

. 实验研究 .

Crispr-Cas12a 在成人弥漫性胶质瘤异柠檬酸脱氢酶 2 基因突变检测中的应用

冯哲斌 张 宇 孔东生 武其嘉 王俊祥 余新光 冯世宇

【摘要】目的 探讨 Crispr-Cas12a 方法对成人弥漫性胶质瘤异柠檬酸脱氢酶 2(IDH2) 基因 R172K 单核苷酸多态性的检测效能。方法 选择 2019 年 1 月至 2022 年 9 月手术切除的初治成人弥漫性胶质瘤组织样本 112 例, 利用 Crispr-Cas12a 方法和直接测序法检测样本 IDH2-R172K 位点突变情况, 以直接测序法为金标准。结果 112 例中, 9 例 IDH2-R172K 突变型, 103 例 IDH2-R172K 野生型。ROC 曲线分析显示, 曲线下面积为 0.967, 约登指数为 0.892, 最佳截断值为 590。以 590 作为 IDH2-R172K 突变型和野生型样本的阈值, Crispr-Cas12a 法的灵敏性为 96.3% (95% CI 81.7%~99.3%), 特异性为 92.9% (95% CI 89.5%~95.3%)。Crispr-Cas12a 法与直接测序法一致性检验 Kappa 值为 0.658, 一致性较好。结论 Crispr-Cas12a 方法能快速、准确地检测成人弥漫性胶质瘤组织样 IDH2-R172K 突变情况, 可作为术中快速检测 IDH2-R172K 突变的方法。

【关键词】成人弥漫性胶质瘤; 异柠檬酸脱氢酶 2; 基因突变; Crispr-Cas12a; 基因直接测序

【文章编号】1009-153X(2023)08-0517-05 【文献标志码】A 【中国图书资料分类号】R 739.41

Application of Crispr-Cas12a in the detection of isocitrate dehydrogenase 2 gene mutation in adult diffuse gliomas

FENG Zhe-bin, KONG Dong-sheng, WU Qi-jia, ZHANG Yu, WANG Jun-xiang, YU Xin-guang, FENG Shi-yu. Department of Neurosurgery, The First Medical Center of PLA General Hospital, Beijing 100089, China

【Abstract】Objective To investigate the efficacy of Crispr-Cas12a in the detection of R172K single nucleotide polymorphism of isocitrate dehydrogenase 2 (IDH2) gene in adult diffuse gliomas. Methods A total of 112 newly diagnosed adult diffuse glioma tissue samples were selected from January 2019 to September 2022, and IDH2-R172K mutations were detected by Crispr-Cas12a and direct sequencing, with direct sequencing as the gold standard. Results Of 112 samples, 9 were IDH2-R172K mutant and 103 were IDH2-R172K wild type. ROC curve analysis of Crispr-Cas12a detection results showed that the area under the curve was 0.967, the Jorden index was 0.892, and the best cutoff value was 590. Using 590 as the threshold for IDH2-R172K mutant and wild-type, the sensitivity and specificity of Crispr-Cas12a were 96.3% (95%CI 81.7%~99.3%) and 92.9% (95%CI 89.5%~95.3%), respectively. The Kappa value of Crispr-Cas12a and direct sequencing was 0.658, showing good consistency. Conclusions Crispr-Cas12a can rapidly and accurately detect IDH2-R172K mutation in adult diffuse glioma tissues, and can be used as a method for rapid intraoperative detection of IDH2-R172K mutation.

