، عدم واکنش دهی یک مرحله‌ای با گلبول‌های قرمز جهت آگلوتیناسیون می‌باشد. از آنتی‌بادی مونوکلونال انسانی علاوه بر استفاده درمانی جهت پیشگیری از بیماری همولیتیک نوزادان، در آزمایش‌های آگلوتیناسیون گلبول‌های قرمز در سنجش‌های سرولوژیک گروه خونی نیز استفاده می‌شود (۵-۳).

برای ایمنی‌زایی در حیوان می‌توان از آنتی‌ژن پروتئینی کامل و یا از توالی پپتیدی خاص از یک پروتئین استفاده کرد (۸-۶). ساختار بزرگتر و پیچیده‌تر پروتئین کامل سبب ایجاد پاسخ ایمنی قوی‌تری نسبت به پپتیدها می‌شود. آنتی‌ژن پروتئینی کامل حاوی تمام ساختارهای اپی‌توپیک بوده و پاسخ ایمنی وسیعی را تولید می‌کند اما ممکن است حاوی بخش‌های غیر هدف و غیر ایمنی‌زا نیز باشد. پپتیدها از آن جایی که بخش‌های کوتاه و مشخصی از آنتی‌ژن هستند، توانایی هدف قرار دادن نواحی خاصی از پروتئین هدف را دارند و از طرفی نیاز به آنتی‌ژن‌های مشتق شده از حیوان و انسان را از بین می‌برند. با این وجود، پپتیدهای سنتتیک جهت ایمنی‌زایی نیاز به کونژوگه شدن با پروتئین بزرگتری به نام حامل (carrier) دارند زیرا آن‌ها به تنهایی وزن مولکولی کمی داشته و فاقد ساختار سه بعدی پایدار هستند. وقتی پپتید به یک حامل قوی مانند KLH متصل می‌شود، در سلول‌های عرضه کننده (مثل دندریتیک سل‌ها) پپتید داخل MHC کلاس II، به لنفوسیت T کمک‌کننده ارائه می‌شود و سلول‌های B هم هم‌زمان آنتی‌ژن را شناسایی کرده و فعال می‌شوند، لذا پاسخ ایمنی قوی‌تری ایجاد می‌شود (۹). هدف این مطالعه، به کارگیری آنتی‌ژن کامل RhD و به موازات آن، یک پپتید سنتتیک ویژه همان آنتی‌ژن در ایجاد ایمنی در خرگوش بود. این پپتید، به جای کونژوگه شدن با پروتئین حامل، دایمریزه شده و از آن برای ایجاد ایمنی در حیوان خرگوش استفاده شد. در این مطالعه قابلیت ایمونیزاسیون شکل دایمر پپتید که اندازه بزرگتری نسبت به پپتید دارد مورد مطالعه قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، ۳ کیسه گلبول قرمز متراکم ($RhD^+$) از پایگاه انتقال خون تهران تهیه شد. گلبول‌های قرمز در دور g ۴۰۰ با انجام سانتریفیوژ از سایر سلول‌های خونی جدا شده و با بافر لیز واجد تریس، Nonidet P-40 (رُوش، آلمان) و EDTA مواجه شدند. در ضمن از مهارکننده پروتئازی PMSF (سیگما، آمریکا) نیز در بافر لیز استفاده شد. روش جداسازی آنتی‌ژن، ساخت ستون کروماتوگرافی تمایلی و خالص‌سازی پروتئین RhD با استفاده از ستون کروماتوگرافی تمایلی صورت گرفت (۱۱، ۱۰).

