FFPE and Fresh-Frozen Samples in NGS Applications

EBIOGEN

TECHNICAL NOTE I JAN. 2026

FFPE 샘플과 Fresh Frozen 샘플의 특성과 활용

FFPE (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded) 조직과 Fresh Frozen 조직은 임상 및 연구 현장에서 가장 널리 사용되는 대표적인 조직 보존 방식이다. 두 샘플 유형은 보존 안정성, 핵산 품질, 운영 요건이 달라 연구 목적과 시료 확보 환경에 따라 전략적으로 선택해야 한다. FFPE 샘플은 포르말린 고정을 통해 세포 구조와 조직 형태를 장기간 안정적으로 보존할 수 있기 때문에 병리 진단과 연계된 대규모 임상 코호트 구축이 가능하다는 점에서 큰 장점을 가진다. 이로 인해 FFPE 샘플은 질환의 발생과 진행, 치료 반응을 후향적으로 분석하는 데 중요한 자원으로 활용되고 있으며, 특히 암 유전체 연구 및 임상 바이오마커 발굴 분야에서 높은 가치를 지닌다. 그러나 포르말린 고정 과정에서 발생하는 화학적 변형으로 인해 DNA 및 RNA 의 단편화, 염기 변형, DNA-단백질 간 교차 결합이 유도될 수 있으며, 이는 라이브러리 제작 효율 저하와 시퀀싱 데이터 품질 변동성을 초래하여 변이 검출 정확도와 재현성에 영향을 미치는 요인으로 작용하게 된다. [1]

반면, Fresh Frozen 샘플은 조직을 신속하게 동결 보존함으로써 핵산과 단백질의 화학적 변형을 최소화할 수 있어 상대적으로 고품질의 DNA 및 RNA 를 확보할 수 있다. 이러한 특성으로 인해 Fresh Frozen 샘플은 전장 유전체 시퀀싱(WGS, Whole Genome Sequencing), 전사체 분석(RNA-Seq), 단일세포 오믹스(Single cell), 멀티오믹스(Multi-omics) 분석 등 고해상도 분자 분석에 특히 적합하다. 다만, 냉동 보관 및 유통을 위한 콜드 체인 유지가 필수적이며, 임상 현장에서는 장기 보관 및 추후 연구에 운영상의 제약이 발생할 수 있다. [2]

임상 환경에서는 생검 또는 동결 조직의 확보가 제한적인 경우가 많아 FFPE 샘플이 사실상 유일한 분석 자원으로 활용되는 경우가 빈번한 반면, 연구 환경에서는 Fresh Frozen 샘플이 표준으로 활용되는 경우가 많다. 따라서 두 샘플 유형의 특성과 한계를 정확히 이해하고, 연구 목적에 부합하는 분석 전략을 수립하는 것은 NGS 기반 유전체 연구의 신뢰도를 확보하는 데 필수적인 요소라 할 수 있다.

본 기술노트에서는 FFPE 샘플과 Fresh Frozen 샘플 각각의 보존 특성, 핵산 품질 특성, NGS 분석 적합성과 실험 설계 시 고려해야 할 핵심 기술적 요소를 정리하여 임상 적용 환경에서 최적의 샘플 선택과 분석 방법을 수립하는 데 실질적인 가이드를 제공하고자 한다.

그림 1. Tissue Sample Type [3]

1. FFPE(Formalin-Fixed Paraffin-Embedded) 샘플을 이용한 NGS 분석

1.1 FFPE 샘플의 연구적 가치

환자의 질병 진단과 치료 전략 수립을 위해 수술 또는 생검 과정에서 조직의 일부를 재취한다. 채취한 조직은 일반적으로 포르말린으로 고정한 뒤 파라핀에 포매하는 방식을 거치며, 이를 FFPE 샘플이라고 한다. FFPE 는 조직의 형태학적 구조를 장기간 안정적으로 보존할 수 있는 표준적인 보존 방법으로, 임상 현장에서 수십 년간 널리 사용되어 왔다. FFPE 블록 또는 슬라이드 형태로 보관된 조직은 수년에서 수십년에 이르기까지 물리적 안정성을 유지할 수 있으며, 임상 진단 이후에도 필요 시 연구 목적으로 활용이 가능하다. [4]

