

PathoProof™ Mastitis PCR Assay

Lyhyet käyttöohjeet

Tässä suomenkielisessä lyhennetyssä käyttöohjeessa kuvaillaan DNA:n eristys, real-time-PCR:n valmistelu ja ongelmanratkaisu. Täydelliset kuvaukset kaikista työvaiheista sekä lisätiedot löytyvät englanninkielisestä PathoProof Mastitis PCR Assay:n käyttöohjeesta.

1. DNA:n eristys

Huolehdi seuraavista asioista ennen DNA:n eristyksen aloittamista.

- Buffer AW1 ja Buffer AW2 toimitetaan konsentraatteina. Ennen ensimmäistä käyttökertaa lisää pullojen kyljessä ilmoitettu määrä etanolia (96–100 %) puskureihin.
- Lämmitä kaksi inkubaattoria: toinen 55°C:seen ja toinen 37°C:seen.
- Tasapainota Buffer AE huoneenlämpöiseksi.
- Jos Buffer AL:ään on muodostunut saostumaa, liuota se inkuboimalla 55°C:ssa.

Alla on esitetty erilliset DNA:n eristysohjeet F-870S- ja F-870L-kitille.

1.1 DNA:n eristysohje F-870S-kitille

1. Valmista tuore seos, jossa on seuraavat tilavuudet jokaista näytettä kohti: 7 µl Proteinase K ja 350 µl Lysis Solution 1. Tee seosta 1–2 näytteen verran ylimääräistä pipetointivaraksi.
2. Vorteksoi maitonäytteet huolellisesti. Lisää 350 µl Lysis Solution 1/Proteinase K -seosta ja 350 µl maitonäytettä jokaiseen reaktioputkeen. Vältä maitokokkareiden pipetointimista reaktioputkeen. Maitonäytteiden lisäksi tee vähintään yksi negatiivinen kontrolli (vain reagensseilla) jokaisella eristyskerralla.
3. Vorteksoi lyhyesti ja sitten inkuboi 55°C:ssa 5 min.
4. Sentrifugoi 5 min 5 000 x g (~7 500 rpm).
5. Poista supernatanti pipetoimalla. On tavallista, että supernatantin päällä on rasvakerros. Poista rasva pipetoimalla. Pelletin päälle saattaa myös jäädä rasvaa, mutta sitä ei tarvitse poistaa.
6. Resuspensoi pelletti 100 µl:aan Lysis Solution 2:ta pipetoinnilla.
7. Inkuboi 37°C:ssa 10 min.
8. Valmista tuore seos, jossa on seuraavat tilavuudet jokaista näytettä kohti: 20 µl Proteinase K ja 200 µl Buffer AL. Tee

seosta 1–2 näytteen verran ylimääräistä pipetointivaraksi. Lisää 220 µl vastavalmistettua seosta reaktioputkeen. Sekoita vorteksoimalla 5–10 s.

