


연구소 생산균주 제작 기록서

	Human RNase inhibitor RCB 제작	문서번호 [Form No.]	RCB_GHRNI_P2_ 2023 년 1 월 16 일
		페이지 번호 [Page No.]	1/16

관련 프로젝트명	연구과제 [20018423] GMP 급 mRNA 백신 생산용 필수효소 생산기술개발
항목	Human RNase inhibitor
용도	RCB
등록 번호	RCB_GHRNI_P2
균주	<i>Escherichia coli</i> Rosett(DE3)
제작 용량	100 vials

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

개정내역		
개정번호	시행일자	변경내용

연구소 생산균주 제작 기록서



Human RNase inhibitor
RCB 제작

문서번호
[Form No.]

RCB_GHRNI_P2_
2023 년 1 월 16 일

페이지 번호
[Page No.]

1/16

주요 SOP

번호	항목	페이지 번호
S1_RCB_GHRNI	배지 제조방법	3/14
S2_RCB_GHRNI	Transformation	4/14
S3_RCB_GHRNI	발현 테스트 (고발현 콜로니 선별 1 차)	5/14
S4_RCB_GHRNI	발현 테스트 (고발현 콜로니 선별 2 차)	6/14
S5_RCB_GHRNI	배양	7/14
S6_RCB_GHRNI	분주	8/14
S7_RCB_GHRNI	항생제 내성 테스트 1	9/14
S8_RCB_GHRNI	항생제 내성 테스트 2	10/14
S9_RCB_GHRNI	항생제 내성 테스트 3	11/14

연구소 생산균주 제작 기록서



Human RNase inhibitor
RCB 제작

문서번호
[Form No.]

RCB_GHRNI_P2_
2023 년 1 월 16 일

페이지 번호
[Page No.]

1/16

1. 배지 제조 방법

S1_RCB_GHRNI

배지명	용도	제조량	제조일	제조사
LB Broth (Soy) 고체	Transformation	0.5 L	22.11.18	백광현
LB Broth (Soy) 액체	배양	1 L	22.11.18	백광현

LB Broth (Soy) 고체


순서	Component	Cat#	Lot#	기준 (/L)	사용량	확인
1	Enzymatic Digest of soy	HSP349	34	10 g	5 g	<input type="checkbox"/>
2	Yeast Extract	CHS-0205	04870601CK3021	5 g	2.5 g	<input type="checkbox"/>
3	Sodium chloride	000S0485	121621	10 g	5 g	<input type="checkbox"/>
4	Agar Bacteriological	MB-A1651	B22M17837YJ	15 g	7.5 g	<input type="checkbox"/>
5	멸균작업			F0=20		<input type="checkbox"/>
6	Kanamycin (50 mg/ml)	K4000-50G	1003389870	1 ml	0.5 ml	<input type="checkbox"/>
7	Chloramphenicol (34 mg/ml)	CHP01	04870225CHP0321	1 ml	0.5 ml	<input type="checkbox"/>

