



QUY TRÌNH THỬ NGHIỆM VẬT LIỆU MANG BioNOC™ II PROTOCOL FOR TESTING BioNOC™ II CARRIERS

Nội dung

Khử trùng vật liệu mang	2
Phủ lớp gắn kết cho vật liệu mang (nếu được yêu cầu)	2
Cấy tế bào	2
Nuôi tế bào	3
Sinh trưởng tế bào trên vật liệu mang với hệ thống mô phỏng Mini Tide Motion sử dụng Rocking Motion (Không bắt buộc)	3
Thu hoạch và đếm tế bào	4
Nhuộm và quan sát tế bào	5
Ví dụ minh họa nhuộm vật liệu mang	6

Khử trùng vật liệu mang

1. Khử trùng ướt vật liệu mang trong dung dịch PBS.
2. Hấp ở 121°C trong 20 phút.
3. Bảo quản vật liệu mang trong PBS cho đến khi sử dụng.

Phủ lớp gắn kết cho vật liệu mang (nếu được yêu cầu)

1. Chuyển vật liệu mang đã khử trùng sang đĩa petri dùng một lần vô trùng 100mm.
2. Loại bỏ sạch PBS.
3. Để vật liệu mang khô tự nhiên.
4. Phủ lớp gắn kết tế bào nếu được yêu cầu. Toàn bộ vật liệu mang phải được đặt trong dung dịch gắn kết trong thời gian và nhiệt độ cần thiết.
5. Loại bỏ dịch chứa chất gắn kết.
6. Để vật liệu mang khô tự nhiên. Rửa sạch bằng PBS nếu cần (phụ thuộc chất gắn kết).
7. Bảo quản vật liệu mang BioNOC™II đã phủ gắn kết-XX (bảo quản ở nhiệt độ phù hợp cho đến khi sử dụng).

Cấy tế bào

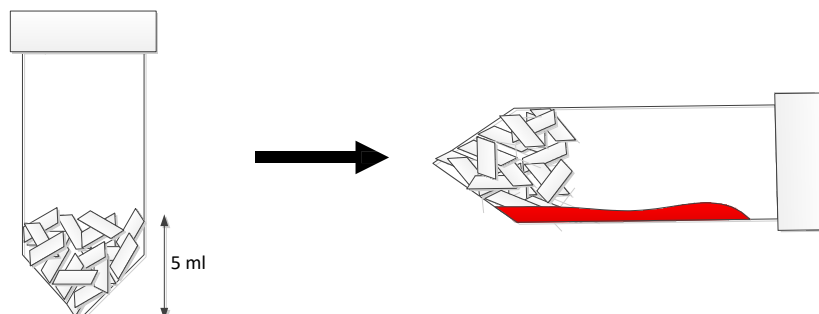
1. Lấy 30 BioNOC™II vật liệu mang vào ống ly tâm 15ml vô trùng.
2. Ủ vật liệu mang với lượng tế bào và môi trường đủ đảm bảo toàn bộ vật liệu mang nằm trong dung dịch chứa tế bào. Mật độ cấy phụ thuộc loại tế bào.

Thông tin tham khảo với một số loại tế bào.

Lưu ý: Không nên cấy tế bào với nồng độ > 1x10⁶ tế bào/ml để tránh vón cục tế bào

Loại tế bào	Mật độ cấy (Số tế bào/vật liệu mang)
Tế bào gốc trung mô	20,000 – 60,000
Tế bào noãn chuột hamster Trung Quốc Chinese hamster ovary cells (CHO)	100,000 – 300,000
HEK293T	100,000 – 300,000
Vero	100,000 – 300,000
Hybridoma OKT 3	100,000 – 300,000
MDCK	60,000 – 120,000

3. Nhẹ nhàng lắc ngược ống 2-3 lần để tế bào trộn đều trộn đều tế bào với vật liệu mang.
(Tham khảo hình bên dưới)



4. Đặt thẳng ống ly tâm trong tủ ấm CO₂ 37°C, 5% CO₂ trong 3-4 giờ.

