

연구소 생산균주 제작 기록서

	Yeast inorganic pyrophosphatase RCB 제작	문서번호 [Form No.]	RCB_GYIPP_ P1_230530
		페이지 번호 [Page No.]	페이지 1 / 13

관련 프로젝트명	연구과제 [20018423] GMP 급 mRNA 백신 생산용 필수효소 생산기술개발
항목	Yeast inorganic pyrophosphatase
용도	RCB
등록 번호	RCB_GYIPP(RIL)_P1
균주	E.coli BL21 DE3 RIL
제작 용량	100 vial

승인				
	팀 [Team]	성명 [Name]	서명일 [Date]	서명 [Signature]
작성 [Prepared by]	연구소	조수예		
검토 [Reviewed by]	연구소	파린다		
승인 [Approved by]	연구소	신용걸		

개정내역		
개정번호	시행일자	변경내용

연구소 생산균주 제작 기록서



Yeast inorganic
pyrophosphatase
RCB 제작

문서번호
[Form No.]
페이지 번호
[Page No.]

RCB_GYIPP_
P1_230530
페이지 2 / 13

주요 SOP

번호	항목	페이지 번호
S1_RCB_GYIPP	배지 제조방법	3/13
S2_RCB_GYIPP	Transformation	4/13
S3_RCB_GYIPP	항생제 내성 테스트	4-5/13
S4_RCB_GYIPP	발현 테스트	6/13
S5_RCB_GYIPP	고발현 콜로니 선별	7/13
S6_RCB_GYIPP	배양	8/13
S7_RCB_GYIPP	분주	9/13
S8_RCB_GYIPP	외래성 미생물 부정시험 1 (항생제테스트)	10-11/13
S9_RCB_GYIPP	외래성 미생물 부정시험 2 (콜로니 PCR)	12/13
S10_RCB_GYIPP	외래성 미생물 부정시험 3 (발현테스트)	13/13

연구소 생산균주 제작 기록서



Yeast inorganic
pyrophosphatase
RCB 제작

문서번호
[Form No.]
페이지 번호
[Page No.]

RCB_GYIPP_
P1_230530
페이지 3 / 13

1. 배지 제조 방법

S1_RCB_GYIPP

배지명	용도	제조량	제조일	제조사
LB Broth (Tryptone) 고체	콜로니 확인	1 L	23.05.08	조수예
LB Broth (Soy) 액체	배양	2 L	23.05.10	조수예

LB Broth (Tryptone) 고체

순서	Component	Cat#	Lot#	기준 (g/L)	사용량	확인
1	NaCl	S0485	12220	10	10	<input type="checkbox"/>
2	Tryptone	T1332.0500	017040.04	10	10	<input type="checkbox"/>
3	Yeast extract	CHS-02	040870601 ck3021	5	5	<input type="checkbox"/>
4	Agar bacterial	MB-A1651	B22M17837YJ	15	15	<input type="checkbox"/>
	1 차수			Up to 1 L	Up to 1 L	<input type="checkbox"/>
	멸균작업 [멸균기 : (주)제이오텍 ST-85G]			F0=20	F0=20	<input type="checkbox"/>

LB Broth (Soy) 액체

순서	Component	Cat#	Lot#	기준 (g/L)	사용량	확인
1	NaCl	S0485	12220	10	20	<input type="checkbox"/>
2	Soy peptone	HSP-349	10058319	10	20	<input type="checkbox"/>
3	Yeast extract	CHS-02	040870601 ck3021	5	10	<input type="checkbox"/>
4	1 차수			Up to 1 L	Up to 2 L	<input type="checkbox"/>
						<input type="checkbox"/>
	멸균작업 [멸균기 : (주)제이오텍 ST-85G]			F0=20	F0=20	<input type="checkbox"/>

연구소 생산균주 제작 기록서



Yeast inorganic
pyrophosphatase
RCB 제작

문서번호
[Form No.]
페이지 번호
[Page No.]

