KIT EDUCATIVO

Determinación del Factor Rh mediante PCR. Electroforesis

TBED1-20

| 20 ESTUDIANTES | ★★★ AVANZADO

Experiencia docente con más de 1 módulo

Número de estudiantes

★★★ *Complejidad de la práctica*

© Tiaris Biosciences | v01.2026

Tiaris Biosciences
PT Rabanales 21, Edif Aldebarán
c/ Astrónoma Cecilia Payne s/n. Córdoba. España
info@tiarisbiosciences.com

CONTENIDOS

1 Introducción 4

1.1. La PCR como técnica 4

1.2. Factor Rh 6

2 Objetivos del Experimento 8

3 Material incluido 8

4 Material requerido (*no incluido*) 9

5 Descripción de la Práctica de Laboratorio 9

5.1. PCR 11

5.2. Visualización de la PCR 12

5.2.1. Preparación del soporte donde se hará el gel de agarosa 12

5.2.2. Preparación del tampón de electroforesis 12

5.2.3. Preparación del gel de agarosa 12

5.2.4. Electroforesis 13

1 INTRODUCCIÓN

1.1. LA PCR COMO TÉCNICA

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, *del inglés Polymerase Chain Reaction*) es una técnica indispensable en biología molecular que ha revolucionado la investigación genética y la medicina molecular desde su desarrollo en la década de 1980 por el científico Kary Mullis. Esta técnica se utiliza en una gran variedad de aplicaciones como son la detección de enfermedades genéticas, el diagnóstico clínico de enfermedades infecciosas, en ciencia forense, en pruebas de paternidad, en la monitorización de terapias, en fraude y seguridad alimentarias, en análisis paleontológicos, entre otros.

A nivel molecular el proceso exige de 3 pasos fundamentales: desnaturalización (*separación de las hebras de ADN*), anillamiento (unión de los cebadores a su región complementaria) y extensión (elongación de las cadenas para la síntesis de nuevo ADN). Estos 3 pasos constituyen un ciclo de PCR, los cuales se repiten de 20 a 40 veces.

Para que la PCR ocurra, la reacción debe contener los siguientes elementos:

- *Molde:* Es el ADN del que queremos millones de copias. Se suele emplear ADN purificado o ADN copia obtenido de la retro-transcripción de ARN.
- *Cebadores:* Son pequeñas moléculas de ADN de simple cadena de 18-30 bases complementarias a los extremos de la región que queremos amplificar (secuencia diana). Se unen al ADN molde en el paso de anillamiento el cual ocurre a la temperatura melting (Tm). La temperatura melting es la temperatura a la que se garantiza la hibridación de ambos cebadores. Los cebadores unidos son el punto de inicio de la amplificación.
- *Nucleótidos:* Los nucleótidos son las unidades que conforman el ADN. En una reacción de PCR deben ser añadidos los 4 dNTPs (*dATP, dCTP, dGTP, dTTP*) en una relación equimolar.
- *Polimerasa:* La reacción de PCR es una reacción enzimática que ocurre por la actividad de una polimerasa que usa ADN como molde (ADN polimerasa). La polimerasa más empleada es la versión recombinante de la polimerasa de la bacteria termorresistente *Thermus aquaticus*. La enzima es resistente a temperaturas de 95°C lo que permite realizar los ciclos de PCR sin tener que añadir enzima nueva cada vez. La temperatura óptima de esta enzima es 72°C.
- *Cofactores de la enzima:* La enzima requiere la presencia de magnesio para su actividad. Se añade en las reacciones de PCR como $MgCl_2$ a concentraciones finales de 2-2,5 mM.
- *Agua grado biología molecular:* Es un agua desionizada de baja conductividad que carece de nucleasas.

La reacción de PCR se incuba en un termociclador donde las rampas de subida y bajada de la temperatura ocurren rápidamente.