임상적으로 FFPE 샘플은 병리학자와 임상의가 환자의 질병 상태를 평가하고 치료 전략을 수립하는 데 핵심적인 자료로 사용된다. 더 나아가, 새로운 진단 기준이나 분석 기술이 등장한 이후에도, 기존 FFPE 샘플을 재분석함으로써 추가적인 정보를 얻는 데에도 중요한 역할을 한다. 이러한 특성으로 인해 FFPE 샘플은 단순한 조직 보존체를 넘어, 환자의 임상적 이력을 담고 있는 귀중한 자산으로 간주된다. 뿐만 아니라, 연구 관점에서도 FFPE 샘플은 높은 활용 가치를 지닌다. 연구자들은 기증받은 인체 조직이나 실험 동물에서 채취한 조직을 FFPE 형태로 보존함으로써, 향후 연구를 위한 장기적 연구 자원을 구축한다. 이처럼 체계적으로 관리되는 FFPE 샘플은 일반적으로 바이오뱅크 샘플로 분류되며, 임상 정보와 연계된 상태로 장기간 축적된다는 점에서 후향적 연구와 대규모 코호트 분석에 특히 용이하다.

1.2 FFPE 샘플의 활용

FFPE 샘플은 장기간 축적된 임상 조직을 활용한 연구를 가능하게 한다. 특히 암 연구 분야에서는 희귀 암이나 특정 아형에 대한 장기 추적 연구가 가능하며, 면역학 및 염증 질환 연구에서도 조직 수준의 병리학적 변화와 분자적 특징을 함께 분석하는 데 활용된다. 더 나아가, 신약 개발 및 비임상 연구에서는 질환 진행 단계별 조직 변화를 비교하거나, 치료 반응과 연관된 바이오마커를 발굴하는 데 있어 FFPE 샘플이 중요한 자원으로 사용된다. [5]

전통적으로 FFPE 샘플은 조직 구조와 형태를 평가하는 형태학적 분석에 주로 사용되어 왔다. 그러나 NGS 기술의 발전으로 인해, FFPE 샘플의 활용 범위는 분자 수준으로 확장되고 있다. 비록 포르말린 고정 과정에서 핵산의 단편화나 화학적 변형이 발생할 수 있음에도 불구하고, 적절한 추출 및 분석 전략을 적용할 경우 수십 년간 보관된 FFPE 샘플에서도 유전체 분석을 위한 DNA 와 전사체 분석을 위한 RNA 를 확보할 수 있음이 입증되었다. 이는 과거에 수집한 임상 샘플을 현대의 분자생물학적 기술로 재해석할 수 있는 가능성을 제시한다. [6]

이처럼 현대 연구에서 FFPE 샘플의 중요성이 다시금 부각됨에 따라, 본 기술노트에서는 FFPE 유래 RNA 에 대해 전사체 분석에 초점을 맞추어, 다양한 분석 접근법의 장단점을 비교하고 FFPE 샘플에 가장 적합한 연구 전략을 제시할 예정이다. 이를 통해 연구자들이 바이오뱅크에 축적된 FFPE 샘플을 보다 효과적으로 활용하여, 과거의 임상 데이터로 현재와 미래의 연구 성과로 연결하는 데 실질적인 가이드를 제공하고자 한다.

