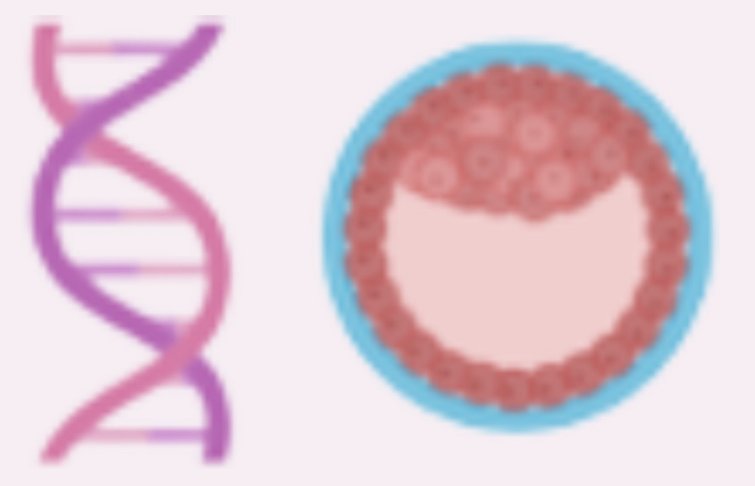


Vergelijkende studie van *sequencing* kits voor gebruik bij LPS in het kader van PGT



Noa Van den Notelaer – Genomics core Leuven

Prof. Dr. W. Bossuyt (stagementor), Dr. E. Dimitriadou (groepsverantwoordelijke fertiliteit), Dr. A. Verfaillie (wet lab verantwoordelijke)

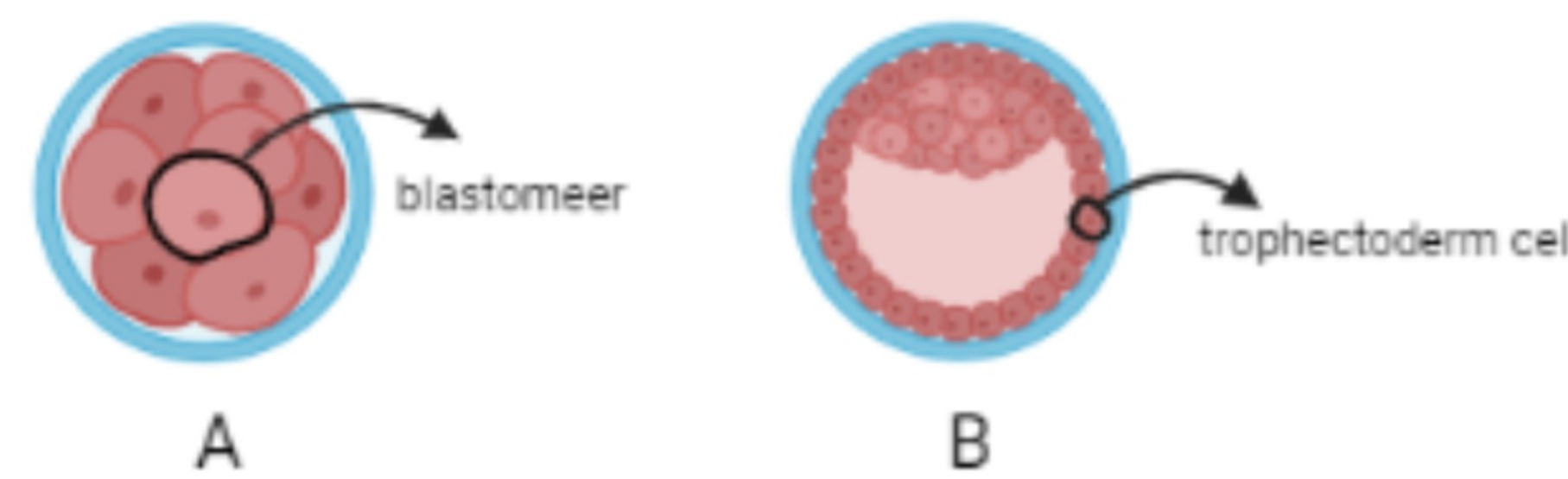


Introductie

Pre-implantatie genetica (PGT) is een techniek die gebruikt wordt bij koppels die een verhoogd risico lopen op een kind met een ernstige aandoening. De embryo's verkregen via IVF worden getest op ernstige genetische afwijkingen voordat ze teruggeplaatst worden in de baarmoeder [1]. *Low-pass short sequencing* (LPS) wordt gebruikt bij PGT voor de diagnose van aneuploidie (PGT-A). Bij LPS wordt het hele genoom gesequencet met een *sequencing coverage* lager dan één. [2]

Voor het gebruik van LPS in het kader van PGT worden twee kits getest, namelijk de Embgenix™ PGT-A Kit (Takara) en de EmbryoMap Sample Prep kit (Vitrolife). Voor deze vergelijking worden de kwaliteitscontroles van de *libraries* en van de *runs* vergeleken. Hiernaast wordt ook gecontroleerd of de NovaSeq 6000 een alternatief is voor de duurere MiSeq *run*.

