

RNA-kvalitet i vevsprøver

Av **ARSALAN MOGHEN**, bioingeniør, MSc¹ og **JOSTEIN HALGUNSET**, overlege², førsteamanuensis³
E-post: arsalan.moghen@stolav.no

1. Avdeling for medisinsk mikrobiologi, St. Olavs Hospital Trondheim.
2. Avdeling for patologi og medisinsk genetikk, St. Olavs Hospital Trondheim.
3. Institutt for laboratoriemedisin, barne- og kvinnesykdommer, Det medisinske fakultet NTNU.

FOR Å KUNNE forebygge og behandle sykdommer effektivt, både hos mennesker og dyr, trenger vi bedre forståelse av ulike faktorerens betydning for sykdomsutviklingen. Vi må ha mer kunnskap om den rolle arv og miljø spiller, og ikke minst om samspillet og vekselvirkningen mellom disse. Mange forskere forsøker å finne svar på slike spørsmål ved å studere DNA, RNA og proteiner i prøver av blod, vev og annet materiale både fra pasienter og fra friske individer.

Interessen for RNA har økt betydelig de senere årene. Messenger RNA (mRNA) er den direkte forbindelsen mellom genene som koder for et protein og de proteinene som lages etter denne koden. Innen moderne kreftforskning undersøkes mRNA-mønstret i kreftcellene, for å kartlegge ekspresjonen av ulike gener og deres funksjon (1), noe man antar kan avsløre nye sider ved sykdommens biologi. Man håper at RNA kan få betydning som biomarkør for ulike typer kreft og at undersøkelser av RNA-profil i biologiske prøver kan bidra til tidligere diagnose og redusert dødelighet (2). Det er også stor interesse for om RNA kan benyttes som utgangspunkt for å utvikle nye typer medikamenter (3).

Samtidig som interessen for RNA øker, blir utfordringene med å håndtere RNA på laboratoriene mer synlige. Straks biologisk materiale separeres fra et levende organ, starter degradering av RNA. Prosessen er avhengig av nukleaser med RNase-aktivitet (4). Potensielle kilder til RNaser i laboratoriet kan være mikro-

organismer i luften, på ulike overflater, i løsninger og vannforsyning, til og med på pipettespiser og i reaksjonsrør. Hud og kroppsvæsker, for eksempel spytt, er andre kilder til kontaminering med RNaser. I laboratorier hvor man dyrker bakteriestammer for plasmid-preparering eller kloning, og ved arbeid med andre bakterielle produkter som restriksjonsenzymmer, er det stor risiko for kontaminering med RNaser. Ved spesielle metoder der man bruker RNaser, for eksempel «nuclease protection assays», er risikoen for kontaminering særlig stor (5).

Nedkortet prøvetakingstid, effektive transportmetoder, optimaliserte ekstraheringsprosedyrer og systematisk kvalitetskontroll, er viktige elementer i biobankvirksomhet i sin alminnelighet, og spesielt i håndteringen av RNA. Siden det ikke finnes noen allment akseptert standardmetode, varierer framgangsmåten mye mellom forskjellige laboratorier. Ettersom mange faktorer kan ha betydning for RNA-integriteten, vil ulikheter i prosedyrer føre til forskjeller i nivå av RNA-ekspresjon i ulike laboratorier, noe som kan påvirke resultatet av genekspresjonsstudier (6). Optimalisering og standardisering av metodene blir derfor spesielt viktig for å kunne stole på resultater av genuttryksprofilering, og for å kunne sammenholde resultater fra ulike sentra.

Målet med denne studien var å undersøke hvordan innsamlings- og lagringsmetoden påvirker RNA-kvaliteten i vevsmateriale, samt å undersøke betydningen