5. Cứ 15 phút trong giờ đầu tiên, lặp lại bước 3 để tế bào được phân bố đều.
6. Trong 2-3 giờ tiếp theo, lặp lại bước 3 cứ 30 phút 1 lần.
7. Sau 3 giờ ủ, mang ống ly tâm đặt vào tủ an toàn sinh học, trộn đều mẫu và lấy ~50 μ l để đếm tế bào. Đếm tế bào còn lại trong dịch nuôi cấy và xác định % của tế bào đã bám.
8. Nếu tỉ lệ bám của tế bào đạt 90% (tức là dưới 10% các tế bào vẫn còn trong môi trường) tiến hành bước tiếp theo, hoặc ủ thêm một giờ để kiểm tra lại tỉ lệ bám. Thông thường, quá trình bám của tế bào diễn ra trong 3-5 giờ.

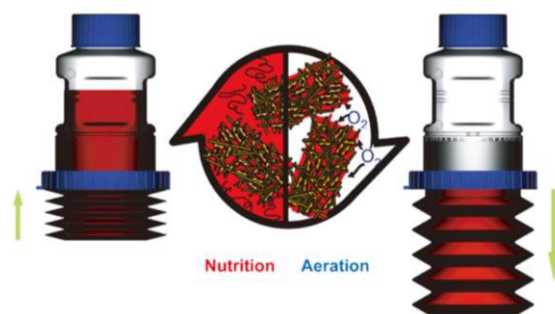
Nuôi tế bào

1. Loại bỏ sạch môi trường.
2. Dùng kẹp đã khử trùng chuyển vật liệu mang từ ống ly tâm sang chai nuôi cấy tế bào T75 chứa 15-20ml môi trường mới đặt trong tủ ấm CO₂.
3. Nuôi vật liệu mang trên hệ thống MiniTide Motion (xem bên dưới)
Thu 3 vật liệu mang và đếm tế bào để theo dõi sinh trưởng hàng ngày. Nhuộm tế bào cần được thực hiện trong ngày.

***Lưu ý:** Tối đa để 20ml môi trường trong bình nuôi cấy T75 hoặc 45ml môi trường trong bình nuôi cấy T175, để tránh việc rò rỉ môi trường hoặc ẩm màng lọc trên nắp chai trong quá trình khuấy trộn.

Sinh trưởng tế bào trên vật liệu mang với hệ thống mô phỏng chuyển động thủy triều Mini TideMotion sử dụng chuyển động bập bênh (không bắt buộc)

Thiết bị nuôi tế bào Tide Motion bioreactor bơm liên tục môi trường vào và ra khỏi vật liệu mang giúp vận chuyển chất dinh dưỡng và khí đến vật liệu mang (Hình 1).



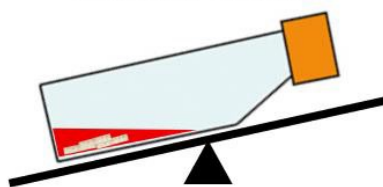
Hình 1: CelCradle™ hoạt động thông qua các nguyên tắc chuyển động thủy triều trong đó các tế bào, được gắn vào các vật liệu mang BioNOC™ II, được luân phiên pha cấp khí và pha cấp môi trường dinh dưỡng thông qua đẩy môi trường lên xuống của hệ thống.

Mô phỏng chuyển động thủy triều với quy mô nhỏ, vật liệu mang đặt trong chai nuôi cấy T75 và được lắc nhẹ nhàng trên thiết bị 2D rocker. Chuyển động tạo ra sự luân phiên pha dinh dưỡng và pha cấp khí (Hình 2).

