



(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) 
2-0002129

(51)⁷ **C12N 5/07, 5/0775**

(13) **Y**

(21) 2-2016-00478

(22) 30.12.2016

(45) 25.10.2019 379

(43) 27.03.2017 348

(73) **ĐẠI HỌC QUỐC GIA THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH (VN)**

Khu phố 6, phường Linh Trung, quận Thủ Đức, thành phố Hồ Chí Minh

(72) **Phạm Văn Phúc (VN)**

(54) **QUY TRÌNH SẢN XUẤT TẾ BÀO GỐC TRUNG MÔ KHÁNG STRESS DO
ENZYM TỪ DÂY RỐN HOẶC MÔ MỠ**

(57) Giải pháp hữu ích đề xuất quy trình sản xuất tế bào gốc trung mô kháng stress do enzym từ dây rốn hoặc mô mỡ gồm các công đoạn:

xử lý các mô với hỗn hợp enzym (trypsin, collagenaza, dispaza, Dnaza) để tạo môi trường stress do enzym;

tách và nuôi cấy sơ cấp các tế bào sống sót sau khi xử lý với enzym để thu được tế bào gốc trung mô kháng stress do enzym; và

nuôi cấy tăng sinh tế bào gốc trung mô kháng stress do enzym.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực công nghệ sinh học y dược, y sinh học và tế bào gốc, cụ thể là đề cập đến quy trình sản xuất tế bào gốc trung mô kháng stress do enzym từ dây rốn hoặc mô mỡ.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Hiện nay, đã biết có nhiều phương pháp tạo tế bào gốc trung mô chẳng hạn như patent Trung Quốc số CN102586184 cấp ngày 23.10.2013 đề cập đến quy trình tạo ngân hàng tế bào gốc trung mô bằng cách xử lý bằng dung dịch đệm PBS chứa trypsin (0,25mg/mL), collagenaza (1mg/mL), dispaza (0,1mg/mL), Dnaza (0,25mg/mL) trong thời gian 10-30 phút ở nhiệt độ 37°C, sau đó mẫu mô được tách bằng xy-lanh và nuôi cấy tăng sinh trên môi trường MSC chứa dung dịch đệm PBS và 10% huyết thanh nhau thai bò (FBS). Tài liệu “Isolation and expansion of mesenchymal stem/stromal cells derived form human placenta tissue” công bố ngày 06.06.2016 đề cập đến quy trình phân lập và tăng sinh tế bào gốc trung mô từ nhau thai người bằng cách xử lý với dung dịch chứa enzym collagenaza (100U/mL), dispaza (2,4U/mL), Dnaza (1,5µg/mL) trong thời gian 1-2 giờ ở nhiệt độ 37°C; sau đó mẫu mô được tách bằng cách lắc mạnh và nuôi cấy tăng sinh trong môi trường DMEM chứa kháng sinh kháng nấm. Tài liệu “Activated platelet-rich plasma improves adipose-derived stem cell transplantation efficiency in injured articular cartilage” công bố năm 2013 đề cập đến phương pháp thu nhận tế bào gốc trung mô từ mô mỡ bằng cách xử lý với enzym collagenaza trong thời gian 30 phút ở nhiệt độ 37°C, sau đó ly tâm và nuôi cấy tăng sinh trong môi trường DMEM/F12 chứa 10-20% huyết tương giàu tiểu cầu hoạt hóa, kháng sinh kháng nấm và 10% huyết thanh nhau thai bò (FBS). Công bố đơn yêu cầu cấp patent Trung Quốc số CN102676451 nộp ngày 19.09.2012 đề cập đến quy trình phân lập tế bào gốc trung mô từ nhau thai bằng cách xử lý mô với trypsin (0,25mg/mL), collagenaza (1mg/mL), dispaza (0,1mg/mL), Dnaza (0,25mg/mL) trong thời gian 15 phút ở nhiệt độ 37°C, sau đó mẫu mô được tách bằng xy-lanh và nuôi cấy tăng sinh trong môi trường MSC.

