(12) **BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ**

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

(11) **1-0020125**

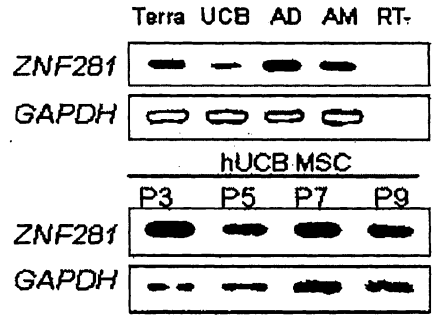
(51)[7] **C12N 5/074**, 5/02, 5/07

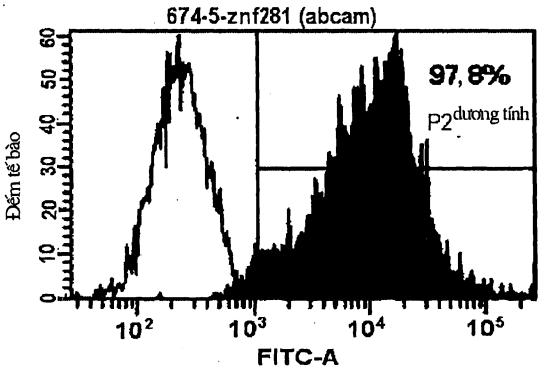
(13) **B**

(21) 1-2011-02809
(22) 03.03.2010
(86) PCT/KR2010/001338 03.03.2010
(87) WO2010/107192 23.09.2010
(30) 10-2009-0023821 20.03.2009 KR
(45) 25.12.2018 369
(43) 25.05.2012 290
(73) SNU R&DB FOUNDATION (KR)
San 56-1, Sinlim-dong, Gwanak-gu Seoul 151-919, Republic of Korea
(72) KANG, Kyung Sun (KR), ROH, Kyoung Hwan (KR)
(74) Văn phòng luật sư Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) PHƯƠNG PHÁP PHÂN LẬP TẾ BÀO GỐC CÓ NGUỒN GỐC TỪ MÁU DÂY RỐN, TẾ BÀO GỐC CÓ NGUỒN GỐC TỪ MÁU DÂY RỐN, CHẤT TRỊ LIỆU VÀ MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY TẾ BÀO GỐC NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp phân lập tế bào gốc toàn năng/đa năng có nguồn gốc từ máu dây rốn được đặc trưng ở chỗ bước nuôi cấy bạch cầu đơn nhân đã phân lập từ máu dây rốn trong bình nuôi cấy chứa fibronectin và tiếp đó thu hoạch tế bào gốc từ môi trường nuôi cấy, các tế bào gốc toàn năng/đa năng có nguồn gốc từ dây rốn được phân lập từ đó; và chất trị liệu bằng tế bào gốc chứa tế bào gốc toàn năng/đa năng có nguồn gốc từ máu dây rốn hoặc các tế bào biệt hóa từ đó. Sáng chế cũng đề cập đến môi trường nuôi cấy tế bào gốc, phương pháp nuôi cấy tế bào gốc khác biệt ở chỗ bước nuôi cấy và tăng sinh các tế bào gốc trong môi trường nuôi cấy, và phương pháp làm tăng tính gốc của các tế bào gốc được đặc trưng ở chỗ môi trường này chứa tế bào gốc hình cầu hoặc cấu trúc ba chiều.





Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp phân lập tế bào gốc toàn năng/đa năng có nguồn gốc từ máu dây rốn, đặc trưng ở chỗ bao gồm bước nuôi cấy bạch cầu đơn nhân được phân lập từ máu dây rốn trong bình nuôi cấy chứa fibronectin và tiếp theo là bước thu hoạch tế bào gốc từ môi trường nuôi cấy này, tế bào gốc toàn năng/đa năng có nguồn gốc từ dây rốn được phân lập bằng phương pháp này; và chất trị liệu bằng tế bào gốc chứa tế bào gốc toàn năng/đa năng có nguồn gốc từ máu dây rốn hoặc các tế bào biệt hóa từ đó. Sáng chế cũng đề cập đến môi trường nuôi cấy các tế bào gốc này, phương pháp nuôi cấy tế bào gốc đặc trưng ở chỗ bao gồm bước nuôi cấy và tăng sinh tế bào gốc trong môi trường nuôi cấy, và phương pháp làm tăng tính gốc của tế bào gốc được đặc trưng bởi môi trường chứa tế bào gốc hình cầu hoặc cấu trúc ba chiều.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các tế bào gốc được đặc trưng bởi tính tự đổi mới, tính biệt hóa và tính bất tử, đã có gợi ý rằng tế bào gốc có thể giải quyết các vấn đề liên quan đến y học tái sinh và thay thế mô sao cho chúng có thể được sử dụng để điều trị các bệnh thoái hóa khác nhau cũng như cho phép có được những hiểu biết chuyên sâu về sinh học tế bào. Tế bào gốc người trưởng thành, thu được từ các mô khác nhau, được quan tâm nhiều hơn so với các tế bào gốc từ phôi thai do chúng có thể được lấy từ nhiều nguồn và không vấp phải nhiều phản đối về mặt đạo đức như khi sử dụng các phôi thai người làm nguồn tế bào. Ngoài ra, các tế bào gốc phân lập từ máu dây rốn có ưu điểm hơn so với tế bào gốc người trưởng thành ở chỗ người cho máu dây rốn không bị thương, không như người cho tủy xương hoặc mô mỡ.

Các tế bào gốc trung mô có nguồn gốc từ máu dây rốn được đưa thành công vào nhiều loại tế bào khác nhau bao gồm tế bào thần kinh, tế bào gan, tế bào tạo xương, v.v., *in vitro* (Sun, W. *et al.,* Stem cells, 23:931, 2005; Hong SH. *et al.,* Biochem. Biophys. Res. Commun., 30:1153, 2005; Hutson EL. *et al.,* Tissue Engineering, 11:1407, 2005). Cũng có nhiều báo cáo về việc cấy ghép thành công in vivo các tế bào gốc trung mô có nguồn gốc từ máu dây rốn đối với những tổn thương, bệnh tiểu đường và bệnh nhồi máu cơ tim (Nonome, K. *et al.,* Am, J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol., 289:1091, 2005; Yoshida, S. *et al.,* Stem cells, 23:1409, 2005; Kim Bo. *et al.,* Circulation, 112:96, 2005). Do ít có khả năng truyền bệnh lây nhiễm và gây ra bệnh mảnh ghép chống lại vật chủ, nên việc cấy ghép các tế bào gốc trung mô có nguồn gốc từ máu dây rốn được ứng dụng rộng rãi cho cả trẻ em và người trưởng thành (Claudio G. B. *et al.,* Annual Review of Medicine, 57:403, 2006). Cho dù việc cấy ghép máu từ dây rốn được chấp nhận là một phương pháp điều trị một số bệnh, đặc biệt là các bệnh liên quan tới sự hình thành tế bào máu (Grewal, SS. *et al.,* Blood, 103:1147, 2004; Knutsen, AP. *et al.,* Journal pediatrics, 142:519, 2003; Ooi, J. *et al.,* Blood, 103:489, 2004; Sanz GF. *et al.,* Blood, 103:489, 2004), nhưng vẫn còn ít các nghiên cứu về tế bào gốc trung mô có nguồn gốc từ máu dây rốn trên lâm sàng. Ví dụ, đã có nhiều báo cáo về các tế bào gốc được sử dụng thành công trong việc chữa trị, không hoàn toàn khỏi nhưng cũng khỏi một phần, cho phụ nữ tổn thương tủy sống và bệnh nhân mắc bệnh Buerger (Kim, SW. *et al., Stem cells*, 2006; Kang, KS. *et al.,* Cytotherapy, 7:368, 2005). Tuy nhiên, cơ chế phát triển tế bào hoặc cách thức nuôi cấy và tăng sinh chúng vẫn còn chưa được biết đến.

Việc phân lập các tế bào gốc trung mô từ máu dây rốn có nhiều khó khăn. Ví dụ, khi phương pháp phân lập các tế bào gốc trung mô có nguồn gốc từ tủy xương được áp dụng cho máu dây rốn, thì tỷ lệ phân lập chỉ còn lại khoảng 20%. Chỉ có 50% tế bào gốc trung mô có thể được phân lập từ máu tươi được lấy trong khoảng

thời gian 5 giờ trước khi tiến hành phân lập. Tuy nhiên, tỷ lệ phân lập bị giảm xuống còn 20% hoặc thấp hơn nếu máu này được lấy quá 5 giờ trước khi phân lập và mặc dù được phân lập, nhưng các tế bào này cũng không tăng sinh tốt.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Các tác giả sáng chế đã tiến hành nhiều nghiên cứu kỹ lưỡng và sâu rộng đối với quá trình phân lập và tăng sinh khối của các tế bào gốc từ máu dây rốn, từ đó phát hiện ra rằng khi được nuôi cấy với sự có mặt của fibronectin, thì bạch cầu đơn nhân được phân lập từ máu dây rốn người có khả năng tăng sinh nhanh và hình thành các cụm tế bào có dạng hình con suốt, và vẫn duy trì được các đặc tính của tế bào gốc sau nhiều ngày. Do đó, dựa trên những phát hiện này, sáng chế đề xuất phương pháp phân lập đặc hiệu tế bào gốc toàn năng/đa năng không liên quan tới sự tạo máu có nguồn gốc từ máu dây rốn và các tế bào gốc trung mô và phương pháp tăng sinh chúng với khối lượng lớn.

Do đó, mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp phân lập tế bào gốc toàn năng/đa năng có nguồn gốc từ dây rốn, bao gồm bước nuôi cấy bạch cầu đơn nhân đã phân lập từ máu dây rốn với sự có mặt của fibronectin và bước lấy các tế bào gốc này ra khỏi môi trường.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất tế bào gốc toàn năng/đa năng có nguồn gốc từ dây rốn được phân lập bằng phương pháp phân lập nêu trên.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất chất trị liệu bằng tế bào gốc bao gồm tế bào gốc toàn năng/đa năng có nguồn gốc từ dây rốn hoặc các tế bào biệt hóa từ đó.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất môi trường nuôi cấy các tế bào gốc này.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất phương pháp nuôi cấy các tế bào gốc, bằng cách sử dụng môi trường nuôi cấy nêu trên.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp làm tăng tính gốc của các tế bào gốc bằng cách sử dụng môi trường nuôi cấy tế bào gốc có dạng hình cầu hoặc cấu trúc ba chiều.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Fig.1 là các ảnh thể hiện cụm tế bào tạo ra sau khi các bạch cầu đơn nhân phân lập từ người máu dây rốn được nuôi cấy trong 14, 15, 16, 17 và 18 ngày (lần lượt là A, B, C, D và E) và tế bào sau khi 3 ngày (F);

Fig.2 là đồ thị thể hiện sự tăng trưởng tế bào tích lũy được biểu thị theo thời gian.

Fig.3 thể hiện kết quả phân tích bộ nhiễm sắc thể sau khi tế bào gốc toàn năng/đa năng có nguồn gốc từ dây rốn được nuôi cấy trong thời gian dài.

Fig.4 là biểu đồ đếm tế bào dòng chảy với các mẫu biểu hiện các chất chỉ dấu khác nhau trên các tế bào gốc toàn năng/đa năng có nguồn gốc từ dây rốn theo sáng chế.

Fig.5 thể hiện các mẫu biểu hiện của các chất chỉ dấu không biệt hóa khác nhau trên tế bào gốc toàn năng/đa năng có nguồn gốc từ dây rốn theo sáng chế như được xác định bằng máy đếm tế bào dòng chảy và nhuộm miễn dịch (A: biểu đồ tế bào dòng chảy của tế bào biểu hiện Oct4, B: hình ảnh của Oct4 nhuộm miễn dịch, C: hình ảnh của nhân được nhuộm trong các tế bào biểu hiện Oct4, D: ảnh kết hợp của sự biểu hiện Oct4 và sự nhuộm nhân).

Fig.6 thể hiện sự biểu hiện của ZNF281 trong terra-1, hUCB-MSC, AD-MSC và AM (tấm phía trên) và trong hUCB-MSC sau khi 3~9 ngày (hình phía dưới) như được phân tích bởi FACS.

Fig.7 thể hiện sự biểu hiện của ZNF281, Oct4, Sox2, c-myc và Rex-1, tất cả các chất này là cần thiết để duy trì trạng thái không biệt hóa, trong tế bào gốc toàn năng/đa năng có nguồn gốc từ dây rốn người theo sáng chế, như được xác định bởi RT-PCR.

Fig.8 là các ảnh thể hiện sự biệt hóa của các tế bào gốc toàn năng/đa năng có nguồn gốc từ dây rốn người thành xương, mỡ, sụn và thần kinh (A: mẫu đối chứng do sự biệt hóa không phải thành tế bào tạo xương sau khi nhuộm bằng Alizarin đỏ S, B: tế

bào do biệt hóa thành tế bào tạo xương sau khi nhuộm bằng Alizarin đỏ S, C: mẫu đối chứng do sự biệt hóa không phải từ tế bào tạo mô mỡ sau khi nhuộm bằng dầu đỏ O, D: tế bào do sựu biệt hóa từ tế bào tạo mô mỡ sau khi nhuộm bằng dầu đỏ O, E: tế bào do sự biệt hóa từ tế bào tạo sụn sau khi nhuộm bằng toluiđin xanh da trời, F: viên tế bào do sự biệt hóa từ tế bào tạo sụn, G: tế bào được nhuộm miễn dịch bằng chất chỉ dấu thần kinh Tuj-1 và MAP2 sau khi biệt hóa tế bào thần kinh).

Fig.9 thể hiện nồng độ ARN của tế bào gốc toàn năng/đa năng có nguồn gốc từ dây rốn sau khi cảm ứng biệt hóa tế bào tạo xương và biệt hóa tế bào tạo mô mỡ, như được xác định bởi RT-PCR (PPAR-γ và FABP-4 là chất chỉ dấu biệt hóa mô mỡ và Colagen loại 1 là chất chỉ dấu biệt hóa sự tạo xương. PPAR-γ: thụ thể hoạt hóa chất tăng sinh gamma, FABP-4: Protein gắn kết axit béo-4, GAPDH: Glyxeraldehyt-3-phosphat đehyđrogenaza).

Fig.10 thể hiện mẫu biểu hiện của các protein ở võng mạc trong tế bào gốc toàn năng/đa năng có nguồn gốc từ dây rốn theo sáng chế.

