



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

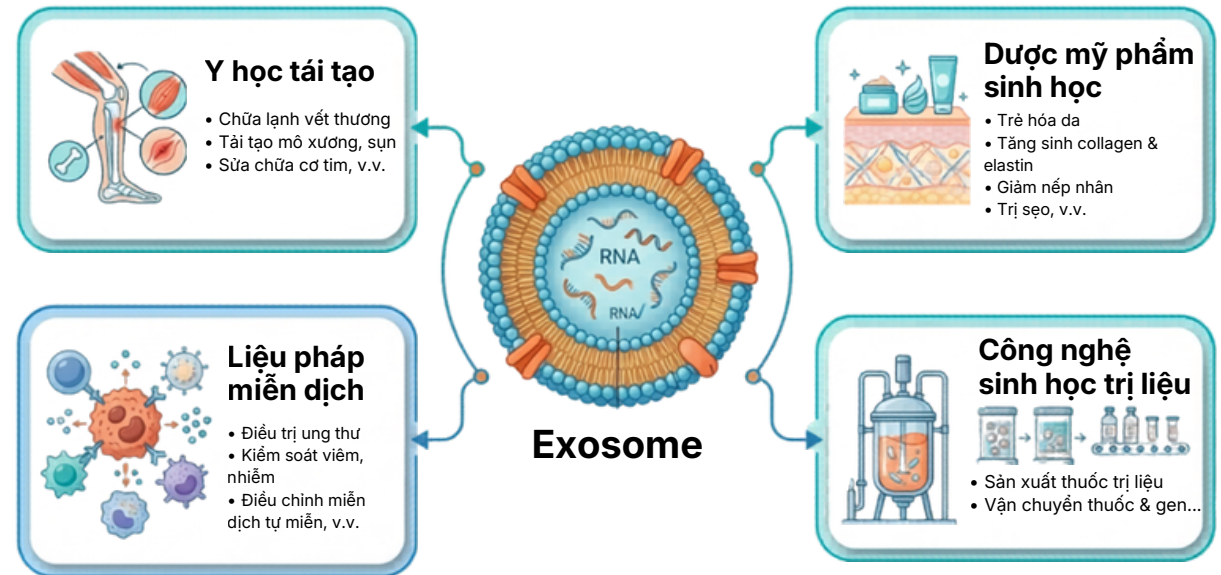
1. BỐI CẢNH VÀ THÁCH THỨC TRONG SẢN XUẤT EXOSOME	3
2. TRỤ CỘT CÔNG NGHỆ	6
3. HƯỚNG DẪN VÀ QUY TRÌNH SẢN XUẤT EXOSOME TỪ TẾ BÀO GỐC TRUNG MÔ	9
4. HƯỚNG DẪN SỬ DỤNG SẢN PHẨM	15

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.

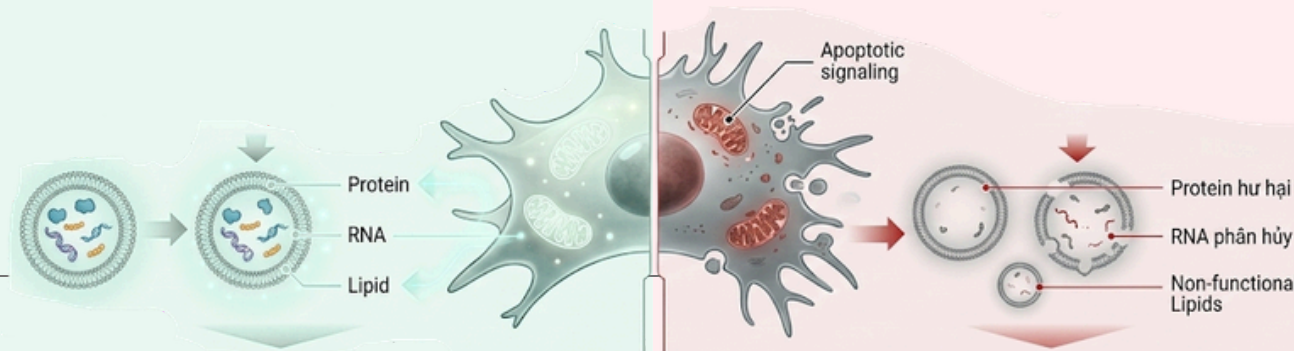
1. Sự suy giảm trạng thái sinh lý của tế bào. Khi bị đặt trong môi trường nghèo dinh dưỡng trong thời gian dài, MSCs dễ rơi vào trạng thái stress sinh học và suy giảm hoạt động chuyển hóa. Điều này có thể ảnh hưởng đến khả năng duy trì chức năng bình thường của tế bào mẹ.

