

Tạo phôi bò nhân bản không có zona pellucida

Nguyễn Khánh Vân, Quấn Xuân Hữu, Vũ Thị Thu Hương, Nguyễn Thị Hương,
Nguyễn Thị Lệ Hương, Phạm Doãn Lân*

Phòng thí nghiệm trọng điểm công nghệ tế bào động vật, Viện Chấn nuôi

Ngày nhận bài 20/10/2017; ngày chuyển phản biện 25/10/2017; ngày nhận phản biện 27/11/2017; ngày chấp nhận đăng 4/12/2017

Tóm tắt:

Mục tiêu của nghiên cứu này là tạo phôi bò nhân bản bằng phương pháp cấy chuyển nhân tế bào soma (nguyên bào sợi da tai bò) vào tế bào trứng bò không có zona pellucida. Phương pháp này bao gồm các bước: Loại nhân tế bào trứng bò thành thực không có zona pellucida bằng dao vi phẫu thuật hoặc micro pipette; dung hợp tế bào trứng nhận với tế bào cho (nguyên bào sợi da tai bò); nuôi *in vitro* trong hệ thống nuôi microwell. Kết quả nghiên cứu cho thấy, tỷ lệ tế bào trứng được loại nhân thành công đạt 84,89%, tỷ lệ tế bào trứng dung hợp thành công với tế bào cho đạt 86,91%. Sau khi dung hợp, các tế bào trứng đã dung hợp với tế bào cho được lựa chọn cho quá trình hoạt hóa và nuôi *in vitro* trong môi trường SOFaa. Tại thời điểm 18 giờ sau hoạt hóa, 88,89% tế bào trứng đã được tái cấu trúc ở giai đoạn 2 tiền nhân. Tỷ lệ phát triển phân chia và tạo phôi nang bò nhân bản tương ứng đạt 87,61 và 24,78%. Kết quả này cho thấy, các tác giả đã thực hiện thành công phương pháp tạo phôi bò nhân bản không có zona pellucida. Phương pháp tạo phôi bò nhân bản không có zona pellucida đơn giản, dễ sử dụng và hiệu quả.

Từ khóa: Cấy chuyển nhân, microwell, phôi bò nhân bản không có zona pellucida.

Chỉ số phân loại: 4.2

Production of zona-free cloned bovine embryos

Khanh Van Nguyen, Xuan Huu Quan, Thi Thu Huong Vu,
Thi Huong Nguyen, Thi Le Huong Nguyen, Doan Lan Pham*

Key Laboratory of Animal Cell Biotechnology, National Institute of Animal Science

Received 20 October 2017; accepted 4 December 2017

Abstract:

The objective of this work was to apply a new zona-free cloning method for producing cloned bovine embryos. The procedure of the method included enucleation of matured oocytes without zona pellucida using a microblade or micropipette; electrofusion of oocyte-donor cell pairs; *in vitro* culture in microwell system. By this method, the percentage of enucleated oocytes was 84.89%, and the percentage of fused oocytes with donor cells was 86.91%. After fusion, oocytes fused with donor cells were selected for activation and *in vitro* culture in SOFaa medium. At 18 hours after activation and culture, the rate of reconstructed oocytes was 88.89%. The development rates of cleavage and blastocyst embryos were 87.61 and 24.78%, respectively. In conclusion, the method of zona-free cloning of bovine embryos was conducted successfully in our lab. This method could be an easy, simple, fast, and efficient operation.

Keywords: Microwell, nuclear transfer, zona-free cloned bovine embryos.

Classification number: 4.2

Đặt vấn đề

Nhân bản động vật bằng phương pháp cấy chuyển nhân tế bào soma (SCNT) đã và đang được áp dụng ở nhiều phòng thí nghiệm trên thế giới. Tuy nhiên, hiệu quả của phương pháp này vẫn thấp và tỷ lệ tạo con non dao động 5-10% tùy thuộc loài [1]. Hiện nay quy trình tạo phôi nhân bản bằng SCNT vẫn chỉ thực hiện ở trong các phòng thí nghiệm, đòi hỏi những kỹ năng vi thao tác phức tạp và chi phí cao. Để giúp cho việc tạo phôi nhân bản trở thành một phương pháp dễ áp dụng phục vụ nghiên cứu, một số nhà khoa học đã cải tiến làm cho quy trình tạo phôi nhân bản bằng SCNT trở nên đơn giản và dễ áp dụng hơn [2, 3]. Điểm nổi bật trong cải tiến của các nhà khoa học chính là việc sử dụng tế bào trứng không có zona pellucida (ZP). Các phôi nang tạo ra từ phương pháp này có chất lượng tương tự như phôi nang có ZP.

Phương pháp tạo phôi nhân bản không có ZP là một phương pháp đơn giản, hiệu quả và dễ sử dụng hơn khi

*Tác giả liên hệ: Email: pdlanvn@yahoo.com

được so sánh với phương pháp nhân bản truyền thống [4]. Quá trình chuẩn bị tế bào chất bằng cách loại nhân tế bào trứng không có màng có thể được thực hiện mà không cần phải nhuộm tế bào trứng với thuốc nhuộm huỳnh quang, hiệu quả loại nhân lên tới 95-100% và bảo tồn được 96-97% thể tích tế bào trứng [5]. Tỷ lệ dung hợp giữa tế bào trứng nhận không có ZP với tế bào soma lên tới 95-100% khi được so sánh với 60-70% của phương pháp nhân bản truyền thống [6]. Số lượng phôi nang được tạo ra bằng phương pháp không ZP bằng hoặc cao hơn so với phương pháp nhân bản truyền thống [7]. Kết quả cấy truyền phôi cũng đã được so sánh đối với cả hai phương pháp. Phương pháp nhân bản không có ZP có thể làm tăng số lượng phôi nhân bản và con non nhân bản bởi tính đơn giản và hiệu quả cao [7].

