Archive of SID

مقاله تحقیقی

تشخیص پیش از تولد گروه خونی *RhD* جنین انسان با استفاده از روش *heminested-PCR*

دکتر قاسم آهنگری* ، استادیار ایمونوژنتیک، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری
شیخ محمد سید محمد پور، فوق لیسانس ژنتیک، دانشگاه شهید بهشتی
دکتر مریم شمس لاهیجانی، استاد بیولوژی، دانشگاه شهید بهشتی
بهاره ربانی، فوق لیسانس ژنتیک، دانشگاه خاتم
دکتر فاطمه محسنی، متخصص بیهوشی، دانشگاه علوم پزشکی ایران

خلاصه

هدف: آنتی ژن گروه خونی رزوس که در ایجاد بیماری همولتیک نوزادان، واکنشهای انتقال خون و کم خونی همولتیک خود ایمن دخیل است، در انتقال خون وطب بالینی اهمیت زیادی دارد. علی رغم مصرف وسیع ایمونوگلوبولین Rh در مادران Rh منفی ایمونیزاسیون ناشی از Rh منفی اتفاق می‌افتد. آنتی ژن RhD با استفاده از روش PCR در ابتدای دوران جنینی قابل شناسایی بوده و افراد Rh منفی فاقد ژن RhD می‌باشند.

روش مطالعه: پنج میلی‌لیتر خون افراد نرمال از ۳۸ فرد Rh مثبت و Rh منفی به‌عنوان کنترل و ۴۰ نمونه پرزهای کوریونی (CVS) از زنان باردار در هفته‌های ۸ تا ۱۲ بارداری تهیه شد. استخراج DNA از CVS انجام گردید. سپس واکنش زنجیره‌ای پلی مراز نیمه آشیانه‌ای (heminested-PCR) با استفاده از پرایمرهای اختصاصی انجام شد. محصولات PCR بر روی ژل آگارز آنالیز شدند. ژن Rh در تمام نمونه های CVS مورد شناسایی قرار گرفت.

نتایج: با استفاده از روش heminested-PCR افراد دهنده خون که از نظر سرولوژی RhD مثبت بودند ژن RhD مورد شناسایی قرار گرفت. سی‌وپنج نمونه دارای ژن RhD مثبت و ۵ نمونه فاقد ژن RhD و یا RhD منفی بود. آزمایشات PCR و الکتروفورز در خصوص نمونه های CVS نمایانگر این بود که همانند نمونه های خونی در مرحله اول تکثیر ژنی چنانچه RhD مثبت باشد دو باند مشاهده شده و در صورت عدم حضور ژن RhD نمونه تکثیر شده بصورت تک باند مشاهده می‌شود.

نتیجه‌گیری: Rh نمونه‌های جنین با استفاده از روش heminested-PC با اطمینان و سرعت زیاد، تعیین می‌شود که نتایج آزمایشهای سرولوژیکی و مطالعات مولکولی، تعیین Rh نمونه های جنین با هم مطابقت دارد.

*مسئول مقاله، آدرس:
تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری.
صندوق پستی ۶۳۴۳-۱۴۱۵۵
E-mail: ghah@ncrgeb.ac.ir

واژه های کلیدی: بیماری همولیتیک نوزادان، نمونه پرزهای کوریونی، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز نیمه آشیانه‌ای، ژن RhD ، آمنیوسنتز

مقدمه

با توجه به پیچیدگی روند تکوین جنین و تاثیرات عوامل ژنتیکی و محیطی حدود ۱۰٪ نوزادان با نوعی نقصهای ژنتیکی، کروموزومی و ناهنجاریهای مادرزادی حاصل از دوران جنینی بدنیا می‌آیند. در حالیکه تعدادی از این نقصها خفیف هستند، تعداد دیگری بسیار شدید می‌باشند. در زوجهای در معرض خطر، که هر دو والد

www.SID.ir

Archive of SID

(در بعضی از بیماریها یکی از والدین) یک ژن معیوب را حمل می‌کنند، احتمال تولد فرزندی با ناهنجاری، بسیار بالاست (بطور متوسط یک دوم یا یک چهارم فرزندان) [۱].

هدف از انجام آزمایش‌های ژنتیک (genetic testing) که با روشهای گوناگون انجام می‌شود، تعیین تغییر ژنتیکی ویژه یا شناسایی یک ژن خاص در فرد است. آزمایشهای ژنتیکی DNA، کروموزوم و یا محصول پروتئینی ژن را مد نظر قرار می‌دهند که در این تحقیق بر DNA تأکید شده است[۳،۲].

در صورتیکه مادر دارای گروه خونی Rh منفی و پدر Rh مثبت باشد با توجه به اینکه آنتی ژن Rh ایمونوژنی قوی است، برای پیشگیری و درمان ایمونیزاسیون ناشی از عدم ناسازگاری Rh و یا بیماری همولتیک نوزادان (hemolytic disease of the newborn)، اطمینان از حضور یا عدم حضور ژن RhD در جنین اهمیت بسزایی دارد زیرا اگر جنین Rh منفی باشد تشخیص بیشتر و درمان لازم نیست. آگاهی از وضعیت Rh جنین در زمانی ضروری است که جنین RhD مثبت باشد. در این حالت لازم است تمهیداتی برای جلوگیری از ایمونیزاسیون و سقط جنین بخاطر عدم سازگاری Rh جنین و مادر صورت پذیرد.

