21 Changi South Street 1 Singapore 486777
Tel: +65 65420833 | Fax: +65 65426920

Quy trình nuôi cấy tế bào trên thiết bị CelCradle™

Nội dung

VẬT LIỆU 2
PHƯƠNG PHÁP 3
Phủ lớp gắn kết lên vật liệu mang (Khuyến nghị khi sử dụng môi trường không chứa huyết thanh) 3
Chuẩn bị tế bào giống 3
Ủ tế bào 3
Nuôi tăng sinh tế bào 4
Nuôi cấy với hệ thống trao đổi môi trường tự động (perfusion system CelCradle™ 500AP) 4
Theo dõi sinh trưởng tế bào (Tham khảo phụ lục A) 4
Thu hoạch tế bào 5
Nhuộm với hóa chất 7
Nhuộm tế bào với thuốc nhuộm huỳnh quang 7
Cố định và nhuộm tế bào với thuốc nhuộm thông thường 7
Theo dõi sinh trưởng tế bào 7
Bằng enzyme tách 7
Tính lượng Glucose tiêu thụ (bằng thiết bị GlucCell hoặc biochemical analyzer) 8
Theo dõi pH 8
Phụ lục B 9
Thu hoạch tế bào từ chai nuôi cấy CelCradle 9
Phụ lục C (Kết quả) 10
Nhuộm tế bào sống 10
Nhuộm Hemotoxylin 11
Nhuộm Trypan Blue 11
Nhuộm sau khi thu hoạch 12
Tế bào đạt hợp lưu cao 12
Sinh trưởng tế bào 13
Theo dõi sự tiêu thụ Glucose 13
Theo dõi pH 14

Esco Aster © All Rights Reserved

VẬT LIỆU

- Dung dịch gắn kết tế bào MSC - MSC Attachment Solution (Biological Industries, 05-752-1) / hóa chất gắn kết khác
- Đệm PBS không chứa Mg2+/Ca2+
- Tế bào gốc trung mô MSC
- Môi trường nuôi cấy - MSC NutriStem® XF Medium (Biological Industries, 05-200-1A-KT) hoặc loại môi trường khác
- CelCradle Stage 3000
- CelCradle™ 500A (EscoAster/VaccixCell) hoặc CelCradle™ 500AP
- Bơm Celfeeder
- Thiết bị đo Glucose - GlucCell Monitoring System (GlucCell Meter + Strips)
- Thiết bị đo pH
- Kẹp dài
- Dụng cụ lọc
- Hóa chất nhuộm Trypan Blue / Hemotoxylin
- Florescent Diacetate (FDA) (1 µg/ml) (ThermoFisher Scientific)
- Propidium Iodide (PI) (1 µg/ml) (ThermoFisher Scientific)
- Hoechst 33342 (1 µg/ml) (ThermoFisher Scientific)
- Enzyme tách tế bào (0.05% Trypsin-EDTA/ Tryple Express/ Accutase/ Accumax)

PHƯƠNG PHÁP

Phủ lớp gắn kết lên vật liệu mang (Được khuyến nghị khi sử dụng môi trường không chứa huyết thanh)

a. Chuyển chai nuôi cấy CelCradle (CC-500A hoặc CC-500AP) vào tủ An toàn sinh học cấp II
b. Phủ vật liệu mang với 120 ml fibronectin hoặc dung dịch chất gắn kết khác (BI, 05-752-1) trong 30 phút ở 37°C
c. Loại bỏ toàn bộ dung dịch
d. Rửa 2 lần với 120ml PBS, xoay nhẹ chai nuôi cấy trong khi rửa.
e. Chuyển sang bước ủ với tế bào

Lưu ý: Tham khảo quy trình phủ vật liệu mang của nhà sản xuất

Chuẩn bị tế bào giống

Chuẩn bị 5 chai nuôi cấy T-175 để thu tổng lượng tế bào giống cho 1 chai CelCradle là 2-3 x 10^7.

Ủ tế bào

1. 2-3 x 10^7 tế bào giống được trộn đều trong 120 ml môi trường ấm (pH trong khoảng 7.2-7.4 – nếu được yêu cầu theo quy trình, thêm 15 mM of HEPES để đảm bảo ổn định pH trong quá trình cấy).
2. Phân bố đều lượng tế bào trên toàn bộ vật liệu mang.
3. Đặt nắp chai nuôi cấy xanh có màng lọc vào đĩa petri sạch đảm bảo sạch cho việc sử dụng sau cấy.
4. Sử dụng nắp trắng kín nắp chặt chai CelCradle trong quá trình ủ với tế bào.
5. Úp ngược chai nuôi cấy và đảm bảo toàn bộ vật liệu mang rơi xuống phần nắp và ngập trong dung dịch.
6. Xoay đều chai nuôi cấy ở vị trí úp ngược để đảm bảo tế bào phân bố đều trong dung dịch.
7. Đặt chai nuôi cấy (giữ ở vị trí úp ngược) vào tủ ấm 37°C, 5% CO_2 (hoặc ở điều kiện thích hợp tùy thuộc loại tế bào nuôi cấy).
8. Ủ tế bào với vật liệu mang trong 3 giờ. Cứ mỗi 30 phút, nghiêng nhẹ và xoay từ từ chai nuôi cấy để các tế bào chưa bám tái phân bố đều.
   Lưu ý: Bước trên cần được thao tác nhẹ nhàng đảm bảo tế bào không bị tách khỏi vật liệu mang trong quá trình xoay chai.
9. Sau 3 giờ, hút 10ml dung dịch từ chai CelCradle.
10. Ly tâm thu cặn tế bào và trộn đều trong thể tích môi trường thích hợp và đếm tế bào để xác định số tế bào còn lại trong dung dịch. Tính hiệu suất bám tế bào.

