

Hovedbudskap

- HUNT biobank inneholder langtidslagret DNA fra mer enn 100 000 deltagere til bruk i komplekse forskningsprosjekter.
- Disse DNA-prøvene lagret under kontrollerte forhold, gir unike muligheter for studier av stabilitet og kvalitet.
- Til tross for mindre forskjeller knyttet til ekstraksjonsmetode og prøvetype, vises det generelt at både konsentrasjon, kvalitet/renhet og integritet tilfredsstiller nødvendige kvalitetskrav selv etter 20 års lagring.

Sammendrag

Introduksjon: Langtidsstabilitet av lagret DNA er avgjørende for kvalitet og pålitelighet i genetisk forskning. Studien vurderte konsentrasjon, renhet og integritet i DNA ekstrahert fra blodprøver samlet inn i den befolkningsbaserte helseundersøkelsen i Trøndelag (HUNT), der de eldste prøvene har vært lagret i mer enn 20 år.

Metode: Studien hadde et retrospektivt design og inkluderte 768 DNA-prøver fra HUNT2, HUNT3 og HUNT4. Målinger av DNA-konsentrasjon og -renhet ved ekstraksjonstidspunktet (T1) ble sammenlignet med nye målinger etter lagring (T2). DNA-integritet ble vurdert ved hjelp av DNA Integrity Number (DIN). Prøver fra ulike ekstraksjonsmetoder og konsentrasjonsnivåer, både ved opprinnelig konsentrasjon og etter normalisering, ble analysert.

Resultater: DNA-konsentrasjonen var i hovedsak stabil over tid, med enkelte mindre variasjoner mellom målemetoder og prøvetyper. Renheten holdt seg innenfor aksepterte kvalitetsgrenser. Fragmenteringen var lav, og kun et fåtall prøver hadde DIN-verdier under 7, noe som indikerer god DNA-integritet.

Konklusjon: DNA lagret i HUNT biobank opprettholder generelt høy kvalitet selv etter mer enn 20 års lagring under kontrollerte forhold. De observerte forskjellene skyldes hovedsakelig metodiske variasjoner snarere enn reell degradering, og materialet er velegnet for videre genetiske analyser.

Nøkkelord

DNA-kvalitet, DNA-bevaring, DNA-holdbarhet, DNA-stabilitet, DNA-nedbrytning

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

Stabilitet av DNA-prøver ved mer enn 20 års lagringstid – erfaringer fra Helseundersøkelsen i Trøndelag (HUNT)

Kristin S. Sætermo^{1,2}, Ann Helen Røstad^{1,2}, Kirsti Kvaløy^{1,2,3}, Therese Haugdahl Nøst^{1,2,4,5}, Erik R. Sund^{1,2}, Marit Næss^{1,2}

¹ HUNT forskningssenter, Institutt for samfunnsmedisin og sykepleie, Fakultet for medisin og helsevitenskap, NTNU – Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet

² Sykehuset Levanger, Helse Nord-Trøndelag

³ Senter for samisk helseforskning, Institutt for samfunnsmedisin, UiT Norges arktiske universitet

⁴ Institutt for samfunnsmedisin, UiT Norges arktiske universitet

⁵ HUNT senter for molekylær og klinisk epidemiologi, NTNU – Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet

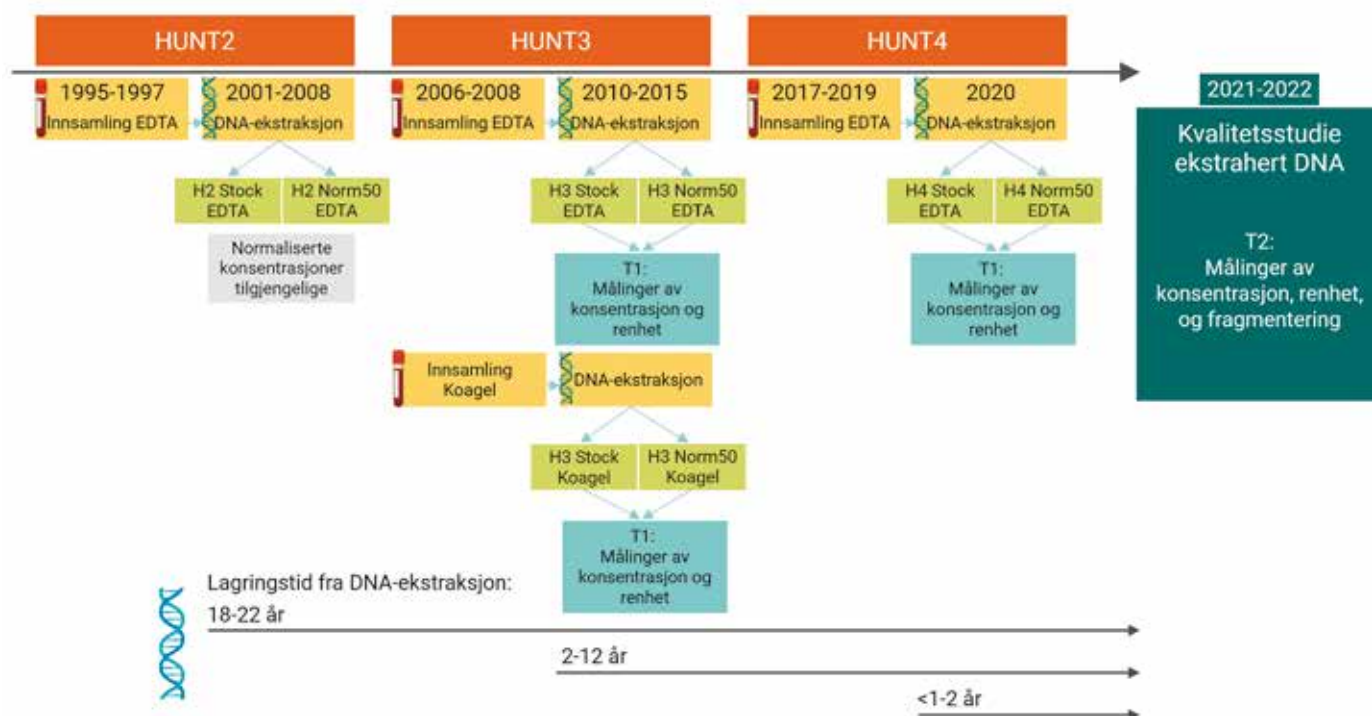
*Korresponderende forfatter: marit.nass@ntnu.no