【Key words】Adult diffuse gliomas; Isocitrate dehydrogenase 2; Crispr-Cas12a; Direct sequencing

弥漫性星形细胞瘤和少突胶质细胞瘤的诊断标准要求对异柠檬酸脱氢酶(isocitrate dehydrogenase, IDH)基因突变情况进行准确检测<sup>[1]</sup>。IDH 基因突变不仅是成人弥漫性胶质瘤的重要的分子分型依据, 而且与手术方案的制定及预后的预测密切相关<sup>[2]</sup>; 因此, 快速、准确地检测 IDH 状态对于成人弥漫性胶质瘤的诊断和预后评估至关重要。目前发现成人弥漫

性胶质瘤 IDH 基因突变包括 IDH1 和 IDH2 两种基因突变类型<sup>[3]</sup>, 二者均可导致 IDH 蛋白的结构与活性改变, 继而影响细胞代谢及肿瘤微环境<sup>[4, 5]</sup>。相较于 IDH1, IDH2 突变发生率更低<sup>[6, 7]</sup>, 且缺乏免疫组化检测位点的覆盖, 临床实践中更容易被忽视。Crispr-Cas 系统是一种体外核酸快速检测的有效工具<sup>[8, 9]</sup>。本研究应用 Crispr-Cas12a 工具对成人弥漫性胶质瘤组织 IDH2-R172K 位点突变(c.515G>A)进行快速检测, 并以二代测序结果为金标准, 初步评价该方法的检测效能。

1 材料与方法

1.1 样本来源 纳入标准: ①术后病理证实为 WHO 分级 2~4 级成人弥漫性胶质瘤[参考《世界卫生组织

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2023.08.011

基金项目:军队装备研发项目(LB20201A060004)

作者单位:100089 北京,解放军总医院第一医学中心神经外科医学部(冯哲斌、张 宇、孔东生、武其嘉、王俊祥、余新光、冯世宇)

通讯作者:冯世宇, E-mail: fgy72123@163.com

余新光, E-mail: xinguangyu@sina.com

中枢神经系统肿瘤分类》<sup>[1]</sup>,肿瘤样本于术后进行直接测序检测;②术后 24 h 内样本放置于冻存管,低温液氮保存,使用前未进行冻融;③病人或家属签署知情同意书。排除标准:①合并胶质瘤外的其他恶性肿瘤;②术前曾行针对胶质瘤的放化疗、电场治疗、生物治疗等;③同时伴有严重细菌、真菌、病毒感染性疾病、传染病。本研究通过解放军总医院伦理委员会批准(伦审第 S2018-268-02 号)。

选择 2019 年 1 月至 2022 年 9 月手术切除的初治成人弥漫性胶质瘤组织样本(术后液氮冻存)作为 Crispr-Cas12a 检测对象。共筛选出 116 例符合标准的成人弥漫性胶质瘤样本,其中 IDH2-R172K 突变型 9 例, IDH2-R172M 突变型 1 例, IDH2-R172S 突变型 1 例, IDH2 野生型 105 例。4 例 IDH2 野生型样本的肿瘤细胞含量小于 10%(依据 HE 染色结果),被排除,因此最终纳入 9 例 IDH2-R172K 突变型样本及 103 例 IDH2-R172K 野生型样本进行 Crispr-Cas12a 检测。11 例 IDH2 突变的胶质瘤病人资料见表 1。

1.2 Crispr-Cas12a 荧光检测体系的构建及验证 选择 IDH2-R172K 作为检测位点。参照特异性检测位点区域设计野生型和突变型模板,设计 PCR 扩增引物,同时针对这些突变区域设计 Crispr DNA(crDNA)并合成所需的寡核苷酸 Crispr RNA(crRNA)。crDNA、引物、IDH 野生型及突变型靶标等信息见表 2。

扩增条件:95 ℃/180 s;95 ℃/10 s、58 ℃/20 s,30 次循环;25 ℃/2 s。

检测蛋白为 Fncas12a。将合成的靶标模板(1~5 μl)加入检测试剂混合液(含有 2 μl crRNA、2 μl Fncas12a、10 μl 荧光探针及 3 μl C Buffer,最后补充

ddH<sub>2</sub>O 至 50 μl)37 ℃反应 0.5 h 读取荧光值,分析荧光曲线,以进行 Crispr-Cas12a 荧光检测体系验证。这些反应均在 37~42 ℃内进行。

1.3 胶质瘤样本的检测 由两名检测员完成全部组织样本检测,检测员不知晓样本 IDH 突变情况。将样本进行随机排序,依排序升序对样本依次进行 Crispr-Cas12a 检测。每例样本重复检测 3 次。