Tại Việt Nam, việc nghiên cứu tạo phôi bò nhân bản bằng kỹ thuật SCNT truyền thống đã được thực hiện tại Viện Công nghệ sinh học (Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam) với sự hợp tác của Viện Nghiên cứu nông nghiệp quốc gia Pháp (INRA) và Đại học Kinki, Nhật Bản [8, 9]. Tuy nhiên, cho đến nay vẫn chưa có nơi nào công bố về việc tạo được phôi bò nhân bản không có ZP. Chúng tôi tiến hành nghiên cứu này với mục tiêu tạo được phôi bò nhân bản không có ZP bằng kỹ thuật SCNT trong điều kiện Việt Nam, từ đó hướng tới việc tạo được bò nhân bản tại Việt Nam.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Thu tế bào trứng và nuôi thành thực *in vitro* tế bào trứng bò

Thu buồng trứng bò từ lò mổ và chuyển về phòng thí nghiệm trong dung dịch NaCl 0,9% ở 32 đến 35°C trong vòng 2-3 giờ. Sử dụng phương pháp chọc hút để thu tế bào trứng bò từ những nang có đường kính 2-6 mm trên buồng trứng. Lựa chọn và sử dụng các tế bào trứng bò có từ 2 lớp tế bào cumulus trở lên, khối tế bào chất đồng

nhất, chặt chẽ cho nuôi thành thực *in vitro*. Các tế bào trứng bò được nuôi thành thực *in vitro* từ 20 đến 22 giờ trong môi trường TCM 199 có bổ sung 10% (v/v) huyết thanh thai bê (FCS, Sigma), cysteamine, sodium pyruvate, kháng sinh và hormone ở điều kiện 38,5°C, 5% CO₂, 5% O₂ và độ ẩm không khí bão hòa.

Chuẩn bị tế bào chất nhận

Lựa chọn các tế bào trứng bò thành thực và loại bỏ ZP: Sau nuôi thành thực *in vitro* 20-22 giờ, loại bỏ lớp tế bào cumulus của tế bào trứng trong môi trường 0,1% hyaluronidase (Sigma). Sau khi loại bỏ tế bào cumulus, các tế bào trứng được rửa 3 lần trong môi trường TALP - Hepes + 10% FCS và chuyển sang môi trường TCM 199 - Hepes (Sigma) + 10% FCS. Lựa chọn các tế bào trứng có thể cực thứ nhất với khối tế bào chất đồng nhất chặt chẽ dưới kính hiển vi soi nổi. Các tế bào trứng có thể cực thứ nhất sẽ được loại bỏ ZP trong môi trường TALP - Hepes + 5 mg/ml pronase (Sigma). Sau khi đã loại bỏ hoàn toàn ZP chuyển các tế bào trứng sang môi trường TCM 199 - Hepes + 10% FCS để bắt hoạt pronase.

Loại nhân tế bào trứng: Tế bào trứng sau khi được loại ZP sẽ được chuyển sang môi trường SOFaa có bổ sung 4 µM Demecolcine (Sigma). Sau 30-40 phút, lựa chọn các tế bào trứng với khối hình nón lồi lên trên màng tế bào trứng sử dụng cho quá trình loại nhân. Quá trình loại nhân tế bào trứng được tiến hành như sau: Loại bỏ một phần tế bào chất có hình nón lồi ra trên màng tế bào trứng bằng một dao cắt vi phẫu thuật hoặc micro pipette dưới kính hiển vi soi nổi có độ phóng đại 100 lần trong môi trường có chứa 5 µg/ml cytochalasin B (Sigma). Phần thể tích tế bào chất bị loại chiếm 10-15% thể tích tế bào trứng.

Chuẩn bị tế bào cho

Nguyên bào sợi bò được phân lập từ mẫu mô tai của bò sữa cao sản trưởng thành. Loại bỏ mỡ thừa, lông bao xung

quanh mảnh mô tai và cắt thành những mảnh mô có diện tích khoảng 1 mm². Đặt các mảnh mô vào trong đĩa nuôi có chứa môi trường nuôi nguyên bào sợi dulbecco modified eagles (DMEM, Sigma) + 10% (v/v) FCS. Nuôi các mảnh mô trong điều kiện 5% CO₂, 37°C và độ ẩm không khí bão hòa. Sau 9-10 ngày kiểm tra các đĩa nuôi, loại bỏ mảnh mô tai từ những đĩa nuôi có chứa nguyên bào sợi bò phát triển. Thay môi trường nuôi và nuôi tiếp cho tới khi nguyên bào sợi bò phát triển đạt tới > 80% thể tích đáy đĩa nuôi thì tiến hành cấy chuyển. Sử dụng nguyên bào sợi bò ở lần cấy chuyển thứ 6-10 cho quá trình cấy SCNT. Trước khi được cấy chuyển vào tế bào trứng nhận, nguyên bào sợi sẽ được nuôi 48 giờ trong môi trường nuôi thiếu huyết thanh DMEM + 0,5% huyết thanh thai bê. Mục đích của việc nuôi nguyên bào sợi bò trong môi trường nuôi thiếu huyết thanh là đồng pha nhân của nguyên bào sợi về giai đoạn G0/G1 của chu trình tế bào.

