

연구소 생산균주 제작 기록서



DNase I (Pichia)
RCB 제작

문서번호
[Form No.]

RCB_GDNSI_P2_20221
202

관련 프로젝트명	연구과제 [20018423] GMP 급 mRNA 백신 생산용 필수효소 생산기술개발
항목	DNase I (Pichia)
용도	RCB
등록 번호	RCB_GDNSI_P2
균주	Pichia pastoris (GS115)
제작 용량	100 vial

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

개정내역

개정번호	시행일자	변경내용
00	2022-11-21	제정

연구소 생산균주 제작 기록서



DNase I (Pichia)
RCB 제작

문서번호
[Form No.]

RCB_GDNSI_P2_20221
202

주요 SOP

번호	항목	페이지 번호
S1_RCB_GDNSI	배지 제조방법	3~5
S2_RCB_GDNSI	Streaking	5
S3_RCB_GDNSI	항생제 내성 테스트	5~6
S4_RCB_GDNSI	고발현 콜로니 선별	6~7
S5_RCB_GDNSI	배양	8
S6_RCB_GDNSI	분주	9

연구소 생산균주 제작 기록서



DNase I (Pichia)
RCB 제작

문서번호
[Form No.]

RCB_GDNSI_P2_20221
202

1. 배지 제조 방법

S1_RCB_GDNSI

배지명	용도	제조량	제조일	제조자
YPD Broth (Soy) 고체	콜로니 확인	500 ml	2022-11-21	김윤정
BMGY Broth (Soy) 액체	배양	500 ml	2022-11-29	김윤정
BMMY Broth (Soy) 액체	발현	500 ml	2022-11-29	김윤정

YPD Broth (Soy) 고체

순서	Component	Cat#	Lot#	기준 (g/L)	사용량	확인
1	Yeast extract	CHS-0205	04870601CK3021	10 g/L	5 g	<input type="checkbox"/>
2	Soy peptone	HS0349	2021/06/04	20 g/L	10 g	<input type="checkbox"/>
3	Dextrose	G5767	SLBP5997V	20 g/L	10 g	<input type="checkbox"/>
4	Agar	MB-A1651	B22M17837YJ	20 g/L	10 g	<input type="checkbox"/>
	멸균작업			F0=20		<input type="checkbox"/>

BMGY Broth (Soy) 액체

순서	Component	Cat#	Lot#	기준 (g/L)	사용량	확인
1	Yeast extract	CHS-0205	04870601CK3021	5 g/L	2.5 g	<input type="checkbox"/>
2	Soy peptone	HS0349	2021/06/04	10 g/L	5 g	<input type="checkbox"/>
3	100 mM Potassium phosphate (pH6.0 ± 0.1)	KH ₂ PO ₄ :PPM05	04871222PPM0520	2.30 g/L	1.15 g	<input type="checkbox"/>
		K ₂ HPO ₄ :PPD05	04871222PPD0520	11.8 g/L	5.9 g	<input type="checkbox"/>
4	Yeast nitrogen base (YNB)	Y0626	MKCN8243	13.4 g/L	6.7 g	<input type="checkbox"/>
5	Biotin	B4639	SLCF3557	0.4 mg/L	0.2 mg	<input type="checkbox"/>
6	Glycerol	GLYC05	0705GLYC4922	10 ml/L	5 ml	<input type="checkbox"/>
	멸균작업			F0=20		<input type="checkbox"/>

연구소 생산균주 제작 기록서



DNase I (Pichia)
RCB 제작

문서번호
[Form No.]

