

## **RCR 2020**

### **ISTITUTI VIRTUALI NAZIONALI**

#### **DEMENZE**

**MALATTIA DI PARKINSON E DISORDINI DEL MOVIMENTO  
SCLEROSI MULTIPLA E DISORDINI NEUROIMMUNOLOGICI**

## **WP3**

# **SOP campionamento e biobancaggio di cellule mononucleate da sangue periferico (PBMCs)**

**Istituto Virtuale Nazionale  
Malattie Neurologiche Rare**

**SOP adottata da IVN Malattie Neurologiche Rare  
Progetto 2021 - WP5, Task 3 –**

Documento redatto da:

- Federico Verde
- Francesca Andretta
- Luisa Benussi

## **WP3**

### **Biochimica – Armonizzazione delle metodiche di campionamento e biobancaggio dei materiali biologici SOP campionamento e biobancaggio di cellule mononucleate da sangue periferico**

#### **Indice**

- I. Scopo e applicazione
- II. Protocollo
- III. Bibliografia

#### **I. SCOPO E APPLICAZIONE**

La presente SOP si riferisce al campionamento e biobancaggio delle cellule mononucleate da sangue periferico (PMBCs), che costituiscono l'oggetto di studi di laboratorio di diversa natura in ambito neurologico (per es. studi biochimici, funzionali, di genetica molecolare, differenziazione iPSCs). La presente SOP è stata redatta sulla base delle procedure in uso nei diversi IRCCS descritte dagli stessi nel corso di una indagine preliminare e di procedure descritte nella letteratura. È seguita una revisione della prima versione della SOP da parte dei singoli IRCCS. Infine è stata svolta una operazione di sintesi delle varie osservazioni provenienti dagli IRCCS che ha portato alla versione definitiva.

#### **II. PROTOCOLLO**

Prelievo venoso da effettuare preferibilmente da vena antecubitale.

Fascia oraria per prelievo venoso: indifferente.

Digiuno del paziente prima del prelievo: non necessario.

Provette per prelievo di sangue: litio eparina (tappo verde) oppure EDTA (tappo viola). La scelta del tipo di provetta è influenzata dal previsto utilizzo delle PMBCs.

Volume di sangue da prelevare: preferibilmente 10 mL.

Tempo tra prelievo e processazione: max 6 ore, idealmente entro 1 ora.

Temperatura del sangue tra prelievo e processazione e durante processazione: T ambiente.

### **Procedura**

1. Invertire 2-3 volte delicatamente la provetta di sangue e trasferire il sangue in una provetta da centrifuga (per es. provetta Falcon da 50 mL).
2. Nella provetta da centrifuga diluire il sangue con eguale volume (rapporto 1:1) di PBS o soluzione fisiologica (NaCl 0,9%).
3. Preparare una provetta da centrifuga da 50 mL e versarvi un volume (v. sotto\*) di gradiente di densità (Histopaque 1700 o Ficoll-Paque o Lympholyte) portato a temperatura ambiente. (\*Per determinare il volume di gradiente di densità: il rapporto tra sangue diluito e gradiente deve essere compreso tra 1:1 e 2:1).
4. Depositare lentamente (eventualmente goccia a goccia mediante pipetta Pasteur) il sangue diluito sul gradiente di densità evitando di disturbare la superficie.
5. Centrifugare: per es. 500 x g, 30 minuti. Disattivare freno (freno 0).
6. Al termine della centrifugazione, il contenuto della provetta apparirà stratificato. Utilizzando una pipetta Pasteur o una pipetta sierologica sterile, prelevare l'anello opalescente (costituito dalle PBMCs) che si trova nell'interfaccia tra il plasma ed il gradiente, e trasferirlo in una provetta da centrifuga da 15 mL contenente 6-10 mL di PBS oppure 10 mL di DMEM con 15% di FBS. Prima del prelievo dell'anello delle PBMCs si possono eventualmente aspirare con cautela, con una pipetta Pasteur o una pipetta P1000, i 2/3 dello strato superiore (contenente il plasma), facendo attenzione ad evitare di causare un movimento dell'anello delle PBMCs.
7. Capovolgere delicatamente la provetta per lavare le cellule.
8. Centrifugare.
9. Rimuovere il surnatante.
10. Aggiungere 5-10 mL di PBS oppure 10 mL di DMEM con 15% di FBS.
11. Capovolgere delicatamente la provetta per lavare le cellule.
12. Centrifugare.
13. Rimuovere il surnatante.

| Alternativa ai punti da 6 a 13

A. Utilizzando una pipetta Pasteur o una pipetta sierologica sterile, prelevare l'anello opalescente (costituito dalle PMBCs) che si trova nell'interfaccia tra il plasma ed il gradiente, e trasferirlo in una provetta da centrifuga da 50 mL portandola a 50 mL con sol. fisiologica.