在未解冻情况下剪取少许冰冻肿瘤组织(约 0.1 ml),常温下融化,进行 DNA 快速提取并获得待检 DNA 上清液。以 5 μl 上清液为模板,使用常规引物进行 PCR 扩增。将扩增体系(上清液 5 μl, Primer mix 2 μl, 扩增 mix 25 μl, ddH<sub>2</sub>O 18 μl, 总体积 50 μl)加入反应耗材下层储液管中。将检测体系(纯化的 Cas12a 2 μl, crRNA 2 μl, 荧光探针 10 μl, C Buffer 3 μl, ddH<sub>2</sub>O 33 μl, 总体积 50 μl)加入耗材上层储液管备用。此步骤避光。使用 V2 型掌上型快速荧光检测仪一体机进行检测。扩增遵循程序:95 ℃/180 s;95 ℃/10 s、58 ℃/20 s,25 次循环;25 ℃/2 s。反应程序为:37 ℃/1 min,30 次循环,每 1 min 采集一次荧光。反应全部结束后,统计分析检测反应(37 ℃)内反应前后荧光值的变化情况(即相对荧光值)。根据阴性阈值判断待测待测样本 DNA 中是否存在待检突变基因。

1.4 HE 染色与直接测序方法 所有冰冻组织样本进行 HE 染色评估样本质量。直接测序采用一步法[多重 PCR 扩增联合下一代测序]进行 IDH 位点突变检测(包括 R132H, R132C, R132S, R132G, R132L, R172K, R172M, R172W, R172G, R172S)。委托北京泛生子基因科技有限公司完成。

表 1 本文纳入 11 例 IDH2 突变胶质瘤病人的临床资料							Crispr-Cas12a 检测的相对荧光值 (针对 IDH2-R172K)		
病例	性别	年龄 (岁)	部位	组织学类型	WHO 分 级	IDH2 突变位点	第一次	第二次	第三次
病例 1	女	48	右额颞岛叶	少突胶质细胞瘤	3 级	R172K	1 800	2 400	1 700
病例 2	男	31	左额颞叶	少突-星形细胞瘤	2 级	R172K	850	900	1 100
病例 3	男	29	右颞叶	星形细胞瘤	2 级	R172K	1 300	1 500	1 550
病例 4	男	38	左额叶	少突-星形细胞瘤	3 级	R172K	2 900	1 900	1 750
病例 5	女	24	右额岛叶	少突胶质细胞瘤	2 级	R172K	600	900	800
病例 6	男	40	左额颞岛叶	少突胶质细胞瘤	3 级	R172K	1 600	1 800	2 200
病例 7	男	53	左额颞顶叶	星形细胞瘤	4 级	R172K	220	750	600
病例 8	男	27	左额顶叶、丘脑	少突-星形细胞瘤	2 级	R132H、R172K	2 300	2 100	1 400
病例 9	女	34	右额岛叶、胼胝体	少突胶质细胞瘤	2 级	R172K	1 700	1 900	1 250
病例 10	男	34	右颞岛叶	星形细胞瘤	3 级	R172M	280	170	400
病例 11	男	49	右额叶	少突胶质细胞瘤	2 级	R172S	330	350	140

表 2 crDNA、上下游引物及 IDH2-R172K 野生型、突变型靶点序列

检测目标	序列
IDH2-R172K crDNA	5'-GTCGCCATGGGCGTGATTGCATCTACAAGAGTAGAAATTACCCTATAGTGAGTCGTATTAATTTTC-3'
IDH2-R172K 上游	5'-CGGTCTGCCACAAAGTCTGT-3'
IDH2-R172K 下游	5'-GTGGGACCACTATTATCTCTGTCC-3'
IDH2-R172K 野生型	5'-CCTGGTCGCCATGGGCGTGCCTGCCAATGGTGATGGGCTTGGTCCAGCCAGGGA-3'
IDH2-R172K 突变型	5'-CCTGGTCGCCATGGGCGTGCCTTGCCAATGGTGATGGGCTTGGTCCAGCCAGGGA-3'

