

TẠO PHÔI BÒ ĐƠN TÍNH IN-VITRO

Bằng các kỹ thuật nhân bản vô tính như hoạt hóa tế bào trứng và nuôi phôi, bước đầu các nhà khoa học thuộc Viện Chăn nuôi đã tạo được phôi bò đơn tính *in-vitro* nhằm mục đích sử dụng như một đối chứng để nghiên cứu, chuẩn hóa các điều kiện tiến hành tạo phôi bò nhân bản từ các tế bào trứng nuôi thành thực có và không có màng sáng. Thành công này hứa hẹn sẽ là tiền đề cho các nghiên cứu khác về tạo phôi và động vật nhân bản tại Việt Nam.

Sinh sản đơn tính là một hình thức sinh sản trong đó cơ thể mới có thể được tạo thành từ một phần của cơ thể mẹ mà không cần tới sự tham gia của con đực. Sinh sản đơn tính chỉ xảy ra trong tự nhiên đối với một số loài động vật bậc thấp (rệp, giun tròn), một số loài động vật không xương sống, còn đối với động vật có vú thì không xảy ra hiện tượng này. Tuy nhiên, có thể tạo phôi đơn tính *in-vitro* từ tế bào trứng ở động vật có vú bằng cách cung cấp các yếu tố kích thích tổng hợp. Gần đây, phôi đơn tính đã được nhiều nhà nghiên cứu quan tâm với mục đích sử dụng nguồn phôi này để nghiên cứu các điều kiện tạo phôi nhân bản bằng cấy chuyển nhân tế bào, chuyển gen, thậm chí chúng còn là tiềm năng để tạo ra dòng tế bào gốc đa năng (Kharche và Birade, 2013). Đã có một số nhà nghiên cứu báo cáo về việc tạo phôi bò đơn tính *in-vitro* (Wang và cs, 2008). Phôi đơn tính ở bò có thể được tạo ra với một xung điện, ethanol, canxi ionophore A23187, cycloheximide (CHX), triphosphate 1,4,5 inositol, ionomycin hoặc strontium (Kharche và Birade, 2013). Việc kết hợp các chất kích hoạt với nhau sẽ mang lại hiệu quả cao trong việc tạo phôi đơn tính *in-vitro* (Jellerette và cs, 2004; Wang và cs, 2008). Theo Kharche và Birade (2013), tế bào trứng bò khi được xử lý với ionomycin (5 phút),

tiếp theo là xử lý với 6-DMAP sẽ làm tăng tối đa sự kích hoạt quá trình sinh sản đơn tính ở trứng bò. Phản ứng kích hoạt (activation) sinh sản đơn tính trong tế bào trứng bò bởi một số tác nhân hoạt hóa có liên quan đến giai đoạn phát triển của tế bào trứng (Kharche và Birade, 2013). Khi kích hoạt tế bào trứng bò ở giai đoạn chưa thành thực hoặc đã hoàn thành quá trình thành thực từ rất lâu sẽ ảnh hưởng đến hiệu quả của quá trình này. Kharche và Birade (2013) nhận thấy khi kích hoạt tế bào trứng bò ở giai đoạn nuôi thành thực *in-vitro* dưới 23 giờ hoặc hơn 42 giờ thì tỷ lệ tế bào trứng bò được hoàn thành quá trình kích hoạt đạt < 40%.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tạo phôi bò đơn tính *in-vitro* bằng ionomycin và 6-DMAP từ tế bào trứng bò nuôi thành thực *in-vitro*. Dưới đây là một số kết quả chính.

Nội dung và phương pháp nghiên cứu

Tạo nguồn tế bào trứng thành thực *in-vitro*

Các tế bào trứng thu từ buồng trứng trong dung dịch TALP - Hepes có bổ sung kháng sinh (200 iu penicillin/ml và 0,2 mg streptomycin) hoặc PBS + 2,5% FCS (v/v) + kháng sinh (200 iu penicillin/ml và 0,2 mg streptomycin); sau đó được nuôi thành thực *in-vitro* trong môi trường TCM 199 + kháng sinh (200 iu penicillin/ml và 0,2 mg

streptomycin) + hormone + 10% FCS (v/v). Tế bào trứng thành thực là tế bào trứng xuất hiện thể cực thứ nhất sau nuôi, được sử dụng cho quá trình tạo phôi đơn tính.

Hoạt hóa tế bào trứng bò (activation)

Tế bào trứng tốt sẽ được loại bỏ lớp tế bào cumulus bằng dung dịch TALP - Hepes có bổ sung Hyaluronidase (1 mg/ml). Có thể tạo phôi bò đơn tính với tế bào trứng bò có màng sáng hoặc không có màng sáng. Đối với phôi đơn tính không màng sáng thì tế bào trứng bò thành thực trước khi hoạt hóa phải được loại bỏ màng sáng bằng dung dịch TALP - Hepes có bổ sung pronase (1,5 mg/ml).

Tế bào trứng thành thực có hoặc không có màng sáng được hoạt hóa trong dung dịch TALP - Hepes có bổ sung ionomycin (5mM) trong 4 phút, sau đó chuyển sang dung dịch TCM 199 complete có bổ sung 1,9 mM 6-DMAP trong 3 giờ ở điều kiện 38,5°C, 5% CO₂, độ ẩm bão hòa.

