



Regenmedlab

Leading Regenerative Medicine Innovation

Exo-SCI Production Handbook

MSCCULT OTS MV MSCCULT OTS ZERO

Website:
biomedmart.com.vn
biomedmart.org

Email: contact@sci.edu.vn
sales@sci.edu.vn
kinhdoanh@sci.edu.vn



MỤC LỤC

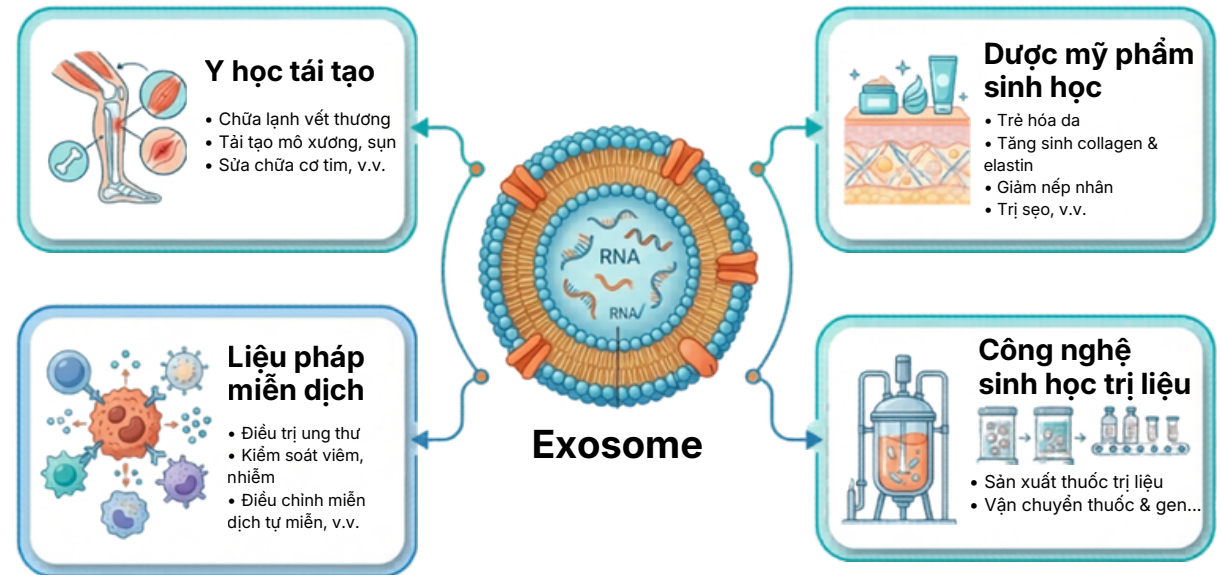
1. BỐI CẢNH VÀ THÁCH THỨC TRONG SẢN XUẤT EXOSOME	3
2. TRỤ CỘT CÔNG NGHỆ	6
3. HƯỚNG DẪN VÀ QUY TRÌNH SẢN XUẤT EXOSOME TỪ TẾ BÀO GỐC TRUNG MÔ	9
4. HƯỚNG DẪN SỬ DỤNG SẢN PHẨM	14
5. CÁC SẢN PHẨM TRONG CÔNG NGHỆ EXO-SCI	15
6. PHỤ LỤC 1: TÍNH TOÁN THỂ TÍCH CHO FLASK T175	20
7. PHỤ LỤC 2: THU HOẠCH, PHÂN LẬP BẰNG HỆ THỐNG REPLIGEN KROSFLO KR2I VÀ BẢO QUẢN SÂU EXOSOME.	22
8. PHỤ LỤC 3: BỘ TIÊU CHUẨN KIỂM SOÁT CHẤT LƯỢNG (QC) CHO MSC-EXOSOME LÂM SÀNG	26

Trong những năm gần đây, exosome nổi lên như một nền tảng quan trọng trong lĩnh vực y học tái tạo và các liệu pháp vô bào (cell-free therapy). Các túi ngoại bào kích thước nano này mang theo protein, lipid và RNA có khả năng điều hòa nhiều quá trình sinh học như tái tạo mô, điều hòa miễn dịch và truyền tín hiệu giữa các tế bào.

Nhờ những đặc tính này, exosome đang được nghiên cứu và ứng dụng trong nhiều lĩnh vực:

- Y học tái tạo
- Liệu pháp miễn dịch
- Dược mỹ phẩm sinh học
- Công nghệ sinh học trị liệu

Sự quan tâm ngày càng tăng đối với exosome kéo theo nhu cầu phát triển các quy trình sản xuất ổn định, có khả năng mở rộng quy mô và đảm bảo chất lượng sản phẩm.



Những giới hạn thường gặp trong quy trình sản xuất

Trong nhiều ứng dụng của y học tái tạo và dược mỹ phẩm sinh học, chất lượng của exosome phụ thuộc chặt chẽ vào trạng thái sinh lý của tế bào mẹ, đặc biệt là tế bào gốc trung mô (MSC). Khi tế bào duy trì được tình trạng sinh học ổn định, các túi ngoại bào được tiết ra thường chứa đầy đủ các tín hiệu sinh học quan trọng như protein, lipid và RNA chức năng.

Tuy nhiên, trong nhiều quy trình truyền thống, exosome thường được thu nhận bằng cách đặt tế bào vào môi trường thiếu dinh dưỡng (serum starvation) nhằm kích thích phản ứng tiết túi ngoại bào. Cách tiếp cận này có thể tạo ra một số hệ quả không mong muốn.

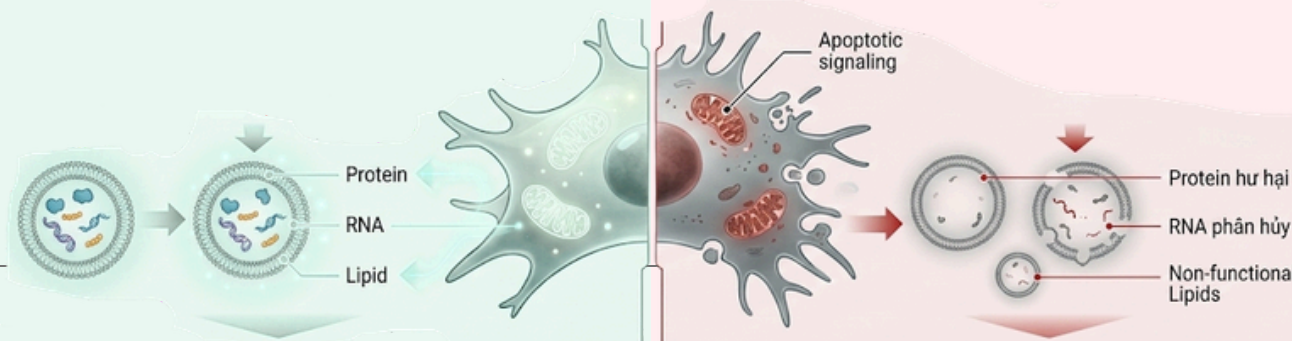
1. Sự suy giảm trạng thái sinh lý của tế bào. Khi bị đặt trong môi trường nghèo dinh dưỡng trong thời gian dài, MSCs dễ rơi vào trạng thái stress sinh học và suy giảm hoạt động chuyển hóa. Điều này có thể ảnh hưởng đến khả năng duy trì chức năng bình thường của tế bào mẹ.

2. Chất lượng túi ngoại bào không đồng nhất. Trong điều kiện stress, các túi ngoại bào được tiết ra có thể chứa ít tín hiệu sinh học chức năng hơn, làm giảm hoạt tính sinh học của exosome thu được.

3. Sự xuất hiện của mảnh vỡ tế bào. Stress tế bào kéo dài có thể kích hoạt quá trình apoptosis. Khi đó, các mảnh vỡ từ tế bào chết (apoptotic bodies) có kích thước tương tự túi ngoại bào có thể xuất hiện trong dịch nuôi, gây nhiễu cho các bước phân tích và tinh sạch exosome.

4. Năng suất và tính ổn định của quy trình. Sản lượng exosome có thể biến động đáng kể giữa các mẻ nuôi cấy, đồng thời phụ thuộc mạnh vào điều kiện môi trường và trạng thái của quần thể tế bào.

5. Khó khăn khi mở rộng quy mô sản xuất. Các quy trình được phát triển trong điều kiện phòng thí nghiệm thường gặp nhiều thách thức khi chuyển sang các hệ thống nuôi cấy quy mô lớn hoặc các quy trình sản xuất có kiểm soát.



VƯỢT QUA MỌI GIỚI HẠN CỦA PHƯƠNG PHÁP THU HOẠCH TRUYỀN THỐNG

Những hạn chế nêu trên cho thấy việc thu nhận exosome không chỉ đơn thuần là một thao tác kỹ thuật riêng lẻ, mà là một chuỗi các bước liên quan chặt chẽ đến trạng thái sinh học của tế bào, điều kiện nuôi cấy và phương pháp xử lý dịch nuôi.

Khi nhu cầu ứng dụng exosome ngày càng mở rộng trong nghiên cứu, dược mỹ phẩm và y học tái tạo, các phòng thí nghiệm và đơn vị phát triển công nghệ bắt đầu tìm kiếm những giải pháp giúp quy trình sản xuất trở nên ổn định và dễ kiểm soát hơn.

Công nghệ Exo-SCI của Viện Tế bào gốc phát triển một cách tiếp cận khác: thay vì kích thích tế bào tiết exosome bằng điều kiện thiếu dinh dưỡng, hệ thống môi trường nuôi cấy được thiết kế để duy trì trạng thái sinh lý ổn định của MSCs đồng thời thúc đẩy quá trình hình thành và tiết exosome.

Trong hệ thống này, môi trường nuôi cấy được tối ưu để:

- Cung cấp nguồn năng lượng và tiền chất cần thiết cho quá trình hình thành màng túi ngoại bào
- Duy trì cân bằng chuyển hóa và hạn chế stress sinh học của tế bào
- Hỗ trợ quá trình đóng gói các tín hiệu sinh học vào bên trong túi ngoại bào
- Giảm nguy cơ hình thành các mảnh vỡ từ tế bào chết



Nhờ đó, MSCs có thể duy trì trạng thái hoạt động ổn định trong suốt chu kỳ nuôi cấy, đồng thời tiết ra lượng exosome cao hơn và đồng nhất hơn so với các phương pháp thu nhận dựa trên starvation.



Cách tiếp cận này cũng cho phép triển khai các chiến lược thu hoạch nhiều chu kỳ (multi-harvest) trên cùng một quần thể tế bào, từ đó nâng cao hiệu quả sử dụng tế bào và cải thiện tính ổn định của quy trình sản xuất.



Những nguyên lý trên là cơ sở cho việc phát triển nền tảng công nghệ Exo-SCI, trong đó các môi trường nuôi cấy và vật liệu hỗ trợ được thiết kế như các thành phần của một hệ thống sản xuất exosome tích hợp.