RCB_GYIPP_
P1_230530
페이지 4 / 13

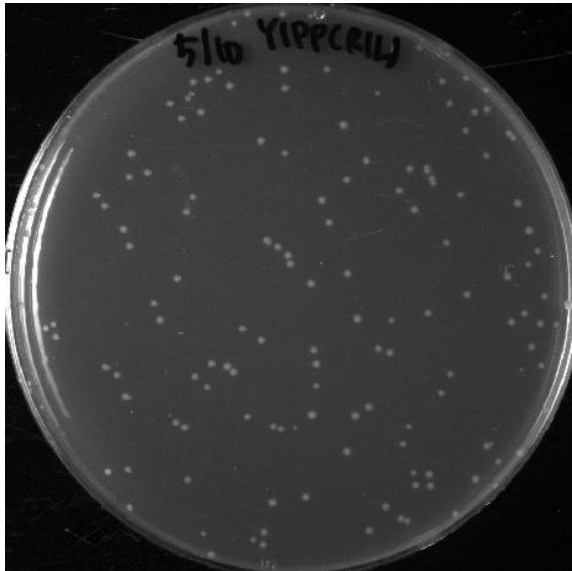
2. Transformation

S2_RCB_GYIPP

실험일 / 실험자	2023-05-10	조수예
Competent cell 정보	BL21(DE3) RIL, Cat# [] Lot# []	
DNA 정보	ME199-01/ pET28a-YIPP/ Kana, CAM	
DNA 사용량	100 ng/ μ l, 2 μ l	
Heat shock	42°C, 30 sec, ice 2 min	
Recovery	900 μ l LB, 37°C, 220 rpm, 1hr	

3. 항생제 내성테스트

S3_RCB_GYIPP

실험일 / 실험자	2023-05-10	조수예
Recovery 용액 분주량	100 μ l (1/10)	
항생제	Kanamycin, Chloramphenicol	
콜로니 수	140	
Cfu/ml	1.4×10^3	
실험결과		

연구소 생산균주 제작 기록서



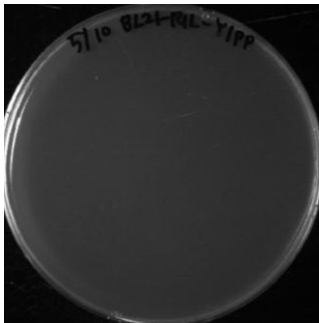
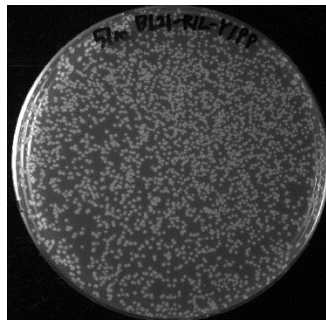


Yeast inorganic
pyrophosphatase
RCB 제작

문서번호
[Form No.]

RCB_GYIPP_
P1_230530

페이지 번호
[Page No.]

페이지 5 / 13

항생제	Ampicilin	Kanamycin
콜로니 수	0	6240
Cfu/ml	0	6.24×10^4
실험결과		
항생제	Chloramphenicol	Tetracyclin
콜로니 수	>10000	>10000
Cfu/ml	$>10000 \times 10$	$>10000 \times 10$
실험결과		
콜로니 보관 [P0]	배양	1 개 콜로니를 각 2 ml LB 배지에 현탁하여 OD ₆₀₀ 4 도달시 배양종료. 총 5 개 콜로니 실시 (고발현 콜로니 선별 실험에 사용)
	충전조성	25% Glycerol (50% Glycerol 과 1:1 혼합), 1 ml 충전 (1.5 ml tube) x 3 vial, -80℃ 보관.

