



(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)



2-0003871

(51) **A61K 35/51; C12N 5/0775; A61K 35/28**
2022.01

(13) **Y**

(21) 2-2022-00523

(22) 25/05/2020

(67) 1-2020-02923

(45) 27/01/2025 442

(43) 25/08/2020 389

(73) Tập đoàn VINGROUP - Công ty CP (VN)

Số 7 Đường Bằng Lăng 1, khu đô thị sinh thái Vinhomes Riverside, phường Việt Hưng, quận Long Biên, thành phố Hà Nội

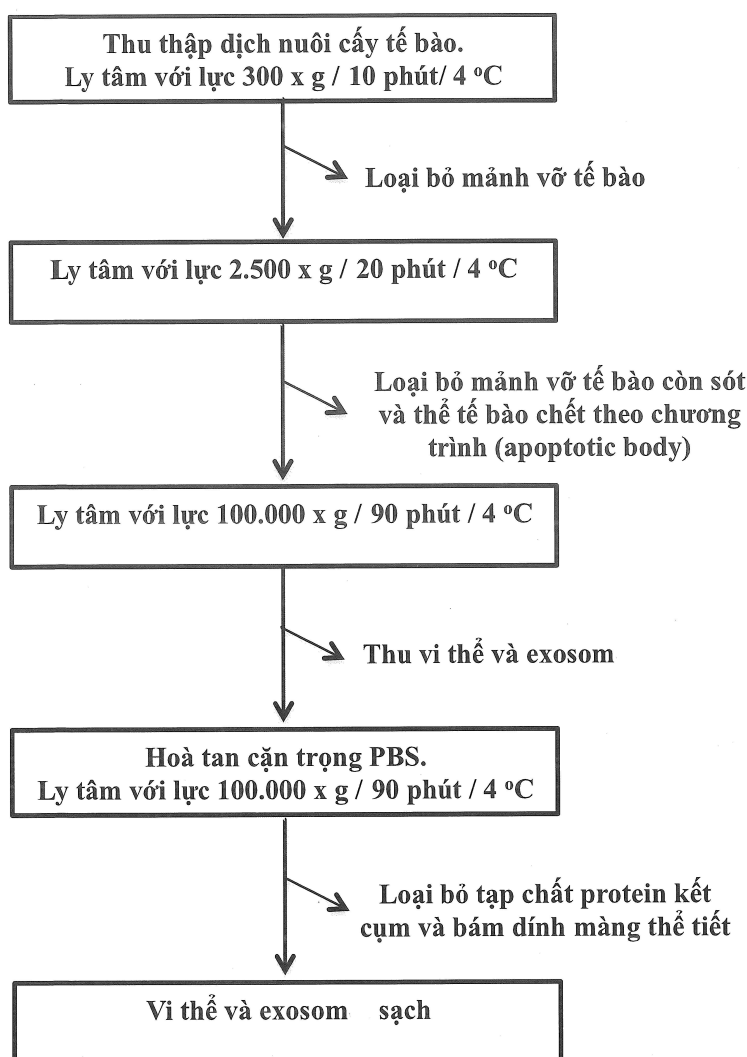
(72) Thân Thị Trang Uyên (VN); Nguyễn Thanh Liêm (VN); Hoàng Hương Diễm (VN).

(74) CÔNG TY LUẬT TRÁCH NHIỆM HỮU HẠN AMBYS HÀ NỘI (AMBYS HANOI)

(54) QUY TRÌNH PHÂN LẬP THỂ TIẾT ĐỒNG THỜI CHỨA VI THỂ VÀ TÚI
NGOẠI BÀO TỪ MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY TẾ BÀO GỐC TRUNG MÔ

(21) 2-2022-00523

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình phân lập thể tiết đồng thời chứa vi thể và túi ngoại bào (exosom) từ dịch nuôi cấy tế bào gốc trung mô theo tiêu chuẩn GMP, trong đó quy trình này bao gồm các bước: a) thu dịch nuôi cấy tế bào chứa vi thể và các exosom; b) ly tâm để loại bỏ tạp tế bào chết và mảnh vỡ tế bào; c) ly tâm để loại bỏ thể tiết loại lớn là sản phẩm của tế bào chết theo chương trình; d) thu cặn giàu vi thể và các exosom; và e) tinh sạch vi thể và các exosom. Quy trình theo giải pháp hữu ích sử dụng kỹ thuật ly tâm với các bước ly tâm, 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 để đồng thời thu được hỗn hợp vi thể và các exosom có kích thước từ 40 – 1000 nm tinh sạch với thời gian được rút ngắn và tăng hiệu suất thu hồi thể tiết. Giải pháp hữu ích còn đề xuất sản phẩm thể tiết đồng thời chứa vi thể và các exosom thu được có tác động kích thích tăng sinh số lượng tế bào và di cư của tế bào nguyên bào sợi biểu bì da.



HÌNH 1

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích đề cập đến lĩnh vực công nghệ sinh học, y sinh học và công nghệ tế bào ứng dụng trong y sinh học. Cụ thể, giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình phân lập làm giàu protein trong thể tiết ngoại bào (extracellular membrane vesicles) ứng dụng cho điều chế kem dưỡng da và mặt nạ dưỡng da từ môi trường nuôi cấy tế bào gốc trung mô được nuôi cấy theo tiêu chuẩn thực hành lâm sàng tốt (Good Manufacture Practice - GMP).

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Thể tiết ngoại bào (extracellular membrane vesicle - EVs) là sản phẩm cấu trúc dạng túi kín nhỏ được tiết ra bởi hầu hết các loại tế bào khác nhau trong cơ thể, từ nuôi cấy tế bào sơ cấp cũng như dòng tế bào thương mại trong phòng thí nghiệm. Dựa vào cơ chế phát sinh, thể tiết được chia làm ba loại (Than *et al.*, 2017):

(1) thể tế bào chết theo chương trình (apoptotic body): là quần thể thể tiết có kích thước lớn nhất từ 1 - 5 μm , hình dạng không đồng nhất, và là sản phẩm của tế bào chết theo chương trình, có chứa các mảnh DNA và bào quan tế bào;

(2) vi thể (microvesicle): là quần thể có kích thước trung bình từ 100 - 1000 nm, hình dạng không đồng nhất, là sản phẩm được hình thành theo cách mọc chồi trực tiếp từ màng tế bào; và

(3) túi ngoại bào (thể exosome): là quần thể thể tiết nhỏ nhất, có kích thước từ 40 - 150 nm, có hình dạng cái bát (cup-shape), được hình thành theo cơ chế nhập nội bào và giải phóng ra môi trường ngoại bào bằng cơ chế xuất bào.

Bảng 1: Tổng hợp phân loại thể tiết theo đặc điểm cơ chế hình thành, hình thái, kích thước và chất chỉ thị.

	Túi ngoại bào (Exosome)	Vi thể (Microvesicle)	Thể tế bào chết theo chương trình (Apoptotic body)
Cơ chế hình thành	Nhập nội bào và xuất bào	Mọc chồi trực tiếp từ màng tế bào	Chết theo chương trình
Hình thái	Cái bát	Không đồng nhất	Không đồng nhất

Kích thước	40 - 250 nm	100 - 1000 nm	1 – 5 μ m
Chất chỉ thị	CD9, CD63, CD81, TSG101, HSP70, ALIX	Phosphatidylserine, TSG101, HSP70, Selectin, Integrin, Flotillin	Histone, Phosphatidylserine, bào quan tế bào, mảnh DNA

Cả ba loại thể tiết này đều có cấu trúc màng là lớp lipid kép giống như màng tế bào. Trước đây thể tiết ngoại bào không được quan tâm, chúng chỉ được coi là rác thải từ tế bào và không có hoạt tính sinh học. Tuy nhiên, các nghiên cứu trong thập kỷ vừa qua đã chứng minh thể tiết có mang rất nhiều thành phần sinh học phân tử nội tại có hoạt tính sinh học như protein, vật chất di truyền (mARNs, miARNs) và lipid (<http://microvesicles.org/>). Quan trọng hơn nữa, thể tiết có thể truyền tải những vật chất này đến tế bào khác theo ba cơ chế khác nhau: (1) tiếp xúc phối tử/thụ thể; (2) trực tiếp dung hợp màng; và (3) nhập bào (Than *et al.*, 2017). Kể từ đó, thể tiết, đặc biệt là vi thể và các exosom, được quan tâm nhiều hơn; và các nghiên cứu gần đây đã chứng minh rằng thể tiết ngoại bào 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 thậm chí ở xa vị trí tiết (paracrine). Do vậy, các vi thể và các exosom đang đặc biệt được quan tâm nghiên cứu cho các ứng dụng trong tương lai nhằm mục đích chẩn đoán hay phát triển thành liệu pháp tiên tiến điều trị bệnh.

Hiện nay, kỹ thuật phân lập thể tiết được thực hiện bằng các kit thương mại hoặc theo kỹ thuật siêu ly tâm truyền thống (Gurunathan *et al.*, 2019). Kỹ thuật ly tâm và các bộ kit thương mại cũng được phát triển riêng cho từng loại dịch chứa thể tiết, chẳng hạn như dịch nuôi cấy tế bào, nước bọt, nước tiểu hay huyết tương. Các bộ kit thương mại thông thường dựa vào nguyên lý khác nhau để phân lập thể tiết, như: (1) kết tủa thể tiết bằng hoá chất như Total Exosom Isolation Reagent (Invitrogen) và ExoQuick (System Bioscience); hoặc gắn thể tiết với hạt từ gắn kháng thể đặc hiệu liên kết thể tiết sau đó phân tách thể tiết khỏi các hạt từ và thu lại bằng ly tâm như DynaMag™-2 Magnet (ThermoFisher Scientific), anti-EpCAM coated magnetic beads (System Biosciences) và MagCapture™ Exosom Isolation Kit; hoặc bằng các màng lọc phân lập dựa theo kích thước của thể tiết. Các bộ kit thương mại đều có ưu điểm là dễ thực hiện và thời gian phân lập thể tiết ngắn. 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 thể tiết, ví dụ như sự đơn giản,

