

## TẠO PHÔI CÁ THỂ KHÂM BẰNG CÂY CHUYÊN TẾ BÀO

Thắm Thị Thu Nga, Trần Thị Quỳnh Anh, Nguyễn Văn Cường

Viện Công nghệ Sinh học

### TÓM TẮT

Chuyển gen bằng phương pháp cấy chuyển tế bào cho phép cài chính xác gen chuyển vào vị trí mong muốn trên bộ gen con nhận. Phương pháp này có ý nghĩa rất to lớn trong việc sản xuất động vật chuyển gen, đặc biệt là động vật biểu hiện protein phục vụ y-dược học. Để phát triển phương pháp này chúng tôi đã tiến hành đưa tế bào được tách từ phôi cá chép chuyển gen vào phôi cá không chuyển gen. Phôi dùng để tách tế bào cho được thu từ cá chép (*Cyprinus carpio*) chuyển gen hormone sinh trưởng người. Các tế bào gốc được tách từ phôi giai đoạn 16 - 32 tế bào bằng phương pháp tiêu hóa trypsin. Phôi nhận (giai đoạn phôi nang - blastula) được thu từ cá chép không chuyển gen. Cấy chuyển tế bào vào phôi được tiến hành với sự trợ giúp của thiết bị vi phẫu. Mỗi phôi nhận được đưa vào bằng phương pháp vi tiêm từ 20 - 100 tế bào cho. Các phôi sống sót đến giai đoạn 13 (sau một ngày ấp) được sử dụng để tách DNA. Việc xác định sự có mặt gen hormone sinh trưởng người ở phôi vi tiêm sống sót được thực hiện bằng phương pháp PCR sử dụng DNA tách từ phôi làm khuôn và các mồi đặc hiệu cho gen hormone sinh trưởng người. Kết quả cho thấy, sản phẩm PCR từ phôi cấy chuyển tế bào chuyển gen xuất hiện vạch DNA tương ứng gen hormone sinh trưởng, trong khi nhóm đối chứng, chuyển tế bào không chuyển gen, không thấy xuất hiện vạch tương ứng. Kết quả này bước đầu cho thấy các tế bào gốc phôi đã tham gia vào dòng mầm phôi nhận sau khi được cấy chuyển.

**Từ khóa:** Cấy chuyển tế bào, dòng mầm, động vật chuyển gen, hormone sinh trưởng, phôi cá

### MỞ ĐẦU

Cho đến nay, chuyển gen vào cá được tiến hành chủ yếu bằng phương pháp vi tiêm. Sử dụng phương pháp này nhiều cá chuyển gen đã được tạo ra (Zhu *et al.*, 1985; Dunham *et al.*, 1992; Hernández *et al.*, 1997; Nguyễn Văn Cường *et al.*, 1999; Pitkanen *et al.*, 1999). Tuy nhiên, phương pháp vi tiêm có một số hạn chế như: chưa chủ động trong việc kiểm soát số lượng bản sao cũng như vị trí cài gen lạ trong DNA hệ gen con chủ.

Việc sản xuất protein được qua động vật chuyển gen nói chung, cá nói riêng, đòi hỏi phải kiểm soát được sự biểu hiện gen về mức độ cũng như thời điểm biểu hiện sản phẩm. Có thể khắc phục những trở ngại của phương pháp vi tiêm, đáp ứng được yêu cầu sản xuất protein được qua động vật chuyển gen là chuyển gen qua tế bào phôi gốc bằng vector biểu hiện retrovirus (Morita *et al.*, 2004; Rocha *et al.*, 2004).

Các dòng gốc phôi cá được tạo ra từ tế bào phôi giai đoạn phôi nang (Hong *et al.*, 2000). Trở ngại lớn nhất trong nghiên cứu tạo dòng tế bào phôi gốc là các dòng tạo ra thường bị giảm khả năng phát triển

sau thời gian nuôi cấy *in vitro* và có khuynh hướng phân hóa trong quá trình nuôi cấy, do vậy giảm khả năng biệt hóa đa năng của tế bào gốc phôi. Tuy nhiên, bằng việc tạo ra môi trường nuôi cấy thích hợp nhiều dòng phôi gốc cá đã được tạo ra: dòng MES1 cá medaka (*Oryzias latipes*) (Hong *et al.*, 1998), zebrafish (*Danio rerio*) (Fan *et al.*, 2002), cá chạch (*Misgurnus anguillicaudatus*) (Nakagawa *et al.*, 2002), cá hồi (*Oncorhynchus mykiss*) (Takeuchi *et al.*, 2001), cá vàng (*Carassius auratus*) (Kusuda *et al.*, 2004).