Các tài liệu nêu trên đều cùng một mục đích là phân lập tế bào gốc trung mô tổng số mà không đề cập đến việc phân lập tế bào gốc trung mô có khả năng kháng

stress do enzym. Tế bào gốc trung mô kháng stress do enzym là những tế bào gốc trung mô đặc biệt, chiếm tỉ lệ rất nhỏ trong quần thể tế bào và tế bào gốc trung mô. Các mẫu mô sau khi được xử lí với tổ hợp các loại enzym ở nồng độ tối ưu thích hợp sẽ tạo ra các tế bào gốc trung mô biểu hiện nhiều đặc tính quý phù hợp với ứng dụng trong điều trị như khả năng chống chịu cao với enzym nên có thể chống chịu, sống sót được khi đưa vào cơ thể người. Phần lớn các nghiên cứu trước đây cho thấy việc ghép tế bào gốc trung mô vào cơ thể có hiệu quả không cao là do đến hơn 50% tế bào gốc ghép vào bị chết do không chịu được stress của cơ thể.

Do vậy, vẫn cần một quy trình sản xuất tế bào gốc trung mô kháng stress do enzym từ dây rốn hoặc mô mỡ nhằm tạo ra quần thể tế bào gốc trung mô có các đặc tính tốt phù hợp trong ứng dụng điều trị.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích đề xuất quy trình sản xuất tế bào gốc trung mô kháng stress do enzym từ dây rốn hoặc mô mỡ, cụ thể đưa ra một quy trình chọn lọc được quần thể tế bào gốc trung mô kháng stress do enzym trong hỗn hợp quần thể tế bào gốc trung mô từ dây rốn hoặc mô mỡ.

Để đạt được mục đích trên, giải pháp hữu ích đề xuất quy trình sản xuất tế bào gốc trung mô kháng stress do enzym từ dây rốn hoặc mô mỡ gồm các công đoạn:

xử lí các mô với hỗn hợp enzym (trypsin, collagenaza, dispaza, DNaza) để tạo môi trường stress do enzym;

tách và nuôi cấy sơ cấp các tế bào sống sót sau khi xử lí với enzym để thu được tế bào gốc trung mô kháng stress do enzym; và

nuôi cấy tăng sinh tế bào gốc trung mô kháng stress do enzym;
khác biệt ở chỗ,

bước xử lí mẫu mô với hỗn hợp enzym bao gồm các enzym trypsin nồng độ từ 25mg/L đến 100mg/L, collagenaza nồng độ từ 5µg/L đến 10µg/L, dispaza nồng độ từ 10µg/L đến 50µg/L, DNaza nồng độ từ 0,1IU/mL đến 0,5IU/mL, sau đó ủ mẫu mô trong hỗn hợp enzym ở 2-37°C, thời gian 6-72 giờ;

bước tách mẫu mô sau khi xử lí enzym thành tế bào đơn được thực hiện bằng phương pháp cơ học sử dụng bơm để đẩy mô giữa 2 xy-lanh thông qua 1 cầu nối; số lần bơm đẩy mô giữa 2 xy-lanh từ 30-50 lần; thời gian nuôi cấy sơ cấp trước khi thay môi trường là ủ liên tục từ 5-10 ngày; và

bước nuôi cấy sơ cấp và nuôi cấy tăng sinh được tiến hành trong môi trường bao gồm môi trường DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12) hoặc IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) bổ sung 1%-20% huyết tương giàu tiểu cầu hoạt hoá và 0,01% kháng sinh kháng nấm.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Hình 1: Sơ đồ mô tả quy trình sản xuất tế bào gốc trung mô kháng stress do enzym từ dây rốn hoặc mô mỡ.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Quy trình sản xuất tế bào gốc trung mô kháng stress do enzym từ dây rốn hoặc mô mỡ thực hiện cụ thể theo 3 công đoạn như sau:

1) xử lý các mô với hỗn hợp enzym (trypsin, collagenaza, dispaza, Dnaza) để tạo môi trường stress do enzym.