* Kanamycin, Chloramphenicol 은 powder 를 녹여 stock 으로 만들어둔 것 사용

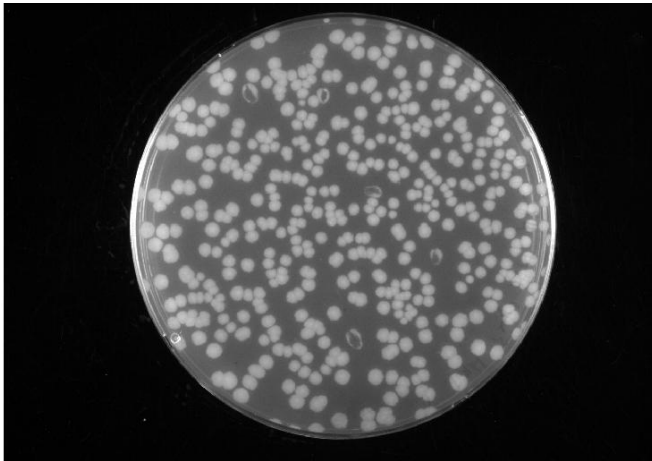
LB Broth (Soy) 액체

순서	Component	Cat#	Lot#	기준 (/L)	사용량	확인
1	Enzymatic Digest of soy	HSP349	34	10 g	10 g	<input type="checkbox"/>
2	Yeast Extract	CHS-0205	04870601CK3021	5 g	5 g	<input type="checkbox"/>
3	Sodium chloride	000S0485	121621	10 g	10 g	<input type="checkbox"/>
4	멸균작업			F0=20		<input type="checkbox"/>
5	Kanamycin (50 mg/ml)	K4000-50G	1003389870	1 ml	1 ml	<input type="checkbox"/>
6	Chloramphenicol (34 mg/ml)	CHP01	04870225CHP0321	1 ml	1 ml	<input type="checkbox"/>

연구소 생산균주 제작 기록서

	Human RNase inhibitor RCB 제작	문서번호 [Form No.]	RCB_GHRNI_P2_ 2023년 1월 16일
		페이지 번호 [Page No.]	1/16

* Kanamycin, Chloramphenicol 은 powder 를 녹여 stock 으로 만들어둔 것 사용

2. Transformation		
S2_RCB_GHRNI		
실험일 / 실험자	2022-11-22	백광현
Competent cell 정보	Rosett(DE3), 100 μ l (4×10^7) in 1.5 ml tube	
DNA 정보	ME4503 / pET28a-HisSMT-hRI / Kanamycin, Chloramphenicol	
DNA 사용량	69.5 ng (139 ng/ μ l, 0.5 μ l)	
Heat shock	42°C, 30 sec, ice 2 min	
Recovery	900 μ l LB, 37°C, 220 rpm, 1hr	
Spreading	100 μ l	
실험결과		
콜로니 보관 [P0]	배양	1 개 콜로니를 각 3 ml LB 배지에 현탁하여 OD ₆₀₀ >4 도달시 배양종료. 총 5 개 콜로니 실시 (OD ₆₀₀ = 4.4~5) (고발현 콜로니 선별 실험에 사용)
	충전조성	25% Glycerol (50% Glycerol 과 1:1 혼합), 1 ml 충전 (1.5 ml tube), -80°C 보관.

3. 발현테스트 (고발현 콜로니 선별 1 차)

연구소 생산균주 제작 기록서

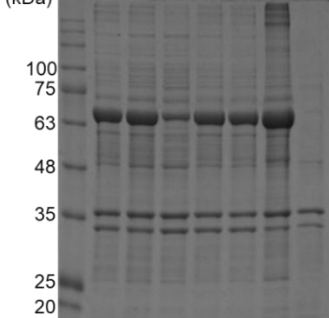
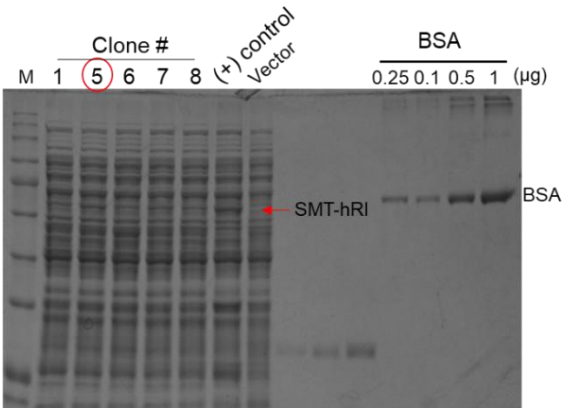


Human RNase inhibitor
RCB 제작

문서번호
[Form No.]
페이지 번호
[Page No.]

