

FFPEサンプルからのRNA抽出

より良い解析を実現するためのサンプルの取り扱いについて

サーモフィッシャーサイエンティフィック
テクニカルサポート

本日のAgenda

FFPEサンプルを用いた遺伝子発現解析

- FFPEサンプルとは
- FFPEサンプルにおける核酸の特徴
- FFPEサンプル作製処理による核酸への影響
- 質の高い核酸を得るためのFFPEサンプル作製での注意点
- FFPEサンプル作製後の注意点

FFPEサンプルから分子生物学用途の核酸を抽出し、 実験に用いるための注意事項

- 採材サンプルの迅速な固定処理
- ばらつきのないFFPEブロック作製操作
- 新鮮なBufferの準備
- 適切環境下でのFFPEサンプルの保管
- 最適な核酸抽出法の選択
- 適切な核酸のQuality評価

FFPEサンプルの大前提は病理診断目的での使用
核酸抽出に特化したFFPEサンプル作製が目的ではない

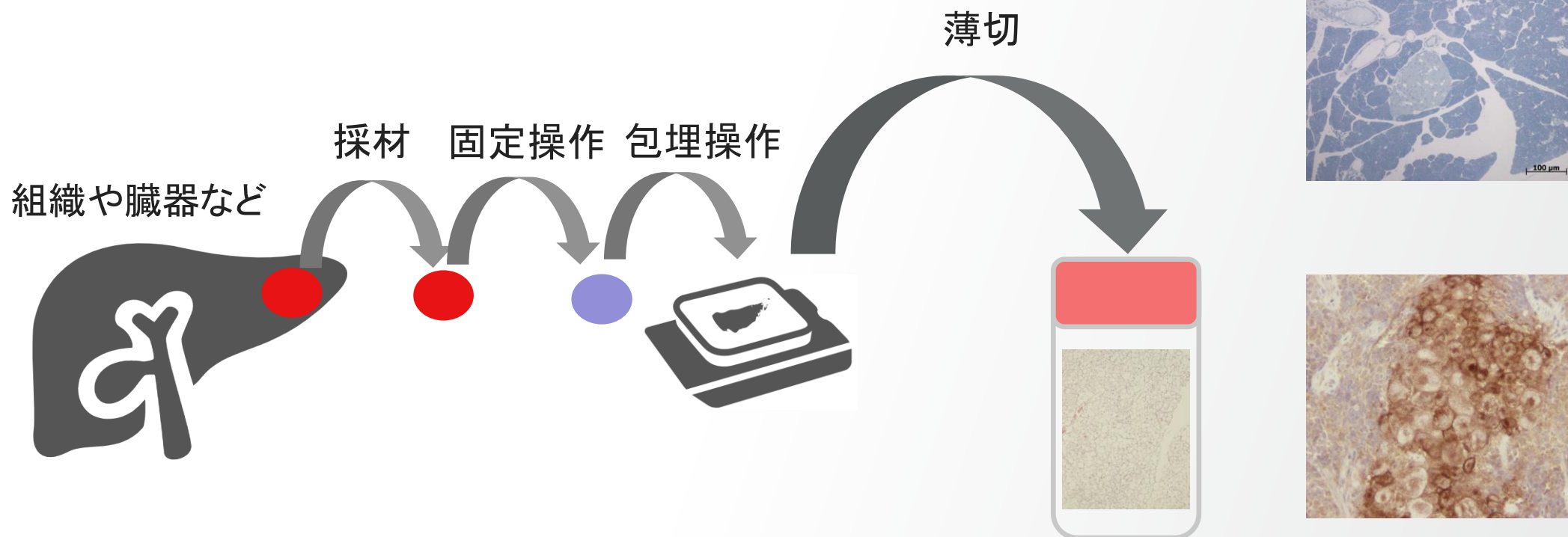
本日のAgenda

FFPEサンプルを用いた遺伝子発現解析

- FFPEサンプルとは
- FFPEサンプルにおける核酸の特徴
- FFPEサンプル作製処理による核酸への影響
- 質の高い核酸を得るためのFFPEサンプル作製での注意点
- FFPEサンプル作製後の注意点

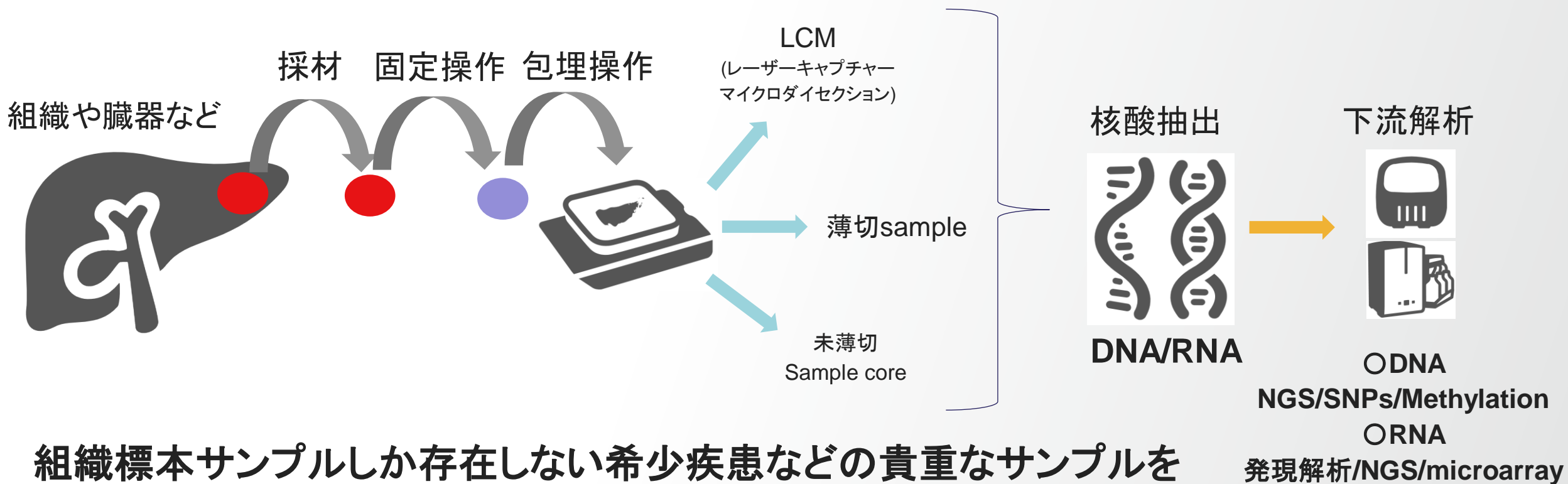
FFPEサンプルとは

FFPE (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded) : ホルマリン固定パラフィン包埋サンプル
採材した組織をホルマリンなどの固定液を用いて固定し、パラフィンに包埋した標本サンプル。
古くから診断・研究のため、病理学的解析を目的とし作製され、長期保管が可能な臨床検体として広く用いられる標本。



FFPEサンプルの分子生物学的実験への応用

核酸抽出法や品質評価技術の向上と、解析アプリケーションの充実により、
FFPEサンプルを組織学的目的のみではなく、分子生物学的用途への利用も拡大している。



組織標本サンプルしか存在しない希少疾患などの貴重なサンプルを用いての分子生物学的研究が可能に！！

FFPEサンプルの分子生物学用途の実際

○どんなFFPEサンプルでも分子生物学的な解析ができるの？

→**できません。**

組織の種類、サンプル処理方法、保存状態・保存期間によっては核酸を回収することができないサンプルも存在する。

核酸を抽出することができなければ解析を実施することは出来ません。

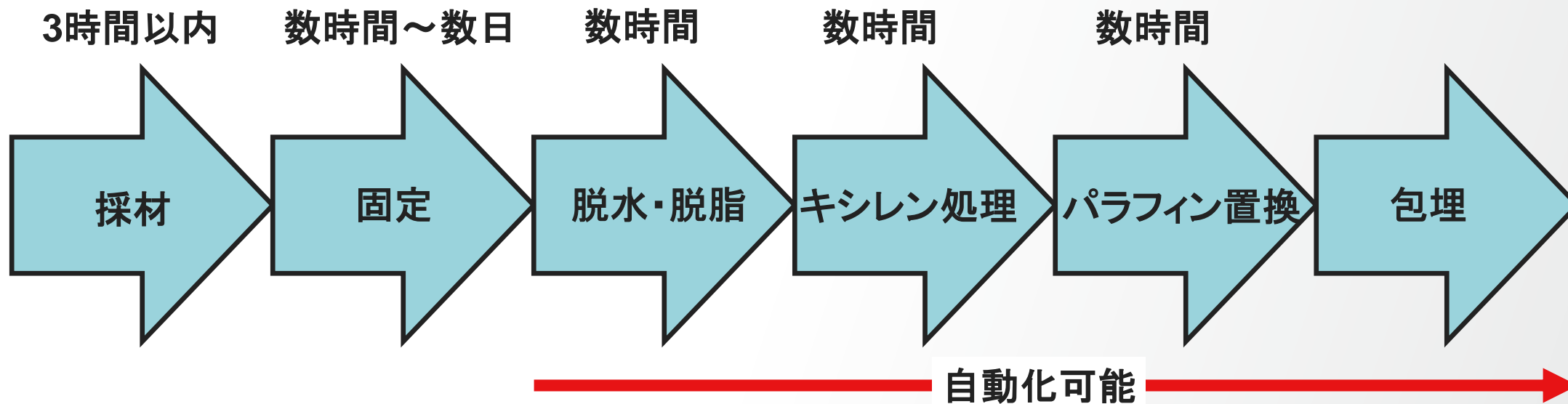
また核酸を回収できても、解析に用いるための“**Quality**”に達していない場合もあります。

まずは対象のFFPEサンプル
の情報を確認



どこの組織なのか？
どのくらい固定まで時間を要したか？
どのような固定処理がされたか？
どんな状態で保存されていたか？
どのくらい保存されていたか？

FFPEサンプル作製の工程 (Block作製まで)



採材してからFFPEブロックになるまで
少なくとも1日以上は時間を要する



本日のAgenda

FFPEサンプルを用いた遺伝子発現解析

- ・FFPEサンプルとは
- ・FFPEサンプルにおける核酸の特徴
- ・FFPEサンプル作製処理による核酸への影響
- ・質の高い核酸を得るためのFFPEサンプル作製での注意点
- ・FFPEサンプル作製後の注意点

FFPEサンプルの核酸の収量と質

- 収量: DNA/RNAともに新鮮組織から抽出した際の半分程度の収量
- ※FFPEサンプルの状態に大きく依存します。
- ※吸光光度計(NanoDrop)で測定した場合、総核酸の量になります。
- DNAもしくはRNAの正確な収量の測定には蛍光光度計が推奨(Qubit)。

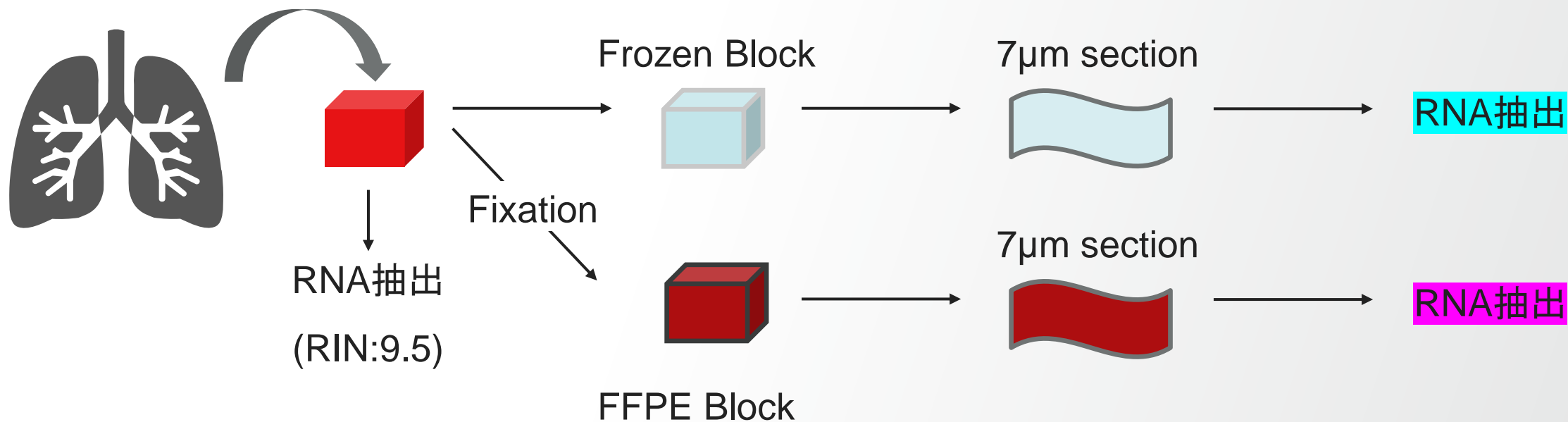
- 質: DNA/RNAともに断片化が進んでいます。
- ※RNAは80-100nt程度
- DNAは200bp前後をピークとし、数bp～数Kbpの幅広いサイズレンジが回収

