

다중 실시간 PCR을 이용한 대체 스플라이싱 효율의 평가 방법

기술보유기관: 충남대학교 산학협력단

연구자 정보: 충남대학교 자연과학대학 생화학과 김기광

기술이전 상담 및 문의: 충남대학교 기술가치센터 파트장 김영찬 / 042-821-8715 / yc.kim@cnu.ac.kr

Key Word: 대체 스플라이싱(Alternative Splicing) / 항암제 반응성 예측 진단키트

본 기술의 스플라이싱 효율 평가방법은 다양한 유전자의 스플라이싱 변이체 진단 및 스플라이싱 기반 치료제의 개발, 모니터링에 활용 가능함

기술개발 배경

[기존 스플라이싱 변이체 정량 분석 기술의 한계 및 정밀 분석 기술 개발 필요성 증가]

- 대체 스플라이싱은 유전자 발현 조절의 핵심 기전으로, 암·신경계질환·희귀질환 등 다양한 질환의 발생 및 치료 반응에 중요한 역할을 수행
- 스플라이싱 변이체의 상대적 발현 수준을 정량하기 위해 PCR, Microarray, RNA-seq 등이 활용되고 있으나, 정량 정확도 및 재현성 측면에서 한계 존재
- 스플라이싱 효율 및 엑손 포함 비율을 보다 정확하고 민감하게 평가할 수 있는 분석 기술 개발 필요성 증가

대표 청구항

[청구항 1]

- (1) 타겟 유전자의 스플라이싱 여부 또는 스플라이싱 효율을 확인하고자 하는 시료로부터 스플라이싱 변이체를 획득한 후, cDNA를 합성하는 단계;
- (2) 상기 단계 (1)에서 획득한 cDNA를 주형으로 하고, 상기 cDNA에 특이적으로 결합하는 프라이머 및 프로브를 이용하여 다중 실시간 PCR을 수행한 후, Ct(threshold cycle) 값을 측정하는 단계; 및
- (3) 상기 단계 (2)에서 측정된 Ct 값을 식 1에 적용하여 스플라이싱 효율을 계산하는 단계;를 포함하는 스플라이싱 효율의 평가 방법.

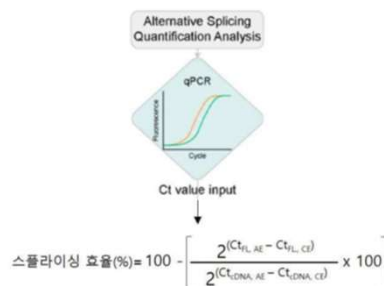
[식 1]

$$\text{스플라이싱 효율(\%)} = 100 - \left[\frac{2^{(Ct_{FL, AE} - Ct_{FL, CE})}}{2^{(Ct_{cDNA, AE} - Ct_{cDNA, CE})}} \times 100 \right]$$

상기 식 1에서, Ct_{FL, AE}는 full-length, FL) cDNA에서 대체 엑손 특이적 프로브를 사용하여 획득한 Ct 값이고, Ct_{FL, CE}는 전장 cDNA에서 구성적 엑손(constitutive exon, CE) 특이적 프로브를 사용하여 획득한 Ct 값이고, Ct_{cDNA, AE}는 스플라이싱 변이체에서 대체 엑손 특이적 프로브를 사용하여 획득한 Ct 값이며, Ct_{cDNA, CE}는 스플라이싱 변이체에서 구성적 엑손 특이적 프로브를 사용하여 획득한 Ct 값이다.