Fig.11 thể hiện sự tiết các xytokin khác nhau vào môi trường nuôi cấy của tế bào gốc toàn năng/đa năng có nguồn gốc từ dây rốn người, như được phân tích bởi dãy kháng thể (A: hUCB-MSC1, B: hUCB-MSC2, C: hUCB-MSC3, D: sự sắp hàng của các kháng thể, POS: mẫu đối chứng dương tính, NEG: mẫu đối chứng âm tính, GCSF (Granulocyte-Colony Stimulating Factor): yếu tố kích thích bạch cầu hạt-cụm tế bào, GM-CSF (Granulocyte Monocyte-Colony Stimulating Factor: yếu tố kích thích cụm tế bào bạch cầu đơn nhân và bạch cầu hạt), ICAM-1 (Intra-Cellular Adhesion Molecule): phân tử bám dính nội phân tử, IFN-γ: Interferon-γ, IL: intơleukin, MCP (Monocyte Chemoattractant Protein): protein hấp dẫn hóa học của bạch cầu đơn nhân, M-CSF (Monocyte Chemoattractant Protein): yếu tố kích thích bạch cầu đơn nhân-cụm tế bào, MIG (Monokine induced by Interferon Gamma): monokin cảm ứng bởi intơleukin gamma, MIP (Monokine induced by Interferon Gamma): protein gây viêm đại thực bào, RANTES (Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted): tế bào T thông thường được điều hòa trong

quá trình hoạt hóa, được biểu hiện và được tiết ra, TGF-β (Transforming Growth Factor-β): yếu tố tăng trưởng biến đổi β, TNF (Tumour Necrosis Factor): yếu tố gây chết hoại khối u, sTNFR (soluble Tumour Necrosis Factor Receptor): thụ thể của yếu tố gây chết hoại khối u hòa tan, PDGF-BB (Platelet-Derived Growth Factor-BB): yếu tố tăng trưởng có nguồn gốc từ tiểu cầu-BB, TIMP2 (Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-2): chất ức chế mô của metaloproteinaza-2).

Fig.12 và Fig.13 là các ảnh thể hiện môi trường nuôi cấy có cấu trúc 3 chiều của tế bào gốc toàn năng/đa năng có nguồn gốc từ dây rốn bằng cách sử dụng quy trình nuôi cấy dạng hình cầu và các tế bào STO và mẫu biểu hiện của các yếu tố phiên mã Oct4 và Sox2 như được xác định bởi RT-PCR (Fig.12: môi trường nuôi cấy có cấu trúc 3 chiều của tế bào gốc toàn năng/đa năng có nguồn gốc từ dây rốn bằng quy trình nuôi cấy dạng hình cầu, Fig.13: môi trường nuôi cấy có cấu trúc 3 chiều của tế bào gốc toàn năng/đa năng có nguồn gốc từ dây rốn trên các tế bào STO).

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến phương pháp phân lập các tế bào gốc có nguồn gốc từ máu dây rốn, được đặc trưng ở chỗ bao gồm bước nuôi cấy bạch cầu đơn nhân đã phân lập từ máu dây rốn trong bình nuôi cấy chứa fibronectin và bước thu hoạch các tế bào gốc này từ môi trường nuôi cấy.

Theo một phương án, bước thu hoạch tế bào gốc từ môi trường bao gồm bước sử dụng tính chất miễn dịch của các tế bào gốc để tách các tế bào gốc này.

Quá trình phân lập bạch cầu đơn nhân từ máu dây rốn có thể được tiến hành bằng cách sử dụng phương pháp thông thường. Sau khi trộn máu dây rốn với Hetasep để làm tan hồng cầu, bạch cầu đơn nhân được phân lập bằng cách sử dụng Ficoll-paque. Theo sáng chế, tốt hơn nếu Hetasep được sử dụng với lượng 0,5 ~ 2ml/5mL.

Để tăng hiệu suất phân lập bạch cầu đơn nhân, máu dây rốn sử dụng trong sáng chế tốt hơn là máu dây rốn được lấy ngay sau khi sinh nở, được bảo quản ở nhiệt độ trong phòng trong 12~48 giờ sau khi lấy máu, hoặc được bảo quản ở 3~5°C trong 6~72 giờ sau khi lấy máu.

Quá trình phân lập các tế bào gốc từ bạch cầu đơn nhân có nguồn gốc từ máu dây rốn theo sáng chế được đặc trưng ở chỗ sử dụng fibronectin. Thuật ngữ "bình nuôi cấy chứa fibronectin", như được sử dụng trong bản mô tả này, có nghĩa là điều kiện trong đó bạch cầu đơn nhân có thể được tiếp xúc với fibronectin. Ví dụ, fibronectin có thể được tạo lớp trên bình nuôi cấy hoặc có thể nằm ở dạng hình cầu hoặc cấu trúc ba chiều trong môi trường nuôi cấy. Theo một phương án của sáng chế, khi bình nuôi cấy chứa fibronection, thì fibronectin có thể có mật độ nằm trong khoảng từ 0,1 đến 1mg/mL.

Fibronectin sử dụng trong sáng chế có thể có nguồn gốc từ động vật nhưng không chỉ giới hạn ở động vật và tốt hơn là có nguồn gốc từ người. Cũng như vậy, fibronectin có thể được điều chế bằng cách tổng hợp nhân tạo (ví dụ, như bằng cách tổng hợp hóa học, tổng hợp nhờ sử dụng chất tổng hợp peptit, v.v.) hoặc sinh tổng hợp (ví dụ, như kỹ thuật ADN tái tổ hợp, nuôi cấy nguyên bào sợi, v.v.) hoặc có thể được tách ra từ huyết tương động vật kể cả người từ nền ngoại bào. Fibronectin có thể là mảnh hoặc trình tự peptit của fibronectin hoặc có thể chứa mảnh hoặc peptit.

Không có giới hạn đặc biệt đối với môi trường nuôi cấy sẵn có khi các bạch cầu đơn nhân được nuôi cấy trong bình nuôi cấy chứa fibronectin. Tốt hơn, nếu SNU-1 hoặc EGM-2 được sử dụng làm môi trường cơ bản để nuôi cấy các bạch cầu đơn nhân.

Môi trường SNU-1 chứa các thành phần sau (bảng 1).

Bảng 1

	SNU-1 (mg/l)		SNU-1 (mg/l)		SNU-1 (mg/l)
$CaCl_2$(khan)	200	L-Isoloxin	78	i-Inositol	3
KCL	400	L-Loxin	78	Riboflavin	0,15
$MgSO_4$(khan)	97,67	L-Lysin HCl	108,75	Thiamin HCl	1,5
NaCl	7635	L-Methionin	22,5	L-Alanin	17,8
$NaH_2PO_4.H_2O$	140	L-Phenylalanin	48	L-Asparagin H_2O	30
D-Glucoza	1000	L-Serin	21	Axit L-aspartic	26,6
Phenol đỏ	10	L-Threonin	72	Axit L-glutamic	29,4
Natri pyruvat	110	L-Tryptophan	15	L-prolin	23
L-Arginin HCl	189	L-Tyrosin 2Na.$2H_2O$	54	Nicotinamit	1,5
L-Xystein.2HCl	36	L-Valin	69	Pyridoxin HCl	1,5
L-Glutamin	292	D-Ca pantotenat	1,5	$NaHCO_3$	1000
Glyxin	15	Cholin Clorua	1,5		
L-Histiđin HCl.H_2O	63	Axit folic	1,5		

Theo sáng chế, tốt hơn nếu môi trường nuôi cấy cơ bản được bổ sung FGF-B (Fibroblast Growth Factor - Yếu tố tăng trưởng nguyên bào sợi), axit ascorbic, EGF (Epidermal Growth Factor - Yếu tố tăng trưởng biểu bì), hyđrocortison, IGF-I (Insulin-like Growth Factor-1 -Yếu tố tăng trưởng giống insulin 1) hoặc VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor - Yếu tố tăng trưởng nội mạch), và heparin và tuỳ ý là GA-1000 (Gentamyxin sulfat, Amphoterixin-B) nếu cần.

Tốt hơn, nếu môi trường nuôi cấy cơ bản được bổ sung huyết thanh bào thai bò (FBS — fetal bovine serum) 20%, bFGF (Yếu tố tăng trưởng nguyên bào sợi)

1~40ng/ml, axit ascorbic 0,1~5,0µg/ml, EGF (Yếu tố tăng trưởng biểu bì) 1~40ng/ml, hyđrocortison 0,1~1µg/ml, IGF-I (Yếu tố tăng trưởng giống insulin 1) 1~40ng/ml hoặc VEGF (Yếu tố tăng trưởng nội mạch) 1~5ng/ml và heparin 20~25µg/ml và tuỳ ý là GA-1000 (Gentamyxin Sulfat, Amphoterixin-B) nếu cần.

Sau khi nuôi cấy trong 3 ngày, các bạch cầu đơn nhân vẫn còn ở trạng thái lơ lửng được loại bỏ chỉ để lại các tế bào bám dính được nuôi cấy. Trong số các bạch cầu đơn nhân bám dính vào bình nuôi cấy, chỉ có các tế bào gốc được tăng sinh. Sau từ 12 đến 20 ngày phân lập, có thể quan sát được quá trình tăng sinh nhanh của tế bào gốc. Trong bản mô tả này, tốt hơn nếu môi trường nuôi cấy được thay bằng môi trường sạch 2 hoặc 3 ngày một lần.

Để thu được tế bào gốc toàn năng/đa năng có nguồn gốc từ dây rốn từ môi trường nuôi cấy, có thể sử dụng kỹ thuật FACS dùng máy đếm tế bào dòng chảy có chức năng phân loại (*Int. Immunol.*, 10(3):275, 1998), có thanh khuấy từ, hoặc phương pháp phân tích trọng lượng dựa trên kháng thể đặc hiệu với các tế bào gốc trung mô (*J. Immunol.*, 141(8):2797, 1998). Để thu được tế bào gốc toàn năng/đa năng từ thể tích khối của môi trường, có thể sử dụng cột có các kháng thể đặc hiệu gắn với phân tử biểu hiện trên bề mặt tế bào được bất động (dưới đây được gọi là "kháng nguyên bề mặt") ở dạng đơn lẻ hoặc kết hợp.

Việc phân loại bằng phương pháp đếm tế bào dòng chảy có thể được tiến hành bằng cách nạp điện tích cho các giọt nhỏ tĩnh điện hoặc bắt giữ tế bào. Trong các quy trình này, kháng thể nhận biết đặc hiệu kháng nguyên bề mặt được đánh dấu bằng huỳnh quang, sau đó cường độ phát huỳnh quang được xác định từ thể tiếp hợp kháng nguyên-kháng thể đã đánh dấu và được chuyển hóa thành tín hiệu điện để xác định nồng độ biểu hiện của kháng nguyên tế bào. Ngoài ra, các loại chất nhuộm huỳnh quang khác nhau có thể được sử dụng ở dạng kết hợp để tách các tế

bào biểu hiện các kháng nguyên bề mặt khác nhau. Các chất nhuộm huỳnh quang là FITC (fluoresxein isothioxyanat), PE (phycoerythrin), APC (allo-phycoxyanin), TR (TexasRed), Cy3, CyChrome, Red613, Red670, TRI-Color, và QuantumRed.

Trong FACS sử dụng máy đếm tế bào dòng chảy, tế bào gốc thu hoạch từ môi trường nuôi cấy bằng cách, ví dụ, quá trình ly tâm có thể được nhuộm miễn dịch trực tiếp bằng kháng thể hoặc có thể được tăng sinh trong môi trường thích hợp trước khi nhuộm miễn dịch bằng kháng thể. Để nhuộm miễn dịch, mẫu tế bào đích được trộn với kháng thể sơ cấp đặc hiệu với kháng nguyên bề mặt và được ủ từ 0,5 đến 1 giờ trên đá lạnh. Nếu kháng thể sơ cấp này được đánh dấu bằng chất nhuộm huỳnh quang, thì mẫu tế bào được rửa và được tách bằng máy đếm tế bào dòng chảy. Nếu kháng thể sơ cấp không được đánh dấu bằng chất nhuộm huỳnh quang, thì mẫu tế bào đã được xử lý bằng kháng thể sơ cấp được rửa và trộn với kháng thể thứ cấp gắn huỳnh quang có thể gắn kết với kháng thể sơ cấp này. Tiếp đó, tế bào nhuộm miễn dịch này được ủ tiếp từ 0,5 đến 1 giờ trên đá lạnh và được rửa trước khi tách bằng máy đếm tế bào dòng chảy.

Tế bào gốc toàn năng/đa năng có nguồn gốc từ dây rốn phân lập theo sáng chế có ít nhất một trong số các tính chất sau:

(a) có đặc tính miễn dịch dương tính với các yếu tố phiên mã c-myc và ZNF281.

(b) bám dính vào bề mặt phủ nền ngoại bào và tạo ra cụm tế bào có hình dạng con suốt hoặc hình cầu sau khi bám dính từ 5 đến 30 ngày.

(c) có CPDL (cumulative population doubling level - nồng độ tích lũy nhân đôi quần thể) nằm trong khoảng từ 30 đến 45.

(d) có đặc tính miễn dịch âm tính với CD14, CD31, CD34, CD45 và HLA-DR.

(e) có tính chuyên biệt đối với trung bì, nội bì và ngoại bì tế bào.

(f) tiết ra ít nhất một xytokin hoặc chemokin được chọn từ nhóm gồm TIMP-2, TGF-β, RANTES CINC-3, EOTAXIN, GM-CSF, IFN-γ, IL-1b, IL-3, IL-6, IL-8, IL-10, IL12p40, IL13, IL-16, IP-10, Leptin, MCP-2, MIG, MIP-3a, b-NGFm, sTNFRI, và PFGF-bb.

Bằng chứng về việc các tế bào gốc toàn năng/đa năng có nguồn gốc từ dây rốn theo sáng chế vẫn không bị biệt hóa có thể thấy từ việc biểu hiện Oct-4, Sox-2, Rex-1, c-myc, và ZNF281 ở tế bào gốc.

Ngoài ra, khi CPDL (nồng độ tích lũy nhân đôi quần thể) nằm trong khoảng từ 30 đến 45, thì tế bào gốc toàn năng/đa năng có nguồn gốc từ dây rốn theo sáng chế có tính tăng sinh mạnh. Phân tích bộ nhiễm sắc thể cho thấy rằng tế bào theo sáng chế tăng sinh nhanh, nhưng vẫn mang cấu trúc của nhiễm sắc thể thông thường.

Tế bào gốc toàn năng/đa năng có nguồn gốc từ dây rốn theo sáng chế có tính miễn dịch âm tính đối với CD14, CD31, CD34, CD45 và HLA-DR, đã biết là chất chỉ dấu tế bào gốc tạo máu hoặc chất chỉ dấu liên quan tới sự thải loại miễn dịch. Do thiếu các chất chỉ dấu liên quan tới sự tạo máu hoặc liên quan tới sự thải loại miễn dịch này, nên các tế bào gốc có nguồn gốc từ máu dây rốn theo sáng chế có thể được cấy ghép bằng cách phân bố mạch ở mức tối thiểu và thải loại miễn dịch và từ đó có thể được sử dụng đặc hiệu trong quá trình dị ghép.

Tế bào gốc toàn năng/đa năng có nguồn gốc từ dây rốn theo sáng chế cũng có thể biệt hóa thành tế bào gan từ các tế bào trung bì và tế bào thần kinh và tế bào võng mạc từ ngoại bì cũng như các tế bào tạo xương, sụn và mô mỡ có nguồn gốc từ trung bì. Do đó, tế bào gốc toàn năng/đa năng có nguồn gốc từ dây rốn theo sáng chế có thể được áp dụng trong điều trị nhiều bệnh khác nhau.

Ngoài ra, tế bào gốc toàn năng/đa năng có nguồn gốc từ máu dây rốn theo sáng chế có thể tiết ra các xytokin hoặc chemokin khác nhau bao gồm TIMP-2, TGF-β, RANTES CINC-3, EOTAXIN, GM-CSF, IFN-γ, IL-1b, IL-3, IL-6, IL-8, IL-10, IL12p40, IL13, IL-16, IP-10, Leptin, MCP-2, MIG, MIP-3a, b-NGFm, sTNFRI, và PFGF-bb. Do có khả năng tiết ra các xytokin hoặc chemokin này, nên tế bào gốc toàn năng/đa năng có nguồn gốc từ dây rốn theo sáng chế có thể được ứng dụng để điều trị nhiều bệnh khác nhau.

