

Quy trình thử nghiệm vật liệu mang BioNOC™ II ứng dụng Tide Motion (mô phỏng vận động thủy triều)

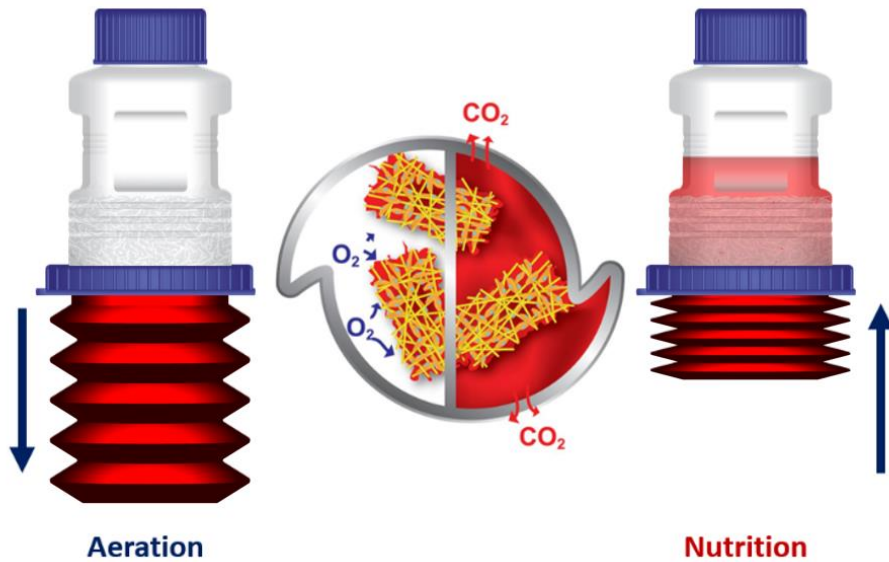
Nội dung

Giới thiệu.....	2
Sinh trưởng tế bào trên vật liệu mang BioNOC™ II với thiết bị CelXrocker™	2
Nuôi cấy tế bào trên CelXrocker™	3
Khử trùng vật liệu mang BioNOC™II	3
Phủ lớp gắn kết tế bào (nếu được yêu cầu).....	3
Cấy tế bào lên vật liệu mang.....	3
Nuôi cấy tế bào	4
Theo dõi sinh trưởng tế bào trên vật liệu mang BioNOC™ II.....	5
Thu hoạch và đếm tế bào.....	5
Nhuộm và quan sát tế bào.....	6
Hình ảnh minh họa nhuộm vật liệu mang.....	7

Giới thiệu

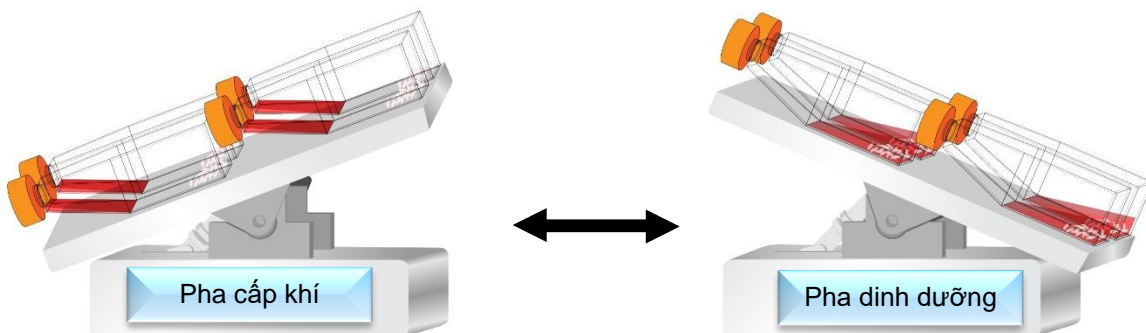
Sinh trưởng tế bào trên vật liệu mang BioNOC™II với thiết bị CelXrocker™

Bằng cơ chế giãn và nén tạo lực đẩy môi trường vào và ra khỏi vật liệu mang, thiết bị nuôi cấy công nghệ Tide Motion giúp vận chuyển hiệu quả khí và chất dinh dưỡng (Hình 1).



