



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ**

(11)



2-0002634

(51)⁷ **A61K 38/18; G01N 1/34**

(13) **Y**

(21) 2-2019-00180

(22) 23/05/2019

(45) 25/05/2021 398

(43) 25/07/2019 376A

(73) Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội (VN)
334 Nguyễn Trãi, quận Thanh Xuân, thành phố Hà Nội

(72) Hoàng Thị Mỹ Nhung (VN); Thân Thị Trang Uyên (VN); Bùi Thị Vân Khánh (VN);
Hoàng Hương Diễm (VN).

(54) **QUY TRÌNH PHÂN LẬP EXOSOM TỪ MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY TẾ BÀO TUA MÁU
DÂY RÓN**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình phân lập exosom từ môi trường nuôi cấy tế bào tua máu dây rốn, trong đó quy trình này bao gồm các bước a) thu dịch nuôi cấy tế bào chứa exosom; b) loại bỏ tạp chất tế bào; c) thu cặn giàu exosom; và d) tinh sạch exosom. Quy trình theo giải pháp hữu ích sử dụng kỹ thuật ly tâm với lực ly tâm và thời gian ly tâm được tối ưu cho phép loại bỏ hiệu quả rác tế bào và các sản phẩm tế bào chết theo chương trình cũng như thể tiết loại lớn (microvesicle) để thu được exosom có kích thước từ 40-150nm tinh sạch với thời gian được rút ngắn.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích đề thuộc lĩnh vực công nghệ sinh học, công nghệ tế bào ứng dụng trong nghiên cứu y học và phát sinh bệnh học, cụ thể là giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình phân lập exosom từ môi trường nuôi cấy tế bào tua máu dây rốn.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Thể tiết ngoại bào (extracellular membrane vesicle) là các túi nhỏ có lớp màng lipid kép giống như màng tế bào và được tiết ra từ nhiều loại tế bào khác nhau. Thể tiết ngoại bào này được tìm thấy trong môi trường nuôi cấy tế bào và nhiều loại dịch thể như huyết tương, nước tiểu, nước bọt, dịch ối và sữa mẹ. Thể tiết ngoại bào được phân làm ba loại: (1) thể tế bào chết theo chương trình (apoptotic body) có kích thước từ 1 - 5 μm là sản phẩm của tế bào chết theo chương trình; (2) thể microvesicle có kích thước từ 100 - 1000 nm, là sản phẩm tiết được hình thành theo cách mọc chồi trực tiếp từ màng tế bào; và (3) thể exosom có kích thước từ 40 - 150 nm, được hình thành theo cơ chế nhập nội bào và giải phóng ra môi trường ngoại bào bằng cơ chế xuất bào. Trước đây, thể tiết ngoại bào được coi là rác thải từ tế bào. Tuy nhiên, các nghiên cứu gần đây đã chứng minh rằng thể tiết ngoại bào này có vai trò quan trọng trong các quá trình sinh lý học của cơ thể do chúng có thể tác động đến chính nhóm tế bào tiết ra chúng (autocrine) hoặc tác động đến các tế bào khác ở môi trường xung quanh (paracrine). Do vậy, thể tiết, đặc biệt là các exosom, đang đặc biệt được quan tâm nghiên cứu cho các ứng dụng trong tương lai nhằm mục đích chuẩn đoán hay điều trị bệnh.

Hiện nay, kỹ thuật phân lập exosom được thực hiện bằng các kit thương mại hoặc theo kỹ thuật siêu ly tâm truyền thống. Các kit thương mại, ví dụ như Total Exosome Isolation Reagent (Invitrogen), ExoQuick (System Bioscience), PureExo[®] Exosome Isolation kit (Bio), đều có ưu điểm là dễ thực hiện và thời gian phân lập ngắn. Chẳng hạn như thời gian thực hiện phân lập đối với Exosome Isolation Reagent thường là ủ qua đêm và ly tâm trong 1 giờ; đối với ExoQuick (System Bioscience), thời gian thực hiện gồm ủ qua đêm và ly tâm hai giai đoạn với tổng thời gian ly tâm khoảng 30 phút; đối với PureExo[®] Exosome Isolation Kit, tổng thời gian thực hiện