Chuẩn bị hỗn hợp enzym trypsin, collagenaza, dispaza, Dnaza

- pha dung dịch gốc trypsin 100X với nồng độ từ 2,5g đến 10g/L (tương đương 2500mg đến 10000mg/L) trong dung dịch đệm phosphat.
- pha dung dịch gốc collagenaza 100X với nồng độ từ 500 µg/L đến 1000µg/L trong dung dịch đệm phosphat.
- pha dung dịch gốc dispaza 100X với nồng độ từ 1000µg/L đến 5000µg/L trong dung dịch đệm phosphat.
- pha dung dịch gốc Dnaza 100X với nồng độ từ 10IU/mL đến 50IU/mL trong dung dịch đệm phosphat.

Tất cả các dung dịch enzym trên có nồng độ 100X nghĩa là nồng độ đậm đặc gấp 100 lần so với nồng độ cần sử dụng 1X và được giữ lạnh ở 2-8°C đến khi sử dụng.

Quá trình xử lý mô như sau:

Mô mỡ hay mô dây rốn được cắt nhỏ thành từng mẫu/mảnh từ 1-2 mm². Rửa các mảnh mô trên bằng 1-50mL dung dịch đệm phosphat, sau đó cho toàn bộ các mảnh mô vào các chai thuỷ tinh. Bổ sung vào chai trên dung dịch đệm phosphat, theo tỉ lệ từ 20 đến 80 gam mẫu mô sẽ bổ sung 100 mL dung dịch đệm. Bổ sung các enzym đã chuẩn bị ở trên vào chai chứa mô với nồng độ cuối sau khi bổ sung nồng độ enzym là 1X. Ví dụ nếu mô chứa trong 100 mL thì chứa khoảng 1 mL mỗi loại enzym. Mẫu mô được xử lý với hỗn hợp enzym bao gồm các enzym trypsin nồng độ từ 25mg đến 100mg/L, collagenaza nồng độ từ 5µg/L đến 10µg/L, dispaza nồng độ từ 10µg/L đến

50µg/L, Dnaza nồng độ từ 0,1IU/mL đến 0,5IU/mL. Trộn đều mẫu mô. Ủ chai thủy tinh chứa mẫu mô trong dung dịch enzym trên trong điều kiện 2-37°C trong 6 đến 72 giờ liên tục.

2) tách và nuôi cấy sơ cấp các tế bào sống sót sau khi xử lí với enzym để thu được tế bào gốc trung mô kháng stress do enzym

Chuẩn bị môi trường nuôi cấy: môi trường DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12) hoặc IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) bổ sung 1%-20% huyết tương giàu tiểu cầu hoạt hoá, 0,01% kháng sinh kháng nấm.

Các tế bào còn sống sau xử lí với enzym được tách và nuôi cấy sơ cấp tế bào gốc trung mô như sau:

Bước 1: Lấy chai chứa mẫu mô từ 2-37°C cho vào bể ủ 37°C, lắc đều sau mỗi 5 phút đến khi nhiệt độ của chai đủ ấm (hoặc sau khoảng 30 phút).

Bước 2: Hút toàn bộ dung dịch và mô trong chai trên vào ống xy-lanh 50 mL, sau đó, nối ống này với 01 ống xy-lanh rộng thông qua 01 ống nối.

Bước 3: Tiến hành bơm dung dịch từ xy-lanh này sang xy-lanh kia và ngược lại; thao tác này được lặp lại 30-50 lần nhằm mục đích phá vỡ các liên kết giữa các tế bào và tách mô thành các tế bào đơn.

Bước 4: Bơm toàn bộ dung dịch trong xy-lanh vào ống li tâm 50 mL, tiến hành li tâm ở tốc độ từ 1000 vòng/phút đến 4000 vòng/phút trong 5 đến 20 phút nhằm mục đích phân tách dịch nổi chứa enzym và mảnh vỡ tế bào (nằm ở phần trên ống li tâm) với tế bào (nằm ở đáy ống li tâm).

Bước 5: Loại bỏ dịch nổi, thu cặn tế bào. Đây là toàn bộ tế bào thu từ mảnh mô dây rốn hay mô mỡ.

Bước 6: Rửa cặn lắng 02 lần trong 1-50mL dung dịch đệm phosphat nhằm mục đích loại bỏ mảnh vỡ tế bào và enzym còn tồn dư.

