1. NIEZBĘDNE ZASOBY

* Produkt końcowy PK/EM-1 – dwie fiolki
* Butelki do hodowli komórkowej T-25 (**MLCCM-09**)
* Probówka wirówkowa 15ml stożkowodenna, sterylna (**MLCCM-06**)
* Pipeta serologiczna 5ml (**MLCCM-02**)
* Pipeta serologiczna 10ml (**MLCCM-03**)
* Pipeta automatyczna 100-1000µl
* Pipeta automatyczna 20-200µl
* Końcówki do pipet 20-200µl (**MLRMM-04**)
* Końcówki do pipet 100-1000µl (**MLRMM-03)**
* Igły jednorazowe sterylne (**MLRMM-10**)
* Strzykawka sterylna typu luer lock (**MLRMM-52**)
* Dulbecco Modified Eagle Medium High Glucose - DMEM (**MWMRM-01** )
* Surowica płodów bydlęcych, Brazylia (**MWSRM-01**)
* Sól Hanks’a (**MWBRM-1**)
* TrypLE select (**MWERM-2**)
* Błękit trypanu 0,4% (**OLRMR-07**)
* Odczynnik do oceny cyklu komórkowego (**OLFCR-13**)
* Alkohol etylowy 96% CZ.D.A **(OLMBR-19)Płyn do dezynfekcji na bazie alkoholu – SODOW-19**
* Woda ultraczysta **(SOCOW-25)**
* Probówka typu Eppendorf 1,5ml (**MLMBM-05)**
* Komora laminarna (**DKJ/U2**)
* Pipetor **DKJ/U26 lub DKJ/U27**
* Inkubator CO2 (**DKJ/U3**)
* Wirówka Eppendorf 5702 (**DKJ/U25**)
* Hemocytometr Burkera (**DKJ/U36**)
* Mikroskop odwrócony (**DKJ/U5**)
* Cytometr przepływowy Beckman Coulter Cytoflex (**DKJ/U1**)

1. **Załącznik nr 6 do SPO/KJ-2/19 – Dziennik liczenia komórek**
2. **INS-6/SPO/KJ-2/19 – Liczenie komórek hemocytometrem Burkera**
3. **Protokół badania liczby, żywotności i czasu podwojenia populacji komórek w produkcie końcowym PK/EM-1 – PRO-16/SPO/KJ-3/19**
4. **PRO-4/SPO/KJ-5/19 - Protokół z monitoringu środowiska płytkami 90mm**
5. BADANIE LICZBY I ŻYWOTNOŚCI KOMÓREK

**Badanie należy realizować w komorze laminarnej**.

W celu określenia liczby i żywotności komórek, po rozmrożeniu i dostarczeniu dwóch fiolek z produktem należy:

1. Obie próby zmierzyć pod kątem liczby i żywotności, zgodnie z **INS-6/SPO/KJ-2/19**.
2. Do określenia ostatecznej liczby komórek PK/EM-1 należy zebrać również wyniki liczenia komórek uzyskane podczas wykonywania następujących badań:

• **INS-20/SPO/KJ-3/19 – Badanie czystości populacji komórek produktu końcowego PK/EM-1**

Wyniki powinny być zapisane w **Dzienniku liczenia komórek** stanowiącym **Załącznik nr 6 do SPO/KJ-2/19.**

1. Wartość liczby komórek żywych, martwych, wszystkich oraz wartości żywotności komórek PK/EM-1 zapisać w **PRO-16/SPO/KJ-3/19**. Do protokołu dołączyć załącznik z mikrografiami z **ostatniego** dnia prowadzenia hodowli.
2. Pozostałą zawiesinę komórek wykorzystać do następnego etapu badania.
3. BADANIE CZASU PODWOJENIA POPULACJI
4. Każdą z 6 butelek T-25 (**MLCCM-09**) zalać po 7,5ml pełnej pożywki: DMEM (**MWMRM-01)**+10% FBS (**MWSRM-01**). Butelki opisać w następujący sposób:

***data i godzina założenia hodowli, seria nr PK/EM-1/NN/YY/LMC/A1-3***

***data i godzina założenia hodowli, seria nr PK/EM-1/NN/YY/LMC/B1-3***

Symbole „A” i „B” oznaczają dwie fiolki jednej serii i używane są dla rozróżnienia dwóch hodowli.

