

Quy trình nuôi cấy tế bào gốc trung mô MSCs trên thiết bị CelCradle™

Contents

NGUYÊN, VẬT LIỆU	2
PHƯƠNG PHÁP	3
Phủ lớp gắn kết (được khuyến nghị)	3
Chuẩn bị cấy tế bào	3
Cấy tế bào	3
Nuôi cấy và tăng sinh	3
Nuôi tế bào với hệ thống nuôi cấy tuần hoàn môi trường (Perfusion) (CelCradle™ 500AP)	4
Theo dõi tăng sinh tế bào (Tham khảo phụ lục A)	4
Thu tế bào	4
Lưu ý khi thu tế bào	5
Phụ lục A	6
Nhuộm tế bào	6
Nhuộm tế bào sống với chất huỳnh quang	6
Cố định tế bào và nhuộm với chất nhuộm không chứa huỳnh quang	6
Thu hoạch và theo dõi sinh trưởng tế bào hàng ngày	6
Bảng enzyme tách	6
Theo dõi nồng độ Glucose (bằng Glucell hoặc Bioanalyzer)	7
Theo dõi pH	7
Phụ lục B (Kết quả)	8
Nhuộm tế bào sống	8
Nhuộm Hemotoxylin ở các ngày khác nhau	9
Tế bào đạt hợp lưu cao	9
Sinh trưởng tế bào	10
Theo dõi sự tiêu thụ Glucose	10
Theo dõi pH	11

NGUYÊN, VẬT LIỆU

- Dung dịch chứa chất gắn kết tế bào MSC (Biological Industries, 05-752-1) / hóa chất gắn kết khác
- PBS không chứa Mg^{2+}/Ca^{2+}
- Mesenchymal Stem Cells
- Tế bào gốc trung mô
- Môi trường hoàn chỉnh - MSC NutriStem® XF Medium (Biological Industries, 05-200-1A-KT) hoặc sử dụng loại môi trường khác
- CelCradle Stage 3000
- CelCradle™ 500A (EscoAster/VaccixCell) or CelCradle™ 500AP
- Bơm Celfeeder / Bơm nhu động
- Celshaker
- Thiết bị đo Glucose GlucCell (máy đo GlucCell + Strips)
- Máy đo pH
- Kẹp dài
- Dụng cụ lọc vật liệu mang
- Trypan Blue / Hemotoxylin
- Florescent Diacetate (FDA) (1 $\mu g/ml$) (ThermoFisher Scientific)
- Propidium Iodide (PI) (1 $\mu g/ml$) (ThermoFisher Scientific)
- Hoechst 33342 (1 $\mu g/ml$) (ThermoFisher Scientific)
- Enzyme tách tế bào (0.05% Trypsin-EDTA/ Tryple Express/ Accutase/ Accumax)

PHƯƠNG PHÁP

Phủ lớp gắn kết (được khuyến nghị)

- Đặt một chai CelCradle 500A trong tủ An toàn sinh học cấp II
 - Phủ vật liệu mang với fibronectin hoặc với dung dịch gắn kết tế bào (BI, 05-752-1) trong 30 phút ở 37°C
 - Hút sạch dịch
 - Rửa sạch vật liệu mang với 250ml PBS bằng lắc nhẹ (nếu cần thiết)
 - Thực hiện bước cấy tế bào lên vật liệu mang
- Lưu ý: Thực hiện phủ lớp gắn kết lên vật liệu mang theo hướng dẫn của nhà sản xuất

Chuẩn bị cấy tế bào

Chuẩn bị 5 chai nuôi cấy T175 với $2-3 \times 10^7$ tế bào giống cho 1 chai CelCradle™ 500A.