Sammendrag

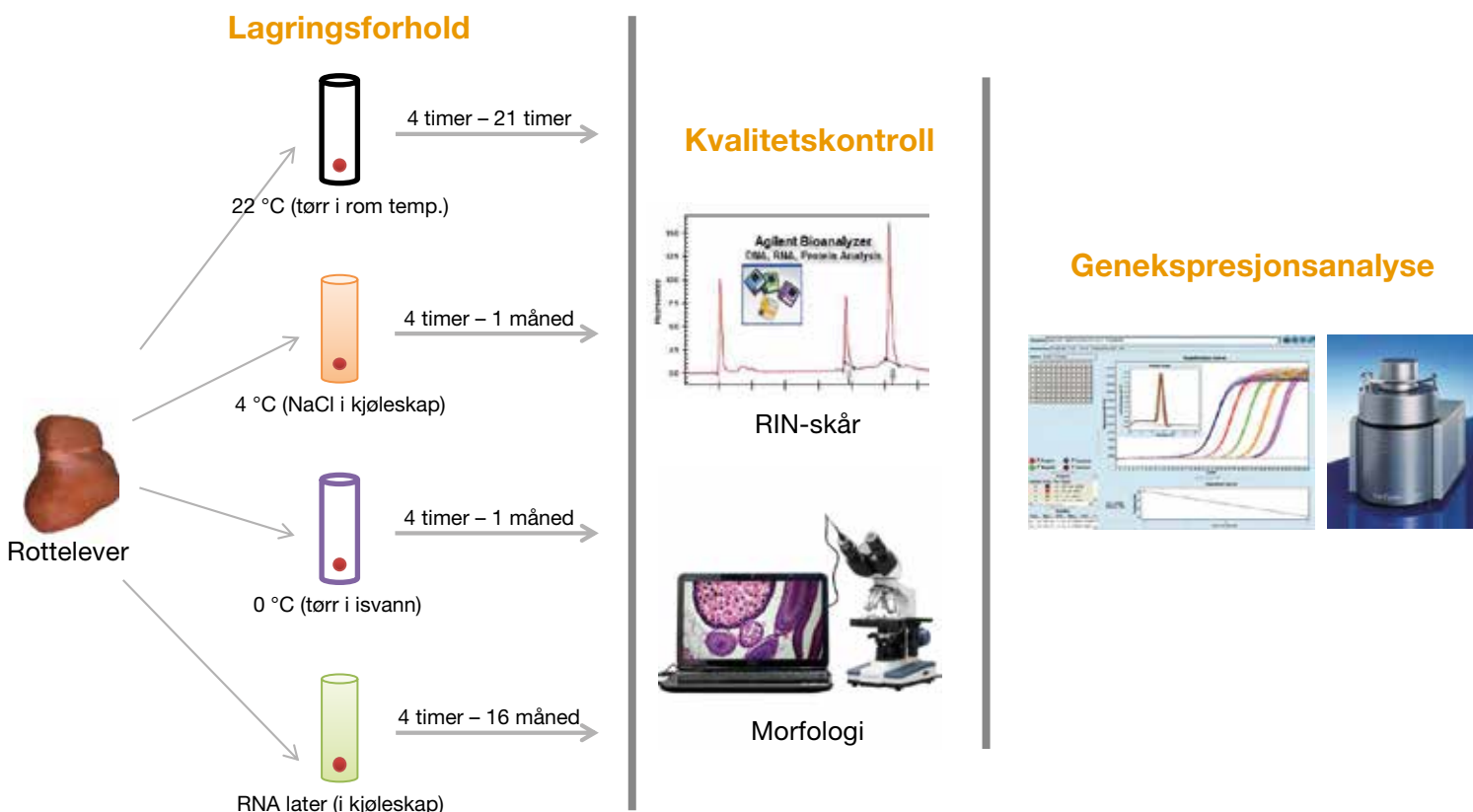
En utfordring innen biobankvirksomhet er å finne fram til prosedyrer som bevarer RNA mest mulig intakt, noe som betinger optimal behandling av materialet gjennom de forskjellige trinnene fra prøvetaking via lagring til analysering. I denne studien ble kapillærelektroforese brukt til å vurdere RNA-kvalitet (uttrykt som RIN-skår), og mikroskopi brukt til å vurdere morfologisk integritet, i vevsprøver som var lagret i inntil 16 måneder under ulike betingelser: Ved 22 °C (romtemperatur), ved 4 °C (kjøleskap), ved 0 °C (på isvann) og i preserveringsmiddelet RNA later (4 °C). Mengden transkript av de fire genene *GAPDH*, *HPRT*, *β-actin* og *Agxt* ble målt med sanntids-PCR.

RNA-kvaliteten viste som forventet markert fall med økende lagringstid, med temperaturavhengig hastighet. Med lavere RIN-skår ble mengden påvisbart transkript redusert, uttrykt ved økende CT-verdi. Samtidig økte usikkerheten, idet variasjonen i CT-verdi mellom parallele prøver ble større. Synlig disintegrering av vevsarkitektur fulgte fallende RIN-skår.

Resultatene indikerer at ekstrahert RNA med RIN-skår > 5, kan brukes ved analyser av genuttrykk i vevsprøver, og at man derfor bør velge lagringsmetode og -temperatur avhengig av hvor lenge materialet trenger å oppbevares, da kostnaden ved lagring øker med lavere temperatur.

Nøkkelord: Biobanking, Genekspresjon, RNA-kvalitet, RIN-skår, Bioanalyser

■ Bioingeniøren er godkjent som vitenskapelig tidsskrift. Denne artikkelen er fagfellevurdert og godkjent etter Bioingeniørens retningslinjer.



FIGUR 1. Skjematisk framstilling som viser de forskjellige lagringsbetingelsene, og videre analyse av uttatt vevsmateriale.

av RNA-kvaliteten for analyser som sanntids-PCR. Slik kunnskap vil være nyttig for forskning på RNA, og gi et grunnlag for optimalisering av prosedyrer for innsamling av prøvemateriale som senere kan benyttes til RNA-analyser. I studien undersøkte vi oppbevaring ved tre forskjellige temperaturer, samt oppbevaring i et preserveringsmiddel som skal bevare RNA.