Innledning

Kunnskap om hvordan kvaliteten på lagret DNA mulig endres over tid er avgjørende for god og pålitelig forskning. For å sikre pålitelighet og reproduserbarhet i DNA-baserte analyser er det nødvendig med validerte og optimaliserte prosedyrer, der høy kvalitet på ekstrahert DNA er en grunnleggende forutsetning for kvalitet i videre forskningsprosesser (1). For at ekstrahert DNA skal være egnet til omfattende og varierte analysepaneler, stilles det ofte krav til konsentrasjon, renhet og integritet. Tidligere studier har vist at DNA-kvalitet påvirkes av faktorer som lagringstid og lagringstemperatur før ekstrahering (2, 3), og at dette kan ha betydning for både utbytte og metyleringsstatus (2). For eksempel fant Towne og Devor at blodprøver som var oppbevart ved 4 °C ga betydelig høyere DNA-utbytte enn prøver lagret ved høyere temperatur (4), mens Madisen med flere viste til at fullblod lagret ved -70 °C ga bortimot tilsvarende DNA-utbytte som fra ferskt materiale (5). En oversiktsartikkel fra Matange med flere har også påpekt at ulike ekstraksjonsmetoder og håndtering av materialet

kan bidra til nedbrytningsgraden av DNA, mens dehydrering, som for eksempel ved frysetørring, kan redusere hydrolyse og derved bedre stabiliteten (6). Endringer i pH kan påvirke nedbrytningen, hvor en reduksjon fra pH 6 til 5 er vist å øke nedbrytningshastigheten vesentlig (7). Dette understreker betydningen av kontrollerte betingelser som pH og temperatur, og bruken av standardiserte buffere som Phosphate Buffered Saline (PBS) eller Tris-EDTA (TE) for å sikre stabilitet av DNA (6).

Til tross for at det finnes flere studier som belyser betydningen av DNA-kvalitet i forskning, er det likevel få studier som har undersøkt vedvarende DNA-kvalitet etter lagring over flere tiår. Siden HUNT biobank oppbevarer ekstrahert DNA fra over 100 000 deltagere, og hvor det eldste materialet nå har vært lagret siden midten av 1990-tallet, har dette gitt en unik mulighet til å studere langtidsstabilitet (8). HUNT er en omfattende befolkningsbasert undersøkelse som inkluderer helseopplysninger fra mer enn 250 000 innbyggere i Trøndelag, gjennom HUNT2 (1995-1997), HUNT3 (2006-2008), HUNT4 (2017-2019) og HUNT COVID (2021-2023) (9-12). Biolo-



FIGUR 1: OVERSIKT over studieutvalget, lagringstid av prøvene fra HUNT2-4 (T1), samt målinger av konsentrasjon, renhet og fragmentering som inngikk i kvalitetsstudie av ekstrahert DNA (T2). Figuren viser utgangsmateriale og tidspunkt for innsamling og DNA-ekstraksjon (gule bokser), konsentrasjon i lagret DNA som opprinnelig (Stock) eller fortynnet til 50 ng/μl, (Norm50) (grønne bokser), samt målinger av konsentrasjon og renhet (turkise bokser). For DNA-målingene fra HUNT2 var kun normaliserte fluorometer-baserte konsentrasjoner tilgjengelige (markert i grå boks).

gisk materiale er samlet inn ved feltstasjoner fra til sammen cirka 120 000 ikke-faste deltagere (13). Det totale biologiske materialet omfatter ulike typer blodprøver (~450 000) i form av serum, EDTA-plasma, buffycoat, NaHep, ACD, og videre; saliva (~24 000), DNA fra blod (~110 000), celler fra munnhule (FTA-kort ~8500), urin (~45 000) og fekale prøver på filterpapir (~13 500). Både materialet og håndteringen av materialet er tidligere detaljert beskrevet i *Data Resource Profile: The HUNT Biobank* (13).

Eksisterende materiale ga derfor et godt utgangspunkt til å undersøke kvaliteten på langtidslagret DNA, hvor målet med studien var å undersøke konsentrasjon, renhet og fragmentering angitt som DNA-integritet (DIN-verdi) i DNA-prøver ekstrahert i ulike HUNT-undersøkelser. Som grunnlag for å gjennomføre studien ville vi undersøke om lagringstemperatur, valg av ekstraksjonsmetode og fryse-/tinesykluser hadde påvirket DNA-kvaliteten i en slik grad at materialet ble forringet over tid (8). Kunnskap fra gjennomført studie kan i stor grad bidra til å gi biobanker generelt en bedre innsikt om kvalite-

ten på langtidslagret DNA som skal benyttes til videre forskningsformål.