Nuôi phôi *in-vitro*

Tế bào trứng sau xử lý với ionomycin và 6-DMAP được rửa và chuyển sang môi trường nuôi phôi SOF có bổ sung kháng sinh (200 iu penicillin/ml và 0,2 mg streptomycin), nuôi ở điều kiện 38,5°C, 5% CO₂, độ ẩm bão hòa. Đối với phôi đơn tính không màng sáng sẽ được nuôi trong hệ thống

đĩa nuôi micro well. Đối với các tế bào trứng có màng sáng thì nuôi trong giọt nuôi (20 tế bào trứng/giọt). Xác định tỷ lệ tế bào trứng phân chia ở 48 giờ, phôi nang ở ngày thứ 7, phôi nang thoát màng (đối với phôi bò đơn tính có màng sáng) ở ngày thứ 8-9 sau hoạt hóa.

Kết quả đạt được

Khả năng phân chia, tạo phôi nang và phôi nang thoát màng của phôi bò đơn tính có màng sáng hoặc không có màng sáng được thể hiện ở bảng 1 và 2.

Kết quả nghiên cứu bước đầu cho thấy tỷ lệ tế bào trứng phân chia ở ngày thứ 2, tỷ lệ tạo phôi nang, phôi nang thoát màng và từ trứng thành thực có màng sáng cao hơn so với tế bào trứng thành thực bị loại bỏ màng sáng.

Kết quả này có thể đưa ra nhận định rằng việc sử dụng tế bào trứng có màng sáng sẽ mang đến hiệu quả tạo phôi bò đơn tính cao hơn so với sử dụng tế bào trứng loại bỏ màng sáng. Tuy nhiên, việc sử dụng các tế bào trứng không có màng sáng có một số thuận lợi trong kỹ thuật

cloning nhằm dung hợp tạo ra các “siêu phôi” (super embryos) cũng như tránh được một số kỹ thuật vi thao tác chuyển nhân phức tạp. Mặc dù tỷ lệ phân chia và tạo phôi nang có thấp hơn so với khi thao tác trên tế bào trứng có màng sáng, nhưng tỷ lệ này cũng cao hơn so với một số báo cáo của Cevik (2009) và Wang (2008).

Như vậy, trong nghiên cứu này, phôi bò nhân bản đơn tính *in-vitro* đã được tạo ra, và đây là kết quả thành công đầu tiên về phôi nhân bản đơn tính tại Viện Chăn nuôi. Sự thành công trong việc tạo phôi bò nhân bản đơn tính *in-vitro* hứa hẹn là tiền đề cho các nghiên cứu khác về tạo phôi và động vật nhân bản tại Việt Nam.

**Nhóm nghiên cứu công nghệ sinh sản
Phòng thí nghiệm trọng điểm công nghệ
tế bào động vật, Viện Chăn nuôi**

Bảng 1: kết quả tạo phôi bò đơn tính *in-vitro* từ trứng thành thực có màng sáng

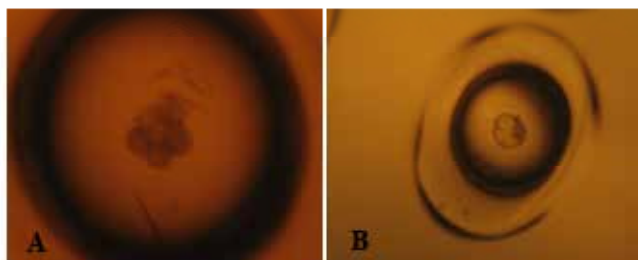
Số tế bào trứng thành thực được hoạt hóa		Số tế bào trứng phân chia		Số phôi nang		Số phôi nang thoát màng	
n	%	n	%	n	%	n	%
32	100	30	93,75	12	37,5	5	15,63

Bảng 2: kết quả tạo phôi bò đơn tính *in-vitro* từ trứng thành thực không có màng sáng

Số tế bào trứng thành thực được hoạt hóa		Số tế bào trứng phân chia		Số phôi nang (có thể coi là số phôi nang thoát màng)	
n	%	n	%	n	%
15	100	13	86,67	2	13,33



Hình 1: hình ảnh tạo phôi bò đơn tính *in-vitro* từ trứng thành thực có màng sáng (A): tế bào trứng phân chia ở ngày thứ 2 sau hoạt hóa; (B): phôi nang bò ở ngày thứ 7 sau hoạt hóa; (C): phôi nang thoát màng ở ngày thứ 9 sau hoạt hóa



Hình 2: hình ảnh tạo phôi bò đơn tính *in-vitro* từ trứng thành thực không có màng sáng (A): tế bào trứng phân chia ở ngày thứ 2 sau hoạt hóa; (B): phôi nang bò ở ngày thứ 7 sau hoạt hóa

Tài liệu tham khảo

1. Cevik M, Tas A, Akkoc T, Bagis H, Arat S (2009), A comparative study of parthenogenetic activation and *in-vitro* fertilization of *in-vitro* matured bovine oocytes. Turk J Vet Anim, **Sci 33**(5), pp.393-399.
2. Jellerette T, Kurokawa M, Lee B, Malcuit C, Yoon S.Y, Smyth J, Vermassen E, De Smedt H, Parys J.B, Fissore R.A (2004), Cell cycle-coupled (Ca^{2+}) (i) oscillations in mouse zygotes and function of the inositol 1,4,5 - trisphosphate receptor-1, Developmental Biology, **274**, pp.94-109.
3. Kharche S.D, Birade H.S (2013), Parthenogenesis and activation of mammalian oocytes for *in-vitro* embryo production: A review, Advances in Bioscience and Biotechnology, **4**, pp.170-182.
4. Wang Z.G, Wang W, Yu S.D, Xu Z.R (2008), Effect of different activation protocols on preimplantation development, apoptosis and ploidy of bovine parthenogenetic embryos, Animal Reproduction Science, **105**, pp.292-301.