Materiale og metode

Leverprøver fra rotter

Det ble samlet leverprøver fra 11 friske unge hannrotter av stamme Wistar. Lov om dyrevelferd og etiske retningslinjer ble fulgt.

Forsøksdyrene ble anestesert ved subkutan injeksjon av 4 ml «haldol-miks» (2 ml haldol, 3 ml fentanyl, 3 ml midazolam og 4 ml sterilt vann), og deretter barbert på buken for å unngå forurensning av hår og andre substanser. Etter at bukveggen var åpnet, ble leveren tatt ut og delt i skiver med størrelse cirka 1 x 3 x 20 mm ved hjelp av en spesialdesignet kniv. Materialet ble overført til sterile plastrør for lagring av vev ved tre forskjellige temperaturbetingelser; 22 °C (tørr i romtemperatur), 4 °C (0,9 % NaCl i kjøleskap), 0 °C (tørr på isvann) og ved 4 °C i preserveringsmiddelet RNA later (Qiagen, Tyskland) (figur 1).

I tillegg ble noen vevsskiver plassert på en plastfolie og umiddelbart nedfrost mellom to metallplater som var avkjølt til -196 °C med flytende nitrogen, og deretter flyttet over i mekanisk ultrafryser for videre oppbevaring ved -80 °C. Disse prøvene ble brukt som referansemateriale (7).

Abstract

RNA quality in tissue samples

A challenge in biobanking is identifying procedures that preserve RNA as intact as possible, which implies optimal treatment of the material through the various stages of sampling, storage and analysis. In this study, capillary electrophoresis was used to assess RNA quality (expressed as RIN score), and microscopy used to assess the morphological integrity of tissue samples that were stored for up to 16 months under various conditions: at 22 °C (room temperature), at 4 °C (refrigerator) and 0 °C (in ice water) and in the storage reagent RNA later (4 °C). The amount of transcripts of the four genes *GAPDH*, *HPRT*, *β-actin* and *Agxt* was measured by real-time PCR.

As expected, the RNA quality showed a pronounced decline with increasing storage time, in a temperature-dependent manner. With lower RIN scores, the amount of detectable transcripts decreased, as expressed by increasing CT values. At the same time, the uncertainty increased as the variation in CT values between parallel samples increased. Visible disintegration of tissue architecture accompanied falling RIN scores accordingly.

The results indicate that extracted RNA with RIN score > 5 may be used for analysis of gene expression in tissue samples, and one should therefore select the storage method and temperature depending on how long the material needs to be stored, since the cost of storage increases with lower temperature.

Key words: Biobanking, Gene expression, RNA quality, RIN score, Bioanalyzer

RNA ekstraksjon

RNA ble isolert med High Pure RNA Tissue Kit (Roche, Tyskland) i henhold til brukermanualen. Fragmenter av vevsskiver ble veid og 30 mg ble overført til rør med keramiske kuler tilsatt 700 μ l lysering/bindingsbuffer med guanidin tiocyanat. Vevsmaterialet ble så homogenisert i MagNA lyser (Roche, Tyskland) ved 3075 g i 50 sekunder. Løsningen ble deretter oppbevart ved romtemperatur i 30 minutter, før 350 μ l av supernatanten ble pipettert over i et sterilt Eppendorfrør. Til slutt ble 50 μ l rensed RNA-løsning frigjort fra glassfiber-filteret ved å tilsette en buffer med lav saltkonsentrasjon. Fra hver prøve ble det produsert tre ekstrakter. Konsentrasjon og renhet av ekstrahert RNA ble målt i et ND-1000 spektrofotometer (Thermo Scientific, USA) med absorbansavlesning ved 230, 260 og 280 nm.

Måling av RNA-integritet

RNA-integritet ble bestemt med kapillærelektroforese ved hjelp av Agilent 2100 Bioanalyser med Agilent RNA 6000 Kit (Agilent Technologies, USA). I instrumentet blir RNA-fragmenter separert etter størrelse, og et mål på RNA-integritet blir beregnet ved hjelp av programvaren «RNA Integrity Number» (RIN-skår). Det beregnes et tall fra 1-10, hvor 10 representerer intakt RNA og 1 indikerer totalt degradert RNA.

