



AF BIOANALYTIKER PETER BRUUN
KLINISK-BIOKEMISK AFDELING
GENTOFTE HOSPITAL
petbru02@geh.regionh.dk

Før banken åbner!

DNA-biobanker er i disse år et højt profileret emne inden for det offentlige sundhedsvæsen. Det er nu, at basis for fremtidens forskning skabes. I denne artikel vil jeg sætte fokus på nogle af de kvalitetsmæssige problematikker, man skal tage stilling til, inden bankkontoen kan åbnes for indskud

Hvad er god DNA-kvalitet? Det er et simpelt spørgsmål med mange svar, for flere faktorer spiller ind, når metode (se faktaboks "DNA-oprensning" side 17) til oprensning af DNA fra fx blod skal vælges. Antallet af prøver, mængden af prøvemateriale, laboratoriets udstyr, økonomi, arbejdsmiljø, traditioner og kvaliteten af oprensede DNA spiller alt sammen en mere eller mindre vigtig rolle i processen.

Det vigtigste succeskriterium er dog, at det oprensede DNA kan bruges til de analyser, man har planlagt. Dette vanskeliggør valget af metode, når det drejer sig om oprensning af prøver til en DNA-biobank. Her kan man ikke nødvendigvis på forhånd vurdere, hvilke metoder eller fremtidige teknologier forskerne har til rådighed og påtænker at anvende ved fremtidige sygdoms- eller befolkningsundersøgelser. I sådanne tilfælde vil en validering over for kendte metoder og målte kvalitetsparametre spille en stor rolle.

Kvalitetsarbejdet får yderligere en dimension i disse år. Undersøgelser har vist, at epidemiologiske kohorteundersøgelser sandsynligvis kræver deltagelse af flere populationer med forskellige gener, miljø og sociokulturelle faktorer for at kunne kaste lys over, hvordan gener og miljø interagerer⁶. Nogle internationale biobanker er begyndt at samarbejde for at komme denne problematik i møde, men udveksling af såvel prøvemateriale som resultater kræver naturligvis også en vis kvalitetssikring⁶.

I det følgende vil jeg beskrive nogle af de parametre, der kan bruges til evaluering af DNAs kvalitet.

Koncentration

Koncentrationsmålinger på DNA har flere formål. I forbindelse med validering af oprensningsmetoder kan koncentrationsbestemmelsen give et fingerpeg om udnyttelsen af blodprøvens DNA. Blodprøvens leukocytværdi bruges her til at udregne det maksimale potentielle udbytte, og det kan så sammenlignes med det målte udbytte. I det daglige bruges koncentrationsmålingen til at normalisere DNA, så man har en ensartet koncentration i de forskellige aliquoter.

Koncentrationsbestemmelsen kan foretages på flere måder. Fotometrisk kan man udnytte, at absorbansen ved 260 nm igennem en 1 cm cuvette svarer til en DNA-koncentration på ca. 50 µg/mL (absorbansen ved 320 nm bør også måles og næsten være nul²). Den fotometriske måling har dog visse ulemper. Målingen kræver en stor mængde prøvemateriale (medmindre man fx bruger et Nanodrop-fotometer, som kan nøjes med 1 µL), og eventuelle rester af RNA medtages i målingen. Alternativt kan man benytte sig af nogle af de kommercielle kits, hvor farvestoffer sætter sig på DNA-strengene og visualiseres vha. fluorescens.

Renhed

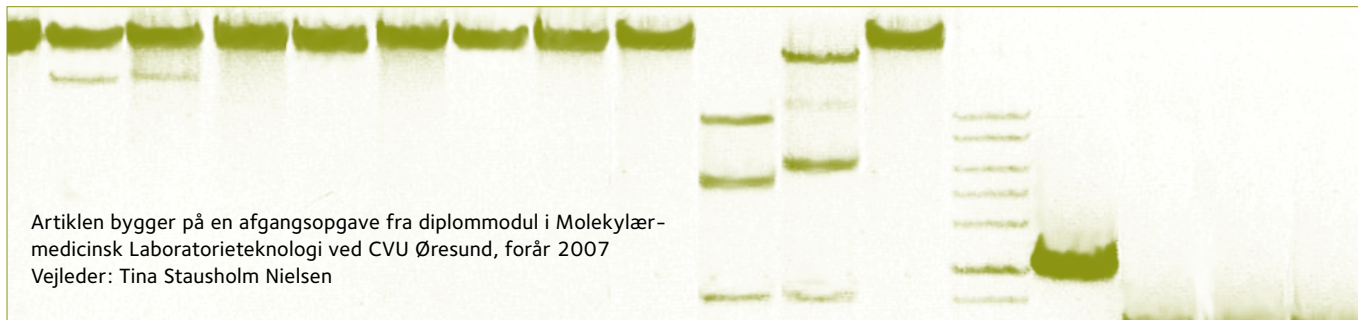
Den mest brugte metode til at undersøge DNA-kvaliteten er ratioen mellem

