

# Arşivlenmiş RNA Örneklerinin Gen Ekspresyon Analizleri Açısından Performansının Değerlendirilmesi Üzerine Metodolojik Çalışma

## Methodological Study on the Evaluation of the Performance of Archived RNA Samples in Terms of Gene Expression Analyzes

<sup>ib</sup> Gökçe GÜLLÜ AMURAN<sup>a</sup>, <sup>ib</sup> Büşra POLAT<sup>a</sup>, <sup>ib</sup> İrem PEKER EYÜBOĞLU<sup>a</sup>, <sup>ib</sup> Tolga ÖZMEN<sup>c</sup>,  
<sup>ib</sup> Handan KAYA<sup>d</sup>, <sup>ib</sup> Mustafa AKKİPRİK<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ABD, İstanbul, Türkiye

<sup>b</sup>Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik ABD, İstanbul, Türkiye

<sup>c</sup>Miami Üniversitesi Miller Tıp Fakültesi, Cerrahi Onkoloji Kliniği, Miami, Amerika Birleşik Devletleri

<sup>d</sup>Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Patoloji ABD, İstanbul, Türkiye

**ÖZET Amaç:** RNA, DNA'ya göre daha düşük kalımlılığa sahip bir moleküldür. RNA analizine dayalı moleküler biyoloji çalışmalarında sıklıkla özel solüsyonlar veya özel şartlar kullanılmaktadır. Bu çalışmada, ddH<sub>2</sub>O içerisinde çözülmüş, 10 yıl boyunca -40 °C'de saklanmış RNA örneklerinin gen ekspresyon analizi açısından performansının değerlendirilmesi amaçlanmıştır. **Gereç ve Yöntemler:** 40 meme dokusundan RNA izole edildi, cDNA sentezinin ardından, eş zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu ile beta-aktin geninin ekspresyonu incelendi. Örnekler 10 yıl boyunca -40 °C'de saklandı ve 10 yıl sonra deneyler tekrar edildi. Elde edilen eşik döngü (ct) değerleri arasındaki fark GraphPad Prism istatistik paket programı kullanılarak incelendi. Veriler normal dağılıma uygunluk gösterdiğinden eşleştirilmiş t-testi ile incelendi ve istatistiksel anlamlılık için p<0,05 sınır değeri kullanıldı. **Bulgular:** Kırk RNA örneğinin tümünde beta-aktin ekspresyonu saptandı. Taze örneklerde elde edilen en düşük ve en yüksek ct değerleri 16,17 ve 26,34 iken, 10 yıl bekletilmiş örneklerde 15,66 ve 26,95'tir. Taze örneklerin ortalama ct değeri 20,20 iken, 10 yıl sonra yapılan deneylerde elde edilen ortalama ct değeri 20,84 olmuştur. İki grup arasında anlamlı fark gözlenmemiştir. **Sonuç:** Elde edilen sonuçlar RNA örneklerinin 10 yıl boyunca -40 °C'de saklanmasının ekspresyon deneylerinde anlamlı farka neden olmadığını, su içerisinde çözülmüş RNA örneklerinin -40 °C'de saklanarak 10 yıl boyunca kullanılabilirliğini göstermiştir. RNA örnekleri 10 yıl sonra yeniden incelenmek üzere arşivlenmiştir.

**ABSTRACT Objective:** RNA is not stable as DNA. Special solutions or special conditions are often used in molecular biology studies based on RNA analysis. In this study, it was aimed to evaluate the performance of RNA samples eluted with ddH<sub>2</sub>O and stored at -40 °C for 10 years in terms of gene expression analysis. **Material and Methods:** RNA was isolated from 40 breast tissues. After cDNA synthesis, expression of beta-actin gene was examined by quantitative polymerase chain reaction. The samples were stored at -40 °C for 10 years and the experiments were repeated 10 years later. The difference between the obtained threshold cycle (ct) values was analyzed using the GraphPad Prism statistical package program. Since the data were in accordance with the normal distribution, they were analyzed with a paired t-test and a cut-off value of p<0.05 was used for statistical significance. **Results:** Beta-actin expression was detected in all 40 RNA samples. While the lowest and highest ct values obtained in fresh samples were 16.17 and 26.34, they were 15.66 and 26.95 in samples that were kept for 10 years. While the average ct value of the fresh samples was 20.20, the average ct value obtained in the experiments performed after 10 years was 20.84. No significant difference was observed between the 2 groups. **Conclusion:** The results showed that storing RNA samples at -40 °C for 10 years did not cause a significant difference in expression experiments, and RNA samples dissolved in water could be used for 10 years by storing them at -40 °C. RNA samples were archived for re-examination 10 years later.