9. Inkuboi 55°C:ssa 10 min. Sentrifugoi muutaman sekunnin ajan.
10. Lisää 200 µl etanolia (96–100 %) näytteeseen ja sekoita vorteksoimalla 15 s. Sekoituksen jälkeen sentrifugoi näyteputkia lyhyesti. On tärkeää, että näyte, Buffer AL ja etanoli on sekoitettu homogeeniseksi seokseksi. Älä käytä muita alkoholeja kuin etanolia, koska se voi alentaa DNA-saantoa.
11. Siirrä varovasti kohdan 10 seos (ilman mahdollisia kokkareita) QIAamp Mini -pylväisiin (asetettu 2 ml keräysputkiin) koskematta pylvään reunaan. Sulje korkki ja sentrifugoi 20 000 x g (~14 000 rpm) 1 min. Aseta QIAamp Mini -pylväs puhtaaseen keräysputkeen (tulee kitin mukana) ja heitä käytetty keräysputki suodoksineen pois. Sulje jokainen pylväs välttääksesi aerosolien leviämistä sentrifugoinnin aikana.
12. Avaa QIAamp Mini -pylväs varovasti ja lisää 500 µl Buffer AW1:tä koskematta pylvään reunaan. Sulje korkki ja sentrifugoi 20 000 x g (~14 000 rpm) 1 min. Aseta QIAamp Mini -pylväs puhtaaseen keräysputkeen (tulee kitin mukana) ja heitä käytetty keräysputki suodoksineen pois.
13. Avaa QIAamp Mini -pylväs varovasti ja lisää 500 µl Buffer AW2:ta koskematta pylvään reunaan. Sulje korkki ja sentrifugoi 20 000 x g (~14 000 rpm) 3 min.
14. Aseta QIAamp Mini -pylväs puhtaaseen 1,5 ml putkeen (ei tule kitin mukana) ja heitä käytetty keräysputki suodoksineen pois. Avaa QIAamp Mini -pylväs varovasti ja lisää 100 µl Buffer AE:ta koskematta pylvään reunaan. Inkuboi huoneenlämmössä 1 min ja eluoi DNA sentrifugoimalla 20 000 x g (~14 000 rpm) 3 min.
15. Eluoidun DNA:n siirto 1,5 ml putkista strippiputkiin helpottaa real-time PCR:n pipetointivaihetta.
16. Puhdistettu DNA säilytetään -20°C:ssa.
17. Jatka kohdasta 2 real-time PCR:illä.

1.2. DNA:n eristysohje F-870L-kitille

QIAamp 96 -levyjen sentrifugoinnit tehdään QIAGEN 4-15C tai 4-16 -levysentrifuugissa 6 000 rpm kierrosnopeudella (5 788 x g). Sentrifuugi on ohjelmoitu siten, etteivät vaaditut g-voimat ylity.

1. Valmista tuore seos, jossa on seuraavat tilavuudet jokaista näytettä kohti: 7 µl Proteinase K ja 350 µl Lysis Solution 1. Jos käytät monikanavapipettiä, tee seosta hieman ylimäärin pipetointivaraksi.
2. Vorteksoi maitonäytteet huolellisesti. Lisää 350 µl Lysis Solution 1/Proteinase K -seosta ja 350 µl maitonäytettä kuhunkin Collection Microtubes -putkeen. Vältä maitokokkareiden pipetointimista reaktioputkeen. Maitonäytteiden lisäksi

tee vähintään yksi negatiivinen kontrolli (vain reagensseilla) jokaisella eristyskerralla. Sulje reaktioputket Collection Microtubes -korkeilla.