Phương pháp nhiễm chuyển gen vào các dòng tế bào động vật được thực hiện thành công ở nhiều phòng thí nghiệm, tuy nhiên chủ yếu các dòng tế bào động vật có vú. Thành công nhiễm chuyển gen bằng vector biểu hiện retrovirus trên dòng tế bào gốc phôi cá còn rất ít. Lý do phần lớn các vector biểu hiện retrovirus nhiễm vào tế bào động vật có vú không nhiễm vào tế bào cá. Gần đây nhờ những thành công trong việc tạo ra dòng tế bào đóng gói và các vector biểu hiện retrovirus có khả năng nhiễm vào tế bào cá nên việc nghiên cứu tạo cá chuyển gen bằng phương pháp tế bào gốc phôi được phát triển (Ma *et al.*, 2001). Sau khi tạo được dòng tế bào gốc phôi mang gen chuyển sẽ tiến hành đưa các dòng tế bào này vào

phôi cá giai đoạn phôi nang để tạo ra dòng cá thể khảm mang gen chuyển. Bằng phương pháp lai tạo sẽ chọn lọc được dòng cá đồng hợp tử chuyển gen sản xuất protein được. Theo hướng nghiên cứu này hàng loạt cá chuyển gen thể "khảm" đã được tạo ra: medaka (Hong *et al.*, 1998), cá hồi (Nilsson *et al.*, 1992), cá ngựa vằn (Ma *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 1992). Gần đây, nhóm nghiên cứu của Đại học Southampton (Anh) đã thành công trong việc tạo cá chuyển gen biểu hiện yếu tố đông máu VII (hFVII) người bằng cách chuyển gen *hFVII* dưới sự điều khiển của promoter CMV (Hwang *et al.*, 2004).

Để xây dựng và phát triển hướng nghiên cứu này chúng tôi tiến hành tách tế bào gốc phôi từ phôi nang của cá chép chuyển gen hormone sinh trưởng người sau đó đưa các tế bào này vào phôi nang cá không chuyển gen. Phôi thể khảm được đánh giá bằng phương pháp PCR sử dụng mỗi đặc hiệu gen hormone sinh trưởng người.

## NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Nguyên liệu

Cá chép chuyển gen hormone sinh trưởng người do phòng Công nghệ gen động vật, Viện Công nghệ Sinh học tạo ra và cá chép giống được nuôi tại viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản I, Đình Bảng, Bắc Ninh.

Não thùy thể cá chép do Công ty Dịch vụ và Nuôi trồng Thủy sản Trung ương (Ngọc Khánh, Ba Đình, Hà Nội) cung cấp. Enzyme trypsin (Fritz Leidhardt Biochemie, Đức); HEPES (Đức); huyết thanh bào thai bò. Một số hóa chất khác được mua tại các hãng Sigma (Mỹ); Serva, Merck (Đức); Trung Quốc.

Thiết bị: Kính hiển vi soi ngược Olympus cùng bộ vi thao tác Olympus, thiết bị kéo, mài và gia công kim vi tiêm Narishige.

### Phương pháp nghiên cứu

#### *Thu nhận phôi trần cá chép*

*Chọn cá bố mẹ thành thục:* Cá bố mẹ khỏe mạnh, trọng lượng từ 1 - 1,5 kg/con, và có các đặc điểm sinh dục phụ như sau:

Cá đực, xuất hiện nhiều mấu gai nhỏ trên nắp mang và sống vây ngực, ở trên 3 - 5 tia vây phía trước, mấu gai trên vây ngực nổi khá rõ. Lỗ sinh dục tương đối nhỏ hơi lõm vào, hình hẹp dài, màu hơi

vàng đỏ, ép nhẹ phần bụng sẽ có tinh dịch màu trắng sữa chảy ra.

Cá cái, trên nắp mang và sống vây ngực trơn bóng, phần bụng to, da mỏng và mềm, lỗ sinh dục to trong, hơi lõm, sưng tấy lên thành màu đỏ tím. Nếu ép nhẹ phần bụng trứng sẽ chảy ra.