2. Fresh Frozen 샘플을 이용한 NGS 분석

2.1 Fresh Frozen 샘플의 연구적 가치

Fresh Frozen 샘플은 조직을 채취한 직후 액체질소 또는 -80℃ 이하의 초저온 환경에서 신속하게 동결 보존한 시료를 의미한다. 이 방식은 포르말린 고정과 같은 화학적 처리를 거치지 않기 때문에, 핵산과 단백질의 구조적·화학적 변형을 최소화할 수 있다. 이러한 특성으로 인해 Fresh Frozen 샘플은 분자생물학적 분석에 가장 이상적인 보존 방법으로 간주되며, 특히 RNA 분해를 효과적으로 억제할 수 있어, 전사체 분석을 포함한 고해상도 오믹스 연구에 널리 활용한다. [7]

Fresh Frozen 샘플은 조직 내 분자 상태를 채취 시점과 가장 유사한 형태로 유지할 수 있다는 점에서, 분석 결과의 정확도와 재현성이 매우 높다. DNA 는 높은 분자량을 유지한 상태로 추출되는 경우가 많아 전장 유전체 분석이나 구조 변이 분석과 같은 정밀 유전체 분석에 적합하며, RNA 또한 높은 RIN(RNA Integrity Number)값을 보이는 경우가 많아 정량적 유전자 발현(Gene expression) 분석과 스플라이싱 변이(Splicing variation) 분석에 유리하다. 이러한 이유로 Fresh Frozen 샘플은 FFPE 기반 분석 결과를 해석하는 기준으로 활용되기도 한다.

2.2 Fresh Frozen 샘플의 활용

Fresh Frozen 샘플은 고품질 핵산 확보가 가능하다는 장점으로 인해, 다양한 NGS 기반 분석에 폭넓게 활용된다. 대표적으로 전장 유전체 시퀀싱(WGS), 전장 엑솜 시퀀싱(WES), 타겟 패널 시퀀싱(Target-seq), 전사체 분석, 메틸레이션 분석 등 다양한 실험 기법에 적용될 수 있다. 특히, 유전자 발현 수준의 미세한 차이나 구조적인 변이를 정밀하게 분석할 수 있다. [8]

다만, Fresh Frozen 샘플은 냉동 보관 및 운송을 위한 콜드 체인 유지가 필수적이며, 온도 변동과 같은 물리적 요인에 의해 샘플 품질이 급격히 저하될 수 있다는 한계를 가진다. 또한, 임상 현장에서는 조직 채취 직후 즉시 동결이 어려운 경우가 많아, 대규모 임상 코호트 구축이나 장기간의 후향적 연구에서는 현실적인 제약이 따른다. 이러한 이유로 Fresh Frozen 샘플은 분석 품질 측면에서는 이상적인 선택지이지만, 실제 임상 적용성과 접근성 특면에서는 FFPE 샘플에 비해 제한적일 수 있다.

3. FFPE 샘플과 Fresh Frozen 샘플의 비교

임상 현장에서 확보되는 생검 조직은 질환의 분자적 특성을 가장 직접적으로 반영하는 생물학적 자원이다. 정밀 진단. 치료 전략 수립, 바이오마커 발굴 및 신약 개발 연구의 핵심 기반이 된다. 이러한 조직 시료는 병원 부설 바이오뱅크, 연구기관 또는 민간 연구 지원 기관에서 획득, 보관되며, 보존 방식에 따라 NGS 분석 적합성과 데이터 품질에 뚜렷한 차이를 보인다.

NGS 분석에서는 조직의 보존 방식이 분석 전략 전반에 직접적인 영향을 미친다. 포르말린 고정 과정에서 발생하는 핵산의 손상과 분절화로 인해, 분석 가능한 범위가 제한될 수 있으며 이에 따라 데이터 해석 기준과 신뢰성에 차이가 발생할 수 있다. 따라서 연구 목적에 부합하는 라이브러리 제작 방식과 분석 접근법을 수립하는 것이 중요하다. 현재 인체 유래 고형 조직의 대표적인 보존 방식은 FFPE 와 Fresh Frozen 이며, 두 방식은 각각 다른 특성을 갖는다. [8]

