

国家计量技术规范规程制修订

《高通量测序仪校准规范》
(征求意见稿)
实验报告

中国计量科学研究院

2023 年 2 月

实验报告

一、 实验目的

验证《高通量测序仪校准规范》的适用性和可行性。

二、 实验地点

高通量测序仪验证实验在北京诺禾致源生物信息科技有限公司、北京贝瑞和康生物技术有限公司、北京六合华大基因科技有限公司、苏州元德友勤医学检验所等。

三、 环境条件

实验过程中环境温度均在 $(15-35)^{\circ}\text{C}$ ，在校准过程中环境温度的变化均在 3°C 以内。实验过程中环境湿度均在 $(10-80)\% \text{ RH}$ 在校准过程中环境湿度变化均在 $5\% \text{ RH}$ 以内。

四、 实验仪器与实验设计

在验证实验中，共对 illumina 公司、华大智造、贝瑞基因不同 8 台，包含 NovaSeq6000 (PE150/PE250)、NextSeq CN500 (SE75/SE150)、MGI-2000 (PE150) (5 种测序方式) 高通量测序仪进行了 30 次验证实验。涵盖了市场上主要的高通量测序仪生产厂家和制造厂家。在实验设计上，按照校准规范对不同品牌的高通量测序仪进行校准，根据实验结果验证校准规范的可行性和有效性。

五、 标准物质

实验使用可准确溯源、明确序列信息的片段化DNA序列标准物质。至少包含两种以上明确量值信息的参考序列，且每种参考序列长度 $\geq 5 \text{ kbp}$ 。参考序列相对丰度的扩展不确定度 $\leq 15\% (k=2)$ 。

六、 实验结果

6.1 NovaSeq 6000 高通量基因测序仪实验

根据校准规范的要求，采用混合标准物质对北京诺禾致源科技股份有限公司的NovaSeq 6000高通量基因测序仪进行了验证实验。按校准规范要求的程序进行了Q20、Q30、GC含量、对比率、覆盖率、准确率等指标的检测，记录测量数据，

按规范中校准项目和校准方法规定计算结算了各项校准结果, 按规范附录D规定要求计算序列相对丰度偏差。验证试验条件和结果见表1。

表 1 NovaSeq 6000 高通量基因测序仪验证实验结果

客户名称	北京诺禾致源生物科技有限公司
器具名称	高通量基因测序仪
型号/规格	NovaSeq 6000 (PE150)
出厂编号	A00609
生产厂商	Illumina
客户地址	北京市朝阳区酒仙桥北路甲 10 号院 301 号楼 101 单元 7 层 714 室
校准日期	2022 年 9 月 30 日

校准环境条件及地点:

温 度:24.0℃

地 点:

湿 度:49.0% RH

其 它: /

依据《高通量基因测序仪校准作业指导书》对该仪器进行校准，结果如下：

基础信息	
读长类型	PE150
设备最大通量	6T

一、读长总数（reads）重复性

	测定值			平均值	重复性
	1	2	3		
reads	71588280	69226278	78424264	73079607	5.34%

二、GC 含量占比偏差

	测定值			平均值	相对偏差
	1	2	3		
GC%	45%; 44%	45%; 44%	45%; 44%	45%; 44%	1.34%; 0.34%

三、碱基识别质量

	测定值			平均值	参考指标
	1	2	3		

Q20	98.06%	98.08%	98.07%	98.07%	≥90%
Q30	94.22%	94.24%	94.42%	94.29%	≥85%
平均碱基错误率	0.02%	0.02%	0.02%	0.02%	≤0.05%