연구소 생산균주 제작 기록서



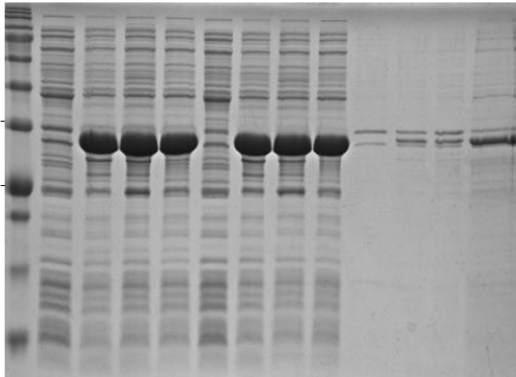
Yeast inorganic
pyrophosphatase
RCB 제작

문서번호
[Form No.]
페이지 번호
[Page No.]

RCB_GYIPP_
P1_230530
페이지 6 / 13

4. 발현테스트

S4_RCB_GYIPP

실험일 / 실험자	2023-05-15			조수예																																																															
테스트 용량	20 ml * 3																																																																		
Cell stock 사용량	#[1] Colony stock 60 μℓ (배양용량의 1/1000)																																																																		
배양 조건	18℃ , 25℃ , 37℃ / 220 rpm																																																																		
Induction 조건	OD600 = 0.6 도달시점 20 ml 씩 18℃ , 25℃ , 37℃, IPTG 1 mM, [18, 4]hr																																																																		
OD600	18℃ , 18hr		25℃ , 18hr		37℃ , 4hr																																																														
	3.5		5.2		3.5																																																														
결과 확인방법	OD ₆₀₀ 1.5 sampling, sonication in 250 μℓ CB50 15% gel, 10 μℓ loading 배양액 [17, 11, 17]μℓ 에 해당																																																																		
실험결과	<div>2 μg/17 μℓ 120 mg/L</div> <table><thead><tr><th></th><th colspan="3">Whole</th><th colspan="3">Sup</th><th colspan="3">Pellet</th></tr><tr><th></th><th colspan="2">O/N</th><th>5hr</th><th></th><th colspan="2">O/N</th><th>5hr</th><th></th><th colspan="2">O/N</th><th>5hr</th></tr><tr><th></th><th>18℃</th><th>25℃</th><th>37℃</th><th></th><th>18℃</th><th>25℃</th><th>37℃</th><th></th><th>18℃</th><th>25℃</th><th>37℃</th></tr></thead><tbody><tr><td>Induction :</td><td>-</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>-</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>-</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td></tr><tr><td></td><td>1</td><td>2</td><td>3</td><td>4</td><td>5</td><td>6</td><td>7</td><td>8</td><td>9</td><td>10</td><td>11</td><td>12</td><td>13</td></tr></tbody></table> <div>(kDa)</div> 							Whole			Sup			Pellet				O/N		5hr		O/N		5hr		O/N		5hr		18℃	25℃	37℃		18℃	25℃	37℃		18℃	25℃	37℃	Induction :	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
		Whole			Sup			Pellet																																																											
		O/N		5hr		O/N		5hr		O/N		5hr																																																							
		18℃	25℃	37℃		18℃	25℃	37℃		18℃	25℃	37℃																																																							
	Induction :	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+																																																						
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13																																																					

연구소 생산균주 제작 기록서



Yeast inorganic
pyrophosphatase
RCB 제작

문서번호
[Form No.]
페이지 번호
[Page No.]

RCB_GYIPP_
P1_230530
페이지 7 / 13

5. 고발현 콜로니 선별

S5_RCB_GYIPP

실험일 / 실험자	2023-05-15				조수예
테스트 용량	20 ml				
Cell stock [P0] 사용량	20 μ l (1/1000)				
배양조건	[37]°C, 220rpm				
Induction 조건	OD600 = 0.6 도달시점 IPTG 1 mM, [4]hr				
Colony#	1	2	3	4	5
OD600	2	2.1	3.2	2	3.1
발현률 (%) 타겟/전체 단백질*100	64	59	60	67	56
실험결과 (PAGE 이미지, OD600)	<p style="text-align: center;">2 μg/24 μl 83 mg/L</p> <div style="text-align: center;"> <div>Whole</div> <div>Sup</div> <div>Pellet</div> </div> <p>Induction : - - - - - + + + + + - - - - - + + + + + - - - - - + + + + +</p> <p>M 1 2 3 4 5 1 2 3 4 5 1 2 3 4 M 5 1 2 3 4 5 1 2 3 4 5 1 2 3 4 5 1 2 3 4 5</p> <p>1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32</p>				

연구소 생산균주 제작 기록서



Yeast inorganic
pyrophosphatase
RCB 제작

문서번호
[Form No.]
페이지 번호
[Page No.]

