

## NGHIÊN CỨU TẠO PHÔI TRÂU (MURRAH × SWAMP BUFFALO) TRONG ỐNG NGHIỆM

Nguyễn Hữu Đức, Nguyễn Thị Ước, Nguyễn Văn Hạnh, Nguyễn Việt Linh, Đặng Nguyễn Quang Thành, Quán Xuân Hữu, Nguyễn Thị Thùy Anh, Bùi Xuân Nguyên

*Viện Công nghệ Sinh học*

### TÓM TẮT

Nghiên cứu này được tiến hành với mục đích góp phần nâng cao hiệu quả của việc tạo phôi trâu lai (Murrah × Swamp buffalo) bằng kỹ thuật thụ tinh ống nghiệm. Buồng trứng trâu được thu từ lò mổ, các trứng được hút ra và phân loại A, B, C tùy chất lượng và chỉ những trứng có chất lượng A và B là được dùng trong các thí nghiệm tiếp theo. Trứng được nuôi thành thực 24 h (38,5°C, 5%CO<sub>2</sub>, độ ẩm bão hòa) trong môi trường MAT-1 (không có EGF) hoặc MAT-2 (bổ sung 10 ng EGF/ml). Tinh trùng đông lạnh trâu Murrah được giải đông và xử lý bằng phương pháp bơi ngược hoặc lọc qua phân lớp Percoll. Thụ tinh ống nghiệm được tiến hành trong môi trường IVF-1 (bổ sung 10 µg Heparin/ml) và IVF-2 (bổ sung 20 µg Heparin/ml) trong 24 h (38,5°C, 5%CO<sub>2</sub>, độ ẩm bão hòa) giữa tinh trùng sau xử lý và trứng đã thành thực. Hợp tử được nuôi trong môi trường B2 (38,5°C, 5%CO<sub>2</sub>, độ ẩm bão hòa). Kết quả cho thấy, EGF có ảnh hưởng dương tính đến sự thành thực trong ống nghiệm của trứng, chất lượng trứng ảnh hưởng đến tỷ lệ thành thực và hiệu quả thụ tinh ống nghiệm. Tỷ lệ trứng thành thực trong ống nghiệm ở môi trường MAT-2 đạt 69,64%, cao hơn rõ rệt 57,23% trong môi trường MAT-1 ( $P < 0,01$ ). Thời gian tối ưu trong xử lý tinh trùng bằng phương pháp bơi ngược là 60 phút và trong phương pháp lọc qua phân lớp Percoll là 20 phút. Kết quả thụ tinh ống nghiệm trong hai môi trường IVF-1 và IVF-2 là không khác nhau thể hiện qua tỷ lệ phôi phân chia ở giai đoạn 2 tế bào (51,92% so với 50,41%).

**Từ khóa:** Nuôi thành thực, phôi trâu (Murrah x Swamp buffalo), thụ tinh ống nghiệm

### MỞ ĐẦU

Công nghệ sinh học sinh sản tiên tiến như thụ tinh ống nghiệm, xác định giới tính phôi... ở trâu còn chưa được nghiên cứu nhiều tại Việt Nam. Trước đây, Bùi Xuân Nguyên và đồng tác giả (1994) tại phòng Công nghệ phôi, Viện Công nghệ sinh học đã bắt đầu nuôi thành thực và thụ tinh *in vitro* trên trứng và tinh trùng của trâu nội (Swamp buffalo); những năm tiếp theo, cũng tại đơn vị trên, một số nghiên cứu nhằm cải thiện hiệu quả tạo phôi trong ống nghiệm cũng được tiến hành như đánh giá ảnh hưởng của việc bổ sung thêm Estradiol-17β vào môi trường nuôi thành thực trứng (Nguyễn Thị Ước *et al.*, 1996; Nguyen Viet Linh *et al.*, 2005).

Đối với các nước có nền công nghệ sinh học sinh sản phát triển và có trâu như Trung Quốc, Ấn Độ, Ý..., các nghiên cứu về nuôi thành thực và thụ tinh ống nghiệm ở trâu là phát triển mạnh mẽ (Abdoon *et al.*, 2001; Gasparrini *et al.*, 2003; Tasripoo *et al.*, 2006).

