

QUY TRÌNH SẢN XUẤT TẾ BÀO GIỐNG HEK293T TRÊN THIẾT BỊ CELCRADLE

Nội dung

Mô tả.....	2
Hóa chất, vật tư	3
Phương pháp.....	4
Phủ lớp gắn kết lên vật liệu mang (Tùy theo yêu cầu).....	4
Tan đông tế bào và cấy trực tiếp lên vật liệu mang/Tăng sinh tế bào	4
Ngày X: Chuẩn bị bước cấy	4
Thực hiện cấy lên trên Celcradle	4
Ngày 0: Cấy tế bào giống	4
Theo dõi sinh trưởng tế bào	5
Thu tế bào	6
Kết quả	6
Đồ thị sinh trưởng tế bào (cam: batch; xanh dương: perfusion)	7
Theo dõi pH và CO ₂ %.....	7
Theo dõi Glucose	8
Nhuộm tế bào	8
Hoạt động chuyển hóa tế bào.....	9

Mô tả

CelCradle™ đã chứng minh là một thiết bị có khả năng nuôi tế bào đạt mật độ cao hiệu quả bởi đặc tính độc đáo là tạo ra môi trường nuôi cấy giàu oxy với ứng suất cắt thấp. Người sử dụng có thể dễ dàng thu được lượng lớn các tế bào giống cho nuôi cấy quy mô lớn hơn như TideXcell-002 hoặc để sản xuất ngân hàng tế bào với mật độ cao. Nghiên cứu này được tiến hành trên CelCradle-500A và 500AP nhằm minh họa sự sinh trưởng của tế bào HEK293T. $0,75 \times 10^8$ tế bào giống được cấy vào một chai CelCradle và kết quả thu được $2,44 \times 10^9$ tế bào. Thực hiện đếm tế bào hàng ngày để theo dõi sự sinh trưởng tế bào. Kết quả cho thấy trong 8 ngày nuôi cấy số tế bào tăng gấp 33 lần và vẫn duy trì khả năng trao đổi chất cao. Không có sự khác biệt rõ rệt giữa sự tăng trưởng tế bào trên hệ thống nuôi cấy không tuần hoàn (batch) và tuần hoàn (perfusion) môi trường. Ngoài ra, nhờ sự thay đổi môi trường ít hơn trong hệ thống perfusion, các tế bào được nuôi trong môi trường ổn định hơn về nồng độ glucose và pH. Báo cáo nghiên cứu cũng đưa ra quy trình nuôi cấy ban đầu. Tuy nhiên, điều kiện nuôi cấy tối ưu của mỗi dòng tế bào có thể thay đổi

Hóa chất, vật tư

- 0.01 % poly-L-lysine (Sigma P4707)
- PBS không chứa Mg²⁺/Ca²⁺
- HEK293T (ATCC: CRL-3216)
- Môi trường nuôi cấy hoàn chỉnh:
 - Môi trường cơ bản DMEM high glucose (Hyclone SH30022.01)
 - 1X Pen/Strep (ThermoFisher Scientific 15141022)
 - 25 mM HEPES (Gibco 15630080)
 - 10% FBS (Hyclone SV30160.03HI)
- CelCradle™ Stage 3000
- CelCradle™ 500A (EscoAster/VaccixCell)
- CelCradle™ 500AP (EscoAster/VaccixCell)
- Thiết bị đo Glucose - GlucCell Meter
- GlucCell Test Strips
- pH meter
- Kẹp dài
- Rây nhựa
- Florescent diacetate (FDA) (1 µg/ml) (ThermoFisher Scientific)
- Propidium Iodide (PI) (1 µg/ml) (ThermoFisher Scientific)
- Hoechst (1 µg/ml) (ThermoFisher Scientific)
- PrestoBlue Assay (ThermoFisher Scientific)
- 0.05 % Trypsin-EDTA (ThermoFisher Scientific 25300054)
- 75 g/L Natri bicarbonate (0.22 µm filtered)
- 100 g/L dung dịch Glucose (0.22 µm filtered)