absorbanserne ved 260 nm og 280 nm² (fremover bruges betegnelsen A260/280 ratio). Dette kan, ligesom koncentrationsbestemmelsen, udføres i almindelig cuvette på et spektrofotometer eller på fx en Nanodrop.

En værdi på omkring 1,8 indikerer en god DNA-kvalitet. Hvis værdien afviger væsentligt fra denne værdi, kan det skyldes flere ting. En forhøjet værdi indikerer, at der findes rester af RNA (der ligesom DNA har absorbanstop ved 260 nm). En lavere værdi er en indikation på proteinkontaminering, altså forhøjet aminosyremængde i produktet, da aromatiske aminosyrer absorberes ved 280 nm². Foretages kvalitetsbestemmelsen på en Nanodrop eller et lignende apparat, fås ud over A260/280-ratioen også en kurve (se figur 1) og en A260/230-ratio. A260/230-ratioen er et udtryk for forholdet mellem DNA-absorbansen og absorbansen ved 230 nm, hvor salte, proteiner og opløsningsmidler⁸ absorberes.

Fragmentlængde

Størrelsen af DNA-fragmenter, altså længden af DNA stykkerne efter oprensningen, er en parameter, man anvender til at bedømme, om DNA er intakt². Fragmentstørrelsen bestemmes ved at lave en gelelektroforese. Ved elektroforesen vandrer DNA-fragmenterne afhængig af deres størrelse og ladning. En markør med kendt fragmentmønster medtages, således at en bestemmelse kan opnås. I mange tilfæl-



Artiklen bygger på en afgangsupgave fra diplommodul i Molekylær-
medicinsk Laboratorieteknologi ved CVU Øresund, forår 2007
Vejleder: Tina Stausholm Nielsen

de bruges en pulsed field gel elektroforese, hvor det elektriske felt ændrer retning kontinuerligt. Dette gør, at de store DNA-fragmenter bevæger sig lettere igennem gelen. En almindelig gelelektroforese med en 0,4 % agarosegel (som dog nemt bliver lidt geleagtig at arbejde med) kan også anvendes⁷. Som kvalitetsparameter er analyser mest velegnet til stikprøvekontrol og validering af såvel nyoprenset som lagret DNA. I mange tilfælde er man dog ikke interesseret i en nøjagtig fragmentlængde, men derimod om der er mange små DNA-fragmenter til stede. I sådanne tilfælde er det muligt at lave en gelelektroforese med en 1% agarosegel. Med denne hurtigere løsning holdes de større DNA-fragmenter tilbage, mens små fragmenter bevæger sig ud i gelen.

Kvalitet kan afgøre resultatet

Det er svært at udtale sig generelt om DNA-kvalitetens betydning for en analyse. Nogle analyser er usædvanligt hårdføre i den retning, mens andre kræver en højere kvalitet.

Ved en lav A260/280-ratio, som kan skyldes en øget proteinmængde i DNA, er der risiko for, at den øgede proteinmængde ændrer PCR's kinetik og effektivitet³. Ved hybridisering og rekombinant teknologi kræves også en meget høj DNA-renhed (A260/280 > 1,8)³.

I nogle tilfælde handler et manglende analyseresultat dog ikke udelukkende om DNA-kvaliteten. Efter oprensning af DNA kan der være rester (inhibitorer) tilbage, som influerer på fx PCR. Disse stoffer kan være rester fra oprensningsprocessen, fx salte, detergenter eller alkohol, men også hæmoglobin, lactoferrin og immunglobulin G (IgG) fra den oprensede prøve kan give problemer. Stofferne binder sig på DNA og/eller polymerasen og inhiberer PCR-reaktionen.