FFPEサンプル由来RNAのQuality

○ Sample : Lung cancer
(RNA quality : RIN9.5/purification of fresh sample)

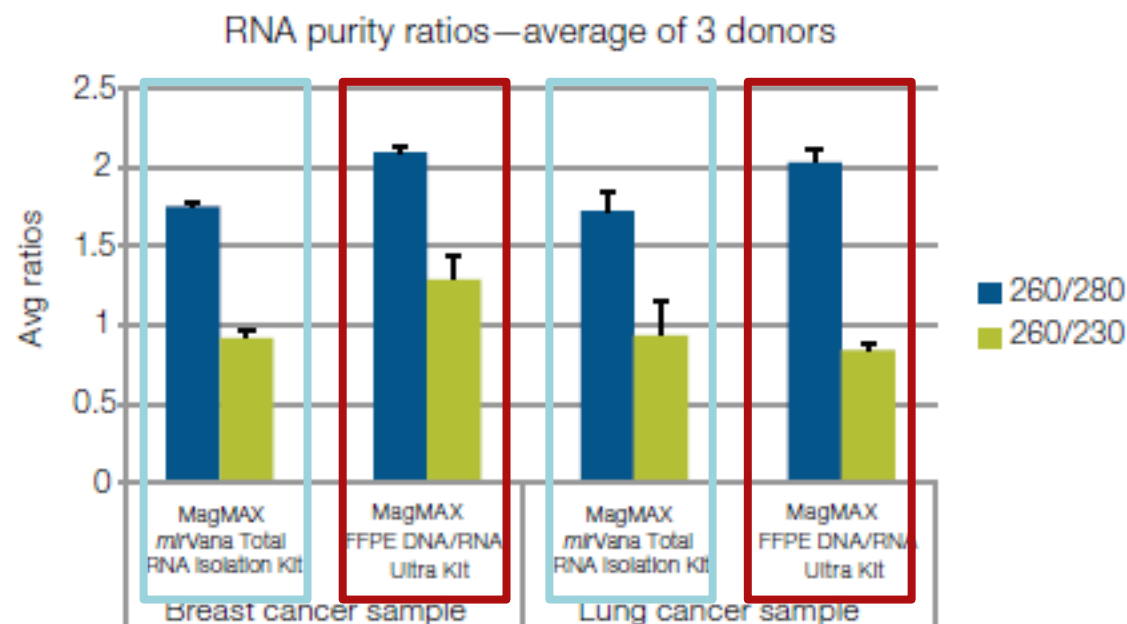
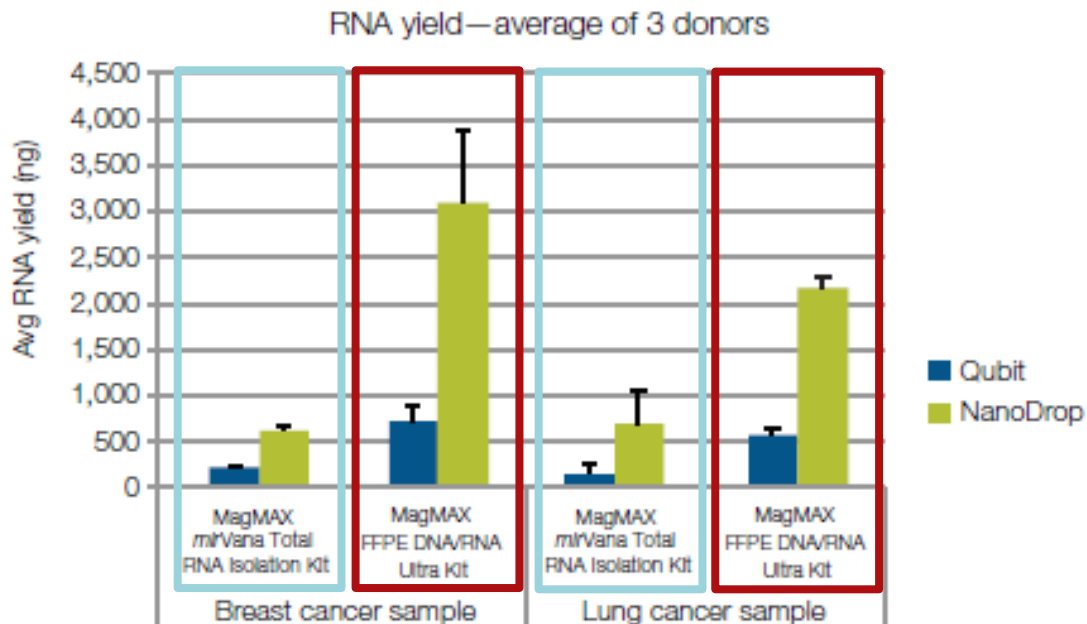
○ Fresh Frozen : 7 μ m Cryo section
(Fixation : no)
Extraction with MagMAX™ mirVana™ Total RNA Isolation Kit

○ FFPE : 7 μ m section
(Fixation : 24hr / Neutral Buffered Formalin
Automation Embedding : 8hr)
Extraction with MagMAX FFPE DNA/RNA Ultra Kit



NanoDrop/Qubitを用いた量的評価

 Fresh frozen
 FFPE

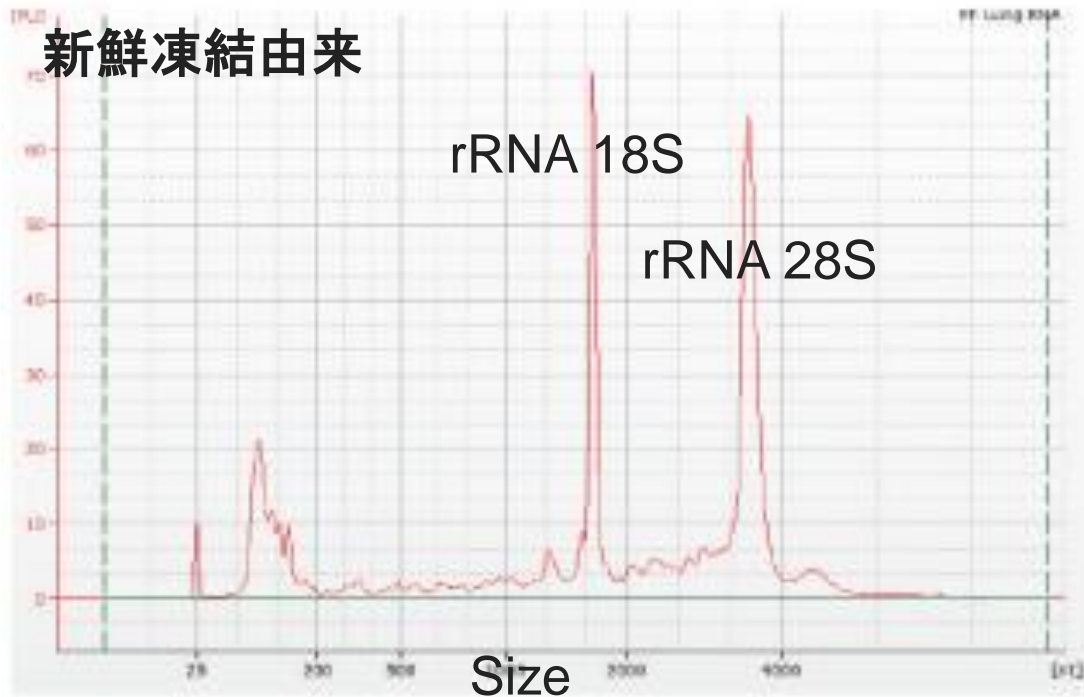


Fresh Frozenサンプル < FFPE sample

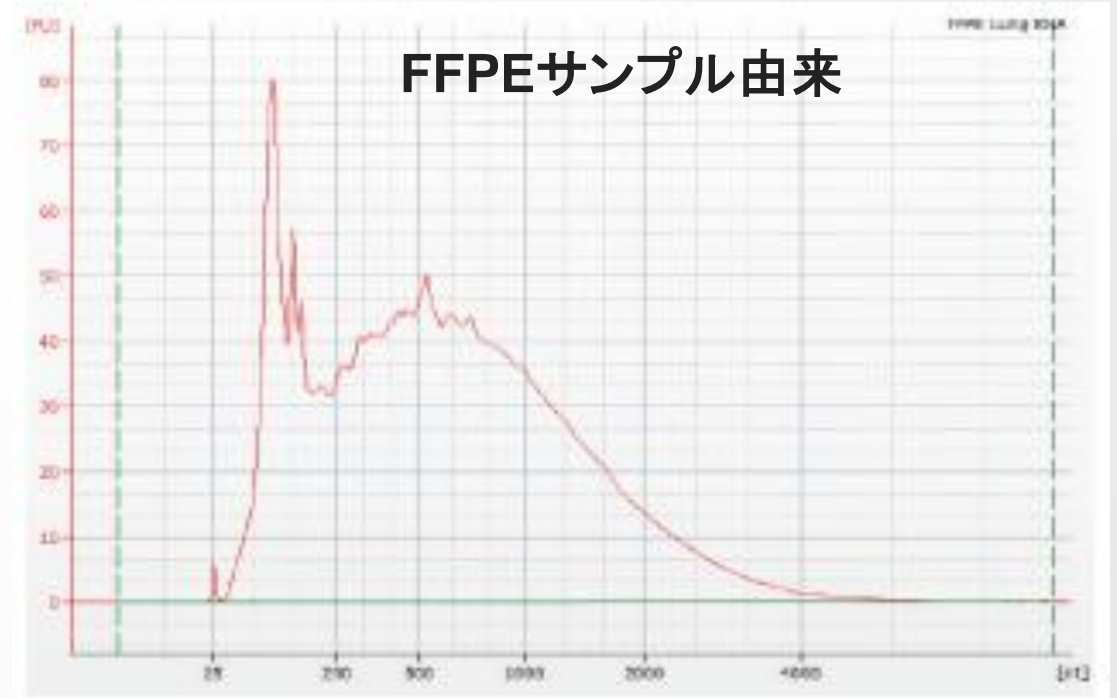
→Fresh FrozenサンプルはRNaseが残存しており、抽出時に活性化した可能性が考えられる
 FFPEサンプルでは固定処理でRNaseが不活性化する為、RNaseによる分解は抑制される

FFPEサンプルの核酸は断片化がされていても大きな量的変化はないのが特徴

Bioanalyzerによる質的評価



RIN 8.7
>65% >200nt



RIN 1.8
~70% of sample is >200nt

FFPEサンプルのRNAは高度に分解が進んでいる

※Agilent Bioanalyzer System
(Agilent RNA 6000 Pico kit)での評価

まとめ: FFPEサンプルの核酸

- ・FFPEサンプル由来の核酸は収量への影響は低い。
→同じ重量の新鮮組織から抽出した核酸の半分程度の収量
- ・FFPEサンプル由来の核酸は質的に大きく変わっている。
→断片化・分解が進んでいる

新鮮組織を用いたFFPEでも抽出した核酸の質に大きく影響する
サンプルの取り扱いによっては、より高度に質の低下が加速し、
分子生物学的用途での使用が難しくなることがある

本日のAgenda

FFPEサンプルを用いた遺伝子発現解析

- ・FFPEサンプルとは
- ・FFPEサンプルにおける核酸の特徴
- ・FFPEサンプル作製処理による核酸への影響
- ・質の高い核酸を得るためのFFPEサンプル作製時の注意点
- ・FFPEサンプル作製後の注意点