**Anahtar Kelimeler:** Meme kanseri; RNA; arşiv;  
gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

**Keywords:** Breast cancer; RNA; archive;  
real-time polymerase chain reaction

**Correspondence:** Gökçe GÜLLÜ AMURAN

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ABD, İstanbul, Türkiye

**E-mail:** gokcegullu@gmail.com



Peer review under responsibility of Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences.

**Received:** 26 May 2022

**Received in revised form:** 05 Oct 2022

**Accepted:** 19 Oct 2022

**Available online:** 02 Nov 2022

2146-9040 / Copyright © 2023 by Türkiye Klinikleri. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) en sık kullanılan moleküler biyolojik yöntemlerden biridir.<sup>1</sup> PZR reaksiyonunda kalıp olarak DNA kullanılır, gen ekspresyon çalışmalarında ise RNA örneklerinden cDNA sentezi yapıp eş zamanlı kantitatif PZR ile gen ekspresyonunun incelenmesi rutin olarak kullanılan bir moleküler biyolojik yöntemdir. Gen ekspresyonunun hesaplanması için çeşitli matematiksel formüller geliştirilmiştir.<sup>2,3</sup> Bu yöntemlerde hedef gen ekspresyonu, yapısal (house keeping) gen olarak adlandırılan, hücrede daima eksprese edilen bir gene kıyasla belirlenir. Yapısal genler oldukça fazladır, farklı dokularda farklı yapısal genler kullanılabilir ancak beta-aktin en sık kullanılan yapısal genlerden biridir.<sup>4</sup> Hangi yöntem kullanılırsa kullanılsın RNA kalımlılığı ekspresyon çalışmalarında sınırlayıcı faktörlerdendir. Biyobankalarda uzun süreler saklanan RNA örneklerinin kalımlılığı rutin olarak kontrol edilir, RNA izolasyonu ve saklanmasında özel solüsyonlar, özel kriyo saklama yöntemleri kullanılır.<sup>5</sup> Özel koşullara ihtiyaç duyulması hem maliyet artırıcıdır hem de yöntemlerin her laboratuvarında uygulanabilmesini kısıtlar. Bu çalışmada, rutin izolasyon yöntemleri ile izole edilmiş, özel bir kimyasal kullanılmadan 10 yıl boyunca, -40 °C'de saklanmış RNA örneklerinin eş zamanlı kantitatif PZR etkinliğindeki değişimini inceledik.

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

### DOKU ÖRNEKLERİ

2010 Temmuz-2012 Ocak aralığında, Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesinde meme kanseri tanısı almış kadınlara ait 40 meme dokusu çalışmaya dâhil edildi. Dâhil edilen doku örneklerinden 18'i kanser dokusu, 22'si komşu sağlıklı dokudur. Çalışma, Helsinki Deklarasyonu prensiplerine uygun olarak yürütülmüş, yöntem Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Etik Kurulu tarafından (tarih: 20 Ocak 2011, no: B.30.2.MAR.0.01.02/AEK/15) onaylanmış ve tüm katılımcıların yazılı onamı alınmıştır.

### RNA İZOLASYONU, SAKLANMASI VE EŞ ZAMANLI KANTİTATİF PZR İLE BETA-AKTİN GENİNİN AMPLİFİYE EDİLMESİ

Doku örneklerinden RNA izolasyonu High Pure RNA Tissue Kit (Roche, Mannheim, Almanya) kul-

lanılarak üretici firma yönergeleri doğrultusunda yapıldı. Elüsyon, kit içerisinde bulunan ddH<sub>2</sub>O ile elüsyon hacmi 100 µL olacak şekilde yapıldı. Elde edilen RNA'ların konsantrasyonları Nano Drop (Thermo Scientific, A.B.D) ile ölçüldü.