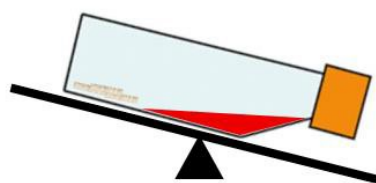
Side-to-side rocker carrying T-flasks



Nutrition supply



Oxygen supply



Hình 2: (Trái) Hình ảnh bình nuôi cấy đặt trên máy lắc bập bênh. (Phải) Sơ đồ thể hiện chuyển động lắc lư của bình nuôi cấy mô phòng nguyên tắc chuyển động thủy triều luân phiên 2 pha quan sát trong CelCradle™ bioreactor.

Các bước thực hiện cấy tế bào lên vật liệu mang và chuyển vật liệu mang vào bình nuôi cấy T-75/T175:

- Đặt máy lắc bập bênh bên trong tủ ấm CO₂ duy trì ở 37°C và 5% CO₂ (hoặc tùy theo yêu cầu của người sử dụng).
- Điều chỉnh tốc độ chuyển động 4 chu kỳ/phút (Mỗi chu kỳ gồm chuyển động từ trái ->phải->trái).
- Đặt chai trên máy lắc bập bênh.
- **0,6ml môi trường/vật liệu mang** (có thể được điều chỉnh tùy từng loại tế bào)
** Để mô phỏng lượng môi trường trên mỗi vật liệu mang khi thực hiện trên CelCradle (500ml môi trường trên 850 vật liệu mang trong mỗi chai). Có thể cung cấp lượng môi trường nhiều hơn trên mỗi vật liệu mang nếu chuyển sang dạng CelCradle tự cấp môi trường.*
- Thay môi trường 2-3 ngày 1 lần tùy theo qui trình nuôi cấy thực hiện trong phòng nghiên cứu và tùy từng dòng tế bào.

Thu và đếm tế bào

1. Tách bằng Enzyme

Các loại Enzyme tách tế bào: Accumax, Trypsin 0.25%, TrypLe Express, Collagenase

1. Chuyển ba vật liệu mang từ chai nuôi cấy vào ống ly tâm 1,5ml.
2. Rửa các vật liệu mang với 1ml PBS. Loại sạch PBS.
3. Lặp lại bước 2 thêm ít nhất 4 lần nữa.
4. Tách tế bào bằng enzyme:
 - i. Trypsin/TrypLE Express: (hầu hết các loại tế bào)
 - Thêm 1ml 0,25% Trypsin-EDTA, ủ ở 37°C for 10-15 phút. Trung hòa bằng 1ml môi trường.
 - ii. Accumax/Accutase: (thích hợp cho tế bào gốc)
 - Thêm 1ml Accumax/Acutase, ủ ở nhiệt độ phòng trong 15-30 phút. (Thời gian ủ phụ thuộc vào mật độ tế bào, chúng tôi đề xuất thí nghiệm ở 15 phút, 20 phút và 30 phút). Accumax được đề xuất cho các tế bào sinh trưởng trong không gian 3D. Tuy nhiên, có thể sử dụng phương pháp hoặc hóa chất mà người sử dụng vẫn thường dùng.
 - iii. Collagenase: (thích hợp cho tế bào gốc)
 - Pha loãng collagenase loại II (Thermo Scientific, mã số 17.101) để đạt được nồng độ cuối cùng của collagenase chứa 100 đơn vị/ml CaCl₂ 5mM hòa tan trong PBS.
 - Thêm 1ml collagenase và ủ trong 15-30 phút. (Người sử dụng cần tối ưu hóa thời gian ủ với collagenase).
5. Gãy nhẹ vào đáy ống 10-20 lần.
6. Chuyển sang ống ly tâm 15ml.
7. Thêm 1ml PBS và hút nhả lên, xuống để lấy sạch tế bào từ các vật liệu mang. Lặp lại bước 5 và 6

8. Lặp lại bước 7 ít nhất 3 lần (tổng ít nhất 4 lần rửa với PBS).
9. Ly tâm, loại bỏ dịch và trộn đều tế bào trong 0,1-0,5 ml môi trường để đếm tế bào trên buồng đếm tế bào. Tính số tế bào trung bình trên một vật liệu mang.