1. Tối ưu hóa năng lượng và chuyển hóa tế bào

Hệ thống môi trường cung cấp các tiền chất chuyển hóa và yếu tố hỗ trợ hoạt động ty thể, giúp MSCs duy trì trạng thái năng lượng ổn định trong suốt chu kỳ nuôi cấy. Nhờ đó, tế bào có thể tiếp tục hình thành và tiết exosome mà không rơi vào trạng thái kiệt quệ như trong điều kiện thiếu dinh dưỡng.

2. Kiểm soát stress và tín hiệu apoptosis

Các thành phần sinh học trong hệ thống môi trường giúp hạn chế kích hoạt các tín hiệu stress và quá trình apoptosis trong quần thể MSCs. Điều này giúp giảm sự hình thành các mảnh vỡ tế bào (apoptotic bodies) – một trong những nguồn gây nhiễu phổ biến trong dịch nuôi.

3. Hỗ trợ quá trình hình thành màng túi ngoại bào

Môi trường nuôi cấy được thiết kế để cung cấp các tiền chất cần thiết cho quá trình hình thành màng lipid của túi ngoại bào. Điều này giúp MSCs có thể hình thành exosome liên tục mà không ảnh hưởng đến cấu trúc tế bào.

Nhờ kết hợp các trụ cột công nghệ trên, Exo-SCI cho phép chuyển đổi cách tiếp cận từ thu nhận exosome dựa trên stress tế bào sang sản xuất exosome có kiểm soát dựa trên điều hòa sinh học của MSCs.

Cách tiếp cận này giúp:

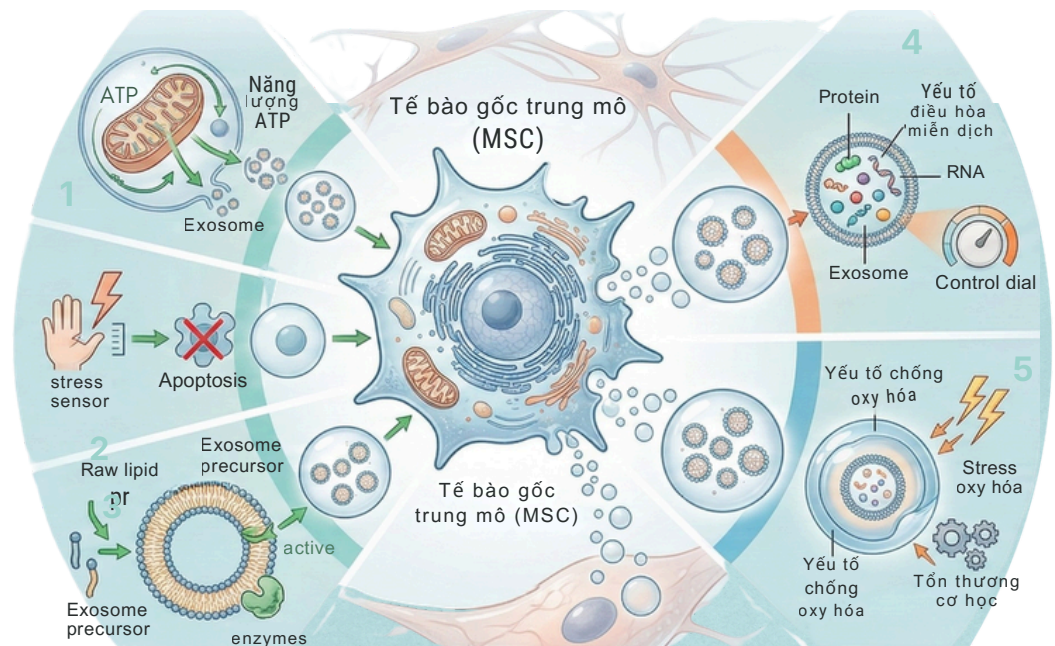
- Duy trì trạng thái sinh lý ổn định của tế bào
- Cải thiện độ đồng nhất của exosome
- Giảm tạp chất sinh học trong dịch nuôi
- Nâng cao hiệu suất thu nhận
- Tạo nền tảng cho các quy trình sản xuất có khả năng mở rộng

4. Điều hòa tín hiệu sinh học trong exosome

Thông qua việc tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy và các yếu tố tăng trưởng, MSCs được duy trì trong trạng thái sinh học thuận lợi để đóng gói các phân tử tín hiệu như protein, RNA và các yếu tố điều hòa miễn dịch vào bên trong exosome.

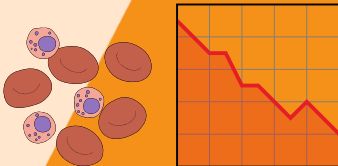
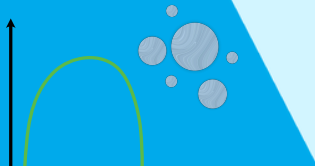
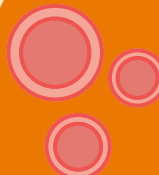
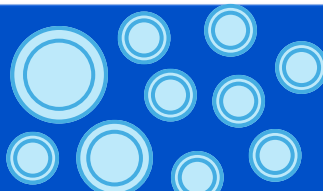
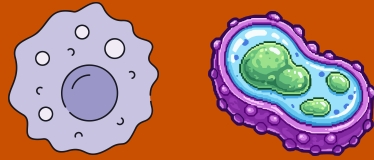
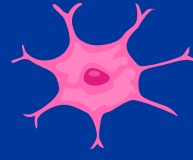
5. Bảo vệ cấu trúc exosome trong quá trình thu nhận

Các yếu tố chống oxy hóa và cơ chế bảo vệ nội bào được tích hợp nhằm giảm tổn thương màng lipid của exosome do stress oxy hóa hoặc các bước xử lý cơ học như ly tâm và lọc.



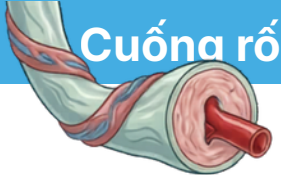
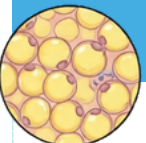
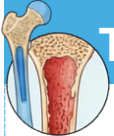
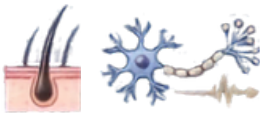
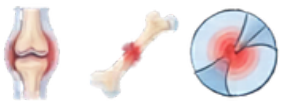
Dữ liệu so sánh hiệu năng

Các nguyên lý công nghệ của Exo-SCI được phản ánh trực tiếp qua các chỉ số thực nghiệm trong quá trình nuôi cấy và thu nhận exosome. Khi so sánh với phương pháp thu nhận dựa trên starvation, sự khác biệt có thể quan sát rõ ở các thông số như tỷ lệ sống của tế bào, sản lượng exosome và độ tinh sạch của dịch nuôi.

Môi trường nền thông thường (Starvation / Ép đói)		Phương pháp ép xung sinh học (MSCCult OTS MV/MSCCult OTS Zero)	
Hiệu quả kinh tế	Chi phí để sản xuất ra 1 Tỷ hạt Exosome nguyên chất cao		Sản lượng tăng 3-5 lần. Giảm tới 60% tổng chi phí vận hành
Mất 20-30% sản lượng: Hạt Exosome mang điện tích dễ dính chặt vào đáy bình/túi nhựa nuôi cấy và màng lọc cô đặc.			Thu hồi trọn vẹn 95-100%: Lưới Protein mang tạo lớp phủ chống dính siêu trơn, giải phóng mọi hạt Exosome lơ lửng an toàn vào dịch.
Chất lượng exosome • Chứa tín hiệu xấu / Hạt rỗng: Tế bào hấp hối thường đóng gói các tín hiệu stress, viêm và lão hóa vào lõi Exosome. • Màng manh: Màng hạt dễ vỡ khi chạy Siêu ly tâm (UC) hoặc Lọc tiếp tuyến (TFF). Dễ bị phá hủy bởi gốc tự do.			• MSCs được "lập trình sinh học" để đóng gói các miRNA phục hồi, yếu tố sinh tân mạch và tín hiệu kháng viêm vào bên trong exosome. • Hệ thống bảo vệ chống oxy hóa nội bào đa tầng giúp ổn định cấu trúc màng exosome và duy trì đầy đủ các marker bề mặt đặc hiệu (CD9, CD63, CD81).
Năng suất tiết • Chỉ đạt khoảng 2000 - 5000 hạt / 1 tế bào. Sau 24h, tế bào kiệt quệ màng và cạn năng lượng nên ngừng tiết. • Nồng độ dịch thô (Raw Conditioned Medium): Thường ở mức 10^8 đến $5 \cdot 10^8$ hạt/mL (Chưa qua siêu ly tâm hay lọc cô đặc TFF).			• Hiệu suất cao: Đạt 15.000-40.000+ hạt/tế bào. • Dịch thô có thể đạt 2×10^9 - $>10^{10}$ hạt/mL. • Với 1 bình T75 (3-5 triệu tế bào, 15 mL môi trường), sau 48h có thể thu 45-100+ tỷ exosome. <i>Nếu sử dụng hệ thống nuôi cấy 3D Bioreactor vi hạt, con số này hoàn toàn có thể nhân lên hàng chục lần</i>
Tỷ lệ chết cao (70-80%): Stress nặng, tế bào teo tóp và kích hoạt lệnh tự chết (Apoptosis) hàng loạt sau 24h.			Khỏe mạnh tuyệt đối (> 95%): Hệ Ma trận Khóa lệnh tự chết bảo vệ quần thể tế bào mẹ nguyên vẹn suốt chu kỳ nuôi cấy.