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:

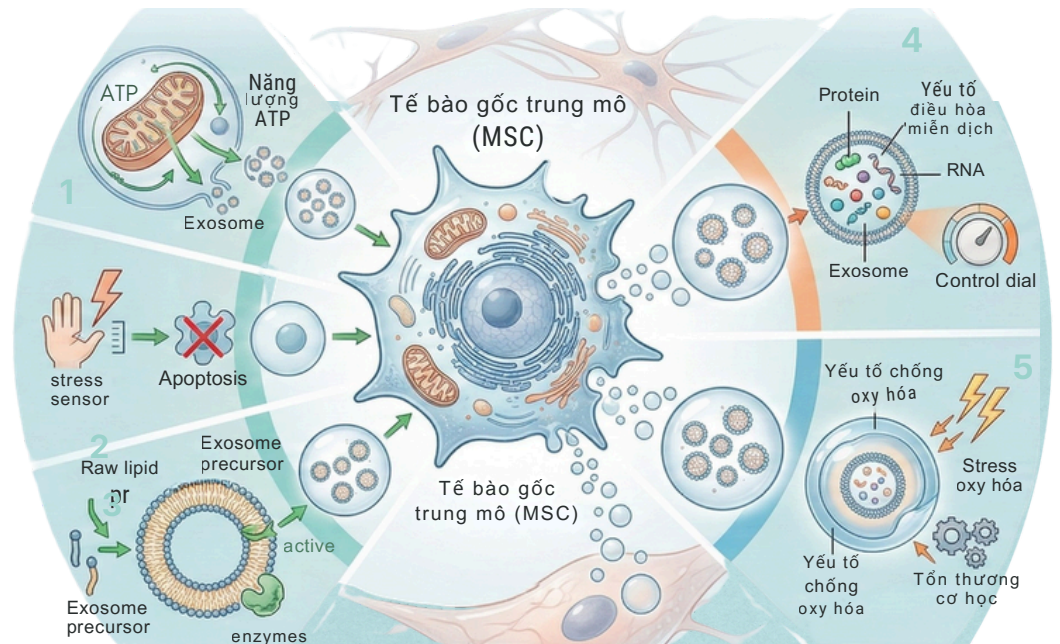
- Duy trì trạng thái sinh lý ổn định của tế bào
- Cải thiện độ đồng nhất của exosome
- Giảm tạp chất sinh học trong dịch nuôi
- Nâng cao hiệu suất thu nhận
- Tạo nền tảng cho các quy trình sản xuất có khả năng mở rộng

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.





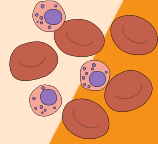
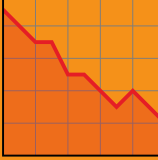
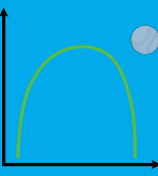

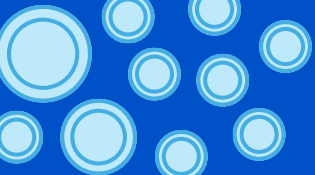
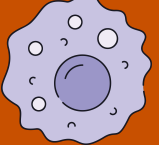

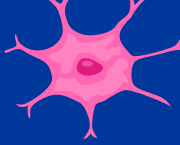
5. Bảo vệ cấu trúc exosome trong quá trình thu nhận

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.