Tính mới của tế bào gốc toàn năng/đa năng có nguồn gốc từ dây rốn theo sáng chế xuất phát từ các đặc tính này.

Như đã nêu trên, tế bào gốc toàn năng/đa năng có nguồn gốc từ dây rốn theo sáng chế có thể được biệt hóa thành nhiều loại tế bào bao gồm tế bào tạo xương, sụn, mỡ, gan và thần kinh, và do đó có thể được ứng dụng trong điều trị các bệnh tương ứng này. Do đó, sáng chế đề cập đến chất trị liệu bằng tế bào gốc bao gồm tế bào gốc toàn năng/đa năng có nguồn gốc từ dây rốn theo sáng chế hoặc các tế bào biệt hóa từ đó. Chất trị liệu bằng tế bào gốc theo sáng chế có thể được dùng để điều trị nhiều bệnh khác nhau bao gồm, ví dụ, bệnh thần kinh (ví dụ, như bệnh suy giảm thần kinh), viêm xương khớp (ví dụ, như viêm khớp phì đại, viêm khớp dạng thấp), hiện tượng mất xương (ví dụ, như bệnh xốp xương), bệnh gan (ví dụ, như xơ gan), và bệnh tim mạch.

Tốt hơn, nếu chất trị liệu bằng tế bào gốc theo sáng chế chứa ít nhất một chất pha loãng có thể bảo vệ và duy trì được tế bào. Dung dịch đệm như nước muối sinh lý, PBS (dung dịch đệm của muối phosphat), HBSS (dung dịch muối cân bằng Hank), và huyết tương hoặc huyết thanh có thể được sử dụng làm chất pha loãng.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến môi trường nuôi cấy các tế bào gốc này. Môi trường này dựa trên môi trường EGM-2 hoặc SNU-1 và được bổ sung huyết thanh bào thai bò (FBS) 20%, bFGF (yếu tố tăng trưởng nguyên bào sợi) 1~40ng/ml, axit ascorbic 0,1~5,0μg/ml, EGF (yếu tố tăng trưởng biểu bì) 1~40ng/ml, hydrocortison 0,1~1μg/ml, IGF-I (yếu tố tăng trưởng giống insulin 1) 1~40ng/ml hoặc VEGF (yếu tố tăng trưởng nội mạch) 1~5ng/ml và heparin 20~25μg/ml, và tuỳ ý là GA-1000 (Gentamyxin Sulfat, Amphoterixin-B) nếu cần.

Môi trường nuôi cấy các tế bào gốc là mới và được sử dụng trong phương pháp phân lập tế bào gốc toàn năng/đa năng có nguồn gốc từ dây rốn theo sáng chế. Hơn nữa, môi trường nuôi cấy theo sáng chế có tác dụng trong quá trình tăng sinh tất cả các tế bào gốc người trưởng thành bao gồm các tế bào gốc có nguồn gốc từ máu dây rốn và được dùng để nuôi cấy tế bào gốc người trưởng thành.

Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế đề cập đến phương pháp nuôi cấy các tế bào gốc bao gồm bước nuôi cấy và tăng sinh các tế bào gốc trong môi trường theo sáng chế. Tốt hơn nếu tế bào gốc này có thể là tế bào gốc người trưởng thành.

Theo một phương án, môi trường nuôi cấy các tế bào gốc theo sáng chế có thể được sử dụng làm môi trường tế bào gốc toàn năng/đa năng có nguồn gốc từ dây rốn theo sáng chế. Trong quá trình nuôi cấy trong môi trường theo sáng chế, tốt hơn nếu tế bào gốc toàn năng/đa năng có nguồn gốc từ dây rốn theo sáng chế có thể được để trong 3~5 ngày sau khi tạo ra cụm tế bào ở dạng con suốt. Tốt hơn, nếu bước nuôi cấy được tiến hành trong điều kiện 5% CO_2 và có thể được tiến hành trong 5~30 ngày, nhưng sáng chế không chỉ giới hạn ở các điều kiện này.

Vẫn theo khía cạnh khác nữa, sáng chế đề cập đến phương pháp làm tăng tính gốc của các tế bào gốc, được đặc trưng bởi môi trường chứa tế bào gốc ở dạng

hình cầu hoặc cấu trúc ba chiều tại đó các tế bào gốc được nuôi cấy. Để nuôi cấy tế bào gốc có cấu trúc ba chiều, tốt hơn là sử dụng MEF (nguyên bào sợi phôi thai chuột). Hơn nữa, tốt hơn nếu tế bào gốc có thể là tế bào gốc người trưởng thành.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "làm tăng tính gốc" có nghĩa là tạo ra được cụm tế bào giống tế bào gốc phôi thai hoặc biểu hiện được các yếu tố phiên mã như Oct4, Sox2, v.v. ở nồng độ cao hơn.

Hiệu quả có lợi

Khi nuôi cấy tế bào gốc toàn năng/đa năng có nguồn gốc từ dây rốn người với sự có mặt của fibronectin, như được giải thích chi tiết ở trên, tế bào gốc toàn năng/đa năng có nguồn gốc từ dây rốn người theo sáng chế này sẽ tăng sinh nhanh trong thời gian dài mà không bị biệt hóa, so với tế bào gốc người trưởng thành thông thường. Ngoài ra, do chúng có khả năng biệt hóa thành nhiều loại tế bào khác nhau như tế bào sụn, xương, và mỡ, nên các tế bào gốc toàn năng/đa năng theo sáng chế có thể được ứng dụng hữu hiệu trong việc điều trị các bệnh không thể chữa được thông thường, cũng như các bệnh thần kinh, bệnh tim mạch, và các bệnh liên quan đến khung xương.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được hiểu chi tiết hơn thông qua các ví dụ dưới đây, chúng chỉ mang tính chất minh họa, chứ không nhằm giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1: Quá trình nuôi cấy, tăng sinh và phân tích bộ nhiễm sắc thể của các tế bào gốc toàn năng/đa năng có nguồn gốc từ dây rốn

Các mẫu UCB của trẻ sinh đủ tháng (n =20) được gom lại ngay sau khi sinh có sự chấp thuận của người mẹ. Mẫu UCB của trẻ sinh đủ tháng được trộn với

HetaSep (Stem cells Technologies INC, Vancouver, BC) để làm tan hồng cầu. Tiếp đó, bạch cầu đơn nhân thu được bằng cách ly tâm theo gradien mật độ Ficoll thông thường. Các bạch cầu đơn nhân này được nuôi cấy với mật độ 1 x $10^{5\sim8}$ tế bào/lỗ trên các đĩa 6 lỗ có phủ 0,1mg/ml - 1mg/ml fibronectin và được giữ trong môi trường SNU-1 hoặc EGM-2 (Lonza) có bổ sung EGM-2 SingleQuots chứa 20% FBS. EGM-2 SingQouts chứa heparin, axit ascorbic, rhEGF, hydrocortison, VEGF, rhFGF-B, R^3-IGF-I, và GA-1000. Các bạch cầu đơn nhân giữ không cho bám dính vào nhau sau khi nuôi cấy 3 ngày được loại bỏ, đồng thời môi trường được thay bằng môi trường mới 2 hoặc 3 ngày một lần.

Các tế bào bám dính được quan sát để tạo ra các cụm tế bào, có dạng hình con suốt 5~30 ngày sau khi nuôi cấy trong điều kiện 5% CO_2 (Fig.1A). Ngay khi được tạo ra, các cụm tế bào tăng sinh nhanh chóng. Các tế bào được tạo hỗn dịch bằng 0,125% Trypsin-EDTA 3~7 ngày sau khi tạo ra cụm tế bào, và được chuyển sang các đĩa sạch trong đó tế bào này tiếp tục được duy trì (các Fig.1B, Fig.1C, Fig.1D, Fig.1E và Fig.1F). Fig.1 là các ảnh thể hiện quá trình nuôi cấy tế bào. Như xem ở Fig.1, cụm tế bào phát triển lan rộng theo thời gian. Sau khi nuôi cấy, các tế bào này có hình thái đồng nhất (Fig.1 thể hiện quá trình phân lập và tăng sinh tế bào gốc toàn năng/đa năng có nguồn gốc từ dây rốn. Các cụm tế bào tạo ra sau khi các bạch cầu đơn nhân được nuôi cấy sau 14 ngày (A), 15 ngày (B), 16 ngày (C), 17 ngày (D) và 18 ngày (E), và tế bào sau khi ngày thứ 3 (F)).

Trong khi chúng vẫn tiếp tục được nuôi cấy, khả năng tăng sinh của tế bào gốc toàn năng/đa năng có nguồn gốc từ dây rốn đã phân lập được phân tích bằng cách xác định CPDL (nồng độ tích lũy nhân đôi quần thể) (Cristofalo et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 95, 1998). Các tế bào được phân chia bằng cách sinh sản phân đôi. Do đó, tốc độ phát triển tế bào có thể được xác định theo thời gian tại đó một tế bào được chia thành hai tế bào, được gọi là thời gian nhân đôi. CDPL của 10 có nghĩa là một tế bào xảy ra 10 quá trình sinh sản, từ đó một tế bào tăng sinh ra khoảng 1000 tế bào. Có một vấn đề lớn nhất đối với các tế bào gốc có nguồn gốc từ

máu dây rốn thông thường đó là chúng có khả năng tăng sinh chậm hơn đáng kể, so với các tế bào gốc trung mô có nguồn gốc từ tủy xương hoặc mô mỡ. Do trên lâm sàng yêu cầu một lượng lớn tế bào gốc, nên khả năng tăng sinh của các tế bào gốc là rất quan trọng. Việc xác định này được tiến hành như sau. Trước tiên, các tế bào gốc toàn năng/đa năng có nguồn gốc từ dây rốn của 3 loại tế bào được phân lập từ các mẫu khác nhau lấy từ máu dây rốn và được nuôi cấy với mật độ $2x10^5$ tế bào trên 100 đĩa và được nuôi cấy giống trong khoảng thời gian như nhau từ 3 đến 4 ngày đồng thời tiến hành đếm tế bào bằng cách sử dụng máy đếm tế bào. Quá trình đếm tế bào được tiến hành cho tới khi các tế bào ngừng phát triển. Các trị số CPDL thu được dựa trên việc xác định lượng tế bào đếm được theo công thức 1 dưới đây:

$$N_H/N_I = 2^X \text{ hoặc } [\log(N_H) - \log(N_I)]/\log(2) = X$$

trong đó, N_I là số lượng tế bào trong môi trường ban đầu và N_H là số lượng tế bào trong điều kiện bão hòa trong quá trình nuôi cấy.

Các trị số CPDL được tính toán trong khi các tế bào tiếp tục được duy trì. Để tiến hành so sánh, hUCB-EPC (human umbilical cord blood derived endothelial progenitor cells - nội tế bào ban đầu có nguồn gốc từ máu dây rốn người) được sử dụng làm mẫu đối chứng. Các kết quả được thể hiện ở Fig.2. Như được thể hiện ở đồ thị của Fig.2, hUCB-EPC có trị số CPDL bằng khoảng 20 sau hơn 2 tháng, trái lại trị số CPDL của tất cả các tế bào gốc toàn năng/đa năng có nguồn gốc từ dây rốn từ 3 mẫu khác nhau được quan sát lại nằm trong khoảng từ 40 đến 45. Các trị số này cho thấy rằng trên lý thuyết, các tế bào có thể phát triển tới 10^{12} tế bào trên một cụm tế bào.

Nhìn chung, các tế bào có khả năng tăng sinh mạnh có thể được hình thành trong các bệnh ung thư, có khả năng phát triển dữ dội. Ngay khi bị ung thư, các tế bào này có thể tăng sinh mà không liên quan tới các tín hiệu điều hoà khác nhau trong cơ thể, và do đó không thể được sử dụng trong các phương pháp trị liệu bằng tế bào gốc và không phù hợp với mục đích nghiên cứu. Do đó, cần xác định xem

nhiễm sắc thể của các tế bào gốc toàn năng/đa năng có nguồn gốc từ dây rốn được phân lập theo sáng chế có bình thường hay không. Trong bản mô tả này, việc phân tích bộ nhiễm sắc thể được tiến hành để thử nghiệm các nhiễm sắc thể của tế bào. Như có thể thấy ở Fig.3, nhận thấy rằng các tế bào có cấu trúc nhiễm sắc thể bình thường ngay cả sau khi nuôi cấy giống 10 ngày.

Ví dụ 2: Phân tích kháng nguyên bề mặt của các tế bào gốc toàn năng/đa năng có nguồn gốc từ dây rốn

Phương pháp đo dòng chảy tế bào được tiến hành để phân tích các đặc tính tế bào được tạo hỗn dịch trong môi trường. Đối với phenotyp của các kháng nguyên bề mặt tế bào, các tế bào thu được sau khi 3~4 ngày nuôi cấy được nhuộm kháng thể tiếp hợp bằng fluoresxein isothioxyanat (FITC) hoặc phycoerythrin (PE), và được phân tích bằng FACSAria (Becton Dickinson, NY).

Các kháng nguyên bề mặt sử dụng để phân tích các đặc tính của tế bào gốc toàn năng/đa năng có nguồn gốc từ dây rốn (tế bào gốc toàn năng/đa năng một phần) phân lập theo sáng chế được cho cảm ứng CD10 (chất chỉ dấu tế bào T), CD14 (chất chỉ dấu bạch cầu mono), CD24 (chất chỉ dấu tế bào biểu mô), CD29 (chất chỉ dấu bạch cầu mono), CD31 (chất chỉ dấu nội bào), CD34 (chất chỉ dấu tế bào gốc tạo máu), CD44 (chất chỉ dấu tế bào gốc trung mô), CD45 (chất chỉ dấu tế bào gốc không tạo máu), CD51/61 (chất chỉ dấu tạo xương), CD73 (chất chỉ dấu tế bào gốc trung mô), CD90 (chất chỉ dấu tế bào gốc trung mô), CD105 (chất chỉ dấu tế bào gốc trung mô), CD133 (chất chỉ dấu tế bào gốc tạo máu), và HLA-DR (chất đánh dầu liên quan tới thải loại miễn dịch), và được phân tích bằng cách sử dụng máy đếm tế bào dòng chảy. Các kết quả được tóm tắt trong Bảng 2 và được mô tả bằng giản đồ ở Fig. 4.