Cấy tế bào

- Chuẩn bị 120ml môi trường ấm chứa $2-3 \times 10^7$ tế bào giống (pH được đảm bảo trong khoảng 7.2-7.4 – thêm HEPES 15 mM nhằm đảm bảo ổn định pH trong quá trình cấy).
- Trộn đều tế bào trong dung dịch chứa vật liệu mang đã được phủ lớp gắn kết.
- Đặt nắp chai xanh có lọc trong một đĩa petri vô trùng và đậy lại để đảm bảo nắp được vô trùng cho đến khi sử dụng lại
- Dùng nắp trắng kín nắp chặt chai trong quá trình cấy.
- Úp ngược chai và đảm bảo toàn bộ vật liệu mang rơi xuống phần nắp mà tiếp xúc hoàn toàn với môi trường.
- Lắc đều đảm bảo tế bào phân bố đều trong chai.
- Đặt chai nuôi cấy vào tủ ấm.
- Ủ 2-4 giờ để tế bào bám vào vật liệu mang. Cứ 15 phút, Lắc chai nhẹ nhàng để các tế bào được phân đều lại trong môi trường.
- Sau 3 giờ, lấy ra 10ml môi trường để đếm số lượng tế bào tự do.
- Lý tâm và kiểm tra tế bào trong dịch và xác định hiệu suất bám tế bào
- Lặp lại bước 7-8 mỗi giờ cấy kiểm tra sự bám của tế bào.
- Dừng quá trình ủ tế bào với vật liệu mang khi hiệu suất bám đạt trên 90%.

Lưu ý: Tế bào gốc trung mô MSCs có thể đạt hiệu suất bám >90% sau 2 giờ. Chúng tôi khuyến nghị nên dừng quá trình ủ tế bào với vật liệu mang sau 3 giờ. Hiệu suất bám tế bào đạt ~98%.

Khoảng thời gian ủ tế bào (giờ)	1	2	2.5-3
Hiệu suất bám của MSCs	90	95	>98

Nuôi cấy và tăng sinh

- Bổ sung môi trường nuôi cấy vào chai 500ml.

2. Chuyển chai nuôi cấy lên CelCradle Stage. Cài đặt các tham số nuôi cấy như sau và nhấn “Start” để bắt đầu quá trình nuôi tế bào.
 - i. Tốc độ lên: 1.0 mm/giây, Thời gian giữ phía trên: 10 giây
 - ii. Tốc độ xuống: 1.0 mm/giây, Thời gian giữ phía dưới: 30 giây

Nuôi tế bào với hệ thống nuôi cấy tuần hoàn môi trường (Perfusion) (CelCradle™ 500AP)

Đối với nuôi cấy trên CelCradle™ 500AP, cần chuẩn bị:

- a. 1 chai 1L chứa môi trường nuôi cấy (Phụ thuộc vào lượng môi trường sử dụng và khoảng thời gian nuôi cấy)
- b. Kết nối với chai CelCradle™ 500 AP và bơm
- c. Cài đặt chương trình như sau:
 - i. Thể tích môi trường trao đổi tuần hoàn (perfusion) (1999ml)
 - ii. Ngày thực hiện perfusion (hàng ngày kể từ ngày nuôi cấy thứ 3)
 - iii. Tần suất thực hiện perfusion 24 lượt/ngày

Theo dõi tăng sinh tế bào (Tham khảo phụ lục A)

Theo dõi nồng độ Glucose và thay đổi pH hàng ngày, dự đoán thời gian thay môi trường hoặc bổ sung Glucose, Natri bicarbonate hoặc các chất cần thiết khác.

Việc theo dõi Glucose, nhuộm và đếm tế bào nên được thực hiện hàng ngày hoặc cách 1 ngày trong những lần thử nghiệm đầu tiên.

- a. 2ml môi trường: Đo pH và Glucose
- b. 1 vật liệu mang: Nhuộm tế bào sống/chết sử dụng FDA, PI, Hoechst theo protocol
- c. 2 vật liệu mang: Sử dụng enzyme tách, thu và đếm tế bào sống
- d. Thay môi trường:
 - a. Nồng độ Glucose giảm xuống dưới 1 g/L – có thể bổ sung trực tiếp Glucose, duy trì nồng độ trong khoảng 1.5-2 g/L đảm bảo cho sự tăng sinh tế bào.
 - b. pH giảm xuống dưới 7.00
 - c. hoặc đều đặn 2-3 ngày (theo quy trình nuôi cấy 2D Glucose và pH ổn định, nên thay môi trường cứ 2-3 ngày)
- f. Thu tế bào khi tế bào đạt hợp lưu tối đa trong 5-7 ngày (Tuy nhiên, không để tế bào MSC phát triển quá dày)

Lưu ý: Tiêu thụ Glucose hoặc đếm số tế bào có thể dùng để tính toán mức độ hợp lưu. Bên cạnh đó, tế bào có thể hình thành các cấu trúc mạng lưới khi đạt hợp lưu cao (Phụ lục B).

