



PLUS KIT | In vitro ανάλυση

για τον προσδιορισμό του υποείδους a.m. cecropia της μέλισσας από την οποία παράγεται το μέλι, σε δείγματα μελιού



HONEYGEN kit

Το Χημείο Λαμίας ανέπτυξε ένα προϊόν βιοτεχνολογίας με την επωνυμία HoneyGen, με το οποίο είναι δυνατή η ταυτοποίηση της γονοτυπικής προέλευσης δειγμάτων ελληνικού μελιού σε δείγματα μελιών τα οποία προέρχονται από μέλισσες *a. M. Cecropia* επειδή παρουσιάζουν διαφοροποίηση στο μιτοχονδριακό γενετικό τους κώδικα σχετιζόμενα με τα μέλια που προέρχονται από μέλισσες άλλων υποείδων της *apis mellifera*. Με το «**plus**» kit είναι δυνατή η ολοκλήρωση της εργασίας στο εργαστήριο το οποίο προμηθεύτηκε το kit ενώ με το απλό kit η εργασία ολοκληρώνεται με την ταυτοποίηση του στο Χημείο Λαμίας.

Το προϊόν υλοποιήθηκε στο πλαίσιο της Δράσης ΕΡΕΥΝΩ – ΔΗΜΙΟΥΡΓΩ - ΚΑΙΝΟΤΟΜΩ και συγχρηματοδοτήθηκε από το Ευρωπαϊκό Ταμείο Περιφερειακής Ανάπτυξης (ΕΤΠΑ) της Ευρωπαϊκής Ένωσης και εθνικούς πόρους μέσω του Ε.Π. Ανταγωνιστικότητα, Επιχειρηματικότητα & Καινοτομία (ΕΠΑνΕΚ) (κωδικός έργου: Τ2ΕΔΚ-04902)

Είδη Δειγμάτων

- **Μέλι:** μέλι μη επεξεργασμένο και αφιλτράριστο αμέσως μετά την παραγωγή

Πριν την χρήση

Το παρόν προϊόν διακινείται και συντηρείται σε συνθήκες κατάψυξης. Μετά το άνοιγμα είναι δυνατόν να διατηρούνται μέρος των αντιδραστηρίων σε θερμοκρασία δωματίου ενώ κάθε αντιδραστήριο φέρει ειδική σήμανση για τις συνθήκες φύλαξης του. Η ημερομηνία λήξης του kit και των αντιδραστηρίων του μονομερώς καταγράφεται στις αντίστοιχες ετικέτες τους και καμία εγγύηση ποιότητας δεν γίνεται δεκτή μετά την ημερομηνία λήξης. Η ημερομηνία λήξης των αντιδραστηρίων του kit ισχύει με την προϋπόθεση ότι τα συστατικά θα αποθηκευτούν δεόντως και δεν θα επιμολυνθούν έπειτα από τον πρώτο χειρισμό σε περίπτωση επαναλαμβανόμενων χρήσεων. Τα αντιδραστήρια με σημείωση * δεν περιλαμβάνονται στο προϊόν.

Με την παραλαβή της συσκευασίας τα αντιδραστήρια Β, C, Η, Ι, J, Κ διατηρούνται στους -20 °C. Πριν την χρήση τους ξεπαγώνουν σε λουτρό πάγου με περιοδική ανάδευση έως ότου ρευστοποιηθεί το περιεχόμενο και μετά το πέρας της χρήσης τους αποθηκεύονται ξανά στους -20 °C.

Για διευκρινήσεις σχετικά με την πορεία και αναφορά προβλημάτων επικοινωνείτε με το επιστημονικό προσωπικό του Χημείου Λαμίας στο τηλέφωνο 2231024526 ή στο email dna@lamialab.com

Οδηγίες χρήσης

Απαιτούμενος εξοπλισμός:

1. Ζυγός ικανός να μετρήσει 20 g με ακρίβεια $\pm 0,5$ g
2. Περιέκτες φυγοκέντρησης όγκου 50 ml
3. Φιαλίδια τύπου Eppendorf όγκου 1,5 ml
4. Φυγόκεντρος όγκων 50 ml και 2 ml με ικανότητα 6000 στροφές ανά λεπτό
5. Πιπέτες ικανές για την μεταφορά 2- 20 μ L, 20- 200 μ L και 200-1000 μ L
6. Πιπέτα πλήρωσης τύπου A των 10 ml
7. Υδατόλουτρο θερμοστατούμενο στους $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$
8. Θερμοαντιδραστήρας τύπου μπλοκ θερμοστατούμενος στους $60\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$
9. Συσκευή PCR ικανή να λειτουργεί με το πρόγραμμα
 - a. $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 1 λεπτό
 - b. 30X
 - i. $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 30 sec
 - ii. $59\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 1 λεπτό
 - iii. $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 30 sec
 - c. 5 λεπτά στους $72\text{ }^{\circ}\text{C}$
10. Συσκευή ηλεκτροφόρησης ικανή να λειτουργεί με συνθήκες 50 volt / 70 min

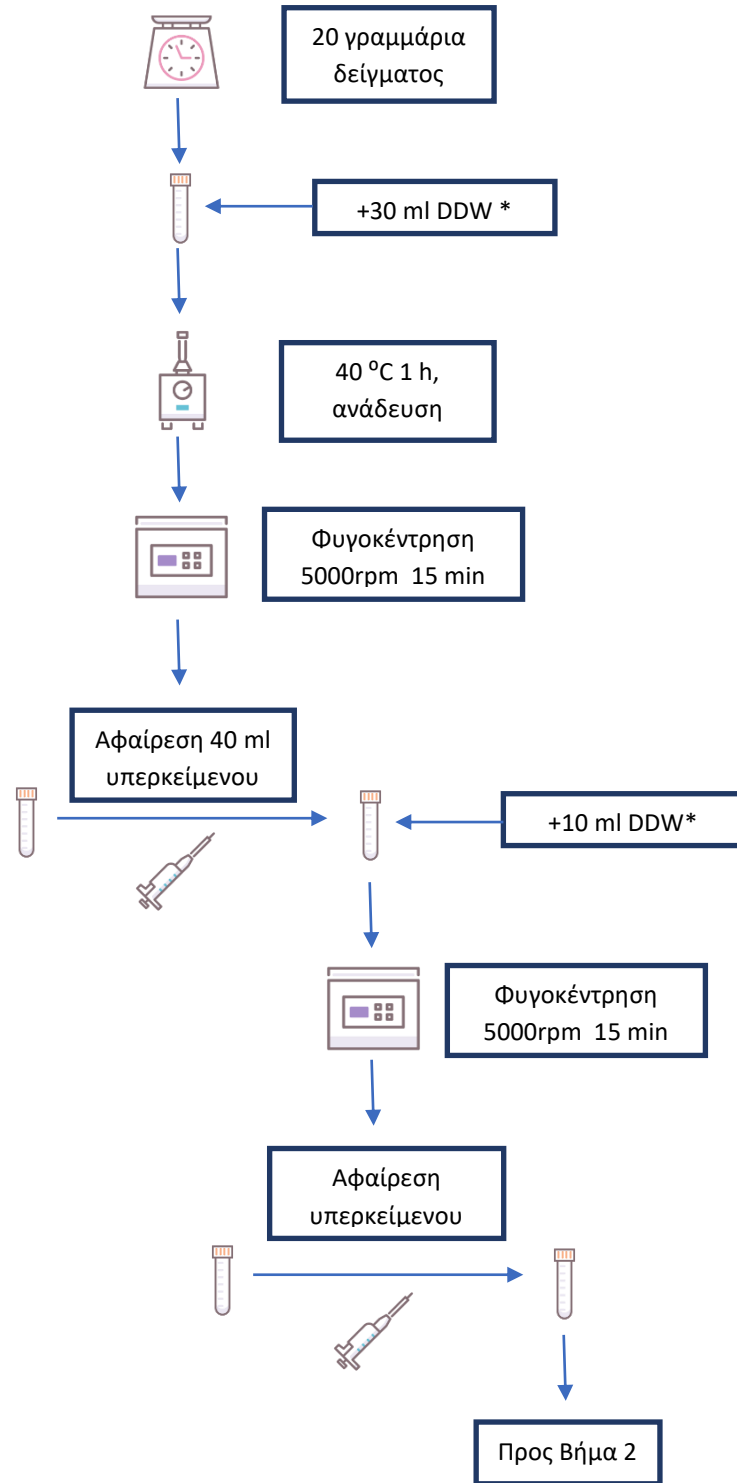
Ακολουθούν εποπτικές οδηγίες χρήσης.

