



025-85653525

www.atgbiotechnology.com

南京市栖霞区江苏生命科技园D6幢710室

ATG[®] Universal HTS DNA Library Prep Kit

通用型高通量测序 DNA 建库试剂盒

SD101

Version 23.1.1



产品说明书
PRODUCT MANUAL

南京巨匠生物科技有限公司
ATG BIOTECHNOLOGY CO.,LTD

目录 Product Manual

| | |
|--|----|
| 01/产品概述..... | 1 |
| 02/产品组分..... | 1 |
| 03/保存及运输条件..... | 1 |
| 04/注意事项..... | 2 |
| 04-1/关于实验操作..... | 2 |
| 04-2/关于 Input DNA 适用范围..... | 2 |
| 04-3/关于接头连接 (Adapter Ligation)..... | 3 |
| 04-4/关于纯化与分选..... | 4 |
| 04-5/关于文库扩增 (Library Amplification)..... | 4 |
| 04-6/关于文库质检 (Library Quality Analysis)..... | 5 |
| 05/自备材料..... | 6 |
| 06/实验流程..... | 6 |
| 06-1/片段化及末端修复加 A (Fragmentation,End Preparation & dA-tailing)..... | 6 |
| 06-2/接头连接 (Adapter Ligation)..... | 7 |
| 06-3/连接产物纯化 (Post-Ligation Clean Up)..... | 8 |
| 06-4/文库扩增 (Library Amplification)..... | 9 |
| 06-5/扩增产物纯化或分选 (Post Amplification Clean Up/Size Selection)..... | 9 |
| 06-6/文库质量控制 (Library Quality Control)..... | 10 |
| 附录一：关于磁珠分选..... | 11 |

01/产品概述

ATG® Universal HTS DNA Library Prep Kit 是针对 Illumina 和 MGI 高通量测序平台开发设计的文库构建试剂盒。产品采用独立的 DNA 片段化模块,既可以用试剂盒自带的片段化试剂,也可使用机械法破碎的 DNA 进行文库构建,一种产品满足更多的需求。产品适用于 100 pg - 1 µg 所有 DNA 样本,包括 cfDNA、FFPE 样本等。本试剂盒广泛适用于多种样本的 PCR 或 PCR-Free 文库构建,且兼容靶向捕获流程。试剂盒中提供的所有试剂都经过了严格的质量控制和功能验证,最大程度上保证了文库构建的稳定性和重复性。

02/产品组分

| 组分编号 | 组分 | SD101-01 (24 rxns) | SD101-02 (96 rxns) |
|---------|--|-----------------------|-----------------------|
| SD101-A |  Frag Enzyme | 48 µl | 192 µl |
| SD101-B |  End Prep Buffer | 144 µl | 576 µl |
| SD101-C |  End Prep Enzyme Mix | 96 µl | 384 µl |
| SD101-D |  Quick Ligation Buffer | 720 µl | 4 × 720 µl |
| SD101-E |  Quick DNA Ligase | 120 µl | 480 µl |
| SD101-F |  2 × Proofast® HTS Master Mix | 600 µl | 4 × 600 µl |

03/保存及运输条件

-30 ~ -15°C保存, ≤0°C运输。

04/注意事项

04-1/关于实验操作

- ❖ 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
- ❖ 使用前请将试剂盒各组份置于室温解冻。解冻后上下颠倒数次充分混匀，短暂离心后置于冰上待用。
- ❖ 配制各步骤反应液时推荐使用移液器吹打混匀或轻轻振荡，剧烈振荡可能会造成文库产出下降。
- ❖ 为避免样品交叉污染，推荐使用带滤芯的枪头，吸取不同样品时请更换枪头。
- ❖ 推荐在带热盖的 PCR 仪中进行各步骤反应，使用前应预热 PCR 仪至反应温度附近。
- ❖ PCR 产物因操作不当极易产生气溶胶污染，进而影响实验结果准确性。推荐将 PCR 反应体系配制区和 PCR 产物纯化检测区进行强制性的物理隔离；使用专用的移液器等设备；并定时对各实验区域进行清洁（使用 0.5%次氯酸钠或 10%漂白剂进行擦拭清理），以保证实验环境的洁净度。
- ❖ 本产品仅作科研用途！