Thu tế bào

1. Dùng dụng cụ lọc rây nhựa để loại môi trường và giữ lại vật liệu mang trong chai Celcradle.
2. Rửa 2 lần với 500ml PBS.
3. Loại bỏ PBS sau 2 lần rửa.
4. Thêm 120 – 150 ml dung dịch enzyme tách tế bào và dùng nắp trắng nắp chai.
5. Úp ngược chai để toàn bộ vật liệu mang nằm trong dung dịch, đặt trong tủ ấm CO2 30 phút
6. Loại bỏ dung dịch.

7. Thêm 0.1% trypsin inhibitor (ức chế trypsin) (hoặc 10% huyết thanh) vào trong môi trường nuôi cấy.
8. Thêm 100 ml môi trường đã bổ sung chất ức chế hoặc huyết thanh vào chai nuôi cấy, nắp kín
9. Dùng một trong hai phương pháp sau để thu tế bào.
 - a. Phương pháp 1:
 - i. Táp mạnh lòng bàn tay vào chai trong 3 phút. Xoay chai và táp vào các vị trí khác nhau.
 - ii. Úp ngược chai. Lắc đều nhẹ nhàng dung dịch trong chai để rửa tế bào và vật liệu mang.
 - iii. Thực hiện táp 20-30 lần tại 1 góc, trước khi chuyển sang góc tiếp theo.
 - iv. Lặp lại táp mỗi góc 3 lần.
 - v. Đổ dung dịch tế bào thu được vào chai ly tâm
 - vi. Thêm 100ml môi trường vào mỗi chai nuôi cấy.
 - vii. Lặp lại bước táp thu tế bào. Thực hiện bước rửa khoảng 4-5 lần.
 - b. Phương pháp 2:
 - i. Dùng Celshaker, đặt cố định chai vào thiết bị và tiến hành chạy.
 - ii. Thời gian: 2,5 phút, tốc độ 400 rpm
10. Thu dung dịch tế bào, ly tâm và kiểm tra mật độ tế bào và tỉ lệ sống sót.
11. Thu vật liệu mang kiểm tra hiệu quả thu hoạch tế bào.

Lưu ý khi thu tế bào

Bước rửa ban đầu với PBS đảm bảo toàn bộ huyết thanh và tế bào chết được loại bỏ. Một lượng nhỏ tế bào sống có thể bị rửa, tuy nhiên phần lớn là tế bào chết. Bước này sẽ làm tăng hiệu quả thu tế bào sống bởi toàn bộ tế bào chết đã được loại bỏ. Việc thu tế bào có thể thực hiện trong hai lần nếu tỉ lệ sống đạt mức chấp nhận.

Thời gian ủ với enzyme là rất quan trọng vì nó liên quan tới hiệu quả thu hoạch tế bào. Phần lớn các tế bào có ngưỡng chịu đựng với trypsin-EDTA khoảng 30 phút mà không ảnh hưởng tới tỉ lệ sống sót. Mật độ cao tế bào có thể yêu cầu lượng lớn hơn enzyme tách và thời gian ủ. Accutase (Innovative Cell Technologies, San Diego, CA) có thể cho phép thời gian lâu hơn so với trypsin mà không ảnh hưởng đến tế bào.

Enzyme dispase và collagenase có thể được kết hợp sử dụng giúp tăng hiệu quả thu hoạch bởi tế bào tiết ra nhiều collagen và ECM hơn khi nuôi cấy 3D trên vật liệu mang BioNOC™ II.

Phụ lục A

Nhuộm tế bào

Nhuộm tế bào sống với chất huỳnh quang

1. Thu mẫu 1-2 BioNOC™ II từ CelCradle và chuyển vào đĩa 24 giếng.
2. Thêm 500µl môi trường nuôi cấy vào mỗi giếng. Thêm thuốc nhuộm nồng độ: 1 µg/ml of Hoescht 33342 (Thermo Fisher, H3570), 1 µM fluorescein diacetate (FDA, Thermo Fisher, C34852 và 1 µg/ml propidium iodide (PI, Sigma Aldrich P4170) trong môi trường nuôi cấy.
3. Ủ vật liệu mang trong 30 phút ở 37°C, 5% CO₂ trước khi chụp ảnh ở các bộ lọc tương ứng (Xanh dương - Hoechst 33342, Xanh lá cây - FDA and Đỏ - PI).