四、比对率重复性

	测定值			平均值	重复性	参考指标
	1	2	3			
比对率	99.93%	99.97%	99.96%	99.95%	0.02%	≥99.00%

五、序列覆盖率重复性

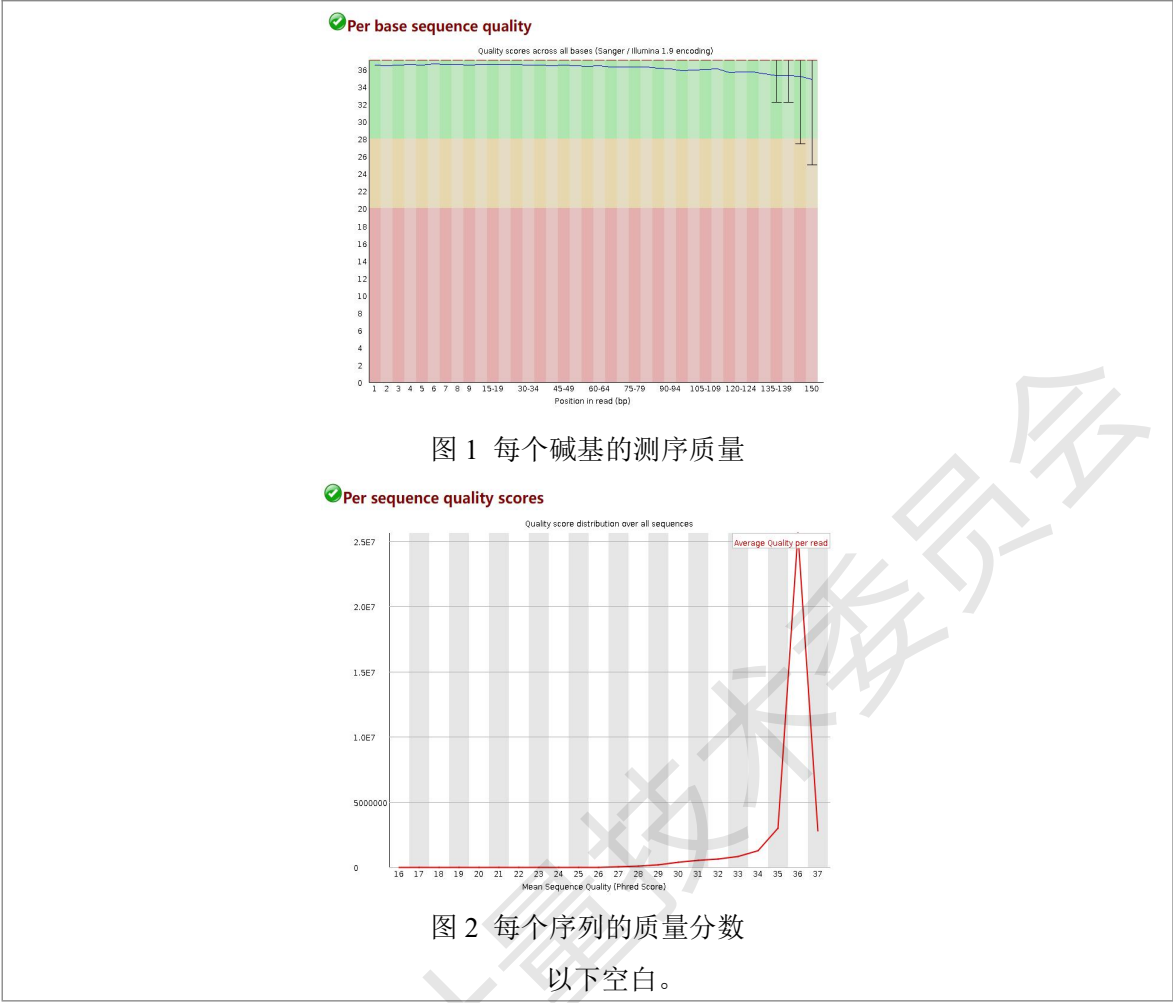
覆盖率	测定值			平均值	重复性
	1	2	3		
100K reads	94.12%	93.97%	94.01%	94.03%	0.07%
1,000K reads	94.79%	94.69%	94.96%	94.81%	0.12%
10,000K reads	97.14%	97.00%	97.00%	97.05%	0.07%

