

연구소 생산균주 제작 기록서



T7 RNA Polymerase
RCB 제작

문서번호
[Form No.]

RCB_GT7RP_P1_
20230111

관련 프로젝트명	연구과제 [20018423] GMP 급 mRNA 백신 생산용 필수효소 생산기술개발
항목	T7 RNA Polymerase
용도	RCB
등록 번호	RCB_GT7RP_P1
균주	E.coli BL21 DE3
제작 용량	100 vial

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

개정내역

개정번호	시행일자	변경내용
00	2022-11-21	제정

연구소 생산균주 제작 기록서



T7 RNA Polymerase
RCB 제작

문서번호
[Form No.]

RCB_GT7RP_P1_
20230111

주요 SOP

번호	항목	페이지 번호
S1_RCB_GT7RP	배지 제조방법	3/13
S2_RCB_GT7RP	Transformation	4/13
S3_RCB_GT7RP	항생제 내성 테스트	4-5/13
S4_RCB_GT7RP	발현 테스트	5-6/13
S5_RCB_GT7RP	고발현 콜로니 선별	6-7/13
S6_RCB_GT7RP	배양	7-8/13
S7_RCB_GT7RP	분주	8-9/13
S8_RCB_GT7RP	외래성 미생물 부정시험 1 (항생제테스트)	10-11/13
S9_RCB_GT7RP	외래성 미생물 부정시험 2 (콜로니 PCR)	12/13
S10_RCB_GT7RP	외래성 미생물 부정시험 3 (발현테스트)	13/13

연구소 생산균주 제작 기록서



T7 RNA Polymerase
RCB 제작

문서번호
[Form No.]

RCB_GT7RP_P1_
20230111

1. 배지 제조 방법

S1_RCB_GT7RP

배지명	용도	제조량	제조일	제조사
LB Broth (Soy) 고체	콜로니 확인	1 L	23.01.05	조수예
LB Broth (Soy) 액체	배양	2 L	23.01.04	조수예

LB Broth (Soy) 고체

순서	Component	Cat#	Lot#	기준 (g/L)	사용량	확인
1	NaCl	S0485	12220	10	10	<input type="checkbox"/>
2	Soy peptone	HSP-349	10058319	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"/>

2. Transformation

연구소 생산균주 제작 기록서



T7 RNA Polymerase
RCB 제작

문서번호
[Form No.]

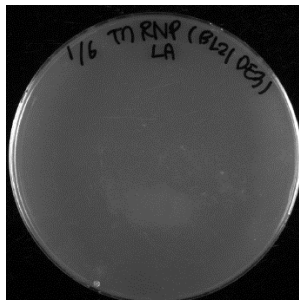
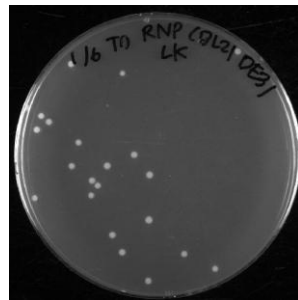
RCB_GT7RP_P1_
20230111

S2_RCB_GT7RP

실험일 / 실험자	2023-01-06	조수예
Competent cell 정보	BL21(DE3), Cat# [CP110] Lot# [220928-1]	
DNA 정보	ME202-01/ pET28a-LacUV5/ Kana	
DNA 사용량	100 ng/ul, 2 ul	
Heat shock	42°C, 30 sec, ice 2 min	
Recovery	900 µl LB, 37°C, 220 rpm, 1hr	

3. 항생제 내성테스트

S3_RCB_GT7RP

실험일 / 실험자	2023-01-06	조수예
Recovery 용액 분주량	100 µl (1/10)	
항생제	Ampicilin	Kanamycin
콜로니 수	0	21
Cfu/ml	0	2.1×10^2
실험결과		
항생제	Chloramphenicol	Tetracyclin
콜로니 수	0	0
Cfu/ml	0	0

연구소 생산균주 제작 기록서

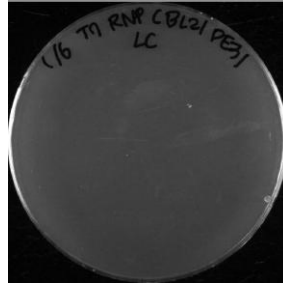


T7 RNA Polymerase
RCB 제작

문서번호
[Form No.]