برای تشخیص پیش از تولد نمونه برداری از پرزهای کوریونی (Chorionic Villus Sampling) و آمنیوسنتز (amniocentesis) انجام می‌شود. اگر مادر Rh منفی و پدر Rh مثبت باشد دو احتمال وجود داد:
۱) پدر برای ژن RhD مثبت هموزیگوت باشد در این صورت تمام فرزندان Rh مثبت خواهند بود.
۲) پدر برای ژن RhD مثبت هتروزیگوت باشد در این صورت به احتمال ۵۰٪ هر یک از فرزندان با گروه خونی Rh مثبت به دنیا خواهند آمد[۵،۴].

Rh مثبت و Rh منفی با تشخیص حضور و عدم حضور ژن RhD در دوران جنینی به روش مولکولی میسر است[۶]. برای دستیابی به نمونه جنین راههای مختلفی وجود دارد که از جمله می‌توان به آمینوسنتز، نمونه برداری از پرزهای کوریونی و استفاده از خون مادر باردار اشاره کرد. با توجه به اینکه در دو دهه اخیر استفاده از پرزهای کوریونی گسترش زیادی پیدا کرده است[۸،۷] در تعدادی از مراکز تشخیص و درمانی کشور، نمونه برداری از پرزهای کوریونی انجام می‌شود. پژوهش حاضر جهت مقایسه ارزش تشخیصی واکنش زنجیره پلیمراز (PCR) برروی DNA خون محیطی با واکنش زنجیره پلیمراز نیمه آشیانه‌ای (heminested-PCR) و DNA استخراج شده از پرزهای کوریونی جنین برای تشخیص پیش از تولد گروه خونی RhD انجام شد.

روش مطالعه

مقدار ۵ سی سی خون EDTA از ۳۸ فرد اهداء کننده خون RhD مثبت و RhD منفی و ۴۰ نمونه از پرزهای کوریونی (CVS) گرفته شد.

DNA ژنومی از خون محیطی به روش سالتینگ اوت استخراج گردید. سپس به DNA استخراج شده ۱۰۰ میکرولیتر (Tris-EDTA) اضافه شد و مورد استفاده قرار گرفت [۹]. نمونه های پرزهای کوریونی جنین در آزمایشگاه پاک شده توسط سرم فیزیولوژی در سه مرحله شستشو و جداسازی گردیدند. در مرحله بعد ۱۵ تا ۲۵ میلیگرم بافت از نمونه‌های پرزهای کوریونی درون میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری استریل قرار داده، ۱۰۰ میکرولیتر (Phosphate buffer saline) به آن اضافه شد و نمونه ها در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. برای استخراج DNA میکروتیوبها به مدت دو دقیقه با دور ۱۰۰۰rpm سانتریفوژ شد تا نمونه پرزهای کوریونی ته نشین شود و محلول رویی خارج گردید. به پرزهای کوریونی ته نشین شده مقدار ۳۰۰ میکرولیتر ترپسین ۰/۵ درصد اضافه شد و میکروتیوبها را به‌شدت به‌هم زدیم تا بافتهای کوریونی مثل پنبه باز شوند سپس دوباره به‌مدت دو دقیقه با دور ۱۰۰۰rpm سانتریفوژ شد و تریپسین سریعاً (به‌مدت کمتر از ۵ دقیقه تماس با نمونه پرزهای کوریونی) توسط میکروپیپت خارج گردید. حدود ۱۰۰ میکرولیتر سود (NaOH) ۵۰ میلی مولار به ته نشین اضافه تا بخش ته نشین شده حل شود. در مرحله بعد بعد از بسته شدن کامل در میکروتیوبها با استفاده از پارافیلم، درون اسفنج مخصوص حمام (آب جوش) قرار داده شدند. پس‌از ۲۰ دقیقه، نمونه‌ها را از حمام آب جوش خارج و پارافیلم را جدا نمودیم. نمونه ها را برای ۱۰ دقیقه درون یخچال قرار دادیم تا خنک شدند. سپس به‌مدت دو دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ شدند، به بخش سطحی ۲۰

www.SID.ir

Archive of SID

میکرولیتر محلول Tris-HCL یک مولار (PH=7.6) اضافه نمودیم. پس از مخلوط کردن Tris-HCL به سوپ رویی، به مدت یک دقیقه با شدت ۱۰۰۰۰rpm سانتریفوژ صورت گرفت. از محلول سطحی که دارای DNA نمونه پرزهای کوریونی بود برای واکنش PCR استفاده شد. تعیین غلظت DNA استخراج شده از نمونه های خونی و پرزهای کوریونی توسط دو روش اسپکتروسکوپی یا جذب نوری (طول موج ۲۶۰ نانومتر) و همچنین از روش الکتروفورز بر روی ژل آگارز و مشاهده DNA استخراج شده استفاده گردید.

PCR برای DNA استخراج شده از خون محیطی

ابتدا برای بهینه کردن واکنش تکثیر ژنی PCR و همچنین ارزیابی میزان دقت این روش جهت شناسایی ژن RhD، از DNA استخراج شده خون محیطی استفاده گردید. حجم PCR بیست میکرولیتر در نظر گرفته شد. سپس مواد مورد نیاز برای انجام واکنش PCR شامل بافر PCR، $MgCl_2$، dnTPmix، آنزیم تکثیر ژنی و یا Taq DNA polymerase، پرایمرهای اختصاصی و آب استریل تهیه گردید. به هر یک از لوله-های میکروتیوب مقدار یک میکرولیتر DNA ژنومی استخراج شده از خون افراد RhD مثبت و منفی اضافه شد. در مرحله بعد لوله‌های میکروتیوب در دستگاه PCR قرار داده شده و آزمایش انجام شد.