De validatie gebeurt met DNA uit embryobiopsies die afkomstig zijn van een dag drie embryo (Figuur 1A) en dag vijf embryo (Figuur 1B).

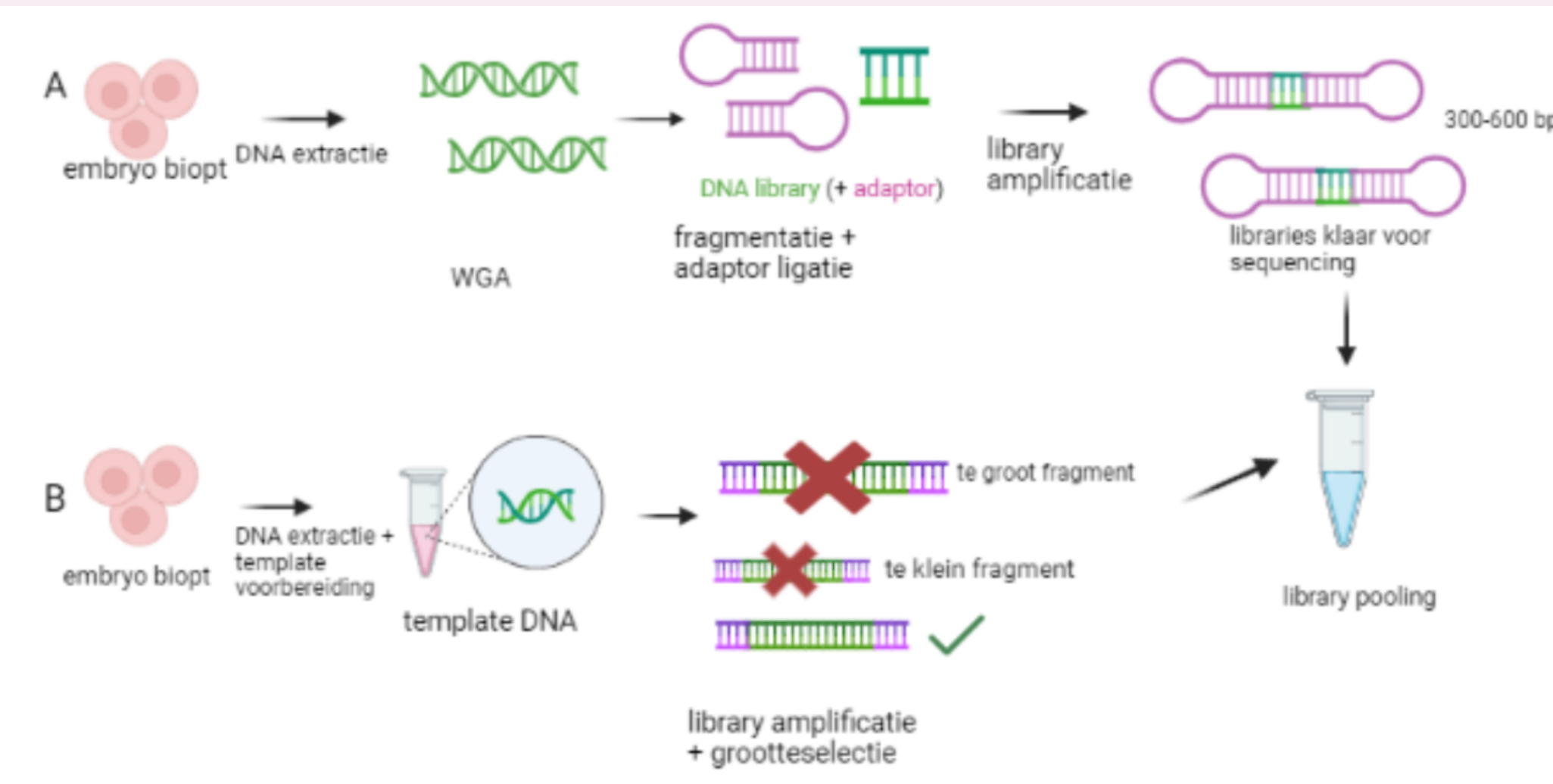


Figuur 1: Soorten embryobiopsies gebruikt voor PGT-A.