Phương pháp

Phủ lớp gắn kết lên vật liệu mang (Tùy theo yêu cầu)

- a. Chai nuôi cấy CelCradle™ được đặt trong tủ an toàn sinh học cấp II (BSC Class II hood)
- b. Phủ vật liệu mang với 0.01% poly-L-lysine (PLL) (Sigma P4707); 30 phút; nhiệt độ phòng
- c. Hút dung dịch chứa chất gắn kết
- d. Rửa vật liệu mang với 250 ml PBS, xoay nhẹ nhàng chai nuôi cấy
- e. Hút bỏ dung dịch PBS
- f. Để vật liệu mang trong BSC qua đêm để khô hoàn toàn.

Tan đông tế bào và cấy lên vật liệu mang/Tăng sinh tế bào

Ngày X: Chuẩn bị bước cấy

- a. Sử dụng tế bào ở thể hệ thấp (tế bào trẻ)
- b. Chuyển ít nhất 2 lần trước khi sử dụng
- c. Chuyển tế bào khi đạt hợp lưu (confluency) trên 85% ở tỷ lệ 1:5-8

Lưu ý: Xử lý liều cao Trypsine có thể ảnh hưởng đến các protein bề mặt dẫn đến giảm khả năng bám của tế bào lên vật liệu mang.

Thực hiện cấy lên trên Celcradle

Ngày 0: Cấy tế bào giống

- a. Chuẩn bị 0.75×10^8 tế bào giống trong 150ml môi trường nuôi cấy.
- b. Chuyển dung dịch chứa tế bào vào chai CelCradle500A (CC)
- c. Nén để loại bỏ khí trong chai nuôi cấy trước khi thay nắp kín trắng
- d. Úp ngược chai CC và đảm bảo toàn bộ vật liệu mang nằm hoàn toàn trong dịch tế bào.
- e. Đặt chai CC vào trong tủ ẩm CO₂ 5% CO₂; 37°C
- f. Cứ 30 phút, xoay nhẹ nhàng chai đảm bảo tế bào còn trong dung dịch được phân bố đều.
- g. Thực hiện đều đặn trong 3-5 giờ đầu của quá trình cấy.
- h. Sau 3 giờ ủ tế bào, Từ từ làm đều dịch tế bào trong chai cùng với vật liệu mang, thu mẫu và đếm tế bào. Xác định hiệu suất bám tế bào dựa theo số tế bào còn lại trong dịch cấy.
- i. Nếu hiệu suất bám đạt trên hoặc bằng 80%, thêm môi trường nuôi cấy vào chai để thể tích cuối cùng đạt 500ml và sử dụng nắp xanh có lọc.
- j. Đặt chai nuôi cấy lên thiết bị và cài đặt thiết bị với các thông số như bên dưới để qua đêm nhằm giúp tế bào thích nghi:
 - i. Tốc độ lên: 1 mm/giây
 - ii. Giữ phía trên: 1 phút
 - iii. Tốc độ xuống: 1 mm/giây