dưới 2 giờ. Tuy nhiên, đặc điểm chung của các kit này là không thể đáp ứng và cân bằng được mong muốn của các nhà nghiên cứu ứng dụng exosom, ví dụ như sự đơn giản, tiết kiệm thời gian, độ tinh sạch, tính nguyên vẹn của exosom thu được và tính không ảnh hưởng đến chức năng của exosom sau khi thu thập. Các kit kể trên tuy đơn giản, nhưng exosom thu được có độ tinh sạch không cao, hoặc kit MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS (Wako) cho phép thu được exosom với độ tinh sạch cao thì lại rất phức tạp, không thể thực hiện được ở quy mô lớn. Quy trình truyền thống phân lập exosom bằng siêu ly tâm, siêu ly tâm kết hợp ly tâm mật độ tỷ trọng (gradient density centrifuge) có nhược điểm là thực hiện qua nhiều bước, tốn nhiều thời gian và công sức. Hiệu suất thu exosom không cao phải thực hiện qua nhiều bước nên có tỷ lệ thất thoát exosom cao. Tuy nhiên, các kết quả phân lập bằng phương pháp siêu ly tâm kết hợp ly tâm mật độ tỷ trọng cao thì cho chất lượng protein chỉ thị cao hơn so với kit thương mại. Hơn nữa, tỷ lệ tương ứng giữa số lượng thể exosom đối với hàm lượng protein trong exosom phân lập được bằng phương pháp siêu ly tâm cao hơn so với của exosom phân lập bằng kit thương mại. Những điều này cho thấy rằng có nhiều hạt không phải là exosom và nhiều phân tử protein kết cụm bị lẫn trong mẫu exosom phân lập được từ bộ kit thương mại. Đây là ưu điểm lớn của phương pháp truyền thống siêu ly tâm so với các kit bán trên thị trường hiện nay. Tuy nhiên, phương pháp siêu ly tâm cũng có khả năng làm lắng cặn các hạt protein kết cụm cùng với exosom. Do đó, việc kết hợp siêu ly tâm với ly tâm mật độ tỷ trọng nhằm rửa exosom sẽ giải quyết được sự tạp nhiễm, tuy nhiên tồn dư của các chất như sucroza hay iodoxanol trong cặn exosom từ ly tâm tỷ trọng làm ảnh hưởng đến chức năng của exosom.

Hiện nay, các thông tin đã biết về phương pháp siêu ly tâm, và siêu ly tâm kết hợp ly tâm mật độ tỷ trọng, trong đó tế bào sau khi thu thập được ly tâm ở 300 g trong 5 phút để loại bỏ tế bào chết, sau đó ly tâm ở 2000 g trong 20 phút để loại bỏ mảnh vỡ tế bào, rác tế bào và sản phẩm của tế bào chết theo chương trình. Sau đó lần lượt ly tâm ở 10.000 g trong 20 phút để loại bỏ thể tiết lớn (microvesicle) và 100.000 g trong 70 phút để thu thập exosom. Để tinh sạch exosom, tiến hành ly tâm tỷ trọng trong 30% sucroza hoặc 60% iodoxanol ở 100.000 g/1080 phút (18 giờ) và rửa loại bỏ dung môi bằng PBS và ly tâm ở 100.000 g /70 phút. Tuy nhiên, kết quả của phương pháp siêu ly tâm, siêu ly tâm kết hợp ly tâm tỷ trọng lại cho các kết quả khác nhau ở các mô hình máy ly tâm và bộ roto khác nhau.

Mặc dù kỹ thuật phân lập exosom đã được công bố, nhưng quy trình này về cơ bản là phức tạp và mất nhiều thời gian. Thời gian trung bình để phân lập exosom mất khoảng 25 giờ và cần phải thao tác với các bước chuyển mẫu phức tạp khiến nhiều ống ly tâm gây ra sự suy giảm số lượng exosom do bám dính vào thành ống và hiệu suất thu thập tại các lần ly tâm. Rửa exosom trong sucroza hoặc iodoxanol có thể dẫn đến tồn dư sucroza hoặc iodoxanol trong mẫu không gây ảnh hưởng đến kết quả phân tích thành phần sinh học phân tử của exosom, tuy nhiên lại gây ảnh hưởng đến kết quả các thí nghiệm về chức năng sinh học của exosom.

Do đó, cần có quy trình phân lập exosom cải tiến, đơn giản hóa các bước thực hiện nhằm thu được exosom tinh sạch, loại bỏ được lượng protein kết tụ tạp nhiễm và giảm được thời gian thực hiện.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích nhằm giải quyết các vấn đề nêu trên, cụ thể là giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình phân lập exosom từ môi trường nuôi cấy tế bào tua máu dây rốn. Quy trình theo giải pháp dựa trên việc tối ưu hóa thời gian ly tâm và trọng lực ly tâm cho phép phân lập được exosom tinh sạch với thời gian rút ngắn.