Hình 1: CelCradle™ vận hành dựa trên nguyên lý thủy triều, các tế bào bám trên vật liệu mang BioNOC™II được luân phiên 2 pha: pha cấp khí và pha cấp chất dinh dưỡng nhờ cơ chế giãn và nén từ phía dưới giúp môi trường đẩy vào và ra.

CelXrocker™ là thiết bị ứng dụng TideMotion ở quy mô nhỏ giúp thực hiện quá trình thử nghiệm với chi phí thấp. Trong hệ thống này, tế bào giống được cấy lên vật liệu mang BioNOC™II và chuyển vào chai nuôi cấy trước khi đặt lên thiết bị rocker. Chuyển động bập bênh mô phỏng hệ thống Tide Motion bởi nó tạo ra 2 pha luân phiên cấp khí và cấp chất dinh dưỡng đồng thời đảm bảo môi trường nuôi cấy được làm đều nhẹ nhàng (Hình 2).



Hình 2: Giản đồ biểu diễn chuyển động bập bênh của chai nuôi cấy mô phỏng nguyên lý thủy triều Tide Motion như trên thiết bị CelCradle™ bằng việc tạo ra 2 pha luân phiên: pha khí và pha dinh dưỡng sử dụng CelXrocker.

Nuôi cấy tế bào trên CelXrocker™

Khử trùng vật liệu mang BioNOC™ II

1. Khử trùng BioNOC™ II trong chai/bình bằng vật liệu chịu nhiệt
2. Khử trùng vật liệu mang trong dung dịch PBS. Đảm bảo toàn bộ vật liệu mang được nằm trong dung dịch PBS.
3. Khử trùng ở 121°C trong 20 phút.
4. Bảo quản vật liệu mang trong PBS đến khi sử dụng.

Lưu ý: Tránh khử trùng khô vật liệu mang bởi có thể dẫn đến phá vỡ cấu trúc bề mặt của vật liệu.

Phủ lớp gắn kết tế bào (nếu được yêu cầu)

1. Chuyển vật liệu mang đã khử trùng vào ống falcon.
2. Hút sạch PBS.
3. Phủ lớp gắn kết lên vật liệu mang Toàn bộ vật liệu mang được nằm hoàn toàn trong dung dịch chất gắn kết với thời gian ủ và thể tích thích hợp.
4. Loại bỏ dung dịch chất gắn kết sau khi ủ.
5. Rửa sạch với PBS nếu cần thiết.
6. Bảo quản vật liệu mang đã được phủ gắn kết (XX-coated BioNOC™ II) (bảo quản ở nhiệt độ phù hợp cho đến khi sử dụng).

Cấy tế bào lên vật liệu mang

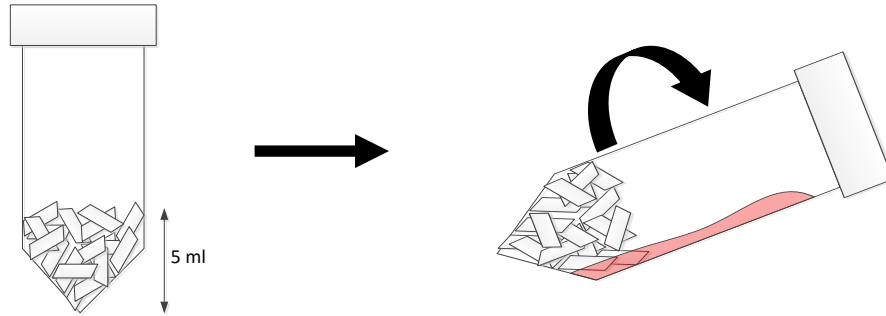
1. Chuyển 30 vật liệu mang vào falcon 50ml.
2. Ủ vật liệu mang với lượng tế bào theo yêu cầu trong ống falcon. Lượng tế bào giống tối ưu cấy trên 1 vật liệu mang được gợi ý như bảng 1.
3. Thêm môi trường vào ống falcon đảm bảo toàn bộ vật liệu mang được nằm hoàn toàn trong dung dịch. Giá trị pH được duy trì trong khoảng 7.0 – 7.4 (pH tối ưu là 7.2)

Loại tế bào	Mật độ tế bào giống (số tế bào/vật liệu mang)
Chick embryo fibroblasts (CEF)	300,000 – 500,000
A-549	200,000 – 300,000
Chinese hamster ovary cells (CHO)	100,000 – 300,000
HEK293T / PK-15 / IBRS-2	100,000 – 300,000
Vero	100,000 – 300,000
Hybridoma (OKT3)	100,000 – 300,000
MDCK	60,000 – 120,000
Leghorn male hepatoma (LMH)	50,000 – 200,000
MARC-145	50,000
Human mesenchymal stem cells (hMSCs)	20,000 – 60,000
Human diploid cells (WI-38 / MRC-5)	15,000 – 20,000

Bảng 1: Mật độ cấy tối ưu ở các loại tế bào khác nhau.