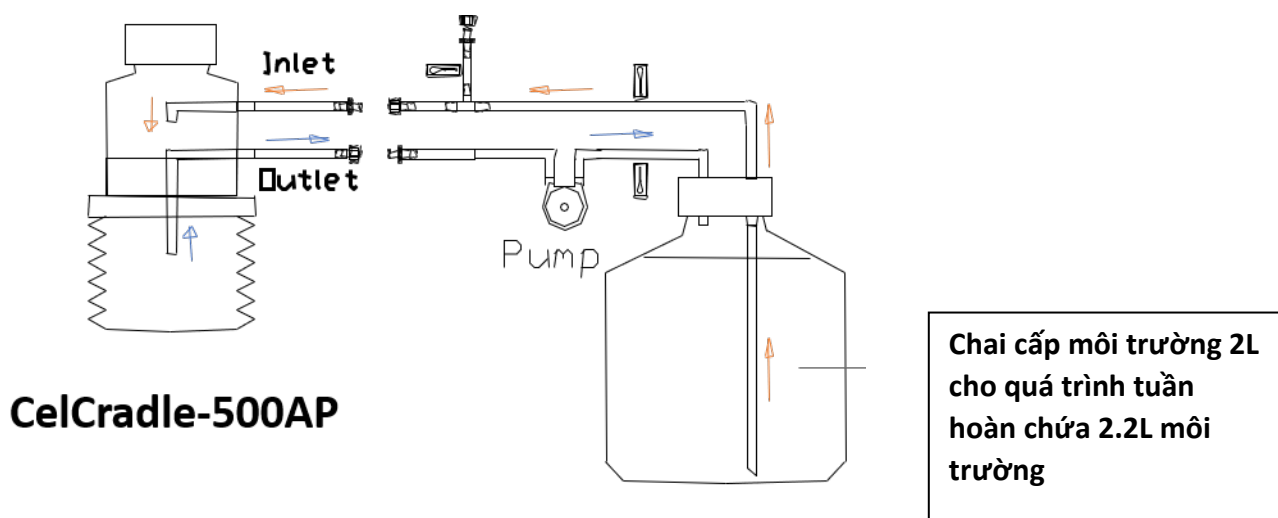
iv. Giữ phía dưới: 1 giây

Hoặc

Tăng thời gian ủ thêm một giờ và kiểm tra hiệu suất bám. Thông thường quá trình ủ để tế bào bám ổn định diễn ra trong khoảng 3-5 giờ, hiệu suất bám sẽ thường không tăng thêm khi tăng thời gian ủ lên quá 5 giờ.

Nuôi cấy trên thiết bị CelCradle dạng tuần hoàn môi trường (500AP)

- a. Nuôi cấy trên thiết bị cấp môi trường trao đổi tuần hoàn, cần chuẩn bị:
 - a. Chai thủy tinh 2L chứa 2.2L môi trường
 - b. Nối với chai CelCradle (500P hoặc 500AP) và bơm (như hình)
 - c. Cài đặt chương trình thích hợp:
 - i. Trao đổi môi trường tuần hoàn (perfusion) (tiêu chuẩn: 1999ml)
 - ii. Ngày thực hiện quá trình tuần hoàn môi trường
 - iii. Tần suất của quá trình tuần hoàn (tiêu chuẩn: 24 chu kỳ/ngày)



Theo dõi sinh trưởng tế bào

Theo dõi hàng ngày nồng độ Glucose và pH của môi trường nuôi cấy, dự đoán thời gian thay môi trường hoặc bổ sung Glucose hoặc Natri bicarbonate

- a. 2ml môi trường: Đo pH và glucose
- b. (tùy yêu cầu)
 - 3 vật liệu mang: đo hoạt động chuyển hóa sử dụng PrestoBlue Assay theo protocol
- c. 3 vật liệu mang: Nhuộm tế bào sống/chết với FDA, PI, Hoechst theo quy trình

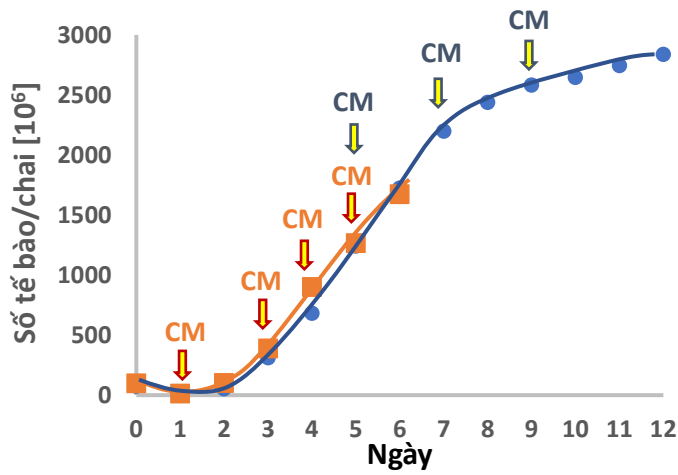
- d. 10 vật liệu mang: xử lý trypsin, thu và đếm tế bào (xem quy trình thu tế bào)
- e. Thay môi trường nuôi cấy khi:
 - a. Nồng độ Glucose giảm xuống dưới 1g/L
- f. Duy trì pH > 6.80
 - a. Nếu pH giảm xuống 7.10, giảm nồng độ CO₂%. Nếu CO₂% đã giảm xuống ngưỡng 0%, thêm lượng nhỏ dung dịch Natri bicarbonate solution (trong khoảng 0.1g/L), theo dõi trong 3 giờ tiếp. Bổ sung natri bicarbonate nếu cần.

