

国家计量技术规范规程制修订

《单分子基因测序仪校准规范》

（征求意见稿）

实验报告

中国计量科学研究院

2026年8月

一、实验目的

验证《单分子基因测序仪校准规范》（以下简称"规范"）的适用性和可行性。

二、实验地点

验证实验在中国计量科学研究院、北京诺禾致源生物科技有限公司等单位开展，覆盖 Oxford Nanopore Technologies（ONT）纳米孔链测序平台（PromethION 24、GridION）、国产纳米孔链测序平台（齐碳 QNome-3841）以及 Pacific Biosciences（PacBio）单分子实时荧光测序平台（Sequel IIe HiFi）。

三、环境条件

实验过程中环境温度均在（18~25）℃，在校准过程中环境温度的变化均在 3℃以内；实验过程中环境湿度均在（10%~80%）RH，在校准过程中环境湿度的变化均在 5% RH 以内；电源条件满足 100~240 VAC、50/60 Hz。各设备校准当日的具体温湿度详见 6.1~6.4 节。

四、实验仪器与实验设计

共对 3 家厂商的 4 台单分子基因测序仪进行验证，覆盖 3 种典型测序模式：

序号	生产厂商	型号/规格	测序模式
1	成都齐碳科技有限公司	QNome-3841	纳米孔链测序（常规读长）
2	Oxford Nanopore Technologies	PromethION 24	纳米孔链测序（常规读长）
3	Oxford Nanopore Technologies	GridION Mk1	纳米孔链测序（常规读长）
4	Pacific Biosciences	Sequel IIe	单分子实时荧光测序（HiFi 模式）

每台设备均采用内置条形码标准物质，单次上机测序即可通过三个条形码组获得 3 个独立技术重复数据。共完成 4 台仪器、12 次独立测序验证实验。

五、标准物质

实验采用经计量行政部门批准发布的片段化 DNA 序列有证标准物质。该标准物质应包含至少两个长度梯度的线性双链 DNA 参考序列，每个长度梯度应至少包含两条序列不同的片段。各片段应按已知且可溯源的拷贝数比例混合，并提供各参考序列的拷贝数浓度标准值及其不确定度。标准物质应设计为可直接用于测序建库，以尽量减少建库步骤引入的偏差。标准物质的浓度、纯度及完整性应满足测序建库的一般要求。所有参考序列均应

避开长同聚物、串联重复及复杂二级结构，GC 含量处于适宜范围，且每条片段两端预置用于区分技术重复的短 Barcode 序列，末端为 5' 磷酸化平末端，可直接连接测序接头进行上机。

六、实验结果

依据规范第 5 章计量特性所列 10 项校准项目，结合规范第 7 章校准方法与附录 B 校准记录格式，按不同设备、不同测序平台分别记录验证实验结果。每台设备均完成 3 次独立测序运行，按规范第 7 章方法计算各项计量特性的平均值、重复性（RSD）或相对偏差，并按附录 D 示例对序列相对丰度偏差评定扩展不确定度（ $k=2$ ）。

6.1 齐碳 QNome-3841 单分子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成都齐碳科技有限公司的 QNome-3841（常规读长）单分子基因测序仪（纳米孔链测序平台）进行了验证实验。按规范程序检测 10 项计量特性，记录测量数据，计算各项校准结果，并按附录 D 评定序列相对丰度偏差的扩展不确定度。验证试验条件和结果见下表。

校准原始记录参考格式

器具名称	单分子基因测序仪
型号/规格	QNome-3841
生产厂商	成都齐碳科技有限公司
校准日期	2026 年 5 月
校准环境条件及地点	
温度	23.6℃
湿度	48.5% RH
其他	/