六、测序一致序列准确率

准确率	测定值			平均值	重复性	参考指标
	1	2	3			
准确率	99.83%	99.84%	99.80%	99.82%	0.02%	≥99.50%

七、序列相对丰度偏差

	测定值			平均值	相对偏差	重复性
	1	2	3			
序列相对丰度	47.77%	50.95%	51.36%	50.03%	2.19%	3.93%



6.2 NovaSeq 6000 高通量基因测序仪验证实验

根据校准规范的要求，采用混合标准物质对北京贝瑞和康生物技术有限公司的NovaSeq 6000高通量基因测序仪进行了验证实验。按校准规范要求的程序进行了Q20、Q30、GC含量、对比率、覆盖率、准确率等指标的检测，记录测量数据，按规范中校准项目和校准方法规定计算结算了各项校准结果, 按规范附录D规定要求计算序列相对丰度偏差。验证试验条件和结果见表2。

表 2 Novaseq 6000 高通量基因测序仪验证实验结果

客户名称	北京贝瑞和康生物技术有限公司
器具名称	高通量基因测序仪
型号/规格	NovaSeq 6000 (PE150)
出厂编号	SNA0040
生产厂商	Illumina

客户地址	北京市昌平区科技园区生命园路4号院5号楼					
校准日期	2022年10月13日					
校准环境条件及地点：						
温 度：	23.5	℃	地 点：			
湿 度：	48.5	% RH	其 它：	/		
依据《高通量基因测序仪校准作业指导书》对该仪器进行校准，结果如下：						
基础信息						
读长类型		PE150				
设备最大通量		6T				
一、读长总数（reads）重复性						
	测定值			平均值	重复性	
	1	2	3			
reads	90121992	99226278	98424264	95924178	5.26%	
二、GC 含量占比偏差						
	测定值			平均值	相对偏差	
	1	2	3			
GC%	45%； 44%	45%； 44%	45%； 44%	45%； 44%	1.34%； 0.34%	
三、碱基识别质量						
	测定值			平均值	参考指标	
	1	2	3			
Q20	97.35%	96.31%	98.55%	97.40%	≥90%	
Q30	92.50%	93.14%	91.57%	92.40%	≥85%	
平均碱基错误率	0.03%	0.03%	0.03%	0.03%	≤0.05%	
四、比对率重复性						
	测定值			平均值	重复性	参考指标
	1	2	3			

比对率	99.93%	99.87%	99.13%	99.64%	0.45%	≥99.00%
-----	--------	--------	--------	--------	-------	---------

五、序列覆盖率重复性

覆盖率	测定值			平均值	重复性
	1	2	3		
100K reads	93.97%	93.97%	93.97%	93.97%	0.00%
1,000K reads	94.92%	96.32%	94.97%	95.40%	0.83%
10,000K reads	97.33%	96.12%	96.37%	96.61%	0.66%