2. Nhuộm CVD (Crystal Violet Dye)

1. Chuyển 3 vật liệu mang từ chai nuôi cấy vào ống 1,5ml
2. Thêm 0,5ml thuốc nhuộm CVD vào mỗi ống ly tâm
3. Vortex mỗi ống 60 giây.
4. Đặt ống vào tủ ấm 37°C trong 2 giờ.
5. Vortex nhiều lần trong quá trình ủ
6. Đếm nhân và tính số lượng tế bào trên một vật liệu mang.

Lưu ý: Thuốc nhuộm CVD được cung cấp bởi ESCO, catalogue no.1400014.
Không thích hợp cho tế bào gốc do sự tiết nhiều chất nền ngoại bào ECM.

Nhuộm và quan sát tế bào

1. Nhuộm với thuốc nhuộm

1. Lấy 1-2 vật liệu mang BioNOC™II từ chai nuôi cấy.
2. Loại nước và cố định tế bào bằng ethanol 70% 5 phút, và sau đó ethanol 99,5% trong 5 phút.
3. Rửa sạch ethanol hai lần bằng nước khử ion hoặc PBS.
4. Nhuộm tế bào với hematoxylin, hoặc H&E trong 5-10 phút.
5. Rửa sạch thuốc nhuộm với nước khử ion.
6. Quan sát các vật liệu mang với dưới kính hiển vi.

Lưu ý: Các loại thuốc nhuộm khác có thể được sử dụng. VD: Trypan blue.

Nhuộm huỳnh quang để phát hiện tế bào còn lại trên vật liệu mang sau thu hoạch tốt hơn. Không sử dụng thuốc nhuộm màu.

2. Nhuộm tế bào sống với thuốc nhuộm huỳnh quang

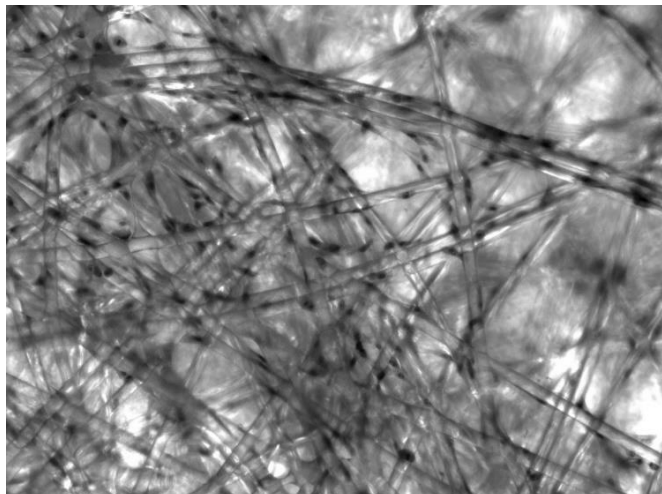
1. Chuyển 1-2 vật liệu mang BioNOC™II từ chai nuôi cấy T sang đĩa 24 giếng,
2. Thêm 500µl môi trường nuôi cấy vào các giếng. Thêm thuốc nhuộm ở nồng độ cuối cùng: 1 µg/µl Hoescht 33342 (Thermo Fisher, H3570), 1 µM calcein green (Thermo Fisher, C34852 và 1 µg/ml PI (propidium iodide, Sigma Aldrich P4170) vào môi trường ở các giếng.
3. Ủ vật liệu mang trong 30 phút ở 37°C, 5% CO₂ trước khi chụp ảnh ở các bộ lọc tương ứng (xanh nước biển cho Hoechst 33342, màu xanh lá cây cho calcein xanh và đỏ cho PI).