1.5 统计学分析 应用 SPSS 22.0 软件分析;以直接测序为金标准,评价 Crispr-Cas12a 方法的诊断效能;依据相对荧光值绘出 Crispr-Cas12a 方法的受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线,求得 IDH2-R172K 突变型和野生型样本相对荧光值的最佳截止值,计算灵敏度、特异性和一致性,利用曲线下面积(area under curve, AUC)评估检测水平,其中 AUC>0.9 为优秀,0.7~0.9 为一般,<0.7 为差;采用 Kappa 一致性检验分析一致性,其中 Kappa>0.75 为一致性很好,0.4~0.75 为一致性较好,<0.4 为一致性较差; $P<0.05$  认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Crispr-Cas12a 检测体系的验证结果 IDH2-R172K 目的基因片段扩增片段长度为 308 bp。对 8 个样本(4 个 IDH2-R172K 野生型、4 个 IDH2-R172K 突变型)在目的基因扩增后进行电泳,均显示出清晰的条带(图 1)。利用不同比例的 IDH2-R172K 突变型与野生型非扩增模板混合进行梯度拷贝检测,模拟体内肿瘤细胞不同频率的 IDH2-R172K 突变,结果显示相对荧光值与 IDH 突变频率呈正相关,理论上可检测频率低至 1% 的 IDH2-R172K 突变(图 2)。考虑到阴性对照组(IDH2-R172K 突变型非扩增模板 0 ng+IDH2-R172K 野生型非扩增模板 100 ng)的荧光值变化程度约为 500 单位,因此预估 IDH 突变型与野生型样本的相对荧光值截止值为 500。

2.2 Crispr-Cas12a 方法检测结果及与直接测序的一

致性 利用 Crispr-Cas12a 方法检测显示,9 例 IDH2-R172K 样本中,26 例次相对荧光值 $\geq 600$ ,1 例次相对荧光值为 220。

ROC 曲线分析显示,AUC 为 0.967(图 3),约登指数为 0.892,最佳相对荧光值为 590,与预实验截止值(500)相近。以 590 作为 IDH2-R172K 突变型和野生型样本的阈值,Crispr-Cas12a 法的灵敏度为 96.3%(95% CI 81.7%~99.3%),特异性为 92.9%(95% CI 89.5%~95.3%),一致性为 93.2%(95% CI 89.9%~95.4%)。Crispr-Cas12a 法与直接测序法一致性检验 Kappa 值为 0.658,一致性较好(表 3)。

3 讨论

IDH 基因状态是成人弥漫性胶质瘤分子分型的重要依据之一,对指导手术治疗具有重要意义<sup>[1]</sup>。不

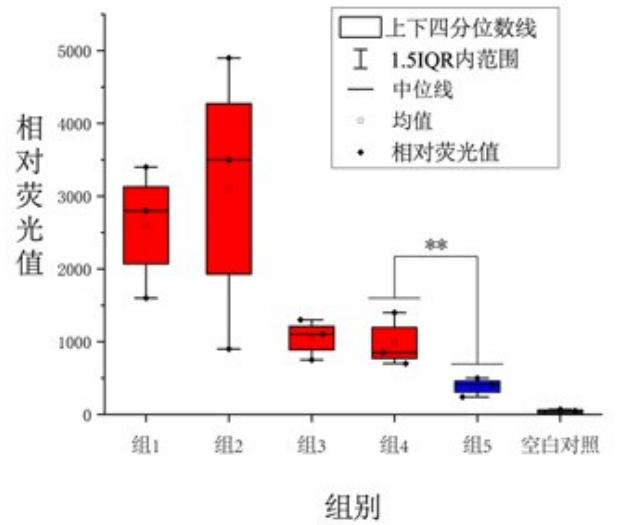


图 2 Fncas12a 荧光体系验证

组 1. 100% IDH2-R172K 突变型模板+0% IDH2-R172K 野生型模板;组 2. 50% IDH2-R172K 突变型模板+50% IDH2-R172K 野生型模板;组 3. 10% IDH2R172K 突变型模板+90% IDH2-R172K 野生型模板;组 4. 1% IDH2-R172K 突变型模板+99% IDH2-R172K 野生型模板;组 5. 0% IDH2-R172K 突变型模板+100% IDH2-R172K 野生型模板;\*\*  $P\leq 0.01$