Thu tế bào

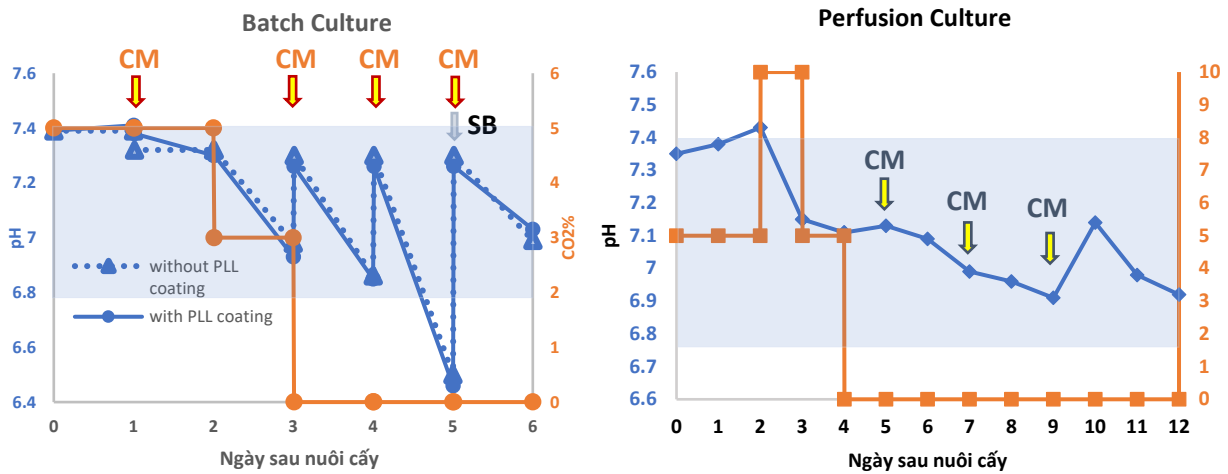
- a. Dùng dụng cụ lọc (rây nhựa) để đổ môi trường ra một cốc đựng dung dịch và giữ lại vật liệu mang trong chai CC
- b. Rửa vật liệu mang với 250ml PBS, nhẹ nhàng úp ngược chai nuôi cấy (sử dụng nắp trắng), xoay đều chai trong 20 giây để vật liệu mang ngập trong dung dịch PBS
- c. Loại bỏ dung dịch
- d. Thực hiện rửa với PBS một lần nữa
- e. Loại bỏ dung dịch
- f. Đổ 120-150ml dung dịch 0.05% trypsin được làm ấm vào chai CC và đầy bằng nắp trắng
- g. Úp ngược chai để các vật liệu mang nằm hoàn toàn trong dung dịch.
- h. Đặt chai CC vào tủ ấm 37°C trong 15-20 phút
- i. Trung hòa bằng 15ml FBS100%
- j. Úp ngược chai và giữ ở vị trí này, sau đó lắc và táp chai vào lòng bàn tay trong 1 phút (xem video gửi kèm)
- k. Thu dịch tế bào sử dụng rây nhựa
- l. Lặp lại bước thu thêm ít nhất 4 lần với 100ml dung dịch môi trường
- m. Thu toàn bộ dịch tế bào
- n. Ly tâm lạnh ở 400x g trong 10 phút
- o. Loại bỏ dịch ly tâm
- p. Trộn đều tế bào với môi trường
- q. Đếm tế bào sống
- r. Tế bào thu được có thể sử dụng làm tế bào giống cho TideXcell-002 hoặc tạo ngân hàng tế bào với mật độ cao.