*Thụ tinh nhân tạo cho cá chép:* Kích dục cá đực nhân tạo có thể tiến hành bằng 2 phương pháp:

Phương pháp sử dụng kích dục tố. Cá thành thục được tiêm kích dục tố LRH-A (Luteotropin Releasing Hormone Analog) và DOM (domperidon) với liều sử dụng: Một ống LRH-A 200 g và 6 viên DOM (10 mg/viên) cho 5 kg cá cái. LRH-A là một loại GnRH-A tổng hợp, thành phần gần giống với GnRH-n (Gonadotropin Releasing Hormone - natural) nhưng bền hơn hợp chất tự nhiên, có tác dụng kích thích sinh sản cho tất cả các loài cá. Liều tiêm sơ bộ bằng 1/3 tổng liều lượng sử dụng, 2/3 còn lại là liều quyết định. Liều quyết định là liều gây chín và rụng trứng, được tiêm sau liều tiêm sơ bộ một khoảng thời gian xấp xỉ bằng thời gian hiệu ứng. Thời gian hiệu ứng là thời gian khoảng từ khi tiêm liều quyết định để gây chín và rụng trứng đến khi cá bắt đầu rụng trứng hàng loạt. Cá đực tiêm một lần cùng với thời điểm tiêm liều quyết định cho cá cái. Liều tiêm cho cá đực bằng 1/5 liều dùng cho cá cái.

Phương pháp sử dụng não thùy thể cá chép. Tuyến yên cá chép (còn gọi là não thùy thể cá chép) được bảo quản trong acetone. Lấy tuyến yên ra để hong khô trên giấy lọc khoảng 10 - 15 phút rồi cho vào cối nghiền nát và hòa tan bằng nước muối sinh lý hoặc nước cất. Dịch thu được sử dụng gây kích dục cá. Liều lượng tiêm: 1,5 - 2,5 g tuyến yên cá chép/kg cá cái; liều tiêm cho cá đực bằng 1/3 liều tiêm cho cá cái. Cách tiêm: Tiến hành tiêm 2 lần, lần thứ nhất bằng 1/3 tổng liều lượng sử dụng, lần thứ hai tiêm lượng còn lại. Đối với cá đực chỉ tiêm một lần vào thời điểm tiêm lần hai cho cá cái. Để cá đẻ vào khoảng 7 - 9 giờ sáng thì tiêm kích thích lần một vào 17 giờ, lần hai vào 24 giờ ngày hôm trước. Liều lượng tiêm còn phụ thuộc vào điều kiện mùa vụ và nhiệt độ môi trường. Vị trí tiêm thường là tiêm vào bắp thịt vùng cơ lưng ở hai bên thân, giữa cơ quan đường bên và vây lưng.

Phương pháp thụ tinh nhân tạo được sử dụng là thụ tinh khô được tiến hành như sau: Vuốt nhẹ nhàng hai bên bụng của con cái để trứng chảy vào bát. Đối với con đực cũng vuốt nhẹ nhàng hai bên bụng cho tinh dịch chảy ra và dùng pipetman hút tinh dịch ở gần lỗ sinh dục. Sau đó, cho thẳng tinh dịch lên

trứng, dùng lông gà trộn đều tinh dịch và trứng một cách nhẹ nhàng để thúc đẩy quá trình thụ tinh. Sau một phút, từ từ cho nước sạch vào đảo nhẹ nhàng khoảng 30 giây. Tiếp tục cho nước sạch vào để loại bỏ tinh dịch và noãn dịch thừa. Trứng cá chép có một lớp màng dính để bám vào giá thể không bị trôi nổi trong nước. Do đó, tiến hành khử dính trong khoảng 10 phút.

**Tạo phôi trần:** Trứng sau khi đã khử dính được chuyển sang đĩa petri có agar để tiến hành loại bỏ màng chorion bằng dung dịch trypsin 0,3% (w/v) pha trong dung dịch Holtfreter khoảng 1 đến 2 phút. Quá trình khử màng được theo dõi trên kính hiển vi, nếu thấy một số màng chorion bị phân hủy thì ngừng ngay quá trình khử màng bằng cách rửa lại trứng nhiều lần bằng dung dịch Holtfreter để đảm bảo cho phôi được bóc màng hoàn toàn mà không làm tổn hại tới phôi.

