

DETERMINACIÓN DEL FACTOR Rh por PCR

Ref. PCRRh

1. OBJETIVO DEL EXPERIMENTO

El objetivo de este experimento es introducir a los estudiantes en los principios y práctica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) mediante el estudio de la determinación del Rh utilizando para ello la técnica de la PCR.

2. INTRODUCCION

2.1 PCR

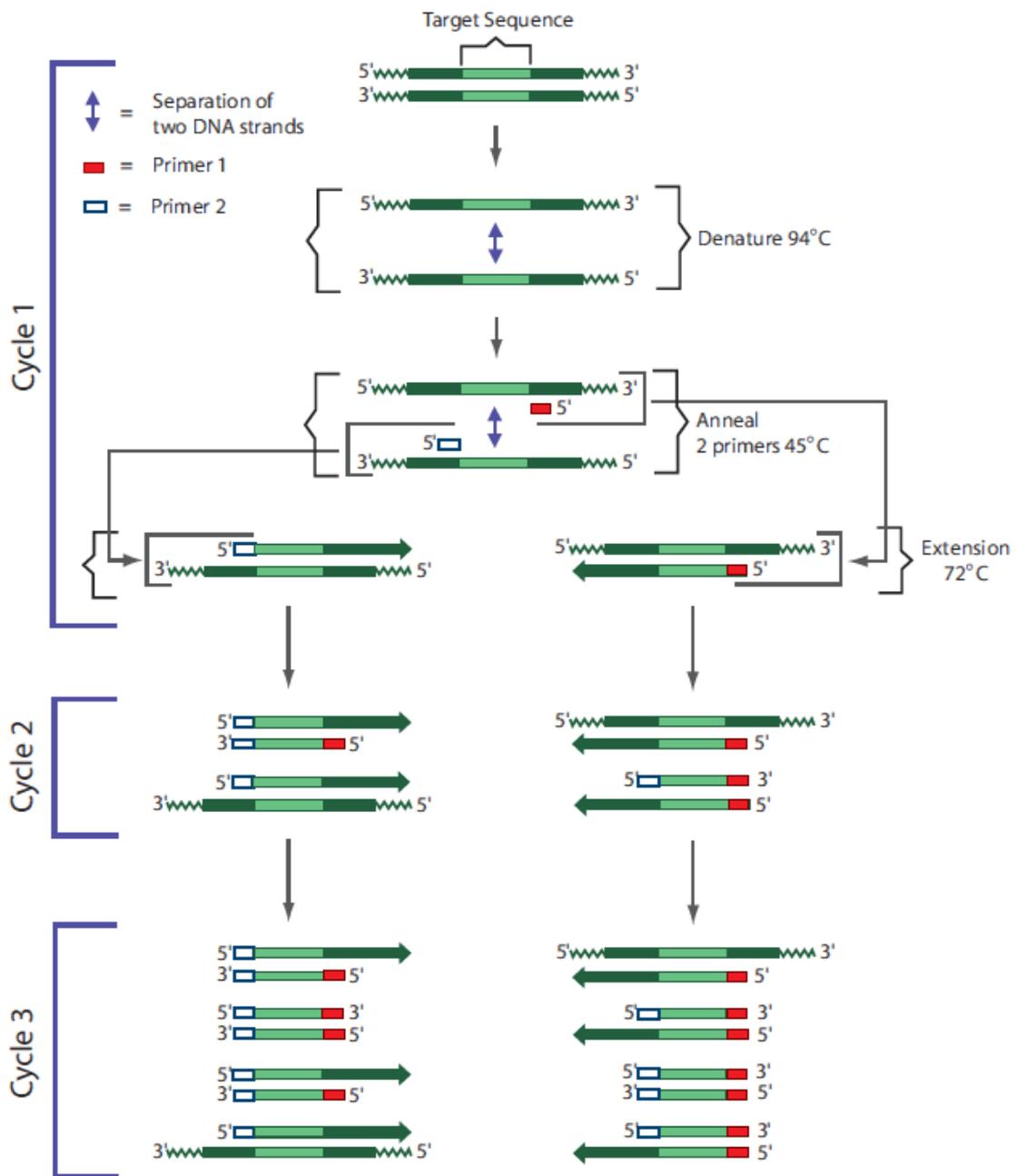
La PCR ha revolucionado la investigación y diagnóstico basado en la Biología Molecular. La PCR es un proceso simple, exacto y altamente reproducible que proporciona la ventaja de empezar con una pequeña cantidad de ADN y ser capaz de amplificarlo de forma que se tenga suficiente para realizar experimentos.