Bảng 2

Kháng nguyên CD trên tế bào gốc có nguồn gốc từ máu dây rốn toàn năng/đa năng	Tế bào/tổng số tế bào được nhuộm rõ ràng (%)
CD10	0,2 ± 0,1
CD14	2,0 ± 1,0
CD24	68,7 ± 2,9
CD29	100 ± 0,0
CD31	0,4 ± 0,7
CD34	3,5 ± 3,4
CD44	100 ± 0,1
CD45	0,0 ± 0,1
CD51/61	6,4 ± 10,8
CD73	99,6 ± 0,5
CD90	99,7 ± 0,3
CD105	99,5 ± 0,8
CD133	0,1 ± 0,1
HLA-DR	2,0 ± 3,2

Ví dụ 3: Mẫu biểu hiện ZNF281 và yếu tố phiên mã nhân trong các tế bào gốc toàn năng/đa năng có nguồn gốc từ dây rốn

ZNF281 (protein mang ngón tay kẽm 281) là một trong các yếu tố phiên mã nhân của ESC (Wang J et al. (2006) Nature 444, 364-368). ZNF281, cũng được gọi là ZBP-99, chứa 4 ngón tay kẽm Kruppel-type có 91% trình tự axit amin tương đồng và 79% trình tự giống như trình tự axit amin được tìm thấy trong ZBP-89. Ngoài ra, các trình tự axit amin trong các phân đoạn có tận cùng là carboxy của 2 gen này có khả năng biến đổi mạnh. Khung đọc mở dự đoán của ADN vòng trong ZNF281 mã hóa protein 99kDa. EMSA (Electrophoretic mobility shift - sự thay đổi tính lưu động điện chuyển như đã nêu) cho thấy rằng protein ZNF281 gắn kết đặc hiệu với các yếu

tố hoạt hóa giàu GC của các gen GASTRIN và ORNITHINE DECARBOXYLASE (Law DJ et al. (1999) Biochem Biophys Res Commun 262, 113-120; Lisowsky T et a l. (1999) FEBS Lett 453, 369-374). ZNF281 được xác định là protein liên kết với c-MYC bằng kỹ thuật xác định protein đa chiều quang phổ khối và tinh chế ái lực liên tiếp (Koch HB et al. (2007) Cell Cycle 6, 205-217.).

Các gen Oct3/4, như các yếu tố phiên mã thuộc họ POU, đã biết là không có mặt trong các mô biệt hóa, nhưng được biểu hiện cụ thể trong các tế bào gốc không biệt hóa có khả năng tăng sinh mạnh (Tai M-H. *et al.,* Carcinogenesis 26:4 95, 2005; Tondreau T. *et al., Stem cells*, 23:1105, 2005). Nhìn chung, Oct3/4 được sử dụng làm các chất chỉ dấu đối với các tế bào gốc từ phôi thai và cũng như các chất chỉ dấu thể hiện sự không biệt hóa. Cụm tế bào được nhuộm bằng cách sử dụng Oct4 làm chất chỉ dấu đối với tính gốc của tế bào gốc. Do đó, nhận thấy rằng nhiều tế bào có Oct4 được nhuộm quanh nhân. Phương pháp đo dòng chảy tế bào cũng chỉ ra sự biểu hiện của Oct4 trong tế bào.

Để nhuộm các protein nội bào, các tế bào được để cố định ở 4°C qua đêm với 4% formalđehyt và được gây thấm trong 10 phút bằng 0,1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich). Các phiến kính và đĩa được ủ trong 1 giờ bằng kháng thể sơ cấp của chuột Oct4 kháng người (1:200), được rửa bằng PBS (dung dịch đệm của muối phosphat; Gibco), được nhuộm miễn dịch trong 1 giờ bằng kháng thể thứ cấp IgG kháng chuột của dê, được tiếp hợp với Alexa594 (Invitrogen) trong lúc đó nhân vẫn được đếm nhuộm bằng DAPI.

Như được thể hiện ở các Fig. 5 và Fig.6, nhận thấy rằng có nhiều tế bào gốc toàn năng/đa năng có nguồn gốc từ dây rốn biểu hiện Oct4 (Fig.5A: biểu đồ tế bào dòng chảy của các tế bào biểu hiện Oct4, B: ảnh của Oct4 được nhuộm miễn dịch, C: ảnh của nhân được nhuộm trong các tế bào biểu hiện Oct4, D: ảnh kết hợp của sự biểu hiện Oct4 và sự nhuộm nhân).

Các gen như Oct4 có liên quan mật thiết đến tính gốc của các tế bào gốc. Trên thực tế, gần đây đã có nhiều nỗ lực khi cho rằng tế bào gốc người trưởng thành

có tính toàn năng tương tự như của các tế bào gốc từ phôi thai bằng cách cho chúng biểu hiện quá mức các gen như Oct4, Sox2 và các gen tương tự (Takahashi et al, Cell, 131(5), 861-872, 2007). Do đó, sự biểu hiện của các gen trong các tế bào gốc này là rất quan trọng trong việc giữ cho các tế bào gốc này ở trạng thái không biệt hóa mà vẫn không mất đi tính gốc của chúng. Do đó, để thử nghiệm các mẫu biểu hiện của ZNF281, Oct-4 và Sox2 trong tế bào gốc toàn năng/đa năng có nguồn gốc từ dây rốn đã phân lập theo sáng chế, phương pháp RT-PCR được tiến hành.

Nhằm mục đích này, các chất mồi được đưa ra trong bảng 3.

Bảng 3

Gen đích	Loại chất mồi	Trình tự	SEQ ID NO:
OCT-4	chất mồi nhạy cảm	5'-CGAAAGAGAAAGCGAACCAG-3'	1
	chất mồi đối nghĩa	5'-GCCGGTTACAGAACCACACT-3'	2
SOX2	chất mồi nhạy cảm	5'-CCTCCGGGACATGATCAG-3‘	3
	chất mồi đối nghĩa	5'-TTCTCCCCCCTCCAGTTC-3'	4
C-MYC	chất mồi nhạy cảm	5'-TACCCTCTCAACGACAGCAG-3'	5
	chất mồi đối nghĩa	5'-GGGCTGTGAGGAGGTTTG-3'	6
ZNF281	chất mồi nhạy cảm	5'-ACGTAACAGCGCAGACAGAA-3'	7
	chất mồi đối nghĩa	5'-GTGTTGAAGCCCAAGTGGTT-3'	8
REX-1	chất mồi nhạy cảm	5'-TGAAAGCCCACATCCTAACG-3'	9
	chất mồi đối nghĩa	5'-CAAGCTATCCTCCTGCTTTGG-3'	10

Như được thể hiện ở Fig.7, Oct-4, Sox2, c-myc, ZNF281, và REX-1 được biểu hiện, cho thấy rằng các tế bào gốc có nguồn gốc từ máu dây rốn theo sáng chế có tính toàn năng.

Ví dụ 4: Biệt hóa tế bào gốc toàn năng/đa năng có nguồn gốc từ dây rốn thành tế bào tạo xương

Tế bào được cảm ứng để biệt hóa thành tế bào tạo xương. Cụ thể, tế bào được cho bám dính vào các đĩa nuôi cấy và được ủ ở mật độ khoảng 70-80%. Tiếp đó, môi trường nuôi cấy được thay bằng môi trường cảm ứng để biệt hóa tế bào tạo xương. Môi trường cảm ứng sự biệt hóa tế bào tạo xương này được tạo ra bằng cách bổ sung glucoza chứa lượng nhỏ DMEM với 10% FBS cùng với 10mM beta-glyxerophosphat (Sigma-Aldrich), 0,1μM Dexamethason (Sigma-Aldrich), và 50μM ascorbat (Sigma-Aldrich). Môi trường này được thay bằng môi trường sạch 3 ngày một lần đồng thời quá trình biệt hóa được xảy ra trong khoảng 2 tuần.

Sau 2 tuần, tiến hành thử nghiệm canxi khoáng hoá do sự biệt hóa sự tạo xương gây ra bằng cách nhuộm Alizarin đỏ S. Quá trình nhuộm được tiến hành như sau. Sau khi môi trường được loại bỏ, tế bào được rửa 2 lần bằng nước cất và được cố định ở 4°C trong 1 giờ trong EtOH lạnh 70%. Tiếp đó, các tế bào này được rửa lại 2 lần bằng nước cất và được nhuộm ở nhiệt độ trong phòng trong 10 phút bằng 40mM Alizarin đỏ S, tiếp đó rửa 5 lần bằng nước cất.

Như được thể hiện ở các Fig.8A và Fig.8B, trong đó Fig.8A không phát hiện thấy canxi khi nhuộm bằng Alizarin đỏ S khi không xảy ra quá trình biệt hóa, trong khi đó ở Fig.8B canxi xuất hiện màu đỏ khi tế bào được cảm ứng để biệt hóa thành tế bào tạo xương, cho thấy rằng các tế bào gốc toàn năng/đa năng có nguồn gốc từ dây rốn được biệt hóa thành tế bào tạo xương có giải phóng canxi.

Ví dụ 5: Biệt hóa tế bào gốc toàn năng/đa năng có nguồn gốc từ dây rốn thành tế bào tạo mô mỡ

Tế bào được cảm ứng để biệt hóa thành tế bào tạo mô mỡ. Cụ thể, tế bào được cho bám dính vào các đĩa nuôi cấy và được nuôi cấy với mật độ khoảng 70-80%. Tiếp đó, môi trường được thay bằng môi trường biệt hóa tế bào tạo mô mỡ. Môi trường biệt hóa tế bào tạo mô mỡ này được tạo ra bằng cách bổ sung glucoza

chứa lượng nhỏ DMEM với 10% FBS cùng với 1μM đexamethason, 10μg/ml insulin (Sigma-Aldrich), 0,5mM 3-isobutyl-1-metylxanthin (Sigma-Aldrich), và 0,2mM inđomethaxin (Sigma-Aldrich). Môi trường biệt hóa được thay bằng môi trường sạch 3 ngày một lần đồng thời quá trình biệt hóa được tiến hành trong khoảng 2-3 tuần.

Sau 2~3 tuần, quá trình biệt hóa tế bào mô mỡ được thử nghiệm bằng cách nhuộm dầu đỏ O. Nhằm mục đích này, môi trường được loại bỏ và tế bào được rửa trong PBS và được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 5 phút trong 10% formalin. Formalin được thay bằng formalin sạch có thể tích tương đương, tiếp đó cố định tế bào ở nhiệt độ trong phòng trong ít nhất 1 giờ. Sau khi loại bỏ formalin, các tế bào này được rửa bằng 60% isopropanol. Rượu được cho bay hơi hoàn toàn trước khi các tế bào được nhuộm ở nhiệt độ trong phòng trong 10 phút bằng dầu đỏ O. Ngay sau khi loại bỏ thuốc nhuộm này, các tế bào được rửa bằng nước cất.

Tế bào tạo mô mỡ xuất hiện màu đỏ trong quá trình xử lý bằng dầu đỏ O do nó đã nhuộm các giọt lipit màu đỏ. Như có thể thấy ở các Fig.8C và 8D, ở Fig.8C các giọt lipit cũng như màu đỏ không thấy xuất hiện khi không xảy ra quá trình biệt hóa tế bào tạo mô mỡ trong khi đó ở Fig.8D khi được cảm ứng để biệt hóa thành tế bào tạo mô mỡ, quan sát thấy các tế bào này có nhiều giọt lipit và có màu đỏ).

Ví dụ 6: Biệt hóa tế bào gốc toàn năng/đa năng có nguồn gốc từ dây rốn thành tế bào sụn

Để tiến hành biệt hóa tế bào thành tế bào sụn, các tế bào được xử lý trong 3 tuần bằng môi trường biệt hóa sụn rTGF-beta 3 (PT-3003) do Lonza cung cấp, đồng thời môi trường này được thay 2 lần 1 tuần bằng môi trường sạch. Quá trình tạo sụn được xác định 1 lần 1 tuần.

Để tiến hành thử nghiệm quá trình biệt hóa thành tế bào sụn, tiến hành nhuộm toluiđin xanh da trời. Các tế bào này được để cố định trong 10 giờ bằng 4%

formalđehyt và tiếp đó để thêm 10 giờ nữa với axit picric. Sau khi sinh tiết đông lạnh, tế bào được nhuộm toluiđin xanh da trời trong 3 phút và được đếm nhuộm trong 3 giây bằng hematoxilin.

Các viên kết sụn không bị phá vỡ, mà vẫn giữ được hình dạng cố định và xuất hiện màu xanh da trời khi được nhuộm bằng toluiđin xanh da trời. Như có thể thấy ở các Fig.8E và 8F, quan sát được các tế bào biệt hóa thành tế bào sụn được nhuộm xanh da trời và vẫn giữ được hình dạng của chúng.

Ví dụ 7: Thay đổi nồng độ biểu hiện gen sau khi biệt hóa tế bào gốc toàn năng/đa năng có nguồn gốc từ dây rốn thành tế bào tạo xương và tạo mô mỡ

Quan sát thấy các tế bào gốc có sự thay đổi đáng kể về mẫu biểu hiện gen trong quá trình biệt hóa. Thông thường, nồng độ biểu hiện của PPAR-γ (Peroxisom Proloferator-activated Receptor-γ – tác nhân hoạt hóa thụ thể sao chép trên nhân tế bào γ) hoặc FABP4 (Fatty acid binding protein 4 - Axit béo gắn kết protein 4) làm tăng tốc độ biệt hóa các tế bào gốc thành tế bào tạo mô mỡ đồng thời nồng độ biểu hiện colagen loại 1 cũng tăng cùng với quá trình biệt hóa các tế bào gốc thành tế bào tạo xương (Mat hews et al., J Am Acad Dermatol, 56(3), 472-492, 2007; Cho et al., J. Cell. Biochem., 96, 533-542, 2005). Do đó, sau khi biệt hóa, nồng độ biểu hiện của gen được biểu hiện trong tế bào của loại đặc hiệu gián tiếp đã chỉ ra xem tế bào gốc có được biệt hóa thành tế bào của loại đặc hiệu không. Các thử nghiệm được tiến hành như sau.

Sau 2 đến 3 tuần biệt hóa thành tế bào tạo xương và mô mỡ, ARN toàn phần được phân lập từ tế bào bằng cách sử dụng Trizol (Invitrogen). ADN vòng được tổng hợp bằng cách sử dụng AccuPower RT Premix (Bioneer), tiếp đó tiến hành PCR nhờ sử dụng kit Maxime PCRPreMix (Intronbio).

Nhằm mục đích này, chất mồi được thể hiện như được chỉ ra trong Bảng 4 dưới đây.

Bảng 4

Gen đích	Loại chất mồi	Trình tự	SEQ ID NO:
PPAR-γ	Chất mồi nhạy cảm	5'-TGCTTTTGTAGGTACCTGGA-3'	11
	Chất mồi đối nghĩa	5'-CATAAACTCTCGTGGAAGTG-3'	12
FABP4	Chất mồi nhạy cảm	5'-GAGTCAACGGATTTGGTCGT-3'	13
	Chất mồi đối nghĩa	5'-GACAAGCTTCCCGTTCTCAG-3'	14
Colagen Loại 1	Chất mồi nhạy cảm	5'-GAGAGAGAGGCTTCCCTGGT-3'	15
	Chất mồi đối nghĩa	5'-CACCACGATCACCACTCTTG-3'	16

Dữ liệu được thể hiện rõ ràng ở Fig.9, nồng độ biểu hiện của các chất chỉ dấu PPAR-γ và FABP4 đối với quá trình biệt hóa tế bào mô mỡ, đã tăng lên đáng kể khi tế bào được cảm ứng để biệt hóa thành tế bào tạo mô mỡ. Cũng như vậy, nồng độ biểu hiện của chất chỉ dấu colagen loại 1 đối với quá trình biệt hóa tế bào tạo xương, cũng tăng lên đáng kể tronh các tế bào được biệt hóa. Đồng thời, nồng độ tương đương của mẫu đối chứng GAPDH được phát hiện ở cả tế bào được biệt hóa và tế bào không được biệt hóa.