六、测序一致序列准确率

准确率	测定值			平均值	重复性	参考指标
	1	2	3			
准确率	99.75%	99.84%	99.71%	99.77%	0.07%	≥99.50%

七、序列相对丰度偏差

	测定值			平均值	相对偏差	重复性
	1	2	3			
序列相对丰度	48.87%	51.31%	49.16%	49.78%	1.94%	2.68%

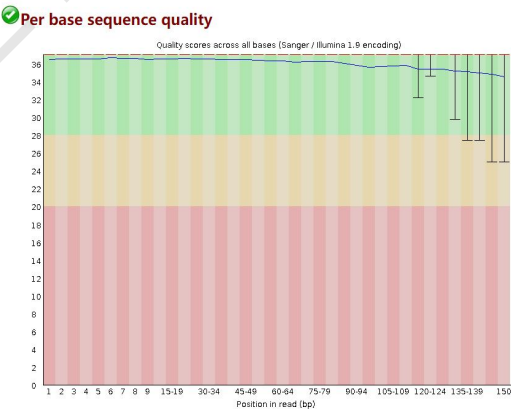
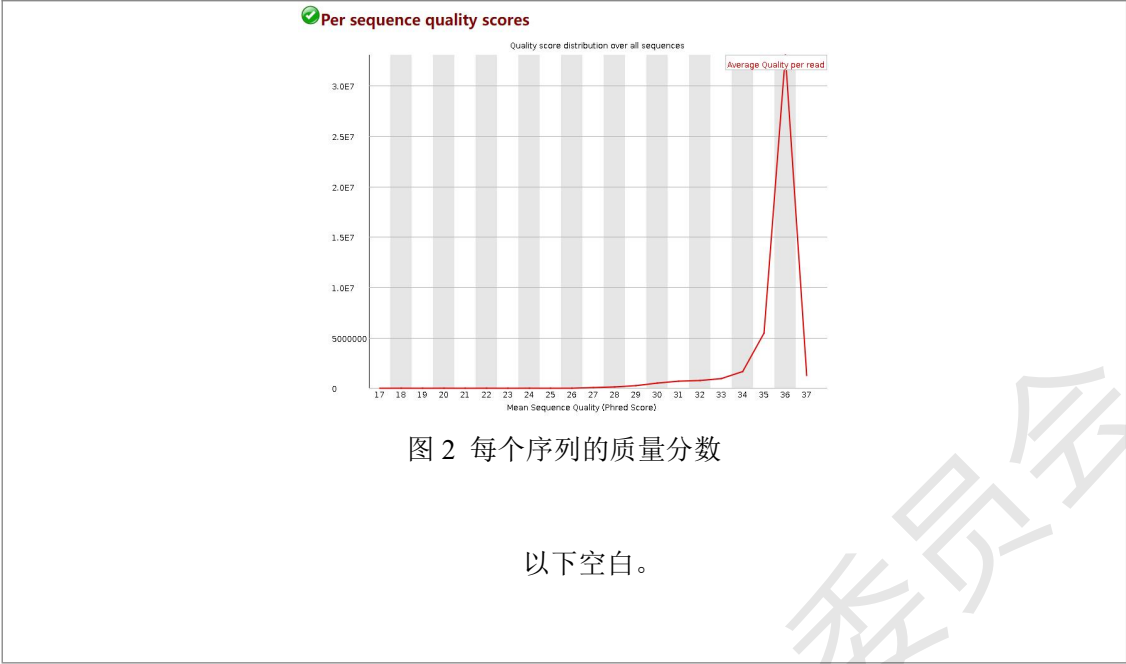


图 1 每个碱基的测序质量



6.3 NextSeq CN500 高通量基因测序仪验证实验

根据校准规范的要求，采用混合标准物质对苏州元德友勤医学检验所有限公司的NextSeq CN500高通量基因测序仪进行了验证实验。按校准规范要求的程序进行了Q20、Q30、GC含量、对比率、覆盖率、准确率等指标的检测，记录测量数据，按规范中校准项目和校准方法规定计算结算了各项校准结果,按规范附录D规定要求计算序列相对丰度偏差。验证试验条件和结果见表3。

表 3 Nextseq CN500 高通量基因测序仪验证实验结果

客户名称	苏州元德友勤医学检验所有限公司
器具名称	高通量基因测序仪
型号/规格	NextSeq CN500 (SE150)
出厂编号	NS500196
生产厂商	Illumina
客户地址	苏州吴中经济开发区吴中大道 2588 号
校准日期	2022 年 10 月 19 日
校准环境条件及地点：	
温 度：	25.0 °C 地 点：
湿 度：	55.1 % RH 其 它： /

依据《高通量基因测序仪校准作业指导书》对该仪器进行校准，结果如下：

基础信息	
读长类型	SE150
设备最大通量	120G

一、读长总数（reads）重复性

	测定值			平均值	重复性
	1	2	3		
reads	26813770	27514190	21546822	25291594	12.90%

二、GC 含量占比偏差

	测定值			平均值	相对偏差
	1	2	3		
GC%	44%	44%	44%	44%	0.34%

三、碱基识别质量

	测定值			平均值	参考指标
	1	2	3		
Q20	93.00%	93.26%	94.78%	93.68%	≥90%
Q30	88.86%	89.66%	88.17%	88.90%	≥85%
平均碱基错误率	0.04%	0.04%	0.03%	0.04%	≤0.05%

四、比对率重复性

	测定值			平均值	重复性	参考指标
	1	2	3			
比对率	99.98%	99.87%	99.63%	99.83%	0.18%	≥99.00%

五、序列覆盖率重复性

覆盖率	测定值		平均值	重复性
-----	-----	--	-----	-----

	1	2	3		
100K reads	47.86%	48.17%	47.76%	47.93%	0.45%
1,000K reads	51.28%	53.21%	52.68%	52.39%	1.90%
10,000K reads	64.11%	65.10%	64.79%	64.67%	0.78%