FFPE組織作製にて核酸の質に影響を及ぼす工程



サンプリングまでの時間



固定液保存までの時間



固定時間

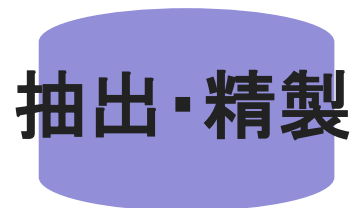
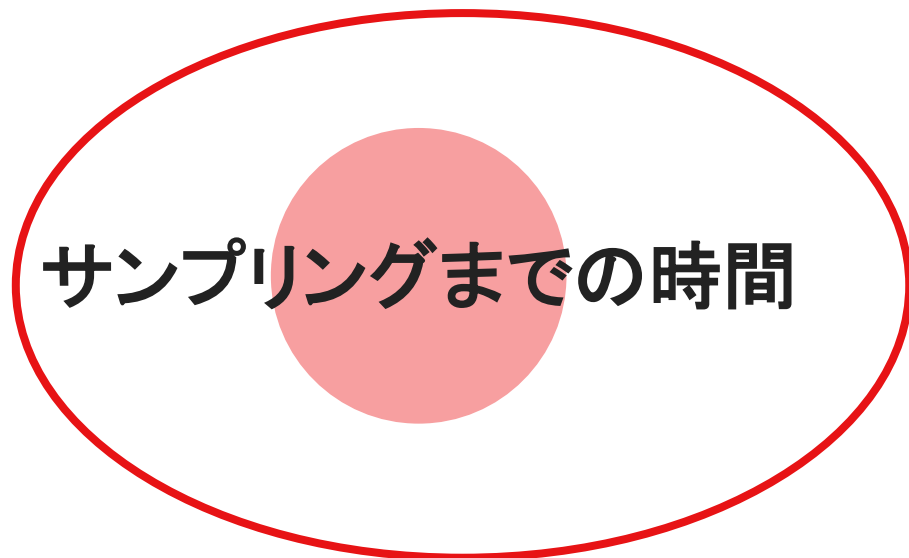


抽出・精製



FFPEサンプルの保存

FFPE組織作製にて核酸の質に影響を及ぼす工程



ガイドライン記載の固定前プロセスの推奨時間



2.1 プレアナリシス段階

a) 固定前プロセス

《切除・採取直後の組織の取扱い》

1. 手術により切除された組織は、**摘出後は速やかに冷蔵庫など4°C下で保管し、1時間以内、遅くとも3時間以内**に固定を行うことが望ましい (C) 文献2, 研究用規程1
2. 内視鏡的に切除等された消化管組織など、比較的小型の組織については、**速やかに**固定液に浸漬し固定を行うことが望ましい (C)
3. 生検により採取された組織は、**速やかに**固定液に浸漬し固定を行う (C)
4. ホルマリン固定パラフィン包埋化を行う細胞検体は、必要な前処理を適切に行ったのちに、**可及的速やかに**固定液に浸漬し固定を行う (C)
5. 手術により切除された組織においては、**摘出後30分以上室温で保持することは極力回避**する (N)

RNase (RNA分解酵素) によるRNA分解

RIBONUCLEASE A

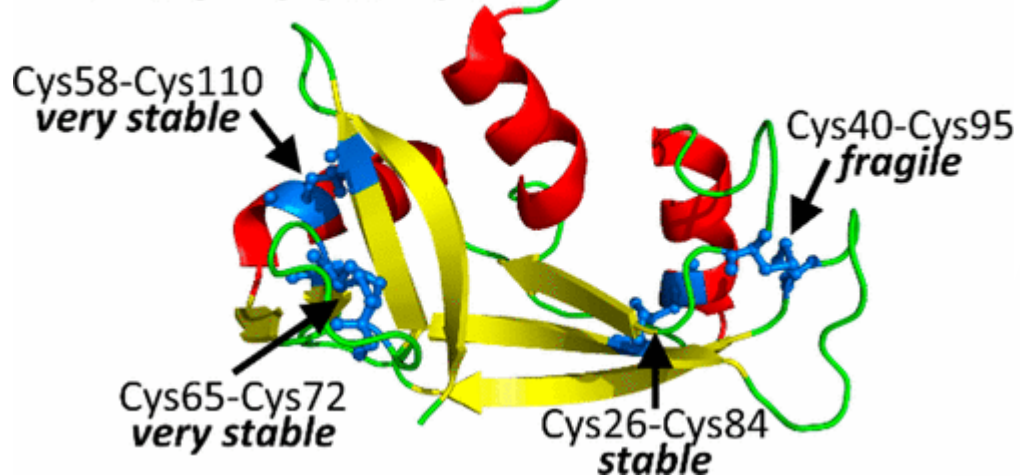
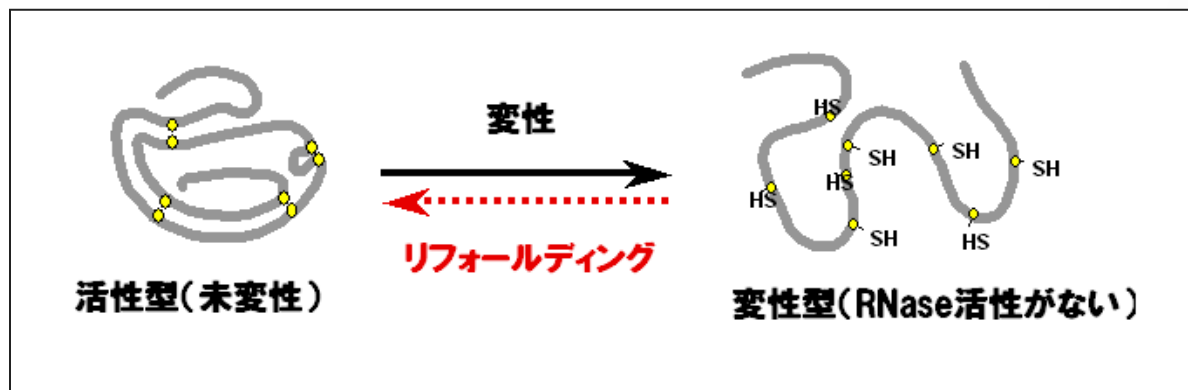
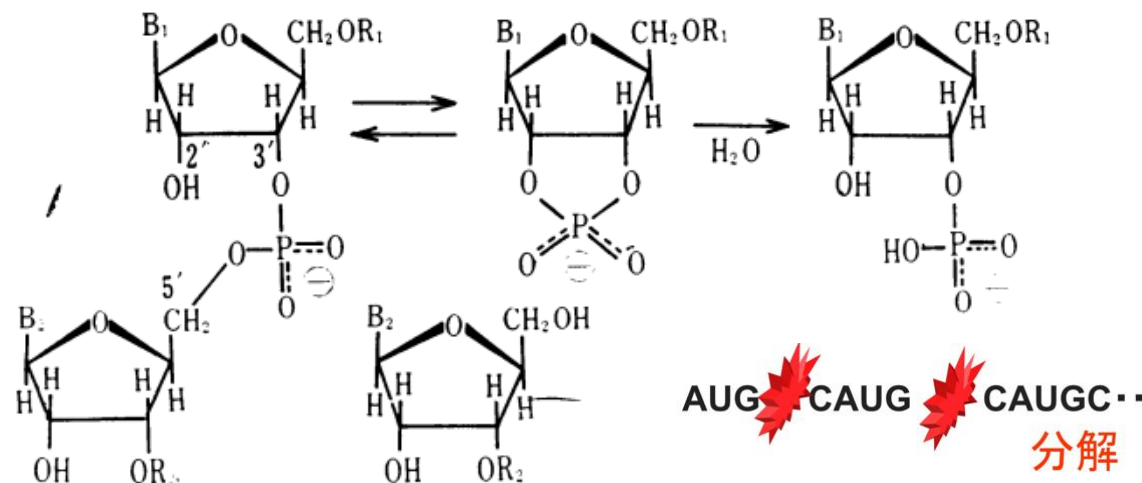


Image from <https://www.x-mol.net/paper/article/405561>

4つのジスルフィド結合による強固な安定性

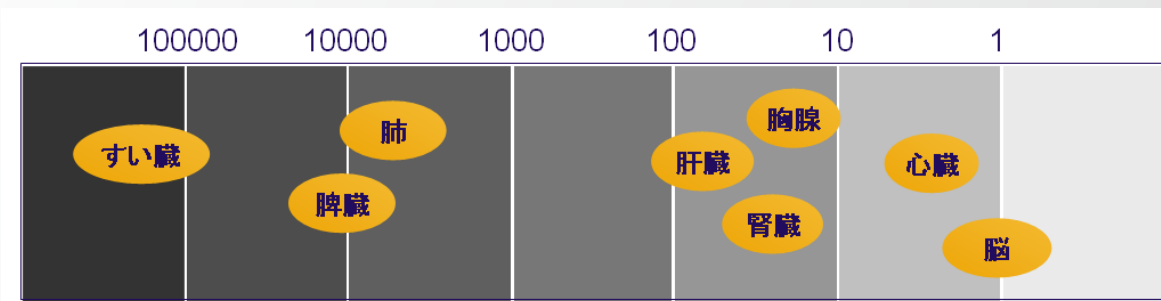


RNase Aは1本鎖RNAをピリミジン残基の3'末側で切断。



https://www.jstage.jst.go.jp/article/jcrsj1959/14/1/14_1_1/_pdf/-char/ja

RNaseは組織によって含有量が異なる

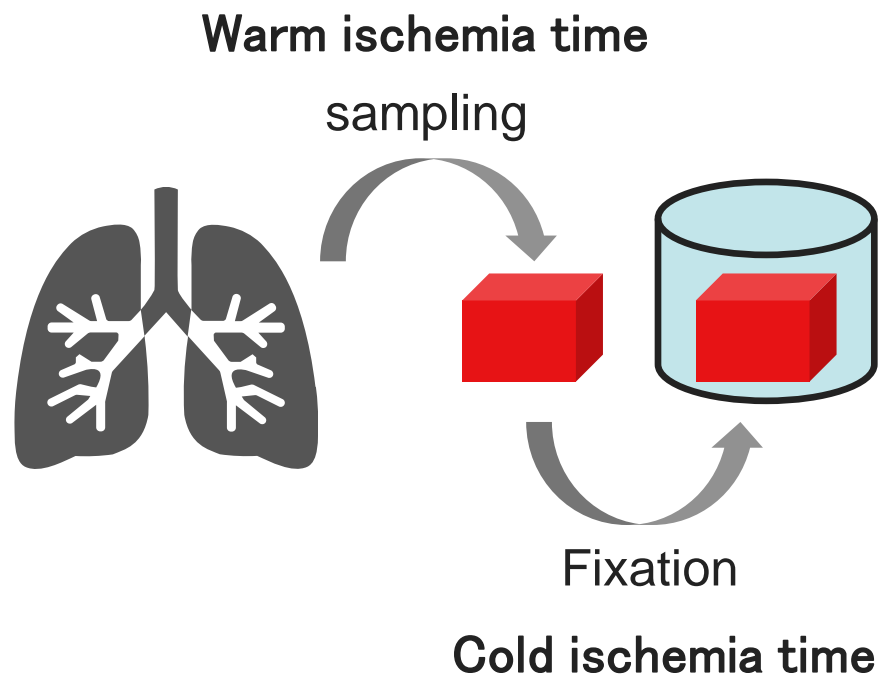


(脳組織内のRNase活性を1としたときのスケール)

サンプル固定までのプロセス

○ Warm ischemia time (温虚血時間): 血流停止から摘出までの時間

○ Cold ischemia time (冷虚血時間) : 虚血してから4°C保存・固定までの時間



これらの工程では **RNaseの影響** を受けることが懸念される
(RNaseは固定液中では酵素活性は失活し、
低温環境下では酵素活性は低下する)

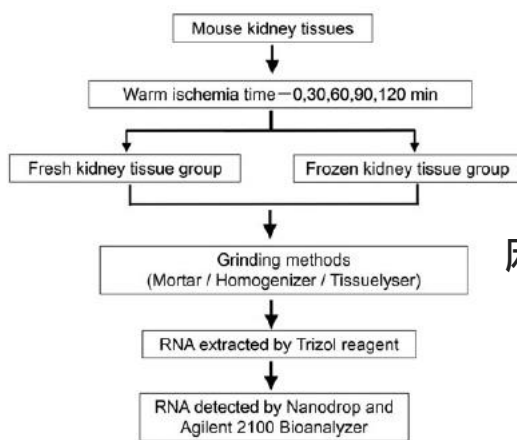
Warm/Cold ischemia timeによるRNA Qualityへの影響

Warm ischemia timeによる影響

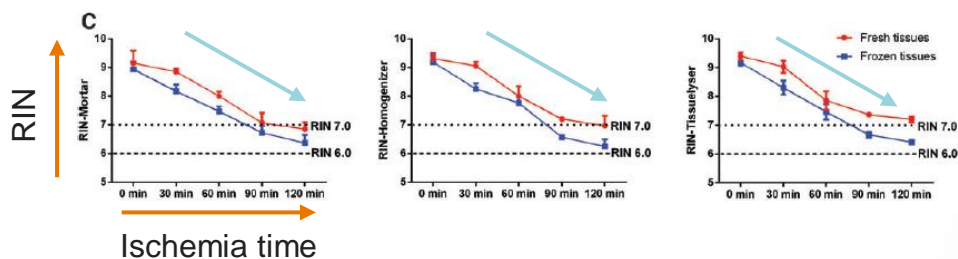
BIOPRESERVATION AND BIOBANKING
Volume 19, Number 4, 2021
© Mary Ann Liebert, Inc.
DOI: 10.1089/bio.2020.0129