چون واکنش تکثیر ژنی به‌روش heminested-PCR بود پس از انجام PCR اولیه در دور دوم PCR، ابتدا محصول واکنش دور اول ۱۰۰ برابر رقیق گردید و یک میکرولیتر از آن بعنوان الگو بکار گرفته شد. در دور دوم PCR از پرایمرهای اختصاصی که در داخل قطعه اختصاصی ژن RhD قرار می‌گیرند استفاده گردید. برای کنترل سیستم از کنترل مثبت و منفی استفاده شد بدینصورت که در کنترل منفی، برای اطمینان از عدم آلودگی واکنشها به DNA خارجی به یکی از واکنشها به جای DNA ژنومی، آب مقطر استریل اضافه شد. در کنترل مثبت یک میکرولیتر از نمونه ای که قبلاً PCR آن انجام شده و Rh آن مشخص بود بعنوان الگو مثبت استفاده شد.

PCR بر روی DNA استخراج شده پرزهای کوریونی

مطابق با PCR نمونه های خونی بهینه شده، واکنش زنجیره‌ای تکثیر ژنی روی نمونه‌های پرزهای کوریونی صورت گرفت. آزمایشات DNA بر روی نمونه پرزهای کوریونی جنینی با استفاده از heminested-PCR انجام گردید. در این آزمایش، پرزهای کوریونی نمونه جنین ۸ تا ۱۲ هفته‌ای مورد آزمایش قرار گرفت.

پس از انجام PCR الکتروفورز DNA های تکثیر شده روی ژل آگارز انجام شد. برای تجزیه و تحلیل نتایج آزمایش با توجه به طول قطعات تکثیر شده از ژل ۱/۵ درصد آگارز (۱/۵ گرم پودر آگارز به ۱۰۰ میلی لیتر بافر Tris Borate-EDTA ٪۰/۵) استفاده گردید. بعد از حرکت محصول بر روی ژل توسط جریان الکتریکی دستگاه الکتروفورز، ژل را که حاوی DNA تکثیر شده می‌باشد به‌مدت ۱۵ دقیقه در رنگ اتیدیوم بروماید ($1\ \mu g/ml$) قرار دادیم و ژل رنگ آمیزی شده را بر روی دستگاه ترانسلومیناتور که دارای نور ماوراء بنفش می‌باشد قرار داده ژنها را مورد شناسایی قرار دادیم.

طراحی پرایمرها بگونه‌ای انجام شد که ژن RhD مثبت بصورت اختصاصی تکثیر یابد. با توجه به اینکه حداقل روی یکی از دو کروموزوم همولوگ شماره یک افراد دارای خون RhD مثبت، ژن RhD قرار دارد، در دور اول PCR، پرایمرهای خارجی قطعه‌ای به طول ۲۹۱ جفت نوکلئوتید را تکثیر می‌کنند که پس از الکتروفورز و رنگ آمیزی قابل مشاهده می‌باشد. ولی بدلیل فقدان ژن RhD در افراد Rh منفی پرایمر خارجی RD-A3 که مکمل این ژن می‌باشد چنین تاثیری نمی‌گذارد. از طرفی، پرایمر RD1 که توالی مکمل آن روی ژن RhcE وجود دارد، در هر دو گروه Rh مثبت و Rh منفی همراه با پرایمر RD2 قطعه ۱۵۴ جفت نوکلئوتیدی کنترل داخلی را تکثیر می‌کند. بنابراین در دور اول PCR دو باند ۲۹۱ و ۱۵۴ نوکلئوتیدی در افراد Rh مثبت و تنها باند ۱۵۴ نوکلئوتیدی مربوط به کنترل داخلی در افراد Rh منفی تکثیر پیدا می‌کنند.

در دور دوم واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، چون جایگاه پرایمر درونی RD5 تنها در درون قطعه تکثیر شده ۲۹۱ نوکلئوتیدی دور اول (در افراد Rh مثبت) قرار دارد، تکثیر DNA فقط در افراد Rh مثبت انجام می‌شود. در

www.SID.ir

Archive of SID

افراد Rh منفی تکثیر DNA صورت نمی‌گیرد و باندی مشاهده نمی‌شود.