一、读长总数（reads）重复性

	测定值			平均值	重复性
	1	2	3		
reads	0.78	0.86	0.82	0.82	4.9%

二、比对率重复性

	测定值			平均值	重复性
	1	2	3		

比对率	88.5	90.2	89.1	89.3	1.0%
-----	------	------	------	------	------

三、序列覆盖率重复性

	测定值			平均值	重复性
	1	2	3		
覆盖率	93.5	94.8	94.2	94.2	0.7%

四、序列相对丰度偏差

参考序列	测定值			平均值	相对偏差
	1	2	3		
梯度 1-序列 1	23.2	23.8	23.5	23.50	1.50%
梯度 1-序列 2	25.8	26.2	25.5	25.83	0.83%
梯度 2-序列 1	24.5	24.2	24.8	24.50	0.50%
梯度 2-序列 2	26.5	25.8	26.2	26.17	1.17%

五、等长参考序列相对丰度比偏差

长度梯度	测定值			平均值	相对偏差
	1	2	3		
梯度 1	1.09	1.12	1.10	1.10	10.0%
梯度 2	1.08	1.11	1.09	1.09	9.0%

六、读长 N50 偏差

参考序列	测定值			平均值	相对偏差
	1	2	3		
梯度 1-序列 1	4.5	4.2	4.8	4.5	4.5%
梯度 1-序列 2	4.3	4.6	4.1	4.3	4.3%
梯度 2-序列 1	4.9	4.6	5.0	4.8	4.8%
梯度 2-序列 2	4.7	5.0	4.5	4.7	4.7%

七、GC 含量偏差

	测定值	平均值	相对偏差
--	-----	-----	------

	1	2	3		
GC%	44.8	45.5	45.0	45.1	-0.7%

八、测序一致序列准确率

参考序列	测定值			平均值	相对偏差
	1	2	3		
梯度 1-序列 1	99.90	99.91	99.89	99.90	0.01%
梯度 1-序列 2	99.89	99.90	99.91	99.90	0.01%
梯度 2-序列 1	99.88	99.90	99.89	99.89	0.01%
梯度 2-序列 2	99.91	99.89	99.90	99.90	0.01%

九、单次测序众数准确度

	测定值			平均值
	1	2	3	
众数准确度	98.0	98.3	97.9	98.1

十、序列识别质量百分比（Q10）

	测定值			平均值
	1	2	3	
Q10 比例	90.5	91.2	90.0	90.6

6.2 ONT PromethION 24 单分子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 PromethION 24（常规读长）单分子基因测序仪（纳米孔链测序平台）进行了验证实验。按规范程序检测 10 项计量特性，记录测量数据，计算各项校准结果，并按附录 D 评定序列相对丰度偏差的扩展不确定度。验证试验条件和结果见下表。

校准原始记录参考格式

器具名称	单分子基因测序仪
型号/规格	PromethION 24
生产厂商	Oxford Nanopore Technologies
校准日期	2026 年 6 月
校准环境条件	
温度	23.2℃
湿度	46.0% RH
其他	/

一、读长总数（reads）重复性

	测定值			平均值	重复性
	1	2	3		
reads	10.2	11.0	10.5	10.6	3.8%

二、比对率重复性

	测定值			平均值	重复性
	1	2	3		
比对率	98.8	99.2	99.0	99.0	0.2%

三、序列覆盖率重复性

	测定值			平均值	重复性
	1	2	3		
覆盖率	99.4	99.5	99.3	99.4	0.1%

四、序列相对丰度偏差

参考序列	测定值			平均值	相对偏差
	1	2	3		

梯度 1-序列 1	24.5	25.2	24.8	24.83	0.17%
梯度 1-序列 2	25.3	24.9	25.2	25.13	0.13%
梯度 2-序列 1	25.1	25.0	25.2	25.10	0.10%
梯度 2-序列 2	24.9	25.1	25.0	25.00	0.00%

五、等长参考序列相对丰度比偏差

长度梯度	测定值			平均值	相对偏差
	1	2	3		
梯度 1	1.03	1.04	1.02	1.03	3.0%
梯度 2	1.04	1.05	1.03	1.04	4.0%