B. Centrifugare.

C. Scartare metà del soprnatante.

D. Diluire con sol. fisiologica portando a volume di 50 mL.

E. Centrifugare.

F. Rimuovere il surnatante.

14. Risospendere il pellet in 1-3 mL di PBS o sol. fisiologica.

15. In una nuova provetta di PP da 0,5 mL, trasferire 10 uL di sospensione cellulare e 10 uL di trypan blue 0,4% (rapporto 1:1). Pipettare 10 uL di sospensione cellulare diluita in una camera di conta (per es. Countless Cell Counting Chamber Slides per Countless Automated Cell Counter, Invitrogen). Eseguire la conta delle cellule.

16. Calcolare il volume necessario di medium di congelamento dopo avere identificato, in base al numero di cellule, le aliquote necessarie per il biobancaggio ( $2-5 \times 10^6$  PBMCs per aliquota).

657

17. Trasferire i corrispondenti volumi in provette di PP per crioconservazione.

18. Aggiungere alle provette sol. fisiologica (1 mL), centrifugare, eliminare il surnatante.

19. Risospendere il pellet cellulare in medium per il congelamento (per es. FBS con 10% DMSO, 1 mL per provetta; alternative: DMEM high-glucose con o senza FBS, StemPro-34 SFM, tutti addizionati di DMSO 10%).

20. Riporre le provette a  $-80^{\circ}\text{C}$  per 24-48 ore in contenitore da congelamento cellulare (per es. Nalgene Mr. Frosty o analoghi), poi trasferirle in azoto liquido. I punti 19-20 consentono di biobancare, e poi scongelare, cellule vitali.

21. Alternativamente ai punti 19-20: una volta eliminato il surnatante della centrifugazione del punto 18, congelare il pellet cellulare a  $-80^{\circ}\text{C}$ . In questo modo si ottengono pellet cellulari per saggi proteici o per estrazione di acidi nucleici.

### III. BIBLIOGRAFIA

- Betsou F, Gaignaux A, Ammerlaan W, Norris PJ, Stone M. Biospecimen Science of Blood for Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC) Functional Applications. *Current Pathobiology Reports* 2019;7:17–27. doi: 10.1007/s40139-019-00192-8.
- Böyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Introduction. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 1968;97:7.
- Chen H, Schürch CM, Noble K, et al. Functional comparison of PBMCs isolated by Cell Preparation Tubes (CPT) vs. Lymphoprep Tubes. *BMC Immunol* 2020;21:15. doi: 10.1186/s12865-020-00345-0.
- Corkum CP, Ings DP, Burgess C, Karwowska S, Kroll W, Michalak TI. Immune cell subsets and their gene expression profiles from human PBMC isolated by Vacutainer Cell Preparation Tube (CPT™) and standard density gradient. *BMC Immunol* 2015;16:48. doi: 10.1186/s12865-015-0113-0.
- Grievink HW, Luisman T, Kluft C, Moerland M, Malone KE. Comparison of Three Isolation Techniques for Human Peripheral Blood Mononuclear Cells: Cell Recovery and Viability, Population Composition, and Cell Functionality. *Biopreserv Biobank* 2016;14:410-415. doi: 10.1089/bio.2015.0104.
- Jiang CY, Niu Z, Green MD, et al. It's not 'just a tube of blood': principles of protocol development, sample collection, staffing and budget considerations for blood-based biomarkers in immunotherapy studies. *J Immunother Cancer* 2021;9:e003212. doi: 10.1136/jitc-2021-003212.
- Mallone R, Mannering SI, Brooks-Worrell BM, et al. Isolation and preservation of peripheral blood mononuclear cells for analysis of islet antigen-reactive T cell responses: position statement of the T-Cell Workshop Committee of the Immunology of Diabetes Society. *Exp Immunol* 2011;163:33-49. doi: 10.1111/j.1365-2249.2010.04272.x.
- Turner RJ, Geraghty NJ, Williams JG, et al. Comparison of peripheral blood mononuclear cell isolation techniques and the impact of cryopreservation on human lymphocytes expressing CD39 and CD73. *Purinergic Signal* 2020;16:389-401. doi: 10.1007/s11302-020-09714-1.
- Ulmer AJ, Scholz W, Ernst M, Brandt E, Flad HD. Isolation and Subfractionation of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) by Density Gradient Centrifugation on Percoll. *Immunobiology* 1984;166:238-250. doi: 10.1016/S0171-2985(84)80042-X.
- van Beem RT, Hirsch A, Lommerse IM, et al. Recovery and functional activity of mononuclear bone marrow and peripheral blood cells after different cell isolation protocols used in clinical trials for cell therapy after acute myocardial infarction. *EuroIntervention* 2008;4:133–138. doi: 10.4244/eijv4i1a21.