Bước 7: Huyền phù cặn lắng trên trong môi trường nuôi sao cho tế bào từ 100g mô sẽ huyền phù trong 50 đến 100ml môi trường nuôi cấy

Bước 8: Huyền phù tế bào được cho vào dụng cụ nuôi cấy sao cho mỗi bình huyền phù tế bào phủ đều bề mặt dụng cụ nuôi.

Bước 9: Nuôi cấy sơ cấp các bình trên trong tủ ẩm CO₂, ở nhiệt độ khoảng 37°C, độ ẩm tuyệt đối.

Bước 10: Sau 5-10 ngày nuôi cấy sơ cấp, thay môi trường nuôi cấy, loại bỏ các tế bào chết không bám dính sẽ thu được các tế bào sống kháng được stress do enzym.

3) nuôi cấy tăng sinh tế bào gốc trung mô kháng stress do enzym

Bước 1: Hút bỏ hết môi trường nuôi đang có sẵn bên trong dụng cụ nuôi tế bào.

Bước 2: Bỏ sung vào dụng cụ nuôi tế bào dung dịch trypsin/EDTA 0,02% - 0,2% với lượng 0,5-20 mL mỗi dụng cụ.

Bước 3: Dùng ống hút (pipet) hút nhả dung dịch để tách tế bào thành tế bào đơn trong 1-5 phút.

Bước 4: Hút toàn bộ huyền phù tế bào cho vào ống li tâm.

Bước 5: Li tâm ở tốc độ 1000 - 4000 vòng/phút trong 5-20 phút nhằm mục đích loại bỏ enzym.

Bước 6: Huyền phù lại cặn tế bào bằng môi trường nuôi cấy.

Bước 7: Chia huyền phù tế bào trên vào các dụng cụ nuôi cấy phù hợp sao cho huyền phù tế bào bao phủ đều bề mặt dụng cụ nuôi.

Bước 8: Tiếp tục nuôi tế bào cùng điều kiện với nuôi cấy sơ cấp.

Bước 9: Tiếp tục tiến hành như trên khi tế bào đạt độ phủ kín từ 70-80% đến khi đủ số lượng cần thiết thì ngưng nuôi cấy tăng sinh. Tế bào ở giai đoạn này sử dụng cho cấy ghép lâm sàng hoặc sử dụng cho các nghiên cứu.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1: Quy trình sản xuất tế bào gốc trung mô kháng stress từ mô mỡ người

1) xử lý các mô với hỗn hợp enzym để tạo môi trường stress do enzym

Chuẩn bị hỗn hợp enzym: trypsin, collagenaza, dispaza, Dnaza như sau:

Pha dung dịch trypsin 100X, với nồng độ 2500mg/L trong dung dịch đệm phosphat. Pha dung dịch collagenaza 100X, với nồng độ 500µg/L trong dung dịch đệm phosphat. Pha dung dịch dispaza 100X, với nồng độ 5000µg/L trong dung dịch đệm phosphat. Pha dung dịch Dnaza 100X, với nồng độ 50IU/mL trong dung dịch đệm phosphat. Tất cả các dung dịch enzym trên được giữ lạnh ở 2-8°C đến khi sử dụng.

Quá trình xử lý mô

Cho 50g mô mỡ được cắt nhỏ thành từng mẫu từ 2 mm²; rửa các mẫu mô trên bằng 20mL dung dịch đệm phosphat; cho toàn bộ các mẫu trên vào các chai thủy tinh trung tính có dung tích 100mL; bổ sung vào chai trên 96mL dung dịch đệm phosphat; bổ sung các enzym đã chuẩn bị ở trên vào chai trên, mỗi loại enzym bổ sung 1mL, lắc đều chai; ủ chai thủy tinh tại 4°C trong 24 giờ liên tục.

Chuẩn bị môi trường nuôi cấy: DMEM/F12 10% huyết tương giàu tiểu cầu hoạt hoá, 0,01% kháng sinh kháng nấm.

2) Tách và nuôi cấy sơ cấp các tế bào sống sót sau khi xử lí với enzym

Lấy chai chứa mẫu mô từ 40°C cho vào bể ủ 37°C, lắc đều sau mỗi 5 phút đến khi nhiệt độ của chai đủ ấm (khoảng 30 phút).

