




# CONNECT GENERATE

## SOP-EMPFEHLUNG 03

Zur Gewinnung, Verarbeitung und Lagerung von Biomaterialien

**PBMC aus EDTA-Vollblut**

<b>RE-GENERATE</b>  Teilprojekt SP2: Koordinierung und Verbesserung der Biorepositorien innerhalb des Deutschen Netzwerks zur Erforschung autoimmuner Enzephalitiden	 <b>CONNECT GENERATE</b>
<b>SOP-Empfehlung 03:</b> <b>Zur Gewinnung, Verarbeitung und Lagerung von</b> <b>PBMC aus EDTA-Vollblut</b>	<b>Version: 1.0</b>  <b>Stand: 04.01.2020</b>

### 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
Mr. Frosty	Nalgene	5100-0001
Sterile Werkbank	wie vorhanden	

Materialien:	Hersteller:	Bestellnummer:
Blutabnahmesystem	Sarstedt	
EDTA-Monovetten 9 ml	Sarstedt	02.1066.001
Matrix-Rack Matrix-Röhrchen 1 ml	Thermo Scientific	3741-BR (1 ml)
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: 1.0

Stand: 04.01.2020

Sterilfilter, Filtropur S Plus 0,2	Sarstedt	83.1826.102
Spritze 2ml oder 5ml, Luer-Lock	Wie vorhanden	
Neubauer-Zählkammer, improved, 0,1 mm Kammertiefe	Wie vorhanden	
Haemocytometer-Deckgläser (20 x 26 mm)	Wie vorhanden	

Reagenzien:	Hersteller:	Bestellnummer:
Lymphoprep	Axis-Shield	1114547
DPBS ohne Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>	Gibco	14190-094
CTL Cryo ABC Kit	C.T.L.	#CTLC-ABC
Trypan-Blau-Lösung	Sigma-Aldrich	T8154-20ML

### SOP 03-3. Durchführung

- \* Am Morgen des Tages der geplanten PBMC-Präparation Lymphoprep und DPBS aus dem Kühlschrank nehmen und auf Raumtemperatur bringen
- \* Zumindest zwei 9ml-EDTA-Monovetten mit Vollblut so schnell als möglich (innerhalb von 1 Stunde) verarbeiten
- \* Hierzu Inhalt der zwei EDTA-Monovetten an der sterilen Werkbank in sterilen 50ml-Zentrifugenröhrchen vereinigen
- \* Restliches Blut mit DPBS ohne Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> aus den Monovetten in das 50ml-Zentrifugenröhrchen spülen
- \* Das vereinigte Blut mit DPBS ohne Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> bis zum Verhältnis 1:1 auffüllen (36 ml)
- \* Für jeweils 18 ml Blut-DPBS-Mischung je ein steriles 50 ml-Zentrifugenröhrchen mit 15 ml Lymphoprep (RT) befüllen

## 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: 1.0

Stand: 04.01.2020

- \* 18ml der Blut-DPBS-Mischung langsam auf die Lymphoprep-Lösung geben; es muss eine ungestörte Trennfläche bilden
  - Hierzu Zentrifugenröhrchen für die ersten 10 ml in einem 30° Winkel halten, danach Winkel langsam steigern
- \* Zentrifugation bei 800 x g für 30 Minuten bei RT, Beschleunigung minimal, Bremse ausgestellt
- \* PBMC-Schicht mit einer Pipette bzw. Pasteurpipette aufnehmen und in ein neues 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführen
- \* PBMCs mit DPBS ohne Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> in Zentrifugenröhrchen bis auf ein Volumen von 45 ml auffüllen
- \* Zentrifugation bei 300 x g für 10 Minuten bei RT (jetzt normale Beschleunigung und Bremsung der Zentrifuge)
- \* Überstand verwerfen und das Pellet in 1 ml DPBS ohne Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> resuspendieren, indem mehrfach an das Röhrchen geschnippt wird, bis keine Zellklumpen mehr sichtbar sind
- \* Die PBMC-Suspensionen aus den beiden Röhrchen in einem 50 ml-Zentrifugenröhrchen vereinigen und mit PBS ohne Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> auf 45 ml auffüllen
- \* Zellzählung
  - Angehauchtes Deckgläschen auf Neubauer-Zählkammer aufschieben, so dass sich Newtonsche Ringe bilden.
  - 100 µl Zellsuspension mit 10 µl Trypan-Blau-Lösung in einem 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsröhrchen versetzen und mit der Pipette mischen
  - 100 µl der mit Trypan-Blau versetzten Zellsuspension in der Pipette aufziehen, den Druckkopf vorsichtig drücken, bis ein Tropfen an der Pipettenspitze hängt, und diesen an den Spalt zwischen Zellkammer und Deckglas halten, so dass die Zellsuspension in die Zählkammer gesaugt wird
  - Zellen einige Minuten ruhen lassen.
  - Unter Phasenkontrast im Mikroskop die Zellen zählen. Hierbei alle vier 16er-Felder auszählen; Zellen, die oben und links auf der Begrenzung des Gesamt-16er-Feldes liegen mitzählen, rechts und unten nicht
  - Die Zellzahl der vier 16er-Felder addieren und durch 4 teilen, dann mit 10.000 multiplizieren. Dies ergibt die Zellzahl pro ml. Die mit 45 multipliziert ergibt die Gesamtzellzahl