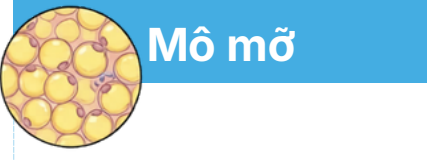

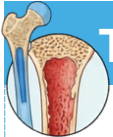


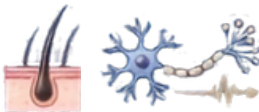
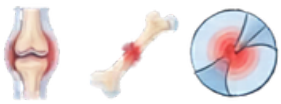
Dữ liệu so sánh hiệu năng

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)
<p>Hiệu quả kinh tế</p> <p>Chi phí để sản xuất ra 1 Tỷ hạt Exosome nguyên chất cao</p> 	<p>Sản lượng tăng 3-5 lần. Giảm tới 60% tổng chi phí vận hành</p> 
<p>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.</p> 	<p>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.</p> 
<p>Chất lượng exosome</p> <ul style="list-style-type: none"> • 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.  	 <ul style="list-style-type: none"> • 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).
<p>Năng suất tiết</p> <ul style="list-style-type: none"> • 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 (Chứa qua siêu ly tâm hay lọc cô đặc TFF). 	 <ul style="list-style-type: none"> • 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>
<p>Tỷ lệ chết cao (70-80%): Stress nặng, tế bào teo tóp và kích hoạt lệnh tự chết (Apoptosis) hàng loạt sau 24h.</p>  	<p>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.</p> 

Bức tranh sản lượng exosome theo nguồn gốc MSCs

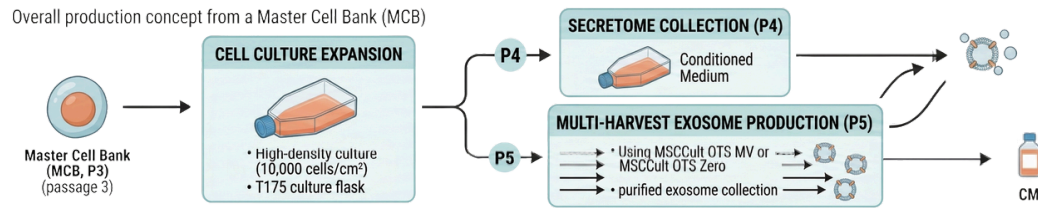
(Dựa trên chu kỳ 48H thu hoạch dùng MSCult OST MV, định lượng bằng TRPS)

	 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 đới 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

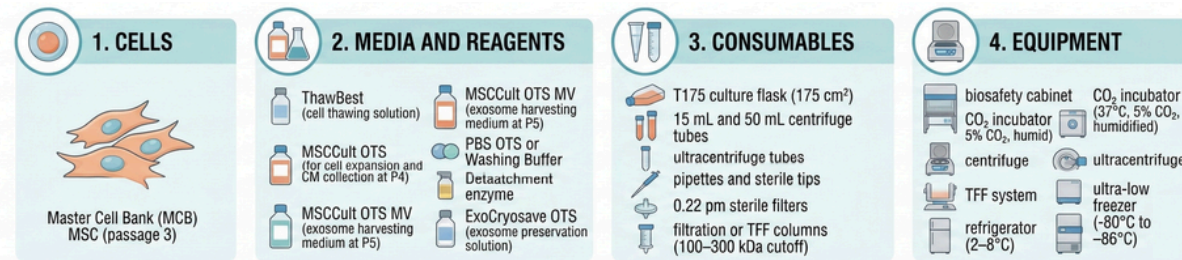
1. Mục đích và phạm vi áp dụng



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.

