**QIAamp DNA Blood Midi Kit**

מבוסס על הפורוטול של החברה:

[**HB-0339-003-1090244-HB-QIAamp-DNA-Blood-MidiMaxi-0215-WW.pdf**](file:///C%3A%5CUsers%5Cmoshee%5CAppData%5CLocal%5CMicrosoft%5CWindows%5CTemporary%20Internet%20Files%5CContent.Outlook%5CBBXAI2XO%5CHB-0339-003-1090244-HB-QIAamp-DNA-Blood-MidiMaxi-0215-WW.pdf)

**שלבים מקדימים:**

להפשיר את הדוגמאות לטמפ' החדר

להכין אמבט מים ב70C

1. **הוסף לתאים 1 מ"ל PBS + 1515ul RnaseA ( עד 5 מיליון בדוגמא), 15 דק ב RT.**

הRNAse מוכן בריכוז של mg/ml100 (mg250 אבקה של RNAse מק"ט R6513-250MGל-ml2.5 מים מזוקקים) ויש להוסיף ממנו ul15 ל1ml PBS, ל 15 דק בטמפ החדר.

**2. הוסף פרוטאז למבחנת צנטריפוגה. 100 מיקרוליטר בשביל דוגמא של 1 מיליליטר.**

**3. הוסף את הדוגמא (1מל) למבחנת הצנטריפוגה ולערבב.**

ניתן להוסיף את הפרוטאז לתוך הדוגמא ולא הפוך אבל אז צריך לערבב יותר ביסודיות.

**4הוסף 1.2 מיליליטר בופר AL למבחנה ולערבב ביסודיות : הפוך את המבחנה 15 פעמים ואז נער את המבחנה במשך דקה.**

**4) אינקובציה ב70C ל10 דק.** אינקובציה נוספת לא תזיק לתהליך.

**5) להוסיף 1 מיליליטר אתנול 96% ולערבב על ידי הפיכת המבחנה 10 פעמים לאחר מכן לנער היטב.**

**6) להעביר את כל התמיסה מהמבחנה הראשונית לקולונה הנמצאת בתוך מבחנת צנטריפוגה(אם הנפח הראשוני היה 1 מיליליטר צריך לדלג על שלב 7).**

חשוב לא להרטיב אתשפת הקולונה כשמעבירים את התמיסה אליה.

**לסרכז במשך 3 דק' בתדירות סיבוב של 3000rpm**

חשוב: לא להדק את המכסים את המבחנות חזק מידי.

**חשוב**: להחזיק את המבחנות במנך אנכי מכיוון שהתמיסה עלולה לעבור דרך שפת הקולונה גם כאשר הפקק סגור.

(אם התמיסה לא עברה כולה את הממברנה ניתן לסרכז פעם נוספת במהירות גבוהה יותר.)

**8) להוציא את הקולונה, לרוקן את התסנין ולהחזיר את הקולונה חזרה לתוך המבחנה. יש לנגב את המבחנה מלמעלה לפני שמחזירים לתוכה את הקולונה.**

**9) להוסיף 2 מיליליטר בופר AW1 לקולונה מבלי להרטיב את שפת המבחנה ולסרכז ב5000rpm במשך דקה.** לא לזרוק את הפילטרט.

**10) להוסיף 2 מיליליטר בופר AW2 לקולונה מבלי להרטיב את שפת המבחנה ולסרכז ב5000 rpm במשך 15 דקות.** לא לזרוק את הפילטרט.

**11) להעביר את הקולונה למבחנה הנקייה (collection tube) ולזרוק את המבחנה הקודמת המכילה את התסנין).**

יש לנגב את הקולונה לפני הכנסתה למבחנה החדשה.

**12)להוסיף 200 מיקרוליטר בופר AE או מים מזוקקים בטמפ' החדר ישירות על הממברנה של הקולונה. לאחר מכן אינקובציה בטמפ' החדר במשך 5 דק ואז לסרכז ב5000rpm במשך 2 דק'.** לאחר מכן לשמור את הDNA בהקפאה C -20על מנת לשמור עליו מפני הידרוליזה חומצית.

**13 א) לDNA בריכוז גבוה: להטעין את התסנין מחדש על הממברנה (200 מיקרוליטר). אינקובציה בטמפ' החדר במשך 5 דק וסירכוז ב5000 rpm במשך 2 דק'.** פחות מהנפח שהטעננו יופק אך זה לא יפגע בכמות הDNA ורק יגרום לו להיות מרוכז יותר.

**13 ב) לתפוקה המקסימלית: להוסיף 200 מיקרוליטר של בופר AE או מים מזוקקים בטמפ' החדר על הממברנה. אינקובציה בטמפ' החדר במשך 5 דק' וסירכוז ב5000 rpm במשך 2 דק'.** פחות מהנפח שהטעננו יופק אך זה לא יפגע בכמות הDNA**.**