*بررسی ویژگی پروتئین خالص شده با روش ELISA:*

در خانه‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای مخصوص الایزا، ۵۰ میکرولیتر از رقت‌های مختلف تهیه شده از پروتئین خالص شده ریخته شد. در یک خانه از یک پروتئین بی‌ربط (گنادوتروپین hCG) به عنوان کنترل منفی استفاده شد که منفی بودن این خانه، اختصاصی بودن واکنش آنتی‌بادی را نشان می‌دهد و در خانه آخر هم PBS به تنهایی اضافه شد. این پلیت در طول شب در یخچال انکوبه شد تا پروتئین‌های ریخته شده در کف پلیت coat شوند. روز بعد ابتدا پلیت را خالی کرده و پس از خشک کردن، ۱۰۰ میکرولیتر بافر بلاکر حاوی سدیم آزاید (آلبومین ۲٪ که آزاید دارد) به خانه‌های پلیت اضافه شد. سپس پلیت به مدت ۳ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از این مدت، پلیت تخلیه شده و روی دستمال خشک شد. عملیات در مراحل بعدی با اضافه کردن ۵۰ میکرولیتر آنتی‌بادی اختصاصی ضد RhD (ایمیونودیاگنوستیکا، آلمان) به خانه‌های پلیت الایزا



[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-06-10 ]

اضافه شد و برای مدت ۱ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از شستشو با محلول PBS واجد تواین ۰/۰۶٪ ، به هر چاهک، ۵۰ میکرولیتر آنتی‌بادی کنژوگه اضافه و به مدت ۴۰ دقیقه در ۳۷ درجه انکوبه شد. پس از شستشو، ۵۰ میکرولیتر سوبسترای TMB اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی قرار داده شد تا زمانی که خانه‌های پلیت رنگ بگیرد ولی خانه PBS رنگ نگرفته باشد. در نهایت، محلول STOP اضافه و توسط دستگاه الایزا ریدر در طول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت شد. آنتی‌ژن خالص شده پس از تعیین غلظت، تقسیم و فریز شد.

*ایجاد دی‌پپتید RhD:*

یک پپتید واجد ۳۰ اسید آمینه با توالی زیر مربوط به انتهای آمینو RhD توسط کمپانی "KJ Ross-Petersen ApS" در کپنهاک دانمارک با خلوص ۹۶/۲۸٪ سنتز شد :

YDASLEDQKGLVASYQVGQDLTVMAAIGLGC

با به کارگیری ( = N, N'- (o-Phenylene) dimaleimide Bis-mailimide (O-PDM (سیگما، آمریکا) که می‌تواند دو مولکول را از طریق گروه‌های SH- با اتصال دی‌سولفیدی به یکدیگر متصل نماید، اقدام به ایجاد دی‌پپتید RhD با اتصال دی‌سولفیدی گردید. برای ایجاد دایمر از پپتید مورد نظر، پودر O-PDM (۱۲ mM) ، در DMSO حل شده و سپس در بافر فسفات به حجم ۱ میلی‌لیتر رسانیده شد. ویال در ظرف یخ قرار داده شد. سپس ۰/۵ mL از O-PDM به ۱ mL از پپتید (۱ mg) اضافه شده و ۲ ساعت و نیم چرخش روی روتاتور در دمای سرد انجام گرفت (۱۲).

از آن جایی که اندازه پپتید ۳۰۵۳.۴۸ دالتون می‌باشد. پیش‌بینی اندازه مولکول دایمر و یک مولکول میل ایمید، ۶۳۷۴ دالتون است. لذا، از یک لوله غشادار با cut off معادل ۵۰۰۰ دالتون برای خارج کردن پپتیدهای منومر و انجام شستشو استفاده شد. برای این منظور از دور ۴۰۰۰ RPM به مدت ۱۰ دقیقه استفاده گردید. در نهایت پس از چند بار شستشو، محلول روی غشا به عنوان مولکول‌های دایمر جمع‌آوری و OD205 nm آن قرائت گردید.