Lưu ý: Vật liệu mang phù hợp với nhiều loại tế bào khác nhau. Vui lòng liên hệ với chúng tôi nếu loại tế bào bạn đang sử dụng không được đề cập ở đây.

4. Nhẹ nhàng nghiêng ống và xoay 2-3 lần để dung dịch tế bào được trộn đều với vật liệu mang (Mô tả như hình bên dưới).



Lưu ý: Tránh nghiêng ống quá 90° hạn chế làm hao hụt tế bào giống.

5. Ủ tế bào với vật liệu mang trong 3-5 tiếng trong tủ ấm (37°C, 5%CO₂), nới lỏng nắp ống falcon đảm bảo cân bằng CO₂.
6. Trong giờ ủ đầu tiên cứ 15 phút, vặn chặt nắp, nhẹ nhàng nghiêng ống và xoay (như mô tả bước 4) làm đều lượng tế bào chưa bám trong dung dịch. Vặn lỏng nắp và đặt lại vào tủ ấm.
7. Trong 2-3 giờ ủ tiếp theo, cứ 30 phút thực hiện lặp lại bước 6.
8. Sau 3 giờ ủ tế bào, mang falcon vào tủ an toàn sinh học cấp II, nghiêng ống và xoay từ từ, thu ~50 µl dung dịch và đếm tế bào. Đếm lượng tế bào còn trong dung dịch để xác định hiệu suất gắn tế bào.
9. Nếu hiệu suất gắn đạt ≥ 90% (i.e. dưới 10% lượng tế bào giống còn trong dung dịch), tiến hành bước tiếp theo. Nếu hiệu suất chưa đạt mong muốn, tiếp tục ủ và theo dõi. Tuy nhiên, quá trình gắn thường kết thúc trong 3-5 giờ.

Lưu ý: Để đảm bảo hiệu suất gắn tế bào, tối thiểu 3 vật liệu mang trong ống falcon 15ml và 10 vật liệu mang trong với falcon 50ml. Thêm lượng môi trường đảm bảo vật liệu mang nằm trong dung dịch. Nếu không sử dụng ống falcon, hiệu suất gắn tối ưu có thể không đạt.

Nuôi cấy tế bào

1. Đặt thiết bị rocker vào tủ ấm CO₂ 37°C, 5%CO₂. Điều chỉnh tốc độ 4 chu kỳ trong 1 (mỗi chu kỳ được tính chuyển động rocker từ trái → phải → trái).
2. Sau khi hoàn thành bước cấy tế bào giống, sử dụng kẹp dài từ từ chuyển vật liệu mang từ ống ly tâm sang chai nuôi cấy T-75 chứa 18 ml (0.6 ml môi trường/vật liệu mang) môi trường.
3. Ly tâm và đếm tế bào số tế bào còn lại trong dung dịch, xác định hiệu suất gắn kết cuối cùng.
4. Đặt chai nuôi cấy lên rocker trong tủ ấm CO₂ 37°C, 5% CO₂ (hoặc các điều kiện nuôi cấy tùy thuộc loại tế bào).
5. Thay môi trường trong 2-3 ngày theo quy trình nuôi cấy của loại tế bào sử dụng.

Lưu ý: Sau khi cấy, tế bào bám chưa chắc chắn vào vật liệu mang, cần thao tác nhẹ nhàng để tránh tế bào tách khỏi vật liệu mang.