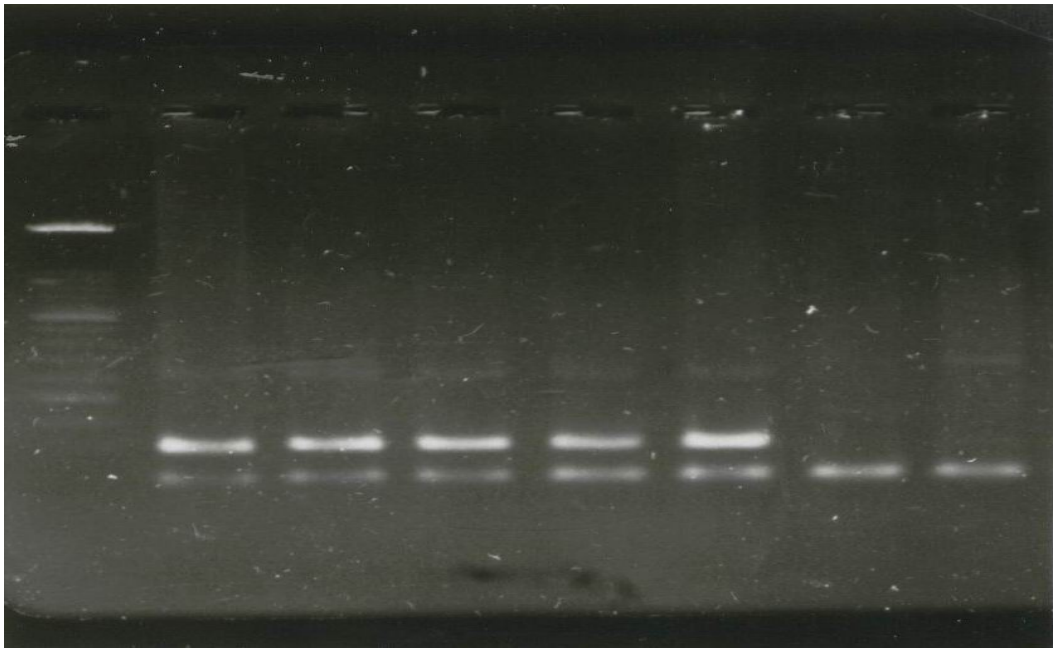
یافته ها

نمونه‌های خون و پرزهای کوریونی تهیه شد، پس از آماده سازی DNA از آنها استخراج گردید. شکل ۱ DNA استخراج شده تعدادی از نمونه های پرزهای کوریونی بر روی ژل آگارز ۰/۷٪ را نشان می‌دهد.

نتایج آزمایشات DNA نمونه‌های خون افراد بالغ با استفاده از روش heminested-PCR نمایانگر این بود که ژن RhD در افراد دهنده خون که از نظر سرولوژی RhD مثبت بودند مورد شناسایی قرار گرفت. ژن RhD در افراد دهنده خون دارای سرولوژی منفی RhD، مورد شناسایی قرار نگرفت (شکل ۲و۳).

آزمایش PCR با استفاده از heminested-PCR و الکتروفورز در خصوص نمونه پرزهای کوریونی نمایانگر این بود که همانند نمونه‌های خونی در مرحله اول تکثیر ژنی چنانچه RhD مثبت بود دو باند مشاهده شده و در صورت عدم حضور ژن RhD نمونه تکثیر شده بصورت تک باند مشاهده گردید (شکل ۴).

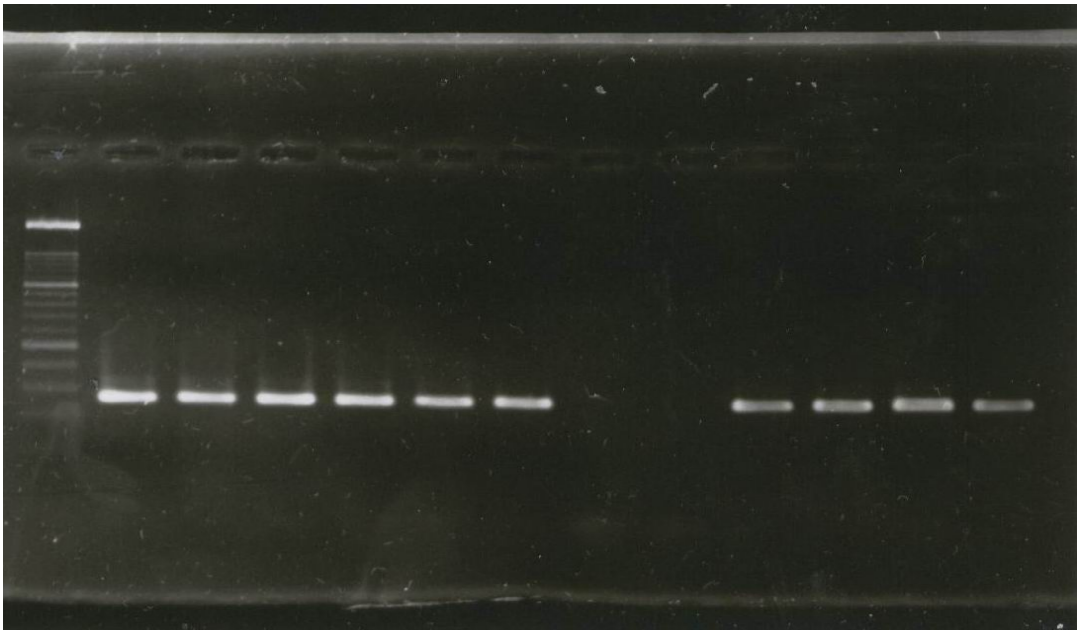
شکل ۱- DNA استخراج شده تعدادی از نمونه های پرزهای کوریونی روی ژل آگارز ۰/۷ درصد