*تزریق به حیوانات:*

بر اساس دستورالعمل، چنانچه مقدار آنتی‌ژن اولیه در محدوده ۲۵۰-۵۰ میکروگرم قرار گیرد، همراه با ادجوانت کامل فروند برای ایمونیزه کردن یک حیوان خرگوش کافی است (۱۳). بر مبنای این اطلاعات تزریقات به ۳ حیوان خرگوش شروع شد. خرگوش‌های مورد استفاده نر بوده و حدود ۲ ماه سن داشتند. در ادامه، تزریقات یادآور در روزهای ۲۱، ۴۲ و ۶۳ از شروع تزریق اول صورت گرفت. لازم به ذکر است در تزریقات یادآور از ادجوانت ناقص فروند استفاده شد. در ضمن همگی تزریقات به صورت داخل عضلانی انجام شد. تزریقات انجام شده به ۳ حیوان خرگوش به ترتیب به صورت زیر بود:

خرگوش‌های ۱ و ۲ دریافت‌کننده آنتی‌ژن کامل RhD که از غشای گلبول‌های قرمز واجد این آنتی‌ژن خالص شده بود. و خرگوش ۳، دریافت‌کننده دی‌پپتید آنتی‌ژن RhD بود که با روش O-PDM تهیه شده بود.

## یافته‌ها

*مراحل آزمایشی پس از تکمیل تزریقات آنتی‌ژن به ۳ حیوان خرگوش:*

خونگیری از حیوانات مزبور انجام و سرم مربوطه از نظر ویژگی آنتی‌بادی ضدRhD با استفاده از روش الایزا ارزیابی گردید (نمودار ۱).

آنتی‌سرم‌های حاصل، در آگلوتیناسیون گلبول‌های قرمز $RhD^+$ استفاده شدند. نتیجه آگلوتیناسیون، مطلوب نبوده و به صورت آگلوتیناسیون ضعیف تا منفی در مشاهده میکروسکوپی خود را نشان داد.

*کروماتوگرافی تمایلی به وسیله آنتی‌ژن D:*

به علاوه، یک ستون کروماتوگرافی تمایلی با استفاده از آنتی‌ژنD تهیه شده و در جداسازی ایمونوگلوبولین‌های ضد RhD از سرم خرگوش‌های ایمن استفاده شد (۱۰).

*به کارگیری آنتی‌بادی‌های خالص شده در آگلوتیناسیون گلبول‌های قرمز:*

لوله‌های مربوط به فراکشن ایمونوگلوبولین که از ستون کروماتوگرافی آنتی‌ژن جداسازی شدند، در آگلوتیناسیون گلبول‌های قرمز $O^+$ مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتیجه immediate spin در مشاهده چشمی منفی و در مشاهده میکروسکوپی مثبت ضعیف نشان داد (شکل ۱).

با افزایش زمان مواجهه گلبول‌های قرمز $D^+$ و آنتی‌بادی‌های حیوانی به ۳۰ دقیقه و سپس انجام سروفیوژ، واکنش‌های ماکروسکوپی حتی در حضور آلبومین ۲۲٪ در غالب موارد در آن‌ها مشهود نبود.

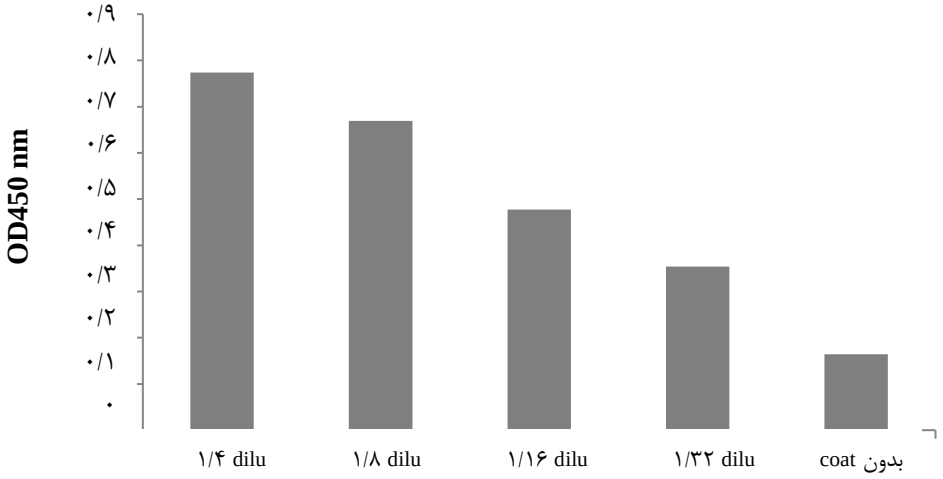
در مرحله نهایی، ۳ بار شستشو با سرم فیزیولوژی انجام و