Lưu ý: Có thể sử dụng các chất nhuộm huỳnh khác để quan sát tế bào. Eg: calcein green, acridine orange, Cell tracker etc.

Cố định tế bào và nhuộm với chất nhuộm không chứa huỳnh quang

1. Thu 1-2 vật liệu mang BioNOC™ II từ CelCradle.
2. Cố định tế bào với ethanol 70% trong 5 phút, và thêm ethanol 99.5% trong 5 phút.
3. Rửa ethanol 2 lần bằng nước khử ion hoặc PBS.
4. Nhuộm tế bào với hematoxylin, hoặc H&E trong 5-10 phút.
5. Rửa sạch chất nhuộm với nước khử ion.
6. Quan sát vật liệu mang dưới kính hiển vi.

Note: Có thể sử dụng chất nhuộm khác, eg. Trypan blue.

Sử dụng chất nhuộm huỳnh quang sẽ giúp quan sát tốt hơn tế bào còn lại trên vật liệu mang sau khi thu hoạch.

Thu hoạch và theo dõi sinh trưởng tế bào hàng ngày

Bằng enzyme tách

Enzyme tách: Accumax, Trypsin 0.25%, TrypLe Express, Collagenase

1. Thu 3 vật liệu mang từ CelCradle vào tuýp ly tâm 1.5 ml.
2. Nhẹ nhàng rửa vật liệu mang với 1ml PBS. Loại PBS.
3. Lặp lại bước 2 thêm 4 lần.
4. Thực hiện xử lý enzyme:
 - i. Trypsin/ TrypLE Express: (hầu hết các loại tế bào)
 - Thêm 1 ml 0.25% Trypsin-EDTA, ủ 37°C trong 10-15 phút. Trung hòa enzyme với 1ml môi trường.
 - ii. Accumax/ Accutase: (phù hợp cho tế bào gốc)
 - Thêm 1 ml Accumax/ Accutase, ủ nhiệt độ phòng trong 15 - 30 phút. (Thời gian ủ phụ thuộc mật độ tế bào, có thể thử nghiệm ở 15 phút, 20 phút và 30 phút). Accumax được khuyến nghị dùng trong nuôi cấy tế bào trên môi trường 3D. Tuy nhiên, có thể áp dụng phương pháp tách tế bào hiện tại của người sử dụng.
 - iii. Collagenase: (phù hợp với tế bào gốc)
 - Chuẩn bị dung dịch Collagenase I (Thermo Scientific, Cat 17101) để đạt thể tích cuối cùng chứa 100 units/ml và 5mM of CaCl₂ trong PBS.
 - Thêm 1ml collagenase và ủ trong 15-30 phút. (Người sử dụng cần tối ưu thời gian ủ collagenase).

5. Gãy phần đáy ống ly tâm bằng tay hoặc dụng cụ kim loại 10-20 lần.
6. Thu toàn bộ dung dịch sang ống ly tâm 15ml.
7. Thêm 1 ml PBS và pipette hút và nhả để lấy sạch tế bào từ vật liệu mang, lặp lại bước 5 và 6.
8. Repeat steps 7 for at least 3 more times (total 4 times of collection with PBS).
9. Ly tâm, loại dịch và trộn tế bào trong thể tích phù hợp, đếm tế bào bằng hemocytometer. Tính số tế bào trung bình trên mỗi vật liệu mang.

Theo dõi nồng độ Glucose (bằng Glucell hoặc Bioanalyzer)