Bức tranh sản lượng exosome theo nguồn gốc MSCs

(Dựa trên chu kỳ 48H thu hoạch dùng MSCult OST MV, định lượng bằng TRPS)

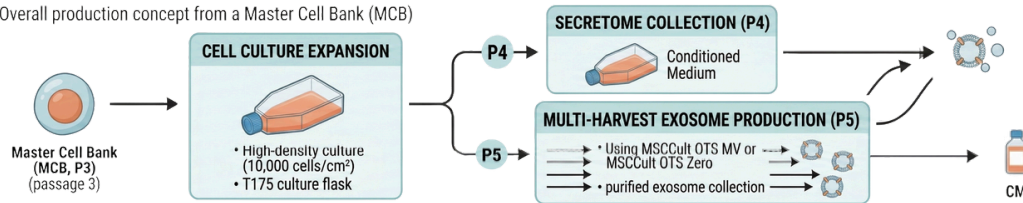
	 Cuốn rốn	 Mô mỡ	 Tủy răng	 Tủy xương
Tốc độ Lão hóa / Suy kiệt tự nhiên	Rất chậm	Chậm	Nhạy cảm / Dễ vỡ	Rất Nhanh (Senescence)
Dự phóng Năng suất (So với ép đối thường)	Tăng ~300%	Tăng ~400%	Tăng ~350%	Tăng ~500 - 800%
Ứng dụng Thành phẩm Khuyến nghị	 Sản xuất quy mô công nghiệp (Mass production), Miễn dịch toàn thân.	 Meso thẩm mỹ cao cấp, Kích thích tăng sinh Collagen/Elastin.	 Meso thẩm mỹ cao cấp, Kích thích tăng sinh Collagen/Elastin.	 Meso thẩm mỹ cao cấp, Kích thích tăng sinh Collagen/Elastin.
Môi trường cơ bản – Normoxia (21% O₂)	≈ 2.000 – 5.000 hạt (mức tham chiếu)	≈ 1.500 – 4.000 hạt (mức tham chiếu)	≈ 1.000 – 3.000 hạt (mức tham chiếu)	≈ 500 – 2.000 hạt (mức tham chiếu)
Môi trường cơ bản – Hypoxia (1–5% O₂)	≈ 4.000 – 8.000 hạt ▲ Tỷ lệ chết >30%, xuất hiện nhiều mảnh vỡ tế bào	≈ 3.000 – 6.000 hạt ▲ Tế bào teo nhỏ, xếp màng	≈ 2.000 – 4.000 hạt Stress mạnh, có thể chết hàng loạt	≈ 1.500 – 3.000 hạt ▲ Tế bào yếu, đáp ứng kém
MSCCult OTS MV – Normoxia (21% O₂)	≈ 15.000 – 30.000 hạt Độ tinh sạch cao, tỷ lệ sống >95%	≈ 12.000 – 25.000 hạt	≈ 10.000 – 20.000 hạt	≈ 8.000 – 15.000 hạt
MSCCult OTS MV + Hypoxia (1–5% O₂)	40.000 – 60.000+ hạt (Exosome giàu miRNA)	30.000 – 50.000+ hạt (Exosome giàu yếu tố tân tạo mạch VEGF)	20.000 – 35.000+ hạt	15.000 – 25.000+ hạt

03

Hướng dẫn và quy trình sản xuất Exosome từ tế bào gốc trung mô

1. Mục đích và phạm vi áp dụng

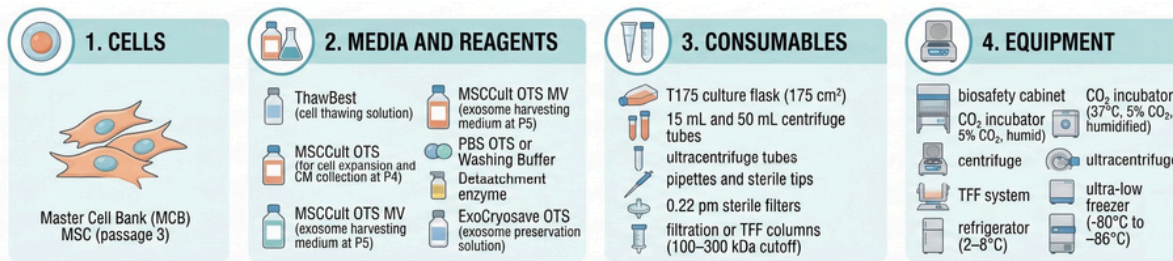
Overall production concept from a Master Cell Bank (MCB)



Quy trình này mô tả chi tiết các bước sản xuất Conditioned Medium (CM) và Exosome từ tế bào gốc trung mô (MSC) bắt đầu từ Master Cell Bank (MCB, passage 3).

Quy trình áp dụng chiến lược cấy mật độ cao (10.000 tế bào/cm²), thu CM secretome thông thường ở lứa P4 và thu Exosome tinh sạch đa kỳ (multi-harvest) ở lứa P5 bằng môi trường ép tiết MSCCult OTS MV hoặc MSCCult OTS Zero trên quy mô flask T175.

2. Mục đích và phạm vi áp dụng



Quy trình này mô tả chi tiết các bước sản xuất Conditioned Medium (CM) và Exosome từ tế bào gốc trung mô (MSC) bắt đầu từ Master Cell Bank (MCB, passage 3).

Quy trình áp dụng chiến lược cấy mật độ cao (10.000 tế bào/cm²), thu CM secretome thông thường ở lứa P4 và thu Exosome tinh sạch đa kỳ (multi-harvest) ở lứa P5 bằng môi trường ép tiết MSCCult OTS MV hoặc MSCCult OTS Zero trên quy mô flask T175.

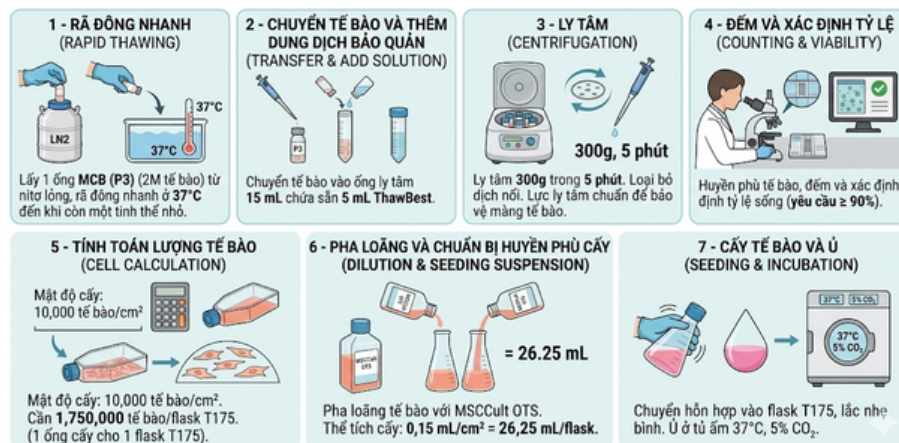
- Vật tư tiêu hao:
 - Flask T175 (175 cm²).
 - Ống ly tâm 15 mL, 50 mL, ống siêu ly tâm, pipette, đầu tip vô trùng.
 - Màng lọc vô trùng 0.22 µm (dùng cho bước tiền xử lý CM).
 - Ống ly tâm lọc hoặc cột lọc TFF (Cut-off 100 kDa – 300 kDa).
- Thiết bị: Tủ cấy vô trùng, tủ ấm CO₂ (37°C, 5% CO₂, độ ẩm bão hòa), máy ly tâm thường, máy siêu ly tâm (Ultracentrifuge) hoặc hệ thống TFF, tủ lạnh 2–8°C, tủ âm sâu (-80°C đến -86°C).

3.1

TĂNG SINH TẾ BÀO TỪ MCB (P3 → P4)

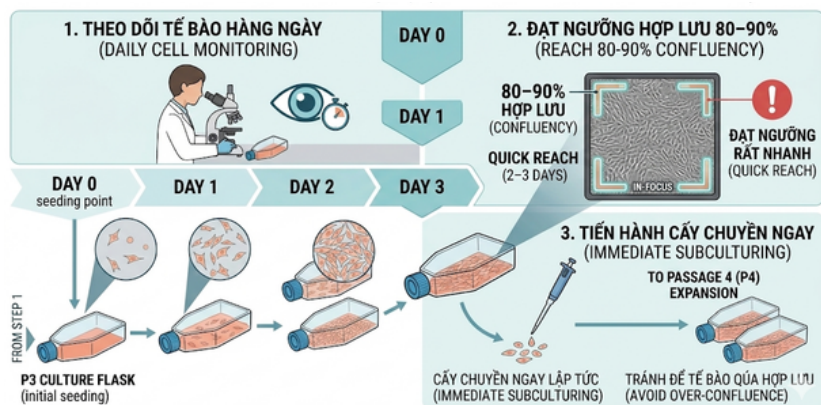
Bước 1: Rã đông và cấy MCB (P3)

- Lấy 1 ống MCB (P3) (chứa 2 triệu tế bào) từ nitơ lỏng, rã đông nhanh trong bể ổn nhiệt 37°C đến khi còn một tinh thể nhỏ.
- Chuyển tế bào vào ống ly tâm 15 mL chứa sẵn 5 mL ThawBest.
- Ly tâm **300g trong 5 phút** (lực ly tâm chuẩn để bảo vệ màng tế bào), loại bỏ dịch nổi.
- Huyền phủ tế bào, đếm và xác định tỷ lệ sống (yêu cầu $\geq 90\%$).
- Tính lượng tế bào: Mật độ cấy 10.000 tế bào/cm² Cần **1.750.000 tế bào/flask T175**. (nghĩa là 1 vial nuôi cho 1 flask T175)
- Pha loãng tế bào với MSCCult OTS. Thể tích cấy: 0,15 mL/cm² = **26,25 mL/flask**.
- Chuyển hỗn hợp vào flask T175, lắc nhẹ bình. Ủ ở tủ ấm 37°C, 5% CO₂.



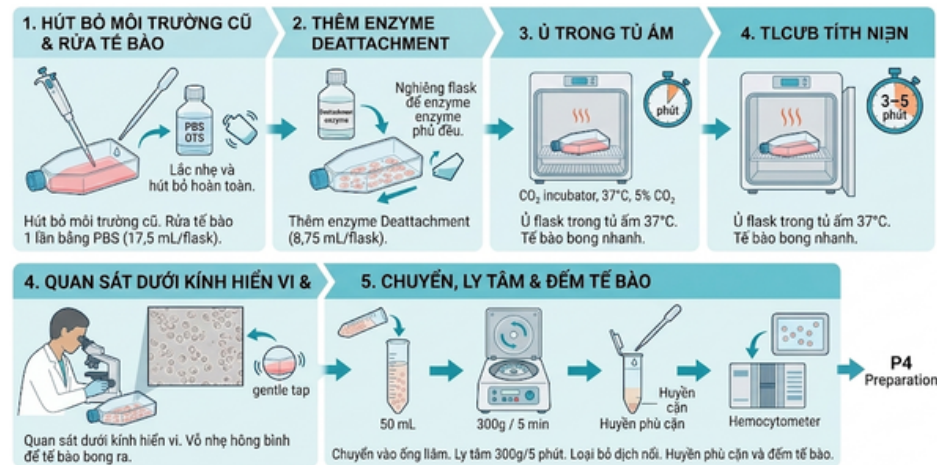
Bước 2: Nuôi tăng sinh (P3)

- Theo dõi tế bào hàng ngày. Với mật độ cấy dày, tế bào sẽ đạt độ hợp lưu 80–90% rất nhanh, thường trong 2–3 ngày.
- Tiến hành cấy chuyển ngay khi đạt ngưỡng hợp lưu.



Bước 3: Cấy chuyển từ P3 sang P4

- Hút bỏ môi trường cũ. Rửa tế bào 1 lần bằng PBS với thể tích khoảng 17,5 mL/flask (~0,1 mL/cm²). Lắc nhẹ và hút bỏ hoàn toàn.
- Thêm enzyme Deattachment: 8,75 mL/flask. Nghiêng flask để enzyme phủ đều.
- Ủ flask trong tủ ấm 37°C trong 3–5 phút (ủ ấm giúp tế bào bong nhanh mà không cần tác động cơ học mạnh).
- Quan sát dưới kính hiển vi, vỗ nhẹ hông bình để tế bào bong ra.
- Chuyển hỗn dịch vào ống ly tâm. Ly tâm 300g trong 5 phút, loại bỏ dịch nổi. Huyền phủ cặn và đếm tế bào.



