

SỬ DỤNG PIEZO TRONG LOẠI NHÂN TRỨNG CHUỘT CÂY NHÂN TẾ BÀO SINH DƯỠNG TẠI VIỆT NAM

Nguyễn Hữu Đức, Nguyễn Thị Ước, Nguyễn Văn Hạnh, Nguyễn Việt Linh, Đặng Nguyễn Quang Thành, Quãn 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 tìm ra chế độ hoạt động thích hợp của thiết bị Piezo sử dụng trong việc loại nhân trứng chuột để cấy nhân tế bào sinh dưỡng tại Việt Nam. Chuột dòng Swiss (8 - 12 tuần tuổi) được gây rụng trứng nhiều bằng PMSG 10 I.U/con (ngày 1), hCG 5 I.U/con (ngày 3) và tiến hành thu trứng 13 - 16 h sau mũi tiêm hCG. Các trứng tốt được hút nhân với sự trợ giúp của thiết bị Piezo. Các thông số: dải băng tần (KHz), tần số (Hz), thời gian (μ S), biên độ (V) đã được khảo sát nhằm tìm ra chế độ thích hợp cho việc loại nhân trứng. Kết quả cho thấy, số trứng thu được là $25,22 \pm 10,43$ cho mỗi chuột cái và số trứng chất lượng tốt là $17,31 \pm 9,40$ ($65,73 \pm 12,57\%$); hiệu quả loại nhân an toàn đạt 80% với sự trợ giúp của thiết bị Piezo theo các thông số dải băng tần là 50 hoặc 100 KHz và tần số trong khoảng 2 - 5 Hz, thời gian trong khoảng 66 - 75 μ S, biên độ trong khoảng 10 - 30V.

Từ khóa: Cấy nhân, loại nhân, Piezo, tế bào sinh dưỡng, trứng chuột

MỞ ĐẦU

Tại Việt Nam, các nghiên cứu tạo phôi động vật có vú bằng phương pháp cấy nhân tế bào sinh dưỡng được bắt đầu tại Phòng Công nghệ phôi, Viện Công nghệ sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam từ những năm 1999 - 2000. Phôi nhân bản nói trên đã được tạo ra đối với một số loài vật nuôi như trâu bò (Nguyễn *et al.*, 2000), Saola (Ước *et al.*, 2002), khỉ (Ước *et al.*, 2005), lợn mini (Nguyễn *et al.*, 2006).

Việc triển khai các nghiên cứu tạo phôi và động vật nhân bản theo hướng phục vụ điều trị (therapeutic cloning) là việc làm cần thiết, có nhiều triển vọng (Wakayama *et al.*, 2001) và mô hình nghiên cứu thích hợp theo hướng này là sử dụng mô hình chuột do những ưu thế về mặt đầu tư, sinh lý sinh sản... mà đối tượng này có thể mang lại. Trong năm 2005, tập thể tác giả tại Phòng Công nghệ phôi cùng các chuyên gia của Viện INRA (Pháp) đã thành công trong việc tạo chuột nhân bản từ tế bào gốc tại Viện INRA (Đức *et al.*, 2005).

Với những thuận lợi về mặt kỹ thuật và thiết bị, chúng tôi tiến hành triển khai nghiên cứu tạo phôi chuột nhân bản ở Việt Nam với sự hỗ trợ của thiết bị Piezo nhằm phục vụ các nghiên cứu cơ bản và ứng dụng trong lĩnh vực công nghệ sinh học sinh sản động vật (khuôn khổ đề tài nghiên cứu cơ bản 2006 -

2008, Bộ Khoa học và Công nghệ), đồng thời tiến hành đào tạo chuyên gia trong lĩnh vực trên.

Trong khuôn khổ nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành tạo trứng chuột có chất lượng tốt, đáp ứng yêu cầu sử dụng trong kỹ thuật nhân bản và khảo sát chế độ hoạt động của thiết bị Piezo nhằm tiến hành hút nhân trứng chuột một cách an toàn để có thể thực hiện việc cấy nhân tế bào sinh dưỡng sau này.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Các hóa chất và môi trường sử dụng trong các nghiên cứu dưới đây đều do hãng Sigma cung cấp.