Morfologi

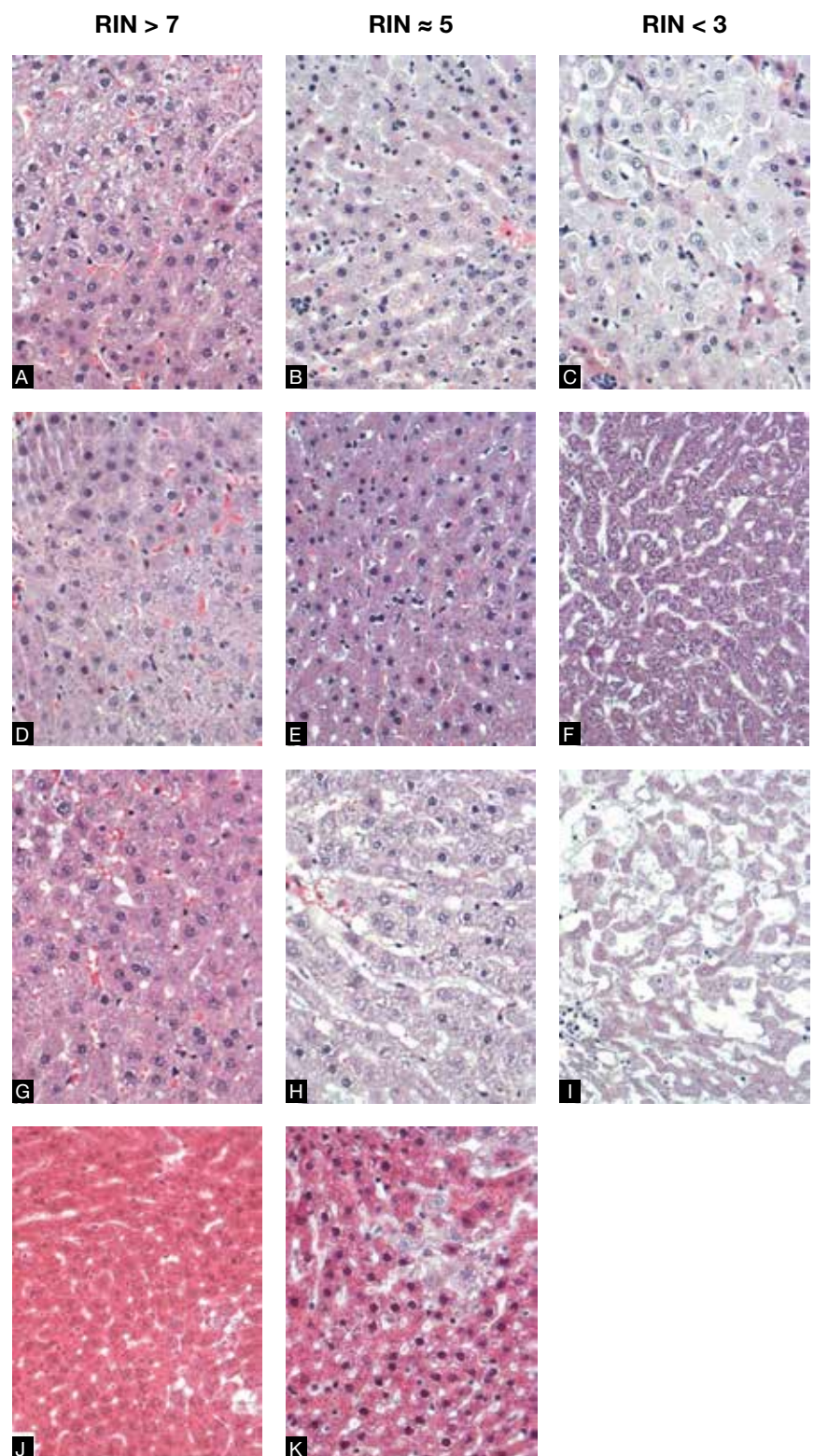
For å vurdere hvordan lagring påvirket vevsmorfologien, ble prøver til lysmikroskopi tatt på ulike tidspunkt fra vevsbiter som var lagret under forskjellige betingelser:

- 22 °C etter fire, 12 og 21 timer.
- 4 °C etter fire timer, tre dager og én måned.
- 0 °C etter fire timer, ni dager og én måned.
- RNA later etter fire timer og fem måneder.

Prøvene til mikroskopi ble fiksert i 4 % bufret formaldehydopløsning og innstøpt i parafinvoks. Fra parafinblokkene ble det skåret tynne snitt (ca 4-8 μ m) som ble lagt på objektglass og farget med hematoxylin-eosin-safran (HES). Preparatene ble deretter vurdert lysmikroskopisk med «Nikon Eclipse 80i» mikroskop.

cDNA-syntese

Komplementær DNA ble syntetisert ved hjelp av Transcriptor First Strand cDNA syntesis Kit (Roche, Germany) i henhold til brukermanualen. En reaksjonsblanding bestå-



FIGUR 2. Mikroskopfotografi (100X) av vevssnitt av rottelever med RIN-skår på henholdsvis over 7, rundt 5 og under 3. 22 °C i (A) fire timer, (B) 12 timer og (C) 21 timer 4 °C i (D) fire timer, (E) tre dager og (F) én måned 0 °C i (G) fire timer, (H) ni dager og (I) én måned RNA later – i (J) fire timer og (K) fem måneder. Det ble ikke laget vevssnitt etter 16 måneder på grunn av lite gjenværende materiale.

ende av total-RNA (1 µg), «Anchored Oligo dT-primer» (2,5 µM) og destillert vann (dH₂O) ble varmebehandlet i 10 minutter ved 65 °C i en varmeblokk.