Cấy SCNT, dung hợp và kích hoạt tế bào trứng

Cấy SCNT: Các tế bào trứng sau loại nhân sẽ được chuyển vào môi trường TCM 199 - Hepes có bổ sung 10 µg/ml phytohemagglutinin (PHA, Sigma) trong vòng 3-5 giây. PHA có tác dụng như một chất keo dính để gắn tế bào trứng nhận đã loại nhân với tế bào cho. Tiếp theo chuyển tế bào trứng vào trong môi trường có chứa tế bào cho đã chuẩn bị trước đó và gắn với tế bào cho theo nguyên tắc: Một tế bào trứng gắn với một tế bào cho.

Dung hợp tế bào trứng nhận với tế bào cho: Cặp tế bào trứng nhận - tế bào cho trước khi dung hợp sẽ được chuyển sang môi trường dung hợp (0,2 M manitol, 50 µM CaCl₂, 100 µM MgSO₄, 0,1% PVA) từ 1 đến 2 phút. Sau đó chuyển các cặp tế bào trứng - tế bào cho này vào buồng dung hợp được kết nối với máy dung hợp (BTX, San Diego, CA) để dung hợp tế bào cho với tế bào trứng nhận. Các cặp tế bào trứng nhận - tế bào cho sau dung hợp sẽ được

chuyển sang môi trường SOFaa có bổ sung FCS, để trong tủ nuôi 2 giờ. Sau 2 giờ, kiểm tra các cặp tế bào trứng - tế bào cho đã dung hợp được với nhau. Các cặp tế bào trứng - tế bào cho đã dung hợp được với nhau là khi tế bào cho di chuyển vào bên trong tế bào chất của tế bào trứng nhận.

Kích hoạt tế bào trứng: Chỉ sử dụng cặp tế bào trứng - tế bào cho đã dung hợp được với nhau cho quá trình kích hoạt tế bào trứng để tạo phôi bò nhân bản. Quá trình kích hoạt tế bào trứng được thực hiện như sau: Chuyển cặp tế bào trứng - tế bào cho đã dung hợp được với nhau sang môi trường TALP - Hepes có bổ sung 5 mM ionomycine trong vòng 4 phút; sau đó sẽ được chuyển sang môi trường SOFaa có bổ sung 1,9 mM 6-DMPAP trong vòng 3 giờ.

Thụ tinh *in vitro* tế bào trứng bò

Tinh trùng bò đông lạnh được giải đông ở 37°C và rửa 3 lần trong môi trường rửa tinh trùng BO [10] không có bovine serum albumin (BSA, Sigma) nhưng có bổ sung 5 mM caffeine bằng cách ly tâm 1.800 vòng/phút ở 37°C trong vòng 5 phút. Sau đó tinh trùng sẽ được pha loãng bằng môi trường BO có bổ sung BSA cho tới khi mật độ tinh trùng đạt $15-18 \times 10^6$ tế bào/ml. Tạo các giọt thụ tinh có chứa tinh trùng đã pha loãng (95 μ l/giọt). Chuyển các tế bào trứng bò sau nuôi thành thực *in vitro* sang giọt thụ tinh và để ở điều kiện 5% CO₂, 5% O₂, 38,5°C, độ ẩm không khí bão hòa. Sau 5-6 giờ, loại bỏ lớp tế bào cumulus bao xung quanh và chuyển các tế bào trứng sang môi trường nuôi phôi SOFaa có bổ sung huyết thanh thai bê bằng hệ thống

Nuôi phôi *in vitro*

Các cặp tế bào trứng - tế bào cho sau khi được xử lý với ionomycine và 6-DMPAP (hợp tử giả định) sẽ được chuyển sang nuôi trong môi trường nuôi phôi SOFaa có bổ sung huyết thanh thai bê bằng hệ thống đĩa nuôi microwell (1 hợp tử giả

định/microwell) ở điều kiện 5% CO₂, 5% O₂, 38,5°C, độ ẩm không khí bão hòa. Kiểm tra khả năng phân chia của phôi ở ngày thứ 2; phôi dâu, phôi nang ở ngày thứ 6-7 sau kích hoạt. Phôi được tạo ra từ các tế bào trứng thành thực không có ZP sẽ được sử dụng như là nhóm đối chứng để đánh giá chất lượng tế bào trứng và điều kiện nuôi phôi *in vitro*.

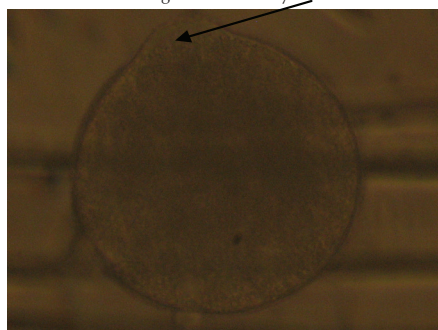
Đánh giá quá trình tái cấu trúc nhân và chất lượng phôi bò nhân bản

Để đánh giá quá trình tái cấu trúc nhân tế bào cho, một số hợp tử giả định sẽ được thu ở thời điểm 18-24 giờ sau kích hoạt và nhuộm với Hoechst 33342. Các hợp tử còn lại sẽ được nuôi tiếp để đánh giá khả năng phân chia và hình thành phôi nang. Các phôi nang bò nhân bản và phôi nang bò thụ tinh *in vitro* sẽ được nhuộm với Hoechst 33342 và tổng số nhân tế bào được đếm dưới kính hiển vi huỳnh quang.