- Vorteksoi lyhyesti ja inkuboi 55°C:ssa 5 min.
- Sentrifugoi 6 000 rpm 5 min.
- Poista supernatantti pipetoimalla. On tavallista, että supernatantin päällä on rasvakerros. Poista rasva pipetoimalla. Pelletin päälle saattaa myös jäädä rasvaa, mutta sitä ei tarvitse poistaa.
- Resuspensoi pelletti 100 µl:aan Lysis Solution 2:ta pipetoimalla. Sulje reaktioputket uusilla Collection Microtubes -korkeilla.
- Inkuboi 37°C:ssa 10 min.
- Valmista tuore seos, jossa on seuraavat tilavuudet jokaisesta näytetä kohti: 20 µl Proteinase K ja 200 µl Buffer AL. Jos käytät monikanavapipettiä, tee seosta hieman ylimäärin pipetointivaraksi. Lisää 220 µl vastavalmistettua seosta jokaiseen näytteeseen koskematta Collection Microtubes -putkien reunoihin. Sulje putket uusilla Collection Microtubes -korkeilla.
- Sekoita huolellisesti ravistelemalla 15 s. Tehokkaan lyytsauksen varmistamiseksi on tärkeää, että näytteet ja Buffer AL sekoitetaan välittömästi ja huolellisesti homogeeniseksi seokseksi. Pidä telineessä olevia Collection Microtubes -putkia molemmiin käsiin ja ravistele voimakkaasti ylös ja alas.
- Inkuboi 55°C:ssa 10 min. Sentrifugoi lyhyesti 3 000 rpm. Anna sentrifuugin saavuttaa 3 000 rpm:n kierrosnopeus ja pysäytä sitten laite.
- Lisää 200 µl etanolia (96–100 %) jokaiseen putkeen. Sulje putket uusilla Collection Microtubes -korkeilla. Sekoita voimakkaasti ravistellen 15 s. Sentrifugoi lyhyesti 3 000 rpm. Anna sentrifuugin saavuttaa 3 000 rpm kierrosnopeus ja pysäytä sitten laite.
- Aseta QIAamp 96 -levy S-Blockin päälle. Merkitse levy myöhempää näytetunnistusta varten. Poista varovasti pipetillä kohdan 11 seoksesta mahdolliset viskoosit kokkareet. Sitten siirrä supernatantti QIAamp 96 -levylle. Älä koske QIAamp 96 -levyn kaivojen reunoihin välttääksesi aerosolien leviämistä sentrifugoinnin aikana.
- Sulje QIAamp 96 -levy AirPore-teipillä. Siirrä S-Block ja QIAamp 96 -levy sentrifuugin roottorikaukaloon. Sentrifugoi 6 000 rpm 4 min.
- Poista teippi. Lisää 500 µl Buffer AW1:tä jokaiseen kaivoon. Sulje QIAamp 96 -levy uudella AirPore-teipillä. Sentrifugoi 6 000 rpm 4 min.
- Poista teippi. Lisää 500 µl Buffer AW2:ta jokaiseen kaivoon. **Älä sulje levyä.** Sentrifugoi 6 000 rpm 15 min. Sentrifugoinnin aikana muodostuva lämpö varmistaa etanolin haihtumisen näytteestä (Buffer AW2:sta). Näytteeseen jäävä etanoli haittaisi näytteiden jatkokäsittelyä.
- Aseta QIAamp 96 -levy Elution Microtubes -putkien (kitin mukana) päälle. Lisää 100 µl Buffer AE:ta jokaiseen kaivoon. Sulje QIAamp 96 -levy uudella AirPore-teipillä ja inkuboi 1 min huoneenlämmössä. Sentrifugoi 6 000 rpm

4 min, minkä jälkeen sulje putket Elution Microtubes -korkeilla.

17. Puhdistettu DNA säilytetään -20°C:ssa.

2. Real-time PCR

Huomioitavaa ennen aloittamista

- Tee ainakin yksi negatiivinen (ei templaattia) PCR-kontrolli jokaisesta neljästä PCR-reaktiosta jokaisessa real-time PCR -ajossa.
- Jos on odotettavissa, että missään ajon näytteissä ei ole bakteereita, suosittelemme, että real-time PCR -ajoon otetaan mukaan PathoProof Amplification Standard ja/tai positiivinen DNA:n eristyskontrolli (esim. aikaisemmin tällä kitillä positiiviseksi testattu maitonäyte).
- Huomaa, että näyteajoissa tulee käyttää samaa real-time PCR -laitetta, samanlaista PCR-kuoppalevyä ja samoja korkeja tai teippejä, kuin on käytetty kalibraatioajossa.

Pidä kaikki reagenssit jäällä PCR-pipetointivaiheen ajan. Vorteksoi PathoProof Master Mix ja PathoProof Primer Mixit 1–4 ja sentrifugoi lyhyesti.