Ví dụ 8: Biệt hóa tế bào gốc toàn năng/đa năng có nguồn gốc từ dây rốn thành tế bào thần kinh

Tế bào được cảm ứng để biệt hóa thành tế bào thần kinh. Đầu tiên, các tế bào được ủ trước đó trong 24 giờ trong DMEM được bổ sung 5% FBS và 10ng/ml bFGF (Yếu tố tăng trưởng nguyên bào sợi cơ bản). Sau đó, tế bào này được xử lý trong 24 giờ trong DMEM chứa 1% DMSO, 100μM BHA, 0,5mM VPA, 10mM KCl, và 10ng/ml NGF, và B27 để tiến hành biệt hóa tế bào thần kinh. Để thử nghiệm quá trình biệt hóa tế bào thần kinh, các tế bào này được cố định bằng 4%

paraformaldehyt và được nhuộm miễn dịch đối với các chất chỉ dấu thần kinh Tuj-1, MAP-2, GFAP, và Neurofilament-160. Do đó, 4 chất chỉ dấu này được quan sát là có biểu hiện (Fig.8G).

Ví dụ 9: Biểu hiện protein đặc hiệu ở võng mạc trong các tế bào gốc trung mô có nguồn gốc từ máu dây rốn

Các đặc tính liên quan đến võng mạc của tế bào gốc toàn năng/đa năng có nguồn gốc từ dây rốn được thử nghiệm bằng cách sử dụng phương pháp miễn dịch huỳnh quang.

Các mẫu biểu hiện của protein đặc hiệu ở võng mạc trong tế bào này được thử nghiệm.

Fig.10 là các ảnh thể hiện các mẫu biểu hiện của protein đặc hiệu ở võng mạc như được xác định bằng phương pháp miễn dịch huỳnh quang. Các mẫu biểu hiện của protein PAX6 và Hu được thể hiện ở Fig.10A. Đã biết PAX6 là chất chỉ dấu có nguồn gốc từ võng mạc và protein Hu được biểu hiện đặc hiệu ở tế bào hạch và tế bào đuôi ngắn của võng mạc, là các thành phần của võng mạc. Chúng không phát hiện được trong môi trường nuôi cấy thông thường.

Trên Fig.10B, opsin và rhodopsin được phát hiện. Opsin được biểu hiện đặc hiệu trong các tế bào hình nón trong khi đó rhodposin là đặc hiệu đối với tế bào hình que. Trong môi trường thông thường, opsin không được phát hiện, nhưng quan sát thấy sự biểu hiện của rhodopsin.

Như được thể hiện ở Fig.10C là các mẫu biểu hiện của CRX và Recoverin. Đã biết rằng CRX là chất chỉ dấu của tế bào nhận ánh sáng pan, và Recoverin là chất

chỉ dấu của tế bào nhận ánh sáng. Các chất chỉ dấu này không phát hiện được trong môi trường thông thường (độ phóng đại 400 lần, thanh tỷ lệ = 50μm).

Ví dụ 10: Phân tích xytokin được giải phóng từ tế bào gốc toàn năng/đa năng có nguồn gốc từ dây rốn

Tác dụng điều trị của các tế bào gốc có thể được chia thành 2 tác dụng lớn: đầu tiên biệt hóa trực tiếp các tế bào gốc thành tế bào được làm suy yếu; và thứ hai, có khả năng tiết ra các xytokin hoặc các yếu tố tăng trưởng khác nhau gây ra những biến đổi tích cực từ đó tạo ra tác dụng điều trị trên tế bào đã có sẵn trước đó. Nhìn chung, đã biết rằng các tế bào gốc tiết ra các xytokin hoặc các yếu tố tăng trưởng khác nhau, được gọi là tác dụng paracrin (Kim et al. Cytokine. 2005). Để thử nghiệm các mẫu tiết của tế bào gốc toàn năng/đa năng có nguồn gốc từ dây rốn đã phân lập theo sáng chế, sử dụng dãy kháng thể xytokin người (RaybioTech. Norc ross, USA).

Đầu tiên, tế bào được làm ổn định trong 24 giờ trong môi trường không chứa cả FBS lẫn các chất bổ sung, sau đó cho 1mL tế bào vào môi trường 2 giờ 1 lần. Mỗi mẫu môi trường được gom lại với lượng 100μL để tạo ra lượng lớn được phân tích định lượng về nồng độ protein, tiếp đó cho thử nghiệm trên dãy.

Như được thể hiện trên Fig. 11, nhận thấy rằng các tế bào gốc toàn năng/đa năng có nguồn gốc từ dây rốn đã phân lập từ 3 mẫu khác nhau là tất cả các tế bào tiết ra IL-8 và TIMP-2. Ngoài ra, cũng quan sát thấy hiện tượng tiết ra các xytokin khác nhau bao gồm TGF-β, RANTES, CINC-3, EOTAXIN, GM-CSF, IFN-γ, IL-1b, IL-3, IL-6, IL-10, IL12p40, IL13, IL-16, IP-10, Leptin, MCP-2, MIG, MIP-3a, b-NGFm, sTNFRI, và PFGF-bb (Fig.11 thể hiện các kết quả phân tích dãy của hUCB-MSC1(A), hUCB-MSC2 (B) và hUCB-MSC3 (C) và sự sắp hàng của các kháng thể

(D)).

Ví dụ 11: Môi trường có cấu trúc 3 chiều của tế bào gốc toàn năng/đa năng có nguồn gốc từ dây rốn

Nhìn chung, tế bào gốc người trưởng thành phát triển, tạo ra lớp đơn trong đĩa nuôi cấy. Tuy nhiên, các thử nghiệm cho thấy rằng tính gốc của tế bào gốc người trưởng thành được tăng lên khi các tế bào gốc người trưởng thành này được phát triển không phải ở dạng 2 chiều, mà phát triển ở dạng hình cầu có cấu trúc 3 chiều. Liên quan đến vấn đề này, đầu tiên, các đĩa nuôi cấy được phủ 0,7% agaroza đến khi đạt độ dày 5mm hoặc lớn hơn sao cho các tế bào không thể bám dính vào đáy đĩa, mà tạo ra các hình cầu. Các tế bào này được nuôi cấy với mật độ nhỏ hơn 2000 tế bào/cm^2 để không cho các tế bào đơn lẻ bám dính vào nhau. Do đó, các hình cầu tạo ra được tách ra từ các tế bào đơn lẻ bằng cách sử dụng thiết bị lọc 40μm. Như được thể hiện ở Fig.12, các tế bào gốc không bị chết, mà tạo ra các hình cầu, và vẫn giữ được các đặc tính của các tế bào gốc khi chúng được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy trong hệ nuôi cấy hình cầu. Như xem ở các Fig.12A-D, quan sát thấy nồng độ biểu hiện của các chất chỉ dấu từ phôi thai như OCT4, SOX2 và các chất tương tự trong tế bào được giữ trong môi trường nuôi cấy dạng hình cầu là cao hơn so với nồng độ của chúng được nằm trong lớp đơn.

Các tế bào gốc từ phôi thai được nuôi cấy thông thường trên lớp nguyên bào sợi từ phôi thai chuột do các kemokin, như LIF, từ nguyên bào sợi từ phôi thai chuột có vai trò quan trọng trong việc duy trì hình thái của các tế bào ES và ngăn cản quá trình biệt hóa các tế bào ES này. Khi được nuôi cấy trên lớp nguyên bào sợi từ phôi thai chuột, thì các tế bào gốc toàn năng/đa năng có nguồn gốc từ dây rốn sẽ không phát triển được trên khuôn bằng phẳng cũng giống đối với các tế bào gốc người trưởng thành thông thường, mà tạo ra các cụm tế bào có cấu trúc 3 chiều. Sau khi

quá trình tăng sinh của chúng bị ức chế bằng cách xử lý bằng 0,1mg/ml mitomyxin C, các tế bào STO được nuôi cấy với mật độ 2 x 10^5 tế bào/ml trên các đĩa phủ 0,1% gelatin và được ủ trong 24 giờ, tiếp đó nuôi cấy các tế bào gốc toàn năng/đa năng có nguồn gốc từ dây rốn trên lớp tế bào STO. Như xem ở Fig.13, quan sát thấy quá trình tăng sinh của các tế bào này trên các tế bào STO trong mẫu là tương tự như đối với tế bào gốc từ phôi thai theo thời gian.

Khả năng ứng dụng trong công nghiệp

Khi được nuôi cấy với sự có mặt của fibronectin, các tế bào gốc toàn năng/đa năng có nguồn gốc từ dây rốn người theo sáng chế có khả năng tăng sinh nhanh trong thời gian dài mà không cần biệt hóa, so với tế bào gốc người trưởng thành thông thường. Ngoài việc các tế bào này có khả năng biệt hóa thành nhiều loại tế bào khác nhau như tế bào sụn, tế bào tạo xương, và tế bào tạo mô mỡ, thì các tế bào gốc toàn năng/đa năng theo sáng chế còn có thể được ứng dụng hữu hiệu trong điều trị các bệnh không thể chữa được thông thường, cũng như các bệnh thần kinh, bệnh tim mạch, và các bệnh liên quan đến khung xương.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp phân lập tế bào gốc toàn năng hoặc đa năng có nguồn gốc từ máu dây rốn biểu hiện ZNF281, Oct-4, Sox-2 và Rex-1, trong đó phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy bạch cầu đơn nhân được phân lập từ máu dây rốn trong bình nuôi cấy chứa fibronectin hoặc mảnh chức năng hoặc peptit của nó và bước thu hoạch các tế bào gốc biểu hiện ZNF281, Oct-4, Sox-2 và Rex-1 từ bình nuôi cấy này trong đó tế bào gốc này ở trạng thái không biệt hóa.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó phương pháp này bao gồm bước phân lập bạch cầu đơn nhân từ máu dây rốn bằng cách trộn máu dây rốn với Hetasep để làm tan hồng cầu và sau đó sử dụng Ficoll-paque.

3. Phương pháp theo điểm 2, trong đó phương pháp này bao gồm bước trộn Hetasep với máu dây rốn với tỷ lệ nằm trong khoảng từ 0,5ml đến 2ml Hetasep trong mỗi 5ml máu dây rốn.

4. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó tế bào gốc thu được từ môi trường nuôi cấy bao gồm bước thu hoạch tế bào gốc từ các cụm tế bào tạo ra từ 5 đến 30 ngày sau khi nuôi cấy.

5. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó:
(i) bình nuôi cấy bao gồm fibronectin hoặc mảnh chức năng hoặc peptit của nó, trong đó fibronectin hoặc mảnh chức năng hoặc peptit của nó được tạo lớp trên bình nuôi cấy, hoặc
(ii) bình nuôi cấy bao gồm môi trường nuôi cấy và môi trường nuôi cấy này bao gồm fibronectin hoặc mảnh chức năng hoặc peptit của nó ở dạng hình cầu hoặc cấu

trúc ba chiều.

6. Phương pháp theo điểm 5, trong đó bình nuôi cấy bao gồm fibronectin hoặc mảnh chức năng hoặc peptit của nó được tạo lớp trên bình nuôi cấy, và trong đó fibronectin hoặc mảnh chức năng hoặc peptit của nó có mặt với mật độ nằm trong khoảng từ 0,1g/mL đến 1mg/mL.

7. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước phân lập tế bào có đặc tính miễn dịch dương tính đối với ZNF281, Oct-4, Sox-2 và Rex-1 từ máu dây rốn.

8. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy tế bào biểu hiện ZNF281, Oct-4, Sox-2 và Rex-1 trong môi trường nuôi cấy hình cầu hoặc cấu trúc ba chiều.

9. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, trong đó bước thu hoạch tế bào gốc biểu hiện ZNF281, Oct-4, Sox-2 và Rex-1 từ môi trường nuôi cấy bao gồm việc dùng đặc tính miễn dịch của tế bào gốc để tách tế bào gốc này ra khỏi các tế bào khác có mặt trong môi trường nuôi cấy và/hoặc ra khỏi môi trường nuôi cấy này.

10. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, trong đó phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy bạch cầu đơn nhân từ máu dây rốn trong bình nuôi cấy chứa fibronectin.

11. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, trong đó phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy bạch cầu đơn nhân được phân lập từ máu dây rốn trong bình nuôi cấy chứa mảnh chức năng hoặc peptit của fibronectin.

12. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 11, trong đó phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy bạch cầu đơn nhân trong môi trường EGM-2 hoặc SNU-1 có bổ sung huyết thanh bào thai bò (FBS), 1ng/ml đến 40ng/ml yếu tố sinh trưởng nguyên bào sợi cơ bản (bFGF), 0,1 µg/ml đến 5,0µg/ml axit ascorbic, 1ng/ml đến 40ng/ml yếu tố sinh trưởng biểu bì (EGF), 0,1µg/ml đến 1µg/ml hydrocortison, 1ng/ml đến 40ng/ml yếu tố tăng trưởng giống insulin 1 (IGF-I) hoặc 1ng/ml đến 5ng/ml yếu tố sinh trưởng màng trong mạch (VEGF) và 20µg/ml đến 25µg/ml heparin.

13. Tế bào gốc toàn năng hoặc đa năng có nguồn gốc từ máu dây rốn khi được phân lập bằng cách tiến hành phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 12.

14. Tế bào gốc toàn năng hoặc đa năng có nguồn gốc từ máu dây rốn theo điểm 13, trong đó tế bào gốc này có ít nhất một trong số các tính chất sau:

(a) tế bào này có đặc tính miễn dịch dương tính đối với sự các yếu tố phiên mã c-myc; và/hoặc

(b) tế bào này bám dính vào bề mặt phủ nền ngoại bào và tạo ra các cụm tế bào có hình con suốt hoặc hình cầu sau khi bám dính từ 5 đến 30 ngày; và/hoặc

(c) tế bào này có nồng độ tích lũy nhân đôi quần thể (CPDL) nằm trong khoảng từ 30 đến 45; và/hoặc

(d) tế bào này có đặc tính miễn dịch âm tính đối với CD14, CD31, CD34, CD45 và HLA-DR; và/hoặc

(e) tế bào này có khả năng biệt hóa thành các tế bào trung bì, nội bì và ngoại bì; và/hoặc

(f) tế bào này tiết ra ít nhất một xytokin hoặc chemokin được chọn từ nhóm gồm TIMP-2, TGF-β, RANTES CINC-3, EOTAXIN, GM-CSF, IFN-γ, IL-1b, IL-3,

IL-6, IL-8, IL-10, IL12p40, IL13, IL-16, IP-10, Leptin, MCP-2, MIG, MIP-3a, b-NGFm, sTNFRI, và PFGF-bb.

15. Chất trị liệu bao gồm tế bào gốc toàn năng hoặc đa năng có nguồn gốc từ máu dây rốn đã được phân lập theo điểm 13 hoặc 14 hoặc các tế bào biệt hóa từ đó.

16. Môi trường nuôi cấy tế bào gốc khi được dùng trong phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 12, trong đó môi trường nuôi cấy này bao gồm môi trường EGM-2 có bổ sung huyết thanh bào thai bò (FBS), 1ng/ml đến 40ng/ml yếu tố sinh trưởng nguyên bào sợi cơ bản (bFGF), 0,1 µg/ml đến 5,0µg/ml axit ascorbic, 1ng/ml đến 40ng/ml yếu tố sinh trưởng biểu bì (EGF), 0,1µg/ml đến 1µg/ml hyđrocortison, 1ng/ml đến 40ng/ml yếu tố tăng trưởng giống insulin 1 (IGF-I) hoặc 1ng/ml đến 5ng/ml yếu tố sinh trưởng màng trong mạch (VEGF) và 20µg/ml đến 25µg/ml heparin.