$$Hiệu\ suất\ bám\ tế\ bào\ = \frac{Tổng\ số\ tế\ bào\ giống\ - Tổng\ số\ tế\ bào\ không\ bám}{Tổng\ số\ tế\ bào\ giống} * 100\%$$

11. Tiến hàng bước tiếp theo nếu hiệu suất bám của tế bào lên vật liệu mang đạt trên 90%

Lưu ý: Phụ thuộc môi trường, huyết thanh và hóa chất dùng phủ vật liệu mang, tế bào MSCs hoàn toàn có thể đạt hiệu suất bám >90% sau 2 giờ. Chúng tôi khuyến nghị nên kết thúc quá trình cấy tế bào sau 4 giờ dù hiệu suất bám chưa đạt mong muốn, và tiến hành bước nuôi tăng sinh tế bào.

Nuôi tăng sinh tế bào

1. Thêm môi trường để đạt thể tích 500ml trong 1 chai nuôi cấy CelCradle.
2. Đặt chai nuôi cấy lên thiết bị. Cài đặt thông số như bên dưới và nhấn “Start” để khởi động và bắt đầu quá trình nuôi.
   i. Top: 1.0 mm/s, Top Holding: 10 s
   ii. Down: 1.0 mm/s, Bottom Holding: 30 s

Nuôi cấy với hệ thống trao đổi môi trường tự động (perfusion system CelCradle™ 500AP)

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

a. Chai cấp môi trường trao đổi 1L chứa 1L môi trường (Phụ thuộc lượng môi trường sử dụng và thời gian nuôi tế bào)
b. Nối với chai nuôi cấy CelCradle 500AP và bơm
c. Cài đặt chương trình như sau:
   i. Thể tích trao đổi môi trường (1999 ml)
   ii. Ngày bắt đầu quá trình trao đổi môi trường (Tất cả các ngày nuôi bắt đầu từ ngày nuôi thứ 3)
   iii. Tần suất thực hiện trao đổi: 24 chu kỳ/ngày

Lưu ý: Tham khảo hướng dẫn sử dụng của bơm.

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

Chúng tôi khuyến nghị nên thực hiện theo dõi hàng ngày các chỉ số cơ bản liên quan đến chuyển hóa như nồng độ glucose trong môi trường, pH môi trường để xác định thời điểm cần thay môi trường hoặc bổ sung thêm glucose nhằm tối ưu hóa điều kiện thử nghiệm.

a. 3 ml môi trường: pH và đo nồng độ
b. 3 vật liệu mang: nhuộm tế bào với FDA, PI, Hoechst theo quy trình.
c. 10 vật liệu mang: dung enzyme tách tế bào, thu và đếm tế bào sống (chi tiết mô tả phần tiếp theo)
d. Thay môi trường nuôi cấy khi:
   a. Nồng độ Glucose giảm xuống thấp
   b. pH dưới 7.00
   c. 3 ngày (Theo quy trình nuôi cấy 2D nếu glucose và pH vẫn ổn định)
f. Thu hoạch tế bào khi mật độ tế bào đạt tối đa trong khoảng ngày 5-7 (Tránh nuôi tế bào đến mật độ quá dày cả khi nuôi trên chai nuôi cấy T-flask)

Lưu ý: Tốc độ tăng trưởng và số tế bào cực đại có thể ảnh hưởng đến số thế hệ tế bào, môi trường và huyết thanh sử dụng. Tham khảo tài liệu đề cập đến loại môi trường, huyết thanh sử dụng cho tế bào gốc trung mô MSCs.

Lưu ý: Tiêu thụ Glucose hoặc tổng số tế bào có thể được sử dụng như thước đo độ hợp lưu. Tế bào bám và nhô ra phần cạnh và mép của vật liệu mang hình thành cấu trúc mạng lưới tế bào khỏe mạnh khi đạt hợp lưu cao (Phụ lục C).

Thu hoạch tế bào

1. Dùng dụng cụ lọc đổ dung dịch môi trường trong chai ra cốc đựng.
2. Nhẹ nhàng rửa 2 lần với 500 ml PBS.
3. Loại bỏ dung dịch PBS sau 2 lần rửa.
4. Thêm 120 – 150 ml dung dịch enzyme ấm vào chai nuôi cấy và dung nắp trắng kín vặn chặt.
5. Úp ngược chai để toàn bộ vật liệu mang ngập trong dung dịch enzyme trong 15 – 30 phút trong tủ ấm.
6. Đổ phần dung dịch enzyme ra cốc đựng (hoặc có thể loại bỏ nếu dung dịch chứa lượng không đáng kể tế bào).
7. Thêm 120 ml dung dịch chứa chất bất hoạt enzyme (soybean inhibitor/ môi trường chứa huyết thanh) vào chai và vặn chặt chai.
   Lưu ý: Môi trường đã sử dụng có thể dùng để bất hoạt enzyme.
8. Úp ngược chai nuôi cấy. Xoay và lắc nhẹ chai để toàn bộ vật liệu mang rơi xuống nắp.
9. Tác động vật lý:
   a. Phương pháp 1 (tham khảo phụ lục B):
      i. Úp ngược chai nuôi cấy, táp mạnh lòng bàn tay vào cạnh chai nuôi cấy 40 lần.
      ii. Xoay chai 90 độ và tiếp tục táp mỗi góc 40 lần.
      iii. Lặp lại chu kỳ 1 lần. (Tổng: 4 góc x 2 lần)