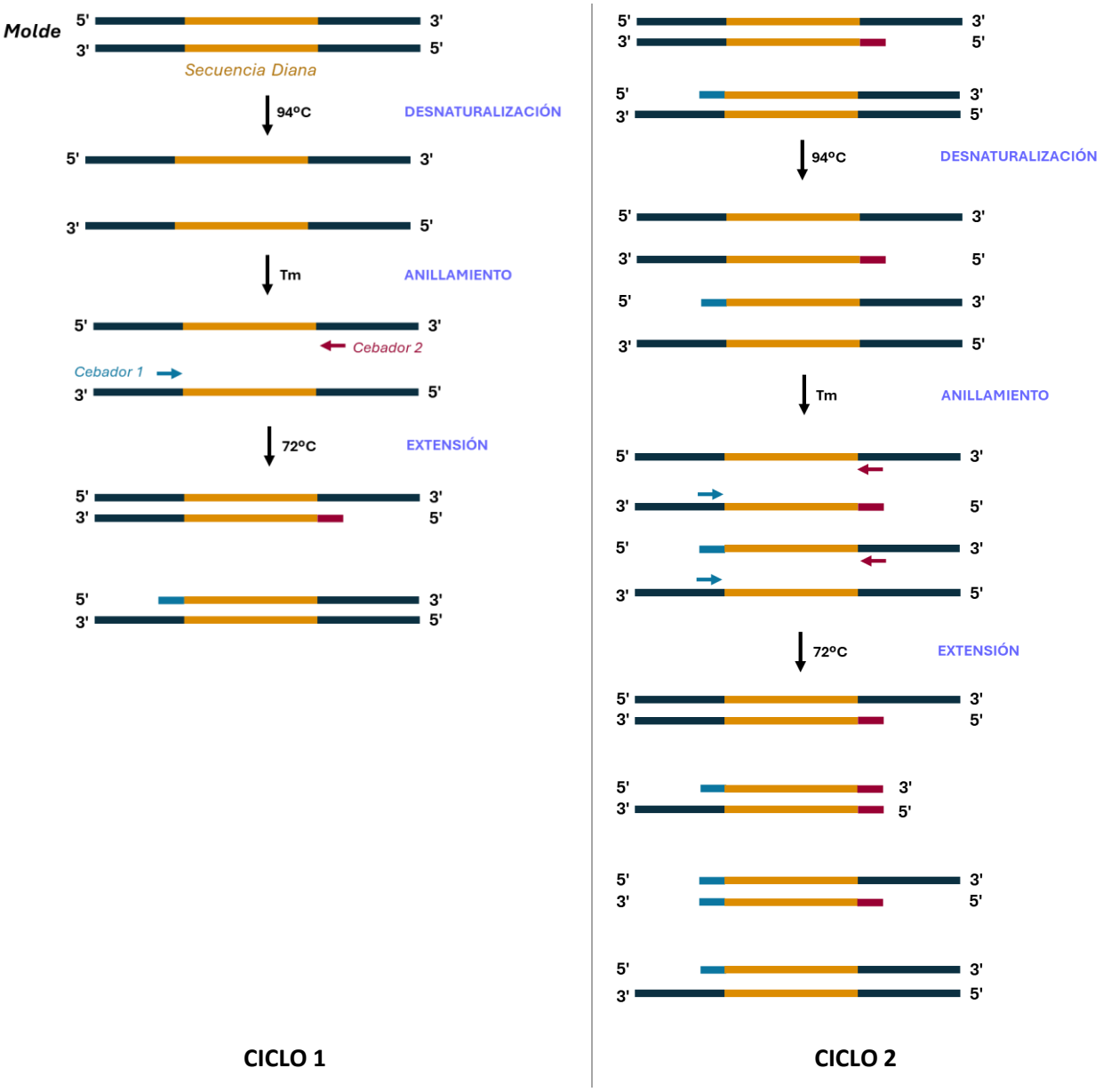


Figura 1. ***Mecanismo molecular de amplificación por PCR usando ADN como molde.*** *La desnaturalización ocurre a 95-98ºC permitiendo que las dos cadenas que forman el ADN se separen, asegurando que los cebadores se puedan unir a su secuencia diana en el paso de anillamiento. El anillamiento se realiza a una temperatura que se establece experimentalmente y ronda la temperatura melting (Tm) de los cebadores; la Tm se calcula en base al contenido de AT y GC. El paso de extensión se realiza entre 68-72ºC en función de la polimerasa a emplear. Actualmente las polimerasas que se emplean son enzimas termoestables, siendo la Taq polimerasa procedente de la bacteria termorresistente Thermus aquaticus, una de las más empleadas.*

1.2. EL FACTOR Rh

El factor Rh fue identificado en 1940 por el científico austríaco Karl Landsteiner, Premio Nobel en 1930 por el descubrimiento de los grupos sanguíneos ABO, y su colega Alexander S. Wiener[1]. Estos científicos observaron que los monos *Macacus rhesus* producían anticuerpos capaces de aglutinar los eritrocitos de la sangre humana. Estos anticuerpos reconocían una proteína presente en la superficie de los glóbulos rojos de la sangre humana, que se denominó antígeno Rhesus o factor Rh.