RCB_GHRNI_P2_
2023 년 1 월 16 일
1/16

S3_RCB_GHRNI

실험일 / 실험자	2022-08-30			백광현	
테스트 용량	10 ml				
배양액	Autoinduction media (4% soy peptone)				
온도	37℃ → 18℃				
Induction 조건	37℃ 에서 OD ₆₀₀ = 6 도달 시 18℃ 로 변경 후 ~18hr 시간 추가 배양				
배양시간	26 hr (총 본배양시간 기준)				
Colony #	1	5	6	7	8
OD ₆₀₀	8.6	10.0	9.7	9.6	8.8
발현률 (%) 타겟/전체 단백질*100	1.25	2.5	0.8	1.25	0.8
결과 확인방법	OD ₆₀₀ 10 기준 1 ml sampling, sonication in 1 ml Rnasin lysis buffer 10% gel, 9.25 μℓ loading				
실험결과					
					

* S3_RCB_GHRNI 는 Soy peptone 배지 사용 이전 Tryptone 배지를 사용하여 고발현 콜로니를 선정한 실험 데이터 중 일부임. 이후 DNA Transformation 단계부터 Soy peptone 배지를 사용하여 다시 발현 클론을 제작하고 고발현 클론을 선별하였음. 그 결과가 S4_RCB_GHRNI 에 기재되어 있으며 Tryptone 배지에서 만들어진 고발현 클론과 발현율이 동등 이상임을 확인하였음.

연구소 생산균주 제작 기록서



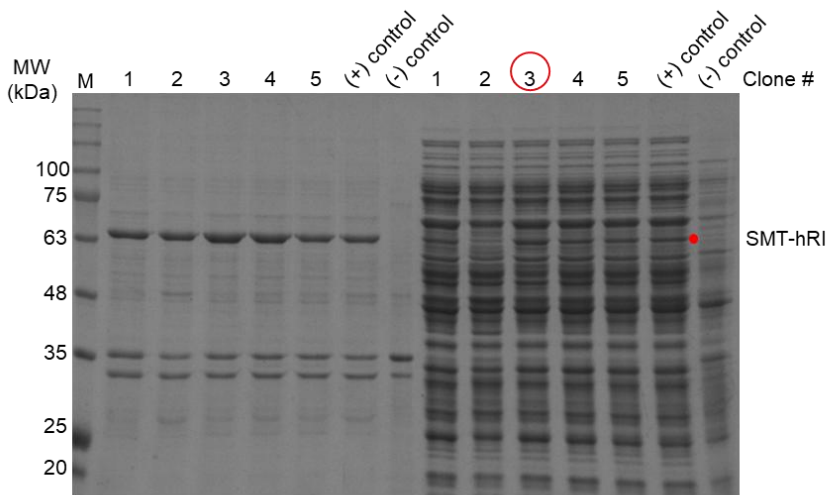
Human RNase inhibitor
RCB 제작

문서번호
[Form No.]
페이지 번호
[Page No.]

RCB_GHRNI_P2_
2023 년 1 월 16 일
1/16

4. 발현테스트 (고발현 콜로니 선별 2 차)

S4_RCB_GHRNI

실험일 / 실험자	2022-11-29			백광현	
테스트 용량	500 ml				
Cell stock [P0] 사용량	10 μ l [P0] stock \rightarrow o/n culture \rightarrow 1/100 (5 ml) 접종				
배양액	Autoinduction media (4% soy peptone)				
온도	37 $^{\circ}$ C \rightarrow 18 $^{\circ}$ C				
배양시간	26 hr (총 본배양시간 기준)				
Induction 조건	37 $^{\circ}$ C 에서 OD ₆₀₀ = 6 도달 시 18 $^{\circ}$ C 로 변경 후 ~18hr 시간 추가 배양				
Colony#	1	2	3	4	5
OD600	13.4	12.7	12.5	13.7	14.7
발현률 (%) 타겟/전체 단백질*100	1.38%	0.23%	2.3%	1.15%	1.15%
실험결과 (PAGE 이미지, OD600)					
	MW (kDa) M 1 2 3 4 5 (+) control (-) control 1 2 3 4 5 (+) control (-) control Clone # 100 75 63 48 35 25 20 SMT-hRI Pellet Soluble extract				

연구소 생산균주 제작 기록서



Human RNase inhibitor
RCB 제작

문서번호
[Form No.]