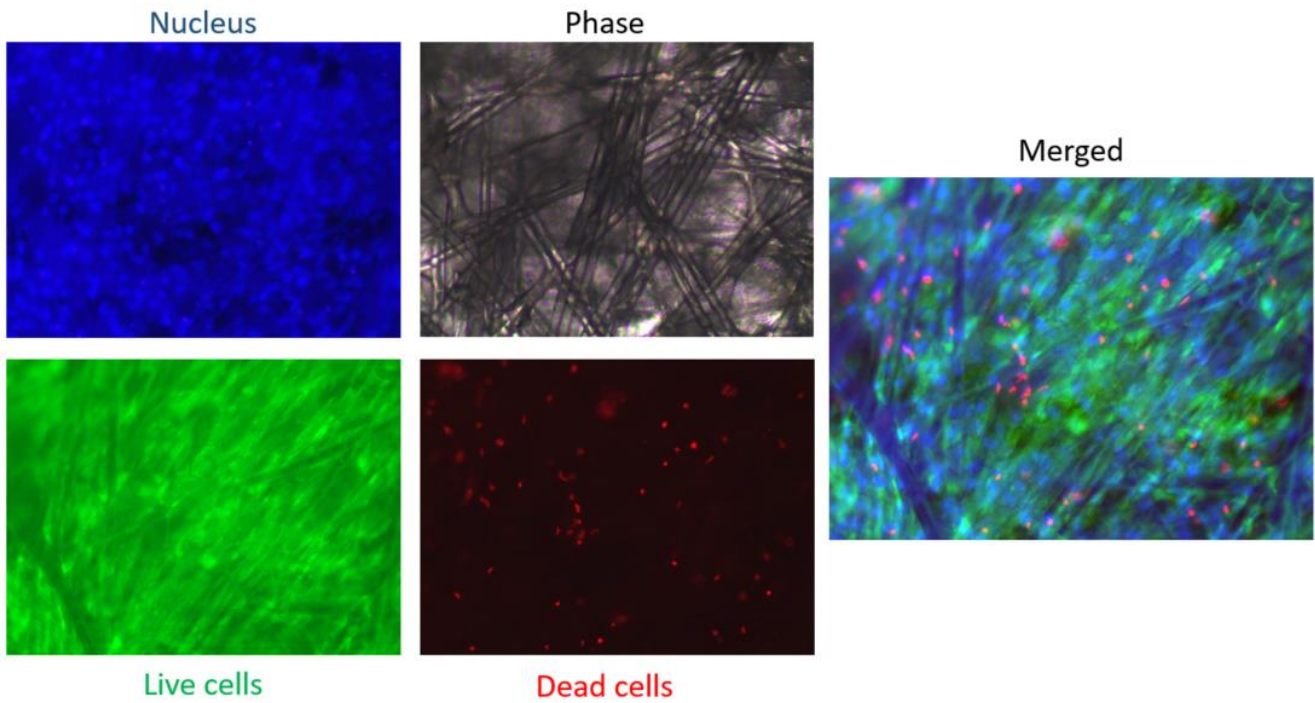
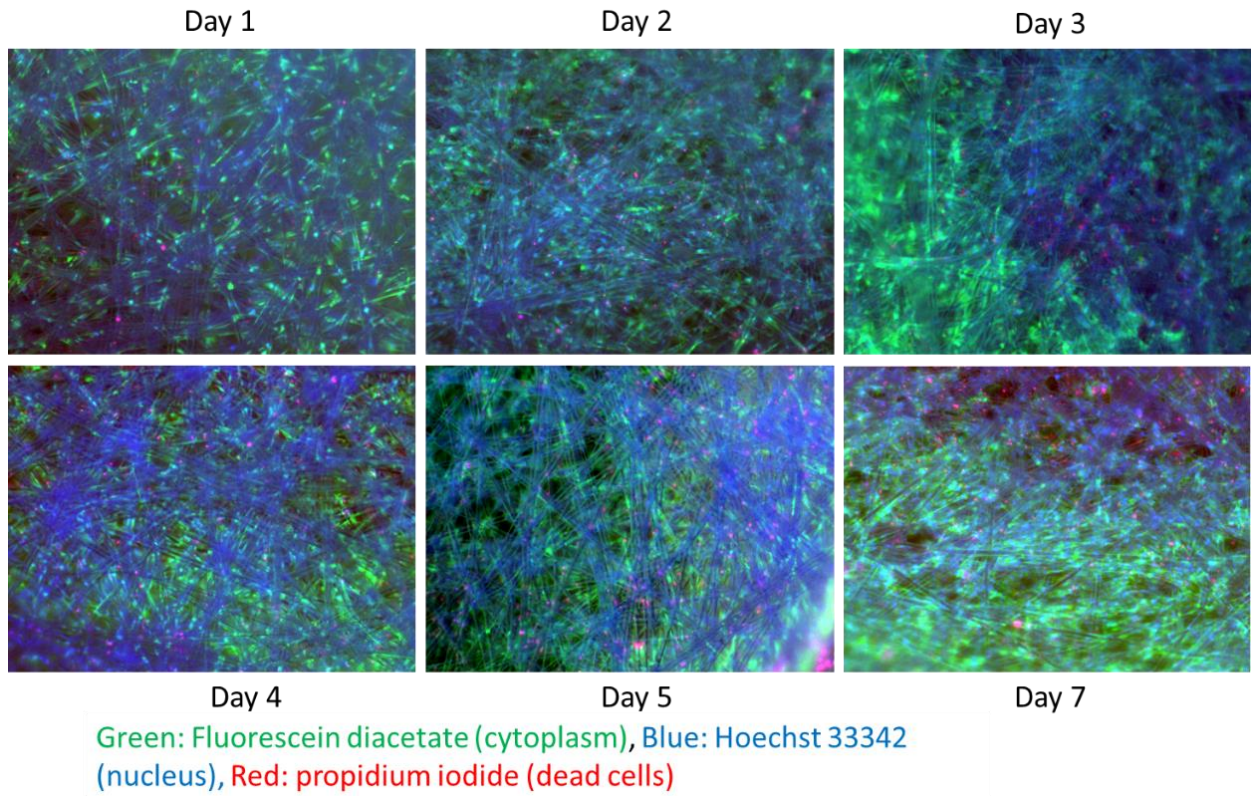
1. Thu 2 ml môi trường từ chai CelCradle và tiến hành đo bằng GlucCell.
2. Đo nồng độ Glucose ở thời điểm T_N (Glucose T_N).
3. Khi thay môi trường, đo nồng độ Glucose ban đầu (Glucose T_0).
4. Glucose tiêu thụ: $\text{Glucose } T_0 - \text{Glucose } T_N$