#### Tách tế bào phôi bằng trypsin

Phôi cá chép sau khi loại bỏ màng chorion được rửa trong dung dịch Ringer vô trùng không có  $Ca^{2+}$  trong 15 phút. Tiếp theo, chuyển phôi sang đĩa petri có chứa dung dịch 0,25% trypsin, 1 mM EDTA, pH 8 pha trong đệm PBS vô trùng. Ủ ở 28,5°C và theo dõi sự phân tách tế bào bằng kính hiển vi. Trong thời gian ủ, dùng pipet pasteur vô trùng miệng hẹp hút lên hút xuống một cách nhẹ nhàng để giúp quá trình phân tách tế bào diễn ra nhanh hơn. Khi thấy các tế bào riêng rẽ xuất hiện thì thêm dung dịch  $CaCl_2$  đến 2 mM và huyết thanh bào thai bò đến 10% để dừng phản ứng. Chuyển dịch tế bào sang ống eppendorf và ly tâm 100 đến 300 vòng/phút trong 3 phút. Loại bỏ dịch nổi và hòa tan tế bào trong dung dịch L-15 có chứa 0,3 mg/ml glutamine; 50 U/ml penicillin; 0,05 mg/ml streptomycin và 0,8 mM  $CaCl_2$ . Tiếp tục ly tâm 100 đến 300 vòng/phút trong 3 phút, loại bỏ dịch nổi và lại hòa tan tế bào.

#### Phương pháp vi tiêm

Phương pháp được tiến hành cơ bản theo Nguyễn

Văn Cường và đồng tác giả (1999). Cây chuyển tế bào vào phôi nhận được tiến hành trên phôi giai đoạn phôi nang (blastula). Hút các tế bào phôi bằng pipet có đường kính đầu kim 40 - 60  $\mu m$  và vi tiêm vào phôi cá không chuyển gen ở giai đoạn phôi nang. Đối chứng được tiêm các tế bào từ phôi cá không chuyển gen. Phôi sống sót đến giai đoạn 13 được sử dụng để tách DNA sử dụng làm khuôn PCR với mỗi đặc hiệu gen hormone sinh trưởng người.

#### Nhân đoạn gen hormone sinh trưởng người

Đoạn gen hormone sinh trưởng người được khuếch đại bằng PCR sử dụng mỗi đặc hiệu có trình tự: 5'- AAGCGTCACCACGACT -3' và 5'-AAAA GCCAGGAGCAG -3'.

Kích thước đoạn gen cần khuếch đại là 427 bp nằm trên exon 5 của gen hormone sinh trưởng người. Phản ứng PCR được tối ưu với 39 chu trình gồm: 94°C, 20 giây; 55°C, 30 giây; 72°C, 1 phút và hoàn thành tổng hợp chuỗi 72°C, 10 phút. Sản phẩm được kiểm tra bằng điện di trên gel 1% agarose (w/v) và so sánh với thang DNA chuẩn 100 bp.

#### KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

##### Tạo phôi cá sử dụng tách tế bào gốc và làm phôi nhận

Để thuận tiện cho thí nghiệm phải chủ động cho cá đẻ vào 7 - 9 h sáng bằng cách tiêm kích thích lần một vào khoảng 17 h và lần hai vào khoảng 23 - 24 h ngày hôm trước. Vị trí tiêm đơn giản nhất là tiêm vào bắp thịt vùng cơ lưng ở hai bên thân, giữa cơ quan đường bên và vây lưng. Trứng và tinh dịch đạt yêu cầu (trứng tròn có màu vàng, tinh dịch có màu trắng sữa) được sử dụng cho thụ tinh nhân tạo khô. Kết quả thu nhận phôi bằng thụ tinh nhân tạo được thể hiện bằng bảng 1.

Bảng 1. Kết quả thu nhận phôi cá bằng thụ tinh nhân tạo.