Τα αντιδραστήρια με σημείωση * δεν περιλαμβάνονται στο προϊόν.

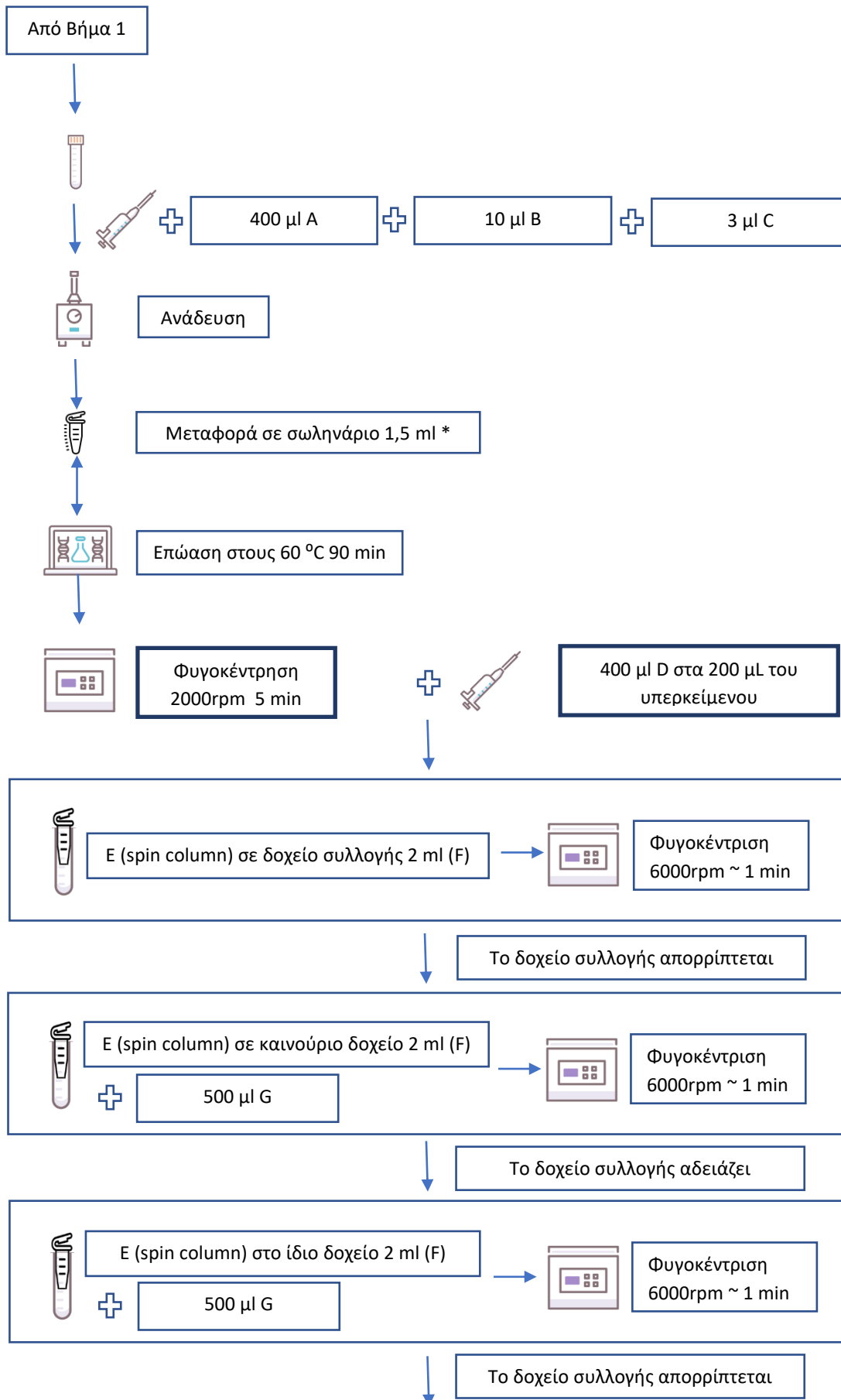
Με την παραλαβή της συσκευασίας τα αντιδραστήρια B, C, H, I, J, K διατηρούνται στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Πριν την χρήση τους ξεπαγώνουν σε λουτρό πάγου με περιοδική ανάδευση έως ότου ρευστοποιηθεί το περιεχόμενο και μετά το πέρας της χρήσης τους αποθηκεύονται ξανά στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