Deretter ble «Reactions buffer 5 x cons.» (8 mM MgCl₂), «Protector RNase Inhibitor» (40 U/µl), «Deoxynucleotide Mix» (1 mM) og «Transcriptor Reverse Transcriptase» (20 U/µl) tilsatt. cDNA-syntesen ble satt i gang ved å sette reaksjonsrøret i en varmeblokk ved 55 °C i 30 minutter. Reaksjonen ble stoppet ved å øke temperaturen til 85 °C i 15 minutter og deretter sette reaksjonsrøret på isblokk.

Sanntids-PCR

For å sammenligne de ulike RNA-ekstraktene ble mengden av tre husholdningsgener (*GADPH*, *β-actin*, og *HPRT*) undersøkt i prøvene med sanntids-PCR. Dette er gener som generelt anses å være nokså konstant uttrykt, upåvirket av eksperimentelle forhold, og de blir ofte brukt ved studier som en intern standard ved kvantitativ-PCR (8). I tillegg til disse tre husholdningsgenene, ble også mengden mRNA fra et leverspesifikt gen (*Agxt*) målt. PCR ble utført med 2 µl cDNA-løsning, primere (10 pmol/µl) (tabell 1) (TIM MOLBIL, Germany) og 18 µl Light Cycler FastStart DNA master^{PLUS} Hyb-Probe kit mastermix (Roche, Germany) med LightCycler 2,0 (Roche, Germany). Det ble kjørt en initial denaturering; 95 °C i 10 minutter, og videre 40 sykluser med følgende betingelser: 95 °C i 15 sekunder, 59 °C i 20 sekunder og 72 °C i 30 sekunder. PCR ble gjort på alle de tre ekstraktene fra hver prøve, og for hvert ekstrakt ble reaksjonen gjort i tre replikater.

Hvert oppsett inneholdt en negativ kontrollprøve (kun reaksjonsmiks), en referanseprøve (materiale som var nedfrost umiddelbart i flytende nitrogen (-196 °C) og videre oppbevart ved -80 °C), og materiale fra tre forskjellige lagringstider.

Resultater

RIN-skår

RIN-skår i RNA-ekstrakt fra vev som var lagret under ulike betingelser er presentert i tabell 2. Resultatene viser at RIN-skår reduseres til under 7 etter 12 timer når

TABELL 2. RIN-skår for RNA-ekstrakt fra rottelever som var oppbevart ved ulike betingelser og varighet. Hvert tall representerer gjennomsnittsverdien for tre ulike ekstrakter. Grønn indikerer høy kvalitet (RIN-skår 7-10), gul indikerer noe degradert RNA (RIN-skår 5-7) og rød indikerer at RNA er degradert (RIN-skår < 5). I ruter hvor det mangler tall, er det ikke utført måling.

Lagringsforhold	4	8	12	16	21	3	5	7	9	12	15	18	21	1	5	16
	Timer					Dager								Måneder		
22 °C	7,1	7,0	6,2	6,0	3,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4 °C	8,8	8,9	-	-	6,9	5,0	-	4,9	4,3	4,3	3,9	2,2	2,4	2,3	-	-
0 °C	9,1	9,0	-	-	8,0	8,8	7,6	7,3	6,2	5,5	3,7	2,6	2,3	2,2	-	-
RNA later	9,0	8,9	-	-	7,1	-	-	-	-	-	-	-	-	7,6	5,9	2,4

TABELL 1. Primer-sekvenser som ble brukt ved sanntids-PCR for å måle mengden transkript av fire utvalgte gener.

Gen	Primer-sekvens
<i>HPRT</i>	Primer 1: GTTGATACAGGCCAGACTTTGT Primer 2: CCACAGGACTAGAACGTCTGC
<i>GAPDH</i>	Primer 1: CTCCCTCAAGATTGTCAGCAA Primer 2: GTCAGATCCACAACGGATACATT
<i>β-actin</i>	Primer 1: ACCCACAAGTGTGCCCATCTA Primer 2: GCCACAGGATTCCATACCCA
<i>Agxt</i>	Primer 1: GGGCAAGACCAGAGTAATTCATCATA Primer 2: TGCTCAGCTTATACTGCCTGAGG

vevet lagres ved 22 °C, etter tre dager ved 4 °C, etter ni dager ved 0 °C og etter fem måneder ved oppbevaring i RNA later. Ekstrahert RNA fra referansemateriale som var lagret ved -80 °C i 9, 11, 14 og 17 måneder, viste henholdsvis 8,8; 8,2; 9,2; og 8,2 i RIN-skår.

Morfologi

Snitt fra vev oppbevart under forskjellige lagringsforhold ble vurdert med lysmikroskopi (figur 2). Figuren viser typisk utseende på snitt fra materiale med RIN-skår over 7, rundt 5 og under 3, ved de forskjellige lagringsbetingelsene. Man ser tydelige forandringer i vevets struktur, parallelt med utviklingen i RIN-skår. Det observeres redusert antall cellekjerener og mer oppløst cytoplasma med økende tid. Den ekstracellulære avstanden mellom cellene (hvit farge), øker etter lengre tids lagring.