   b. Phương pháp 2:
      i. Đặt chai nuôi cấy vào thiết bị CelShaker và khởi động chu kỳ với tham số như sau:
         - Thời gian: 3 phút, tốc độ 400 rpm
10. Đổ/pipette chuyển dung dịch chứa tế bào vào cốc đựng.
11. Thêm 120 ml môi trường vào chai nôi cấy.
12. Lặp lại bước 8 đến 11 thêm 3 lần, trừ bước 11 ở lần cuối cùng.
13. Thu toàn bộ tế bào đem ly tâm và kiểm tra mật độ và tỉ lệ sống sót.
14. Nhuộm vật liệu mang sau khi thu té bào với thuốc nhuộm huỳnh quang (Fluorescein diacetate) xem xét hiệu quả thu hoạch.

Lưu ý: Nếu số lượng tế bào còn lại đáng kể trên vật liệu mang sau khi thu hoạch, cần tiến hành tối ưu bước thu hoạch. Tham khảo phần tiếp theo.

Lưu ý: Bước rửa ban đầu với PBS khá quan trọng, cần đảm bảo rửa sạch toàn bộ huyết thanh và tế bào chết. Một lượng nhỏ tế bào có thể bị tách khỏi vật liệu mang, phần lớn là tế bào chết. Công đoạn này có thể giúp tăng tỉ lệ sống sót tế bào.

Lưu ý: Thời gian ủ của enzyme cũng tối quan trọng cho hiệu quả thu hoạch. Phần lớn tế bào có giới hạn chịu đựng với trypsin-EDTA là 30 phút. Mật độ cao tế bào sẽ yêu cầu lượng enzyme và thời gian ủ nhiều hơn. Accutase (Innovative Cell Technologies, San Diego, CA) có thể cho phép ủ lâu hơn so với trypsin mà không gây ảnh hưởng đến tế bào.

Lưu ý: Enzyme collagenase có thể sử dụng làm tăng hiệu quả thu hoạch đối với tế bào gốc hoặc tế bào nguyên thủy bởi chúng thường giải phóng nhiều chất nền ngoại bào ECM khi nuôi 3D trên vật liệu mang BioNOC™ II.

PHỤ LỤC A

Nhuộm với hóa chất

Nhuộm tế bào với thuốc nhuộm huỳnh quang

1. Chuyển 3 BioNOC™ II từ CelCradle sang phiến 24 giếng.
2. Thêm 1 ml of môi trường nuôi cấy vào giếng. Thêm thuốc nhuộm ở nồng độ: 1 µg/ml Hoescht 33342 (Thermo Fisher, H3570) và 1 µg/ml propidium iodide (PI, Sigma Aldrich P4170).
3. Ủ vật liệu mang 20-30 phút ở 37°C, 5% CO_2
4. Thêm 1 µg/ml fluorescein diacetate (FDA, Thermo Fisher, C34852) vào giếng; tiến hành quan sát dưới kính hiện vi ở bộ lọc phù hợp và chụp ảnh (Xanh dương - Hoechst 33342, Xanh lá - FDA và đỏ - PI).

Lưu ý: Có thể sử dụng các hóa chất nhuộm huỳnh quang khác nhau. Eg. calcein green, acridine orange, Cell tracker etc.

Cố định và nhuộm tế bào với thuốc nhuộm thông thường

1. Thu 1-2 BioNOC™ II từ CelCradle.
2. Loại nước và cố định tế bào bằng ethannol 70% trong 5 phút.
3. Loại bỏ ethanol và rửa sạch 2 lần với nước khử ion hoặc PBS.
4. Nhuộm tế bào với trypan blue hoặc hematoxylin trong 5-10 phút.
5. Rửa sạch thuốc nhuộm bằng nước khử ion.
6. Quan sát vật liệu mang dưới kính hiển vi.

Lưu ý: Các hóa chất nhuộm khác có thể được sử dụng. Tuy nhiên, thuốc nhuộm huỳnh quang cho phép quan sát tế bào tốt hơn so với thuốc nhuộm thường trong trường hợp ít tế bào và rải rác trên vật liệu mang sau thu hoạch.