Theo dõi pH

1. Thu 2ml môi trường từ chai CelCradle và tiến hành đo pH.
2. Thực hiện đo ngay sau khi thu môi trường đảm bảo pH không bị thay đổi bởi điều kiện phòng.

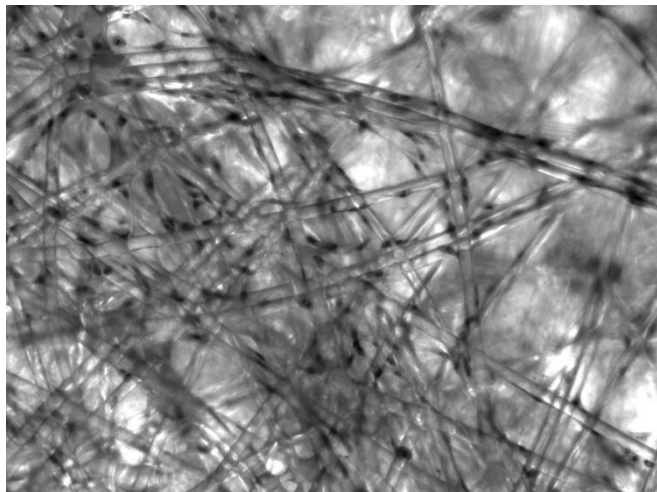
Phụ lục B (Kết quả)