Håndtering af prøver og DNA

Selve oprensningen er dog ikke den

eneste faktor, som har indflydelse på DNA-kvaliteten. Kvaliteten afhænger også af udgangsmaterialet, altså hvordan prøvematerialet bliver behandlet før oprensningen, og hvordan det oprensede DNA opbevares.

Logistik og opbevaring

Opbevaringer af blodprøver fra prøvetagning til oprensning er en disciplin, som kan sætte den største logistik på en prøve. Det er nemlig slet ikke usædvanligt med decentral prøvetagning og efterfølgende forsendelse med postvæsenet eller transportfirma.

I artiklen 'DNA Extraction og Stability for Epidemiological studies'³ samler forfatterne egne og publicerede artiklers resultater mht. opbevaring af prøvemateriale. Oplysningerne sammenfattes til nogle korte retningslinjer:

- 1: Opbevaring og transport ved stuetemperatur er kun acceptabel i 24 timer.
- 2: Hvis prøverne er mere end 2 døgn undervejs, eller udendørstemperaturen er over 23° C anbefales transport ved 4° C.
- 3: Hvis oprensning finder sted inden for 8 døgn, bør prøverne opbevares ved 4° C.
- 4: Hvis oprensning finder sted senere end 8 døgn, bør lysering af erythrocytter (første trin af oprensningsprocessen - se faktaboks side 17) foretages.

Alle fire retningslinjer virker ganske fornuftige, men de er måske ikke altid lige nemme at efterleve.

Retningslinjerne efterlader ikke meget albuerum, når det kommer til transport, opbevaring og arbejdsplanlægning. Alttså logistikken i en biobank.

Håndtering har betydning for kvaliteten

I førnævnte artikel³ undersøger forfatterne også, hvilke konsekvenser det har for DNA-kvaliteten, når prøvematerialet

har været opbevaret på frost. I deres egne undersøgelser ser de ikke samme fald i DNA-udbytte pga. degradering som i andre publikationer. De finder derimod lavere A260/280-ratioer. Deres A260/280-ratioer er mellem 1,1 og 1,4, når fuldblodet har været frosset (-40° C, -80° C og -196° C) i en uge til en måned. Den øgede mængde protein i det oprensede DNA, som ratioerne er udtryk for, giver problemer ved nogle af de analyser, som man har valgt at teste over for. Der er dog ingen problemer ved PCR. Resultaterne er lidt overraskende, da man måske ville forvente, at en lysning af celler inden DNA-oprensning, ville hjælpe oprensningen lidt på vej og give bedre resultater.

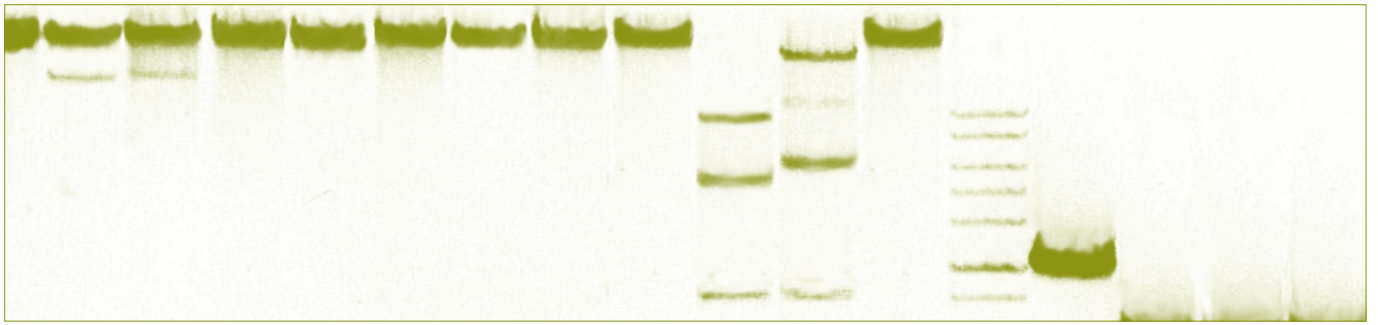
Forfatterne af artiklen er da også opmærksomme på problemet, da det ikke er muligt for dem at overholde retningslinjerne, i modsætning til fx den norske biobank¹, som har prioriteret logistikken meget højt. Deres konklusion er, at man må inkludere overvejelser om prøvehåndtering i selve valideringen af analyserne.