quy mô thực hiện, tiết kiệm thời gian, độ tinh sạch, tính nguyên vẹn của thể tiết thu được và tính không ảnh hưởng đến chức năng của thể tiết sau khi thu thập. Các bộ kit thương mại kể trên tuy đơn giản, nhưng thể tiết thu được có độ tinh sạch không cao, hoặc kit MagCapture™ Exosom Isolation Kit PS (Wako) cho phép thu được thể túi các exosom với độ tinh sạch cao thì lại rất phức tạp, không thể thực hiện được ở quy mô lớn. Ngoài ra, các bộ kit thương mại này tối ưu cho phân tách chỉ một quần thể các exosom mà không có bộ kit nào thiết kế cho phân lập đồng thời vi thể (microvesicle) và thể túi các exosom. Quy trình truyền thống phân lập thể tiết bằng 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, công sức và hiệu suất thu thập thể tiết không cao. Thông thường, phương pháp siêu ly tâm kết hợp ly tâm mật độ tỷ trọng cao được sử dụng để phân lập và tinh sạch từng quần thể thể tiết riêng biệt (Théry *et al.*, 2006). Sản phẩm bước đầu từ siêu ly tâm sẽ tiếp tục được ly tâm mật độ tỷ trọng cao ở bước thứ hai. Các kết quả thu được từ ly tâm mật độ tỷ trọng cao cho chất lượng chất chỉ thị cao hơn cũng như hình ảnh chỉ ra độ tinh sạch tốt hơn (không bị các phân tử protein kết cụm bám dính khi soi dưới kính hiển vi) so với các bộ kit thương mại. Tuy nhiên, ly tâm tỷ trọng cao không phù hợp để phân lập kết hợp thu thập đồng thời hai quần thể vi thể và túi các exosom do tỷ trọng của hai quần thể này khác nhau. Các exosom phân bố ở mật độ tỷ trọng 1,15 đến 1,19 g/ml trong dung dịch gradien sucroza, trong khi đó vi thể (microvesicle) không đồng nhất về hình dạng, phổ kích thước phân bố rộng và biên độ trọng lượng rất rộng nên không thể phân tách bằng phương pháp mật độ tỷ trọng. Ngoài ra khi sử dụng phương pháp ly tâm tỷ trọng cao trong dung dịch sucroza hoặc iodoxanol, các phân tử sucroza và iodoxanol này sẽ có nguy cơ không được loại bỏ hoàn toàn khỏi dịch chứa các exosom. Điều này tuy không gây ảnh hưởng đến các kết quả xét nghiệm sinh hoá liên quan đến thành phần sinh học phân tử (các protein, các ARN) bên trong thể tiết các exosom, nhưng sẽ làm ảnh hưởng đến hiệu quả và chức năng sinh học của các exosom thu thập được bằng ly tâm tỷ trọng mật độ cao. Do vậy, ứng dụng điều trị sau này của thể tiết thu được bằng ly tâm tỷ trọng mật độ cao sẽ bị ảnh hưởng nghiêm trọng. Vậy nên, sử dụng phương pháp ly tâm tỷ trọng cao và các bộ kit thương mại là không phù hợp cho mục đích đồng thời tách được hai quần thể vi thể và các exosom, và ứng dụng hai quần thể thể tiết này cho các ứng dụng chức năng trong lâm sàng. Tuy nhiên, siêu ly tâm có thể đồng thời phân tách được cả hai quần thể vi thể và các exosom và có thể ứng dụng chúng sau này.

Hiện nay, các thông tin đã biết về phương pháp siêu ly tâm truyền thống thu thập các quần thể thể tiết (EV) riêng biệt được thực hiện theo trình tự tăng dần lực ly tâm (Théry *et al.*, 2006): (1) dịch nuôi tế bào sau khi thu thập được ly tâm ở 300 x g trong 10 phút để loại bỏ tế bào chết và mảnh vỡ tế bào; (2) sau đó dịch nổi ly tâm ở 2000 x g trong 10 phút để thu thập thể tế bào chết theo chương trình; (3) dịch nổi sau đó tiếp tục ly tâm ở 10000 x g trong 30 phút để thu thập vi thể; (4) và phần dịch nổi thu được ly tâm ở lực 100000 x g trong 70 phút để thu thập thể các exosom. Để tinh sạch các exosom, cần các exosom được pha loãng trong một thể tích nhỏ PBS và tiến hành ly tâm tỷ trọng trong 30% sucroza hoặc 60% iodoxanol ở 100000 x g trong 70 phút. Tuy vậy, các kết quả của phương pháp siêu ly tâm, siêu ly tâm kết hợp ly tâm tỷ trọng tinh sạch thể tiết lại cho các kết quả khác nhau ở các mô hình máy ly tâm và bộ rotor văng hay rotor góc khác nhau.

Mặc dù kỹ thuật phân lập các quần thể thể tiết theo trình tự tăng dần lực ly tâm để thu thập thể tế bào chết theo chương trình, vi thể và thể túi các exosom đã được công bố, nhưng quy trình này về cơ bản là phức tạp và mất nhiều thời gian. Sản phẩm thu được là ba quần thể thể tiết riêng biệt (Than *et al.*, 2018). Quy trình thực hiện trải qua nhiều bước tiến hành dẫn đến bị thất thoát nhiều thể tiết hơn do bám dính vào ống ly tâm, dụng cụ hút và chứa dịch và các thao tác thực hiện. Việc thu thập vi thể và các exosom riêng biệt sẽ làm giảm hàm lượng protein toàn phần thu được từ hai quần thể thể tiết này. Do vậy, việc thu thập đồng thời hai quần thể vi thể và túi các exosom là rất quan trọng do có thể tăng sản lượng protein toàn phần từ một thể tích dịch nuôi cấy. Việc thu thập được sản phẩm đồng thời chứa cả vi thể và các exosom trong cùng một sản phẩm ly tâm như trong mô tả của giải pháp hữu ích này sẽ làm giàu hơn hàm lượng hoạt chất phân tử sinh học trong chúng, giúp tăng hoạt tính sinh học của sản phẩm thể tiết, do đó làm giảm đáng kể chi phí nuôi cấy tế bào để tạo ra thể tiết. Tuy nhiên, kể cả các siêu ly tâm truyền thống, siêu ly tâm kết hợp ly tâm tỷ trọng và các kit thương mại đều chưa có quy trình mô tả phân lập đồng thời vi thể và thể túi các exosom.

Do đó, cần có quy trình phân lập đồng thời vi thể và các exosom nhằm thu được sản phẩm thể tiết bao gồm hỗn hợp vi thể và các exosom tinh sạch; loại bỏ được lượng protein kết tụ tạp nhiễm; tăng hàm lượng protein toàn phần, các hoạt chất sinh học có cùng hiệu quả chức năng trong các quần thể thể tiết; giảm được chi phí nguyên liệu; và, thời gian tạo ra sản phẩm thể tiết.

Tài liệu tham khảo

- Gurunathan, S., Kang, M. H., Jeyaraj, M., Qasim, M., & Kim, J. H. (2019). Review of the Isolation, Characterization, Biological Function, and Multifarious Therapeutic Approaches of Các exosom. *Cells*, 8(4).
- Stahl, P. D., & Raposo, G. (2019). Extracellular Vesicles: Các exosom and Microvesicles, Integrators of Homeostasis. *Physiology (Bethesda)*, 34(3), 169-177.
- Than, U. T. T., Guanzon, D., Broadbent, J. A., Leavesley, D. I., Salomon, C., & Parker, T. J. (2018). Differential expression of keratinocyte-derived extracellular vesicle miRnas discriminate các exosom from apoptotic bodies and microvesicles. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 9, 535.
- Than, U. T. T., Guanzon, D., Leavesley, D., & Parker, T. (2017). Association of extracellular membrane vesicles with cutaneous wound healing. *Int J Mol Sci*, 18(5).
- Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G., & Clayton, A. (2006). Isolation and characterization of các exosom from cell culture supernatants and biological fluids. *Current Protocols in Cell Biology*, 3.22.21-23.22.29.

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 theo giải pháp hữu ích đề xuất quy trình phân lập thể tiết ngoại bào đồng thời chứa vi thể và túi ngoại bào (các exosom) từ môi trường nuôi cấy tế bào gốc trung mô. Quy trình theo giải pháp dựa trên việc tối ưu hóa quy trình ly tâm nhằm:

- (i) cho phép phân lập được cả hai loại thể tiết vi thể và các exosom trong cùng một thời gian rút ngắn;
- (ii) tăng sản lượng protein toàn phần và do đó tăng hàm lượng các hoạt chất sinh học của thể tiết trong một sản phẩm;
- (iii) và sản phẩm hỗn hợp vi thể và các exosom có hiệu quả lên tế bào da tương tự với thể các exosom tinh sạch riêng biệt và ứng dụng sản phẩm hỗn hợp vi thể và các exosom cho sản xuất mỹ phẩm dưỡng da.

Theo đó, giải pháp hữu ích đề xuất quy trình phân lập thể tiết đồng thời chứa vi thể và túi ngoại bào các exosom từ môi trường nuôi cấy tế bào gốc trung mô cho mục đích làm giàu protein và ứng dụng trong điều chế mỹ phẩm dưỡng da, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) thu dịch nuôi cấy tế bào gốc trung mô chứa thể tiết gồm hỗn hợp tế bào chết theo chương trình, vi thể và các exosom. Tế bào gốc trung mô được nuôi cấy theo tiêu chuẩn

GMP. Khi tế bào phát triển đạt 80 % diện tích bề mặt chai nuôi cấy, dịch nổi nuôi cấy tế bào (supernatant) được thu thập. Dịch nổi có thể tiến hành ly tâm ở bước tiếp theo ngay sau khi thu hoặc có thể được bảo quản trong chai bảo quản tối đa trong 3 ngày (72 h) ở 4 °C trước khi ly tâm thu thập thể tiết.

b) ly tâm dịch nuôi tế bào đã thu với lực 300 x g trong 10 phút ở nhiệt độ 4 °C để thu dịch nổi, loại bỏ cặn sau ly tâm gồm xác tế bào và mảnh vỡ tế bào trong dịch nuôi cấy tế bào.

c) ly tâm phần dịch nổi thu được sau ly tâm ở bước b) với lực 2.500 x g trong 20 phút ở 4 °C để loại bỏ thể tế bào chết theo chương trình có trong dịch nổi thu từ nuôi cấy tế bào. Sau khi loại bỏ phần cặn chứa sản phẩm tế bào chết theo chương trình là quần thể thể tiết loại lớn và có thành phần khác biệt so với hai quần thể vi thể và các exosom, thu phần dịch nổi chứa vi thể và các exosom.

d) ly tâm phần dịch nổi thu được sau ly tâm ở bước c) chứa vi thể và các exosom với lực 100000 x g trong 90 phút ở 4 °C trong điều kiện áp suất giảm, thu cặn giàu vi thể và các exosom, loại bỏ phần dịch nổi. Theo phương án khác, quá trình ly tâm này được thực hiện trong điều kiện chân không.

e) tinh sạch hỗn hợp vi thể và các exosom bằng cách đánh tan phần cặn chứa vi thể và các exosom trong dung dịch muối đệm phosphat (PBS – Phosphate-buffered saline) và tiếp tục ly tâm thu hỗn hợp vi thể và các exosom sạch với lực ly tâm 100000 x g trong 90 phút ở 4 °C trong điều kiện áp suất giảm. Cặn thu được là sản phẩm gồm hỗn hợp vi thể và các exosom đã được rửa sạch các tạp chất bám dính. Quá trình ly tâm được thực hiện trong điều kiện chân không. Ngoài ra, lượng dung dịch PBS bổ sung để hòa tan cặn chứa vi thể và các exosom bằng lượng dịch nổi đầu vào ly tâm được loại bỏ sau khi kết thúc ly tâm.

Trong đó dịch nổi môi trường nuôi cấy tế bào gốc trung mô được thu nhận vào ngày thứ 4 nuôi cấy (D4) khi tế bào phát triển đạt 80 % diện tích bề mặt chai nuôi cấy. Tế bào được nuôi cấy với mật độ 5000 tế bào/1 cm² bề mặt chai nuôi cấy, thể tích 0,133 mL dịch môi trường/ 1 cm² chai nuôi cấy.