Se han desarrollado gran cantidad de test diagnósticos, también se ha utilizado en mapaje y secuenciación de ADN en proyectos de genoma y está siendo utilizado en determinaciones forenses, paternidades, diagnóstico clínico, etc.

En todos los casos se amplifican segmentos de ADN que posteriormente son sometidos a análisis y estudios varios.

En una reacción de PCR, el primer paso es la preparación de la muestra de ADN que es extraída de varias fuentes biológicas o tejidos. En la PCR, el ADN o gen a amplificar se define como "target" (diana) y los oligonucleótidos sintéticos utilizados se definen como "primers" (cebadores). Un set de 2 cebadores de entre 20-45 nucleótidos son sintetizados químicamente para que se correspondan con los extremos del gen a amplificar. Cada cebador se une a uno de los extremos de cada cadena de ADN y es el punto de inicio de la amplificación.

Una reacción típica de PCR contiene ADN molde, Taq polimerasa y los 4 dNTPS en un tampón de reacción apropiado. El volumen total de reacción es de 25-50 μ l. En el primer paso de la reacción de PCR, las cadenas complementarias de ADN se separan (desnaturalizan) la una de la otra a 94°C, mientras que la Taq polimerasa permanece estable. En el segundo paso, conocido como emparejamiento, la muestra es enfriada a una temperatura entre 40-65°C que permita la hibridación de los 2 cebadores, cada uno a una hebra del ADN molde. En el tercer paso, conocido como extensión, la temperatura es elevada a 72°C y la Taq polimerasa añade nucleótidos a los cebadores para completar la síntesis de una nueva cadena complementaria.



Estos tres pasos, desnaturalización-emparejamiento-extensión, constituye un ciclo de PCR. Este proceso se repite durante 20-40 ciclos amplificando la secuencia objeto exponencialmente. La PCR se lleva a cabo en un termociclador, un instrumento que es programado para un rápido calentamiento, enfriamiento y mantenimiento de las muestras varias veces. El producto amplificado es luego detectado por separación de la mezcla de reacción mediante electroforesis en gel de agarosa.

2.1 Factor Rh

En 1940, Landsteiner y Wiener demostraron que los anticuerpos producidos contra las células rojas de la sangre de los monos Rhesus eran capaces de aglutinar alrededor del 85 % de los eritrocitos de la sangre de la población humana.

Los anticuerpos producidos se demostró que se dirigían a una molécula que se denominó antígeno Rhesus (Rh), los individuos que poseían esta molécula fueron denominados Rh positivo y el 15 % restante Rh negativo.

El locus Rh consiste en 2 genes estructurales: D y CcEe, los cuales codifican para la cadena del polipéptido D y las proteínas C/c y E/e respectivamente.

La presencia o ausencia del gen D en el genoma determina la base genética del polimorfismo de los grupos sanguíneos Rh-positivo/Rh-negativo. Por tanto, los individuos son clasificados como Rh+ si contienen el antígeno D en la membrana de sus eritrocitos. De todas formas, el sistema Rh es mucho más complejo, y hasta 47 diferentes Rh antígenos han sido descritos.

El antígeno D es altamente inmunogénico e induce una respuesta inmune en muchas personas Rh- cuando reciben una transfusión con sangre Rh+. Por esta razón, en muchos países se realizan controles rutinarios en los donantes de sangre y los individuos que se van a someter a una transfusión, de forma que pacientes Rh- reciben exclusivamente productos D negativo.

El sistema Rh se ha observado que también está implicado en afecciones como la enfermedad hemolítica del recién nacido, anemias hemolíticas autoinmunes y reacciones hemolíticas de origen no inmune. La enfermedad hemolítica del recién nacido ocurre cuando una madre Rh- lleva un feto Rh+, a pesar, de que los eritrocitos fetales están separados de la circulación de la madre por la placenta, durante el embarazo, eritrocitos fetales pueden escapar a la circulación de la madre donde son consideradas como extrañas y producir una respuesta inmune. Repetidos embarazos provoca un elevado nivel de anticuerpos en la madre que pueden atravesar la placenta, alcanzar la circulación fetal y reaccionar con los eritrocitos del feto causando su muerte. Para evitar esto, una terapia inmunosupresiva es administrada a la madre.

En esta práctica, los alumnos aislarán el ADN de su saliva y lo utilizarán para llevar a cabo la reacción de PCR. **La base de esta práctica es la amplificación de un fragmento del gen D.** La amplificación de este fragmento indicará que la persona es Rh+. Debido a que los genes D y CcEe son altamente homólogos, es posible diseñar cebadores que se emparejan en una región del gen D y también a una región del gen CcEe (ver figura 1).