Hút toàn bộ dung dịch và mô trong chai trên vào 02 ống xy-lanh 50 mL, sau đó, nối mỗi ống này với 01 ống xy-lanh rộng thông qua 01 ống nối.

Dùng tay đẩy dung dịch từ xy-lanh này sang xy-lanh kia và ngược lại; thao tác này được lặp lại 30 lần.

Sau đó, bơm toàn bộ dung dịch trong xy-lanh vào ống li tâm 50 mL, tiến hành li tâm ở tốc độ từ 3500 vòng/phút trong 10 phút.

Loại bỏ dịch nổi, thu cặn tế bào.

Rửa cặn lắng 02 lần trong 20 mL dung dịch đệm phosphate.

Huyền phù cặn lắng trên trong 45 mL môi trường nuôi.

Chia huyền phù tế bào được cho vào 03 bình nuôi cấy T 75 cm² sao cho mỗi bình 15 mL.

Nuôi cấy sơ cấp các bình trên trong tủ ẩm CO₂, 37°C, độ ẩm tuyệt đối.

Sau 5 ngày nuôi cấy sơ cấp, thay môi trường, bỏ các tế bào chết không bám dính được sẽ thu được các tế bào sống kháng được stress enzym.

3) Nuôi cấy tăng sinh tế bào kháng stress do enzym

Hút bỏ hết môi trường nuôi đang có sẵn bên trong bình nuôi tế bào.

Bổ sung vào bình nuôi tế bào dung dịch trypsin/EDTA 0,2% với lượng 10 mL.

Dùng ống hút (pipet) hút nhả dung dịch để tách tế bào thành tế bào đơn trong 3 phút;

Hút toàn bộ huyền phù tế bào cho vào ống li tâm;

Li tâm ở tốc độ 2500 vòng/phút trong 5 phút;

Huyền phù lại cặn tế bào bằng môi trường nuôi cấy;

Chia huyền phù trên thành 3 phần, và bổ sung vào 3 bình nuôi tế bào mới (cấy chuyển 1 thành 3);

Tiếp tục nuôi tế bào cùng điều kiện với nuôi cấy sơ cấp;

Tiếp tục tiến hành như trên khi tế bào đạt độ phủ kín từ 70-80% đến khi đủ số lượng cần thiết thì ngưng nuôi cấy tăng sinh.

Ví dụ 2: Quy trình sản xuất tế bào gốc trung mô kháng stress từ mô dây rốn người

Bước 1: xử lí các mô với hỗn hợp enzym để tạo môi trường stress do enzym

Chuẩn bị hỗn hợp enzym: trypsin, collagenaza, dispaza, Dnaza như sau:

Pha dung dịch trypsin 100X, với nồng độ 2500mg/L trong dung dịch đệm phosphat. Pha dung dịch collagenaza 100X, với nồng độ 500µg/L trong dung dịch đệm phosphat. Pha dung dịch dispaza 100X, với nồng độ 5000µg/L trong dung dịch đệm phosphat. Pha dung dịch Dnaza 100X, với nồng độ 50IU/mL trong dung dịch đệm phosphat. Tất cả các dung dịch enzym trên được giữ lạnh ở 2-8°C đến khi sử dụng.

Chuẩn bị môi trường nuôi cấy: DMEM/F12 10% huyết tương giàu tiểu cầu hoạt hoá, 0,01% kháng sinh kháng nấm.

Quá trình xử lí mô: cho 50g mô dây rốn được cắt nhỏ thành từng mẫu từ 2 mm², rửa các mẫu mô trên bằng 20mL dung dịch đệm phosphat, cho toàn bộ các mẫu trên vào các chai thuỷ tinh trung tính có dung tích 100mL, bổ sung vào chai trên 96mL dung dịch đệm phosphat, bổ sung các enzym đã chuẩn bị ở trên vào chai trên, mỗi loại enzym bổ sung 1mL, lắc đều chai; ủ chai thuỷ tinh tại 4°C trong 24 giờ liên tục.