Effects of Warm Ischemia Time, Cryopreservation, and Grinding Methods on RNA Quality of Mouse Kidney Tissues

Nan Liu,^{1,*} Yi Luo,^{2,*} Yuan Zhu,^{1,3} Hongwei Peng,¹ Cong Zou,¹ Zongning Zhou,¹ Wen Chen,¹ Hui Wang,¹ Huiqin Liu,¹ Ying Hu,¹ Shanshan Zhang,¹ and Kaiyu Qian^{1,3}



麻醉後、採材までの時間



Cold ischemia timeによる影響

MOLECULAR MEDICINE REPORTS 22: 4278-4288, 2020

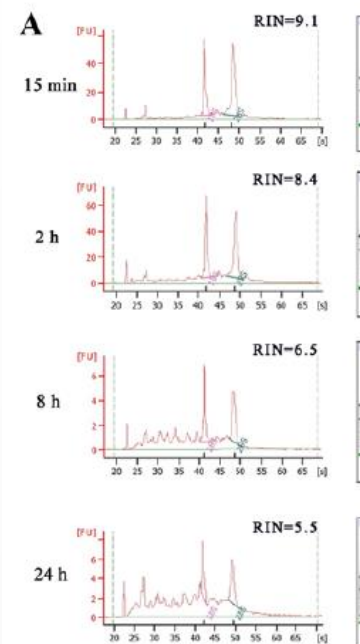
Effects of *ex vivo* ischemia time and delayed processing on quality of specimens in tissue biobank

DAN GUO^{1*}, ANQI WANG^{1*}, TING XIE^{1*}, SUMEI ZHANG¹, DINGYAN CAO¹ and JIAN SUN^{1,2}

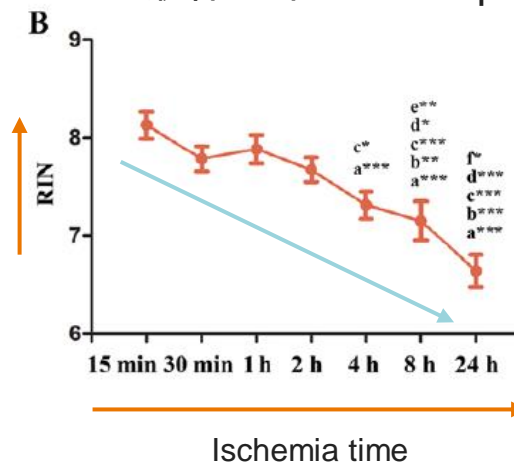
¹Clinical Biobank, Department of Medical Research Center, ²Department of Pathology, Peking Union Medical College Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100730, P.R. China

Received January 14, 2020; Accepted July 16, 2020

DOI: 10.3892/mmr.2020.11503



採材後、PBSにてWashしてから、
液体窒素へのSnap Frozenまでの時間



固定時のサンプルサイズとRNA Quality

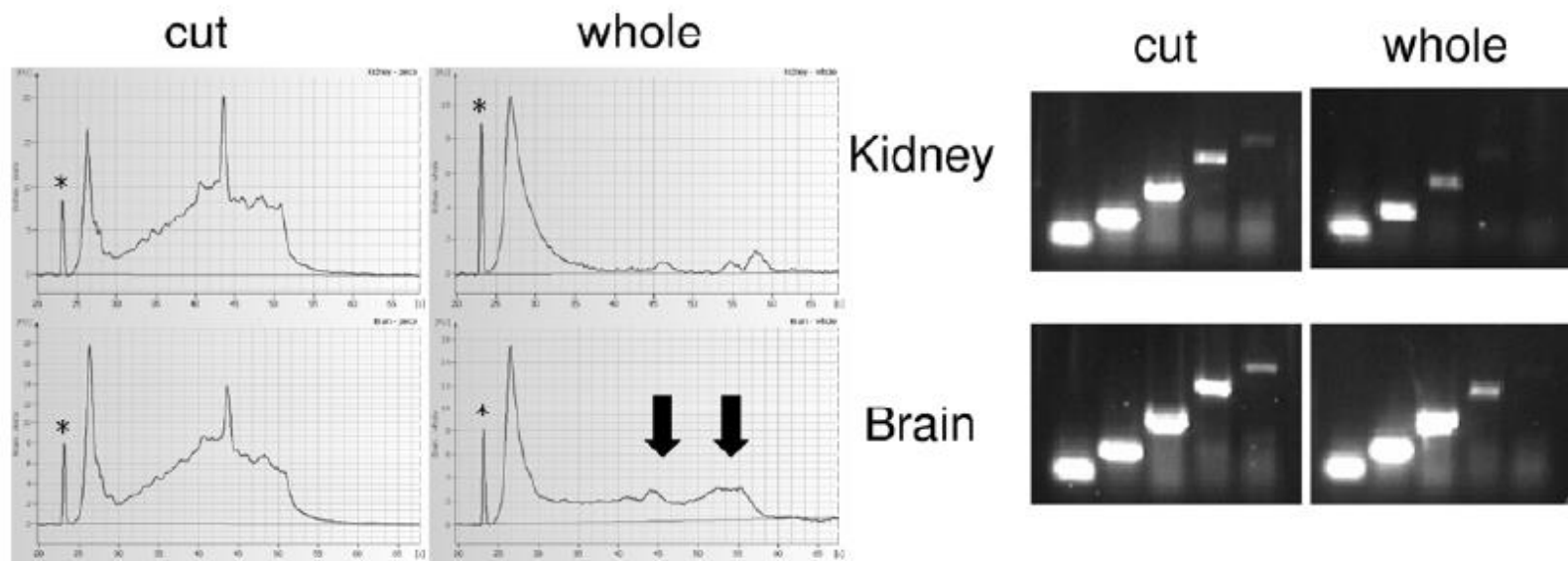
Determinants of RNA Quality from FFPE Samples

Silke von Ahlfen¹, Andreas Missel¹, Klaus Bendrat², Martin Schlumpberger^{1*}

¹ QIAGEN GmbH, Hilden, Germany, ² Gemeinschaftspraxis für Pathologie Niendorf und Hamper, Hamburg, Germany

The large archives of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue specimens that exist are a highly valuable source of sample material for molecular biological analysis, including gene expression profiling. However, current data on adverse effects of standard pathological practice on the usefulness of biomolecular analytes obtained from such archived specimens is largely anecdotal. Here, we present a systematic examination of the most relevant parameters for integrity and useability of RNA obtained from FFPE samples, including storage time and conditions, fixation time, and specimen size. The results are particularly relevant for any application relying on cDNA synthesis as an initial step of the procedure, such as RT-PCR, and microarray analysis.

Citation: von Ahlfen S, Missel A, Bendrat K, Schlumpberger M (2007) Determinants of RNA Quality from FFPE Samples. PLoS ONE 2(12): e1261. doi:10.1371/journal.pone.0001261



- Cut: 3mm以下にカットし、固定
- Whole:そのまま固定
- 固定時間は一晩
- FFPE組織を作製
- 10μm sectionからRNA抽出



WholeサンプルでRIN及び
長鎖のPCRでの増幅が悪い



Wholeサンプルでは固定液が
浸透する前にRNaseが機能したため
RNA qualityが低下したと考える

固定前処理の最適な時間

- 採材後は極力早く固定液につける
→RNaseによる分解の影響を極力小さくするため

可能であれば3時間以内

- 固定液に浸漬する前に十分に適切なサイズにトリミングする
→固定液の浸透を早くし、RNaseを素早く不活性化するため

ホルマリンの浸透速度は1mm/hr → 固定前の十分な入割もしくはトリミング(3mm程度)が必要

- 固定前処理の最適解は対象組織によって変わる可能性がある
→組織ごとにRNase含有は異なるため

膵臓などのRNase含有が高い臓器についてはより迅速な固定前処理が必要

※3時間以内の固定前処理は免疫組織解析でも影響が少ないとされている

H scoreによる評価

Delay to Formalin Fixation (Cold Ischemia Time) Effect on Breast Cancer Molecules

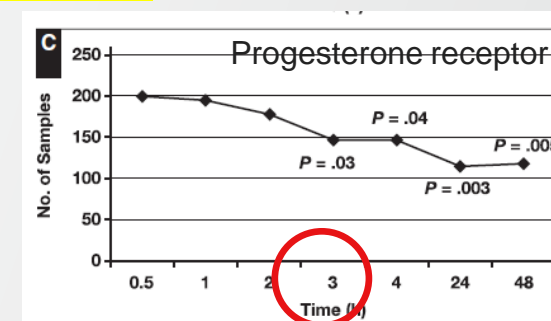
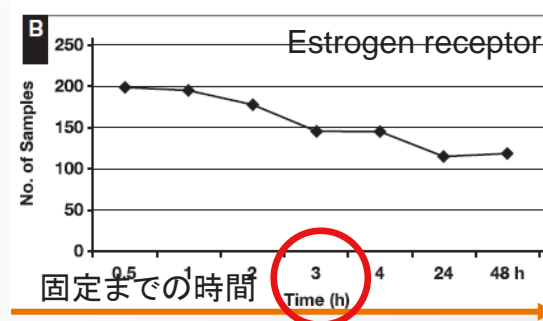
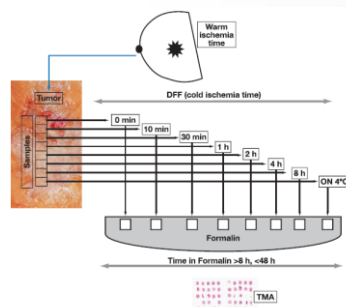
Thaer Khoury, MD

From the Department of Pathology, Roswell Park Cancer Institute, Buffalo, NY.

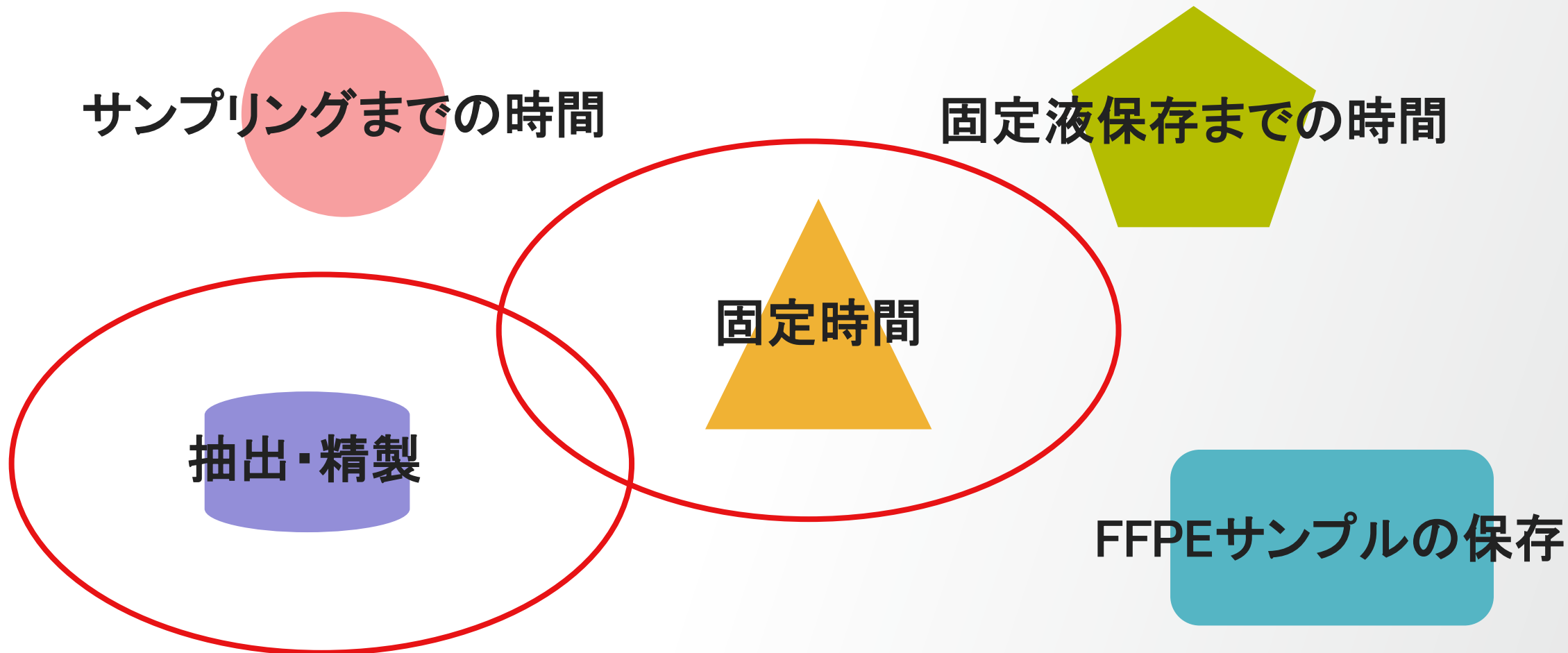
Key Words: Breast cancer; Delay to formalin fixation; Breast biomarkers; Review