Việc tạo phôi trâu lai hiện đang là vấn đề được quan tâm. Tại Việt Nam, chúng ta đang có một số

lượng ít các cá thể trâu Murrah và việc đông lạnh tinh trùng của chúng cũng bắt đầu được quan tâm. Ngoài ra, chúng ta có thể chủ động nhập nguồn tinh trâu Murrah từ các nước khác nhằm làm tươi máu cũng như góp phần cải thiện chất lượng đàn giống và đàn trâu lai thương phẩm. Đây là những tiền đề thuận lợi cho việc nghiên cứu và ứng dụng công nghệ thụ tinh ống nghiệm trên trâu.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tập trung nâng cao hiệu quả nuôi thành thực trứng trâu nội (Swamp buffalo) bằng việc bổ sung Epidermal Growth Factor (EGF), xử lý tinh trùng đông lạnh-giải đông của trâu Murrah bằng phương pháp bơi ngược và lọc qua phân lớp Percoll, tiến hành thụ tinh ống nghiệm nhằm tạo ra các phôi trâu lai. Nghiên cứu này góp phần nâng cao hiệu quả các phương pháp tạo phôi trâu lai làm tiền đề cho việc cải thiện chất lượng đàn trâu Việt Nam thông qua các công nghệ sinh học sinh sản tiên tiến.

### VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Các hóa chất và môi trường sử dụng trong các

nguyên cứu dưới đây đều do hãng Sigma hoặc Gibco cung cấp.

### Thu mẫu, bảo quản và khai thác trứng từ buồng trứng

Buồng trứng trâu (Swamp buffalo) được thu từ các lò mổ. Chúng được bảo quản trong dung dịch nước muối sinh lý có bổ sung kháng sinh ở nhiệt độ 30-35°C. Trứng được hút từ các nang và soi tìm trên kính hiển vi soi nổi WILD (Thụy Sĩ) trước khi nuôi trong môi trường TCM-199 (Tissue Culture Medium-199) có bổ sung hormone và huyết thanh bê.

### Nuôi trứng thành thực trong ống nghiệm

Môi trường nuôi MAT-1 (không có EGF) và MAT-2 (bổ sung 10 ng EGF/ml) được sử dụng. Hai môi trường trên có thành phần cơ bản là môi trường TCM-199 có bổ sung 10% huyết thanh bê, FSH (0,5 µg/ml), LH (0,1 µg/ml), Estradiol-17β (2,0 µg/ml). Sau thời gian nuôi 24 h trong tủ nuôi (38,5°C; 5%CO<sub>2</sub>; độ ẩm bão hòa), trứng thành thực được đánh giá thông qua sự xuất hiện của thể cực (polar body).

### Xử lý tinh trùng dùng trong thụ tinh ống nghiệm

Tinh trùng đông lạnh của trâu Murrah được sử dụng trong các nghiên cứu. Các tinh trùng khỏe được chọn lọc bằng phương pháp bơi ngược dòng (swim-up) hoặc lọc qua phân lớp Percoll trong các khoảng thời gian (phút) khác nhau.

### Thụ tinh ống nghiệm và nuôi phôi

Tinh trùng có chất lượng tốt được đưa vào trong môi trường thụ tinh cùng với trứng đã nuôi thành thực. Môi trường thụ tinh IVF-1 (bổ sung 10 µg Heparin/ml) và IVF-2 (bổ sung 20 µg Heparin/ml) được sử dụng cho các nghiên cứu. Hai môi trường IVF-1 và IVF-2 nói trên đều có bổ sung Epinephrine (1 µM), Hypotaurine (10 µM) và Penicillamine (20 µM). Quá trình thụ tinh xảy ra 24 h trong tủ nuôi Sanyo có nhiệt độ 38,5°C, 5%CO<sub>2</sub> và độ ẩm bão hòa. Nồng độ tinh trùng trong môi trường thụ tinh được khống chế ở 10<sup>6</sup> tinh trùng/ml.

