

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

Revision changes

04-10-2021: SOP PBMC standard and SOP PBMC POM are archived. There will be two new SOPs for PBMC isolation including this SOP “gradient centrifugation” and the new standard SOP with the autoMACS procedure. The “old” SOP PBMC standard is never used by LMI, so the following changes have been made to the “old” procedure the SOP PBMC POM.

- Aliquotation is changed
- Freezing medium is changed
- Comments are added
- Relevant documentation is updated

1. Goal

To describe how PBMCs must be isolated and stored for purposes of the Radboud Biobank, so that:

1. Interested parties including potential users know how the biomaterial has been handled.
2. The laboratory can assess whether they can process the biomaterial as described under paragraph 2 “Preparation”.
3. The laboratory knows the requirements for the collection, processing and storage of the biomaterial to enable registration of deviations.
4. The sub biobank knows the requirements for the collection and transport of the biomaterial to ensure correct delivery.
5. The RB is able to couple this procedure to the biomaterial in storage to determine the fitness for purpose.

1.1 Scope off application

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

2. Protocol PBMC gradient centrifugation

Collection

Delivery	In blood collection tubes.
Type of tube	20 -40 ml blood with anticoagulant (lithium-heparin, natrium-heparin or EDTA). Standard 10 ml lithium-heparin tube, no gel, no protease inhibitors. BD tube 367526 or equivalent.
Temperature	Keep the tubes at room temperature until preparation.

Preparation

Time until freezing	Prepare the blood as soon as possible and freeze the PBMCs. Maximum: Within 24 hours after collection.
Isolation protocol	Isolation of cells from the blood by density gradient centrifugation. A detailed decription of the procedure is documented in LMI SOP Qdoc 070613 .
Isolation medium	Lymphoprep separation medium of 1,077 g/ml, STEMCELL, 07851/07861.

Storage

Counting	Cell counting is performed as described in Qdoc 084484 .
Aliquotation	Divide the PBMC suspension in cryotubes of 10 x 10 ⁶ cells. Store max 6 and always minimal 2 cryotubes. If the amount of cells per aliquot differ from 10 x 10 ⁶ cells, register the exact

number of cells in the Biobank management system.
For a detailed description see appendix 2 of [Qdoc 070613](#).

Register	Register the microtubes in the Biobank management system and attach a cryovial label.
Storage medium	Recovery cell culture freezing medium, Thermo Fisher Scientific, 12648-10.
Type of tube	2 ml cryotube.
Temperature	Freeze material first at -80°C (min. 24 hours, max. 1 week). Long-term storage in liquid nitrogen (-196°C).

Miscellaneous

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

3. Quality assurance

Review takes place via i) an internal audit (see the [audit year plan](#) in DMS) and ii) 2-monthly performance reviews of deviations registered in the biobank management system (DMS map "[Registraties en controles](#)").

3.1 Performance indicator

95% of the samples from the sub biobank have been prepared and stored within the parameters of this procedure.

4. Comments

- This SOP fits within the framework of the Parelsnoer Institute.
- This SOP is only used for the POM and NLe study. POM wishes to isolate the whole cohort with the same isolation procedure and NLe wishes to stick to the gradient method for harmonization of the isolation procedure with external centers.

5. Relevant documents

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

link	Title
Qdoc 070613	LMI_PBMC isolation by gradient centrifugation and Cryopreservation.
Qdoc 084484	TI – Cellcounter DxH500
Qdoc 087728	SOP PBMC isolation with AutoMACS Pro Separator
Qdoc 086431	Monstermanagement LMI t.b.v. Radboud Biobank
Qdoc 086592	DVO LMI-Radboud Biobank (Concept)

Wijzigingen bij revisie

04-10-2021: SOP PBMC standard en SOP PBMC POM worden gearchiveerd. Er komen hiervoor twee nieuwe SOPs waaronder deze SOP “gradiënt centrifugation” en de nieuwe standaard SOP met de autoMACS procedure. De “oude” SOP PBMC standaard is nooit gebruikt bij LMI dus de volgende wijzigingen zijn doorgevoerd ten opzichte van de “oude” procedure de SOP PBMC POM.