구분	FFPE	Fresh Frozen
보존 방식	포르말린 고정 후 파라핀 포매	급속 동결 (액체질소, -80℃ 이하)
장기 보존 안전성	매우 높음	중간
핵산 무결성	중간 (단편화 및 화학적 변형 존재)	매우 높음 (고분자량 유지)
RNA 품질 지표	DV200 기준으로 평가	RIN 기준으로 평가
임상 접근성	매우 높음 (표준적 병리 시료)	낮음 (임상 현장 제약)
대규모 코호트 구축	용이	어려움
대표적 활용 분야	후향적 임상 연구, 바이오마커 발굴, 병리 연계 연구	정밀 유전체 분석, 단일세포, 멀티오믹스 연구

표 1. FFPE 샘플과 Fresh Frozen 샘플 비교 요약

4. 연구 사례

4.1 FFPE 기반 Total RNA-Seq 최신 연구 사례

FFPE 샘플에서 전사체를 포괄적으로 분석하기 위한 방법으로 Total RNA-Seq 분석 전략이 활용되고 있다. Total RNA-Seq 은 rRNA 제거 기반으로 전체 RNA 분자를 대상으로 분석을 수행하며, Poly(A) tail 유무에 관계없이 다양한 전사체를 포착할 수 있다는 특징을 가진다. 이러한 접근법은 RNA 분절화가 발생한 FFPE 샘플에서도 전사체 정보를 비교적 안정적으로 확보하는 데 유리하다. [9]

(A) Whole-Transcriptome RNA-Seq of FFPE Renal Cell Carcinoma Samples

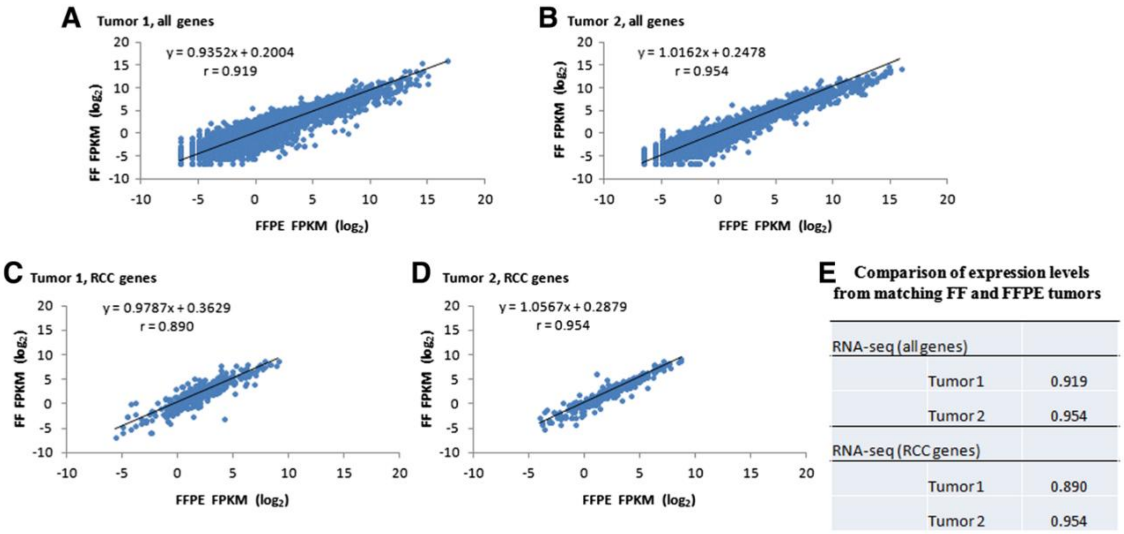

그림 2. High concordance of total RNA-seq–based gene expression profiles between matched FF and FFPE samples [10]

FFPE renal cell carcinoma total RNA-Seq 연구는 FFPE 조직에서도 전체 전사체 수준의 Total RNA 기반 전사체 분석이 가능함을 보여준 대표적인 사례이다. 이 연구에서는 rRNA 제거 기반 라이브러리 제작 전략을 적용하여, poly(A) tail 유무와 관계없이 FFPE 샘플에 존재하는 다양한 전사체를 비교적 안정적으로 포착하였다. 그 결과, 포르말린 고정 및 장기간 보관으로 인해 분해된 FFPE 시료의 RNA 에서도 수천 개 이상의 유전자가 안정적으로 검출되었으며, 전사체 수준의 발현 프로파일을 성공적으로 구축할 수 있음을 입증하였다.