Các trứng sau thụ tinh được nuôi trong tủ nuôi Sanyo, khống chế nhiệt độ ở 38,5°C, 5%CO<sub>2</sub>, độ ẩm bão hòa. Môi trường nuôi phôi được sử dụng là môi trường B2 (Rhone-Merieux).

### Xử lý số liệu

Phương pháp phân tích  $\chi^2$  được dùng để kiểm tra

giả thuyết về tính đồng nhất của các tập hợp liên quan đến số trứng thành thực, số phôi phân chia (Renault *et al.*, 1992).

Các ký hiệu a, b được dùng để biểu diễn sự sai khai có ý nghĩa thống kê ( $P < 0,05$ ) giữa các nhóm thí nghiệm (so sánh cột).

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Nuôi thành thực trứng trâu trong ống nghiệm

*Thực nghiệm 1:* So sánh khả năng thành thực của trứng trâu loại A trong môi trường MAT-1 và MAT-2. Kết quả được trình bày trong bảng 1.

*Thực nghiệm 2:* So sánh khả năng thành thực của trứng loại A và B trong môi trường MAT-2. Kết quả được trình bày trong bảng 2.

Các nghiên cứu về nuôi thành thực và thụ tinh ống nghiệm trên đối tượng trâu Việt Nam bắt đầu được nghiên cứu tại Phòng Công nghệ Phôi-Viện Công nghệ sinh học từ những năm 1994 (Bùi Xuân Nguyên *et al.*, 1994). Tiếp theo đó, chúng tôi đã tiến hành một số nghiên cứu nhằm cải thiện hiệu quả của các giai đoạn chính trong quá trình tạo phôi trâu *in vitro*, bao gồm: thu mẫu buồng trứng, khai thác trứng, nuôi thành thực, thụ tinh và nuôi phôi.

Trong một số nghiên cứu trước đây, chúng tôi đã sử dụng môi trường TCM-199 có bổ sung các hormone sinh sản (FSH, LH, Estradiol-17β) vào môi trường nuôi thành thực trứng trâu và đã thu được trứng trâu thành thực ở giai đoạn Metaphase II, trong đó việc bổ sung Estradiol-17β ở nồng độ 3 µg/ml cho hiệu quả rõ rệt: tỷ lệ trứng thành thực, thụ tinh tăng từ 18,2% lên 50,1% và tỷ lệ phôi đầu-phôi nang tăng từ 6,2% lên 29,6% (Nguyễn Thị Ước *et al.*, 1996; Nguyen Viet Linh *et al.*, 2005).

Mặt khác, có một số nghiên cứu trên thế giới cho thấy ảnh hưởng dương tính của yếu tố EGF (Epidermal Growth Factor) đến hiệu quả tạo phôi ống nghiệm ở động vật có vú (Purohit *et al.*, 2005). Do vậy, trong khuôn khổ đề tài này, chúng tôi tiến hành nuôi trứng trâu trong ống nghiệm dựa trên nền môi trường đã nghiên cứu ở giai đoạn trước, có cải biến bằng bổ sung yếu tố EGF ở nồng độ 10 ng/ml với hy vọng cải thiện chất lượng trứng thành thực.

Kết quả thực nghiệm trình bày ở bảng 1 cho thấy việc bổ sung EGF có ảnh hưởng dương tính rõ rệt, tỷ lệ trứng thành thực trong lô đối chứng (môi trường MAT-1 chỉ đạt 57,23%, thấp hơn rõ rệt ( $P < 0,01$ ) so

với kết quả 69,64% đạt được trong môi trường MAT-2.

Các trứng thu từ buồng trứng có chất lượng khác nhau tùy thuộc giai đoạn phát triển của chúng trong

buồng trứng. Trong các nghiên cứu, chúng tôi chỉ sử dụng các trứng có chất lượng A hoặc B (Hình 2, Hình 3). Kết quả nuôi thành thực với loại trứng A (đạt 65,91%) là cao hơn ( $P < 0,05$ ) so với loại trứng B (chỉ đạt 45%).