Liczba wykorzystywanych butelek: 2 fiolki x 3 powtórzenia = 6.

1. Oddzielnie z każdej z dwóch badanych fiolek o znanych koncentracjach żywych komórek pobrać do trzech butelek T-25 (**MLCCM-09**) po 10 tysięcy żywych komórek/cm2 (ok 250 tysięcy komórek/butelkę).
2. Delikatnie wymieszać komórki w butelkach i przenieść do inkubatora.
3. Zapisać dokładną godzinę rozpoczęcia hodowli w **PRO-16/SPO/KJ-3/19**.
4. **UWAGA!**
5. Po 72h zmienić pożywkę – w tym celu przygotować ponownie pełną pożywkę.

**Należy pamiętać, że to badanie jest połączone z badaniem bioaktywności produktu końcowego PK/EM-1 i wymieniane medium stanowi próby badane wg instrukcji**   
**INS-19/SPO/KJ-3/19. Media pohodowlane należy przenieść do sześciu 15 ml probówek wirówkowych (MLCCM-06) i odpowiednio opisać:**

**PK/EM-1/NN/YY/B/A1-3  
PK/EM-1/NN/YY/B/B1-3**

1. Po minimum 144h od rozpoczęcia hodowli odkleić komórki – należy zebrać medium hodowlane z każdej butelki „A” i „B” do probówek 15ml opisanych jako „A” i „B”. Wypłukać każde naczynie 3ml soli Hanks’a i zalać każde naczynie 2ml TrypLE Select, po czym umieścić naczynia w inkubatorze na 10min.
2. Zapisać dokładną godzinę zakończenia hodowli w **PRO-16/SPO/KJ-3/19** i obliczyć liczbę godzin w hodowli.
3. Po odklejeniu komórek zebrać zawiesinę z każdego naczynia hodowli „A” i hodowli „B” i przenieść do probówek zawierających pożywkę, odpowiednio opisanych „A” lub „B”.
4. Wirować 300 x g przez 5 minut.
5. Zebrać supernatant, zawiesić osad z każdej probówki w 1ml medium.
6. Połączyć 3 próby A
7. Połączyć 3 próby B
8. Próby zmierzyć pod kątem liczby i żywotności, zgodnie z **INS-6/SPO/KJ-2/19** stosując rozcieńczenie 20-krotne: 100ul próby badanej + 900ul DMEM (**MWMRM-01**), a następnie 20ul rozcieńczonej próby zmieszać z 20ul błękitu trypanu (**OLRMR-07**).
9. Obliczyć czas podwojenia populacji (PDT) korzystając z poniższego wzoru:
10. Wprowadzić wynik do **PRO-16/SPO/KJ-3/19**.
11. BADANIE CYKLU KOMÓRKOWEGO

Dzień 0.