Gây rụng trứng nhiều và thu trứng chuột

Chuột dòng Swiss (8 - 12 tuần tuổi) được Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương cung cấp. Sử dụng PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotropin) (Nhật Bản) (10 I.U./con-tiêm ngày 1) và hCG (Human Chorionic Gonadotropin) (Nhật Bản) (5 I.U./con-tiêm ngày 3) gây rụng trứng nhiều. Trứng được thu 13 - 16 h sau mũi tiêm hCG, môi trường thu trứng là môi trường M2. Dùng Hyaluronidase (0,25%) để tách lớp tế bào cumulus xung quanh trứng, thao tác được thực hiện trên kính hiển vi soi nổi Nikon. Các trứng có chất lượng tốt (nguyên sinh chất sáng màu, đầu nhọn, có thể cực) được sử dụng cho mục đích loại nhân tiếp theo.

Loại nhân trứng chuột với sự hỗ trợ của thiết bị Piezo

Trứng được chuyển vào môi trường M2 có chứa Cytochalasin B với nồng độ 5 µg/ml. Các thao tác loại nhân được tiến hành trên kính hiển vi vi phẫu thuật Olympus với sự hỗ trợ của thiết bị Piezo và kim hút nhân có đường kính 10 - 20 µm theo phương pháp của Zhou và đồng tác giả (2000).

Các thông số hoạt động của thiết bị Piezo bao gồm: dải băng tần (1,5 - 100 KHz), tần số (1 - 100 Hz), thời gian (60 - 500 µS) và biên độ (0 - 100 V). Các thông số này được khảo sát trong khi tiến hành loại nhân trứng để tìm ra chế độ hoạt động thích hợp của hệ Piezo sao cho quá trình hút nhân là an toàn (trứng không bị tan màng nguyên sinh chất trước và sau khi hút nhân).

Xử lý số liệu

Phương pháp phân tích χ^2 được dùng để kiểm tra giả thuyết về tính đồng nhất của các tập hợp liên quan đến số trứng được loại nhân an toàn (Renault *et al.*, 1992).

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

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Gây rụng trứng nhiều và chọn lọc trứng

Ba mươi hai chuột cái dòng Swiss được tiêm PMSG và hCG nhằm gây rụng trứng nhiều. Kết quả thu trứng được trình bày trong bảng 1.

Bảng 1. Tạo trứng chuột chất lượng tốt sử dụng trong kỹ thuật nhân bản.

Lô thí nghiệm	Số chuột sử dụng	Số trứng thu được (n)	Số trứng chất lượng tốt (n)	(%)
1	8	231	170	73,59
2	6	190	135	71,05
3	6	116	67	57,86
4	5	94	53	56,38
5	7	176	129	73,30
Cộng	32	807	554	
Số trứng trung bình/chuột (Mean ± SD)		25,22 ± 10,43	17,31 ± 9,40	65,73 ± 12,57

Loại nhân trứng chuột với sự hỗ trợ của thiết bị Piezo

Chuột dòng Swiss do Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương cung cấp cho chúng tôi đáp ứng yêu cầu về tình trạng sức khỏe, sạch bệnh để có thể sử dụng trong các thí nghiệm tạo trứng chất lượng tốt dùng trong kỹ thuật nhân bản.

Các trứng thu được từ ống dẫn trứng sau khi tiêm PMSG và hCG đa phần đều ở trạng thái thành thực (Metaphase II), các trứng này có chất lượng không đồng đều vì vậy việc tiến hành phân loại và chọn lọc là cần thiết cho mục đích khử nhân. Điều này được thực hiện trên kính hiển vi soi nổi, độ phóng đại 200 - 250 lần.

Số lượng trứng thu được là dao động tùy mỗi cá

thể, tuy nhiên, với khảo sát ở 32 chuột cái, chúng tôi thu được 807 trứng, trong đó có 554 trứng đạt chất lượng. Số trứng thu được trung bình trên một con cái là 25,22 ± 10,43 và số trứng chất lượng tốt là 17,31 ± 9,40, chiếm 65,73 ± 12,57% (Bảng 1). Kết quả này cho thấy tiềm năng sử dụng trứng chuột cho các nghiên cứu là lớn, đặc biệt số lượng trứng đáp ứng yêu cầu của kỹ thuật nhân bản là đáng ghi nhận.