RCB_GDNSL_P2_20221
202

상세기술 (1 L 기준)

- ① Yeast extract 5 g, Soy Peptone 10 g, / 1 L (autoclave)
- ② 상온에서 식힌 후
- ③ 1 M potassium phosphate buffer, pH6.0 \pm 0.1 을 100 ml 첨가
→ 1 M K₂HPO₄ 132 ml + 1 M KH₂PO₄ 868 ml 을 mix 하여 1 M potassium phosphate buffer, pH6.0 \pm 0.1 인지 확인하고 인산 (H₃PO₄, Phosphoric acid 또는 수산화칼륨(KOH)으로 적정
→ 1 M K₂HPO₄ : Potassium phosphate dibasic 174.18 g 을 최종 1L 되게 DW 로 녹인 후, Filter sterilize
→ 1 M KH₂PO₄ : Potassium phosphate monobasic 136.09 g 을 최종 1L 되게 DW 로 녹인 후, Filter sterilize
- ④ yeast nitrogen base (134 g/L) 을 100 ml 첨가
→ Yeast nitrogen base 134 g / 1 L 넣고 Heat stirring 으로 완전히 녹인 다음 Filter sterilize
- ⑤ Biotin (20 mg/ 100 ml) 을 2 ml 첨가
→ Biotin 20 mg / 100 ml 에 녹인 뒤, Filter sterilize
- ⑥ 10% Glycerol 을 100 ml 첨가
→ 100% Glycerol 100 ml + D.W 900 ml 혼합 뒤 Filter sterilize

BMMY Broth (Soy) 액체

순서	Component	Cat#	Lot#	기준 (g/L)	사용량	확인
1	Yeast extract	CHS-0205	04870601CK302 1	5 g/L	2.5 g	<input type="checkbox"/>
2	Soy peptone	HS0349	2021/06/04	10 g/L	5 g	<input type="checkbox"/>
3	100 mM Potassium phosphate (pH6.0 \pm 0.1)	KH ₂ PO ₄ :PPM05	04871222PPM05 20	2.30 g/L	1.15 g	<input type="checkbox"/>
		K ₂ HPO ₄ :PPD05	04871222PPD05 20	11.8 g/L	5.9 g	<input type="checkbox"/>
4	Yeast nitrogen base (YNB)	Y0626	MKCN8243	13.4 g/L	6.7 g	<input type="checkbox"/>
5	Biotin	B4639	SLCF3557	0.4 mg/L	0.2 mg	<input type="checkbox"/>
6	Methanol	1.06009.1011	L1215809222	5 ml/L	2.5 ml	<input type="checkbox"/>
	멸균작업			F0=20		<input type="checkbox"/>

상세기술 (1 L 기준)

- ① Yeast extract 5 g, Soy Peptone 10 g, / 1 L (autoclave)
- ② 상온에서 식힌 후
- ③ 1 M potassium phosphate buffer, pH6.0 \pm 0.1 을 100 ml 첨가
→ 1 M K₂HPO₄ 132 ml + 1 M KH₂PO₄ 868 ml 을 mix 하여 1 M potassium phosphate buffer, pH6.0 \pm 0.1 인지 확인하고 인산 (H₃PO₄, Phosphoric acid 또는 수산화칼륨(KOH)으로 적정
→ 1 M K₂HPO₄ : Potassium phosphate dibasic 174.18 g 을 최종 1L 되게 DW 로 녹인 후, Filter sterilize

연구소 생산균주 제작 기록서



DNase I (Pichia)
RCB 제작

문서번호
[Form No.]

RCB_GDNSL_P2_20221
202

→ 1 M KH₂PO₄ : Potassium phosphate monobasic 136.09 g 을 최종 1L 되게 DW 로 녹인 후,
Filter sterilize
④ yeast nitrogen base (134 g/L) 을 100 ml 첨가
→ Yeast nitrogen base 134 g / 1 L 넣고 Heat stirring 으로 완전히 녹인 다음 Filter
sterilize
⑤ Biotin (20 mg/ 100 ml) 을 2 ml 첨가
→ Biotin 20 mg / 100 ml 에 녹인 뒤, Filter sterilize
⑥ 0.5% Methanol 을 100 ml 첨가
→ 100% Methanol 50 ml + D.W 950 ml 혼합 뒤 Filter sterilize