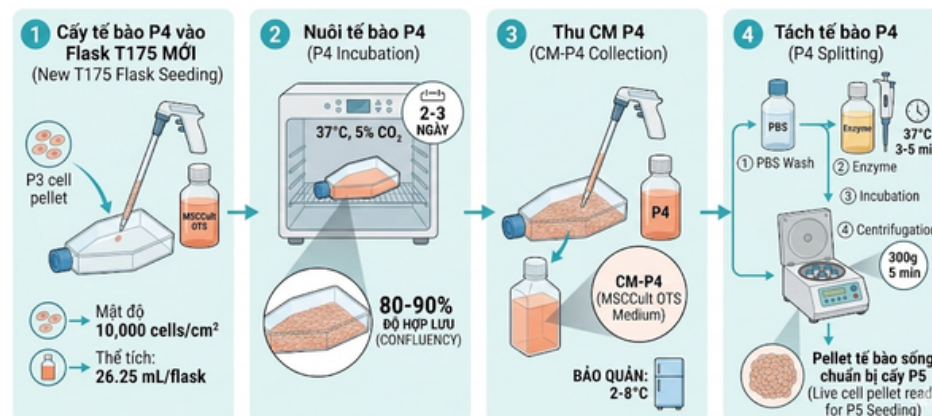
3.2

THU NHẬN CONDITIONED MEDIUM (CM) Ở P4 & P5

Bước 4: Cấy P4 và Thu CM secretome

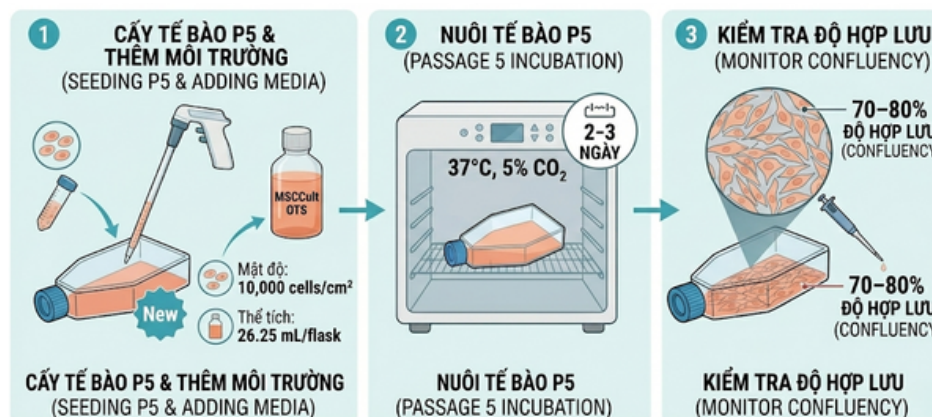
(Môi trường bình thường MSCCult OTS)

1. Cấy tế bào P4 vào Flask T175 MỚI với mật độ 10.000 tế bào/cm² trong môi trường MSCCult OTS (26,25 mL/flask).
2. Nuôi ở 37°C, 5% CO₂ trong 2-3 ngày cho đến khi đạt 80-90% độ hợp lưu.
3. Thu CM P4: Hút toàn bộ dịch nuôi (CM MSCCult OTS) vào chai vô trùng, dán nhãn "CM-P4 (Môi trường MSCCult OTS)", bảo quản 2-8°C.
4. Tách tế bào P4: Ngay trên flask vừa hút dịch, thực hiện rửa PBS, ủ enzyme (37°C/3-5 phút), ly tâm (300g/5 phút) tương tự Bước 3 để thu pellet tế bào sống chuẩn bị cấy sang P5.



Bước 5: Cấy P5 chuẩn bị ép tiết Exosome

1. Cấy tế bào P5 vào Flask T175 MỚI (10.000 tế bào/cm²) với 26,25 mL/flask môi trường nuôi cấy MSCCult OTS.
2. Nuôi trong 2-3 ngày cho đến khi đạt độ hợp lưu 70-80%.

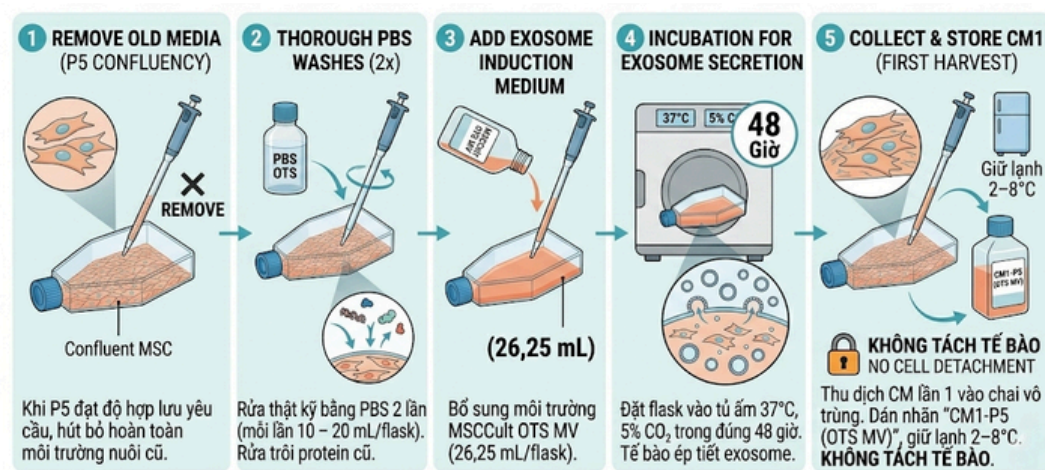


THU NHẬN CONDITIONED MEDIUM (CM) Ở P4 & P5

Bước 6: Thu CM Exosome Lần 1

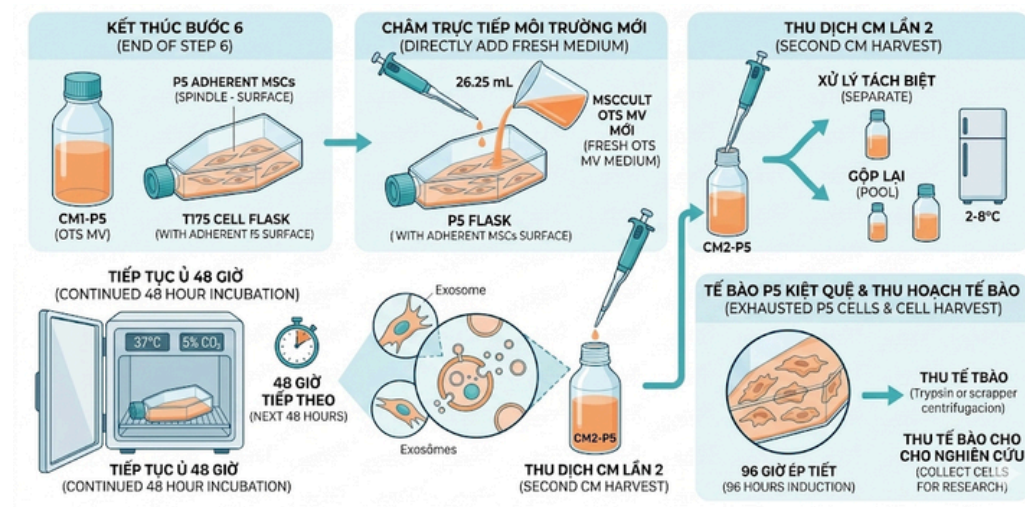
(Bảng môi trường ép tiết MSCCult OTS MV)

1. Khi P5 đạt độ hợp lưu yêu cầu, hút bỏ hoàn toàn môi trường nuôi cũ.
2. Rửa thật kỹ bằng PBS 2 lần (mỗi lần 10 – 20 mL/flask) để rửa trôi hoàn toàn các protein của môi trường tăng sinh.
3. Bổ sung môi trường MSCCult OTS MV với thể tích 26,25 mL/flask.
4. Đặt flask vào tủ ấm 37°C, 5% CO₂ trong đúng 48 giờ.
5. Thu dịch CM lần 1 vào chai vô trùng, dán nhãn "CM1-P5 (OTS MV)", giữ lạnh 2–8°C. **KHÔNG TÁCH TẾ BÀO.**



Bước 7: Thu CM Exosome Lần 2

1. Ngay sau khi hút dịch CM lần 1 ở Bước 6, giữ nguyên lớp tế bào đang bám trong flask.
2. Châm trực tiếp 26,25 mL môi trường MSCCult OTS MV MỚI vào chính flask đó.
3. Tiếp tục ủ 37°C, 5% CO₂ trong đúng 48 giờ tiếp theo.
4. Thu dịch CM lần 2 ("CM2-P5"). Có thể gộp chung với CM lần 1 hoặc xử lý tách biệt, giữ lạnh 2-8°C.
5. Sau 96 giờ ép tiệt, tế bào P5 đã kiệt quệ. Tiến hành thu tế bào P5 cho các mục đích nghiên cứu khác.



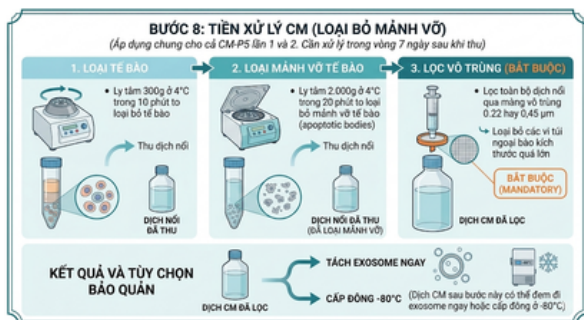
3.3

TIỀN XỬ LÝ VÀ TÁCH EXOSOME

Lưu ý: CM-P4 dùng để chế tạo Seretome; CM-P5 dùng để thu exosome tinh sạch. Quy trình bên dưới trình bày các bước để thu exosome.

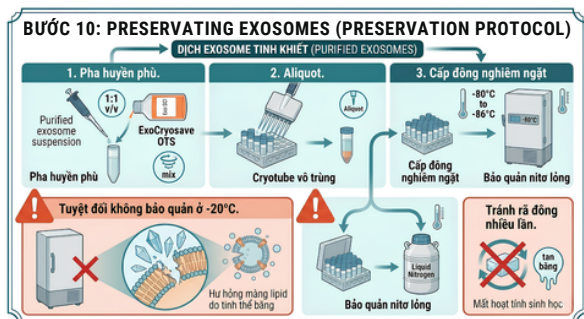
Bước 8: Tiền xử lý CM (Loại bỏ mảnh vỡ)

1. (Áp dụng chung cho cả CM-P5 lần 1 và 2. Cần xử lý trong vòng 7 ngày sau khi thu).
2. Ly tâm 300g ở 4°C trong 10 phút để loại bỏ tế bào. Thu dịch nổi.
3. Ly tâm 2.000g ở 4°C trong 20 phút để loại bỏ mảnh vỡ tế bào (apoptotic bodies). Thu dịch nổi.
4. Bắt buộc: Lọc toàn bộ dịch nổi qua màng vô trùng 0.22 hay 0,45 μm để loại bỏ các vi túi ngoại bào kích thước quá lớn.
5. (Dịch CM sau bước này có thể đem đi tách exosome ngay hoặc cấp đông ở -80°C).