Theo đó, giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình phân lập exosom từ môi trường nuôi cấy tế bào tua máu dây rốn, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) thu dịch nuôi cấy tế bào chứa exosom bằng cách thu nhận môi trường nuôi cấy tế bào tua máu dây rốn được cảm ứng bởi tế bào ung thư phổi, sau đó tiến hành ly tâm với lực 250 g trong 10 phút ở nhiệt độ phòng và loại bỏ phần cặn tế bào thu dịch nuôi cấy tế bào chứa exosom;

b) loại bỏ tạp chất tế bào bằng cách chuyển phần dịch nuôi cấy tế bào tua chứa exosom vào thiết bị ly tâm và tiến hành ly tâm với lực 16.500 g trong 20 phút ở 4°C trong điều kiện áp suất giảm, sau khi loại bỏ phần cặn chứa tạp chất tế bào, thu phần dịch nổi chứa exosom;

c) thu cặn giàu exosom bằng cách chuyển phần dịch nổi chứa exosom vào ống ly tâm và tiến hành ly tâm với lực 100.000 g trong 90 phút ở 4°C trong điều kiện áp suất giảm, sau khi loại bỏ phần dịch nổi thu được phần cặn chứa exosom; và

d) tinh sạch exosom bằng cách hòa tan phần cặn chứa exosom trong dung dịch PBS và tiếp tục ly tâm thu exosom sạch với lực ly tâm 100.000 g trong 90 phút ở 4°C thu cặn chứa exosom tinh sạch.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó môi trường nuôi cấy tế bào tua máu dây rốn được thu nhận vào ngày thứ 7 nuôi cấy sau khi được cảm ứng bởi dịch chiết tế bào ung thư phổi K549 và TNF α vào các ngày thứ 5 và thứ 6 nuôi cấy.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó lượng dịch chiết tế bào ung thư phổi K549 và TNF α được bổ sung vào môi trường nuôi cấy để cảm ứng lần lượt là 50 μ /ml và 500 U/ml.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó lượng dung dịch PBS bổ sung để hòa tan cặn chứa exosom bằng lượng dịch nổi được loại bỏ.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó cặn chứa exosom tinh sạch thu được bởi quy trình theo giải pháp được pha loãng và bảo quản trong dung dịch PBS 1X.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là ảnh chụp exosom phân lập từ dịch nuôi cấy tế bào tua cảm ứng bởi tế bào ung thư phổi A549 và TNF α qua kính hiển vi được phân lập bằng quy trình theo giải pháp hữu ích.

Hình 2 là hình ảnh phân tích chất chỉ thị của exosom phân lập từ dịch nuôi cấy tế bào tua cảm ứng bởi tế bào ung thư phổi và TNF α .

Hình 3 là hình ảnh phân tích sự phân bố thành phần protein theo kích thước trong exosom phân lập từ dịch nuôi cấy tế bào tua cảm ứng bởi tế bào ung thư phổi và TNF α .

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Sau đây, giải pháp hữu ích được mô tả chi tiết với các phương án thực hiện và các ví dụ cụ thể. Tuy nhiên, các phương án và các ví dụ thực hiện cụ thể này chỉ nhằm minh họa để hiểu rõ bản chất của giải pháp hữu ích chứ không nhằm mục đích giới hạn phạm vi yêu cầu bảo hộ của giải pháp hữu ích.

Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình phân lập exosom từ môi trường nuôi cấy tế bào tua máu dây rốn, trong đó quy trình này bao gồm các bước: a) thu dịch nuôi cấy

tế bào chứa exosom; b) loại bỏ tạp chất tế bào; c) thu cặn giàu exosom; và d) tinh sạch exosom.

Theo giải pháp hữu ích, exosom đích để phân lập theo giải pháp hữu ích là các túi nhỏ có màng lipit kép được tiết ra từ tế bào nuôi cấy, cụ thể là từ tế bào tua máu dây rốn. Exosom là một thành phần của thể tiết ngoại bào (extracellular membrane vesicles), có bản chất là các túi nhỏ có lớp màng lipit kép giống như màng tế bào và được tiết ra từ nhiều loại tế bào khác nhau. Trong số các thể tiết ngoại bào, exosom có kích thước nhỏ nhất, từ 40 - 150 nm, được hình thành theo cơ chế nhập nội bào và giải phóng ra môi trường ngoại bào bằng cơ chế xuất bào. Các exosom này khác với các thể tiết ngoại bào khác như thể chết theo chương trình (apoptotic body) có kích thước từ 1 đến 5 μm , là sản phẩm của tế bào chết theo chương trình và thể vi túi (microvesicle) có kích thước từ 100 đến 1000 nm, là sản phẩm tiết được hình thành theo cách mọc chồi trực tiếp từ màng tế bào.