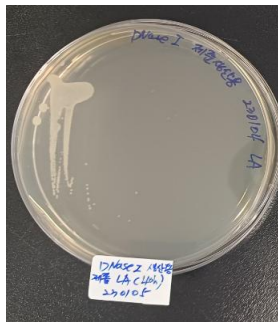
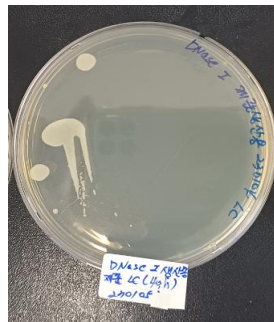
2.Streaking

S2_RCB_GDNSI

실험일 / 실험자	2022-11-23	김윤정
Cell Stock 정보	Pichia pastoris (GS115), 100 ul in 1.5 ml tube	
DNA 정보	CS17-109-04-pPIC9K-DNase I (-α-MF)/ pPIC9K Pichia vector	

3. 항생제 내성테스트

S3_RCB_GDNSI

실험일 / 실험자	2022-12-07		김윤정	
Colony	기존 Cell stock 사용함			
항생제	Ampicilin	Kanamycin	Chloramphenicol	
콜로니 수	多	多	多	
Cfu/ml	多	多	多	
실험결과				
콜로니 보관 [P1]	배양	1개 콜로니를 각 50 ml BMGY 배지에 현탁하여 OD ₆₀₀ 3 도달시 배양종료. 총 4개 콜로니 실시 (고발현 콜로니 선별 실험에 사용)		

연구소 생산균주 제작 기록서



DNase I (Pichia)
RCB 제작

문서번호
[Form No.]

RCB_GDNSI_P2_20221
202

	충전조성	25% Glycerol (50% Glycerol 과 1:1 혼합), 1 ml 충전 (1.5 ml tube), -80℃ 보관.
참고	Antibiotics have no effect on yeast growth nor on protein expression Ref. DOI: 10.3389/fmicb.2015.01002	

4. 고발현 콜로니 선별

S5_RCB_GDNSI

실험일 / 실험자	2022-12-07			김윤정	
테스트 용량	50 ml (BMMY 배지)				
Cell stock [P1] 사용량	60 μ l				
배양 조건	30℃, 96 hr, 220 rpm				
Induction 조건	24 hr 주기로 Final 3% Methanol 추가				
Colony#	#1	#2	#3	Control	Soy peptone
OD600	61.5	58.8	47.1	45.9	40
발현률 (%) 타겟/전체 단백질*100	100	100	90	100	50