Tế bào gốc trung mô nuôi cấy cho thu thập vi thể và các exosom có thể ở bất kỳ giai đoạn nào từ P2 cho đến P7. Theo phương án của giải pháp hữu ích, thể tích dịch ly tâm

và/hoặc dung dịch PBS bổ sung để hòa tan cặn chứa vi thể và các exosom bằng 2/3 thể tích ống ly tâm.

Theo phương án của giải pháp hữu ích, trong đó cặn chứa vi thể và các exosom tinh sạch thu được bởi quy trình theo giải pháp được pha loãng trong dung dịch PBS 1X để trở thành sản phẩm gồm có vi thể và các exosom.

Giải pháp hữu ích đề xuất sản phẩm vi thể và các exosom tinh sạch thu được bởi quy trình theo giải pháp hữu ích. Sản phẩm của quy trình được bảo quản ở - 80 °C.

Theo phương án của giải pháp hữu ích, sản phẩm vi thể và các exosom thu được có hàm lượng protein toàn phần cao hơn so với quy trình thu thập các exosom thông thường. Cụ thể là hiệu suất thu hồi protein toàn phần đạt 150,1 %.

Theo phương án của giải pháp hữu ích, sản phẩm vi thể và các exosom thu được có hiệu quả kích thích hoạt động chức năng của tế bào nguyên bào sợi biểu bì da.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là lưu đồ quy trình phân lập thể tiết đồng thời chứa vi thể và các exosom từ dịch nuôi môi trường nuôi cấy tế bào gốc trung mô theo một phương án của giải pháp hữu ích.

Hình 2 là ảnh chụp vi thể và các exosom phân lập từ dịch nuôi tế bào gốc trung mô dây rốn qua kính hiển vi điện tử truyền qua được phân lập bằng quy trình theo một phương án của giải pháp hữu ích.

Hình 2A1 hình đại diện vi thể có kích thước và hình dạng không đồng nhất

Hình 2A2 là hình đại diện các exosom có kích thước khoảng 200 nm và có dạng lõm hình cái bát.

Hình 3 là hình ảnh phân tích chất chỉ thị của vi thể và các exosom phân lập từ dịch nuôi cấy tế bào gốc trung mô dây rốn.

Hình 4 là kết quả so sánh hiệu suất thu hồi hàm lượng protein toàn phần trong mẫu thu thập (A) (hỗn hợp vi thể và các exosom) theo giải pháp hữu ích và trong mẫu thu thập (B) (các exosom) theo quy trình thu thập thông thường.

Hình 5 là biểu đồ so sánh ảnh hưởng của sản phẩm hỗn hợp vi thể và các exosom thu được theo quy trình của giải pháp hữu ích và các exosom theo quy trình thông thường lên sự tăng sinh tế bào

Hình 6 là biểu đồ so sánh ảnh hưởng của hỗn hợp vi thể và các exosom và các exosom riêng lẻ lên sự di cư tế bào

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 thể tiết đồng thời chứa vi thể và các exosom giàu protein toàn phần từ môi trường nuôi cấy tế bào gốc trung mô cho mục đích điều chế sản phẩm dưỡng da, trong đó quy trình này bao gồm các bước: a) thu dịch nuôi cấy tế bào chứa các tạp chất và các quần thể thể tiết gồm cả thể tế bào chết theo chương trình, vi thể và các exosom; b) loại bỏ tạp chất là tế bào chết và mảnh vỡ tế bào; c) loại bỏ thể tế bào chết theo chương trình (apoptotic body) là sản phẩm của tế bào chết theo chương trình; d) thu cặn giàu vi thể và các exosom; và e) tinh sạch vi thể và các exosom.

Theo giải pháp hữu ích, vi thể và các exosom đích để phân lập theo giải pháp hữu ích là các túi kín nhỏ có màng lipit kép được tiết ra từ các loại tế bào gốc trung mô nuôi cấy theo tiêu chuẩn GMP. Vi thể và các exosom là hai quần thể kích thước trung bình và kích thước nhỏ của thể tiết ngoại bào (extracellular membrane vesicles - EV), có bản chất là lớp màng lipit kép giống như màng tế bào đóng kín thành dạng túi, chứa nhiều hoạt chất sinh học phân tử có chức năng bên trong, và được tiết ra từ nhiều loại tế bào khác nhau. Trong số các thể tiết ngoại bào, vi thể có phổ kích thước nhỏ và trung bình, từ 100 nm đến 1000 nm, có hình dạng không đồng nhất, được hình thành theo cơ chế mọc chồi trực tiếp từ màng tế bào. Trong khi đó các exosom có kích thước nhỏ nhất, từ 40 nm đến 200 nm, có hình dạng cái bát (cup-shape), được hình thành theo cơ chế nhập nội bào và giải phóng ra môi trường ngoại bào bằng cơ chế xuất bào. Hai quần thể vi thể và các exosom này khác với quần thể tế bào chết theo chương trình, thể tế bào chết theo chương trình có kích thước lớn nhất từ 1 - 5 μm , là sản phẩm của tế bào chết theo chương trình, có chứa các bào quan hoặc mảnh bào quan của tế bào và các mảnh DNA bị phân cắt trong quá trình tế bào chết. Do vậy chức năng và thành phần các vật chất sinh học trong thể tế bào chết theo chương trình khác biệt rất lớn so với vi thể và các exosom. Mặc dù các vi thể và các exosom này cùng có chứa nhiều thành phần sinh học phân tử; tuy nhiên, cho đến nay chỉ có các exosom là được quan tâm nghiên cứu nhiều hơn cả (Stahl *et al.*, 2019). Gần đây, người ta nhận

thấy một phần đáng kể các thành phần sinh học phân tử trong vi thể và các exosom là giống nhau (Than *et al.*, 2018), và điều này có thể làm cho vi thể và các exosom có hoạt tính sinh học như nhau đối với một số quá trình sinh học tế bào. Do vậy, có thể ứng dụng vi thể và các exosom để kích thích một quá trình sinh học hay điều trị một bệnh nhất định nào đó.

Trong bước thu dịch nổi nuôi tế bào có chứa vi thể và các exosom, môi trường nuôi cấy tế bào gốc trung mô được thu gom. Dịch nuôi cấy tế bào gốc trung mô có chứa vi thể và các exosom được thu thập từ phương pháp nuôi cấy tế bào theo tiêu chuẩn GMP. Theo đó, tế bào được cấy ở thời điểm ban đầu 5000 tế bào/1 cm² bề mặt chai nuôi cấy. Tế bào được nuôi trong điều kiện 37 °C và 5 % CO₂. Vào ngày thứ 4, khi tế bào đạt 80 % diện tích bề mặt chai nuôi cấy, dịch nuôi cấy tế bào được thu thập vào ống bảo quản. Dịch này sẽ được sử dụng để ly tâm thu thập vi thể và các exosom.

Trong bước loại tế bào chết và mảnh vỡ tế bào tạp nhiễm vào dịch nuôi tế bào, dịch nuôi tế bào được ly tâm với lực 300 x g trong thời gian 10 phút ở nhiệt độ 4 °C. Cặn ly tâm sẽ bị loại bỏ gồm xác tế bào chết không bám dính bề mặt chai nuôi cấy và các mảnh vỡ tế bào, kích thước nhỏ hơn hoặc tương đương kích thước tế bào gốc trung mô (17,9 µm). Tạp chất này có cấu trúc màng lipid kép giống như vi thể và các exosom cần được phân lập theo giải pháp hữu ích, tuy nhiên chúng không phải là túi kín do là sản phẩm của tế bào chết hoặc vỡ do bị hoại tử.

Trong bước loại bỏ sản phẩm tế bào chết theo chương trình – thể apoptotic body, dịch nổi được ly tâm với lực 2.500 x g trong thời gian 20 phút ở 4 °C. Cặn thu được sẽ bị loại bỏ là thể tế bào chết theo chương trình, kích thước từ 1 - 5 µm và có cấu trúc màng lipid kép giống như vi thể và các exosom cần được phân lập theo giải pháp hữu ích.

Trong bước thu thập vi thể và các exosom, dịch nổi sau khi loại bỏ thể tế bào chết theo chương trình được ly tâm với lực 100000 x g trong thời gian 90 phút ở 4 °C. Cặn thu được là hỗn hợp gồm có vi thể và các exosom với kích thước khác nhau, từ 40 nm đến 1000 nm. Chúng là các cấu trúc đóng kín, có hình dạng không đồng nhất (vi thể) hoặc dạng cái bát đồng nhất (các exosom).

Hình 2 thể hiện ảnh chụp vi thể và các exosom phân lập từ dịch nuôi tế bào gốc trung mô dây rốn qua kính hiển vi điện tử truyền qua được phân lập bằng quy trình theo một phương án của giải pháp hữu ích. Hình 2A1 là hình đại diện vi thể có kích thước và

hình dạng không đồng nhất. Hình 2A2 là hình đại diện các exosom có kích thước khoảng 200 nm và có dạng lõm hình cái bát. Hình ảnh cho thấy không có những cụm protein lớn và các cấu trúc lạ lẫn trong hỗn hợp vi thể và các exosom được quan sát. Đồng thời không có những đốm/ hạt đen là các cấu trúc phân tử protein kích thước lớn bám lên bề mặt vi thể và các exosom.

Hình 3 là hình ảnh phân tích chất chỉ thị của vi thể và các exosom phân lập từ dịch nuôi cấy tế bào gốc trung mô dây rốn. Cả ba mẫu sinh học đều có biểu hiện chất chỉ thị CD9 và HSP70. Lượng protein toàn phần sử dụng để tra vào các giếng là: mẫu 1: 10 μ g, mẫu 2: 5 μ g, mẫu 3: 5 μ g.

Hình 4 là bảng số liệu so sánh hàm lượng protein toàn phần thu được từ một mẫu thể tích môi trường nuôi cấy theo quy trình phân lập hỗn hợp vi thể và các exosom của giải pháp hữu ích (A) và quy trình phân lập thể tiết cho các exosom theo quy trình thông thường (B) đã công bố. Kết quả được thử nghiệm cho 05 mẫu thể tiết thu từ tế bào gốc trung mô dây rốn nuôi cấy ở P3. Kết quả cho thấy, trung bình hàm lượng protein toàn phần trong mẫu (A) (là sản phẩm hỗn hợp vi thể và các exosom thu thập theo quy trình của giải pháp hữu ích) đạt hiệu suất cao hơn 150,1 % so với mẫu (B) (là thể tiết thu theo quy trình thông thường).