Materiale og metode

Studieutvalg og inklusjonskriterier

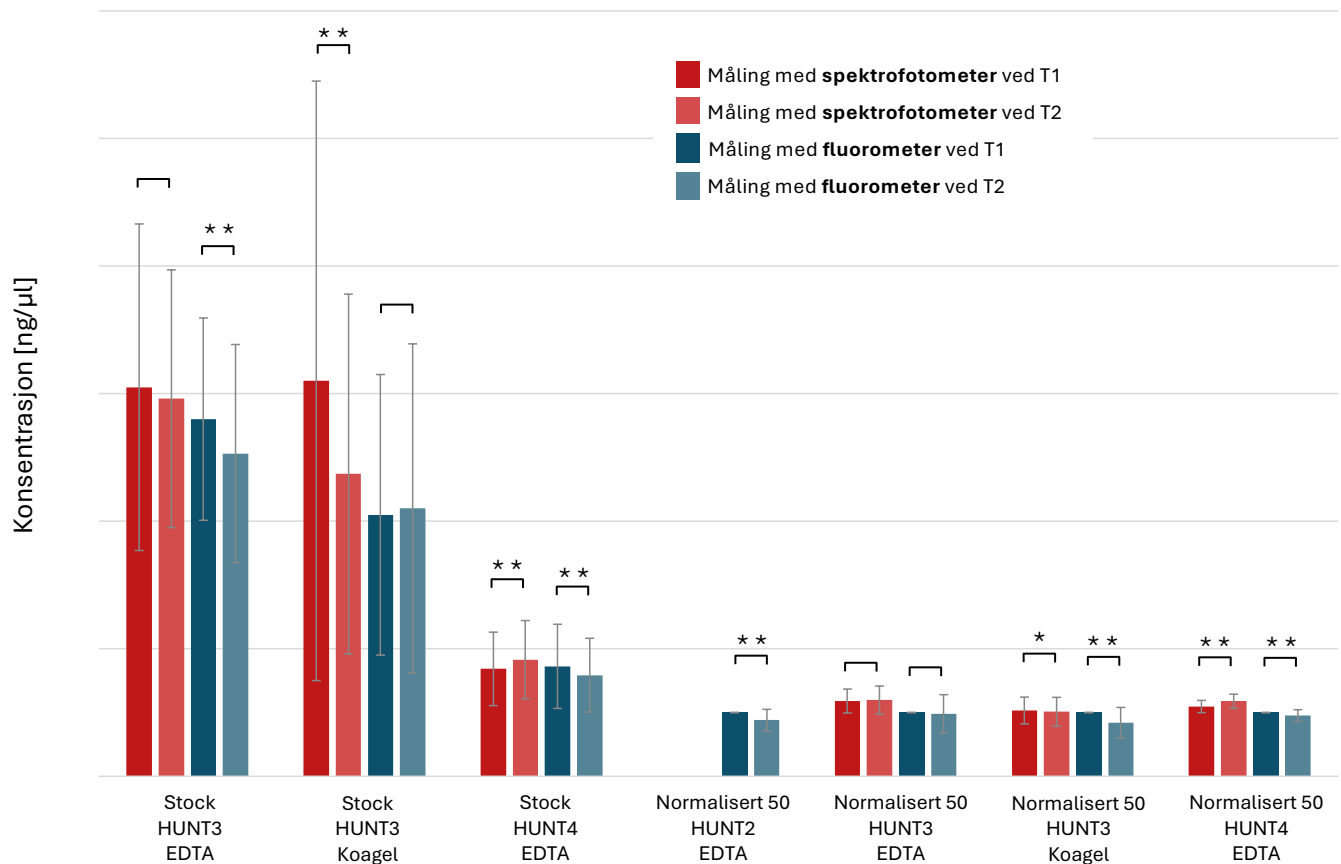
Da studiens formål var kvalitetsvurdering av biologisk materiale, var REK-godkjenning ikke nødvendig. Studien ble imidlertid godkjent av Dataadgangskomiteen (DAK) ved HUNT.

Studien hadde et retrospektivt design og inkluderte totalt 768 DNA-prøver ekstrahert etter innsamling fra henholdsvis HUNT2 (n=192), HUNT3 (n=384) og HUNT4 (n=192).

Enkeltstående målinger av DNA-konsentrasjon og -renhet ved tidspunkt T2 (gjennomføring av kvalitetsstudien) ble sammenlignet med tilsvarende tidligere målinger utført ved ekstraksjonstidspunktet (T1). Fragmentering (måling av DIN-verdi) ble kun målt ved T2. Bruk av internkontroll under alle målinger har verifisert valide måleresultater. For å undersøke om DNA-kvaliteten var påvirket av konsentrasjonsnivå, ble deler av studien gjennomført ved at vi analyserte prøver fra Stock (det vil si opprinnelig konsentrasjon etter

ekstrahering). De resterende prøvene var normalisert (fortynnet) til 50 ng/μl (Norm50) – en konsentrasjon som ofte benyttes ved prosjektutlevering fra HUNT biobank. Utvalget av Stock og Norm50-prøver ble gjort uavhengig av hverandre, og de representerer ulike individer. Figur 1 viser oversikt over utvalgte prøver. Et randomisert utvalg av prøver fra HUNT2-4 ble inkludert dersom de oppfylte følgende kriterier: 1) DNA skulle være ekstrahert fra EDTA fullblod eller koagel, 2) ekstraksjon skulle være basert på saltutfelling eller en kulebasert metode, 3) samme ekstraksjonsmetode måtte være brukt når prøvene fra ulike tidsperioder ble sammenlignet og 4) prøver målt med fluorometri skulle ha en DNA-konsentrasjon < 400 ng/μl.