Bước 2: Tách và nuôi cấy sơ cấp các tế bào sống sót sau khi xử lí với enzym

Lấy chai chứa mẫu mô từ 4°C cho vào bể ủ 37°C, lắc đều sau mỗi 5 phút đến khi nhiệt độ của chai đủ ấm (khoảng 30 phút).

Hút toàn bộ dung dịch và mô dây rốn trong chai trên vào 02 ống xy-lanh 50 mL, sau đó, nối mỗi ống này với 01 ống xy-lanh rỗng thông qua 01 ống nối.

Dùng tay đẩy dung dịch từ xy-lanh này sang xy-lanh kia và ngược lại; thao tác này được lặp lại 30 lần.

Sau đó, bơm toàn bộ dung dịch trong xy-lanh vào ống li tâm 50 mL, tiến hành li tâm ở tốc độ từ 3500 vòng/phút trong 10 phút.

Loại bỏ dịch nổi, thu cặn tế bào.

Rửa cặn lắng 02 lần trong 20mL dung dịch đệm phosphat.

Huyền phù cặn lắng trên trong 45 mL môi trường nuôi.

Chia huyền phù tế bào được cho vào 03 bình nuôi cấy chữ T 75 cm² sao cho mỗi bình 15 mL.

Nuôi cấy sơ cấp các bình trên trong tủ ấm CO₂, 37°C, độ ẩm tuyệt đối.

Sau 5 ngày nuôi cấy sơ cấp, thay môi trường, bỏ các tế bào chết không bám dính được sẽ thu được các tế bào sống kháng được stress enzym.

Bước 3: Nuôi cấy tăng sinh tế bào kháng stress do enzym

Hút bỏ hết môi trường nuôi đang có sẵn bên trong bình nuôi tế bào.

Bổ sung vào bình nuôi tế bào dung dịch trypsin/EDTA 0,2% với lượng 10 mL.

Dùng ống hút (pipet) hút nhả dung dịch để tách tế bào thành tế bào đơn trong 3 phút.

Hút toàn bộ huyền phù tế bào cho vào ống li tâm.

Li tâm ở tốc độ 3500 vòng/phút trong 5 phút.

Huyền phù lại cặn tế bào bằng môi trường nuôi cấy.

Chia huyền phù trên thành 3 phần, và bổ sung vào 3 bình nuôi tế bào mới (cấy chuyển 1 thành 3).

Tiếp tục nuôi tế bào cùng điều kiện với nuôi cấy sơ cấp.

Tiếp tục tiến hành như trên khi tế bào đạt độ phủ kín từ 70-80% đến khi đủ số lượng cần thiết thì ngưng nuôi cấy tăng sinh.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Quy trình sản xuất tế bào gốc trung mô kháng stress do enzym từ dây rốn hoặc mô mỡ theo giải pháp hữu ích đã lựa chọn được tổ hợp các enzym ở nồng độ thích hợp nhất để xử lý mẫu mô nhằm thu được các tế bào gốc trung mô kháng stress do enzym có đặc tính tốt. Các bước tiến hành của quy trình tương đối đơn giản không đòi hỏi các thiết bị phức tạp nên có thể sản xuất với quy mô lớn. Tế bào gốc trung mô kháng stress được tạo ra từ quy trình có các đặc tính ưu việt như khả năng sống sót cao sau khi ghép, chịu được stress của môi trường nuôi cấy, lão hoá chậm, sản xuất mạnh các chất thứ cấp, điều biến miễn dịch mạnh, do vậy có tiềm năng ứng dụng trong nghiên cứu, sàng lọc thuốc và cấy ghép điều trị bệnh với hiệu tốt, ổn định, đặc biệt các bệnh liên quan đến hệ miễn dịch như đái tháo đường, tự miễn.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình sản xuất tế bào gốc trung mô kháng stress do enzym từ dây rốn hoặc mô mỡ gồm các công đoạn:

xử lí các mô với hỗn hợp enzym (trypsin, collagenaza, dispaza, Dnaza) để tạo môi trường stress do enzym;