**Bảng 1.** Khả năng thành thực trong ống nghiệm của trứng trâu trong môi trường MAT-1 (không có EGF) và MAT-2 (có bổ sung EGF).

| Môi trường nuôi thành thực | Trứng loại A<br>(n) | Trứng thành thực |                    |
|----------------------------|---------------------|------------------|--------------------|
|                            |                     | (n)              | (%)                |
| MAT-1                      | 124                 | 71               | 57,23 <sup>a</sup> |
| MAT-2                      | 112                 | 78               | 69,64 <sup>b</sup> |

(<sup>a</sup>, <sup>b</sup>  $P < 0,01$ )

**Bảng 2.** Ảnh hưởng của chất lượng trứng đến khả năng thành thực ống nghiệm trong môi trường MAT-2 (có bổ sung EGF).

| Chất lượng trứng đưa vào nuôi | Số trứng sử dụng<br>(n) | Trứng thành thực |                    |
|-------------------------------|-------------------------|------------------|--------------------|
|                               |                         | (n)              | (%)                |
| Loại A                        | 132                     | 87               | 65,91 <sup>a</sup> |
| Loại B                        | 160                     | 72               | 45,00 <sup>b</sup> |

(<sup>a</sup>, <sup>b</sup>  $P < 0,05$ )

### Thụ tinh ống nghiệm bằng tinh trùng đông lạnh

Tinh trùng đông lạnh-giải đông của trâu Murrah được sử dụng trong các thí nghiệm. Việc chọn lọc tinh trùng khỏe, chất lượng tốt được tiến hành bằng phương pháp bơi ngược (Swim-up) hoặc phương pháp lọc qua phân lớp Percoll.

*Thực nghiệm 1:* Chọn lọc tinh trùng bằng phương pháp bơi ngược. Kết quả được trình bày trong bảng 3.

*Thực nghiệm 2:* Chọn lọc tinh trùng bằng phương pháp lọc qua phân lớp Percoll. Kết quả được trình bày trong bảng 4.

**Bảng 3.** Hiệu quả thu nhận tinh trùng chất lượng tốt bằng phương pháp bơi ngược.

| Thời gian xử lý<br>bơi ngược (phút) | Thu nhận tinh trùng chất lượng tốt,<br>vận động cấp 1 - 2 (triệu con) |
|-------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| 30                                  | 0,14 - 0,18                                                           |
| 40                                  | 0,55 - 0,62                                                           |
| 50                                  | 0,81 - 0,95                                                           |
| 60                                  | 1,15 - 2,03                                                           |
| 80                                  | 1,52 - 2,24                                                           |
| 100                                 | 1,61 - 2,37                                                           |

Xử lý tinh trùng dùng trong kỹ thuật thụ tinh ống nghiệm là bắt buộc và hai phương pháp mà chúng tôi tiến hành trong khuôn khổ đề tài này là những

phương pháp phổ biến và tin cậy trong việc chọn lọc các tinh trùng khỏe, chất lượng tốt dùng trong thụ tinh ống nghiệm.

Tại Việt Nam, các phương pháp này đã được chúng tôi sử dụng trong các nghiên cứu tạo phôi bò thụ tinh ống nghiệm (Nguyễn Thị Ước *et al.*, 1999; Nguyễn Hữu Đức *et al.*, 1998; Duc *et al.*, 2003). Trên đối tượng trâu, chúng tôi cũng đã dùng phương pháp này để chọn lọc tinh trùng của trâu nội (Nguyễn Thị Ước *et al.*, 1996), tuy nhiên với tinh trâu Murrah, các xử lý này là các thực nghiệm bước đầu và mục tiêu đặt ra là thu được các tinh trùng

khỏe, vận động cấp 1 - 2 dùng cho bước thụ tinh ống nghiệm tiếp theo.

Môi trường IVF-1 và IVF-2 được sử dụng trong quá trình thụ tinh ống nghiệm giữa tinh trùng trâu Murrah (nồng độ  $10^6$  tinh trùng/ml) và trứng trâu nội đã thành thực trong môi trường MAT-2 (có bổ sung EGF). Kết quả thụ tinh được phản ánh qua tỷ lệ phôi phân chia ở giai đoạn 02 tế bào.