대표도

[도 3]



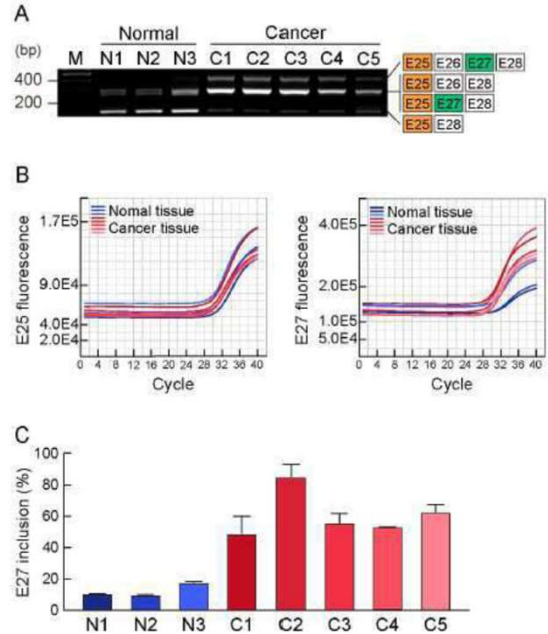
기술 완성도(TRL)

TRL1	TRL2	TRL3	TRL4	TRL5	TRL6	TRL7	TRL8	TRL9
기초이론/ 아이디어	기초연구/ 개념정립	실험실 규모의 기 본성능 검증 /기준규격 설정	연구실 규모의 시작품 test /세포주 실험 in-vitro	유사환경 구성 시스템 성능평가/ 실험동물모델 효능 검증 in-vivo	Pilot 규모 시제품 제 작 / 인체적용시험	실제 환경에서 성능 검증/ 개별인정 진행	표준화/ 인허가 취득	사업화

기술 구현 내용

[암 조직 검체를 이용한 스플라이싱 효율 평가]

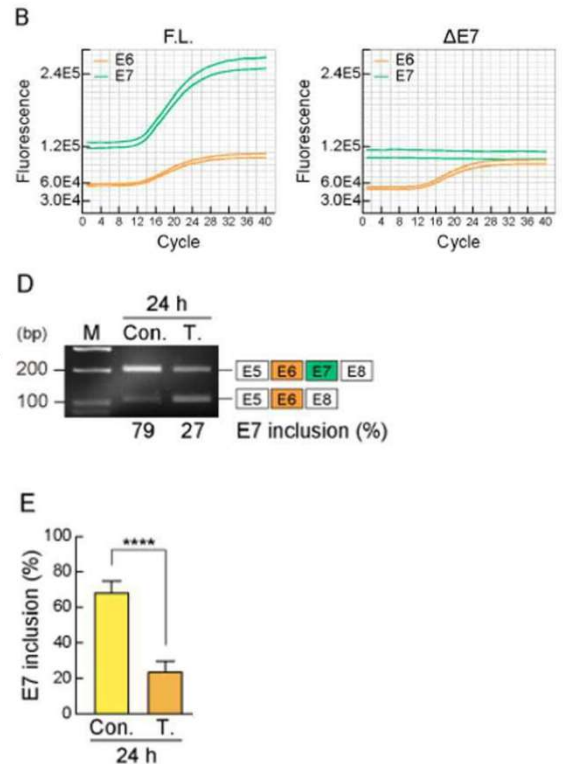
- 임상 적용 가능성 평가를 위하여 자궁내막암(UCEC) 환자 조직 검체를 대상으로 분석
- 3개의 정상조직(N1~N3), 5개의 암조직(C1~C5)
- (A) 기존 RT-PCR 수행하였을 때, 정상조직과 암 조직 사이의 뚜렷한 PBRM1 대체 스플라이싱 패턴 차이가 관찰되었으며, 특히 암조직에서 E27을 포함한 밴드가 뚜렷하게 확인
- (B) 본 발명의 다중 실시간 PCR 분석을 진행하였을 때, E25 특이적 HEX 형광 신호는 모든 검체에서 유사한 증폭 양상을 보였으나, E27 특이적 FAM 형광신호는 정상 조직 대비 암 조직에서 증가된 양상을 보였음
- (C) 본 발명의 스플라이싱 효율 평가를 위한 계산식을 활용하였을 때, 암 조직에서의 E27 포함 비율은 평균 $56.7 \pm 10.3\%$ 으로, 정상조직 $11.2 \pm 6.8\%$ 과 비교하여 높게 나타났음
- 따라서, 본 발명의 다중 실시간 PCR 분석법은 암 조직간 E27 포함율의 이질성을 약 **45-80%** 범위로 정밀하게 검출 가능함을 확인하였으며, 향후 치료법 또는 약물 선택을 위한 치료 방향성 제시나 면역치료 반응 예측을 위한 환자 분류에도 활용될 수 있을 것으로 예상됨