Trong bước thu dịch nuôi cấy tế bào chứa exosom, môi trường nuôi cấy tế bào tua máu dây rốn được cảm ứng bởi tế bào ung thư phổi được thu gom. Theo đó tế bào tua máu dây rốn, hay còn gọi là tế bào đơn nhân được phân lập từ máu cuống rốn được cấy trên môi trường nuôi cấy chuẩn với mật độ khoảng 2×10^6 tế bào/mL môi trường. Môi trường nuôi cấy tế bào được thu được bằng phương pháp nuôi cấy tế bào tiêu chuẩn để thu tế bào máu cuống rốn. Để cảm ứng, vào ngày nuôi cấy thứ 5, bổ sung lần 1 dịch chiết tế bào ung thư K549 với lượng 50 $\mu\text{g/mL}$ môi trường nuôi cấy và TNF α (Tumor necrosis factor alpha) với lượng 500 U/mL môi trường nuôi cấy. Tiếp đó, vào ngày thứ 6 bổ sung lần 2 dịch chiết tế bào ung thư K549 và TNF α với hàm lượng ứng để cảm ứng biệt hóa tế bào gốc cuống rốn thành tế bào tua trưởng thành. Môi trường nuôi cấy tế bào tua trưởng thành được thu thập vào ngày thứ 7. Tiếp đó, môi trường nuôi cấy tế bào tua trưởng thành này được ly tâm lực 250 g trong 10 phút ở nhiệt độ phòng. Sau khi loại bỏ phần cặn tế bào thu dịch nuôi cấy tế bào chứa exosom. Phần dịch nuôi cấy tế bào này được sử dụng để phân lập exosom.

Trong bước loại tạp chất tế bào, bước này nhằm loại bỏ các mảnh vỡ tế bào hay còn gọi là rác tế bào, bước này chủ yếu nhằm loại bỏ các thành phần thể tiết ngoại bào như thể chết theo chương trình (apoptotic body) có kích thước từ 1 - 5 μm và thể vi túi (microvesicle) có kích thước từ 100 đến 1000 nm. Đây là những tạp chất có bản chất và cấu trúc tương tự như các exosom cần được phân lập theo giải pháp hữu ích.

Theo các phương pháp truyền thống quá trình này được thực hiện với ba mức ly tâm khác nhau với lực ly tâm tăng dần. Trước tiên, tiến hành với lực ly tâm 2000 g trong 20 phút để loại bỏ mảnh vỡ tế bào, rác tế bào hoặc sản phẩm tan bào của tế bào chết theo chương trình. Tiếp đó tiến hành ly tâm với lực ly tâm 10.000 g trong 20 phút để loại bỏ thể tiết loại lớn (microvesicle). Cuối cùng, tiến hành ly tâm ở mức 100.000 g trong 70 phút để thu thập exosom. Quy trình này mặc dù cho phép tách được exosom, nhưng do có một lượng protein tạp nhiễm bị co cụm giống các exosom nên để tinh sạch lysosome mất rất nhiều thời gian, cụ thể cần tới 18 giờ ly tâm ở 100.000 g trong dung dịch 30% sucroza hoặc 60% iodoxanol. Ngoài ra, để loại bỏ sucroza hoặc iodoxanol cần tiến hành với PBS ở 10.000 g trong 70 phút để thu exosom tinh sạch.

Các tác giả giải pháp hữu ích đã nghiên cứu và bất ngờ phát hiện ra rằng, bằng cách ly tâm một lần duy nhất với lực 16.500 g trong 20 phút ở 4°C trong điều kiện áp suất giảm cho phép loại bỏ được đồng thời cả mảnh vỡ tế bào, rác tế bào hoặc sản phẩm tan bào của tế bào chết theo chương trình cũng như thể tiết loại lớn (microvesicle) một cách triệt để. Theo đó, các thành phần protein tạp nhiễm có trọng lượng tương đương được co cụm giả như exosom được loại bỏ hiệu quả, điều này cho phép quá trình tinh sạch exosom diễn ra thuận lợi. Ngoài ra, do không cần thực hiện thao tác thay ống và hút dịch ly tâm nên cho phép thu được lượng exosom lớn hơn so với phương pháp ly tâm 2 giai đoạn.

Trong bước thu cặn giàu exosom, tiến hành chuyển phần dịch nổi chứa exosom vào ống ly tâm và tiến hành ly tâm với lực 100.000 g trong 90 phút ở 4°C trong điều kiện áp suất giảm. Quá trình này được thực hiện với thời gian dài hơn so với phương pháp thông thường vì trong phương pháp thông thường, có một lượng protein “giả” exosom sẽ tham gia kết cụm và kéo các exosom nhanh chóng lắng xuống phía đáy của ống ly tâm nên quá trình này xảy ra nhanh hơn. Quá trình theo giải pháp loại bỏ được phần lớn các protein giả exosom nên các exosom thu được lắng chậm hơn. Quá trình này kéo dài hơn so với phương pháp thông thường 20 phút. Ngược lại, quá trình này không cần thực hiện bước ly tâm tỷ trọng trong dung môi sucroza 30% hoặc iodoxanol 60% mà vẫn thu được exosom tinh sạch. Hay theo cách khác, bằng cách kết hợp ly tâm 16.500 g trong 20 phút ở 4°C và 100.000 g trong 90 phút ở 4°C đã cho phép thu

được exosom tinh sạch tương đương với quá trình ly tâm tỷ trọng trong 18 giờ. Điều này cho phép rút ngắn quá phân lập exosom một cách hiệu quả.