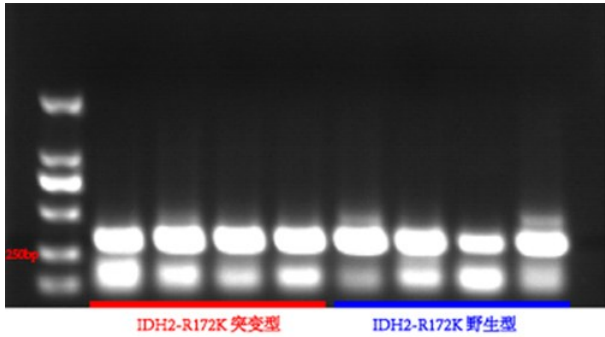


图 1 脑胶质瘤样本 IDH2-R172K 基因扩增产物电泳鉴定



同亚型成人弥漫性胶质瘤的手术切除范围不同。少突胶质细胞瘤的切除应以保护神经功能为主,可以接受少量肿瘤组织残留<sup>[10]</sup>;星形细胞瘤则需要达到影像学范围尽可能完全切除<sup>[11]</sup>。IDH野生型低级别弥漫性胶质瘤的切除范围往往需要超出影像学所示范围<sup>[12]</sup>。而对胶质母细胞瘤,65岁以下的病人需要切除MRI增强范围病变和非增强范围病变,65岁以上的病人则建议仅切除增强病变<sup>[13]</sup>。因此,结合术前影像学特征,术中明确IDH状态有助于成人弥漫性胶质瘤病人的精准个体化手术。此外,与胶质瘤相比,一些非肿瘤性改变(梗死、坏死、脑脓肿、辐射改变)以及颅内转移瘤的影像学表现可能与成人弥漫性胶质瘤相似,导致术前诊断不明确,而这些病变并不具有IDH突变的特征<sup>[14]</sup>。本研究Crispr-Cas12a方法检测IDH突变耗时约50 min,可作为术中快速检测方法,不仅可以指导手术,也有助于鉴别诊断。此外,本文11例IDH2突变的样本中,8例组织含有少突胶质细胞瘤的成分,提示IDH1野生型除了具有少突胶质细胞瘤病理学特征外,应注意是否存在IDH2突变<sup>[3,15]</sup>。

目前,IDH2突变的主要检测手段依赖术后直接测序<sup>[16]</sup>。但是直接测序不能用于术中快速检测,无法指导手术。免疫组化法不能检测IDH2突变,使IDH2突变容易被忽视。

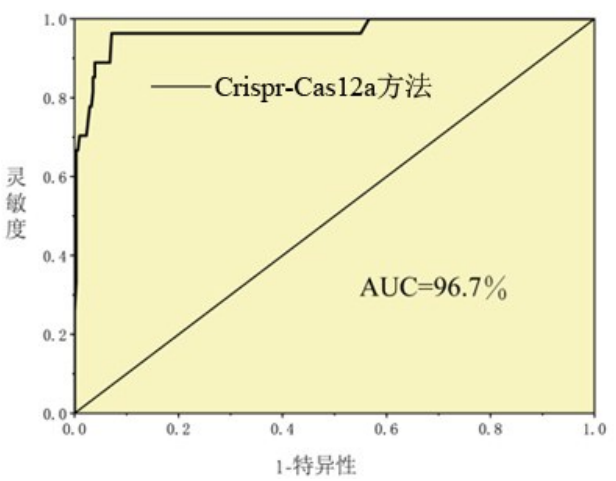


图3 ROC曲线分析Crispr-Cas12a法检测脑胶质瘤IDH2-R172K基因突变的效能

表3 Crispr-cas12a法与直接测序法检测脑胶质瘤IDH2-R172K基因突变的一致性分析(例次)