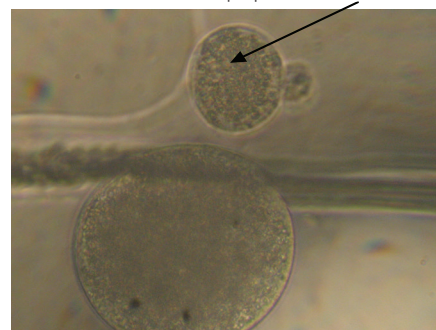
Phân tích số liệu

Số liệu của tất cả các nội dung nghiên cứu được xử lý thống kê bằng phần mềm Microsoft Excell 2007, sự khác nhau có ý nghĩa được kiểm tra bằng χ^2 sử dụng hàm CHITEST, sự sai khác có ý nghĩa với $p < 0,05$.

Nhân tế bào trứng lỗi ra sau xử lý với demecolcine



Phần tế bào chất bị loại bỏ chứa nhân



Hình 1. Tế bào trứng trước loại nhân. Hình 2. Tế bào trứng sau loại nhân.

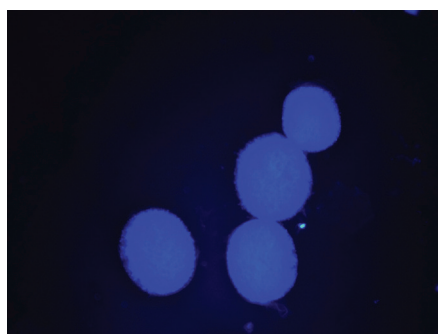
Bảng 1. Hiệu quả loại nhân tế bào trứng.

Tế bào trứng loại nhân (n)	Tế bào trứng không bị hỏng sau loại nhân n; % (M $\pm$ SE)	Tế bào trứng không bị hỏng sau loại nhân và không còn nhân sau loại n; % (M $\pm$ SE)
422	404 95,25 $\pm$ 1,69	342 84,89 $\pm$ 1,38

thường được sử dụng như là tế bào chất nhận. Kỹ thuật loại nhân tế bào trứng nhận bằng cách loại bỏ phần tế bào chất xung quanh thể cực thứ nhất của tế bào trứng là phương pháp phổ biến nhất, tuy nhiên hiệu quả của phương pháp này vẫn còn thấp. Theo Jeon và cs (2011) [11], mặc dù lượng thể tích tế bào chất xung quanh thể cực thứ nhất bị loại bỏ chiếm 20-30% thể tích tế bào trứng thì tỷ lệ tế bào trứng được loại nhân thành công chỉ đạt 42-60% tổng số tế bào trứng được loại nhân. Nhuộm tế bào trứng với hoechst 33342 xác định chính xác vị trí và hiệu quả loại nhân lên tới 100%. Tuy nhiên, việc tiếp xúc dù chỉ rất ngắn với tia UV có thể ảnh hưởng đến chất lượng tế bào chất [11].

Ở giai đoạn phát triển đầu tiên của kỹ thuật tạo phôi động vật nhân bản không có ZP, tế bào trứng nhận sau khi được loại bỏ ZP sẽ được chia đôi bởi một dao cắt vi thao tác và chỉ sử dụng nửa tế bào trứng không có nhân cho cấy SCNT. Tuy nhiên, nhược điểm của kỹ thuật này là làm lãng phí 50% tế bào chất của tế bào trứng ban đầu trong quá trình loại nhân, khi dung hợp cần phải sử dụng hai nửa tế bào chất của tế bào trứng để khôi phục lại lượng tế bào chất ban đầu. Do đó, phôi nhân bản vô tính tạo ra bằng kỹ thuật này có thể chứa ba kiểu gen khác nhau của ADN ty thể trong một tế bào, và không tốt cho sự phát triển tiếp theo của phôi [12]. Để giải quyết được vấn đề này, Vajta và cs (2005) [12] đã đưa ra đề xuất xác định nhiễm sắc thể bằng cách xử lý tế bào trứng với một chất hóa học có thể tác động đến bộ khung tế bào, qua đó giúp các kỹ thuật viên có thể xác định chính xác vị trí của nhân tế bào trứng, lượng thể tích tế bào chất có chứa nhiễm sắc thể bị loại bỏ trong quá trình loại nhân ít hơn 10% thể tích tế bào trứng nhận. Bằng cách này, chỉ cần sử dụng một tế bào trứng nhận cho quá trình cấy chuyển nhân tế bào cho, nâng cao hiệu quả quá trình tạo phôi động vật nhân bản không có ZP.

Hiện nay, các nhà nghiên cứu đã sử dụng một số chất hóa học trong quá trình này với mục đích xác định được chính xác vị trí của nhân tế bào trứng. Cũng theo Jeon và cs (2011) [11], khi sử dụng demecolcine trong quá trình loại nhân tế bào trứng sẽ nâng cao được hiệu quả loại nhân, tỷ lệ loại nhân thành công có thể lên tới 95,7% mà tế bào trứng không bị những ảnh hưởng tiêu cực.