Bước 10: Bảo quản exosome

1. Pha huyền phù Exosome thu được với dung dịch ExoCryosave OTS theo tỷ lệ 1:1 (v/v).
2. Chia nhỏ (aliquot) vào các ống cryotube vô trùng.
3. Cấp đông và bảo quản nghiêm ngặt ở -80°C đến -86°C (hoặc nitơ lỏng).
4. Cảnh báo: Tuyệt đối không bảo quản ở -20°C (tinh thể băng ở dải nhiệt này sẽ đâm rách màng lipid exosome). Tránh rã đông nhiều lần.



Bước 9: Tách exosome

(Lựa chọn 1 trong 2 phương pháp)

1. Phương pháp A: Siêu ly tâm (Ultracentrifugation)
2. Chuyển dịch sau Bước 8 vào ống siêu ly tâm. Ly tâm 10.000g, 4°C trong 30 phút. Chuyển dịch nổi sang ống siêu ly tâm MỚI.
3. Siêu ly tâm 100.000g, 4°C trong 70 - 90 phút.
4. Exosome sẽ tạo thành một lớp cặn (pellet) mờ bám chặt ở đáy ống. Hút bỏ HOÀN TOÀN dịch nổi (đốc ngược ống nhẹ nhàng trên giấy thấm vô trùng, tuyệt đối không giữ lại dịch nổi để tránh lẫn tạp chất).
5. Thêm một lượng nhỏ (50 - 100 μL) PBS OTS hoặc dung dịch ExoCryosave vào đáy ống, dùng pipette hút nhà nhiều lần để đánh tan hoàn toàn cặn exosome.
6. Phương pháp B: Lọc tiếp tuyến (TFF) / Ống ly tâm lọc
7. Sử dụng màng lọc có kích thước phân tử (MWCO) 100 kDa - 300 kDa.
8. Chạy hệ thống TFF (hoặc ly tâm ống lọc) để cô đặc CM và loại bỏ protein tự do lọt qua màng.
9. Thu dịch cô đặc chứa exosome trên màng (Retentate), tiến hành rửa (diafiltration) bằng PBS theo hướng dẫn của thiết bị.



Tên thiết bị y tế / Vật liệu phụ trợ: Môi trường nuôi tế bào gốc trung mô (chuyên dụng thu hoạch Exosome)

Chủng loại: MSCCult OTS MV và MSCCult OTS Zero

1. Thông tin sản phẩm

1.1. Quy cách – Kích cỡ

Tên sản phẩm	MSP	Thành phần	Quy cách	Điều kiện bảo quản
MSCCult OTS MV	560	MSCCult OTS MV Basal	500 mL	2-8 °C
	561	MSCCult OTS MV Supplement A	4,5 mL	-20 – 40 °C
	593	MSCCult OTS MV Supplement B	4,5 mL	-20 – 40 °C
MSCCult OTS Zero	560	MSCCult OTS Zero Basal	500 mL	2-8 °C
	594	MSCCult OTS Zero Supplement A	4,5 mL	-20 – 40 °C
	595	MSCCult OTS Zero Supplement B	4,5 mL	-20 – 40 °C

Các thành phần của sản phẩm không bán riêng lẻ

1.2. Mô tả chung

MSCCult OTS MV và **MSCCult OTS Zero** là hệ thống môi trường thu hoạch Conditioned Medium (CM) và Exosome chuẩn lâm sàng thế hệ mới, tích hợp công nghệ "Ép xung Sinh học - Bio-Overclocking System". Môi trường chủ động cung cấp năng lượng và nguyên liệu, giúp tế bào gốc trung mô (MSCs) sản xuất lượng Exosome bùng nổ (tăng X3 - X5 lần) mà vẫn duy trì tỷ lệ sống khỏe mạnh >95% trong suốt chu kỳ ép tiết.

Cả 2 dòng sản phẩm đều đạt tiêu chuẩn Serum-Free (vô huyết thanh), Xeno-Free (không thành phần động vật) và Chemically Defined (định chuẩn hóa học), không chứa kháng sinh/kháng nấm, đảm bảo độ tinh sạch quang học 100%.

- **MSCCult OTS MV:** Chứa Human Serum Albumin (HSA) làm protein mang, giúp nạp nguyên liệu lipid tối đa cho màng Exosome. Tối ưu cho phân khúc R&D, phòng khám da liễu thẩm mỹ (thu dịch thô ứng dụng lăn kim/Meso) hoặc tinh chế bằng phương pháp Siêu ly tâm (Ultracentrifugation).
- **MSCCult OTS Zero (Albumin-Free):** Công thức loại bỏ hoàn toàn Albumin. Tối ưu tuyệt đối cho sản xuất công nghiệp chuẩn GMP, bồn cấy 3D Bioreactor, phân lập bằng hệ thống Lọc tiếp tuyến (TFF) giúp chống tắc màng (fouling) tuyệt đối và không gây nhiễu cho các phân tích định lượng protein (BCA).

1.3. Mục đích sử dụng

Sản phẩm là vật liệu phụ trợ sử dụng trong quy trình nghiên cứu, phát triển và sản xuất sản phẩm trị liệu vô bào (Cell-free therapy). Dùng để ép tế bào gốc trung mô (từ mô mỡ, mô cuống rốn, tủy xương, máu cuống rốn, tủy răng...) giải phóng Conditioned Medium (CM) hay Exosome để sản xuất chế phẩm trị liệu/dược mỹ phẩm.

2. Đặc tính và hiệu năng

- Nội độc tố < 0,5 EU/mL
- Không phát hiện Mycoplasma. Đạt chỉ tiêu vô trùng (âm tính).
- pH: 7,2 - 8,0
- Áp suất thẩm thấu: 285 - 330 mOsm/kg.
- Hiệu năng: Duy trì tế bào sống > 95% sau chu kỳ ép tiết 48 giờ.

4. Vật liệu và hoá chất cần thiết (không cung cấp kèm theo)

STT	Nhóm	Chủng loại	Mã sản phẩm
1	Môi trường nuôi tăng sinh nền ban đầu	MSCCult OTS	245
2	Dung dịch rửa tế bào	PBS OTS	
3		Washing Buffer	
4	Dung dịch tách tế bào	Deattachment	
5		Trysinizer	
6	Dung dịch bảo quản Exosome	ExoCryosave OTS	
7	Vật tư	Bình Flask (T75, T175) hoặc hệ thống 3D Bioreactor; Màng lọc vô trùng 0.22 µm.	
8	Thiết bị	Tủ ấm CO2, Máy ly tâm, Máy siêu ly tâm hoặc Hệ thống lọc tiếp tuyến (TFF).	

1.4. Thành phần

- Amino Acids, Vitamine.
- Epidermal Growth Factor (EGF), Fibroblast Growth Factor (FGF), Sodium Pyruvate.
- Lưu ý: MSCCult OTS MV có chứa HSA, MSCCult OTS Zero hoàn toàn không chứa Albumin.

3. Hoàn nguyên, pha loãng, phối trộn

- Sản phẩm được cung cấp ở dạng pha sẵn 1X.
- Không cần pha loãng.
- Đối với các ống Supplement, ră đông chậm môi trường bằng cách đặt vial trong tủ mát 2-8°C qua đêm (tuyệt đối không dùng bể ổn nhiệt). Trộn 1 vial supplement A và 1 vial supplement B vào 1 chai 500 mL basal, trộn đều trước khi sử dụng.

5. Điều kiện bảo quản và hạn sử dụng

(Dành cho Môi trường)

- 12 tháng kể từ ngày sản xuất nếu bảo quản ở nhiệt độ từ -20°C – 40°C đối với supplement và 2-8°C đối với môi trường basal.
- 14 ngày kể từ ngày trộn supplement vào basal bảo quản ở nhiệt độ từ 0°C đến 8°C.
- Tránh tiếp xúc ánh sáng.
- Sau khi trộn supplement vào basal thì môi trường hoàn chỉnh không được giữ đông lạnh < 0°C

Lưu ý: Quy trình dưới đây được tính toán tham chiếu cho bình Flask T175. Tất cả thao tác phải thực hiện trong điều kiện vô khuẩn. Nên sử dụng MSCs ở P4 hoặc P5 để thu Exosome).

Phối trộn tạo môi trường MSCCult OTS MV hoàn chỉnh

1. Rã đông MSCCult OTS MV Supplement an toàn: Lấy chai 2 vial Supplement A và B rã đông tự nhiên trong ngăn mát tủ lạnh (2-8°C) hoặc để ở nhiệt độ phòng. (**TUYỆT ĐỐI KHÔNG**: Không ngâm tuýp Supplement vào bể nước ấm 37°C).
2. Thao tác pha trộn: Trong tủ cấy sinh học, hút toàn bộ 10 mL Supplement (gồm 4,5 mL Supplement A và 4,5 mL Supplement B) bơm vào chai Basal 500 mL. Hút 2-3 mL môi trường trong chai để tráng lại vial Supplement 1-2 lần để lấy sạch chất. Lắc đảo ngược chai nhẹ nhàng 5-6 lần.
3. Hạn sử dụng sau khi pha (Complete Medium): Môi trường sau khi đã phối trộn bắt buộc bảo quản ở 2-8°C và chỉ nên sử dụng tối ưu trong vòng 14 ngày và tối đa là 30 ngày.

Pro-Tip: Nếu khách hàng nuôi cấy ít và không xài hết 500 mL trong 14 ngày, nên chia nhỏ tuýp supplement theo tỉ lệ tương ứng. Khi dùng, lấy 100 mL Basal pha với 0,9 mL Supplement A và 0,9 mL Supplement B. Pha đến đâu xài đến đó là cách tốt nhất để MSC luôn được ăn môi trường tươi nhất!

Phần III: Tiền xử lý Conditioned Medium (CM)

(Lưu ý: Dịch CM cần được xử lý trong vòng 7 ngày sau khi thu. **KHÔNG** cấp đông dịch thô nếu cần sử dụng dịch để thu Exosome).

Ly tâm 300g ở 4°C trong 10 phút để loại bỏ tế bào nổi. Thu dịch nổi.

Ly tâm tiếp 2.000g ở 4°C trong 20 phút để loại bỏ mảnh vỡ tế bào (apoptotic bodies). Thu dịch nổi.

BƯỚC BẮT BUỘC: Lọc toàn bộ dịch nổi qua màng lọc vô trùng 0.22 µm (hoặc 0.45 µm) để loại bỏ các vi túi ngoại bào kích thước quá lớn. (Dịch sau bước này sẵn sàng để tách exosome). Trong quy mô sản xuất lớn, việc lọc này có thể sử dụng lọc TFF hay các capsule lọc hay phễu lọc.

Phần I: Nuôi cấy tăng sinh sinh khối tế bào đầu vào

1. Cấy tế bào gốc trung mô (MSCs) vào bình T175 với mật độ cao: **10.000 tế bào/cm²** (Khoảng 1.750.000 tế bào/bình).
2. Sử dụng môi trường tăng sinh sinh khối nền **MSCCult OTS** (Tuyệt đối chưa dùng môi trường MV/Zero ở bước này). Thể tích nuôi: **0,15 mL/cm²** (tương đương 26,25 mL/bình T175).
3. Đặt vào tủ ấm 37°C, 5% CO₂, độ ẩm bão hòa. Theo dõi hàng ngày đến khi đạt độ hợp lưu 70-80% (khoảng 2-3 ngày).