Fig.1

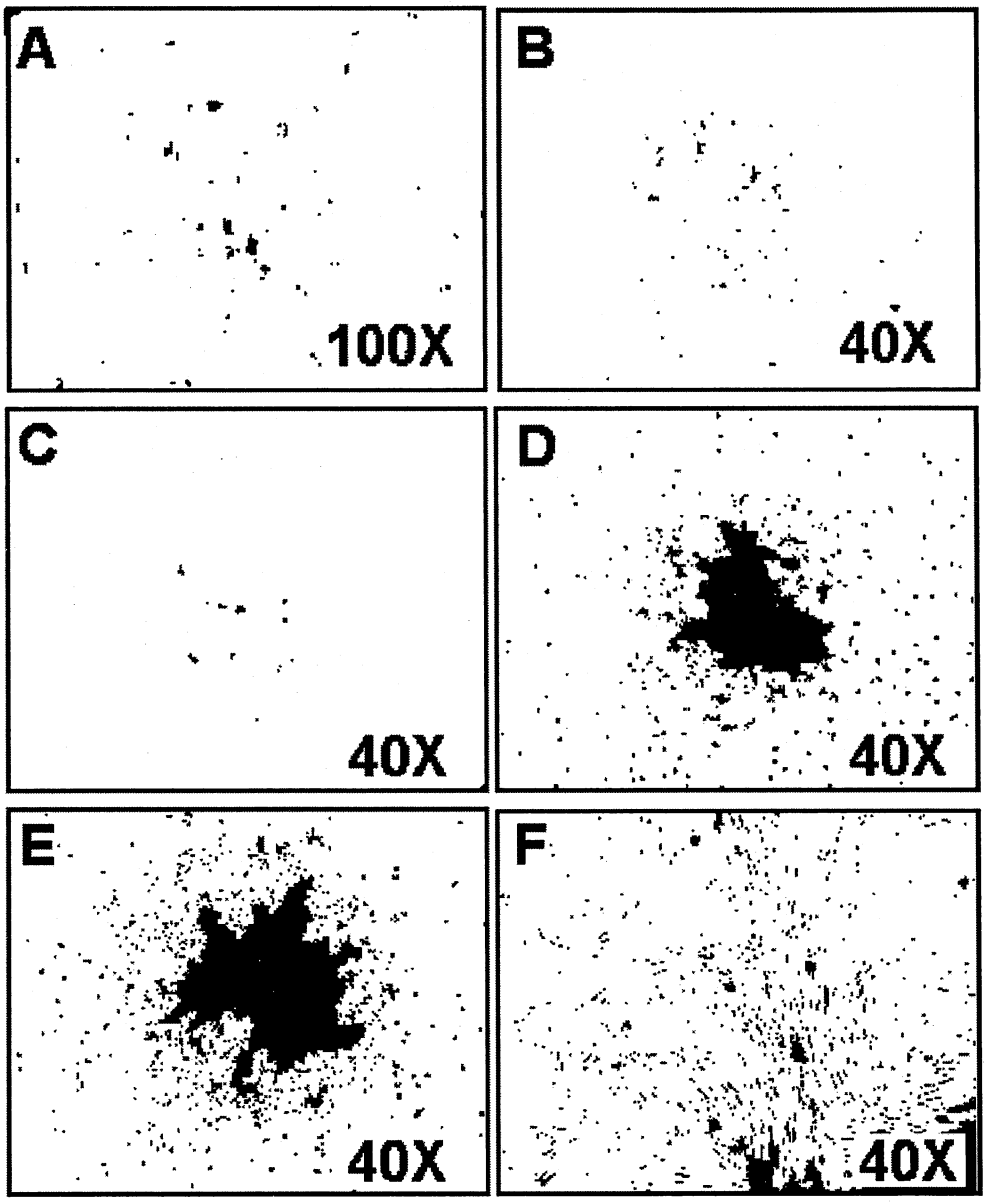
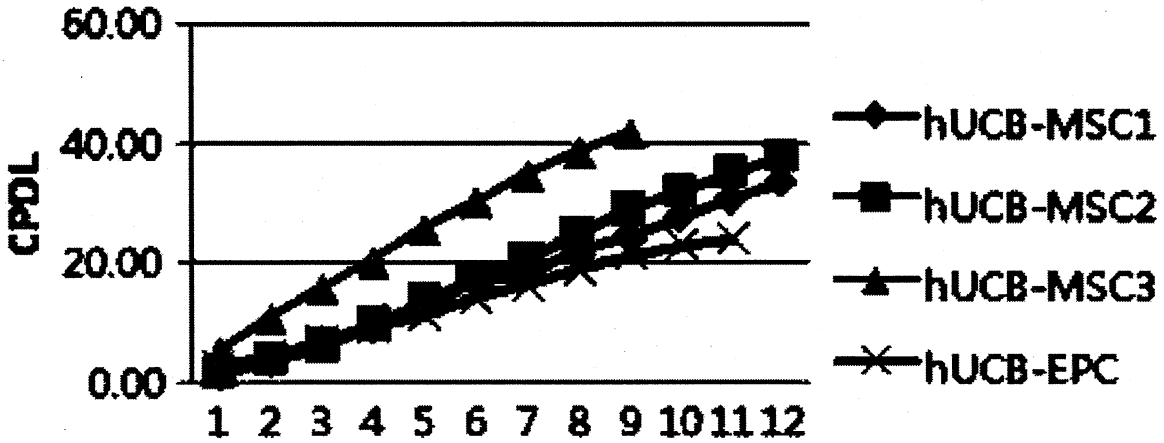


Fig.2



Ngày

Fig. 3

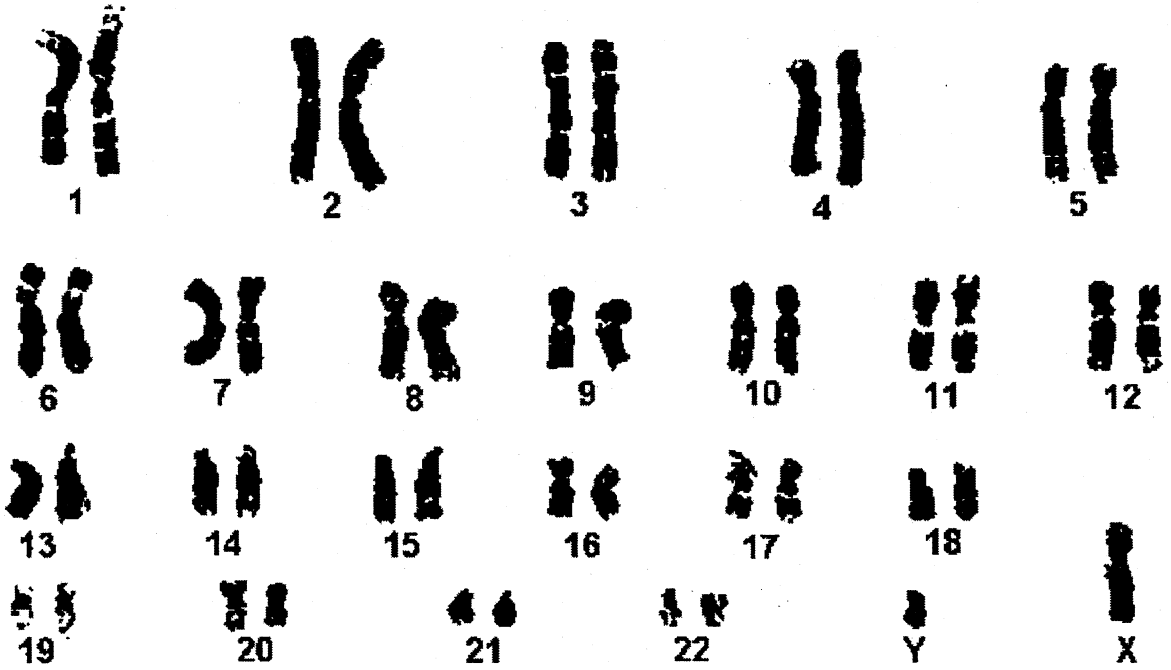


Fig.4

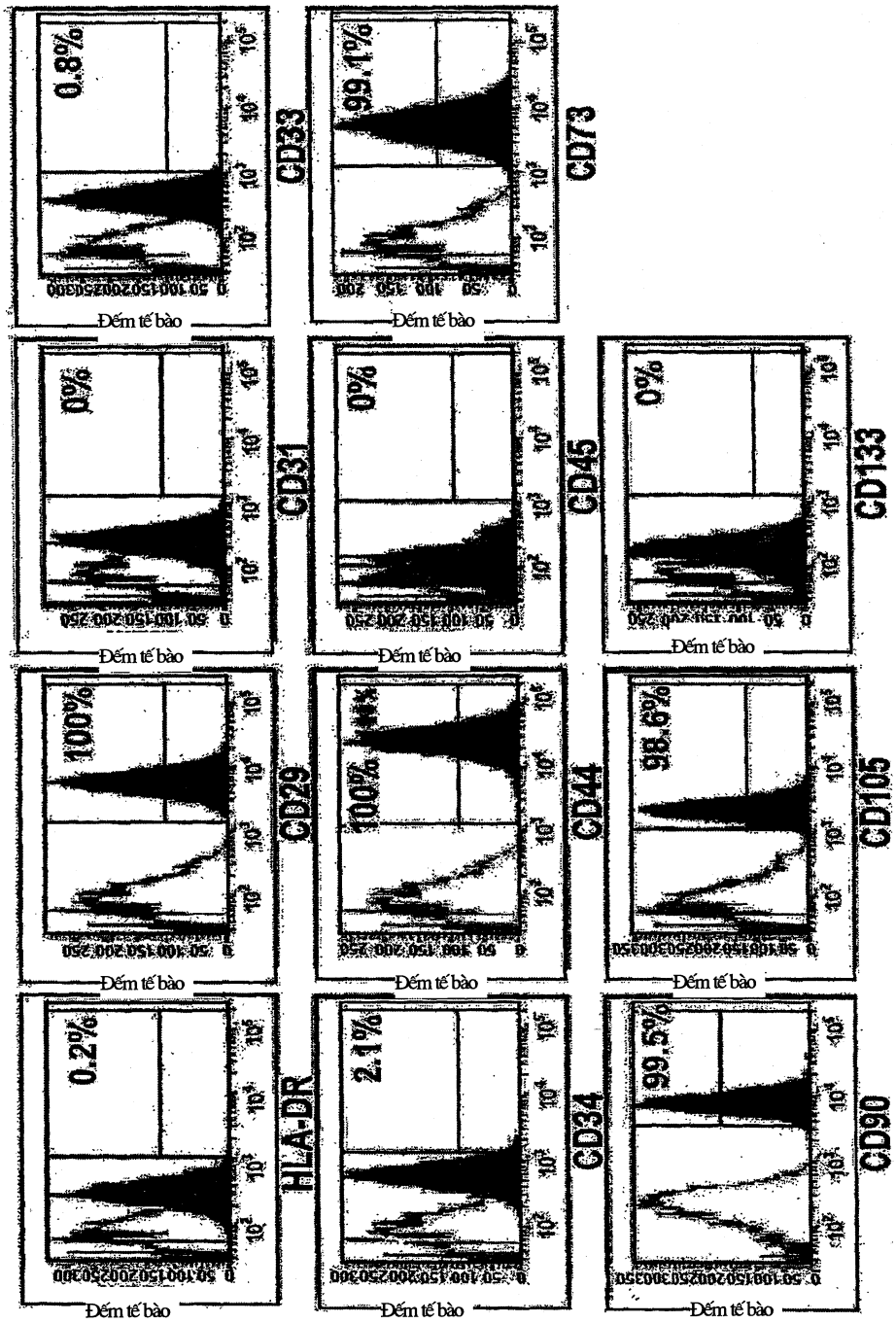

0.8%
CD33
99.1%
CD73
0%
CD31
0%
CD45
0%
CD133
100%
CD29
100%
CD44
98.6%
CD105
0.2%
HLA-DR
2.1%
CD34
99.5%
CD90
Đếm tế bào

Fig.5

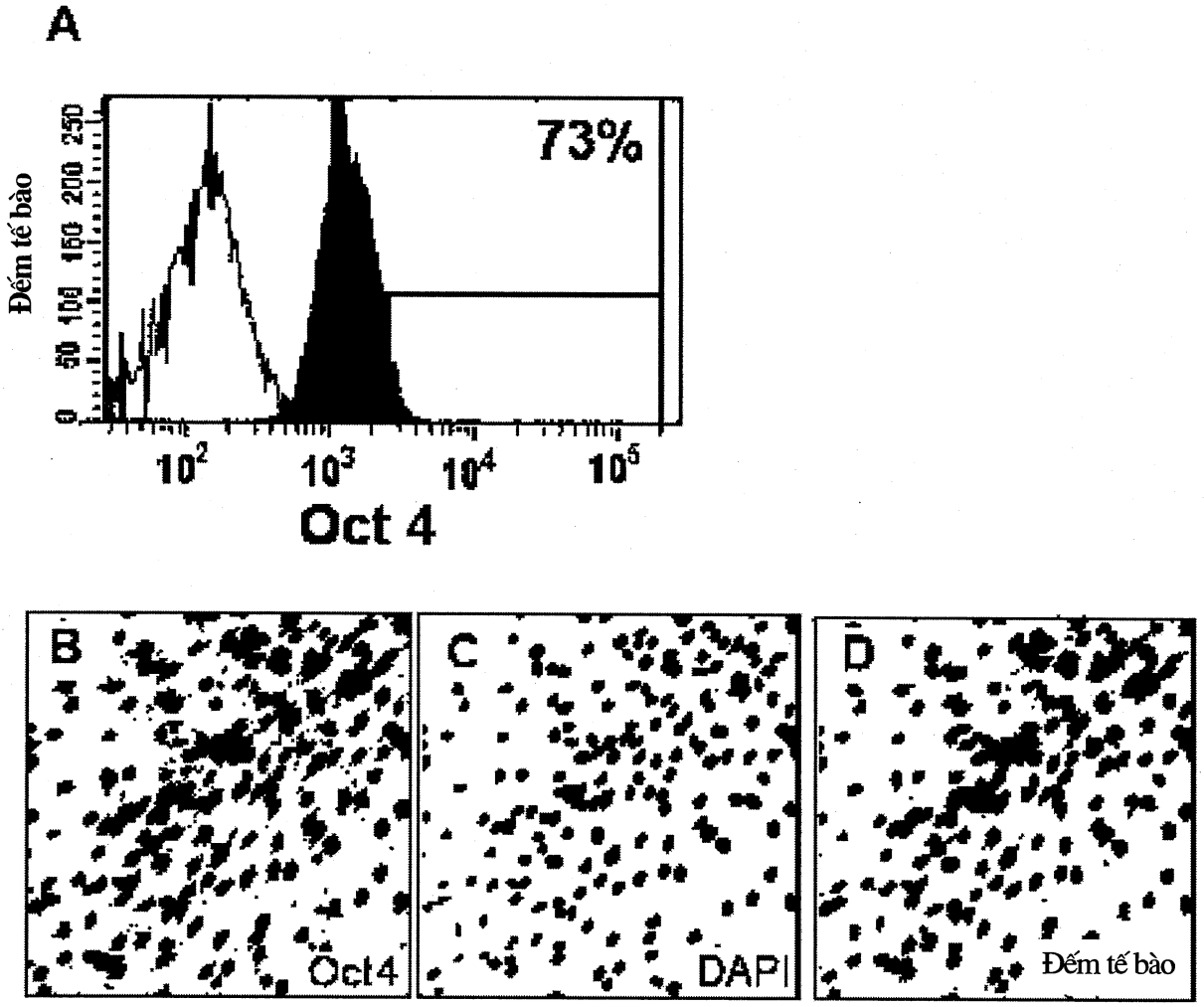
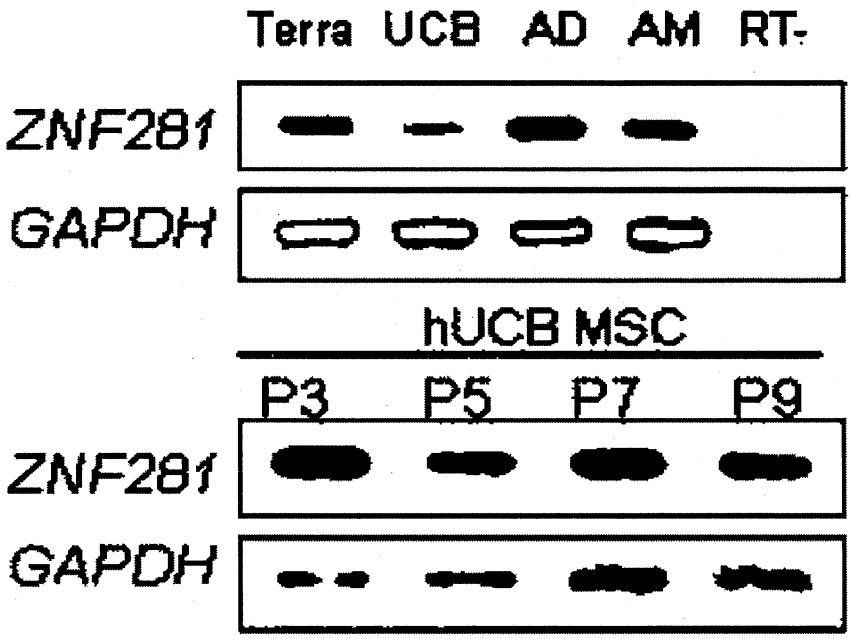