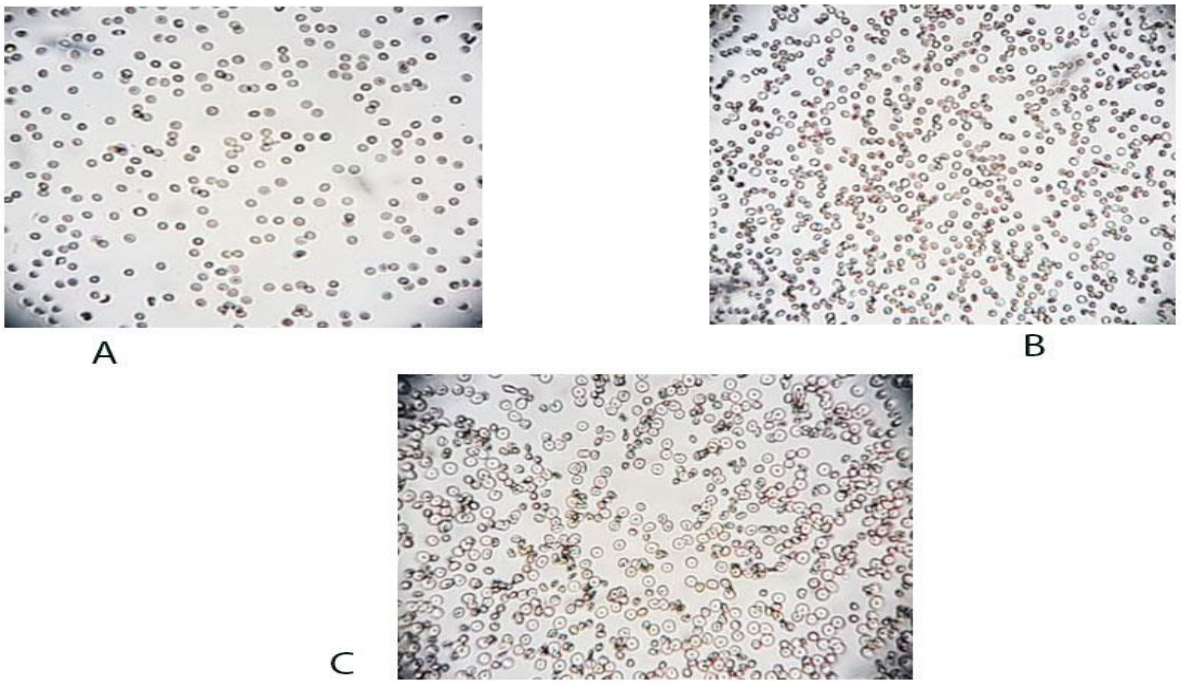
[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-06-10 ]

سپس "anti-IgG" افزوده شده و نتایج در جدول ثبت گردید (جدول ۱). تشکیل آگرگیت‌های قوی به دنبال به کارگیری آنتی‌بادی ثانویه درگلبول‌های قرمز $D^+$ در شکل مشاهده می‌شود (شکل ۲). نتایج نشان‌دهنده واکنش‌دهی مثبت آنتی‌بادی‌های خرگوشی ضد RhD با گلبول‌های قرمز $O^+$ با به کارگیری آنتی‌بادی ثانویه می‌باشد.

**بررسی ویژگی آنتی‌ژن RhD خالص شده با روش ELISA**




**نمودار ۱ : واکنش‌دهی آنتی‌ژن خالص شده با آنتی‌بادی ضد RhD تجاری، نشان‌دهنده ویژگی مورد نظر در مخلوط آنتی‌ژنی به دست آمده از ۵ بار کار با ستون کروماتوگرافی تمایلی می‌باشد.**