Hình 5 là bảng số liệu so sánh vai trò trong sự tăng sinh tế bào nguyên bào sợi biểu bì da của hỗn hợp vi thể và các exosom thu được theo giải pháp hữu ích và thể các exosom thu được theo quy trình thông thường. Thử nghiệm tăng sinh thực hiện trên hai nguồn tế bào tiết thể tiết là tế bào gốc trung mô mô mỡ và tế bào gốc trung mô dây rốn. Hình 5A thể hiện số lượng tế bào nguyên bào sợi biểu bì da tăng sinh từ giai đoạn 0 h đến 48 h khi tế bào được bổ sung hỗn hợp vi thể và các exosom tiết từ tế bào gốc trung mô dây rốn (EV_UC), hỗn hợp vi thể và các exosom tiết từ tế bào gốc trung mô mô mỡ (EV_AD), thể các exosom tiết từ tế bào gốc trung mô dây rốn (EX_UC), và thể các exosom tiết từ tế bào gốc trung mô mô mỡ (EX_AD). Cả bốn nhóm thí nghiệm đều cho thấy số lượng tế bào tăng lên nhiều so với nhóm đối chứng (là nhóm được nuôi cấy theo quy trình thông thường không được bổ sung thể tiết). Hình 5B cho thấy sự khác biệt (có phân tích thống kê) giữa các nhóm tế bào nguyên bào sợi biểu bì da được bổ sung thể tiết ở thời điểm 24 h, trong đó nhóm nguyên bào sợi biểu bì da tăng sinh tốt nhất khi được bổ sung vào môi trường nuôi cấy hỗn hợp vi thể và các exosom (EV_UC và EV_AD). Hình 5C cho thấy có sự tăng

số lượng tế bào (có phân tích thống kê) của các nhóm tế bào nguyên bào sợi biểu bì da được bổ sung thể tiết so với nhóm tế bào nguyên bào sợi không được bổ sung thể tiết (nhóm đối chứng) ở thời điểm 48 h; tuy nhiên, không có sự khác biệt về tăng sinh số lượng tế bào giữa các nhóm nguyên bào sợi biểu bì khi được bổ sung vào môi trường nuôi cấy hỗn hợp vi thể và các exosom (EV_UC và EV_AD) hay thể các exosom (EX_UC, EX_AD).

Hình 6 là bảng số liệu so sánh vai trò trong sự di cư tế bào nguyên bào sợi biểu bì da của hỗn hợp sản phẩm vi thể và các exosom thu được theo giải pháp hữu ích và thể các exosom thu được theo quy trình thông thường. Thử nghiệm sự di cư của nguyên bào sợi biểu bì da dưới tác động của thể tiết được thực hiện trên hai nguồn tế bào tiết thể tiết là tế bào gốc trung mô mô mỡ và tế bào gốc trung mô dây rốn. Số liệu cho thấy sự di cư của nguyên bào sợi biểu bì da ở các nhóm tế bào bổ sung với thể tiết đều cao hơn so với nhóm đối chứng bắt đầu từ thời điểm 24h. Trong đó, không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nhóm tế bào được bổ sung vào môi trường nuôi cấy hỗn hợp vi thể và các exosom (EV_UC và EV_AD) hay thể các exosom (EX_UC, EX_AD).

Các tác giả giải pháp hữu ích đã nghiên cứu và phát hiện ra rằng, bằng cách ly tâm với lực 2.500 x g trong thời gian 20 phút ở 4°C sẽ loại bỏ được thể tế bào chết theo chương trình có kích thước ≥ 1000 nm. Tiếp đó bằng cách ly tâm một lần duy nhất với lực 100000 x g trong 90 phút ở 4 °C trong điều kiện áp suất chân không cho phép thu được đồng thời cả vi thể và các exosom đạt hiệu suất thu hồi cao nhất. Cặn vi thể và các exosom được pha loãng trong PBS và ly tâm lại với lực 100000 x g trong thời gian 90 phút ở 4 °C sẽ loại bỏ hiệu quả các thành phần protein tạp nhiễm bám dính lên bề mặt vi thể và các exosom hoặc các thành phần protein kết dính tạo cụm có kích thước và trọng lượng tương đương vi thể hoặc các exosom. Ngoài ra, do không cần thực hiện các bước thu thập vi thể và các exosom riêng biệt nên cho phép thu được hai quần thể này trong một sản phẩm ly tâm với lượng lớn hơn so với phương pháp ly tâm truyền thống thực hiện 2 bước tách biệt thu thập vi thể và các exosom.

Trong bước thu loại bỏ thể tế bào chết theo chương trình, với lực 2.500 x g và thời gian ly tâm 20 phút ở 4 °C, tác giả giải pháp hữu ích nhận thấy rằng thể tế bào chết theo chương trình được loại bỏ hiệu quả, không bị tạp nhiễm vào sản phẩm vi thể và các exosom ở thì ly tâm sau. Các quy trình ly tâm trước đây được thực hiện quá trình tự tăng dần lực

ly tâm nhằm mục đích các thể tế bào chết theo chương trình kích thước lớn, trọng lượng lớn ($1 - 5 \mu\text{m}$) sẽ bị loại bỏ với lực ly tâm thấp và không bị nhiễm vào các vi thể và các exosom nhỏ hơn. Tuy nhiên, các quy trình trước đây ly tâm dịch nuôi tế bào hay dịch lỏng ở $2.000 \times g$ trong thời gian 20 phút ở 4°C để loại bỏ thể tế bào chết theo chương trình, các thể tế bào chết theo chương trình vẫn còn sót lại với số lượng ít sẽ lắng hoàn toàn cùng vi thể ($100 - 1000 \text{ nm}$) ở bước ly tâm tiếp theo với lực $10000 \times g$ trong thời gian 30 phút ở 4°C . Các vi thể vẫn còn sót lại trong dịch nổi từ bước ly tâm trên sẽ bị lắng hoàn toàn xuống cặn cùng thể các exosom ở lần ly tâm tiếp theo với lực $100000 \times g$ trong 90 phút ở 4°C . Do vậy, ở phương pháp siêu ly tâm truyền thống có sự nhiễm chéo một phần của thể tế bào chết theo chương trình vào vi thể, và nhiễm một phần vi thể vào các exosom. Với phương pháp sử dụng lực ly tâm và thời gian ly tâm của giải pháp hữu ích này, toàn bộ thể tế bào chết theo chương trình đã được loại bỏ hoàn toàn khỏi dịch nổi và sẽ không làm nhiễm sản phẩm vi thể và các exosom cần được thu thập theo giải pháp theo giải pháp hữu ích.

Tại bước thu thập vi thể và các exosom, phần dịch nổi chứa vi thể và các exosom được tiến hành ly tâm với lực $100000 \times g$ trong 90 phút ở 4°C trong điều kiện áp suất giảm. Quá trình này được thực hiện với thời gian dài tương đương so với phương pháp thông thường. Thời gian ly tâm theo giải pháp hữu ích sẽ thu được cả những vi thể có kích thước và trọng lượng lớn lắng xuống trước, các exosom kích thước và trọng lượng nhỏ lắng xuống đáy ống ly tâm chậm hơn so với vi thể. Với lực ly tâm lớn hơn và/ hoặc thời gian ly tâm dài hơn có thể có hiệu suất thu hồi tương đương, tuy nhiên sẽ có nguy cơ phá huỷ vi thể bởi sự tác động của lực ly tâm.

Trong bước tinh sạch vi thể và các exosom, cặn hỗn hợp vi thể và các exosom được pha loãng trong thể tích PBS tương đương với thể tích dịch nổi được loại bỏ. Việc pha loãng này kết hợp đảo trộn bằng pipett nhẹ nhàng sẽ tách rời các hạt protein có thể bám dính vào bề mặt thể tiết, đồng thời lực đảo trộn bằng pipet có thể phá vỡ các cấu trúc lỏng lẻo của protein kết cụm lớn (từ những phân tử protein nhỏ) đã lắng xuống cùng cặn vi thể và các exosom khi ly tâm thu thập vi thể và các exosom. Tiếp theo dung dịch PBS có chứa vi thể và các exosom sẽ được tiến hành ly tâm với lực $100000 \times g$ trong 70 - 90 phút ở 4°C . Với lực ly tâm tương tự bước thu thập cặn vi thể và các exosom, tác giả giải pháp nhận thấy rằng thu hồi hiệu quả vi thể và các exosom sạch và đã loại bỏ được các thành phần bám dính. Đồng thời, thời gian ly tâm có thể giảm bớt 20 phút xuống còn 70 phút

hoặc giữ nguyên thời gian ly tâm trong 90 phút đều không ảnh hưởng đến hiệu suất thu thập vi thể và các exosom. Dịch nuôi tế bào có chứa nhiều thành phần bổ sung và có độ nhớt cao trong bước ly tâm thu thập vi thể và các exosom, nên thời gian tinh sạch vi thể và các exosom ở bước rửa sạch có thể thực hiện nhanh hơn (trong 70 phút) do độ nhớt trong dịch rửa PBS nhỏ hơn làm nhanh hơn quá trình lắng xuống của vi thể và các exosom. Hơn nữa, quá trình tinh sạch này không cần thực hiện bước ly tâm tỷ trọng trong dung môi sucroza 30% hoặc iodoxanol 60% mà vẫn thu được vi thể và các exosom tinh sạch. Hay theo cách khác, bằng cách kết hợp ly tâm 100000 x g trong 90 phút ở 4 °C và 100000 x g trong 70 - 90 phút ở 4 °C đã cho phép thu được vi thể và các exosom tinh sạch. Điều này dẫn đến tăng hiệu suất thu thập vi thể và các exosom, rút ngắn quá trình phân lập vi thể và các exosom một cách hiệu quả (ngắn hơn quá trình thu thập thông thường 50 phút). Quá trình tinh sạch theo giải pháp hữu ích chỉ nhằm loại bỏ các phân tử protein bám dính lên bề mặt vi thể và các exosom, các hạt protein kết cụm và các phân tử nhỏ không phải vi thể và các exosom tạp nhiễm vào dịch nuôi tế bào, cùng lắng đọng vào cặn ly tâm. Hơn nữa, việc tăng hiệu quả thu hỗn hợp vi thể và các exosom sẽ làm tăng lượng các thành phần sinh học phân tử (protein) trong hỗn hợp, do đó sẽ làm tăng hiệu quả sinh học của sản phẩm, giảm chi phí đầu vào như hoá chất, vật tư và nhân lực cho việc nuôi tế bào và ly tâm thu thập thể tiết.

Theo đó, sau khi thu sản phẩm vi thể và các exosom tinh sạch ở dạng cặn, phần cặn chứa vi thể và các exosom tinh sạch này được pha loãng trong dung dịch PBS 1X và bảo quản ở -80 °C cho đến khi sử dụng.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1: Nuôi cấy tế bào gốc trung mô

Tiến hành xử lý bề mặt chai nuôi cấy bằng cách pha loãng dung dịch CTS™ CELLStart Substrate (Gibco, USA) trong PBS với tỷ lệ 1 : 300. Bổ sung 5 mL dung dịch CELLStart đã pha loãng vào chai nuôi cấy tế bào T75 (Nunc™ EasYFlask 75cm² Cell Culture Flask, ThermoFisher Scientific, USA) hoặc 10 mL dung dịch CellStart đã pha loãng vào chai nuôi cấy tế bào T225 (Nunc™ EasYFlask 225cm² Cell Culture Flask, ThermoFisher Scientific, USA). Dung dịch xử lý bề mặt chai được ủ ở 37 °C trong thời gian 30 phút hoặc ở 4 °C trong thời gian tối đa 48 h trước khi rửa hai lần bằng PBS.

Hút môi trường nuôi cấy tế bào gốc trung mô StemMACS cho vào chai nuôi cấy tế bào T75 hoặc T225. Sử dụng kỹ thuật trộn bằng pipet trộn đều dịch tế bào, hút dịch tế bào vào nuôi cấy sao cho mật độ 5000 tế bào/1 cm² bề mặt chai nuôi cấy. Nuôi tế bào ở 37 °C và 5 % CO₂. Nguồn tế bào có thể có từ rã đông hoặc trực tiếp từ cấy chuyển tế bào. Tế bào được ủ tiếp ở 37 °C và 5 % CO₂ trong thời gian 4 ngày để tế bào phát triển.