- Valmista neljä erillistä PCR-seosta yhdistämällä PathoProof Master Mix ja PathoProof Primer Mixit 1–4 neljään erilliseen putkeen. Näytemäärästä riippuen käytä joko taulukossa 1.A tai 1.B esitettyä laskutapaa PCR-seostilavuuksien laskemiseen.
- Vorteksoi PCR-seokset ja sentrifugoi lyhyesti.
- Valmistele PCR-kuoppalevy. Varaa aina neljä vierekkäistä kaivoa yhdeltä riviltä yhtä näytettä varten (kuva 1). Esimerkiksi varaa näytteelle 1 kaivot A1–A4. Täytä levyn kaivot suunnassa A → H, eli ensin alas, sitten oikealle ja jälleen alas. Lisää 15 µl PCR-seoksia 1–4 niihin neljään kaivoon, jotka on varattu kullekin näytteelle. Esimerkiksi näytettä 1 varten lisää PCR-seoksia 1, 2, 3 ja 4 mainitussa järjestyksessä kaivoihin A1, A2, A3 ja A4 (kuva 1). On tärkeää lisätä aina PCR-seos 1 levyn sarakkeisiin 1, 5 ja 9, PCR-seos 2 sarakkeisiin 2, 6 ja 10, PCR-seos 3 sarakkeisiin 3, 7, ja 11, sekä PCR-seos 4 sarakkeisiin 4, 8 ja 12. Tämän järjestyksen säilyttäminen on välttämätöntä virheettömän tulosten analysoinnin takia. Jos PathoProof Amplification Standard* on mukana ajossa, lisää 15 µl PCR-seoksia 1–4 PathoProof Amplification Standardille varattuihin kaivoihin. Varaa aina neljä viimeistä pipetoitavaa kaivoa negatiivisille (ei templaattia) PCR-kontroleille ja lisää niihin 15 µl PCR-seoksia 1–4 (kuva 1).
- Lisää 5 µl eristettyä DNA:ta niihin neljään kaivoon, jotka on varattu kullekin näytteelle, esimerkiksi pipetoi näytettä 1 kaivoihin A1–A4. Jos PathoProof Amplification Standard on

* PathoProof Amplification Standard sisältää DNA:ta kaikista PathoProof Mastitis PCR Assayn tunnistamista bakteerilajeista tai -ryhmistä. Sitä käytetään positiivisena kontrollina real-time PCR:ssä. Sitä tarvitaan myös Norden Lab Mastitis Studio General Edition -tietokoneohjelman kalibrointiin.

Taulukko 1.A

Laskukaava, kun näytemäärä < 20

PCR-seos 1:

- PathoProof Master Mix = $(N + 2) \times 10 \mu\text{l}$
- PathoProof Primer Mix 1 = $(N + 2) \times 5 \mu\text{l}$

PCR-seos 2:

- PathoProof Master Mix = $(N + 2) \times 10 \mu\text{l}$
- PathoProof Primer Mix 2 = $(N + 2) \times 5 \mu\text{l}$

PCR-seos 3:

- PathoProof Master Mix = $(N + 2) \times 10 \mu\text{l}$
- PathoProof Primer Mix 3 = $(N + 2) \times 5 \mu\text{l}$

PCR-seos 4:

- PathoProof Master Mix = $(N + 2) \times 10 \mu\text{l}$
- PathoProof Primer Mix 4 = $(N + 2) \times 5 \mu\text{l}$

N = Näytemäärä

Sisältäen yhden tai useamman seuraavista kontrolleista:

- Negatiivinen PCR-kontrolli (välttämätön joka ajossa)
- PathoProof Amplification Standard (positiivinen PCR-kontrolli)
- Negatiivinen DNA-eristyskontrolli
- Positiivinen DNA-eristyskontrolli

Kaavat sisältävät pipetointivaran.