Selv om PicoGreen, som benyttes ved måling med fluorometri, i teorien skal kunne gi en lineær standardkurve opp til 1000 ng/μl, har vi gjennom mange års erfaring imidlertid sett at standardkurven flater ut ved 400 ng/μl, og derav vil gi redusert nøyaktighet på målinger av konsentrasjonsnivå ≥ 400 ng/μl. Høye konsentrasjoner ses også ofte i sammenheng med økt viskositet, noe som igjen kan ➤



FIGUR 2. Sammenligninger av DNA-konsentrasjon i opprinnelige ekstrakter (Stock-prøver) og i normaliserte ekstrakter (Norm50-prøver) fra ulike HUNT-innsamlingsrunder. Konsentrasjonen ble målt ved to tidspunkter: ved ekstraksjon fra innsamlingsrunden (T1) og senere i forbindelse med denne kvalitetsstudien i 2021–2022 (T2). To ulike metoder ble benyttet: spektrofotometri (røde søyler) og fluorometri (blå søyler). Prøveresultat fra T1 for normaliserte prøver er representert som forventet konsentrasjon på 50 ng/μl. Søylen høyde angir gjennomsnittlig konsentrasjon, og linjene viser ett standardavvik fra gjennomsnittet. Statistisk signifikans for parvise sammenligninger mellom T1 og T2 er angitt med ** for $p < 0,01$ og * for $p \leq 0,05$.

påvirke nøyaktighet i målingene. Dette var bakgrunnen for vårt valg om å sette grensen oppad til 400 ng/μl i kriterium 4.

Innsamling og lagring av prøvemateriale i HUNT2-4

For å sikre høy kvalitet på biologisk materiale til biobankformål, ble prøver samlet inn ved feltstasjoner i kommunene som inngikk i undersøkelsene og sendt med kurer til biobankens laboratorium innen 24 timer. Ved mottak ble blodprøvene fraksjonert, alikvotert og umiddelbart frosset ned. Tiden fra prøvetaking til nedfrysing var maksimalt 72 timer i HUNT2 og maksimalt 36 timer i HUNT3 og HUNT4 (13). Prøvene ble deretter lagret ved -70 °C i HUNT2 og -80 °C i HUNT3 og HUNT4. Tiden fra nedfrysing til DNA-ekstraksjon (T1) varierte mellom 4–13 år for HUNT2, 2–9 år for HUNT3 og 1–3 år for HUNT4. Etter ekstraksjon har DNA fra HUNT2 og HUNT3 vært lagret ved -20 °C, mens DNA fra HUNT4 har vært lagret ved -80 °C.

Ekstraksjon og måling av DNA-konsentrasjon og renhet

DNA ble ekstrahert fra blodprøver over ulike tidsperioder og ved bruk av ulike validerte kit, metoder og instrumenter (tabell S1 – tilgjengelig i nettsversjon av artikkelen.).

Etter ekstraksjon ble DNA-konsentrasjon målt ved hjelp av spektrofotometri og/eller fluorometri, og hvor de spektrofotometriske målinger inkluderte vurdering av DNA-renhet basert på A260/A280-forholdet.

Basert på de fluorometriske målingene ble deler av stock-materialet fortennet til Norm50. Nøyaktigheten av fortennet konsentrasjon ble kontrollert ved spektrofotometriske målinger som viste en gjennomsnittlig DNA-konsentrasjon på 50 ng/μl ± 9,9 ng/μl.

Fra tidspunkt T1 forelå det ingen tilgjengelige måleresultat for HUNT2-materialet, utover Norm50 EDTA (med forventet måleverdi som beskrevet over). I

tillegg manglet noen spektrofotometriske målinger for utvalget fra HUNT3 Koagel Norm50.

Ved tidspunkt T2 ble DNA-konsentrasjon og -renhet målt for alle prøver ved bruk av spektrofotometri og fluorometri.

Måling av DNA-fragmentering

DNA-integritet sier noe om graden av fragmentering av genomisk DNA. Enkelte analyser kan være sensitive overfor dette og det var derfor ønskelig å vurdere fragmenteringsgrad i lagret DNA ved T2. Slike typer analyser kan utføres for eksempel ved ulike typer gel-elektroforese. Her brukte vi instrumentet TapeStation 4200, hvor fragmentering uttrykkes som DNA Integrity Number (DIN-verdi). DIN-verdien angir DNA-kvalitet på en skala fra 1 til 10, der lave verdier indikerer sterkt fragmentert DNA, mens verdier >7 regnes som god kvalitet (14).