Theo dõi sinh trưởng tế bào

Bằng enzyme tách

Tác nhân enzyme tách: Chúng tôi khuyến nghị sử dụng loại enzyme hoạt tính nhẹ hơn trypsin bởi khi tăng thời gian ủ có thể trypsin có thể tác động tới tế bào. Chúng tôi đưa ra một số gợi ý enzyme có thể sử dụng thay thế:

1. Chuyển 3 vật liệu mang từ CelCradle sang tube ly tâm 1.5 ml.
2. Nhẹ nhàng rửa với 1 ml PBS. Loại bỏ PBS.
3. Lặp lại bước 2 thêm 4 lần.
4. Thêm enzyme tách tế bào:
   i. Trypsin
      - Thêm 1 ml 0.25% Trypsin-EDTA, ủ 37°C trong 15-30 phút.
   ii. TrypLE Express: (hầu hết loại tế bào)
      - Thêm 1 ml TrypLE Express, ủ 37°C trong 15-30 phút.
   iii. Accumax/ Accutase: (thích hợp với tế bào gốc)
      - Thêm 1 ml Accumax/ Accutase, ủ ở nhiệt độ phòng trong 15 - 30 phút. (Thời gian ủ phụ thuộc mật độ tế bào, có thể thực hiện thí nghiệm tối ưu thời gian ủ với enzyme ở 15 phút, 20 phút và 30 phút). Accumax được khuyến nghị sử dụng trong nuôi cấy 3D.
   iv. Collagenase: (thích hợp với tế bào gốc)

- Pha loãng collagenase loại I (Thermo Scientific, Cat 17101) đạt nồng độ thích hợp chứa 100 units/ml và 5 mM $CaCl_2$ được pha trong PBS.
- Thêm 1 ml collagenase và ủ trong 15 – 30 phút. (Tối ưu thời gian ủ với collagenase nếu cần thiết).

5. Thu dung dịch enzyme và chuyển qua ống 15 mL. Thêm 1 ml môi trường để trung hòa hoạt tính enzyme.
6. Dùng bút hoặc thanh kim loại gảy phần đáy ống 40 lần.
7. Chuyển dung dịch chứa tế bào sang ống 15 ml trên.
8. Thêm 1 ml PBS hoặc môi trường hoặc môi trường đã sử dụng rửa sạch tế bào khỏi vật liệu mang bằng pipette hút và nhả vài lần. Lặp lại bước 5 và 6.
9. Lặp lại bước 7 tối thiểu 3 lần nữa. (tổng 4 lần thu bằng PBS/môi trường đã sử dụng).
10. Ly tâm, thu tế bào và trộn tế bào với thể tích thích hợp để đếm tế bào trên hemocytometer. Tính số tế bào trung bình trên 1 vật liệu mang.

Lưu ý: Phụ thuộc mật độ tế bào, quy trình thu hoạch có thể được điều chỉnh nhằm tối ưu hiệu quả.

Tính lượng Glucose tiêu thụ (bằng thiết bị GlucCell hoặc biochemical analyzer)

1. Lấy ra 2 ml môi trường từ CelCradle để đo nồng độ Glucose bằng thiết bị GlucCell.
2. Thực hiện đo Glucose tại thời điểm T_N (Glucose T_N).
3. Khi thay môi trường mới, đo Glucose (Glucose T_0) coi là nồng độ ban đầu.
4. Glucose tiêu thụ: Glucose T_0 – Glucose T_N

Theo dõi pH

1. Lấy ra 2 ml môi trường từ CelCradle để đo pH.
2. Tiến hành đo ngay sau khi thu mẫu từ chai CelCradle để đảm bảo pH không bị thay đổi dưới điệu kiện phòng.