RNA'dan cDNA sentezi, High-Capacity cDNA Reverse Transcription kiti (Thermo Scientific, A.B.D) ile 10 µL RNA kullanılarak, 20 µL son hacimde, kit yönergeleri doğrultusunda gerçekleştirildi. Reaksiyon koşulları şöyledir, 25 °C'de 10 dk, 37 °C'de 120 dk ve 85 °C'de 5 dk. Reaksiyon sonrasında cDNA'lar -20 °C'de saklandı ve 6 hafta içerisinde kullanıldı.

Eş zamanlı kantitatif PZR Ampigene qPCR Green mix (Enzo, ABD) ve uygun primerler kullanılarak, 20 µL son hacimde, Light Cycler 480 real time PCR (Roche, Almanya) cihazında gerçekleştirildi. Tüm deneylerde kontaminasyonun dışlanması için negatif kontroller de kullanıldı.

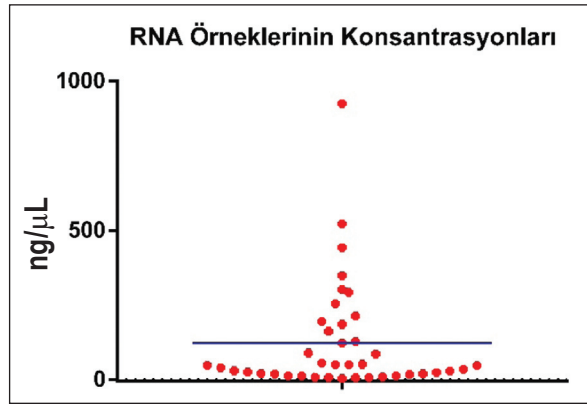
Reaksiyon içeriği kit kılavuzunda belirtildiği gibi 10 µL 2X qPCR mix, 0,8 µL forward ve reverse primer, 2 µL cDNA ve 6,4 µL ddH<sub>2</sub>O kullanılarak hazırlandı. Kit yönergeleri doğrultusunda 2 dk 95 °C'de polimeraz aktivasyonu gerçekleştirildikten sonra 40 döngü amplifikasyon yapıldı. Beta-aktin geni için kullanılan primer dizileri Forward: 5'AGACCGCGTCCGCC3' ve Reverse: 5'TATCATCATCCATGGTGAGCTGG3' ve bağlanma sıcaklığı 58 °C'dir. Amplifikasyon sonrasında erime eğrisi analizi yapılarak özgül olmayan bağlanma olup olmadığı incelendi.

### İSTATİSTİKSEL ANALİZ

2012 ve 2022 yıllarında elde edilen eşik döngü (ct) değerleri GraphPad Prism (GraphPad, A.B.D) paket programı ile değerlendirildi, normal dağılıma uygun oldukları belirlenen ct değerleri arasındaki farkın anlamlılığı parametrik yöntemlerle incelendi. Bu amaçla, eşleştirilmiş t-testi kullanıldı ve istatistiksel anlamlılık için sınır değer p<0,05 kullanıldı.

## BULGULAR

Kırk doku örneğinin tümünden başarılı bir şekilde RNA izole edildi. En düşük konsantrasyon 3,61 ng/µL ve en yüksek konsantrasyon 925,10 ng/µL ölçüldü. Konsantrasyonların dağılımı Şekil 1'de gösterilmiştir.



ŞEKİL 1: Dokulardan izole edilen RNA'ların konsantrasyonları.