Kết quả

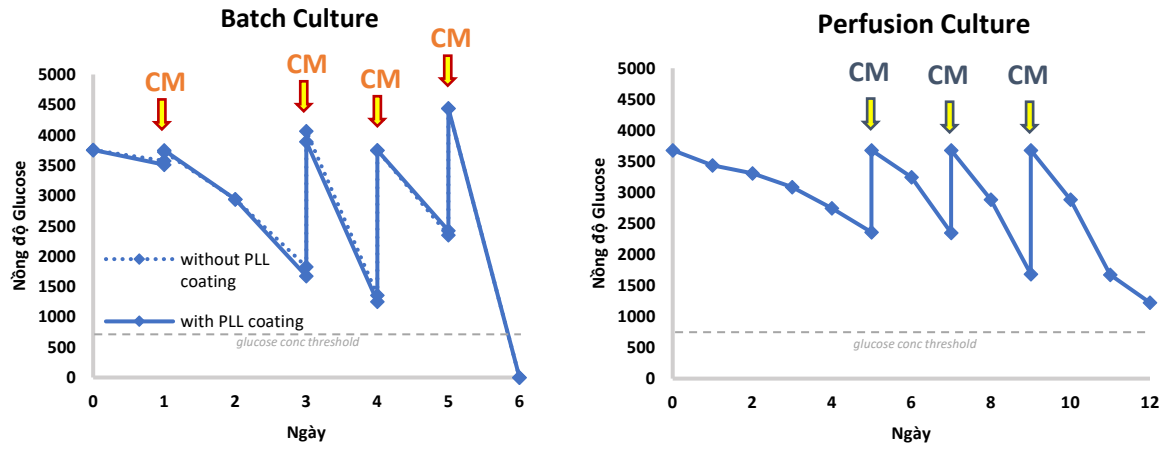
Đồ thi sinh trưởng tế bào (cam: 500A; xanh dương: 500AP)