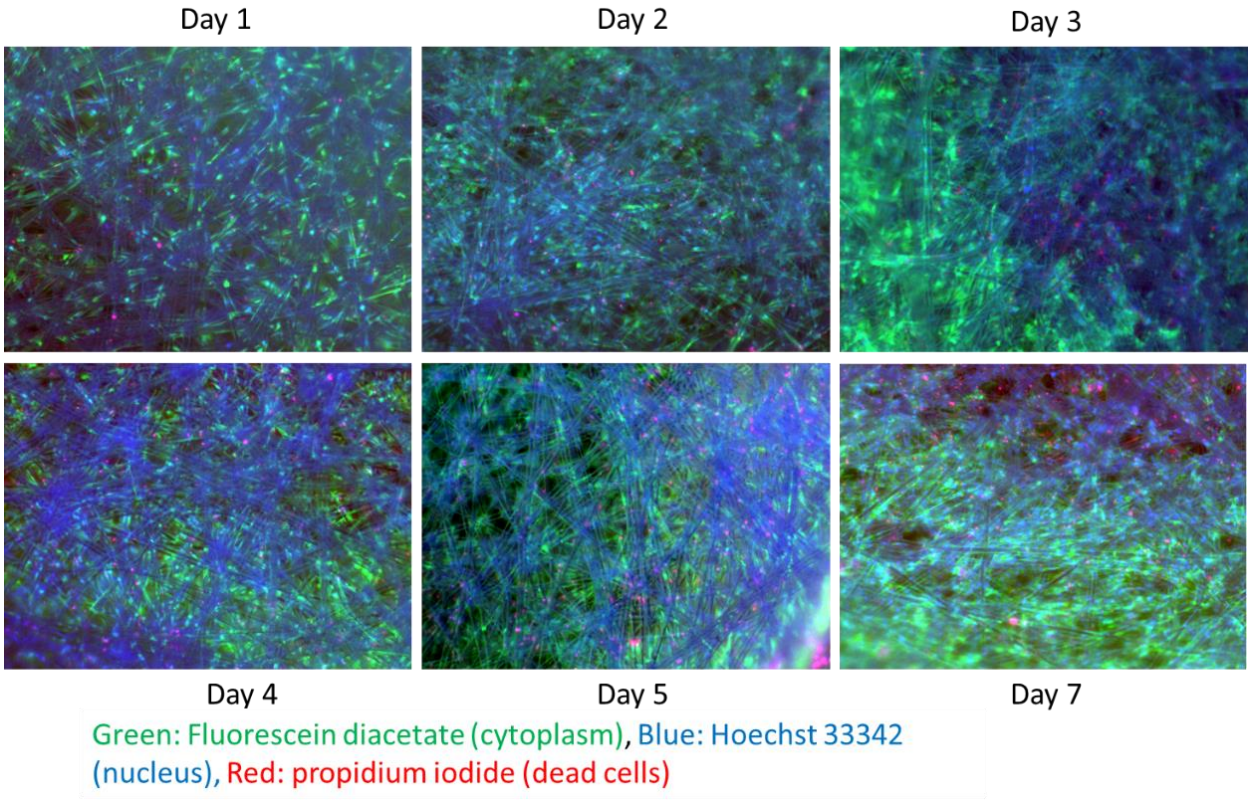
Phụ lục B

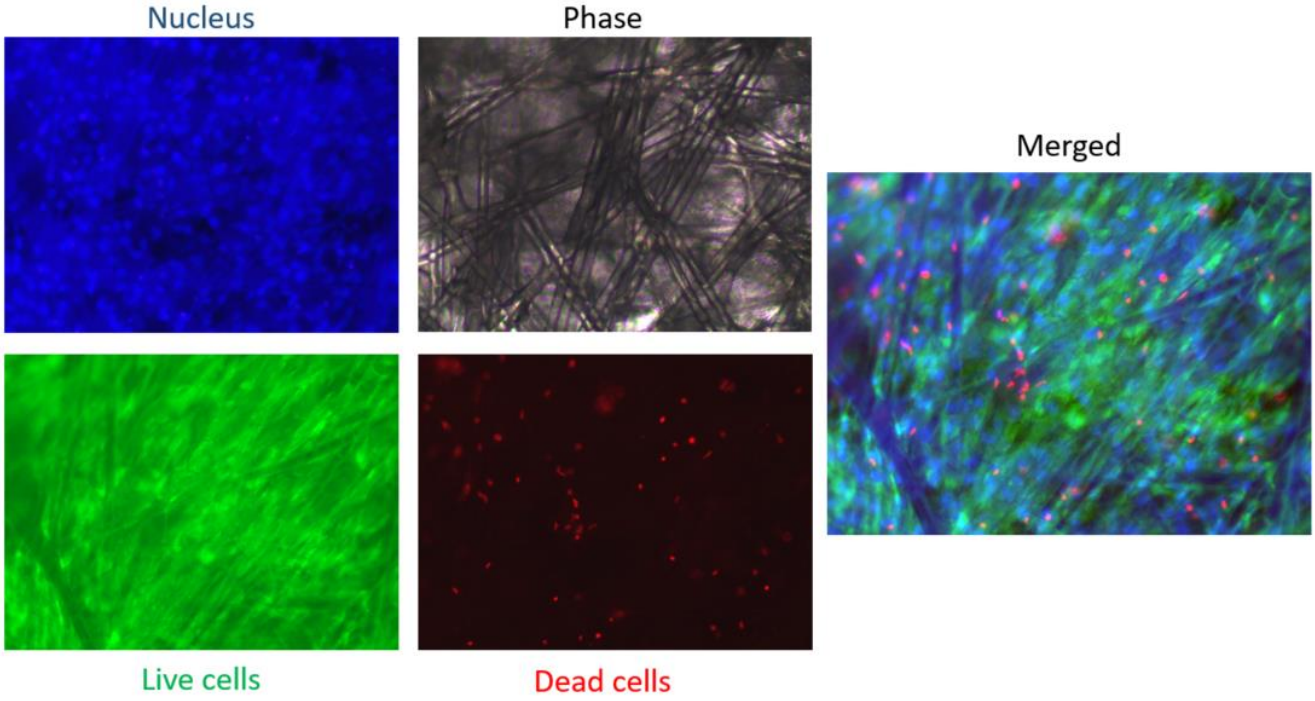
Thu hoạch tế bào từ chai nuôi cấy CelCradle

Tham khảo video đính kèm (https://www.youtube.com/watch?v=u0GCUHF14Vk).

Phụ lục C (Kết quả)