Gerçek zamanlı PZR sonucunda tüm örneklerden kabul edilebilir aralıkta ct değeri elde edildi. Elde edilen en düşük ct değeri 15,66 en yüksek ct değeri ise 26,95 olarak belirlendi. Ct değerlerine ait ayrıntılar Tablo 1'de verilmiştir. 2012 ve 2022 yıllarında elde edilen ct değerlerinin normal dağılıma uygun olduğu belirlendi ve eşleştirilmiş t-testi ile aradaki farkın anlamlılığı incelendi. İki grup arasındaki farkların ortalama değerinin 0,64 olduğu ve %95 güven aralığında bu farkın anlamlı olmadığı belirlendi ( $p=0,12$ ). Elde edilen ct değerleri eşleştirilmeden incelendiğinde de farkın anlamlı olmadığı belirlendi ( $p=0,29$ ). Örnekler kanser dokuları ve sağlıklı dokular olarak ayrı ayrı incelendiğinde de ct değerlerindeki değişimin anlamlı düzeyde farklı olmadığı belirlendi. Şekil 2'de örneklerin 10 yıl önceki ve 10 yıl sonraki ct değerleri eşleştirilmiş, artma azalma eğilimleri gösterilmiştir. Şekil 3'te ise dağılımlardaki farkın gözlenmesi için ct değerleri saçılım grafiği olarak verilmiştir.

**TABLO 1:** Aynı RNA örnekleri kullanılarak, 2012 ve 2022 yıllarında beta-aktin geni için yapılmış gerçek zamanlı PZR deneyleri sonunda elde edilen ct değerlerine ilişkin bilgiler.

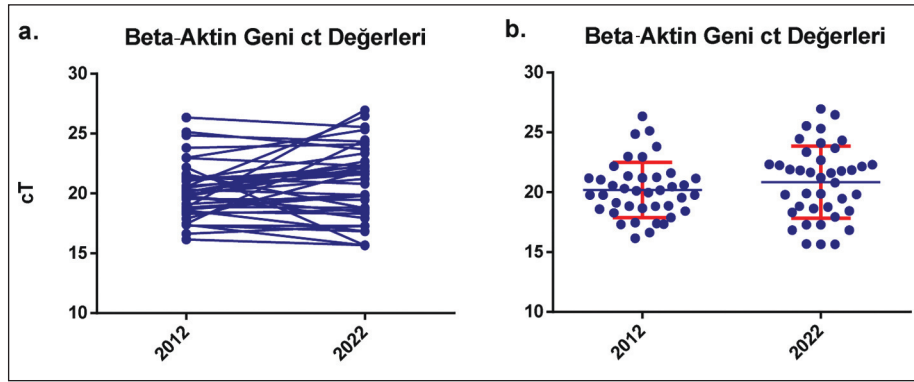
	2012 sonuçları	2022 sonuçları
Örnek sayısı	40	40
Minimum ct	16,17	15,66
Maksimum ct	26,34	26,95
Ortalama	20,20	20,84
Ortanca	20,06	21,42

PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu; ct: eşik döngü.

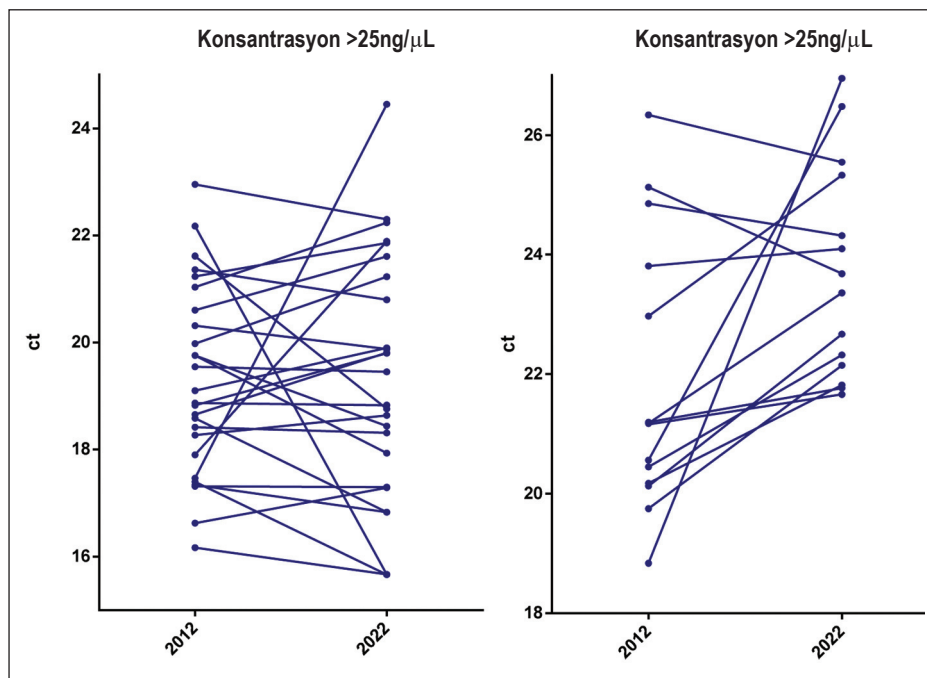
Örnekler RNA konsantrasyonlarının 25 ng/µL'den düşük ve yüksek olanlar şeklinde 2 gruba ayrıldı. Konsantrasyonu 25 ng/µL'den küçük olan RNA örneklerinde 10 yıl sonra elde edilen ct'lerin genellikle yükselme eğiliminde olduğu gözlemlendi (Şekil 3). Konsantrasyonu 25 ng/µL'den büyük olan örneklerde gözlenen ct değişimi istatistiksel olarak anlamlı değilken, 25 ng/µL'den daha düşük konsantrasyondaki örneklerde gözlenen ct artışının istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ( $p=0,0134$  ve farkın ortanca değeri=1,75). Bu örneklerde elde edilen en yüksek ct değeri 26,95'tir.