RCB_GHRNI_P2_
2023년 1월 16일

페이지 번호
[Page No.]

1/16

5. 배양

S5_RCB_GHRNI

작업일 / 수행자

2022-12-07~08

백광현

배양용량

200 ml

Cell stock [P0]
사용량

#3 Colony, 10 μ l [P0] stock \rightarrow o/n culture \rightarrow 1/100 (0.2 ml) 접종

배양 종료 기준

배양 시간 (18 시간)

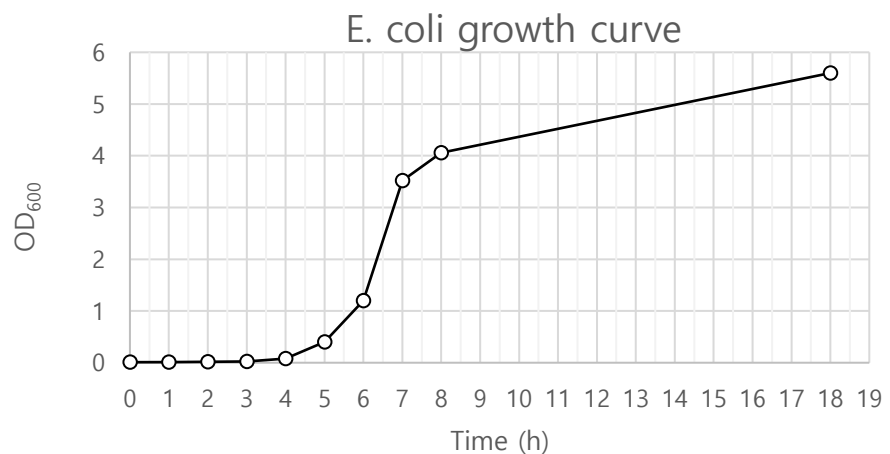
최종 OD₆₀₀

5.6

종배양 진행차수

2 회차 [P2]

성장곡선



연구소 생산균주 제작 기록서



Human RNase inhibitor
RCB 제작

문서번호
[Form No.]

RCB_GHRNI_P2_
2023년 1월 16일

페이지 번호
[Page No.]

1/16

6.분주

S6_RCB_GHRNI

작업일 / 수행자

2022-12-08

백광현

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

배양액 교반 필요 (중간 bottle shaking 5 초)

보관온도 조건

-60°C 이하

보관장소/냉동고정보

엔지노믹스 3층 연구소 냉동고 (-80°C)

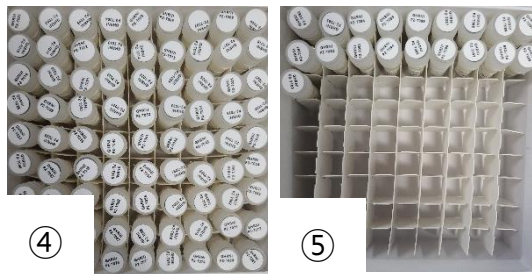
보관사진



①

②

③



④

⑤

① 균주 보관 냉장고 (3 층)

② 균주 보관 위치

③ 균주 보관 박스

④ 분주된 균주 (A-2-1)

⑤ 분주된 균주 (A-2-2)

보관 Vial 수량

100


보관 시작 일시

2022-12-11

보관 시작 온도(°C)

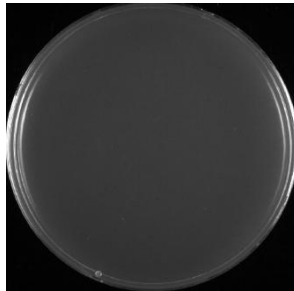
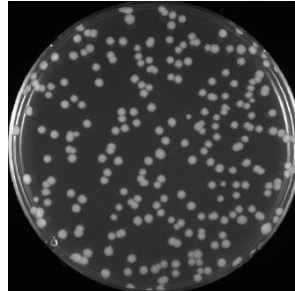
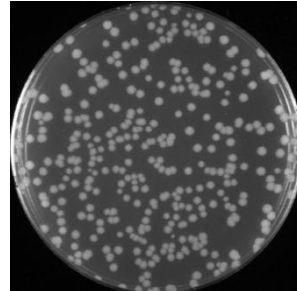
-80°C