Det lyder jo alt sammen godt, men lidt modstridende i forbindelse med en biobank, hvor metoderne endnu ikke er klarlagte. Det ideelle ville selvfølgelig være at oprense på frisk fuldblod eller måske gemme forarbejdet fuldblod, hvilket giver de bedste resultater. Man kunne også overveje, om det netop var deres anvendte oprensningsmetode, som giver dårlige resultater, når udgangspunktet er frosne blodprøver.

Endelig er der også mulighed en low budget biobank med tørret blod på 'filterpapir'. Det er en nem og billig løsning, som imidlertid ikke giver mulighed for større mængder af DNA³, hvilket betyder, at man kan risikere at løbe tør for prøvemateriale.

DNA & opbevaringsmedier

Den væske, som man vælger til at gen-



>>> opløse DNA i, har også betydning for kvalitet og holdbarhed. Når det drejer sig om DNA, der skal bruges inden for kort tid, kan man sagtens genopløse (se faktaboks side 17) DNA i destilleret vand. Denne løsning anbefales dog generelt ikke, da pH kan svinge og forårsage en degradering af DNA. En Tris-buffer er anbefalet, da den stabiliserer pH og leverer ioner til at stabilisere bindingerne i DNA's struktur¹⁺²⁺³.

DNA & plastik

Når oprensningen af fuldblod er færdig, skal der findes et opbevaringsformat til det oprensede DNA. Mange faktorer indvirker på valget, og opbevaring af DNA i plastmateriale af typen polypropylene kan ikke anbefales, da der kan ske tab og denaturering af DNA under opbevaringen⁵. Fabrikanten er ikke altid villige til at informere om den nøjagtige sammensætning af deres plastvarer, og hvilken overfladebehandling de har brugt⁵. Selvom fabrikanten fortæller, at deres produkter er velegnede til opbevaring af DNA, er det en god ide at teste plastvarerne ved validering og leverandørskift.

Ud over problemet med plasttyper er der også et utal af systemer til opbevaring af DNA på markedet. En biobank kan sagtens drives med manuelle opbevaringssystemer, hvor bioanalytikere aliquoterer DNA ud i forskellige glas. Dette er dog noget af en arbejdsbelastning, og man indfører nogle ukendte variable mht. kontaminering og forbytning af prøver. En oplagt løsning er 96 (8*12 brønde) brønds mikrotiterplader, da mange automatiserede oprensningssystemer bruger dette format. Hvis man kører batch af analyser, kan formatet være ganske o.k. Man risikerer dog at kontaminere prøver og skade DNA ved gentagne optøninger¹.

Der eksisterer desuden løsninger, hvor det er muligt at arbejde i det robotventlige 96-format og samtidig fi-

ske individuelle prøver ud (vha. robot eller manuelt)¹.

DNA & opbevaringstemperatur

Valget af temperaturen til opbevaring af oprenset DNA afhænger af formålet med DNA-oprensningen, og af hvor længe man påtænker at opbevare det.

Opbevarer man DNA i buffer, kan det holde i op til 2 måneder ved stuetemperatur og op til 12 måneder i køleskab (4° C). Når temperaturen kommer under nul grader, er DNA beskyttet mod nucleasers påvirkning, og holdbarheden ser ud til at øges til mindst 10 år (-80° C). Erfaringerne med langtidsopbevaring af DNA, oprenset med moderne metoder, er af naturlige grunde begrænsede³. Enkelte anbefaler, at man ikke oprenser DNA, hvis primære formål er at indgå i en biobank, førend en større afprøvning har fundet sted³. Samme artikel fastslår, at opbevaring af uproceseret fuldblod går ud over kvaliteten. Lidt af et dilemma!

Nyere litteratur¹⁺² beretter dog om problemfri opbevaring af DNA ved såvel -20° C og -80° C. Anbefalinger³ om ikke at lægge alle æggene i en kurv, altså gemme DNA i forskellige aliquoter ved forskellige temperaturer, lyder dog ganske fornuftigt.