De esta forma, todas las muestras de ADN sirven como molde para la amplificación. **Los individuos Rh+ producirán 2 fragmentos de diferentes tamaños (1200pb y 600 pb) y los individuos Rh- una única banda correspondiente al fragmento del gen CcEe (1200 pb).**

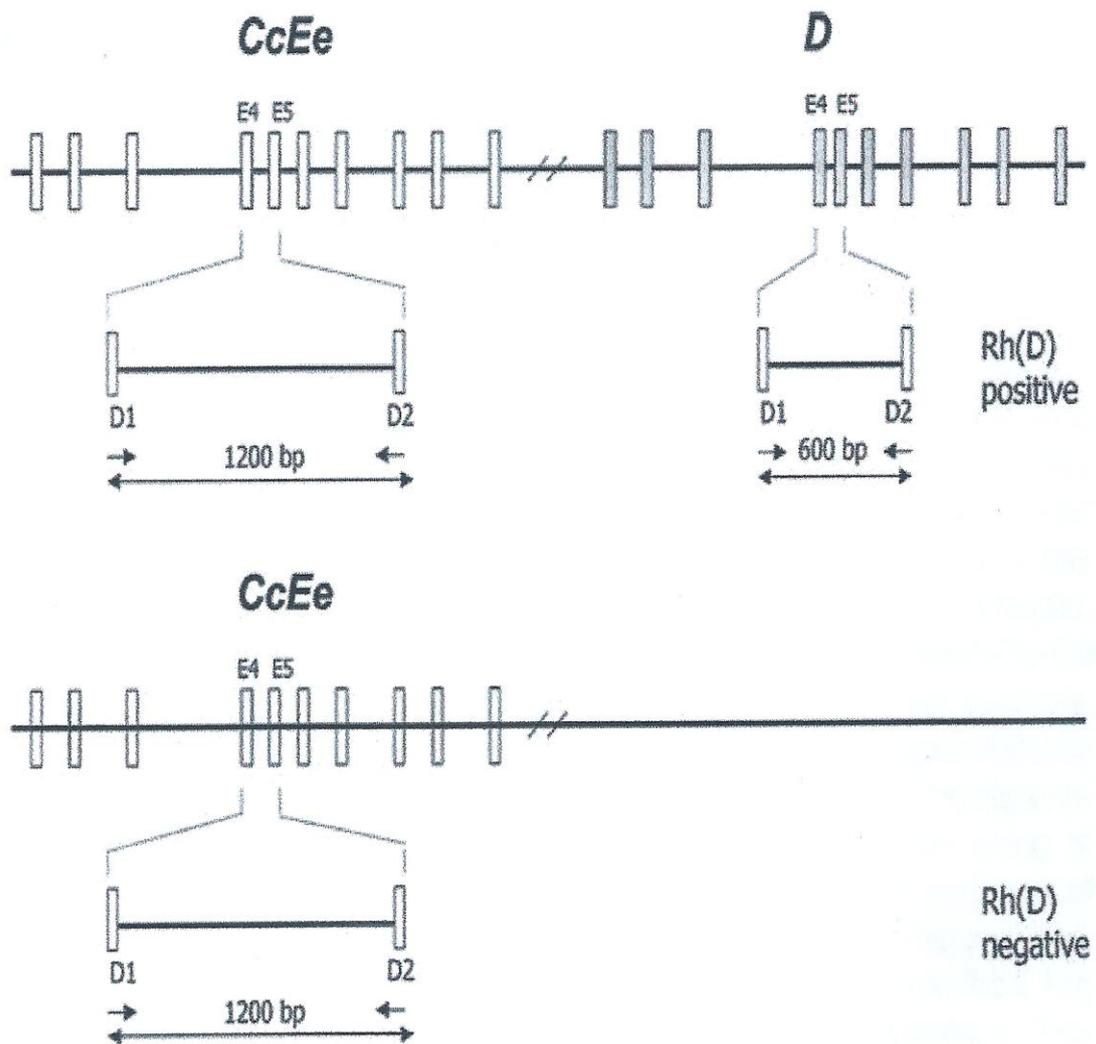


Figura 1

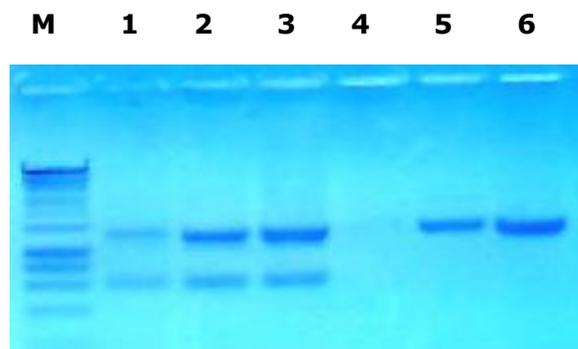


Figura 2

Análisis de PCR de diferentes individuos para la detreminación del Rh.