연구소 생산균주 제작 기록서

	Human RNase inhibitor RCB 제작	문서번호 [Form No.]	RCB_GHRNI_P2_ 2023 년 1 월 16 일
		페이지 번호 [Page No.]	1/16

7. 항생제 내성테스트 1

S7_RCB_GHRNI

실험일 / 실험자	2022-12-26	백광현	
고발현 클론	Cultured cell 0.001 μl (at OD ₆₀₀ =1) [1/10 ⁵ 희석한 것 100 μl]		
항생제	Ampicilin	Kanamycin	Chloramphenicol
콜로니 수	0	320	426
Cfu/ml	0	3.2 x 10 ⁸ cfu/ml	4.26 x 10 ⁸ cfu/ml
실험결과			

연구소 생산균주 제작 기록서







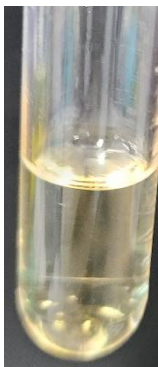
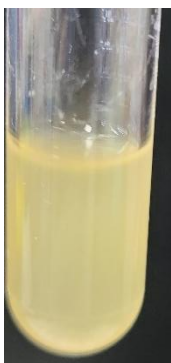

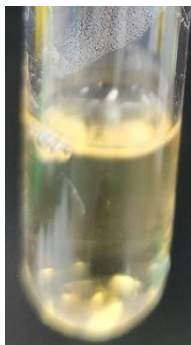
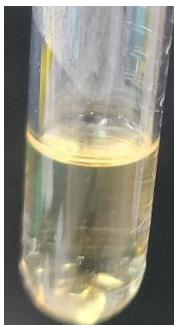



Human RNase inhibitor
RCB 제작

문서번호
[Form No.]
페이지 번호
[Page No.]

RCB_GHRNI_P2_
2023 년 1 월 16 일
1/16

8. 항생제 내성테스트 2

S8_RCB_GHRNI

실험일 / 실험자		2023-01-03~04		백광현	
사용한 Cell stock 번호		33, 48, 83, 96			
Cell stock [P2] 사용량		20 μl → 3 ml LB media (+ antibiotics), 37 °C o/n			
시험결과					
Tube #	Media 사진				
33	LB-Ampicillin	LB-Kanamycin	LB-Chloramphenicol	LB-Tetracycline	
					
48	LB-Ampicillin	LB-Kanamycin	LB-Chloramphenicol	LB-Tetracycline	
					
83	LB-Ampicillin	LB-Kanamycin	LB-Chloramphenicol	LB-Tetracycline	
					



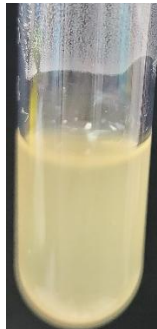

연구소 생산균주 제작 기록서



Human RNase inhibitor
RCB 제작

문서번호
[Form No.]
페이지 번호
[Page No.]