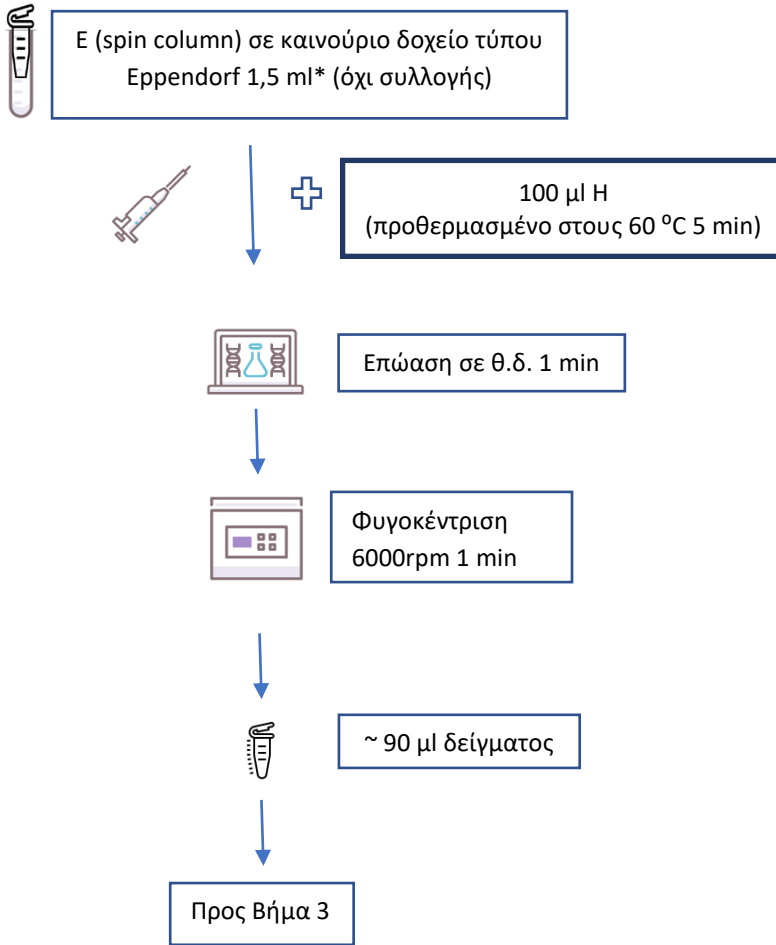
Για διευκρινήσεις σχετικά με την πορεία και αναφορά προβλημάτων επικοινωνείτε με το επιστημονικό προσωπικό του Χημείου Λαμίας στο τηλέφωνο 2231024526 ή στο email: dna@lamialab.com

ΒΗΜΑ 1



ΒΗΜΑ 2





ΒΗΜΑ 3

10 µL από Βήμα 2. Συμπληρώνουμε μέχρι τα 25 µl με αντιδραστήριο H.



