

QUY TRÌNH THAO TÁC CHUẨN (SOP)
PHÂN LẬP VÀ NUÔI CẤY TẾ BÀO GỐC TRUNG MÔ TỪ TỦY RĂNG SỮA (SHED)
(Phương pháp Nuôi cấy Khối mô - Tissue Explant Culture)

- Mã tài liệu: SOP-SCI-SHED-001
- Đơn vị thực hiện: Viện Tế bào gốc
- Phiên bản: 2.0 (Cập nhật phương pháp Tissue Explant)

1. MỤC ĐÍCH & PHẠM VI ÁP DỤNG

- Mục đích: Quy định chi tiết các bước thao tác chuẩn từ khâu tiếp nhận, bảo quản, vận chuyển mẫu răng sữa về phòng thí nghiệm, kỹ thuật tách răng thu tủy, đến quy trình phân lập bằng phương pháp nuôi cấy khối mô (Tissue Explant) và nuôi cấy tăng sinh tế bào gốc trung mô tủy răng sữa (SHED – Stem cells from Human Exfoliated Deciduous teeth).
- Phạm vi áp dụng: Áp dụng cho toàn bộ Kỹ thuật viên, Nghiên cứu viên thuộc Khối Sản xuất / Phòng thí nghiệm Phân lập & Nuôi cấy Tế bào – Viện Tế bào gốc.

2. TRÁCH NHIỆM

- Kỹ thuật viên / Nghiên cứu viên: Tuân thủ nghiêm ngặt từng bước trong SOP này; ghi chép đầy đủ hồ sơ nhật ký lô/mẫu.
- Cán bộ An toàn sinh học & QLCL (QA/QC): Giám sát việc tuân thủ quy trình, kiểm tra điều kiện phòng sạch và phê duyệt kết quả kiểm định chất lượng sản phẩm tế bào.

3. THIẾT BỊ, DỤNG CỤ VÀ HÓA CHẤT

3.1. Hóa chất & Môi trường chuyên dụng (Viện Tế bào gốc / Regenmedlab)

- Dung dịch vận chuyển mô: Transferring Medium (50 mL) bổ sung Penicillin/Streptomycin 2% và Amphotericin B 1%.
- Môi trường nuôi cấy ban đầu: DentalCult Primary (chuyên dụng cho giai đoạn P0, chứa các yếu tố tăng trưởng tối ưu hóa cho sự bám dính mảnh mô và kích thích tế bào bò ra).
- Môi trường nuôi cấy tăng sinh: DentalCult (hoặc DentalCult Supplement 20X pha với môi trường nền).
- Dung dịch rửa: Washing Buffer / Cell Buffer hoặc DPBS 1X (không chứa Ca^{2+}/Mg^{2+}) bổ sung 1–2% Antibiotic-Antimycotic.
- Dung dịch cấy truyền: Deattachment.
- Dung dịch nhuộm đếm: Trypan Blue 0.4%.

3.2. Dụng cụ & Thiết bị

- Tủ an toàn sinh học cấp II (BSC Class II) đặt tại phòng sạch.
- Tủ cấy CO₂ (37°C, 5% CO₂, độ ẩm >95%).
- Kính hiển vi đảo ngược, máy đếm tế bào, máy ly tâm lạnh vi sinh.
- Dụng cụ phẫu thuật vô trùng: Kim tách răng chuyên dụng (Tooth cracker), cán & lưỡi dao mổ vi phẫu (#11/#15), kẹp phẫu thuật vi phẫu không răng, kim nạo tủy.
- Chai nuôi cấy T25/T75, đĩa Petri vô trùng (35 mm, 90 mm), ống ly tâm 15 mL/50 mL.