Phần II: Ép tiết và Thu hoạch Đa chu kỳ (Multi-Harvest)

1. Khi tế bào đạt độ hợp lưu 70-80%, hút bỏ hoàn toàn môi trường nuôi sinh khối cũ.
2. **BƯỚC BẮT BUỘC:** Rửa thật kỹ lớp tế bào bằng dung dịch **PBS OTS** hoặc Washing Buffer **2 lần** (Mỗi lần dùng khoảng 10-20 mL/bình T175) để rửa trôi hoàn toàn protein thừa từ môi trường tăng sinh. Hút bỏ sạch dịch rửa.
3. Bổ sung môi trường ép tiết **MSCCult OTS MV** hoặc **MSCCult OTS Zero** với thể tích **0,15 mL/cm²** (Tương đương 26,25 mL cho bình T175). Đặt vào tủ ấm 37°C, 5% CO₂. (Mẹo: Có thể nuôi trong điều kiện oxy thấp Hypoxia 1-5% O₂ để ép tế bào sinh yếu tố tăng tạo mạch mạnh nhất).

1. **Thu hoạch đợt 1:** Sau đúng **48 giờ**, hút toàn bộ dịch (CM lần 1) vào chai vô trùng, bảo quản lạnh 2-8°C. **Giữ nguyên lớp tế bào bám trong bình, KHÔNG tách tế bào.**
2. **Thu hoạch đợt 2:** Ngay lập tức châm trực tiếp 26,25 mL môi trường MSCCult OTS MV/Zero MỚI vào chính bình đó. Tiếp tục ủ 48 giờ và thu dịch CM đợt 2. Sau 96 giờ ép tiết, kết thúc mẻ thu (tiến hành thu tế bào cho các mục đích nghiên cứu khác).

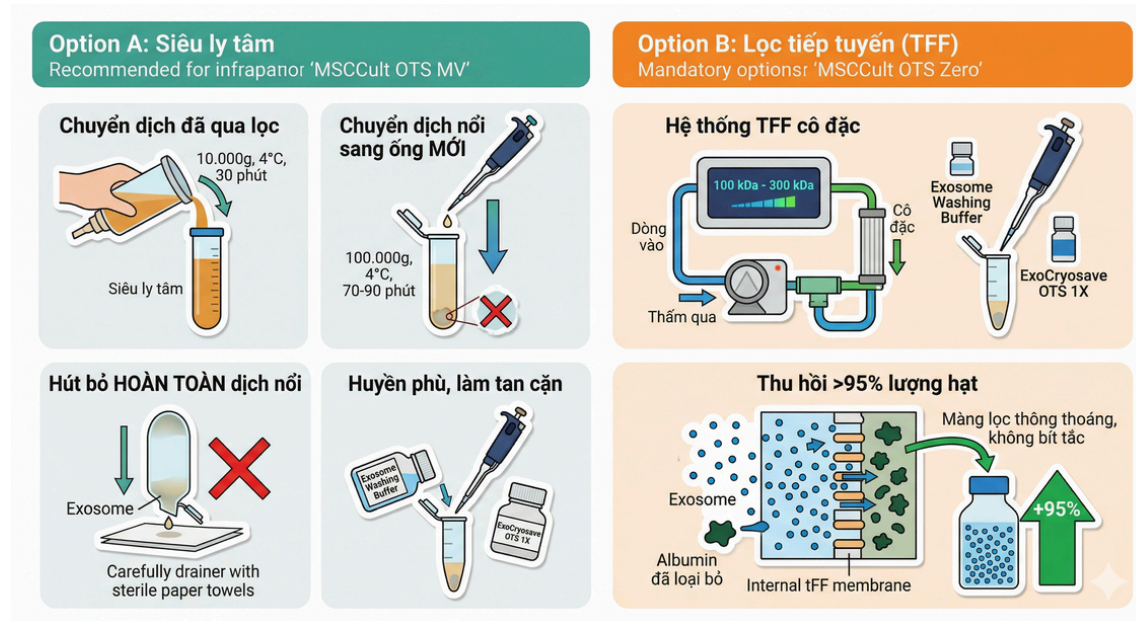
Phần IV: Phân lập và Tách Exosome

Lựa chọn A: Siêu ly tâm (Ultracentrifugation) - Khuyến dùng với dòng MSCCult OTS MV

1. Chuyển dịch đã qua lọc vào ống siêu ly tâm. Ly tâm **10.000g, 4°C trong 30 phút**. Chuyển dịch nổi sang ống MỚI.
2. Siêu ly tâm **100.000g, 4°C trong 70 - 90 phút**.
3. Exosome tạo thành lớp cặn mỡ dưới đáy. Đốc ngược ống nhẹ nhàng trên giấy thấm vô trùng để hút bỏ HOÀN TOÀN dịch nổi (tránh lẫn tạp chất).
4. Huyền phù, làm tan cặn Exosome bằng 50-100 μ L dung dịch Exosome Washing Buffer hoặc ExoCryosave OTS 1X để đông lạnh và ExoDrysave OTS 1X để đông khô.

Lựa chọn B: Lọc tiếp tuyến (TFF) - Bắt buộc dùng dòng MSCCult OTS Zero

1. Sử dụng hệ thống TFF có kích thước màng (MWCO) 100 kDa – 300 kDa.
 2. Chạy bơm hệ thống TFF để cô đặc dịch và tiến hành rửa (diafiltration) bằng PBS.
- (MSCCult OTS Zero loại bỏ hoàn toàn Albumin nên màng lọc TFF sẽ cực kỳ thông thoáng, thu hồi trọn vẹn >95% lượng hạt đi qua mà không lo bít tắc màng).



Phần V: Bảo quản Exosome

1. Pha huyền phù Exosome thu được với dung dịch **ExoCryosave OTS** theo tỷ lệ **1:1 (v/v)**.
2. Chia nhỏ (aliquot) vào các ống cryotube vô trùng.
3. **CẤP ĐÔNG NGHIÊM NGẶT**: Bảo quản trong tủ âm sâu từ **-80°C đến -86°C** (hoặc Nitơ lỏng).
4. **CẢNH BÁO TỐI QUAN TRỌNG**: Tuyệt đối **KHÔNG** bảo quản **Exosome ở nhiệt độ -20°C**. Tinh thể băng hình thành ở dải nhiệt này sẽ đâm rách màng lipid và phá hủy hoàn toàn cấu trúc Exosome. Tránh rã đông nhiều lần.



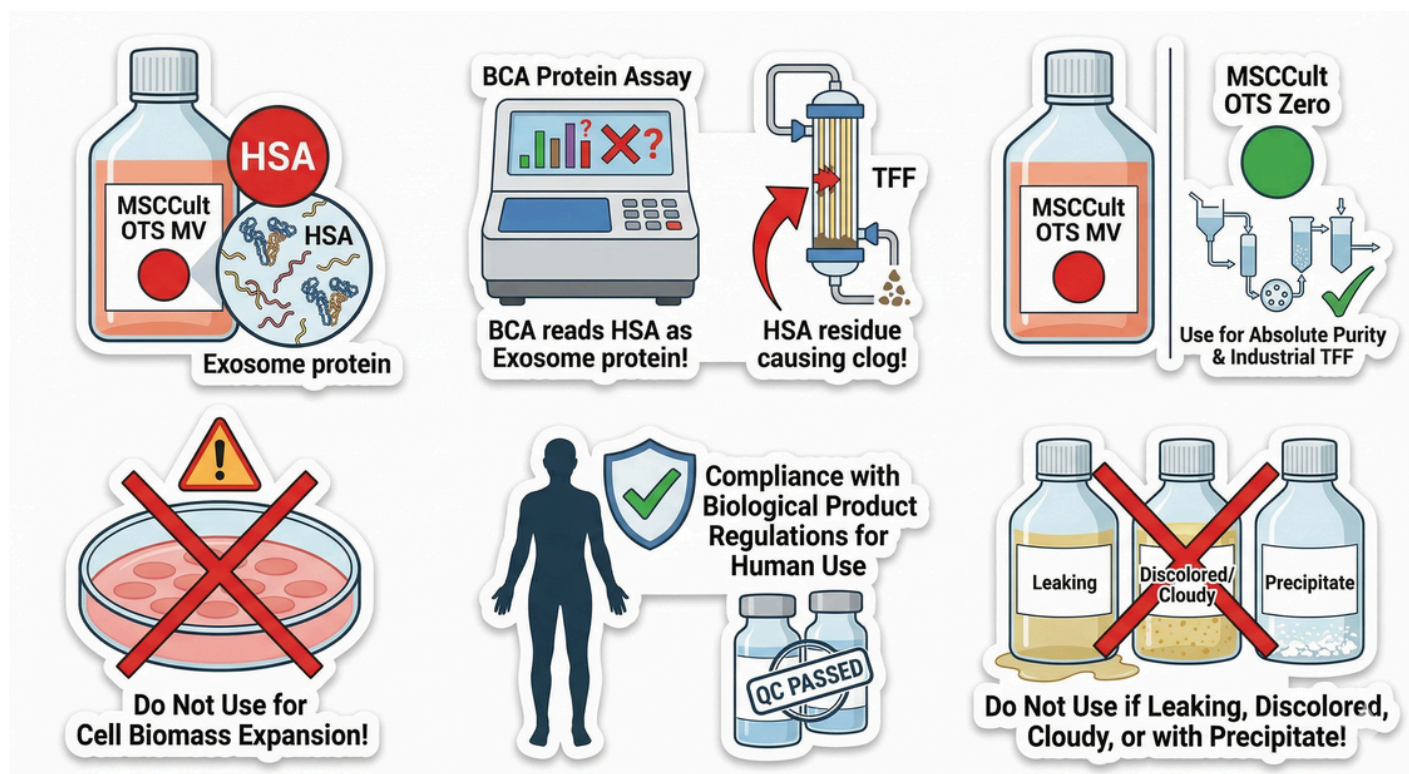
Phần VI: Cảnh báo và khuyến cáo an toàn

Lưu ý y tế về HSA: Dòng MSCCult OTS MV có chứa Human Serum Albumin (USP). Máy đo phân tích protein BCA sẽ đo nhầm lượng HSA này thành protein của Exosome. Cặn HSA cũng có thể gây tắc màng TFF. Nếu cần phân tích độ tinh sạch tuyệt đối hoặc chạy máy TFF quy mô công nghiệp, hãy chuyển sang dòng MSCCult OTS Zero.

Không dùng nhầm mục đích: Không dùng MSCCult OTS MV/Zero để nuôi tăng sinh sinh khối tế bào ban đầu.

Việc sử dụng trực tiếp các chế phẩm thu được lên người cần tuân thủ các quy định của cơ quan chức năng về quản lý chế phẩm sinh học.

Không sử dụng dung dịch nếu bị rò rỉ, đổi màu, bị đục hoặc có tủa.