Sanntids-PCR

Prøver med tre forskjellige lagringsbetingelser og ulike lagringstider ble analysert med sanntids-PCR. Det ble valgt ut lagringstider som representerer henholdsvis RIN-skår over 7, RIN-skår rundt 5 og RIN-skår under 3 (tabell 2):

- 4 °C etter fire timer, tre og 18 dager
- 0 °C etter fire timer, ni og 21 dager
- RNA later etter fire timer, fem og 16 måneder

Amplifikasjonskurvene for sanntids-PCR-analyse viser identiske mønstre for alle de fire utvalgte genene (figur 3). Resultatene viser at det er en forskjell på cirka 2 til 3 CT-verdier mellom den første og den andre amplifikasjonskurven, som tilsvarer RIN-skår > 7 og RIN-skår ≈ 5. Forskjellen mellom den andre og den tredje amplifikasjonskurven, som tilsvarer RIN-skår ≈ 5 og RIN-skår < 3, varierer fra ingen til 5 CT-verdier (figur 3). Amplifikasjonskurven for referanseprøven (materiale som var nedfrost umiddelbart i flytende nitrogen (-196 °C) og videre oppbevart ved -80 °C) var cirka 2 til 3 CT-verdier lavere enn for de tre forskjellige lagringstidene (resultat ikke vist).