六、测序一致序列准确率

准确率	测定值			平均值	重复性	参考指标
	1	2	3			
准确率	99.56%	99.76%	99.61%	99.64%	0.10%	≥99.50%

七、序列相对丰度偏差

	测定值			平均值	相对偏差	重复性
	1	2	3			
序列相对丰度	46.15%	48.25%	49.01%	47.80%	0.04%	3.10%

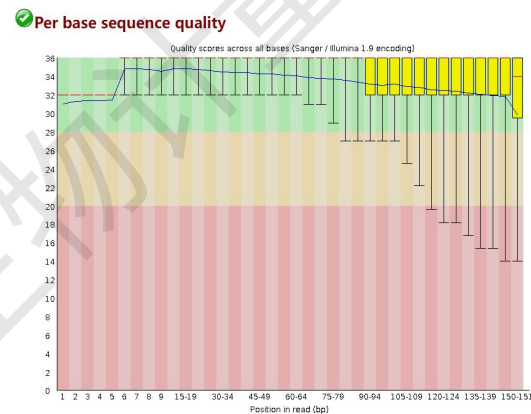
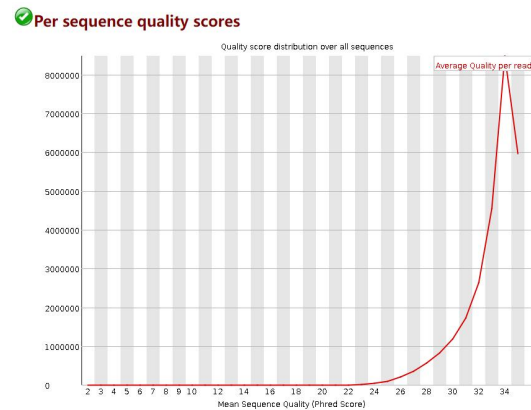
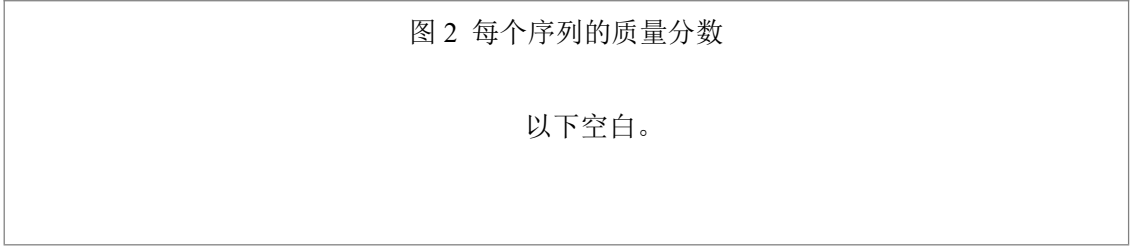


图1 每个碱基的测序质量





6.4 MGI-2000 高通量基因测序仪验证实验

根据校准规范的要求，采用混合标准物质对北京六合华大基因科技有限公司的MGI-2000高通量基因测序仪进行了验证实验。按校准规范要求的程序进行了Q20、Q30、GC含量、对比率、覆盖率、准确率等指标的检测，记录测量数据，按规范中校准项目和校准方法规定计算结算了各项校准结果, 按规范附录D规定要求计算序列相对丰度偏差。验证试验条件和结果见表4。

表 4 MGI-2000 高通量基因测序仪验证实验结果

客户名称	北京六合华大基因科技有限公司				
器具名称	高通量基因测序仪				
型号/规格	MGI-2000 (PE150)				
出厂编号					
生产厂商	华大智造（MGI）				
客户地址	北京市顺义区裕华路 28 号北京空港科技园 6 号楼				
校准日期	2022 年 12 月 14 日				
校准环境条件及地点：					
温 度：	24.8	℃	地 点：		
湿 度：	45.5	% RH	其 它：	/	
依据《高通量基因测序仪校准作业指导书》对该仪器进行校准，结果如下：					
基础信息					
读长类型			PE150		
设备最大通量			600G		
一、读长总数（reads）重复性					
	测定值			平均值	重复性
	1	2	3		

reads	38704870	34219641	36528320	36484277	6.15%
-------	----------	----------	----------	----------	-------