RCB_GT7RP_P1_
20230111

실험결과



콜로니 보관
[P0]

배양

1 개 콜로니를 각 2 ml LB 배지에 현탁하여 OD₆₀₀ 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°C 보관.

4. 발현테스트

S4_RCB_GT7RP

실험일 / 실험자

2023-01-09

조수예

테스트 용량

20 ml * 3

Cell stock 사용량

#[1] Colony stock
60 μ l (배양용량의 1/1000)

배양 조건

18°C, 25°C, 37°C / 220 rpm

Induction 조건

OD₆₀₀ = 0.6 도달시점 20 ml 씩 18°C, 25°C, 37°C, IPTG 1 mM, [18, 5]hr

OD₆₀₀

18°C, 18hr

25°C, 18hr

37°C, 5hr

0.48

1.94

2.6

결과 확인방법

OD₆₀₀ 1.5 sampling, sonication in 250 μ l CB50

12% gel, 10 μ l loading

배양액 [125, 30, 23] μ l 에 해당

연구소 생산균주 제작 기록서

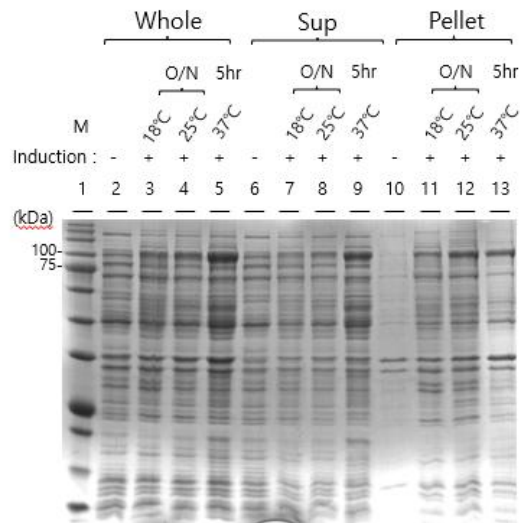


T7 RNA Polymerase
RCB 제작

문서번호
[Form No.]

RCB_GT7RP_P1_
20230111

실험결과



5. 고발현 콜로니 선별

S5_RCB_GT7RP

실험일 / 실험자	2023-01-09			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, [5]hr				
Colony#	1	2	3	4	5
OD600	4.52	4.34	4.12	4.76	4.66
발현률 (%) 타겟/전체 단백질*100	19	17	17	21	15

연구소 생산균주 제작 기록서

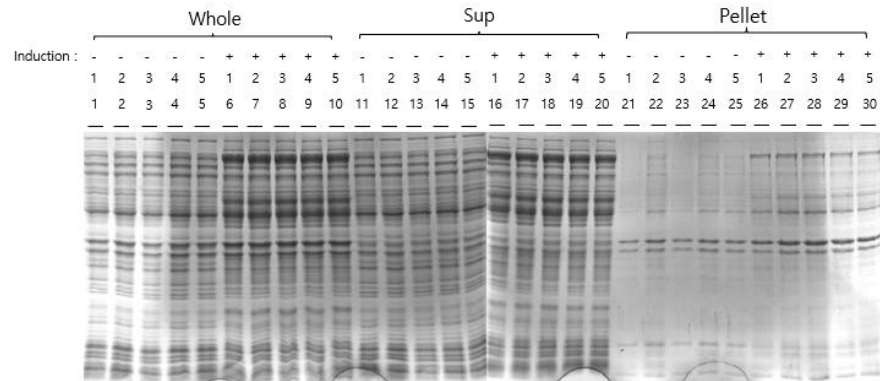


T7 RNA Polymerase
RCB 제작

문서번호
[Form No.]