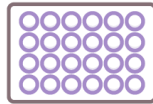
25 µL K (Taq polymerase)



1 µL i (forward)
1 µL j (reverse)



PCR tube 0,2 ml*



95 °C για 6 λεπτά
30 X {
i) 95 °C για 30 sec
ii) 59 °C για 1 λεπτό
iii) 72 °C για 30 sec
6 λεπτά στους 72 °C



Ηλεκτροφόρηση 50 volt / 70 min
Αγαρόζη 3% σε TBE 1X *
50 bp DNA ladder *
Target band: 111 bp

ΒΗΜΑ 1

20 γραμμάρια δείγματος το οποίο αρχικά έχει ομογενοποιηθεί εν θερμό σε υδατόλουτρο στους 40°C τοποθετούνται σε σωλήνα φυγοκέντρησης ο οποίος πληρώνεται μέχρι τα 50 γραμμάρια με απιονισμένο νερό ελεύθερο μικροβίων (δεν περιλαμβάνεται). Στη συνέχεια το διάλυμα που προκύπτει υπό ανάδευση θερμαίνεται σε υδατόλουτρο στους 40°C για 60 λεπτά. Το διάλυμα απομακρύνεται από το υδατόλουτρο ανά 5 λεπτά και αναδεύεται με στόχο να διαλυθούν όλα τα σάκχαρα και να μην υπάρχει υπόλειμμα στον πάτο του σωλήνα. Στη συνέχεια ο σωλήνας τοποθετείται στην φυγόκεντρο όπου φυγοκεντρείται για 15 λεπτά στις 5000 στροφές ανά λεπτό. Χρειάζεται προσοχή στην περίπτωση όπου τοποθετείται μόνο ένα δείγμα σε φυγόκεντρο καθώς στην απέναντι θέση της φυγοκέντρου θα πρέπει να υπάρχει τυφλό δείγμα ίσου βάρους. Με προσοχή αφαιρούνται 40 ml του υπερκείμενου και τοποθετούνται εκ νέου 10 ml απιονισμένου νερού ελεύθερου μικροβίων (δεν περιλαμβάνεται). Γίνεται ελαφριά ανάδευση με το χέρι και ο σωλήνας επανατοποθετείται στην φυγόκεντρο και φυγοκεντρείται για ακόμη 15 λεπτά στις ίδιες στροφές ανά λεπτό και στην ίδια θερμοκρασία. Στο τέλος της φυγοκέντρησης αφαιρείται το σύνολο του υπερκείμενου με ένα σιφώνιο πλήρωσης ή με απόχυση, με προσοχή ώστε να μην διαταραχθεί το ίζημα. Το ίζημα συλλέγεται με 400 mL ρυθμιστικού διαλύματος λύσης (δοκιμάστηκαν διάφορα διαλύματα λύσης όπως περιγράφεται παρακάτω) για το επόμενο βήμα του καθαρισμού (ΒΗΜΑ 2).

ΒΗΜΑ 2

Το ίζημα που συλλέχθηκε στο προηγούμενο βήμα της απομόνωσης του γενετικού υλικού διαλυτοποιείται με 400 mL ρυθμιστικό διάλυμα λύσης A, προστίθενται 10 mL διάλυμα B και 3 mL διάλυμα C και το σύνολο του αιωρήματος μεταφέρεται σε κωνικό φιαλίδιο τύπου Eppendorf των 1,5 ml (δεν περιλαμβάνεται) με ισχυρή ανάδευση σε συσκευή vortex. Το διάλυμα θερμοστατείται στους 60°C για 90 λεπτά. Στη συνέχεια και αφού έρθει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος φυγοκεντρείται σε χαμηλές στροφές και παραλαμβάνουμε από το υπερκείμενο 200 mL σε νέο φιαλίδιο τύπου Eppendorf των 1,5 ml (δεν περιλαμβάνεται). Για την προσρόφηση προσθέτουμε 400 mL διαλύματος D και ακολουθεί ισχυρή ανάδευση για 10 δευτερόλεπτα. Το διάλυμα φορτώνεται σε στηλάκι spe E το οποίο τοποθετείται σε ένα φιαλίδιο συγκέντρωσης των απορριμμάτων φυγοκέντρησης F. Γίνεται φυγοκέντρηση σε χαμηλή ταχύτητα για 3 λεπτά και στη συνέχεια για 1 λεπτό σε υψηλή ταχύτητα (>6000 σαλ). Το στηλάκι αφαιρείται με προσοχή από το φιαλίδιο συγκέντρωσης και τοποθετείται σε νέο φιαλίδιο συγκέντρωσης των απορριμμάτων φυγοκέντρησης F. Για την πλύση προστίθενται στο στηλάκι 500 mL διαλύματος G και φυγοκεντρείται για 1 λεπτό σε υψηλή ταχύτητα (>6000 σαλ). Το στάδιο αυτό επαναλαμβάνεται αφού απορριφθούν τα εκχυλίσματα της πρώτης πλύσης. Στη συνέχεια το στηλάκι τοποθετείται σε κωνικό φιαλίδιο τύπου Eppendorf των 1,5 ml (δεν περιλαμβάνεται) και προσθέτουμε χωρίς να αγγίξουμε το προσροφητικό υλικό 100 mL ρυθμιστικού διαλύματος H το οποίο έχει προθερμαθεί στους 60 °C για 2 λεπτά. Αναμένουμε για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια φυγοκεντρούμε για 1 λεπτό σε υψηλή ταχύτητα (>6000 σαλ) Αφαιρούμε με προσοχή και απορρίπτουμε το στηλάκι. Το διάλυμα που προκύπτει στο κωνικό φιαλίδιο τύπου Eppendorf όγκου περίπου 90 mL περιέχει το καθαρισμένο γενετικό υλικό.