二、GC 含量占比偏差

	测定值			平均值	相对偏差
	1	2	3		
GC%	45%; 45%	45%; 45%	45%; 45%	45%; 45%	1.34%; 1.34%

三、碱基识别质量

	测定值			平均值	参考指标
	1	2	3		
Q20	97.70%	95.77%	98.24%	97.24%	≥90%
Q30	92.98%	92.17%	93.75%	92.97%	≥85%
平均碱基错误率	0.03%	0.03%	0.03%	0.03%	≤0.05%

四、比对率重复性

	测定值			平均值	重复性	参考指标
	1	2	3			
比对率	99.98%	99.97%	99.83%	99.93%	0.08%	≥99.00%

五、序列覆盖率重复性

覆盖率	测定值			平均值	重复性
	1	2	3		
100K reads	94.47%	94.17%	93.76%	94.13%	0.38%
1,000K reads	97.04%	96.08%	95.68%	96.27%	0.73%
10,000K reads	99.70%	98.87%	98.79%	99.12%	0.51%

六、测序一致序列准确率

准确率	测定值			平均值	重复性	参考指标
	1	2	3			

准确率	99.67%	99.56%	99.18%	99.47%	0.26%	≥99.50%
-----	--------	--------	--------	--------	-------	---------

七、序列相对丰度偏差

	测定值			平均值	相对偏差	重复性
	1	2	3			
序列相对丰度	44.31%	47.25%	48.18%	46.58%	1.26%	4.34%

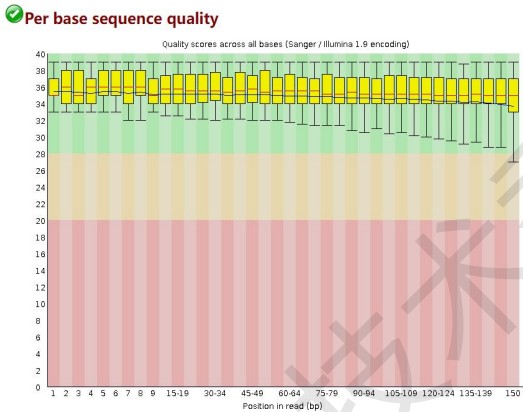


图 1 每个碱基的测序质量

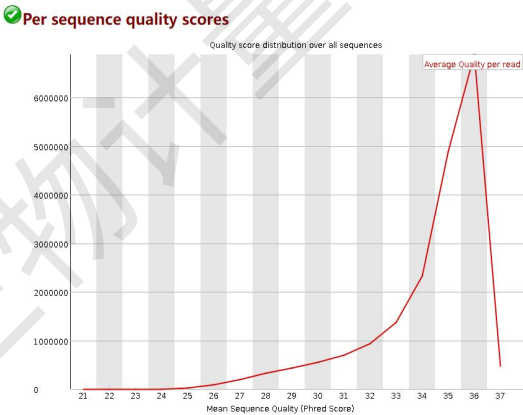


图 2 每个序列的质量分数

以下空白。

6.5 NextSeq CN500 高通量基因测序仪验证实验

根据校准规范的要求，采用混合标准物质对北京贝瑞和康生物技术有限公司的NextSeq CN500高通量基因测序仪进行了验证实验。按校准规范要求的程序进行了Q20、Q30、GC含量、对比率、覆盖率、准确率等指标的检测，记录测量数据，

按规范中校准项目和校准方法规定计算结算了各项校准结果, 按规范附录D规定要求计算序列相对丰度偏差。验证试验条件和结果见表5。

表 5 NextSeq CN500 高通量基因测序仪验证实验结果

客户名称	北京贝瑞和康生物技术有限公司
器具名称	高通量基因测序仪
型号/规格	NextSeq CN500(SE75)
出厂编号	TPNB500295
生产厂商	Illumina、贝瑞和康
客户地址	北京市昌平区科技园区生命园路 4 号院 5 号楼
校准日期	2022 年 10 月 20 日