04-2/关于 Input DNA 适用范围

试剂盒兼容机械法及酶切法片段化的 DNA，并提供酶切法片段化模块，兼容范围为 100 pg - 1000 ng Input DNA。应尽可能使用 A260/A280 = 1.8 - 2.0 的高质量 Input DNA。表 1 中列举了将本试剂盒应用于常见应用中推荐的 Input DNA 量。

表 1 常见应用中推荐 Input DNA 量

| 应用 | 样本类型 | 推荐 Input DNA 量 |
|-------------------|-------------|----------------|
| 全基因组测序 | 复杂基因组 | 50 ng - 1 μg |
| 靶向捕获测序 | 复杂基因组 | 10 ng - 1 μg |
| 全基因组/靶向捕获测序 | FFPE DNA | ≥50 ng |
| 全基因组/靶向捕获测序 | cfDNA/ctDNA | ≥100 pg |
| 全基因组测序 | 微生物基因组 | 1 ng - 1 μg |
| 全基因组测序 (PCR-free) | 复杂/简单基因组 | ≥50 ng |
| 免疫共沉淀测序 | ChIP DNA | ≥100 pg |
| 靶向测序 | 扩增子 | ≥100 pg |

△ 上表为使用高质量 DNA 时推荐的 Input DNA 量，当 Input DNA 质量较差或需要进行片段分选时，应适当上调使用量。

- ❖ 若 Input DNA 制备过程中带入高浓度金属离子螯合剂或其他盐，可能会影响 Fragmentation 或 End Preparation 步骤的效率。当使用机械法进行 Fragmentation 且产物不进行纯化或长度分选直接建库时，请将 DNA 稀释在 0.1 × TE 中进行 Fragmentation，请勿在 ddH₂O 中进行；当使用试剂盒自带的片段化

模块进行 Fragmentation 时，由于 Frag Enzyme 对 EDTA 敏感，请确认 DNA 样品中 EDTA 浓度，如打断或未修反应体系中 EDTA 终浓度大于 0.01 mM，请按照 06 步骤操作说明对 DNA 样本进行预处理。

04-3/关于接头连接 (Adapter Ligation)

- ❖ 试剂盒兼容 Illumina 和 MGI 测序平台 Adapter，用户可根据个人需求选择市面上合适的 Adapter。
- ❖ Adapter 的质量和用量直接影响建库效率和文库的质量。推荐 Adapter: Input DNA 摩尔比在 10: 1 - 200: 1 之间。Adapter 投入量过高可能会导致 Adapter 或 Adapter Dimer 残留；投入量不足又会影响连接效率进而导致文库产出降低。表 2 列举了不同 Input DNA 量推荐的 Adapter 使用量。

表 2 100 pg - 1 μg Input DNA 推荐的 Adapter 使用浓度

| Input DNA | Adapter: Input DNA 摩尔比 | Adapter 工作浓度 |
|-----------|------------------------|--------------|
| 1 μg | 10: 1 | 10 - 15 μM |
| 500 ng | 20: 1 | 10 - 15 μM |
| 250 ng | 40: 1 | 10 μM |
| 100 ng | 100: 1 | 5 - 10 μM |
| 50 ng | 100: 1 | 5 μM |
| 10 ng | 200:1 | 2 μM |
| 1 ng | 200: 1 | 0.5 μM |
| 100 pg | 400: 1 | 0.1 μM |

△ 接头添加计算

eg. 投入 100 ng 片段长度为 300 bp 的 DNA 片段时

1) 粗略计算投入 DNA 摩尔数: DNA 摩尔数(pmol) ≈ 投入 DNA 质量(ng)/[0.66 × 投入 DNA 平均长度(bp)]; 投入 DNA 摩尔数(pmol) = 100 ÷ (0.66 × 300) = 0.5 pmol;

2) 计算接头添加的摩尔数: 根据表 2 推荐接头添加比例, 查询投入 100 ng DNA 时接头的添加比例为 100: 1, 接头添加的摩尔数 = 100 × 0.5 pmol = 50 pmol;

3) 计算接头添加体积: 接头添加体积 = 接头添加摩尔数(50 pmol) ÷ 接头浓度(10 μmol/L) = 5 μl。

△ Adapter 的质量会直接影响 Adapter 与 Input DNA 的摩尔比, 进而影响连接效率和文库产出。应选用优质的 Adapter; 使用 0.1 × TE 稀释和保存 Adapter 溶液; 尽量避免反复冻融。