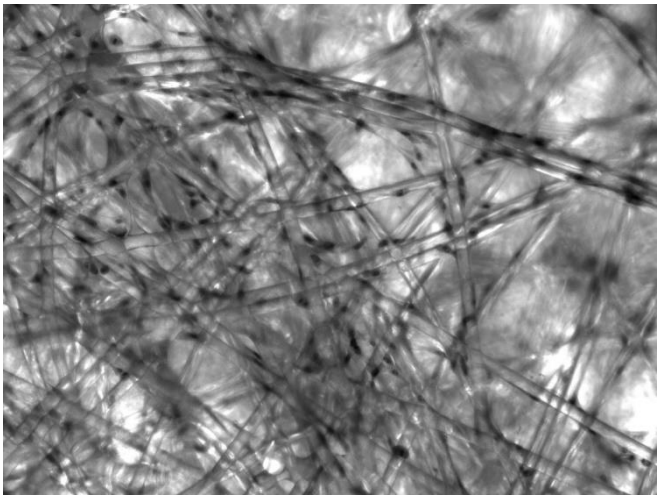
Nhuộm tế bào sống



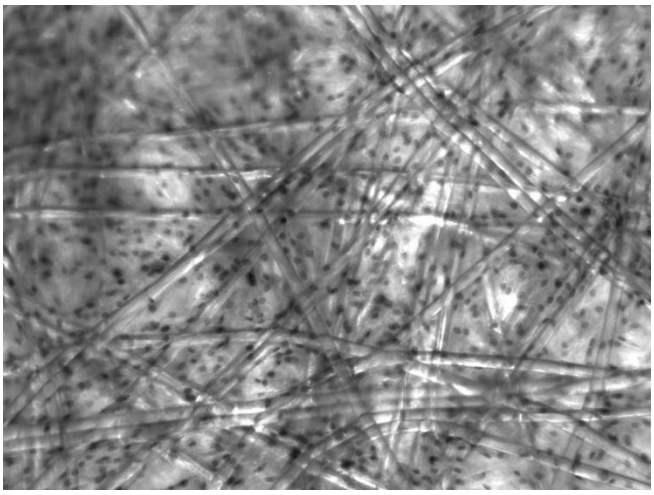


Nhuộm Hemotoxylin

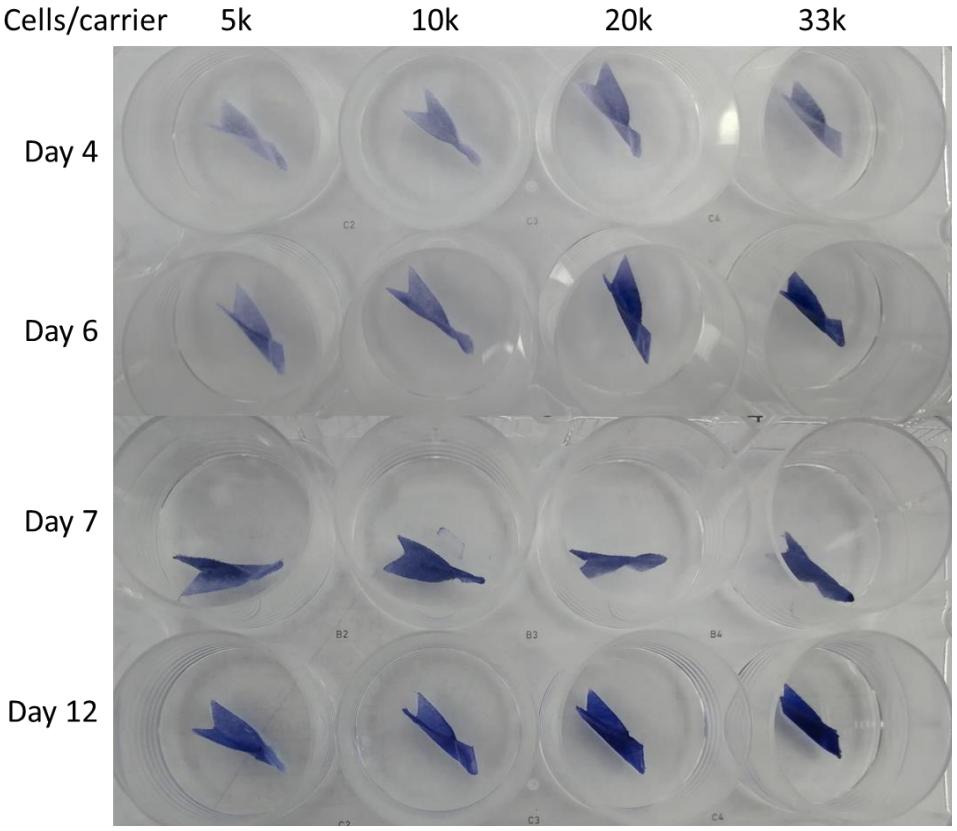
Day 1



Day 3

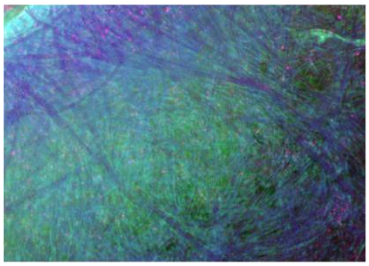


Nhuộm Trypan Blue

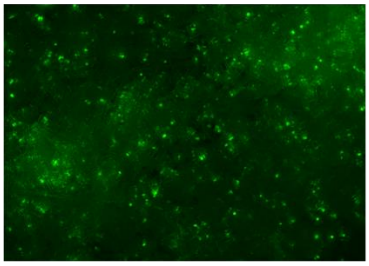