## TARTIŞMA

Gen ekspresyon çalışmalarında, RNA'dan cDNA sentezlenir ve kantitatif PZR yöntemi ile hedef genin RNA miktarı tayin edilir.<sup>2</sup> Gen ekspresyon çalışmalarında kullanılacak örnekler doku veya RNA olarak saklanmaktadır, ancak saklama koşulları RNA degradasyonuna sebep olabileceğinden en ideal saklama koşulu için çeşitli analizler yapılmaktadır. Bazı biyobankalarda dokular ön muamele yapılmaksızın, bazı biyobankalarda özel solüsyonlar ile muamele edilerek saklanır. Bazı biyobankalarda ise dokular değil RNA örnekleri saklanmaktadır. Stephenson ve ark. kan örneklerini PAXgene blood RNA tüplerinde (Qiagen, Almanya) 3 yıl boyunca saklamış, RNA konsantrasyonu ve veriminde anlamlı düşüş olmadığını ancak izolasyon veriminin yıllar içerisinde azaldığını belirlemişlerdir.<sup>6</sup> Benzer bir çalışmada, PAXgene tüplerde saklanmış RNA örneklerinin 7 yıl boyunca miktar ve kalımlılık açısından zarar görmediği belirlenmiştir.<sup>7</sup> Yine benzer bir çalışmada, sıvı azot içerisinde saklanmış biyobanka örneklerindeki DNA, RNA miktarı ve kalitesi analiz edilmiş ve uzun süre kriyo saklamanın dokulardaki DNA, RNA miktar ve kalitesine etki etmediği belirlenmiştir.<sup>8</sup> -80 °C ve sıvı azotta uzun süre saklamanın RNA, DNA miktarı ve kalımlılığı üzerine etkisinin incelendiği çalışmada, 250 ng/µL konsantrasyona sahip örneklerin RNA kalımlılığı arasında fark gözlenmemiş ancak 25 ng/µL konsantrasyona sahip RNA örnekleri -80 °C'de saklandığında RNA kalımlılığında anlamlı düşüş olduğu saptanmıştır.<sup>5</sup> Kullandığımız RNA örnekleri için bu bulgunun geçerli olup olmadığını test etmek amacıyla konsantrasyonları 25 ng/µL'den



ŞEKİL 2: Örneklerin beta-aktin geni için elde edilen ct değerleri. A) 2012 ve 2022 yıllarında elde edilen ct değerlerinin dropline grafik ile gösterimi. B) Örneklerin 2012 ve 2022 yıllarında elde edilen ct değerlerinin dağılımını gösteren saçılım grafiği. ct: eşik döngü



ŞEKİL 3: Konsantrasyonu 25 ng/µL'den büyük ve küçük olan örneklerin ct değerlerindeki değişimlerin dropline grafikler ile gösterimi.

büyük ve küçük olan örneklerimizi ayrı ayrı inceledik. Şekil 3'te görüldüğü üzere 25 ng/µL'den daha düşük konsantrasyona sahip örneklerin ct değerlerinde yükselme meydana gelmiştir.