Thí nghiệm	Số cá thí nghiệm	Số cá đẻ trứng (Tỷ lệ %)	Tỷ lệ trứng phát triển thành phôi nang (%)
Sử dụng kích dục tố LRH-A	6 con	4 con (67)	52,0
Sử dụng não thùy thể cá chép	4 con	2 con (50)	58,5
Trung bình		(58,5)	55,2

Sử dụng kích dục tố và não thùy thể cá chép về cơ bản cho kết quả tương tự nhau. Kích dục tố kích thích cá đẻ tốt hơn nhưng tỷ lệ trứng phát triển thành phôi nang thấp hơn. Trong thí nghiệm của chúng tôi tỷ lệ cá đẻ đạt trung bình khoảng 58,5%, tỷ lệ trứng phát triển thành phôi nang khoảng 55%.

Các phôi giai đoạn 16 - 32 tế bào được sử dụng tách tế bào (phôi cho), còn các phôi nang, sau 5 - 7 h thụ tinh (1000 - 2000 tế bào) được sử dụng làm

phôi tiếp nhận tế bào (phôi nhận).

#### Loại màng dai chorion của phôi

Tỷ lệ phôi loại màng bằng enzyme nguyên vẹn (không bị phá hủy) phát triển bình thường đến khi nở thành cá con đạt 42% so với tổng số phôi thí nghiệm, bằng 53,5% so với đối chứng không bóc màng (Bảng 2). Phôi tạo ra hoàn toàn có thể sử dụng cho nghiên cứu tiếp theo.

**Bảng 2.** Kết quả đánh giá phôi cá bóc màng.

Đợt thí nghiệm	Tỷ lệ nở (%)	
	Trứng bóc màng	Trứng không bóc màng
1	21,3	56,6
2	66,6	73,0
3	46,8	95,0
4	45,6	96,2
5	30,2	72,8
Trung bình	42,1 ± 19,8 (so với tổng số trứng thí nghiệm) 53,5% (so với đối chứng không bóc màng)	78,7 ± 18,5

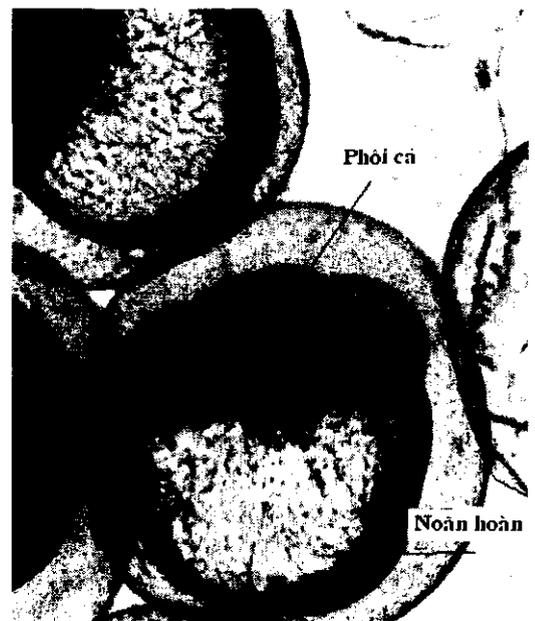
#### Tách và cấy chuyển tế bào

Phôi giai đoạn 16 - 32 tế bào, sau 2 - 2,5 h thụ tinh (Hình 1) được sử dụng để tách tế bào gốc vì giai đoạn này tế bào đa năng có khả năng hòa nhập tốt nhất vào phôi nhận (Varadi, Horvath, 1997).

Phôi cá chép chuyển gen sau khi loại bỏ màng chorion được rửa trong dung dịch Ringer vô trùng không có  $Ca^{2+}$ . Tiếp theo chuyển phôi sang đĩa petri để tiêu hóa trypsin. Quá trình phân tách tế bào được theo dõi bằng kính hiển vi. Khi thấy các tế bào riêng rẽ xuất hiện thì thêm dung dịch  $CaCl_2$  để dừng phản ứng. Chuyển dịch tế bào sang ống eppendorf và ly tâm loại bỏ dịch nổi. Các tế bào gốc phôi có hình tròn to được hòa trong dung dịch L-15 để sử dụng cấy chuyển tế bào (Hình 2). Cấy chuyển tế bào vào phôi cá được tiến hành với sự trợ giúp của thiết bị vi phẫu. Hút các tế bào phôi bằng pipet và vi tiêm vào phôi cá không chuyển gen ở giai đoạn phôi nang (Hình 3). Đối chứng được tiêm các tế bào từ phôi cá không chuyển gen.