Nhuộm sau khi thu hoạch

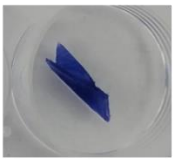
Harvesting (%)	80.3
Viability (%)	97.9



Before harvesting



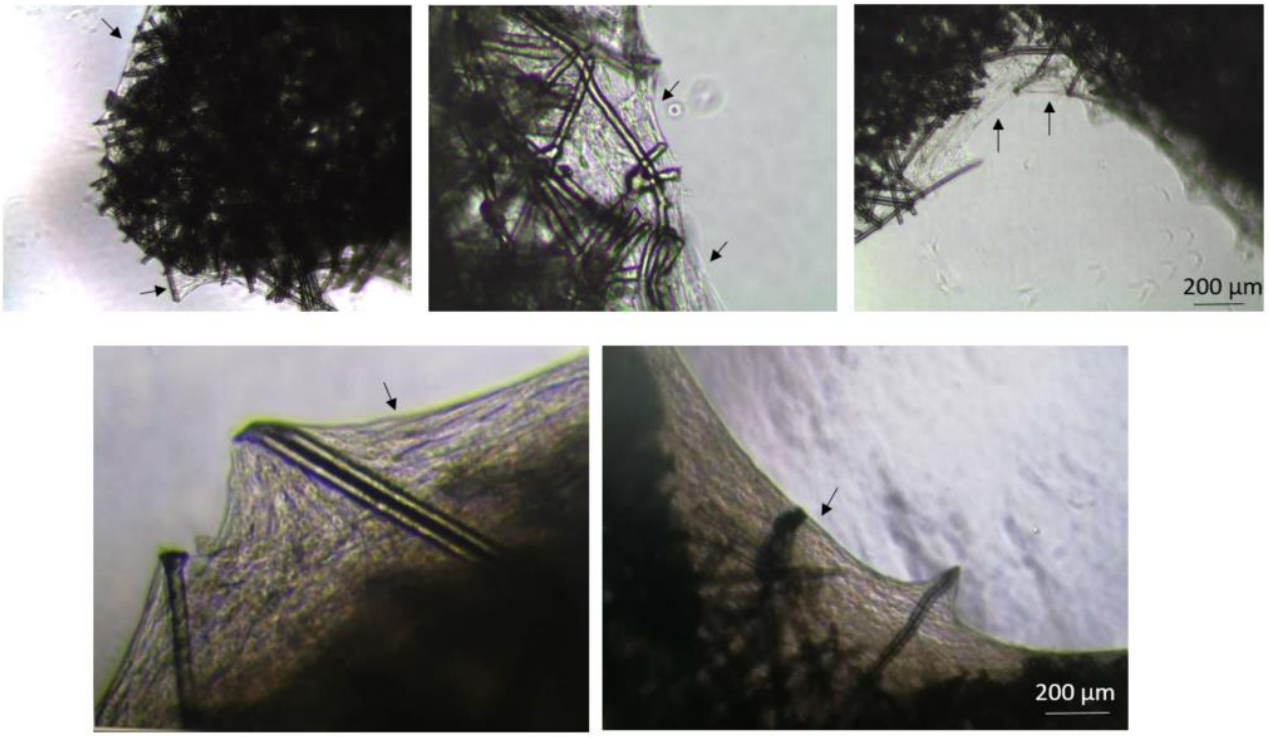
After harvesting



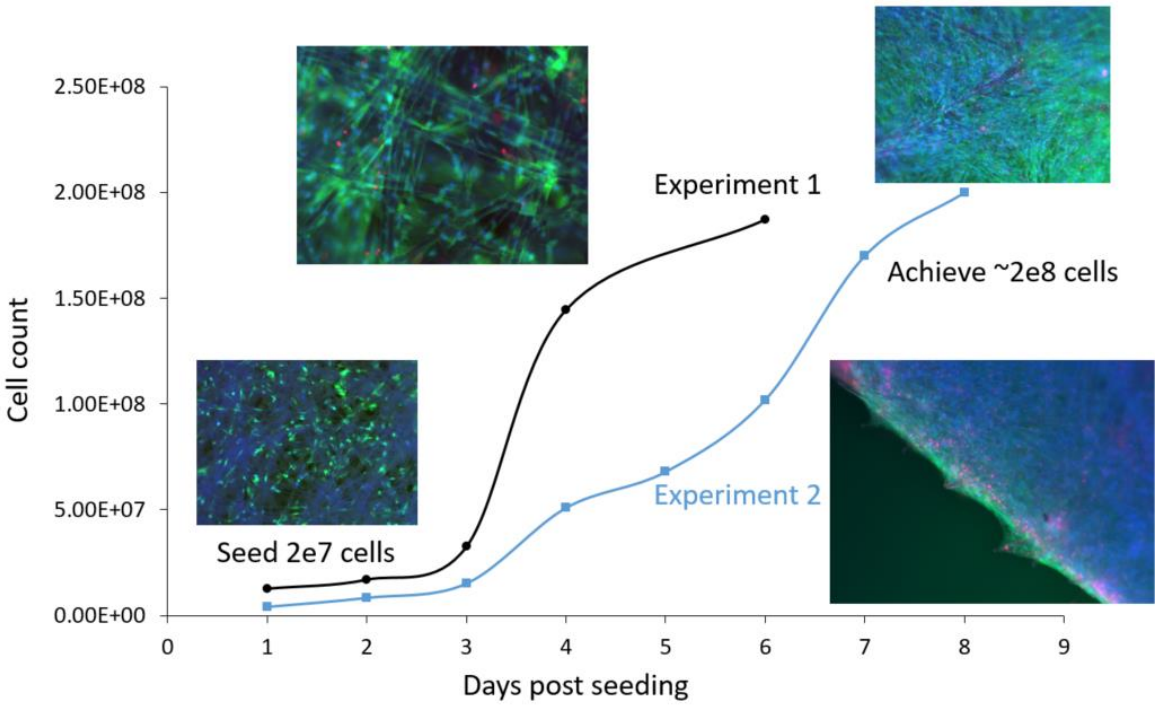
Before harvesting