Tại ngày thứ 2, hút bỏ môi trường nuôi cấy bằng pipet. Bổ sung môi trường nuôi cấy mới với thể tích tương đương (10 mL/T75 hoặc 30 mL/T225).

Vào ngày thứ 4, khi tế bào đạt khoảng 80 % diện tích bề mặt chai nuôi cấy, thu tế bào bảo quản hoặc cấy chuyển tế bào. Nếu tế bào không đạt 80 % diện tích bề mặt chai nuôi cấy vào ngày thứ 4, tiếp tục thay môi trường mới cho đến khi tế bào phát triển đạt 80 % diện tích bề mặt chai.

Ví dụ 2: Phân lập vi thể và các exosom từ môi trường nuôi cấy tế bào gốc trung mô

Tiến hành xử lý bề mặt chai nuôi cấy bằng cách pha loãng dung dịch CTS™ CELLStart Substrate (Gibco, USA) trong PBS với tỷ lệ 1 : 300. Bổ sung 5 mL dung dịch CELLStart đã pha loãng vào chai nuôi cấy tế bào T75 (Nunc™ EasYFlask 75cm² Cell Culture Flask, ThermoFisher Scientific, USA). Thực hiện xử lý bề mặt 05 chai nuôi cấy tế bào T75. Dung dịch xử lý bề mặt chai được ủ ở 37 °C trong thời gian 30 phút hoặc 4 °C trong tối đa 48 h trước khi rửa hai lần bằng PBS. Tiếp theo đó tế bào được cấy vào chai với mật độ 375.000 tế bào trong 10 mL môi trường cho 01 chai T75. Tế bào được ủ tiếp ở 37 °C và 5 % CO₂ trong thời gian 4 ngày để tế bào phát triển. Tại ngày thứ 4, khi tế bào đạt 80 % diện tích bề mặt chai nuôi cấy, môi trường nuôi cấy được hút chia vào 02 ống ly tâm 50 mL (Corning, USA), mỗi ống 25 mL và bảo quản ở 4 °C trong thời gian tối đa 48 giờ cho tới khi ly tâm.

Hai ống dịch tế bào thu được vào ngày nuôi cấy thứ 4 được ly tâm ở 300 x g trong 10 phút ở 4 °C (Allegra X-15R, Benchtop Centrifuge, Beckman Coulter) và loại bỏ cặn tế bào chết và mảnh vỡ tế bào. Thu dịch nuôi cấy chứa thể tế bào chết theo chương trình, vi thể và các exosom.

Dịch nổi tiếp tục được chuyển vào ống ly tâm 50 mL và ly tâm với lực 2.500 x g (Allegra X-15R, Benchtop Centrifuge, Beckman Coulter) trong thời gian 20 phút ở 4 °C

để làm lắng cặn thể tế bào chết theo chương trình. Cặn thể tế bào chết theo chương trình được loại bỏ và thu dịch nổi chứa vi thể và các exosom.

Sau khi thu dịch nổi giàu vi thể và các exosom, dịch nổi được cho vào ống ly tâm chuẩn bị cho thu thập vi thể và các exosom.

Vệ sinh hai bộ rotor SW 32Ti và SW 40Ti (Beckman Coulter) và các bộ adaptor tương ứng bằng ethanol 70 % và để ở 4 °C qua đêm để làm lạnh trước khi sử dụng. Khử trùng các ống ly tâm Optiseal Polypropylene 29,9 mL và Thinwall Polypropylene 13,2 mL (Beckman Coulter) bằng nhiệt trước khi tiến hành ly tâm.

Dịch nổi chứa vi thể và các exosom được chuyển vào các ống ly Optiseal Polypropylene với thể tích đạt từ 20 đến 25 mL (Beckman Coulter). 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 nổi giàu vi thể và các exosom hoặc PBS. Đưa các ống ly tâm có chứa dịch nổi chứa vi thể và các exosom và ống đối trọng vào adaptor và đóng kín nắp. Gắn bộ adaptor vào rotor SW 32Ti đã để lạnh theo thứ tự từ 1 đến 6. Nếu không đủ dịch cho 6 ống ly tâm thì vẫn phải lắp các adaptor theo đúng vị trí từ 1 đến 6 đã được ghi rõ trên adaptor và rotor. Các thao tác được thực hiện trong tủ an toàn sinh học. Mở nguồn điện của máy ly tâm và vệ sinh máy bằng ethanol 70 °C và giấy không bụi Kimwipes trước khi đặt rotor vào máy ly tâm và đóng chặt cửa máy.

Sau đó lựa chọn chương trình chạy: loại rotor văng SW 32Ti, loại ống Optiseal Polypropylene 29,9 mL (Beckman Coulter), lực ly tâm: 100000 x 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 µL thì tiến hành chạy máy.

Khi kết thúc chu kỳ ly tâm, bơm khí vào buồng máy ly tâm, mở cửa máy và lấy rotor cùng với adaptor ra khỏi máy. Chuyển các adaptor ra giá đỡ và chuyển rotor vào bảo quản lạnh 4 °C. Vệ sinh adaptor bằng ethanol 70 °C và chuyển adaptor có chứa ống ly tâm vào tủ an toàn sinh học. Lấy ống ly tâm có chứa dịch nổi ly tâm ra giá đỡ và hút bỏ dịch nổi. Phần cặn thu được gồm vi thể và các exosom và có thể là các thành phần tạp nhiễm như các phân tử protein kết thành cụm protein kích thước lớn. Cặn thu được tiếp tục được đánh

tan và pha loãng trong PBS. Thể tích PBS pha loãng bằng với thể tích dịch nổi giàu vi thể và các exosom ban đầu khi tiến hành ly tâm.

Hút dịch PBS pha loãng vi thể và các exosom chuyển sang ống ly tâm Thinwall Polypropylene 13,2 mL (Beckman Coulter) đã khử trùng nhiệt sao cho thể tích đạt 2/3 ống (từ 9 đến 12 mL). 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 dung dịch PBS pha loãng có chứa vi thể và các exosom hoặc PBS. Đưa các ống ly tâm và ống đối trọng vào bộ lắp ghép và lắp vào rotor SW 40Ti đã để lạnh theo số thứ tự. Gắn bộ adaptor vào rotor SW 40Ti đã để lạnh theo thứ tự từ 1 đến 6. Nếu không đủ dịch cho 6 ống ly tâm thì vẫn phải lắp các adaptor theo đúng vị trí từ 1 đến 6 đã được ghi rõ trên adaptor và rotor. Các thao tác được thực hiện trong tủ an toàn sinh học. Mở nguồn điện của máy ly tâm và vệ sinh máy trước khi đặt rotor vào máy ly tâm (Optima™ XPN 100K, Beckman Coulter) và đóng chặt cửa máy.

Sau đó chọn chương trình chạy: loại rotor SW 40Ti, loại ống Thinwall Polypropylene 13,2 mL (Beckman Coulter), lực ly tâm: 100000 x 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 µL thì bắt đầu chạy máy.

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

Tiếp theo, lấy ống ly tâm ra khỏi adaptor và đặt lên giá đỡ. Hút loại bỏ dịch nổi và thu phần cặn là vi thể và các exosom. Cặn vi thể và các exosom này được pha loãng trong PBS và bảo quản ở - 80 °C.

Ví dụ 3. Kiểm tra hình thái học sản phẩm vi thể và các exosom thu được

Để kiểm tra về mặt hình thái học sản phẩm thể tiết bao gồm vi thể và các exosom thu được từ ví dụ 2, tiến hành kiểm tra bằng cách nhuộm màu và soi dưới kính hiển vi điện tử truyền qua (transmission electron microscope).

Cặn vi thể và các exosom được cố định bằng paraformaldehyt 4 % với thể tích 1 : 1. Hút 5 µL dung dịch thể tiết đã được cố định chuyển sang màng Formvar-carbon coated grids (Ted Pella, Inc., Redding CA) và đợi khô ở nhiệt độ phòng. Nhuộm thể tiết bằng

uranyl-oxalat trong 10 - 15 phút ở nhiệt độ phòng, sau đó tiếp tục để khô tự nhiên ở nhiệt độ phòng. Soi màng formvar-carbon bằng kính hiển vi điện tử truyền qua JEOL 1100 Transmission Electron Microscope (TEM) (JEOL Ltd., Tokyo, Japan).

Kết quả được thể hiện trên hình 2 cho thấy có hai quần thể thể tiết cùng được quan sát trên hình ảnh. Cụ thể:

(1) vi thể (hình 2A1) thu được là quần thể thể tiết có kích thước trung bình từ 100 nm đến 1000 nm. Hình dạng không đồng nhất giữa các vi thể. Bề mặt vi thể nhăn và không nhẵn do sự mất nước trong quá trình nhuộm.

(2) các exosom (hình 2A2) thu được có hình cái bát do sự sụp xuống của màng các exosom là kết quả của sự mất nước trong quá trình nhuộm, kích thước từ 40 nm đến 250 nm. Đặc điểm các exosom khác biệt so với vi thể về kích thước và hình dạng. Tuy cùng trải qua một quy trình nhuộm và cùng bị mất nước do tác động của thuốc nhuộm, nhưng vi thể không bị sụp màng lipid mà bị nhăn bề mặt màng và có hình dạng không đồng nhất, còn các exosom có bề mặt nhẵn và màng lipid bị sụp xuống thành vết lõm tạo ra hình dạng cái bát.

Quan sát thấy hai quần thể vi thể và các exosom thu được trong cùng một sản phẩm ly tâm cho thấy quy trình ly tâm trong ví dụ 2 đạt hiệu quả thu thập cả vi thể và các exosom.

Quan sát thấy không có các hạt nhuộm màu đen là các phân tử protein kết cụm lại tạo thành cấu trúc protein lớn lắng cặn cùng vi thể và các exosom trong quá trình ly tâm. Đồng thời, cũng không quan sát thấy có sự bám dính của các phân tử protein lên màng vi thể và các exosom. Điều này cho thấy vi thể và các exosom thu được theo ví dụ 2 là hoàn toàn tinh sạch (hình 2).

Ví dụ 4: Kiểm tra chất chỉ thị sản phẩm thể tiết vi thể và các exosom thu được

Để kiểm tra chất chỉ thị protein đối với sản phẩm thu được từ ví dụ 2, tiến hành chiết protein tổng số của hỗn hợp vi thể và các exosom thu được. Tiến hành phân tách bằng điện di gel 4 – 12 % polyacrylamit. Protein sau đó được chuyển sang màng PDVF và nhuộm với kháng thể CD9 và HSP70.

Kết quả được thể hiện trên hình 3 cho thấy các mẫu đều biểu hiện dấu hiệu các chất chỉ thị. Mẫu 1: mẫu hỗn hợp vi thể và các exosom thu được từ lần nuôi cấy tế bào 1; mẫu

2: mẫu hỗn hợp vi thể và các exosom thu được từ lần nuôi cấy tế bào 2; mẫu 3: mẫu hỗn hợp vi thể và các exosom thu được từ lần nuôi cấy 3.

Kết quả phân tích chất chỉ thị vi thể và các exosom này bổ sung chứng cứ cho phân tích hình thái vi thể và các exosom trong ví dụ 3. Điều này tiếp tục chứng tỏ sản phẩm thu được chứa vi thể và các exosom.