Nhuộm tế bào sống

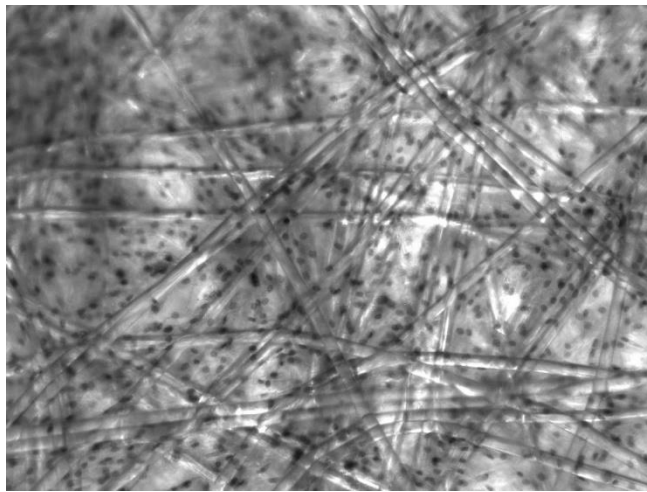


Nhuộm Hemotoxylin ở các ngày khác nhau

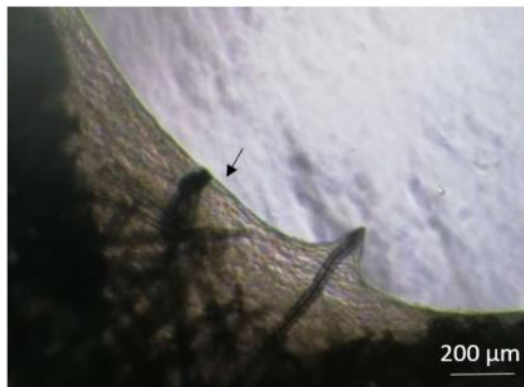
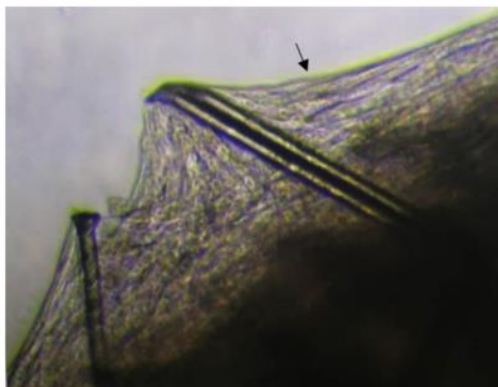
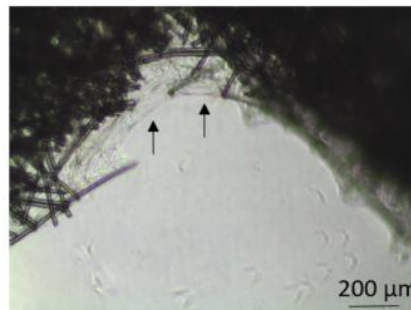
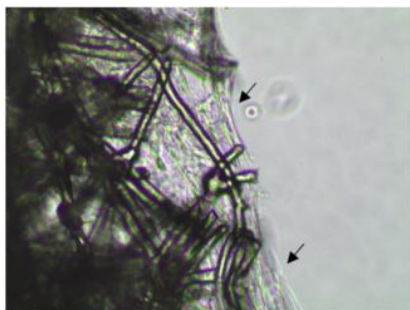
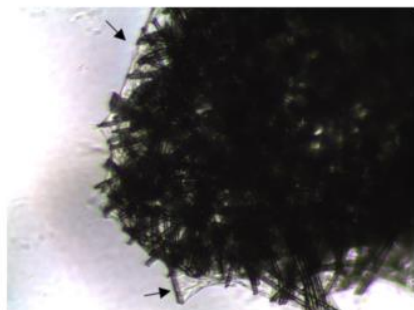
Ngày 1