校准环境条件及地点：

温 度：24.8℃

地 点：

湿 度：45.5% RH

其 它：/

依据《高通量基因测序仪校准作业指导书》对该仪器进行校准，结果如下：

基础信息	
读长类型	SE75
设备最大通量	180G

一、读长总数（reads）重复性

	测定值			平均值	重复性
	1	2	3		
reads	30029855	36311414	35929921	34090396.67	10.33%

二、GC 含量占比偏差

	测定值			平均值	相对偏差
	1	2	3		
GC%	44%	44%	44%	44%	0.34%

三、碱基识别质量

	测定值	平均值	参考指标
--	-----	-----	------

	1	2	3		
Q20	93.18%	94.38%	93.96%	93.84%	≥90%
Q30	89.92%	90.12%	92.10%	90.71%	≥85%
平均碱基错误率	0.05%	0.04%	0.04%	0.04%	≤0.05%

四、比对率重复性

	测定值			平均值	重复性	参考指标
	1	2	3			
比对率	99.83%	99.81%	99.89%	99.84%	0.04%	≥99.00%

五、序列覆盖率重复性

覆盖率	测定值			平均值	重复性
	1	2	3		
100K reads	23.84%	23.91%	24.16%	23.97%	0.70%
1,000K reads	25.74%	25.69%	25.68%	25.70%	0.13%
10,000K reads	39.94%	39.62%	38.79%	39.45%	1.50%

六、测序一致序列准确率

准确率	测定值			平均值	重复性	参考指标
	1	2	3			
准确率	99.67%	99.56%	99.18%	99.47%	0.26%	≥99.50%

七、序列相对丰度偏差

	测定值			平均值	相对偏差	重复性
	1	2	3			
序列相对丰度	48.25%	50.01%	49.46%	49.24%	1.40%	1.83%

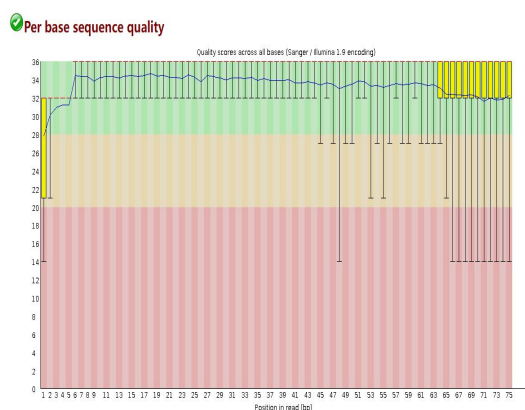


图 1 每个碱基的测序质量

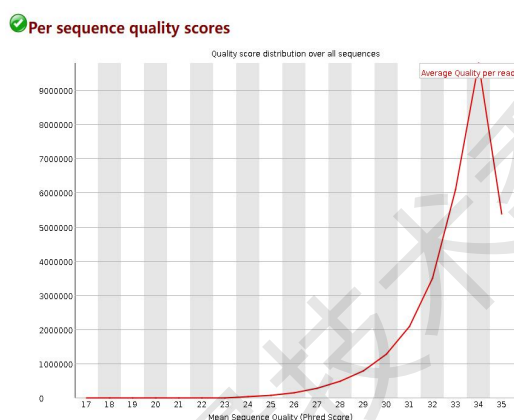


图 2 每个序列的质量分数

以下空白。

七、 实验结论

通过对 Illumina 公司的 NovaSeq 6000、NextSeq、贝瑞公司的 NextSeq CN500 以及华大基因的 BGI-2000 共 4 种不同型号以及 4 种不同的芯片（PE150、PE250、SE75、SE150）的高通量基因测序仪进行了多次验证实验。验证试验选择的生产厂商涵盖现行在用仪器的主要类型。验证试验选择的仪器型号也尽可能涵盖了不同的仪器型号，最具代表性的仪器。在实验设计上，分别比较了采用标准物质对高通量基因测序仪的 Q20、Q30、GC 含量、对比率、覆盖度、深度、准确率等指标按照校准规范的规定程序进行实验验证分析。结果证明制定的《高通量基因测序仪校准规范》能够很好的评价和反应出高通量基因测序仪的性能技术指标，可以有效的评定仪器的性能状况。