Lưu ý: Sử dụng thiết bị Esco CelXrocker™ hoặc 2D rocker với tốc độ chậm và nhẹ nhàng 4-6 chu kỳ trong 1 phút. Nếu tốc độ quá nhanh, tế bào có thể bị tách khỏi vật liệu mang hoặc sinh trưởng tế bào giảm. Trong trường hợp này, có thể cân nhắc nuôi tế bào trong điều kiện tĩnh, tuy nhiên, tế bào có thể không đạt sự sinh trưởng cực đại do môi trường dinh dưỡng thiếu. Trong trường hợp không sử dụng rocker, thêm đủ lượng môi trường và nuôi tĩnh tế bào. Sử dụng 2D rocker tạo điều kiện tối ưu cho thử nghiệm, thiết bị tạo ra chuyển động luân phiên qua trái và qua phải. Lựa chọn orbital rocker, 3D rocker hoặc nuôi cấy tĩnh có thể thu được kết quả không tối ưu.

Lưu ý: Các giá trị đưa ra khi nuôi cấy trên 30 BioNOC™II. Lượng môi trường và kích thước chai nuôi cấy có thể thay đổi theo số lượng BioNOC™II thử nghiệm. Ví dụ, Nếu nuôi cấy trên 50 vật liệu mang BioNOC™II,

cần sử dụng chai nuôi cấy T-175 với 30ml môi trường. Không vượt quá 5ml môi trường (10 vật liệu mang) trong 1 chai T-25 hoặc 18ml môi trường (30 vật liệu mang) trong 1 chai T-75 hoặc 30ml môi trường (50 vật liệu mang) trong 1 chai T-175 để tránh làm ướt màng lọc ở nắp chai trong quá trình nuôi, tránh nhiễm chéo trong toàn bộ các bước thực hiện.

Lưu ý: 0.6ml môi trường/vật liệu mang được khuyến nghị cho thử nghiệm ban đầu, có thể điều chỉnh đối với các loại tế bào khác nhau. Thể tích 0.6 ml/vật liệu mang mô phỏng thể tích tương đương khi nuôi cấy trên CelCradle (500ml môi trường cho 850 vật liệu mang trong 1 chai nuôi cấy). Tuy nhiên, lượng môi trường sử dụng có thể thay đổi khi nuôi cấy trên hệ thống perfusion CelCradle, được hiểu là môi trường được tự động trao đổi tuần hoàn với chai nuôi cấy.

Lưu ý: Trong những thử nghiệm đầu tiên, chúng tôi khuyến nghị theo dõi tăng trưởng tế bào trong suốt quá trình nuôi cấy. Thực hiện cách ngày việc thu và đếm số tế bào từ 3 mẫu vật liệu mang. Thu 1- 2 vật liệu mang nhuộm cùng ngày và quan sát sự sinh trưởng tế bào trực tiếp trên vật liệu mang (chi tiết được mô tả như quy trình bên dưới).

Theo dõi sinh trưởng tế bào trên vật liệu mang BioNOC™ II

Thu hoạch và đếm tế bào

1. Dùng enzyme tách

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

1. Chuyển 3 vật liệu mang từ chai nuôi cấy vào tube ly tâm 1.5ml.
2. Nhẹ nhàng rửa với 1ml PBS không chứa Ca^{2+} và Mg^{2+} , thực hiện 3 lần (nhẹ nhàng đảo tube lên xuống 5 lần mỗi lần rửa).
3. Thực hiện tách bằng Enzyme:
 - i. Trypsin/ TrypLE Express: (hầu hết các loại tế bào)
 - Thêm 1ml 0.05 – 0.25% Trypsin-EDTA, ủ 37°C trong 10-15 phút.
 - ii. Accumax/ Accutase: (phù hợp với tế bào gốc)
 - Thêm 1ml Accumax/ Accutase, ủ nhiệt độ phòng trong 15-30 phút. (Thời gian ủ phụ thuộc mật độ tế bào, nên thực hiện thí nghiệm tối ưu thời gian ủ 15 phút, 20 phút và 30 phút). Accumax được cho là thích hợp trong nuôi cấy 3D. Tuy nhiên, người sử dụng hoàn toàn có thể dùng enzyme và phương pháp tách tế bào hiện tại.
 - iii. Collagenase: (phù hợp với tế bào gốc)
 - Pha loãng Collagenase II (Thermo Scientific, Cat 17101) để đạt nồng độ thích hợp chứa 100 unit/ml trong HBSS.
 - Thêm 1ml collagenase và ủ 15-30 phút (có thể tối ưu thời gian ủ enzyme nếu cần thiết).
4. Sau khi ủ với enzyme, chuyển dung dịch enzyme sang ống ly tâm 15ml.
5. Thêm hóa chất trung hòa enzyme hoặc PBS (tùy theo loại enzyme sử dụng) vào tube ly tâm 1.5 ml chứa vật liệu mang, sử dụng 1 đầu của kẹp gậy vào đáy tube liên 40-60 lần.
6. Chuyển dung dịch vào cùng ống ly tâm 15 ml trên.
7. Lặp lại 5 - 6 lần, tối thiểu thêm 3 lần rửa với 1ml PBS hoặc môi trường.
8. Đếm tế bào trực tiếp hoặc ly tâm, thu tế bào, trộn tế bào trong thể tích phù hợp và đếm.
9. Tính số tế bào trung bình trên 1 vật liệu mang.
10. Cấy tế bào thu được trên chai nuôi cấy hoặc trên các phiến nhiều giếng, kiểm tra hình thái và tỉ lệ sống sót sau thu hoạch.