Lưu ý: Các loại thuốc nhuộm huỳnh quang có thể được sử dụng để phát hiện tế bào. Ví dụ. fluorescein diacetate, cell tracker, etc

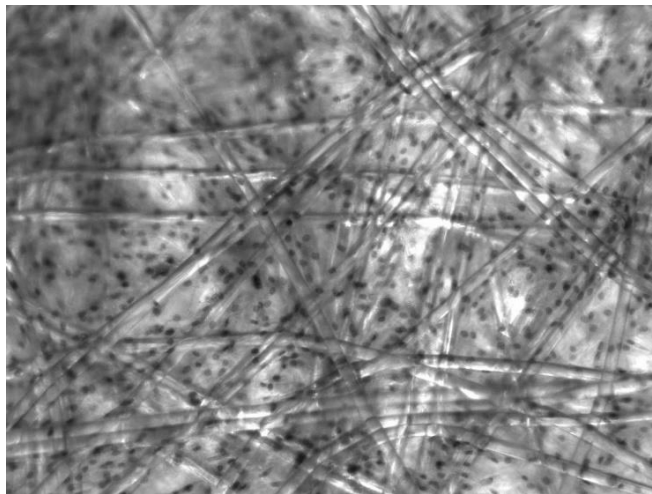
Hình ảnh về nhuộm vật liệu mang

1. Nhuộm Hematoxylin Tế bào gốc trung mô đã được cố định

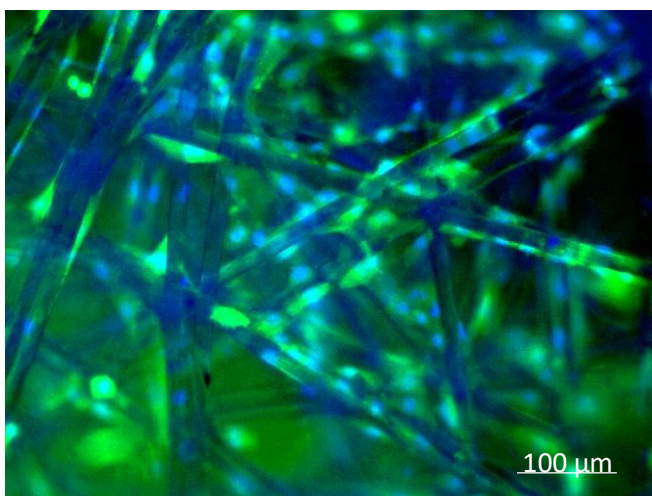
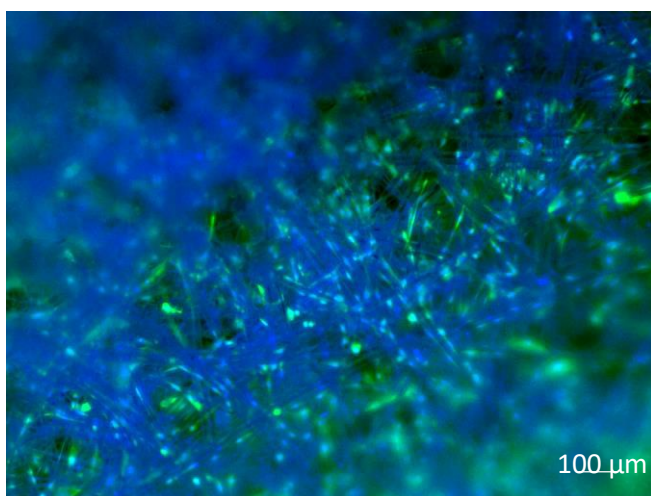
Ngày 1



Ngày 3



2. Nhuộm huỳnh quang tế bào sống: Tế bào gốc trung mô



Xanh lá cây: Calcein green phát hiện tế bào chất, Xanh lá cây: Hoechst 33342 phát hiện nhân, đỏ: propidium iodide phát hiện tế bào chết (không có hoặc rất ít)