Ví dụ 5: Kiểm tra hàm lượng protein toàn phần của sản phẩm vi thể và các exosom thu được

Tế bào gốc trung mô dây rốn được nuôi theo ví dụ 1 ở P3. Dịch nổi nuôi cấy được thu và phân lập vi thể và các exosom được thực hiện theo ví dụ 2. Các exosom được thu thập theo quy trình phân lập thông thường, cụ thể lần lượt trải qua các bước ly tâm: 300 x g/10 phút, 2000 x g/10 phút, 10000 x g/30 phút, 100000 x g/90 phút, và rửa ở 100000 x g/90 phút. Tất cả các thí nghiệm được thực hiện ở điều kiện 4 °C.

Sản phẩm hỗn hợp vi thể và các exosom thu được theo quy trình của giải pháp hữu ích được kiểm tra hàm lượng protein tổng số bằng bộ kit Pierce BCA Protein Assay Kit (BCA) (Thermo Fisher Scientific). Đồng thời, mẫu các exosom thu được theo quy trình thông thường cũng được kiểm tra hàm lượng protein toàn phần nhằm so sánh với lượng protein thu được theo giải pháp hữu ích.

Mẫu sản phẩm được trộn với đệm tách chiết protein (RIPPA) và ủ ở 95 °C/5 phút. Ly tâm loại bỏ cặn và thu dịch nổi.

Chuẩn bị dung dịch protein albumin chuẩn theo dải từ 0 µg, 25 µg, 125 µg, 250 µg, 500 µg, 750 µg, 1000 µg, 1500 µg, 2000 µg theo hướng dẫn của bộ kit.

Pha dung dịch BCA theo lượng mẫu tính dựa theo công thức sau:

$(\text{số mẫu albumin chuẩn} + \text{số mẫu cần đo}) \times (3 \text{ lần lặp lại}) \times (\text{thể tích BCA/1 mẫu}) = \text{thể tích dung dịch cần}$. Tiếp đó pha dung dịch BCA theo tỷ lệ về thể tích 50 chất A : 1 chất B.

Quy trình thực hiện được tiến hành theo từng bước như sau:

Nhỏ 25 µL mẫu chuẩn albumin, mẫu vi thể và các exosom, và mẫu các exosom vào các giếng của đĩa 96 giếng.

Nhỏ dung dịch 200 μL dung dịch BCA vào tất cả các giếng chứa mẫu chuẩn albumin, vi thể và các exosom, và các exosom. Lắc đều trong vòng 30 giây.

Ủ ở 37°C trong 30 phút. Kết thúc ủ lấy ra để lạnh ở nhiệt độ phòng.

Đo độ hấp thụ tại bước sóng 562 nm bằng máy đo quang phổ Glomax.

Dựng đường chuẩn và tính toán nồng độ protein toàn phần trong các mẫu vi thể và các exosom và mẫu các exosom theo nồng độ mẫu chất chuẩn albumin đã biết.

Kết quả đo lường protein toàn phần được thể hiện trong hình 4 cho thấy hàm lượng protein toàn phần thu được trong hỗn hợp vi thể và các exosom cao hơn so với hàm lượng protein toàn phần thu được trong mẫu các exosom.

Từ cùng một số lượng tế bào tiết ra, lượng protein toàn phần trong hỗn hợp vi thể và các exosom thu thập theo ví dụ 2 của giải pháp hữu ích đạt trung bình là $0,722 \mu\text{g}/10^6$ tế bào tiết so với $0,481 \mu\text{g}/10^6$ tế bào tiết trong các exosom thu thập theo phương pháp thông thường. Hiệu suất thu hồi protein tổng số theo giải pháp hữu ích cao hơn 150,1 % so với phương pháp thông thường.

Ví dụ 6: Kiểm tra tác động của sản phẩm vi thể và các exosom lên sự tăng sinh số lượng tế bào nguyên bào sợi biểu bì da

Tế bào nguyên bào sợi biểu bì da người được nuôi cấy trong môi trường Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) có chứa 5 % huyết thanh nhau thai bò (FBS). Ban đầu, nguyên bào sợi biểu bì được cấy với mật độ 18.000 tế bào/500 μL DMEM/1 giếng của đĩa nuôi tế bào 24 giếng và được để qua đêm cho tế bào bám dính vào bề mặt đĩa nuôi cấy trong điều kiện 37°C và 5 % CO_2 .

Sau khi để qua đêm, loại bỏ môi trường cũ và thay môi trường nuôi tế bào mới DMEM và 5 % FBS đã ly tâm ở $120000 \times g/18 \text{ h}$ để loại bỏ thể tiết FBS.

Bổ sung vào các giếng nuôi cấy dịch chứa vi thể và các exosom (phân lập theo ví dụ 2 của giải pháp hữu ích) và các exosom (thu thập theo phương pháp thông thường) với nồng độ $1 \mu\text{g}$ protein toàn phần dịch thể tiết/1 mL môi trường nuôi cấy, tương đương $0,5 \mu\text{g}$ protein toàn phần dịch thể tiết/500 μL môi trường/1 giếng thí nghiệm.

Thể tiết được phân lập cho thử nghiệm tăng sinh tế bào được thu thập từ tế bào gốc trung mô dây rốn và tế bào gốc trung mô mô mỡ. Hỗn hợp vi thể và các exosom tiết từ tế

bào gốc trung mô dây rốn viết tắt là EV_UC; hỗn hợp vi thể và các exosom tiết từ tế bào gốc trung mô mô mỡ viết tắt là EV_AD; thể các exosom tiết từ tế bào gốc trung mô dây rốn viết tắt là EX_UC; và thể các exosom tiết từ tế bào gốc trung mô mô mỡ viết tắt là EX_AD.

Tế bào nguyên bào sợi biểu mô da được nuôi và phát triển bình thường trong điều kiện 37 °C và 5 % CO₂. Đếm số lượng tế bào ở các thời điểm 24 h và 48 h để tính khả năng tăng sinh số lượng tế bào dưới sự kích thích của thể tiết. Nhóm đối chứng được tiến hành như nuôi cấy tế bào bình thường và không được bổ sung thể tiết.

Kết quả thu được về sự tăng sinh số lượng tế bào qua các thời điểm 24 h và 48 h được thể hiện trong hình 5 cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nhóm tế bào nguyên bào sợi biểu bì da được bổ sung thể tiết ở thời điểm 24 h, trong đó nhóm nguyên bào sợi biểu bì da tăng sinh tốt nhất khi được bổ sung vào môi trường nuôi cấy hỗn hợp vi thể và các exosom (EV_UC và EV_AD). Tại thời điểm 48h, không có sự khác biệt về tăng sinh số lượng tế bào giữa các nhóm nguyên bào sợi biểu bì khi được bổ sung vào môi trường nuôi cấy hỗn hợp vi thể và các exosom (EV_UC và EV_AD) hay thể các exosom (EX_UC, EX_AD), tuy nhiên tất cả các nhóm tế bào được bổ sung thể tiết đều biểu hiện khả năng tăng sinh số lượng tế bào tốt hơn nhóm đối chứng không được bổ sung thể tiết.

Kết quả này cho thấy với hàm lượng protein toàn phần như nhau, hỗn hợp sản phẩm vi thể và các exosom thu thập theo ví dụ 2 của giải pháp hữu ích và sản phẩm các exosom thu thập theo quy trình thông thường có tác dụng như nhau đối với sự tăng sinh số lượng tế bào nguyên bào sợi biểu bì da. Do vậy, hiệu suất thu hồi protein toàn phần theo giải pháp hữu ích đạt hiệu quả cao hơn sẽ cho sản lượng sản phẩm thể tiết đầu ra cao hơn nhằm ứng dụng đối với tế bào da.

Ví dụ 7: Kiểm tra tác động của sản phẩm vi thể microvesicles và các exosom lên sự di cư tế bào

Tế bào nguyên bào sợi biểu bì da người được nuôi cấy trong DMEM có chứa 5 % FBS. Ban đầu nguyên bào sợi biểu bì được cấy với mật độ 200000 tế bào/500 µL DMEM/1 giếng của đĩa nuôi tế bào 24 giếng và được để qua đêm cho tế bào bám dính vào bề mặt đĩa nuôi cấy trong điều kiện 37 °C và 5 % CO₂.

Sau khi để qua đêm, bổ sung vào môi trường nuôi tế bào mitomycin C sao cho đạt nồng độ 10 $\mu\text{g/mL}$ môi trường, tương đương 5 $\mu\text{g}/500 \mu\text{L}$ môi trường/1 giếng. Ủ tế bào với mitomycin C trong 2 h trong điều kiện 37 °C và 5 % CO_2 .

Rửa tế bào 2 lần bằng DMEM ấm trước khi tạo vết thương bằng cách dùng đầu tip 100 μL rạch lên bề mặt giếng sao cho tế bào bong khỏi đáy giếng. Rửa sạch tế bào bong khỏi bề mặt giếng nuôi cấy 2 lần bằng DMEM ấm.

Bổ sung vào các giếng nuôi cấy dịch chứa vi thể và các exosom (phân lập theo ví dụ 2 của giải pháp hữu ích) và các exosom (thu thập theo phương pháp thông thường) với nồng độ 1 μg protein toàn phần dịch thể tiết/1 mL môi trường nuôi cấy, tương đương 0,5 μg protein toàn phần dịch thể tiết/500 μL môi trường/1 giếng thí nghiệm.

Theo dõi sự di cư của nguyên bào sợi biểu bì da đóng kín vết thương rạch bằng cách chụp ảnh tế bào sau mỗi 4 giờ cho đến khi kết thúc ở thời điểm 48 h. Ảnh chụp được phân tích bằng phần mềm Image J.

Thể tiết được phân lập cho thử nghiệm tăng sinh tế bào được thu thập từ tế bào gốc trung mô dây rốn và tế bào gốc trung mô mô mỡ. Hỗn hợp vi thể và các exosom tiết từ tế bào gốc trung mô dây rốn viết tắt là EV_UC; hỗn hợp vi thể và các exosom tiết từ tế bào gốc trung mô mô mỡ viết tắt là EV_AD; thể các exosom tiết từ tế bào gốc trung mô dây rốn viết tắt là EX_UC; và thể các exosom tiết từ tế bào gốc trung mô mô mỡ viết tắt là EX_AD.

Kết quả cho thấy sự di cư của nguyên bào sợi biểu bì da ở các nhóm tế bào bổ sung với thể tiết đều cao hơn so với nhóm chứng bắt đầu từ thời điểm 24h. Trong đó, không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nhóm tế bào được bổ sung vào môi trường nuôi cấy hỗn hợp vi thể và các exosom (EV_UC và EV_AD) hay thể các exosom (EX_UC, EX_AD).