<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>	
<p><b>SOP-Empfehlung 03:</b> Zur Gewinnung, Verarbeitung und Lagerung von <b>PBMC aus EDTA-Vollblut</b></p>	<p><b>Version: 1.0</b></p> <hr/> <p><b>Stand: 04.01.2020</b></p>

- \* Zentrifugation des 50 ml-Zentrifugenröhrchen bei 300 x g für 10 Minuten bei RT (volle Beschleunigung, Bremse angeschaltet)
- \* Überstand vorsichtig dekantieren
- \* Zellpellet in CTL-Cryo C-Lösung aufnehmen
  - Für  $10^7$  Zellen werden 0,5 ml CTL-Cryo C-Lösung benötigt, pro Milliliter können  $10^6$  Zellen erwartet werden, damit sollen  $3-4 \times 10^7$  Zellen als Ausbeute erwartet werden
  - Pro 1 ml-Matrix-Röhrchen sollten min.  $10^7$  Zellen eingefroren werden, also ca. 3-4 1ml-Matrix-Röhrchen
- \* Bei einem geplanten 1 ml-Matrix-Röhrchen 0,5 ml CTL-Cryo B-Lösung tropfenweise zu 0,5 ml CTL-Cryo A-Lösung geben (100% zuviel), bei zwei geplanten 1 ml-Matrix-Röhrchen 0,8 ml CTL-Cryo A- und B-Lösung (60% zuviel), wenn mehr 0,3 ml pro Röhrchen (20% zuviel) -> CTL-Cryo AB-Mix
- \* Stempel aus Einmalspritze mit entsprechendem Volumen entfernen; Spritze auf Sterilfilter stecken und auf einem 15 ml-Spitzröhrchen platzieren. Den CTL-Cryo AB-Mix in die Spitze transferieren, den Stempel in die Spitze einsetzen und die Flüssigkeit durch den Sterilfilter drücken.
- \* Den CTL-Cryo AB-Mix in Pipette aufziehen und langsam und tropfenweise bis zum Verhältnis 1:1 zu den Zellen in der CTL-Cryo C-Lösung geben -> PMBCs in CTL-Cryo ABC-Mix durch vorsichtiges Invertieren mischen
- \* Je 1 ml der PMBCs in CTL-Cryo ABC-Mix in ein 1 ml-Matrix-Röhrchen überführen
  - Zellzahl pro Matrixtube min.  $10^7$
- \* Matrix-Röhrchen in den zuvor auf Raumtemperatur gelagerten Mr. Frosty überführen, den Deckel schließen und bei  $-80^\circ\text{C}$  für zumindest 48 Stunden lagern (max. 1 Woche). Falls keine Beschriftung der Röhrchen erfolgt ist, Zettel mit Identität der Proben beilegen
- \* Matrix-Röhrchen mit kryokonservierten PMBCs mittels 2D Barcode Reader einscannen, Identität und Aufbewahrungsort zuordnen, dann an den gewählten Ort im Stickstofftank bzw.  $-140^\circ\text{C}$ -Truhe überführen