RCB_GHRNI_P2_
2023 년 1 월 16 일
1/16

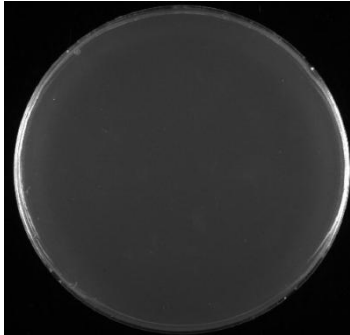
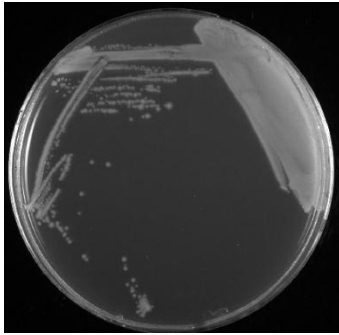
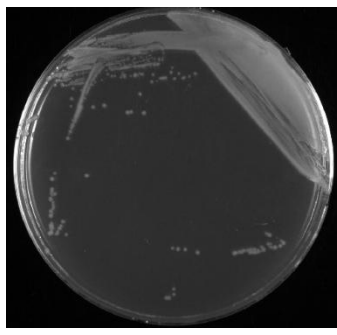
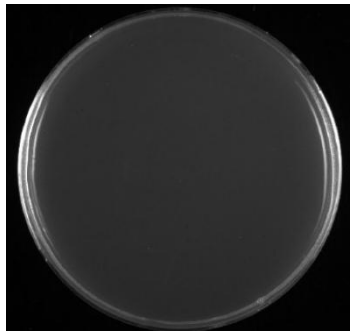
	LB-Ampicillin	LB-Kanamycin	LB-Chloramphenicol	LB-Tetracycline
96				

9. 항생제 내성테스트 3

S9_RCB_GHRNI

실험일 / 실험자	2023-01-03~04	백광현
사용 할 Cell stock 번호	33, 48, 83, 96	
Cell stock [P2] 사용량	20 μ l	

시험결과

Tube #	플레이트 사진		
33	LB-Ampicillin	LB-Kanamycin	LB-Chloramphenicol
			
	LB-Tetracycline		
			

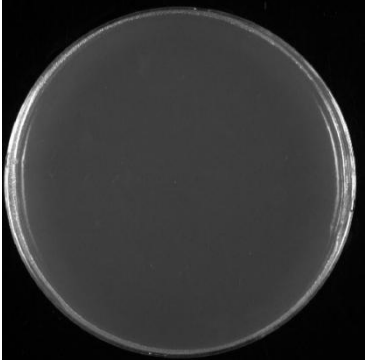
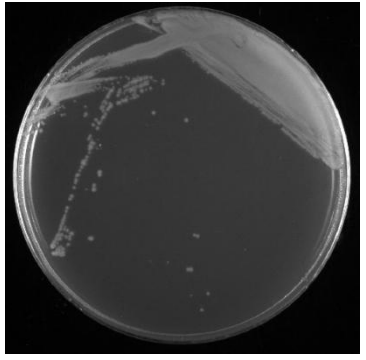
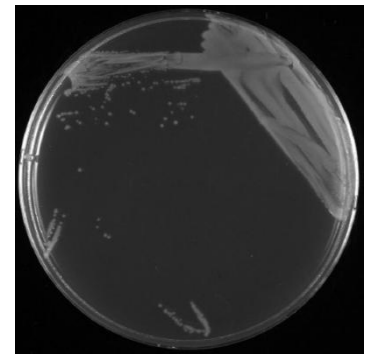
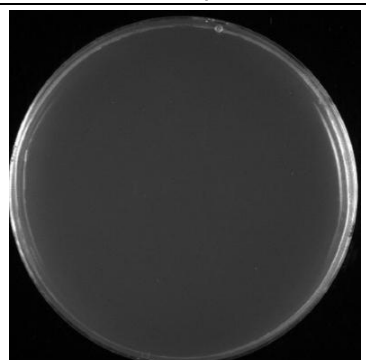
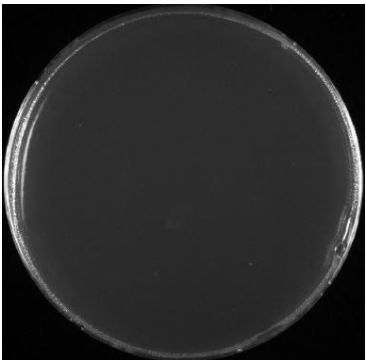
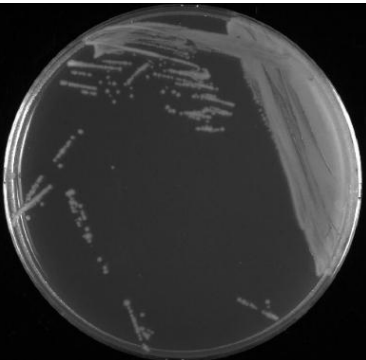
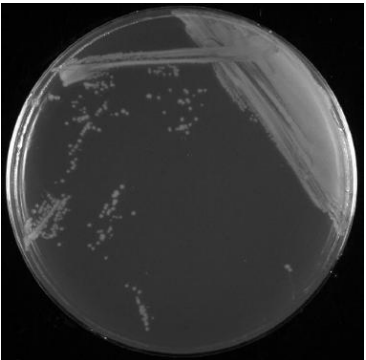
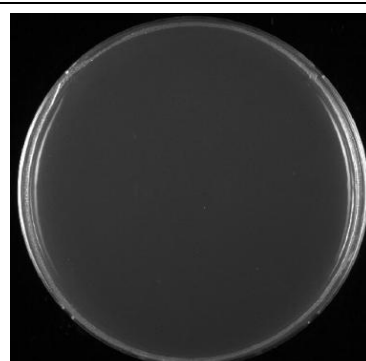
연구소 생산균주 제작 기록서