Kết quả này cho thấy với hàm lượng protein toàn phần như nhau, hỗn hợp sản phẩm vi thể và các exosom thu thập theo ví dụ 2 của giải pháp hữu ích và sản phẩm các exosom thu thập theo quy trình thông thường có tác dụng như nhau đối với sự kích thích tế bào nguyên bào sợi biểu bì da di cư đến vị trí vết thương và đóng kín vết thương. Tuy nhiên, hiệu quả của bổ sung thể tiết đều cao hơn nhóm chứng không bổ sung thể tiết. Do vậy,

hiệu suất thu hồi protein toàn phần theo giải pháp hữu ích đạt hiệu quả cao hơn sẽ cho sản lượng sản phẩm thể tiết đầu ra cao hơn nhằm ứng dụng đối với tế bào da.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Giải pháp theo giải pháp hữu ích cho phép phân lập vi thể và các exosom từ dịch nuôi tế bào gốc trung mô nuôi cấy theo tiêu chuẩn GMP. 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 từ dịch nuôi tế bào. Sản phẩm của quy trình này gồm có vi thể và các exosom có kích thước từ 50 - 1000 nm tinh sạch với hiệu suất thu hồi cao và rút ngắn thời gian ly tâm. Sản phẩm hỗn hợp vi thể và các exosom có hoạt tính sinh học lên tế bào nguyên bào sợi da tương tự với sản phẩm thể tiết các exosom.

Quy trình theo giải pháp của giải pháp hữu ích sử dụng liên tục lực ly tâm 300 x g trong 10 phút ở nhiệt độ phòng và 2.500 x g trong 20 phút ở 4 °C cho phép loại bỏ rác tế bào và các thể tế bào chết theo chương trình không mong muốn triệt để trước khi ly tâm thu vi thể và các exosom. Việc loại bỏ hiệu quả rác tế bào và thể tế bào chết theo chương trình là rất quan trọng trong việc loại bỏ tạp nhiễm vật thể không mong muốn vào sản phẩm vi thể và các exosom cần phân lập theo giải pháp hữu ích.

Quy trình theo giải pháp theo giải pháp hữu ích sử dụng lực ly tâm 100000 x g trong 90 phút ở 4 °C cho phép thu hồi vi thể và các exosom với hiệu suất cao. Việc kết hợp thu hồi vi thể và các exosom trong cùng một thì ly tâm cho phép giảm bước ly tâm từ hai bước ly tâm (ly tâm thu vi thể xong mới tiếp đến ly tâm thu các exosom) xuống còn một bước ly tâm. Việc kết hợp thu vi thể và các exosom trong cùng một thao tác ly tâm giúp giảm thời gian ly tâm và giảm các thao tác thực hiện, bao gồm giảm số lần ly tâm, giảm sử dụng ống ly tâm và giảm sử dụng pipet. Do vậy, quy trình theo giải pháp hữu ích cho phép thu hồi sản lượng vi thể và các exosom lớn hơn thể hiện qua hàm lượng protein toàn phần và giảm thời gian ly tâm thực hiện thu thập.

Quy trình theo giải pháp hữu ích, đánh tan cặn chứa vi thể và các exosom trong PBS và sử dụng lực ly tâm 100000 x g trong 90 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 và số lần ly tâm thu hồi vi thể và các exosom. Theo đó, các thành phần protein tạp nhiễm kết cụm có trọng lượng

trương đương vi thể hoặc các exosom bị phá vỡ do lực đảo trộn bằng pipet tạo thành các phân tử protein cấu trúc nhỏ hơn và không lắng xuống cùng với thể vi thể và các exosom với lực ly tâm như trong giải pháp của giải pháp hữu ích. Ngoài ra, việc đánh tan cặn chứa vi thể và các exosom trong PBS cũng làm phân tách các hạt protein cấu trúc lớn kết cụm hoặc không kết cụm bám dính vào bề mặt vi thể và các exosom. Do vậy, quy trình theo giải pháp của giải pháp hữu ích cho phép thu thập được vi thể và các exosom tinh sạch hiệu quả, phù hợp sử dụng cho các mục đích phân tích chức năng và ứng dụng vi thể và các exosom trong lâm sàng.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình phân lập thể tiết đồng thời chứa vi thể và túi ngoại bào (exosom) từ dịch nuôi cấy tế bào gốc trung mô được nuôi theo tiêu chuẩn GMP, trong đó quy trình bao gồm các bước:

a) thu dịch nuôi cấy tế bào gốc trung mô chứa vi thể và các exosom khi tế bào phát triển đến 80% bề mặt diện tích chai nuôi cấy;

b) ly tâm dịch nuôi cấy tế bào với lực 300 x g trong 10 phút ở nhiệt độ 4°C, thu dịch nổi, loại bỏ cặn sau ly tâm gồm xác tế bào và mảnh vỡ tế bào trong dịch nuôi cấy tế bào;

c) ly tâm phần dịch nổi thu được sau ly tâm ở bước b) với lực 2.500 x g trong 20 phút ở 4 °C , thu dịch nổi chứa vi thể và các exosom, loại bỏ cặn ly tâm chứa sản phẩm tế bào chết theo chương trình;

d) ly tâm phần dịch nổi thu được sau ly tâm ở bước c) chứa vi thể và các exosom với lực 100000 x g trong 90 phút ở 4°C trong điều kiện áp suất giảm, thu cặn giàu vi thể và các exosom, loại bỏ phần dịch nổi; và

e) tinh sạch vi thể và các exosom bằng cách đánh tan phần cặn chứa vi thể và các exosom trong dung dịch muối đệm phosphat (PBS-Phosphate buffered saline) và tiếp tục ly tâm thu vi thể và các exosom sạch với lực ly tâm 100000 x g trong 90 phút ở 4°C trong điều kiện áp suất giảm, thu cặn sau ly tâm là sản phẩm gồm vi thể và các exosom tinh sạch.

2. Quy trình theo điểm 1, trong đó bước ly tâm thu cặn giàu vi thể và các exosom ở bước d) được thực hiện trong điều kiện chân không.

3. Quy trình theo điểm 1 hoặc điểm 2, trong đó bước ly tâm để tinh sạch vi thể và các exosom ở bước e) được thực hiện trong điều kiện áp suất giảm hoặc áp suất chân không.

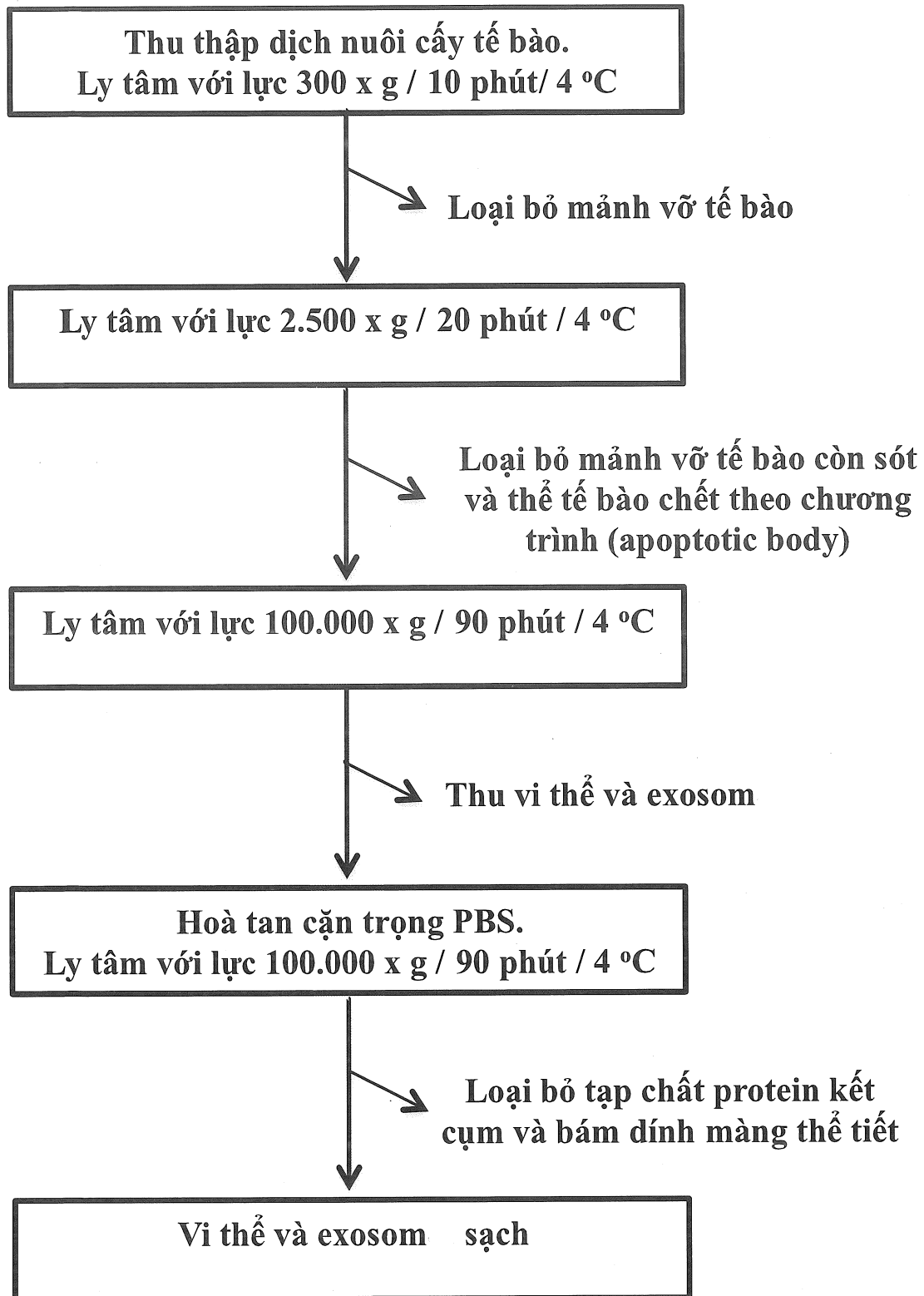
4. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó ở bước a) dịch nuôi cấy tế bào gốc trung mô được thu vào ngày thứ 4 của quá trình nuôi cấy khi tế bào phát triển đạt 80% diện tích bề mặt chai nuôi cấy.

5. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó ở bước e) lượng dung dịch PBS bổ sung để hòa tan cặn chứa vi thể và các exosom bằng lượng dịch nổi đầu vào ly tâm được loại bỏ sau khi kết thúc ly tâm.

6. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó lượng dịch nuôi cấy tế bào gốc trung mô ở bước b) hoặc dung dịch PBS có chứa vi thể và các exosom ở bước e) trong mỗi ống ly tâm phải đạt ít nhất 2/3 thể tích ống ly tâm.