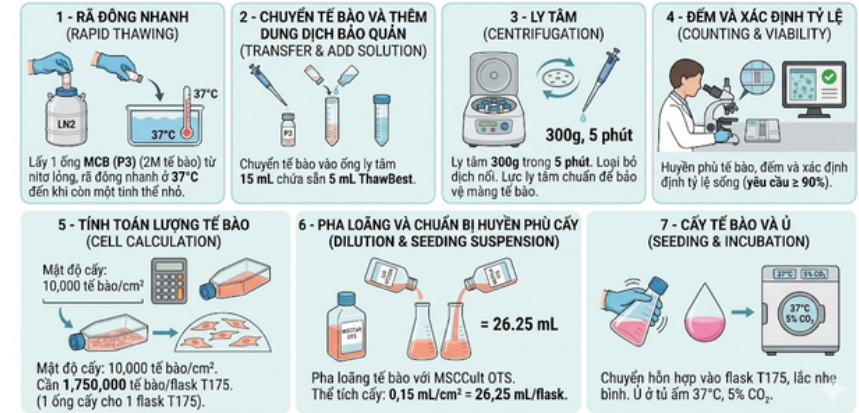
- Vật tư tiêu hao:
 - Flask T175 (175 cm²).
 - Ống ly tâm 15 mL, 50 mL, ống siêu ly tâm, pipette, đầu tip vô trùng.
 - Màng lọc vô trùng 0.22 µm (dùng cho bước tiền xử lý CM).
 - Ống ly tâm lọc hoặc cột lọc TFF (Cut-off 100 kDa – 300 kDa).
- Thiết bị: Tủ cấy vô trùng, tủ ấm CO₂ (37°C, 5% CO₂, độ ẩm bão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

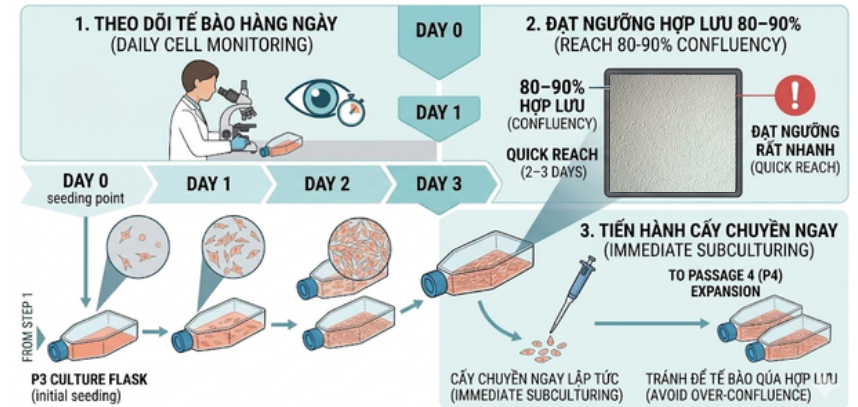
Bước 1: Rã đông và cấy MCB (P3)

1. 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.
2. Chuyển tế bào vào ống ly tâm 15 mL chứa sẵn 5 mL ThawBest.
3. Ly tâm **300g trong 5 phút** (lực ly tâm chuẩn để bảo vệ màng tế bào), loại bỏ dịch nổi.
4. Huyền phù tế bào, đếm và xác định tỷ lệ sống (yêu cầu $\geq 90\%$).
5. 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)
6. Pha loãng tế bào với MSCCult OTS. Thể tích cấy: 0,15 mL/cm² = **26,25 mL/flask**.
7. Chuyển hỗn hợp vào flask T175, lắc nhẹ bình. Ủ ở tủ ấm 37°C, 5% CO₂.