Se utiliza un gel de agarosa 1 % que se tiñe con el DanaBlue de DanaGen-Bioted para la detección de los productos de la PCR amplificados utilizando ADN genómico de diferentes individuos y utilizando los primers Rh-Forward y Rh Reverse.

Marker: DanaMarker BEETHOVEN.

Pocillo 1: Individuo Rh+

Pocillo 2: Individuo Rh+

Pocillo 3: Individuo Rh+

Pocillo 4: Control negativo.

Pocillo 5: Individuo Rh-

Pocillo 6: Individuo Rh-

3. COMPONENTES

Se suministran reactivos suficientes para la realización de 25 PCR individuales y la realización de 4 gels de electroforesis en agarosa al 1 %.

Tampón de electroforesis concentrado 10X	100 ml	
Agarosa	1.5 gr	
MIX PCR	700 µl	Conservar a -20°C
Control positivo Rh +	20 µl	Conservar a -20°C

Tampón de electroforesis 10X para elaborar 2 x 500 ml de Tampón de electroforesis 1X que es el Tampón de trabajo.

3.1 POLIMERASA MIX HOT STAR

Lista para su uso 2X, que permite amplificar cualquier fragmento a partir de ADN, de forma que el usuario sólo ha de añadir agua. **Se requiere un paso de activación de 10 minutos a 95°C** de forma que se eliminen los productos no específicos como “primers-dimers”. Además contiene un **colorante rojo** que permite la fácil visualización y la siembra directa en el gel sin necesidad de mezclar con un tampón de carga.

4. PRÁCTICA

4.1 Extracción del ADN

El paso previo a cualquier estudio genético suele ser el aislamiento del ADN genómico, esto se puede llevar a cabo de diferentes formas (métodos caseros, kits comerciales, etc.) y a partir de diferentes muestras (sangre, tejido, etc.).

Para la realización de esta práctica se recomienda que la fuente del ADN provenga de la **saliva del alumno**, ya que es la fuente de ADN más accesible y no supone ningún riesgo, como pueda ser la extracción de sangre. Para ello se recomienda el uso del DANAGENE SALIVA KIT que permite obtener el ADN genómico a partir de una muestra de saliva o frotis bucal.

4.2 Reacción de la PCR

NOTA: Utilizar siempre puntas con filtro y cambiar de punta cada vez que se realiza una acción para evitar contaminaciones que puede dar lugar a falsos resultados.

1. Utilizar **2,5 µl** (100-250 ng) del ADN de cada alumno para cada reacción de PCR.

IMPORTANTE: a) Preparar un control negativo de amplificación, para ello colocar **2,5 µl de agua libre de nucleasas** en lugar del ADN, esto sirve para saber si los reactivos o micropipetas y puntas pueden estar contaminados con ADN. En el control negativo no se ha de amplificar nada.

b) Preparar un control positivo de amplificación, para ello colocar **2,5 µl del control positivo Rh+** en lugar del ADN.

REACTIVOS	VOLUMEN
MIX PCR	22,50 µl
ADN (100-250 ng)	2,5 µl
Volumen Total	25 µl

2. Mezclar bien, el colorante rojo incluido en la polimerasa facilita el proceso.
3. Para aquellos termocicladores que no tengan un “heated lid”, añadir 25 µl de aceite mineral para prevenir la evaporación.
4. Realizar el proceso de amplificación.

IMPORTANTE: Para la activación de la Polimerasa “HOT STAR” es necesario programar un paso de desnaturalización inicial de 10 minutos a 95°C, después programar los 30 o 40 ciclos específicos de cada producto a amplificar.

PROGRAMA Rh

PASO	TEMPERATURA	TIEMPO
Desnaturalización HOT STAR	95°C	10 minutos
Ciclos PCR Realizar 35 ciclos	95°C	30 segundos
	64°C	30 segundos
	72°C	45 segundos
Extensión final	72°C	10 minutos
Final	4°C	

5. El producto de la PCR puede ser sembrado directamente en un gel de agarosa después de la PCR, ya que el colorante rojo actúa como tampón de carga.
6. Utilizar el método de detección o tinción del ADN que se use en el laboratorio. Le recomendamos el uso del DANABLUE o GELSAFE, nuestros métodos no tóxicos.
7. Se ha de obtener un resultado similar al observado en la figura 2.
8. Se puede calcular la frecuencia observada de los diferentes polimorfismos en la clase.

Para cualquier duda o consulta adicional, por favor, contacte con nosotros bioted@arrakis.es