Taulukko 1.B

Laskukaava, kun näytemäärä ≥ 20

PCR-seos 1:

- PathoProof Master Mix = $N \times 11 \mu\text{l}$
- PathoProof Primer Mix 1 = $N \times 5.5 \mu\text{l}$

PCR-seos 2:

- PathoProof Master Mix = $N \times 11 \mu\text{l}$
- PathoProof Primer Mix 2 = $N \times 5.5 \mu\text{l}$

PCR-seos 3:

- PathoProof Master Mix = $N \times 11 \mu\text{l}$
- PathoProof Primer Mix 3 = $N \times 5.5 \mu\text{l}$

PCR-seos 4:

- PathoProof Master Mix = $N \times 11 \mu\text{l}$
- PathoProof Primer Mix 4 = $N \times 5.5 \mu\text{l}$

N = Näytemäärä

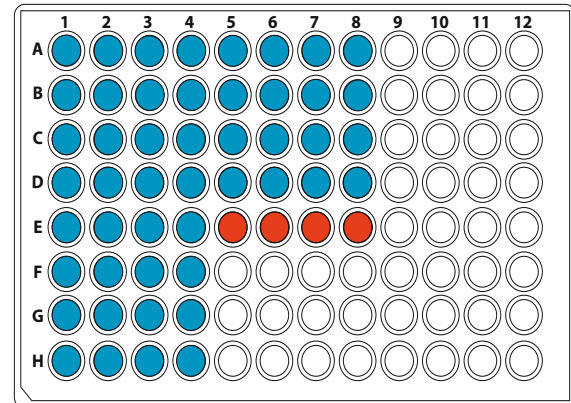
Sisältäen yhden tai useamman seuraavista kontrolleista:

- Negatiivinen PCR-kontrolli (välttämätön joka ajossa)
- PathoProof Amplification Standard (positiivinen PCR-kontrolli)
- Negatiivinen DNA-eristyskontrolli
- Positiivinen DNA-eristyskontrolli

Kaavat sisältävät pipetointivaran.

mukana ajossa, lisää 5 μl standardia neljään vierekkäiseen kaivoon. Neljään viimeiseen kaivoon, jotka on varattu negatiiviselle (ei templaattia) PCR-kontrollille, ei lisätä mitään (kuva 1).

5. Sulje PCR-kuoppalevy siihen yhteensopivalla optisesti kirkkaalla teipillä tai optisesti kirkkailla korkeilla ja sentrifugoi levysentrifuugilla (3 000 rpm, 5 s).
6. Aseta PCR-kuoppalevy real-time PCR -laitteeseen ja aloita real-time PCR -ajo.



- A1 Näyte 1, PCR-seos 1
- A2 Näyte 1, PCR-seos 2
- A3 Näyte 1, PCR-seos 3
- A4 Näyte 1, PCR-seos 4

... jne.

- D5 Näyte 12, PCR-seos 1
- D6 Näyte 12, PCR-seos 2
- D7 Näyte 12, PCR-seos 3
- D8 Näyte 12, PCR-seos 4
- E5 Negatiivinen PCR-kontrolli (ilman templaattia), PCR-seos 1
- E6 Negatiivinen PCR-kontrolli (ilman templaattia), PCR-seos 2
- E7 Negatiivinen PCR-kontrolli (ilman templaattia), PCR-seos 3
- E8 Negatiivinen PCR-kontrolli (ilman templaattia), PCR-seos 4


Kuva 1. Kaaviokuva PCR-kuoppalevystä ja PathoProof™ Mastitis PCR Assaylle välttämättömistä näytejärjestyksestä.

3. Ongelmanratkaisu

Koska mahdolliset ongelmat havaitaan vasta real-time PCR:n jälkeen, alla esitetään ensin ongelmanratkaisu real-time PCR -työvaiheelle ja sitten DNA:n eristykselle.