Am J Clin Pathol April 2018;149:275-292

DOI: 10.1093/AJCP/AQX164

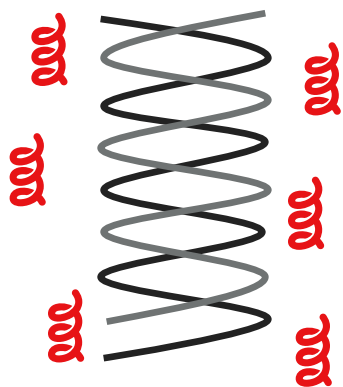


FFPE組織作製にて核酸の質に影響を及ぼす工程

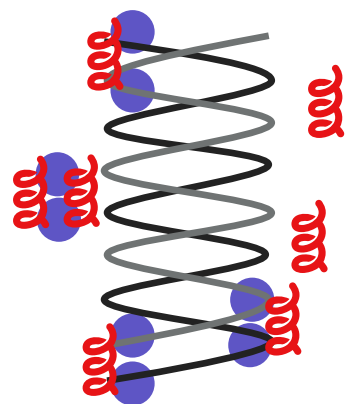


固定操作によるクロスリンク

FFPEサンプルは固定操作による安定した組織構造を維持している。
一方で、固定組織内の核酸は特殊な状態で存在している。



未固定サンプル



固定済みサンプル

**固定済みサンプルの核酸は
タンパク質と架橋された状態で存在！**



核酸



タンパク質

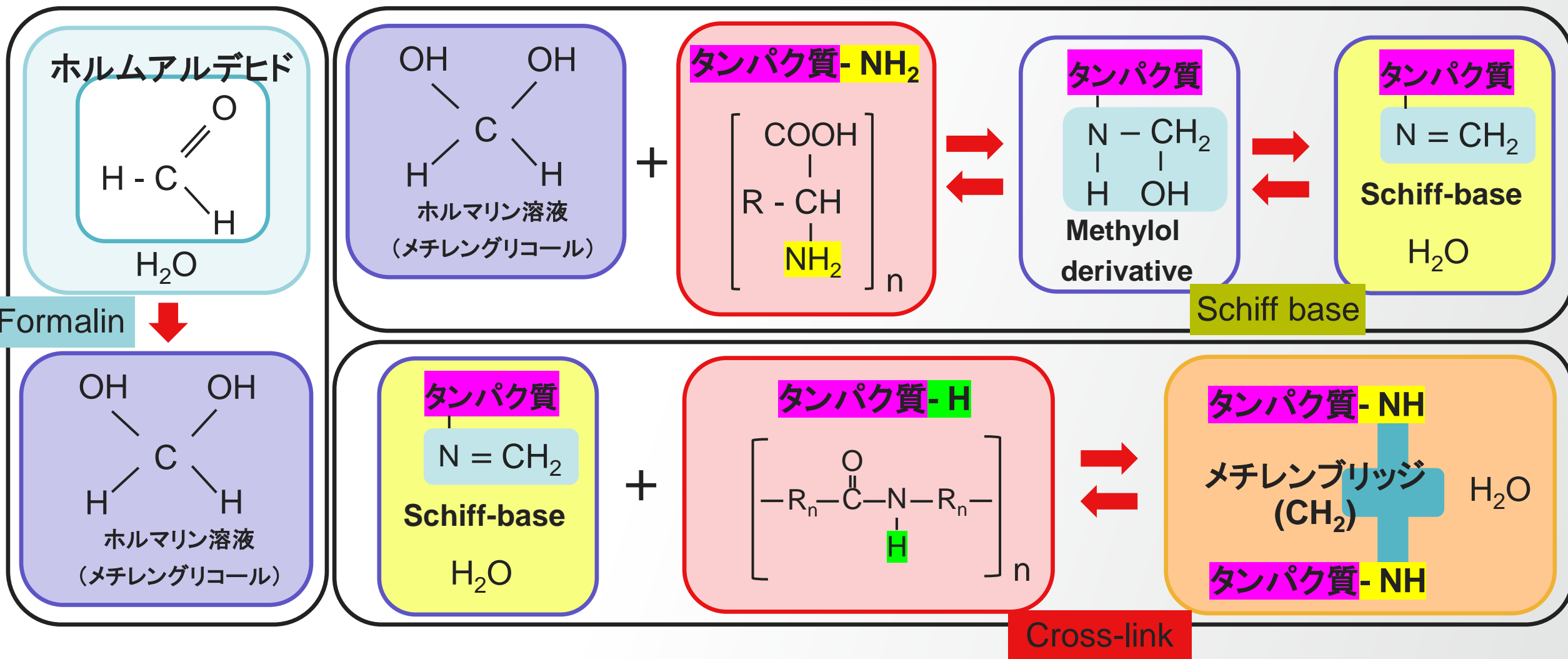


架橋

架橋(クロスリンク)とは？

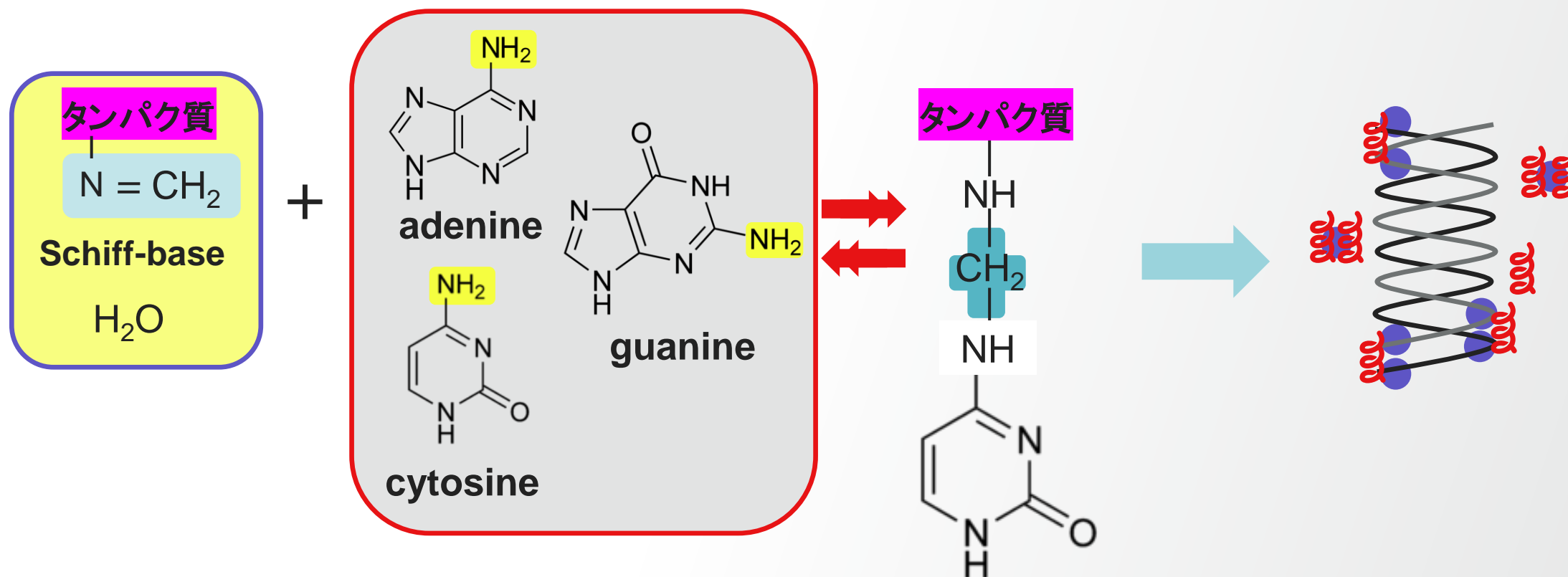
■組織固定に使用されるホルマリンに代表される固定液は

タンパク質-タンパク質を架橋(クロスリンク)し、タンパク質を安定化させる働きを有する



核酸-タンパク質間のクロスリンク

固定液によるクロスリンクはタンパク質-核酸間でも起こる



※核酸 - タンパク質間のクロスリンク

ChIP (chromatin immune precipitation: クロマチン免疫沈降)で応用されている技術

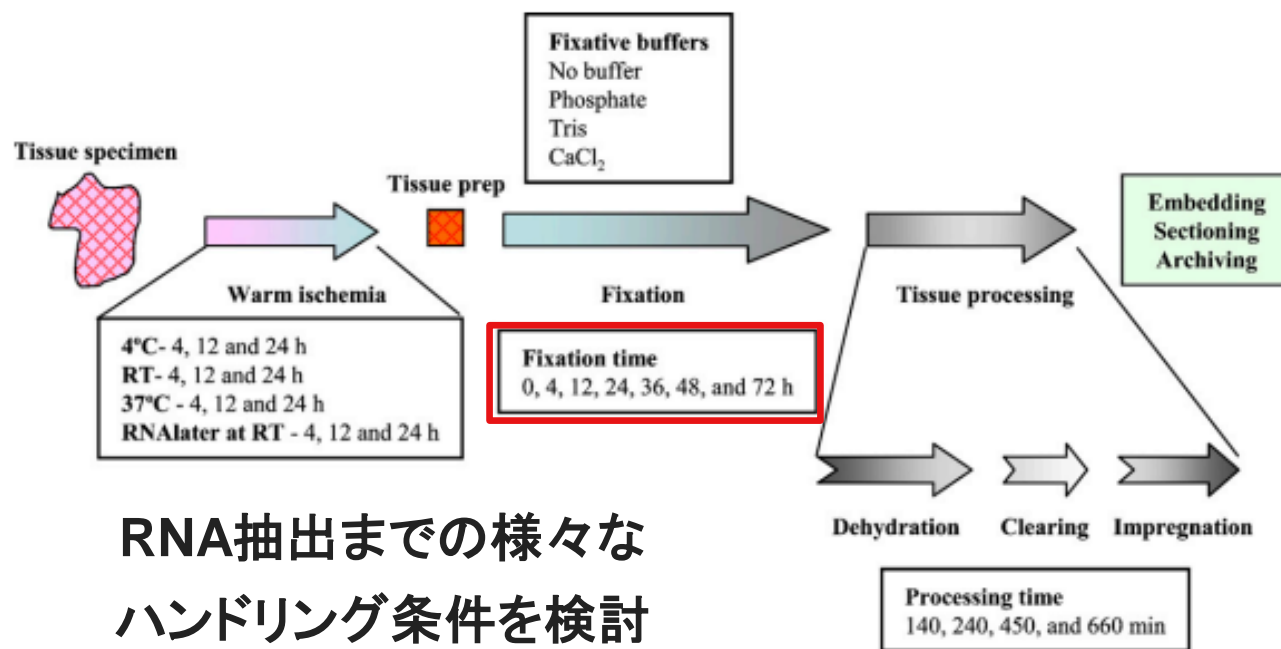
固定時間によるRNA質への影響

ARTICLE

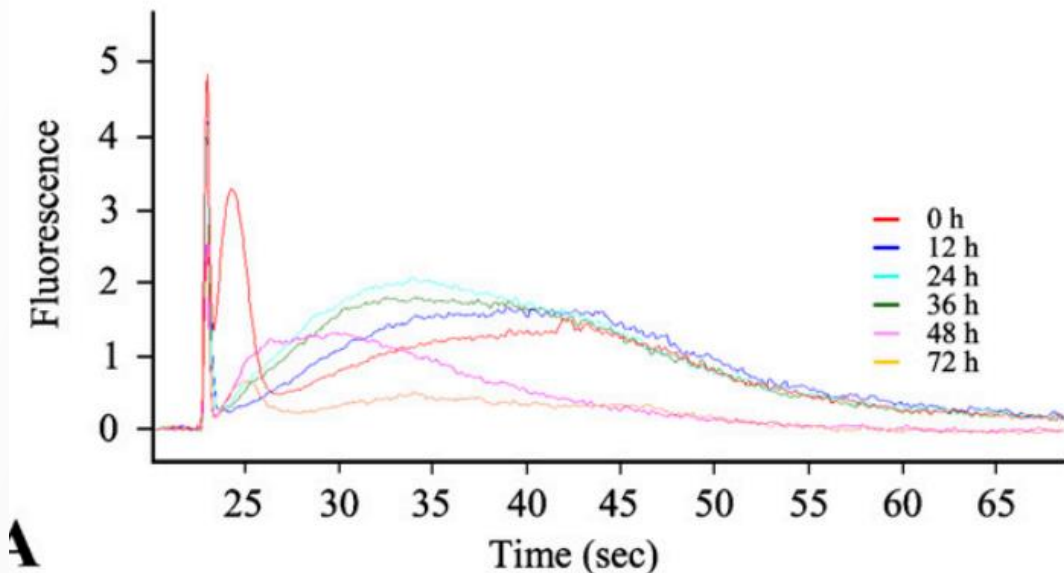
Factors in Tissue Handling and Processing That Impact RNA Obtained From Formalin-fixed, Paraffin-embedded Tissue