El sistema Rh es el grupo sanguíneo más complejo y polimórfico de la membrana del glóbulo rojo. Este sistema presenta un gran interés clínico debido a que sus antígenos son sumamente inmunogénicos y juegan un papel central en la patogénesis de la enfermedad hemolítica feto-neonatal, en algunas anemias hemolíticas autoinmunes y en reacciones hemolíticas transfusionales. Se han identificado más de 50 antígenos diferentes del sistema Rh, siendo seis los antígenos más frecuentes: antígeno D, C, E, d, c, e[2]. Estos antígenos están codificados por dos genes ubicados en el brazo corto del cromosoma 1 humano (1p 34-36). El gen que codifica el antígeno D se conoce como *RHD*, mientras que el gen *RHCE* codifica los antígenos C y E. Ambos genes se encuentran a una distancia de 30 kb (*Figura 2*).

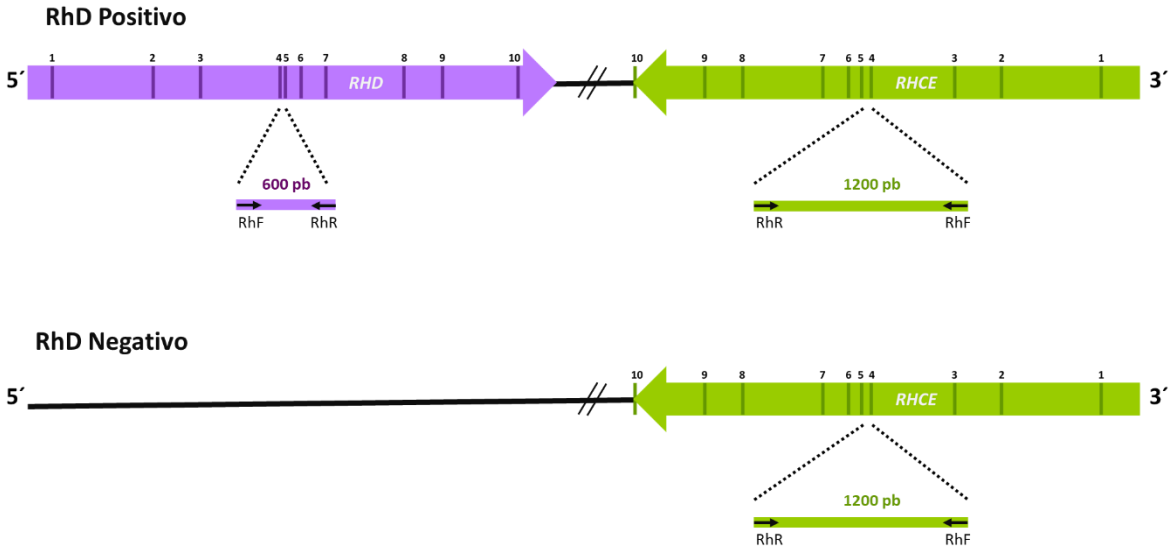


Figura 2. ***Esquema de la organización cromosómica de los genes RHD y RHCE en individuos Rh+ y Rh-.*** *Las líneas transversales señalan los exones que son las regiones codificantes (10 en ambos genes). Los cebadores RhF y RhR se unen a los exones 4 y 5, respectivamente, de los genes RHD y RHCE. La PCR usando estos cebadores daría lugar a 2 bandas de 600 pb y 1.200 pb en un Rh positivo y únicamente una banda de 1.200 pb en un Rh negativo.*

[1] Landsteiner, K., & Wiener, A. S. (1940). An Agglutinable Factor in Human Blood Recognized by Immune Sera for Rhesus Blood. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 43 (2): 223-224.
[2] Avent ND, Reid ME. (2000) The Rh blood group system: a review. Blood 95 (2): 375-387.