04-4/关于纯化与分选

- ❖ DNA 片段长度分选步骤可选择在末端修复/dA 尾添加之前,或接头连接后,或文库扩增后进行。当 Input DNA 质量 ≥ 50 ng, 可选择在接头连接后分选; 如 Input DNA 质量 < 50 ng, 建议在文库扩增后进行分选。
- ❖ 如接头连接后进行长度分选, 推荐纯化后洗脱体积为 105 μl ; 如不进行长度分选, 推荐纯化后洗脱体积为 23 μl 。
- ❖ 如文库质控显示纯化产物 Adapter 或 Adapter Dimer 污染, 可对其再进行一次磁珠纯化; 使用 Nuclease-free ddH₂O 将纯化产物补足体积至 50 μl , 加入 50 μl 磁珠 (1 \times) 进行二次纯化。这样可以显著降低 Adapter 或 Adapter Dimer 的残留, 特别是构建 PCR-Free 文库。
- ❖ 磁珠使用前应先平衡至室温, 否则会导致得率下降、分选效果不佳。
- ❖ 磁珠每次使用前都应充分振荡混匀或使用移液器上下吹打充分混匀。
- ❖ 转移上清时, 请勿吸取磁珠, 即使微量残留都将影响后续文库质量。
- ❖ 磁珠漂洗使用的 80%乙醇应现用现配, 否则将影响回收效率。
- ❖ 进行长度分选时, 初始样品体积应尽量 ≥ 100 μl , 不足时请用超纯水补齐。以防因样品体积太小导致移液误差增大。
- ❖ 产物洗脱前应将磁珠置于室温干燥。干燥不充分容易造成无水乙醇残留影响后续反应; 过分干燥又会导致磁珠开裂进而降低纯化得率。通常情况下, 室温干燥 3 - 5 min 足以让磁珠充分干燥。
- ❖ DNA 纯化或长度分选产物如需保存, 可使用 TE Buffer 洗脱, 产物可于 4 $^{\circ}\text{C}$ 可保存 1 - 2 周, -20 $^{\circ}\text{C}$ 可保存 1 个月。

04-5/关于文库扩增 (Library Amplification)

- ❖ 是否需要进行文库扩增取决于投入 DNA 量、Adapter 是否为完整长度、应用需要等因素, 如使用非完整长度 Adapter, 必须进行这一步骤, 如使用完整长度 Adapter, 当投入 DNA < 200 ng 时, 推荐进行文库扩增; 当投入 DNA > 200 ng, 可不进行文库扩增
- ❖ Library Amplification 步骤需要严格控制扩增循环数。循环数不足, 会导致文库产出不足; 循环数过多, 又会导致过度扩增、偏好性增加、重复度增加、嵌合产物增加、扩增突变积累等多种不良后果。表 3 列举了当使用 100 pg - 1 μg 高质量 Input DNA 时, 获得 1 μg 文库推荐的扩增循环数。

表 3 100 pg - 1 µg Input DNA 推荐的扩增循环数

| Input DNA (Into End Preparation) | Number of cycles required to generate (1 µg) |
|-------------------------------------|---|
| 1 µg | 3 - 5 |
| 100 ng | 6 - 8 |
| 50 ng | 7 - 9 |
| 10 ng | 10 - 13 |
| 1 ng | 13 - 15 |
| 100 pg | 17 - 19 |

△ 上表为使用约 300 bp 高质量 Input DNA 时测得的循环数参数。当 DNA 质量较差、文库长度较长时, 需适当提高循环数以获取足量文库。

△ 若建库过程中进行过长度分选, 则参照较高循环数进行 Library Amplification; 若不进行长度分选, 则参照较低循环数即可。

04-6/关于文库质检 (Library Quality Analysis)

通常情况下, 构建好的文库可通过长度分布检测和浓度检测来进行质量评价:

- ❖ 文库浓度检测可使用: 基于双链 DNA 荧光染料的方法, 如 Qubit, PicoGreen 等; 基于 qPCR 绝对定量的方法。文库浓度检测不可使用: 基于光谱检测的方法, 如 NanoDrop 等。
- ❖ 推荐使用 qPCR 方法进行文库浓度检测, 原因是: Qubit, PicoGreen 等基于双链 DNA 荧光染料的浓度测定方法时, 无法有效区分单端连接 Adapter 的产物、两端均未连接 Adapter 的产物以及其他不完整双链结构产物; qPCR 绝对定量基于 PCR 扩增原理, 仅定量样品中两端 Adapter 完整的文库 (即可测序的文库), 可排除单端或双端都不连接 Adapter 的不可测序文库的干扰。另外, 过度扩增因产物不是完整的双链结构, 当使用基于识别双链 DNA 的荧光染料来进行文库定量时, 定量结果会比实际值偏低; 但基于 qPCR 的文库定量体系(如 ATG[®] HS qPCR SYBR Green Master Mix #Q101 - Q401) 在定量过程中包含变性过程, 仍然可以准确定量这种过度扩增的文库。
- ❖ 文库长度分布检测: 可通过 Agilent Bioanalyzer 2100, Qsep 等基于毛细管电泳或微控流原理的设备进行检测。

05/自备材料

DNA 片段纯化分选磁珠：AMPure XP Selection Beads (或国产性能相当同类产品)

DNA Adapter & PCR Primer Mix

DNA 质控：Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer 或其他等效产品。

其他材料：无水乙醇、灭菌超纯水，低吸附 EP 管、PCR 管、磁力架、PCR 仪等。

06/实验流程

实验开始前,请确认模板 DNA 溶解于何种溶剂(推荐使用灭菌超纯水),该溶剂是否含有 EDTA。如不含 EDTA 或 EDTA 终浓度 $< 0.01\text{mM}$, 直接进行实验;如有 EDTA,且终浓度 $> 0.01\text{mM}$, 可使用 $2.2 \times$ 磁珠对模板 DNA 进行纯化, 灭菌超纯水洗脱。

06-1/片段化及末修加 A (Fragmentation, End Preparation & dA-tailing)

此步骤对 Input DNA 进行片段化, 若使用机械法片段化的 DNA 或 cfDNA 请勿添加 Frag Enzyme。

1. 提前取出 End Prep Buffer 于冰上解冻, 和 End Prep Enzyme Mix, Frag Enzyme 颠倒混匀后于灭菌 PCR 管中配制如下反应(冰上操作):

| 组分 | 用量 | |
|---------------------|------------------|---|
| Input DNA | 48 μl | |
| End Prep Buffer | 6 μl |  |
| End Prep Enzyme Mix | 4 μl |  |
| Frag Enzyme* | 2 μl |  |
| Total | 60 μl | |

* Frag Enzyme 用于 DNA 片段化, 若投入 DNA 已进行过片段化处理或无需进行片段化, 请勿添加此组分。

2. 使用移液器轻轻吹打混匀(请勿振荡), 并短暂离心将反应液收集至管底。

3. 将 PCR 管置于 PCR 仪中，进行下述反应：

| 温度 | 时间 |
|-----------|--------|
| 热盖 105 °C | On |
| 37 °C | *参照下表 |
| 72 °C | 15 min |
| 4 °C | Hold |

* 片段化时间需依据 Input DNA 质量及目标片段大小而定：

| 插入片段主峰大小 | 片段化时间 | 优化范围 |
|----------|--------|-------------|
| 150 bp | 20 min | 12 - 25 min |
| 200 bp | 13 min | 10 - 20 min |
| 250 bp | 10 min | 8 - 15 min |
| 350 bp | 8 min | 5 - 12 min |

△ 若投入 DNA 已进行过片段化处理或无需进行片段化，此步骤孵育时长为 10 min 即可。

06-2/接头连接 (Adapter Ligation)

此步骤将在上一步 End Preparation 产物末端连接 Adapter

1. 根据 Input DNA 量按表 2 稀释 Adapter 至合适浓度。
2. 将 Quick Ligation Buffer 解冻后颠倒混匀，置于冰上备用。
3. 在 End Preparation & dA-tailing 步骤 PCR 管中配制如下反应(冰上操作)：

| 组分 | 用量 |
|-------------------------|-------------|
| dA-tailed DNA (上一步反应产物) | 60 μ l |
| Quick Ligation Buffer | 30 μ l |
| Quick DNA Ligase | 5 μ l |
| DNA Adapter | 5 μ l |
| Total | 100 μ l |

4. 使用移液器轻轻吹打混匀 (请勿振荡)，并短暂离心将反应液收集至管底。

5. 将 PCR 管置于 PCR 仪中，进行下述反应：

| 温度 | 时间 |
|-----------|--------|
| 热盖 105 °C | Off |
| 20 °C | 15 min |
| 4 °C | Hold |