4. NỘI DUNG QUY TRÌNH

Bước 1: Thu nhận răng sữa tại nha khoa

1. Tiêu chuẩn chọn mẫu:
 1. Răng sữa lung lay tự nhiên (đến tuổi thay) hoặc răng chỉ định nhổ do chỉnh hình.
 2. Răng không bị sâu tủy nặng, không có dấu hiệu nhiễm trùng nha chu nghiêm trọng, vùng tủy còn nguyên vẹn và hồng tươi.
2. Thao tác thu nhận:
 1. Sau khi nhổ/thu nhận, rửa sơ thân răng bằng dung dịch NaCl 0.9% vô trùng để loại bỏ máu bám ngoài.
 2. Chuyển ngay mẫu răng vào ống chứa Transferring Medium (50 mL) đã chuẩn bị sẵn.

Bước 2: Bảo quản và vận chuyển về Phòng Lab

- Điều kiện nhiệt độ: Bảo quản ở 2°C – 8°C trong thùng lạnh cách nhiệt chuyên dụng.
- Thời gian vận chuyển: Vận chuyển về phòng lab trong vòng 4 – 12 giờ (tối đa không quá 24 giờ kể từ khi thu nhận).
- Ghi nhãn ống mẫu: Ghi rõ Mã ID mẫu, Ngày/Giờ thu nhận, Họ tên/Ngày sinh người cho mẫu.

Bước 3: Tiếp nhận và tiền xử lý tại Phòng Lab

1. Kiểm tra đối chiếu mã ID mẫu và tình trạng niêm phong ống vận chuyển.
2. Chuyển ống mẫu vào Tủ an toàn sinh học Cấp II.
3. Chuyển răng ra đĩa Petri vô trùng, tiến hành rửa răng 3 – 5 lần bằng dung dịch Washing Buffer (hoặc DPBS 1X) chứa 2% Penicillin/Streptomycin nhằm loại bỏ hoàn toàn vết máu và vi sinh vật khoang miệng còn sót lại.

Bước 4: Tách răng và thu nhận tủy răng

1. Đặt răng đã rửa sạch lên đĩa Petri vô trùng mới.

2. Dùng kim tách răng chuyên dụng kẹp nhẹ tại rãnh cổ răng (ranh giới giữa thân răng và chân răng) để làm vỡ vỏ men/ngà răng mà không làm dập khối mô tủy bên trong.
3. Dùng kẹp phẫu thuật vi phẫu hoặc kim nạo tủy gấp nhẹ nhàng toàn bộ khối mô tủy (màu hồng nhạt) ra khỏi hốc tủy.
4. Chuyển khối tủy vừa gấp vào đĩa Petri 35 mm chứa 1 mL DPBS 1X để rửa sạch máu thừa.

Bước 5: Phân lập tế bào tủy răng bằng phương pháp Nuôi cấy khối mô (Tissue Explant)

1. Cắt nhỏ mô tủy: Dùng lưỡi dao mổ vi phẫu vô trùng băm nhẹ khối mô tủy thành các mảnh nhỏ kích thước khoảng 0.5 – 1.0 mm³.
2. Kỹ thuật bám dính khô (Dry attachment):

Dùng đầu kẹp vi phẫu sắp xếp các mảnh mô tủy lên đáy chai cấy T25 (khoảng 4 – 6 mảnh mô/chai T25) hoặc đĩa 6 giếng. Phân bố đều các mảnh mô để tạo khoảng trống cho tế bào tăng sinh.

Đặt chai cấy (đã mở hé nắp lọc) vào tủ cấy CO₂ ở 37°C trong vòng 15 – 30 phút (chưa thêm môi trường) để dịch mô khô nhẹ, giúp mảnh mô bám dính tự nhiên vào bề mặt nhựa của chai cấy.
3. Chiến lược thêm môi trường thể tích nhỏ (Chống trôi mô):

Sau thời gian ủ bám dính khô, nghiêng nhẹ chai cấy và cẩn thận thêm từ từ một lượng rất nhỏ môi trường DentalCult Primary (khoảng 0.5 – 1.0 mL cho chai T25) vào góc chai cấy.

Từ từ hạ phẳng chai cấy để môi trường tráng nhẹ trôi qua đáy chai, vừa đủ làm ẩm ngập chân các mảnh mô, tuyệt đối không đổ môi trường trực tiếp lên trên mảnh mô làm trôi/nổi mô.
4. Cố định môi trường nuôi cấy:

Đặt chai cấy vào tủ cấy CO₂ (37°C, 5% CO₂).