After harvesting

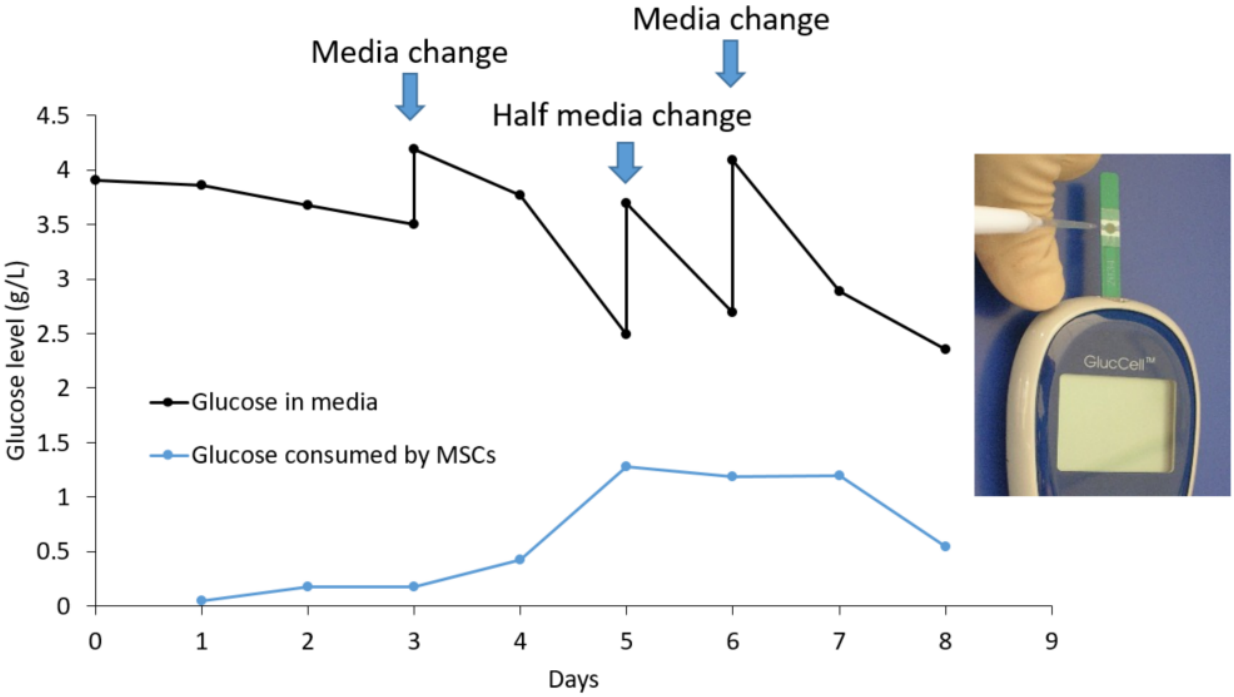
Tế bào đạt hợp lưu cao



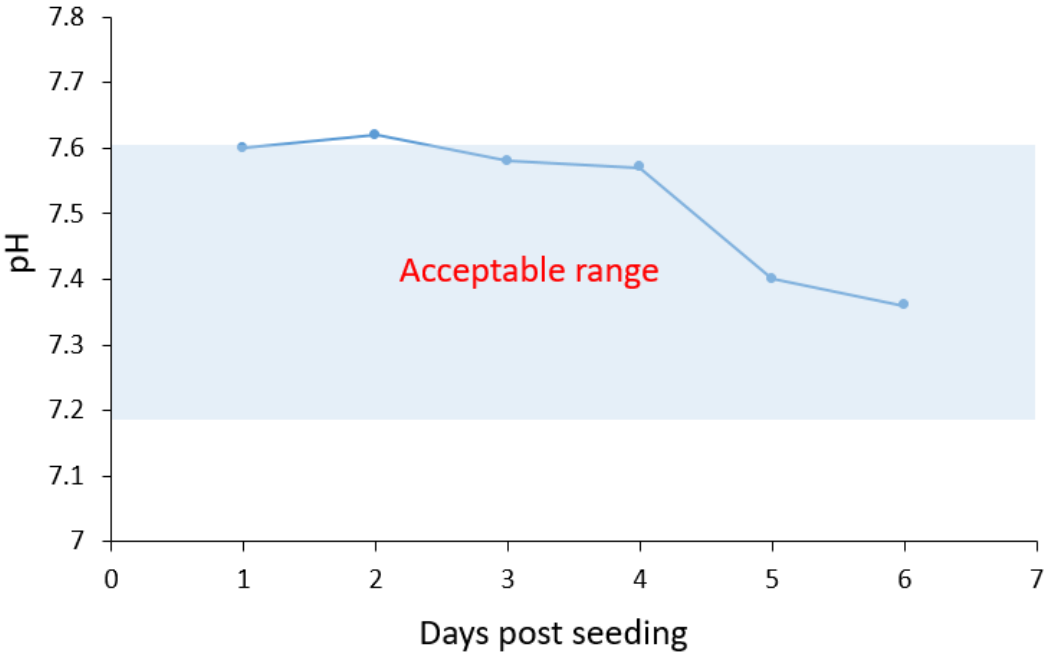
Sinh trưởng tế bào



Theo dõi sự tiêu thụ Glucose



Theo dõi pH


7.8
7.7
7.6
7.5
7.4
7.3
7.2
7.1
7
pH
Acceptable range
0
1
2
3
4
5
6
7
Days post seeding