

# HƯỚNG DẪN SỬ DỤNG ỐNG THU TẾ BÀO ĐƠN NHÂN

MNC COLLECTION TUBE, Cat: 270

## 1. MỤC ĐÍCH

Thu thập máu toàn phần và tách lớp tế bào đơn nhân (PBMC) bằng phương pháp ly tâm qua gel phân tách tích hợp sẵn trong ống, phục vụ cho các ứng dụng miễn dịch, nuôi cấy tế bào hoặc phân tích tế bào học.

## 2. THÀNH PHẦN VÀ THÔNG SỐ ỐNG

- **Chất chống đông:** 1,25 mL dung dịch ACD-A (Acid Citrate Dextrose-A).
- **Gel phân tách:** tỉ trọng  $1.077 \pm 0.003$  g/mL.
- **Thể tích máu khuyến nghị:** 10–11 mL máu toàn phần.
- **Cơ chế hút:** ống chân không vô trùng, chỉ dùng một lần.

## 3. DỤNG CỤ VÀ ĐIỀU KIỆN CẦN THIẾT

- Ống MNC Collection Tube, bảo quản ở nhiệt độ phòng (18–25°C), còn hạn sử dụng.
- Bộ lấy máu chân không: kim, holder.
- Máy ly tâm ống 15 mL.
- Pipet vô trùng (Pasteur hoặc pipet nhựa 1–2 mL), ống ly tâm 15 mL hoặc 50 mL.
- Dung dịch rửa: PBS 1X vô trùng.
- Tủ cấy vô trùng (nếu thao tác nuôi cấy tế bào).
- Cồn sát khuẩn, bông, dây garô, băng dán.

## QUY TRÌNH THU MÁU VÀ LY TÂM THU MNC

### Bước 1: Chuẩn bị

1. Kiểm tra hạn sử dụng, tính toàn vẹn của ống (không nứt, gel không bị xáo trộn).
2. Dán nhãn ghi thông tin mẫu lên ống.

## Bước 2: Thu thập máu

1. Thực hiện kỹ thuật lấy máu tĩnh mạch vô trùng theo quy trình chuẩn.
2. Gắn kim vào holder, cắm ống MNC Collection Tube vào holder nhưng **chưa ấn xuyên nắp**.
3. Sau khi luồn kim vào tĩnh mạch, ấn ống ngập vào kim để máu tự chảy vào nhờ áp lực chân không.
4. Cho máu chảy đến khi đạt **10–11 mL** (tương đương đầy ống theo thiết kế). Rút ống ra khỏi holder.
5. **Ngay lập tức**, đảo nhẹ ống **8–10 lần** (kiểu xoay cổ tay) để trộn đều máu với ACD-A. **Không lắc mạnh** tránh tan huyết.

**Lưu ý:** Nếu lấy máu bằng bơm tiêm và chuyển vào ống qua nắp cao su, cần thực hiện trong điều kiện vô trùng và chỉ dùng ống vẫn giữ chân không (phải bơm đúng thể tích). Tuy nhiên, khuyến cáo dùng hệ thống chân không trực tiếp.

## Bước 3: Ly tâm phân tách

1. Cân bằng ống trong máy ly tâm (đối xứng, cùng khối lượng).
2. Đặt ống vào rotor **swing-out**. Nếu bắt buộc dùng rotor góc cố định, lớp tế bào sẽ nghiêng, gây khó khăn khi thu hoạch.
3. Ly tâm ở **nhiệt độ phòng (18–25°C)** với thông số:
  - **Lực ly tâm:** 1500 × g
  - **Thời gian:** 15 phút
  - **Phanh (brake): Tắt** (hoặc để mức thấp nhất, "no brake") nhằm tránh xáo trộn lớp tế bào khi máy giảm tốc.

Nếu máy ly tâm chỉ cài tốc độ RPM, quy đổi tương đương 800 g. Tham khảo hướng dẫn nhà sản xuất ống nếu có thông số khác (thường dao động 800–1200 g / 20–30 phút).

4. Sau khi kết thúc, lấy ống ra nhẹ nhàng, tránh rung lắc.

## Bước 4: Quan sát kết quả phân tách

Sau ly tâm, máu trong ống phân thành 4 lớp rõ rệt (từ trên xuống):

- **Huyết tương:** vàng nhạt, trong.
- **Lớp tế bào đơn nhân (MNC/buffy coat):** màng mỏng trắng đục, nằm ngay phía trên gel.
- **Gel phân tách:** lớp trong suốt hoặc hơi đục, đông đặc như sáp.

- **Hồng cầu + bạch cầu hạt:** khối đỏ sẫm dưới cùng.

## Bước 5: Thu hoạch lớp MNC

Thao tác trong tủ vô trùng (nếu cần):

1. Dùng pipet nhựa vô trùng nhẹ nhàng hút bỏ phần lớn huyết tương phía trên, để lại khoảng **0,5 – 1,0 cm** chất lỏng trên bề mặt lớp MNC.
2. Dùng pipet mới, nhẹ nhàng thu lấy toàn bộ lớp MNC (trắng đục) cộng với một ít huyết tương còn sót lại. Thu khoảng 1–2 mL dịch chứa tế bào.
3. Chuyển dịch này vào ống ly tâm 15 mL đã có sẵn 5–10 mL PBS hoặc môi trường.

## Bước 6: Rửa tế bào

1. Thêm PBS/môi trường cho đủ 10–15 mL, đầy nắp, trộn nhẹ nhàng (đảo ống).
2. Ly tâm 300–400 × g trong **10 phút** ở 4–8°C hoặc nhiệt độ phòng (bật phanh được).
3. Hút bỏ dịch nổi, giữ lại cặn tế bào.
4. Tái huyền phù tế bào bằng 5–10 mL PBS/môi trường và lặp lại bước rửa thêm 1 lần nếu cần (để loại bỏ tiểu cầu và huyết tương sót).
5. Sau lần rửa cuối, tái huyền phù trong môi trường nuôi cấy hoặc dung dịch đệm phù hợp với mục đích sử dụng.

## Bước 7: Kiểm tra tế bào (khuyến nghị)

- Đếm số lượng tế bào bằng buồng đếm hoặc máy đếm tự động.
- Nhuộm Trypan Blue để xác định tỉ lệ sống (>95% là đạt yêu cầu).

## CÁC LƯU Ý QUAN TRỌNG

- **Thời gian xử lý:** Nên tách MNC trong vòng **2–4 giờ** sau khi lấy máu, bảo quản máu ở nhiệt độ phòng trước ly tâm (không làm lạnh).
- **Trộn nhẹ nhàng:** Sau khi lấy máu phải trộn ngay, tránh hình thành cục máu đông nhỏ làm mất tế bào.
- **Sử dụng rotor swing-out:** Giúp mặt phân cách gel phẳng, tối ưu thu hoạch. Rotor góc cố định sẽ làm gel nghiêng, MNC khó thu sạch.
- **Không phá vỡ gel:** Khi thu lớp MNC, không chạm mạnh pipet xuống gel để tránh hút lẫn gel và hồng cầu.

- **Tình trạng ống:** Nếu gel bị xáo trộn, có bọt khí hoặc chuyển màu bất thường, không sử dụng.
- **An toàn sinh học:** Xử lý máu và vật sắc nhọn theo quy định an toàn sinh học cấp 2.