

国家计量技术规范规程制修订

《高通量基因测序仪校准规范》
(征求意见稿)
编制说明

中国计量科学研究院

2023年02月

《高通量基因测序仪校准规范》（征求意见稿）

编写说明

一、任务来源

根据国家市场监督管理总局 2020 年国家计量技术规范制定、修订及宣贯计划,由中国计量科学研究院承担《高通量基因仪校准规范》的制定工作。

二、规范修订的必要性

高通量测序（High-Throughput Sequencing），也称为大规模并行测序（Massively Parallel Sequencing, MPS）或下一代测序（Next Generation Sequencing, NGS），有效解决一代测序（Sanger Sequencing）成本高、通量低、对人力需求高等问题，可一次对几百万到几十亿条核酸分子进行序列测定。目前高通量测序平台主要有基于桥式 PCR 扩增结合边合成边测序、乳液 PCR 扩增结合半导体合成测序、DNA 纳米球滚环扩增结合联合探针锚定聚合技术等技术原理的测序仪。

高通量基因仪主要由主机、控制软件组成，其中主机包括主体架构、操作系统主机、光学系统、XYZ 平台、芯片平台、气液系统、电子控制系统、试剂存储系统、电源系统、显示系统等。

高通量基因测序仪具有较大的通量，能在提高效率的同时降低研究成本。目前已经成为了生命科学研究、临床检验、法医检验、食品微生物检验、动植物物种研究与检验等实验室的必备仪器设备之一。特别是在临床微生物病原学鉴定、微生物耐药学诊断、肿瘤诊断、遗传疾病诊断检测中发挥着重要作用。国内众多的高通量测序平台都

有各自的一套评价标准，以提供对外检测的数据。然而目前该类仪器的校准，既没有行业标准也没有国家标准，各检测实验室采用自校验的方式校准该类仪器，技术要求、校验条件、校验项目、校验方法、校验结果的处理各不相同。制定《高通量基因测序仪校准规范》目的是为该类仪器的校准提供技术依据，使得使用该类仪器检测工作的各类实验室和分析测试中心，能够更好地为科研、社会、经济建设和发展提供客观、可比、可溯源的检测数据。体现我国在分析检测高技术领域和标准领域的水平。

三、《高通量基因测序仪校准规范》制定过程

1. 2019年11月。《高通量基因仪校准规范》由中国计量科学研究院、中国测试技术研究院负责起草、深圳华大智造科技有限公司参与起草，归口全国生物计量技术委员会，项目正式启动。
2. 2020年6月。《高通量基因仪校准规范》起草组就规范的架构设定、校准项目、具体指标等广泛听取了与会专家的建议和意见。来自于生产厂家、应用客户、仪器维修单位等各个方面的专家提出了许多建设性的意见和建议。
3. 2020年12月22号，在线上开展全国生物计量技术委员会中期会议，汇报了《高通量基因仪校准规范》（草稿）完成情况，并向与会专家进一步征求意见。
4. 2021年1月-5月，举行多次线上及小型线下专家讨论会。《高通量基因仪校准规范》起草组就关键参数、指标、标准物质验证等工作细节进行讨论。并对前期基因组标准物质的适用性、合理性、

科学性进行了详细的探讨。

5. 2021年6月~2022年5月，起草小组开展实验验证，发现前期标准物质无法适用于全部高通量基因测序仪；随后进行多轮技术攻关，研制出最新高通量基因测序仪文库标准物质，用于高通量基因测序仪的校准。
6. 2022年6月~12月，起草小组基于高通量基因测序仪校准用标准物质和多家测序企业验证实验数据以及国内外仪器生产厂商的广泛意见，合理确定了高通量基因测序仪的计量特性、校准条件、校准项目和校准方法等内容，完成了适用性验证实验，最后编制完成《高通量基因仪校准规范》（征求意见稿）、编制说明和实验报告。
7. 2023年1月~2023年2月，根据与会专家意见，对《高通量基因仪校准规范》（征求意见稿）进行修改和完善，形成征求意见稿，报全国生物计量技术委员会进行审定。

四、规范制定的主要技术依据及原则

（一）依据

本次制订中校准规范文本结构按照 JJF 1071-2010《国家计量校准规范编写规则》的要求完成。其中不确定度评定部分按照 JJF 1059.1-2012《测量不确定度评定与表示》要求完成。根据 JJF1071-2010《国家计量校准规范编写规则》的要求，此规范架构上包括封面、扉页、目录、引言、范围、引用文件、术语和计量单位、