RCB_GYIPP_
P1_230530
페이지 8 / 13

6. 배양

S6_RCB_GYIPP

작업일 / 수행자	2023-05-30	조수예		
배양용량	200 ml			
Cell stock [P0] 사용량	#[1] Colony, 200 μ l (1/1000)			
배양조건	37°C, 220 rpm, [8]hr			
배양 시간 기록	배양 시작 시간 : 2023-05-30 9:00 배양 종료 시간 : 2023-05-30 17:00			
배양 종료 기준 [OD 값 / 배양시간]	6 / 8 hr			
최종 OD ₆₀₀	6			
종배양 진행차수	1 회차 [P1]			
성장곡선	2 hr	4 hr	6 hr	8 hr
				6

연구소 생산균주 제작 기록서



Yeast inorganic
pyrophosphatase
RCB 제작

문서번호
[Form No.]
페이지 번호
[Page No.]

RCB_GYIPP_
P1_230530
페이지 9 / 13

7.분주

S7_RCB_GYIPP

작업일 / 수행자

2023-05-30

조수예

충전조성

25% Glycerol (50% Glycerol 과 1:1 혼합)
Cat# [EBG001-250] Lot# [NI]

충전량

1 ml (1.5 ml 스크류 뚜껑 튜브, Axygen #SCT-150-SS-C-S)

분주 작업 공간

연구소 클린벤치 [JSCB-1800SL]

충전시 주의

배양액 교반 필요 (중간 bottle shaking 5 초)

보관온도 조건

-60°C 이하

보관장소/냉동고정보

Forma Series Ultra-Low Freezer

보관사진



보관 Vial 수량

100

라벨 확인

항목

내용

확인내용

확인

Product 명

RCB_GYIPP(RIL)

제품명 확인

☐

Lot#

230530

제조번호 확인

☐

Vial#

1 부터 100 까지
부여

Vial 순번 확인

☐

보관 시작 일시

2023-05-30

실 보관 온도 기록(°C)

[-80]°C

연구소 생산균주 제작 기록서


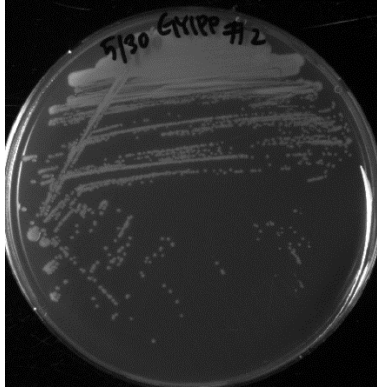
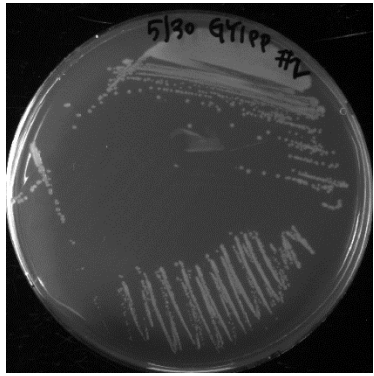
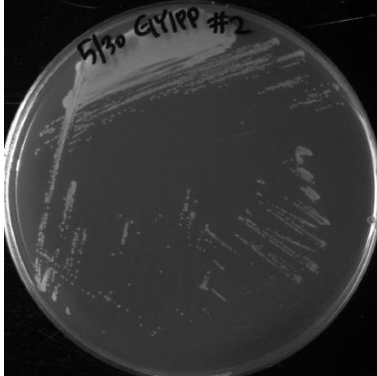


Yeast inorganic
pyrophosphatase
RCB 제작

문서번호
[Form No.]
페이지 번호
[Page No.]