Trong bước tinh sạch exosom, tiến hành hòa tan phần cặn chứa exosom trong dung dịch PBS. Theo một phương án ưu tiên, lượng dung dịch PBS bổ sung để hòa tan cặn chứa exosom bằng lượng dịch nổi được loại bỏ. Sau khi hòa tan phần cặn, tiếp tục ly tâm thu exosom sạch với lực ly tâm 100.000 g trong 90 phút ở 4°C thu cặn chứa exosom tinh sạch. Bước này nhằm rửa và loại bỏ các tạp chất tồn dư trong quá trình thu exosom mà không phải loại bỏ dung môi. Điều này cho thấy rằng, phương pháp theo giải pháp hữu ích, chỉ bằng việc điều chỉnh lực ly tâm ở 16.500 g và 100.000 g với thời gian 20 phút và 90 phút tương ứng cho phép tối ưu hóa được quy trình, bỏ được việc sử dụng dung môi trong ly tâm tỷ trọng nên thu được exosom tinh sạch hơn và không cần bước loại bỏ dung môi phức tạp. Quá trình tinh sạch theo giải pháp hữu ích chỉ nhằm loại bỏ các phân tử protein kết cụm có thể bám dính màng exosom và các phân tử nhỏ không phải exosom tạp nhiễm vào dịch nuôi tế bào và cùng lắng đọng vào cặn exosom ở thì ly tâm trước.

Theo đó sau khi thu exosom tinh sạch ở dạng cặn, phần cặn chứa exosom tinh sạch này được pha loãng và bảo quản trong dung dịch PBS 1X cho đến khi sử dụng.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1: Phân lập exosom từ môi trường nuôi cấy tế bào tua máu cuống rốn

Tiến hành cấy 100 mL tế bào đơn nhân được phân lập từ máu cuống rốn vào trong chai nuôi cấy (Tissue Culture Treated Flasks, 75 cm², Falcon - Corning, USA) với mật độ 2×10^6 tế bào/mL môi trường nuôi cấy. Đến ngày thứ 5 nuôi cấy, bổ sung lần 1 dịch chiết tế bào ung thư K549 50 µg/mL môi trường nuôi cấy và Tumor necrosis factor alpha (TNFα) 500 U/mL môi trường nuôi cấy và ngày thứ 6 bổ sung lần 2 dịch chiết tế bào ung thư K549 và TNFα với hàm lượng tương tự lần 1 để cảm ứng biệt hóa thành tế bào tua trưởng thành.

Thu 100 mL môi trường nuôi cấy tế bào tua trưởng thành vào ngày nuôi cấy thứ 7 và ly tâm ở 250 g trong 10 phút ở nhiệt độ phòng và loại bỏ cặn tế bào chết, thu dịch nuôi cấy chứa exosom.

Vệ sinh hai bộ roto SW 32Ti và SW 40Ti của hãng Beckman và các bộ lắp ghép tương ứng bằng etanol 70% và để ở 4°C qua đêm để làm lạnh. Khử trùng các ống ly

tâm (Thinwall Ultraclear 13,2 mL và Thinwall Ultraclear 38,5 mL, Beckman Coulter) bằng etanol 70% trước và tráng lại bằng PBS 1X hai lần, để khô tự nhiên trong tủ an toàn sinh học cấp II trước khi tiến hành thí nghiệm 1 giờ.

Sau khi tế bào tua được cảm ứng trưởng thành, thu toàn bộ môi trường nuôi cấy vào ống ly tâm (Thinwall Ultraclear, Beckman Coulter). Thể tích dịch nổi cho vào các ống ly tâm đã khử trùng đạt 2/3 ống. Cân bằng ống đối trọng bằng cân phân tích, sự sai lệch giữa các ống đối trọng không quá 0,1 mg. Ống đối trọng có thể là dịch nuôi cấy tế bào hoặc PBS. Đưa các ống ly tâm và ống đối trọng vào bộ lắp ghép của roto SW 32Ti đã để lạnh theo thứ tự và lắp bộ lắp ghép vào roto SW 32Ti (đã để lạnh). Mở nguồn điện của máy ly tâm và vệ sinh máy trước khi đặt roto vào máy ly tâm và đóng chặt cửa máy.