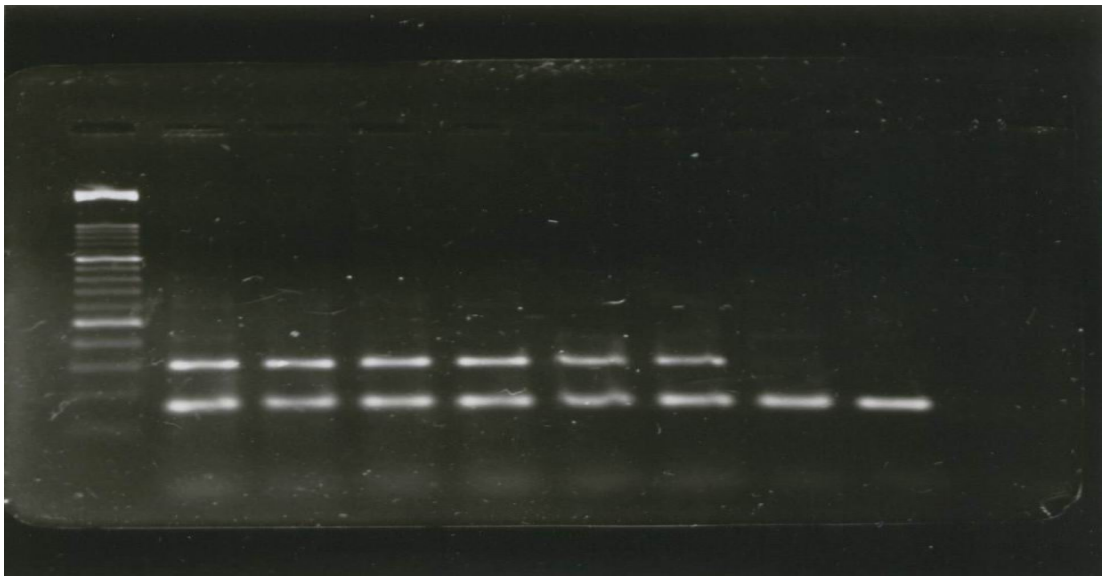
شکل ۲- تعیین گروه خونی RhD به‌روش heminested-PCR که الکتروفوروگرام فوق نمایانگر RhD مثبت و در دو چاهک سمت راست که تک باند مشاهده می‌گردد RhD منفی می‌باشد.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳: تعیین گروه خونی RhD به‌روش heminested-PCR. الکتروفوروگرام فوق نمایانگر این است که ژن RhD در مرحله دوم بجز چاهکهای ۸و۹ که منفی است در بقیه چاهکها مورد شناسایی قرار گرفته و مثبت می‌باشد.

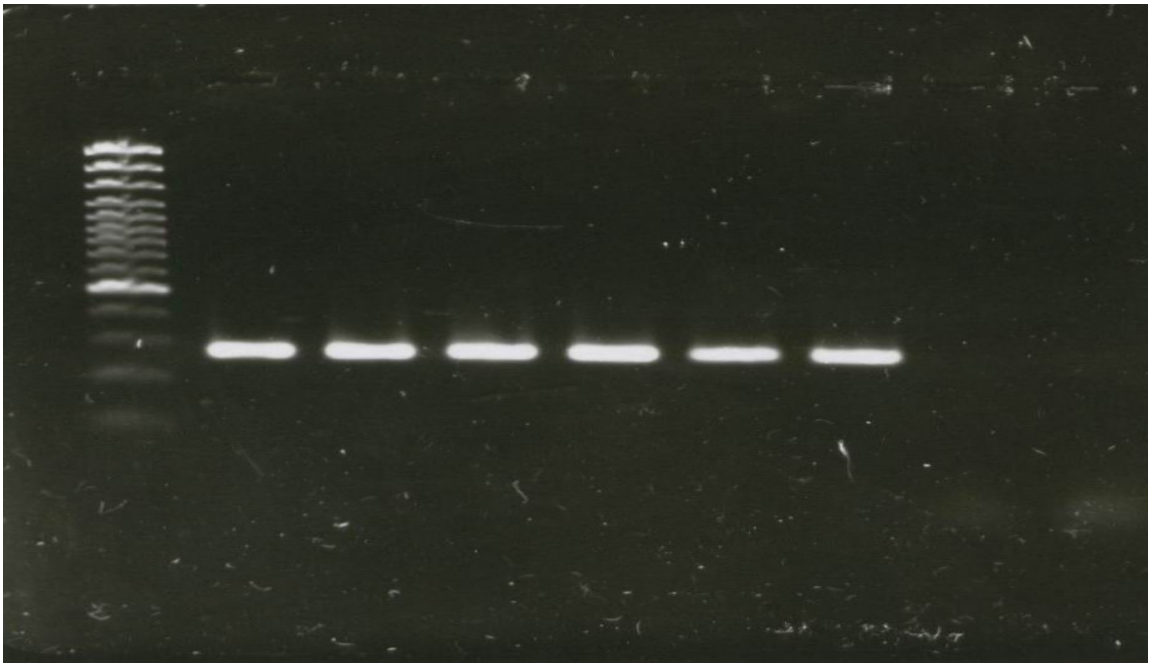


شکل ۴: تعیین گروه خونی RhD نمونه‌های جنین در دور اول آزمایش PCR. آزمایشات مؤید تکثیر ژن RhD (دو باند) در تمام نمونه ها بجز نمونه ۷و۸ که RhD منفی (تک باند) است، می‌باشد (چپ به راست).