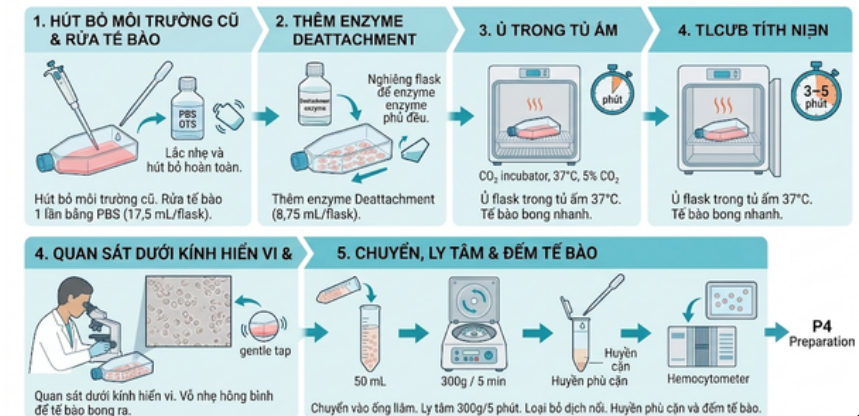
Bước 2: Nuôi tăng sinh (P3)

1. 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.
2. Tiến hành cấy chuyển ngay khi đạt ngưỡng hợp lưu.



Bước 3: Cấy chuyển từ P3 sang P4

1. 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.
2. Thêm enzyme Deattachment: 8,75 mL/flask. Nghiêng flask để enzyme phủ đều.
3. 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).
4. Quan sát dưới kính hiển vi, vỗ nhẹ hông bình để tế bào bong ra.
5. Chuyển hỗn dịch vào ống ly tâm. Ly tâm 300g trong 5 phút, loại bỏ dịch nổi. Huyền phù cặn và đếm tế bào.

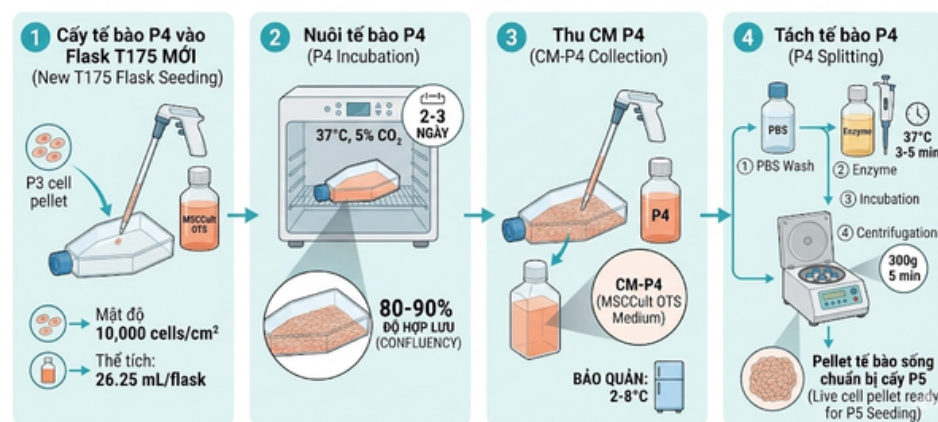


3.2

THU NHẬN CONDITIONED MEDIUM (CM) Ở P4 & P5

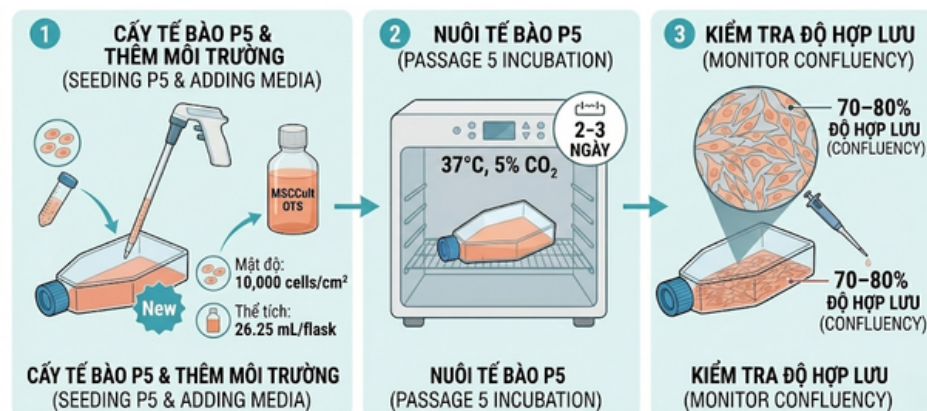
Bước 4: Cây P4 và Thu CM secretome (Môi trường bình thường MSCCult OTS)