Phần VII: Xử lý thải bỏ

Tuân thủ nghiêm ngặt quy định về chất thải sinh học y tế.

Không đổ trực tiếp dịch môi trường xuống hệ thống nước thải chung.

Không tái sử dụng bao bì.

Phần VIII: Ký hiệu sử dụng trên nhãn

MSP: Mã sản phẩm | LOT: Số lô | NSX: Ngày sản xuất |
HSD: Hạn sử dụng | Biểu tượng Nhiệt kế chéo: Giới hạn nhiệt độ.

Regenmedlab®

ISO 13485:2016

MSP 560 **500 mL**

MSP: Mã sản phẩm

Môi trường nuôi tế bào gốc trung mô

MSCCult QTS® MV Basal

LSX

NSX

HSD 12 tháng kể từ NSX nếu bảo quản ở nhiệt độ từ 2°C đến 8°C
14 ngày kể từ **ngày phối trộn** nếu bảo quản ở nhiệt độ từ 2°C đến 8°C

ĐÂY LÀ VẬT LIỆU PHỤ TRỢ TRONG SẢN XUẤT SẢN PHẨM TRỊ LIỆU TẾ BÀO VÀ GEN

Sản xuất bởi **Viện Tế bào gốc**
Toà nhà B2-3, Trường Đại học Khoa học tự nhiên,
Khu phố 6, Phường Linh Xuân,
Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam
Tiêu chuẩn: TCCS 019:2023/SCI
Số công bố:
Thông tin khác xem tại:

8 936189 623087

SẢN XUẤT TẠI VIỆT NAM

ĐÃ VỎ TRÙNG

Giới hạn nhiệt độ.

Vui lòng quét mã



MSCCult OTS MV

Mô tả	Quy cách	Bảo quản
Môi trường nuôi thu exosome/CM	1 chai basal: 500 mL	2-8 °C
	1 vial supplement A: 4,5 mL	- 40 - 8 °C
	1 vial supplement B 4,5 mL	- 40 - 8 °C



ExoCryosave OTS 2X

Mô tả	Quy cách	Bảo quản
Dung dịch trữ đông exosome ở nồng độ stock 2X	Chai 100 mL	- 20 - 8 °C



MSCCult OTS Zero

Mô tả	Quy cách	Bảo quản
Môi trường nuôi thu exosome/CM	1 chai basal: 500 mL	2-8 °C
	1 vial supplement A: 4,5 mL	- 40 - 8 °C
	1 vial supplement B 4,5 mL	- 40 - 8 °C



ExoDrysav OTS 1X

Mô tả	Quy cách	Bảo quản
Dung dịch đông khô exosome 1X	Chai 100 mL	- 20 - 8 °C



Exosome Washing Buffer

Mô tả	Quy cách	Bảo quản
Dung dịch rửa exosome, sử dụng trong quy trình TFF để trao đổi buffer; thay thế việc sử dụng PBS	Chai 500 mL	2-8 °C



ExoDrysav OTS 2X

Mô tả	Quy cách	Bảo quản
Dung dịch đông khô exosome 2X	Chai 100 mL	- 20 - 8 °C



ExoCryosave OTS 1X

Mô tả	Quy cách	Bảo quản
Dung dịch trữ đông exosome 1X	Chai 500 mL	- 20 - 8 °C

Thao tác	Công thức khuyến cáo	Thể tích (mL/flask)
Cấy tế bào / Bổ sung môi trường (OTS và MV)	0,15 mL/cm ²	26,25 mL
Rửa tế bào bằng PBS	~ 0,10 mL/cm ²	17,50 mL (Tối ưu tiết kiệm)
Enzyme tách tế bào (Deattachment)	0,05 mL/cm ²	8,75 mL

PHỤ LỤC 2

Thu hoạch, Phân lập bằng hệ thống Repligen KrosFlo KR2i và Bảo quản sâu Exosome.

Hệ thống áp dụng: Repligen KrosFlo KR2i (Màng 300 kDa) tích hợp hệ sinh thái hóa chất OTS của Viện Tế bào gốc.

GIAI ĐOẠN 1: NUÔI CẤY VÀ ÉP TIẾT EXOSOME (CELL CULTURE)



1.1. Tăng sinh khối tế bào:

- Cấy tế bào gốc trung mô (MSCs - ưu tiên lứa P4 hoặc P5) vào hệ thống nuôi cấy (ví dụ bình T175) bằng môi trường nền MSCCult OTS. Nuôi ở 37°C, 5% CO₂ đến khi đạt độ hợp lưu 50-60%.

1.2. Rửa tế bào (Bước Bắt Buộc):

- Hút bỏ hoàn toàn môi trường nuôi cấy cũ.
- Rửa lớp tế bào thật kỹ ít nhất 2 lần bằng dung dịch PBS OTS hoặc Washing Buffer (10-20 mL/bình T175) để loại bỏ 100% protein dư thừa. Hút bỏ sạch dịch rửa.

1.3. Ép tiết bùng nổ:

- Bổ sung môi trường MSCCult OTS MV/MSCCult OTS Zero (đã pha trộn Supplement A & B) với định mức 0.15 mL/cm² (Tương đương 26.25 mL/bình T175). Đặt lại vào tủ ấm.

1.4. Thu hoạch Conditioned Medium (CM):

- Sau đúng 48 giờ, hút toàn bộ dịch CM đợt 1 vào chai vô trùng, bảo quản lạnh 2-8°C. (Có thể châm thêm môi trường mới vào bình để tiếp tục ép tiết đợt 2 nếu quy trình sản xuất yêu cầu).

GIAI ĐOẠN 2: TIỀN XỬ LÝ DỊCH CM (PRE-CLEARING)

Lưu ý: Dịch CM thô cần được xử lý trong vòng 7 ngày, KHÔNG cấp đông dịch thô.

2.1. Ly tâm loại bỏ tế bào: Ly tâm dịch CM ở 300g / 4°C / 10 phút. Chuyển dịch nổi sang ống mới.

2.2. Ly tâm loại bỏ mảnh vỡ (Apoptotic bodies): Quay tiếp dịch nổi ở 2.000g / 4°C / 20 phút. Thu dịch nổi.

2.3. Lọc vi mô (Microfiltration): Bơm toàn bộ dịch nổi qua màng lọc vô trùng 0.22 µm (Capsule hoặc phễu lọc). Dịch CM trong suốt sau bước này đã sẵn sàng để đưa lên hệ thống TFF.

GIẢI ĐOẠN 3: VẬN HÀNH TFF TRÊN REPLIGEN KROSFLO KR2i

3.1. Thiết lập hệ thống:

- Lắp màng lọc Hollow Fiber/Flat Sheet 300 kDa vào máy KR2i.
- Thực hiện xả màng (Flush) và cân bằng màng (Equilibration) bằng Nước cất pha tiêm (WFI).

3.2. Cô đặc (Concentration):

- Đưa dịch CM (đã lọc 0.22 μm) vào bình chứa (Feed Reservoir).
- Cài đặt phần mềm KF Comm: Giữ áp suất xuyên màng (TMP) ở mức thấp (khoảng 2 - 5 psi) và tốc độ trượt (Shear Rate) ở mức 2000 - 4000 s^{-1} để tạo dòng chảy tối ưu mà không sinh lực cắt làm rách màng Exosome.
- Chạy máy để rút thể tích dịch CM xuống mức thể tích làm việc nhỏ nhất (Minimum Working Volume) của hệ thống.

3.3. Trao đổi đệm / Rửa muối (Diafiltration - Bước Quyết Định):

- Chuyển phần mềm KR2i sang chế độ Constant Volume Diafiltration (CVD).
- Kết nối đường cấp dung dịch (Diafiltration buffer) trực tiếp vào bình Exosome Washing Buffer.
- Cài đặt chạy liên tục từ 7 đến 10 Diavolumes (DV) (Ví dụ: Thể tích cô đặc là 50mL thì cần chạy qua 350 - 500 mL WFI). Bước này đảm bảo quét sạch 100% môi trường cũ và ion kim loại.

3.4. Thu hồi (Recovery):

- Xả hệ thống, thu hồi dung dịch Retentate (Exosome).
- Lúc này, bạn đang có mẻ Exosome tinh khiết, nằm trong dung môi Exosome Washing Buffer. Đặt ngay ống chứa lên khay đá lạnh (4°C).



GIẢI ĐOẠN 4: ĐỊNH HÌNH VÀ BẢO QUẢN (CHỌN 1 TRONG 2 PHƯƠNG ÁN)

PHƯƠNG ÁN A: ĐÔNG LẠNH VỚI ExoCryosave OTS (Dùng Đệm 2X)



Tối ưu cho bảo quản lỏng dài hạn ở -86°C hoặc Nitơ lỏng.

4A.1. Phối trộn: Trên khay đá lạnh, trộn dịch Exosome (trong Exosome Washing Buffer) với dung dịch ExoCryosave OTS (2X) theo tỷ lệ 1:1 về thể tích.

4A.2. Đồng nhất: Hút nhả bằng pipette nhẹ nhàng 5-10 lần hoặc đảo ngược ống. **TUYỆT ĐỐI KHÔNG** vortex tạo bọt.

4A.3. Đóng ống & Cấp đông siêu tốc (Snap-Freezing):

- Chia liều (Aliquot) vào các ống LoBind. (Chứa khoảng không để đá giãn nở).
- Thả ngập trực tiếp các ống vào Nitơ lỏng hoặc bể Đá khô - Ethanol trong 1-2 phút cho hóa thủy tinh lập tức.
-

4A.4. Lưu trữ: Nhanh chóng chuyển vào tủ âm sâu -80°C đến -86°C. (Cảnh báo: Không bảo quản ở -20°C).
(Mẹo rã đông: Nhúng ngập ống vào bể nước ấm 37°C, vừa tan đá là vùi ngay vào đá lạnh 4°C).

PHƯƠNG ÁN B: ĐÔNG KHÔ VỚI ExoDrysav OTS (Dùng Đệm 2X)



Tối ưu cho việc vận chuyển và bảo quản ở nhiệt độ phòng, tạo dạng bột xốp hòa tan tức thì.

4B.1. Phối trộn: Trộn dịch Exosome (trong Exosome Washinh Buffer) với dung dịch ExoDrysav OTS (2X) theo tỷ lệ 1:1 về thể tích (để tạo thành nồng độ 1X cuối cùng). Đồng nhất nhẹ nhàng.

4B.2. Đóng lọ (Vial Filling): Chia dung dịch vào các lọ thủy tinh trung tính đông khô. Thể tích dịch **KHÔNG VƯỢT QUÁ 30%** thể tích lọ.

4B.3. Đậy nắp hờ (Half-Stoppering): Đặt hờ nắp cao su xẻ rãnh lên miệng lọ (phải lộ khe hờ rãnh để hơi nước thoát ra). Xếp các lọ lên khay sấy.