پس از انجام دور اول PCR از نمونه‌های تکثیر شدهٔ مرحله اول بعنوان DNA الگو استفاده نمودیم. با استفاده از پرایمرهای اختصاصی قطعه ژن RhD را بطور اختصاصی تکثیر کردیم. در این مرحله شناسایی باند در الکتروفوروگرام مؤید حضور ژن RhD و گروه خونی RhD مثبت و عدم شناسایی باند اختصاصی مؤید عدم حضور ژن RhD و گروه خونی RhD منفی در جنین بود (شکل ۵).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۵- تعیین گروه خونی RhD نمونه های جنینی در دور دوم آزمایش PCR. آزمایشات مؤید تکثیر ژن RhD و گروه خونی RhD مثبت (تک باند اختصاصی) است که در تمام نمونه ها بجز نمونه های ۷و۸ که بدون حضور ژن تکثیر یافته می‌باشد مشاهده می‌گردد. (از چپ به راست)

بحث

آنتی ژنهای گروه خونی Rh، نقش مهمی در بیماری همولیتیک نوزادان و سقط جنین ناشی از عدم سازگاری دارد. با وجود گسترش وسیع مصرف ایمونوگلوبولین RhD جهت پیشگیری و درمان مادران Rh منفی دارای جنین Rh مثبت، ایمنی ناشی از آنتی ژن Rh رخ می‌دهد[۱۰].

در مورد بارداریهایی که مادر Rh منفی و پدر Rh مثبت هتروزیگوت است، در صورتیکه جنین Rh مثبت باشد و مادر سابقه ایمونیزاسیون در حاملگیهای پیشین را داشته باشد، احتمال ایمونیزاسیون شدید مادر و آسیب جدی به جنین وجود دارد. در این حالت، باید درمانهای تهاجمی داخل رحمی (تزریق گلبولهای قرمز به داخل رگهای بند ناف) انجام شود. با توجه به خطرات ناشی از درمان داخل رحمی (۱/۵٪ سقط جنین خودبخودی و ۴۰٪ خونریزی بین مادر و جنین)، آگاهی از نوع Rh جنین اهمیت زیادی دارد. زیرا در مواردی که جنین Rh منفی باشد به انجام درمانهای تهاجمی احتیاج نیست[۱۲،۱۱]. تداخل خون مادر و جنین در طی بارداری، سبب تحریک سیستم ایمنی مادر و ساخت آنتی بادی ضد Rh در مادر می‌شود و درصورت مثبت بودن Rh جنین در طی حاملگی‌های بعدی، علائم ناسازگاری و حتی سقط خواهد داشت. بنابراین طراحی روش خاصی برای تشخیص زود هنگام Rh جنین، کمک زیادی به تشخیص و اتخاذ روش صحیح درمانی می‌نماید [۱۴،۱۳].

تا چند سال اخیر در مواردی که مادر Rh منفی و پدر Rh مثبت هتروزیگوت بوده تنها راه تعیین گروه خونی جنین، نمونه برداری از خون جنین بود که خطر تشدید ایمونیزاسیون و سقط خودبخودی را بدنبال داشت [۱۵]. پس از شناسایی ساختار مولکولی گروه خونی Rh، توسط کارترون و همکاران که معلوم گردید ، تنها افراد Rh مثبت دارای ژن RhD هستند. با استفاده از هر نوع سلول هسته دار جنینی (از طریق آمنیو سنتز و نمونه پرزهای کوریونی) ، تعیین نوع گروه خونی Rh قبل از تولد قابل انجام گردید. تحقیقات نشان داده‌اند که توالی دو ژن RhD و RhCE در اگزونهای ۴، ۵، ۷، ۱۰ و انترون‌ها با یکدیگر تفاوت دارد. از زمان تعیین توالی و تشخیص ژن Rh تحقیقات گوناگون برای شناسایی حضور یا عدم حضور ژن RhD صورت گرفته است[۱۶].

پرایمرهای طراحی شده در پژوهش اخیر براساس اگزون ۱۰ ژن Rh طراحی شده است و ارزیابی‌های

www.SID.ir

Archive of SID

مختلف نشان داده‌اند که این روش بیشترین دقت را دارا است[۱۶]. تحقیق اخیر، با پرایمرهای طراحی شده برای اگزون ۱۰ ژن RhD و RhCE و بصورت heminested-PCR انجام شد. در دور اول PCR، دو پرایمر RD1 و RD2 توالی ۱۵۴ جفت نوکلئوتیدی (کنترل درونی) را از ژن RhcE، در افراد Rh مثبت و Rh منفی و دو پرایمر خارجی (RD2, RD-A3)، توالی ۲۹۱ جفت نوکلئوتیدی را تنها از ژن RhD تکثیر نمود. بدین ترتیب، در دور اول PCR دو باند ۲۹۱ و ۱۵۴ جفت نوکلئوتیدی در افراد Rh مثبت و تنها یک باند ۱۵۴ جفت نوکلئوتیدی (کنترل درونی) در افراد Rh منفی مشاهده گردید. در تمام نمونه های خونی و پرزهای کوریونی نتایج تعیین مولکولی Rh با نتایج سرولوژیکی مطابقت داشت.