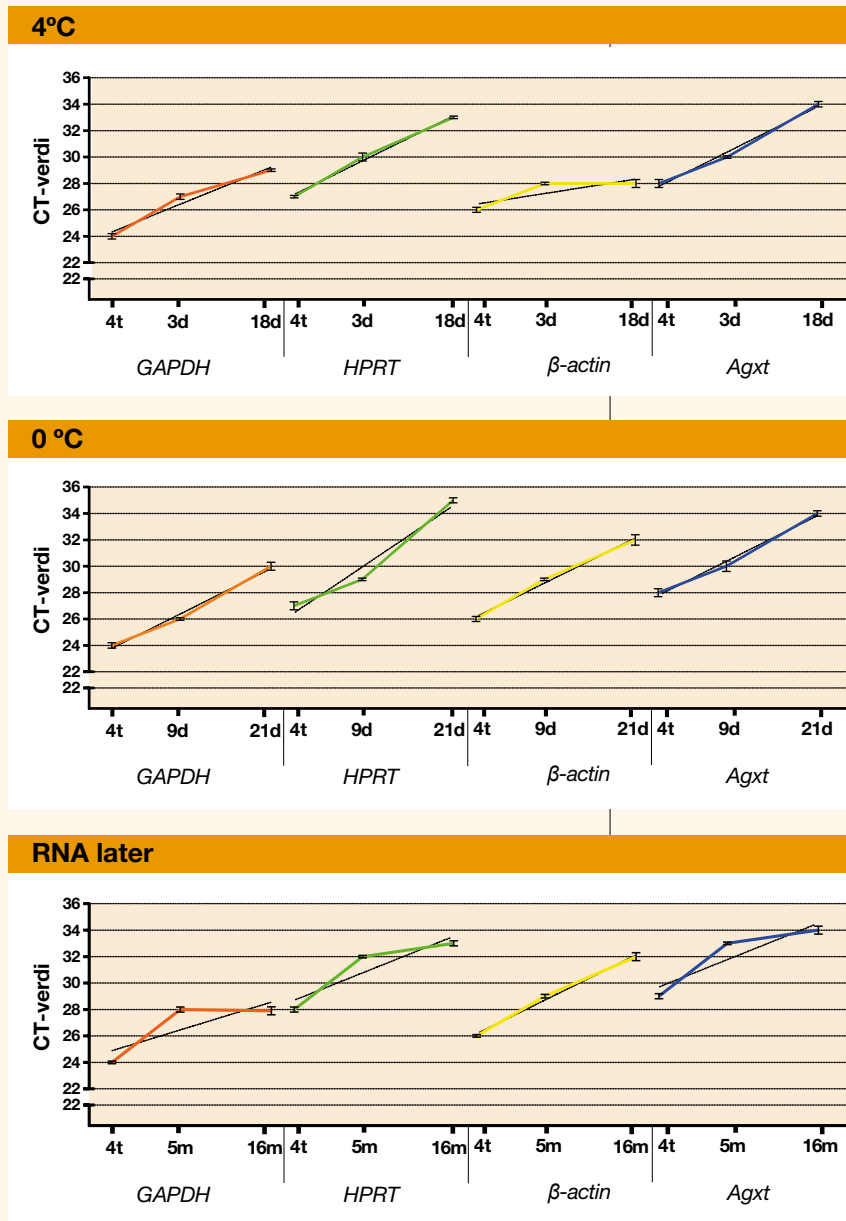
Diskusjon

RIN-skår

RIN-skår blir ofte brukt som en pålitelig og informativ, standardisert metode for evaluering av RNA-kvalitet i forbindelse med genekspressjonsanalyser (9). For å undersøke omfanget av RNA-degradering i vev som var lagret under forskjellige forhold, ble en vevsbit valgt til RNA-ekstraksjon, og ekstraktet ble analysert med hensyn på RIN-skår. Vev lagret ved 22 °C ble undersøkt for kvalitet nesten hver fjerde time. Resultatene viser at RIN-skår faller under 7 i løpet av 12 timers lagring, men at RIN-skår fortsatt holder seg rundt 6 i inntil 16 timer. Våre funn bekrefter resultatene fra en lignende studie utført av Botling og Micke (10). Først etter 21 timers lagring ved romtemperatur ble RIN-skår beregnet til 3. Det som er bemerkelsesverdig med våre resultater er den betydelige reduksjonen av RIN-skår i tidsrommet fra 16 til 21 timer, med et fall fra 6 til 3. Dette er i motsetning til de første 16 timene, da man ser en mer gradvis utvikling. Observasjonen kan tyde på at RNA-degraderingen i vev lagret ved romtemperatur eskalerer etter en viss tid. I motsetning til dette viser kvaliteten av RNA i vev lagret ved 4 °C og 0 °C en jevn reduksjon gjennom hele lagringsperioden. Etter tre dager ved 4 °C er RIN-skår under 5, mens en slik verdi ikke opptrer før etter 12 dager ved 0 °C. Vev lagret på RNA later viser fortsatt en RIN-skår over 7 etter én måned, og først etter fem måneder måles RIN-skår rundt 6. Det ble bare gjort én måling etter dette tidspunktet på grunn av begrenset gjenværende vevsmateriale. Etter 16 måneder er RIN-skår 2,4, og det er derfor vanskelig å anslå presist når RIN-skår falt under 5. For videre arbeid ble det plukket ut materiale fra hver av lagringsbetingelsene, tilsvarende RIN-skår over 7, rundt 5 og under 3, for undersøkelse av morfologi og sanntids-PCR.

RIN-skår og morfologi

De observerte forandringene i morfologi følger fallet i RIN-skår, slik at ved RIN-skår > 7 observerte vi hovedsakelig normal struktur (figur 2A, 2D, 2G, 2J), mens tydelige strukturforandringer kom fram ved RIN-skår ≈ 5 (figur 2B, 2E, 2H, 2K). Dette gjelder ved alle lagringsbetingelser. Vi fant omtrent tilsvarende struktu-



FIGUR 3. Resultater av sanntids-PCR fra vev (rottelever) som var oppbevart ved 4°C, 0°C og i RNA later (4°C). Mengden transkript for fire gener (GAPDH, HPRT, beta-actin, Agxt) er målt ved sanntids-PCR ved tre utvalgte tidspunkt som tilsvarer RIN-skår > 7, RIN-skår ≈ 5 og RIN-skår < 3. Tre tekniske paralleller er satt opp for hver lagringstid og standardavvik er vist i grafen. Data presentert i figuren er fra et representativt eksperiment.

— GAPDH
— HPRT
— beta-actin
— Agxt

relle forandringer i vev oppbevart ved 22 °C i 12 timer, oppbevart ved 4 °C i tre dager, ved 0 °C i én måned og i RNA-later etter fem måneder. Alle disse prøvene hadde en RIN-skår på omtrent 5. Det tyder på at de prosessene som fører til degradering av RNA pågår parallelt

med prosessene som fører til morfologiske strukturforandringer i vevet. Dette ser ut til å gjelde for alle lagringsbetingelser. For å kunne fastslå dette med større sikkerhet er det imidlertid nødvendig med mer omfattende undersøkelser.

Det er antatt at DNA og proteiner er mer stabile og robuste for degradering enn RNA. Ut fra dette kunne man forvente at strukturen i kjerne og cytoplasma skulle ha vist mindre endringer enn de man ser i RNA, men i prøver med lav RIN-skår ser vi en nesten total forandring av hele strukturen, noe som tyder på at proteolytiske og andre enzymer bryter ned også DNA og proteiner, samtidig som RNA degraderes. Det kunne derfor ha vært interessant å ekstrahere DNA og proteiner i tillegg til RNA, for å komplettere bildet av degraderingsprosessene.

Betydning av RNA-kvalitet for resultatene av sanntid-PCR
Mønsteret på amplifikasjonskurvene fra sanntid-PCR var nesten identiske for alle de fire utvalgte genene. Med lavere RIN-skår ble mengden påvisbart transkript redusert. Dette er uttrykt ved økende CT-verdi. Det var 2-3 CT-verdier forskjell for den første og andre amplifikasjonskurven (tilsvarende RIN-skår > 7 og RIN-skår ≈ 5). Mellom den andre og tredje amplifikasjonskurven (RIN-skår ≈ 5 og RIN-skår < 3) observerte man større variasjon, fra ingen til en forskjell på 5 CT-verdier. Dette tyder på at RNA med dårlig kvalitet (RIN skår < 5) vil gi mer usikre og variable resultater i genekspressionsanalyser.