RCB_GT7RP_P1_
20230111

실험결과
(PAGE 이미지, OD600)



6. 배양

S6_RCB_GT7RP

작업일 / 수행자	2023-01-10		조수예	
배양용량	200 ml			
Cell stock [P0] 사용량	#[4] Colony, 200 μ l (1/1000)			
배양조건	37°C, 220 rpm, [16]hr			
배양 시간 기록	배양 시작 시간 : 2023-01-10 17:00 배양 종료 시간 : 2023-01-11 9:00			
배양 종료 기준 [OD 값 / 배양시간]	5.25 / 16 hr			
최종 OD ₆₀₀	5.25			
종배양 진행차수	1 회차 [P1]			
성장곡선	2 hr	4 hr	6 hr	16 hr
	0.1	-	-	5.25

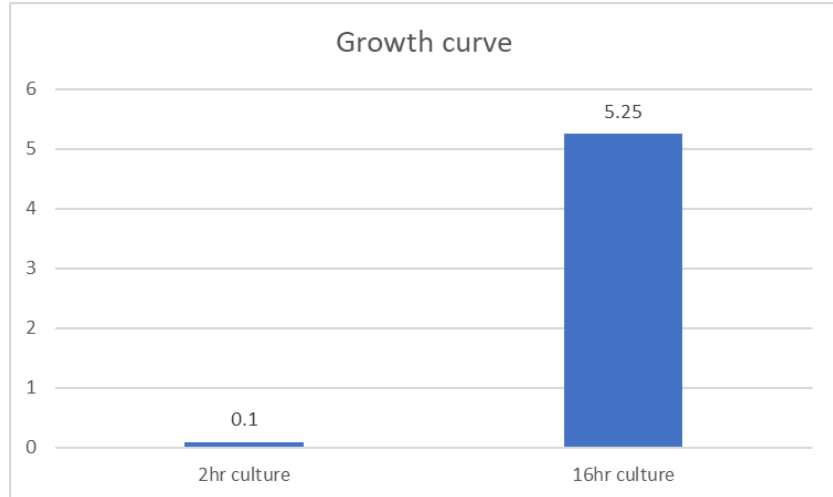
연구소 생산균주 제작 기록서



T7 RNA Polymerase
RCB 제작

문서번호
[Form No.]

RCB_GT7RP_P1_
20230111



7.분주

S7_RCB_GT7RP

작업일 / 수행자	2023-01-11	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	

연구소 생산균주 제작 기록서



T7 RNA Polymerase
RCB 제작

문서번호
[Form No.]

RCB_GT7RP_P1_
20230111

보관사진



보관 Vial 수량

105 (QC 용 샘플 5 vial)

라벨 확인

항목

내용

확인내용

확인

Product 명

RCB_GT7RP

제품명 확인

☐

Lot#

230111

제조번호 확인

☐

Vial#

1 부터 100 까지
부여

Vial 순번 확인

☐

보관 시작 일시

2023-01-11

실 보관 온도 기록(℃)

[-80]℃

연구소 생산균주 제작 기록서

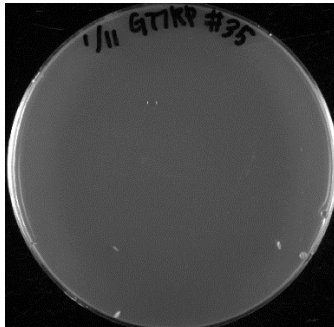
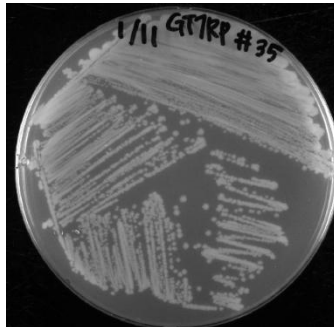
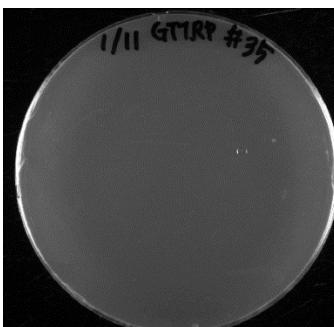
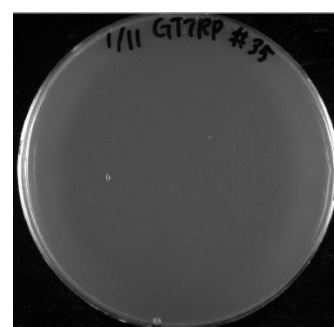


T7 RNA Polymerase
RCB 제작

문서번호
[Form No.]