La distinción entre individuos Rh+ y Rh- está determinada por la presencia o ausencia del antígeno D en la superficie de los eritrocitos. Cuando una persona tiene el antígeno RhD en sus glóbulos rojos, se considera Rh positivo (~ 85% de la población), mientras que la ausencia de este antígeno indica un resultado Rh negativo.

Rutinariamente la detección clínica del factor Rh se realiza mediante hemoaglutinación. Sin embargo, aquellos pacientes RHD débiles o parciales no pueden identificarse correctamente con técnicas serológicas convencionales. En 1999 se logró un gran avance en la base molecular del RhD débil. Mediante una PCR que permite amplificar los diez exones de RHD y las regiones de intrones flanqueantes, y mediante análisis de ADN copia, Wagner et al. descubrieron que todas las muestras de RhD débil investigadas presentaban mutaciones en los exones. Este trabajo también describió la base molecular de los tipos 1 a 16 de RhD débil[3].

La web Rhesus base (http://www.rhesusbase.info)[4], actualizado por el Dr. Franz Wagner, es el mejor recurso disponible para quienes requieren información sobre las variantes RH identificadas hasta la fecha.

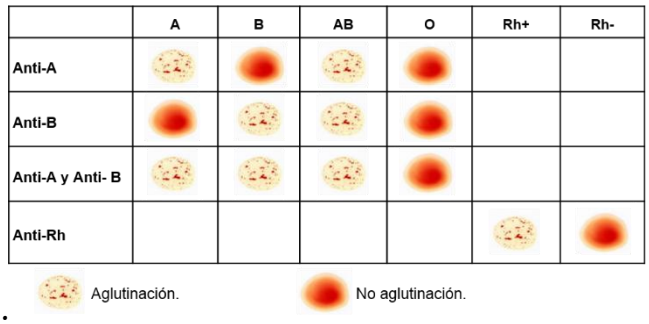


Figura 3. ***Determinación mediante aglutinación de los grupos sanguíneos ABO y Rh.***

La determinación clínica del factor Rh es de gran importancia para establecer la compatibilidad sanguínea en las transfusiones de sangre y en el embarazo. La incompatibilidad del Rh puede causar la enfermedad hemolítica del recién nacido la cual se produce cuando una madre con Rh- gesta un feto con Rh+. Aunque los glóbulos rojos fetales están inicialmente separados de la circulación materna por la placenta, durante el embarazo, algunos eritrocitos fetales pueden escapar a la circulación materna, donde se perciben como extraños, desencadenando una respuesta inmune. Con embarazos repetidos, la madre desarrolla niveles elevados de anticuerpos que pueden atravesar la placenta, llegar a la circulación fetal y reaccionar con los eritrocitos del feto, provocando inflamación del hígado, el bazo o el corazón, acumulación de líquido en los pulmones y otros síntomas de gravedad como puede ser una anemia hemolítica por destrucción de los glóbulos rojos. Para prevenir esto, se administra a la gestante una terapia inmunosupresora con inmunoglobulina Rh (RhoGAM).

[3] Wagner FF, Gassner C, Müller TH, et al. (1999) Molecular basis of weak D phenotypes. Blood 93: 385-93.
[4] Wagner FF, Flegel WA. (2014) The Rhesus Site. Transfus Med Hemother 41:b357-63.

El sistema Rh está asociado también con otras patologías como la anemia hemolítica autoinmune. Este trastorno es poco común, con una incidencia de 1 a 3 casos por 100.000 habitantes por año, y se debe a la presencia en sangre de autoanticuerpos que destruyen los eritrocitos.

2 OBJETIVOS DEL EXPERIMENTO

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica molecular de gran utilidad que permite superar algunas de las limitaciones de las técnicas clásicas de hemaglutinación. El objetivo de esta práctica es introducir a los estudiantes en los fundamentos y la aplicación práctica de la PCR, así como en el análisis de los productos amplificados mediante electroforesis en gel de agarosa. Para ello, la práctica se centrará en la determinación molecular del factor Rh mediante amplificación por PCR y posterior visualización de los fragmentos obtenidos.

3 MATERIAL INCLUIDO *(para 20 estudiantes)*

El kit incluye reactivos suficientes para la realización de reacciones de PCR con un volumen final de 25 µL para 20 muestras problema, 2 controles Rh+, 2 controles Rh-, 2 controles negativos y para 3 geles de agarosa de 100 mL de agarosa al 0,7 %.