Việc hút nhân trứng chuột là bắt buộc nhằm tạo trứng “rỗng” trước khi cấy nhân tế bào sinh dưỡng vào. Do ưu thế của hệ Piezo trong kỹ thuật hút nhân trứng, cấy nhân tế bào sinh dưỡng vào trong nguyên sinh chất kết hợp với phương pháp hoạt hóa bằng hóa học sau này, việc loại thể cực là không cần thiết ở giai đoạn hút nhân này (Wakayama *et al.*, 1998; 2001; Zhou *et al.*, 2000).

Thiết bị Piezo cho phép chúng ta dễ dàng và thuận lợi hơn khi hút nhân (cũng như cấy nhân tế bào sau này), đặc biệt khi thao tác trên trứng chuột. Tuy nhiên, việc tìm ra chế độ thích hợp cho hệ Piezo là vấn đề đầu tiên, yêu cầu đặt ra là trứng trước cũng như sau hút nhân đều không bị phá hủy (tan).

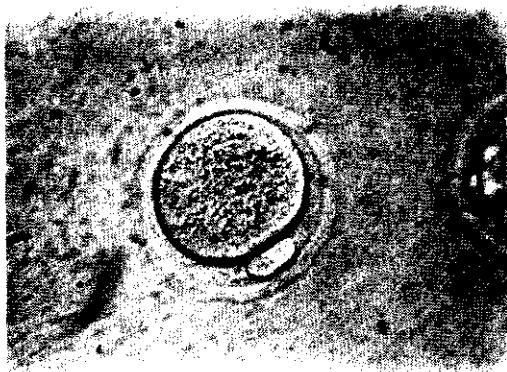
Theo các phương pháp loại nhân thông thường ở trứng động vật có vú (bò, cừu, dê, lợn, thỏ...), người ta sử dụng kim hút nhân có đầu vát nhọn (kỹ thuật

chuẩn bị phức tạp). Ngoài ra, nếu sử dụng loại kim này, sẽ rất ảnh hưởng đến kết quả loại nhân trên trứng chuột vì màng nguyên sinh chất của trứng chuột mỏng, dễ bị phá vỡ trong quá trình thao tác. Trong khi đó, với sự hỗ trợ của thiết bị Piezo, chúng ta có thể sử dụng kim hút nhân có đầu cắt bằng (kỹ thuật chuẩn bị đơn giản), và điều này góp phần quan trọng trong việc đảm bảo tính toàn vẹn của màng nguyên sinh chất của trứng trước và sau khi loại nhân.

Bảng 2. Ảnh hưởng của chế độ Piezo đến hiệu quả hút nhân trứng chuột.

Băng tần (KHz)	Tần số (Hz)	Thời gian (μ S)	Biên độ (V)	Số trứng sử dụng (n)	Trứng được loại nhân an toàn (n)	Trứng được loại nhân an toàn (%)
50	2 - 5	66 - 75	10 - 30	107	88	82,24 ^a
50	> 5	> 75	> 30	126	65	51,59 ^b
100	2 - 5	66 - 75	10 - 30	113	91	80,53 ^a
100	5 >	> 75	> 30	122	62	50,82 ^b

(^a, ^b P < 0,05)



Hình 1. Trứng chuột trước khi hút nhân.



Hình 2. Hút nhân trứng trên kính hiển vi vi thao tác với sự hỗ trợ của hệ Piezo.



Hình 3. Nhân trứng đã được hút khỏi trứng.



Chúng tôi đã tiến hành khảo sát các chế độ liên quan của thiết bị Piezo (Bảng 2), kết quả cho thấy: khi vận hành Piezo ở dải băng tần là 50 hoặc 100 KHz và tần số trong khoảng 2 - 5 Hz, thời gian trong khoảng 66 - 75 μ S, biên độ trong khoảng 10 - 30 V sẽ cho hiệu quả loại nhân tốt hơn (80% trứng an toàn) so với các chế độ khác (50% trứng an toàn) ($P < 0,05$).