Sau đó lựa chọn chương trình chạy: loại roto SW 32Ti, loại ống Thinwall Ultraclear 38,5 mL (Beckman Coulter), lực ly tâm: 16.500 g, thời gian: 20 phút, nhiệt độ: 4 °C, gia tốc: maximum, giảm tốc: maximum.

Tiến hành ly tâm: Bật hút chân không, đợi cho đạt mức < 200 µL thì tiến hành chạy máy.

Khi kết thúc chu kỳ ly tâm, bơm khí vào buồng máy ly tâm (Open vent), mở cửa máy và lấy roto ra khỏi máy. Chuyển các ống ly tâm vào tủ an toàn sinh học. Vệ sinh roto cùng bộ lắp ghép và để ở 4 °C.

Hút dịch nổi có chứa exosom và chuyển sang ống ly tâm mới, loại bỏ cặn có chứa mảnh vỡ tế bào, thể chết theo chương trình và các thể tiết loại lớn (microvesicle).

Cho dịch nổi chứa exosom thu được ở trên vào ống ly tâm Thinwall Ultraclear 13,2 mL (Beckman Coulter) đã khử trùng sao cho thể tích đạt 2/3 ống. Cân bằng ống đối trọng bằng cân phân tích, sự sai lệch giữa các ống đối trọng không quá 0,1 mg. Ống đối trọng có thể là dịch nuôi cấy tế bào hoặc PBS. Đưa các ống ly tâm và ống đối trọng vào bộ lắp ghép và lắp vào roto SW 40Ti đã để lạnh theo số thứ tự. Mở nguồn điện của máy ly tâm và vệ sinh máy trước khi đặt roto vào máy ly tâm (Optima™ XPN 100K, Beckman Coulter) và đóng chặt cửa máy.

Sau đó chọn chương trình chạy: loại roto SW 40Ti, loại ống Thinwall Ultraclear 13,2 mL (Beckman Coulter), lực ly tâm: 100.000 g, thời gian: 90 phút, nhiệt độ: 4°C, gia tốc: maximum, giảm tốc: maximum.

Tiến hành ly tâm: bật hút chân không, đợi cho đạt mức $< 200 \mu\text{L}$ thì bắt đầu chạy máy.

Khi kết thúc chu kỳ ly tâm, bơm khí vào buồng máy ly tâm, mở cửa máy và lấy roto ra khỏi máy. Chuyển các ống ly tâm vào tủ an toàn sinh học. Vệ sinh roto cùng bộ lắp ghép và để ở 4°C .

Hút loại bỏ dịch nổi và thu phần cặn exosom. Cặn exosom này được pha loãng trong PBS với một lượng bằng lượng dịch nổi hút bỏ để tiếp tục tinh sạch.

Dịch exosom pha trong PBS được cho vào các ống ly tâm Thinwall Ultraclear 13,2 mL (Beckman Coulter) đã khử trùng sao cho thể tích đạt $2/3$ ống. Cân bằng ống đối trọng bằng cân phân tích, sự sai lệch giữa các ống đối trọng không quá $0,1 \text{ mg}$. Ống đối trọng có thể là dịch nuôi cấy tế bào hoặc PBS. Đưa các ống ly tâm đã chứa dịch exosom pha trong PBS và ống đối trọng vào bộ lắp ghép của roto SW 40Ti đã để lạnh theo đúng thứ tự. Mở nguồn điện của máy ly tâm và vệ sinh máy trước khi đặt roto vào máy ly tâm và đóng chặt cửa máy.

Sau đó chọn chương trình chạy: loại roto SW 40Ti, loại ống Thinwall Ultraclear 13,2 mL (Beckman Coulter), lực ly tâm: 100.000 g, thời gian: 90 phút, nhiệt độ: 4°C , gia tốc: maximum, giảm tốc: maximum.

Tiến hành ly tâm: bật hút chân không, đợi cho đạt mức $< 200 \mu\text{L}$ thì khởi động máy.

Khi kết thúc chu kỳ ly tâm, bơm khí vào buồng máy ly tâm, mở cửa máy và lấy roto ra khỏi máy. Chuyển các ống ly tâm vào tủ an toàn sinh học. Vệ sinh roto cùng bộ lắp ghép và để ở 4°C .

Hút loại bỏ dịch nổi, cặn exosom sạch được pha loãng trong $100 \mu\text{L}$ PBS và bảo quản ở -80°C .

Ví dụ 2. Kiểm tra sản phẩm exosom

Để kiểm tra về mặt hình thái học sản phẩm exosom thu được từ Ví dụ 1, tiến hành kiểm tra bằng cách nhuộm màu và soi dưới kính hiển vi điện tử truyền qua (transmission electron microscope).