Lưu ý: Thu toàn bộ vật liệu mang trong chai nuôi cấy, điều chỉnh lượng enzyme đảm bảo toàn bộ vật liệu mang nằm trong enzyme (khoảng 1,5 – 2ml cho 10 vật liệu mang). Nghiêng chai nuôi cấy để vật liệu mang nằm trong dung dịch enzyme

2. Dùng CVD (Crystal Violet Dye)

Lưu ý: CVD được cung cấp bởi ESCO, catalog no.1400014. Tế bào gốc tiết lượng lớn ECM, do vậy CVD không phù hợp sử dụng cho tế bào gốc.

1. Chuyển 3 vật liệu mang BioNOC™II từ chai nuôi cấy sang tube ly tâm 1.5ml
2. Thêm 0.5 ml CVD vào mỗi tube.
3. Vortex các tube trong 60 giây.
4. Ủ trong 2 giờ trong tủ ấm 37°C.
5. Thực hiện vortex vài lần trong quá trình ủ.
6. Đếm nhân và tính trung bình số tế bào trên 1 vật liệu mang.

Nhuộm và quan sát tế bào

1. Nhuộm tế bào

1. Chuyển 1-2 BioNOC™II từ chai nuôi cấy vào phiến 24 giếng.
2. Hút sạch dịch môi trường và cố định tế bào bằng ethanol 70% - 100% trong 15 phút.
3. Rửa sạch ethanol bằng nước khử ion hoặc PBS.
4. Nhuộm tế bào bằng hematoxylin, hoặc H&E trong 5-10 phút.
5. Rửa sạch thuốc nhuộm bằng nước khử ion.
6. Quan sát tế bào dưới kính hiển vi.

Lưu ý: Có thể sử dụng các loại thuốc nhuộm khác nhau, ví dụ. Trypan blue. Sử dụng thuốc nhuộm huỳnh quang để quan sát tế bào tốt còn lại trên vật liệu mang sau khi thu hoạch. Không dùng thuốc nhuộm màu đối với trường hợp sau thu hoạch.

2. Nhuộm tế bào sống với thuốc nhuộm huỳnh quang

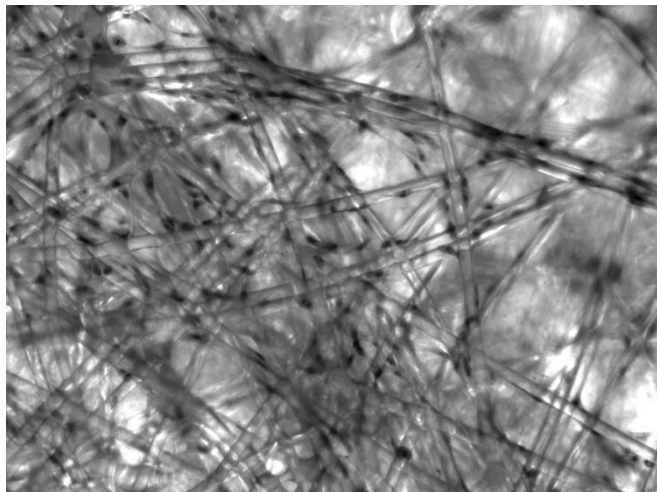
1. Chuyển 1-2 BioNOC™II từ chai nuôi cấy sang phiến 24 giếng.
2. Thêm 500 µl môi trường vào mỗi giếng. Thêm thuốc nhuộm ở nồng độ: 1 µg/ml Hoechst 33342 (Thermo Fisher, H3570), 1 µM calcein green (Thermo Fisher, C34852 và 1 µg/ml PI (propidium iodide, Sigma Aldrich P4170) trong môi trường.
3. Ủ trong 30 phút ở 37°C, 5% CO₂ trước khi chụp ảnh ở các bộ lọc khác nhau (Xanh dương - Hoechst 33342, xanh lá - calcein green và đỏ - PI).