특히 동일 환자에서 유래한 Fresh Frozen 조직과 FFPE 조직을 비교 분석한 결과, FFPE RNA-Seq 으로 얻은 유전자 발현 값은 Fresh Frozen RNA-Seq 결과와 높은 상관 관계를 보였다. 나아가, RNA-Seq 기반으로 측정한 유전자 발현 값과 RT-qPCR 결과 간의 비교에서도 Fresh Frozen 샘플 및 FFPE 샘플 모두에서 높은 유사도가 확인되었다. [10] 이는 FFPE 조직에서 수행한 Total RNA-Seq 이 단순한 유전자 검출을 넘어, 정량적 발현 비교가 가능한 신뢰성 있는 전사체 데이터를 제공할 수 있음을 의미한다.

이 연구는 FFPE 샘플을 이용한 Total RNA 기반 전사체 분석의 기술적 가능성을 실제 임상 종양 조직에서 검증한 사례로 평가된다. 전통적인 poly(A) 기반 mRNA-Seq 이나 3′-tag 기반 RNA-Seq 이 FFPE RNA 의 분해 특성으로 인해 분석 범위와 정확도에 한계를 갖는 반면, rRNA depletion 기반 total RNA-Seq 접근법을 통해 FFPE 샘플에서도 보다 넓은 전사체 영역(lncRNA, pre-mRNA, intronic transcript 등)을 포괄적으로 분석할 수 있음을 시사한다. 이는 대규모 장기간 보관된 FFPE 블록을 활용한 후향적 전사체 연구와 임상 바이오마커 발굴 연구의 확장 가능성을 보여주는 중요한 근거로 해석할 수 있다.

4.2 FFPE 기반 Spatial Transcriptomics

Spatial Transcriptomics 는 전통적인 NGS 가 제공하는 전사체의 정량적 정보뿐 아니라, 조직 내 공간적 위치 정보까지 동시에 확보할 수 있는 기술이다. 조직 절편 내 각각의 위치에서 발현되는 유전자 프로파일을 유지하면서, 조직학적 구조와 결합된 발현 맵을 구축할 수 있어, 병리적 변이 위치, 세포 이질성, 공간적 상호작용을 종합적으로 이해하는 데 활용된다.

초기 Spatial Transcriptomics 는 Fresh Frozen 조직을 대상으로 적용되어 왔으나, 최근 FFPE 샘플에서도 적용 가능한 플랫폼들이 등장하면서 장기 보관된 임상 조직을 활용한 공간 전사체 연구가 현실적인 접근법으로 자리잡고 있다.

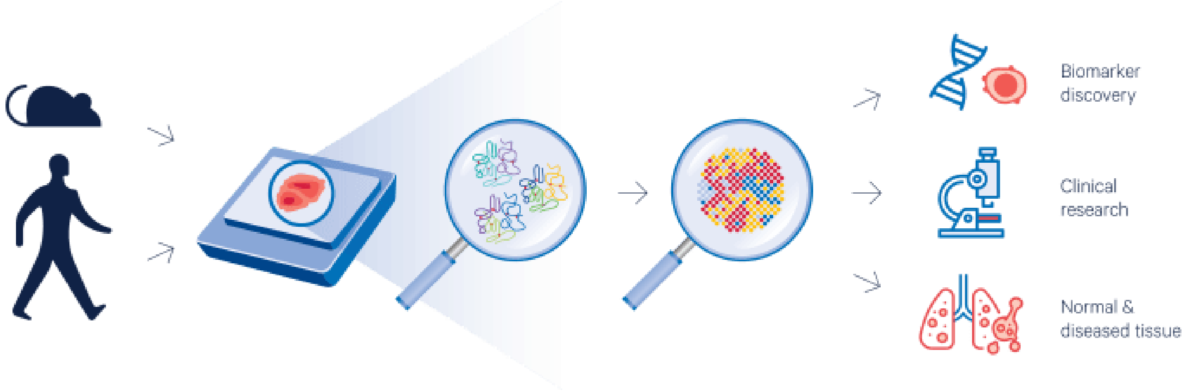

그림 3. Spatial gene expression of intact FFPE tissue sections allows for biomarker discovery [11]

