

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

Revision changes

N.A.

1. Goal

To describe how Peripheral Mononuclear Blood Cells (PBMCs) are isolated and stored when they are collected for iPSC purposes within 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 of application

This procedure is applicable to all employees concerned at the Radboud Biobank, Stem Cell Technology Center (SCTC) and Genome Research Cell Culture.

2. Protocol isolation and storage of PBMCs

Collection

Delivery	30 ml heparin blood. 3 ml of this 30 ml is stored as back-up by the cell culture laboratory of Genome Research for potential EBV transformation. (SOP Heparin-whole blood for EBV-cellines).
Type of tube	10 ml tube lithium-heparin (or Na-heparin). Standard tube, no gel, no protease inhibitors. BD tube 367526 or equivalent.
Temperature	Keep tubes at room temperature until preparation.

Preparation

Time until freezing	Prepare and freeze on the same day as collected.
---------------------	--

Isolation protocol	Isolation of cells from the blood by density gradient centrifugation. SepMate procedure (Stemcell Technologies), SCTC document Qdoc:046588.
--------------------	--

Storage

Register	Register the microtubes in the Biobank management system by PBM-number (unique number, generated by Helix, indicating that it concerns PBMCs).
Storage medium	RPMI 1640 medium (10% FCS + pen/strep 1:100) with 10% DMSO.
Aliquotation	Divide the cells over two vials.
Type of tube	2 ml cryogenic vial (Corning).
Temperature	Controlled freezing: slowly lower the temperature till -80°C. After 24 hours place the cells into liquid nitrogen (-196°C) for long term storage.

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

-

5. Relevant documents

Qdocs, literature, legislation and codes of conduct, website e.d..

link	Titel
Qdoc 046588	Het maken van Induced-Pluripotente Stamcellen (iPS) / Production of Induced Pluripotent Stem Cells (iPSC).
Bio-17125	SOP Heparin-whole blood for EBV-cellines
Qdoc 019732	Preparation of blood for EBV transformation (Cell culture) (For cell culture technicians of Genome research only).
Bio-17124	Monster management Genome Research
	Monster management Stem Cell Technology Center
LINK	Sepmate Procedure

Wijzigingen bij revisie

1. Doel

Vastleggen hoe Perifere Mononucleaire Bloed Cellen (PBMCs) moeten worden geïsoleerd en opgeslagen wanneer deze voor iPSC doeleinden 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, het Stem Cell Technology Center (SCTC) en het celkweek lab van de afdeling Genoom Research.

2. Protocol isolatie en opslag PBMCs

Afname

Aanlevering 30 ml heparine bloed.
3 ml van deze 30 ml wordt opgeslagen als back-up voor mogelijke EBV transformatie door het celkweeklab Genoom Research.
(SOP Heparin-whole blood for EBV-cellines).

Type afnamebuis 10 ml buis lithium-heparine (or Na-heparine).
Standaard buis, geen gel, geen proteaseremmers.
BD buis 367526 of gelijkwaardig.

Temperatuur Buis tot bewerking bewaren op kamertemperatuur.

Bewerking

Tijd tot invriezen Op dezelfde dag als afname bewerken en invriezen.

Isolatieprotocol Cellen uit het bloed isoleren d.m.v. dichtheid-gradiënt centrifugatie.
SepMate procedure (Stemcell Technologies), SCTC document Qdoc 046588.

Opslag

Aanmelden De microbuizen (ampullen) registreren onder het PBM- nummer in het biobankbeheersysteem. (PBM-nummer is een uniek door Helix gegenereerd nummer dat aangeeft dat het PBMC materiaal betreft).

Opslagmedium RPMI 1640 medium (10% FCS + pen/strep 1:100) met 10% DMSO.

Aliquotering De cellen verdelen over twee ampullen.

Type buis 2 ml cryogenic vial (Corning).

Temperatuur Materiaal eerst invriezen bij -80°C. Gecontroleerde daling van temperatuur naar -80°C. Na 24 uur overdracht naar vloeibare stikstof (-196°C) voor langdurige opslag.

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

-

5. Relevante documentatie

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

link	Titel
Qdoc 046588	Het maken van Induced-Pluripotente Stamcellen (iPS) / Production of Induced Pluripotent Stem Cells (iPSC).
Bio-17125	SOP Heparin-whole blood for EBV-cellines
Qdoc 019732	Preparation of blood for EBV transformation (Celkweek) (NB alleen bestemd voor medewerkers Genoom Research)
Bio-17124	Monster management Genoom Research
	Monster management Stem Cell Technology Center
LINK	Sepmate Procedure