1. Zawiesinę komórek pozostałą po założeniu hodowli na badanie czasu podwojenia populacji połączyć w jednej probówce.
2. Przepipetować i pobrać do osobnej probówki 5×10^5 żywych komórek.
3. Ilość µl do pobrania należy wyliczyć ze średniej dwóch zliczeń wykonanych przed założeniem hodowli, odnotować w protokole.
4. Komórki zwirować z prędkością 300 x g przez 5 min.
5. Zebrać supernatant a komórki zawiesić w 1ml 70% alkoholu etylowego i zwirować 300 x g przez 5 minut.
6. Po zwirowaniu usunąć alkohol, a komórki zawiesić w 1ml soli Hanksa i zwirować 300 x g przez 5 minut.
7. Po zwirowaniu usunąć nadsącz, a komórki ponownie zawiesić w 1ml soli Hanksa i zwirować 300 x g przez 5 minut.
8. Po zwirowaniu usunąć nadsącz, a komórki zawiesić w 500µl odczynnika do oceny cyklu komórkowego (**OLFCR-13**), inkubować 15 minut w temperaturze pokojowej.
9. W czasie inkubacji uruchomić cytometr, a następnie program ‘CytExpert’.
10. W kolejnym kroku przygotować cytometr do pracy poprzez wybór opcji ‘Cytometer’ 🡪 ‘System Startup Program’, następnie wybrać ‘Initialize’, co spowoduje wysunięcie stacji na próby badane.
11. Należy umieścić probówkę z 3ml wody destylowanej w stacji cytometru i rozpocząć płukanie poprzez wybranie opcji ‘Start’.
12. Po przygotowaniu cytometru do pracy należy sprawdzić status kalibracji urządzenia z wykorzystaniem QC Beads Beckman (**MLFCM-02**)🡪 odczynnik należy wyjąć z lodówki i ogrzać do temperatury pokojowej.
13. Po ogrzaniu i zworteksowaniu butelki z QC Beads Beckman należy do probówki typu eppendorf 1,5 ml – **MLMBM-05** dodać 330 µl wody destylowanej, a następnie dodać jedną kroplę QC Beads i wymieszać na mieszadle typu vortex.
14. W programie należy wybrać zakładkę 🡪 ‘QC/Standardization 🡪 Start QC/Standarization.
15. Po otwarciu ekranu funkcji QC/Standardization należy w oknie ‘LOT No.’ wybrać numer serii używanego opakowania QC Beads Beckman.
16. Po wybraniu numeru serii należy wybrać opcję „Initialize” oraz umieścić próbę z QC Beads Beckman w stacji cytometru i nacisnąć ‘Start’.
17. Po wykonaniu analizy wyświetli się wynik kalibracji – ‘QC Report’ - ‘QC Passed’ – oznacza, że urządzenie działa poprawnie i można wykonywać analizy; wynik QC/Standardization należy zapisać w formie .pdf poprzez wybór opcji „Export to PDF” w lokalizacji: Deskop\KJ\Wyniki INS-18\_SPO\_KJ-3\_19\_CK, w podfolderze nazwanym nazwą i numerem produktu badanego, tym samym co wyniki surowe z badań.
18. W przypadku niepowodzenia kalibracji, gdy ‘QC Results’ -` ‘QC failed’ należy również zapisać wynik w postaci pliku pdf w folderze nazwanym numerem analizowanej serii, oraz odnotować niepowodzenie testu w protokole w miejscu na istotne uwagi i komentarze analityka.
19. Po niepowodzeniu należy wykonać działania uwzględnione w **Załączniku 3 do SPO/KJ-3 – Schemat działania w przypadku niepowodzenia testu kalibracji cytometru przepływowego**.
20. Następnie należy otworzyć wzór dla badania cyklu komórkowego poprzez wybór zakładki File🡪 New Experiment from Template
21. W polu Template należy wybrać: Raw data\EM-1\_QC/ EM-1\_QC\_CK.xitm
22. W zakładce ‘New Experiment’ zapisać plik usuwając frazę EXP i zastąpić ją nazwą produktu i dopiskiem CK (np. PK-EM-1\_2\_23\_CK 20230309.xit). W polu New Experiment należy wybrać lokalizację, w której zapisane zostaną wyniki z badania: Raw data\EM-1\_QC i utworzyć podfolder o nazwie numeru serii badanego produktu poprzez wybór ‘New Folder’ po czym wybrać ‘Open’
23. Wybrać z listy próbkę o nazwie t-0 a następnie przycisk ‘Initialize’ co spowoduje wysunięcie stacji na próby badane.
24. Należy się upewnić, że liczba wyświetlanych zliczeń (‘Events to display’) wynosi 1000, a liczba zapisywanych zliczeń wynosi 10000 (‘Events to record’).
25. Prędkość przepływu próbki (‘Sample flow rate’) należy ustawić na slow.
26. Próbkę umieścić w stacji oraz wybrać ‘Run’ w celu wykonania zliczeń.
27. Po pojawieniu się pierwszych zliczeń należy nacisnąć przycisk ‘Record’.
28. Po zakończeniu zbierania zliczeń, należy wyjąć próbę ze stacji i zweryfikować czy w kanale PE widoczny jest prawidłowy obraz struktury cyklu komórkowego, jak na zdjęciu poniżej:



1. Po zebraniu danych należy zapisać plik z eksperymentem.
2. Uruchomić płukanie systemu przepływowego poprzez wybranie zakładki Cytometer 🡪 Daily Clean.
3. Po zakończeniu czyszczenia wyłączyć urządzenie.