Trong thí nghiệm trên, mỗi phôi nhận ở giai đoạn phôi nang, sau 5 - 7 h thụ tinh (1000 - 2000 tế bào) được đưa vào 20 - 100 tế bào gốc từ phôi cá chuyển gen giai đoạn 16 - 32 tế bào. Tỷ lệ tế bào

ngoại chiếm khoảng từ 2 - 5 %. Các phôi vi tiêm được ấp tiếp trong môi trường Holtfreter.

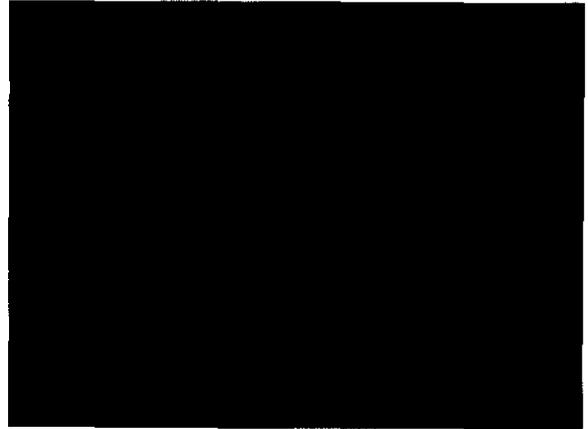


### Xác định phôi thể khảm bằng PCR

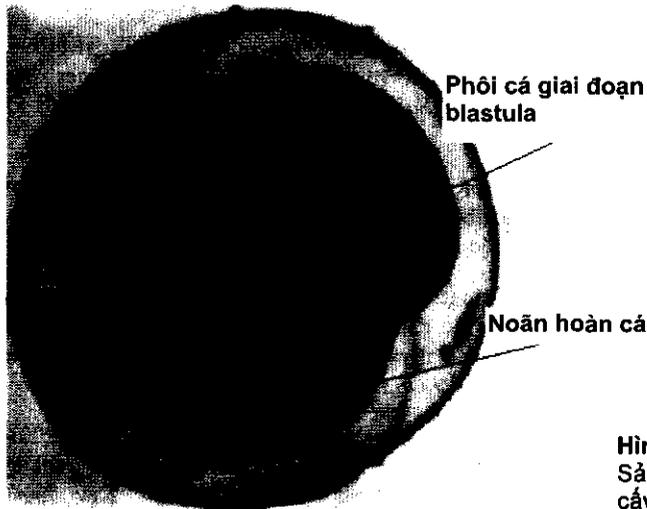
Để đánh giá khả năng hòa nhập của các tế bào cấy chuyển vào phôi nhận, các phôi vi tiêm sống sót đến giai đoạn 13 - 15, giai đoạn phôi không (sau một ngày ấp) được thu nhận tách DNA sử dụng làm khuôn PCR khuếch đại gen hormone sinh trưởng. Kết quả điện di sản phẩm PCR cho thấy, ở phôi chuyển tế bào tách từ phôi cá chuyển gen xuất hiện vạch tương ứng với DNA hormone sinh trưởng chuẩn, trong khi lô đối chứng không thấy xuất hiện sản phẩm PCR. Tuy nhiên, ảnh điện di xuất hiện vạch có kích thước lớn hơn GH chuẩn. Kết quả này có thể giải thích do một số gen hormone sinh trưởng khi xen vào DNA hệ gen phôi cá ở dạng cotamer, có nghĩa một số đoạn GH đã nối với nhau trước khi xen vào gen cá hoặc có thể do một số đoạn cùng gắn vào một điểm trên DNA gen cá.

Kết quả trên cho thấy, tế bào được tách từ phôi cá giai đoạn 16 - 32 đã hòa nhập và tiếp tục phát triển sau khi được vi tiêm vào khoang dưới đĩa mầm của phôi nhận ở giai đoạn phôi nang. Kết quả này

khẳng định tế bào phôi cá giai đoạn từ 16 - 32 tế bào là tế bào đa năng. Nghiên cứu cấy chuyển tế bào gốc tách từ phôi cá ngựa vằn chuyển gen sắc tố (Kimmel *et al.*, 1988) thấy phôi vi tiêm giai đoạn 13 - 15 bắt đầu biểu hiện sắc tố, các tế bào gốc chuyển gen đã hòa nhập vào phôi nhận không chuyển gen.