A
Đếm tế bào
0
50
100
150
200
250
73%
10^2
10^3
10^4
10^5
Oct 4
B
Oct4
C
DAPI
D
Đếm tế bào

Fig.6


Terra UCB AD AM RT-
ZNF281
GAPDH
hUCB MSC
P3 P5 P7 P9
ZNF281
GAPDH

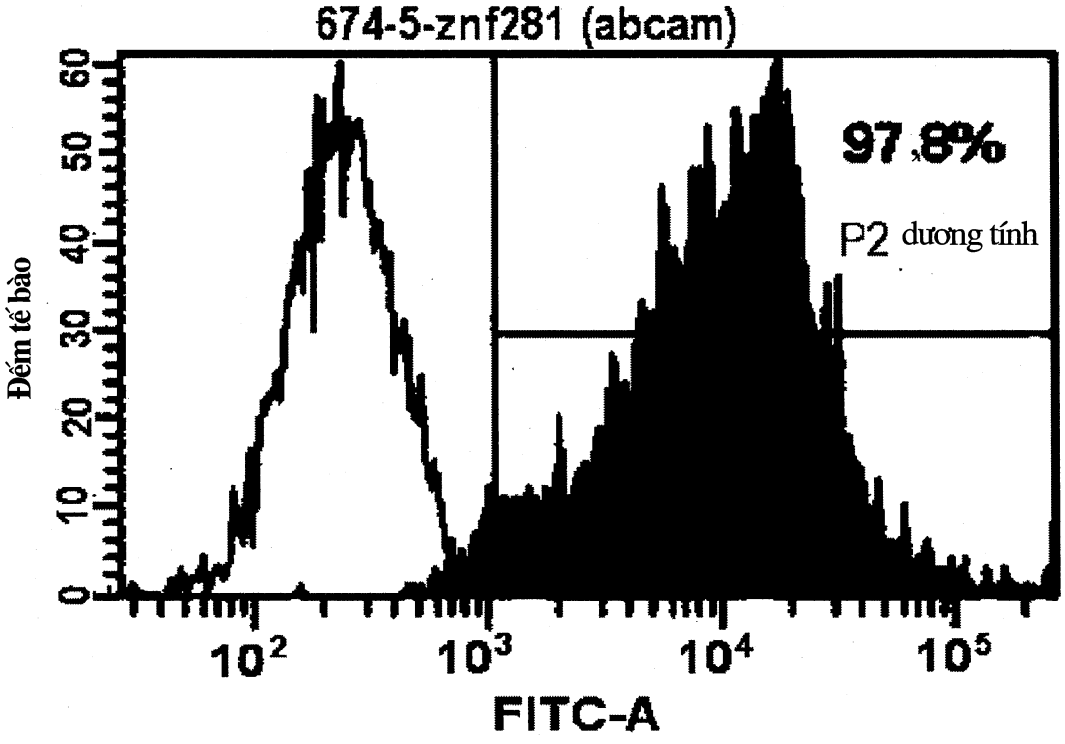

674-5-znf281 (abcam)
97,8%
P2 dương tính
Đếm tế bào
0 10 20 30 40 50 60
10^2 10^3 10^4 10^5
FITC-A