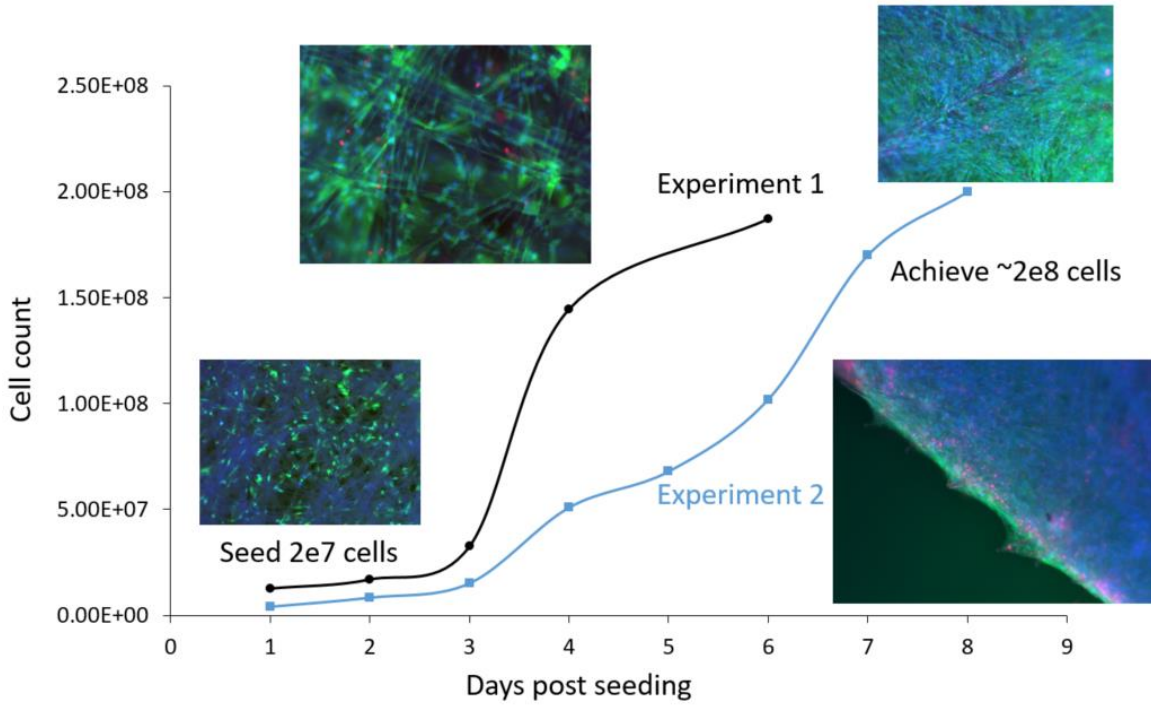
Ngày 3



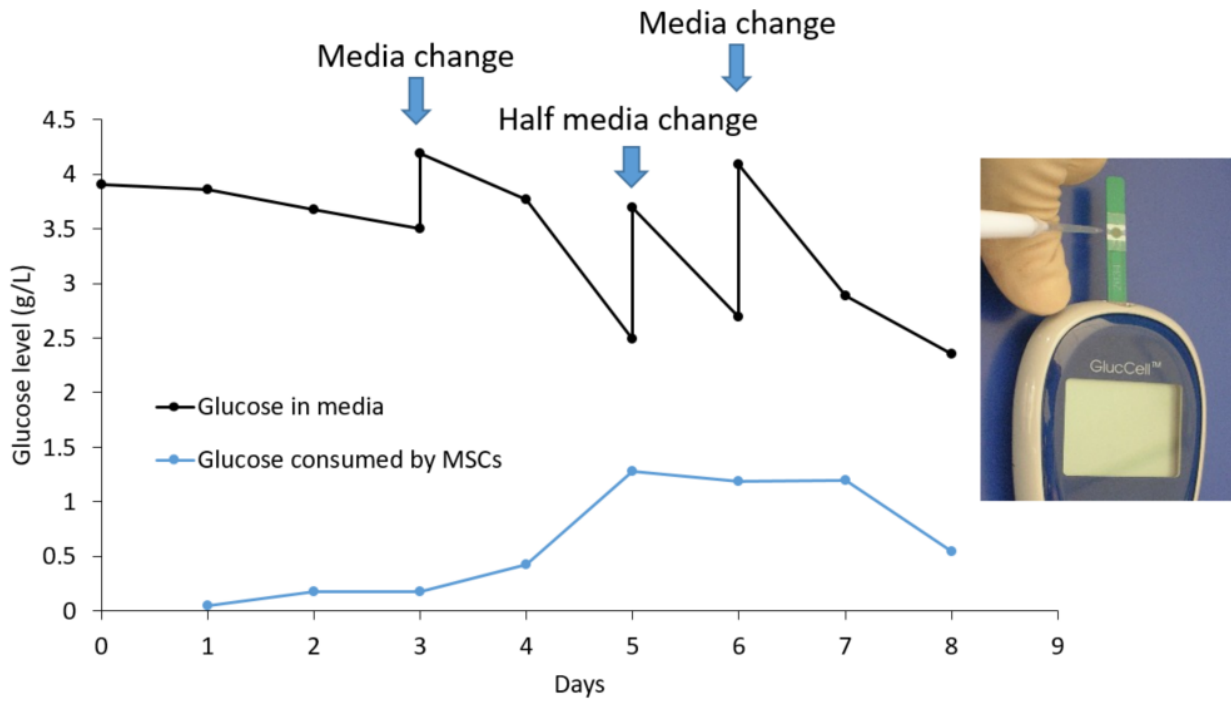
Tế bào đạt hợp lưu cao



Sinh trưởng tế bào



Theo dõi sự tiêu thụ Glucose





Theo dõi pH