Materiaal en methode

De *library* preparatie gebruikmakende van de Embgenix™ PGT-A Kit (CE-IVD) omvatte drie stappen: DNA extractie, *Whole Genome Amplification* en tenslotte de aanmaak van sequencebare *libraries*. [3]

De *library* preparatie met de EmbryoMap Sample Prep kit bestond uit drie stappen: DNA extractie en *template* voorbereiding, *library* amplificatie en grootteselectie met kwantificatie. [4]

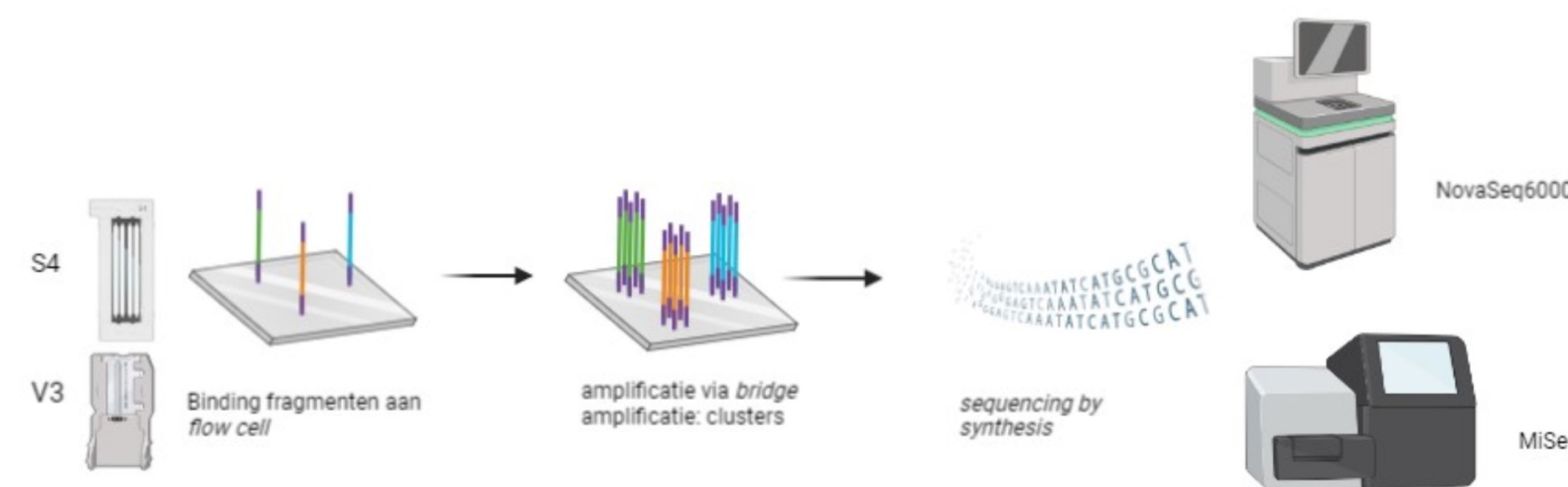


Figuur 2: Workflow library preparatie met Embgenix PGT-A Kit en EmbryoMap Sample Prep kit.

De concentraties van de *libraries* werden gemeten door de Qubit 2.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific). De fragmentlengtes werden gecontroleerd door de Fragment Analyzer (Advanced Analytical).

Na de *library* preparatie werden de finale *libraries* gedenuceerd met NaOH of hitte.

De *sequencing* gebeurde met de MiSeq® (Illumina) of met de NovaSeq 6000® (Illumina).



Figuur 3: Sequencing-By-Synthesis met NovaSeq 6000 en MiSeq

Resultaten

Als eerste werd de QC van de *library* zelf vergeleken (Qubit en Fragment Analyzer). De gemeten concentraties van de *pools* zijn weergegeven in Tabel 1. Tabel 2 geeft de gemiddelde fragmentlengtes weer van de *libraries*.