Resultatene fra analysen av RIN-skår og amplifikasjonskurvene fra PCR, viste godt samsvar, slik at ved høyere RIN-skår fikk man en lavere CT-verdi og motsatt. Det samme ble observert for de tre lagringsbetingelsene som ble undersøkt, dvs. 4 °C, 0 °C og i RNA later. Det kan tolkes som at RNA med RIN-skår > 5, kan gi meningsfulle resultater ved genekspressionsanalyser, og prøver helt ned mot RIN-skår 3 kan benyttes. Men selv om man kan gjennomføre teknisk vellykkede analyser, vil resultatet være beheftet med større usikkerhet, siden lavere RNA-kvalitet fører til større variasjon mellom parallellene. Dette betyr i praksis at hvis man gjentok forsøket på nytt, ville man risikere å få avvikende resultater sammenliknet med forrige forsøk. Et større antall biologiske paralleller kan kompensere for dette, men generelt gjelder at dersom man er nødt til å utføre analyser på RNA med dårlig kvalitet, bør man tolke resultatene med forsiktighet.

Funnene korrelerer godt med at degradering av RNA skjer ved en prosess som innebærer hydrolyse av tilfeldige fosfodiesterbindinger i tilfeldige mRNA. Man vil da få en blanding av degraderte mRNA, med en kontinuerlig fordeling av korte og lange fragmenter, og med en gradvis forskyving i fordelingen mot kortere fragmenter. En andel av fragmentene vil da få brudd i området mellom primerne, og disse vil dermed ikke formeres eksponentielt i PCR reaksjonen.

Konklusjon

Resultatene viser at man for et gitt formål bør velge lagringsmetode avhengig av hvilket materiale som analyseres og hvor lenge det skal lagres. Om innsamlingen av materialet strekker seg over flere år, er det nødvendig å bruke svært lav temperatur for å sikre god kvalitet. Dette kan oppnås ved å lagre materialet ved -196 °C i dampfasen over flytende nitrogen, eller ved -80 °C i mekanisk fryser. For prosjekter som skal gjennomføres i løpet av korte tidsrom, kan man vurdere å bruke alternative lagringsmetoder med høyere temperatur som 0 °C, 4 °C eller til og med 22 °C. Resultatene fra denne studien viser hvordan lavere temperatur fører til forsinkelse av RNA-degraderingen.

Man bør på forhånd foreta en vurdering av økonomiske konsekvenser av temperaturvalg innenfor den totale prosjektøkonomien. RNA later er et utmerket og kostnadseffektivt middel for å øke holdbarheten på prøvematerialet, hvis det kun skal brukes til analyse av RNA.

I biobanksammenheng bør man tenke langt framover. Vi må forvente nye oppdagelser og etablering av nye metoder, så det er alltid usikkert hva det oppsamlede materialet i en biobank kan tenkes brukt til i framtiden og hvordan dette best kan skje. Derfor er det viktig at biobanker arbeider kontinuerlig for å bevare kvaliteten på det materialet som lagres. ■

Referanser

- Jiang H, Teng R, Wang Q, Zhang X, Wang H, Wang Z et al. Transcriptional analysis of estrogen receptor alpha variant mRNAs in colorectal cancers and their matched normal colorectal tissues. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2008;112(1-3):20-4.
- Li Y, St John MA, Zhou X, Kim Y, Sinha U, Jordan RC et al. Salivary transcriptome diagnostics for oral cancer detection. *Clin Cancer Res.* 2004;10:8442-50.
- Sullenger A, Gilboa E. Emerging clinical applications of RNA. *Nature.* 2002;418: 252-8.
- Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW. Quantitative real-time RT-PCR-a perspective. *J Mol Endocrinol.* 2005;34(3):597-601.
- Wilson IG. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl Environ Microbiol.* 1997;63(10):3741-51.
- Fleige S, Pfaffl MW. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol Aspects Med.* 2006;27(2-3):126-39.
- Bertilsson H, Angelsen A, Viset T, Skogseth H, Tessen MB, Halgunset J. A new method to provide a fresh frozen prostate slice suitable for gene expression study and MR spectroscopy. *The Prostate.* 2011;71:461-9.
- Lee PD, Sladek R, Greenwood CM, Hudson TJ. Control genes and variability: absence of ubiquitous reference transcripts in diverse mammalian expression studies. *Genome Res.* 2002;12:292-7.
- Copois V, Bibeau F, Bascoul-Mollevis C, Salvétat N, Chalbos P, Bareil C et al. *J Biotechnol.* 2007;127(4):549-59.
- Botling J, Micke P. Biobanking of fresh frozen tissue from clinical surgical specimens: transport logistics, sample selection, and histologic characterization. *Methods Mol Biol.* 2011;675:299-306.