<도5. 암 조직 검체에서 본 기술의 스플라이싱 효율 평가 방법 검증>

[HTRA2 E7의 스플라이싱 효율 평가]

- PBRM1 유전자 외의 다른 유전자의 스플라이싱 분석에도 적용 가능한지 확인
- (B) 다중 실시간 PCR 수행하였을 때, E7을 포함하는 FL의 경우 FAM(E7) 및 HEX(E6) 형광 신호 모두 검출되었으며, E7이 배제된 ΔE7에서는 HEX(E6) 형광신호만 검출
- (D) 대조군과 대비하여 Target SSO 처리군(T)에서 E7 포함 비율이 감소하였음
- (E) 본 발명의 다중 실시간 PCR 분석법을 이용하였을 때, 대조군의 E7 포함 비율은 $67.3 \pm 8.9\%$, Target SSO 처리군(T)은 $23.8 \pm 4.2\%$ 로 나타났음
- 따라서, 본 발명의 다중 실시간 PCR 분석법 기반 스플라이싱 효율 평가 방법이 다양한 유전자의 스플라이싱 변화를 정량적으로 평가할 수 있는 표준화된 분석 플랫폼인 것을 확인

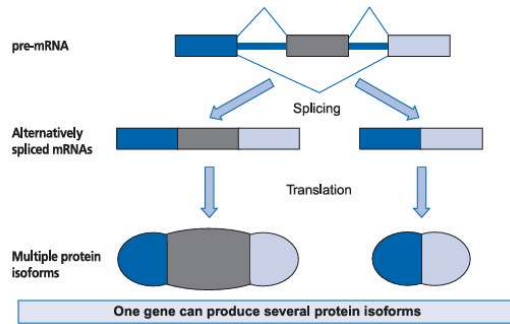


<도6. 본 기술의 다중 실시간 PCR을 이용한 HTRA2 E7의 스플라이싱 효율 평가>

기술개발 내용 및 차별성

[다중 실시간 PCR을 이용한 대체 스플라이싱 정밀 정량 분석 플랫폼]

- 기존 분석법과 달리, 표적 mRNA의 스플라이싱 효율 및 엑손 포함 비율을 정밀하게 정량할 수 있는 분석 플랫폼 기술
- “대체 스플라이싱 효율 정량 분석”
 - 대체 엑손(Alternative Exon) 및 구성적 엑손(Constitutive Exon) 특이적 형광 프로브를 이용하여 스플라이싱 효율 및 엑손 포함 비율을 정확하게 측정
- “높은 정확도 및 재현성 확보”
 - PCR 효율 및 프로브 간 증폭 효율 차이를 보정하여 분석 정확도와 재현성을 향상
- “환자 조직 기반 임상 적용성 검증”
 - 자궁내막암 환자 조직 검체를 이용하여 정상 조직과 암 조직 간 PBRM1 스플라이싱 차이를 확인함으로써 임상 적용 가능성 확보



비즈니스 아이디어

- 항암제 반응성 예측 진단키트
- 정밀의료 기반 동반진단 플랫폼
- 핵산치료제 효능평가 플랫폼



시장동향

〈글로벌 동반진단 시장 규모 및 전망〉

(단위: 억달러)



출처: Markets and Markets, 재가공

- 글로벌 동반진단(Companion Diagnostics) 시장은 2026년 63억 1천만 달러이며, 연평균 약 12.9%의 성장률로 2031년에 115억 7천만달러를 달성할 것으로 예상됨

특허/권리현황

No.	특허명	등록현황	특허번호
1	다중 실시간 PCR을 이용한 대체 스플라이싱 효율의 평가 방법	미공개	10-2025-0185316 (2025.11.28)