RCB_GYIPP_
P1_230530
페이지 10 / 13

8. 외래성 미생물
부정시험 1 (항생제내성)
S8_RCB_GYIPP

RCB vial# (2개)	#41, #79	
실험일/실험자	2023-05-17	조수예
배양방법	RCB 10 μ l 를 항생제가 포함된 LB agar plate 에 streaking 하여 37°C, 18hr 배양	
#41 항생제 테스트 결과	1. Ampicilin	2. Kanamycin
		
	증식여부 [-]	증식여부 [+]
	3. Chloramphenicol	4. Tetracyclin
		
	증식여부 [+]	증식여부 [+]
PASS/FAIL	PASS	

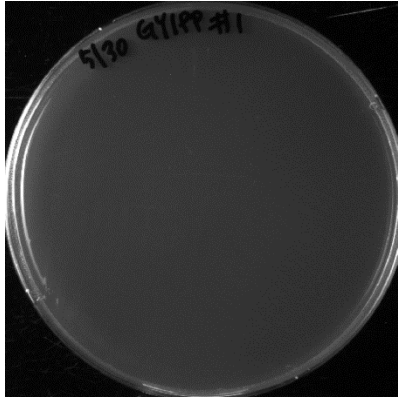
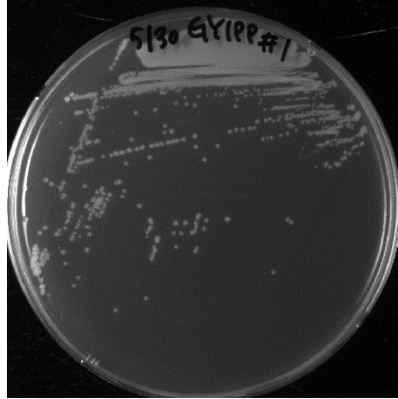
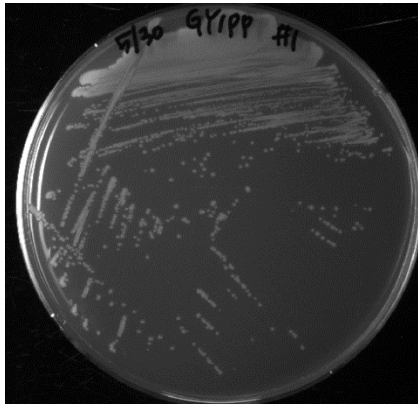
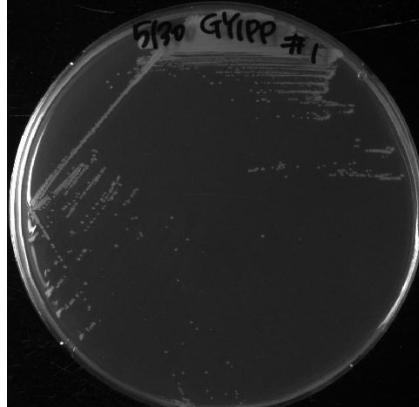
연구소 생산균주 제작 기록서



Yeast inorganic
pyrophosphatase
RCB 제작

문서번호
[Form No.]
페이지 번호
[Page No.]