Dzień 5.

1. Po zebraniu komórek z hodowli w ramach badania czasu podwojenia populacji, zawiesiny komórek po ich policzeniu należy połączyć w probówce o objętości 15 ml Na podstawie średniej liczby komórek w 1 ml z wcześniejszych pomiarów, obliczyć objętość zawiesiny w której znajduje się 5x10 żywych komórek, odmierzyć tę objętość do probówki typu eppendorf i zwirować z prędkością 300 x g przez 5 minut.
2. Zebrać supernatant a komórki zawiesić w 1ml 70% alkoholu etylowego i zwirować z prędkością 300 x g przez 5 minut.
3. Po zwirowaniu usunąć alkohol, a komórki zawiesić w 1ml soli Hanksa i zwirować z prędkością 300 x g przez 5 minut.
4. Po zwirowaniu usunąć nadsącz, a komórki ponownie zawiesić w 1ml soli Hanksa i zwirować z prędkością 300 x g przez 5 minut.
5. Po zwirowaniu usunąć nadsącz, a komórki zawiesić w 500µl odczynnika do oceny cyklu komórkowego (**OLFCR-13**), inkubować 15 minut w temperaturze pokojowej.
6. Podczas inkubacji prób z odczynnikiem do cyklu komórkowego uruchomić cytometr i program CytExpert.
7. Przygotować cytometr do pracy poprzez wybór opcji ‘Cytometer 🡪 ‘System startup program’.

Po czym podłożyć probówkę z 3ml wody destylowanej do próbnika cytometru.

1. Po przygotowaniu cytometru do pracy należy sprawdzić status kalibracji urządzenia z wykorzystaniem QC Beads Beckman – **MLFCM-02** 🡪 odczynnik należy wyjąć z lodówki i ogrzać do temperatury pokojowej.
2. Po ogrzaniu do temperatury pokojowej i zworteksowaniu butelki z QC Beads Beckman, należy do probówki typu eppendorf 1,5 ml – **MLMBM-05** dodać 330 µl wody ultraczystej (**SOCOW-25**), a następnie dodać jedną kroplę QC Beads i wymieszać na mieszadle typu vortex.
3. W urządzeniu należy wybrać 🡪 ‘QC/Standardization’ 🡪 ‘Start QC/Standardization’.
4. Po otwarciu ekranu funkcji QC/Standardization należy w oknie ‘Select LOT’ wybrać numer serii używanego opakowania QC Beads Beckman.
5. Umieścić próbę z QC Beads Beckman w stacji cytometru i nacisnąć ‘Start QC/Standarization’.
6. Po wykonaniu analizy wyświetli się wynik kalibracji – ‘QC Report’. ‘QC Passed’ – oznacza, że urządzenie działa poprawnie i można wykonywać analizy; wynik QC/Standardization należy zapisać w formie .pdf poprzez wybór opcji „Export to PDF” w folderze o lokalizacji: Deskop\KJ\Wyniki INS-18\_SPO\_KJ-3\_19\_CK, w podfolderze nazwanym nazwą i numerem produktu badanego, tym samym co wyniki surowe z badań.
7. W przypadku niepowodzenia kalibracji, gdy ‘QC Results’ 🡪 QC failed’ należy również zapisać wynik w postaci pliku pdf w folderze nazwanym numerem analizowanej serii, oraz odnotować niepowodzenie testu w protokole w miejscu na istotne uwagi i komentarze analityka.
8. **Załączniku 3 do SPO/KJ-3 – schemat działania w przypadku niepowodzenia testu kalibracji cytometru przepływowego**.
9. Następnie należy otworzyć plik z zapisanym w dniu 0 badaniem cyklu komórkowego i wybrać z listy próbkę o nazwie t-144 oraz przycisk „Initialize” co spowoduje wysunięcie stacji na próby badane.
10. Należy się upewnić, że liczba wyświetlanych zliczeń (‘Events to display’) wynosi 1000, a liczba zapisywanych zliczeń wynosi 10000 (‘Events to record’).
11. Prędkość przepływu próbki (‘Sample flow rate’) należy ustawić na slow.
12. Próbkę umieścić w stacji oraz wybrać „Run” w celu wykonania zliczeń.
13. Po pojawieniu się pierwszych zliczeń należy nacisnąć przycisk „Record”.
14. Po zakończeniu zbierania zliczeń, należy wyjąć próbę ze stacji i zweryfikować czy w kanale PE widoczny jest prawidłowy obraz struktury cyklu komórkowego, czy też może wskazywać na mutacje i obecność komórek nowotworowych (np. rozwidlenie pierwszego peaku na histogramie, lub nietypowe zwiększenie wysokości obszaru między pierwszym a drugim peakiem).
15. Wynik oceny wprowadzić do **PRO-16/SPO/KJ-3/19**.
16. W celu utworzenia kopi zapasowej wyniku badań, dane surowe zapisane pod ścieżką wewnętrzna oprogramowania Cytoflex → ‘Raw Data’ → ‘EM-1\_QC’ → podfolder z nawą i numerem badanego produktu podlegają eksportowi do zewnętrznej formy .xit. Wyniki surowe w formie plików .xit należy wyeksportować pod ścieżką Deskop\KJ\Wyniki INS-18\_SPO\_KJ-3\_19\_CK, w podfolderze nazwanym nazwą i numerem produktu badanego. Generowanie pliku zewnętrznego .xit wymaga:

* Odnalezienia zapisanych danych durowych w formie wewnętrznej na ścieżce oprogramowania Cytoflex → ‘Raw Data’ → ‘EM-1\_QC’ → podfolder z nazwą i numerem badanego produktu jak określa to niniejsza instrukcja;
* Kliknięcia prawym przyciskiem myszy na wewnętrzny plik .xit uzyskany w danym badaniu i ostatecznie określony jako ostateczny, podlegający dokumentacji w postaci załącznika do protokołu badań;
* Wybraniu opcji „Export Experiment…” z otworzonego okna;
* Zapisaniu zewnętrznej postaci .xit pod zachowując nazwę nadaną dla postaci wewnętrznej oprogramowania
* Upewnić się, że w podfolderze z wyeksportowanymi danymi surowymi znajduje się plik .pdf określający QC/Standardization

1. Postać dokumentacyjną wyników surowych należy zapisać w formie .pdf, a następnie wydrukować i dołączyć do protokołu w formie numerowanych załączników, oraz odnotować w protokole dołączone załączniki. Eksportowanie wyników w formie .pdf wygląda następująco: wybrać z paska narzędzi opcję Print → Batch Print → Select All (wybrać wszystkie dni prowadzania badania – t0 oraz t144) + Merge printing → OK. Powinno pojawić się okno Preview, z paska okna wybrać zakładkę Export Document → PDF File → OK. Plik pdf zapisać pod ścieżką Deskop\KJ\Wyniki INS-18\_SPO\_KJ-3\_19\_CK → podfolder z nazwą i numerem badanego produktu zachowując nazwę nadaną dla postaci wewnętrznej oprogramowania. Oba wygenerowane pliki PDF, połączyć w jeden załącznik. Plik .pdf z wynikiem kalibracji QC/Standardization nie jest drukowany jako załącznik badań do protokołu. Następnie wydrukować wykresy z pomiarów i dołączyć do protokołu badania jako załączniki.
2. Cytometr poddać czyszczeniu, po czym wyłączyć urządzenie.
3. PRZYGOTOWANIE CERTYFIKATU ANALITYCZNEGO

Uzyskane w badaniu wyniki należy wprowadzić do wydrukowanego formularza certyfikatu analitycznego **COA-12/KJ-3/19 Certyfikat analityczny z badania liczby i żywotności, czasu podwojenia populacji i cyklu komórkowego komórek w produkcie końcowym PK/EM-1**. Po wprowadzeniu wyników i zestawieniu z kryteriami akceptacji, osoba autoryzująca wynik podpisuje certyfikat.

**- KONIEC INSTRUKCJI -**