1. Cây 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: Cây P5 chuẩn bị ép tiết Exosome

1. Cây 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%.

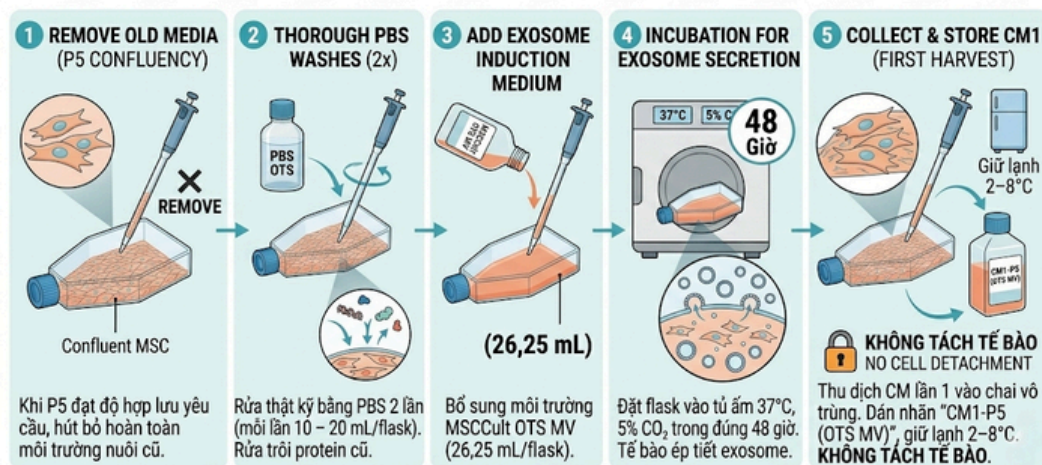


3.2

THU NHẬN CONDITIONED MEDIUM (CM) Ở P4 & P5

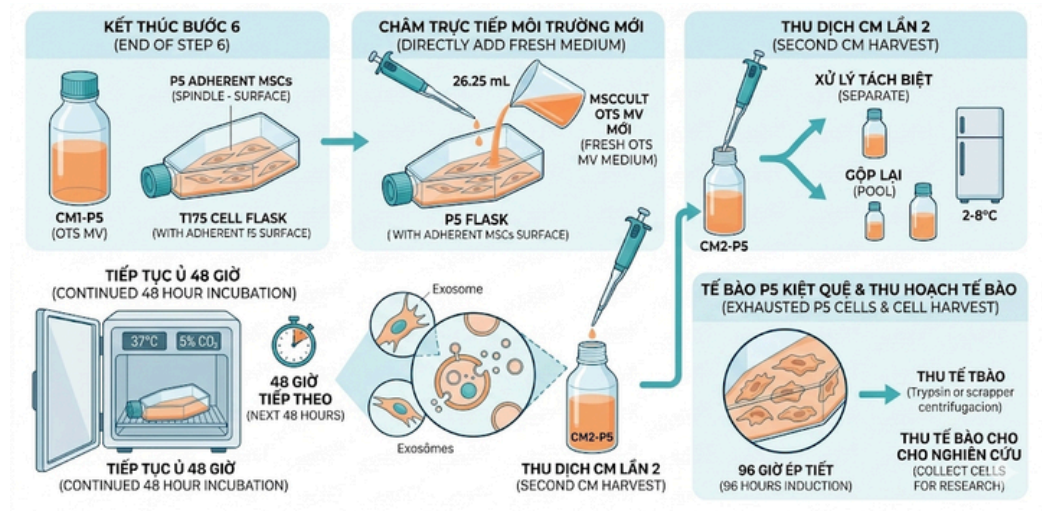
Bước 6: Thu CM Exosome Lần 1 (Bằng môi trường ép tiết MSCCult OTS MV)