Statistisk styrke og analyser

Styrkeberegningen ble utført ved hjelp av

TABELL 1: Fragmentering målt som DIN-verdier^a i prøveekstrakter med opprinnelig konsentrasjon (Stock) og konsentrasjonsnormaliserte ekstrakter (Norm50) lagret i HUNT biobank fra ulike innsamlingsrunder i HUNT-undersøkelsen. Gjennomsnitt (standardavvik), differanse i gjennomsnitt (%), 95 % konfidensintervall for differansen, p-verdi for forskjellen mellom Stock og Norm50 er presentert.

Gruppe	N	Ekstraksjons-metode	Gj.snitt Stock (std ^b)	Gj.snitt Norm50 (std ^b)	Differanse gj.snitt	95% KI ^c for differansen	P-verdi ^d
HUNT2 EDTA	191	Saltutfelling	8,8 (±0,6)	8.8 (±0,5) ^e	-0,02	[-0,2 , 0,1]	0,77
HUNT3 EDTA	192	Saltutfelling	9,4 (±0,3)	8.7 (±0,6)	-0,70	[-0,9 , -0,6]	<0,001
HUNT3 Koagel	192	Saltutfelling	8,8 (±0,6)	9.0 (±0,4)	0,20	[0,1 , 0,4]	0,002
HUNT4 EDTA	192	Kulebasert	8,5 (±0,3)	8.4 (±0,3)	-0,04	[-0,1 , 0,1]	0,42

^a DIN = DNA Integrity Number. ^b std = standardavvik. ^c KI = konfidensintervall. ^d p-verdi for forskjellen mellom Stock og Norm50 (uparet T-test). ^e En prøve med DIN 1.2 ble ekskludert.

en nettbasert kalkulator (15). Beregningen av utvalgsstørrelse var basert på et før- og etter-design med to måletidspunkt for de samme prøvene. Primære endepunkter var kontinuerlige mål for DNA-konsentrasjon og DIN-verdi, med signifikansnivå 0,05 og statistisk styrke på 90 prosent. Utgangskonsentrasjonene ble valgt basert på tilgjengelige stock- og normaliserte ekstrakter i biobanken for å sikre lav måleusikkerhet. Flere antagelser angående forventede endringer ble vurdert i beregningene. Med en forventet endring i konsentrasjon på 2 ng/μL, vurdert som både realistisk og relevant basert på tidligere erfaringer, ble nødvendig utvalgsstørrelse beregnet til 84 prøver. Av praktiske hensyn knyttet til biobankens rørformatering ble det inkludert 96 prøver i hver gruppe. Prøvene som inngikk i analysene skulle i utgangspunktet ha tilgjengelige måleverdier for både konsentrasjon og renhet ved begge tidspunkter. Dette var imidlertid ikke tilgjengelig for prøver fra HUNT2, og for HUNT3 Norm50 koagel var det kun 62 prøver med tilgjengelige T1-målinger fra spektrofotometer. Forskjeller mellom T1 og T2 ble analysert med parett t-test. DIN-verdier ble målt ved kun ett tidspunkt og forskjeller i DIN-verdi mellom grupper ble dermed analysert med en uparet t-test. Det ble også utført sensitivitetsanalyser, både ved å replikere analysene i materialet hvor mulige uteliggere var utelatt, og ved å gjennomføre analysene ved bruk av Wilcoxon-test (ikke-parametrisk test) for avhengige og uavhengige observasjoner. Alle tester var tosidige, og med et signifikansnivå på 5 %. Statistiske analyser ble utført i Stata (versjon 18).

Resultater

Spektrofototrimålinger av konsentrasjon

For HUNT3 (Stock EDTA, Norm50 EDTA og Norm50 Koagel) var DNA-konsentrasjonen i hovedsak stabil mellom T1 og T2 (figur 2 og tabell S2 – tilgjengelig

i nettversjon av artikkelen). For HUNT3 Stock koagel ble det observert en statistisk signifikant reduksjon i konsentrasjon mellom de to måletidspunktene (relativ nedgang 24 %). For HUNT4-prøver (Stock EDTA og Norm50) så vi derimot en økning i DNA-konsentrasjon ved T2 sammenlignet med T1. Sensitivitetsanalyser der potensielle uteliggere ble ekskludert, endret i liten grad disse sammenligningene. For HUNT3 Norm50 EDTA ble forskjellen mellom T1 og T2 imidlertid statistisk signifikant etter fjerning av to uteliggere.

Fluorometriske målinger av konsentrasjon

Fluorometriske målinger viste stabile konsentrasjoner mellom T1 og T2 for HUNT3 Norm50 EDTA og HUNT3 Stock koagel. For de øvrige gruppene ble det observert en statistisk signifikant nedgang i konsentrasjon over tid (figur 2 og tabell S3 – tilgjengelig i nettversjon av artikkelen). Størst relativ nedgang ble observert for HUNT3 Norm50 koagel (17 %). Sensitivitetsanalysene viste at ekskludering av mulige uteliggere ikke hadde betydning for forskjellene mellom T1 og T2.

Renhet av DNA

Måling av A260/A280-forholdet viste stabile verdier mellom T1 og T2 både for HUNT3 og HUNT4. Bortsett fra to prøver fra HUNT4 stock som viste marginalt for høye verdier, lå prøvene innenfor det forventede intervallet på 1,7–2,0, noe som indikerer god DNA-kvalitet (16, 17).