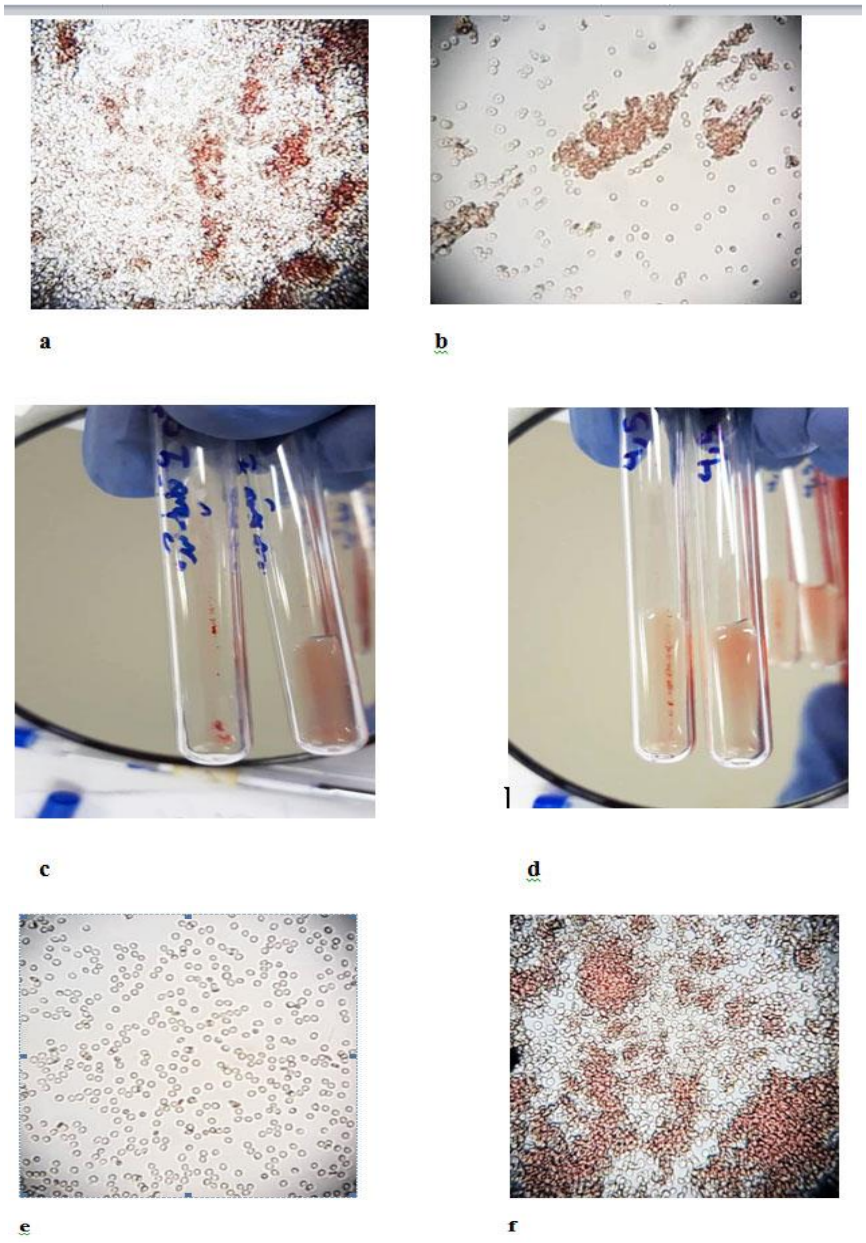

**شکل ۱: تشکیل آگرگیت‌های کوچک میکروسکوپی در مواجهه آنتی‌بادی‌های به دست آمده از سرم حیوانات ایمن و گلبول‌های قرمز شکل A : مواجهه سرم خرگوش ۲ با گلبول‌های قرمز $D^-$ ، پس از آن اشکال B و C ، به ترتیب اشاره به واکنش گلبول‌های قرمز $D^+$ با آنتی‌بادی حیوان ۲ (دریافت‌کننده آنتی‌ژن کامل RhD ) و حیوان ۳ (دریافت‌کننده دایمر پپتیدی) می‌باشد.**



[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-06-10 ]