**Bảng 4.** Hiệu quả thu nhận tinh trùng chất lượng tốt bằng phương pháp lọc qua phân lớp Percoll.

| Thời gian xử lý<br>lọc qua phân lớp Percoll (phút) | Thu nhận tinh trùng chất lượng tốt,<br>vận động cấp 1 - 2 (triệu con) |
|----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| 05                                                 | 0,24 - 0,30                                                           |
| 10                                                 | 0,84 - 0,94                                                           |
| 15                                                 | 1,9 - 2,53                                                            |
| 20                                                 | 2,15 - 2,67                                                           |
| 25                                                 | 2,89 - 3,61                                                           |
| 30                                                 | 2,98 - 3,82                                                           |

#### Sự phát triển *in vitro* của phôi trâu thụ tinh ống nghiệm

Trứng trâu (Swamp buffalo) loại A hoặc B được nuôi cùng tinh trùng trâu Murrah trong 24 h, sau đó chúng được tách sạch lớp tế bào cumulus bao quanh và chuyển vào nuôi tiếp trong môi trường B2 (Rhone Merieux) nhằm đảm bảo cho sự phân chia và phát triển tiếp theo của các hợp tử và phôi.

*Thực nghiệm 1:* So sánh khả năng thụ tinh ống nghiệm của trứng loại A trong môi trường IVF-1 với tinh trùng được xử lý bằng phương pháp bơi ngược hoặc lọc qua phân lớp Percoll. Kết quả được trình bày trong bảng 5.

*Thực nghiệm 2:* So sánh khả năng thụ tinh trong ống nghiệm của tinh trùng được xử lý bằng phương pháp bơi ngược trong môi trường IVF-1 hoặc IVF-2 với trứng loại A. Kết quả được trình bày trong bảng 6.

*Thực nghiệm 3:* So sánh hiệu quả tạo phôi của trứng loại A và B sau thụ tinh ống nghiệm trong môi trường IVF-1 với tinh trùng xử lý bằng phương pháp bơi ngược đồng. Kết quả được trình bày trong bảng 7.

Kết quả từ bảng 5 cho thấy hiệu quả thụ tinh ống nghiệm của tinh trùng được xử lý bằng hai phương pháp bơi ngược và lọc qua phân lớp Percoll là không khác nhau và đây là cơ sở để chúng tôi lựa chọn phương pháp bơi ngược trong các thực nghiệm tạo phôi *in vitro* sau này.

**Bảng 5.** Hiệu quả thụ tinh ống nghiệm với tinh trùng được xử lý bằng phương pháp bơi ngược hoặc lọc qua phân lớp Percoll.

| Phương pháp xử lý tinh trùng | Trứng loại A<br>(n) | Phôi phân chia ở giai đoạn 2 tế bào |                    |
|------------------------------|---------------------|-------------------------------------|--------------------|
|                              |                     | (n)                                 | (%)                |
| Bơi ngược                    | 120                 | 66                                  | 55,00 <sup>a</sup> |
| Lọc Percoll                  | 115                 | 59                                  | 51,31 <sup>a</sup> |

Không có sự khác nhau về hiệu quả tạo phôi khi thực hiện thụ tinh ống nghiệm trong hai môi trường IVF-1 và IVF-2 (Bảng 6). Điều này chứng tỏ, khi thay đổi nồng độ Heparin (một tác nhân

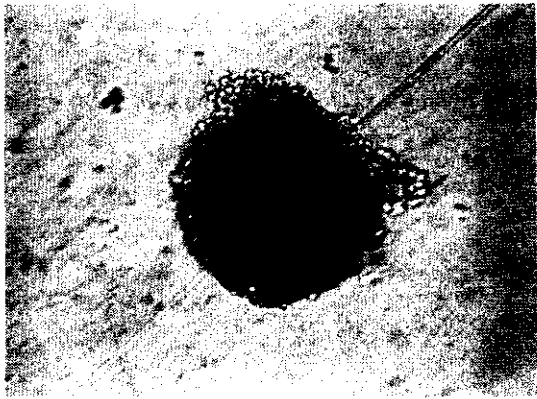
đóng vai trò kiện toàn năng lực thụ tinh của tinh trùng) trong khoảng 10  $\mu$ g - 20  $\mu$ g/ml cũng không góp phần cải thiện hiệu quả thụ tinh lên cao hơn.