Fragmentering av DNA

Det ble observert lav grad av DNA-fragmentering ved T2 (Tabell 1). Kun fem prøver hadde DIN-verdier <7, noe som tyder på at integriteten over tid i hovedsak var godt bevart. Prøver ekstrahert med kulebasert metode viste noe lavere DIN-verdi enn prøver ekstrahert med saltutfelling (p < 0,05),

og en statistisk signifikant forskjell i DIN-verdi mellom Stock- og Norm50-ekstraktene ble observert for både HUNT3-EDTA-prøver og HUNT3-koagelprøver.

Diskusjon

Målet med studien var å undersøke kvaliteten til DNA ekstrahert fra ulike HUNT-undersøkelser lagret over tid. Dette ble gjort ved å sammenligne konsentrasjon og renhet ved tidspunkt for ekstraksjon (T1) med gjentatt måling i denne kvalitetsstudien (T2). I tillegg ble det målt grad av fragmentering etter lagring for å undersøke DNA-integritet (T2).

Resultatene tyder på at DNA-konsentrasjonen i ekstrakter lagret i opptil 22 år i all hovedsak har vært stabil. Det er statistisk signifikante forskjeller for flere av sammenligningene som er gjort, men de numeriske forskjellene er i hovedsak små. Videre indikerer variasjon mellom målemetoder og type prøveekstrakt at observerte endringer i konsentrasjon delvis kan skyldes valg av metode, noe som er i samsvar med tidligere funn (6). Tiden fra innsamling til gjennomført ekstraksjon (T1) varierte for de ulike prøvene, men siden blodprøvene har vært lagret ved -80 °C fra prøvetaking og fram til ekstraksjonstidspunkt (T1) forventer vi ikke at dette skal ha påvirket resultatene i denne studien i vesentlig grad (5). Ved høye DNA-konsentrasjoner ga fluorometriske målinger gjennomgående lavere estimerte verdier enn spektrofotometriske målinger. Dette er forventet, ettersom fluorometri kun kvantifiserer intakt dobbelttrådet DNA (dsDNA), mens degraderte fragmenter og enkelttrådet DNA (ssDNA) ikke registreres. Spektrofotometri måler derimot totalt nukleinsyreinnhold, inkludert eventuelle kontaminanter, og skiller ikke mellom dsDNA, ssDNA og RNA (18, 19).

Spektrofotometriske målinger av ➤

HUNT4 Stock-ekstrakter indikerte en økning i DNA-konsentrasjon fra T1 til T2, mens fluorometriske målinger viste en reduksjon i samme periode. Denne diskrepansen kan igjen skyldes at spektrofotometri måler totalt nukleinsyreinnhold, inkludert enkelttrådede nukleinsyremolekyler, som er mer ustabile og kan akkumulere som følge av degradering. Fluorometri måler derimot kun intakt dsDNA, og gir dermed lavere konsentrasjoner når degradering har funnet sted. Forskjeller mellom metodene kan i tillegg skyldes at ekstraksjonsmetodene (saltutfelling og magnetiske kuler) påvirker stabiliteten til ssDNA og dsDNA ulikt. Samtidig indikerer gjennomgående høye DIN-verdier at degradering av dsDNA ikke har hatt vesentlig betydning for de observerte konsentrasjonsendringene. I Norm50 ekstrakter fra HUNT2-4 så vi mindre endringer i DNA-konsentrasjon over tid.

DNA-ekstraktene i studien har vært lagret ved -20 °C (HUNT2-3) og -80 °C (HUNT4), og selv om det synes å være samsomt med tidligere studier utført på langtidslagring av DNA, er dette temperaturer som er dokumentert å sørge for god bevaring av DNA-kvalitet (2, 20, 21). Samlet sett tyder våre resultater på at lagring over tid ikke har medført systematiske endringer i DNA-konsentrasjonene. Derimot tyder våre funn på at ulikhet i målemetoder, type prøveekstrakt og ekstraksjonsprosedyrer kan ha hatt større betydning for resultatene.

DNA-ekstraktene hadde gjennomgående god renhet ved både T1 og T2, noe som indikerer at verken ekstraksjonsmetoder eller lagringstid i vesentlig grad har påvirket kvaliteten. De stabile målingene over tid støtter at biobankens rutiner sikrer konsistens og pålitelig DNA-materiale.

Det ble observert minimal fragmentering, men resultatene antyder at saltutfelling er noe mer skånsomt enn kulebasert ekstraksjon. Fragmentering kan oppstå ved fryse/tineprosesser, på grunn av iskrystaller som skader DNA (6, 8, 22). I de langtidslagrede prøvene ved HUNT var fragmenteringen imidlertid lav; ved T2 hadde under 1 % av prøvene DIN < 7. Det ble heller ikke observert systematiske forskjeller i fragmenteringsgrad mellom prøver med høy (Stock) og

lav (Norm50) DNA-konsentrasjon. For prøver fra HUNT4 ble det observert noe lavere, men fortsatt tilfredsstillende DIN-verdier sammenlignet med HUNT2 og HUNT3. Dette antas å være relatert til bruk av kulebasert ekstraksjonsmetode, som gir større mekanisk belastning enn saltutfellingsmetoden. Fordelene ved kulebasert metode er redusert arbeidsmengde og lavere kostnader. Høye DIN-verdier etter opptil 22 års lagring indikerer minimal degradering under gjeldende lagringsforhold, og bekrefter at DNA fra HUNT biobank er godt egnet til videre genetiske analyser, herunder genomvide assosiasjonsstudier (Eng: GWAS). Det er grunn til å anta at endringer i målt DNA-mengde over tid reflekterer forskjeller i målemetoder snarere enn reell degradering.