Biyobankalarda örnek saklanması özel şartlar ve teçhizatın kullanılması hem maliyeti artırır hem de yöntemi zorlaştırır. Bu nedenle biyobankalarda doğrudan -80 °C'de saklama, sıvı azotta saklama gibi yöntemler kullanılmakta ve farklı yöntemler arasında periyodik olarak kalite kontrol çalışmaları yapılmaktadır. Literatürde dokudan izole edilmiş RNA'ların uzun süre saklandıktan sonra analiz edildiği çalışma-

lar oldukça kısıtlıdır, örnekler genellikle izolasyon yapılmadan saklanmaktadır. İzolasyon yapılmadan saklanmış örneklerde zaman içerisinde verimin düştüğüne dair çalışmalar olduğu gibi aksini gösteren çalışmalar da mevcuttur.<sup>7,9</sup> Ancak 4 yıl -80 °C'de saklanmış örneklerde DNA, RNA konsantrasyonu ve kalitesinde anlamlı bir kayıp olmadığı belirlenmiştir, bu çalışmada 10 yıllık arşivlemeye dair veri bulunmamaktadır.<sup>10</sup> Elde ettiğimiz veriler bu bulguyu destekler nitelikte olduğu gibi RNA örneklerinin daha uzun süre saklanması hakkında da bilgi vermektedir. Tüm örnekler bir arada değerlendirildiğinde -40°C'de

10 yıl saklama sonucu RNA'lar degrade olmamış, örneklerin eş zamanlı kantitatif PZR veriminde değişiklik olmamıştır. Bu çalışmada, RNA kalınlığının belirlenmesi için RNA lizatında daha fazla kopyası bulunan, yapısal genlerden olan beta-aktinin PZR verimliliği incelenmiştir. Yapısal olmayan genlere göre daha fazla miktarda bulunan beta-aktinin incelenmesinin RNA harabiyetini daha net ortaya koyacağı, beta-aktin ct'lerinde gözlenen değişimin RNA harabiyetini yansıtacağı düşünülerek planlanmıştır. Ancak farklı klinik tablolarla ifadeleri değişen, yapısal genlere göre daha düşük seviyelerde ifade edilen, yapısal olmayan genler için de analizlerin yapılması eş zamanlı kantitatif PZR deneylerinde kullanılacak RNA'ların saklama koşullarının belirlenmesi açısından önem arz etmektedir.

## SONUÇ

Elde ettiğimiz bulgular, meme dokusundan izole edilmiş RNA'ların -40 °C'de, 10 yıl boyunca saklanması beta-aktin geni ct değerinde anlamlı bir artışa sebep olmadığını, dokulardan izole edilmiş RNA'ların özel şartlar ve solüsyonlar gerekmeksizin -40°C'de saklanmasının uygun olacağını göstermektedir. Ancak konsantrasyonu düşük RNA örneklerinde 10 yıl sonunda elde edilen ct değerleri ilk değerlerden daha yüksek olduğundan, izolasyon sonrasında konsantrasyon ölçümü yapıp düşük konsantrasyona sahip örneklerin konsantre edilmesi, doku varsa izolasyonun tekrarlanması yerinde olacaktır.

## Teşekkür

Genel cerrahi uzmanı Prof. Dr. Bahadır Güllüoğlu'na hastaların organize edilmesi ve örneklerin toplanmasındaki katkılarından ötürü teşekkür ederiz.

## Finansal Kaynak

Bu çalışma sırasında, yapılan araştırma konusu ile ilgili doğrudan bağlantısı bulunan herhangi bir ilaç firmasından, tıbbi alet, gereç ve malzeme sağlayan ve/veya üreten bir firma veya herhangi bir ticari firmadan, çalışmanın değerlendirme sürecinde, çalışma ile ilgili verilecek kararı olumsuz etkileyebilecek maddi ve/veya manevi herhangi bir destek alınmamıştır.