연구소 생산균주 제작 기록서

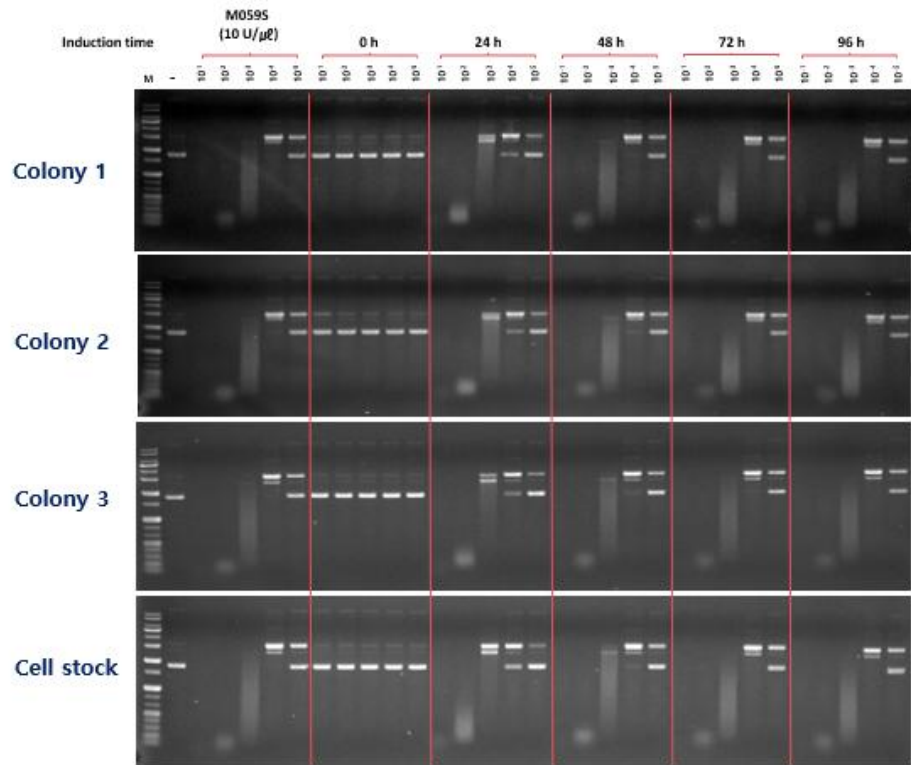


DNase I (Pichia)
RCB 제작

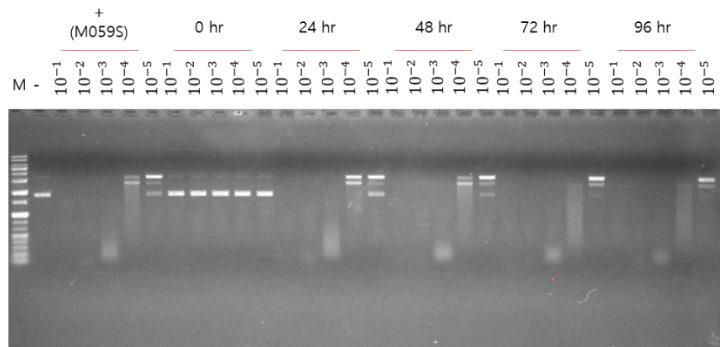
문서번호
[Form No.]

RCB_GDNSL_P2_20221
202

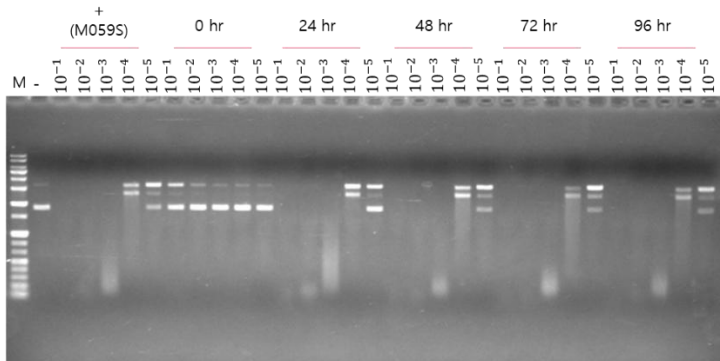
실험결과
(PAGE 이미지, OD600)



Casein
peptone



Soy
peptone



연구소 생산균주 제작 기록서



DNase I (Pichia)
RCB 제작

문서번호
[Form No.]

RCB_GDNSI_P2_20221
202

5. 배양

S6_RCB_GDNSI

작업일 / 수행자	2022-12-09			김윤정	
배양용량	50 ml				
배지	BMGY				
Cell stock [P1] 사용량	50 μl (1/1000)				
배양 조건	30℃, 45hr, 220 rpm				
배양 종료 기준	45 hr				
최종 OD ₆₀₀	17.2				
종배양 진행차수	2 회차 [P2]				
성장곡선	18 hr	22 hr	26 hr	42 hr	46 hr
	8.94	11.6	13.6	17.3	17.2
	<div><p>Growth curve</p><p>OD₆₀₀</p><p>30°C Culture (hr)</p></div>				

연구소 생산균주 제작 기록서



DNase I (Pichia)
RCB 제작

문서번호
[Form No.]

RCB_GDNSI_P2_20221
202

6. 분주

S7_RCB_GDNSI

작업일 / 수행자

2022-12-07

김윤정

충전조성

25% Glycerol (50% Glycerol 과 1:1 혼합)

충전량

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

충전시 주의

Pichia 용 clean bench 에서 작업

보관온도 조건

-70°C ~ -80°C

보관장소/냉동고정보

3 층 -80°C 냉동고

보관사진



보관 Vial 수량

100

보관 시작 일시

2022-12-07

보관 시작 온도(°C)

-80°C