Tabel 1: Concentraties pools in nM gemeten door Qubit 2.0 Fluorometer. / nM = nanomolair

	Embgenix™ PGT-A Kit	EmbryoMap Sample Prep kit
Concentratie (nM)	4	19,98

Tabel 2: Gemiddelde fragmentlengtes libraries in bp gemeten door Fragment Analyzer. / bp = basenpaar

	Embgenix™ PGT-A Kit	EmbryoMap Sample Prep kit
Gemiddelde fragmentlengte (bp)	335	865

Daarnaast werden de resultaten van de *sequencing* vergeleken om te bepalen welke kit de meeste geschikte is. Hierbij werd gekeken naar de verschillende kwaliteitsparameters. De bekomen waarden werden gecontroleerd met de verwachte waarden beschreven in de specificaties van de toestellen. [5-7]

Tabel 3 geeft een overzicht van de verwachte en effectieve *run metrics* bij de MiSeq *runs*. Tabel 4 geeft een overzicht van de verwachte en effectieve *run metrics* bij de NovaSeq 6000 *run*.

Tabel 3: Verwachte run metrics en effectieve run metrics bij MiSeq runs. / M = miljoen

MiSeq	Verwacht	Embgenix™ PGT-A Kit	EmbryoMap Sample Prep kit
Clusters PF (%)	≥ 85	85,5	91,72
≥ Q ₃₀ (%)	≥ 85	94,5	95,4
Cluster count PF (M)	20-25	28,72	21
Cluster density (clusters/mm ²)	1200-1400	1447 ± 52	957 ± 40

Tabel 4: Verwachte run metrics en effectieve run metrics bij NovaSeq 6000 run. / n.v.t. = niet van toepassing, M = miljoen

NovaSeq 6000	Verwacht	Embgenix™ PGT-A Kit
Clusters PF (%)	≥ 65	± 83
≥ Q ₃₀ (%)	≥ 85	93,3
Cluster count PF (M)	50	127
Cluster density (clusters/mm ²)	n.v.t.	2961

Discussie en conclusie

Uit Tabel 1 kan besloten worden dat de EmbryoMap *library* een veel hogere concentratie heeft dan de Embgenix™ PGT-A *library*. Vervolgens worden de resultaten van de Fragment Analyzer vergeleken van beide *libraries*. Uit Tabel 2 kan besloten worden dat de fragmentlengte van de EmbryoMap Sample Prep kit *library* niet voldoet aan de gewenste fragmentlengte van 550bp.

Uit Tabel 3 kan besloten worden dat de clusters PF en het % ≥ Q₃₀ voor beide kits voldoen aan de verwachte waarden. Op basis van deze parameters kan geen verschil gemaakt worden.

Echter heeft *flow cell* bij de *run* met de EmbryoMap Sample Prep kit een cluster *density* die lager is dan die bij de Embgenix™ PGT-A Kit. Dit kan een verklaring zijn voor het verschil in cluster *count* PF.

Voorlopig lijkt het dat de NovaSeq 6000 een goed alternatief biedt voor de MiSeq indien men kiest voor de Embgenix™ PGT-A Kit. Uit Tabel 4 kan besloten worden dat alle QC parameters bij de NovaSeq 6000 *run* voldoen.

Er kan dus voorlopig geen eenduidig besluit gemaakt worden over welke kit de voorkeur krijgt voor het gebruik van LPS in het kader van PGT wegens te weinig QC data.

Referenties

1. UZ Leuven. Pre-implantatie genetische testing (PGT). (Geraadpleegd op 15/5/2023). Beschikbaar op <https://www.uzleuven.be/nl/pgt>.
2. L. Spans. Low Pass Sequencing (LPS) van DNA libraries. UZ Leuven: CME; 2023; CEMOL-MT278-PR.
3. Takara. Embgenix™ PGT-A Kit (CE-IVD) for Illumina® MiSeq® System. USA; 2022; 32 p's.
4. Vitrolife. EMBRYOMAP™ SAMPLE PREP GUIDE. Göteborg, Zweden; 2021; 32 p's
5. Illumina. Specifications for the MiSeq system. (Geraadpleegd op 30/5/2023). Beschikbaar op <https://www.illumina.com/systems/sequencing-platforms/miseq/specifications.html>.
6. Illumina. NovaSeq 6000 System Specifications. (Geraadpleegd op 30/5/2023). Beschikbaar op <https://www.illumina.com/systems/sequencing-platforms/novaseq/specifications.html>.
7. Illumina. Measuring sequencing accuracy. (Geraadpleegd op 25/5/2023). Beschikbaar op <https://www.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing/plan-experiments/quality>.