

[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 new standard with the AutoMACS Pro Separator.

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 with the AutoMACS Pro Separator

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.
Equipment	AutoMACS Pro Separator, Miltenyi, 130-092-545
Isolation protocol	The erythrocytes are removed by sedimentation (Sedimentation kit 2, Miltenyi, 130-126-357) followed by depletion of granulocytes and remains of erythrocytes (Whole blood PBMC isolation kit, Miltenyi, 130-126-359). For a detailed description of the isolation procedure see Qdoc 088067 .

Storage

Counting	Cell counting is performed as described in Qdoc 084484 .
Aliquotation	Divide the PBMC suspension in cryotubes of 10×10^6 cells. Store max 6 and always minimal 2 cryotubes. If the amount of cells per aliquot differs from 10×10^6 cells, register the exact number of cells in the Biobank management system. For a detailed description see appendix 2 of Qdoc 088067 .

Register	Register the cryotubes in the Biobank management system and attach a cryovial label.
Storage medium	Recovery cell culture freezing medium, Thermo Fisher Scientific, 12648-010.
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

5. Relevant documents

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

link	Title
Qdoc 088067	AutoMACS procedure LMI
Qdoc 084484	TI – Cellcounter DxH500
Qdoc 086431	Monstermanagement LMI t.b.v. Radboud Biobank
Qdoc 079596	SOP PBMC isolation gradient centrifugation
Qdoc 086592	DVO LMI-Radboud Biobank (Concept)

Wijzigingen bij revisie

04-10-2021:

De SOP PBMC standaard en de SOP PBMC POM zijn gearchiveerd. Er zijn twee nieuwe SOPs voor PBMC isolatie waaronder deze nieuwe standaard methode met de autoMACS Pro Separator.

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 beoogde 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 met de AutoMACS Pro Separator

Afname

Aanlevering In bloedbuizen.

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 PBMCs invriezen.
Maximum: Binnen 24 uur na afname.

Apparatuur AutoMACS Pro Separator, Miltenyi, 130-092-545

Isolatieprotocol De erythrocyten verwijderen door middel van sedimentatie (Sedimentation kit 2, Miltenyi, 130-126-357), gevolgd door het verwijderen van de granulocyten en resten van de erythrocyten (Whole blood PBMC isolation kit, Miltenyi, 130-126-359). Voor een gedetailleerde beschrijving van de AutoMACS methode zie [Qdoc 088067](#).

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 088067](#).

Aanmelden De cryobuizen (ampullen) aanmelden in het biobankbeheersysteem en voorzien van een cryovial-etiket.

Opslagmedium	Recovery cell culture freezing medium, Thermo Fisher Scientific, 12648-010
Type buis	2 ml cryotube
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.

5. Relevante documentatie

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

link	Title
Qdoc 088067	AutoMACS procedure LMI
Qdoc 084484	TI – Cellcounter DxH500
Qdoc 086431	Monstermanagement LMI t.b.v. Radboud Biobank
Qdoc 079596	SOP PBMC isolation gradient centrifugation
Qdoc 086592	DVO LMI-Radboud Biobank (Concept)