Componentes	TBED1-20	Almacenaje
Red PCR Master Mix 2,5x	350 µL	-20 °C
Mezcla de Cebadores RhF/ RhR 10x	70 µL	-20 °C
Agua Biología Molecular	2 x 1 mL	-20 °C
Control RHD (1 ng/ µL)	10 µL	-20 °C
Control RHCE (1 ng/ µL)	10 µL	-20 °C
Lambda *Hind*III (50 µg/ µL)	20 µL	-20 °C
TiariStain™ Green Safe 20.000x	20 µL	25 °C ⚠
Tampón de Electroforesis TAE 50x	30 mL	25 °C
Agarosa Baja Electroendosmosis	3 g	25 °C

⚠ Almacenar a temperatura ambiente. Si el producto se almacena a 4°C o a -20°C, se deteriora completamente.

4 MATERIAL REQUERIDO (*no suministrado*)

Para la ejecución de la práctica se requiere:

- Micropipetas
- Termociclador
- Sistema de electroforesis (*cubeta, soporte para hacer los geles, fuente de electroforesis*)
- Transiluminador
- Microondas o placa calefactora
- Tubos de PCR
- Puntas para micropipetas
- Matraz 250 mL
- Agua destilada o desionizada

5 DESCRIPCIÓN DE LA PRÁCTICA DE LABORATORIO

El ADN de los alumnos, aislado previamente, será empleado como molde para la amplificación de los genes *RHD* y *RHCE*. Estos genes tienen una homología superior al 90%, lo que permite el diseño y uso de una única pareja de cebadores para amplificar dos regiones genómicas distintas. Los cebadores se anillan tanto sobre el gen *RHD* como en el gen *RHCE*, actuando ambos genes como diana molecular.

La amplificación de dos fragmentos de diferente tamaño (575 pb y 1.200 pb) indicará que la persona es Rh+. En el caso de la amplificación de una única banda de 1.200 pb indicará que el individuo es Rh- (*Figura 2*). El gen *RHCE* actúa como un excelente control positivo de la ejecución de la técnica pues está presente tanto en personas Rh+ como en Rh-.

Para que ocurra la reacción de amplificación, la reacción incluirá los siguientes componentes:

a) una master mix (*Red PCR Master Mix 2,5 x*): Es una mezcla que contiene los cuatro desoxinucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), la Taq ADN polimerasa recombinante, un buffer optimizado para la reacción de PCR (Mg^{2+} como cofactor de la polimerasa y otros aditivos), un colorante que nos permitirá monitorizar posteriormente la electroforesis y un agente como el glicerol que favorecerá la carga del volumen de PCR en los pocillos del gel de agarosa.

b) Cebadores RhF y RhR (*Mezcla de Cebadores RhF/ RhR 10x*): son suministrados como una mezcla 10x de ambos.

c) ADN molde: Referido a la muestra de ADN genómico de los estudiantes o al ADN control (*Control Rh+ y Rh-)* incluidos en el kit. El kit no incluye reactivos para purificar el ADN.

d) Agua Biología Molecular.

La práctica incluye un segundo módulo: una electroforesis en gel de agarosa. Ello implica la preparación del gel, su inmersión en buffer de electroforesis, la aplicación de las muestras y la migración electroforética de las mismas.

En primer lugar, se prepara el gel de agarosa disolviendo la cantidad necesaria de agarosa en el tampón de electroforesis TAE1x mediante calentamiento, hasta su completa solubilización. Una vez obtenida la disolución, se deja enfriar hasta aproximadamente 55 °C. Tras añadir a la solución el intercalante del ADN (TiariStain™ Green Safe), esta se vierte en el molde correspondiente, previamente preparado. Tras el vertido de la solución de agarosa, colocar un peine para generar los pocillos, donde se depositarán posteriormente las muestras. Dejar en reposo hasta la total solidificación de la agarosa.

Cuando el gel ha solidificado, los peines son removidos y el gel sobre su soporte, se introduce en la cubeta de electroforesis horizontal. Ubicar los pocillos hacia el lado donde se encuentra el polo negativo. A la cubeta se le añade buffer TAE1x hasta cubrir el gel completamente. La cubeta se dispone con los electrodos en extremos opuestos, uno positivo y otro negativo.