概述、计量特性、校准条件、校准项目和校准方法、校准结果表达、复校时间间隔、附录几个部分。

（二）原则

1、架构

架构上按照引言、范围、引用文献、概述、计量特性、校准条件、校准项目和校准方法、校准结果几部分制定《高通量基因测序仪校准规范》。

2、术语与计量单位的选择

术语和计量单位的选择遵照 JJF1001-2011《通用计量术语及定义》选择使用。

3、计量特性确定原则

根据高通量基因测序仪的特点，确定高通量基因测序仪的计量特性；计量特性确定过程中也参照了现行有效 YY/T 1723-2020《高通量基因测序仪》、GB/T 40226-2021《环境微生物宏基因组检测 高通量测序法》、GB/T 30989-2014《高通量基因测序技术规程》等标准中的有关指标。

五、规范制定说明

《高通量基因仪校准规范》共分为 10 个部分，即范围、引用文件、术语、概述、计量特性、校准条件、校准项目和校准方法、校准结果表达、复校时间间隔和附录等 10 个部分。

1、范围

针对高通量测序仪测序流程中，需要将待测样本片段化构建测序文库，且现有高通量测序仪都以短读长技术进行测序（单次测序长度 $\leq 1000\text{bp}$ ）。因此规定适用范围，且不适用于桑格（Sanger）测序技术为原理的基因测序仪和纳米孔技术为主要原理的单分子测序仪的校准。

2、引用文献

本规范引用了下列文件：YY/T 1723-2020《高通量基因测序仪》、GB/T 40226-2021《环境微生物宏基因组检测 高通量测序法》、GB/T 30989-2014《高通量基因测序技术规程》。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本规范，凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本规范。

3、术语

这一部分对规范中使用的名词术语进行了定义，包括碱基识别质量、测序覆盖率、比对率、序列相对丰度。

4、概述

在概述部分，主要对高通量基因测序仪的原理和仪器组成进行了简要介绍。

5、计量特性

这部分规定了高通量基因测序仪的计量特征。通过对生产厂家和用户的调研，高通量测序仪主要关注测序下机数据质量、测序数据量的重复性、稳定性以及比对结果的准确性。因此选择了读长总数重复性（Reads）、GC含量占比偏差（GC%）、碱基识别质量百分比、

平均碱基错误率、比对率重复性、序列覆盖率重复性、测序一致序列准确率、序列相对丰度偏差。

6、校准条件

这部分主要规定了高通量基因测序仪校准时需要满足的环境条件，以及使用的标准物质和分析软件推荐。

7、校准项目和校准方法

这部分主要针对高通量基因测序仪的读长总数重复性（Reads）、GC 含量占比偏差（GC%）、碱基识别质量百分比、平均碱基错误率、比对率、比对率重复性、序列覆盖率重复性、测序一致序列准确率、序列相对丰度偏差指标的具体校准方法进行了具体说明和数学公式化处理。

8、校准结果表达

经校准的高通量基因测序仪，出具校准证书，校准证书应符合 JJF 1071-2010 中 5.12 的要求。推荐的校准记录格式见附录 B，校准证书参考格式见附录 C。测序仪校准结果的测量不确定度按 JJF1059.1-2012 的要求评定，校准结果测量不确定度评定示例见附录 D。

9、复校时间间隔

建议不超过 1 年。由于复校时间间隔的长短是由仪器的使用情况、使用者、仪器本身质量等诸多因素所决定的，因此，送校单位可根据实际使用情况自主决定复校时间间隔。如果对仪器的检测数据有怀疑或者更换主要部件及维修后，应重新校准。

10、附录

附录 A 是标准物质的选择原则，附录 B 和附录 C 给出了校准记录 and 校准证书的内容，附录 D 给出了测量不确定度评定示例。

《高通量基因仪校准规范校准规范》规范制定起草小组

2023 年 02 月

参考文献

[1] 国家质量监督检验检疫总局. JJF 1001-2011, 通用计量术语及定义[S].

[2] 国家质量监督检验检疫总局. JJF 1059.1, 测量不确定度评定与表示[S].

[3] 国家药品监督管理局. YY/T 1723-2020, 高通量基因测序仪[S].

[4] 国家质量监督检验检疫总局、国家标准化管理委员会. GB/T 30989-2014, 高通量基因测序技术规程[S].

[5] 国家质量监督检验检疫总局、国家标准化管理委员会. GB/T 40226-2021, 环境微生物宏基因组检测 高通量测序法[S].

[6] Qin JJ, Li YR, Cai ZM, et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes[J]Nature, 2012.