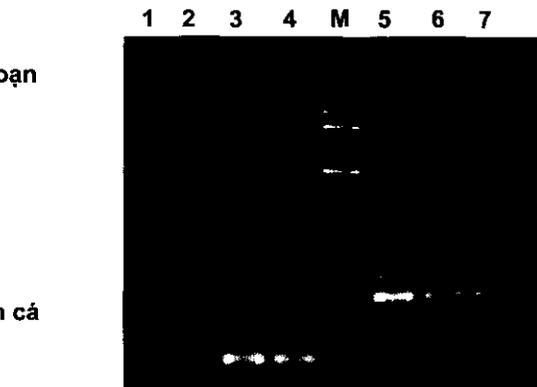
Hình 2. Tế bào gốc phôi.



Hình 3. Ảnh phôi cá giai đoạn phôi nang (giai đoạn 8).

### KẾT LUẬN

Đã ứng dụng thành công phương pháp cấy chuyển tế bào vào phôi cá gồm các bước: i) Tách tế bào gốc đa năng từ phôi cá chép giai đoạn 16 - 32 tế



Hình 4. Sản phẩm PCR gen hormone sinh trưởng. Sản phẩm PCR sử dụng DNA khuôn từ: 1, 2: Phôi cấy chuyển tế bào không chuyển gen; 3, 4: Plasmid chuẩn chứa gen hormone sinh trưởng; 5-7: Phôi cấy chuyển tế bào chuyển gen hormone sinh trưởng.

bào, ii) Tạo phôi nang trần làm phôi nhận, iii) Cấy chuyển tế bào vào phôi bằng phương pháp vi tiêm, iv) Đánh giá phôi thể khảm bằng PCR sử dụng các môi đặc hiệu cho gen hormone sinh trưởng. Việc đánh giá hiệu quả tạo phôi và cá chuyển gen thể khảm đang được tiến hành.

