




# CONNECT GENERATE

## SOP-EMPFEHLUNG 03

Zur Gewinnung, Verarbeitung und Lagerung von Biomaterialien

**PBMC aus EDTA-Vollblut**

<h2>RE-GENERATE</h2> <p>Teilprojekt SP2: Koordinierung und Verbesserung der Biorepositorien innerhalb des Deutschen Netzwerks zur Erforschung autoimmuner Enzephalitiden</p>	 <p><b>CONNECT GENERATE</b></p>
<p>SOP-Empfehlung 03: Zur Gewinnung, Verarbeitung und Lagerung von <b>PBMC aus EDTA-Vollblut</b></p>	<p><b>Version: 2.0</b></p>
	<p><b>Stand: 09.04.2024</b></p>

### SOP 03-1. Zielsetzung und Bemerkung

<b>Zielsetzung:</b>	Diese SOP-Empfehlung dient zur Standardisierung der Gewinnung, Verarbeitung und Lagerung der Biomaterialien von im GENERATE-Register eingeschlossenen Autoimmunencephalitis-Patienten.
<b>Bemerkung:</b>	Die SOP-Empfehlung 03 ist eine <b>Empfehlung</b> an die teilnehmenden Zentren, da aus strukturellen Gründen in den einzelnen Studienzentren die Abläufe in einigen Details nicht oder nur schwer angepasst werden können.

### SOP 03-2. Geräte, Materialien und Reagenzien

Geräte:	Hersteller:	Bestellnummer:
-80°C-Gefrierschrank Ultra Freezer	Thermo Electron LED GmbH	ULT FZ TSX40086V
Stickstofftank oder -140°C- Truhe	wie vorhanden	
2D Barcode Reader SR (single rack) VisionMate®	Thermo Scientific	479-1250
<i>Eines der beiden unten stehenden Kühladapter zum Einfrieren von Zellen:</i>		
Mr. Frosty	Nalgene	5100-0001
CoolCell™ LX	Corning	432138

Materialien:	Hersteller:	Bestellnummer:
Blutabnahmesystem	Sarstedt	
EDTA-Monovetten 9 ml	Sarstedt	02.1066.001
Cryobank Röhrchen 2 mL, 2D- codiert, steril, im Rack	Nunc™	374221
Zentrifugenröhrchen 50 ml	Falcon	210270

## RE-GENERATE

Teilprojekt SP2: Koordinierung und Verbesserung der Biorepositorien innerhalb des Deutschen Netzwerks zur Erforschung autoimmuner Enzephalitiden




### SOP-Empfehlung 03: Zur Gewinnung, Verarbeitung und Lagerung von PBMC aus EDTA-Vollblut

Version: 2.0

Stand: 09.04.2024

Neubauer-Zählkammer, improved, 0,1 mm Kammertiefe	Wie vorhanden	
Haemocytometer-Deckgläser (20 x 26 mm)	Wie vorhanden	
SepMate Röhrchen	STEMCELL	85450

Reagenzien:	Hersteller:	Bestellnummer:
Pancoll	Pan Biotech	P04-60125
DPBS ohne Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>	Gibco	14190-094
Recovery Cell Culture Freezing Medium	Gibco	12648010
Trypan-Blau-Lösung	Sigma-Aldrich	T8154-20ML

<p style="text-align: center;"><b>RE-GENERATE</b></p> <p style="text-align: center;">Teilprojekt SP2: Koordinierung und Verbesserung der Biorepositorien innerhalb des Deutschen Netzwerks zur Erforschung autoimmuner Enzephalitiden</p>	 <b>CONNECT GENERATE</b>
<p><b>SOP-Empfehlung 03:</b>  <b>Zur Gewinnung, Verarbeitung und Lagerung von  PBMC aus EDTA-Vollblut</b></p>	<p><b>Version: 2.0</b></p> <hr/> <p><b>Stand: 09.04.2024</b></p>