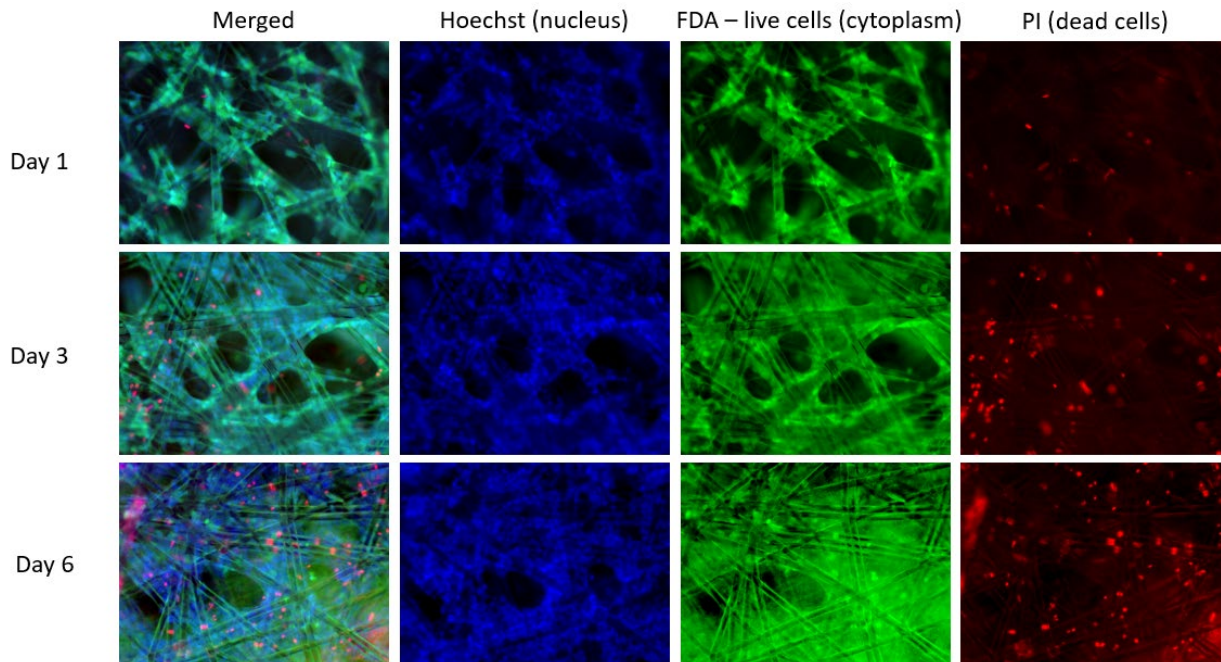
Theo dõi pH và CO₂%



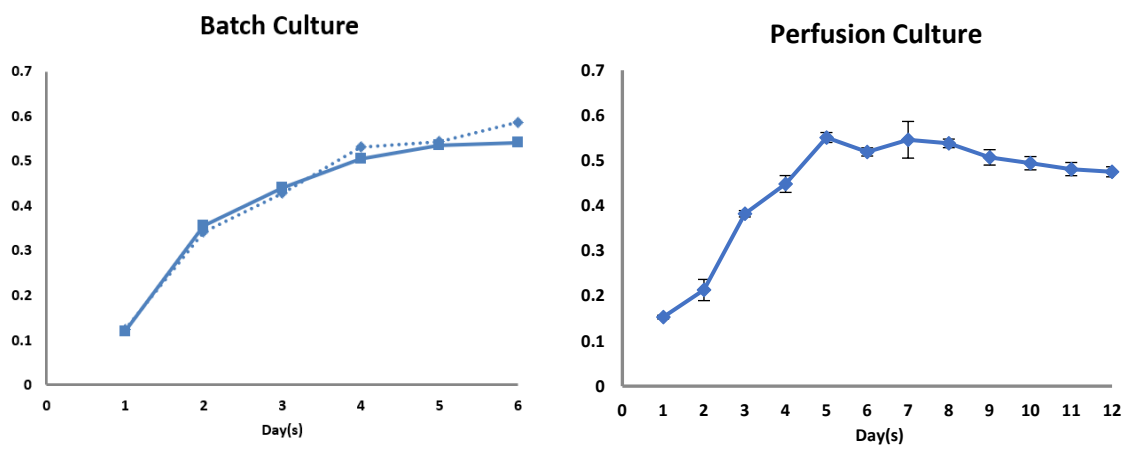
Theo dõi Glucose



Nhuộm tế bào

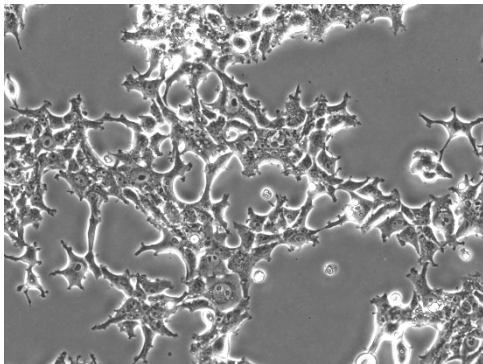


Hoạt động chuyển hóa tế bào

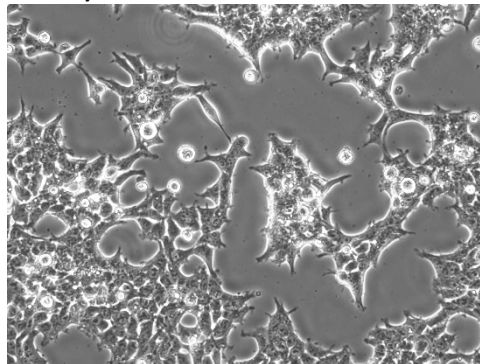


Tế bào thu từ vật liệu mang duy trì được hình thái của tế bào bình thường

Tế bào được chuẩn bị cho cấy **Ngày 0**



Tế bào thu hoạch từ CC (**Ngày 6**) cấy trở lại chai nuôi cấy 2D



Hiệu quả thu hoạch đạt >90%, và > 95% số tế bào thu được sống sót. Tế bào thu được từ CelCradle được cấy trở lại trên đĩa qua đêm. Tế bào duy trì được hình thái của tế bào bình thường.