A continuación, las muestras de ADN se preparan mezclándolas con un tampón de carga que contiene glicerol, lo que aumenta su densidad y facilita que se depositen en el fondo de los pocillos. Con ayuda de una micropipeta, se cargan cuidadosamente las muestras en cada pocillo.

Por último, se conecta la fuente de alimentación y se aplica el campo eléctrico, iniciándose la migración de las moléculas a través del gel de agarosa.

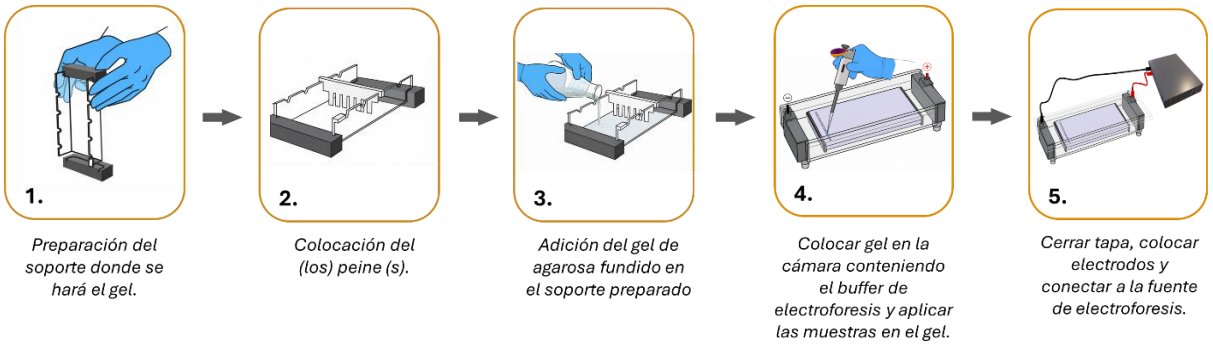


Figura 4. ***Flujo de trabajo para la realización de una electroforesis.***

Al emplear como intercalante el TiariStain™ Green Safe, los fragmentos amplificados se observarán colocando el gel en un transiluminador con luz azul y filtro naranja (preferiblemente) o ultravioleta.

5.1. PCR

1. Rotular cuatro tubos de PCR como muestra (M o inicial del nombre), controles positivos (RHD, RHE) y control negativo (C-).
2. Añadir en un tubo de PCR los siguientes componentes:

Componentes	Volumen/ Cantidad
Factor Rh PCR Master Mix (2,5x)	10 µL
Mezcla de Cebadores RhF/ RhR 10x	2 µL
Agua para PCR	Hasta completar 25 µL
ADN genómico	~150 ng

Si utiliza un termociclador sin heated lid, añadir 25 µL de aceite mineral para prevenir la evaporación.

3. Incluye tres muestras control: RhD, RhCE y control negativo:

	Componentes	Volumen
RHD	Factor Rh PCR Master Mix (2,5x)	10 µL
	Control RHD (1 ng/ µL)	3-5 µL
	Agua para PCR	Hasta completar 25 µL
RHCE	Factor Rh PCR Master Mix (2,5x)	10 µL
	Control RHCE (1 ng/ µL)	3-5 µL
	Agua para PCR	Hasta completar 25 µL
Control Negativo	Factor Rh PCR Master Mix (2,5x)	10 µL
	Agua para PCR	15 µL

4. Programar el termociclador tal y como se indica en la siguiente tabla,

Pasos	Ciclos	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	1 x	94 °C	05:00
Desnaturalización	40 x	94 °C	0:35
Anillamiento		62 °C	0:35
Extensión		72 °C	0:50
Extensión final	1 x	72 °C	10:00
Conservación	1 x	4 °C	∞

5. Colocar los tubos de PCR en el termociclador, cerrar la tapa e iniciar el programa.

5.2. VISUALIZACIÓN DE LA PCR

Para visualizar los productos de la PCR, realizaremos una electroforesis en gel de agarosa.