### SOP 03-3. Durchführung

- \* Am Morgen des Tages der geplanten PBMC-Präparation Pancoll und DPBS aus dem Kühlschrank nehmen und auf Raumtemperatur bringen
- \* Zwei SepMate-Röhrchen vorbereiten: jeweils 15 ml Pancoll vorsichtig durch das Loch mittig im SepMate-Röhrchen pipettieren (dabei entstehende kleine Luftbläschen haben keinen Einfluss auf das Resultat)
- \* Inhalt von drei 9ml-EDTA-Monovetten innerhalb von 1 Stunde nach Blutabnahme in einem 50ml-Zentrifugenröhrchen vereinigen. Mit DPBS nachspülen, um alles Blut aus den Röhrchen zu bekommen
- \* Das vereinigte Blut mit DPBS bis zum Verhältnis 1:1 auffüllen (bei 25ml Vollblut aus 3 EDTA-Monovetten entspricht dies 25ml DPBS)
- \* 3-mal sanft kippen, um zu mischen
- \* Beide SepMate-Röhrchen aufrecht stellen und jeweils 25 ml der Blut DPBS Mischung langsam entlang der Röhrchenwand einfüllen
- \* Zentrifugation bei 1200 x g für 10 Minuten bei RT mit normaler Beschleunigung und Bremse
- \* Den Überstand (enthält PBMCs) mit einer sanften Bewegung jeweils in ein neues 50 ml-Zentrifugenröhrchen auskippen – **dabei das SepMate Röhrchen NICHT länger als 2 Sekunden gekippt halten!**
- \* 1. Waschschrift: Überstand mit PBMCs mit DPBS in den beiden 50 ml-Zentrifugenröhrchen bis auf ein Volumen von 45 ml auffüllen
- \* Zentrifugation bei 300 x g für 8 Minuten bei RT (normale Beschleunigung und Bremsung der Zentrifuge)
- \* 2. Waschschrift: Überstand vorsichtig abpipettieren und verwerfen. Pellet der PBMCs mit DPBS bis auf ein Volumen von 45 ml auffüllen
- \* Zentrifugation bei 300 x g für 8 Minuten bei RT (normale Beschleunigung und Bremsung der Zentrifuge)
- \* Überstand vorsichtig abpipettieren und verwerfen und das Pellet mit PBMCs in 1 ml DPBS resuspendieren, indem mehrfach an das Röhrchen geschnippt wird, bis keine Zellklumpen mehr sichtbar sind
- \* Die PBMC-Suspensionen aus den beiden 50 ml-Zentrifugenröhrchen in einem vereinigen und mit DPBS auf 5-10 ml auffüllen.

## RE-GENERATE

Teilprojekt SP2: Koordinierung und Verbesserung der Biorepositorien innerhalb des Deutschen Netzwerks zur Erforschung autoimmuner Enzephalitiden



### SOP-Empfehlung 03: Zur Gewinnung, Verarbeitung und Lagerung von PBMC aus EDTA-Vollblut

Version: 2.0

Stand: 09.04.2024

- \* Zellzählung
- \* Zentrifugation bei 300 x g für 10 Minuten bei RT
- \* Überstand vorsichtig abpipettieren und verwerfen
- \* Die gewünschte Zellzahl sollte dem Endvolumen angepasst werden  
*Beispiel:*  
*Absolut-Zellzahl  $10 \times 10^7$*   
*Gewünschte Zellzahl  $1 \times 10^7$ /ml pro Röhrchen*  
*Daraus ergibt sich ein Volumen von 10 ml Recovery Cell Culture Freezing Medium*
- \* Das Pellet zunächst in 1ml Recovery Cell Culture Freezing Medium vorsichtig resuspendieren, dabei das Entstehen von Luftblasen vermeiden, dann auf das gewünschte Volumen an Recovery Cell Culture Freezing Medium auffüllen und einmal vorsichtig auf und ab pipettieren und dann jeweils 1ml der Zellen in ein Cryo-Röhrchen überführen
- \* Cryo-Röhrchen in Kühladapter CoolCell oder zuvor auf Raumtemperatur gelagerten Mr. Frosty platzieren, den Deckel schließen und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  für zumindest 48 Stunden lagern (max. 1 Woche)
- \* Cryo-Röhrchen mit kryokonservierten PBMCs mittels 2D Barcode Reader einscannen, Identität und Aufbewahrungsort zuordnen, dann an den gewählten Ort im Stickstofftank bzw.  $-140^{\circ}\text{C}$ -Truhe überführen