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 tiết, 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)

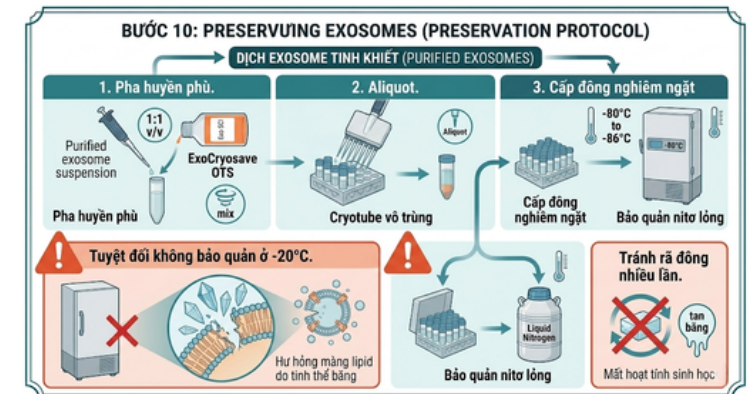
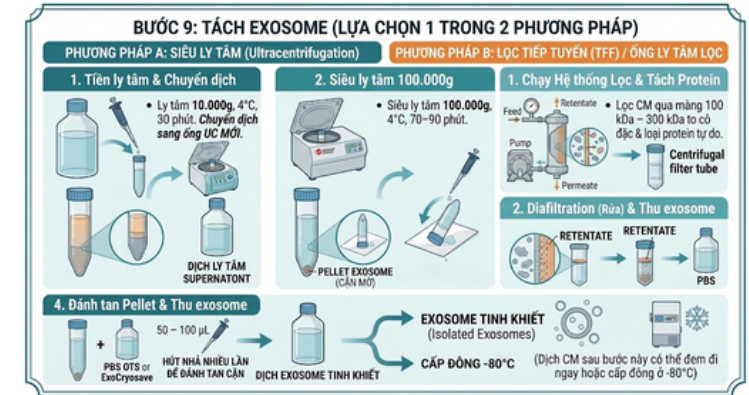
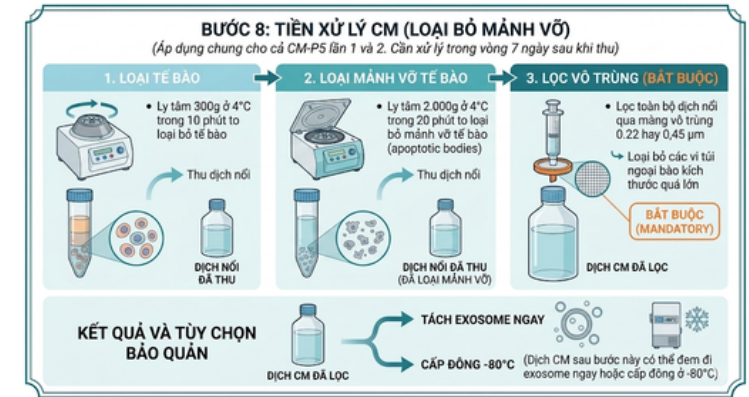
1. (Áp dụng chung cho cả CM-P5 lần 1 và 2. Cần xử lý trong vòng 7 ngày sau khi thu).
2. Ly tâm 300g ở 4°C trong 10 phút để loại bỏ tế bào. Thu dịch nổi.
3. Ly tâm 2.000g ở 4°C trong 20 phút để loại bỏ mảnh vỡ tế bào (apoptotic bodies). Thu dịch nổi.
4. Bắt buộc: Lọc toàn bộ dịch nổi qua màng vô trùng 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 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 nhả 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.