Fremtiden afgøres nu

Der er mange faktorer, som skal tages hensyn til, når DNA-biobankerne holder deres indtog inden for det danske sundhedsvæsen. Som beskrevet i artiklen, handler problematikken om meget andet end blot at tage en blodprøve, oprense DNA og nedfryse det. Det er afgørende for fremtidig forskning, at vi tager den hårde diskussion, som afklarer, hvad vi kan, skal og vil!

Såfremt forskerne og sygehusejerne beslutter sig til at satse på DNA-biobanker af den bedste kvalitet, kræver det tilførsel af store midler. Pengene skal bruges til udstyr (robotter, fryse-

anlæg, kvalitetssikringsudstyr, edb-systemer mv.), lokaler og ikke mindst en organisation med mennesker, som har de rette kompetencer. Det skal samtidig påpeges, at en satsning på biobanker med lidt dårligere DNA-kvalitet heller ikke er spor billig, men en ganske brugbar løsning i mange sammenhænge.

Et større arbejde med afprøvninger, beskrivelser og procedurer (SOPs) for prøvetagning, prøvebehandling, DNA-oprensning, DNA-opbevaring mv. venter forude. Det ville i den sammenhæng være naturligt at have ambitioner om at blive ISO-certificeret, i lighed med den norske biobank¹.

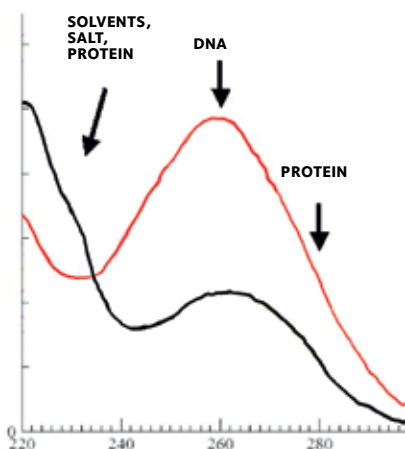
Med det store arbejde, som skal lægges i processen, kommer man let til at spekulere på, om man ikke kunne udnytte det kvalitetsmæssige arbejde i et bredere perspektiv. Kunne faciliteterne i en stor biobankorganisation bruges til at lave central prøvebehandling, så forskere kunne aflevere prøver, fra udlandet eller eksterne projekter, til biobanken og få DNA eller resultater retur? Ideen er spændende, men ikke uproblematisk. Ejerskabet til såvel resterende prøvemateriale, forskningsmidler, oprenset DNA og resultater er blot nogle af de varme emner, som skal afgøres, før tanken kan blive til virkelighed.

Endelig er det også vigtigt at tænke på de mennesker/patienter, som sætter deres DNA i banken. De giver deres samtykke til indskuddet, men hvordan sikrer man sig, at de også får udbytte af resultaterne. Vil man fx give dem adgang til resultater og tage behandlingsmæssige konsekvenser, hvis fremtidens forskning placerer dem i en risikogrube?

Der er nok at tage fat på, før banken åbner!

FIGUR 1:

Fotometrisk måling af RNA (og DNA)



Illustrationen (inspireret af kilde nummer 8), viser 2 absorbanskurver (Kurverne er ikke målfaste og der er ikke angivet A260/280 og A260/230-ratioer) og med pile er der markeret de bølgelængder, hvor salte, opløsningsmidler (solvents) og proteiner har en indflydelse på kurvernes forløb. Den røde kurve er meget tæt på idealkurven. Den har en meget flot top ved 260 nm og tilpas absorbans ved 230 og 260 nm. Den sorte kurve er derimod ikke pæn. Toppen ved 260 nm er ikke så udtalt, og der er en tydelig stigning i området ved 230 nm, hvilket tyder på et forhøjet indhold af fx proteiner, salt eller opløsningsmidler.

ORDFORKLARING:

Aliquote Portion eller udportionering

DNA DeoxyriboNucleic Acid

RNA RiboNucleic Acid

Polymerase Enzym som bruges i forbindelse med kopiering af DNA

SOP Standard Operating Procedure

PCR Polymerase Chain Reaction. Den teknik som bruges til replikation af DNA

kb kilobaser. Altså hvor mange tusinde baser DNA strengen er

Biobank En struktureret samling af menneskeligt biologisk materiale, der er tilgængeligt efter bestemte kriterier, og hvor oplysninger, der forbundet med det biologiske materiale, kan henføres til enkeltpersoner⁹.