Siden HUNT2 (1995-1997) har HUNT biobank oppgradert både metoder og instrumentering, noe som har medført variasjon i prosedyrer og målemetoder. Alle metoder er imidlertid validert av leverandør og videre verifisert etter standardiserte prosedyrer ved HUNT biobank. Resultater fra ulike tidspunkter har gjort det mulig å sammenligne DNA-konsentrasjon og -renhet ved ekstraksjon (T1) og etter flere års lagring (T2) (figur 1).

Innføringen av magnetisk kulebasert ekstraksjon i 2014 bidro til bedre homogenitet i prøvene, og dagens protokoll inkluderer bufferjustering for prøver med utgangskonsentrasjon over 350 ng/μl. HUNT biobank har deltatt i årlige ringtester, International Society for Biological and Environmental Repositories (ISBER) siden 2012, og Integrated Biobank of Luxembourg (IBBL) siden 2014. Sammen med interne kontrollmålinger bekrefter disse pålitelige konsentrasjonsmålingene over tid. I tillegg gjennomføres rutinemessig reanalyse før utlevering, for å sikre korrekt DNA-mengde og tilstrekkelig kvalitet til videre analyser.

En styrke ved denne kvalitetsstudien er sammenligningen av prøver som har vært lagret over kort og lang tid (opptil 22 år). En begrensning er som nevnt at endringer i prosedyrer og målemetoder over tid kan ha påvirket resultatene, noe som medfører en viss grad av usikkerhet knyttet til tolkningen av holdbarhet ved direkte

sammenligning. At studien omfatter et stort antall sammenligninger og hypotesetester øker sannsynligheten for statistisk signifikante funn, selv ved små forskjeller. I tolkningen av resultatene har vi derfor lagt vekt på størrelsen for både de absolutte og de relative forskjellene, ikke bare på p-verdier. De observerte endringene i DNA-konsentrasjon var små og innenfor forventet analytisk variasjon, til tross for statistisk signifikante forskjeller i flere sammenligninger.

Samlet sett illustrerer funnene at utvikling og forbedring av instrumenter, prosedyrer og analysemetoder er en naturlig del av laboratoriedrift over tid. Dette er forhold som må tas i betraktning i holdbarhetsstudier der prøver sammenlignes på tvers av lange tidsintervaller. Studien understreker derfor betydningen av robuste protokoller og grundig dokumentasjon ved skifte av instrumenter og metodikk. Dette er avgjørende for å sikre valide sammenligninger av måleresultater.

Konklusjon

HUNT biobank har lang erfaring med ekstraksjon, oppbevaring og utlevering av DNA til forskningsprosjekter. Selv om utvikling av prosedyrer og målemetoder sannsynligvis har påvirket sammenligninger av DNA-konsentrasjon og -kvalitet i denne studien, tyder funnene samlet sett på at DNA lagret i biobanken holder seg generelt stabilt over tid og er oppbevart under tilfredsstillende forhold.

Våre resultater indikerer at langtidslagring i seg selv ikke har medført systematiske endringer i DNA-prøvene. Derimot synes variasjon i målemetoder, type prøveekstrakt og ekstraksjonsprosedyrer å ha hatt betydning for de observerte forskjellene.

DNA fra HUNT kan derfor leveres ut til forskningsprosjekter med tilfredsstillende kvalitet, selv etter mange års lagring. Internkontrollrutiner og kontinuerlig kvalitetsovervåking av ekstrahert DNA vil videreføres som en del av den løpende utviklingen av metoder og prøvebehandlinger. ■

Forfatterens bidrag

AHR og KSS initierte studien og gjennomførte laboratoriedelen av analysene,

samt skrev råtkast til artikkelen. MN, KK, ES og THN var involvert i arbeidet knyttet til presentasjon av data, beskrivelse og veiledning under gjennomføring av studien. ES og THN var involvert i statistiske beregninger og framstilling av figurer og tabeller. MN og KK har hatt ansvar for kildehenvisning og bearbeidet manuskriptet til sin endelige form. Alle medforfattere har bidratt med revidering og forbedring av manuskriptet i prosessen og godkjent den endelige versjonen av dette.

Takk: Takk til Biobank Norge (NFR-prosjekt #296162) for støtte og finansiering av arbeidet

Helseundersøkelsen i Trøndelag (HUNT) er et samarbeidsprosjekt mellom HUNT forskningssenter (Fakultet for medisin og helsevitenskap, Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet NTNU), Trøndelag fylkeskommune, Helse Midt-Norge og Nasjonalt folkehelseinstitutt.