Joon-Yong Chung, Till Braunschweig, Reginald Williams, Natalie Guerrero, Karl M. Hoffmann, Mijung Kwon, Young K. Song, Steven K. Libutti, and Stephen M. Hewitt

Tissue Array Research Program, Laboratory of Pathology (J-YC,TB,RW,NG,SMH), Surgery Branch (MK,SKL), Center for Cancer Research, and Pediatric Oncology Branch (YKS), National Cancer Institute, and Digestive Diseases Branch, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (KMH), National Institutes of Health, Bethesda, Maryland



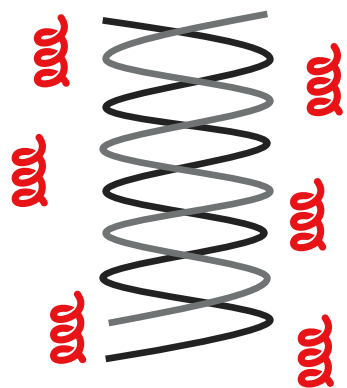
RNA抽出までの様々な
ハンドリング条件を検討



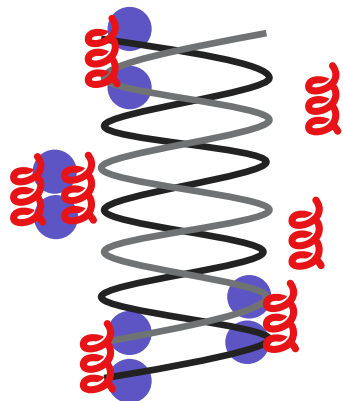
A

固定時間が長いほど
RNAフラグメント長は短くなる
→固定時間が長くなると
RNA Qualityが低下

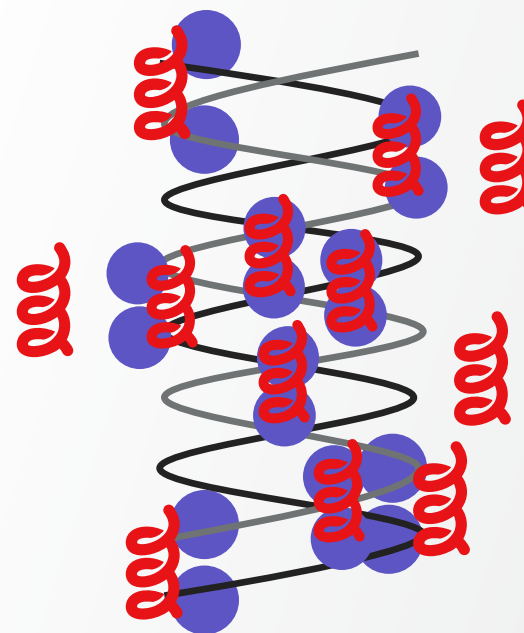
固定時間がRNAの質に影響を与える要因



未固定サンプル



固定済みサンプル



過固定サンプル

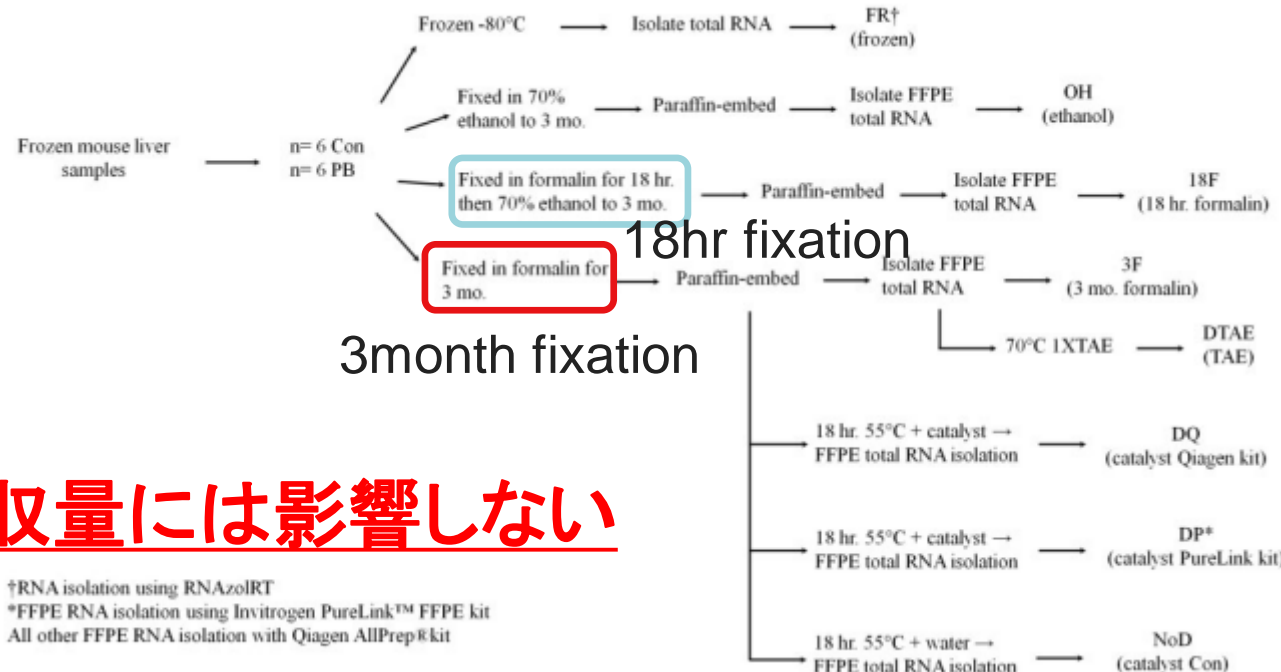
○固定時間が長くなるほど”核酸-タンパク質”の架橋箇所が増える
→過剰な固定操作による架橋箇所密度の増加は
核酸の柔軟性を失し、断片化を促進させる

固定時間は収量には影響しない

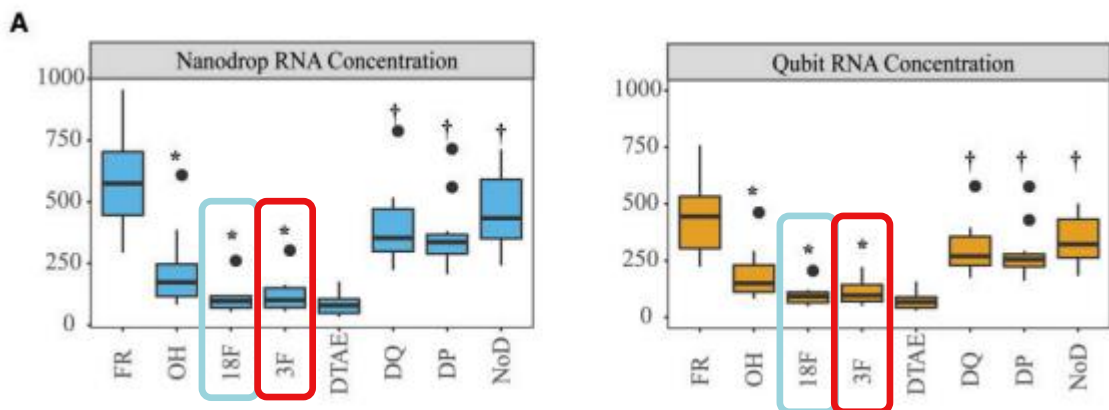
Demodifying RNA for Transcriptomic Analyses of Archival Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Samples

Leah C. Wehmas,^{*,1} Charles E. Wood,^{*} Remi Gagne,[†] Andrew Williams,[†] Carole Yauk,[†] Mark M. Gosink,[‡] Deidre Dalmas,[§] Ruixin Hao,^{||} Raegan O'Loone,^{||} and Susan Hester^{*}

^{*}National Health and Environmental Effects Research Laboratory, U.S. Environmental Protection Agency, Research Triangle Park, North Carolina 27709; [†]Environmental Health Science and Research Bureau, Health Canada, Ottawa, Canada K1A 0K9; [‡]Pfizer Drug Safety R&D, Groton, Connecticut 06340; [§]GlaxoSmithKline, King of Prussia, Pennsylvania 19406; ^{||}DuPont, Newark, Delaware 19714; and ^{||}ILSI Health and Environmental Sciences Institute, Washington, District of Columbia 20005



固定時間はQualityには影響するが、収量には影響しない



[†]RNA isolation using RNAzolRT
^{*}FFPE RNA isolation using Invitrogen PureLink™ FFPE kit
 All other FFPE RNA isolation with Qiagen AllPrep® kit

まとめ: FFPEサンプル作製処理による核酸への影響

- サンプリング・固定処理までの時間は核酸の質に影響を及ぼす
→ RNaseの活性を抑える必要がある
- 固定時のサンプルサイズは核酸の質に影響を及ぼす
→ 固定液がサンプル内部に到達するまでの時間を要する
- 固定時間は核酸の質に影響を及ぼす
→ ”核酸-タンパク質”間架橋に伴う核酸断片化が進む

**FFPEサンプル作製の工程の多くは
核酸の質に影響を及ぼすことがある**

本日のAgenda

FFPEサンプルを用いた遺伝子発現解析

- FFPEサンプルとは
- FFPEサンプルにおける核酸の特徴
- FFPEサンプル作製処理による核酸への影響
- 質の高い核酸を得るためのFFPEサンプル作製での注意点
- FFPEサンプル作製後の注意点

核酸の質に影響を与える操作の徹底

- 採材サンプルの迅速な固定処理
- ばらつきのないFFPEブロック作製操作
- 固定時間・固定液・包埋にかける時間
- 新鮮なBufferの準備

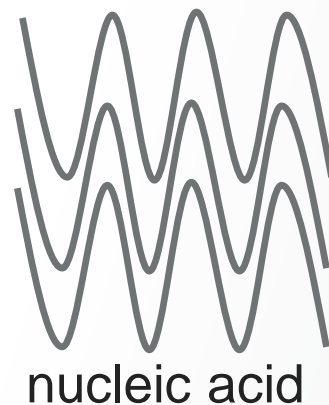
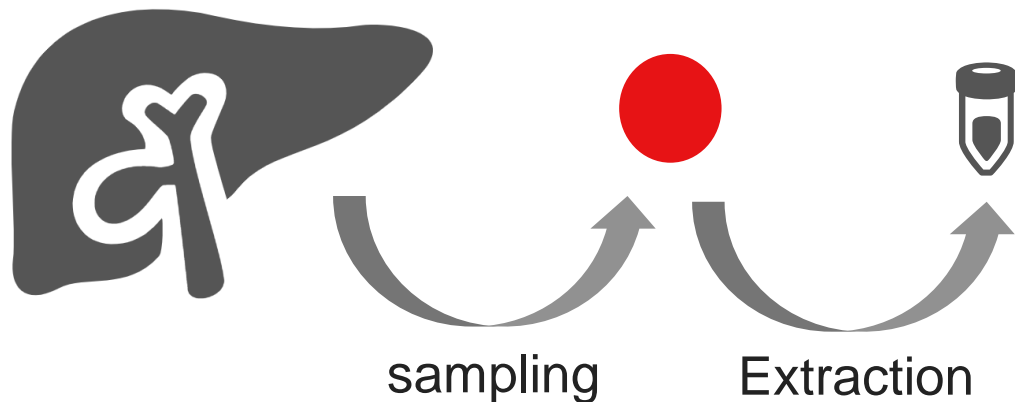
サンプル作製工程はFFPE由来の良質な核酸を得るために最も重要な要素