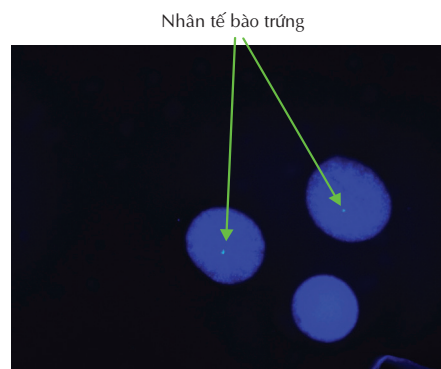
Hình 3. Tế bào trứng loại nhân thành công.

Demecolcine có tác dụng đẩy phần nhân tế bào trứng thành thực ra sát ngoại vi tế bào trứng [13]. Phần nhân tế bào trứng khi bị đẩy ra sẽ có hình nón (hình 1), qua đó giúp cho các kỹ thuật viên dễ nhận biết được vị trí nhân tế bào trứng dưới kính hiển vi soi nổi thông thường, nhờ vậy mà quá trình loại nhân tế bào trứng trở nên đơn giản hơn. Lượng thể tích tế bào chất chứa vật liệu di truyền được loại bỏ trong quá trình loại nhân sẽ <15%, do đó lượng tế bào chất còn lại đủ để hoàn thiện một phôi tái cấu trúc sau khi đã được dung hợp với một tế bào cho. Bên cạnh đó, phương pháp này cho phép tế bào trứng không cần phải nhuộm hoechst 33342 và tiếp xúc với tia cực tím (UV). Việc nhuộm tế bào trứng với hoescht 33342 và tiếp xúc với tia UV có thể là nguyên nhân gây tổn thương các bào quan trong tế bào chất, ADN ty thể, qua đó giảm hiệu quả tạo phôi nhân bản [14].

Hiệu quả dung hợp tế bào cho với tế bào nhận

Để tạo ra được phôi nhân bản, nhân

của tế bào cho hoặc tế bào cho phải được chuyển vào bên trong tế bào chất của tế bào trứng nhận bằng cách sử dụng kỹ thuật vi tiêm hoặc dung hợp tế bào cho với tế bào trứng nhận. Theo Malenko và cs (2015) [7], hiện nay dung hợp tế bào trứng nhận với tế bào cho là kỹ thuật phổ biến nhất trong quá trình tạo phôi nhân bản. Đối với kỹ thuật tạo phôi nhân bản không màng sáng, trước khi dung hợp tế bào trứng



Hình 4. Tế bào trứng vẫn còn nhân sau loại nhân.

nhận sẽ được kết dính với tế bào cho bằng dung dịch phytohemagglutinin (PHA). Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng PHA ở nồng độ 1 mg/ml. Theo Oback và cs (2007) [4] đây là nồng độ PHA phù hợp và không ảnh hưởng đến sự phát triển tiếp theo của phôi nhân bản. Quá trình dung hợp tế bào trứng nhận - tế bào cho thành công là sau khi dung hợp tế bào cho đi vào bên trong tế bào chất của tế bào trứng nhận. Trong nghiên cứu này chúng tôi đã dung hợp 544 cặp tế bào trứng nhận - tế bào cho. Kết quả cho thấy, có 470 (86,91%, bảng 2) cặp tế bào trứng nhận - tế bào cho được dung hợp thành công.

Kết quả của chúng tôi là cao hơn so với Oback và cs (2003) [15]. Theo các tác giả này, hiệu quả dung hợp tế bào cho với tế bào trứng nhận trong nghiên cứu của họ chỉ đạt 80%. Sự thành công của quá trình dung hợp phụ thuộc rất nhiều vào việc tiếp xúc giữa tế bào cho với màng tế bào trứng nhận. Việc sử dụng PHA sẽ làm tăng hiệu quả kết dính giữa tế bào cho với

tế bào trứng nhận, giúp cho quá trình kết dính tế bào cho với tế bào trứng nhận trở nên đơn giản hơn, rút ngắn thời gian kết dính tế bào cho với tế bào trứng nhận so với phương pháp tạo phôi nhân bản có ZP [15]. Đối với phương pháp tạo phôi nhân bản có ZP, tế bào cho trước khi dung hợp với tế bào trứng nhận sẽ được chuyển vào dưới ZP bằng một micropipette. Do không có sự kết dính nên tế bào cho sẽ di chuyển trong không gian dưới ZP, chính vì thế theo Lagutina và cs (2007) [6] hiệu quả dung hợp tế bào trứng nhận với tế bào cho theo phương pháp này thường không vượt quá 60-70% đối với bò. Trong khi đó đối với phương pháp tạo phôi nhân bản không ZP, theo Lagutina và cs (2007) [6] tỷ lệ tế bào trứng nhận dung hợp được với tế bào cho có thể lên tới 100% đối với bò, ngựa.

Hiệu quả tạo phôi bò nhân bản không có ZP

Khả năng tái cấu trúc của nhân tế bào cho sau kích hoạt: Sau khi nhân của tế bào cho được dung hợp với tế bào trứng nhận đã loại nhân và trải qua quá trình kích hoạt chúng sẽ bắt đầu quá trình hình thành tiền nhân thứ hai. Với 90 tế bào trứng đã được cấy SCNT và kích hoạt thành công có 80 (88,89%, bảng 3) tế bào trứng hình thành tiền nhân thứ hai tại thời điểm 18 giờ sau kích hoạt.