Khi tiến hành thụ tinh các trứng có chất lượng B, chúng tôi cũng thu được các phôi ở giai đoạn phân chia 02 tế bào, tuy tỷ lệ này là thấp hơn ( $P < 0,05$ ) so với kết quả đối với trứng loại A (Bảng 7) nhưng kết quả cũng cho chúng ta thấy tiềm năng tạo phôi ống nghiệm từ các

trứng loại B. Hiệu quả tạo phôi trâu ở giai đoạn 02 tế bào (50 - 55%) mà chúng tôi thu được là tương đương với kết quả của các phòng thí nghiệm khác trên thế giới (Abdoon *et al.*, 2001; Gasparrini *et al.*, 2003; Purohit *et al.*, 2005; Tasripoo *et al.*, 2006).



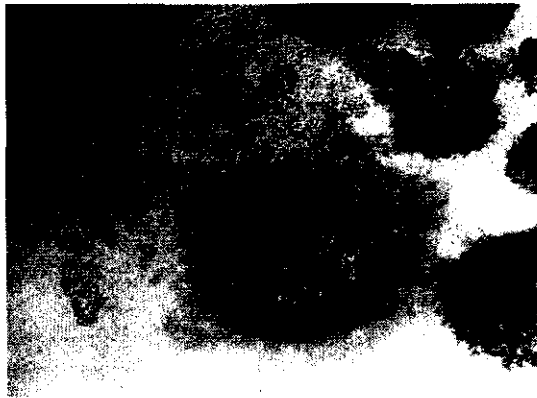
Hình 1. Buồng trứng trâu.



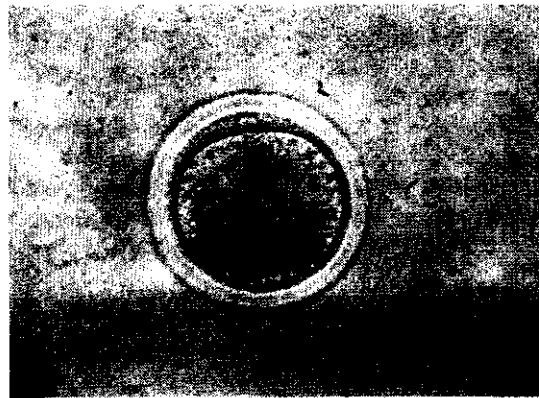
Hình 2. Trứng trâu loại A.



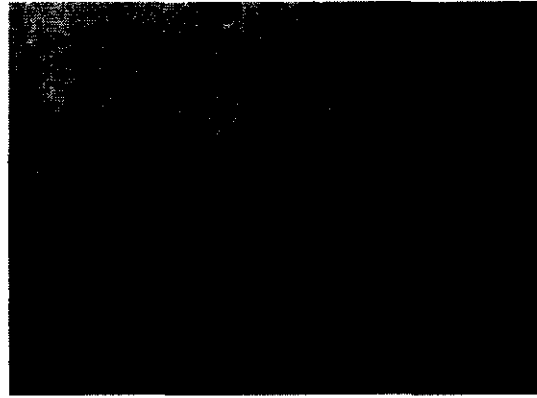
Hình 3. Trứng trâu loại B.



Hình 4. Trứng trâu thành thực với sự toi bông của lớp tế bào cumulus bao quanh.



Hình 5. Trứng trâu thành thực với sự xuất hiện của thể cực.



Hình 6. Phôi trâu ở giai đoạn phân chia 02 tế bào.