3.1 Real-time PCR

Ongelma	Mahdollinen selitys	Suosittelut toimenpiteet
Varoitusteksti ilmestyy Norden Lab Mastitis Studio -ohjelman Calibration wizardin viimeiseen ikkunaan: yhden tai useamman kalibraationäytteen Ct-arvot eivät ole sallituissa rajoissa.	Virheitä real-time PCR:n pipetoimisissa.	Toista kalibraatioajo ja kiinnitä erityistä huomiota reagenssien oikeaan pipetointiin.
Sisäisen monistuskontrollin Ct-arvot eivät ole sallituissa rajoissa.*	Reagensseja on jäänyt puuttumaan pipetoitaessa PCR-reaktioita.	Toista real-time PCR ja kiinnitä erityistä huomiota reagenssien oikeaan pipetointiin.
	Liikaa Primer Mixiä tai Primer Mixin virheellinen pipetointi.	Varmista, että oikea määrä Primer Mixiä menee oikeaan kaivoon.
Näytteiden sisäisten monistuskontrollien Ct-arvot eivät ole sallituissa rajoissa*, mutta negatiivisen kontrollin sisäiset monistuskontrollit ovat sallituissa rajoissa.	DNA-eristyksestä on jäänyt näytteisiin PCR-inhibiittoreita.	Katso kappale 3.2; DNA-eristyksen ongelmanratkaisu.
Yhden näytteen sisäisten monistuskontrollien Ct-arvot eivät ole sallituissa rajoissa*, mutta negatiivisen kontrollin ja muiden näytteiden sisäiset monistuskontrollit ovat sallituissa rajoissa.	Reagensseja on jäänyt puuttumaan pipetoitaessa kyseisen näytteen PCR-reaktioita.	Toista real-time PCR kyseiselle näytteelle.
	Näytteessä on liian paljon PCR-inhibiittoreita.	Laimenna DNA-näytettä esim. 1:5 ja 1:10 ja toista real-time PCR laimennetuista näytteistä**. Katso kappale 3.2; DNA-eristyksen ongelmanratkaisu.
Yhden näytteen yhden kaivon sisäisen monistuskontrollin Ct-arvo ei ole sallituissa rajoissa*, mutta saman näytteen rinnakkaisten kaivojen, negatiivisen kontrollin ja muiden näytteiden sisäiset monistuskontrollit ovat sallituissa rajoissa.	Reagensseja on jäänyt puuttumaan kyseisen kaivon PCR-reaktioita pipetoimissa.	Toista real-time PCR kaikille neljälle rinnakkaiselle reaktiolle kyseisestä näytteestä.
	Näytteessä on paljon bakteeri-DNA:ta. (Varmista asia monistuskäyristä.)	Ei vaadi toimenpiteitä.
Yhden näytteen yhden kaivon sisäisen monistuskontrollin Ct-arvo ei ole sallituissa rajoissa* eikä mikään kohde monistu kyseisessä kaivos- sa. Kuitenkin saman näytteen rinnakkaisten kaivojen, negatiivisen kontrollin ja muiden näytteiden sisäiset monistuskontrollit ovat sallituissa rajoissa.	Näytteessä on PCR-inhibiittoreita sellaisessa pitoisuudessa, että ne inhiboivat vain herkimmän sisäisen kontrollin monistumista (tavallisesti PathoProof Primer Mix 1), mutta eivät kolmea muuta sisäistä kontrollia.	Laimenna DNA-näytettä esim. 1:5 ja 1:10 ja toista real-time PCR laimennetuista näytteistä**. Katso kappale 3.2; DNA-eristyksen ongelmanratkaisu.
Negatiivisen kontrollin kaivoissa tapahtuu monistumista.	Negatiivinen kontrolli on kontaminoitunut.	Ryhdy varotoimenpiteisiin kontaminaatioiden eliminoimiseksi.
Sisäisen monistuskontrollin Ct-arvot ovat sallituissa rajoissa kaikissa kaivoissa, mutta mikään bakteerikohde ei monistu.	Epäonnistunut DNA-eristys.	Katso kappale 3.2; DNA-eristyksen ongelmanratkaisu. Ota real-time PCR -ajoon mukaan PathoProof Amplification Standard ja/tai positiivinen DNA:n eristyskontrolli (esim. aikaisemmin tällä kitillä positiiviseksi testattu näyte).
	Maitonäyte ei sisältänyt bakteereita.	