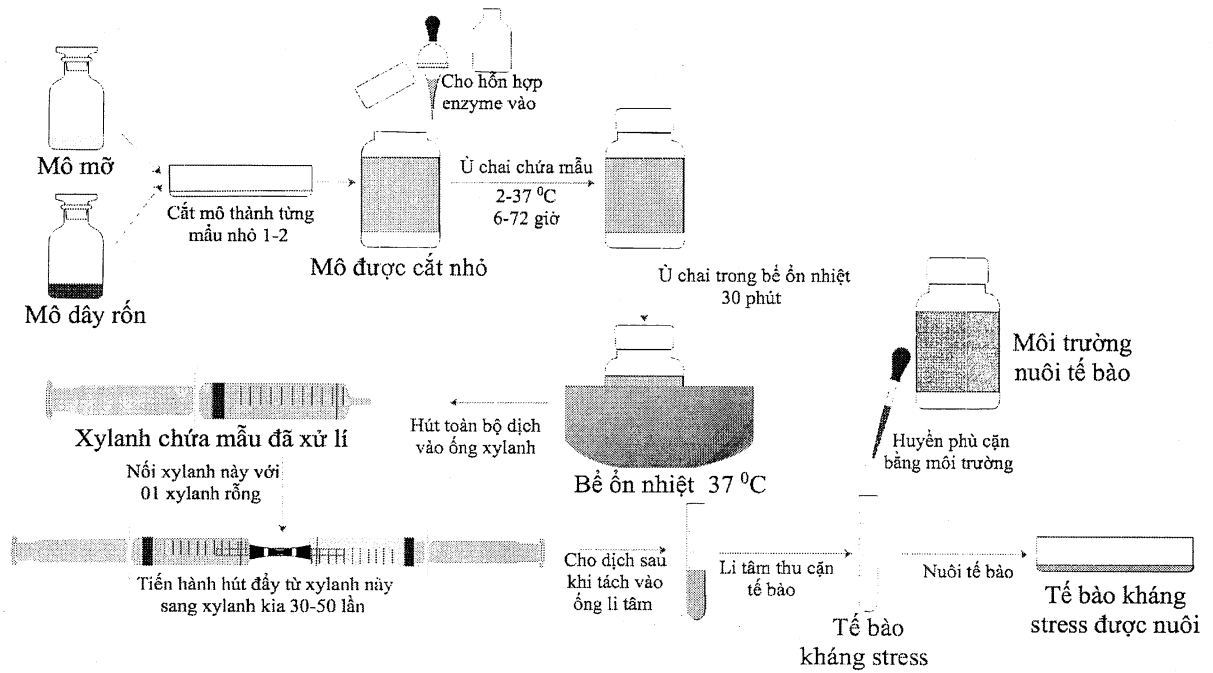
tách và nuôi cấy sơ cấp các tế bào sống sót sau khi xử lí với enzym để thu được tế bào gốc trung mô kháng stress do enzym; và

nuôi cấy tăng sinh tế bào gốc trung mô kháng stress do enzym;
khác biệt ở chỗ,

bước xử lí mẫu mô với hỗn hợp enzym bao gồm các enzym trypsin nồng độ từ 25mg đến 100mg/L, collagenaza nồng độ từ 5µg/L đến 10µg/L, dispaza nồng độ từ 10µg/L đến 50µg/L, Dnaza nồng độ từ 0,1IU/mL đến 0,5IU/mL, sau đó ủ mẫu mô trong hỗn hợp enzym ở 2-37°C, thời gian 6-72 giờ;

bước tách mẫu mô sau khi xử lí enzym thành tế bào đơn được thực hiện bằng phương pháp cơ học sử dụng bơm để đẩy mô giữa 2 xy-lanh thông qua 1 cầu nối; số lần bơm đẩy mô giữa 2 xy-lanh từ 30-50 lần; thời gian nuôi cấy sơ cấp trước khi thay môi trường là ủ liên tục từ 5-10 ngày; và

bước nuôi cấy sơ cấp và nuôi cấy tăng sinh được tiến hành trong môi trường bao gồm môi trường DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12) hoặc IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) bổ sung 1%-20% huyết tương giàu tiểu cầu hoạt hoá và 0,01% kháng sinh kháng nấm.



Hình 1