Kết quả được thể hiện trên Hình 1 cho thấy exosom thu được có hình cái bát do sự mất nước trong quá trình nhuộm âm tính tế bào, bề mặt exosom nhẵn, kích thước

trong khoảng 40 – 150 nm. Không có sự bám dính của các phân tử protein lên màng exosom. Không có sự tập nhiễm của các quần thể không phải là exosom nhưng có phổ phân bố kích thước tương đương, các quần thể hạt này sẽ không có hình dạng cái bát khi nhuộm âm tính theo quy trình nhuộm exosom. Điều này cho thấy exosom thu được theo Ví dụ 1 là hoàn toàn tinh sạch.

Để kiểm tra chỉ thị protein đối với sản phẩm thu được, tiến hành chiết protein tổng số của tế bào làm đối chứng với các mẫu exosom thu được. Tiến hành phân tách bằng điện di gel 10% polyacrylamit. Protein sau đó được chuyển sang màng PDVF và nhuộm với kháng thể GAPDH, CD9 và CD63. Kết quả được thể hiện trên Hình 1 cho thấy các mẫu exosom và tế bào tiết đều biểu hiện dấu hiệu các chất chỉ thị, tuy nhiên dấu hiệu được nhận thấy biểu hiện nhiều hơn ở tế bào tiết. DC: dịch chiết tế bào tua tiết exosom; EX1: mẫu exosom 1; EX2: mẫu exosom 2; EX3: mẫu exosom 3. Điều này chứng tỏ sản phẩm thu được chứa exosom.

Để khẳng định phân đoạn exosom, protein tổng số được phân tách bằng điện di gel 10% polyacrylamit. Kết quả trên Hình 3 cho thấy các phân đoạn protein được phân tách rõ cho thấy thành phần protein trong exosom phân bố tương tự với thành phần protein trong tế bào tiết.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích cho phép phân lập exosom từ môi trường nuôi cấy tế bào tua máu dây rốn, trong đó quy trình này khác biệt ở chỗ sử dụng kỹ thuật ly tâm với lực ly tâm và thời gian ly tâm được tối ưu cho phép loại bỏ hiệu quả rác tế bào và các sản phẩm tế bào chết theo chương trình cũng như thể tiết loại lớn (microvesicle) để thu được exosom có kích thước từ 40-150nm tinh sạch với thời gian được rút ngắn.

Quy trình theo giải pháp hữu ích sử dụng lực ly tâm 16.500 g trong 20 phút ở 4°C cho phép loại bỏ tạp chất tế bào và các protein kết tụ hiệu quả mà không cần phải sử dụng kỹ thuật ly tâm tỷ trọng trong dung môi sucroza hoặc idoxanol và do đó giảm được thời gian ly tâm tỷ trọng cao. Quy trình cho phép rút ngắn thời gian phân lập exosom bằng phương pháp ly tâm từ 25 giờ xuống còn 5,3 giờ với chất lượng exosom tinh sạch, đảm bảo các yêu cầu phân tích và nghiên cứu.

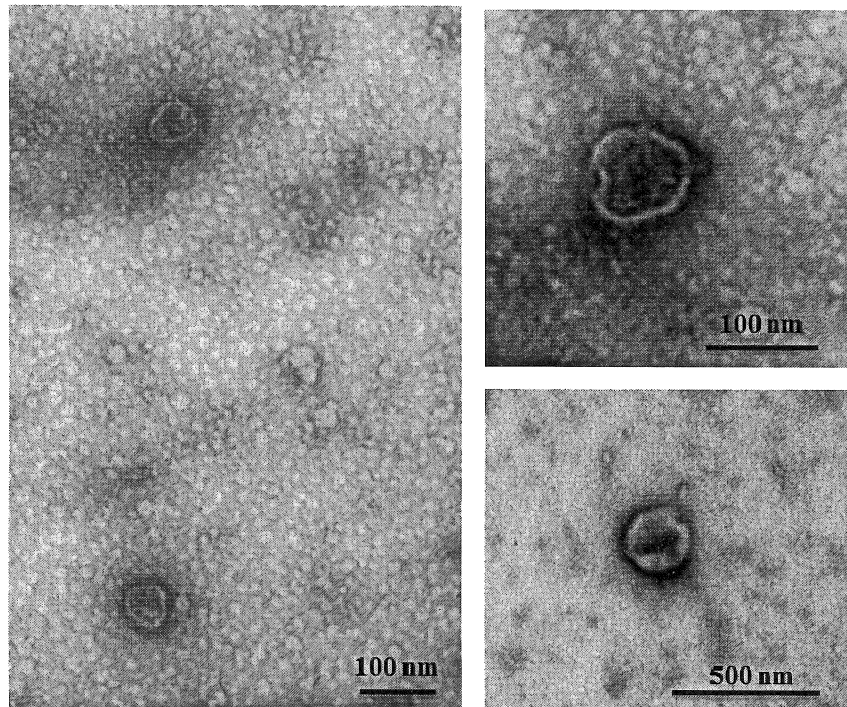
Quy trình theo giải pháp hữu ích rút ngắn các bước thực hiện và bằng cách ly tâm một lần duy nhất với lực 16.500 g trong 20 phút ở 4°C trong điều kiện áp suất giảm