با توجه به جایگاه پرایمرهای اختصاصی در اگزون ۱۰ ژن Rh (که توالی آن در افراد با ژنوتیپ مختلف نسبتاً ثابت است)، نتایج دقیق تعیین Rh قابل پیش بینی بوده صحت نتایج بدست آمده با ارزیابیهای قبلی که دقت بالای پرایمرهای طراحی شده برای اگزون ۱۰ را نشان داده‌اند، کاملاً قابل توجیه است. استفاده از یک کنترل درونی که قسمتی از ژن RhEC را در تمام سلولها تکثیر می‌کند، از نتایج منفی کاذب ناشی از نقص در انجام واکنش جلوگیری می‌کند[۱۳].

از مزایای دیگر روش استفاده شده در این پژوهش، شناسایی افراد Rh مثبت و Rh منفی در دور اول واکنش تکثیر ژنی می‌باشد و انجام دور دوم (heminested) دقت و حساسیت آنرا افزایش می‌دهد. دور دوم با یک میکرولیتر از محصول PCR دور اول (با رقت ۱/۱۰۰ بعنوان الگو DNA) و با استفاده از پرایمرهای درونی (RD5 و RD2) و ۱۵ سیکل PCR صورت گرفت، چون پرایمرهای داخلی تنها به توالی حاصل از ژن RhD (۲۹۱ جفت باز) تکثیر شده در دور اول اتصال پیدا می‌کنند. در دور دوم تنها در افراد Rh مثبت یک باند ۲۶۲ جفت باز مشاهده شد. در افراد Rh منفی هیچ توالی تکثیر نیافت[۴].

هر چند حساسیت دور اول این آزمایش، برای شناسایی ژن RhD، در حد ژنوم دهها سلول می‌باشد، اما استفاده از پرایمرهای داخلی (در این روش) حساسیت آنرا بسیار بالا می‌برد بطوری‌که با DNA ژنومی تک سلول، ژن RhD قابل شناسایی می‌باشد. نتایج حاصل از دور دوم heminested-PCR با دور اول کاملاً مطابقت داشت و هیچ نتیجه اشتباهی مشاهده نگردید. در برخی از مطالعات که تنها از یک دور PCR برای تعیین RhD استفاده شده است، در صورت اتصال پرایمرها به توالی-های غیر هدف، احتمال حصول نتایج کاذب وجود داشت ولی با انجام دور دوم PCR در پژوهش اخیر، از بروز چنین نتایجی پیشگیری گردید[۱۰].

بعلت تنوع ژنتیکی بالای لوکوس Rh و برای جلوگیری از نتایج منفی کاذب ناشی از هدف یا بازآرایی لوکوس Rh، برخی از محققین استفاده همزمان از دو جفت پرایمر را برای تکثیر دو توالی اختصاصی ژن RhD در هر واکنش پیشنهاد نموده‌اند[۱۲]. اما در پژوهش اخیر از heminested PCR بجای استفاده همزمان از دو جفت پرایمر برای هر واکنش استفاده گردید.

آگاهی از ژنوتیپ گروه خونی هر یک از والدین در انتخاب نوع روش بررسی مولکولی Rh نقش بسزایی دارد و امکان می‌دهد تجزیه و تحلیلهای متناسب با ژنوتیپ پدر و مادر انجام شود[۱۷]. بعلت تنوع ژنتیکی زیاد در لوکوس Rh، در برخی موارد حتی استفاده از چند روش منجر به کسب نتایج منفی کاذب می‌شود. بنابراین در چنین مواردی برای حصول نتایج دقیقتر پیشنهاد می‌شود که آزمایش کنترل مثبت (با پرایمرهای بکار گرفته شده برای تعیین Rh جنین) برای DNA پدر نیز بعمل آید. یعنی تطبیق نتایج آزمایشهای سرولوژیکی و بررسیهای مولکول تعیین Rh پدر هتروزیگوت؛ درستی روش استفاده شده برای تعیین Rh جنین را معلوم می‌نماید[۱۸].

نتیجه گیری

با استفاده از این روش، Rh نمونه های جنین با اطمینان و سرعت زیاد، تعیین می‌شود. در مطالعه ما که نتایج آزمایشهای سرولوژیکی و مطالعات مولکولی، تعیین Rh نمونه های جنین با هم مطابقت داشت. مقایسه روش تعیین Rh در تحقیق حاضر، با روشهایی که قبلاً بکار گرفته شده نشان می‌دهد که طراحی دقیق پرایمرها و انجام آزمایش (بصورت heminested-PCR) دقت آنرا بطور قابل ملاحظه ای بالا می‌برد، بطوریکه، در هیچ یک

www.SID.ir

Archive of SID

از نمونه های آزمایش شده (اعم از نمونه های خونی و پرزهای کوریونی) نتایج کاذب بدست نیامد. همچنین، با استفاده از پرایمرهای معکوس مشترک، برای تکثیر انواع مختلف توالیها دقت واکنش بالا می‌رود و در عین حال از هزینه انجام واکنش کاسته می‌شود. از طرف دیگر استفاده از پرزهای کوریونی در تعیین Rh، این امکان را بوجود می‌آورد که پزشک متناسب با وضعیت بالینی جنین، صحیح ترین راه را برای معالجه انتخاب کند.