Crispr-Cas12a 方 法	NGS测序	
	阳性	阴性
阳性	26	22
阴性	1	287

Crispr检测作为新一代检测技术<sup>[17,18]</sup>,具有反应速度快、灵敏度高、易操作等优势,适用于体外核酸快速检测<sup>[19]</sup>,已应用于多种疾病的诊断,例如SARS-CoV-2<sup>[20,21]</sup>、人偏肺病毒等<sup>[22]</sup>。Crispr-Cas12a识别特异性靶分子的能力很强,能够对粗扩增后的样本进行检测<sup>[18]</sup>。本实验检测体系的检测能力达到1%频率的突变,可以满足临床需要。另外,Crispr-Cas12a方法检测IDH2-R172K的灵敏度较高,但特异性较低。由于IDH2-R172K基因为点突变,野生型与突变型仅存在一个碱基对差异,crRNA在反应中可能不可避免地野生型片段发生错配,出现假阳性结果。ROC曲线显示,Crispr-Cas12a方法的AUC达0.967,灵敏度与特异性均在90%以上,表明本方法对IDH2-R172K野生型与突变型的区分能力较强,具有相当高的检验效能。另外,Crispr-Cas12a方法具有检测速度快,成本低的优势,可以弥补直接测序的速度偏慢、较昂贵的不足。

本实验首次将Crispr-Cas12a工具引入成人弥漫性胶质瘤的分子检测,具备一定的创新性。该方法具有一些优势:首先,检测耗时约50 min,基本满足术中快速检测需求。由于快速荧光检测仪一体机可以实时展现相对荧光值,因此有进一步缩短检测时间的可能;其次,该实验所需的仪器少,对检测环境要求较低,试剂成本低,可以在手术室中展开检测,有利于普及应用;另外,单次检测所需的样本量很少,一粒小米粒大小的肿瘤组织(约0.1 ml)即满足检测需求。若有条件,多孔快速荧光检测仪可以同时床旁进行多次检测,以进一步提高检测结果的准确性。此外,考虑到样本来源于标本库,并非全部检测者亲自采集,因此对样本进行HE染色并评估样本质量是有必要的。

本实验有以下几点不足:首先,IDH2-R172K突变型样本数量较少,这是与其较低的突变频率有关,作为弥补,我们设置了相对较大数量的阴性对照;其次,我们忽视了其它罕见位点的突变,如R172M、R172W、R172G、R172S等,这些突变发生频率很低,虽然理论上将这些位点纳入检测完全可行,但是没有足够的突变型样本验证针对这些位点的检测体系是否有效;最后,我们只进行了冰冻样本的检测,尽管冰冻样本与新鲜样本的DNA含量没有显著差别<sup>[23]</sup>,但在应用于临床前,需要完善对新鲜样本的检测。

总之,本研究初步探索了Crispr-Cas12a方法快速检测成人弥漫性胶质瘤冰冻样本IDH2-R172K突

变,该方法灵敏度、特异度高,与直接测序一致性良好,基本完成快速定性检测,具有潜在的临床应用价值。

【参考文献】

[1] LOUIS DN, PERRY A, WESSELING P, *et al.* The 2021 WHO classification of tumors of the central nervous system: a summary [J]. *Neuro Oncol*, 2021, 23(8): 1231-1251.

[2] JIANG T, NAM DH, RAM Z, *et al.* Clinical practice guide—lines for the management of adult diffuse gliomas [J]. *Cancer Lett*, 2021, 499: 60-72.

[3] AMMENDOLA S, BROGGI G, BARRESI V. IDH-mutant diffuse gliomas: tips and tricks in the era of genomic tumor classification [J]. *Histol Histopathol*, 2023, 38(7): 739-753.

[4] DANG L, WHITE DW, GROSS S, *et al.* Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate [J]. *Nature*, 2009, 462(7274): 739-744.

[5] DANG L, YEN K, ATTAR EC. IDH mutations in cancer and progress toward development of targeted therapeutics [J]. *Ann Oncol*, 2016, 27(4): 599-608.