**جدول ۱: نتیجه چشمی مشاهده آگلوتیناسیون گلبول‌های قرمز پس از مواجهه گلبول‌های قرمز $D^+$ و $D^-$ با آنتی‌بادی ضد RhD خرگوشی و به کارگیری آنتی‌بادی ثانویه نشان‌دهنده کارآیی هر دو نوع آنتی‌بادی در آگلوتیناسیون گلبول‌های قرمز می‌باشد.**

| RBC Blood group | خرگوش‌های ۱ و ۲ دریافت‌کننده آنتی‌ژن کامل RhD غشایی | خرگوش ۳ دریافت‌کننده دایمر پپتیدی | |
|---|---|---|---|
| $O^+$ | +۳ | +۳ | Immediate spin n= ۳ |
| مثبت | | | |
| $O^-$ | ۰ | ۰ | |
| منفی | | | |




**شکل ۲: واکنش‌دهی آنتی‌بادی‌های خرگوشی ضد RhD با گلبول‌های قرمز $O^+$ در حضور آنتی‌بادی ثانویه. a ، b و f ، مشاهده میکروسکوپی تشکیل آگرگیت حاصل از واکنش آنتی‌بادی‌های خرگوشی ضد RhD با گلبول‌های قرمز $O^+$ پس از شستشو و مواجهه با آنتی‌بادی ثانویه e مشاهده میکروسکوپی عدم تشکیل آگرگیت حاصل از واکنش آنتی‌بادی‌های خرگوشی ضد RhD با گلبولهای قرمز $O^-$ پس از شستشو و مواجهه با آنتی‌بادی ثانویه d وc مشاهده چشمی واکنش لوله‌ای تشکیل آگلوتیناسیون و یا عدم تشکیل آن به ترتیب برای گلبول‌های $O^+$ و $O^-$ به دنبال مواجهه با آنتی‌بادی خرگوشی و سپس آنتی‌بادی ثانویه**



[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-06-10 ]

## بحث

در این مطالعه، آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال خرگوشی بر علیه RhD به دست آمد. برای این منظور، آنتی‌ژن D استخراج شده از غشای گلبول‌های قرمز انسان و به موازات آن، یک پپتید سنتتیک مربوط به قسمت ایمونوژن آنتی‌ژن RhD به صورت دایمر استفاده گردید. از آنتی‌سرم‌های ایجاد شده در خرگوش، مولکول‌های IgG تخلیص شد. آنتی‌بادی‌های خالص شده، در حضور آنتی‌بادی ثانویه منجر به آگلوتیناسیون گلبول‌های قرمز $O^+$ گردیدند. به کارگیری یک پپتید سنتتیک مربوط به انتهای آمینو این آنتی‌ژن، در شکل دایمر آن ویژگی ایمونوژنیک مشابهی در مقایسه با آنتی‌ژن کامل نشان داد.

به کارگیری آنتی‌بادی ضد RhD اهمیت به سزایی در تشخیص و درمان دارد. شرکت‌های تجاری مختلف انواع این آنتی‌بادی‌ها را ارائه می‌نمایند؛ از جمله آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال ضد RhD که در حیوان خرگوش تولید می‌شوند. این آنتی‌بادی‌ها همگی از کلاس IgG بوده و کاربردهایی هم‌چون ELISA و westen blot ، برای آن‌ها ذکر شده است. در مطالعه‌های مختلف، آنتی‌بادی‌های مونوکلونال موشی ضد RhD جهت به کارگیری در روش‌های مختلف سنجش‌های ایمونولوژیکی عرضه شده‌اند (۱۴). از طرفی، برخی آنتی‌بادی‌های ضد RhD نیز به صورت نوترکیب تولید می‌شوند مانند محصول نوترکیب ضد RhD که تنها واجد قسمت Fab مولکول آنتی‌بادی بوده و در سلول‌های CHO بیان می‌شود (۱۵). بسیاری از محصولات معرفی شده، قابلیت آگلوتیناسیون گلبول‌های قرمز را نداشته و جهت این منظور طراحی و تولید نشده‌اند.