Human RNase inhibitor
RCB 제작

문서번호
[Form No.]
페이지 번호
[Page No.]

RCB_GHRNI_P2_
2023 년 1 월 16 일
1/16

48	LB-Ampicillin		LB-Kanamycin		LB-Chloramphenicol	
	LB-Tetracycline					
83	LB-Ampicillin		LB-Kanamycin		LB-Chloramphenicol	
	LB-Tetracycline					

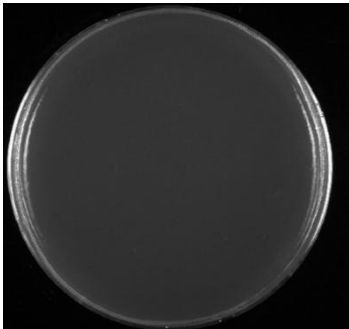
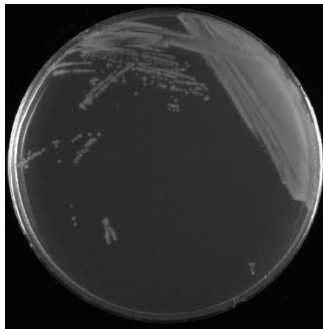
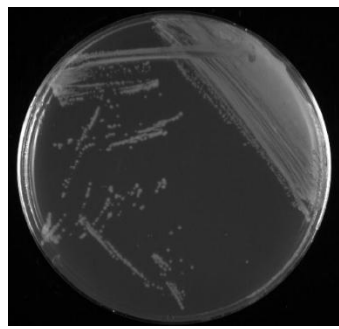
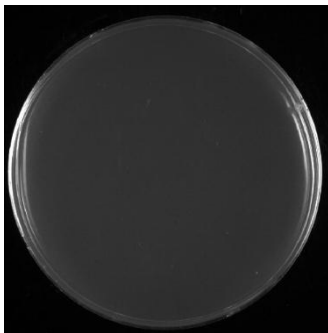
연구소 생산균주 제작 기록서



Human RNase inhibitor
RCB 제작

문서번호
[Form No.]
페이지 번호
[Page No.]