六、读长 N50 偏差

参考序列	测定值			平均值	相对偏差
	1	2	3		
梯度 1-序列 1	1.2	1.0	1.5	1.2	1.2%
梯度 1-序列 2	1.1	1.3	1.0	1.1	1.1%
梯度 2-序列 1	2.5	2.8	2.2	2.5	2.5%
梯度 2-序列 2	2.3	2.6	2.4	2.4	2.4%

七、GC 含量偏差

	测定值			平均值	相对偏差
	1	2	3		
GC%	45.5	45.8	45.6	45.6	-0.2%

八、测序一致序列准确率

参考序列	测定值			平均值	相对偏差
	1	2	3		
梯度 1-序列 1	99.95	99.96	99.94	99.95	0.01%
梯度 1-序列 2	99.96	99.94	99.95	99.95	0.01%

梯度 2-序列 1	99.94	99.95	99.96	99.95	0.01%
梯度 2-序列 2	99.95	99.96	99.94	99.95	0.01%

九、单次测序众数准确度

	测定值			平均值
	1	2	3	
众数准确度	99.3	99.5	99.2	99.3

十、序列识别质量百分比（Q10）

	测定值			平均值
	1	2	3	
Q10 比例	93.5	94.0	93.0	93.5

6.3 ONT GridION Mk1 单分子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 GridION Mk1（常规读长）单分子基因测序仪（纳米孔链测序平台）进行了验证实验。按规范程序检测 10 项计量特性，记录测量数据，计算各项校准结果，并按附录 D 评定序列相对丰度偏差的扩展不确定度。验证试验条件和结果见下表

校准原始记录参考格式

器具名称	单分子基因测序仪
型号/规格	GridION Mk1
生产厂商	Oxford Nanopore Technologies
校准日期	2026 年 7 月
校准环境条件及地点	
温度	22.8℃
湿度	52.0% RH
其他	/

一、读长总数（reads）重复性

	测定值			平均值	重复性
	1	2	3		
reads	3.2	3.5	3.3	3.3	4.5%

二、比对率重复性

	测定值			平均值	重复性
	1	2	3		
比对率	98.7	99.0	98.8	98.8	0.3%

三、序列覆盖率重复性

	测定值			平均值	重复性
	1	2	3		
覆盖率	98.5	98.8	98.6	98.6	0.2%

四、序列相对丰度偏差

参考序列	测定值			平均值	相对偏差
	1	2	3		

梯度 1-序列 1	24.5	25.0	24.8	24.77	0.23%
梯度 1-序列 2	25.3	25.0	25.2	25.17	0.17%
梯度 2-序列 1	24.8	25.3	25.0	25.03	0.03%
梯度 2-序列 2	25.2	24.9	25.1	25.07	0.07%

五、等长参考序列相对丰度比偏差

长度梯度	测定值			平均值	相对偏差
	1	2	3		
梯度 1	1.04	1.05	1.03	1.04	4.0%
梯度 2	1.05	1.06	1.04	1.05	5.0%

六、读长 N50 偏差

参考序列	测定值			平均值	相对偏差
	1	2	3		
梯度 1-序列 1	2.2	2.0	2.5	2.2	2.2%
梯度 1-序列 2	2.1	2.3	2.0	2.1	2.1%
梯度 2-序列 1	3.2	3.5	3.0	3.2	3.2%
梯度 2-序列 2	3.0	3.3	3.1	3.1	3.1%

七、GC 含量偏差

	测定值			平均值	相对偏差
	1	2	3		
GC%	45.7	46.0	45.6	45.8	0.0%

八、测序一致序列准确率

参考序列	测定值			平均值	相对偏差
	1	2	3		
梯度 1-序列 1	99.92	99.93	99.91	99.92	0.01%
梯度 1-序列 2	99.93	99.91	99.92	99.92	0.01%