△ 当 Input DNA 量较低时，可尝试将连接时间延长一倍。

06-3/连接产物纯化 (Post-Ligation Clean Up)

1. 磁珠平衡至室温后，涡旋振荡混匀。
2. 吸取 60 μ l (0.6 \times)磁珠至 100 μ l 接头连接产物中，使用移液器轻轻吹打 10 次充分混匀。室温孵育 5 min。
3. 将 PCR 管短暂离心并置于磁力架上分离磁珠和液体，待溶液澄清后 (约 5 min)，小心移除上清。
4. 保持 PCR 管始终置于磁力架上，加入 200 μ l 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠，室温孵育 30 sec，小心移除上清。
5. 重复步骤 4，总计漂洗两次。
6. 保持 PCR 管始终置于磁力架上，开盖空气干燥磁珠 3 - 5 min 至无乙醇残留。
7. 将 PCR 管从磁力架上取出，进行洗脱：
 - ❖ 如纯化产物不进行双轮磁珠分选：加入 23 μ l 洗脱液(10 mM Tris-HCl, pH 8.0 - 8.5)或 Nuclease-free ddH₂O 洗脱，使用移液器轻轻吹打充分混匀，于室温放置 2 min，将 PCR 管短暂离心并置于磁力架上静置，待溶液澄清后 (约 5 min)，小心移取 20 μ l 上清至新 PCR 管中，切勿触碰磁珠。
 - ❖ 如纯化产物需进行双轮磁珠分选：加入 105 μ l 洗脱液 (10 mM Tris-HCl, pH 8.0 - 8.5)或 Nuclease-free ddH₂O 洗脱，使用移液器轻轻吹打充分混匀，于室温放置 2 min，将 PCR 管短暂离心并置于磁力架上静置，待溶液澄清后 (约 5 min)，小心移取 100 μ l 上清至新 PCR 管中，切勿触碰磁珠，根据磁珠使用说明的分选条件进行长度分选。

※ 纯化样品可于 4°C 稳定保存一周。长期保存置于 -20°C，避免反复冻融。

06-4/文库扩增 (Library Amplification)

此步骤将对纯化或长度分选后的接头连接产物进行 PCR 扩增富集。

1. 将 PCR Primer Mix、2 × Proofast[®] HTS Master Mix 解冻后颠倒混匀，短暂离心后于灭菌 PCR 管中配制如下反应(冰上操作):

| 组分 | 用量 |
|--|------------|
| 纯化或分选后的接头连接产物 | 20 μ l |
| PCR Primer Mix | 5 μ l |
| 2 × Proofast [®] HTS Master Mix | 25 μ l |
| Total | 50 μ l |

2. 使用移液器轻轻吹打混匀(请勿振荡)，并短暂离心将反应液收集至管底。

3. 将 PCR 管置于 PCR 仪中，进行下述反应:

| 温度 | 时间 | 循环数 |
|-------|--------|------------|
| 98 °C | 1 min | Rep: 1 |
| 98 °C | 10 sec | 循环数选择参照表 3 |
| 60 °C | 15 sec | |
| 72 °C | 15 sec | |
| 72 °C | 5 min | Rep: 1 |
| 4 °C | Hold | |

06-5/扩增产物纯化或分选(Post Amplification Clean Up/Size Selection)

1. 如需长度分选，参考磁珠使用说明进行，如不需要进行长度分选，使用 AMPure XP Selection Beads (或国产性能相当的同类产品)对反应产物进行纯化:

2. 磁珠平衡至室温后，涡旋振荡混匀。

3. 吸取 45 μ l (0.9 ×) 磁珠至 50 μ l 文库扩增产物中，使用移液器轻轻吹打 10 次充分混匀。室温孵育 5 min。

4. 将 PCR 管短暂离心并置于磁力架上分离磁珠和液体，待溶液澄清后 (约 5 min)，小心移除上清。

5. 保持 PCR 管始终置于磁力架上，加入 200 μ l 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠，室温孵育 30 sec，小心移除上清。

6. 重复步骤 5，总计漂洗两次。

7. 保持 PCR 管始终置于磁力架上，开盖空气干燥磁珠 3 - 5 min 至无乙醇残留。

8. 将 PCR 管从磁力架上取出，加入 23 μ l 洗脱液 (10 mM Tris-HCl, pH 8.0 - 8.5)或 Nuclease-free ddH₂O 洗脱，使用移液器轻轻吹打充分混匀，于室温放置 2 min，将 PCR 管短暂离心并置于磁力架上静置，待溶液