だが抽出方法も重要

FFPEサンプルからの核酸抽出

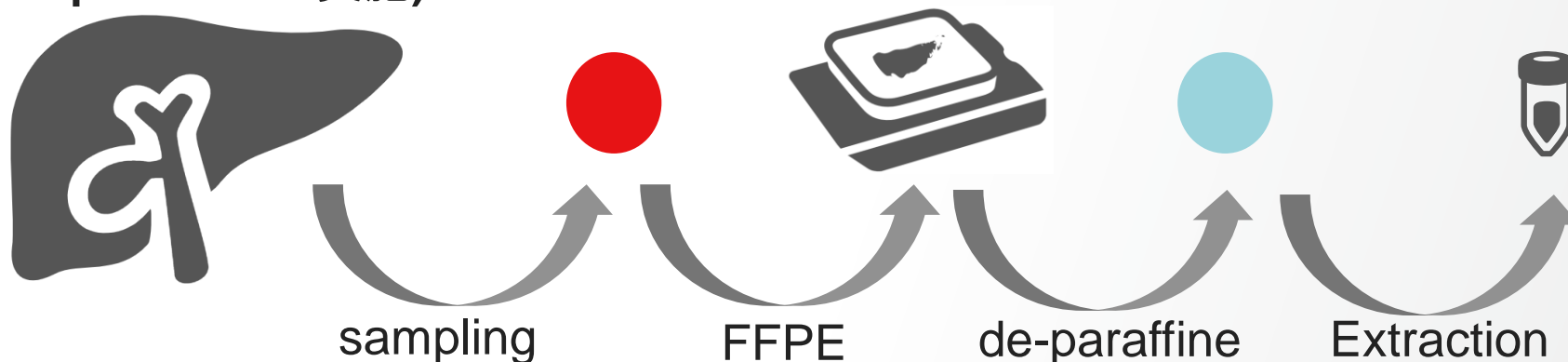
FFPEサンプルは一般的なサンプルとは抽出方法も大きく異なる

○一般的なサンプルからの核酸抽出

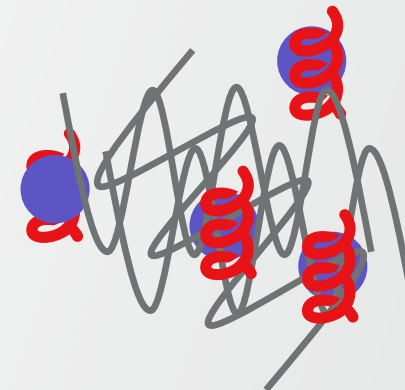


架橋された状態の核酸は
酵素反応を阻害する
(主にメチレンブリッジが要因)

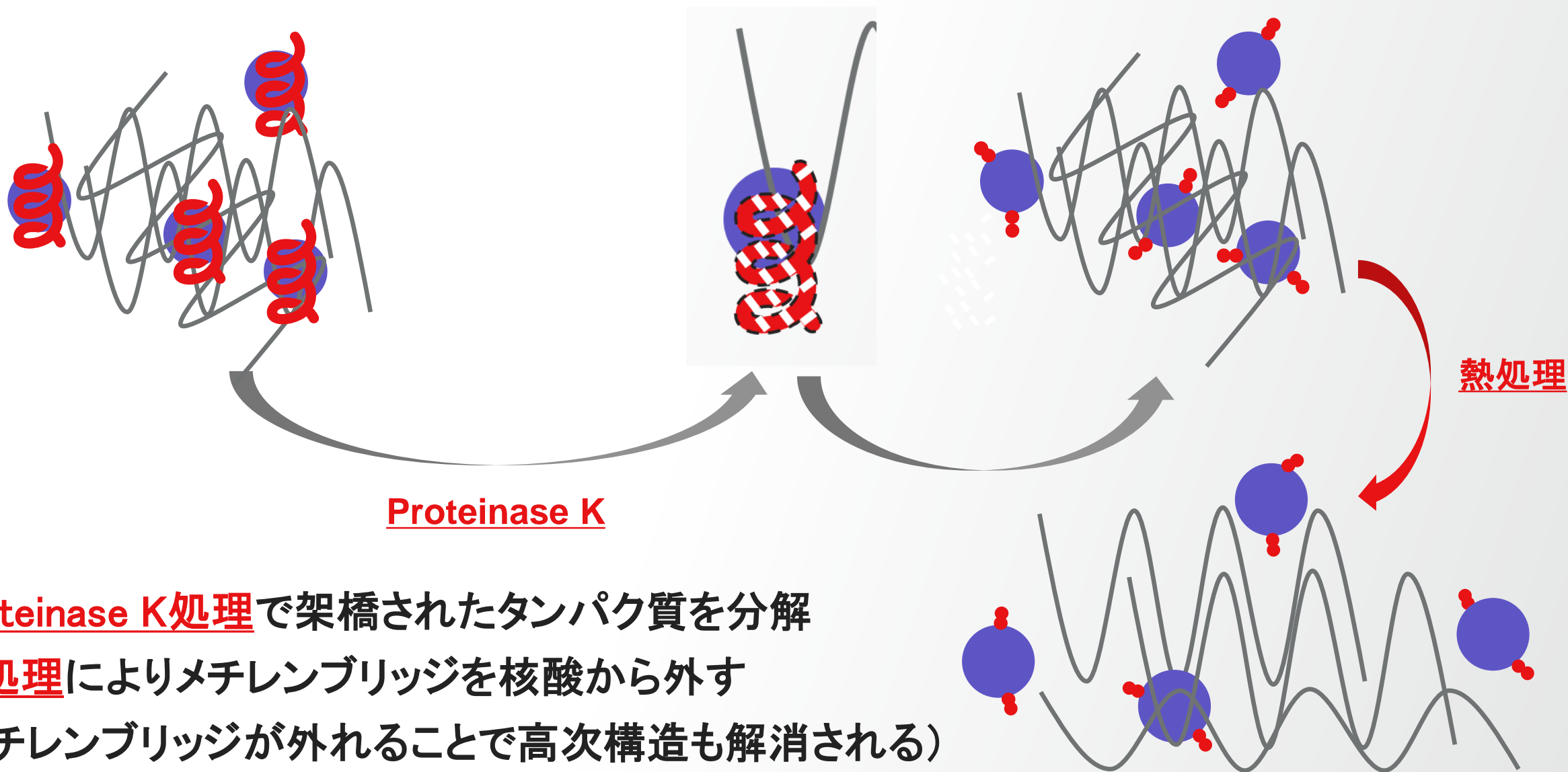
○もし同じ方法でFFPEサンプルから核酸を抽出した場合 (de-paraffineは実施)



一般的な抽出方法でFFPEサンプルを処理すると
核酸にタンパクが架橋された状態で存在
(複雑な構造を取りやすい)



Proteinase Kと熱処理による解析可能な核酸の抽出



Proteinase K

熱処理

Proteinase K処理で架橋されたタンパク質を分解

熱処理によりメチレンブリッジを核酸から外す

(メチレンブリッジが外れることで高次構造も解消される)

精製キットによる抽出工程

キット毎に最適な条件のProteinaseK/熱処理が設定されている



Sectionの厚み	Protease添加量
<40μm	4μL (+Digestion buffer 100μL)
40-80μm	4μL (+Digestion buffer 200μL)

50°C15min→80°C15min (extend 2min)

RecoverAll™ Multi-Sample RNA/DNA Isolation Workflow(カラム精製)

製品番号: A26069



Sectionの厚み	Protease添加量
<40μm	10μL(+DNase buffer 100μL)
>40μm (上限※)	10μL(+DNase buffer 200μL)

55°C1hr→90°C1hr

※条件は特に設けていないが80μmくらいまでが妥当

MagMAX™ FFPE DNA/RNA Ultra Kit(自動精製装置用: Magnet beads)

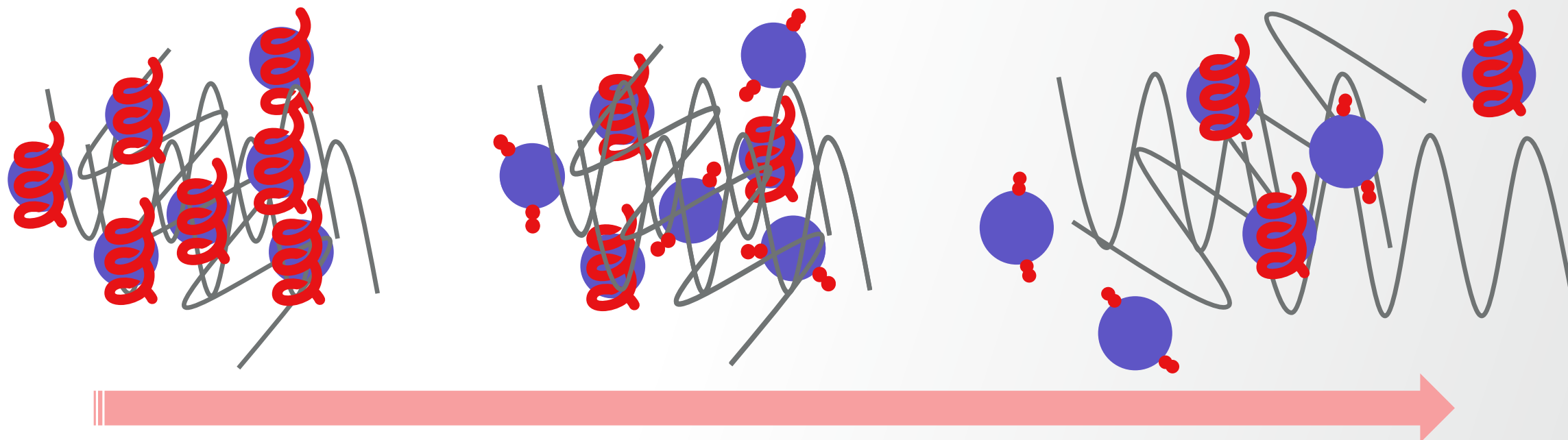
製品番号: A31881

製品ごとにProtease濃度の設定は異なる為、処理時間も異なる

FFPEサンプル抽出での注意点 (FFPE作製工程編)

○固定時間が長い

→過固定によりクロスリンク箇所の密度が増加



過固定サンプルを規定量使用した場合、マニュアル通り抽出を実施してもタンパク分解と架橋の加水分解がキット指定のマニュアルでは処理が追い付かない。

結果的に質の低下した核酸が抽出精製されることで、以降のアプリケーションで問題となる可能性が高い

FFPEサンプル抽出での注意点 (サンプル精製編)

○適切ではないサンプル量

→Kit指定のサンプル量以上を使用した場合、収量・質ともに低下する

収量・質が低下する要因

○脱パラ不良

→脱パラが不十分だと精製効率が低下する

○Proteinase K処理不良

→架橋を外す処理が不十分になり、以降のアプリケーションに支障が生じる

○精製時のCapacity over

→Column、磁気ビーズへの核酸吸着に問題が生じ、
結果的に収量・質の低下した核酸になる

FFPEサンプル抽出での注意点(Qualityの正確な評価)

精製した核酸の正確なQuality評価は以降のアプリケーションを進めるための重要な情報



吸光光度計
(NanoDrop series)



蛍光光度計
(Qubit series)



フラグメント解析装置
(Bioanalyzer Agilent社)

目的に合わせて最適な測定法の選択が重要

測定法の違い

	吸光光度計	蛍光光度計	フラグメント解析装置
核酸収量	<ul style="list-style-type: none"> ○260nmでの評価 ○核酸(DNA/RNA)を測定 ○RNA抽出においてDNAが残存していると過大評価される ○低濃度では測定が難しい 	<ul style="list-style-type: none"> ○<u>任意の核酸(RNAなど)の特異的な収量の測定が可能</u> ○<u>低濃度でも測定可能</u> 	<ul style="list-style-type: none"> ○RNAの場合、18S/28Sの蛍光値から算出する為正確性に欠ける
核酸Quality	<ul style="list-style-type: none"> ○各波長のスペクトルを表示 ○<u>吸光を有するコンタミネーションの判定可能(例:タンパク質・塩類など)</u> ○分解の評価は出来ない ○分解されていてもスペクトルに大きな変化はない 	<ul style="list-style-type: none"> ○Qualityの評価は難しい 	<ul style="list-style-type: none"> ○<u>核酸分解の指標としてRIN※値での評価が可能(※RNA Integrity Number)</u>
FFPEサンプルの評価	<ul style="list-style-type: none"> ○<u>タンパク質などのコンタミネーションの確認には最適</u> ○収量の評価は過大評価される可能性がある 	<ul style="list-style-type: none"> ○<u>濃度が少ないFFPEサンプルでも正確に目的とする核酸の収量を測定できる</u> 	<ul style="list-style-type: none"> ○<u>分解の程度評価については最適な手法</u>