Kết quả của chúng tôi cho thấy, hiệu quả của quá trình kích hoạt tế bào trứng bò sẽ được nâng cao khi sử dụng kết hợp ionomycine với 6-DMAP trong quá trình kích hoạt. Kết quả này cũng phù hợp với một số báo cáo trước đây về việc sử dụng kết hợp một chất hóa học có khả năng làm tăng lượng Ca nội bào với một chất ức chế quá trình tổng hợp protein như 6-DMAP trong quá trình kích hoạt sẽ làm tăng hiệu quả của quá trình kích hoạt và khả năng phát triển tiếp theo của phôi bò nhân bản [16].

Khả năng phát triển in vitro của

Bảng 2. Hiệu quả dung hợp tế bào trứng nhận với tế bào cho.

Cặp tế bào trứng nhận - tế bào cho (n)	Cặp tế bào trứng nhận - tế bào cho hỏng hoặc không dung hợp được sau dung hợp (n)	Cặp tế bào trứng nhận - tế bào cho dung hợp thành công n, % (M ± SE)
544	74	470 86,91 ± 1,98

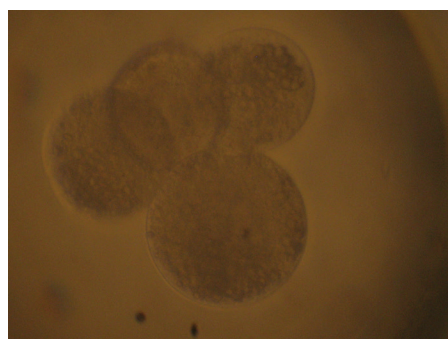
Bảng 3. Khả năng tái cấu trúc của nhân tế bào cho sau khi được cấy chuyển vào tế bào trứng nhận và kích hoạt.

Thời gian sau kích hoạt	Tế bào trứng đã cấy chuyển nhân và kích hoạt (n)	Tế bào trứng có 2 tiền nhân n, % (M ± SE)
18 giờ	90	80 88,89 ± 2,9

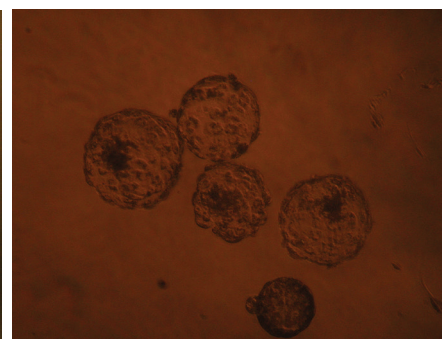
Bảng 4. Khả năng tạo phôi bò nhân bản không có ZP.

Loại phôi	n	Phân chia n, % (M ± SE)	Phôi nang n, % (M ± SE)	Tổng số tế bào M ± SE
Nhân bản	380	334 87,61 ± 0,65 ^a	91 24,78 ± 0,64 ^b	86,3 ± 2,14
Đối chứng (IVF)	120	104 86,98 ± 1,43 ^a	28 24,06 ± 1,89 ^b	105,6 ± 1,65

Ghi chú: Các giá trị trong cùng một cột có chữ cái khác nhau là sai khác có ý nghĩa (p < 0,05).



Hình 5. Phôi bò nhân bản ở giai đoạn 4 tế bào (ngày thứ 2 sau hoạt hóa).



Hình 6. Phôi nang bò nhân bản sau cấy chuyển nhân không có ZP.

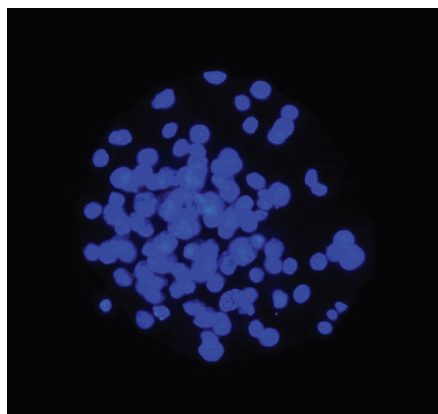
phôi bò nhân bản được tạo ra bằng kỹ thuật SCNT: Các tế bào trứng nhận sau khi đã dung hợp được với tế bào cho và kích hoạt sẽ được chuyển vào nuôi trong hệ thống nuôi microwell. Hiệu quả tạo phôi bò nhân bản sau dung hợp phụ thuộc vào nhiều yếu tố, như quá trình kích hoạt, môi trường và hệ thống nuôi phôi. Theo kết quả nghiên cứu của chúng tôi, tỷ lệ phân chia và tạo phôi nang bò nhân bản tương ứng đạt 87,61 và 24,78% (bảng 4, hình 5 và 6). Kết quả này cho thấy, hệ thống nuôi phôi in vitro cũng như môi trường nuôi

phôi SOFaa của chúng tôi là phù hợp cho việc tạo phôi bò nhân bản.