(A) Systematic benchmarking of imaging spatial transcriptomics platforms in FFPE tissues

최근 발표된 Systematic benchmarking of imaging spatial transcriptomics platforms in FFPE tissues 연구는 FFPE 조직에서도 이미지 기반 공간 전사체 분석이 기술적으로 충분히 구현 가능함을 보여준 대표적인 벤치마크 사례이다. 이 연구에서는 Xenium, MERSCOPE, CosMx 등 주요 이미지 기반 Spatial Transcriptomics(iST, 이미지 기반 공간 전사체 분석) 플랫폼을 FFPE 조직으로 구성된 Tissue microarray(TMA)에 적용하여, 적용하여, UMI 수, 유전자 검출 수, 공간 신호 품질, 플랫폼 간 재현성 등을 체계적으로 비교 평가하였다. 그 결과, FFPE 조직에서도 각 플랫폼이 의미 있는 수준의 공간 유전자 발현 신호를 안정적으로 복원할 수 있음이 확인되었다. [12]

특히 서로 다른 암 유형으로 구성된 FFPE TMA 를 이용한 분석을 통해, 각 플랫폼이 탐지 감도, 공간 해상도, 타깃 유전자 수, 신호 대 잡음비(SNR) 측면에서 서로 다른 강점과 한계를 보인다는 점이 명확히 드러났다. 예를 들어 Xenium 과 CosMx 는 단일세포 수준에 가까운 공간 해상도와 높은 정량성을 제공한 반면, MERSCOPE 는 상대적으로 많은 타깃 유전자를 안정적으로 검출할 수 있는 장점을 보였다. 이러한 결과는 FFPE 조직에서도 연구 목적에 따라 적절한 Spatial Transcriptomics 플랫폼을 선택할 수 있는 실질적인 근거를 제시한다.

이 연구는 FFPE 샘플을 이용한 이미지 기반 공간 전사체 분석이 단순한 기술 검증 단계를 넘어, 플랫폼 간 성능 비교와 표준화 논의가 가능한 수준에 도달했음을 보여준다. 전통적으로 FFPE 조직은 RNA 분해와 화학적 변형으로 인해 공간 전사체 분석에 부적합하다고 여겨져 왔으나, 본 연구는 FFPE 에서도 공간적 유전자 발현 패턴, 세포 밀도 차이, 조직 구조에 따른 발현 등을 충분히 복원할 수 있음을 입증하였다.

5. Ebiogen's NGS Service

이바이오젠은 앞서 소개한 기술적 발전과 연구 트렌드를 반영하여, FFPE 및 Fresh Frozen 샘플 모두에 적용 가능한 전사체 분석, Spatial Transcriptome 분석 서비스를 제공하고 있다. 각 서비스는 샘플 품질 특성과 연구 목적을 고려한 최적의 라이브러리 제작 및 데이터 분석 파이프라인을 기반으로 설계되어, 임상 연구부터 기초 연구까지 폭넓은 적용이 가능하다.

5.1 Ebiogen's Sample Submission Guide – FFPE Sample

- FFPE 샘플의 경우, 포르말린 고정 및 파라핀 포매된 블록에서 절편을 준비해 1.5 mL tube 에 담아서 의뢰한다. (DV200 ≥ 30% : 실험 가능한 RNA 기준)

5.2 QuantSeq 3' mRNA-Seq

Sample requirement	>1μg total RNA (Min. >10ng total RNA)
Library method	QuantSeq 3' mRNA-Seq Library Prep Kit FWD
NGS run format	NextSeq, SE100
Data yield	>10M read/sample
Turnaround time	~2 weeks after RNA QC
Sample type	Tissue, Cell, Whole Blood(Paxgene), Plant, Fungi, **FFPE**, Sorted cell, etc.