سپاسگزاری

از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری که با تصویب این تحقیق و قبول هزینه انجام آن زمینه اجرای آن را فراهم نمودند تشکر می‌شود. همچنین از آقای دکتر سیروس زینلی و کلیه همکاران سازمان انتقال خون تهران و مراکز ناباروری که نمونه در اختیار محققین قرار دادند سپاسگزاری می‌شود.

www.SID.ir

Archive of SID

Prenatal diagnosis of human fetal Rh blood group by heminested-PCR

G Ahangari* MT & PhD, Ass Prof of Immunogenetics, Institute for Genetic Engineering & Biotechnology
Sh M Seid Mohamadpoor MSc of Genetics, Shahid Beheshti University
M Shams Lahijani PhD, Prof of Biology, Shahid Beheshti University
B Rabani, MSc of Genetics, Khatam University
F Mohseni MD, Anestesiologist, Iran University of Mdical Sciences

Abstract

Background: The rhesus blood group antigen system is important in transfusion and clinical medicine, being involved in hemolytic disease of the newborn, transfusion reactions and autoimmune hemolytic anemia. Despite the widespread use of rhesus immunoglobulin prophylaxis in rhesus D (RhD)-negative mothers, rhesus immunization still occurs. Knowledge of the RhD status of the fetus is important in the clinical management, because no further diagnosis or therapeutic procedures are necessary if the fetus is RhD-negative. RhD antigen can be detected using a sensitive PCR-based assay. It was shown that RhD negative individuals lack the RhD gene.

Methods: We obtained 5ml blood samples from thirty eight RhD positive and negative blood donors, as controls and forty chorionic villus samples (CVS) from pregnant women at 8 to 12 weeks of gestation.

DNA was extracted from CVS by standard salting out and blood DNA was extracted by boiling procedure. DNA amplification (heminested-PCR) was carried out with appropriate primers.

Results: PCR products were analyzed on an agarose gel. RhD gene determined in all CV samples.

* Correspondence author,
Address: Institute for Genetic Engineering & Biotechnology,
P.O Box: 14155-6343,
Tehran, IR Iran.
E-mail: ghah@nrcgeb.ac.ir

Keywords: Hemolytic disease of the newborn (HDN), RhD gene, heminested-PCR, chorionic villus sampling (CVS).

REFERNCES:

1. Kerlinsk YY, Kuliev A. Preimplantation Genetic Diagnosis. USA, Parthenon Publishing group Inc. 2000 Pp:1-12.
2. Kerzin- Storrar L. Genetic Counseling and molecular testing, methods in molecular medicine: Molecular diagnosis of genetic disease. USA, Human Press. 1996 Pp:12-47.
3. Sybert VP, Holbrook KA. Prenatal diagnosis and screening. Dermatologic Clinics. 1987;5(1):17-41.
4. Ahangari G, Zainali S, Ebrahimi M, et al. Analysis of fetal sex and RhD gene in fetal cells DNA from maternal blood by polymerase chain reaction. Middle East Fertility Soci J. 2003;8(3):263-8.
5. Lo Y, Bowell PJ, Selinger M, et al. Prenatal determination of fetal RhD status by analysis of prepheral blood of Rhesus negative mothers. Annals New York Academy of science, USA. 1993; 22-8.
6. Le van Km C, Mouro I, Cherif- Zahar B, et al. Molecular Cloning and primary structure of the human blood group RhD. Proc Natl Acad Sci, USA. 1992;89:1925-9.
7. Lighten AD, Overton TG, Sepulveda W, et al. Accuracy of Prenatal determination of RhD type status by polymerase chain reaction with amniotic cells. Am J Obstet Gynecol. 1995;173(4):1182-5.

www.SID.ir

Archive of SID

8. Escudero T, Lee M, Carrel D, et al. Current awareness. Prenatal Diagn. 2000;20(7):603-9.

9. Sambrook J, Fitsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA. 1989.

10. Chavez GF, Mulinare J, Edmonds LD. Epidemiology of RhD hemolytic disease of the new born in the united states. JAMA. 1991;265:3270-4.

11. Chakravaty A. Prenatal diagnosis and therapy: International conference on prenatal diagnosis of genetic disorders. 1996;1:23.

12. Van den Veyer IB, Chon SS, Cota J, et al. Single cell analysis of the RhD blood type for use in preimplantation diagnosis in the prevention of severe hemolytic disease of the new born. Am J Obstet Gynecol. 1995;172:533-40.

13. Bennett PR, Le van Kim C, Colin Y, et al. Prenatal determination of fetal RhD type by DNA amplification. New Engl J Med. 1993;329:607-10.

14. Legler TJ, Mass JH, Kohler M, et al. RhD sequencing: a new toll for decision making on transfusion therapy and provision of Rh prophylaxis. Transfus Med. 2001;11(5):383-8.

15. Rossiter JP, Blekemore KJ, Kickler TS, et al. The use of polymerase chain reaction to determine fetal RhD status. Am J Gynecol. 1994;171:1047-51.

16. Aubin JT, Le van Kim C, Mouro I, et al. Specificity and sensitivity of RhD genotyping methods by PCR-based DNA amplification. Bri J Hematol. 1997;98:356-64.

17. Cotorruelo C, Biondi C. Garia Borras S, et al. Early detection of RhD status in pregnancies at risk of hemolytic disease of the newborn. Clin Exp Med. 2002;29(2):77-81.

18. Maaskant-Vanwijk PA, Faas BH, De Ruijter JA. Genotyping of RhD by multiplex polymerase chain reaction analysis of six RhD specific exon. Transfusion. 1998;38:1015-21.

19. Avent ND, Liu W, Warner KM. Immunochemical analysis of the human erythrocyte Rh polypeptides. J Bio Chem. 1996;271(14):233-9.

www.SID.ir