[6] CHEN S, ZHU H, JIN M, *et al.* Molecular and clinical characteristics of IDH mutations in Chinese NSCLC patients and potential treatment strategies [J]. *Cancer Med*, 2022, 11(22): 4122-4133.

[7] TESILEANU CMS, VALLENTGORD WR, SANSON M, *et al.* Non-IDH1-R132H IDH1/2 mutations are associated with increased DNA methylation and improved survival in astrocytomas, compared to IDH1-R132H mutations [J]. *Acta Neuropathol*, 2021, 141(6): 945-957.

[8] HILLE F, RICHTER H, WONG SP, *et al.* The biology of CRISPR-cas: backward and forward [J]. *Cell*, 2018, 172(6): 1239-1259.

[9] BARRANGOU R, FREMAUX C, DEVEAU H, *et al.* CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes [J]. *Science*, 2007, 315(5819): 1709-1712.

[10] CARSTAM L, CORELL A, SMITS A, *et al.* WHO grade loses its prognostic value in molecularly defined diffuse lower-grade gliomas [J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 803975.

[11] WIJNENGA MMJ, FRENCH PJ, DUBBINK HJ, *et al.* The impact of surgery in molecularly defined low-grade glioma: an integrated clinical, radiological, and molecular analysis [J]. *Neuro Oncol*, 2018, 20(1): 103-112.

[12] WANG P, LUO C, HONG PJ, *et al.* The role of surgery in

idh-wild-type lower-grade gliomas: threshold at a high extent of resection should be pursued [J]. *Neurosurgery*, 2021, 88(6): 1136-1144.

[13] MOLINARO AM, HERVEY-JUMPER S, MORSHED RA, *et al.* Association of maximal extent of resection of contrast-enhanced and non-contrast-enhanced tumor with survival within molecular subgroups of patients with newly diagnosed glioblastoma [J]. *JAMA Oncol*, 2020, 6(4): 495-503.

[14] NEFF C, CIOFFI G, WAITE K, *et al.* Molecular marker testing and reporting completeness for adult-type diffuse gliomas in the United States [J]. *Neurooncol Pract*, 2023, 10(1): 24-33.

[15] KOH J, CHO H, KIM H, *et al.* IDH2 mutation in gliomas including novel mutation [J]. *Neuropathology*, 2015, 35(3): 236-244.

[16] GUARNACCIA M, GUARNACCIA L, LA COGNATA V, *et al.* A targeted next-generation sequencing panel to genotype gliomas [J]. *Life (Basel)*, 2022, 12(7): 956.

[17] CHEN JS, MA E, HARRINGTON LB, *et al.* CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity [J]. *Science*, 2018, 360(6387): 436-439.

[18] YAN WX, HUNNEWELL P, ALFONSE LE, *et al.* Functionally diverse type V CRISPR-Cas systems [J]. *Science*, 2019, 363(6422): 88-91.

[19] ZETSCHE B, GOOTENBERG JS, ABUDAYYEH OO, *et al.* Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system [J]. *Cell*, 2015, 163(3): 759-71.

[20] LIANG Y, LIN H, ZOU L, *et al.* CRISPR-Cas12a-based detection for the major SARS-CoV-2 variants of concern [J]. *Microbiol Spectr*, 2021, 9(3): e0101721.

[21] MAYURAMART O, NIMSAMER P, RATTANABURI S, *et al.* Detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 and influenza viruses based on CRISPR-Cas12a [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2021, 246(4): 400-405.

[22] QIAN W, HUANG J, WANG T, *et al.* Visual detection of human metapneumovirus using CRISPR-Cas12a diagnostics [J]. *Virus Res*, 2021, 305: 198568.

[23] KELLY R, ALBERT M, DE LADURANTAYE M, *et al.* RNA and DNA integrity remain stable in frozen tissue after long-term storage at cryogenic temperatures: a report from the ontario tumour bank [J]. *Biopreserv Biobank*, 2019, 17(4): 282-287.