Trong nghiên cứu này, tỷ lệ phân chia, phôi nang bò thu được từ tế bào trứng đã cấy SCNT và tiếp theo được kích hoạt bằng ionomycine và 6-DMAP là tương tự như nhóm đối chứng (bảng 4, p > 0,05). Tuy nhiên, phôi nang bò nhân bản của chúng tôi có tổng số tế bào thấp hơn so với phôi đối chứng (phôi IVF) (86,3 so với 105,6). Kết quả này phù hợp với báo cáo của Liu và cs (1998), Yamazaki

và cs (2005) [16, 17]. Các tác giả này cũng sử dụng kết hợp ionomycin và 6-DMAP trong quá trình kích hoạt tế bào trứng bò. Mặc dù tổng số tế bào của phôi nang bò nhân bản trong nghiên cứu của chúng tôi là cao hơn so với Yamazaki và cs (2005) (75,4) [17] nhưng lại thấp hơn so với Jang và cs (2011) (118,6) [18]. Sự khác nhau giữa các kết quả nghiên cứu có thể là do điều kiện thí nghiệm, chất lượng tế bào trứng, cũng như điều kiện nuôi phôi *in vitro*.

Việc sử dụng 6-DMAP cho phép kích hoạt khả năng sinh sản đơn tính ở trứng bò với tỷ lệ phân chia đạt 80%, tỷ lệ phôi nang đạt 20-30% [19]. Tuy nhiên, nếu chỉ sử dụng riêng lẻ 6-DMAP thì không đủ để kích hoạt quá trình sinh sản đơn tính của tế bào trứng [20]. Theo Kharche và Birade (2013) [21], 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. Siti Khadijah và cs (2014) [22] cũng nhận thấy, việc sử dụng kết hợp ionomycin với 6-DMAP trong quá trình kích hoạt tế bào trứng bò sẽ cho tỷ lệ phân chia và phôi nang sau kích hoạt cao.



Hình 7. Phôi nang bò nhân bản được nhuộm với hoechst 33342 xác định tổng số tế bào.

Bên cạnh việc sử dụng ionomycin và 6-DMAP cho quá trình kích hoạt tế bào trứng bò, chúng tôi sử dụng môi trường nuôi phôi SOFaa có bổ

sung BSA và huyết thanh thai bê với mục đích nâng cao hiệu quả tạo phôi bò nhân bản. Theo Jang và cs (2011) [18], phôi bò nhân bản được nuôi trong môi trường SOFaa có bổ sung BSA và huyết thanh thai bê sẽ nâng cao khả năng tạo phôi nang bò nhân bản cũng như hỗ trợ cho sự ra đời của bê nhân bản vô tính sau cấy chuyển phôi.

Chúng tôi sử dụng các nguyên bào sợi bò (tế bào cho) đã trải qua quá trình nuôi thiếu huyết thanh trong một thời gian dài (48 giờ) trước khi được cấy chuyển vào tế bào chất của tế bào trứng nhận ở nghiên cứu này. Việc nuôi các nguyên bào sợi bò (tế bào cho) trong điều kiện thiếu huyết thanh sẽ làm tăng tỷ lệ các nguyên bào sợi có nhân ở giai đoạn G0/G1 của chu trình tế bào [23]. Theo Miranda và cs (2009) [23], Saikhun và cs (2004) [24], khi nhân của nguyên bào sợi được nuôi trong điều kiện thiếu huyết thanh sẽ hỗ trợ sự phát triển của phôi tái cấu trúc đến giai đoạn phôi nang tốt hơn là các nguyên bào sợi nuôi trong điều kiện đầy đủ huyết thanh. Hill và cs (2000) [25] khi nghiên cứu ảnh hưởng của tế bào cho đến hiệu quả tạo phôi nang bò nhân bản đã nhận thấy, việc nuôi tế bào cho trong điều kiện thiếu huyết thanh trước khi cấy chuyển nhân sẽ cải thiện đáng kể tỷ lệ phôi nang bò nhân bản so với tế bào cho không được nuôi trong điều kiện thiếu huyết thanh (43 so với 12%).

Đối với phôi không có ZP cần thiết phải có một hệ thống nuôi phôi đặc trưng. Trong nghiên cứu này, chúng tôi nuôi phôi bò nhân bản không có ZP trong hệ thống nuôi microwell. Theo Feltrin và cs (2015) [26], việc nuôi phôi bò nhân bản không có màng ZP trong hệ thống nuôi microwell sẽ hỗ trợ tối đa cho sự phát triển đến giai đoạn phôi nang. Ngoài ra, cũng theo Feltrin và cs (2015) [26], với lượng thể tích môi trường nhỏ trong các microwell sẽ làm tăng nồng độ các yếu tố thuận lợi trong môi trường xung quanh phôi, qua đó làm tăng tỷ lệ phôi nang bò

nhân bản. Tương tự như vậy, Malenko và cs (2015) [7] cũng cho rằng, khi nuôi phôi nhân bản không có ZP trong hệ thống nuôi microwell cho tỷ lệ phôi nang dao động từ 33 đến 48%.

Kết luận

Lần đầu tiên tại Việt Nam, đã tạo thành công phôi bò nhân bản không có ZP bằng kỹ thuật SCNT với tỷ lệ tạo phôi nang đạt 24,78%. Phương pháp nhân bản không có ZP đơn giản, dễ sử dụng, nhanh chóng và hiệu quả hơn so với phương pháp nhân bản thông thường trước đây.