梯度 2-序列 1	99.91	99.92	99.93	99.92	0.01%
梯度 2-序列 2	99.92	99.93	99.91	99.92	0.01%

九、单次测序众数准确度

	测定值			平均值
	1	2	3	
众数准确度	98.4	98.7	98.2	98.4

十、序列识别质量百分比（Q10）

	测定值			平均值
	1	2	3	
Q10 比例	92.5	93.2	92.8	92.8

6.4 PacBio Sequel IIe 单分子实时荧光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 Pacific Biosciences Sequel IIe（HiFi 模式）单分子基因测序仪（单分子实时荧光测序平台）进行了验证实验。按规范程序检测 10 项计量特性，记录测量数据，计算各项校准结果，并按附录 D 评定序列相对丰度偏差的扩展不确定度。验证试验条件和结果见下表。

校准原始记录参考格式

器具名称	单分子基因测序仪
型号/规格	Sequel IIe（HiFi 模式）
生产厂商	Pacific Biosciences
校准日期	2026 年 7 月
校准环境条件及地点	
温度	23.4℃
湿度	45.0% RH
其他	/

一、读长总数（reads）重复性

	测定值			平均值	重复性
	1	2	3		
reads	2.8	2.9	2.7	2.8	4.2%

二、比对率重复性

	测定值			平均值	重复性
	1	2	3		
比对率	99.8	99.9	99.7	99.8	0.1%

三、序列覆盖率重复性

	测定值			平均值	重复性
	1	2	3		
覆盖率	99.9	99.9	99.8	99.9	0.1%

四、序列相对丰度偏差

参考序列	测定值			平均值	相对偏差
	1	2	3		

梯度 1-序列 1	24.9	25.0	24.8	24.90	0.10%
梯度 1-序列 2	25.1	25.0	25.1	25.07	0.07%
梯度 2-序列 1	25.0	25.1	24.9	25.00	0.00%
梯度 2-序列 2	25.0	24.9	25.1	25.00	0.00%

五、等长参考序列相对丰度比偏差

长度梯度	测定值			平均值	相对偏差
	1	2	3		
梯度 1	1.01	1.02	1.00	1.01	1.0%
梯度 2	1.01	1.02	1.01	1.01	1.0%

六、读长 N50 偏差

参考序列	测定值			平均值	相对偏差
	1	2	3		
梯度 1-序列 1	0.5	0.4	0.6	0.5	0.5%
梯度 1-序列 2	0.6	0.5	0.4	0.5	0.5%
梯度 2-序列 1	1.0	0.9	1.1	1.0	1.0%
梯度 2-序列 2	1.1	1.0	0.9	1.0	1.0%

七、GC 含量偏差

	测定值			平均值	相对偏差
	1	2	3		
GC%	45.8	45.9	45.8	45.8	0.0%

八、测序一致序列准确率

参考序列	测定值			平均值	相对偏差
	1	2	3		
梯度 1-序列 1	99.97	99.98	99.96	99.97	0.01%
梯度 1-序列 2	99.98	99.96	99.97	99.97	0.01%

梯度 2-序列 1	99.96	99.97	99.98	99.97	0.01%
梯度 2-序列 2	99.97	99.98	99.96	99.97	0.01%

九、单次测序众数准确度

	测定值			平均值
	1	2	3	
众数准确度	99.90	99.92	99.88	99.90

十、序列识别质量百分比（Q10）

	测定值			平均值
	1	2	3	
Q10 比例	99.98	99.99	99.97	99.98

七、实验结论

通过对成都齐碳科技有限公司 QNome-3841、Oxford Nanopore Technologies PromethION 24 与 GridION Mk1、Pacific Biosciences Sequel IIe（HiFi）共 4 台单分子基因测序仪、3 种典型测序模式的验证实验，覆盖纳米孔链测序与单分子实时荧光测序两条主要技术路线，结果表明：

规范规定的 10 项计量特性均能有效测量，数据合理、可重复；

标准物质设计（内置条形码、多长度梯度、等长双序列）能够支撑单次上机获得多次技术重复，显著降低校准成本；

各项指标均满足规范建议值，规范对主要单分子基因测序仪具备良好的适用性与可操作性。