**Bảng 6.** Hiệu quả thụ tinh ống nghiệm trong hai môi trường IVF-1 và IVF-2 của trứng trâu nội và tinh trùng trâu Murrah.

| Môi trường thụ tinh ống nghiệm | Trứng loại A (n) | Phôi phân chia ở giai đoạn 2 tế bào |                    |
|--------------------------------|------------------|-------------------------------------|--------------------|
|                                |                  | (n)                                 | (%)                |
| IVF-1                          | 104              | 54                                  | 51,92 <sup>a</sup> |
| IVF-2                          | 123              | 62                                  | 50,41 <sup>a</sup> |

**Bảng 7.** Ảnh hưởng của chất lượng trứng đến hiệu quả tạo phôi ống nghiệm.

| Chất lượng trứng đưa vào thụ tinh | Số trứng sử dụng (n) | Phôi phân chia ở giai đoạn 2 tế bào |                    |
|-----------------------------------|----------------------|-------------------------------------|--------------------|
|                                   |                      | (n)                                 | (%)                |
| Loại A                            | 117                  | 62                                  | 52,99 <sup>a</sup> |
| Loại B                            | 223                  | 80                                  | 35,87 <sup>b</sup> |

(<sup>a</sup>, <sup>b</sup> P < 0,05)

## KẾT LUẬN

Epidermal Growth Factor có ảnh hưởng dương tính đến sự phát triển của trứng trong quá trình nuôi thành thực *in vitro*, chất lượng trứng ban đầu (A hoặc B) có ảnh hưởng lớn đến tỷ lệ thành thực trong ống nghiệm. Tỷ lệ trứng thành thực đạt 60 - 75%.

Môi trường IVF-1 và IVF-2 cho hiệu quả thụ tinh tương đương nhau (Heparin trong giới hạn từ 10 µg đến 20 µg/ml), chất lượng trứng ảnh hưởng rõ rệt đến hiệu quả thụ tinh ống nghiệm (phản ánh qua tỷ lệ phôi phân chia). Tỷ lệ phôi phân chia đạt 50 - 55%.

Phôi trâu lai (Murrah × Swamp buffalo) ở giai đoạn 02 tế bào thu được sau khi thụ tinh trong ống nghiệm (với các phương pháp nuôi thành thực trứng, sử lý tinh trùng trước đó) thể hiện sự phân chia và có hình thái bình thường. Các phương pháp trên có thể được sử dụng trong các nghiên cứu tiếp theo để đánh giá chất lượng phôi thụ tinh ống nghiệm ở giai đoạn sớm (số lượng nhiễm sắc thể, số lượng tế bào ở các giai đoạn phôi dâu-phôi nang).

**Lời cảm ơn:** Công trình được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí của Đề tài khởi nghiệp cấp cơ sở, Viện Công nghệ sinh học.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

Abdoon AS, Kandil OM, Otoi T, Suzuki T (2001) Influence of oocyte quality, culture media and

gonadotropins on cleavage rate and development of *in vitro* fertilized buffalo embryos. *Anim Reprod Sci* 65(3-4): 215-223.

Bùi Xuân Nguyên, Nguyễn Hữu Đức, Lê Văn Ty, Nguyễn Thị Ước (1994) Kết quả bước đầu nghiên cứu nuôi trứng và thụ tinh *in vitro* ở trâu bò. *Kỷ yếu Viện Công nghệ sinh học*: 166-168.

Duc NH, Uoc NT, Ty LV, Hanh NV, Thanh NT, Bui LC, Anh NT, Huu QX, Nguyen BX (2003) Potential for *in vitro* production of embryo from follicular oocyte of Yellow and Yellow-Red Sindhi crossbred cattle. *Theriogenology* 59(1): 442.

Gasparrini B, Sayoud H, Neglia G, Matos DG, Donnay I, Zicarelli L (2003) Glutathione synthesis during *in vitro* maturation of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes: effects of cysteamine on embryo development. *Theriogenology* 60(5): 943-952.

Nguyen Viet Linh, Nguyen Thi Uoc, Quan Xuan Huu, Nguyen Van Hanh, Nguyen Huu Duc, Nguyen Trung Thanh, Bui Linh Chi, Nguyen Khac Tich, Duong Dinh Long, Fabio de Rensis, Bui Xuan Nguyen (2005) Effect of 17β-Estradiol supplementation on the *in vitro* maturation and embryo production in swamp buffalo. *Proceedings of the 2<sup>nd</sup> Asian Reproductive Biotechnology Conference, Thailand*: 167.