* Jos sisäisten monistuskontrollien Ct-arvot eivät ole hyväksyttävissä rajoissa, Norden Lab Mastitis Studio näyttää varoitusmerkin  näytteen nimen vieressä run viewerissä ja sample viewerin vasemmassa yläkulmassa. Lisäksi sana "Failed" ilmestyy sisäisten monistuskontrollien Ct-arvojen perään sample viewerissä.

** Laskeaksesi Ct-arvon näytteelle, vähennä 1:2 laimennetun näytteen saamasta Ct-arvosta 1 sykli, 1:5 laimennoksen saamasta arvosta 2.3 sykliä, 1:10 laimennoksen saamasta arvosta 3.3 sykliä ja 1:20 laimennoksen saamasta arvosta 4.3 sykliä.

3.2 DNA:n eristys

Real-time PCR:n jälkeen havaittu DNA-eristysongelma	Mahdollinen selitys	Suosittelut toimenpiteet
<ul style="list-style-type: none"> Vähän tai ei ollenkaan DNA:ta Näytteeseen on jäänyt PCR-inhibiittoreita 	Epätäydellinen liysaus alentuneesta Proteinase K:n aktiivisuudesta johtuen	Säilytä Proteinase K -liuos -20°C:ssa ja käytön aikana jäällä. Valmista aina tuore seos Proteinase K:sta Lysis Solution 1:n ja Buffer AL:n kanssa. Toista DNA-eristys uudella näytteellä.
	Epätäydellinen liysaus johtuen näytteen riittämättömästä sekoituksesta Buffer AL:n kanssa	Toista DNA-eristys uudella näytteellä. Sekoita näyte ja Buffer AL välittömästi ja perusteellisesti pulssivortexoimalla.
	Etanolia ei lisätty lyaattiin tai lisättiin vääränlaista etanolia ennen siirtoa QIAamp Mini -pylväisiin tai QIAamp 96 -levylle.	Toista DNA-eristys uudella näytteellä. Käytä 96–100 % etanolia. Älä käytä denaturoitua etanolia, isopropanolia tai laimeampaa etanolia.
	Buffer AW1 tai AW2 esivalmisteltu virheellisesti.	Toista DNA-eristys uudella näytteellä. Varmista, että Buffer AW1 ja AW2 -konsentraatit laimennetaan oikealla määrällä 96–100 % etanolia, kuten ohjeistettu pullojen kyljessä. Älä käytä denaturoitua etanolia, isopropanolia tai laimeampaa etanolia.
	Buffer AW1 ja AW2 käytettiin väärässä järjestyksessä	Varmista, että Buffer AW1 ja AW2 käytetään oikeassa järjestyksessä. Toista DNA-eristys uudella näytteellä.
	Eristetyssä DNA:ssa on jäämiä Buffer AW2:sta	Varmista, ettei QIAamp Mini -pylväs tai QIAamp 96 -levy kosketa suodokseen eluointia edeltävässä työvaiheessa. Varmista, että QIAamp 96 -levy sentrifugoidaan ilman AirPore-teippiä ennen DNA:n eluointia, jotta etanoli haihtuu näytteestä (Buffer AW2:sta).
	QIAamp Mini -pylvästä tai QIAamp 96 -levyä ei inkuboitu huoneenlämmössä (15–25°C) 1 minuutin ajan ennen eluointia	Buffer AE:n lisäyksen jälkeen inkuboi QIAamp Mini -pylvästä tai QIAamp 96 -levyä huoneenlämmössä 1 minuutin ajan ennen eluointia.
	DNA ei eluoidu tehokkaasti	Tehostaaksesi eluointia pipetoi Buffer AE keskelle QIAamp Mini -pylvään tai QIAamp 96 -levyn kalvoa ja inkuboi huoneenlämmössä 5 minuutin ajan ennen sentrifugointia.