Fig.7

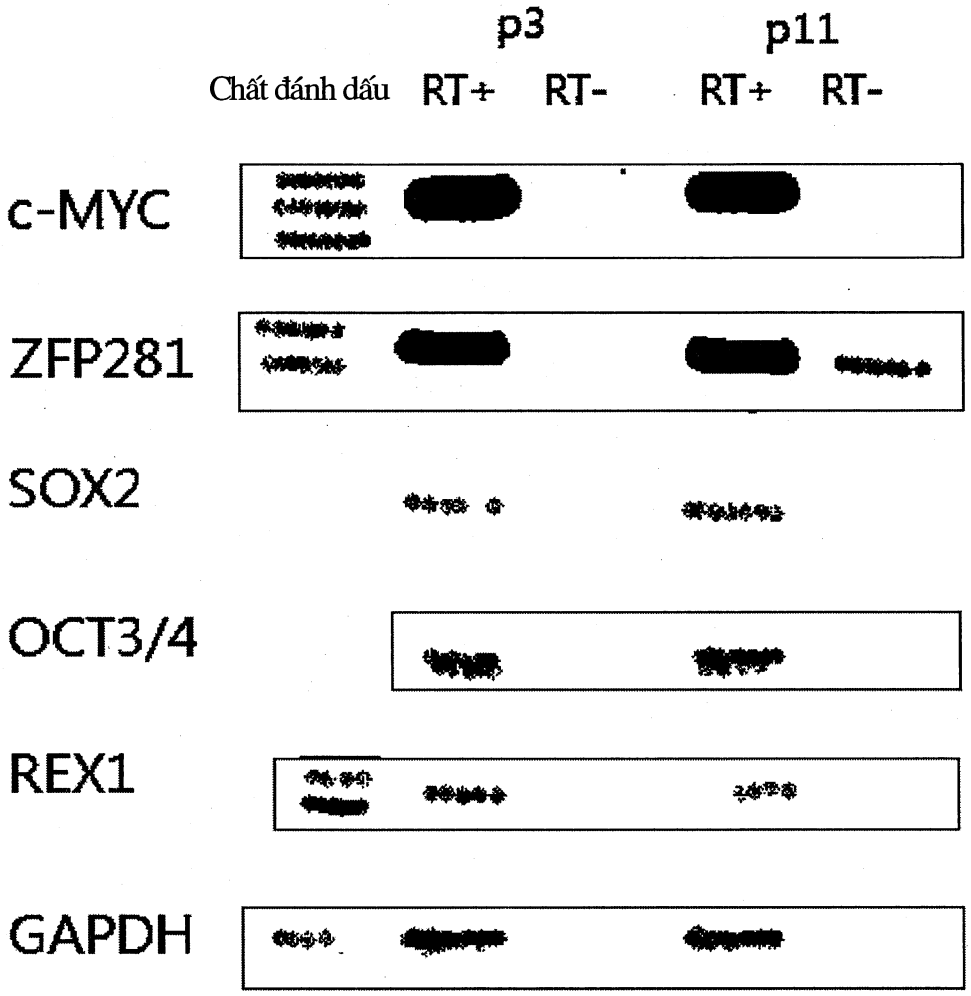

p3
p11
Chất đánh dấu
RT+
RT-
RT+
RT-
c-MYC
ZFP281
SOX2
OCT3/4
REX1
GAPDH

Fig. 8

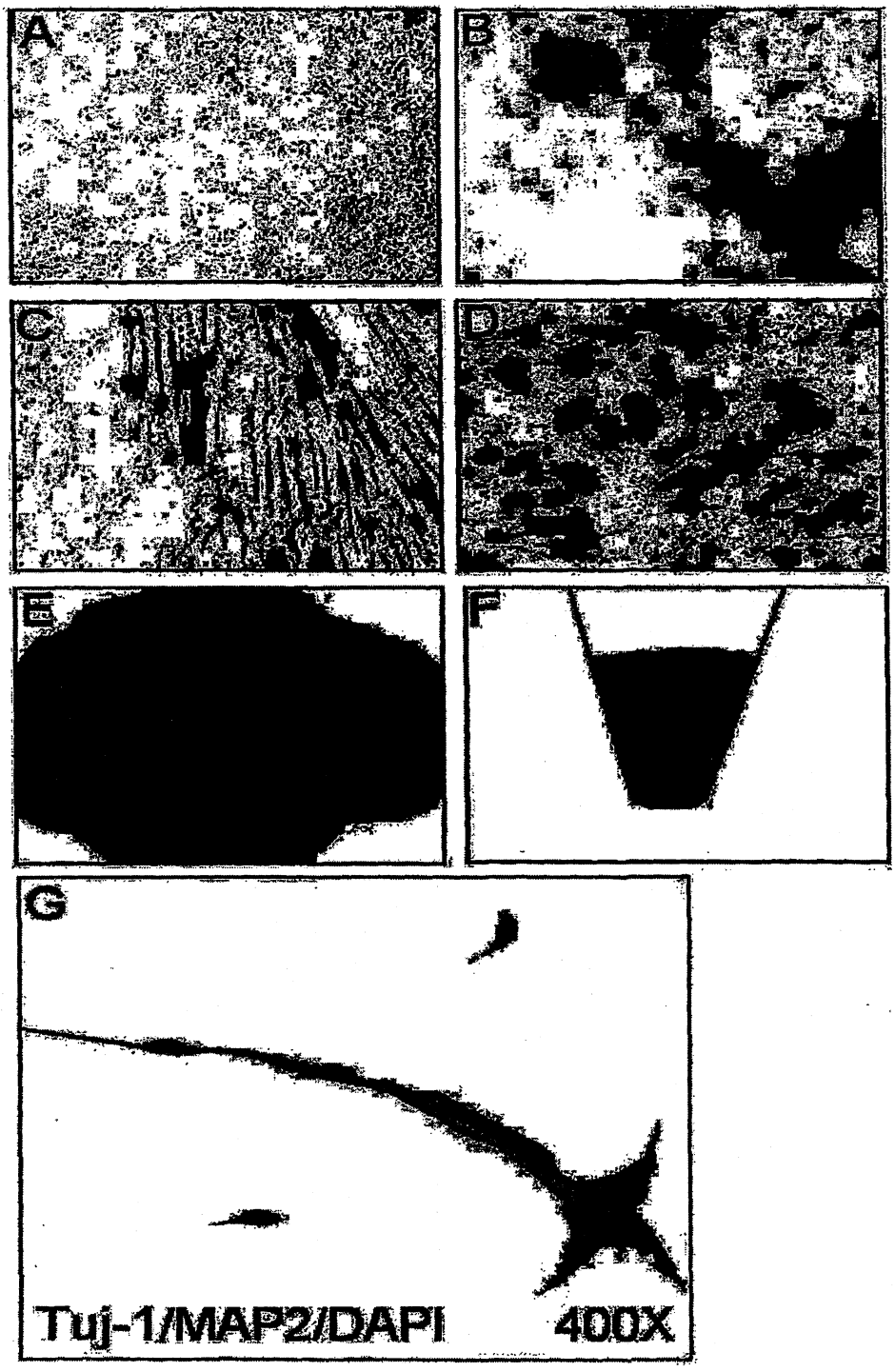


Fig.9

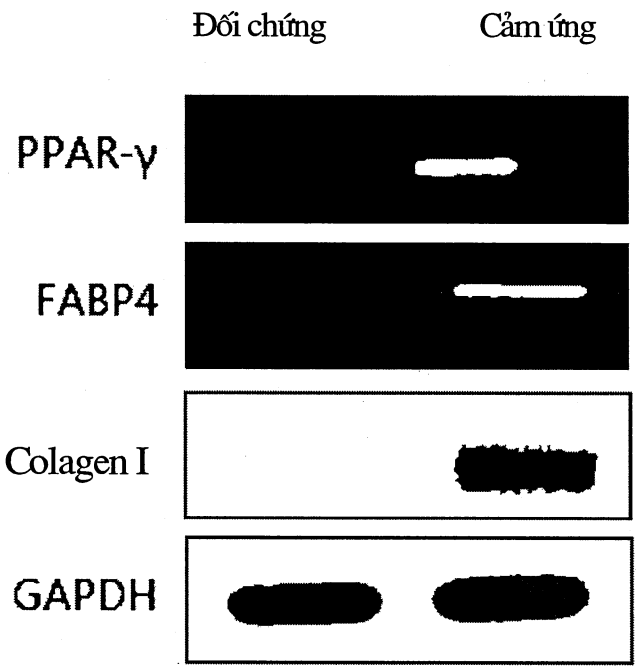


Fig.10

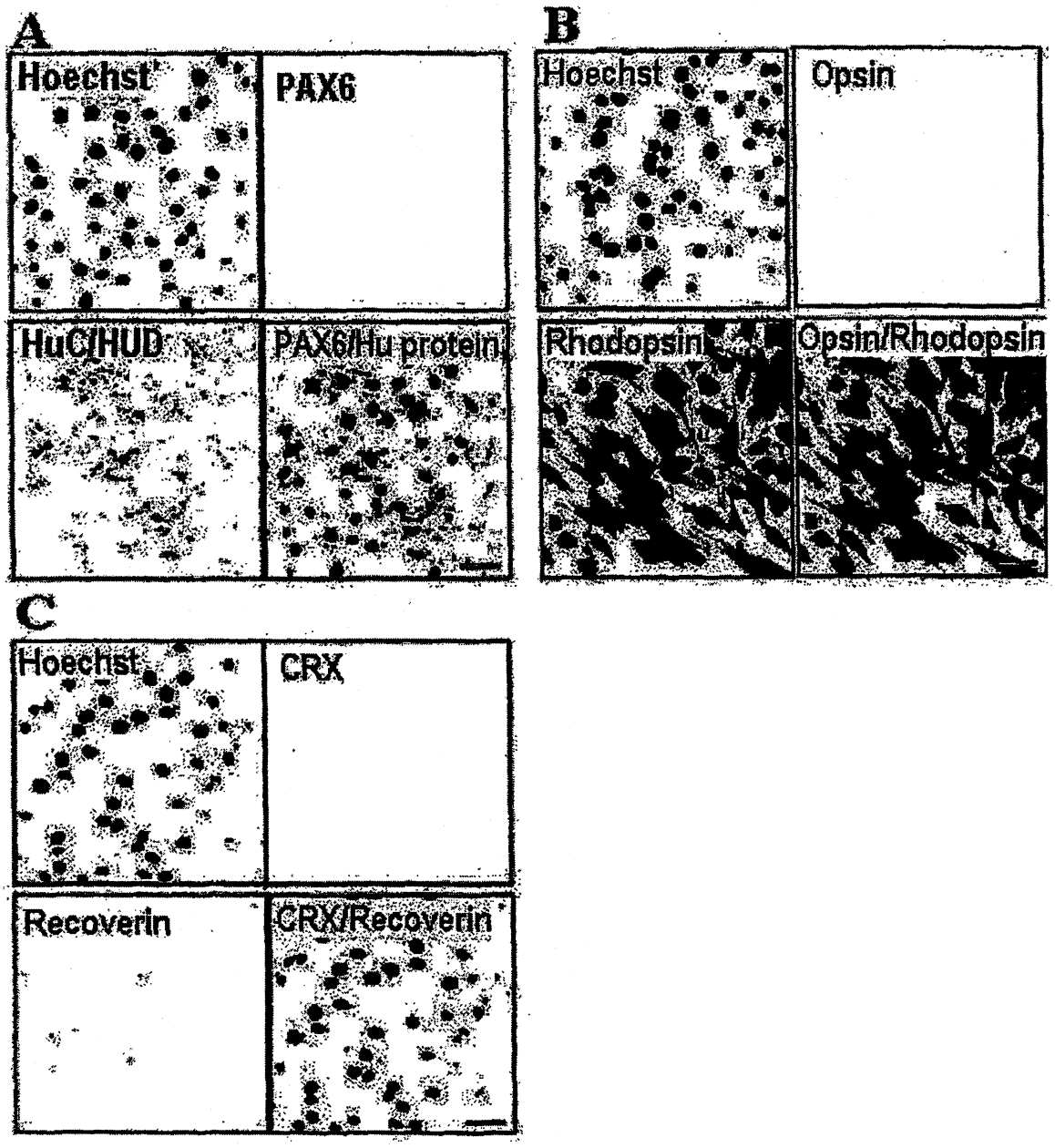

A
Hoechst
PAX6
HuC/HUD
PAX6/Hu protein
B
Hoechst
Opsin
Rhodopsin
Opsin/Rhodopsin
C
Hoechst
CRX
Recoverin
CRX/Recoverin

Fig.11

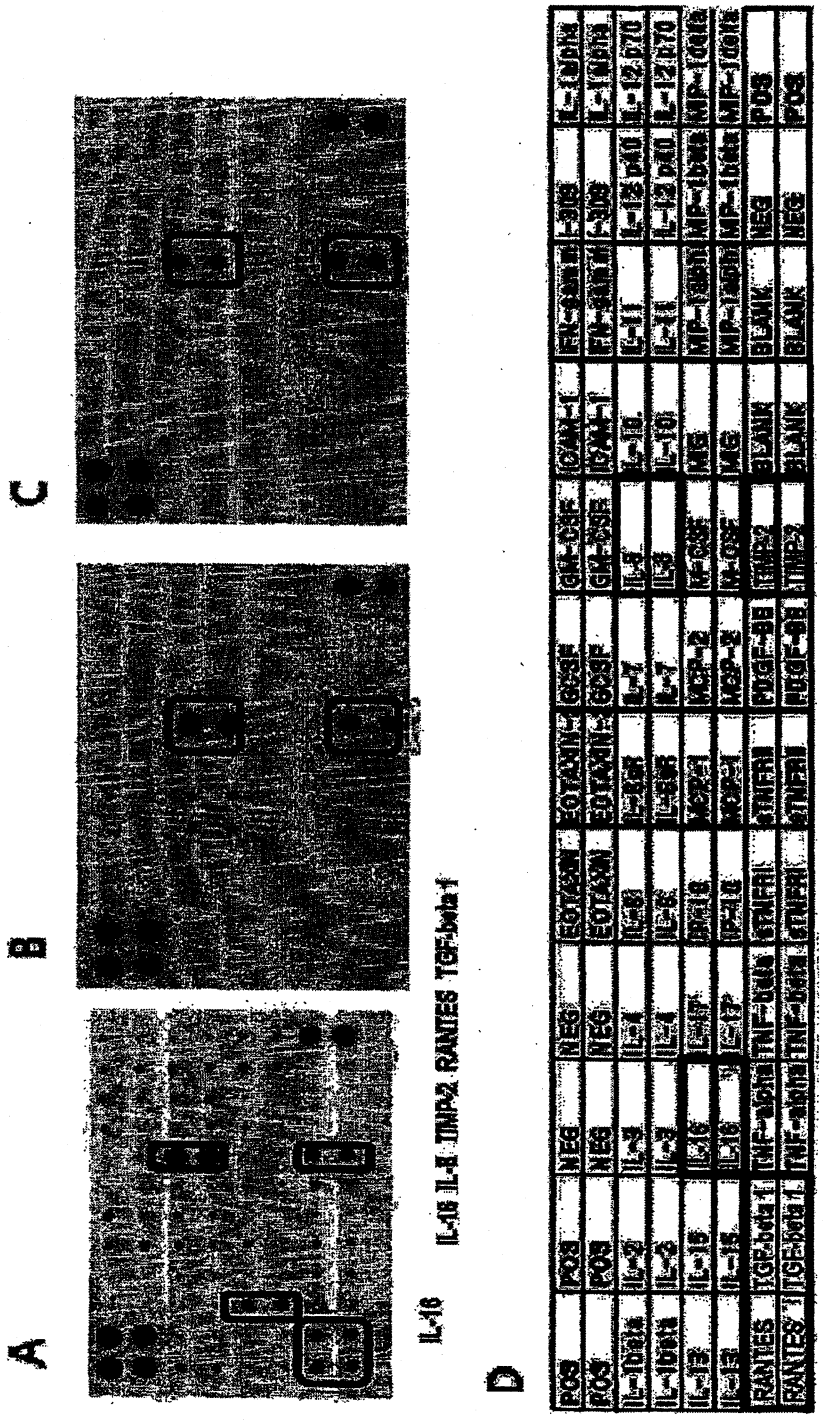


Fig. 12

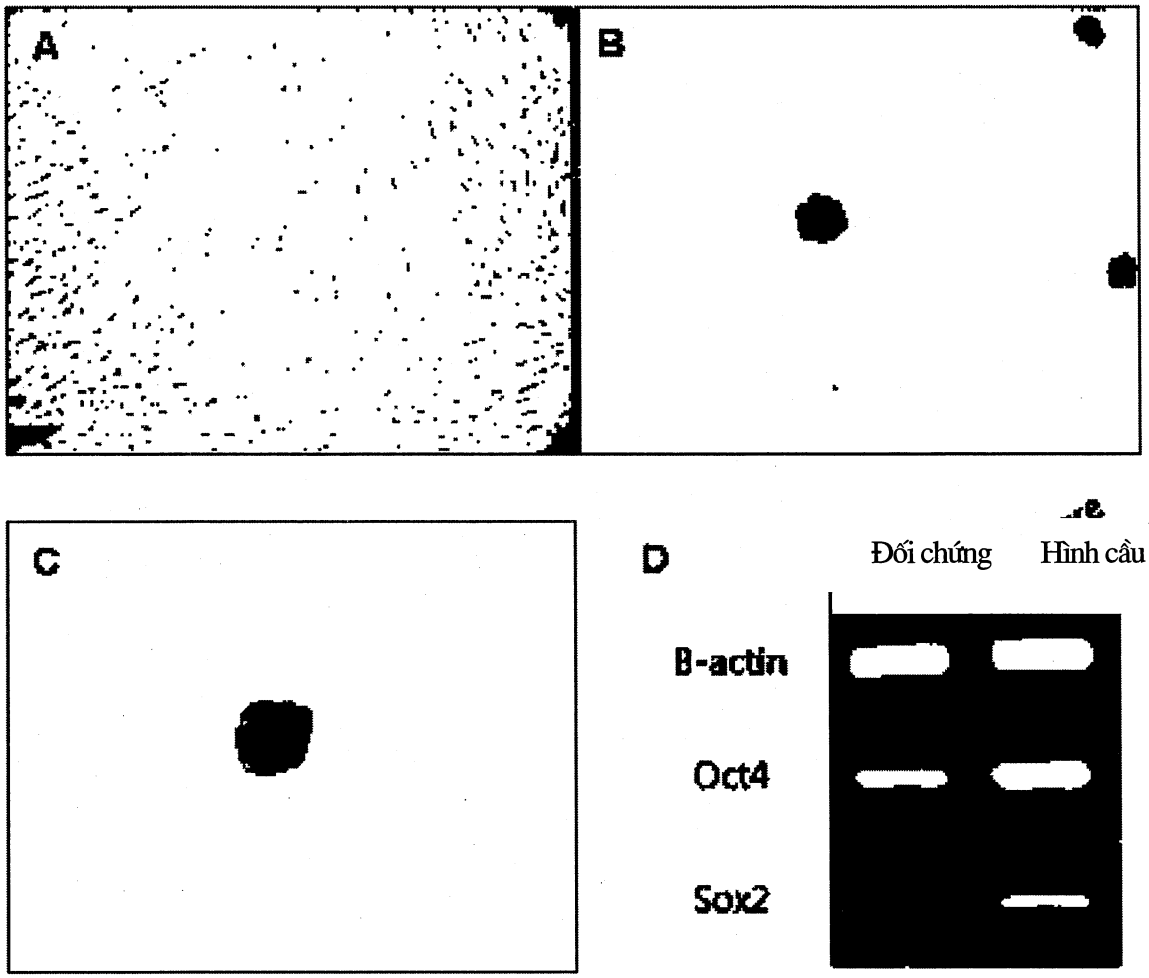
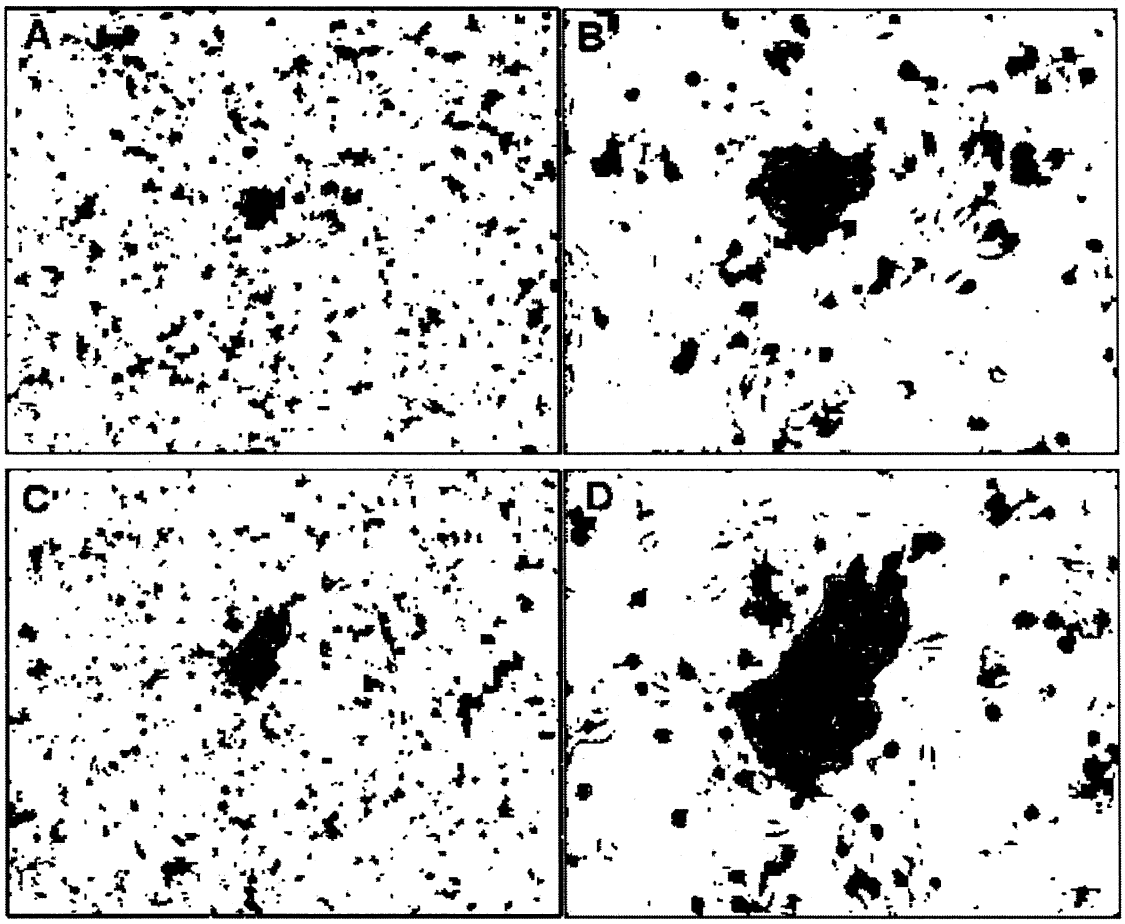


Fig.13



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> SNU R&DB FOUNDATION

<120> Phương pháp phân lập tế bào gốc có nguồn gốc từ máu dây rốn, tế bào gốc có nguồn gốc từ máu dây rốn, chất trị liệu và môi trường nuôi cấy tế bào gốc này

<150> KR1020090023821
<151> 2009-03-20

<160> 16

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> chất mồi

<400> 1
cgaaagagaa agcgaaccag 20

<210> 2
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> chất mồi

<400> 2
gccggttaca gaaccacact 20

<210> 3
<211> 18
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> chất mồi

<400> 3
cctccgggac atgatcag 18

<210> 4
<211> 18
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> chất mồi

<400> 4
ttctcccccc tccagttc 18

<210> 5
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> chất mồi

<400> 5
tacctctca acgacagcag 20

<210> 6
<211> 18
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> chất mồi

<400> 6
gggctgtgag gaggtttg 18

<210> 7
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> chất mồi

<400> 7
acgtaacagc gcagacagaa 20

<210> 8
<211> 20
<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> chất mồi

<400> 8
gtgttgaagc ccaagtggtt 20

<210> 9
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> chất mồi

<400> 9
tgaaagccca catcctaacg 20

<210> 10
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> chất mồi

<400> 10
caagctatcc tcctgctttg g 21

<210> 11
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> chất mồi

<400> 11
tgcttttgta ggtacctgga 20

<210> 12
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> chất mồi

<400> 12
cataaactct cgtggaagtg 20

<210> 13
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> chất mồi

<400> 13

gagtcaacgg atttggtcgt 20

<210> 14
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> chất mồi

<400> 14
gacaagcttc ccgttctcag 20

<210> 15
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> chất mồi

<400> 15
gagagagagg cttccctggt 20

<210> 16
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> chất mồi

<400> 16

caccacgatc accactcttg 20