cho phép loại bỏ được đồng thời cả mảnh vỡ tế bào, rác tế bào hoặc sản phẩm tan bào của tế bào chết theo chương trình cũng như thể tiết loại lớn (microvesicle) một cách triệt để. Theo đó, các thành phần protein tạp nhiễm có trọng lượng tương đương được co cụm giả như exosom được loại bỏ hiệu quả, điều này cho phép quá trình tinh sạch exosom diễn ra thuận lợi. Ngoài ra, do không cần thực hiện thao tác thay ống và hút dịch ly tâm nên cho phép thu được lượng exosom lớn hơn so với phương pháp ly tâm thông thường.

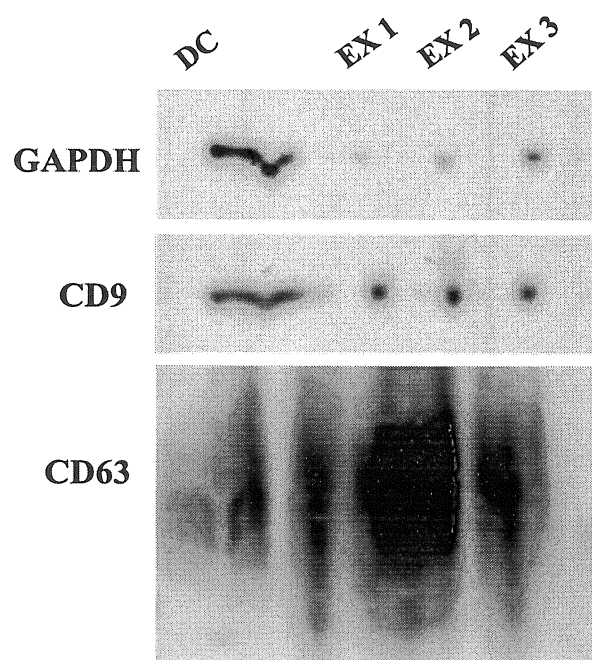
YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình phân lập exosom từ môi trường nuôi cấy tế bào tua máu dây rốn, trong đó quy trình này bao gồm các bước:
 - a) thu dịch nuôi cấy tế bào chứa exosom bằng cách thu nhận môi trường nuôi cấy tế bào tua máu dây rốn được cảm ứng bởi tế bào ung thư phổi, sau đó tiến hành ly tâm với lực 250 g trong 10 phút ở nhiệt độ phòng và loại bỏ phần cận tế bào thu dịch nuôi cấy tế bào chứa exosom;
 - b) loại bỏ tạp chất tế bào bằng cách chuyển phần dịch nuôi cấy tế bào tua chứa exosom vào thiết bị ly tâm và tiến hành ly tâm với lực 16.500 g trong 20 phút ở 4°C trong điều kiện áp suất giảm, sau khi loại bỏ phần cận chứa tạp chất tế bào, thu phần dịch nổi chứa exosom;
 - c) thu cận giàu exosom bằng cách chuyển phần dịch nổi chứa exosom vào ống ly tâm và tiến hành ly tâm với lực 100.000 g trong 90 phút ở 4°C trong điều kiện áp suất giảm, sau khi loại bỏ phần dịch nổi thu được phần cận chứa exosom; và
 - d) tinh sạch exosom bằng cách hòa tan phần cận chứa exosom trong dung dịch PBS và tiếp tục ly tâm thu exosom sạch với lực ly tâm 100.000 g trong 90 phút ở 4°C thu cận chứa exosom tinh sạch.
2. Quy trình theo điểm 1, trong đó môi trường nuôi cấy tế bào tua máu dây rốn được thu nhận vào ngày thứ 7 nuôi cấy sau khi được cảm ứng bởi dịch chiết tế bào ung thư phổi K549 và TNF α vào các ngày thứ 5 và thứ 6 nuôi cấy.
3. Quy trình theo điểm 1 hoặc 2, trong đó lượng dịch chiết tế bào ung thư phổi K549 và TNF α được bổ sung vào môi trường nuôi cấy để cảm ứng lần lượt là 50 μ /ml và 500 U/ml.
4. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó lượng dung dịch PBS bổ sung để hòa tan cận chứa exosom bằng lượng dịch nổi được loại bỏ.
5. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó cận chứa exosom tinh sạch được pha loãng và bảo quản trong dung dịch PBS 1X.

HÌNH 1



HÌNH 2



HÌNH 3