Nguyễn Thị Ước, Nguyễn Hữu Đức, Lê Văn Ty, Bùi Xuân Nguyên (1996) Sự chín nhân trong ống nghiệm của trứng trâu nuôi trong môi trường TC-199 có bổ sung FSH và Estradiol-17β. *Kỷ yếu Viện công nghệ sinh học*: 274-278.

Nguyễn Thị Ước, Nguyễn Hữu Đức, Lê Văn Ty, Bùi

Linh Chi, Hoàng Nghĩa Sơn, Bùi Xuân Nguyên (1999) Thụ tinh ống nghiệm trứng bò nội tại Việt Nam. *Tài liệu Hội nghị Công nghệ Sinh học Toàn quốc*: 934-936.

Nguyễn Hữu Đức, Nguyễn Thị Ước, Lê Văn Ty, Bùi Linh Chi, Bùi Xuân Nguyên (1998) Nghiên cứu chọn lọc tinh trùng bò dùng trong thụ tinh ống nghiệm. *Kỷ yếu Viện Công nghệ sinh học*: 169-174.

Purohit GN, Brady MS, Sharma SS (2005) Influence of epidermal growth factor and insulin-like growth factor-1 on nuclear maturation and fertilization of buffalo

cumulus oocyte complexes in serum free media and their subsequent development *in vitro*. *Anim Reprod Sci* 87(3-4): 229-239.

Renault J (1992) *Formulaire de probabilités et de statistique*. Dunod Université, Paris.

Tasripoo K, Srisakwattana K, Suthikrai W, Chetasing S, Kamonpatana M (2006) Potential use of buffalo follicular fluid for *in vitro* maturation of buffalo oocytes. *Proceedings of the 5<sup>th</sup> Asian Buffalo Congress, China*: 610-615.

## **STUDY ON THE *IN VITRO* PRODUCTION OF BUFFALO EMBRYO (MURRAH × SWAMP BUFFALO)**

Nguyen Huu Duc\*, Nguyen Thi Uoc, Nguyen Van Hanh, Nguyen Viet Linh, Dang Nguyen Quang Thanh, Quan Xuan Huu, Nguyen Thi Thuy Anh, Bui Xuan Nguyen

*Institute of Biotechnology*

### **SUMMARY**

The studies on *in vitro* production of crossbred buffalo embryo (Murrah × Swamp buffalo) were undertaken. Ovaries were recovered from the slaughterhouse. Oocytes collected were classified A, B and C according to their quality and only the oocytes grade A or B were used for the experiments. Cumulus oocyte complexes (COCs) were cultured for *in vitro* maturation for 24 hrs (38.5°C, 5%CO<sub>2</sub>, humidified air) in medium MAT-1 (without EGF) or MAT-2 (with 10ng EGF/ml). Frozen-thawed Murrah sperms were treated by swim-up or gradient Percoll procedure. *In vitro* fertilization (selected Murrah sperm and matured Swamp buffalo oocyte) was carried out in the medium IVF-1 (supplied 10 µg Heparin/ml) or IVF-2 (supplied 20 µg Heparin/ml) for 24 hrs (38.5°C, 5%CO<sub>2</sub>, humidified air). Buffalo zygotes were subsequently cultured in B2 medium (38.5°C, 5%CO<sub>2</sub>, humidified air). Our results show that EGF influences positively on the development of oocyte during the *in vitro* maturation, the quality of oocyte have a great effectiveness on the rate of matured oocyte and the result of *in vitro* fertilization. The proportion of matured oocyte reaches 69,64% in MAT-2 medium, significantly higher than that of 57.23% in MAT-1 medium (P < 0.01). For treatment of sperm prior to *in vitro* fertilization, the optimal time of swim-up and gradient Percoll process is about 60 minutes and 20 minutes, respectively. We obtained the similar cleavage rate of buffalo embryo at 2 cell stage in two media IVF-1 and IVF-2 (51.92% and 50.41%, respectively).

**Keywords:** *In vitro* fertilization, *in vitro* maturation, Murrah-Swamp buffalo embryo

\* Author for correspondence: Tel: 84-4-7562902; Fax: 84-4-7912633; E-mail: [nhduc\\_66@yahoo.com](mailto:nhduc_66@yahoo.com)