BIOBANKER

I 2004 blev det besluttet at lave en stor biobank på Rigshospitalet. Den skal indeholde blod fra samtlige 45.000 patienter, som får taget blodprøver på Rigshospitalet på årsbasis. I første omgang planlægges en model, hvor blodprøver fra alle patienterne nedfryses. DNA vil så blive oprenset, når forskere/forskningsgrupper har behov for det. Der er endnu ikke en fastsat en startdato¹⁰.

Biobanker er ikke et nyt fænomen. I årevis har man indsamlet prøvemateriale i forbindelse med populations- og sygdomsundersøgelser. Herlev-Østerbroundersøgelsen og pku-registeret på SSI er nogle af de mest kendte, men der eksisterer mange større eller mindre biobanker rundt om i det danske sundhedsvæsen. Det nyskabende ved Rigshospitalets biobank er, at man nedfryser materiale fra alle indlagte patienter, uanset diagnose og sygdomshistorie. Dette giver nogle spændende perspektiver mht. optimering af patientbehandling, forskning og udvikling. Den tværgående forskning vil blive styrket, og specialer, der ikke er så forsknings-tunge, vil også kunne drage stor fordel af den.

Biobankerne reguleres af persondataloven, lov om patienters rettigheder, lov om videnskabetisk komite og af centralstyrelsesloven. I 2003 oprettede Sundhedsstyrelsen vævsanvendelsesregisteret. Her kan patienter lade sig registrere og angive, at eget væv (blodprøver, vævsprøver, celleskrab og opfor-meret DNA) ikke må anvendes til andet end behandling af patienten selv. Vævet må dog godt bruges til kvalitetssikring og undervisning⁹.

DNA-OPRENSNING

Der eksisterer utallige metoder til DNA oprensning fra fuldblod, både kommercielle kits og hjemmelavede metoder. Traditionelt kan de klassificeres i fire traditionelle kategorier, alt efter hvad der anvendes for at binde/udfælde DNA:

- i: Enzym
- ii: Enzym og organiske opløsningsmidler
- iii: Opløsningsmidler
- iv: Fast fase (Resin, Affinity geler, silica)
Uanset hvilken kategori den anvendte metode hører til, består oprensningen af 5 trin:
 - 1: Isolation af leukocytter eller lyse af erythrocytter (detergenter, salte)
 - 2: Lyse af cellekerner (sodium dodecyl sulfat (SDS), proteinase K)
 - 3: Deproteinisering (DNA fældes vha. phenol, kloroform eller udsaltning)
 - 4: Rensning af DNA (ethanol)
 - 5: Genopløsning af DNA

LITTERATURHENVISNINGER

- 1: Ronningen KS, Paltiel L, Meltzer HM, Nordhagen R, Lie KK, Hovengen R, Haugen M, Nystad W, Magnus P, Hoppin JA: The biobank of the Norwegian Mother and Child Cohort Study: a resource for the next 100 years. *Eur J Epidemiol.* 2006;21(8):619-25.
- 2: Santella RM: Approaches to DNA/RNA Extraction and whole genome amplification. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006 Sep;15(9):1585-7.
- 3: Visvikis S, Schlenck A, Maurice M: DNA extraction and stability for epidemiological studies. *Clin Chem Lab Med.* 1998;36:551-5.
- 4: Bessetti J: PCR inhibition – an introduction to PCR inhibitors. Profiles in DNA, Promega corporation. 2007 Mar.
- 5: Gaillard C, Strausse F: Eliminating DNA loss and denaturation during storage in plastic microtubes, *American Clinical Laboratory.* 2001 Mar: 52-4.
- 6: Foredrag af Mylène Deschênes, P3G, fra P3G conference juni 2006 <http://www.p3gconsortium.org/events/dna2006/deschenes/> (set og hørt 15.05.2007)
- 7: Produktspecifikation DNA markør <http://www.neb.com/nebecomm/products/productN3019.asp> (set 15.05.2007)
- 8: RNA quality control http://www.flychip.org.uk/protocols/gene_expression/rna_qc.php (set 15.05.2007)
- 9: Tema: Kongres i klinisk kemi, Danske Bioanalytikere, juni 2006 <http://www.dbio.dk/forside/fagbladet/tidligere-numre/aargang-2006/> (set 14.08.2007)
- 10: Overlæge Henrik Ullum, ph.d., Rigshospitalets Blodbank