5.3 Total RNA-Seq

Sample requirement	>2μg total RNA
Library method	RiboCop rRNA Depletion kit + CORALL RNA-seq Library Prep kit
NGS run format	NextSeq, PE150
Data yield	> 9 Gb/sample
Turnaround time	~3 weeks after RNA QC
Sample type	Tissue, Cell, Whole Blood(Paxgene), Plant, Fungi, **FFPE**, etc.

5.4 Visium HD Spatial Gene Expression

Species	Human, Mouse
Number of Gene	Human ~18,000 genes, Mouse ~19,000 genes
Sample Type	**FFPE**, Fresh Frozen, Fixed Frozen Tissue
Capture Size	6.5 mm x 6.5mm (1spot/slide)
Turnaround Time	~5 weeks after RNA QC

5.5 GeoMx Spatial Transcriptome + Protein Profiling

Service Name	**GeoMx WTA* Service**	**GeoMx IPA Service**	**GeoMx DPA Service**
Species	Human, Mouse	Human	Human
Number of Gene, protein	Human ~18,000 gene Mouse ~20,000 gene	~ 570 proteins	~ 1200 proteins
Data Yield	~100 reads/μm^2	50 reads/μm^2	50 reads/μm^2
Sample Type	Tissue (**FFPE**, Tissue microarray, Fresh frozen tissue, Core needle biopsy etc,.)		
Capture Size	14.6 x 36.2 mm^2		
Turnaround time	~3 weeks after ROI selection		
Publication	NanoString GeoMx Publication		

자세한 내용은 이바이오젠 홈페이지에서 확인할 수 있다.

이바이오젠 홈페이지 URL : https://www.e-biogen.com/

6. 참고문헌

1. Conde et al., *The Utilization of Formalin Fixed-Paraffin-Embedded Specimens in High Throughput Genomic Studies.* (PLoS One. 2017)

2. Baker et al., *The impact of tissue handling on RNA integrity and transcriptome profiling.* (Nature Methods, 2010)

3. NanoString Technologies. Spatial biology sample types: FFPE, fresh frozen, and tissue microarray (TMA). Available from: https://www.nanostring.com/

4. Kokkat TJ, et al. *Archived Formalin-Fixed Paraffin-Embedded (FFPE) Blocks: A Valuable Resource for Clinical and Translational Research.* (PLoS ONE. 2013)

5. Siegel MB, et al. *RNA-seq from archival FFPE breast cancer samples: molecular pathway fidelity and novel discovery.* (BMC Medical Genomics. 2019)

6. Coudry et al., *Successful application of microarray and next-generation sequencing to formalin-fixed, paraffin-embedded tissue.* (Journal of Molecular Diagnostics, 2013)

7. Shabihkhani *et al. The procurement, storage, and quality assurance of frozen blood and tissue biospecimens in pathology, biorepository, and biobank settings.* (Clin Biochem. 2014)

8. Jacobsen et al., *Comparison of whole transcriptome sequencing of fresh, frozen, and formalin-fixed, paraffin-embedded cardiac tissue.* (Sci Rep. 2023)

9. Zhao et al., *Comparison of RNA-Seq by poly(A) capture, ribosomal RNA depletion, and DNA microarray for expression profiling* (BMC Genomics, 2014)

10. Li P, Conley A, Zhang H, Kim HL. *Whole-Transcriptome profiling of formalin-fixed, paraffin-embedded renal cell carcinoma by RNA-seq* (BMC Genomics, 2014)

11. 10x Genomics. *When spatial gene expression meets FFPE tissue blocks: A modern-day love story.* 10x Genomics Blog, May 5, 2021. Available at https://www.10xgenomics.com/blog/when-spatial-gene-expression-meets-ffpe-tissue-blocks-a-modern-day-love-story

12. Wang H, Huang R, Nelson J, et al. *Systematic benchmarking of imaging spatial transcriptomics platforms in FFPE tissues.* (Nature Communications, 2025)