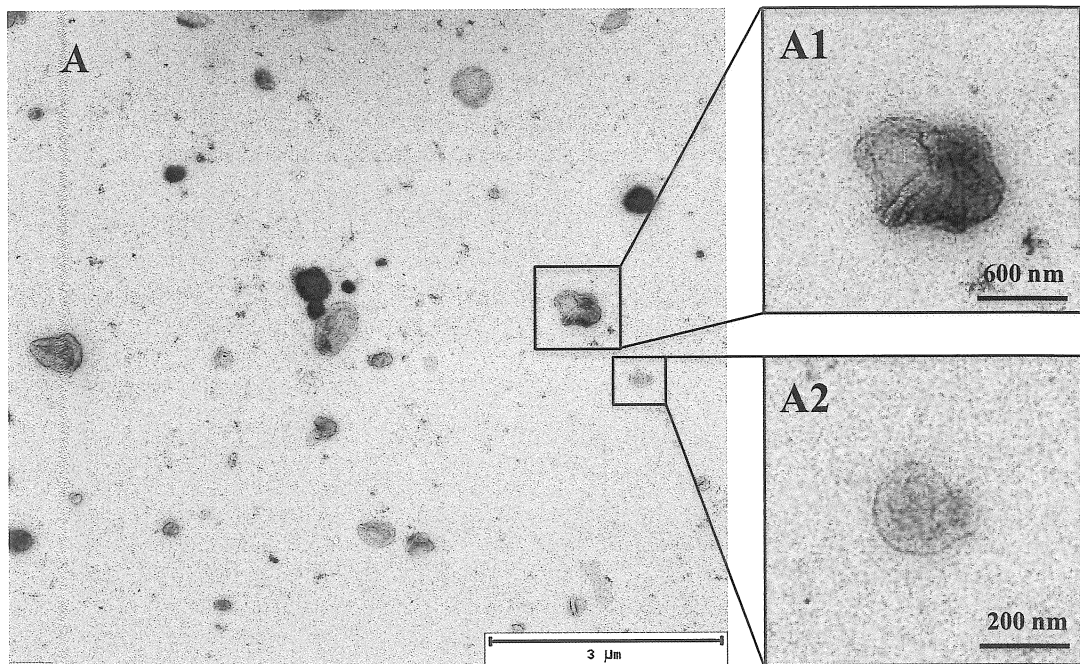
7. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó cặn chứa vi thể và các exosom tinh sạch thu được ở bước e) được pha loãng trong dung dịch PBS 1X và bảo quản ở - 80°C.

1/6



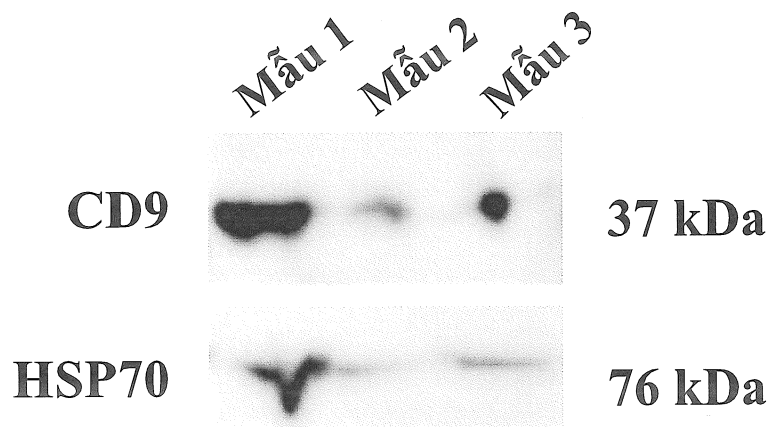
HÌNH 1

2/6



HÌNH 2

3/6



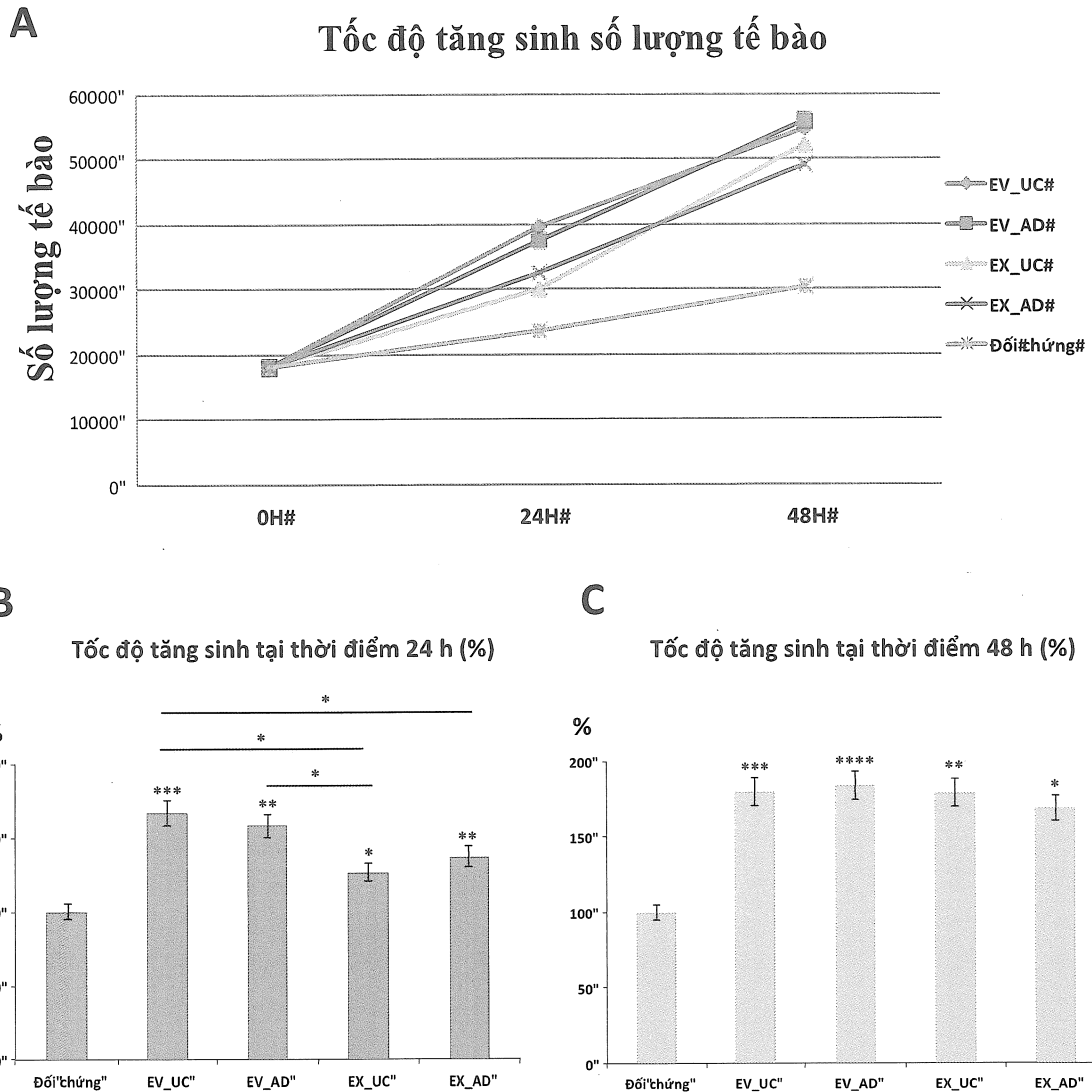
Hình 3

4/6

Mẫu	Số lượng tế bào tiết UCMSC $p3 \times 10^6$	(A) Hàm lượng protein toàn phần trong hỗn hợp vi thể và exosom ($\mu g / 10^6$ UCMSC p3)	(B) Hàm lượng protein toàn phần trong thể tiết exosom ($\mu g /$ 10^6 UCMSC p3)	Hiệu suất tăng hàm lượng protein toàn phần theo giải pháp sáng chế: (A) / (B) $\times 100 \%$
1	60	0,748	0,492	152
2	40	0,67	0,437	153,3
3	12,25	0,713	0,548	130,1
4	214,6	0,67	0,476	140,7
5	18	0,81	0,454	178,4
Trung bình		0,722	0,481	150,1

Hình 4

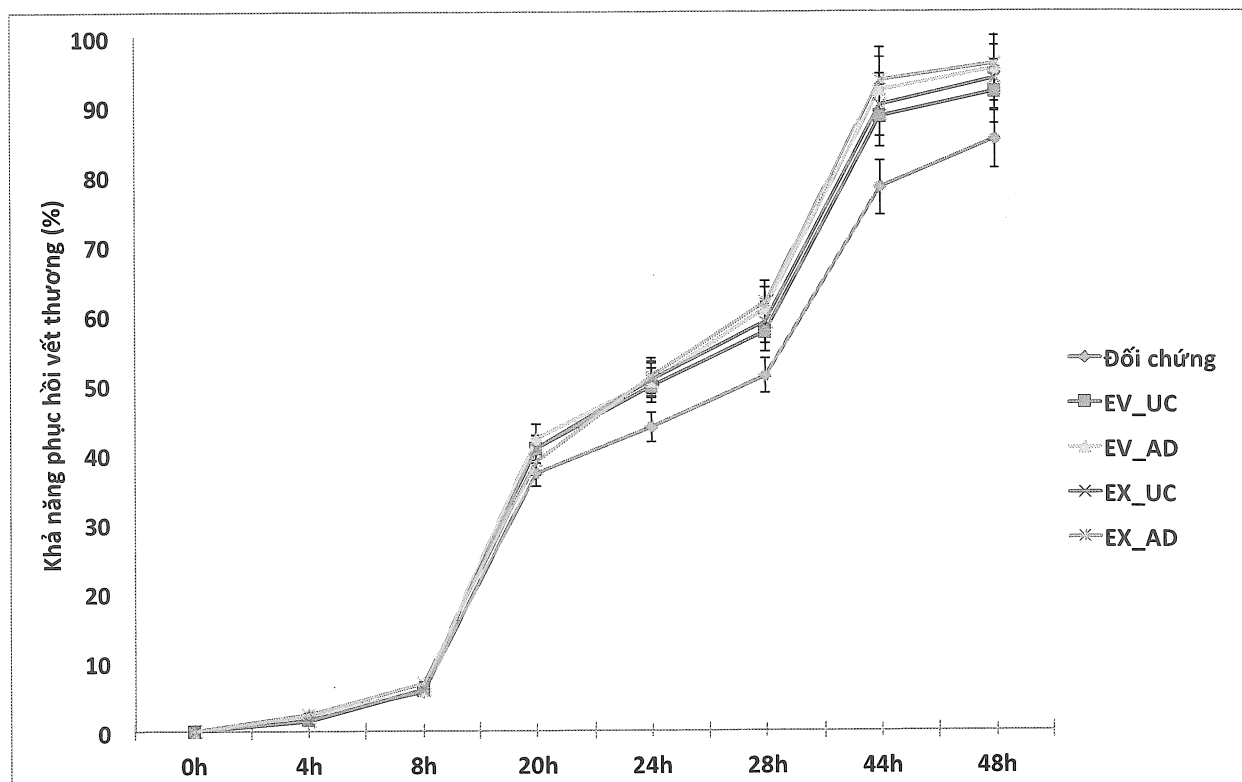
5/6



EV_UC: sản phẩm thể tiết gồm vi thể và exosom từ tế bào gốc trung mô dây rốn;
 EV_AD: sản phẩm thể tiết gồm vi thể và exosom từ tế bào gốc trung mô mô mỡ;
 EX_UC: sản phẩm thể tiết exosom từ tế bào gốc trung mô dây rốn; EX_AD: sản phẩm thể tiết exosom từ tế bào gốc trung mô mô mỡ. Đối chứng: nhóm không bổ sung thể tiết. *: p-value < 0.05, **: p-value < 0.01, ***: p-value < 0.001, ****: p-value < 0.0001.

Hình 5

6/6



EV_UC: vi thể và exosom từ tế bào gốc trung mô dây rốn; EV_AD: vi thể và exosom từ tế bào gốc trung mô mô mỡ; EX_UC: exosom từ tế bào gốc trung mô dây rốn; EX_AD: exosom từ tế bào gốc trung mô mô mỡ.

Hình 6