در رابطه با تولید آنتی‌بادی‌های آگلوتینه کننده گلبول‌های قرمز، آنتی‌بادی‌ها غالباً از کلاس IgM بوده و قدرت آگلوتیناسیون گلبول‌های قرمز را دارا هستند. در این مطالعه، آنتی‌بادی‌های تولید شده در حیوان خرگوش که عمده آن از کلاس IgG می‌باشند، قابلیت ایجاد آگلوتیناسیون گلبول‌های قرمز را در روش دو مرحله‌ای با به کارگیری آنتی‌بادی ثانویه داشتند. این مطالعه هم‌چنین، قابلیت آنتی‌ژنیک مشابهی را برای پپتید سنتتیک در شکل دایمر آن نشان داد. بر اساس نتایج این مطالعه، به نظر می‌رسد، برای ایمنی‌زایی مناسب یک پپتید، بتوان از شکل مناسب دایمر آن پپتید، به عنوان جایگزین کونژوگه پپتید و پروتئین کریر استفاده نمود. البته باید توجه شود که انتخاب روش ایجاد دایمر پپتیدی برای ممانعت از ایجاد شاخص‌های آنتی‌ژنتیک غیر اختصاصی بسیار حائز اهمیت است. در این مطالعه یک اسید آمینه (سیستئین) به انتهای پپتید اضافه شده و ایجاد اتصالات دی‌سولفیدی هدف قرار گرفته از ایجاد اتصالات اسیدهای آمینه در قسمت‌های داخلی پپتید احتراز شده است. علی‌رغم این که در مطالعه‌های گذشته، از آنتی‌ژن‌های پپتیدی در ایجاد آنتی‌بادی‌های ضد آنتی‌ژن‌های Rh استفاده شده است از آن جایی که مطالعه مشابهی در رابطه با به کارگیری دایمر پپتیدی جهت ایمونیزاسیون یافت نشد، امکان مقایسه در این رابطه فراهم نگردید (۱۶).

به نظر می‌رسد علت اصلی عدم انجام مطالعه مشابه، پذیرش روش معمول در استفاده از پپتیدها در اتصال کوالانت آن‌ها با یک پروتئین حامل باشد. از جمله محدودیت‌های مطالعه، مشکلات کار با حیوانات آزمایشگاهی و محدودیت مقدار خون قابل دسترس آن‌ها در طول مطالعه بوده است.

## نتیجه‌گیری

برای حصول واکنش آگلوتیناسیون با به کارگیری آنتی‌بادی پلی‌کلونال بر علیه آنتی‌ژن RhD، هر چند ایمونیزاسیون به صورت موفقیت‌آمیزی صورت گرفته باشد، نیاز به آنتی‌بادی لایه دوم وجود دارد. به نظر می‌رسد، ایمونیزاسیون با یک پپتید اختصاصی به صورت دایمر آن بتواند در ایمونیزاسیون حیوان بر علیه آن آنتی‌ژن مؤثر باشد.

## حمایت مالی

این مقاله حاصل یک طرح پژوهشی می‌باشد که توسط مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ایران تأمین مالی شده است.

## ملاحظات اخلاقی

این مطالعه با کد اخلاق IR.TMI.REC.1395.016 حاصل قسمتی از یک طرح پژوهشی بوده و مصوب شورای پژوهش مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ایران می‌باشد.

## عدم تعارض منافع

هیچ گونه تعارض منافعی در مطالعه حاضر وجود ندارد.

## نقش نویسندگان

دکتر فاطمه یاری: طراحی مطالعه، انجام کار پژوهش و نگارش مقاله

فاطمه گرزین: همکاری در انجام کار پژوهش



[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-06-10 ]

**تشکر و قدردانی**

این تحقیق قسمتی از نتایج یک طرح پژوهشی مصوب مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ایران می‌باشد. بدین وسیله نویسندگان مقاله از این مؤسسه به دلیل حمایت‌های مالی، تشکر و قدردانی می‌نمایند.