KẾT LUẬN

Đã thu được trứng chuột do gây rụng trứng nhiều với số lượng thu trung bình ở một chuột cái là $25,22 \pm 10,43$ và số trứng chất lượng tốt đạt yêu cầu dùng trong kỹ thuật nhân bản là $17,31 \pm 9,40$ (65,73 $\pm$ 12,57%).

Đã hút nhân trứng chuột thành công với hiệu quả an toàn đạt 80% với sự trợ giúp của thiết bị Piezo.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này nhận được sự tài trợ của Chương trình nghiên cứu cơ bản thuộc lĩnh vực Khoa học sự sống, Bộ Khoa học và Công nghệ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bui Xuan Nguyen, Le Van Ty, Bui Linh Chi, Nguyen Huu Duc, Nguyen Thi Uoc (2000) Comparison between the efficiencies of using bovine and buffalo oocytes as host ooplasm for embryo production by adult cell nuclear transfer. *Theriogenology* 53(1): 235.

Duc Nguyen Huu, Vincent Brochard, Alice Jouneau, Jean Paul Renard, Nguyen Bui Xuan (2005) Development of cloned mice embryos using microinjection of different passage of embryonic stem cell. *Proceedings of the 2nd Asian Reproductive*

Biotechnology Conference: 35.

Nguyen BX, Uoc NT, Nagai T, Viet Linh N, Huu QX, Hanh NV, Nguyen TT, Duc NH, Bui LC (2006) Production of Ban minipig embryo by somatic cell nuclear transfer. *Reprod Fert & Development* 18(1): 147.

Uoc NT, Ty LV, Tuoc D, Duc NH, Hanh NV, Thanh NT, Bui LC, Laloy E, Renard JP, Nguyen BX (2002) Effect of tissue sampling condition on the *in vitro* multiplication and reprogramming potential of somatic cells obtained from different specimens of the Saola (*Pseudoryx nghetinhensis*) species. *Theriogenology* 57(1): 437.

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

Uoc NT, Bavister BD, Hanh NV, Bui LC, Thanh NT, Duc NH, Huu QX, Linh NV, Bui XN (2005) Somatic cell nuclear transfer in non-human primates: the possibility of using oocytes matured *in vitro* for up to 3 days as host ooplasm. *Proceedings of the Annual Conference of the International Embryo Transfer Society, Copenhagen, Denmark, 8 - 12 January 2005*: 117-118.

Wakayama Teruhiko, Ryuzo Yanagimachi (2001) Mouse cloning with nucleus donor cells of different age and type. *Mol Reprod Dev* 58: 376-383.

Wakayama T, Perry ACF, Zuccotti M, Johnson KR, Yanagimachi R (1998) Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 394: 369-372.

Zhou Q, Boulanger L, Renard JP (2000) A simplified method for the reconstruction of fully competent mouse zygotes from adult somatic donor nuclei. *Cloning* 2: 35-44.

USING PIEZO FOR ENUCLEATION OF MOUSE OOCYTES IN SOMATIC CELL NUCLEAR TRANSFER IN VIETNAM

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

This study was performed for determination of suitable parameters of Piezo equipment during the enucleation of mouse oocyte prior to somatic cell nuclear transfer. Female mouse (8 - 12 week old) was superovulated by administration of PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotropin) 10 I.U./female (day 1), hCG (Human Chorionic Gonadotropin) 5 I.U./female (day 3) and collection of matured oocyte was

* Author for correspondence: Tel: 84-4-7562902; Fax: 84-4-7912633; E-mail: nhduc_66@yahoo.com

carried out at about 13 - 16 hours after hCG injection. The good oocytes were collected and enucleation was conducted with the help of Piezo equipment. Results show that, the average number of superovulated oocyte was $25.22 \pm 10.43/\text{female}$ and of good oocytes was $17.31 \pm 9.40/\text{female}$ ($65.73 \pm 12.57\%$), efficiency of the enucleation reaches 80% with the help of Piezo equipment (Bandwidth was 50 or 100 KHz and Frequency was 2 - 5 Hz, Duration was 66 - 75 μS , Amplitude was 10 - 30 V).

Keywords: *Enucleation, mouse oocyte, nuclear transfer, Piezo, somatic cell*