## Çıkar Çatışması

Bu çalışma ile ilgili olarak yazarların ve/veya aile bireylerinin çıkar çatışması potansiyeli olabilecek bilimsel ve tıbbi komite üyeliği veya üyeleri ile ilişkisi, danışmanlık, bilirkişilik, herhangi bir firmada çalışma durumu, hissedarlık ve benzer durumları yoktur.

## Yazar Katkıları

**Fikir/Kavram:** Gökçe Güllü Amuran; **Tasarım:** Gökçe Güllü Amuran; **Denetleme/Danışmanlık:** Gökçe Güllü Amuran; **Veri Toplama ve/veya İşleme:** Gökçe Güllü Amuran, Büşra Polat, İrem Peker Eyüboğlu, Mustafa Akkiprik, Handan Kaya, Tolga Özmen; **Analiz ve/veya Yorum:** Gökçe Güllü Amuran, Büşra Polat, İrem Peker Eyüboğlu, Mustafa Akkiprik, Handan Kaya, Tolga Özmen; **Kaynak Taraması:** Gökçe Güllü Amuran; **Makalenin Yazımı:** Gökçe Güllü Amuran; **Eleştirel İnceleme:** Gökçe Güllü Amuran, Büşra Polat, İrem Peker Eyüboğlu, Mustafa Akkiprik; **Kaynaklar ve Fon Sağlama:** Gökçe Güllü Amuran, Büşra Polat, İrem Peker Eyüboğlu, Mustafa Akkiprik; **Malzemeler:** Gökçe Güllü Amuran, Büşra Polat, İrem Peker Eyüboğlu, Mustafa Akkiprik.

## KAYNAKLAR

- Analytical Methods Committee AN. 59. PCR-the polymerase chain reaction. Anal. Methods. 2013;6:333-6. [Crossref] [PubMed]
- Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. Nat Protoc. 2008;3(6):1101-8. [Crossref] [PubMed]
- Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res. 2001;29(9):e45. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- de Kok JB, Roelofs RW, Giesendorf BA, Pennings JL, Waas ET, Feuth T, et al. Normalization of gene expression measurements in tumor tissues: comparison of 13 endogenous control genes. Lab Invest. 2005;85(1):154-9. [Crossref] [PubMed]
- Babel M, Mamilos A, Seitz S, Niedermair T, Weber F, Anzeneder T, et al. Compared DNA and RNA quality of breast cancer biobanking samples after long-term storage protocols in - 80 °C and liquid nitrogen. Sci Rep. 2020;10(1):14404. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- Stephenson NL, Hornaday KK, Doktorchik CTA, Lyon AW, Tough SC, Slater DM. Quality assessment of RNA in long-term storage: the all our families biorepository. PLoS One. 2020;15(12):e0242404. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- Tang R, She Q, Lu Y, Yin R, Zhu P, Zhu L, et al. Quality control of RNA extracted from PAXgene blood RNA tubes after different storage periods. Biopreserv Biobank. 2019;17(5):477-82. [Crossref] [PubMed]
- Kelly R, Albert M, de Ladurantaye M, Moore M, Dokun O, Bartlett JMS. RNA and DNA integrity remain stable in frozen tissue after long-term storage at cryogenic temperatures: a report from the Ontario tumour bank. Biopreserv Biobank. 2019;17(4):282-7. [Crossref] [PubMed]
- Duale N, Lipkin WI, Briese T, Aarem J, Rønningen KS, Aas KK, et al. Long-term storage of blood RNA collected in RNA stabilizing Tempus tubes in a large biobank—evaluation of RNA quality and stability. BMC Res Notes. 2014;7:633. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- Ortega-Pinazo J, Diaz T, Martinez B, Jiménez A, Pinto-Medel MJ, Ferro P. Quality assessment on the long-term cryopreservation and nucleic acids extraction processes implemented in the andalusian public biobank. Cell Tissue Bank. 2019;20(2):255-65. [Crossref] [PubMed]