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.



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

HƯỚNG DẪN SỬ DỤNG

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

STT	Mã sản phẩm	Chủng loại	Quy cách
1	264	MSCCult OTS MV	Chai 100 mL
2	265	MSCCult OTS MV	Chai 500 mL
3	241	MSCCult OTS Zero	Chai 500 mL

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.

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.

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)

- Môi trường nuôi tăng sinh nền ban đầu: MSCCult OTS (Mã SP: 245).
- Dung dịch rửa tế bào: PBS OTS hoặc Washing Buffer.
- Dung dịch tách tế bào: Deattachment (Mã SP: 120, 121) hoặc Trysinizer.
- Dung dịch bảo quản Exosome: ExoCryosave OTS (Mã SP: 192, 322).
- Vật tư: Bình Flask (T75, T175) hoặc hệ thống 3D Bioreactor; Màng lọc vô trùng 0.22 µm.
- Thiết bị: Tủ ấm CO2, Máy ly tâm, Máy siêu ly tâm hoặc Hệ thống lọc tiếp tuyến (TFF).

3. Hoàn nguyên, pha loãng, phối trộn

- Sản phẩm được cung cấp ở dạng pha sẵn 1X.
- Không cần pha loãng. Không cần bổ sung bất kỳ thành phần nào trước khi sử dụng.
- Rã đông chậm môi trường bằng cách đặt chai trong tủ mát 2-8°C qua đêm (tuyệt đối không dùng bể ổn nhiệt). Trộn đều nhẹ nhàng trước khi dùng.

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 đến dưới 0°C.
- 02 tháng kể từ ngày sản xuất nếu bảo quản ở nhiệt độ từ 0°C đến 8°C.
- Tránh tiếp xúc ánh sáng. Tránh lặp lại quá 3 chu kỳ rã đông – đông lạnh.

6. Quy trình sử dụng

(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).

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. **BUỐC 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 tân 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 III: TIỀN XỬ LÝ CONDITIONED MEDIUM (CM)

1. (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).
2. Ly tâm 300g ở 4°C trong 10 phút để loại bỏ tế bào nổi. Thu dịch nổi.
3. Ly tâm tiếp 2.000g ở 4°C trong 20 phút để loại bỏ mảnh vỡ tế bào (apoptotic bodies). Thu dịch nổi.
4. **BUỐC 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).

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 mờ dưới đáy. Dốc 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 µL dung dịch PBS OTS hoặc ExoCryosave OTS.
- **Lựa chọn B: Lọc tiếp tuyến (TFF) - Bắt buộc dùng dòng MSCCult OTS Zero**
 5. Sử dụng hệ thống TFF có kích thước màng (MWCO) 100 kDa – 300 kDa.
 6. 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 NGHIỆM 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.

7. 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 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.

10. Những sản phẩm liên quan

Tên chủng loại	Quy cách	Mã sản phẩm
MSCCult OTS (Tăng sinh nền)	Chai 500 mL	245
ExoCryosave OTS	Chai 100 mL / 500 mL	192 / 322
Washing Buffer	Chai 100 mL / 500 mL	149 / 150
Deattachment	Chai 100 mL / 500 mL	120 / 121
MSCCult I / MSCCult II	Chai 500 mL	108 / 296
ADSCCult I / ADSCCult II	Chai 500 mL	117 / 294

8. 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.

9. 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.

11. Liên hệ

- **Website:** biomedmart.com.vn | biomedmart.org
- **Email:** contact@sci.edu.vn | sales@sci.edu.vn | kinhdoanh@sci.edu.vn
- **Hotline:** 028 3636 1206