

Determinación de genotipos para los grupos ABO por PCR-RFLP

El gen ABO codifica una glucosiltransferasa, que cataliza la transferencia de carbohidratos al antígeno H. Las proteínas codificadas por los alelos A y B difieren mínimamente en su secuencia de aminoácidos, pero catalizan la transferencia de carbohidratos diferentes (N-acetilgalactosamina o galactosa) al antígeno H. El alelo O tiene una delección de una base y codifica una proteína no funcional.

Las diferencias en la secuencia de nucleótidos de los diferentes alelos determinan cambios en sus mapas de restricción. En esta práctica se amplificarán dos regiones del gen que tienen dianas de restricción diferentes en alguno de los tres alelos (ver Tun y col. 1996).

SESIÓN 1

1 Extracción de DNA

1.1 Pasar un bastoncillo de algodón por la cara interna de la mejilla

1.2 Cortar el extremo del bastoncillo y colocarlo en un tubo Eppendorf

1.3 Añadir **150 µl** de **tampón TE** y **4µl** de **proteínasa K**.

1.4 Incubar a **56°C** durante **45 min.**

1.5 Calentar a **100°C** durante **15 min.**

1.6 Dejar enfriar a temperatura ambiente y centrifugar **1 min.**

2 Amplificación del amplicón 1

Los cebadores 1 y 2 permiten amplificar el segmento comprendido entre los nucleótidos 2193 y 2393. Se produce una molécula de 199 pb en el alelo O y de 200 pb en los alelos A y B. En el alelo O tiene un blanco de restricción para **Kpn I** que está ausente en los alelos A y B.

2.1 En un tubo de **10,2 ml** mezclar:

Cebador 1	1µl	5' TGCAGTAGGAAGGATGTCCTC 3'
Cebador 2	1µl	5' AATGTCCACAGTCACTCGCC 3'
DNA	10,5µl	

2.2 Añadir **12,5 µl** de la **PCR Mix** (Nucleótidos, tampón y polimerasa *Taq*). Mantener en hielo hasta colocar en el termociclador.

3 Amplificación del amplicón 2

Los cebadores 3 y 4 permiten amplificar el segmento comprendido entre los nucleótidos 783 y 911. Se genera una molécula de 128 pb en los tres alelos. En el alelo B tiene un blanco de restricción para **Alu I** que está ausente en los alelos A y O.

3.1 En un tubo de **0,2 ml** mezclar:

Cebador 3	1µl	5' TGGAGATCCTGACTCCGCTG 3'
Cebador 4	1µl	5' GTAGAAATCGCCCTCGTCCTTG 3'
DNA	10,5µl	

3.2 Añadir **12,5 µl** de la **PCR Mix** (Nucleótidos, tampón y polimerasa *Taq*). Mantener en hielo hasta colocar en el termociclador.

4 Programación del termociclador

Pasos

1	Desnaturalización	5 min	94°C
2	Desnaturalización	30 seg	94°C
3	Unión cebadores	30 seg	56°C
4	Extensión	45 seg	72°C
5	Extensión	7 min	72°C

Repetir los pasos 2, 3 y 4 30 veces. Duración: 1h 45 min. aprox.

SESIÓN 2

5 Digestiones con enzimas de restricción

5. 1 Digestión del producto del **amplicón 1** con ***Kpn I***. El alelo 0 produce dos fragmentos de 171 y 28 pb. Los alelos A y B no se digieren.

Mezclar en un tubo:

<i>Kpn I</i>	1 µl
Tampón L	2 µl
BSA	2 µl
DNA	15 µl

5. 2 Digestión del producto del **amplicón 2** con ***Alu I***. El alelo B produce dos fragmentos de 88 y 40 pb. Los alelos A y 0 no se digieren.

Mezclar en un tubo:

<i>Alu I</i>	1 µl
Tampón A	2 µl
DNA	17 µl

5. 3 Incubar a 37°C.

SESIÓN 3

6 Electroforesis

Comprobar el resultado de las digestiones en un gel de **agarosa al 2,5%**, con **Marker V** como control.