RCB_GHRNI_P2_
2023 년 1 월 16 일
1/16

96	LB-Ampicillin		LB-Kanamycin		LB-Chloramphenicol	
	LB-Tetracycline					
	Colony PCR test	LB-Kanamycin, LB-Chloramphenicol plate 에서 자란 colony 5 개 씩 사용				
	Colony PCR primer	HRI F-2				

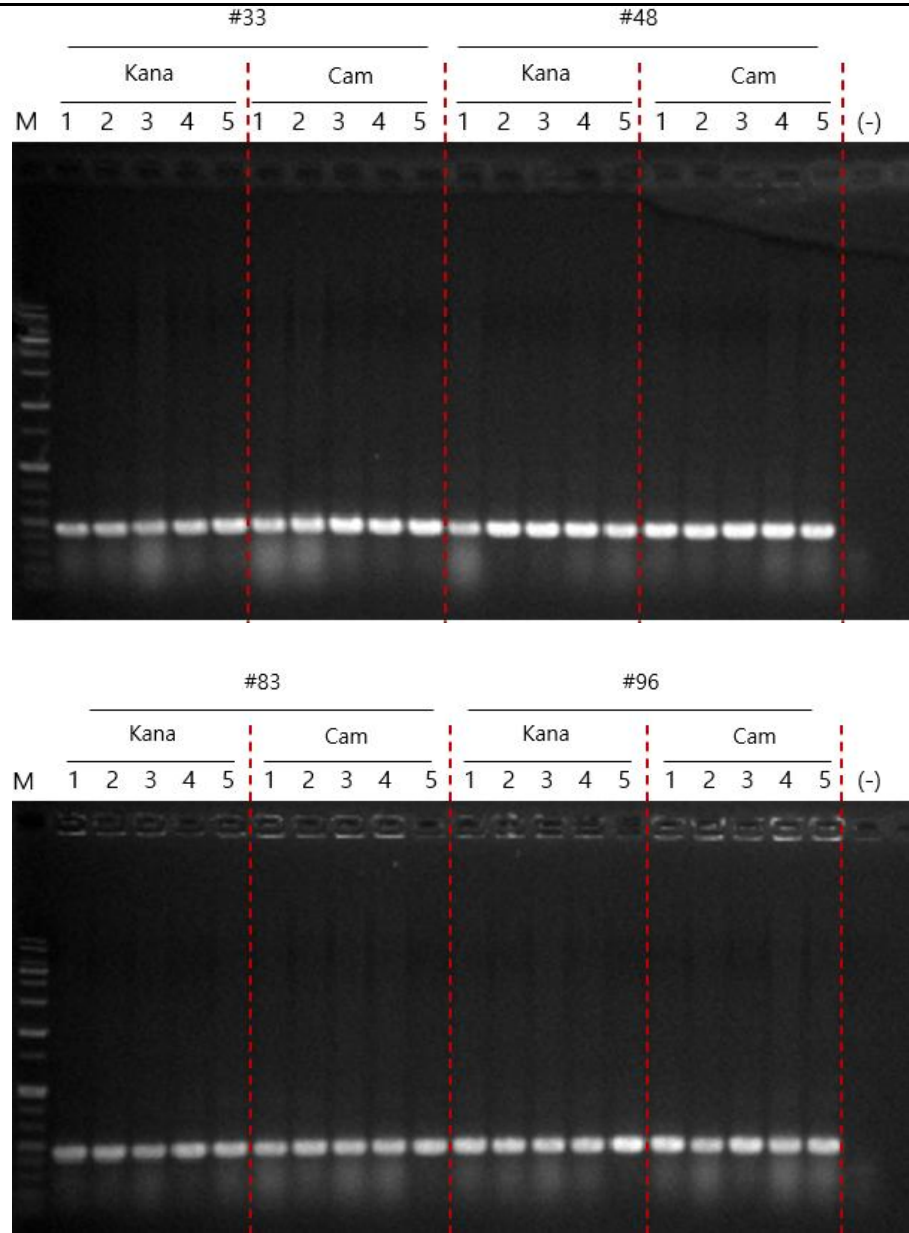
연구소 생산균주 제작 기록서



Human RNase inhibitor
RCB 제작

문서번호
[Form No.]
페이지 번호
[Page No.]

RCB_GHRNI_P2_
2023 년 1 월 16 일
1/16



(-) : Rosett (DE3) transformed with pET28aHisSMT3 vector