## References:

1- Avent ND, Reid ME. The Rh blood group system: a review. Blood. 2000; 95(2): 375-87. [DOI:10.1182/blood.V95.2.375] [PMID]
2- Westhoff CM. The structure and function of the Rh antigen complex. Semin Hematol. 2007; 44(1): 42-50. [DOI:10.1053/j.seminhematol.2006.09.010] [PMID] []
3- Nadarajan VS. Serological analysis of Rh antigens: how far can we go? Annals of Blood. 2023; 8. [DOI:10.21037/aob-23-30]
4- 4. Li HY, Guo K. Blood Group Testing. Front Med (Lausanne). 2022; 9: 827619. [DOI:10.3389/fmed.2022.827619] [PMID] []
5- Wu H, Li R, Wei H, Zhu W, Xing Y. Clinical Characteristics and Prognosis of Hemolytic Disease of the Newborn Caused by Irregular Antibodies: A 13-Year Retrospective Analysis. Children (Basel). 2024;11(12): 1409. [DOI:10.3390/children11121409] [PMID] []
6- Grant GA. Synthetic Peptides for Production of Antibodies that Recognize Intact Proteins. Curr Protoc Immunol. 2003; 55(1): 9.2: 1-9. [DOI:10.1002/0471142735.im0902s55] [PMID]
7- Tamura T, Tomimatsu K, Katakura Y, Yamashita M, Matsumoto SE, Aiba Y, et al. Anti-peptide antibody production elicited by in vitro immunization of human peripheral blood mononuclear cells. Biosci Biotechnol Biochem. 2007; 71(12): 2871-5. [DOI:10.1271/bbb.60460] [PMID]
8- Lee BS, Huang JS, Jayathilaka LP, Lee J, Gupta S. Antibody Production with Synthetic Peptides. Methods Mol Biol. 2016; 1474: 25-47. [DOI:10.1007/978-1-4939-6352-2_2] [PMID]
9- Millard AL, Ittelet D, Schooneman F, Bernard J. Dendritic cell KLH loading requirements for efficient $CD4^+$ T-cell priming and help to peptide-specific cytotoxic T-cell response, in view of potential use in cancer vaccines. Vaccine. 2003; 21(9-10): 869-76. [DOI:10.1016/S0264-410X(02)00534-0] [PMID]
10- Cochet S, Blancher A, Roubinet F , Hattab C , Cartron JP, Bertrand O. Immunopurification of the blood group RhD protein from human erythrocyte membranes. J Chromatogr B Biomed Sci Appl. 1999 10; 735(2):207-17. [DOI:10.1016/S0378-4347(99)00424-7] [PMID]
11- Rezaeeyan H , Yari F, Milani S. The Blood Group Rhc Protein from Human Erythrocyte Membranes as an Immunogen for Producing Antibodies in Mice. Iran J Ped Hematol Oncol. 2024; 14( 1): 44-52. [DOI:10.18502/ijpho.v14i1.14663]
12- Greg T. Hermanson, editor: Bioconjugation. 3rd ed. UK: Pierce Biotechnology, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL; 2013: Chapter 13
13- Johnstone A and Thorpe R, editors: Immunochemistry in Practice. 3rd ed. London: Blackwell Science; 1996: Chapter 2
14- Walker RY, Andrew S, Kumpel BM, Austin EB. Murine monoclonal antibodies reactive with a human monoclonal anti-RhD antibody (BRAD-5). Transfus Med. 2000; 10(3): 225-31. [DOI:10.1046/j.1365-3148.2000.00258.x] [PMID]
15- Miescher S, Zahn-Zabal M, De Jesus M, Moudry R, Fisch I, Vogel M, et al. CHO expression of a novel human recombinant IgG1 anti-RhD antibody isolated by phage display. Br J Haematol. 2000;111(1): 157-66. https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2000.02322.x [DOI:10.1046/j.1365-2141.2000.02322.x]
16- Hermand P, Mouro I, Huet M, Bloy C, Suyama K, Goldstein J, et al. Immunochemical characterization of rhesus proteins with antibodies raised against synthetic peptides. Blood. 1993 ;82(2): 669-76. https://doi.org/10.1182/blood.V82.2.669.bloodjournal822669 [DOI:10.1182/blood.V82.2.669.669]



[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-06-10 ]