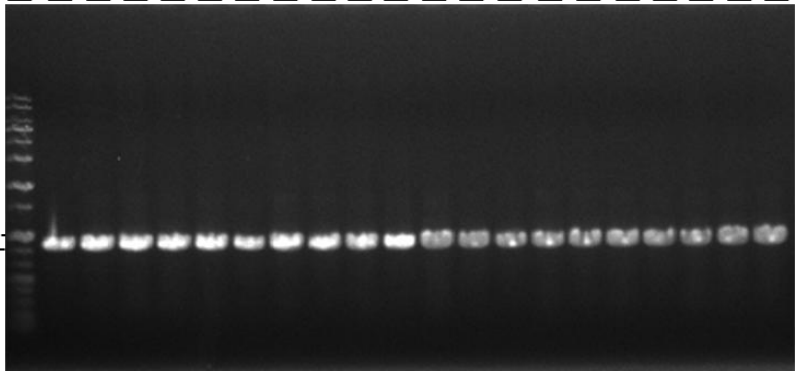
RCB_GYIPP_
P1_230530
페이지 11 / 13

#79 항생제 테스트 결과	1. Ampicilin	2. Kanamycin
		
	증식여부 [-]	증식여부 [+]
	3. Chloramphenicol	4. Tetracyclin
		
	증식여부 [+]	증식여부 [+]
PASS/FAIL	PASS	

연구소 생산균주 제작 기록서

	Yeast inorganic pyrophosphatase RCB 제작	문서번호 [Form No.]	RCB_GYIPP_ P1_230530
		페이지 번호 [Page No.]	페이지 12 / 13

9. 외래성 미생물 부정시험 2 (콜로니 PCR)
S9_RCB_GYIPP

대상 콜로니	S8_RCB_GYIPP 실험의 [Kanamycin, Chloramphenicol] 항생제 Plate 콜로니 10 개	
실험일/실험자	2023-05-31 / 조수예	
PCR Primer set (5' - 3')	Primer #[RC2205-07F/R] F : AGAAGGAGATATACCATGACCTACACTACC R : GTGGTGGTGCCTCGAGTTAAACAGAACCGGA	
Target size	[864]bp	
Colony PCR 결과	<div> <div>Colony :</div> <div> <div>Kanamycin Plate</div> <div>Chloramphenicol Plate</div> </div> <div> <div>1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21</div> <div>  </div> </div> </div>	
	Product 생성여부	[10]/10
PASS/FAIL	PASS	

연구소 생산균주 제작 기록서



Yeast inorganic
pyrophosphatase
RCB 제작

문서번호
[Form No.]
페이지 번호
[Page No.]

RCB_GYIPP_
P1_230530
페이지 13 / 13

10. 외래성 미생물
부정시험 3 (발현테스트)
S9_RCB_GT7RP

실험일 / 실험자	2023-05-31	조수예																																																																				
테스트 용량	20 ml																																																																					
Cell stock 사용량	Vial #[49], #[79] 20 μ l (배양용량의 1/1000)																																																																					
온도조건	[37] $^{\circ}$ C																																																																					
Induction 조건	OD ₆₀₀ = 0.6 도달시점 IPTG 1 mM, [4]hr (control: 25 $^{\circ}$ C 6hr)																																																																					
OD600	4.24 (control 25 $^{\circ}$ C: 2.6)																																																																					
결과 확인방법	OD ₆₀₀ 1.5 sampling, sonication in 250 μ l CB50 15% gel, 10 μ l loading 배양액 [14] μ l 에 해당																																																																					
실험결과	<div>1 μg/14 μl 71 mg/L</div> <table><thead><tr><th></th><th colspan="4">Whole</th><th colspan="4">Sup</th><th colspan="4">Pellet</th></tr><tr><th>Induction temp:</th><th colspan="2">25</th><th colspan="2">37</th><th colspan="2">25</th><th colspan="2">37</th><th colspan="2">25</th><th colspan="2">37</th></tr><tr><th>Induction :</th><th>M</th><th>-</th><th>+</th><th>-</th><th>+</th><th>-</th><th>+</th><th>-</th><th>+</th><th>-</th><th>+</th><th>-</th><th>+</th></tr><tr><th></th><th>1</th><th>2</th><th>3</th><th>4</th><th>5</th><th>6</th><th>7</th><th>8</th><th>9</th><th>10</th><th>11</th><th>12</th><th>13</th></tr></thead><tbody><tr><td>(kDa)</td><td colspan="13"></td></tr></tbody></table>			Whole				Sup				Pellet				Induction temp:	25		37		25		37		25		37		Induction :	M	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	(kDa)													
	Whole				Sup				Pellet																																																													
Induction temp:	25		37		25		37		25		37																																																											
Induction :	M	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+																																																									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13																																																									
(kDa)																																																																						
발현율	52 (25 $^{\circ}$ C), 60 (37 $^{\circ}$ C)																																																																					
PASS/FAIL	PASS																																																																					