

[Klik hier voor de LINK naar de Nederlandse versie](#)

## Revision changes

N.A.

### 1. Goal

To describe how Peripheral Mononuclear Blood Cells (PBMC's) must be isolated and stored within the framework of the Parelshoer Institute for the purposes of the Radboud Biobank, so that:

1. Potential users know how the biomaterial has been handled.
2. The laboratory preparing the biomaterial for storage knows the minimal requirements for the handling of it.

#### 1.1 Scope off application

This procedure is applicable to all employees concerned at the Radboud Biobank and the Radboud Laboratory of Medical Immunology.

## 2. Protocol PBMC's Standard

### Collection

Delivery	in 2-4 collection tubes.
Type of tube	10 ml lithium-heparin tube. Standard tube, no gel, no protease inhibitors. BD tube 367526 or equivalent.
Temperature	Keep the tubes at room temperature until preparation.

### Preparation

Time until freezing	Within 24 hours after collection.
Isolation protocol	Isolation of cells from the blood by density gradient centrifugation.
Isolation medium	Density of separation medium must be 1,077 g/ml (Lymphoprep™ 1.077).

### Storage

Register	Register the microtubes in the Biobank management system and attach a cryovial label.
Storage medium	20% freezing medium: 6 parts RPMI, 2 parts inactivated flebopool and 2 parts DMSO. Add in 1:1- ratio to culture medium.
Aliquotation	Divide material over 2 microtubes of $5 \times 10^6$ – $20 \times 10^6$ cells. When there are more than $40 \times 10^6$ cells, divide over more microtubes. Register the exact number in the Biobank management system.
Type of tube	2 ml cryotube™ (Nunc)
Temperature	Freeze material first at $-80^{\circ}\text{C}$ (min. 24 hours, max. 1 week). Long-term storage in liquid nitrogen ( $-196^{\circ}\text{C}$ ).

### Miscellaneous

Deviations	Note all deviations from this procedure in the Biobank management system.
------------	---

### 3. Quality assurance

Review takes place via an internal audit (see the audit plan).

#### 3.1 Performance indicator

95% of the relevant samples have been prepared and stored within the parameters of this procedure.

### 4. Comments

This SOP fits within the framework of the Parelinoer Institute. Because the PSI standards are not unambiguous, some personal choices have been made concerning aliquotation. For explanation see document Bio-17165 "Onderbouwing SOP Isolatie en opslag van PBMC's".

### 5. Relevant documents

Qdocs, literature, legislation and codes of conduct, website etc.

link	Title
<a href="#">Qdoc 070613</a>	Isolation and freezing PBMCs tbv Biobank
<a href="#">Qdoc 019634</a>	HCI: Steriele isolatie van lymfocyten uit buffycoat en bloedbuis
<a href="#">Qdoc 020355</a>	HCI: Steriel invriezen en ontdooien van lymfocyten
<a href="#">Bio-15698</a>	Monstermanagement LMI t.b.v. Radboud Biobank
<a href="#">Bio-17165</a>	Onderbouwing SOP PBMC's standaard

## Wijzigingen bij revisie

N.v.t.

### 1. Doel

Vastleggen hoe Peripheral Mononuclear Blood Cells (PBMC's) binnen de kaders van het Parelinoer Instituut moeten worden geïsoleerd en opgeslagen wanneer deze binnen de Radboud Biobank worden verzameld, zodat:

1. Potentiële uitnemers weten hoe het materiaal verwerkt is.
2. Het uitvoerend laboratorium weet wat de minimale eisen zijn voor de verwerking van het materiaal.

#### 1.1 Toepassingsgebied

Deze procedure is van toepassing voor alle betrokken medewerkers van de Radboud Biobank en het Laboratorium Medische Immunologie.

### 2. Protocol PBMC's standaard

#### Afname

Aanlevering	In 2-4 afnamebuizen.
Type afnamebuis	10 ml buis lithium-heparine Standaard buis, geen gel, geen proteaseremmers. BD buis 367526 of gelijkwaardig.
Temperatuur	Buis tot bewerking bewaren op kamertemperatuur.

#### Bewerking

Tijd tot invriezen	Binnen 24 uur na afname invriezen.
Isolatieprotocol	Cellen uit het bloed isoleren d.m.v. dichtheidsscheidingcentrifugatie.
Isolatiemedium	Dichtheidsscheidingsmedium moet 1,077 g/ml zijn (Lymphoprep™ 1.077).

#### Opslag

Aanmelden	De microbuizen (ampullen) aanmelden in het biobankbeheersysteem en voorzien van een cryovial-etiket.
Opslagmedium	20% invriesmedium: 6 delen RPMI, 2 delen geïnactiveerde flebopool en 2 delen DMSO. In 1:1-verhouding toevoegen aan kweekmedium.
Aliquotering	Verdelen over 2 ampullen van $5 \cdot 10^6$ - $20 \cdot 10^6$ cellen. Indien er meer dan $40 \cdot 10^6$ cellen zijn, verdelen over meer ampullen. Het exacte aantal cellen vastleggen in het biobankbeheersysteem.
Type buis	2 ml cryotube™ (Nunc)
Temperatuur	Materiaal eerst invriezen bij $-80^{\circ}\text{C}$ (min. 24 uur, max. 1 week). Langdurige opslag in vloeibare stikstof ( $-196^{\circ}\text{C}$ ).

#### Overige

Afwijkingen	Elke afwijking van het bovenstaande noteren in het biobankbeheersysteem.
-------------	--

### 3. Kwaliteitsborging

Toetsing vindt plaats via interne audit (zie verder planning Interne audits).

#### 3.1 Prestatie-indicator

95% van de monsters zijn bewerkt volgens de eisen van deze SOP.

#### 4. Opmerkingen

SOP valt in principe binnen de kaders van Parelsnoer, maar omdat die SOP niet overal eenduidig was, zijn er enkele eigen keuzes gemaakt m.b.t. de aliquotering. Voor toelichting zie Onderbouwing SOP Isolatie en opslag van PBMC's.

#### 5. Relevante documentatie

Qdocs, literatuur, wet en regelgeving, website e.d

link	Titel
<a href="#">Qdoc 070613</a>	Isolation and freezing PBMCs tbv Biobank
<a href="#">Qdoc 019634</a>	HCI: Steriele isolatie van lymfocyten uit buffycoat en bloedbuis
<a href="#">Qdoc 020355</a>	HCI: Steriel invriezen en ontdooien van lymfocyten
<a href="#">Bio-15698</a>	Monstermanagement LMI t.b.v. Radboud Biobank
<a href="#">Bio-17165</a>	Onderbouwing SOP PBMC's standaard