Lưu ý: Các thuốc nhuộm huỳnh quang có thể được sử dụng để quan sát tế bào. Ví dụ. fluorescein diacetate, Cell tracker etc.

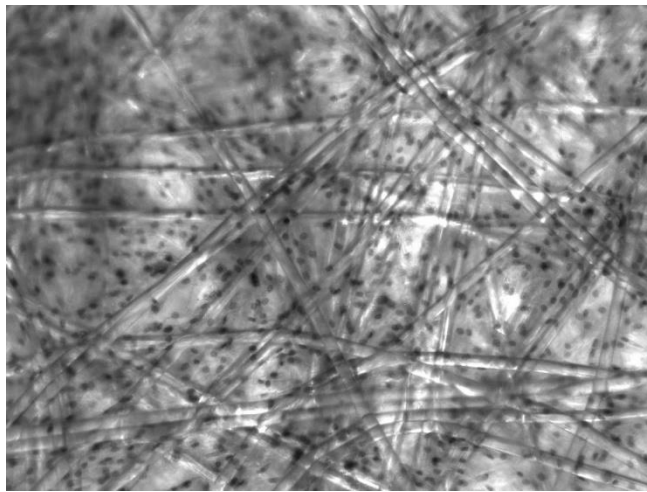
Hình ảnh minh họa nhuộm vật liệu mang

1. Tế bào gốc trung mô MSC được cố định và nhuộm với hematoxylin

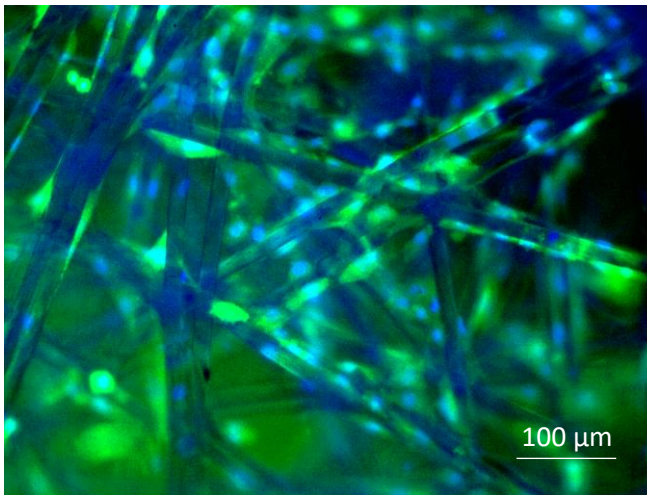
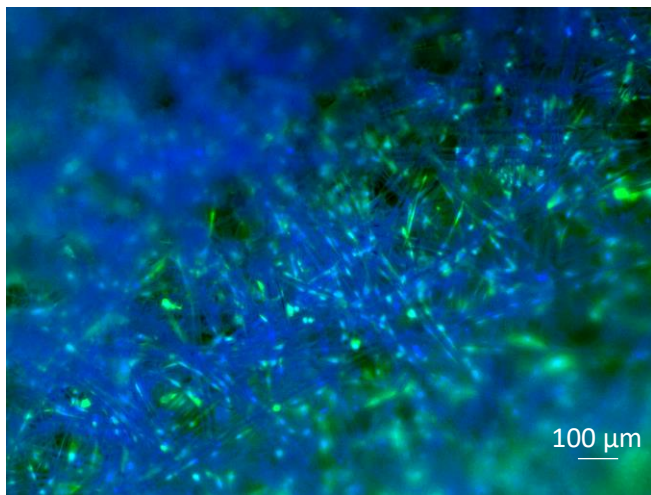
Ngày 1



Ngày 3



2. Tế bào gốc trung mô MSC được nhuộm huỳnh quang



Xanh lá: Calcein green nhuộm tế bào chất, xanh dương: Hoechst 33342 nhuộm nhân, đỏ: propidium iodide nhuộm tế bào chết (không thấy hoặc rất ít được quan sát)