4B.4. Chạy chu trình Sấy đông khô (Lyophilization Cycle):

- Pha 1 (Cấp đông): Hạ nhiệt độ khay xuống -40°C đến -45°C, giữ tối thiểu 4 - 6 tiếng.
- Pha 2 (Sấy sơ cấp - Thăng hoa): Bật bơm chân không rút xuống 50 - 100 mTorr. Nâng nhiệt khay từ từ lên -25°C đến -20°C. Giữ trong 24 - 48 tiếng.
- Pha 3 (Sấy thứ cấp): Giữ áp suất chân không tối đa. Nâng nhiệt khay từ từ (0.2°C/phút) lên +25°C. Duy trì 6 - 12 tiếng để hạ độ ẩm < 2%.
- Pha 4 (Đóng nắp - Stoppering): Kích hoạt hệ ép nắp thủy lực để niêm phong nắp cao su ngay trong điều kiện chân không của buồng sấy (hoặc xả khí Nito qua màng lọc vô trùng rồi đóng nắp).

4B.5. Hoàn nguyên: Bánh xốp trắng tinh bám đáy lọ được bảo quản ở 25°C hoặc 4°C. Khi dùng, bơm lượng Nước cất (WFI) đúng bằng thể tích dung dịch đã chia vào lọ ban đầu, lắc nhẹ 1-2 giây bánh sẽ tan ngay lập tức tạo dung dịch đẳng trương pH 7.4.

BẢNG KHẮC PHỤC SỰ CỐ (TROUBLESHOOTING)

Hiện tượng	Nguyên nhân có thể	Cách khắc phục & Phòng ngừa
Hệ thống KR2i báo áp lực (TMP) cao bất thường, tắc màng 300 kDa	Môi trường ép tiết có lẫn Albumin; Hoặc dịch CM chưa được lọc 0.22 µm kỹ càng.	Tuân thủ tuyệt đối việc dùng MSCCult OTS Zero. Kiểm tra màng lọc 0.22 µm trước khi đưa lên TFF.
Bánh đông khô bị xẹp, co rúm, chảy nước dính đáy lọ (Cake Collapse)	Mẫu Exosome vẫn còn sót lại muối (NaCl, gốc Phosphate, v.v.).	Ở Giai đoạn 3 (bước Diafiltration), tăng số vòng rửa bằng Exosome Washinh Buffer lên tới hạn 7 - 10 DV. Tuyệt đối không để bất kỳ dung dịch PBS hay Wash buffer nào tham
Hao hụt số lượng/Hình thái Exosome bị vỡ	Bị stress cơ học (Shear stress) do bọt khí, lực ly tâm quá mạnh, hoặc thông số máy TFF quá cao; Rã đông sai cách.	Đuổi bọt khí kỹ trên KR2i, duy trì TMP thấp (< 5 psi). Khi đông lạnh, phải cấp đông siêu tốc (Snap-freeze) và rã đông nhanh ở 37°C.

Chất lượng của exosome phụ thuộc hoàn toàn vào "nhà máy" sản xuất ra chúng (tế bào MSC) và môi trường xung quanh.

PHẦN 1. KIỂM SOÁT NGUYÊN LIỆU ĐẦU VÀO VÀ QUÁ TRÌNH TRUNG GIAN (IN-PROCESS QC)

1. Tiêu chuẩn đối với Tế bào gốc trung mô (MSCs):

- **Pháp lý & Đạo đức:** Nguồn mô phân lập MSC phải được Hội đồng đạo đức phê duyệt.
- **Sàng lọc người hiến:** Người hiến mô phải được sàng lọc âm tính với: HIV, HBV, HCV, HTLV, HEBV, HCMV và TP (Giang mai). Tuyệt đối không có tiền sử cá nhân và gia đình mắc các bệnh di truyền, tim mạch hoặc ung thư.
- **Đặc tính tế bào:** Phải thỏa mãn các tiêu chuẩn kiểu hình (phenotype) đặc trưng của MSC.
- **Độ sạch sinh học:** Đã được kiểm tra vô trùng (âm tính hoàn toàn với vi khuẩn, vi nấm và mycoplasma).
- **Kiểm soát tuổi tế bào:** Để hạn chế các kiểu hình tiết liên quan đến lão hóa (SASPs) làm giảm chất lượng exosome, bắt buộc phải kiểm tra tình trạng lão hóa của MSC, hoặc ưu tiên chỉ sử dụng tế bào ở số lần cấy chuyển thấp (thế hệ/passage 4 hoặc 5).
- **Di truyền học:** Tùy trường hợp, MSC cần được kiểm tra bộ nhiễm sắc thể (Karyotype) trước khi đưa vào sản xuất.

2. Tiêu chuẩn đối với Môi trường thu nhận (Exosome harvest medium):

- **Độ tinh khiết:** KHÔNG được chứa các túi tiết ngoại lai (exogenous secretory vesicles) và các thành phần bổ sung như: huyết thanh bò (bovine serum), dịch chiết tiểu cầu, dịch chiết tuyến yên, muối mật.
- **Thành phần cấm:** KHÔNG chứa chất chỉ thị màu (phenol red) và thuốc kháng sinh.
- **Kiểm tra tồn dư:** Nếu ở giai đoạn nuôi cấy tăng sinh tế bào trước đó có sử dụng môi trường chứa huyết thanh bò, thành phẩm exosome cuối cùng bắt buộc phải được kiểm tra tồn dư BSA (Bovine Serum Albumin).

3. Kiểm soát quá trình tinh sạch:

- **Lọc thô:** Dịch nuôi cấy phải được lọc qua màng 0.22 μ m để loại bỏ mảnh vỡ tế bào và các hạt >220 nm.
- **Lọc tiếp tuyến (TFF):** Kích thước lỗ màng lọc TFF phải từ 100 - 300 kDa (giữ lại các hạt >30 nm).
- **Lưu ý:** Việc tái sử dụng cột lọc và đường ống có thể làm tăng nồng độ nội độc tố (Endotoxin) do vi sinh vật bám dính, cần giám sát chặt chẽ.

PHẦN 2. TIÊU CHUẨN KIỂM ĐỊNH THÀNH PHẨM (FINAL PRODUCT QC)

Đây là 7 tiêu chí xuất xưởng (Release criteria) cốt lõi. Một lô sản phẩm exosome bắt buộc phải vượt qua toàn bộ các bài test này để được cấp Giấy chứng nhận phân tích (Certificate of Analysis - CoA).

STT	Chỉ tiêu đánh giá	Tiêu chuẩn chấp thuận (Acceptance Criteria)	Phương pháp / Thiết bị đo
1	Hình thái (Morphology)	Các túi màng có dạng hình chiếc cốc (cup-round) hoặc hình tròn.	Kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM).
2	Kích thước (Size)	Đỉnh phân bố kích thước (peak distribution) phải nằm trong dải từ 30 nm đến 150 nm.	Phân tích theo dõi hạt nano (NTA), TRPS hoặc Nano-flow. (Lưu ý: Không dùng TEM cho tiêu chí này).
3	Dấu ấn bề mặt & nội bào (Markers)	Dương tính (> 90%): - 2 trong 3 marker màng: CD9, CD63, CD81. - 1 trong 2 marker nội bào: Alix, Tsg101. Âm tính (< 5%): - Âm tính với cả 3 marker: Calnexin, Histone 3, GM130.	Flow Cytometry
4	Độ tinh sạch sinh hóa	Tỷ lệ số lượng hạt exosome/nồng độ protein không được thấp hơn 108 hạt/ μ g.	NTA/TRPS kết hợp định lượng nồng độ protein.
5	An toàn Vi sinh & Virus	Âm tính tuyệt đối với: Nấm, Vi khuẩn, Mycoplasma, HIV, HBV, HCV, HTLV, EBV, HCMV, TP và các yếu tố virus ngoại sinh	Nuôi cấy vi sinh, PCR / Huyết thanh học.
6	Nội độc tố (Endotoxin)	Mức độ nội độc tố phải < 0.5 EU/mL.	Thử nghiệm LAL.
7	Hiệu lực sinh học (Potency)	Thể hiện hoạt tính sinh học in vitro hoặc in vivo tương ứng với mục đích sử dụng trên lâm sàng (VD: Khả năng kích thích tân tạo mạch máu).	Các thử nghiệm chức năng (Functional assays).

PHẦN 3. ĐÓNG GÓI, BAO BÌ VÀ LƯU TRỮ

- **Vật liệu đóng gói:** Bao bì tiếp xúc trực tiếp với exosome phải vô trùng, không chứa chất sinh nhiệt/gây sốt (pyrogen-free). Đặc biệt, vật liệu KHÔNG được có tính hấp phụ đối với exosome và KHÔNG gây kết tụ (aggregation) hạt. Nếu bảo quản âm sâu, vật liệu phải chịu được nhiệt độ -86°C .
- **Thông tin trên Nhãn (Labeling):** Bắt buộc hiển thị: Tên sản phẩm, Số lượng exosome, Nguồn gốc tế bào, Thể tích, Ngày sản xuất, Số lô (Batch number), Điều kiện bảo quản và Ngày hết hạn. Hướng dẫn sử dụng phải được đặt kèm bên trong túi đựng sản phẩm.
- **Bảo quản và Vận chuyển:**
 - **Dạng lỏng đông lạnh:** Trữ ở -80°C . Vận chuyển bằng đá khô (dry ice). Không nên rã đông và tái cấp đông nhiều lần.
 - **Dạng đông khô (Lyophilized):** Trữ ở $2-8^{\circ}\text{C}$ hoặc nhiệt độ phòng (thời gian ngắn). Vận chuyển ở $2-8^{\circ}\text{C}$.

PHẦN 4. GIÁM SÁT LÔ SẢN XUẤT VÀ LƯU MẪU (AUDITING & RETENTION)

- **Đánh giá xuất lô (Batch Release):** Việc lấy mẫu thành phẩm phải được tiến hành ngẫu nhiên theo tỷ lệ quy định của mỗi quốc gia (Ví dụ: Quy định 3% thì một lô 100 sản phẩm sẽ rút ngẫu nhiên 3 lọ để test). Tất cả các sản phẩm được rút ngẫu nhiên này phải đạt 100% các tiêu chí ở Phần 2 thì lô sản xuất đó mới được cấp chứng nhận chuẩn hóa, đi kèm với CoA và Hồ sơ lô (Lot document).
- **Lưu mẫu hồi cứu (Retention Samples):**
- **Số lượng:** Phải lưu giữ số lượng mẫu đủ để thực hiện ít nhất 02 lần đánh giá hồi cứu
- **Thời gian lưu:** Mẫu phải được lưu trữ ít nhất 01 năm sau ngày hết hạn sử dụng (Expiration date) của lô sản phẩm đó.

Góc nhìn chuyên gia:

Việc tinh sạch exosome là một thách thức lớn. Trong bộ tiêu chuẩn trên, hai chỉ số giúp chúng ta tự tin chứng minh với giới chức y tế rằng sản phẩm của mình là "Exosome tinh khiết" (chứ không phải rác tế bào/cell debris hay protein tự do) chính là: Dấu ấn loại trừ (Âm tính $< 5\%$ với Calnexin, Histone 3, GM130) và Độ tinh sạch hạt/protein ($> 10^8$ hạt/ μg).