Giữ nguyên chai cấy, tuyệt đối không di chuyển hay rung lắc trong 3 – 5 ngày đầu để tránh làm bung/trôi các mảnh mô.

Bước 6: Nuôi cấy ban đầu và bổ sung môi trường (Primary Culture – P0)

1. Nâng thể tích môi trường: Sau 48 – 72 giờ, kiểm tra dưới kính hiển vi đảo ngược. Khi các mảnh mô đã bám chặt vào đáy chai, cẩn thận bổ sung thêm môi trường DentalCult Primary lên mức chuẩn 3 – 4 mL/chai T25.
2. Theo dõi sự bò ra của tế bào (Outgrowth): Tế bào dạng hình thoi (fibroblast-like) sẽ bắt đầu bò ra từ viền mảnh mô sau khoảng 5 – 8 ngày.
3. Duy trì nuôi cấy: Thay môi trường DentalCult Primary định kỳ 2 – 3 ngày/lần (hút cẩn thận môi trường cũ ra và cho môi trường mới vào nhẹ nhàng theo thành chai).

4. Khi các quần thể tế bào bò ra từ mảnh mô đạt độ che phủ 70–80% diện tích đáy chai, tiến hành cấy truyền.

Bước 7: Nuôi cấy tăng sinh và cấy truyền (Subculture – P1, P2...)

1. Hút bỏ môi trường nuôi cấy, rửa nhẹ bề mặt tế bào 1 lần bằng DPBS 1X.
2. Dùng kẹp vi phẫu gấp bỏ các mảnh mô tùy cũ (nếu muốn loại bỏ khối mô gốc) hoặc giữ nguyên để tiếp tục thu tế bào đợt sau.
3. Bổ sung 1 mL Deattachment, ủ ở 37°C trong 3 – 5 phút cho tế bào thu tròn và bong ra.
4. Thu huyền dịch tế bào, ly tâm 300 × g trong 5 phút.
5. Hút bỏ dịch nổi, tái huyền phục cận tế bào trong môi trường DentalCult. Nhuộm Trypan Blue và đếm số lượng, độ sống tế bào.
6. Cấy truyền sang chai T75 mới với mật độ 5.000 – 8.000 cells/cm² sử dụng môi trường DentalCult.
7. Tiếp tục nuôi cấy, duy trì thay môi trường DentalCult mỗi 2–3 ngày cho đến khi đạt số lượng tế bào cần thiết.

5. KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG (QUALITY CONTROL)

1. Đánh giá hình thái: Tế bào bò ra từ khối mô có dạng hình thoi đồng nhất đặc trưng của tế bào gốc trung mô (MSCs).
2. Kiểm tra vô trùng: Mẫu môi trường nuôi cấy ở P0 và P1 phải âm tính với Vi khuẩn, Nấm, Mycoplasma và Endotoxin.
3. Phân tích dấu ấn bề mặt (Flow Cytometry):
 - Dương tính (> 95%): CD73, CD90, CD105.
 - Âm tính (< 2%): CD34, CD45, CD14/CD11b, CD19/CD79a, HLA-DR.
4. Đánh giá khả năng biệt hóa: Khả năng biệt hóa đa hướng thành tế bào xương (Osteoblasts), mỡ (Adipocytes) và sụn (Chondrocytes).

6. TÀI LIỆU THAM CHIẾU & DANH MỤC SẢN PHẨM LIÊN QUAN

Danh mục vật tư & môi trường nuôi cấy của Viện Tế bào gốc / Regenmedlab:

- DentalCult Primary (Môi trường phân lập/nuôi cấy ban đầu tủy răng)
- DentalCult (Môi trường nuôi cấy tăng sinh tủy răng)
- Transferring Medium (Dung dịch vận chuyển mô)
- Washing Buffer (Dung dịch rửa tế bào/mô)