**Lời cảm ơn:** Công trình được hoàn thành với sự hỗ trợ kinh phí từ Đề tài Nghiên cứu cơ bản trong khoa học tự nhiên, mã số 6.104.06.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ma CG, Fan LC, Ganassin R, Bols N, Collodi P (2001) Production of zebrafish germ-line chimeras from embryo cell cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(5): 2461-2466.
- Dunham RA, Ramboux AC, Duncan PL, Hayat M, Chen TT, Lin CM, Kight K, Gonzalez-Villasenor I, Powers DA (1992) Transfer, expression, and inheritance of salmoid growth hormone gene in channel catfish, *Ictalurus punctatus*, and effects on performance traits. *Mol Mar Biol Biotechnol* 1(4-5): 380-389.
- Nilsson EE, Cloud JG (1992) Rainbow trout chimeras produced by injection of blastomeres into recipient blastulae. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 9425-9428.
- Fan L, Collodi P (2002) Progress towards cell-mediated gene transfer in zebrafish. *Brief Funct Genomic Proteomic* 1(10): 131-138.
- Hernández O, Guillén I, Estrada MP, Cabrera E, Pimentel R, Pina JC, Abad Z, Sánchez V, Hidalgo Y, Martínez R, Lleonart R, de la Fuente J (1997) Characterization of transgenic tilapia lines with different ectopic expression of tilapia growth hormone. *Mol Mar Biol Biotechnol* 6(4): 364-375.
- Hong Y, Winkler C, Scharlt M (1998) Efficiency of cell culture derivation from blastula embryos and of chimera formation in the medaka (*Oryzias latipes*) depends on donor genotype and passage number. *Dev Genes Evol* 208(10): 595-602.
- Hong Y, Chen S, Scharlt M (2000) Embryonic stem cells in fish: current status and perspective. *Fish Physiol Biochem* 22(2): 165-170.
- Hwang G, Muller F, Rahman MA, Williams DW, Murdock PJ, Pasi KJ, Goldspink G, Farahmand H, Maclean N (2004) Fish as bioreactors: Transgene expression of human coagulation factor VII in fish embryos. *Mar Biotechnol* 6(5): 485-492.
- Kimmel CB, Warga RM (1988) Cell lineage and developmental potential of cells in the zebrafish embryo. *Trends Gen* 4: 68-74.
- Kusuda S, Teranishi T, Koide N, Nagai T, Arai K, Yamaha E (2004) Pluripotency of cryopreserved blastomere of the goldfish. *J Exp Zool A Comp Exp Biol* 301(2): 131-138.
- Martinez R, Estrada MP, Berlanga J, Guillen I, Hernandez O, Cabrera E, Pimentel R, Morales R, Herrera F, Morales A, Pina JC, Abad Z, Sanchez V, Melamed P, Lleonart R, de la Fuente J (1996) Growth enhancement in transgenic tilapia by ectopic expression of tilapia growth hormone. *Mol Mar Biol Biotechnol* 5(1): 62-70.
- Morita T, Yoshizaki G, Kobayashi M, Watabe S, Takeuchi T (2004) Fish eggs as bioreactor: the production of bioactive luteinizing hormone in transgenic trout embryos. *Transgenic Res* 13(6): 551-557.
- Nakagawa M, Kobayashi T, Ueno K (2002) Production of gerline chimera in loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) and proposal of preservation of endangered fish species. *J Exp Zool* 293(6): 624-631.
- Nguyễn Văn Cường, Vũ Văn Diễn, Nguyễn Kim Độ, Nguyễn Thị Diệu Thúy, Quyền Đình Thi (1999) Tạo cá chuyển gen hormone sinh trưởng người. *Báo cáo khoa học, Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc, Hà Nội, 9-10/1999. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật: 1429-1436.*
- Pitkanen TI, Krasnov A, Teerijoki H, Molsa H (1999) Transfer of growth hormone (GH) transgenes into Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). *Gen Anal* 15(3-5): 91-105.
- Rocha A, Ruiz S, Estepa A, Coll JM (2004) Application of inducible and targeted gene strategies to produce transgenic fish. *Mar Biotechnol* (NY) 6(2): 118-127.
- S Lin, Longt W, Chen J, Hopkins N (1992) Production of germ-line chimeras in zebrafish by cell transplants from genetically pigmented to albino embryos. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 4519-4523.
- Takeushi Y, Yoshizaki G, Takeushi T (2001) Production of germline chimeras in rainbow trout by blastomere transplantation. *Mol Reprod Dev* 59(4): 380-389.
- Varadi L, Horvath L (1997) Production of fish chimeras from embryonic cells. *Acta Biol Hung* 48(1): 95-104.
- Hong Y, Winkler C, Scharlt M (1998) Production of medakafish chimeras from stable embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(7): 3679-3684.
- Zhu Z, Li G, He L, Chen S (1985) Novel gene transfer into the fertilized eggs of goldfish (*Carassius auratus* L-1758) *Z-Angew Ichthyol* 1: 31-34.

## GENERATION OF CHIMERIC FISH EMBRYO BY CELL TRANSPLANTATION

Tham Thi Thu Nga, Tran Thi Quynh Anh, Nguyen Van Cuong\*

*Institute of Biotechnology*

### SUMMARY

Cell mediated gene transfer systems allow transgene to be inserted into host genomes at precise loci through homologous recombination. This method has tremendous application in transgenic animal production, especially in valuable species that expressed pharmaceutical proteins. To develop method for performing insertional transgene in fish by cell-mediated transfer, we introduced cells isolated from transgenic carp embryos into non-transgenic recipients at blastula stage. Donor embryos used for cell isolation were obtained from transgenic carp (*Cyprinus carpio*) for human growth hormone. Cells were dissociated from embryos at 16 - 32 cell stage by trypsin digestion. Recipient embryos used for cell transplantation experiment were obtained from non- transgenic carp. The recipient embryos at blastula stage were dechorionated with trypsin. Cell transplants were performed with aid of a micromanipulator. Approximately 20 - 100 cells were delivered into cell mass of each recipient blastula by microinjection. The survival embryos at stage 13 (after one day incubation) were examined for the presence of human growth hormone gene by PCR. In experimental group, the specific band for human growth hormone gene was detected, while in the control it was not observed. The results showed that cell from transgenic embryos at 16 - 32 cell stage can contribute to the germ line after transplantation to recipient embryos at blastula stage.

**Keywords:** *Cell transplantation, germ line, growth hormone gene, fish embryo, transgenic animal*

---

\* Author for correspondence: Tel: 84-4-8362430; Fax: 84-4-8363144; E-mail: [cuong@ibt.ac.vn](mailto:cuong@ibt.ac.vn)