Interessekonflikter

Medforfatterne erklærer ingen interessekonflikt for denne studien

Referanser:

- Baoutina A, Bhat S, Partis L, Emslie KR. Storage Stability of Solutions of DNA Standards. *Anal. Chem.* 2019;91(19):12268–74.
- Schröder C, Steimer W. gDNA extraction yield and methylation status of blood samples are affected by long-term storage conditions. *Plos One.* 2018;13(2).
- Huang LH, Lin PH, Tsai KW, Wang LJ, Huang YH, Kuo HC, et al. The effects of storage temperature and duration of blood samples on DNA and RNA qualities. *PLoS One.* 2017;12(9):e0184692.
- Towne B, Devor EJ. Effect of storage time and temperature on DNA extracted from whole blood samples. *Hum Biol.* 1990;62(2):301–6.
- Madisen L, Hoar DI, Holroyd CD, Crisp M, Hodes ME. DNA banking: the effects of storage of blood and isolated DNA on the integrity of DNA. *Am J Med Genet.* 1987;27(2):379–90.
- Matange K, Tuck JM, Keung AJ. DNA stability: a central design consideration for DNA data storage systems. *Nat Commun.* 2021;12(1):1358.
- Lindahl T, Nyberg B. Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid. *Biochemistry.* 1972;11(19):3610–8.
- Chung WJ, Cui Y, Chen CS, Wei WH, Chang RS, Shu WY, et al. Freezing shortens the lifetime of DNA molecules under tension. *J Biol Phys.* 2017;43(4):511–24.
- Åsvold BO, Langhammer A, Rehn TA, Kjelvik G, Grøntvedt TV, Sørgerd EP, et al. Cohort Profile Update: The HUNT Study, Norway. *Int J Epidemiol.* 2023;52(1):e80–e91.
- Krokstad S, Langhammer A, Hveem K, Holmen TL, Midthjell K, Stene TR, et al. Cohort Profile: the HUNT Study, Norway. *Int J Epidemiol.* 2013;42(4):968–77.
- Holmen TL, Bratberg G, Krokstad S, Langhammer A, Hveem K, Midthjell K, et al. Cohort profile of the Young-HUNT Study, Norway: A population-based study of adolescents. *Int J Epidemiol.* 2014;43(2):536–44.
- Rangul V, Holmen TL, Langhammer A, Ingul JM, Pape K, Fenstad JS, et al. Cohort Profile Update: The Young-HUNT Study, Norway. *Int J Epidemiol.* 2024;53(1).
- Næss M, Kvaløy K, Sørgerd EP, Sætermo KS, Norøy L, Røstad AH, et al. Data Resource Profile: The HUNT Biobank. *Int J Epidemiol.* 2024;53(3).
- Kalghatgi ST, Nahid; Jones, Susan. Monitoring Long-Term DNA storage in the Biorepositories at Corell Institute 2019: <https://www.chem-agilent.com/appnote/pdf/application-coriell-biorepositories-din-tapestation-5994-1362en-agilent.pdf> (29.4.26).
- Kane S. Sample Size Calculator: Clin.Cal.com; 2025 [updated 18.01.2025; cited 2026 08.04]: <https://clincalc.com/stats/samplesize.aspx> (29.4.26).
- Ahn SJ, Costa J, Rettig Emanuel J. PicoGreen Quantitation of DNA: Effective Evaluation of Samples Pre-or Post-PCR. *Nucleic Acids Res.* 1996;24(13):2623–5.
- Inc TFS. NanoDrop 1000 Spectrophotometer v.3.8 User's Manual web page: Thermo Fisher; 2010 [cited 2022 27.04]. Manual]: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/nd-1000-v3.8-users-manual-8%205x11.pdf> (29.4.26).
- Bruijns B, Hoekema T, Oomens L, Tiggelaar R, Gardeniers H. Performance of Spectrophotometric and Fluorometric DNA Quantification Methods. *Analytica.* 2022;3(3):371–84.
- Versmessen N, Van Simaey L, Negash AA, Vandekerckhove M, Hulpiau P, Vanechoutte M, et al. Comparison of DeNovix, NanoDrop and Qubit for DNA quantification and impurity detection of bacterial DNA extracts. *PLoS One.* 2024;19(6):e0305650.
- QIAGEN. DNA sample storage: best practices after extraction: QIAGEN; 2013 [cited 2026 14.01]. <https://www.qiagen.com/us/knowledge-and-support/knowledge-hub/bench-guide/dna/handling-dna/storage-of-dna> (29.4.26).
- Tarique I, Khatri P, Bhutto B, Tariq M, Chandio I, Soomro M, et al. Effect of Temperature and Storage Time on DNA Quality and Quantity from Normal and Diseased Tissues. *J Basic Appl Sci.* 2017;13:203–6.
- Yoo H-B, Lim H, Yang I, Kim S-K, Park S-R. Flow cytometric investigation on degradation of macro-DNA by common laboratory manipulations. *J Biophysical Chem.* 2011;02:102–11.

Om forfatterne



Kristin S. Sætermo, BSc i kjemi-bioteknologi, senioringeniør ved HUNT forskningssenter, Fakultet for medisin og helsevitenskap, NTNU.



Ann Helen Røstad, BSc i kjemi-bioteknologi, senioringeniør ved HUNT forskningssenter, Fakultet for medisin og helsevitenskap, NTNU.



Kirsti Kvaløy, cand.scient. og D.Phil., professor i epidemiologi ved HUNT forskningssenter, Institutt for samfunnsmedisin, NTNU.



Therese Haugdahl Nøst, epidemiolog og ph.d., forsker ved HUNT forskningssenter, Fakultet for medisin og helsevitenskap, NTNU, og prosjektleder for Nordisk Biobank Nettverk.



Erik R. Sund, epidemiolog og ph.d., forsker ved HUNT forskningssenter, Fakultet for medisin og helsevitenskap, NTNU.



Marit Næss, bioingeniør og ph.d., daglig leder ved HUNT forskningssenter og biobank, Fakultet for medisin og helsevitenskap, NTNU.