Đề nghị tiếp tục nghiên cứu và sử dụng phôi bò nhân bản làm nguồn phôi nguyên liệu để cấy chuyển phôi tạo bò nhân bản.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được thực hiện từ nguồn kinh phí của Bộ Khoa học và Công nghệ hỗ trợ hoạt động thường xuyên cho Phòng thí nghiệm trọng điểm công nghệ tế bào động vật. Chúng tôi xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] D. Solter (2000), "Mammalian cloning: Advances and limitations", *Nat. Rev. Genet.*, **1**, pp.199-207.
- [2] P.J. Booth, S.J. Tan, R. Reipurth (2001), "Simplification of bovine somatic cell nuclear transfer by application of a zona - free manipulation technique", *Cloning Stem Cells*, **3**, pp.139-150.
- [3] G. Vajta, I.M. Lewis, P. Hyttel (2001), "Somatic cell cloning without micromanipulators", *Cloning*, **3**, pp.89-95.
- [4] B. Oback, D.N. Wells (2007), "Cloning cattle: The methods in the madness", *Adv. Exp. Med. Biol.*, **591**, pp.30-57.
- [5] M.I. Prokofiev, et al. (2007), "Blind enucleation of oocytes is highly efficient in zona - free bovine cloning", *Reprod. Fertil. Dev.*, **19**, pp.156-157.
- [6] I. Lagutina, et al. (2007), "Comparative aspects of somatic cell nuclear transfer with conventional and zona - free method in cattle, horse, pig and sheep", *Theriogenology*, **67**, pp.90-98.
- [7] G.P. Malenko, et al. (2015), "Perspective of zona - free method use in farm animal cloning", *Agricultural Biology*, **50(4)**, pp.420-430.
- [8] B.X. Nguyen, et al. (2000), "Cloning of

Ha-an bovine embryos by nuclear transfer with adult somatic cells", *J. Biology*, **1**, pp.10-15.

[9] L.V. Ty, et al. (2003), "Production of embryos of an endangered species (*Bos gaurus*) by the xenogenic nuclear transfer into the ooplast of the domestic cow for preservation of this animal in Vietnam", *J. Biology*, **25(2)**, pp.1-6.

[10] B.G. Brackett, G. Oliphant (1975), "Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*", *Biol. Reprod.*, **12**, pp.260-274.

[11] B.G. Jeon, D.H. Betts, W.A. King, G.J. Rho (2011), "In vitro developmental potential of nuclear transfer embryos cloned with enucleation methods using pre-denuded bovine oocytes", *Reprod. Dom. Anim.*, **46**, pp.1035-1042.

[12] G. Vajta, P.M. Kragh, N.R. Mtango, H. Callesen (2005), "Handmade cloning approach: potentials and limitations", *Reprod. Fertil Dev.*, **17(1-2)**, pp.97-112.

[13] X.C. Li, Y. Zhang, S. Hua, J.H. Shu, Z.P. Zhang, J.W. Cao (2007), "The use of demecolcine for enucleation of bovine oocytes", *Belg. J. Zool.*, **137(2)**, pp.209-214.

[14] G. Verma, et al. (2015), "Handmade cloning: Recent advances, potential and pitfalls", *J. Anim. Sci. Biotechnol.*, **6**, p.43.

[15] B. Oback, et al. (2003), "Cloned

cattle derived from a novel Zona-free embryo reconstruction system", *Cloning Stem Cells*, **5(1)**, pp.3-12.

[16] L. Liu, J.C. Ju, X. Jang (1998), "Parthenogenetic development and protein patterns of newly matures bovine oocytes following chemical activation", *Mol. Reprod. and Dev.*, **49**, pp.298-307.

[17] W. Yamazaki, et al. (2005), "Use of strontium in the activation of bovine oocytes reconstructed by somatic cell nuclear transfer", *Zygote*, **13**, pp.295-302.

[18] S. Jang, S.G. Hong, B.C. Lee (2011), "Cloned aclves derived from somatic cell nuclear transfer embryos cultured in chemically defined medium or modified synthetic oviduct fluid", *J. Vet. Sci.*, **12(1)**, pp.83-89.

[19] F. Perecin, S.C. Meo, C.L.V. Leal, J.M. Garcia (2007), "Oocytes activation and preimplantation development of bovine embryos obtained by specific inhibition of cyclin-dependent kinases", *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, **59(2)**, pp.280-287.

[20] Q.A. Winger, et al. (1997), "Bovine parthenogenesis is characterized by abnormal chromosomal complements: Implications for maternal and paternal co-dependence during early bovine development", *Dev. Genet.*, **21**, pp.160-166.

[21] S.D. Kharche, H.S. Birade (2013),

"Parthenogenesis and activation of mammalian oocytes for *in vitro* embryo production: A review", *Advances in Bioscience and Biotechnology*, **4**, pp.170-182.

[22] I. Siti Khadijah, et al. (2014), "Comparison of Bovine embryonic development of parthenogenetically activated oocytes by different combinations of chemical treatments", *Mal. J. Anim. Sci.*, **17(1)**, pp.85-94.

[23] M.D.S. Miranda, et al. (2009), "Serum starved apoptotic fibroblasts reduce blastocyst production but enable development to term after SCNT in cattle", *Cloning and stem cells*, **11(4)**, pp.565-573.

[24] J. Saikhun, et al. (2004), "Development of swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos after parthenogenetic activation and nuclear transfer using serum fed or starved fetal fibroblast", *Reprod. Nutr. Dev.*, **44**, pp.65-78.

[25] J.R. Hill, et al. (2000), "Development rates of male bovine nuclear transfer embryos derived from adult and fetal cells", *Biol. Reprod.*, **62**, pp.1135-1140.

[26] C. Feltrin, et al. (2015), "Effectiveness of mcirowell-based *in vitro* culture systems for zona - free cloned bovine embryos", *Acta Scientiae Veterinariae*, **43**, pp.1- 9.