- Aliquoteren is gewijzigd
- Opslagmedium is gewijzigd
- Opmerkingen zijn toegevoegd
- Relevante documentatie is geupdated

1. Doel

Vastleggen hoe PBMCs worden geïsoleerd en opgeslagen wanneer dit binnen de Radboud Biobank wordt verzameld, zodat:

1. Geïnteresseerden waaronder potentiële uitnemers weten hoe het materiaal verwerkt wordt.
2. Het uitvoerend laboratorium kan beoordelen of zij de bewerking van het materiaal kunnen uitvoeren zoals beschreven onder punt 2 “Bewerking”.
3. Het uitvoerend laboratorium weet welke eisen worden gesteld aan de afname, transport, verwerking en opslag van het biomateriaal voor de registratie van afwijkingen.
4. De deelbiobank weet welke eisen worden gesteld aan afname en transport zodat gestuurd kan worden op een juiste aanlevering.
5. De RB koppelt deze materiaalbeschrijving aan het opgeslagen biomateriaal voor bepaling van de geschiktheid voor het doel.

1.1 Toepassingsgebied

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

2. Protocol PBMC gradiënt centrifugatie

Afname

Aanlevering	In bloedafname buizen.
Type afnamebuis	20 – 40 ml bloed met anticoagulant (lithium-heparine, natrium-heparine of EDTA). Standaard lithium-heparine buis, geen gel, geen proteaseremmers. BD buis 367526 of gelijkwaardig.
Temperatuur	Buis tot bewerking bewaren op kamertemperatuur.

Bewerking

Tijd tot invriezen	Afgenomen bloed zo snel mogelijk verwerken en cellen invriezen. Maximum binnen 24 uur na afname PBMCs invriezen.
Isolatieprotocol	Cellen uit het bloed isoleren d.m.v. dichtheidsscheidingcentrifugatie. Voor gedetailleerde beschrijving zie Qdoc 070613 .
Isolatiemedium	Lymphoprep dichtheidsscheidingsmedium van 1,077 g/ml, STEMCELL, 07851/07861.

Opslag

Telling	Celtelling staat beschreven in Qdoc 084484 .
Aliquotering	Verdeel de PBMC suspensie in 10×10^6 cellen per cryobuis. Maximaal 6 cryobuizen en altijd minimaal 2 cryobuizen opslaan. Als het aantal cellen per cryotube afwijkt van 10×10^6 dan het exacte aantal cellen vastleggen in het biobankbeheersysteem. Gedetailleerde beschrijving staat in

bijlage 2 van [Qdoc 070613](#).

Aanmelding	De microbuizen (ampullen) aanmelden in het biobankbeheersysteem en voorzien van een cryovial-etiket.
Opslagmedium	Recovery cell culture freezing medium, Thermo Fisher Scientific, 12648-10.
Type buis	2 ml cryobuis.
Temperatuur	Materiaal eerst invriezen bij -80°C (min. 24 uur, max. 1 week). Langdurige opslag in vloeibare stikstof (-196°C).

Overige

Afwijkingen Elke afwijking van het bovenstaande noteren in het biobankbeheersysteem.

3. Kwaliteitsborging

Toetsing vindt plaats via i) Interne audits (zie [audit jaarplan](#) in DMS) en ii. 2 maandelijks overzichten van de afwijkingen geregistreerd in het biobankbeheersysteem (DMS map [Registraties en controles](#)).

3.1 Prestatie-indicator

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

4. Opmerkingen

Deze SOP valt binnen de kaders van Parelsnoer.

Deze SOP wordt alleen nog gebruikt voor de POM en NLe studie. Alle nieuwe studies gaan over op de AutoMACS procedure. POM wil het gehele cohort laten isoleren met dezelfde procedure en NLe wil vasthouden aan de gradiëntmethode ten behoeve van harmonisatie van isolatie procedure met externe centra.

5. Relevante Documentatie

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

link	Title
Qdoc 070613	Isolation and freezing PBMCs tbv Biobank
Qdoc 084484	TI – Cellcounter DxH500
Qdoc 087728	SOP PBMC isolation with AutoMACS Pro Separator
Qdoc 086431	Monstermanagement LMI t.b.v. Radboud Biobank
Qdoc 086592	DVO LMI-Radboud Biobank (Concept)