RCB_GT7RP_P1_
20230111

8. 외래성 미생물
부정시험 1 (항생제내성)
S8_RCB_GT7RP

RCB vial# (2 개)	#35, #64	
실험일/실험자	2023-01-11	조수예
배양방법	RCB 10 μ l 를 항생제가 포함된 LB agar plate 에 streaking 하여 37°C, 18hr 배양	
#35 항생제 테스트 결과	1. Ampicilin	2. Kanamycin
		
	증식여부 [-]	증식여부 [+]
	3. Chloramphenicol	4. Tetracyclin
		
	증식여부 [-]	증식여부 [-]
PASS/FAIL	PASS	



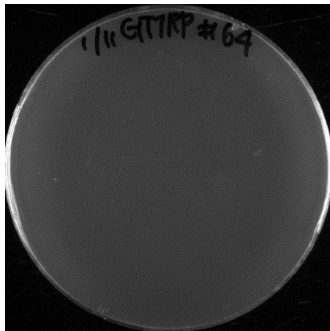

연구소 생산균주 제작 기록서



T7 RNA Polymerase
RCB 제작

문서번호
[Form No.]

RCB_GT7RP_P1_
20230111

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

연구소 생산균주 제작 기록서



T7 RNA Polymerase
RCB 제작

문서번호
[Form No.]

RCB_GT7RP_P1_
20230111

9. 외래성 미생물
부정시험 2 (콜로니 PCR)
S9_RCB_GT7RP

대상 콜로니	S8_RCB_GT7RP 실험의 [Kanamycin] 항생제 Plate 콜로니 10 개	
실험일/실험자	2023-01-12 / 조수예	
PCR Primer set (5' - 3')	Primer #[GT7RP_F/R] F : CGCCAGCAACCGCACCTGTG R: TTCGGATCCGCGACCCATTT	
Target size	[2652]bp	
Colony PCR 결과	<div>RCB : #35 #64</div> <div>1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22</div> <div>(kb)</div> <div> </div>	
	Product 생성여부	[10]/10
PASS/FAIL	PASS	

연구소 생산균주 제작 기록서



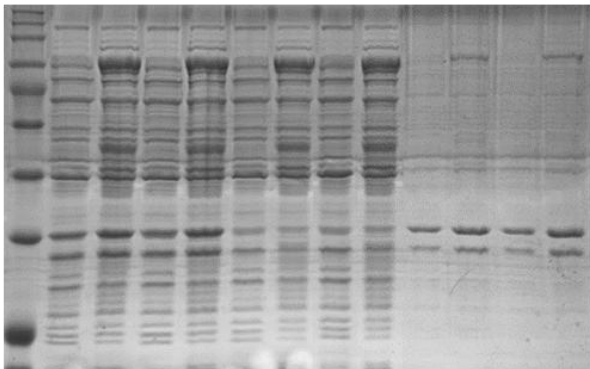
T7 RNA Polymerase
RCB 제작

문서번호
[Form No.]

RCB_GT7RP_P1_
20230111

10. 외래성 미생물
부정시험 3 (발현테스트)

S9_RCB_GT7RP

실험일 / 실험자	2023-01-12	조수예
테스트 용량	20 ml	
Cell stock 사용량	Vial #[49], #[105] 20 μ l (배양용량의 1/1000)	
온도조건	[37] $^{\circ}$ C	
Induction 조건	OD600 = 0.6 도달시점 IPTG 1 mM, [5]hr	
OD600	4.5 / 4.1	
결과 확인방법	OD ₆₀₀ 1.5 sampling, sonication in 250 ul CB50 12% gel, 10 μ l loading 배양액 [13, 14] μ l 에 해당	
실험결과	<div><div><div>Whole</div><div>Sup</div><div>Pellet</div></div><div><div><div>#49</div><div>#105</div></div><div><div>#49</div><div>#105</div></div><div><div>#49</div><div>#105</div></div></div><div>Induction : - + - + - + - + - + - +</div><div>1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13</div><div></div></div>	
발현율	15 / 15	
PASS/FAIL	PASS	