5.2.1. PREPARACIÓN DEL SOPORTE DONDE SE HARÁ EL GEL DE AGAROSA

1. Coger el soporte y cerrar los extremos con los topes o con cinta de carrocero (*Figura 4. Paso 1*), para que cuando se vierta la solución de agarosa fundida, esta no se derrame.
2. Colocar el peine para formar los pocillos. Valore si colocar 1 o 2 peines y disponer de 1 o 2 filas de pocillos donde cargar las muestras (*Figura 4. Paso 2*).

5.2.2. PREPARACIÓN DEL TAMPÓN DE ELECTROFORESIS

1. Preparar el Tampón de electroforesis TAE a una concentración 1x. Necesitará un volumen correspondiente al del gel más el de la cubeta de electroforesis. Preparar la cantidad necesaria según su cubeta de electroforesis y tamaño del gel.

	Volumen a preparar		
	500 mL	1 L	1,5 L
TAE 50x	10 mL	20 mL	30 mL
Agua Destilada	490 mL	980 mL	1.470 mL

5.2.3. PREPARACIÓN DEL GEL DE AGAROSA

1. En un matraz, pesar la cantidad de agarosa necesaria para preparar un gel de agarosa al 0,7% en Tampón de electroforesis TAE 1x. En función del número de pocillos del peine, calcule la cantidad de geles que necesite para cargar todas las muestras.

	Tamaño Soporte			
	7 x 7 cm	7 x 10 cm	6 x 10 cm	15 x 10 cm
Agarosa	0,22 g	0,29 g	0,35 g	0,7 g
TAE 1x	32 mL	42 mL	50 mL	100 mL

2. En un microondas, fundir la agarosa hasta que esté totalmente disuelta. Agitar la solución de vez en vez hasta que no queden granos de agarosa sin fundir.
3. Cuando la solución esté atemperada (~55 °C), añadir a la agarosa fundida el intercalante TiariStain™ Green Safe a razón de 3 µL para un gel de hasta 50 mL y 5 µL para un gel de 100 mL. Mezclar hasta que la coloración sea homogénea.

4. Verter cuidadosamente la solución en el soporte donde se solidificará el gel (*Figura 4. Paso 3*). Evitar que queden burbujas.
5. Una vez solidificado el gel, quitar el peine con cuidado y colocarlo en la cámara de electroforesis conteniendo tampón de electroforesis 1x.

5.2.4. ELECTROFORESIS

1. Una vez que el gel se haya solidificado, sujetar el peine por ambos lados y desencajarlo del gel.
2. Quitar los topes o la cinta de carrocero y colocar el gel sobre su soporte (*sin los topes o la cinta de carrocero en su defecto*) en la cámara de electroforesis, conteniendo ésta tampón de electroforesis TAE1x suficiente para que quede el gel cubierto.

   Colocar en la cubeta de electroforesis el gel sobre su soporte, teniendo en cuenta que los pocillos deben estar cerca del polo negativo.
3. Añadir Buffer TAE 1x hasta cubrir el gel.

   El tampón puede recuperarse y utilizarse al menos una vez más.
4. Cargar una muestra por pocillo, añadiendo todo el volumen de PCR.

   No requiere añadir tampón de carga pues la Master Mix lo incluye.
5. Reservar un pocillo para cargar 5 µL del patrón de peso molecular Lambda-*Hind*III.
6. Tras cargar todas las muestras disponibles, colocar la tapa de la cubeta de electroforesis, conectar los electrodos a la fuente (*Figura 4. Paso 5*).
7. Configurar la fuente de corriente a 75 voltios (30 minutos) o a 150 voltios (20 minutos).

   El colorante rojo permite monitorizar la migración electroforética. Evitar que salga del gel.
8. Cuando el frente de carga haya migrado lo suficiente, parar la fuente de electroforesis.
9. Coger el gel y colocarlo en el transiluminador.
10. Hacer foto y analizar los resultados obtenidos.
11. A partir del patrón de bandas, puede establecerse la siguiente relación:

Resultado de PCR	Interpretación molecular	Fenotipo compatible
RHD (+) / RHCE (+)	Se detecta RHD	Rh positivo
RHD (+) / RHCE (–)	Se detecta RHD, no RHCE	Rh positivo si los controles son correctos
RHD (–) / RHCE (+)	No se detecta RHD en la región analizada	Rh negativo, si los controles son correctos
RHD (–) / RHCE (–)	No se detectan ni RHD, ni RHCE	No interpretable, repetir PCR