BHMA 3 (DNA «PLUS» KIT ONLY)

Αρχικά στα φιαλίδια PCR (δεν περιλαμβάνεται) προστίθεται 10 µL από το BHMA 2, 25 µL διαλύματος H και 25 µL ρυθμιστικού διαλύματος πολυμεράσης έτοιμο προς χρήση Taq polymerase, 1 µL forward primer i, 1 µL reverse primer j. Το διάλυμα που προκύπτει ανακινείται με την χρήση μικροπιπέτας προσθέτοντας και αφαιρώντας ποσότητα 20 µL στο ίδιο διάλυμα εις τριπλό.

Το φιαλίδιο PCR τοποθετείται στον θερμικό κυκλοποιητή και επιλέγονται οι εξής συνθήκες θερμικής κυκλοποίησης: Η αποδιάταξη του γενετικού υλικού γίνεται στους 95°C για 6 λεπτά και μετά ακολουθούν 30 κύκλοι ο καθένας από τους οποίους έχει κατά σειρά αποδιάταξη του γενετικού υλικού στους 95°C για 30 sec, θερμοκρασίας ανόπτωσης 59°C για 30 sec, επιμήκυνση στους 72°C για 30 sec. Στο τέλος των 30 κύκλων επαναλαμβάνεται η επιμήκυνση στους 72°C για 6 λεπτά και στη συνέχεια το δείγμα επαναφέρεται σε θερμοκρασία δωματίου. Στη διάρκεια της θερμικής κυκλοποίησης στο επάνω μέρος των φιαλιδίων εφαρμόζεται θερμοκρασία 100 °C ώστε να αποτραπεί η συσσώρευση υδρατμών.

ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΣΕ ΓΕΛΗ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ

Παρασκευάζεται ένα διάλυμα TBE 1X όγκου 500 ml (δεν περιλαμβάνεται) σε απιονισμένο νερό . Για το εκμαγείο γέλης μέσα στο οποίο θα κινητοποιηθούν τα παραγόμενα DNA προστίθενται σε μία κωνική φιάλη 1,5 γραμμάρια αγαρόζης υψηλής καθαρότητας και 50 ml από το παρασκευασμένο ρυθμιστικό διάλυμα TBE 1X. Το διάλυμα τοποθετείται σε φούρνο μικροκυμάτων για 2 λεπτά (εναλλακτικά γίνεται ήπια θέρμανση σε θερμαντική πλάκα ύπο συνεχή ανάδευση). Το διάλυμα κρύνει μέχρι τους 50 °C περίπου και προστίθεται σε αυτό 2,5 µL βρωμιούχου αιθιδίου 1% (δεν περιλαμβάνεται) σε εν λειτουργία απαγωγό αερίων. Το διάλυμα ανακινείται ήπια για να διαλυθεί στο βρωμιούχο αιθίδιο και με αυτό γεμίζουμε το εκμαγείο ηλεκτροφόρησης. Αφήνουμε το εκμαγείο να κρύνει και να πήξει. Προσθέτουμε το εκμαγείο στο διάλυμα και φορτώνουμε στην πρώτη θέση φόρτωσης δειγμάτων έτοιμο ladder 50 bp (δεν περιλαμβάνεται). Στις υπόλοιπες θέσεις του εκμαγείου φορτώνουμε 1, 2 ή και περισσότερα δείγματα. Μετά την φόρτωση των δειγμάτων πληρώνουμε την δεξαμενή της ηλεκτροφόρησης με διάλυμα ρυθμιστικού διαλύματος TBE 1X μέχρι την χαραγή και συνδέουμε τα ηλεκτρόδια της ανόδου και της καθόδου. Το ρεύμα το οποίο διοχετεύουμε είναι της τάξης των 50 volts (5volts/cm) και ο χρόνος της ηλεκτροφόρησης είναι τα 70 λεπτά. Με το πέρας των 70 λεπτών το κομμάτι της πηγμένης αγαρόζης μεταφέρεται με προσοχή σε συσκευή φθορισμού , τοποθετείται ειδικό φίλτρο και φωτογραφίζεται το αποτέλεσμα σε σκοτεινό θάλαμο. Εναλλακτικά χρησιμοποιείται πηγή φωτός led ισχυρού μπλε χρώματος με δυνατότητα παρακολούθησης της πορείας της ηλεκτροφόρησης χωρίς να αποδομείται το γενετικό υλικό από την ακτινοβολία.

HONEYGEN “PLUS” KIT | VERSION 01 16062023 IK

Όλες οι μέθοδοι που παρέχονται από το Χημείο Λαμίας είναι εγγυημένο ότι ανταποκρίνονται ή ξεπερνούν τις δημοσιευμένες προδιαγραφές μας, όταν χρησιμοποιούνται υπό κανονικές συνθήκες στο εργαστήριό σας.

Το Χημείο Λαμίας δεν παρέχει καμία εγγύηση οποιουδήποτε είδους, είτε ρητή ή σιωπηρή, εκτός από το ότι τα υλικά από τα οποία είναι κατασκευασμένα τα προϊόντα της είναι σταθερής ποιοτικής στάθμης. Δεν υπάρχει καμία εγγύηση εμπορευσιμότητας αυτού του προϊόντος, ή της καταλληλότητας του προϊόντος για οποιοδήποτε σκοπό. Το Χημείο Λαμίας δεν φέρει καμία ευθύνη για τυχόν ζημιές, συμπεριλαμβανομένων ειδικών ή επακόλουθων ζημιών, ή δαπάνες που προκύπτουν άμεσα ή έμμεσα από τη χρήση αυτού του προϊόντος. Η συγκεκριμένη μέθοδος θεωρείται ότι είναι μια μέθοδος ανίχνευσης, σε περίπτωση δικαστικής διερεύνησης, τα δείγματα που ανιχνεύτηκαν ως θετικά πρέπει να επιβεβαιωθούν και με πρότυπη μέθοδο αναφοράς. Αυτό το προϊόν προορίζεται αποκλειστικά μόνο για ερευνητικούς σκοπούς ή την Βιομηχανία και πρέπει να χρησιμοποιείται από εξειδικευμένους τεχνικούς.

Το προϊόν υλοποιήθηκε στο πλαίσιο της Δράσης ΕΡΕΥΝΩ – ΔΗΜΙΟΥΡΓΩ - ΚΑΙΝΟΤΟΜΩ και συγχρηματοδοτήθηκε από το Ευρωπαϊκό Ταμείο Περιφερειακής Ανάπτυξης (ΕΤΠΑ) της Ευρωπαϊκής Ένωσης και εθνικούς πόρους μέσω του Ε.Π. Ανταγωνιστικότητα, Επιχειρηματικότητα & Καινοτομία (ΕΠΑνΕΚ) (κωδικός έργου: Τ2ΕΔΚ-04902)



www.lamialab.com
e: dna@lamialab.com
t: +30 2231024526