澄清后 (约 5 min), 小心移取 20 μ l 上清至新 PCR 管或 EP 管中, 切勿触碰磁珠。

※ 纯化样品可于 4°C 稳定保存一周。长期保存置于 -20°C, 避免反复冻融。

06-6/文库质量控制 (Library Quality Control)

通常情况下, 构建好的文库可通过浓度检测和长度分布检测来进行质量评价。详见 04-6。

附录一：关于磁珠分选

- ❖ 为了满足不同应用的需要，建库过程中通常需要进行双轮磁珠分选以控制文库 Insert Size 的分布范围。片段分选进行步骤的选择和优缺点参见表 4。应保证分选方案执行位置的唯一性，进行两次或者两次以上的分选会导致文库复杂度和产出严重下降！

表 4 片段分选进行位置的选择和优缺点

| 片段分选步骤 | 适用情况 | 优点 | 缺点 | 样本列举 |
|--------------------------|---|--|--------------------|--|
| End Preparation 之前 | Input DNA 量充足，但分布范围宽或主峰与预期文库 Insert Size 不一致；Input DNA 纯度较差 | 分选产物长度分布集中；能准确控制 Input DNA 量；能进一步提高 Input DNA 纯度，提高建库成功率 | DNA 损失大；文库分布范围略宽 | Fragmentation 不充分或过度的基因组 DNA |
| Adapter Ligation 之后 | Input DNA 分布范围适合且量充足 | 减少短片段 DNA 丢失；绝大多数情况下通用 | 文库分布范围略宽 | Fragmentation 适度的基因组 DNA 或分布范围较宽的 FFPE DNA |
| Library Amplification 之后 | Input DNA 量少 | 减少建库过程中 Input DNA 的损失，提高文库复杂度 | 文库分布范围宽 | cfDNA |
| 建库过程中不进行分选 | Input DNA 分布范围已满足建库要求；Input DNA 量少 | 减少建库过程中 Input DNA 的损失，提高文库复杂度 | 无法控制文库 Insert Size | 多重 PCR 产物、断裂程度较高的 FFPE DNA |

- ❖ 双轮磁珠分选是通过控制磁珠的使用量来进行 DNA 长度选择。其基本原理为：第一轮磁珠结合分子量较大的 DNA，通过丢弃磁珠去除这部分产物；第二轮磁珠结合剩余产物中分子量较大的 DNA，通过丢弃上清去除分子量较小的 DNA。初始样品中的很多组分都会干扰双轮磁珠分选效果。因此，当分选方案执行位置不同时，双轮磁珠使用量也不尽相同。以磁珠提供的使用说明选择合适的分选参数。
- ❖ 分选步骤：
 1. 样品预处理：需要片段分选的步骤，均需将样品加 Nuclease-free ddH₂O 补充至 100 μl 体积。
 2. 吸取 X μl 磁珠(一轮)至上述 100 μl 产物中，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打 10 次充分混匀，室温孵育 5 min。
 3. 将 PCR 管短暂离心并置于磁力架上分离磁珠和液体。待溶液澄清后 (约 5 min)，**小心转移上清至新 PCR 管中，丢弃磁珠。**
 4. 吸取 Y μl 磁珠(二轮)至上清中，用移液器轻轻吹打 10 次充分混匀，室温孵育 5 min。
 5. 将 PCR 管短暂离心并置于磁力架上分离磁珠和液体。待溶液澄清后 (约 5 min)，**小心移除上清。**

6. 保持 PCR 管始终置于磁力架上，加入 200 μ l 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠。室温孵育 30 sec, 小心移除上清。
7. 重复步骤 6，总计漂洗两次。
8. 保持 PCR 管始终置于磁力架上，开盖空气干燥磁珠 3 - 5 min 至无乙醇残留。
9. 将 PCR 管从磁力架上取出，根据后续步骤，加入适量洗脱液 (10 mM Tris-HCl, pH 8.0 - 8.5) 或 Nuclease-free ddH₂O 洗脱。涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀，于室温放置 2 min。将 PCR 管短暂离心并置于磁力架上静置。待溶液澄清后 (约 5 min)，小心移取上清至新 PCR 管中，切勿触碰磁珠。