FFPEサンプルから分子生物学的解析が可能な 質の高い核酸の抽出

- 採材サンプルの迅速な固定処理
- ばらつきのないFFPEブロック作製操作
固定時間・固定液・包埋にかける時間
- 新鮮なBufferの準備
- 抽出Kitに沿った抽出方法・Quality評価
(サンプル量・キット工程の順守と
目的に合わせたQuality評価)

本日のAgenda

FFPEサンプルを用いた遺伝子発現解析

- ・FFPEサンプルとは
- ・FFPEサンプルにおける核酸の特徴
- ・FFPEサンプル作製処理による核酸への影響
- ・質の高い核酸を得るためのFFPEサンプル作製での注意点
- ・FFPEサンプル作製後の注意点

FFPE組織作製にて核酸の質に影響を及ぼす工程

サンプリングまでの時間

固定液保存までの時間

固定時間

抽出・精製

FFPEサンプルの保存

核酸の質は保存環境・保存期間にも依存する

RESEARCH ARTICLE

Impact of storage conditions on the quality of nucleic acids in paraffin embedded tissues

Daniel Groelz¹*, Christian Viertler²*, Daniela Pabst², Nadine Dettmann¹, Kurt Zatloukal²

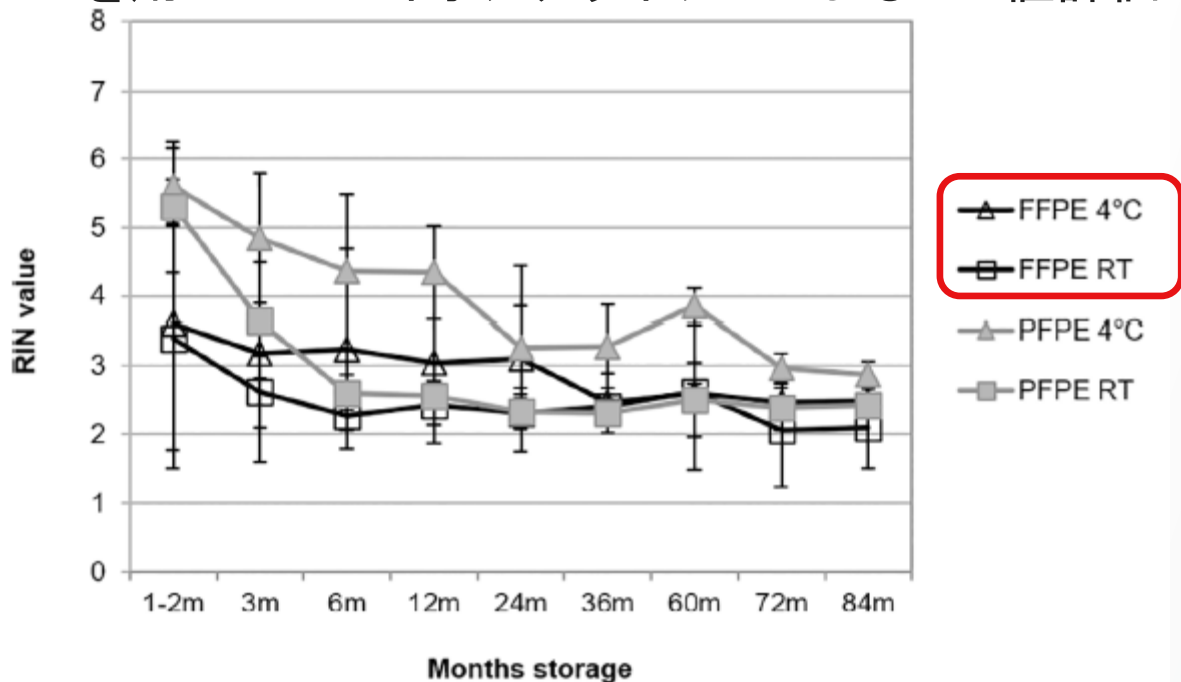
1 QIAGEN GmbH, Research and Development, Hilden, Germany, 2 Institute of Pathology, Medical University of Graz, Graz, Austria

* These authors contributed equally to this work.

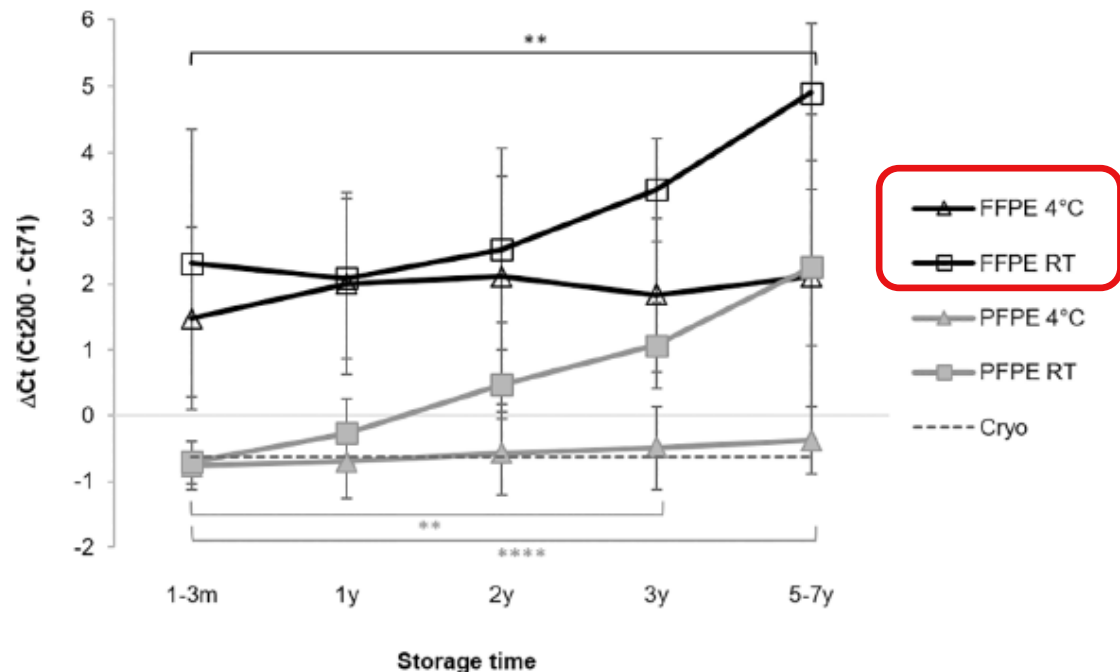
* Daniel.groelz@qiagen.com

室温保管(22°C)では保管期間が長くなるほど抽出したRNAの質は低下する

室温または4°Cに保管したFFPEから抽出したRNAを用いてのバイオアナライザーによるRIN値評価



室温または4°Cに保管したFFPEから抽出したRNAを用いてのRT-qPCR(GAPDH)



核酸の量は保存期間にも依存する

Retrospective Clinical Research Report



Journal of International Medical Research
48(6) 1-10
© The Author(s) 2020
Article reuse guidelines:
sagepub.com/journals-permissions
DOI: 10.1177/0300060520931259
journals.sagepub.com/home/imr
SAGE

Effect of preservation time of formalin-fixed paraffin-embedded tissues on extractable DNA and RNA quantity

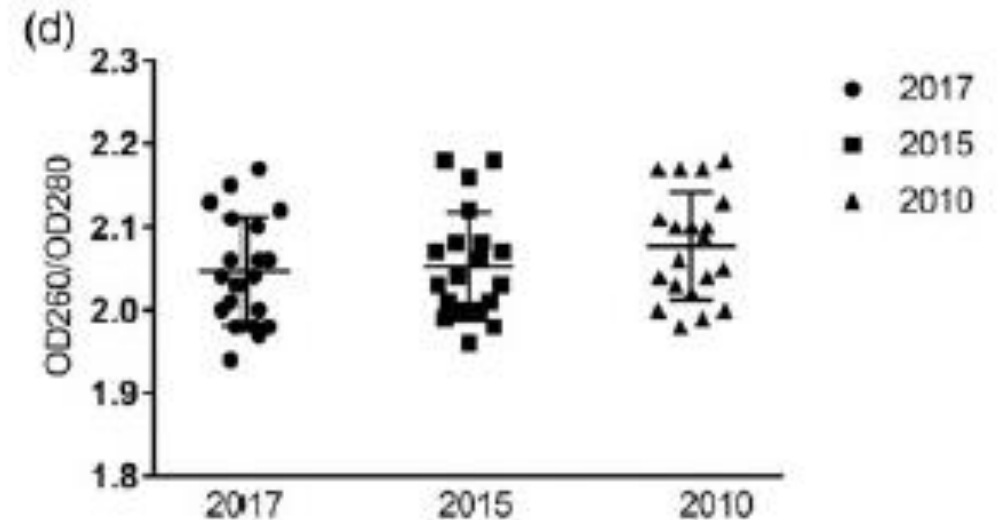
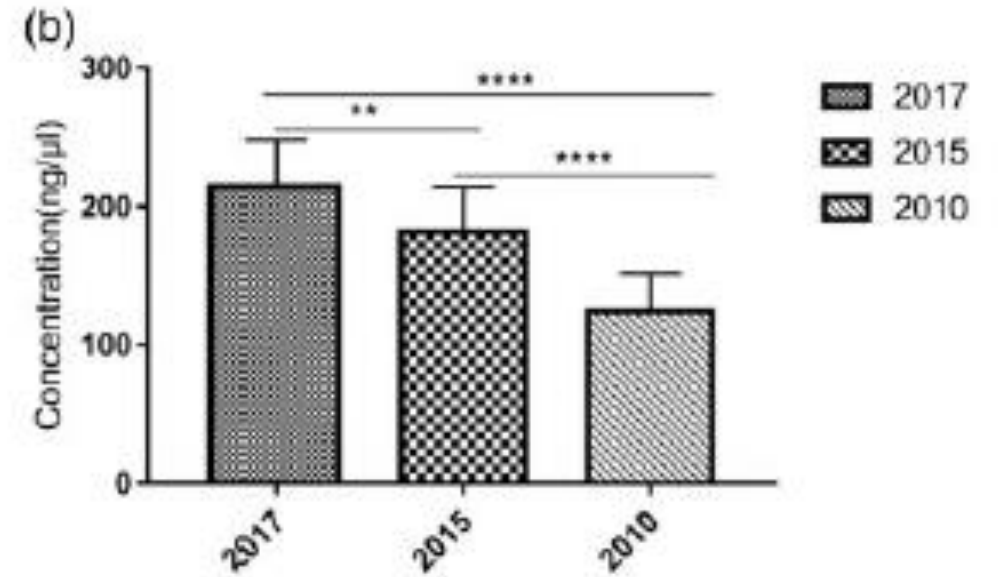
Qing-qing Yi^{1,*}, Rong Yang^{2,*}, Jun-feng Shi³,
Nai-yan Zeng⁴, Dong-yu Liang¹, Shuang Sha³
and Qing Chang¹

2010/2015/2017年に作製したFFPEサンプルが対象
FFPE作製手法は同じ

25°C50%湿度環境にてFFPEブロックを保存

2018年にRNA抽出を実施(保管期間1/3/8年)

→保管期間が長いサンプルほど収量が少ない



FFPE Blockの最適な保管環境

《FFPEブロックの保管》

14. FFPEブロックの保管は、室温でよいが、多湿を避け冷暗所が望ましい (C)。ゲノム診断を目的として作製されたFFPEブロックは、冷蔵下の保存が望ましい (R) 文献18

- 室温保管でも3年以内であれば核酸に大きな影響はない
- 長期保管(3年以上)のサンプルを用いる場合は保管期間による質・収量の低下がある事がある

保管期間・保管条件によって、抽出核酸の収量・質に影響を及ぼす可能性がある。

→解析の際には保管期間・保管条件も考慮する必要がある場合がある

ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程



一般社団法人 日本病理学会
The Japanese Society of Pathology

まとめ: FFPEサンプルを用いた分子生物学実験で注意したい事

- 採材サンプルの迅速な固定処理
(採材後3時間以内が望ましい)
- ばらつきのないFFPEブロック作製操作
(固定前サンプルサイズ調整・固定時間の順守)
- 新鮮なBufferの準備
(新鮮な固定液が望ましい)
- 最適な核酸抽出法の選択
(FFPEに対応した抽出キットの選択)
- 適切な核酸のQuality評価
(測定法の違いによるメリット・デメリットを加味しての評価)
- 適切環境下でのFFPEサンプルの保管
(高温多湿ではない環境、もしくは4°C環境)